

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5341525号
(P5341525)

(45) 発行日 平成25年11月13日(2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日(2013.8.16)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 35/28 (2006.01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06

請求項の数 13 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2008-554549 (P2008-554549)	(73) 特許権者	507135869
(86) (22) 出願日	平成19年2月14日 (2007.2.14)		セルラント セラピューティクス, インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2009-526784 (P2009-526784A)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 94070, サン カルロス, インダストリアルロード 1531
(43) 公表日	平成21年7月23日 (2009.7.23)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/062163		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W02007/095594	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成19年8月23日 (2007.8.23)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成22年2月15日 (2010.2.15)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/773, 405		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成18年2月14日 (2006.2.14)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 造血幹細胞の生着を増強するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者におけるサブオプティマル造血幹細胞 (HSC) 移植片の生着の増強用医薬の製造における、同種異系骨髓前駆体 (MP) 細胞移植片の使用であって、該MP細胞移植片は、多数の無関係のドナーからのプールされ、培養増殖された骨髓前駆体細胞を含み、該MP細胞は、共通骨髓系前駆細胞、顆粒球/マクロファージ前駆細胞、及び巨核球/赤血球前駆細胞を含み、かつ、該MP細胞は、骨髓細胞系列の最終分化細胞に最後には発達するが、リンパ細胞系列の細胞には分化しない、前記使用。

【請求項 2】

上記サブオプティマルHSC移植片が 5.0×10^6 未満のCD34⁺ HSC / 患者体重10 kgを含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

上記サブオプティマルHSC移植片が 1.0×10^6 未満のCD34⁺ HSC / 患者体重1 kgを含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

前記サブオプティマルHSC移植片が末梢血又は骨髓から得られる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 5】

前記サブオプティマルHSC移植片が臍帯血 (UCB) から得られる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 6】

前記サブオプティマルHSC移植片が 4×10^7 未満の有核細胞 / 患者体重1 kgを含む、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記サブオプティマルHSC移植片が 4.0×10^5 未満のCD34⁺細胞 / 患者体重1 kgを含む、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 8】

前記サブオプティマルHSC移植片が2未満の臍帯血単位から得られたHSCを含む、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 9】

前記サブオプティマルHSC移植片が1の臍帯血単位から得られたHSCを含む、請求項 5 に記載の使用。

10

【請求項 10】

前記同種異系MP細胞移植片と前記HSC移植片が前記患者に関して主要組織適合性複合体(MHC)で少なくとも一部不適合である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 11】

前記同種異系MP細胞が前記HSC移植片に関してMHCで少なくとも一部不適合である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 12】

前記MP細胞移植片が前記HSC移植片と同時に投与される、請求項 1 に記載の使用。

20

【請求項 13】

前記MP細胞移植片が前記HSC移植片から12時間以内に投与される、請求項 1 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 関連出願の引照

本出願は、U.S.S.N. 60/773,405 (2006年2月14日提出) (この記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される) の35 U.S.C. § 119(e) 下での利益を主張する。

【0002】

2. 産業上の利用分野

本発明は、幹細胞療法改善のための方法および組成物、特に、サブオプティマル用量の造血幹細胞の生着を促進するための方法および組成物に関する。

30

【背景技術】

【0003】

3. 発明の背景

造血幹細胞移植(HSCT)は、広範な多数の血液学的障害の処置の重要な構成成分である。一般的に、2種類のHSCTが存在する: 即ち、自己由来および同種異系移植である。自己由来移植は、骨髄破壊的処置後のレシピエント自身の細胞の注入を包含する。自己由来細胞移植片は、移植片対宿主病(GVHD)の危険を最小限にし、そして合併症低減を生じる。同種異系移植は、典型的にはレシピエントのMHCと適合性であるドナーを用いるドナー幹細胞の注入を包含する。しかしながら適合性非血縁ドナー(MUD)移植片は、より強力な移植片対宿主反応にも関連し、したがってより高い死亡率を生じる。

40

【0004】

造血幹細胞(HSC)の3つの主要供給源が存在する: 即ち、骨髄、末梢血および臍帯血である。臍帯血(UCB)は、血縁および非血縁同種異系造血幹細胞移植のための、他の造血前駆細胞供給源(例えば骨髄および動員末梢血)のほかに取り得る実用的代替供給源である。しかしながら残念なことに、臍帯血は容易に入手可能で、そして移植片対宿主病のより低い発生率を示すにもかかわらず、それは生着遅延を特徴とする。

【0005】

50

したがって、臍帯血から得られるHSCを用いて血液学的障害を治療することは非常に有望である一方、造血性回復の速度の遅さが依然として大きな妨げとなっている (Laughlin, et al., N. Eng. J. Med. 351: 22; 2265-2275 (2004))。凍結保存有核細胞 (NC) 用量は好中球回復の主要決定因子であり、そしてより高いCD34⁺細胞用量は非血縁ドナーUCB移植における生存率改善と関連する (Laughlin, et al.)。1.8×10⁷NC / レシピエント体重1kg未満または1.7×10⁵CD34⁺細胞 / kg未満の注入細胞用量を有するUCBの成人レシピエントは、典型的には、より低い生着および生存を示す (Wagner et al., Blood. 100; 51, 1611-1618)。有核細胞用量が1.5×10⁷ kgより低い場合、UCBに関して、特に不十分な結果が観察された (Grewal, et al. Blood, 101; 11; 4233-4244)。

10

【0006】

ヒト白血球抗原 (HLA) 不適合のレベルとHSC Tにおける生存率との間には、十分に確立された関係も存在する。例えば、移植片が少なくとも1.7×10⁵CD34⁺細胞 / kgを含有する場合、2以下のHLAで本質的に異なるUCB移植片の受取りにおいて高確率の生存が認められる (Wagner et al.)。

【0007】

その結果として、より高い細胞用量でのUCB移植片が成人患者における最適生着のために必要とされる、というコンセンサスが明らかになりつつある。一単位の臍帯血は、凍結時点で少なくとも2.0×10⁷の有核細胞 / kgを有し、そして、単独でまたはレシピエントと組合せて、HLA、BまたはDRB1に関する適合性の2以下の不一致を示すべきである、ということ、Rocha等は示唆している (Rocha et al., N. Eng. J. Med. 351: 22; 2276-2285 (2004))。最小許容可能注入UCB移植片細胞用量は未だ意見の一致を見ていないが、約1.5×10⁷有核細胞 / kg ~ 約1.5×10⁵CD34⁺細胞の最小許容可能用量が示唆されている (Grewal et al., Wagner et al.)。

20

【0008】

任意の事象においては、これらの量またはそれ以上のUCG細胞用量を用いる場合でさえ、生着の効率は依然として、骨髄または末梢血からのHSCを用いる場合より有意に低い (Rocha et al., p. 2281 and Figure 1 A.)。さらに生着は、単一の不適合が存在する場合でさえ悪化することが示されている (Gluckman et al., Exp. Hematol. 32: 397-407 (2004))。したがって、幹細胞移植の効能を改善するために、UCBから得られるHSCの生着を増強することに依然として大きな関心が寄せられている。

30

【発明の開示】**【0009】****4. 発明の要約**

本発明の開示に従って、幹細胞移植を改善するための方法、組成物およびキットが記載される。特に、造血幹細胞 (HSC) の生着を促進するための方法であって、HSC移植片と一緒に移植患者に骨髄前駆細胞 (MP) 移植片を投与することを包含する方法が提供される。MP移植片は、HSC移植片にとっておよび / または患者にとって自己由来であるかまたは同種異系であり、そしてさらに同種異系MP細胞の混合集団を含み得る。好ましい実施形態では、MP細胞は、投与前にin vitroで増幅される。

40

【0010】

本明細書中で実証されるように、HSCを伴うMPの投与は、特に最適以下用量のHSCを受容している被験者において特に、HSCの生着を劇的に増強し得る。したがって、一態様において、サブオプティマルHSC移植片の生着を増強するための方法であって、HSC移植片と一緒に患者にMP移植片を投与することを包含する方法が提供される。一般的に、最適HSC用量投与は、HSC移植片中の有核細胞 (NC) および / またはCD34⁺細胞の数の、および / または患者およびHSC移植片間のMHCでの不適合のレベルの一関数である。

【0011】

一態様では、幹細胞移植を首尾よく達成するために、最適HSC移植片は細胞 / 患者体

50

重1kgの閾値数を要する。最適HSC移植片は、一般的に少なくとも約 1.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg、少なくとも約 2.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg、好ましくは少なくとも約 3.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg、さらに好ましくは約 4.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg、最も好ましくは 5.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kgを含有する。

【0012】

したがって一態様では、本発明の方法は、一般的に約 5.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満、さらに特定的には約 4.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満、好ましくは約 3.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満、さらに好ましくは約 2.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満、または最も好ましくは約 1.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満を含むサブオプティマルHSC移植片と一緒にMP移植片を用いる。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は、骨髄または末梢血から得られる。一実施形態では、サブオプティマル移植片は、注入のために約 5×10^8 有核細胞/患者体重1kg未満、さらに好ましくは 4.5 または 4.0×10^8 有核細胞/患者体重1kg未満、および最も好ましくは約 4.1×10^8 有核細胞/患者体重1kg未満を含む。代替的一実施形態では、サブオプティマル移植片は、注入のために約 6×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満、さらに好ましくは約 $4.5 \sim 5.5 \times 10^6$ CD34+細胞/患者体重1kg未満、および最も好ましくは約 5.0×10^6 CD34+細胞/患者体重1kg未満を包含し得る。

【0014】

20

いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は、臍帯血から得られる。一実施形態では、サブオプティマル移植片は、2より少ない臍帯血単位から得られる、さらに好ましくは単一臍帯血単位から得られるHSCを含む。別の実施形態では、サブオプティマル移植片は、注入のために約 4×10^7 有核細胞/患者体重1kg未満、さらに好ましくは 3.0×10^7 有核細胞/患者体重1kg未満、および最も好ましくは約 3.5×10^7 有核細胞/患者体重1kg未満を含む。代替的一実施形態では、サブオプティマル移植片は、約 5×10^5 CD34+細胞/患者体重1kg未満、さらに好ましくは約 $3.5 \sim 4.5 \times 10^5$ CD34+細胞/患者体重1kg未満、および最も好ましくは約 4.0×10^5 CD34+細胞/患者体重1kg未満を包含し得る。

【0015】

別の態様では、サブオプティマル移植片は、患者表現型と比較して、1つより多くのMHC不適合を有するHSCを含む。

30

【0016】

幹細胞移植を改善するための組成物も提供される。一態様では、組成物は、造血幹細胞および骨髄前駆細胞の自己由来または同種異系混合物を含む。一実施形態では、MP細胞は、HSCとの組合せ前に増幅される。本発明の方法に従ってMPおよびHSCを単離し、増幅し、保存し、そして投与するためのキットも提供される。

5. 添付の図面の簡単な説明

【0017】

図面は例証目的だけのためであって、如何なる点でも本発明の教示の範囲を限定するものではない、と当業者は理解する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

6. 本発明の詳細な説明

6.1 定義

本発明の開示に関して、本明細書中の記載で用いられる技術および科学用語は、特に別記しない限り、当業者により一般に理解される意味を有する。したがって以下の用語は、以下の意味を有するよう意図される：

【0019】

「同種異系の」とは、同一種の成員に由来すること、同一種の成員に起源を有すること、あるいは同一種の成員であることを指し、この場合、成員は遺伝的血縁であるか、ある

50

いは遺伝的非血縁であるが、しかし遺伝的に類似する。「同種異系移植片」とは、ドナーからレシピエントへの細胞または器官の移入を指し、この場合、レシピエントはドナーと同一種である。

【 0 0 2 0 】

「自己由来の」とは、同一被験者または患者に由来すること、または同一被験者または患者に起源を有することを指す。「自己由来移植片」とは、被験者自身の細胞または器官の収集物および再移植片を指す。

【 0 0 2 1 】

「委任骨髓前駆細胞」または「骨髓前駆細胞」または「MP」とは、骨髓細胞系列の最終分化細胞のいずれかに最後には発達し得るが、しかし典型的にはリンパ細胞系列の細胞に分化しない多能性または単能性前駆細胞を指す。それゆえ、「骨髓前駆細胞」は、骨髓細胞系列中の任意の前駆細胞を指す。骨髓細胞系列の委任前駆細胞は本明細書中で示されるような少能性CMP、GMPおよびMEPを含むが、しかし、単能性赤血球前駆細胞、巨核球前駆細胞、顆粒球前駆細胞およびマクロファージ前駆細胞も包含する。骨髓前駆細胞の異なる細胞集団は、それらの分化能力ならびに特徴的な一組の細胞マーカーの存在により、他の細胞と区別可能である。

10

【 0 0 2 2 】

「共通骨髓前駆細胞」または「CMP」とは、顆粒球/単球(GMP)前駆細胞ならびに巨核球/赤血球(MEP)前駆細胞を生じるその能力により特性化される細胞を指す。これらの前駆細胞は、限定または非自己複製能力を有するが、しかし骨髓系樹状細胞、骨髓系赤血球系細胞、赤血球系細胞、巨核球、顆粒球/マクロファージ、顆粒球およびマクロファージ細胞を生じ得る。

20

【 0 0 2 3 】

「コンジェニック」とは、同一種の成員に由来すること、同一種の成員に起源を有すること、あるいは同一種の成員であることを指し、この場合、成員は、小遺伝子領域、典型的には単一遺伝子座(即ち単一遺伝子)を除いて、遺伝子的に同一である。「コンジェニック移植片」とは、ドナーまたはレシピエントからの細胞または器官の移入を指し、この場合、レシピエントは、単一遺伝子座を除いてドナーと遺伝子的に同一である。

【 0 0 2 4 】

「増幅」または「増幅される」とは、細胞の状況では、同一であり得るし、そうでない場合もある細胞の初期集団からの単数または複数の特徴的細胞型の数の増大を指す。増幅のために用いられる初期細胞は、増幅から生成される細胞と同一である必要はない。例えば増幅細胞は、ex-vivoまたはin vitro増殖ならびに細胞の初期集団の分化により産生され得る。この用語に含まれるのは、細胞の分化能力を特性化するために用いられる限界希釈検定である。

30

【 0 0 2 5 】

「機能的な」とは、細胞の状況では、単数または複数の限定機能検定により同定されるような特定細胞型と関連した一定の機能または活性を実施し得る細胞あるいはそれを保持する細胞を指す。例えば「機能的GMP細胞」は、顆粒球およびマクロファージに最後は分化し得る前駆細胞であって、この場合、最終的分化細胞は顆粒球およびマクロファージとして機能する。

40

【 0 0 2 6 】

「移植片対宿主応答」または「GVH」または「GVHD」は、異なるMHCクラスのリンパ球が宿主中に導入されて、宿主に対するリンパ球の反応を生じる場合に起きる細胞性応答を指す。

【 0 0 2 7 】

「顆粒球/マクロファージ前駆細胞」または「GMP」は、共通骨髓前駆細胞由来の、そして顆粒球およびマクロファージ細胞を生じるが、しかし典型的には骨髓系系列の赤血球系細胞または巨核球を生じないその能力により特性化される細胞を指す。

【 0 0 2 8 】

50

「単離される」とは、天然のものであれ、合成されたものであれ、その自然状態でそれが関連する少なくとも1つの他の生成物、化合物または組成物から分離される生成物、化合物または組成物を指す。

【0029】

「造血幹細胞」または「HSC」は、造血系のすべての細胞型、例えばB細胞、T細胞、NK細胞、リンパ系樹状細胞、骨髄系樹状細胞、顆粒球、マクロファージ、巨核球および赤血球系細胞に最後に分化し得るクローン原性自己複製多能性細胞を指す。造血系の他の細胞に関する場合、HSCは典型的には、特徴的一組の細胞マーカーの存在により限定される。

【0030】

「マーカー表現型分類」とは、その表現型（例えば分化状態および/または細胞型）を確定するための細胞上のマーカーまたは抗原の同定を指す。これは、細胞上に存在する抗原を認識する抗体を用いる免疫表現型分類により実行され得る。抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得るが、しかし一般的には他の細胞マーカーとの最小交差反応性を有するよう選択される。ある種の細胞分化または細胞表面マーカーは、細胞が由来する動物種に独特であるが、一方、他の細胞マーカーは種間で共通である、と理解されるべきである。種間の等価細胞型を限定するこれらのマーカーは、構造（例えばアミノ酸配列）における種差が存在する場合でも、同一マーカー同定を提供する。細胞マーカーとしては、ある種の場合においては細胞分化（CD）マーカーとも呼ばれる細胞表面分子、および遺伝子発現マーカーが挙げられる。遺伝子発現マーカーは、細胞型または分化状態を示す発現遺伝子の組である。一部は、遺伝子発現プロファイルは細胞表面マーカーを反映するが、しかしそれらは非細胞表面分子を含み得る。

【0031】

「巨核球/赤血球前駆細胞」または「MEP」とは、共通骨髄系前駆細胞由来の、そして赤血球および巨核球を生じるがしかし典型的には顆粒球、マクロファージまたは骨髄系樹状細胞を生じないその能力により特性化される細胞を指す。

【0032】

「不適合同種異系の」とは、典型的には当業界で用いられる標準検定、例えば限定数のMHC抗原の血清学的分析または分子分析により確定されるような非同種主要組織適合性複合体（MHC）抗原（即ちタンパク質）を有する同一種に由来すること、それに起源を有すること、またはその成員であることを指す。「一部不適合」とは、成員間で、典型的にはドナーおよびレシピエント間で試験されたMHC抗原の部分的適合を指す。例えば「半不適合」とは、試験されたMHC抗原の50%が2つの成員間で異なるMHC抗原を示すことを指す。「全」または「完全」不適合とは、試験されたすべてのMHC抗原が2つの成員間で異なっていることを指す。

【0033】

「骨髄破壊的」または「骨髄破壊」とは、典型的には細胞傷害性作因または放射線への曝露による造血系の損傷または破壊を指す。骨髄破壊は、造血系を破壊する高用量の細胞傷害性作因または全身放射線照射によりもたらされる完全骨髄破壊を包含する。それは、非骨髄破壊的状態調節により引き起こされる完全未満の骨髄破壊状態も包含する。したがって非骨髄破壊的状態調節は、被験者の造血系を完全に破壊しない処置である。

【0034】

「自己複製」とは、分裂し、そして親細胞の同一（例えば自己複製的）特質を有する少なくとも1つの娘細胞を生成する細胞の能力を指す。二次娘細胞は、特定の分化経路に委ねられ得る。例えば自己複製性造血幹細胞は分裂して、骨髄系またはリンパ系経路における分化に委ねられ得る1つの娘幹細胞ともう1つの娘細胞を生じる。方向付けされた前駆細胞は典型的には自己複製能力を失っており、そして細胞分裂時に、さらに分化された（即ち制限された）表現型を表示する2つの娘細胞を生じる。

【0035】

「ソーティング」とは、それが細胞に関する場合、物理的特質あるいはマーカーの存在

10

20

30

40

50

に基づいた細胞の分離（例えば側方散乱（SSC）および前方散乱（FSC）を用いるソーティング、あるいは標識化抗体を用いる蛍光活性化細胞ソーティング（FACS））、あるいは細胞マーカーの存在に基づいた細胞の分析、例えばソーティングを伴わないFACSを指す。

【0036】

「実質的に純粋な細胞集団」とは、特定細胞マーカー特質を有し、ならびに総細胞集団を作り上げている細胞の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75~80%、さらに好ましくは少なくとも約85~90%、最も好ましくは少なくとも約95%である分化能力を有する細胞の集団を指す。したがって「実質的に純粋な細胞集団」とは、指示検定条件下で、特定マーカー特質および分化能力を表示しない約50%より少ない、好ましくは約20~25%より少ない、さらに好ましくは約10~15%より少ない、最も好ましくは約5%より少ない細胞を含有する細胞の集団を指す。

10

【0037】

「被験者」または「患者」は互換的に用いられ、そして指示された場合を除いて、哺乳類、例えばヒトおよび非ヒト霊長類、ならびにウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタおよびその他の哺乳類種を指す。

【0038】

「同種同系の」とは、特に抗原または免疫学的反応に関して、遺伝子的に同一である同一種に由来すること、それに起源を有すること、またはその成員であることを指す。これらは、適合MHC型を有する一卵性双生児を含む。したがって「同種同系移植片」とは、ドナーからドナーと遺伝的に同一であるレシピエントへの細胞または器官の移入を指す。

20

【0039】

「異種の」とは、異なる種、例えばヒトと齧歯類、ヒトとブタ、ヒトとチンパンジー等に由来すること、それに起源を有すること、またはその成員であることを指す。「異種移植片」とは、ドナーからドナーのものとは異なる種であるレシピエントへの細胞または器官の移入を指す。

【0040】

6.2 造血幹細胞移植片の生着増強

本発明の開示は、幹細胞生着を促進するための方法、組成物およびキットを記載する。一態様では、それを必要とする患者におけるHSCの生着を増強するための方法であって、患者に(MP)細胞を投与することを包含する方法が提供される。本明細書中で初めて実証されたように、MP細胞はHSCの生着を増強し、それにより、特にHSC移植片が細胞数および/またはHLA不適合に関して最適以下である場合、HSC移植片を受容している移植患者の生存を改善する。

30

【0041】

造血幹細胞は自己複製可能な多能性幹細胞であり、そして許容状態で造血系のすべての細胞型を生じるそれらの能力により特性化される。HSC自己複製とは、分裂し、同一自己複製およびHSCの分化能力を有する少なくとも1つの娘細胞を生じる；即ち、細胞分裂は付加的HSCを生じる。自己複製は、造血系の補充のための非分化幹細胞の連続的供給源を提供する。HSCを同定するために有用なマーカー表現型は、当業界で一般的に既知のものである。ヒトHSCに関しては、細胞マーカー表現型としては、好ましくは、 $CD34^+CD38^-CD90^+(Thy1)^+Lin^-$ が挙げられる。マウスHSCに関しては、例示的マーカー表現型は、 $Scal-1^+CD90^+$ （例えばSpangrude, G.J. et al., Science 1: 661-673 (1998)参照）または $c-kit^+Thy1^0Lin^-Scal-1^+$ （例えばUchida, N. et al., J. Clin. Invest. 101(5): 961-966 (1998)参照）である。代替的HSCマーカー、例えばアルデヒドデヒドロゲナーゼ（Storms et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 96: 9118-23 (1999)参照）、AC133（Yin et al., Blood 90: 5002-12 (1997)参照）およびCD150（SLAM）（Kiel Cell 2005, 121(7) 1109-21参照）も有益な用途を見出し得る。

40

50

【0042】

HSCは、方向付けされたリンパ系または骨髄系前駆(MP)細胞を生じる。本明細書中で用いる場合、方向付けされた骨髄系前駆細胞とは、骨髄系列の最終分化細胞のいずれかに分化し得る細胞集団を指す。骨髄系前駆細胞に含まれるのは、限定または非自己複製能力により特性化されるがしかし細胞分裂して顆粒球/マクロファージ前駆細胞(GMP)ならびに巨核球/赤血球前駆細胞(MEP)を生成し得る細胞集団である共通骨髄系前駆細胞(CMP)である。非自己複製細胞とは、細胞分裂を受けて娘細胞を生じ、この何れもが親細胞型の分化能力を有さないが、しかしその代わりに分化娘細胞を生じる細胞を指す。CMPを同定するために有用なマーカー表現型としては、当業界で一般に既知のものが挙げられる。ネズミ起源のCMP細胞に関しては、細胞集団は、マーカー表現型 $c-k i t^{h i g h} (C D 1 1 7) C D 1 6^{l o w} C D 3 4^{l o w} S c a - 1^{n e g} L i n^{n e g}$ により特性化され、そしてさらに、マーカー表現型 $F c R^{l o} I L - 7 R^{n e g} (C D 1 2 7)$ により特性化される。ネズミCMP細胞集団は、B220、CD4、CD8、CD3、Ter119、Gr-1およびMac-1を含むマーカーの発現の非存在によっても特性化される。ヒト起源のCMP細胞に関しては、細胞集団は $C D 3 4^{+} C D 3 8^{+}$ により特性化され、そしてさらに、マーカー表現型 $C D 1 2 3^{+} (I L 3 R) C D 4 5 R A^{n e g}$ により特性化される。ヒトCMP細胞集団は、細胞マーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56およびCD235aの非存在によっても特性化される。種々の骨髄系前駆細胞に関するマーカー表現型の説明は、例えば米国特許第6,465,247号および第6,761,883号; Akashi, Nature 404: 193-197 (2000)ならびにManz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(18): 11872-7 (2002) (これらの記載内容はすべて、参照により本明細書中で援用される)に記載されている。

10

20

【0043】

骨髄系列のもう一つの方向付けられた前駆細胞は、顆粒球/マクロファージ前駆細胞(GMP)である。この前駆細胞集団の細胞は、顆粒球(例えば好塩基球、好酸球および好中球)およびマクロファージを生じるそれらの能力により特性化される。他の方向付けられた前駆細胞と同様に、GMPは自己複製能力を欠く。ネズミGMPは、マーカー表現型 $c-k i t^{h i} (C D 1 1 7) S c a - 1^{n e g} F c R^{h i} (C D 1 6) I L 7 R^{n e g} C D 3 4^{P o s}$ により特性化される。ネズミGMPはさらにまた、マーカーB220、Ter119、CD4、CD8、CD3、Gr-1、Mac-1およびCD90の発現を欠く。ヒトGMPは、マーカー表現型 $C D 3 4^{+} C D 3 8^{+} C D 1 2 3^{+} C D 4 5 R A^{+}$ により特性化される。ヒトGMP細胞集団は、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56およびCD235aの非存在によっても特性化される。

30

【0044】

CMP由来である巨核球/赤血球前駆細胞(MEP)は、方向付けられた巨核球前駆細胞および赤血球前駆細胞に分化するそれらの能力により特性化される。成熟巨核球は、トロンボポイエチンにより調節される発生プロセスである血小板形成のための前駆体である多倍数体細胞である。赤血球系細胞は、エリスロポイエチンにより調節されるプロセスにより方向付けられた赤血球前駆細胞から形成され、そして最終的には成熟赤血球に分化する。ネズミMEPは、細胞マーカー表現型 $c-k i t^{h i}$ および $I L 7 R^{n e g}$ により特性化され、そしてさらに、マーカー表現型 $F c R^{l o}$ および $C D 3 4^{l o w}$ により特性化される。ネズミMEP細胞集団は、B220、Ter119、CD4、CD8、CD3、Gr-1およびCD90の非存在によっても特性化される。マウスMEPに関する別の例示的マーカー表現型は、 $c-k i t^{h i g h} S c a - 1^{n e g} L i n^{n e g / l o w} C D 1 6^{l o w} C D 3 4^{l o w}$ である。ヒトMEPは、マーカー表現型 $C D 3 4^{+} C D 3 8^{+} C D 1 2 3^{n e g} C D 4 5 R A^{n e g}$ により特性化される。ヒトMEP細胞集団は、マーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56およびCD235aの非存在によっても特性化される。

40

【0045】

50

骨髄系列におけるさらなる限定前駆細胞は、顆粒球前駆体、マクロファージ前駆体、巨核球前駆体および赤血球前駆体である。顆粒球前駆細胞は、最終分化顆粒球、例えば好酸球、好塩基球、好中球に分化し得るそれらの能力により特性がされる。G Pは、典型的には、骨髄系列の他の細胞に分化しない。巨核球前駆細胞(M K P)に関しては、これらの細胞は、最終分化巨核球に分化するが、しかし一般的には骨髄系列の他の細胞に分化しないそれらの能力により特性化される(例えばWO 2004/024875参照)。

【0046】

H S CおよびM P細胞は、種々の供給源、例えば骨髄、末梢血、臍帯血から、ならびに造血および骨髄前駆細胞を保有することが既知のその他の供給源、例えば肝臓、特に胎児肝臓から得られる。末梢血および臍帯血は、H S CおよびM P細胞の富供給源である。細胞は、当業界で既知のそして一般に実行される方法を用いて得られる。例えば骨髄細胞を調製するための方法は、Sutherland et al., Bone Marrow Processing and Purging: A Practical Guide (Gee, A.P. ed.), CRC Press Inc. (1991)に記載されている。H S CおよびM P細胞は、適切な増幅および分化技法を用いて、始原幹細胞供給源、例えば胚性幹細胞(Thomson et al., Science 282: 1145 (1998))および生殖細胞(Shamblott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726 (1998))からも得られる。

10

【0047】

H S CおよびM P細胞は、本明細書中で一般的に記載されるように、造血系を有する任意の動物種から得られる。好ましくは適切な動物は、哺乳類、例えば齧歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、霊長類(例えばヒト)等が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0048】

いくつかの実施形態では、増幅幹細胞集団が用いられ得る。幹細胞は、サイトカインの混合物を含む別個の培地組成物中で増幅され得る。増幅幹細胞集団は、細胞起源の任意のメカニズムまたは理論により解釈または限定されるべきでなく、そして培養中で増殖される細胞ならびにC D 3 4抗原の発現において増大する細胞、あるいはその組合せを含み得る。幹細胞発現技法は、当業界で既知である(例えば米国特許第6,326,198号、米国特許第6,338,942号、米国特許第6,335,195号)(これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される)。

【0049】

いくつかの実施形態では、増幅M P集団が用いられ得る。M Pは、サイトカインの混合物を含む別個の培地組成物中で増幅され得る。増幅M P集団は、細胞起源の任意のメカニズムまたは理論により解釈または限定されるべきでなく、そして培養中で増殖される細胞ならびにC D 3 4抗原の発現において増大する細胞、あるいはその組合せを含み得る。M P発現技法は、当業界で既知である(例えば同時係属中米国特許出願第11/259,592号(表題「Methods of Expanding Myeloid Cell Populations and Uses Thereof」)および米国特許第6,967,029号)(これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される)。

30

【0050】

本発明は、自己由来または同種異系H S C移植片に適用可能である。したがって一実施形態では、本発明の方法は、M P細胞を投与することによる自己由来H S C移植片の生着増強を提供するが、この場合、M P細胞は、本明細書中で実証されるように、H S C移植片または患者に関して自己由来または同種異系であり得る。他の実施形態では、本発明の方法は、M P細胞を投与することによる同種異系H S C移植片の生着増強を提供するが、この場合、M P細胞は、本明細書中で実証されるように、H S C移植片または宿主に関して自己由来または同種異系であり得る。したがって、本発明の方法に用いられるH S CおよびM P細胞がH S C移植片のM H Cにならびに移植片レシピエントに関して完全適合、部分不適合同種異系および/または完全不適合同種異系細胞であり、そして血縁ドナー(通常は同一親対立遺伝子を有する同胞)または非血縁ドナーからであり得る、と本発明は確定した。

40

50

【 0 0 5 1 】

H S CおよびM P細胞は、実質的に純粋な細胞集団を得るために、さらなる選択および精製（陽性および陰性選択方法の両方を含み得る）にも付され得る。一態様では、蛍光活性化細胞選別（F A C S）（フローサイトメトリーとも呼ばれる）は、異なる細胞集団を分類し、分析するために用いられる。H S CまたはM P細胞集団に特異的な細胞マーカーを有する細胞は、細胞マーカーを結合する抗体または典型的には抗体の混合物でタグづけされる。異なるマーカーに向けられる各抗体は、検出可能分子、特に他の抗体とカップリングされた他の蛍光染料から弁別され得る蛍光染料と接合される。タグ化または「染色」細胞の流れは、検出される細胞から蛍光色素および発光スペクトルを引き出す光源を通過させられて、特定の標識化抗体の存在を確定する。異なる蛍光色素の同時検出（当業界では、多色蛍光細胞選別とも呼ばれる）により、異なる組の細胞マーカーを表示する細胞が同定され、集団中の他の細胞から単離され得る。他のF A C Sパラメーター、例えば側方散乱（S S C）、前方散乱（F S C）および生体染料染色（例えばヨウ化プロピジウムを用いる）（例として挙げられるが、これらに限定されない）は、サイズおよび成育可能性に基づいた細胞の選択を可能にする。H S Cおよび前駆細胞のF A C Sソーティングおよび分析は、とりわけ、米国特許第5,137,809号；第5,750,397号；第5,840,580号；第6,465,249号；Manz, M.G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11872-11877 (2002)；およびAkashi, K. et al., Nature 404 (6774): 193-197 (2000)に記載されている。蛍光活性化細胞ソーティングに関する一般ガイダンスは、例えばShapiro, H.M., Practical Flow Cytometry, 4th Ed., Wiley-Liss (2003)およびOrmerod, M.G., Flow Cytometry: A Practical Approach, 3rd Ed., Oxford University Press (2000)に記載されている。

10

20

【 0 0 5 2 】

細胞の精製は、本明細書中に記載される方法の組合せも包含する、と理解されるべきである。典型的組合せは、望ましくない細胞および細胞材料の大部分を除去するのに有効である初期手順、例えば白血球泳動法を包含する。第二ステップとしては、基質に結合される抗体に関する免疫吸着による1つまたは複数の前駆細胞集団に共通のマーカーを発現する細胞の単離を包含し得る。例えば抗C D 3 4抗体を含有する磁気ビーズは、C D 3 4抗原を一般的に発現するH S C、C M PおよびG M P細胞を結合し、捕捉し得る。高分解能の異なる細胞型を提供する付加的ステップ、例えば一組の特定細胞マーカーに対する抗体を用いるF A C Sソーティングは、所望の細胞の実質的に純粋な集団を得るために用いられ得る。別の組合せは、抗C D 3 4抗体と結合された磁気ビーズを用いる初期分離と、その後のF A C Sを用いる付加的回数の精製を包含し得る。

30

【 0 0 5 3 】

治療作用を達成するために必要とされる細胞の量は、特定の目的のために慣用的手順に従って経験的に確定される。一般的に、治療目的のために細胞を投与するために、細胞は、薬理学的有効用量で投与される。「薬理学的有効用量」または「薬理学的有効用量」とは、特に被験者の生着または生存のための、所望の生理学的作用を生じるのに十分な量、または所望の結果を達成し得る量である。治療的利益は、改善が実現されるか否かにかかわらず、基礎を成す疾患または障害の進行を止めることまたは遅くすることも包含する。上記のような薬理学的有効用量は、以下でさらに記載されるように、細胞と組合せて用いられる治療化合物にも当てはまる。

40

【 0 0 5 4 】

幹細胞移植片は、患者の年齢、体重および健康状態、適応症の性質および重症度の一関数として変わり得る。H S Cに関する適切な投与量範囲は、これらの考慮事項によって変わる。

【 0 0 5 5 】

幹細胞移植を成功させるためには、最適H S C移植片は閾値数の細胞/患者体重1 kgを要する。発表済みデータおよび近年の臨床試験からの結論によれば、最適H S C移植片は、一般的に少なくとも約 1.0×10^6 C D 3 4 + 細胞/患者体重1kg、少なくとも約 2.0×10^6 C D 3 4 + 細胞/患者体重1kg、好ましくは少なくとも約 3.0×10^6 C D 3 4 + 細胞/患者

50

体重1kg、さらに好ましくは約 4.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg、最も好ましくは 5.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kgを含有すべきである（例えばOlivieri, A. et al. (1998) Haematologica, 83: 329-337; Mavroudis, D. et al. (1996) Blood, Vo. 88, No. 8 (October 15); pp 3223-3229; Singhal, S. et al. (2000) Bone Marrow Transplantation, 26, 489-96; Bittencourt, H. et al. (2002) Blood, Vol. 99, No.8 (April 15); 2726-2733参照）。

【 0 0 5 6 】

好ましい態様では、本発明の方法および組成物は、当業界で既知の方法により確定した場合に、最適未満のH S C用量、例えば中央値未満の治療利益を生じる用量を有する移植片を用いる用途を見出す。いくつかの実施形態では、M P細胞の投与は、サブオプティマル用量の造血幹細胞の生着を増強する。いくつかの実施形態では、被験者の生存は、サブオプティマル用量の造血幹細胞と一緒にM P細胞を投与することにより増大され得る。このような方法では、サブオプティマル移植片と一緒に患者にM Pを投与すると、処置の有効性における全体的改善を生じる。

10

【 0 0 5 7 】

したがって一態様では、本発明の方法は、一般的に約 5.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満、さらに特定的には約 4.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満、好ましくは約 3.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満、さらに好ましくは約 2.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満、または最も好ましくは約 1.0×10^6 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満を含むサブオプティマルH S C移植片と一緒にM P移植片を用いる。

20

【 0 0 5 8 】

臍帯血単位は、単一胎盤および臍帯から収集される血液である。臍帯血単位中の有核細胞の数は、変化する。さらに、臍帯血単位中の有核細胞の数は、凍結および解凍後により少なくなり得る。したがってH S Cを投与するに際しては、有核細胞数が当該単位の解凍の前に測定されるか、後に測定されるかに留意することは得るところが大きい。いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は、2未満の臍帯血単位を含む。いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は単一臍帯血単位を含む。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は、患者に投与される有核細胞 (N C) / 患者体重1 kgの一関数である。一実施形態では、注入のための最低以下のU C B移植片は、約 4×10^7 有核細胞 / 患者体重1kgである。一実施形態では、サブオプティマルU C B移植片は、 3.0×10^7 有核細胞 / 患者体重1kg未満、好ましくは約 3.5×10^7 有核細胞 / 患者体重1kg未満である。一実施形態では、注入のためのサブオプティマルU C B移植片は、約2または 2.5×10^7 有核細胞 / 患者体重1 kgである。

30

【 0 0 6 0 】

骨髄または末梢血供給源からの最適H S C移植片に関する閾値細胞数は、一般的にU C B移植片に関するものより大きいおよその大きさである。一実施形態では、これらの供給源からの注入のためのサブオプティマル移植片は、約 5×10^8 有核細胞 / 患者体重1kgである。一実施形態では、サブオプティマル移植片は、4または 4.5×10^8 有核細胞 / 患者体重1kg未満、好ましくは約 4.1×10^8 有核細胞 / 患者体重1kg未満である。一実施形態では、サブオプティマル移植片は、約 3.5×10^8 有核細胞 / 患者体重1kg未満である。

40

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は、患者に投与されるC D 3 4 + 細胞の数の一関数である。一実施形態では、注入のためのサブオプティマルU C B移植片は、約 5×10^5 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満である。一実施形態では、注入のためのサブオプティマルU C B移植片は、約 $3.5 \sim 4.5 \times 10^5$ C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満、好ましくは約 4×10^5 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満である。一実施形態では、注入のためのサブオプティマルU C B移植片は、約 3×10^5 C D 3 4 + 細胞 / 患者体重1kg未満である。

【 0 0 6 2 】

骨髄または末梢血供給源からの最適H S C移植片に関する閾値細胞数は、一般的にU C

50

B 移植片に関するものより大きいおよその大きさである。一実施形態ではこれらの供給源からの注入のためのサブオプティマル移植片は、約 5×10^6 C D 3 4⁺細胞 / 患者体重1kg未満である。一実施形態では、注入のためのサブオプティマル移植片は、約 4×10^6 C D 3 4⁺細胞 / 患者体重1kg未満、好ましくは約 3×10^6 C D 3 4⁺細胞 / 患者体重1kg未満である。一実施形態では、注入のためのサブオプティマル移植片は、約2または 1×10^6 C D 3 4⁺細胞 / 患者体重1kg未満である。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片はMHCでの不適合の関数であり、例えばサブオプティマル移植片は、一部または全部不適合同系異種ドナーからであり得る。いくつかの実施形態では、サブオプティマル移植片は、患者に関してMHC遺伝子座で少なくとも一部不適合である。一実施形態では、サブオプティマル移植片は、1つまたは複数の抗原に関して不適合である。一実施形態では、サブオプティマル移植片は、少なくとも2つの抗原に関してMHCで不適合である。抗原は、同一MHC遺伝子座内または異なるMHC遺伝子座内であり得る。

10

【 0 0 6 4 】

MHC不適合の程度の確定は、当業界で既知でありそして用いられる標準試験を使用する。例えば移植生物学において重要であると確認されたヒトにおけるMHC遺伝子の少なくとも6つの主要部類が存在する。HLA-A、HLA-B、HLA-CはHLAクラスIIタンパク質をコードするが、一方、HLA-DR、HLA-DQおよびHLA-DPはHLAクラスIIタンパク質をコードする。これらの各群内の遺伝子は、ヒト集団中に見出される多数のHLA対立遺伝子または変異体において反映されるように、高多型性であり、そして個体間のこれらの群における差は、移植細胞に対する免疫応答の強度に関連する。MHC適合の程度を確定するための標準方法は、HLA-BおよびHLA-DR、またはHLA-A、HLA-BおよびHLA-DR群内の対立遺伝子を検査する。したがって試験は、それぞれ2または3つのHLA群内の少なくとも4、好ましくは少なくとも6つのMHC抗原から成る。

20

【 0 0 6 5 】

血清学的MHC試験において、各HLA抗原型に対して向けられる抗体は一被験者（例えばドナー）からの細胞と反応させられて、抗体と反応するある種のMHC抗原の存在または非存在を確定する。これは、多の被験者（例えばレシピエント）の反応性プロフィールと比較される。抗体とMHCとの反応は、典型的には、抗体を細胞とともにインキュベートし、次に補体を付加して、細胞溶解を誘導する（即ちリンパ球傷害性試験）ことにより確定される。反応は検査され、反応において溶解された細胞の量により等級分けされる（Mickelson, E. and Petersdorf, E.W., Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E.D. eds., pg 28-37, Blackwell Scientific, Malden, MA (1999)）。その他の細胞ベースの検定としては、標識化抗体を用いるフローサイトメトリーまたは酵素結合免疫検定（ELISA）が挙げられる。

30

【 0 0 6 6 】

MHC型を確定するための分子方法は、一般的に、合成プローブおよび/またはプライマーを用いて、HLAタンパク質をコードする特定遺伝子配列を検出する。合成オリゴヌクレオチドは、特定のHLA型と関連した制限断片長多型を検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いられ得る（Vaughn, R.W., Methods in Molecular Biology: MHC Protocols 210: 45-60 (2002)）。あるいはプライマーは、直接DNAシーケンシング、制限断片多型分析（RFLP）、あるいは一連の配列特異的オリゴヌクレオチドプライマー（SSOP）によりさらに検査され得る（Petersdorf, E.W. et al., Blood 92(10): 3515-20 (1998); Morishima, Y. et al., Blood 99(11): 4200-6 (2002); およびMiddleton, D. and Williams, F., Methods in Molecular Biology: MHC Protocols 210: 67-112 (2002)）。

40

【 0 0 6 7 】

サブオプティマル移植片は上記のように確定されるが、しかし本発明の開示は、このよ

50

うな測定基準に限定されない。代替的測定基準は、当業者に既知である。例えばサブオプティマル移植片は、例えば収集され、解凍され、または投与されるコロニー形成細胞の数、顆粒球-マクロファージコロニー形成細胞の数、バースト形成単位-赤血球系細胞の数、あるいはコロニー形成単位-顆粒球赤血球系単球マクロファージ細胞の数により確定し得る。

【 0 0 6 8 】

一般的に、治療目的のためにM P細胞を投与するために、細胞は薬理学的有効用量で投与される。「薬理学的有効量」または「薬理学的有効用量」とは、特に障害または疾患状態を治療するために、例えば障害または疾患の1つまたは複数の症候または症状発現を低減するかまたは排除するために、所望の生理学的作用を生じるのに十分な量、または所望の結果を達成し得る量である。治療的利益は、改善が実現されるか否かにかかわらず、基礎を成す疾患または障害の進行を止めることまたは遅くすることも包含する。

10

【 0 0 6 9 】

治療作用を達成するために必要とされるM P細胞の量は、特定の目的のために慣用的手順に従って経験的に確定され得る。M P細胞の量は、患者の年齢、体重および健康状態、適応症の性質および重症度の一関数として広範に変わり得る。さらに、投与されるM P細胞の量は幹細胞移植片に伴って変わり得るが、しかし概して、M P細胞の量は、H S C生着を増強する量で投与される。いくつかの実施形態では、M P細胞の量は、患者生存を増大する量で投与される。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、注入されるM P細胞の数は、約 1×10^5 ~ 約 1×10^9 細胞 / 体重1 kg、さらに好ましくは約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 細胞 / kg、最も好ましくは約 1×10^7 細胞 / kg、または必要な場合はそれ以上であり得る。

20

【 0 0 7 1 】

患者への細胞の移植は、当業界で一般的に用いられる方法により成し遂げられる。投与の好ましい方法は、静脈内注入である。上記のように、輸注される細胞の数は、性別、年齢、体重、疾患または障害の種類、障害の段階、細胞集団中の所望の細胞のパーセンテージ（例えば細胞集団の純度）、ならびに治療利益を生じるために必要とされる細胞数といったような因子を考慮に入れる。

【 0 0 7 2 】

細胞は、1回の注入で、あるいは治療作用を生じるのに十分な限定時間に亘っての連続注入により、投与され得る。処置が連続注入を包含する場合、異なる集団の細胞が注入され得る。製薬上許容可能な担体は、以下でさらに説明されるように、患者への細胞の注入のために用いられ得る。これらは典型的には、例えば緩衝生理食塩水（例えばリン酸塩緩衝生理食塩水）または非補足基本細胞培地、あるいは当業界で既知の培地を含み得る。いくつかの実施形態では、M P細胞は、幹細胞移植と同時に、その後または前に、用いられ得る。

30

【 0 0 7 3 】

骨髄系前駆細胞を投与する造血幹細胞移植片の生着の増強方法は、種々の障害の処置のために用いられ得る。いくつかの実施形態では、障害は、疾患または骨髄破壊的処置により引き起こされる造血の不足に関する。本明細書中で用いる場合、「処置」とは、治療的または予防的処置、あるいは疾患、障害または望ましくない状態に関する抑制的測定を指す。処置は、疾患症候の開始前および/または臨床的症状発現または疾患または症状の発現の後に、適切な形態で被験者細胞を投与して、疾患重症度を低減し、疾患進行を止め、または疾患を排除することを包含する。疾患の防止としては、好ましくは障害に対する感受性増大を示す被験者における、障害または疾患の症候の開始の延長または遅延が挙げられる。

40

【 0 0 7 4 】

本開示はさらに、固形器官、細胞または組織移植の分野における造血幹細胞移植片の生着を増強するためのM P細胞の使用を提供する。例として本開示はさらに、心臓、肺、肝

50

臓、腎臓、島細胞、皮膚、内分泌器官または膵臓の移植における造血幹細胞移植片の生着を増強するためのM P細胞の使用を提供するが、これらに限定されない。

【 0 0 7 5 】

6 . 3 補助的処置

種々の補助的処置は、本明細書中に記載される方法とともに用いられ得る。一態様では、補助的処置としては、特に、抗真菌剤、抗細菌剤および抗ウイルス剤が挙げられる。

【 0 0 7 6 】

一態様では、補助的投与剤は、抗真菌剤である。真菌感染は、骨髄破壊療法およびH S C Tを受けたことのある患者においては有意の問題である。生着遅延を示すレシピエントおよびG V H Dを発症する患者は、典型的には真菌感染に対して高い危険に曝されている。真菌感染の型は変更され、そして例としては特に、カンジダ症（例えばカンジダ・クルセイ*candida krusei*、カンジダ・グラブラタ*candida glabrata*、カンジダ・アルピカンス*candida albicans*、カンジダ・トロピカリス*candida tropicalis*による）、アスペルギルス症（例えばアスペルギルス・フミガツス*aspergillus fumigatus*、アスペルギルス・フラブス*aspergillus flavus*による）、ムコール菌症（例えばリゾビウム・アリズス*rhizobium arrhizus*、アブシジア・コリムピフェラ*absidia corymbifera*、リゾムコール・プシルス*rhizomucor pusillus*による）、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ・カプスラーツム、コクシジオイデス・イミチスが挙げられる。

【 0 0 7 7 】

補助的投与のための抗真菌剤は、一般的には全身用抗真菌剤である。この型の有用な一抗真菌剤は、ポリエンマクロライド系抗生物質の群からのアンフォテリシンBである。アンフォテリシンBは、例えばデオキシシクロレートとの複合体として；コレステリル・スルフェートを含有するコロイド懸濁液中で；そしてダイズ・レシチン、コレステロールおよびジステアロイルホスファチジルグリセロールから作製されるリボソーム中に封入された種々の処方物中に、当業界で既知のその他の処方物中に利用可能である。

【 0 0 7 8 】

別の抗真菌剤は、フルシトシン（フッ化ピリミジン系薬剤）である。真菌によるフルシトシンの脱アミノ化は、5-フルオロウラシル、代謝拮抗剤およびDNA合成阻害剤を生じる。フルシトシンは典型的には、クリプトコッカスおよびカンジダ症菌の感染症のために用いられる。単独で用いられるがしかし、フリシトシンは一般的に、アンフォテリシンBと組合せて用いられる。

【 0 0 7 9 】

イミダゾールおよびトリアゾールは、アゾールベースの抗真菌剤の広範な一クラスを代表する。イミダゾールおよびトリアゾールは、ステロール14- -デメチラーゼを阻害して、エルゴステロールの生合成損傷ならびに細胞膜ベースの活性、例えば電子運搬の崩壊を引き起こす、と考えられる。アゾールベースの抗真菌剤は、ある型のカンジダ症菌、例えばカンジダ・アルピカンス、カンジダ・グラブラタおよびカンジダ・ネオフォルマンス*candida neoformans*に対して有効である。全身投与に適した例示的アゾール抗真菌剤としては、特に、ケトコンザオール、イトラカナゾール、フルコナゾール、エコナゾール、ポリコナゾールおよびテルカノゾールが挙げられる。

【 0 0 8 0 】

真菌感染のほかに、好中球減少症患者は、種々の細菌性病原体による感染に感受性である。骨髄破壊レジメンおよびH S C Tを受けている患者は、グラム陽性細菌（例えば連鎖球菌*streptococcus*および黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus*）およびグラム陰性細菌（例えば大腸菌*E. coli*および緑膿菌*Pseudomonas aeruginosa*）の両方による高率の細菌感染を有する。敗血症は、一般的出来事である。さらに生着遅延、ならびに封入細菌、例えば肺炎球菌*streptococcus pneumoniae*またはインフルエンザ菌*haemophilus influenza*に対する免疫応答の回復損傷は、G V H Dを有する移植片レシピエントに関する罹患率を増大する。

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

補助的抗細菌療法は、特定細菌病原体に適した任意の既知の抗生物質を使用し得る。これらの例としては、広範囲の抗生物質ならびにより多くの標的化抗細菌性化合物の両方が挙げられる。増幅骨髄細胞に適切な種々のクラスの抗細菌剤としては、例えばキノロンおよびフルオロキノロン、 β -ラクタム系抗生物質、アミノグリコシド、テトラサイクリン、マクロライド、ならびにその種々のcogenerが挙げられるが、これらに限定されない。例示的キノロン化合物としては、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン、ロメフロキサシンおよびモキシフロキサシンが挙げられる。例示的 β -ラクタム系抗生物質としては、ペニシリン（例えばペニシリンG、ペニシリンV）、アンピシリン、カルペニシリン、メチシリン、カルバペネムおよびセファロsporin（例えばセファロシン、セファマンドール、セファクロル、セフォニド、セフォタン、セファトキシム、セフトジジム、セフトゾキシム、セフェピム）が挙げられる。例示的アミノグリコシドとしては、ネオマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシンおよびネチルミシンが挙げられる。例示的マクロライドとしては、エリスロマイシン、クラリスロマイシンおよびアジスロマイシンが挙げられる。その他の抗生物質は、当業者に明らかである。

【0082】

ウイルス感染も、骨髄破壊患者およびHSC Tにおいては問題である。一般的に、ウイルス感染の危険増大は、骨髄破壊療法によりもたらされる損傷細胞媒介免疫性に起因する。これらの感染の多くは、血清陽性患者においてまたは血清陽性ドナーの細胞中に存在する潜伏ウイルスの再活性化から生じる。一般に遭遇するウイルスとしては、特に、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ヘルペスウイルス-6、エプスタイン・バーウイルス；アデノウイルス等が挙げられる。細胞注入に付加するものとして、選択される抗ウイルス化合物は、患者が遭遇するウイルスに適したものである。有用な抗ウイルス化合物としては、例えばアシクロビル、シドフォビル、ガンシクロビル、イドクスウリジン、ペンシクロビル、バルガンシクロビル、バラシクロビル、ビダラピン、アマンタジン、リマンタジン、ザナミビル、フォミビルセン、イミキモドおよびリバビリンが挙げられるが、これらに限定されない。レトロウイルスに対して向けられる治療薬としては、特に、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（例えばジドブジン、ジダノシン、スタブジン、ザルシタピン、ラミビツジン）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（例えばネビラピン、エファビレンズ、デルビルジン）、ならびにプロテアーゼ阻害剤（例えばサキニビル、インジナビル、リトナビル、ネルフィナビル、アンブレナビルおよびロピナビル）が挙げられる。

【0083】

抗真菌剤、抗細菌剤および抗ウイルス剤は、感染の発生を低減するための予防薬として、あるいは疾患の出現時に用いられ得る。予防薬は、免疫抑制患者に共通の真菌感染のために、そして血清陽性患者または血清陽性移植患者におけるウイルス感染のために、特に指示される。したがって治療目的のための実施形態は、HSC、MP細胞ならびに抗真菌、抗細菌または抗ウイルス化合物の組合せを包含する。

【0084】

さらなる一実施形態では、補助的投与剤は、最終分化骨髄細胞、特に顆粒球、マクロファージ、巨核球および赤血球系細胞の分化および動員を増強するサイトカインまたは増殖因子である。顆粒球発達を増強するために、サイトカインC-CSFおよびGM-CSFが用いられ得る。G-CSFは、HSC Tにおける好中球の生着および産生を加速するのに有効である。別の実施形態では、サイトカインまたは増殖因子は、トロンボポイエチンである。TPOの投与は、移植前駆細胞の生着を増強し、そして巨核球および血小板の発達を促進する（Fox, N et al., J. Invest. 110: 389-394 (2002); Akahori, H. et al., Stem Cells 14(6): 678-689 (1996)）。

【0085】

種々のビヒクルおよび賦形剤ならびに投与経路が、当業者に明らかであるように、補助療法のために用いられ得る。代表的処方技法は、特に、Remington: The Science and Pra

10

20

30

40

50

ctice of Pharmacy, 19th Ed., Mack Publishing Co., Easton, , PA (1995)およびHandbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed, Kibbe, A.H. ed., Washington DC, American Pharmaceutical Association (2000) (これらの記載内容は参照により本明細書中で採用される)に教示されている。

【0086】

製剤組成物は、一般的に、製薬上許容可能な担体、ならびに薬理的有効量の化合物あるいはその混合物またはその適切な塩を含む。製剤組成物は、粉末、顆粒、溶液、懸濁液、エアロゾル、固体、ピル、錠剤、カプセル、ゲル、局所用クリーム、座薬、経皮パッチおよび当業界で既知のその他の処方物として処方され得る。

【0087】

本明細書中で用いる場合、「製薬上許容可能な担体」は、製剤組成物を処方するに際して、当業者に既知の標準製薬上許容可能担体のうちのいずれかを含む。したがって製薬上許容可能な塩としてまたは接合体として存在するような化合物は、それ自体、製薬上許容可能な希釈剤中の、例えば生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、水性エタノール中の、あるいはグルコース、マンニトール、デキストラン、プロピレングリコール、油(例えば植物油、動物油、合成油等)、微晶質セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、リン酸カルシウム、ゼラチン、ポリソルベート80等の溶液中の処方物として、あるいは適切な賦形剤中の固体処方物として、調製され得る。

【0088】

製剤組成物はしばしば、1つまたは複数の緩衝剤(例えば中性緩衝生理食塩水またはリン酸塩緩衝生理食塩水)、炭水化物(例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン)、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン、酸化防止剤(例えばアスコルビン酸、メタ亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシルエン、ブチル化ヒドロキシアニソール等)、静菌剤、キレート化剤、例えばEDTAまたはグルタチオン、処方物をレシipientの血液と等張、低張または弱低張性にさせる溶質、沈殿防止剤、増粘剤、防腐剤、風味剤、甘味剤および着色化合物を適切な場合はさらに含む。

【0089】

当業者に既知の任意の適切な担体が組成物中に用いられ得るが、しかし担体の種類は典型的には、投与方式によって変わる。治療用組成物は、任意の適切な投与方法、例えば経口、鼻、粘膜、直腸、膺、局所、静脈内、腹腔内、皮内、皮下および筋肉内投与のために処方され得る。

【0090】

本明細書中に記載される製剤組成物は、単位用量または多用量容器中、例えば密封アンプルまたはバイアル中で提供される。このような容器は、典型的には、使用するまで処方物の滅菌性および安定性を保存するような方法で密封される。概して、処方物は、上記のような油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳濁液として貯蔵され得る。代替的には、製剤組成物は、凍結-乾燥状態で貯蔵され、使用直前に滅菌液体担体の付加のみを要し得る。

【0091】

宿主に投与される量は、何が投与されているか、投与の目的(例えば予防または治療)、宿主の状態、投与方法、投与回数、投与間の間隔等によって変わる。これらは当業者により経験的に確定され、そして治療的応答の程度に関して調整され得る。適切な用量を確定するに際して考慮すべき因子としては、被験者のサイズおよび重量、被験者の年齢および性別、症候の重症度、疾患の段階、作用物質の送達の方法、作用物質の半減期、作用物質の効力が挙げられるが、これらに限定されない。考慮すべき疾患の段階としては、疾患が急性であるか、慢性であるか、再発または寛解期、ならびに疾患の進行性が挙げられる。

【0092】

10

20

30

40

50

治療的有効量に関する投与量および投与回数を確定することは、当業者の技術の範囲内である。例えば初期有効用量は、細胞培養またはその他のin vitro検定から概算され得る。用量は次に、動物モデルで処方されて、循環濃度または組織濃度、例えば細胞培養検定により確定されるようなIC₅₀の濃度を生じる。

【0093】

6.4 キット

本明細書中に記載される方法は、HSC生着を増強するためのキットにより促進される。キットは、細胞、例えばHSC、MP（これらに限定されない）、例えば増幅および/または単離細胞、および/または補助的療法用化合物、HSCおよびMPを単離または増幅するための手段、患者に細胞を投与するための手段、あるいはその任意の組合せを含むし得る。キットは、製薬上許容可能な担体、生理学的に許容可能な担体、使用説明書、容器、投与のための器、抗体のいずれかまたはすべて、あるいはその任意の組合せを任意に包含し得る。標識は、典型的にはキットに添付し、そして書かれているかまたは記録された任意の構成要素（これは電子的またはコンピューター読取り可能形態（例えばディスク、光学ディスク、メモリーチップまたはテープ）であり得る）を含み、使用説明書またはキット内容物の使用のためのその他の情報を提供する。

10

【実施例】

【0094】

7. 実施例

本発明の教示の態様は、以下の実施例を考慮に入れてさらに理解され得るが、これらは如何なる点でも本発明の教示の範囲を限定するよう意図されるべきでない。

20

【0095】

7.1 実施例1：実験方法

マウスからのHSCまたはMPの調製 マウス骨髄細胞を得るために、動物を安楽死させて、大腿骨/脛骨を取り出し、筋肉を取り除く。乳鉢と乳棒を用いて、骨を押し潰してパルプ状にして、骨髄をナイロンスクリーンを通して濾過し、次に1200 RPMで5分間遠心分離する。細胞を、氷上で3~4分間、1 mlのACK溶液（0.3 MNH₄Cl、0.2 MKHCO₃、MiliQ濾過水）中に再懸濁し、次に、試験管に染色媒質（2% FCSおよび2 mM EDTA、w/oカルシウム、w/oマグネシウム、w/oフェノールレッドを含有するハンクス緩衝生理食塩水）を充填することにより洗浄する。細胞を遠心分離し、濾過し、染色媒質中に再懸濁して、マウスIgG（1 mg/mlストックの1:50希釈液、Sigma, St. Louis, MO）を付加する。細胞を氷上で10~15分間インキュベートして、次に染色媒質中の100 μl/マウスの最終容積中に10 μl/マウスの容積でCD117マイクロビーズ（Miltenyi Biotech, Auburn CA）と混合する。細胞を、氷上で25分間インキュベートする。細胞を洗浄し、最終容積~1 ml/マウスで染色媒質中に再懸濁して、ナイロンスクリーンを通して濾過する。posselid設定を用いて、メーカーの指示に従って、AMAC（Miltenyi, Auburn, CA）を用いて、細胞を濃化する。濃化後、適切な濃度で付加される以下の指示接合抗体（ebioscience, San Diego, CA）とともに染色媒質中に約1×10⁸細胞/mlで細胞を再懸濁する：Sc a-1アロフィコシアニン（APC）、c-k i t R-フィコエリトリン-シアニン7タンデム（PE-Cy7）、Thy-1.1フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、系統（CD3、CD4、CD5、CD8、B220、mac-1、Gr-1およびTer119）R-フィコエリトリン（PE）。細胞を氷上で25分間インキュベートし、洗浄し、遠心分離し、そして染色媒質中に再懸濁する。ヨウ化プロピジウム（PI）を付加して、死細胞を除外する。マウスKTL S-HSC、c-k i t^{high}Thy^{low}Sc a-1^{pos}系統^{neg}またはマウスMP c-k i t^{high}Thy^{neg}Sc a-1^{neg}系統^{neg/low}をFACSにより単離する。

30

40

【0096】

細胞培養および増幅 Lin^{neg/low}KTL S-HSCをAKRマウス（H2Kk）から類別し、サイトカインおよび増殖因子組合せc-K i t L、FL、TPOおよびIL6を含有する500 μl/ウエルの無血清培地（X-Vivo 15基本培地（Cambrex Bioscience,

50

MD) ; ペンストレップ (100×)、グルタマックス (100×)、2-メルカプトエタノール (5×10^{-5} M)、c-K i t L (50 ng/ml)、F L (30 ng/ml)、T P O (5 ng/ml) および I L 6 (10 ng/ml) (Biosource, Camarillo, CA および R & D Systems, Minneapolis, MN) 中でプレート化する。細胞を、24ウエルプレート中で約10,000細胞/ウエルでプレート化する。細胞を7日間培養して、M P c (培養由来M P) を得る。細胞を2日目に500 μ l/ウエルで育てて、4日目に、培地の半分を新鮮な培地と取り替える。5日目に、1 ml の新鮮な培地を付加しながら細胞を6ウエルプレートに移す。7日目に、培養細胞を収集し、3つの小アリコート进行分析のために取り出す。

【0097】

増幅細胞集団中のマウスH S Cに関する染色 : 細胞を各ウエルから取り出し、洗浄し、次に対応する円錐形F A C S管に移して、血球計により計数する。細胞を1100 rpmで5分間遠心分離し、上清を除去する。50 μ lの遮断抗体(ラットI g GおよびマウスI g G 1:50)を付加し、10分間インキュベートして、その後、適切な濃度の以下の抗体(eBioscience, San Diego, CA)を用いて、50~100 μ lの抗体溶液を付加する: S c a - 1 アロフィコシアニン(A P C)、T h y - 1、1フルオレセイン・イソチオシアネート(F I T C)、c - k i t ・フィコエリトリン-シアニン7タンデム(P E - C y 7)、B 2 2 0、M a c - 1、G R - 1 R-フィコエリトリン(P E)。氷上で25分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、遠心分離し、そしてP Iを含有する染色培地中に再懸濁する。細胞を、F A C SによりH S Cに関して分析する。

【0098】

培養増幅細胞集団中の骨髄前駆体に関する染色 : 上記のH S C細胞の染色のために実行したのと同じ方法で、細胞を調製する。50 μ lの遮断抗体(ラットI g GおよびマウスI g G 1:50)とともにインキュベート後、50~100 μ lの系統-ビオチン(T e r 1 1 9、G r - 1、B 2 2 0)を各試験管に付加し、その後、氷上に20分間置く。細胞を2~3 mlのS Mで洗浄し、遠心分離して、次に50~100 μ lの以下の抗体溶液中に適切な濃度で再懸濁する: ストレプトアビジン・カスケードブルー(Molecular Probes, Eugene, OR)、c - k i t ・フィコエリトリン-シアニン7タンデム(P E - C y 7)、S c a - 1 アロフィコシアニン(A P C)、C D 3 4 フルオレセイン・イソチオシアネート(F I T C)、2 . 4 G 2 (F c R) R-フィコエリトリン(eBioscience, San Diego, CA)。細胞を、F A C SによりM P (C M P、G M P、M E P)に関して分析する。

【0099】

成熟前駆細胞サブセットに関する培養増幅細胞の染色 : 上記と同様に、細胞を処理する。遮断抗体とともにインキュベート後、細胞を、50~100 μ lの以下の抗体溶液中に再懸濁する: C D 3 フィコエリトリン-シアニン7タンデム(P E - C y 7)、B 2 2 0 パシフィックブルー、G r - 1 R-フィコエリトリン(P E)およびM a c - 1 アロフィコシアニン(A P C) (eBioscience, San Diego, CA)。氷上で25分間インキュベーション後、細胞を上記と同様にF A C S分析に関して処理する。

【0100】

ドナー細胞の存在に関する再構成マウスのスクリーニング ドナー細胞集団に関するH S Cおよび/またはM Pを移植されたマウスのスクリーニングを、室温でP B S中の0.5 mM E D T A 0.5 ml中の約10~15滴の血液を収集することにより実行する。P B S中の2% デキストラン-500 1 mlを付加し、37 $^{\circ}$ Cで30~45分間インキュベートする。ほとんどの赤血球が沈殿する。その結果生じた上清を新しい試験管に移して、細胞を遠心分離(5分、1000 rpm)により収集し、残りの赤血球を、氷上で5~6分間、1.0 mlの1×A C K (0.3 M N H₄ C l、0.2 M K H C O₃、MiliQ濾過水)で溶解する。この後、洗浄し、1200 rpmで5分間遠心分離する。ペレットが依然として赤色である場合、洗浄ステップを反復する。氷上で10~15分間、50 μ l/試験管でのラットI g GおよびマウスI g G (各々、1:50)で細胞を遮断する。ビオチニル化M a c - 1 およびG R - 1 (eBioscience, San Diego, CA)を適切な濃度で付加し、暗所で20分間、氷上でインキュベートする。細胞を洗浄し、1200 rpmで5分間遠心分離する。以下の抗体を、合成またはM U D移植片(C 5 7 B 6 /

K a、C D 4 5 . 1 ; C 5 7 B 1 6 / K a C D 4 5 . 2 または 1 2 9) ストレプトアビジン・カスケードブルー (Molecular Probes, Eugene, OR)、C D 4 5 . 1 アロフィコシアニン (A P C)、C D 4 5 . 2 フルオレセイン・イソチオシアネート (F I T C)、B 2 2 0 R-フィコエリトリン シアニンタンデム (P E - C y 7) および C D 3、C D 4、C D 8 R-フィコエリトリン (P E) (eBioscience, San Diego, CA) に関して、適切な濃度で付加する。以下の抗体を、同種異系移植片 (C 5 7 B 6 / K a、H 2 K b ; B a 1 b / b、H 2 K d) ストレプトアビジン・カスケードブルー (Molecular Probes, Eugene, OR)、C D 3 アロフィコシアニン (A P C)、H 2 K b フルオレセイン・イソチオシアネート (F I T C)、B 2 2 0 R-フィコエリトリン シアニンタンデム (P E - C y 7) および H 2 K d R-フィコエリトリン (P E) (eBioscience, San Diego, CA) に関して、適切な濃度で付加する。以下の抗体を、培養同種異系 M P (C 5 7 B 6 / K a、C D 4 5 . 1 ; 1 2 9、C D 4 5 . 2 ; A K R、H 2 K k) C D 4 5 . 2 ビオチン (eBioscience, San Diego, CA) を伴う M U D 移植片に関して、適切な濃度で付加する。洗浄後、以下の抗体を適切な濃度で付加する：ストレプトアビジン R-フィコエリトリン・タンデム (P E - C y 5)、C D 4 5 . 1 アロフィコシアニン (A P C)、H 2 K k フルオレセイン・イソチオシアネート (F I T C)、M a c - 1 および G r - 1 R-フィコエリトリン・シアニンタンデム (P E - C y 7)、B 2 2 0 パシフィックブルー および C D 3 R-フィコエリトリン (P E) (eBioscience, San Diego, CA)。氷上での 25 分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、遠心分離し、そして P I を含有する S M 中に再懸濁する。細胞を、F A C S により分析する。

10

20

【 0 1 0 1 】

培養由来 M P の凍結：細胞を、2000 万細胞 / ml の濃度で凍結する。85% F C S および 15% D M S O を含有する凍結培地を調製する。培養由来 M P 細胞を計数し、洗浄する。11 00 RPM で遠心分離する。細胞ペレットを 1000 万細胞 / ml で再懸濁する。試験管を静かに混合しながら、等容積の D M S O 凍結培地を、徐々に 1 滴ずつ付加する。凍結バイアル中に細胞を 1 ml / バイアルに分取する。細胞を、- 80 で一晩凍結する。翌日、長期間貯蔵のためにバイアルを液体窒素に移す。

【 0 1 0 2 】

7 . 2 実施例 2 : サブオプティマル用量の H S C と関連した生存を増大するための精製骨髓前駆細胞の使用

30

レシピエントマウスの 100% において放射線防護を提供するために H S C が不適切数で提供された場合に M P が生存を改善し得るか否かを確定するために、これらの試験を設計した。これらの試験は、M P が、同種同系 (図 3)、適合非血縁ドナー (M U D) (図 4)、または完全不適合同種異系設定 (図 5) での精製 H S C 移植後の回復を増大し得るか否かを調べた。これらの試験において、各試験に関する H S C および M P は、同一ドナーに由来した。

【 0 1 0 3 】

H S C をマウス骨髓 (B M) から調製し、L i n^{neg} K T L S - H S C を、C 5 7 B 1 / 6 K A マウス (H - 2 b、C D 9 0 . 1、C D 4 5 . 2) から類別した。図 1 は、C 5 7 B 6 / K a (T h y - 1 . 1、C D 4 5 . 2) からの K T L S H S C に関するソートゲートを示す。全骨髓および c - k i t 濃化後の両方に関して、ゲーティング・プロフィールを示す。このゲーティング戦略により類別された H S C を、移植実験に用いた。

40

【 0 1 0 4 】

M P をマウス骨髓 (B M) から調製し、C 5 7 B 1 / 6 K A マウス (H - 2 b、C D 9 0 . 1、C D 4 5 . 2) から類別した。図 2 は、C 5 7 B 6 / K a (T h y - 1 . 1、C D 4 5 . 2) からの M P に関するソートゲートを示す。全骨髓および c - k i t 濃化後の両方に関して、ゲーティング・プロフィールを示す。このゲーティング戦略により類別された M P を、移植実験に用いた。

【 0 1 0 5 】

0 日目に、分割線量放射線照射 (総計 9 ~ 11 Gy、セシウム源) を用いて、宿主マウス C

50

57B1/Ka (H-2b, CD90.1, CD45.1)、129 (H-2b, CD45.2) または Balb/c (H-2d, CD45.2) を致死照射した。類別HSCおよびMPを所望の用量で併合し、レシピエント動物中に眼窩後方注射により注入した。生存およびドナー・キメラ現象に関して、動物をモニタリングした。

【0106】

図3は、同種同系移植片モデルにおける生存データを示す。50のKTLS C57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.2) HSCを、単独で、または100,000のC57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.2) MPと組合せて、C57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.1) 宿主中に移植した。図3は、HSC移植片へのMPの付加が生存を改善したことを示す。

10

【0107】

図4は、同種異系（適合非血縁ドナー）移植片モデルにおける生存データを示す。100（図4A）または250（図4B）KTLS C57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.2, H2b) HSCを、単独で、または200,000のC57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.2, H2b) MPと組合せて、129 (CD45.1, H2b) 宿主中に移植した。図4は、HSC移植片へのMPの付加が、100および250の幹細胞用量の両方で、生存を改善したことを示す。

【0108】

図5は、同種異系（完全不適合）移植片モデルにおける生存データを示す。500（図5A）または2000（図5B）KTLS C57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.2, H2b) HSCを、単独で、または200,000のC57B6/Ka (Thy-1.1, CD45.2, H2b) MPと組合せて、Balb/c (CD45.1, H2d) 宿主中に移植した。図5は、HSC移植片へのMPの付加が、500および2000の幹細胞用量の両方で、生存を改善したことを示す。

20

【0109】

図6は、3つの移植片モデル（同種同系、適合非血縁ドナーおよび不適合同種異系）に関する生存およびキメラ現象データを要約する。

【0110】

3つのモデル（同種同系、MUDおよび不適合同種異系）すべてにおいて、サブオプティマル用量のHSCと組合せたMPの含入は、HSC単独を上回って生存を改善した。

30

【0111】

7.3 実施例3：サブオプティマル用量のHSCと関連した生存を増大するための同種異系培養由来骨髄前駆細胞の使用

HSC用量が放射線防護を提供するために必要とされる用量より低い場合に、同種異系培養由来MPの含入が適合非血縁ドナー（MUD）HSC移植後の生存率を改善し得たか否かを確定するために、この試験を設計した。

【0112】

HSCをマウス骨髄（BM）から調製し、Lin^{neg/low}KTLS-HSCを、AKRマウス（H-2k, CD90.1, CD45.2）から類別した。c-KitL、FL、TPOおよびIL-6を補足した無血清培地中で、類別細胞をプレート化した。細胞を7日間培養した。培養期間後、細胞を採取し、MP（CMP/GMP/MEP）およびHSC含量に関して分析して、凍結した。図8は、AKR (Thy-1.1, CD45.2, H2k) 培養誘導MPの分析を示す。

40

【0113】

移植当日に、Lin^{neg}KTLS-HSCを、C57B1/Ka (H-2b, CD90.1, CD45.1) マウスから類別した（図7）。AKR KTLS HSCを類別し、記載されたように7日間培養した。この培養期間後、細胞を分析し、凍結した。移植のための細胞用量は、培養中のc-kit⁺細胞の数に基づいて算定する。

【0114】

0日目に、分割線量放射線照射（総計11.5 Gy、セシウム源）を用いて、宿主マウス12

50

9 (H-2b、CD90.2、CD45.2)を致死照射した。培養細胞を凍結し、成育可能性に関してFACSにより再分析し、そしてMP (CMP/GMP/MEP)およびHSC含量に関して分析した。総細胞数ならびにHSCおよびMP細胞数を、ソーティング分析から算定する。マウスへの注入のために用いられる細胞は、染色されない。培養由来MPを所望数のHSCと併合して、眼窩後方注射により状態調節宿主中に移植した。

【0115】

図9は、適合非血縁ドナーKTL5 HSCが完全不適合同種異系培養由来MPと同時に移植された移植モデルにおける生存データを示す。100のKTL5 C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.1、H2b) HSCを、単独で、または500,000のc-kit⁺ AKR (Thy-1.1、CD45.2、H2k) 培養由来MP (MPc) と組合せて、129 (CD45.2、H2d) 宿主中に移植した。HSC移植片へのMPcの付加は、生存を改善した。併合移植片からの生存は、同一用量のHSCまたはMPc単独を移植するより大きい。

10

【0116】

このモデルにおいて、同種異系 (MUD) HSCおよび第三者同種異系培養由来MPの併合移植片は、HSCまたはMP単独を上回って生存を増強する (図9)。

【0117】

図10は、MHC適合非血縁ドナーHSCが2名のMHC不適合ドナー由来のMPcと同時に移植された移植モデルにおける生存データを示す。50の同種異系HSC (Balb/b、H-2b)を、単独で、あるいは1,000,000または2,000,000のプール化同種異系培養由来MP (FVB、H-2q; AKR、H2k) と組合せて、致死照射宿主 (C57B1/Ka、H-2b) 中に移植した。HSC移植片へのMPcの付加は、HSC単独と比較して、生存を改善した。HSCおよびMPcの併合移植片は、HSCまたはMPc移植単独と比較して、生存を改善した。

20

【0118】

本発明の特定実施形態の前記記載は、例証および説明の目的のために提示されてきた。それらは、網羅的であるよう、あるいは開示された正確な形態に本発明を限定するよう意図されないし、そして上記の教示にかんがみて、多数の修正および変更が可能であることは明らかである。本発明の原理ならびにその実際の適用を最良に説明するために、それにより、意図された特定用途に適している場合、本発明をならびに種々の修正を伴う種々の実施形態を最良に利用するために、実施形態を選択し、記載した。

30

【0119】

本明細書中で引用される特許、特許出願、出版物および参考文献はすべて、各々の個々の出版物または特許出願が特定のそして個別に参照により援用されることが示されたのと同程度に、これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1A-B】C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2)からのKTL5 HSCに関するソートゲートを示す。

【図2A-B】C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.2)からのMPに関するソートゲートを示す。

40

【図3】同種同系移植片モデルにおける生存データを示す。

【図4A-B】同種異系 (適合非血縁ドナー) 移植片モデルにおける生存データを示す。

【図5A-B】同種異系 (完全不適合) 移植片モデルにおける生存データを示す。

【図6】3つの移植片モデル (同種同系、適合非血縁ドナーおよび不適合同種異系) に関する生存およびキメラ現象データを要約する。

【図7A-B】実施例3で用いられるKTL5 C57B6/Ka (Thy-1.1、CD45.1、H2b) HSCを精製するために用いられるソーティングを示す。

【図8A-B】AKR (Thy-1.1、CD45.2、H2k) 培養誘導MPの分析を示す。

50

【図9】適合非血縁ドナーK T L S H S Cが完全不適合同種異系培養由来MPと同時に移植された移植モデルにおける生存データを示す。

【図10】M H C適合非血縁ドナーH S Cが2名のM H C不適合ドナー由来のM P cと同時に移植された移植モデルにおける生存データを示す。

【図1A - B】

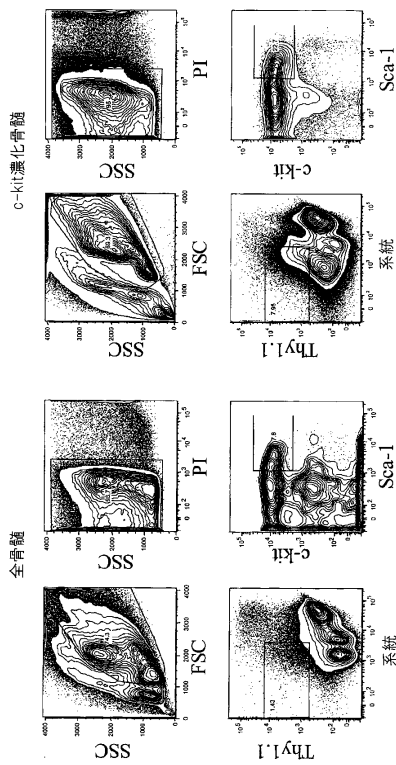


FIG. 1A

FIG. 1B

【図2A - B】

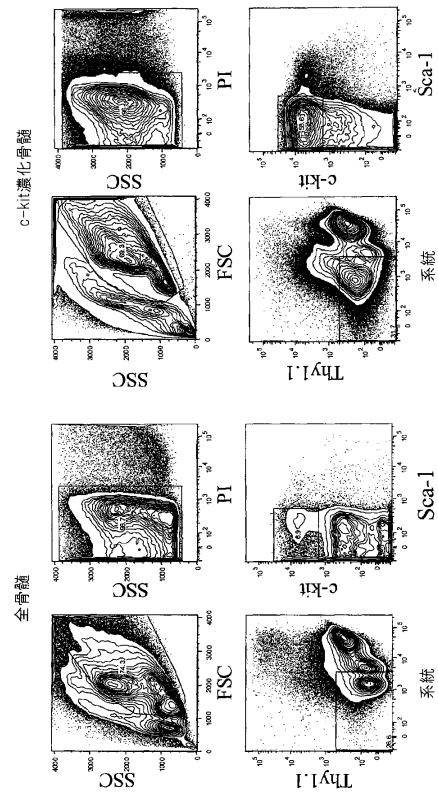


FIG. 2A

FIG. 2B

【 図 3 】

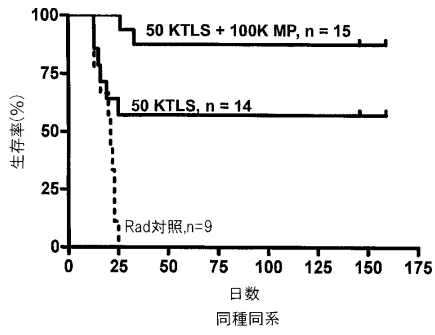


FIG. 3

【 図 4 A - B 】

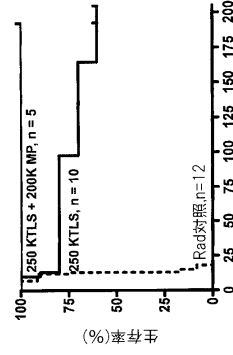


FIG. 4B

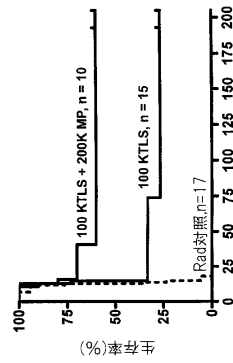


FIG. 4A

【 図 5 A - B 】

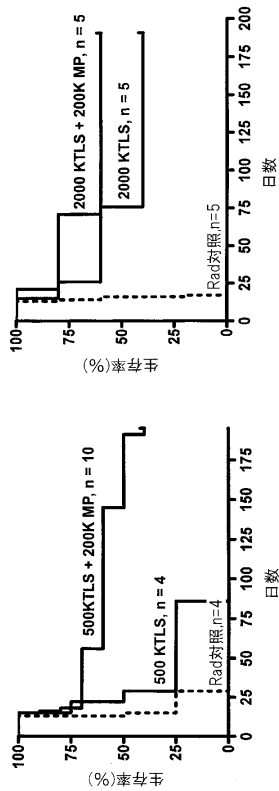


FIG. 5B

FIG. 5A

【 図 6 】

移植片モデル	細胞用量	生存率(%)	長期キメラ現象
同種同系	50 KTLS n = 14	57 %	≤ 94 %
	50 KTLS + 100K MP n = 15	87 %	≤ 92 %
同種異系 適合 非血縁	100 KTLS n = 15	26 %	≤ 68 %
	100 KTLS + 200K MP n = 10	60 %	≤ 93 %
	250 KTLS n = 10	60 %	≤ 80 %
	250 KTLS + 200K MP n = 5	100 %	≤ 81 %
同種異系 C57/B6-> Balb/c	500 KTLS n = 5	0 %	N/A
	500 KTLS + 200K MP n = 10	40 %	≤ 89 %
	1000 KTLS n = 5	0 %	N/A
	1000 KTLS + 200K MP n = 5	20 %	≤ 0.13 %
	2000 KTLS n = 5	40 %	≤ 95 %
	2000 KTLS + 200K MP n = 5	60 %	≤ 93 %

FIG. 6

【 図 7 A - B 】

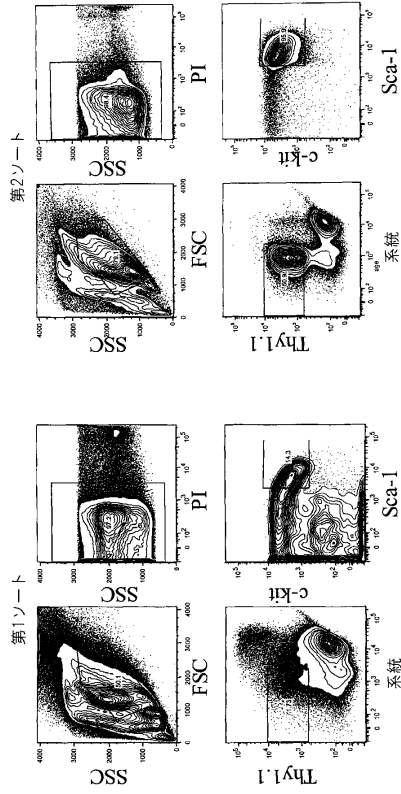


FIG. 7B

FIG. 7A

【 図 8 A - B 】

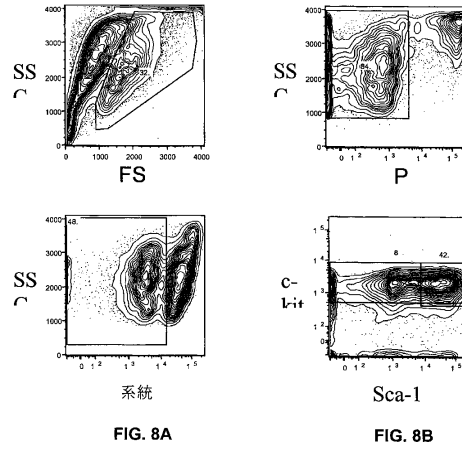


FIG. 8A

FIG. 8B

【 図 9 】

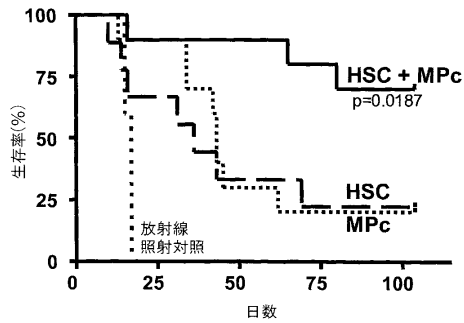


FIG. 9

【 図 10 】

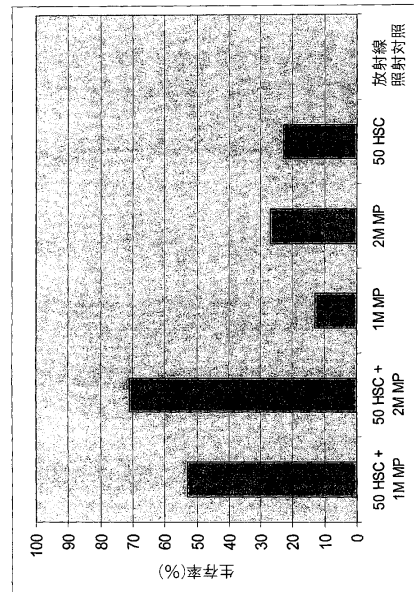


FIG. 10

フロントページの続き

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 クリステンセン, ジュリー リネ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95006, ボールダー クリーク, ローガン クリーク ロ
ード 200

(72)発明者 カルズンキー, ホルガー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, ラーク アベニュー 16
15

審査官 平林 由利子

(56)参考文献 BITMANSOUR, A. et al, Myeloid progenitors protect against invasive aspergillosis and Ps
eudomonas aeruginosa infection following hematopoietic stem cell transplantation, Bloo
d, 2002年, Vol.100, No.13, p.4660-7

ARBER, C. et al. Blood, 2003, Vol.102, No.11, Part 1, p.941A

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00 - 35/76

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)