

(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2010-508854

(P2010-508854A)

(43) 公表日 平成22年3月25日(2010.3.25)

| (51) Int.Cl.                   | F I                 | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 5/07 (2010.01)</b>  | C 1 2 N 5/00 E      | 4 B 0 6 5   |
| <b>A 6 1 K 35/44 (2006.01)</b> | A 6 1 K 35/44       | 4 C 0 8 7   |
| <b>A 6 1 K 35/28 (2006.01)</b> | A 6 1 K 35/28       |             |
| <b>A 6 1 K 35/14 (2006.01)</b> | A 6 1 K 35/14       |             |
| <b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b> | A 6 1 P 43/00 1 0 5 |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)   |                     |             |

(21) 出願番号 特願2009-536475 (P2009-536475)  
 (86) (22) 出願日 平成19年11月8日 (2007.11.8)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年6月17日 (2009.6.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/084037  
 (87) 国際公開番号 W02008/060932  
 (87) 国際公開日 平成20年5月22日 (2008.5.22)  
 (31) 優先権主張番号 60/857,547  
 (32) 優先日 平成18年11月8日 (2006.11.8)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506274442  
 アルダジェン, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27  
 713, ダラム, メリディアン パー  
 クウェイ 2810, スイート 148  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (72) 発明者 バルバー, アンドリュウ イー.  
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27  
 707, ダラム, ネーション アベニ  
 ュー 2608

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞移植の後の生着を改善するための方法

(57) 【要約】

本発明は、少なくとも2つの幹細胞集団を移植することによって、組織を修復、再生および再構築する方法に関し、個々で上記第1の幹細胞集団および上記第2の幹細胞集団は、約2～約24時間の時間間隔を隔てて、被験体に導入される。上記幹細胞は、臍帯、動員末梢血、または骨髄に由来する。少なくとも上記第2の集団の細胞は、成人幹細胞および前駆細胞について富化されている。本発明の方法は、骨髄破壊または化学療法後の被験体における造血回復を促進することにおいて有用である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験体における血液組織を再構築するための方法であって、該方法は、該被験体に、第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を導入する工程を包含し、ここで該第 2 の細胞集団は、該第 1 の細胞集団の 2 時間後から 2 4 時間後に導入され、そして少なくとも該第 2 の細胞集団は生着する能力がある、方法。

**【請求項 2】**

前記第 2 の細胞集団は、前記第 1 の細胞集団の約 4 時間後に導入される、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記第 1 の細胞集団および前記第 2 の細胞集団の両方が生着する能力がある、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記第 1 の細胞集団および前記第 2 の細胞集団は、臍帯血、骨髓、および動員末梢血 (mobilized peripheral blood) からなる群より選択される供給源から由来する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記第 1 の細胞集団および前記第 2 の細胞集団は、同じ供給源に由来する、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記第 1 の細胞集団および前記第 2 の細胞集団は、異なる供給源に由来する、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記被験体は、骨髓破壊 (bone marrow ablation) 後に造血再構築 (hematopoietic reconstitution) の必要がある、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 8】**

少なくとも前記第 2 の細胞集団は、成人幹細胞および前駆細胞が豊富である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記第 2 の細胞集団は、前記第 1 の集団の約 4 時間後に導入される、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

癌を有する被験体における骨髓破壊性処置後の血液機能を回復させるための方法であって、該方法は、第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を該被験体に導入する工程を包含し、ここで該第 2 の細胞集団は、該第 1 の細胞集団の 2 時間後から 2 4 時間後に導入され、少なくとも該第 2 の集団は生着する能力がある、方法。

**【請求項 11】**

少なくとも前記第 2 の細胞集団は、成人幹細胞および前駆細胞が豊富である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記被験体は、癌治療に関連した後遺症のための処置が必要である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

被験体における幹細胞集団の生着を強化するための方法であって、該方法は、第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を該被験体に導入する工程を包含し、ここで該第 2 の細胞集団は、該第 1 の細胞集団の 2 時間後から 2 4 時間後に導入され、少なくとも該第 2 の集団は生着する能力がある、方法。

**【請求項 14】**

少なくとも前記第 2 の細胞集団は、成人幹細胞および前駆細胞が豊富である、請求項 13

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 15】

前記被験体における好中球生着までの時間は、コントロール被験体における好中球生着までの時間と比較して短縮される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

血小板生着までの時間は、コントロール被験体における血小板生着までの時間と比較して短縮される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 17】

遺伝性障害を有する被験体における骨髓破壊性処置後の血液機能を回復させるための方法であって、該方法は、第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を該被験体に導入する工程を包含し、ここで該第 2 の細胞集団は、該第 1 の細胞集団の 2 時間後から 24 時間後に導入され、少なくとも該第 2 の集団は生着する能力がある、方法。

10

【請求項 18】

少なくとも前記第 2 の細胞集団は、成人幹細胞および前駆細胞が豊富である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

癌を有する被験体における骨髓破壊性処置後の骨髓の幹細胞もしくは前駆細胞の活性を回復させるための方法であって、該方法は、第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を該被験体に導入する工程を包含し、ここで該第 2 の細胞集団は、該第 1 の細胞集団の 2 時間後から 24 時間後に導入され、少なくとも該第 2 の集団は富化された ALDH<sup>b</sup> 幹細胞集団である、方法。

20

【請求項 20】

遺伝性障害を有する被験体における骨髓破壊性処置後の骨髓の幹細胞もしくは前駆細胞の活性を回復させるための方法であって、該方法は、第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を該被験体に導入する工程を包含し、ここで該第 2 の細胞集団は、該第 1 の細胞集団の 2 時間後から 24 時間後に導入され、少なくとも該第 2 の集団は富化された ALDH<sup>b</sup> 幹細胞集団である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、早期の前駆体細胞が豊富な幹細胞集団を使用して、組織を再構築、修復および再生するための改善された方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

過去 10 年間にわたって、臍帯血 (UCB) 移植は、移植治療で処置可能な難病 (catastrophic disease) を有する被験体において造血細胞移植のため代替生存ドナー幹細胞供給源であることが示された。UCB 細胞は、耐え難い急性または慢性の移植片対宿主病 (GVHD) なしに、部分的にミスマッチの HLA 障壁と交差し得る (非特許文献 1 ; 非特許文献 2 ; 非特許文献 3)。従って、十分にマッチしている、血縁関係にあるかもしくは血縁関係にない、生存している骨髓または生体幹細胞のドナーがい

多くの被験体は、骨髓破壊性の (myeloablative) 照射および / または化学療法後に幹細胞を救うために、部分的に HLA がマッチしている UCB 細胞を利用し得る。UCB 細胞用量 (レシピエントの体重 1 kg あたりで表される) は、UCB 移植後の結果の最良の予測変数である (非特許文献 4 ; 非特許文献 5)。結果と強く相関する細胞用量閾値は、同定された。低細胞用量を受容する被験体においては、恒久性の生着 (engraftment) が最終的に生じる一方で、骨髓および血小板生着における顕著な遅延が存在し (せいぜい、より長期間の入院を生じる)、そして供給源利用において顕著な増大を生じ、最悪の場合には、感染およびレジメンに関連する毒性から早期の死亡が増大する。

40

【0003】

50

体重が < 40 kg の幼児および子供では、被験体の 90% 超において妥当な時間枠内で、首尾良い生着に重要な細胞用量 (  $3 \times 10^7$  個の有核細胞 / kg として定義される ) を送達する、十分にマッチしている UCB 単位を見いだすことは可能である。体重が > 40 kg のティーンエイジャーおよび成人では、これは、その時間の中でおそらく 30 ~ 50% である。UCB 単位は、比較的固定数の総有核細胞を含むので、体重 > 70 kg の被験体についての最適細胞投与量を送達する単位は、その時間の中で < 15% で同定されるに過ぎない。UCBT に利用可能な細胞用量を増大しようとする試みは、エキソピボ増殖および組み合わせ単位移植を含んだ。エキソピボでの UCB 細胞の増殖は可能である一方で、増殖した細胞の注入の以前の第 I 相研究は、生着時間の短縮を生じなかった ( 非特許文献 6 ; 非特許文献 7 )。同様に、1 回の骨髓破壊性移植のための最大 5 UCB の組み合わせは、好中球または血小板生着までの時間を短縮しなかった。

10

## 【0004】

いくつかのストラテジーが、好中球および / 血小板生着までの時間を短縮する目的で、移植に利用可能な細胞を増大させる方法に対処してきた。成功裏であれば、これらアプローチは、レジメン関連の毒性を少なくすることによって、移植手順の安全性を高めたであろう。UCBT 後の生着は、総合的かつ事象なしの生存の主要な予測変数である。絶対好中球数 ( ANC ) 回復までの時間および / または総合的生着可能性を低下させることによって生着を促進し得る介入は、有利である。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

20

## 【0005】

【非特許文献 1】Wagner R. Blood ( 1996 ) 88 ( 3 ) : 795 - 802

【非特許文献 2】Rubinstein R. N Engl J Med ( 1998 ) 339 ( 22 ) : 1565 - 1577

【非特許文献 3】Rocha R. N Engl J Med ( 2000 ) 342 ( 25 ) : 1846 - 1854

【非特許文献 4】Kurtzberg J R. N Engl J Med ( 1996 ) 335 : 157 - 166

【非特許文献 5】Stevens R. Blood ( 2002 ) 100 ( 7 ) : 2662 - 2664

30

【非特許文献 6】Jaroscak R. Blood ( 2003 ) 101 ( 12 ) : 5061 - 5067

【非特許文献 7】McNiece R. Cytotherapy ( 2004 ) 6 ( 4 ) : 311 - 317

## 【発明の概要】

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

被験体における組織を再構築、修復および再生するにあたって使用するための方法が、本明細書に提供され、この方法は、少なくとも第 1 の細胞集団および第 2 の細胞集団を上記被験体に導入することによる。上記第 1 の細胞集団は、UCB、骨髓 ( BM )、動員末梢血 ( mobilized peripheral blood ) ( MPB )、または UCB 由来幹細胞、BM 由来幹細胞、もしくは MPB 由来幹細胞を含み得るか、非生存細胞および細胞細片 ( 例えば、代表的には、造血性移植片などとして従来から使用される融解された細胞生成物において見いだされるもの ) とともに有核細胞、幹細胞、またはこのような細胞型の混合物を含み得るか、あるいは上記被験体への導入後に、肝臓および / または肺から、上記第 2 の幹細胞の細胞集団の放出を促進するように、そしてこの幹細胞集団の生着を強化するように、特異的に動作された薬剤を含み得る。上記第 2 の細胞集団は、臍帯、動員末梢血、または骨髓から単離された幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記第 1 のおよび / または上記第 2 の幹細胞集団は、幹細胞および前駆細胞について実質的に富化されている。本発明の方法は、骨髓破壊性治療後に、好中球生着および /

40

50

または血小板生着までの時間および免疫再構築を促進することにおいて特に有用であり、ここで上記細胞集団は中心静脈内ラインを介して投与される。上記方法は、悪性障害、遺伝性障害、免疫障害を有する患者を処置するために使用され得るか、または損傷後に組織を修復するために使用され得る。

【発明を実施するための形態】

【0007】

(発明の詳細な説明)

I. 概観

幹細胞および前駆細胞 (stem and progenitor cell) (SPC) は再生されかつ特定の生物学的シグナルが特定の細胞型もしくは組織型へと上記細胞を分化するように誘導するまで、発生的潜在能力を維持する。成人幹細胞および前駆細胞 (adult stem and progenitor cell) (ASPC) は、誕生後に生物の組織において保持される小さなSPC集団であり、生涯にわたって連続的に再生される。インビトロコロニーアッセイは、骨髄 (BM)、動員末梢血 (MPB)、および臍帯血 (UCB) はすべて種々のASPCを含むことを実証した。骨髄は、多分化能 (multipotentia) ASPC が特に豊富である。

10

【0008】

本明細書において使用される場合、「幹細胞」とは、分化および自己再生の能力、ならびに組織を再生させる能力を有する細胞をいう。幹細胞は、本願において臍帯血幹細胞を使用することに関して主に記載されるが、本発明は、臍帯血幹細胞を使用することに限定されず、他の器官の成人幹細胞 (肝臓幹細胞、膵臓幹細胞、神経幹細胞、骨髄幹細胞、末梢血幹細胞、臍帯血幹細胞またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない) を含む得る。いくつかの実施形態において、本発明は、胚性幹細胞の使用を除く。さらに、本発明は、いずれの特定の供給源から得られるいずれの特定の幹細胞の移植にも限定されないが、互いに混合されている「複数の幹細胞供給源」由来の幹細胞を含む得る。従って、間葉系間質細胞 (mesenchymal stromal cell) は、生着の量を増大させるために、単一のまたは複数の幹細胞供給源から得られた幹細胞の同時移植において使用され得る。

20

【0009】

本明細書において使用される場合、「生着」および「インビボ再生」とは、移植された (implanted or transplanted) 幹細胞が宿主生物においてそれら自身を再生し、そして/または分化した細胞子孫を生成し、ならびに/あるいは上記宿主における失われたもしくは損傷した細胞を置換する生物学的プロセスをいう。

30

【0010】

同種異系細胞治療は、種々の疾患もしくは病理学的状態を処置するために使用される。同種異系細胞治療は、いくつかのタイプの悪性疾患およびウイルス性疾患のための重要な治癒力のある治療である。同種異系細胞治療は、被験体への細胞の注入もしくは移植を要し、それによって、上記注入もしくは移植された細胞は、上記被験体以外のドナーから由来する。本明細書において使用される場合、用語「由来する (derive)」もしくは「~に由来する (derived from)」とは、細胞もしくは目的の生物から物理的物質もしくは情報物質 (目的の生物からの単離形態、収集物、および推論 (inference) を含む) を得ることが意図される。

40

【0011】

同種異系細胞治療プロトコルに利用された同種異系ドナーのタイプとしては、以下が挙げられる：ヒト白血球抗原 (HLA) マッチしている同胞、マッチしている生物学的に血縁関係のないドナー、部分的にマッチしている生物学的に血縁関係にあるドナー、生物学的に血縁関係にある臍帯血ドナー、および生物学的に血縁関係のない臍帯血ドナー。上記同種異系ドナー細胞は、通常、骨髄採取、末梢血の回収物、もしくは誕生時の胎盤の臍帯血 (placental cord blood) によって得られる。

【0012】

50

本発明の方法は、2つの細胞調製物（または「集団」）の投与もしくは導入を包含し、ここで各々の投与は、造血を促進するようにタイミングを合わせて隔てられる。「投与」もしくは「導入」とは、本明細書に記載される細胞集団を被験体に静脈内導入することをいう。いくつかの実施形態において、上記2つの細胞調製物の投与は、骨髄破壊性治療の後に続く。上記細胞集団の各々についての投与方法は、同じである必要はない。例えば、上記第1の細胞集団は、注入によって投与され、上記第2の細胞集団は、注射によって投与され得る。

#### 【0013】

本発明の目的のために、一方の細胞調製物は、「第1の細胞集団」といわれ、他方の細胞調製物は、「第2の細胞集団」または「追加細胞集団（*supplement cell population*）」といわれる。上記第2の細胞集団は、第1の細胞集団のわずか約1時間後、わずか約1.5時間後、約2時間後、約2.5時間後、約3時間後、約3.5時間後、約4時間後、約4.5時間後、約5時間後、約5.5時間後、約6時間後、約6.5時間後、約7時間後、約7.5時間後、約8時間後、約8.5時間後、約9時間後、約9.5時間後、約10時間後、約11時間後、約12時間後、約13時間後、約14時間後、約15時間後、約16時間後、約17時間後、約18時間後、約19時間後、約20時間後、約21時間後、約22時間後、約23時間後、またはわずか約24時間後に被験体に投与される。

#### 【0014】

上記第1の細胞集団は、UCB、BM、MPB、またはUCB由来幹細胞、BM由来幹細胞もしくはMPB由来幹細胞を含み得、有核細胞、幹細胞、もしくはこのような細胞タイプの混合物を、非生細胞および細胞細片（代表的には、造血移植片などとして従来から使用される融解した細胞生成物において見いだされるようなもの）とともに含み得る。さらに、上記第1の集団は、被験体への導入後に、肝臓および/または肺からの上記第2の幹細胞の細胞集団の放出を促進するように特異的に操作される薬剤を含み得る。このような薬剤としては、幹細胞の管外遊出に関与する内皮細胞レセプターに特異的にもしくは非特異的に結合し得る任意の分子、または以下で議論されるように、細網内皮マクロファージによるファゴサイトーシスをブロックすることができる任意の分子（例えば、コロイド鉄、抗セレクチン抗体など）が挙げられ得る。上記第2の細胞集団は、生着できる任意の細胞集団を含み得る。「生着可能」な細胞集団は、レシピエント被験体におけるドナー細胞の増殖および機能を生じるものである。一実施形態において、上記細胞集団は、胚性幹細胞を含まない。別の実施形態において、上記第2の細胞集団は、始原幹細胞集団について精製されているおよび/または富化されている、UCB由来細胞、BM由来細胞、MPB由来細胞を含む。上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団は、異なる細胞供給源から得られてもよいし、異なる細胞供給源に由来していてもよい。例えば、上記第1の細胞集団は、臍帯に由来し得るのに対して、上記第2の細胞集団は、骨髄またはMPBに由来し得る。あるいは、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団は、同じドナーからの同じ供給源（例えば、UCB、MPB、もしくはBM）に由来し得る。別の実施形態において、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団は、異なる供給源から由来し得るが、ただし、ドナー細胞は、移植片対宿主病（GVHD）および/または移植片拒絶（例えば、部分的もしくは完全HLAマッチングによる）の発生に関する可能性を最小限にするために、従来の方法によって選択または操作される。上記第1の細胞集団および第2の細胞集団が同じドナーに由来する場合、上記ドナーから回収したUCB、BM、またはMPBは、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団について、それぞれ、約80%/20%、約75%/25%、約60%/40%、約65%/35%、約60%/40%、約55%/45%、または約50%/50%の比率（*split*）に配分され得る。この比率は、特定の時間で回収された1つの細胞バッチの配分（例えば、上記ドナーから回収された血液もしくは血液製剤の単一のバッグ、上記パラメーターに従う比率）であり得るか、あるいはこの比率は、ある期間にわたって上記ドナーから回収された血液もしくは血液製剤の総量（例えば、上記ドナーからプールされたバッチ）の配分であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0015】

各注入に必要とされる有核細胞数は、上記第1の細胞集団の組成物に依存する。例えば、上記第1の細胞集団が、上記被験体への導入後に、肝臓および/または肺からの上記第2の幹細胞の細胞集団の放出を促進するに十分な細胞数を含む場合、上記第2の細胞集団は、いくつかの幹細胞を含み得る。あるいは、またはさらに、上記第2の細胞集団が生着に十分な幹細胞数を含む場合、上記第1の細胞集団は、豊富なASPCも、さらにいかなるASPCも必要としない可能性がある。第1の細胞集団および第2の細胞集団の両方の最適な用量は、本明細書の他の場所で議論される。

## 【0016】

いかなる特定の理論にも作用機構にも拘束されないが、初期の細胞調製物の注入が肝臓および肺（注入された細胞を隔離する傾向がある）におけるレセプターなどを結合し得、生着のために骨髄へ戻る生存性幹細胞の数を制限し得ると考えられる。移植における移植片材料の注入のための現在の方法はすべて、中心線（central line）を介した静脈内注入を伴う。この経路は、肺循環へすぐに、注入される物質を導く。上記注入される物質の大部分は、肺における微小血管（ここで肺静脈性毛細血管が、肺胞の周りの領域における肺動脈に連絡している）によって妨害される。この領域は、粒状物質および死につつある細胞を除去し得る肺マクロファージで覆われている。上記粒状物質および死につつある細胞はともに、融解されたUCB、BM、およびMPBに由来する未精製移植片調製物中によく見られる。この微小血管系を介する物質の流れは、上記移植片における細片および死細胞の蓄積によって示され、このことは、続いて、おそらく、細網内皮系におけるファゴサイトーシスによって、幹細胞/前駆細胞が循環に向かって肺を出る能力を遅らせるかまたは阻害する（Hall (1985) Immunol Today 6(5) : 149 - 152 において概説され、これはその全体が本明細書に参考として援用される）。

## 【0017】

上記細網内皮系（RES）は、肝臓、脾臓、肺、および骨髄の固定マクロファージからなり、上記宿主に種々の免疫学的防御（感染からの防御、新生物形成サーベイランス、および外来抗原の認識を含む）を提供する（Gilbreathら (1985) J Immunol 134 : 6420 ; Saba (1981) Arch Int Med 126 : 1031）。抗原をプロセッシングする後者の機能は、上記宿主が同種異系の組織および器官の移植物を拒絶する能力を増強し、そして移植された組織の拒絶を調節するために、上記RESの抑制に關与するものを刺激した。デキストラン硫酸および炭素での動物の前処置は、どうやら上記RESの細胞の取り込み能力の飽和の結果として、上記RESの貪食細胞によるリポソームの取り込みの減少を生じた（Souhamiら (1981) Biochim Biophys Acta 674 : 354）。

## 【0018】

RES活性に影響を及ぼすことに加えて、いかなる特定の理論によっても機構によっても拘束されないが、上記第1の集団における細胞および細胞細片は、上記第2の集団における治療的に活性な細胞上に発現されるリガンドの内皮レセプターを占有し続けることによって、肺内皮細胞への上記第2の集団における細胞の接着を制限し得る。本質において、上記第1の集団は、類似のリガンドを発現する上記第2の集団における細胞から、上記内皮を隠すかまたは「マスク」する。上記第2の集団における細胞は、従って、より自由に肺を離れ、血液から骨髄へと移動し、そして成功裏の生着のために重要な骨髄微小環境ニッチについて競合する。

## 【0019】

他者は、初期および追加の細胞調製物注入の使用を記載したが、第1の細胞集団のみを受容している被験体と比較したとき、治療的応答は改善されなかった（Fernandezら (2003) Exp Hematol 31(6) : 535 - 44 ; Shpallら (2002) Biol Blood Marrow Transplant 8(7) : 368 - 376）。これら研究者らは、上記第2の細胞集団が、上記第1の細胞集団の投

10

20

30

40

50

与後数日または数週間で投与されることによるプロトコルを記載している。対照的に、本発明の方法は、上記第1の集団の24時間以内に上記第2の細胞集団を投与することを企図する。いかなる特定の理論によっても機構によっても拘束されないが、上記最初の細胞集団と上記第2の細胞集団との間の時間の遅延が長すぎると、RES活性および上記内皮への接着をブロックすることによって媒介されるいかなる有益な効果も認められないことがあり得る。

#### 【0020】

従って、第1の細胞集団および第2の細胞集団を含む本発明の組成物は、血液組織または他の幹細胞機能および前駆細胞機能を再構築するための方法において有用であり、ここで上記方法は、上記第2の細胞集団を、上記第1の細胞集団の2時間から24時間後に被験体に導入する工程を包含する。これらおよび他の実施形態において、少なくとも上記第2の集団は、生着可能である。特定の実施形態において、少なくとも上記第2の集団は、ASPCについて富化されている。

10

#### 【0021】

##### II. 適応症

本明細書に記載される細胞集団は、広く種々の処置プロトコルのために使用され得る。このプロトコルにおいて、身体組織または器官は、これら細胞集団の生着、移植もしくは注入によって、増大させられるか、修復されるかまたは置換される。本明細書において使用される場合、「処置」とは、有益なもしくは望ましい臨床結果（すなわち、「治療的応答」）を得るためのアプローチである。本発明の目的に関して、有益なもしくは望ましい臨床結果としては、検出可能であろうと、検出不能であろうと、症状の緩和、疾患の事象の減少、疾患の安定化（すなわち、悪化していない）、疾患進行の遅延もしくは鈍化、上記疾患状態の改善もしくは軽減、および寛解（部分的であろうと完全であろうと）が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」とはまた、処置を受けていないかまたは異なる処置（すなわち、単一の細胞用量のみ、または24時間より長く間隔を空けて複数の細胞用量、または本明細書に包含されないいくつかの他の処置）を受けている場合に予期される生存と比較して、長期の生存を意味し得る。「処置」とは、治療的処置および予防的（*prophylactic or preventive*）手段の両方に言及する。処置を必要とするものは、障害を既に有するもの、および上記障害が予防されるべきものを包含する。疾患を「緩和」とは、処置も異なる処置もない状況と比較して、疾患状態の程度および/または望ましくない臨床的発現が少なくされるか、そして/あるいはその進行の時間的推移が鈍化されるかまたは短縮されることを意味する。代表的には、上記「処置」は、上記被験体に、有効な幹細胞および前駆細胞を付加的に投与して、組織（特に、造血細胞）を再生する工程を包含する。

20

30

#### 【0022】

本明細書に記載される方法において有用な細胞集団は、種々の状況において利用され得る。一実施形態において、上記細胞は、血液学的な回復を促進するために、1種以上の疾患、処置、またはこれらの組み合わせから生じる血液機能が減少した被験体に投与される。

#### 【0023】

例えば、本発明の方法は、以下を有する患者の処置に有用である：正常の血球生成および成熟がないことまたはその機能不全から生じる疾患、過剰増殖性幹細胞障害、再生不良性貧血、汎血球減少症、血小板減少症、赤血球無形成（*red cell aplasia*）、薬物、照射もしくは感染、突発性に起因するブラックファン-ダイヤモンド症候群；造血性悪性疾患（急性リンパ芽球性（リンパ性）白血病、慢性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性悪性骨髄硬化症、多発性骨髄腫、真性赤血球增多症、原因不明の骨髄化生、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫が挙げられる）；悪性の固形腫瘍（悪性の黒色腫、胃癌、卵巣癌、乳癌、小細胞肺癌、網膜芽細胞腫、精巣癌、神経膠芽細胞腫、横紋筋肉腫、神経芽細胞腫、ユーイング肉腫、リンパ腫が挙げられる）を有する被験体における免疫抑制；自己免疫

40

50

疾患、関節リウマチ、糖尿病I型、慢性肝炎、多発性硬化症、および全身性エリテマトーデス；遺伝性（先天性）障害、貧血、家族性再生不良性ファンコニ症候群、ブルーム症候群、赤芽球癆（PRCA）、先天性角化異常症（*dyskeratosis congenital*）、ブラックファン-ダイヤモンド症候群、先天性赤血球異形成症候群（*congenital dyserythropoietic syndromes*）I - IV、MPS I、MPS II、MPS III、MPS IV、MPS V、小児性（*Infantile*）クラッペ病、副腎脳白質ジストロフィー症、異染性白質ジストロフィー、テイ・サックス病、シュバッハマン-ダイヤモンド症候群（*Chwachmann-Diamond syndrome*）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損症、ホルムアミノトランスフェラーゼ欠損症、レッシュ-ナイハン症候群、先天性球状赤血球症、先天性楕円赤血球症、先天性有口赤血球症、先天性Rhヌル病（*Rh null disease*）、発作性夜間血色素尿症、G6PD（グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ）、*variants 1, 2, 3*、ピルビン酸キナーゼ欠損症、先天性エリスロポエチン感受性欠損症、鎌状赤血球症および鎌状赤血球形成傾向、サラセミア、サラセミア、サラセミア、メトヘモグロビン血症、免疫の先天性障害、重症複合型免疫不全症（*SCID*）、ベアリンパ球症候群、イオノフォア応答性複合型免疫不全症（*ionophore-responsive combined, immunodeficiency*）、キャッピング異常性を伴う複合型免疫不全症（*combined immunodeficiency with a capping abnormality*）、ヌクレオシドホスホリラーゼ欠損症、顆粒球アクチン欠損症（*granulocyte actin deficiency*）、小児性顆粒球減少症、ゴーシェ病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、コストマン症候群、細網異形成症、先天性白血球機能不全症候群；大理石骨病、骨髄硬化症、後天性溶血性貧血、後天性免疫不全症、リンパ球セットにおける不均化に拘わる障害および加齢している食細胞障害に起因する免疫機能障害、コストマン顆粒球減少症、慢性肉芽腫症、チェディアック-東症候群（*Chediak-Higashi syndrome*）、好中球アクチン欠損症（*neutrophil actin deficiency*）、好中球膜GP-180欠損症（*neutrophil membrane GP-180 deficiency*）、代謝性蓄積症（*metabolic storage disease*）、ムコ多糖沈着症、ムコリピドーシス、免疫機構に関する種々の障害、ウイスコット-アルドリッチ症候群、および1アンチトリプシン欠損症。

#### 【0024】

高用量化学療法剤の複数サイクルにより認められる血液毒性続発症は、自己由来造血性幹細胞の連結的な投与（*conjunctive administration*）によって軽減されることもまた示された。従って、本発明の方法は、骨髄破壊性化学療法後の幹細胞の再注輸が記載されてきた疾患（急性白血病、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫、精巣癌、乳癌、多発性骨髄腫、サラセミア、および鎌状赤血球貧血が挙げられる）に有用である（*Chesonら*、（1989）*Ann. Intern. Med.* 30 110:51；*Wheelerら*（1990）*J. Clin. Oncol.* 8:648；*Takvorianら*（1987）*N. Engl. J. Med.* 316:1499；*Yeagerら*（1986）*N. Eng. J. Med.* 315:141；*Bironら*（1985）*In Autologous Bone Marrow Transplantation: Proceedings of the First International Symposium*, *Dickeら*編, p.203；p.189の*Peters*（1985）*ABMT*（同書）；*Barlogie*,（1993）*Leukemia* 7:1095；*Sullivan*,（1993）*Leukemia* 7:1098-1099）。

#### 【0025】

癌細胞を標的とし破壊するために使用される大部分の化学療法剤は、すべての増殖しつつある細胞（すなわち、細胞分裂を経験している細胞）を死滅させることによって作用す

る。骨髄は、身体において最も活動的に増殖している組織のうちの1つであるので、造血性幹細胞は、化学療法剤によって頻りに損傷されるかまたは破壊され、結果として、血球生成は、減少されるかまたは中止される。従って、本発明は、化学療法後の血小板生着および好中球生着を促進することによって、骨髄破壊性移植の結果を改善するために有用である。

#### 【0026】

##### III. 細胞調製物の供給源

本発明の方法は、一般に、同種異系幹細胞治療の使用を包含する。同種異系細胞治療は、悪性疾患およびウイルス背得疾患のいくつかのタイプの重要な治癒力のある治療である。同種異系細胞治療は、被験体への細胞の注入もしくは移植（この注入もしくは移植される細胞は、上記被験体以外のドナーに由来する）を包含する。同種異系細胞治療プロトコルに利用されている同種異系ドナーのタイプとしては、以下が挙げられる：HLAがマッチしている同胞（sib）、マッチしていない血縁関係にないドナー、部分的にマッチしている家族構成員のドナー、血縁関係にある臍帯血ドナー、および血縁関係にない臍帯血ドナー。上記同種異系ドナー細胞は、通常、骨髄採取、末梢血回収または誕生時の胎盤の臍帯血回収によって得られる。

10

#### 【0027】

同種異系細胞は、好ましくは、ヒト白血球抗原（HLA）適合性ドナーから選択される。一般に、HLA適合性リンパ球は、完全にHLAマッチした親族（例えば、両親、兄弟もしくは姉妹）から得られ得る。しかし、ドナーリンパ球は、同胞ドナーが単一遺伝子座ミスマッチであるとしても、望ましい結果を得るために、レシピエントと十分にHLA適合性であり得る。ドナーが上記レシピエントと血縁関係がなければ、好ましくは、上記ドナーリンパ球は、上記レシピエントと完全にHLAがマッチしている。一実施形態において、上記細胞は、6/6遺伝子座においてHLAがマッチしているドナーから得られる。別の実施形態において、上記細胞は、5/6遺伝子座においてHLAがマッチしているドナーから得られる。なお別の実施形態において、上記細胞は、4/6遺伝子座においてHLAがマッチしているドナーから得られる。A遺伝子座におけるミスマッチは、B遺伝子座におけるミスマッチよりも好ましい。B遺伝子座におけるミスマッチは、DR遺伝子座におけるミスマッチよりも好ましい。UCBを利用する種々の実施形態において、投与前に上記細胞のHLAタイプ分けすることは必ずしも必要ではない。

20

30

#### 【0028】

従って、一実施形態において、本発明は、少なくとも1名（1つ）のドナーから回収された第1の細胞集団および第2の細胞集団を個体に投与する工程を包含する、上記個体を処置するための方法を提供する。この状況において「ドナー」とは、成人、小児、乳児または胎盤を意味する。別の実施形態において、上記方法は、複数のドナーから回収されかつプールされた第1の細胞集団および/または第2の細胞集団を上記個体に投与する工程を包含する。あるいは、上記第1の幹細胞集団および上記第2の幹細胞集団は、別々に複数のドナーから得られて、別個に投与されてもよい（例えば、1名（1つ）以上のドナーが、上記第1の細胞集団のために利用され、同じまたは異なるドナーのうちの1名（1つ）以上が、上記第2の細胞集団に利用される。

40

#### 【0029】

本明細書に記載される方法は、一般に、ドナー細胞の同種異系移植を記載しているが、種々の実施形態に関して、宿主（または「被験体」）細胞の自家移植が行われることが企図される。上記第1の細胞集団は同種異系であり得る一方で上記第2の細胞集団は自己由来であるか、または上記第1の細胞集団は自己由来であり得る一方で上記第2の細胞集団は同種異系であることがさらに企図される。造血組織以外の組織（または、いくつかの実施形態において、造血組織を含む）の修復のために、例えば、損傷もしくは疾患後の組織再生もしくは修復のために、上記被験体からのUCB由来細胞、BM由来細胞、またはMPB由来細胞を利用することが特に有利であり得る。

#### 【0030】

50

#### IV. 回収方法

臍帯血は、任意の医療的にまたは薬学的に受容可能な様式で回収され得る。臍帯血の回収のための種々の方法が、記載されている。例えば、Coe, 米国特許第6,102,871号; Haswell, 米国特許第6,179,819 B1号を参照のこと。UCBは、例えば、血液バッグ、移動用バッグ (transfer bag)、または滅菌プラスチックチューブに回収され得る。それらから由来するUCBまたは幹細胞は、投与のために単一の個体 (すなわち、単一単位として) から回収されたのと同様に貯蔵され得るか、またはその後の投与のために他の単位とともにプールされ得る。

##### 【0031】

骨髄は、最も好ましくは、後腸骨稜から吸引することによって得られ得る。前駆細胞はまた、末梢血前駆細胞を移動させるフィルグラスチム (顆粒球コロニー刺激因子、すなわち、G-CSF [Neupogen, Thousand Oaks, CA]) での処置によってドナーまたは被験体から単離され得る (Bruggerら. (1993) Br J Haematol. 84 (3): 402-7)。上記細胞は、Brugger (1993) に記載されるように、白血球アフェレーシスで回収され得る。

10

##### 【0032】

凍結される場合、上記細胞は、適切な極低温の容器に移され、そして上記容器は、一般に、-120 から -196 まで温度が下げられ、その温度で維持される。必要とされる場合、上記細胞の温度 (すなわち、極低温容器の温度) は、上記被験体への導入と適合する温度に上昇させられ (一般に、ほぼ室温からほぼ体温へ (例えば、約20 から約37.6 へ (両端含む)))、上記細胞は、以下で議論されるように被験体へ導入される。

20

##### 【0033】

#### V. 幹細胞の富化

本発明の種々の実施形態において、少なくとも上記第2の細胞集団は、ASPCについて富化される。いくつかの実施形態において、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団はともに、本明細書に記載されるかまたは当該分野で公知の富化方法のうちの1つ以上を (任意の組み合わせにおいて) 使用して富化される。本明細書で使用される場合、用語「富化される」または「富化」とは、細胞集団におけるASPC数と組み合わせで使用される場合に、ASPCの総数が操作されていない細胞集団と比較したか、または本明細書で開示されていない様式によって操作された集団と比較したときに、上記細胞集団中の総細胞数と比例して、一定であるかまたは増大されていることを意味する。

30

##### 【0034】

細胞表面マーカーおよび他のマーカー (例えば、細胞内酵素および上記細胞の光散乱特性) の組み合わせを使用して、本発明の細胞集団は、有利には、これら特性に基づいて、上記細胞を分類もしくは単離することによって、特定の治療的用途に「合わせて作られ」得る。また、これら独特の幹細胞集団のうちのいくつかは、特定の細胞系統を表すので、上記集団は、インビボで特定の細胞系統を選択的に再構築するために使用され得る。造血系統を生じる幹細胞は、移植される幹細胞の濃度および有効性を増すために使用され得、それによって、毒性を低下させ得る。有利には、これら細胞は、自己由来骨髄および末梢血から分類され得るので、拒絶の可能性をさらに低下させかつ幹細胞移植片の有効性を増大させ得る。間葉性組織 (例えば、骨、神経、希突起神経膠細胞、筋肉、脈管構造、骨髄間質、および真皮) を生じる幹細胞は、罹患したもしくは損傷した組織を修復または置換するために使用され得る。「分類される」または「単離される」とは、哺乳動物から回収され、細胞マーカー (抗体に対してが挙げられるが、これに限定されない) (結合体化していようと結合体化していなかつとも)、蛍光マーカー、酵素マーカー、色素、染料などと接触された幹細胞を意図する。

40

##### 【0035】

「細胞表面マーカー」とは、特定の抗体を介して検出可能な細胞表面に発現されたタンパク質である。本発明において有用な細胞表面マーカーとしては、以下が挙げられるが、

50

これらに限定されない：CD（分化のクラスター）抗原であるCD1a、CD2、CD3、CD5、CD7、CD8、CD10、CD13、CD14、CD16、CD19、CD29、CD31、CD33、CD34、CD35、CD38、CD41、CD45、CD56、CD71、CD73、CD90、CD105、CD115、CD117、CD124、CD127、CD130、CD133、CD138、CD144、CD166、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DR、VEGFレセプター1（VEGF-R1）、VEGFレセプター-2（VEGF-R2）、およびグリコホリンA。「細胞内マーカー」とは、遺伝子の発現または遺伝子生成物（例えば、検出可能な酵素）を意図する。例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）は、大部分の造血性幹細胞において発現される細胞内酵素である。これは、蛍光物質を使用することによって、フローサイトメトリーを介して検出され得る（例えば、米国特許第5,876,956号、同第6,627,759号、および同第6,991,897号、ならびに米国特許出願第11/247,764号および同第10/589,173号（これらの各々は、その全体が本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。

10

20

30

40

50

#### 【0036】

集団は、側方散乱チャンネル（SSC）光度および前方散乱チャンネル（FSC）光度に基づく上記細胞の光散乱特性に基づいてさらに富化され得る。「側方散乱」とは、フローサイトメトリーによって測定される場合、直角に（レーザー源の方向から約90°）散乱した光の量を意図する。「前方散乱」とは、レーザー源の方向から概して90°未満で散乱した光の量を意図する。一般に、細胞顆粒性が増大するにつれて側方散乱が増大し、そして細胞直径が増大するにつれて前方散乱が増大する。側方散乱および前方散乱は、光強度として測定される。当業者は、側方散乱の量が、ユーザーが規定した設定を使用して微分され得ることを認識する。用語「低側方散乱」および「SSC<sup>low</sup>」とは、上記フローサイトメーターの側方散乱チャンネルにおいて、約50%強度未満、約40%強度未満、約30%強度未満、またはさらに低い強度を意図する。逆に、「高側方散乱」または「SSC<sup>high</sup>」細胞は、SSC<sup>low</sup>ではない、逆の関係にある細胞集団である。前方散乱は、側方散乱と同じ様式で規定されるが、その光は、前方散乱チャンネルで集められる。従って、本発明の実施形態は、幹細胞供給源から得られた細胞の細胞表面マーカー、細胞内マーカー、および光散乱特性の組み合わせに基づいた幹細胞集団の選択を包含する。

#### 【0037】

本明細書に開示される方法において有用な少なくとも上記第2の幹細胞集団は、マーカーの陽性発現に基づいて分類され得るASPCを含み得る。いくつかの実施形態において、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団はともに、マーカーの陽性発現に基づいて分類される。「発現について陽性」とは、目的のマーカー（細胞内であろうと細胞外であろうと）が任意の方法（フローサイトメトリーが挙げられるが、これらに限定されない）を使用して細胞の中または細胞上で検出可能であることを意図する。用語「発現について陽性」、「陽性に発現している」、「発現している」、上付文字で使用される「<sup>+</sup>」および上付文字で使用される「<sup>pos</sup>」とは、本明細書で交換可能に使用される。「発現について陰性」とは、目的のマーカー（細胞内であろうと細胞外であろうと）が、いかなる特定の方法（フローサイトメトリーが挙げられるが、これらに限定されない）を用いても、細胞の中でも細胞上でも検出できないことを意図する。用語「発現について陰性」、「陰性発現」、「発現していない」、上付文字で使用される「<sup>-</sup>」および上付文字で使用される「<sup>neg</sup>」とは、本明細書において交換可能に使用される。

#### 【0038】

上付文字で使用される「<sup>b</sup>」とは、（例えば、FACSを用いて）蛍光によって測定される場合に、同様に発現について陽性である他の細胞よりも明るい、目的のマーカーの陽性発現を意図する。当業者は、光度が検出閾値に基づくことを認識する。一般に、当業者は、陰性コントロールサンプルを最初に分析し、FSCおよびSSCによって目的の集団の周りにゲート（ビットマップ（bitmap））を設定し、光電子倍增管電圧を調節し、上記細胞のうちの97%が陰性コントロールと一致して、蛍光マーカーで染色されて

いないように見えるように、望ましい放射波長における蛍光を得る。一旦これらパラメーターが確立されると、染色された細胞は分析され、蛍光が、上記染色されていない蛍光細胞集団に対する相対的存在として記録される。本明細書で使用される場合、用語「明るい」または上付文字の「<sup>b</sup>r」とは、染色されていないコントロール細胞に対して検出可能な蛍光において、約20倍より大きい、約30倍より大きい、約40倍より大きい、約50倍より大きい、約60倍より大きい、約70倍より大きい、約80倍より大きい、約90倍より大きい、約100倍より大きい、またはそれ以上の増加を意図する。逆に、本明細書において使用される場合、用語「薄暗い(dim)」または上付文字の「<sup>d</sup>im」とは、「明るい」または「<sup>b</sup>r」として規定されるものの逆の関係にある集団を意図する。

#### 【0039】

いくつかの実施形態において、少なくとも上記第2の細胞集団は、マーカーの発現に基づいて富化され得る。例えば、限定なく、いくつかの細胞によるCD34（非常にグリコシル化されたI型膜貫通タンパク質）またはCD133（5回膜貫通糖タンパク質）の発現は、幹細胞活性および前駆細胞活性と関連しており、これら抗原のいずれか一方または両方を発現する細胞は、治療的用途のために、細胞分類によって単離され得る。他の実施形態において、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団はともに、このようなマーカーの陽性発現に基づいて分類される。

#### 【0040】

いくつかの実施形態において、少なくとも上記第2の細胞集団は、細胞表面マーカーの発現の欠如に基づいて富化され得る（すなわち、上記富化された集団は、これらマーカーを発現する細胞を「実質的に含まない」）。例えば、限定なく、CD45を発現する細胞は、代表的には、造血系統の範囲であるが、これら細胞は、細胞分類または他の方法によって取り出されて、治療目的で、非造血要素について富化された細胞集団（例えば、内皮前駆細胞）を生成し得る。他の実施形態において、上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団はともに、これら細胞表面マーカーの発現の欠如に基づいて富化され得る。

#### 【0041】

いくつかの実施形態において、本発明の方法において有用な少なくとも上記第2の細胞集団内のASPCのうち少なくとも10%、20%または30%は、目的の細胞マーカーを発現する；他の実施形態において、少なくとも上記第2の細胞集団内のASPCのうち少なくとも40%、50%、または60%は、目的の細胞マーカーを発現する；なお他の実施形態において、少なくとも上記第2の細胞集団内のASPCのうち少なくとも70%、80%、または90%は、目的の細胞マーカーを発現する；さらに他の実施形態において、少なくとも上記第2の細胞集団内のASPCのうち少なくとも95%、96%、97%、98%、99%またはさらに100%は、目的の細胞マーカーを発現する。「実質的に含まない」とは、上記集団中の細胞のうち約5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満またはさらに0%が、目的のマーカーを発現することを意図する。臍帯血から精製された細胞集団の用途は、本明細書で具体的に例示されるが、他の供給源（骨髄、末梢血、および胎児肝臓を含む）由来のこのような細胞の用途はまた、企図される。

#### 【0042】

当該分野で公知および本明細書に記載される選択方法は、ASPCをさらに富化するために使用され得る。一般に、ASPCの供給源をモノクローナル抗体と反応させて、同種の細胞表面抗原を発現する細胞部分集団を、補体媒介性溶解、凝集法、または蛍光活性化セルソーティング(FACS)によって免疫磁性ビーズを陽性的にまたは陰性的にいずれか一方で選択する。規定された細胞表面表現型を有する得られた部分集団のこの機能的属性は、次いで、コロニー形成アッセイを使用して決定される。ASPC活性を有するおよび有さない細胞の表現型が一旦既知になれば、これら方法は、治療的移植に適切なASPCを選択するために使用され得る。

#### 【0043】

望ましい場合、最終的に分化した細胞の大部分は、陰性選択分離工程を最初に使用する

10

20

30

40

50

ことによって除去され得る。例えば、磁性ビーズ分離は、少なくとも上記第2の細胞集団からの多数の系統が約束された細胞を除去するために最初に使用され得る。望ましくは、総細胞のうちの少なくとも約80%、通常は、少なくとも約70%が、除去される。

#### 【0044】

細胞分離のための手順としては、抗体がコーティングされた磁性ビーズを使用した磁性分離による陽性選択または陰性選択、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローナル抗体に結合されるかまたはモノクローナル抗体とともに使用される細胞傷害性薬剤（補体および細胞毒素が挙げられるが、これらに限定されない）、および固体マトリクス（例えば、プレート）に結合された抗体での「パニング」、エラトリエーション（*elutriation*）または任意の他の便利な技術が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0045】

正確な細胞分離を提供する技術としては、フローサイトメトリーが挙げられるが、これに限定されない。フローサイトメトリーは、種々の程度の洗練化（*sophistication*）（例えば、複数のカラーチャンネル、ローアングル（*low angle*）および鈍い光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなど）を有し得る。種々の特定の用途に分けられた（*dedicated*）系統のための抗体は、種々の蛍光色素によって明るくされ得る。マルチカラー分析における使用が見いだされ得る蛍光色素としては、フィコビリプロテイン（例えば、フィコエリトリンおよびアロフィコシアニン）；フルオレセイン；およびデキサスレッドが挙げられる。少なくとも上記第2の細胞集団の細胞はまた、死細胞において選択的に蓄積する色素（例えば、ヨウ化プロビジウムおよび7-アミノアクチノマイシンD（7-*AAD*））を使用することによって、死細胞に対して選択され得る。好ましくは、上記細胞は、約2% ウシ胎児血清（*FCS*）または0.2% ウシ血清アルブミン（*BSA*）を含む培地中に回収される。例えば、*Fallonら*（2003）*Br. J. Haematol.* 121:1（本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

20

#### 【0046】

陽性選択のための他の技術が使用され得、正確な分離を可能にする（例えば、アフィニティークラムなど）。選択された方法は、少なくとも上記第2の細胞集団の望ましい集団のうちの約20%未満、約15%未満、約10%未満、または約5%未満の残余量にまで非前駆細胞の除去を可能にするはずである。

30

#### 【0047】

上記富化工程のために使用される単離手順に拘わらず、少なくとも上記第2の集団の得られた細胞は、治療的に重要な特性を有する。一実施形態において、本発明の方法において有用な少なくとも上記第2の細胞集団は、 $ALDH^b r$ 細胞を含む。 $ALDH^b r$ 細胞は、高レベルの酵素アルデヒドデヒドロゲナーゼを発現し、フローサイトメトリー分析において低い側方散乱シグナルを与える。 $ALDH^b r$ 細胞集団の種々の特性およびこれらを得る方法は、当該分野で周知である。例えば、米国特許第6,537,807号；米国特許第6,627,759号；*Stormsら*（1999）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9118；*PCT*公開番号WO2005/083061；*Stormsら*（2005）*Blood* 106（1）:95-102；および*Hessら*（2004）*Blood* 104（6）:1648-55（これらの各々は、それら全体が本明細書に参考として援用される）を参照のこと。

40

#### 【0048】

これら $ALDH^b r$ 細胞は、造血系統のうちのいずれかの細胞（骨髓系細胞（例えば、血小板、巨核球、および赤血球）およびリンパ性細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、および抗原提示細胞）が挙げられるが、これらに限定されない）を生成するために使用され得る。これら細胞はまた、造血系統のうちのいずれかの細胞（骨髓性細胞（例えば、血小板、巨核球、および赤血球）およびリンパ性細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、および抗原提示細胞）が挙げられるが、これらに限定されない）を生成することができる。

50

## 【0049】

間葉系幹細胞(MSC)は、造血性幹細胞とよく似て、抗体のパネルを使用して特徴付けられた。MSCは、一般に、CD14、CD34およびCD45の発現を欠いている。MSCは、一般に、CD105およびCD73に対して陽性である。培養された間葉細胞を同定するために研究者によって使用される他のマーカーとしては、CD29、Thy-1(CD90)、CD115、CD144、CD166、およびHLA-A、HLA-B、もしくはHLA-Cのようなマーカーの陽性発現が挙げられる。機能的には、MSCは、脂肪生成細胞コロニー、骨形成細胞コロニー、筋形成細胞コロニー、および軟骨形成細胞コロニーへと分化するそれらの能力についてインビトロで試験され得る。

## 【0050】

他の実施形態において、UCBから単離される、本発明の方法において有用な少なくとも上記第2の細胞集団は、例えば、ALDH<sup>b</sup>である。なお他の実施形態において、骨髄および動員末梢血から単離された、少なくとも上記第2の細胞集団は、例えば、ALDH<sup>b</sup>である。

## 【0051】

他の幹細胞精製もしくは濃縮の方法としては、対向流遠心分離エラトリエーション(counterflow centrifugal elutriation)、平衡密度遠心分離、単位重力での速度沈降、免疫ロゼット形成および免疫付着、ならびにTリンパ球除去のような技術の使用が挙げられ得る。

## 【0052】

富化されたASPCは、その後の移植の際に、特定のタイプの細胞の発生を促進するためにエキソピボで操作され得るかまたは増殖され得る。例えば、UCB細胞は、同種異系移植後の好中球、赤血球、および血小板の生着を促進しようとするために、増殖されてきた。エキソピボ増殖のための技術は、当該分野で十分に記載されている。例えば、McNiece and Bridgman (2001) Exp. Hematol. 29:3; McNieceら(2000) Exp. Hematol. 28:1186; Jaroscaから(2003) Blood 101:5061を参照のこと。本発明は、このように増殖されたかまたは操作された細胞集団(この細胞集団は、実際に、培養を介して選択された細胞集団を含む)はまた、上記第1の細胞集団または上記第2の細胞集団のために使用され得ることを予測する。

## 【0053】

## VI. 投与

本発明の方法において有用な細胞集団は、種々の治療レジメンおよび診断レジメンにおける適用を有する。それら細胞集団は、好ましくは、被験体への投与の前に、適切なキャリア(例えば、緩衝化生理食塩水)中に希釈される。上記細胞は、任意の生理学的に受容可能なビヒクルにおいて投与され得る。細胞は、患者の臨床的管理を促進するために、中心線を通じて、注射、カテーテルなどによって、従来どおり、血管内に投与される。この投与経路は、肺血管系を介して、最初の通過循環(pass circulation)に細胞を送達する。通常、少なくとも約 $1 \times 10^5$ 個細胞/kgおよび好ましくは、約 $1 \times 10^6$ 個細胞/kg以上が、上記第1の細胞集団において、または上記第1の細胞集団および上記第2の細胞集団の組み合わせで、投与される。例えば、Sezerら(2000) J. Clin. Oncol. 18:3319およびSienaら(2000) J. Clin. Oncol. 18:1360を参照のこと。望ましい場合、さらなる薬物(例えば、5-フルオロウラシルおよび/または増殖因子)がまた、同時に導入され得る。適切な増殖因子としては、サイトカイン(例えば、IL-2、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、M-CSF、GM-CSF、 $\gamma$ -インターフェロン、およびエリスロポエチン)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、本発明の細胞集団は、有益なサイトカインの分泌および/または幹細胞増殖、ホーミングもしくは分化を誘導するシグナルを送達し得る細胞表面タンパク質の提示が挙げられるが、これらに限定されない任意の手段によって、生着を支援または高める他の細胞集団と組み合わ

10

20

30

40

50

せて投与され得る。これらの実施形態において、上記第2の細胞集団のうちの100%未満が、富化された幹細胞を含む。

【0054】

いくつかの実施形態において、第1の肝細胞集団および/または第2の幹細胞集団は、標準的方法を使用して凍結および融解された後に、赤血球および/または顆粒球の除去によって整えられ得る (condition)。

【0055】

上記第1の幹細胞集団および/または上記第2の幹細胞集団は、任意の薬学的にもしくは医療的に受容可能な様式において (注射または輸液によるものが挙げられる) 被験体に投与され得る。上記細胞集団または追加される細胞集団は、任意の薬学的にもしくは医療的に受容可能なキャリアを含み得るか、またはこのようなキャリア中に含まれ得る。例えば、本発明の薬学的組成物は、本明細書に記載されるように、1種以上の薬学的にもしくは生理学的にもしくは受容可能なキャリア、希釈剤もしくは賦形剤と組み合わせて、標的細胞集団を含み得る。このような組成物は、緩衝液 (例えば、中性緩衝化生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水など) ; 炭水化物 (例えば、グルコース、マンノース、スクロースもしくはデキストラン、マンニトール) ; タンパク質; ポリペプチドもしくはアミノ酸 (例えば、グリシン) ; 抗酸化剤; キレート剤 (例えば、EDTAもしくはグルタチオン) ; アジュバント (例えば、水酸化アルミニウム) ; および保存剤を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与のために処方される。上記第1の幹細胞集団および/または上記第2の幹細胞集団は、任意の薬学的にもしくは医療的に受容可能な容器 (例えば、血液バッグ、移動用バッグ、プラスチックチューブもしくはバイアル) の中に入れて収容され得るか、貯蔵され得るか、または輸送され得る。

10

20

【0056】

本発明の細胞組成物は、組織修復もしくは再生を達成するためにまたは望ましい疾患もしくは状態を処置するために十分な量で、被験体 (好ましくは、ヒト) に導入されるべきである。好ましくは、少なくとも約  $2.5 \times 10^7$  個細胞/kg、少なくとも約  $3.0 \times 10^7$  個細胞/kg、少なくとも約  $3.5 \times 10^7$  個細胞/kg、少なくとも約  $4.0 \times 10^7$  個細胞/kg、少なくとも約  $4.5 \times 10^7$  個細胞/kg、または少なくとも約  $5.0 \times 10^7$  個細胞/kg が、上記第1の細胞集団、上記第2の集団、または上記第1の幹細胞集団と上記第2の幹細胞集団との組み合わせのいずれか一方において、任意の処置のために使用される。いくつかのドナーからの臍帯血が使用される場合、被験体に導入される臍帯血幹細胞の数は、より多い可能性がある。上記第2の細胞集団が、ASPCについて富化される場合、生着を容易にするかまたは促進するために必要な1kgあたりの有核細胞数は、 $2.5 \times 10^7$  個細胞/kg より少ない可能性がある。従って、本発明の方法は、血液学的な回復のために必要な移植細胞数を減少させ得る。この方法は、移植に利用可能な細胞数 (例えば、臍帯血に由来する) が制限される場合、特に有用である。

30

【0057】

「治療上有効な量」が示される場合、本発明の組成物の投与されるべき正確な量は、被験体の年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染もしくは転移の程度、および被験体の状態の考慮事項とともに、当業者によって決定され得る。上記細胞は、当該分野で一般に公知である注入もしくは注射技術を使用することによって投与され得る。

40

【0058】

VII. 補助療法

本発明の方法における第1の幹細胞集団および第2の幹細胞集団の使用によれば、上記ドナー細胞の免疫学的拒絶を低下させるために上記宿主を処置し得る (例えば、米国特許第5,800,539号 (1998年9月1日発行) ; および米国特許第5,806,529号 (1998年9月15日発行) に記載されるもの (これらはともに、本明細書に参考として援用される) )。

【0059】

本発明の特定の実施形態において、本発明の細胞は、薬剤 (例えば、骨髄破壊性 (高用

50

量)化学療法)、化学療法、照射、免疫抑制剤(例えば、抗胸腺細胞グロブリン(ATG)、ブスルファン、IVIg、メルファラン、メチルプレドニゾン、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびFK506)、抗体、または他の免疫破壊性(immunoblative)薬剤(例えば、CAMPATH)、抗CD3抗体もしくは他の抗体治療、サイトキシン(cytokine)、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、および局所もしくは全身照射での処置の後に、被験体に投与される。これら薬物は、カルシウム依存性ホスファターゼカルシニューリンを阻害する(シクロスポリンおよびFK506)か、または増殖因子誘導性シグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する(ラパマイシン)(Liuら, Cell 66:807-815, 1991; Hendersonら, Immun. 73:316-321, 1991; Biererら, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993; Isoniemi(前出))。さらなる実施形態において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、いずれかの化学療法剤(例えば、フルダラビン)を使用するT細胞破壊性治療、外部ビーム放射療法(external-beam radiation therapy)(XRT)、シクロホスファミド、または抗体(例えば、OKT3もしくはCAMPATH)と組み合わせて(例えば、前、同時もしくは後)、被験体に投与される。別の実施形態において、本発明の細胞組成物は、B細胞破壊性治療(例えば、CD20と反応する薬剤(例えば、Rituxan))の後に投与される。例えば、一実施形態において、被験体は、高用量の化学療法による標準的な処置、続いて、幹細胞移植を受け得る。移植後、被験体は、本明細書に記載される2つの細胞集団の注入を受ける。

#### 【0060】

被験体に投与されるべき上記処置の投与量は、処置される状態の正確な性質および処置の被験体によって変動する。ヒト投与のための投与量の概算は、当該分野で受け入れられている実務に従って行われ得る。

#### 【0061】

##### VIII. 治療応答のモニタリング

被験体における治療応答をモニターするための方法は、被験体における、総合的かつ事象なしの生存、血小板生着、ANC生着、疾患の再発などのうちの1種以上の評価を包含する。処置に対する応答は、適切なコントロールに対して比較され得る。これら応答をモニターするための方法は、当該分野で周知であり、本明細書において例示される。

#### 【0062】

本発明の目的のために、「被験体」とは、本発明の細胞調製物を投与している個体をいう。上記被験体は、ヒト、非ヒト霊長類、実験動物などであり得るが、好ましくは、ヒトである。「コントロール」とは、観察の性質に依存して、処置されていないか、偽処置されているか(例えば、上記個体は、第1の細胞集団および第2の細胞集団(ここで一方の集団および両方の集団は、本明細書に記載される細胞調製物を含まない)で処置されている)、生着を改善するためおよび/または幹細胞移植に対する治療応答を改善するために、類似のまたは別個の方法で処置されているか、あるいは本明細書に記載される幹細胞マーカーのうちの1種以上について富化されていない細胞集団で処置されている個体(または個体群)を包含し得る。例えば、ALDH<sup>b</sup>細胞について富化された第2の細胞集団で処置された上記被験体の治療応答を比較しようとする場合、適切なコントロールは、第2の細胞集団がALDH<sup>b</sup>細胞について富化されていない被験体の治療応答を包含し得るか、または第2の細胞集団が代替の細胞表面マーカー(例えば、CD34)について富化された被験体の治療応答を包含し得る。あるいは、コントロールは、歴史的コントロール(historical control)であり得る。例えば、本発明の方法に対する上記被験体の応答は、生着を調節するためおよび/または幹細胞移植に対する治療応答を改善するために、類似のまたは別個の手順を受けている被験体の以前に研究された集団において認められた応答に対して比較され得る。

#### 【0063】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、部分的には、T細胞集団を除去することによって、I I I期および/またはI V期の急性移植片対宿主病(G v H D)の発生率および/または重篤度の低下を生じる。本発明の幹細胞集団からのこの除去は、同種異系移植のレシピエントにおけるG v H Dの発生率および重篤度を低下させることが予期され得る。例えば、H o a n d S o i f f e r ( 2 0 0 1 ) B l o o d 9 8 : 3 1 9 2を参照のこと。G v H Dは、ドナーT細胞が標的器官損傷(これは、しばしば死をもたらす)を引き起こす、正常宿主細胞上の抗原に対して反応する場合に生じる。G v H Dの主要な標的器官は、免疫系、皮膚、肝臓および腸である。

#### 【0064】

G v H Dには2種類存在する：急性および慢性。急性G v H Dは、移植後最初の3ヶ月以内に現れる。急性G v H Dの徴候としては、皮膚剥離または皮膚水疱とともに、拡大しかつより重篤になり得る手および足上の赤らんだ皮膚の皮疹が挙げられる。G v H Dは、その重篤度に基づいてランク付けされる：段階(stage)(または期(grade))1は軽度であり、段階(または期)4は重篤である。慢性G v H Dは、移植後3ヶ月以降に発生する。慢性G v H Dの症状は、急性G v H Dのものに類似であるが、さらに、慢性G v H Dはまた、眼の粘液腺、口の唾液腺、および胃の内層および腸を潤滑にする腺に影響を及ぼし得る。

#### 【0065】

本明細書において記載される細胞集団の投与後に、上記被験体は、悪性細胞のレベルについて、すなわち、最小の後遺症(residual disease)の証拠についてモニターされ得る。このようなモニタリングは、再発の臨床的徴候についての被験体の追跡を含み得る。上記モニタリングはまた、適切である場合、いかなる残りの悪性細胞をも検出または定量するための種々の分子アッセイもしくは細胞アッセイを包含し得る。例えば、性別ミスマッチであるドナーおよびレシピエントの場合、残っている宿主由来の細胞は、適切な性別マーカー(例えば、Y染色体特異的核酸プライマーもしくはプローブ)の使用を介して検出され得る。ドナーとレシピエントとの間で単一のH L A遺伝子座がミスマッチの場合、残っている宿主細胞は、上記ドナーとレシピエントとの間で異なるクラスI遺伝子座もしくはクラスII遺伝子座のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)分析によって詳細に記録され得る。あるいは、腫瘍細胞に特異的な適切な分子マーカーが使用され得る。例えば、慢性骨髄性白血病におけるb c r / a b l転座に対して、種々の腫瘍において活性化された腫瘍遺伝子に対して、不活性化された腫瘍サプレッサ遺伝子、他の腫瘍特異的遺伝子、もしくは腫瘍細胞に対して特異的であることが公知の任意の他のアッセイ試薬に対して、特異的な核酸プライマーおよび/またはプローブが、使用され得る。これらもしくは機能的に匹敵する手順のいずれかが、残っている悪性細胞の証拠について上記被験体をモニターするために使用され得る。一実施形態において、本発明の方法は、コントロールと比較した場合、悪性細胞の存在において、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、または少なくとも約100%の減少を生じる。

#### 【0066】

本発明の方法に従う被験体の処置は、上記疾患、障害もしくは状態が、いずれかの方法で測定可能に改善される場合、有効であるとみなされ得る。このような改善は、多くの指標によって示され得る。測定可能な指標としては、例えば、特定の疾患、障害もしくは状態と関連した生理学的状態もしくは生理学的状態のセット(血圧、心拍数、呼吸率、種々の血球タイプの数、特定のタンパク質、炭水化物脂質もしくはサイトカインの血中レベル、または上記疾患、障害もしくは状態と関連した遺伝的マーカーの調節された発現が挙げられるが、これらに限定されない)における検出可能な変化が挙げられる。本発明の幹細胞もしくは追加細胞集団での個体の処置は、このような指標のうちのいずれか1つが、正常値範囲内もしくは正常値近くの値に変化することによってこのような測定に回答してい

10

20

30

40

50

る場合、有効であるとみなされる。上記正常値は、種々の指標について当該分野で公知である正常範囲によって、またはコントロールにおけるこのような値に対する比較によって、確立され得る。医学においては、処置の有効性はまた、しばしば、個体の健康状態の個々の印象および主観的感觉によって特徴付けられる。従って、改善はまた、本発明の細胞集団の投与後に、主観的指標（例えば、個体の改善の主観的感觉、満足状態（well-being）の増大、健康状態の改善、エネルギーレベルの改善など）によって特徴付けられ得る。一実施形態において、本発明の方法は、コントロールと比較した場合に、上記の臨床的指標のうちの1種以上において、少なくとも約30%、少なくとも約35%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約100%、約125%、約150%、約175%、約200%、約250%、少なくとも約300%、またはそれ以上の改善を生じる。

10

#### 【0067】

血液学的な回復の主な尺度は、好中球数である。好中球は、通常、血中の全白血球のうちの約45~75%を構成する。上記好中球数が、血液1 $\mu$ lあたり1,000個細胞未満に低下すると、感染の危険性がある程度高まる；上記好中球数が1 $\mu$ lあたり500個細胞未満に低下すると、感染の危険性は、大きく高まる。好中球によって提供される重要な防御がない場合、感染制御は問題になり、そして被験体は、感染によって死亡する危険性がある。従って、臨床的状況（例えば、移植の状況）では、好中球数が早く回復するほど、被験体が病院から早く解放され得る。従って、好中球の臨床的に直接関連するレベルを達成するためにかかる時間の任意の短縮は、上記被験体にとって有益であり、血液学的な回復の促進として本明細書において企図される。本発明の目的のために、好中球生着は、少なくとも500個の好中球/ $\mu$ lの絶対好中球数（ANC）として定義される。上記好中球数は、個々の被験体（または複数の被験体の平均）がANC閾値に達する日付として、または移植後特定の日数までに500個好中球/ $\mu$ lのANCを有する被験体の割合（通常は、42日目あたり）として、またはある個体が特定の日付までに特定の閾値に達する確率として報告され得る。一実施形態において、本発明の方法は、10日目以前、11日目以前、12日目以前、13日目以前、14日目以前、15日目以前、16日目以前、17日目以前、18日目以前、19日目以前、20日目以前、21日目以前、22日目以前、23日目以前、24日目以前、25日目以前、26日目以前、27日目以前、28日目以前、29日目以前、30日目以前、31日目以前、32日目以前、33日目以前、34日目以前、35日目以前、36日目以前、37日目以前、38日目以前、39日目以前、40日目以前、41日目以前、42日目以前、43日目以前、44日目以前、45日目以前、46日目以前、47日目以前、または48日目以前に、好中球生着を生じる。別の実施形態において、正常とみなされる基準ANC数に患者が達する日数は、コントロール患者群に対して、5日間、6~10日間、11~20日間、または20日間超まで促進される。

20

30

#### 【0068】

血液学的な回復はまた、血小板の臨床的に直接関連する回復によって測定され得る（当業者によって認識されるように、血液1 $\mu$ l単位で150,000~450,000個の間の血小板が通常存在する）。従って、血小板の臨床的に直接関連する回復の速度の任意の増加は有利であり、本明細書で企図される。本発明の目的のために、血小板生着は、輸液の支援なしで、少なくとも50,000個の血小板/血液1 $\mu$ lの血小板数の維持として定義される。上記血小板数は、個々の被験体（または複数の被験体の平均）が上記血小板数閾値に達する日付として、または移植後特定の日数までに（通常、約180日目）少なくとも50,000個血小板/ $\mu$ l血液の血小板数を有する上記被験体の割合（または少なくとも50,000個血小板/ $\mu$ l血液の血小板数に達する被験体の確率）として報告され得る。一実施形態において、本発明の方法は、50日目以前、55日目以前、60日目以前、65日目以前、70日目以前、75日目以前、80日目以前、85日目以前、90日目以前、95日目以前、または100日目以前に、血小板生着を生じる。別の実施形態において、患者が正常であるとみなされる基準血小板数を達成する日数は、コントロ

40

50

ール患者群に対して、5日間、6～10日間、11～20日間、または20日間超まで促進される。

【0069】

特定の実施形態において、T細胞回復の速度はまた、血液学的な回復の促進の指標である。T細胞回復の指標は、上記被験体におけるPHA誘導性増殖に対する応答および/またはCD4+細胞数の増加が挙げられ得る。上記CD4+の数は、個々の被験体（または複数の被験体の平均）がCD4+数の閾値に達する日付として、または移植後特定の基準日数までに（通常は、100日目）、閾値CD4+数を有する上記被験体の割合（または被験体が閾値CD4+数に達する確率）として報告され得る。一実施形態において、本発明の方法は、100日目に、コントロール集団の患者における数より少なくとも約25%～100%以上であるT細胞数を生じる。別の実施形態において、患者が基準CD4数を達成する移植後日数は、コントロール群の患者が同じ基準CD4数を達成する日数よりも、約10～約20日間早いか、約20～約30日間早いか、約30～約40日間早いか、約40～約50日間早いか、または50日間を超えて早い。

10

【0070】

治療的応答はまた、総合的および/または事象なしの生存に関して測定され得る。事象なしの生存（EFS）は、移植から最初の事象の日までの時間として定義される。事象は、移植失敗、自己再構築（autologous reconstitution）、再発、または死亡として定義される。白血病被験体における再発は、標準的基準によって決定される。第3のエンドポイントは、急性GvHDの発生率の説明、および非再発死亡率の他の尺度が挙げられる。GvHDは、標準的基準に従ってスコア付けされる（Przepiorakaら、(1995) Bone Marrow Transplant, 15: 825-828）。一実施形態において、本発明の方法は、報告されるコントロールより少なくとも約30%、少なくとも約35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、少なくとも約300%、またはそれ以上の%改善された総合的および/または事象なしの生存（例えば、より少ない事象の発生率（特に、III期および/またはIV期の急性GvHD）、生存日数の数の増大、および/またはコントロール集団と比較した場合に移植後特定の日付まで生存している患者数がより多いこと）を生じる。

20

【0071】

治療的応答の別の包括的尺度は、180日目での総合的な生存である。この測定基準において、本発明に従って移植された患者群における生存は、従来の方法によって処置されたコントロール群における総合的な生存と比較される。本発明の一実施形態において、患者は、コントロール患者と比較して、少なくとも約5%の総合的な生存、少なくとも約6～10%の総合的な生存、少なくとも約11～15%の総合的な生存、少なくとも約16～20%の総合的な生存、または20%超の総合的な生存の改善を示す。

30

【0072】

以下の実施例は、例示のために提供されるのであって、限定のために提供されるのではない。

【実施例】

40

【0073】

（実験）

実施例1：血縁関係にないミスマッチのUCB移植後の免疫再構築

免疫再構築は、UCB移植の約100名の生存者において評価し、650日間のメジアン（範囲は121～2450日間）で追跡した。この研究の結果は、Kleinら（2001）Biol Blood and Marrow Trans 7: 454-466において見いだされ得る。簡潔には、機能的パラメーターおよび免疫表現型パラメーターは、移植後3ヶ月、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月、24ヶ月および36ヶ月で、移植した患者の末梢血においてアッセイした。患者を、一般に、移植後最初の3ヶ月間にわたってメチルプレドニゾロン（methylprednisolone）、および移植後最初の1年

50

間にわたってシクロスポリンで維持した。移植後2年間および3年間に、免疫化を再び設けた。活動性の慢性のGvHDがない全ての生存している患者は、通常のCDC推奨に従って、死滅ワクチンおよび生ワクチンの完全な量 (full complement) を受けた。乳児および2歳未満の幼児は、CD4数およびPHA応答によって測定される場合、移植後6ヶ月までにT細胞免疫機能を回復した。2歳~12歳の小児は、移植後9~12ヶ月までに同様の機能を回復した。対照的に、ティーンエイジャーおよび成人は、移植後3年までに免疫機能を回復した。上記宿主の胸腺は、上記UCB移植片からの免疫再構成に寄与するようである。患者が若くかつ胸腺が健康であるほど(例えば、移植前に放射線に曝露されていない)、胸腺の回復はより早くかつ上記移植片からの免疫再構築により早く寄与する。小児は、移植後1年までに正常化した一方で、成人は、移植後3年

10

#### 【0074】

実施例2：先天性の代謝の間違い (Inborn Errors of Metabolism) を有する小児患者におけるUCB移植の臨床結果

臍帯血移植研究 (COBLT) (複数施設の、見込みのある、NIHにより支援された、血縁関係にないドナー臍帯血移植の治験) からの最近の結果は、UCBTの分野をさら

20

#### 【0075】

COBLT研究の異なる階層は、先天性の代謝の間違いを有する69名の小児において臍帯血移植の有効性を評価した。小児性クラッペ病およびハーラー症候群 (MPS I) を有する赤ん坊におけるUCBTの結果の事前および未決のままの報告が増加した。通常のプロトコルは、予備レジメン (ブスルファン、シクロホスファミド、ATG) およびGvHD予防 (シクロスポリン、ステロイド) について使用した。MPS 1-V (n=36、20名は以前に報告した)、グロボイド細胞型白質ジストロフィー (クラッペ病、n=16)、副腎脳白質ジストロフィー症 (n=8)、異染色性白質ジストロフィー (n=6) およびテイ・サックス病 (n=3) を有し、メジアン年齢1.8歳 (範囲は0.1~11.7歳) およびメジアン体重12.3kg (範囲3.9~42.3kg) の患者に、部分的にHLAがミスマッチの、血縁関係にないドナー臍帯血 (COBLT (83%) もしくは他の (17%) パンクから選択されたメジアン8.7x10<sup>7</sup>個有核細胞/kg (範囲2.8~38.8個細胞/kg) を与える) を移植した。CBUを、保菌者ドナー (carrier donor) の使用を防ぐために、酵素活性についてスクリーニングした。患者の64%が男性、77%が白色人種であった。HLAクラスI A & Bで低分解能タイプ分けおよびHLAクラスII DRB1で高分解能タイプ分けすることによって測定される場合、上記患者のほぼ半数 (48%) が、4/6でHLA遺伝子座がマッチしているUCB単位を受けた。

30

40

#### 【0076】

好中球生着 (ANC 500/μL、100日目までで90%のドナーキメラ現象を伴う) の累積発生率は、78%であった (メジアンは26日間で起こった)。急性のI期~IV期のGvHDの累積発生率は、46%であった。180日間および1年間での生存確率は、それぞれ、80%および72%であった。レシピエントとドナーとの間のHLA不均衡のレベルは、生着にも、GvHDにも、総合的な生存にも影響を及ぼさなかった。MPS、TSD、GLDおよびMLDを有する生存している患者は全て、移植後の巧妙さ

50

(skill)を安定化したおよび/または増した。ALDを有する8名の患者(そのうちの全員が、移植の紹介の時点で軽度から中程度の臨床的症状を有した)のうちの3名は、安定化の前に、神経学的悪化とともに疾患進行を経験した。症状の発生前に移植した、ハーラー症候群の重篤な表現型を有する赤ん坊(Kurtzberg, 2005(前出)およびDexterら(1977) J Cell Physiol 91:335-344)およびクラッペ病を有する新生児(Gartnerら(1980) Gartner Proc Natl Acad Sci 77:4756-4759)における結果は、年齢にあった正常な思考力指数を有する患者の大部分で前例がなかった。移植時の年齢が若いほどかつ上記疾患の過程において早期であるほど、総合的結果はよりよくなる。従って、臍帯血移植が、先天性の代謝の間違いを有する乳児、幼児および小児の早期の処置のための速やかに入手可能なドナー供給源を提供することは明らかである。

10

## 【0077】

実施例3: ALDH<sup>b</sup>r UCB細胞を富化するための事前の精製工程

移植のために選択された臍帯血単位を、細胞、ヘスパン(hespan)および10% DMSOの合計25mlで、2区画の低温保存バッグ(20%/80% 分割)中に保存する。移植の-5日目に、その20%(5ml)画分を、液体窒素から取り出し(手順5D.160.01)、どろどろした粘稠性になるまで37で融解する。デキストラン/アルブミンを添加して、最初の容積の4倍に希釈し、上記細胞を洗浄し、ペレット化し、ALDESORT(登録商標)アッセイ緩衝液/100U/ml DNase I(Aldagen, Inc., Durham, NC)中に再懸濁する。赤血球対白血球の比を、 $< 1 \times 10^8$ 個細胞/mlに調節する。上記細胞は、細胞を標識するために、EASYS EP(登録商標)(StemCell Technologies)抗グリコホリンAおよびCD14カクテルで除去した系統である。上記標識した細胞を、EASYS EP(登録商標)磁性ナノ粒子と混合し、室温で10分間インキュベートする。次いで、上記サンプルを、系統陽性細胞を除去するEASYS EP(登録商標)磁性に露出する。残っている系統除去細胞を、コニカルチューブの中へと穏やかに吸引する。RBC:WBC比をチェックすると、 $< 1:10$ であるはずである。RBC:WBC比がより高ければ、上記EASYS EP(登録商標)除去を反復する。

20

## 【0078】

実施例4: 高速FACSソーティングによるALDH<sup>b</sup>r UCB細胞の単離

上記系統除去細胞を、活性化ALDESORT(登録商標)試薬で染色し、37で15分間インキュベートする。上記反応を停止させ、コントロールを調製して、上記ALDH<sup>b</sup>r細胞を、FACS Ariaソーター(BD Biosciences)での高速フローソーティングによって単離する。ALDH<sup>b</sup>r細胞を単離するための方法は、Stormsら, 1999(前出)およびPCT公開番号WO 2005/083061(これらとともに、それらの全体が本明細書に参考として援用される)中により十分に記載される。上記細胞を凍結し得るか、または以下に記載されるようにすぐに注入し得る。

30

## 【0079】

実施例5: 従来からの操作していない移植片(第1の細胞集団)についてのUCB融解および注入

UCBのバッグを、フード下で無菌技術を使用して、実験室で融解する。上記UCBを37のウォーターバス中で融解し、5% アルブミン/デキストラン溶液[アルブミン25%(12.5gms/50ml)(500mlデキストラン中に25gms)]を使用して1:1容積まで希釈して、細胞生存性を保つ。上記5% アルブミン/デキストラン溶液を、ストップコック付き移動用バッグを使用して、上記融解したUCBにゆっくりと添加し、穏やかに混合する。上記融解しかつ希釈したUCBを次に秤量し、遠心分離する(4で2000rpm×20分間)。標本を、細胞数および生存性、培養、クローン産生性アッセイ、ならびに表現型のために得る。DMSOおよび上記アルブミン/デキストラン溶液を含む上清を除去し、上記UCBペレットを、5% アルブミン/デキストラン溶液を使用して1:1容積まで再び再懸濁する。上記UCBを患者同定情報で標識し、

40

50

注入のためにベッドサイドに移動する。上記UCBを、上記患者の中心静脈カテーテルを介して、1～3ml/分の速度で注入する。UCBを、インラインフィルターなしで注入し、照射しない。上記患者が胸部締め付けまたは他の症状を発生させる場合、注入の残りを続行する前に、短期間の休憩（1～2分間）が必要とされ得る。大容積のUCB（>15ml/kg）が注入されるべきである場合、上記UCBの半分を注入し得、続いて、30分間の休憩がとられ、次いで、上記UCBのその残りが注入される。バイタルサインを、注入が完了して2時間後まで、15分ごとにとる。水和（2.5～3.0ml/kg/時間）を、UCB注入が完了して12時間後にわたって維持する。容積過負荷または減少した尿排出が生じる場合、フロセミド（0.5～1.0mg/kg/用量）を与える。

#### 【0080】

実施例6：ALDH<sup>b</sup>r細胞（第2の集団）の融解、分類および注入

上記UCB細胞を融解し、ALDH<sup>b</sup>rを分類する（凍結前に分類されない場合）。0日目（移植日）に、従来UCB移植片を注入して約4時間後、上記ALDH<sup>b</sup>rUCB細胞を採取し、計数し、生存性およびグラム染色についてチェックし、注入セットに接続し、注入のための骨髄移植ユニットへと運ばれる。

#### 【0081】

実施例7：悪性状態を有する患者のコンディショニング（Conditioning）

同種異系BMTを受けているALLを有する患者のための標準的細胞減少（cytoreduction）は、シクロホスファミド（100～200mg/kg）および全身照射（TBI、1,000～1440cGy）を包含する。これらのレジメンを用いると、事象のない生存率は、2回目の軽減において、ALLを有する小児の20～45%および成人の20%で、およびマッチしている血縁関係のある同種異系BMTを受けているANLLを有する患者の最大60%で達成され得る。その後の軽減では、事象のない生存は、再発で移植した場合に治癒した患者のうちわずか8%で減少する。ATGは、さらなる免疫抑制治療のために使用される；メチルプレドニゾロンは、患者がATGを許容できない場合の代わりになる。

#### 【0082】

COBLT研究からの生着速度、GvHD、再発および生存（Kleinら、2001（前出）；Martinら、2006（前出））を歴史的コントロールとして使用して、上記移植の成功をベンチマーク問題でテストする（benchmark）。

#### 【0083】

実施例8：非悪性状態を有する患者のコンディショニング

同種異系BMTを受けている非悪性状態を有する患者についての標準的細胞減少は、4日間にわたってブスルファン16mg/kg（m<sup>2</sup>あたりの投与に対して小児患者について調節され、そして第1の用量PKによる目的レベルで追跡される）、4日間にわたってシクロホスファミド200mg/kgおよび3日間にわたってATG 90mg/kgを含む。このレジメンを使用する血縁関係のないドナー臍帯血による生着速度は、80～90%の間に及ぶ。TBIは、後期の有害事象（例えば、増殖遅延、内分泌機能不全、認知障害、慢性肺疾患または心筋症）を最小にするために避けられる。

#### 【0084】

実施例9：生着の評価

末梢血サンプルを、キメラ現象について+30日またはそのあたり、60日またはそのあたり、および100日またはそのあたりで試験する。骨髄吸引液および生検を、細胞質状（cellularity）およびドナーキメラ現象について、41～44日目に、上記患者がこのときまでに好中球回復を示していなければ行う。次いで、血小板数、ANC、GvHD、および成功裏の生着の種々の他の臨床的指標を、当該分野で公知のように評価する。

#### 【0085】

本明細書に記載される、本発明の多くの改変および他の実施形態は、前述の詳細な説明および関連する図面において示される技術の恩恵を受ける、これら発明が属する分野の当

10

20

30

40

50

業者にとって想起される。従って、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されるのではなく、かつ改変および他の実施形態は、添付の特許請求の範囲および本明細書に開示される実施形態一覧の範囲内に含まれることが意図されることは、理解されるべきである。特定の用語が本明細書において使用されるが、それらは、広い意味でかつ説明の意味でのみ使用されるのであって、限定目的で使用されるのではない。

【 0 0 8 6 】

本明細書で言及される全ての刊行物および特許出願は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。全ての刊行物および特許出願は、各個々の刊行物または特許出願が具体的にかつ個々に参考として援用されることを示されるかのように同程度まで、本明細書に参考として援用される。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2007/084037

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>INV. A61K35/38 A61K35/44 A61P35/00   |   |  |
|---|---|--|
| 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)<br>A61K   |   |  |
| 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 practical, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE  |   |  |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT  |   |  |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| Y   | WO 2005/083061 A (STEMCO BIOMEDICAL INC [US]; GENTRY TRACY [US]; FOSTER SANDRA J. [US]; B) 9 September 2005 (2005-09-09)<br>*cf. abstract, page 1, first para., page 4, lines 15-27, page 5, line 25 bridging with page 6, line 12, page 12, lines 4-17, page 15, lines 12-26, claims 1/9/14* | 1-20   |
| Y   | US 2003/157078 A1 (HALL FREDERICK L [US] ET AL) 21 August 2003 (2003-08-21)<br>*cf. page 2, section [0011], page 3, sections [0028] and [0032], page 5, section [0043], page 6, sections [0060]-[0062]*   | 1-20   |
| Y   | US 2004/107453 A1 (FURCHT LEO T [US] ET AL) 3 June 2004 (2004-06-03)<br>*cf. abstract, page 5, sections [0045], [0049] and [0050], claims 1, 3, 29 and 35*  | 1-20   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |  |
| * Special categories of cited documents :<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*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<br>*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<br>*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.<br>*Z* document member of the same patent family |   |  |
| Date of the actual completion of the international search:<br>9 June 2008   |   | Date of mailing of the international search report<br>19/06/2008 |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax. (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br>Stoltner, Anton                            |

3

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.  
**PCT/US2007/084037**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s)   | Publication date                                     |
|--|------------------|---|--|
| WO 2005083061 A                        | 09-09-2005       | AU 2004316477 A1<br>CA 2556018 A1<br>EP 1718735 A1<br>JP 2007521831 T | 09-09-2005<br>09-09-2005<br>08-11-2006<br>09-08-2007 |
| US 2003157078 A1                       | 21-08-2003       | NONE  |  |
| US 2004107453 A1                       | 03-06-2004       | NONE  |  |

## フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC20 CA44  
4C087 AA10 BB34 BB44 BB59 NA05 NA10 ZB21