



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102257388 B

(45) 授权公告日 2015.03.18

(21) 申请号 200980141163.9

(22) 申请日 2009.08.18

(30) 优先权数据

61/189,349 2008.08.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2009/001060 2009.08.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/019997 EN 2010.02.25

(83) 生物保藏信息

PTA-9362 2008.07.10

(73) 专利权人 中胚有限公司

地址 美国纽约

(72) 发明人 S·格龙索斯 A·C·W·赞内蒂诺

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

C12N 5/20(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101056974 A, 2007.10.17,

Cristina Cid等. Anti-heat shock protein 90 β antibodies decrease pre-oligodendrocyte population in perinatal and adult cell cultures. Implications for remyelination in multiple sclerosis. 《Journal of Neurochemistry》. 2005,

审查员 段晓露

权利要求书1页 说明书25页 附图5页

(54) 发明名称

单克隆抗体 STRO-4

(57) 摘要

本发明涉及一种称为 STRO-4 的单克隆抗体及其用于富集诸如间充质前体细胞 (MPC) 的多潜能细胞的用途, 所述单克隆抗体特异性结合人和绵羊 HSP-90 β 。

人热休克蛋白-90 β 的肽序列 (NCBI, 登录号 P08238)

匹配的STRO-4测序的肽以黑体表示

1 PEEVHHGEEE VETFAFAQAEI AQLMSLIINT FYSNKEIFLR ELISNASDAL
51 DKIRYESLTD PSKLDGKEL KIDIPNPQE RTLLVDVTGI GMTKADLINN
101 LGTIAKSGTK AFMEALQAGA DISMIGQFGV GFYSAYLVAE KVVVITKHND
151 DEQYAWESSA GGSFTVRADH GEPIGRGTKV ILHLKEDQTE YLEERRVKVE
201 VKKHSQFIGY PITLYLEKER EKEISDDEAE EEKGEKEEED KDDEEKPKIE
251 DVGSDEEDDS GKDKKKKTKK IKEKYIDQEE LNKTKPIWTR NPDDITQEEY
301 GEFYKSLTND WEDHLAVKHF SVEGQLEFRA LLFIPRRAPF DLFENKKKKN
351 NIKLYVRRVF IMDSCDELIP EYLNFRGVV DSEDLP LNIS REMLQQSKIL
401 KVIRKNIVKK CLELFSELAE DKENYKKFYE AFSKNLKLGI HEDSTNRRRL
451 SELLRYHTSQ SGDEMTSLSE YVSRMKETQK SIYYITGESK EQVANSAFVE
501 RVRKRGFEVY YMTEPIDEYC VQQLKEFDGK SLVSVTKEGL ELPEDEEEKK
551 KMEESKAKFE NLCKLMKEIL DKKVEKVTIS NRLVSSPCCI VTSTYGWITAN
601 MERIMKAQAL RDNSTMGYMM AKKHLEINPD HPIVETLRQK AEADKNDKAV
651 KDLVLLFET ALLSSGFSL EDPQTHSNRIY RMIKLG LGID EDEVAEEEPN
701 AAVPDEIPPL EGEDASRME EVD

1. 一种富集间充质前体细胞的方法,所述方法包括从组织来源制备细胞样品并且使用 HSP-90 β 结合剂来富集表达 HSP-90 β 标记物的细胞。

2. 权利要求 1 的方法,其中富集表达所述 HSP-90 β 标记物的细胞包括:

使细胞样品与 HSP-90 β 结合剂接触;和

将结合所述 HSP-90 β 结合剂的细胞与不结合所述 HSP-90 β 结合剂的细胞分离。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述 HSP-90 β 结合剂是特异性结合 HSP-90 β 的抗体或其抗原结合片段或衍生物。

4. 权利要求 2 或 3 的方法,其中所述 HSP-90 β 结合剂选自:

(i) 以保藏登录号 PTA-9362 保藏于 ATCC 的杂交瘤细胞系所产生的 STRO-4 单克隆抗体;

(ii) 包含 STRO-4 抗体的重链和轻链可变区以及人重链和轻链恒定区的嵌合抗体;和

(iii) 包含至少一个来自 STRO-4 抗体的互补决定区 (CDR) 和人框架和恒定区序列的人源化抗体。

5. 权利要求 2 或 3 的方法,其中所述 HSP-90 β 结合剂或其抗原结合片段是 STRO-4 抗体或 STRO-4 抗体的抗原结合片段,并且其中所述 STRO-4 抗体是由杂交瘤细胞系产生的,所述杂交瘤细胞系依据布达佩斯条约的条款于 2008 年 7 月 10 日保藏于 ATCC,保藏登录号为 PTA-9362。

6. 权利要求 1 至 3 中任一项的方法,其中所述细胞样品源自胎盘、脂肪组织、牙齿、骨髓、皮肤、肝、肾、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、脾、淋巴结、胸腺、卵巢、胰、骨、韧带、骨髓、腱或骨骼肌。

7. 通过权利要求 1 至 6 中任一项的方法获得的富集的多潜能细胞群。

单克隆抗体 STRO-4

技术领域

[0001] 本发明涉及热休克蛋白-90 β (HSP-90 β) 作为鉴定和 / 或分离多潜能细胞的标记物的用途。更具体地, 本发明涉及特异性结合人和绵羊 HSP-90 β 的单克隆抗体 (称为 STRO-4) 的鉴定。本发明还涉及通过本发明的方法富集的细胞群和这些细胞的治疗用途。

[0002] 发明背景

[0003] 包含造血支持性骨髓基质和相关骨组织的细胞组分源自一群多潜能细胞, 该多潜能细胞包括多潜能间充质干细胞 (MSC) 和它们的前体 (间充质前体细胞 (MPC))。MPC 存在于主要位于环绕血管的血管周围生态位的骨髓空间中 (Gronthos S et al., 2003 和 Shi S et al., 2003)。在过去二十年中, 研究集中于不同人基质 / 间充质细胞群重建脂肪、骨、软骨和肌肉的再生潜能 (Gronthos S et al., 2003 和 Simmons PJ et al., 1991)。但是, 这些技术的成功应用取决于以下能力: 分离纯化的 MPC 群, 以及随后离体控制它们的生长和分化。此外, 需要克服通常与基于干细胞的治疗有关的各种技术和安全性顾虑, 这通过在合适的大量人疾病临床前动物模型代表中评价 MPC 制品 (preparation) 的安全性和功效实现。人矫形和心脏疾病 / 创伤的绵羊模型已得到广泛使用, 因为绵羊与人解剖、生理、免疫学和胚胎发育具有相似性 (Airey JA et al., 2004; Liechty KW et al., 2000 和 Mackenzie TC et al., 2001)。

[0004] 同时, 数种人多潜能细胞特异性标记物如 STRO-1、CD106、CD146 已经在文献中进行了描述 (Gronthos S et al., 2003 和 Shi S et al., 2003), 在人疾病绵羊模型中检查多潜能细胞的治疗潜力的显著进展受到限制, 这是因为缺乏允许分离和表征绵羊组织中等同的多潜能细胞群的特异性试剂。诸如单克隆抗体的与绵羊和人多潜能细胞均反应的生物学试剂的开发分别会极大促进在临床前和临床试验中监测和等同绵羊和人多潜能细胞群的功能性的能力。

[0005] 已包括在本说明书中的关于文献、法规、材料、装置、论文等的任何讨论只是为了提供本发明的背景。其不应被视作承认任何或全部这些内容由于存在于本申请每项权利要求的优先权日之前而构成现有技术基础的一部分或是本发明相关领域的公知常识。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明描述了一种称为 STRO-4 的新单克隆抗体 (mAb) 的产生和表征, 该单克隆抗体从未分级的绵羊和人骨髓鉴定和分离多潜能细胞。具体地, STRO-4 抗体能够在两个物种中基本上分离全部产克隆多潜能细胞 (CFU-F: 成纤维细胞集落形成单位)。分离的多潜能细胞表现出高增殖潜能和多谱系分化。

[0008] 出人意料的, 本发明人发现热休克蛋白-90 β (HSP-90 β) 蛋白在体内多潜能细胞的细胞表面表达, 并且据发现单克隆抗体 STRO-4 鉴定 HSP-90 β 上表达的独特表位。

[0009] 因此, 在一实施方案中, 本发明提供了 HSP-90 β 作为鉴定和 / 或富集多潜能细胞的标记物的用途。

[0010] 在一实施方案中, 本发明提供了一种富集多潜能细胞的方法, 所述方法包括从组织来源制备细胞样品并且富集表达所述 HSP-90 β 标记物的细胞。

- [0011] 在本发明的一实施方案中,多潜能细胞是成体多潜能细胞。
- [0012] 在一实施方案中,本发明的富集的细胞群没有被体外培养。
- [0013] 在另一实施方案中,本发明的富集的细胞群能够产生克隆 CFU-F。
- [0014] 在另一实施方案中,富集的细胞群对于 HSP-90 β^+ /STRO-4⁺ 细胞是同质 (homogenous) 的。
- [0015] 在一个实例中,富集多潜能细胞的方法包括:
- [0016] 使细胞样品与 HSP-90 β 结合剂接触;和
- [0017] 将结合所述 HSP-90 β 结合剂的细胞与不结合所述 HSP-90 β 结合剂的细胞分离。
- [0018] 在另一实施方案中,本发明还提供了一种鉴定细胞样品中多潜能细胞的存在的方法,所述方法包括鉴定样品中表达所述 HSP-90 β 标记物的细胞。
- [0019] 在一实例中,鉴定细胞样品中多潜能细胞存在的方法包括:
- [0020] 从组织来源获得细胞样品;
- [0021] 在适合于 HSP-90 β 与所述 HSP-90 β 结合剂结合的条件下,使所述细胞样品与 HSP-90 β 结合剂接触;和
- [0022] 检测结合所述样品中细胞的 HSP-90 β 结合剂的存在,其中结合所述 HSP-90 β 结合剂的细胞指示多潜能细胞的存在。
- [0023] 细胞样品可以源自疑似含有多潜能细胞的任何组织来源。例如,组织来源可以是胎盘、脂肪组织、牙齿、骨髓、皮肤、肝、肾、心脏、视网膜、脑、毛囊、肠、肺、脾、淋巴结、胸腺、卵巢、胰、骨、韧带、骨髓、腱或骨骼肌。在优选实施方案中,组织来源是骨髓。
- [0024] 富集多潜能细胞的细胞来源可以是人或绵羊来源。但是,本发明还适用于源自其他动物物种的细胞,包括牛、马、鼠、猪、犬或猫。
- [0025] 本发明还涉及从本发明多潜能细胞的体外培养产生的子代细胞。本发明的扩增的细胞可以具有多种表型,这取决于培养条件(包括培养基中刺激因子的数量和/或类型)、传代次数等。
- [0026] 在另一实施方案中,培养本发明的富集群产生还表达选自以下标记物的一种或多种标记物的多潜能细胞:STRO-1、STRO-3(TNSAP)、LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-选择蛋白、L-选择蛋白、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD29、CD 18、CD61、整合蛋白 β 、6-19、血栓调节蛋白、CD10、CD13、SCF、PDGF-R、EGF-R、IGF1-R、NGF-R、FGF-R、瘦蛋白 -R、(STRO-2 = 瘦蛋白 -R)、RANKL、STRO-1^{bright} 和 CD146 或这些标记物的任意组合。
- [0027] 在本发明的另一实施方案中,本发明的多潜能细胞在培养时不能产生造血细胞。
- [0028] 本发明的方法还可以包括在第一富集步骤之前收获多潜能细胞来源的步骤。这可以包括,例如从受试者手术取出组织,并且从该组织分离细胞以形成单细胞悬液。这种分离可以通过物理或酶促方式实现。这类方式是本发明领域的技术人员熟知的。在本发明的一实例中,这个步骤涉及使用已知技术收集骨髓细胞。
- [0029] 用于本发明方法的 HSP-90 β 结合剂可以是鉴定为具有对 HSP-90 β 的结合亲和力的任何多肽或化合物。
- [0030] 优选地, HSP-90 β 结合剂特异性结合 HSP-90 β 。
- [0031] 优选地, HSP-90 β 结合剂特异性结合 HSP-90 β 上的表位,其中 HSP-90 β 包含与

SEQ ID NO :1 (图 5) 的序列至少约 75% 相同的序列, 优选与 SEQ IDNO :1 至少约 78% 相同, 更优选至少约 80% 相同, 仍然更优选至少约 85% 相同, 仍然更优选至少约 90% 相同, 甚至更优选与 SEQ ID NO :1 至少约 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 相同。

[0032] 在一实施方案中, HSP-90 β 结合剂选自肽、拟肽类 (peptidomimetic)、核酸适配体、肽适配体、树状聚体和小有机分子。

[0033] 在一实例中, HSP-90 β 结合剂是寡核苷酸。优选地, 寡核苷酸是标记的寡核苷酸。

[0034] 在另一实施方案中, HSP-90 β 结合剂是纯化的抗 HSP-90 β 抗体或其抗原结合片段或衍生物。抗 HSP-90 β 抗体可以是单克隆抗体、重组抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0035] 在本发明的一实施方案中, 抗 HSP-90 β 单克隆抗体是由杂交瘤细胞系产生的 STRO-4 抗体, 所述杂交瘤细胞系依据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的条款于 2008 年 7 月 10 日保藏于 ATCC, 保藏登录号为 PTA-9362。

[0036] 用于本发明方法的其他合适的抗 HSP-90 β 单克隆抗体包括可商购的抗体, 如小鼠抗人 Hsp90 β mAb 克隆 H9010 (Invitrogen)、小鼠抗 Hsp90b mAb 克隆 EMD-5E12 (Calbiochem)、小鼠抗人 HSP90 β mAb 克隆 K3725B (Cosmo Bio Co., Ltd) 和小鼠抗人 Hsp90 β mAb 克隆 K3705 (Assay Designs/Stressgen Bioreagents)。上文未提及的其他可商购的抗体考虑为在本发明范围内。

[0037] 在另一实施方案中, 本发明提供了一种 HSP-90 β 结合剂或其抗原结合片段或衍生物, 其选自:

[0038] (i) STRO-4 单克隆抗体;

[0039] (ii) 嵌合抗体, 其包含来自 STRO-4 的重链和轻链的可变区以及人重链和轻链的恒定区; 和

[0040] (iii) 人源化抗体, 其包含至少一个来自 STRO-4 的互补决定区 (CDR) 以及人框架 (framework) 区和恒定区序列。

[0041] 在另一实施方案中, 人源化抗体包含所有 6 个来自 STRO-4 的 CDR。

[0042] 在另一实施方案中, HSP-90 β 结合剂是重组抗体, 其包含与杂交瘤细胞系产生的 STRO-4 抗体的序列基本上相同的序列, 所述杂交瘤细胞系依据布达佩斯条约的条款于 2008 年 7 月 10 日保藏于 ATCC, 保藏登录号为 PTA-9362。

[0043] 在本发明的一实施方案中, HSP-90 β 结合剂是标记的。

[0044] 在一实例中, 标记是荧光标记。在另一实例中, 标记是酶标记。

[0045] 在另一实施方案中, 结合 HSP-90 β 结合剂的细胞的分离通过机械式细胞分选仪进行。

[0046] 在本发明的另一实施方案中, HSP-90 β 结合剂与荧光标记化合物偶联。在这种情况下, 结合 HSP-90 β 结合剂的细胞的分离优选使用荧光激活细胞分选仪 (FACS) 进行。

[0047] 在本发明的另一实施方案中, HSP-90 β 结合剂与固体颗粒连接。优选地, 固体颗粒是磁性颗粒。在本发明的这一实施方案中, 结合 HSP-90 β 结合剂的细胞的分离优选通过从液相分离颗粒相进行。

[0048] 在本发明的另一优选实施方案中, 在分离步骤前, 使细胞样品与针对连接到固体颗粒的 HSP-90 β 结合剂的抗体接触, 其中结合 HSP-90 β 结合剂的细胞的分离通过从液相分离颗粒相进行。

[0049] 在本发明的另一实施方案中,细胞样品的细胞是在固体支持物上培养的粘附细胞,未结合的 HSP-90 β 结合剂的去除通过漂洗进行。

[0050] 在本发明的另一实施方案中,细胞样品的细胞是悬浮培养的,未结合的 HSP-90 β 结合剂的去除通过离心细胞样品并分离所得上清进行。

[0051] 在另一实施方案中,将细胞样品进行进一步的细胞分选步骤以富集或减少细胞中表达至少一种其他多潜能细胞标记物的细胞群。多潜能细胞标记物可以是选自以下标记物的一种或多种标记物:STRO-1、STRO-3(TNSAP)、CD106、CD146、LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-选择蛋白、L-选择蛋白、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD29、CD18、CD61、整合蛋白 β 、6-19、血栓调节蛋白、CD10、CD13、SCF、PDGF-R、EGF-R、IGF1-R、NGF-R、FGF-R、瘦蛋白 -R、(STRO-2 = 瘦蛋白 -R)、RANKL 或这些标记物的任意组合。

[0052] 本发明还提供了通过本发明的方法获得的富集的多潜能细胞群。

[0053] 本发明还提供了富集的 HSP-90 β^+ 多潜能细胞群。

[0054] 优选地,总富集的细胞群的至少 1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 95% 是具有表型 HSP-90 β^+ 的多潜能细胞。

[0055] 优选地,富集的多潜能细胞群通过本发明的方法获得。

[0056] 本发明还提供了通过培养本发明的富集的多潜能细胞群而获得的扩增的细胞群。

[0057] 在一实施方案中,本发明的富集的细胞群或本发明的扩增的细胞群包含至少一些经遗传修饰的细胞。

[0058] 本发明还提供了一种产生组织特异性定向的细胞群的方法,所述方法包括

[0059] 在一种或多种刺激因子的存在下培养本发明的多潜能细胞群,和

[0060] 将所述培养的细胞群置于使所述多潜能细胞偏向分化为特定组织类型的条件下。

[0061] 在本发明这种方法的一实施方案中,组织类型选自胎盘组织、心肌、血管组织、骨组织、软骨组织、脂肪组织、神经组织、平滑肌和内皮组织。

[0062] 本发明还提供了一种组合物,其包含本发明的富集的多潜能细胞和 / 或本发明的扩增的细胞群。

[0063] 在优选实施方案中,所述组合物还包含刺激因子。这样的组合物可以是治疗上有益的,因此会制备成药学可接受的形式。

[0064] 在另一实施方案中,所述组合物还包含使本发明的多潜能细胞偏向分化为一种特定组织类型的因子。优选地,所述组织类型选自但不限于心肌、血管组织、骨组织、软骨组织、脂肪组织、神经组织、胎盘、平滑肌和内皮组织。

[0065] 在另一实施方案中,本发明的组合物还包含纤维蛋白胶。

[0066] 本发明还提供了一种产生或修复受试者的组织的方法,所述方法包括给予所述受试者本发明的富集和 / 或扩增的多潜能细胞群。

[0067] 本发明还提供了一种产生或修复受试者的组织的方法,所述方法包括给予所述受试者本发明的组合物。

[0068] 本发明还提供了本发明的富集和 / 或扩增的多潜能细胞群在制备用于产生或修复受试者的组织的药物中的用途。

[0069] 本发明还提供了本发明的组合物在制备用于产生或修复受试者的组织的药物中的用途。

[0070] 优选地,根据本发明产生或修复的组织选自但不限于心肌、血管组织、骨组织、软骨组织、脂肪组织、神经组织、胎盘、平滑肌和内皮组织。

[0071] 优选地,本发明的多潜能细胞是人来源的。

[0072] 本发明还提供了通过本发明的方法获得的分离的细胞或其子代细胞,其中所述细胞是遗传修饰的。

[0073] 本发明还提供了一种 STRO-4 杂交瘤细胞系,其依据布达佩斯条约的条款于 2008 年 7 月 10 日保藏于 ATCC,保藏登录号为 PTA-9362。

[0074] 本发明还提供了由杂交瘤细胞系产生的 STRO-4 抗体,所述杂交瘤细胞系依据布达佩斯条约的条款于 2008 年 7 月 10 日保藏于 ATCC,保藏登录号为 PTA-9362。

[0075] 本发明还提供了一种分离的抗体,其与杂交瘤细胞系产生的 STRO-4 抗体结合多潜能细胞上相同的表位,所述杂交瘤细胞系依据布达佩斯条约的条款于 2008 年 7 月 10 日保藏于 ATCC,保藏登录号为 PTA-9362。

[0076] 本发明还提供了一种组合物,其包含 HSP-90 β 结合剂或其抗原结合片段或衍生物。优选地,所述组合物还包含一种或多种药学可接受的载体(carrier)和/或合适的佐剂或赋形剂。

[0077] 在本说明书中,单词“包含(comprise)”或者诸如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”的变形应理解为表示包括一个指定的元素、整数或步骤或者元素、整数或步骤的组,但不排除任何其他元素、整数或步骤或者元素、整数或步骤的组。

附图说明

[0078] 图 1. STRO-4 抗原由包括基本上所有产克隆 MPC 在内的绵羊和人 BM MNC 的小细胞群表达

[0079] 对 Ficol1 分离的绵羊和人 BM MNC 的样本进行单色免疫荧光和流式细胞术以检查 STRO-4 抗原的表达。对每个群,绵羊(A)和人(B)BMMNC 样品中 STRO-4⁺ 细胞的平均发生率分别是 4.0% \pm 1.2 和 3.0% \pm 1.0(n = 3)。数据显示为 1×10^4 个光散射门控事件的单参数荧光(藻红蛋白(PE))直方图,收集为列表式数据。IgG 对照(虚线);mAb STRO-3(实线)。将未分级 BM 和 MACS 选择的 STRO-4⁺ 和 STRO-4⁻ 绵羊(C)和人(D)BMMNC 的单细胞悬液接种入普通生长培养基以评价每种细胞组分中粘附性集落形成细胞的发生率。按照方法部分的描述,培养 12 天后,将集落(50 个细胞或更多的聚集体)染色并评分。柱图表示对于每种细胞组分,接种的每 10^5 个细胞的产克隆集落的数目,该结果来自 3 个独立实验的平均值。这些数据证明大多数产克隆 MPC 仅限于 BM 的 STRO-4⁺ 组分。

[0080] 图 2. 离体扩增的 MPC 表达高水平的 STRO-4 抗原。

[0081] 传代两次的绵羊 MPC(A) 和人 MPC(B) 以及 MG63 细胞(C) 的单细胞悬液通过胰蛋白酶/EDTA 消化获得,然后进行处理以用于单色流式细胞术。随后将细胞用 STRO-4 上清孵育,然后用偶联 PE 的山羊抗鼠 IgG 间接标记。直方图代表 2×10^4 个事件,收集为列表式数据。STRO-4 的阳性(通过水平统计学标记物高亮显示)定义为大于 99% 的同种型匹配的未结合对照抗体(1B5;黑线)所观察到的荧光水平的荧光水平。结果证明大多数离体扩增的绵羊和人 MPC 表达 STRO-4(粗线)。

[0082] 图 3. STRO-4 抗原选择的绵羊和人 MPC 的发展潜力。

[0083] 在成脂 (adipocytic)、成骨或成软骨条件下诱导源自 STRO-4 抗原选择的绵羊和人 MPC 的细胞的传代培养物。于脂肪形成诱导两周内,通过油红 -O 染色 (箭头) 检测人 MPC(A) 和绵羊 MPC(B) 培养物 (200×) 中含脂脂肪细胞簇的存在。于骨诱导条件下培养 4 周内,在人 MPC(C) 和绵羊 MPC(D) 培养物 (200×) 中形成用茜素红试剂 (箭头) 阳性染色的矿化沉积物。于成软骨诱导 3 周后,在人 MPC(E) 和绵羊 MPC(F) 培养物 (箭头) (200×) 中,聚集培养中蛋白聚糖的甲苯胺蓝阳性染色存在于围绕软骨细胞样细胞 (箭头) 的整个细胞团。

[0084] 图 4. STRO-4 抗体鉴定 90kDa 分子量的蛋白。

[0085] 按照方法部分的描述,从培养扩增的 STRO-4⁺ 人 MPC 的单细胞悬液制备质膜裂解物。将细胞裂解物用 STRO-4 上清或同种型匹配的对照抗体 1B5 孵育,然后通过磁珠分离进行免疫沉淀。通过 10% (w/v) SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析免疫沉淀物,然后利用考马斯蓝染色显示。

[0086] 图 5. STRO-4 抗体鉴定热休克蛋白 -90 β。

[0087] 按照方法部分的描述,从培养扩增的 STRO-4⁺ 人 MG63 的单细胞悬液制备质膜裂解物。将细胞裂解物用 STRO-4 上清孵育,然后通过磁珠分离进行免疫沉淀。通过 10% (w/v) SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析免疫沉淀物,然后利用考马斯蓝染色显示。从凝胶切下 90kDa 条带,将其进行胰蛋白酶消化,然后利用具有 MS 模式的 TOF/TOF 光学装置的 Applied Biosystems 4700 蛋白质组分析仪 (Proteomics Analyser) 进行质谱分析。微量测序肽分析证明了与人热休克蛋白 -90 β (NCBI, 登录号 P08238) 匹配的 STRO-4 测序的肽 (粗体)。

[0088] 图 6. STRO-4 抗体对热休克蛋白 -90 β 的特异性反应性的确认。

[0089] 按照方法部分的描述,制备培养扩增的 STRO-4⁺ 人 MPC 作为单独的全细胞裂解物或用于产生 STRO-4 或 1B5 免疫沉淀物。在 10% (w/v) SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上通过电泳分析全细胞裂解物和 STRO-4 或 1B5 免疫沉淀物。将蛋白转移至 PVDF 膜,然后用 5% 脱脂奶粉 -0.05% 吐温 -20 封闭,然后将滤膜 (filter) 用可商购的针对 HSP-90 β 的多克隆抗体孵育。通过 ImageQuant 软件 (Molecular Dynamics), 利用 FluorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 显示免疫反应性蛋白。抗 HSP-90 β 抗体在对照全细胞裂解物制品和 STRO-4 免疫沉淀样品中均检测到特征性 90kDa 条带。

[0090] 发明详述

[0091] 术语“和 / 或”,例如“X 和 / 或 Y”应当理解为表示“X 和 Y”或“X 或 Y”,并且应当对这两种含义或任一种含义提供明确的支持。

[0092] 微生物保藏详细资料

[0093] 产生命名为 STRO-4 的单克隆抗体的杂交瘤于 2008 年 7 月 10 日保藏于美国典型培养物保藏中心 (ATCC), 登录号为 PTA-9362。

[0094] 该保藏依据国际公认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约的条款和其下细则进行。这保证了从保藏日起 30 年可以维持成活力的培养物。该有机体可以根据布达佩斯条约的条款从 ATCC 得到,布达佩斯条约保证在相关专利公布后,公众可永久并且不受限制的获得培养物的子代。

[0095] 本申请的受让人同意,如果在合适条件下培养时保藏的培养物死亡或丢失或破坏,将根据通知迅速用相同培养物的活样本进行替换。保藏株的可获得性不应理解为对违

反任何政府根据其专利法所授权的权利来实施发明的许可。

[0096] 常规技术

[0097] 除非另外专门定义,本文使用的所有技术和科学术语都应与本领域(例如细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学)普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

[0098] 除非另外指出,本发明使用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术是本领域技术人员公知的标准方法。这类技术在贯穿以下的文献中进行了描述和解释,例如 J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons(1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press(1989), T. A. Brown(editor), Essential Molecular Biology :A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press(1991), D. M. Glover and B. D. Hames(editors), DNA Cloning :A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press(1995 and 1996) 和 F. M. Ausubel et al. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience(1988, 包括到现在为止的所有更新), Ed Harlow and David Lane(editors) Antibodies :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988) 和 J. E. Coligan et al. (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons(包括到现在为止的所有更新)。

[0099] 多潜能细胞

[0100] 多潜能细胞是能够产生几种成熟细胞类型中的任意种的细胞。在一实施方案中,多潜能细胞源自成体组织。该术语包括例如间充质前体细胞(MPC)、间充质干细胞(MSC)和多潜能扩增的MPC子代(MEMP)。

[0101] 间充质前体细胞(MPC)是在骨髓、血液、真皮和骨膜中发现的细胞;其能够分化为间充质或结缔组织的特定类型,包括脂肪、骨、软骨、弹性、肌肉和纤维结缔组织。这些细胞进入的特定谱系定向和分化途径取决于各种机械影响和/或诸如生长因子、细胞因子的内源生物活性因子的影响和/或宿主组织所建立的局部微环境条件的影响。间充质前体细胞定义为不会终端分化的细胞;其可以无限地分裂;其分裂产生的子细胞是干细胞或在一定时期会不可逆分化以产生表型和/或功能不同的细胞类型的祖细胞。MPC是能够形成大量多潜能细胞的非造血祖细胞。

[0102] 多潜能细胞的富集

[0103] 本文使用的术语“富集的”、“富集”或其变形用于描述与未处理的细胞群相比,一种特定细胞类型的比例或许多种特定细胞类型的比例增加的细胞群。

[0104] 本发明的富集多潜能细胞的方法可以基于检测单独的HSP-90 β 标记物的存在或HSP-90 β 标记物结合一种或多种其他标记物的存在。例如,富集多潜能细胞的方法还可以基于富集对选自以下标记物的一种或多种标记物阳性的细胞:STRO-1、STRO-3(TNSAP)、CD106、CD146、LFA-3、THY-1、VCAM-1、ICAM-1、PECAM-1、P-选择蛋白、L-选择蛋白、CD49a/CD49b/CD29、CD49c/CD29、CD49d/CD29、CD29、CD18、CD61、整合蛋白 β 、6-19、血栓调节蛋白、CD10、CD13、SCF、PDGF-R、EGF-R、IGF1-R、NGF-R、FGF-R、瘦蛋白-R、(STRO-2=瘦蛋白-R)、RANKL或这些标记物的任意组合。因此,本发明的富集的多潜能细胞群也可以对这些标记物的一种或多种或它们的组合是阳性的。

[0105] 细胞对指定标记物是“阳性”表示它可以是该标记物的低 (lo 或 dim) 或高 (高 (bright), bri) 表达者 (expresser), 这取决于标记物在细胞表面存在的程度, 其中该术语涉及用于细胞的颜色分选方法的荧光或其他颜色的强度。lo (或 dim 或 dull) 和 bri 的区别在用于分选的特定细胞群的标记物的背景下进行理解。

[0106] 当用于本文时, 术语“高”指当可检测地标记时在细胞表面产生较高信号的标记物。同时不希望受理论约束, 认为“高”细胞比样品中的其他细胞表达更多的靶标记物抗原 (例如由 STRO-1 识别的抗原)。例如, 通过 FACS 分析, 当用荧光偶联的 STRO-1 抗体标记时, STRO-1^{bri} 细胞比非 - 高细胞 (STRO-1^{dull/dim}) 产生更多的荧光信号。

[0107] 在另一实例中, STRO-1^{bright} 细胞具有 STRO-1 表面表达的 2 个 log 级的更高表达。这是相对于同种型匹配的阴性对照计算的。通过比较, STRO-1^{dim} 和 / 或 STRO-1^{intermediate} 细胞相对于同种型匹配阴性对照具有 STRO-1 表面表达的少于 2 个 log 级的更高表达, 通常是约 1 个 log 或更低的表达。

[0108] 例如, 所述方法可以包括制备第一部分富集的细胞池 (pool) 的步骤, 这通过富集第一多潜能细胞特异性标记物的表达进行, 然后进行从部分富集的细胞池富集 HSP-90 β 的表达的步骤。在另一实例中, 所述方法可以包括基于选择表达 HSP-90 β 的细胞的初始富集步骤, 然后进行涉及富集不同多潜能细胞标记物的步骤。仍在另一实例中, 所述方法涉及同时选择表达 HSP-90 β 和一种或多种其他多潜能细胞标记物的细胞。

[0109] 优选地, 大部分多潜能细胞能够分化为至少两种定向细胞类型。多潜能细胞可以分化成的细胞系的非限制性实例包括骨前体细胞; 肝细胞祖细胞 (progenitor), 其对于胆管上皮细胞和肝细胞是多能性的; 神经限制性细胞, 其可以产生发展为少突胶质细胞和星形胶质细胞的胶质细胞前体; 神经元前体, 其发展为神经元; 心肌和心肌细胞的前体, 葡萄糖应答性胰岛素分泌胰 β 细胞系。其他细胞系包括但不限于成牙本质细胞、牙质产生细胞和软骨细胞以及下列前体细胞: 视网膜色素上皮细胞、成纤维细胞、诸如角质形成细胞的皮肤细胞、树突细胞、毛囊细胞、输尿管 (renal duct) 上皮细胞、平滑肌和骨骼肌细胞、睾丸祖细胞、血管内皮细胞、腱细胞、韧带细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、骨髓基质细胞、心肌细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞、周细胞、血管细胞、上皮细胞、神经胶质细胞、神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。在优选实施方案中, 多潜能细胞至少能在体内或体外培养以产生脂肪细胞、成骨细胞和 / 或软骨细胞。

[0110] 应理解表达细胞表面 HSP-90 β 的细胞的分离可以受到多种不同方法的影响, 但是所有这些方法在一定程度上依赖于细胞与 HSP-90 β 结合剂的结合, 然后是表现出高水平结合或低水平结合或不结合的那些细胞的分离。

[0111] HSP-90 β / STRO-4 抗原

[0112] HSP-90 β 通常存在于细胞的细胞质中, 它作为分子伴侣蛋白以促进后天细胞生长和分化的许多关键调节子的正常折叠、胞内沉积和蛋白水解转换。其是高度保守的应激应答蛋白家族的部分。在正常生理条件下 HSP 通常以低水平表达, 但在响应细胞应激时则表现出显著增加的表达。

[0113] 应理解术语“HSP-90 β ”不限于人或绵羊来源的序列, 还包括获得自任何来源的同源序列, 例如同系物, 尤其是直系同源物 (即获得自除了人之外的物种的同系物)、等位基因变体及其片段和合成肽或衍生物。

[0114] 多肽的序列同一性(%同一性)通过 FASTA(Pearson and Lipman, (1988)) 分析(GCG 程序)确定,这使用缺省设置和长度为至少 50 个氨基酸的查询序列,因此 FASTA 分析在至少 50 个氨基酸的区域比对两条序列。更优选地,FASTA 分析在至少 100 个氨基酸的区域比对两条序列。更优选地,FASTA 分析在至少 250 个氨基酸的区域比对两条序列。甚至更优选地,FASTA 分析在至少 350 个氨基酸的区域比对两条序列。

[0115] 术语“HSP-90 β ”还包括上述全长多肽的片段及其变体,包括 HSP-90 β 序列的片段。优选的片段包括包含表位的那些片段。合适片段的长度为至少约 6 或 7 个氨基酸,例如长度为至少 10、12、15 或 20 个氨基酸。它们的长度还可以小于 200、100 或 50 个氨基酸。

[0116] HSP-90 β 结合剂

[0117] 当用于本文时,短语“HSP-90 β 结合剂”指识别和/或特异性结合 HSP-90 β 的部分。

[0118] “特异性结合”表示 HSP-90 β 结合剂能够以合适的亲和力和/或亲合性结合 HSP-90 β 以提供用于选择性富集表达 HSP-90 β 的细胞的有效工具。即,与替代性靶标(例如非 HSP-90 β)相比,HSP-90 β 结合剂与 HSP-90 β 的结合更频繁、更快速、持续时间更长和/或亲和力更高。例如,与结合其他非 HSP90 β 靶标相比,特异性结合 HSP90 β 或者其表位或免疫原性片段的 HSP90 β 结合剂的结合具有更高的亲和力、亲合性、更容易和/或持续时间更长。

[0119] 优选的 HSP-90 β 结合剂是经鉴定具有对 HSP-90 β 的结合亲和力的多肽或化合物。

[0120] 基于非抗体的结合剂

[0121] 本发明的 HSP-90 β 结合剂包括肽、拟肽类、核酸适配体、肽适配体、树状聚体和小有机分子。

[0122] 核酸适配体(可适应的低聚物)是能够形成提供结合分子靶标的能力的二级和/或三级结构的核酸分子。例如,通过将随机寡核苷酸克隆入载体(或者就 RNA 适配体而言是表达载体)来产生适配体文库,其中随机序列的两侧是提供 PCR 引物的结合位点的已知序列。例如,使用 SELEX(指数级富集配体系统进化(Sytematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment))选择活性增加的适配体。用于产生和/或筛选适配体文库的合适方法描述于例如 Elloington and Szostak, Nature 346 :818-22,1990。

[0123] 用于合成小有机化合物的技术依据化合物而显著改变,但是这类方法是本领域技术人员公知的。在一实施方案中,使用信息学方法从已知化合物中选择合适的化学结构单元来产生组合文库。例如,QSAR(定量构效关系(Quantitative Structure Activity Relationship))建模方法使用线性回归或化合物结构的回归树来确定适应性。Chemical Computing Group, Inc. (Montreal, Canada) 的软件使用关于活性以及非活性化合物的高通量筛选实验数据来产生随机 QSAR 模型,该模型随后用于选择前导化合物。二元 QSAR 方法基于化合物的 3 种特性,其构成特定化合物能或不能完成所需功能的可能性的“描述符(descriptor)”:部分电荷、摩尔折射率(键合相互作用)和 logP(分子的亲脂性)。分子中的每个原子都有表面积,并且具有与此相关的这 3 种特性。具有某种范围的部分电荷的化合物所有原子都被确定,并将表面积(Van der Walls Surface Area 描述符)相加。然后将二元 QSAR 模型用于建立活性模型或 ADMET 模型,其用于构建组合文库。因此,在初始

筛选中鉴定的前导化合物可用于扩大筛选的化合物列表从而鉴定高活性化合物。

[0124] 基于抗体的结合剂

[0125] 尤其优选的 HSP-90 β 结合剂是抗 HSP-90 β 抗体或其抗原结合片段或其衍生物/变体(天然存在或重组的,来自任何来源)。

[0126] 如本文使用的,术语“抗体”指这样的免疫球蛋白分子,其能够通过至少一个位于免疫球蛋白分子可变区的表位识别位点来结合靶标,例如 HSP-90 β 和/或其表位和/或其免疫原性片段和/或其修饰形式(例如糖基化、糖基化等)。该术语不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且包括变体、包含具有所需特异性的表位识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、人抗体、嵌合抗体以及包含所需特异性的表位识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰构型。

[0127] 本文使用的术语“抗体结合片段”旨在表示抗体的任何片段,其保留结合 HSP-90 β 的能力,优选特异性结合 HSP-90 β 的能力。这包括:

[0128] (1) Fab, 含有抗体分子的单价抗原结合片段的片段,可以通过以下方式制备:用木瓜蛋白酶消化整个抗体以产生完整的轻链和一条重链的一部分;

[0129] (2) Fab', 抗体分子的片段,可以通过以下方式获得:用胃蛋白酶处理整个抗体,然后还原,以产生完整的轻链和重链的一部分;每个抗体分子获得两个 Fab' 片段;

[0130] (3) (Fab')₂, 抗体的片段,可以通过以下方式获得:用胃蛋白酶处理整个抗体,没有后续的还原;F(ab)₂ 是通过两条二硫键结合在一起的两个 Fab' 片段的二聚体;

[0131] (4) Fv, 定义为基因工程片段,其含有表达为两条链的轻链的可变区和重链的可变区;和

[0132] (5) 单链抗体(“SCA”),定义为基因工程分子,其含有轻链的可变区、重链的可变区,通过合适的多肽连接物(linker)连结为遗传融合的单链分子。

[0133] (6) 单结构域抗体,优选不含轻链的可变重链结构域。

[0134] 制备这些片段的方法是本领域已知的。(参见,例如,Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, New York (1988), 其通过引用并入本文)。

[0135] 术语“单克隆抗体”指能够结合相同抗原并优选地结合抗原内相同表位决定簇的同质性抗体群。该术语不意图限制抗体的来源或其制备方式。

[0136] 术语“嵌合抗体”指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种(例如鼠,如小鼠)或者属于特定抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种(例如灵长类,如人)或者属于另一抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或者同源;以及这样的抗体的片段,只要它们表现出期望的生物学活性(美国专利 4,816,567 号;和 Morrison et al. (1984) *Proc. Natl Acad. Sci USA* 81:6851-6855)。

[0137] 术语“人源化抗体”应当理解为表示嵌合分子,其通常使用重组技术制备,具有源自非人物种的免疫球蛋白的表位结合位点,并且分子的剩余免疫球蛋白结构基于人免疫球蛋白的结构和/或序列。抗原结合位点优选包含来自非人抗体的互补决定区(CDR),其移植到人抗体的可变结构域中合适的框架区上;并且剩余区域来自人抗体。表位结合位点可以是野生型或由一个或多个氨基酸取代修饰。已知重链和轻链的可变区均含有 3 个互补决定区(CDR),其根据所关注表位而变化,并决定结合能力;侧翼是 4 个框架区(FR),其在指定物

种中是相对保守的,据推测为 CDR 提供支架。当根据特定表位制备非人抗体时,可以将可变区“重塑 (reshape)”或“人源化”,这通过将源自非人抗体的 CDR 移植到存在于待修饰人抗体的 FR 上进行。这种方法的应用是本领域已知的,和 / 或在本文中更详细地描述。

[0138] 本文使用的术语恒定区 (CR) 指提供效应物功能的抗体分子的部分。受试者人源化抗体的恒定区源自人免疫球蛋白。重链恒定区可以选自 5 种同种型中的任意种: α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。此外,各种亚类(诸如重链的 IgG 亚类)的重链负责不同的效应物功能,因此通过选择期望的重链恒定区可以产生具有期望的效应物功能的抗体。优选的重链恒定区是 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3) 和 $\gamma 4$ (IgG4)。轻链恒定区可以是 κ 或 λ 型,优选 κ 型。

[0139] “框架区”是除了 CDR 残基以外的那些可变结构域残基。天然存在抗体的每个可变结构域通常具有 4 个 FR,经鉴定为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。如果根据 Kabat 确定 CDR,则轻链 FR 残基位于约残基 1-23(LCFR1)、35-49 或 40-54(LCFR2)、57-88 或 62-93(LCFR3) 以及 98-107 或 103-112(LCFR4);重链 FR 残基位于重链残基中约残基 1-30 或 1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94 或 67-96(HCFR3) 以及 103-113 或 109-119(HCFR4)。如果 CDR 包含来自高变环的氨基酸残基,则轻链 FR 残基位于轻链中约残基 1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3) 以及 97-107(LCFR4);重链 FR 残基位于重链残基中约残基 1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3) 以及 102-113(HCFR4)。在一些情况下,当 CDR 包含来自 Kabat 所确定的 CDR 的氨基酸和高变环的氨基酸时,FR 残基将相应调整。技术人员会清楚在 FR 定位的一些变化,例如作为突变(例如缺失和 / 或插入)的结果,例如多达 5 个残基变化、或 4 个残基变化、或 2 个残基变化、或 1 个残基变化(例如,本文所示例的抗体)。

[0140] 本文使用的术语“互补决定区”(同义词 CDR;即 CDR1、CDR2 和 CDR3)指抗体可变结构域的氨基酸残基,其存在是抗原结合必需的。每个可变结构域通常具有 3 个 CDR 区,称为 CDR1、CDR2 和 CDR3。每个互补决定区可以包含来自 Kabat 确定的“互补决定区”的氨基酸残基(即轻链可变结构域中的约残基 24-34 或 24-39(L1)、50-56 或 55-61(L2) 和 89-97 或 93-102(L3) 以及重链可变结构域中的 31-35 或 26-35(H1)、50-65 或 50-66(H2) 和 95-102 或 97-108(H3);Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)) 和 / 或来自“高变环”的那些残基,即轻链可变结构域中的约残基 26-32(L1)、50-52(L2) 和 91-96(L3) 以及重链可变结构域中的 26-32(H1)、53-55(H2) 和 96-101(H3);Chothia and Lesk(1987)J.Mol Biol.196:901-917)。在一些情况下,互补决定区可以包含 Kabat 确定的 CDR 区和高变环的氨基酸。技术人员会清楚在 FR 定位的一些变化,例如作为突变(例如缺失和 / 或插入)的结果,例如,多达 5 个残基变化、或 4 个残基变化、或 2 个残基变化、或 1 个残基变异(例如,本文所示例的抗体)。

[0141] 本文使用的术语“衍生物”旨在表示包含一个或多个保守氨基酸取代的抗 HSP-90 β 抗体或其抗原结合片段。术语“保守取代”应当表示表 1 所述的氨基酸取代。

[0142] 表 1. 示例性取代

[0143]

原始残基	示例性取代
Ala(A)	val ;leu ;ile ;gly
Arg(R)	lys
Asn(N)	gln ;his
Asp(D)	glu
Cys(C)	ser
Gln(Q)	asn ;his
Glu(E)	asp
Gly(G)	pro, ala
His(H)	asn ;gln
Ile(I)	leu ;val ;ala
Leu(L)	ile ;val ;met ;ala ;phe
Lys(K)	arg
Met(M)	leu ;phe
Phe(F)	leu ;val ;ala
Pro(P)	gly
Ser(S)	thr
Thr(T)	ser
Trp(W)	tyr
Tyr(Y)	trp ;phe
Val(V)	ile ;leu ;met ;phe ;ala

[0144] 术语“保守取代”还包括具有类似亲水指数或分数的氨基酸取代。每种氨基酸基于它们的疏水性和电荷特性而分配了亲水指数：异亮氨酸 (+4.5)；缬氨酸 (+4.2)；亮氨酸 (+3.8)；苯丙氨酸 (+2.8)；半胱氨酸 / 胱氨酸 (+2.5)；甲硫氨酸 (+1.9)；丙氨酸 (+1.8)；甘氨酸 (-0.4)；苏氨酸 (-0.7)；丝氨酸 (-0.8)；色氨酸 (-0.9)；酪氨酸 (-1.3)；脯氨酸 (-1.6)；组氨酸 (-3.2)；谷氨酸 (-3.5)；谷氨酰胺 (-3.5)；天冬氨酸 (-3.5)；天冬酰

胺 (-3.5); 赖氨酸 (-3.9) 和精氨酸 (-4.5)。在进行基于亲水指数的变化时, 亲水指数在 ± 0.2 以内的氨基酸的取代是优选的。更优选地, 取代包括亲水指数在 ± 0.1 以内的氨基酸, 更优选在约 ± 0.05 以内。

[0145] 术语“保守氨基酸取代”还包括基于亲水性制备的类似氨基酸的取代, 尤其是由此产生的生物学功能等同的蛋白或肽预期用于免疫实施方案, 就如目前的情况。例如, 取决于邻近氨基酸的亲水性的蛋白最大的局部平均亲水性与其免疫原性和抗原性有关。如美国专利 4,554,101 号所详述, 下列亲水值已经分配给氨基酸残基: 精氨酸 (+3.0); 赖氨酸 (+3.0); 天冬氨酸 (+3.0 \pm 0.1); 谷氨酸 (+3.0 \pm 0.1); 丝氨酸 (+0.3); 天冬酰胺 (+0.2); 谷氨酰胺 (+0.2); 甘氨酸 (0); 苏氨酸 (-0.4); 脯氨酸 (-0.5 \pm 0.1); 丙氨酸 (-0.5); 组氨酸 (-0.5); 半胱氨酸 (-1.0); 甲硫氨酸 (-1.3); 缬氨酸 (-1.5); 亮氨酸 (-1.8); 异亮氨酸 (-1.8); 酪氨酸 (-2.3); 苯丙氨酸 (-2.5); 色氨酸 (-3.4)。在基于类似的亲水值进行变化时, 优选地, 取代的氨基酸具有彼此在约 ± 0.2 以内的亲水值, 更优选在约 ± 0.1 以内, 甚至更优选在 ± 0.05 以内。

[0146] 当涉及本发明的氨基酸序列和 / 或用于本发明时, 术语“衍生物”包括对序列的一个 (或多个) 氨基酸的任何取代、变化、修饰、替换、缺失或添加, 只要所得的氨基酸序列优选具有天然存在的 HSP-90 β 至少 50% 的生物学活性, 更优选至少基本上相同的活性。

[0147] 本文使用的术语“衍生物”还包括与抗体或抗原结合片段直接或间接连接的其他组分。例如, 衍生物包括增强或增加抗体在体内的半衰期的化合物, 例如聚乙二醇或白蛋白。在另一实例中, 衍生物还包括可检测的化合物, 例如荧光化合物或放射性化合物或酶, 例如以促进检测和 / 或成像。在另一实例中, 衍生物还包括毒性化合物, 例如放射性化合物或细胞毒素。

[0148] 重组产生抗体的方法是本发明领域的技术人员熟知的。这类技术在贯穿以下的文献中进行了描述和解释, 例如 J. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T. A. Brown (editor), *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)。

[0149] 可以利用表达全长 HSP-90 β 或其片段的细胞作为免疫抗原来制备本发明的抗体。用于免疫动物的肽可以源自翻译的 cDNA 或化学合成, 并且如果需要将其纯化并偶联至载体蛋白。这类常用的与肽化学偶联的载体包括钥孔血蓝蛋白 (KLH)、甲状腺球蛋白、牛血清白蛋白 (BSA) 和破伤风毒素。然后将偶联的肽用于免疫动物 (例如小鼠或兔)。

[0150] 如果需要, 可以将多克隆抗体进一步纯化, 例如通过与基质结合并洗脱, 激发抗体的肽与该基质结合。本领域技术人员清楚免疫学领域用于纯化和 / 或浓缩多克隆抗体以及单克隆抗体的各种常用技术 (参见例如 Coligan, et al., Unit 9, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, 其通过引用并入本文)。

[0151] 单克隆抗体可以利用任何技术制备, 所述技术通过培养连续细胞系产生抗体分子, 例如杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和 EBV-杂交瘤技术 (Kohler et al., 1975; Kozbor et al., 1985; Cote et al., 1983; Cole et al., 1984)。

[0152] 本领域已知的方法还允许从抗体表达文库鉴定和分离表现出结合 HSP-90 β 的抗体。

[0153] 具有与 mAb STRO-4 相同或类似的表位特异性的抗体可以通过它们与该特定 mAb 竞争结合 HSP-90 β (例如结合带有 HSP-90 β 的细胞,如 MPC ;或结合分离的 HSP-90 蛋白或其片段) 的能力进行鉴定。利用受体嵌合体 (Rucker et al., 1996) 或本领域技术人员已知的其他技术可以对 STRO-4mAb 的结合位点定位。

[0154] 无需过度实验还可以确定单克隆抗体是否与 STRO-4mAb 具有相同的特异性,这通过确定前者是否阻止后者结合 HSP-90 β 进行。如 STRO-4mAb 结合的降低所示,如果测试的单克隆抗体与 STRO-4mAb 竞争,则两种单克隆抗体结合相同或密切相关的表位。

[0155] 另一种确定单克隆抗体是否具有 STRO-4mAb 的特异性的方法是将待检测的单克隆抗体用 HSP-90 β 预孵育,然后添加 STRO-4mAb 以确定 STRO-4mAb 结合 HSP-90 β 的能力是否被抑制。如果 STRO-4mAb 的结合被抑制,则很可能被检测的单克隆抗体具有与 STRO-4mAb 相同或功能等同的表位特异性。

[0156] 可以将本发明使用的单克隆抗体改造以改变抗体的同种型。例如,可以将 IgG2A 同种型改造为 IgG1, IgG2B 或其他同种型。

[0157] 应理解可以将诸如本发明的抗体的 HSP-90 β 结合剂与可用于例如细胞分离、治疗或诊断应用的化合物偶联。在一实例中,将本发明的抗体与标记偶联。标记可以是其存在可以方便地检测的任何实体。例如,标记可以是直接标记,例如详细描述于 May et al. 的美国专利 5,656,503 号中的那些标记。直接标记包括但不限于在天然状态可以通过肉眼方便地看到或借助于滤光器和 / 或施加的刺激如 UV 光以激发荧光的实体。实例包括放射性化合物、化学发光化合物、电活性化合物 (如氧化还原标记) 和荧光化合物。直接颗粒标记如染料溶胶、金属溶胶 (如金) 和有色胶乳颗粒也是非常适合的,并且与荧光化合物一起都是优选的。在这些选择中,有色胶乳颗粒和荧光化合物是最优选的。将标记浓缩到小区域或体积中应当产生容易检测的信号,例如强着色区域。也可以使用间接标记,例如酶,如碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶,尽管这些间接标记通常需要在可以检测可见信号之前添加一种或多种显影剂,如底物。

[0158] 标记与诸如本发明抗体的结合剂的偶联可以通过共价或非共价 (包括疏水) 键合,或通过吸附。用于这类偶联的技术是本领域常见的,并且可以轻易地适应于使用的具体试剂。

[0159] 诸如本发明抗体的用于本发明方法的结合剂也可以包被在固体支持物上。例如,抗体可以包被在合成塑料材料、磁性颗粒、微量滴定测定板、微阵列芯片、胶乳珠、包含纤维素或合成聚合材料的滤器、玻璃或塑料载片、浸量尺、毛细管装填装置等。

[0160] 可以将 HSP-90 β 结合剂与固体支持物连接以允许粗分离。分离技术优选的最大程度保留待收集组分的活性。可以使用不同效率的各种技术来获得较粗的分离。使用的具体技术取决于分离效率、相关细胞毒性、表现的易用性和速度以及先进设备和 / 或专门技能的需求。用于分离的方法可以包括但不限于磁力分离、使用包被抗体的磁珠、亲和力层析和利用连接到固体基质的抗体的“淘选 (panning)”。提供精确分离的技术包括但不限于 MACS、Dyna1 磁珠选择和 FACS。

[0161] 细胞分选技术

[0162] 用诸如抗 HSP-90 β 抗体的 HSP-90 β 结合剂识别间充质前体细胞的能力不仅允许组织样品中这些细胞的鉴定和定量,而且允许它们在悬液中的分离和富集。这可以通过多

种细胞分选技术实现,通过所述技术细胞根据与细胞抗体复合物或连接到抗体上的标记有关的特性而被物理分离。该标记可以是磁性颗粒或荧光分子。抗体可以被这样交联:它们形成多细胞的聚集物,其可以通过它们的密度进行分离。可选地,抗体可以连接到固定的基质,期望的细胞与该基质粘附。

[0163] 从未结合的细胞分离抗体结合的细胞的各种方法是已知的。例如,可以标记结合到细胞的抗体(或抗同种型抗体),然后通过检测所述标记存在的机械细胞分选仪来分离细胞。荧光激活细胞分选仪是本领域公知的。

[0164] 在一实施方案中,抗 HSP-90 β 抗体连接到固体支持物。各种固体支持物是本领域技术人员已知的,包括但不限于琼脂糖珠、聚苯乙烯珠、中空纤维膜、聚合物和塑料培养皿。可以通过简单地从细胞悬液物理分离固体支持物来从细胞悬液中去除抗体所结合的细胞。

[0165] 超顺磁微粒可用于细胞分离。例如,微粒可以用抗 HSP-90 β 抗体包被。然后将抗体标记的超顺磁微粒用含有所关注的细胞的溶液孵育。微粒结合期望的多潜能细胞的表面,然后可以在磁场中收集这些细胞。

[0166] 在另一实例中,使细胞样品与例如固相连结的抗 HSP-90 β 单克隆抗体物理接触。固相连结可以包括,例如将抗体吸附到塑料、硝酸纤维素或其他表面。抗体还可以吸附到中空纤维膜的大孔(大到足以允许细胞流过)壁。可选地,抗体可以共价连接到表面或珠,例如 Pharmacia Sepharose 6MB 大珠(macrobead)。用含有多潜能细胞的悬液孵育固相连结的抗体的精确条件和持续时间取决于对所用系统特定的几种因素。但是,合适条件的选择在本领域是公知的。

[0167] 在允许多潜能细胞结合足够时间之后,用生理缓冲液洗脱或洗去未结合的细胞。在进行合适的测试以确保实现期望的分离后,可以回收未结合的细胞并用于其他目的或丢弃。然后用任何合适的方法从固相分离结合的细胞,这主要取决于固相和抗体的特性。例如,可以通过剧烈搅拌从塑料培养皿洗脱结合的细胞。可选地,可以通过酶促“切口(nicking)”或消化固相和抗体之间的酶敏感性“间隔子(spacer)”序列来洗脱结合的细胞。结合琼脂糖珠的间隔子可以从例如 Pharmacia 商购。

[0168] 然后通过离心用缓冲液洗涤细胞的洗脱、富集组分,并根据常规技术将所述富集组分或未结合的组分低温保存为成活状态以备后用或导入移植受体。

[0169] 多潜能细胞的分化

[0170] 本发明多潜能细胞向骨前体细胞或骨的偏向分化的条件可以包括例如在补充了 10% FCS、100 μ M L-抗坏血酸-2-磷酸酯、地塞米松 10^{-7} M 和 3mM 无机磷酸盐的 α MEM 中培养。这些条件已经证实在体外诱导人骨髓基质细胞发展为矿化的骨基质(Gronthos et al., 1994)。

[0171] 用于将本发明的多潜能细胞分化为成骨细胞的合适条件可以包括在存在 I 型胶原蛋白、纤维蛋白原、纤维蛋白、聚乙醇酸、聚乳酸、骨钙蛋白或骨粘连蛋白的条件下培养细胞。在一具体实例中,在存在 I 型胶原蛋白、纤维蛋白原和纤维蛋白的条件下培养细胞。在替代性实例中,在存在 I 型胶原蛋白、纤维蛋白原、纤维蛋白、骨钙蛋白和骨粘连蛋白的条件下培养细胞。在这种方法的背景下, I 型胶原蛋白、纤维蛋白原、纤维蛋白、聚乙醇酸、聚乳酸、骨钙蛋白或骨粘连蛋白可以单独使用或在生长因子的存在下使用。应理解本段中上文所列化合物的任何组合都是本发明所预期的。

[0172] 遗传修饰的细胞的产生

[0173] 在一实施方案中,本发明涉及遗传修饰的细胞,尤其是遗传修饰的本发明的多潜能细胞。优选地,细胞经遗传修饰以产生异源蛋白。通常,细胞经这样的遗传修饰:从细胞分泌异源蛋白。异源蛋白可以是任何所关注的蛋白。例如,异源蛋白可以是血小板来源的生长因子(PDGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和基质来源的因子1 α (SDF-1 α)。

[0174] 在另一实例中,异源蛋白是生物活性因子,其加速多潜能细胞向特定组织类型的分化。生物活性因子可以是例如合成糖皮质激素或骨形态发生蛋白,如BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-6或BMP-7。

[0175] 在一实施方案中,细胞可以经修饰以表达功能性非蛋白编码多核苷酸,如dsRNA(通常用于RNA沉默)、反义寡核苷酸或催化性核酸(如核酶或DNA核酶)。

[0176] 遗传修饰的细胞可以在存在足以支持该修饰的细胞生长的量的至少一种细胞因子的条件下培养。因此,获得的遗传修饰的细胞可以立即使用(例如,用于移植)、培养和体外扩增或者保存以备用。修饰的细胞可以通过本领域公知的方法保存,例如在液氮中冻存。

[0177] 本文使用的遗传修饰包括任何遗传修饰方法,其包括将外源或外来多核苷酸引入多潜能细胞或者多潜能细胞内的内源基因的修饰。遗传修饰包括但不限于转导(病毒介导的宿主DNA从宿主或供体转移到受体,体外或体内)、转染(用分离的病毒DNA基因组转化细胞)、脂质体介导的转移、电穿孔、磷酸钙转染或共沉淀等。转导的方法包括将细胞用生产者细胞直接共培养(Bregni et al., 1992)或者在有或没有合适生长因子和聚阳离子的条件下用单独的病毒上清培养细胞(Xu et al., 1994)。

[0178] 外源多核苷酸优选通过载体引入宿主细胞。载体优选包含插入的编码序列的转录和翻译必需的元件。用于构建这类载体的方法是本领域公知的。例如,用于构建合适表达载体的技术详细描述于Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N. Y. (3rd Ed., 2000)和Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., New York(1999)。

[0179] 载体可以包括但不限于病毒载体,如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒和单纯疱疹病毒;粘粒;质粒载体;合成载体;以及通常用于本领域的其他重组媒介物。这样的载体是本领域公知的,其含有启动子和可以将多核苷酸可操作连接进入的克隆位点。这类载体能够在体外或体内转录RNA,并且可以从诸如Stratagene(La Jolla, Calif.)和Promega Biotech(Madison, Wis.)的来源商购。具体实例包括Stratagene的pSG、pSV2CAT、pXt1;及Pharmacia的pMSG、pSVL、pBPV和pSVK3。

[0180] 优选的载体包括逆转录病毒载体(参见Coffin et al., "Retroviruses", Chapter 9 pp; 437-473, Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1997)。可以通过本领域公知的方法重组产生用于本发明的载体。例如W094/29438、W097/21824和W097/21825描述了逆转录病毒包装质粒和包装细胞系的构建。示例性载体包括pCMV哺乳动物表达载体,如pCMV6b和pCMV6c(Chiron Corp.)、pSFFV-Neo和pBluescript-Sk+。有用的逆转录病毒载体的非限制性实例是源自鼠、禽或灵长类逆转录病毒的那些载体。常见的逆转录病毒载体包括基于莫洛尼鼠白血病病毒的那些载体(MoMLV-载体)。其他MoMLV来源的载体包括Lmily、LINGFER、MINGFR和MINT。其他载体包括基于长臂猿白血病病毒(GALV)和莫

洛尼鼠肉瘤病毒 (MOMSV) 和脾灶形成病毒 (spleen focus forming virus, SFFV) 的那些载体。源自鼠干细胞病毒 (MESV) 的载体包括 MESV-MiLy。逆转录病毒载体还包括基于慢病毒的载体, 非限制性实例包括基于人免疫缺陷病毒 (HIV-1 和 HIV-2) 的载体。

[0181] 在产生逆转录病毒载体构建体时, 病毒的 gag、pol 和 env 序列可以从病毒去除, 从而为插入外源 DNA 序列提供空间。外源 DNA 编码的基因通常在位于长末端重复序列 (LTR) 中的强病毒启动子的控制下进行表达。合适的控制调节序列的选择取决于使用的宿主细胞, 并且该选择是本领域技术人员已知的。除了 LTR 的启动子外, 许多启动子也是已知的。非限制性实例包括噬菌体 λ PL 启动子、人巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子; 莫洛尼鼠肉瘤病毒 (MMSV)、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 或脾灶形成病毒 (SFFV) 的 U3 区启动子; 粒酶 A 启动子; 以及粒酶 B 启动子。此外, 可以使用诱导型或多重控制元件。合适启动子的选择对本领域技术人员是显而易见的。

[0182] 如果包装细胞系反式提供 gag、pol 和 env 功能, 则这类构建体可以有效地包装入病毒颗粒。因此, 当将载体构建体引入包装细胞时, 细胞产生的 gag-pol 和 env 蛋白与载体 RNA 组装以产生感染性的病毒体 (viron), 其被分泌入培养基。由此产生的病毒可以感染并整合入靶细胞的 DNA, 但不产生感染性病毒颗粒, 因为它缺乏必要的包装序列。目前使用的大部分包装细胞系转染了分离的质粒, 每种质粒均含有必要的编码序列之一, 从而在产生可复制的病毒之前, 多重重组事件是必需的。可选地, 包装细胞系载有原病毒。原病毒是残缺的, 从而尽管它可以产生组装感染性病毒所需的全部蛋白, 但其自身的 RNA 不能包装入病毒。取而代之的是包装由重组病毒产生的 RNA。因此, 从包装细胞释放的病毒储液 (stock) 仅含有重组病毒。逆转录病毒包装系的非限制性实例包括 PA12、PA317、PE501、PG13、PSI、CRIP、RDI 14、GP7C-tTA-G10、ProPak-A (PPA-6) 和 PT67。参考 Miller et al., 1986、Danos et al., 1988、Pear et al., 1993 和 Finer et al., 1994。

[0183] 其他合适的载体包括腺病毒载体 (参见 Frey et al., 1998 和 WO 95/27071) 和腺相关病毒载体。这些载体是本领域公知的, 例如描述于 Chatterjee et al., 1996 和 Stem Cell Biology and Gene Therapy, eds. Quesenberry et al., John Wiley & Sons, 1998 和美国专利 5,693,531 号及 5,691,176 号。腺病毒来源的载体的使用在某些情况下可能是有益的, 因为它们不能够感染不分裂的细胞。与逆转录病毒 DNA 不同, 腺病毒 DNA 不整合入靶细胞的基因组。此外, 腺病毒载体比逆转录病毒载体具有大得多的外源 DNA 携带能力。腺相关病毒载体是另一种有用的递送系统。这种病毒的 DNA 可以整合入不分裂的细胞, 并且用腺相关病毒载体已经将多种多核苷酸成功地引入不同的细胞类型。

[0184] 在一些实施方案中, 构建体或载体包含两种或更多种异源多核苷酸序列。优选地, 额外的核酸序列是编码选择性标记物、结构基因、治疗基因或细胞因子 / 趋化因子基因的多核苷酸。

[0185] 构建体或载体可以包含选择性标记物以监测成功的遗传修饰和选择已经整合 DNA 的细胞。非限制性实例包括抗药性标记物, 如 G418 (硫酸新霉素) 或潮霉素。此外可以使用阴性选择, 例如其中标记物是 HSV-tk 基因。该基因使得细胞对诸如无环鸟苷和更昔洛韦 (gancyclovir) 的试剂敏感。NeoR (新霉素 / G418 抗性) 基因是常用的, 但是可以使用基因序列不存在于靶细胞中的任何方便的标记基因。其他非限制性实例包括低亲和力神经生长因子 (NGFR)、增强的荧光绿色蛋白 (EGFP)、二氢叶酸还原酶基因 (DHFR)、细菌 hisD 基因、

鼠 CD24 (HSA)、鼠 CD8a (lyt)、赋予对嘌呤霉素或腐草霉素抗性的细菌基因以及 β -半乳糖苷酶 (glactosidase)。

[0186] 额外的多核苷酸序列可以通过相同载体引入宿主细胞,或者可以通过第二载体引入宿主细胞。在优选实施方案中,选择性标记物与多核苷酸包含在相同载体中。

[0187] 本发明还包括这样遗传修饰内源基因的启动子区:与野生型多潜能细胞相比,使内源基因的表达上调,导致编码蛋白的产生增加。

[0188] 富集的多潜能细胞组合物的用途

[0189] 对于各种治疗目的,期望诸如 MPC 的多潜能细胞的富集。这些目的包括缺失或损伤骨骼组织的再生,增强各种塑料或金属假器官装置的移植,这些目的通过将分离或培养扩增的骨髓来源的间充质细胞附着到假器官装置的多孔表面进行,这在骨髓来源的间充质细胞激活和后续分化时产生天然骨桥。

[0190] 培养的间充质细胞的复合移植可以用于提高骨髓移植期间造血细胞储备的速率。

[0191] 可以通过培养的从本发明多潜能细胞扩增的骨髓来源的间充质细胞修复的一类缺陷是骨中严重的骨骼缺陷类型,这由损伤引起或感染肿瘤的骨的大面积切除产生。在正常情况下,这类缺陷不会痊愈,并产生不结合的骨。可以通过在缺陷部位植入包含在磷酸钙陶瓷媒介物中的培养的间充质细胞来治疗这类缺陷。

[0192] 可以通过培养的从本发明多潜能细胞扩增的骨髓来源的间充质细胞修复的另一类缺陷是损伤的关节软骨,这由创伤或由诸如骨关节炎和类风湿性关节炎的疾病产生。

[0193] 可以在例如骨形成和修复中使用根据本发明获得的多潜能细胞的富集或扩增的细胞群,因此可以在需要骨形成的部位引入多潜能细胞以及合适支持物的组合。因此,例如可以通过在缺陷部位植入包含在磷酸钙陶瓷媒介物中的培养或扩增的多潜能细胞来修复由骨损伤或渗透了肿瘤的骨部分的切除引起的骨骼缺陷。合适的方法和技术参见 Caplan et al., 美国专利 5, 226, 914 和美国专利 5, 837, 539, 与本发明相比,这两者都使用干细胞的粗制品。

[0194] 此外,富集的细胞群或组合物可用于辅助锚定假器官装置。因此,在移植前,可以在诸如用于臀、膝和肩置换的那些假器官装置的表面包被富集的多潜能细胞。多潜能细胞然后可以分化为生骨细胞,从而加速骨向内生长的过程和假器官装置的并入(参见 Caplan et al. 的美国专利 5, 226, 914 和美国专利 5, 837, 539)。

[0195] 富集的细胞群或组合物还可以用于基因疗法,从而例如,富集的细胞群可以具有转化入其中的外源核酸,然后将这类细胞群引入患者体内以治疗疾病或疾病状况。可选地,它可以用于治疗剂的释放。关于合适的技术,我们参考 Gerson et al. 的美国专利 5, 591, 625, 与本发明相比,其使用干细胞的粗制品。

[0196] 可选地,富集的细胞群或组合物可以用于增强骨髓移植,其中在引入全骨髓前,可以将含有富集的多潜能细胞的组合物注射入经历骨髓移植的患者。采用这种方式,可以提高血生成的速率,尤其是在放射或化疗之后。组合物还可以包含多潜能细胞和造血细胞的混合物,其可用于放疗或化疗。

[0197] 细胞组合物

[0198] 本发明的细胞组合物如包含诸如 MPC 的多潜能细胞那些组合物,可以用于各种类

型组织的再生,包括骨、软骨、腱、韧带、肌肉、皮肤和其他结缔组织以及神经、心脏、肝、肺、肾、胰、脑和其他器官组织。

[0199] 本文使用的“药学可接受的载体”或“赋形剂”包括但不限于生理上相容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在一实施方式中,载体适合于肠胃外给药。可选地,载体适合于静脉内、腹膜内、肌肉内、舌下或口服给药。药学可接受的载体包括无菌水溶液或分散剂以及用于无菌注射溶液或分散剂的临用前制备的无菌粉剂。用于药学活性物质的这类介质和试剂的使用是本领域公知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,其在本发明的药物组合物中的使用都是预期的。所述组合物中还可以并入辅助活性化合物。

[0200] 在一些实施方案中,本发明的组合物可以联合合适的基质一起给药,例如,用于支持细胞并为骨、软骨、肌肉、神经、表皮和/或其他结缔组织的生长提供表面。基质可以是传统基质生物材料的形式。基质可以提供细胞的缓释和/或为其存在提供合适的环境。在一些实施方案中,多种胶原和非胶原蛋白预期上调并从细胞分泌。这种现象通过增强基质沉积来加速组织再生。基质蛋白也可以在遗传改造的细胞中表达,并且增强移植的细胞在移植区域的植入和附着。

[0201] 本发明的细胞组合物可以单独给药或作为与其他细胞的混合物给药。可以与本发明的组合物联合给予的细胞包括但不限于其他多潜能或多能性细胞或软骨细胞、成软骨细胞、骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨衬细胞、干细胞或骨髓细胞。不同类型的细胞可以在给药前立即或给药前不久与本发明的组合物混合,或在给药前将它们共培养一段时间。

[0202] 本发明的细胞组合物可以与其他有益的药物或生物分子(生长因子、营养因子)一起给药。当多潜能细胞与其他试剂一起给药时,它们可以在单一药物组合物中一起给药,或在分离的药物组合物中与其他试剂同时或顺序给药(在给予其他试剂之前或之后)。可以共给予的生物活性因子包括抗凋亡剂(如 EPO、EPO 模拟体(mimetibody)、TPO、IGF-I 和 IGF-II、HGF、胱天蛋白酶抑制剂);抗炎剂(如 p38 MAPK 抑制剂、TGF- β 抑制剂、抑制素、IL-6 和 IL-1 抑制剂、吡嘧司特、曲尼司特、REMICADE、西罗莫司和 NSAID(非甾体类抗炎药;例如替泊沙林、托美丁、舒洛芬);免疫抑制/免疫调节剂(如钙依赖磷酸酶抑制剂,如环孢素、他克莫司;mTOR 抑制剂(如西罗莫司、依维莫司);抗增殖剂(如硫唑嘌呤、麦考酚酸酯);糖皮质激素(如泼尼松龙、氢化可的松);抗体,如单克隆抗 IL-2R α 受体抗体(如巴利昔单抗、达克珠单抗)、多克隆抗 T 细胞抗体(如抗胸腺细胞球蛋白(ATG);抗淋巴细胞球蛋白(ALG);单克隆抗 T 细胞抗体 OKT3));抗血栓形成剂(如肝素、肝素衍生物、尿激酶、PPack(右旋苯丙氨酸脯氨酸精氨酸氯甲基酮)、抗凝血酶化合物、血小板受体拮抗剂、抗凝血酶抗体、抗血小板受体抗体、阿司匹林、双嘧达莫、鱼精蛋白、蛭素、前列腺素抑制剂和血小板抑制剂);和抗氧化剂(如普罗布考、维生素 A、抗坏血酸、生育酚、辅酶 Q-10、谷胱甘肽、L-半胱氨酸、N-乙酰半胱氨酸)以及局部麻醉剂。作为另一实例,细胞可以与美国专利 5,827,735 号中描述的疤痕抑制因子共给药,该专利通过引用并入本文。

[0203] 在一实施方案中,本发明的细胞组合物的给药可以采用未分化细胞的形式,即生长培养基中培养的。可选地,也可以在刺激分化为诸如成骨表型的期望表型的条件下培养后给予细胞组合物。

[0204] 纤维蛋白胶

[0205] 纤维蛋白胶是一类手术封闭剂 (sealant), 已经用于各种临床处理中。如技术人员已知的, 多种封闭剂可以用于本发明的组合物。但是, 本发明的优选实施方案涉及纤维蛋白胶与本发明细胞的使用。

[0206] 当用于本文时, 术语“纤维蛋白胶”指在钙离子的存在下, 由纤维蛋白聚合物交联形成的不溶性基质。纤维蛋白胶可以形成自纤维蛋白原或其衍生物或代谢产物、纤维蛋白 (可溶性单体或聚合物) 和 / 或其源自形成纤维蛋白基质的生物组织或流体的复合物。可选地, 纤维蛋白胶可以形成自通过重组 DNA 技术产生的纤维蛋白原或其衍生物或代谢产物或者纤维蛋白。

[0207] 纤维蛋白胶也可以通过纤维蛋白原与纤维蛋白胶形成的催化剂 (如凝血酶和 / 或因子 XIII) 的相互作用形成。如本领域技术人员所了解的, 纤维蛋白原在催化剂 (诸如凝血酶) 的存在下蛋白水解切割并转化为纤维蛋白单体。纤维蛋白单体然后可以形成聚合物, 其可以交联形成纤维蛋白胶基质。诸如因子 XIII 的催化剂的存在可以增强纤维蛋白聚合物的交联。纤维蛋白胶形成的催化剂可以源自含有纤维蛋白原或凝血酶的血浆、冷沉淀物或其他血浆组分。可选地, 催化剂可以通过重组 DNA 技术产生。

[0208] 血块形成的速率取决于与纤维蛋白原混合的凝血酶的浓度。作为酶依赖性反应, 温度越高 (高达 37°C), 血块形成速率越快。血块的拉伸强度取决于使用的纤维蛋白原的浓度。

[0209] 纤维蛋白胶的用途及其制备和使用方法由 Hirsh et al. 在美国专利 5, 643, 192 号中描述。Hirsh 公开了从单一供体提取纤维蛋白原和凝血酶组分以及仅这些组分的组合用做纤维蛋白胶。Marx 在美国专利 5, 651, 982 号中描述了另一种纤维蛋白胶的制备和使用方法。Marx 提供了通过脂质体在哺乳动物中用做局部封闭剂的纤维蛋白胶。用于创伤愈合的局部纤维蛋白原复合物 (TFC) 的制备和使用是本领域已知的。美国红十字会 (American Red Cross) 的 PCT 申请号 PCT/US95/15876, PCT 公开号 W096/17633 讨论了含有纤维蛋白原、凝血酶和氯化钙的 TFC 制品, 例如在 PCT 公开号 W096/17633 的第 16-18 页。

[0210] 几种出版物描述了用于递送治疗剂的纤维蛋白胶的用途。例如, 美国专利 4, 983, 393 公开了用作阴道内插入物 (insert) 的组合物, 其包含琼脂糖、琼脂、粘多糖盐水溶液、胶原蛋白、纤维蛋白和酶。此外, 美国专利 3, 089, 815 公开了由纤维蛋白原和凝血酶组成的注射用药物制剂, 并且美国专利 6, 468, 527 公开了促进各种生物和非生物试剂递送到体内特定部位的纤维蛋白胶。

[0211] 本领域技术人员应当理解可以对具体实施方案所示的本发明做出许多变化和改变而不脱离广泛描述的本发明的精神或范围。因此, 本发明的实施方案在各个方面都应被认为是说明性的而非限制性的。

实施例

[0212] 现在将参考下列非限制性实施例来更详细地描述本发明。

[0213] 实施例 1 材料和方法

[0214] 小鼠的免疫和抗体分泌杂交瘤细胞系的产生

[0215] 收获 VCAM-1/CD106 阳性免疫选择的绵羊 MPC, 并将其重悬于补充了 20 μ g 胞壁酰二肽 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) 作为佐剂的 300 μ l PBS。用 5×10^6 BMSSC

对 BALB/c 小鼠进行腹膜内免疫,随后以三周的间隔进一步加强免疫 3 次以确保免疫应答的充分亲和力成熟。融合前 3 天,通过尾静脉给予重悬于 100 μ l PBS 的 5×10^6 个细胞。在融合前,立刻处死小鼠,无菌取出它们的脾。通过将 NS1-Ag4-1 鼠骨髓瘤细胞系与源自用胰蛋白酶处理的培养的绵羊 MPC 免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞融合来制备分泌与培养的 BMSSC 反应的抗体的杂交瘤。基本上按照先前的描述进行脾细胞与骨髓瘤细胞的融合 (Filshie RJ et al.,1998 和 Zannettino AC et al.,1996)。

[0216] 针对与骨髓单核细胞的低反应性以及与原代免疫原 (培养的绵羊 MPC) 和人培养的 MPC 的反应性来筛选杂交瘤。还针对反应性以及绵羊和人集落形成 MPC (CFU-F) 的富集来选择 STRO-4 杂交瘤。

[0217] 骨髓样品

[0218] 根据皇家阿德雷德医院 (Royal Adelaide Hospital) 的人类伦理委员会批准的指南,获得正常人成体骨髓的吸出物。根据医学与兽医科学研究所 (Institute of Medical and Veterinary Science) 的动物伦理委员会批准的指南,获得绵羊骨髓的吸出物。基本上按照先前的描述,通过密度梯度分离制备绵羊和人骨髓单核细胞 (BMMNC) (Gronthos S et al.,2003)。如下所述,将 BMMNC 制品用于免疫磁性或荧光活化细胞分选。

[0219] MPC 细胞培养

[0220] 按照先前的描述,于 12 天期间内,以一式三份的孔,在一式三份的 6 孔板中,按照 0.1 至 1×10^4 个未分级或免疫选择的 BMMNC 每 cm^2 的接种密度进行集落效率测定。按照先前的描述 (Gronthos S et al.,2003),使细胞在补充了 20% 胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和 100 μ M L-抗坏血酸-2-磷酸酯、50U/ml 青霉素、50 μ g/ml 链霉素的 α -MEM 中,于 5% CO_2 和 37 $^\circ\text{C}$ 湿润气氛下生长。用 4% 低聚甲醛固定后计数集落 (> 50 个细胞的细胞簇),然后用 0.1% 甲苯胺蓝染色。通过接种 1 至 5×10^4 个未分级或 STRO-4⁺ 免疫选择的 BMMNC 每 cm^2 建立原代 BMSSC 培养物,然后如上所述在 α -MEM 中生长。

[0221] 分化测定

[0222] 为了诱导骨形成,将 MPC 在补充了 10% FCS、100 μ M L-抗坏血酸-2-磷酸酯、地塞米松 10^{-7} M 和 3mM 无机磷酸盐的 α -MEM 中培养,其中通过茜素红染色鉴定矿化沉积 (Gronthos S et al.,2003)。按照先前的描述,在 0.5mM 异甲基丁基甲基黄嘌呤 (IBMX)、0.5 μ M 氢化可的松和 60 μ M 吲哚美辛的存在下诱导脂肪形成,其中使用油红 O 染色来鉴定载脂脂肪细胞 (Gronthos S et al.,2003)。在用 10ng/ml TGF- β 3 处理的聚集培养物中评价软骨形成分化,并且通过 0.1% 甲苯胺蓝过夜染色以检测蛋白聚糖合成进行评价 (Gronthos S et al.,2003)。

[0223] 磁性-活化细胞分选 (MACS)

[0224] 这按照先前的描述 (Gronthos S et al.,2003) 进行。简言之,将约 $1-3 \times 10^8$ 个正常绵羊或人 BMMNC 用抗 VCAM-1/CD106 或 STRO-4 澄清 (neat) 上清在冰上孵育 1 小时。根据制造商的说明书,将细胞制品用山羊抗小鼠 IgG 链霉亲和素微珠并且最后用链霉亲和素 FITC (1/50; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) 在冰上孵育 30 分钟,然后在 Mini MACS 磁柱 (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA) 上分离。

[0225] 间接免疫荧光和流式细胞分析

[0226] 在免疫标记前,将培养的细胞 (绵羊 MPC、人 MPC、MG63、HOS、SAOS 在封闭缓冲液

(HBSS+20mM Hepes、1%正常人 AB 血清、1%牛血清白蛋白 (BSA :Cohn fraction V, Sigma Aldrich Pty Ltd, NSW, Australia) 和 5% FCS 中于冰上孵育 20 分钟。在冰上将 1×10^5 个细胞的等份重悬于 100 μ L 任意 STRO-4 的上清中,保持 45 分钟。在相同条件下,使用同种型匹配的非结合对照抗体,抗体 IgG1 (1B5) (由澳大利亚纽卡斯尔大学 (University of Newcastle, AUS) 的 L. K. Ashman 教授惠赠) 用作培养上清。然后在含 5% FCS 的 HBSS 中洗涤细胞,并用山羊抗小鼠 IgG (γ -链特异性) 藻红蛋白 (PE) (1/50 ;Southern Biotechnology Associates, Birmingham AL) 在冰上孵育 45 分钟。在分析之前,将细胞在含 5% FCS 的 HBSS 中洗涤两次,并重悬于 PBS/1% 低聚甲醛中。使用 Coulter Excel 流式细胞仪 (Coulter Corp., Hialeah, FL) 进行流式细胞分析。当荧光水平大于 99% 的使用同种型匹配的非结合对照抗体所观察到的荧光水平时,确定各种抗体的阳性。每个样品收集 20,000 个事件作为列表式数据,并使用 Coulter ELITE 软件进行分析。

[0227] 免疫沉淀和蛋白印迹

[0228] 按照先前的描述制备细胞裂解物。在添加澄清的 STRO-4 上清和同种型匹配的非结合对照 (1B5) 之前,将山羊抗小鼠 Ig 偶联的 Dynabeads (Dyna1, Oslo, Sweden) 在 1% (v/v) NP40-50mM Tris-HCl、150mM NaCl、1mM EDTA [TSE] 中洗涤两次。然后将该混合物在 4 $^{\circ}$ C 下孵育至少 6 小时,同时进行转动。在 1% NP40TSE 中将所得的预加载 (pre-armed) 的 Dynabeads 洗涤两次,并使用磁性颗粒收集器 (MPC-1, Dyna1) 收集珠。向其中添加 1.0ml 合适的 NP40 细胞裂解物的等份。将样品在 4 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时,同时进行转动。然后将免疫沉淀物在 1% (v/v) NP40-TSE 中洗涤两次,在 0.1% (v/v) NP40-TSE 洗涤一次,并在 TSE, pH 8.0 洗涤一次。然后去除上清,将样品在 -20 $^{\circ}$ C 下保存或立即用于电泳。各种免疫沉淀物代表来自 5×10^6 个细胞等价物 (equivalent) 的材料。按照先前的描述 (Zannettino AC et al., 1996), 将样品在 25 μ L 还原性样品缓冲液 (62.5mM Tris、3% (w/v) SDS、10% (v/v) 甘油和 5% (v/v) 2-巯基乙醇) 中煮沸 3 分钟,并使用考马斯蓝,通过 10% (w/v) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

[0229] 对于质谱和蛋白测序,将切下的条带在 37 $^{\circ}$ C 下进行 16 小时的胰蛋白酶消化。然后使用 Millipore C18 ZipTip 将样品脱盐并浓缩,并且将 1 μ L 等份点样至含有 1 μ L 基质 (α -氰基-4-羟基肉桂酸, 8mg/mL, 在 70% v/v AcN, 1% v/v TFA 中) 的样品板,并空气干燥。利用具有 MS 模式的 TOF/TOF 光学装置的 Applied Biosystems 4700 蛋白质组分析仪进行基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 质谱。使用 Nd:YAG 激光 (355nm) 照射样品。以反射 (reflectron) 模式获得的光谱的质量范围是 750 至 3500Th。输出数据的格式适合于提交到数据库搜索程序 Mascot (Matrix Science Ltd, London, UK)。

[0230] 对于免疫印迹,将未染色凝胶上的蛋白转移到聚乙烯-二氟乙酸酯 (PVDF; MSI Membranes, Geneworks, Adelaide, Australia), 于湿印迹装置 (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA) 中在 30mA 下过夜。用 PBS 中的 5% 脱脂奶粉-0.05% 吐温-20 封闭 2 小时后,将滤膜用针对 HSP-90 的多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnologies) 在室温下孵育 1 小时。随后按照制造商的推荐,用山羊抗小鼠碱性磷酸酶偶联物 (Amersham Biosciences, Poole, UK) 检测一抗,并利用 ImageQuant 软件 (Molecular Dynamics) 在 FluorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 上显示免疫反应性蛋白 (Zannettino AC et al., 1996 和 Shi S et al., 2001)。

[0231] 实施例 2 鉴定绵羊和人 MPC 的单克隆抗体 STRO-4 的产生

[0232] 按照方法部分的描述,在源自用培养的 VCAM-1/CD106 阳性来源的绵羊 MPC 免疫的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞系 NS1-Ag4-1 融合后,产生与绵羊 MPC 反应的一组小鼠单克隆抗体 (mAb)。初步筛选设计为鉴定与绵羊和人产克隆 MPC(CFU-F) 反应的 mAb。选择这样的一种杂交瘤 STRO-4 用于进一步分析,因为它鉴定了绵羊和人骨髓单核细胞的一个小亚组 (图 1A 和 B),并有效地分离了绵羊和人 CFU-F (图 1C 和 D)。离体扩增的绵羊和人 MPC 维持了由 STRO-4 鉴定的抗原的高细胞表面表达 (图 2A 和 B),并表现出多谱系分化为成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞的能力 (图 3)。按照方法部分的描述,使用同种型检测试剂盒确定来自三级 (tertiary) 杂交瘤上清的 STRO-4 的免疫球蛋白同种型为 IgG1。

[0233] 实施例 3 STRO-4 识别的抗原的表征

[0234] 使用免疫沉淀从未成熟的人骨肉瘤细胞系 MG63 纯化 STRO-4 抗原,该 MG63 表达高细胞表面水平的 STRO-4 抗原 (图 2C)。按照方法部分的描述,用 1% NP40 提取人 MG63 质膜蛋白,并用 STRO-4 抗体孵育。按照方法部分的描述,利用偶联至 Dynal 磁珠的绵羊抗小鼠 IgG 抗体回收 STRO-4 免疫沉淀的蛋白,并通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分析。分析的免疫沉淀物的考马斯蓝染色揭示了表观分子量为 90kDa 的特异性肽条带 (图 4)。从凝胶上切下 90kDa 蛋白片段,将其制备用于质谱和氨基酸序列分析。使用所得的 STRO-4 肽序列检索国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 的蛋白数据库,发现其与人热休克蛋白-90 β (登录号 P08238) 表现出同源性 (图 5)。

[0235] 为了证实 STRO-4 反应性 90kDa 肽是 HSP-90 β ,通过 SDS-PAGE 分析全细胞裂解物和 STRO-4 免疫沉淀的提取物。按照方法部分的描述,使用可商购的与人 HSP-90 β 反应的兔多克隆抗体进行蛋白印迹分析。STRO-4-免疫沉淀物在 90kDa 的合适分子量处表现出与 HSP-90 特异性抗体的特异性反应性 (图 6)。

[0236] 在本研究中,基于 STRO-4 细胞表面表达而选择的绵羊和人 MPC 细胞群在体外证实了广泛的增殖,并且保留它们分化为骨、软骨和脂肪组织的能力。迄今为止,几乎没有抗体试剂表现出不同物种之间的交叉反应性。

[0237] 因此,可以使用针对 STRO-4 的抗体作为分离和富集 MPC 的有效工具。

[0238] 参考文献

[0239] Airey JA, Almeida-Porada G, Colletti EJ, Porada CD, Chamberlain J, Movsesian M, Sutko JL, Zanjani ED (2004) Human mesenchymal stem cells form Purkinje fibers in fetal sheep heart. *Circulation* 109(11):1401-7.

[0240] Anseth KS et al (2002) In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery 78(103):199-209.

[0241] Bregni et al. (1992). Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 80,1418-22.

[0242] Chen B, Piel WH, Gui L, Bruford E, Monteiro A (2005) The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86(6):627-37.

[0243] Cole et al. (1984) Human monoclonal antibodies. *Mol. Cell Biochem.* 62,

109-20.

[0244] Cote et al. (1983) Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2026-30.

[0245] Danos et al. (1988) Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 6460-4

[0246] Filshie RJ, Zannettino AC, Makrynika V, Gronthos S, Henniker AJ, Bendall LJ, Gottlieb DJ, Simmons PJ, Bradstock KF (1998) MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. Leukemia 12(3) :414-21.

[0247] Finer et al. (1994) kat : a high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. Blood. 83, 43-50.

[0248] Frey et al. (1998) High-efficiency gene transfer into ex vivo expanded human hematopoietic progenitors and precursor cells by adenovirus vectors. Blood 91, 2781-92.

[0249] Gronthos et al. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. Blood 84, 4164-73.

[0250] Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. J Cell Sci 116(Pt 9) :1827-35.

[0251] Kohler et al. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256, 495-7.

[0252] Kozbor et al. (1985). Specific immunoglobulin production and enhanced tumorigenicity following ascites growth of human hybridomas. J. Immunol. Methods 81, 31-42.

[0253] Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW (2000) Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. Nat Med 6(11) :1282-6.

[0254] Mackenzie TC, Flake AW (2001) Human mesenchymal stem cells persist, demonstrate site-specific multipotential differentiation, and are present in sites of wound healing and tissue regeneration after transplantation into fetal sheep. Blood Cells Mol Dis 27(3) :601-4.

[0255] Miller et al. (1986) Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. Mol Cell Biol. 6, 2895-902.

[0256] Miller et al. (1989) Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques. 7, 980-82, 984-86, 989-990.

[0257] Pear et al. (1993) Production of High-Titer Helper-Free Retroviruses by Transient Transfection. Proc Natl Acad Sci USA. 90, 8392-8396.

- [0258] Pearson WR and Lipman DJ(1988)Improved tools for biological sequence comparison. 85(8) :2444-8.
- [0259] Rucker et al. (1996)Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. Cell 87,437-46.
- [0260] Shi S,Robey PG,Gronthos S(2001)Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. Bone 29(6) :532-9.
- [0261] Shi S,Gronthos S(2003)Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res 18(4) :696-704.
- [0262] Simmons PJ,Torok-Storb B(1991)Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood 78(1) :55-62.
- [0263] Voss AK,Thomas T,Gruss P(2000)Mice lacking HSP90beta fail to develop a placental labyrinth. Development 127(1) :1-11.
- [0264] Yamada T,Hashiguchi A,Fukushima S,Kakita Y,Umezawa A,Maruyama T,Hata J(2000)Function of 90-kDa heat shock protein in cellular differentiation of human embryonal carcinoma cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 36(2) :139-46.
- [0265] Zannettino AC,Rayner JR,Ashman LK,Gonda TJ,Simmons PJ(1996)A powerful new technique for isolating genes encoding cell surface antigens using retroviral expression cloning. J Immunol 156(2) :611-20.
- [0266] Xu et al. (1994).Correction of the enzyme deficiency in hematopoietic cells of Gaucher patients using a clinically acceptable retroviral supernatant transduction protocol. Exp. Hemat. 22,223-30.

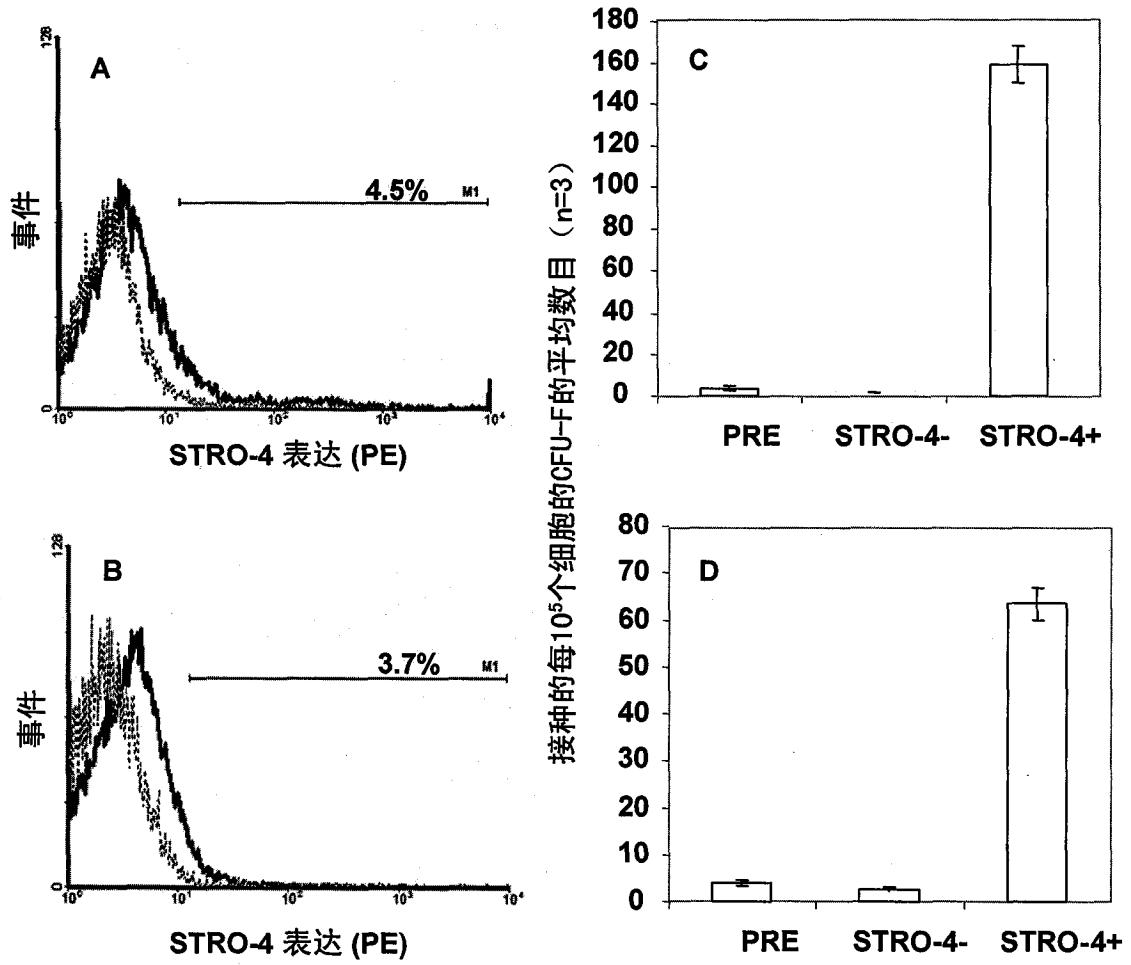


图 1

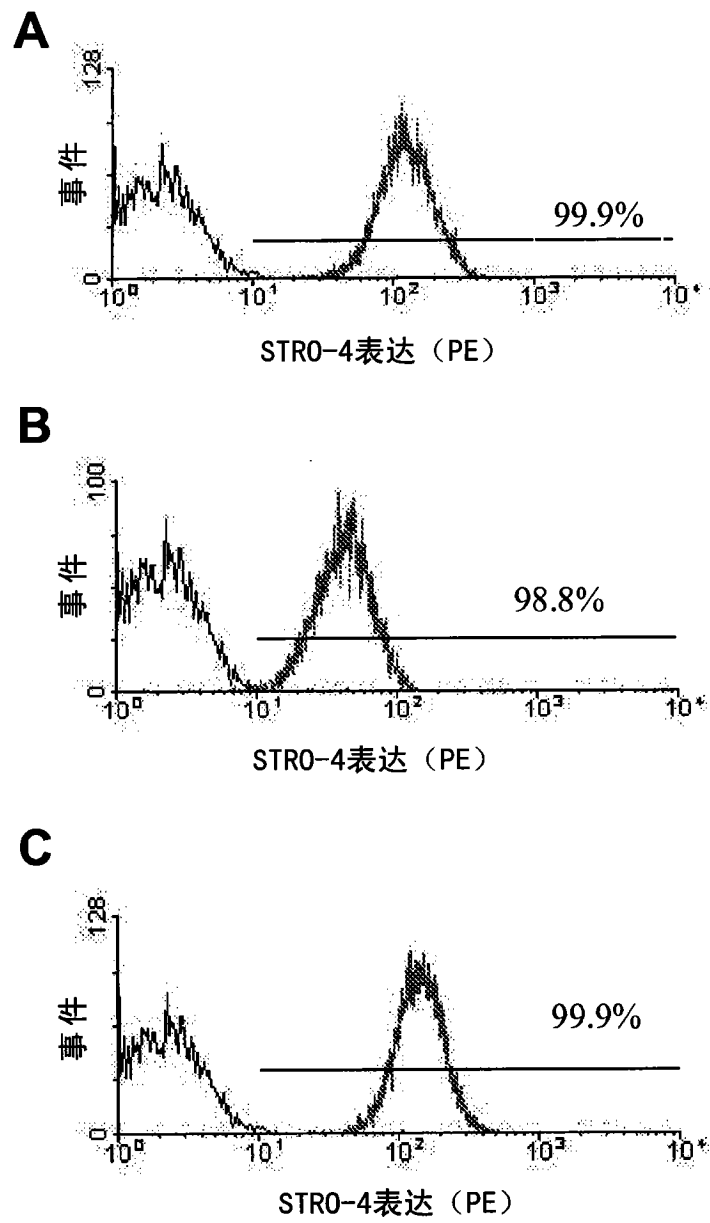


图 2

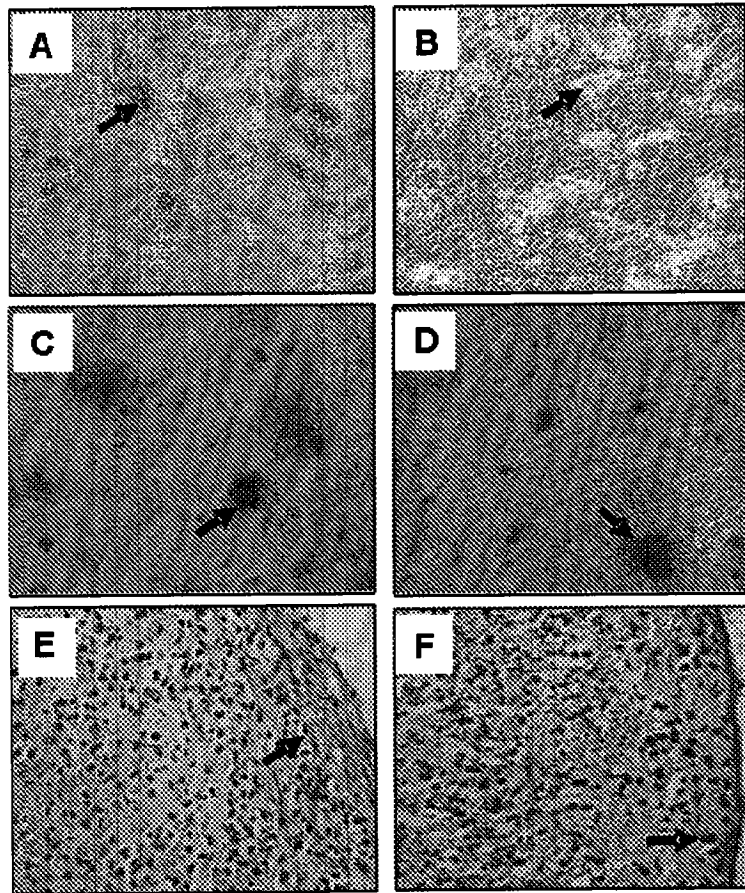


图 3

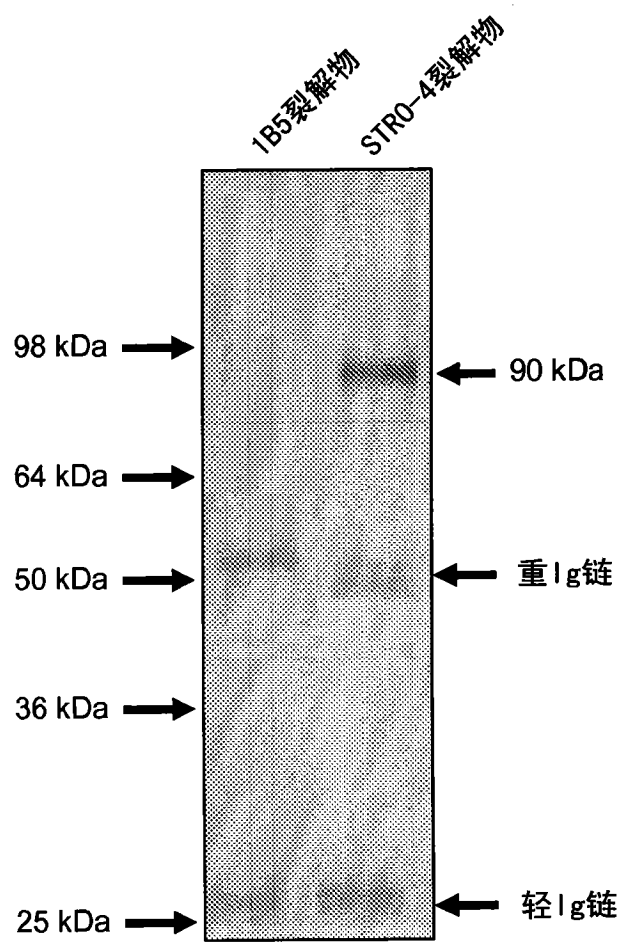


图 4

人热休克蛋白-90 β 的肽序列 (NCBI, 登录号 P08238)

匹配的STR0-4测序的肽以黑体表示

1 PEEVHHGEEE VETFAFQAEI AQLMSLIINT FYSNKEIFLR ELISNASDAL
 51 DKIRYESLTD **PSKLD**SGKEL KIDIIPNPQE RTLTLVDTGI **GMTKAD**LINN
 101 LGTIAKSGTK AFMEALQAGA DISMIGQFGV GFYSAYLVAE KVVVITKHND
 151 **DEQYAWESSA GGSFTVRADH** GEPIGRGTKV ILHLKEDQTE YLEERRVKEV
 201 VKKHSQFIGY PITLYLEKER EKEISDDEAE EEKGEKEEED KDDEEKPKIE
 251 **DVGSDEEDDS GKDKKKKTKK** IKEKYIDQEE LNKTKPIWTR **NPDDITQEEY**
 301 **GEFYKSLTND WEDHLAVKHF** **SVEGQLEFRA** LLFIPRRAPF **DLFENK**KKKN
 351 NIKLYVRRVF IMDSCDELIP EYLNfirgvv **DSEDLPLNIS** REMLQQSKIL
 401 KVirKNIVKK CLELFSELAE DKENYKKFYE AFSKNLKLGI HEDSTNRRRL
 451 SELLRYHTSQ **SGDEMTSLSE** YVSRMKETQK SIYYITGESK **EQVANS**AFVE
 501 RVRKRGFEVV YMTEPIDEYC VQQLKEFDGK SLVSVTKEGL ELPEDEEEKK
 551 KMEESKAKFE **NLCKLMKEIL** **DKKVEKVTIS** NRLVSSPCCI VTSTYGWTAN
 601 MERIMKAQAL RDNSTMGYMM AKKHLEINPD **HPIVETLRQK** AEADKNDKAV
 651 KDLVLLFET ALLSSGFSLE DPQTHSNRIY RMIKLGID EDEVAEEPN
 701 AAVPDEIPPL EGDEDASRME EVD

图 5

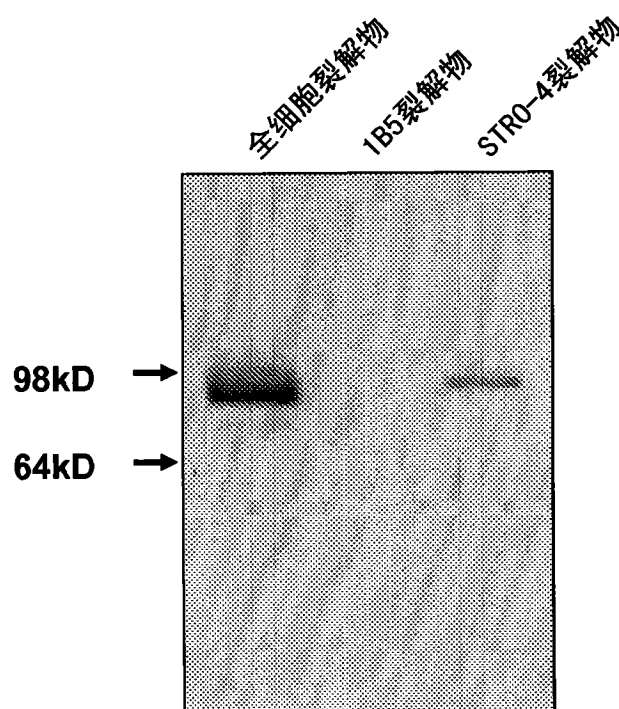


图 6