



(12) PATENT

(19) NO

(11) 335515

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 5/0789 (2010.01)

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

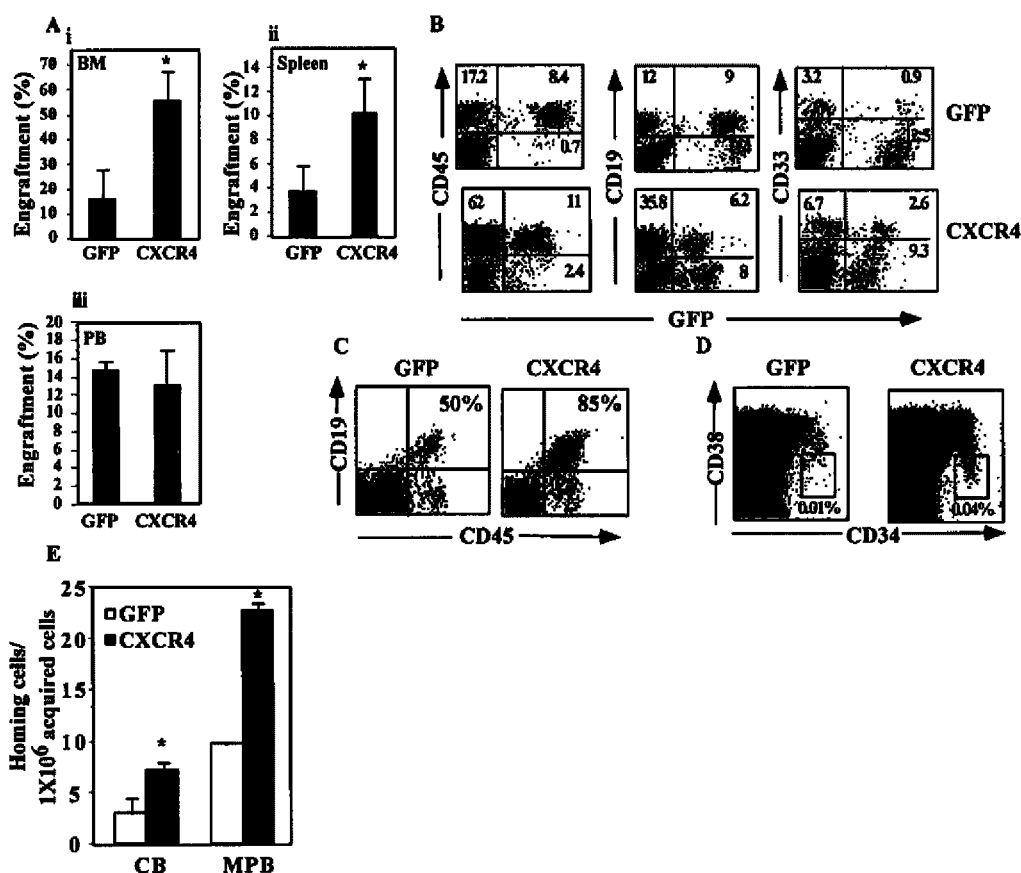
A61K 35/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20062709	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.11.08 PCT/IL2004/01018
(22)	Inng.dag	2006.06.12	(85)	Videreføringsdag	2006.06.12
(24)	Løpedag	2004.11.08	(30)	Prioritet	2003.11.13, IL, 158868
(41)	Alm.tilgj	2006.08.11			
(45)	Meddelt	2014.12.22			
(73)	Innehaver	Yeda Research and Development Company Ltd, P O Box 95, IL-76100 REHOVOT, Israel			
(72)	Oppfinner	Tsvee Lapidot, 6 Boxer Street, IL-74046 NESS-ZIONA, Israel			
		Joy Kahn, 120/5 Hayarden Blvd., IL-99081 RAMAT BEIT SHEMESH, Israel			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	In vitro fremgangsmåte for fremstilling av en populasjon av celler som omfatter hematopoetiske stamceller, cellepopulasjon, anvendelse derav og farmasøytisk preparat omfattende nevnte cellepopulasjon.			
(56)	Anførte publikasjoner	SHINICHIRO SAWADA ET AL., "Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors", Journal of Experimental Medicine, Tokyo, JP, vol. 187, no. 9, 1998, side 1439-1449 FAWZIA LOUACHE ET AL., "Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors", Blood, vol. 84, no. 10, 1994, s. 3344-3355			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse gjelder stamceller som er egnet for transplantasjon og fremgangsmåter for fremstilling derav.



Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse gjelder hematopoetiske stamceller som er egnet for transplantasjon og fremgangsmåter for fremstilling derav.

Oppfinnelsens bakgrunn

- 5 Kliniske og eksperimentelle fremgangsmåter for transplantasjon av hematopoetiske stamceller (HSC) etterligner den fysiologiske prosessen med HSC-migrasjon fra sirkulasjonen til beinmarg (BM) som opptrer under den sene embryonale utvikling og ved "steady state"-hematopoese hos voksne gjennom hele livet¹⁻³. Genoverføring til humane HSC kan være et lovende verktøy for korrigering av et bredt utvalg av
10 hematopoetiske og genetiske forstyrrelser. HSC-transplantasjonen kan anvendes for varig tilførsel av disse genetisk modifiserte cellene til BM, som i sin tur vil frigi modne celler med det korrigerte gen til sirkulasjonen gjennom hele livet.

- En forbedret effektivitet av stamcelletransplantasjon vil forbedre resultatet av kliniske transplantasjoner, så vel som genterapifremgangsmåter, og kan oppnås ved
15 å modulere stamcellenes evne til å vandre til og repopulere mottakerens BM. For dette formål er det nødvendig med en bedre forståelse av mekanismene som regulerer disse prosessene.

- Interaksjoner mellom kjemokinet stromalavledet faktor-1 (SDF-1), også betegnet CXCL12, og den tilhørende reseptor, CXCR4, spiller en avgjørende rolle for
20 kimsettingen av stamceller i BM under den embryonale utvikling hos mus^{10,11}. Tidligere kunne de foreliggende oppfinnere ved anvendelse av immundeffisierte NOD/SCID-mus som mottakere vise at både in vivo-migrasjon ("homing") over kort tid og flercellelinje-repopulasjon i høyt nivå av beinmargen hos mus med humane CD34⁺-anrikede celler avhenger av SDF-1/CXCR4-interaksjoner¹²⁻¹⁵. Som
25 støtte for disse resultatene har det blitt vist at enten høyt nivå av CXCR4-ekspresjon på humane CD34⁺-celler eller høyt nivå av SDF-1 induerte retningsstyrt motilitet in vitro og korrelerer med hurtigere gjenvinning ved både allogeneiske og autologe kliniske transplantasjoner med positiv seleksjon av CD34⁺-celler^{16,17}.

- CXCR4-ekspresjonen er en dynamisk prosess som reguleres av faktorer i
30 omgivelsene, f.eks. cytokiner, kjemokiner, stromaceller, adhesjonsmolekyler og proteolytiske enzymer¹⁸. I hematopoetiske stamceller og forløperceller av humant opphav kan CXCR4 oppreguleres fra intracellulære lagre ved in vitro-cytokindyrking over kort tid (~ 40 timer)^{13,19} eller stimulering av navlesnorblod (CB)-CD34⁺ med proteolytiske enzymer som MMP-2 og MMP-9²⁰. Dette forsterker
35 så in vitro-migrasjonen mot en SDF-1-gradient¹³, så vel som evnen til in vivo-"homing" og repopulasjon i transplanterte NOD/SCID-mus og serielt transplanterte $\beta 2m$ null-NOD/SCID-mus^{12,13}, noe som kobler selvfornying og utvikling av stamceller til motilitet. En nyere rapport viste at dyrkning over lengre tid med en cytokinblanding fører til en redusert ekspresjon av CXCR4 på celleoverflaten av
40 humane CB CD34⁺-anrikede celler²², og den reduserte repopulasjonen ble

dokumentert med humane forløperceller dyrket in vitro over lengre tidsrom²³. Nylig viste de foreliggende oppfinnere at CB CD34⁺/CXCR4⁻-sorterte celler har et lavt nivå av intracellulær CXCR4 som etter kort tids stimulering med cytokiner in vitro hurtig kan uttrykkes funksjonelt på celleoverflaten og formidle CDF-1-avhengig "homing" og repopulasjon av transplanterte NOD/SCID-mus¹⁵.

I tillegg til den sentrale rollen når det gjelder formidling av retningsstyrt migrasjon av humane stamceller og musestamceller²⁴ deltar SDF-1/CXCR4-interaksjoner også i andre stamcellefunksjoner. Det er av betydning at SDF-1/CXCR4-interaksjoner også deltar i bibeholdelse av stamceller og forløperceller i BM^{10,32,33}. Denne hypotesen har også blitt bekreftet av andre undersøkelser, som viste deltagelse av SDF-1/CXCR4-interaksjoner for forankring av humane HSC injisert direkte inn i BM-hulen hos mus^{34,35}. Interferering med disse interaksjonene induserer frigjøring/mobilisering av både humane forløperceller og museforløperceller fra BM til sirkulasjonen³⁶⁻⁴¹.

Transgene mus som overuttrykker human CD4 og CXCR4 på sine CD4⁺ T-celler har forhøyet nivå av disse cellene i BM og kun svært lavt nivå i sirkulasjonen⁴². Overekspresjonen av CXCR4 på humane CD34⁺-forløperceller kan således forbedre cellenes potensial for "homing" og repopulasjon.

Lentivirusvektorer har blitt anvendt for innføring av transgener i SCID-repopulerende celler (SRC)⁴³⁻⁴⁶ grunnet deres enestående evne til å transudere celler som ikke deler seg⁴⁷. Videre ble et signifikant klinisk gjennombrudd i genterapi oppnådd i pasienter med human alvorlig kombinert immunsvikt (SCID)-X1 og førte til full korrigering av sykdomsfenotypen^{48,49}, noe som beviser at genterapi kan virke i praksis. Imidlertid foreligger det materiale som kan tyde på at svekket "homing"⁸ og lav implantering⁹ av retroviralt transduserte humane CD34⁺-celler.

Det er godt dokumentert at lave konsentrasjoner av SDF-1 i synergi med andre tidlig virkende cytokiner forhøyer proliferasjonen av både humane CD34⁺-celler og musestamceller og -forløperceller, noe som tyder på en rolle for dette kjemokin i overlevelse av forløperceller²⁵⁻²⁹, mens et høyt nivå av SDF-1 induserer en hviletilstand i prolifererende humane langtidskulturinitierende celler (LCIC) og primitive humane CD34⁺-stamceller fra føtal lever som kan serielt repopulere transplanterte NOD/SCID-mus^{30,31}.

En av ulempene med BM-transplantasjon er det langvarige, reduserte nivå av umodne forløperceller, f.eks. langtidskulturinitierende celler (LTCIC) (1 gangs reduksjon) i BM hos transplanterte pasienter, sammenlignet med friske individer⁴⁻⁷.

Langtidskulturinitierende celler (LTC-IC) er hematopoetiske forløperceller som kan danne kolonidannende enhet-celler (CFU) etter 5-8 uker (35-60 dager) i kultur på beinmarg (BM)-stroma og representerer forløperceller som i dag kan påvises in

vitro. Det har blitt rapportert at langtidskulturer initiert med CD34⁺CD38⁻-celler fra human BM og navlesnorblod kan fortsette å danne CFU i minst 100 dager, dvs. ut over standardtidsrommet for LTC-IC. Enkeltcellekulturer fra navlesnorblod ble anvendt for å undersøke hvorvidt subpopulasjonen av CD34⁺CD38⁻-celler kan danne CFU ut over 60 dager ("forlenget langtidskulturinitierende celler" eller ELTC-IC). I motsetning til LTC-IC fra navlesnorblod prolifererer ELTC-IC senere i kultur og er en mer hvilende forløperpopulasjon. ELTC-IC danner 3-4 ganger mer avkom enn LTC-IC ($P < 0,002$). Dette er et funksjonelt hierarki av forløperceller i langtidskultur som korrelerer med graden av hviletilstand. (Blood. 1996 1. nov.; 88(9) 3306-13 Crooks GM et al.).

Shinichiro Sawada et al., "Disturbed CD4⁺ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors", Journal of Experimental Medicine, Tokyo, JP, vol. 187, no. 9, 1998, side 1439-1449, rapporterer at T cellelinje-tropiske (T-tropisk) HIV type 1 stammer trenger inn i celler ved å interagere med celleoverflatemolekylene CD4 og CXCR4. Transgene mus som hovedsakelig uttrykker human CD4 og CXCR4 på sine CD4-positive T-lymfocytter (CD4⁺ T-celler) ble frembragt. Det er videre vist at CD4⁺ T-cellemigrasjon i transgene mus styres mot benmarg hovedsakelig forårsaket av CXCR4 overekspresjon, noe som fører til alvorlig tap av CD4⁺ T-celler fra sirkulerende blod. Det er angitt at CXCR4 spiller en viktig rolle i lymfocytt migrasjon gjennom vev, særlig mellom perifert blod og beinmarg som deltar i reguleringen av lymfocytt homeostase i disse rommene.

Fawzia Louache et al., "Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors", Blood, vol. 84, no. 10, 1994, side 3344-3355 angir at murine hematopoietiske stamceller og forløperceller uttrykker lave nivåer av CD4. Det er undersøkt om CD4 molekylet også er tilstede på humane hematopoietiske forløperceller. Resultatene viser at 20 til 50 % av humane CD34⁺ hematopoietiske forløperceller og modne celler uttrykker lave nivåer av CD4 antigenet.

I lys av en stadig mer omfattende anvendelse av stamcellebehandling er det svært ønskelig å forhøye nivået av CD34⁺CD38⁻-celler i populasjonen av stamceller for å forbedre effektiviteten og graden av vellykkethet forbundet med celleerstatningsterapi.

35 Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse gjelder følgende elementer;

1. In vitro fremgangsmåte for fremstilling av en populasjon av celler som omfatter hematopoietiske stamceller anriket med umodne, primitive forløperceller, der fremgangsmåten omfatter innføring av et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 i oppsamlede stamceller.

2. Fremgangsmåte ifølge element 1, der cellepopulasjonen viser forbedret SDF-1 induisert cellemigrasjon som respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller lavere enn tilnærmet 50 ng/ml.
- 5 3. Fremgangsmåte ifølge element 1, der cellepopulasjonen viser forbedret SDF-1 induisert cellemigrasjon som respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller høyere enn tilnærmet 1 µg/ml.
- 10 4. Fremgangsmåte ifølge element 1, der cellepopulasjonen viser en reduksjon i desensitivisering ved SDF-1 som respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller høyere enn tilnærmet 1 µg/ml.
- 15 5. Fremgangsmåte ifølge element 1, der de umodne, primitive forløpercellene er fra CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-cellelinjen.
6. Fremgangsmåte ifølge element 1, der oppsamlingen av stamcellene oppnås etter en fremgangsmåte for induksjon av stamcellemobilisering og/eller omfatter en kirurgisk fremgangsmåte.
- 20 7. Fremgangsmåte ifølge element 1, der den videre omfatter isolering ved FACS av stamceller med et CXCR4-nivå som ligger over en på forhånd bestemt terskelverdi.
- 25 8. Fremgangsmåte ifølge element 1, der stamcellene kan differensiere mot den myeloide og den erytroide cellelinje.
9. Fremgangsmåte ifølge element 5, der mengden av umodne, primitive forløperceller fra CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-linjen er tilnærmet 1-5 % av populasjonen.
- 30 10. Fremgangsmåte ifølge element 5, der de umodne, primitive forløpercellene fra CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-linjen foreligger i en mengde som er lik eller høyere enn tilnærmet 3 % av populasjonen.
- 35 11. Cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller anriket med umodne, primitive forløperceller som viser forbedret sSDF-1 induisert cellemigrasjon om respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller lavere enn tilnærmet 50 ng/ml eller er lik eller høyere enn tilnærmet 1 µg/ml, fremstilt ved å innføre et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 inn i stamcellene som resulterer

fra overekspresjon av CXCR4 på stamcellene.

12. Cellepopulasjon ifølge element 11, der cellene kan differensiere mot den myeloide og den erythroide linje.
5
13. Cellepopulasjon ifølge element 11, der de umodne, primitive forløpercellene er fra $CD34^{+}/CD38^{-/lav}$ -linjen.
14. Cellepopulasjon ifølge element 13, der mengden av umodne primitive forløperceller av $CD34^{+}/CD38^{-/lav}$ –linjen er tilnærmet 1-5 % av populasjonen.
10
15. Cellepopulasjon ifølge element 13, der mengden av umodne primitive forløperceller av $CD34^{+}/CD38^{-/lav}$ -linjen er tilnærmet eller høyere enn 3 % av populasjonen.
15
16. Anvendelse av en cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller ifølge ethvert av elementene 11-15, for fremstilling av et medikament for forhøyet "homing" av de hematopoetiske stamcellene til et målvev hos et individ med behov for dette, der målvevet er utvalgt fra gruppen som består av beinmarg, blodkar, hjerte, lunge, lever, bukspyttkjertel, nyre, nervesystem, hud, bein og skjelettmuskel.
20
17. Anvendelse av en cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15, for fremstilling av et medikament for forhøyet repopulasjon av et målvev i et individ med behov for dette, der målvevet er utvalgt fra gruppen som består av beinmarg, blodkar, hjerte, lunge, lever, bukspyttkjertel, nyre, nervesystem, hud, bein og skjelettmuskel.
25
18. Anvendelse av en cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 i fremstillingen av et medikament for å muliggjøre transplantasjon.
30
19. Anvendelse ifølge element 18, hvori transplantasjonen følger etter kjemoterapeutiske fremgangsmåter.
20. Anvendelse ifølge element 18, hvori transplantasjonen er autolog.
35
21. Anvendelse ifølge element 20, hvori transplantasjonen omfatter mobilisering av autologe celler.

22. Anvendelse ifølge element 18, hvori transplantasjonen er heterolog.
23. Anvendelse ifølge element 18, hvori transplantasjonen utføres med mobiliserte stamceller.
- 5 24. Cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller ifølge ethvert av elementene 11-15, for anvendelse for å forhøye "homing" av de hematopoetiske stamcellene til et målvev hos et individ med behov for dette.
- 10 25. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15, for anvendelse for å forhøye repopulasjon av et målvev i et individ med behov for dette.
- 15 26. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse ifølge element 24 eller 25, hvori nevnte målvev er valgt fra gruppen som består av beinmarg, blodkar, hjerte, lunge, lever, bukspyttkjertel, nyre, nervesystem, hud, bein og skjelettmuskel.
- 20 27. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse for å muliggjøre transplantasjon.
28. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse ifølge element 27, hvori transplantasjonen følger etter kjemoterapeutiske fremgangsmåter.
- 25 29. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse ifølge element 27, hvori transplantasjonen er autolog.
- 30 30. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse ifølge element 29, hvori transplantasjonen omfatter mobilisering av autologe celler.
- 30 31. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse ifølge element 27, hvori transplantasjonen er heterolog.
- 35 32. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse ifølge element 27, hvori transplantasjonen utføres med mobiliserte stamceller.
33. In vitro fremgangsmåte for fremstilling av en cellepopulasjon som omfatter hematopoetiske stamceller som fremviser CXCR4 med intakt 6H8-epitop, der fremgangsmåten omfatter innføring av et DNA-fragment som omfatter sekvensen til

CXCR4 i stamcellene.

34. Cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller som omfatter intakt CXCR4 6H8-epitop, der cellepopulasjonen er fremstilt ved å innføre et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 inn i stamcellene som resulterer i overekspresjon av CXCR4 på stamcellene.

35. Anvendelse av en cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15, for fremstilling av et medikament for transplantasjon.

10

36. Cellepopulasjon ifølge ethvert av elementene 11-15 for anvendelse i transplantasjon.

37. Farmasøytisk preparat som omfatter en populasjon av hematopoetiske stamceller som omfatter stamceller som fremviser intakt CXCR4 6H8-epitop, fremstilt ved å innføre et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 inn i stamcellene som resulterer i overekspresjon av CXCR4 på stamcellene.

15

Kort beskrivelse av figurene

Oppfinnelsen beskrives heri ved henvisning til de vedlagte figurer som eksempler. Idet det nå vises spesielt til figurene i detalj skal det understrekes at de spesielle detaljer som er vist kun er eksempler og gis for en illustrativ diskusjon av de foretrukne utførelser av foreliggende oppfinnelse, og gis med det formål å tilveiebringe hva som antas å være den mest anvendbare og lettest forståelige beskrivelse av prinsippene og de konseptuelle aspekter av oppfinnelsen. I denne sammenheng gjøres ingen forsøk på å vise strukturelle detaljer av oppfinnelsen i mer detalj enn hva som er nødvendig for en grunnleggende forståelse av oppfinnelsen, idet beskrivelsen sammen med figurene vil gjøre det åpenbart for fagfolk hvordan forskjellige former av oppfinnelsen kan utføres i praksis.

25

I figurene gjelder følgende:

30 Fig. 1 viser en skjematisk fremstilling av lentivirusvektorkonstruksjonene. Kun de relevante delene av det integrerte provirus vises. EF1- α -promoterer anvendes for å styre ekspresjonen av enten grønt fluorescerende protein (GFP)-cDNA i kontrollvektoren (øvre felt) eller den bisitroniske CXCR4-IRES-GFP-kassett i den eksperimentelle vektor (nedre felt). SD = spleisedonor, SA = spleiseakseptor, pA = polyadenyleringssignal, SIN = selvinaktiverende vektor.

35

Fig. 2 viser CXCR4-ekspresjon på overflaten av lentivirustransduserte humane CD34⁺-celler. Etter narreinfeksjon eller lentivirusinfeksjon ble CD34⁺-celler fra navlesnorblod (CB) og mobilisert perifert blod (MPB) analysert ved væskestrømscytometri for enten GFP-ekspresjon alene eller ekspresjon av GFP

- sammen med CXCR4 ved anvendelse av et anti-hCXCR4-PE-antistoff. A. Resultatene viser en representativ FACS-analyse av CD⁺-celler fra CB. Tallene angir prosentandelen av CD34⁺-celler i den totale cellepopulasjonen. Foroverspredning (FCS) viser cellestørrelsen. B. Resultatene angir prosentandel av
- 5 CB- og MPB-CD34⁺-celler som uttrykker CXCR4 og representerer middelerdi $\pm$ SE fra 7 uavhengige eksperimenter. *p<0,01 sammenlignet med kontroll-GFP-infiserte celler. C. Immunfluorescenspåvisning av CXCR4-ekspresjon på celleoverflaten (øvre felt) og intracellulært (nedre felt) i GFP-transduserte celler (GFP), CXCR4-transduserte celler (CXCR4) eller isotype-kontrollceller.
- 10 Fig. 3 viser innholdet av klonogene forløperceller blant transduserte CB CD34⁺-celler. Lentiviralt transduserte CB CD34⁺-celler ble utsådd i halvfast metylcellulosekultur. A. GFP⁺-kolonidannende celle (CFC)-kolonier ble analysert ved fasekontrastmikroskopi på dag 14. Det øvre felt angir BFU-E (a)- og CFU-GM (b)-kolonier fra celler transdusert med kontrollvektor. Nedre felt angir BFU-E (c)-
- 15 og CFU-GM (d)-koloner fra CXCR4-transduserte celler. Et representativt eksperiment vises. B. Resultatene angir det totale antall CFU-GM- og BFU-E-kolonier. Tallene over søylene angir prosentandelen av GFP⁺-kolonier av det totale antall kolonier. Søylene representerer middelerdi $\pm$ SE fra tre uavhengige eksperimenter. *p=0,004 sammenlignet med BFU-E-kolonier fra GFP-transduserte
- 20 celler. C. CB- og MPB-CD34⁺-celler ble merket med monoklonale antistoffer mot human CD34 og CD38. Tallene angir prosentandelen av positive celler i hele populasjonen. Et representativt eksperiment av 3 er vist.
- Fig. 4 viser funksjonalitet av CXCR4 uttrykt på transduserte CD34⁺-celler. A. CXCR4-transduserte CB-CD34⁺-celler ble stimulert med SDF-1 (300 ng/ml) over
- 25 de angitte tidsrom, og det intracellulære innhold av F-aktin ble målt ved FACS. Resultatene angir antall gangers økning av F-aktininnholdet etter stimulering med SDF-1, sammenlignet med ikke-stimulerte celler. Resultatene representerer middelerdi $\pm$ SE fra tre uavhengige eksperimenter. B. CXCR4-transduserte CB- og MPB-CD34⁺-celler ble analysert i en transbrønn-migrasjonsanalyse for migrering
- 30 mot forskjellige SDF-1konsentrasjoner som angitt. Resultatene angir prosent migrerende celler mot SDF-1. Søylene representerer middelerdi $\pm$ SE fra fem uavhengige eksperimenter. *p<0,04 (CB), *p=0,03 (MPB), sammenlignet med kontroll-GFP-transduserte celler med 125 ng/ml SDF-1. *p<0,05 (CB), *p<0,05 (MPB) sammenlignet med kontroll-GFP-transduserte celler med 10 ng/ml SDF-1.
- 35 Fig. 5 viser responsen av CXCR4-overuttrykkende CB-CD34⁺-celler på forskjellige SDF-1-konsentrasjoner. A. lentivirustransduserte CB-CD34⁺-celler ble inkubert i 7 dager under serumfrie betingelser med CDF-1 (50 ng/ml) i kombinasjon med SCF (50 ng/ml), FLT-3L (50 ng/ml) og IL-6 (50 ng/ml). Resultatene vises som antall gangers økning av antall levende celler, sammenlignet med celler inkubert i fravær
- 40 av SDF-1. Resultatene representerer middelerdi $\pm$ SE fra tre uavhengige eksperimenter utført i duplikat. B. Lentivirustransduserte CD-CD34⁺-celler ble

inkubert over natten med 1 $\mu\text{g/ml}$ SDF-1 og undersøkt for (i) CXCR4-ekspressjon ved immunfarging og (ii) SDF-1 (125 ng/ml)-indusert in vitro-migrasjon ved anvendelse av et transbrønn-migrasjonssystem. Søylene representerer middelerdi $\pm$ SE fra to uavhengige eksperimenter utført i duplikat. * $p < 0,05$ sammenlignet med ubehandlede celler (sorte søyler).

Fig. 6 viser flercellelinjerekonstituering in vivo og GFP-ekspressjon av CXCR4-overuttrykkende SCID-repopulerende celler (SRC). CXCR4-transduserte CB-CD34⁺-celler ble injisert i subletalt bestrålte NOD/SCID-mus. Fem uker etter transplantasjonen ble musene undersøkt for nærvær av humane repopulerende celler og sammenlignet med kontroll-GFP-transduserte celler. A. Muse-BM (i), -milt (ii) og perifert blod (PB) (iii) ble analysert for implantering av humane celler ved FACS-analyse og påvisning av % humane CD45⁺-celler. Søylene representerer middelerdi $\pm$ SE fra ni uavhengige eksperimenter utført i duplikat eller triplikat. * $p < 0,005$ sammenlignet med kontroll-GFP-transduserte celler. B. Lymfoid og myeloid differensiering av humane SRC i en representativ NOD/SCID-transplantatmottaker er vist ved farging med CD19- henholdsvis CD33-antistoff. Tallene angir prosentandelen av positive celler ut fra den totale levende populasjonen. C. BM-celler ble farget for den humanspesifikke pan-leukocyttmarkør CD45 og B-cellelinjedifferensieringsmarkøren CD19 og analysert ved FACS. Tallene angir prosentandelen av CD19-celler beregnet ut fra den totale CD45-populasjonen. Resultatene viser et representativt eksperiment. D. Implanterte muse-BM-celler ble farget med humanspesifikt monoklonalt anti-CD34- og CD38-antistoff og analysert ved væskestrømscytometri. Tallene angir prosentandelen av primitive, ikke-differensierte CD34⁺/38^{-lav}-celler. Resultatene stammer fra et representativt eksperiment. E. "homing" av anrikede, umodne CD34⁺-celler til milten ble bestemt 16 timer (MPB) eller 2 timer (CB) etter transplantasjonen ved farging med humanspesifikt monoklonalt anti-CD34- og anti-CD38-antistoff. Søylene representerer middelerdi $\pm$ SE fra tre uavhengige eksperimenter utført i duplikat. * $p < 0,05$ sammenlignet med kontrollceller.

Fig. 7 viser en skjematisk fremstilling av CXCR4.

Fig. 8 viser at overekspressjonen av CXCR4 på CB-CD34⁺-celler forhindrer ødeleggelse av 6H8-epitopen in vivo. A. Transduserte CD34⁺-celler ble transplantert inn i subletalt (375R) bestrålte NOD/SCID-mus. Fem uker etter transplantasjonen ble muse-BM høstet og analysert for nærvær av humane celler med positiv farging for 12G5- eller 6H8-epitopen på CXCR4. Tallene representerer den gjennomsnittlige CXCR4-fluorescens. B. Relativt histogram av FACS-analyse av den gjennomsnittlige CXCR4-fluorescens som i A etter farging av GFP (kontroll)- og CXCR4-overuttrykkende celler med monoklonale antistoffer mot 12G5 og 6H8.

Beskrivelse av de foretrukne utførelser

Foreliggende oppfinnelse gjelder hematopoetiske stamceller anriket på umodne, primitive forløperceller og med forbedret CXCR4-signaloverføring som respons på lave og høye konsentrasjoner av SDF-1 og fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse derav som angitt i kravene.

Foreliggende oppfinnelse bygger på resultater som viser at transgene stamceller som overuttrykker CXCR4 viser et forhøyet nivå av $CD34^{+}/CD38^{-}/^{lav}$ - cellepopulasjonen og/eller viser forbedret CXCR4-signaloverføringsevne som respons på lave og høye konsentrasjoner av SDF-1 og fremviser intakt CXCR4 6H8-epitop.

Prinsippene og utførelsen av foreliggende oppfinnelse kan forstås bedre ved henvisning til figurene og de vedlagte beskrivelser.

Før minst én utførelse av oppfinnelsen beskrives i detalj bør det forstås at oppfinnelsen ikke er begrenset i sin anvendelse til detaljene som fremkommer i den påfølgende beskrivelse eller som eksemplifiseres ved eksemplene. Oppfinnelsen kan ha andre utførelser og kan praktiseres og utføres på forskjellige måter. Det bør også forstås at de uttrykk og den terminologi som benyttes heri benyttes for å beskrive oppfinnelsen og skal ikke betraktes som begrensende for den.

Anvendelsen av celleterapi er stadig voksende og blir gradvis en viktig terapeutisk behandlingsform ved behandling av forskjellige forstyrrelser. Transplantasjon av hematopoetiske stamceller (HSC) (f.eks. fra beinmarg, navlesnorblod eller mobilisert perifert blod) er ett eksempel på en rutinemessig utført cellulær terapi som godtas av forsikringsselskapene. Imidlertid er mange andre celleterapiers også under utvikling, innbefattet immunterapi mot kreft og infeksjonssykdommer, kondrocytterapi for bruskdefekter, nevroncelleterapi for nevrodegenerative sykdommer og stamcelleterapi for en rekke forskjellige formål [Forbes (2002) Clinical Science 103:355-369].

Ett av problemene forbundet med stamcelleterapi er problemet med å oppnå vellykket implantering av celler i målvevet over lang tid. I dag viser pasienter som ble vellykket transplantert et svært lavt nivå av stamceller og umodne forløperceller som danner celler med den ønskede fenotype.

Behandling av $CD34^{+}$ -forløperceller med cytokiner som HGF og MMP har tidligere blitt vist å oppregulere ekspresjonen av CXCR4 og gi en bedre respons på SDF-1. Under økende konsentrasjoner av SDF-1 internaliseres imidlertid CXCR4, og cellene responderer i mindre grad på SDF-1. En økning av nivået av SDF-1 induserer også desensitivisering og inngang i hviletilstand av prolifererende humane langtidskulturinitierende celler (LCIC) og primitive humane $CD34^{+}$ -stamceller fra føtal lever som kan serielt repopulere transplanterte NOD/SCID-mus^{30,31}.

Ett av problemene forbundet med BM-transplantasjon er det reduserte nivå av langvarige umodne forløperceller (10 gangers reduksjon) i BM hos transplanterte pasienter, sammenlignet med friske individer⁴⁻⁷.

5 De foreliggende oppfinnere har funnet at transgene hematopoetiske stamceller som overuttrykker CXCR4 viser et uventet høyt nivå av CD34⁺/CD38^{-lav}-cellepopulasjon.

De beholdte resultater viser at transgene stamceller, f.eks. CB- og MPB-CD34⁺-anrikede celler, med hell kan transduseres med lentivirusvektorer som gir høy ekspresjon av CXCR4-transgenet. I én utførelse er f.eks. transduserte celler $87 \pm 2,7$ % (CB) og 80 ± 4 % (MPB) positive for ekspresjon av CXCR4 på celleoverflaten, mens kun $28 \pm 3,1$ % av både CB- og MPB-CD34⁺-celler infisert med GFP-vektoren uttrykte endogen CXCR4.

15 Det vises at transgene celler som overuttrykker CXCR4 ikke påvirkes når det gjelder evnen til å differensiere mot de myeloide og erytroide cellelinjer. I samsvar med oppfinnelsen vises det at transduserte CD34⁺-celler (både kontrolltransduksjon og CXCR4-transduksjon) viste flercellelinjedifferensiering til GFP⁺-CFC-kolonier, f.eks. burst-forming unit-erytroide (BFU-E) og colony-forming unit-granulocyt-makrofag (CFU-GM)-kolonier basert på fasekontrastmikroskopi på dag 14 (fig. 3A).

20 Uventet nok viste MPB-CD34⁺-celler transdusert med CXCR4 en høyere prosentandel (2,9 %) av CD34⁺/CD38^{-lav}-populasjonen, sammenlignet med 0,5 % hos kontrollceller. Denne effekten ble ikke observert i CB-CD34⁺-celler (fig. 3C). CXCR4-transduksjon understøtter følgelig vekst og/eller bevaring av den primitive CD34⁺/CD38^{-lav}-populasjonen.

25 Også uventet viser CXCR4-transduserte stamceller mer intakt CXCR4 6H8-epitop på overflaten av stamcellene.

Transgene celler som overuttrykker CXCR4 viser en signifikant forhøyet respons på SDF-1-formidlet kjemotaksis på $1,5 \pm 0,04$ ($p < 0,001$) ganger for CB og $2,3 \pm 0,3$ ($p = 0,03$) ganger for MPB, sammenlignet med kontrollvektortransduserte celler (fig. 30 4B). I tillegg viser transgene celler som overuttrykker CXCR4 forhøyet aktinpolymerisering og/eller forhøyet cellemotilitet formidlet av SDF-1. Det ble i samsvar med oppfinnelsen funnet at CD34⁺-celler som overuttrykker CXCR4 viser en $3 \pm 0,11$ ($p < 0,001$) gangers økning av aktinpolymeriseringen sammenlignet med $1,5 \pm 0,07$ ($p = 0,002$) gangers økning i kontrollcellene, sammenlignet med ikke-stimulerte celler (fig. 4A).

35 Overekspresjonen av CXCR4 på humane forløperceller fører således til forhøyet SDF-1-indusert signaloverføring, noe som fører til forhøyet cellemotilitet og aktinpolymerisering.

Videre ble det ved vurdering av proliferasjonen av CXCR4-overuttrykkende celler over et tidsrom på 7 dager observert at CXCR4-transduserte CB-CD34⁺-celler nesten fordoblet sitt utsådde antall, mens kontrollcelletallet var redusert til under den opprinnelig utsådde mengde.

- 5 CXCR4-transduserte celler viste en forhøyet implantering på opptil $4 \pm 0,7$ ($p=0,001$) ganger av CB-CD34⁺-celler sammenlignet med kontrollceller (fig. 6A). Videre viser en representativ FACS-farging med monoklonale antistoffer mot CD19 og CD33 at flercellelinje-hematopoesen til lymfoide og myeloide populasjoner ble opprettholdt i transduserte celler (fig. 6B), med en tendens mot mer B-
- 10 cellelymfopoiese i mus transplantert med CXCR4-transduserte celler (fig. 6C), mest sannsynlig siden SDF-1 også er en pre-B-cellevekstfaktor. Videre ble gjennomsnittelig $36 \% \pm 19 \%$ (området fra 7,5 % til 77 %) av CD45⁺-cellene funnet å uttrykke GFP (fig. 6B). Transgen ekspresjon blir også påvist i både myeloide og lymfoide populasjoner (fig. 6B). Mus transplantert med CXCR4-
- 15 overuttrykkende celler viste en fire gangers økning av populasjonen av primitive CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-cellepopulasjonen i BM, sammenlignet med mus injisert med kontrollvektortransduserte celler (fig. 6D), noe som tyder på at den høyere grad av implantering av CXCR4-overuttrykkende celler skyldes forhøyet repopulasjon av den mest primitive cellepopulasjonen.
- 20 Det ble observert at to timer (CB) eller 16 timer (MPB) etter transplantasjonen viste CXCR4-transduserte celler en mer enn to gangers økning av "homing" til milten, sammenlignet med de tilsvarende kontrollceller (fig. 6E). Disse forskjellene ble imidlertid ikke observert når det gjelder "homing"-evnen til BM (resultater ikke vist). Disse resultatene tyder på at CXCR4-transduserte celler først kan vandre over
- 25 kort tid til milten før repopulasjon (5 uker etter transplantasjonen) av BM, som tidligere foreslått (Papayannopoulou T. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:214-219, ref. 18: Kollet O, *Blood.* 2001;97:3283-3291).

- 30 De foreliggende funn tillater fremstilling av stamceller som effektivt kan rekrutteres til et målvev og repopulere dette, og kan således anvendes i en rekke forskjellige kliniske anvendelser, f.eks. reparasjon av leverskade og ved transplantasjon av lever eller beinmarg.

- 35 Ifølge ett aspekt beskrives således en fremgangsmåte for erholdelse av "forlenget langtidskulturinitierende celler" eller ELTC-IC eller for en økning av populasjonen av primitive CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-celler. Ifølge et annet aspekt beskrives en fremgangsmåte for å gjøre ELTC-IC-celler i stand til å respondere på SDF-1, selv når de eksponeres overfor høye SDF-1-konsentrasjoner.

Som anvendt heri viser begrepet "stamceller" til celler som kan differensiere til andre celletyper med en gitt, spesialisert publikasjon (dvs. "fullt ut differensierte" celler).

Som anvendt heri er en "transgen celle" en celle som bærer et innført gen eller gensegment.

Ikke-begrensede eksempler på stamceller er hematopoetiske stamceller (HSC) og mesenchymale stamceller (MSC) erholdt fra beinmargsvev fra et individ med hvilken
 5 som helst alder eller fra navlesnorblod fra et nyfødt individ, embryonale stamceller (ES-celler) erholdt fra embryonalt vev etter befruktning (f.eks. balstocyst) eller embryonale kimeceller (EG-celler) erholdt fra genitalvev fra et foster på hvilket som helst tidspunkt under drektheten, fortrinnsvis før 10 ukers drekthet. Ytterligere beskrivelser av stamceller som kan anvendes ifølge dette aspekt av foreliggende
 10 oppfinnelse er oppsummert heri nedenfor.

HSC - hematopoetiske stamceller (HSC) - er de formative, pluripotente blastcellene som blant annet forefinnes i føtal lever, navlesnorblod, beinmarg og perifert blod og som kan differensieres til alle de spesifikke typene av hematopoetiske celler eller blodceller, f.eks. erytrocytter, lymfocytter, makrofager og megakariocytter. I
 15 beinmargen foreligger typisk HSC i nisjer som leverer alle de nødvendige faktorer og adhesive egenskaper til opprettholdelse av cellenes evne og gir en egnet, balansert forsyning av modent avkom gjennom organismens levetid [Whetton (1999) Trends Cell Biol 9:233-238; Weissman (2000) Cell 100:157-168; Jankowska-Wieczorek (2001) Stem Cells 19:99-107; Chan (2001) Br. J. Haematol.
 20 112:541-557].

HSC som anvendes heri er fortrinnsvis CD34⁺-celler og mer foretrukket CD34⁺/CD38⁻/lav⁻-celler, som er en mer primitiv stamcellepopulasjon og derfor mindre cellelinjebegrenset og som ble vist å være en hovedandel av langtids-BM-repopulerende celler.

25 MSC - mesenchymale stamceller - er de formative, pluripotente blastcellene som blant annet forefinnes i beinmarg, blod, dermis og periosteum og som kan differensieres til mer enn én spesifikk type av mesenchymvev eller bindevev (dvs. de vev i kroppen som understøtter de spesialiserte elementene, f.eks. adipostvev, beinvev, stroma, bruskvev, elastisk og fibrøst bindevev) avhengig av forskjellige
 30 påvirkninger fra bioaktive faktorer, f.eks. cytokiner.

Tilnærmet 30 % av de celler fra humant beinmargaspirat som adhererer til plast anses å være MSC. Disse cellene kan ekspanderes in vitro og så induseres til differensiering. Det faktum at adulte MSC kan ekspanderes in vitro og stimuleres til dannelsen av beinceller, bruskceller, seneceller, muskelceller eller fettceller gjør dem
 35 attraktive i strategier for vevsmodifisering og genterapi. In vivo-analyser har blitt utviklet for analyse av MSC-funksjon. MSC injisert i sirkulasjonen kan integreres i en rekke vev, som beskrevet heri ovenfor. Nærmere bestemt kan skjelettmuskel og hjertemuskel induseres ved eksponering overfor 5-azacytidin, og nevronal differensiering av MSC fra rotte og menneske i kultur kan induseres ved
 40 eksponering overfor β -merkaptetanetol, DMSO eller butylert hydroksyanisol

- [Tomita (199) 100:11247-11256; Woodbury (2000) J. Neurosci. Res. 61:364-370]. Videre observeres MSC-avledede celler å integrere dypt inn i hjernen etter perifer injeksjon, så vel som etter direkte injeksjon av humane MSC i rottehjerne, de migrerer langs veier som anvendes under migrasjon av nevronale stamceller under utviklingen, får en bred fordeling og begynner å miste markører på HSC-spesialisering [Azizi (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3908-3913].
- 5 Fremgangsmåter for fremming av proliferasjon av mesenchymale stamceller og linjespesifikke celler beskrives i US patentskrift nr. 6 248 587.
- Epitoper på overflaten av de humane mesenchymale stamcellene (hMSC), f.eks. SH2, SH3 og SH4, som beskrives i US patentskrift nr. 5 486 359, kan anvendes som reagenser for analyse og innfangning av den mesenchymale stamcellepopulasjonen fra en heterogen cellepopulasjon, slik som den f.eks. foreligger i beinmarg.
- 10 Mesenchymale forløperstamceller, som er positive for CD45, anvendes fortrinnsvis, siden disse mesenchymale forløperstamcellene kan differensiere til de forskjellige mesenchymale cellelinjene.
- 15

Foretrukne stamceller er humane stamceller.

Tabell 1 nedenfor gir eksempler på adulte stamceller som kan anvendes for erholdelse av den angitte fenotype i et målvev av interesse.

Tabell 1

<i>Stamcelle</i>	<i>Differensiert fenotype</i>	<i>Målvev</i>	<i>Referanse</i>
Beinmarg	Ovale celler, hepatocytter	Lever	Petersen (1999) Science 84:1168-1170
KTLS-celler	Hepatocytter	Lever	Lagasse (2000) Nat. Med. 6:1229-1234
Beinmarg	Hepatocytter	Lever	Alison (2000) Nature 406: 257; Thiese (2000) Hepatology 32:11-16
Pankreatiske eksokrine celler	Hepatocytter	Lever	Shen (2000) Nat. Cell Biol. 2:879-887
Bukspyttkjertel	Hepatocytter	Lever	Wang (2001) Am. J. Pathol. 158:571-579
Beinmarg	Endotel	Lever	Gao (2001) Lancet 357:932-933
Beinmarg	Tubulært epitel, glomeruli	Nyre	Poulsom (2001) J. Pathol. 195:229-235
Beinmarg	Endotel	Nyre	Lagaaij (2001) Lancet 357:33-37
Ekstra renale celler	Endotel	Nyre	Williams (1969) Surg. Forum 20:293-294
Beinmarg	Myokard	Hjerte	Orlic (2001) Nature 410:701-704
Beinmarg	Kardiomyocytter og endotel	Hjerte	Jackson (2001) J. Clin Invest. 107:1395-1402
Beinmarg	Type 1-pneumocytter	Lunge	Krause (2001) Cell 105:369-377
Nevronale celler	Flere hematopoetiske cellelinjer	Beinmarg	Bjornson (1999) Science 283:534-537
Beinmarg	Nevroner	CNS	Mezey (2000) Science 290:1779-1782
Beinmarg	Mikroglia og asteroocytter	CNS	Eglitis (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4080-4085

Som nevnt heri ovenfor kan stamcellene med hell transduseres med lentivirusvektorer med høy ekspresjon av CXCR4-transgenet.

Begrepene "polypeptid og protein" i den foreliggende beskrivelse kan benyttes om hverandre.

- 5 Foreliggende oppfinnelse beskriver også muteiner av det ovenfor beskrevne CXCR4-protein, hvor muteinene bibeholder i det vesentlige den samme biologiske aktivitet som CXCR4-proteinet med i det vesentlige kun de naturlig forekommende sekvenser av CXCR4. Slike "muteiner" kan være muteiner hvori opptil tilnærmet 20, fortrinnsvis ikke mer enn 10 aminosyrerester kan være deletert, addert eller
- 10 substituert med andre aminosyrerester i CXCR4-proteinet, slik at modifikasjoner av denne typen ikke i vesentlig grad endrer den biologiske aktivitet av muteinet sammenlignet med proteinet selv.

Disse muteinene fremstilles ved kjente fremgangsmåter for syntese og/eller setestyrte mutagenese eller ved hvilken som helst annen kjent teknikk som er egnet for dette.

- 15 Ethvert slikt mutein har fortrinnsvis en sekvens av aminosyrer som i tilstrekkelig grad ligner sekvensen til CXCR4 til at muteinet har i det vesentlige den samme aktivitet som CXCR4. Det kan således fastslås hvorvidt et gitt mutein har i det vesentlige den samme aktivitet som det basale protein ifølge oppfinnelsen ved hjelp av rutinemessig eksperimentering som omfatter å analysere et slikt mutein ved
- 20 analysene for biologisk aktivitet som er beskrevet i eksemplene nedenfor.

- Muteiner av CXCR4-proteinet som kan anvendes eller nukleinsyrer som koder for disse, omfatter et begrenset sett av i det vesentlige CXCR4-lignende sekvenser, f.eks. substitusjonspeptider eller -polynukleotider, som rutinemessig kan erholdes av en gjennomsnittsfagperson uten omfattende eksperimentering basert på den lære
- 25 og de retningslinjer som gis heri. For en detaljert beskrivelse av proteinkjemi og proteinstruktur, se Schulz, G. E. et al., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York, 1978; og Creighton, T. E., Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983. For en presentasjon av nukleotidsekvenssubstitusjoner, f.eks. kodonpreferanser, se Ausubel et al., Current
- 30 Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- Foretrukne endringer i muteiner er hva som betegnes "konservative" substitusjoner. Konservative aminosyresubstitusjoner i proteinet som i det vesentlige har de
- 35 naturlig forekommende CXCR4-sekvenser kan omfatte synonyme aminosyrer innen en gruppe som har tilstrekkelig like fysikalsk-kjemiske egenskaper til at substitusjonen mellom medlemmer av gruppen vil bevare molekylets biologiske funksjon, se Grantham, Science, bind 185, sider 862-864 (1974). Det er åpenbart at insersjoner og delesjoner av aminosyrer også kan innføres i den ovenfor definerte

- sekvens uten å endre funksjonen, særlig dersom insersjonene eller delesjonene kun omfatter noen få aminosyrer, f.eks. under 50 og fortrinnsvis under 20, og ikke fjerner eller forskyver aminosyrer som er avgjørende for en funksjonell konformasjon, f.eks. cysteinrester Anfinsen, "Principles That Govern The Folding of Protein Chains", Science, bind 181, sider 223-230 (1973). Muteiner fremstilt ved slike delesjoner og/eller insersjoner er også beskrevet. Fortrinnsvis er de synonyme aminosyregruppene gruppene som er definert i tabell A. Mer foretrukket er de synonyme aminosyregruppene gruppene som er definert i tabell B, og mest foretrukket er de synonyme aminosyregruppene gruppene som er definert i tabell C.

10

TABELL A

Foretrukne grupper av synonyme aminosyrer

Aminosyre synonym gruppe

Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

15

TABELL B

Mer foretrukne grupper av synonyme aminosyrer

Aminosyre synonym gruppe

Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

TABELL C

De mest foretrukne grupper av synonyme aminosyrer

Aminosyre synonym gruppe

Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

5

Eksempler på innføring av aminosyresubstitusjoner i proteiner som kan anvendes for erholdelse av muteiner av proteinet for anvendelsen beskrevet heri omfatter hvilke som helst kjente fremgangsmåte-trinn, f.eks. som beskrevet i US patentskrifter nr. RE 33,653, 4 959 314, 4 588 585 og 4 737 462, tilhørende Mark et al., 5 116 943, tilhørende Kohts et al., 4 965 195, tilhørende Namen et al., 4 879 111, tilhørende Chong et al. og 5 017 691, tilhørende Lee et al., og lysinsubstituerte proteiner som beskrives i US patentskrift nr. 4 904 584 (Straw et al.).

10

15

20

I en annen foretrukket utførelse beskrevet heri har ethvert mutein av CXCR4-protein for anvendelsen beskrevet heri en aminosyresekvens som i det vesentlige tilsvarer aminosyresekvensen til det ovenfor beskrevne CXCR4-protein. Uttrykket "i det vesentlige tilsvarer" er ment å omfatte muteiner med mindre endringer av sekvensen til det basale protein som ikke påvirker proteinets basale egenskaper, særlig når det gjelder evnen til CXCR4. Typen av endringer som generelt anses å falle innenfor uttrykket "i det vesentlige tilsvarer" er endringer som vil være en følge av konvensjonelle mutageneseteknikker anvendt på DNA som koder for CXCR4-protein og som fører til noen få mindre endringer, og analyse av den ønskede aktivitet, f.eks. økt sensitivitet av stamceller overfor en kjemoattraktant.

Foreliggende oppfinnelse beskriver også CXCR4-varianter. En foretrukket CXCR4-variant er en variant som har minst 80 % aminosyreidentitet, en mer foretrukket CXCR4-variant er en variant med minst 90 % identitet og en mest foretrukket variant er en variant med minst 95 % identitet med aminosyresekvensen til CXCR4.

- 5 Begrepet "sekvensidentitet" som anvendt heri betyr at aminosyresekvensene sammenlignes ved sammenstilling ifølge Hanks og Quinn (1991), med en forfining av områder med lav homologi ved anvendelse av programmet Clustal-X, som er Windows-grensesnittet for flersekvenssammenstillingsprogrammet ClustalW (Thompson et al., 1994). Clustal-X-programmet er tilgjengelig over internett fra
- 10 <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx/>. Det bør naturligvis forstås at dersom denne lenken blir inaktiv vil en gjennomsnittsfagperson kunne finne versjoner av dette programmet i andre lenker ved anvendelse av standardsøketeknikker for internett uten omfattende eksperimentering. Dersom ikke annet er angitt er den nyeste versjonen av alle programmer som det vises til heri på den effektive
- 15 innleveringsdato for den foreliggende patentsøknad den versjon som anvendes for utførelse av foreliggende oppfinnelse.

En annen fremgangsmåte for bestemmelse av "sekvensidentitet" er følgende.

- Sekvensene sammenstilles ved anvendelse av versjon 9 av GDAP-programmet til Genetic Computing Group (globalt sammenstillingsprogram) ved anvendelse av
- 20 standardmatrisen (BLOSUM62) (verdier -4 til +11) med en gapåpningsstraff på -12 (for første null i et gap) og en gaputvidelsesstraff på -4 (for hver ekstra null i gapet). Etter sammenstillingen beregnes prosent identitet ved å uttrykke antall identiteter som en prosentandel av antall aminosyrer i sekvensen.

- Muteiner beskrevet heri omfatter muteiner som kodes av en nukleinsyre, f.eks. DNA
- 25 eller RNA, som hybridiserer til DNA eller RNA under stringente betingelser og som koder for CXCR4-proteinet, innbefattet i det vesentlige alle de naturlig forekommende sekvenser som koder for CXCR4 og sekvenser som kan avvike i nukleotidsekvens fra den naturlig avledede nukleotidsekvens grunnet den genetiske kodes degenererthet, dvs. at en noe forskjellig nukleinsyresekvens fortsatt kan kode
- 30 for den samme aminosyresekvens grunnet denne degenerertheten.

- Begrepet "hybridisering" som anvendt heri skal omfatte hvilken som helst prosess ved hvilken en tråd av en nukleinsyre bindes til en komplementær tråd via baseparing (Coombs J. 1994, Dictionary of Biotechnology, stokton Press, New York, NY). "Amplifisering" er definert som fremstillingen av ytterligere kopier av
- 35 en nukleinsyresekvens og utføres generelt ved anvendelse av polymerase-kjedereaksjonsteknologier som er velkjente innen faget (Dieffenbach og Dveksler, 1995, PCR Primer, a Labortory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview NY).

"Stringens" opptrer typisk i et område fra tilnærmet $T_m - 5^{\circ}\text{C}$ (5°C under probens smeltetemperatur) til tilnærmet 20°C til 25°C under T_m .

Begrepet "stringente betingelser" viser til hybridiseringsbetingelser og påfølgende vaskebetingelser som gjennomsnittsfagfolk konvensjonelt betegner "stringente". Se Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publications and Wiley Interscience, New York, NY, 1987-1995; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Som anvendt heri er stringensbetingelser en funksjon av temperaturen som anvendes i hybridiseringseksperimentet, molariteten av monovalente kationer og prosentandelen av formamid i hybridiseringsløsningen. For å bestemme graden av stringens som inngår i et gitt sett av betingelser anvendes først ligningen til Meinkoth et al. (1984) for bestemmelse av stabiliteten av hybrider med 100 % identitet, uttrykt som smeltetemperaturen T_m for DNA-DNA-hybridet:

$$T_m = 81,5 \text{ C} + 16,6 (\text{LogM}) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form}) - 500/L$$

hvor M er molariteten av monovalente kationer, %GC er prosentandelen av G- og C-nukleotider i DNA, % form er prosentandelen av formamid i hybridiseringsløsningen og L er lengden av hybridet i basepar. For hver °C som T_m reduseres med relativt til T_m beregnet for et hybrid med 100 % identitet økes den tillatte mengde feiltilpasning med tilnærmet 1 %. Dersom T_m anvendt i et gitt hybridiseringseksperiment ved de angitte konsentrasjoner av salt og formamid er 10°C under T_m beregnet for et 100 % hybrid ifølge ligningen til Meinkoth vil hybridisering skje selv dersom det er opptil 10 % feiltilpasning.

Som anvendt heri er "betingelser med høy stringens" betingelser som gir en T_m som ikke er mer enn 10°C under den T_m som ville foreligge for en perfekt dupleks med målsekvensen, enten beregnet ved hjelp av formelen ovenfor eller faktisk målt. "Betingelser med moderat stringens" er betingelser som gir en T_m som ikke er mer enn 20°C under den T_m som ville foreligge for en perfekt dupleks med målsekvensen, enten beregnet ved formelen ovenfor eller faktisk målt. Uten begrensning anvender betingelser med høy stringens (5-10°C under den beregnede eller målte T_m for hybridet) og moderat stringens (15-20°C under den beregnede eller målte T_m for hybridet) en vaskeløsning med 2 X SSC (standard saltvann-sitrat) og 0,5 % SDS (natriumdodecylsulfat) ved den egnede temperatur under den beregnede T_m for hybridet. Den endelige stringens av betingelsene skyldes hovedsakelig vaskebetingelsene, særlig dersom de benyttede hybridiseringsbetingelser er betingelser som tillater dannelsen av mindre stabile hybrider sammen med stabile hybrider. Vaskebetingelsene ved høy stringens fjerner så de mindre stabile hybridene. Vanlige hybridiseringsbetingelser som kan anvendes med vaskebetingelser med høy stringens til moderat stringens som beskrevet ovenfor er hybridisering i en løsning av 6 X SSC (eller 6 X SSPE (standard saltvann-fosfat-EDTA), 5 X Denhardts reagens, 0,5 % SDS, 100 µg/ml denaturert, fragmentert laksemelk-DNA ved en temperatur som er tilnærmet 20-25°C under

Tm. Dersom blandede prober anvendes foretrekkes det å benytte tetrametylammoniumklorid (TMAC) i stedet for SSC (Ausubel, 1987, 1999). Adulte stamceller kan erholdes ved anvendelse av en kirurgisk fremgangsmåte, f.eks. beinmargaspirasjon, eller de kan høstes ved anvendelse av kommersielle systemer, f.eks. systemene som er tilgjengelige fra Nexell Therapeutics Inc., Irvine, CA, USA. Stamceller som benyttes i foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis oppsamlet (dvs. høstet) ved anvendelse av en fremgangsmåte for mobilisering av stamceller som benytter kjemoterapi eller cytokinstimulering for frigjøring av HSC til sirkulasjonen hos individer. Stamceller erholdes fortrinnsvis ved anvendelse av denne fremgangsmåten, siden mobilisering vites å gi flere HSC og forløperceller enn beinmargskirurgi.

Stamcellemobilisering kan induseres ved en rekke forskjellige molekyler. Eksempler omfatter, men er ikke begrenset til, cytokiner som granulocyttkolonistimulerende faktor (G-CSF), granulocyt-makrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF), interleukin (IL)-7, IL-3, IL-12, stamcellefaktor (SCF) og flt-3-ligand, kjemokiner som IL-8, Mip-1 α , Gro β eller SDF-1 og de kjemoterapeutiske midlene syklofosfamid (Cy) og paklitaksel. Det vil forstås at disse molekylerne er forskjellige når det gjelder kinetikk og effektivitet, imidlertid anvendes ifølge de nå kjente utførelser G-CSF fortrinnsvis alene eller i kombinasjon med f.eks. syklofosfamid for mobilisering av stamcellene. G-CSF tilføres typisk daglig i en dose på 5-10 μ g/kg i 5-10 dager. Fremgangsmåter for mobilisering av stamceller er beskrevet i US patentskrifter nr. 6 447 766 og 6 162 427. Humane embryonale stamceller kan isoleres fra humane blastocyster. Humane blastocyster erholdes typisk fra humane embryoer før in vivo-implantering eller fra in vitro-fertiliserte (IVF) embryoer. Alternativt kan et encellet humant embryo ekspanderes til blastocyststadiet. For isolering av humane ES-celler fjernes zona pellucida fra blastocysten, og den indre cellemassen (ICM) isoleres ved immunkirurgisk behandling, hvori trofektodermcellene lyseres og fjernes fra intakt ICM ved forsiktig pipettering. ICM utsås så i en vevsdyrkningsflaske inneholdende et egnet medium som tillater vekst av dem. Etter 9-15 dager assosieres den ICM-avledede utvekst i klumper, enten ved mekanisk dissosiering eller ved enzymatisk degradering, og cellene utsås så på ny i friskt vevsdyrkningsmedium. Kolonier som viser ikke-differensiert morfologi utvelges enkeltvis ved hjelp av en mikropipette, dissosieres mekanisk til klumper og utsås på ny. De resulterende ES-cellene splittes rutinemessig hver 1-2 uke. For ytterligere detaljer vedrørende fremgangsmåter for fremstilling av humane ES-celler, se Thomson et al., [US patentskrift nr. 5 843 780, Science 282: 1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38: 133, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844, 1995], Bongso et al., [Hum Reprod 4: 706, 1989], Gardner et al., [Fertil. Steril. 69:84, 1998].

Det vil forstås at kommersielt tilgjengelige stamceller også kan anvendes ifølge dette aspekt av foreliggende oppfinnelse. Humane EC-celler kan erholdes fra det

humane embryonale stamcelleregister ved NIH (<http://escr.nih.gov>). Ikke-begrensede eksempler på kommersielt tilgjengelige embryonale stamcellelinjer er BG01, BG02, BG03, BG04, CY12, CY30, CY92, CY10, TE03 og TE32.

Humane EG-celler kan erholdes fra de primordiale kimcellene erholdt fra humane fostre etter tilnærmet 8-11 ukers svangerskap ved anvendelse av laboratorieteknikker som er kjente blant fagfolk. Genitalkammen dissosieres og kuttet i mindre biter, som deretter disaggregeres til celler ved mekanisk dissosiasjon. EG-cellene dyrkes så i vevsdykningsflasker med et egnet medium. Cellene dyrkes med daglig erstatning av mediet inntil en cellemorfologi som er forenlig med EG-celler observeres, typisk etter 7-30 dager eller 1-4 passasjer. For ytterligere detaljer vedrørende fremgangsmåter for fremstilling av EG-celler, se Shambloott et al., [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726, 1998] og US pat. nr. 6 090 622.

Det vil forstås at en anrikning av en stamcellepopulasjon som viser pluripotens med fordel kan utføres. Således kan f.eks. som skissert heri ovenfor CD34⁺-stamceller oppkonsentreres ved anvendelse av affinitetskolonner eller FACS, som videre beskrevet heri nedenfor.

Dyrkning av stamceller under proliferative betingelser kan også oppnås dersom stamcelletallet er for lavt til å anvendes i behandling. Dyrkning av stamceller er beskrevet i US patentskrifter nr. 6 511 958, 6 436 704, 6 280 718, 6 258 597, 6 184 035, 6 132 708 og 5 837 5739.

Når først stamceller er erholdt transfekteres de med DNA som omfatter sekvensen som koder for CXCR4 eller en aktiv del derav.

De "transformerte, transfekterte eller transgene" cellene dyrkes under egnede betingelser som tillater ekspresjon av proteinet som kodes av polynukleotidet eller det foreliggende DNA.

Stamcellene kan transformeres med et rekombinant bakteriofag-DNA, plasmid-DNA eller en kosmid-DNA-ekspresjonsvektor som omfatter den CXCR4-kodende sekvens, lentivirussystemer anvendes fortrinnsvis for ekspresjon av CXCR4 eller den aktive del derav. I alle tilfeller dyrkes transformerte celler under effektive betingelser som tillater ekspresjon av CXCR4. Effektive dyrkningsbetingelser omfatter, men er ikke begrenset til, effektivt medium, bioreaktor og temperatur-pH- og oksygenbetingelser som tillater proteindannelse. Et effektivt medium viser til ethvert medium hvori en celle kan dyrkes for dannelse av det rekombinante, modifiserte polypeptid. Et slikt medium omfatter typisk en vandig løsning med assimilerbare kilder for karbon, nitrogen og fosfat og egnede salter, mineraler, metaller og andre næringsstoffer, f.eks. vitaminer. Celler ifølge foreliggende oppfinnelse kan dyrkes i konvensjonelle bioreaktorer for fermentering, rysteflasker, reagensrør, mikrotiterplater og petriskåler. Dyrkingen kan utføres ved en

temperatur, en pH og et oksygeninnhold som er egnet for en rekombinant celle. Slike dyrkningsbetingelser ligger innenfor kunnskapsområdet til gjennomsnittsfagpersonen.

- 5 I slike tilfeller omfatter ekspresjonskonstruksjonen et cis-virkende regulatorisk element som er aktivt i pattedyrceller (se eksempler ovenfor) og som kan være induserbart, vekstspesifikt eller vevsspesifikt.

Eksempler på celletypespesifikke og/eller vevsspesifikke promotere omfatter promotere som albuminpromoter, som er leverspesifikk [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], lymfoidspesifikke promotere [Calame et al., (1988) Adv. 10 Immunol. 43:235-275]; særlig promotere fra T-celleresreptorer [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] og immunglobuliner [Banjeri et al. (1983) Cell 33:729-740], nevronspsifikke promotere som nevrofilamentpromoter [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], bukspyttkjertelspsifikke promotere [Edlunh et al. (1985) Science 230:912-916] eller brystkjertelspsifikke promotere, 15 f.eks. melkemysepromoter (US patentskrift nr. 4 873 316 og europeisk patnetsøknad publikasjon nr. 264,166). Nukleinsyrekonstruksjonen ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre omfatte en enhancer, som kan ligge nært eller fjernt fra promotersekvensen og som kan fungere for oppregulering av transkripsjonen fra denne.

- 20 Det induserbare, cis-virkende regulatoriske element kan fortrinnsvis reguleres ved å endre miljøet til stamcellene under "homing"-implanteringsprosessen.

Nukleinsyrekonstruksjonen kan videre omfatte et IRES-element, fortrinnsvis EMCV IRES, som kan ligge mellom CXCR4-genet og en markør- eller seleksjonsgensekvens og som kan bidra til oppregulering av translasjonen av 25 markørgenet eller seleksjonsgenet.

Når først CXCR4 eller en aktiv del derav overuttrykkes viser stamcellene en forhøyet respons på SDF-1.

- 30 Påvisning og isolering av celler som overuttrykker CXCR4 ifølge dette aspekt av foreliggende oppfinnelse kan oppnås ved anvendelse av en rekke cytologiske, biokjemiske og molekylære fremgangsmåter som er velkjente innen faget.

Analyse av reseptornivået kan oppnås ved væskestrømcytometri. Denne tilnærmingen benytter instrumentering som analyserer enkeltceller som strømmer forbi eksitasjonskilder i et flytende medium. Teknologien kan gi hurtig, kvantitativ flerparameteranalyse av enkeltvise levende (eller døde) celler basert på måling av 35 utsending av synlig lys og fluorescerende lys. Den basale fremgangsmåten fokuserer på: måling av fluorescensintensiteten fra fluorescensmerkede antistoffer og ligander som binder spsifikke celleassosierte molekyler. For isolering av cellepopulasjoner ved anvendelse av en fluorescensaktivert celledorterer settes stamceller ifølge

foreliggende oppfinnelse i forbindelse med anti-CXCR4, kommersielt tilgjengelig fra R&D, 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN.

Andre cytologiske eller biokjemiske fremgangsmåter for kvantitativ vurdering av nivået av ekspresjonen av den kjemotaktiske reseptor omfatter, men er ikke begrenset til, bindingsanalyse ved anvendelse av et merket (f.eks. radioaktivt merket) kjemokin, western blot analyse, celleoverflatebiotinylering og immunfluorescensfarging. Det vil forstås at ekspresjonsnivået av reseptoren også kan bestemmes på mRNA-nivået. F.eks. kan CXCR4-mRNA påvises i celler ved hybridisering til en spesifikk probe. Slike prober kan være klonede DNA eller fragmenter derav, RNA, typisk fremstilt ved in vitro-transkripsjon, eller oligonukleotidprober, generelt fremstilt ved syntese i fast fase. Fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse av prober som er egnet for spesifikk hybridisering er velkjente og hyppig anvendt innen faget. Kvantifisering av mRNA-nivå kan også oppnås ved anvendelse av en amplifiseringsreaksjon [f.eks. PCR, "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)], ved anvendelse av primere som hybridiserer spesifikt til mRNA for en kjemotaktisk reseptor av interesse.

En rekke kontroller kan med fordel anvendes for å forbedre nøyaktigheten i mRNA-påvisningsanalyser. Prøvene kan f.eks. hybridiseres til en irrelevant probe og behandles med RNase A før hybridiseringen for en vurdering av falsk hybridisering.

Funksjonelle analyser kan også anvendes for å bestemme ekspresjonen av den kjemotaktiske reseptor. F.eks. kan en kjemotaksisanalyse som benytter en gradient av det kjemotaktiske middel (f.eks. SDF-1) og som følger stamcellemigrasjonen gjennom en membran mot det kjemotaktiske middel anvendes for påvisning og isolering av stamceller som viser forhøyet kjemotaksis. Dersom cellene ikke uttrykker den kjemotaktiske reseptor (f.eks. CXCR4) i tilstrekkelig høyt nivå vil de fleste cellene forbli på membranen. Etter forhøyet ekspresjon av kjemoattraktantreseptoren ifølge foreliggende oppfinnelse vil imidlertid cellene migrere gjennom membranen og slå seg til på bunnen av brønnen i kjemotaksisplaten (se eksempel 3 i eksempelseksjonen). Det vil også forstås at en funksjonell "homing"-analyse også kan benyttes i fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse. En slik analyse er beskrevet i Kollet (2001) Blood 97:3283-3291.

Stamceller som viser forbedret CXCR4-signaloverføring som respons på lave eller høye SDF-1-konsentrasjoner og/eller stamceller som viser et forhøyet nivå av umodne, primitive forløperceller, f.eks. CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-populasjonen, kan anvendes i et bredt utvalg av kliniske anvendelser.

Ifølge et annet aspekt beskrives således en fremgangsmåte for behandling av en forstyrrelse som krever celle- eller vevserstatning. Fremgangsmåten utføres ved å

- tilføre til et individ med behov for dette en terapeutisk effektiv mengde av transgene stamceller som overuttrykker CXCR4 eller en aktiv del derav, slik at det oppnås et forhøyet nivå av umodne, primitive forløperceller, f.eks. CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-populasjonen, med bedre respons på SDF-1, selv i et miljø med forhøyet konsentrasjon av SDF-1, slik at forstyrrelsen som krever celle- eller vevserstatning i individet behandles. Forstyrrelser som krever celle- eller vevserstatning omfatter, men er ikke begrenset til, forskjellige former for immunsvikt, f.eks. i T- og/eller B-lymfocytter eller immunforstyrrelser, f.eks. reumatoid artritt. Slik immunsvikt kan være en følge av virusinfeksjoner, HTLV I, HTLV II, HTLV III, alvorlig eksponering overfor stråling, kreftbehandling eller en følge av annen medisinsk behandling. Hematopoetiske mangler omfatter, men er ikke begrenset til, leukemier, f.eks. akutt lymfoblastleukemi (ALL), akutt ikke-lymfoblastleukemi (ANLL), akutt myelocytteleukemi (AML) eller kronisk myelocytteleukemi (CML). Andre slike hematologiske mangler kan være, men er ikke begrenset til, alvorlige kombinerte immunsvikt (SCID)-syndromer [f.eks. adenosindeaminase (ADA)-mangel og X-koblet SCID (XSCID)], osteopetrose, aplastisk anemi, Guchers sykdom, talassemi og andre medfødte eller genetisk bestemte hematopoetiske unormaliteter. Andre forstyrrelser som krever celle- eller vevserstatning omfatter forstyrrelser forbundet med leversvikt, bukspyttkjertelsvikt, nevrologiske forstyrrelser, forstyrrelser som krever forhøyet beindannelse, f.eks. osteoartritt, osteoporose, traumatiske eller patologiske tilstander som omfatter ett av bindevevene, f.eks. beindefekter, bindevevsdefekter, skjelettdefekter eller bruskdefekter.
- Foretrukne enkeltindivider er pattedyr, f.eks. hunder, katter, sauer, griser, hester, storfe og, fortrinnsvis, mennesker.
- Stamcellene ifølge dette aspekt av foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis erholdt fra individet som skal behandles. Imidlertid kan stamceller også erholdes fra en syngeneisk donor, en allogeneisk donor eller, mindre foretrukket, fra en xenogenisk donor.
- Det vil forstås at dersom allogeneiske eller xenogeneiske stamceller anvendes behandles fortrinnsvis mottakeren og/eller cellene for å forhindre graft versus host- og host versus graft-avvisning. Immunsupprimeringsfremgangsmåter er velkjente innen faget, og noen beskrives i US patentskrift nr. 6 447 765.
- Det vil forstås at stamcellene beskrevet heri kan være genetisk modifisert til å uttrykke hvilket som helst terapeutisk gen, f.eks. et antiviralt middel mot hepatitt, videre beskrevet i US patentskrift nr. 5 928 638. Stamcellene transplanteres inn i mottakerindividet. Dette oppnås generelt ved anvendelse av fremgangsmåter som er velkjente innen faget og omfatter vanligvis injeksjon eller innføring av de behandlede stamcellene i individet ved anvendelse av kliniske verktøy som er velkjente blant fagfolk (US patentskrifter nr. 6 447 765, 6 383 481, 6 143 292 og 6 326 198).

- F.eks. kan innføring av stamcellene oppnås lokalt eller systemisk via intravaskulær tilførsel, f.eks. intravenøs eller intraarteriell tilførsel, intraperitoneal tilførsel og lignende. Cellene kan injiseres i en 50 ml Fenwall-infusjonspose ved anvendelse av sterile sprøyter eller andre sterile overføringsmekanismer. Cellene kan så
- 5 umiddelbart infiseres ved IV-tilførsel over et tidsrom, f.eks. 15 min., i en fri flyt-IV-slange til pasienten. I noen utførelser kan ytterligere reagenser, f.eks. buffere eller salter, også tilsettes. Preparatet som skal tilføres må være utformet, fremstilt og lagret ifølge standardfremgangsmåter i samsvar med korrekt sterilitet og stabilitet.
- 10 Stamcelledosene kan bestemmes ut fra den foreskrevne anvendelse. Generelt når det gjelder parenteral tilførsel er det vanlig å tilføre fra tilnærmet 0,01 til tilnærmet 5 millioner celler pr. kg kroppsvekt av mottakeren. Antall celler som anvendes vil avhenge av mottakerens kroppsvekt og tilstand, antall tilførsler eller tilførselshyppigheten og andre variabler som er kjente blant fagfolk.
- 15 En ytterligere ekspansjon av et CXCR4-overuttrykkende system kan fungere som et effektivt verktøy for å forbedre den kompromitterte "homing" og implantering etter genterapifremgangsmåter^{8,9}. I tillegg kan CXCR4-overekspresjon på humane CD34⁺-celler tillate forbedret klinisk CB-CD34⁺-transplantasjon, så vel som transplantasjon av autologe, mobiliserte PBL-CD34⁺, etter kjemoterapibehandling,
- 20 som begge kan være begrenset av lavt celleutbytte⁶. Videre besitter andre celletyper, f.eks. mesenchymale stamceller, evnen til å migrere til forskjellige organer, imidlertid er implanteringsnivået for disse spesielt lavt. Utvikling av et system som tillater konstitutiv eller forbigående CXCR4-ekspresjon på celleoverflaten sammen med induksjon av ekspresjon av SDF-1 eller tilførelse av
- 25 SDF-1 til målorganet kan være gunstig for retningsstyrt migrasjon in vivo, så vel som for langtids repopulasjon og utvikling av forskjellige celletyper i organet av interesse i pasienter, som en del av organreparasjon. Vi foreslår derfor overekspresjon av CXCR4 som et universelt system for regulering av stamcellefunksjon og -utvikling som kan forbedre utfallet av mange kliniske
- 30 fremgangsmåter.
- Etter tilførsel av cellene til individet kan virkningen av behandlingen om ønskelig evalueres som kjent innen faget. Behandlingen kan gjentas etter behov eller ønske.
- Ytterligere formål, fordeler og nye egenskaper ved den foreliggende oppfinnelse vil være åpenbare for gjennomsnittsfagpersonen etter en undersøkelse av de påfølgende
- 35 eksemplene, som ikke er ment å være begrensende. I tillegg kan alle de forskjellige utførelser og aspekter av foreliggende oppfinnelse som er skissert heri ovenfor og som kreves i kravseksjonen nedenfor finne eksperimentell støtte i de påfølgende eksempler.

EKSEMPLER

Det vises nå til de påfølgende eksempler, som sammen med beskrivelsene ovenfor illustrerer oppfinnelsen på en ikke-begrensende måte.

Generelt omfatter nomenklaturen som anvendes heri og

- 5 laboratoriefremgangsmåtene som benyttes i foreliggende oppfinnelse molekylære, biokjemiske og mikrobiologiske teknikker og rekombinant DNA-teknikker. Slike teknikker er grundig forklart i litteraturen. Se f.eks. "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989), "Current Protocols in Molecular Biology" bind I-III Ausubel, R.M., red. (1994), Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988), Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (red.) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", bind 1.4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); fremgangsmåtene som er beskrevet i
- 10 US patentskrifter nr. 4 666 828, 4 683 202, 4 801 531, 5 192 659 og 5 272 057, "Cell Biology: A Laboratory Handbook", bind I-III Cellis, J. E., red. (1994); "Current Protocols in Immunology" bind I-III Coligan J. E., red. (1994); Stites et al. (red.) "Basic and Clinical Immunology" (8. utgave), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (red.), "Selected Methods in Cellular Immunology",
- 20 W. H. Freeman and Co., New York (1980); tilgjengelige immunanalyser er omfattende beskrevet i patentlitteraturen og den vitenskapelige litteratur, se f.eks. US patentskrifter nr. 3 791 932, 3 839 153, 3 850 752, 3 850 578, 3 853 987, 3 867 517, 3 879 262, 3 901 654, 3 901 654, 3 935 074, 3 984 533, 3 996 345, 4 034 074, 4 098 876, 4 879 219, 5 011 771 og 5 281 521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., red. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., og Higgins S. J., red. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., og Higgins S.J., red. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., red. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) og "Methods in Enzymology", bind 1-317,
- 30 Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Andre generelle referanser gis i det foreliggende dokument.

Fremgangsmåtene heri antas å være velkjente innen faget og gis for å gjøre det enkelt for leseren. **EKSEMPEL 1:**

CXCR4-transduserte humane CD34⁺-celler har forhøyet CXCR4-ekspresjon på overflaten

CXCR4 ble overuttrykt på humane CB- og MPB-CD34⁺-anrikede celler ved anvendelse av et HIV-avledet, lentiviralt genoverføringssystem. De transduserte cellene ble analysert for ekspresjon av CXCR4 på overflaten.

Materialer og eksperimentelle fremgangsmåter

Humane celler - Celler fra navlesnorblod (CB) og adulte mobiliserte celler fra perifert blod (MPB) ble beholdt etter orientering og godkjenning. CD34⁺-celleanrikning ble oppnådd ved anvendelse av magnetisk kule-separasjon som beskrevet tidligere [Kollet (2001) Blood 97:3283-3291]. CXCR4-ekspresjonen ble bestemt ved væskestrømscytometri og anvendelse av rensset anti-human CXCR4 (klon 12G5, R&D, Minneapolis, MN) og sekundært F(ab')₂-fragment fra anti-muse-IgG fra geit konjugert til FITC (Jackson, West Grove, PA).

Virusvektorkonstruksjon og -fremstilling - Lentivirusekspresjonsvektoren med det humane CXCR4-gen ble konstruert ved å isolere et CXCR4-cDNA på 1,2 kb fra humane CB-celler og koble dette til genet for forbedret grønt fluorescerende protein (GFP) via et internt ribosominngangssete (IRES). Fragmentet som inneholdt CXCR4-IRES-GFP ble ligert til EF-1 α -promoter for dannelsen av en selvinaktiverende (SIN) vektor hvori fragmentet som inneholdt den bisistroniske EF-1 α -CXCR4-IRES-GFP-kassett var innsatt i en pHR'-SIN-vektorryggrad (Woods et al. Blood. 2000 des. 1;96(12):3725-33) vennligst beholdt fra Dr. Didier Trono, Geneve, Sveits. Kontrollvektoren mangler CXCR4-genet og uttrykker kun GFP (fig. 1).

Replikasjonsdefisient, selvinaktiverende HIV-avledet lentivirusvektor ble fremstilt ved forbigående transfeksjon av 293T-pakkecellelinjen ved hjelp av FuGENE 6-transfeksjonsreagens (Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland) og anvendelse av et treplasmidsystem: overføringsvektoren pHR'-EF1 α -GFP-SIN (kontrollvektor) eller pHR'-EF1 α -CXCR4-IRES-GFP-SIN for CD34⁺-celler eller pHR'-CMV-GFP (kontrollvektor) eller pHR'-CMV-CXCR4-IRES-GFP (eksperimentell vektor for hMSC, det kappekodende plasmid pMD.G og pakkekonstruksjonen pCMVR8.91 (Zufferey R, Nat. Biotechnol. 1997; 15:871-875 Naldini L, Science. 1996;272:263-267). 24 timer etter transfeksjonen ble virussupernatanten erstattet med serumfritt medium tilsatt 2 % BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10 mg/ml insulin (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), 200 mg/ml transferin (Sigma), 0,1 mM 2-merkaptetanol, 2 mM L-glutamin (Biological Industries), 100 mg/ml streptomycin (Biological Industries), og 10 mM Hepes (Biological Industries). 24 timer senere ble virussupernatant oppsamlet, filtrert (0,45 μ m Minisart-filter, Sartorius AG, Tyskland) og anvendt for transduksjon av målceller.

Transduksjon av CD34⁺-celler - Transduksjon av CD34⁺-celler ble utført ved anvendelse av en dobbelt transduksjonsfremgangsmåte i HSC⁵⁰. CD34⁺-celler (opptil 4 x 10⁵ pr. brønn) ble prestimulert med SCF (50 ng/ml) i 400 μ l serumfritt medium i 24 timer i en 12-brønners plate. Virussupernatant (1,6 ml/35 mm brønn) tilsatt SCF (50 ng/ml), FLT-3L (50 ng/ml), begge fra R&D Systems (Minneapolis, MN) og IL-6 (50 ng/ml, Interpharm Laboratories, Ares-Serono Group, Ness Ziona, Israel) ble tilsatt til cellene med en virusbelastning på opptil 2x10⁷ TU/ml (første

infeksjon). Transduksjonen ble gjentatt 24 timer senere (annen infeksjon). Infeksjonseffektiviteten ble bestemt ut fra celleekspresjonen av CXCR4 ved anvendelse av spesifikt anti-human CXCR4-PE (12G5, BD Pharmingen, San Diego, CA) og GFP (FL1-kanalen) ved væskestrømscytometrisk analyse (Kollet 2002
 5 blood bind 100 side 2778) (FACSCalibur, Becton Dickinson (BD), San Jose, CA) 72 timer etter transduksjonen. Kontrollcellene ble dyrket under de samme betingelser som de transduserte cellene uten behandling med lentivirusvektorer.

Det ble funnet at både CB- og MPB-CD34⁺-celler viste høy transduksjonseffektivitet vurdert ved væskestrømscytometri og nådde 70 % GFP-
 10 positive celler i GFP-vektor (kontroll)-transduserte celler og 50 % i CXCR4-transduserte celler (fig. 2A - øvre felt). Videre var CXCR4-infiserte CD34⁺-celler 87±2,7 % (CB) og 80±4 % (MPB) positive for ekspresjon av CXCR4 på celleoverflaten, mens kun 28±3,1 % av både CB- og MPB-CD34⁺-celler infisert med GFP-vektoren uttrykte endogen CXCR4, et nivå som tilsvarer nivået hos ikke-
 15 transduserte celler (kontrollceller) (fig. 2A - nedre felt (representativt) og B). Det er av interesse at CXCR4-transduserte celler viste en høyere gjennomsnittelig fluorescensintensitet (MFI) på 89,4, sammenlignet med 10,2 for GFP-vektortransduserte celler (fig. 2C). Den intracellulære ekspresjonen av CXCR4 var imidlertid lavere enn i de tilsvarende kontrollceller (GFP) (fig. 2C). Det er å merke
 20 seg at celler transdusert med CXCR4-vektoren hadde færre GFP⁺-celler, i samsvar med tidligere rapporter som viser redusert ekspresjonsnivå av gener som er plassert nedstrøms for et IRES⁵¹.

Disse resultatene viser at både CB- og MPB-CD34⁺-celler med hell kan transduseres med lentivirusvektorer med høy ekspresjon av CXCR4-transgenet.

25 **EKSEMPEL 2**

CXCR4-overuttrykkende humane CD34⁺-celler bibeholder sitt in vitro-differensieringspotensial og transgenekspresjonen.

Stamceller og forløperceller er i stand til in vitro-flerlinjedifferensiering til både myeloide og erytroide cellelinjer når de tilføres en egnet cytokinblanding (Metcalf,
 30 d, recent results in cancer research, 1977, bind 61, s. 1). Vi undersøkte derfor virkningen av transgenekspresjonen på de transduserte cellenes evne til å differensiere in vitro til de differensierte cellelinjene.

Eksperimentelle fremgangsmåter

CFU-analyse - For å påvise nivået av humane forløperceller samt opprettholdt transgenekspresjon etter transduksjon i ex vivo-kulturer ble halvfast dyrking utført
 35 som beskrevet tidligere⁵². Kort beskrevet ble CB-CD34⁺-transduserte celler (3x10³ celler/ml) utsådd i 0,9 % metylcellulose (Sigma), 30 % FCS, 5x10⁻⁵M 2ME, 50 ng/ml SCF, 5 ng/ml IL-3, 5 ng/ml GM-CSF (R&D) og 2 u/ml erythropoietin (Orto Bio Tech, Don Mills, Canada). Kulturene ble inkubert ved 37°C i den fuktiggjorte
 40 atmosfære som inneholdt 5 % CO₂ og ble analysert 14 dager senere ved

fasekontrastmikroskopi for GFP⁺, så vel som for myeloide eller erytroide kolonier ut fra morfologiske kriterier.

Det ble funnet at transgenekspresjonen ikke påvirket cellenes evne til å differensiere mot den myeloide og erytroide cellelinje. Transduserte CD34⁺-celler (både kontrollceller og CXCR4-celler) viste flercellelinjedifferensiering til GFP⁺-CFC-kolonier, f.eks. burst-forming unit-erytroide (BFU-E)-kolonier og colony-forming unit-granulocyt-makrofag (CFU-GM)-kolonier, vurdert ut fra fasekontrastmikroskopi på dag 14 (fig. 3A). Antall GFP⁺-CFC-kolonier som var transdusert med kontrollvektoren var to ganger høyere enn GFP⁺-CFC-kolonier transdusert med CXCR4-vektoren, i samsvar med den lavere prosentandel av GFP⁺-celler etter transduksjon med denne vektoren (fig. 3B). Det er av interesse at mens både kontrollceller og CXCR4-transduserte celler ga det samme antall CFU-GM-kolonier var det en 25 % (p=0,004) reduksjon av BFU-E-kolonier dannet fra CXCR4-transduserte celler (fig. 3B), noe som bekrefter tidligere funn av Gibellini et al. som viser at SDF-1/CXCR4-interaksjoner undertrykker differensiering av den erytroide cellelinje. Videre viste MPB-CD34⁺-CXCR4-transduserte celler en høyere prosentandel (2,9 %) av CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-populasjonen, sammenlignet med 0,5 % i kontrollceller. Denne virkningen ble ikke observert for CB-CD34⁺-celler (fig. 3C). CXCR4-transduksjon kan følgelig gi en bedre bevaring og/eller ekspansjon av den primitive CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-populasjon.

EKSEMPEL 3

CXCR4 uttrykt på transduserte CD34⁺-celler er funksjonelt.

Kjemokiner induserer cellemotilitet ved å aktivere en kaskade av intracellulære begivenheter som fører til cytoskjelettearrangering, særlig aktinpolymerisering⁵⁴. Som et middel for bestemmelse av den innsatte reseptors funksjonalitet undersøkte vi virkningen av CXCR4-overekspresjon på SDF-1-indusert aktivering av motilitetsmaskineriet.

Eksperimentelle fremgangsmåter

Aktinpolymeriseringsanalyse - Transduserte celler ble stimulert med SDF-1α (300 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ) i serumfritt RPMI ved 37°C i de angitte tidsrom. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 3 volumer 3,7 % paraformaldehyd ved romtemperatur i 10 min., fulgt av vask med PBS og permeabilisering på is i 2 min. med 0,1 % Triton-Hepes (20 mM Hepes, 300 mM sukrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 % Triton). Cellene ble så farget med FITC-falloidin (2 mg/ml, Sigma) i 30 min. ved romtemperatur, vasket og analysert ved væskestrømscytometri.

Migreringsanalyse - RPMI (600 µl) tilsatt 10 % FCS og 125 ng/ml SDF-1α ble tilsatt til nedre kammer i en Costar 24-brønners transbrønnplate (Corning (porestørrelse 5 µm), NY). 1 x 10⁵ transduserte CD34⁺-celler i 100 µl medium ble fylt i øvre kammer og fikk migrere i 4 timer ved 37°C. Migrerende celler ble

oppsamlet fra nedre kammer og talt i 30 sek. ved anvendelse av en FACSCalibur. Den spontane kontrollmigrasjonen ble utført uten SDF-1 α i nedre kammer.

Vi fant at CB-CD34⁺-celler viste en topp av aktinpolymerisering etter 30 sek. stimulering med SDF-1 (fig. 4A). På dette tidspunkt viste CXCR4-overuttrykkende celler en $3\pm0,11$ ($p<0,001$) gangers økning av aktinpolymeriseringen mot en $1,5\pm0,07$ ($p=0,002$) gangers økning hos kontrollcellene, sammenlignet med ikke-stimulerte celler (fig. 4A). I lys av disse resultatene undersøkte vi migrasjonsevnen til CXCR4-transduserte CB- og MPB-CD34⁺-celler mot en gradient av SDF-1 (125 ng/ml) i en transbrønn-migrasjonsanalyse. Celler som overuttrykte CXCR4 viste en signifikant forhøyet respons på SDF-1-formidlet kjemotaksis på $1,5\pm0,04$ ($p<0,001$) ganger for CB og $2,3\pm0,3$ ($p=0,03$) ganger for MPB, sammenlignet med kontrollvektortransduserte celler (fig. 4B). Sett under ett tyder disse resultatene på at overekspresjon av CXCR4 på humane anrikede CD34⁺-forløperceller fører til forhøyet SDF-1-indusert signalisering, noe som fører til økt cellemotilitet.

15 EKSEMPEL 4

CXCR4-transduserte CD34⁺-celler responderer mer på lave SDF-1-konsentrasjoner.

Man tenkte seg at overekspresjon av CXCR4 på CD34⁺-celler kan gjøre dem mer responderende overfor lave SDF-1-konsentrasjoner. For å analysere dette ble in vitro-migrering av transduserte celler utført mot forskjellige SDF-1-konsentrasjoner. Videre har lave konsentrasjoner av kjemokinet SDF-1 i synergi med cytokiner blitt vist å forsterke proliferasjonen av humane CD34⁺-celler, så vel som overlevelse av både humane forløperceller og museforløperceller²⁵⁻²⁸. Virkningen av SDF-1 i lave konsentrasjoner på proliferasjonen av CXCR4-overuttrykkende celler ble følgelig målt.

Eksperimentelle fremgangsmåter

Migrasjonsanalyse - som beskrevet tidligere (12). Kort beskrevet ble RPMI (600 μ l) tilsatt 10 % FCS og inneholdende enten 10 ng/ml eller 125 ng/ml SDF-1 α tilsatt til nedre kammer i en Costar 24-brønners transbrønnplate (Corning (porestørrelse 5 μ m), NY). 1×10^5 transduserte CD34⁺-celler i 100 μ l medium ble fylt i øvre kammer og fikk migrere i 4 timer ved 37°C. Migrerende celler ble oppsamlet fra nedre kammer og talt i 30 sek. ved anvendelse av en FACSCalibur. Kontrollmåling av spontan migrasjon ble utført uten SDF-1 α i nedre kammer.

Proliferasjonsanalyse - Etter en 96-timers transduksjonsfremgangsmåte ble CB-CD34⁺-celler dyrket i 7 dager i duplikat i serumfritt medium tilsatt 50 ng/ml SFC, 50 ng/ml FLT-3L og 50 ng/ml IL-6 i nærvær eller fravær av 50 ng/ml SDF-1. Cellene ble talt daglig, og levedyktigheten ble evaluert ved trypanblåtteksklusjon.

Det ble funnet at allerede ved lave konsentrasjoner av SDF-1 (10 ng/ml) hadde migrasjonen av CB-CXCR4-transduserte celler nådd et toppnivå på 25 %, tilsvarende migrasjonen av disse cellene ved høy SDF-1-konsentrasjon (125 ng/ml).

Som vist i fig. 4B viste ved lave konsentrasjoner av SDF-1 (10 ng/ml) CXCR4-infiserte celler isolert fra human CB opptil 2,5 ganger ($p < 0,05$) økning av migrasjonen, sammenlignet med de tilsvarende kontrollvektortransduserte cellene, mens denne økningen ved høyere SDF-1-konsentrasjoner (125 ng/ml) var mindre fremtredende (1,5 ganger). Selv om prosentandelen av migrerende celler var mye lavere enn for CB-CD34⁺-celler viste på tilsvarende måte CXCR4-transduserte MPB-CD34⁺-celler en 2,6 ($p = 0,05$) gangers økning av migrasjonen mot 10 ng/ml SDF-1, sammenlignet med to gangers økning for 125 ng/ml SDF-1 (fig. 4B). Videre ble det ved måling av proliferasjon av CXCR4-overuttrykkende celler over et tidsrom på 7 dager observert at CXCR4-transduserte CB-CD34⁺-celler nesten hadde fordoblet det utsådde antall ($p < 0,05$) allerede 48 timer etter utsåingen, og denne virkningen kunne observeres i opptil 7 dager ($p = 0,001$) i kultur. Kontrollceller hadde imidlertid kun forhøyet sitt celletall på dag 5 med opptil $1,2 \pm 0,005$ ganger, og på dag 7 var celletallet falt til under den opprinnelige utsådde mengde (fig. 5A). Det er å merke seg at denne forsterkende proliferative virkningen av CXCR4-overuttrykkende celler ikke ble påvist ved høyere konsentrasjoner av SDF-1 (100 ng/ml) (resultater ikke vist). Lengre tid i kultur førte til celledifferensiering, noe som utelukker muligheten for cellulær transformasjon etter lentivirustransduksjon. Sett under ett viser våre resultater at overekspresjon av CXCR4 på CD34⁺-celler forsterker cellenes respons på lave SDF-1-konsentrasjoner og øker både cellenes motilitet og deres proliferasjon/overlevelse, med en lavere respons på høye konsentrasjoner sammenlignet med kontrollceller.

EKSEMPEL 5:

CXCR4-overuttrykkende celler responderer mindre på SDF-1-indusert desensitivisering.

Det har blitt vist at SDF-1 i høye konsentrasjoner (1 μ g/ml og høyere) induserer desensitivisering og internalisering via endocytose av CXCR4-molekylet på celleoverflaten, som eventuelt kan resykleres til celleoverflaten⁵⁵. Vi analyserte derfor virkningen av høye SDF-1-konsentrasjoner på celler som overuttrykker CXCR4.

Eksperimentelle fremgangsmåter

CXCR4-ekspresjon på celleoverflate - CXCR4-transduserte CB-CD34⁺-celler ble inkubert over natten med 1 μ g/ml SDF-1. Ekspresjonen av CXCR4 på celleoverflaten ble bestemt ved å merke cellene med anti-humant CXCR4-PE (12G5, BD Pharmingen, San Diego, CA) og analyse ved væskestrømscytometri (FACSCalibur, Becton Dickinson (BD), San Jose, CA).

Migrasjonsanalyse - RPMI (600 μ l) tilsatt 10 % FCS og 125 ng/ml SDF-1 α ble tilsatt til nedre kammer i en Costar 24-brønners transbrønnplate (Corning (porestørrelse 5 μ m), NY). 1×10^5 transduserte CD34⁺-celler i et 100 μ l medium ble fylt i øvre kammer og fikk migrere i 4 timer ved 37°C. Migrerende celler ble

oppsamlet fra nedre kammer og talt i 30 sek. ved anvendelse av en FACSCalibur. Kontrollmåling av spontan migrasjon ble utført uten SDF-1 α i nedre kammer.

CXCR4-transduserte CB-CD34⁺-celler ble inkubert over natten med 1 μ g/ml SDF-1 og analysert for ekspresjon av CXCR4 på celleoverflaten. Uventet var det bare en
 5 40 % ($p < 0,05$) reduksjon av ekspresjonen av reseptoren på celleoverflaten hos CXCR4-overuttrykkende celler, mens det i kontrollceller var opptil 90 % ($p < 0,05$) internalisering av reseptoren (fig. 5Bi). Etter denne desensitiviseringen ble cellene også analysert in vitro for retningsstyrt migrasjon mot en SDF-1 (125 ng/ml)-
 10 gradient. Kontrollcellene viste en signifikant ($p < 0,05$) reduksjon i SDF-1-formidlet migrasjon, mens migrasjonen av CXCR4-transduserte celler knapt ble påvirket (fig. 5Bii). Dette tyder på at internaliseringen av CXCR4 kompenseres av en konstant overekspresjon av reseptoren, som kontinuerlig forblir funksjonell.

EKSEMPEL 6:

CXCR4-overekspresjon forbedrer SRC-implantering i NOD/SCID-mus.

15 For å anslå virkningen av overekspresjon av CXCR4 på den SDF-1/CXCR4-avhengige implantering av humane CB-CD34⁺-celler ble transduserte forløperceller transplantert inn i NOD/SCID-mus.

Eksperimentelle fremgangsmåter

20 **Mus.** NOD/LtSz-Prkdcscid (NOD/SCID)-mus ble oppalt og holdt som beskrevet tidligere¹⁸. Alle eksperimenter var godkjent av dyrestellkomiteen ved Weizmann-instituttet. Åtte-ti uker gamle mus ble subletalt bestrålt (375 cGy fra en ⁶⁰Co-kilde) og transplantert med humane celler som angitt [2×10^5 celler/mus (transplantasjon) og 5×10^5 celler/mus ("homing")] 24 timer etter bestrålingen.

25 **Implantering og "homing" av humane celler** - Musene ble avlivet tilnærmet fem uker etter transplantasjonen, og beinmarg og miltceller ble høstet og resuspendert i encellesuspensjon. Implantering av humane celler ble analysert ved væskestrømscytometri (FACSCalibur, BD) ved anvendelse av spesifikt, monoklonalt anti-human CD45-APC mAb (BD Pharmingen). Cellelinjeanalysen ble utført ved farging med anti-CD19-PE (BD Pharmingen) eller anti-CD33-PE (BD).
 30 Den mer primitive cellepopulasjonen ble analysert ved anvendelse av CD34-APC mAb (BD Pharmingen) sammen med anti-CD38-PE (BD). Humane celler ble også analysert for GFP-ekspresjon (FL1-kanalen). Human plasma og muse-IgG ble anvendt for blokkering av Fc-reseptorer. Isotypekontrollantistoff og celler erholdt fra mus som ikke gjennomgikk transplantasjonen ble anvendt som negative
 35 kontroller, og humane CB-CD34⁺-celler ble anvendt som positive kontroller.

Vi fant at CXCR4-transduserte celler viste en forhøyet implantering av humane celler i BM hos mus på opptil $4 \pm 0,7$ ($p = 0,001$) ganger for CB-CD34⁺-celler, sammenlignet med kontrollceller (fig. 6Ai). På tilsvarende måte viste CXCR4-transduserte celler en $2,7 \pm 0,8$ ($p = 0,05$) gangers økt repopulasjon av milten (fig.
 40 6Aii). det er av interesse at ingen signifikante forskjeller ble observert når det gjaldt

- antall sirkulerende humane celler i mus transplantert med kontrollceller eller CXCR4-transduserte celler (fig. 6Aiii). Videre viser en representativ FACS-farging med monoklonale CD19- og CD33-antistoffer at multilinje-hematopoese til lymfoide og myeloide populasjoner ble opprettholdt i BM hos mus (fig. 6B), med en tendens mot mer B-cellelymfopoiese i mus transplantert med CXCR4-transduserte celler (fig. 6C), sannsynligvis siden SDF-1 også er en Pre-B-cellevekstfaktor. Videre ble gjennomsnittelig $36 \% \pm 19 \%$ (område 7,5 % til 77 %) av CD45⁺-cellene funnet å uttrykke GFP (fig. 6B). Transgen ekspresjon ble også påvist i både myeloide og lymfoide populasjoner (fig. 6B). Mus transplantert med CXCR4-overuttrykkende celler viste en fire gangers økning av den primitive CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-cellepopulasjonen, sammenlignet med mus injisert med kontrollvektortransduserte celler (fig. 6D), noe som tyder på at det høyere implanteringsnivå av CXCR4-overuttrykkende celler skyldes en forhøyet repopulasjon av den mer primitive cellepopulasjon.
- Det har tidligere blitt vist at "homing" av umodne humane CD34⁺38⁻/^{lav}-CXCR4⁺-celler til milt og BM hos mus avhenger av CXCR4/SDF-1-interaksjoner¹⁸. Det ble derfor videre undersøkt hvorvidt overekspresjon av CXCR4 på humane CD34⁺-celler kunne forbedre "homing" av cellene til BM og milt hos subletalt bestrålte NOD/SCID-mus. Det ble observert at 2 timer (CB) eller 16 timer (MPB) etter transplantasjonen viste CXCR4-transduserte celler en mer enn to gangers forhøyet "homing" til milten, sammenlignet med de tilsvarende kontrollcellene (fig. 6E). Disse forskjellene ble imidlertid ikke observert når det gjaldt evne til "homing" til BM (resultater ikke vist). Disse resultatene tyder på at CXCR4-transduserte celler først kan vandre i kort tid til milten før repopulasjon (5 uker etter transplantasjonen) av BM, som tidligere foreslått¹⁸.

EKSEMPEL 7:

Antigene determinanter på overuttrykt CXCR4.

- I et første sett av eksperimenter analyserte vi binding av det monoklonale antistoff 6H8, som er spesifikt for aminosyrerestene 22-25 i human CXCR4-a - et sete som er lokalisert innen det første, N-terminale, ekstracellulære domenet i CXCR4 (fig. 7), til enten kontroll-GFP-transduserte CD34⁺-celler fra navlesnorblod eller CXCR4-overuttrykkende CD43⁺-celler. Vi fant at GFP (kontroll)-transduserte CB-CD34⁺-celler, som kun uttrykker endogen CXCR4, ikke bandt det monoklonale antistoff 6H8, trass i at de bandt det monoklonale antistoff 12G5 (ikke vist), som bindes til det andre ekstracellulære domenet i human CXCR4, mens CXCR4-overuttrykkende CB-CD34⁺-celler ga positiv farging med både antistoff 12G5 og antistoff 6H8. Disse resultatene tyder på at overekspresjon av CXCR4 delvis forhindrer ødeleggelse eller kløyving av 6H8-epitopen, som har blitt vist å spille en rolle i CXCR4-kjemotaksisfunksjonen (Brelot et al., J. Biol. Chem. 275:23736-23744).
- I et andre sett av eksperimenter fulgte vi bindingen av de monoklonale antistoffene 6H8 og 12G5 til humane celler isolert fra BM fra NOD/SCID-mus transplantert med

- enten kontrollceller eller CXCR4-overuttrykkende CB-CD34⁺-celler (fig. 8). Vi fant at humane celler isolert fra kimær BM hos mus som bar humane CXCR4-overuttrykkende celler viste en høyere prosentandel av celler som var positive for både 6H8 og 12G5 enn i kimær BM fra mus med humane kontrollceller. Siden
- 5 kontroll-GFP-bærende celler viste en klar ødeleggelse av 6H8-epitopen var det videre ingen ødeleggelse hos GFP-bærende, CXCR4-overuttrykkende celler, noe som viser at det også er mindre ødeleggelse in vivo av 6H8-epitopen i de overuttrykkende cellene.
- Selv om oppfinnelsen har blitt beskrevet i forbindelse med spesifikke utførelser av
- 10 den er det åpenbart at mange alternativer, modifikasjoner og variasjoner vil være åpenbare for fagfolk. Følgelig er det meningen at alle slike alternativer, modifikasjoner og variasjoner som ligger innenfor de vedlagte kravs ånd og brede område omfattes av oppfinnelsen. I tillegg bør sitering eller identifisering av
- 15 hvilken som helst referanse i den foreliggende patentsøknad ikke oppfattes som en innrømmelse av at en slik referanse er tilgjengelig som teknikkens stand for foreliggende oppfinnelse.

REFERANSER

1. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35
2. Abkowitz J, Robinson A, Kale S, Long M, Chen J. The mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood.* 2003
3. Wright DE, Wagers AJ, Pathak Gulati A, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001;294:1933-1936
4. Selleri C, Maciejewski J, De Rosa G, Raiola A, Risitano A, Picardi M, Pezzullo L, Luciano L, Ricci P, Varriale G, Della Cioppa P, Del Vecchio L, Rotoli B. Long-lasting decrease of marrow and circulating long-term culture initiating cells after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:1029-1037
5. Podesta M. Transplantation hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:331-336.
6. Podesta M, Piaggio G, Frassoni F, Pitto A, Mordini N, Bregante S, Valeriani A, Bacigalupo A. Deficient reconstitution of early progenitors after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:1011-1017
7. Carton G, Herault O, Benboubker L, Clement N, Bernard M, Roingeard F, Desbois I, Colombat P, Binet C, Domenech J. Quantitative and qualitative analysis of the human primitive progenitor cell compartment after autologous stem cell transplantation. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research.* 2002;11:359-368
8. Hall K, Abonour R, Cornetta K, EF S. Decreased homing of transduced human bone marrow CD34+ cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2003;abst. 100
9. Kang E, Hanazano Y, Frare P, Vanin E, De Witte M, Metzger M, Liu J, Tisdale J. Persistent low-level engraftment of rhesus peripheral blood progenitor cells transduced with the fanconi anemia C gene after conditioning with low-dose irradiation. *Mol Ther.* 2001;3:911-919
10. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996;382:635-638
11. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9448-9453
12. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, Hershkovich R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T. Rapid and efficient homing of human CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood.* 2001;97:3283-3291
13. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science.* 1999;283:845-848
14. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman R, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *JCI.* 2000;106:1331-1339
15. Kollet O, Petit I, Kahn J, Samira S, Dar A, Peled A, Deutsch V, Gunetti M, Piacibello W, Nagler A, Lapidot T. Human CD34+CXCR4- sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. *Blood.* 2002;100
16. Spencer A, Jackson J, Baulch-Brown C. Enumeration of bone marrow 'homing' haemopoietic stem cells from G-CSF-mobilised normal donors and influence on engraftment following allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:1019-1022.
17. Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S, van der Lelie H, van der Schoot CE, Gerritsen WR. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97:799-804
18. Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia.* 2002;16:1992-2003
19. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol.* 1998;160:1522-1531

20. Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003;112:160-169
21. Rusten L, Cue L, Pharo A, Jacobsen S, Lapidot T, Kvalheim G. TNF- α and TGF- β potentially upregulate the expression of CXCR4 on peripheral blood progenitor cells. *Blood.* 2000;94:252a
22. Denning-Kendall P, Singha S, Bradley B, Hows J. Cytokine expansion culture of cord blood CD34⁺ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells.* 2003;21:61-70
23. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5320-5325
24. Wright DE, Bowman EP, Wagers AJ, Butcher EC, Weissman IL. Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J Exp Med.* 2002;195:1145-1154
25. Graft-FAure S, Levesque C, Ketata E, Jean P, Vasse M, Soria C, Vannier JP. Recruitment of primitive peripheral blood cells: synergism of interleukin 12 with interleukin 6 and stromal cell-derived FACTOR-1. *Cytokine.* 2000;12:1-7
26. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, H. KC. Enhanced myelopoiesis in sdf-1-transgenic mice: sdf-1 modulates myelopoiesis by regulating progenitor cell survival and inhibitory effects of myelosuppressive chemokines [abstract]. *Blood.* 1999;94:650a
27. Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, Le Bousse-Kerdiles MC. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood.* 2000;95:756-768
28. Lataillade JJ, Clay D, Bourin P, Herodin F, Dupuy C, Jasmin C, Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G(0)/G(1) transition in CD34(+) cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism. *Blood.* 2002;99:1117-1129.
29. Broxmeyer H, Kohli L, Kim C, Lee Y, Mantel C, Cooper S, Hangoc G, Shaheen M, Li X, Clapp D. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and Gxi proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73:630-638
30. Cashman J, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Stromal-derived factor 1 inhibits the cycling of very primitive human hematopoietic cells in vitro and in NOD/SCID mice. *Blood.* 2002;99:792-799.
31. Cashman J, Dykstra B, Clark-Lewis I, Eaves A, Eaves C. Changes in the proliferative activity of human hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice and enhancement of their transplantability after in vivo treatment with cell cycle inhibitors. *J. Exp. Med.* 2002;196:1141-1149
32. Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity.* 1999;10:463-471
33. Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, Katsura Y, kishimoto T, Nagasawa T. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999;96:5663-5667
34. Yahata T, Ando K, Sato T, Miyatake H, Nakamura Y, Mugurumu Y, Kato S, Hotta T. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood.* 2003;101:2905-2913
35. Wang J, Kimura T, Asada R, Harada S, Yokota S, Kawamota Y, Fujimura Y, Tsuji T, Ikehara S, Sonoda Y. SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34⁺ cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood.* 2003;101:2924-2931
36. Shen H, Cheng T, Olszak I, Garcia-Zepeda E, Lu Z, Herrmann S, Fallon R, Luster AD, Scadden DT. CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 2001;166:5027-5033
37. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood.* 2002;99:44-51

38. Levesque J-P, Bendall LJ, Hendy J, Williams B, Simmons PJ. SDF-1 α is inactivated by proteolytic cleavage in the bone marrow of mice mobilized by either G-CSF or cyclophosphamide. *Blood*. 2001;98:831a
39. Moore MA, Hattori K, Heissig B, Shieh JH, Dias S, Crystal RG, Rafii S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;938:36-45, 45-37
40. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001;97:3354-3360
41. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, Ponomaryov T, Taichman RS, Arenzana-Seisdedos F, Fujii N, Sandbank J, Zipori D, Lapidot T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3:687-694
42. Sawada S, Gowrishankar K, Kitamura R, Suzuki M, Suzuki G, Tahara S, Koito A. Disturbed CD4⁺ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J. Exp. Med.* 1998;187:1439-1449
43. Guenechea G, Gan OI, Inamitsu T, Dorrell C, Pereira D, Kelly M, Naldini L, Dick J. Transduction of human CD34⁺CD38⁻ bone marrow and cord blood-derived SCID-repopulating cells with third generation lentiviral vectors. *Mol Ther.* 2000;1:566-573
44. Miyoshi H, Smith K, Mosier D, Verma I, Torbett B. Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science*. 1999;283:682-686
45. Barquintero J, Segovia J, Ramirez M, Limon A, Guenechea G, Puig T, Briones J, Garcia J, Bueren J. Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells generating stable engraftment of transgene-expressing cells in NOD/SCID mice. *blood*. 2000;3085-3093
46. Woods N, Fahlman C, Mikkola H, Hamaguchi I, Olsson K, Zufferey R, Jacobsen S, Trono D, Karlsson S. Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood*. 2000;96:3725-3733
47. Sutton R, Reitsma M, Uchida N, Brown P. Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J Virol.* 1999;73:3649-3660
48. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Basile G. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-672
49. Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Morteollaro A, Morecki S, Andolfi G, Tabucchi A, Carlucci F, Marinello E, Cattaneo F, Vai S, Servida P, Miniero R, Roncarolo M, Bordignon C. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloblastic conditioning. *Science*. 2002;296:2410-2413
50. Darash-Yahana M, Kahn J, Aslan H, Gropp M, Nagler A, Gazit Z, Reubini B, Lapidot T, Gazit D, Galun E, Peled A. Rapid and efficient lentiviral mediated transduction of human mesenchymal and hematopoietic stem cells. Submitted. 2003
51. Wagstaff M, Lilley C, Smith J, Robinson M, Coffin R, Latchman D. Gene transfer using a disabled herpes virus vector containing the EMCV IRES allows multiple gene expression in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 1998;5:1566-1570
52. Metcalf D. Hematopoietic colonies: In vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results in Cancer Res.* 1977;61:1
53. Gibellini D, Bassini A, Re MC, Ponti C, Miscia S, Gonelli A, La Placa M, Zauli G. Stroma-derived factor 1 α induces a selective inhibition of human erythroid development via the functional upregulation of Fas/CD95 ligand. *Br J Haematol.* 2000;111:432-440
54. Bleul CC, Aiuti A, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;184:1101-1109
55. Signoret N, Oldbridge J, Perchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* 1997;139:651-664

PATENTKRAV

1. In vitro fremgangsmåte for fremstilling av en populasjon av celler som omfatter hematopoetiske stamceller anriket med umodne, primitive forløperceller, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter innføring av et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 i oppsamlede stamceller.
5
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellepopulasjonen viser forbedret SDF-1 induert cellemigrasjon som respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller lavere enn tilnærmet 50 ng/ml.
10
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellepopulasjonen viser forbedret SDF-1 induert cellemigrasjon som respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller høyere enn tilnærmet 1 µg/ml.
15
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellepopulasjonen viser en reduksjon i desensitivisering ved SDF-1 som respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller høyere enn tilnærmet 1 µg/ml.
20
5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de umodne, primitive forløpercellene er fra CD34⁺/CD38⁻/^{lav}-cellelinjen.
25
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at oppsamlingen av stamcellene oppnås etter en fremgangsmåte for induksjon av stamcellemobilisering og/eller omfatter en kirurgisk fremgangsmåte.
30
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den videre omfatter isolering ved FACS av stamceller med et CXCR4-nivå som ligger over en på forhånd bestemt terskelverdi.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at stamcellene kan differensiere mot den myeloide og den erytroide cellelinje.
35

9. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
karakterisert ved at mengden av umodne, primitive forløperceller fra
CD34⁺/CD38^{-lav}-linjen er tilnærmet 1-5 % av populasjonen.
- 5 10. Fremgangsmåte ifølge krav 5,
karakterisert ved at de umodne, primitive forløpercellene fra
CD34⁺/CD38^{-lav}-linjen foreligger i en mengde som er lik eller høyere enn tilnærmet
3 % av populasjonen.
- 10 11. Cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller anriket med umodne,
primitive forløperceller som viser forbedret sSDF-1 induisert cellemigrasjon om
respons på en konsentrasjon av SDF-1 som er lik eller lavere enn tilnærmet 50
ng/ml eller er lik eller høyere enn tilnærmet 1 µg/ml, fremstilt ved å innføre et
DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 inn i stamcellene som resulterer
15 fra overekspresjon av CXCR4 på stamcellene.
12. Cellepopulasjon ifølge krav 11,
karakterisert ved at cellene kan differensiere mot den myeloide og den
erythroide linje.
- 20 13. Cellepopulasjon ifølge krav 11,
karakterisert ved at de umodne, primitive forløpercellene er fra
CD34⁺/CD38^{-lav}-linjen.
- 25 14. Cellepopulasjon ifølge krav 13,
karakterisert ved at mengden av umodne primitive forløperceller av
CD34⁺/CD38^{-lav}-linjen er tilnærmet 1-5 % av populasjonen.
- 15 15. Cellepopulasjon ifølge krav 13,
karakterisert ved at mengden av umodne primitive forløperceller av
CD34⁺/CD38^{-lav}-linjen er tilnærmet eller høyere enn 3 % av populasjonen.
- 35 16. Anvendelse av en cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller
ifølge ethvert av kravene 11-15, for fremstilling av et medikament for forhøyet
"homing" av de hematopoetiske stamcellene til et målvev hos et individ med behov
for dette, der målvevet er utvalgt fra gruppen som består av beinmarg, blodkar,
hjerte, lunge, lever, bukspyttkjertel, nyre, nervesystem, hud, bein og skjelettmuskel.

17. Anvendelse av en cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15, for fremstilling av et medikament for forhøyet repopulasjon av et målvev i et individ med behov for dette, der målvevet er utvalgt fra gruppen som består av beinmarg, blodkar, hjerte, lunge, lever, bukspyttkjertel, nyre, nervesystem, hud, bein og skjelettmuskel.
- 5
18. Anvendelse av en cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 i fremstillingen av et medikament for å muliggjøre transplantasjon.
- 10
19. Anvendelse ifølge krav 18, hvori transplantasjonen følger etter kjemoterapeutiske fremgangsmåter.
20. Anvendelse ifølge krav 18, hvori transplantasjonen er autolog.
- 15
21. Anvendelse ifølge krav 20, hvori transplantasjonen omfatter mobilisering av autologe celler.
22. Anvendelse ifølge krav 18, hvori transplantasjonen er heterolog.
- 20
23. Anvendelse ifølge krav 18, hvori transplantasjonen utføres med mobiliserte stamceller.
24. Cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller ifølge ethvert av kravene 11-15, for anvendelse for å forhøye "homing" av de hematopoetiske stamcellene til et målvev hos et individ med behov for dette.
- 25
25. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15, for anvendelse for å forhøye repopulasjon av et målvev i et individ med behov for dette.
- 30
26. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse ifølge krav 24 eller 25, hvori nevnte målvev er valgt fra gruppen som består av beinmarg, blodkar, hjerte, lunge, lever, bukspyttkjertel, nyre, nervesystem, hud, bein og skjelettmuskel.
- 35
27. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse for å muliggjøre transplantasjon.

28. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse ifølge krav 27, hvori transplantasjonen følger etter kjemoterapeutiske fremgangsmåter.
- 5 29. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse ifølge krav 27, hvori transplantasjonen er autolog.
30. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse ifølge krav 29, hvori transplantasjonen omfatter mobilisering av autologe celler.
- 10 31. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse ifølge krav 27, hvori transplantasjonen er heterolog.
32. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse ifølge krav 27, hvori transplantasjonen utføres med mobiliserte stamceller.
- 15 33. In vitro fremgangsmåte for fremstilling av en cellepopulasjon som omfatter hematopoetiske stamceller som fremviser CXCR4 med intakt 6H8-epitop, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter innføring av et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 i stamcellene.
- 20 34. Cellepopulasjon omfattende hematopoetiske stamceller som omfatter intakt CXCR4 6H8-epitop, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er fremstilt ved å innføre et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 inn i stamcellene som resulterer i overekspresjon av
- 25 CXCR4 på stamcellene.
35. Anvendelse av en cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15, for fremstilling av et medikament for transplantasjon.
- 30 36. Cellepopulasjon ifølge ethvert av kravene 11-15 for anvendelse i transplantasjon.
37. Farmasøytisk preparat, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en populasjon av hematopoetiske stamceller som omfatter stamceller som fremviser intakt CXCR4 6H8-epitop,
- 35 fremstilt ved å innføre et DNA-fragment som omfatter sekvensen til CXCR4 inn i stamcellene som resulterer i overekspresjon av CXCR4 på stamcellene.

Figure 1

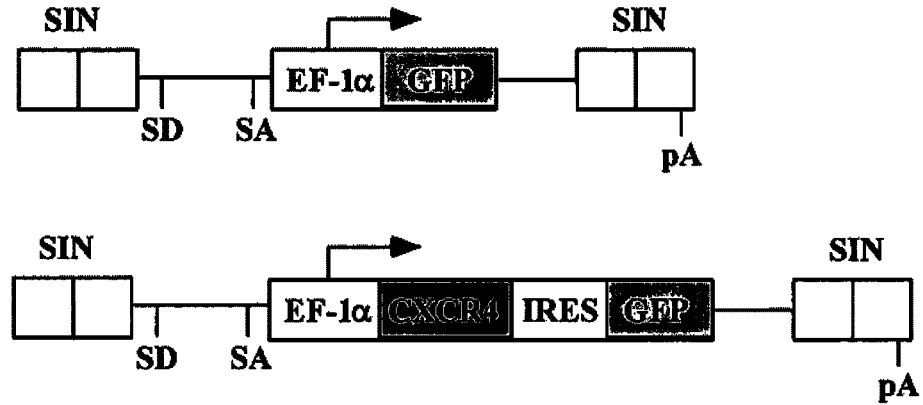


Figure 2

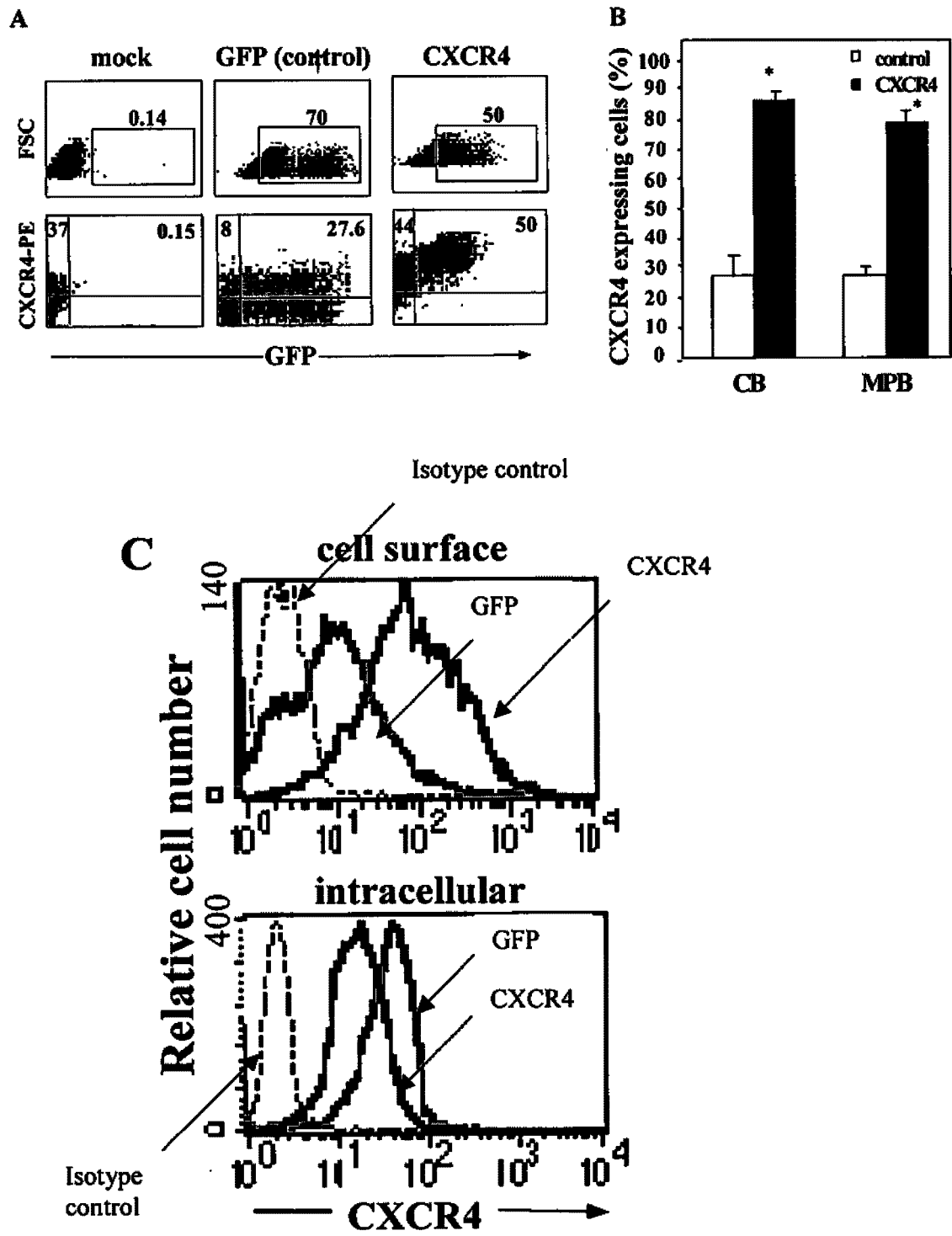


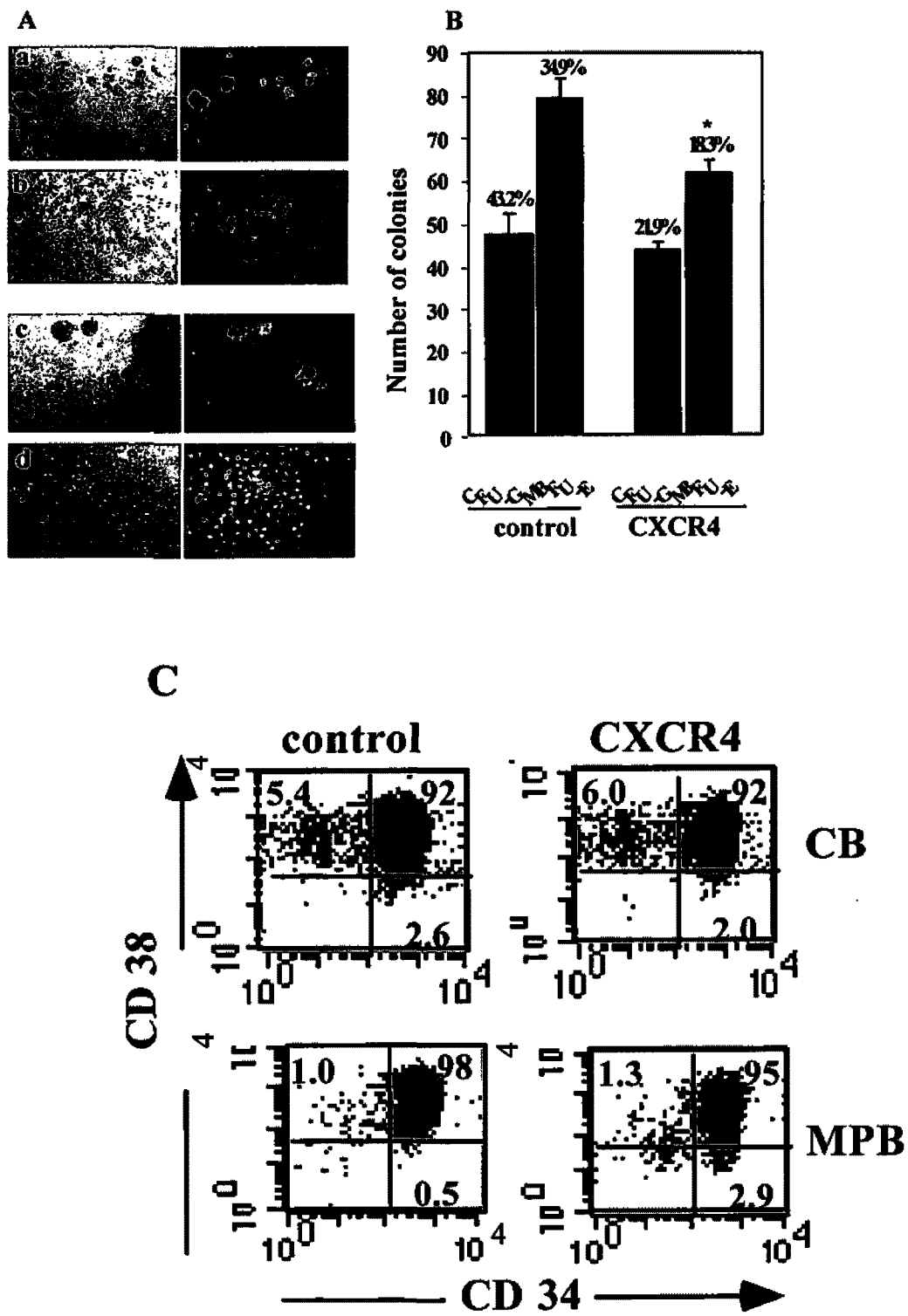
Figure 3:

Figure 4

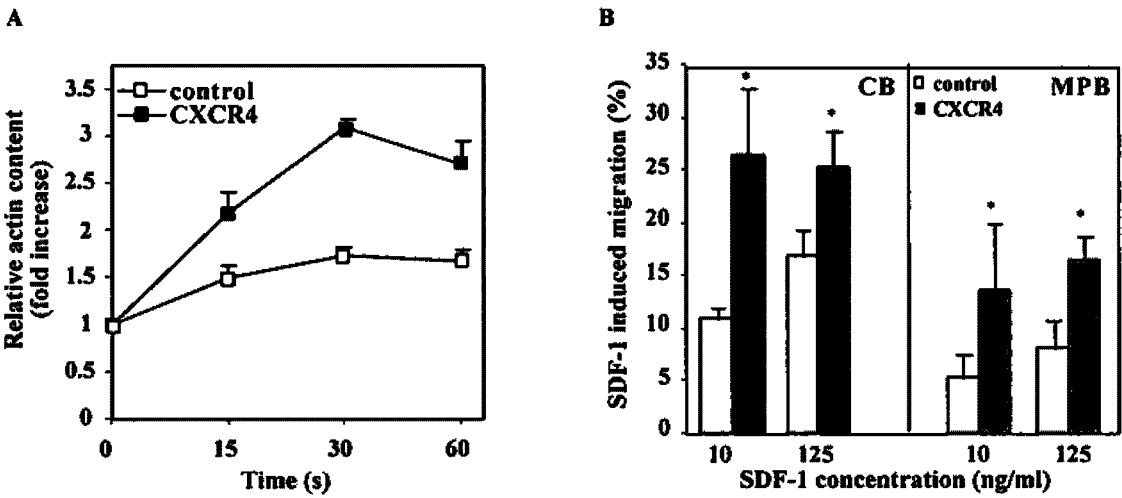


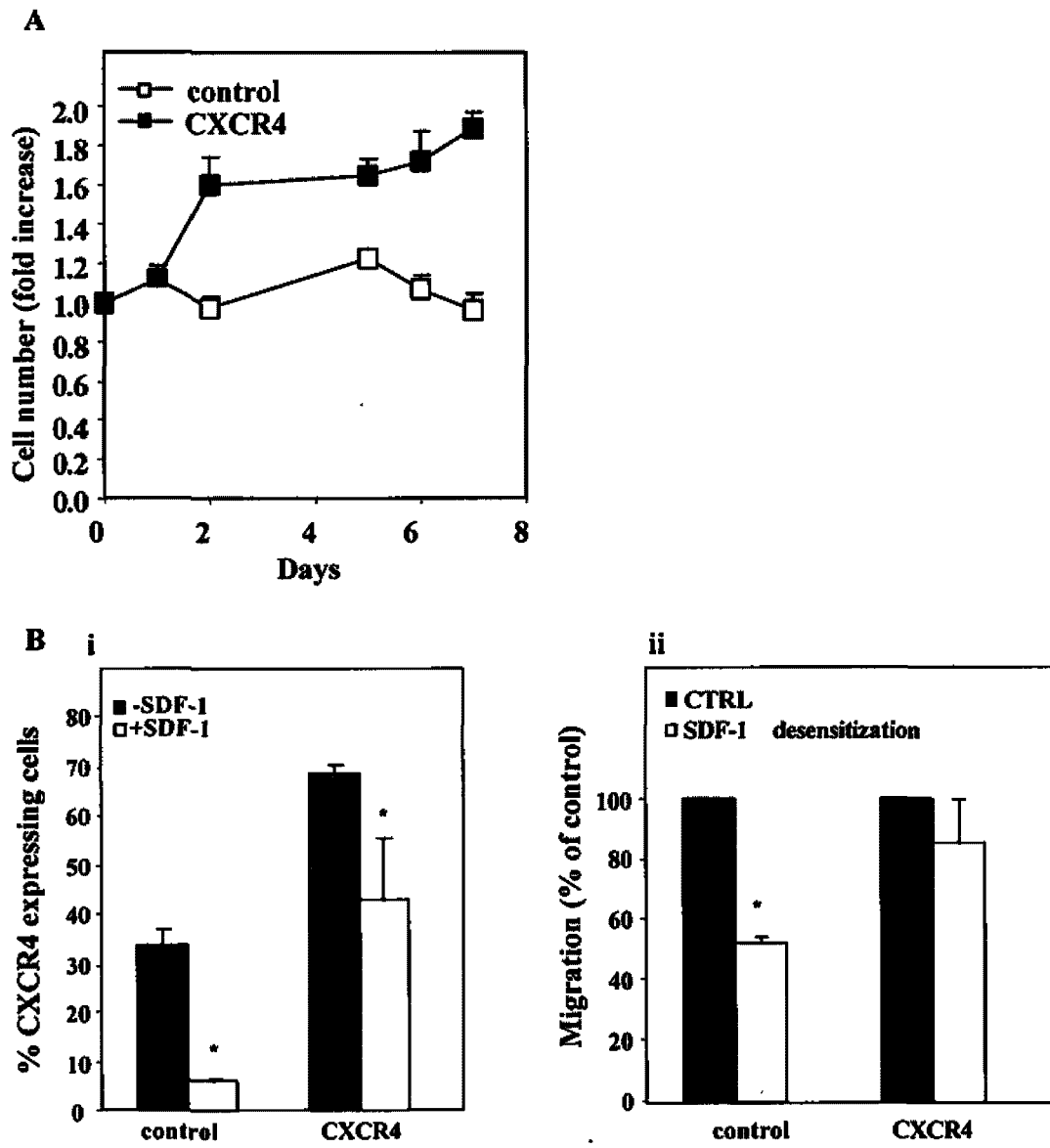
Figure 5:

Figure 6

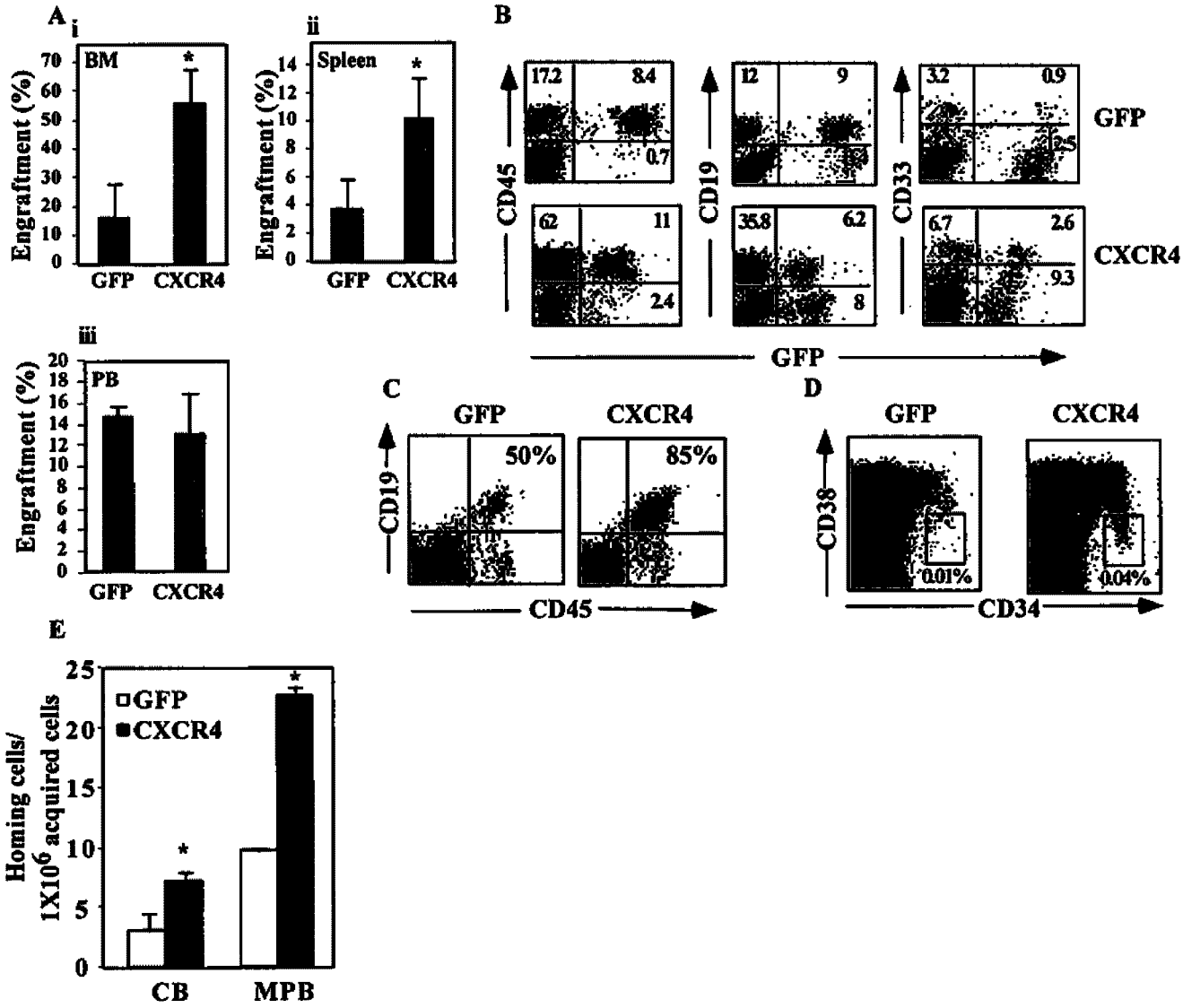


Figure 7

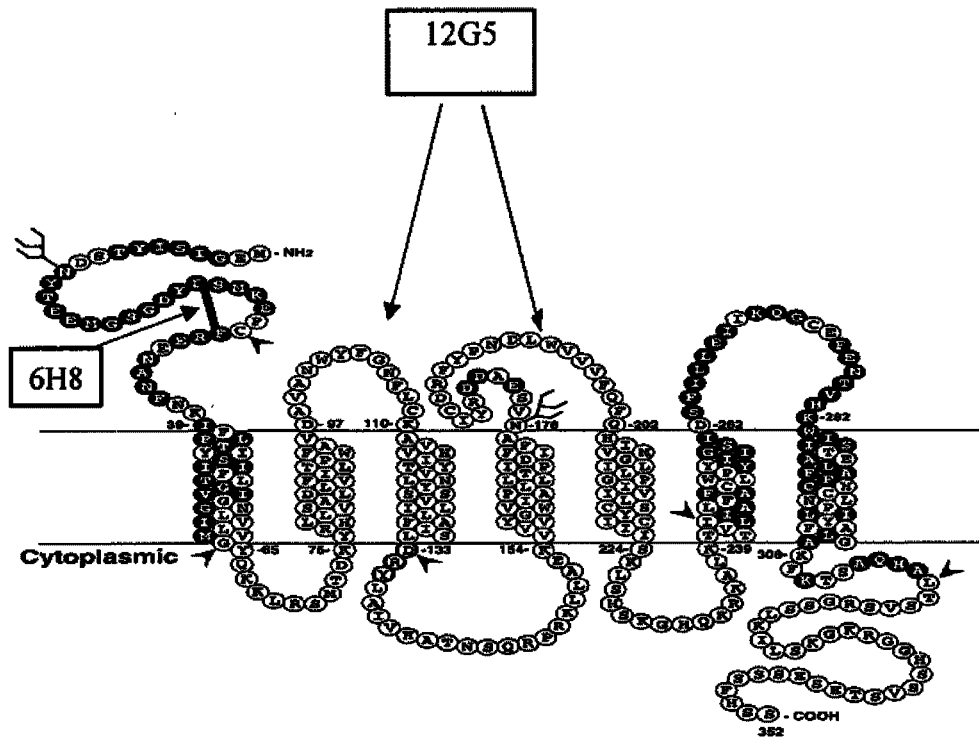


Figure 8

