

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5906252号  
(P5906252)

(45) 発行日 平成28年4月20日 (2016. 4. 20)

(24) 登録日 平成28年3月25日 (2016. 3. 25)

(51) Int. Cl.

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>35/50</b>	<b>(2015. 01)</b>	A 6 1 K	35/50	
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/02</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 P	1/02	
<b>A 6 1 P</b>	<b>43/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 P	43/00	1 1 7
A 6 1 K	45/00	(2006. 01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	38/27	(2006. 01)	A 6 1 K	45/00	

請求項の数 9 (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-544452 (P2013-544452)  
 (86) (22) 出願日 平成23年12月14日 (2011. 12. 14)  
 (65) 公表番号 特表2014-501242 (P2014-501242A)  
 (43) 公表日 平成26年1月20日 (2014. 1. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/001980  
 (87) 国際公開番号 W02012/087348  
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012. 6. 28)  
 審査請求日 平成26年10月31日 (2014. 10. 31)  
 (31) 優先権主張番号 61/459, 859  
 (32) 優先日 平成22年12月20日 (2010. 12. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507324186  
 ステムニオン, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 1 5 2 1 9 ペンシルバ  
 ニア州, ビッツバーグ, スイート 2 0 0  
 , テクノロジー ドライブ 1 0 0  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫  
 (74) 代理人 100170221  
 弁理士 小瀬村 暁子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 歯科疾患、障害、および損傷の治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

その必要がある患者の歯肉炎から進行した歯周炎を予防し、回復させ、改善し、または治療するための方法において使用するための医薬組成物であって、該医薬組成物は、羊膜由来細胞性サイトカイン溶液 (ACCS) の治療上有効量を含み、該羊膜由来細胞性サイトカイン溶液は、5 ~ 16ng/mL の VEGF、3.5 ~ 4.5ng/mL のアンジオゲニン、100 ~ 165pg/mL の PDGF、2.5 ~ 2.7ng/mL の TGF 2、0.68 μg/mL の TIMP-1 および 1.04 μg/mL の TIMP-2 を含む、前記医薬組成物。

【請求項 2】

歯周炎が、骨組織が破壊されている進行した歯周炎である、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 3】

ACCS が持続放出用に製剤化されている、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 4】

ACCS が、他の物質または治療法と組み合わせて投与される、請求項 1 の医薬組成物。

【請求項 5】

他の物質が活性物質である、請求項 4 の医薬組成物。

【請求項 6】

活性物質が、成長因子、サイトカイン、インヒビター、免疫抑制剤、ステロイド、ケモカイン、抗体、抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、マイトマイシン C、および他の細胞タイプからなる群から選択される、請求項 5 の医薬組成物。

10

20

**【請求項 7】**

他の治療法が非外科的および外科的治療法からなる群から選択される、請求項 4 の医薬組成物。

**【請求項 8】**

非外科的治療法が、専門的歯科クリーニング、スケーリングおよびルートプレーニングからなる群から選択される、請求項 7 の医薬組成物。

**【請求項 9】**

外科的治療法が、フラップ手術/ポケット縮小手術、骨移植、組織工学、軟組織移植、組織再生誘導法、および骨の外科手術からなる群から選択される、請求項 7 の医薬組成物。

10

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****関連出願への相互参照**

本出願は、2010年12月20日出願の米国仮出願No. 61/459,859の35 USC § 119(e)に基づく優先権を主張する。該仮出願の全体は参照によりここに組み入れられる。

**【0002】****発明の属する分野**

本発明の分野は、歯科疾患、障害および損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療するための方法に関する。特に、本発明の分野は、歯肉(gingival (gums))および骨の歯科疾患、障害または損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療することに関する。該歯科疾患、障害および損傷を予防し、回復させ、改善し、および治療するためのそのような方法は、胚外サイトカイン分泌細胞(extraembryonic cytokine-secreting cells)(本明細書において、ECS細胞と称する)およびそれに由来するならし培地、例えば羊膜由来多能性前駆(AMP)細胞、それに由来するならし培地(本明細書において、羊膜由来細胞性サイトカイン溶液またはACCS、プールされたACCSと称する)、および/またはそれに由来する細胞産物、ならびに生理的サイトカイン溶液(本明細書において、PCSと称する)を、それぞれ単独でかつ/または互いに組み合わせてかつ/または、活性および/もしくはは不活性物質を含む他の物質と組み合わせて含む新規組成物を利用する。

20

30

**【背景技術】****【0003】****発明の背景**

歯肉炎(歯肉の炎症)は、通常、歯周炎(歯肉疾患)に先立つ。初期の歯肉炎では、プラーク(歯の表面に形成される細菌の粘着性で無色のフィルム)中の細菌が歯肉の炎症を引き起こし、しばしば出血させる。この段階では、歯は依然としてその槽にしっかりと埋め込まれており、不可逆的な骨または他の組織の損傷は生じていない。しかし、未治療のままにすると、歯肉炎は歯周炎に進行しうる。歯周炎では、歯肉の内側の層および骨が歯から離れ、ポケットと称される空間を形成する。これらのポケットは残渣を溜め、しばしば感染を受ける。プラーク中の細菌によって生産される毒素、および感染と闘う時に身体によって生産される酵素は、歯を固定する骨および結合組織の破壊を引き起こす。疾患が進行するにつれて、ポケットは深くなり、より多くの骨および結合組織が破壊される。最終的に歯はもはや適所に固定されず、ゆるくなり、歯の喪失に至ることがよくある。実際、歯周炎は成人の歯の喪失の主因である。

40

**【0004】**

プラークは歯肉炎および歯周炎の根本原因である。しかし、他の要因がこれらの疾患に同様に寄与しうる。該要因には、妊娠、思春期、月経、および閉経期に関連するホルモンの変動が含まれ、これらはすべて、歯肉をより感受性にし、歯肉炎を発症しやすくしうる。さらに、多数の疾患が歯肉に影響しうる。そのような疾患には、癌またはHIV感染などの疾患が含まれ、両疾患は免疫系の適正な機能を妨害しうる。糖尿病患者は、一般に、非

50

糖尿病患者より、歯周病を含む感染を発症する可能性が高い。一部の投薬は、歯および歯肉に対する保護作用を有する唾液の流量を低下させることから、投薬も口腔衛生に影響しうる。喫煙は歯肉組織が自身で修復することを困難にする。そして当然、毎日の歯磨きおよびフロスの使用を行わないなどの不十分な口腔衛生は歯肉炎を発症しやすくする。歯科疾患の家族歴(遺伝的なもの)も同様に歯肉疾患の発症の要因でありうる。

#### 【0005】

研究者らは、歯肉疾患と他の重大な健康状態、例えば脳卒中および心疾患との潜在的関連を特定している。糖尿病が歯肉疾患の危険因子であるだけでなく、歯肉疾患は糖尿病を悪化させることがある。

#### 【0006】

歯肉疾患の現在の非外科的治療には、歯肉線の上下から、プラーク、および歯表面で形成され硬化したプラークである歯石を除去するための専門的歯科クリーニングが含まれる。年2回を超える専門的歯科クリーニングがしばしば推奨される。スケーリングおよびルートプレーニングは、局所麻酔薬条件下で行われる、深部を清掃する非外科的処置であり、それにより、歯肉線の上下からプラークおよび歯石を削り取り(スケーリング)、歯根上のざらざらした箇所を滑らかにする(プレーニング)。ざらざらした箇所の平滑化は細菌を除去し、歯肉が歯に再び付着するためのきれいな表面を提供する。

#### 【0007】

歯肉疾患の外科的治療には、フラップ手術/ポケット縮小手術が含まれる。この処置中、歯肉を押し広げ、歯石を除去する。一部の場合には、損傷した骨の平らでない表面を滑らかにして、疾患を生じさせる細菌が溜まる領域を制限する。そして、組織が歯の周囲にぴったりフィットするように歯肉を納める。この方法は、歯肉と歯の間のポケットのサイズを縮小させ、それにより、有害な細菌が生育できる領域を減少させる。骨移植は、患者自身の骨、合成骨、または提供骨の破片を使用して、歯肉疾患によって破壊された骨を置換するステップを含む。移植片は、骨の再生のためのプラットフォームとして働き、骨の再生が歯の安定性を回復させる。組織工学と称される新規技術は、身体が、加速された速度で骨および組織を再生するよう促す。軟組織移植は薄い歯肉を強化するか、または歯肉が後退した領域を埋める。ほとんどの場合に口蓋から採取される、移植組織を適所で縫合し、患部に組織を付加する。歯を支える骨が破壊されている場合、組織再生誘導法を実施する。この処置は骨および歯肉組織成長を刺激する。フラップ手術と組み合わせて実施される場合、メッシュ様の布の小片を骨と歯肉組織との間に挿入する。これは、歯肉組織が、骨となるべき領域内へと成長することを妨げ、それにより骨および結合組織が再生して歯をより良好に支えることが可能になる。骨の外科手術は、中度および高度の骨減少に起因する骨の浅いくぼみを滑らかにする。フラップ手術後、歯の周囲の骨の形を整えてくぼみを減少させる。これは、細菌が溜まって増殖することをより困難にする。

#### 【0008】

抗生物質療法を外科手術および他の治療と組み合わせて、または単独で使用して、歯肉疾患に関連する細菌を減少させるかもしくはは一時的に排除するか、または骨への歯の付着の破壊を抑制することができる。クロルヘキシジンは、口または歯周ポケットのプラークおよび歯肉炎を抑制するために使用される抗生物質である。それは、口内洗浄剤、またはルートプレーニング後にポケットに入れて時間をかけてゆっくり薬物を放出するゼラチン充填チップとして利用可能である。ドキシサイクリン、テトラサイクリン、およびミノサイクリンを含む他の抗生物も歯肉疾患を治療するために使用されうる。さらに、フッ化物、およびトリクロサンと称される、プラークおよび歯肉炎を減少させるための抗生物質を含む市販の練り歯磨きが推奨されうる。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本発明の目的は、本明細書中に記載の新規組成物を使用して、歯科疾患、障害または損傷、特に、歯周病(歯肉疾患)を患う患者に新規治療選択肢を提供することである。また、

10

20

30

40

50

本発明の目的は、口腔潰瘍、例えばウイルス性潰瘍、歯科インプラント、骨移植、骨の破壊(fractures of the bone)、などの他の歯科障害または状態を有する患者に新規治療選択肢を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

#### 発明の要旨

本発明の目的は、歯科疾患、障害および損傷、特に、歯周病(歯肉疾患)を予防し、回復させ、改善し、または治療するための新規方法を提供することである。該歯科疾患、障害および損傷を予防し、回復させ、改善し、および治療するためのそのような方法は、胚外サイトカイン分泌細胞(本明細書において、ECS細胞と称する)およびそれに由来するならし培地、例えば羊膜由来多能性前駆(AMP)細胞、それに由来するならし培地(本明細書において、羊膜由来細胞性サイトカイン溶液またはACCS、プールされたACCSと称する)、および/またはそれに由来する細胞産物、ならびに生理的サイトカイン溶液(本明細書において、PCSと称する)を、それぞれ単独でかつ/または互いに組み合わせてかつ/または、活性および/もしくは不活性物質を含む他の物質と組み合わせて含む新規組成物を利用する。

10

【0011】

したがって、本発明の第1の態様は、その必要がある患者の歯科疾患、障害または損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療するための方法であって、胚外サイトカイン分泌(ECS)細胞、それに由来するならし培地、それに由来する細胞溶解物、それに由来する細胞産物、および生理的サイトカイン溶液(PCS)からなる群から選択される1種以上の組成物の治療上有効量を患者に投与するステップを含む方法である。

20

【0012】

態様1の一実施形態では、歯科疾患は歯肉炎および歯周炎からなる群から選択される。

【0013】

態様1の別の実施形態では、ECS細胞は羊膜由来多能性前駆(AMP)細胞である。

【0014】

態様1のさらに別の実施形態では、ならし培地は羊膜由来細胞性サイトカイン溶液(ACCS)またはプールされたACCSである。特定の実施形態では、ACCSまたはプールされたACCSを持続放出用に製剤化する。

【0015】

態様1の別の特定の実施形態では、PCSを持続放出用に製剤化する。

30

【0016】

態様1のさらに別の実施形態では、ECS細胞、それに由来するならし培地、それに由来する細胞溶解物またはそれに由来する細胞産物を他の物質または治療法と組み合わせて投与する。特定の実施形態では、他の物質は活性物質である。特定の実施形態では、活性物質は、成長因子、サイトカイン、インヒビター、免疫抑制剤、ステロイド、ケモカイン、抗体、抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、マイトマイシンC、および他の細胞タイプからなる群から選択される。別の特定の実施形態では、他の治療法は非外科的および外科的治療法からなる群から選択される。特定の実施形態では、非外科的治療法は、専門的歯科クリーニング、スケーリングおよびルートプレーニングからなる群から選択される。特定の実施形態では、外科的治療法は、フラップ手術/ポケット縮小手術、骨移植、組織工学、軟組織移植、組織再生誘導法、および骨の外科手術からなる群から選択される。

40

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の他の特徴および利点は添付の説明、実施例および特許請求の範囲から明らかになる。本出願を通じて引用されるすべての参考文献、係属中の特許出願および登録済み特許の開示内容は参照によりここに明示的に組み入れられる。不一致の場合は、定義を含めて本明細書が統制する。

【0018】

#### 定義

50

本明細書中で定義される「単離された」とは、その元の環境から取り出され、したがってその天然状態から「ヒトの手によって」改変された物質を表す。

【0019】

本明細書中で定義される「遺伝子」は、ポリペプチド鎖の生産に関与するDNAのセグメントである；それは、コード領域の前および後ろの領域、ならびに個別のコードセグメント(エキソン)の間の介在配列(イントロン)を含む。

【0020】

本明細書中で使用される用語「タンパク質マーカー」とは、細胞または細胞集団に特徴的な任意のタンパク質分子を意味する。タンパク質マーカーは細胞の細胞膜上に位置するか、または、一部の 경우에는、分泌タンパク質である。

10

【0021】

本明細書中で使用される「濃縮された(enriched)」とは、混合物から望ましくない物質を除去するかまたは所望の物質を選択しかつ分離することによって1種以上の物質の量を選択的に濃縮するかまたは増加させる(すなわち、特定の細胞マーカーを用いて、集団中のすべての細胞が該マーカーを発現するわけではない不均質な細胞集団から細胞を分離する)ことを意味する。

【0022】

本明細書中で使用される用語「実質的に精製された」とは、特定のマーカーまたはマーカーの組み合わせに関して実質的に均質の細胞集団を意味する。実質的に均質とは、特定のマーカーまたはマーカーの組み合わせに関する、少なくとも90%、および好ましくは95%均質を意味する。

20

【0023】

本明細書中で使用される用語「胎盤」とは、早産および満期胎盤の両者を意味する。

【0024】

本明細書中で使用される用語「全能細胞」とは、以下の意義を有するものとする。哺乳類では、全能細胞は成体中で任意の細胞タイプ；胚外膜の任意の細胞タイプ(群)(例えば胎盤)になる潜在能力を有する。全能細胞は受精卵およびその卵割によって生じるおよそ最初の4細胞である。

【0025】

本明細書中で使用される用語「万能性(pluripotent)幹細胞」とは、以下の意義を有するものとする。万能性幹細胞は、身体中の任意の分化細胞を作製する潜在能力を有する真の幹細胞であるが、栄養膜に由来する胚外膜の成分の作製に寄与できない。羊膜は、栄養膜ではなく胚盤葉上層から発生する。3タイプの万能性幹細胞：胚性幹(ES)細胞(霊長類では全能性でもある)、胚性生殖(EG)細胞、および胚性癌腫(EC)細胞が今日までに確認されている。EC細胞は、胎児の生殖腺で時折生じる腫瘍である奇形癌腫から単離することができる。他の2種と異なり、それらは通常異数体である。

30

【0026】

本明細書中で使用される用語「多能性(multipotent)幹細胞」とは真の幹細胞であるが、限られた数のタイプにしか分化することができない。例えば、骨髄は、すべての血液細胞を生じさせる多能性幹細胞を含むが、他の細胞タイプに分化することはできない。

40

【0027】

本明細書中で使用される用語「胚外組織」とは、胚の保護、栄養補給、老廃物除去、などに関与する胚体の外側に位置する組織を意味する。胚外組織は出生時に廃棄される。胚外組織には、非限定的に、羊膜、絨毛膜(栄養膜および胚外中胚葉、例えば臍帯および血管)、卵黄嚢、尿膜および羊水(それに含まれるすべての成分を含む)が含まれる。胚外組織およびそれに由来する細胞は発生中の胚と同一の遺伝子型を有する。

【0028】

本明細書中で使用される用語「胚外細胞」または「EE細胞」とは、胚外組織に由来する細胞の集団を意味する。

【0029】

50

本明細書中で使用される用語「胚外サイトカイン分泌細胞」または「ECS細胞」とは、細胞外間隙または周囲の培地中に生理的に適切な時間的様式で生理的に適切なレベルのVEGF、アンジオゲニン、PDGFおよびTGF- $\beta$ 2およびMMPインヒビターTIMP-1および/またはTIMP-2を分泌する特徴を有する胚外組織に由来する細胞の集団を意味する。ECS細胞は、いかなる非ヒト動物材料の存在下でも培養されたことがなく、それにより、それらおよびそれらに由来する細胞産物はヒト臨床使用に好適である。それらは異種に汚染されていないからである。ECS細胞は、本出願およびUS2003/0235563、US2004/0161419、US2005/0124003、米国仮出願Nos. 60/666,949、60/699,257、60/742,067、60/813,759、米国出願No. 11/333,849、米国出願No. 11/392,892、PCTUS06/011392、US2006/0078993、PCT/US00/40052、米国特許No. 7,045,148、US2004/0048372、およびUS2003/0032179（これら文献の開示内容は参照によりその全体がここに組み入れられる）に記載の細胞集団および組成物から選択してよい。以前、ECS細胞は栄養因子分泌胚外細胞またはTSE細胞と称された。

#### 【0030】

本明細書中で使用される用語「羊膜由来多能性前駆細胞」または「AMP細胞」とは、羊膜に由来する上皮細胞である特定の細胞集団を意味する。AMP細胞は以下の特徴を有する。それらは、いかなる非ヒト動物材料の存在下でも培養されたことがなく、それにより、それらおよびそれらに由来する細胞産物はヒト臨床使用に好適である。それらは異種に汚染されていないからである。AMP細胞は、ヒト血清アルブミンを補充した基本培地で培養される。好ましい実施形態では、AMP細胞は、サイトカインVEGF、アンジオゲニン、PDGFおよびTGF- $\beta$ 2およびMMPインヒビターTIMP-1および/またはTIMP-2を分泌する。サイトカインまたは固有の組み合わせのサイトカイン群の生理的範囲は、以下の通りである：VEGFの場合はほぼ5~16ng/mL、アンジオゲニンの場合はほぼ3.5~4.5 ng/mL、PDGFの場合はほぼ100~165pg/mL、TGF- $\beta$ 2の場合はほぼ2.5~2.7ng/mL、TIMP-1の場合はほぼ0.68  $\mu$ g/mLおよびTIMP-2の場合はほぼ1.04  $\mu$ g/mL。AMP細胞は、場合により、チモシン-4を発現しうる。AMP細胞は支持細胞層なしで増殖し、タンパク質テロメラーゼを発現せず、非腫瘍原性である。AMP細胞は造血幹細胞マーカーCD34タンパク質を発現しない。この集団でのCD34陽性細胞の不存在は、単離物に造血幹細胞、例えば臍帯血または胚性線維芽細胞が混入していないことを示す。細胞の実質的に100%が低分子量サイトケラチンに対する抗体と反応し、その上皮性の性質を裏づける。AMP細胞の選択および単離元である、新たに単離された羊膜由来細胞は、幹/前駆細胞マーカーc-kit(CD117)およびThy-1(CD90)に対する抗体と反応しない。満期または早産胎盤から細胞を取得するために使用されるいくつかの手法は当技術分野において公知である(例えば、US 2004/0110287; Anker et al., 2005, Stem Cells 22:1338-1345; Ramkumar et al., 1995, Am. J. Ob. Gyn. 172:493-500を参照のこと)。しかし、本明細書中で使用される方法は改善された固有の組成物および細胞集団を提供する。

#### 【0031】

本明細書中に記載の特定の組成物、生育条件、培地、などに言及する場合の用語「アニマルフリー」とは、非ヒト動物由来材料、例えばウシの血清、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、ビタミン、などが特定の組成物または方法の調製、生育、培養、増殖、保存または製剤化に使用されないことを意味する。「非ヒト動物由来材料を含まない」とは、材料が非ヒト動物の身体もしくは物質中に存在したか、または非ヒト動物の身体もしくは物質と接触したことが一度もなく、ゆえにそれらが異種に汚染されていないことを意味する。そのような組成物および/または方法の調製、生育、培養、増殖、保存および/または製剤化では、組み換え生産ヒトタンパク質などの臨床等級の材料しか使用されない。

#### 【0032】

細胞組成物に関する用語「増殖させた(expanded)」とは、細胞集団が、以前の方法を使用して得られるより、顕著に高い細胞濃度を構成することを意味する。例えば、AMP細胞の増殖組成物中の羊膜組織1グラムあたりの細胞レベルは、以前の方法を使用するそのような細胞中の約20倍増加と比較して、5回の継代後、初代培養物中の羊膜上皮細胞の数より少なくとも50~150倍高い。別の例では、AMP細胞の増殖組成物中の羊膜組織1グラムあ

10

20

30

40

50

たりの細胞レベルは、3回の継代後、初代培養物中の羊膜上皮細胞の数より少なくとも30～100倍高い。したがって、「増殖させた」集団は、以前の方法と比べて、少なくとも2倍、最高10倍の、羊膜組織1グラムあたりの細胞数の向上を有する。用語「増殖させた」とは、ヒトが介入して細胞数を増加させた状況のみを含むことが意図される。

【0033】

本明細書中で使用される用語「継代」とは、組織培養容器中で集密に到達したかまたは集密に近い培養物中で生育する細胞を容器から取り出し、新鮮な培地で希釈し(すなわち1:5希釈し)、かつ新しい組織培養容器に入れてその継続した増殖および生存を可能にする細胞培養技術を意味する。例えば、羊膜から単離された細胞は初代細胞と称される。そのような細胞を本明細書中に記載の生育培地中で生育させることによって培養物中で増殖させる。そのような初代細胞を二次培養する場合、二次培養の各ラウンドは継代と称される。本明細書中で使用される「初代培養」とは、新たに単離された細胞集団を意味する。

10

【0034】

本明細書中で使用される用語「分化」とは、細胞が、進行的に、より特殊化される過程を意味する。

【0035】

本明細書中で使用される用語「分化効率」とは、分化しているかまたは分化することができる、集団中の細胞のパーセンテージを意味する。

【0036】

本明細書中で使用される「ならし培地」とは、特定の細胞または細胞集団が培養され、その後細胞が取り出された培地である。細胞が培地中で培養されると、それらは、他の細胞の挙動を支援するかまたは他の細胞の挙動に影響しうる細胞因子を分泌する。そのような因子には、非限定的に、ホルモン、サイトカイン、細胞外基質(ECM)、タンパク質、小胞、抗体、ケモカイン、受容体、インヒビターおよび顆粒が含まれる。そのような細胞因子を含む培地はならし培地である。

20

【0037】

本明細書中で使用される用語「羊膜由来細胞性サイトカイン溶液」または「ACCS」とは、ヒト血清アルブミンを補充した基本培地で培養されたAMP細胞に由来するならし培地を意味する。以前、ACCSは「羊膜由来細胞性サイトカイン懸濁液」と称されていた。

【0038】

本明細書中で使用される用語「生理的レベル」とは、生物系において物質が見出されるレベルかつ生化学的および/または生物学的過程の適正な機能にとって適切なレベルを意味する。

30

【0039】

本明細書中で使用される用語「生理的サイトカイン溶液」または「PCS」組成物とは、細胞に由来しない組成物でかつ生理的濃度の、VEGF、アンジオゲニン、PDGFおよびTGF 2から選択される1種以上の因子および少なくとも1種のMMPインヒビターを有する組成物を意味する。好適なMMPインヒビターの例には、非限定的に、TIMP-1およびTIMP-2が含まれる。PCSに関する詳細は米国公開No. US-2009-0054339-A1に見出せる。これらの文献の内容は参照によりここに組み入れられる。

40

【0040】

本明細書中で使用される用語「プールされた」とは、プールされない組成物と比べて、より一定であるかまたは一貫した特徴を有する新規組成物を創出するように混合された複数の組成物を意味する。

【0041】

用語「治療上有効量」とは、所望の生理的効果を達成(すなわち歯科疾患を治療)するために必要な治療物質の量を意味する。

【0042】

本明細書中で使用される用語「溶解物」とは、細胞、例えばAMP細胞を溶解し、場合により、細胞片(例えば細胞膜)を除去した場合に得られる組成物を表す。これは、機械的手

50

段によって、凍結および解凍によって、超音波処理によって、EDTAなどの界面活性剤の使用によって、または、例えばヒアルロニダーゼ、ディスパーゼ、プロテアーゼ、およびヌクレアーゼを使用する酵素消化によって達成することができる。一部の例では、細胞を溶解し、細胞膜部分を保持し、かつ可溶化細胞の残りの部分を廃棄することが望ましい。

【0043】

本明細書中で使用される用語「製薬的に許容される」とは、治療物質に加えて、製剤を構成する成分が、本発明にしたがって治療される患者への投与に好適であることを意味する。

【0044】

本明細書中で使用される用語「組織」とは、特定の機能の実施において結束した、同じように特殊化した細胞の集合をいう。

10

【0045】

本明細書中で使用される用語「治療タンパク質」には、広範囲の生物活性タンパク質が含まれ、それには、非限定的に、成長因子、酵素、ホルモン、サイトカイン、サイトカインのインヒビター、血液凝固因子、ペプチド成長因子および分化因子が含まれる。

【0046】

本明細書中で使用される用語「移植」とは、未分化、部分的分化、または完全分化型の細胞、例えば細胞懸濁液または基質もしくは組織に組み込まれた細胞を含む組成物をヒトまたは他の動物に投与することをいう。

【0047】

20

本明細書中で使用される用語「a」または「an」は、1以上；少なくとも1を意味する。

【0048】

本明細書中で使用される用語「付属的な(adjunctive)」とは、共同して(jointly)、～と一緒に(together with)、～に加えて(in addition to)、～と併せて(in conjunction with)、などを意味する。

【0049】

本明細書中で使用される用語「共投与する」は、2以上の物質の同時投与または逐次投与を含んでよい。

【0050】

本明細書中で使用される「治療(Treatment)」、「治療する(treat)」、または「治療すること(treating)」とは、哺乳類、特にヒトの疾患または状態の任意の治療を含み、かつ：(a) 疾患または状態が、該疾患または状態にかかりやすいかもしれないが、まだそれを有すると診断されていない被験体で発生することを予防すること；(b) 疾患または状態を阻害する、すなわちその発症を阻止すること；(c) 疾患または状態を軽減させかつまたは改善する、すなわち疾患または状態の退行を生じさせること；または(d) 疾患または状態を治す、すなわちその発症または進行を停止させることを含む。本発明の方法によって治療される被験体集団には、望ましくない状態または疾患を患う被験体、ならびに該状態または疾患を発症する危険性がある被験体が含まれる。本明細書中で使用される用語「改善する(ameliorate)」とは、状態、例えば歯科疾患、障害または損傷を改善し(improve)、より良好にし(make better)、より寛容性にする(make more tolerable)かまたは回復させる(reverse)ことを意味する。

30

40

【0051】

詳細な説明

本発明では、当技術分野の技術の範囲内の慣用の分子生物学、微生物学、および組み換えDNA技術を用いてよい。そのような技術は文献で完全に説明される。例えば、Sambrook et al, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III; Celis, ed., 1994, "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III; Coligan, ed., 1994, "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III; Gait ed., 1984, "Oligonucleotide Synthesis"; Hames & Higgins eds., 1985, "Nucleic Acid Hybridization"; Hames & Higgins, eds., 198

50



4, "Transcription And Translation"; Freshney, ed., 1986, "Animal Cell Culture"; IRL Press, 1986, "Immobilized Cells And Enzymes"; Perbal, 1984, "A Practical Guide To Molecular Cloning"を参照のこと。

【 0 0 5 2 】

ある範囲の値が指定される場合、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除いて下限の単位の10分の1までの、該範囲の上限と下限の間に入るそれぞれの値および該指定範囲の任意の他の指定値または間に入る値は本発明の範囲内に包含されることが理解される。指定範囲において特に除外される任意の境界値がある場合、より小さい範囲の上限および下限は、そのより小さい範囲に単独で含まれてよく、これもまた本発明の範囲内に包含される。指定範囲が一方または両方の境界値を含む場合、その含まれる境界値の一方または両方を除外する範囲もまた本発明に含まれる。

10

【 0 0 5 3 】

特に指定されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意義と同一の意義を有する。本明細書中に記載の方法および材料と類似または等価の任意の方法および材料を本発明の実施および試験において使用することもできるが、好ましい方法および材料をここに記載する。

【 0 0 5 4 】

文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、本明細書および特許請求の範囲で 사용되는単数形「a」、「and」および「the」は複数への言及を含むことに留意する必要がある。

20

【 0 0 5 5 】

治療上の使用 - 本発明の組成物は、非限定的に歯肉炎および歯周炎を含む、歯科疾患、障害、または損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療するために有用である。

【 0 0 5 6 】

細胞の取得および培養

ECS細胞 - 本発明のECS細胞の生産に後に使用することができる細胞を胚外組織から単離するための種々の方法が当技術分野で報告されている(例えば、US2003/0235563, US2004/0161419, US2005/0124003, 米国仮出願Nos. 60/666,949, 60/699,257, 60/742,067, 60/813,759, 米国出願No. 11/333,849, 米国出願No. 11/392,892, PCT/US06/011392, US2006/0078993, PCT/US00/40052, 米国特許No. 7,045,148, US2004/0048372, およびUS2003/0032179を参照のこと)。

30

【 0 0 5 7 】

ECS細胞の特定 - 胚外組織を単離したら、組織中のどの細胞がECS細胞に関連する特徴(上記定義を参照のこと)を有するかを特定することが必要である。例えば、VEGF、アンジオゲニン、PDGFおよびTGF- $\beta$ 2およびMMPインヒビターTIMP-1および/またはTIMP-2を細胞外間隙または周囲の培地に分泌するその能力に関して細胞をアッセイする。一部の例では、標準アッセイを使用して特定の因子を検出することが困難であるかまたは不可能である。その理由は、アッセイ方法による検出レベル未満の生理的レベルで細胞が特定の因子を分泌するからであるかもしれない。因子(群)がECS細胞および/または他の局所細胞によって利用されており、ゆえに標準アッセイを使用して検出可能なレベルでの蓄積が妨げられることもあるかもしれない。因子が分泌される時間的様式がサンプリングのタイミングと一致しないこともありうる。

40

【 0 0 5 8 】

AMP細胞組成物 - (a) 胎盤から羊膜を回収するステップ、(b) プロテアーゼを使用して羊膜から上皮細胞を解離させるステップ、(c) 天然由来または組み換え生産ヒト血清アルブミンを加えた、非ヒト動物タンパク質を含まない基本培地中で細胞を培養するステップ; (d) 上皮細胞培養物からAMP細胞を選択するステップ、および場合により(e) 場合により追加の添加物および/または成長因子(すなわち組み換えヒトEGF)を使用して、細胞をさらに増殖させるステップを使用してAMP細胞組成物を製造する。詳細は米国公開No. 2006-

50

0222634-A1に含まれる。該文献は参照によりここに組み入れられる。

【0059】

AMP細胞の培養 - 基本培地で細胞を培養する。そのような培地には、非限定的に、上皮細胞用のEPILIFE(登録商標)培地(Cascade Biologicals)、OPTI-PRO<sup>TM</sup>無血清培地、VP-SFM無血清培地、IMDM高濃縮基本培地、KNOCKOUT<sup>TM</sup> DMEM低浸透圧培地、293 SFM II限定無血清培地(すべてGibco; Invitrogen製)、HPGM造血前駆細胞増殖培地、Pro 293S-CDM無血清培地、Pro 293A-CDM無血清培地、UltraMDCK<sup>TM</sup>無血清培地(すべてCambrex製)、STEMLINE(登録商標) T細胞増殖培地およびSTEMLINE(登録商標) II造血幹細胞増殖培地(ともにSigma-Aldrich製)、DMEM培地、DMEM/F-12栄養混合物増殖培地(ともにGibco製)、Ham F-12栄養混合物増殖培地、M199基本培地(ともにSigma-Aldrich製)、および他の同等の基本培地が含まれる。そのような培地には、ヒトタンパク質が含まれるか、またはヒトタンパク質を補充すべきである。本明細書中で使用される「ヒトタンパク質」とは、天然に生産されるヒトタンパク質または組み換え技術を使用して生産されるヒトタンパク質であり、例えばヒト血清アルブミンである。特定の実施形態では、基本培地はIMDM高濃縮基本培地、STEMLINE(登録商標) T細胞増殖培地またはSTEMLINE(登録商標) II造血幹細胞増殖培地、またはOPTI-PRO<sup>TM</sup>無血清培地、またはその組み合わせであり、ヒトタンパク質は、少なくとも0.5%~10%までの濃度で添加されるヒト血清アルブミンである。特定の実施形態では、ヒト血清アルブミンは約0.5%~約2%である。特定の実施形態では、ヒト血清アルブミンは0.5%である。ヒト血清アルブミンは液体または乾燥(粉末)形態に由来してよく、それには、非限定的に、組み換えヒト血清アルブミン、PLASBUMIN(登録商標)正常ヒト血清アルブミンおよびPLASMANATE(登録商標)ヒト血液画分(ともにTalecris Biotherapeutics製)が含まれる。

10

20

【0060】

最も好ましい実施形態では、異種汚染を回避するために非ヒト動物産物を含まない系を使用して細胞を培養する。この実施形態では、培地は、IMDM高濃縮基本培地、STEMLINE(登録商標) T細胞増殖培地またはSTEMLINE(登録商標) II造血幹細胞増殖培地、OPTI-PRO<sup>TM</sup>無血清培地、またはDMEM培地であり、10%の量までのヒト血清アルブミンを加える。

【0061】

本発明は、さらに、動物由来タンパク質が組み換えヒトタンパク質で置換され、かつBSAなどの動物由来血清がヒト血清アルブミンで置換されている上記基本培地のいずれかの使用を想定する。好ましい実施形態では、培地は非ヒトアニマルフリーであることに加えて無血清である。

30

【0062】

場合により、他の因子を使用する。一実施形態では、0~1 µg/mLの範囲の濃度の上皮細胞成長因子(EGF)を使用する。好ましい実施形態では、EGF濃度は約10~20ng/mLである。

【0063】

ならし培地の調製

ECS細胞のならし培地 - ECS細胞を使用することを除き、ACCSに関して以下に記載されるようにしてECS細胞のならし培地を得る。

【0064】

ACCSの調製 - 本発明のAMP細胞を使用してACCSを調製することができる。一実施形態では、本明細書中に記載されるようにAMP細胞を単離し、5~30mLの範囲の培地、好ましくは10~25mLの範囲の培地、および最も好ましくは約10mLの培地を含むT75フラスコ中に1 x 10<sup>6</sup>細胞/mLを播種する。細胞を集密まで培養し、培地を交換し、一実施形態では、集密化の1日後にACCSを回収する。別の実施形態では、培地を交換し、集密化の2日後にACCSを回収する。別の実施形態では、培地を交換し、集密化の3日後にACCSを回収する。別の実施形態では、培地を交換し、集密化の4日後にACCSを回収する。別の実施形態では、培地を交換し、集密化の5日後にACCSを回収する。別の実施形態では、培地を交換し、集密化の3日後にACCSを回収する。別の好ましい実施形態では、培地を交換し、集密化の3、4、5、6日またはそれ以上の後にACCSを回収する。当業者は、非限定的にセルファクトリー、フラス

40

50

コ、ホローファイバー、または懸濁培養装置を含む他の組織培養容器の使用、または集密に満たないかつ/または活発に増殖中の培養物からのACCSの回収などの、AMP細胞培養物からACCSを回収するための他の実施形態もまた、本発明の方法によって想定されることを認識する。ACCSを回収後に冷凍保存することも本発明によって想定される。ACCSを回収後に凍結乾燥することも本発明によって想定される。ACCSを回収後に持続放出用に製剤化することも想定される。

【0065】

組成物の使用目的に応じて種々の方法で本発明の組成物を製造することができる。例えば、本発明の実施に有用な組成物は、本発明の物質、すなわちECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSを、溶液、懸濁液、または両者(溶液/懸濁液)中に含む液体であってよい。用語「溶液/懸濁液」とは、活性物質の第1の部分が溶液中に存在し、かつ活性物質の第2の部分が、液体マトリックス中の懸濁液中に、微粒子型で存在する液体組成物を表す。液体組成物には、ゲルも含まれる。液体組成物は水性であるか、または軟膏、ろう膏(salve)、クリーム、などの剤形であってよい。

【0066】

本発明の方法の実施に有用な水性懸濁液または溶液/懸濁液は1種以上のポリマーを懸濁化剤として含んでよい。有用なポリマーには、水溶性ポリマー、例えばセルロースポリマーおよび水不溶性ポリマー、例えば架橋カルボキシル含有ポリマーが含まれる。本発明の水性懸濁液または溶液/懸濁液は好ましくは粘性もしくは粘膜炎付着性であるか、またはさらに好ましくは、粘性でかつ粘膜炎付着性である。

【0067】

医薬組成物 - 本発明は、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSおよび製薬的に許容される担体の医薬組成物を提供する。用語「製薬的に許容される」とは、動物、および特にヒトでの使用に関して、連邦または州政府の規制当局または米国薬局方もしくは他の一般に認識される薬局方に列挙される規制当局によって認可されることを意味する。用語「担体」とは、組成物とともに投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを表す。そのような医薬用担体は、滅菌液体、例えば水および、石油、動物、植物または合成起源の油を含む油、例えばピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などであってよい。好適な医薬用賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、穀粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物は、所望であれば、微量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含むこともできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出製剤などの剤形をとりうる。好適な医薬用担体の例はE. W. Martinの「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載され、さらに他の担体は当業者によく知られている。

【0068】

本発明の医薬組成物を中性または塩の形式で製剤化することができる。製薬的に許容される塩には、遊離アミノ基と形成される塩、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸、などから生じる塩、および遊離カルボキシル基と形成される塩、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、第二鉄の水酸化物、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン、などから生じる塩が含まれる。

【0069】

治療キット - 本発明はまた、パッケージング材料、および該パッケージング材料内に含まれる本発明の医薬組成物を含む製品を提供し、ここで、該医薬組成物は、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSの組成物を含む。パッケージング材料は、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSを、歯科疾患、障害または損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療するために使用できることを示すラベルまたは添付文書を含む。

## 【0070】

製剤化、用量および投与

ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSを含む組成物を被験体に投与して、種々の細胞または組織の機能を提供し、例えば、歯科疾患、障害または損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療することができる。本明細書中で使用される「被験体」とは、ヒトまたは非ヒト動物を意味する。

## 【0071】

そのような組成物を、賦形剤および助剤を場合により含む1種以上の生理学的に許容される担体を使用して任意の慣用の様式で製剤化することができる。適正な製剤は、選択される投与経路に依存する。組成物を、歯科疾患を予防し、回復させ、または治療するか、または治療上重要な代謝機能を回復させるためのその使用に関する説明書とともにパッケージングすることができる。組成物を1種以上の生理学的に許容される担体中でレシピエントに投与してもよい。細胞用の担体には、非限定的に、生理的濃度の塩の混合物を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)または乳酸加リンゲル液の溶液が含まれる。

10

## 【0072】

本発明の特定の実施形態の実施に有用な医薬組成物(すなわち局所投与を利用する医薬組成物)は、製薬的に許容される担体とともに治療上有効量の活性物質を含む。そのような医薬組成物は、液体、ゲル、軟膏、ろう膏、持続放出製剤、または歯肉、骨および歯への投与に好適な他の製剤であってよい。組成物は本発明の組成物(すなわちECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCS)および、場合により、少なくとも1種の製薬的に許容される賦形剤を含む。

20

## 【0073】

種々の実施形態では、本発明の組成物は、溶液、懸濁液、または両者中に活性物質を含む液体を含むことができる。本明細書中の用語「懸濁液」とは、活性物質の第1の部分が溶液中に存在し、かつ活性物質の第2の部分が、液体マトリックス中の懸濁液中に、微粒子型で存在する液体組成物を含む。本明細書中で使用されるように、液体組成物には、ゲルが含まれる。

## 【0074】

好ましくは、液体組成物は水性である。あるいは、該組成物は軟膏の剤形をとることができる。好ましい実施形態では、組成物はin situでゲル化できる水性組成物、より好ましくはin situでゲル化できる水溶液である。そのような組成物は、歯肉および/または歯との接触時にゲル化を促すために有効な濃度のゲル化剤を含んでよい。好適なゲル化剤には、非限定的に、熱硬化性ポリマー、例えばエチレンオキシドおよびプロピレンオキシドのテトラ置換エチレンジアミンブロックコポリマー(例えば、ポロキサミン1307); ポリカルボフィル; および多糖、例えばゲラン、カラゲナン(例えば、カップ-カラゲナンおよびイオタ-カラゲナン)、キトサンおよびアルギナートガムが含まれる。フレーズ「in situでゲル化できる」には、ゲルを形成できる低い粘性の液体だけでなく、投与時に実質的に高い粘性またはゲルの硬さを示す粘性の液体、例えば半液体およびチキソトロピックゲルも含まれる。

30

## 【0075】

本発明の水性組成物は生理的に適合したpHおよび重量オスモル濃度を有する。好ましくはこれらの組成物は、例えば滅菌条件下での製造およびパッケージングによる、および/または許容される保存剤の抗菌有効量を含ませることによる、微生物の生育を阻害する手段を含む。好適な保存剤には、非限定的に、水銀含有物質、例えばフェニル水銀塩(例えば、フェニル水銀の酢酸塩、ホウ酸塩および硝酸塩)およびチメロサル; 安定化二酸化塩素; 四級アンモニウム化合物、例えば塩化ベンザルコニウム、セチルトリメチルアンモニウムプロミドおよびセチルピリジニウムクロライド; イミダゾリジニル尿素; パラベン、例えばメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベンおよびブチルパラベン、およびそれらの塩; フェノキシエタノール; クロロフェノキシエタノール; フェノキシプロパノール; クロロブタノール; クロロクレゾール; フェニルエチルアルコール; EDTA二ナ

40

50

トリウム；およびソルビン酸およびその塩が含まれる。

【0076】

組成物は、局所投与用の活性物質を含むデポー製剤を包含しうる。デポー製剤は本発明の組成物(すなわち、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCS)を含む。組成物を含む微粒子を生体適合性の製薬的に許容されるポリマーまたは脂質カプセル化剤に埋め込むことができる。すべてまたは実質的にすべての活性物質を長期間にわたって放出するようにデポー製剤を構成することができる。ポリマーまたは脂質マトリックスは、存在すれば、すべてのまたは実質的にすべての活性物質の放出後、投与部位から輸送されるように十分に分解するように構成することができる。デポー製剤は、製薬的に許容されるポリマーおよび溶解または分散させた活性物質を含む液体製剤であってよい。注入時に、ポリマーは、例えばゲル化するかまたは沈殿することによって注入部位でデポーを形成する。

10

【0077】

組成物は、口腔の好適な位置に挿入することができる固形物を構成してよく、該位置で固形物は活性物質を放出する。該固形物からの放出は、好ましくは、固形物が概して密接に接触している歯、歯肉および骨に対する放出である。そのような様式での口腔での移植に好適な固形物は、一般に、ポリマーを含み、生物分解性(bioerodible)または非生物分解性(non-bioerodible)であってよい。本発明の組成物を含む移植片の調製に使用できる生物分解性ポリマーには、非限定的に、脂肪族ポリエステル、例えばポリ(グリコリド)、ポリ(ラクチド)、ポリ(イブシロン-ε-カプロラクトン)、ポリ(ヒドロキシ酪酸)およびポリ(ヒドロキシ吉草酸)のポリマーおよびコポリマー、ポリアミノ酸、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、脂肪族ポリカーボネートおよびポリエーテルラクトースが含まれる。好適な非生物分解性ポリマーの例はシリコーンエラストマーである。

20

【0078】

当業者は、特定の目的のために、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSの適切な濃度、すなわち用量を容易に決定することができる。当業者は、好ましい用量が、その必要がある患者の歯科疾患、障害または損傷を予防し、回復させ、改善し、または治療するなどの治療効果を生じさせる用量であることを認識する。例えば、ACCS、プールされたACCSまたはPCSの好ましい用量の1つは塗布面積1平方センチメートルあたり約0.1~1000 μLの範囲である。他の好ましい用量範囲は、塗布面積1平方センチメートルあたり1.0~100 μLおよび塗布面積1平方センチメートルあたり約0.01~50.0 μLである。同様に、ECS細胞、例えばAMP細胞を、約 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mLの範囲、好ましくは約 $2.5 \times 10^7 \sim 7.5 \times 10^7$ 細胞/mL、最も好ましくは約 $5 \times 10^7$ 細胞/mLの濃度で調製する。当然、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSの適正な用量は、いくつかの変動要素に基づく使用時点での経験的な決定を必要とする。該変動要素には、非限定的に、治療対象の疾患、損傷、障害または状態の重症度およびタイプ；患者の年齢、体重、性別、健康；患者に投与されている他の投薬および治療；などが含まれる。当業者はまた、投与回数(投与計画)もまた、例えば治療対象の疾患、損傷、障害または状態の重症度およびタイプに基づいて経験的に決定する必要があることを認識する。好ましい実施形態では、1回の投与で十分である。他の好ましい実施形態は、2、3、4回、またはそれ以上の投与を想定する。

30

40

【0079】

本発明の別の実施形態では、歯科疾患を予防し、回復させ、改善し、または治療するために、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSとともに、他の物質、例えば活性物質および/または不活性物質を共投与することが望ましい。活性物質には、非限定的に、サイトカイン、ケモカイン、抗体、インヒビター、抗生物質、抗真菌剤、抗ウイルス剤、免疫抑制剤、他の細胞タイプ、などが含まれる。不活性物質には、担体、希釈剤、安定剤、ゲル化剤、送達ビヒクル、ECM(天然および合成)、支持体(scaffolds)、などが含まれる。ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSを他の医薬活性物質とともに投与する場合、より少ないECS細胞、例えばAM

50

P細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSださえ治療上有効である必要がありうる。

【0080】

ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSは、好ましくはチューブ、例えばカテーテルなどの送達デバイス経由での被験体の標的部位への注入によって投与することができる。好ましい実施形態では、チューブは、針、例えばシリンジをさらに含み、それを通して、細胞および/またはACCSまたはPCSを所望の位置で被験体に導入することができる。

【0081】

ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSの投与のタイミングは治療対象の歯科疾患のタイプおよび重症度に依存する。好ましい実施形態では、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSを歯科疾患の診断後できる限り速やかに投与する。他の好ましい実施形態では、ECS細胞、例えばAMP細胞および/またはACCS、プールされたACCSまたはPCSを診断後2回以上投与する。

【0082】

部分的にまたは完全に分化した細胞を含む組成物も本発明の方法によって想定される。そのような部分的にまたは完全に分化した細胞の組成物は、ECS細胞、例えばAMP細胞を適切な試薬で、かつ細胞が部分的または完全分化を受けて、例えば結合組織細胞、例えば線維芽細胞または骨細胞になる適切な条件下で処理することによって得られる。当業者はそのような部分的または完全分化を生じさせることができる条件に精通している。使用前(すなわち移植前、投与前、など)に、または使用と同時に、細胞を分化条件下で処理することができる。特定の実施形態では、使用前および使用中に細胞を分化条件下で処理する。

【0083】

持続放出組成物

ACCS、プールされたACCSまたはPCSを持続放出組成物として製剤化することができる。当業者は、ACCS、プールされたACCSまたはPCSなどのタンパク質ベースの治療物質などの治療物質の持続放出組成物を作製するための方法論に精通している。

【0084】

持続放出組成物は、本明細書中に記載の任意の方法によって作製することができる。例えば、多小胞性リポソーム製剤(multivesicular liposome formulation)技術はタンパク質およびペプチド治療物質の持続放出に有用である。Qui, J., et al, (ACTA Pharmacol Sin, 2005, 26(11):1395-401)は、持続放出インターフェロナルファ-2bの製剤化に関するこの方法論を記載する。Vyas, S.P., et al, (Drug Dev Ind Pharm, 2006, 32(6):699-707)は、多胞性リポソーム中のペグ化インターフェロナルファのカプセル化を記載する。ACCS、例えばプールされたACCS、およびPCSは多小胞性リポソーム持続放出製剤での使用に好適である。

【0085】

ナノ粒子技術もまた、持続放出組成物の作製に有用である。例えば、Packhaeuser, C.B., et al, (J Control Release, 2007, 123(2):131-40)は、インスリン負荷ジアルキルアミノアルキル-アミン-ポリ(ビニルアルコール)-g-ポリ(ラクチド-co-グリコリド)ナノ粒子に基づく生分解性非経口デポー系を記載し、ナノ粒子ベースのデポーは生物活性高分子(すなわちタンパク質)のための徐放デバイスの設計に好適な候補であると結論する。Dailley, L.A., et al, (Pharm Res 2003, 20(12):2011-20)は、分岐ポリマー-DEAPA-PVAL-g-PLGAに基づくエアロゾル治療のための、界面活性剤を含まない、生分解性ナノ粒子を記載し、DEAPA-PVAL-g-PLGAは多用途の薬物送達系であると結論する。ACCS、例えばプールされたACCS、およびPCSはナノ粒子ベースの持続放出製剤での使用に好適である。

【0086】

ポリマーベースの持続放出製剤もまた、非常に有用である。Chan, Y.P., et al, (Expert Opin Drug Deliv, 2007, 4(4):441-51)は、タンパク質およびペプチド治療物質の持続

放出に使用されるMedusaシステム(Flamel Technologies)のレビューを記載する。これまで、Medusaシステムは、動物モデル(ラット、イヌ、サル)および腎癌(IL-2)およびC型肝炎(IFN-アルファ(2b))患者での臨床試験においてIL-2およびIFN-アルファ(2b)の皮下注射に適用されてきた。Chavanpatil, M.D., et al, (Pharm Res, 2007, 24(4):803-10)は、水溶性分子の持続的かつ増強された細胞送達のための新規プラットフォームとして界面活性剤-ポリマーナノ粒子を記載する。Takeuchi, H., et al, (Adv Drug Deliv Res, 2001, 47(1):39-54)は、リポソームおよびポリマー性ナノ粒子を含む、ペプチド薬物送達のための粘膜付着性ナノ粒子系を記載する。Wong, H.L., et al, (Pharm Res, 2006, 23(7):1574-85)は、新規ポリマー-脂質ハイブリッド系を記載するが、これは多剤耐性乳癌細胞に対するドキソルビシンの細胞傷害性を高めることが示されている。ACCS、例えばプールされたACCS、およびPCSは上記持続放出製剤方法論での使用に好適である。

10

【0087】

さらに、本明細書中で特に記載されないが、当業者によく知られている他の持続放出方法論もまた、使用に好適である。

【0088】

当業者は、現在、臨床実施および臨床開発されている、歯科疾患を予防し、回復させ、または治療するための任意のおよびすべての標準的方法および様式が本発明の方法の実施に好適であることを認識する。投与経路、製剤化、他の物質との共投与(適切な場合)などは本明細書中の他の箇所で詳細に考察される。

【0089】

20

#### 実施例

以下の実施例は、本発明の方法および組成物の製造方法および使用方法についての完全な開示および説明を当業者に提供するために記載され、発明者らが自らの発明とみなすものの範囲を限定することは意図されていない。使用される数字(例えば、量、温度、など)に関する精度を保証するよう努めたが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。特に指定しない限り、割合は重量に基づく割合であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧であるか、またはほぼ大気圧である。

【実施例1】

【0090】

#### 実施例1: AMP細胞組成物の調製

30

解離剤PXXIIIを使用して羊膜上皮細胞を出発羊膜から解離させた。羊膜の平均重量範囲は18~27 gであった。PXXIIIで解離させた場合、羊膜1gあたりの回収された細胞数は約 $10 \sim 15 \times 10^6$ であった。

【0091】

選択AMP細胞を取得する方法 - 羊膜上皮細胞を羊膜からの単離直後にプレーティングした。培養してほぼ2日後、非接着細胞を除去し、接着細胞を維持した。プラスチック組織培養容器へのこの接着は、所望のAMP細胞集団を取得するために使用される選択方法である。接着および非接着AMP細胞は類似の細胞表面マーカー発現プロファイルを有するようであるが、接着細胞の方が高い生存度を有し、ゆえに所望の細胞集団である。ヒト血清アルブミンを補充した基本培地中で接着AMP細胞を、ほぼ120,000~150,000細胞/cm<sup>2</sup>に達するまで培養した。この時点で、培養物は集密になっていた。好適な細胞培養物はほぼ5~14日の範囲でこの細胞数に達する。この基準の達成はAMP細胞の増殖能の指標であり、この基準を達成しない細胞はその後の分析および使用のために選択されない。AMP細胞がほぼ120,000~150,000細胞/cm<sup>2</sup>に達したら、それらを回収し、凍結保存した。この回収時点はp0と称する。

40

【実施例2】

【0092】

#### 実施例2: ACCSの作製

本発明のAMP細胞を使用して、プールされたACCSなどのACCSを作製することができる。上記のようにAMP細胞を単離し、ほぼ10mLの上記培地を含むT75フラスコ中にほぼ $1 \times 10^6$

50

細胞/mLを播種した。細胞を集密まで培養し、培地を交換し、集密化の3日後にACCSを回収した。場合により3日後に再びACCSを回収し、場合により3日後に再び回収する。当業者は、集密培養からACCSを回収するための他の実施形態、例えば他の組織培養容器、例えば、非限定的に、セルファクトリー、フラスコ、ホローファイバー、または懸濁培養装置、などを使用する実施形態もまた、本発明の方法によって想定されることを認識する(上記「詳細な説明」を参照のこと)。ACCSを、回収後に、冷凍保存し、凍結乾燥し、放射線照射し、かつ/または持続放出用に製剤化することもまた、本発明によって想定される。異なる時点でACCSを回収することもまた、想定される(詳細に関しては「詳細な説明」を参照のこと)。

### 【実施例3】

10

#### 【0093】

##### 実施例3: PCS組成物の作製

担体中で生理的レベルの指定サイトカインまたは因子を組み合わせることによって以下のPCS組成物を製造する。

#### 【0094】

組成物A: VEGFおよびTIMP-1; 組成物B: VEGF、アンジオゲニンおよびTIMP-1; 組成物C: VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BBおよびTIMP-1; 組成物D: VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2およびTIMP-1; 組成物E: VEGFおよびTIMP-2; 組成物F: VEGF、アンジオゲニンおよびTIMP-2; 組成物G: VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BBおよびTIMP-2; 組成物H: VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2およびTIMP-2; 組成物I: VEGF、TIMP-1およびTIMP-2; 組成物J: VEGF、アンジオゲニン、TIMP-1およびTIMP-2; 組成物K: VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BB、TIMP-1およびTIMP-2; 組成物L: VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2、TIMP-1およびTIMP-2; 組成物M: アンジオゲニンおよびTIMP-1; 組成物N: アンジオゲニン、PDGF-BBおよびTIMP-1; 組成物O: アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2およびTIMP-1; 組成物P: アンジオゲニンおよびTIMP-2; 組成物Q: アンジオゲニン、PDGF-BBおよびTIMP-2; 組成物R: アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2およびTIMP-2; 組成物S: アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2、TIMP-1およびTIMP-2; 組成物T: PDGF-BBおよびTIMP-1; 組成物U: PDGF-BB、TGF 2およびTIMP-1; 組成物V: PDGF-BBおよびTIMP-2; 組成物W: PDGF-BB、TGF 2およびTIMP-2; 組成物X: PDGF-BB、TIMP-1およびTIMP-2; 組成物Y: PDGF-BB、TGF 2、TIMP-1およびTIMP-2。好ましい組成物は組成物Lである。

20

30

#### 【0095】

組成物A-Yは場合によりチモシン 4を含有する。当業者は、特定の実施形態で、他のMMPIインヒビター(すなわち、TIMP-3、TIMP-4または合成MMPインヒビター)が好適でありうることを認識する(J. Frederick Woessner, Jr., J. Clin. Invest. 108(6): 799-800 (2001); Brew, K., et al, Biochim Biophys Acta. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83)。

#### 【0096】

VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2、TIMP-1およびTIMP-2を以下の生理的レベルで添加される: VEGFについてほぼ5~16ng/mL, アンジオゲニンについてほぼ3.5~4.5 ng/mL, PDGFについてほぼ100~165pg/mL, TGF 2についてほぼ2.5~2.7ng/mL, TIMP-1についてほぼ0.68 µg/mL, およびTIMP-2についてほぼ1.04 µg/mL。VEGFはInvitrogen, カタログ#PHG0144, PHG0145, PHG0146, PHG0141またはPHG0143から入手することができ; アンジオゲニンはR&D Systems, カタログ#265-AN-050または265-AN-250から入手することができ; PDGF-BBはInvitrogen, カタログ#PHG0044, #PHG0045, #PHG0046, #PHG0041, #PHG0043から入手することができ; TGF 2はInvitrogen, カタログ#PHG9114から入手することができ; TIMP-1はR&D Systems, カタログ#970-TM-010から入手することができ; TIMP-2はR&D Systems, カタログ#971-TM-010から入手することができる。VEGF、アンジオゲニン、PDGF-BB、TGF 2、TIMP-1およびTIMP-2を、生理食塩水、PBS、乳酸加リンゲル液、細胞培養培地、水または当業者に公知の他の好適な水溶液などの担体に加える。

40

### 【実施例4】

#### 【0097】

50



実施例4：持続放出組成物の作製

ACCS、例えばプールされたACCS、またはPCSの組成物を、本明細書中に記載されている(「詳細な説明」を参照のこと)かまたはそうでなければ当業者によく知られている持続放出製剤技術のいずれかと組み合わせることによって、ACCS、例えばプールされたACCS、またはPCSの持続放出組成物を製造する。

【実施例5】

【0098】

実施例5：動物モデルにおける歯周病の発症を予防するためのACCSの使用

モデル：P. gingivalis誘発性歯周炎のウサギモデルでACCSを試験した。該モデルは、6週間にわたる結紮+ P. gingivalis適用を利用したが、これは、疾患モデルの確認時にかなりの量の歯肉の炎症および歯周病に関連する骨減少を誘発する。ACCSを、P. gingivalis適用の前に適用し、その後、次の6週にわたって週に3回適用した。

10

【0099】

結果：ACCSの局所適用は、結紮+ P. gingivalisによって誘発された軟組織での炎症性変化および骨減少からの顕著なレベルの保護をもたらした。これらのデータは、ACCSが歯周病の発症を予防するか、または改善することができることを示す。プラセボ(非ならし培地)適用は、無処置群で観察されるものと類似の顕著な量の軟組織炎症および骨減少によって示されるように、いかなる保護作用も有さなかった。

【実施例6】

【0100】

20

実施例6：動物モデルにおいて歯周病の進行を止めるか、または歯周病から回復させるためのACCSの使用

モデル：P. gingivalis誘発性歯周炎のウサギモデルでACCSを試験する。該モデルは、6週間にわたる結紮+ P. gingivalis適用を利用するが、これは、疾患モデルの確認時にかなりの量の歯肉の炎症および歯周病に関連する骨減少を誘発する。ACCSを、結紮+ P. gingivalis適用の6週間後に適用し、その後、追加の6週にわたって週に3回適用した。

【実施例7】

【0101】

実施例7：歯周病の動物モデルでのAMP細胞の使用

モデル：P. gingivalis誘発性歯周炎のウサギモデルでAMP細胞を試験した。該モデルは、6週間にわたる結紮+ P. gingivalis適用を利用するが、これは、疾患モデルの確認時にかなりの量の歯肉の炎症および歯周病に関連する骨減少を誘発する。AMP細胞はACCSと同じ肯定的な効果(疾患を予防するか、または回復させるか、またはその進行を停止させる)を有することが予測される。その理由は、AMP細胞が、ACCS中に存在する活性因子を分泌するからである。

30

【0102】

本発明は、その思想または本質的な特性から逸脱することなく、他の特定の形態で具現化されうる。任意の等価の実施形態は本発明の範囲内であるものとする。実際、本明細書中で示されるものおよび説明されるものに加えて、本発明の種々の改変が前記説明から当業者に明らかになる。そのような改変もまた、特許請求の範囲の範囲内に入るものとする。

40

【0103】

本明細書を通して、種々の刊行物が参照されている。各刊行物は参照によりその全体が本明細書中に組み入れられるものとする。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 37/36

(72)発明者 ゴールデン, ウィリアム, ジェイ .  
アメリカ合衆国 0 2 1 3 2 マサチューセッツ州, ボストン, リッチウッド ストリート 5 2  
(72)発明者 ラップ, ランダル, ジー .  
アメリカ合衆国 0 5 4 8 8 バーモント州, スウォントン, ファデン ロード 6 1

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 米国特許出願公開第2010/0080779(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 3 5 / 5 0  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )