

(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2005-506849

(P2005-506849A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/04	Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12	A 6 1 K 35/12		4 B O 6 3
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 7/00		4 B O 6 5
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/06		4 C O 8 7
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00		
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 108 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-540336 (P2003-540336)	(71) 出願人	504058570
(86) (22) 出願日	平成14年10月24日 (2002.10.24)		ザ・ピーター・マッカラム・キャンサー・
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月30日 (2004.4.30)		インスティテュート
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/001443		THE PETER MACCALLUM
(87) 国際公開番号	W02003/038071		CANCER INSTITUTE
(87) 国際公開日	平成15年5月8日 (2003.5.8)		オーストラリア国、ヴィクトリア 300
(31) 優先権主張番号	PR 8565		2、イースト・メルボルン、セント・アン
(32) 優先日	平成13年10月30日 (2001.10.30)		ドリュース・プレイス、スモルガン・ファ
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		ミリー・ビルディング
		(74) 代理人	100078662
			弁理士 津国 肇
		(74) 代理人	100075225
			弁理士 篠田 文雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造血幹細胞およびその子孫の検出およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、造血幹細胞 (HSC) またはその子孫を含む細胞試料を得る工程；グルクロン酸およびN - アセチルグルコサミンの二糖繰り返し配列の少なくとも1個を有する炭水化物配列またはその同等物の少なくとも1個の存在を検出する工程；およびその配列またはその同等物を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法に関する。本発明は、HSCまたはその子孫を単離するために、HSCまたはその子孫の細胞集団を濃縮する方法、およびそれらの発明の方法を用いて得られた細胞調製物、およびそれらの使用にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

造血幹細胞（HSC）またはその子孫を含む細胞試料を得る工程；
グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンの二糖繰り返し配列の少なくとも1個を有する炭水化物配列またはその同等物の少なくとも1個の存在を検出する工程；およびその配列またはその同等物を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法。

【請求項 2】

ヒアルロン酸（HA）、ヒアルロン酸シンターゼ（HAS）またはその断片用のマーカーと細胞との相互作用を促進する手法で、試料をそのマーカーに暴露するか、またはそのマーカーと混合する、請求項1記載の方法。 10

【請求項 3】

マーカーが、細胞表面上のHA、HASまたはその断片を同定する、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

マーカーが、HA、HASまたはその断片への抗体；HA、HASまたはその断片へのアゴニストおよびアンタゴニスト；HA、HASまたはその断片への結合蛋白質；DNA、RNA、mRNA、またはHAあるいはHAS蛋白質の存在によってHAまたはHASの発現を検出し得る核酸検出システム；ならびにHA、HASまたはその断片用の酵素、蛍光または比色アッセイからなる群から選択される、請求項3記載の方法。 20

【請求項 5】

結合蛋白質が、ヒアルロン酸結合蛋白質（HABP）である、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

マーカーが、そのマーカーの同定を強化させるための標識を包含する、請求項2記載の方法。

【請求項 7】

蛍光、放射線または酵素標識が、検出を強化させるためのマーカーに結合している、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；
細胞上のヒアルロン酸（HA）またはヒアルロン酸シンターゼ（HAS）もしくはその断片の存在を検出する工程；および
細胞上のHA、HASまたはその断片を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含む請求項1記載の方法。 30

【請求項 9】

HAまたはHASを検出する、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

HASの一部に対応するペプチド配列またはその同等物を検出する、請求項8記載の方法。

【請求項 11】

試料が、胚または成体の供給源に由来する、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。 40

【請求項 12】

細胞試料が、腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊髄、骨膜、骨内膜または他の骨腔をはじめとする骨髄に由来する、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項 13】

細胞試料が、血液、胚の卵黄囊、胎児肝臓、脾臓、末梢血、皮膚、真皮、ES細胞またはES細胞培養物に由来する、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項 14】

試料が、組織試料、細胞懸濁物またはインビトロで増殖させた細胞である、請求項1～13のいずれか1項記載の方法。 50

【請求項 15】

試料を、H A、H A Sまたはその断片の検出前に、C D 3 4⁺細胞に対して濃縮する、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 16】

H S Cまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

その試料をH A、H A Sまたはその断片に対する抗体と混合する工程；

H A、H A Sまたはその断片の存在を検出する工程；および

H S Cまたはその子孫上の抗体の存在を検出することによって、H A、H A Sまたはその断片を有するH S Cまたはその子孫を同定する工程、を含む請求項 8 記載の方法。

【請求項 17】

抗体が、H A、H A Sまたはその断片に特異的である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

H S Cまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

その試料をH A、H A Sまたはその断片に対する結合蛋白質と混合する工程；

その結合蛋白質の存在を検出する工程；および

H S Cまたはその子孫上のその結合蛋白質の存在を検出することによって、H A、H A Sまたはその断片を有するH S Cまたはその子孫を同定する工程、を含む請求項 8 記載の方法。

【請求項 19】

結合蛋白質が、H A B P、またはH A B Pに基づく合成指示薬である、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

H S Cまたはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

細胞上のH A、H A Sまたはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上のH A、H A Sまたはその断片の存在によって同定された細胞を選択する工程、を含むH S Cまたはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法。

【請求項 21】

検出方法が、H AもしくはH A Sへの抗体；またはH Aへの結合蛋白質（H A B P）の使用を伴う、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

H S Cまたはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

細胞上のH A、H A Sまたはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上のH A、H A Sまたはその断片の存在によって同定された細胞を選び出す工程、を含む集団からH S Cまたはその子孫を除去する方法。

【請求項 23】

選択前にH AまたはH A Sを検出するために抗体またはH A B Pを用いる、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

H S C関係状態または関連状態を処置または診断する方法における、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項記載の方法によって単離または同定されたH S Cの使用。

【請求項 25】

H S C関係状態または関連状態を処置または診断する薬剤の調製における、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項記載の方法によって単離または同定されたH S Cの使用。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項記載の方法および特異的細胞系列用の特異的マーカーを用いて細胞系列を同定および単離することを含む、H S C集団内の亜集団を単離するための方法。

【請求項 27】

細胞系列が、リンパ球、骨髄球または赤血球細胞系列である、請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

10

20

30

40

50

H S C またはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

その試料を H A、H A S またはその断片に対する抗体と混合する工程；

その抗体の存在を検出する工程；および

H S C またはその子孫上の抗体の存在を検出することによって、H A、H A S またはその断片を有する H S C またはその子孫を同定する工程、を含む請求項 1 記載の方法。

【請求項 29】

抗体が、H A、H A S またはその断片に特異的である、請求項 28 記載の方法。

【請求項 30】

抗体が、酵素、磁気ビーズ、コロイド状磁気ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物、クロマトグラフィー樹脂、固体支持体および薬物からなる群から選択される分子または化合物とコンジュゲートしている、請求項 28 または 29 記載の方法。 10

【請求項 31】

酵素が、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼおよび - ガラクトシダーゼからなる群から選択される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

蛍光色素が、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、フィコエリトリン、アロフィコシアニンおよびテキサスレッドからなる群から選択される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 33】

金属化合物が、フェリチン、コロイド金およびコロイド状超常磁性ビーズからなる群から選択される、請求項 30 記載の方法。 20

【請求項 34】

ハプテンが、ビオチン、ジゴキシゲニン、オキサザロンおよびニトロフェノールからなる群から選択される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 35】

放射性化合物が、テクネチウム 99m、¹²⁵I、および放射性核種を含むアミノ酸からなる群から選択される、請求項 30 記載の方法。

【請求項 36】

放射性核種が、¹⁴C、³H および ³⁵S からなる群から選択される、請求項 35 記載の方法。 30

【請求項 37】

C D 3 4⁺ を前濃縮し、請求項 8 記載の H A、H A S またはその断片の検出によって H S C またはその子孫を同定し、別のマーカーを H A、H A S またはその断片用のマーカーと別個か、または組合わせて用いてその亜集団を識別することを含む、H S C 集団内の亜集団を識別する方法。

【請求項 38】

亜集団を、H A または H A S の発現のレベルによって識別する、請求項 37 記載の方法。

【請求項 39】

識別された亜集団が、C D 3 4⁺、C D 3 8⁻、C D 9 0⁺ (t h y 1) および L i n⁻ 細胞からなる群から選択される H S C 集団の表現型である、請求項 37 記載の方法。 40

【請求項 40】

細胞および抗体またはマーカーを、抗体またはマーカーが H A または H A S および H S C またはその子孫に特異的に結合するのに十分な条件下で混合し、その後定量する、試料中の H S C またはその子孫の数を測定するための診断アッセイ。

【請求項 41】

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得ること；

細胞上の H A、H A S またはその断片の存在を検出すること；

H A、H A S またはその断片の存在によって同定された細胞を選択することを含む、H S C またはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法。

【請求項 42】

H A、H A S またはその断片を認識してそれらに結合する抗体、マーカ-または結合蛋白質を H A、H A S またはその断片に結合させる条件下で、その抗体、マーカ-または結合蛋白質と H S C またはその子孫の混合物とを混合し、その抗体、マーカ-または結合蛋白質によって認識された細胞を分離して、H S C またはその子孫を実質的に濃縮した集団を得ることを含む、H S C またはその子孫の集団を濃縮する方法。

【請求項 4 3】

請求項 4 1 記載の方法と、物理的性質、細胞表面特性および生体染色特性の相違に基づく分離または単離技術からなる群から選択される分離または濃縮技術との使用を含む H S C またはその子孫を分離または濃縮する方法。

【請求項 4 4】

技術が、F A C S、または複数のカラーチャンネル、低角度オブチュ-ズ光散乱検出チャンネル、もしくはインピーダンスチャンネルによって改変された F A C S である、請求項 4 3 記載の方法。

【請求項 4 5】

細胞を、H A、H A S またはその断片への抗体を用いた正の選択によって、最初大まかな分離によって分離し、その後精密な分離によって分離する、請求項 4 2 または 4 3 記載の方法。

【請求項 4 6】

H A または H A S の同定の前に、前濃縮工程で C D 3 4⁺細胞を濃縮する、請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得る工程；
その細胞集団を H A、H A S またはその断片に対する結合蛋白質と混合する工程；および細胞上の H A、H A S またはその断片を示す結合蛋白質の存在によって同定された細胞を選択する工程、を含む H S C またはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法。

【請求項 4 8】

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得る工程；
その細胞集団を H A、H A S またはその断片に対する抗体と混合する工程；および細胞上の H A、H A S またはその断片を示すその抗体の存在によって同定された細胞を選択する工程、を含む H S C またはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法。

【請求項 4 9】

細胞集団用の特異的マーカ-を、細胞集団を更に濃縮するために用いる、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

特異的マーカ-が、特異的細胞系列用のものであり、これらの細胞を濃縮するため、またはこれらの細胞の反対を濃縮するために用いられる、請求項 4 9 記載の方法。

【請求項 5 1】

細胞系列が、リンパ球、骨髄球または赤血球系列である、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

マーカ-が、間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞を除去または選び出すことによって、H S C またはその子孫を濃縮するために用いられる、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 3】

別の幹細胞特異性マーカ-の正の選択により更に濃縮することを含む、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 4】

幹細胞マーカ-を、C D 3 4⁺、T h y - 1⁺および c - k i t⁺からなる群から選択する、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

請求項 1 9、2 0 および 4 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項記載の方法によって調製される H S C またはその子孫の濃縮集団。

10

20

30

40

50

【請求項 56】

HSC またはその子孫を除去した集団を残すために、HA またはHAS を発現する細胞を選び出すことによって、HSC またはその子孫を実質的に含まない集団を提供するためのHA またはHAS の使用。

【請求項 57】

HA、HAS またはその断片への抗体または結合蛋白質を用いて、HA またはHAS を検出する、請求項 56 記載の使用。

【請求項 58】

HA を、HABP によって検出する、請求項 56 記載の使用。

【請求項 59】

HSC またはその子孫に対する負の選択を受けていない対照細胞集団に比べて減少したHSC 集団を有する細胞集団。

10

【請求項 60】

HSC またはその子孫を含む細胞集団を得ること；
細胞上のHA、HAS またはその断片の存在を検出すること；
細胞上のHA、HAS またはその断片の存在によって同定されたそれらの細胞を選択すること；
HA、HAS またはその断片の存在によって同定されたそれらの細胞を単離すること、を含むHSC またはその子孫を単離する方法。

【請求項 61】

HSC の単離が、抗体コート化磁気ビーズ、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローナル抗体と結合した細胞毒性剤、またはモノクローナル抗体と共に用いる細胞毒性剤、および固体マトリックスに結合した抗体の使用からなる群から選択される方法による、請求項 60 記載の方法。

20

【請求項 62】

HSC またはその子孫を含む細胞集団を得ること；
その細胞集団をHA、HAS またはその断片に対する結合蛋白質と混合すること；
HA、HAS またはその断片の結合蛋白質によって同定されたそれらの細胞を選択すること；
その結合蛋白質によって同定された細胞を単離すること、を含むHSC またはその子孫を単離する方法。

30

【請求項 63】

HSC またはその子孫を含む細胞集団を得ること；
その細胞集団をHA、HAS またはその断片に対する抗体と混合すること；
HA、HAS またはその断片に対する抗体によって同定されたそれらの細胞を選択すること；
その抗体によって同定された細胞を単離すること、を含むHSC またはその子孫を単離する方法。

【請求項 64】

抗体が、HA またはHAS に特異的である、請求項 63 記載の方法。

40

【請求項 65】

抗体が、全種の HA ポリクローナルヒツジ抗体である、請求項 64 記載の方法。

【請求項 66】

請求項 60 ~ 65 のいずれか 1 項記載の方法によって単離されたHSC またはその子孫。

【請求項 67】

細胞が、CD34⁺、HA⁺である、請求項 66 記載のHSC。

【請求項 68】

細胞が、CD34⁺、thy1、HA⁺である、請求項 66 記載のHSC。

【請求項 69】

細胞が、CD34⁺、CD38⁻、thy1⁺、HA⁺である、請求項 66 記載のHSC。

50

【請求項 70】

C D 3 4⁺、C D 3 8⁻、t h y 1⁺およびH A⁺細胞を含む細胞の濃縮集団を含む、濃縮したH S Cおよびその子孫の組成物。

【請求項 71】

自家生着における請求項 70 記載の組成物の使用。

【請求項 72】

遺伝子欠損を修復するため、またはH S Cもしくはその子孫あるいはその子孫の生来欠けている遺伝子能力を提供するための、遺伝子導入によって改変された請求項 70 記載の組成物の使用。

【請求項 73】

H S Cまたはその子孫の再生および分化に関連する因子を単離および定義するための、請求項 70 記載の組成物の使用。

【請求項 74】

H S Cまたはその子孫を含む細胞集団を得ること；
その細胞集団をH A、H A Sまたはその断片に対する結合蛋白質と混合すること；
H A、H A Sまたはその断片に対する結合蛋白質によって同定されたそれらの細胞を選択すること；
その結合蛋白質による選択の前の細胞集団中の細胞の量に対する選択細胞の量を定量すること、を含むH S Cまたはそれらの子孫の含量を測定する方法。

【請求項 75】

H S Cまたはその子孫を含む細胞集団を得ること；
その細胞集団をH A、H A Sまたはその断片に対する抗体と混合すること；
H A、H A Sまたはその断片に対する抗体によって同定されたそれらの細胞を選択すること；
そのH AまたはH A S抗体による選択の前の細胞集団中の細胞の量に対する選択細胞の量を定量すること、を含むH S Cまたはその子孫の含量を測定する方法。

【請求項 76】

H S C関連状態の診断のための、請求項 74 または 75 記載の方法の使用。

【請求項 77】

その状態が、白血病、上皮性悪性腫瘍、非上皮性悪性腫瘍、およびH S Cまたはそれらの子孫の活性増加を引き起こす一般的感染からなる群から選択される、請求項 76 記載の使用。

【請求項 78】

H S Cまたはそれらの子孫の活性増加が、造血幹細胞集団内で起こる、請求項 77 記載の使用。

【請求項 79】

H S Cまたはそれらの子孫の活性増加が、リンパ球系列内で起こる、請求項 77 記載の使用。

【請求項 80】

定量が、リンパ球系列から分化して、抗体産生、細胞免疫系の調節、血液中の異物の検出、または宿主にとって異物である細胞の検出をもたらす、B細胞およびT細胞を示すことの提供である、請求項 74 または 75 記載の方法。

【請求項 81】

細胞集団から同定されたH S Cまたはそれらの子孫を有する抗体処置試料を無処置試料と比較して、H S Cを含む成分を同定することを含む、請求項 75 記載の方法。

【請求項 82】

H AまたはH A Sもしくはその断片の指示薬および担体を含む、集団内のH S Cまたはその子孫を検出するための組成物。

【請求項 83】

H A、H A Sまたはその断片の指示薬が、H S Cまたはその子孫上のH AまたはH A Sも

10

20

30

40

50

しくはその断片を同定し得る検出手段を包含する、請求項 8 2 記載の組成物。

【請求項 8 4】

指示薬が、H A、H A S またはその断片への抗体または結合蛋白質である、請求項 8 3 記載の組成物。

【請求項 8 5】

結合蛋白質が、H A B P である、請求項 8 4 記載の組成物。

【請求項 8 6】

特異的細胞系列を識別するための別のマーカーを含む、請求項 8 3 記載の組成物。

【請求項 8 7】

細胞集団中の H S C またはその子孫の存在を同定することによって、H S C またはその子孫に関連する状態を診断する方法。 10

【請求項 8 8】

H S C またはその子孫中の H A、H A S またはその断片の発現および/または活性を調整することを含む、H S C またはその子孫の増殖および/または分化を制御する方法。

【請求項 8 9】

H S C 内の H A または H A S の発現および/または活性の調整を、H A または H A S のアンタゴニスト、阻害剤、擬似物質または誘導体を用いて実行する、請求項 8 8 記載の方法。

【請求項 9 0】

請求項 1 9、2 0 および 4 1 ~ 5 4 のいずれか 1 項記載の方法によって調製された H S C またはその子孫の濃縮集団を含む組成物の有効量を投与することを含む、H S C 関連状態を処置する方法。 20

【請求項 9 1】

H S C 関連状態が、大球性貧血および再生不良性貧血；血小板減少症；形成不全；汎発性血管内凝固症候群 (D I C)；脊髄形成異常；自己免疫性血小板減少性紫斑症 (I T P)；H I V 誘導性 I T P および白血病からなる群から選択される、請求項 9 0 記載の方法。

【請求項 9 2】

エリトロポエチン、コロニー刺激因子、インターロイキンから選択される因子、および H S C またはその子孫に関連するストローマ細胞を用いて、1 種以上の選択系列への成熟、増殖および分化をもたらすことによる、免疫無防備状態の宿主を再生させるための細胞の使用、または特異的系列のための細胞源としての細胞の使用。 30

【請求項 9 3】

造血細胞の分化および成熟に関連する因子の単離および評価における H S C およびその子孫の使用。

【請求項 9 4】

遺伝子疾患の処置のための H S C の使用。

【請求項 9 5】

遺伝子欠損を修復するための自家幹細胞または同種異型幹細胞の遺伝子改変による、H S C に関連する遺伝子疾患の処置のための請求項 9 4 記載の使用。

【請求項 9 6】

疾患が、 - サラセミア、鎌状赤血球貧血、またはアデノシンデアミナーゼ、レコンビナーゼもしくはレコンビナーゼ調節遺伝子内の欠損である、請求項 9 5 記載の使用。 40

【請求項 9 7】

H S C またはその子孫の非制御的増殖から生じる H S C 関連状態を処置する方法であって、H S C またはその子孫内での H A、H A S またはその断片の発現を制御することを含む方法。

【請求項 9 8】

H S C またはその子孫の非制御的増殖から生じる H S C 関連状態を処置する方法であって、H S C またはその子孫内での H A、H A S またはその断片の発現および/または活性を低下させることを含む方法。 50

【請求項 99】

状態が、急性骨髄性白血病（AML）および慢性骨髄性白血病（CLL）からなる群から選択される、請求項 98 記載の方法。

【請求項 100】

HSC またはその子孫の分化から生じる HSC 関連状態を処置する方法であって、HSC またはその子孫内での HA、HAS またはその断片の発現および / または活性を制御することを含む方法。

【請求項 101】

HSC またはその子孫の分化から生じる HSC 関連状態を処置する方法であって、HSC またはその子孫内での HA、HAS またはその断片の発現および / または活性を低下させることを含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数の細胞型、特に造血幹細胞（HSC）および HSC 由来細胞の特異的集団の同定に関する。本発明は、幹細胞およびその子孫の分離および使用の方法も提供する。幹細胞およびそれらの子孫の発育を調節する方法も得られる。

【0002】

緒言

その細胞の濃縮集団を得る努力の中で、特異的細胞型を同定することに大きな関心が寄せられている。濃縮集団を保持することによって、特異的細胞型がより明確に理解され、移植、遺伝子療法、白血病のような癌、乳癌を含む新生物性癌をはじめとする疾患の処置、または組織および皮膚の修復を含む様々な状況での使用が得られる。

20

【0003】

幹細胞は、最終的に植物または動物の様々な部分に寄与する細胞を生成する。幹細胞の一種が、造血幹細胞である。

【0004】

造血幹細胞は、非常に様々な範囲の活性を担うことができる。それらは、リンパ球、骨髄球および赤血球をはじめとする数種の系列に分裂される。B 細胞および T 細胞を含むリンパ球系列は、抗体を産生し、細胞免疫を調節して、血中の疾患誘導性生物のような異物を検出する。単球、顆粒球および巨核球をはじめとする骨髄球系列は、血液の異物を監視し、新生物細胞から防御し、異物を取り除いて、血小板を産生する。赤血球系列は、酸素を運搬する赤血球細胞を包含する。

30

【0005】

造血幹細胞は、自己再生能、多系列の増殖および分化能、ならびに造血およびリンパ球系を長期間支持する能力を有している。それらは、主として可能性がより限定された細胞を含む造血前駆細胞コンパートメント（haematopoietic progenitor compartment）（HPC）内で亜集団を形成する。HPC 細胞は、主として骨髄ストローマ内に存在し、そこではストローマ細胞と、細胞外マトリックス成分と、サイトカインとの複雑な相互作用によって、細胞増殖および分化が調節されている。HPC 細胞は、様々な生理学的、病理学的および医原的環境下の血中にも存在する。HPC は、骨髄または末梢血から採取されることができ、消耗的（即ち破壊的）線量の化学療法および / または放射線療法を受けた患者に静注することによって、骨髄を再度生着させて造血および免疫を再生させる。こうして HSC 細胞移植は、血液および固形の悪性疾患、骨髄不全、ならびに造血、免疫または代謝の先天性異常の患者の管理において、相当な臨床的用途を持つ。

40

【0006】

こうして、自家 HPC 細胞を供給することが必要とされているが、その自家 HPC 細胞は、HPC 細胞集団が化学療法および / または放射線療法によって枯渇された患者に再導入される前に、インビトロで培養されてもよい。そのような HPC 細胞の集団は、自然に正常レベルを回復するのに数週または数ヶ月かかる場合がある。患者自身からの自家細胞を

50

使用すれば、移植細胞の拒絶が避けられる。

【0007】

インビボでは、HPC細胞は一般に、骨髄ストローマ内に存在する。インビトロでのHPC細胞は、より分化した前駆細胞を増殖および放出する前に、骨髄ストローマに接着することができる。幹細胞は、多系統に著しく増殖および分化して、最終的に赤血球、血小板、様々な白血球、ならびにTおよびBリンパ球のような免疫細胞のような、完全に分化した細胞または子孫を生成する。こうして、HPC細胞または幹細胞を、それが枯渇した患者に再導入すれば、これらの造血細胞型の十分な集団を得る。

【0008】

造血幹細胞が相対的に不足することで、一般に幹細胞および造血系の分化についての広範囲な研究が妨げられてきた。造血幹細胞を濃縮した細胞集団が容易に入手できれば、幹細胞の挙動に影響を及ぼす生物学的改変物質の同定が可能になる。例えば、(1)特定の系列への幹細胞の献身(dedication)という初期の工程；(2)そのような献身の阻害；および(3)幹細胞増殖を制御する能力、に関連する未だ発見されていない増殖因子があるかもしれない。

【0009】

濃縮集団中の十分な数の幹細胞を利用できることは、例えば癌の化学療法のような幹細胞を破壊する処置を受けた患者の造血を再生させるのにも極めて有用となる。

【0010】

造血を成体哺乳類の骨髄(BM)に局在化させるには、原始造血幹細胞(HSC)と、ストローマ細胞が介する骨髄の造血微小環境(HM)間の発達上での調節された相互作用を伴う、という提案が、かなりの証拠によって裏づけられている。

【0011】

BM内の成熟した造血細胞の解剖学的位置は、より原始的な細胞の空間的分布よりもより良く理解されている。マウスにおける過去の研究で、系列の限定されたクローン化造血前駆細胞(HPC)も、縦方向の中心静脈近くで大腿骨の軸を交差する明確に定義された空間的分布に最大数あって同じであることが確認された。これに対して、分類体系的により原始的な前駆体である脾臓コロニー形成単位(CFU-S)は、骨髄の中心領域に少なく、骨に隣接した領域である骨内膜に最大濃縮があるという逆の分布を示す。

【0012】

静注された細胞によって造血を回復するには、BM HM内のHPCのホーミング、移動および定着(lodgement)をはじめとする複数の調和したイベントが必要となる。初期のイベントであるホーミングは、HSCをBMへ循環させる特異的な募集であり、骨髄の微小血管上皮によるHSCの選択的認識、および上皮細胞を通じた血管外造血部位への移動を伴う。これに対して、定着は、管外遊出後のイベントを包含し、血管外コンパートメント内の適切なHM隙間(niches)に細胞を選択的に移動させること、と定義されている。現在のデータは、ホーミングが、成熟した白血球の、組織への管外遊出に関わるものと同様の細胞接着分子(CAM)のカスケードを伴うことを示唆している。原始造血細胞は、インテグリン、シアロムチン、IgスーパーファミリーおよびCD44ファミリーの様々なメンバーをはじめとする幅広いCAMのレパートリーを示す。現在のデータは、BMへのHSCホーミングにおける、P-セレクチンのシアロムチンレセプターであるPSG-1、 α インテグリン VLA-4、およびSDF-1のレセプターであるCXCR4の重要な役割を示唆している。これに対して、BMへのホーミングの後、HSC定着の部位に影響を及ぼす分子については、ほとんど知られていない。

【0013】

しかし、細胞表面マーカーによるこれらの特異的細胞型の同定が、一般に同定の最良の手段であることが証明されている。別の細胞表面抗原の同定が、造血幹細胞の同定、分離および更なる特徴づけにおいて、非常に価値があることは明らかである。

【0014】

最年まで、BM内の造血幹細胞(HSC)の空間分布を定義することは、不可能であった

。これは、HSCが手に入りやすく、疑いのない現場 (in-situ) 同定を可能にする、単一の独特な抗原マーカーが無かったためである。

【0015】

したがって、本発明の目的は、先行技術の問題の幾つかを克服する、または少なくとも軽減することにある。

【0016】

発明の概要

出願人は、ヒアルロン酸 (HA) およびヒアルロン酸シターゼ (HAS) が、造血幹細胞 (HSC) 内で発現されることを見出した。HAは、一般に多数の細胞の細胞外マトリックス内に見出される高分子量直鎖状炭化水素である。

10

【0017】

本発明の1つの態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

【0018】

HAまたはHASもしくはその同等物もしくはその断片を同定するいずれの手段が用いられてもよい。しかし、本発明の好ましい態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

20

その試料をHAまたはHASもしくはその断片に対する抗体と混合する工程；

HAまたはHASもしくはその断片の存在を検出する工程；および

HSCまたはその子孫上の抗体の存在を検出することによって、HAまたはHASもしくはその断片を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

【0019】

好ましくは抗体は、HAまたはHASもしくはその断片に特異的ないずれかの抗体である。本発明で用いられる抗体は、HAを示し、HAまたはHASもしくはその断片に特異的に結合するのに十分な特異性を保持する天然または組換え体のどちらか、合成または天然由来のどちらか、モノクローナルまたはポリクローナルのどちらかの、いずれの抗体またはその断片も包含する。

30

【0020】

本発明の更に別の好ましい態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

その試料をHAまたはHASもしくはその断片の結合蛋白質と混合する工程；

その結合蛋白質の存在を検出する工程；および

HSCまたはその子孫上のその結合蛋白質の存在を検出することによって、HAまたはHASもしくはその断片を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

【0021】

40

結合蛋白質、特にHA結合蛋白質 (HABP) は、HAを検出するのに有用である。HABPは、生化学工業株式会社から得てもよい。しかし、その結合蛋白質の性質に基づきいずれの同等物も、HAを同定するために用いられてよい。その結合蛋白質の結合部分が同定されて、指示薬またはHAとして合成的に調製されると考えられる。したがって、HABPを基剤とする合成指示薬は、本発明の範囲内のものである。

【0022】

本発明は、

HSCまたはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在によって同定された細胞を選択する工

50

程、を含むHSCまたはその子孫を濃縮された細胞集団を得る方法も包含する。

【0023】

好ましくは検出方法は、HAまたはHASへの抗体の使用を伴うか、あるいはHAへの結合蛋白質(HABP)が用いられて、HAまたはその同等物を検出することもできる。

【0024】

同じく、別の好ましい実施形態において、

HSCまたはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在によって同定されたそれらの細胞を選び出す工程、を含む集団からHSCまたはその子孫を除去する方法を提供する。

10

【0025】

更に、選択の前のHAまたはHASを検出するために、抗体またはHABPが使用されてもよい。

【0026】

本発明に記載された方法は、HSCもしくはその子孫を細胞集団から分離するため、またはそのような集団中のHSC含量を測定するために利用されてもよい。HSCが分離または同定されれば、それらがHSC関係状態または関連状態を処置または診断する方法に用いられてもよく、あるいは更なる分離技術が、HSC集団内の亜集団を分離するために用いられてもよい。リンパ球、骨髄球または赤血球細胞のような特異的細胞系列用の特異的マーカーが、様々な細胞系列を同定および分離するために用いられてもよい。

20

【0027】

発明の記載

本発明に1つの態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンの二糖繰り返し配列の少なくとも1個を有する炭水化物配列またはその同等物の少なくとも1個の存在を検出する工程；および

その配列またはその同等物を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

【0028】

本明細書に記載された炭水化物配列は、HSCまたはその子孫上に特異的に発現されることが見出されている。その配列は、グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンを含む二糖繰り返し単位またはその同等物の少なくとも1個を包含する。複数の繰り返し二糖単位が、二糖繰り返し配列の連続分子として結合されて直鎖状分子を提供してもよく、あるいはその炭水化物繰り返し配列に、グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンの二糖ではない分子またはその同等物が散在されていてもよい。しかし、少なくとも2個の二糖単位が順序正しくグルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンまたはそれらの同等物、その後グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミンまたはそれらの同等物を含む少なくとも4個の糖であることを提供する、少なくとも1個の繰り返し二糖によってHSCまたはその子孫を同定できる。

30

【0029】

本明細書で用いられる用語「その同等物」は、同様の方法で作用する配列または分子を意味するが、その配列または分子の活性または作用を実質的に変化させない欠失、付加または置換を有していてもよい。

40

【0030】

本発明の別の態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片を有するHSCを同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

【0031】

50

出願人は、HSCおよびその子孫が、HAを合成および発現することを示した。HA合成および発現は、多数の哺乳類系に見出されており、主に原始造血細胞内に発現される。HAは、骨髄内の移植HSCの定着に不可欠であり、それらの空間分布を著しく変化させるヒアルロニダーゼを用いて特異的に除去されることが見出されている。加えて、インビトロでHSCの表面上のHAを代替のリガンドに結合させると、HSCの増殖および分化が十分に抑制される。

【0032】

その産生に関連する分子は、これまでHSCやそれらの同定に関連づけられていなかった。特に、その分子は、HSCまたはその子孫からの発現に関連づけられていなかった。

【0033】

HAは、繰り返し二糖単位（グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミン）のある単鎖高分子量多糖類であり、3種のHAS遺伝子（Has1、Has2、Has3）のうち1種によってコード化された3種のヒアルロン酸シンターゼ（HAS）のうち1種によって合成される。最後のものは、血漿膜に存在する、絶対不可欠な膜グリコシルトランスフェラーゼであり、HAを細胞表面の蛋白質に共有結合しない遊離直鎖状ポリマーとして細胞周囲の空間に転移させる。つまりHAは、多くの異なる器官に存在しており、BM微小環境内のECMの成分である。細胞表面HAは、正常および新生物の両方の様々な細胞型の接着、運動および増殖に有意に影響を及ぼす。多価性である（隣接細胞の多数のレセプターを架橋させる）ことによって、内在性の細胞表面HAとその主たるレセプターCD44との相互作用は、複数の細胞型の凝集を媒介する。細胞のHAへの暴露、またはHAもしくはHASの異所性発現のどちらかによって、細胞の運動または浸潤が増加する。その上、HA分解またはHAレセプターの遮断のどちらかの結果として、細胞運動の阻害も起こる。HAは、細胞増殖、分化および組織修復にも影響を及ぼし、HAが、腫瘍の病原および転移部に関わる場合もある。

【0034】

HAまたはHASもしくはHASの断片が、HSC上で検出されてもよい。好ましくはHAまたはHAS分子が検出される。しかし、HAS分子の断片によって、HAが指示されてもよい。そのような断片が、HAS分子の一部に対応するペプチド配列またはその同等物を含んでいてもよい。

【0035】

本明細書の説明および特許請求の範囲の全体を通して、言語「含む」、および「含んでいる」並びに「包含する」のようなその言葉の変形は、その他の添加剤、成分、整数または工程を除外するものではない。

【0036】

HSCまたはその子孫の試料は、胚または成体の供給源をはじめとするいずれの供給源から発しているもよい。好ましくはそのHSC供給源は、腸骨稜、脛骨、大腿骨、脊髄、骨膜、骨内膜または他の骨腔をはじめとする骨髄からのものである。HSCは、血液、胚の卵黄嚢、胎児肝臓、脾臓、末梢血、皮膚、真皮に由来してもよく、またはES細胞もしくはES細胞培養物に由来してもよい。

【0037】

その試料は、いずれかの供給源に由来し、HAまたはHASもしくはその断片用のマーカの相互作用によってHSCまたはその子孫を同定した組織試料もしくは細胞懸濁物またはインビトロで増殖させた細胞であってもよい。試料は、HAまたはHASもしくはその断片の検出前に、CD34⁺細胞を濃縮されてもよい。

【0038】

骨髄の単離のために、限定するものではないが低濃度、一般に約5~25mMの許容され得る緩衝液と共に、ウシ胎児血清（FCS）または他の天然由来因子を簡便に補充した塩溶液をはじめとする適切な溶液が、骨を洗い流すために用いられることができる。簡便な緩衝液としては、限定するものではないが、HEPES、リン酸緩衝液および乳酸緩衝液が挙げられる。さもないければ、従来技術によって、骨髄が骨から吸引されることができ

10

20

30

40

50

る。

【0039】

本明細書で用いられる用語「子孫」は、HSCに由来する全ての細胞を包含し、いずれか特定の細胞型に分化又は特異化されていない原始細胞を包含する。

【0040】

HAまたはHASもしくはその断片を検出する方法は、HSCまたはその子孫を含む試料の種類に依存する。一般に試料は、細胞とのマーカー相互作用を促進する手法で、HAまたはHASもしくはその断片用のマーカーに暴露するか、またはマーカーと混合する。例えば、試料が血液試料中のように細胞懸濁液なら、マーカーは単に、細胞懸濁液に添加すればよい。これは、マーカーがHAまたはHASもしくはその断片を物理的に同定することを意図する場合に適用し得る。

10

【0041】

HAまたはHASもしくはその断片用のマーカーは、HAまたはHASもしくはその断片を同定するいずれの手段を包含してもよく、好ましくはそれは、細胞表面のHAまたはHASもしくはその断片を同定するマーカーであり、限定するものではないが、HAまたはHASもしくはその断片への抗体、HAまたはHASもしくはその断片へのアゴニストおよびアンタゴニスト、ヒアルロン酸結合蛋白質(HABP)のようなHAへの結合蛋白質、またはHASもしくはその断片への結合蛋白質、DNA、RNA、mRNAまたはHAあるいはHAS蛋白質のいずれかの存在によってHAまたはHASの発現を検出し得る核酸検出システム、ならびにHAまたはHASもしくはその断片用の酵素、蛍光または比色アッセイが挙げられる。HAまたはHASもしくはその断片に結合し、固定されていてもよい結合蛋白質またはリガンドが、HA陽性細胞の単離および同定の手段として働いてもよい。パンニングなどの技術を、HA陽性細胞の単離及び同定にこのようなアプローチに役立ててもよい。検出の方法は、選択されたマーカーの種類によって当業者には明白であろう。

20

【0042】

マーカーは、マーカーの同定を強化させるための標識の添加を包含してもよい。例えば、当業者によく知られた蛍光、放射線または酵素マーカーが、検出を強化させるためにマーカーに結合されていてもよい。

【0043】

HASに適用される用語「その断片」は、HASを同定し得るHASの一部を包含するもので、HAS分子全体ではない。これの例としては、HASに同一性を与えるHASのエピトープまたはHASの活性部分が挙げられる。

30

【0044】

本発明の好ましい態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

その試料をHAまたはHASもしくはその断片に対する結合蛋白質と混合する工程；

その結合蛋白質の存在を検出する工程；および

HSCまたはその子孫上のその結合蛋白質の存在を検出することによって、HAまたはHASもしくはその断片を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

40

【0045】

結合蛋白質、特にHA結合蛋白質(HABP)は、HAを検出するのに有用である。HABPは、生化学工業株式会社から得てもよい。しかし、その結合蛋白質の性質に基づきいずれかの同等物が、HAを同定するために用いられてもよい。その結合蛋白質の結合部分が同定されて、指示薬またはHAとして合成的に製造され则认为られる。したがって、HABPに基づく合成指示薬は、本発明の範囲内のものである。

【0046】

HABPの使用は、製造業者の指導に従ってもよい。しかし、結合蛋白質は、HSCまたはそれらの子孫に結合したHABPの同定を促進するために更に標識されていてもよい。

50

【0047】

本発明の別の好ましい態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞試料を得る工程；

その試料をHAまたはHASもしくはその断片に対する抗体と混合する工程；

その抗体の存在を検出する工程；および

HSCまたはその子孫上の抗体の存在を検出することによって、HAまたはHASもしくはその断片を有するHSCまたはその子孫を同定する工程、を含むHSCまたはその子孫を同定する方法を提供する。

【0048】

好ましくは抗体は、HAまたはHASもしくはその断片に特異的ないずれかの抗体である。本発明で用いられる抗体は、HAまたはHASもしくはその断片に特異的に結合するのに十分な特異性を保持し、HAまたはHASを示す天然または組換え体のどちらか、合成または天然由来のどちらか、モノクローナルまたはポリクローナルのどちらかの、いずれの抗体またはその断片も包含する。本明細書で用いられる用語「抗体」は、抗体全体、および機能的部分を含む抗体断片を包含する。用語「抗体」は、抗体全体が結合特異性を有するエピトープに結合をもたらす軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域の十分な部分を含むいずれかの単一特異性および/または二重特異性化合物を包含する。断片は、少なくとも1個の重鎖または軽鎖免疫グロブリンポリペプチドの可変領域を含むことができ、限定するものではないが、Fab断片、F(ab')₂断片およびFv断片が挙げられる。

10

20

【0049】

組換え抗体は、当該技術分野で知られるいずれの組換え手段によっても生成されることができる。そのような組換え抗体としては、限定するものではないが、細菌内で産生された断片、および定常領域の大部分がヒト抗体の定常領域に置換された非ヒト抗体が挙げられる。加えて、そのような「ヒト化」抗体は、遺伝子技術によって組換え抗体を発現する宿主脊椎動物から得られることができる。

【0050】

加えて、単一特異性ドメインを、当該技術分野で知られるいずれの方法によって、別の適切な分子化合物に結合できる。その結合は、例えば化学的なものか、または遺伝子工学によることができる。

30

【0051】

その抗体を、限定するものではないが、酵素、磁気ビーズ、コロイド状磁気ビーズ、ハプテン、蛍光色素、金属化合物、放射性化合物、クロマトグラフィー樹脂、固体支持体または薬物をはじめとする他の適切な分子および化合物とコンジュゲート (conjugate) することができる。抗体にコンジュゲートすることができる酵素としては、限定するものではないが、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼおよび - ガラクトシダーゼが挙げられる。抗体にコンジュゲートすることができる蛍光色素としては、限定するものではないが、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、フィコエリトリン、アロフィコシアニンおよびテキサスレッド (Texas Red) が挙げられる。抗体にコンジュゲートすることができる別の蛍光色素については、Haugland, R. P. Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1992-1994)を参照されたい。抗体にコンジュゲートすることができる金属化合物としては、限定するものではないが、フェリチン、コロイド金、そして特にコロイド状超常磁性ビーズが挙げられる。抗体にコンジュゲートすることができるハプテンとしては、限定するものではないが、ビオチン、ジゴキシゲニン、オキサザロン (oxazalone) およびニトロフェノールが挙げられる。抗体にコンジュゲートする、または組み込むことができる放射性化合物は、当該技術分野で知られており、限定するものではないが、テクネチウム99m、¹²⁵I、ならびに限定するものではないが¹⁴C、³Hおよび³⁵Sをはじめとするいずれかの放射性核種を含むアミノ酸が挙げられる。

40

【0052】

50

H A または H A S もしくはその断片への抗体は、抗体またはその機能的部分を生成するための当該技術分野で知られた方法によって得られてもよい。そのような方法としては、限定するものではないが、所望の特異性の細胞表面抗体を有する B 細胞を分離すること、軽鎖および重鎖の変領域を発現する D N A をクローニングすること、ならびに適切な宿主細胞内で組換え遺伝子を発現させることが挙げられる。標準的モノクローナル抗体生成技術は、抗体が不死化された抗体産生ハイブリドーマ細胞から得られる場合に用いられることができる。これらのハイブリドーマは、H S C またはその子孫によって動物を免疫化し、好ましくは免疫化宿主脾臓から単離された免疫化動物からの B リンパ球を、適合性のある不死化細胞、好ましくは B 細胞ミエロームと融合させることによって産生されることができる。

10

【0053】

H A または H A S もしくはその断片への抗体は、いずれの供給源から得られてもよい。それらは、市販のものであってもよい。実際上は、細胞上の H A または H A S または H A もしくは H A S の断片の存在を検出するいずれの手段も、本発明の範囲内のものである。そのような抗体の例が、Biogenesisの全種 (pan-species) の H A ポリクローナルヒツジ抗体である。

【0054】

本発明に概説された方法は、細胞の集団から H S C またはその子孫を同定するのに特に有用である。しかし別のマーカーが、全般的 H S C 集団内の亜集団を更に識別するために用いられてもよい。好ましくは、C D 3 4⁺細胞の前濃縮 (pre-enrichment) 工程が、当該技術分野で用いられる方法によって行われる。この工程の後に、H A または H A S の測定が行われてもよい。

20

【0055】

別のマーカーを用いる工程が、H A または H A S もしくはその断片用のマーカーと別個に、または組合わせて適用されてもよい。

【0056】

様々な亜集団が、H A または H A S の発現のレベルによって識別されてもよい。これは、細胞表面で発現された H A として明示されてもよく、その H A は、本明細書に概説された方法によって検出されてもよい。しかし、本発明は、限定するものではないが、C D 3 4⁺、C D 3 8⁻、C D 9 0⁺ (t h y 1) および L i n⁻細胞をはじめとする H S C 集団の様々な表現型間を識別するために用いられてもよい。好ましくは同定される細胞は、限定するものではないが、C D 3 4⁺、C D 3 8⁻、C D 9 0⁺ (t h y 1) または L i n⁻細胞を含む群から選択される。

30

【0057】

本発明の別の態様において、

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

細胞上の H A または H A S もしくはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上の H A または H A S もしくはその断片の存在によって同定された細胞を選択する工程、を含む H S C またはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法が提供される。

【0058】

したがって本発明は、H S C またはその子孫の集団を濃縮する方法を包含する。その方法は、H A または H A S もしくはその断片を認識して結合する抗体またはマーカーを H A または H A S もしくはその断片に結合させる条件下で、その抗体もしくはマーカーまたは結合蛋白質と H S C またはその子孫の混合物とを混合して、抗体またはマーカーによって認識された細胞を分離して H S C またはその子孫を実質的に濃縮した集団を得ることを伴う。その方法を、試料中の H S C またはその子孫の数についての診断アッセイとして用いることができる。細胞および抗体またはマーカーが、抗体またはマーカーを H A または H A S および H S C またはその子孫に特異的に結合させるのに十分な条件下で混合され、その後定量される。H S C またはその子孫は、単離されるか、または更に精製されることができる。

40

50

【 0 0 5 9 】

好ましくは、マーカーはH Aに結合するH A結合蛋白質（H A B P）である。H A B Pの適切な供給業者は、生化学工業株式会社である。

【 0 0 6 0 】

先に論じたように、細胞集団は、先に論じたそれらの試料をはじめとするH S Cまたはその子孫のいずれの供給源から得られてもよい。

【 0 0 6 1 】

H AまたはH A Sもしくはその断片の存在の検出は、細胞上のH AまたはH A Sを同定するいずれの方法によって実行されてもよい。好ましくはその検出は、H AまたはH A Sに対するマーカーまたは結合蛋白質の使用による。H AまたはH A S用のマーカーは、先に論じたいずれのマーカーであってもよい。しかし、H AまたはH A Sへの抗体または結合蛋白質は、H AまたはH A S用のマーカーとして特に有用である。

10

【 0 0 6 2 】

先に論じたように、H AまたはH A SまたはH AもしくはH A Sの断片が、検出されてもよい。好ましくは、H AまたはH A Sの分子全体が検出される。しかし、分子を識別する分子の一部も、同じく有効であると考えられる。

【 0 0 6 3 】

様々な技術が、特定の系列の細胞を最初に除去することによって、細胞を分離または濃縮するのに使用できる。モノクローナル抗体および結合蛋白質は、細胞系列および/または分化の段階を同定するのに特に有用である。抗体は、大まかな分離のために固体支持体に結合できる。利用される分離技術は、回収される分画の生存力を最大限に保持しなければならない。「比較的大まかな」分離を得るために、異なる有効性のある様々な技術を用いることができる。利用される個々の技術は、分離の効率、関連する細胞毒性、実行の容易さおよび速度、ならびに精巧な装置および/または技術の熟達の必要性に依存する。

20

【 0 0 6 4 】

分離または濃縮のための手順としては、限定するものではないが、抗体コーティング磁気ビーズを用いた磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローナル抗体に結合した細胞毒性剤、またはモノクローナル抗体と共に用いられる細胞毒性剤、例えば限定するものではないが補体およびサイトトキシン、および固形マトリックス、例えばプレートに結合させた抗体による「パニング（panning）」、エルトリエーション、あるいはいずれか別の従来技術を包含することができる。

30

【 0 0 6 5 】

分離または濃縮技術の使用としては、限定するものではないが物理的性質（密度勾配遠心法および向流式の（counter-flow）遠心エルトリエーション）、細胞表面特性（レクチンおよび抗体アフィニティー）、および生体染色特性（ミトコンドリア結合色素rho123およびD N A結合色素、Hoescht33342）の差異に基づくものが挙げられる。

【 0 0 6 6 】

正確な分離をもたらす技術としては、限定するものではないが、様々な精巧度、例えば複数のカラーチャネル、低角度オブチュース光散乱検出チャネル（low angle and obtuse light scattering detecting channels）、またはインピーダンスチャネルなどを変更し得るF A C Sが挙げられる。H Aの発現レベルによってこれらの細胞を分離および識別し得るいずれの方法を用いてもよい。

40

【 0 0 6 7 】

最初の分離では、通常は約 1×10^{10} 細胞、好ましくは約 $5 \times 10^{8-9}$ 細胞で開始して、H AまたはH A Sもしくはその断片への抗体または結合蛋白質が、少なくとも1つの蛍光色素で標識できる一方、様々な特定系列に対する抗体または結合蛋白質を、少なくとも1つの異なる蛍光色素にコンジュゲートすることができる。各系列は分離工程で分離できるが、所望ならH AまたはH A Sおよび/または他のH S Cマーカーに対して正の選択をするのと同時にその系列が分離される。死亡細胞に結合する色素（限定するものではないがヨウ化プロピジウム（P I）など）を用いることによって、細胞を死亡細胞に対して選択

50

できる。

【0068】

分離の特定の順序は、本発明にとって重要ではないと思われるが、示された順序が好ましい。好ましくは細胞は、H A または H A S もしくはその断片への抗体を用いた正の選択により、最初大まかな分離によって分離され、その後精密な分離によって分離される。H A または H A S の同定の前に、C D 3 4⁺細胞を濃縮する前濃縮工程が適用されることが好ましい。

【0069】

本発明の好ましい態様において、

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

10

その細胞集団を H A または H A S もしくはその断片に対する結合蛋白質と混合する工程；
および

細胞上の H A または H A S もしくはその断片を示す結合蛋白質の存在によって同定された細胞を選択する工程、を含む H S C またはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法を提供する。

【0070】

結合蛋白質は、上記のとおりである。

【0071】

本発明の好ましい態様において、

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

20

その細胞集団を H A または H A S もしくはその断片に対する抗体と混合する工程；および
細胞上の H A または H A S もしくはその断片を示す抗体の存在によって同定された細胞を選択する工程、を含む H S C またはその子孫を濃縮した細胞集団を得る方法を提供する。

【0072】

細胞を単離するための抗体を用いるいずれの分離方法が用いられてもよく、それらは当業者にはよく知られている。H S C またはその子孫の同定のための上記説明は、ここでも適用できる。

【0073】

いずれかの細胞集団を更に濃縮するために、それらの細胞集団用の特異的マーカーが用いられてもよい。例えば、リンパ球、骨髄球または赤血球系列のような特異的細胞系列用の特異的マーカーが、これらの細胞を濃縮するため、またはこれらの細胞の反対を濃縮するために用いられてもよい。これらのマーカーは、間葉幹細胞またはケラチノサイト幹細胞を除去または選び出すことによって、H S C またはその子孫を濃縮するために用いられてもよい。

30

【0074】

上記方法は、他の幹細胞特異性マーカーの正の選択によって細胞を更に濃縮する工程を含むことができる。適切な陽性幹細胞マーカーとしては、限定するものではないが、C D 3 4⁺、T h y - 1⁺および c - k i t⁺が挙げられる。

【0075】

特定の因子による適切な選択と、H S C またはその子孫を自己再生させ、H S C またはその子孫をそれらのマーカーに関してスクリーニングさせるバイオアッセイの開発とによって、生存する H S C またはその子孫の濃縮された組成物を、様々な目的で生成できる。

40

【0076】

本発明の更に別の態様において、本明細書に記載された方法によって調製された H S C またはその子孫の濃縮集団を提供する。

【0077】

同様に、別の好ましい実施形態において、

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得る工程；

細胞上の H A または H A S もしくはその断片の存在を検出する工程；および

細胞上の H A または H A S もしくはその断片の存在によって同定されたそれらの細胞を選

50

び出す工程、を含む集団からHSCまたはその子孫を除去する方法を提供する。

【0078】

その濃縮と同様の手法において、HAまたはHASが、HSCまたはその子孫を実質的に含まない集団を提供するために、逆の形で用いられてもよい。HAまたはHASを発現するそれらの細胞を選択するための、上記で利用された方法は、前記細胞を選び出してHSCまたはその子孫を除去した集団を残すために用いることができる。

【0079】

好ましくはHAまたはHASは、HAまたはHASもしくはその断片への抗体または結合蛋白質を用いることによって検出される。より好ましくはHAは、結合蛋白質HABPによって検出される。マーカー、結合蛋白質または抗体がHSCまたはその子孫に結合すれば、分離のためのいずれの上記方法を、HSCまたはその子孫を識別および選び出すために用いてもよい。

10

【0080】

本発明の更に別の態様において、HSCまたはその子孫の負の選択を受けなかった対照細胞集団に比べて少ないHSC集団を有する細胞集団を提供する。

【0081】

本発明の更に別の態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞集団を得ること；

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在を検出すること；

細胞上のHAまたはHASもしくはその断片の存在によって同定されたそれらの細胞を選択すること；

20

HAまたはHASもしくはその断片の存在によって同定されたそれらの細胞を単離すること、を含むHSCまたはその子孫を単離する方法を提供する。

【0082】

HSCまたはその子孫は、上記のとおり濃縮のために用いられるいずれかの方法に、HSCを分離する別の工程を加えて単離されてもよい。有用な技術としては、抗体コート化磁気ビーズを用いた磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローナル抗体に結合した細胞毒性剤、またはモノクローナル抗体と共に用いられる細胞毒性剤、例えば限定するものではないが補体およびサイトトキシン、そして固体マトリックス、例えばプレートに結合させた抗体による「パンニング」、エルトリエーション、またはいずれか別の従来技術が挙げられる。当業者は、これらの技術に通じており、HAまたはHASが選択されるものならば、いずれの公知の技術も用いることができる。

30

【0083】

別の好ましい態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞集団を得ること；

その細胞集団をHAまたはHASもしくはその断片に対する結合蛋白質と混合すること；

HAまたはHASもしくはその断片に対する結合蛋白質によって同定されたそれらの細胞を選択すること；

その抗体によって同定されたそれらの細胞を単離すること、を含むHSCまたはその子孫を単離する方法を提供する。

40

【0084】

その結合蛋白質は、上記のとおりである。

【0085】

別の好ましい態様において、

HSCまたはその子孫を含む細胞集団を得ること；

その細胞集団をHAまたはHASもしくはその断片に対する抗体と混合すること；

HAまたはHASもしくはその断片に対する抗体によって同定されたそれらの細胞を選択すること；

その抗体によって同定されたそれらの細胞を単離すること、を含むHSCまたはその子孫を単離する方法を提供する。

50

【 0 0 8 6 】

H A または H A S に特異的で、目下入手できるいずれの抗体を用いてもよい。適切な抗体は、Biogenesisの全種 (pan-species) の H A ポリクローナルヒツジ抗体である。

【 0 0 8 7 】

H S C またはその子孫の集団が単離されれば、更に別の単離技術が、H S C またはその子孫内の亜集団を単離するために用いられてもよい。細胞系列のための F A C S のような細胞選択システムを含む特異的マーカーが、様々な細胞系列を同定および単離するために用いられてもよい。

【 0 0 8 8 】

別の態様において、本明細書に記載された方法によって単離された H S C またはその子孫を提供する。好ましくはその細胞は、C D 3 4⁺、H A⁺である。より好ましくはその細胞は、C D 3 4⁺、t h y 1、H A⁺である。最も好ましくはその細胞は、C D 3 4⁺、D 3 8⁻、t h y 1⁺、H A⁺である。

【 0 0 8 9 】

本発明は、別の態様において、C D 3 4⁺、D 3 8⁻、t h y 1⁺および H A⁺細胞を含む細胞の濃縮集団を含む、濃縮した H S C およびその子孫の組成物も提供する。

【 0 0 9 0 】

組成物が、H S C またはその子孫を濃縮されている場合、これらは自家生着 (autologous engraftment) に用いられてもよい。更に、H S C またはその子孫を使用することによって、対宿主性移植片病が避けられる。加えて、一般に個体または H S C のいずれかに関して、遺伝子欠損を修復するため、または H S C もしくはその子孫もしくはその子孫の生来欠いている遺伝子能力を提供するために、細胞は、適切な遺伝子導入によって改変されることができる。加えて、H S C 組成物は、再生および分化に関連する因子を単離および定義するために用いることができる。

【 0 0 9 1 】

本発明の更に別の態様において、

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得ること；

その細胞集団を H A または H A S もしくはその断片に対する結合蛋白質と混合すること；

H A または H A S もしくはその断片に対する結合蛋白質によって同定されたそれらの細胞を選択すること；

その結合蛋白質による選択の前の細胞集団中の細胞の量に対する選択細胞の量を定量すること、を含む H S C またはその子孫の含量を測定する方法を提供する。

【 0 0 9 2 】

その結合蛋白質は、上記のとおりである。

【 0 0 9 3 】

本発明の更に別の態様において、

H S C またはその子孫を含む細胞集団を得ること；

その細胞集団を H A または H A S もしくはその断片に対する抗体と混合すること；

H A または H A S もしくはその断片に対する抗体によって同定されたそれらの細胞を選択すること；

H A または H A S 抗体による選択の前の細胞集団中の細胞の量に対する選択細胞の量を定量すること、を含む H S C またはその子孫の含量を測定する方法を提供する。

【 0 0 9 4 】

選択した H S C またはその子孫の量を定量することによって、限定するものではないが、正常な状態および悪性腫瘍の状態、あるいはより具体的には、特に造血幹細胞集団、より具体的にはそれらの集団のリンパ球系列において、白血病、上皮性悪性腫瘍または非上皮性悪性腫瘍または H S C もしくはそれらの子孫の活性増加を引き起こし得る一般的感染のような、H S C 関連状態の診断方法を提供する。特にその定量は、抗体の産生、細胞免疫系の調節、血中の異物の検出、宿主にとって異物である細胞の検出などをもたらすリンパ球系列から分化する B 細胞および T 細胞を示すことの提供であってよい。単球、顆粒球

、巨核球およびその他の細胞をはじめとする骨髄球系列は、血流中の異物の存在を監視し、新生物細胞から防御し、血流中の外来物質を取り除いて、血小板を産生する等を行う。赤血球系列は、酸素の運搬体として働く赤血球細胞をもたらす。

【0095】

その方法は、細胞集団から同定されたHSCまたはその子孫を有する抗体処置試料を無処置試料と比較して、HSCを含む成分を同定することによって実施されてもよい。対照では、全細胞数がカウントされることができ、診断目的には多数の試料が測定されてもよく、細胞数の変動が比較されて、HSCまたはそれらの子孫のレベルの増加または減少を監視してもよいと思われる。

【0096】

本発明の更に別の態様において、集団中のHSCまたはその子孫を検出するための、HAまたはHASもしくはその断片の指示薬、および担体を含む組成物を提供する。

【0097】

HAまたはHASもしくはその断片の指示薬は、HSCまたはその子孫上のHAまたはHASもしくはその断片を同定し得るいずれの検出手段を含んでいてもよい。好ましくはその指示薬は、HAまたはHASもしくはその断片への抗体または結合蛋白質である。

【0098】

抗体は、HAまたはHASの分子全体を検出してよく、あるいはHAS内に含まれHASを示す特異的ペプチド配列を検出してよい。

【0099】

組成物は、別のマーカーを含んで、特異的細胞系列を識別してもよい。

【0100】

本発明は、細胞集団内のHSCまたはその子孫の存在を同定することによって、HSCまたはその子孫に関連する状態を診断する方法も提供する。例えば、造血幹細胞の増加または減少レベルが、血中の異常を示してもよい。これは、白血病のような疾患では重要になる場合があり、同じく増加は、感染を示すT細胞およびB細胞を含めたリンパ球系列へ分化するHSCまたはその子孫の増加と解釈してよい。

【0101】

本発明の更に別の態様において、

HSCまたはその子孫内のHAまたはHASもしくはその断片の発現および/または活性を調整すること、を含むHSCまたはその子孫の増殖および/または分化を制御する方法を提供する。

【0102】

出願人は、HAまたはHASがHSCまたはその子孫内で発現されることを見出した。増殖の前のHAまたはHASの発現レベルは、続く細胞の増殖または分化に合わせて変動する。細胞内のHAまたはHASの発現および/または活性を調整することによって、細胞の増殖または分化を制御してもよい。

【0103】

本明細書で用いられる用語「ヒアルロン酸の発現および/または活性を調整する」は、非改変レベルと比較して、HAまたはHASの発現および/または活性を改変または変動させることを意味する。

【0104】

フレーズ「細胞の増殖および/または分化を制御する」は、インビトロまたはインビボのいずれかで、非調整細胞に比べて細胞の増殖および/または再生の程度、あるいは細胞の分化の程度を高める工程を包含する。細胞培養における細胞増殖の増加又は減少は、該当する分子への暴露の前後に細胞数をカウントすることによって、検出できる。増殖の程度は、細胞の密集の程度を顕微鏡検査することによって定量できる。細胞増殖は、チミジン取り込みアッセイを用いて定量できる。

【0105】

細胞分化の増加または減少は、様々な体細胞型または前駆細胞型に特異化された分化細胞

10

20

30

40

50

型を同定することによって検出されてもよい。同定は、細胞型を同定するための、当業者に知られる細胞マーカーを用いて実施されてもよい。

【0106】

本明細書で用いられる「活性」は、HSC細胞内のHAまたはHASの機能に関するもので、HAを合成するHASの能力、あるいはシャペロンまたは上流もしくは下流のエフェクター分子に結合し、それによって増殖または分化に影響を及ぼす上流または下流の経路を活性化または抑制するHAの能力を包含する。

【0107】

本明細書で用いられる用語「発現および/または活性を調整する」は、HAまたはHASの未改変レベルに比較して、HAまたはHASの発現および/または活性を改変または変化させることを包含する。発現および/または活性は、増殖または分化を増加または減少させるために、未改変レベルに比較して増加または減少されてもよい。

10

【0108】

HSC内でのHAまたはHASの発現および/または活性の調整は、HAまたはHASのアンタゴニスト、阻害剤、擬似物質または誘導体を用いて実行してもよい。本明細書で用いられる用語「アンタゴニスト」または「阻害剤」は、HAまたはHASのいずれかに結合すると、HAまたはHASの活性を遮断または調整する分子を指す。アンタゴニストおよび阻害剤は、蛋白質、核酸、炭水化物、抗体、またはHAもしくはHASに結合するリガンドをはじめとするいずれか別の分子を包含してもよい。適切なリガンドは、HAに結合していてもよいHABPである。蛋白質が、HAを分解することができ、それによってHSC上で暴露されたHAのレベルに影響を及ぼし得るヒアルロニダーゼなどの酵素を包含してもよい。HAまたはHASの活性および/または発現の他の調整物質としては、ある範囲の合理的に設計された合成阻害剤が挙げられる。

20

【0109】

HABPの適切な濃度は、5~20 μg/mlの範囲内である。ヒアルロニダーゼの場合、これは室温または同等の条件で約15分間、0.1単位/mlで用いてもよい。

【0110】

調整は、HAS遺伝子もしくはHAS活性の発現および/もしくは活性の増加もしくは減少、結合特性の変化、または生物学的、機能的もしくは免疫学的性質のいずれか他の変化であってもよい。

30

【0111】

調整物質としては、限定するものではないが、酵素の発現および活性のための、HASの上流および下流での調節物質が挙げられる。

【0112】

本明細書で用いられる用語「擬似物質」は、HAまたはHASまたはその一部の構造の知識から開発され、そのためHAまたはHAS様分子の作用の一部または全てを実行することができる構造の分子を指す。

【0113】

HAまたはHASの発現および/または活性の調整は、直説法または間接法によって実行してもよい。HAまたはHASの発現および/または活性の調整は、当業者に知られる直説法を用いて実行されてもよく、限定するものではないが、ノックアウト法、アンチセンス法、三重らせん法、標的変異(targeted mutation)、遺伝子療法、転写に作用する薬剤による調節が挙げられる。HAまたはHASの発現および/または活性を調整する間接法は、サイトカインのような上流または下流の調整物質を標的とすることを包含してもよい。

40

【0114】

HAまたはHASの発現および/または活性の阻害は、HAまたはHASの発現および/または活性を直接的または間接的に標的とする様々な阻害剤を用いて実行してもよい。阻害は、HAまたはHASの機能に関与する上流または下流の標的を阻害することによって実行してもよい。

50

【0115】

本発明の別の態様において、本明細書に記載された方法によって調製されたHSCまたはその子孫の濃縮集団を含む組成物の効果的量を投与することを含む、HSC関連状態を処置する方法を提供する。

【0116】

本明細書で用いられる「HSC関連状態」は、HSCもしくはその子孫との相互作用から生じるいずれかの状態、またはHSCもしくはその子孫に依存するいずれかの状態を意味する。HSC関連状態の例は、貧血（大球性貧血および再生不良性貧血を含む）；血小板減少症；形成不全；汎発性血管内凝固症候群（DIC）；脊髄形成異常；免疫性（自己免疫性）血小板減少性紫斑症（ITP）；およびHIV誘導性ITPおよび白血病をはじめとする悪性状態が包含されてもよい。

10

【0117】

「処置」は、治療的処置および予防的または防御的測定の両方を指す。処置を必要とするものとしては、既に疾患または障害のあるものに加え、疾患または障害が防御されるべきものが挙げられる。

【0118】

記載された方法によって分離されたHSCまたはこの子孫を含む本発明の組成物は、多数の方法での使用を見出すことができる。

【0119】

これらの細胞は、放射線照射された宿主および/もしくは化学療法を受けた宿主のような、免疫無防備状態の宿主を完全に再生するために用いられるか、または限定するものではないが、エリトロポエチン、コロニー刺激因子、例えばGM-CSF、G-CSFもしくはM-CSF、インターロイキン、例えばIL-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8などをはじめとする様々な因子、または特定の系列になるHSCもしくはその子孫に関連するか、またはそれらの増殖、成熟および分化に関連するストローマ細胞を用いることによる1種以上の選択された系列への成熟、増殖および分化を提供することによって、特異的系列の細胞供給源として用いることができる。

20

【0120】

HAまたはHASは、移植後の細胞の空間分布に関与することが見出された。ヒアルロニダーゼによる細胞の処置は、細胞の空間分布に影響を及ぼす。このため、患者の造血系の移植または再生のために用いられる細胞は、正常な細胞型および細胞分布を達成するためにHAの除去を阻害する化合物、またはHAもしくはHASの発現レベルを保持する化合物で前処理してもよい。

30

【0121】

HSCまたはその子孫は、造血細胞の分化および成熟に関連する因子の分離および評価に用いることもできる。つまり本発明は、ならし培地のような培地の活性を測定するアッセイ、または細胞増殖活性、特定系列への特定化との関与などについて液体を評価するアッセイにおいて造血幹細胞を使用することを包含する。

【0122】

HSCは、遺伝子疾患の処置に用いられることができる。つまり本発明は、遺伝子欠損を修復するための自家幹細胞または同種異型幹細胞の遺伝子改変によって、HSCに関連する遺伝子疾患を処置することを包含する。例えば、限定するものではないが、サラセミア、鎌状赤血球貧血、アデノシンデアミナーゼ欠損症、レコンビナーゼ欠損症またはレコンビナーゼ調節遺伝子欠損症などを含む疾患は、相同的組換えまたはランダムな組換のいずれかによって野生型遺伝子を造血幹細胞に導入して修復されてもよい。

40

【0123】

遺伝子療法の用途において、遺伝子は、例えば欠損遺伝子の置換として、治療的に有効な遺伝子産物をインビボ合成するために、細胞内に導入される。「遺伝子療法」は、単独処置によって持続効果が達成される従来の遺伝子療法と、治療的に有効なDNAまたはmRNAの単回または反復投与を伴う遺伝子療法剤の投与との両方を包含する。アンチセンス

50

R N A および D N A が、インピボで特定の遺伝子の発現を遮断するための治療剤として用いられることができる。

【 0 1 2 4 】

遺伝子療法への適応としては、正常幹細胞が化学療法時に利点を有して選択圧力を受けられるために薬物耐性遺伝子を導入することが挙げられる。適切な薬物耐性遺伝子としては、限定するものではないが、多剤耐性 (M D R) 蛋白質をコード化する遺伝子が挙げられる。

【 0 1 2 5 】

造血細胞に関連する疾患以外で、限定するものではないがホルモン、酵素、インターフェロン、増殖因子などの特定の分泌産物の不足に関係する疾患が、遺伝子改変によって処置できる。適切な調節開始領域を用いることによって、欠損蛋白質を誘導的に産生することができ、それによってそのような蛋白質を正常に生成する細胞型とは異なる細胞型においても、その蛋白質の生成が自然な生成と並行して行われることになる。リボザイム、アンチセンスまたは他のメッセージを挿入して、特定の遺伝子産物、または疾患、特に血液リンパ性疾患 (hematolymphotropic diseases) の感受性を阻害することもできる。

10

【 0 1 2 6 】

本発明の更に別の態様において、H S C またはその子孫の非制御的増殖から生じる H S C 関連状態を処置する方法であって、

H S C またはその子孫内の H A または H A S もしくはその断片の発現を制御することを含む方法を提供する。

20

【 0 1 2 7 】

本発明の好ましい態様において、H S C またはその子孫の非制御的増殖から生じる H S C 関連状態を処置する方法であって、

H S C またはその子孫内の H A または H A S もしくはその断片の発現および / または活性を低下させることを含む方法を提供する。

【 0 1 2 8 】

非制御的増殖が起こる典型的な状態は、急性骨髄性白血病 (A M L) および慢性骨髄性白血病 (C M L) をはじめとする白血病のような悪性状態である。

【 0 1 2 9 】

出願人は、ヒト白血病細胞が H A レベルの上昇を呈していることを示した。具体的には、ヒト白血病細胞系 (H L - 6 0 、 M o 7 e および K 5 6 2) は、1種以上の H A S 遺伝子を発現し、高レベルの H A を合成するが、その H A は、ヒアルロニダーゼによって効率的に除去される。加えて、患者の A M L 、 C M L 、急性リンパ性白血病 (A L L) 、慢性リンパ性白血病 (C L L) 、 P L L 、慢性骨髄単球性白血病 (chronic monomyelocytic leukaemia) (C M M L) 、混合型白血病、およびヘアリーセル白血病の試料からの白血病芽球による H A 合成が増加している (表 1 に示した) 。

30

【 0 1 3 0 】

【 表 1 】

白血病試料におけるHAの発現

疾患	分析した患者数	HAが上昇した試料(%)	HAを発現する白血病細胞(%)
CLL	8	8/8	2****/1**/3*
AML	10	10/10	5****/2****/2*
ALL	2	2/2	2*
CML	8	7/8	1****/1*
CMML	4	4/4	1****/1***/1**/1*
PLL	2	2/2	1****/1**
混合型	1	1/1	1****
ヘアリーセル	2	1/2	1****

**** 75-100% 白血病細胞

*** 50-75% 白血病細胞

** 25-50% 白血病細胞

* < 25% 白血病細胞

10

【0131】

正常な臍帯血CD34⁺細胞に比較して、白血病細胞の大部分が、HAを発現する芽細胞数の上向きの調節を呈した。CML CD34⁺細胞の明白な集団が、細胞表面HAも有意に高レベルに発現した(図6)。患者の試料は全て、HAS1を発現したが、少数の試料が、HAS2および/またはHAS3を発現した。

20

【0132】

したがってこれらの白血病においては、HAおよびHASが高レベルで発現される。HA発現のレベルを制御することによって、これらの細胞の増殖に影響を及ぼすことができる。HAの発現レベルを低下させれば、増殖レベルを低下させることができる。これは、HAまたはHASの発現および/または活性を調整するための上記方法のいずれによって実行されてもよい。

【0133】

患者を処置するために、適切な調整物質が投与されてもよい。調整物質は、限定するものではないが経鼻、経口、経皮、筋肉内、腹腔内、皮下または静脈内をはじめとする様々な経路で投与されてもよい。

30

【0134】

これは、HASに結合することによってHA合成を防御する機能阻害抗体、または薬剤を用いて促進されてもよい。あるいは、細胞は、レトロウイルスによってHASアンチセンスを形質導入された細胞であってもよい。

【0135】

本発明の更に別の態様において、HSCまたはその子孫の分化から生じるHSC関連状態を処置する方法であって、HSCまたはその子孫内のHAまたはHASもしくはその断片の発現および/または活性を制御することを含む方法を提供する。

40

【0136】

増加と同様に、分化は、HSCまたはその子孫内でのHAまたはHASの発現によって影響を受ける。

【0137】

本発明の好ましい態様において、HSCまたはその子孫の分化から生じるHSC関連状態を処置する方法であって、HSCまたはその子孫内のHAまたはHASもしくはその断片の発現および/または活性を低下させることを含む方法を提供する。

50

【0138】

H A または H A S の発現および / または活性の適切な調整物質を利用して分化を減少させることによって、特に非制御的分化からくる癌において分化を制御できる。調整は、上記のとおり実行されてもよい。

【0139】

本発明で用いられる手順の実施例を、より完全にここに記載する。しかし、以下の記載が例示に過ぎず、上記発明の概要の制限としてとらえるべきでないことは理解されるはずである。

【0140】

実施例

10

【0141】

実験

(a) 臍帯血 Mercy Hospital for Women (East Melbourne, Australia)での正常な帝王切開分娩の後にインフォームドコンセントに従って、臍帯血 (C B) 試料を得た。

【0142】

(b) マウス 6 ~ 8 週齢の B A L B / c H - 2 D マウス、ならびに共通遺伝子系の C 5 7 B I / 6 J (L y 5 . 2) マウスおよび P T R P A (L y 5 . 1) マウスを、Animal Resource Center (Perth, WA, Australia)から購入し、実験での使用の前に少なくとも 1 週間、従来どおり清潔に飼育した。C D 4 4⁺ マウス (2) には、Dr. Tak Mak (Amgen Institute, Ontario Cancer Institute, University of Toronto)から贈与された。マウスは全てマウス用飼料 (Barastok, St. Arnaud, Victoria, Australia) および酸性水を自由に摂取させた。

20

【0143】

(c) 放射線照射 造血を回復する細胞の能力を、2台の向き合った¹³⁷Cs線源 (Gammacell 40; Atomic Energy of Canada, Ottawa, Canada)から 1 . 4 Gy / 分の線量を 4 時間間隔で 2 等量に分けることにより致死量に近い放射線量 (9 . 5 Gy) を受けたマウスで分析した。

【0144】

(d) 造血細胞の単離 マウスを頸部脱臼によって屠殺した。B M を、大腿骨、脛骨および腸骨稜からごく普通に採取した。これらの骨を、2 % 加熱非働化 (H I) ウシ胎児血清 (F C S ; Hyclone, Logan, UT) を補充したリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中で完全に摩砕した。骨断片を複数回洗浄して、上清の細胞懸濁液および洗浄画分を 4 0 μ m フィルター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) で濾過して、大きな骨粒子を除去した。骨髄を遠心分離 (4 0 0 g、5 分間) して、新たな緩衝液で再懸濁させた。細胞上清を 4 0 μ m フィルターで再度濾過して、2 % H I F C S 補充 P B S (緩衝液) で 1 0⁷ 細胞 / m l に希釈した。

30

【0145】

(e) 造血細胞濃縮方法

(i) マウス 低密度 (< 1 . 0 7 7 7 g / c m³) の骨髄単核細胞を、動物用の Nycoprep (Accurate Chemical and Scientific corporation, Westbury, NY) を用いて不連続密度遠心分離法によって単離した。更に処理する前に、単離した細胞を緩衝液で洗浄した。L i n⁻ 細胞を、先に記載されたもの (1) と同様の手法で単離した。簡単に説明すると、低密度細胞を、ビオチン化または非コンジュゲート化されたラット抗マウス一次抗体 : 抗 B 2 2 0 (C D 4 5 R ; B 細胞) ; 抗 M a c - 1 (C D 1 1 b ; マクロファージ) ; 抗 G r - 1 (L y - 6 G ; 好中球) ; 抗 L y t - 2 (C D 8)、抗 L 3 T 4 (C D 4)、抗 C D 3 および抗 C D 5 (T 細胞) ; ならびに抗 T e r 1 1 9 (赤血球細胞) のカクテルで標識した。チャンネルの蛍光の平均および / または検出した陽性細胞のパーセント値が最大に変動する濃度で、フローサイトメトリー分析によって抗体の各バッチを評価した。2 倍強度の抗体カクテル 5 0 μ L を等量の緩衝液中の 5 × 1 0⁶ 個の細胞に添加して、細胞と抗体の懸濁液を氷上で 2 0 分間インキュベートした。過去に記載されたとおり (1)、L

40

50

Lin⁻細胞を、MACSシステム(Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany)を用いて、免疫磁気選択法によって除去した。簡単に説明すると、ヤギ抗ラットIgGマイクロビーズ(Miltenyi Biotec) 13 μlを、洗浄した抗体標識細胞の懸濁液87 μl(緩衝液に10⁷細胞)に添加して、細胞をビーズと4で15分間インキュベートした。細胞を緩衝液で洗浄して、PBS 1.5 ml、5 mM EDTAおよび1%ウシ血清アルブミン(BSA) / 10⁸細胞で再懸濁させた。その後、細胞を最大2 mlまでカラム(Dカラム、最大容量1 × 10⁹細胞、一般には最大表示容量の半分より多量には通さない)に添加し、メッシュに通して、5分間放置して磁化させた。20ゲージ針によってPBS、5 mM EDTA、1% BSA 50 mlで細胞を溶離させることによって、Lin⁻細胞(非磁気分画)を採取した。

10

(ii) ローダミン123(Rh)標識 Lin⁻細胞を緩衝液で洗浄して、1 × 10⁶細胞/mlに再懸濁させて、Rh(Molecular Probes, Eugene, OR)の最終濃度0.1 μg/ml(緩衝液で希釈)で37の暗所で20分間インキュベートした。細胞を遠心分離して10⁶細胞/mlに再懸濁させて、37の暗所で15分間流出させ、遠心分離してPBS 0.5% HI FCSで10⁸細胞/mlに再懸濁させた。細胞を最終濃度1:80(6.8 μg/ml)のヤギ抗ラットフィクロエリトリン(PE)コンジュゲート二次抗体(Biosource International; Camarillo, CA)と暗所の氷上で更に20分間インキュベートした。最後に、細胞を緩衝液で洗浄して、5 × 10⁶細胞/mlに再懸濁させ、蛍光活性化セルソーティング(FACS)の前に氷上で保存した。

20

(iii) 幹細胞抗原1(Scal-1)およびc-kit標識 Lin⁻細胞を洗浄、遠心分離して、Scal-1 FITC(Pharmingen; 1 μg / 5 × 10⁶細胞)およびc-kit PE(Pharmingen; 1 μg / 5 × 10⁶細胞)およびストレパビジン-Red 670(Gibco; 1 / 160最終濃度)のカクテル中で、暗所の氷上で20分間再懸濁させた。最後に、細胞を緩衝液で洗浄して、5 × 10⁶細胞/mlに再懸濁させて、蛍光活性化セルソーティング(FACS)の前に氷上で保存した。

(iv) ヒト フィコール-ハイパック密度勾配(d = 1.077 g/ml, Pharmacia Biotech, Sweden)を用いた不連続密度遠心分離によって、低密度の単核細胞をCBから分離し、400 gの遠心分離によって3回洗浄した。分離した細胞は、更に処置する前にPBSで洗浄した。Lin⁻細胞を、先に記載のとおり分離した。簡単に説明すると、抗CD19、CD20およびCD24(B細胞および赤血球); 抗CD3、CD2およびCD56(T細胞およびNK細胞); 抗CD16、CD66bおよびCD11b(顆粒球および単球); 抗CD14、CD36(単球、血小板および赤血球)をはじめとする系列抗体のカクテルで細胞を標識した。ヤギ抗マウスIgGマイクロビーズおよび上記のようなMACSシステムを用いた免疫磁気的選択によって、Lin⁻細胞を除去した。

30

(v) CD34、CD38およびCD15標識 Lin⁻細胞を洗浄、遠心分離して、CD34 FITCおよびCD38 PEまたはCD15 FITC(Becton Dickinson, San Jose, CA;メーカーが推奨する濃度)のカクテルで、暗所の氷上で20分間再懸濁させた。最後に、細胞の緩衝液で洗浄して、5 × 10⁶細胞/mlに再懸濁させ、蛍光活性化セルソーティング(FACS)の前に氷上で保存した。

40

【0146】

(f) ヒアルロン酸標識 細胞表面のヒアルロン酸(HA)の存在を、最終濃度20 μg/mlのビオチン化ヒアルロン酸結合蛋白質(HABP; 生化学工業、東京(日本))を用いて氷上で20分間検出した。細胞を洗浄して、上記のとおりストレパアビジン-PEまたはRed-670(Gibco BRL, Grand Island, NY)で標識した。

【0147】

(g) ヒアルロニダーゼ処置 HABP標識が特異的であることを保証し、生着した細胞の空間分布における細胞表面HAの重要性を評価するために、骨髄の亜集団を0.1単位ヒアルロニダーゼ(HY)(Sigma Aldrich)で21で15分間処置して、HAを除去した。細胞をPBS 0.5% HI FCSで洗浄した。

【0148】

50

(h) フローサイトメトリー 200 mWで488 nm光を発光する5ワットアルゴンイオンレーザー (Coherent Innova 90, Palo Alto, CA) と、50 mWで350 / 360 nm光を発光するSpectra-Physics紫外線 (UV) レーザー (Mountain View, CA) とを搭載したFACSstar^{plus}セルソーターで、標識した細胞をソーティングした。前方光散乱パスの488 nmバンドパス10フィルターと1ディケード対数減光フィルター (1-decade logarithmic neutral density filter) とで、光散乱シグナルを回収した。Rh発光緑色蛍光パルスは、FITC 530 nmバンドパス15フィルターで回収した。フィコエリトリン (PE) の励起によって発光した赤橙色蛍光パルスを、440ダイクロイックシヨートパスミラーで反射させ、575 nmバンドパスダイクロイック26フィルターで回収した。Red 670の励起によって発光したパルスを、ロングパスRG655フィルターで回収した。

10

【0149】

(i) 細胞培養 複数のサイトカインおよび様々な濃度のHABPを含有する無血清培地 (serum deprived media) 100 μ lを含有する96穴プレートに、培養する細胞を直接ソーティングした。1% BSA、10 μ g/mlヒトインシュリン、200 μ g/mlヒトトランスフェリン、0.05 mM 2-メルカプトエタノール、および21 μ g/ml LDLを含有するイスコブ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco BRL)で、マウス細胞を培養した。ヒト細胞は、0.5% プミネート (buminate) (Baxter, Glendale, CA)を含有するX Vivo 10培地 (Bio Whittaker, Verviers, Belgium) で培養した。

20

【0150】

(j) 5 - (および6) - カルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (CFSE) 標識 空間分布分析用に移植される細胞を、先に記載されたとおり(1)に蛍光色素CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR)で標識した。簡単に説明すると、PBS 0.5% HI FCSで細胞を洗浄して、PBS 0.5% HI FCSで 10^6 細胞/mlの密度に再懸濁させて、37 $^{\circ}$ Cで2分間プレインキュベートした。DMSOで5 mMに希釈し、その後PBSで5 μ Mに希釈したCFSEを添加して、0.5 μ Mの最終濃度を得、色素溶液細胞混合物を、37 $^{\circ}$ Cで更に10分間インキュベートした。20% FCSを含有する氷冷PBSを色素溶液細胞液の容量の10倍量添加して染色を止めた。最後に、細胞をPBSで洗浄して、注入のためにレシピエント毎に0.3 mlまでのPBSに再懸濁させた。

30

【0151】

(k) 移植片 細胞を、外側尾静脈に注入することによって移植した。注入した細胞の実際数は、Lin⁻Sca⁺HA⁺細胞500個、Lin⁻Sca⁺HA⁻細胞500個、Lin⁻HA⁺細胞5000~6000個、Lin⁻HA⁻細胞5~6 $\times 10^5$ 個、Lin⁻Rh^{du}細胞 1.1×10^5 個、およびLin⁻Rh^{bright}細胞 5.5×10^5 個の無処置およびヒアルロン酸処置細胞であった。

【0152】

(l) 移植細胞の空間分布の分析 移植後15時間目に、CFSE陽性細胞の空間分布を、先に記載されたとおり(1)分析した。簡単に説明すると、2%パラホルムアルデヒド、0.05%グルタルデヒドを、下降大動脈に生理学的圧力で灌流することによって、BMを固定した。大腿骨を取り出して、10% EDTAで脱灰した。その後、骨を脱水させてパラフィンに包埋した。各大腿骨の縦方向切片3.5 μ mを切断し、色あせ防止用封入剤 (Vectashield, Vector Laboratories) に封入した。切片は全て、FITCおよびテキサスレッドの2重フィルターセット (578 nmでの緑色励起および610 nmでの赤色励起) を用いた蛍光顕微鏡 (Zeiss Camperdown, NSW, Australia) で分析した。このフィルターセットは、発光帯域幅が短く、CFSE陽性BM細胞を宿主の骨髄細胞と容易に識別できるために特別に選択した。

40

【0153】

移植のレシピエント毎に少なくとも6個の縦方向切片からCFSE標識細胞 (陽性細胞)

50

の位置を分析することによって、移植細胞の空間分布を決定した。各切片が大腿骨全体をより多く含むようにしながら、中心の縦方向切片を横方向切片に対比させて分析した。各細胞の一度だけの分析が確実に行われるよう、それぞれ別の3.5 μm切片も分析した。陽性細胞の位置は、骨内膜（骨内膜の12細胞以内と先に恣意的に定義された(3)）または中心（いずれかの骨内膜から12細胞より多く）のいずれかと設定した(1)。

【0154】

(m) RNA抽出 RNAを、RNAzol B (Bresatec, SA, Australia) 抽出法を用いて抽出した。簡単に説明すると、細胞を遠心分離して、0.2 ml / 10⁶細胞のRNAzol Bで細胞を溶解してRNAを調製した。そのホモジネートをクロロホルムで抽出し、イソプロパノールで沈殿させた。RNAを洗浄して乾燥し、滅菌水で再懸濁させた。

【0155】

(n) 逆転写PCR (RT-PCR) ランダムヘキサマー (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) およびSuperscript II逆転写酵素 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) を用いて、テンプレートcDNAを調製した。PCRを、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて実施した: Geneworks (Adelaide, SA, Australia) によって合成された、マウスHas-1センス(5' CGTGGACTACGTGCAGGTCTGTG3') (配列番号1) およびアンチセンス(5' GAGCGCGAGGTAATACTTGGTAGC3') (配列番号2)、マウスHas-2センス(5' GACCACACAGACAGGC GGA3') (配列番号3) およびアンチセンス(5' TCCCAGGGTAGGTCAGCCTT3') (配列番号4)、マウスHas-3センス3'5' (5' GAGCGTGTGCGAGCTGTGGTGTG3') (配列番号5) およびアンチセンス(5' GAAGCATCTCAATGGTGCAGGCT3') (配列番号6)、ヒトHAS-1センス(5' GCTACCAAGTACACCTCCAGGTC3') (配列番号7) およびアンチセンス(5' CGCGTAGAACAAGACGCAGCACAG3') (配列番号8)、ヒトHAS-2センス(5' GCTCGCAACACGTAACGCACA3') (配列番号9) およびアンチセンス(5' GGCACTTAGATCGAGCTGTG3') (配列番号10)、およびヒトHAS-3センス(5' AGCCTGCAGGAGGGCATTGGA3') (配列番号11) およびアンチセンス(5' GGAGCGCGCGGTATACTTAGTTCGG3') (配列番号12)。PCRは全て、遺伝子機器 (Innovonics, Melbourne, Australia) 内でパラフィン油30 μlの下、25 μlの容量で実施した。各PCRは、1x Taqゴールド緩衝液、200 μM dNTPS (Boehringer Mannheim, Branchburg, NJ)、4 μg/ml各プライマー、1.5 mM MgCl₂、10% DMSOおよび0.5単位 Taq Gold(Boehringer Mannheim)で構成されていた。PCRは、94 °Cで10分の最初のサイクルでTaqゴールドの活性化、30秒の変性を次のサイクル、60 °Cで30秒のアニーリングを10サイクル、続いて55 °Cで30秒のアニーリングを更に25サイクル、および72 °Cで30秒の伸長を35サイクル、その後72 °Cで5分間の最後の伸長という条件で実施した。

【0156】

(o) 統計解析 平均間の差を、適宜、一元配置分散分析 (ANOVA) またはスチューデントt検定によって評価した。

【0157】

実施例1: マウス造血細胞におけるHA発現

HAの絶対特異性を実証するヒアルロン酸結合蛋白質 (HABP) のビオチン化形態の結合によるフローサイトメトリー分析によって、HAの発現を実証した(4)。このアプローチを用いて、HABP結合を2種のマウスHSC濃縮細胞亜集団、つまりLin⁻Sc a⁺Kit⁺ (図1a) およびLin⁻Rh^{du11}で検出し、酵素ヒアルロニダーゼ (HY) による細胞の前処置によって完全に除去した (図1b)。加えて、CD44^{hi}マウス(2)から分離した同様の割合のLin⁻Rh123^{du11}細胞は、HABPの結合を呈し(26.5%に比較して25.0%)、細胞表面で検出されたHAが大部分のレセプターC

D44(19)への外来性HAの結合によるものではなく、原始造血細胞自身でのデノボ合成によるものであることが実証された。重要なこととして、RT-PCR分析は、HABP⁻細胞ではなくLin⁻Scal⁺Kit⁺、Lin⁻HABP⁺細胞がHas-1、Has-2およびHas-3を発現していることを実証した(図2aおよび2b)。

【0158】

原始BM細胞によるHAの発現は、マウスの独特な特徴ではなく、ヒト造血細胞前駆体の特徴である。CD34、CD38およびHABPを用いたヒト臍帯血(CB)のFACS分析(図3)では、推定されるヒトHSCがHAを合成することが示された。興味深いこととして、成熟した細胞表現型に相関してHA発現のレベルが有意に低下し、CD34⁻CD38⁺細胞ではHA発現は検出されないことが示された。マウスでのデータによれば、分離されたヒトCD34⁺およびLin⁻HA⁺細胞もHAS1、HAS2およびHAS3を発現し、Lin⁻HA⁻はそれらが発現しなかった(図4)。これらのデータをまとめると、HAがHSCを濃縮したマウスおよびヒト造血細胞集団で合成および発現されることが実証される。

10

【0159】

しかし、HSCを再集団化させると、小さい割合でLin⁻Rh123^{du11}細胞のみを現した(5)。HSCがHABP⁺亜集団内に含まれるかどうかを検討するために、FACSを用いて、Lin⁻HABP⁺とLin⁻HABP⁻、及びLin⁻Scal⁺HABP⁺とLin⁻Scal⁺HABP⁻の亜集団およびその細胞を単離して、共通遺伝子系Ly5.1/Ly5.2マウスモデルを用いてインビボでアッセイした(6)。Lin⁻HABP⁺細胞5000~6000個によって、移植後8週目には、致死量放射線照射されたレシピエントの末梢血(PB)の造血細胞系列の全てが再生した(表2)が、同数のLin⁻HABP⁺細胞ではそのようにならず、レシピエントは移植後14~16日目に死亡した。加えて、500個のLin⁻Scal⁺HABP⁺細胞の移植によって、致死量放射線照射を受けたレシピエントの多数の造血細胞系列が、移植後4週目に再生した(表2)。こうしてHAは、長期間の再集団化能のあるHSCで発現されたが、生着のレベルは、注入した非分別Lin⁻Scal⁺細胞から予測されるものよりも有意に低かった(7)。しかし、6匹のレシピエントのうち1匹だけに、致死量放射線照射されたレシピエントを救命することができたHABP⁻細胞があり(Lin⁻Scal⁺HABP⁻細胞500個の移植後)、この集団内にはHSCの大部分が含まれないことが示唆される。1匹の生存したレシピエントでは、HA⁺細胞の移植の後に見られたのと同じ割合でドナー細胞があった(~9%)。予測された生着レベルよりもこのように低かった理由は依然として不明であるが、HAが単に受動的に構造的役割を担っているのではなく、特異的シグナル誘導分子であることも示唆される。

20

30

【0160】

【表2】

表2 インビボでHAを発現して造血を再生させるLin⁻細胞の能力の分析

	Lin ⁻ HABP ⁺ 細胞の移植の後 検出されたドナー細胞内の 各亜集団(%)*	Lin ⁻ Sca ⁺ HABP ⁺ 細胞の移植の後 検出されたドナー細胞内の 各亜集団(%)*
MAC-1/GR-1	40±3	68
B220	36±6	UN
CD4/CD8	20±3	22

10

【0161】

マウスにLin⁻HABP⁺細胞5000~6000個(4匹)またはLin⁻Sca⁺HABP⁺細胞500個(2匹)のどちらかを注入して、移植後4~8週目に分析した。末梢血を採取して、塩化アンモニウムを用いて赤血球細胞を溶解した。ドナー細胞の割合(%)を、Ly5.1抗体標識を利用して測定したところ、Lin⁻HABP⁺細胞5000~6000個またはLin⁻Sca⁺HABP⁺細胞500個の移植の後、それぞれ9±1.7%および9.4±0.02%であった。

20

【0162】

白血球では、マクロファージおよび顆粒球(MAC-1/GR-1)、B細胞(B220)およびT細胞(CD4/CD8)を標識し、ドナーの割合をLy5.1抗体を用いて分析した*。

UNは「不明」

【0163】

実施例3：HSC増殖の負の調節物質としてのHAの潜在的役割

インビトロでのストローマ不含のサイトカイン依存的培養によって、代理の可溶性リガンドHABPによるHAの連結反応が、マウスおよびヒト両方のHSC増殖を著しく抑制するが、初期に作用する造血細胞増殖因子の強力な組み合わせによって刺激されることが実証された。マウスHSCおよび推定のヒトHSC(それぞれLin⁻Sca⁺Kit⁺細胞およびLin⁻CD34⁺CD38⁻細胞)の両方を、マウスHSCおよびヒトHSCそれぞれでSCF(75ng/ml)、IL-11、FLT3リガンドおよびIL-6(全て100ng/ml)、またはG-CSF、SCF、FLT3リガンド、MGDF(全て100ng/ml)、IL-6およびIL-3(両方とも10ng/ml)のいずれかで構成された複数のサイトカインと様々な濃度のHABPとの存在下、無血清条件で培養した。図5に示すように、これによって、HABPの濃度増加の存在に対応して細胞増殖が有意に阻害された。この予期しないデータから、造血に対するHAの著しい増殖阻害効果が示される。増殖阻害に加え、図5aに示すように、HABP量を増加させてHSCをインキュベートすると、投入した集団の細胞表現型が維持され、細胞分化が阻害された。これに対して、HABPの非存在下で培養された細胞が有意な割合で分化して、CD15陽性になった(図5b)。この観察された増殖調節的役割は、インビトロでのHAの添加によって造血が不安定になることを示した近年の報告と一致するものである(8)。この試験では、外来性HAをLTBMに添加すると、前駆体と成熟したBM細胞の両方の産生が増加したが、HYを添加すると細胞産生が阻害された。これらの培養で、HAが骨髓球とリンパ球前駆体に共通する祖先の前駆体によって造血を調節していると考えられた。加えて、この観察されたHAの増殖調節的役割は、シアロムチンPSGL-1:P-セレクチンの相互作用について近年記載されたものと非常に類似している(9)。その明確に検証さ

30

40

50

れた接着分子としての役割に加えて、PSGL-1は、ヒト造血細胞前駆体の強力な負の調節物質であることがここに示された。

【0164】

実施例4：移植されたマウスHSCの空間分布におけるHAの役割

我々の研究室での更に近年のデータから、このHSCにおけるCAMの発現が機能的に重要で、それらの移植後の定着を調節することに関与することが示された。Lin⁻Rh^{du1}細胞を移植前にHYで処置すると、移植後15時間目の骨内膜にある細胞数が、無処置細胞と比較して~40%減少した(それぞれ39±3および65±8)。これに対して、Lin⁻Rh^{bright}細胞のHY処置では、Has遺伝子はいずれも合成されず(データは示さない)、同じ時点でそれらの空間分布が変化しないことが示された(それぞれ41±3および37±4)。これは、HPCではなくHSCの空間配置を決定する際の特異的役割を示唆している。

10

【0165】

総括すると、我々のデータは、インビトロおよびインビボでHAのHSC合成および発現を初めて実証するものであり、少なくとも2種の哺乳類種の原始造血細胞の、非常に特異的であるがまだ認識されていない特徴を表している。HSC上でのHAの存在は、幹細胞生物学において、具体的には移植後のHSCの定着の調節において機能的に重要である。加えて、そのデータは、HSC表面のHAが代替のリガンドに結合することで、これらの細胞の増殖および分化を調節する際に重要な役割を演じていることも示唆している。

【0166】

20

【表3】

参考文献

1. Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Coverdale, J.A. 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97:2293.
2. Schmits, R., J. Filmus, N. Gerwin, G. Senaldi, F. Kiefer, T. Kundig, A. Wakeham, A. Shahinian, C. Catzavelos, J. Rak, C. Furlonger, A. Zakarian, J.J. Simard, P.S. Ohashi, C.J. Paige, J.C. Gutierrez-Ramos, and T.W. Mak. 1997. CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90, no. 6:2217. 10
3. Nilsson, S.K., M.S. Dooner, C.Y. Tiarks, H.-U.G. Weier, and P.J. Quesenberry. 1997. Potential and distribution of transplanted hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model. *Blood* 89, no. 11:4013. 20
4. Engstrom-Laurent, A., and R. Hallgren. 1985. Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* 44, no. 2:83.
5. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58. 30
6. Spangrude, G.J., and D.M. Brooks. 1993. Mouse strain variability in the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone marrow cells. *Blood* 82, no. 11:3327.
7. Spangrude, G.J., and R. Scollay. 1990. A simplified method for enrichment of mouse hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 18, no. 8:920. 40
8. Khaldoyanidi, S., A. Denzel, and M. Zoller. 1996. Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. *Journal of Leukocyte Biology* 60:579.

9. Levesque, J.P., A.C. Zannettino, M. Pudney, S. Niutta, D.N. Haylock, K.R. Snapp, G.S. Kansas, M.C. Berndt, and P.J. Simmons. 1999. PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity* 11, no. 3:369.

【 0 1 6 7 】

最後に、本明細書に概説した本発明の精神を逸脱することなく、様々な他の改良および / または変更が実施されてもよいことは理解されるべきである。 10

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 6 8 】

【 図 1 A 】 マウス HSC ($Lin^- Sca^+ Kit^+$ 細胞) 上の HA の発現を示す。

【 図 1 B 】 $Lin^- Rh^{dull}$ HSC 上の HA の発現、および HY 処置による除去を示す。

【 図 2 】 マウス細胞内での HAS 遺伝子の発現を示す

【 図 3 】 成熟した $CD34^+$ 細胞上の HA 発現を示す。

【 図 4 】 ヒト HSC 内での HAS 遺伝子発現を示す。

【 図 5 a (i) 】 マウス HSC の増殖阻害を示す。

【 図 5 a (i i) 】 ヒト HSC の増殖阻害を示す。 20

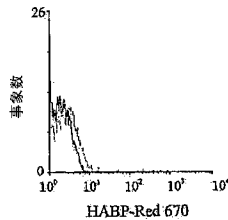
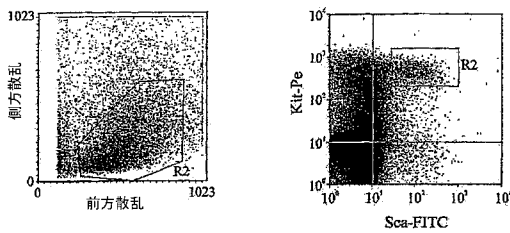
【 図 5 b (i) 】 培養した $CD34^+ CD38^-$ CB 細胞の分化を示す。

【 図 5 b (i i) 】 培養した $CD34^+ CD38^-$ CB 細胞の表現型分析を示す。

【 図 6 】 様々な濃度の H A B P の存在下で培養された細胞の $CD34^+$ 発現の維持を示す

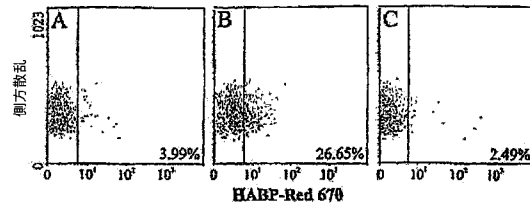
【 図 1 A 】

マウスHSC上でのHAの発現
($Lin^- Sca^+ Kit^+$ 細胞)

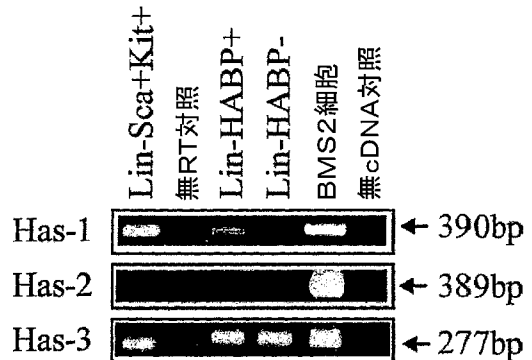


【 図 1 B 】

$lin^- Rh^{dull}$ HSC 上での HA 発現および HY 処置による除去

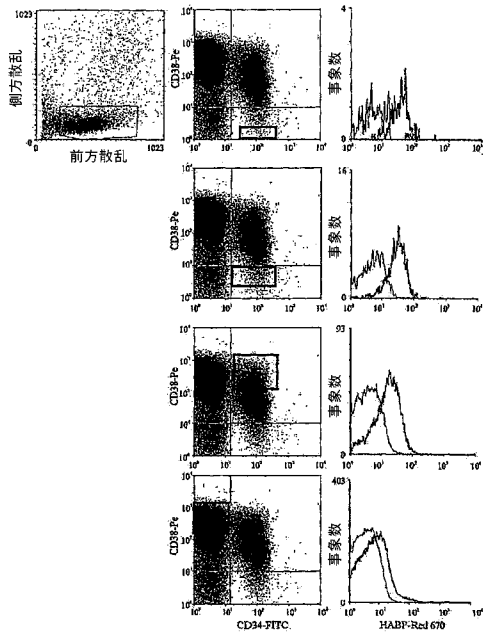


【 図 2 】

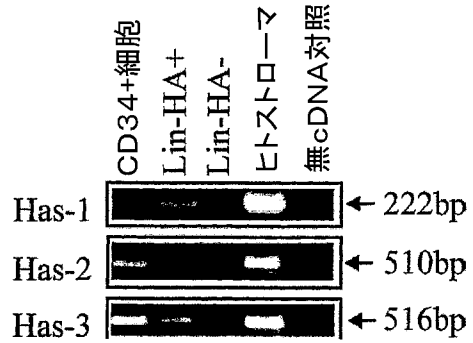


【 図 3 】

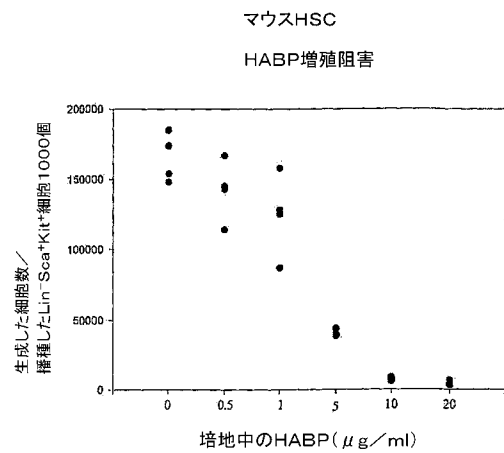
成熟したCD34⁺細胞上でのHA発現



【 図 4 】

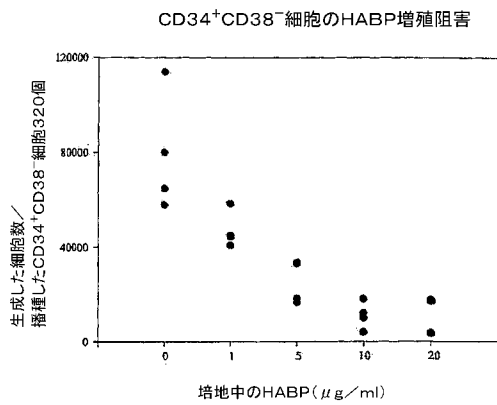


【 図 5 a (i) 】



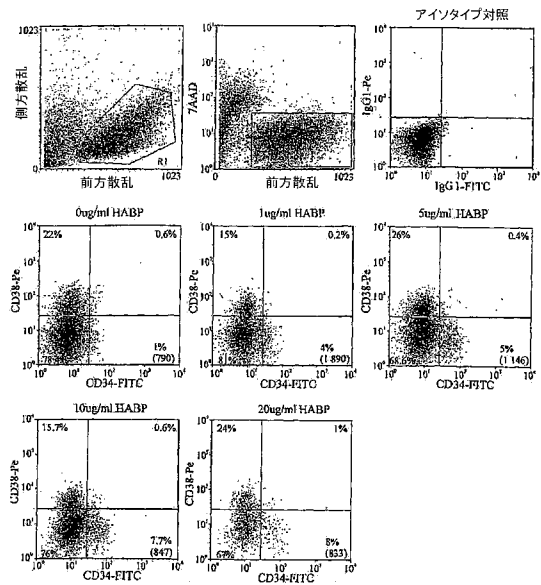
【 図 5 a (i i) 】

ヒトHSC



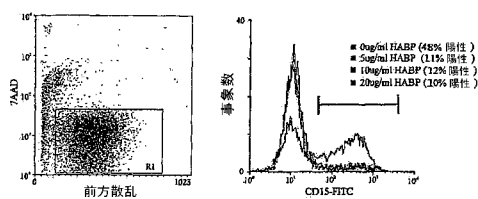
【 図 5 b (i i) 】

培養したCD34⁺CD38⁻CB細胞の表現型分析 (播種した細胞320個/穴)



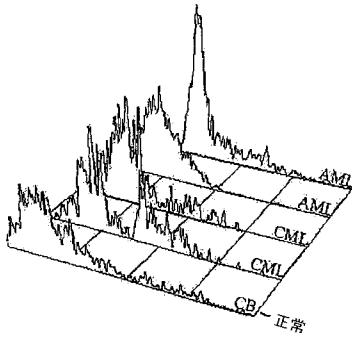
【 図 5 b (i) 】

培養したCD34⁺CD38⁻CB細胞の分化 (播種した細胞1000個/穴)



【 図 6 】

フローサイトメトリー



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 May 2003 (08.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/038071 A1

(51) International Patent Classification: C12N 5/06, G01N 33/569, 33/58, 33/60, 33/68, 33/573 (74) Agent: PHILLIPS ORMONDE & FITZPATRICK; 367 Collins Street, Melbourne, VIC 3000 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU02/01443

(22) International Filing Date: 24 October 2002 (24.10.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: PR 8565 30 October 2001 (30.10.2001) AU

(71) Applicant (for all designated States except US): THE PETER MACCALLUM CANCER INSTITUTE [AU/AU]; Smorgan Family Building, St Andrews Place, East Melbourne, VIC 3002 (AU).

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): NILSSON, Susan, Kaye [AU/AU]; 12 Narron Street, East Bentleigh, VIC 3165 (AU); SIMMONS, Paul, John [GB/AU]; 55 Davis Street, Kew, VIC 3101 (AU); HAYLOCK, David, Norman [AU/AU]; 13 Argo Street, South Yarra, VIC 3144 (AU).

Published:
with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/038071 A1

(54) Title: DETECTION OF HAEMATOPOIETIC STEM CELLS AND PROGENY AND USUS THEREOF

(57) Abstract: The present invention relates to a method of identifying a haematopoietic stem cell (HSC) or progeny thereof comprising the steps of: obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof; detecting the presence of at least one carbohydrate sequence having a sequence of at least one disaccharide repeat of glucuronic acid and N-acetylglucosamine or an equivalent thereof; and identifying a HSC or progeny thereof having the sequence or equivalent thereof. The invention also relates to methods of enriching cell populations for HSC or progeny thereof, for isolating HSC or progeny thereof and cell preparations obtained using the methods of their invention and their uses.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

**DETECTION OF HAEMATOPOIETIC STEM CELLS AND PROGENY AND
USES THEREOF**

5 The present invention relates to the identification of a specific population of cell types, in particular, haematopoietic stem cells (HSC) and cells deriving from HSC. The invention also provides for methods of isolation and uses of the stem cells and their progeny derived from the methods. Methods of regulating development of the stem cells and their progeny are also provided.

10

INTRODUCTION

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

20 Stem cells give rise to cells, which ultimately contribute to various parts of the plant or animal. One type of stem cell is the haematopoietic stem cell.

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

30 Haematopoietic stem cells are capable of self-renewal, multilineage proliferation and differentiation, and long-term support of the haematopoietic and lymphoid systems. They form a subpopulation within the haematopoietic

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

2

progenitor compartment (HPC), which mainly comprises cells of more limited potentiality. HPC cells are mainly located within the bone marrow stroma, where complex interaction with stromal cells, extracellular matrix components and cytokines, permits regulation of cell proliferation and differentiation. HPC cells are also present in the blood under a variety of physiological, pathological and iatrogenic circumstances. HPC can be harvested from bone marrow or peripheral blood, and will re-engraft the bone marrow following intravenous infusion in patients who have received ablative (i.e. destructive) doses of chemotherapy and/or radiotherapy, leading to regeneration of haematopoiesis and immunity. Thus, HPC cell transplantation is of considerable clinical utility in the management of patients with haematological and solid malignancies, bone marrow failure, and inborn errors of haematopoiesis, immunity or metabolism.

15 There is thus a need for supplies of autologous HPC cells which may be cultured *in vitro* prior to reintroduction into a patient whose HPC cell population has been depleted due to chemotherapy and/or radiotherapy. The populations of such HPC cells may take many weeks or months to recover naturally to their normal levels. The use of autologous cells from the patient themselves avoids rejection of the transplanted cells.

In vivo, HPC cells are generally located within the bone marrow stroma. *In vitro*, HPC cells are able to adhere to bone marrow stromal layers before proliferating and releasing more committed progenitors. Stem cells undergo marked proliferation and differentiation into multiple lineages, ultimately giving rise to fully differentiated cells or progeny, such as red blood cells, platelets, a variety of white blood cells, and also immune cells such as T lymphocytes and B lymphocytes. Thus, the reintroduction of HPC cells or stem cells into the patient who is depleted therein, allows efficient repopulation of these haematopoietic cell types.

The relative paucity of hematopoietic stem cells has prevented extensive research on stem cells and hematopoietic differentiation in general. The ready availability of a cell population enriched in hematopoietic stem cells

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

3

would make possible the identification of biological modifiers affecting stem cell behavior. For example, there may be as yet undiscovered growth factors associated with (1) early steps of dedication of the stem cell to a particular lineage; (2) the prevention of such dedication; and (3) the ability to control stem cell proliferation.

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

Considerable evidence supports the proposal that the localization of hemopoiesis to the bone marrow (BM) in adult mammals involves developmentally regulated interactions between primitive hematopoietic stem cells (HSC) and the stromal cell mediated hemopoietic microenvironment (HM) of the marrow.

Anatomical location of maturing hemopoietic cells within the BM is better understood than the spatial distribution of more primitive cells. Previous studies in the mouse have established that lineage restricted clonogenic hemopoietic progenitor cells (HPC) also conform to a well-defined spatial distribution across the axis of the femur with greatest numbers near the central longitudinal vein. In contrast, hierarchically more primitive progenitors, colony-forming unit spleen (CFU-S), exhibit the converse distribution with low numbers in the central region of the marrow and greatest enrichment in a region adjacent to bone the endosteum.

The reestablishment of hemopoiesis by intravenously infused cells requires several coordinated events including homing, migration and lodgement of HPC within the BM HM. The initial event, homing, is the specific recruitment of circulating HSC to the BM and involves the selective recognition of HSC by the microvascular endothelium of the marrow and trans-endothelial cell migration into the extravascular hemopoietic space. In contrast, lodgement encompasses events following extravasation and is defined as the selective

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

4

migration of cells to suitable HM niches in the extravascular compartment. Current data suggests that homing involves a similar cascade of cell adhesion molecules (CAMs) to those participating in the extravasation of mature leukocytes into tissues. Primitive hemopoietic cells exhibit a broad repertoire of CAMs including various members of the integrin, sialomucin, Ig super family and CD44 families. Current data suggest key roles for the sialomucin receptor for P-selectin, PSGL-1, the β_1 integrin VLA-4 and the receptor for SDF-1, CXCR4 in HSC homing to the BM. In contrast, very little is known about the molecules that influence the site of HSC lodgement following homing to the BM.

However, identification of these specific cell types by cell surface markers has generally proven to be the best means of identification. The identification of additional cell surface antigens would clearly be of major value in the identification, isolation and further characterization of hematopoietic stem cells.

Until recently, it has not been possible to define the spatial distribution of hemopoietic stem cells (HSC) within the BM. This is due to the rarity of HSC and the lack of a single, unique antigenic marker allowing their unambiguous identification *in situ*.

Accordingly, it is an object of the present invention to overcome or at least alleviate some of the problems of the prior art.

25

SUMMARY OF THE INVENTION

Applicants have found that hyaluronic acid (HA) and hyaluronic acid synthase (HAS) is expressed in hematopoietic stem cells (HSC). HA is a high molecular weight linear carbohydrate generally found in the extracellular matrix of many cells.

In an aspect of the present invention there is provided a method of identifying a HSC or progeny thereof comprising the steps of:

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

5

obtaining a cell sample including HSCs or progeny thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;
and
identifying the HSCs or progeny thereof having HA or HAS or a
5 fragment thereof on the cell.

Any means of identifying the HA or HAS or equivalent or fragment thereof
may be used. However, in a preferred aspect of the present invention there
is provided a method of identifying a HSC or progeny thereof comprising the
10 steps of:

obtaining a cell sample including HSCs or progeny;
combining the sample with an antibody for HA or HAS or fragment
thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof; and
15 identifying the HSCs or progeny thereof having HA or HAS or
fragment thereof by detecting the presence of the antibody on the HSCs or
progeny thereof.

Preferably, the antibody is any antibody specific for HA or HAS or fragment
20 thereof. The antibody used in the present invention encompasses any
antibody or fragment thereof, either native or recombinant, synthetic or
naturally-derived, monoclonal or polyclonal which retains sufficient specificity
to bind specifically to the HA or HAS or a fragment thereof which is indicative
of HA.

25

In yet another preferred aspect of the present invention there is provided a
method of identifying a HSC or progeny thereof comprising the steps of:

obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
combining the sample with a binding protein for HA or HAS or a
30 fragment thereof;
detecting the presence of the binding protein; and
identifying the HSC or progeny thereof having HA or HAS or a
fragment thereof by detecting the presence of the binding protein on the HSC
or progeny thereof.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

6

Binding protein, especially HA binding protein (HABP) is useful for detecting HA. HABP may be obtained from Seikagaku Corporation. However, any equivalent based on the binding protein properties may be used to identify the HA. It is conceivable that the binding portions of the binding protein are
5 identified and synthetically prepared as an indicator or HA. Accordingly, synthetic indicators based on the HABP are within the scope of the present invention.

The present invention also encompasses a method for obtaining a cell
10 population enriched in HSCs or progeny thereof comprising the steps of
obtaining a cell population comprising HSCs or progeny thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;
and
15 selecting for cells which are identified by the presence of HA or HAS
or a fragment thereof on the cell.

Preferably the method of detection involves the use of an antibody to HA or HAS; or a binding protein (HABP) to HA can also be used to detect HA or
20 equivalents thereof.

Similarly, in another preferred embodiment, there is provided a method of removing HSCs or progeny thereof from a population comprising the steps of
25 obtaining a cell population comprising HSCs or progeny thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;
and
selecting out those cells which are identified by the presence of HA or
HAS or a fragment thereof on the cell.

Again, the use of antibodies or HABP to detect HA or HAS prior to selection
30 may also be employed.

The methods described herein may also be used to isolate HSCs or progeny thereof from cell populations or measure HSC content in such populations. Once a HSC is isolated or identified, they may be used in methods of treating

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

7

or diagnosing HSC related or associated conditions or further isolation techniques may be employed to isolate subpopulations within the HSC populations. Specific markers for specific cell lineages such as lymphoid, myeloid or erythroid cells may be used to identify and isolate the various cell lineages.

FIGURES

- Figure 1a shows expression of HA on murine HSC (Lin⁻Sca⁺Kit⁺ cells).
- Figure 1b shows HA expression on Lin⁻Rh^{duj}HSC and removal by HY treatment.
- Figure 2 shows expression of HAS genes in murine cells.
- Figure 3 shows HA expression on maturing CD34⁺ cells.
- Figure 4 shows HAS gene expression in human HSC.
- Figure 5a(i) shows growth inhibition in murine HSC.
- Figure 5a(ii) shows growth inhibition in human HSC.
- Figure 5b(i) shows differentiation of cultured CD34⁺ CD38⁻CB cell.
- Figure 5b(ii) shows phenotypic analysis of cultured CD34⁺ CD38⁻ CB cell.
- Figure 6 shows maintenance of CD34⁺ expression of cells cultured in the presence of various concentrations of HABP.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one aspect of the present invention there is provided a method of identifying a HSC or progeny thereof comprising the steps of

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

8

- obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
detecting the presence of at least one carbohydrate sequence having
a sequence of at least one disaccharide repeat of glucuronic acid and N-
acetylglucosamine or an equivalent thereof; and
5 identifying a HSC or progeny thereof having the sequence or
equivalent thereof.

The carbohydrate sequences described herein have been found to be
expressed specifically on HSC or progeny thereof. The sequence includes at
10 least one repeat unit of disaccharide wherein the unit includes glucuronic
acid and N-acetylglucosamine or an equivalent thereof. Several repeat
disaccharide units may be joined as a continuous molecule of disaccharide
repeats to provide a linear molecule or the carbohydrate repeats may be
interspersed with molecules which are not disaccharides of glucuronic acid
15 and N-acetylglucosamine or an equivalent thereof. However, the HSC or
progeny thereof can be identified by at least one repeat disaccharide
providing at least 2 disaccharide units are at least 4 saccharides comprising,
in order, glucuronic acid and N-acetylglucosamine or an equivalent thereof,
then glucuronic acid and N-acetylglucosamine or an equivalent thereof.

20

The term "equivalent" thereof as used herein means a sequence or molecule
which functions in a similar way but may have deletions, additions or
substitutions that do not substantially change the activity or function of the
sequence or molecule.

25

In another aspect of the present invention there is provided a method of
identifying a HSC or progeny thereof comprising the steps of:

- obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;
30 and
identifying the HSC having HA or HAS or a fragment thereof on the
cell.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

9

Applicants have shown that HSC and progeny thereof synthesize and express HA. HA synthesis and expression was found in multiple mammalian systems, and may be expressed mainly into primitive hematopoietic cells. HA was found to be critical in the lodgment of transplanted HSC within the bone marrow, with its specific removal using hyaluronidase significantly altering their spatial distribution. In addition, the binding of HA on the surface of HSC to a surrogate ligand *in vitro* results in a profound suppression of HSC proliferation and differentiation.

10 The molecule or molecules associated with its production have not previously been connected to HSC nor for their identification. In particular, the molecule has not been associated with expression from a HSC or progeny thereof.

HA is single-chain high molecular-mass polysaccharide of repeating disaccharide units (glucuronic acid and N-acetylglucosamine) which is synthesised by one of 3 hyaluronic acid synthases (HAS), encoded by one of 3 HAS genes (Has 1, Has 2, Has 3). The latter are integral membrane glycosyltransferases, located at the plasma membrane and translocate HA as a free linear polymer to the pericellular space, not covalently linked to proteins on the cell surface. Accordingly, HA is present in many different organs and is a component of the ECM within the BM microenvironment. Cell surface HA significantly affects the adhesion, motility and growth of a wide variety of cell types, both normal and neoplastic. Due to its multivalency (which allows cross bridging of multiple receptors on adjacent cells), the interaction of endogenous cell surface HA with its primary receptor, CD44, mediates aggregation of several cell types. Increased cell movement or invasion may follow either the exposure of cells to HA, or the ectopic expression of HA or HAS. Moreover, inhibition of cell movement also occurs as a consequence of either HA degradation or the blocking of HA receptors.

30 HA also influences cell proliferation, differentiation and tissue repair and HA may be implicated in the pathogenesis and dissemination of tumours.

HA or HAS or a fragment of HAS may be detected on the HSC. Preferably the HA or HAS molecule is detected. However, fragments of the HAS

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

10

molecule may also be indicative of HA. Such fragments may include peptide sequences corresponding to portions of the HAS molecule or an equivalent thereof.

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

- 10 The sample of HSC or progeny thereof may originate from any source including an embryonic or adult source. Preferably, the HSC source is from the bone marrow including iliac crests, tibiae, femurs, spine, periosteum, endosteum or other bone cavities. The HSC may also be derived from blood, embryonic yolk sac, fetal liver, spleen, peripheral, blood, skin, dermis, or may be derived from ES cells or ES cell cultures.

15

- The sample may be a tissue sample or a cell suspension or cells derived from either source grown *in vitro* which allows for interaction of a marker for HA or HAS or fragment thereof to identify the HSC or progeny thereof. The sample may also be enriched for CD34+ cells prior to detection of HA or HAS or fragment thereof.

20

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

25

- 30 The term "progeny" as used herein includes all cells deriving from HSC and includes primitive cells which have not differentiated or specialized to any particular cell type.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

11

The method of detecting HA or HAS or fragment thereof will be dependent upon the type of sample including the HSC or progeny thereof. Generally the sample is exposed or combined with a marker for HA or HAS or fragment thereof in a manner which facilitates the marker interaction with the cells. For example, where the sample is a cell suspension as in a blood sample, the marker may simply be added to the cell suspension. This is applicable where the marker is intended to physically identify HA or HAS or fragment thereof.

The marker for HA or HAS or fragments thereof may include any means which identifies HA or HAS or fragments thereof, preferably it is a marker which identifies HA or HAS or fragments thereof on a cell surface which includes but is not limited to antibodies to HA or HAS or fragments thereof, agonists and antagonists against HA or HAS or fragments thereof, binding proteins to HA such as hyaluronic binding protein (HABP) or HAS or fragments thereof, nucleic acid detection systems which can detect expression of HA or HAS either by the presence of DNA, RNA, mRNA or HA or HAS protein, and enzymatic, fluorescence or colourimetric assays for HA or HAS or fragments thereof. Binding protein or ligands which bind to HA or HAS or fragments thereof and which may be immobilized may serve as a means for isolation and identification of HA positive cells. Techniques such as panning may utilize these approaches to isolation and identification of HA positive cells. The method of detection will be apparent to the skilled addressee for the type of marker selected.

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

The term "fragment thereof" as it applies to HAS includes portions of HAS which can still identify HAS but is not the full HAS molecule. Examples of this includes epitopes of HAS or active portions of HAS which provide identity to HAS.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

12

In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of identifying a HSC or progeny thereof comprising the steps of:

- obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
- combining the sample with a binding protein for HA or HAS or a
5 fragment thereof;
- detecting the presence of the binding protein; and
- identifying the HSC or progeny thereof having HA or HAS or a
fragment thereof by detecting the presence of the binding protein on the HSC
or progeny thereof.

10

Binding protein, especially HA binding protein (HABP) is useful for detecting HA. HABP may be obtained from Seikagaku Corporation. However, any equivalent based on the binding protein properties may be used to identify the HA. It is conceivable that the binding portions of the binding protein are
15 identified and synthetically prepared as an indicator or HA. Accordingly, synthetic indicators based on the HABP are within the scope of the present invention.

Use of HABP may be in accordance with the directions given by the
20 manufacturer. However, the binding protein may be further labelled to facilitate the identification of the bound HABP to HSC or their progeny.

In another preferred aspect of the present invention there is provided a method of identifying a HSC or progeny thereof comprising the steps of:

- 25 obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
- combining the sample with an antibody for HA or HAS or a fragment thereof;
- detecting the presence of the antibody; and
- identifying the HSC or progeny thereof having HA or HAS or a
30 fragment thereof by detecting the presence of the antibody on the HSC or progeny thereof.

Preferably, the antibody is any antibody specific for HA or HAS or a fragment thereof. The antibody used in the present invention encompasses any

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

13

antibody or fragment thereof, either native or recombinant, synthetic or naturally-derived, monoclonal or polyclonal which retains sufficient specificity to bind specifically to the HA or HAS or a fragment thereof which is indicative of HA or HAS. As used herein, the terms "antibody" or "antibodies" include the entire antibody and antibody fragments containing functional portions thereof. The term "antibody" includes any monospecific or bispecific compound comprised of a sufficient portion of the light chain variable region and/or the heavy chain variable region to effect binding to the epitope to which the whole antibody has binding specificity. The fragments can include the variable region of at least one heavy or light chain immunoglobulin polypeptide, and include, but are not limited to, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, and Fv fragments.

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

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

The antibodies can be conjugated to other suitable molecules and compounds including, but not limited to, enzymes, magnetic beads, colloidal magnetic beads, haptens, fluorochromes, metal compounds, radioactive compounds, chromatography resins, solid supports or drugs. The enzymes that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, alkaline phosphatase, peroxidase, urease and β -galactosidase. The fluorochromes that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, fluorescein isothiocyanate, tetramethylrhodamine isothiocyanate, phycoerythrin, allophycocyanins and Texas Red. For additional

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

14

fluorochromes that can be conjugated to antibodies see Haugland, R. P. Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (1992-1994). The metal compounds that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, ferritin, colloidal gold, and particularly, colloidal superparamagnetic beads. The haptens that can be conjugated to the antibodies include, but are not limited to, biotin, digoxigenin, oxazalone, and nitrophenol. The radioactive compounds that can be conjugated or incorporated into the antibodies are known to the art, and include but are not limited to technetium 99m, ¹²⁵I and amino acids comprising any radionuclides, including, but not limited to ¹⁴C, ³H and ³⁵S.

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

Antibodies to HA or HAS or fragments thereof may be obtained from any source. They may be commercially available. Effectively, any means which detects the presence of HA or HAS or fragments of HA or HAS on the cells is with the scope of the present invention. An example of such an antibody is a pan-species α HA polyclonal sheep antibody from Biogenesis.

The methods outlined herein are particularly useful for identifying HSCs or progeny thereof from a population of cells. However, additional markers may be used to further distinguish subpopulations within the general HSC population. Preferably, a pre-enrichment step for CD34⁺ cells is made by

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

15

methods used in the art. Following this step, HA or HAS determination may be made.

5 The step of using additional markers may be applied separately or in combination with a marker for HA or HAS or a fragment thereof.

10 The various sub-populations may be distinguished by levels of expression of HA or HAS. This may manifest as expressed HA on the cell surface which may be detected by the methods outlined herein. However, the present invention may be used to distinguish between various phenotypes of the HSC population including, but not limited to, the CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺ (thy1) and Lin⁻ cells. Preferably the cells identified are selected from the group including, but not limited to, CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺ (thy 1), or Lin⁻.

15 In another aspect of the present invention, there is provided a method for obtaining a cell population enriched in HSC or progeny thereof comprising the steps of

obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;

20 and

selecting for cells which are identified by the presence of HA or HAS or a fragment thereof on the cell.

25 The present invention thus encompasses methods of enriching a population for HSCs or progeny thereof. The methods involve combining a mixture of HSCs or progeny thereof with an antibody or marker or binding protein that recognizes and binds to HA or HAS or fragments thereof under conditions which allow the antibody or marker to bind to HA or HAS or a fragment thereof and separating the cells recognized by the antibody or marker to
30 obtain a population substantially enriched in HSCs or progeny thereof. The methods can be used as a diagnostic assay for the number of HSCs or progeny thereof in a sample. The cells and antibody or marker are combined under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody or marker

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

16

to HA or HAS and the HSCs or progeny thereof which are then quantitated. The HSCs or progeny thereof can be isolated or further purified.

5 Preferably, the marker is a HA binding protein (HABP) which binds to HA. A suitable source of HABP is Seigaku Corporation.

As discussed above the cell population may be obtained from any source of HSCs or progeny thereof including those samples discussed above.

10 The detection for the presence of HA or HAS or a fragment thereof may be conducted in any way to identify HA or HAS on the cells. Preferably the detection is by use of a marker or binding protein for HA or HAS. The marker for HA or HAS may be any of the markers discussed above. However, antibodies or binding proteins to HA or HAS are particularly useful as a
15 marker for HA or HAS.

As discussed above, HA or HAS or a fragment of HA or HAS may be detected. Preferably the whole molecule of HA or HAS will be detected. However, it is conceivable that portions of the molecule which distinguish the
20 molecule will be equally as effective.

Various techniques can be employed to separate or enrich the cells by initially removing cells of dedicated lineage. Monoclonal antibodies and binding proteins are particularly useful for identifying cell lineages and/or
25 stages of differentiation. The antibodies can be attached to a solid support to allow for crude separation. The separation techniques employed should maximize the retention of viability of the fraction to be collected. Various techniques of different efficacy can be employed to obtain "relatively crude" separations. The particular technique employed will depend upon efficiency
30 of separation, associated cytotoxicity, ease and speed of performance, and necessity for sophisticated equipment and/or technical skill.

Procedures for separation or enrichment can include, but are not limited to, magnetic separation, using antibody-coated magnetic beads, affinity

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

17

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

5

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

10

Techniques providing accurate separation include, but are not limited to, FACS, which can have varying degrees of sophistication, e.g., a plurality of color channels, low angle and obtuse light scattering detecting channels, impedance channels, etc. Any method which can isolate and distinguish these cells according to levels of expression of HA may be used.

15

In a first separation, typically starting with about 1×10^{10} , preferably at about $5 \times 10^{8-9}$ cells, antibodies or binding proteins to HA or HAS or fragments thereof can be labeled with at least one fluorochrome, while the antibodies or binding proteins for the various dedicated lineages, can be conjugated to at least one different fluorochrome. While each of the lineages can be separated in a separate step, desirably the lineages are separated at the same time as one is positively selecting for HA or HAS and/or other HSC markers. The cells can be selected against dead cells, by employing dyes associated with dead cells (including but not limited to, propidium iodide (PI)).

20

25

While it is believed that the particular order of separation is not critical to this invention, the order indicated is preferred. Preferably, cells are initially separated by a coarse separation, followed by a fine separation, with positive selection with antibodies to HA or HAS or fragments thereof. It is preferred that a pre-enrichment step is applied which enriches CD34+ cells prior to identification of HA or HAS.

30

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

18

In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of obtaining a cell population enriched in HSCs or progeny thereof comprising the steps of:

- obtaining cell populations comprising HSCs or progeny thereof;
 - 5 combining the cell population with a binding protein for HA or HAS or a fragment thereof; and
 - selecting for cells which are identified by the presence of the binding protein which is indicative of HA or HAS or a fragment thereof on the cell.
- 10 The binding protein is as described above.

In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of obtaining a cell population enriched in HSCs or progeny thereof comprising the steps of:

- 15 obtaining cell populations comprising HSCs or progeny thereof;
- combining the cell population with an antibody for HA or HAS or a fragment thereof; and
- selecting for cells which are identified by the presence of the antibody which is indicative of HA or HAS or a fragment thereof on the cell.

20

Any separation methods employing antibodies to isolate cells may be utilised and are familiar to the skilled addressee. The description above for identification of HSCs or progeny thereof is applicable here.

- 25 To further enrich for any cell population, specific markers for those cell populations may be used. For instance, specific markers for specific cell lineages such as lymphoid, myeloid or erythroid lineages may be used to enrich for or against these cells. These markers may be used to enrich for HSCs or progeny thereof by removing or selecting out mesenchymal or
- 30 keratinocyte stem cells.

The methods described above can include further enrichment steps for cells by positive selection for other stem cell specific markers. Suitable positive stem cell markers include, but are not limited to, CD34⁺, Thy-1⁺, and c-kit⁺.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

19

By appropriate selection with particular factors and the development of bioassays which allow for self-regeneration of HSCs or progeny thereof and screening of the HSCs or progeny thereof as to their markers, a composition enriched for viable HSCs or progeny thereof can be produced for a variety of purposes.

In yet another aspect of the present invention, there is provided an enriched population of HSCs or progeny thereof prepared by the methods described herein.

Similarly, in another preferred embodiment, there is provided a method of removing HSC or progeny thereof from a population comprising the steps of
obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;
and
selecting out those cells which are identified by the presence of HA or HAS or a fragment thereof on the cell.

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

Preferably, HA or HAS is detected by using an antibody or binding protein to HA or HAS or a fragment thereof. More preferably, the HA is detected by the binding protein HABP. Once the marker, binding protein or antibody is attached to the HSC or progeny thereof, any method described above for isolation may be used to distinguish and select out for HSC or progeny thereof.

In yet another aspect of the present invention, there is provided a cell population having a decreased HSC population relative to a control cell

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

20

population which has not undergone negative selection for HSC or progeny thereof.

- In yet another aspect of the present invention, there is provided a method of
- 5 isolating a HSC or progeny thereof comprising
- obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
 - detecting the presence of HA or HAS or a fragment thereof on a cell;
 - selecting for those cells which are identified by the presence of HA or
- 10 HAS or a fragment thereof on the cell; and
- isolating those cells identified by the presence of HA or HAS or a
- fragment thereof.

- The HSCs or progeny thereof may be isolated by any of the methods used for enrichment as described above with the added step of isolating the HSC.
- 15 Useful techniques include magnetic separation, using antibody-coated magnetic beads, affinity chromatography, cytotoxic agents joined to a monoclonal antibody or used in conjunction with a monoclonal antibody, including, but not limited to, complement and cytotoxins, and "panning" with antibody attached to a solid matrix, e.g., plate, elutriation or any other
- 20 convenient technique. Persons skilled in the art would be familiar with these techniques and can employ any known techniques providing HA or HAS is selected for.

- In another preferred aspect there is provided a method of isolating a HSC or
- 25 progeny thereof comprising
- obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
 - combining the cell population with a binding protein for HA or HAS or fragment thereof;
 - selecting for those cells which are identified by the binding protein for
- 30 HA or HAS or fragment thereof; and
- isolating those cells identified by the antibody.

The binding protein is as described above.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

21

In another preferred aspect there is provided a method of isolating a HSC or progeny thereof comprising

- obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
- combining the cell population with an antibody for HA or HAS or
5 fragment thereof;
- selecting for those cells which are identified by the antibody for HA or HAS or fragment thereof; and
- isolating those cells identified by the antibody.

- 10 Any antibody presently available which is specific for HA or HAS may be used. A suitable antibody is a pan-species α HA polyclonal sheep antibody from Biogenesis.

- 15 Once the HSC or progeny thereof population is isolated, further isolation techniques may be employed to isolate sub-populations within the HSCs or progeny thereof. Specific markers including cell selection systems such as FACS for cell lineages may be used to identify and isolate the various cell lineages.

- 20 In another aspect there is provided a HSC or progeny thereof isolated by the methods described herein. Preferably the cell is CD34⁺, HA⁺. More preferably, the cell is CD34⁺, thy1, HA⁺. Most preferably, the cell is CD34⁺, CD38⁻, thy1⁺, HA⁺.

- 25 The present invention also provides in another aspect, a composition of enriched HSC and progeny thereof comprising an enriched population of cells including CD34⁺, CD38⁻, thy1⁺, and HA⁺ cells.

- 30 Where the compositions are enriched for HSC or progeny thereof, these may be used in autologous engraftment. Further, the use of autologous HSCs or progeny thereof will avoid graft-versus-host disease. In addition, the cells can be modified by appropriate gene transfer, to correct genetic defects or provide genetic capabilities naturally lacking in the HSCs or progeny thereof or their progeny, either as to the individual or as to the HSC generally. In

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

22

addition, the HSC composition can be used to isolate and define factors associated with their regeneration and differentiation.

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of measuring the content of HSC or their progeny said method comprising

5 obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
combining the cell population with a binding protein for HA or HAS or fragment thereof;
selecting for those cells which are identified by the binding protein for

10 HA or HAS or fragment thereof; and
quantifying the amount of selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection with the binding protein.

The binding protein is as described above.

15

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of measuring the content of HSC or progeny thereof said method comprising

obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
combining the cell population with an antibody for HA or HAS or

20 fragment thereof;
selecting for those cells which are identified by the antibody for HA or HAS or fragment thereof; and
quantifying the amount of selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection with HA or HAS antibody.

25

Quantifying the amount of selected HSCs or progeny thereof provides for a means of diagnosis of a HSC associated condition such as, but not limited to normal and malignant conditions or more specifically, leukaemia, carcinomas, or sarcomas or general infections which can cause an increase

30 in the activity of HSC or their progeny, particularly in the haematopoietic stem cell populations, more specifically in the lymphoid lineages of those populations. In particular, the quantitation may provide an indication of the B and T cells which may differentiate from the lymphoid lineages to provide for the production of antibodies, regulation of the cellular immune system,

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

23

detection of foreign agents in the blood, detection of cells foreign to the host, and the like. The myeloid lineage, which includes monocytes, granulocytes, megakaryocytes as well as other cells, monitors for the presence of foreign bodies in the blood stream, provides protection against neoplastic cells, scavenges foreign materials in the blood stream, produces platelets, and the like. The erythroid lineage provides the red blood cells, which act as oxygen carriers.

The method may be performed by comparing the antibody treated sample having the HSC or their progeny identified from the cell population with a non-treated sample to identify that component which comprises the HSC. The whole cell numbers can be counted in the control. For diagnostic purposes it is considered that multiple samples may be measured and the fluctuations of cell numbers compared to monitor increasing or decreasing levels of HSC or their progeny.

In yet another aspect of the present invention there is provided a composition for detecting HSC or progeny thereof in a population, said composition comprising an indicator of HA or HAS or a fragment thereof and a carrier.

The indicator of HA or HAS or fragment thereof may include any detection means which can identify HA or HAS or a fragment thereof on a HSC or progeny thereof. Preferably the indicator is an antibody or binding protein to HA or HAS or a fragment thereof. The binding protein may be HABP.

The antibody may detect the full molecule of HA or HAS or detect specific peptide sequences contained within HAS which are indicative of HAS.

The composition may also comprise additional markers to distinguish specific cell lineages.

The invention also provides for methods of diagnosing conditions associated with HSCs or progeny thereof by identifying the presence of HSC or progeny thereof in a cell population. For instance, increased or decreased levels of

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

24

haematopoietic stem cells may indicate abnormalities in the blood. This may be important in diseases such as leukaemia, similarly, increases may translate to increase in HSCs or progeny thereof differentiating to lymphoid lineages including T and B cells indicating infection. Other methods may measure HA or HAS expression on leukemia or other malignancies.

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of controlling proliferation and/or differentiation in a HSC or progeny thereof, said method comprising

10 modulating expression and/or activity of HA or HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.

Applicants have found that HA or HAS is expressed in the HSC or progeny thereof. Prior to proliferation, levels of expression of HA or HAS change consistent with subsequent proliferation or differentiation of the cell. By modulating the expression and/or activity of HA or HAS in the cell, proliferation or differentiation of the cell may be controlled.

By the term "modulating expression and/or activity of hyaluronic acid" as used herein means modifying or altering the expression and/or activity of HA or HAS compared to unmodified levels.

The phrase "controlling proliferation and/or differentiation of a cell" encompasses the step of increasing the extent of growth and/or reproduction of the cell or specialization of the cell relative to an unmodulated cell either *in vitro* or *in vivo*. An increase or decrease in cell proliferation in cell culture can be detected by counting the number of cells before and after exposure to a molecule of interest. The extent of proliferation can be quantified via microscopic examination of the degree of confluency. Cell proliferation can also be quantified using a thymidine incorporation assay.

An increase or decrease in cell differentiation may be detected by identifying differentiated cell types which have specialized into various somatic or

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

25

progenitor cell types. Identification may be carried out using cell markers known by the skilled addressee to identify cell types.

5 "Activity" as used herein relates to a function of a HA or HAS in a HSC cell, and includes the ability of HAS to synthesize HA or of HA to bind to chaperone, or upstream or downstream effector molecules thereby activating or repressing upstream or downstream pathways which affect proliferation or differentiation.

10 The term "modulating expression and/or activity" as used herein includes modifying or altering the expression and/or activity of HA or HAS, compared to unmodified levels of HA or HAS. Expression and/or activity may be increased or decreased compared to unmodified levels to increase or decrease proliferation or differentiation.

15

Modulation of HA or HAS expression and/or activity in the HSC may be achieved using antagonists, inhibitors, mimetics or derivatives of the HA or HAS. The terms "antagonist" or "inhibitor", as used herein, refer to a molecule which, when bound to either HA or HAS, blocks or modulates the activity of HA or HAS. Antagonists and inhibitors may include proteins, nucleic acids, carbohydrates, antibodies or any other molecules including ligands which bind to HA or HAS. A suitable ligand is HABP which may bind to HA. Proteins may include enzymes such as hyaluronidase which can break down HA and therefore affect the level of HA exposed on the HSC.

20 Other modulators of the activity and/or expression of HA or HAS include a range of rationally-designed, synthetic inhibitors.

A suitable concentration of HABP is in the range of 5-20 μ g/ml. In the case of hyaluronidase this may be used at 0.1 units per ml for approximately 15min

30 at room temperature or equivalent condition.

Modulation may be an increase or a decrease in expression and/or activity of an HAS gene or HAS activity, a change in binding characteristics, or any other change in the biological, functional or immunological properties.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

26

Modulators include, but are not limited to upstream and downstream regulators of HAS for expression and activity of the enzyme.

5 The term "mimetic", as used herein, refers to a molecule, the structure of which is developed from knowledge of the structure of HA or HAS or portions thereof and, as such, is able to effect some or all of the actions of HA or HAS-like molecules.

10 Modulation of HA or HAS expression and/or activity may be achieved by direct or indirect methods. Modulation of expression and/or activity of HA or HAS may be achieved using direct methods known to those of skill in the art and include, but are not limited to, knockout technology, antisense technology, triple helix technology, targeted mutation, gene therapy, regulation by agents acting on transcription. Indirect methods for modulating
15 expression and/or activity of HA or HAS may include targeting upstream or downstream regulators such as cytokines.

Inhibition of expression and/or activity of HA or HAS may be achieved using a wide variety of inhibitors that target HA or HAS expression and/or activity
20 either directly or indirectly. Inhibition may be achieved by inhibiting upstream or downstream targets involved in HA or HAS function.

In another aspect of the present invention, there is provided a method of treating a HSC associated condition comprising administering an effective
25 amount of a composition comprising an enriched population of HSC or progeny thereof and wherein said HSC or progeny thereof, said enriched population of HSC or progeny thereof prepared by the methods described herein.

30 A "HSC associated condition" as used herein means any condition which results from an interaction with HSC or progeny thereof or is dependent upon HSC or progeny thereof. Examples of the HSC associated conditions may include anemia (including macrocytic and aplastic anemia); thrombocytopenia; hypoplasia; disseminated intravascular coagulation (DIC);

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

27

myelodysplasia; immune (autoimmune) thrombocytopenic purpura (ITP); and HIV induced ITP and malignant conditions including leukaemia..

5 "Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disease or disorder as well as those in which the disease or disorder is to be prevented.

10 The compositions of the present invention which comprise HSC or progeny hereof isolated by the described methods can find use in a number of ways.

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

25 HA and HAS has been found to be involved in the spatial distribution of the cells following transplantation. Treatment of the cells with hyaluronidase affects the spatial distribution of the cells. Hence, cells used for transplantation or reconstitution of patient's hematopoietic system may be pretreated with compounds which inhibit the removal of HA or preserve the level of expression of HA or HAS to achieve a normal cell type and distribution.

30 The HSCs and progeny thereof can also be used in the isolation and evaluation of factors associated with the differentiation and maturation of hematopoietic cells. Thus, the invention encompasses the use of hematopoietic stem cells in assays to determine the activity of media, such

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

28

as conditioned media, or to evaluate fluids for cell growth activity, involvement with dedication of particular lineages, or the like.

The HSCs can be used for the treatment of genetic diseases. Thus, the invention encompasses treatment of genetic diseases associated with HSCs by genetic modification of autologous or allogeneic stem cells to correct the genetic defect. For example, diseases including, but not limited to, beta-thalassemia, sickle cell anemia, adenosine deaminase deficiency, recombinase deficiency, recombinase regulatory gene deficiency, etc. may be corrected by introduction of a wild-type gene into the haematopoietic stem cells, either by homologous or random recombination.

In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve *in vivo* synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA. Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes *in vivo*.

Other indications of gene therapy include introduction of drug resistance genes to enable normal stem cells to have an advantage and be subject to selective pressure during chemotherapy. Suitable drug resistance genes include, but are not limited to, the gene encoding the multi-drug resistance (MDR) protein.

Diseases other than those associated with hematopoietic cells can also be treated by genetic modification, where the disease is related to the lack of a particular secreted product including, but not limited to, hormones, enzymes, interferons, growth factors, or the like. By employing an appropriate regulatory initiation region, inducible production of the deficient protein can be achieved, so that production of the protein will parallel natural production, even though production will be in a different cell type from the cell type that

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

29

normally produces such protein. It is also possible to insert a ribozyme, antisense or other message to inhibit particular gene products or susceptibility to diseases, particularly hematolymphotropic diseases.

- 5 In yet another aspect of the present invention there is provided a method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from uncontrolled proliferation of HSCs or progeny thereof, said method comprising
- 10 controlling expression of HA or HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.

- In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from uncontrolled proliferation of HSCs or progeny thereof, said method
- 15 comprising
- reducing expression and/or activity of HA or HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.

- Typical conditions in which uncontrolled proliferation occurs is in malignant
- 20 conditions such as leukaemia including acute myeloid leukaemia (AML) and chronic myeloid leukaemia (CML).

- The applicants have shown human leukaemic cells exhibit elevated levels of HA. Specifically, human leukaemic cell lines (HL-60, Mo7e and K562)
- 25 express one or more HAS genes and synthesise high levels of HA which is efficiently removed by hyaluronidase. In addition, increased HA synthesis by leukaemic blasts from patient AML, CML, acute lymphoid leukaemia (ALL), chronic lymphoid leukaemia (CLL), PLL, chronic monomyelocytic leukaemia (CMML), bi-phenotypic, and Hairy Cell leukaemic samples (Table 1 has been
- 30 shown).

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

30

Expression of HA on Leukaemic samples

Disease	Number of patients analysed	% samples with elevated HA	% of leukaemic cells expressing HA
CLL	8	8/8	2****/1**/3*
AML	10	10/10	5****/2**/2*
ALL	2	2/2	2*
CML	8	7/8	1****/1*
CMMML	4	4/4	1****/1****/1**/1*
PLL	2	2/2	1****/1**
Bi-phenotypic	1	1/1	1****
Hairy Cell	2	1/2	1****

- **** 75-100% leukaemic cells
 *** 50-75% leukaemic cells
 ** 25-50% leukaemic cells
 * < 25% leukaemic cells

- 5 Compared to normal cord blood CD34⁺ cells, the majority of leukaemic cells exhibited an up regulation of the number of blast cells expressing HA. A distinct population of CML CD34⁺ cells also expressed significantly higher levels of cell surface HA (Figure 6). Patient samples all express HAS1, but limited samples express HAS2 and/or HAS3.
- 10 Accordingly in these leukaemias, HA and HAS are expressed at high levels. Controlling the level of HA expression can affect the proliferation of these cells. Decreasing the level of expression of HA can decrease the level of proliferation. This may be achieved by any of the methods described above for modulating the expression and/or activity of HA or HAS.
- 15 To treat the patient, a suitable modulator may be administered. The modulator may be administered by a variety of routes, including but not limited to, nasally, orally, transdermally, intramuscularly, intraperitoneally, subcutaneously, or intravenously.
- 20 This may be facilitated by using function-blocking antibodies, or agents that bind to HAS and therefore prevent HA synthesis. Alternatively cells may be retrovirally transduced cells with HAS antisense.
- 25

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

31

In yet another aspect of the present invention there is provided a method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from differentiation of HSCs or progeny thereof, said method comprising
controlling expression and/or activity of HA or HAS or a fragment
5 thereof in a HSC or progeny thereof.

Like proliferation, differentiation is affected by expression of HA or HAS in HSC or progeny thereof.

10 In a preferred aspect of the present invention there is provided a method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from differentiation of HSCs or progeny thereof, said method comprising
reducing expression and/or activity of HA or HAS or a fragment
thereof in a HSC or progeny thereof.

15

By reduction of differentiation using suitable modulators of HA or HAS expression and/or activity, differentiation can be controlled particularly in cancers which result from uncontrolled differentiation. Modulation may be conducted as described above.

20

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

25

EXAMPLES

Experimental

- 5 (a) **Umbilical Cord Blood.** Cord blood (CB) samples were obtained following informed consent after normal and caesarian section deliveries at the Mercy Hospital for Women (East Melbourne, Australia).
- 10 (b) **Mice.** Six to 8 week old BALB/c H-2D, and congenic C57Bl/6J (Ly5.2) and PTRPA (Ly5.1) mice were purchased from Animal Resources Center (Perth, WA, Australia) and housed clean conventionally for at least a week prior to experimental use. CD44^{-/-} mice (2) were kindly donated by Dr Tak Mak (Amgen Institute, Ontario Cancer Institute, University of Toronto). All
- 15 mice received mouse chow (Barastok, St. Arnaud, Victoria, Australia) and acidified water ad libitum.
- (c) **Irradiation.** The ability of cells to reconstitute hemopoiesis was analyzed in mice receiving a near-lethal dose of irradiation (9.5 Gy) in two
- 20 equal fractions separated by a 4 hr interval, delivered from 2 opposing ¹³⁷Cs sources (Gammacell 40; Atomic Energy of Canada, Ottawa, Canada) at a dose-rate of 1.4 Gy/min.
- (d) **Isolation of hemopoietic cells.** Mice were killed by cervical
- 25 dislocation. BM was routinely collected from femurs, tibiae and iliac crests. These bones were thoroughly ground in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 2% heat inactivated (HI) fetal calf serum (FCS; Hyclone, Logan, UT). The bone fragments were washed multiple times, and the supernatant cell suspension and wash fractions were filtered through a 40
- 30 μm filter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) to remove large bone particles. The marrow was centrifuged (400g, 5 min) and resuspended in fresh buffer. The cell supernatant was refiltered through a 40 μm filter, and diluted to 10⁷ cells/ml PBS supplemented with 2% HI FCS (buffer).

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

33

(e) **Hemopoietic cell enrichment strategies.**

- (i) **Murine.** Bone marrow mononuclear cells of low density (<1.0777 g/cm³) were isolated by discontinuous density centrifugation using Nycoprep for animals (Accurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY). The isolated cells were washed in buffer prior to further manipulation. Lin⁻ cells were isolated in a similar manner to that previously described (1). Briefly, low density cells were labelled with a cocktail of biotinylated or unconjugated primary rat anti-mouse antibodies: anti-B220 (CD45R; B cells); anti-Mac-1 (CD11b; macrophages); anti-Gr-1 (Ly-6G; neutrophils); anti-Lyt-2 (CD8), anti-L3T4 (CD4), anti CD3, and anti CD5 (T cells); and anti-Ter119 (erythroid cells). Each batch of antibody was evaluated by flow cytometric analysis for the concentration that resulted in the greatest shift in mean channel fluorescence and/or the percentage positive cells detected. Fifty microliters of double strength antibody cocktail was added per 5 x 10⁶ cells suspended in an equal volume of buffer and the cell:antibody suspension incubated on ice for 20 minutes. Lin⁺ cells were removed by immunomagnetic selection using the MACS system (Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany) as previously described (1). In brief, washed, antibody labeled cells were incubated with goat anti-rat IgG microbeads (Miltenyi Biotec) at 4°C for 15 minutes by adding 13 µl of beads to 87 µl of cell suspension (containing 10⁷ cells in buffer). The cells were washed in buffer, and resuspended in 1.5 ml of PBS, 5 mM EDTA, and 1% bovine serum albumin (BSA)/10⁸ cells. Up to 2 ml of the cells were then added to the column (D column, maximum capacity 1 x 10⁹ cells, generally not run at more than half the maximum stated capacity), run into the mesh, and left to magnetize for 5 minutes. The Lin⁻ cells (non-magnetic fraction) were collected by eluting the cells through a 20-gauge needle with 50 mls of PBS, 5 mM EDTA, and 1% BSA.
- (ii) **Rhodamine123 (Rh) labelling.** Lin⁻ cells were washed in buffer, resuspended at 1 x 10⁶ / ml and incubated in a final Rh (Molecular Probes, Eugene, OR) concentration of 0.1 µg/ml (diluted in buffer) for 20 minutes at 37°C in the dark. The cells were centrifuged, resuspended at 10⁶ cells/ml, allowed to efflux for 15 min at 37°C in the dark, centrifuged, and

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

34

resuspended at 10^6 cells/ml in PBS 0.5% HI FCS. Cells were incubated with a final concentration of 1:80 (6.8 μ g/ml) goat anti-rat phycoerythrin (PE) conjugated secondary antibody (Biosource International; Camarillo, CA) on ice, in the dark for a further 20 minutes. Finally, the cells were washed in
5 buffer, resuspended at 5×10^6 cells/ml and stored on ice prior to fluorescence activated cell sorting (FACS).

(iii) Stem Cell Antigen 1 (Sca-1) and c-kit labeling. Lin⁻ cells were washed, centrifuged, and resuspended in a cocktail of Sca-1 FITC (Pharmingen; 1 μ g/ 5×10^6 cells) and c-kit PE (Pharmingen; 1 μ g/ 5×10^6 cells), and streptavidin-Red 670 (Gibco; 1/160 final concentration) on ice in the dark for 20 min. Finally, the cells were washed in buffer, resuspended at 5×10^6 cells/ml and stored on ice prior to fluorescence activated cell sorting (FACS).

15

(iv) Human. Mononuclear cells of low density were isolated from CB by discontinuous density centrifugation using Ficoll-Hypaque density gradient ($d = 1.077$ g/ml, Pharmacia Biotech, Sweden) and washed 3 times by centrifugation at 400 *g*. The isolated cells were washed in PBS prior to
20 further manipulation. Lin⁻ cells were isolated as previously described. Briefly, cells were labeled with a cocktail of lineage antibodies including anti CD19, CD20, and CD24 (B cells and erythroid cells); anti CD3, CD2 and CD56 (T cells and NK cells); anti CD16, CD66b and CD11b (granulocytes and monocytes); anti CD14, CD36 (monocytes, platelets and erythroid cells). Lin⁺
25 cells were removed by immunomagnetic selection using goat anti-mouse IgG microbeads and the MACS system as described above.

(v) CD34, CD38 and CD15 labelling. Lin⁻ cells were washed, centrifuged, and resuspended in a cocktail of CD34 FITC and CD38PE, or
30 CD15 FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA; at the concentration recommended by the manufacturer) on ice in the dark for 20 min. Finally, the cells were washed in buffer, resuspended at 5×10^6 cells/ml and stored on ice prior to fluorescence activated cell sorting (FACS).

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

35

- (f) **Hyaluronic acid labeling.** The presence of hyaluronic acid (HA) on the cell surface was detected using a final concentration of 20 µg/ml of biotinylated hyaluronic acid binding protein (HABP; Seikagaku, Tokyo, Japan) on ice for 20 min. Cells were washed, and labeled with streptavidin-PE or Red-670 (Gibco BRL, Grand Island, NY) as described above.
- (g) **Hyaluronidase Treatment.** To ensure that HABP labeling was specific, as well as to assess the importance of cell surface HA on the spatial distribution of engrafting cells, marrow sub-populations were treated with 0.1U hyaluronidase (HY) (Sigma Aldrich) for 15 min at 21°C to remove HA. Cells were washed in PBS 0.5% HI FCS.
- (h) **Flow cytometry.** Labeled cells were sorted on a FACStar^{plus} cell sorter equipped with a 5-watt argon ion laser (Coherent Innova 90, Palo Alto, CA) emitting 488 nm light at 200 mW, and a Spectra-Physics ultraviolet (UV) laser (Mountain View, CA) emitting 350/360 nm light at 50 mW. Light-scatter signals were collected through a 488-nm band pass 10 filter and a 1-decade logarithmic neutral density filter in the forward light scatter path. Rh emitted green fluorescence pulses were collected through an FITC 530-nm band pass 15 filter. Orange fluorescence pulses emitted following excitation of phycoerythrin (PE) were reflected through a 440 dichroic short pass mirror, and collected through a 575-nm band pass dichroic 26 filter. Pulses emitted following the excitation of Red 670 were collected through a long pass RG655 filter.
- (i) **Cell Culture.** Cells to be cultured were sorted directly into 96 well plates containing 100µl of serum deprived media containing multiple cytokines and various concentrations of HABP. Murine cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco BRL) containing 1% BSA, 10µg/ml human insulin, 200µg/ml human transferrin, 0.05mM 2-Mercaptoethanol and 21µg/ml LDL. Human cells were cultured in X Vivo 10 media (Bio Whittaker, Verviers, Belgium) containing 0.5% buminate (Baxter, Glendale, CA).

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

36

(j) 5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)

Labeling. Cells to be transplanted for spatial distribution analysis were labeled with the fluorescent dye CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR) as previously described (1). Briefly, cells were washed in PBS 0.5% HI FCS, resuspended in PBS 0.5% HI FCS at a density of 10^6 cells/ml, and pre-incubated at 37°C for 2 min. CFSE diluted to 5 mM in DMSO, and then to 5 μ M in PBS was added to give a final concentration of 0.5 μ M, and the dye solution cell mixture incubated at 37°C for a further 10 min. Staining was stopped by adding 10 times the dye solution cell volume of ice cold PBS containing 20% FCS. Finally, the cells were washed in PBS, and resuspended for injection in up to 0.3 ml PBS per recipient.

(k) Transplants. Cells were transplanted by injection into the lateral tail vein. The actual numbers of cells injected were 500 Lin⁻ Sca⁺ HA⁺ cells, 500 Lin⁻ Sca⁺ HA⁻ cells, 5000-6000 Lin⁻ HA⁺ cells, $5-6 \times 10^5$ Lin⁻ HA⁻ cells, 1.1×10^5 Lin⁻Rh^{dull} and 5.5×10^5 Lin⁻Rh^{bright} untreated and hyaluronidase treated cells.

(l) Analysis of transplanted cell spatial distribution. 15 hrs post-transplant, the spatial distribution of CFSE positive cells was analyzed as previously described (1). Briefly, BM was fixed by perfusing 2% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehyde through the descending aorta at physiological pressure. Femurs were removed and decalcified in 10% EDTA. Bones were then dehydrated embedded in paraffin. Three-and-a-half- μ m longitudinal sections of each femur were cut and mounted in antifade mounting medium (Vectashield, Vector Laboratories). All sections were analysed under a fluorescence microscope (Zeiss, Camperdown, NSW, Australia) using an FITC and Texas red dual filter set (green excitation at 578 nm, and red excitation at 610 nm). This filter set was specifically chosen because the short emission band-widths enabled CFSE positive BM cells to be easily distinguished from host marrow cells.

The spatial distribution of transplanted cells was determined by analysing the location of CFSE labeled cells (positive cells) from at least 6 longitudinal

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

37

sections per transplant recipient. Central longitudinal sections were analyzed as opposed to transverse sections, as each individual section encompasses more of the entire femur. To ensure that individual cells were only analyzed once, every alternate 3.5µm section was analyzed. The location of positive cells were designated as either endosteal (previously arbitrarily defined as within 12 cells of the endosteum (3)) or central (greater than 12 cells from either endosteum) (1).

(m) RNA extraction. RNA was extracted using an RNAzol B (Bresatec, SA, Australia) extraction method. Briefly, cells were centrifuged, and RNA prepared by lysing the cells with 0.2 ml/10⁶ cells of RNAzol B. The homogenate was chloroform extracted and isopropanol precipitated. RNA was washed, dried and resuspended in sterile water.

(n) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Template cDNA was prepared using random hexamers (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and Superscript II reverse transcriptase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). PCR was performed using the following oligonucleotide primers: murine Has-1 sense (5' CGTGACTACGTGCAGGTCTGTG 3') (Seq ID No: 1) and antisense (5' GAGCGCGAGGTATACTTGGTAGC 3') (Seq ID No: 2), murine Has-2 sense (5' GACCACACAGACAGGCGGA 3') (Seq ID No:3) and antisense (5' TCCAGGGTAGGTCAGCCTT 3') (Seq ID No:4), murine Has-3 sense 3' 5' (5' GAGCGTGTGC GAGCTGTGGT GTG 3') (Seq ID No:5) and antisense (5' GAAGCATCTCAATGGTGCAGGCT 3') (Seq ID No:6), human HAS-1 sense (5' GCTACCAAGTACACCTCCAGGTC 3') (Seq ID No:7) and antisense (5' CGCGTAGAACAGACGCAGCACAG 3') (Seq ID No:8), human HAS-2 sense (5' GCTCGCAACACGTAACGCAA 3') (Seq ID No:9) and antisense (5' GGCACCTAGATCGAGCTGTG 3') (Seq ID No:10), and human HAS-3 sense (5' AGCCTGCAGGAGGCATGGA 3') (Seq ID No:11) and antisense (5' GGAGCGCGGGTATACTTAGTTCGG 3') (Seq ID No:12) synthesized by Geneworks (Adelaide, SA, Australia). All PCR were performed in a 25 µl volume under 30 µl of paraffin oil in a gene machine (Innovonics, Melbourne, Australia). Each PCR consisted of 1x Taq gold buffer, 200 µM dNTPS (Boehringer Mannheim, Branchburg, NJ), 4

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

38

$\mu\text{g/ml}$ of each primer, 1.5 mM MgCl_2 , 10% DMSO, and 0.5 U Taq Gold (Boehringer Mannheim). PCRs were performed with a profile of 10 min of Taq gold activation at 94°C for the first cycle and 30 sec denaturing for subsequent cycles, 30 sec of annealing at 60°C for 10 cycles followed by 30
5 sec of annealing at 55°C for a further 25 cycles, and 30 sec extension at 72°C for the 35 cycles followed by a final 5 min extension at 72°C.

(o) **Statistical analysis.** Differences between means were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) or students t-test where appropriate.

10

Example 1: HA expression on murine hemopoietic cells.

Expression of HA was demonstrated by flow cytometric analysis through the binding of a biotinylated form of hyaluronic acid binding protein (HABP), which demonstrates absolute specificity for HA (4). Using this approach,
15 HABP binding was detected on two murine sub-populations enriched for HSC: $\text{Lin}^-\text{Sca}^+\text{Kit}^+$ (Fig. 1a) and $\text{Lin}^-\text{Rh}^{\text{dull}}$ and was completely eliminated by prior treatment of the cells with the enzyme hyaluronidase (HY) (Fig. 1b). In addition, a similar proportion of $\text{Lin}^-\text{Rh}123^{\text{dull}}$ cells isolated from $\text{CD44}^{-/-}$ mice (2) exhibited binding of HABP (25.0% compared to 26.5%), demonstrating
20 that HA detected on the cell surface is not due to the binding of exogenous HA to its major receptor CD44 (19) but due to de-novo synthesis by primitive hemopoietic cells themselves. Importantly, RT-PCR analysis demonstrated that $\text{Lin}^-\text{Sca}^+\text{Kit}^+$, $\text{Lin}^-\text{HABP}^+$ but not HABP^- cells express Has-1, Has-2 and Has-3 (Fig. 2 a + b).

25

Example 2: HA expression of human HPC.

The expression of HA by primitive BM cells is not a unique feature of the mouse but is also a characteristic of human hemopoietic progenitors. FACS analysis of human umbilical cord blood (CB) (Fig. 3) using CD34, CD38 and
30 HABP showed putative Human HSC synthesise HA. Interestingly, there was a significant decrease in the level of HA expression in correlation with a maturing cell phenotype, with no HA expression detected on $\text{CD34}^+\text{CD38}^+$ cells. In accord with data in the mouse, isolated human CD34^+ and Lin^-HA^+ cells but not Lin^-HA^- also express HAS1, HAS2 and HAS3 (Fig. 4).

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

39

Collectively these data demonstrate that HA is synthesized by and expressed on murine and human hemopoietic populations enriched for HSC.

- However, repopulating HSC represent only a minor proportion of Lin⁻ Rh123^{high} cells (5). In order to examine whether HSC were contained within the HABP⁺ subpopulation, FACS was used to isolate Lin⁻HABP⁺ and Lin⁻HABP⁻, and Lin⁻Sca⁺HABP⁺ and Lin⁻Sca⁺HABP⁻ subpopulations and the cells assayed *in vivo* using the congenic Ly5.1 / Ly5.2 mouse model (6). 5000-6000 Lin⁻HABP⁺ cells reconstituted all hemopoietic lineages in the peripheral blood (PB) of lethally irradiated recipients 8 weeks post-transplant (Table 2) while an equivalent number of Lin⁻HABP⁻ cells failed to do so, with the recipients dying 14-16 days post-transplant. In addition, transplantation of 500 Lin⁻Sca⁺HABP⁺ cells resulted in reconstitution of multiple hemopoietic lineages of lethally irradiated recipients 4 weeks post-transplant (Table 2).
- Thus HA is expressed on HSC with long-term repopulating potential, but the level of engraftment is significantly lower than predicted from infused unfractionated Lin⁻Sca⁺ cells (7). However, in only one of six recipients were HABP⁻ cells capable of rescuing lethally irradiated recipients (following a transplant of 500 Lin⁻Sca⁺HABP⁻ cells), suggesting that the majority of HSC are not contained within this population. In the one surviving recipient, there was an equivalent proportion of donor cells to that seen following a transplant of the HA⁺ cells (~9%). The reason for this lower than expected level of engraftment remains unclear, but is suggestive of HA not simply playing a passive structural role, but also being a specific signal-inducing molecule.

25

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

40

Table 2. Analysis of the ability of Lin⁻ cells expressing HA to reconstitute hemopoiesis *in vivo*.

	% of each subpopulation within the donor cells detected following a transplant of Lin ⁻ HABP ⁺ cells*	% of each subpopulation within the donor cells detected following a transplant of Lin ⁻ Sca ⁺ HABP ⁺ cells*
MAC-1/GR-1	40±3	68
B220	36±6	UN
CD4/CD8	20±3	22

5 Mice were injected with either 5000-6000 Lin⁻ HABP⁺ cells (4 mice) or 500 Lin⁻Sca⁺HABP⁺ cells (2 mice) and analyzed 4-8 weeks post-transplant. Peripheral blood was collected, and the red blood cells lysed using ammonium chloride. The percentage donor cells was determined using LY5.1 antibody labeling, and was 9±1.7% and 9.4±0.02% following a transplant of 5000-6000 Lin⁻ HABP⁺ cells or 500 Lin⁻Sca⁺HABP⁺ cells respectively.

White blood cells were labeled for macrophages and granulocytes (MAC-1/GR-1), B cells (B220) and T cells (CD4/CD8) and the proportion of donor analyzed using an Ly5.1 antibody*.

15 UN unknown

Example 3: The potential role of HA as a negative regulator of HSC proliferation.

15 *In vitro* stroma-free, cytokine-dependent cultures demonstrated that the ligation of HA by a the surrogate soluble ligand HABP results in a profound suppression of both murine and human HSC proliferation while stimulated by a potent combination of early acting hemopoietic growth factors. Both murine and putative human HSC (Lin⁻Sca⁺Kit⁺ and Lin⁻CD34⁺CD38⁻ cells respectively) were cultured in serum free conditions in the presence of multiple cytokines consisting of either SCF (75ng/ml), IL-11, FLT3 Ligand and IL-6 (all 100ng/ml) or G-CSF, SCF, FLT3 Ligand, MGDF (all 100ng/ml), il-6

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

41

and IL-3 (both 10ng/ml) for murine and human HSC respectively, and various concentrations of HABP. As shown in Figure. 5 this resulted in a significant inhibition of cell proliferation corresponding to the presence of increasing concentrations of HABP. This unexpected data shows a marked growth inhibitory effect of HA on hemopoiesis. In addition to growth inhibition, as shown in Figure 5a incubating HSC in increasing amounts of HABP maintained cells phenotypic of the input population and prevented cell differentiation. In contrast a significant proportion of cells cultured in the absence of HABP differentiated to become CD15 positive (Fig. 5b). This observed growth regulatory role is in accord with a recent report showing that the addition of HA *in vitro* results in perturbation of hemopoiesis (8). In this study, exogenous HA was added to LTBMNC, resulting in enhanced production of both progenitors and mature BM cells, whereas the addition of HY resulted in the inhibition of cell production. In these cultures, HA was thought to be regulating hemopoiesis through a progenitor ancestral to the common myeloid and lymphoid progenitor. In addition this observed growth regulatory role of HA is very similar to that recently described for the sialomucin PSGL-1: P-Selectin interaction (9). In addition to its well-documented role as an adhesion molecule, PSGL-1 has now been shown to be a potent negative regulator of human hemopoietic progenitors.

Example 4: The role of HA in the spatial distribution of transplanted murine HSC.

Further recent data from our laboratory indicates that the expression of this CAM on HSC is functionally significant, being involved in regulating their lodgment post-transplant. When Lin⁻Rh^{dim} cells were treated with HY prior to transplantation, there was an ~ 40% reduction in the number of cells located at the endosteum 15 hours post-transplant compared to untreated cells (39±3 and 65±8 respectively). In contrast, HY treatment of Lin⁻Rh^{bright} cells, shown not to synthesize any of the Has genes (data not shown), did not alter their spatial distribution at the same time-point (41±3 and 37±4 respectively). This suggests a specific role in determining the spatial localization of HSC but not HPC.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

42

Overall our data is the first demonstration of HSC synthesis and expression of HA *in vitro* and *in vivo*, representing a very specific but as yet unrecognized characteristic of primitive hemopoietic cells in at least two mammalian species. The presence of HA on HSC is functionally significant in stem cell biology, specifically in the regulation of HSC lodgment post-transplant. In addition, the data also suggests that the binding of HA on the surface of HSC to a surrogate ligand plays an important role in regulating the proliferation and differentiation of these cells.

REFERENCES

1. Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Coverdale, J.A. 2001. Spatial
5 localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the
localization of stem cell niches. *Blood* 97:2293.
2. Schmits, R., J. Filmus, N. Gerwin, G. Senaldi, F. Kiefer, T. Kundig, A.
Wakeham, A. Shahinian, C. Catzavelos, J. Rak, C. Furlonger, A.
Zakarian, J.J. Simard, P.S. Ohashi, C.J. Paige, J.C. Gutierrez-Ramos,
10 and T.W. Mak. 1997. CD44 regulates hematopoietic progenitor
distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90, no.
6:2217.
3. Nilsson, S.K., M.S. Dooner, C.Y. Tiarks, H.-U.G. Weier, and P.J.
Quesenberry. 1997. Potential and distribution of transplanted
15 hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model. *Blood* 89, no.
11:4013.
4. Engstrom-Laurent, A., and R. Hallgren. 1985. Circulating hyaluronate
in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the
effect of corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* 44, no. 2:83.
- 20 5. Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification
and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*
241:58.
6. Spangrude, G.J., and D.M. Brooks. 1993. Mouse strain variability in
the expression of the hematopoietic stem cell antigen Ly-6A/E by bone
25 marrow cells. *Blood* 82, no. 11:3327.
7. Spangrude, G.J., and R. Scollay. 1990. A simplified method for
enrichment of mouse hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 18, no.
8:920.
8. Khaldoyanidi, S., A. Denzel, and M. Zoller. 1996. Requirement for
30 CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells.
Journal of Leukocyte Biology 60:579.
9. Levesque, J.P., A.C. Zannettino, M. Pudney, S. Niutta, D.N. Haylock,
K.R. Snapp, G.S. Kansas, M.C. Berndt, and P.J. Simmons. 1999.
PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

44

selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity* 11, no. 3:369.

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

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

45
SEQUENCE LISTING

<110> The Peter MacCallum Cancer Institute

5 <120> Detection of Haematopoietic Stem Cells and Progeny and Uses Thereof

<130> 650415

10 <140> PR8565
<141> 2001-10-30

<150> PR8565
15 <151> 2001-10-30

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

20 <210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> Musa sp.

25 <400> 1
cgtggactac gtgcaggtct gtg
23

30 <210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Musa sp.

35 <400> 2
gagcgcgagg tatacttggt agc
23

40 <210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Musa sp.

45 <400> 3
gaccacacag acagggcga
19

50 <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Musa sp.

55 <400> 4
tcccaggta ggtcagcctt
20

60 <210> 5
<211> 25
<212> DNA

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

46

<213> Musa sp.
 <400> 5
 gagcgtgt gcgagctgtg gtgtg
 5 25

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Musa sp.

<400> 6
 gaagcatttc aatggtgcag gct
 15 23

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Musa sp.

<400> 7
 gctaccaagt acacctcag gtc
 20 25

<210> 8
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Musa sp.

<400> 8
 cgcgtagaac agacgcagc acag
 30 35

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Musa sp.

<400> 9
 gctcgcaaca cgtaacgcaa
 40 45

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Musa sp.

<400> 10
 ggcacttaga tcgagctgtg
 50 55

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Musa sp.

<400> 11

29

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

47

agcctgcagg agggcatgga
20

5 <210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> Musa sp.

10 <400> 12
ggagcggcgg cggatactt agttcgg
27

15

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

48

CLAIMS:

1. A method of identifying a haematopoietic stem cell (HSC) or progeny thereof comprising the steps of:
 - 5 obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
 - detecting the presence of at least one carbohydrate sequence having a sequence of at least one disaccharide repeat of glucuronic acid and N-acetylglucosamine or an equivalent thereof; and
 - 10 identifying a HSC or progeny thereof having the sequence or equivalent thereof.
2. The method according to claim 1 wherein the sample is exposed or combined with a marker for hyaluronic acid (HA), hyaluronic acid synthase (HAS) or a fragment thereof in a manner which facilitates interaction of the marker with the cells.
- 15 3. The method according to claim 2 wherein the marker identifies HA, HAS or a fragment thereof on a cell surface.
4. The method according to claim 3 wherein the marker is selected from the group consisting of: antibodies to HA, HAS or a fragment thereof; agonists and antagonists against HA, HAS or a fragment thereof; binding
- 20 proteins to HA, HAS or a fragment thereof; nucleic acid detection systems which can detect expression of HA or HAS by the presence of DNA, RNA, mRNA or HA or HAS protein; and enzymatic, fluorescent or colorimetric assays for HA, HAS or a fragment thereof.
5. The method according to claim 4 wherein the binding protein is
- 25 hyaluronic binding protein (HABP).
6. The method according to claim 2 wherein the marker includes a label to enhance identification of the marker.
7. The method according to claim 6 wherein a fluorescent, radioactive or enzymatic label is linked to the marker to enhance detection.
- 30 8. A method according to claim 1 comprising the steps of:
 - obtaining a cell sample including HSCs or progeny thereof;
 - detecting the presence of hyaluronic acid (HA) or hyaluronic acid synthase (HAS) or a fragment thereof on a cell; and

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

49

- identifying the HSCs or progeny thereof having HA, HAS or a fragment thereof on the cell.
9. A method according to claim 8 wherein HA or HAS is detected.
10. A method according to claim 8 wherein a peptide sequence corresponding to a portion of HAS or an equivalent thereof is detected.
- 5 11. A method according to any one of claims 1 to 10 wherein the sample is from an embryonic or adult source.
12. A method according to any one of claims 1 to 11 wherein the cell sample is from bone marrow including iliac crests, tibiae, femurs, spine, periosteum, endosteum or other bone cavities.
- 10 13. A method according to any one of claims 1 to 11 wherein the cell sample is from blood, embryonic yolk sac, fetal liver, spleen, peripheral blood, skin, dermis, ES cells or ES cell cultures.
14. A method according to any one of claims 1 to 13 wherein the sample is a tissue sample, a cell suspension or cells grown *in vitro*.
- 15 15. A method according to any one of claims 1 to 14 wherein the sample is enriched for CD34⁺ cells prior to detection of HA, HAS or a fragment thereof.
16. A method according to claim 8 comprising the steps of:
- 20 obtaining a cell sample including HSCs or progeny thereof;
- combining the sample with an antibody for HA, HAS or a fragment thereof;
- detecting the presence of HA, HAS or a fragment thereof; and
- identifying the HSC or progeny thereof having HA, HAS or a fragment thereof by detecting the presence of the antibody on the HSC or progeny thereof.
- 25 17. A method according to claim 16 wherein the antibody is specific for HA, HAS or a fragment thereof.
18. A method according to claim 8 comprising the steps of:
- obtaining a cell sample including HSCs or progeny thereof;
- combining the sample with a binding protein for HA, HAS or a fragment thereof;
- 30 detecting the presence of the binding protein; and
- identifying the HSC or progeny thereof having HA, HAS or a fragment thereof by detecting the presence of the binding protein on the HSC or progeny thereof.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

50

19. A method according to claim 18 wherein the binding protein is HABP or a synthetic indicator based on HABP.
20. A method for obtaining a cell population enriched in HSCs or progeny thereof comprising the steps of:
- 5 obtaining a cell population comprising HSCs or progeny thereof;
detecting the presence of HA, HAS or a fragment thereof on a cell; and
selecting for cells which are identified by the presence of HA, HAS or a fragment thereof on the cell.
21. A method according to claim 20 wherein the method of detection
- 10 involves the use of an antibody to HA or HAS; or a binding protein (HABP) to HA.
22. A method of removing HSCs or progeny thereof from a population comprising the steps of:
- obtaining a cell population comprising HSCs or progeny thereof;
- 15 detecting the presence of HA, HAS or a fragment thereof on a cell; and
selecting out those cells which are identified by the presence of HA, HAS or a fragment thereof on the cell.
23. A method according to claim 22 wherein antibodies or HABP is used to detect HA or HAS prior to selection.
- 20 24. Use of a HSC isolated or identified according to the method of any one of claims 1 to 23 in a method of treating or diagnosing HSC related or associated conditions.
25. Use of a HSC isolated or identified according to the method of any one of claims 1 to 23 in the preparation of a medicament for treating or
- 25 diagnosing HSC related or associated conditions.
26. A method for isolating subpopulations within a HSC population comprising using a method according to any one of claims 1 to 16 and specific markers for specific cell lineages to identify and isolate the cell lineages.
- 30 27. A method according to claim 26 wherein the cell lineage is a lymphoid, myeloid or erythroid cell lineage.
28. A method according to claim 1 comprising the steps of:
obtaining a cell sample including HSC or progeny thereof;
combining the sample with an antibody for HA, HAS or a fragment thereof;

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

51

detecting the presence of the antibody; and
identifying the HSC or progeny thereof having HA, HAS or a fragment thereof
by detecting the presence of the antibody on the HSC or progeny thereof.

29. The method according to claim 28 wherein the antibody is specific for
5 HA, HAS or a fragment thereof.
30. The method according to claim 28 or 29 wherein the antibody is
conjugated to a molecule or compound selected from the group consisting of:
enzymes, magnetic beads, colloidal magnetic beads, haptens,
10 fluorochromes, metal compounds, radioactive compounds, chromatography
resins, solid supports and drugs.
31. The method according to claim 30 wherein the enzyme is selected
from the group consisting of alkaline phosphatase, peroxidase, urease and β -
galactosidase.
32. The method according to claim 30 wherein the fluorochrome is
15 selected from the group consisting of fluorescein isothiocyanate,
tetramethylrhodamine isothiocyanate, phycoerythrin, allophycocyanins and
Texas Red.
33. The method according to claim 30 wherein the metal compound is
selected from the group consisting of ferritin, colloidal gold, and colloidal
20 superparamagnetic beads.
34. The method according to claim 30 wherein the hapten is selected from
the group consisting of biotin, digoxigenin, oxazalone, and nitrophenol.
35. The method according to claim 30 wherein the radioactive compound
is selected from the group consisting of technetium 99m, ^{125}I and amino
25 acids comprising a radionuclide.
36. The method according to claim 35 wherein the radionuclide is selected
from the group consisting of ^{14}C , ^3H and ^{35}S .
37. A method for distinguishing subpopulations within a HSC population
comprising pre-enrichment for CD34⁺, identifying HSCs or progeny thereof
30 by detection of HA, HAS or a fragment thereof according to claim 8 and using
of additional markers separately or in combination with a marker for HA, HAS
or a fragment thereof to distinguish the subpopulations.
38. A method according to claim 37, wherein the sub-populations are
distinguished by levels of expression of HA or HAS.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

52

39. A method according to claim 37 wherein the subpopulations distinguished are phenotypes of the HSC population selected from the group consisting of CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺ (thy1) and Lin⁻ cells.
40. A diagnostic assay for determining numbers of HSCs or progeny thereof in a sample wherein the cells and antibody or marker are combined under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody or marker to HA or HAS and the HSCs or progeny thereof which are then quantitated.
41. A method of obtaining a cell population enriched in HSCs or progeny thereof comprising:
- 10 Obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
Detecting the presence of HA, HAS or a fragment thereof on a cell; and
Selecting for cells which are identified by the presence of HA, HAS or a fragment thereof.
42. A method of enriching a population for HSCs or progeny thereof comprising combining a mixture of HSCs or progeny thereof with an antibody, marker or binding protein that recognizes and binds to HA, HAS or a fragment thereof under conditions which allow the antibody, marker or binding protein to bind to HA, HAS or a fragment thereof and separating the cells recognized by the antibody, marker or binding protein to obtain a
- 20 population substantially enriched in HSCs or progeny thereof.
43. A method of separating or enriching HSCs or progeny thereof comprising use of a method according to claim 41 and a separation or enrichment technique selected from the group consisting of those based on differences in physical, cell surface, and vital staining properties.
- 25 44. A method according to claim 43 wherein the technique is FACS, or FACS modified by plurality of color channels, low angle and obtuse light scattering detecting channels, or impedance channels.
45. A method according to claim 42 or 43 wherein cells are initially separated by a coarse separation, followed by a fine separation, with positive
- 30 selection with antibodies to HA, HAS or fragments thereof.
46. A method according to claim 45 wherein a pre-enrichment step enriches CD34⁺ cells prior to identification of HA or HAS.
47. A method of obtaining a cell population enriched in HSCs or progeny thereof comprising the steps of:

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

53

- obtaining cell populations comprising HSCs or progeny thereof;
combining the cell population with a binding protein for HA, HAS or a
fragment thereof; and
selecting for cells identified by presence of the binding protein which is
5 indicative of HA, HAS or a fragment thereof on the cell.
48. A method of obtaining a cell population enriched in HSCs or progeny
thereof comprising the steps of:
obtaining cell populations comprising HSCs or progeny thereof;
combining the cell population with an antibody for HA, HAS or a fragment
10 thereof; and selecting for cells which are identified by the presence of the
antibody which is indicative of HA, HAS or a fragment thereof on the cell.
49. A method according to claim 48 wherein a specific marker for a cell
population is used to further enrich for the cell population.
50. A method according to claim 49 wherein the specific marker is for a
15 specific cell lineage and is used to enrich for or against these cells.
51. A method according to claim 50 wherein the cell lineage is a lymphoid,
myeloid or erythroid lineage.
52. A method according to claim 48 wherein the marker is used to enrich
for HSCs or progeny thereof by removing or selecting out mesenchymal or
20 keratinocyte stem cells.
53. A method according to claim 48 comprising further enrichment by
positive selection for another stem cell specific marker.
54. A method according to claim 53 wherein the stem cell marker is
selected from the group consisting of CD34⁺, Thy-1⁺, and c-kit⁺.
- 25 55. An enriched population of HSCs or progeny thereof prepared by a
method according to any one of claims 19, 20 and 41 to 54.
56. Use of HA or HAS to provide a population substantially devoid of
HSCs or progeny thereof by selecting out cells expressing HA or HAS to
leave a population stripped of the HSCs or progeny thereof.
- 30 57. Use according to claim 56 wherein HA or HAS is detected using an
antibody or binding protein to HA, HAS or a fragment thereof.
58. Use according to claim 56 wherein HA is detected by HABP.
59. A cell population having a decreased HSC population relative to a
control cell population with no negative selection for HSC or progeny thereof.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

54

60. A method of isolating a HSC or progeny thereof comprising:
obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
detecting the presence of HA, HAS or a fragment thereof on a cell;
selecting for those cells which are identified by the presence of HA, HAS or a
5 fragment thereof on the cell; and
isolating those cells identified by the presence of HA, HAS or a fragment
thereof.
61. A method according to claim 60 wherein isolating the HSC is by a
method selected from the group consisting of antibody-coated magnetic
10 beads, affinity chromatography, use of cytotoxic agents joined to or used in
conjunction with a monoclonal antibody, and antibody attached to a solid
matrix.
62. A method of isolating a HSC or progeny thereof comprising:
obtaining a cell population comprising HSCs or progeny thereof;
15 combining the cell population with a binding protein for HA, HAS or fragment
thereof;
selecting for those cells which are identified by the binding protein for HA,
HAS or fragment thereof; and
isolating cells identified by the binding protein.
- 20 63. A method of isolating a HSC or progeny thereof comprising
obtaining a cell population comprising HSCs or progeny thereof;
combining the cell population with an antibody for HA, HAS or fragment
thereof;
selecting for those cells which are identified by the antibody for HA, HAS or
25 fragment thereof; and
isolating cells identified by the antibody.
64. A method according to claim 63 wherein the antibody is specific for
HA or HAS.
65. A method according to claim 64 wherein the antibody is a pan-
30 species α HA polyclonal sheep antibody.
66. A HSC or progeny thereof isolated by a method according to any one
of claims 60 to 65.
67. A HSC according to claim 66 wherein the cell is CD34⁺, HA⁺.
68. A HSC according to claim 66 wherein the cell is CD34⁺, thy1, HA⁺.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

55

69. A HSC according to claim 66 wherein the cell is CD34⁺, CD38⁻, thy1⁺, HA⁺.
70. A composition of enriched HSCs and progeny thereof comprising an enriched population of cells including CD34⁺, CD38⁻, thy1⁺, and HA⁺ cells.
- 5 71. Use of a composition according to claim 70 in autologous engraftment.
72. Use of a composition according to claim 70 modified by gene transfer, to correct genetic defects or provide genetic capabilities naturally lacking in the HSCs or progeny thereof or their progeny.
- 10 73. Use of a composition according to claim 70 to isolate and define factors associated with regeneration and differentiation of HSCs or their progeny.
74. A method of measuring the content of HSC or their progeny said method comprising:
- 15 obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
combining the cell population with a binding protein for HA, HAS or fragment thereof;
selecting for those cells which are identified by the binding protein for HA, HAS or fragment thereof; and
- 20 quantifying the amount of selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection with the binding protein.
75. A method of measuring the content of HSC or progeny thereof said method comprising:
- 25 obtaining a cell population comprising HSC or progeny thereof;
combining the cell population with an antibody for HA, HAS or fragment thereof;
selecting for those cells which are identified by the antibody for HA, HAS or fragment thereof; and
- 30 quantifying the amount of selected cells relative to the quantity of cells in the cell population prior to selection with HA or HAS antibody.
76. Use of the method according to claim 74 or 75 for diagnosis of a HSC associated condition.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

56

77. Use according to claim 76 wherein the condition is selected from the group consisting of leukaemia, carcinomas, sarcomas, and general infections causing an increase in the activity of HSC or their progeny.
78. Use according to claim 77 wherein the increase in the activity of HSC or their progeny is in the haematopoietic stem cell populations.
79. Use according to claim 77 wherein the increase in the activity of HSC or their progeny is in the lymphoid lineages.
80. A method according to claim 74 or 75 wherein the quantitation provides an indication of the B and T cells which may differentiate from the lymphoid lineages to provide for the production of antibodies, regulation of the cellular immune system, detection of foreign agents in the blood, or detection of cells foreign to the host.
81. The method according to claim 75 comprising comparing the antibody treated sample having the HSC or their progeny identified from the cell population with a non-treated sample to identify that component which comprises the HSC.
82. A composition for detecting HSC or progeny thereof in a population, said composition comprising an indicator of HA or HAS or a fragment thereof and a carrier.
83. The composition according to claim 82 wherein the indicator of HA, HAS or a fragment thereof includes a detection means which can identify HA or HAS or a fragment thereof on a HSC or progeny thereof.
84. The composition of claim 83 wherein the indicator is an antibody or binding protein to HA, HAS or a fragment thereof.
85. The composition of claim 84 wherein the binding protein is HABP.
86. The composition according to claim 83 comprising additional markers to distinguish specific cell lineages.
87. A method of diagnosing a condition associated with HSCs or progeny thereof by identifying the presence of HSC or progeny thereof in a cell population.
88. A method of controlling proliferation and/or differentiation in a HSC or progeny thereof, said method comprising modulating expression and/or activity of HA, HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

57

89. A method according to claim 38 wherein modulation of HA or HAS expression and/or activity in HSC is achieved using antagonists, inhibitors, mimetics or derivatives of the HA or HAS.
90. A method of treating a HSC associated condition comprising
5 administering an effective amount of a composition comprising an enriched population of HSC or progeny thereof and wherein said enriched population of HSC or progeny thereof is prepared by a method according to any one of claims 19,20 and 41 to 54.
91. A method according to claim 90 wherein the HSC associated condition
10 is selected from the group consisting of macrocytic and aplastic anemia; thrombocytopenia; hypoplasia; disseminated intravascular coagulation (DIC); myelodysplasia; autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP); HIV induced ITP and leukaemia.
92. Use of cells to reconstitute an immunocompromised host or as a
15 source of cells for specific lineages, by providing for their maturation, proliferation and differentiation into one or more selected lineages with factors selected from erythropoietin, colony stimulating factors, interleukins, and stromal cells associated with the HSCs or progeny thereof.
93. Use of HSCs and progeny thereof in isolation and evaluation of
20 factors associated with differentiation and maturation of hematopoietic cells.
94. Use of HSCs for the treatment of genetic diseases.
95. Use according to claim 94 for treatment of genetic diseases associated with HSCs by genetic modification of autologous or allogeneic stem cells to correct the genetic defect.
96. Use according to claim 95 wherein the disease is beta.-thalassemia,
25 sickle cell anemia, or a deficiency in adenosine deaminase, recombinase, or recombinase regulatory gene.
97. A method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from uncontrolled proliferation of HSCs or progeny thereof,
30 said method comprising controlling expression of HA, HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.
98. A method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from uncontrolled proliferation of HSCs or progeny thereof,

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

58

said method comprising reducing expression and/or activity of HA ,HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.

99. A method according to claim 98 wherein the condition is selected from the group consisting of acute myeloid leukaemia (AML) and chronic myeloid leukaemia (CML).

5 100. A method of treating a HSC associated condition wherein said condition results from differentiation of HSCs or progeny thereof, said method comprising
controlling expression and/or activity of HA, HAS or a fragment thereof in a
10 HSC or progeny thereof .

101. A method of treating a HSC associated condition resulting from differentiation of HSCs or progeny thereof, comprising reducing expression and/or activity of HA, HAS or a fragment thereof in a HSC or progeny thereof.

WO 03/038071

PCT/AU02/01443

1/10

Figure 1A

EXPRESSION OF HA ON MURINE HSC
(lin-Sca⁺Kit⁺ Cells)

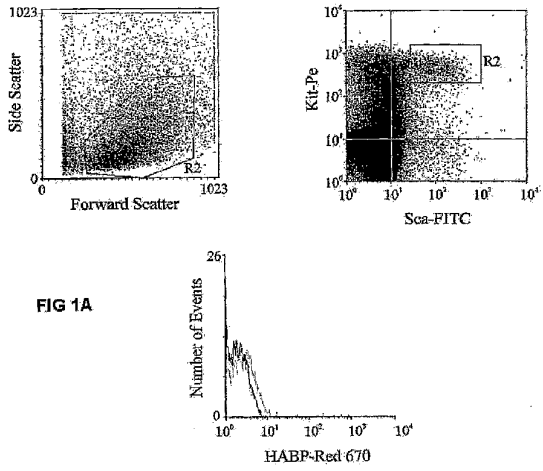


Figure 1B

HA EXPRESSION ON $lin^- Rh^{dull}$ HSC AND REMOVAL BY HY TREATMENT

FIG 1B

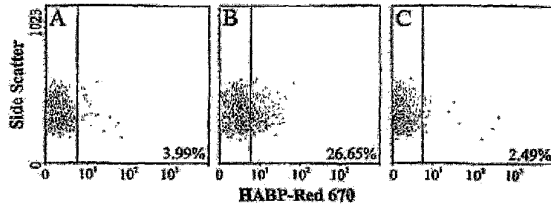


Figure 2

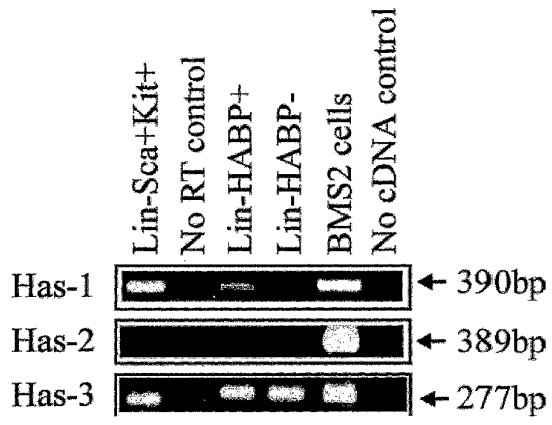


Figure 3

HA Expression on Maturing CD34⁺ Cells

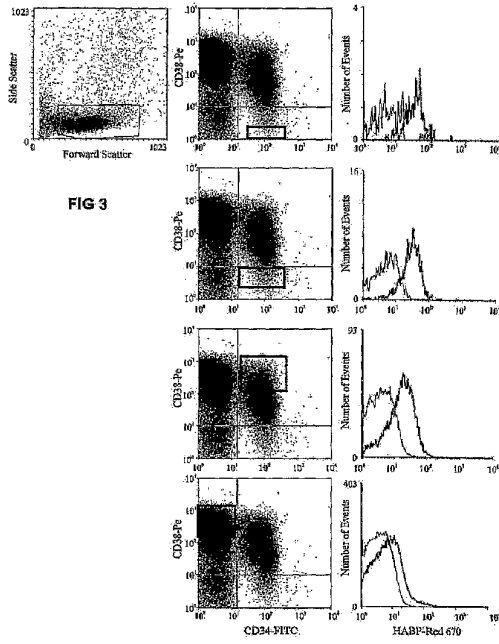


Figure 4

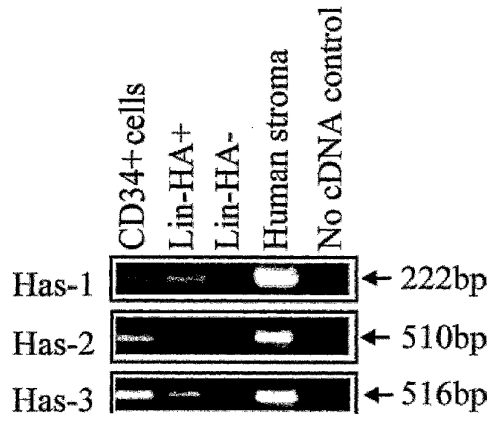


Figure 5a(i)

MURINE HSC

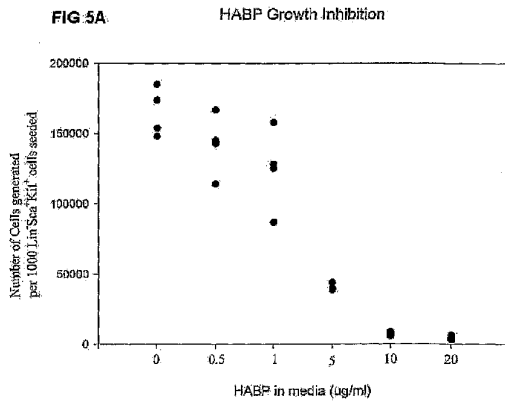


Figure 5a(ii)

HUMAN HSC

FIG 5A (ii) HABP Growth Inhibition of CD34⁺CD38⁻ Cells

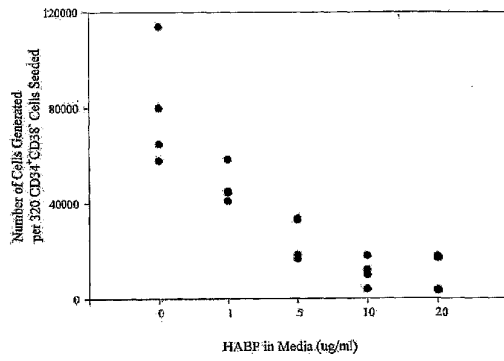


Figure 5b(i)

FIG 5B

Differentiation of Cultured CD34+CD38- CB Cells
(1000 Cells Seeded per Well)

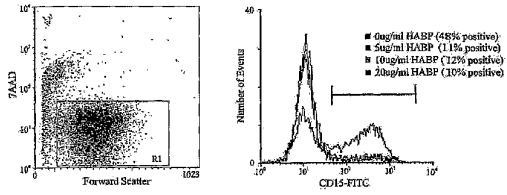
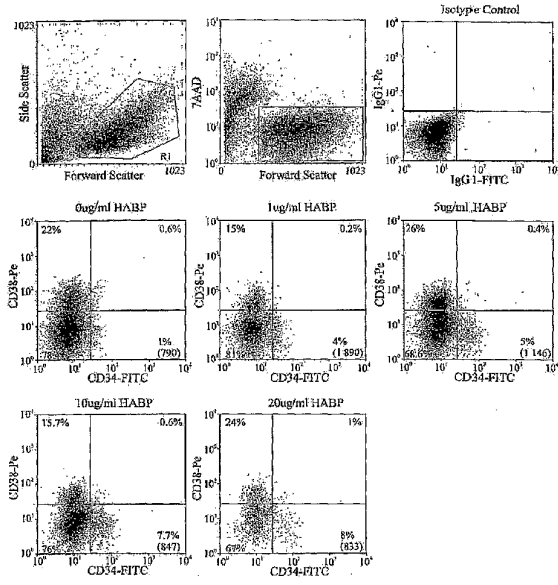


Figure 5b(ii)

Phenotypic Analysis of Cultured CD34⁺CD38⁻ CB Cells
(320 Cells Seeded per Well)

FIG 5B (ii)



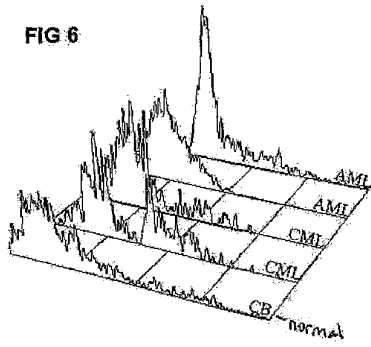
WO 03/038071

PCT/AU02/01443

10/10

FLOW CYTOMETRY

FIG 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/01443
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. 7: C12N 5/06 G01N 33/569, 33/58, 33/60, 33/68, 33/573		
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)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WDPL, STN and IPC as above (keywords used: haematopoietic stem cell, HSC, glucuronic acid, N-acetylglucosamine, HABP hyaluronic acid synthases HAS and HA and similar terms)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 200047163 A2 (INST NATIONAL DE LA SANTE ET DE AL RECHERCHE MEDICALE (INSERM)) 17 August 2000 See claims, Examples.	1 - 101
A	WO 200244345 A1 (GEN HOSP CORP) 6 June 2002 See whole document.	1 - 101
A	AU 60562/99 (MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH DEVELOPMENT, USA) 30 March 2000 See whole document.	1 - 101
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "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 9 January 2003		Date of mailing of the international search report 15 JAN 2003
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pci@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6283 3929		Authorized officer ANTHEA HARVIE Telephone No : (02) 6283 2552

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU02/01443

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

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member					
WO	200047163	AU	200026762	EP	1150692	FR	2789587
WO	200244345	AU	200219987				
AU	60562/99	WO	200017326				
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 5/06	G 0 1 N 33/53	S
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	E
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ニルソン, スーザン・ケイ
オーストラリア国、ヴィクトリア 3 1 6 5、イースト・ベントリー、ナムロン・ストリート 1
2

(72) 発明者 シモンズ, ポール・ジョン
オーストラリア国、ヴィクトリア 3 1 0 1、キュー、デービス・ストリート 5 5

(72) 発明者 ハイロック, デヴィッド・ノーマン
オーストラリア国、ヴィクトリア 3 1 4 4、サウス・ヤーラ、アルゴ・ストリート 1 3

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA12 GA11 HA11 HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ26 QQ67 QR48 QS36
4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y BA30 BD14 BD44 CA44 CA46
4C087 AA02 BB64 NA05 ZA36 ZA51 ZA55 ZB27

专利名称(译)	检测造血干细胞及其后代及其应用		
公开(公告)号	JP2005506849A	公开(公告)日	2005-03-10
申请号	JP2003540336	申请日	2002-10-24
申请(专利权)人(译)	彼得·麦卡勒姆癌症研究所		
[标]发明人	ニルソン・スーザン・ケイ シモンズ・ポール・ジョン ハイロック・デヴィッド・ノーマン		
发明人	ニルソン,スーザン・ケイ シモンズ,ポール・ジョン ハイロック,デヴィッド・ノーマン		
IPC分类号	A61K35/12 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P35/02 C12N5/0789 C12N15/09 C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569 C12N5/06		
CPC分类号	C12N5/0647 G01N33/5308 G01N33/56966 G01N33/56972 G01N2333/91097 G01N2400/40		
FI分类号	C12Q1/04.ZNA A61K35/12 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P35/02 G01N33/53.S G01N33/53.Y G01N33/566 C12N5/00.E C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA12 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063 /QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ26 4B063/QQ67 4B063/QR48 4B063/QS36 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/BA30 4B065/BD14 4B065/BD44 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA02 4C087/BB64 4C087/NA05 4C087/ZA36 4C087/ZA51 4C087/ZA55 4C087 /ZB27		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001PR8565 2001-10-30 AU		
其他公开文献	JP2005506849A5 JP4354275B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及鉴定造血干细胞 (HSC) 或其后代的方法, 其包括以下步骤: 获得包括HSC或其后代的细胞样品; 和 检测至少一种碳水化合物序列的存在, 所述碳水化合物序列具有葡糖醛酸和N-乙酰基葡糖胺的至少一个二糖重复序列或其等同物; 并鉴定具有其序列或等同物的HSC或其后代。本发明还涉及富集HSC或其后代的细胞群, 分离HSC或其后代的方法以及使用本发明的方法及其用途获得的细胞制剂。

疾患	分析した患者数	HAが上昇した試料(%)	HAを発現する白血球細胞(%)
CLL	8	8/8	2****/1**/3*
AML	10	10/10	5****/2***/2*
ALL	2	2/2	2*
CML	8	7/8	1****/1*
CMML	4	4/4	1****/1***/1**/1*
PLL	2	2/2	1****/1**
混合型	1	1/1	1****
ヘアリーセル	2	1/2	1****

**** 75-100% 白血病細胞

*** 50-75% 白血病細胞

** 25-50% 白血病細胞

* < 25% 白血病細胞