

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-519922

(P2010-519922A)

(43) 公表日 平成22年6月10日(2010.6.10)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04		4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	S	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号	特願2009-552238 (P2009-552238)	(71) 出願人	509205250
(86) (22) 出願日	平成20年3月7日 (2008.3.7)		スオメン ブナイネン リステイ, ヴェリ
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月5日 (2009.11.5)		パルベル
(86) 国際出願番号	PCT/FI2008/050110		フィンランド共和国 ヘルシンキ エファ
(87) 国際公開番号	W02008/107522		イー00310, キビハーンティ 7
(87) 国際公開日	平成20年9月12日 (2008.9.12)	(71) 出願人	509205261
(31) 優先権主張番号	20070199		グリコス フィンランド リミテッド
(32) 優先日	平成19年3月8日 (2007.3.8)		フィンランド共和国 ヘルシンキ エファ
(33) 優先権主張国	フィンランド (FI)		イー00790, ヴィッキンカーリ 6
		(74) 代理人	100096024
			弁理士 柏原 三枝子
		(74) 代理人	100125520
			弁理士 高橋 剛一
		(74) 代理人	100155310
			弁理士 柴田 雅仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト細胞の新規の酸性グリカンマーカ

(57) 【要約】

本発明はいくつかの型のヒト細胞の新規の酸性グリカンマーカの分析に関する。当該分析は質量分析法又は特異的な結合剤分子によって行われる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化学構造の量及び存在を分析することによって、ヒト幹細胞又はその状態を分析する方法であって、

- a . 好ましくはタンパク質上の 1 の N - アセチルラクトサミン、又は、
- b . G D 3 ガングリオシドの 1 のラクトース残基、

につき少なくとも 2 のシアル酸残基を含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、前記細胞の状態が、前記細胞の分化、細胞型、又はコンタミネーションに関して分析されることを特徴とする方法。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、前記シアル酸が Neu G c、Neu A c、又は Neu - O A c であり、N - アセチルラクトサミンが Gal 3 / 4 G l c N A c であることを特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、シアル酸がジシアル酸の Neu X Neu X エピトープを形成し、X が A c 又は G c、好ましくは A c であり、更に「ジシアル酸」非還元末端エピトープと見なされることを特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の方法において、

20

a 1) タンパク質及び / 又は N - アセチルラクトサミンエピトープ上にある、特に、間葉、胚性、又は造血幹細胞の分析用の Neu N A c 8 Neu N A c 3 G a l、及び / 又は、

a 2) ガングリオ系列ガングリオシド G D 3 上にある、特に造血又は間葉細胞の分析用の Neu N A c 8 Neu N A c 3 G a l、
として、Neu N A c 8 Neu N A c 3 G a l エピトープが認識され、前記ジシアル酸エピトープが提供されることを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の方法において、タンパク質及び / 又は N - アセチルラクトサミンエピトープ上の Neu N A c 8 Neu N A c 3 G a l として、Neu N A c 8 Neu N A c 3 G a l エピトープが認識され、前記ジシアル酸エピトープが提供されることを特徴とする方法。

30

【請求項 7】

請求項 4 に記載の方法において、前記分析が質量分析法を用いることによって、又は前記エピトープを認識する特異的な結合物質 / 結合剤を用いることによって行われることを特徴とする方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法において、前記結合剤が S 2 - 5 6 6 抗体であることを特徴とする方法。

【請求項 9】

請求項 7 に記載の方法において、前記抗体が造血幹細胞又は分化した間葉細胞の認識用に用いられることを特徴とする方法。

40

【請求項 10】

請求項 7 に記載の方法において、前記結合剤が G D 3 ガングリオシド抗体、又は O A c G D 3 認識抗体であることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項 7 に記載の方法において、前記抗体が造血幹細胞又は分化した間葉細胞の集団の認識用に用いられることを特徴とする方法。

【請求項 12】

請求項 6 に記載の方法において、請求項 7 及び 9 に記載の前記抗体が同時に用いられる

50

ことを特徴とする方法。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が「非直鎖状にジシアル酸付加された」N - アセチルラクタミンであり、Gal の三位に一方のシアル酸、及び GlcNAc の六位に他方のシアル酸を含むことを特徴とする方法。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が NeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAc 上にあり、X が Ac 又は Gc であることを特徴とする方法。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法において、前記化学構造が細胞のコンタミネーションに関する細胞の分析用に用いられ、前記化学構造が選択的に NeuGc を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 16】

分析用抗体の選択又は生成のための、請求項 1 ないし 6 又は 14 のいずれか 1 項に記載の化学構造の使用であって、間葉、造血幹細胞、及びその直接的に分化した細胞の精製を含むことを特徴とする使用。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の使用において、前記エピトープの化学構造が請求項 1 ないし 6 又は 14 のいずれか 1 項に記載の型の N - アセチルラクタミンと、間葉、胚性、又は造血幹細胞からの細胞表面タンパク質のポリペプチドとを含むことを特徴とする使用。

20

【請求項 18】

請求項 16 又は 17 に記載の使用において、前記エピトープが固相に固定化されるか、あるいは観察可能なタグで標識されることを特徴とする使用。

【請求項 19】

請求項 16 又は 17 に記載の使用において、前記エピトープがファージディスプレイライブラリ又は免疫の選択用に用いられることを特徴とする使用。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が式 $C : S_k H_n N_p F_q$ に従い、好ましくは N - 単糖組成を有する N - グリカンであり、k が 2 ないし 5 の整数であり、n が 3 ないし 6 の整数であり、p が 3 ないし 5 の整数であり、q は 0 又は 1 となる整数であり、S が Neu5Ac 及び / 又は Neu5Gc であり、H が D - Man 又は D - Gal の群から選択される六炭糖であり、N が N - D - アセチルヘキソサミン、好ましくは GlcNAc 又は GalNAc、より好ましくは GlcNAc であり、F が L - フコースであることを特徴とする方法。

30

【請求項 21】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が 1 のジシアル酸付加された N - アセチルラクタミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が式 NeuAc₄NeuAc₄Gal₄GlcNAc に従う 1 のジシアル酸付加された N - アセチルラクタミンを含むことを特徴とする方法。

40

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法において、前記ジシアル酸付加された N - アセチルラクタミンが NeuAc₄NeuAc₃Gal₄GlcNAc、NeuAc₄NeuAc₃Gal₄GlcNAc、NeuAc₈NeuAc₃Gal₄GlcNAc、及び / 又は NeuAc₈NeuAc₆Gal₄GlcNAc であることを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の方法において、N - グリカンの化学構造が、式 OS1 : (NeuAc)_mGal₁(Fuc_{3/4})_{n-1}GlcNAc₂Man₃([Man₆])_n

50

2) Man₄GlcNAc₄(Fuc₆)_{n3}GlcNAcの式に従い、n₁、n₂、及びn₃が0又は1の整数であり、ただし、n₁が0の場合はn₃は1、n₁が1の場合はn₃は0とするか、あるいはn₁及びn₃の双方が0とし、mが2又は3の整数であることを特徴とする方法。

【請求項25】

請求項1に記載の方法において、前記化学構造が式NeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAcに従う1のジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンを含み、XがAc又はGcであることを特徴とする方法。

【請求項26】

請求項10に記載の方法において、前記化学構造が組成S₂G₁H₅N₄及び/又はS₁G₂H₅N₄を有し、SがNeu₅Acであり、GがNeu₅Gcであり、HがD-Manの群から選択される六炭糖であり、NがN-D-アセチルヘキソサミン、好ましくはGlcNAc又はGalNAc、より好ましくはGlcNAcであることを特徴とする方法。

10

【請求項27】

請求項1に記載の方法において、N-グリカンの化学構造が式(NeuX_{m1})Gal₁GlcNAc₂Man₃([NeuX_{m2}]Gal₁GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAcに従い、XがGcかAcかのいずれかであり、ただし、少なくとも1のGc又はAcが分子中にあり、GcとAcの双方がジシアル酸エピトープ中にありうるとし、m₁が2かつm₂が1であるか、あるいはm₂が2かつm₁が1であり、シアル酸残基がGalに₃又は₆結合されるか、GlcNAcに₆結合されるか、あるいは、互いに₈又は₉結合され、前記Gal残基が₃及び/又は₄結合されることを特徴とする方法。

20

【請求項28】

請求項1に記載の方法において、N-グリカンの化学構造が式NeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAc₂Man₃(NeuX_{Gal₃GlcNAc₂Man₆)Man₄GlcNAc₄GlcNAc、及び/又は、他の分枝異性体NeuX_{Gal₃GlcNAc₂Man₃/6}(NeuX_{Gal₃(NeuX₆)GlcNAc₂Man₆/3})Man₄GlcNAc₄GlcNAcに従うことを特徴とする方法。}

30

【請求項29】

請求項1に記載の方法において、グリカンが組成S₂H₄N₅F₁を有することを特徴とする方法。

【請求項30】

請求項1に記載の方法において、分化する細胞又は細胞型における差異が分析されることを特徴とする方法。

【請求項31】

請求項1に記載の方法において、前記幹細胞がヒト造血幹細胞、胚性幹細胞、又は間葉幹細胞の群から選択されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

[概要]

本発明は、いくつかの型のヒト細胞の新規の酸性グリカンマーカの分析に関する。当該分析は、質量分析法又は特異的な結合剤分子によって行われる。

【背景技術】

【0002】

本発明は、ある好ましい様態においては、ジシアル酸エピトープに関し、2のシアル酸残基が、糖脂質の化学構造上、特にガングリオ系列ガングリオシドGD₃上にあり、異なる変異体を伴うNeuNAc₈NeuNAc₃Galを有する「ジシアル酸(dis

50

ialic acid)」のような、末端部の非還元末端エピトープ中で互いに結合され、「ganglio disialic acid）」と見なされ、ある好ましい様態においては、ほとんど未知で希少なエピトープがタンパク質及び/又はN-アセチルラクタミンの化学構造に結合され、「タンパク質/LacNAcジシアル酸 (protein/LacNAc disialic acid)」と見なされる。これらの化学構造は化学的に異なり、異なる方法で別個に細胞を特徴づける。本発明は好ましくは、造血又は間葉幹細胞、及びその分化した細胞のコンテキストにおけるGD3認識抗体の使用、あるいは、タンパク質及び/又はN-アセチルラクタミン上のジシアル酸エピトープを認識する異なる抗体を同時に用いる、ganglio系列の特異的なGD3抗体の使用に関する。糖鎖付加の細胞型特異性のため、胚性幹細胞上に同定されるグリカンは、造血又は間葉幹細胞の糖鎖付加を予言しない。

10

【0003】

バックグラウンドにおける異なる分鎖型糖脂質エピトープGD2はNeuNAc₈NeuNAc₃(GalNAc₄)Galの糖脂質であり、特定の間葉幹細胞の調製時に認識されうる。これは異なる非還元末端の化学構造であり、本発明は特に抗体に関するものであり、交差反応しないか、あるいは、この化学構造を用いた非常に低い反応性を有していることは理解される。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、ジシアル酸付加された異常なエピトープの量及び存在を分析することによって、以下の末端部の非還元末端化学構造を含むヒト幹細胞、好ましくはヒト造血幹細胞、胚性幹細胞、又は間葉幹細胞と、それから得られる分化細胞とを分析する方法に関する。

20

a)ある好ましい様態においては、XはAc又はGc、好ましくはAcであり、更に、「ジシアル酸」エピトープと見なされるNeuX₂NeuXエピトープ、より好ましくはNeuNAc₈NeuNAc₃Galエピトープ、更により好ましくは、ジシアル酸エピトープがN-アセチルラクタミン上に提供される。本発明は、特に以下の2のサブタイプのNeuNAc₈NeuNAc₃Galエピトープと、これらを認識する試薬とに関する。

a1)タンパク質及び/又はN-アセチルラクタミンエピトープ上のNeuNAc₈NeuNAc₃Galは、「タンパク質/LacNAcジシアル酸」と見なされる。「タンパク質/LacNAcジシアル酸」の検出は特に、造血幹細胞及びその分化細胞のコンテキストにおいて好ましい。

30

a2)ganglio系列ganglioシドGD3上のNeuNAc₈NeuNAc₃Galは、「ganglio系ジシアル酸」と見なされる。「ganglio系ジシアル酸」は特に、間葉幹細胞、好ましくは臍帯血由来、及びより好ましくは、その骨原性又は脂肪生成方向へ分化する細胞のコンテキストにおいて好ましい。

b)本発明は更に、Galの三位に一方のシアル酸、及びGlcNAcの六位に他方のシアル酸を含む「非直鎖状にジシアル酸付加された」N-アセチルラクタミンに関し、エピトープはNeuX₂Gal₃(NeuX₆)GlcNAc上にあり、XはAc又はGcである。

40

【0005】

ある好ましい様態においては、本発明は脂質又はタンパク質に結合されたジシアル酸付加されたエピトープの分析に関する。

【0006】

ある好ましい様態においては、ジシアル酸付加されたN-アセチルラクタミンはタンパク質に結合される。

【0007】

分析は、質量分析法、及び/又は、「タンパク質/LacNAcジシアル酸」及び/又は「ganglio系ジシアル酸」のような標的グリカンを認識する特異的な結合物質を用いることによって行われる。質量分析的なプロファイリングは正確な化学構造とは別個の、

50

ジシアル酸付加された化学構造を含む異常な化学構造を明らかにでき、定量的で特異的な単糖組成の量は、特定の幹細胞クラス及び/又はその分化細胞に特徴づけられることが理解される。本発明は、末端部のジシアル酸付加されたエピトープを認識する特異的な結合剤分子によって、ジシアル酸付加された化学構造が認識できることを更に明らかにした。特に、化学構造がタンパク質結合されたグリカン上で認識された場合に、これらはS2-566(生化学工業株式会社)を含んだ。

【0008】

分析すべき好ましい型のN-グリカンは、式 $C : S_k H_n N_p F_q$ に従う好ましいN-単糖組成を有し、kは2ないし5の整数であり、nは3ないし6の整数であり、pが3ないし5の整数であり、qは0又は1となる整数であり、SはNeu5Ac及び/又はNeu5Gcであり、HはD-Man又はD-Galの群から選択される六炭糖であり、NはN-D-アセチルヘキソサミン、好ましくはGlcNAc又はGalNAc、より好ましくはGlcNAcであり、FはL-フコースである。

10

【0009】

本方法は、ある好ましい様態においては、N-グリカンに関し、N-グリカンは1のジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンを含み、好ましくはN-グリカンは式 $NeuAc\ NeuAc\ Gal\ 4GlcNAc$ に従う1のジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンエピトープを含む。

【0010】

ジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンエピトープはある好ましい様態においては、好ましくは $NeuAc\ NeuAc\ 3Gal\ 4GlcNAc$ 又は $NeuAc\ NeuAc\ 6Gal\ 4GlcNAc$ 、更により好ましくは $NeuAc\ 8NeuAc\ 3Gal\ 4GlcNAc$ を含むジシアル酸エピトープである。

20

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、異なるGD3抗体でのCD34陽性及び陰性細胞のFACS染色の結果である。異なる抗ジシアル酸抗体での陽性染色を有するCD34+及びCD34-細胞の割合が示される。抗体は品番MAB4308のChemicon社のVIN-IS-56、品番554274のBD Pharmingen社のMB3.6、品番mab0014のCovab社社の4F6、及び生化学工業株式会社のS2-566(品番270554)であった。

30

【図2】図2は、GD3抗体での臍帯血由来の造血幹細胞のFACS染色の結果である。抗GD3のS2-566(生化学工業株式会社、品番270554)での陽性染色を有するCD34及びCD133陽性細胞、ならびにCD34及びCD133陰性細胞の割合が示される。

【図3】図3は、異なるGD3抗体での間葉幹細胞(MSC)、ならびに骨形成上分化された(OG)、及び脂肪生成上分化された(AG)細胞のFACS染色の結果である。間葉幹細胞は骨髓(A)又は臍帯血(B)のいずれかから得られた。異なる抗ジシアル酸抗体での陽性染色を有する細胞の割合が示される。抗体は品番MAB4308のChemicon社のVIN-IS-56、品番554274のBD Pharmingen社のMB3.6、品番mab0014のCovab社社の4F6、生化学工業株式会社のS2-566(品番270554)、及び品番G2005-67の米国Biological社の4i283であった。

40

【図4】図4は、抗体S2-566(生化学工業株式会社、品番270554)での、骨髓(BM)及び臍帯血(CB)からの、間葉幹細胞(MSC)、ならびに骨形成上分化された(OG)及び脂肪生成上の(AG)分化中の/分化した細胞のFACS分析である。

【図5】図5は、幹細胞命名法である。

【図6】図6は、抗ジシアル酸抗体による造血幹細胞ライセートの免疫プロットである。CD34+及びCD34-細胞の細胞ライセートはS2-566(生化学工業株式会社、品番270554)及びVIN-IS-56(Chemicon社、品番MAB4308

50

)でプロットされ、可視化した検出タンパク質が示される。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、ジシアル酸付加された異常なエpiteープの量及び存在を分析することによって、以下の末端部の非還元末端化学構造を含むヒト幹細胞と、それから得られる分化細胞とを分析する方法に関する。

a)ある好ましい様態においては、XはAc又はGc、好ましくはAcであり、更に、「ジシアル酸」エpiteープと見なされるNeuX NeuXエpiteープ、より好ましくはNeuNAc 8NeuNAc 3Galエpiteープ、更により好ましくは、ジシアル酸エpiteープがN-アセチルラクトサミン上に提供される。本発明は、特に以下の2のサブタイプのNeuNAc 8NeuNAc 3Galエpiteープと、これらを認識する試薬とに関する。

a1)タンパク質及び/又はN-アセチルラクトサミンエpiteープ上のNeuNAc 8NeuNAc 3Galは、「タンパク質/LacNAcジシアル酸」と見なされる。「タンパク質/LacNAcジシアル酸」の検出は特に、造血幹細胞及びその分化細胞のコンテキストにおいて好ましい。

a2)ガングリオ系列ガングリオシドGD3上のNeuNAc 8NeuNAc 3Galは、「ガングリオ系ジシアル酸」と見なされる。「ガングリオ系ジシアル酸」は特に、間葉幹細胞、好ましくは臍帯血由来、及びより好ましくは、その骨原性又は脂肪生成方向へ分化する細胞のコンテキストにおいて好ましい。

b)本発明は更に、Galの三位に一方のシアル酸、及びGlcNAcの六位に他方のシアル酸を含む「非直鎖状にジシアル酸付加された」N-アセチルラクトサミンに関し、エpiteープはNeuX 3Gal 3(NeuX 6)GlcNAc上にあり、XはAc又はGcである。

【0013】

ある好ましい様態においては、本発明は脂質又はタンパク質に結合されたジシアル酸付加されたエpiteープの分析に関する。

【0014】

ある好ましい様態においては、ジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンはタンパク質に結合される。

【0015】

ある好ましい様態においては、ジシアル酸付加されたエpiteープは、a)1のN-アセチルラクトサミンにつき少なくとも2のシアル酸残基を含み、シアル酸がNeuGc又はNeuAcであり、N-アセチルラクトサミンがGal 3/4GlcNAcである場合に、好ましくは1のジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンユニットを、末端部の非還元末端のジシアル酸付加された化学構造に関連する好ましい様態においては、ジシアル酸又は、非直鎖状にジシアル酸付加されたN-アセチルラクトサミンを含むN-グリカン、b)タンパク質によって、アスパラギンと還元末端部のN-グリカンのGlcNAcとの間の正常な結合を切断するN-グリコシダーゼ酵素を構成すべく、異常な基幹化学構造上に2のシアル酸を有する、N-グリカン又は同様の大きさのオリゴ糖を含むN-グリカン型の化学構造、である。b)の群は異常なエpiteープを含み、NeuX 3末端を有する化学構造に位置的な分枝を示す、3結合のシアル酸に主に特異的な型のシアリダーゼ酵素によって切断可能な2のシアル酸残基を含む。

【0016】

[ジシアル酸エpiteープ及びこれらを認識する結合剤]

好ましい脂質結合したNeuX NeuXエpiteープは、GD3ガングリオシド上にNeuX 8NeuX 3Galエpiteープを含み、NeuX 8NeuX 3Gal 4Glc Cerの化学構造を有し、XはAc又はGcにできる。GD3ガングリオシドは特に、造血幹細胞及び/又は間葉幹細胞、ならびにその分化細胞のキャラクタリゼーション用として好ましい。タンパク質及び/又はN-アセチルラクトサミンに結合されたエpite

10

20

30

40

50

トープ Neu X₈ Neu X₃ Gal (GlcNAc) は、基幹にグルコース残基を含む糖脂質エピトープ Neu X₈ Neu X₃ Gal 4 Glc Cer と別個に、細胞を特徴づけることが明らかにされた。

【 0017 】

[ジシアル酸 N - アセチルラクトサミンエピトープ]

ジシアル酸付加された N - アセチルラクトサミンエピトープは、ある好ましい様態においては、好ましくは Neu Ac Neu Ac 3 Gal 4 GlcNAc 又は Neu Ac Neu Ac 6 Gal 4 GlcNAc、更により好ましくは Neu Ac 8 Neu Ac 3 Gal 4 GlcNAc を含むジシアル酸エピトープである。

【 0018 】

本発明は更に、特に化学構造が Neu Ac 8 Neu Ac 3 Gal GlcNAc、好ましくは Neu Ac 8 Neu Ac 3 Gal 4 GlcNAc のような N - アセチルラクトサミン上で、好ましくはタンパク質上で認識される場合に、末端部のジシアル酸付加されたエピトープを認識する特異的な結合剤分子によって認識されうることを明らかにした。好ましい結合剤は特に化学構造が Neu Ac 8 Neu Ac 3 Gal GlcNAc、好ましくは Neu Ac 8 Neu Ac 3 Gal 4 GlcNAc のような N - アセチルラクトサミン上で、好ましくはタンパク質上で認識される場合に、抗体 S2 - 566 (生化学工業株式会社) を含む。

【 0019 】

[ガングリオ系及びタンパク質 / LacNAc のジシアル酸の結合剤の組合せ使用]

ある好ましい様態においては、本発明は特異的なジシアル酸認識抗体の組合せの使用に関し、第 1 の抗体は好ましくは特異的又は排他的に、タンパク質及び / 又はラクトサミンに結合したエピトープ Neu X₈ Neu X₃ Gal (GlcNAc)、好ましくは Neu X₈ Neu X₃ Gal (GlcNAc) を認識でき、第 2 の抗体は、タンパク質及び / 又はラクトサミンに結合したエピトープではない、糖脂質上の、好ましくは GD3 上のエピトープ Neu X₈ Neu X₃ Gal を特異的又は排他的に認識する特異性を有する。

【 0020 】

[排他的及び二重特異性のタンパク質 / LacNAc 及びガングリオ系のジシアル酸結合抗体]

異なるエピトープは「タンパク質 / LacNAc ジシアル酸」と「ガングリオ系ジシアル酸」の結合抗体間で観察されうることは理解される。ある好ましい様態においては、本発明は排他的な特異性を有する方法及び結合剤試薬に関する。

【 0021 】

ある好ましい様態においては、本発明は排他的な「ガングリオ系ジシアル酸」に特異的な結合剤に関し、抗体のような結合剤は「ガングリオ系ジシアル酸」に結合されるが、タンパク質又は N - アセチルラクトサミンに結合したエピトープを認識しない。

【 0022 】

ある好ましい様態においては、本発明は排他的な「タンパク質 / LacNAc ジシアル酸」に特異的な結合剤に関し、抗体のような結合剤は「タンパク質 / LacNAc ジシアル酸」に結合されるが、「ガングリオ系ジシアル酸」エピトープを認識しない。

【 0023 】

本発明は更に、二重特異性の抗体に関し、抗体は「ガングリオ系ジシアル酸」エピトープと、「タンパク質 / N - アセチルラクトサミンジシアル酸」エピトープとの双方を認識できる。

【 0024 】

[特異的な結合剤及び / 又は質量分析法による分析]

分析は、質量分析法、及び / 又は、特異的なグリカン結合物質を用いることによって好ましくは行われる。質量分析的なプロファイリングは正確な化学構造とは別個の、ジシアル酸付加された化学構造を含む異常な化学構造を明らかにでき、定量的で特異的な単糖組

10

20

30

40

50

成の量は、細胞に特徴づけられることが理解される。

【0025】

[好ましいN - グリカン化学構造]

分析すべき好ましい型のN - グリカンは、式 $C : S_k H_n N_p F_q$ に従う好ましいN - 単糖組成を有し、kは2ないし5の整数であり、nは3ないし6の整数であり、pが3ないし5の整数であり、qは0又は1となる整数であり、SはNeu5Ac及び/又はNeu5Gcであり、HはD - Man又はD - Galの群から選択される六炭糖であり、NはN - D - アセチルヘキソサミン、好ましくはGlcNAc又はGalNAc、より好ましくはGlcNAcであり、FはL - フコースである。

【0026】

本方法は、ある好ましい様態においては、N - グリカンに関し、N - グリカンは1のジシアル酸付加されたN - アセチルラクトサミンを含み、好ましくはN - グリカンは、式 $NeuAc - NeuAc - Gal - 4GlcNAc$ に従う1のジシアル酸付加されたN - アセチルラクトサミンエピトープを含む。化学構造用の好ましい結合剤は抗体S2 - 566 (生化学工業株式会社)と同様の特異性を有する抗体を含む。

【0027】

N - グリカンの化学構造は、式 $OS1 : (NeuAc)_m Gal - (Fuc_{3/4})_{n1} - GlcNAc - 2Man - 3([Man_6]_{n2}) - Man - 4GlcNAc - 4(Fuc_6)_{n3} - GlcNAc$ の式に従い、n1、n2、及びn3は0又は1の整数であり、ただし、n1が0の場合はn3は1、n1が1の場合はn3は0とするか、あるいはn1及びn3の双方が0とし、mが2又は3の整数であることを特徴とする。

【0028】

より好ましくは、N - グリカンの化学構造は、式 $(NeuAc)_m Gal - GlcNAc - 2Man - 3([Man_6]_{n2}) - Man - 4GlcNAc - 4(Fuc_6)_{n3} - GlcNAc$ に従い、変数は式OS1に記載されたものと同様であり、更により好ましくは、 $NeuAc - NeuAc - Gal - GlcNAc - 2Man - 3([Man_6]_{n2}) - Man - 4GlcNAc - 4(Fuc_6)_{n3} - GlcNAc$ に従い、変数は式OS1に記載されたものと同様である。

【0029】

[ジシアル酸付加されたN - アセチルラクトサミンエピトープ $NeuX - 3Gal - 3(NeuX - 6)GlcNAc$]

別個の様態においては、N - グリカンは式 $NeuX - 3Gal - 3(NeuX - 6)GlcNAc$ に従う1のジシアル酸付加されたN - アセチルラクトサミンエピトープを含み、XはAc又はGcであり、好ましくはN - グリカンは組成 $S_2G_1H_5N_4$ 及び $S_1G_2H_5N_4$ を有する。より好ましくは、N - グリカンの化学構造は、式 $(NeuX)_m - 1Gal - GlcNAc - 2Man - 3([NeuX]_{m2} - Gal - GlcNAc - 2Man - 6) - Man - 4GlcNAc - 4GlcNAc$ に従い、XはGcかAcかのいずれかであり、ただし、少なくとも1のGc又はAcが分子中にあり、GcとAcの双方がジシアル酸エピトープ中にありうるとし、m1が2かつm2が1であるか、あるいはm2が2かつm1が1であり、シアル酸残基はGalに3又は6結合されるか、GlcNAcに6結合されるか、あるいは、互いに8又は9結合される。Gal残基は3及び/又は4結合される。

【0030】

より好ましくは、N - グリカンの化学構造は、式 $NeuX - Gal - 3(NeuX - 6)GlcNAc - 2Man - 3(NeuX - Gal - 3GlcNAc - 2Man - 6) - Man - 4GlcNAc - 4GlcNAc$ 、及び/又は、他の分枝異性体 $NeuX - Gal - 3GlcNAc - 2Man - 3(NeuX - Gal - 3(NeuX - 6)GlcNAc - 2Man - 6) - Man - 4GlcNAc - 4GlcNAc$ に従う。

【0031】

[組成 $S_2H_4N_5F_1$ を有するジシアル酸付加されたグリカン]

10

20

30

40

50

本発明は更に、ジシアル酸付加されたグリカンに関し、組成 $S_2H_4N_5F_1$ を有し、好ましくはグリカンは式 $GlcNAc \{ (NeuAc)_2GalGlcNAc_2Man_3(GlcNAc_2Man_6)[GlcNAc]Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)GlcNAc \}$ 、又は $(NeuAc)_2GalGlcNAc_2Man_3(GlcNAc_2Man_6)[GlcNAc_4]Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)GlcNAc$ 、又は $(NeuAc)_2GalGlcNAc_2Man_3(GalNAcGlcNAc_2Man_6)Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)GlcNAc$ 、又は $NeuAcGalGlcNAc_2Man_3(NeuAcGalNAcGlcNAc_2Man_6)Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)GlcNAc$ に従う化学構造を有する。

10

【0032】

[好ましい細胞型]

分析すべき好ましい細胞は、幹細胞及びこれらから分化する細胞を含む。好ましい幹細胞はヒト造血幹細胞、胚性幹細胞、又は間葉幹細胞の群から選択され、好ましい細胞は直接的にそれから得られる。好ましくは、造血細胞及び間葉幹細胞は臍帯血又は骨髄由来のヒト細胞である。

【0033】

[細胞の状態の分析]

本発明は特に、

- a) 細胞の分化状態、及び/又は、
 - b) 幹細胞と幹細胞から分化した細胞型との間で分析されうる好ましい様態においては、分化の分析が分化状態及び細胞型状態の双方の分析を含む、細胞型における差異、及び/又は、
 - c) 好ましくは、細胞培養又は精製試薬による抗原性又は免疫原性の炭水化物のような外来性物質の炭水化物の効果に関するコンタミネーション状態、
- を好ましくは含む、幹細胞の状態の分析に関する。

20

【0034】

特異的な様態においては、本発明はジシアル酸付加された化学構造の分析による、幹細胞の調製中のコンタミネーションの分析に関し、好ましくは特徴的なジシアル酸付加されたエピトープの分析と、ジシアル酸付加されたエピトープ中の異常なシアル酸、好ましくは $NeuGc$ の存在の分析とを好ましくは含む。本明細書で、用語「コンタミネーション (contamination)」は更に、外来性物質によるコンタミネーションの危険性を含み、コンタミネーションの分析は更に、本発明による細胞での使用を目的とした細胞培養物質のような外来性物質によるコンタミネーションの危険の分析を含む。

30

【0035】

ある好ましい様態においては、 $NeuGc$ のコンタミネーションは非ヒト性物質のような外来性物質の炭水化物、好ましくは、動物性細胞 (フィーダ細胞を含む) のような動物性 (本明細書では非ヒト動物とする) 物質、あるいは、糖タンパク質、単糖、オリゴ糖、グリカン、又は糖脂質のような動物性物質由来の細胞培養物質と接触中である細胞から分析される。ある好ましい様態においては、タンパク質に関連するコンタミネーションが分析され、本発明による細胞の糖タンパク質、及び/又は外来性物質の糖タンパク質の分析を含む。別個の好ましい様態においては、糖脂質に関連するが分析され、本発明による細胞の糖脂質、及び/又は外来性物質の糖脂質の分析を含む。

40

【0036】

ある好ましい様態においては、細胞の分化及び/又は細胞型状態、ならびにコンタミネーション状態が分析される。

【0037】

[少なくとも1のN-アセチルラクタミン残基を含む新規のオリゴシアル酸付加されたN-グリカン]

本発明は、N-アセチルラクタミン又は1のジシアル酸付加されたN-アセチルラク

50

トサミンユニットにつき少なくとも2のシアル酸残基を含む、幹細胞及び対応する分化細胞による新規のオリゴシアル酸付加されたN-グリカン化学構造を明らかにした。ある好ましい様態においては、グリカンは1のN-アセチルラクトサミン残基のみを含む、単分岐型グリカンである。幹細胞は好ましくはヒト幹細胞である。

【0038】

本発明はN-アセチルラクトサミン及びグリカンを含む2のシアル酸残基が、多数の型の幹細胞及び造血性、胚性及び間葉幹細胞を含むその派生物のキャラクタリゼーション用に有用であることを明らかにした。

【0039】

[好ましい末端部の(NeuAc)₂GalGlcNAcエピトープ]
LacNAcジシアル酸である(NeuAc)₂GalGlcNAcエピトープは
1)シアル酸が好ましくは8及び/又は9結合、より好ましくは8結合によって互いに結合される、ジシアル酸化学構造と、
2)シアル酸が1型のN-アセチルラクトサミン化学構造：NeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAc中のGal及びGlcNAcに結合され、XがGc及び/又はAcである非直鎖状にジシアル酸付加された化学構造と、
の2の型の末端部化学構造に対応する。

10

【0040】

[好ましい末端部のNeuAc₂Gal₄GlcNAcエピトープ]
例えば、特異的な4ガラクトシダーゼ(例えば、肺炎球菌ガラクトシダーゼ)の消化によって観察可能な、2型のN-アセチルラクトサミンは胚性幹細胞のN-グリカン中の主要なグリカン型であり、従って、発明はより好ましくは、特にS₂/H₃N₄F₀/1(例えば、式)中にある化学構造(例えば、以下のような式OS₃): NeuAc₂NeuAc_{3/6}Gal₄GlcNAc、NeuAc₈NeuAc_{3/6}Gal₄GlcNAc、更に好ましくはNeuAc₈NeuAc₃Gal₄GlcNAc、のオリゴシアル酸エピトープに対応する、末端部のエピトープの化学構造に関することが理解される。これらの化学構造は胚性幹細胞で見られるS₂H₃N₃/4F₁の化学構造、並びに、相同的な造血細胞のS₂/H₃N₄F₀/1の化学構造、間葉型細胞で見られるS₂H₃N₃/4F₀/1の化学構造、及び胚性幹細胞のS₂H₄N₅F₁の化学構造を含更なる末端部の末端部GlcNAcが特に好ましい。

20

30

【0041】

[好ましい末端部のNeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAcエピトープ]
ある好ましい様態においては、本発明は1型のN-アセチルラクトサミン化学構造：NeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAcに関し、二分岐型グリカンを含むNeuGcに関し、特に胚性幹細胞のN-グリカンを含むNeuGcのコンテキストにおいて、XはGc及び/又はAcであり、好ましくはX群のうちの少なくとも1つはGcである。

【0042】

[単糖組成及び質量分析シグナル]

幹細胞のグリコーム中のオリゴシアル酸付加された化学構造の好ましい群は、以下の質量分析シグナルに対応するグリカン:

40

m/z 1694でのシグナル(S₂H₃N₃)、
m/z 1840でのシグナル(S₂H₃N₃F₁)、
m/z 1856でのシグナル(S₂H₄N₃)、
m/z 2002でのシグナル(S₂H₄N₃F₁)、
m/z 2294でのシグナル(S₃H₄N₃F₁)、
m/z 2408でのシグナル2408(S₂H₄N₅F₁)、
m/z 2528でのシグナル(S₂G₁H₅N₄)、及び
m/z 2544でのシグナル(S₁G₂H₅N₄)であり、
好ましい単糖組成はシグナルの後に付与している。SはNeu5Acであり、GはNeu

50

5 G c であり、H は D - M a n 又は D - G a l の群から選択される六炭糖であり、N は N - D - アセチルヘキソサミン、好ましくは G l c N A c 又は G a l N A c 、より好ましくは G l c N A c であり、F は L - フコースである。

【0043】

好ましい単糖組成はこのように、式 $C : S_k H_n N_p F_q$ に従い、k は 2 ないし 5 の整数であり、n は 3 ないし 6 の整数であり、p は 3 ないし 5 の整数であり、q は 0 又は 1 となる整数であり、S は N e u 5 A c 又は N e u 5 G c であり、H は D - M a n 又は D - G a l の群から選択される六炭糖であり、N は N - D - アセチルヘキソサミン、好ましくは G l c N A c 又は G a l N A c 、より好ましくは G l c N A c であり、F は L - フコースである。

10

【0044】

脱プロトン化した単一荷電イオンのシグナルは、例えば、M A L D I - T O F 質量分析法によって陰イオンモード分析用に与えられるが、単糖組成に基づき同じ分子組成に対応するいくつかの他のシグナルが、他の分析可能な非共有結合性の付加イオン（カリウム / ナトリウムの付加物のような）又はシグナル、又はグリカンの単糖組成に対応する組成物、又はグリカンの化学的派生物のように測定されうる

【0045】

[S 2 / 3 H 3 N 3 / 4 F 0 / 1 の化学構造の好ましい群]

幹細胞のグリコーム中のオリゴシアル酸付加された化学構造の好ましい群は、

m / z 1694 でのシグナル (S 2 H 3 N 3) 、
 m / z 1840 でのシグナル (S 2 H 3 N 3 F 1) 、
 m / z 1856 でのシグナル (S 2 H 4 N 3) 、
 m / z 2002 でのシグナル (S 2 H 4 N 3 F 1) 、
 m / z 2294 でのシグナル (S 3 H 4 N 3 F 1)

20

に対応するグリカンである。

【0046】

この群は同様の単糖組成を含むことが理解される。グリカンは胚性幹細胞中、造血幹細胞中、及び間葉幹細胞中にあるオリゴシアル酸付加された化学構造を有する組成に類似する。このように、この型の化学構造は、多数の方の幹細胞に関する方法、特に分析用に好ましい。最も好ましくは、本発明はヒト幹細胞の認識に関する。

30

【0047】

ある好ましい様態においては、本発明は、組成が式 $O S 1 : (N e u A c)_m G a l (F u c 3 / 4)_{n_1} G l c N A c 2 M a n 3 ([M a n 6]_{n_2}) M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6)_{n_3} G l c N A c$ に従う単分岐型で N - グリカン型の化学構造を含む場合に、組成 S 2 H 3 N 3 、 S 2 H 3 N 3 F 1 、 S 2 H 4 N 3 、 S 2 H 4 N 3 F 1 及び S 3 H 4 N 3 F 1 を有する、好ましいオリゴシアル酸付加された N - グリカンの化学構造の分析に関し、n 1 、 n 2 、及び n 3 は 0 又は 1 の整数であり、ただし、n 1 が 0 の場合は n 3 は 1 、 n 1 が 1 の場合は n 3 は 0 とするか、あるいは n 1 及び n 3 の双方が 0 とし、m は 2 又は 3 の整数である。最も好ましくは、組成は式： $(N e u A c)_m G a l G l c N A c 2 M a n 3 ([M a n 6]_{n_2}) M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6)_{n_3} G l c N A c$ に従う化学構造を含み、変数は式 O S 1 に記載されるのと同じである。

40

【0048】

[質量分析法又は特異的な結合試薬による分析方法]

本発明は特に、特異的な結合剤試薬による、及び / 又は、グリカン化学構造の質量分析的なプロファイリングによる末端部の化学構造の認識に関する。

【0049】

ある好ましい様態においては、本発明は化学構造の認識、及び / 又は化学構造に対応する質量分析シグナルに基づく組成に関する。

【0050】

50

好ましい結合剤試薬は末端部のエピトープのような特徴的な化学構造のエピトープ、及び/又は、Man の分枝を含むか、あるいはMan の分枝を含まない単分岐型化学構造のような特徴的な分枝するエピトープに関する。別の好ましい様態においては、本発明はN-アセチルラクトサミンと、少なくとも2のシアル酸残基とを含む末端部のオリゴシアル酸エピトープの認識に関する。好ましい結合剤は抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。

【0051】

ある好ましい様態においては、NeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAc、より好ましくはNeuAc₃Gal₃(NeuGc₆)GlcNAc、及び/又はNeuGc₃Gal₃(NeuAc₆)GlcNAcの群から選択される化学構造のうち少なくとも1つを特に認識するモノクローナル抗体に関する。別個の様態においては、抗体はNeuX₃Gal₃(NeuX₆)GlcNAcに結合され、化学構造中のNeuGcの存在とは本質的に独立して有効に結合され、このような抗体は化学構造のいくつかの異性体形態を有効に認識し、好ましい化学構造の認識に有効であることが理解される。

10

【0052】

ある好ましい様態においては、NeuAc₈NeuAc_{3/6}Gal₄GlcNAc、より好ましくはNeuAc₈NeuAc₃Gal₄GlcNAc、及び/又はNeuAc₈NeuAc₆Gal₄GlcNAcの群から選択される化学構造のうち少なくとも1つを特に認識するモノクローナル抗体に関する。ある好ましい様態においては、本発明はNeuAc₈NeuAc₃Gal₄GlcNAc、又はより短いエピトープであるNeuAc₈NeuAc_{Gal}を認識する場合の抗体の使用に関し、これらに用いられる多数のこのような抗体及び方法は、当該技術分野で既知であることが理解される。

20

【0053】

[CD133 + 造血幹細胞のN-グリコーン中にオリゴシアル酸付加されたラクトサミン化学構造]

本発明は造血幹細胞中にある新規のオリゴシアル酸付加された化学構造を明らかにする。陰イオンモードにおけるMALDI-TOF質量分析法はm/z 1856及びm/z 2294でのシグナルを明らかにする。シグナルは臍帯血由来のCD133陽性造血幹細胞中に特異的に存在するが、対応するCD133陰性造血幹細胞にはないグリカンの化学構造を示す。表1を参照されたい。本発明はある好ましい様態においては、造血幹細胞の分析用の質量分析シグナルの使用に関する。

30

【0054】

m/z 1856でのシグナルに割り当てられる好ましい単糖組成はS₂H₄N₃であり、m/z 1856はS₃H₄N₃F₁である。

【0055】

[好ましいS_{2/3}H₃N₄F_{0/1}の化学構造]

造血幹細胞のグリコーン中のオリゴシアル酸付加された化学構造の好ましい部分群はm/z 1856でのシグナル(S₂H₄N₃)及びm/z 2294でのシグナル(S₃H₄N₃F₁)に対応するグリカンである。これらは好ましい同様の組成群を形成する。グリカンは胚性幹細胞中及び間葉幹細胞中に存在するオリゴシアル酸付加された化学構造と組成において類似性を有する。このように、この型の化学構造は多重型の幹細胞に関する方法、特に分析に好ましい。

40

【0056】

ある好ましい様態においては、組成が単分岐型でN-グリカン型の化学構造の式OS₂:(NeuAc)_mGal(Fuc_{3/4})_{n₁}GlcNAc₂Man₃(Man₆)Man₄GlcNAc₄(Fuc₆)_{n₃}GlcNAcを含む場合に、本発明は組成S₂H₃N₃及びS₂H₄N₃F₁を有する、好ましいオリゴシアル酸付加されたN-グリカンの化学構造の分析に関し、n₁及びn₃は0又は1の整数であり、た

50

だし、 n_1 が0の場合は n_3 は1、 n_1 が1の場合は n_3 は0とし、 m は2又は3の整数である。より好ましくは、組成は式 $(NeuAc)_2GalGlcNAc_2Man_3(Man_6)Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)_{n_3}GlcNAc$ に従う化学構造を含み、変数は式OS3に記載のものと同様である。

【0057】

[ヒト胚性幹細胞]

本発明は胚性幹細胞中に存在する新規のオリゴシアル酸付加された化学構造に関する。陰イオンモードにおけるMALDI TOF質量分析法は m/z 1840及び m/z 2002、 m/z 2408、 m/z 2528、ならびに m/z 2544でのシグナルを示した。シグナルは特定の分化段階で胚性幹細胞中に特異的に存在するが、コントロール細胞(mEF)中に存在しないか、より弱く存在するグリカンの化学構造を示す。表2を参照されたい。本発明は好ましい様態においては、様々な分化段階での胚性型幹細胞の分析用の、特異的なシグナルの使用に関する。

10

【0058】

m/z 1840でのシグナルに割り当てられる好ましい単糖組成は $S_2H_3N_3F_1$ であり、 m/z 2002でのシグナルについてが $S_2H_4N_3F_1$ であり、 m/z 2408でのシグナルについてが $S_2H_4N_5F_1$ であり、 m/z 2528でのシグナルについてが $S_2G_1H_5N_4$ であり、 m/z 2544についてのシグナルが $S_1G_2H_5N_4$ である。本発明はオリゴ糖及びオリゴ糖派生物、特に胚性幹細胞の分析用のグリコシド修飾及び/又は完全メチル化されたオリゴ糖組成に関する。

20

【0059】

本発明は好ましい様態においては、様々な分化段階での胚性型幹細胞の分析用の好ましい単糖組成での、グリカン化学構造の使用に関する。

【0060】

[好ましい $S_2H_3N_3/4F_1$ の化学構造の部分群]

胚性幹細胞のグリコーム中のオリゴシアル酸付加された化学構造の好ましい部分群は、 m/z 1840でのシグナル($S_2H_3N_3F_1$)、及び同様の組成での m/z 2002でのシグナル($S_2H_4N_3F_1$)に対応するグリカンである。グリカンは造血幹細胞中に存在するオリゴシアル酸付加された化学構造、及び間葉幹細胞中に存在するオリゴシアル酸付加された化学構造と、組成において類似性を有する。このように、この型の化学構造は多重型の胚性幹細胞に関する方法、特に分析に好ましい。

30

【0061】

ある好ましい様態においては、組成が単分岐型でN-グリカン型の化学構造である式OS3: $(NeuAc)_2Gal(Fuc_{3/4})_{n_1}GlcNAc_2Man_3([Man_6]_{n_2})Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)_{n_3}GlcNAc$ を含む場合に、組成 $S_2H_3N_3F_1$ 及び $S_2H_3N_4F_1$ を有する好ましいオリゴシアル酸付加されたN-グリカンの化学構造の分析に関し、 n_1 、 n_2 及び n_3 は0又は1の整数であり、ただし、 n_1 が0の場合は n_2 は1、 n_1 が1の場合は n_2 は0とする。より好ましくは、組成は式 $(NeuAc)_2GalGlcNAc_2Man_3([Man_6]_{n_2})Man_4GlcNAc_4(Fuc_6)_{n_3}GlcNAc$ に従う化学構造を含み、変数は式OS3のものと同様である。

40

【0062】

[好ましい $S_2H_4N_5F_1$ の化学構造の部分群]

胚性幹細胞のグリコーム中のオリゴシアル酸付加された化学構造の好ましい部分群は、 m/z 2408でのシグナル($S_2H_4N_5F_1$)に対応するグリカンである。グリカンは表2に示されるように、胚性幹細胞の分化中の量において特異な減少を伴う。このように、この型の化学構造は幹細胞、ある好ましい様態においては、胚性型幹細胞に関する方法、特に分析方法に好ましい。

【0063】

[$S_2H_4N_5F_1$ の化学構造を含む末端部の $GlcNAc$]

50

ある好ましい様態においては、本発明は組成が末端部のジシアリル (d i a s i a l y l) エピトープと、末端部の H e x N A c の化学構造とを有する二分岐型で N - グリカン型の化学構造を含む場合に、組成 S 2 H 4 N 5 F 1 の化学構造を有する、好ましいオリゴシアル酸付加された N - グリカンの化学構造の分析に関し、ある好ましい様態においては、G l c N A c 残基である。G l c N A c 残基は G l c N A c 2 と、末端部の H e x N A c の化学構造のような N - グリカンの基幹に連結され、ある好ましい様態においては、M a n 4 の化学構造：G l c N A c { (N e u A c) 2 G a l G l c N A c 2 M a n 3 (G l c N A c 2 M a n 6) [G l c N A c] M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6) G l c N A c }、より好ましくは (N e u A c) 2 G a l G l c N A c 2 M a n 3 (G l c N A c 2 M a n 6) [G l c N A c 4] M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6) G l c N A c に連結される更に分岐する G l c N A c と、に好ましくは対応する。

10

【0064】

[S 2 H 4 N 5 F 1 の化学構造を含む L a c d i N A c]

ある好ましい様態においては、本発明は組成が末端部の L a c d i N A c 化学構造を有する二分岐型で N - グリカン型の化学構造を含む場合に、組成 S 2 H 4 N 5 F 1 の化学構造を有する、好ましいオリゴシアル酸付加された N - グリカンの化学構造の分析に関する。L a c d i N A c エピトープは化学構造 G a l N A c G l c N A c、好ましくは G a l N A c 4 G l c N A c を有し、好ましいシアル酸付加された L a c d i N A c エピトープは既知の哺乳類のグリカン化学構造に基づく、化学構造 N e u A c 6 G a l N A c 4 G l c N A c を有する。好ましいシアリルラクトサミンの化学構造は N e u A c 3 / 6 G a l 4 G l c N A c を含む。

20

【0065】

本発明は特に、末端部のジシアリル (d i a s i a l y l) エピトープ及び式 (N e u A c) 2 G a l G l c N A c 2 M a n 3 (G a l N A c G l c N A c 2 M a n 6) M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6) G l c N A c に従う末端の L a c d i N A c 化学構造、及び / 又は、末端部のシアリルラクトサミンエピトープ及び式 N e u A c G a l G l c N A c 2 M a n 3 (N e u A c G a l N A c G l c N A c 2 M a n 6) M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6) G l c N A c に従うシアル酸付加された L a c d i N A c エピトープを有する組成に関する。シアリル L a c d i N a c を含む化学構造が必ずしも末端部のジシアリルエピトープを含まないが、グリカンは通常の 2 のシアル酸を含むグリカンとしてこの群に分類され、胚性幹細胞の分化と更に関連することは理解される。

30

【0066】

[S 2 G 1 H 5 N 4 及び S 1 G 2 H 5 N 4 を含む化学構造の好ましい部分群]

ある好ましい様態においては、本発明は、組成が 2 の N - アセチルラクトサミンと、好ましくは N e u G c (G) が N e u A c (S) かのいずれかの残基である 3 のシアル酸残基、ひいては N - アセチルラクトサミンユニットにつき少なくとも 2 のシアル酸残基とを含む場合に、組成 S 2 G 1 H 5 N 4 及び S 1 G 2 H 5 N 4 の化学構造を有する、好ましいオリゴシアル酸付加された N - グリカンの化学構造の分析に関する。

40

【0067】

この化学構造の群は胚性幹細胞のコンテキストにおいて特に好ましい。動物性タンパク質によるコンタミネーションのコンテキストにおいて、N e u G c を含む化学構造を分析するのに有用であることは更に理解される。別の好ましい様態においては、組成は、グリカンの末端部のジシアル酸エピトープを認識する動物性タンパク質によるコンタミネーションのコンテキストにおいて分析される。特異的な好ましい様態においては、末端部のエピトープは、コンタミネーションするポテンシャルのある動物性タンパク質と同様の、1 型の N - アセチルラクトサミンのジシアロエピトープ N e u X 3 G a l 3 (N e u X 6) である。

【0068】

50

本発明は好ましくは、式 $OS - Gc : (NeuX)_{m_1} Gal - GlcNAc - 2Man_3 ([NeuX]_{m_2} GlcNAc - 2Man_6) Man_4 GlcNAc - 4GlcNAc$ に従う化学構造に関し、XはGcかAcかのいずれかであり、ただし、少なくとも1のGc又はAcが分子中にあり、GcとAcの双方がジシアル酸エピトープ中にありうるとし、 m_1 が2かつ m_2 が1であるか、あるいは m_2 が2かつ m_1 が1であり、シアル酸残基はGalに3又は6結合されるか、GlcNAcに6結合されるか、あるいは、互いに8又は9結合される。Gal残基は3及び/又は4結合される。

【0069】

ある好ましい様態においては、式 $OS - Gc$ に従う化学構造は2型のN-アセチルラクトサミンと、2のシアル酸残基： $(NeuX)_{m_1} Gal - 4GlcNAc - 2Man_3 ([NeuX]_{m_2} Gal - 4GlcNAc - 2Man_6) Man_4 GlcNAc - 4GlcNAc$ 、より好ましくは $NeuX - NeuX - Gal - 4GlcNAc - 2Man_3 (NeuX - Gal - 4GlcNAc - 2Man_6) Man_4 GlcNAc - 4GlcNAc$ 、及び/又は、他の分枝異性体 $NeuX - Gal - 3GlcNAc - 2Man_3 (NeuX - NeuX - Gal - 4GlcNAc - 2Man_6) Man_4 GlcNAc - 4GlcNAc$ と、を含む。

10

【0070】

別個の好ましい様態においては、式 $OS - Gc$ に従う化学構造は1型のN-アセチルラクトサミンと、2のシアル酸残基： $NeuX - Gal - 3(NeuX - 6)GlcNAc - 2Man_3 (NeuX - Gal - 3GlcNAc - 2Man_6) Man_4 GlcNAc - 4GlcNAc$ 、及び/又は、他の分枝異性体 $NeuX - Gal - 3GlcNAc - 2Man_3 (NeuX - Gal - 3(NeuX - 6)GlcNAc - 2Man_6) Man_4 GlcNAc - 4GlcNAc$ と、を含む。

20

【0071】

[間葉幹細胞]

本発明は間葉幹細胞と間葉幹細胞からの分化細胞とに存在する新規のオリゴシアル酸付加された化学構造に関し、ともに間葉型幹細胞とみなされる。陰イオンモードにおけるMALDI-TOF質量分析法は m/z 1694、 m/z 1840、 m/z 1856、及び m/z 2002でのシグナルを示した。シグナルは特定の分化段階で間葉型細胞中に特異的に存在するが、細胞培養培地のコントロール(ヒトのAB型血清を指すAbserum、又はウシ胎仔血清を指すFCS)には存在しないグリカンの化学構造を示す。表3を参照されたい。本発明は好ましい様態においては、様々な分化段階での間葉型細胞の幹細胞の分析用の特異的なシグナルの使用に関する。

30

【0072】

[好ましいS2H3N3/4F0/1の化学構造]

間葉幹細胞のグリコームにおけるオリゴシアル酸付加された化学構造の好ましい群は、

m/z 1694でのシグナル(S2H3N3)、
 m/z 1840でのシグナル(S2H3N3F1)、
 m/z 1856でのシグナル(S2H4N3)、及び
 m/z 2002でのシグナル(S2H4N3F1)

40

に対応するグリカンである。この群は同様の単糖組成を含むことは理解される。グリカンは胚性幹細胞中に存在するオリゴシアル酸付加された化学構造、及び、造血幹細胞中のオリゴシアル酸付加された化学構造と組成において類似性を有する。このように、この型の化学構造は多重型の幹細胞、ある好ましい様態においては、間葉型幹細胞に関する方法、特に分析に好ましい。

【0073】

ある好ましい様態においては、本発明は、組成が式 $OS_4 : (NeuAc)_2 Gal - (Fuc_{3/4})_{n_1} GlcNAc - 2Man_3 ([Man_6]_{n_2}) Man$

50

4 G l c N A c 4 (F u c 6) n 3 G l c N A c に従う単分岐型で N - グリカン型の化学構造を含む場合に、組成 S 2 H 3 N 3、S 2 H 3 N 3 F 1、S 2 H 4 N 3、及び S 2 H 4 N 3 F 1 を有する、好ましいオリゴシアル酸付加された N - グリカンの化学構造の分析に関し、n 1、n 2、及び n 3 は 0 又は 1 の整数であり、ただし、n 1 が 0 の場合は n 3 は 1、n 1 が 1 の場合は n 3 は 0 とするか、あるいは n 1 及び n 3 の双方が 0 とする。より好ましくは、組成は式 (N e u A c) 2 G a l G l c N A c 2 M a n 3 ([M a n 6] n 2) M a n 4 G l c N A c 4 (F u c 6) n 3 G l c N A c に従う化学構造を含み、変数は式 O S 4 に記載のものと同様である。

【 0 0 7 4 】

[異常なジシアリル及び他のシアリルの化学構造の組成]

本発明は更に基幹化学構造と別個の、本発明による好ましいジシアリルエピトープに関する。本発明は特に、幹細胞のグリカンの化学構造、特に胚性幹細胞のグリカンの分析に関し、これらは陰性モードにおいて m / z 1 6 7 9 の質量分析シグナルの組成 S 2 H 2 N 3 F 1 と、m / z 1 8 0 0 でのシグナルの S 2 H 4 N 2 F 1 とを有する異常なグリカンの化学構造を含む。シグナルは分化中に増加した。本発明は更に組成 S 1 H 6 N 4 F 1 A c、S 1 H 7 N 5 F 1 A c を有する異常なグリカンの質量シグナル及び / 又は単糖組成の存在の特異的な分析に関し、本発明は、好ましくは化学構造が N e u A c 上にある 7、8、又は 9 - O - アセチル基の群、最も好ましくは 9 - O A c から選択される、O - アセチル基によって修飾されるシアル酸を含む場合の特異的な化学構造に関することが好ましい。本発明は特にシアル酸の認識に関し、化学構造 A c - N e u A c 3 / 6 G a l G l c N A c 中にある場合、シアルは質量分析スキャン中の質量分析フラグメントとして、又はエピトープを認識するモノクローナル抗体によって認識でき、好ましくは N - グリカンに結合される。本発明は特に、グリカンと、2 段階又は 3 段階の細胞への胚性幹細胞の分化のコンテキストにおける、アセチル化されたシアル酸の分析に関する。

【 0 0 7 5 】

[幹細胞命名法]

本発明は総ての幹細胞型、特にヒト幹細胞の分析に関する。幹細胞の一般命名法は図 5 に記載する。本発明の代替的な命名法は、ある好ましい様態においては、図 5 に示されるように成体幹細胞の等価物 (臍帯血型の物質を含む) である、初期のヒト細胞について述べている。骨髄及び血液中の成体幹細胞は「血液関連組織 (b l o o d r e l a t e d t i s s u e) 」からの幹細胞と等価である。

【 0 0 7 6 】

[好ましい型の初期のヒト細胞]

本発明は特異的に、組織起源の細胞及び / 又はその分化状態に基づく、初期のヒト細胞と見なされる特異的な型の幹細胞に関する。

【 0 0 7 7 】

本発明は特異的に、多能性細胞を意味する初期のヒト細胞集団と、熟成した、細胞が得られるドナー個体及び組織型を含む細胞の起源に基づく、その得られた細胞集団とに関し、好ましい臍帯血、ならびに加齢した個体又は成体からの骨髄とを含む。

【 0 0 7 8 】

好ましい分化状態に基づく分類は、好ましくは「固形組織前駆体 (s o l i d t i s s u e p r o g e n i t o r) 」細胞、より好ましくは「間葉幹細胞」、又は、固形組織に分化するか、あるいは外胚葉性、中胚葉性、内胚葉性のいずれかの細胞に、より優先的には間葉幹細胞に分化することが可能な細胞を含む。

【 0 0 7 9 】

本発明は更に、細胞培養に関する状態に基づく初期のヒト細胞の分類と、2 の主要な型の細胞物質とに関する。本発明は好ましくは、新鮮な細胞、凍結した細胞、及び培養した細胞を含む初期のヒト細胞の 2 の主要な細胞物質型に関する。

【 0 0 8 0 】

[臍帯血細胞、胚性型細胞、及び骨髄細胞]

本発明は特異的に、多能性細胞を意味する初期のヒト細胞集団と、熟成した、細胞が得られるドナー個体及び組織型を含む細胞の起源に基づく、その得られた細胞集団とに関し、

a) 臍帯血及び関連物質に関する 1) ヒト新生児のような初齢の細胞、及び 2) 胚性細胞型の物質

b) 好ましくは骨髄細胞を含む、ヒトの「血液関連組織」から好ましくは得られる、加齢した個体（非新生児、好ましくは成体）からの幹及び前駆体細胞を含む。

【0081】

[固形組織、好ましくは間葉幹細胞に分化する細胞]

本発明は好ましい様態下においては特異的に、「固形組織前駆体」とみなされる非造血性組織に分化することが可能な細胞に関し、血液細胞以外の細胞に分化する細胞になる。より好ましくは、固形組織への分化のために生成される細胞集団は「間葉型細胞」であり、中胚葉起源の細胞、より好ましくは間葉幹細胞に有効に分化可能な多能性細胞である。ほとんどの従来技術は、本発明による間葉型細胞及び間葉幹細胞と非常に異なる特徴を有する造血細胞に関する。

10

【0082】

本発明による好ましい固形組織前駆体は、選択された臍帯血の多能性細胞集団、臍帯血から培養された間葉幹細胞、骨髄から培養/取得された間葉幹細胞、及び胚性細胞を含む。より特異的な様態においては、好ましい固形組織前駆体細胞は間葉幹細胞、より好ましくは「血液に関連する間葉細胞」であり、更により好ましいのは骨髄又は臍帯血から得られる間葉幹細胞である。

20

【0083】

特異的な様態下では、臍帯血のより多くの造血幹細胞型としての CD34+ 細胞、又は通常の CD34+ 細胞は、固形組織前駆体細胞から除外される。

【0084】

[新鮮な細胞及び培養した細胞]

[新鮮な細胞]

本発明は特に、健常な個体からの新鮮な細胞、好ましくは非修飾細胞、及び非操作の細胞に関する。

【0085】

本発明は、ある好ましい様態においては、ドナーから単離された、細胞培養で培養されない細胞を意味する「新鮮な細胞 (fresh cell)」に関する。現行の細胞培養手順が細胞の状態を変化させることは本発明によって理解される。細胞物質に関し個体ドナーの実際の状態に密接に対応する新鮮な細胞、及びポテンシャルのある新鮮な細胞集団は、直接的な移植療法に有用であり、あるいは更なる細胞物質の生成のためのポテンシャルのある素材物質であるため、本発明は特異的に、新鮮な細胞集団の分析に関する。

30

【0086】

本願発明者は初期のヒト細胞から、最も好ましくは臍帯血細胞から得られる、好ましい新鮮な細胞集団における差異を示すことができた。本発明者はヒト臍帯血から特に「相同的な細胞集団」を生成することができた。これは本発明の様々な態様で特に好ましい。本発明は更に、新鮮な細胞のための細胞精製プロセスに対する本発明の特異的な態様に関し、特にコンタミネーションのポテンシャルの分析及び細胞の精製中のその分析に関する。

40

【0087】

より好ましい様態においては、新鮮な細胞は健常な個体に関する/健常な個体から得られる物質である。健常な個体はヒトが癌の治療下ではないことを意味するが、これはこのような治療が細胞の状態を有効に変化させるからであり、別の好ましい様態においては、健常なヒトは細胞の状態を変化させる他の状態を含む他の主要な病気の治療を受けている。新鮮な細胞が例えば、癌患者への細胞移植のために、このような患者から以前に収集した細胞を用いて生成されることが必要とされうる、いくつかの場合においては、別個の態様下で、本発明は更に、このような細胞物質についての発明の分析及び他の態様に関する

50

ことが理解される。

【0088】

[非修飾細胞]

更により好ましくは、新鮮な細胞は、成長因子又はサイトカイン放出に影響を与える治療によって生体内で修飾されない細胞であることを意味する「非修飾細胞 (non-modulated cell)」である。例えば、幹細胞はCSF (コロニ刺激成長因子) のような成長因子によって末梢血に放出されうる。このような治療は好ましい新鮮な細胞から細胞の状態を変えると見なされる。修飾は特に分化を生じさせることにより、細胞の総て又は一部に永続的な変化を生じさせうる。

【0089】

[非操作の細胞]

更により好ましくは、新鮮な細胞は、細胞の状態を永続的に変える治療によって操作されない細胞であることを意味する「非操作の細胞 (non-manipulated cell)」であり、永続的な操作は細胞の遺伝的・化学構造の変化を含む。操作は例えば、遺伝子トランスフェクション、ウィルス形質導入、及び放射線によって、又は細胞の遺伝的・化学構造に影響を与える化学物質による変異の誘発を含む。

【0090】

[特定の特異的に選択された造血幹細胞集団を除外した限定された新鮮な細胞]

より好ましい限定された新鮮な細胞群は特に有効的に、細胞及びその前駆体を形成する固形組織に関する。特異的な様態下で、この群はa)末梢血又は骨髄からCD34+細胞として選択された細胞集団のような、より多くの特異的に選択された造血幹細胞様の細胞集団を含まず、b)別の限定された様態においては、更に全骨髄及び末梢血の単核細胞が除外される。新鮮な細胞集団は、細胞がそのマーカに関連して選択されない場合に、部分的にCD34+と同一の細胞を含むことができることが理解される。固形組織が細胞を形成する場合、マーカに関連して選択される完全な細胞集団は本発明によって好まれないことが理解される。別の限定された様態は、臍帯血から特異的に選択されたCD34+細胞集団、及び/又は、臍帯血からの全単核細胞を除外する。本発明は更に、総てのCD34+細胞集団、及び/又は末梢血、骨髄、及び臍帯血の総ての全細胞集団が除外される場合、限定された新鮮な細胞集団に関する。本発明は更に、CD34+細胞集団が除外される場合、及び、CD34+細胞集団と上述の総ての3の全細胞集団が除外される場合、限定された新鮮な細胞集団に関する。

【0091】

[培養細胞]

本発明者は初期のヒト細胞中に特異的なグリカンの化学構造と、細胞が培養される場合の本発明による好ましいその部分集団とを発見した。本発明による特定の特異的な化学構造は特に培養細胞について明らかにされ、本発明による特異的なグリカンの特異的な変化は、培養細胞集団中で明らかにされた。

【0092】

本発明は、特異的な細胞培養関連の試薬、方法、及び、細胞培養プロセス中に有害なポテンシャルのある炭水化物のコンタミネーションによる危険がある場合に用いられうる分析を明らかにした。

【0093】

[培養した修飾細胞]

培養細胞が細胞増殖を促進するために修飾されうることは更に理解される。特異的な様態下で、本発明は、サイトカイン及び/又は成長因子の作用により修飾された細胞を意味する、培養した「修飾細胞 (modulated cell)」のための、分析及び本発明の他の態様に関する。本発明者は培養細胞中の初期の変化の一部が、修飾の特定の範囲に関することに留意する。

【0094】

本発明は好ましくは、操作されない場合の培養細胞に関する。本発明は更に、特に環境

10

20

30

40

50

放射線のような環境因子や、細胞調製に対し蓄積する有害なポテンシャルのある代謝物によって非意図的に誘発される場合の、細胞集団中の操作によって誘発される変化の観測に関する。

【0095】

[好ましい型の培養細胞]

本発明は特異的に、好ましい培養細胞のような培養された固形組織前駆体に関する。より好ましくは本発明は、培養のための好ましい細胞型としての間葉型細胞及び胚性型細胞に関する。更により好ましい間葉型細胞は間葉幹細胞、より好ましくは、臍帯血又は骨髓から得られる間葉幹細胞である。

【0096】

別個の様態下では、本発明は更に、好ましい培養細胞群としての培養した造血幹細胞に関する。

【0097】

[多能性培養細胞の部分群]

本発明は特に、培養した多能性細胞及び細胞集団に関する。好ましい多能性培養細胞は細胞培養中に濃縮される様々な多能性細胞集団を意味する。本発明者は人工的に成長させた幹細胞型の細胞集団の特異的な特徴を明らかにすることができた。本発明による多能性細胞は好ましくはヒト幹細胞である。

【0098】

[培養した間葉幹細胞]

本発明は特に間葉幹細胞に関する。最も好ましい型の間葉幹細胞は「血液関連の間葉細胞 (blood-related mesenchymal cell)」と見なされる血液関連組織、最も好ましくはヒト血液又は血液形成組織から、最も好ましくはヒト臍帯血又はヒト骨髓から得られるか、あるいは、別個の様態においては、胚性型細胞から得られる。臍帯血及び骨髓から得られる間葉幹細胞は別個であることが好ましい。

【0099】

[培養した胚性型細胞及び細胞集団]

本発明者は本発明による培養した胚性型細胞の特異的な糖鎖付加の性質を明らかにできた。本発明は特異的に、本発明についての好ましい培養細胞としての様々な胚性型細胞に関する。

【0100】

[初期の血液細胞集団及び対応する間葉幹細胞]

[臍帯血]

初期の血液細胞集団は、多能性細胞で濃縮された血液細胞物質を含む。好ましい初期の血液細胞集団は、多能性細胞、骨髓血液細胞、及び臍帯血細胞について濃縮された末梢血液細胞を含む。ある好ましい様態においては、本発明は初期の血液又は初期の血液由来の細胞集団から得られる間葉幹細胞、好ましくは細胞集団の分析に関する。

【0101】

[骨髓]

別個の好ましい、別の群の初期の血液細胞は骨髓血液細胞である。これらの細胞は更に多能性細胞を含む。ある好ましい様態においては、本発明は骨髓細胞集団から得られる間葉幹細胞、好ましくは細胞集団の分析に関する。

【0102】

[初期のヒト血液細胞の好ましい部分集団]

本発明は特異的に、初期のヒト細胞の部分集団に関する。ある好ましい様態においては、部分集団は抗体による選択によって、別の様態においては、特異的な細胞型に好ましい細胞培養によって生成される。ある好ましい様態においては、細胞は、好ましくは初期の血液細胞からの抗体選択方法によって生成される。好ましくは初期のヒト血液細胞は臍帯血細胞である。

【0103】

10

20

30

40

50

CD34陽性細胞集団は比較的大きく異質性である。それは、特異的な細胞生成物を生成するのを目的とするいくつかのアプリケーションにとっ最適ではない。本発明は好ましくは、相同的な細胞集団と呼ばれる、CD34マーカに結合させるのに選択されない細胞を意味する、特異的に選択される非CD34の集団に関する。相同的な細胞集団は、例えばCD133+細胞集団に対応し、特異的に選択されたCD34+細胞集団より小さくなるサイズを有する、より小さなサイズの単核細胞集団になり得る。好ましい相同的な、初期のヒト細胞の部分集団はCD34+細胞集団より大きくなりうることは更に理解される。相同的な細胞集団はCD34+細胞集団の部分集団にでき、好ましい様態においては、特異的にCD133+細胞集団又はCD133型細胞集団である。本発明による「CD133型細胞集団(CD133-type cell population)」はCD133+細胞集団と同様であるが、CD133とは別のマーカに対して、好ましくは選択される。マーカは好ましくはCD133で共発現されるマーカである。ある好ましい様態においては、本発明はCD133型細胞集団としてのCD133+細胞集団又はCD133+部分集団に関する。好ましい相同的な細胞集団が更に特異的なCD133型細胞として規定されうる以外の細胞集団を含むことは理解される。

10

【0104】

好ましくは相同的な細胞集団は、特異的な結合剤を、細胞集団の細胞表面マーカに結合することによって選択される。ある好ましい様態においては、相同的な細胞はCD34マーカと低い相関を有し、細胞表面上にあるCD133と高い相関を有する細胞表面マーカによって選択される。好ましい細胞表面マーカは、CD133型細胞中に濃縮された、本発明による3にシアル酸付加された化学構造を含む。好ましくは完全な、純性のCD133+細胞集団は本発明による分析に好ましい。

20

【0105】

本発明はある好ましい様態においては、天然細胞に関し、遺伝的に修飾されない細胞を意味する。遺伝的修飾が修飾細胞から細胞及び基礎環境を変えることは知られている。本発明は更にある好ましい様態においては、新鮮な非培養細胞に関する。

【0106】

本発明は、特異的な分化能の細胞の分析のためのマーカの使用に関し、細胞は好ましくはヒト血液細胞、又は、より好ましくはヒト臍帯血細胞である。

30

【0107】

[細胞又は標的の化学構造を含む細胞成分を単離するための一般的方法]

本発明は、本発明により結合剤分子エピトープを接触させるステップを含む、細胞又は細胞成分の分画の単離方法に関する。対応する標的の化学構造は幹細胞上で発現され、細胞集団を含む、濃縮された標的の化学構造を単離するのに用いられる。

【0108】

細胞成分を単離する好ましい方法は、以下のステップ：

- 1) 幹細胞標本を提供するステップと、
 - 2) 本発明による結合剤分子を、細胞又は細胞分画上にある、対応する標的の化学構造と接触させるステップと、
 - 3) 結合剤及び標的の化学構造の複合物を、細胞又は細胞物質の少なくとも一部から単離するステップと、
- を含む。

40

【0109】

細胞の単離用の好ましい方法は、免疫磁気ビーズによる、又は他の細胞選別手段による、ある好ましい様態においてはFACSによる選択を含む。

【0110】

本発明による細胞成分の単離は、特異的な結合剤によって結合されたグリカンの化学構造である、対応する標的の化学構造に本発明による結合剤分子を結合するステップを含む方法において、本発明による標的の化学構造を有するグリカンの増加(又は濃縮)量を含む分子分画の生成を意味する。

50

【 0 1 1 1 】

成分は一般的に、細胞膜及び小器官分画と、可溶タンパク質、液体、及び遊離型のグリカン分画のような分画を有する可溶グリカンとを含む細胞膜分画といった細胞の化学構造の特異的な分画に濃縮されることは理解される。結合剤は全細胞分画に用いられることは理解される。

【 0 1 1 2 】

ある好ましい様態においては、標的の化学構造はプロテアーゼ又は洗浄性の可溶膜タンパク質により放出可能な細胞表面タンパク質のような、細胞タンパク質の分画内に濃縮される。

【 0 1 1 3 】

[細胞及び / 又は細胞相互作用の分析用の結合試薬の使用]

細胞表面上にある炭水化物の化学構造は、他の細胞を有し、細胞基質を取り囲む接触と関連することが理解される。従って、同定された細胞表面のグリカンの化学構造、及び特にこれらを特異的に認識する結合試薬は細胞の分析のために有用である。好ましい分析方法は、細胞を結合試薬と接触させるステップと、細胞に対する結合試薬の効果を評価するステップとを含む。ある好ましい様態においては、細胞は細胞培養状態で結合剤と接触する。ある好ましい様態においては、結合剤は多原子価 (p o l y v a l e n t) 又はより好ましくは多価 (m u l t i v a l e n t) の形態で、あるいは別の好ましい様態においては、表に付着した形態で表される。効果は特徴的な成長の変化、又は細胞内の細胞シグナルにできる。

【 0 1 1 4 】

[F A C S 及び抗体データ]

F A C S データはタンパク質 / N - アセチルラクトサミン特異性を有する抗ジシアル酸抗体が C D 3 4 + 造血幹細胞の主要部分に有効に、及び、C D 1 3 3 + により更に有効に標識されることを明らかにした。本発明はある好ましい様態においては、造血幹細胞用のマーカとしてタンパク質を保有するジシアル酸エピトープに関する。データは更に、「タンパク質 / L a c N A c ジシアル酸」抗体を用いて、C D 3 4 + 細胞中に特異的に標識される単一のタンパク質を明らかにした。本発明は特に、造血幹細胞用のマーカとしてのタンパク質、及び / 又はそのジシアル酸付加されたグリカンエピトープに関する。図 6 を参照されたい。

【 0 1 1 5 】

蛍光標示式細胞分取器 (F l u o r e s e n c e a c t i v a t e d c e l l s o r t i n g : F A C S) は好ましくは臍帯血由来の間葉細胞の分析用に用いられた。本明細書では F A C S 分析は間葉幹細胞中の陽性細胞の少数集団、及び骨形成分化細胞における増加量、及び脂肪細胞の分化細胞における一般的に更に高い量を明らかにした。図 3 及び図 4 参照。本発明は特に、F A C S 分析で示された標識パターンにより例示されたような、抗体の特異的な標識レベルを伴う相対量の細胞に基づく細胞の認識に関する。本発明は特に、造骨細胞 (O B) の細胞と、脂肪細胞 (A C) の分化細胞用に示されたような、新規の完全な標識細胞とにおいて、連続変化する標的抗原の量に関し、特に抗体の等価物で標識された場合、同様の F A C S パターンを有する細胞集団が用いられる。本発明は更に陽性選択で標識された特異的な細胞集団と、抗体による陰性選択での非標識細胞との分離に関し、選択的に更に、部分的に反応する細胞集団を分離する。本発明は更に特異的な間葉細胞集団のキャラクタリゼーションの方法に関し、細胞は本発明による抗体、好ましくは 1 又は複数の抗ジシアル酸エピトープの抗体で標識され、好ましくはその集団は本質的に図 4 による F A C S 特性を有する。

【 0 1 1 6 】

本発明は更に、好ましくはキャラクタリゼーション及び / 又は細胞集団の治療の発達用のジシアルル (d i a s i a l y l) エピトープに特異的な抗体へ結合される集団に、本質的に同様であることが好ましい、特異的な単離細胞に関する。本発明は本質的に、造血幹細胞又は分化した間葉細胞、及び細胞集団に関し、細胞はジシアル酸付加された特異的

10

20

30

40

50

なエピトープ用の結合剤、好ましくは非還元末端の末端部のエピトープに特異的な抗体で標識される。

【0117】

[グライコム物質からの、及び結合方法による細胞表面上の化学構造の認識]

本発明は質量分析法による物理化学的分析に加え、いくつかの方法が化学構造の分析のために有用であることを明らかにした。本発明は本質的に、i) 結合剤と見なされるグリカン結合する分子による認識の方法に関する。これらの分子はグリカン結合し、結合剤に結合される標識のような結合の観察を固有に可能にするステップを含む。好ましい結合剤は、a) 抗体、レクチン、及び酵素のようなタンパク質、b) タンパク質の結合領域及び部位のようなペプチド及びファージディスプレイのペプチド合成ライブラリ由来の類似体、c) 他のポリマ又はペプチド物質を模倣する有機体の骨格物質を含む。

10

【0118】

ペプチド及びタンパク質は好ましくは、タンパク質がモノクローナル抗体、グリコシダーゼ、グリコシル転位酵素、植物レクチン、動物レクチン、又はその模倣ペプチドの群から選択される場合、組換え型タンパク質、又はその派生型の、対応する炭水化物の認識領域であり、結合剤は検出可能な標識化学構造を含みうる。

【0119】

炭水化物の認識における酵素の属は、レクチン（酵素活性なしにタンパク質を結合する炭水化物）の属に連続する。a) 天然のグリコシルトランスフェラーゼ（Rauvalaら（1983）、PNAS（USA）3991-3995）及びグリコシダーゼ（Rauvala及びHakomori（1981）、J. Cell Biol. 88, 149-159）はレクチン活性を有する。b) 酵素を結合する炭水化物は、触媒性のアミノ酸残基を変異することによって、レクチンへ修飾されうる（国際公開第9842864号；Aalto J.ら、Glycoconjugate J.（2001）、18（10）；751-8；Mega及びHase（1994）BBA 1200（3）331-3を参照）。c) 天然レクチンは、グリコシダーゼに対し構造的に相同的であり、酵素及びレクチンの属の連続性を示すことで更に知られる（Sun, Y-J.ら、J. Biol. Chem.（2001）、276（20）、17507-14）。酵素活性なしにタンパク質を結合する炭水化物としての抗体の属は更にレクチンの概念に非常に近いが、抗体はレクチンとして通常は分類されない。

20

30

【0120】

[ペプチドの明確性の概念及びタンパク質を結合する炭水化物の連続性の概念]

タンパク質がペプチド鎖からなり、ひいてはペプチドによる炭水化物の認識は明らかになることは更に理解される。例えば、タンパク質を結合する炭水化物の活性部位から得られるペプチドは炭水化物を認識できることは、当該技術分野で知られている（例えば、Geng J-G.ら（1992）、J. Biol. Chem. 19846-53）。上述のように、抗体フラグメントは結合タンパク質の記載の、及び遺伝子操作された変異体に含まれる。明らかに遺伝子操作された変異体は、酵素、抗体及びレクチンの含有型、切断型、又はフラグメント型のペプチドである。

【0121】

レクチンと延在する抗体エピトープとを含む、有用な結合剤の特異性は、（Debaray及びMontreuil（1991）、Adv. Lectin Res 4, 51-96；“The molecular immunology of complex carbohydrates”，Adv Exp Med Biol（2001）、491（Albert M Wu編集）Kluwer Academic/Plenum publishers, New York；“Lectins” second Edition（2003）、（Sharon、Nathan及びLis, Halina編集）Kluwer Academic publishers Dordrecht, The Netherlands）のような概説及び研究書、及びpubmed/espacenetのようなインターネットデータベース、又はwww.glyco.is.rit

40

50

sumci.ac.jpのような抗体データベースから入手可能であり、モノクローナル抗体のグリカンの特異性を列挙する。

【0122】

[好ましい結合剤分子]

本発明は、本発明による細胞のキャラクタリゼーションに、及びより特異的には、本発明による好ましい細胞群及び細胞型に対して有用な様々な型の結合剤分子を明らかにした。好ましい結合剤分子は特異的な化学構造、又は細胞表面の炭水化物の上にある構造上の特徴に関する結合特異性に基づき分類される。好ましい結合剤は1以上の単糖残基を特異的に認識する。

【0123】

植物レクチンの総て又はほとんどのような現行の結合剤分子のほとんどは、その特異性において最適ではなく、通常様々な結合を有する1又はいくつかの単糖を雑に認識することは理解される。更に、レクチンの特異性はヒト型のいくつかのグリカンで通常上手く特徴付けされない。

【0124】

好ましい高特異性の結合剤は、

A)少なくとも1の単糖残基と、これらと別の単糖との間の特異的な結合の化学構造を認識し、次の単糖残基はMS1B1結合剤と見なされ、

B)更に好ましくはMS2B1結合剤と見なされる第2の単糖残基の少なくとも一部分を認識し、

C)更により好ましくは、第2の結合の化学構造及び/又は第3の単糖残基の少なくとも一部分を認識し、MS3B2結合剤と見なされ、好ましくはMS3B2は特異的で完全な三糖類の化学構造を認識し、

D)最も好ましくは、結合する化学構造は3の結合の化学構造を有する四糖類を少なくとも部分的に認識し、MS3B2結合剤と見なされ、

好ましくは結合剤は完全な四糖類配列を認識する。

【0125】

好ましい結合剤は天然のヒト及び/又は動物性の、あるいはグリカンの特異的な認識用に関連された他のタンパク質を含む。好ましい高特異性の結合剤のタンパク質は特異的な抗体、好ましくはモノクローナル抗体、レクチン、好ましくは哺乳類若しくは動物レクチン、又は特異的なグリコシル転位酵素、より好ましくはグリコシダーゼ型の酵素、グリコシルトランスフェラーゼ、若しくはグリコシド転移中の酵素である。

【0126】

[抗体]

当該技術分野で知られる様々な手順が、ポリクローナル抗体のペプチドモチーフ及び部位又はそのフラグメントへの生成のために用いられうる。抗体の生成のために、いくつかの好適な宿主動物(限定しないが、ウサギ、マウス、ラット、又はハムスターを含む)は、ペプチド(免疫原性フラグメント)を伴う注射によって免疫化される。様々なアジュバントが免疫学的な応答を増加させるために用いられ、宿主の種に依存して、限定しないがフロイントの(完全及び不完全)アジュバント、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、多価陰イオン、油乳濁液、スカシガイ・ヘモシアニン、ジニトロフェノールのような表面活性物質、及びBCG(Bacille Calmette-Guerin:カルメット・ゲラン桿菌)及びコリネバクテリウムバルバムのような有用なポテンシャルのあるヒトアジュバントを含む。

【0127】

1又は複数のペプチドモチーフに対するモノクローナル抗体は、培養中の連続株化細胞によって抗体分子の生成用に規定する技術を用いることによって調製できる。これらは限定しないがK h l e rらによって独創的に記載されたハイブリドーマ技術(Nature, 256:495-497, 1975)、及び近年のヒトB細胞のハイブリドーマ技術(Kosborら, Immunology Today, 4:72, 1983)、及びE

10

20

30

40

50

BVハイブリドーマ技術 (Coleら, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985) を含み、総ては特異的に引用によって本明細書中に取り込まれる。抗体は更にクローン化された免疫グロブリンのcDNAからバクテリア中で生成されうる。組換え型ファージ抗体系の使用を伴い、バクテリア培養中に抗体を迅速に生成及び選択すること、及び、それらの化学構造を遺伝子操作することを可能にできる。

【0128】

ハイブリドーマ技術が用いられる場合、骨髄腫の株化細胞が用いられうる。ハイブリドーマを生成する融解手順での使用に適したこのような株化細胞は好ましくは、非抗体生成され、高融解効率を有し、所望の融解細胞 (ハイブリドーマ) のみの成長を支持する特定の選択培地中の成長を不可能にする酵素欠損症を示す。例えば、免疫化された動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-I1、MPC11-X45-GTG1.7、及びS194/5XX0 BuIを用いることができ、ラット用に、R210.RCY3、Y3-Ag1.2.3、IR983F及び4B210を用いることができ、U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2、及びUC729-6の総ては細胞融解で結合するのに有用にできる。

10

【0129】

モノクローナル抗体の生成に加えて、「キメラ抗体」の生成用に開発した技術、つまり、適切な抗原特異性及び生物学的活性を有する分子を得るために、マウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングは用いることができる (Morrissonら, *Proc Natl Acad Sci* 81:6851-6855, 1984; Neubergerら, *Nature* 312:604-608, 1984; Takedaら, *Nature* 314:452-454; 1985)。代替的には、単鎖抗体の生成 (米国特許第4,946,778号) について記載された技術は、インフルエンザに特異的な単鎖抗体を生成するのに適用できる。

20

【0130】

分子のイデオタイプを含む抗体フラグメントは、既知の技術によって生成できる。例えば、このようなフラグメントは限定しないが、抗体分子のペプシン消化によって生成されうるF(ab')₂フラグメントと、F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成できるFab'フラグメントと、パバイン及び還元剤で抗体分子を扱うことによって生成できる2のFabフラグメントとを含む。

30

【0131】

非ヒト抗体は当該技術分野で既知のいずれかの方法によってヒト化できる。好ましい「ヒト化抗体」はヒト定常部を有する一方、抗体の可変部位又は少なくとも相補性決定領域(CDR)は、非ヒト種から得られる。ヒト軽鎖の定常部はI型又はII型のいずれかの軽鎖からなるが、ヒト重鎖の定常部はIgM、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4)、IgD、IgA、又はIgEのいずれかの免疫グロブリンからなる。

【0132】

非ヒト抗体をヒト化する方法は当該技術分野で公知である (米国特許第5,585,089号及び第5,693,762号を参照)。通常、ヒト化した抗体は非ヒトであるソースからフレームワーク領域に導入される1又はそれ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、ヒト抗体の対応する部位と齧歯類の相補性決定領域(CDR)の少なくとも一部分を置換することによって、例えば、Jonesら (*Nature* 321:522-525, 1986)、Riechmannら (*Nature*, 332:323-327, 1988) 及びVerhoeyenら (*Science* 239:1534-1536, 1988) で記載の方法を用いて行われうる。操作された抗体を調製するための多数の技術は、例えば「Owens及びYoung, J., *Immunol. Meth.*, 168:149-165, 1994」に記載される。更なる変更は親和性又は免疫原性を修飾すべく抗体フレームワークにその後導入できる。

40

50

【 0 1 3 3 】

[結合剤分子を含む方法]

[間葉細胞のグリカンの認識]

[通常の観察]

本発明は更に、末端部のグリカンの化学構造を認識する、更なる結合剤好ましくは特異的な抗体又はレクチンのスクリーニングのための、標的の化学構造及び特異的なグリカンの標的の化学構造の使用と、本発明によるスクリーニングによって生成された結合剤の使用に関する。スクリーニング用の好ましいツールは、本発明による 1 又はいくつかの造血幹細胞のグリカンエピトープと、更なるコントロールグリカンとを含むグリカンアレイである。本発明は既知の抗体のスクリーニングと、高特異性の抗体を見つけるための、公表された特異性の情報検索に関する。

10

【 0 1 3 4 】

細胞の主要部分上で認識できる個体のマーカは、そのコンテキストにおいて関連する細胞が特異的なグリカンエピトープを発現しない場合に、細胞の認識及び / 又は単離用に用いられうることは更に理解される。これらのマーカはマーカの発現が関連する細胞で低い又は存在しない場合に、例えば、組織又は細胞培養のような生物学的物質からの細胞集団の単離のために用いられうる。幹細胞を含む組織は通常、初期の幹細胞段階でこれらを含み、一致する高発現のマーカは細胞単離のために最適化又は選択されることが理解される。特異的な分化状態を保存するために細胞培養状態を選択することは可能であり、主要な又は事実上の全細胞集団を認識する現存の抗体は、これらのコンテキストにおいては細胞の分析又は単離に対し有用である。

20

【 0 1 3 5 】

FACS 分析のような方法は細胞上にある化学構造の定量的な決定を可能にし、ひいては細胞集団の一部を認識する抗体は更に細胞集団に対し特徴的である。

【 0 1 3 6 】

本発明は更に、末端部のグリカンの化学構造を認識する、更なる結合剤好ましくは特異的な抗体又はレクチンのスクリーニングのための、標的の化学構造及び特異的なグリカンの標的の化学構造の使用と、本発明によるスクリーニングによって生成された結合剤の使用に関する。スクリーニング用の好ましいツールは、本発明による 1 又はいくつかの造血幹細胞のグリカンエピトープと、更なるコントロールグリカンとを含むグリカンアレイである。本発明は既知の抗体のスクリーニングと、高特異性の抗体を見つけるための、公表された特異性の情報検索に関する。更に、本発明はファージディスプレイライブラリからの化学構造の検索に関する。

30

【 0 1 3 7 】

細胞の主要部分上で認識できる個体のマーカは、そのコンテキストにおいて関連する細胞が特異的なグリカンエピトープを発現しない場合に、細胞の認識及び / 又は単離用に用いられうることは更に理解される。これらのマーカはマーカの発現が関連する細胞で低い又は存在しない場合に、例えば、組織又は細胞培養のような生物学的物質からの細胞集団の単離のために用いられうる。幹細胞を含む組織は通常、初期の幹細胞段階でこれらを含み、一致する高発現のマーカは細胞単離のために最適化又は選択されることが理解される。ある好ましい様態においては、本発明は、好ましくは本発明によりグリカンエピトープを認識するモノクローナル抗体を含む、タンパク質を認識するアシアロガングリオシドのような、本発明の結合剤による間葉細胞の選択に関する。別個の様態においては、本発明は認識のために最適化されたレクチン又はレクチンに相同的なタンパク質の使用に関する。

40

【 0 1 3 8 】

特異的な分化状態を保存するために細胞培養状態を選択することは可能であり、主要な又は事実上の全細胞集団を認識する現存の抗体は、これらのコンテキストにおいては細胞の分析又は単離に対し有用である。

【 0 1 3 9 】

50

FACS分析のような方法は細胞上にある化学構造の定量的な決定を可能にし、ひいては細胞集団の一部を認識する抗体は更に細胞集団に対し特徴的である。

【0140】

[組合せ]

集団の特異的な分析用のいくつかの抗体の組合せは、細胞集団を特徴付ける。ある好ましい様態においては、少なくとも1の「有効な結合抗体」は、細胞集団の主要部分(35%超)又はほとんど(50%)を認識し(好ましくは30%以上、好ましさが増える順番で40%、50%、60%、70%、80%、最も好ましくは90%以上)、少なくとも1の「非結合抗体」との組合せの分析方法に対して選択され、好ましくは少数部分を認識し(好ましくは方法の検出限界ないし低レベルの認識、好ましい順番に、細胞の10%、7%、5%、2%又は1%未満、例えば細胞の0.2-10%、より好ましくは細胞の0.2-5%、更により好ましくは0.5-2%、又は最も好ましくは0.5%-1.0%)、又は細胞集団の部分を認識せず(検出限界未満又はその点、例えば、好ましい順番に5%、2%、1%、0.5%、及び0.2%未満)、より好ましくは本発明による細胞集団の部分を実際に認識しない。更に別の様態においては、組合せ方法は「中程度の結合抗体」の使用を含み、細胞の実質的な部分を認識し、好ましくは5ないし50%、より好ましくは7%ないし40%、最も好ましくは10ないし35%になる。

10

【0141】

本発明は、互いの陽性及び陰性の標的を認識すべく、互いの末端部のエピトープを認識するいくつかの試薬、好ましくは少なくとも2の試薬、より好ましくは少なくとも3のエピトープ、更により好ましくは少なくとも4、更により好ましくは少なくとも5、更により好ましくは少なくとも6、更により好ましくは少なくとも7、及び最も好ましくは少なくとも8、の使用に関する。延在するエピトープを選択的及び特異的に認識する高特異性の結合剤を伴い、より少ない結合剤しか必要でなくなり、例えば、好ましくは少なくとも2の試薬、より好ましくは少なくとも3のエピトープ、更により好ましくは少なくとも4、更により好ましくは少なくとも5、最も好ましくは少なくとも6の抗体の組合せで用いられることが理解されるであろう。延在するエピトープを選択的及び特異的に認識する高特異性の結合剤は、延在するエピトープのうちの1つを、好ましさが増える順番で、少なくとも5、10、20、50、又は100倍の親和性で結合させ、抗体結合の親和性を測定するための方法は当該技術分野で公知である。本発明は更に、1の延在したエピトープであるが、更に同一の末端部の化学構造を有する、少なくとも1の、好ましくは少なくとも1の追加の延在したエピトープの有効な認識を可能にする低特異性の抗体の使用に関する。

20

30

【0142】

試薬は好ましさが増える順番で、細胞標識実験で示した5、10、20、40、又は70あるいは総ての試薬を含むアレイで好ましくは用いられる。

【0143】

抗体は本発明による標的の化学構造として明らかにされた特定のグリカンエピトープを認識する。抗体の特異性及び親和性はクローン官で変化することは理解される。特定のグリカンの化学構造を認識すると知られる特定のクローンは、必ずしも同一の細胞集団を認識するとは限らないことは理解された。

40

【0144】

[炭水化物阻害による細胞からの結合剤又は結合剤複合物の放出]

本発明はある好ましい様態においては、結合剤からのグリカンの放出に関する。これは、

- a) 結合剤を含む方法による細胞の濃縮又は単離後の可溶結合剤からの細胞の放出、
 - b) 細胞の濃縮又は単離後、又は細胞培養中、例えば細胞の継代中の固相に結合された結合剤からの放出
- を含むいくつかの方法について好ましい。

【0145】

50

阻害する炭水化物は結合するレクチンのエピトープ又はその1又はそれ以上の部分に対応するように選択させる。好ましい炭水化物はオリゴ糖、単糖、及びその複合物を含む。炭水化物の好ましい濃度は、1 mMないし500 mMの細胞によって許容可能な濃度を含み、より好ましくは10 mMないし250 mM、更により好ましくは10ないし100 mMであり、高濃度は単糖及び固相に結合した結合物を含む方法にとって好ましい。

【0146】

一価の阻害状態の例は、細胞がエピトープ及び/又は濃度の大きい固相に多価に結合され、又は多数/多価の複合物が調製される場合の阻害に関し、「Venable A.ら(2005), BMC Developmental biology」に示される。本発明は更に、CD34+磁気ビーズからの細胞の放出について知られるのと同様に、プロテアーゼ消化による結合剤の放出の方法に関する。

10

【0147】

[固定化された結合剤]

本発明は幹細胞の培養のための又はそのコンテキストにおける特異的な結合剤の使用に関し、結合剤は固定化される。固定化は非共有結合性の固定化を含み、共有結合は固定化方法、及び更なる部分の特異的な固定化、及び非特異的な固定化を含む。

【0148】

好ましい非共有結合性の固定化方法は受動吸収法を含む。好ましい方法においては、細胞培養皿又はウェルのプラスチック面のような表面は結合剤で受動的に吸収される。好ましい方法は溶媒又は湿性状態の結合剤のタンパク質を表面に、好ましくは表面上に均一に吸収することを含む。好ましい均一な分布は、好ましくは10分ないし3日、より好ましくは1時間ないし1日、最も好ましくは8ないし20時間一晩中、吸収期間中にわずかな振とうを用いて生成される。固定化の洗浄ステップは好ましくは、レクチンの剥離を防ぐために遅い液流を用いて穏やかに行われる。

20

【0149】

[特異的な固定化]

特異的な固定化は、本発明による幹細胞の特異的な細胞表面のグリカンのような、リガンドであるグリカンへの結合剤の結合部位の結合を妨げないタンパク質部位での固定化を目的とする。好ましい特異的な固定化方法は結合剤のタンパク質/ペプチドの表面での特異的なアミノ酸残基の化学的な接合を含む。好ましい方法においては、システインのような特異的なアミノ酸残基は、固定化部位にクローン化され、接合はシステインから行われ、別の好ましい方法においては、N-末端部のシステインは過ヨウ素酸によって酸化され、アミノ-オキシ-メチルヒドロキシルアミン又はヒドラジンの化学構造のようなアルデヒド反応性試薬に接合し、更なる好ましい化学物質はInvitrogen社によって販売されている「クリック」ケミストリと、Pierce社及びMolecular probes社によって販売されている、アミノ酸特異的なカップリング試薬とを含む。好ましい特異的な固定化は、グリカンが結合部位に近くないか、長いスペースが用いられる場合に、好ましくは結合剤のO-又はN-グリカンのようなタンパク質に結合された炭水化物から生じる。

30

【0150】

[グリカンに固定化された結合剤のタンパク質]

好ましいグリカンの固定化は反応性の官能基選択的なグリカンの連結基R1を通して生じ、化学基は結合剤のタンパク質部分に対し主要な又は結合破壊的な変化なしで、第2の官能基選択的な連結基R2に特異的に接合されうる。アルデヒド及びケトンと反応する官能基選択的な基はアミノ-オキシ-メチルヒドロキシルアミン又はヒドラジンの化学構造として含む。好ましいR1基はタンパク質の表面に化学的に合成されるアルデヒド又はケトンのようなカルボニルである。他の好ましい官能基選択的な基はマレイミド及びチオールを含み、「クリック」試薬はアジド及びそれに対する反応基を含む。好ましい合成ステップは、a) 選択的に化学物質を酸化する炭水化物による、好ましくは過ヨウ素酸による化学的な酸化、又はb) ガラクトースオキシダーゼのような非還元末端の末端部の単糖を

40

50

酸化する酵素による、又は、グリカンの末端部の単糖に修飾された単糖残基を転移することによる、酵素的な酸化を含む。当該技術分野に既知の酸化的な酵素又は過ヨウ素酸の使用は、Kabi-Freinsenius社（国際公開第2005EP02637号、国際公開第2004EP08821号、国際公開第2004EP08820号、国際公開第2003EP08829号、国際公開第2003EP08858号、国際公開第2005092391号、国際公開第2005014024号、引用として完全に含まれる）、及び独国の研究所によるHES多糖類を組換え型タンパク質に直接接合する特許出願に記載されている。末端部の単糖残基を転移するための好ましい方法は、本発明者の一部によるUS2005014718（引用として完全に含まれる）、又はQasba及びRamakrishnan及びその同僚によるUS2007258986（引用として完全に含まれる）の特許出願に記載されるように、又は、Neose（US2004132640、引用として完全に含まれる）のグリコペグ化の特許において記載の方法を用いることによって、変異体であるガラクトシルトランスフェラーゼの使用を含む。

10

20

30

40

50

【0151】

[高特異性の化学タグを含む複合物]

ある好ましい様態においては、結合剤はタグに特異的にあるいは非特異的に接合され、Tと見なされ、リガンドLによって特異的に認識可能となり、タグの例は、ビオチン結合リガンドである（ストレプト）アビジン、又は別のフルオロカルボニル若しくはペプチド/抗原に結合されるフルオロカルボニル、又はペプチド/抗原用の特異的な抗体等を含む。

【0152】

[好ましい複合物の化学構造]

好ましい複合物の化学構造は式CONJ: B - (G -)_m R1 - R2 - (S1 -)_n T - に従い、ここでBは結合剤であり、Gはグリカンであり（結合剤がグリカン接合された場合）、R1及びR2は化学選択的な連結基であり、Tはタグ、好ましくはビオチンであり、Lはタグ用に特異的に結合するリガンドであり、S1は選択的なスペーサ基、好ましくはC1 - C10アルキルであり、m及びnはそれぞれ、0又は1のいずれかとなる整数である。

【0153】

[結合剤の複合]

本発明は更に、固相を含む表面、又はポリマ等を含む基質への接合を含む結合剤の複合に関する。結合剤の交差連結、あるいは細胞に対する結合剤の効果を防ぐため、グリカンの結合剤を接合することは特に有用であることは理解されるであろう。

【0154】

複合物は式COMP: B - (G -)_m R1 - R2 - (S1 -)_n (T -)_p (L -)_r (S2)_s - SOLに従う化学構造を含み、Bは結合剤であり、SOLは固相又は基質又は表面又は標識（更にリガンド接合された標識にできる）であり、Gはグリカンであり（結合剤がグリカン接合された場合）、R1及びR2は化学選択的な連結基であり、Tはタグ、好ましくはビオチンであり、Lはタグ用に特異的に結合するリガンドであり、S1は選択的なスペーサ基、好ましくはC1 - C10アルキルであり、m、n、p、r及びsはそれぞれ、0又は1のいずれかとなる整数である。

[実施例]

【実施例1】

【0155】

[細胞標本の生成]

[造血幹細胞]

[臍帯の臍帯血の収集]

ヒト用語の臍帯の臍帯血（UCB）ユニットが、母親のインフォームドコンセントの送達後収集され、UCBは収集の24時間以内に処理された。単核細胞（MNC）はUCBをリン酸バッファ食塩水（PBS）と1:1で希釈し、その後のFicoll-Paq

ue Plus (Amersham Biosciences社, Uppsala, スウェーデン)の密度勾配遠心分離(400g/40分)で各UCBユニットから単離された。単核細胞フラグメントは勾配から収集され、PBSで2回洗浄された。

【0156】

[臍帯の臍帯血細胞の単離及び培養]

ヒト臍帯の臍帯血からのCD34陽性及び陰性細胞ならびにCD133陽性及び陰性細胞は、Kekarainenら(2006, BMC Cell Biol, 7:30)に記載されるような磁気細胞分離及び二重選択装置(magnetic affinity cell sorting and double selection: Miltenyi Biotec社, 独国)を用いて単離された。洗浄された細胞ペレットは質量分析又はウェスタンブロッティング分析前に、-70℃で凍結され保存された。FACS分析のために、細胞は新鮮に用いられた。

10

【0157】

[間葉幹細胞]

[臍帯血由来の間葉幹株化細胞]

[臍帯の臍帯血細胞の単離及び培養]

収集された臍帯の臍帯血から、CD45/グリコホリンA(GlyA)陰性細胞の選択が免疫標識された磁気ビーズ(Miltenyi Biotec社)を用いて行われた。MNCはCD45及びGlyAの双方の磁気マイクロビーズを用いて同時に30分間インキュベートされ、製造者の指示(Miltenyi Biotec社)に従い、LDカラム(LD column)を用いて陰性で選択された。CD45/GlyAの陰性 溶離分画及び陽性分画の双方が収集され、培養培地で懸濁され、計数された。CD45/GlyA陽性細胞は、フィブロネクチン(FN)でコーティングされた $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$ の密度での6ウェルプレートに蒔かれた。CD45/GlyA陰性細胞は約 1×10^4 細胞/ウェルのFNコーティングされた96ウェルプレート(Nunc社)に蒔かれた。非接着性の細胞のほとんどが培地が次の日に交換された時に除去された。非接着性の細胞の残りは、次の週に2度の培地交換中に除去された。

20

【0158】

細胞は、56%のDMEM低グルコース(DMEM-LG, Gibco社, <http://www.invitrogen.com>)、40%のMCDB-201(Sigma-Aldrich社)、2%のウシ胎仔血清(FCS)、1xペニシリン-ストレプトマイシン(双方ともGibco社から入手)、1xITS液体培地栄養補助剤(インスリン-トランスフェリン-セレニウム)、1xリノール酸-BSA、 5×10^{-8} Mのデキサメタゾン、0.1mMのL-アスコルビン酸-2-リン酸塩(以上の3つ総てはSigma-Aldrich社から入手)、10nMのPDGF(R&D systems社, <http://www.RnDSystems.com>)、及び10nMのEGF(Sigma-Aldrich社)からなる培地中で初期培養された。後の継代において(7継代後)、細胞は更にFCS濃度が10%に増加する以外は、同一の増殖培地で培養された。

30

【0159】

プレートはコロニに対してスクリーニングされ、コロニ中の細胞が80ないし90%のコンフルエントである場合、細胞は継代培養された。第1の継代で細胞数がまだ小さい場合、細胞は室温でトリプシン/EDTAのミネラル量(0.25%/1mM, Gibco社)で脱離され、トリプシンはFCSで阻害された。細胞は無血清培地で流され、血清濃度を2%に調節した標準的な培養液に懸濁した。細胞は約2000ないし3000/cm²で蒔かれた。後の継代において、細胞は規定の時点で規定の領域からトリプシン/EDTAで脱離され、血球計数器で計数され、2000ないし3000細胞/cm²の密度で再度蒔かれた。

40

【0160】

[骨髄由来の間葉幹株化細胞]

[骨髄由来の幹細胞]

50

骨髄 (BM) 由来のMSCはLeskelaら(2003)により述べられたように取得された。手短には、整形外科中に得られた骨髄は - MEM (Minimum Essential Alpha - Medium) で培養され、20mMのHEPES、10%のFCS、1xペニシリン - ストレプトマイシン及び2mMのL - グルタミン (総てGibco社) とともに補充された。2日の細胞接着期間後、細胞はCa²⁺及びMg²⁺を含まないPBS (Gibco社) で洗浄され、同一の培地で2000ないし3000細胞/cm²の密度で細胞を蒔き、ほぼコンフルエンスまで週に2回新鮮な培地と交換することによって更に継代培養される。

【0161】

[間葉幹細胞表現型の決定]

UCB及びBMの双方由来の間葉幹細胞は、フローサイトメトリ (FACSCalibur、Becton Dickinson社) によって表現型化された。CD13、CD14、CD29、CD34、CD44、CD45、CD49e、CD73及びHLA - ABC (総てはカリフォルニア州サンホゼのBD Biosciences社から入手、<http://www.bdbiosciences.com>)、CD105 (英国ケンブリッジのAbeam社、<http://www.abcam.com>)、CD133 (BD Biosciences社) に対するフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 又はフィコエリトリン (PE) 接合型抗体は、直接標識のために用いられた。適切なFITC及びPE接合型のアイソタイプのコントロール (BD Biosciences社) が用いられた。CD90及びHLA - DRに対する非接合型の抗体 (双方、BD Biosciences社から入手) は、間接的な標識用に用いられた。間接的な標識のために、FITC接合型のヤギ抗マウスIgG抗体 (Sigma - Aldrich社) が第2の抗体として用いられた。

【0162】

UCB由来の細胞は造血性マーカーのCD34、CD45、CD14及びCD133に対し陰性であった。細胞はCD13 (アミノペプチダーゼN)、CD29 (1 - インテグリン)、CD44 (ヒアルロン酸受容体)、CD73 (SH3)、CD90 (Thy1)、CD105 (SH2 / エンドグリン)、及びCD49eについて陽性に染色した。細胞は更にHLA - ABCについて陽性に染色したが、HLA - DRについては陰性であった。BM由来の細胞は同様の表現型を有することを示した。それらはCD14、CD34、CD45及びHLA - DRについては陰性であるが、CD13、CD29、CD44、CD90、CD105、及びHLA - ABCについては陽性であった。

【0163】

[脂肪生成分化]

UCB由来のMSCの脂肪生成ポテンシャルを評価するために、細胞は3の複製ウェルにおける24ウェルプレート (Nunc社) に3x10³/cm²の密度で蒔かれた。UCB由来のMSCは、標本がグライコム分析用に調製される前に、DMEM低グルコース、2%のFCS (双方ともGibco社から入手)、10µg/mlのインスリン、0.1mMのインドメタシン、0.1µMのデキサメタゾン (Sigma - Aldrich社)、及びペニシリン - ストレプトマイシン (Gibco社) からなる脂肪生成誘発培地中で5週間培養された。培地は分化培養中に週に2回交換された。

【0164】

[骨原性分化]

UCB及びBM由来のMSCの骨原性分化を誘発するために、細胞は24ウェルプレート (Nunc社) 上に3x10³/cm²の密度で標準的な増殖培地中に蒔かれた。次の日に、培地は10%のFBS (Gibco社)、0.1µMのデキサメタゾン、10mMの - グリセロリン酸、0.05mMのL - アスコルビン酸 - 2 - リン酸塩 (Sigma - Aldrich社)、及びペニシリン - ストレプトマイシン (Gibco社) で補充される - MEMからなる骨原性誘発培地を交換した。BM由来のMSCはグライコム分析用に標本を調製する前に、週に2回培地を交換して3週間培養した。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 5 】

[胚性幹細胞]

[ヒト胚性幹株化細胞 (h E S C)]

フィンランドの h E S C 株である F E S 2 1、F E S 2 2、F E S 2 9、及び F E S 3 0 の生成は述べられた (M i k k o l a ら、2 0 0 6 B M C D e v . B i o l . 6 : 4 0) 。手短には、分析された株化細胞のうちの 2 つはマウス胎仔線維芽細胞 (M E F) のフィーダに初期に由来し、その上で培養され、2 つはヒト包皮繊維芽細胞 (H F F) のフィーダ細胞上にある。本研究について、株の総ては H F F フィーダ細胞上に転移され、ノックアウト血清リプレースメント (G i b c o 社) を用いて補充される無血清培地に培養される。胚様体 (E B) の形態を誘発するために、h E S C コロニは最初は 1 0 ないし 1 4 日間成長するのを許容し、その後、コロニは小さな断片に切断され、非接着性のペトリ皿の上に転移され、懸濁培養を形成した。形成された E B は、b F G F なしで標準的な培養液中で次の 1 0 日間、懸濁状態で培養した。更なる分化 (段階 3 の分化細胞への) のために、E B はインスリン - トランスフェリン - セレニウムで補充される培地において、ゼラチンコーティングされた培養皿に転移され、1 0 日間培養された。

10

【 実施例 2 】

【 0 1 6 6 】

[質量分析グライコームシグナルのジシアル酸付加された化学構造への割当て]

[グライコーム分析用に収集された細胞]

[間葉幹細胞]

1 m l の細胞培養培地はグライコーム分析用に保存され、培地の残りは吸引によって除去された。細胞培養プレートは p H 7 . 2 の P B S バッファで洗浄された。P B S は吸引され、細胞は 5 m l の P B S で搔爬及び収集した (2 回繰り返し) 。この時点で、小さな細胞分画 (1 0 μ l) は細胞計数のために取られ、標本の残りは 4 0 0 g で 5 分間遠心分離した。上澄みは吸引され、ペレットは更に 2 回 P B S で洗浄した。細胞は 1 . 5 m l の P B S で収集され、5 0 m l の管から 1 . 5 m l の収集管に転移され、5 4 0 0 r p m で 7 分間遠心分離した。上澄みは吸引され、洗浄が 1 回以上繰り返された。細胞ペレットは - 7 0 で保存され、グライコーム分析用に用いられた。

20

【 0 1 6 7 】

[胚性幹細胞]

グリカン分析のために、細胞は機械的に収集され、洗浄され分析まで凍結保存された。蛍光標示式細胞分取 (F A C S) 分析において、機械的に単離された h E S C コロニからの 7 0 ないし 9 0 % の細胞は、一般的に T r a 1 - 6 0 及び T r a 1 - 8 1 陽性であった。分化プロトコルは神経上皮細胞の発達に好ましいが、別の末端部の分化細胞型への分化に関連しない。段階 3 の培養は、線維芽細胞及びニューロンの形態によって支配される異種起源の細胞集団からなった。

30

【 0 1 6 8 】

[造血幹細胞]

単離及び洗浄された細胞ペレットは質量分析的なグリカン分析前に - 7 0 で凍結及び保存された。

40

【 0 1 6 9 】

[質量分析的な分析用のグリカン単離]

アスパラギン結合されたグリカンは、本質的に述べられた (N y m a n ら、1 9 9 8 , E u r . J . B i o c h e m . , 2 5 3 : 4 8 5) ようなフロボバクテリウム・メニンゴゼプチクムの N - グリコシダーゼ F の消化 (C a l b i o c h e m 社、米国) によって細胞糖タンパク質から脱離された。細胞のコンタミネーションは、- 2 0 で 8 0 ないし 9 0 % (v / v) のアセトン水溶液でグリカンを沈殿し、6 0 % (v / v) の氷冷メタノールで抽出することによって除去された。グリカンは C 1 8 シリカ樹脂 (B o n d E l u t、V a r i a n 社、米国) を通って水中を通過させ、多孔性黒鉛状炭素 (C a r b o g r a p h、A l l t e c h 社、米国) に吸収させた。炭素カラムは水で洗浄され、次いで中

50

性のグリカンは水中の25%のアセトニトリル(v/v)と、水中の25%アセトニトリル(v/v)中の0.05%(v/v)のトリフルオロ酢酸でシアル酸付加されたグリカンで溶離された。双方のグリカン分画は強い陽イオン交換樹脂(Bio-Rad社、米国)及びC₁₈シリカ樹脂(ZipTip、Millipore社、米国)を通して水中に更に通過させた。シアル酸付加されたグリカンは更にn-ブタノール:エタノール:水(10:1:2、v/v)で結晶セルロースに吸収し、同一の溶媒で洗浄され、50%のエタノール:水(v/v)によって溶離することによって精製された。総ての上のステップは小型化クロマトグラフィカラム上で行われ、小さな溶離及び処理量が用いられた。

【0170】

[質量分析法]

MALDI-TOF質量分析法は、本質的に述べられた(Saarinenら, 1999, Eur. J. Biochem., 259:829)ようなBruker Ultraflex TOF/TOF装置(Bruker社、独国)で行われた。中性かつシアル酸付加されたグリカン成分の相対モル存在比は、中性かつシアル酸付加されたN-グリカン分画として別個に分析された場合に、質量スペクトル中の相対シグナル強度に基づき、正確に割り当てできる。質量分析的な分析方法の各ステップは、ヒト細胞から抽出された合成グリカンの混合物又はグリカン混合物による再現性のために制御された。

【0171】

[データ分析]

質量分析的な未処理データは、重複する同位体パターンの効果、多数のアルカリ金属付加物のシグナル、還元オリゴ糖から水を除去した生成物、及び標本中の元のグリカンから生じない他の干渉する質量分析シグナルを除去することによりグリカン特性に変換する。存在するグリカン特性における、得られたグリカンシグナルは、100%に正規化され、標本間の比較を可能にした。

【0172】

グライコーム特性において、生成された多数の「異常な」質量シグナルは表1ないし3に記載のジシアル酸又はオリゴシアル酸付加された単糖組成物に割り当てられるように操作された。特異的なシアリダーゼ及びガラクトシダーゼによるグリコシダーゼ分析は、構造上の情報を増加させ、より特異的な割り当てを可能にするために行われた。ストレプトコッカスの3-シアリダーゼに対する感受性を有する化学構造部分のために、代替的に異常な割り当てが明らかにされた。データと、2のシアル酸及び1のN-アセチルラクトサミンユニット、又は3のシアル酸及び2のN-アセチルラクトサミンユニットの存在に基づいて、表1ないし3、及び記載の式に概略的に示された化学構造が得られた。

【実施例3】

【0173】

[抗ジシアルル抗体による造血性及び間葉幹細胞のFACS分析]

[造血幹細胞]

造血性細胞のFACS分析は、幹細胞集団の抗体CD34及びCD133での二重の標識分析を用いて臍帯血単核細胞集団で実行された。図1は異なるGD3抗体でのCD34陽性及び陰性細胞の染色結果を示す。VIN-IS-56は(品番MAB4308)でChemiconから入手され、MB3.6はBD Pharmingen社(品番554274)から入手され、4F6はCovab社(品番mab0014)から入手され、S2-566は生化学工業株式会社(品番270554)から入手された。データは特に、タンパク質上の好ましいジシアル酸エピトープを認識できることが知られる(Sato C.ら, J. Biol. Chem. 200, 275:15422)、抗体S2-566による大多数のCD34+細胞の有効かつ特異的な標識を明らかにした。抗体MB3.6及び4F6は有効なタンパク質認識を有することが報告されていないが、幹細胞集団に好ましいより低い反応性を通して、部分的であるようなくつかの相互反応を有することができる。抗体VIN-IS-56は造血幹細胞の優先的でない標識を示した。

【0174】

図2は抗GD3のS2-566(生化学工業株式会社)で標識された臍帯血由来の造血幹細胞、CD34及びCD133陽性細胞,及びCD34及びCD133陰性細胞のFACS染色の結果を示す。CD133+細胞の高い染色効果は抗体がCD34+よりもより原始的な幹細胞集団を認識したことを示す。データは特に臍帯血に由来する造血幹細胞の認識及び単離に特に有用であることを明らかにした。対応する陰性細胞での低い反応性は、上述の抗体を用いた磁気粒子細胞精製法のようなFACS又は他の単離方法は高く濃縮された幹細胞分画を精製することが示された。本発明は特に造血幹細胞の分析及び単離用のジシアル酸エピトープを認識する結合剤の使用に関する。抗体は更に造血幹細胞集団のキャラクタリゼーションに有用であった。

【0175】

[間葉幹細胞]

図3は間葉幹細胞(MSC)ならびに骨形成上(OG)及び脂肪生成上(AG)の分化細胞のFACS染色の結果を示す。骨髄(BM)由来のMSC染色は図3Aに可視化され、臍帯血(CB)由来のものは異なる抗ジシアル酸抗体を伴い図3Bに示した。VINIS-56は(品番MAB4308)でChemiconから入手され、MB3.6はBD Pharmingen社(品番554274)から入手され、4F6はCovab社(品番mab0014)から入手され、S2-566は生化学工業株式会社(品番270554)から入手され、4i283は米国Biological社(品番G2005-67)から入手された。総てのGD3抗体は細胞分化状態に関する差異を有さずにBM由来細胞の一部だけを標識した。代わりに、総ての神経節特異的なGD3抗体が試験されて、骨原性又は脂肪生成のいずれかの方向に分化する臍帯血由来のMSCの顕著に増大する標識があった。はっきりとした差異は「タンパク質/ラクトサミンジシアル酸」の抗体S2-566及び他の「神経節ジシアル酸」のGD3抗体で明らかではなかった。MB3.6はしかしながら、S2-566と同様の特異性を有すると見なされ、図3Bにあるような特に分化した臍帯血の間葉幹細胞の認識のためにあまり好ましくない代替物であると見なされる。本発明は更に、O-アセチルGD3由来のシアル酸標識抗体(4i283、米国Biological社)の完全に異なる特異性を明らかにした。幹細胞又はその分化細胞への結合は観察されなかった。

【0176】

図4は抗体S2-566(生化学工業株式会社)を用いた骨髄(BM)及び臍帯血(CB)からの間葉幹細胞(MSC)ならびに骨形成上(OG)及び脂肪生成上(AG)の分化細胞のより特異的なFACS分析を示す。

【実施例4】

【0177】

[抗ジシアル酸抗体を用いた造血幹細胞ライセートの免疫プロット]

ヒト臍帯の臍帯血からのCD34陽性及び陰性細胞は実施例1に記載のように磁気細胞分離を用いて単離された。細胞ペレットは-70で凍結及び保存された。解凍された細胞は、氷上で15分間 60×10^6 細胞/mlでのプロテアーゼ阻害剤を伴い、pH7.4で、1%のTriton X-100、10mMのナトリウムリン酸塩、300mMのNaCl中に溶解された。多数の臍帯の臍帯血ユニットからのライセートは一緒に貯蔵された。貯蔵されたライセートは、13,000rpmで10分間、遠心分離によって洗浄された。

【0178】

レーンごとの27µgの全タンパク質の細胞ライセート(Bradford法で決定)は、PVDF膜上へ更にプロットされる10%のSDS-PAGEゲルで動作させた。膜は0.1%のTween-20を含むPBS中の1%のBSAでブロックされた。膜は第1の抗体S2-566(生化学工業株式会社)(PBS中に1µg/ml、0.1%のTween-20、0.1%のBSA)で+4で一晩インキュベートされた。0.05%のTween-20を含むPBSで洗浄後、膜は過氧化物接合型のヤギ抗マウスIgG+IgM(1:5000希釈、Thermo Scientific社)でインキュベート

10

20

30

40

50

された。検出はAmersham ECLウエスタンブロッティング試薬（GE Healthcare社）を用いて行われた。

【0179】

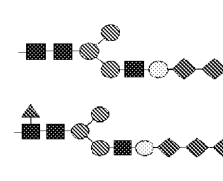
図6は抗ジシアル酸のS2-566（生化学工業株式会社）のCD34+造血幹細胞ライセートのタンパク質への特異的な結合を明らかにする。特定のタンパク質はゲルで可視化された分子重量マーカから算出される、約45kDaの分子重量を有する。対応する分化したCD34-細胞においては、染色が可視化できなかった。コントロール実験においては、既知の糖脂質抗体VIN-IS-56は、造血幹細胞ライセートのプロットにおいていかなる糖タンパク質へのいかなる強い又は特異的な結合をも示さなかった。

[表]

[表1：CD133+造血幹細胞のN-グリコームにおける、オリゴシアル酸付加されたラクトサミンの化学構造の存在]

【0180】

【表1】

m/z	CD133+	CD133-	
	%	%	
1856	0,87	0	
2294	1,65	0	

m/zは質量対変化の比率を示し、%は細胞の全グリコームからのグリカン型の相対量を示す。好ましい化学構造型は、カラーコード化した化学構造において示され、四角形（青/暗色）がGlcNAcであり、丸形がMan（緑）、黄色がGal（明色）、NeuNAcは菱形によって示される。

[表2：ヒト胚性幹細胞のN-グリコームにおけるオリゴシアル酸付加された化学構造の存在]

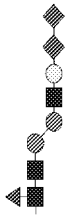
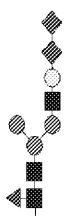

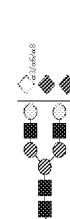
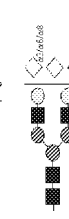
【0181】

10

20

30

【表 2】

							
mEF	%	0	0,2	0	0	0	0
St3	%	0,6	0,9	0	0	0	0
St2	%	0,4	1,1	0,3	0,1	0	0
St1	%	0,2	0,3	1,1	0,2	0,2	0,2
	m/z	1840	2002	2408	2528	2544	

10

20

30

40

m / z は質量対変化の比率を示し、%は細胞の全グリコームからのグリカン型の相対量を示す。好ましい化学構造型はカラーコード化した化学構造において示され、四角形（青 / 暗色）が G l c N A c であり、丸形が M a n（緑）、黄色が G a l（明色）、N e u N A c は菱形（マゼンダ）、N e u G c が菱形（ライトブルー）によって示され、S t 1 は段階 1 であり（未分化）、S t 2 は段階 2 であり（分化）、S t 3 は段階 3（分化）であり、m E F はコントロールのマウスフィーダ細胞である。化学構造は、単糖組成 S 2 H 3 N 3 F 1、S 2 H 4 N 3 F 1、S 2 H 4 N 5 F 1、二分岐型化学構造 3 / 6 / 8 結合のシアル酸である S 2 G 1 H 5 N 4、及び S 1 G 2 H 5 N 4 に対応する。

【表 3：間葉幹細胞及びその由来する細胞集団の異なる型におけるグリカン型の相対量】

50

【 0 1 8 2 】
【 表 3 】

m/z	BM MSC (Abserum) %	BM MSC (FCS) I %	BM MSC (FCS) II %	osteogeniset %	AB serum %	FCS %
1694	0	0	0,06	0	0	0
1840	0,26	0,19	0,13	0	0	0
1856	0	0	0	1,37	0	0
2002	0,32	0,32	0,34	0,18	0	0

10

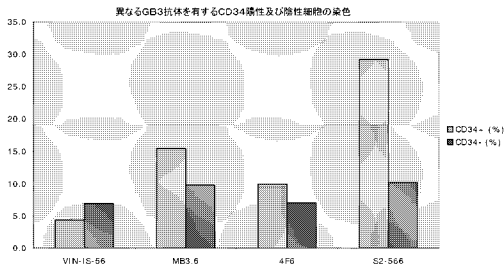
20

30

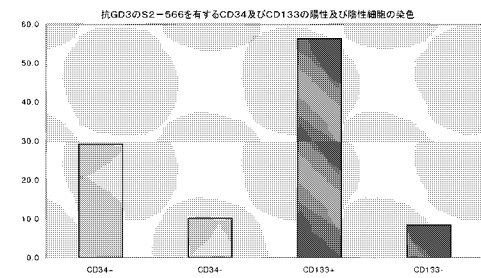
m / z は質量対変化の比率を示し、%は細胞の全グリコームからのグリカン型の相対量を示す。例示的な化学構造型は、カラーコード化した化学構造において示され、四角形（青 / 暗色）が G l c N A c であり、丸形が M a n （緑）、G a l （黄色 / 明色）、N e u N A c は菱形（マゼンダ）によって示される。B M M S C は骨髄の間葉幹細胞（2の別個のデータセットが示される）を示し、“ o s t e o g e e n i s e t ” は骨原性細胞に分化した骨髄の間葉幹細胞を示す。

40

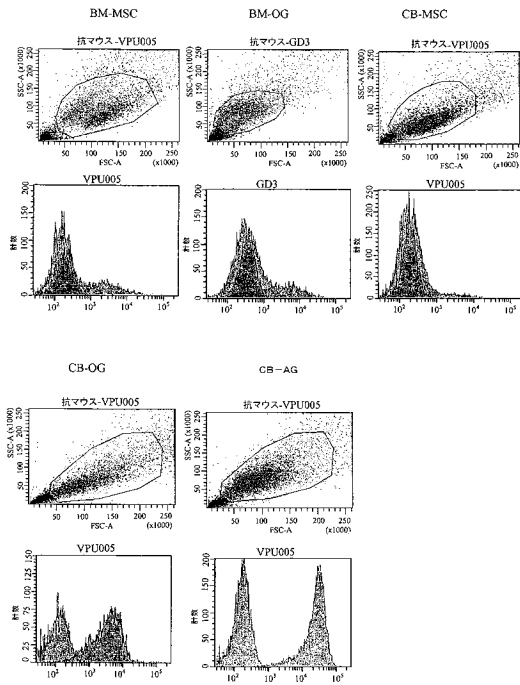
【 図 1 】



【 図 2 】

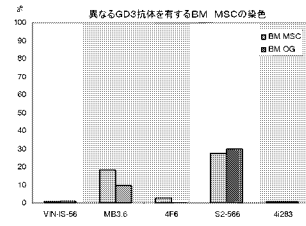


【 図 4 】

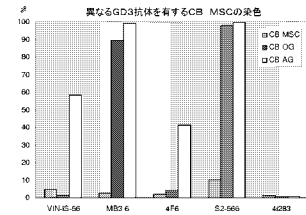


【 図 3 】

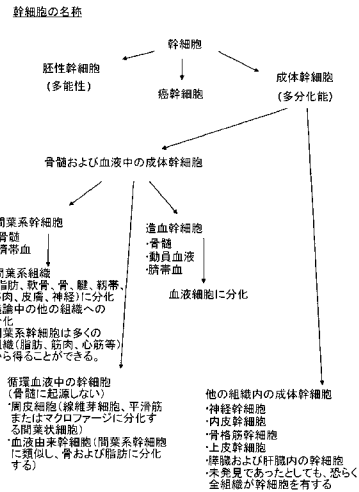
A



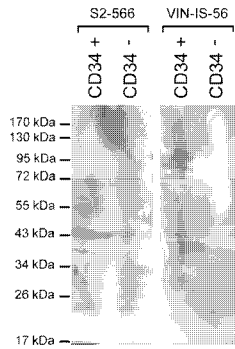
B



【 図 5 】



【 図 6 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成21年6月8日(2009.6.8)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒト細胞を含む細胞標本中の化学構造の量及び存在を分析することによって、ヒト幹細胞又はそれから得られる分化細胞の状態を分析する方法であって、前記化学構造が、

a . 前記ヒト細胞が間葉、胚性、又は造血幹細胞である場合は、1のN - アセチルラクトサミン、

及び / 又は、

b . 前記ヒト細胞が分化した間葉細胞、又は造血幹細胞である場合は、GD3 ガングリオシドの1のラクトース残基、

につき少なくとも2のシアル酸残基を含み、ただし、前記シアル酸がNeuNAc 8NeuNAc 3Galの化学構造か、一方のシアル酸をGalの三位に、及び、他方のシアル酸をGlcNAcの六位に含む、非直鎖状にジシアル酸付加されたN - アセチルラクトサミンかを形成することを特徴とする方法。

【 請求項 2 】

請求項 1 に記載の方法において、前記細胞の状態が前記細胞の分化に関して分析されることを特徴とする方法。

【 請求項 3 】

請求項 1 又は 2 に記載の方法において、前記シアル酸がNeuGc、NeuAc、又は

Neu - OAcであり、前記化学構造が N - アセチルラクトサミンGal 3 / 4 GlcNAcを含むことを特徴とする方法。

【請求項4】

請求項3に記載の方法において、シアル酸がジシアル酸のNeuX NeuXエピトープを形成し、XがAc又はGc、好ましくはAcであり、更に「ジシアル酸」非還元末端エピトープと見なされることを特徴とする方法。

【請求項5】

請求項3に記載の方法において、

a 1) タンパク質及び/又はN - アセチルラクトサミンエピトープ上にある、分化した間葉細胞又は造血幹細胞の分析用のNeuNAc 8NeuNAc 3Gal、

及び/又は、

a 2) ガングリオ系列ガングリオシドGD3上にある、造血幹細胞の分析用、又は、請求項1のa.の事項に記載の化学構造と組み合わせた、分化した間葉細胞の分析用のNeuNAc 8NeuNAc 3Gal、
として、NeuNAc 8NeuNAc 3Galエピトープが認識され、前記ジシアル酸エピトープが提供されることを特徴とする方法。

【請求項6】

請求項5に記載の方法において、タンパク質及び/又はN - アセチルラクトサミンエピトープ上のNeuNAc 8NeuNAc 3Galとして、NeuNAc 8NeuNAc 3Galエピトープが認識され、前記ジシアル酸エピトープが提供され、前記細胞が造血幹細胞又は分化した間葉細胞であることを特徴とする方法。

【請求項7】

請求項5に記載の方法において、前記分析が質量分析法を用いることによって、又は前記エピトープを認識する特異的な結合物質/結合剤を用いることによって行われることを特徴とする方法。

【請求項8】

請求項7に記載の方法において、前記結合剤がS2 - 566抗体であることを特徴とする方法。

【請求項9】

請求項7に記載の方法において、前記結合剤がGD3ガングリオシド抗体、又はOAcGD3認識抗体であることを特徴とする方法。

【請求項10】

請求項7に記載の方法において、前記抗体が造血幹細胞又は分化した間葉細胞の集団の認識用に用いられることを特徴とする方法。

【請求項11】

請求項6に記載の方法において、請求項8及び10に記載の前記抗体が同時に用いられることを特徴とする方法。

【請求項12】

請求項11に記載の方法において、前記抗体が分化した間葉細胞を分析するのに用いられることを特徴とする方法。

【請求項13】

請求項1に記載の方法において、前記化学構造が「非直鎖状にジシアル酸付加された」N - アセチルラクトサミンであり、Galの三位に一方のシアル酸、及びGlcNAcの六位に他方のシアル酸を含むことを特徴とする方法。

【請求項14】

請求項1に記載の方法において、前記化学構造がNeuX 3Gal 3(NeuX 6)GlcNAc上にあり、XがAc又はGcであることを特徴とする方法。

【請求項15】

請求項14に記載の方法において、前記化学構造が細胞のコンタミネーションに関する細胞の分析用に用いられ、前記化学構造が選択的にNeuGcを含むことを特徴とする方

法。

【請求項 16】

分析用抗体の選択又は生成のための、請求項 1 ないし 6 又は 14 のいずれか 1 項に記載の化学構造の使用であって、分化した間葉細胞、造血幹細胞、及びその直接的に分化した細胞の精製を含み、前記分析が請求項 1 に記載に従って行われることを特徴とする使用。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の使用において、前記エピトープの化学構造が請求項 1 ないし 6 又は 14 のいずれか 1 項に記載の型の N - アセチルラクトサミンと、間葉、胚性、又は造血幹細胞からの細胞表面タンパク質のポリペプチドとを含むことを特徴とする使用。

【請求項 18】

請求項 16 又は 17 に記載の使用において、前記エピトープが固相に固定化されるか、あるいは観察可能なタグで標識されることを特徴とする使用。

【請求項 19】

請求項 16 又は 17 に記載の使用において、前記エピトープがファージディスプレイライブラリ又は免疫の選択用に用いられることを特徴とする使用。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が式 $C : S_k H_n N_p F_q$ に従い、好ましくは N - 単糖組成を有する N - グリカンであり、k が 2 ないし 3 の整数であり、n が 3 又は 5 の整数であり、p が 3 又は 4 の整数であり、q は 0 又は 1 となる整数であり、ただし、n が 3 の場合は p は 3 又は 4 であるとし、あるいは、n が 5 の場合は p は 4、k は 3 であるとし、S が Neu5Ac 及び / 又は Neu5Gc であり、H が D - Man 又は D - Gal の群から選択される六炭糖であり、N が N - D - アセチルヘキソサミン、好ましくは GlcNAc 又は GalNAc、より好ましくは GlcNAc であり、F が L - フコースであることを特徴とする方法。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が 1 のジシアル酸付加された N - アセチルラクトサミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 22】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が式 NeuAc 8 NeuAc 3 Gal 1 4 GlcNAc に従う 1 のジシアル酸付加された N - アセチルラクトサミンを含むことを特徴とする方法。

【請求項 23】

請求項 1 に記載の方法において、前記ジシアル酸付加された N - アセチルラクトサミンが NeuAc 8 NeuAc 3 Gal 4 GlcNAc 又は NeuAc 8 NeuAc 3 Gal 4 Glc であることを特徴とする方法。

【請求項 24】

請求項 1 に記載の方法において、N - グリカンの化学構造が、式 $OS1 : (NeuAc)_m Gal (Fuc_{3/4})_{n1} GlcNAc_2 Man_3 ([Man_6]_{n2}) Man_4 GlcNAc_4 (Fuc_6)_{n3} GlcNAc$ の式に従い、n1、n2、及び n3 が 0 又は 1 の整数であり、ただし、n1 が 0 の場合は n3 は 1、n1 が 1 の場合は n3 は 0 とするか、あるいは n1 及び n3 の双方が 0 とし、m が 2 又は 3 の整数であり、シアル酸残基が Gal に 3 結合され、互いに 8 結合されることを特徴とする方法。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の方法において、前記化学構造が式 $NeuX_3 Gal_3 (NeuX_6) GlcNAc$ に従う 1 のジシアル酸付加された N - アセチルラクトサミンを含み、X が Ac 又は Gc であることを特徴とする方法。

【請求項 26】

請求項 10 に記載の方法において、前記化学構造が組成 $S_2 G_1 H_5 N_4$ 及び / 又は $S_1 G_2 H_5 N_4$ を有し、S が Neu5Ac であり、G が Neu5Gc であり、H が D - M

an又はD - Galの群から選択される六炭糖であり、NがN - D - アセチルヘキソサミン、好ましくはGlcNAc又はGalNAc、より好ましくはGlcNAcであることを特徴とする方法。

【請求項27】

請求項1に記載の方法において、N - グリカンの化学構造が式 $(NeuX)_{m_1}GalGlcNAc_2Man_3([NeuX]_{m_2}GalGlcNAc_2Man_6)Man_4GlcNAc_4GlcNAc$ に従い、XがGcかAcかのいずれかであり、ただし、少なくとも1のGc又はAcが分子中にあり、GcとAcの双方がジシアル酸エピトープ中にありうるとし、m1が2かつm2が1であるか、あるいはm2が2かつm1が1であり、シアル酸残基がGalに3結合され、互いに8結合され、前記Gal残基が3及び/又は4結合されることを特徴とする方法。

【請求項28】

請求項1に記載の方法において、N - グリカンの化学構造が式 $NeuX_3Gal_3(NeuX_6)GlcNAc_2Man_3(NeuXGal_3GlcNAc_2Man_6)Man_4GlcNAc_4GlcNAc$ 、及び/又は、他の分枝異性体 $NeuXGal_3GlcNAc_2Man_3/6(NeuX_3Gal_3(NeuX_6)GlcNAc_2Man_6/3)Man_4GlcNAc_4GlcNAc$ に従い、XがGcかAcかのいずれかであり、ただし、少なくとも1のGc又はAcが分子中にあり、GcとAcの双方がジシアル酸エピトープ中にありうるものとすることを特徴とする方法。

【請求項29】

請求項1に記載の方法において、グリカンが組成 $S_2H_4N_5F_1$ を有し、Sが Neu_5Ac 及び/又は Neu_5Gc であり、HがD - Man又はD - Galの群から選択される六炭糖であり、NがGlcNAcであり、FがL - フコースであることを特徴とする方法。

【請求項30】

請求項1に記載の方法において、分化する細胞又は細胞型における差異が分析されることを特徴とする方法。

【請求項31】

請求項1に記載の方法において、N - アセチルラクトサミン上の、好ましくはタンパク質上、及び、GD3ガングリオシドの1のラクトース残基上の、双方の化学構造が分析されることを特徴とする方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC8: G01N, C12N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched FI, SE, NO, DK Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Epo-Internal, WPI, Biosis, Medline, STN Caplus, STN Registry	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	REN, S. et al. Disialoganglioside GD3 is selectively expressed by developing and mature human mast cells. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001, Vol. 107, No. 2 Part 2, pages 322-330. page 322, abstract; page 323, left column, paragraph 1, lines 24-29; page 324, right column, paragraph 1 of results; page 324, right column, 2 last lines - page 325, left column, line 5; page 325, figure 1B; page 327, paragraph 1 of discussion, lines 1-6
Y	1-5, 7, 9-11, 30, 31 1-12, 30, 31
X	DRAPER, J. S. et al. Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. Journal of Anatomy, 2002, Vol. 200, No. Pt 3, pages 249 - 258. page 249, abstract; page 250, left column, paragraph 1, lines 14-22; pages 250 and 251, materials and methods; page 252, right column, lines 8-14; page 253, figure 3; page 254, right column, lines 2-12; page 255, figure 5
Y	1-5, 7, 9-11, 30, 31 1-12, 30, 31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 17 June 2008 (17.06.2008)	Date of mailing of the international search report 24 June 2008 (24.06.2008)
Name and mailing address of the ISA/FI National Board of Patents and Registration of Finland P. O. Box 1160, FI-00101 HELSINKI, Finland Facsimile No. +358 9 6939 5328	Authorized officer Jan-Jonas Filén Telephone No. +358 9 6939 500

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050110

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the Extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050110

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YANAGISAWA, M. and YU, R. K. The expression and functions of glycoconjugates in neural stem cells. <i>Glycobiology</i> , 2007, Vol. 17, No. 7, pages 57R-74R (First published 16 Feb 2007). page 58R, figure 1; page 58, right column, lines 6-13; pages 60R, last paragraph – page 61R, paragraph 3; page 64R, left column, paragraph 2; page 64R, right column, paragraph 2	1-5, 10, 30, 31
Y		1-12, 30, 31
X	EP 0316882 A2 (KANTO ISHI PHARMA CO LTD) 24 May 1989 (24.05.1989), page 2, line 53 – page 3, line 7; page 6, lines 5-39; page 7, lines 12-23; page 7, line 41 – page 8, line 11	16, 18, 19
X	MIYAZAKI, H. et al. Differential effects of a murine monoclonal antibody reactive with the disialylgalactosyl residue on the growth of melanoma cells and T cell activation: Comparison with anti-GD3 antibody R24. <i>International Journal of Oncology</i> , 1996, Vol. 9, No. 2, pages 241-245., page 241, abstract; page 241-242, materials and methods	16
Y	SATO, C. et al. Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein, adipo Q. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , 2001, Vol. 276, No. 31, pages 28849 – 28856., page 28849, abstract; page 28850, left column, lines 7-10; page 28853, right column, paragraphs 1 and 2; page 28853, figure 5b	1-12, 30, 31
X	WO 2007006870 A2 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALV et al.) 18 January 2007 (18.01.2007), page 7, lines 14-31; page 10, lines 14-21; page 40 line 17 – page 42, line 24; page 52, line 6 – page 61, line 5; page 66, lines 20-26; Tables 7B, 11, 14, 16, 20, 22, 25, 27, 39, 40, 43B, 47, and 48	1, 2, 20, 21, 26, 29, 30, 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FI2008/050110

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members(s)	Publication date
EP 0316882 A2	24/05/1989	KR 960014441B B1	15/10/1996
		IL 88400 A	10/06/1993
		AU 2518688 A	25/05/1989
		AU 624583B B2	18/06/1992
		NO 885113 A	18/05/1989
		HU 48679 A2	28/06/1989
		CN 1042734 A	06/06/1990
		CA 1337800 C	26/12/1995
		NZ 226974 A	27/03/1990
		FI 885279 A	18/05/1989
		DE 3850634T T2	27/10/1994
		AT 108482T T	15/07/1994
		US 5141864 A	25/08/1992
		JP 1132374 A	24/05/1989
.....			
WO 2007006870 A2	18/01/2007	AU 2006268559 A1	18/01/2007
		EP 1904532 A2	02/04/2008
		WO 2008000918 A1	03/01/2008
		WO 2007054622 A1	18/05/2007
		WO 2007054620 A1	18/05/2007
		FI 20060630 A	12/01/2007
.....			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FI2008/050110

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI2008/050110

Continuation of Box No. III

The single general inventive concept for claims 1-31 is a method to analyse the status of human stem cells by analyzing glycan structures comprising at least two sialic acid residues.

In view of the prior art cited in the international search report the above mentioned method do not comprise a special technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT.

This authority found that there are at least two inventions within claims 1-31 not so linked as to form a single general inventive concept in this international application, as follows:

Method for analyzing status of human stem cells by analyzing the amount of or presence of a structure, comprising at least two sialic acid residues per

Invention I: a. one N-acetyllactosamine preferably on protein or

Invention II: b. one lactose residue of GD3 ganglioside

In view of the prior art cited in the international search report further lack of unity seems to exist within both of the inventions, since the structures do not appear to comprise a common structural feature different from the prior art structures.

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ナトゥーネン, スヴィ
フィンランド共和国 ヴァンター エフアイ - 0 1 5 2 0 , オーラニンティ 1 0 イー 1 8

(72) 発明者 サトマー, テロ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ - 0 0 7 0 0 , ラエティ 1 0 ケイ

(72) 発明者 ナトゥーネン, ヤリ
フィンランド共和国 ヴァンター エフアイ - 0 1 5 2 0 , オーラニンティ 1 0 イー 1 8

(72) 発明者 ヴァルム, レーナ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ - 0 0 6 3 0 , スールスオンティ 1 9

(72) 発明者 ピッカネン, ヴィルヴェ
フィンランド共和国 ヘルシンキ エフアイ - 0 0 1 8 0 , サンタカトゥ 2 ジー 1 1 6

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ08 QQ67 QR72 QR77 QS33 QS36 QS39 QX01

专利名称(译)	人细胞的新型酸性聚糖标记物		
公开(公告)号	JP2010519922A	公开(公告)日	2010-06-10
申请号	JP2009552238	申请日	2008-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	扫描Homet放大器奈嫩江启发式帆帕尔贝尔 格力高扫描芬兰有限公司		
申请(专利权)人(译)	锁门Punainen启发式, Veriparuberu Grikos芬兰有限公司		
[标]发明人	ナトウーネンスヴィ サトマーテロ ナトウーネンヤリ ヴァルムレーナ ピッカネンヴィルヴェ		
发明人	ナトウーネン,スヴィ サトマー,テロ ナトウーネン,ヤリ ヴァルム,レーナ ピッカネン,ヴィルヴェ		
IPC分类号	C12Q1/04 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/56966 G01N2400/38		
FI分类号	C12Q1/04 G01N33/53.S		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ67 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	Goichi高桥		
优先权	2007000199 2007-03-08 FI		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及分析几种类型人细胞的新型酸性聚糖标记物。通过质谱法或特定的粘合剂分子进行分析。