

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

A61K 9/22
A61K 39/395 C07K 16/00
C12P 21/08 C12N 5/00
G01N 33/558

[21] 申请号 96194719.5

[43]公开日 1998年10月14日

[11] 公开号 CN 1195982A

[22]申请日 96.6.12

[30]优先权

[32]95.6.12 [33]US[31]60/000,137

[86]国际申请 PCT/IL96/00010 96.6.12

[87]国际公布 WO96/41620 英 96.12.27

[85]进入国家阶段日期 97.12.12

[71]申请人 依达研究发展有限公司

地址 以色列雷霍沃特

共同申请人 拉莫特大学应用研究及工业发展有
限公司

[72]发明人 A·雅因 Z·内佛

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图页数 8 页

[54]发明名称 用作间充质骨骼祖细胞标记物的成纤维
细胞生长因子受体 3

[57]摘要

本发明涉及作为间充质骨骼祖细胞的新标记物的成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3)。通过使用该新标记物,可以在组织中鉴定间充质骨骼祖细胞并加以定位,还可获得这些细胞基本纯的培养物。可以在药物组合物或植入物中将间充质骨骼祖细胞的纯培养物(可任选地在活体外进行各种操作)用作活性成分,以用于骨和/或软骨的修复。FGFR3还可用作鉴定和定位软骨衍生和骨衍生肿瘤的标记物。能够与 FGFR3 结合的试剂还可用于将细胞毒试剂导向软骨衍生和骨衍生的肿瘤。

权 利 要 求 书

1.一种鉴定间充质骨骼祖细胞的方法，其特征在于，它包括：

5 (a)在会发生配体-受体结合的条件下，将成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR3) 结合剂施用于被分析的细胞或组织上；

(b) 确定那些细胞与该 FGFR3 结合剂发生了结合，这些细胞就是间充质骨骼祖细胞。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该 FGFR3-结合剂是对 FGFR3 特异的抗体。

10 3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该 FGFR3-结合剂是成纤维细胞生长因子 9(FGF9)。

4.一种获得基本纯的间充质骨骼祖细胞培养物的方法，其特征在于，它包括：

(a)将 FGFR3 结合剂使用于含间充质骨骼祖细胞的细胞源中；和

15 (b)从该细胞源中分离出与 FGFR3 结合的细胞，这些细胞构成基本纯的间充质骨骼祖细胞的培养物。

5.如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，该细胞源是自身非增殖的软骨细胞，去分化的成纤维细胞样细胞，从软骨膜、滑膜或骨膜获得的细胞，或者该细胞源来自胚胎。

6.一种基本纯的间充质骨骼祖细胞培养物。

20 7.用权利要求 5 所述方法获得的间充质骨骼祖细胞。

8.一种用于修复骨和软骨的药物组合物，其特征在于，它含有适用于维持软骨细胞活力的介质和权利要求 6 或 7 所述的间充质骨骼祖细胞。

9.如权利要求 8 所述的药物组合物，其特征在于，它还含有 FGF 家族的成员。

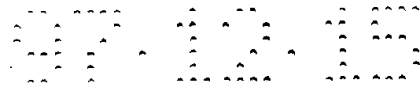
10.如权利要求 9 所述的药物组合物，其特征在于，它含有 FGF9。

25 11.一种适用于骨或软骨植入的植入物，其特征在于，它包括：允许生长的胶质环境和权利要求 6 或 7 所述的间充质骨骼祖细胞。

12.如权利要求 9 所述的植入物，其特征在于，还含有 FGF 家族的成员。

13.如权利要求 12 所述的植入物，其特征在于，含有 FGF9。

30 14.一种治疗软骨发育不全症病人、患其他生长障碍疾病的病人和预计软骨和骨生长前景差的长骨生长部损伤(physeal injuries)的方法，其特征在于，在需要生长或修复的部位分别施用或植入权利要求 6-8 所述的药物组合物或权利要求 9 或 10 所述的植入物。



15.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，被施用的细胞是自身的。

16.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，这些细胞是异体的。

17.一种在组织或样品中检测软骨-骨瘤的方法，其特征在于，它包括：

(i) 将受检组织或样品与 FGFR3 结合剂接触；

5 (ii) 检测是否存在与 FGFR3 结合剂结合的细胞，阳性检测结果表明在受检组织或样品中存在软骨-骨瘤。

18.如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，该软骨-骨瘤是选自下组的良性肿瘤：外生骨疣和骨赘。

10 19.一种治疗软骨-骨瘤的药物组合物，其特征在于，它包含：药学上可接受的载体和作为活性成分的连于细胞毒性分子的 FGFR3 结合剂。

20.如权利要求 19 所述的药物组合物，其特征在于，该 FGFR3 结合剂是 FGF9。

21.如权利要求 19 所述的药物组合物，其特征在于，该 FGFR3 结合剂是针对 FGFR3 的抗体。

15 22.一种特异性地摧毁软骨-骨瘤的方法，其特征在于，它包括：给需要这种治疗的对象施用治疗有效量的偶联于细胞毒性分子的 FGFR 结合剂。

23.如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，该 FGFR3 结合剂是 FGF9。

24.如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，该 FGFR3 结合剂是针对 FGFR3 的抗体。

说明书

用作间充质骨骼祖细胞标记物的成纤维细胞生长因子受体 3

5 发明领域

本发明涉及鉴定间充质骨骼祖细胞的方法，它是通过鉴别在细胞表面上有成纤维细胞生长因子受体 3(fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3)为特征的细胞而加以鉴定的。

10 本发明还涉及通过采用 FGFR3-结合剂而获得间充质骨骼祖细胞的方法。本发明还涉及基本上为纯间充质骨骼祖细胞的培养物，以及含有该间充质骨骼祖细胞的药物组合物和植入物。

另一方面，本发明涉及鉴定软骨-骨瘤(cartilage-bony tumor)的方法，以及治疗软骨-骨瘤的药物组合物。

15 发明背景

骨骼生长既依赖于组织细胞组份-软骨细胞和长骨的软骨生长中心的细胞膜受体二者发挥正常的功能，还依赖于循环的和局部的激素及生长因子的常态和浓度水平。因此，生长失调被划分为截然不同的两类(a)循环因子的失调，和(b)靶软骨组织的失调。

20 正常的分化过程是从间充质干细胞开始的，这些干细胞分化成骨骼祖细胞，后者或者分化成前软骨干细胞(它最终形成软骨)，或者分化成前成骨干细胞(它最终形成骨头)。

要追踪间充质干细胞支持的生长以及它们在正常人和患生长疾病的家族中的迁移情况是有难度的，其中包括缺少用于这些特异间充质干细胞的合适标记物。
25 例如，已有零星的和不完整的、关于生长板干细胞的最初位置和迁移路径的信息，它支持纵向的和横向的生长。在一百多年来长期争论的问题即“Ranvier 对 La Croix 之争”仍然悬而未决。1889 年，Ranvier 声称“形成骨膜骨的细胞来自生长板的细胞”，而 1951 年 La Croix 宣称“并置式(appositional)生长由软骨膜外周的细胞造成”。Ranvier 的理论在 70 年代早期得到了 Rigal, Hert, J.(Acta Anat (Bazel) 82:420-436(1972))和其他学者的支持，而在 90 年代得到了 Langenskiold
30 等人(Acta. Orthop. Scand., 64:683-687(1993))的支持，他们表明来自胚层的细胞迁移到骨沟的边界处，作为纵向和横向骨生长的源头。

然而，对各种类型的软骨细胞和影响间充质分化的因子的充分了解却受到了阻碍，因为不能确定这些细胞的初级储存体的最初位置，因而受到了体外细胞培养的限制。一个困难是缺少特异性的表型标记物来跟踪相继的分化事件。II型胶原的分泌被认为是软骨细胞分化主要的早期标记，而碱性磷酸酶的合成是成骨细胞分化的早期标记。成熟的成骨细胞也产生骨桥蛋白、骨粘连蛋白和骨钙蛋白，这3种细胞外的基质蛋白与I型胶原一起沉积在矿化的骨基质上。不幸的是，仅鉴别出少量的分化标记物，而且其中某些标记物如碱性磷酸酶、骨桥蛋白和骨粘连蛋白等对于成骨分化并不特异，而且另一些标记物如骨钙蛋白很少在体外表达。此外，间充质细胞系和分化的软骨细胞和成骨细胞的初级培养物，会表现出不同的表型而且常常是处于不同分化阶段的各种细胞类型的混合物(Eriebacher, A.等人, 细胞(Cell) 80:371-378, (1995); Yamaguchi, T.P.和 Rossant, J., Current opinion in Genetics and Development 5: 485-491(1995))。

因此，特别需要开发一种能够精确地确定对纵向和横向生长以及骨修复有支持和贡献的干细胞位置和来源的标记物，以便可以更好地了解正常状态和病理状态下间充质发育的机制，以及获得有治疗用途的基本纯的间充质骨骼祖细胞培养物。

发明概述

本发明基于一个出人意料的发现：成纤维细胞生长因子受体3(FGFR3)可作为间充质骨骼祖细胞的标记物。本发明还基于这样一个出人意料的发现，即间充质骨骼祖细胞的解剖位置是在La Croix沟的软骨膜中。

在下文中用术语“间充质骨骼祖细胞”表示下列类型的细胞：(a)能够分化成骨骼祖细胞的间充质干细胞，(b)骨骼祖细胞，(c)前软骨干细胞，和(d)前成骨干细胞，或2种或多种上述细胞类型的混合物。间充质骨骼祖细胞都具有对骨和/或软骨的生长作出贡献的特性，与其他类型的软骨或骨衍生细胞相比显示出增强的增殖性，而且在适当的趋化剂如成纤维细胞生长因子9存在下还会有迁移的倾向。

这些间充质骨骼祖细胞，在胚胎和新生儿早期，支持关节软骨和长骨生长部生长板软骨的生长。然而，在一生中很早的时候(出生后几个月)，这些干细胞与关节区域的联系便没有了，导致关节软骨的自我损伤愈合性差。这些间充质骨骼祖细胞继续维持长骨纵向和纬向(横向)生长的细胞来源，直至长骨生长部关闭(在18-22岁时)，而且继续提供骨膜的干细胞储藏库(与整个一生的骨折骨痂有关)。

在成年人中，尤其是在高龄中，跟踪未分化的、可能形成增殖的软骨细胞的细胞源的技术早先已经失败，因为这种细胞源的稀少而且不能胜任作为这种未分化细胞的标记物。

通过使用作为本发明基础的发现，即 FGFR3 是间充质骨骼祖细胞的标记物，有可能开发出鉴定间充质骨骼祖细胞的方法，就是通过鉴定表面上存在 FGFR3 这一特征的细胞。这一方法对于追踪间充质骨骼祖细胞至关重要，比如为了更好地了解与 FGFR3 受体有关的生长停止的病理状况，例如导致遗传性侏儒-软骨发育不全症、在多发性遗传外生骨疣中持续表达，和在原发性骨关节炎骨赘中的再表达。

10 因此，本发明提供了一种鉴定间充质骨骼祖细胞的方法，它包括：

(a) 在会发生配体-受体结合的条件下，将成纤维细胞生长因子受体 3(FGFR3) 结合剂施用于被分析的细胞或组织上；

(b) 确定那些细胞与该 FGFR3 结合剂发生了结合，该细胞就是间充质骨骼祖细胞。

15 FGFR3 结合剂可以是抗体或成纤维细胞生长因子 9(FGF9)，它应被标记然后施用于被分析的组织，例如施用于关节组织。被标记的那些区域可作为间充质骨骼祖细胞来源。

较佳地，间充质骨骼祖细胞的来源是 La Croix 区域中的软骨膜，而且该区域与滑膜和骨膜接触。

20 本发明方法可出于各种目的，用于在不同组织中(如关节中)，鉴别和确定间充质骨骼祖细胞的位置，例如为了获得间充质骨骼祖细胞的培养物，在体外使它们继续增殖然后再返回体内以刺激软骨和骨头的生长。或者，鉴定出这些细胞便可以将它们从组织部位中去除，以便消除这些干细胞在各种疾病和失调(这些病的特征是未分化的间充质骨骼祖细胞过度活跃)中的过度活跃。此外，通过确定携带
25 FGFR3 的细胞的区域，可以在原位对这些细胞进行操作，如通过向这些细胞的精确位置处施用各种调节剂。这样的试剂可以是稳定 FGFR3 从而维持这些细胞更长时间地处于未分化的增殖状态的试剂，一个例子是 FGF9。或者，这样的试剂可以是使携带 FGFR3 的细胞提早分化，一个例子是 FGF9 拮抗剂。

30 通过利用 FGFR3 是间充质骨骼祖细胞的标记物这一事实，可以第一次从非胚胎材料获得基本纯的这些细胞的培养物。根据本发明方法，通过将 FGFR3 用作标记物，已发现间充质骨骼祖细胞被定位于生长板外周的软骨膜环(La Croix 区域)中。在一生后期关节软骨的自我损伤愈合性差可以下列原因为基础进行解释：在

生长停止时，这些关节区便与其潜在的、位于软骨膜 La Croix 区域的干细胞来源失去了联系。

因此，本发明不仅能够确定间充质骨骼祖细胞的位置，而且还能第一次获得这些细胞基本纯的大量培养物。术语“基本纯的培养物”指培养物基本上由上述定义的术语“间充质骨骼祖细胞”所包括的 4 种细胞类型中的一种或多种细胞构成。

因此，本发明涉及一种从不同来源获得大量间充质骨骼祖细胞的方法，这在下面进行阐述。通过使用对 FGFR3 特异的抗体，或使用该受体的特异配体如 FGF9 配体，可鉴定间充质骨骼祖细胞，并将其与来源中其他细胞相分离。

10 一种获得基本纯的间充质骨骼祖细胞培养物的方法，它包括：

(c)将 FGFR3 结合剂使用于含间充质骨骼祖细胞的细胞源中；和

(d)从该细胞源中仅分离出与 FGFR3 结合的细胞，这些细胞构成基本纯的间充质骨骼祖细胞的培养物。

15 分离可以用手术进行，如用手术刀将那些结合于标记的 FGFR3 结合剂的区域取下；也可用各种细胞分离系统进行，这些细胞分离系统能够将具有特定标记 (FGFR3 结合剂)的各细胞从来源中的非标记的细胞群分离开。

20 用于获得间充质骨骼祖细胞的合适来源是来自关节镜或骨髓活体检查的自身来源。活体检查来源可以是非增殖性的软骨细胞或去分化的成纤维细胞样细胞。细胞来源还可从软骨膜、滑膜或骨膜区域或这些区域接触的位置处获得。只有通过使用特异性的标记物，才有可能将间充质骨骼祖细胞从这些来源中分离出来，因为在组织中这些细胞很少。另外，细胞来源也可以是来自胚胎。

25 从这些来源中获得的间充质骨骼祖细胞可被诱导，从而在适当的生长因子和肝素存在下在活体外进行增殖，然后再输送回体内。或者是以适合维持软骨细胞活力的介质中的药物组合物形式；或者是以植入物的形式被引入到所需的部位，其中间充质骨骼祖细胞处于允许生长的胶质环境中。较佳地，药物组合物和植入物都含有合适的成纤维细胞生长因子，尤其是成纤维细胞生长因子 9，以便刺激这些间充质骨骼祖细胞上的 FGFR3 的活性。

30 本发明的药物组合物或植入物可用于有缺陷的关节软骨的修复和再生，用于治疗软骨发育不全症病人，用于治疗患其他生长障碍疾病的病人和用于治疗预计软骨和骨生长速率差的物理性损伤(physical injuries)。本发明的药物组合物或植入物可用作调控生长板内生长速度的调控手段，以便提高生长速度和/或防止过早的分化；或者用于直接注射到细脊椎的髓核中，以便改善脊椎受伤的愈合情况。如

果需要，可在活体外通过分子工程方法对自身的间充质骨骼祖细胞进行改变，以便在引入所需部位之前具有所需的表达特性。遗传操作的例子有，对野生型 FGFR3 的过度表达进行操作以便替换突变的缺陷受体；或者对显性负突变型 FGFR3 的表达进行操作，以便抑制野生型受体的活性(例如在各种类型的肿瘤病

5 例中)，以及类似的操作。

事实上，本发明方法包括将间充质骨骼祖细胞包埋在粘滞的、允许生长的环境中，通常以透明质酸为基础，从而形成复合的半固态的植入物。将植入物转移至靶定的生长部位例如关节受损伤的部位。或者通过打开关节手术，或者通过关节镜设备，将植入物注入受伤的管腔直至关节表面。然后通过喷射设备形成薄的

10 渗透膜，从而封闭缺陷并保证固定和维持植入物处于可靠位置。

另一方面，本发明基于这样的发现，即 FGFR3 也存在于软骨-骨瘤上，例如良性瘤(如外生骨疣和骨赘)，因此 FGFR3 既可以作为存在这种肿瘤的指示物，还可以作为精确定位这些肿瘤的标记物。因此，本发明还包括在组织或样品中检测软骨-骨瘤的方法，它包括：

15 (i)将测试组织或样品与 FGFR3 结合剂接触；

(ii)检测是否存在与 FGFR3 结合剂结合的细胞，阳性检测结果表明在测试的组织或样品中存在软骨-骨瘤。

检测可用合适的针对 FGFR3 的标记抗体，或用对 FGFR3 特异的标记配体如 FGF9。将该标记的 FGFR3 结合剂在体内施用于组织，不仅能够确定在该组织中

20 是否存在肿瘤，而且还可精确地确定肿瘤的位置，这对于手术切除是有帮助的。

FGFR3 存在于软骨-骨瘤细胞这一事实，还可用于将细胞毒性剂特异性地导向肿瘤部位，即通过将合适的细胞毒性分子连于对 FGFR3 特异的受体如 FGF9 或对 FGF9 特异的抗体上。因此，本发明还涉及治疗软骨-骨瘤的药物组合物，它包括

25 连于细胞毒性分子的 FGFR3 结合剂；还涉及治疗这种肿瘤的方法，即通过将治疗有效量的连于细胞毒性分子的 FGFR3 施用于治疗对象。

细胞毒试剂在本领域是众所周知的，而且该术语在本发明的上下文中指任何能够摧毁软骨衍生或骨衍生肿瘤细胞的试剂。这种试剂的例子有例如氨甲蝶呤、阿霉素(doxombicin)、环磷酰胺等。

还可以通过诱导携带 FGFR3 的细胞发生分化而治疗肿瘤。这可通过向被

30 FGFR3 结合剂标记的区域，引入 FGFR3 分化诱导剂而进行治疗。分化诱导剂的例子是 FGF9 拮抗剂或针对 FGF9 的抗体。

还可以将可削弱野生型 FGFR3 活性的显性负探测剂(detective)FGFR3(如通过

遗传工程)引入肿瘤而进行治疗。

在下面，结合一些不起限定作用的附图和实施例来阐述本发明。

附图的详细描述

5 图 1-用针对 FGFR3 的抗体对豚鼠骨髓切片的组织染色结果。显微照片 1-5 为通过年轻豚鼠骨髓的切片。

1.用 Masson's 三色组织染色剂染色的前后向切片(放大 6 倍)，该染色剂是对结缔组织成分如胶原和原聚糖(proto glycan)的特异染色剂。

2.用针对 FGFR3 的抗体进行免疫组织化学染色的前后向切片(放大 400 倍)。

10 3, 4&5, 轴向切片。

3.对抗体剂 FGFR3 进行的免疫组织化学染色(放大 100 倍);

4.Masson's 三色染剂(放大 25 倍); 和

5.对抗体剂 FGFR3 进行的免疫组织化学染色(放大 400 倍)。

图 2 由显微照片 6-11 构成，它们是 17 天大的鸡胚胎长骨骨髓的前后向切片。

15 显微照片 6、10&11 是采用针对 FGFR3 的抗体的免疫组织化学染色法染色，而显微照片 8 是用对原聚糖特异的 Alcian 蓝 pH 2.5 染色的(注意在某些区域没有被染色)。

这些显微照片的放大倍数如下：6(25 倍); 7(40 倍); 9(100 倍); 10(40 倍); 和 11(100 倍)。

20 7 和 9 用 Masson's 三色染剂染色。

图 3 显示了年轻大鼠的股骨生长情况，其中在长骨生长部周围的软骨膜(prechondrian)环被去除(STRIP); 在软骨膜被暴露但是没有去除的大鼠中股骨的生长情况; 以及在没有任何手术的大鼠(CNTL)中股骨的生长情况。

25 图 4 显示了从关节软骨、骨髓、长骨生长部和软骨膜获得的细胞，在体外生长至形成细胞集落时的天数。

发明详述

材料和方法

(a) 初级软骨细胞培养物:

30 从 11 天大的小鸡胚胎中获得长骨(股骨和胫骨)的骨髓。在解剖之后，组织块在 Tyrod's 溶液中用胰蛋白酶进行处理，然后进行机械打碎，直至获得游离细胞的悬浮液。然后细胞被高浓度(5×10^6)地进行平板培养。

(b) 初级软骨细胞培养物的 PCR 筛选:

当达到汇合时, 收集细胞并用 RNA 纯化试剂盒(三试剂)(Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio)进行裂解。细胞的 RNA 用苯酚进行抽提, 用异丙醇进行沉淀, 然后再悬浮于水中, 通过测量光密度进行定量分析。在获得纯净的 RNA(O.D. 260/280nm>1.5)后, 用反转录酶反应制备 cDNA, 然后筛选是否有成纤维细胞生长因子(FGF)。使用聚合酶链反应(PCR)技术, 采用针对 FGFR3 和 FGF9 的寡核苷酸引物对。变性是在 94 °C, 退火是在 52-65 °C, 延伸是在 72 °C 进行, 重复 35 个循环。

(c) FGF9 的放射标记:

10 如前制备重组的小鼠 FGF9(Hecht, D.等人,Growth factors 12, 223-233(1995)), 通过氯胺 T 法用 Na¹²⁵I(0.5mCi)进行标记, 然后在肝素-琼脂糖凝胶柱与游离的碘分开。比活性的范围为 0.5-2 × 10⁵ cpm/ng。

(d) 免疫组织化学法:

15 脱钙的骨头在用福尔马林和苦味酸固定之后, 将其包埋在液态石蜡中。对石蜡块进行切割和制备, 以用于采用标准方案的免疫组织化学分析。对载玻片进行染色, 其中抗-FGFR3 抗体的效价逐渐上升。

(e) 原位杂交:

20 用 ³⁵S 标记的尿苷, 从重组的含有 FGF9 和 FGFR3 的质粒(Bluescript-Stratagen)中制得 T7(反义探针)和 T3(有义探针)。大小为怀孕后 10.5 天至 18.5 天的小鼠胚胎, 在聚甲醛中固定, 在浓度逐渐上升的乙醇中脱水, 然后包埋在液态石蜡中。切割和制备切片, 然后用标准方法与适当的 RNA 探针进行杂交。

实施例 1

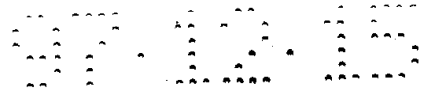
用针对 FGFR3 的抗体进行的组织化学染色

25 如图 1 所示, 被针对 FGFR3 的抗体染色的区域并不对应于被 Masson's 三色染料(它是公认的软骨染色剂)所染色的区域。这些发现表明, 具有 FGFR3 的细胞并不位于软骨本身, 而是在名为 La Croix 沟的这一区域的软骨膜中。

实施例 2

30 年轻大鼠的 La Croix 环的剥离

在 3 个组中每个组有 10 只大鼠。组 1 作为对照组(CNTL)。大鼠被麻醉但是不进行任何手术。组 2(SHAM)作为假手术组, 它们被麻醉并切开软组织暴露出软骨



膜。组 3(STRIP)在环放大(loop magnification)条件下(这样可仅切割软组织而不对长骨生长部本身造成损伤),剥离了长骨生长部周围的软骨膜环。在 4 周后,测量大鼠的平均股骨长度,结果示于图 3。手术的反侧肢体的长度与对照肢体的长度相当(数据未标出)。假手术的肢体表现出肢体长度增加的趋势,这种趋势还未达到统计学的显著状态。被剥离后的肢体显示出肢体生长的停止。这些结果表明,将被 FGFR3-抗体染色的区域去除后会导致肢体长度的停滞,这表明这些区域与正常的生长有关。

实施例 3

10 从 La Croix 环获得的细胞在体外生长

从上述大鼠中取出的 La Croix 区域的软骨膜组织,被置于培养皿中合适的生长培养基中,并测定形成集落所需的时间。与之对比,将从远端股骨的不同部位(关节软骨、骨髓(骨)、长骨生长部)获得的组织在相同的条件下进行培养,也测定形成集落所需的时间。

15 如图 4 所示,从软骨膜取出的组织能快速地形成细胞集落(在培养约 3 天后),而从其他区域取出的组织仅在植入起 10 多天后才形成培养物。这些结果再次表明,从被 FGFR3-抗体染色的区域获得的细胞,比从没有 FGFR3 特征的骨头其他区域获得的细胞生长得更快。

20 实施例 4

在外生骨疣中存在 FGFR3

25 将针对 FGFR3 的抗体施用于从外生骨疣良性瘤获得的组织上。抗体染色了纤维变性组织的细胞,而基本上没有染色软骨细胞(数据未给出)。这些发现表明,FGFR3 存在于软骨-骨衍生的良性瘤(外生骨疣)上,从而可以使用 FGFR3 结合剂(如抗体)来鉴定这些肿瘤以及将细胞毒试剂导向这些肿瘤。该发现还导致可用造成 FGFR3 消失并因而导致分化的试剂(如 FGF9 拮抗剂)来治疗这些肿瘤。

说明书附图

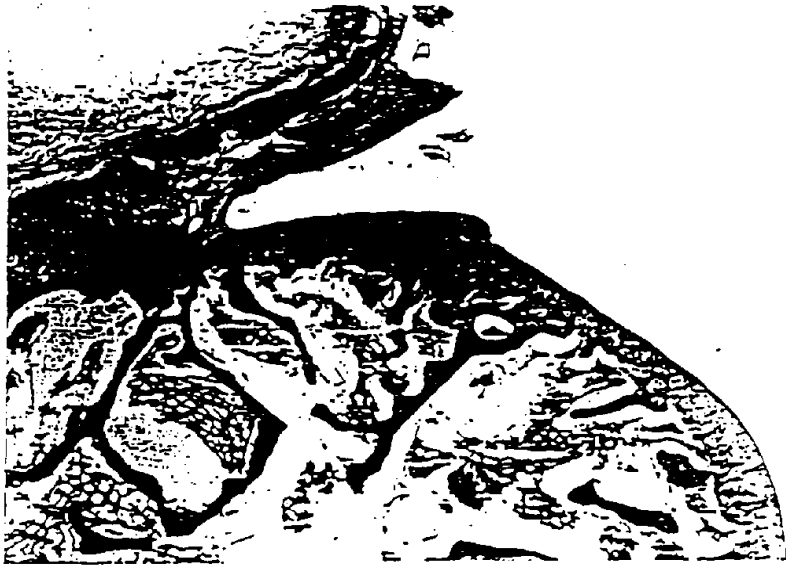


2

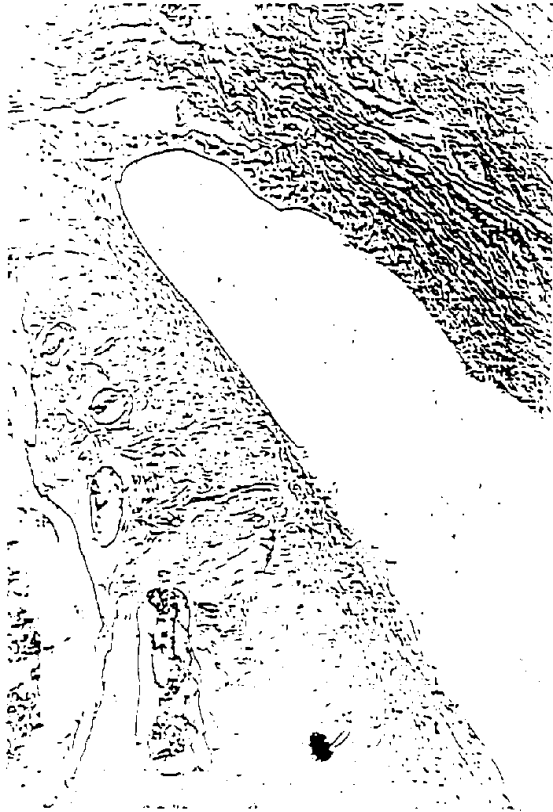
图 1



1



4



3

图 1(续1)



5

图 1(续2)



7

图 2



6



8

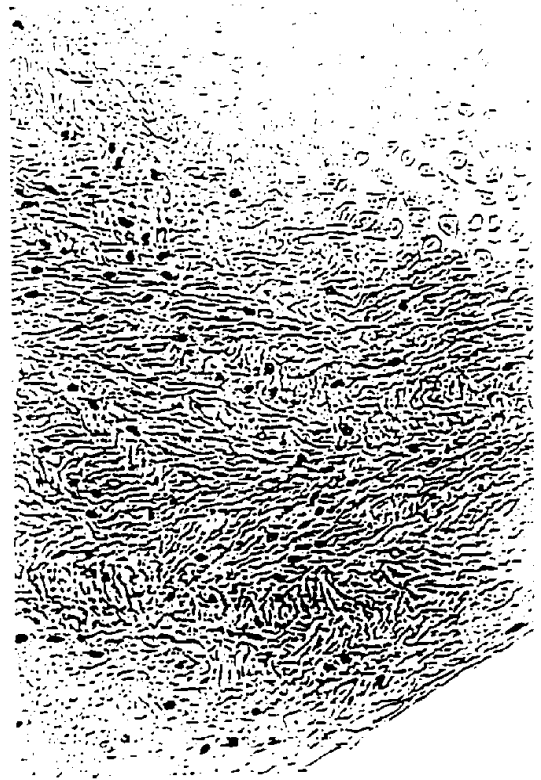


9

图 2(续1)



11



10

图 2(续2)

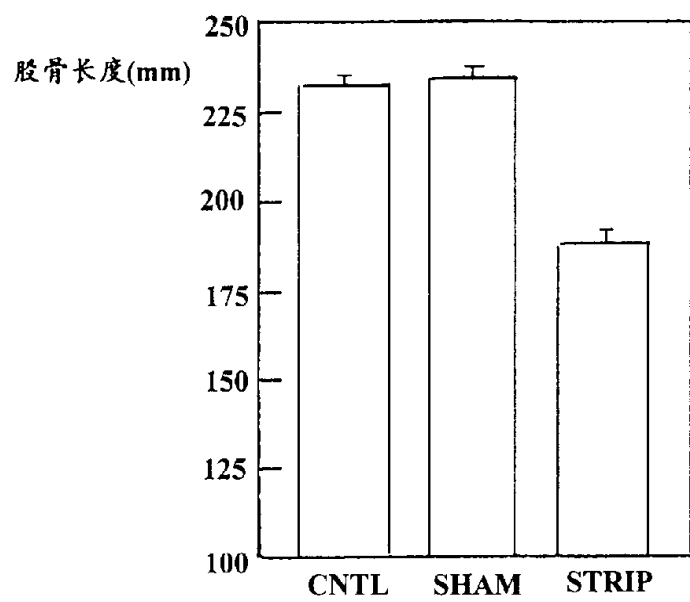


图 3

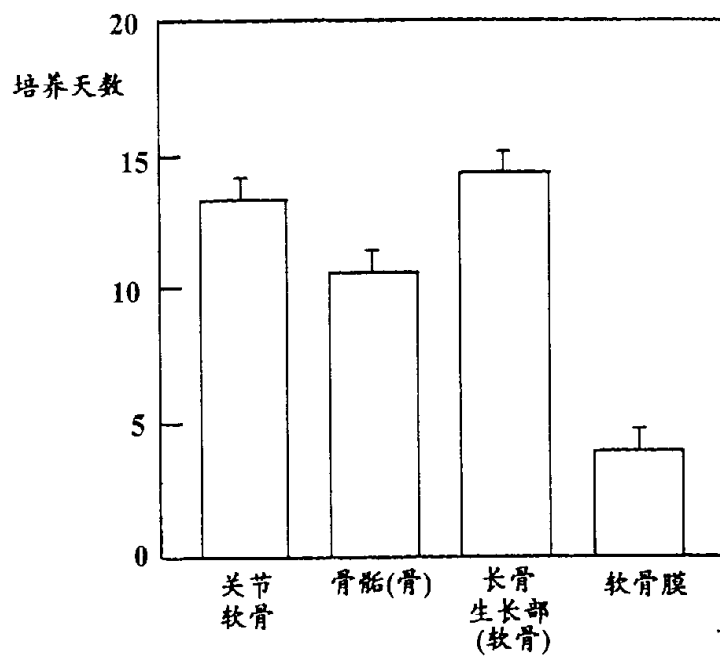


图 4