

(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2016-516672

(P2016-516672A)

(43) 公表日 平成28年6月9日 (2016. 6. 9)

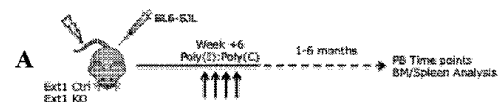
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/28 (2015. 01)	A 6 1 K 35/28	4 B 0 6 3
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/16 (2006. 01)	A 6 1 K 37/08	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/727 (2006. 01)	A 6 1 K 31/727	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 116 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-560373 (P2015-560373)	(71) 出願人	507044516
(86) (22) 出願日	平成26年2月28日 (2014. 2. 28)		プレジデント アンド フェローズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月22日 (2015. 10. 22)		ハーバード カレッジ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/019596		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
(87) 国際公開番号	W02014/134539		138, ケンブリッジ, クインシー
(87) 国際公開日	平成26年9月4日 (2014. 9. 4)		ストリート 17
(31) 優先権主張番号	61/770, 533	(71) 出願人	592017633
(32) 優先日	平成25年2月28日 (2013. 2. 28)		ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ション
(31) 優先権主張番号	61/828, 568		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
(32) 優先日	平成25年5月29日 (2013. 5. 29)		ストン フルーツ ストリート 55
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	61/904, 768		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成25年11月15日 (2013. 11. 15)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 幹細胞を動員するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法および組成物、ならびに移植した造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために前処置する関連方法、ならびに造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法に関する。一局面において、本発明は、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法を提供し、上記方法は、上記被験体においてエクソストシン 1 (exostosin 1) (EXT1) のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法であって、該方法は、該被験体においてエクソストシン 1 (E X T 1) のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を該被験体に投与し、それによって、該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する、方法。

【請求項 2】

糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法であって、該方法は、E X T-1 のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を該被験体に投与し、それによって、該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する、方法。

10

【請求項 3】

細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な E X T 1 のレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を該被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項 4】

処置が必要な被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法であって、該方法は、

20

(a) 該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な E X T 1 のレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を該被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために該被験体を前処置する工程；ならびに

(b) 造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を該被験体に移植する工程であって、ここで該移植された造血幹細胞は、該被験体の骨髓に生着し、それによって、該被験体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置する工程、を包含する、方法。

30

【請求項 5】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法であって、該方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を該被験体に投与し、それによって、該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する、方法。

【請求項 6】

糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法であって、該方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を該被験体に投与し、それによって、該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する、方法。

40

【請求項 7】

細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を該被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で移植される末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項 8】

処置が必要な被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患

50

を処置するための方法であって、該方法は、

(a) 該被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なヘパリン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を該被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために該被験体を前処置する工程；ならびに

(b) 該被験体に造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を移植する工程であって、ここで該移植された造血幹細胞は、該被験体の骨髓に生着し、それによって、該被験体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置する工程、を包含する、方法。

【請求項 9】

10

前記薬剤は、間葉細胞において発現されるヘパリン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記薬剤は、骨髓間葉細胞において発現されるヘパリン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記薬剤は、M x 1 + 骨格幹細胞および／もしくは前駆細胞において発現されるヘパリン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

20

前記薬剤は、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T-1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M-1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項 5～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記薬剤は、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；s i R N A、s h R N A、アンチセンス R N A、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される抽出物；天然に存在するもしくは合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記被験体において動員される前記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、C D 3 4 + 末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記被験体において動員された前記幹細胞および／もしくは前駆細胞を採取する工程をさらに包含する、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

40

前記採取された幹細胞および／もしくは前駆細胞を、移植が必要な被験体に移植する工程をさらに包含する、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記被験体において動員された前記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、該被験体への自家移植のために採取される、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記被験体において動員された前記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、レシピエント被験体への同種異系移植のために採取される、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆

50

細胞のその後の生着のために、前記被験体において動員して前記被験体を前処置する、請求項 1、2、5、6 および 9～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記被験体は、細胞傷害性前処置の非存在下で移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞のその後の生着のために前処置される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される、請求項 3、7 および 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記被験体は、放射線療法なしで生着のために前処置される、請求項 3、7 および 20 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

従来の動員レジメンに対する応答において不十分な動員を示す被験体を選択する工程をさらに包含する、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記被験体は、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）に対する応答において不十分な動員を示す、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

組換え顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくは peg 化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

G-CSF またはそのグリコシル化形態もしくは peg 化形態とヘパリンとの組み合わせを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 1～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

血液悪性腫瘍と診断されたか、血液悪性腫瘍を有する疑いがあるか、または血液悪性腫瘍を発生させるリスクがある被験体を選択する工程をさらに包含する、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

非悪性疾患と診断されたか、非悪性疾患を有する疑いがあるか、または非悪性疾患を発生させるリスクがある被験体を選択する工程をさらに包含する、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPSS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

糖尿病と診断されたか、糖尿病を有する疑いがあるか、または糖尿病を発生させるリスクがある被験体を選択する工程をさらに包含する、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

前記被験体は、幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す、請求項 1～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体を選択する工程をさらに包含する、請求項 3 または 7 に記載の方法。

【請求項 34】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法であって、該方法は、(i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに(ii) CXCR2 アゴニストおよび CXCR4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、該被験体の末梢血へと造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な量で、該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 35】

前記被験体において動員された末梢血幹細胞を採取する工程をさらに包含する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記末梢血幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含み得、前記造血幹細胞動員およびアフエレーシスは、同日に行われる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

単一セッションのアフエレーシスにより、レシピエントの体重 1 kg あたり約 $2 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ の細胞用量のために十分な末梢血幹細胞が集められる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

(i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに(ii) CXCR2 アゴニストおよび CXCR4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該前処置された被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与することによって、移植される幹細胞の生着のために、幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する、請求項 34～37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

移植が必要な被験体へと前記採取した末梢血幹細胞を移植する工程をさらに包含する、請求項 34～38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法であって、該方法は、(a) (i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに(ii) CXCR2 アゴニストおよび CXCR4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で、該ドナーに投与する工程；ならびに(b) 該動員した循環末梢血幹細胞を、被験体における移植のために該ドナーから採取する工程、を包含する方法。

【請求項 41】

移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、(a) (i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに(ii) CXCR2 アゴニストまたは CXCR4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効

10

20

30

40

50

な量で該被験体に投与し、それによって、移植される末梢血幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項 4 2】

末梢血幹細胞移植が必要な被験体を処置するための方法であって、該方法は、(a) (i) 少なくとも 1 種のヘパリン硫酸インヒビターならびに (i i) C X C R 2 アゴニストまたは C X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞のその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチを前処置するために有効な量で該被験体に投与する工程；ならびに (b) 該被験体へと末梢血幹細胞を移植する工程、を包含する方法。

【請求項 4 3】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される、請求項 3 4 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記少なくとも 1 種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項 3 4 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、(i) G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体および (i i) G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される、請求項 3 4 ~ 4 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 3 4 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一アフエレーシスセッションで約 $1 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 ~ $10 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、前記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する、請求項 3 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一アフエレーシスセッションで約 $2 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 ~ $8 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、前記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する、請求項 3 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一アフエレーシスセッションで約 $3 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 ~ $6 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、前記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する、請求項 3 4 ~ 4 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される、請求項 3 4 ~ 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記被験体は、放射線なしで生着のために前処置される、請求項 3 4 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記被験体は、間質細胞を弱らせることなく生着のために前処置される、請求項 3 4 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記被験体は、前記被験体に G - C S F を投与することなく生着のために前処置される

10

20

30

40

50

、請求項 3 4～5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 4】

組換え顆粒球コロニー刺激因子（G－C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M－C S F）、インターロイキン－3（I L－3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 3 4～5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

少なくとも 1 種の化学療法剤を前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 3 4～5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記動員された造血幹細胞は、C D 3 4⁺末梢血幹細胞を含む、請求項 3 4～5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記造血幹細胞は、自家移植のために前記被験体において動員される、請求項 3 4～5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記造血幹細胞は、同種異系移植のために前記被験体において動員される、請求項 3 4～5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記被験体は、G－C S F のみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 3 4～5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 3 4～5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記被験体は、G－C S F とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 3 4～6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である、請求項 3 4～6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記被験体は、非悪性疾患を示す患者である、請求項 3 4～6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（M P S－I H）、副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（S C I D）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

10

20

30

40

50

処置が必要な被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法であって、該方法は、(a) (i) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびにCXCR2アゴニストおよびCXCR4アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で、該ドナーに投与する工程；ならびに(b) 該ドナーから動員された循環末梢血幹細胞を末梢血幹細胞移植が必要な被験体へと移植する工程を包含する、方法。

【請求項67】

前記2種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、EXT1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびVCAM-1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項66または67に記載の方法。

【請求項69】

前記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される、請求項66～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

前記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項66～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項71】

組換え顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-3(IL-3)、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項66～70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項72】

前記動員された造血幹細胞は、CD34⁺末梢血幹細胞を含む、請求項66～71のいずれか1項に記載の方法。

【請求項73】

前記被験体への移植前に、前記ドナーから前記CD34⁺末梢血幹細胞を採取する工程をさらに包含する、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記動員された造血幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含む、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

前記ドナーへの前記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、アフエレーシス手順と同日に行われる、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

前記アフエレーシス手順は、前記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与の1時間以内に行われる、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

前記末梢血幹細胞の移植前に、移植される末梢血幹細胞の生着のために該末梢血幹細胞移植が必要な前記被験体を前処置する工程をさらに包含する、請求項66～76のいずれか1項に記載の方法。

【請求項78】

前処置する工程は、(i) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに(ii) CXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の前記前処置された被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該前処置された被験体

10

20

30

40

50

の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与する工程を包含する、請求項 77 に記載の方法。

【請求項 79】

前記被験体は、前記末梢血幹細胞の移植の前に、化学療法の処置も放射線療法の処置も投与されない、請求項 66～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

前記ドナーおよび前記被験体は、同じ個体である、請求項 66～79 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 81】

前記ドナーおよび前記被験体は、異なる個体である、請求項 66～80 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 82】

前記ドナーおよび／もしくは前記被験体は、G-CSF のみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 66～81 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 83】

前記ドナーおよび／もしくは前記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 66～82 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 84】

前記ドナーおよび／もしくは前記被験体は、G-CSF とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 66～83 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 85】

前記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である、請求項 66～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 86】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 87】

前記血液悪性腫瘍の従来処置の治療上有効な量を前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 85 または 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記被験体は、非悪性疾患を示す患者である、請求項 66～87 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 89】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群 (MPSS-IH)、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症 (SCID)、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記非悪性疾患の従来処置の治療上有効な量を前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 89 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 1】

(i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに C X C R 2 アゴニストおよび C X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを使用して、造血幹細胞再動員から利益を得る被験体を選択するための方法であって、該方法は、G - C S F およびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤またはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程であって、ここで G - C S F およびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤またはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、(i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに (i i) C X C R 2 アゴニストおよび C X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを使用する造血幹細胞再動員から利益を得る被験体である、工程を包含する、方法。

10

【請求項 9 2】

前記被験体において造血幹細胞を再動員するために、前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを該被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択され、前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体および G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 9 1 または 9 2 に記載の方法。

20

【請求項 9 4】

移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、(i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターならびに (i i) C X C R 2 アゴニストおよび C X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員の組み合わせを、移植される幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

30

【請求項 9 5】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択され、前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体および G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 9 4 に記載の方法。

40

【請求項 9 6】

(i) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、ならびに (i i) C X C R 2 アゴニストおよび C X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む 2 種以上の動員薬剤を含む組成物。

【請求項 9 7】

組換え顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 、インターロイキン - 3 (I L - 3) 、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインをさらに含む、請求項 9 6 に記載の組成物。

【請求項 9 8】

50

少なくとも１種の化学療法剤をさらに含む、請求項９６または９７に記載の組成物。

【請求項９９】

急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫、Ｔ細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される血液悪性腫瘍の少なくとも１種の従来処置をさらに含む、請求項９６～９８のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１００】

骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（ＭＰＳ－ＩＨ）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（ＳＣＩＤ）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される非血液悪性腫瘍の少なくとも１種の従来処置をさらに含む、請求項９６～９８のいずれか１項に記載の組成物。

10

【請求項１０１】

前記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である、請求項９６～１００のいずれか１項に記載の組成物。

20

【請求項１０２】

前記組成物は、Ｇ－ＣＳＦのみおよびプレリキサフォルのうちの１種以上の投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である、請求項９６～１０１のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０３】

前記組成物は、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するために有用である、請求項９６～１０２のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０４】

前記組成物は、前記幹細胞ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である、請求項９６～１０３のいずれか１項に記載の組成物。

30

【請求項１０５】

前記組成物は、前記幹細胞ニッチから末梢血へと早ければ１５分程度で造血幹細胞を動員する、請求項１０４に記載の組成物。

【請求項１０６】

前記２種以上の動員薬剤の組み合わせは、皮下投与のために製剤化される、請求項９６～１０５のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０７】

前記少なくとも１種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、ＥＸＴ１のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびＶＣＡＭ－１のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項９６～１０６のいずれか１項に記載の組成物。

40

【請求項１０８】

前記少なくとも１種のＣＸＣＲ２アゴニストは、Ｇｒｏ－ｂｅｔａまたはそのアナログもしくは誘導体およびＧｒｏ－ｂｅｔａΔ４またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される、請求項９６～１０７のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１０９】

前記少なくとも１種のＣＸＣＲ４アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項９６～１０８のいずれか１項に記載の組成物。

【請求項１１０】

50

造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法であって、該方法は、（a）試験薬剤を提供する工程；および（b）該試験薬剤が、（i）少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、ならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力を評価する工程を包含する、方法。

【請求項 1 1 1】

前記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t aまたはそのアナログもしくは誘導体およびG r o - b e t a Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

以下を含むキット：

（a）（i）少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせ；ならびに（b）（i）被験体において造血幹細胞を動員する；（i i）G - C S Fのみ、プレリキサフォル、またはG - C S Fとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；（i i i）移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および（i v）該被験体において幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために、該被験体への該2種以上の動員薬剤の組み合わせを投与するための説明書。

【請求項 1 1 3】

前記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t aまたはそのアナログもしくは誘導体およびG r o - b e t a Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 1 2 に記載のキット。

【請求項 1 1 4】

前記動員された末梢血幹細胞を前記被験体へと移植するための1種以上の医療デバイスをさらに含む、請求項 1 1 2 または 1 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 1 5】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法であって、該方法は、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を該被験体の末梢血へと動員するために有効な量で該被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 1 1 6】

前記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、前記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および前記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；s i R N A、s h R N A、アンチセンスR N A、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される抽出物；天然に存在するかもしくは合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記2種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される、請求項 1 1 5 ま

たは 116 に記載の方法。

【請求項 118】

前記少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニストは、Gro-beta またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 115～117 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 119】

前記少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニストは、Gro-beta Δ4 またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 115～118 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 120】

前記少なくとも 1 種の CXCR4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 115～119 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 121】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、EXT1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および VCAM-1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項 115～120 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 122】

組換え顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン-3 (IL-3)、およびこれらのグリコシル化形態もしくは peg 化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 115～121 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 123】

前記動員された造血幹細胞は、CD34⁺末梢血幹細胞を含む、請求項 115～122 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 124】

前記 CD34⁺末梢血幹細胞を採取する工程をさらに包含する、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 125】

前記動員された幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含み、該アフエレーシス手順は、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニストおよび前記 CXCR4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせが前記被験体に投与されるその同日に行われる、請求項 124 に記載の方法。

30

【請求項 126】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一アフエレーシスセッションで約 $1 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重～ $10 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、前記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する、請求項 115～125 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 127】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一アフエレーシスセッションで約 $2 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重～ $8 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、前記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する、請求項 115～125 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 128】

前記 2 種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一アフエレーシスセッションで約 $3 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重～ $6 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、前記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する、請求項 115～125 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 129】

移植される幹細胞の生着のために幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する、請求項 115～129 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 1 3 0】

前記被験体を前処置する工程は、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の該前処置された被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該前処置された被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与する工程を包含する、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記被験体を前処置する工程は、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを含む組成物を、移植される幹細胞の該前処置された被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該前処置された被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与する工程を包含する、請求項 1 3 0 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記被験体に少なくとも 1 種の化学療法剤を投与する工程をさらに包含する、請求項 1 2 9 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される、請求項 1 2 9 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記被験体は、放射線なしで生着のために前処置される、請求項 1 2 9 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記被験体は、間質細胞を弱らせることなく生着のために前処置される、請求項 1 2 9 ～ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記被験体は、該被験体に G - C S F を投与することなく生着のために前処置される、請求項 1 2 9 ～ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記採取した末梢血幹細胞を、移植が必要な被験体へと移植する工程をさらに包含する、請求項 1 2 4 ～ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記造血幹細胞は、自家移植のために前記被験体において動員される、請求項 1 1 5 ～ 1 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記造血幹細胞は、同種異系移植のために前記被験体において動員される、請求項 1 1 5 ～ 1 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記被験体は、G - C S F のみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 1 1 5 ～ 1 3 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 1 1 5 ～ 1 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記被験体は、G - C S F とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 1 1 5 ～ 1 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である、請求項 1 1 5 ～ 1 4 2 のいずれか 1 項

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記被験体は、非悪性疾患を示す患者である、請求項 1 1 5 ～ 1 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4 6】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群 (M P S - I H)、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症 (S C I D)、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

20

末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法であって、該方法は、(a) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストおよび少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で該ドナーに投与する工程；ならびに (b) 該動員した循環末梢血幹細胞を、被験体における移植のために該ドナーから採取する工程、を包含する方法。

【請求項 1 4 8】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストおよび前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される、請求項 1 4 7 に記載の方法。

30

【請求項 1 4 9】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 4 7 または 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 4 7 ～ 1 4 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 4 7 ～ 1 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 5 2】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低減する薬剤、および V C A M - 1 のレベルもしくは活性を低減する薬剤からなる群より選択される、請求項 1 4 7 ～ 1 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

組換え顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、インターロイキン - 3 (I L - 3)、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与す

50

る工程をさらに包含する、請求項 1 4 7 ～ 1 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記循環末梢血幹細胞は、C D 3 4 ⁺ 末梢血幹細胞を含む、請求項 1 4 7 ～ 1 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

前記末梢血幹細胞を採取する工程は、アフェレーシスを含み、前記造血幹細胞動員およびアフェレーシスは、同日に行われる、請求項 1 4 7 ～ 1 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

単一セッションのアフェレーシスにより、レシピエントの体重 1 k g あたり約 $2 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ の細胞用量のために十分な C D 3 4 ⁺ 末梢血幹細胞が集められる、請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で、前処置される予定の被験体に投与することによって、移植される末梢血幹細胞の生着のために末梢血幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する、請求項 1 4 7 ～ 1 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記被験体は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために前処置される、請求項 1 5 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記採取された末梢血幹細胞を、移植が必要な被験体に移植する工程をさらに包含する、請求項 1 4 7 ～ 1 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記造血幹細胞は、自家移植のために前記被験体において動員される、請求項 1 4 7 ～ 1 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

前記造血幹細胞は、同種異系移植のために前記被験体において動員される、請求項 1 4 7 ～ 1 6 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記被験体は、G - C S F のみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 1 4 7 ～ 1 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

前記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 1 4 7 ～ 1 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

前記被験体は、G - C S F とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 1 4 7 ～ 1 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である、請求項 1 4 7 ～ 1 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および

10

20

30

40

50

若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記被験体は、非悪性疾患を示す患者である、請求項 1 4 7 ～ 1 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（M P S - I H）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（S C I D）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 1 6 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、（a）少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される末梢血幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項 1 7 0】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、および前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される、請求項 1 6 9 に記載の方法。

【請求項 1 7 1】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 6 9 ～ 1 7 0 に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 6 9 ～ 1 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7 3】

前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 1 6 9 ～ 1 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7 4】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項 1 6 9 ～ 1 7 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7 5】

組換え顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、インターロイキン - 3（I L - 3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 1 6 9 ～ 1 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7 6】

組換え顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、インターロイキン - 3（I L - 3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインは、前記被験体に投与されない、請求項 1 6 9 ～ 1 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 177】

前記被験体は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために前処置される、請求項 169～176 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 178】

移植が必要な被験体へと CD34+末梢血幹細胞を移植する工程をさらに包含する、請求項 169～177 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 179】

前記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である、請求項 169～178 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 180】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 179 に記載の方法。

【請求項 181】

前記被験体は、非悪性疾患を示す患者である、請求項 169～180 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 182】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群 (MPS-IH)、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症 (SCID)、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 181 に記載の方法。

【請求項 183】

処置が必要な被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法であって、該方法は、(a) 少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の CXCR4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて、循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で該ドナーに投与する工程；ならびに (b) 末梢血幹細胞移植が必要な被験体に、該ドナーから該動員された循環末梢血幹細胞を移植する工程、を包含する方法。

【請求項 184】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、前記少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニスト、および前記少なくとも 1 種の CXCR4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される、請求項 183 に記載の方法。

【請求項 185】

前記少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニストは、Gro-beta またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 183 または 184 に記載の方法。

【請求項 186】

前記少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニストは、Gro-beta Δ4 またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 183～185 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 187】

前記少なくとも 1 種の CXCR4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 183～186 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 188】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびV C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項183～187のいずれか1項に記載の方法。

【請求項189】

組換え顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、インターロイキン-3（I L - 3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはp e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインを前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項183～188のいずれか1項に記載の方法。

【請求項190】

前記動員された造血幹細胞は、C D 3 4 + 末梢血幹細胞を含む、請求項183～189のいずれか1項に記載の方法。

【請求項191】

前記被験体への移植の前に、前記ドナーから前記C D 3 4 + 末梢血幹細胞を採取する工程をさらに包含する、請求項183～190に記載の方法。

【請求項192】

前記動員された造血幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含む、請求項191に記載の方法。

【請求項193】

前記ドナーへの前記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、前記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および前記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、前記アフエレーシス手順と同日に行われる、請求項192に記載の方法。

【請求項194】

前記アフエレーシス手順は、前記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、前記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および前記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与の1時間以内に行われる、請求項193に記載の方法。

【請求項195】

前記末梢血幹細胞の移植前に、移植される末梢血幹細胞の生着のために該末梢血幹細胞の移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する、請求項183～194のいずれか1項に記載の方法。

【請求項196】

前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の前記前処置された被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該前処置された被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与する工程を包含する、請求項195に記載の方法。

【請求項197】

前記被験体は、前記末梢血幹細胞の移植前に、化学療法の処置も放射線療法の処置も投与されていない、請求項183～196のいずれか1項に記載の方法。

【請求項198】

前記ドナーおよび前記被験体は、同じ個体である、請求項183～197のいずれか1項に記載の方法。

【請求項199】

前記ドナーおよび前記被験体は、異なる個体である、請求項183～197のいずれか1項に記載の方法。

【請求項200】

前記ドナーおよび／もしくは前記被験体は、G - C S F のみの投与に対する応答におい

10

20

30

40

50

て不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 183～199 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 201】

前記ドナーおよび／もしくは前記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 183～200 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 202】

前記ドナーおよび／もしくは前記被験体は、G-CSF とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される、請求項 183～201 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 203】

前記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である、請求項 183～202 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 204】

前記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される、請求項 203 に記載の方法。

【請求項 205】

前記血液悪性腫瘍の従来処置の治療上有効な量を前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 203 または 204 に記載の方法。

20

【請求項 206】

前記被験体は、非悪性疾患を示す患者である、請求項 183～205 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 207】

前記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群 (MPS-IH)、副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症 (SCID)、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される、請求項 206 に記載の方法。

30

【請求項 208】

前記非悪性疾患の従来処置の治療上有効な量を前記被験体に投与する工程をさらに包含する、請求項 206 または 207 に記載の方法。

【請求項 209】

少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の CXCR4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを使用して、造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体を選択するための方法であって、該方法は、G-CSF およびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程であって、ここで G-CSF およびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の CXCR2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の CXCR4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを使用する造血幹細胞再動員から利益を得る被験体である工程を包含する、方法。

40

【請求項 210】

50

前記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびV C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択され、前記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体およびG r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびM o z o b i l (登録商標) またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される、請求項209に記載の方法。

【請求項211】

移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストを、移植される幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項212】

移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、少なくとも1種のC X C R 4 アゴニストを、移植される幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項213】

移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体を、移植される末梢血幹細胞の該被験体の骨髓ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の骨髓ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される末梢血幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項214】

移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項215】

移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項216】

移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法であって、該方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の該被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、該被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で該被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために該被験体を前処置する工程を包含する、方法。

【請求項217】

少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上

10

20

30

40

50

の動員薬剤の組み合わせを含む、組成物。

【請求項 2 1 8】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、および前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせは、皮下投与のために製剤化される、請求項 2 1 7 に記載の組成物。

【請求項 2 1 9】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 2 1 7 または 2 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 2 0】

前記少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 2 1 7 ~ 2 1 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 1】

前記少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項 2 1 7 ~ 2 2 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 2】

前記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される、請求項 2 1 7 ~ 2 2 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 3】

組換え顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 、インターロイキン - 3 (I L - 3) 、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインをさらに含む、請求項 2 1 7 ~ 2 2 2 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 4】

前記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である、請求項 2 1 7 ~ 2 2 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 5】

前記組成物は、G - C S F のみおよびプレリキサフォルのうちの 1 種以上の投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である、請求項 2 1 7 ~ 2 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 6】

前記組成物は、移植した幹細胞の生着のために被験体を前処置するために有用である、請求項 2 1 7 ~ 2 2 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 7】

前記組成物は、前記幹細胞ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である、請求項 2 1 7 ~ 2 2 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 2 8】

前記組成物は、前記幹細胞ニッチから末梢血へと早ければ 1 5 分程度で造血幹細胞を動員する、請求項 2 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 2 9】

造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法であって、該方法は、(a) C X C R 2 タンパク質もしくはその機能的フラグメントを提供する工程；(b) 試験薬剤を提供する工程；ならびに(c) 該試験薬剤が該 C X C R 2 タンパク質もしくはその機能的フラグメントを作動する能力をアッセイする工程であって、ここで該 C X C R 2 タンパク質もしくはその機能的フラグメントを作動する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である工程、を包含する方法。

【請求項 2 3 0】

造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法であって、該方法は、(a) C X C R 4 タン

10

20

30

40

50

パク質もしくはその機能的フラグメントを提供する工程；（b）CXCR4結合パートナーを提供する工程；（c）試験薬剤を提供する工程；および（d）該試験薬剤が該CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントへの該CXCR4結合パートナーの結合を阻害する能力をアッセイする工程であって、ここで該CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントへの該CXCR4結合パートナーの結合を阻害する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である工程、を包含する方法。

【請求項231】

造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法であって、該方法は、（a）試験薬剤を提供する工程；ならびに（b）該試験薬剤が、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力を評価する工程を包含する、方法。

10

【請求項232】

前記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項231に記載の方法。

【請求項233】

20

以下を含むキット：

（a）（i）少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、（ii）少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および（iii）少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせ；ならびに（b）（i）少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、（ii）少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および（iii）少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、（i）被験体において造血幹細胞を動員する；（ii）G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；（iii）移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および（iv）該被験体において幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために該被験体に投与するための説明書。

30

【請求項234】

前記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、前記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である、請求項233に記載のキット。

【請求項235】

40

前記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、前記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および前記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、前記被験体に移植するための1種以上の医療デバイスをさらに含む、請求項233～234に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年2月28日に提出された米国仮出願第61/770,533号、2013年5月29日に提出された米国仮出願第61/828,568号、および201

50

3年11月15日に出願された米国仮出願第61／904,768号の利益を請求する。
上記出願のすべての教示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府支援

米国国立衛生研究所により授与されたH L 0 4 4 8 5 1、H L 9 7 7 9 4およびH L 0 9 7 7 4のもと政府支援によって本発明がなされた。政府は、本発明における特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

10

造血幹細胞(HSC)移植は、全世界で年間約60,000名の患者を処置および治療するために使用される、一般的な医学的救命手順である。その一般的な使用にも拘わらず、HSC移植から利益を受け得る患者のごく一部がこの手順を受けるに過ぎないので、移植効率および患者アクセスを改善するために重大な要求が未だ満たされていないままである。動員されたHSCは、HSC移植のために広く使用されており、骨髓由来HSCと比較して、改善された転帰を有する。有効な動員レジメンは存在する(例えば、G-CSF)一方で、G-CSF不応性集団において機能する、G-CSFを使わないレジメンもしくは医薬を同定する必要は未だ残っている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

20

【0004】

(発明の要旨)

動員抵抗性集団(例えば、糖尿病誘発性の動員障害)において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法、ならびに移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を(例えば、化学療法および放射線療法のような細胞傷害性前処置の非存在下で)前処置する非細胞傷害性の方法が必要である。本発明は、これらの必要性に対処し、加えて他の望ましい特徴を有するさらなる解決法に関する。

【0005】

よって、一局面において、本発明は、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法を提供し、上記方法は、上記被験体においてエクソストシン1(exostotin 1)(EXT1)のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する。

30

【0006】

一局面において、本発明は、糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法を提供し、上記方法は、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する。

【0007】

40

一局面において、本発明は、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を前処置するための方法を提供し、上記方法は、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なEXT1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を上記被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0008】

一局面において、本発明は、処置が必要な被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法を提供し、上記方法は、(a)上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なEXT1のレ

50

ベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を上記被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために該被験体を前処置する工程；ならびに（b）造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体に移植する工程であって、ここで上記移植される造血幹細胞は、上記被験体の骨髓に生着し、それによって、上記被験体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置する工程を包含する。

【0009】

一局面において、本発明は、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法を提供し、上記方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する。

10

【0010】

一局面において、本発明は、糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法を提供し、上記方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する。

【0011】

一局面において、本発明は、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を前処置するための方法を提供し、上記方法は、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を該被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

20

【0012】

一局面において、本発明は、処置が必要な被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法を提供し、上記方法は、（a）上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を上記被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程；ならびに（b）上記被験体に造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を移植する工程であって、ここで上記移植される造血幹細胞は、上記被験体の骨髓に生着し、それによって、上記被験体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置する工程を包含する。

30

【0013】

本発明は、任意の細胞、組織、器官もしくは個体においてEXT1もしくはその生成物（ヘパラン硫酸）のレベルもしくは活性を阻害することを企図する。いくつかの実施形態において、上記薬剤は、間葉細胞において発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する。いくつかの実施形態において、上記薬剤は、骨髓間葉細胞において発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する。いくつかの実施形態において、上記薬剤は、Mx1+骨格幹細胞および／もしくは前駆細胞において発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する。

40

【0014】

いくつかの実施形態において、上記薬剤は、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；siRNA、shRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される抽出物；天然に存在するかもしくは合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記薬剤

50

は、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T-1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、および V C A M-1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される。

【0015】

いくつかの実施形態において、上記被験体において動員される上記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、C D 3 4⁺末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む。

【0016】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体において動員された上記幹細胞および／もしくは前駆細胞を採取する工程を包含する。

【0017】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記採取された幹細胞および／もしくは前駆細胞を、移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

【0018】

いくつかの実施形態において、上記被験体において動員された上記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、上記被験体への自家移植のために採取される。いくつかの実施形態において、上記被験体において動員された上記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、レシピエント被験体への同種異系移植のために採取される。いくつかの実施形態において、上記幹細胞および／もしくは前駆細胞は、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞のその後の生着のために、上記被験体を前処置するために上記被験体において動員される。

【0019】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞のその後の生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、放射線療法なしで生着のために前処置される。

【0020】

いくつかの実施形態において、上記方法は、従来の動員レジメンに対する応答において不十分な動員を示す被験体を選択する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体は、顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F) に対する応答において不十分な動員を示す。

【0021】

いくつかの実施形態において、上記方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子 (G-C S F)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M-C S F)、インターロイキン-3 (I L-3)、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインを上記被験体に投与する工程を包含する。

【0022】

いくつかの実施形態において、上記方法は、G-C S F またはこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態とヘパリンとの組み合わせを上記被験体に投与する工程を包含する。

【0023】

いくつかの実施形態において、上記方法は、血液悪性腫瘍と診断されたか、血液悪性腫瘍を有する疑いがあるか、または血液悪性腫瘍を発生させるリスクがある被験体を選択する工程を包含する。いくつかの実施形態において、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患は、血液悪性腫瘍を含む。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型 B 細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性 B 細胞非ホジキンリンパ腫、T 細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。

【0024】

いくつかの実施形態において、上記方法は、非悪性疾患と診断されたか、非悪性疾患を

10

20

30

40

50

有する疑いがあるか、または非悪性疾患を発生させるリスクがある被験体を選択する工程を包含する。いくつかの実施形態において、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患は、非悪性疾患を含む。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髓線維症、骨髓異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（M P S - I H）、副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（S C I D）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。

10

【0025】

いくつかの実施形態において、上記方法は、糖尿病と診断されたか、糖尿病を有する疑いがあるか、または糖尿病を発生させるリスクがある被験体を選択する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体は、幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す。いくつかの実施形態において、上記方法は、糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体を選択する工程を包含する。

【0026】

一局面において、本発明は、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法を提供し、上記方法は、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、上記被験体の末梢血へと造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

20

【0027】

いくつかの実施形態において、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法は、上記被験体において動員された末梢血幹細胞を採取する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法は、アフエレーシスを介して上記末梢血幹細胞を採取する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員およびアフエレーシスは、同日に行われる。いくつかの実施形態において、単一セッションのアフエレーシスで、レシピエントの体重1 k gあたり約 $2 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ の間の細胞用量のために十分な末梢血幹細胞が集められる。いくつかの実施形態において、上記方法は、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与することによって、移植される幹細胞の生着のために、幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法は、移植が必要な被験体へと上記採取した末梢血幹細胞を移植する工程を包含する。

30

40

【0028】

一局面において、本発明は、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法を提供し、上記方法は、（a）（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員した循環末梢血幹細胞を、被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程を包含する。

【0029】

一局面において、本発明は、移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置す

50

るための方法を提供し、上記方法は、(a) (i) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに (i i) C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって、移植される末梢血幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0030】

一局面において、本発明は、末梢血幹細胞移植が必要な被験体を処置するための方法を提供し、上記方法は、(a) (i) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに (i i) C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞のその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチを前処置するために有効な量で上記被験体に投与する工程；ならびに (b) 上記被験体へと末梢血幹細胞を移植する工程を包含する。

【0031】

いくつかの実施形態において、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される。いくつかの実施形態において、上記組成物は、皮下投与のために製剤化される。

【0032】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびV C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストは、(i) G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体および (i i) G r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。

【0033】

いくつかの実施形態において、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $1 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 $\sim 10 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $2 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 $\sim 8 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $3 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 $\sim 6 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。

【0034】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、放射線療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、間質細胞を弱らせることなく生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、上記被験体に G - C S F を投与することなく生着のために前処置される。

【0035】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F)、インターロイキン - 3 (I L - 3)、およびこれらのグリコシル化形態もしくは p e g 化形態からなる群より選択されるサイトカインを上記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、本発明の方法は、少なくとも1種の化学療法剤を上記被験体に投与する工程を包含する。

10

20

30

40

50

【0036】

いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞は、CD34⁺末梢血幹細胞を含む。

【0037】

本明細書で記載される方法が、自家幹細胞移植もしくは同種異系幹細胞移植と関連して使用され得ることは認識されるべきである。自家幹細胞移植の状況において、「ドナー」および「被験体」とは、同じ個体をいう。同種異系幹細胞移植の状況において、「ドナー」および「被験体」とは、異なる個体をいう。しかし、当業者に明らかであるはずのいくつかの状況において、「被験体」は、本明細書で記載される造血幹細胞動員薬剤もしくは造血幹細胞動員薬剤の組み合わせを、このような造血幹細胞が必要な被験体へのその後の採取および移植のために受ける個体をいうために「ドナー」と交換可能に使用される。

10

【0038】

いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞は、自家移植のために上記被験体において動員される。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞は、同種異系移植のために前記被験体において動員される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、G-CSFのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、G-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。

20

【0039】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。

【0040】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、非悪性疾患を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群(MPS-IH)、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症(SCID)、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。

30

【0041】

一局面において、本発明は、処置が必要な被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法を提供し、上記方法は、(a)(i)少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターならびにCXCR2アゴニストおよびCXCR4アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに(b)上記動員された循環末梢血幹細胞を上記ドナーから末梢血幹細胞移植が必要な被験体へと移植する工程を包含する。

40

【0042】

いくつかの実施形態において、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせは、組成物として製剤化される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、EXT1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびVC

50

AM-1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。いくつかの実施形態において、上記方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-3(IL-3)、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインを上記被験体に投与する工程を包含する。

【0043】

いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞は、CD34⁺末梢血幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体への移植前に、上記ドナーから上記CD34⁺末梢血幹細胞を採取する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含む。いくつかの実施形態において、上記ドナーへの前記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、アフエレーシス手順と同日に行われる。いくつかの実施形態において、上記アフエレーシス手順は、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与の1時間以内に行われる。

【0044】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記末梢血幹細胞の移植前に、移植される末梢血幹細胞の生着のために上記末梢血幹細胞移植が必要な前記被験体を前処置する工程を包含する。いくつかの実施形態において、前処置する工程は、(i)少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに(ii)少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0045】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、上記末梢血幹細胞の移植の前に、化学療法処置も放射線療法処置も投与されない。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび上記被験体は、同じ個体である。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび上記被験体は、異なる個体である。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび/もしくは上記被験体は、G-CSFのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび/もしくは上記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび/もしくは上記被験体は、G-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。

【0046】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記血液悪性腫瘍の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。

【0047】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、非悪性疾患を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強

10

20

30

40

50

皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（M P S - I H）、副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（S C I D）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記非悪性疾患の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。

【0048】

一局面において、本発明は、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびにC X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを使用して、造血幹細胞再動員から利益を得る被験体を選択するための方法を提供し、上記方法は、G - C S Fおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤またはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程であって、ここでG - C S Fおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤またはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを使用する造血幹細胞再動員から利益を得る被験体である、工程を包含する。

【0049】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体において造血幹細胞を再動員するために、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせを上記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびV C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択され、上記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体およびG r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。

【0050】

一局面において、本発明は、移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法を提供し、上記方法は、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、E X T 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびV C A M - 1 のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択され、上記少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストは、G r o - b e t a またはそのアナログもしくは誘導体およびG r o - b e t a Δ 4 またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。

【0051】

一局面において、本発明は、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、ならびに（i i）C X C R 2 アゴニストおよびC X C R 4 アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、組換え顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）、顆粒球マクロファージコ

ロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインをさらに含む。いくつかの実施形態において、上記組成物は、少なくとも1種の化学療法剤をさらに含む。いくつかの実施形態において、上記組成物は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される血液悪性腫瘍の少なくとも1種の従来処置を含む。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPSS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される非血液悪性腫瘍の少なくとも1種の従来処置を含む。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-CSFのみおよびプレリキサフォルのうちの1種以上の投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、上記幹細胞ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、上記幹細胞ニッチから末梢血へと早ければ15分程度で造血幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記2種以上の動員薬剤の組み合わせは、皮下投与のために製剤化される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、EXT1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびVCAM-1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-betaΔ4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。

10

20

30

【0052】

一局面において、本発明は、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法を提供し、上記方法は、（a）試験薬剤を提供する工程；および（b）上記試験薬剤が、（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、ならびに（ii）CXCR2アゴニストおよびCXCR4アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力を評価する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-betaΔ4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。

40

【0053】

一局面において、本発明は、（a）（i）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターならびに（ii）CXCR2アゴニストおよびCXCR4アンタゴニストのうちの少なくとも一方を含む2種以上の動員薬剤の組み合わせ；ならびに（b）（i）被験体において

50

造血幹細胞を動員する；(i i) G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(i i i) 移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(i v) 上記被験体において幹細胞増殖を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために、上記被験体への上記2種以上の動員薬剤の組み合わせを投与するための説明書を含むキットを提供する。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。いくつかの実施形態において、上記キットは、上記動員された末梢血幹細胞を上記被験体へと移植するための1種以上の医療デバイスを含む。

10

【0054】

一局面において、本開示は、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法を提供し、上記方法は、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血へと動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

20

【0055】

いくつかの実施形態において、幹細胞および／もしくは前駆細胞（例えば、造血の）を動員するための方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインを上記被験体に投与する工程をさらに包含する。

【0056】

いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞は、CD34⁺末梢血幹細胞を含む。

30

【0057】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記CD34⁺末梢血幹細胞を採取する工程をさらに包含する。

【0058】

いくつかの実施形態において、上記動員された幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含み、例えば、アフエレーシスは、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記CXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせが上記被験体に投与されるその同日に行われる。

【0059】

いくつかの実施形態において、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよびCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一セッションのアフエレーシスで約 1×10^6 / kg 体重 $\sim$ 10×10^6 / kg 体重の間の細胞用量を採取するために十分に、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一セッションのアフエレーシスで約 2×10^6 / kg 体重 $\sim$ 8×10^6 / kg 体重の間の細胞用量を採取するために十分に、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、少なくと

40

50

も1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される上記2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $3 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重 $\sim 6 \times 10^6 / \text{kg}$ 体重の間の細胞用量を採取するために十分に、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。

【0060】

いくつかの実施形態において、上記方法は、移植される幹細胞の生着のために、幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを含む組成物を、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体に少なくとも1種の化学療法剤を投与する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、放射線療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、間質細胞を弱らせることなく生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、上記被験体にG-CSFを投与することなく生着のために前処置される。

【0061】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記採取した末梢血幹細胞を、移植が必要な被験体へと移植する工程をさらに包含する。

【0062】

いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞は、自家移植のために上記被験体において動員される。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞は、同種異系移植のために上記被験体において動員される。

【0063】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、1種以上の薬剤、例えば、G-CSFのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、G-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。

【0064】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マンタル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。

【0065】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、非悪性疾患を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強

10

20

30

40

50

皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（H I V）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（M P S - I H）、副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（S C I D）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。

【0066】

別の局面において、本開示は、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法を提供し、上記方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストおよび少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員した循環末梢血幹細胞を、被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程を包含する。

【0067】

いくつかの実施形態において、上記循環末梢血幹細胞は、C D 3 4 ⁺ 末梢血幹細胞を含む。

【0068】

いくつかの実施形態において、上記循環末梢血幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含み、上記造血幹細胞動員およびアフエレーシスは、同日に行われる。いくつかの実施形態において、単一セッションのアフエレーシスで、レシピエントの体重の約 $2 \times 10^6 / \text{kg} \sim 10 \times 10^6 / \text{kg}$ の間の細胞用量のために十分なC D 3 4 ⁺ 末梢血幹細胞が集められる。

【0069】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニスト、および少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で、上記前処置される予定の被験体に投与することによって、移植される末梢血幹細胞の生着のために末梢血幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために前処置される。

【0070】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法は、採取された末梢血幹細胞を、このような移植が必要な被験体に移植する工程をさらに包含する。

【0071】

いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞は、自家移植のために上記必要な被験体において動員される。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞は、同種異系移植のために上記被験体において動員される。

【0072】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、1種以上の薬剤、例えば、G - C S F のみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、G - C S F とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。

【0073】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。

【0074】

いくつかの形態において、上記被験体は、非悪性疾患を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPSS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。

10

【0075】

いくつかの局面において、本開示は、移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法を提供し、上記方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される末梢血幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

20

【0076】

いくつかの実施形態において、上記方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインを上記被験体に投与する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、組換え顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインは、上記被験体に投与されない。

30

【0077】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために前処置される。

【0078】

いくつかの実施形態において、上記方法は、CD34⁺末梢血幹細胞をそのような移植が必要な被験体へと移植する工程をさらに包含する。

40

【0079】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。

【0080】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、非悪性疾患を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドー

50

シス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。

【0081】

いくつかの局面において、本開示は、処置が必要な被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法を提供し、上記方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて、循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記ドナーから末梢血幹細胞移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

10

【0082】

いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞は、CD34⁺末梢血幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記方法は、以下をさらに包含する。

【0083】

上記被験体への移植の前に、上記CD34⁺末梢血幹細胞を上記ドナーから採取する工程。

20

【0084】

いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含む。いくつかの実施形態において、上記ドナーへの上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与は、上記アフエレーシス手順と同日に行われる。

【0085】

いくつかの実施形態において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせの投与の1時間以内に行われる。

30

【0086】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記末梢血幹細胞の移植前に、移植される末梢血幹細胞の生着のために上記末梢血幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程をさらに包含する。

【0087】

いくつかの実施形態において、前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される末梢血幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

40

【0088】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、上記末梢血幹細胞の移植前に、化学療法の処置も放射線療法の処置も投与されていない。

【0089】

いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび上記被験体は、同じ個体である。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび上記被験体は、異なる個体である。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび／もしくは上記被験体は、G-CSFのみの投与

50

に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび／もしくは上記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記ドナーおよび／もしくは上記被験体は、G-C-S-Fとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。

【0090】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記血液悪性腫瘍は、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病からなる群より選択される。

10

【0091】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記血液悪性腫瘍の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程をさらに包含する。

【0092】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、非悪性疾患を示す患者である。いくつかの実施形態において、上記非悪性疾患は、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群からなる群より選択される。

20

【0093】

いくつかの実施形態において、上記方法は、上記非悪性疾患の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程をさらに包含する。いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを使用して、造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体を選択するための方法を提供し、上記方法は、G-C-S-Fおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程であって、ここでG-C-S-Fおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを使用する造血幹細胞再動員から利益を得る被験体である工程を包含する。

30

【0094】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、EXT1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびVCAM-1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-betaΔ4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびMozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。

40

【0095】

50

いくつかの局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0096】

いくつかの局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のCXCR4アゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

10

【0097】

いくつかの局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体を、移植される末梢血幹細胞の上記被験体の骨髓ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の骨髓ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される末梢血幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0098】

いくつかの局面において、移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、Gro-beta Δ4またはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

20

【0099】

いくつかの局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0100】

いくつかの局面において、移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから造血幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

30

【0101】

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを含む組成物を提供する。

40

【0102】

本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせは、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；siRNA、shRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される

50

抽出物；天然に存在するかもしれないもしくは合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される。

【0103】

本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせは、皮下投与のために製剤化される。

【0104】

本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；siRNA、shRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される抽出物；天然に存在するかもしれないもしくは合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される。

【0105】

本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体である。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体である。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体、硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体、EXT1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤、およびVCAM-1のレベルもしくは活性を低下させる薬剤からなる群より選択される。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびMozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体であり、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体であり、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、Mozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体である。

【0106】

本開示のこの局面およびいくつかの局面のいくつかの実施形態において、本明細書で記載される組成物および方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態からなる群より選択されるサイトカインをさらに含むか、またはサイトカインを被験体に投与する工程をさらに包含する。

【0107】

いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために

10

20

30

40

50

有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-C S Fのみおよびプレリキサフォルのうちの1種以上の投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、上記幹細胞ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、上記幹細胞ニッチから末梢血へと早ければ15分程度で造血幹細胞を動員する。

【0108】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) CXCR2タンパク質もしくはその機能的フラグメントを提供する工程；(b) 試験薬剤を提供する工程；ならびに(c) 上記試験薬剤が上記CXCR2タンパク質もしくはその機能的フラグメントを作動する能力をアッセイする工程であって、ここで上記CXCR2タンパク質もしくはその機能的フラグメントを作動する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である工程、を包含する。

10

【0109】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントを提供する工程；(b) CXCR4結合パートナーを提供する工程；(c) 試験薬剤を提供する工程；ならびに(d) 上記試験薬剤が上記CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントへの上記CXCR4結合パートナーの結合を阻害する能力をアッセイする工程であって、ここで上記CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントへの上記CXCR4結合パートナーの結合を阻害する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である工程、を包含する。

20

【0110】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) 試験薬剤を提供する工程；ならびに(b) 上記試験薬剤が、少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力を評価する工程を包含する。

【0111】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびMozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。

30

【0112】

いくつかの局面において、本開示は、以下を含むキットを提供する：(a) (i) 少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、(ii) 少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および(iii) 少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせ；ならびに(b) (i) 少なくとも1種のヘパリン硫酸インヒビター、(ii) 少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および(iii) 少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(ii) G-C S Fのみ、プレリキサフォル、またはG-C S Fとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(iii) 移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(iv) 上記被験体において幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書。

40

【0113】

50

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXC R2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXC R4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせは、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；s i R N A、s h R N A、アンチセンスR N A、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される抽出物；天然に存在するかもしれない合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせ、からなる群より選択される。

【0114】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、ヘパリン硫酸またはそのアナログもしくは誘導体および硫酸プロタミンまたはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXC R2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXC R4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびMozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。いくつかの実施形態において、上記キットは、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXC R2アゴニスト、および上記少なくとも1種のCXC R4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、上記被験体に移植するための1種以上の医療デバイスをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0115】

特許および特許出願のファイルは、カラーで仕上げられた少なくとも1つの図面を含む。カラー図面つきでのこの特許もしくは特許出願の公報のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、当該官庁によって提供される。

【0116】

【図1】図1 A、図1 B、図1 Cおよび図1 Dは、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが骨髄におけるHSPC保持に必須であり、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子EXT1の欠失がHSPC局在化においてゆるやかな変化を生じることを図示する。図1 A（上）は、図1 B、図1 Cおよび図1 Dに示される結果を生じた実験デザインの模式図を示す。図1 Bは、コロニー形成能力によって測定される造血前駆細胞が血中で有意に増大されることを示す。図1 Cおよび図1 Dは、免疫型として規定された前駆細胞（図1 C、中央）および幹細胞（図1 D、右）がEXT1の欠失の6ヶ月後に骨髄中で有意に減少されることを示す。これら結果は、1実験群につき6～10匹の動物での3回の独立した実験を表す。

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

【0117】

【図2】図2 A、図2 Bおよび図2 Cは、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が造血幹細胞局在化に対するVCAM-1の活性を変化させることを図示する。図2 Aは、図2 Bおよび図2 Cに示される結果を生じた実験デザインの模式図を示す。図2 Bおよび図1 Cは、VCAM-1誘発性の動員が、コロニー形成単位アッセイ（図2 B、左下パネル）および競合再集合アッセイ（図2 C、右下パネル）によって示されるように、Ext1/ヘパラン硫酸プロテオグリカンに依存することを示す。これら結果は、1実験群につき5匹の動物での2回の独立した実験を表す。* * $p < 0.05$; * * * $p < 0.01$; n s = 有意でない。

【0118】

【図3】図3 A、図3 Bおよび図3 Cは、ヘパリン硫酸が内因性HSPGと競合し、機能的に強力なHSCの動員を可能にすることを図示する。図3 A（上）は、図3 Bおよび図3 Cに示される結果を生じた実験デザインの模式図を示す。図3 Bは、一連の競合移植物によって測定される場合、ヘパリンがG-CSF誘発性の動員を有意に増強することを示

す（左下パネル）。図 3 C は、G-CSF とヘパリンとの組み合わせによって達成された、増強された動員が、無傷の内因性 HSPG に依存することを示す（右下パネル）。これら結果は、1 実験群につき 6 ～ 10 匹の動物での 3 回の独立した実験を表す。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

【0119】

【図 4】図 4 は、ヘパラン硫酸インヒビターと AMD 3100 とを組み合わせることによる、顕著に効率的な幹細胞動員を図示する。単一用量の AMD 3100 のみ（5 mg/kg）、または AMD 3100 + ヘパリン（100 U/マウス）もしくは硫酸プロタミン（40 mg/kg）で処置した動物の血液を、致命的に照射したコンジュニック宿主の移植において使用した。生着したドナー細胞の相対頻度を示す。1 のところにある線 = AMD 3100 のみ。結果は、6 ～ 10 匹/群に由来する。

【0120】

【図 5】図 5 A、図 5 B、図 5 C、図 5 D、図 5 E、図 5 F、図 5 G、図 5 H、図 5 I、図 5 J、図 5 K および図 5 L は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが HPSCL 局在化を制御することを示す。図 5 A は、実験デザインを示す模式的概略図である。図 5 B ～ 5 J は、pIpC 誘発の 24 週間後に集めたデータに関する。図 5 B および図 5 C は、コミットされた骨髓系前駆細胞（共通骨髓系前駆細胞（CMP）、顆粒球-マクロファージ前駆細胞（GMP）および、巨核球-赤血球前駆細胞（MEP））およびコミットされたリンパ系前駆細胞（CLP）への寄与（図 1 B）、ならびに KLS CD48-CD150+HSC への寄与（図 5 C）を示す骨髓分析の結果を図示する棒グラフである。図 5 D は、骨髓 KLS CD48-CD150+細胞集団におけるアポトーシスを図示する棒グラフである。図 5 E は、細胞周期の G0、G1 および S-G2-M 期にある細胞のパーセンテージを示す、骨髓 KLS CD48-CD150+HSC の細胞周期分析の結果を示す棒グラフである。図 5 F は、末梢白血球（WBC）数を示す棒グラフである。図 5 G は、キメラマウスにおけるメチルセルロース中のコロニー形成単位アッセイ（CFU）によって測定される循環前駆細胞の数を示す末梢血分析を示す棒グラフである。図 5 H ～ 5 K は、総重量（mg）を示す脾臓分析の結果（図 5 H）、KLS 48-CD150+HSC への寄与（図 5 I）、CMP、GMP および MEP 細胞への寄与（図 5 J）、ならびに WT CD45.2 脾細胞の等しい数と競合したコントロールもしくは変異キメラマウス（CD45.1）に由来する脾細胞を注入したレシピエント C57BL/6J（CD45.2）マウスの、移植後 16 週間での相対的 PB 再構成（図 5 K）を示す棒グラフである。図 5 L は、コントロールマウス（ $n = 8$ ）および変異マウス（ $n = 4 \sim 5$ ）の大腿骨の皮質骨（上のパネル）および海綿骨（下のパネル）の代表的三次元マイクロ CT 画像を示す。データは、少なくとも 3 回の独立した実験（ $n = 5 \sim 8$ 匹のマウス/遺伝子型/実験）の代表。データは、平均 $\pm$ SEM として表される。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

【0121】

【図 6-1】図 6 A、図 6 B、図 6 C、図 6 D、図 6 E、図 6 F、図 6 G、図 6 H、図 6 I、図 6 J、図 6 K、図 6 L、図 6 M、図 6 N、図 6 O、図 6 P、図 6 Q、図 6 R、図 6 S、図 6 T、図 6 U、図 6 V および図 6 W は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが造血幹細胞/前駆細胞局在化を制御することを示す。図 6 A ～ 図 6 C は、BM Mx1+間葉細胞における Ext1 欠失の評価を示す。図 6 A は、コントロールマウスおよび変異マウスが、どのようにして ROSA26-loxP-stop-loxP-EYFP（Rosa-EYFP）系統に交配されて、CD45-Ter119-Mx1+細胞の予測単離（prospective isolation）を容易にしたかを示す模式図である。図 6 B は、コントロールマウスおよび変異マウス（ $n = 3$ /遺伝子型）に由来するエキソビボで増殖させた BM CD45-Ter119-Mx1+（EYFP+）細胞における Ext1 のウェスタンブロットを示し、Gapdh は、添加コントロールとして示される。図 6 C は、Gapdh に対して Ext1 バンドの光学密度を測定することによって行われる定量を示す棒グラフである。図 6 D ～ 6 F は、コントロールマウスおよび変異マウスに由来するエキソビボで増殖させた（図 6 D）、および新たに単離した（図 6 E）、BM CD45

-Ter119-Mx1+BM細胞におけるHSレベルの定量を示す棒グラフである。図6Fは、コントロールマウスおよび変異マウスにおけるCD45-Ter119-Mx1+CD105+CD140+Scal+間葉性幹細胞への寄与を示す骨髓分析を示す棒グラフである。図6G~6Kは、ドナー細胞集団(CD45.1)の出現率(図6G)、白血球(WBC)数(図6H)、赤血球(RBC)数(図6I)、血小板(PLT)数(図6J)、ならびにB細胞(B220)、骨髓系細胞(Mac1およびGr1)およびT細胞(CD3)への寄与(図6K)を示す、移植の6~8週間後にpIpC誘発する前の、キメラExt1コントロールマウスおよび変異マウスの末梢血造血パラメーターの分析を図示する。図6L~6Sは、pIpC誘発の24週間後のキメラExt1コントロールマウスおよび変異マウスの分析を示す。図6Lは、総体重(TBW)(g)を示す棒グラフである。図6Mおよび6Nは、レシピエントマウスにおける全BM細胞性(図6M)、ならびにB細胞(B220)、骨髓系細胞(Mac1およびGr1)およびT細胞(CD3)への寄与(図6N)を示す骨髓分析を図示する棒グラフである。図6O~6Qは、レシピエントマウスにおけるB細胞(B220)、骨髓系細胞(Mac1およびGr1)およびT細胞(CD3)への寄与(図6O)、血小板数(PLT)(図6P)および赤血球数(RBC)(図6Q)を示す末梢血分析を示す棒グラフである。図6Rおよび6Sは、コントロールおよび変異キメラマウスにおいて、細胞周期分析を示す、脾臓に存在するKLS-CD48-CD150+HSC分析(図6R);細胞周期のG0、G1およびS-G2-M期の細胞、およびアポトーシス(図6S)を示すグラフである。図6Tは、B細胞(B220)、骨髓系細胞(Mac1およびGr1)およびT細胞(CD3)への寄与を示す、WT-CD45.2脾細胞の等しい数と競合したコントロールマウスもしくは変異キメラマウス(CD45.1)に由来する脾細胞を注入したレシピエントC57BL/6J(CD45.2)マウスの、移植の16週間後のPB再構成を示す棒グラフである。図6Uは、pIpC誘発の24週間後のキメラコントロールマウスおよび変異マウスにおけるCD62Low循環好中球の分布を示す棒グラフである。図6Vは、pIpC誘発の24週間後のコントロールマウスおよび変異キメラマウスのBMにおけるCxcl12タンパク質レベルを示す棒グラフである。図6Wは、pIpC誘発の24週間後のキメラExt1コントロールマウスおよび変異マウスの大腿の代表的ヘマトキシリンおよびエオシン染色を示す。倍率:上のパネルは4×、下のパネルは40×。データは、別段示されなければ、少なくとも2回の独立した実験(n=5~8匹のマウス/遺伝子型/実験)の代表。データは、平均±SDもしくはメジアン±IQR(四分位数間領域)として表される。ns:有意でない; * p<0.05; ** p<0.01。

【図6-2】図6A、図6B、図6C、図6D、図6E、図6F、図6G、図6H、図6I、図6J、図6K、図6L、図6M、図6N、図6O、図6P、図6Q、図6R、図6S、図6T、図6U、図6Vおよび図6Wは、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが造血幹細胞/前駆細胞局在化を制御することを示す。図6A~図6Cは、BM-Mx1+間葉細胞におけるExt1欠失の評価を示す。図6Aは、コントロールマウスおよび変異マウスが、どのようにしてROSA26-loxP-stop-loxP-EYFP(Rosa-EYFP)系統に交配されて、CD45-Ter119-Mx1+細胞の予測単離(prospective isolation)を容易にしたかを示す模式図である。図6Bは、コントロールマウスおよび変異マウス(n=3/遺伝子型)に由来するエキソビボで増殖させたBM-CD45-Ter119-Mx1+(EYFP+)細胞におけるExt1のウェスタンブロットを示し、Gapdhは、添加コントロールとして示される。図6Cは、Gapdhに対してExt1バンドの光学密度を測定することによって行われる定量を示す棒グラフである。図6D~6Fは、コントロールマウスおよび変異マウスに由来するエキソビボで増殖させた(図6D)、および新たに単離した(図6E)、BM-CD45-Ter119-Mx1+BM細胞におけるHSレベルの定量を示す棒グラフである。図6Fは、コントロールマウスおよび変異マウスにおけるCD45-Ter119-Mx1+CD105+CD140+Scal+間葉性幹細胞への寄与を示す骨髓分析を示す棒グラフである。図6G~6Kは、ドナー細胞集団(CD45.1)の出現率(図6G)、白

血球 (WBC) 数 (図 6 H)、赤血球 (RBC) 数 (図 6 I)、血小板 (PLT) 数 (図 6 J)、ならびに B 細胞 (B220)、骨髓系細胞 (Mac1 および Gr1) および T 細胞 (CD3) への寄与 (図 6 K) を示す、移植の 6~8 週間後に pIpC 誘発する前の、キメラ Ext1 コントロールマウスおよび変異マウスの末梢血造血パラメーターの分析を図示する。図 6 L~6 S は、pIpC 誘発の 24 週間後のキメラ Ext1 コントロールマウスおよび変異マウスの分析を示す。図 6 L は、総体重 (TBW) (g) を示す棒グラフである。図 6 M および 6 N は、レシピエントマウスにおける全 BM 細胞性 (図 6 M)、ならびに B 細胞 (B220)、骨髓系細胞 (Mac1 および Gr1) および T 細胞 (CD3) への寄与 (図 6 N) を示す骨髓分析を図示する棒グラフである。図 6 O~6 Q は、レシピエントマウスにおける B 細胞 (B220)、骨髓系細胞 (Mac1 および Gr1) および T 細胞 (CD3) への寄与 (図 6 O)、血小板数 (PLT) (図 6 P) および赤血球数 (RBC) (図 6 Q) を示す末梢血分析を示す棒グラフである。図 6 R および 6 S は、コントロールおよび変異キメラマウスにおいて、細胞周期分析を示す、脾臓に存在する KLS CD48-CD150+HSC 分析 (図 6 R); 細胞周期の G0、G1 および S-G2-M 期の細胞、およびアポトーシス (図 6 S) を示すグラフである。図 6 T は、B 細胞 (B220)、骨髓系細胞 (Mac1 および Gr1) および T 細胞 (CD3) への寄与を示す、WT CD45.2 脾細胞の等しい数と競合したコントロールマウスもしくは変異キメラマウス (CD45.1) に由来する脾細胞を注入したレシピエント C57BL/6J (CD45.2) マウスの、移植の 16 週間後の PB 再構成を示す棒グラフである。図 6 U は、pIpC 誘発の 24 週間後のキメラコントロールマウスおよび変異マウスにおける CD62Low 循環好中球の分布を示す棒グラフである。図 6 V は、pIpC 誘発の 24 週間後のコントロールマウスおよび変異キメラマウスの BM における Cxcl12 タンパク質レベルを示す棒グラフである。図 6 W は、pIpC 誘発の 24 週間後のキメラ Ext1 コントロールマウスおよび変異マウスの大腿の代表的ヘマトキシリンおよびエオシン染色を示す。倍率: 上のパネルは 4x、下のパネルは 40x。データは、別段示されなければ、少なくとも 2 回の独立した実験 (n=5~8 匹のマウス/遺伝子型/実験) の代表。データは、平均±SD もしくはメジアン±IQR (四分位数間領域) として表される。ns: 有意でない; * p<0.05; ** p<0.01。

【0122】

【図 7】図 7 A、図 7 B、図 7 C、図 7 D、図 7 E、図 7 F および図 7 G は、ヘパラン硫酸が Vcam-1 依存性 HSPC 接着を調節することを示す。図 7 A および図 7 B は、BM 腔における HSC の相対的位置づけを示す。図 7 A は、コントロールマウスおよび変異マウスが Col2.3 プロモーター標識骨芽細胞の下で GFP を発現する系統へと交配されたことを示す。図 7 B は、Col2.3 GFP 細胞 (左パネル) および骨内膜表面 (右パネル) に由来する、移植の 24 時間後の LKS CD48-CD150+HSC の距離 (μm 単位) を示す。図 7 C および図 7 D は、Mx1+細胞におけるニッチ関連分子の発現を示す。図 7 C は、Vcam1、Cxcl12、Angpt1 および Scf1 についてのリアルタイム PCR 結果を示す。図 7 D は、コントロールマウスおよび変異マウスに由来する BM CD45-Ter119-Mx1+細胞における Vcam1 タンパク質レベルの代表的ヒストグラムである。図 7 E、図 7 F および図 7 G は、Mx1+細胞における Vcam1 の機能的評価を示す。図 7 E は、実験デザインの模式的概略図である。図 7 F は、G-CSF および Vcam1 中和抗体を注射したコントロールマウスおよび変異マウスの末梢血における CFU-C アッセイによって測定された循環前駆細胞の数を示す。図 7 G は、G-CSF および Vcam1 中和抗体もしくはアイソタイプコントロールで動員したコントロールマウスもしくは変異マウスに由来する末梢血 150 μL を注入したレシピエントマウスにおける、移植の 16 週間後の全末梢血再構成を示す。CD45.1 BM 細胞を、コントロールマウスおよび変異マウスにおいて等しい数で放射線防御のために移植した。データは、少なくとも 2 回の独立した実験 (n=5~8 匹のマウス/遺伝子型/実験) の代表。動員実験において、PB を、実験群あたり少なくとも 5 匹のマウスから集めた。データは、平均±SD として表される。ns: 有意でない; * p<0.05; *

* $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

【0123】

【図8】図8A、図8B、図8Cおよび図8Dは、ヘパラン硫酸がVcam1依存性HSC接着を調節することを示す。図8Aは、DiD標識HSC（赤）；青、第2の調和生成シグナル（second-harmonic generation signal）（骨）；緑、Col2.3GFP（骨芽細胞）の等しい数を注射したコントロールマウスおよび変異マウスの骨髄腔の代表的写真である。スケールバー、100 μ m。図8Bは、コントロールマウスおよび変異Ext1マウスに由来するCD45-Ter119-Mx1+間葉細胞におけるCxcl2タンパク質レベル定量を示す。図8Cは、コントロールマウスおよび変異Ext1マウスに由来するCD45-Ter119-Mx1+間葉細胞におけるVcam1タンパク質レベル定量を示す。図8Dは、Vcam1中和抗体もしくはアイソタイプコントロールを受容するExt1コントロールマウスもしくは変異マウスからコロニー形成単位アッセイ（CFU）によって測定した末梢血循環前駆細胞の定量を示す。データは、別段示されなければ、少なくとも2回の独立した実験（ $n = 5 \sim 8$ 匹のマウス／遺伝子型／実験）の代表。データは、平均±SDとして表される。ns：有意でない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ 。

【0124】

【図9】図9A、図9B、図9C、図9D、図9E、図9F、図9G、図9H、図9I、図9J、図9K、図9Lおよび図9Mは、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの薬理的阻害がHSPC動員を誘発することを示す。図9Aは、実験デザインの模式的概略図である。図9Bは、G-CSFもしくはG-CSF+ヘパリンを受容するC57BL/6J（CD45.2）マウスにおける末梢WBC数を示すグラフである。図9Cは、致命的に照射したCD45.1コンジュニクレシピエントに移植した、C57BL/6J（CD45.2）由来のG-CSFもしくはG-CSF+ヘパリンで動員したPBの全ドナー（CD45.2）再構成を示す。CD45.1 BM細胞を、両方の群において等しい数で放射線防御のために移植した。X軸の中断は、致命的に照射したレシピエントへの連続BM移植を表す。図9D～9Fは、G-CSF（ $n = 1$ ）もしくはG-CSF+ヘパリン（ $n = 2$ ）誘発性の動員に際して、細胞接着遺伝子（図9D）、細胞増殖遺伝子（図9E）および増殖調節遺伝子（図9F）における変化を示す、PBからFACSソートしたHSPC（Lin⁻、cKit⁺、Sca1⁺）において差次的に発現された遺伝子のクラスター形成を図示する。青および黄は、それぞれ高発現および低発現を示す。図9G～9Hは、致命的に照射したレシピエントへのG-CSFもしくはG-CSF+ヘパリン動員したPBの非競合的移植を示し、好中球（図9G）および血小板回復（図9H）を示す。図9Iは、致命的に照射したCD45.1コンジュニクレシピエントに移植した、Ext1変異マウス由来のG-CSFもしくはG-CSF+ヘパリン動員したPBの全ドナー（CD45.2）再構成を示す。CD45.1 BM細胞を、両方の群において等しい数で放射線防御のために移植した。図9Jは、G-CSFとヘパリンもしくはG-CSFとヒルジンを受容するC57BL/6Jマウス（CD45.2）由来のPBを注入したレシピエントCD45.1マウスの、移植16週間後の相対的PB再構成を示す。レシピエントマウスを致命的に照射し、放射線防御のためにCD45.1細胞を与えた。図9K～9Lは、非糖尿病および糖尿病のコントロールおよび変異マウス由来のG-CSFで動員したPB（合計4群）（図9K）を、または非糖尿病および糖尿病のC57BL/6Jマウス由来のG-CSF+ヘパリンで動員したPB（図9L）を注入したレシピエントマウスの、移植16週間後の相対的PB再構成を示す。移植のために、致命的に照射したCD45.1動物を、レシピエントとして使用した。CD45.1 BMを、放射線防御のために等しい数で使用した。図9Mは、Vcam1阻害がヘパリン誘発性動員を排除することを示す。末梢血循環前駆細胞を、ビヒクル、AMD3100もしくはVcam1中和抗体のみ、またはヘパリンと組み合わせて受容する動物のコロニー形成単位アッセイ（CFU）によって測定した。データは、少なくとも2回の独立した実験（ $n = 5 \sim 8$ 匹のマウス／遺伝子型／実験）の代表。動員実験において、PBを、1実験群あたり少なくとも5匹のマウ

スから集めた。データは、平均±SDもしくは平均±IQR（四分位数間領域）として表される。ns：有意でない；* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ 。

【0125】

【図10】図10A、図10B、図10C、図10Dおよび図10Eは、ヘパリン硫酸プロテオグリカンの薬理的阻害がHSPC動員を誘発することをさらに示す。図10Aは、ビヒクル（PBS）もしくはヘパリンを受容するC57BL/6Jマウスにおける末梢WBC数を示す。図10Bは、ビヒクル（PBS）もしくはヘパリンを受容するC57BL/6Jマウスにおいてコロニー形成単位アッセイ（CFU）によって測定した末梢血循環前駆細胞を示す。図10Cは、ビヒクル、AMD3100もしくはVcam1中和抗体のみ、またはヘパリンと組み合わせて受容するC57BL/6Jマウスに由来するPB循環前駆細胞コロニーを示すCFUアッセイの代表的画像である。図10Dは、ビヒクル（PBS）もしくはヘパリンを受容するC57BL/6Jマウスに由来するCD45-TER119-Mx1+間葉細胞におけるVcam1タンパク質レベル定量を示す。図10Eは、G-CSFのみもしくはAMD3100と組み合わせて受容するExt1コントロールマウスもしくは変異マウス（CD45.2）のPBを注入したレシピエントCD45.1マウスの、移植16週間後での相対的PB再構成を示す。レシピエントマウスを致命的に照射し、放射線防御のためにCD45.1細胞を与えた。

【0126】

【図11】図11A、図11Bおよび図11Cは、Mx1+間葉細胞が、移植したHSPCの生着を制御することを示す。図11Aは、 10^6 および 8×10^6 CD45.1コンジュニックBM細胞を注入した非前処置コントロールマウス、ならびに 10^6 、 4×10^6 および 8×10^6 CD45.1コンジュニックBM細胞を注入した変異レシピエントマウスの全PB再構成を示すグラフである。図11Bは、Ext1変異レシピエントマウスへの 8×10^6 CD45.1コンジュニックBM細胞の非前処置移植の16週間後のPB分析を示す棒グラフであり、B細胞（B220）、骨髄系細胞（Mac1およびGr1）およびT細胞（CD3）への寄与を示す。図11Cは、ニッチにおいて発現されるEXT1/HSPGの機能的役割に関する提唱されたモデルの模式図である。n=5匹のマウス/遺伝子型。データは、平均±SEMとして表される。* $p < 0.05$ ；** $p < 0.01$ 。

【発明を実施するための形態】

【0127】

（発明の詳細な説明）

本開示は、幹細胞移植に関連して使用するための幹細胞および／もしくは前駆細胞（例えば、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞）の動員に関する。簡潔には、上記幹細胞移植プロセスは、被験体（例えば、ドナー）への動員薬剤の注射、骨髄空間から被験体の血液への被験体の幹細胞の動員、その動員した幹細胞を血液から（例えば、アフエレーシスを介して）集めること、その集めた幹細胞を（例えば、注入バッグ中に）保存するための準備、その集めて保存した動員幹細胞の低温保存、移植される予定の保存した動員幹細胞の生着のために被験体を前処置すること、上記幹細胞の前処置した被験体への移植、ならびに上記被験体における絶対的好中球数および血小板数を増大させることによって証明される生着および回復のうちのいずれかもしくは全てを含み得る。（Haematopoietic Stem Cell Mobilization and Apheresis: A Practical Guide for Nurses and Other Allied Health Care Professionals, European Group for Blood and Marrow Transplantation-Nurses Group（その内容は、本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。

【0128】

本開示は、幹細胞移植に関与する手順のうちのいずれかと関連する方法、組成物、薬剤

およびキット（例えば、幹細胞を動員するための方法、移植のために動員された幹細胞を採取するための方法、その後の移植のために、採取された動員幹細胞を保存するための方法、移植される幹細胞の増強された生着のために、被験体を前処置するための方法、幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法、幹細胞動員のために被験体を選択するための方法、ならびに上記方法における使用のための組成物、薬剤およびキット）の使用を企図する。

【0129】

HSPCの動員

【0130】

本発明のある種の局面は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法に関する。本明細書で使用される場合、「動員する」および「造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する」とは、第1の位置（例えば、幹細胞ニッチ、例えば、骨髄）から第2の位置（例えば、組織（例えば、末梢血）もしくは器官（例えば、脾臓））への造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移動を誘発する行為をいうために交換可能に使用される。本明細書で記載される研究は、ヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）が骨髄幹細胞ニッチにおける造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の保持を維持するのに関与することを示す。特に、本発明者らは、驚くべきことにかつ予測外なことに、エクソストシン-1（GeneID: 2131、EXT-1（EXT、LGS、TTV、LGC R、およびTRRPS 2としても公知）、ヘパラン硫酸の生成に必須のグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子）の欠失が、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を骨髄から出て行かせることを示した。驚くべきことに、かつ予測外なことに、本発明者らは、ヘパラン硫酸（例えば、内因性）の阻害（例えば、薬理的な）が、動員抵抗性が他の方法では不十分な動員を生じる状況においてすら、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強することをさらに示した。

【0131】

本明細書で開示されるある種の局面は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの組み合わせが、G-CSFのみ、もしくはプレリキサフォルと組み合わせて使用する造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員と比較して、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するにあたって有意により有効であるということを実証する、本明細書で記載される顕著な研究に依拠する。よって、いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト（例えば、Gro-beta）および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト（例えば、プレリキサフォル）を使用して造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員することに関する方法ならびに組成物を提供する。

【0132】

本明細書で開示されるある種の局面は、G-CSFおよび少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターの組み合わせが、G-CSFのみを使用する造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員と比較して、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するにあたって有意により有効であるということを実証する、本明細書で記載される顕著な研究に依拠する。よって、いくつかの局面において、本開示は、G-CSFおよび少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター（例えば、ヘパリン硫酸）の組み合わせを使用して造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員することに関する方法ならびに組成物を提供する。

【0133】

本明細書で開示されるある種の局面は、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストおよび少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターの組み合わせが、プレリキサフォルのみを使用する造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員と比較して、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するにあたって有意により有効であるということを実証する、本明細書で記載される顕著な研究に依拠する。よって、いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター（例えば、ヘパリン硫酸）および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト（例えば、プレリキサフォル）の組み合わせを使用し

て造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員することに関する方法ならびに組成物を提供する。

【0134】

よって、本発明は、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための種々の方法を提供する。

【0135】

一局面において、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法は、上記被験体においてエクソストシン1 (EXT-1) のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する。一局面において、被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員する工程を包含する。

10

【0136】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法のある種の局面は、一般に、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、およびG-CSFのうちの2種以上の組み合わせを使用することを包含する。

【0137】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための例示的方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、およびG-CSFからなる群より選択されるいずれか2種以上の動員薬剤の組み合わせを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を末梢血へと動員するために十分な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

20

【0138】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための別の例示的方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

30

【0139】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するためのさらに別の例示的方法は、G-CSFもしくは少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストのいずれかと組み合わせて少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0140】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するためのなおさらに別の例示的方法は、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストと組み合わせて少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

40

【0141】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するためのさらなる例示的方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストと組み合わせて少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0142】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するためのなおさらなる例示的方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストと組み合わせて少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血

50

に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0143】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するためのなおさらなる例示的方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、および少なくとも1種のCXCR2アゴニストの組み合わせを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0144】

被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するためのなお別の例示的方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよびG-CSFの組み合わせを、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体の末梢血に動員するために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0145】

本発明のある種の局面は、幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す個体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強することに関する。驚くべきことに、かつ予測外なことに、本明細書で記載される研究は、本明細書で記載される薬剤が糖尿病誘発性の動員障害を克服するにあたって有効であることを示す。よって、理論によって束縛されることは望まないが、本明細書で記載される薬剤は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す個体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するために使用され得ると考えられる。当業者に認識されるように、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す個体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の増強された動員は、例えば、中でも、細胞をその後の採取および移植のために上記被験体において細胞を動員するために、または上記被験体をその後の生着のために前処置するために、またはこれらの組み合わせなどのために、種々の有用な適用を有する。

【0146】

一局面において、本発明は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法を提供し、上記方法は、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する。一局面において、本発明は、糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法を提供し、上記方法は、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する。

【0147】

一局面において、本発明は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法を提供し、上記方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する。一局面において、本発明は、糖尿病誘発性の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法を提供し、上記方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の有効量を上記被験体に投与し、それによって、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強する工程を包含する。

【0148】

いくつかの実施形態において、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するための方法は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体を選択する工程を包含する。

造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す被験体を選択する工程は、当業者に利用可能な任意の技術に従って行われ得る。例えば、上記被験体は、従来の動員薬剤（例えば、G-CSF）に対して不十分な動員を示すことについて選択され得る。いくつかの実施形態において、上記被験体は、動員障害を誘発することが報告されている疾患、状態もしくは障害（例えば、糖尿病）に罹患している被験体である。動員障害を示す被験体を選択するための他の適切な技術は、当業者に明らかである。

【0149】

本明細書で使用される場合、「造血幹細胞」とは、造血系統へ分化し得、骨髓系統（例えば、単球およびマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板、樹状細胞）、およびリンパ系統（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞）を含め、全ての血球タイプ（例えば、白血球および赤血球）を生じ得る幹細胞をいう。「幹細胞」とは、これらが複数の細胞タイプを形成する能力（多能性）およびこれらが自己再生する能力によって定義される。造血幹細胞は、例えば、細胞表面マーカー（例えば、CD34-、CD133+、CD48-、CD150+、CD244-、cKit+、Sca1+）によって、ならびに系統マーカーの欠如（例えば、B220、CD3、CD4、CD8、Mac1、Gr1、およびTer119などについて陰性）によって同定され得る。造血幹細胞を同定および分析するための方法は、Challen et al.（例えば、「Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification and Analysis」、Cytometry A. 2009; 75(1): 14-24（その全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと）によって総説されている。本明細書で記載される方法は、移植に有用な任意の幹細胞（末梢血幹細胞、骨髓幹細胞、臍帯由来幹細胞、遺伝的に改変された幹細胞などが挙げられるが、これらに限定されない）を企図する。

【0150】

本明細書で使用される場合、用語「造血前駆細胞」とは、造血細胞系統（一般には、自己再生しない）になるようにコミットされ、短期造血幹細胞（ST-HSC）、多分化能前駆細胞（MPP）、骨髓系共通前駆細胞（CMP）、顆粒球-単球前駆細胞（GMP）、巨核球-赤血球前駆細胞（MEP）、およびコミットされたリンパ系前駆細胞（CLP）が挙げられるが、これらに限定されない造血系のいくつかの細胞タイプ（例えば、顆粒球、単球、赤血球、巨核球、B細胞およびT細胞）へと分化し得る多能性細胞を包含する。造血前駆細胞の存在は、完全メチルセルロースアッセイ（complete methylcellulose assay）において、コロニー形成単位細胞（CFU-C）として機能的に、または当業者に公知のアッセイを使用して細胞表面マーカー（例えば、CD45-、CD34+、Ter119-、CD16/32、CD127、cKit、Sca1）の検出を通じて表現型として決定され得る。

【0151】

一般に、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが、それらの細胞ニッチにおける造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の接着の維持を担う任意の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員し得る。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞は、KLSCD150+CD48-細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞は、CD34-CD133+細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、骨髓系共通前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、顆粒球／単球前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、巨核球／赤血球前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、コミットされたリンパ系前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、骨髓系共通前駆細胞、顆粒球／単球前駆細胞、巨核球／赤血球前駆細胞の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、上記造血前駆細胞は、CD150-CD48-CD244+細胞を含む。

いくつかの実施形態において、上記造血前駆細胞は、 $CD150-CD48+CD244+$ 細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記造血前駆細胞は、 $Lin-SCA-1-c-Kit+CD34+CD16/32^{mid}$ 細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記造血前駆細胞は、 $Lin-SCA-1-c-kit+CD34-CD16/32^{low}$ 細胞を含む

【0152】

本発明は、当業者にとって望ましい任意の目的のために造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員することを企図する。当業者は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員が、例えば、末梢血中の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の数を増大させることによって、移植のために（例えば、アフェレーシスを介して）採取され得る造血幹細胞および／もしくは前駆細胞のアクセスがよりしやすい供給源を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記被験体において動員された幹細胞および／もしくは前駆細胞を採取する工程を包含する。いくつかの実施形態において、上記方法は、上記採取された幹細胞および／もしくは前駆細胞をこのような移植が必要な被験体へと移植する工程を包含する。いくつかの実施形態において、被験体において動員された上記造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、上記被験体への自家移植のために採取される。いくつかの実施形態において、上記被験体において動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、レシピエント被験体への同種異系移植のために採取される。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、従来の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員レジメン（例えば、 $G-CSF$ ）を利用する不十分な動員に対する応答において、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有用である。

【0153】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、組換え顆粒球コロニー刺激因子（ $G-CSF$ ）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ $GM-CSF$ ）、インターロイキン-3（ $IL-3$ ）、およびこれらのグリコシル化形態もしくは peg 化形態からなる群より選択されるサイトカインを上記被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、 $G-CSF$ またはそのグリコシル化形態もしくは peg 化形態とヘパリンとの組み合わせを、上記被験体に投与する工程を包含する。

【0154】

いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞および／もしくは前駆細胞は、例えば、幹細胞ニッチ（例えば、骨髄）（その中に、上記移植される細胞が生着し得る）において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の数を減少させることによって、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置するために、被験体において動員される。

【0155】

本明細書で開示される本発明の方法（例えば、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法）の局面は、その動員された幹細胞（例えば、 $CD34^{+}$ および／もしくは $CD133^{+}$ 末梢血幹細胞）を採取する工程を包含する。よって、いくつかの局面において、本開示は、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法を提供する。末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための例示的方法は、以下の工程を包含する：（a）少なくとも1種の $CXCR2$ アゴニスト、少なくとも1種の $CXCR4$ アンタゴニスト、および少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターからなる群より選択される2種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

【0156】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための方法は、以下の工程を包含する：（a）少なくとも1種の

C X C R 2 アゴニスト、少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニスト、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、および G - C S F からなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

【0157】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体において移植するために採取するための方法は、以下の工程を包含する：（a）少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニスト、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、および G - C S F からなる群より選択される 2 種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

10

【0158】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体において移植するために採取するための方法は、以下の工程を包含する：（a）少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニスト、少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニスト、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、および G - C S F からなる群より選択される 3 種以上の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

20

【0159】

末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するための別の例示的方法は、以下を包含する：（a）少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストおよび少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

【0160】

末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するためのさらに別の例示的方法は、以下を包含する：（a）少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも 1 種の C X C R 4 アンタゴニストを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

30

【0161】

末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するためのさらに別の例示的方法は、以下を包含する：（a）少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも 1 種の C X C R 2 アゴニストを、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

40

【0162】

末梢血幹細胞を、このような細胞が必要な被験体における移植のために採取するためのさらになお別の例示的方法は、以下を包含する：（a）少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターおよび G - C S F を、末梢血幹細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞を、上記被験体における移植のために上記ドナーから採取する工程。

【0163】

採取、前処置および移植に関する上記の説明が、ここで記載される採取方法に等しく適

50

用可能であることは認識されるべきである。

【0164】

本開示は、動員された幹細胞を採取するおよび／もしくは集めるための任意の適切な方法の使用を企図する。いくつかの実施形態において、上記動員された造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を採取する工程は、アフエレーシスを含む。本明細書で記載される研究は、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト（例えば、Gro-betaもしくはGro-beta Δ 4）および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト（例えば、プレリキサフォルもしくはMozobil（登録商標））の組み合わせが、幹細胞を迅速にかつ効率的に動員し、そしてG-CSFおよびプレリキサフォル（単独もしくは組み合わせにおいて）と比較して、増大した効率を示すことを示す。結果として、いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、上記アフエレーシス手順が、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストが上記被験体に投与されるその同日に行われることを可能にする。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、上記アフエレーシス手順が、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFが上記被験体に投与されるその同日に行われることを可能にする。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、上記アフエレーシス手順が、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターが上記被験体に投与されるその同日に行われることを可能にする。他の研究において、動員された幹細胞を被験体（例えば、ドナー）からアフエレーシスを介して採取する工程は、ヘルスケア施設に1回訪れる間に、上記動員薬剤が上記被験体に投与されるその同日に行われ得る。

10

20

【0165】

いくつかの場合、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの投与後に早ければ15分程度で開始し得る。いくつかの実施形態において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの投与後に早ければ20分、22分、25分、30分、35分、40分、47分、52分、58分もしくは1時間程度で開始し得る。

【0166】

いくつかの場合において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸アンタゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの投与後に早ければ15分程度で開始し得る。いくつかの実施形態において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの投与後に早ければ20分、22分、25分、30分、35分、40分、47分、52分、58分もしくは1時間程度で開始し得る。

30

【0167】

いくつかの場合において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸アンタゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストの投与後に早ければ15分程度で開始し得る。いくつかの実施形態において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストの投与後に早ければ20分、22分、25分、30分、35分、40分、47分、52分、58分もしくは1時間程度で開始し得る。

40

【0168】

いくつかの場合において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸アンタゴニストおよびG-CSFの投与後に早ければ15分程度で開始し得る。いくつかの実施形態において、上記アフエレーシス手順は、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFの投与後に早ければ20分、22分、25分、30分、35分、40分、47分、52分、58分もしくは1時間程度で開始し得る。

【0169】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの投与は、単一セッションのアフエレーシス

50

10

20

30

40

50

$6 / \text{k g}$ 体重 $\sim 6 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、単一セッションのアフェレーシスで上記レシピエントの体重 1 k g あたり約 $1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ の間の細胞用量のために十分な CD 3 4 + 末梢血幹細胞が集められる。

【0172】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターおよび G-C S F の投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $1 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重 $\sim 10 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、単一セッションのアフェレーシスで上記レシピエントの体重 1 k g あたり約 $1 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6$ の間の細胞用量のために十分な CD 3 4 + 末梢血幹細胞が集められる。いくつかの実施形態において、上記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターおよび G-C S F の投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $2 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重 $\sim 8 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、単一セッションのアフェレーシスで上記レシピエントの体重 1 k g あたり約 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ の間の細胞用量のために十分な CD 3 4 + 末梢血幹細胞が集められる。いくつかの実施形態において、上記少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビターおよび G-C S F の投与は、単一セッションのアフェレーシスで約 $3 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重 $\sim 6 \times 10^6 / \text{k g}$ 体重の間の細胞用量を採取するために、上記被験体において循環末梢血幹細胞のある量を動員する。いくつかの実施形態において、単一セッションのアフェレーシスで上記レシピエントの体重 1 k g あたり約 $1 \times 10^6 \sim 10^6 \times 10^6$ の間の細胞用量のために十分な CD 3 4 + 末梢血幹細胞が集められる。

【0173】

生着のための前処置

【0174】

本発明のある種の局面は、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞（例えば、末梢血幹細胞、骨髓幹細胞、臍帯由来幹細胞、遺伝子改変幹細胞など）の生着のために被験体を前処置するための方法に関する。

【0175】

一般には、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、本明細書で記載される 1 種以上の幹細胞動員薬剤を利用する。いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書で記載される造血幹細胞動員薬剤を利用して、移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法に関する。いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書で記載される造血幹細胞動員薬剤を利用して、移植される骨髓幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法に関する。いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書で記載される造血幹細胞動員薬剤を利用して、移植される臍帯由来幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法に関する。いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書で記載される造血幹細胞動員薬剤を利用して、移植される遺伝子改変幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法に関する。いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書で記載される造血幹細胞動員薬剤を利用して、移植される末梢血幹細胞、骨髓幹細胞、末梢血幹細胞、および遺伝子改変幹細胞からなる群より選択される幹細胞の混合物を含む移植される幹細胞集団の生着のために被験体を前処置するための方法に関する。

【0176】

いくつかの局面において、本開示は、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法を提供し、上記方法は、少なくとも 1 種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも 1 種の CXCR 2 アゴニスト、および少なくとも 1 種の CXCR 4 アンタゴニストからなる群より選択される幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員薬剤を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから細胞（例えば、幹細胞および／もしくは前駆細胞）を枯渇させるために有効な

量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0177】

一局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0178】

別の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0179】

一局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0180】

さらに別の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0181】

さらに別の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、Gro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0182】

なおさらなる別の局面において、本開示は、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法を提供し、上記方法は、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0183】

他の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、Mozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体を、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0184】

ある種の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のため

に、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0185】

ある種の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

10

【0186】

ある種の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

【0187】

ある種の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

20

【0188】

ある種の局面において、移植される幹細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、およびG-CSFからなる群より選択される2種以上の幹細胞動員薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記被験体の幹細胞ニッチから幹細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与し、それによって移植される幹細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

30

【0189】

いくつかの実施形態において、上記除去される幹細胞および／もしくは前駆細胞は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記幹細胞ニッチは、骨髄を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、末梢血幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、採取された動員末梢血幹細胞（例えば、CD34⁺および／もしくはCD133⁺）を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、採取された動員末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞（例えば、CD34⁺および／もしくはCD133⁺）を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、臍帯由来幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、骨髄幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記移植される幹細胞は、遺伝子改変幹細胞および／もしくは前駆細胞を含む。

40

【0190】

本明細書で開示される方法（例えば、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法）の局面は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、末梢血幹細胞移植が必要な被験体を前処置する工程を包含する。本明細書で使用される場合、幹細胞（増殖させた造血幹細胞が挙げられる）の「生着する」および「生着」は、上記幹細胞がインビボで存続する動物へと、例えば、注射によって上記幹細胞の場所を定めることを意味する。こ

50

れは、造血幹細胞が、例えば、進行中の血球形成に寄与する能力によって容易に測定され得る。本明細書で使用される場合、「生着のために被験体を前処置する」、「幹細胞ニッチを空にする」および「ニッチの空き」を作るとは、健康な移植される幹細胞（例えば、末梢血幹細胞、骨髄幹細胞、臍帯由来幹細胞、遺伝子改変幹細胞、最小限に操作された幹細胞など）の上記被験体の幹細胞ニッチ（例えば、骨髄）におけるその後の生着のために、上記幹細胞ニッチにおいて細胞（例えば、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞）の上記量を枯渇させるプロセスをいうために、交換可能に使用される。「ニッチを空にする薬剤」とは、「ニッチの空き」を作る薬剤をいう。本明細書で記載される動員薬剤（例えば、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員薬剤）が移植される幹細胞のその後の生着のために、被験体を前処置するために使用される状況において、上記動員薬剤は、ニッチを空にする薬剤ともいわれることは、認識されるはずである。本開示は、本明細書で記載される薬剤（例えば、動員薬剤および／もしくはニッチを空にする薬剤）が、幹細胞ニッチ（例えば、骨髄）から造血幹細胞、CMP、GMP、MEP、および／もしくはCLPの量を減らすために使用され得ることを企図する。本開示は、特定の被験体の処置の過程で認識される任意の前処置方法、ならびに望ましい移植用供給源である任意の幹細胞供給源を企図する。

10

【0191】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターからなる群より選択される少なくとも2種のニッチを空にする薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

20

【0192】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、およびG-CSFからなる群より選択される少なくとも2種のニッチを空にする薬剤の組み合わせを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

30

【0193】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0194】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

40

【0195】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0196】

50

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-C S Fを、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0197】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストおよび少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストを含む組成物を、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

10

【0198】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストを含む組成物を、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0199】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストを含む組成物を、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

20

【0200】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-C S Fを含む組成物を、移植される幹細胞の上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおけるその後の生着のために、上記前処置される被験体の幹細胞ニッチにおいて幹細胞および／もしくは前駆細胞を枯渇させるために有効な量で上記被験体に投与する工程を包含する。

【0201】

いくつかの実施形態において、上記除去される幹細胞および／もしくは前駆細胞は、造血幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記幹細胞ニッチは、骨髄を含む。

30

【0202】

いくつかの実施形態において、上記被験体を前処置する工程は、化学療法もしくは放射線療法を上記被験体に投与して、上記被験体の骨髄ニッチに残っているいかなる癌細胞をも死滅させ、健康な末梢血幹細胞が上記被験体の骨髄ニッチへと移植され生着する余地があるようにする工程を包含する。このような前処置する工程は、いくらかの患者、特に、上記化学療法もしくは放射線療法によって引き起こされる毒性の全身効果（これは非悪性血液疾患の処置を受けている患者が耐えられないもしくは耐えるのに気が進まない）が原因で、「毒性前処置」と本明細書でいわれる。

40

【0203】

生着のために患者を前処置するための従来法は、代表的には、全身照射および高用量化学療法を包含し、これらは処置プランの一部として放射線療法もしくは高用量化学療法を要する悪性腫瘍に罹患していない患者（例えば、H I Vおよび他の免疫不全）にとって毒性があり、望ましくない。

【0204】

化学療法もしくは放射線療法と組み合わせて被験体にG-C S Fを投与することによって代表的には行われる毒性前処置とは対照的に、動員薬剤として少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストおよび少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストを使用する本明細書で記載される方法は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために被験体を前処置し得るの

50

で、非毒性前処置を可能にする。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために被験体を前処置し得る動員薬剤として少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用し、それによって、非毒性前処置を可能にする。いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、化学療法も放射線療法もなしで生着のために被験体を前処置し得る動員薬剤として少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを使用し、それによって、非毒性前処置を可能にする。

【0205】

従来の細胞傷害性前処置法とは対照的に、本発明は、非細胞傷害性前処置法を提供する。特に、本発明は、驚くべきことにかつ予測外なことに、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞が、細胞傷害性前処置の非存在下で、インビボでEXT-1欠損動物に生着することを示した。理論によって拘束されることは望まないが、例えば、EXT-1阻害もしくはVCAM-1阻害を介する、被験体でのヘパラン硫酸プロテオグリカンの阻害は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために、上記被験体を前処置するための有効な代替の非細胞傷害性方法を提供する。

10

【0206】

一局面において、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な、レベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。一局面において、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために被験体を前処置するための方法は、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程を包含する。

20

【0207】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、化学療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、放射線療法なしで生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、間質細胞を弱らせることなく生着のために前処置される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、上記被験体にG-CSFを投与することなく生着のために前処置される。

30

【0208】

本明細書で記載される前処置法のうちのいずれかが、幹細胞（例えば、末梢血幹細胞、例えば、CD34⁺末梢血幹細胞もしくはCD133⁺末梢血幹細胞、骨髓幹細胞、臍帯由来幹細胞、遺伝子改変幹細胞）を、上記移植される細胞の生着のために上記被験体に移植する工程を包含し得ることは、認識されるべきである。

40

【0209】

動員されたHSPCの移植

【0210】

本発明の局面（例えば、幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法）は、移植が必要な被験体に幹細胞を移植する工程を包含する。本明細書で開示される方法は、何らかの種の幹細胞をこのような移植（例えば、末梢血幹細胞、骨髓幹細胞、臍帯由来幹細胞、遺伝子改変幹細胞など）が必要な被験体に移植することを企図する。

【0211】

いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法（例えば、造血幹細胞を動員するための方法）は、採取された末梢血幹細胞を、移植が必要な被験体に移植する工程を

50

包含する。

【0212】

処置法

【0213】

本発明のある種の局面は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法に関する。造血幹細胞および／もしくは前駆細胞（H P S C）移植は、相変わらず、多くの血液障害に関する常套手段としての根治療法である。しかし、成功裡のH P S C移植は、十分なH S P Cをそれらの採取および患者への移植のために循環の中に動員する能力、ならびにその移植されるH P S Cのその後の生着のために骨髓ニッチを効率的に空にするのを起こせる能力に依存する。しかし、動員を誘発し、その後の生着のために骨髓ニッチを空にするための従来法には、いくつかの欠点がある。例えば、現在の動員方法（例えば、G－C S F誘発）は、動員抵抗性になりやすく、このことは、いくらかの個体にとって救命的な治療を危うくし得る。同様に、生着のために患者を前処置するための現在の方法は、代表的には、全身照射および高用量化学療法を含み、これらは、処置プランの一部として放射線療法もしくは高用量化学療法を要する悪性腫瘍には罹患していない患者（例えば、H I V患者および他の免疫不全）にとって毒性でありかつ望ましくない。よって、本明細書で記載される方法は、例えば、動員抵抗性が別の方法では不十分な動員（例えば、動員障害）を生じる状況下ですら、強い造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を提供することによって、ならびに細胞傷害性前処置の非存在下で、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の増強された生着のために被験体を前処置する非細胞傷害性前処置法を提供することによって、H P S C移植の安全性および効力を増強する。

【0214】

一局面において、処置が必要な被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法は、（a）上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な、レベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を上記被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程；ならびに（b）造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体に移植する工程であって、ここで上記移植された造血幹細胞は、上記被験体の骨髓に生着し、それによって、上記被験体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置する工程を包含する。一局面において、処置が必要な被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための方法は、（a）上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効なヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤のある量を上記被験体に投与し、それによって、細胞傷害性前処置の非存在下で、移植される造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の生着のために上記被験体を前処置する工程；ならびに（b）造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記被験体に移植する工程であって、ここで上記移植された造血幹細胞は、上記被験体の骨髓に生着し、それによって、上記被験体における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置する工程を包含する。

【0215】

処置が必要な被験体において幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための例示的方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のC X C R 2 アゴニストおよび少なくとも1種のC X C R 4 アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員薬剤の組み合わせを、幹細胞および／もしくは前駆細胞ドナーにおいて循環幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記ドナーから幹細胞移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

【0216】

いくつかの実施形態において、処置が必要な被験体において幹細胞移植を要する疾患を

処置するための方法は、（a）少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、幹細胞ドナーにおいて循環幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環幹細胞を上記ドナーから幹細胞移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

【0217】

いくつかの実施形態において、処置が必要な被験体において幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、幹細胞ドナーにおいて循環幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環幹細胞を上記ドナーから幹細胞移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

10

【0218】

いくつかの実施形態において、処置が必要な被験体において幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを、幹細胞ドナーにおいて循環幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環幹細胞を上記ドナーから幹細胞移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

【0219】

いくつかの実施形態において、処置が必要な被験体において幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、（a）少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFを、幹細胞ドナーにおいて循環幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環幹細胞を上記ドナーから幹細胞移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

20

【0220】

処置が必要な被験体において末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患を処置するための別の例示的方法は、（a）少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員薬剤の組み合わせを、末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞ドナーにおいて循環末梢血幹細胞を動員するために有効な量で上記ドナーに投与する工程；ならびに（b）上記動員された循環末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞を上記ドナーから末梢血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植が必要な被験体に移植する工程を包含する。

30

【0221】

採取、前処置、および移植に関する上記の説明が、ここで記載される処置方法の局面に等しく適用可能であることは、理解されるべきである。

【0222】

いくつかの実施形態において、幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、血液悪性腫瘍の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。

【0223】

いくつかの実施形態において、幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、非悪性疾患の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。

40

【0224】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、血液悪性腫瘍の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。

【0225】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、非悪性疾患の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。

【0226】

いくつかの実施形態において、末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法は、心臓修復もしくは心筋症（cardiac myopathy）の従来処置の治療上有効な量を上記被験体に投与する工程を包含する。動員されたCD34⁺および／もしくは

50

C D 1 3 3⁺細胞が心臓修復のために使用され得る例示的適応症としては、わずか2～3例を挙げれば、アンギナ（例えば、難治性狭心症）の処置、心筋虚血（例えば、慢性心筋虚血）における心機能の改善が挙げられるが、これらに限定されない。

【0227】

本明細書で使用される場合、「treat（処置する）」、「treatment（処置）」、「treating（処置すること）」、もしくは「amelioration（改善）」とは、疾患、障害もしくは医学的状态を参照して使用される場合、その目的が症状もしくは状態の進行もしくは重症度を改善する（reverse）か、緩和するか、改善する（ameliorate）か、阻害するか、遅らせるかもしくは止めることである、状態の治療的処置をいう。用語「処置すること」とは、状態の少なくとも1つの有害効果もしくは症状を低下させることもしくは緩和することを含む。処置は、一般に、1以上の症状もしくは臨床マーカーが低下される場合に「有効」である。あるいは、処置は、状態の進行が低下するもしくは停止する場合に「有効」である、すなわち、「処置」は、症状もしくはマーカーの改善を含むだけでなく、処置の非存在下で、予測される症状の進行もしくは悪化の停止もしくは少なくとも遅延もまた含む。有益なもしくは望ましい臨床結果としては、1以上の症状の緩和、欠損の程度の減少、例えば、本明細書で記載される状態、疾患もしくは障害の状態の安定した（すなわち、悪化していない）状態、または本明細書で記載される状態、疾患もしくは障害の始まりの遅延もしくは緩慢化、および処置の非存在下で、予測されるものと比較した場合の寿命の長期化が挙げられるが、これらに限定されない。

【0228】

動員薬剤（例えば、G-CSF）および細胞傷害性前処置法（例えば、化学療法もしくは放射線療法）の別個の投与を代表的には要する従来法とは対照的に、本明細書で記載される方法、組成物および薬剤のある種の実施形態は、単一薬剤の投与を介する造血幹細胞および／もしくは前駆細胞のその後の生着のために、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞ならびに非細胞傷害性前処置の二重の動員を可能にすることは、認識されるべきである。例えば、本明細書で記載される薬剤が、自家造血幹細胞および／もしくは前駆細胞移植のために被験体に投与される場合、上記薬剤は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を効率的に動員すると同時に、いったんそれらが（例えば、アフェレーシスを介して）採取されたら、それら細胞の生着のために上記被験体を前処置する。

【0229】

本明細書で使用される場合、用語「投与すること」は、例えば当業者に周知の技術に従って薬学的に受容可能な組成物へと製剤化される本明細書で記載される薬剤（例えば、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤またはヘパラン硫酸のレベルもしくは活性を阻害する薬剤）の、作用部位への送達を生じる方法もしくは経路による被験体への配置をいう。EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤、またはこのような薬剤を含む薬学的組成物は、上記被験体において有効な処置を生じる任意の適切な経路によって投与され得る。

【0230】

本発明は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植が望ましい疾患、障害もしくは状態と関連する任意の疾患、障害、状態もしくは合併症を処置することを企図する。いくつかの実施形態において、本開示は、このような処置が必要な被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置するための方法を提供する。このような疾患の例としては、例えば、血液悪性腫瘍および非悪性血液疾患が挙げられる。

【0231】

いくつかの実施形態において、上記疾患は、血液悪性腫瘍である。本明細書で記載される方法で処置され得る例示的な血液悪性腫瘍としては、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリ

ンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、上記疾患は、非悪性障害である。本明細書で記載される方法で処置され得る例示的な非悪性疾患の例としては、骨髄線維症、骨髄異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染色性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群が挙げられるが、これらに限定されない。本開示はまた、心筋修復のために本明細書で記載される方法に従って動員される細胞の使用を企図する。例えば、ある種の動員されたCD34⁺および／もしくはCD133⁺細胞は、新血管新生に寄与し得、そして損傷した心組織の虚血組織の血管形成もしくは再灌流を促進し得る。このような処置が必要な被験体を同定するための方法は、本明細書で記載される。このような被験体を同定するための他の適切な方法は、当業者に明らかである。

10

【0232】

被験体

【0233】

本明細書で使用される場合、「被験体」とは、ヒトもしくは動物を意味する。通常、上記動物は、脊椎動物（例えば、霊長類、齧歯類、飼い慣らされた動物もしくは狩猟用動物）である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカーク（macaque）（例えば、アカゲザル）が挙げられる。齧歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが挙げられる。飼い慣らされた動物および狩猟用動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、野牛、スイギュウ、ネコ種（例えば、イエネコ）、イヌ種（例えば、イヌ、キツネ、オオカミ）、トリ種（例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ）および魚類（例えば、マス、ナマズおよびサケ）が挙げられる。患者もしくは被験体としては、前述のうちのいずれかの部分セット（例えば、ヒト、霊長類もしくは齧歯類のような1以上の群もしくは種を排除して、上記のうちの全て）が挙げられる。ある種の実施形態において、上記被験体は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。用語「患者」、「個体」および「被験体」は、本明細書で交換可能に使用される。好ましくは、上記被験体は、哺乳動物である。上記哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、もしくはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、有利なことには、例えば、動物モデル、例えば、血液悪性腫瘍の動物モデルを示す被験体として使用され得る。さらに、本明細書で記載される方法は、飼い慣らされた動物および／もしくはペットを処置するために使用され得る。被験体は、雄性もしくは雌性であり得る。

20

30

【0234】

被験体は、（例えば、本明細書で記載される血液悪性腫瘍もしくは非悪性疾患の）処置が必要な、本明細書で記載される状態、疾患もしくは障害、またはこのような状態に関連する1以上の合併症を有するまたはこれらに罹患していると以前に診断されたか同定され、そして必要に応じて、しかしある状態、もしくはこの状態に関する1以上の合併症の処置をこれまで受ける必要はなかった被験体であり得る。あるいは、被験体は、ある状態に関する1以上の合併症の処置が必要なこのような状態を有すると以前に診断されなかった被験体であり得る。むしろ、被験体は、ある状態の1以上のリスク因子もしくはこのような状態に関する1以上の合併症を示す被験体を含み得る。特定の状態の処置が「必要な被験体」は、その状態を有するか、その状態を有すると診断されたか、または所定の参照集団に対してその状態を発生させるリスクが増大した被験体であり得る。

40

【0235】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、血液悪性腫瘍、例えば、本明細書で記載される血液悪性腫瘍と診断されたか、それらを有する疑いがあるか、また

50

はそれらを発生させるリスクがある被験体を選択する工程を包含する。

【0236】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、非悪性疾患、例えば、本明細書で記載される非悪性疾患と診断されたか、それらを有する疑いがあるか、またはそれらを発生させるリスクがある被験体を選択する工程を包含する。

【0237】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、糖尿病と診断されたか、それらを有する疑いがあるか、またはそれらを発生させるリスクがある被験体を選択する工程を包含する。

【0238】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、動員レジメンに対する応答において不十分な動員を示す被験体を選択する工程を包含する。例えば、第1の動員レジメンを投与される被験体は、上記被験体において造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員を増強するために、本明細書で記載される薬剤の投与のために選択され得る。本発明は、任意の動員薬剤もしくはレジメンに対する応答において不十分な動員を示す被験体において動員を増強することを企図する。いくつかの実施形態において、上記被験体は、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）に対する応答において不十分な動員を示す。いくつかの実施形態において、上記被験体は、幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員障害を示す。

【0239】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、造血幹細胞動員薬剤の以前の投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて被験体を選択する工程をさらに包含する。本明細書で記載される研究は、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストとの組み合わせでの少なくとも1種のCXCR2アゴニストの投与が、G-CSFのみ、プレリキサフォルのみ、もしくはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与より有意に有効であることを示す。よって、いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、G-CSFのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて被験体を選択する工程をさらに包含する。本明細書で記載される研究は、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストとの組み合わせでの少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターの投与が、プレリキサフォルのみの投与より有意に有効であり、G-CSFとの組み合わせでの少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターの投与がG-CSFのみの投与より有意に有効であることをさらに示す。よって、いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、G-CSFのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて被験体を選択する工程をさらに包含する。いくつかの実施形態において、上記被験体は、プレリキサフォルのみの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。いくつかの実施形態において、上記被験体は、G-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示すことについて選択される。

【0240】

このような実施形態において、被験体は、本明細書で記載される教示に従って、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用する再動員のために選択され得る。例示的实施形態において、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用する造血幹細胞再動員から利益を得る被験体を選択するための方法は、G-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程を包含し、ここでG-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用する造血幹細胞再動員から利益を得る被験体である。

【0241】

このような実施形態において、被験体は、本明細書で記載される教示に従って、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用する再動員のために選択され得る。例示的实施形態において、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用する造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体を選択するための方法は、G-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程を包含し、ここでG-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを使用する造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体である。

10

【0242】

このような実施形態において、被験体は、本明細書で記載される教示に従って、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを使用する再動員のために選択され得る。例示的实施形態において、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを使用する造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体を選択するための方法は、G-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程を包含し、ここでG-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを使用する造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体である。

20

【0243】

このような実施形態において、被験体は、本明細書で記載される教示に従って、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFを使用する再動員のために選択され得る。例示的实施形態において、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFを使用する造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体を選択するための方法は、G-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体を同定する工程を包含し、ここでG-CSFおよびプレリキサフォルからなる群より選択される動員薬剤もしくはレジメンの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-CSFを使用する造血幹細胞再動員から利益を受ける被験体である。

30

【0244】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、血液悪性腫瘍を示す患者である。例示的な血液悪性腫瘍としては、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、びまん性大細胞型B細胞非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性B細胞非ホジキンリンパ腫、T細胞非ホジキンリンパ腫、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、および若年性骨髄単球性白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0245】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、血液悪性腫瘍と診断された被験体を選択する工程をさらに包含する。血液悪性腫瘍と関連する障害に罹患している被験体は、示した症状に基づいて選択され得る。例えば、血液悪性腫瘍に罹患している被験体は、疲労、不定愁訴、息切れ、虚弱、過剰もしくは容易にあざができやすいこと、歯茎の出血もしくは頻繁な鼻血、再発性の感染もしくは発熱、寝汗、体重減少、食欲不振、リンパ節腫脹、腹部臓器の肥大に起因するしこりもしくは膨張、腹痛、骨痛、背痛、錯乱、譫妄、頭痛、視覚障害、体液貯留、排尿の減少という症状を示し得る。

【0246】

50

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、血液悪性腫瘍を発生させるリスクがある被験体を選択する工程をさらに包含する。血液悪性腫瘍を発生させるリスクがある被験体は、家族歴（例えば、1998～2001年の間にリンパ腫を有すると診断された患者の研究は、何らかの血液悪性腫瘍の、および特に何らかのリンパ腫の陽性家族歴を有する個体については、非ホジキンリンパ腫のリスクが増大していることを示した；Mensah et al. Non-Hodgkin's lymphoma and family history of hematological malignancy. Am J Epidemiol. 2007 165 (2) : 126-33を参照のこと）に基づいて、もしくは示された症状に基づいて、選択され得る。

【0247】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、血液悪性腫瘍を有する疑いがある被験体を選択する工程をさらに包含する。血液悪性腫瘍を有する疑いがある被験体は、家族歴、診断検査（例えば、白血病もしくはリンパ腫と関連する転座について）に基づいて、または示した症状もしくはこれらの組み合わせに基づいて、選択され得る。

【0248】

いくつかの実施形態において、上記被験体は、非悪性血液疾患を示す患者である。例示的な非悪性血液疾患としては、骨髓線維症、骨髓異形成症候群、アミロイドーシス、重症再生不良性貧血、発作性夜間ヘモグロビン尿症、免疫性血球減少症、全身性強皮症、関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、クローン病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、ファンコーニ貧血、鎌状赤血球症、ベータサラセミアメジャー、ハーラー症候群（MPS-IH）、副腎白質ジストロフィー、異染性白質ジストロフィー、家族性血球貪食性リンパ組織球症および他の組織球障害、重症複合免疫不全症（SCID）、ならびにウィスコット・オルドリッチ症候群が挙げられるが、これらに限定されない。

【0249】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、非悪性血液疾患と診断された被験体を選択する工程をさらに包含する。非悪性血液疾患と関連する障害に罹患している被験体は、示した症状に基づいて選択され得る。例えば、鎌状赤血球症（例えば、鎌状赤血球貧血症）に罹患している被験体は、定期的な疼痛エピソード、手および足の腫脹、頻繁な感染症、および成長遅延という症状を示し得る。

【0250】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、非悪性血液疾患を発生させるリスクがある被験体を選択する工程をさらに包含する。非悪性血液疾患を発生させるリスクがある被験体は、家族歴（例えば、鎌状赤血球形質を有する親をもつ小児は、鎌状赤血球症を発生させるかもしくはこれを有するリスクがあり得る）、起源（例えば、アフリカ、インドおよび地中海人種の子孫は、鎌状赤血球症を発生させるリスクがより高いと考えられる）、診断検査（例えば、βグロビン遺伝子における点変異は、鎌状赤血球症および／もしくはサラセミアのスクリーニングのために使用され得る）に基づいて、または示した症状に基づいて、選択され得る。

【0251】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、非悪性血液疾患を有する疑いのある被験体を選択する工程をさらに包含する。非悪性血液疾患を有する疑いのある被験体は、家族歴、診断検査に基づいて、または示した症状もしくはこれらの組み合わせに基づいて、選択され得る。

【0252】

いくつかの実施形態において、本明細書で記載される方法は、心臓修復の必要がある被験体を選択する工程をさらに包含する。心臓修復の必要がある被験体は、例えば、急性虚血性傷害および／もしくは慢性心筋症に起因する、損傷した心組織の履歴に基づいて選択され得る。

【0253】

組成物

【0254】

本開示は、本明細書で記載される薬剤（例えば、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の動員薬剤）を含む組成物を企図する。いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストを含む組成物を提供する。いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物を提供する。いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターを含む組成物を提供する。

【0255】

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物を提供する。上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物は、造血幹細胞の動員および移植を包含する任意の適用のために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、他の動員処置に対して不十分に応答するか、または他の動員処置に対する応答において動員しない被験体において、造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-CSFのみ、およびプレリキサフォルのうちの1種以上の投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、幹細胞ニッチから末梢血への幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で幹細胞ニッチから末梢血へ幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で骨髄ニッチから末梢血へ造血幹細胞を動員する。

【0256】

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物を提供する。上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物は、造血幹細胞の動員および移植を含む任意の適用のために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、他の動員処置に対して不十分に応答するか、または他の動員処置に対する応答において動員しない被験体において、造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-CSFのみ、もしくはプレリキサフォルのみ、もしくはG-CSFとの組み合わせでの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、幹細胞ニッチから末梢血への幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で幹細胞ニッチから末梢血へ幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で骨髄ニッチから末梢血へ造血幹細胞を動員する。

【0257】

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストを含む組成物を提供する。上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストを含む組成物は、造血幹細胞の動員および移植を含む任意の適用のために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である

。いくつかの実施形態において、上記組成物は、他の動員処置に対して不十分に応答するか、または他の動員処置に対する応答において動員しない被験体において、造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-C-S-Fのみ、もしくはプレリキサフォルのみ、もしくはG-C-S-Fとの組み合わせでの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、幹細胞ニッチから末梢血への幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で幹細胞ニッチから末梢血へ幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で骨髄ニッチから末梢血へ造血幹細胞を動員する。

10

【0258】

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-C-S-Fを含む組成物を提供する。上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよびG-C-S-Fを含む組成物は、造血幹細胞の動員および移植を含む任意の適用のために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、他の動員処置に対して不十分に応答するか、または他の動員処置に対する応答において動員しない被験体において、造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-C-S-Fのみ、もしくはプレリキサフォルのみ、もしくはG-C-S-Fとの組み合わせでの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、幹細胞ニッチから末梢血への幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で幹細胞ニッチから末梢血へ幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で骨髄ニッチから末梢血へ造血幹細胞を動員する。

20

30

【0259】

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物を提供する。上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを含む組成物は、造血幹細胞の動員および移植を含む任意の適用のために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、他の動員処置に対して不十分に応答するか、または他の動員処置に対する応答において動員しない被験体において、造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-C-S-Fのみ、もしくはプレリキサフォルのみ、もしくはG-C-S-Fとの組み合わせでの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、幹細胞ニッチから末梢血への幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で幹細胞ニッチから末梢血へ幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で骨髄ニッチから末梢血へ造血幹細胞を動員する。

40

【0260】

50

いくつかの局面において、本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストおよびG-CSFを含む組成物を提供する。上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストおよびG-CSFを含む組成物は、造血幹細胞の動員および移植を含む任意の適用のために使用され得る。いくつかの実施形態において、上記組成物は、造血幹細胞を末梢血へと動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、他の動員処置に対して不十分に応答するか、または他の動員処置に対する応答において動員しない被験体において、造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、G-CSFのみ、もしくはプレリキサフォルのみ、もしくはG-CSFとの組み合わせでの投与に対する応答において不十分な動員を示す被験体において造血幹細胞を再動員するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置するために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、幹細胞ニッチから末梢血への幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で幹細胞ニッチから末梢血へ幹細胞を動員する。いくつかの実施形態において、上記組成物は、骨髄ニッチから末梢血への造血幹細胞の迅速な動員のために有用である。いくつかの実施形態において、上記組成物は、早ければ15分程度で骨髄ニッチから末梢血へ造血幹細胞を動員する。

10

【0261】

20

いくつかの局面において、組成物は、EXT1のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤および本明細書で記載される少なくとも1種のニッチを空にする薬剤を含む。いくつかの局面において、組成物は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤（例えば、ヘパラン硫酸インヒビター）および本明細書で記載される少なくとも1種のニッチを空にする薬剤を含む。いくつかの局面において、組成物は、EXT1のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤およびヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤を含む。いくつかの局面において、組成物は、EXT1のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤および本明細書で記載されるサイトカインを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤および本明細書で記載されるサイトカインを含む。いくつかの実施形態において、組成物は、EXT1のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤、ならびにCXCR2アゴニスト、CXCR4アンタゴニストおよびG-CSFのうちの少なくとも1種を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、EXT1のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤、ならびにCXCR2アゴニスト、CXCR4アンタゴニストおよびG-CSFのうちの少なくとも2種を含む。いくつかの実施形態において、組成物は、EXT1のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤、CXCR2アゴニスト、CXCR4アンタゴニストおよびG-CSFを含む。

30

【0262】

同定法

40

【0263】

本開示は、幹細胞動員薬剤（例えば、造血幹細胞動員薬剤）および前処置薬剤を同定するための種々の方法を企図する。

【0264】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、（a）CXCR2タンパク質もしくはその機能的フラグメントを提供する工程；（b）試験薬剤を提供する工程；および（c）上記試験薬剤が上記CXCR2タンパク質もしくはその機能的フラグメントを作動する能力をアッセイする工程であって、ここで上記CXCR2タンパク質もしくはその機能的フラグメントを作動する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である、工程を包含する。

50

【0265】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) CXCR4タンパク質もしくはそのフラグメントを提供する工程；(b) CXCR4結合パートナーを提供する工程；(c) 試験薬剤を提供する工程；および(d) 上記試験薬剤が、上記CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントへの上記CXCR4結合パートナーの結合を阻害する能力をアッセイする工程であって、ここで上記CXCR4タンパク質もしくはその機能的フラグメントへの上記CXCR4結合パートナーの結合を阻害する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である、工程を包含する。

【0266】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) ヘパラン硫酸プロテオグリカンを提供する工程；(b) ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合パートナーを提供する工程；(c) 試験薬剤を提供する工程；および(d) 上記試験薬剤が、上記ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合パートナーへの上記ヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合を阻害する能力をアッセイする工程であって、ここで上記ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合パートナーへの上記ヘパラン硫酸プロテオグリカンの結合を阻害する試験薬剤は、候補の造血幹細胞動員薬剤である、工程を包含する。

10

【0267】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) 試験薬剤を提供する工程；および(b) 上記試験薬剤が、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力をアッセイする工程を包含する。

20

【0268】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) 試験薬剤を提供する工程；および(b) 上記試験薬剤が、少なくとも1種のヘパラン硫酸アンタゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力をアッセイする工程を包含する。

【0269】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) 試験薬剤を提供する工程；および(b) 上記試験薬剤が、少なくとも1種のヘパラン硫酸アンタゴニストおよび少なくとも1種のCXCR2アゴニストの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力をアッセイする工程を包含する。

30

【0270】

いくつかの局面において、造血幹細胞動員薬剤を同定するための方法は、(a) 試験薬剤を提供する工程；および(b) 上記試験薬剤が、少なくとも1種のヘパラン硫酸アンタゴニストおよびG-CSFの造血幹細胞動員効果に匹敵する能力をアッセイする工程を包含する。

【0271】

本明細書で記載される方法に従って同定される候補の造血幹細胞動員薬剤は、移植される動員幹細胞の増強された生着のために、被験体を前処置するそれらの能力についてさらに評価され得る。

40

【0272】

キット

【0273】

本明細書で記載される薬剤は、キット中で提供され得る。上記キットは、(a) 上記薬剤（例えば、上記薬剤を含む組成物）、および(b) 情報資料を含む。上記情報資料は、記述資料、指示資料、マーケティング資料、または本明細書で記載される方法および／もしくは本明細書で記載される方法のための上記薬剤の使用に関する他の資料であり得る。例えば、上記情報資料は、被験体において造血幹細胞を動員するために上記被験体に上記薬剤を投与する；(i i) G-CSFのみ、プレリキサフォル、もしくはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体

50

において造血幹細胞を再動員する；（i i i）移植される末梢血幹細胞の生着のために、被験体を前処置する；および（i v）上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、ための方法を記載する。

【0274】

一実施形態において、上記情報資料は、適切な様式で、例えば、適切な用量、投与形態、もしくは投与様式（例えば、本明細書で記載される用量、投与形態、もしくは投与様式）で、上記薬剤を投与するための説明書を含み得る。別の実施形態において、上記情報資料は、適切な被験体、例えば、ヒト（例えば、成人を）選択するための説明書を含み得る。上記キットの情報資料は、その形態において限定されない。多くの場合、上記情報資料（例えば、説明書）は、印刷物（例えば、印刷されたテキスト、図面、および／もしくは写真、例えば、ラベルもしくは印刷されたシート）で提供される。しかし、上記情報資料はまた、他の形式（例えば、点字、コンピューター読み取り可能な物体、ビデオ記録、もしくは音声記録）で提供され得る。別の実施形態において、上記キットの情報資料は、リンクもしくは連絡情報（例えば、物理的アドレス、eメールアドレス、ハイパーリンク、ウェブサイトもしくは電話番号）であり、ここで上記キットのユーザーは、本明細書で記載される方法での調節因子および／もしくはその使用についての実質的情報を入手し得る。当然のことながら、上記情報資料はまた、任意の形式の組み合わせで提供され得る。

10

【0275】

上記キットの薬剤もしくは組成物に加えて、他の成分、例えば、溶媒もしくは緩衝液、安定化剤もしくは保存剤、および／または本明細書で記載される状態もしくは障害（例えば、動員された末梢血幹細胞の移植を要する疾患）を処置するための第2の薬剤が含まれ得る。あるいは、上記他の成分は、上記キット中に含まれ得るが、上記薬剤以外の異なる組成物もしくは容器中に含まれ得る。このような実施形態において、上記キットは、上記薬剤と上記他の成分とを混合するための、または上記調節因子と上記他の成分とを一緒に使用するための説明書を含み得る。

20

【0276】

上記薬剤は、任意の形態、例えば、液体、乾燥形態もしくは凍結乾燥形態で提供され得る。上記薬剤が、実質的に純粋および／もしくは無菌であることは、好ましい。上記薬剤が液体溶液で提供される場合、上記液体溶液は、好ましくは、水性溶液であり、滅菌の水溶性溶液が好ましい。上記薬剤が乾燥形態で提供される場合、再構成は、一般に、適切な溶媒を添加することによって行われる。上記溶媒（例えば、滅菌水もしくは緩衝液）は、必要に応じて、上記キット中に提供され得る。

30

【0277】

上記キットは、上記薬剤を含む組成物のための1以上の容器を含み得る。いくつかの実施形態において、上記キットは、上記薬剤（例えば、組成物中の）および情報資料のために、別個の容器、仕切り（divider）もしくは区画を含む。例えば、上記薬剤（例えば、組成物中の）は、ボトル、バイアル、もしくはシリンジの中に含まれ得、上記情報資料は、プラスチックスリーブもしくはパケットの中に含まれ得る。他の実施形態において、上記キットの別個の要素は、単一の分割できない容器内に含まれる。例えば、上記薬剤（例えば、組成物中の）は、ラベルの形態にある情報資料が貼付されたボトル、バイアルもしくはシリンジの中に含まれる。いくつかの実施形態において、上記キットは、複数の（多数の）個々の容器を含み、各々は、上記薬剤（例えば、組成物中の）の1以上の単位投与形態（例えば、本明細書で記載される投与形態）を含む。例えば、上記キットは、複数のシリンジ、アンプル、ホイルパケット、もしくはブリスターパックを含み、各々は、上記薬剤の単一の単位用量を含む。上記キットの容器は、気密および／もしくは水密であり得る。

40

【0278】

上記薬剤（例えば、組成物中の）は、被験体、例えば、成人被験体、例えば、動員された末梢血幹細胞の移植を要する疾患（例えば、血液悪性腫瘍）に罹患している被験体に投与され得る。上記方法は、例えば全血球計算を得るために、被験体を評価する工程、それ

50

によって、血液悪性腫瘍を有するとして被験体を同定する工程を包含し得る。全血球計算を得るための方法は、当業者に公知である。

【0279】

いくつかの局面において、キットは、(a) (i) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、(ii) 少なくとも1種のCXCR2アゴニスト、および(iii) 少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストからなる群より選択される2種以上の幹細胞動員薬剤の組み合わせ；ならびに(c) 上記(i)、(ii) および(iii) から選択される2種以上の幹細胞動員薬剤の組み合わせを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(ii) G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(iii) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(iv) 上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

10

【0280】

いくつかの局面において、キットは、(a) 少なくとも1種のCXCR2アゴニスト；(b) 少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト；ならびに(c) 上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(ii) G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(iii) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(iv) 上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

20

【0281】

いくつかの局面において、キットは、(a) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター；(b) 少なくとも1種のCXCR4アンタゴニスト；ならびに(c) 上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(ii) G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(iii) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(iv) 上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

30

【0282】

いくつかの局面において、キットは、(a) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター；(b) 少なくとも1種のCXCR2アンタゴニスト；ならびに(c) 上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種のCXCR2アンタゴニストを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(ii) G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(iii) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(iv) 上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

40

【0283】

いくつかの局面において、キットは、(a) 少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター；(b) G-CSF；ならびに(c) 上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記G-CSFを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(ii) G-CSFのみ、プレリキサフォル、またはG-CSFとプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(iii) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(iv)

50

上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

【0284】

いくつかの局面において、キットは、(a) E X T 1 のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤；(b) 少なくとも1種の C X C R 4 アンタゴニスト；ならびに(c) 上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種の C X C R 4 アンタゴニストを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(i i) G - C S F のみ、プレリキサフォル、または G - C S F とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(i i i) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(i v) 上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

10

【0285】

いくつかの局面において、キットは、(a) E X T 1 のレベルもしくは活性を阻害する少なくとも1種の薬剤；(b) 少なくとも1種の C X C R 2 アンタゴニスト；ならびに(c) 上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターおよび上記少なくとも1種の C X C R 2 アンタゴニストを、(i) 被験体において造血幹細胞を動員する；(i i) G - C S F のみ、プレリキサフォル、または G - C S F とプレリキサフォルとの組み合わせの投与に対する応答において不十分な動員を示した被験体において造血幹細胞を再動員する；(i i i) 移植される末梢血幹細胞の生着のために被験体を前処置する；および(i v) 上記被験体において末梢血幹細胞移植を要する疾患を処置する、のうちの1以上のために上記被験体に投与するための説明書を含む。

20

【0286】

薬剤

【0287】

本発明は、本明細書で記載される方法および組成物と関連して種々の薬剤の使用を企図する。特に、本明細書で記載される研究は、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤が、例えば、E X T - 1 のレベルもしくは活性を阻害することによって、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するための方法および組成物において使用され得、動員抵抗性が別の方法では不十分な動員を生じる状況において、ならびに細胞傷害性前処置を要することなく生着のために被験体を前処置するための非細胞傷害性方法において、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員するにあたって特に有効であることを示す。当業者によって認識されるように、前述の薬剤は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の移植を要する疾患の処置のための種々の方法において使用され得る。

30

【0288】

本明細書で企図される方法および組成物は、本明細書で記載される薬剤の「有効量」を投与することを企図する。本明細書で使用される場合、「～のために有効な量」、「有効量」、もしくは「治療上有効な量」は、造血幹細胞および／もしくは前駆細胞を動員して、上記被験体の細胞ニッチから出ていく、例えば、上記被験体の骨髓から上記被験体の末梢血へと出て行くために有効である上記薬剤のある量を意味するために、交換可能に使用される。有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。一般に、有効量は、上記被験体の履歴、年齢、状態、性別、ならびに上記被験体における医学的状态の重症度およびタイプ、ならびに血液悪性腫瘍もしくは非悪性障害における病的プロセスを阻害する他の薬剤の投与に伴って変動し得る。

40

【0289】

いくらかの状況において、本明細書で記載される薬剤の投与は、上記被験体の細胞ニッチ(例えば、骨髓)における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を減少させる。本明細書で使用される場合、用語「減少」、「低下した」、「低下」、「減少させる」もしくは「阻害する」は、概して、統計的に有意な量程度の減少を意味するために、全て本明細書で使用される。しかし、疑義を回避するために、「低下した」、「低下」または「減

50

少する」もしくは「阻害する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%程度、例えば、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%程度の減少（ここで上記減少は、100%未満である）を意味する。一実施形態において、上記減少は、100%の減少（例えば、参照サンプルと比較して、ないレベル）、または参照レベルと比較して10～100%の間の任意の減少を含む。いくつかの実施形態において、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の投与は、上記被験体の骨髓における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を、参照レベルと比較して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%と同じくらいの程度減少させる。いくつかの実施形態において、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の投与は、上記被験体の骨髓における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を、参照レベルと比較して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%と同じくらいの程度減少させる。

【0290】

いくらかの状況において、本明細書で記載される薬剤の投与は、上記被験体の末梢血中の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を増大させる。本明細書で使用される場合、用語「増大した」、「増大する」もしくは「増強する」もしくは「活性化する」は、概して、統計的に有意な量程度の増大を意味するために、全て本明細書で使用される；疑義を回避するために、「増大した」、「増大する」もしくは「増強する」もしくは「活性化する」は、参照レベルと比較して少なくとも10%の増大、例えば、参照レベルと比較して少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%または最大で100%までもしくは100%（を含む）の増大または10～100%の間の任意の増大、あるいは参照レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍もしくはもしくは少なくとも約10倍の増大、または2倍～10倍の間の任意の増大またはより多くの増大を意味する。いくつかの実施形態において、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の投与は、上記被験体の末梢血中の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を、参照レベルと比較して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%と同じくらいの程度増大させる。いくつかの実施形態において、EXT-1のレベルもしくは活性を阻害する薬剤の投与は、上記被験体の末梢血中の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を、参照レベルと比較して少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、または少なくとも約10倍、またはより多くの程度増大させる。いくつかの実施形態において、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の投与は、上記被験体の末梢血中の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を、参照レベルと比較して少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%と同じくらいの程度増大させる。いくつかの実施形態において、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤の投与は、上記被験体の末梢血中の造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の量を、参照レベルと比較して少なくとも約1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、または少なくとも約10倍またはより多くの程度増大させる。

【0291】

用語「統計的に有意」もしくは「有意に」とは、統計的有意性をいい、一般に、マーカーの規定濃度より2標準偏差（2DS）下回るかもしくは2標準偏差以下を意味する。上記用語は、差異がある統計的証拠に言及する。それは、帰無仮説が実際に真である場合に、その帰無仮説を棄却すると決定する可能性として定義される。この決定はしばしば、p値を使用して行われる。

10

20

30

40

50

【0292】

本発明は、細胞ニッチ（例えば、骨髄幹細胞ニッチ）における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の保持に關与する任意のヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害することを企図する。いくつかの実施形態において、上記薬剤は、間葉細胞に置いて発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する。いくつかの実施形態において、上記薬剤は、骨髄間葉細胞において発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する。いくつかの実施形態において、上記薬剤は、Mx1+骨格幹細胞および／もしくは前駆細胞において発現されるヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する。

【0293】

本発明はまた、細胞ニッチ（例えば、骨髄）における造血幹細胞および／もしくは前駆細胞の保持を妨害する何らかの方法で、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害することを企図する。ヘパラン硫酸プロテオグリカンのレベルもしくは活性を阻害する薬剤がヘパラン硫酸インヒビターともいわれ得ることは、理解されるべきである。本明細書で使用される場合、「ヘパラン硫酸インヒビター」とは、内因性ヘパラン硫酸のレベルおよび／もしくは活性（例えば、骨髄に幹細胞および／もしくは前駆細胞を保持することにおけるVCAM-1とのヘパラン硫酸プロテオグリカンの相互作用）と競合し得る任意の薬剤をいう。

【0294】

いくつかの実施形態において、上記ヘパラン硫酸インヒビターは、EXT-1のレベルもしくは活性を減少させる薬剤を含む。EXT-1のレベルもしくは活性を減少させる例示的薬剤としては、shRNA、miRNA、siRNA、マイクロRNA、低分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および抗EXT-1抗体が挙げられるが、これらに限定されない。EXT-1に対して指向されるshRNAは、Reijmers et al. (Blood. 2010; 115 (3): 601-604) によって記載される。抗EXT-1抗体は、市販されている（例えば、Abcamから）。

【0295】

ヘパラン硫酸の例示的な低分子インヒビターは、Garud et al. (J Biol Chem. 2008; 283 (43): 28881-28887) によって記載される。いくつかの実施形態において、上記ヘパラン硫酸インヒビターは、グリコシルトランスフェラーゼインヒビターを含む。いくつかの実施形態において、上記ヘパラン硫酸インヒビターは、内因性ヘパラン硫酸の競合的インヒビターである。このようなインヒビターの例としては、ヘパリン硫酸、硫酸プロタミン、スルフェン、およびこれらのアナログもしくは誘導体が挙げられる。ヘパリンに対する類似性を示す分子の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ヘパリンテトラサッカリド、ペントサンポリスルフェート、ホスホマンノペンタノーススルフェート、および選択的化学的O脱硫酸化ヘパリン。少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターとして使用され得るヘパリン誘導体は、米国特許第4,816,446号（本明細書に参考として援用される）に記載される。少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターとして使用され得るポリ硫酸化ヘパリンは、欧州特許番号EP0322659A1（本明細書に参考として援用される）に記載される。

【0296】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビターは、VCAM-1のレベルもしくは活性を減少させる薬剤である。VCAM-1のレベルもしくは活性を減少させる例示的薬剤としては、shRNA、miRNA、siRNA、マイクロRNA、低分子、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および抗VCAM-1抗体が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、VCAM-1のレベルもしくは活性を減少させる薬剤は、Symbio polylolである。いくつかの実施形態において、VCAM-1のレベルもしくは活性を減少させる薬剤は、プロテアソームインヒビターである。いくつかの実施形態において、VCAM-1のレベルもしくは活性を

減少させる薬剤は、プロブコール、ならびに欧州特許番号EP 1 4 6 6 3 9号（その全体において本明細書に参考として援用される）に記載されるとおりのプロブコールのコハク酸エステルである。いくつかの実施形態において、VCAM-1のレベルもしくは活性を減少させる薬剤は、一酸化窒素である。VCAM-1の例示的低分子インヒビターとしては、PCT国際出願公開番号WO/2001/070757A2（その内容は、本明細書に参考として援用される）に記載されるチオケタールおよびチオエーテルが挙げられる。VCAM-1の発現を阻害するためのさらなる化合物および方法は、米国特許第6,147,250号（その内容は、本明細書に参考として援用される）に記載される。VCAM-1発現を阻害するためのさらなる化合物および方法は、米国特許第6,828,447号、同第6,548,699号、同第6,617,352号、同第6,660,914号および同第7,189,870号に見出され得る。ヒトVCAM-1 RNAに対して指向される例示的アンチセンスオリゴは、米国特許第5,596,090号（その全体において本明細書に参考として援用される）に見出され得る。

10

【0297】

本開示は、少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストの、単独もしくは組み合わせでの、本明細書に記載される方法、組成物およびキットにおける幹細胞および/前駆細胞の動員薬剤としての使用を企図する。本開示は、ヘパラン硫酸を阻害するか、CXCR2を作動するか、もしくはCXCR4を拮抗し、そして幹細胞を動員する能力のある任意の薬剤の使用を企図する。本明細書に記載される方法、組成物、およびキットにおいて、上記少なくとも1種のヘパラン硫酸インヒビター、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストおよび上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストとして使用され得る薬剤の例示的なタイプとしては、有機低分子もしくは無機低分子；サッカリン；オリゴサッカリド；ポリサッカリド；ペプチド、タンパク質、ペプチドアナログおよび誘導体からなる群より選択される生物学的高分子；ペプチド模倣物；siRNA、shRNA、アンチセンスRNA、リボザイム、およびアプタマーからなる群より選択される核酸；細菌、植物、真菌、動物細胞、および動物組織からなる群より選択される生物学的物質から作製される抽出物；天然に存在するもしくは合成の組成物；ならびにこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

20

【0298】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、ケモカインGro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体である。Gro-betaの例示的形態は、ヒトGro-betaポリペプチド（GenBank Accession: AAP13104）である。例示的なGro-betaアナログもしくは誘導体は、デスアミノGro-betaタンパク質（MIP-2 alphaとしても公知）であり、これは、PCT国際出願公開WO/1994/029341（その全体において本明細書に参考として援用される）に記載されるように、そのN末端においてアミノ酸2位～8位の間が短縮された成熟Gro-Sタンパク質のアミノ酸配列を含む。別のGro-betaアナログもしくは誘導体は、米国特許第6,413,510号（その全体において本明細書に参考として援用される）に記載されるダイマー改変Gro-betaタンパク質である。さらに別の例示的なGro-betaアナログもしくは誘導体は、Bensinger et al.（Bone Marrow Transplantation（2009）, 43, 181-195（本明細書に参考として援用される））によって記載されるように、SB-251353（幹細胞および他の白血球の移動の指向に関与するGro-betaアナログ）である。

30

40

【0299】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaΔ4またはそのアナログもしくは誘導体である。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-betaΔ4またはそのアナログもしくは誘導体からなる

50

群より選択される。

【0300】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、Mozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体である。いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびMozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。プレリキサフォルの例示的アナログとしては、De Clercq, E. (Pharmacol Ther. 2010 128(3): 509-18 (その全体において本明細書に参考として援用される)) によって記載されるように、AMD11070、AMD3465、KRH-3955、T-140、および4F-ベンゾイル-TN14003が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0301】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体であり、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体である。

【0302】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体であり、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、Mozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体である。

20

【0303】

いくつかの実施形態において、上記少なくとも1種のCXCR2アゴニストは、Gro-betaまたはそのアナログもしくは誘導体およびGro-beta Δ 4またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択され、上記少なくとも1種のCXCR4アンタゴニストは、プレリキサフォルまたはそのアナログもしくは誘導体およびMozobil（登録商標）またはそのアナログもしくは誘導体からなる群より選択される。

【0304】

任意の適切な投与経路は、本明細書で記載される薬剤を被験体に投与するために使用され得る。薬物送達ストラテジーに関する包括的な総説については、Horet al., Curr. Opin. Mol. Ther. (1999), 1: 336-3443; Groothuis et al., J. Neuro Virol. (1997), 3: 387-400; およびJan, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 (その全ての内容は、本明細書に参考として援用される) を参照のこと。

30

【0305】

上記薬剤は、上記薬剤の治療上有効な量を含む薬学的に受容可能な組成物中に製剤化され得、1種以上の薬学的に受容可能なキャリア（添加剤）および／もしくは希釈剤と一緒に製剤化され得る。

40

【0306】

上記製剤は、便利なことには、単位投与形態で提示され得、薬学分野で周知の方法のうちのいずれかによって調製され得る。技術、賦形剤および製剤は、一般に、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1985, 17th edition、Nema et al., PDA J. Pharm. Sci. Tech. 1997 51: 166-171において見出される。

【0307】

本明細書で記載される薬剤は、他の薬学的に活性な薬剤と組み合わせて被験体に投与さ

50

れ得る。例示的な薬学的に活性な薬剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Harrison's Principles of Internal Medicine, 13th Edition, Eds. T. R. Harrison et al. McGraw-Hill N. Y., NY; Physician's Desk Reference, 50th Edition, 1997, Oradel New Jersey, Medical Economics Co.; Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th Edition, Goodman and Gilman, 1990; United States Pharmacopeia, The National Formulary, USP XII NF XVII, 1990（これら全ての完全な内容は、本明細書に参考として援用される）において見出されるもの。いくつかの実施形態において、上記薬学的に活性な薬剤は、血液悪性腫瘍の従来処置である。いくつかの実施形態において、上記薬学的に活性な薬剤は、非悪性疾患の従来処置である。当業者は、彼らの専門技術、知識および経験に基づいて、上述の参考文献を使用して、任意の特定の血液悪性腫瘍もしくは非悪性疾患を処置するための適切な従来薬学的に活性な薬剤を選択し得る。

10

【0308】

いくつかの実施形態において、上記薬学的に活性な薬剤は、造血幹細胞動員薬剤である。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員薬剤は、サイトカインである。本明細書に記載される薬剤（例えば、ヘパラン硫酸インヒビター）と関連して使用するための例示的サイトカインとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターロイキン-3（IL-3）、およびこれらのグリコシル化形態もしくはpeg化形態。

20

【0309】

いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員薬剤は、化学療法剤（例えば、CY、パクリタキセル、エトポシド）である。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員薬剤は、EPOである。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員薬剤は、幹細胞因子である。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員薬剤は、TPOである。いくつかの実施形態において、上記造血幹細胞動員薬剤は、副甲状腺ホルモンである。

30

【0310】

いくつかの実施形態において、上記薬学的に活性な薬剤は、化学療法剤である。例示的な化学療法剤としては、ビンブラスチン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン、シタラビン、シクロホスファミドおよびシスプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。他の適切な化学療法剤は、当業者に明らかである。

【0311】

いくつかの定義

【0312】

本明細書で別段定義されなければ、本願と関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、別段状況が要求しなければ、単数形は、複数形を含み、複数形は単数形を含むものとする。

40

【0313】

本明細書に記載される場合、「comprising（含む、包含する）」もしくは「comprise（含む、包含する）」は、本発明に必須である、組成物、方法、およびそれぞれのその構成要素を参照して使用されるが、必須か否かに拘わらず、特定されていない要素の包含に対しては開かれている。

【0314】

本明細書で使用される場合、用語「consisting essentially of（から本質的になる）」とは、所定の実施形態に必要とされるそれら要素に言及する

50

。この用語は、本発明のその実施形態の基本的かつ新規もしくは機能的な特徴に本質的に影響を及ぼさないさらなる要素の存在を許容する。

【0315】

用語「*consisting of*（からなる）」とは、上記実施形態のその説明に記載されていないいかなる要素をも排除する、本明細書に記載されるとおりの組成物、方法、およびそれらそれぞれの構成要素に言及する。

【0316】

実施例におけるもの以外に、もしくは別段示される場合、本明細書で使用される成分もしくは反応条件の量を表す全ての数字は、全ての場合、用語「約」によって修飾されると理解されるべきである。用語「約」は、パーセンテージに関して使用される場合、±1%を意味し得る。

【0317】

単数形の使用「*a*（1つの、ある）」、「*an*（1つの、ある）」、および「*the*（上記、その、この）」は、状況が別段明示しなければ、複数形を含む。同様に、文言「*or*（もしくは、または、あるいは）」は、状況が別段明示しなければ、「および、ならびに、そして（*and*）」を含むことが意図される。本明細書に記載されるものに類似もしくは等価な方法および材料が、本開示の実施もしくは試験において使用され得るものの、適切な方法および材料が本明細書に記載される。用語「*comprise*（含む、包含する）」は、「*includes*（含む、包含する）」を意味する。略語「*e. g.*（例えば）」は、ラテン語の *exempli gratia*（例えば）に由来し、非限定的な例を示すために本明細書で使用される。従って、略語「*e. g.*（例えば）」は、用語「*for example*（例えば）」と同義である。

【実施例】

【0318】

（実施例）

【0319】

実施例1：HIV/AIDSのHSC移植治療を達成するための障壁を低くするための前処置の毒性の低下

【0320】

造血幹細胞（HSC）移植は、HIVの見かけ上の治癒に関する1つの公知の基本である。強力な化学療法後の同種異系CCR5^{-/-}造血性移植物が検出不能なHIVという耐えている状態を提供した「ベルリン患者」は、幹細胞ベースのアプローチに関する強力な原理を提供する¹。近年、同種異系移植で処置した2名のさらなる患者は、移植の8ヶ月後および17ヶ月後に検出不能なHIVウイルス負荷を有すると報告された（Abstract THAA0101 XIX International AIDS Conference, Washington, DC; July 22-27, 2012）。さらに、HIV耐性を増強するように遺伝子改変されたHSCは、臨床試験²（および報告されていないSystemix後援の多施設治験、調査者としてDTS）で試験された。TALLENおよびジンクフィンガーヌクレアーゼのような新生遺伝子改変ストラテジーを強化する複合的な努力は、HIV保有者を標的とし得るHIV耐性免疫系を作り出す手段として、より多くの幹細胞移植の機会を提供するHIV耐性自家HSCを作り出すことに焦点を当てている³。これらアプローチは、成功裡であれば、終生の抗レトロウイルス治療なしでHIVを永続的にコントロールもしくは根絶し得る手段を提供し得る。このような結果は、転帰が、毒性、複雑性およびコストを低減するために移植においてかなりの進展を要するということを達成することを除けば、莫大な明らかな利益を有する。

【0321】

移植前の前処置は、代表的には、レシピエントの骨髓内の造血幹細胞を枯渇させるために、高用量の化学療法の投与によっておよび／もしくは放射線療法と組み合わせて、達成される。これら前処置の伝統的な方法はしばしば、生命をおびやかす悪性腫瘍を有していない患者でのHSC移植物の使用を排除し、HSC移植物から利益を得ることができる患

10

20

30

40

50

者の数を顕著に減少させる。非骨髄破壊的な低減した前処置レジメンの開発は、根治的なHSC移植をより広い範囲の疾患（最も顕著には、HIV）へと大いに拡げる。非骨髄破壊的な前処置を使用してHSC生着を達成するための以前の試みは、明らかな全身毒性なしでのHSCの選択的な標的化および除去が、免疫系のほぼ完全な置換を可能にすることを示した。しかし、これらアプローチは、マウス特異的抗体試薬を使用する⁴かまたは低線量の放射線療法と組み合わせる⁵かのいずれかであった。AMD3100（HSCを骨髄から出ていかにさせることができるCXCR4アンタゴニスト）の使用、もしくは前処置なしでの幹細胞の反復注入は、中程度レベルのキメラ現象を達成したが、不十分な生着レベルが一部原因で、臨床実施には拡がらなかった⁶。他の戦略が必要である。今日までの移植の成功を考えれば、遺伝子改変技術においてなされた進歩、および終生の抗レトロウイルス化学療法という気が遠くなるほどの難題、HIV/AIDSの幹細胞療法への障壁の低下は、非常に筋が通っていると思われる。本発明者らがここで考察するアプローチは、潜在的には、臨床試験へとさらに拡げるために、遺伝子改変された自家細胞もしくは同種異型細胞のいずれかのより迅速な移動を生じ得る。

10

【0322】

HIVのための幹細胞療法の課題は、新しくもなく、実際に、本発明者ら他は、過去に一連の前臨床研究および臨床研究を行った⁷⁻¹⁰。これらは、HSCがHIVに感染したか否か（本発明者らが感染していないことを見出した⁷）およびHIV複製を制限する遺伝子構築物を有するレトロウイルス感染した細胞が、HIV感染個体に成功裡に移植され得るか否かに焦点を当てた。さらに、本発明者らは、AIDS関連リンパ腫を有する患者におけるHSC移植の使用に関する多施設治験を行ったところ、それが成し遂げられ得、根底にある悪性腫瘍に永続的に影響を与え得ることを示した。遺伝子改変したかもしくはCCR5-/-HSPCの高効率生着を達成する新規な手段の発見は、潜在的に根治的なアプローチの適用への現在制限となっている障壁周辺を革新する。

20

【0323】

本発明者らが移植における改善を達成しようと計画している具体的手段は、骨髄ニッチを空にするという新規な、低コストの低毒性手段を試験するために、骨髄中でのHSPC保持でのグリコシルトランスフェラーゼEXT1の役割の本発明者らの新たな発見を利用する、多くの新規な発見および構築物を包含する。ニッチを空にすることを可能にするためのこれら試みは、新たな薬剤もしくは新たな生物学に全て基づき、各々が臨床適用の潜在能力を有する新規なアプローチを表す。特に、上記試みは、明確な知見の迅速な解釈を可能にする新規用途について既にFDAに認可されている多くの化合物を使用する。

30

【0324】

HIV/AIDSの根治的処置モダリティとしてのHSC移植を使用することへの1つの重大な障壁、毒性前処置を越える手段として、本発明者らは、HSCニッチに対して最小限の毒性および損傷でHSC生着を達成するために低減した前処置アプローチを試験し続ける。本発明者らの方法論は、注入される細胞が内因性幹細胞と成功裡に競合して生着を達成する機会を提供する。特に、本発明者らは、上記ニッチを損傷しないが非常に効率的な動員を引き起こす、骨髄中でのHSC保持に関わる種々の分子を標的とすることが公知の、機械的に異なる動員薬剤を組み合わせる。次いで、このアプローチは、注入される細胞が内因性細胞と競合することを可能にする。本発明者らは、現在実際に、非常に毒性の、標的化されていない前処置レジメンを必要とせずに、注入される細胞に競合的利益を提供することを目的とする。本明細書に記載される研究は、HSC移植レシピエントにとって新規な前処置戦略の概念実証を確立する。改善された前処置レジメンは、急性の免疫抑制およびオフターゲット組織損傷を制限し、非悪性血液疾患および免疫疾患、HIV/AIDSを有する患者にとってHSC移植を制限する課題のうちの少なくとも1つを潜在的に解決する。

40

【0325】

実施例2：CXCR2およびCXCR4の操作を通じてニッチ毒性なくニッチを空にすることを増強する

50

【0326】

前臨床データは、C X C R 2 アゴニストが、作用動態および移動させられる細胞の品質の両方に関して、現在のケア標準より優れている可能性がある。このプロジェクトの目的は、既存の G S K C X C R 2 アゴニスト、G r o o b e t a を C X C R 4 インヒビターである M o z o b i l（登録商標）と組み合わせて試験し、動員、生着および非毒性前処置レジメンとして現在のケア標準と転帰を比較することである。動物を、G - C S F、プレリキサフォル（例えば、M o z o b i l（登録商標））、G r o o b e t a もしくは他の動員薬剤の種々の組み合わせで処置し、H S C 動員を誘発するそれらの能力について試験する。動員される細胞を、それらのインビトロおよびインビボでの機能的な能力、ならびに照射したマウスにおける生存および造血回復を増強する能力について分析する。細胞を機能的アッセイ、免疫組織化学およびトランスクリプトミクスによって特徴付けして、動員される幹細胞集団におけるバリエーションを規定する一助とする。

10

【0327】

潜在的な影響は、H S C 移植に適格な患者数を有意に増大させ得、健康なおよび自家移植のドナーの両方に対して G - C S F と関連した罹病率を低減し得、認識されるドナー時間の減少に鑑みてクオリティー・オブ・ライフを高め、そして非悪性疾患を有する患者または低減したもしくは非毒性前処置によって遺伝子治療を要する患者にとっての救命医療として H S C 移植の増大した使用を潜在的に可能にし得る医療の同定である。この迅速な動員戦略はまた、非造血性適応症における使用の可能性を有する。なぜなら動員された C D 3 4 + 細胞は、虚血性心疾患の治療として、フェーズ I I I において活発に調査されている最中だからである。

20

【0328】

造血幹細胞（H S C）移植は、多くの悪性血液疾患に関して現在唯一の根治的処置モデルである。しかし、移植関連の罹病率および死亡率は未だ高く、H S C 移植から利益を受け得る患者のうちのごく僅かが実際に H S C 移植を受けるに過ぎない。これら本質的なリスクを低減させれば、各年で移植される患者数が大いに増大する可能性がある。

【0329】

移植のための H S C 源としては、骨髄、臍帯血、もしくは動員される末梢血が挙げられる。定常状態条件下では、H S C および H P C は、骨髄ニッチの中にいるが、これら集団によって生成される成熟細胞は、骨髄を出て末梢へと入る。増大した H P C が化学療法後に患者において見出されたという観察に基づくと、H S C および H P C が自然に出て行くことを高められ得るということが知られるようになった。造血性増殖因子である顆粒球コロニー刺激因子（G - C S F）は、移植用の H S C および H P C を動員するために臨床的に広く使用されている。G - C S F 動員末梢血幹細胞（P B S C）は、より迅速な生着、より短期間の入院（¹⁻⁴）、およびいくらかの環境では、骨髄と比較して優れた全生存（⁵）と関連する。動員される成人 H S C および H P C は、自家移植および同種異系移植のためにいまや広く使用されている。

30

【0330】

成功裡ではあるものの、改善された H S P C 動員薬剤の重大な医療的ニーズが未だにある。なぜなら G - C S F レジメンは、反復皮下注射を要し、これが骨痛（しばしば重症でかつ衰弱する合併症）、悪心、頭痛、および疲労（⁶⁻⁹）に由来する罹病率としばしば関連するからである。これらは、正常なボランティアにおいて高い%の自主撤退を伴って生活様式破壊的であり得、そして癌化学療法の過酷さに耐えている患者にとっては特に悲惨である。さらに、正常なドナーの小さな集団では、G - C S F は、重篤な毒性とも関連した。その成功にも拘わらず、G - C S F に対する応答における不十分な動員は、正常な健康ドナーのうち15%に起こる。十分数の C D 3 4 + を達成しない患者は、1回より多くのアフレーシス手順がしばしば必要である（¹⁸⁻²⁰）。患者のうち最大で60%までが、高用量化学療法の連携サイクルを要する自家移植のために最適な C D 3 4 + 細胞数を動員しない（²⁵⁻²⁷）。これは、長期のアフレーシスをしばしば要し（²⁹）、移植レシピエントの最大グループを構成するリンパ腫および多発性骨髄腫を有する

40

50

患者（^{2 8}）にとって特に問題である。これら問題は、H S P Cを動員するための代替法が大きな影響を有し得る状況をもたらす。

【0331】

低分子C X C R 4アンタゴニストであるプレリキサフォル（A M D 3 1 0 0）は、G - C S Fのみでの不十分な動員という問題に対処することが示されており（^{3 2 - 3 5}）、G - C S Fに失敗した非ホジキンリンパ腫もしくは多発性骨髄腫を有する患者におけるP B S Cの動員のために、G - C S Fと組み合わせて使用されることが今やF D Aによって承認されている。しかし、患者のかかなりの割合がプレリキサフォル投与後ですら十分数をなお動員できておらず、患者のうちの約33%は、下痢もしくは注射部位反応を報告する。プレリキサフォル+G - C S Fは、これら患者においてH S Cを動員する能力に明らかに影響を与えたものの、代替薬剤にもまだかなりの臨床状の好機が残っている。以下の問題を克服する薬剤は、特に魅力的である： 1）かなりの骨痛および他の望ましくない効果をもたらすG - C S Fの複数回の毎日の注射の要求；2）現在ある動員薬剤での患者およびボランティアの部分集団における変動しやすく、最適状態には及ばない動員；ならびに3）必要とされるアフエレーシス手順の総数および最適な動員時間を推定することができないこと。

10

【0332】

動員薬剤の効力を試験することは、臨床効力の明確なエンドポイントによって促進され得る。適切な動員の臨床目標が確立された。 $> 3 \times 10^6 / \text{kg}$ のC D 3 4 +細胞用量は、同種異系移植片レシピエントの中で低減した罹病率および死亡率（^{2 1}）と関連する。最大 $10 \times 10^6 / \text{kg}$ までのより高いC D 3 4 +細胞用量は、特に、再発のリスクが高い疾患を有する患者（^{2 3, 2 4}）にとっては、より迅速な生着、より低い罹病率およびより良好な生存率（^{2 2}）を生じると報告される。従って、動員レジメンの成功を測定するパラメーターは、適切である。この提唱の主要な焦点は、造血幹細胞採取の既存の治療に対する薬理学的代替手段の開発であるものの、本発明者らが探索していると提唱する臨床上的影響については好機がさらにある。内因性幹細胞をそのニッチから動員する薬剤は、ニッチを空にし、移植される細胞の生着を可能にし得る。G - C S Fは、幹細胞ニッチに対するその公知の有害効果が原因でこの機能において制限されているが、代替のアプローチは、同様には妨げられていない可能性がある。この機能が最適化されるのであれば、細胞傷害性化学療法も放射線療法もなしで幹細胞生着のために上記レシピエントを前処置する可能性は、考えられ得る。このような転帰は、非悪性疾患（例えば、鎌状赤血球貧血症、先天性免疫不全症、蓄積症（s t o r a g e d e f e c t）およびH I V）を処置することにおける利益を仮定すれば、臨床コミュニティーにとってはますます重要である。新たな動員薬剤が細胞傷害性なしで生着を達成し得るか否かを規定することは、動員研究の延長であり、重要な潜在的影響の延長である。

20

30

【0333】

実施例3：C X C R 2の操作によるニッチ毒性なしでニッチを空にすることを増強し、H S Cと骨髄ニッチとの間のヘパラン硫酸プロテオグリカン相互作用が最近規定された

【0334】

H S P Cのニッチ保持は、S D F - 1とH S P C上のそのコグネイトレセプターC X C R 4との相互作用によって部分的に維持される。臨床的には、上記C X C R 4アンタゴニスト、A M D 3 1 0 0は、アフエレーシスによる採取およびその後の移植のために骨髄から末梢にH S P Cが出て行くのを増強するために、G - C S Fと組み合わせて使用することがF D Aによって承認されている。この組み合わせは、明らかに骨髄ニッチを空にするが、G - C S Fは、間質ニッチ細胞を有意に弱らせる^{1 8}。これは、目的が単に幹細胞採取である場合にほとんど重大ではないが、低毒性前処置の状況において、上記ニッチを空にして、競合している細胞を生着させ得ることを考える場合には問題である。これは、G - C S Fがこの状況において不成功であった理由であり得る；それは、注入される細胞および内因性細胞に関するニッチの支持能力を低減させる。従って、H S P Cをニッチから去らせると同時に、ニッチ完全性を維持するストラテジーは、低減した前処置ストラテジ

40

50

ーにとって好ましい。本明細書で記載される研究は、適切な動員が起こって、上記ニッチを破壊することなく、移植される細胞の生着を可能にし得るか否かを決定するために2つのこのようなアプローチの組み合わせを使用することを企図する。

【0335】

上記CXCR2アゴニスト、GRO- β は、HSPCを迅速に動員し得る薬剤であり、G-CSFと比較した場合に優れた生着能力で長期間再集合するHSCの動員を生じる¹⁹。この薬剤は、MMP-9を活性化するという点でG-CSFもしくはAMD3100とは全く異なる推定作用機構を有する。それは非常に急激に起こり、マウスにおいて最大で注入後15分程度でHSPCを動員する。G-CSFとは異なり、上記動員は、免疫組織化学によって骨髓形態の変化と関連しない（データは示さず）。それは、ニッチを空にする薬剤として働く優れた候補である。本発明者らはまた、骨髓中でのHSC保持においてヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）の新規な関与（これは、G-CSFによって動員されるものとは機能的に異なる細胞の幹細胞動員を誘発するために薬理的に操作され得る）を近年同定した。このプロセスは、ヘパリンおよびAND3100の使用を要するものであり、承認された薬剤（これは、臨床試験へと迅速に移行し得る）を使用する強い動員を達成する。

【0336】

細胞外マトリクスタンパク質が骨髓ニッチの重要な要素として働くと仮定すると、オステオポンチンがそのような役割を果たすことが示された^{20, 21}。さらに、HSPGは、発生において局所組織中で複数の他のサイトカインおよびモルフォゲンの勾配を生じることが公知である^{22, 23}ので、本発明者らは、それらが役割を果たすか否かを試験した。これを評価するために、本発明者らは、EXT1（ヘパラン硫酸プロテオグリカンの生成に必須なグリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子²⁴）の条件付き欠失の効果を試験した。本発明者らは、条件付き対立遺伝子保有マウスと、CreリコンビナーゼがMx1プロモーターの制御下で発現されるマウスとを交配することによって、上記を試験した。Mx1は、造血性細胞においてポリ（I）／ポリ（C）によって誘発可能であり、本発明者らは、近年、骨系統間葉幹／前駆細胞において示した²⁵。造血性細胞に対するEXT1の直接効果を排除するために、以下の研究を、移植によってキメラになった動物で行った：それらの造血系は、野性型であると同時に、微小環境は、EXT1 f1／f1（KO）もしくは＋／＋（コントロール）である。

【0337】

キメラ動物を、Creの条件付き活性化によって、造血に対する微小環境中でのEXT1欠失の効果を評価し、続いて1～6ヶ月間にわたって血液、骨髓および脾臓について評価した（図1）。血中のコロニー形成単位（CFU）の数字は、有意に増大し（ $p < 0.01$ ）（左パネル）、付随して、骨髓中の骨髓系前駆細胞（中央パネル）およびHSC（右パネル）では逆に減少した（ $p < 0.05$ ）。

【0338】

この効果についての潜在的基礎を調べたところ、本発明者らは、IHCによって骨髓の骨系細胞におけるVCAM-1発現の減少を観察した（データは示さず）ので、動員研究によってVCAM-1の機能的役割を試験した（図2）。本発明者らは、VCAM-1中和抗体（もしくはアイソタイプコントロール）を、G-CSFと組み合わせて使用して細胞を動員し（模式図は上パネル）、G-CSF＋抗VCAM-1による動員が、EXT1欠失の状況においてコロニー形成単位アッセイ（ $p < 0.001$ ）および競合的移植アッセイ（ $p < 0.01$ ）によって測定される場合を除いて、相加的である（ $p < 0.01$ ）であることを見出した。これらデータは、VCAM1がEXT1欠失によって骨髓におけるHSPC保持の変化に関与する分子のうちの1つであることを示唆するのみならず、G-CSF動員に対してEXT1欠失の特徴的な機構および骨髓中の幹細胞のVCAM-1保持を確立することでのEXT-1制御HSPGの重要性をも裏付ける。

【0339】

内因性HSPGが公知の薬理的HSPGと競合し得ると仮定して、本発明者らは、ヘ

パリン硫酸が幹細胞局在化に対する E X T 1 欠失の効果を摸倣し得るか否かを調べた。最初に、これを、標準的 G - S C F 動員レジメンの後に単一用量のヘパリン硫酸 (100 U / マウス) を使用して、末梢血を採取し、これを使用して、致命的に照射したコンジュニクレスピエントを再構成して行った (図 3)。次いで、最初のレシピエントを、4 ヶ月後に採取し、二次的に致命的に照射したレシピエントに移植するために使用した。

【0340】

結果は、ヘパリン硫酸が幹細胞の相加的動員を誘発することを示す (左下パネル)。上記細胞は、二次的生着を提供するにあたって明確により能力があるようである (左下パネル、折れ線グラフの中断後) ($p < 0.001$)。これらデータは、安価で臨床的に利用可能なヘパリン硫酸が、G - C S F のみと比較して、機能的に異なる、おそらく機能的に優れた幹細胞集団を動員し得ることを示唆する。

10

【0341】

ヘパリン硫酸が内因性 H S P G との競合因子として機能するのを誘発するか否かを試験するために、本発明者らは、これが E X T 1 K O において G - C S F 動員を増大する能力を調べたところ、その効果を喪失していることが観察された (右下パネル)。従って、ヘパリン硫酸は、内因性プロテオグリカンが減少される場合に不活性であり；ヘパリン硫酸は、その活性に関してこれら分子の存在に依存し、このことは、ヘパリン硫酸が、内因性 H S P G に局所的に結合される V C A M - 1 のような分子への結合をおそらく通じて、H S P G を阻害するのを誘発することを示唆することを示唆する。

【0342】

20

H S P G は、特に強力な二次的再構成能力で幹細胞の局在化を制御するようであったので、および H S P G インヒビターが、医院で容易に利用可能であるので、本発明者らは、ニッチ傷害が回避されるべき状況においてこのアプローチが有用であり得るか否かを試験した。本発明者らは、ヘパリン硫酸もしくは別の臨床的に使用される H S P G アンタゴニストである硫酸プロタミンを単独で、幹細胞動員薬剤として試験した。いずれも単独では十分に有効ではなかった (データは示さず)。従って、本発明者らは、それらを、G - C S F と関連する骨内膜細胞への傷害なしに幹細胞を動員し得る A M D 3 1 0 0 とともに試験した。データは、いずれの薬剤も A M D 3 1 0 0 のみと比較して、動員の効力の増強を提供することを示し (図 4 中の 1 のところの線で示される)、A M D 3 1 0 0 + ヘパリン硫酸は、特別有効性を提供する (2 ~ 6 倍の増強) ($p < 0.05$)。

30

【0343】

G R O - β 、H S インヒビターおよび A M D 3 1 0 0 がニッチから H S P C を迅速に動員し得、H S C 局在化を左右する異なる分子実体を標的とすると仮定すると、これら薬剤は、内因性 H S P C を最大限に動員するために使用され得る。

【0344】

実施例 1 ~ 3 の参考文献

【表 A】

1. M. J. Kennedy *et al.*, *Cancer Res.* 53, 5424 (1993).
2. I. G. McQuaker *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 15, 451 (1997).
3. J. Jansen *et al.*, *Bone Marrow Transplant.* 23, 1251 (1999).
4. J. Nemunaitis *et al.*, *Bone Marrow Transplant.* 15, 949 (1995).
5. Stem Cell Trialists' Group, *J. Clin. Oncol.* 23, 5074 (2005).
6. P. Anderlini *et al.*, *Bone Marrow Transplant.* 27, 689 (2001).
7. P. Anderlini, D. Przepiorka, M. Korbling, R. Champlin, *Bone Marrow Transplant.* 21 Suppl 3, S35 (1998). 10
8. S. D. Rowley, G. Donaldson, K. Lilleby, W. I. Bensinger, F. R. Appelbaum, *Blood* 97, 2541 (2001).
9. C. Fortanier *et al.*, *Bone Marrow Transplant.* 29, 145 (2002).
10. P. Anderlini *et al.*, *Transfusion* 37, 507 (1997).
11. D. Lysak *et al.*, *Transfusion* 51, 319 (2011).
12. M. M. Mueller *et al.*, *Vox Sang.* 104, 46 (2013).
13. M. Cavo *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 25, 2434 (2007).
14. M. A. Gertz, *Br. J. Haematol.* 150, 647 (2010). 20
15. M. Attal *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 349, 2495 (2003).
16. P. Stiff *et al.*, *Bone Marrow Transplant.* 26, 471 (2000).
17. N. Schmitz *et al.*, *Blood* 85, 1666 (1995).
18. H. E. Broxmeyer *et al.*, *J. Exp. Med.* 201, 1307 (2005).
19. J. F. DiPersio *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 27, 4767 (2009).
20. J. F. DiPersio *et al.*, *Blood* 113, 5720 (2009).
21. L. M. Pelus, *Curr Opin Hematol* 15, 285 (2008).
22. S. M. Kymes *et al.*, *Am. J. Manag. Care* 18, 33 (2012). 30
23. H. Bittencourt *et al.*, *Blood* 99, 2726 (2002).
24. M. A. Pulsipher *et al.*, *Blood* 114, 2606 (2009).
25. R. Nakamura *et al.*, *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 449 (2008).
26. J. P. Panse *et al.*, *Br. J. Haematol.* 128, 659 (2005).

【0345】

実施例4：間葉細胞へパラン硫酸生成の阻害は、幹細胞動員を改善し、細胞傷害性前処置なしで生着を可能にする

【0346】

導入

【0347】

グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子 *Ext 1* は、ヘパラン硫酸 (HS) 生成に必須であり、成体マウスの間葉細胞 (骨格幹細胞/前駆細胞) の集団において阻害される場合、造血幹細胞および前駆細胞 (HSPC) 局在化において顕著な変化を生じる。HSPC は、*Ext 1* 欠失の後に、骨髓から脾臓へと出ていった。これは、間葉細胞における変化したシグナル伝達およびそれらによる *Vcam 1* 生成の低下と関連した。さらに、HS の薬理的阻害が、G-CSF 抵抗性の状況におけるものを含め、G-CSF のみよりも、定性的にはより強力な、および定量的にはより多くの HSPC を骨髓から動員した。*Ext 1* 欠失後の内因性 HSPC の低下した存在は、宿主のいかなる毒性の前処置もなしで、移

40

50

植されるHSPCの生着と関連した。従って、HS生成の障害は、非悪性状態のためのHSPC移植において放射線療法もしくは化学療法の毒性を回避するための手段を提供し得る。

【0348】

発生において細胞のパターンを確立することは、多細胞生物によって必要とされるより高次の組織化の根本である。モルフォゲン勾配は、パターン確立およびその後の組織機能において中心的な役割を果たし(Akiyama et al., 2008; Vied et al., 2012)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)との相互作用を通じて維持される(Inatani et al., 2003)。造血系において、HSPGは、重要な造血性サイトカインとインビトロで相互作用し、このことは、骨髓(BM)区画化におけるそれらの潜在的役割を示唆する(Gordon et al., 1987; Roberts et al., 1988)。

10

【0349】

本発明者らの研究室は近年、Myxovirus resistance 1(Mx1)遺伝子のインターフェロン誘発性発現によって特徴付けられる骨髓(BM)骨格幹細胞/前駆細胞の集団を記載した(Park et al., 2012)。これら細胞は、骨のホメオスタシスに関与し、HSPCニッチの構成要素であると示されたネスチン1+間葉集団と部分的に重なる(Mendez-Ferrer et al., 2010)。本発明者らは、局所的に分泌されるマトリクスタンパク質との相互作用によって維持されるサイトカインおよびモルフォゲンが、造血幹細胞/前駆細胞(HSPC)ニッチを維持するにあたって必須であると仮定した。これを試験するために、本発明者らは、Mx1+間葉細胞においてExt1遺伝子(ヘパラン硫酸(HS)の合成に必須のグリコシルトランスフェラーゼ)を条件付きで欠失させた(Inatani et al., 2003; McCormick et al., 1998)。

20

【0350】

本発明者らのデータは、Mx1+間葉細胞およびそれらの子孫において発現されるExt1/HSPGが、部分的に血管細胞接着分子-1(Vcam-1)を調節することによって、BM中のHSPC局在化および保持を制御することを示す。内因性HSの競合的な薬理的障害は、糖尿病モデルにおいて動員抵抗性の状況におけるものを含め、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の動員効力を増強した。さらに、上記動員されたHSPCは、照射した宿主での一次および二次移植における再構成の動態を改善した。最終的に、移植されるHSPCの生着は、マウスがExt1欠損にされた直後に細胞傷害性前処置なしで効率的に起こった。

30

【0351】

これら知見は、骨髓造血幹細胞ニッチにおけるHSの重要な役割を示し、HSもしくは酵素Ext1の標的化が臨床的移植に重要である動員もしくは生着のいずれかにおいて転帰を達成するための新規な方法を提供し得ることを示唆する。

【0352】

結果

【0353】

ヘパラン硫酸はHSPC局在化を制御する

40

【0354】

Mx1は、ポリ(I):ポリ(C)(pIpC)によるインターフェロン誘発の後に、造血系においておよび骨系統間葉細胞において発現される(Kuhn et al., 1995; Park et al., 2012)。Mx1プロモーターによって駆動されるcreリコンビナーゼによるfloxed対立遺伝子の二対立遺伝子欠失は、造血系において非常に効率的である(Gurumurthy et al., 2010)が、間葉区画においてあまり特徴付けられていない。pIpC投与の際の間葉区画におけるExt1欠失の効率を評価するために、コントロールおよび変異Ext1マウスを、ROSA26-loxP-stop-loxP-EYFP(Rosa-YFP)レポーターマウスと

50

交配して、*Ext1* *flx/flx*; *Mx1* *cre*+; *Rosa-YFP*+ (変異 *YFP*) 動物および *Ext1*+/+; *Mx1* *cre*+; *Rosa-YFP*+ (コントロール *YFP*) 動物を作った (図 6 A)。変異およびコントロール *YFP*+、*CD45*−、*Ter119*−骨格前駆細胞を、*pIpC* 誘発の 21 日後にフローソートし、*Ext1* の効率的欠失を、ウェスタンブロットによって、エキソビボで増殖させた細胞で検証した (図 6 B および 図 6 C)。さらに、*Ext1* 欠失の際の *HS* 生成の顕著な排除は、インビボで増殖した *Mx1* + 間葉細胞および新たに単離された *Mx1* + 間葉細胞で検出された (図 6 D および 図 6 E)。重要なことには、*Ext1* の欠失は、*BM* 中の免疫表現型で規定された間葉幹細胞の量に影響を及ぼさなかった (図 6 F)。

【0355】

Ext1 欠失を *Mx1* + 骨格前駆細胞に制限するために、本発明者らは、*CD45*. 1 発現コンジェニック動物 (*B6.SJL*) から致命的に照射した変異 (*Ext1* *flx/flx*; *Mx1* *cre*+) マウスもしくはコントロール (*Ext1* *flx/flx*; *Mx1* *cre*−) マウス (ともに *C57BL/6J* マウスバックグラウンドにある) へと全 *BM* 細胞を移植して (図 5 A)、コントロールおよび変異キメラを作った。移植の 6~8 週間後に、その造血系は、*CD45*. 1 細胞 (図 6 G) によって完全に置換され、キメラ動物は、末梢血 (*PB*) 中の白血球 (*WBC*) 数、赤血球 (*RBC*) 数、血小板数および *WBC* 系統分布のような同等のパラメーターを示した (図 6 H、図 6 I、図 6 J および 図 6 K)。次いで、*Ext1* を *pIpC* 誘発によって非造血性細胞において欠失させ、造血を 24 週間モニターした。*pIpC* の 24 週間後に、コントロールおよび変異キメラマウスの両方が、匹敵する総体重 (*TBW*) および *BM* 細胞性を示した (図 6 L および 図 6 M)。骨髓免疫表現型分析から、変異キメラにおける *Mac1* + *Gr1* + および *CD3* + 細胞の割合の有意な低下および *B220* + 集団における減少の傾向が明らかになった (図 6 N)。同様に、本発明者らは、成熟骨髓系前駆細胞 (骨髓系共通前駆細胞もしくは *CMP*、巨核球赤血球前駆細胞もしくは *MEP*、および顆粒球マクロファージ前駆細胞もしくは *GMP*) の割合の有意な低下 (図 5 B)、減少したリンパ系共通前駆細胞 (*CLP*) の傾向、ならびに変異キメラマウスの *BM* 中での *LKS* *CD48* − *CD150* + 造血幹細胞 (*HSC*) の割合の 1/2 減少 (図 5 C) を見出した。しかし、これら変化は、*HSC* 死滅の増大にも、増殖欠損にも原因があるとはできなかった (図 5 D および 図 5 E)。変異キメラマウスでの *HSC* のアポトーシスおよび細胞周期の変化がないと仮定して、本発明者らは、*PB* および脾臓を試験することによって、*HSPC* の誤った局在化を評価した。24 週間の時間経過の後、変異キメラは、顕著な白血球増加 (図 5 F) (と、*PB* 中のリンパ系細胞および骨髓系細胞の数の有意な増大 (図 6 O))、ならびに中程度の血小板減少と正常な赤血球 (*RBC*) 数 (図 6 P および 図 6 Q) を発現した。さらに、*PB* コロニー形成アッセイ (*CFU-C*) は、変異キメラマウスにおいて循環前駆細胞の有意な増大を示した (図 5 G)。

【0356】

変異キメラは、*pIpC* 注射の 24 週間後に、有意により大きな脾臓を有した (図 5 H)。脾臓の免疫表現型特徴付けから、*HSC* (図 5 I)、*CMP* および *GMP* の割合の実質的増大が明らかになったが、これらマウスにおいて *MEP* の増大は明らかにならなかった (図 5 J)。脾臓におけるこの *HSC* 蓄積は、それらの増殖の増大もしくは細胞死への抵抗に原因があるとはできない (図 6 R および 6 S)。さらに、変異キメラマウス由来の脾細胞と、*C57BL/6J* マウス由来の等しい数の脾細胞との競合的移植から、コントロールキメラ由来の脾細胞と比較して、有意に長期の競合的利点が明らかになった (図 5 K)。この移植実験におけるコントロールおよび変異キメラに由来する *HSC* による血球系統への寄与は、等しかった (図 6 T)。

【0357】

HSPC の誤った局在化は、好中球ターンオーバーおよび好中球誘発性の *BM* 微小環境変化と関連した (*Casanova-Acebes et al.*, 2013)。循環「老化」好中球 (図 6 U) および *BM* *Cxcl12* レベル (図 6 V) の分布は、コントロ

10

20

30

40

50

ールおよび変異キメラ $Ext1$ マウスにおいて等しかった。このことは、本発明者らのモデルにおいて認められた好中球増加が $HSPC$ の誤った局在化を説明しないことを示唆する。骨系細胞が、多くのマウスモデルにおいて造血に影響を及ぼす (Mercier et al., 2012) ことを示したと仮定して、本発明者らは、 $Ext1$ 変異マウスにおいて観察された $HSPC$ の誤った局在化が、損なわれた骨系細胞機能の結果であるか否かを評価した。骨の組織形態的計測的、マイクロCTおよび組織学的な分析から、有意差は示されなかった。このことは、 $Mx1$ + 骨格前駆細胞における $Ext1$ 欠失が骨格系のホメオスタシスには必須でないことを示唆する (図5L、図6W、表1および表2)。まとめると、これら結果は、 $Mx1$ + 骨格前駆細胞の集団による HS の生成が、 BM 腔における $HSPC$ 保持を調節することを示す。

【0358】

【表1】

表1：雄性 $EXT-1$ コントロールおよび変異の大腿マイクロCT分析

パラメーター	$EXT-1-loxP/loxP-$ (n=8)	$EXT-1-loxP/loxP-$ $Mx1cre+$ (n=4-5)	p 値
皮質骨			
全断面容積 (mm^3)	1.02±0.13	0.96±0.07	0.371
皮質容積 (mm^3)	0.41±0.08	0.37±0.06	0.408
骨髓容積 (mm^3)	0.62±0.10	0.59±0.04	0.617
皮質厚 (mm)	0.16±0.03	0.15±0.02	0.347
海綿骨			
BV/TV (-)	0.05±0.04	0.04±0.02	0.681
Tb.Th (mm)	0.040±0.009	0.039±0.008	0.829
Tb.N (/mm)	2.57±0.44	2.81±0.38	0.391
Tb.Sp (mm)	0.40±0.07	0.36±0.05	0.352
Conn.D (/mm ³)	61±44	51±20	0.674
SMI (-)	2.78±0.65	3.08±0.19	0.395
略語：BV、骨量；TV、総量；Tb、骨梁；Th、厚み；n、数；Sp、分離；Conn. D、連結性密度；SMI、構造モデル指数 値は、平均±SDとして表される。			

【0359】

【表 2 - 1】

表 2. 雄性EXT-1コントロールおよび変異の近位脛骨組織形態分析

パラメーター	<i>EXT-1-loxP/loxP-Mx1cre-</i> (n=8)	<i>EXT-1-loxP/loxP-Mx1cre+</i> (n=5)	p 値
BV/TV (%)	2.62±0.18	2.16±1.23	0.673
Tb.Th (μm)	32.41±15.24	23.58±4.77	0.241
Tb.N (/mm)	0.71±0.33	0.86±0.47	0.508
Tb.Sp (μm)	1727±1083	2334±3062	0.612
MS/BS (%)	27.34±11.66	28.47±12.52	0.872
MAR (μm/day)	1.72±0.33	1.33±0.82	0.252
BFR/BS (μm ³ /μm ² /year)	163±62	164±102	0.992
BFR/BV (%/year)	1059±374	1278±804	0.514
BFR/TV (%/year)	27±19	35±25	0.489
Ob.S/BS (%)	23.69±15.79	17.38±11.73	0.460
N.Ob/T.Ar (/mm ²)	28.08±29.96	24.25±14.16	0.796
N.Ob/B.Pm (/mm)	17.08±9.76	12.00±7.45	0.343
OV/TV (%)	0.126±0.272	0.039±0.031	0.500
OS/BS (%)	14.02±16.47	7.85±6.27	0.446
O.Th (μm)	3.18±1.04	2.05±1.22	0.101
Oc.S/BS (%)	4.94±2.77	3.35±1.39	0.263
N.Oc/T.Ar (/mm ²)	2.00±0.98	2.43±1.69	0.569
N.Oc/B.Pm (/mm)	1.56±0.81	1.55±0.74	0.987
ES/BS (%)	3.01±1.49	2.46±0.90	0.474

【表 2 - 2】

略語：BV、骨量；TV、総量；Tb、骨梁；Th、厚み；n、数；Sp、分離；MS/BS：石灰化表面／骨面；MAR：骨石灰化添加速度；BFR/BS：骨形成速度／骨面；BFR/BV：骨形成速度／骨体積；BFR/TV：骨形成速度／総体積；ObS/BS：骨芽細胞表面／骨面；N.Ob/T.Ar：骨芽細胞数／全断面；N.Ob/B.Pm：骨芽細胞数／骨周囲；OV/TV：類骨面／総体積；OS/BS：類骨面／骨面；O.Th：類骨厚；Oc.S/BS：破骨細胞面／骨面；N.Oc/T.Ar：破骨細胞数／全断面；N.Oc/B.Pm：破骨細胞数／骨周囲長；ES/BS：浸食面／骨面。値は、平均±SDとして表される。

【0360】

ヘパラン硫酸は、Vcam-1 依存性HSPC接着を調節する

【0361】

BMにおけるHSPCの微小解剖学的位置づけは、それらの異型相互作用に影響を与えて、刺激に対する活性および応答を変化させる。本発明者らは、BMにおけるHSPC位

置づけがMx1+骨格前駆細胞におけるExt1欠失に際して影響を受けるか否かを評価した。コントロールおよび変異マウスを、骨芽細胞を特異的に標識して、Col2.3プロモーターの制御下でGFPを発現するレポーター系統(Col2.3-GFP)に交配した(図7A)。Ext1コントロールおよび変異Col2.3-GFP+マウスを致命的に照射し、104 WT LKS CD48-CD150+DiD(1,1'-ジオクタデシル-3,3,3'-テトラメチルインドジカルボシアニンペルクロレート)標識HSCを移植した。標識したHSCを、生体内高分解能二光子共焦点顕微鏡によって注射の24時間後の頭蓋冠BMにおいて可視化し、骨芽細胞までのそれらの相対的距離(Col2.3-GFP+)および骨内膜面を定量した。変異動物におけるDiD+細胞の解剖学的位置づけは、GFP+骨系細胞からの距離がより大きい細胞で顕著に変化した(図7B および図8A)。HSが、HSPC局在化を調節することが公知の分子の調節に影響を及ぼすか否かを調査するために、コントロールおよび変異YFP+(図6A)、CD45-、Ter119-骨格前駆細胞を、pIpC誘発の21日後にフローソートした。mRNAレベルの評価から、Cxc112、Vcam1、Scfおよびアンジオポエチン-1(Mercier et al., 2012)の発現が、骨芽細胞からさらに離れて観察されたHSC局在化と一致して、変異マウスにおいて有意にダウンレギュレートされることが明らかになった(図7C)。

【0362】

骨系細胞におけるCxc112およびScfの条件付き欠失は、HSPC生物学に影響を及ぼさず(Ding and Morrison, 2013; Ding et al., 2012; Greenbaum et al., 2013)、アンジオポエチン-1は、Ext1欠失の際にHSCで変化しなかった状態であるHSC静止を制御する(Arai et al., 2004)(図5E)。さらに、BM中のCxc112レベル、およびMx1+間葉性細胞によって生成されるCxc112タンパク質は、コントロールおよび変異マウスにおいて匹敵した(図6Vおよび図8B)。よって、本発明者らは次に、Mx1+間葉細胞におけるExt1欠失の際に認められたHSPC欠損が、Vcam1発現における変化の結果であるか否かを評価した。Vcam1は、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリンVla4のリガンドである。Vla4-Vcam1軸は、HSPCのニッチへのHSPC接着において役割を果たし、この相互作用の薬理的阻害は、HSPC動員を生じる(Craddock et al., 1997; Parayannopoulou et al., 1995)。Vcam1タンパク質レベルは、変異マウス中のMx1+間葉細胞において有意に低下した(図7Dおよび図8C)。Vcam1発現における観察された低下が、Ext1変異キメラマウスにおいて認められるHSPCの誤った局在化に機能的に寄与するか否かを決定するために、本発明者らは、Vcam1中和抗体の添加が、コントロールおよび変異動物においてG-CSF誘発性のHSPC動員にどのようにして影響を及ぼすかを評価した(図7E)。G-CSFと一緒にVcam1中和抗体を受けたコントロール動物から動員されたPBは、G-CSFのみを受容する動物と比較して、循環CFU-Cにおいて有意な増大(図7F左パネル)(Craddock et al., 1997)および移植後に致命的に照射したコンジュニクレシピエントにおいて増大したドナーキメラ現象(図7G左パネル)を示した。しかし、G-CSFとVcam1中和抗体との組み合わせで動員された変異Ext1マウス由来のPBは、G-CSFのみと、CFU-Cの等しい数(図7F右パネル)および致命的に照射したコンジュニクレシピエントにおいて造血を再構成する等しい能力(図7G右パネル)を示した。匹敵する結果を、G-CSF投与なしでVcam1中和抗体に対する応答において得た(図8D)。まとめると、Mx1+骨格前駆細胞におけるExt1の欠失およびそのHSPG生成物は、Vcam1および他の接着メディエーターの生成を低減させ、領域を幹細胞保持の部位としてあまり機能しないようにする。

【0363】

インビボでのヘパラン硫酸プロテオグリカンの薬理的競合的阻害は、HSPC動員を誘発する

10

20

30

40

50

【0364】

H S 摸倣物は、おそらく内因性H S P G の競合的阻害を通じて、マウスにおいて迅速なH S P C 動員を誘発することが示された (Di Giacomo et al., 2012; Frenette and Weiss, 2000; Sweeney et al., 2002)。非常に硫酸化されたグリコサミノグリカンであるヘパリンは、それだけで動員を誘発する能力を欠いていることが示された (Frenette and Weiss, 2000)。驚くべきことに、本発明者らは、ヘパリン投与 (P B 採取の1時間前に100U/マウス) が、W B C 数の有意な変化なしで、C F U アッセイによって測定される場合、循環H S P C の数において中程度であるが有意な増大を誘発することを観察した (図10Aおよび図10B)。H S 生成の遺伝的欠失がH S P C 局在化を変化させ、ヘパリンがH S P G シグナル伝達を競合的に阻害する安価なF D A 承認薬であるという本発明者らの所見を考慮して、本発明者らは、ヘパリンが現在のG - C S F 動員レジメンと協同し得るか否かを調査した (図9A)。

【0365】

G - C S F と組み合わせてヘパリン (P B 採取の1時間前に100U/マウス) で処置したマウスは、G - C S F のみで処置したマウスと比較して、P B 中のW B C 数において中程度の ($p < 0.05$) 増大を示した (図9B)。しかし、ヘパリンとG - C S F との組み合わせは、致命的に照射したコンジュニックマウスへのP B 競合的移植によって測定される場合、長期の再構成細胞の動員を有意に増大した (図9C、折れ線グラフの中断前)。さらに、これら細胞は、二次レシピエントに生着するそれらの能力によって示されるように、効率的に自己再生した (図9C、折れ線グラフの中断後)。重要なことには、ヘパリンおよびG - C S F の投与は、G - C S F のみと比較して、明瞭な転写シグナチャーとともにH S C の集団を動員する (図9D、図9E、図9Fおよび表3)。このことは、H S 競合阻害が、H S P C の異なる集団を動員するか、または上記動員プロセスが、遺伝子発現特徴を迅速に変化させるために十分異なっているかのいずれかを示唆する。好中球および血小板数の回復は、臨床状況におけるB M 移植後の成功裡の生着を規定し、回復までの時間は、生存を推定する (Davies et al., 2000)。重要なことには、G - C S F およびヘパリンの共投与によって動員されたP B の非競合的移植は、G - C S F のみと比較して、好中球 (図9G) および血小板 (図9H) の4~6日間早い回復を生じた。ヘパリンとG - C S F との組み合わせは、E x t 1 変異マウスにおいてG - C S F のみを超えてH S P C 動員を増大させなかった。このことは、ヘパリンが、内因性H S P G を調節することによって、野生型マウスにおいてG - C S F 誘発性動員を増強することを示唆する (図9I)。また、ヒルジン (非ヘパリンベースの抗凝固剤) は、G - C S F 誘発性のH S P C 動員に影響を及ぼさなかった (図9J)。このことは、観察された効果がヘパリン抗凝固特性の結果ではなかったことを示唆する。

【0366】

【表3-1】

表3 : G - C S F のみで動員したH S P C に対してG - C S F + ヘパリンにおいて差次的に発現された遺伝子

プローブ	遺伝子記号	調節	log比	p 値
細胞集団				
1416693 at	Foxc2	ダウン	-1.0062	0.0078
1417155 at	Mycn	ダウン	-3.1231	0
1417311 at	Crip2	アップ	1.5451	0.0015
1417493 at	Bmi1	アップ	1.4062	0.0048
1417932 at	Il18	アップ	1.0414	0.0025
1419271 at	Pax6	ダウン	-1.1718	0.0006
1421066 at	Jak2	アップ	1.865	0
1421679 a at	Cdkn1a	アップ	1.224	0.0078
1424638 at	Cdkn1a	アップ	0.9342	0.0058

【表 3 - 2】

1424893_at	Ndel1	アップ	2.2582	0
1426569_a_at	Frk	ダウン	-0.6869	0.0055
1427351_s_at	Igh-6	アップ	1.136	0.0008
1429615_at	Zfp91	アップ	1.5046	0.0002
1432459_a_at	Zbtb32	アップ	2.0602	0
1433489_s_at	Fgfr2	ダウン	-1.0878	0.0029
1436186_at	E2f8	アップ	1.6996	0.0031
1437039_at	Cops2	アップ	1.0689	0.0055
1448834_at	Foxm1	アップ	1.3727	0.0043
1449044_at	Eef1e1	ダウン	-1.5725	0.0053
1449145_a_at	Cav1	アップ	0.6057	0.0095
1449351_s_at	Pdgfc	アップ	0.8549	0.0002
1450923_at	Tgfb2	ダウン	-0.8205	0.0089
1451651_at	LOC100044885	アップ	1.8016	0.0001
増殖調節				
1416035_at	Hif1a	アップ	1.4512	0.0002
1418349_at	Hbegf	アップ	1.1121	0.0045
1419988_at	Map3k7	アップ	1.3737	0.0005
1423753_at	Bambi	アップ	1.0132	0.0095
1427418_a_at	Hif1a	アップ	1.0208	0.009
1433489_s_at	Fgfr2	ダウン	-1.0878	0.0055
1436736_x_at	D0H4S114	アップ	1.0423	0.0076
1448183_a_at	Hif1a	アップ	1.0676	0.0063
1451563_at	Emr4	ダウン	-1.216	0.0019
1451866_a_at	Hgf	アップ	1.1982	0.0022
細胞接着				
1416808_at	Nid1	アップ	2.492	0.0002
1418424_at	LOC100044927	アップ	0.6592	0.0033
1421694_a_at	Vcan	アップ	0.6578	0.0034
1421811_at	LOC640441	アップ	1.8823	0.0038
1424409_at	Cldn23	アップ	1.2088	0.0049
1428455_at	Col14a1	アップ	0.5514	0.0061
1448393_at	Cldn7	アップ	0.9215	0.0046
1450938_at	Pnn	アップ	1.1524	0.0048
1455056_at	Lmo7	アップ	1.7536	0.0096
1417123_at	Vav3	ダウン	-1.0319	0
1417484_at	Ibsp	ダウン	-0.8826	0
1419820_at	Pkhd1	ダウン	-0.7303	0.0006
1420429_at	Pcdhb3	ダウン	-0.6167	0.004
1420524_a_at	Masp2	ダウン	-0.6803	0.0043
1421610_at	Cx3cl1	ダウン	-0.6985	0.0011
1425017_at	Pcdhac1	ダウン	-1.2135	0
1425935_at	2900042B11Rik	ダウン	-0.8534	0.0008
1426865_a_at	Ncam1	ダウン	-2.1841	0.0009
1426911_at	Dsc2	ダウン	-1.7295	0
1427592_at	Pcdh7	ダウン	-1.4432	0

10

20

30

40

【表 3 - 3】

1430676_at	Col19a1	ダウン	-1.8701	0.0005
1436714_at	Lpp	ダウン	-1.2253	0
1437218_at	Fnl	ダウン	-0.9914	0.0001
1448162_at	Vcam1	ダウン	-0.6517	0.0021
1449091_at	Cldn8	ダウン	-1.7035	0
1450758_at	Cntnap2	ダウン	-1.479	0
1453128_at	Lyve1	ダウン	-0.9659	0.0001
1453589_a_at	6820431F20Rik	ダウン	-1.5251	0.0076
ダウンおよびアップは、ヘパリン処置に言及する。低強度および低分散のプロープは、分析から外した。FDR（偽発見率）補正を適用した。				

10

【0367】

造血幹細胞移植は、多くの血液障害にとって相変わらず常套手段的根治療法のままである。しかし、G-C S F 動員抵抗性は、いくらかの個体にとって救命治療を危うくし得る。従って、本発明者らは、H S P G の遺伝的もしくは薬理的競合阻害が、I 型糖尿病誘発性の動員障害のマウスモデル（Ferraro et al., 2011）において、G-C S F 誘発性の、BM から H S P C が出て行くことを促進し得るか否かを評価した。G-C S F は、I 型糖尿病マウスにおいて H S P C を効率的に動員しなかった。しかし、G-C S F への損なわれた応答は、M x 1 + 間葉細胞において E x t 1 発現を欠如する I 型糖尿病マウスにおいて十分に矯正された（図 9 K）。さらに、ヘパリンと G-C S F との組み合わせは、致命的に照射されたマウスへの P B 競合的移植によって測定される場合、糖尿病動物における長期の再構成細胞の正常な動員を生じた（図 9 L）。これらデータは、内因性 H S P G の機能的競合阻害が、薬理的に誘発された糖尿病を有する動物において注意される動員異常をレスキューすることを示す。

20

【0368】

次に、本発明者らは、ヘパリン誘発性の動員が、G-C S F 刺激の非存在下での V c a m 1 阻害の際に排除されるか否かを評価した。なぜなら、V c a m 1 は、少なくとも部分的には、E x t 1 変異マウスにおいて認められる欠損の原因であるからである。ヘパリンの投与は、C F U アッセイによって測定される場合、ビヒクルと比較して H P S C 動員を増強した（図 9 M および図 10 C）。逆に、ヘパリンおよび V c a m 1 中和抗体の共投与は、V c a m 1 中和のみを超えて H S P C 動員を改善しなかった。このことは、ヘパリンが V c a m 1 依存性接着を調節することによって動員を誘発することを示唆する（図 9 M および図 10 C）。しかし、P B 採取の 1 時間前のヘパリンの投与は、M x 1 間葉細胞における V c a m 1 レベルを調節しない（図 10 D）。このことは、以前に示されたように（Schlesinger et al., 2009）、V c a m 1 - V l a 4 相互作用に影響を及ぼすアロステリック相互作用のような V c a m 1 依存性接着に対するヘパリンの効果において代替の機構が関係していることを示唆する。重要なことには、本発明者らの結果はまた、ヘパリンの共投与が A M D 3 1 0 0 誘発性の動員を増強することを示す（図 9 M、図 10 C の中央の陰影付きのパネル）。さらに、A M D 3 1 0 0、C x c r 4 アンタゴニスト（Broxmeyer et al., 2005）はまた、E x t 1 欠損マウスにおいて G-C S F 誘発性の動員を増強する（図 10 E）。このことは、H S P C 保持における H S の役割が、C x c l 1 2 - C x c r 4 軸とは無関係であることを示唆する。

30

40

【0369】

M x 1 + 間葉細胞は、移植される造血幹細胞および前駆細胞の生着を制御する

【0370】

BM における H S P C 生着は、全身照射および高用量化学療法によってしばしば達成される、BM ニッチを効率的に空白にすることに依拠する（Armitage, 1994）。これら前処置法は、処置プランの一部として放射線療法もしくは高用量化学療法を要す

50

る悪性腫瘍には罹患していない患者にとって毒性であり望ましくない。

【0371】

本発明者らは、Mx1+間葉細胞におけるExt1の排除が、細胞傷害性前処置なしで生着を可能にし得るか否かを評価した。pIpC誘発の3週間後、コントロールマウスおよび変異マウスに、コンジェニックCD45.1 BM細胞を移植し、16週間追跡した。顕著なことには、コントロール動物は、移植された細胞用量とは無関係に生着しなかった一方で、変異マウスは、移植の過程全体を通じて用量依存性様式で生着の有意な増大を示した(図11A)。細胞の生着は、長期の多系統再構成を示した(図11B)。よって、HSPGのMx1+間葉細胞生成は、BMにおけるHSPC生着のプロセスを調節する。このことは、HSを標的とすることが、細胞傷害性の事前処置なしで生着を可能にする手段を提供し得ることを示唆する。

10

【0372】

考察

【0373】

分泌型および膜結合型HSPGは、異種細胞相互作用に必要な微小環境を作り出して組織を作り維持する、Drosophilaから哺乳動物までの生物における多くの生物学的プロセスに関与している(Kraushaar et al., 2012; Viel et al., 2012)。造血において、いくつかの先行する報告は、HSPGの重要性を示した。例えば、HS模倣物は、造血幹細胞/前駆細胞(HSPC)動員を誘発することを示した(Di Giacomo et al., 2012; Frenette and Weiss, 2000; Sweeney et al., 2002)。その一方で、HS切断酵素ヘパラーゼの過剰発現は、BMにおけるHSPC蓄積を生じた(Spiegel et al., 2008)。さらに、グリピカン-3(細胞表面HSPG)は、細胞外ジペプチジルペプチダーゼCD26を阻害する(Khurana et al., 2013)し、CD26は、HSPCのホーミングおよびBMから出て行くことに影響を及ぼす(Christopherson et al., 2004)。ここで、本発明者らは、HSの骨格幹細胞/前駆細胞生成が、HSPC骨髄保持を制御し、動員抵抗性の状況においてすらより強力なHSPCを動員するために阻害され得、そしてHSPC生着のために非毒性前処置を可能にするように標的化され得るという証拠を示す。これらデータを通じて、本発明者らは、Mx1発現間葉細胞および/もしくはそれらの子孫が、造血幹細胞のニッチに関与するBM細胞の集団を含むことを示す(図11C)。

20

30

【0374】

骨格幹細胞/前駆細胞によって生成される内因性HSPGの操作は、臨床的に重要な課題に十分に関連するように局在化を変化させ得る。第1に、G-CSFとヘパリンの共投与は、より迅速な造血性の再構成および増大した二次移植能を有する定量的に明瞭なHSPCを動員した。これらデータは、これら薬剤の併用が、移植のための非常に強力なHSPCの回収に有利であり得ることを示唆する。第2に、ヘパリンもしくはExt1欠失は、糖尿病表現型によって誘発されるG-CSF抵抗性の状況ですら、G-CSF誘発性のHSPC動員を増強した。挿話的であるが、糖尿病表現型の病態生理的基礎は、ニューロパチーを含む。Ext1の欠失は動員欠損の発生を妨げるので、HSが糖尿病のニューロパチー合併症に関与するか否かを考慮することは、興味をそそる。最後に、Ext1欠失は、注入されるHSPCが生着し得、いくらかの非悪性臨床状態にとって意味があるキメラ現象のレベルを達成し得る状況を提供した。キメラ現象のレベルは、AMD3100が5倍多くの骨髄細胞を使用する他者によって前処置レジメンとして使用した場合(Chen et al., 2006)に認められるものの2倍より高かったことに注意すべきである。なぜなら動物におけるExt1欠失の誘発は、細胞を注入する前の3週間の間隔にわたって動物の見かけ上の健康を損なわなかったもので、Ext1機能の阻害は、細胞傷害性前処置なしでHSPC生着を達成する戦略であり得る。この論点は、非悪性疾患のためにHSPCを遺伝的に改変するという成功の改善とともに、ますます重要である(Aiuti et al., 2013; Biffi et al., 2013)。

40

50

【0375】

実施例4の実験手順

【0376】

マウス

【0377】

Ext1 flox/floxマウスは、以前に記載された (Inatani et al., 2003)。C57BL/6J、B6.SJL-Ptprca Pep3b/BoyJ (B6.SJL)、Mx1-Cre (B6.Cg-Tg (Mx1-cre) lCgn/J)、Rosa26-loxP-stop-loxP-EYFP (Rosa-YFP, B6.129X1-Gt (Rosa) 26Sortm1 (EYFP) Cos/J) および Col2.3-GFP (B6.Cg-Tg (Col1a1*2.3-GFP) lRowe/J) マウスを、Jackson laboratoryから購入した。6~12週齢の雄性マウスを使用した。ポリイノシン酸-ポリシチジル酸 (pIpC) を、Amersham (GE-Healthcare Life Sciences) から得、4日間にわたって1日おきにPBS中で25mg/kg 総体重 (TBW) の用量で腹腔内 (i.p.) 注射によって投与した。Harvard University Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) および Subcommittee on Research Animal Care of the Massachusetts General Hospital が全ての動物研究を承認した。

10

20

【0378】

フローサイトメトリー分析

【0379】

造血区画および間葉区画の免疫表現型特徴付けを、以前に記載されるように行った (Gurumurthy et al., 2010)。詳細については、補遺情報を参照のこと。Vcam1およびCxc112タンパク質レベルを、それぞれ抗Vcam1-APC抗体および抗Cxc112-APC抗体、ならびにその対応するアイソタイプコントロール (R&D Systems) で評価した。全てのデータ収集を、LSRIIもしくはFACS Aria II (Beckon Dickinson) で行い、データ分析をFlowJo (Treestar) で行った。

30

【0380】

移植アッセイ

【0381】

非競合的BM移植に関して、図1aに記載されるキメラを作製するために、B6.SJL (CD45.1) マウス由来の 1×10^6 全BM細胞を、pIpC投与の6~8週間前に、致命的に照射した (移植前に4~24時間セシウム源から9.5Gy) Ext1-loxP/loxP-Mx1cre (CD45.2) レシピエントに移植した。好中球および血小板回復アッセイを、以前に記載されるように行った (Hoggatt et al., 2013)。簡潔には、C57BL/6J (CD45.2) マウス由来の 3×10^6 の動員されたPB単核細胞 (MNC) を、致命的に照射したB6.SJL (CD45.1) マウスに移植し、少なくとも36日間追跡した。細胞傷害性前処置なしでの移植のために、B6.SJLマウス由来の 1×10^6 、 4×10^6 もしくは 8×10^6 の全BM細胞を、pIpC投与の3週間後にExt1-loxP/loxP-Mx1creレシピエントに移植した。動員された末梢血 (PB) の競合的移植のために、150 μ l のPB (CD45.2) を、 2×10^5 コンジェニックBM支持細胞と混合し、致命的に照射したCD45.1レシピエントに注射した。細胞を、側方尾静脈注射 (lateral tail vein injection) によって注入した。FACS分析によって、4週間間隔で生着をモニターした。

40

【0382】

生体内顕微鏡検査

50

【0383】

頭蓋冠BM腔中のHSPCのインビボ画像化およびデータ分析を、以前に記載されるように行った (Lo Celso et al., 2009)。簡潔には、FACSソートしたHSCを、DiD (Invitrogen) で1:200希釈を使用して、37℃において15分間PBS中で染色し、致命的に照射したExt1コントロールおよび変異Col2.3-GFP+レシピエントに注射した。マウスを24時間後に画像化した。HSC、GFP+骨芽細胞と骨との間の距離を、Image Jソフトウェアを使用して測定した。

【0384】

HSC動員および採血

10

【0385】

組換えヒトG-CSF (Neupogen, Filgrastim) を、8回連続注射のために12時間ごとに、125μg/kg TBWで投与した。ヘパリンナトリウム (APP Pharmaceuticals) を、単一用量100Uでi.p.注射した。単一用量において40mg/kg TBWでヒルジンを使用した。Vcam1中和抗体およびその対応するアイソタイプコントロール (ラットIgG2a, k) を、3用量にわたって毎日2mg/kg TBWで静脈注射し、PBサンプルを最後の注射の翌日に眼窩後部採血によって得た。AMD3100を、単一用量5mg/kg TBWで皮下投与した。PBサンプルを、G-CSFの最後の注射の3時間後およびヘパリン、AMD3100、もしくはヒルジン注射の1時間後に、眼窩後部採血によって得た。

20

【0386】

糖尿病マウスモデル

【0387】

4~6週齢のC57BL/6J雄性マウスもしくはExt1-loxP/loxP-Mx1cre雄性マウスにおいて以前に記載されるように糖尿病を誘発した (Ferraro et al., 2011)。300mg/dlより高いグルコース値を有する動物のみを実験に使用した。

【0388】

統計分析

【0389】

30

不對の両側スチューデントt検定もしくは一元配置ANOVA、続いて適切な事後検定を使用した。正規 (ガウス) 分布に従うサンプルに関して、データを、平均±SDとしてプロットした。あるいは、Mann-Whitney U検定を使用し、データを平均±IQR (四分位数範囲) としてプロットした。統計的有意性を、以下のように示す: ns: 有意でない; * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001。

【0390】

フローサイトメトリ分析

【0391】

造血幹細胞および前駆細胞を、系統マーカー、ならびに蛍光色素に結合体化した以下のマーカーによって同定した: c-Kit-APC、CD34-FITC、CD16/32-PE-Cy7、CD127-APC-Cy7、CD48-Pacific Blue、CD150-PEおよびSca-1-PE-Cy7。系統染色を、Mac-1a (CD11b)、Gr-1 (Ly-6G/C)、Ter119 (Ly-76)、CD3、CD4、CD8a (Ly-2) およびB220に対するビオチン化抗マウス抗体のカクテルで行い、続いて、Pacific Orangeに結合体化したストレプトアビジン (Invitrogen) で検出を行った。コンジュニック系統識別のために、抗CD45.1-PE-Cy7抗体および抗CD45.2-FITC抗体を使用した。成熟リンパ系細胞および骨髓系細胞を、以下によって同定した: B220-Pacific Blue (B細胞)、Mac-1a-PEおよびGr1-APCもしくはFITC (骨髓系細胞) およびCD3-PE-Cy5もしくはAlexa700 (T細胞)。

40

50

【0392】

循環好中球の評価を、以前に記載されるように行った (Casanova-Acebes et al., 2013)。好中球を、それらのMac1 (PE-Cy7)、Gr1 (FITC)、CD62 (APC) およびCxc4 (PE) の発現によって、ならびにB220 (Pacific Blue)、CD3、CD4、CD8、Ter119、CD115、CD117、CD49b およびF4/80 (全てビオチン化、続いてPacific Orangeに結合体化されたストレプトアビジンで検出) の発現の欠如によって同定した。細胞周期分析については、骨髓細胞を、最初にHSC細胞表面マーカー (Lineage-APC-Cy7、c-Kit-APC、Sca1-PE-Cy7、CD48-PE およびCD150-PE-Cy5) に関して染色し、固定し、BD Cytotfix /Cytoperm Kit (BD Biosciences) を使用して透過性にし、Ki-67-FITC (BD Biosciences) で45分間、4℃において染色し、続いて、DAPI (2pg/mL) (Invitrogen) でDNA染色した。アポトーシスに関しては、7-AAD およびAnnexin V-FITC (BD Biosciences) 染色を、製造業者の説明書に従って使用した。

【0393】

間葉幹細胞を、CD45-Ter119- (ともにPE-Cy7) BM細胞の中で、CD105 (PE)、CD140 (APC)、Sca1 (Pacific Blue) およびMx1 (Rosa26-loxP-stop-loxP-EYFP) の発現によって同定した (Chan et al., 2009; Morikawa et al., 2009; Park et al., 2012)。

【0394】

Mx1+間葉細胞におけるExt1欠失に際したヘパラン硫酸生成の評価を、抗HS抗体10E4 (Seikagaku Corporation)、続いて、PE結合体化抗マウスIgMとインキュベーションして製造業者の説明書に従って行った。

【0395】

全ての抗体を、別段示されなければ、BD Biosciences、BioLegendもしくはeBiosciencesから購入した。

【0396】

全血球計算 (CBC)

30

【0397】

血球計算を、自動Vetscan HM2 (Abaxis) で行った。

【0398】

コロニー形成単位 (CFU) アッセイ

【0399】

CFUアッセイを、以前に記載されるように行った (Ferraro et al., 2011)。等体積のPB (実験に依存して50~200µl) を、アンモニウム塩化物-カリウム緩衝液での赤血球溶解に供し、4mlのメソカルトM3434 (Stem Cell Technologies) 中に再懸濁し、35mm培養ディッシュにプレートし (1mL/ディッシュ)、8日間にわわって37℃で培養し、その後、コロニー形成についてスコア付けした。

40

【0400】

マイクロCT

【0401】

海綿骨および皮質骨の微小構造を、高分解能マイクロCT (resolution 7µm, microCT35, Scanco Medical AG, Bassersdorf, Switzerland) によって大腿骨で分析した。骨を、エネルギーレベル55kVp および強度145µAでスキャンした。上記マイクロCT35を、Scancoによって提供される模型を使用して、1週間に1回補正する。海綿骨密度 (cancellous bone volume fraction) および微小構造を、遠位大腿骨成

50

長板から0.15mm近位で出発して、近位3.2mmまで拡げて二次海綿において評価した。約460の連続スライスを、成長板の遠位端において7μm間隔で近位方向に拡げて作製し、300の連続スライスを分析用に選択した。最大グレースケール値の29%での固定閾値を使用して、全てのサンプルで軟組織から骨を分離した。皮質領域についてのスキャンを、7μmの等方ボクセルサイズで各大腿骨の中間点において測定した。中央骨幹分析に関しては、皮質殻(cortical shell)を、最大グレースケールの35%でユーザー定義閾値によって輪郭を示し、全86スライスを通じて反復した。全スキャンを、製造業者のソフトウェア(Scanco, バージョン4.05)を使用して分析した。マウクロCTデータの取得および分析を、近年発表されたガイドライン(Bouxsein et al., 2010)に従って行った。

10

【0402】

骨組織形態測定

【0403】

コントロールおよび変異マウスに致命的に照射し、6週齢で 10^6 BM細胞を移植した。Ext1欠失を、pIpC注射によって移植後3週間で誘発した。静的および動的組織形態計測測定値を、12週齢で(BM移植の6週間後)変異マウスとコントロールマウスとの間で分析した。サンプル採取前に、マウスに7日間および2日間、それぞれ、20mg/kg カルセインおよびデメクロサイクリンをi.p.注射した。脛骨を以前に記載されるように(Liu et al., 2012)分析し、パラメーターの記載については標準命名法を使用した(Dempster et al., 2013)。

20

【0404】

骨組織学

【0405】

組織学的準備および分析を、以前に記載されるように行った(Guo et al., 2010)。

【0406】

RNA単離、定量的リアルタイムPCRおよびマイクロアレイ遺伝子発現プロファイリングのために、Ext1-loxP/loxP-Mx1cre+-Rosa-YFP+およびExt1-loxP/loxP-Mx1cre+-Rosa-YFP+マウスに由来するYFP+CD45-Ter119-PI-(ヨウ化プロピジウム)細胞を、Trizol試薬(Invitrogen)の中へと直接FACSソートし、mRNAを、製造業者の説明書に従って抽出した。cDNA合成を、RETROscript逆転写キット(Ambion)で行った。リアルタイムPCRを、SYBRグリーン(Applied Biosystems)技術を使用して製造業者の説明書に従って行った。本研究でのSYBRグリーンリアルタイムPCRに使用したプライマーは、以前に公開されている(Ding and Morrison, 2013; Mendez-Ferrer et al., 2010; Pomyje et al., 2001; Zerfaoui et al., 2008)(全て5'→3')。

30

【0407】

【化1】

40

VCAM1: TGCCGAGCTAAATTACACATTG (配列番号 :1)および

CCTTGTGGAGGGATGTACAGA (配列番号 :2).

【0408】

【化2】

CXCL12: TGCATCAGTGACGGTAAACCA (配列番号 :3)および

CACAGTTTGGAGTGTGAGGAT (配列番号 :4).

【0409】

【化 3】

Angptl: GCGCTGGCAGTACAATGACAGT (配列番号 : 5) および
ATTTTCCATCACATGCTCCAGAT (配列番号 : 6).

【0 4 1 0】

【化 4】

SCF1: CCCTGAAGACTCGGGCCTA (配列番号 : 7) および
CAATTACAAGCGAAATGAGAGCC (配列番号 : 8).

【0 4 1 1】

【化 5】

EXT-1: GCCCTTTTGT TTTTATTTTGG (配列番号 : 9) および
TCTTGCC TTTGTAGATGCTC (配列番号 : 10).

【0 4 1 2】

【化 6】

Frizzled-1: CAGCAGTACAACGGCGAAC (配列番号 : 11) および
GTCCTCCTGATTTCGTGTGGC (配列番号 : 12).

【0 4 1 3】

マイクロアレイ分析のために、G-C S Fのみもしくはヘパリンと組み合わせて動員したマウスに由来するPBを、本文主要部に記載されるように集めた。単核細胞を、勾配遠心分離によって単離し、H S P Cマーカー (L i n e g a e e-、c-k i t+、S c a-1+) に関して染色し、T r i z o l (I n v i t r o g e n) へと直接ソートした。RNAを製造業者の説明書に従って抽出した。増幅されたcDNAを、Nu G E N O v a t i o n V 2増幅システムを使用して製造業者の説明書に従って総RNAから調製した。増幅されたcDNAを、Z y m o R e s e a r c h D N A C l e a n & C o n c e n t r a t o rシステムを使用して精製した。精製したcDNAを、製造業者の説明書に従って、M o u s e 4 3 0 Aマイクロアレイにハイブリダイズさせた。N e x u s E x p r e s s i o n v 2. 0 (B i o d i s c o v e r y) を使用してデータを分析した。低分散、低強度および偽発見率 (F D R) 補正を、データ分析のために適用した。

【0 4 1 4】

ウェスタンブロッティング

【0 4 1 5】

E x t 1-l o x P / l o x P-M x 1 c r e+-R o s a-Y F P+およびE x t 1-l o x P / l o x P-M x 1 c r e+-R o s a-Y F P+マウスに由来するY F P+C D 4 5-T e r 1 1 9-P I- (ヨウ化プロピジニウム) 細胞を、F A C Sソートし、リボスクレオシドおよびデオキシリボスクレオシドなしの、20% F B S、2. 2 g / L 炭酸水素ナトリウムおよび2. 5 m L の2-メルカプトエタノール (100×、M i l l i p o r e E S-007-E) を補充したα-M E M培地中で10日間にわたってエキソビボで増殖させた。細胞を、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビター (10 m M N a F、1 m M N a₃ V O₄ および1×プロテアーゼカクテル (R o c h e)) を補充したR I P A緩衝液 (B o s t o n B i o p r o d u c t s) 中で溶解した。タンパク質抽出物 (20 μ g) を、12. 5% ポリアクリルアミドゲルでS D S-P A G Eによって分離し、ニトロセルロース膜 (B i o-R a d) 上にイムノブロットし、標準プロトコルを使用してケミルミネッセンスによって可視化した。以下の抗体を使用した: 抗E x t 1 (S i g m a, w h 0 0 0 2 1 3 1 m l) および抗ウサギG a p d h (a b c a m, a b 9 4 8 5) 。フィルムをスキャンし、I m a g e Jソフトウェア (N I H) を使用してデンシトメトリー測定を行った。E x t 1バンドの光学密度を、G a p d hの光学密度に対して正規化した。E x t 1タンパク質のレベルを、G a p d

10

20

30

40

50

h のレベルに対してその光学密度の比として表した。

【表 B - 1】

実施例 4 の参考文献

1. Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M.P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M.C., et al. (2013). Lentiviral

【表 B - 2】

- | | |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. Science 341, 1233151. 2. Akiyama, T., Kamimura, K., Firkus, C., Takeo, S., Shimmi, O., and Nakato, H. (2008). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation by stabilizing Dpp on the cell surface. Dev Biol 313, 408-419. 3. Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 118, 149-161. 4. Armitage, J.O. (1994). Bone marrow transplantation. N Engl J Med 330, 827-838. 5. Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., Baldoli, C., Martino, S., Calabria, A., Canale, S., et al. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. Science 341, 1233158. 6. Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., et al. (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. J Exp Med 201, 1307-1318. 7. Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A.G., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. Cell 153, 1025-1035. 8. Chen, J., Larochelle, A., Fricker, S., Bridger, G., Dunbar, C.E., and Abkowitz, J.L. (2006). Mobilization as a preparative regimen for hematopoietic stem cell transplantation. Blood 107, 3764-3771. 9. Christopherson, K.W., 2nd, Hangoc, G., Mantel, C.R., and Broxmeyer, H.E. (2004). Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. Science 305, 1000-1003. 10. Craddock, C.F., Nakamoto, B., Andrews, R.G., Priestley, G.V., and Papayannopoulou, T. (1997). Antibodies to VLA4 integrin mobilize long-term repopulating cells and augment cytokine-induced mobilization in primates and mice. Blood 90, 4779-4788. 11. Davies, S.M., Kollman, C., Anasetti, C., Antin, J.H., Gajewski, J., Casper, J.T., Nademanee, A., Noreen, H., King, R., Confer, D., et al. (2000). Engraftment and | <p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p> |
|---|---|

【表 B - 3】

- survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program. *Blood* 96, 4096-4102.
12. Di Giacomo, F., Lewandowski, D., Cabannes, E., Nancy-Portebois, V., Petitou, M., Fichelson, S., and Romeo, P.H. (2012). Heparan sulfate mimetics can efficiently mobilize long-term hematopoietic stem cells. *Haematologica* 97, 491-499.
 13. Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231-235. 10
 14. Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457-462.
 15. Ferraro, F., Lymperi, S., Mendez-Ferrer, S., Saez, B., Spencer, J.A., Yeap, B.Y., Masselli, E., Graiani, G., Prezioso, L., Rizzini, E.L., et al. (2011). Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med* 3, 104ra101.
 16. Frenette, P.S., and Weiss, L. (2000). Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and independent mechanisms. *Blood* 96, 2460-2468. 20
 17. Gordon, M.Y., Riley, G.P., Watt, S.M., and Greaves, M.F. (1987). Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature* 326, 403-405.
 18. Greenbaum, A., Hsu, Y.M., Day, R.B., Schuettelpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* 495, 227-230. 30
 19. Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature* 468, 659-663.
 20. Hoggatt, J., Mohammad, K.S., Singh, P., Hoggatt, A.F., Chitteti, B.R., Speth, J.M., Hu, P., Poteat, B.A., Stilger, K.N., Ferraro, F., et al. (2013). Differential stem- and progenitor-cell trafficking by prostaglandin E2. *Nature* 495, 365-369.

【表 B - 4】

21. Inatani, M., Irie, F., Plump, A.S., Tessier-Lavigne, M., and Yamaguchi, Y. (2003). Mammalian brain morphogenesis and midline axon guidance require heparan sulfate. *Science* 302, 1044-1046.
22. Khurana, S., Margamuljana, L., Joseph, C., Schouteden, S., Buckley, S.M., and Verfaillie, C.M. (2013). Glypican-3-mediated inhibition of CD26 by TFPI: a novel mechanism in hematopoietic stem cell homing and maintenance. *Blood* 121, 2587-2595. 10
23. Kraushaar, D.C., Rai, S., Condac, E., Nairn, A., Zhang, S., Yamaguchi, Y., Moremen, K., Dalton, S., and Wang, L. (2012). Heparan sulfate facilitates FGF and BMP signaling to drive mesoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 287, 22691-22700.
24. Kuhn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427-1429.
25. Lo Celso, C., Fleming, H.E., Wu, J.W., Zhao, C.X., Miake-Lye, S., Fujisaki, J., Cote, D., Rowe, D.W., Lin, C.P., and Scadden, D.T. (2009). Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature* 457, 92-96. 20
26. McCormick, C., Leduc, Y., Martindale, D., Mattison, K., Esford, L.E., Dyer, A.P., and Tufaro, F. (1998). The putative tumour suppressor EXT1 alters the expression of cell-surface heparan sulfate. *Nat Genet* 19, 158-161.
27. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834. 30
28. Mercier, F.E., Ragu, C., and Scadden, D.T. (2012). The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* 12, 49-60.
29. Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G.V., and Wolf, N.S. (1995). The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9647-9651.
30. Park, D., Spencer, J.A., Koh, B.I., Kobayashi, T., Fujisaki, J., Clemens, T.L., Lin, C.P., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2012). Endogenous bone marrow 40

【表 B - 5】

- MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell* 10, 259-272.
31. Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T.D., Bloomfield, F., and Dexter, T.M. (1988). Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature* 332, 376-378.
 32. Schlesinger, M., Simonis, D., Schmitz, P., Fritzsche, J., and Bendas, G. (2009). Binding between heparin and the integrin VLA-4. *Thromb Haemost* 102, 816-822. 10
 33. Spiegel, A., Zeharia, E., Vagima, Y., Itkin, T., Kalinkovich, A., Dar, A., Kollet, O., Netzer, N., Golan, K., Shafat, I., et al. (2008). Heparanase regulates retention and proliferation of primitive Sca-1+/c-Kit+/Lin- cells via modulation of the bone marrow microenvironment. *Blood* 111, 4934-4943.
 34. Sweeney, E.A., Lortat-Jacob, H., Priestley, G.V., Nakamoto, B., and Papayannopoulou, T. (2002). Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* 99, 44-51. 20
 35. Vied, C., Reilein, A., Field, N.S., and Kalderon, D. (2012). Regulation of stem cells by intersecting gradients of long-range niche signals. *Dev Cell* 23, 836-848.
 36. Bouxsein, M.L., Boyd, S.K., Christiansen, B.A., Guldberg, R.E., Jepsen, K.J., and Muller, R. (2010). Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25, 1468-1486.
 37. Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A.G., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., et al. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025-1035. 30
 38. Chan, C.K., Chen, C.C., Luppen, C.A., Kim, J.B., DeBoer, A.T., Wei, K., Helms, J.A., Kuo, C.J., Kraft, D.L., and Weissman, I.L. (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* 457, 490-494.
 39. Dempster, D.W., Compston, J.E., Drezner, M.K., Glorieux, F.H., Kanis, J.A., Malluche, H., Meunier, P.J., Ott, S.M., Recker, R.R., and Parfitt, A.M. (2013). Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 40

【表 B - 6】

- 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28, 2-17.
40. Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231-235.
 41. Ferraro, F., Lymperi, S., Mendez-Ferrer, S., Saez, B., Spencer, J.A., Yeap, B.Y., Masselli, E., Graiani, G., Prezioso, L., Rizzini, E.L., et al. (2011). Diabetes impairs hematopoietic stem cell mobilization by altering niche function. *Sci Transl Med* 3, 104ra101. 10
 42. Guo, J., Liu, M., Yang, D., Buxsein, M.L., Thomas, C.C., Schipani, E., Bringhurst, F.R., and Kronenberg, H.M. (2010). Phospholipase C signaling via the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor is essential for normal bone responses to PTH. *Endocrinology* 151, 3502-3513.
 43. Liu, Y., Berendsen, A.D., Jia, S., Lotinun, S., Baron, R., Ferrara, N., and Olsen, B.R. (2012). Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest* 122, 3101-3113. 20
 44. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
 45. Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., et al. (2009). Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206, 2483-2496.
 46. Park, D., Spencer, J.A., Koh, B.I., Kobayashi, T., Fujisaki, J., Clemens, T.L., Lin, C.P., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2012). Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell* 10, 259-272. 30
 47. Pomyje, J., Zivny, J.H., Stopka, T., Simak, J., Vankova, H., and Necas, E. (2001). Angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in tumour and non-tumour tissues during growth of experimental melanoma. *Melanoma Res* 11, 639-643.
 48. Zerfaoui, M., Suzuki, Y., Naura, A.S., Hans, C.P., Nichols, C., and Boulares, A.H. (2008). Nuclear translocation of p65 NF-kappaB is sufficient for VCAM-1, 40

【表 B - 7】

but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells: Differential requirement for PARP-1 expression and interaction. *Cell Signal* 20, 186-194.

【0416】

同定される全ての特許および他の刊行物は、例えば、本開示と関連して使用され得るこのような刊行物中に記載される方法論を記載および開示する目的で、本明細書に明示的に参考として援用される。これら刊行物は、本願の出願日より前のそれらの開示に関しての

み提供される。本発明者らは、この点に関しては何も、先行発明によってもしくは何らかの他の理由でこのような開示に先行する権利がないという自白として解釈されるべきではない。日付に関する全ての主張もしくはこれら文書の内容に関する表示は、出願人に利用可能な情報に基づき、これら文書の日付もしくは内容の正確さに関して何ら自白を構成するものではない。

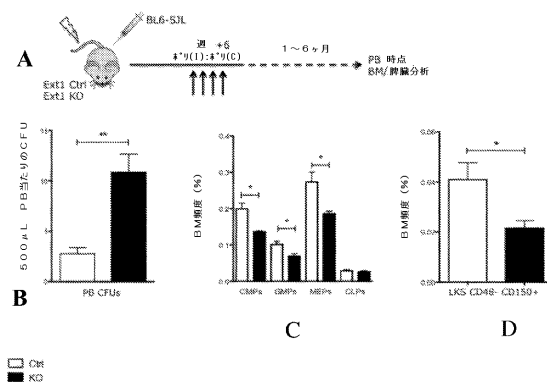
【0417】

本発明の多くの改変および代替の実施形態は、前述の説明に鑑みて当業者に明らかである。よって、この説明は、本発明を実施するための最良の実施態様を当業者に教示する目的である。構造の詳細は、本発明の趣旨から逸脱することなく実質的に変化し得、添付の特許請求の範囲内にある全ての改変の専用は、留保される。本明細書内で、明確かつ正確な仕様が記載され得る方法で実施形態が記載されてきたが、本発明から離れることなく実施形態が種々に組み合わせられ得るかもしくは分けられ得ることは、意図されかつ認識される。本発明が添付の特許請求の範囲および適用法令によって求められる範囲までに制限されるのみであることが意図される。

【0418】

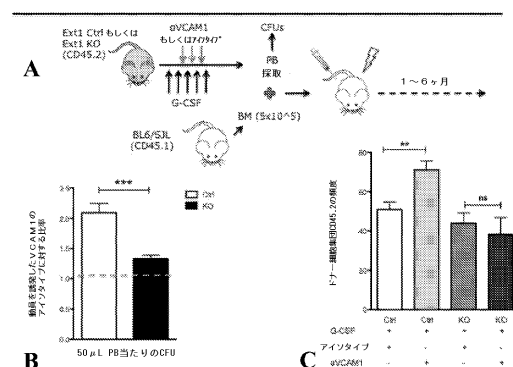
以下の特許請求の範囲は、本明細書で記載される発明の全ての包括的なおよび具体的な特徴、ならびに文言としてそれらの間に入るといわれ得る本発明の範囲の全ての主張を網羅するものとするともまた、理解されるべきである。

【図 1】



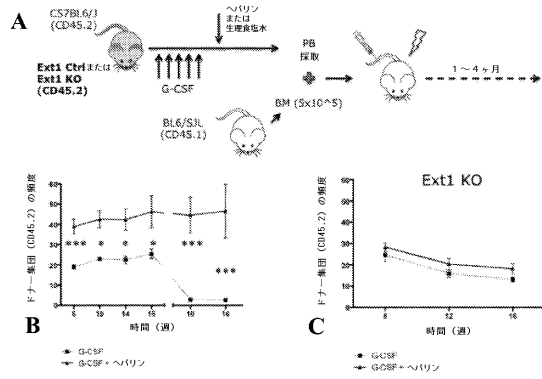
FIGS. 1A-1D

【図 2】



FIGS. 2A-2C

【図 3】



FIGS. 3A-3C

【図 4】

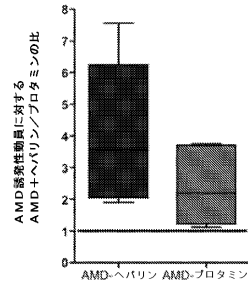
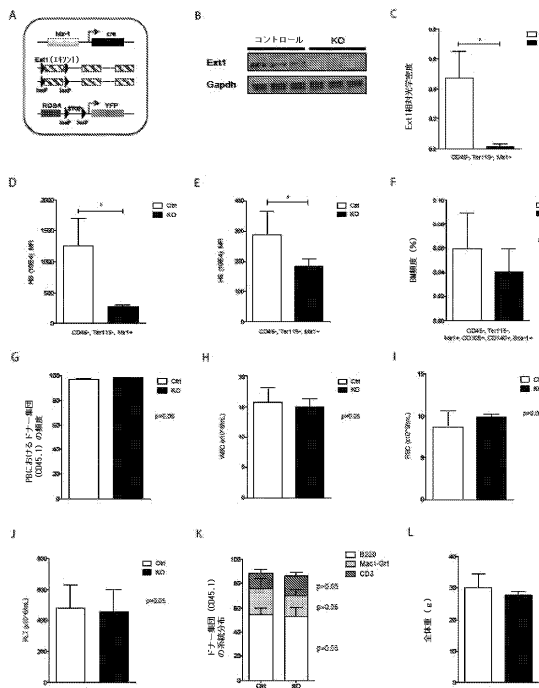


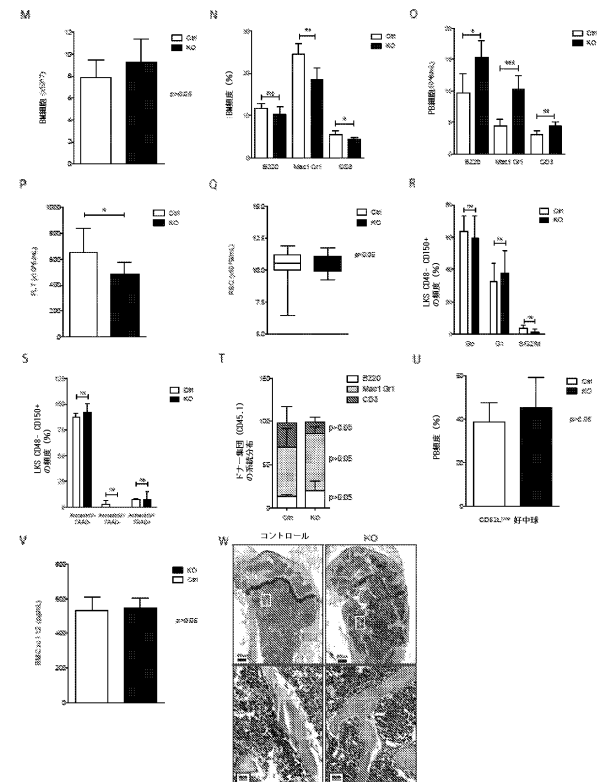
FIG. 4

【図 6 - 1】



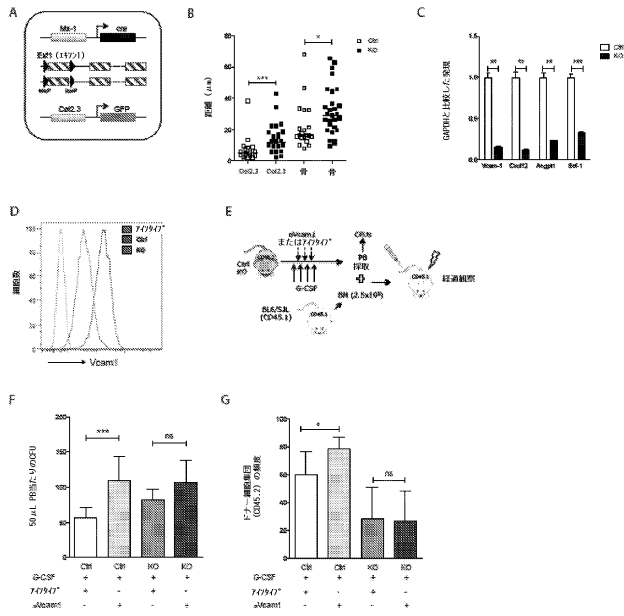
FIGS. 6A-6L

【図 6 - 2】



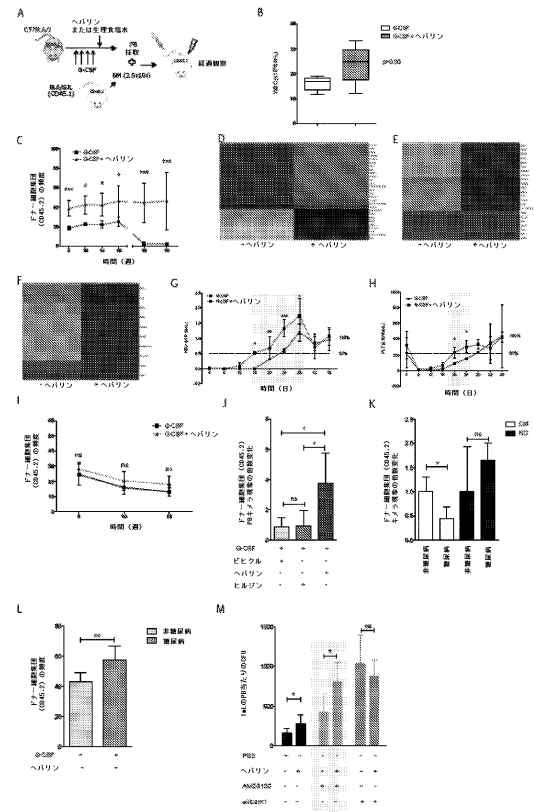
FIGS. 6M-6W

【図 7】



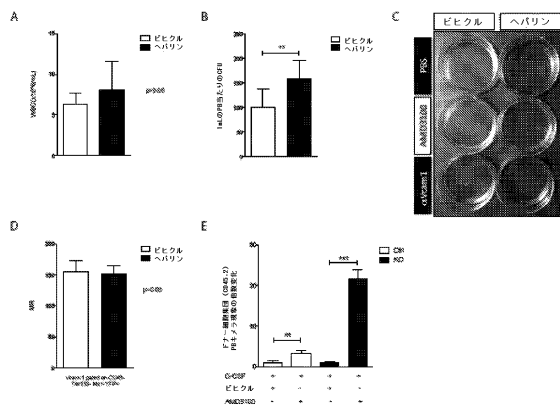
FIGS. 7A-7G

【図 9】



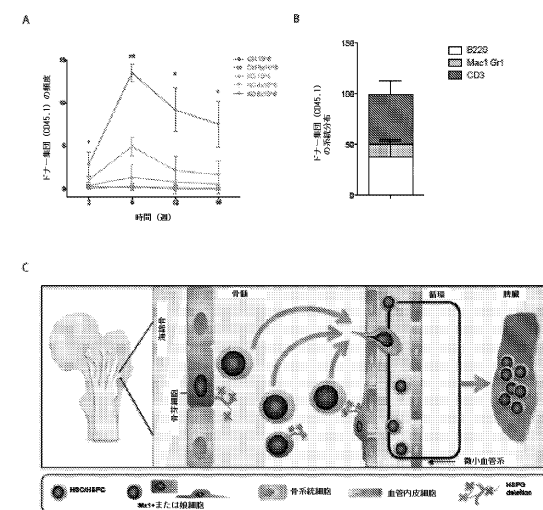
FIGS. 9A-9M

【図 10】



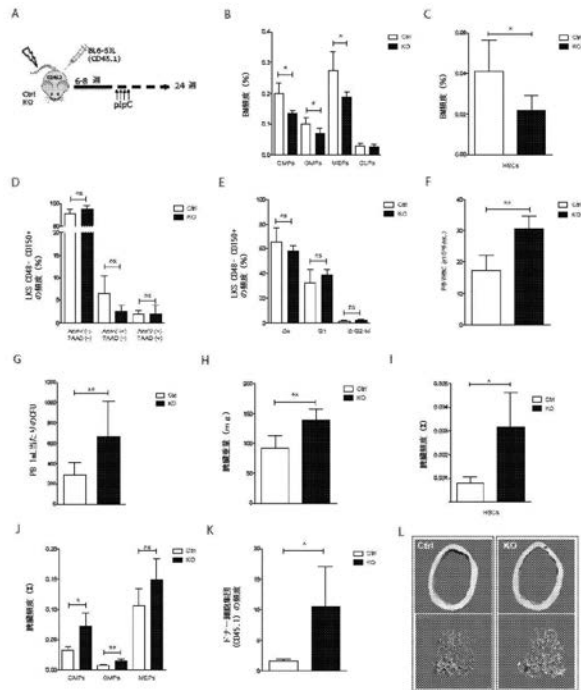
FIGS. 10A-10E

【図 11】



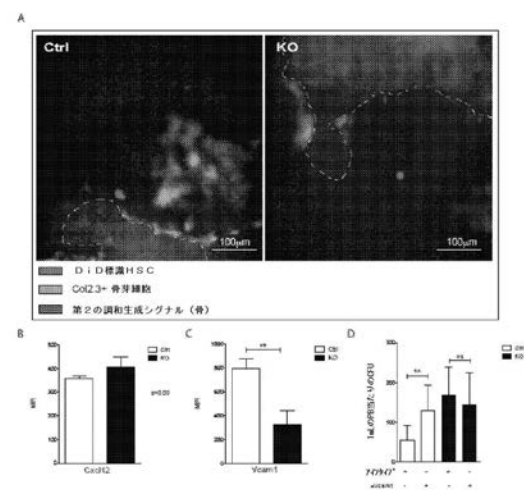
FIGS. 11A-11C

【図 5】



FIGS. 5A-5L

【図 8】



FIGS. 8A-8D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/19596

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/00, A01N 63/00, C12N 15/11 (2014.01) USPC - 435/375, 424/93.7, 514/44A 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, A01N 63/00, C12N 15/11 (2014.01) USPC - 435/375, 424/93.7, 514/44A Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST; Google Scholar; PatBase search terms - EXT-1, EXT1, Exostosin 1, heparan sulfate, cxcr-4, cxcr4, cxcr-2, cxcr2, mobilization, mobilizing, hematopoietic, stem, precursor, progenitor, cell, cells, transplan\$, mobiliz\$, inhib\$, reduc\$, antag\$, Exostosin Glycosyltransferase 1, diabet\$, mobilopathy,																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2011/0305675 A1 (SCADDEN et al.) 15 December 2011 (15.12.2011) para [0007]; [0025]; [0131].</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>2-4, 9/(1-4), 33/3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2013/0028870 A1 (ROYAL et al.) 31 January 2013 (31.01.2013) abstract; para [0002]; [0006].</td> <td>2, 9/2, 33/3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2011/0020274 A1 (ZHENG Y.) 27 January 2011 (27.01.2011) para [0011]; [0037]; [0131]; [0440]-[0450].</td> <td>3, 4, 9/(3,4), 33/3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2011/0166078 A1 (CABANNES et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0004]; [0071]-[0075].</td> <td>9/(1-4)</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2011/0305675 A1 (SCADDEN et al.) 15 December 2011 (15.12.2011) para [0007]; [0025]; [0131].	1	Y		2-4, 9/(1-4), 33/3	Y	US 2013/0028870 A1 (ROYAL et al.) 31 January 2013 (31.01.2013) abstract; para [0002]; [0006].	2, 9/2, 33/3	Y	US 2011/0020274 A1 (ZHENG Y.) 27 January 2011 (27.01.2011) para [0011]; [0037]; [0131]; [0440]-[0450].	3, 4, 9/(3,4), 33/3	Y	US 2011/0166078 A1 (CABANNES et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0004]; [0071]-[0075].	9/(1-4)
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	US 2011/0305675 A1 (SCADDEN et al.) 15 December 2011 (15.12.2011) para [0007]; [0025]; [0131].	1																		
Y		2-4, 9/(1-4), 33/3																		
Y	US 2013/0028870 A1 (ROYAL et al.) 31 January 2013 (31.01.2013) abstract; para [0002]; [0006].	2, 9/2, 33/3																		
Y	US 2011/0020274 A1 (ZHENG Y.) 27 January 2011 (27.01.2011) para [0011]; [0037]; [0131]; [0440]-[0450].	3, 4, 9/(3,4), 33/3																		
Y	US 2011/0166078 A1 (CABANNES et al.) 07 July 2011 (07.07.2011) para [0004]; [0071]-[0075].	9/(1-4)																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 14 July 2014 (14.07.2014)		Date of mailing of the international search report 08 AUG 2014																		
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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/19596

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 10-32, 39, 43-65, 69-90, 99-109, 118-146, 150-168, 172-182, 186-208, 220-228
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Group I, claims 1-4, 9 (in part), and 33 (in part), directed to a method of mobilizing hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject, the method comprising administering to a subject an effective amount of an agent that inhibits the level or activity of exostosis 1 (EXT1).

--continued on first extra page attached hereto--

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-4, 9(1-4), and 33/3

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/19596

continuation of Box No. III: Observations where unity of invention is lacking

Group II+, claims 5-8, 9 (in part), 33 (in part), 34-38, 40-42, 66-68, 94, 95, 115-117, 147-149, 169-171, 183-185 and 211-212, 216-219, directed to a method of mobilizing hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject, the method comprising administering to a subject an effective amount of an agent that inhibits the level or activity of heparan sulfate proteoglycans, and/or at least one of a CXCR2 agonist or a CXCR4 antagonist. Group II+ may be searched upon payment of additional fee(s). An exemplary election would be: an agent that inhibits the level or activity of heparan sulfate proteoglycans. It is believed that claims 5-8, 9 (in part), and 33 (in part), read on this named invention. Applicants must indicate, if applicable, the claims which read on this named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

Another exemplary election would be: an agent that inhibits the level or activity of heparan sulfate proteoglycans, and a CXCR2 agonist (claims 34-38, 40-42, 66-68, 94, 95, 115-117, 147-149, 169-171, 183-185 and 216).

Group III, claims 91-93, 209 and 210, directed to a method of selecting a subject who would benefit from hematopoietic stem cell remobilization using a combination of two or more mobilization agents.

Group IV, claims 96-98, 112-114, 233-235, directed to a composition comprising two or more mobilization agents.

Group V, claims 110, 111 and 229-232, directed to a method of identifying a hematopoietic stem cell mobilizing agent.

Group VI, claims 213-214, directed to a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted stem cells, comprising administering to a subject G-CSF or an analog or derivative thereof.

Group VII, claim 215, directed to a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted stem cells, comprising administering to a subject Plerixafor or an analog or derivative thereof.

The inventions listed as Groups I+, II-VII 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:

Special Technical Features

Group I includes the special technical feature of administering to a subject an effective amount of an agent that inhibits the level or activity of EXT1, which is not required by Groups II+, III-VII.

Group II+ includes the special technical feature of administering mobilization agents that inhibit the level or activity of heparan sulfate proteoglycans, and/or at least one of a CXCR2 agonist or a CXCR4 antagonist in amounts effective to deplete hematopoietic stem cells from the subject's stem cell niche for subsequent engraftment in the subject's stem cell niche of transplanted peripheral blood stem cells, which is not required by Groups I and III-VII.

Group III includes the special technical feature of a method of selecting a subject who would benefit from hematopoietic stem cell remobilization using a combination of two or more mobilization agents, comprising identifying a subject who exhibits poor mobilization in response to administration of a mobilization agent or regimen, which is not required by Groups I-II+ and IV-VII.

Group IV includes the special technical feature of a composition comprising two or more mobilization agents, which is not required by Groups I, II+, III and V-VII.

Group V includes the special technical feature of a method of identifying a hematopoietic stem cell mobilizing agent, comprising providing a test agent; and assessing the ability of the test agent to emulate the hematopoietic stem cell mobilizing effect of a combination of two or more mobilization agents, which is not required by Groups I, II+, III-IV, VI and VII.

Group VI includes the special technical feature of administering to a subject G-CSF or an analog or derivative thereof, which is not required by Groups I, II+, III-V and VII.

Group VII includes the special technical feature of administering to a subject Plerixafor or an analog or derivative thereof, which is not required by Groups I, II+, III-VI.

Common Technical Features

Groups I, II+, III-VII share the common technical features of conditioning a subject for engraftment of transplanted stem cells, comprising administering to a stem cell mobilization agent(s).

Groups I and II+ share the common technical features:

- (i) a method of mobilizing hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject
- (ii) a method of enhancing hematopoietic stem cell and/or progenitor cell mobilization in a subject who exhibits diabetes-induced hematopoietic stem cell and/or progenitor cell mobilopathy;
- (iii) a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in the absence of cytotoxic conditioning.
- (iv) a method of treating a disease requiring transplantation of hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject in need of such treatment, wherein the transplanted hematopoietic stem cells engraft in the subject's bone marrow.

The inventions of Group II+ share the common technical features:

- (i) a method of mobilizing hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject, comprising administering to a subject a combination of two or more mobilization agents comprising (i) at least one heparan sulfate inhibitor and (ii) at least one of a CXCR2 agonist and a CXCR4 antagonist.
 - (ii) a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted peripheral blood stem cells, comprising: (a) administering to a subject a combination of two or more mobilization agents comprising (i) at least one heparan sulfate inhibitor and (ii) at least one of a CXCR2 agonist or a CXCR4 antagonist, in amounts effective to deplete hematopoietic stem cells from the subject's stem cell niche for subsequent engraftment in the subject's stem cell niche of transplanted peripheral blood stem cells
 - (iii) a method of treating a subject in need of a peripheral blood stem cell transplantation.
- Groups II+-VI share the common technical features: hematopoietic stem cells and/or progenitor cells mobilization agents comprising i) at least one heparan sulfate inhibitor, and ii) at least one of a CXCR2 agonist and a CXCR4 antagonist.
- Group III and VI share the common technical feature of G-CSF and Plerixafor as stem cell mobilization agents.

--continued on next extra page--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/19596

continuation of previous page

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because these shared technical features are made obvious over US 2011/0020274 A1 to Zheng Y., (hereinafter Zheng), in view of US 2010/0129440 A1 to Zhao et al., (hereinafter Zhao) and US 2011/0166078 A1 to Cabannes et al., (hereinafter Cabannes).

Zheng teaches a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted stem cells, comprising administering a stem cell mobilization agent (para [0037] and [0440]-[0444] 'CASIN, G-CSF, or AMD3100 treatment result in significantly increased engraftment of donor cells in the pre-conditioned recipients').

Concerning the common technical features of Groups I and II+, Zheng teaches (i) a method of mobilizing hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject (abstract and para [0106]).

Zheng teaches (ii) a method of enhancing hematopoietic stem cell and/or progenitor cell mobilization in a subject who exhibits hematopoietic stem cell and/or progenitor cell mobilopathy (para [0039] and [0106]), yet does not specifically teach the hematopoietic stem cell and/or progenitor cell mobilopathy is diabetes-induced. However, Zheng does teach treatment of hematopoietic deficits caused by various conditions. Zhao teaches that diabetes can be treated with hematopoietic stem cells which develop into insulin-producing cells (abstract, para [0015], [0068]-[0069]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have performed the method of mobilizing HSCs in patients having stem cell mobilopathy of Zheng, to the diabetes patient needing hematopoietic cell transplantation of Zhao, because mobilizing stem cells and generating insulin-producing cells in the pancreas of diabetic patients, would have achieved similar therapeutic goal as stem cell replacement therapy.

Zheng teaches (iii) a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in the absence of cytotoxic conditioning (para [0037] and [0440]-[0444] 'donor HSCs might engraft better in hosts treated with a mobilizing agent such as CASIN compared with non-mobilized controls. To test this, bone marrow transplantation is performed on recipient mice which are pre-conditioned with CASIN...CASIN, G-CSF, or AMD3100 treatment result in significantly increased engraftment of donor cells in the pre-conditioned recipients').

Zheng teaches (iv) a method of treating a disease requiring transplantation of hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject in need of such treatment (para [0034]-[0036], [0106] 'This allows the novel use of an active compound to produce a pharmaceutical preparation for enhanced mobilization of hematopoietic stem cells (e.g., in the treatment of diseases requiring peripheral stem cell transplantation)'), wherein the transplanted hematopoietic stem cells engraft in the subject's bone marrow (para [0259], [0389] and [0095], Fig. 3 '(f) Engraftment of donor derived cells in BM from primary recipients through tertiary recipients').

Concerning the common technical features among the inventions of Group II+ and the common technical feature shared by Group II+, III -VI,

Zheng teaches (i) a method of mobilizing hematopoietic stem cells and/or progenitor cells in a subject (ii) a method of conditioning a subject for engraftment of transplanted peripheral blood stem cells (para [0037] and [0259]), comprising: (a) administering to a subject a combination of two or more mobilization agents comprising (i) a first mobilization agent and (ii) a CXCR4 antagonist (para [0011], [0259] and [0414] 'G-CSF induces mobilization mainly through cleaving several adhesion molecules including c-Kit, VCAM-1, CXCR-4; G-CSF is a CXCR4 antagonist), in amounts effective to deplete hematopoietic stem cells from the subject's stem cell niche for subsequent engraftment in the subject's stem cell niche of transplanted peripheral blood stem cells (para [0105] and [0260]-[0261] 'The method of mobilizing progenitor cells can also be used for mobilization of stem/progenitor cells in individuals who will serve as allogeneic donors of progenitor cells...Detachment of LICs from their niche by inducing mobilization of LICs (e.g., by administering a Cdc42-specific inhibitor) can be used in combination with traditional cancer therapies').

Zheng does specifically teach the first mobilization agent is (i) at least one heparan sulfate inhibitor. Cabannes teaches a method of mobilizing hematopoietic stem cells comprising treating said cells with a combination of two or more mobilization agents comprising at least one heparan sulfate inhibitor (para [0071]-[0072] 'for use in interfering with the interaction of one or more heparan sulphate binding protein with heparan sulphate and/or for use in promoting the mobilisation of stem cells, in particular hematopoietic stem cells' and [0075]).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have applied the mobilization agents taught by Cabannes to the mobilization methods taught by Zheng, in order to further effect mobilization of hematopoietic stem cells for therapeutic purposes.

Zheng further teaches (iii) a method of treating a subject in need of a peripheral blood stem cell transplantation (para [0038]-[0039]).

Concerning the common technical feature shared by Group III and VI, Zheng further teaches G-CSF as stem cell mobilization agent (para [0414] and Cabannes further teaches Plerixafor as stem cell mobilization agent (para [0015]) and

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I, II+, III-VII lack unity of invention under PCT Rule 13.

NOTE: Claim 111 can not dependant on claim 141. For the purposes of the present search and opinion claim 111 is treated as dependent from claim 110.

NOTE: Claims 10-32, 39, 43-65, 69-90, 99-109, 116-146, 150-168, 172-182, 186-208 and 220-228 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/395	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z

(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, T M), 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, KM, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 スキャッデン, デイビッド ティー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 8, ウェストン, レキシントン ストリート
6 2

(72)発明者 サエズ, ボルハ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 1 5, ボストン, セント ジャーマン ストリート
3 4 アpartment 5

(72)発明者 フェラーロ, フランチェスカ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 4 4 6, ランズデール, イースト 4ティエエイチ
ストリート 2 1 5

(72)発明者 ホガット, ジョナサン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, 1 / 2 オックスフォード
ストリート 1 3 2

Fターム(参考) 2G045 AA24

4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ53 QR32 QR62 QR66 QR82 QS25
QS33 QS34 QX02
4C084 AA02 AA17 AA19 BA44 DA01 DA02 DA15 DA19 DC50 MA17
MA43 MA44 NA05 ZA01 ZA51 ZA55 ZA66 ZA89 ZA96 ZB07
ZB15 ZB26 ZB27 ZB33 ZC75
4C086 AA01 AA02 BC58 EA27 GA07 NA05 ZA01 ZA51 ZA55 ZA66
ZA89 ZA96 ZB07 ZB15 ZB26 ZB27 ZB33 ZC75

4C087	AA01	AA02	BB44	CA04	NA05	ZA01	ZA51	ZA55	ZA66	ZA89
	ZA96	ZB07	ZB15	ZB26	ZB27	ZB33	ZC75			