(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-508965
(P2025-508965A)
(43)公表日　令和7年4月10日(2025.4.10)

| (51)国際特許分類 | | | FI | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ* | *35/33* | *(2015.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/33 | | ４Ｃ０８７ |
| *Ａ６１Ｐ* | *37/04* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 37/04 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １０７ | |
| *Ａ６１Ｋ* | *35/17* | *(2025.01)* | Ａ６１Ｋ | 35/17 | | |

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全33頁）

(21)出願番号　特願2024-552178(P2024-552178)
(86)(22)出願日　令和5年2月2日(2023.2.2)
(85)翻訳文提出日　令和6年10月23日(2024.10.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/061822
(87)国際公開番号　WO2023/168153
(87)国際公開日　令和5年9月7日(2023.9.7)
(31)優先権主張番号　63/316,264
(32)優先日　令和4年3月3日(2022.3.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/344,691
(32)優先日　令和4年5月23日(2022.5.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/383,500
最終頁に続く

(71)出願人　523096528
フィブロバイオロジクス インコーポレイテッド
ＦＩＢＲＯＢＩＯＬＯＧＩＣＳ， ＩＮＣ．
アメリカ合衆国 テキサス州 ７７２８９、ヒューストン，ピーオー ボックス ８９１１４６
(74)代理人　110000729
弁理士法人ユニアス国際特許事務所
(72)発明者　オヒーロン、ピート
アメリカ合衆国 テキサス州 ７７０５９、ヒューストン、エバーグリーン エルム ウェイ １７００６
(72)発明者　ホージャ、ハミド
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　萎縮した脾臓の再生と修復を刺激する線維芽細胞の治療的使用

(57)【要約】
本開示の実施形態は、組織再生のための個体への細胞集団の投与に関する。細胞集団は、線維芽細胞及び／又は免疫細胞を含んでもよく、これらの細胞は修飾されていても、修飾されていなくてもよい。再生のための組織は脾臓であってもよい。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
個体に有効量の細胞集団を投与する工程を含み、それにより個体の脾臓組織が再生される、個体の脾臓又は脾臓組織を再生する方法であって、細胞集団が、非修飾又は修飾線維芽細胞、非修飾又は修飾免疫細胞、活性化又は非活性化線維芽細胞、活性化又は非活性化免疫細胞、線維芽細胞誘導体、免疫細胞誘導体、又はそれらの組み合わせを含む、方法。
【請求項２】
線維芽細胞誘導体が、細胞外小胞、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体、又は線維芽細胞の他の断片若しくは生物学的成分を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
投与前及び／又は投与中に、細胞を活性化することができる１つ以上の薬剤に細胞を曝露することにより、細胞の集団を活性化する、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
薬剤が、１つ以上の核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティック因子、成長因子、ホルモン、又はそれらの組合せを含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
細胞の集団がインビトロ、インビボ、又はエクスビボで活性化される、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
細胞集団が個体に対して自家、同種異系、異種、同系、又はそれらの組み合わせである、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
１つ以上のアジュバントを個体に投与することをさらに含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
アジュバントが化学アジュバント、ウイルスアジュバント、細菌アジュバント、又はそれらの組み合わせを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
アジュバントが、カプセル化されたＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含む、請求項７又は８に記載の方法。
【請求項１０】
再生が器官形成及び／又はＴ細胞発生及び／又はＢ細胞発生を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
再生が脾臓萎縮の逆転を含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
再生が脾臓における免疫細胞の産生を再活性化又は刺激することを含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
再生が脾臓分化を含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
再生が、脾臓のリクルート、幹細胞の脾臓上皮細胞及び／又は脾臓線維芽細胞への分化、及び／又は脾臓上皮細胞及び／又は脾臓線維芽細胞の拡張を含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
脾臓線維芽細胞が脾臓網状線維芽細胞を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
活性化された細胞集団が個体に全身投与される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】

活性化された細胞集団が個体の脾臓に局所的に投与される、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
線維芽細胞及び／又は免疫細胞を活性化を誘導する１つ以上の条件に曝露する工程を含む、活性化線維芽細胞又は非活性化線維芽細胞、活性化線維芽細胞の誘導体、活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞、活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞の誘導体、又はそれらの組合せを産生するインビトロ方法であって、活性化線維芽細胞、活性化線維芽細胞の誘導体、活性化免疫細胞、及び／又は活性化免疫細胞の誘導体が脾臓組織を再生するための活性を含む、方法。
【請求項１９】
活性化線維芽細胞又は非活性化線維芽細胞、及び／又は活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞が、脾臓に対して自家である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
活性化線維芽細胞又は非活性化線維芽細胞、及び／又は活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞が、脾臓に対して同種異系である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
活性化線維芽細胞、及び／又は活性化免疫細胞が、脾臓に対して異種である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２２】
活性化線維芽細胞、及び／又は活性化免疫細胞が、脾臓に対して同系である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２３】
再生が、脾臓における免疫細胞の産生及び／又は活性を刺激、改善、及び／又は増加させることを含む、請求項１８～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
１つ以上の条件が、１つ以上の核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティック因子、成長因子、ホルモン、又はそれらの組合せを含む、請求項１８～２１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
有効量の活性化線維芽細胞、活性化線維芽細胞の誘導体、活性化免疫細胞、活性化免疫細胞の誘導体、又はそれらの組み合わせを個体に提供する工程を含む、個体における脾臓の細胞の産生及び／又は活性を刺激、改善、又は増加させる方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、２０２２年３月３日に出願された米国仮特許出願番号第６３／３１６，２６４号の優先権を主張し、また、２０２２年５月２３日に出願された米国仮特許出願番号第６３／３４４，６９１号の優先権を主張し、さらに、２０２２年１１月１３日に出願された米国仮特許出願出願第６３／３８３，５００号の優先権を主張するものであり、これらの出願はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
Ｉ．技術分野
本開示は、少なくとも医学、免疫学、細胞生物学、分子生物学の分野に関する。
【背景技術】
【０００３】
ＩＩ．背景
線維芽細胞は、もはや臓器の単なる構造的構成要素ではなく、免疫プロセスにダイナミックに関与していると考えられている。線維芽細胞は、Ｔ制御細胞の遊走、増殖、活性に影響を与える環境を作り出し、免疫寛容を確保している［１］。
【０００４】

脾臓は、血液中の病原体に対する免疫系の迅速な反応と、そのような病原体に対する長期的な適応反応の維持を担う重要な二次リンパ器官のひとつである。脾臓はまた、鉄代謝と赤血球ホメオスタシスの重要な臓器でもある。脾臓はまた、血小板や白血球の重要な貯蔵場所としても機能している。脾臓では、内皮細胞、中皮細胞、網状細胞、赤血球、顆粒球、単核球、造血細胞、マクロファージ、樹状細胞、形質細胞、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞、遊走Ｂ細胞など、さまざまな細胞が同定されている。加齢に伴い、脾臓の構造と機能が変化し、ワクチン接種に積極的に反応する能力が低下し、ウイルスや細菌の病原体感染に対する感受性が高まり、自己免疫疾患の発生率が上昇する［２］。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

寿命が延び、人口に占める高齢者の割合が増える中、線維芽細胞や脾臓の他の細胞との相互作用を利用した細胞療法によって、脾臓の生産性を向上させ、寿命を延ばすことが求められている。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

概要

本明細書に開示される実施形態は、個体における組織を再生するための組成物および方法に関する。いくつかの実施形態において、１つ以上の組成物は、組織を再生する目的、重要な器官機能のために必要な細胞の増殖を刺激する目的、及び／又は脾臓萎縮を含む器官萎縮を回復するために必要な細胞産物の産生を再活性化する目的を含めて、個体に投与される。投与は、脾臓組織などの組織の再生に有用であり得る。いくつかの実施形態において、再生は、器官形成及び／又はＴ細胞発生及び／又はＢ細胞発生を含む。いくつかの実施形態において、組織が脾臓を含む場合、再生は脾臓萎縮を逆転させることを含む。いくつかの実施形態において、再生は脾臓分化などの組織分化を含む。ある実施形態では、再生は、組織のリクルート、幹細胞の組織の上皮細胞及び／又は組織の線維芽細胞への分化、及び／又は組織の上皮細胞及び／又は組織の線維芽細胞の拡張を含む。特定の実施形態では、前述の活性の全て又は少なくともいくつかの組み合わせが、組織の再生に包含される。組織の線維芽細胞は、場合によっては脾臓網状線維芽細胞を含んでいてもよい。

【０００７】

特定の実施形態は、細胞集団及び細胞療法としてのそれらの使用に関する。細胞集団は、修飾及び／又は非修飾線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の他の断片又は生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）を含んでいてもよい。細胞集団は、修飾免疫細胞及び／又は非修飾免疫細胞を含んでもよい。細胞集団は、線維芽細胞誘導体（エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）を含んでもよい。いくつかの実施形態において、細胞集団は、非修飾の線維芽細胞（線維芽細胞からの溶解液及び／又は線維芽細胞培養からの調整培地を含み、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の他の断片又は生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、非修飾の免疫細胞、活性化線維芽細胞、活性化免疫細胞、線維芽細胞誘導体、免疫細胞誘導体、又はそれらの組み合わせを含む。線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）及び／又は免疫細胞は、細胞を活性化することができる１つ以上の薬剤に細胞を曝露することによって活性化され得る。線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）及び／又は免疫細胞は、細胞を活性化することができる１つ以上の薬剤に細胞を曝露することによって活性化され得、それによって

それぞれ活性化線維芽細胞及び／又は活性化免疫細胞を産生する。いくつかの実施形態において、薬剤（複数可）は、１つ以上の核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティック因子、成長因子、ホルモン、又はそれらの組み合わせを含む。細胞集団はインビトロ又はエクスビボで活性化されうる。

【０００８】

いくつかの実施形態では、線維芽細胞は、ＣＣＬ２１、ポドプラニン、ＣＣＬ１９、ＩＬ－７、ＩＬ－３３、ＤＥＳ、ＭＡｄＣＡＭ－１、ＣＸＣＬ１３、ＢＡＦＦ、ＩＬ－６などの因子のうちの１つ以上を発現及び放出する、又は発現するように活性化された線維芽細胞を選択することによって、インビボ、エクスビボ、又はその両方の組み合わせで活性化される［３－１０］。

【０００９】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ、及び、又は転写因子調節を用いた活性化法により、線維芽細胞を活性化して、ＳＰＩＢ、ＷＴ１、ＳＴＡＴ１、ＳＴＡＴ２、ＩＲＦ９（ＩＳＦＧ３）、ＥＴＳなどの転写因子を発現させることができる［１１、１２］［１３－１６］。

【００１０】

いくつかの実施形態において、活性化方法は、Ｂｓｔ２、ＣＸＣＬ９、ＣＸＬＸ１０、Ｌｙ６ｃ、Ｓｃａ－１、Ｔｉｍｄ４、Ｆａｂｐ５の発現及び分泌の増加を確実にするために、ＲＮＡ及び又は転写因子による線維芽細胞の活性化を含む［１３、１７］。

【００１１】

いくつかの実施形態では、ＲＮＡ及び又はエピジェネティックな調節は、インビボ又はエクスビボで、Ｃｏｌ１ａ１、Ｃｏｌ３ａ１、Ｃｏｌ６ａ１、Ｄｎｃ、Ｌｕｍ、Ｍｇｐ、Ｓｐａｒｃ、Ｓｐｅｒｉｎｇ１、Ｓｅｒｐｉｎｈ１、Ｈｔｒａ１、Ｈｔｒａ３、Ｍｍｐ２、及び又はＭｍｐ３などの線維芽細胞関連遺伝子の１つ又は２つ以上の組み合わせの発現を増加させるために使用され得る［１８］。

【００１２】

いくつかの実施形態では、細胞集団は個体に関して、自家、同種異系、異種、同系、又は細胞集団はそれらの組み合わせを含み得る。

【００１３】

いくつかの実施形態では、細胞集団は、脾臓の少なくとも一部の再生が必要な個体を少なくとも含む個体に全身的に及び／又は個体の脾臓に局所的に投与される。

【００１４】

特定の実施形態は、活性化された線維芽細胞、活性化された線維芽細胞の誘導体（エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片又は生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、活性化された免疫細胞、活性化された免疫細胞の誘導体、又はそれらの組み合わせなどの活性化された細胞集団を産生するための、インビトロ法を含む方法に関する。いくつかの実施形態において、本方法は、線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）及び／又は免疫細胞を、活性化を誘導する１つ以上の条件に曝露する工程を含む。線維芽細胞、活性化された線維芽細胞の誘導体（エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、活性化された免疫細胞、及び／又は活性化された免疫細胞の誘導体の活性化は、細胞集団を脾臓を再生できるようにし得る。活性化された細胞は、個体に関して、自家、同種異系、異種、同系であってもよく、又は集団はそれらの組み合わせから構成されてもよい。いくつかの実施形態では、細胞は、１つ以上の核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティック因子、成長因子、ホルモン、又はそれらの組み合わせを含む条件によって活性化される。

【００１５】

いくつかの実施形態において、組織の再生は、脾臓における免疫細胞の産生及び／又は

活性を刺激、改善、又は増加させることを含む。

【００１６】

本開示の実施形態には、個体における組織を再生する方法が含まれ、該方法は、有効量の細胞集団を個体に投与する工程を含み；ここで、組織は個体の脾臓を含み；細胞集団は、非修飾又は修飾線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、非修飾又は修飾免疫細胞、活性化又は非活性化線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、活性化又は非活性化免疫細胞、線維芽細胞誘導体（マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、免疫細胞誘導体、又はそれらの組合せを含み、それによって個体における脾臓組織の再生がもたらされる。場合によっては、投与前及び／又は投与中に、細胞を活性化することができる１つ以上の薬剤に細胞を曝露することによって、細胞集団が活性化される。この薬剤は、１つ以上の核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティック因子、成長因子、ホルモン、又はそれらの組み合わせを含み得る。場合によっては、細胞集団はインビトロ、インビボ、又はエクスビボで活性化され、細胞集団は個体に関して、自家、同種異系、異種、同系、又はそれらの組み合わせであってもよい。どのような方法であっても、１つの工程は、化学的アジュバント、ウイルスアジュバント、細菌アジュバント、又はそれらの組み合わせなど、１つ以上のアジュバントを個体に投与することをさらに含んでいてもよい。いずれの場合においても、アジュバントは、カプセル化されたＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又はそれらの組み合わせを含み得る。

【００１７】

ある特定の実施形態では、再生は器官形成及び／又はＴ細胞発生及び／又はＢ細胞発生を含む。特定の実施形態において、再生は、脾臓萎縮を逆転させることを含む。特定の実施形態において、再生は、脾臓免疫細胞の産生を再活性化又は刺激することを含む。特定の実施形態において、再生は、組織分化を含む。ある特定の実施形態において、再生は、組織のリクルート、幹細胞の組織の上皮細胞及び／又は組織の線維芽細胞への分化、及び／又は組織の上皮細胞及び／又は組織の線維芽細胞の拡張を含む。

【００１８】

任意の組成物及び／又は方法の特定の実施形態において、組織の線維芽細胞は脾臓網状線維芽細胞を含む。

【００１９】

活性化された細胞集団が一つ以上の個体に投与される方法では、個体に全身的に投与してもよいし、個体の脾臓に局所的に投与してもよい。

【００２０】

特定の実施形態では、活性化線維芽細胞又は非活性化線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、活性化線維芽細胞の誘導体（エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞、活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞の誘導体、又はそれらの組合せを産生するインビトロ方法であって、線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）及び／又は免疫細胞を活性化を誘導する条件に曝露する工程を含み、活性化線維芽細胞、活性化線維芽細胞の誘導体（エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の

任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、活性化免疫細胞、及び／又は活性化免疫細胞の誘導体が脾臓組織を再生するための活性を含む、方法が提供される。活性化線維芽細胞又は非活性化線維芽細胞（線維芽細胞；線維芽細胞様細胞；線維芽細胞からの溶解物；線維芽細胞培養からの調整培地；及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、及び／又は活性化免疫細胞又は非活性化免疫細胞は、脾臓との関係において、自家、同種異系、異種、又は同系であってもよい。特定の実施形態において、再生は、脾臓における免疫細胞の産生及び／又は活性を刺激、改善、及び／又は増加させることを含む。本方法において、条件は、１つ以上の核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティック因子、成長因子、ホルモン、又はそれらの組合せを含んでいてもよい。

【００２１】

一実施形態では、個体における脾臓の細胞の産生及び／又は活性を刺激、改善、又は増加させる方法であって、有効量の活性化線維芽細胞、活性化線維芽細胞の誘導体、活性化免疫細胞、活性化免疫細胞の誘導体、又はそれらの組み合わせを個体に提供する工程を含む方法が提供される。

【００２２】

本明細書で議論される任意の実施形態は、本開示の任意の方法又は組成物に関して実施され得、逆もまた同様であることが企図される。さらに、本開示の組成物は、本開示の方法を達成するために使用することができる。

【００２３】

以上、以下に続く発明の詳細な説明をよりよく理解できるように、本発明の特徴および技術的利点をかなり大まかに概説した。以下、本発明の特許請求の範囲の主題を形成する本発明の追加の特徴および利点を説明する。開示された構想および特定の実施形態は、本発明の同じ目的を遂行するための他の構造を修正または設計するための基礎として容易に利用され得ることが、当業者には理解されるべきである。また、このような等価な構造は、添付の特許請求の範囲に記載された本発明の精神および範囲から逸脱しないことも、当業者には理解されるはずである。本発明の特徴であると考えられる新規な特徴は、その組織および操作方法の両方に関して、さらなる目的および利点とともに、以下の説明からよりよく理解されるであろう。

【００２４】

本明細書中で議論される任意の実施形態は、本発明の任意の方法または組成物に関して実施することができ、逆もまた同様であることが企図される。さらに、本発明の組成物は、本発明の方法を達成するために使用することができる。

【００２５】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の具体的な実施形態を示すものであるが、本発明の精神および範囲内での様々な変更および修正は、この詳細な説明から当業者には明らかとなるので、例示のためにのみ与えられていることを理解されたい。

【発明を実施するための形態】

【００２６】

詳細な説明

Ｉ．定義の例

長年の特許法の慣例に従い、本明細書において、特許請求の範囲を含め、含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）という単語と組み合わせて使用される場合、「ａ」および「ａｎ」という単語は、「１つ以上」を表す。本開示のいくつかの実施形態は、本開示の１つまたは複数の要素、方法ステップ、および／または方法から構成されるか、またはこれらから本質的に構成され得る。本明細書に記載される任意の方法または組成物が、本明細書に記載される任意の他の方法または組成物に関して実施され得ることが企図される。

【００２７】

「約（ａｂｏｕｔ）」又は「約（ａｐｐｒｏｘｉｍａｔｅｌｙ）」という用語は、基準量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量又は長さに対して、３０％、２５％、２０％、２５％、１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％又は１％だけ変動する量、レベル、値、数、頻度、百分率、寸法、サイズ、量、重量又は長さを指す。特定の実施形態において、数値に先行する場合の用語「約」又は「約」は、１５％、１０％、５％、又は１％の範囲のプラス又はマイナスの値を示す。生物学的システム又はプロセスに関して、この用語は、好ましくは値の５倍以内、より好ましくは２倍以内の桁以内を意味し得る。特に断りのない限り、「約」という用語は、特定の値に対して許容できる誤差範囲内であることを意味する。

【００２８】

本明細書において、「活性化免疫細胞」という用語は、代謝、免疫学的、エピジェネティック、成長因子分泌、表面マーカー発現、マイクロベシクルの産生と排泄など、細胞内の１つ以上の変化を誘導することができる１つ以上の刺激で処理された免疫細胞を指す。

【００２９】

本明細書で使用される用語「投与される」又は「投与する」は、組成物が患者に意図された効果をもたらすように、組成物を個体に提供する任意の方法を指す。例えば、投与する１つの方法は、カテーテル、アプリケーターガン、シリンジなどのような、しかしこれらに限定されない医療デバイスを使用する間接的な機構によるものである。第二の例示的な投与方法は、局所組織投与、経口摂取、経皮パッチ、局所、吸入、座薬などのような直接的な機構によるものである。

【００３０】

本明細書で使用する「同種異系」とは、同じ種の１つ以上の個体からではあるが、自然環境では免疫学的に不適合であるか、又は免疫学的に不適合になりうる、他の体からの組織又は細胞を意味する。

【００３１】

本明細書で使用される「自家」とは、同一の個体の体から由来又は移植された組織又は細胞を指す（すなわち、自家献血、自家骨髄移植）。

【００３２】

本明細書において、「薬剤」とは、１つ以上の低分子、核酸、サイトカイン、ケモカイン、転写因子、エピジェネティクス因子、成長因子、及び／又はホルモンを指す。

【００３３】

本明細書で使用される「異種」とは、患者とは異なる種由来の組織又は細胞を指す。

【００３４】

「細胞培養」とは、休止期、老化期、（活発に）分裂しているかに関わらず、生存可能な細胞を含む人工的なインビトロ系を指す。細胞培養では、細胞は適切な温度、典型的には３７℃の温度で、典型的には酸素と$CO_2$を含む雰囲気下で培養され、維持される。しかし、培養条件は細胞種ごとに大きく異なる可能性があり、特定の細胞種に対して条件を変化させると、異なる表現型が表現される可能性がある。培養系で最もよく変化する要因は増殖培地である。増殖培地は、栄養素、成長因子の濃度、その他の成分の有無で変化する。培地を補うために使われる成長因子は、子牛血清のような動物の血液に由来することが多い。

【００３５】

本明細書を通じて、文脈上別段の定めがない限り、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅ）」、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」及び「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という語は、記載されたステップもしくは要素またはステップもしくは要素群を含むことを意味するが、他のステップもしくは要素またはステップもしくは要素群を排除することを意味しないと理解される。「からなる」とは、「からなる」という語句の後に続くものを含むこと、およびそれらに限定されることを意味する。したがって、「からなる」という表現は、列挙された要素が必要とされるかまたは必須であり、他の要素が存在しない可能性があることを示す。「から本質的になる」とは、その語句の後に列挙された要素を含むこと、及び列挙

された要素について開示で指定された活性または作用を妨げないか、またはそれに寄与しない他の要素に限定されることを意味する。したがって、「本質的にからなる」という表現は、列挙された要素は必要とされるかまたは必須であるが、他の要素は任意であり、列挙された要素の活性または作用に影響を及ぼすかどうかに応じて、存在してもしなくてもよいことを示す。

【００３６】

本明細書で使用する「個体」という用語は、医療施設に収容されていてもいなくてもよく、医療施設の外来患者として治療されていてもよいヒト又は動物を指す。個体は、インターネットを介して１つ以上の医療用組成物を受けることができる。個体は、ヒト又はヒト以外の動物のあらゆる年齢を含んでよく、したがって、成人及び少年（すなわち、子供）の両方、及び幼児を含む。「個体」という用語が医学的治療の必要性を意味することは意図されていないため、個体は、臨床的であろうと基礎科学研究の支援であろうと、自発的であろうと非自発的であろうと実験に参加することができる。「対象」又は「個体」という用語は互換的に使用することができ、哺乳類、例えばヒト、実験動物（霊長類、ラット、マウス、ウサギなど）、家畜（牛、羊、ヤギ、豚、七面鳥、鶏など）、家庭用ペット（イヌ、ネコ、げっ歯類など）、ウマ、トランスジェニック非ヒト動物を含む、方法又は材料の対象となるあらゆる生物又は動物を指す。

【００３７】

本明細書全体を通して、「一実施形態」、「実施形態」、「特定の実施形態」、「関連する実施形態」、「ある実施形態」、「追加の実施形態」、又は「さらなる実施形態」、又はそれらの組み合わせへの言及は、実施形態に関連して記載される特定の特徴、構造、又は特性が、本開示の少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通じて様々な場所に前述の語句が現れるが、必ずしもすべてが同じ実施形態を指すわけではない。さらに、特定の特徴、構造、又は特性は、１つまたは複数の実施形態において任意の好適な方法で組み合わせることができる。

【００３８】

用語「低減する（ｒｅｄｕｃｅ）」、「阻害する（ｉｎｈｉｂｉｔ）」、「減少させる（ｄｉｍｉｎｉｓｈ）」、「抑制する（ｓｕｐｐｒｅｓｓ）」、「減少させる（ｄｅｃｒｅａｓｅ）」、「予防する（ｐｒｅｖｅｎｔ）」、及び文法的等価物（「より低く（ｌｏｗｅｒ）」、「より小さく（ｓｍａｌｌｅｒ）」などを含む）は、治療を受けた対象と比較して、未治療の対象の症状の発現について言及する場合、治療を受けた対象における症状の量及び／又は大きさが、医学的に訓練された人員によって臨床的に適切であると認識される任意の量だけ、未治療の対象における症状の量及び／又は大きさよりも低いことを意味する。一実施形態では、治療を受けた対象における症状の量及び／又は大きさは、未治療の対象における症状の量及び／又は大きさより少なくとも１０％低い、少なくとも２５％低い、少なくとも５０％低い、少なくとも７５％低い、及び／又は少なくとも９０％低い。

【００３９】

本明細書で細胞又は細胞集団に言及する際に使用される「非修飾」という用語は、その細胞種に固有の特性（標準的な細胞培養中に本質的に変化する可能性のあるものを除く）を変化させる可能性のある薬剤に曝されることなく、その細胞種に対する標準的な条件下でのみ培養された細胞を指し得る。非修飾細胞は内在性の遺伝物質のみから構成される、すなわち非修飾細胞は導入遺伝子を含まない。いくつかの実施形態では、何らかの操作を受けていないか、培養されただけの細胞を指す。具体的な実施形態では、「修飾」細胞とは、別の細胞型に分化する時点まで刺激された細胞であり、もはや出発物質の形態を有していない可能性がある。これは、例としてＭＳＣや線維芽細胞に適用できる。

【００４０】

本明細書において、「移植」という用語は、生きた組織又は細胞を採取し、それを体の別の部分又は別の体に移植するプロセスを指す。

【００４１】

「治療（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」、「治療（ｔｒｅａｔ）」、「治療（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」とは、疾患や症状の影響を軽減する方法を意味する。治療はまた、症候だけでなく、疾患や症状そのものを軽減する方法を指すこともある。治療は、治療前のレベルからの任意の減少であり得、疾患、症状、又は疾患若しくは症状の症候の完全な切除であり得るが、これらに限定されない。したがって、開示された方法において、「治療」は、疾患の少なくとも１つの症候の重症度の軽減を含む、確立された疾患又は疾患の進行の重症度の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、又は１００％の軽減を指すことができる。例えば、細胞の免疫原性を低下させるための開示された方法は、同一対象又は対照の対象において、治療前レベルと比較して細胞の免疫原性に検出可能な低下がある場合、治療であるとみなされる。したがって、減少は、ネイティブレベル又は対照レベルと比較して、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００％、又はその間の任意の量の減少であり得る。「治療」とは、必ずしも疾患又は症状の治癒を意味するのではなく、疾患又は症状の見通しの改善を意味することが理解され、本明細書において企図される。具体的な実施形態において、治療とは、少なくとも１つの症候の重篤度又は程度の軽減を指し、代替的又は追加的に、少なくとも１つの症候の発症の遅延を指すこともある。

【００４２】

ＩＩ．線維芽細胞

本開示の実施形態は、脾臓に線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）を導入する、及び／又は既存の線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）を脾臓内で改変し、その機能を再生させるための組成物、方法、及び／又はシステムを包む［３、４］。特定の実施形態において、本開示は、第一のタイプの細胞と第二のタイプの細胞及び／又はある種の薬剤との相互作用に関する。相互作用は、相互作用の結果として、第一及び／又は第二のタイプの細胞に対する１つ以上の修飾を含み得る。本開示の実施形態には、線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）が、特定の細胞及び／又は核酸、サイトカイン、ケモカイン、若しくは増殖因子を含む特定の薬剤の１つ若しくは組み合わせに曝露されることにより修飾される、組成物、方法、及びシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、これらの修飾又は非修飾線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）を脾臓に導入することにより、脾臓網状線維芽細胞、脾臓線維芽細胞、脾臓マクロファージ、間質オーガナイザー細胞、および／または他の非造血細胞などの必要な機能的細胞が再生される。いくつかの実施形態では、導入により新しい組織成長の基盤が開始される［５］。これらの細胞の再生は、以下のようないくつかの可能な段階を経て行われる：修飾または非修飾の投与線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）の網状線維芽細胞、脾臓線維芽細胞、間質オーガナイザー細胞、および／または不連続性脾上皮への分化；老化した脾臓網様上皮、線維芽細胞、および／または間質オーガナイザー細胞を活性化すること（修飾または非修飾線維芽細胞との細胞間接触を含む）；脾臓微小環境中の修飾または非修飾線維芽細胞から排泄される産物による、老化脾臓網様上皮、線維芽細胞、および／または間質オーガナイザー細胞の活性化；注入された修飾／非修飾線維芽細胞の直接的／間接的作用によって、および／または修飾／非修

飾線維芽細胞から排泄された産物を介して、局所幹細胞から脾臓網状線維芽細胞、脾臓線維芽細胞、脾臓マクロファージ、および／または間質オーガナイザー細胞への分化；および／または、損傷または加齢に伴う萎縮の影響を受けた脾臓に残存する少数の脾臓網状線維芽細胞、脾臓線維芽細胞、脾臓マクロファージ、間質オーガナイザー細胞を十分な数まで増殖させること（これは、脾臓の機能に影響を与え、著しく改善する可能性がある）。

【００４３】

いくつかの実施形態において、脾臓萎縮の逆転は、脾臓の無脂肪率を決定するなどの磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）によってモニターされる。加えて、全血球数評価、血球の蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）ソーティング特性評価、および／またはフローサイトメトリーは、脾臓の変化を決定するのに必要な測定基準を提供し、および／または萎縮した脾臓に注入された修飾および／または非修飾線維芽細胞の影響をモニターし得る。

【００４４】

特定の実施形態は、線維芽細胞および／または線維芽細胞から排泄される特定の薬剤への曝露により、本明細書に開示される任意の脾臓細胞を含む特定の細胞が修飾される組成物、方法、および／またはシステムに関する。特定の実施形態において、線維芽細胞と１つまたは複数の他のタイプの細胞との相互作用（そして任意に、その相互作用はまた、１つまたは複数の特定の薬剤を含む）は、線維芽細胞および／または脾臓の１つまたは複数の細胞の修飾をもたらす［６］。具体的な実施形態では、脾臓の細胞は少なくとも免疫細胞を含む。

【００４５】

特定の実施形態において、線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）の脾臓への導入は、脾臓構造及び機能の再生を刺激するために、脾臓において見出される線維芽細胞及び／又は他の細胞の修飾をもたらす［７］。特定の態様において、線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体又は線維芽細胞の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）及び／又はそれから産生される薬剤の曝露は、１種類以上の免疫細胞への修飾をもたらし、及び／又は１種類以上の免疫細胞及び／又はそれから産生される薬剤の曝露は、線維芽細胞への修飾をもたらす。具体的な実施形態では、１種類以上の薬剤も暴露に含まれ、環境及び／又は細胞及び／又は組織に内因性である他の場合のように、外因的に提供されてもされなくてもよい。

【００４６】

特定の実施態様において、本開示の方法は、培養物のようなインビトロ又はエクスビボで起こる。特定の態様において、本方法は、人の手によって生じ、体における通常の又はランダムな発生を包含しない。本開示の方法は、特定の態様において、非天然的である。特定の実施態様において、ある種類の細胞を別の種類の細胞に曝露する方法において使用される細胞の濃度は、自然界では発生せず、自然界でランダムに起こるものではない。具体的な実施形態において、１つ以上の薬剤を１つ以上のタイプの細胞に曝露する方法において使用される１つ以上の薬剤の濃度は、自然界では発生せず、自然界でランダムに発生しない。エクスビボ又はインビトロで起こる本開示に包含されるあらゆる種類の細胞の修飾は、インビボでは自然には同じようには起こらない。特定の実施形態では、萎縮した脾臓を再活性化する目的で、ドナーからの組織生検が、細胞の１つ又は組み合わせを単離、特性化、必要に応じて活性化、増殖、ドナーへの再導入を行うために用いられる［８］。

【００４７】

本開示は、上皮細胞、胸腺細胞、樹状細胞、マクロファージ、Ｂリンパ球、筋様細胞、内皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞、脾臓網状線維芽細胞、脾臓線維芽細胞、脾臓マクロファージ、間質オーガナイザー細胞、およびそれらの混合物を含む細胞の治療的使用を包含する。少なくともいくつかの場合において、線維芽細胞は、化学的、物理的、及び／又は

エピジェネティックに活性化されるなど、１つ以上の免疫細胞および脾臓に見出される他の細胞に暴露される前に修飾されているか、または通常体内で見出されない条件に暴露されている。特定の実施形態では、免疫細胞またはその誘導体は、線維芽細胞に暴露される前に、活性化されるなどの修飾を受けている。

【００４８】

本開示の実施形態は、線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体、又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）を培養条件の修飾を通して自家、同種異系、異種、又は同系遺伝子治療細胞として利用する手段を提供する。本開示の一実施形態において、線維芽細胞は、免疫原性の低い供給源（例えば、胎盤線維芽細胞、卵膜組織由来線維芽細胞、臍帯血由来線維芽細胞など）から抽出される。

【００４９】

本開示の実施形態は、特定のタイプの線維芽細胞の免疫原性を低減する方法を提供する。線維芽細胞は、皮膚、心臓、血管、骨髄、骨格筋、肝臓、膵臓、脳、包皮を含むがこれらに限定されない様々な組織または器官由来であり得、これらは生検（適切な場合）または剖検時に得ることができる。ある態様では、細胞は線維芽細胞を含み、胎児由来、新生児由来、成体由来、またはそれらの組み合わせであり得る。

【００５０】

本開示の任意の方法において使用するための線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体、又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）は、特定の実施形態において、特定の培地成分（複数可）に曝露され得る。

【００５１】

特定の実施形態は、脾臓に導入するための、活性化又は非活性化線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、及び／又はエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体、又は線維芽細胞の任意の他の断片若しくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、または活性化または非活性化免疫細胞、または活性化または非活性化免疫細胞もしくは線維芽細胞誘導体を産生する方法に関する。脾臓への導入は、免疫細胞、鉄代謝、および／または赤血球ホメオスタシスの産生または活性を刺激、改善、および／または増加させる可能性がある。いくつかの実施形態において、本方法はインビボで実施される。いくつかの実施形態において、本方法はインビトロで実施される。いくつかの実施形態において、本方法はエクスビボで実施される。

【００５２】

いくつかの実施形態では、線維芽細胞は自家である。いくつかの実施形態では、線維芽細胞は同種異系である。いくつかの実施形態では、線維芽細胞は異種である。

【００５３】

特定の実施形態は、線維芽細胞（線維芽細胞、線維芽細胞様細胞、線維芽細胞からの溶解物、線維芽細胞培養からの調整培地、および／またはエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体、または線維芽細胞の他の断片もしくは生物学的成分を含む細胞外小胞を含む）、薬剤で活性化された線維芽細胞、および／または線維芽細胞と１種類以上の免疫細胞および／または誘導体薬剤の脾臓への導入に関する。脾臓は萎縮していてもよい。この導入により、器官形成やＴ細胞の発達、および／または脾臓の萎縮の回復が誘導され得る。この導入により、脾臓の萎縮を回復させるために、組織の分化を誘導することができる［１４］。この導入により、赤脾髄、白脾髄、または脾辺縁帯への幹細胞の細胞リクルートと分化が誘導され得る［１２］。この導入により、すでに脾臓に存在している脾臓内皮細胞、中皮細胞、網状細胞、網状線維芽細胞、脾臓線維芽細胞、脾臓マクロファージ、間質オーガナイザー細胞などの細胞の増殖を誘導し得る［１５－１７］。

【００５４】

ある種の実施形態は、免疫系を活性化するために線維芽細胞と組み合わせた１つ以上のアジュバントの使用に関する。アジュバントは、化学物質、ウイルス、または細菌産物ベースであってもよい。

【００５５】

ある種の実施形態は、カプセル化ＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、あるいは他のＲＮＡｉ分子やシステムと線維芽細胞との組み合わせに関する。この組み合わせは、局所的に脾臓組織の再生を活性化するか、あるいは脾臓の萎縮を逆転させ得る。

【００５６】

ＩＩＩ．薬剤

特定の実施形態は、特定の薬剤およびそのような薬剤を使用する方法に関する。薬剤は、本明細書に包含される方法及び組成物に有用な任意の薬剤を含んでよい。本開示の細胞集団は、１つ又は様々な目的のために、１つ又は複数の薬剤に曝露され得る。薬剤は、例えば、細胞集団の細胞を活性化してもよい。いくつかの実施形態では、未修飾の細胞集団及び／又は薬剤によって活性化された細胞集団、及び／又は細胞集団の誘導体を含む細胞集団が、薬剤と共に個体に投与される。投与は、組織の退縮を逆転させるために組織の分化を誘導することができる。投与は、組織の上皮細胞及び／又は脾臓網状線維芽細胞などの組織の線維芽細胞への幹細胞の組織リクルート及び分化を誘導することができる。投与は、組織に存在する上皮細胞及び／又は線維芽細胞の増殖を誘導することができる。

【００５７】

いくつかの実施形態において、薬剤はアジュバントを含む。いくつかの実施形態において、アジュバントは、個体の免疫系を活性化するために個体に投与される。アジュバントは、免疫系を活性化するために細胞集団と組み合わせて使用することができる。アジュバントは、化学的、ウイルス性、細菌産物ベース、又はそれらの組み合わせであり得る。

【００５８】

特定の実施形態において、線維芽細胞は、線維芽細胞の生存能力及び増殖能力を維持するためにインビトロで培養される。本開示は、レシピエント免疫系による線維芽細胞の認識を減少させるための既知の培養技術の改変を提供する。一実施形態では、線維芽細胞は、異種成分を含まない培地などの異種成分を含まない条件下で培養される。場合によっては、培地は、例えば、子牛胎児血清を含まない。具体的な実施形態において、本開示は、子牛胎児血清を、線維芽細胞の免疫原性の低下を促進するもの、例えば、ヒト血小板豊富血漿、血小板溶解液、臍帯血血清、自己血清、及び／又は線維芽細胞増殖因子、上皮増殖因子、白血病抑制因子、インスリン様増殖因子、アンギオポエチン、及び血管内皮増殖因子の１つ又は組み合わせのような１つ又は複数の規定されたサイトカイン、などの１つ以上の他の薬剤で置換することを包含する。

【００５９】

Ａ．核酸

特定の実施形態において、核酸配列は、組み込まれた配列又は組み換えポリヌクレオチドの単離されたセグメント及び組み換えベクター、ハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに十分なポリヌクレオチド、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを同定、分析、変異又は増幅するためのＰＣＲプライマー又は配列決定プライマー、ポリヌクレオチドの発現を阻害するためのアンチセンス核酸、及び本明細書中に記載される前記の相補配列のような種々の実施態様で存在し得る。エピトープをコードする核酸もまた提供される。融合タンパク質を含むタンパク質をコードする核酸もまた提供される。核酸は、一本鎖又は二本鎖であり得、そしてＲＮＡ及び／又はＤＮＡヌクレオチド並びにそれらの人工変異体（例えば、ペプチド核酸）を含み得る。

【００６０】

特定の実施形態において、本明細書中に開示される配列に対して実質的な同一性を有するポリヌクレオチド変異体；本明細書中に記載される方法（例えば、標準的なパラメーターを使用するＢＬＡＳＴ分析）を使用して、本明細書中に提供されるポリヌクレオチド配列と比較して、その間のすべての値及び範囲を含めて、少なくとも７０％、７５％、８０

％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％以上の配列同一性を含むもの、が存在する。特定の態様において、単離されたポリヌクレオチドは、配列の全長にわたって、本明細書に記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、好ましくは９５％以上の同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；又は前記単離されたポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列を含むであろう。

【００６１】

核酸セグメントは、コード配列自体の長さに関係なく、他の核酸配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、多重クローニング部位、他のコードセグメントなどと組み合わせることができ、そのような場合、全体の長さはかなり変化する可能性がある。核酸はどのような長さでもよい。それらは、例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、１００、１２５、１７５、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、７５０、１０００、１５００、３０００、５０００又はそれ以上のヌクレオチドの長さであり得、及び／又は１つ以上の付加的配列、例えば、調節配列を含み得、及び／又はより大きな核酸、例えば、ベクターの一部であり得る。したがって、ほぼ任意の長さの核酸断片が採用され得、好ましくは、全長は、意図される組換え核酸プロトコールにおける調製及び使用の容易さによって制限されることが企図される。場合によっては、核酸配列は、例えば、ポリペプチドの精製、輸送、分泌、翻訳後修飾を可能にするため、又は標的化もしくは有効性のような治療上の利点を可能にするために、追加の異種コード配列を有するポリペプチド配列をコードし得る。上述したように、タグ又は他の異種ポリペプチドを修飾ポリペプチドコード配列に付加してもよく、ここで「異種」とは修飾ポリペプチドと同一ではないポリペプチドを指す。

【００６２】

Ｂ．ハイブリダイゼーション

特定のハイブリダイゼーション条件下で他の核酸にハイブリダイズする核酸。核酸をハイブリダイズさせる方法は、当該技術分野において周知である。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6を参照されたい。本明細書で定義されるように、中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、５×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）、０．５％ＳＤＳ、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）、約５０％ホルムアミド、６×ＳＳＣ、５５℃のハイブリダイゼーションバッファー（又は、約５０％ホルムアミドを含み、４２℃のハイブリダイゼーション温度などの他の類似のハイブリダイゼーション溶液）を含む予備洗浄溶液、及び０．５×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳで６０℃の洗浄条件を使用する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、６×ＳＳＣ、４５℃でハイブリダイゼーションし、次いで０．１×ＳＳＣ、０．２％ＳＤＳ、６８℃で１回以上洗浄する。さらに、当業者であれば、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％又は少なくとも９９％が互いに同一であるヌクレオチド配列を含む核酸が、典型的には互いにハイブリダイズしたままであるように、ハイブリダイゼーション及び／又は洗浄条件を操作して、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加又は減少させることができる。

【００６３】

ハイブリダイゼーション条件の選択に影響するパラメーターと適切な条件を考案するための指針は、例えばSambrook、Fritsch、及びManiatis（Molecular Cloning：A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapter 9 and 11 (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, Inc., section 2.10 and 6.3-6.4 (1995)、これらの両方は、全ての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）により記載されており、例えば、ＤＮＡの長さ及び／又は塩基組成に基づいて、当業者により容易に決定され得る。

【００６４】

Ｃ．変異

変更は、本明細書中の任意の細胞に対する内因性核酸又は外因性核酸を含む核酸に変異により導入することができ、それによりそれがコードするポリペプチド（例えば、抗体又は抗体誘導体）のアミノ酸配列に変化をもたらす。変異は、当技術分野で公知の任意の技術を用いて導入することができる。一実施形態では、例えば部位特異的変異誘発プロトコールを用いて１つ以上の特定のアミノ酸残基を変化させる。別の実施形態では、１つ以上のランダムに選択された残基が、例えばランダム変異誘発プロトコールを用いて変更される。どのように作製しても、変異ポリペプチドを発現させ、所望の特性についてスクリーニングすることができる。

【００６５】

核酸がコードするポリペプチドの生物学的活性を著しく変化させることなく、核酸に変異を導入することができる。例えば、非必須アミノ酸残基のアミノ酸置換につながるヌクレオチド置換を行うことができる。あるいは、コードするポリペプチドの生物学的活性を選択的に変化させる１つ以上の変異を核酸に導入することもできる。例えば、Romain Studer et al., Biochem. J. 449:581-594 (2013)を参照のこと。例えば、変異は生物活性を定量的又は定性的に変化させることができる。定量的変化の例としては、活性の増加、減少、又は除去が挙げられる。質的な変化の例としては、抗体の抗原特異性を変化させることが挙げられる。

【００６６】

Ｄ．プローブ

別の態様では、核酸分子は、核酸配列の検出のためのプライマー又はハイブリダイゼーションプローブとして使用するのに適している。核酸分子は、全長ポリペプチドをコードする核酸配列の一部のみ、例えば、プローブ又はプライマーとして使用できる断片、あるいは所定のポリペプチドの活性部分をコードする断片を含むことができる。

【００６７】

別の実施形態では、核酸分子は特定の抗体配列に対するプローブ又はＰＣＲプライマーとして使用することができる。例えば、核酸分子プローブは、診断方法において使用され得るか、又は核酸分子ＰＣＲプライマーは、特に、抗体の可変ドメインを産生する際に使用するための核酸配列を単離するために使用され得るＤＮＡの領域を増幅するために使用され得る。例えば、Gaily Kivi et al., BMC Biotechnol. 16:2 (2016)を参照のこと。好ましい実施形態では、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。より好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは、目的の抗体の重鎖及び軽鎖の高度可変領域からのものである。さらに好ましい実施形態では、オリゴヌクレオチドは１つ以上のＣＤＲの全部又は一部をコードする。

【００６８】

核酸の所望の配列に基づくプローブは、核酸又は類似の核酸、例えば目的のポリペプチドをコードする転写産物を検出するために使用することができる。プローブは、標識基、例えば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、又は酵素補酵素を含むことができる。このようなプローブは、ポリペプチドを発現する細胞を同定するために用いることができる。

【００６９】

Ｅ．阻害性オリゴヌクレオチド

いくつかの態様において、本開示は、目的の遺伝子の発現を阻害する阻害性オリゴヌクレオチドに関する。阻害性オリゴヌクレオチドは、目的の遺伝子のＲＮＡ及び／又はタンパク質の発現を阻害し得る。阻害性オリゴヌクレオチドの例としては、ｓｉＲＮＡ（ｓｍａｌｌ　ｉｎｔｅｒｆｅｒｉｎｇ　ＲＮＡ）、ショートヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、及びそれらのいずれかをコードするオリゴヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない。阻害性オリゴヌクレオチドは、遺伝子の転写を阻害するか、又は細胞における遺伝子転写物の翻訳を阻害することができる。阻害性オリゴヌクレオチド酸は、１６～１０００ヌクレオチド長であってもよく、特定の実施形態では１８～１００ヌクレオチド長である。オリゴヌクレオチ

ドは、少なくとも又は多くとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、４０、５０、６０、７０、８０、又は９０（又はそこから誘導可能な任意の範囲）のヌクレオチドを有してもよい。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又は阻害性ＲＮＡをコードするｃＤＮＡであってもよい。

【００７０】

阻害性オリゴヌクレオチドは当技術分野でよく知られている。例えば、ｓｉＲＮＡ及び二本鎖ＲＮＡは、米国特許第６，５０６，５５９号及び同第６，５７３，０９９号、並びに米国特許公開第２００３／００５１２６３号、同第２００３／００５５０２０号、同第２００４／０２６５８３９号、同第２００２／０１６８７０７号、同第２００３／０１５９１６１号、及び同第２００４／００６４８４２号に記載されており、これらはすべて、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【００７１】

具体的に、阻害オリゴヌクレオチドは、目的の遺伝子の発現を少なくとも１０％、２０％、３０％、又は４０％、より具体的に少なくとも５０％、６０％、又は７０％、最も具体的に少なくとも７５％、８０％、９０％、９５％、９９％、又は１００％以上減少させることができるか、又は前述の間の任意の範囲若しくは値で減少させることができる。

【００７２】

さらなる実施形態では、目的のタンパク質を阻害する合成オリゴヌクレオチドがある。阻害剤は、１７～２５ヌクレオチドの長さであってよく、成熟ｍＲＮＡの５’～３’配列に少なくとも９０％相補的な５’～３’配列を含む。特定の実施形態において、阻害剤分子は、長さが１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、若しくは２５ヌクレオチド、又はそこから誘導可能な任意の範囲である。さらに、阻害剤分子は、成熟ｍＲＮＡ、特に成熟した天然に存在するｍＲＮＡの５’から３’までの配列に対して、少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、９９．１、９９．２、９９．３、９９．４、９９．５、９９．６、９９．７、９９．８、９９．９若しくは１００％相補的であるか、又はそこから誘導可能な任意の範囲である配列（５’から３’まで）を有する。当業者であれば、ｍＲＮＡ阻害剤の配列として、成熟ｍＲＮＡの配列に相補的なプローブ配列の一部を使用することができるであろう。さらに、プローブ配列のその部分は、成熟ｍＲＮＡの配列に依然として９０％相補的であるように改変することができる。

【００７３】

いくつかの実施形態において、阻害オリゴヌクレオチドはアナログであり、修飾、特にヌクレアーゼ耐性を増加させ、結合親和性を改善し、及び／又は結合特異性を改善する修飾を含み得る。例えば、ヌクレオシド又はヌクレオチドの糖部分が炭素環部分で置換される場合、それはもはや糖ではない。さらに、他の置換、例えば糖間ホスホジエステル結合の置換がなされると、得られる物質はもはや真の種ではない。このような化合物はすべてアナログであると考えられる。本明細書を通して、核酸種の糖部分への言及は、真の糖、又は野生型核酸の糖の構造的位置を占める種のいずれかを指すと理解されるものとする。さらに、糖間結合への言及は、野生型核酸の様式で糖又は糖アナログ部分を結合する役割を果たす部分を含むものとする。

【００７４】

本開示は、修飾オリゴヌクレオチド、すなわち、オリゴヌクレオチドアナログ又はオリゴヌクレオシド、及び修飾をもたらすための方法に関する。これらの修飾されたオリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドアナログは、天然に存在する対応物と比較して、増加した化学的及び／又は酵素的安定性を示し得る。細胞外及び細胞内ヌクレアーゼは一般に、骨格修飾化合物を認識せず、したがって結合しない。プロトン化された酸形態として存在する場合、負に荷電した骨格がないため、細胞への浸透が促進される可能性がある。

【００７５】

修飾されたヌクレオシド間結合は、天然に存在するホスホジエステル－５’－メチレン

結合を４原子の連結基で置き換えることで、得られる化合物にヌクレアーゼ耐性と細胞への取り込み促進を与えることを意図している。

【００７６】

修飾は固体支持体を用いて達成することができ、固体支持体は手作業で操作することもできるし、ＤＮＡ合成装置の技術分野の当業者に一般的に知られている方法論を用いてＤＮＡ合成装置と組み合わせて使用することもできる。一般に、この手順は、選択された配列において互いに隣接する２つのヌクレオシドの糖部分を官能基化することを含む。５’から３’の意味では、構造Ｈのような「上流」のシントンはその末端３’部位で修飾され、構造Ｈ１のような「下流」のシントンはその末端５’部位で修飾される。

【００７７】

ヒドラジン、ヒドロキシルアルニン、及び他の連結基によって連結されたオリゴヌクレオシドは、５’－ヒドロキシルでジメトキシトリチル基によって保護され、３’－ヒドロキシルでシアノエチルジイソプロピル－ホスファイト部分でのカップリングのために活性化され得る。これらの化合物は、標準的な固相の自動ＤＮＡ合成技術により、任意の配列に挿入することができる。最もポピュラーなプロセスの一つはホスホラミダイト技術である。均一な骨格結合を含むオリゴヌクレオチドは、ＣＰＧ固相支持体、及びＡｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．３８０Ｂ及び３９４、Ｍｉｌｌｉｇｅｎ／Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ ７５００及び８８００などの標準核酸合成機を用いて合成できる。最初のヌクレオチド（３’末端の１番）は、制御細孔ガラスなどの固体支持体に付着させる。配列特定の順序で、それぞれの新しいヌクレオチドが、手動操作又は自動合成システムによって取り付けられる。

【００７８】

遊離アミノ基は、例えば酢酸中のアセトンと水素化シアノホウ素ナトリウムでアルキル化できる。アルキル化工程は、高分子上に他の有用な機能性分子を導入するために用いることができる。このような有用な機能性分子としては、レポーター分子、ＲＮＡ切断基、オリゴヌクレオチドの薬物動態学的特性を改善するための基、オリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基などが挙げられるが、これらに限定されない。このような分子は、骨格連結の窒素原子への結合を介して高分子に結合又は共役させることができる。あるいは、このような分子は、１つ以上のヌクレオチドの糖部分のヒドロキシル基から伸びるペンダント基に結合させることができる。このような他の有用な官能基の例は、参照により本明細書に組み込まれるＷＯ１９９３００７８８３、及び他の上記した特許出願により提供される。

【００７９】

固体支持体には、制御細孔ガラス（ＣＰＧ）、オキサリル制御細孔ガラス、アミノポリエチレングリコール誘導体化支持体であるＴｅｎｔａＧｅｌ Ｓｕｐｐｏｒｔ、ポリスチレン／ジビニルベンゼンの共重合体であるＰｏｒｏｓを含む、ポリヌクレオチド合成のために当該技術分野で知られているものが含まれ得る。ヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドの結合及び切断は、標準的な手順で行うことができる。本明細書で使用する場合、固体支持体という用語は、成長するオリゴヌクレオシドをＣＰＧなどの固定相に結合させるために使用される任意のリンカー（例えば、長鎖アルキルアミン及びスクシニル残基）をさらに含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、１つ以上のロックトヌクレオチド、エチレン架橋ヌクレオチド、ペプチド核酸、又は５’（Ｅ）－ビニルホスホネート（ＶＰ）修飾を有するものとしてさらに定義され得る。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、１つ以上のホスホロチオエート化ＤＮＡ又はＲＮＡ塩基を有する。

【００８０】

ＩＶ．細胞治療

本明細書の特定の実施形態は、本明細書に開示される適応症に有用な実質的に同種、同種、又は異種の細胞集団を包含する。細胞集団は、修飾及び／又は非修飾線維芽細胞、修飾及び／又は非修飾免疫細胞、又は脾臓などの組織を再生することができる任意の修飾及

び／又は非修飾細胞を含む、本明細書に開示される任意の細胞を含んでよい。本明細書のある実施形態は、細胞療法として個体に細胞集団を投与する方法を包含する。

【００８１】

いくつかの実施形態において、線維芽細胞は、１つ以上の因子及び／又は薬剤を産生するように操作又は刺激される。いくつかの実施形態において、線維芽細胞を操作又は刺激して、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、脳由来神経栄養因子（ＢＤＮＦ）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦ）、塩基性線維芽細胞成長因子（ｂＦＧＦ）、ＦＧＦ－６、グリア由来神経栄養因子（ＧＤＮＦ）、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＣＳＦ）、肝細胞成長因子（ＨＧＦ）、ＩＦＮ－γ、インスリン様成長因子結合タンパク質（ＩＧＦＢＰ－２）、ＩＧＦＢＰ－６、ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、単球走化性タンパク質（ＭＣＰ－１）、単核食細胞コロニー刺激因子（Ｍ－ＣＳＦ）、神経栄養因子（ＮＴ３）、組織メタロプロテイナーゼ阻害因子（ＴＩＭＰ－１）、ＴＩＭＰ－２、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ－β）、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、ＶＥＧＦ－Ｄ、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子受容体（ｕＰＡＲ）、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＩＬ１－ａ、ＩＬ－３、レプチン、幹細胞因子（ＳＣＦ）、間質細胞由来因子－１（ＳＤＦ－１）、血小板由来成長因子－ＢＢ（ＰＤＧＦＢＢ）、トランスフォーミング成長因子β（ＴＧＦβ－１）及び／又はＴＧＦβ－３を産生させる。操作又は刺激された線維芽細胞からの因子は、調整培地中に存在し、治療的使用のために収集され得る。

【００８２】

Ａ．細胞培養

特定の実施形態は、本明細書に記載される組成物及び／又は方法における使用に組み込むための任意の適切な細胞の培養に関する。いくつかの実施形態では、細胞は適切な温度、典型的には３７℃の温度で、典型的には酸素及び$CO_2$を含む雰囲気下で増殖され、維持される。培養条件は細胞種ごとに大きく異なってもよく、特定の細胞種に対して条件を変化させると、異なる表現型が発現され得る。培養系で最もよく変化する要因は増殖培地である。成長培地は、栄養素、成長因子の濃度、その他の成分の有無で変化する。培地を補うために使われる成長因子は、子牛血清のような動物の血液に由来することが多い。

【００８３】

いくつかの実施形態では、細胞は少なくとも約１０日間から約４０日間、少なくとも約１５日間から約３５日間、少なくとも約１５日間から約２１日間、例えば少なくとも約１５日間、約１６日間、約１７日間、約１８日間、約１９日間、又は約２１日間培養され得る。いくつかの実施形態において、本開示の細胞は、６０日以下、又は５０日以下、又は４５日以下で培養され得る。細胞は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、又は４０日間培養されてもよい。細胞は液体培地の存在下で培養してもよい。典型的には、培地は当分野で公知の基本培地製剤からなる。イーグル最小必須培地（ＭＥＭ）、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）、α変法最小必須培地（α－ＭＥＭ）、基本必須培地（ＢＭＥ）、イスコフ変法ダルベッコ培地（ＩＭＤＭ）、ＢＧＪｂ培地、Ｆ－１２栄養混合物（Ｈａｍ）、Ｌｉｅｂｏｖｉｔｚ　Ｌ－１５、ＤＭＥＭ／Ｆ－１２、変法イーグル必須培地（ＥＭＥＭ）、ＲＰＭＩ－１６４０、及びこれらの改変物及び／又は組み合わせなどを含むが、これらに限定されない多くの基本培地処方が本明細書における培養細胞に使用できる。上記の基本培地の組成は、当技術分野において一般的に知られており、培地及び／又は培地サプリメントの濃度を、培養される細胞に対して必要に応じて変更又は調節することは、当業者の技術の範囲内である。いくつかの実施形態において、培地処方は、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１００Ｕ／ｍｌペニシリンＧ、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン及び２ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｌ－グルタミンを補充したＩＭＤＭからなるエクスプランツ培地（ＣＥＭ）であってもよい。他の実施形態では、上記のものから選択されるような、さらなる基本培地処方を採用することができる。

【００８４】

細胞の培養には、インビトロで細胞を支持できる培地であればどれでも使用できる。細胞の増殖を支持し得る培地処方としては、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）、α変法最小必須培地（αＭＥＭ）、ロズウェルパーク記念研究所培地１６４０（ＲＰＭＩ培地１６４０）などが挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、細胞の増殖を支持するために、２０％までのウシ胎児血清（ＦＢＳ）又は１～２０％のウマ血清が上記培地に添加される。しかしながら、細胞の培養に必要な増殖因子、サイトカイン、ホルモンが培地中に適切な濃度で供給される場合には、規定された培地を使用することもできる。本開示の方法において有用な培地は、細胞の培養に有用な抗生物質、分裂促進化合物、又は分化化合物を含むがこれらに限定されない、１つ以上の目的の化合物を含んでいてもよい。細胞は、２７℃～４０℃、例えば３１℃～３７℃の温度で増殖させることができ、加湿インキュベーター内で増殖させることができる。二酸化炭素濃度は２％～１０％に維持され、酸素濃度は１％～２２％に維持され得る。しかしながら、本開示は決して、細胞を単離し培養するいずれか一つの方法に限定して解釈されるべきではない。むしろ、細胞を単離し培養するいかなる方法も、本開示に含まれると解釈されるべきである。

【００８５】

細胞培養に使用するために、培地には１つ以上のさらなる成分を添加することができる。例えば、最適な増殖と拡張に必要な微量元素や物質を細胞に供給するために、追加のサプリメントを使用することができる。そのようなサプリメントには、インスリン、トランスフェリン、セレン塩、及びそれらの組み合わせが含まれる。これらの成分は、ハンクス平衡塩溶液（ＨＢＳＳ）、アール塩溶液などの塩溶液に含めることができるが、これらに限定されない。さらに抗酸化サプリメント、例えばβ－メルカプトエタノールを加えてもよい。多くの培地はすでにアミノ酸を含んでいるが、いくつかのアミノ酸は、例えば、溶液中では安定性が低いことが知られているＬ－グルタミンのように、後で補充してもよい。培地には、抗生物質及び／又は抗真菌性化合物、例えば、典型的にはペニシリンとストレプトマイシンの混合物、及び／又はアンホテリシン、アンピシリン、ゲンタマイシン、ブレオマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ナリジクス酸、ネオマイシン、ナイスタチン、パロモマイシン、ポリミキシン、ピューロマイシン、リファンピシン、スペクチノマイシン、テトラサイクリン、タイロシン、及びゼオシンなどの他の化合物が例示されるがこれらに限定されない。また、細胞培養培地に哺乳動物の血漿や血清を補充することも考えられる。血漿や血清には、生存能や増殖に必要な細胞因子や成分が含まれていることが多い。適切な血清代替物の使用も企図されている。

【００８６】

特定の緩衝液、培地、試薬、細胞、培養条件など、又はそれらのサブクラスへの言及は、限定を意図するものではなく、その議論が提示される特定の文脈において、当業者が興味又は価値があると認識するであろう、そのような関連材料すべてを含むように読まれるべきである。例えば、ある緩衝系又は培養培地を別の緩衝系又は培養培地に置き換えることはしばしば可能であり、示唆された方法、材料又は組成物の使用が指示されている目的と同じ目的を達成するために、異なるが公知の方法が使用される。特定の実施形態では、細胞は、細胞培養培地を含む細胞培養系、好ましくは培養容器中で、特に、細胞をインビトロ老化から保護し、及び／又は非特異的若しくは特異的な初期化を誘導するために適切かつ決定された物質を添加した細胞培養培地中で培養される。

【００８７】

Ｂ．細胞生成

本開示のある種の方法は、ヒト組織試料から得られた細胞の培養に関するものである。本開示の特定の実施態様において、細胞は、細胞の接着を可能にする基質上にプレーティングされる。これは、例えば、細胞の接着に適合する１つ以上の基質表面を提示する培養プレートに細胞をプレーティングすることによって実施され得る。１つ以上の基質表面が、培養系に導入された細胞の懸濁液（例えば、培地中の懸濁液）と接触すると、細胞と基質表面との間に細胞接着が生じ得る。従って、特定の実施形態では、細胞は、プレーティ

ングされた細胞が前記基質表面と接触することができるように、一般的に細胞の接着に適合する少なくとも１つの基質表面を特徴とする培養系に導入され、このような実施形態は、細胞の接着を可能にする基質上へのプレーティングを包含する。

【００８８】

本開示の細胞は、細胞表面マーカーなどの特異的マーカータンパク質の発現によって同定し、特徴付けることができる。これらの細胞の検出及び単離は、例えばフローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ、及び／又は磁気ビーズによって達成することができる。単一細胞ＲＮＡ－Ｓｅｑ及び／又は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）は、細胞特異的遺伝子を定量化するため、及び／又は分化に応答した遺伝子発現の変化をモニターするために使用され得る。特定の実施形態において、細胞を同定し、特徴付けるために使用されるマーカータンパク質は、免疫系細胞を含む様々な細胞タイプ及びサブタイプについて以前に刊行物で同定された分化クラスタ（ＣＤ）マーカーのリストの一部である。これらは、ｃ－Ｋｉｔ（ＣＤ１１７）、Ｎａｎｏｇ、Ｓｏｘ２、Ｈｅｙ１、ＳＭＡ、Ｖｉｍｅｎｔｉｎ、Ｃｙｃｌｉｎ　Ｄ２、Ｓｎａｉｌ、Ｅ－カドヘリン、Ｎｋｘ２．５、ＧＡＴＡ４、ＣＤ１０５、ＣＤ９０、ＣＤ２９、ＣＤ７３、Ｗｔ１、ＣＤ３４、ＣＤ４５、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ３、ＴＣＲ、ＣＤ２、ＣＤ２８、ＣＤ５、ＣＤ７、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ｌｄｂ、ｌｇａ、ｓｉｇ、ＣＤ４０、ＭＨＣ　ＩＩ、ＣＤ２２、ＣＲ１／ＣＤ３５、ＣＲ２／ＣＤ２１、Ｂ７／ＣＤ８０、ＣＤ５、ＦｃｇＲ　ＩＩ／ＣＤ３２、及びそれらの組み合わせからなる群から選択できる。

【００８９】

Ｃ．ポリペプチド発現

いくつかの態様において、本開示のポリペプチド又はペプチドをコードする核酸分子が存在し、本明細書に包含される任意の細胞は、それらを産生するように改変され得る。これらは、当技術分野で公知の方法、例えば、免疫化され単離されたマウスのＢ細胞から単離されたもの、ファージディスプレイ、任意の適切な組換え発現系で発現されたもの、又は組換え法によって生成され得る。核酸分子は、大量のポリペプチドを発現させるために使用することができる。

【００９０】

Ｄ．ベクター

いくつかの態様において、所望の配列のポリペプチド又はその一部をコードする核酸分子を含む発現ベクターが企図される。いくつかの態様において、核酸分子を含む発現ベクターは、融合タンパク質、改変抗体、抗体断片、及びそれらのプローブをコードし得る。転写及び翻訳を調節する制御配列に加えて、ベクター及び発現ベクターは、同様に他の機能を果たす核酸配列を含んでもよい。

【００９１】

本開示のポリペプチド又はペプチドを発現させるために、ポリペプチド又はペプチドをコードするＤＮＡは、遺伝子領域が転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、発現ベクターに挿入され得る。典型的には、いずれかの宿主細胞で使用される発現ベクターは、プラスミド又はウイルスの維持、及び外来性ヌクレオチド配列のクローニング及び発現のための配列を含む。このような配列は、「フランキング配列」と総称されるが、典型的には、以下の作動可能に連結されたヌクレオチド配列の１つ以上を含む：プロモーター、１つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナー及びアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、及び選択可能なマーカーエレメント。このような配列及びその使用方法は当技術分野でよく知られている。

【００９２】

Ｅ．発現系

上述した発現ベクターの少なくとも一部又は全部を含む多数の発現系が存在する。原核生物ベース及び／又は真核生物ベースの系は、核酸配列、又はそれらの同族ポリペプチド

、タンパク質及びペプチドを産生するための実施形態と共に使用するために採用され得る。商業的に広く入手可能な系としては、細菌、哺乳動物、酵母、及び昆虫細胞系が挙げられるが、これらに限定されない。異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセシングと修飾のための特徴的で特異的なメカニズムを有する。適切な細胞株又は宿主系は、発現された外来タンパク質の正しい修飾及びプロセシングを確実にするために選択され得る。当業者は、適切な発現系を用いて、核酸配列又はその同族ポリペプチド、タンパク質、又はペプチドを産生するベクターを発現させることができる。

【００９３】

Ｆ．遺伝子導入の方法

組成物の発現を効果的にするための核酸送達のための適切な方法は、本明細書に記載されるように、又は当業者に公知であろうように、核酸（例えば、ウイルス及び非ウイルスベクターを含むＤＮＡ；ＣＲＩＳＰＲ－Ｃａｓ９）を任意の細胞、任意の組織又は任意の生物に導入することができる実質的に任意の方法を含むことが予想される。このような方法には、マイクロインジェクション（Harland and Weintraub、1985；米国特許第５，７８９，２１５号、各々参照により本明細書に組み込まれる）を含む、注射（米国特許５，９９４，６２４、５，９８１，２７４、５，９４５，１００、５，７８０，４４８、５，７３６，５２４、５，７０２，９３２、５，６５６，６１０、５，５８９，４６６及び５，５８０，８５９、各々参照により本明細書に組み込まれる）によるようなＤＮＡの直接送達；エレクトロポレーションによる方法（米国特許第５，３８４，２５３号、参照により本明細書に組み込まれる）；リン酸カルシウム沈殿による方法（Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990）；ＤＥＡＥデキストランを使用し、次いでポリエチレングリコールを使用する方法（Gopal、1985）；直接音波ローディングによる方法（Fechheimer et al., 1987）；リポソームを介するトランスフェクションによる方法（Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991）；微粒子銃による方法（ＰＣＴ出願番号ＷＯ９４／０９６９９及びＷＯ９５／０６１２８；米国特許第５，６１０，０４２；５，３２２，７８３、５，５６３，０５５、５，５５０，３１８、５，５３８，８７７及び５，５３８，８８０号、各々参照により本明細書に組み込まれる）；シリコンカーバイド繊維による撹拌による方法（Kaeppler et al., 1990；米国特許第５，３０２，５２３号及び第５，４６４，７６５号、各々参照により本明細書に組み込まれる）；アグロバクテリウム媒介形質転換（米国特許第５，５９１，６１６号及び第５，５６３，０５５号、各々参照により本明細書に組み込まれる）；又はプロトプラストのＰＥＧ媒介形質転換（Omirulleh et al., 1993；米国特許第４，６８４，６１１号及び第４，９５２，５００号、各々参照により本明細書に組み込まれる）；乾燥／阻害媒介ＤＮＡ取り込み（Potrykus et al., 1985）による方法が含まれるが、これらに限定されない。他の方法としては、レンチウイルス又はレトロウイルス導入による遺伝子導入のようなウイルス導入がある。

【００９４】

いくつかの実施形態において、本明細書に包含される任意の細胞は、１つ以上の内因性遺伝子のノックダウン又はノックアウトを有するように改変され得る。当業者は、例えば、あらゆる種類のＲＮＡ干渉及びＣＲＩＳＰＲ技術を含む、そうするための標準的な手順に精通している。

【００９５】

Ｇ．ＣＲＩＳＰＲ－媒介遺伝子活性化

腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）ファミリー、活性化ＮＦκＢ受容体（ＲＡＮＫ）、ＣＤ４０、リンパ球β受容体（ＬＴβＲ）、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）Ｆｏｘｎ１、Ｗｎｔを含む様々な遺伝子が、胸腺上皮細胞（ＴＥＣ）の成熟と発達に関与している（Sun, Luo et al. 2013, Sun, Sun et al. 2015）。ＴＥＣの成熟はまた、成熟に必要な遺伝子のエピジェネティックな活性化に必要な因子を提供できるという点で、胸腺細胞、線維芽細胞、間葉系幹細胞などの他の細胞との相互作用や依存性にも関与している。この

実施形態では、線維芽細胞、及び／又は脾臓からの細胞は、胸腺の皮質及び髄質の両方に対して予定されたＴＥＣ活性化の原因となる遺伝子の１つ又は組み合わせの遺伝子及びプロモーター領域のＣＲＩＳＰＲ媒介メチル化を通じてエピジェネティックに活性化され得る（Vojta, Dobrinic et al. 2016, Tyurin-Kuzmin, Karagyaur et al. 2018, Kang, Park et al. 2019, Nakamura, Gao et al. 2021, Singina, Sergiev et al. 2021）。ＴＥＣの成熟に必要な遺伝子の発現を再活性化するために、遺伝子やプロモーター領域のアセチル化にも同じ手法を用いることができる。

【００９６】

Ｈ．宿主細胞

別の態様では、組換え発現ベクターが導入された任意の宿主細胞の使用が企図される。目的のタンパク質をコードする発現構築物は、当該分野で公知の種々の方法に従って細胞にトランスフェクトされ得る。ベクターＤＮＡは、通常の形質転換又はトランスフェクション技術によって原核細胞又は真核細胞に導入することができる。いくつかのベクターは、原核細胞及び真核細胞の両方において複製及び／又は発現されることを可能にする制御配列を用いることができる。特定の態様において、発現構築物は、ＮＦＡＴ－１又はＮＦ－κＢによって制御されるもののような、細胞活性化に連結されるプロモーターの制御下に置くことができる。宿主細胞を維持し、ベクターの複製を可能にするために宿主細胞をインキュベートする条件は、当業者であれば理解できるであろう。また、ベクターの大規模生産、ベクターによってコードされる核酸及びその同族ポリペプチド、タンパク質、又はペプチドの生産を可能にする技術及び条件も理解され、知られている。

【００９７】

哺乳動物細胞を安定的にトランスフェクションする場合、使用する発現ベクターやトランスフェクション技術にもよるが、ごく一部の細胞が外来ＤＮＡをゲノムに組み込み得ることが知られている。これらの要素（ｉｎｔｅｇｒａｎｔ）を同定し、選択するために、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）を目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入するのが一般的である。導入された核酸で安定的にトランスフェクトされた細胞は、当該技術分野で知られている他の方法の中でも、薬剤選択（例えば、選択可能マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生き残り、他の細胞は死滅する）によって同定することができる。

【００９８】

Ｉ．製剤化及び細胞の培養

特定の実施形態では、本開示の細胞は特別に製剤化されてもよく、及び／又は特定の培地で培養されてもよい。細胞は、有害な影響なしにレシピエントに送達するのに適するような方法で製剤化されてもよい。

【００９９】

特定の態様における培地は、動物細胞の培養に使用される培地を基礎培地として用いて調製することができ、例えば、ＡＩＭ Ｖ、Ｘ－ＶＩＶＯ－１５、ＮｅｕｒｏＢａｓａｌ、ＥＧＭ２、ＴｅＳＲ、ＢＭＥ、ＢＧＪｂ、ＣＭＲＬ １０６６、Ｇｌａｓｇｏｗ ＭＥＭ、Ｉｍｐｒｏｖｅｄ ＭＥＭ Ｚｉｎｃ Ｏｐｔｉｏｎ、ＩＭＤＭ、Ｍｅｄｉｕｍ １９９、Ｅａｇｌｅ ＭＥＭ、αＭＥＭ、ＤＭＥＭ、Ｈａｍ、ＲＰＭＩ－１６４０、Ｆｉｓｃｈｅｒ’ｓ培地、及びこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、動物細胞の培養に使用できる培地であれば、特にこれらに限定されるものではない。特に、培地はゼノフリーであっても化学的に規定されていてもよい。

【０１００】

培地は、血清含有培地、無血清培地、あるいはゼノフリー培地とすることができる。異種動物由来成分の混入を防ぐという観点から、血清は幹細胞と同じ動物由来のものを用いることができる。無血清培地とは、未処理又は未精製の血清を含まない培地を指し、それゆえ精製された血液由来成分や動物組織由来成分（成長因子など）を含む培地を含むことができる。

【０１０１】

培地は血清の代替物を含んでも含まなくてもよい。血清の代替物としては、アルブミン（脂質リッチアルブミン、ウシアルブミン、組換えアルブミン又はヒト化アルブミンなどのアルブミン代替物、植物デンプン、デキストラン及びタンパク質加水分解物など）、トランスフェリン（又は他の鉄トランスポーター）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、２－メルカプトエタノール、３’－チオールグリセロール、又はこれらの等価物を適切に含む材料を挙げることができる。血清の代替物は、例えば国際公開第９８／３０６７９号（その全体が本明細書に組み込まれる）に開示された方法により調製することができる。あるいは、より便宜的に、任意の市販の材料を使用することができる。市販の材料としては、ノックアウト血清代替物（ＫＳＲ）、化学的に規定された脂質濃縮物（Ｇｉｂｃｏ）、グルタマックス（Ｇｉｂｃｏ）などが挙げられる。

【０１０２】

特定の実施形態において、培地は、ビオチン、酢酸ＤＬα－トコフェロール、ＤＬα－トコフェロール、ビタミンＡ（酢酸塩）などのビタミン；ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）又はヒトアルブミン、脂肪酸フリーフラクションＶなどのタンパク質；カタラーゼ；ヒト組換えインスリン；ヒトトランスフェリン；スーパーオキシドジスムターゼ；コルチコステロンなどのその他の成分；Ｄ－ガラクトース；エタノールアミンＨＣｌ；グルタチオン（還元型）；Ｌ－カルニチンＨＣｌ；リノール酸；リノレン酸；プロゲステロン；プトレシン２ＨＣｌ；亜セレン酸ナトリウム；及び／又はＴ３（トリオード－Ｉ－チロニン）の１種、２種、３種、４種、５種、６種、７種、８種、９種、１０種、１１種、１２種、１３種、１４種、１５種、１６種、１７種、１８種、１９種、２０種又はそれ以上を含み得る。特定の実施形態において、これらのうちの１つ以上が明確に除外され得る。

【０１０３】

いくつかの実施形態において、培地は、１種以上のビタミンをさらに含む。いくつかの実施形態において、培地は、ビオチン、酢酸ＤＬα－トコフェロール、ＤＬα－トコフェロール、ビタミンＡ、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸ニコチン酸アミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、ビタミンＢ１２の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、又は１３種（及びそこから誘導可能な任意の範囲）を含む、又は培地はそれらの組み合わせ又はそれらの塩を含む。いくつかの実施形態において、培地は、ビオチン、酢酸ＤＬα－トコフェロール、ＤＬα－トコフェロール、ビタミンＡ、塩化コリン、パントテン酸カルシウム、パントテン酸、葉酸ニコチンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、イノシトール、及びビタミンＢ１２を含むか、又はこれらから本質的になる。いくつかの実施形態において、ビタミンは、ビオチン、酢酸ＤＬα－トコフェロール、ＤＬα－トコフェロール、ビタミンＡ、又はそれらの組み合わせ若しくは塩を含むか、又は本質的にそれらからなる。いくつかの実施形態において、培地は、タンパク質をさらに含む。いくつかの実施形態において、タンパク質は、アルブミン若しくはウシ血清アルブミン、ＢＳＡの画分、カタラーゼ、インスリン、トランスフェリン、スーパーオキシドジスムターゼ、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、培地は、コルチコステロン、Ｄ－ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、Ｌ－カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、又はトリオード－Ｉ－チロニン、又はそれらの組み合わせから選択される１つ以上をさらに含む。いくつかの実施形態において、培地は、Ｂ－２７（登録商標）サプリメント、ゼノフリーＢ－２７（登録商標）サプリメント、ＧＳ２１ＴＭサプリメント、又はそれらの組み合わせの１つ以上を含む。いくつかの実施形態において、培地は、アミノ酸、単糖類、無機イオンを含むか、又は更に含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸は、アルギニン、シスチン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、若しくはバリン、又はそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、無機イオンは、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、若しくはリン、又はそれらの組み合わせ若しくは塩を含む。いくつかの実施形態において、培地は、モリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅、若しくはマンガン、又

はそれらの組み合わせのうちの１つ以上をさらに含む。特定の実施形態において、培地は、本明細書において議論される１つ以上のビタミン、及び／又は本明細書において議論される１つ以上のタンパク質、及び／又はコルチコステロン、Ｄ－ガラクトース、エタノールアミン、グルタチオン、Ｌ－カルニチン、リノール酸、リノレン酸、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸ナトリウム、又はトリオード－Ｉ－チロニン、Ｂ－２７（登録商標）サプリメント、ゼノフリーＢ－２７（登録商標）サプリメント、ＧＳ２１ＴＭサプリメント、アミノ酸（例えば、アルギニン、シスチン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、グルタミン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン、又はバリンなど）、単糖、無機イオン（ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、窒素、及び／又はリンなど）又はそれらの塩、及び／又はモリブデン、バナジウム、鉄、亜鉛、セレン、銅、又はマンガンの１つ以上を含むか、又はこれらから本質的になる。特定の実施形態では、これらのうちの１つ以上を明確に除外することができる。

【０１０４】

培地はまた、１つ以上の外部から添加された脂肪酸又は脂質、アミノ酸（非必須アミノ酸など）、ビタミン（複数可）、成長因子、サイトカイン、抗酸化物質、２－メルカプトエタノール、ピルビン酸、緩衝剤、及び／又は無機塩を含むことができる。特定の実施形態では、これらのうちの１つ以上を明確に除外することができる。

【０１０５】

培地成分の１つ以上は、少なくとも、多くとも、又は約０．１、０．５、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１５０、１８０、２００、２５０ｎｇ／Ｌ、ｎｇ／ｍｌ、μｇ／ｍｌ、ｍｇ／ｍｌ、又はそこから派生する任意の範囲の濃度で添加することができる。

【０１０６】

特定の実施形態では、本開示の細胞は特に製剤化される。それらは細胞懸濁液として製剤化されてもされなくてもよい。特定の場合には、それらは単回投与形態で製剤化される。それらは全身投与用又は局所投与用に製剤化されてもよい。場合によっては、細胞は使用前の保存のために製剤化され、細胞製剤はＤＭＳＯ（例えば、５％ＤＭＳＯ中）などの１つ以上の凍結保存剤を含んでもよい。細胞製剤は、ヒトアルブミンを含むアルブミンを含んでもよく、具体的な製剤は２．５％のヒトアルブミンを含む。細胞は、静脈内投与用に特別に製剤化されてもよく、例えば、１時間未満の静脈内投与用に製剤化される。特定の実施形態では、細胞は室温で解凍時から１、２、３、４時間以上安定な製剤化された細胞懸濁液にある。

【０１０７】

Ｖ．組成物の投与

本開示の一実施形態では、本開示に包含される方法で調製されるような有効量の線維芽細胞が、１つ以上の病状の治療または予防のために個体に投与される。具体的な実施形態において、線維芽細胞は、内皮応答性の改善、免疫細胞活性の増加、細胞分化、および脾臓萎縮の逆転のために投与される。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、カプセル化されたＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、又は他のＲＮＡｉ組成物が細胞集団とともに投与される。この投与により、組織再生が局所的に活性化されたり、組織の退縮が逆転したりする可能性がある。

【０１０９】

本開示の実施形態は、脾臓における免疫細胞活性を刺激する１つ以上の薬剤と万能ドナー線維芽細胞を共投与する方法を提供する［９、１０］。本開示の具体的な実施形態では、万能ドナー線維芽細胞と、成長因子、ケモカイン、および／またはサイトカインの１つまたは組み合わせとの共投与のための方法が提供される。本開示の一実施形態では、免疫原性を低下させる条件下で処理された線維芽細胞由来の万能ドナー線維芽細胞を利用して

、導入された修飾／非修飾線維芽細胞による、または個体の神経成長因子（ＮＧＦ）の調節制御下にある内因性細胞からの、血管内皮成長因子（ＶＥＧＦ）産生を刺激し、それにより、胸腺などの他の臓器で実証されているように、脾臓の組織再生および血行再建を導く［１１－１３］。

【０１１０】

本明細書で提供される療法は、治療用組成物（例えば、線維芽細胞、免疫細胞、細胞の誘導体、線維芽細胞からのエクソソーム、薬剤など）を単独で又は組み合わせて投与することを含み得る。治療薬は、当技術分野で知られている任意の適切な方法で投与することができる。例えば、第１及び第２の治療法は、順次（異なる時間）又は同時（同じ時間）に投与することができる。いくつかの実施形態において、第１及び第２の治療は、別々の組成物で投与される。いくつかの実施形態において、第１及び第２の処置は、同じ組成物中にある。

【０１１１】

本開示の実施形態は、治療用組成物を含む組成物及び方法に関する。異なる治療法は、１つの組成物で投与してもよいし、２つの組成物、３つの組成物、又は４つの組成物のような２つ以上の組成物で投与してもよい。組成物の様々な組み合わせが採用されてもよい。

【０１１２】

本開示の治療用組成物（例えば、線維芽細胞を含むか又は線維芽細胞からの細胞、細胞産物）は、同じ投与経路によって投与されてもよいし、異なる投与経路によって投与されてもよい。いくつかの実施形態において、療法は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、髄腔内、脳室内、又は経鼻により投与される。いくつかの実施形態において、組成物は脾臓に直接投与される。いくつかの実施形態において、抗生物質は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、髄腔内、脳室内、又は経鼻により投与される。適切な投与量は、治療される疾患の種類、疾患の重症度及び経過、個体の臨床状態、個体の臨床歴及び治療に対する反応、並びに主治医の裁量に基づいて決定され得る。

【０１１３】

治療薬には様々な「単位用量」が含まれる。単位用量は、治療組成物を所定量含むものとして定義される。投与される量、並びに特定の経路及び製剤は、臨床技術に携わる者の判断能力の範囲内である。単位用量は、1回の注射として投与される必要はないが、一定期間にわたる連続注入を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、単位用量は、単回投与可能な用量を含む。

【０１１４】

投与量は、治療回数と単位投与量の両方において、望まれる治療効果に依存する。有効量は、特定の効果を達成するのに必要な量を指すと理解される。特定の実施形態における実施において、１０ｍｇ／ｋｇ～２００ｍｇ／ｋｇの範囲の用量が、これらの薬剤の保護能力に影響を及ぼすことができることが企図される。従って、用量としては、約０．１、０．５、１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１５５、１６０、１６５、１７０、１７５、１８０、１８５、１９０、１９５、及び２００、３００、４００、５００、１０００μｇ／ｋｇ、ｍｇ／ｋｇ、μｇ／日、又はｍｇ／日、又はそこから誘導可能な任意の範囲が挙げられる。さらに、このような用量は、１日、及び／又は複数日、週、又は月の間に複数回で投与することができる。

【０１１５】

特定の実施形態において、医薬組成物の有効量は、約１μＭ～１５０μＭの血中レベルを提供し得るものである。別の実施形態において、有効量は、約４μＭ～１００μＭ；又は約１μＭ～１００μＭ；又は約１μＭ～５０μＭ；又は約１μＭ～４０μＭ；又は約１μＭ～３０μＭ；又は約１μＭ～２０μＭ；又は約１μＭ～１０μＭ；又は約１０μＭ～

１５０μＭ；又は約１０μＭ～１００μＭ；又は約１０μＭ～約５０μＭ；又は約２５μＭ～約１５０μＭ；又は約２５μＭ～約１００μＭ；又は約２５μＭ～約５０μＭ；又は約５０μＭ～約１５０μＭ；又は約５０μＭ～約１００μＭ（又はそこから誘導可能な任意の範囲）の血中レベルを提供する。他の実施形態において、用量は、対象に投与される治療薬から生じる薬剤の以下の血中レベルを提供し得る：約、少なくとも約、又は多くとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、若しくは１００μＭ、又はそこから誘導可能な任意の範囲である。特定の実施形態において、対象に投与される治療薬は、体内で代謝されて代謝治療薬となり、この場合、血中濃度はその治療薬の量を指すことがある。あるいは、治療剤が対象によって代謝されない範囲において、本明細書で議論される血中濃度は、代謝されない治療剤を指す場合がある。

【０１１６】

治療用組成物の正確な量もまた、実施者の判断に依存し、各個人に特有である。投与量に影響する因子には、患者の身体的及び臨床的状態、投与経路、意図する治療目標（症状の緩和対治癒）、特定の治療物質又は被験者が受けている可能性のある他の療法の効力、安定性及び毒性が含まれる。

【０１１７】

体重のμｇ／ｋｇ又はｍｇ／ｋｇという投与量単位は、μｇ／ｍｌ又はｍＭ（血中濃度）という同等の濃度単位に換算して表すことができることは、当業者には理解され、認識されるであろう。また、取り込みは種及び臓器／組織に依存することが理解される。取り込み及び濃度測定に関して適用可能な換算係数及び生理学的仮定は周知であり、当業者であれば、１つの濃度測定値を別の濃度測定値に換算し、本明細書に記載の用量、効能及び結果に関して合理的な比較及び結論付けを行うことができるであろう。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$10^5$～約$10^{13}$の細胞が、１回の点滴につきヒトに投与される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$1.5\times10^6$～約$1.5\times10^{12}$の細胞が注入される。一部の実施形態では、１００ｋｇあたり約$1\times10^9$～約$5\times10^{11}$の細胞が注入される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$4\times10^9$～約$2\times10^{11}$の細胞が注入される。一部の実施形態では、１００ｋｇあたり約$5\times10^8$細胞～約$1\times10^{11}$細胞が注入される。いくつかの実施形態では、細胞の単回投与が提供される。いくつかの実施形態では、複数回の投与が提供される。いくつかの実施形態では、複数回の投与が３～７日間連続して行われる。いくつかの実施形態では、３～７回の投与が、３～７日間連続して提供される。いくつかの実施形態では、５回の投与が、５日間連続して提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$10^5$～約$10^{13}$の細胞の単回投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$1.5\times10^8$～約$1.5\times10^{12}$の細胞の単回投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$1\times10^9$～約$5\times10^{11}$の細胞の単回投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$5\times10^{10}$細胞の単回投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり$1\times10^{10}$細胞の単回投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$10^5$～から約$10^{13}$の細胞の複数回の投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$1.5\times10^8$～約$1.5\times10^{12}$の細胞の複数回の投与が提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約$1\times10^9$～約$5\times10^{11}$の細胞の複数回の投与が、３～７日間連続して提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約４×１０

$^{9}$の細胞の複数回の投与が、３～７日間連続して提供される。いくつかの実施形態では、１００ｋｇあたり約２×１０$^{11}$の細胞の複数回の投与が、３～７日間連続して提供される。いくつかの実施形態では、約３．５×１０$^{9}$の細胞の５回の投与が、連続する５日間にわたって提供される。いくつかの実施形態では、約４×１０$^{9}$の細胞の５回の投与が、連続する５日間にわたって提供される。いくつかの実施形態では、約１．３×１０$^{11}$細胞の５回の投与が、連続する５日間にわたって提供される。いくつかの実施形態では、約２×１０$^{11}$の細胞の５回の投与が、連続する５日間にわたって提供される。

【０１１９】

ＶＩ．本開示のキット

本明細書に記載される細胞性組成物及び／又は非細胞性組成物のいずれか、又はそれらに類似するものが、キットに含まれ得る。非限定的な例では、線維芽細胞、線維芽細胞由来産物、又はそれらの誘導体（例えば、線維芽細胞由来のエクソソーム）を調製するための方法において使用するための１つ以上の試薬が、キットに含まれ得る。このような試薬としては、細胞、ベクター、１つ以上の成長因子、ベクター、１つ以上の共刺激因子、培地、酵素、緩衝液、ヌクレオチド、塩、プライマー、化合物などが挙げられる。キットの構成要素は適切な容器で提供される。

【０１２０】

キットの一部の成分は、水性媒体中又は凍結乾燥形態で包装され得る。キットの容器手段には、一般に、少なくとも１つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、注射器又は他の容器手段が含まれ、その中に成分を入れることができ、好ましくは、好適に分注することができる。キット中に２つ以上の成分が含まれる場合、キットは一般的に第２、第３又は他の追加の容器を含み、そこに追加の成分を別々に入れることができる。しかしながら、成分の様々な組み合わせがバイアルに含まれ得る。本開示のキットはまた、一般に、商業的販売のために成分を密閉して収容するための手段を含む。このような容器には、所望のバイアルが保持される射出成形又はブロー成形プラスチック容器が含まれ得る。

【０１２１】

キットの成分が１つ及び／又は複数の液体溶液で提供される場合、液体溶液は水溶液であり、無菌水溶液が特に有用である。場合によっては、容器手段はそれ自体が注射器、ピペット、及び／又は他のそのような器具であってもよく、あるいは所望の反応のための複数の区画を有する基板であってもよい。

【０１２２】

キットの一部の成分は乾燥粉末として提供され得る。試薬及び／又は成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は適切な溶媒の添加により再構成することができる。溶媒は、別の容器手段で提供されることも想定される。キットはまた、滅菌された許容可能な緩衝液及び／又は他の希釈剤を含むための第二の容器手段を含んでいてもよい。

【０１２３】

具体的な実施形態では、試薬及び材料には、所望の配列を増幅するためのプライマー、ヌクレオチド、適切な緩衝液又は緩衝試薬、塩などが含まれ、場合によっては、試薬には、特定の所望の細胞を単離するための装置又は試薬が含まれる。

【０１２４】

特定の実施形態では、個体から１つ以上のサンプルを抽出するのに適した１つ以上の器具がキット内に存在する。器具は、注射器、細い針、メスなどであってもよい。

【０１２５】

本開示及びその利点について詳細に説明したが、添付の特許請求の範囲によって定義される設計の精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書において様々な変更、置換及び改変を行うことができることを理解されたい。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載されたプロセス、機械、製造、物質組成、手段、方法及びステップの特定の実施形態に限定されることを意図するものではない。当業者であれば、本開示から容易に理解されるように、本明細書に記載される対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすか、又は実質的に同じ結果を達成する、現在存在するか、又は後に開発されるプロセス、機械、製造、

物質組成物、手段、方法、又はステップが、本開示に従って利用され得る。従って、添付の特許請求の範囲は、そのようなプロセス、機械、製造、物質組成物、手段、方法、又はステップをその範囲内に含むことを意図している。

【０１２６】

本明細書において開示され、特許請求される全ての方法は、本開示に照らして過度の実験を行うことなく製造及び実行することができる。本開示の組成物及び方法は、好ましい実施形態の観点から記載されているが、本開示の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される方法のステップ又はステップの順序において、方法に変形が適用され得ることは、当業者には明らかであろう。より具体的には、化学的及び生理学的に関連する特定の薬剤を、本明細書に記載される薬剤の代わりに用いても、同じ又は類似の結果が得られることは明らかであろう。当業者に明らかなそのような類似の代替物及び改変はすべて、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の精神、範囲及び概念の範囲内であるとみなされる。

【０１２７】

本開示およびその利点について詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、本明細書において様々な変更、置換および改変を行うことができることを理解されたい。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載されたプロセス、機械、製造、物質組成、手段、方法およびステップの特定の実施形態に限定されることを意図するものではない。当業者であれば、本開示の開示から容易に理解されるように、本明細書に記載される対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすか、または実質的に同じ結果を達成する、現在存在するか、または後に開発されるプロセス、機械、製造、物質組成物、手段、方法、またはステップが、本開示に従って利用され得る。従って、添付の特許請求の範囲は、そのようなプロセス、機械、製造、物質組成物、手段、方法、またはステップをその範囲内に含むことを意図している。

【０１２８】

参考文献

以下の参考文献は、それらが本明細書に記載されたものを補足する例示的な手順又は他の詳細を提供する限りにおいて、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

1. Clark, R.A. and T.S. Kupper, IL-15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. Blood, 2007. 109(1): p. 194-202.

2. Quandelacy, T.M., et al., Age- and sex-related risk factors for influenza-associated mortality in the United States between 1997-2007. Am J Epidemiol, 2014. 179(2): p. 156-67.

3. Tan, J.K. and T. Watanabe, Murine spleen tissue regeneration from neonatal spleen capsule requires lymphotoxin priming of stromal cells. J Immunol, 2014. 193(3): p. 1194-203.

4. Tan, J.K.H. and T. Watanabe, Determinants of postnatal spleen tissue regeneration and organogenesis. NPJ Regen Med, 2018. 3: p. 1.

5. Turner, V.M. and N.A. Mabbott, Influence of ageing on the microarchitecture of the spleen and lymph nodes. Biogerontology, 2017. 18(5): p. 723-738.

6. Sun, L., et al., FSP1(+) fibroblast subpopulation is essential for the maintenance and regeneration of medullary thymic epithelial cells. Sci Rep, 2015. 5: p. 14871.

7. Riera, M., S. Buczacki, and Z.A. Khan, Splenic regeneration following splenectomy and impact on sepsis: a clinical review. J R Soc Med, 2009. 102(4): p. 139-42.

8. Han, D., et al., Targeting Brain-spleen Crosstalk After Stroke: New Insights Into Stroke Pathology and Treatment. Curr Neuropharmacol, 20

21. 19(9): p. 1590-1605.
9. Bronte, V. and M.J. Pittet, The spleen in local and systemic regulation of immunity. Immunity, 2013. 39(5): p. 806-18.
10. Lewis, S.M., A. Williams, and S.C. Eisenbarth, Structure and function of the immune system in the spleen. Sci Immunol, 2019. 4(33).
11. Park, H.J., et al., Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. Biochim Biophys Acta, 2007. 1773(9): p. 1462-72.
12. Zanardo TE, C., et al., Decellularized Splenic Matrix as a Scaffold for Spleen Bioengineering. Front Bioeng Biotechnol, 2020. 8: p. 573461.
13. Smith, J.N., et al., 15-PGDH inhibition activates the splenic niche to promote hematopoietic regeneration. JCI Insight, 2021. 6(6).
14. Lim, H.K. and H.C. O'Neill, Identification of Stromal Cells in Spleen Which Support Myelopoiesis. Front Cell Dev Biol, 2019. 7: p. 1.
15. Wang, Z., et al., The spleen may be an important target of stem cell therapy for stroke. J Neuroinflammation, 2019. 16(1): p. 20.
16. Faustman, D.L., Regenerative medicine: Stem cell research turns to the spleen. Discov Med, 2005. 5(29): p. 447-9.
17. Faustman, D.L. and M. Davis, Stem cells in the spleen: therapeutic potential for Sjogren's syndrome, type I diabetes, and other disorders. Int J Biochem Cell Biol, 2010. 42(10): p. 1576-9.

【国際調査報告】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 23/61622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. A61L 27/36 (2023.01)
ADD.

CPC - INV. A61L 27/3633, A61L 27/3637, A61L 27/36

ADD. A61L 27/3604
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)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>—<br>Y | US 8,039,258 B2 (Harris et al.) 18 October 2011 (18.10.2011) Entire document, especially Abstract, col 2 ln 40-47; col 4 ln 61-63, col 8 ln 3-34 | 1, (3-4)/1, 25<br>---<br>2, (3-4)/2 |
| Y | US 2017/0209365 A1 (Exostemtech Co., Ltd.) 27 July 2017 (27.07.2017) Entire document, especially Abstract, para [0011]; [0027]; [0051]; [0058]; [0060] | 2, (3-4)/2 |
| A | US 4,963,489 A (Naughton et al.) 16 October 1990 (16.10.1990) Entire document | 1-4, 25 |
| A | US 2011/0172150 A1 (Bader) 14 July 2011 (24.07.2011) Entire document | 1-4, 25 |
| A | US 6,696,575 B2 (Schmidt et al.) 24 February 2004 (24.02.2004) Entire document | 1-4, 25 |
| A | US 9,828,603 B2 (Cedars-Sinai Medical Center) 28 November 2017 (28.11.2017) Entire document | 1-4, 25 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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 | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 12 April 2023 | JUL 03 2023 |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer<br>Kari Rodriquez<br>Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300 |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/US 23/61822

**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.: 5-17
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:
-- See Extra Sheet --

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, 25

**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 23/61822

Continuation of:
Box III Observations where unity of invention is lacking

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 searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I: Claims 1-4 and 25 directed to a method of regenerating a spleen or tissue of a spleen in an individual, comprising the step of administering an effective amount of a population of cells to the individual, wherein the population of cells comprises unmodified or modified fibroblasts, unmodified or modified immune cells, activated or non-activated fibroblasts, activated or non-activated immune cells, fibroblast derivatives, immune cell derivatives, or a combination thereof, thereby resulting in regeneration of spleen tissue in the individual; and a method of stimulating, improving, or increasing production and/or activity of cells in a spleen in an individual, comprising the step of providing to the individual an effective amount of activated fibroblasts, derivatives of activated fibroblasts, activated immune cells, derivatives of activated immune cells, or a combination thereof.

Group II: Claims 18-24 directed to an in vitro method of producing activated or non-activated fibroblasts, derivatives of activated fibroblasts, activated or non-activated immune cells, derivatives of activated or nonactivated immune cells, or a combination thereof, comprising the step of exposing fibroblasts and/or immune cells to one or more conditions that induce activation, wherein the activated fibroblasts, derivatives of activated fibroblasts, activated immune cells, and/or derivatives of activated immune cells comprise activity for regenerating spleen tissue.

The inventions listed as Groups I-II 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 requires a method of regenerating a spleen or tissue of a spleen in an individual, comprising the step of administering an effective amount of a population of cells to the individual, not specifically required by Group II.

Group II requires an in vitro method of producing activated or non-activated fibroblasts, derivatives of activated fibroblasts, activated or non-activated immune cells, derivatives of activated or nonactivated immune cells, or a combination thereof, comprising the step of exposing fibroblasts and/or immune cells to one or more conditions that induce activation, not specifically required by Group I.

Common Technical Features:

Groups I and II share the technical feature of a cell population comprising activated or non-activated fibroblasts, derivatives of activated fibroblasts, activated or non-activated immune cells, derivatives of activated or nonactivated immune cells, wherein the cells comprise activity for regenerating spleen tissue.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is being anticipated by US 8,039,258 B2 to Harris et al. (hereinafter 'Harris'). Harris discloses a cell population (col 2 ln 40-47 - '...Tissue engineering often uses porous scaffolds to act as a template for cells to grow and produce new tissue. The present invention provides a novel scaffold that can be provided in a desired size and shape dependant on the contemplated use, has structural integrity Such that it can be implanted and secured in the body of a mammal, and possesses excellent tissue ingrowth and vascularization properties...') comprising activated or non-activated fibroblasts (col 8 ln 3-14 - '...The tissue-engineering scaffolds of the present invention can be used in combination with cells, and/or biological factors and/or bioactives for many tissue engineering applications, such as creation of artificial organs, tissue repair and tissue regeneration... Other cells that may be incorporated include... fibroblasts...'), derivatives of activated fibroblasts, activated or non-activated immune cells, derivatives of activated or nonactivated immune cells, wherein the cells comprise activity for regenerating spleen tissue (col 4 ln 61-63 - '...Accordingly, the composition and microstructure of these scaffolds can be optimized to regenerate or repair the desired anatomical features of the tissue that is being engineered...'; col 8 ln 27-34 - '...The tissue-engineering scaffold of the present invention can be used to treat a variety of tissue, including, but not limited to... spleen... The scaffolds can be used to form tissue-engineered organs and portions or specific sections thereof, such as spleen...').

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Groups I-II lack unity under PCT Rule 13.

Item 4 continued: Claims 5-17 are unsearchable claims 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

(32)優先日 令和4年11月13日(2022.11.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
アメリカ合衆国 テキサス州 ７７２８９、ヒューストン、ピーオー ボックス ８９１１４６ フィブロバイオロジクス インコーポレイテッド内
Ｆターム（参考） 4C087 AA01 AA02 BB63 CA04 NA14 ZB02 ZB09 ZB22