

(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2014-529406
(P2014-529406A)

(43) 公表日 平成26年11月13日(2014.11.13)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/071 (2010.01)
A 61 K 35/12 (2006.01)
A 61 K 35/32 (2006.01)
A 61 K 35/28 (2006.01)
A 61 K 35/44 (2006.01)

F 1

C 12 N 5/00
A 61 K 35/12
A 61 K 35/32
A 61 K 35/28
A 61 K 35/44

2 O 2 A

テーマコード(参考)

4 B 06 5
4 C 08 1
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-528501 (P2014-528501)
(86) (22) 出願日 平成24年8月27日 (2012.8.27)
(85) 翻訳文提出日 平成26年4月28日 (2014.4.28)
(86) 國際出願番号 PCT/US2012/052575
(87) 國際公開番号 WO2013/033043
(87) 國際公開日 平成25年3月7日 (2013.3.7)
(31) 優先権主張番号 61/528,556
(32) 優先日 平成23年8月29日 (2011.8.29)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/528,563
(32) 優先日 平成23年8月29日 (2011.8.29)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/528,567
(32) 優先日 平成23年8月29日 (2011.8.29)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 514052025
セーフガード セル テクノロジー イン
ク.
アメリカ合衆国、44122 オハイオ州
、クリーブランド、25455 レッチワ
ース ロード
(74) 代理人 100104411
弁理士 矢口 太郎
(72) 発明者 カプラン、アーノルド、アイ.
アメリカ合衆国、44121 オハイオ州
、クリーブランド ハイツ、1300 オ
ークリッジ ドライブ
F ターム(参考) 4B065 AA93X AC12 AC20 BA22 BD14
BD45 CA44

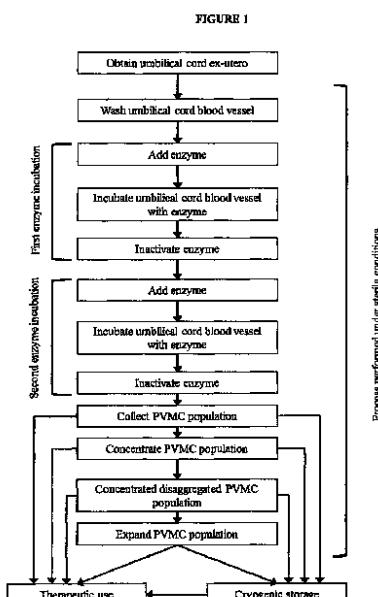
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】血管周囲薬用細胞の単離および治療的使用

(57) 【要約】

本明細書に開示の実施形態は、血管周囲薬用細胞 (perivascular medicinal cells : PVMCs) および PVMCs を単離する方法およびそれらの使用方法を対象とする。本明細書における一部の実施形態は、薬用能力を有する PVMCs の組成物を記載する。一部の実施形態は、PVMCs を臍帯血管から単離する方法を記載する。一部の実施形態は、PVMCs を骨から単離する方法を対象とする。一部の実施形態は、強化された自己骨移植片を作製する方法を記載する。一部の実施形態は、骨再生を刺激する方法であって、治療有効量の骨由来 PVMCs を投与する段階を有する方法を記載する。本明細書に開示の実施形態は、細胞機能に影響を及ぼす疾患を処置する方法を対象とする。本明細書中の一部の実施形態は、部位依存性栄養因子を分泌することができる PVMCs を記載する。一部の実施形態は、骨組織を再建する方法を記載する。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離された P V M C。

【請求項 2】

請求項 1 (P V M C が骨に由来する) の単離された P V M C。

【請求項 3】

骨が骨チップ、小柱骨腔、骨髓、骨腔洗浄またはそれらの組み合わせを具える、請求項 2 に記載の単離された P V M C。

【請求項 4】

請求項 1 (P V M C がアンビリカル・コード血管に由来する) の P V M C。 10

【請求項 5】

骨断片をグラインダまたは骨工場に通すことから成る骨チップを生産する方法。

【請求項 6】

請求項 5 (骨断片が低温的に凍る) の方法

【請求項 7】

骨形成細胞をリン酸カルシウム基板 (高い親和性が骨形成細胞の存在を示す) に細胞の決定吸着を準備に含んでいる P V M C 調合剤から分離する方法。

【請求項 8】

骨移植として使用される骨組織、そして濃縮 P V M C s の人口で骨移植を補充している (i i) の第 1 部分を対象物から引き抜いている (i) から成る強化された、自家組織の骨移植をする方法。 20

【請求項 9】

強化された、自家組織の骨移植をする方法は、以下を含む :

- a. 酵素、機械の力またはそれらの組み合わせを有する主題から細胞サスペンションを骨組織の第 1 部分から引き抜くこと、
- b. 濃縮骨から派生した P V M C s の人口を得るために浮く密度堆積、濾過または遠心分離によって、細胞中止の細胞に集中すること、そして、c. 強化された、自家組織の骨移植のために、濃縮骨から派生した P V M C s の人口を有する主題からの骨移植として使用される骨組織の第 2 部分を補充すること。

【請求項 10】

請求項 9 (骨組織の第 1 部分が大腿骨、大腿骨の末端領域またはそれらの組み合わせの近位領域から生じる) の方法。 30

【請求項 11】

請求項 9 (骨組織の第 2 部分が腸骨頂上、大腿骨、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、肩甲骨またはそれらの組み合わせのうちの少なくとも 1 つから成る人間の骨から生じる) の方法。

【請求項 12】

更に成り立っていて、新しい自家骨髓、被処理自家骨髓、冷凍された自家骨髓、新しい自家骨、被処理自家骨、冷凍された自家骨またはそれらの組み合わせで強化された、自家組織の骨移植を補充している請求項 9 の方法。 40

【請求項 13】

複数の単離された P V M C s および薬学的に受け入れられるキャリアの治療上有効量から成る医薬品組成物。

【請求項 14】

複数の P V M C s が骨、アンビリカル・コード血管、解剖的なソースを含んでいる P V M C s またはそれらの組み合わせに由来する P V M C s を具える、請求項 13 に記載の医薬品組成物。

【請求項 15】

骨が骨チップ、小柱骨腔、骨髓、骨腔洗浄またはそれらの組み合わせを具える、請求項 14 に記載の医薬品組成物。 50

【請求項 16】

骨髄細胞から更に成っている請求項13の医薬品組成物。

【請求項 17】

足場材料から更に成っている請求項13の医薬品組成物。

【請求項 18】

足場材料が骨チップ、セラミック系骨移植代理、リン酸カルシウム・セラミック、硫酸カルシウム・セラミック、生体ガラス、ポリマー・ベースの骨移植代理、分解可能なおよび非分解性ポリマー、被処理同種移植骨材料、鉱化された被処理同種移植、d e m i n e r a l i z e d された被処理同種移植、コラーゲン・スポンジまたはそれらの組み合わせを具える、請求項17に記載の医薬品組成物。

10

【請求項 19】

その必要の主題にP V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成るアポトーシスを調整する方法。

【請求項 20】

その必要の主題にP V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る有糸分裂を調整する方法。

【請求項 21】

その必要の主題にP V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る脈管形成を調整する方法。

【請求項 22】

その必要の主題にP V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る骨形成を調整する方法。

20

【請求項 23】

請求項22（血管周囲医薬の細胞が骨芽細胞を形成する能力を有する）の方法。

【請求項 24】

その必要の主題にP V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る免疫調節の方法。

【請求項 25】

複数のP V M C s および受け入れられるキャリアから成る組成物。

30

【請求項 26】

複数のP V M C s が骨、アンビリカル・コード血管またはそれらの組み合わせに由来するP V M C s を具える、請求項25に記載の組成物。

【請求項 27】

26（骨が骨チップ、骨髄組織および他の組織から成る）が骨（インター髄運河、骨チップ、小柱骨腔、骨腔洗浄またはそれらの組み合わせからの骨髄）を圧縮するというクレームの組成物。

【請求項 28】

骨髄細胞から更に成っている請求項25の組成物。

【請求項 29】

足場材料から更に成っている請求項25の組成物。

40

【請求項 30】

足場材料が骨チップ、セラミック系骨移植代理、リン酸カルシウム・セラミック、硫酸カルシウム・セラミック、生体ガラス、ポリマー・ベースの骨移植代理、分解可能なおよび非分解性ポリマー、被処理同種移植骨材料、鉱化された被処理同種移植、d e m i n e r a l i z e d された被処理同種移植、コラーゲン・スポンジまたはそれらの組み合わせを具える、請求項29に記載の組成物。

【請求項 31】

P V M C s を分離すること間の方法は、方法に骨を入れる：主題から骨組織の検体を提供している（i）、P V M C s を骨から抽出している（ii）、そして、抽出されたP V M C s に集中している（iii）。

50

【請求項 3 2】

方法クレーム 3 1 (骨組織を磨くことを更に含む)。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 (P V M C s を抽出することが成り立つ) の方法 : 酵素の消化、機械の力またはそれらの組み合わせによって、細胞サスペンションを骨組織から引き抜いている (i) 、そして、浮く密度堆積、濾過、遠心分離またはそれらの組み合わせによって、P V M C s の人口を細胞中止から切り離している (ii) 。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 (酵素の消化が P V M C の付属品を小さい血管の基底膜から隔離する一つ以上の酵素を使用する) の方法。 10

【請求項 3 5】

請求項 3 1 の方法、抽出された P V M C s に集中することが、成り立っている方法によって、成し遂げられる使用する P V M C . 上の細胞表面抗原に、親和性を有する抗体を含んでいる磁気ビーズの

【請求項 3 6】

請求項 3 5 (抗体が反 C D 1 4 6 、反 C D 1 0 5 、反 C D 1 6 6 、反 C D 2 7 1 またはそれらの組み合わせから選択される) の方法。

【請求項 3 7】

その必要の主題に P V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る細胞機能に影響を及ぼす疾患を治療する方法。 20

【請求項 3 8】

請求項 3 7 (P V M C s がサイトに依存する栄養に関する要因を隠すことができる) の方法。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 (サイトに依存する栄養に関する要因がプロスタグランジン E 2 (P G E 2) から選択される) の中で方法、間質細胞は、要因 1 を引き出した (S D F 1 V a s c u l a r 内皮成長因子 (V E G F) V E G F 1 6 5 、インターロイキン 1 (I L)

) インターロイキン 6 (I L 6) インターロイキン 7 (I L 7) インターロイキン 8 (I L 8) インターロイキン 1 2 (I L 1 2) インターロイキン 1 6 (I L 1 6) 肝細胞増殖因子 (H G F) トランスフォーミング成長因子 (T G F) 塩基性線維芽細胞成長因子 (b F G F) 顆粒白血球 大食細胞コロニー刺激因子 (G M C S F) 30

インシュリン様成長因子 1 (I G F 1) インドールアミン 2 , 3 ジオキシゲナーゼ (I D O) インターロイキン 1 0 (I L 1 0) ヒト白血球抗原 G (H L A G) 白血病抑制因子 (L I F) クラス II 主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) e o t a x i n 、顆粒白血球、起動、表されて、分泌される (R A N T E S) 通常の T 細胞、 I L 1 受容体アントゴニスト (I L 1 r a) 腫瘍壞死 f a c t o r 、 T N F 、腫瘍壞死 f a c t o r (T N F) 上皮の好中球を起動させているタンパク質 7 8 (E N A 7 8) に調整されて、コロニー刺激因子 (G c s f) e o t a x i n 、单球化学遊走物質タンパク質 1 (M C P 1) 单球化学遊走物質タンパク質 3 (M C P 3) 大食細胞炎症性のタンパク質 1 (M I P 1) 大食細胞炎症性のタンパク質 3 (M I P 3) 40

大食細胞炎症性のタンパク質 1 (M I P 1) 細胞接着分子 1 (I C A M 1) V C A M 1 、顆粒白血球コロニー刺激因子 (G C S F) 成長ホルモン、幹細胞要因 (S C F) 甲状腺刺激ホルモン (T S H) C D 4 0 および C D 4 0 リガンド、胎盤成長因子 (P 1 G F) e o t a x i n 3 、フラクタルキン、上皮の好中球を起動させているタンパク質 7 8 (E N A 7 8) I n t e r f e r o n 誘導可能な T 細胞 化学遊走物質 (i T A C) 成長調整された発ガン遺伝子 (G R O) 発展調整された発ガン遺伝子 (G R O) I n t e r f e r o n 誘導可能なタンパク質 1 0 (I P 1 0) C D

1 4 6 、 C D 1 0 5 、 C D 1 6 6 、 C D 4 4 、 C D 2 7 1 、 C D 7 3 、 C D 9 0 、 C D 4 4 、 C D 1 0 またはそれらの組み合わせ。

【請求項 4 0】

疾患が虚血性心疾患、燃焼、ストローク、炎症性腸疾患、クローン病、慢性関節リウマチ、狼瘡、筋萎縮性側索硬化症、脊髄の損傷、ポリ外傷、骨骨折、糖尿病またはそれらの組み合わせである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 41】

その必要の主題に P V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る骨組織を再建する方法。

【請求項 42】

その必要の主題に P V M C s の治療上有効量から成る組成物を与えることから成る骨の範囲内で金属装置を固定する方法。

【請求項 43】

請求項 42 (金属装置が頭蓋顔面骨、頭蓋、下顎骨、 clavicle 、肩甲骨、胸骨、肋骨、上腕骨、尺骨、半径、心皮、指骨、掌骨、膝蓋骨、腓骨、大腿骨、脛骨、足根骨、中足骨、仙骨、股関節または腰椎から選択される骨において、固定される) の方法。

【請求項 44】

P V M C s をアンビリカル・コード血管から分離する方法は、以下を含む：臍帯血容器を消耗させること、 P V M C を分離するために第 1 の酵素混合物をアンビリカル・コード血管に加えること、媒体を加えること、そして、媒体を加えた後に洗浄溶離剤を集めて。そこにおいて、洗浄溶離剤は、内皮、内皮細胞下細胞およびそれらの組み合わせから選択される細胞の細胞懸濁液から成る。

【請求項 45】

アンビリカル・コード血管が静脈または動脈である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

第 1 の酵素の混合物がコラゲナーゼから選択される酵素、中性であるか酸性プロテアーゼ、 G A G a s e s 、メタロプロテアーゼ clostrypain 、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システイン・プロテアーゼおよびそれらの組み合わせを具える、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

請求項 44 に記載の方法において、第 1 の酵素混合物が、さらに、媒体、抗生物質およびそれらの組み合わせから選択される第 2 の薬品を含む方法。

【請求項 48】

請求項 47 (媒体がタイロードの溶液、泌乳されたリングルの解決手段、 acetated されたリンガー溶液、 T R I S を緩衝された食塩水 (T B S) ハンクのバランスのよい食塩水 (H B S S) アールのバランスのよい食塩水 (E B S S) スタンダード塩性のケン酸塩 (S S C) H E P E S を緩衝された食塩水 (H B S) G e y のバランスのよい食塩水 (G B S S) 最小限の必須の中程度のイーグル 変更態様 (M E M) リン酸緩衝食塩水 (P B S) およびそれらの組み合わせから選択される) の方法。

【請求項 49】

請求項 47 (抗生物質がストレプトマイシン、ゲンタマイシン、菌ゾーン、 p e n i c i l l i n G 、アンホテリシン B およびそれらの組み合わせから選択される) の方法。

【請求項 50】

臍帯血容器を消耗させることがアンビリカル・コード血管に針を中心に嵌入して、媒体を有するアンビリカル・コード血管を洗浄することを具える、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 51】

請求項 44 (媒体がタイロードの溶液、泌乳されたリングルの解決手段、 acetated されたリンガー溶液、 T R I S を緩衝された食塩水 (T B S) ハンクのバランスのよい食塩水 (H B S S) アールのバランスのよい食塩水 (E B S S) スタンダード塩性のケン酸塩 (S S C) H E P E S を緩衝された食塩水 (H B S) G e y のバランスのよい食塩水 (G B S S) 最小限の必須の中程度のイーグル 変更態様 (M E M) リン酸緩衝食塩水 (P B S) およびそれらの組み合わせから選択される) の方法。

【請求項 52】

10

20

30

40

50

請求項 4 4 の方法（約 15 の？C から約 38 の？C . にわたっている温度で第 1 の酵素混合物を有するアンビリカル・コード血管を暖めることを更に含む）

【請求項 5 3】

請求項 5 2（アンビリカル・コード血管が約 15 ~ 約 60 分間の第 1 の酵素混合物によって、暖められてもよい）の方法。

【請求項 5 4】

更に成り立っていて、酵素を不活性化している請求項 5 2 の方法。

【請求項 5 5】

そこにおいて、請求項 4 4 の中で方法、媒体は、タイロードの溶液、泌乳されたリングルの解決手段、a c e t a t e d されたリンガー溶液、T R I S を緩衝された食塩水（T B S ）ハンクのバランスのよい食塩水（H B S S ）アールのバランスのよい食塩水（E B S S ）クエン酸（S S C ）スタンダード食塩水、H E P E S を緩衝された食塩水（H B S ）G e y のバランスのよい食塩水（G B S S ）最小限の必須の中程度のイーグル 変更態様（ M E M ）リン酸緩衝食塩水（P B S ）またはそれらの組み合わせから選択される。10

【請求項 5 6】

請求項 4 4 の方法（第 2 の酵素混合物をアンビリカル・コード血管に加えることを更に含む）。

【請求項 5 7】

そこにおいて、請求項 5 6 の中で方法、第 2 の酵素混合物は、コラゲナーゼ、中性であるか酸性プロテアーゼ、G A G a s e s 、メタロプロテアーゼ c l o s t r i p a i n 、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システイン・プロテアーゼまたはそれらの組み合わせから選択される酵素から成る。20

【請求項 5 8】

請求項 5 6 に記載の方法において、第 2 の酵素混合物が、さらに、媒体、抗生物質およびそれらの組み合わせから選択される第 2 の薬品を含む方法。

【請求項 5 9】

請求項 5 6（媒体がタイロードの溶液、泌乳されたリングルの解決手段、a c e t a t e d されたリンガー溶液、T R I S を緩衝された食塩水（T B S ）ハンクのバランスのよい食塩水（H B S S ）アールのバランスのよい食塩水（E B S S ）スタンダード塩性のクエン酸塩（S S C ）H E P E S を緩衝された食塩水（H B S ）G e y のバランスのよい食塩水（G B S S ）最小限の必須の中程度のイーグル 変更態様（ M E M ）リン酸緩衝食塩水（P B S ）またはそれらの組み合わせから選択される）の方法。30

【請求項 6 0】

請求項 5 6（抗生物質がストレプトマイシン、ゲンタマイシン、菌ゾーン、p e n i c i l l i n G 、アンホテリシン B またはそれらの組み合わせから選択される）の方法。

【請求項 6 1】

請求項 5 6 の方法（約 15 の？C から約 38 の？C . にわたっている温度で第 2 の酵素混合物を有するアンビリカル・コード血管を暖めることを更に含む）

【請求項 6 2】

請求項 6 1（アンビリカル・コード血管が約 15 ~ 約 60 分間の第 2 の酵素混合物によって、暖められる）の方法。

【請求項 6 3】

更に成り立っていて、酵素を不活性化している請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 4】

請求項 5 6 の方法（第 2 の酵素混合物を有するアンビリカル・コード血管を暖めた後に第 2 の媒体をアンビリカル・コード血管に加えることを更に含む）。

【請求項 6 5】

請求項 6 4（第 2 の媒体がタイロードの溶液、泌乳されたリンガー溶液、a c e t a t e d されたリンガー溶液、T R I S を緩衝された食塩水（T B S ）ハンクのバランスのよ40

50

い食塩水(H B S S)アールのバランスのよい食塩水(E B S S)スタンダード塩性のクエン酸塩(S S C)H E P E Sを緩衝された食塩水(H B S)G e yのバランスのよい食塩水(G B S S)最小限の必須の中程度のイーグル 変更態様(M E M)リン酸緩衝食塩水(P B S)またはそれらの組み合わせから選択される)の方法。

【請求項 6 6】

請求項 6 4 の方法(媒体を加えた後に第 2 の洗浄溶離剤を集めることを更に含む)。

【請求項 6 7】

第 2 の洗浄溶離剤が内皮、内皮細胞下細胞およびそれらの組み合わせから選択される細胞の細胞懸濁液を具える、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

請求項 6 6 の方法(媒体を有する第 2 の溶離剤を洗うことを更に含む)。

【請求項 6 9】

そこにおいて、請求項 6 8 の中で方法、媒体は、タイロードの溶液、泌乳されたリンガー溶液、a c e t a t e d されたリンガー溶液、T R I S を緩衝された食塩水(T B S)ハンクのバランスのよい食塩水(H B S S)アールのバランスのよい食塩水(E B S S)クエン酸(S S C)スタンダード食塩水、H E P E S を緩衝された食塩水(H B S)G e yのバランスのよい食塩水(G B S S)最小限の必須の中程度のイーグル 変更態様(M E M)リン酸緩衝食塩水(P B S)またはそれらの組み合わせから選択されてもよい。

【請求項 7 0】

請求項 6 7 (細胞中止が P V M C s から成ってもよい)の方法。

【請求項 7 1】

請求項 6 7 の方法(細胞中止を細胞培養培地で培養することを更に含む)。

【請求項 7 2】

請求項 7 1 (細胞中止が P V M C s およびそこにおいて、P V M C s が細胞培養皿に付着できることを成ってもよい)の方法。

【請求項 7 3】

請求項 7 0 の方法(濃縮分解された P V M C s の人口を得るために P V M C s に集中することを更に含む)。

【請求項 7 4】

請求項 6 7 の方法(P V M C s を中止が細胞培養培地で培養した細胞から分離することを更に含む)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2011年8月29日付で出願された米国特許仮出願第 6 1 / 5 2 8 , 5 5 6 号、2011年8月29日付で出願された米国特許仮出願第 6 1 / 5 2 8 , 5 6 3 号、および2011年8月29日付で出願された米国特許仮出願第 6 1 / 5 2 8 , 5 6 7 号の恩典を主張するものであり、これらの各々は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 2】

本明細書中の実施形態は、血管周囲薬用細胞(p e r i v a s c u l a r m e d i c i n a l c e l l s : 「 P V M C s 」)を単離するための方法を対象とする。一部の実施形態は、P V M C s を臍帯血管から単離するための方法を対象とする。一部の実施形態は、P V M C s を臍帯血管から単離するための方法であって、前記臍帯血管から排出する工程と；第1の酵素混合物を前記臍帯血管に添加して P V M C を解離させる工程と；培地を添加する工程と；前記培地の添加後に洗浄溶出液を採取する工程とを有する方法を対象とし、ここで前記洗浄溶出液は、内皮細胞、内皮下細胞、およびそれらの組合せから選択

10

20

30

40

50

される細胞の細胞浮遊液を有する。一部の実施形態において、前記臍帯血管は、静脈または動脈である。

【0003】

一部の実施形態において、前記第1の酵素混合物は、コラゲナーゼ、中性または酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、およびそれらの組合せから選択される酵素を有する。一部の実施形態において、前記第1の酵素混合物は、培地、抗生物質、およびそれらの組合せから選択される第2の薬剤をさらに有する。一部の実施形態において、前記培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline:TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution:HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution:EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(standard saline citrate:SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline:HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution:GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification:-MEM)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline:PBS)、およびそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、前記抗生物質は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、およびそれらの組合せから選択される。
10

【0004】

前記方法の一部の実施形態は、前記臍帯血管を前記第1の酵素混合物とともに約15から約38の範囲の温度で恒温放置する工程をさらに有する。一部の実施形態では、前記臍帯血管は前記第1の酵素混合物とともに約15から約60分間恒温放置がある。一部の実施形態において、前記方法は、前記酵素を不活性化する工程をさらに有する。
20

【0005】

前記方法の一部の実施形態において、前記培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline:TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution:HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution:EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(standard saline citrate:SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline:HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution:GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification:-MEM)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline:PBS)、またはそれらの組合せから選択される。
30

【0006】

前記方法の一部の実施形態は、第2の酵素混合物を前記臍帯血管に添加する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記第2の酵素混合物は、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せから選択される酵素を有する。一部の実施形態において、前記第2の酵素混合物は、培地、抗生物質、およびそれらの組合せから選択される第2の薬剤をさらに有する。一部の実施形態において、前記培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline:TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution:HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution:
40

on : E B S S)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate : S S C)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES - buffered saline : H B S)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution : G B S S)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification : - M E M)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline : P B S)、またはそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、前記抗生物質は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択される。

【0007】

10

前記方法の一部実施形態は、前記臍帯血管を前記第2の酵素混合物とともに約15から約38の範囲の温度で恒温放置する工程をさらに有する。一部の実施形態では、前記臍帯血管は前記第2の酵素混合物とともに約15から約60分間恒温放置される。一部の実施形態において、前記方法は、前記酵素を不活性化する工程をさらに有する。

【0008】

20

前記方法の一部実施形態は、前記臍帯血管を前記第2の酵素混合物とともに恒温放置した後に該臍帯血管に第2の培地を添加する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記第2の培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS - buffered saline : T B S)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution : H B S S)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution : E B S S)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate : S S C)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES - buffered saline : H B S)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution : G B S S)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification : - M E M)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline : P B S)、またはそれらの組合せから選択される。

【0009】

30

前記方法の一部の実施形態は、前記培地を添加した後に第2の洗浄溶出液を採取する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記第2の洗浄溶出液は、内皮細胞、内皮下細胞、およびそれらの組合せから選択される細胞の細胞浮遊液を有する。

【0010】

40

前記方法の一部の実施形態は、前記第2の溶出液を培地で洗浄する工程をさらに有する。一部の実施形態では、前記培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS - buffered saline : T B S)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution : H B S S)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution : E B S S)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate : S S C)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES - buffered saline : H B S)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution : G B S S)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification : - M E M)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline : P B S)、またはそれらの組合せから選択され得る。前記方法の一部の実施形態において、前記細胞浮遊液は、P V M C sを有することがある。

【0011】

50

前記方法の一部の実施形態は、細胞培養培地中で前記細胞浮遊液を培養する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記細胞浮遊液は、P V M C sを有することがあり、ここで前記P V M C sは、細胞培養皿への接着が可能である。前記方法の一部の実施形

態は、前記 P V M C s を濃縮して、濃縮された脱凝集 P V M C s の集団を得る工程をさらに有する。

【 0 0 1 2 】

前記方法の一部の実施形態は、前記 P V M C s を細胞培養培地中で培養された前記細胞浮遊液から単離する工程をさらに有する。

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態は、P V M C s を骨から単離するための方法を対象とする。一部の実施形態は、P V M C s を骨から単離するための方法であって、(i) 被検者からの骨組織の試料を提供する工程と；(i i) 前記 P V M C s を前記骨から抽出する工程と；(i i i) 前記抽出された P V M C s を濃縮する工程とを有する方法を対象とする。一部の実施形態において、前記 P V M C s を抽出する工程は、(i) 細胞浮遊液を前記骨組織から酵素消化、機械力、またはそれらの組合せによって抽出する段階と；(i i) P V M C s の集団を前記細胞浮遊液から浮遊密度沈降、濾過、遠心分離、またはそれらの組合せによって分離する段階とを有する。一部の実施形態は、前記骨組織を破碎する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記酵素消化は、小血管の基底膜から P V M C の付着を切断する 1 若しくはそれ以上の酵素を使用する。一部の実施形態では、前記抽出された P V M C s を濃縮する工程は、前記 P V M C 上の細胞表面抗原に対して親和性を有する抗体を含有する磁性ビーズの使用を有する方法によって果たされる。一部の実施形態において、前記抗体は、抗 C D 1 4 6 、抗 C D 1 0 5 、抗 C D 1 6 6 、抗 C D 2 7 1 、またはそれらの組合せから選択される。

10

20

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態は、P V M C s を有する組成物を対象とする。一部の実施形態は、複数の P V M C s と許容され得る担体とを有する組成物である。前記組成物の一部の実施形態において、前記複数の P V M C s は、骨、臍帯血管、またはそれらの組合せに由来する P V M C s を有する。前記組成物の一部の実施形態において、前記骨は、骨細片、骨髄組織および他の組織、緻密骨、髓間管 (intermedullary canal) からの骨髄、骨細片、骨梁骨小腔、骨小腔洗浄、またはそれらの組合せを有する。前記組成物の一部の実施形態は、骨髄細胞をさらに有する。前記組成物の一部の実施形態は、足場材料をさらに有する。前記組成物の一部の実施形態において、前記足場材料は、骨細片、セラミック系代用骨移植片、リン酸カルシウムセラミックス、硫酸カルシウムセラミックス、バイオガラス、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、加工同種骨移植材料、石灰化加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、コラーゲンスponジ、またはそれらの組合せを有する。

30

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態は、P V M C を対象とする。一部の実施形態において、前記 P V M C は、骨に由来する。一部の実施形態において、前記 P V M C は、臍帯血管に由来する。一部の実施形態において、前記骨は、骨細片、骨梁骨小腔、骨髄、骨小腔洗浄、またはそれらの組合せを有する。

【 0 0 1 6 】

40

一部の実施形態は、P V M C s を有する医薬組成物を対象とする。一部の実施形態は、治療有効量の複数の単離された P V M C s と医薬的に許容され得る担体とを有する医薬組成物を対象とする。一部の実施形態において、前記複数の P V M C s は、骨、臍帯血管、P V M C s を含有する解剖学的源、またはそれらの組合せに由来する P V M C s を有する。一部の実施形態において、前記骨は、骨細片、骨梁骨小腔、骨髄、骨小腔洗浄、またはそれらの組合せを有する。前記医薬組成物の一部の実施形態は、骨髄細胞をさらに有する。前記医薬組成物の一部の実施形態は、足場材料をさらに有する。一部の実施形態において、前記足場材料は、骨細片、セラミック系代用骨移植片、リン酸カルシウムセラミックス、硫酸カルシウムセラミックス、バイオガラス、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、加工同種骨移植材料、石灰化加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、コラーゲンスponジ、またはそれらの組合せを有する。

50

【0017】

一部の実施形態は、強化された自家骨移植片を作製する方法であって、(i)骨移植片として使用される骨組織の第1の部分を被検者から抽出する工程、その後(ii)前記骨移植片に濃縮されたPVMCsの集団を補充する工程を有する方法を対象とする。

【0018】

一部の実施形態は、強化された自家骨移植片を作製するための方法であって、
a. 細胞浮遊液を被検者からの骨組織の第1の部分から酵素、機械力、またはそれらの組合せで抽出する工程と；

b. 前記細胞浮遊液中の細胞を浮遊密度沈降、濾過、または遠心分離によって濃縮して、濃縮された骨由来PVMCsの集団を獲得する工程と；

c. 前記被検者からの骨移植片として使用するための骨組織の第2の部分に濃縮された骨由来PVMCsの前記集団を補充して、前記強化された自家骨移植片を作製する工程とを有する方法を対象とする。

10

【0019】

一部の実施形態において、骨組織の前記第1の部分は、大腿骨の近位領域、大腿骨の遠位領域、またはそれらの組合せが起源である。一部の実施形態において、骨組織の前記第2の部分は、腸骨稜、大腿骨、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、肩甲骨、またはそれらの組合せのうちの少なくとも1つを有する人骨が起源である。一部の実施形態は、前記強化された自家骨移植片に新鮮な自家骨髓、加工自家骨髓、冷凍自家骨髓、新鮮な自家骨、加工自家骨、冷凍自家骨、またはそれらの組合せを補充する工程をさらに有する。

20

【0020】

一部の実施形態は、細胞機能に影響を及ぼす疾患を処置する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。一部の実施形態において、前記PVMCsは、部位依存性栄養因子を分泌することができる。一部の実施形態において、前記部位依存性栄養因子は、プロスタグランジンE2 (prostaglandin E2 : PGE2)、間質細胞由来因子-1 (stromal-cell derived factor-1 : SDF-1 血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、VEGF165、インターロイキン-1 (interleukin-1 : IL-1)、インターロイキン-6 (interleukin-6 : IL-6)、インターロイキン-7 (interleukin-7 : IL-7)、インターロイキン-8 (interleukin-8 : IL-8)、インターロイキン-12 (interleukin-12 : IL-12)、インターロイキン-16 (interleukin-16 : IL-16)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor : HGF)、トランスフォーミング成長因子ベータ (transforming growth factor beta : TGF-β)、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor : GM-CSF)、インスリン様成長因子1 (insulin-like growth factor 1 : IGF-1)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (indoleamine 2,3-dioxygenase : IDO)、インターロイキン-10 (interleukin-10 : IL-10)、ヒト白血球抗原G (human leukocyte antigen G : HLA-G)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF)、クラスII主要組織適合性複合体 (class II major histocompatibility complex : MHC)、エオタキシン、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G-CSF)、活性化により調節される、発現され分泌された正常T細胞 (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted : RANTES)、IL-1受容体アゴ

30

40

50

ニスト(IL-1 receptor antagonist : IL-1ra)、腫瘍壞死因子-(tumor necrosis factor-)、TNF-、腫瘍壞死因子-(tumor necrosis factor- : TNF-)、上皮好中球活性化タンパク質78(epithelial neutrophil-activating protein 78 : ENA-78)、エオタキシン、単球走化性タンパク質1(monocyte chemoattractant protein 1 : MCP-1)、単球走化性タンパク質3(monocyte chemoattractant protein 3 : MCP-3)、マクロファージ炎症性タンパク質-1(macrophage inflammatory protein-1 : MIP-1)、マクロファージ炎症性タンパク質-3(macrophage inflammatory protein-3 : MIP-3)、マクロファージ炎症性タンパク質-1(macrophage inflammatory protein-1 : MIP-1)、細胞間接着分子-1(intercellular adhesion molecule-1 : ICAM-1)、VCAM-1、顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF)、成長ホルモン、幹細胞因子(stem cell factor : SCF)、甲状腺刺激ホルモン(thyroid-stimulating hormone : TSH)、CD40およびCD40リガンド、胎盤成長因子(placental growth factor : PlGF)、エオタキシン-3、フラクタルカイン、上皮好中球活性化タンパク質78(epithelial neutrophil-activating protein 78 : ENA-78)、インターフェロン誘導性T細胞アルファ化学誘引物質(Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant : i-TAC)、成長調節癌遺伝子-アルファ(growth regulated oncogene-alpha : GRO)、成長調節癌遺伝子-ベータ(growth regulated oncogene-beta : GRO)、インターフェロン誘導性タンパク質-10(Interferon-inducible protein-10 : IP-10)、CD146、CD105、CD166、CD44、CD271、CD73、CD90、CD10、またはそれらの組合せから選択される。一部の実施形態において、前記疾患は、虚血性心疾患、熱傷、脳卒中、炎症性腸疾患、クローン病、関節リウマチ、狼瘡、筋萎縮性側索硬化症、脊髄損傷、多発外傷、骨折、糖尿病、またはそれらの組合せである。
10
20
30
30

【0021】

一部の実施形態は、骨組織を再建する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。

【0022】

一部の実施形態は、金属デバイスを骨の中に固定する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。一部の実施形態では、前記金属デバイスは、頭蓋顔面骨、頭蓋骨、下頸骨、鎖骨、肩甲骨、胸骨、肋骨、上腕骨、尺骨、橈骨、心皮、指節骨、中手骨、膝蓋骨、腓骨、大腿骨、脛骨、足根骨、中足骨、仙骨、寛骨、または腰椎から選択される骨内に固定される。
40

【0023】

一部の実施形態は、アポトーシスを修飾する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。

【0024】

一部の実施形態は、有糸分裂を修飾する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。

【0025】

一部の実施形態は、血管新生を修飾する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。

【0026】

一部の実施形態は、骨形成を修飾する方法であって、治療有効量の P V M C s を有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。一部の実施形態において、前記血管周囲薬用細胞は、骨芽細胞を形成する能力を有する。

【0027】

一部の実施形態は、免疫修飾方法であって、治療有効量の P V M C s を有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する方法を対象とする。

【0028】

一部の実施形態は、骨細片を製造する方法であって、骨断片を破碎機またはボーンミルに通す工程を有する方法を対象とする。一部の実施形態では、前記骨断片は極低温冷凍される。

10

【0029】

一部の実施形態は、骨形成原細胞を P V M C 調製物から分離する方法であって、リン酸カルシウム基材への前記調製物中の細胞の吸着を判定する工程を有する方法であって、高い親和性は、骨形成原細胞の存在を示す方法を対象とする。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、本明細書に記載の実施形態に従って P V M C s を臍帯血管から単離するための例示的工程を図示するフローチャートである。

20

【発明を実施するための形態】

【0031】

一部の実施形態は、一般に、細胞、ヒト組織に関し、より詳細には、ヒト組織由来 P V M C s 、ヒト組織由来 P V M C s を使用する方法、骨由来および臍帯血管由来 P V M C s を含有する組成物、ならびに骨由来および臍帯血管由来 P V M C s を調製および使用するためのシステムに関する。

【0032】

間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells : M S C s) の周皮細胞としての同定は、骨形成、再生、および修復のプロセスに新しい意味を持たせた。成長因子およびシグナル伝達分子が M S C s と一緒にこれらのプロセスにおいて重要な役割を果たす。

【0033】

新たな血管系の形成もまた、骨成長、再生、および修復において、前記プロセスを駆動する点でも、骨形成を方向づける点でも、重大な役割を果たす。血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor : P D G F) などのシグナル伝達分子は、骨への骨芽細胞分化を刺激する機能があると考えられる。生理的には、P D G F s は、周皮細胞をそれらの反管腔側の在所から損傷部位に動員すること、前記細胞集団の増殖を誘発すること、ならびに骨芽細胞の成長および分化を制御することができ、新たな血管形成を促進することもできる。

30

【0034】

収率、一貫性、および / または純度が増した活性 P V M C s の集団を迅速かつ確実に調製することができ、それによって前記細胞の抽出後操作の必要を低減または排除することができる、交代のアプローチが必要とされている。理想的には、この細胞集団は、レシピエントへのそれらの直接配置に適している手法で獲得されることになる。

40

【0035】

インビトロで、周皮細胞、すなわち血管周囲細胞は、骨原性、軟骨原性、脂肪原性、および筋原性系列への多分化能があり、それらの細胞表面発現プロファイル (C D 1 4 6 + 、 C D 3 4 - 、 C D 4 5 、および C D 4 6 -) の点で M S C s に類似している。

【0036】

局在血管周囲細胞は、生理的骨治癒 (すなわち、仮骨形成) に一定の役割を果たすことができる。さらに、血管系による軟骨の軟骨内置換は、血管周囲細胞を損傷部位にもたらす。これらの血管周囲細胞は、同所性および異所性位置両方で血管によって駆動される骨

50

における分化が可能であり得る。

【0037】

骨損傷、例えば、限定ではないが骨折は、以前には連結していた2つの骨片間の分離を特徴とし得る。前記2つの骨片間に作られる間隙は、間葉前駆細胞で満たされ、間葉前駆細胞が、軟骨に分化する（機械的に不安定な骨折箇所）、または血管を前記骨折箇所にまたがらせる（機械的に安定した骨折箇所）。これらの空間を満たす細胞が前記間隙にまたがり、結合組織を形成する骨折端間の接続を提供する。骨損傷後の前記接続空間全体にわたる前記骨折箇所外での骨形成の駆動因子は血管であり、該血管は、前記前駆細胞を骨形成性骨芽細胞になるように方向づけ、これらの骨芽細胞は、それらの基底外側が該血管に対向するように方向づけられ、協調して、それらの先端側部からそれらは類骨を分泌し、類骨が最終的に石灰化されて体重支持骨を形成する。一部の実施形態では、本明細書における実施形態の前記PVMCsを使用して、間葉前駆細胞の役割を果たすことができる。

10

【0038】

自家骨移植は、例えば、限定ではないが骨損傷後、局所的骨欠損が存在する場合、および偽関節の際、骨原性再生を誘導するための有効なツールであり得る。理論により拘束されることを望まないが、骨髓穿刺濃縮物（bone marrow aspiration concentration : BMAC）を用いる自家骨移植は、間葉幹細胞を含有することができ、間葉幹細胞は、免疫細胞増殖、分化、および表現型の調節に一役割を果たすことができ、炎症および損傷を和らげることができ、組織再生を駆動するエフェクター分子を生産することができると考えられる。

20

【0039】

本発明の組成物および方法を記載する前に、記載された特定のプロセス、組成物、または方法論は変わることがあるので、本発明はこれらに限定されないことを理解されたい。説明の中で用いる専門用語は、特定のバージョンまたは実施形態を記載するためのものにすぎず、本発明の範囲を限定するためのものではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることになることも理解されたい。別段の定義がない限り、本明細書において用いるすべての技術用語および科学用語は、当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様のまたは等価の任意の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験の際に使用することができるが、好ましい方法、デバイス、および材料を今から記載する。本明細書において言及するすべての出版物は、この参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。先行発明によるそのような開示より前に生じたものとする権利が本発明にないことを認めるものと見なすべきものは、本明細書にはない。

30

【0040】

本明細書においておよび添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈による別段の明確な指図がない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば、「血管周囲薬用細胞」（perivascular medicinal cell : PVMC）への言及は、1若しくはそれ以上のPVMCsおよび当業者に公知のそれらの等価物などへの言及である。

40

【0041】

本明細書において用いる場合、用語「約」は、それを用いている数の数値のプラスまたはマイナス10%を意味する。したがって、約50%は、45%～55%の範囲内を意味する。

【0042】

用語「血管周囲薬用細胞」または「PVMC」は、本明細書において用いる場合、单核細胞、内皮細胞、内皮下細胞、血管周囲細胞、または骨形成原細胞を指す。PVMC单核細胞は、CD146+、CD271+、CD90+、CD166+、CD73+、CD105+、CD44+、CD29+、SSEA4+、CD45-、CD31-、vWF-、およびCD14-、またはそれらの組合せから選択される分化抗原群（cluster of differentiation : CD）マーカーの1つ、一部、またはすべての

50

発現によって特徴づけられる。PVMC内皮または内皮下細胞は、Syto16+、CD45-、CD31+、CD156+、またはそれらの組合せの1つ、一部、またはすべての発現によって特徴づけられる。PVMC骨形成原細胞は、アルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシン、またはそれらの組合せの1つ、一部、またはすべての発現によって特徴づけられる。PVMCsは、MHCクラスIについて陰性であることがあるが、MHCクラスIIを発現することもある。単離されたPVMCsを、細胞表面ポリペプチドなどのマーカーの存在に基づいて、他の細胞タイプと区別することができる。これらのマーカーの検出は、免疫細胞化学、蛍光活性化細胞選別(fluorescence-activated cell sorting: FACS)、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR)などを用いて行うことができる。

PVMCsの同定に有用なマーカーとしては、これに限定されるものではないが、成長因子受容体: CD121(IL-1R)、CD25(IL-2R)、CD123(IL-3R)、CD71(トランスフェリン受容体)、CD117(SCF-R)、CD114((3-CSF-R)、PDGF-R、およびEGF-R; 造血系マーカー: CD1a、CD11b、CD14、CD34、CD45、CD133; 接着受容体: CD166(ALCAM)、CD54(ICAM-1)、CD102(ICAM-2)、CD50(ICAM-3)、CD62L(L-セレクチン)、CD62e(E-セレクチン)、CD31(PECAM)、CD44(ヒアルロン酸受容体); インテグリン: CD49a(VLA)、CD49b(VLA-2)、CD49c(VLA-3)、CD49d(VLA-4)、CD49e(VLA-5)、CD29(VLA-)、CD104(4-インテグリン); ならびに他の多種多様なマーカー: D90(Thy1)、CD105(エンドグリーン)、CD80(B7-1)、およびCD8(B7-2)を含むことができる。一部の実施形態において、PVMCsは、CD146+、CD271+、CD90+、CD166+、CD73+、CD105+、CD44+、CD29+、SSEA4+、CD45-、CD31-、vWF-、CD14-、またはそれらの組合せを発現する、臍帯血管に由来する細胞を含むことができる。一部の実施形態において、PVMCsは、臍帯血管、内皮細胞、骨形成原細胞、またはそれらの組合せに由来する細胞を含むことができる。一部の実施形態では、PVMCsは、PVMCsを含有することができる任意の解剖学的源に由来することができる。細胞学的源の例は、これに限定されるものではないが、血管(これに限定されるものではないが、静脈および動脈を含む)、骨膜、骨梁骨、脂肪組織、滑膜、骨格筋、乳歯、臍臓、肺、肝臓、羊水、胎盤、および血液を含む。PVMCsは、これに限定されるものではないが、細胞表面マーカーCD29、CD105、CD44、CD73、CD146、およびCD166を発現することができる。一部の実施形態において、PVMC調製物は、抗原発現および生存力の点においてかつCD73+/CD105+/CD44+/CD29+/SSEA4+/CD45-/CD31-/vWF-/CD14-の表現型を発現するように90%超純粋であることができる。これらのPVMCsは、MHCクラスIについて陰性であることがあるが、MHCクラスIIを発現することもある。一部の実施形態において、PVMC調製物は、90%未満純粋、80%未満純粋、70%未満純粋、60%未満純粋、または50%未満純粋であると予想される。

【0043】

PVMC細胞表面マーカーは、ヒトCD29、CD105、CD44、CD73、SSEA4、CD45、CD31、vWF、およびCD14に対するものを含む様々な抗体で標識した後、FACSによって特徴づけることができる。一部の実施形態では、その後、フルオレシンと結合させた二次抗体を使用することができる。

【0044】

本明細書において用いる場合、用語「単離されたPVMC」は、PVMCsが生物から単離された、PVMC、PVMC集団、またはPVMC調製物を指す。一部の実施形態において、前記生物は、哺乳動物である。一部の実施形態において、前記哺乳動物は、妊娠哺乳動物である。一部の実施形態において、前記妊娠哺乳動物は、ヒトである。一部の実

10

20

30

40

50

施形態において、単離された P V M C は、骨膜、骨梁骨、脂肪組織、滑膜、骨格筋、乳歯、臍臓、肺、肝臓、羊水、胎盤、血液、および臍帯血管、またはそれらの組合せから単離された P V M C である。一部の実施形態において、単離された P V M C は、骨に由来する P V M C である。一部の実施形態において、単離された P V M C は、臍帯血管に由来する P V M C である。

【 0 0 4 5 】

一部の実施形態では、P V M C 複合体を単離することができる。一部の実施形態において、P V M C 複合体は、細胞の群を有する。一部の実施形態において、前記 P V M C 複合体は、骨形成原細胞、単核細胞、内皮細胞 内皮下細胞、間葉幹細胞、またはこれらの組合せを含むことができる。自家移植片を使用または作製する実施形態において、前記 P V M C は、P V M C 複合体であることがあり、または精製された P V M C であることもある。

10

【 0 0 4 6 】

P V M C s は、分化、栄養媒介因子の生産、および宿主環境との相互作用において広範な多様性を呈示する。一部の実施形態において、本発明の前記 P V M C s は、自家性であることもあり、同種異系であることもあり、または異種源からのものであることがある。一部の実施形態において、前記 P V M C は、自家使用を意図したものである。P V M C s を単離することができ、これらの細胞を、それらが育てられた患者に投与して戻すことができる。この自家移植技術は、免疫抑制プロトコルの必要がないようになる。一部の実施形態において、P V M C s は、胚性である場合もあり、または出生後の源からのものである場合もある。骨髄を、腸骨稜、大腿骨、脛骨、肋骨、もしくは他の骨髄腔、またはそれらの組合せから獲得することができる。他の P V M C s 源としては、脂肪、骨膜、皮膚、および骨格筋、肝臓、胎盤、血液、および臍帯血管、またはそれらの組合せを含む。

20

【 0 0 4 7 】

本明細書において用いる場合、用語「薬用能力 (medicinal capabilities)」は、特定の生理環境で前記 P V M C によって分泌される分子の範囲を指す。P V M C s は、免疫修飾機能の一因となり損傷部位で再生環境を提供することによっていわゆる「栄養効果」を別個にもたらす膨大な一連の生物活性分子から、それらの薬用特性を引き出す。

30

【 0 0 4 8 】

本明細書において用いる場合、用語「栄養効果」は、部位に依存して前記 P V M C により分泌される分子の範囲を指す。一部の実施形態において、P V M C s の栄養効果は、前記 P V M C の身体位置に非常に依存して変化することになる。例えば、一部の実施形態において、P V M C s による生物活性分子の分泌および生成は、抗原提示および T 細胞前駆体増殖に影響を及ぼすことにより T 細胞阻害をもたらして、免疫監視機構から損傷部位を保護することができ、傷害を受けた組織に対する自己免疫感作を未然に防ぐことができる。一部の実施形態において、P V M C s は、虚血組織において抗アポトーシス効果を有することができる。P V M C s によって分泌される分子は、正常レベルの酸素または栄養素を損傷した組織に侵入させない破断または機能不全血管に起因する細胞死から保護することができる。一部の実施形態において、P V M C s は、抗瘢痕化または抗線維化効果を有することができる。P V M C s によって分泌される分子は、創傷部位における筋線維芽細胞の侵入または機能を阻害し、その結果、高濃度コラゲナーゼ瘢痕組織の形成を阻害することができる。一部の実施形態において、P V M C s は、血管新生効果を有することができる。P V M C s によって分泌される分子は、損傷部位への内皮細胞またはそれらの前駆体の動員を惹起することができる。そのため、その損傷部位でそれらは分裂し、原始血管を形成することができる。一部の実施形態において、前記 P V M C は、それ自体が周皮細胞に成長して、新たに形成された血管に付着し、発生期血管に安定性を提供することができる。一部の実施形態において、P V M C s は、組織固有前駆体に分裂および分化するように影響を及ぼす分裂促進因子を分泌し、損傷部位の組織を再生することができる。一部の実施形態において、P V M C s は、様々な修復およびヘルパー細胞を損傷部位に動

40

50

員することができる強力な化学誘引物質を分泌し、組織再生を促進することができる。

【0049】

P V M C s は、消化された細胞外基質 (extracellular matrix : E C M) にも他の走化性刺激にも応答して、損傷部位に移動することが可能であり得る。P V M C s による生物活性分子の分泌または生成は、抗原提示および T 細胞前駆体増殖に影響を及ぼすことにより T 細胞阻害をもたらして、免疫監視機構から損傷部位を保護することができ、傷害を受けた組織に対する自己免疫感作を未然に防ぐことができる。

【0050】

それを必要とする被検者への P V M C s の投与は、損傷部位に存在する P V M C s の数の増加のため P V M C の生理および治療効果を増強する結果となる。一部の実施形態において、それを必要とする被検者への P V M C s の投与は、該被検者体内の P V M C s の数を増加させる結果となる。一部の実施形態において、P V M C 投与の前記生理および治療効果は、損傷部位に存在する P M V C s の数と正の相関関係がある。

10

【0051】

本明細書において用いる場合、用語「細胞培地（単数）」または「細胞培地（複数）」を用いて、単核細胞および / または神経細胞が成長する細胞成長培地を記載する。細胞培地は、当該技術分野において周知であり、少なくとも最小必須培地に加えて任意選択の薬剤、例えば、成長因子、グルコース、非必須アミノ酸、インスリン、トランスフェリン、および当該技術分野において周知の他の薬剤を有する。

【0052】

本明細書において用いる場合、用語「非接着細胞」を用いて、培養期間の終了時に組織培養フラスコ内に浮遊状態で残存する細胞を記載する。

20

【0053】

用語「接着細胞」を用いて、組織培養プラスチックに付着しており、G i b c o - B R L からの酵素不含細胞解離バッファーの添加によりまたはトリプシン - E D T A の添加によりフラスコから剥離される細胞を記載する。

30

【0054】

本明細書において用いる場合、用語「単核細胞」を用いて、骨髓または臍帯血管または血液から単離された単一の核を含有する細胞を記載する。単核細胞は、F I C O L L (商標) または P E R C O L L (商標) の密度勾配を用いて単離することができる。単核細胞を骨髓または臍帯血管または血液から獲得し、P V M C s 源として使用する。

30

【0055】

本明細書において用いる場合、用語「骨」は、骨髓組織および他の骨関連組織、緻密骨（これに限定されるものではないが、骨細片、骨断片、骨粉、または骨セグメントなどを含む）、髓間管からの骨髓、またはそれらの組合せを指す。一部の実施形態において、用語「骨」は、骨髓を含む。

【0056】

本明細書において用いる場合、用語「骨由来」は、限定ではないが、骨、骨細片、骨粉、骨セグメント、骨断片、骨髓、または骨小腔洗浄から単離された材料を指す。骨小腔洗浄は、骨小腔からの骨髓の物理的除去後に行われる。

40

【0057】

本明細書において用いる場合、用語「骨組織」は、これに限定されるものではないが、骨、骨細片、骨粉末、骨セグメント、骨断片、骨髓スクープ、または骨小腔洗浄からの組織を指す。

【0058】

用語「骨髓細胞」は、線維芽細胞（網様結合組織）、マクロファージ、脂肪細胞、骨芽細胞、破骨細胞、洞様毛細血管を形成する内皮細胞、造血幹細胞、間葉幹細胞、内皮幹細胞、周皮細胞、P V M C s 、組織ヘルパー細胞、またはそれらの組合せを指す。

【0059】

本明細書において用いる場合、用語「解離させる」は、血管を包囲する基底膜から P V

50

M C s を、それらを血管組織から分離することができるように、放出させるプロセスを指す。一部の実施形態において、前記血管は、臍帯血管である。P V M C の解離は、前記 P V M C s を臍帯内の小血管の基底膜に連結する結合の酵素消化によって果たされる。一部の実施形態において、酵素消化は、前記 P V M C s が別個に会合している分離した会合分子を収容している前記基底膜の結合を切断する。例えば、前記基底膜中のヘパリンに結合する P D G F - B B および P D G F - B B は次いで、P D G F 受容体を発現する P V M C s への結合が可能であり得る。一部の実施形態において、前記酵素消化は、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、G A G アーゼ、またはメタロプロテアーゼ、クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、あるいはそれらの組合せから選択される 1 若しくはそれ以上の酵素を使用することにより果たすことができる。前記 1 若しくはそれ以上の酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。一部の実施形態において、前記酵素消化は、小血管の基底膜から P V M C の付着を切断する 1 若しくはそれ以上の酵素を使用する。一部の実施形態において、酵素消化は、それら自体が前記基底膜に結合することができる分子に前記 P V M C を連結する結合を切断するための酵素消化も含む。例えば、前記基底膜中のヘパリンに結合する P D G F - B B および P D G F - B B は次いで、P D G F 受容体を発現する P V M C s への結合が可能であり得る。
10

【 0 0 6 0 】

本明細書において用いる場合、用語「フラッシュ」は、クランプされた血管などの腔を液体で満たすおよび空にするプロセスを指す。一部の実施形態では、満たす前記プロセスの直後に空にすることができる。一部の実施形態では、満たすおよび空にする前記プロセスを恒温放置期間によって隔てる。一部の実施形態では、前記液体をさらなる使用のために保持する。一部の実施形態では、前記液体を廃棄する。
20

【 0 0 6 1 】

P V M C s を臍帯血管から単離するための方法

一部の実施形態では、P V M C s を骨膜、骨梁骨、脂肪組織、滑膜、骨格筋、乳歯、臍臓、肺、肝臓、羊水、胎盤、血液、および臍帯血管から単離することができる。一部の実施形態において、臍帯血管血および臍帯血管は、それらの入手可能性、非侵襲性、および自家細胞ベースの療法の可能性のため、特に有利な P V M C s 源であり得る。前記臍帯血管は、ワルトン膠様質として公知の粘液様結合組織によって包囲された、2 本の動脈および 1 本の静脈を含有する。一部の実施形態では、P V M C s を前記臍帯動脈および静脈の血管周囲領域から単離することができる。
30

【 0 0 6 2 】

満期産新生児における前記臍帯血管は、約 50 センチメートル長、および直径約 2 センチメートルであり得る。一部の実施形態において、本明細書における実施形態の前記臍帯血管は、約 25 cm から約 60 cm、約 30 cm から約 60 cm、約 35 cm から約 60 cm、約 40 cm から約 60 cm、約 45 cm から約 60 cm、約 30 cm から約 55 cm、約 35 cm から約 55 cm、約 40 cm から約 55 cm、約 45 cm から約 55 cm、約 45 から約 55 cm、約 50 から約 55 cm、約 40 cm、約 45 cm、約 50 cm、約 55 cm、またはこれらの値のいずれか 2 つの間の範囲の長さを有することがある。
40

【 0 0 6 3 】

一部の実施形態では、満期分娩からの臍帯血管血の単離を、満期正常分娩または帝王切開後に娩出したての胎盤から子宮外で行うことができる。一部の実施形態において、臍帯血管血の単離は、胎盤を懸架する工程と、静脈にカニューレを挿入する工程と、特別設計の採取バッグまたは容器に重力によって血液を排出させる工程とを有することがある。子宮外単離中に母体または乳児に危険はないが、臍帯血管血の微生物汚染の危険性は高い。

【 0 0 6 4 】

一部の実施形態において、P V M C s を臍帯血管から単離する方法は、前記臍帯血管に酵素または酵素混合物を添加して、前記 P V M C s を該臍帯動脈または静脈から解離させ
50

る工程を有する。一部の実施形態は、前記酵素または酵素混合物を添加する前に前記臍帯血管から排出する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記単離プロセスは、無菌である。一部の実施形態では、前記臍帯血管を任意の胎盤哺乳動物から単離することができる。一部の実施形態において、前記臍帯血管は、ヒトであってもよく、または非ヒト胎盤哺乳動物、例えば、限定ではないが野生動物、飼い馴らされた動物、または家畜からのものであってもよい。

【0065】

一部の実施形態において、PVMCsを臍帯血管から単離する前記方法は、(i)臍帯血管の内容物を排出し、該臍帯血管に針を挿入する工程と、(ii)前記臍帯血管を滅菌リン酸緩衝生理食塩水でフラッシュする工程と、(iii)前記内容物を採取する工程とを有する。一部の実施形態において、前記臍帯血管の内容物を排出する前記プロセスは、ストッパーを有する2本の針を1本は臍帯血管の頂部に、もう1本は臍帯血管の底部に挿入する工程と、前記血管を空にする工程と、前記洗浄溶出液を採取する工程とを有する。一部の実施形態において、前記血管は、静脈であってもよく、または動脈であってもよい。一部の実施形態において、前記血管を空にする工程は、重力で前記血管を空にさせる段階を有する。

10

【0066】

一部の実施形態では、酵素混合物を前記臍帯血管内で恒温放置する。一部の実施形態では、前記酵素混合物を前記臍帯血管内で、該臍帯血管の内容物の排出、フラッシュおよび採取後に恒温放置する。一部の実施形態において、前記酵素混合物は、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、前記酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。コラゲナーゼは、コラーゲン中のペプチド結合を壊す酵素である。コラーゲンは、結合組織の主成分であり、哺乳動物において最も豊富なタンパク質であり、また動物の細胞外基質の重要な成分である。タンパク質分解酵素としても公知のプロテアーゼは、タンパク質を形成するペプチド鎖内のアミノ酸を互いに連結するペプチド結合の加水分解によってタンパク質異化を果たすことができる。プロテアーゼは、セリンプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、およびグルタミン酸プロテアーゼを含む酵素の多数の広範な群を有する。プロテアーゼは、それらが最も良く機能する最適pHによってさらに分類される。タンパク質中の特定のペプチド結合を壊すことができるプロテアーゼもあり、その一方で、タンパク質の個々のアミノ酸への完全消化ができるプロテアーゼもある。哺乳動物のプロテアーゼに加えて、多数の細菌、真菌、および植物プロテアーゼも存在する。プロテアーゼは、アミノ酸残基を連結するペプチド結合を分断することにより、長いタンパク質鎖を短い断片に消化することができる。末端アミノ酸をタンパク質鎖から引き離すことができるプロテアーゼ（エキソペプチダーゼ、例えば、アミノペプチダーゼ、カルボキシペプチダーゼAなど）もあり、その一方で、タンパク質の内部ペプチド結合を攻撃するプロテアーゼ（エンドペプチダーゼ、例えば、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パパイン、エラスターなど）もある。ペプチダーゼは、それらの触媒活性部位の特徴および作用条件に従って4つの主要グループに分けられる：セリンプロテイナーゼ、システイン（チオール）プロテイナーゼ、アスパラギン酸プロテイナーゼ、およびメタロプロテイナーゼ。プロテアーゼの一定の基への結合は、当該触媒部位の構造、およびその活性に不可欠なアミノ酸（構成成分の1つとして）に依存する。GAGアーゼは、二糖繰り返し単位から成る長い分岐多糖である、グリコサミノグリカン（Glycosaminoglycans: GAGs）またはムコ多糖を加水分解することができる酵素である。前記繰り返し単位は、ヘキサミン（窒素を含有する6炭素糖）に連結した、ヘキソース（6炭素糖）またはヘキソロン酸から成る。これらの分子は、結合組織の重要な成分である。GAG鎖をタンパク質に共有結合させて、結合組織、軟骨、および腱において見つけることができるプロテオグリカン、例えばコンドロ

20

30

40

50

イチンを形成することができる。メタロプロテイナーゼ（またはメタロプロテアーゼ）は、その触媒活性が亜鉛またはコバルト依存性であるタンパク質分解酵素である。メタロプロテイナーゼ中で見つけられる亜鉛またはコバルトイオンは、3つの配位子によってタンパク質に配位されている。前記金属イオンに配位する配位子は、ヒスチジン、グルタメート、アスパルテート、リシン、およびアルギニンで異なり得る。第4の配位位置は、不安定な水分子が占めている。メタロプロテイナーゼおよびエキソペプチダーゼの2つのサブグループがあり、メタロエキソペプチダーゼ、エンドペプチダーゼ、およびメタロエンドペプチダーゼもそうである。メタロエンドペプチダーゼは、例えば、マトリックスメタロプロテイナーゼを含む。エンドプロテイナーゼ Arg-C としても公知のクロストリパインは、アルギニンのカルボキシルペプチド結合上のタンパク質を切断するプロテイナーゼである。それは、クロストリジウム・ヒストリチクム (Clos tridium histolyticum) から単離されたものであり、約7.4から約7.8のpHで最適に機能する。

10

【0067】

酵素消化は、前記PVMScを小血管の基底膜に連結する結合を特異的に切断する。より具体的には、酵素消化は、小血管の基底膜からPVMCの付着を切断する。一部の実施形態において、酵素消化は、それら自体が前記基底膜に結合することができる分子に前記PVMCを連結する結合を切断するための酵素消化も含む。例えば、前記基底膜中のヘパリンに結合するPDGF-BBおよびPDGF-BBは次いで、PDGF受容体を発現するPVMCsへの結合が可能であり得る。一部の実施形態において、酵素消化は、糖とペプチドまたは糖と別の糖を伴う、特異的ペプチド結合、エステル結合、またはそれらの組合せを切断する結果となる。一部の実施形態において、酵素消化は、脂肪酸の複合脂質または単純エステルへの結合を特異的に切断することができる。さらなる実施形態において、酵素消化は、前記結合がベンゼン環を伴うコレステロールまたは分子への結合を切断することができる。一部の実施形態では、1つの結合の切断が結果的に他の結合を不安定にして、その結果、PVMCと会合することができる分子の配座変化を生じさせる場合がある。

20

【0068】

一部の実施形態において、前記酵素混合物は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択される抗生物質をさらに有する。一部の実施形態において、前記抗生物質は、前記酵素混合物の約20%を構成する。一部の実施形態において、前記酵素は、タイロード液、乳酸リンゲル液、最小必須培地イーグルアルファ変性 (minimum essential medium Eagle alpha modification: -MEM)、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)、またはそれらの組合せから選択される培地をさらに有する。一部の実施形態において、前記酵素混合物中の前記抗生物質は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択される抗生物質を有することができる。

30

【0069】

一部の実施形態では、前記酵素混合物を約1から約10分間、約10から約20分間、約20から約60分間、約20から約30分間、約30から約40分間、約40から約50分間、約50から約60分間、約60から約120分間、恒温放置する。一部の実施形態では、前記酵素混合物を約15から約38、約15から約20、約20から約25、約25から約30、約30から約35、または約35から約38の範囲の温度で恒温放置する。一部の実施形態では、前記臍帯血管をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) でフラッシュすることにより前記解離酵素混合物を不活性化し、前記酵素混合物およびPBSを採取する。

40

【0070】

一部の実施形態では、第2の酵素混合物との第2の恒温放置を行うことがある。一部の

50

実施形態では、酵素混合物との多回恒温放置を行うことがある。驚くべきことに、酵素との2回恒温放置を行うと、前記第2の恒温放置は、結果としてPVMCsを臍帯血管から単離させられる。理論により拘束されることを望まないが、前記第1の酵素混合物との第1の恒温放置が結果として内皮細胞を解離させ、それにより前記基底膜が露出された状態になると考えられる。前記第2の酵素混合物との第2の恒温放置において、前記基底膜に結合している前記PVMCsを該基底膜から解離させることができ、それを採取することができると考えられる。

【0071】

一部の実施形態において、PVMCsを臍帯血管から単離する前記方法は、細胞浮遊液中のPVMCsを濃縮する工程をさらに有する。一部の実施形態において、PVMCsを濃縮する工程は、濃縮され、解離された血管周囲薬用細胞の集団を獲得するための浮遊密度沈降、濾過、または遠心分離の使用を有する。

10

【0072】

一部の実施形態では、前記濃縮された臍帯血管由来PVMCsの調製に、前記PVMCsの濃縮後に前記濃縮されたPVMCsを培養して、濃縮された臍帯血管由来PVMCsの前記集団を選択的に増殖させる工程を追加することができる。一部の実施形態では、臍帯血管から単離されたPVMCsを、約1から20%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum: FBS)で補足されたダルベッコ変性イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)で希釈することができる。一部の実施形態では、前記DMEM混合物を激しくボルテックスして前記組織を機械的に分散させ、続いてベンチトップ遠心機で濃縮することができ、その後、当該上清を除去することができる。一部の実施形態では、Percol 11(商標)、続いて、インタクトPercol 11(商標)勾配を保証するための破壊を伴わない第2ラウンドの遠心分離を用いることにより、残存細胞ペレットを分別して成核細胞を採取することになる。その後、前記勾配の上部画分を新しい試験管に移し、DMEMで補足し、その後、遠心分離することができる。遠心分離後、前記ペレットを乱すことなく当該上清を除去することができる。一部の実施形態では、その後、前記ペレットをDMEMに再浮遊させ、DMEMを使用して遠心分離により数回洗浄することができる。得られるPVMC細胞浮遊液は、その結果、増殖または濃縮の準備が整った状態であり得る。

20

【0073】

一部の実施形態では、PVMCsの集団を臍帯血管から濃縮する工程を、前記PVMC上の細胞表面抗原に対して親和性を有する抗体を有する磁性ビーズの使用によって果たすことができる。さらに他の実施形態では、PVMCsの濃縮を増殖した細胞集団に対して行うことができる。PVMCsは限られた回数しか継代されず、その後増殖および分化能力の低減を経験することがあると予想される。さらに、PVMC調製物の成長特性および細胞収率は、ドナーの年齢に依存し、個体間で様々である。さらに他の実施形態では、PVMC集団の前記濃縮を該細胞集団の事前増殖なしで行うことができる。

30

【0074】

一部の実施形態では、濃縮された臍帯血管由来PVMCsの前記集団を培養しない。一部の実施形態では、臍帯血管から獲得されたPVMCsを培地中で培養して増殖させる。

40

【0075】

一部の実施形態では、臍帯血管からのPVMCsを細胞培養で増殖させることができる。一部の実施形態では、PVMCsの一次培養物を100mm培養皿1つにつき約10⁷細胞で播種し、約10%ウシ胎仔血清と、約2mM L-グルタミンと、約100単位/mlペニシリンと、約100μg/mlストレプトマイシンとを含有するDMEM培養培地中で増殖させることができる。PVMCsは、前記負に帯電した培養皿に接着する。一部の実施形態において、前記方法は、前記培養培地に接着する細胞を選択する工程をさらに有することがある。一部の実施形態において、前記方法は、DMEMですすぐ工程と接着細胞の前記選択を反復する工程とをさらに有することがある。接着細胞の選択後、PVMC集団をさらに二次培養してもよい。

50

【0076】

一部の実施形態において、臍帯血管からのPVMCsは、細胞表面マーカーCD29、CD105、CD44、CD73、CD146、およびCD166を発現するが、造血系および内皮細胞マーカーを発現しない。一部の実施形態において、前記PVMC集団は、抗原発現および生存力の点で90%超純粋であり、ならびにCD73+/CD105+/CD44+/CD29+/SSEA4+/CD45-/CD31-/vWF-/CD14-の表現型を発現する。一部の実施形態において、前記PVMCsは、MHCクラスIに対して陰性であるが、MHCクラスIIを発現する。一部の実施形態において、前記PVMC集団は、90%未満純粋、80%未満純粋、70%未満純粋、60%未満純粋、または50%未満純粋であることがある。一部の実施形態では、精製されたまたは不純な細胞集団を任意の適切な培地に採取することができる。一部の実施形態において、前記PVMCsは、前記精製された細胞集団の約30%またはそれ以上、好ましくは前記精製された細胞集団の約50%またはそれ以上、さらに好ましくは前記精製された細胞集団の約90%またはそれ以上、および最も好ましくは前記精製された細胞集団の約95%またはそれ以上（実質的に純粋）になる。

10

【0077】

細胞表面マーカーを、ヒトCD29、CD105、CD44、CD73、SSEA4、CD45、CD31、vWF、およびCD14に対するものを含む様々な抗体で標識した後、フローサイトメトリーによって特徴づけることができる。その後、フルオレシンと結合させた二次抗体を使用する。

20

【0078】

一部の実施形態では、PVMCsを臍帯血管からFACS選別によって単離することができる。PVMCsを単離するための細胞表面抗原、例えば、限定ではないがCD29、CD105、CD44、およびCD73の使用は、PVMC集団の陽性免疫選択のための手段を提供し、PVMC細胞集団の表現型分析、例えばフローサイトメトリーのための手段も提供する。CD29、CD105、CD44、およびCD73抗原の発現について選択された細胞を、他の幹細胞および前駆細胞マーカー（これに限定されるものではないが、SSEA4ヒト胚性幹期特異的マーカー（embryonic stem system specific markers）を含む）についての選択により、さらに精製することができる。

30

【0079】

一部の実施形態において、臍帯血管からの実質的に純粋なPVMCsの前記調製物、臍帯血管由来PVMCsサブセットを、当該技術分野において公知の他の表面マーカーに基づいて他の細胞から分離することができる。

【0080】

分離のための手順としては、これに限定されるものではないが、抗体被覆磁性ビーズを使用する磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、および固体マトリックス、例えばプレートに付着した抗体での「パンニング」、または他の好都合な技法を含むことができる。正確な分離を提供する技法としては、これに限定されるものではないが、様々な洗練度、例えば、多色チャンネル、低角および鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなどを有することができる蛍光活性化細胞選別機を含む。死滅細胞は、死滅細胞に会合している色素（ヨウ化プロピジウム（propidium iodide：PI）、LDS）での選択によって排除することができる。前記選択された細胞の生存力に過度に有害でない任意の技法を利用することができる。

40

【0081】

抗体被覆磁性ビーズを使用する一部の実施形態では、該抗体を、特定の細胞タイプの分離の容易さを可能にする標識、例えば磁性ビーズ；アビジンまたはストレプトアビジンに高い親和性で結合するビオチン；蛍光活性化細胞選別機（fluorescence-activated cell sorter：FACS）で使用することができる蛍光色素；およびハプテンなどと結合させることができる。多色分析を前記FACSとともにま

50

たは免疫磁気分離とフローサイトメトリーとの組合せで利用することもできる。多色分析は、多数の表面抗原、例えば CD 7 3 + 、 CD 1 0 5 + 、 CD 4 4 + 、 CD 2 9 + 、と S S A E 4 細胞マーカーを認識する抗体とに基づく細胞の分離にとって興味深いものである。多色分析に使用されている蛍光色素としては、これに限定されるものではないが、フィコビリタンパク質、例えば、フィコエリトリンおよびアロフィコシアニン；フルオレシン；ならびにテキサスレッドを含む。陰性表示は、染色レベルが、アイソタイプ適合陰性対照の輝度またはそれ以下であることを示すことができる。dim表示は、染色レベルが陰性染色レベルの近いことがあるが、アイソタイプ適合対照より明るいこともあるということを示すことができる。

【0082】

10

一部の実施形態では、CD 2 9 、 CD 1 0 5 、 CD 4 4 、 CD 7 3 、 S S E A 4 、 CD 4 5 、 CD 3 1 、 v W F 、および CD 1 4 抗体を超常磁性微粒子（微粒子）などの磁性試薬に直接または間接的に結合させる。磁性粒子への直接結合は、当該技術分野において公知であるように、様々な化学的連結基の使用によって果たすことができる。前記抗体を側鎖アミノまたはスルフヒドリル基およびヘテロ官能性架橋試薬によって前記微粒子にカップリングさせることができる。多数のヘテロ官能性化合物がエンティティへの連結に利用可能である。一部の実施形態において、前記連結基は、3 - (2 - p y r i d y i d i o) プロピオン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (S P D P) または 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボン酸 N - ヒドロキシスクシンイミドエステル (S M C C) と前記抗体上の反応性スルフヒドリル基および前記磁性粒子上の反応性アミノ基である。

20

【0083】

一部の実施形態では、CD 2 9 、 CD 1 0 5 、 CD 4 4 、 CD 7 3 、 S S E A 4 、 CD 4 5 、 CD 3 1 、 v W F 、および CD 1 4 抗体を前記磁性粒子に間接的にカップリングさせる。一部の実施形態では、前記抗体をハプテンに直接接合させ、ハプテン特異的第2ステージ抗体は前記粒子に結合させる。一部の実施形態において、適するハプテンとしては、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、F I T C 、ジニトロフェニル、ニトロフェニル、アビジン、ビオチンなどを含む。前記ハプテンのタンパク質への接合方法は、当該技術分野において公知であり、かかる接合のためのキットは、市販されている。

30

【0084】

一部の実施形態では、特定の細胞サブセットを結合するために必要な抗体の量を、試験分離および分析を行うことによって経験的に決定する。一部の実施形態では、前記細胞および抗体を、複合体の形成に十分な期間、恒温放置する。一部の実施形態において、前記期間は、少なくとも約 5 分、少なくとも約 10 分、約 30 分まで、または約 60 分までであることがある。

【0085】

40

一部の実施形態では、前記 P V M C s 上に存在するまたは不在であることが公知の細胞表面マーカーに特異的な抗体または結合分子とともに前記細胞をさらに恒温放置することができる。例えば、一部の実施形態では、CD 4 5 、 CD 3 1 、 v W F 、または CD 1 4 マーカーを発現する細胞を陰性選択することができる。

【0086】

一部の実施形態では、前記標識された細胞を前記特異的抗体調製物に従って分離する。一部の実施形態において、蛍光色素標識抗体は、F A C S 分離、免疫磁気選択用の磁性粒子、および特に高勾配磁気選択 (h i g h g r a d i e n t m a g n e t i c s e l e c t i o n : H G M S) などに有用である。例示的磁気分離デバイスは、国際公開第 9 0 / 0 7 3 7 0 号パンフレット、国際出願第 P C T / U S 9 6 / 0 0 9 5 3 号、および欧州特許出願公開第 4 3 8 , 5 2 0 号明細書に記載されており、これらの各々はこの参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0087】

50

一部の実施形態では、臍帯血管からの前記 P V M C 細胞集団を適切な培地に採取するこ

とができる。ウシ胎仔血清 (fetal calf serum: FCS)、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、ヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) などで多くの場合補足された、ダルベッコ変性イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)、ハンクス塩基性塩類溶液 (Hank's Basic Salt Solution: HBSS)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's phosphate buffered saline: ; dPBS)、RPMI、イスコフ変性ダルベッコ培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium: IMDM)、5 mM EDTAを伴うリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) などを含む様々な培地が市販されており、それらを使用することができる。好ましい培養培地としては、DMEM、F-12、M199、およびRPMIを含む。

10

【0088】

一部の実施形態において、臍帯血管からの前記PVMCsは、前記細胞集団の約30%もしくはそれ以上、前記細胞集団の約50%もしくはそれ以上、前記細胞集団の約90%もしくはそれ以上、または前記細胞集団の約95%もしくはそれ以上を構成することができる。

【0089】

一部の実施形態では、臍帯血管からの単離されたPVMCsを、約10%ウシ胎仔血清と、約2mM L-グルタミンと、約100単位/mLペニシリンと、約100μg/mLストレプトマイシンとを含有するDMEM培養培地中で増殖させることができる。一部の実施形態では、前記臍帯血管由来PVMCsをT75フラスコに入れ、DMEM培養培地で希釈する。一部の実施形態では、この混合物を、約5%CO₂を有する約37°での恒温器の中で3日間保管する。前記恒温放置時間の後、前記PVMCsは、前記フラスコの表面に接着し、骨髄の残存成分をPBSでの洗浄によって除去することができる。

20

【0090】

一部の実施形態では、基礎培地および低グルコースを約10~20%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS)とともに用いて、臍帯血管からのPVMCsを増殖させることができる。一部の実施形態では、血小板溶解産物などの他のタンパク質源を使用することができる。一部の実施形態では、組換えヒト線維芽細胞増殖因子 (recombinant human fibroblastic growth factor: rhFGF)などのさらなる因子を、増殖能力を強化するための培養補足物として使用することができる。一部の実施形態では、約10ng/mL rhFGF-2を使用して、PVMC細胞集団の集団倍加時間を短縮する。

30

【0091】

一部の実施形態において、臍帯血管からの単離されたPVMCsを、5%CO₂を有する37°恒温器において、約10%ウシ胎仔血清と、約10ng/mL線維芽細胞成長因子と、約2mM L-グルタミンと、約100U/Lペニシリン-ストレプトマイシンとで補足されたイスコフ変性ダルベッコ培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium: IMDM) 中で増殖させ、単離前に約10から20回継代することができる。

40

【0092】

ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) は、病原体を宿していることがある、PVMCレシピエントは、抗FBS抗体を発生させることがあり、そのため場合によっては無血清培地の使用を要する。一部の実施形態では、FGFと、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) と、ransforming growth factor- (transforming growth factor- : TGF-) とで補足された無血清培地中でPVMCsを成長させることができる。一部の実施形態では、高血小板血漿をFBSの有効な代用品として使用することができる。

50

【0093】

一部の実施形態は、PVMCsを臍帯血管から単離する方法であって、前記臍帯血管の内容物を排出して細胞浮遊液を作製する工程と、酵素混合物を使用して前記細胞浮遊液から前記PVMCsを解離させる工程とを有する方法を記載する。一部の実施形態において、前記臍帯血管の前記内容物を排出する前記プロセスは、前記臍帯血管に針を挿入する工程と、溶液でフラッシュする工程とを有する。一部の実施形態において、前記方法は、前記細胞浮遊液を採取する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記溶液は、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline: TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution: HBSS)、アル平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸含有生理食塩水(Standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution: GBSS)、またはそれらの組合せである。
10

【0094】

一部の実施形態では、前記PVMCsを解離させる工程をインタクト臍帯血管に対して行う。一部の実施形態において、PVMCsを臍帯血管から単離する方法は、前記臍帯血管を洗浄液で洗浄する工程と、酵素混合物を添加する工程とを有する。一部の実施形態では、前記臍帯血管の内部のみを洗浄液または前記酵素混合物に曝露する。
20

【0095】

一部の実施形態では、前記酵素混合物を前記臍帯血管内で恒温放置する。一部の実施形態では、前記酵素混合物は、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼクロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せを有する。前記酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。

【0096】

一部の実施形態は、PVMCsを臍帯血管から単離する方法であって、前記臍帯血管に酵素を添加して、前記PVMCsを該臍帯血管から解離させる工程を有する方法である。一部の実施形態は、前記臍帯血管から排出する工程と、前記臍帯血管に酵素を添加して前記PVMCsを該臍帯血管から解離させる工程とをさらに有する。一部の実施形態において、前記臍帯血管の内容物を排出する前記プロセスは、前記臍帯血管を生理食塩水でフラッシュする工程を有する。一部の実施形態において、前記臍帯血管から排出する工程は、前記臍帯血管に針を挿入する段階と、前記臍帯血管を生理食塩水でフラッシュする段階とを有する。一部の実施形態において、前記生理食塩水は、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)である。
30

【0097】

一部の実施形態において、前記酵素は、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼクロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せから選択される。前記酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。
40

【0098】

一部の実施形態において、前記酵素混合物は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択される抗生物質をさらに有する。一部の実施形態において、前記抗生物質は、前記酵素混合物の約20%を構成する。一部の実施形態において、前記酵素混合物は、タイロード液、乳酸リングル液、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential
50

medium Eagle alpha modification: -MEM)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)、またはそれらの組合せから選択される培地をさらに有する。一部の実施形態において、前記酵素混合物中の前記抗生物質は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択される抗生物質を有することができる。

【0099】

一部の実施形態は、前記酵素を前記臍帯血管とともに恒温放置する工程を有する。一部の実施形態では、前記酵素を約20から約60分間、恒温放置する。一部の実施形態では、前記酵素を約15から約35の範囲の温度で恒温放置する。

10

【0100】

一部の実施形態は、前記酵素を不活性化する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記酵素を不活性化する工程は、前記臍帯血管を溶液でフラッシュする段階を有する。一部の実施形態では、前記溶液はリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)、血清含有培地、EDTA、ジイソプロピルフルオロリン酸(Diisopropylfluorophosphate: DFP)、エチレンジアミン四酢酸(Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA)、エチレングリコール四酢酸(ethylene glycol tetraacetic acid: EGTA)、システイン、ヒスチジン、ジチオトレイトル(Dithiothreitol: DTT)、2-メルカプトエタノール、o-フェナントロリン、Hg²⁺、Pb²⁺、Cd²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、2-マクログロブリン、1,10-フェナントロリン、トシリルリシルクロロメチルケトン(Tosyl Lysyl Chloromethyl Ketone: TLCK)、重金属イオン、クエン酸アニオン、ホウ酸アニオン、およびTrisアニオン、アルファ1-アンチトリプシン、C1-阻害因子、アンチトロンビン、アルファ1-アンチキモトリプシン、プラスミノゲン活性化因子阻害因子-1、ニューロセルピン、アプロチニン、ベスタチン、E64、ロイペプチド、組織メタロプロテイナーゼ阻害因子(tissue inhibitors of metalloproteinases: TIMPs)1~4、またはそれらの組合せから選択され得る。

20

【0101】

一部の実施形態は、前記臍帯血管を酵素混合物とともに2度目に、恒温放置する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記酵素混合物は、前記第1の恒温放置において使用したのと同じ酵素であってよい。

30

【0102】

一部の実施形態では、臍帯血管からのPVMCsの単離を無菌環境で行う。

【0103】

一部の実施形態は、血管周囲薬用細胞の集団を濃縮する工程をさらに有する。一部の実施形態において、PVMCsの集団を濃縮する工程は、浮遊密度沈降、濾過、遠心分離、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、PVMCsの前記集団を濃縮する工程によって、濃縮された脱凝集血管周囲薬用細胞の集団を得る。

40

【0104】

一部の実施形態は、多数の臍帯血管由来調製物を併せる、PVMCsの単離方法である。一部の実施形態では、多数の臍帯血管由来調製物を、血管周囲薬用細胞の集団を濃縮する前記工程後に併せることができる。一部の実施形態では、多数の臍帯血管由来調製物を、第2の酵素との第2の恒温放置を行う前記工程後に併せることができる。

【0105】

一部の実施形態は、PVMCsを臍帯血管から単離する方法であって、酵素混合物を前記血管に添加して、前記血管周囲薬用細胞を解離させる工程を有する方法である。一部の実施形態において、前記臍帯血管は、長さ約2cmから約10mであり得る。一部の実施形態において、前記血管は、静脈または動脈である。一部の実施形態において、前記酵素

50

混合物は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水 (TRIS-buffered saline: TBS)、ハンクス平衡塩類溶液 (Hank's balanced salt solution: HBSS)、アール平衡塩類溶液 (Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水 (Standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水 (HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液 (Gey's balanced salt solution: GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性 (minimum essential medium Eagle alpha modification: -MEM)、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)、またはそれらの組合せから選択される培地を有する。一部の実施形態において、前記酵素混合物中の前記抗生物質は、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択される抗生物質を有することができる。一部の実施形態において、前記抗生物質は、前記酵素混合物の約20%を構成する。一部の実施形態において、前記酵素混合物は、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せを有する。前記酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。一部の実施形態において、前記酵素混合物は、IV型コラゲナーゼを有する。

10

20

30

【0106】

一部の実施形態では、前記臍帯血管を、培地、抗生物質、またはそれらの混合物を有する前記酵素混合物の添加前に、浸漬培地に浸漬する。一部の実施形態において、前記浸漬培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水 (TRIS-buffered saline: TBS)、ハンクス平衡塩類溶液 (Hank's balanced salt solution: HBSS)、アール平衡塩類溶液 (Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水 (Standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水 (HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液 (Gey's balanced salt solution: GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性 (minimum essential medium Eagle alpha modification: -MEM)、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態では、前記抗生物質はストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択され得る。一部の実施形態において、前記抗生物質は、前記浸漬培地の約20%を構成することができる。

30

40

【0107】

一部の実施形態では、前記臍帯血管にカニューレを挿入することができる。一部の実施形態は、前記カニューレが挿入された血管をヘパリン培地で洗浄する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記ヘパリン培地は、タイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水 (TRIS-buffered saline: TBS)、ハンクス平衡塩類溶液 (Hank's balanced salt solution: HBSS)、アール平衡塩類溶液 (Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水 (Standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水 (HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液 (Gey's balanced salt solution: GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性 (minimum essential medium Eagle alpha modification: -MEM)、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS)、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態では、前記抗生物質はストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択され得る。一部の実施形態において、前記抗生物質は、前記浸漬培地の約20%を構成することができる。

50

buffered saline : PBS)、またはそれらの組合せであつてよい。一部の実施形態において、前記ヘパリン培地は、ヘパリンを約50から約200単位/mLの量で有する。

【0108】

一部の実施形態は、前記臍帯血管の第1の端部を、該血管に前記酵素混合物を添加する前にクランプする工程をさらに有する。一部の実施形態は、前記臍帯血管の第2の端部を、該血管に前記酵素混合物を添加した後にクランプして、クランプされた臍帯血管を作製する工程をさらに有する。一部の実施形態は、クランプされた臍帯血管を作製する工程の後、前記クランプされた臍帯血管を約15から約38の範囲の温度で恒温放置する工程をさらに有する。一部の実施形態では、前記クランプされた臍帯血管を約15から約60分間、恒温放置することがある。10

【0109】

一部の実施形態は、前記臍帯血管の第1の端部のクランプを外す工程と、前記臍帯血管にタイロード液を添加する工程とをさらに有する。一部の実施形態は、タイロード液を添加する工程の後、前記臍帯血管の前記第1の端部を再びクランプする工程と、前記臍帯血管をマッサージする工程とをさらに有する。一部の実施形態は、タイロード液を添加する工程の後、洗浄溶出液を採取する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記洗浄溶出液は、内皮および内皮下細胞の細胞浮遊液を有する。一部の実施形態は、前記溶出液を培地で洗浄する工程をさらに有する。一部の実施形態では、前記培地はタイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline:TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution:HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution:EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate:SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline:HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution:GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification:-MEM)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline:PBS)、またはそれらの組合せから選択され得る。20

【0110】

一部の実施形態は、第2の酵素混合物を前記臍帯血管に添加する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記酵素混合物は、酵素、培地、抗生物質、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態では、前記培地はタイロード液、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline:TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution:HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution:EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate:SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline:HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution:GBSS)、最小必須培地イーグルアルファ変性(minimum essential medium Eagle alpha modification:-MEM)、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline:PBS)、またはそれらの組合せから選択され得る。40

【0111】

一部の実施形態では、前記抗生物質はストレプトマイシン、ゲンタマイシン、ファンギゾン、ペニシリンG、アンホテリシンB、またはそれらの組合せから選択され得る。一部の実施形態において、前記抗生物質は、前記酵素混合物の約20%を構成する。一部の実施形態では、前記酵素はコラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、50

システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せから選択され得る。前記酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。一部の実施形態において、前記酵素は、ⅠV型コラゲナーゼを有する。

【0112】

一部の実施形態は、前記臍帯血管の第1の端部を、前記酵素混合物を添加する前にクランプする工程をさらに有する。一部の実施形態は、前記臍帯血管の第2の端部を、該血管に前記酵素混合物を添加した後にクランプして、クランプされた臍帯血管を作製する工程をさらに有する。一部の実施形態は、クランプされた臍帯血管を作製する工程の後、前記クランプされた臍帯血管を約15から約38の範囲の温度で恒温放置する工程をさらに含む。一部の実施形態では、前記クランプされた臍帯血管を約15から約60分間、恒温放置することがある。

10

【0113】

一部の実施形態は、前記臍帯血管の第1の端部のクランプを外す工程と、前記臍帯血管にタイロード液を添加する工程とをさらに有する。一部の実施形態は、タイロード液を添加する工程の後、前記臍帯血管の前記第1の端部を再びクランプする工程と、前記臍帯血管をマッサージする工程とをさらに有する。一部の実施形態は、タイロード液を添加する工程の後、洗浄溶出液を採取する工程をさらに有する。

20

【0114】

一部の実施形態は、臍帯血管から単離されたPVMCsを有する組成物を対象とする。
一部の実施形態において、前記PVMCsは、薬用能力を有する。

【0115】

PVMCsを骨から単離するための方法

一部の実施形態において、PVMCsを骨から単離する方法は、細胞浮遊液を前記骨から抽出する工程と、PVMCsの集団を前記細胞浮遊液から分離する工程とを有する。一部の実施形態において、抽出工程は、酵素消化、機械力、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、前記方法は、PVMCsの前記集団を濃縮する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記方法は、前記濃縮されたPVMCsの集団を選択的に増殖させる工程をさらに有する。

30

【0116】

一部の実施形態では、PVMCsを骨細片から単離することができる。一部の実施形態では、PVMCsを骨髄スクープ、骨髄スコープ、または骨小腔洗浄から単離することができる。

【0117】

一部の実施形態において、骨からのPVMCsの単離は、(i)細胞浮遊液を前記骨から酵素消化、機械力、またはそれらの組合せによって抽出する工程と；(ii)PVMCsの集団を前記細胞浮遊液から浮遊密度沈降、濾過、遠心分離、またはそれらの組合せによって分離する工程とを有する。

【0118】

一部の実施形態において、細胞浮遊液を前記骨から抽出する工程は、前記PVMCsを前記骨中の小血管の基底膜に連結する結合を特異的に切断するための酵素消化を有する。より具体的には、酵素消化は、前記基底膜の一部分であり得る分子を切断することができ、結果としてPVMC結合ドメインを放出する。

40

【0119】

一部の実施形態において、前記方法は、前記細胞浮遊液を抽出する工程の前に前記骨を破碎する工程をさらに有する。一部の実施形態において、破碎工程は、前記骨を清浄化して外来軟組織を除去する段階と、前記骨を破碎する段階とを有する。一部の実施形態において、粒径は、約1から約50mm³の範囲である。一部の実施形態において、前記骨の酵素消化は、コラゲナーゼ 中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ、クロストリパイン(C.ヒストリチクムからのシステインプロテアーゼ)、セ

50

リンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せから選択される酵素で前記骨を処理する段階を有することがある。前記酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。一部の実施形態において、前記酵素消化は、前記 P V M C s を前記骨断片の中の小血管の前記基底膜に連結する結合を特異的に切断する。一部の実施形態において、酵素消化は、前記 P V M C s が別々に会合している分離した会合分子、例えば、前記基底膜中のヘパリンに結合する P D G F - B B を収容している前記基底膜の結合を切断し、P D G F - B B は次いで、P D G F 受容体を発現する P V M C s に結合することが可能であり得る。一部の実施形態では、骨断片の前記酵素消化を骨の機械的破壊後でも、インタクト骨断片でも行うことができる。

10

【0120】

一部の実施形態において、前記細胞浮遊液を骨から抽出する工程は、密度勾配遠心分離を有することがある。一部の実施形態では、密度勾配遠心分離を、一連の遠心分離工程によって遂行することができる。一部の実施形態では、遠心分離を約 $500 \times g$ から約 $2,500 \times g$ で行うことができる。一部の実施形態において、これらの調製物は、整形外科的および歯科的用途での直接使用に適し得る。一部の実施形態では、前記骨を密度勾配遠心分離の前に酵素消化に付すことがある。

【0121】

一部の実施形態では、前記 P V M C s を骨から抽出する工程は、骨髄試料をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline : PBS) で希釈することによって果たすことができる。PBSなどの適する媒体での希釈は、酵素消化の前記プロセスに適する環境を提供する。一部の実施形態では、PBSでの希釈の後に、1若しくはそれ以上の酵素、例えば、コラゲナーゼ 中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、メタロプロテアーゼ、クロストリパイン (C. histriotheliumからのシステインプロテアーゼ)、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せを使用する酵素消化の前記工程が続くことがある。前記1若しくはそれ以上の酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真菌、またはそれらの組合せからのものであってよい。一部の実施形態において、前記酵素消化は、小血管または洞様毛細血管の基底膜から P V M C の付着を切断する酵素を使用することがある。一部の実施形態において、P V M C s の骨髄からの前記抽出は、酵素消化の工程を含まない。一部の実施形態では、その後、前記希釈されたまたは酵素的に消化された試料を、Percol 1 (商標) を使用する密度勾配分離に付して单核細胞を獲得することができる。前記单核画分を P V M C s の増殖のためのダルベッコ変性イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM) 内の細胞培養力セットにプレーティングすることができる。一部の実施形態において、前記方法は、P V M C s の集団を前記細胞浮遊液から浮遊密度沈降、濾過、遠心分離、免疫ビーズ選択、またはそれらの組合せによって分離する工程をさらに有する。

20

【0122】

一部の実施形態において、前記方法は、前記濃縮された P V M C s を培養して、濃縮された骨由来 P V M C s の集団を選択的に増殖させる工程をさらに有することがある。

40

【0123】

一部の実施形態では、骨組織を有する骨細片または粉碎された骨試料を、1から20%ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum : FBS) で補足された DMEM で希釈することができる。一部の実施形態では、前記骨 - DMEM 混合物を激しくボルテックスして、前記組織を機械的に分散させ、それを前記骨から分離し、続いてベンチトップ遠心機で遠心分離することができ、その後、当該上清を除去することができる。一部の実施形態では、Percol 1 (商標)、続いて、インタクト Percol 1 (商標) 勾配を保証するための破壊を伴わない第2ラウンドの遠心分離を用いることにより、残存細胞ペレットを分別して成核細胞を採取することになる。その後、前記勾配の上部画分を新しい試験管に移し、DMEMで補足し、その後、遠心分離することができる。遠心分離後

50

、前記ペレットを乱すことなく当該上清を除去することができる。一部の実施形態では、その後、前記ペレットをD M E Mに再浮遊させ、D M E Mを使用して遠心分離により数回洗浄することができる。得られるP V M C細胞浮遊液は、その結果、増殖または濃縮の準備が整った状態であり得、または治療的に使用され得る。一部の実施形態では、前記P V M C細胞浮遊液を骨と併用することができる。一部の実施形態では、前記P V M C細胞浮遊液を、それを必要とする被検者に全身送達または直接注入することができる。

【0124】

一部の実施形態において、P V M C sの前記集団を濃縮する工程は、前記P V M C上の細胞表面抗原に対して親和性を有する抗体を有する磁性ビーズの使用を有する。一部の実施形態において、P V M C sを濃縮する工程は、増殖させた細胞集団を濃縮する段階を有することがある。理論により拘束されることを望まないが、P V M C sは限られた回数しか継代されず、その後増殖および分化能力の低減を経験するがあると考えられる。さらに、P V M C調製物の成長特性および細胞収率は、ドナーの年齢に依存することがあり、個体間で様々であることがあると考えられる。一部の実施形態では、P V M C集団の前記濃縮を該細胞集団の事前増殖なしで行うことができる。

10

【0125】

一部の実施形態では、濃縮された骨由来P V M C sの前記集団を培養しないことがある。一部の実施形態では、ヒト骨髄から獲得されたP V M C sを培地中に培養して増殖させることがある。

20

【0126】

一部の実施形態では、骨由来P V M C sを細胞培養で増殖させることができる。P V M C sの一次培養物を100mm培養皿1つにつき約10⁵から約10⁹細胞で播種し、約1から20%ウシ胎仔血清と、約1~3mM L-グルタミンと、約5~200単位/mLペニシリンと、約5~200μg/mLストレプトマイシンとを含有するD M E M培養培地中で増殖させることができる。P V M C sは、前記負に帯電した培養皿に接着することができ、その結果、反復継代およびD M E Mでのすぎ後、接着細胞のみの選択が可能である。一部の実施形態では、P V M C集団を接着細胞の選択後にさらに二次培養することができる。一部の実施形態では、ヒトフィブロネクチンで培養皿をプレコートすることにより、P V M C sを選択することができる。一部の実施形態では、ヒトフィブロネクチンを前記培養培地に添加することができる。一部の実施形態では、接着P V M C sを培養皿からトリプシンでの処理によって除去することができる。一部の実施形態において、かかる選択的培養は、造血機能の細胞を除去する。なぜならこれらの細胞は、非接着性でありまたはあまり付着しないからである。一部の実施形態において、造血細胞は、前記培養培地に接着し、トリプシンでの処理によって剥離しない。

30

【0127】

骨由来P V M C sは、C D 2 9、C D 1 0 5、C D 4 4、C D 7 3、C D 1 4 6、C D 1 6 6、またはそれらの任意の組合せから選択される細胞表面マーカーを発現することができる。一部の実施形態において、前記P V M C sは、造血系および内皮細胞マーカーを発現することができない。一部の実施形態において、本明細書における実施形態の単離されたP V M C集団は、約90%超純粋であることができる。一部の実施形態において、本明細書における実施形態のP V M C集団は、約50%超純粋、60%純粋、70%純粋、または80%純粋であることができる。一部の実施形態において、用語「純粋な」は、抗原発現、生存力、C D 7 3 + / C D 1 0 5 + / C D 4 4 + / C D 2 9 + / S S E A 4 + / C D 4 5 - / C D 3 1 - / v W F - / C D 1 4 - の表現型を発現する能力、またはそれらの任意の組合せを指す。一部の実施形態において、本明細書における実施形態の単離されたP V M C集団は、約90%まで純粋、約80%まで純粋、約70%まで純粋、約60%まで純粋、または約50%まで純粋であることができる。一部の実施形態において、骨由来P V M C集団は、不純である。

40

【0128】

細胞表面マーカーを、ヒトC D 2 9、C D 1 0 5、C D 4 4、C D 7 3、S S E A 4、

50

C D 4 5、C D 3 1、v W F、およびC D 1 4に対するものを含む様々な抗体で標識した後、フローサイトメトリーによって特徴づけることができる。その後、フルオレシンと結合させた二次抗体を使用することができる。

【0129】

一部の実施形態では、骨由来P V M C sを異種骨由来細胞調製物からまたはF A C S選別によって抽出および濃縮することができる。P V M C sに対する細胞表面抗原、例えばC D 2 9、C D 1 0 5、C D 4 4、C D 7 3の使用は、P V M C 集団の陽性免疫選択のための手段を提供し、P V M C 細胞集団の表現型分析、例えばフローサイトメトリーのための手段も提供する。C D 2 9、C D 1 0 5、C D 4 4、およびC D 7 3抗原の発現について選択された細胞を他の幹細胞および前駆細胞マーカー（これに限定されるものではないが、S S A E 4ヒト胚性幹期特異的マーカーを含む）についての選択により、さらに精製することができる。
10

【0130】

一部の実施形態において、前記細胞浮遊液から骨由来P V M C sの集団を濃縮する工程は、前記P V M C sの表面マーカーを使用して前記P V M C sを前記異種細胞浮遊液から分離する段階を有する。一部の実施形態において、前記P V M C sを分離するために使用する前記表面マーカーとしては、C D 2 9、C D 1 0 5、C D 4 4、C D 7 3、S S E A 4、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。

【0131】

一部の実施形態において、骨由来P V M C sを抽出および濃縮するための手順としては、抗体被覆磁性ビーズを使用する磁気分離、アフィニティクロマトグラフィー、および固体マトリックス、例えばプレートに付着した抗体での「パンニング」、または当該技術分野において公知の他の好都合な技法を含むことができる。正確な分離を提供する技法としては、様々な洗練度、例えば、多色チャンネル、低角および鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなどを有することができる蛍光活性化細胞選別機を含む。死滅細胞は、死滅細胞に会合している色素、例えば、ヨウ化プロピジウム（p r o p i d i u m u i o d i d e : P I ）またはL D Sでの選択によって排除することができる。前記選択された細胞の生存力に過度に有害でない任意の技法を利用することができる。
20

【0132】

一部の実施形態において、抗体被覆磁性ビーズは、特定の細胞タイプの分離の容易さを可能にする標識、例えば、磁性ビーズ；アビジンまたはストレプトアビジンに高い親和性で結合するビオチン；蛍光活性化細胞選別機（f l u o r e s c e n c e - a c t i v a t e d c e l l s o r t e r : F A C S ）で使用することができる蛍光色素；またはハプテンなどと結合させた抗体を有することができる。多色分析を前記F A C Sとともにまたは免疫磁気分離とフローサイトメトリーとの組合せで利用することもできる。多色分析は、多数の表面抗原、例えばC D 7 3 +、C D 1 0 5 +、C D 4 4 +、C D 2 9 +、とS S A E 4細胞マーカーを認識する抗体とに基づく細胞の分離にとって興味深いものであり得る。多色分析に使用されている蛍光色素としては、これに限定されるものではないが、フィコビリタンパク質、例えば、フィコエリトリンおよびアロフィコシアニン；フルオレセイン、ならびにテキサスレッドを含むことができる。一部の実施形態において、陰性表示は、染色レベルが、アイソタイプ適合陰性対照の輝度またはそれ以下であることを示す。一部の実施形態において、d i m表示は、染色レベルが陰性染色レベルに近いことがあるが、アイソタイプ適合対照より明るいこともあるということを示す。
30

【0133】

一部の実施形態では、C D 2 9、C D 1 0 5、C D 4 4、C D 7 3、S S E A 4、C D 4 5、C D 3 1、v W F、およびC D 1 4抗体を超常磁性微粒子などの磁性試薬に直接または間接的に結合させることができる。磁性粒子への直接結合は、様々な化学的連結基の使用によって果たすことができる。一部の実施形態では、抗体を側鎖アミノまたはスルフヒドリル基およびヘテロ官能性架橋試薬によって前記微粒子にカップリングさせることができる。多数のヘテロ官能性化合物がエンティティへの連結に利用可能である。一部の実
40

施形態において、前記連結基としては、これに限定されるものではないが、3-(2-pyridyldiyl)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SPD P)または4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(SMCC)と前記抗体上の反応性スルフヒドリル基および前記磁性粒子上の反応性アミノ基を含むことができる。

【0134】

一部の実施形態では、抗CD29、抗CD105、抗CD44、抗CD73、抗SSE A4、抗CD45、抗CD31、抗vWF、および抗CD14抗体を前記磁性粒子に間接的にカップリングさせることができる。前記抗体をハプテンに直接接合させることができ、ハプテン特異的第2ステージ抗体を前記粒子に結合させることができる。適するハプテンとしては、これに限定されるものではないが、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、FITC、ジニトロフェニル、ニトロフェニル、アビジン、ビオチンなどを含む。前記ハプテンのタンパク質への接合方法は、当該技術分野において公知であり、かかる接合のためのキットは、市販されている。

10

【0135】

一部の実施形態では、特定の細胞サブセットを結合するために必要な抗体の量を、試験分離および分析を行うことによって経験的に決定することができる。一部の実施形態では、前記細胞および抗体を、複合体の形成に十分な期間、例えば、これに限定されるものではないが、少なくとも約5分、少なくとも約10分、または約30分もしくはそれ以下、または約60分もしくはそれ以下、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲の期間、恒温放置することができる。

20

【0136】

一部の実施形態では、前記PVMCs上に存在するまたは不在であることが公知の細胞表面マーカーに特異的な抗体または結合分子とともに前記細胞をさらに恒温放置することができる。例えば、CD45、CD31、vWF、またはCD14マーカーを発現する細胞を陰性選択することができる。

20

【0137】

一部の実施形態では、前記標識された細胞を前記特異的抗体調製物に従って分離することができる。蛍光色素標識抗体は、FACS分離、免疫磁気選択用の磁性粒子、特に高勾配磁気選択(high gradient magnetic selection:HGM S)などに有用であり得る。PVMCsを分離および単離するための手順が抗体を用いる実施形態において、一部の実施形態では、かかる抗体が、細胞培養および増殖中の自然な細胞プロセスによって消費され得るので、強化された自家骨移植片に使用され得る前記PVMC調製物中に検出可能な抗体がないことになることに留意されたい。

30

【0138】

一部の実施形態では、精製されたまたは不純な細胞集団を任意の適切な培地に採取することができる。一部の実施形態では、これに限定されるものではないが、ウシ胎仔血清(fetal calf serum:FCS)、ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin:BSA)、ヒト血清アルブミン(human serum albumin:HSA)、またはそれらの組合せで多くの場合補足された、ダルベッコ変性イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium:DMEM)、ハンクス塩基性塩類溶液(Hank's Basic Salt Solution:HBSS)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's phosphate buffered saline:;dPBS)、RPMI、イスコフ変性ダルベッコ培地(Iscove's modified Dulbecco's medium:IMDM)、約5mM EDTAを伴うリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline:PBS)などを含む任意の市販培地を使用することができる。一部の実施形態において、前記培地は、DMEM、F-12、M199、RPMI、またはそれらの任意の組合せであってよい。

40

【0139】

50

一部の実施形態において、前記 P V M C s は、前記精製された細胞集団の約 30 % またはそれ以上、好ましくは前記精製された細胞集団の 50 % またはそれ以上、さらに好ましくは前記精製された細胞集団の 90 % またはそれ以上、および最も好ましくは前記精製された細胞集団の約 95 % またはそれ以上（実質的に純粋）であることになる。

【 0 1 4 0 】

一部の実施形態では、単離された P V M C s を、約 10 % ウシ胎仔血清と、約 2 mM L - グルタミンと、約 100 単位 / mL ペニシリンと、約 100 µg / mL ストレプトマイシンとを含有する D M E M 培養培地中で増殖させることができる。前記骨髄を T 75 フラスコに入れ、D M E M 培養培地で希釈することができる。この混合物を、約 5 % C O₂ を有する約 37 °C の恒温器の中で約 3 日間保管することができる。前記恒温放置時間の後、前記 P V M C s は、前記フラスコの表面に接着していることがあり、骨髄の残存成分を P B S での洗浄によって除去することができる。10

【 0 1 4 1 】

一部の実施形態では、基礎培地および低グルコースを約 1 ~ 20 % ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum : F B S) とともに用いて、P V M C s を増殖させることができる。一部の実施形態では、血小板溶解産物などの他のタンパク質源を使用することができる。一部の実施形態では、増殖能力を強化するための培養補足物としてのさらなる因子、例えば、限定ではないが組換えヒト線維芽細胞増殖因子 (recombinant human fibroblastic growth factor : r h F G F) を使用することができる。一部の実施形態では、10 ng / mL r h F G F - 2 は、P V M C 細胞集団の集団倍加時間を短縮することができる。20

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態において、単離された P V M C s を、約 5 % C O₂ を有する 37 °C 恒温器において、約 1 ~ 200 % ウシ胎仔血清と、約 1 ~ 20 ng / mL 線維芽細胞成長因子と、約 1 ~ 3 mM L - グルタミンと、約 1 ~ 200 U / mL ペニシリン - ストレプトマイシンとで補足されたイスコフ変性ダルベッコ培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium : I M D M) 中で増殖させ、単離前に約 5 ~ 30 回継代することができる。

【 0 1 4 3 】

ウシ胎仔血清は、病原体を宿していることがあり、P V M C レシピエントは、抗 F B S 抗体を発生させることがあり、そのため場合によっては無血清培地の使用を要する。一部の実施形態では、F G F と、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor : P D G F) と、トランスフォーミング成長因子 - (transforming growth factor - : T G F -) とで補足された無血清培地中で P V M C s を成長させることができる。さらなる実施形態では、高血小板血漿もまた F B S の有効な代用品であると思われる。自家血清もまた実行可能な代替品となるが、前記培地を補足するために必要な大容量により制限される。加えて、幾つかの無血清被定義培地が間葉幹細胞の増殖用に市販されており、それらもまた P V M C s の増殖に適用可能となる。一部の実施形態では、自家血清を使用して無血清培地を補足することができる。一部の実施形態では、自家血清を無血清培地に添加して、約 5 から約 25 % の最終濃度を達成する。一部の実施形態において、前記自家血清は、自家ヒト血清であってもよい。かかる化学的に定義された培地の使用は、それらを特定の P V M C 源のためにおよび場合によっては P V M C s の特定の治療的使用のために最適化することを要する。30

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態は、骨から獲得された P V M C s を単離する方法であって、(i) 被検者からの骨または骨組織の試料を提供する工程と；(i i) 前記 P V M C s を前記骨または骨組織から抽出する工程と；(i i i) 前記抽出された P V M C s を濃縮する工程とを有する方法を対象とする。40

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、骨または骨組織を破碎機に通すことによって加工して、骨細片を

10

20

30

40

50

製造することができる。骨細片は、骨と骨髄組織との両方を有することがある。一部の実施形態において、骨細片は、緻密骨、骨髄、髄管からの組織、海綿骨組織、またはそれらの組合せを有することがある。一部の実施形態では、骨の断片を Noviomagus Bone Millなどのボーンミルに通すことによって骨細片に粉碎する。一部の実施形態では、骨断片を粉碎前に冷凍する。一部の実施形態において、骨断片は、粉碎前は新鮮である。一部の実施形態において、前記粉碎された骨細片は、インタクト骨梁構造を有する。一部の実施形態では、PVMCsを培養してPVMC集団を選択的に増殖させることができる。一部の実施形態では、PVMCsを培養しないことがある。一部の実施形態において、前記培養されたPVMCsは、細胞培養表面に接着性であり得る。

【0146】

10

一部の実施形態において、前記PVMCsを抽出する工程は、(i)細胞浮遊液を前記骨から、酵素消化、機械力、またはそれらの組合せによって抽出する段階と；(ii)PVMCsの集団を前記細胞浮遊液から浮遊密度沈降、濾過、遠心分離、またはそれらの組合せによって分離する段階とを有する。

【0147】

一部の実施形態において、細胞浮遊液の前記骨からの形成は、前記PVMCsを前記骨中の小血管の基底膜に連結する結合を特異的に切断するための酵素消化を有する。一部の実施形態において、酵素消化は、小血管を包囲する基底膜からのPVMCsの切断を有する。一部の実施形態において、酵素消化は、前記PVMCsが別々に会合している分離した会合分子、例えば、前記基底膜中のヘパリンに結合するPDGF-BBを収容している前記基底膜の結合を切断し、PDGF-BBは次いで、PDGF受容体を発現するPVMCsに結合することが可能であり得る。

20

【0148】

20

一部の実施形態では、前記酵素消化を、コラゲナーゼ、中性もしくは酸性プロテアーゼ、GAGアーゼ、もしくはメタロプロテアーゼ、クロストリパイン、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せから選択される1若しくはそれ以上の酵素を使用することによって果たすことができる。前記1若しくはそれ以上の酵素は、これに限定されるものではないが、動物、植物、細菌、もしくは真、またはそれらの組合せからのものであってよい。一部の実施形態において、前記酵素消化は、小血管の基底膜からPVMCの付着を切断する1若しくはそれ以上の酵素を使用する。一部の実施形態において、酵素消化は、分子であって、それら自体が前記基底膜に結合することができるものである分子に前記PVMCを連結する結合を切断するための酵素消化も含む。例えば、前記基底膜中のヘパリンに結合するPDGF-BBおよびPDGF-BBは次いで、PDGF受容体を発現するPVMCsへの結合が可能であり得る。

30

【0149】

一部の実施形態において、PVMCsを単離する前記方法は、PVMCsの集団を濃縮する工程をさらに有する。一部の実施形態では、PVMCsの集団を濃縮する工程は、前記PVMC上の細胞表面抗原に対して親和性を有する抗体を有する磁性ビーズの使用によって果たすことができる。一部の実施形態において、抗体は、抗CD146、抗CD105、抗CD166、抗CD271、またはそれらの組合せから選択される。一部の実施形態では、親和性を有する抗体またはCD45、CD34、またはそれらの組合せを使用して、CD45、CD34、またはそれらの組合せを発現する細胞をPVMCsの前記集団から除去することができる。一部の実施形態では、抗体アフィニティーカラムを使用することができ、抗体アフィニティーカラムにPVMC調製物を通し、その後、溶離してより濃縮されたPVMC調製物を生じさせることができる。

40

【0150】

一部の実施形態において、前記濃縮された骨由来PVMCsの調製は、前記PVMCsを濃縮する工程の後、前記濃縮されたPVMCsを培養して、濃縮された骨由来PVMCsの前記集団を選択的に増殖させる工程をさらに有する。一部の実施形態では、濃縮された骨由来PVMCsの前記集団を培養しない。

50

【0151】

一部の実施形態において、前記細胞浮遊液中の細胞を濃縮する工程は、遠心分離によるものであってもよい。

【0152】

単離されたPVMCsを濃縮および増殖させるための方法

一部の実施形態において、単離されたPVMCsの前記集団の濃縮は、前記単離されたPVMC上の細胞表面抗原に対して親和性を有する抗体を有する磁性ビーズの使用を含む。一部の実施形態において、前記単離されたPVMCsの濃縮は、増殖した細胞集団を濃縮する工程を有することがある。理論により拘束されることを望まないが、単離されたPVMCsは限られた回数しか継代されず、その後増殖および分化能力の低減を経験することがあると考えられる。さらに、単離されたPVMC調製物の成長特性および細胞収率は、ドナーの年齢に依存することがあり、個体間で様々であることがあると考えられる。一部の実施形態では、単離されたPVMC集団の前記濃縮を前記細胞集団の事前増殖なしで行うことができる。

10

【0153】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを細胞培養で増殖させることができる。単離されたPVMCsの一次培養物を100mm培養皿1つにつき約10⁵から約10⁹細胞で播種し、約1から20%ウシ胎仔血清と、約1～3mM L-グルタミンと、約5～200単位/mLペニシリンと、約5～200μg/mLストレプトマイシンとを含有するDMEM培養培地中で増殖させることができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、前記負に帯電した培養皿に接着することができ、その結果、反復継代およびDMEMでのすぎ後、接着細胞のみの選択が可能である。一部の実施形態では、単離されたPVMC集団を、接着細胞の選択後にさらに二次培養することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを、ヒトフィプロネクチンで培養皿をプレコートすることにより選択することができる。一部の実施形態では、ヒトフィプロネクチンを前記培養培地に添加することができる。一部の実施形態では、単離された接着PVMCsを培養皿からトリプシンでの処理によって除去することができる。一部の実施形態では、かかる選択的培養は、造血機能の細胞を除去する。なぜならこれらの細胞は、非接着性であり、またはあまり付着しないからである。一部の実施形態において、造血細胞は、前記培養培地に接着し、トリプシンでの処理によって剥離しない。

20

【0154】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、CD29、CD105、CD44、CD73、CD146、CD166、またはそれらの任意の組合せから選択される細胞表面マーカーを発現することができる。一部の実施形態において、前記PVMCsは、造血系および内皮細胞マーカーを発現することができない。一部の実施形態において、本明細書における実施形態の単離されたPVMC集団は、約90%超純粋であることができる。一部の実施形態において、本明細書における実施形態のPVMC集団は、約50%超純粋、60%純粋、70%純粋、または80%純粋であることができる。一部の実施形態において、用語「純粋な」は、抗原発現、生存力、CD73+/CD105+/CD44+/CD29+/SSEA4+/CD45-/CD31-/vWF-/CD14-の表現型を発現する能力、またはそれらの任意の組合せを指す。一部の実施形態において、本明細書における実施形態の単離されたPVMC集団は、約90%まで純粋、約80%まで純粋、約70%まで純粋、約60%まで純粋、または約50%まで純粋であることができる。一部の実施形態において、骨由来PVMC集団は、不純である。

30

40

【0155】

細胞表面マーカーを、ヒトCD29、CD105、CD44、CD73、SSEA4、CD45、CD31、vWF、およびCD14に対するものを含む様々な抗体で標識した後、フローサイトメトリーによって特徴づけることができる。その後、フルオレシンと結合させた二次抗体を使用することができる。

【0156】

50

一部の実施形態では、単離された P V M C s を異種由来細胞調製物からまたは F A C S 選別によって抽出および濃縮することができる。P V M C s に対する細胞表面抗原、例えば C D 2 9 、 C D 1 0 5 、 C D 4 4 、 C D 7 3 の使用は、P V M C 集団の陽性免疫選択のための手段を提供し、P V M C 細胞集団の表現型分析、例えばフローサイトメトリーのための手段も提供する。C D 2 9 、 C D 1 0 5 、 C D 4 4 、および C D 7 3 抗原の発現について選択された細胞を他の幹細胞および前駆細胞マーカー（これに限定されるものではないが、S S A E 4 ヒト胚性幹期特異的マーカーを含む）についての選択により、さらに精製することができる。

【 0 1 5 7 】

一部の実施形態において、前記細胞浮遊液から単離された P V M C s の集団を濃縮する工程は、前記 P V M C s の表面マーカーを使用して前記 P V M C s を前記異種細胞浮遊液から分離する工程を有する。一部の実施形態において、前記 P V M C s を分離するために使用する前記表面マーカーとしては、C D 2 9 、 C D 1 0 5 、 C D 4 4 、 C D 7 3 、 S S E A 4 、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。

10

【 0 1 5 8 】

一部の実施形態において、単離された P V M C s を抽出および濃縮するための手順としては、抗体被覆磁性ビーズを使用する磁気分離、アフィニティークロマトグラフィー、および固体マトリックス、例えばプレートに付着した抗体での「パンニング」、または当該技術分野において公知の他の好都合な技法を含むことができる。正確な分離を提供する技法としては、様々な洗練度、例えば、多色チャンネル、低角および鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなどを有することができる蛍光活性化細胞選別機を含む。死滅細胞は、死滅細胞に会合している色素、例えば、ヨウ化プロピジウム（ p r o p i d i u m i o d i d e : P I ）または L D S での選択によって排除することができる。前記選択された細胞の生存力に過度に有害でない任意の技法を利用することができる。

20

【 0 1 5 9 】

一部の実施形態において、抗体被覆磁性ビーズは、特定の細胞タイプの分離の容易さを可能にする標識、例えば、磁性ビーズ；アビジンまたはストレプトアビジンに高い親和性で結合するビオチン；蛍光活性化細胞選別機（ f l u o r e s c e n c e - a c t i v a t e d c e l l s o r t e r : F A C S ）で使用することができる蛍光色素；またはハブテンなどと結合させた抗体を有することができる。多色分析を前記 F A C S とともにまたは免疫磁気分離とフローサイトメトリーとの組合せで利用することもできる。多色分析は、多数の表面抗原、例えば C D 7 3 + 、 C D 1 0 5 + 、 C D 4 4 + 、 C D 2 9 + 、と S S A E 4 細胞マーカーを認識する抗体とに基づく細胞の分離にとって興味深いものであり得る。多色分析に使用されている蛍光色素としては、これに限定されるものではないが、フィコビリタンパク質、例えば、フィコエリトリンおよびアロフィコシアニン；フルオレセイン、ならびにテキサスレッドを含むことができる。一部の実施形態において、陰性表示は、染色レベルが、アイソタイプ適合陰性対照の輝度またはそれ以下であることを示す。一部の実施形態において、d i m 表示は、染色レベルが陰性染色レベルに近いことがあるが、アイソタイプ適合対照より明るいこともあるということを示す。

30

【 0 1 6 0 】

一部の実施形態では、C D 2 9 、 C D 1 0 5 、 C D 4 4 、 C D 7 3 、 S S E A 4 、 C D 4 5 、 C D 3 1 、 v W F 、および C D 1 4 抗体を超常磁性微粒子などの磁性試薬に直接または間接的に結合させることができる。磁性粒子への直接結合は、様々な化学的連結基の使用によって果たすことができる。一部の実施形態では、抗体を側鎖アミノまたはスルフヒドリル基およびヘテロ官能性架橋試薬によって前記微粒子にカップリングさせることができる。多数のヘテロ官能性化合物がエンティティへの連結に利用可能である。一部の実施形態において、前記連結基としては、これに限定されるものではないが、3 - (2 - p y r i d y i d i o) プロピオン酸 N - ヒドロキシスルフヒドエステル（ S P D P ）または 4 - (N - マレイミドメチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボン酸 N - ヒドロキシスルフヒドエステル（ S M C C ）と前記抗体上の反応性スルフヒドリル基および前記

40

50

磁性粒子上の反応性アミノ基を含むことができる。

【0161】

一部の実施形態では、抗CD29、抗CD105、抗CD44、抗CD73、抗SSE A4、抗CD45、抗CD31、抗vWF、および抗CD14抗体を前記磁性粒子に間接的にカップリングさせることができる。前記抗体をハプテンに直接接合させることができ、ハプテン特異的第2ステージ抗体を前記粒子に結合させることができる。適するハプテンとしては、これに限定されるものではないが、ジゴキシン、ジゴキシゲニン、FITC、ジニトロフェニル、ニトロフェニル、アビジン、ビオチンなどを含む。前記ハプテンのタンパク質への接合方法は、当該技術分野において公知であり、かかる接合のためのキットは、市販されている。

10

【0162】

一部の実施形態では、特定の細胞サブセットを結合するために必要な抗体の量を、試験分離および分析を行うことによって経験的に決定することができる。一部の実施形態では、前記細胞および抗体を、複合体の形成に十分な期間、例えば、限定ではないが少なくとも約5分、少なくとも約10分、または約、約30分もしくはそれ以下、または約60分もしくはそれ以下、またはこれらの値のいずれか2つ間の範囲の期間、恒温放置することができる。

【0163】

一部の実施形態では、前記PVMCs上に存在するまたは不在であることが公知の細胞表面マーカーに特異的な抗体または結合分子とともに前記細胞をさらに恒温放置することができる。例えば、CD45、CD31、vWF、またはCD14マーカーを発現する細胞を陰性選択することができる。

20

【0164】

一部の実施形態では、前記標識された細胞を前記特異的抗体調製物に従って分離することができる。蛍光色素標識抗体は、FACS分離、免疫磁気選択用の磁性粒子、特に高勾配磁気選択(high gradient magnetic selection: HGMS)などに有用であり得る。PVMCsを分離および単離するための手順が抗体を用いる実施形態において、一部の実施形態では、かかる抗体が、細胞培養および増殖中の自然な細胞プロセスによって消費され得るので、強化された自家骨移植片に使用され得る前記PVMC調製物中で検出可能な抗体がないことになることに留意されたい。

30

【0165】

一部の実施形態では、精製されたまたは不純な細胞集団を任意の適切な培地に採取することができる。一部の実施形態では、これに限定されるものではないが、ウシ胎仔血清(fetal calf serum: FCS)、ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)、ヒト血清アルブミン(human serum albumin: HSA)、またはそれらの組合せで多くの場合補足された、ダルベッコ変性イーグル培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)、ハンクス塩基性塩類溶液(Hank's Basic Salt Solution: HBSS)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Dulbecco's phosphate buffered saline: ; dPBS)、RPMI、イスコフ変性ダルベッコ培地(Iscove's modified Dulbecco's medium: IMDM)、約5mM EDTAを伴うリシン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)などを含む任意の市販培地を使用することができる。一部の実施形態において、前記培地は、DMEM、F-12、M199、RPMI、またはそれらの任意の組合せであってよい。

40

【0166】

一部の実施形態において、前記単離されたPVMCsは、前記精製された細胞集団の約30%またはそれ以上、好ましくは前記精製された細胞集団の約50%またはそれ以上、さらに好ましくは前記精製された細胞集団の約90%またはそれ以上、および最も好ましくは前記精製された細胞集団の約95%またはそれ以上(実質的に純粋)であることにな

50

る。

【0167】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを、約10%ウシ胎仔血清と、約2mM L-グルタミンと、約100単位/mLペニシリンと、約100μg/mLストレプトマイシンとを含有するD MEM 培養培地で増殖させることができる。前記骨髄をT75フラスコに入れ、D MEM 培養培地で希釈することができる。この混合物を、約5%CO₂を有する約37度の恒温器の中で約3日間保管することができる。前記恒温放置時間の後、前記PVMCsは、前記フラスコの表面に接着していることがあり、骨髄の残存成分をPBSでの洗浄によって除去することができる。

【0168】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを、基礎培地および低グルコースを約1~20%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum: FBS)とともに用いて増殖させることができる。一部の実施形態では、血小板溶解産物などの他のタンパク質源を使用することができる。一部の実施形態では、増殖能力を強化するための培養補足物としてのさらなる因子、例えば、限定ではないが組換えヒト線維芽細胞増殖因子(combinant human fibroblastic growth factor: rhFGF)を使用することができる。一部の実施形態では、10ng/mL rhFGF-2は、PVMC細胞集団の集団倍加時間を短縮することができる。

【0169】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを、約5%CO₂を有する37度恒温器において、約1~200%ウシ胎仔血清と、約1~200ng/mL線維芽細胞成長因子と、約1~3mM L-グルタミンと、約1~200U/Lペニシリン-ストレプトマイシンとで補足されたイスコフ変性ダルベッコ培地(Iscove's modified Dulbecco's medium: IMDM) 中で増殖させ、単離前に約5~30回継代することができる。

【0170】

ウシ胎仔血清は、病原体を宿していることがあり、単離されたPVMCレシピエントは、抗FBS抗体を発生させることがあり、そのため場合によっては無血清培地の使用をする。一部の実施形態では、FGFと、血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor: PDGF)と、トランスフォーミング成長因子-(transforming growth factor-: TGF-)とで補足された無血清培地中でPVMCsを成長させることができる。さらなる実施形態では、高血小板血漿もまたFBSの有効な代用品であると思われる。自家血清もまた実行可能な代替品となるが、前記培地を補足するために必要な大容量により制限される。加えて、幾つかの無血清被定義培地が間葉幹細胞の増殖用に市販されており、それらもまたPVMCsの増殖に適用可能となる。一部の実施形態では、自家血清を使用して無血清培地を補足することができる。一部の実施形態では、自家血清を無血清培地に添加して、約5から約25%の最終濃度を達成する。一部の実施形態において、前記自家血清は、自家ヒト血清であってもよい。かかる化学的に定義された培地の使用は、それらを特定のPVMC源のためにおよび場合によってはPVMCsの特定の治療的使用のために最適化することを要する。

【0171】

脱灰骨を調製するための方法

一部の実施形態では、PVMC調製物を、脱灰骨を使用して調製することができる。一部の実施形態において、脱灰骨を調製する方法は、酸を骨材料と混合して脱灰骨粉を作製する工程を有する。一部の実施形態において、脱灰骨としては、完全脱灰骨または部分脱灰骨を含むことができる。一部の実施形態において、骨材料としては、骨細片、骨粉、またはそれらの組合せを含むことができる。一部の実施形態では、骨細片と骨粉との混合物を使用して脱灰骨を作製することができる。一部の実施形態では、骨細片を使用して脱灰骨を作製することができる。一部の実施形態において、前記方法は、骨を破碎して骨細片

10

20

30

40

50

を作製する工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記方法は、骨細片を粉碎して骨粉を作製する工程をさらに有する。一部の実施形態において、酸は、強無機酸であり得る。本明細書において用いる場合、骨細片は、骨断片、骨セグメント、骨片、または骨裂片などを指すことができる。一部の実施形態では、前記酸は、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、ホウ酸、フッ化水素酸、または臭化水素酸から選択され得る。一部の実施形態において、前記骨粉を前記酸と混合する工程は、約6時間から約48時間の期間であることがある。一部の実施形態において、前記骨粉を前記酸と混合する前記期間は、約6から約36時間、約6から約24時間、約12から約48時間、約12から約36時間、約12から約24時間、またはこれらの値のいずれか2つの間の範囲であることがある。

【0172】

一部の実施形態において、前記方法は、骨材料をエタノールの中に浸す工程をさらに有する。一部の実施形態において、前記エタノールは、70%エタノールである。一部の実施形態では、別の滅菌・抗菌または抗真菌剤を使用することができる。一部の実施形態において、前記方法は、前記骨を破碎して骨細片を作製する工程を有することがある。一部の実施形態において、前記細片は、約5mmまでの縁部寸法を有する不規則形状多面体の形態であることがある。一部の実施形態において、細片は、約10mmまでの縁部寸法を有する不規則形状多面体の形態であることがある。一部の実施形態において、前記方法は、前記骨細片を粉碎する工程と、前記細片をふるいにかけてその前記粉碎された骨を約100～800ミクロンのサイズにして骨粉を作製する工程とをさらに有する。一部の実施形態では、近位脛骨からの骨細片を粉碎して、サイズが約3.6mmから約8.0mmの範囲の粒子を形成することができる。一部の実施形態では、遠位大腿骨からの骨細片を粉碎して、サイズが約2.0mmから約8.0mmの範囲の粒子を形成することができる。一部の実施形態では、大腿骨骨頭からの骨細片を粉碎して、サイズが約2.0mmから約5.0mmの範囲の粒子を形成することができる。粉碎された骨細片のサイズをその最大軸周りで測定することができる。一部の実施形態では、前記粉碎された骨材料を混合容器に入れ、過酸化水素で清浄化し、攪拌することができる。一部の実施形態では、前記骨細片を、前記骨を粉碎することなく、すすぎに付すことができる。一部の実施形態では、その後、前記骨材料を除去し、滅菌水ですすぐことができる。さらなる実施形態では、前記すすいだ骨材料を、前記清浄化した混合容器に戻し入れることができ、エタノールまたは別の滅菌・抗菌・もしくは抗真菌剤を添加することができ、前記溶液を混合することができる。一部の実施形態では、前記骨材料をふるいに移し入れ、開放減圧を前記ふるいの底部に適用することができ、前記骨粉を乾燥させることができる。一部の実施形態では、前記乾燥させた骨材料を部分脱灰プロセスに移すことができ、そこでそれを計量することができる。さらなる実施形態では、前記骨材料を酸と混合することができる。一部の実施形態では、前記骨材料を前記酸と接触させておく時間が長いほど、前記骨粉の脱灰度は大きくなる。

【0173】

一部の実施形態では、前記骨材料を約2:1、約3:1、約4:1、約5:1、約6:1、約7:1、約8:1、約9:1、または約10:1の3%過酸化水素(H₂O₂)水溶液対骨の比率で清浄化し約5から30分間攪拌することができる。一部の実施形態では、その後、前記骨材料を取り出し、滅菌水ですすぐことができる。エタノールまたは他の滅菌・抗菌・もしくは抗真菌剤を前記すすいだ骨材料に添加して溶液を作製することができる。一部の実施形態では、前記溶液を約10から約60分間、混合することができる。一部の実施形態において、前記方法は、前記溶液を乾燥させて、乾燥させた骨材料を形成する工程をさらに有する。一部の実施形態では、前記骨粉をNo.70ふるいに移し入れ、開放減圧を前記ふるいの底部に適用することができ、前記骨粉を約10から約60分間、乾燥させることができる。一部の実施形態では、前記乾燥させた骨材料を計量することができ、グラムでの骨重量を、適用される酸の体積を決定するチャートと比較することができる。一部の実施形態において、添加する酸の量は、骨1グラムごとに約16mLであり得る。一部の実施形態では、前記骨材料を強無機酸、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫

10

20

30

40

50

酸、ホウ酸、フッ化水素酸、または臭化水素酸と約1から約12時間混合して前記塩酸による部分的な骨の表面への係合を果たして、部分脱灰骨を作製することができる。さらなる実施形態では、前記骨材料を強無機酸、例えば、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、ホウ酸、フッ化水素酸、または臭化水素酸と約12から約24時間混合して前記塩酸による最大骨表面係合を果たして、灰分の大部分を除去することができる。一部の実施形態では、前記骨材料を強無機酸とより長期間混合して、前記骨を完全に脱灰することができる。

【0174】

一部の実施形態では、部分的に脱灰された骨細片または完全に脱灰された骨細片を単離されたPVMCsと併用して、骨再生を促進し組織再生および修復のための再生環境を作ることに有用であり得る治療用調製物を形成することができる。

10

【0175】

骨細片を作製するための方法

一部の実施形態は、骨細片を製造する方法であって、骨断片を破碎機またはボーンミルに通す工程を有する方法である。一部の実施形態において、骨細片は、骨組織、骨髓、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、骨細片は、緻密骨、骨髓、髄管からの組織、海綿骨組織、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態では、骨の断片を粉碎して骨細片を形成する。一部の実施形態では、骨の前記断片をボーンミルまたは破碎機に通すことによって粉碎する。

【0176】

一部の実施形態において、前記骨断片は、大腿骨、腸骨梁、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、または肩甲骨を有する人骨が起源である。

20

【0177】

一部の実施形態において、前記骨断片は、近位大腿骨、遠位大腿骨、またはそれらの組合せが起源である。一部の実施形態において、前記骨断片は、新鮮である。一部の実施形態では、前記骨断片は極低温冷凍される。一部の実施形態において、前記骨細片は、インタクト骨梁構造を有する。一部の実施形態において、前記骨細片は、PVMCsを有する。一部の実施形態において、骨細片は、骨髓組織および他の組織が付着している骨断片を有する。

【0178】

骨細片は、それらの起源に依存してサイズが様々であり得る。一部の実施形態では、骨断片を粉碎して、サイズが3.6mmから8.0mmの範囲の骨細片を形成する。一部の実施形態では、遠位大腿骨が起源である骨断片を粉碎して、サイズが約2.9mmから約7.1mmの範囲の骨細片を形成する。一部の実施形態では、大腿骨骨頭からの骨断片起點を粉碎して、サイズが約2.2mmから約3.4mmの範囲の粒子を形成することができる。一部の実施形態では、粉碎された骨細片のサイズをその最大軸周りで測定する。

30

【0179】

一部の実施形態において、骨細片を製造する方法は、骨断片を破碎機またはボーンミルに通す工程を有し、骨細片を極低温保存する工程をさらに有する。

【0180】

一部の実施形態において、骨細片を製造する方法は、骨断片を破碎機またはボーンミルに通す工程を有し、それを必要とする患者への治療的投与をさらに有する。

40

【0181】

骨形成原細胞を単離するための方法

一部の実施形態では、骨形成原細胞をPVMC調製物、骨細片、骨粉、またはそれらの組合せと混合することができ、骨形成原細胞は、骨の再生微小環境を作ることに寄与することができる。

【0182】

一部の実施形態では、骨形成原細胞をPVMC調製物から単離することができる。骨形成原細胞は、アルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase:AP)の高い発現レベルのため、PVMCsの集団の中で同定することができる。APに対

50

する抗体は市販されており、それらを蛍光タグに結合させて高レベルの A P を発現する細胞 (A P - H i g h 細胞) の選別を可能にすることができます。

【 0 1 8 3 】

一部の実施形態では、 P V M C 調製物と骨髄細胞との組合せを、約 1 n M から約 1 0 0 n M の最終濃度のデキサメチルソーム (d e x a m e t h y l s o m e) と、アスコルビン酸塩またはアスコルビン酸 - 2 - リン酸とを有する培地中で 5 から 1 0 日の期間、培養することができる。一部の実施形態では、細胞を 7 日間培養する。さらなる実施形態において、使用する前記培地は、骨形成原細胞の成長のための誘導培地として役立つ。 P V M C s は、接着細胞であり、トリプシンおよびコラゲナーゼ消化後に脱凝集され、培養皿から放出され得る。その後、脱凝集された細胞を A P 発現レベルにより選別することができ、それによって A P - H i g h 細胞の単離が可能になる。前記 A P - H i g h 細胞を隔離することができ、該細胞は、新鮮な調製物中の固有骨形成原細胞に対する標準物質としての役割を果たすことができる。さらに、前記 A P - H i g h 細胞を使用して、骨形成原細胞をインビオおよびインビトロで染色することができる。

10

【 0 1 8 4 】

一部の実施形態は、骨形成原細胞を P V M C 調製物から分離するための方法であって、前記 P V M C 調製物と高特異的活性アルカリホスファターゼに対して親和性を有する抗体とを混合する工程を有する方法を対象とする。

【 0 1 8 5 】

一部の実施形態は、骨形成原細胞を P V M C 調製物から分離するための方法であって、リン酸カルシウム基材への前記調製物中の細胞の吸着を判定する工程を有する方法を対象とし、ここで、高い親和性は、前記骨形成原細胞の存在を示す。

20

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態は、骨形成原細胞を P V M C 調製物から分離する方法であって、前記 P V M C 調製物を被覆ペトリ皿にプレーティングする工程と、骨形成原細胞を該細胞の差次的付着に基づいて単離する工程とを有する方法を対象とする。一部の実施形態では、前記被覆ペトリ皿をフィプロネクチン、ラミニン、他の細胞外基質分子、またはそれらの組合せで被覆する。

【 0 1 8 7 】

強化された自家骨移植片を作製するための方法

30

一部の実施形態は、強化された自家骨移植片を作製する方法であって、

a . 細胞浮遊液を被検者からの骨組織の第 1 の部分から酵素、機械力、またはそれらの組合せで抽出する工程と；

b . 前記細胞浮遊液中の細胞を浮遊密度沈降、濾過、または遠心分離によって濃縮して、濃縮された骨由来 P V M C s の集団を獲得する工程と；

c . 前記被検者からの骨移植片として使用される骨組織または代用骨の第 2 の部分に濃縮された骨由来 P V M C s の前記集団を補充して、前記強化された自家骨移植片を作製する工程と

を有する方法を対象とし得る。

40

【 0 1 8 8 】

一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する方法は、骨由来 P V M C s を被検者から単離する工程と、骨移植片として使用される前記被検者からの骨部分に前記骨由来 P V M C s を補充する工程とを有する。一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する方法は、骨由来 P V M C s を被検者の骨組織の第 1 の部分から単離する工程と、骨移植片として使用される前記被検者からの骨組織の第 2 の部分を抽出する工程と、前記骨移植片に前記骨由来 P V M C s を補充する工程とを有する。

【 0 1 8 9 】

一部の実施形態において、細胞浮遊液を骨組織の第 1 の部分から抽出する工程は、前記血管周囲細胞を前記骨中の小血管の基底膜に連結する結合を特異的に切断するための酵素消化を有する。より具体的には、酵素消化は、前記基底膜の一部分であり得る分子を切断

50

し、結果として P V M C 結合ドメインを放出させることができる。

【 0 1 9 0 】

一部の実施形態において、P V M C s を含有する強化された自家骨移植片は、骨移植片として使用される骨組織の第1の部分を被検者から抽出し、その後、濃縮された骨由来 P V M C s の集団（ここで、該濃縮された骨由来 P V M C s は、該 P V M C s を前記被検者からの骨組織の第2の部分から抽出および濃縮することによって調製することができる）を前記骨移植片に補充して、該強化された自家骨移植片を作製することによって、製造することができる。

【 0 1 9 1 】

一部の実施形態において、骨組織の第1の部分は、骨が起源である。一部の実施形態において、骨組織の第2の部分は、骨、骨細片、骨髓、骨小腔洗浄から組織、またはそれらの組合せが起源である。一部の実施形態において、骨組織の第1の部分は、骨髓を有し、骨組織の第2の部分は、骨細片を有する。

10

【 0 1 9 2 】

一部の実施形態において、骨組織の前記第1の部分は、腸骨梁、大腿骨、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、もしくは肩甲骨、またはそれらの組合せを有する人骨が起源である。一部の実施形態では、この組織を患者に対する外科手術後の廃棄組織として獲得し、自家使用のために準備することができる。一部の実施形態において、骨は、大腿骨、腸骨梁、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、肩甲骨、またはそれらの組合せの近位および遠位領域が起源であり得る。

20

【 0 1 9 3 】

もう1つの実施形態において、骨組織の前記第2の部分は、腸骨梁、大腿骨、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、もしくは肩甲骨、またはそれらの組合せを有する人骨が起源である。

【 0 1 9 4 】

一部の実施形態では、前記強化された自家骨移植片に骨から単離された P V M C s を補充することができる。一部の実施形態では、非脱灰、脱灰骨細片、または部分脱灰骨細片を骨粉とまたは骨由来 P V M C s と併用して、強化された自家骨移植片調製物を作製することができる。

30

【 0 1 9 5 】

一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、強化された自家骨移植片に新鮮な自家骨髓、加工自家骨髓、冷凍自家骨髓、またはそれらの組合せを補充する工程を含むことができる。

【 0 1 9 6 】

一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、強化された自家骨移植片に1若しくはそれ以上の合成代用骨を追加して補充する工程を有し、ここで前記合成代用骨は、リン酸カルシウム系代用骨、カルシウムアバタイト、-リン酸三カルシウム、天然および合成ポリマー、セラミックス、A l l o g r o 、O p t e f o r m 、G r a f t o n 、O r t h o B l a s t 、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、バイオガラス、O s t e o G r a f t 、N o r i a n S R S 、P r o O s t e o n 、O s t e o s e t 、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、C o r t o s s 、開孔性（o p e n p o r o s i t y ）ポリ乳酸ポリマー I m m i x 、またはそれらの組合せを有する。

40

【 0 1 9 7 】

一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、石灰化加工同種移植片、最小脱灰加工同種移植片、部分脱灰加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、またはそれらの組合せを追加する工程を有することができる。

【 0 1 9 8 】

一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、コラーゲンスポンジ、B M P - 2 含有コラーゲンスポンジ、B M P - 7 含有コラーゲンスポンジ、B

50

M P - 2 および B M P - 7 含有スponジ、またはそれらの組合せの追加を有する。一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、P D G F - B B の添加を含むことができる。一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、P D G F - B B をコラーゲンスponジまたは別の適するビヒクルに添加する工程を有する。一部の実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する前記方法は、P D G F - B B 含有コラーゲンスponジの追加を有する。

【 0 1 9 9 】

一部の実施形態において、前記自己骨移植片は、単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、もしくは増殖させたP V M C s、単離されたP V M C s、またはそれらの組合せと併用されるリン酸カルシウム系代用骨を有することができる。一部の実施形態では、自家骨断片を他の代用骨、例えば、ヒドロキシアパタイト、カルシウムアパタイト、および - リン酸三カルシウムと併用することができる。一部の実施形態において、前記自家骨移植片は、単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、もしくは増殖させたP V M C s、単離されたP V M C s、またはそれらの組合せを有することに加えて、天然および合成ポリマー、セラミックス、もしくは他の骨代用材料、またはそれらの組合せを有する。さらなる実施形態において、前記骨は、ルート関節形成術 (route arthroplasty) 中に獲得される廃棄膝関節または股関節骨 / 骨髓からのものであり得る。

10

【 0 2 0 0 】

一部の実施形態において、自家骨移植片は、骨膜、骨梁骨、脂肪組織、滑膜、骨格筋、乳歯、脾臓、肺、肝臓、羊水、胎盤、血液、および臍帯血管、またはそれらの組合せから単離されたP V M C を有することができる。一部の実施形態において、自家骨移植片は、臍帯血管から単離されたP V M C を有することができる。

20

【 0 2 0 1 】

一部の実施形態では、前記P V M C s を前記骨の骨梁骨小腔から獲得することができる。一部の実施形態では、P V M C s を大腿骨骨頭、遠位大腿骨、または近位脛骨から獲得することができる。一部の実施形態において、前記骨は、骨髓組織および他の組織、緻密骨、髄管からの骨髓、またはそれらの組合せを有する。

【 0 2 0 2 】

さらなる実施形態では、自家代用骨移植片を単独で使用してもよく、または他の材料（例えば、A l l o g r o 、O p t e f o r m 、G r a f t o n 、またはO r t h o B l a s t ）と併用してもよい。一部の実施形態では、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、およびバイオガラスを含むセラミック系代用骨移植片を単独で使用してもよく、または併用してもよい（例えば、O s t e o G r a f t 、N o r i a n S R S 、P r o O s t e o n 、またはO s t e o s e t ）。一部の実施形態では、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマーを単独で使用してもよく、または他の材料（例えば、C o r t o s s 、開孔性ポリ乳酸ポリマー、またはI m m i x ）と併用してもよい。

30

【 0 2 0 3 】

一部の実施形態において、強化された自家移植片はまた、加工同種骨移植材料、例えば、石灰化加工同種移植片、最小脱灰加工同種移植片、部分脱灰加工同種移植片、または脱灰加工同種移植片を有することができる。一部の実施形態において、強化された自家移植片はまた、コラーゲンスponジ、B M P - 2 含有コラーゲンスponジ、B M P - 7 含有コラーゲンスponジ、B M P - 2 およびB M P - 7 含有スponジ、またはそれらの組合せを有することができる。

40

【 0 2 0 4 】

一部の実施形態は、強化された自家骨移植片を作製する方法であって、骨移植片として使用される骨組織の第1の部分を被検者から抽出し、その後、濃縮された骨由来P V M C s の集団（ここで、該濃縮された骨由来P V M C s は、該P V M C s を前記被検者からの同じ自家骨組織の第2の部分から抽出および濃縮することによって調製することができる）を前記骨移植片に補充して、該強化された自家骨移植片を作製する工程を有する方法を

50

有する。

【0205】

一部の実施形態において、強化された自己骨移植片を作製する前記方法は、リン酸カルシウム系代用骨、単離された骨芽細胞、全骨髄、未精製の、精製された、もしくは増殖させたPVMCs、またはそれらの組合せを添加する工程を含むことができる。一部の実施形態において、強化された自己骨移植片を作製する前記方法は、自家骨断片、代用骨、例えば、これに限定されるものではないが、ヒドロキシアパタイト、カルシウムアパタイト、-リン酸三カルシウム、またはそれらの組合せを追加する工程を含むことができる。一部の実施形態において、前記自家骨移植片は、単離された骨芽細胞、全骨髄、未精製の、精製された、また増殖させたPVMCsを有することに加えて、天然および合成ポリマー、セラミックス、もしくは他の骨代用材料、またはそれらの組合せを有する。

10

【0206】

一部の実施形態において、強化された自己骨移植片を作製する前記方法は、自家代用骨移植片を単独でまたは他の材料（例えば、Allogro、Optiform、Grafton、またはOrthoblast）と併用で追加する工程を含むことができる。一部の実施形態では、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、およびバイオガラスを含むセラミック系代用骨移植片を単独で使用してもよく、または併用してもよい（例えば、OsteoGraft、Norian SRS、ProOsteon、またはOsteoset）。一部の実施形態では、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマーを単独で追加してもよく、または他の材料（例えば、Cortoss、開孔性ポリ乳酸ポリマー、またはImmix）と併用してもよい。

20

【0207】

一部の実施形態において、強化された自家移植片を作製する方法はまた、加工同種骨移植材料、例えば、石灰化加工同種移植片、最小脱灰加工同種移植片、部分脱灰加工同種移植片、または脱灰加工同種移植片を追加する工程を有することができる。一部の実施形態において、強化された自家移植片を作製する方法はまた、コラーゲンスponジ、BMP-2含有コラーゲンスponジ、BMP-7含有コラーゲンスponジ、BMP-2およびBMP-7含有スponジ、またはそれらの組合せを追加する工程を有することができる。

30

【0208】

もう1つの実施形態において、強化された自家骨移植片を作製する方法は、前記濃縮されたPVMCsを工程(c)の前に培養して、濃縮された骨由来PVMCsの前記集団の前記PVMC部分の前記部分を選択的に増殖させる工程をさらに有する。もう1つの実施形態では、濃縮された骨由来PVMCの前記集団を培養しないことがある。

【0209】

一部の実施形態では、PVMC調製物、およびPVMCsを含有する自家骨移植片を使用して、骨髄を有するまたは有さない治療有効量のPVMCsを有する組成物をヒト患者の胴、頭または肢に投与することにより、骨再生を刺激することができる。一部の実施形態において、前記投与された周皮細胞は、分泌骨芽細胞に直接分化すること、および/または骨形成のための再生微小環境を提供することが可能であり得る。

40

【0210】

PVMC調製物および投与

一部の実施形態において、前記PVMCsは、自家使用のためのものであってよい。一部の実施形態では、PVMCsを被検者から単離することができ、これらの細胞を、それらが育てられた前記被検者に投与して戻すことができる。一部の実施形態において、自家移植は、免疫抑制プロトコルの必要がないようにすることができる。

【0211】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを治療的に利用することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、同種輸液(allogeneic infusate)の一部を形成することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを単離された骨芽細胞、全骨髄、未精製の、精製された、もしくは増殖させたPVMC

50

sと併用して、輸液を形成することができる。一部の実施形態において、輸液はまた、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リソルブ液、酢酸リソルブ液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline : TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution : HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution : EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate : SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline : HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution : GBSS)、またはそれらの組合せを有する平衡塩類溶液を含むことができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを組織に直接注入することができる。例えば、単離されたPVMCsの調製物をカテーテルによって心臓に直接注入することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを治療的投与前に足場に包み込むことができる。適する足場の例としては、既製支柱および酵素または触媒により架橋がインビボで起こるように活性化される架橋性複合体を含む。

10

【0212】

一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物をヒト被検者の胸、頭、または肢に投与することができ、該調製物は、骨再生のための再生微小環境を提供することが可能であり得る。一部の実施形態において、単離されたPVMCsの固有分泌活性は、傷害を受ける組織損傷部位で再生微小環境を確立することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、瘢痕化を阻害する、アポトーシスを阻害する、血管新生を刺激する、ならびに有糸分裂および組織固有幹または前駆細胞を刺激する生物活性因子を分泌することができ、細菌が損傷部位、例えば開放創に存在するとき抗生物質タンパク質を分泌することもできる。単離されたPVMCsの前記多面的効果を「栄養活性」と呼ぶことができる。

20

【0213】

一部の実施形態では、前記単離されたPVMCsの薬用能力を、具体的な異なる解剖学的位置によって決定されるような特定の生理環境で該PVMCsによって分泌される分子の範囲によって定義することができる。一部の実施形態では、前記PVMCsの薬用能力を、該PVMCによって分泌される分子の範囲によって定義する。一部の実施形態において、前記PVMCによって分泌される分子の範囲は、部位依存性である。

30

【0214】

一部の実施形態では、ヒト骨組織から単離されたPVMCsを自己移植片に使用することができ、該PVMCsは、プロスタグランジンE2(prostaglandin E2 : PGE2)、間質細胞由来因子-1(stromal-cell derived factor-1 : SDF-1)、血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)、インターロイキン-7(interleukin-7 : IL-7)、およびインターロイキン-8(interleukin-8 : IL-8)の分泌によって再生環境を提供することができる。

【0215】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)、肝細胞成長因子(hepatocyte growth factor : HGF)、トランスフォーミング成長因子(transforming growth factor beta : TGF-)、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor : bFGF)、ならびに顆粒球マクロファージコロニー-刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor : GM-CSF)およびインスリン様成長因子1(insulin-like growth factor 1 : IGF-1)、内皮細胞成長および生存を増進する因子の分泌によって抗アポトーシス微小環境を提供することができる。

40

【0216】

50

一部の実施形態において、単離された P V M C s は、T 細胞の増殖の阻害、T 細胞の抑制、B 細胞増殖の阻害および促進、N K 細胞活性化の抑制、樹状細胞およびマクロファージのサイトカイン分泌プロファイルの修飾、ならびに形質細胞による免疫グロブリン生産の抑制によって、免疫修飾特性を有することができる。プロスタグランジン E 2 (Prostaglandin E 2 : P G E - 2) は、免疫細胞に対する P V M C s の多数の効果におけるならびに樹状細胞およびマクロファージの分泌プロファイルの修飾における中心的な媒介因子であり得る。P V M C s によって分泌される T G F - 1 および H G F は、免疫修飾の役割を有することができる。P V M C s はまた、T 細胞増殖を停止させることができるインドールアミン 2 , 3 - デオキシゲナーゼ (indoleamine 2 , 3 - dioxygenase : I D O) を発現することができる。P V M C s の免疫修飾効果を媒介する他の分子としては、インターロイキン (interleukin : I L) - 1 0 、ヒト白血球抗原 G (human leukocyte antigen G : H L A - G) 、および白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : L I F) を含むことができ、後者は、T 細胞増殖の抑制にばかりでなく、調節 T 細胞の產生および維持にも重要な役割を果たす。さらにもう 1 つの実施形態において、P V M C s は、炎症誘発性サイトカインインターロイキン - 1 (interleukin - 1 : I L - 1) 、インターロイキン - 2 (interleukin - 2 : I L - 2) 、インターロイキン - (interferon - : I F N -) 、腫瘍壞死因子 - (tumor necrosis factor - : T N F -) 、およびインターロイキン - 1 (interleukin - 1 : I L - 1) を阻害することができる。さらにもう 1 つの実施形態において、P V M C s は、低用量の I F N - の影響下、クラス II 主要組織適合性複合体 (class II major histocompatibility complex : M H C) 分子を発現し、抗原提示細胞として挙動することができる。

【 0 2 1 7 】

一部の実施形態において、単離された P V M C s はまた、組織修復中に一役割を果たすことができる。P V M C s は、一斉に作用して病変を回復させる種々の生物活性分子を分泌することができる。理論により拘束されることを望まないが、前記プロセスの初期段階に、P V M C s は、炎症性細胞に対する化学誘引物質であり得る炎症誘発性分子、すなわち、エオタキシン、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G - C S F) 、および I L - 8 、ならびに活性化により調節される、発現され分泌された正常 T 細胞 (regulated upon activation, normal T - cell expressed and secreted : R A N T E S) の発現によって免疫細胞に対して支持的効果を提供することができる可能性が高い。P V M C s の T N F - または I L - 1 への曝露は、I L - 1 、I L - 6 、I L - 7 、I L - 1 2 、I L - 1 6 、I L - 1 受容体アンタゴニスト (I L - 1 receptor antagonist : I L - 1 r a) 、T N F - 、腫瘍壞死因子 - (tumor necrosis factor - : T N F -) 、上皮好中球活性化タンパク質 7 8 (epithelial neutrophil activating protein 7 8 : E N A - 7 8) 、エオタキシン、I L - 8 、单球走化性タンパク質 1 (monocyte chemoattractant protein 1 : M C P - 1) 、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 (macrophage inflammatory protein - 1 : M I P - 1) 、M I P - 1 、R A N T E S 、細胞間接着分子 - 1 (intercellular adhesion molecule - 1 : I C A M - 1) 、V C A M - 1 、G - C S F 、G M - C S F 、成長ホルモン、幹細胞因子 (stem cell factor : S C F) 、V E G F _{1 6 5} 、b F G F 、甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone : T S H) 、C D 4 0 、および C D 4 0 リガンドを含む走化性および刺激性分子の発現を増加させることができる。一部の実施形態において、P V M C s は、創傷治癒の早期に炎症性細胞に応答することおよび後続の免疫応答段階のた

10

20

30

40

50

めの生理的支持を提供することが可能であり得る。しかし、局所環境は、治癒過程で変化を受けるので、PVMCsの発現プロファイルは経時に変化し、したがって、損傷部位の免疫監視の阻害、および防止（自己免疫事象の開始）をもたらす結果となることがある。

【0218】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、大規模な線維化の確立が生ずる前に抗線維化効果を有することができる。HGFおよびbFGFは、PVMCsによる線維化の防止に関与することができる。組織損傷の状況で、PVMCsは、増殖性になり、HGFを分泌することができ、HGFが次いで抗線維化効果および免疫修飾効果を媒介する。したがって、一部の実施形態では、線維化を防止するためのPVMCsの投与を、線維化を回避すべき症例においてHGF（およびおそらく他の抗瘢痕化因子）の局所生産を増加させる方法と見なすことができる。10

【0219】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、インビトロで造血を支持することが可能であり得、この能力は、可溶性因子、例えばSCF、LIF、IL-6、およびマクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor : M-CSF）の構成的分泌を伴うことがある。加えて、造血の支持は、G-CSFおよびGM-CSFのIL-1誘導分泌によってさらに増強される場合がある。20

【0220】

理論により拘束されることを望まないが、血液供給の確立は、傷害を受けた組織の回復の基本であると考えられる。一部の実施形態において、PVMCsは、bFGF、VEGF、胎盤成長因子（placental growth factor : PI GF）、およびMCP-1、ならびに低酸素条件下で培養された内皮細胞の死滅を阻害しインビトロアッセイにおいて毛細血管様構造の形成を促進する血管新生および抗アポトーシス因子、例えばIL-6、VEGF、およびMCP-1の分泌によって、血管新生促進効果を有することができる。PVMCsはまた、内皮細胞の基質として役立つ細胞外基質成分を提供することによって血管新生に寄与することができる。一部の実施形態において、PVMCsは、周皮細胞に転移し、新たに形成された血管系を安定させることができる。30

【0221】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1 α)、CCL4 (MIP-1 β)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL20 (MIP-3 α)、CCL26 (エオタキシン-3)、CX3CL1 (フラクタルカイン)、CXCL5 (ENA-78)、CXCL11 (i-TAC)、CXCL1 (GRO α)、CXCL12 (SDF-1)、CXCL8 (IL-8)、CXCL2 (GRO β)、およびCXCL10 (IP-10)を含む様々な走化性分子を分泌することができる。これらの走化性分子の標的細胞としては、単球、好酸球、好中球、好塩基球、記憶およびナイーブT細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、ならびに造血および内皮前駆細胞を含む。一部の実施形態では、PVMCsによるケモカイン発現を他の細胞タイプ、特に免疫細胞への曝露によって修飾することができる。40

【0222】

一部の実施形態において、純粋な、実質的に純粋な、または不純な単離されたPVMCsを有する組成物は、薬用能力を有する。さらなる実施形態において、これらの組成物の前記PVMCsは、薬用能力を有する。一部の実施形態において、前記PVMCsは、CD146、CD105、CD166、CD44、CD73、CD90、またはそれらの組合せを発現することができる。一部の実施形態において、前記PVMCsは、CD45陰性であることがある。一部の実施形態において、組成物は、骨および骨髄細胞から単離されたPVMCsを有する。

【0223】

一部の実施形態では、純粋な、実質的に純粋な、または不純なPVMC調製物をヒト患50

者の胸、頭または肢に投与することができる。さらにもう1つの実施形態において、PVCsは、再生微小環境を提供することが可能であり得る。

【0224】

一部の実施形態では、純粹な、実質的に純粹な、または不純なPVC調製物を骨細片、完全脱灰骨細片、または部分脱灰骨細片と併用することができる。

【0225】

一部の実施形態は、治療有効量の複数の単離されたPVCsと医薬的に許容され得る担体とを有する医薬組成物を対象とする。一部の実施形態において、前記複数のPVCsは、骨、臍帯血管、PVCsを含有する解剖学的源、またはそれらの組合せに由来するPVCsを有する。一部の実施形態において、前記骨は、骨細片、骨梁骨小腔、骨髓、骨小腔洗浄、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、前記PVCsは、PVCsを含有することができるいずれの解剖学的源に由来してもよい。解剖学的源の例は、これに限定されるものではないが、血管（静脈および動脈を含むが、これに限定される）、骨膜、骨梁骨、脂肪組織、滑膜、骨格筋、乳歯、脾臓、肺、肝臓、羊水、胎盤、および血液を含む。一部の実施形態において、前記PVCは、CD146、CD105、CD166、CD44、CD73、CD90、またはそれらの組合せから選択されるCDを発現する。一部の実施形態において、前記PVCは、CD45を発現しない。一部の実施形態は、骨髓細胞をさらに有する。一部の実施形態は、足場材料をさらに有する。一部の実施形態において、前記足場材料は、前記足場材料は、骨細片、セラミック系代用骨移植片、リン酸カルシウムセラミックス、硫酸カルシウムセラミックス、バイオガラス、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、加工同種骨移植材料、石灰化加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、コラーゲンスポンジ、またはそれらの組合せを有する。

10

20

30

40

【0226】

一部の実施形態は、単離されたPVCを対象とする。一部の実施形態において、前記PVCは、骨に由来する。一部の実施形態において、前記骨は、骨細片、骨梁骨小腔、骨髓、骨小腔洗浄、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、前記PVCは、臍帯血管に由来する。

【0227】

一部の実施形態は、複数のPVCsと許容され得る担体とを有する組成物を対象とする。一部の実施形態において、前記複数のPVCsは、骨、臍帯血管、またはそれらの組合せに由来するPVCsを有する。一部の実施形態において、前記骨は、骨細片、骨髓組織および他の組織、緻密骨、髓間管からの骨髓、骨細片、骨梁骨小腔、骨小腔洗浄、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、前記PVCは、CD146、CD105、CD166、CD44、CD73、CD90、およびそれらの組合せから選択されるCDを発現する。一部の実施形態において、前記PVCは、CD45を発現しない。一部の実施形態は、骨髓細胞をさらに有する。一部の実施形態は、足場材料をさらに有する。一部の実施形態において、前記足場材料は、前記足場材料は、骨細片、セラミック系代用骨移植片、リン酸カルシウムセラミックス、硫酸カルシウムセラミックス、バイオガラス、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、加工同種骨移植材料、石灰化加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、コラーゲンスpongji、またはそれらの組合せを有する。

【0228】

医薬組成物はまた、医薬的に許容され得る担体を含有することができる。用語「医薬的に許容され得る担体」は、治療薬、例えば抗体またはポリペプチド、遺伝子、および他の治療薬の投与のための担体を指す。前記用語は、前記組成物を受ける個体に有害な抗体の生産をそれ自体が誘導せず過度の毒性なく投与することができる任意の医薬的担体を指す。適する担体は、大きい、ゆっくりと代謝される高分子、例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体、および不活性ウイルス粒子であり得る。かかる担体は、当業者に周知である。治療組成物中の医

50

薬的に許容され得る担体としては、液体、例えば、水、生理食塩水、グリセロール、およびエタノールを含むことができる。補助物質、例えば、湿潤または乳化剤およびpH緩衝物質なども、かかるビヒクル中に存在することができる。

【0229】

典型的には、前記治療組成物を注射剤として、溶液または懸濁液のいずれかとして調製する；注射前の液体ビヒクルへの溶解または懸濁に適する固体形態を調製することもできる。リポソームは、医薬的に許容され得る担体の定義に含まれる。医薬的に許容され得る塩、例えば、無機酸塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、および硫酸塩など；ならびに有機酸の塩、例えば酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、および安息香酸塩なども、前記医薬組成物中に存在することがある。医薬的に許容され得る賦形剤の詳細な論考は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (1995) Alfonso Gennaro, Lippincott, Williams, & Wilkinsにおいて入手することができ、これは、この参考によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0230】

PVMCsの治療的使用

本明細書において用いる場合の用語「治療有効量」は、所望の疾患もしくは病態を処置、改善もしくは予防するための、または検出可能な治療もしくは予防効果を呈示するための治療薬の量を指す。前記効果を、例えば、化学的マークーまたは抗原レベルによって検出することができる。治療効果は、身体症状の低減、例えば体温低下も含む。

20

【0231】

被検者のための的確な有効量は、前記被検者のサイズおよび健康状態、前記病態の性質および程度、ならびに投与に選択された治療または治療の組合せに依存することになる。したがって、正確な有効量を前以て特定することは有用でない。しかし、所与の状況のための有効量は、常例的実験によって決定され、臨床家の判断の範囲内である。

【0232】

一部の実施形態は、同種輸液を投与する段階を含む、それを必要とする患者を処置する方法を対象とする。一部の実施形態において、前記輸液は、平衡塩類溶液、単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを有する。

30

【0233】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを治療的に利用することができる。一部の実施形態において、臍帯血管から単離されたPVMCsは、同種輸液の一部を形成することができる。一部の実施形態において、骨から単離されたPVMCsは、同種輸液の一部を形成することができる。一部の実施形態において、単離された単離されたPVMCsを単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、または増殖させたPVMCsと併用して、輸液を形成することができる。一部の実施形態において、輸液はまた、リン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline: TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution: HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸含有生理食塩水(Standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution: GBSS)、またはそれらの組合せを有する平衡塩類溶液を含むことができる。一部の実施形態では、臍帯血管から単離されたPVMCsを組織に直接注入することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを治療的投与前に足場に包み込むことができる。適する足場の例としては、既製支柱および酵素または触媒により架橋がインピボで起こるように活性化される架橋性複合体を含む。

40

【0234】

50

一部の実施形態では、単離されたPVMCs調製物をヒト患者の胴、頭、または肢に投与することができ、該調製物は、組織再生のための再生微小環境を提供することが可能であり得る。一部の実施形態において、単離されたPVMCsの固有分泌活性は、傷害を受ける組織損傷部位で再生微小環境を確立する。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、瘢痕化を阻害する、アポトーシスを阻害する、血管新生を刺激する、ならびに有糸分裂および組織固有幹または前駆細胞を刺激する生物活性因子を分泌することができ、細菌が損傷部位、例えば開放創に存在するとき抗生物質タンパク質を分泌することができる。本明細書において用いる場合、PVMCsの前記多面的効果を「栄養活性」と呼ぶことができる。

【0235】

10

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを同種移植片に使用することができ、該PVMCsは、プロスタグランジンE2 (prostaglandin E2 : PGE2)、間質細胞由来因子-1 (stromal-cell derived factor-1 : SDF-1)、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、インターロイキン-7 (interleukin-7 : IL-7)、およびインターロイキン-8 (interleukin-8 : IL-8) の分泌によって再生環境を提供すると予想される。

【0236】

20

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor : HGF)、トランスフォーミング成長因子 (transforming growth factor beta : TGF-)、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)、ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor : GM-CSF) およびインスリン様成長因子1 (insulin-like growth factor 1 : IGF-1)、内皮細胞成長および生存を増進する因子の分泌によって抗アポトーシス微小環境を提供する。

【0237】

30

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、T細胞の増殖の阻害、T細胞の抑制、B細胞増殖の阻害および促進、NK細胞活性化の抑制、樹状細胞およびマクロファージのサイトカイン分泌プロファイルの修飾、ならびに形質細胞による免疫グロブリン生産の抑制によって、免疫修飾特性を有することができる。プロスタグランジンE2 (prostaglandin E2 : PGE-2) は、免疫細胞に対するPVMCsの多数の効果におけるならびに樹状細胞およびマクロファージの分泌プロファイルの修飾における中心的な媒介因子であり得る。PVMCsによって分泌されるTGF-1 およびHGF はまた、免疫修飾の役割を有すると予想される。PVMCsは、T細胞増殖を停止させることができて示されているインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (indoleamine 2,3-dioxygenase :IDO) を発現することができる。PVMCsの免疫修飾効果を媒介する他の分子としては、インターロイキン (interleukin : IL)-10、ヒト白血球抗原G (human leukocyte antigen G : HLA-G)、および白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を含むことができ、後者は、T細胞増殖の抑制にばかりでなく、調節T細胞の產生および維持にも重要な役割を果たす。一部の実施形態において、PVMCsは、炎症誘発性サイトカインインターロイキン-1 (interleukin-1 : IL-1)、インターロイキン-2 (interleukin-2 : IL-2)、インターロイキン- (interferon- : IFN-)、腫瘍壊死因子- (tumor necrosis factor- : TNF-)、およびインターロイキン-1 (interleukin-1 : IL-1) を阻害することができる。一部の実施形態において、PVMCsは、低用量のIFN- の影響下、クラスI

40

50

I 主要組織適合性複合体 (class II major histocompatibility complex : MHC) 分子を発現し、抗原提示細胞として挙動する。

【0238】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsはまた、組織修復中に一役割を果たすことができる。PVMCsは、一斉に作用して病変を回復させる種々の生物活性分子を分泌することが可能であり得る。一部の実施形態において、前記プロセスの初期段階の間、PVMCsは、炎症性細胞に対する化学誘引物質であり得る炎症誘発性分子、すなわち、エオタキシン、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G-CSF)、およびIL-8、ならびに活性化により調節される、発現され分泌された正常T細胞 (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted : RANTES) の発現によって免疫細胞に対して支持的効果を提供することができる。PVMCsのTNF-またはIL-1への曝露は、IL-1、IL-6、IL-7、IL-12、IL-16、IL-1受容体アンタゴニスト (IL-1 receptor antagonist : IL-1ra)、TNF-、腫瘍壊死因子- (tumor necrosis factor - : TNF-)、上皮好中球活性化タンパク質78 (epithelial neutrophil-activating protein 78 : ENA-78)、エオタキシン、IL-8、単球走化性タンパク質1 (monocyte chemoattractant protein 1 : MCP-1)、マクロファージ炎症性タンパク質-1 (macrophage inflammatory protein-1 : MIP-1)、MIP-1、RANTES、細胞間接着分子-1 (intercellular adhesion molecule-1 : ICAM-1)、VCAM-1、G-CSF、GM-CSF、成長ホルモン、幹細胞因子 (stem cell factor : SCF)、VEGF₁₆₅、bFGF、甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone : TSH)、CD40、およびCD40リガンドを含む走化性および刺激性分子の発現増加を生じさせる結果となり得る。PVMCsは、創傷治癒の早期に炎症性細胞に応答することおよび後続の免疫応答段階のための生理的支持を提供することができる。しかし、局所環境は、治癒過程で変化するので、PVMCsの発現プロファイルは経時的に変化し、結果として損傷部位の免疫監視の阻害をもたらすことができ、自己免疫事象の開始を防止することができる。
10
20
30

【0239】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、大規模な線維化の確立が生ずる前に抗線維化効果を有することができる。bFGFおよびHGFは、PVMCsによる線維化の防止に関与することができる。組織損傷の状況で、PVMCsは、増殖性になり、HGFを分泌することができ、HGFが次いで抗線維化効果および免疫修飾効果を媒介する。したがって、一部の実施形態では、線維化を防止するためのPVMCsの投与を、線維化を回避すべき症例においてHGF (およびおそらく他の抗瘢痕化因子) の局所生産を増加させる方法と見なすことができる。

【0240】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、インビトロで造血を支持することが可能であり得、この能力は、可溶性因子、例えばSCF、LIF、IL-6、およびマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor : M-CSF) の構成的分泌を伴うことがある：加えて、造血の支持は、G-CSFおよびGM-CSFのIL-1誘導分泌によってさらに増強される場合がある。

【0241】

血液供給の確立は、傷害を受けた組織の回復の基本であり得る。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、bFGF、VEGF、胎盤成長因子 (placental growth factor : PGF)、およびMCP-1、ならびに低酸素条件下

40

50

で培養された内皮細胞の死滅を阻害しインビトロアッセイにおいて毛細血管様構造の形成を促進する血管新生および抗アポトーシス因子、例えばIL-6、VEGF、およびMCP-1の分泌によって、血管新生促進効果を有することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsはまた、内皮細胞の基質として役立つ細胞外基質成分を提供することによって血管新生に寄与することができると予想される。PVMCsが周皮細胞に転移し、新たに形成された血管系を安定させることができることも予想される。

【0242】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1 α)、CCL4(MIP-1 β)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL20(MIP-3 α)、CCL26(エオタキシン-3)、CX3CL1(フラクタルカイン)、CXCL5(ENA-78)、CXCL11(i-TAC)、CXCL1(GRO α)、CXCL12(SDF-1)、CXCL8(IL-8)、CXCL2(GRO β)、およびCXCL10(IP-10)を含む様々な走化性分子を分泌することができる。これらの標的細胞としては、単球、好酸球、好中球、好塩基球、記憶およびナイーブT細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、ならびに造血および内皮前駆細胞を含む。PVMCsによるケモカイン発現は、他の細胞タイプ、特に免疫細胞への曝露によって修飾されることになる可能性が高い。

【0243】

一部の実施形態では、単離されたPVMCs、PVMC調製物、またはそれらの組合せを使用して、治療有効量の単離されたPVMCsを有する組成物を投与することにより骨再生を刺激することができる。一部の実施形態において、前記単離されたPVMCsは、骨髄をさらに有することができる。一部の実施形態において、前記組成物の投与は、ヒト患者の胴、頭、または肢へのものである。前記投与された血管周囲細胞は、分泌骨芽細胞に直接分化すること、および/または骨形成のための再生微小環境を提供することが可能であり得る。

【0244】

単離されたPVMC調製物をヒト患者の胴、頭、または肢に投与することができ、該調製物は、骨再生のための再生微小環境を提供することが可能であり得る。単離されたPVMCsの固有分泌活性は、傷害を受ける組織損傷部位で再生微小環境を確立する。本明細書において用いる場合、用語「栄養活性」は、瘢痕化を阻害する、アポトーシスを阻害する、血管新生を刺激する、ならびに有糸分裂および組織固有幹または前駆細胞を刺激する生物活性因子を分泌し、かつ細菌が損傷部位、例えば開放創に存在するとき抗生物質タンパク質も分泌する、前記単離されたPVMCsの能力を指す。

【0245】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsは、プロスタグランジンE2(prostaglandin E2:PGE2)、間質細胞由来因子-1(stromal-cell derived factor-1:SDF-1)、血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)、インターロイキン-7(interleukin-7:IL-7)、およびインターロイキン-8(interleukin-8:IL-8)の分泌によって再生環境を提供することができる。

【0246】

一部の実施形態において、前記単離されたPVMCsは、血管内皮成長因子(vascular endothelial growth factor:VEGF)、肝細胞成長因子/hepatocyte growth factor:HGF)、トランスフォーミング成長因子(transforming growth factor beta:TGF- β)、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor:bFGF)、ならびに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor:GM-CSF)およびインスリン様成長因子1(insulin

10

20

30

40

50

- like growth factor 1 : IGF - 1) 、内皮細胞成長および生存を増進する因子の分泌によって抗アポトーシス微小環境を提供することができる。

【 0 2 4 7 】

一部の実施形態において、単離された P V M C s は、虚血組織において抗アポトーシス効果を有することができる。一部の実施形態において、単離された P V M C s は、傷害を受けた組織への酸素および栄養供給低減を生じさせる結果となる破断または機能不全血管に起因する細胞死から保護する分子を分泌することができる。

【 0 2 4 8 】

一部の実施形態において、単離された P V M C s は、 T 細胞の増殖の阻害、 T 細胞の抑制、 B 細胞増殖の阻害および促進、 N K 細胞活性化の抑制、樹状細胞およびマクロファージのサイトカイン分泌プロファイルの修飾、ならびに形質細胞による免疫グロブリン生産の抑制によって、免疫修飾特性を有することができる。 Prostaglandin E 2 (Prostaglandin E 2 : PGE - 2) は、免疫細胞に対する P V M C s の多数の効果におけるならびに樹状細胞およびマクロファージの分泌プロファイルの修飾における中心的な媒介因子であり得る。 P V M C s によって分泌される T G F - 1 および H G F は、免疫修飾の役割を有することができる。 P V M C s は、 T 細胞増殖を停止させることが示されているインドールアミン 2 , 3 - デオキシゲナーゼ (indoleamine 2 , 3 - dioxygenase : IDO) を発現することができる。一部の実施形態において、単離された P V M C s の免疫修飾効果を媒介する他の分子としては、インターロイキン (interleukin : IL) - 10 、ヒト白血球抗原 G (human leukocyte antigen G : HLA - G) 、および白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF) を含むことができ、後者は、 T 細胞増殖の抑制にばかりでなく、調節 T 細胞の產生および維持にも重要な役割を果たす。一部の実施形態において、単離された P V M C s は、炎症誘発性サイトカインインターロイキン - 1 (interleukin - 1 : IL - 1) 、インターロイキン - 2 (interleukin - 2 : IL - 2) 、インターロイキン - (interferon - : IFN -) 、腫瘍壊死因子 - (tumor necrosis factor - : TNF -) 、およびインターロイキン - 1 (interleukin - 1 : IL - 1) を阻害することが可能であり得る。一部の実施形態において、単離された P V M C s は、低用量の IFN - の影響下、クラス II 主要組織適合性複合体 (class II major histocompatibility complex : MHC) 分子を発現し、抗原提示細胞として挙動する。

一部の実施形態において、単離された P V M C s はまた、組織修復中に一役割を果たすことができる。一部の実施形態において、単離された P V M C s は、一斉に作用して病変を回復させる種々の生物活性分子を分泌することが可能であり得る。前記プロセスの初期段階において、 P V M C s は、炎症性細胞に対する化学誘引物質であり得る炎症誘発性分子、すなわち、エオタキシン、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G - c s f) 、および IL - 8 、ならびに活性化により調節される、発現され分泌された正常 T 細胞 (regulated upon activation, normal T - cell expressed and secreted : RANTES) の発現によって免疫細胞に対して支持的効果を提供する可能性が高い。一部の実施形態において、単離された P V M C s の TNF - または IL - 1 への曝露は、 IL - 1 、 IL - 6 、 IL - 7 、 IL - 12 、 IL - 16 、 IL - 1 受容体アンタゴニスト (IL - 1 receptor antagonist : IL - 1ra) 、 TNF - 、腫瘍壊死因子 - (tumor necrosis factor - : TNF -) 、上皮好中球活性化タンパク質 78 (epithelial neutrophil - activating protein 78 : ENA - 78) 、エオタキシン、 IL - 8 、单球走化性タンパク質 1 (monocyte chemoattractant protein 1 : MCP - 1) 、マクロファージ炎症性

【 0 2 4 9 】

一部の実施形態において、単離された P V M C s はまた、組織修復中に一役割を果たすことができる。一部の実施形態において、単離された P V M C s は、一斉に作用して病変を回復させる種々の生物活性分子を分泌することが可能であり得る。前記プロセスの初期段階において、 P V M C s は、炎症性細胞に対する化学誘引物質であり得る炎症誘発性分子、すなわち、エオタキシン、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G - c s f) 、および IL - 8 、ならびに活性化により調節される、発現され分泌された正常 T 細胞 (regulated upon activation, normal T - cell expressed and secreted : RANTES) の発現によって免疫細胞に対して支持的効果を提供する可能性が高い。一部の実施形態において、単離された P V M C s の TNF - または IL - 1 への曝露は、 IL - 1 、 IL - 6 、 IL - 7 、 IL - 12 、 IL - 16 、 IL - 1 受容体アンタゴニスト (IL - 1 receptor antagonist : IL - 1ra) 、 TNF - 、腫瘍壊死因子 - (tumor necrosis factor - : TNF -) 、上皮好中球活性化タンパク質 78 (epithelial neutrophil - activating protein 78 : ENA - 78) 、エオタキシン、 IL - 8 、单球走化性タンパク質 1 (monocyte chemoattractant protein 1 : MCP - 1) 、マクロファージ炎症性

10

20

30

40

50

タンパク質 - 1 (macrophage inflammatory protein - 1 : MIP - 1)、MIP - 1、RANTES、細胞間接着分子 - 1 (intercellular adhesion molecule - 1 : ICAM - 1)、VCAM - 1、G - CSF、GM - CSF、成長ホルモン、幹細胞因子 (stem cell factor : SCF)、VEGF₁₆₅、bFGF、甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone : TSH)、CD40、およびCD40リガンドを含む走化性および刺激性分子の発現増加を生じさせる結果となり得る。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、創傷治癒の早期に炎症性細胞に応答することおよび後続の免疫応答段階のための生理的支持を提供することが可能であり得る。一部の実施形態において、局所環境は、治癒過程で変化するので、単離されたPVMCsの発現プロファイルは経時的に変化し、損傷部位の免疫監視の阻害、および防止 (自己免疫事象の開始) をもたらす結果となる可能性が高い。

10

【0250】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、大規模な線維化の確立が生ずる前に抗線維化または抗瘢痕化効果を有することができる。HGFおよびbFGFは、単離されたPVMCsによる線維化の防止に関与することができる。組織損傷の状況で、単離されたPVMCsは、増殖性になり、HGFを分泌することができ、HGFが次いで抗線維化効果および免疫修飾効果を媒介する。したがって、一部の実施形態において、線維化を防止するための単離されたPVMCsの投与を、線維化を回避すべき症例においてHGF (およびおそらく他の抗瘢痕化因子) の局所生産を増加させる方法と見なすことができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsの前記抗線維化または抗瘢痕化効果は、損傷部位に移動し通常は高濃度コラゲナーゼ瘢痕組織を生成する筋線維芽細胞の侵入および機能を阻害することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、造血を支持することができあり得、この能力は、可溶性因子、例えばSCF、LIF、IL - 6、およびマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor : M-CSF) の構成的分泌を伴うことがある；加えて、造血の支持は、G - CSFおよびGM - CSFのIL - 1誘導分泌によってさらに増強される場合がある。

20

【0251】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、組織固有前駆体を分裂および分化するように刺激して損傷部位において組織の再生を生じさせる結果となる分裂促進因子を分泌することにより、分裂促進特性を有することができる。

30

【0252】

一部の実施形態において、それを必要とする被検者に投与される単離されたPVMCsは、血管新生効果を有することができる。単離されたPVMCsによって分泌される分子は、結果として損傷部位への血管内皮細胞またはそれらの前駆体の動員をもたらすことができる。前記損傷部位に動員されると、内皮細胞またはそれらの前駆体は、分裂し、原始血管を形成することができる。血液供給の確立は、傷害を受けた組織の回復の基本である。PVMCsは、bFGF、VEGF、胎盤成長因子 (placental growth factor : PGF)、およびMCP - 1、ならびに低酸素条件下で培養された内皮細胞の死滅を阻害しインビトロアッセイにおいて毛細血管様構造の形成を促進する血管新生および抗アポトーシス因子、例えばIL - 6、VEGF、およびMCP - 1の分泌によって、血管新生促進効果を有することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、内皮細胞の基質として役立つ細胞外基質成分を提供することによって血管新生に寄与することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、周皮細胞に転移し、新たに形成された血管系を安定させることができる。

40

【0253】

一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、様々な修復およびヘルパー細胞を再生中の組織ゾーンに動員することができる強力な化学誘引物質である分子を分泌することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、CCL2 (MCP - 1

50

)、CCL3(MIP-1 α)、CCL4(MIP-1 β)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL20(MIP-3 α)、CCL26(エオタキシン-3)、CX3CL1(フラクタルカイン)、CXCL5(ENA-78)、CXCL11(i-TAC)、CXCL1(GRO α)、CXCL12(SDF-1)、CXCL8(IL-8)、CXCL2(GRO β)、およびCXCL10(IP-10)を含む様々な走化性分子を分泌することができる。これら化学誘引物質の標的細胞としては、単球、好酸球、好中球、好塩基球、記憶およびナイーブT細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、ならびに造血および内皮前駆細胞を含むことができる。単離されたPVMCsによるケモカイン発現は、他の細胞タイプ、特に免疫細胞への曝露によって修飾されることになると考えられる。

10

【0254】

一部の実施形態において、前記単離されたPVMCsは、CD146、CD105、CD166、CD44、CD73、CD90、またはそれらの組合せを発現することができる。一部の実施形態において、前記PVMCsは、CD45陰性である。

【0255】

一部の実施形態では、単離されたPVMCsを治療的に利用することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、同種輸液の一部を形成することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、もしくは増殖させたPVMCsと併用して、輸液を形成することができる。一部の実施形態において、輸液はまた、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リソングル液、酢酸リソングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline: TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution: HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution: GBSS)、またはそれらの組合せを有する平衡塩類溶液を含むことができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを組織に直接注入することができる。例えば、単離されたPVMCsの調製物をカテーテルによって心臓に直接注入することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMCsを治療的投与前に足場に包み込むことができる。適する足場の例としては、既製支柱および酵素または触媒により架橋がインビボで起こるように活性化される架橋性複合体を含む。

20

【0256】

一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物をヒト患者の胸、頭、または肢に投与することができ、該調製物は、骨再生のための再生微小環境を提供することができあり得る。一部の実施形態において、単離されたPVMCsの固有分泌活性は、組織損傷部位で再生微小環境を確立することができる。一部の実施形態において、単離されたPVMCsは、瘢痕化を阻害する、アポトーシスを阻害する、血管新生を刺激する、ならびに有糸分裂および組織固有幹または前駆細胞を刺激する生物活性因子を分泌することができ、かつ細菌が損傷部位、例えば開放創に存在するとき抗生物質タンパク質を分泌することもできる。PVMCsの前記多面的効果を「栄養活性」と呼ぶことができる。

30

【0257】

一部の実施形態では、前記PVMCsの薬用能力を、具体的な異なる解剖学的位置によって決定されるような特定の生理環境で該PVMCsによって分泌される分子の範囲によって定義する。

40

【0258】

一部の実施形態では、前記PVMCsを前記骨の骨梁骨小腔から獲得する。一部の実施形態では、PVMCsを大腿骨骨頭、遠位大腿骨、または近位脛骨から獲得する。

【0259】

一部の実施形態は、骨再生を刺激する方法であって、治療有効量のPVMCsを有する

50

組成物を投与する段階を有する方法を対象とする。一部の実施形態において、前記組成物は、骨髄をさらに有する。一部の実施形態では、PVMC調製物を骨芽細胞と併用する。

【0260】

一部の実施形態では、PVMC調製物をヒト患者の腕、頭、または肢に投与する。一部の実施形態において、PVMCsは、再生微小環境を提供することができる。

【0261】

一部の実施形態において、細胞機能に影響を及ぼす疾患を処置する方法は、治療有効量のPVMCsを有する組成物を、それを必要とする被検者に投与する段階を有する。一部の実施形態において、前記疾患は、虚血性心疾患、熱傷、脳卒中、炎症性腸疾患、クローキン病、関節リウマチ、狼瘡、筋萎縮性側索硬化症、脊髄損傷、多発外傷、骨折、糖尿病、またはそれらの組合せである。10

【0262】

一部の実施形態において、前記PVMCsは、部位依存性栄養因子を分泌することができる。一部の実施形態において、前記栄養因子の部位依存性効果は、アポトーシスの修飾；有糸分裂の修飾；血管新生の修飾；免疫修飾、瘢痕化および線維化の修飾、またはそれらの組合せから選択される。

【0263】

一部の実施形態において、前記部位依存性栄養因子は、プロスタグランジンE2 (prostaglandin E2 : PGE2)、間質細胞由来因子-1 (stromal-cell derived factor-1 : SDF-1)、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、VEGF165、インターロイキン-1 (interleukin-1 : IL-1)、インターロイキン-6 (interleukin-6 : IL-6)、インターロイキン-7 (interleukin-7 : IL-7)、インターロイキン-8 (interleukin-8 : IL-8)、インターロイキン-12 (interleukin-12 : IL-12)、インターロイキン-16 (interleukin-16 : IL-16)、血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor : HGF)、トランスフォーミング成長因子ベータ (transforming growth factor beta : TGF-β)、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor : GM-CSF)、インスリン様成長因子1 (insulin-like growth factor 1 : IGF-1)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (indoleamine 2,3-dioxygenase : IDO)、インターロイキン-10 (interleukin-10 : IL-10)、ヒト白血球抗原G (human leukocyte antigen G : HLA-G)、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor : LIF)、クラスII主要組織適合性複合体 (class II major histocompatibility complex : MHC)、エオタキシン、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony stimulating factor : G-CSF)、活性化により調節される、発現され分泌された正常T細胞 (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted : RANTES)、IL-1受容体アゴニスト (IL-1 receptor antagonist : IL-1ra)、腫瘍壊死因子- (tumor necrosis factor-)、TNF-、腫瘍壊死因子- (tumor necrosis factor- : TNF-)、上皮好中球活性化タンパク質78 (epithelial neutrophil activating protein 78 : ENA-78)、エオタキシン、単球走化性タンパク質1 (monocyte chemoattractant protein-20
30
40
50

1 : MCP - 1) 、单球走化性タンパク質 3 (monocyte chemoattractant protein 3 : MCP - 3) 、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 (macrophage inflammatory protein - 1 : MIP - 1) 、マクロファージ炎症性タンパク質 - 3 (macrophage inflammatory protein - 3 : MIP - 3) 、マクロファージ炎症性タンパク質 - 1 (macrophage inflammatory protein - 1 : MIP - 1) 、細胞間接着分子 - 1 (intercellular adhesion molecule - 1 : ICAM - 1) 、VCAM - 1 、顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor : G-CSF) 、成長ホルモン、幹細胞因子 (stem cell factor : SCF) 、甲状腺刺激ホルモン (thyroid-stimulating hormone : TSH) 、CD40 および CD40 リガンド、胎盤成長因子 (placental growth factor : PlGF) 、エオタキシン - 3 、フラクタルカイン、上皮好中球活性化タンパク質 78 (epithelial neutrophil-activating protein 78 : ENA - 78) 、インターフェロン誘導性 T 細胞アルファ化学誘引物質 (Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant : i-TAC) 、成長調節癌遺伝子 - アルファ (growth regulated oncogene-alpha : GRO) 、成長調節癌遺伝子 - ベータ (growth regulated oncogene-beta : GRO) 、インターフェロン誘導性タンパク質 - 10 (Interferon-inducible protein - 10 : IP - 10) 、CD146 、 CD105 、 CD166 、 CD44 、 CD271 、 CD73 、 CD90 、 CD44 、 CD10 、またはそれらの組合せから選択される。
10

【 0264 】

一部の実施形態において、前記 PVMCs は、 CD271 、 CD73 、 CD90 、またはそれらの組合せを発現する。一部の実施形態において、前記 PVMCs は、 CD146 、 CD105 、 CD44 、 CD10 、またはそれらの組合せを発現する。一部の実施形態において、前記血管周囲細胞は、 CD34 、 CD45 、またはそれらの組合せを発現しない。
20

【 0265 】

一部の実施形態では、前記 PVMCs をヒトドナーから獲得する。一部の実施形態において、投与される PVMCs は、自家血管周囲薬用細胞である。一部の実施形態において、投与される前記 PVMCs は、同種血管周囲薬用細胞である。
30

【 0266 】

一部の実施形態では、 PVMCs をヒト骨髓、ヒト組織、または非脱灰骨から獲得する。一部の実施形態において、前記ヒト組織は、脂肪、筋肉、皮膚、胎盤、臍帯組織、血管組織、またはそれらの組合せから選択される毛細血管含有組織である。
40

【 0267 】

一部の実施形態では、 PVMCs を医薬的に許容され得る担体とともに投与する。一部の実施形態では、前記組成物を静脈内注射、腹腔内注射、直接組織注射によって、または必要に応じた領域への直接適用によって投与する。一部の実施形態では、前記組成物を熱傷または創傷に直接適用することができる。一部の実施形態では、前記組成物を静脈内投与する。一部の実施形態において、前記医薬的に許容され得る担体は、標準注入媒質を有する。一部の実施形態において、標準注入媒質は、增量剤、血液ベースの製品、代用血液、緩衝溶液、薬物、栄養素、またはそれらの組合せを有する。一部の実施形態において、增量剤は、これに限定されるものではないが、 D5W 、 2 / 3D 、 1 / 3S 、 2 分の 1 生理食塩水、正常生理食塩水、乳酸リンゲル液、および D5NS を含む。一部の実施形態において、血液ベースの製品は、これに限定されるものではないが、全血、赤血球、白血球、血漿、凝固因子、および血小板を含む。一部の実施形態において、代用血液は、これに限定されるものではないが、酸素運搬代用血液、ヘモグロビン系酸素運搬体 (hemog
50

l o b i n - b a s e d o x y g e n c a r r i e r s : H B O C) 、 お よ び パ ー フ ル オ ロ カ ー ボ ン 系 酸 素 運 搬 体 (p e r f l u o r o c a r b o n - b a s e d o x y g e n c a r r i e r s : P F B O C) を 含 む 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 緩 衝 溶 液 は 、 こ れ に 限 定 さ れ る も の で は な い が 、 乳 酸 リ ン グ ル 液 お よ び 静 脈 内 投 与 用 重 炭 酸 ナ ト リ ユ ム を 含 む 。 栄 軍 素 と し て は 、 こ れ に 限 定 さ れ る も の で は な い が 、 塩 、 グ ル コ ース 、 ア ミ ノ 酸 、 脂 質 、 お よ び ビ タ ミ ン を 含 む 。 薬 物 は 、 こ れ に 限 定 さ れ る も の で は な い が 、 通 用 は 静 脈 内 、 筋 肉 内 、 皮 下 、 お よ び 腹 腔 内 経 路 に よ つて 投 与 さ れ る こ と に な る 薬 物 を 含 む 。

【 0 2 6 8 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 ア ポ ロ ー シ ス を 修 飾 す る 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 虚 血 細 胞 に お け る ア ポ ロ ー シ ス を 修 飾 す る こ と が で き る 。

【 0 2 6 9 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 有 糸 分 裂 を 修 飾 す る 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 固 有 組 織 前 駆 体 に お け る 有 糸 分 裂 を 修 飾 す る こ と が で き る 。

【 0 2 7 0 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 血 管 新 生 を 修 飾 す る 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 成 長 因 子 を 分 泌 す る こ と が で き る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 血 管 周 囲 組 織 に 局 在 さ れ 、 新 た に 形 成 さ れ た 血 管 を 安 定 さ せ る 。

【 0 2 7 1 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 骨 組 織 を 再 建 す る 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。

【 0 2 7 2 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 金 属 デ バ イ ス を 骨 の 中 に 固 定 す る 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。 一 部 の 実 施 形 態 で は 、 前 記 金 属 デ バ イ ス は 、 頭 蓋 顔 面 骨 、 頭 蓋 骨 、 下 頸 骨 、 鎖 骨 、 肩 甲 骨 、 胸 骨 、 肋 骨 、 上 腕 骨 、 尺 骨 、 桡 骨 、 心 皮 、 指 節 骨 、 中 手 骨 、 膝 蓋 骨 、 腓 骨 、 大 腿 骨 、 膝 骨 、 足 根 骨 、 中 足 骨 、 仙 骨 、 寽 骨 、 ま た は 腰 椎 か ら 選 択 さ れ る 骨 内 に 固 定 さ れ る 。

【 0 2 7 3 】

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 血 管 周 围 組 織 に 局 在 す る こ と が で き る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 新 た に 形 成 さ れ た 血 管 を 安 定 さ せ る 。

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 、 血 管 新 生 分 子 、 血 管 形 成 性 分 子 、 ま た は そ れ ら の 組 合 せ を 分 泌 す る 。

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 血 管 新 生 ま た は 血 管 形 成 性 分 子 は 、 血 管 内 皮 細 胞 を 誘 引 し 、 増 加 さ せ る 。

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 前 記 組 成 物 の 投 与 は 、 内 皮 細 胞 の 動 員 お よ び 增 殖 を 生 じ さ せ る 結 果 と な る 。

【 0 2 7 4 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 骨 形 成 を 修 饪 す る 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 P V M C s は 骨 芽 細 胞 を 形 成 す る 能 力 を 有 す る 。

【 0 2 7 5 】

一 部 の 実 施 形 態 は 、 免 疫 修 饪 方 法 で あ つて 、 治 療 有 効 量 の P V M C s を 有 す る 組 成 物 を 、 そ れ を 必 要 と す る 被 檢 者 に 投 与 す る 段 階 を 有 す る 方 法 を 対 象 と す る 。 一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 免 疫 修 饪 は 、 サ イ ト カ イ ン 、 成 長 因 子 、 ま た は そ れ ら の 組 合 せ の 少 な く と も 1 つ に よ つて 媒 介 さ れ る 。

一 部 の 実 施 形 態 に お い て 、 前 記 免 疫 修 饪 は 、 リ ン パ ま た は リ ン パ 系 に お け る も の で ある 。

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

一部の実施形態は、P V M C sと足場材料とを有する組成物を対象とする。一部の実施形態において、前記P V M C sは、冷凍保存されており、その後、解凍されている。一部の実施形態において、前記足場材料は、骨細片、セラミック系代用骨移植片、リン酸カルシウムセラミックス、硫酸カルシウムセラミックス、バイオガラス、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、加工同種骨移植材料、石灰化加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、コラーゲンスponジ、またはそれらの組合せを有する。

【0277】

一部の実施形態では、本開示に記載の前記P V M C調製物をヒト被検者に投与して、細胞機能に影響を及ぼす疾患を処置することができる。前記P V M C sを単独で使用してもよく、または他の治療薬と併用してもよい。単独で使用するとき、P V M C調製物を静脈内投与することができ、または損傷部位に投与することができる。治療レジメンは、時間経過を規定した多回注射から構成されることもあり、または単回注射で構成されることもある。細胞ベースの療法、例えば、本開示に記載の実施形態は、前記細胞が特定の病的微小環境に応答するので、病変内で様々な部位で何回も多数の治療効果を発揮する利点を有することができる。

10

【0278】

治療的投与のためのP V M C調製物は、濃縮された骨または臍帯由来P V M C sの集団が補充された骨の第1の部分から調製された自家骨移植片を含むことができる。一部の実施形態では、前記濃縮された骨または臍帯由来P V M C sは、該P V M C sを前記被検者からの同じ自家骨組織の第2の部分から抽出および濃縮することによって調製して、前記強化された自家骨移植片を作製ことができる。

20

【0279】

一部の実施形態において、P V M C調製物は、同種輸液の一部を形成することができる。骨または臍帯由来P V M C sを単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、または増殖させたP V M C sと併用して輸液を形成することになる。一部の実施形態において、前記輸液はまた、平衡塩類溶液、例えば、限定ではないがリン酸緩衝生理食塩水、乳酸リングル液、酢酸リングル液、T R I S緩衝生理食塩水(T R I S - buffered saline: T B S)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution: H B S S)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution: E B S S)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate: S S C)、H E P E S緩衝生理食塩水(H E P E S - buffered saline: H B S)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution: G B S S)、またはそれらの組合せを含むことができる。

30

【0280】

一部の実施形態では、前記P V M C調製物を組織に直接注入することができる。例えば、骨由来P V M C sの調製物をカテーテルによって心臓に直接注入することができる。一部の実施形態において、疾患を処置する前記方法は、P V M C調製物を足場に包み込む段階を有することができる。P V M C調製物を治療的投与前に足場に包み込むことができる。適する足場の例としては、既製支柱および酵素または触媒により架橋がインビボで起こるように活性化される架橋性複合体を含む。

40

【0281】

一部の実施形態では、P V M Cの調製物を骨細片と併用して、創傷部位に直接適用することができるペーストを形成することができる。前記ペーストは、再生微小環境を提供することが可能であり得る。一部の実施形態において、前記ペーストは、抗アポトーシス特性を有することができる。

【0282】

P V M C調製物を、これに限定されないが合成代用骨を含む多種多様な追加の要素と共に投与することができ、前記合成代用骨は、リン酸カルシウム系代用骨、カルシウムアバタイト、-リン酸三カルシウム、天然および合成ポリマー、セラミックス、A l l o g

50

ro、Optiform、Grafton、Orthoblast、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、バイオガラス、OsteoGraft、Norian SRS、ProOsteon、Osteoset、ポリマー系代用骨移植片、分解性および非分解性ポリマー、Cortoss、開孔性ポリ乳酸ポリマー、Immix、またはそれらの組合せ；石灰化加工同種移植片、脱灰加工同種移植片、またはそれらの組合せ；コラーゲンスponジ、BMP-2含有コラーゲンスponジ、BMP-7含有コラーゲンスponジ、BMP-2およびBPM-7含有コラーゲンスponジ、またはそれらの組合せ；PDGF-BB；単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、もしくは増殖させたPVMCs、またはそれらの組合せと併用されるリン酸カルシウム系代用骨；単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、または増殖させたPVMCsを有することに加えて、代用骨、例えば、ヒドロキシアパタイト、カルシウムアパタイト、-リン酸三カルシウム、天然および合成ポリマー、セラミックス、もしくは他の代用骨材料、またはそれらの組合せ；ルート関節形成術中に獲得される廃棄膝関節または股関節骨／骨髓を有する。一部の実施形態では、前記PVMCsを単独で使用してもよく、または骨もしくは他の足場、例えば自家骨移植片と併用してもよい。

10

【0283】

単離されたPVMCsおよびPMVC調製物を保管するための方法

一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを将来の使用のために保管することができる。単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せの保管は、-20から-250の範囲の温度での極低温保存によって果たすことができる。一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せをプラズマライトおよびジメチルスルホキシドと混合し、その後、液体窒素または液体窒素蒸気中で保管することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを約0.5Mエチレングリコール、約1.0Mプロピレングリコール、および約1.5Mジメチルスルホキシドと培養培地の存在下で混合し、その後、液体窒素または液体窒素蒸気中で保管することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを培養培地および10%ジメチルスルホキシドと混合物し、その後、液体窒素または液体窒素蒸気中で保管することができる。一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを冷凍する前記プロセスを瞬間冷凍によって果たす。本明細書に記載する場合、瞬間冷凍は、PVMC調製物を液体窒素に浸漬し、その結果、前記単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せの急速冷凍を生じさせるプロセスを含む。一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを冷凍する前記プロセスを、前記PVMC調製物の温度を該調製物の液体窒素蒸気への浸漬により徐々に低下させることによって果たす。一部の実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを、温度プローブに連結された冷凍庫に入れ、ここで当該温度を、所望の冷凍温度への漸進的降下を可能にするためのコンピュータ制御プロトコルによって低下させる。さらなる実施形態では、単離されたPVMC調製物、単離されたPVMCs、骨もしくは骨組織に由来する単離されたPVMCs、臍帯血管に由来する単離されたPVMCs、またはそれらの組合せを、温度プローブに連結された冷凍庫に入れ、ここで当該温度を、所望の冷凍温度への漸進的降下を可能にするためのコンピュータ制御プロトコルによって低下させる。

20

30

40

50

P V M C s、臍帯血管に由来する単離された P V M C s、またはそれらの組合せを所定の量の P V M C s が入っているクリオバイアルに詰め、- 85 機械的冷凍器内で 24 時間のイソプロパノール浴中のバイアルの浮遊、続いての -196 での保管のための液体窒素への投入から成るダンプ・フリーズ法 (dump-freeze method) を用いておおよそ -1 / 分で冷却する。一部の実施形態では、単離された P V M C 調製物、単離された P V M C s、骨もしくは骨組織に由来する単離された P V M C s、臍帯血管に由来する単離された P V M C s、またはそれらの組合せを保管場所から回収し、直ちに 37 水浴で解凍し、続いて滅菌培地で注意深く洗浄して、10 分にわたる完全培地でのゆっくりとした希釈によって抗凍結剤を除去し、500 × g での 5 分間の遠心分離、上清の吸引、および新たな完全培地での再浮遊が続く。

10

【0284】

一部の実施形態では、極低温冷凍の単離された P V M C 調製物、単離された P V M C s、骨もしくは骨組織に由来する単離された P V M C s、臍帯血管に由来する単離された P V M C s、またはそれらの組合せを、該調製物を約 35 から 40 の温度での予熱滅菌水浴に入れることによって解凍することができる。前記水浴に浸漬したら、前記単離された P V M C 調製物、単離された P V M C s、骨もしくは骨組織に由来する単離された P V M C s、臍帯血管に由来する単離された P V M C s、またはそれらの組合せを解凍するまで混合する。したがって、前記単離された P V M C 調製物、単離された P V M C s、骨もしくは骨組織に由来する単離された P V M C s、臍帯血管に由来する単離された P V M C s、またはそれらの組合せは、細胞培養での増殖または P V M C 生存力についての試験に適している。一部の実施形態では、単離された P V M C 調製物、単離された P V M C s、骨もしくは骨組織に由来する単離された P V M C s、臍帯血管に由来する単離された P V M C s、またはそれらの組合せを、該調製物を液体窒素蒸気に約 30 から 45 分間浸漬することによって解凍することができる。その後、前記 P V M C 調製物を、細胞培養での増殖、試験、または治療的使用のために必要とされるまでドライアイス中で維持する。

20

【0285】

本発明ならびに用いる方法および材料を例示する実施形態を、以下の非限定的実施例への参照によりさらに理解することができる。

(実施例)

【実施例 1】

30

【0286】

臍帯血管からの P V M C s の単離

P V M C s を臍帯血管の静脈または動脈から多段プロセスによって単離することになる。臍帯血管の 4 ~ 5 cm 長部分を単離し、抗生素質 (300 単位 / mL ペニシリン、300 µg / mL ストレプトマイシン、150 µg / mL ゲンタマイシン、および 1 µg / mL ファンギゾンを含有するタイロード液に浸漬することになる、あるいは 20 % 抗生物質 (167 単位 / mL ペニシリン G、50 µg / mL ゲンタマイシン、0.3 µg / mL アンホテリシン) を含有する 80 % - MEM に浸漬することになる。P V M C s を臍帯血管から、子宮外で臍帯血管組織を獲得してから 6 から 12 時間以内に単離すべきである。

40

【0287】

第 1 工程では、前記臍帯血管にカニューレを挿入し、100 単位 / mL ヘパリンを含有するタイロード液で洗浄することになり、前記洗浄溶液を廃棄する。

【0288】

第 2 工程では、前記臍帯血管の遠位端をクランプし、前記カニューレが挿入された臍帯血管または静脈を 1 mg / mL コラゲナーゼ (IV 型) を含有する - MEM あるいは最適化酵素ミックスで満たす。代替工程では、コラゲナーゼ (IV 型) の代わりにメタロプロテイナーゼを用いる。

【0289】

第 3 工程では、前記臍帯血管の近位端をクランプすることになり、コラゲナーゼあるいは前記最適化酵素混合物を含有する当該臍帯を 20 ~ 30 分間、37 で恒温放置する。

50

その後、前記臍帯血管をクランプから外し、 $1\text{ mg}/\text{mL}$ コラゲナーゼ(IV型)を含有する前記-MEMあるいは最適化酵素ミックスを前記静脈または動脈から排出する。

【0290】

第4工程では、前記臍帯血管を再びクランプし、タイロード液で洗浄し、その後、前記臍帯血管を穏やかにマッサージすることになる。結果として得られるタイロード溶液は、内皮および内皮下細胞の浮遊液を含有する。前記タイロード細胞浮遊液を採取し、当該細胞を洗浄し、その後、 $10\% \text{ FEB}$ と、 2 mM L-Gルタミン と、 $100\text{ 単位}/\text{mL}$ ペニシリンと、 $100\text{ 单位}/\text{mL}$ ストレプトマイシンとで補足されたD MEM中、37で、 $5\% \text{ CO}_2$ で3日間培養する。このプロセスによって、主として内皮細胞を有する細胞の集団と小PVMC集団を得ることになる。

10

【0291】

第5工程では、前記第2工程から第4工程を繰り返して第2のタイロード細胞浮遊液を得ることになり、第2のタイロード細胞浮遊液を、 $10\% \text{ FBS}$ と、 2 mM L-Gルタミン と、 $100\text{ 单位}/\text{mL}$ ペニシリンと、 $100\text{ 单位}/\text{mL}$ ストレプトマイシンとで補足されたD MEM中、37で、 $5\% \text{ CO}_2$ で3日間培養することができる。この第2の細胞浮遊液は、PVMCsが富化されていると予想される。

【実施例2】

【0292】

臍帯血管からのPVMCsの単離

PVMCsを、臍帯血管の静脈または動脈から、2回の別個の酵素恒温放置を含む多段プロセスによって単離することになる。第1工程では、臍帯血管の4~5cm長部分を単離し、抗生物質($300\text{ 单位}/\text{mL}$ ペニシリン、 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、 $150\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン、および $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ファンギゾンを含有するタイロード液に浸漬することになる、あるいは 20% 抗生物質($167\text{ 单位}/\text{mL}$ ペニシリンG、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン、 $0.3\mu\text{g}/\text{mL}$ アンホテリシン)を含有する 80% -MEMに浸漬することになる。PVMCsを臍帯血管から、子宮外で臍帯血管組織を獲得してから6から12時間以内に単離すべきである。

20

【0293】

第2工程では、臍帯の前記部分をリングスタンドに対して垂直位置に取り付けることになり、前記臍帯の頂部および底部をクランプする。これに続いて、前記血管の頂部および底部にカニューレを挿入し、前記懸架された臍帯血管の前記血管の前記頂部および底部に3方口を挿入し、ここで前記頂部の前記3方口は、前記血管への培地の送達を可能にすることができる。前記3方口により、培地の挿入、前記血管へのおよび血管からの空気の移動、ならびに前記血管に含有された培地を空にすることが可能になる。

30

【0294】

その後、第3工程では、前記臍帯血管を、 $100\text{ 单位}/\text{mL}$ ヘパリンを含有するタイロード液で洗浄することになり、前記洗浄溶液を廃棄する。前記タイロードを、前記臍帯血管の前記底部に挿入された前記3方口に、前記血管が溶液で満たされるまで注入する。その後、同じ3方口を通して前記タイロード液を空にする。

40

【0295】

第4工程では、前記臍帯血管を、 $1\text{ mg}/\text{mL}$ コラゲナーゼ(IV型)を含有する-MEMあるいは最適化酵素ミックスで満たすことになる。代替工程では、コラゲナーゼ(IV型)の代わりにメタロプロテイナーゼを用いる。 $1\text{ mg}/\text{mL}$ コラゲナーゼ(IV型)を含有する前記-MEMあるいは最適化酵素ミックスを、前記臍帯血管の前記底部に挿入された前記3方口に、前記血管が培地で満たされるまで注入する。その後、 $1\text{ mg}/\text{mL}$ コラゲナーゼ(IV型)を含有する前記-MEMあるいは最適化酵素ミックスを、同じ3方口を通して空にする。

【0296】

第5工程では、 $1\text{ mg}/\text{mL}$ コラゲナーゼ(IV型)を含有する-MEMあるいは最適化酵素ミックスを含有する前記臍帯血管を $20\sim30$ 分間、37で恒温放置する。

50

前記臍帯血管の前記底部の前記 3 方口を通して前記臍帯血管を空にし、廃棄する。

【0297】

第 6 工程では、前記第 2 工程から第 4 工程を繰り返して第 2 のタイロード細胞浮遊液を得ることになり、第 2 のタイロード細胞浮遊液を、10% FBS と、2 mM L-グルタミンと、100 単位 / mL ベニシリンと、100 単位 / mL ストレプトマイシンとで補足された DMEM 中、37° で、5% CO₂ で 3 日間培養することができる。この第 2 の細胞浮遊液は、PVMCs が富化されていると予想される。

【0298】

PVMCs を前記臍帯血管から単離する前記プロセスの間、前記臍帯を極低温保存することが可能である。前記単離プロセスの前記第 1 工程におけるタイロード液への浸漬後の極低温保存が企図される。単離プロセスの前記第 3 工程の後の、すなわち、前記臍帯血管をタイロード液で洗浄して、前記血管中に残存する残留血液をフラッシュした後の前記臍帯の極低温保存も企図される。前記血管を前記第 2 工程で記載したように洗浄したら、それを適する凍結保護溶液、例えば、グリセロール、エチレングリコール、プロピレングリコール、またはジメチルスルホキシドを含有する別のグリコールで満たす。その後、当該臍帯切片を瞬間凍結させて、氷結晶の形成、ならびに前記血管の中に含有されている組織および細胞に対する傷害を回避する。前記臍帯切片を、-70° での 1 から 24 時間の初期冷凍、続いて液体窒素中 -196° での長期極低温保存によって段階的様式で冷凍することもできる。極低温保存された試料を前記単離プロトコルの完了のために解凍することができる。組織および細胞生存力を維持するために、極低温保存された試料を急速解凍すべきである。

10

20

30

40

【実施例 3】

【0299】

PVMCs の培養

臍帯血管から単離された PVMCs を培養して、濃縮された臍帯血管由来 PVMCs の集団を選択的に増殖させることができる。臍帯血管から単離された 1 若しくはそれ以上の細胞浮遊液を、10% ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) で補足された DMEM で希釈することができる。前記 DMEM 混合物を激しくボルテックスして当該細胞を機械的に分散させ、続いて 480 × g で 5 分間、ベンチトップ遠心機において遠心分離することができ、その後、当該上清を除去する。Percol 1 (商標) (密度 1.03 ~ 1.12 g / mL)、続いて、インタクト Percol 1 (商標) 勾配を保証するための破壊を伴わない 480 × g での 15 分間の第 2 ラウンドの遠心分離を用いることにより、残存細胞ペレットを分別して成核細胞を採取することになる。その後、前記勾配の上部画分を新しい試験管に移し、DMEM で補足し、続いて 480 × g で 15 分間、遠心分離する。遠心分離後、前記ペレットを乱すことなく当該上清を除去する。その後、前記ペレットを DMEM に再浮遊させ、DMEM を使用して遠心分離により数回洗浄する。得られる PVMC 細胞浮遊液は、その結果、増殖または濃縮の準備が整っている。

30

【実施例 4】

【0300】

大腿骨の大腿骨骨頭からの PVMCs の単離

股関節置換手術からの廃棄骨断片または大腿骨骨頭を骨細片としても、PVMCs 源としても使用することができる。先ず、細胞浮遊液を前記骨から酵素消化および機械力によって抽出することよって；次に、前記抽出された PVMCs を濃縮し、PVMC 集団を選択的に増殖させることによって PVMCs を単離することができる。

【0301】

細胞浮遊液を大腿骨の大腿骨骨頭から抽出するために、前記骨を破碎してもよい。先ず、前記骨の外来軟組織を取って清浄化し、粉碎して、5 mm までの縁部寸法を有する不規則形状多面体の形態の皮質 / 海綿質細片を獲得する。前記骨細片は、骨髄を有することもある。場合によっては、骨細片を大腿骨骨頭から獲得することになり、前記清浄化プロセ

50

スを省いて前記調製物中に骨髄組織を留めておく。骨を機械的に破壊することに加えて、前記骨断片の酵素消化を、次の酵素での一連の処理に前記骨を付すことによって果たすこともできる：コラゲナーゼ、プロテアーゼ、GAGアーゼ、およびメタロプロテアーゼ、クロストリパイン（C.ヒストリチクムからのシステインプロテアーゼ）、セリンプロテアーゼ、アルカリプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、またはそれらの組合せ。理論により拘束されることを望まないが、酵素消化は、前記PVMCsを前記骨断片中の小血管の基底膜に連結する結合を特異的に切断すると考えられる。一部の実施形態では、骨断片の前記酵素消化を、骨の機械的破壊の後でも、インタクト骨断片でも行うことができる。

【0302】

10

酵素消化後、骨断片から獲得された前記細胞浮遊液を、Smart prep 2（商標）遠心機を2,500 rpmで3分間、続いて2,300 rpmで9分間使用する密度勾配遠心分離により清浄化および採取することができる。あるいは、重力により、粒子を採取管の底部に集めて細胞を回収することができる。

【0303】

20

その後、PVMC細胞浮遊液を、前記PVMC上の細胞表面抗原に対して親和性を有する抗体を有する磁性ビーズの使用により濃縮することができる。PVMCの濃縮を、増殖させた細胞集団に対して行ってもよい。PVMC集団の濃縮を、前記細胞集団の事前の増殖なしに行ってもよい。PVMC調製物は自家様式で投与されてもよい。絶対細胞純度が要求されないこともある。理論により拘束されることを望まないが、内皮細胞または単球中の不純物は、骨形成事象に有益である場合があると考えられる。

【0304】

一部の実施形態では、その後、前記濃縮物を多孔質ヒドロキシアパタイト顆粒（Orthooss（登録商標）；97m²/g、全孔隙率60%、結晶間隙結晶サイズ10~60mm、Ca/P 2.03）と混合することができ、またはブタもしくはウシコラーゲンスポンジ（100mgゼラチン、インビボでの再吸収期間2~3週間）に適用することができる。前記濃縮物を自己フィブリンクロットに包み込んでもよい。

【0305】

30

これらの調製物は、整形外科的、歯科、および頭蓋顔面再建用途での直接使用に適し得る。単離されたPVMCsを-195°での極低温保管によって将来の使用のために保管することができる。

【実施例5】

【0306】

骨再生のための再生微小環境を作るためのPVMCsの投与

PVMC調製物、例えば実施例1からのものをヒト被検者に投与して、損傷後の骨の再生を促進することになる。これらの細胞を単独で使用してもよく、骨または他の足場、例えば自己骨移植片と併用してもよい。単独で使用するとき、PVMC調製物を静脈内注射することができ、または損傷部位に注射することができる。治療レジメンは、時間経過を規定した多回注射から構成されることもあり、または単回注射で構成することもある。治療レジメンはまた、患者の静脈に前以て挿入されたカテーテルに接続された生理食塩水のバッグに注入口を介してPVMC調製物を注入することによる点滴静注によって患者の静脈に注入することもできる。細胞ベースの療法、例えば、本出願に記載の実施形態は、前記細胞が特定の病的微小環境に応答するので、病変内で様々な部位で何回も多数の治療効果を発揮する利点を有することができる。

40

【0307】

PVMC調製物、例えば実施例1のものは、同種輸液の一部を形成することができる。骨由来PVMCsを単離された骨芽細胞、全骨髓、未精製の、精製された、または増殖させたPVMCsと併用して、静脈内投与用の輸液を形成することができる。輸液はまた、リン酸緩衝生理食塩水、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水（TRIS-buffered saline: TBS）、ハンクス平衡塩類溶液（Hank's

50

's balanced salt solution: HBSS)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution: EBSS)、標準クエン酸添加生理食塩水(Standard saline citrate: SSC)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline: HBS)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution: GBSS)、またはそれらの組合せを有する平衡塩類溶液を含むことができる。あるいは、骨由来PVMCsを組織に直接注入することができる。例えば、骨由来PVMCsの調製物をカテーテルによって心臓に直接注入することができる。さらに、骨由来PVMCsを損傷部位への直接的な治療的投与前に足場に包み込むことができる。例えば、骨細片と併用してペーストにした骨由来PVMCsを、外科的に露出させて準備した損傷した脊椎骨または他の骨上に直接配置することができる。適する足場の例としては、既製支柱および酵素または触媒により架橋がインビボで起こるように活性化される架橋性複合体を含む。

10

【実施例6】

【0308】

抜歯および歯科インプラントでの置換におけるPVMCと骨細片との複合材の使用

歯科インプラントは、通常はチタンで作製された「ルート」デバイスであり、欠如歯を置換するための歯または歯群に似ている修復を支持するために歯科学において使用されるデバイスである。事実上、今日配置されているすべての歯科インプラントは、歯根型骨内インプラントである、すなわち、それらは、実際の歯根に似ているように見え、したがって「歯根型」を有し、歯根が以前、抜歯前にあった骨小腔内に配置される。顎の骨は、チタンポストを受け入れ、チタンポストと骨結合する。骨結合は、インプラント表面と周囲骨の癒合を指す。

20

【0309】

骨結合インプラントの配置は、骨の燃焼または圧迫壊死を防止するような高度に調整された速度で手動骨刀または精密ドリルのいずれかを使用する骨への準備を必要とする。骨が前記インプラント表面上に成長すること(骨結合)を可能にするための可変量の時間の後、歯冠(单数または複数)を前記インプラント上に配置することになる。インプラントを配置するために要する時間量は、施術者の経験、骨の質および量、ならびに個々の状況の難しさに依存して変わり得る。

30

【0310】

PVMCと骨細片との複合材を抜歯後に残存する空洞の填塞または前記インプラントの包囲に利用して、骨結合を促進することができる。前記PVMCと骨細片との配合調製物を使用して、抜歯後に抜歯部位を充填することもできる。前記PVMCと骨細片との調製物は、抜歯部位内の骨形成を刺激するために必要な再生微小環境を提供することができる。前記PVMCと骨細片との複合材調製物を準備が整った抜歯部位に挿入する。前記準備が整った抜歯部位への前記PVMCと骨細片との複合材調製物の挿入後、前記歯科インプラントを前記充填された抜歯部位に挿入し、その上に人工歯を取り付けることになる。前記PVMCと骨細片との複合材調製物の存在によって作られる、結果として生ずる再生微小環境が、前記金属ポスト周囲で骨形成を生じさせる結果になる。

40

【実施例7】

【0311】

部分脱灰骨の調製

大腿骨骨頭からの骨を骨細片に破碎し、粉碎し、ふるいにかけて、約800マイクロメートルのサイズを有する粉碎された骨を単離することになる。前記骨細片は、骨髄を含有することがある。前記粉碎された骨は、骨細片と骨粉との組合せを有することがある。前記粉碎された骨材料を混合容器に入れ、5:1比の3%過酸化水素で清浄化し、15分間攪拌し、取り出し、最低3000mLの滅菌水ですすぐことになる。前記すすいだ骨材料を、前記清浄化した混合容器に戻し入れ、少なくとも1000mLの70%EtOHを添加し、前記溶液を30分間混合することになる。前記骨材料をNo.70ふるいに移し入

50

れることになり、前記ふるいの底部に開放減圧を適用し、前記骨粉を20分間乾燥させる。前記乾燥させた骨材料を計量することになる。グラムでの骨重量を、適用される酸の体積を決定するチャートと比較することになり、ここでおおよそ1グラムの骨は、おおよそ16mLの酸を要することになる。前記骨材料を0.6M塩酸と約7時間混合して、灰分を部分的に除去することになる。前記骨材料を塩酸とより長時間(24時間まで)混合して、より多くの灰分を除去することができる。

【実施例8】

【0312】

骨からの骨細片の獲得

骨からの骨細片の獲得は多段プロセスである。適する骨は、腸骨稜、大腿骨、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、もしくは肩甲骨、またはそれらの組合せを有する人骨が起源である。一部の実施形態では、この組織を患者に対する外科手術後に廃棄組織として獲得し、自家使用のために準備することができる。一部の実施形態において、骨は、大腿骨の近位および遠位領域、腸骨稜、膝蓋骨、脛骨、上腕骨、鎖骨、肋骨、または肩甲骨が起源である。

10

【0313】

第1工程では、適するボーンミル、例えば、Noviomagus Bone Mill 1を平面上で製造業者の使用説明書に従って先ず組み立て、小サイズ骨粒子には「微粉碎」を用いる。その後、適するボールまたは採取容器を粉碎ドラム出口の下に配置する。

20

【0314】

第2工程では、骨の断片を獲得し、この断片を破碎プロセス前もしくは後に冷凍することができ、またはこの断片は新鮮である場合もある。前記単離された骨を粉碎するために、過剰な組織および関節軟骨をボーンカッタでトリミングする。

30

【0315】

第3工程では、骨の前記断片を前記ミルのハウジングに入れる。大腿骨骨頭からの骨を使用するとき、前記骨頭を通常は半分に切断し、骨梁骨表面を前記ミルの回転方向に対向させて骨頭のそれぞれの半分を別々に粉碎する。前記ミルのブッシュブロックに下向きに圧力を適用しながら前記ミルのハンドルを時計回りに回転させると、骨断片は骨細片に粉碎される。前記骨細片をボールまたは採取容器に採取する。また、過剰な骨細片を、前記粉碎プロセス中にそれらを保持することができる粉碎ドラムおよびハウジング内から、スパチュラで回収する。

30

【0316】

骨細片は、骨と骨髄との両方を有することがある。あるいは、骨細片は、緻密骨、骨髄、髄管からの組織、海綿骨組織、またはそれらの組合せを有することもある。この方法によって形成される骨細片のサイズは、前記骨の起源に依存して様々である。例えば、近位脛骨からの骨細片を粉碎して、サイズが約3.6mmから約8.0mmの範囲の粒子を形成することができ；遠位大腿骨からの骨細片を粉碎して、サイズが約2.9mmから約7.1mmの範囲の粒子を形成することができ；大腿骨骨頭からの細片を粉碎して、サイズが約2.2mmから約3.4mmの範囲の粒子を形成することができる。粉碎された骨細片のサイズをその最長軸周りで測定することができる

40

その後、骨を極低温保存してもよく、または直ちに治療的投与に使用してもよい。

【実施例9】

【0317】

部分脱灰骨細片の調製

大腿骨骨頭からの骨を、その最大軸周りの寸法が約3.0mmである骨細片に粉碎することになる。前記骨細片は、骨髄を含有することがある。前記骨細片を混合容器に入れ、5:1比の3%過酸化水素で清浄化し、15分間攪拌し、取り出し、最低3000mLの滅菌水ですすぐことになる。前記すすいだ骨材料を、前記清浄化した混合容器に戻し入れ、少なくとも1000mLの70%EtOHを添加し、前記溶液を30分間混合することになる。前記骨材料をふるいに移し入れることになり、前記ふるいの底部に開放減圧を適

50

用し、前記骨細片を20分間乾燥させる。前記乾燥させた骨材料を計量することになる。グラムでの骨重量を、適用される酸の体積を決定するチャートと比較することになり、ここでおよそ1グラムの骨は、およそ16mLの酸を要することになる。前記骨細片を0.6M塩酸と約7時間混合して、灰分を部分的に除去することになる。前記骨細片を塩酸とより長時間(24時間まで)混合して、より多くの灰分を除去することができる。

【実施例10】

【0318】

骨細片からのPVMCsの直接培養

PVMCsを骨細片から直接培養して、濃縮された骨由来PVMCsの集団を選択的に増殖させることができる。骨組織を含有する粉碎された骨試料を、10%ウシ胎仔血清(fetal bovine serum: FBS)で補足されたD MEMで希釈する。前記骨-D MEM混合物を激しくボルテックスして、前記組織を機械的に分散させ、それを前記骨から分離し、続いてベンチトップ遠心機において480×gで5分間遠心分離することができ、その後、当該上清を除去する。Percol 11(商標)(密度1.03~1.12g/mL)、続いて、インタクトPercol 11(商標)勾配を保証するための破壊を伴わない480×gでの15分間の第2ラウンドの遠心分離を用いることにより、残存細胞ペレットを分別して成核細胞を採取することになる。その後、前記勾配の上部画分を新しい試験管に移し、D MEMで補足し、その後、480×gで15分間遠心分離する。遠心分離後、前記ペレットを乱すことなく当該上清を除去する。その後、前記ペレットをD MEMに再浮遊させ、D MEMを使用して遠心分離により数回洗浄する。得られるPVMC細胞浮遊液は、その結果、増殖または濃縮の準備が整っている。

10

20

20

【0319】

本発明を、本発明の一定の好ましい実施形態を参照して相当詳細に記載したが、他のバージョンが可能である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および範囲を、本明細書に収載されている説明および好ましいバージョンに限定すべきでない。

【実施例11】

【0320】

骨再生のための再生微小環境を作るためのPVMCsの投与

PVMC調製物をヒト被験者に投与して、損傷後の骨の再生を促進することになる。前記PVMC調製物は、骨髄を含む。前記PVMC調製物を骨粉と併用することになり、静脈内注射することができ、または損傷部位に注射することができる。治療レジメンは、時間経過を規定した多回注射から構成されることもあり、または単回注射で構成されることもある。治療レジメンはまた、患者の静脈に前以て挿入されたカテーテルに接続された生理食塩水のバッグに注入口を介してPVMC調製物を注入することによって点滴静注により患者の静脈に注入することもできる。

30

【実施例12】

【0321】

骨再生のための輸液中のPVMCsの投与

PVMC調製物を、それを必要とする被験者に同種輸液として投与することになる。骨または臍帯由来PVMCsを単離された骨芽細胞、全骨髄、未精製の、精製された、または増殖させたPVMCsと併用して、静脈内投与用の輸液を形成することになる。前記輸液はまた、平衡塩類溶液、例えば、限定ではないがリン酸緩衝生理食塩水、乳酸リングル液、酢酸リングル液、TRIS緩衝生理食塩水(TRIS-buffered saline:TBS)、ハンクス平衡塩類溶液(Hank's balanced salt solution:H B S S)、アール平衡塩類溶液(Earle's balanced salt solution:E B S S)、標準クエン酸添加生理食塩水(S standard saline citrate:S S C)、HEPES緩衝生理食塩水(HEPES-buffered saline:H B S)、ゲイ平衡塩類溶液(Gey's balanced salt solution:G B S S)、またはそれらの組合せを含むことができる。あるいは、骨または臍帯由来PVMCsを組織に直接注入することに

40

50

なる。例えば、骨由来 P V M C s の調製物をカテーテルによって心臓に直接注入することになる。

【実施例 1 3】

【0 3 2 2】

骨再生のための P V M C s の直接投与

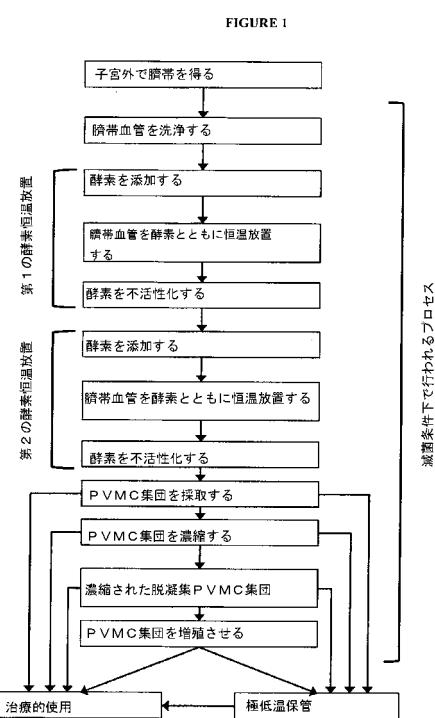
骨または臍帯由来 P V M C s を損傷部位への直接的な治療的投与の前に足場に包み込むことになる。骨細片と併用してペーストにした骨または臍帯由来 P V M C s を、外科的に露出させて準備した損傷した脊椎骨または他の骨上に直接配置することができる。適する足場の他の例としては、これに限定されるものではないが、既製支柱および酵素または触媒により架橋がインビボで起こるように活性化される架橋性複合体を含む。

10

【0 3 2 3】

本発明を、本発明の一定の好ましい実施形態を参照して相当詳細に記載したが、他のバージョンが可能である。したがって、添付の特許請求の範囲の精神および範囲を、本明細書に収載されている説明および好ましいバージョンに限定すべきでない。

【図 1】



【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 12/52575 |
|--|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/00; C12N 5/071; A01N 63/00 (2012.01) USPC - 435/325; 435/366; 424/93.7 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) IPC(8) - C12N 5/00; C12N 5/071; A01N 63/00 (2012.01) USPC - 435/325; 435/366; 424/93.7 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C12N 5/00; C12N 5/071; A01N 63/00 (2012.01) - see keyword below USPC - 435/325; 435/366; 424/93.7 - see keyword below | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); PatBase; Medline; Google: pericyte, perivascular stem cells, PSCs, PVMC, PVC, HUCPVC, hPVC, multipotent, differentiate, bone, isolated, purify, extract, culture, bone chip, bone cavity, bone marrow, bone cavity lavage; CD146+, CD34-, CD45-, CD46-, umbilical cord blood vessel, administer, implant, repair, autologous, | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | US 2007/0264239 A1 (HUARD et al.) 15 November 2007 (15.11.2007), Abstract, para [0006], [0010], [0013], [0055], and [0058] | 1-3 |
| X | CRISAN et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. Cell Stem Cell. 2008, Vol. 3(3), p. 301-13. Abstract; pg 302, col 2, up para ; pg 304, Fig 2; pg 306, col 2; and pg 308, col 2 | 1-3 |
| A | ALLT et al. Pericytes: cell biology and pathology. Cells Tissues Organs. 2001, Vol. 169(1), p. 1-11. Abstract | 1-3 |
| A | INOUE et al. Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm. Mol Cell Biol. 2003, Vol. 23(7), p. 2614-2622. pg 2614, col 1, para 1 | 1-3 |
| A | SARUGASER et al. Isolation, propagation, and characterization of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). Methods Mol Biol. Vol. 2009, Vol. 482, p. 269-79. Abstract; pg 270, middle para; and pg 273, Fig 17.1 | 1-3 |
| A | ZHANG et al. The Nell-1 growth factor stimulates bone formation by purified human perivascular cells. Tissue Eng Part A. 2011, Vol. 17(19-20), p. 2497-509. Epub 2011 Jul 18. pg 2497, col 1, and col 2; pg 2498, col 2, para 1 and last para; pg 2501, col 2, top para; and pg 2502, Fig 2; and pg 2507, col 2, para 1 | 1-3 |
| A | US 2010/0209387 A1 (Wasilewski) 19 August 2010 (19.08.2010), para [0052], [0087], and [0148] | 1-3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * 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 | | |
| Date of the actual completion of the international search 27 December 2012 (27.12.2012) | | Date of mailing of the international search report 09 JAN 2013 |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201 | | Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/52575

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 2011/0177023 A1 (ENNIS et al.) 21 July 2011 (21.07.2011), para [0005], [0015], and [0030] | 1-3 |
| A | CRISAN et al. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. Ann N Y Acad Sci. 2009, Vol. 1176, p. 118-23. Entire documentation, especially Abstract; pg 119, Table 1, and col 2, last para | 1-3 |
| A | US 2010/0260721 A1 (MCGONAGIE et al.) 14 October 2010 (14.10.2010), para [0020], [0021], [0023], and [0028] | 1-3 |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 12/52575 |
|--|--|---|
| Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet) | | |
| <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). | | |
| Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet) | | |
| <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>Group I+, claims 1-4, drawn to an isolated PVMC.. The first named invention (claims 1-3) is limited to wherein the PVMC is derived from bone. Applicant is invited to elect wherein the PVMC is derived from an umbilical cord blood vessel (claim 4), to be searched by paying additional fee.</p> <p>Group II, claims 5-6, drawn to a method of producing bone chips comprising passing a bone fragment through a grinder or bone mill.</p> <p>Group III, claim 7, drawn to a method of separating osteogenic cells from a PVMC preparation comprising determining adsorption of a cell in the preparation to calcium phosphate substrates, wherein a high affinity indicates the presence of an osteogenic cell.</p> <p>*****Continued in the extra sheet*****</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, limited to wherein the PVMC is derived from bone. | | |
| Remark on Protest | <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/52575

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

Group IV+, claims 8-12, drawn to a method of making an enhanced, autologous bone graft. The first named invention (claim 8), is limited the method comprising (i) extracting from a subject a first portion of bone tissue to be used as a bone graft, then (ii) supplementing the bone graft with a population of concentrated PVMCs. Applicant is invited to elect the method (claims 9-12) comprising: a. extracting a cell suspension from a first portion of bone tissue from a subject with an enzyme, mechanical force, or a combination thereof; b. concentrating the cells in the cell suspension by buoyant density sedimentation, filtration or centrifugation to obtain a population of concentrated bone-derived PVMCs; and c. supplementing a second portion of bone tissue to be used as a bone graft from the subject with the population of concentrated bone-derived PVMCs, so as to make the enhanced, autologous bone graft, to be searched by paying additional fee.

Group V, claims 13-18, 25-30, drawn to a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a plurality of isolated PVMCs and a pharmaceutically acceptable carrier, or a composition comprising a plurality of PVMCs and an acceptable carrier.

Group VI+, claims 19-24, 37-43, drawn to a method comprising administering a composition comprising a therapeutically effective amount of PVMCs to a subject in need thereof. The first named invention (claim 19), is limited to a method of modulating apoptosis. Applicant is invited to elect (an) additional method(s), including a method of modulating mitosis (claim 20), modulating angiogenesis (claim 21), modulating bone formation or reconstructing bone tissue (claims 22-23, 41), immunomodulation (claim 24), treating a disease that affects cellular function, wherein the PVMCs are capable of secreting a site-dependent trophic factor (claims 37-40), or/and anchoring a metal device within a bone (claims 42-43), to be searched by paying additional fee for each election.

Group VII, claims 31-36, drawn to a method for isolating PVMCs from bone the method comprising: (i) providing a sample of bone tissue from a subject; (ii) extracting the PVMCs from the bone; and (iii) concentrating the extracted PVMCs.

Group VIII, claims 44-74, drawn to a method for isolating PVMCs from an umbilical cord blood vessel comprising: draining the umbilical cord blood vessel; adding a first enzyme mixture to the umbilical cord blood vessel to disassociate the PVMC; adding a medium; and collecting a wash eluent after adding the medium, wherein the wash eluent comprises a cell suspension of cells selected from the group consisting of endothelial, subendothelial cells, and combinations thereof.

The inventions listed as Groups I+-VIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I+-VII do not include the inventive concept of isolating PVMCs from an umbilical cord blood vessel, as required by Group VIII.

Groups I+-III, V-VI+, VIII do not include the inventive concept of isolating PVMCs from bone, as required by Groups IV+ and VII.

Groups I+-V and VII-VIII do not include the inventive concept of administering a composition comprising a therapeutically effective amount of PVMCs to a subject, as required by Groups VI+.

Groups I+-IV+ and VI+-VIII do not include the inventive concept of a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of a plurality of isolated PVMCs and a pharmaceutically acceptable carrier, or a composition comprising a plurality of PVMCs and an acceptable carrier, as required by Group V.

Groups I+-III and V-VIII do not include the inventive concept of making an enhanced, autologous bone graft, as required by Groups IV+.

Groups I+-II and IV+-VIII do not include the inventive concept of separating osteogenic cells from a PVMC preparation comprising determining adsorption of a cell in the preparation to calcium phosphate substrates, as required by Groups III.

Groups I+ and III-VIII do not include the inventive concept of producing bone chips comprising passing a bone fragment through a grinder or bone mill, as required by Groups II.

Among Group I+, the PVMC that is derived from bone (claims 2-3), requires different resource from the PVMC that is derived from an umbilical cord blood vessel (claim 4).

Among Group IV+, Claim 8 does not include the inventive concept of obtaining a population of concentrated bone-derived PVMCs; and supplementing a second portion of bone tissue with the population of concentrated bone-derived PVMCs, as required by claims 9-12.

Furthermore, among Group VI+, each method, including a method of modulating apoptosis (claim 19), a method of modulating mitosis (claim 20), a method of modulating angiogenesis (claim 21), a method of modulating bone formation or reconstructing bone tissue (claims 22-23, 41), a method of immunomodulation (claim 24), a method of treating a disease that affects cellular function, wherein the PVMCs are capable of secreting a site-dependent trophic factor (claims 37-40), or a method of anchoring a metal device within a bone (claims 42-43), is for treating a specific disorder, each comprising a different pathological change, requires a different treatment regime and a different method for detecting and monitoring the effect of treatment.

The inventions of Groups I+ through VIII share the technical feature of PVMC; and Groups I+ further share the technical feature of an isolated PVMC. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2007/0264239 A1 to HUARD et al. (hereinafter 'Huard'), OR by an article entitled 'A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs' by CRISAN et al. (hereinafter 'Crisan'; Cell Stem Cell. 2008, Vol. 3(3), p. 301-13) as follows:

*****Continued in the next extra sheet*****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/62575

Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

Huard discloses an isolated PVMC (Abstract -'provides a pericyte having a marker pattern comprising CD146+, CD34-, and CD45-, ... isolated', wherein 'a pericyte having a marker pattern comprising CD146+, CD34-, and CD45-, ... isolated' is 'an isolated PVMC', please see the definition in the Specification that follows; para [0013] - 'Once the pericytes have been separated from the other cells, they can be cultured'; para [0058] - 'Pericytes are isolated from ... bone marrow'; para [0055] - 'vascular pericytes serve as multipotent stem cells in human organs'; para [0010] - 'a pericyte-specific expression pattern: positive for CD146 (i.e., CD146+), not expressing CD34 (i.e., CD34-), and not expressing CD45 (i.e., CD45-); ...not expressing CD56 (i.e., CD56-); Note: Huard does not specifically teach 'CD46-' as defined in the specification but 'CD56-', since the pericytes taught by Huard serve as multipotent stem cells, it means the cells are not complement regulatory protein positive, which is also known as CD46; Further note: because of the cells are multipotent, it means the cells have not differentiated to a specific cell type, therefore, the cells do not express markers for specific cell types including CD46; Please also see Wikipedia for CD46; Specification: para [0002] - 'perivascular medicinal cells ("PVMCs")'. Please note: the phrase 'perivascular medicinal cells' used by the application including 'medicinal' to define 'the perivascular cells' for 'medicinal' use, which is equivalent to 'perivascular cells' that are 'multipotent' or 'pericytes' used in the art; para [0035] - 'pericytes, or perivascular cells are multipotent for osteogenic,... and myogenic lineages and are similar to MSCs in their cell surface expression profile (CD146+, CD34-, CD45-, and CD46-); para [0013] - 'the extracted PVMCs ... antibodies with affinity to cell surface antigens on the PVMC.... anti-CD146'; Please see: an article entitled 'Pericytes: cell biology and pathology. Cells Tissues Organs' by ALLT et al.; 2001, Vol. 169(1), p. 1-11; Abstract - 'Pericytes are perivascular cells with multifunctional activities'; Please also see an article entitled 'Disruption of Mouse CD46 Causes an Accelerated Spontaneous Acrosome Reaction in Sperm' by INOUE et al.; Mol Cell Biol. 2003, Vol. 23(7), p. 2614-2622; pg 2614, col 1, para 1 - 'CD46 (membrane cofactor protein [MCP]) is known as a complement receptor').

Furthermore, Crisan also discloses an isolated PVMC (Abstract - 'identified perivascular cells, principally pericytes, in multiple human organs', wherein each of 'perivascular cells, principally pericytes' is 'an isolated PVMC'; Please see discussion above, and the cell markers that follow; pg 302, col 2, up para - 'The same population of CD146+ CD34- CD45- CD56- cells was detected in all tissues analyzed (Figures 2D-2J)', pg 304, Fig 2, Legend - 'A similar cell subset was detected and sorted in skeletal muscle (D), placenta (E), adipose tissue (F), skin (G), myocardium (H), pancreas (I), and bone marrow (J)', wherein each cell in each boxed cell subset is 'an isolated PVMC'; pg 308, col 2 - 'we have validated the CD146+... CD34- CD45-... phenotype as an indicator of pericyte/perivascular cell identity throughout human fetal and adult organs'; pg 306, col 2 - 'perivascular cells from either skeletal muscle... bone marrow, or other organs expressed all recognized markers of MSC', wherein 'expressed all recognized markers of MSC' is an indication that the cells are multipotent; Abstract - 'Mesenchymal stem cells (MSCs)'; Specification: para [0002] - 'perivascular medicinal cells ("PVMCs")', para [0035] - 'pericytes, or perivascular cells are multipotent for osteogenic,... and myogenic lineages and are similar to MSCs in their cell surface expression profile (CD146+, CD34-, CD45-, and CD46-); para [0013] - 'the extracted PVMCs ... antibodies with affinity to cell surface antigens on the PVMC.... anti-CD146'. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of claim 4 of Groups I+ and Group VIII further share the technical feature of PVMC is derived from an umbilical cord blood vessel. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, an article entitled 'Isolation, propagation, and characterization of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs)' by SARUGASER et al. (Methods Mol Biol. Vol. 2009, Vol. 482, p. 269-79) discloses an isolated PVMC is derived from an umbilical cord blood vessel (Abstract - 'non-invasive isolation, and characterization, of a rich source of mesenchymal progenitor cells, which we call human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs)...They present a non-hematopoietic myofibroblastic mesenchymal phenotype (CD45-, CD34-, CD105+, ... 3G5+, CD146+)', wherein each of 'HUCPVCs' is 'perivascular cell or pericyte or PVMCs isolated from 'an umbilical cord blood vessel', see discussion above; pg 270, middle para - 'HUCPVCs present ... the pericyte marker 3G5 ...characterized as CD45-, CD34-, CD105+, ... CD146+', pg 273, Fig 17.1, Legend - 'the umbilical vessels. The latter are surrounded by the perivascular tissue from which HUCPVCs are harvested'. Specification: para [0002] - 'perivascular medicinal cells ("PVMCs")', para [0035] - 'pericytes, or perivascular cells are multipotent ... and are similar to MSCs in their cell surface expression profile (CD146+, CD34-, CD45-, and CD46-); para [0013] - 'the extracted PVMCs ... antibodies with affinity to cell surface antigens on the PVMC.... anti-CD146, anti-CD105', wherein using 'anti-CD146, anti-CD105' indicating PVMC is CD105+ and CD146+). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The Inventions of Groups IV+ and the claims 22-23 and 41-43 of Groups VI+ further share the technical feature of modulating bone tissue using PVMCs; and Groups IV+ further share the technical feature of making an enhanced, autologous bone graft, comprising (i) extracting from a subject a first portion of bone tissue to be used as a bone graft, then (ii) supplementing the bone graft with a population of concentrated PVMCs. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, an article entitled 'The Nell-1 growth factor stimulates bone formation by purified human perivascular cells' by ZHANG et al. (hereinafter 'Zhang'; Tissue Eng Part A. 2011, Vol. 17(19-20), p. 2497-509. Epub 2011 Jul 18) discloses developing an enhanced, autologous bone graft (pg 2497, col 1 - 'bone autografts', which is 'autologous bone graft'; pg 2497, col 2 - 'Low stem cell numbers limit the use of fresh autologous bone marrow,... identification of readily available stem cell sources and development of well-defined stem cell differentiation protocols'; Abstract - 'bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) for bone regeneration and repair has been a critical endeavor. We previously established an effective protocol to homogeneously purify human pericytes from multiple fetal and adult tissues, including ... bone marrow, ... and identified pericytes as a primitive origin of human MSCs', wherein 'pericytes' are PVMCs, as discussed above; pg 2498, col 2, para 1 - 'distinct microvessel pericytes (CD146 +, CD34 -, CD45 -, CD56 -) were isolated and then expanded in vitro'; Specification: para [0002] - 'perivascular medicinal cells ("PVMCs")', para [0035] - 'pericytes, or perivascular cells are multipotent ...are similar to MSCs in their cell surface expression profile (CD146+, CD34-, CD45-, and CD46-); para [0013] - 'the extracted PVMCs ... antibodies with affinity to cell surface antigens on the PVMC.... anti-CD146', --comprising (i) obtaining a first portion of bone tissue to be used as a bone graft (pg 2498, col 2, last para - 'A commercial human cancellous bone chip (hCBC) preparation (MTF) consisting of minimally processed hCBC mixed with demineralized bone matrix was used as a scaffold', wherein 'demineralized bone matrix' is the 'first portion of bone tissue to be used as a bone graft', -- then (ii) supplementing the bone graft with a population of concentrated PVMCs (pg 2498, col 2, last para - 'human cancellous bone chip (hCBC)... with demineralized bone matrix was used as a scaffold. About 2.5 x 10(5) pericytes were ... seeded onto the surface of an hCBC scaffold', wherein 'pericytes' are 'PVMCs' as discussed above; pg 2501, col 2, top para - 'Histology revealed clear differences in endochondral bone formation as early as 2 weeks postimplantation. hCBC alone ... manifested very limited chondrogenesis (Fig. 2A-F), whereas the hCBC+ pericytes group exhibited robust chondrogenesis (Fig. 2G-I)'; pg 2502, Fig 2).

*****Continued in the next extra sheet*****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/52575

Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

(Continuation of the discussion for Groups IV+ and the claims 22-23 and 41-43 of Groups VI+)

Although Zhang does not specifically teach the first portion of bone tissue to be used as a bone graft is extracted from a subject, one of ordinary skill in the art at the time the invention was made would have known to do so, because Zhang teaches using pericytes (PVMCs), the methods can improve autologous bone graft in comparison with using stem cells (pg 2507, col 2, para 1 - 'Advantages of using homogenously purified human pericytes (CD146+, CD34-, CD45-, CD56-) over conventional hMSC include...these pericytes can be expanded into large amounts in a short time in vitro without alteration of their MSC characteristics,... the collection of highly purified human pericytes... expected for future use in personalized reparative and regenerative medicine of the skeleton', wherein 'personalized reparative and regenerative medicine of the skeleton' comprising 'autologous bone graft'; pg 2497, col 1 - 'bone autografts'), wherein autologous bone graft comprising extracting from a subject a first portion of bone tissue to be used as a bone graft, as defined by the procedure (please see: US 2010/0209387 A1 to Wasielewski; para [0148] - 'Current bone graft procedures involve extracting bone from other parts of the patient's body (chin, ramus, hip, or tibia)... and waiting for the grafted material to fuse', wherein 'extracting bone from other parts of the patient's body' is 'extracting from a subject a first portion of bone tissue to be used as a bone graft' for 'autologous bone graft', in which recipient and donor are the same person; para [0052] - 'extracted from the intended recipient of the medical implant or therapeutic stem cell compositions in order to create an autologous... the stem cell donor and bone or soft tissue graft patient are the same person'; para [0087] - 'graft bone particles ... available from autologous or allogenous sources. Autologous harvested bone graft'. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of the claims 9-12 of Groups IV+ and Group VII further share the technical feature of isolating PVMCs from bone the method comprising: (i) providing a sample of bone tissue from a subject; (ii) extracting the PVMCs from the bone; and (iii) concentrating the extracted PVMCs. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, Crisan further discloses isolating PVMCs from bone (pg 308, col 2 - 'we have validated the CD146+... CD34- CD45-... phenotype as an indicator of pericyte/perivascular cell identity throughout human fetal and adult organs. ... perivascular cells isolated prospectively from ... nonmuscle tissues', wherein 'perivascular cells isolated' are 'PVMCs' as discussed above, and wherein 'nonmuscle tissues' include bone; pg 302, col 2, up para - 'The same population of CD146+ CD34- CD45- CD56- cells was detected in all tissues analyzed (Figures 2D-2J)'; pg 304, Fig 2, Legend - 'A similar cell subset was detected and sorted in ...bone marrow (J)', wherein each cell in boxed cell subset in (J) is 'an isolated PVMC' from bone; pg 306, col 2 - 'perivascular cells from... bone marrow, or other organs expressed all recognized markers of MSC', wherein 'expressed all recognized markers of MSC' is an indication that the cells are multipotent; Specification: para [0002] - 'perivascular medicinal cells ("PVMCs")'; para [0035] - 'pericytes, or perivascular cells are multipotent ... and are similar to MSCs in their cell surface expression profile (CD146+, CD34-, CD45-, and CD46-); para [0013] - 'the extracted PVMCs ... antibodies with affinity to cell surface antigens on the PVMC.... anti-CD146'; — the method comprising: (i) providing a sample of bone tissue from a subject (pg 302, col 2, up para - '24 fetal bone marrows'); (ii) extracting the PVMCs from the bone (pg 305, col 2, lower para - 'perivascular cells extracted'; wherein the perivascular cells need to be extracted from all tissues for cell sorting or culturing; pg 311, col 1, para 2 - 'Fresh tissues were cut into small pieces in Dulbecco's modified Eagle's medium...Final cell dissociation was achieved'; pg 311, col 1, para 3 - 'Cells from all tissues were then processed for immunofluorescence staining', wherein 'all tissues' include 'bone'; pg 306, col 2 - 'perivascular cells from... bone marrow, or other organs expressed all recognized markers of MSC'; pg 302, col 2, up para - 'The same population of CD146+ CD34- CD45- CD56- cells was detected in all tissues analyzed (Figures 2D-2J)'; pg 304, Fig 2, Legend - 'A similar cell subset was detected and sorted in ...bone marrow (J)', wherein each cell in boxed cell subset in (J) is 'an isolated PVMC' from bone).

Although Crisan does not specifically teach (iii) concentrating the extracted PVMCs, this limitation is determined by the procedures of extracting/or isolating cells from a tissue because it is a basic step to obtain concentrated cells before culturing the cells to the growth media for cells to grow (please see pg 307, Fig 5, Legend - '(C) Cultured perivascular cells were centrifuged into high-density cell pellets and cultivated in chondrogenic medium'). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of Groups VI+ further share the technical feature of administering a composition comprising a therapeutically effective amount of PVMCs to a subject in need thereof. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, US 2011/0177023 A1 to ENNIS et al. discloses administering a composition comprising a therapeutically effective amount of genetically modified PVMCs to a subject in need thereof (para [0015] - 'genetically modified HUCPVCs are administered with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient', wherein 'HUCPVCs' are 'perivascular cells or PVMCs' isolated from a 'human umbilical cord'; para [0005] - 'a method for protecting a subject against challenge from a biological or chemical agent by administering a human umbilical cord perivascular cell (HUCPVC)', wherein each of 'perivascular cells' is a 'PVMC', as discussed above; para [0030] - 'the HUCPVCs are characterized, at harvest, as ? CD34-, ... CD45-, ..., CD105(SH2)+, ... positive for ...CD146 and 3G5 (a pericyte marker); Specification: para [0002] - 'perivascular medicinal cells ("PVMCs")'; para [0035] - 'pericytes, or perivascular cells are multipotent ... and are similar to MSCs in their cell surface expression profile (CD146+, CD34-, CD45-, and CD46-); para [0013] - 'the extracted PVMCs ... antibodies with affinity to cell surface antigens on the PVMC.... anti-CD146, anti-CD105', wherein using 'anti-CD146, anti-CD105' indicating PVMC is CD105+ and CD146+). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+-VIII therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note:

Claims 44, 46, 48-49, 51, 58, 67, are objected as using an improper Markush group in each claim. For the purposes of this ISR, the limitation 'selected from' in each claim is reconstructed to be 'selected from the group consisting of'.

フロントページの続き

| (51) Int.CI. | F I | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|------------|
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 0 5 |
| A 6 1 P 9/00 (2006.01) | A 6 1 P 9/00 | |
| A 6 1 P 19/00 (2006.01) | A 6 1 P 19/00 | |
| A 6 1 P 37/02 (2006.01) | A 6 1 P 37/02 | |
| A 6 1 L 27/00 (2006.01) | A 6 1 L 27/00 | Z |
| | A 6 1 L 27/00 | Y |
| | A 6 1 L 27/00 | V |

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

F ターム(参考) 4C081 AA14 AB02 AB13 BA16 CA01 CA29 CD12 CD34 CF01 CF06
 CF21 DB03
 4C087 AA01 AA02 AA04 AA05 BB46 BB59 BB63 CA04 NA14 ZA36
 ZA96 ZB07 ZB21