(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-507459
(P2025-507459A)
(43)公表日　令和7年3月19日(2025.3.19)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ	*33/68*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/68		２Ｇ０４５
Ａ６１Ｐ	*37/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		４Ｂ０６３
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｐ	*43/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全31頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-545241(P2024-545241)
(86)(22)出願日　令和5年1月27日(2023.1.27)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月19日(2024.9.19)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/011710
(87)国際公開番号　WO2023/147029
(87)国際公開日　令和5年8月3日(2023.8.3)
(31)優先権主張番号　63/303,585
(32)優先日　令和4年1月27日(2022.1.27)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　524283431
アイオン ヘルススパン， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３７，マイアミ， ベイ ポイント ロード ５５０
(71)出願人　514198183
ユニバーシティ オブ マイアミ
アメリカ合衆国 ３３１３６ フロリダ州，マイアミ，ルーム ３１０，スイート ３００，３アールデー フロア，エヌダブリュ ７ティーエイチ アベニュー １９５１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ＳＴＮＦＲ２）を分析する方法およびその使用

(57)【要約】
本開示は、例えば、間葉系幹細胞を含む細胞の免疫調節活性を試験する方法、およびＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置するための免疫調節活性を有すると決定される上記細胞の使用に関する。インビボでのそれらの有効な免疫調節効果に関して間葉系幹細胞を評価するインビトロの方法が、本明細書で開示される。いくつかの実施形態において、複数の細胞は、ヒト間葉系幹細胞、または間葉系間質細胞、または医療用シグナル伝達細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記細胞は、出生後の脂肪組織、膝蓋下脂肪体、出生後の骨髄、出生後の子宮内膜、周産期の臍帯、周産期の絨毛膜、周産期の羊膜、または周産期の胎盤に由来する。

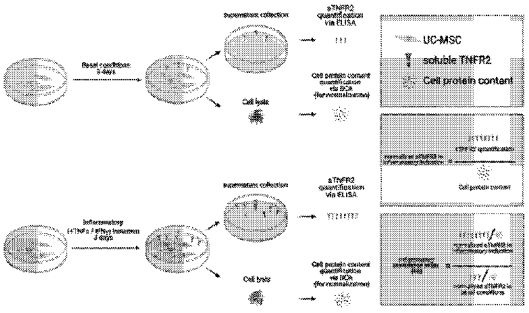


FIG. 3

【特許請求の範囲】
【請求項１】
複数の細胞の免疫調節活性を試験する方法であって、前記方法は、
ａ．　前記複数の細胞を、細胞の第１群および細胞の第２群へと分離すること；
ｂ．　前記細胞の第１群を基礎条件において培養し、前記細胞の第２群を炎症条件において培養すること；
ｃ．　前記細胞の第１群の培養上清、前記細胞の第２群の培養上清、前記細胞の第１群の細胞、および前記細胞の第２群の細胞を収集すること；
ｄ．　前記細胞の第１群の培養上清および前記細胞の第２群の培養上清中の可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ＴＮＦＲ２）タンパク質のレベルを決定すること；
ｅ．　前記細胞の第１群および前記細胞の第２群の前記可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを、ステップｃにおいて収集した前記細胞の第１群および前記細胞の第２群それぞれの全タンパク質レベルで正規化すること；
ｆ．　前記細胞の第２群の前記可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の前記正規化されたレベルを前記細胞の第１群の前記可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の前記正規化されたレベルで除算することによって、炎症刺激指数（ＩＳＩ）を計算すること；ならびに
ｇ．　前記ＩＳＩが１より高い場合に、前記複数の細胞が免疫調節活性を有することを決定すること、
を包含する方法。
【請求項２】
前記複数の細胞は、ヒト間葉系幹細胞、間葉系間質細胞、または医療用シグナル伝達細胞を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記複数の細胞は、出生後の脂肪組織、膝蓋下脂肪体、出生後の骨髄、出生後の子宮内膜、周産期の臍帯、周産期の絨毛膜、周産期の羊膜、または周産期の胎盤に由来する、請求項１または２に記載の細胞。
【請求項４】
前記炎症条件は、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）またはインターフェロンγ（ＩＦＮγ）の存在を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記炎症条件は、ＴＮＦβ、ＩＬ－１β、または結合組織成長因子（ＣＴＧＦ）の存在をさらに含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
ＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置することを必要とする被験体においてＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置する方法であって、前記方法は、前記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで前記複数の細胞は、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される方法。
【請求項７】
前記複数の細胞は、１より高い前記炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記被験体に、治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する、請求項６または７に記載の方法。
【請求項９】
炎症性障害または線維症のうちの少なくとも一方の状態を処置することを必要とする被験体において炎症性障害または線維症のうちの少なくとも一方の状態を処置する方法であって、前記方法は、前記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで前記細胞は、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される方法。

【請求項１０】
前記複数の細胞は、１より高い前記炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記被験体に、治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する、請求項９または１０に記載の方法。
【請求項１２】
炎症状態を処置することを必要とする被験体において炎症状態を処置する方法であって、前記方法は、前記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで前記細胞は、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される方法。
【請求項１３】
前記複数の細胞は、１より高い前記炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記被験体に、治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する、請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
特徴づけられる線維性状態を処置することを必要とする被験体において特徴づけられる線維性状態を処置する方法であって、前記方法は、前記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで前記細胞は、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される方法。
【請求項１６】
前記複数の細胞は、１より高い前記炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記被験体に、治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する、請求項１５または１６に記載の方法。
【請求項１８】
腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）の増加によって特徴づけられる状態を処置することを必要とする被験体において腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）の増加によって特徴づけられる状態を処置する方法であって、前記方法は、前記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで前記細胞は、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される方法。
【請求項１９】
前記複数の細胞は、１より高い前記炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記被験体に、治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する、請求項１８または１９に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０２２年１月２７日出願の米国仮特許出願第６３／３０３，５８５号（これは、その全体において参考として援用される）の優先権を主張する。
【０００２】
分野
本開示は、細胞の免疫調節活性を決定する方法および炎症性疾患を処置するための使用に関する。

【背景技術】
【０００３】
背景
間葉系幹細胞（ＭＳＣ）ベースの治療の安全性および有効性は、炎症性疾患、免疫疾患、自己免疫疾患、筋骨格系疾患、心血管系疾患、神経変性疾患、および消化管疾患を含む種々の障害に関する多くの臨床試験において調査されている。しかし、多くのこのような試験からの初期の結果から、これらの細胞治療には変動性の程度がかなりあり、臨床観察において再現性がない場合があることが明らかにされている。
【０００４】
インビボでＭＳＣをそれらの有効な免疫調節効果に関して評価するための新規なインビトロの方法が必要とされる。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】
要旨
本開示の一実施形態は、複数の細胞の免疫調節活性を試験するための方法であって、上記方法は、
ａ．　上記複数の細胞を、細胞の第１群および細胞の第２群へと分離すること；
ｂ．　上記細胞の第１群を基礎条件において培養し、上記細胞の第２群を炎症条件において培養すること；
ｃ．　上記細胞の第１群の培養上清、上記細胞の第２群の培養上清、上記細胞の第１群の細胞、および上記細胞の第２群の細胞を収集すること；
ｄ．　上記細胞の第１群の培養上清および上記細胞の第２群の培養上清中の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを決定すること；
ｅ．　上記細胞の第１群および上記細胞の第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを、ステップｃにおいて収集した上記細胞の第１群および上記細胞の第２群それぞれの全タンパク質レベルで正規化すること；
ｆ．　上記細胞の第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルを上記細胞の第１群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルで除算することによって、炎症刺激指数（ＩＳＩ）を計算すること；ならびに
ｇ．　上記ＩＳＩが１より高い場合に、上記複数の細胞が炎症刺激および免疫調節活性に対する応答性を有することを決定すること、
を包含する方法である。
【０００６】
いくつかの実施形態において、上記複数の細胞は、ヒト間葉系幹細胞、または間葉系間質細胞、または医療用シグナル伝達細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記細胞は、出生後の脂肪組織、膝蓋下脂肪体、出生後の骨髄、出生後の子宮内膜、周産期の臍帯、周産期の絨毛膜、周産期の羊膜、または周産期の胎盤に由来する。
【０００７】
いくつかの実施形態において、上記炎症条件は、ＴＮＦαおよび／またはＩＦＮγの存在を含む。いくつかの実施形態において、上記炎症条件は、ＴＮＦβ、ＩＬ－１β、または結合組織成長因子（ＣＴＧＦ）の存在をさらに含む。
【０００８】
本開示の一実施形態は、ＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置することを必要とする被験体においてＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、任意の前述の局面の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される。いくつかの実施形態において、免疫調節活性を有する上記複数の細胞は、１より高い炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される。
【０００９】

本開示の一実施形態は、炎症性障害および／または線維症を処置することを必要とする被験体において炎症性障害および／または線維症を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、任意の前述の局面の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される。いくつかの実施形態において、免疫調節活性を有する上記複数の細胞は、１より高い炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される。

【００１０】

本開示の一実施形態は、炎症状態を処置することを必要とする被験体において炎症状態を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、任意の前述の局面の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される。いくつかの実施形態において、免疫調節活性を有する上記複数の細胞は、１より高い炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される。

【００１１】

本開示の一実施形態は、特徴づけられる線維性状態を処置することを必要とする被験体において特徴づけられる線維性状態を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、任意の前述の局面の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される。いくつかの実施形態において、免疫調節活性を有する上記複数の細胞は、１より高い炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される。

【００１２】

本開示の一実施形態は、ＴＮＦの増加によって特徴づけられる状態を処置することを必要とする被験体においてＴＮＦの増加によって特徴づけられる状態を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、任意の前述の局面の方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される。いくつかの実施形態において、免疫調節活性を有する上記複数の細胞は、１より高い炎症刺激指数（ＩＳＩ）を有するとして決定される。いくつかの実施形態において、任意の前述の局面の方法は、上記被験体に治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する。

【図面の簡単な説明】

【００１３】

添付の図面は、本明細書の中に組み込まれ、その一部を構成し、以下で記載されるいくつかの局面を例証する。

【００１４】

【図１】図１は、標準的希釈物調製のステップを示す。

【００１５】

【図２】図２は、９６ウェルプレートにおけるサンプルおよび標準物を調製するレイアウトを示す（表５を参照のこと）。

【００１６】

【図３】図３は、正規化された定量および炎症刺激指数（ＩＳＩ）を介して可溶性ＴＮＦＲ２放出を測定する模式図を示す。

【００１７】

【図４】図４は、炎症誘導に対して基礎培養条件において３日間にわたるＵＣ－ＭＳＣによる可溶性ＴＮＦＲ２（ｓＴＮＦＲ２）放出を示す。

【００１８】

【図５】図５は、基礎条件に対する炎症条件におけるｓＴＮＦＲ２放出の比として計算された、ＵＣ－ＭＳＣによるｓＴＮＦＲ２放出の炎症刺激指数（ＩＳＩ）を示す。

【００１９】

【図６】図６は、患者における観察を示す。ＣＯＶＩＤ－１９急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を有する被験体（ｎ＝２４）における可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ｓＴＮＦＲ２）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、および腫瘍壊死因子β（ＴＮＦβ）の血漿濃度。

６日目では、ＵＣ－ＭＳＣレシピエントは、コントロールと比較して、血漿ｓＴＮＦＲ２の有意に上昇したレベル、ならびにＴＮＦαおよびＴＮＦβの有意に減少したレベルを有した。データは、メジアン値および最小から最大値を示す箱ひげ図として、ならびに個々の値を示す線付き散布図として示される。

【００２０】

【図７】図７は、異なるドナーからの、および異なる培養継代でのＵＣ－ＭＳＣ調製物のｓＴＮＦＲ２炎症刺激指数（ＩＳＩ）を示す。ＩＳＩ値を、静的ｓＴＮＦＲ２放出アッセイを介して得た。ヒストグラムは、３連の試験からの平均ｓＴＮＦＲ２　ＩＳＩを示す；エラーバーは、平均の標準誤差を示す。Ａ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｓｔ　継代２；　Ｂ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｓｔ　継代４；　Ｃ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｓｔ　継代５；　Ｄ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｒ０１　継代４；　Ｅ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｒ０１　継代５；　Ｆ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－ＭＣＢ－１　バッチ１　継代２；　Ｇ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－ＭＣＢ－１　バッチ２　継代２；　Ｈ：ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－ＭＣＢ－１　継代４。

【００２１】

【図８】図８は、トリパンブルー生存率試験の細胞の計数に関するダイヤグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【００２２】

詳細な説明

本発明の実施形態に対して詳細に参照がなされる。その例は、図面および実施例中で例証される。しかし、本発明は、多くの異なる形態において具現化され得、本明細書で示される実施形態に限定されると解釈されるべきではない。

【００２３】

別段定義されなければ、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。用語「含む、包含する（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」およびそのバリエーションは、本明細書で使用される場合、用語「含む、包含する、が挙げられる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」およびそのバリエーションと同義語的に使用され、オープンで非限定的な用語である。用語「含む、包含する（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」および用語「含む、包含する、が挙げられる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」は、種々の実施形態を記載するために本明細書で使用されており、用語「から本質的になる」および「からなる」は、より具体的な実施形態を提供するために「含む、包含する（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」および「含む、包含する、が挙げられる（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」の代わりに使用され得、同様に開示される。本開示および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ａ（１つの、ある）」、「ａｎ（１つの、ある）」、「ｔｈｅ（上記、この、その）」は、文脈が別段明らかに規定しなければ，複数形への言及を含む。

【００２４】

以下の定義は、本明細書において使用される用語の十分な理解のために提供される。

【００２５】

用語法

用語「約」とは、量、パーセンテージなどのような測定可能な値に言及するときに本明細書で使用される場合、その測定可能な値から±２０％、±１０％、±５％、または±１％の変動を包含することが意味される。

【００２６】

被験体への「投与」または「投与すること（ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｉｎｇ）」は、被験体に薬剤を導入または送達する任意の経路を含む。投与は、任意の適切な経路（経口、静脈内、腹腔内、鼻内、吸入などが挙げられる）によって行われ得る。投与は、自己投与および他者による投与を含む。

【００２７】

「コントロール」は、比較目的のために実験で使用される代わりの被験体またはサンプ

ルである。コントロールは、「陽性」または「陰性」であり得る。

【００２８】

用語「増加した（ｉｎｃｒｅａｓｅｄ）」または「増加する」は本明細書で使用される場合、一般に、統計的に有意な量による増加を意味する； 例えば、「増加した」は、参照レベルと比較した場合、少なくとも１０％の増加、例えば、少なくとも約２０％、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％の増加、もしくは１００％までおよび１００％を含む増加、または参照レベルと比較した場合、１０～１００％の間の任意の増加、または参照レベルと比較した場合、少なくとも約２倍、もしくは少なくとも約３倍、もしくは少なくとも約４倍、もしくは少なくとも約５倍もしくは少なくとも約１０倍の増加、または２倍～１０倍もしくは１０倍超の間の任意の増加を意味する。

【００２９】

用語「低減した（ｒｅｄｕｃｅｄ）」、「低減する」、「低減」、または「減少する（ｄｅｃｒｅａｓｅ）」とは、本明細書で使用される場合、一般に、統計的に有意な量による減少を意味する。しかし、疑義を回避するために、「低減した」は、参照レベルと比較した場合、少なくとも１０％の減少、例えば、少なくとも約２０％、もしくは少なくとも約３０％、もしくは少なくとも約４０％、もしくは少なくとも約５０％、もしくは少なくとも約６０％、もしくは少なくとも約７０％、もしくは少なくとも約８０％、もしくは少なくとも約９０％の減少もしくは１００％までおよび１００％を含む減少、または参照レベルと比較した場合、１０～１００％の間の任意の減少を意味する。

【００３０】

本明細書で使用される場合、用語「レベル」とは、サンプル（例えば、被験体に由来するサンプル）中の標的分子の量に言及する。その分子の量は、当該技術で公知の任意の方法によって決定され得、その分子（すなわち、遺伝子、ｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、タンパク質、酵素など）の性質に一部依存する。当該技術は、ヌクレオチド（例えば、遺伝子、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡなど）、ならびにタンパク質、ポリペプチド、酵素などに関する定量方法に精通している。サンプル中の分子の量またはレベルは、絶対的な用語で決定される必要はなく、相対的な用語で決定され得ることは理解される（例えば、コントロールまたは偽または非処理のサンプルと比較した場合）。

【００３１】

本明細書で使用される場合、用語「し得る、してもよい（ｍａｙ）」、「必要に応じて、および「必要に応じて～し得る（ｍａｙ ｏｐｔｉｏｎａｌｌｙ）」とは、交換可能に使用され、その状態が起こる場合、およびその状態が起こらない場合を含むことが意味される。従って、例えば、製剤が「賦形剤を含み得る（ｍａｙ ｉｎｃｌｕｄｅ ａｎ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔ）」という陳述は、上記製剤が賦形剤を含む場合、および上記製剤が賦形剤を含まない場合を含むことが意味される。

【００３２】

本明細書で使用される場合、用語「被験体」または「宿主」とは、生きている生物（例えば、ヒト、家畜、イヌ、ネコ、および他の哺乳動物が挙げられるが、これらに限定されない哺乳動物）に言及し得る。治療剤の投与は、被験体の処置のために有効な投与量および期間で行われ得る。いくつかの実施形態において、上記被験体はヒトである。

【００３３】

「治療剤」とは、有益な生物学的効果を有する任意の組成物に言及する。有益な生物学的効果としては、治療効果（例えば、障害もしくは他の望ましくない生理学的状態の処置）および予防的効果（例えば、障害もしくは他の望ましくない生理学的状態の防止）の両方を含む。上記用語はまた、本明細書で具体的に言及される有益な薬剤の薬学的に受容可能な、薬理学的に活性な誘導体（塩、エステル、アミド、プロエージェント、活性代謝産物、異性体、フラグメント、アナログなどが挙げられるが、これらに限定されない）を包含する。用語「治療剤」が使用される場合、次いで、または特定の薬剤が特に特定される

場合、上記用語は、その薬剤自体、および薬学的に受容可能な、薬理学的に活性な、塩、エステル、アミド、プロエージェント、結合体、活性代謝産物、異性体、フラグメント、アナログなどを含むことが理解されるべきである。

【００３４】

用語「処置する」、「処置すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」、「処置」、およびその文法上のバリエーションは、本明細書で使用される場合、感染もしくは状態の１もしくはこれより多くの付随する症状を部分的にもしくは完全に遅らせる、緩和する、軽減する、またはその強度を低減する、ならびに／あるいはＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）の１もしくはこれより多くの症状を緩和する、軽減するもしくは妨げることを含む。本発明に従う処置は、防止的に、予防的に、緩和的にまたは治療的に適用され得る。予防的処置は、開始前に（例えば、感染の明らかな徴候の前に）、早期の開始の間に（例えば、感染の初期徴候および症状の際に）、感染の発生の確立後に、被験体に投与される。予防的投与は、感染の出現の数分から数ヶ月前に行い得る。

【００３５】

方法

いくつかの局面において、複数の細胞の免疫調節活性を試験するための方法であって、上記方法は、

ａ．　上記複数の細胞を、細胞の第１群および細胞の第２群へと分離すること；

ｂ．　上記細胞の第１群を基礎条件において培養し、上記細胞の第２群を炎症条件において培養すること；

ｃ．　上記細胞の第１群の培養上清、上記細胞の第２群の培養上清、上記細胞の第１群の細胞、および上記細胞の第２群の細胞を収集すること；

ｄ．　上記第１群の培養上清および上記第２群の培養上清中の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを決定すること；

ｅ．　上記第１群および上記第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを、ステップｃにおいて収集した上記細胞の群それぞれの全タンパク質レベルで正規化すること；

ｆ．　上記第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルを上記第１群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルで除算することによって、炎症刺激指数（ＩＳＩ）を計算すること；ならびに

ｇ．　上記ＩＳＩが１より高い場合に、上記複数の細胞が免疫調節活性を有することを決定すること、

を包含する方法が、本明細書で開示される。

【００３６】

可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（可溶性ＴＮＦＲ２）がまた、ｓＴＮＦＲ２、ｓＴＮＦ－ＲＩＩ、ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ、ＣＤ１２０ｂ、ＴＢＰＩＩ、ＴＮＦ－Ｒ－ＩＩ、ＴＮＦ－Ｒ７５、ＴＮＦＢＲ、ＴＮＦＲ１Ｂ、ＴＮＦＲ２、ＴＮＦＲ８０、ｐ７５、ｐ７５ＴＮＦＲ、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーメンバー１Ｂ、ＴＮＦレセプタースーパーファミリーメンバー１Ｂ（これは、遺伝子「ＴＮＦレセプタースーパーファミリーメンバー１Ｂ」またはＴＮＦＲＳＦ１Ｂの生成物である）として公知であることは、理解されるべきであり、本明細書で企図される。

【００３７】

本明細書で使用される用語「免疫調節活性（ｉｍｍｕｎｏｍｏｄｕｌａｔｏｒｙ　ａｃｔｉｖｉｔｙ）」は、炎症活性を減少させるという活性（例えば、超炎症性（例えば、サイトカインストーム）または超免疫応答のモジュレーションを含む）に言及する。いくつかの実施形態において、上記免疫調節活性は、抗炎症効果である。

【００３８】

いくつかの実施形態において、上記複数の細胞は、ヒト間葉系幹細胞、もしくは間葉系間質細胞、医療用シグナル伝達細胞、または複能性間質細胞を含む。いくつかの実施形態において、上記細胞は、出生後の膵島または膵臓組織、出生後の脂肪組織、膝蓋下脂肪体、出生後の骨髄、出生後の子宮内膜、出生後の歯髄、周産期の臍帯、周産期の絨毛膜、周

産期の羊膜、または周産期の胎盤のような器官および組織に由来する。いくつかの実施形態において、上記複数の細胞は、間葉系幹細胞を含む。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「間葉系幹細胞」または「ＭＳＣ」は、間葉系細胞系統（すなわち、骨芽細胞、軟骨芽細胞および脂肪細胞）に分化し得る細胞である。当業者に周知の形態的および機能的基準は、これらの細胞を特定するために使用される。Ｈｏｒｗｉｔｚら，前出； Ｄｏｍｉｎｉｃｉら，前出； Ｔｒｉｖｅｄｉ Ｐ & Ｈｅｍａｔｔｉ Ｐ，「Ｄｅｒｉｖａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ」， Ｅｘｐ． Ｈｅｍａｔｏｌ． Ｊａｎ． ５， ２００８； Ｔｒｉｖｅｄｉ Ｐ & Ｈｅｍａｔｔｉ Ｐ，「Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＤ３４＋ ｐｒｉｍｉｔｉｖｅ ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ＣＤ５６＋ ｍｅｓｅｎｃｈｙｍａｌ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｃｏｃｕｌｔｕｒｅｄ ｗｉｔｈ ｍｕｒｉｎｅ ＯＰ９ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ」， Ｅｘｐ． Ｈｅｍａｔｏｌ． ３５： １４６－１５４（２００７）；および米国公開特許出願番号２００６／０００８９０２（これらの各々は、その全体において示されるかのように本明細書に参考として援用される）を参照のこと。間葉系幹細胞またはＭＳＣは、それらの特徴的な単核の卵形、星形または紡錘形で、丸～楕円の核を有することによって認識され得る。楕円の細長い核は、代表的には、顕著な核小体およびヘテロクロマチンおよびユークロマチンの混在を有する。これらの細胞は、細胞質をほとんど有しないが、核から延びるようである多くの薄い突起を有する。間葉系幹細胞またはＭＳＣは、造血系統細胞マーカー（例えば、ＣＤ１４、ＣＤ３４、またはＣＤ４５）および内皮系統細胞マーカー（例えば、ＣＤ３１およびＶＥ－カドヘリン）に関しては陰性であるが、以下のマーカーのうちの１つ、２つ、３つまたはこれより多くのものに関して染色し得る： ＣＤ２９、ＣＤ４４、ＣＤ７３、ＣＤ９０、ＣＤ１０５、ＣＤ１０６（ＶＣＡＭ）、ＣＤ１６６（ＡＬＣＡＭ）、およびアルカリホスファターゼ。間葉系幹細胞またはＭＳＣは、マーカーとしてＳＴＲＯ－１および／またはＣＤ１４６も発現し得る。

【００４０】

いくつかの実施形態において、上記炎症条件は、ＴＮＦαおよび／またはＩＦＮγを含む。いくつかの実施形態において、上記炎症条件は、ＴＮＦβ、ＩＬ－１β、結合組織成長因子（ＣＴＧＦ）をさらに含む。よって、いくつかの例では、上記細胞の第２群は、ＴＮＦα、ＩＦＮγ、ＴＮＦβ、ＩＬ－１β、もしくはＣＴＧＦ、またはこれらの任意の組み合わせを含む細胞培養培地中で培養される。

【００４１】

上記細胞は、少なくとも１分間、少なくとも１時間、少なくとも１日間、少なくとも２日間、少なくとも３日間、少なくとも４日間、少なくとも５日間、少なくとも６日間、少なくとも７日間、少なくとも８日間、少なくとも９日間、少なくとも１０日間、少なくとも１５日間、少なくとも２０日間、少なくとも３０日間、または少なくとも６０日間、培養され得る。いくつかの実施形態において、上記細胞は、少なくとも１日間培養される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、少なくとも２日間培養される。いくつかの実施形態において、上記細胞は、少なくとも３日間培養される。

【００４２】

ＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置することを必要とする被験体においてＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、本明細書で開示される方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される、方法がまた、本明細書で開示される。

【００４３】

よって、いくつかの局面において、ＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置することを必要とする被験体においてＣＯＶＩＤ－１９関連急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を処置する方法であって、上記方法は、
上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、
ａ．　上記複数の細胞を、細胞の第１群および細胞の第２群へと分離すること；
ｂ．　上記細胞の第１群を基礎条件において培養し、上記細胞の第２群を炎症条件において培養すること；
ｃ．　上記細胞の第１群の培養上清、上記細胞の第２群の培養上清、上記細胞の第１群の細胞、および上記細胞の第２群の細胞を収集すること；
ｄ．　上記第１群の培養上清および上記第２群の培養上清中の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを決定すること；
ｅ．　上記第１群および上記第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを、ステップｃにおいて収集した上記細胞の群それぞれの全タンパク質レベルで正規化すること；
ｆ．　上記第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルを上記第１群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルで除算することによって、炎症刺激指数（ＩＳＩ）を計算すること；ならびに
ｇ．　上記ＩＳＩが１より高い場合に、上記複数の細胞が免疫調節活性を有することを決定すること、
を包含する方法を使用して、免疫調節活性を有するとして決定される、
方法が本明細書で開示される。

【００４４】
いくつかの実施形態において、上記複数の細胞は、１より高いＩＳＩを有するとして決定される。

【００４５】
「ＡＲＤＳ」または「急性呼吸窮迫症候群」とは、肺にあるごく小さな弾力性のある気嚢（肺胞）に液体が蓄積した場合に起こる疾患に言及する。ＡＲＤＳの症状としては、例えば、極度の呼吸困難、息切れ、および／または血中の低酸素レベルが挙げられ、それはまた、錯乱、眩暈、過度の発汗、低血圧、心拍数の上昇を含む一連の他の症状を生じる。ＡＲＤＳは、肺胞における炎症性の変化の結果であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される上記細胞の投与は、例えば、極度の呼吸困難、息切れ、および／または血中の低酸素レベルを含む症状のうちの１またはこれより多くのものを軽減し得る。いくつかの実施形態において、上記細胞の投与は、上記被験体において炎症を減少させる。いくつかの実施形態において、上記細胞の投与は、上記被験体においてＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２ウイルスのレベルを減少させる。本明細書で使用される用語「増加する」および「減少する」が、上記被験体の処置の前と比較した場合の、または一般的集団または試験集団におけるこのような症状の発生率と比較した場合の、増加または減少に言及し得ることは、理解されるべきであり、本明細書で企図される。

【００４６】
炎症性障害および／または線維症を処置することを必要とする被験体において炎症性障害および／または線維症を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、本明細書で開示される方法を使用して免疫調節活性を有するとして決定される方法がまた、本明細書で開示される。

【００４７】
よって、いくつかの局面において、炎症性障害および／または線維症を処置することを必要とする被験体において炎症性障害および／または線維症を処置する方法であって、上記方法は、上記被験体に複数の細胞を投与することを含み、ここで上記細胞は、
ａ．　上記複数の細胞を、細胞の第１群および細胞の第２群へと分離すること；
ｂ．　上記細胞の第１群を基礎条件において培養し、上記細胞の第２群を炎症条件において培養すること；

ｃ．　上記細胞の第１群の培養上清、上記細胞の第２群の培養上清、上記細胞の第１群の細胞、および上記細胞の第２群の細胞を収集すること；
ｄ．　上記第１群の培養上清および上記第２群の培養上清中の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを決定すること；
ｅ．　上記第１群および上記第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質のレベルを、ステップｃにおいて収集した上記細胞の群それぞれの全タンパク質レベルで正規化すること；
ｆ．　上記第２群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルを上記第１群の可溶性ＴＮＦＲ２タンパク質の正規化されたレベルで除算することによって、炎症刺激指数（ＩＳＩ）を計算すること；ならびに
ｇ．　上記ＩＳＩが１より高い場合に、上記複数の細胞が免疫調節活性を有することを決定すること、
を包含する方法を使用して、免疫調節活性を有するとして決定される、
方法が本明細書で開示される。

【００４８】

いくつかの実施形態において、上記複数の細胞は、１より高いＩＳＩを有するとして決定される。

【００４９】

いくつかの実施形態において、任意の前述の局面の方法は、上記被験体に治療上有効な量の抗ＣＯＶＩＤ治療剤を投与することをさらに包含する。

【００５０】

一実施形態において、上記抗ＣＯＶＩＤ治療剤は、以下のうちの１またはこれより多くのものである：　バリシチニブ、ルキソリチニブ、トファシチニブ、イマチニブ、フルボキサミン、メチルプレドニゾロン、ロピナビル、リトナビル、ダルナビル、ファビピラビル、レムデシビル、ソホスブビル／ダクラタスビル、ニルマトレルビル、ブデソニド、アルテスナート、Ｉ型インターフェロン、テルミサルタン、ニタゾキサニド、ニクロサミド、ブロムヘキシン、ドルナーゼアルファ、デクスメデトミジン、フルオキセチン、サビザブリン、リバビリン、モルヌピラビル、ダノプレビル、ベムニホスブビル、ガリデシビル、ＢＣＸ－４４３０、オパガニブ、アルビドール、クロロキン、デキサメタゾン、ヘパリン、ニタゾキサニド、トシリズマブ、サリルマブ、レビリマブ、シルツキシマブ、クラザキズマブ、シルクマブ、オロキズマブ、アナキンラ、カナキヌマブ、マブリリムマブ、レンジルマブ、ギムシルマブ、オチリマブ、ＴＪ００３２３４、エマパルマブ、アダリムマブ、インフィキシマブ（Ｉｎｆｉｘｉｍａｂ）、セクキヌマブ、イキセキズマブ、リサンキズマブ、ルホトレルビル）、エンソビベプ、フェンレチニド、リンタトリモド、ベムセンチニブ、プリチデプシン、エメチン塩酸塩、スズプロトポルフィリン、アントロキノノール、二メシル酸アピリモド（Ａｐｉｌｉｍｏｄ　ｄｉｍｅｓｙｌａｔｅ）、ブレキナル、ブリラシジン、サンギバマイシン、テンポール（Ｔｅｍｐｏｌ）、ＲＰ－７２１４、ＰＢＩ－０４５１、およびマシチニブ。

【００５１】

一実施形態において、静的ｓＴＮＦＲ２放出アッセイにおいて、細胞は、別個の培養容器中で培養され、炎症培地またはコントロール（基礎）培地に曝される。次いで、ｓＴＮＦＲ２の値は、それぞれの培地中で測定され、正規化され、上記条件において測定されるｓＴＮＦＲ２の間の比が計算される。

【００５２】

図７は、異なるドナーからの、異なる培養継代でのＵＣ－ＭＳＣ調製物でのｓＴＮＦＲ２炎症刺激指数（ＩＳＩ）を示す。ＩＳＩ値を、静的ｓＴＮＦＲ２放出アッセイを介して得た。そのヒストグラムは、三連の試験からの平均ｓＴＮＦＲ２　ＩＳＩを示す；エラーバーは、平均の標準誤差を示す。Ａ：　ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｓｔ　継代２；　Ｂ：　ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｓｔ　継代４；　Ｃ：　ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｓｔ　継代５；　Ｄ：　ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｒ０１　継代４；　Ｅ：　ＵＣ－　ＭＳＣ　ＳＣＩ－Ｒ０１　継代５；　Ｆ：　ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－ＭＣＢ－１　バッチ１　継代２；　Ｇ：　ＵＣ－

ＭＳＣ　ＳＣＩ－ＭＣＢ－１　バッチ２　継代２；　Ｈ：　ＵＣ－ＭＳＣ　ＳＣＩ－ＭＣＢ－１　継代４。

【００５３】

一実施形態において、動的なｓＴＮＦＲ２放出アッセイにおいて、同じ細胞調製物が固定して維持され、培養培地が上記細胞の周りを流れる（「灌流（ｐｅｒｉｆｕｓｉｏｎ）」）。この実施形態において、その同じ細胞が、異なる時間範囲の間に、固定された細胞の周りに異なる組成を有する培地の流動を介して、基礎条件および炎症条件培地に動的に曝され得る。サンプルは、灌流アッセイ全体を通じて異なる時点で収集され、ｓＴＮＦＲ２放出の値が種々のサンプルにおいて測定され得、その差異が、基礎培地と比較して、炎症培地への曝露後に測定されるｓＴＮＦＲ２の量において計算され得る。チャンバに固定された細胞の周りで培地の自動化灌流を行うための機器は、市販されている。

【００５４】

ｓＴＮＦＲ２放出における差異（「デルタｓＴＮＦＲ２」、または「ΔｓＴＮＦＲ２」と称される）、およびｓＴＮＦＲ２放出における変化の動態は、複数の細胞調製物を比較する場合に有用である。

【００５５】

ｓＴＮＦＲ２値の正規化は、好ましい実施形態において示されるように、インビトロ実験の結論における細胞タンパク質含有量に基づき得る。

【００５６】

他の実施形態において、ｓＴＮＦＲ２の正規化は、初期の播種における細胞数、または細胞播種密度、または培養培地中の細胞濃度に基づき得る。

【００５７】

一実施形態において、上記培養培地は、１０％　血小板溶解物を含む。他の実施形態において、上記培養培地は、９％、または８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％　血小板溶解物を含む。他の実施形態において、上記培養培地は、血小板溶解物を含まない。

【００５８】

一実施形態において、上記培養培地は、化学的に規定された培養培地である。

【００５９】

一実施形態において、炎症誘導は、ＴＮＦαおよびＩＦＮγの添加に基づく。他の実施形態において、炎症誘導は、ＴＮＦα、またはＴＮＦβ、またはＩＦＮγ、または他の炎症性サイトカインの添加に基づく。

【００６０】

ある特定の実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～１５０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～１２５００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～１００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～７０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～４０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～４０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～３０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～２５００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～２０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～１５００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、０～１０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、１００～１５００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、５００～２５００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、５００～２０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、５００～１５００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、５００～１０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、５００～４０００ｐｇ／ｍｌである。一実施形態において、ＴＮＦαの濃度は、１００～４０００ｐｇ／ｍｌである。

【００６１】
ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、０～２００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、０～１５０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、０～１００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、０～５０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、５００～５０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、５００～１００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、１００～１００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、１００～７５００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、１００～５０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、１００～２００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＴＮＦβの濃度は、５００～２００００ｐｇ／ｍｌである。
【００６２】
ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～１００００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～５０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～２０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～１７５０ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～１５００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～１２５０ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、０～１０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、５００～１５００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、５００～１２５０ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、１００～１０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、１００～２０００ｐｇ／ｍｌである。ある特定の実施形態において、ＩＦＮγの濃度は、５００－２０００ｐｇ／ｍｌである。
【００６３】
他の実施形態において、ｓＴＮＦＲ２放出に関して分析される上記細胞は、懸濁培養で培養される。
【００６４】
他の実施形態において、ｓＴＮＦＲ２放出に関して分析される上記細胞は、撹拌なしもしくは撹拌ありのいずれかでマイクロキャリアに接着した状態で、または懸濁した状態で培養される。
【００６５】
ある特定の実施形態において、ｓＴＮＦＲ２放出に関して分析される上記細胞は、マトリクスに接着している。
【００６６】
他の実施形態において、ｓＴＮＦＲ２放出に関して分析される上記細胞は、材料中の孔を通るｓＴＮＦＲ２の動きを可能にするその材料に埋め込まれる。
【００６７】
ある特定の実施形態において、上記細胞は、マトリクス上へと接着させるか、または容器への封入によって固定され、培養培地は、インビトロシステムにおいて上記細胞の周りを流動される（灌流）。その流体、すなわち、培養培地、または薬物を含む溶液、または細胞の懸濁物は、インビトロシステムの中を流動して、上記細胞と接触する。この方法を用いると、その固定細胞からのｓＴＮＦＲ２の放出の動態が詳細に分析され、異なるサンプルが、経時的におよび／またはコントロール培地もしくは炎症誘導培地への曝露後に収集され得る。
【００６８】
本明細書で示される標準化されたインビトロ方法を利用して、細胞調製物をスクリーニングし、その目的がｓＴＮＦＲ２のインビボ濃度を増加させる、ならびに／またはＴＮＦαおよび／もしくはＴＮＦβのインビボ濃度を減少させることである場合に、臨床上の有

効性に関する最大の潜在力を有する調製物を選択し得る。
【００６９】
この方法は、細胞集団のインビボでの有効性および効果を推測する潜在力を有して、ｓＴＮＦＲ２の放出に関連するインビトロ効力に基づいて細胞集団の選択を可能にする。
【実施例】
【００７０】
以下の実施例は、本開示の主題に従う組成物、方法、および結果を例証するために以下に示される。これらの実施例は、本明細書で開示される主題の全ての局面の例証であることが意図されるのではなく、むしろ、代表的な方法および結果を例証することが意図される。これらの実施例は、当業者に明らかな本発明の均等物および変形期待を排除することは意図されない。
【００７１】
実施例１．　培養したＵＣ－ＭＳＣによるｓＴＮＦＲ２放出の測定
本開示の一実施形態は、炎症性メディエーターの存在下または非存在下で、正規化されたＥＬＩＳＡ定量および炎症刺激指数（ＩＳＩ）を介して、培養したＵＣ－ＭＳＣによるｓＴＮＦＲ２放出を測定する方法である。これは、代表的方法であり、上記方法における変形形態は、本開示の範囲内である。
【００７２】
間葉系幹細胞（ＭＳＣ）は、ヒトの胚に起源があり、成人複能性幹細胞と考えられる。ＭＳＣは、間質幹細胞の不均一なサブセットであり、これは、骨髄、動員末梢血（ｍｏｂｉｌｉｚｅｄ　ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｂｌｏｏｄ）、臍帯血、臍帯（ＵＣ）、胎盤、脂肪組織、歯髄、ならびにさらには胎児肝臓および肺から単離され得る。ＵＣは、２本の臍動脈（ＵＣＡ）および１本の臍静脈（ＵＣＶ）を含み、これらはともに、羊膜上皮によって覆われるウォートンゼリー（Ｗｈａｒｔｏｎ’ｓ　ｊｅｌｌｙ）（ＷＪ）として公知の特定の粘液様結合組織内に埋め込まれる。ＵＣは、医療廃棄物とみなされており、非侵襲性の様式で収集される。さらに、ＵＣへのアクセスは、倫理的な問題で妨げられたことはない。ＵＣ－ＭＳＣは、他の供給源に由来するＭＳＣに類似であり、それらの複能性、すなわち、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、ニューロン、および肝細胞へと分化する能力を維持しながら自己再生のための別個の能力を有するが、いくつかの分化能力が、部分的であることが公知である。さらに、ＭＳＣは、それらの強力な免疫調節特性、抗炎症特性、および修復特性に起因して、治療モダリティーとして提案されている。
【００７３】
ＵＣ－ＭＳＣ処置は顕著な臨床上の利益（生存の有意な改善、重篤な有害事象のない生存、およびＣＯＶＩＤ－１９急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を有する患者における回復までの時間が挙げられる）と関連することが観察された。注入後６日目で、ＵＣ－ＭＳＣレシピエントは、コントロールと比較して、血漿可溶性ＴＮＦレセプター２（ｓＴＮＦＲ２）の有意に増加したレベル、ならびにＴＮＦαおよびＴＮＦβの有意に減少したレベルを生じさせることが示された。それらの観察は、ｓＴＮＦＲ２が、ＣＯＶＩＤ－１９　ＡＲＤＳにおける炎症の減少を決定する、ＴＮＦαおよびＴＮＦβ血漿レベルに対するＵＣ－ＭＳＣ効果を媒介することにおいて機構的な役割を果たすことを示唆した。
【００７４】
この試験は、炎症性メディエーターの存在下または非存在下で、正規化されたＥＬＩＳＡ定量および炎症刺激指数（ＩＳＩ）を介して、培養したＵＣ－ＭＳＣによって放出されるｓＴＮＦＲ２（ＵＣ－ＭＳＣ処置の抗炎症効果の中心的なメディエーター）の測定を提供する。
【００７５】
定義
Ａ．　ＧＭ：　成長培地
Ｂ．　ＩＩＭ：　炎症誘導培地
Ｃ．　ＩＳＩ：　炎症刺激指数

Ｄ．　ＭＳＣ：　間葉系幹細胞
Ｅ．　効力：　生成物が所定の結果をもたらす特定の能力またはキャパシティ
Ｆ．　ＳＯＰ：　標準作業手順
Ｇ．　ｓＴＮＦＲ２：　可溶性ＴＮＦレセプター２
Ｈ．　ＵＣ－ＭＳＣ：　臍帯由来間葉系幹細胞
Ｉ．　ＷＲ：　作業試薬。

【００７６】

機器および材料

Ａ．　機器：
１．　生物学的安全キャビネット（ＢＳＣ）
２．　遠心分離機
３．　血球計算板とカバースリップ
４．　インキュベーター
５．　マイクロピペット（２～２０μｌ、２０～２００μｌ、１００～１０００μｌ）
６．　マイクロプレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）　ｉＤ３、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）
７．　顕微鏡
８．　マルチチャネルピペット
９．　ピペットエイド
１０．　冷蔵庫
１１．　タイマー

Ｂ．　用品：
１．　１．５ｍｌ　微量遠心チューブ
２．　１５ｍＬ　コニカルポリプロピレンチューブ
３．　ベントキャップ付き２５ｃｍ^2　矩形傾斜ネック細胞培養フラスコ
４．　９６ウェルプレート
５．　フェイスマスク
６．　ガーゼ
７．　手袋（非滅菌）
８．　手袋（滅菌）
９．　マイクロピペットチップ、滅菌：　２～２００μｌおよび１００～１０００μｌ
１０．　セロロジカルピペット、滅菌：　５ｍｌ、１０ｍｌ、２５ｍｌ、５０ｍｌ

Ｃ．　試薬：
１．　ＣＴＳ^{TM}　ＴｒｙｐＬＥ^{TM}　Ｓｅｌｅｃｔ　Ｅｎｚｙｍｅ、ｃＧＭＰグレード、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
２．　ＤＭＥＭ、低グルコース、ピルベート、グルタミンなし、フェノールレッドなし、ｃＧＭＰグレード、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
３．　ＧｌｕｔａＭＡＸ　１００Ｘ、ｃＧＭＰグレード、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
４．　ＩＦＮγ、インビトロ使用、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ
５．　ＭＥＭ－ＮＥＡＡ　１００×、ｃＧＭＰグレード、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
６．　ミクロＢＣＡプロテインアッセイキット、インビトロ使用、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
７．　ＰＬＴＧｏｌｄ、ｃＧＭＰグレード、Ｍｉｌｌ　Ｃｒｅｅｋ
８．　ＲＩＰＡ溶解および抽出緩衝液、インビトロ使用、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
９．　可溶性ＴＮＦレセプター２　ヒト、ＥＬＩＳＡ　ＫＩＴ、インビトロ使用、Ａｂｃａｍ
１０．　ＴＮＦα、インビトロ使用、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ
１１．　ヒトＴＮＦ－ＲＩＩ（可溶性）組換えタンパク質、インビトロ使用、Ｔｈｅｒｍ

ｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ
Ｄ．　方法：
１．　ＵＣ－ＭＳＣ効力アッセイ：　バッチ生成記録。
２．　培地および試薬調製：　炎症誘導培地および可溶性ＴＮＦレセプター２ヒト試薬
３．　標準曲線調製：　可溶性ＴＮＦレセプター２ヒト標準および希釈アルブミン（ＢＳＡ）標準
【表１】
表 1. BSA

バイアル	希釈液の体積	BSAの体積および供給源	
A	900	100	ストック
B	800	200	A
C	400	400	B
D	400	400	C
E	400	400	D
F	400	400	E
G	480	320	F
H	400	400	G
I	800	0	希釈液

【表２】
表 2. レイアウト BSA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	標準 A		標準 I		-	バッチ 42 IIM B			-	-	-	-
B	標準 B		バッチ 40 IIM A			バッチ 42 IIM C			-	-	-	-
C	標準 C		バッチ 40 IIM B			バッチ 42 BM A			-	-	-	-
D	標準 D		バッチ 40 IIM C			バッチ 42 BM B			-	-	-	-
E	標準 E		バッチ 40 BM A			バッチ 42 BM C			-	-	-	-
F	標準 F		バッチ 40 BM B			-			-	-	-	-
G	標準 G		バッチ 40 BM C			-			-	-	-	-
H	標準 H		バッチ 42 IIM A			-			-	-	-	-

【表３】
表 3. ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	標準 1		バッチ 40 IIM A			バッチ 42 IIM C			-	-	-	-
B	標準 2		バッチ 40 IIM B			バッチ 42 BM A			-	-	-	-
C	標準 3		バッチ 40 IIM C			バッチ 42 BM B			-	-	-	-
D	標準 4		バッチ 40 BM A			バッチ 42 BM C			-	-	-	-
E	標準 5		バッチ 40 BM B			誘導誘導培地			-	-	-	-
F	標準 6		バッチ 40 BM C			基礎培地			-	-	-	-
G	標準 7		バッチ 42 IIM A			-			-	-	-	-
H	標準 8		バッチ 42 IIM B			-			-	-	-	-

【００７７】
さらなる考慮事項
Ａ．　一実施形態において、少なくとも２名の予め訓練され、かつ資格のあるｃＧＭＰ関

係者が、この手順全体を通して存在するべきである。一実施形態において、全ての計算手順は、存在している第二のスタッフメンバーによって検証されるべきである。
Ｂ．　一実施形態において、ここで記載される製造プロセスは、複数のステップを含み、完了するのに６日間かかる。製品製造に関与するｃＧＭＰ施設職員は、プロセスの各ステップにおいて記録を出すべきである。
Ｃ．　一実施形態において、細胞播種および拡大は、滅菌／無菌技術を使用して行われるべきである。これは、安全キャビネット（ＢＳＣ）の中での作業を含む。
Ｄ．　一実施形態において、この手順において使用される全ての供給物、培地および試薬の製造業者、ロット番号および有効期限は、記録されるべきである。
Ｅ．　一実施形態において、ｓＴＮＦＲ２ヒトＥＬＩＳＡ　ＫＩＴからの全てのサンプルおよび試薬は、使用前に室温（１８～２５℃）にすること。
Ｆ．　一実施形態において、開封したマイクロプレートウェルまたは試薬は、－２０℃で最長１ヶ月間貯蔵してもよい。

【００７８】

手順

Ａ．　培地、試薬、および標準物調製
１．　培地調製
１．１　成長培地（ＧＭ）
培地を一瓶調製するために、以下に示される順に以下の試薬を添加する：
ａ．　１０００ｍｌ　ＤＭＥＭ
ｂ．　５４ｍｌ　ＰＬＴＧｏｌｄＴＭ（５％　ＰＬＴＧｏｌｄ）
ｃ．　１０．８ｍｌ　ＧｌｕｔａＭＡＸ　Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ　２００ｍＭ
ｄ．　１０．８ｍｌ　ＭＥＭ－ＮＥＡＡ、以下とともに培地に１０ｍＭの表示をする：
・　培地名
・　調製日
・　有効期限（調製後１４日間）
・　培地を調製するｃＧＭＰ施設職員のイニシャル
１．２　炎症誘導培地（ＩＩＭ）
注：　３日目の使用前に培地を調製すること。
４５ｍｌのＩＩＭを調製するために、以下に示される順に以下の試薬を添加する：
ａ．　４４．５ｍｌ　ＧＭ
ｂ．　２２５μｌ　ＩＦＮγ（最終濃度：　１０ｎｇ／ｍｌ）
ｃ．　３３７．５μｌ　ＴＮＦα（最終濃度：　１５ｎｇ／ｍｌ）　以下とともに培地に表示する：
・　培地名
・　調製日
・　新鮮なものを使用する
・　培地を調製するｃＧＭＰ施設職員のイニシャル
２．　試薬調製（可溶性ＴＮＦレセプター２ヒトＥＬＩＳＡキット）

【表４】

表4

試薬	調製
１×アッセイ希釈液B	５×アッセイ希釈液Bを、使用前に脱イオン水で5倍希釈するべきである
１×洗浄溶液	20×洗浄濃縮物は目に見える結晶を含む場合、室温へと平衡化し、溶解するまで穏やかに混合すること。20ml洗浄緩衝液を脱イオン水へと希釈して、400mlの１×洗浄緩衝液を得る。
１×ビオチン化可溶性TNFレセプター2検出抗体	ビオチン化抗ヒト可溶性TNFレセプター2バイアルを、使用前に短時間遠心する。100μlの１×アッセイ希釈液Bをバイアルへと添加して、検出抗体濃縮物を調製する。ピペットで上下させて、穏やかに混合する。検出抗体濃縮物を、アッセイ手順において使用する前に１×アッセイ希釈液Bで80倍希釈するべきである。
1X HRP－ストレプトアビジン溶液	500×HRP－ストレプトアビジン濃縮物バイアルを短時間遠心し、使用前にピペットで上下させて、穏やかに混合する。HRP－ストレプトアビジン濃縮物を１×アッセイ希釈液Bで500倍希釈する（例えば、20μlの500×HRP－ストレプトアビジン濃縮物を10ml １×アッセイ希釈液Bの入ったチューブに添加して、最終の500倍希釈した１×HRP－ストレプトアビジン溶液を調製する）。希釈した溶液は、翌日の使用のために貯蔵されるべきではない。

３．　可溶性ＴＮＦレセプター２ヒト標準物の調製

注：　製造業者の推奨に従って、使用直前に段階希釈した標準物を調製すること。使用ごとに新鮮な一連の標準物を常に調製すること。

３．１　１バイアル（１バイアル／標準曲線）のみを再構成する

３．２　ｓＴＮＦＲ２標準物のバイアルを短時間遠心する。４００μｌの１×アッセイ希釈液Ｂをそのバイアルに添加することによって、５０ｎｇ／ｍｌ　ストック標準物を調製する。完全にかつ穏やかに混合する。

３．３　１～３の希釈率での段階標準希釈物について、チューブ＃１～７に表示をする。

３．４　４０μｌの５０ｎｇ／ｍｌ　ストック標準物を、チューブ＃１の９６０μｌの１×アッセイ希釈液Ｂに添加することによって、標準物＃１を調製する。完全にかつ穏やかに混合する。

３．５　４００μｌの１×アッセイ希釈液Ｂを残りのチューブにピペットで移す。

３．６　２００μｌ　標準物＃１をチューブ＃２に添加することによって標準物＃２を調製し、完全に混合する。

３．７　２００μｌ　標準物＃２をチューブ＃３に添加することによって標準物＃３を調製し、完全に混合する。

３．８　図２をガイドとして使用し、さらなる段階希釈物を調製する（表５を参照のこと）。

３．９　１×アッセイ希釈液Ｂ（チューブ８：　陰性コントロール）は、ゼロ標準（０μｇ／ｍｌ）として役立つ（図１）。

【表５】

表5.可溶性TNFレセプター2ヒト標準物の調製

標準物 #	ストック標準物 (µl)	1xアッセイ 希釈液B (µl)	前の標準物から 200µlを添加する	全体積 (µl)	最終濃度
1	40	960	0	1000	2000
2	0	400	+200 µl 標準物#1	400	666.7
3	0	400	+200 µl 標準物#2	400	222.2
4	0	400	+200 µl 標準物#3	400	74.07
5	0	400	+200 µl 標準物#4	400	24.69
6	0	400	+200 µl 標準物#5	400	8.23
7	0	400	+200 µl 標準物#6	600	2.74
8 (陰性コントロール)	0	400	0	400	0

４．　希釈アルブミン（ＢＳＡ）標準物の調製

２．０ｍｇ／ｍＬ　アルブミン標準物の各１ｍＬアンプルは、各希釈物の３つの反復物を試験管手順の中に含め得るように、一連の希釈標準物を調製するために十分である。新鮮な一連の標準物を、使用ごとに調製するべきである。

４．１　蒸留水を使用して一連のタンパク質標準物を調製する。ガイドとして表６を使用する。

【表６】

表6. 希釈アルブミン(BSA)標準物の調製

バイアル	希釈液の体積	BSAの体積および供給源	最終BSA濃度
A	4.5mL	0.5mL のストック	200µg/mL
B	8.0mL	2.0mL のバイアルA希釈物	40µg/mL
C	4.0mL	4.0mL のバイアルB希釈物	20µg/mL
D	4.0mL	4.0mL のバイアルC希釈物	10µg/mL
E	4.0mL	4.0mL のバイアルD希釈物	5µg/mL
F	4.0mL	4.0mL のバイアルE希釈物	2.5µg/mL
G	4.8mL	3.2mL のバイアルF希釈物	1µg/mL
H	4.0mL	4.0mL のバイアルG希釈物	0.5µg/mL
I	8.0mL	0	0µg/mL = ブランク

４．２　以下の式を使用して、必要とされる作業試薬（ＷＲ）の全体積を決定する：［（＃標準物×２回の反復）　＋　（＃未知数×３回の反復）］　×　（１５０µｌのＷＲ）　＝　必要とされるＷＲ全体積

４．３　２５部のＭｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ａ（ＭＡ）および２４部のＲｅａｇｅｎｔ　Ｂ（ＭＢ）を、１部のＭｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｃ（ＭＣ）（２５：２４：１）と混合することによって、必要とされるＷＲ体積を調製する。

注：　ＷＲは、室温において閉じた容器の中で貯蔵される場合は、１日安定である。

Ｂ．　細胞播種および拡大

１．　ＵＣ－ＭＳＣバイアルまたはセグメント（複数可）の解凍および細胞拡大

１．１　凍結貯蔵からのＵＣ－ＭＳＣを含む１バイアルまたは２～３セグメントを取り出す。

１．２　標本バッグ中にサンプルを入れ、３７℃のウォーターバスの中でそれを、穏やかに渦を巻くように回すことによって、迅速に解凍する（小さな氷の結晶がバイアルまたはセグメント（複数可）の中に残るまで）。上記細胞を穏やかに扱って、機械的損傷を回避する。これは、３分以下で行うべきである。

１．３　サンプルがいったん解凍したら、滅菌アルコールプレップパッドを使用してそ

れを拭き取る。
１．４　そのサンプルをＢＳＣ内部に入れ、ゆっくりと上記細胞をシリンジで滅菌５０ｍｌ　コニカルチューブへと移す。
１．５　ゆっくりと滴下様式で、１０ｍｌの室温のＧＭをその同じ５０ｍＬコニカルチューブへと添加する。
１．６　細胞を５００×ｇで１０分間、室温において、「高」にブレーキを設定して遠心分離する。
１．７　細胞を遠心分離機から取り出し、上清を穏やかに吸引除去する。
１．８　そのペレットを１０ｍｌのＧＭに再懸濁し、室温へと平衡化する。
１．９　細胞計数および生存率（「トリパンブルーまたはヨウ化プロピジウム（ＰＩ）およびチアゾールオレンジ（ＴＯ）を使用する生存率試験」を行う。その結果を記録する。トリパンブルー生存率試験は、生きている（生存）細胞の細胞膜が（トリパンブルー）色素を排除し、非生存細胞がその色素を取り込む能力に基づく。細胞を、顕微鏡下で評価し、生存細胞および非生存細胞両方の計数を行って、パーセント生存率を決定する。トリパンブルーは、使用前に濾過されるべきである。細胞は、色素を添加したら直ぐに計数されるべきである。生存細胞が２～３分以内にその色素を取り込み始め、これは、低い生存率という結果をもたらす。
ａ．試薬
・　０．４％　トリパンブルー（濾過したもの）、Ｓｉｇｍａまたは同等なもの
・　リン酸緩衝化食塩水（ＰＢＳ）、ＭｅｄｉａＴｅｃｈまたは同等なもの
・　７０％　エタノール
ｂ．　手順
新鮮な細胞における生存率
１．　以下の手順は、懸濁物中で調製した新鮮な細胞に関するものである。
２．　血球計算板およびカバーガラスを徹底的にきれいにすることを確実にし、風乾する。７０％　アルコールおよびリントフリーワイプを使用する。
３．　カバースリップを両方のＶ字の切り込みを部分的に覆うように血球計算板上に置く。
４．　マイクロピペットを使用して、新鮮な細胞を完全に混合し、１００μｌを小さなチューブに入れる。
５．　１００μｌの０．４％　トリパンブルーを添加する。細胞生成物が濃すぎる場合、トリパンブルーを添加する前にＰＢＳで希釈し、十分に混合する。
６．　血球計算板に以下のように載せる：
ａ．　ピペットを使用して、１滴の上記細胞／トリパンブルー混合物を、カバースリップを乱すことなくＶ字の切り込みのうちの一方に、カバーガラスと計数チャンバとの間に入れる。その領域をゆっくりと完全に満たし、チャンバセクションの縁部で溶液が溢れでてしまう前に、ピペットを外す。
ｂ．　いっぱいにし過ぎても充填不足してもよくない。チャンバに載せすぎたか、または気泡が見える場合、過剰な液体を除去しようと試みるのではなく、チャンバをきれいにしてやり直す。
７．　回転させて４×対物レンズにし、顕微鏡のステージの上に血球計算板を注意深く配置する。
８．　およそ１分間のインキュベーション後かつ３分より前に細胞を計数する。インキュベーションの２～３分後に、生存細胞はその色素を取り込み始め、不適切な計数を生じる可能性がある。
９．　生存細胞は染色されないままである一方で、死細胞は色素を取り込んだ後青色に見える。
１０．　合計１００個の無作為の細胞において、染色されていない有核細胞に対して染色された有核細胞の数を計数する。これらの計数は、図８における１～５と番号付けされた四分円のいずれでも行い得る。

１１．　データを記録する。
１２．　以下の式を使用してパーセント生存率を計算する：
％　生存細胞　＝　生存細胞数×１００
計数した全細胞数
解凍した細胞の生存率
１．　凍結保存した細胞を迅速に解凍する。
２．　新鮮細胞手順における生存率からのステップ＃２～＃１２をたどる。
１．１０　５ｍＬ　ＧＭ／フラスコで再懸濁した５００，０００　生存細胞／フラスコ（２０．０００　細胞／ｃｍ^2）の濃度において上記細胞を６個の２５ｃｍ^2　フラスコ中に播種する（条件ごとに３フラスコ：「基礎」および炎症誘導」）。
１．１１　上記細胞を、ＧＭ中で７２時間（３日間）、３７℃、５％　ＣＯ$_2$インキュベーターの中で培養する。
Ｃ．　炎症誘導
１．　炎症誘導（ＴＮＦα／ＩＦＮγ）
１．１　使用前にＩＩＭを調製し、３７℃で加温する。
１．２　フラスコから培地を全て除去する。
１．３　５ｍｌの予め加温したＧＭを一方のフラスコに添加し、そのフラスコを「基礎」として印を付ける。
１．４　５ｍｌの予め加温したＩＩＭを他方のフラスコに添加し、そのフラスコを「炎症誘導」として印を付ける。
１．５　組織培養フラスコを、５％　ＣＯ$_2$の３７℃のインキュベーターに３日間戻す。
Ｄ．　効力アッセイ
誘導の３日目の後：
１．　ｓＴＮＦＲ２測定
注：　全ての標準物を二連で、サンプルを三連でアッセイすることが推奨される。キットに含まれる９６ウェルプレートストリップは、すぐに使える状態で供給される。
１．１　培養上清を１５ｍｌ　チューブ中に収集する。
１．２ その上清を１，５００ｒｐｍにおいて５分間遠心分離して、デブリを除去する。
１．３　上清を新たな１５ｍｌ　チューブへと穏やかに注ぐ。
１．４　その上清を、ｓＴＮＦＲ２ヒトＥＬＩＳＡキット（Ａｂｃａｍ）の１×アッセイ希釈液Ｂ（試薬調製、Ｖ、Ａ、２節）で５倍希釈する
１．５　１００μＬの各標準物を二連で（標準物調製Ｖ、Ａ、３節を参照のこと）、および各サンプル（ＵＣ－ＭＳＣサンプル、ＴＮＦＲ２標準物、培地）を三連で適切なウェルへと添加する（図２）。ウェルを覆い、一晩４℃において穏やかに振盪しながらインキュベートする。
１．５．１　ＴＮＦＲ２標準物：
ａ）　Ｈは高濃度として定義（Ｈ）
ｂ）　Ｍは中程度の濃度として定義（Ｍ）
ｃ）　Ｌは低濃度として定義（Ｌ）
１．５．２　ブランク培地：
ａ）　ＧＭ
ｂ）　ＩＩＭ
１．５．３　上清（試験サンプル）：
ａ）　上清ＧＭ（ｓＧＭ）
ｂ）　上清ＩＩＭ（ｓＩＩＭ）
１．６　翌日、溶液を廃棄し、１×洗浄溶液で４回洗浄する。各ウェルにマルチチャネルピペットまたは自動洗浄機を使用して１×洗浄溶液（３００μＬ）を満たすことによって洗浄する。最後の洗浄の後、デカントすることによっていかなる残っている洗浄緩衝液をも除去する。プレートを反転させ、きれいなペーパータオルで拭いとる。
１．７　１００μＬの１×ビオチン化可溶性ＴＮＦレセプター２検出抗体（試薬調製、

Ｖ、Ａ、２節）を各ウェルに添加する。穏やかに振盪しながら、１時間、室温においてインキュベートする。
１．８　溶液を廃棄する。洗浄をステップ１．６にあるように反復する。
１．９　１００μＬの１×ＨＲＰ－ストレプトアビジン溶液を各ウェルに添加する。穏やかに振盪しながら、４５分間、室温においてインキュベートする。
１．１０　溶液を廃棄する。洗浄をステップ１．６にあるように反復する。
１．１１　１００μＬのＴＭＢ　１工程基質試薬を各ウェルに添加する。穏やかに振盪しながら、遮光して３０分間、室温においてインキュベートする。
１．１２　５０μＬの停止溶液を各ウェルに添加する。
１．１３　そのプレートを、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ（登録商標）　ｉＤ３の中に載せ、そのプレートを４５０ｎｍで即座に読み取る。
２．　タンパク質定量
注：　ｓＴＮＦＲ２分泌は、細胞溶解物全タンパク質含有量に対して正規化される。このために、その細胞溶解物全タンパク質含有量は、「ミクロＢＣＡプロテインアッセイキット」（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）で定量される。
２．１　タンパク質溶解物
ａ．　簡潔には、上清除去後に、細胞単層を５ｍｌの冷ＤＰＢＳで２回洗浄する。
ｂ．　１ｍｌの冷ＲＩＰＡ緩衝液（４℃）を各２５ｃｍ^2　フラスコにマイクロピペットで添加する。
ｃ．　そのフラスコを４℃で５分間インキュベートする。
ｄ．　細胞溶解物を収集し、１０，０００ｒｐｍで５分間遠心分離して細胞デブリを除去する。
ｅ．　遠心分離してから、細胞溶解物を新たな微量遠心チューブに移し、タンパク質定量のためにさらに処理する。
２．２　Ｍｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙでのタンパク質定量
ａ．　ウシ血清アルブミン標準曲線（０～２００μｇ／ｍｌ）を本明細書で記載されるように準備する。
ｂ．　細胞溶解物を蒸留水で１：１００希釈する。
ｃ．　各標準物１５０μＬを二連でまたは希釈した細胞溶解物１５０μＬを三連で、９６ウェルプレートへと添加する。
ｄ．　各ウェルに、１５０μＬのＷＲ（２５：２４：１、試薬ＭＡ：ＭＢ：ＭＣ）を添加する。
ｅ．　プレート振盪機上で３０秒間完全に混合する。
ｆ．　そのプレートを３７℃で２時間インキュベートする。
ｇ．　マイクロプレートリーダーで５６２ｎｍでの吸光度を測定する。
Ｅ．　分析
１．　アッセイを、誘導フラスコおよび非誘導フラスコの３セットで行い、結果をＳｏｆｔＭａｘ　Ｐｒｏ　Ｓｏｆｔｗａｒｅを使用して分析する。
２．　ｓＴＮＦＲ２　ＥＬＩＳＡ：
２．１　各サンプルのｓＴＮＦＲ２濃度を、４パラメトリックロジスティック回帰にフィットさせたアッセイ標準曲線（０～２，０００μｇ／ｍｌ）を使用して計算する。
２．２　２つのブランク培地サンプルおよび６つの試験サンプル（３×誘導および３×非誘導）の三連のウェルの値を平均して、各ブランク／フラスコについての平均ｓＴＮＦＲ２濃度を得る。
２．３　合計８つの平均（各フラスコにつき１つ、および各ブランク培地につき１つ）があるはずである。
３．　全タンパク質ＢＣＡアッセイ：
３．１　各サンプルについての細胞溶解物全タンパク質濃度を、線形回帰にフィットさせたＭｉｃｒｏ　ＢＣＡ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａｓｓａｙ標準曲線を使用して計算する。
３．２　６つの試験サンプル（３×誘導および３×非誘導）の三連のウェルの値を平均

して、各フラスコについての平均全タンパク質を得る。
３．３　合計６つの平均（各フラスコにつき１つ）があるはずである。
４．　正規化されたｓＴＮＦＲ２計算：
４．１　全フラスコ（ＵＣ－ＭＳＣ基礎群およびＵＣ－ＭＳＣ炎症誘導群の両方）に関して、ｓＴＮＦＲ２濃度を、各フラスコのｓＴＮＦＲ２値をその相当する全タンパク質濃度値で除算することによって正規化する。
４．２　次いで、基礎培養条件においてその正規化されたｓＴＮＦＲ２を、ＵＣ－ＭＳＣ基礎の正規化されたｓＴＮＦＲ２濃度を平均することによって計算する。その得られた値は、≧０．２（ｐｇ／ｍＬ）／（全タンパク質のμｇ）であるはずである。
５．　炎症刺激指数（ＩＳＩ）計算：
５．１　ＩＳＩを、非誘導正規化されたｓＴＮＦＲ２濃度に対する誘導正規化されたｓＴＮＦＲ２濃度の比として、フラスコの各セットに関して計算する。
５．２　その３つのＩＳＩを平均し、その得られた値は≧１．５であるはずである。
【００７９】
注
Ａ．　全細胞タンパク質含有量を、使用した細胞溶解物の体積（ＲＩＰＡ、１．５ｍｌ）のおよび希釈率（１：１００）に基づいて計算する。
【００８０】
品質管理
Ａ．　ｓＴＮＦＲ２の定量に関する偽陽性結果についての潜在性を評価するために、培地サンプル（成長培地および炎症誘導培地）を分析する。
Ｂ．　標準曲線にわたる範囲に及ぶ濃度を有する外部ｓＴＮＦＲ２標準はまた、ＥＬＩＳＡキットが適切に機能することを確実にするために実行される。これらの値は、理論的濃度の２０％以内にあるべきである。
Ｃ．　誘導および非誘導ＥＬＩＳＡ反復物の％ＣＶは、正確な結果を確実にするために≦２０％であるべきである。前記％ＣＶが＞２０％である場合、１つの値は、域外値として外され得る。
Ｄ．　その標準曲線は、４パラメーターロジスティック回帰にフィットされるべきであり、許容可能と考えられる≧０．９８のＲ２値を有するはずである。Ｒ２値が＜０．９８である場合、値は、標準物の各濃度に関して少なくとも１つの値が存在する限りにおいて域外値として外され得る。
Ｅ．　使用した全ての機器は、維持されるべきである。
【００８１】
実施例２．　可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ｓＴＮＦＲ２）放出の分析に基づく免疫調節細胞に関するインビトロ効力アッセイ
免疫調節細胞に関するインビトロ効力アッセイは、可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ｓＴＮＦＲ２）放出の分析に基づいた。これは、代表的アッセイであり、アッセイプロトコールにおける変形形態は、本開示の範囲内である。
【００８２】
本明細書中の試験は、免疫調節細胞（例えば、間葉系幹細胞）の効力を決定するために、生物学的に関連するインビトロアッセイを開発したところ、適格であった。その効力アッセイは、上記細胞によって放出される可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ｓＴＮＦＲ２）の測定に焦点を当てている。それは、細胞タンパク質含有量、および上記細胞によって放出されるｓＴＮＦＲ２の炎症刺激指数（ＩＳＩ）の計算で正規化した、ＥＬＩＳＡを介するｓＴＮＦＲ２定量に基づく。ＩＳＩを、基礎条件に対する炎症誘導におけるｓＴＮＦＲ２放出の比として計算する。そのアッセイを、インビトロで培養した細胞で行う。一実施形態において、上記アッセイで分析されるべき細胞は、臍帯由来間葉系幹細胞（ＵＣ－ＭＳＣ）である。上記基礎条件は、最終細胞生成物の生成に利用される同じ培地中で上記細胞を培養することに相当する。上記炎症誘導は、これらの培養の培地中にＴＮＦα（１５ｎｇ／ｍＬ）およびＩＦＮγ（１０ｎｇ／ｍＬ）を添加することで得られる。上記細胞

は、基礎条件においてまたは培養の特定の時間量にわたる炎症誘導の下で、および好ましい実施形態では３日間の培養にわたって維持される。次いで、その上清を収集し、ｓＴＮＦＲ２定量のための市販のキット（例えば、Ａｂｃａｍ　Ｓｏｌｕｂｌｅ　ＴＮＦＲ２　Ｈｕｍａｎ　ＥＬＩＳＡ　ＫＩＴ，　Ａｂｃａｍ，　カタログ番号ａｂ１００６４３）で試験する。全細胞タンパク質含有量に基づく正規化のために、上記細胞を、ＲＩＰＡ溶解および抽出緩衝液（例えば、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，　カタログ番号８９９００）で溶解し、タンパク質含有量を、ＢＣＡ法で（例えば、ミクロＢＣＡプロテインアッセイキット（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，　カタログ番号２３２３５）で）得る。そのアッセイを図３に記載する。そのアッセイに関するＳＯＰは、本明細書中、上記の実施例１で提供される。

【００８３】

効力アッセイのデータ

実施例１に記載される方法を、Ｄｉａｂｅｔｅｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｃＧＭＰ施設で製造した「ＵＣ－ＭＳＣ最終生成物（バッチ、凍結保存）」のステージから解凍したＵＣ－ＭＳＣを用いて適用した。その実験から、炎症（ＴＮＦα／ＩＦＮγ）誘導に対して基礎培養条件下での３日間にわたるＵＣ－ＭＳＣによるｓＴＮＦＲ２放出を定量した。結果を表７、図４、および図５に示す。

【表７】

表7.

UC-MSC 培養条件	sTNFR2 反復物濃度 (pg/ml)	細胞溶解物 タンパク質濃度 (μg)	正規化された sTNFR2 (pg/ml)/μg タンパク質)	炎症刺激指数 (ISI)
基礎条件	52.7	788	0.067	1
	41.7		0.053	1
	43.4		0.055	1
	53.4		0.068	1
炎症 (TNFα/IFNγ) 誘導	97.5	576	0.169	2.527
	96.7		0.168	3.174
	90.0		0.156	2.832
	96.9		0.168	2.479

【００８４】

患者に関連するアッセイの生物学的関連性

急性呼吸窮迫症候群（ＡＲＤＳ）を有するＣＯＶＩＤ　１９患者における超炎症応答を、炎症促進性メディエーター（腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）αおよびβを含む）の高血清レベルによって特徴づける。これら２つの分子（ＡＲＤＳ病態生理に関わる）は、ＴＮＦＲ２に結合する。ＴＮＦＲ２可溶性形態は、ＴＮＦ機能に対して阻害効果を有することが報告された。本明細書中での試験は、ＣＯＶＩＤ－１９　ＡＲＤＳに関するフェーズｌ／２ａ臨床試験において、ＵＣ－ＭＳＣ処置群およびコントロール群の両方でのＴＮＦα、ＴＮＦβ、および可溶性ＴＮＦＲ２（ｓＴＮＦＲ２）の血漿レベルを調査した。ｓＴＮＦＲ２は、６日目で、コントロール群の患者と比較して、ＵＣ－ＭＳＣ処置群の患者で増加した（図６を参照のこと）。ＴＮＦαおよびＴＮＦβは、６日目で減少することが見出された。その観察は、図６に示される。

【００８５】

方法（患者における観察）

血液サンプルを、０日目（注入前）および６日目（２回目の注入の３日後）で臨床試験の無作為化被験体から得た。簡潔には、全血をＥＤＴＡ処理チューブへと収集し、氷上に移し、２時間以内に血漿分離のために処理した。全血を２，０００ｇで１５分間、４℃において遠心分離し、血漿を収集し、処理するまで－８０℃で貯蔵した。定量的マルチプレックスタンパク質アレイ（ＲａｙＢｉｏ（登録商標）　Ｑ－Ｓｅｒｉｅｓ，　ＲａｙＢｉｏｔｅｃｈ）を利用して、製造業者の指示に従ってＴＮＦＲ２、ＴＮＦα、ＴＮＦβの血漿レベル（ｐｇ／ｍｌ）を全てのサンプルで同時に決定した。蛍光シグナルを、Ｃｙ３波

長レーザースキャナーを介して可視化し、アレイごとに生成した標準曲線を使用して濃度に変換した。

【００８６】

統計分析を、２サンプルＴ検定およびノンパラメトリックＷｉｌｃｏｘｏｎ２サンプル検定を使用して行った。符合順位検定を、群内の時点間の変化を調べる一対比較のために使用した。全ての試験を両側検定し、統計的有意性をｐ＜０．０５で確立した。データは、平均および平均の標準誤差で示す。

【００８７】

結果（患者における観察）

ＵＣ－ＭＳＣ群およびコントロール群における患者は、ベースラインタンパク質レベルにおいて有意差を示さなかった。コントロール群において、ｓＴＮＦＲ２、ＴＮＦαおよびＴＮＦβレベルは、０日目と６日目の間で有意差がなかった。ＴＮＦαおよびＴＮＦβレベルは、０日目と６日目の間で有意に減少した（それぞれ、ｐ＝０．００５およびｐ＝０．００２）。６日目の群間の比較は、コントロール群のＴＮＦα（３１９±４０　対　９５０±２２６ｐｇ／ｍｌ、ｐ＝０．０４８）およびＴＮＦβ（８１０±１２６　対　２，９４４±７３５ｐｇ／ｍｌ、ｐ＝０．０３２）と比較して、ＵＣ－ＭＳＣ群において有意に低いレベルを明らかに示した。ｓＴＮＦＲ２は、６日目のコントロールと比較して、ＵＣ－ＭＳＣ群において有意により高いレベルを示した（２６，６０９±８４６ｐｇ／ｍｌ　対　２３，１１１±７６０ｐｇ／ｍｌ，　ｐ＝０．０２１）。図６を参照のこと。

【００８８】

最近完了したフェーズｌ／２ａ臨床試験では、ＵＣ－ＭＳＣ処置は、ＣＯＶＩＤ－１９ＡＲＤＳを有する患者における加速した臨床回復と関連した。それらの結果を説明する助けになる、重要な根底にある免疫／炎症性メディエーター軸における差異の分子的証拠が、本明細書で提供される。６日目に、ＵＣ－ＭＳＣレシピエントは、コントロールと比較して、血漿ｓＴＮＦＲ２の有意に上昇したレベルならびにＴＮＦαおよびＴＮＦβの有意に減少したレベルを有した。ＴＮＦレセプターベースの薬物を試験して、慢性炎症性疾患を処置したところ、重篤なＣＯＶＩＤ－１９患者における超炎症減弱化について同様に有益であり得る。ＴＮＦ遮断は、循環インターロイキン（ＩＬ）－１およびＩＬ－６レベルの迅速な低減（＜１２時間）、ならびに炎症した組織における白血球トラフィッキングおよび毛細管透過性に強く影響を及ぼす接着分子および血管内皮細胞成長因子（ＶＥＧＦ）の低減を生じることから、臨床上有効である。試験は、抗ＴＮＦ治療の際に、炎症した組織におけるＴＮＦ濃度が、抗ＴＮＦ抗体に結合して血液循環へと通過するにつれて低減したことを示した。

【００８９】

さらに、ｓＴＮＦＲ２は、ＴＮＦを結合し得、ＴＮＦ誘導性細胞傷害性および免疫反応性を中和し、炎症反応をモジュレートする。例えば、より高いｓＴＮＦＲ２レベルは、減少したＴ細胞活性化および調節性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の段階的な生成をもたらす。これに基づいて、試験は、ＭＳＣによるＴＮＦＲ２の発現がそれらのより高いＦｏｘｐ３＋Ｔｒｅｇ誘導能力に相関することを示した。従って、本明細書での知見は、ＵＣ－ＭＳＣ効果の重要な機序を示すのに対して、ｓＴＮＦＲ２血漿レベルは、ＣＯＶＩＤ－１９　ＡＲＤＳ進行および治療後の臨床転帰の予測因子であり得る。

【００９０】

ここで、上記で記載される患者における観察に基づけば、および先の段落において記載される効力アッセイの観察に基づけば、本明細書で開発された効力アッセイは、生物学的に意義がある。

【００９１】

効力の保証

この効力アッセイ、正規化された定量および炎症刺激指数（ＩＳＩ）を介する可溶性ＴＮＦＲ２放出の測定は、提唱されるフェーズ２ｂ／３試験において使用されるべき生成物の効力の保証のために利用される。フェーズ２ｂ／３試験のために利用されるＵＣ－ＭＳ

Ｃの各バッチの効力の保証に関する基準は、以下である：

・　３日間の培養にわたって全細胞タンパク質含有量によって正規化した可溶性ＴＮＦＲ２（ｓＴＮＦＲ２）放出＞０．０１（ｐｇ／ｍＬ）／（μｇ）

・　炎症刺激指数（ＩＳＩ）＞１

・　一実施形態において、基礎条件における３日間培養にわたって全細胞タンパク質含有量によって正規化した可溶性ＴＮＦＲ２（ｓＴＮＦＲ２）放出＞０．０２（ｐｇ／ｍＬ）／（μｇ）

・　炎症刺激指数（ＩＳＩ）＞１．５

・　一実施形態において、炎症誘導下での３日間培養にわたって全細胞タンパク質含有量によって正規化した可溶性ＴＮＦＲ２（ｓＴＮＦＲ２）放出＞０．０３（ｐｇ／ｍＬ）／（μｇ）

・　炎症刺激指数（ＩＳＩ）＞１．５

【００９２】

本開示は、ヒトにおいて腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）炎症経路を改変する免疫調節細胞（またはそれらのセクレトーム）に関する効力アッセイの必要性に対処する。免疫調節細胞のタイプとしては、間葉系幹細胞、間葉系間質細胞、医療用シグナル伝達細胞（ＭＳＣ）が挙げられる。

【００９３】

このインビトロ効力アッセイは、インビボでの免疫調節機能を推定するために、基礎条件または炎症条件におけるインビトロでの可溶性腫瘍壊死因子レセプター２（ｓＴＮＦＲ２）の放出の測定に基づく。現在、ＭＳＣベースの治療の安全性および有効性は、炎症性疾患、免疫疾患、自己免疫疾患、筋骨格疾患、心血管疾患、神経変性疾患、および消化管疾患を含む種々の障害に関して多くの臨床試験において調査されている。しかし、このような試験のうちの多くからの初期の結果から、これらの細胞治療には変動性の程度がかなりあり、臨床観察において再現性がない場合があることが明らかにされている。最も重要なことには、一貫性のない証拠は、効力の不一致において反映される調製物に標準化された特徴がないことを含め、使用される細胞ベースの生成物における本質的な差異に潜在的に関連する。従って、インビボでの有効な免疫調節作用のために、インビトロでＭＳＣバッチを先験的で定性的に評価する迅速かつ正確な方法が、本明細書で示される。

【００９４】

別段定義されなければ、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示の発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で引用される刊行物およびこれらが引用される資料は、本明細書に具体的に援用される。

【００９５】

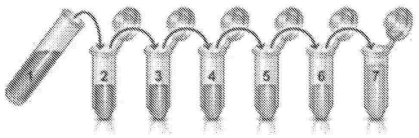
当業者は、多くの変更および改変が本発明の好ましい実施形態に対して行われ得ること、およびこのような変更および改変が本発明の趣旨から逸脱することなく行われ得ることを認識する。従って、全てのこのような均等な変形形態を網羅する添付の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨および範囲内に入るとして意図される。

【図面】

【図１】

標準希釈調製表

標準 #	希釈する分注 (µL)	希釈液 (µL)	合計量 (µL)	出発濃度 (pg/mL)	最終濃度 (pg/mL)
1	40	960	1,000	50,000	2,000
2	200	400	600	2,000	666.7
3	200	400	600	666.7	222.2
4	200	400	600	222.2	74.07
5	200	400	600	74.07	24.69
6	200	400	600	24.69	8.23
7	200	400	600	8.23	2.74
8	0	400	400	0	0



チューブ8：陰性コントロール
(1X アッセイ希釈液 B)



FIG. 1

【図２】

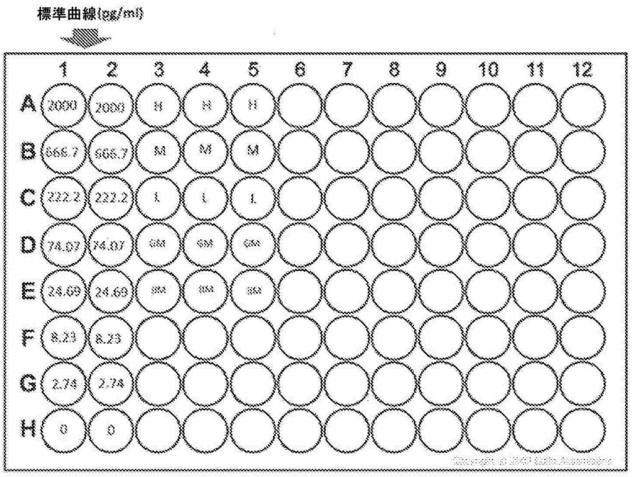


FIG. 2

【図３】

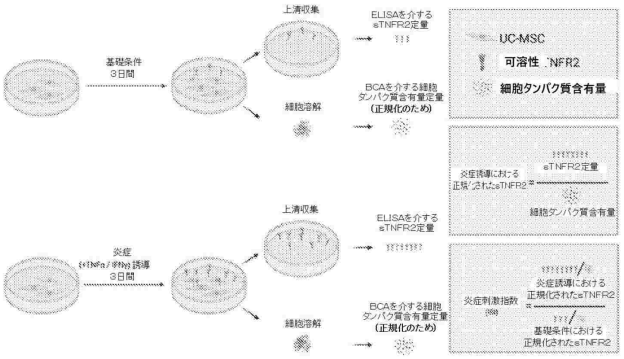


FIG. 3

【図４】

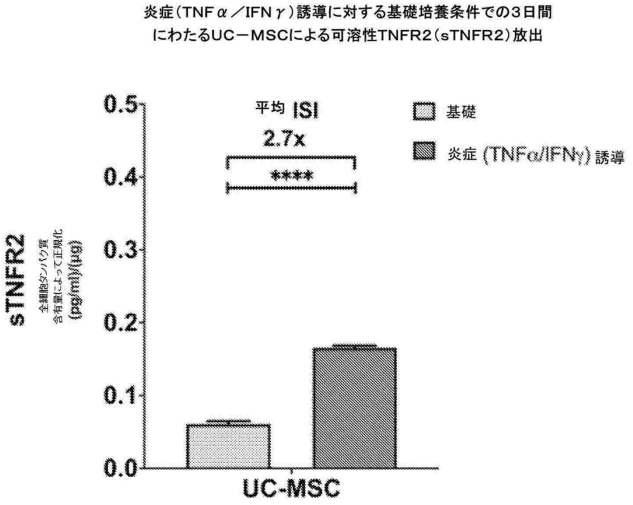


FIG. 4

【図５】

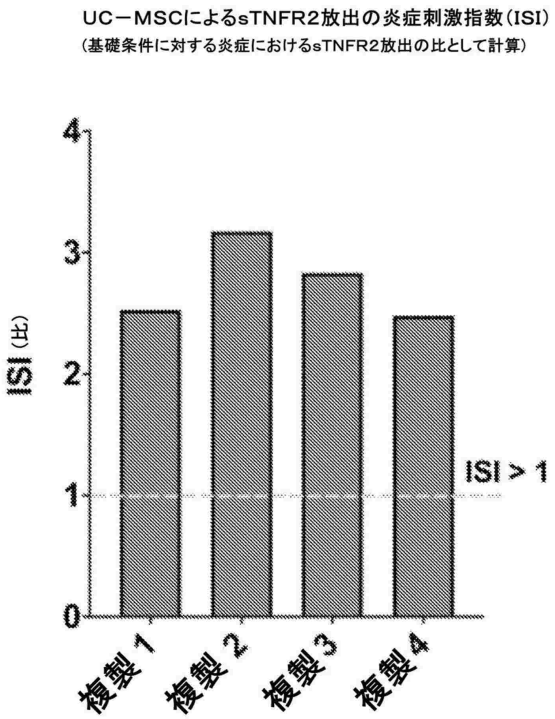


FIG. 5

【図６】

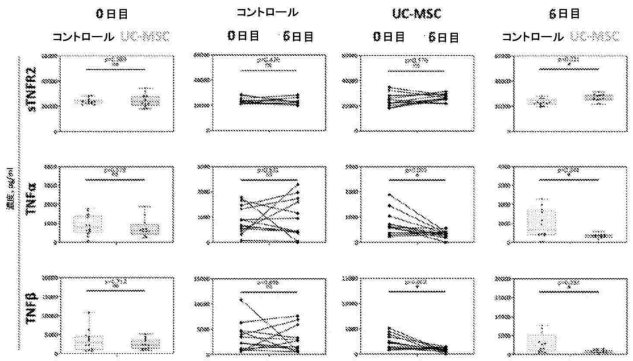


FIG. 6

【図７】

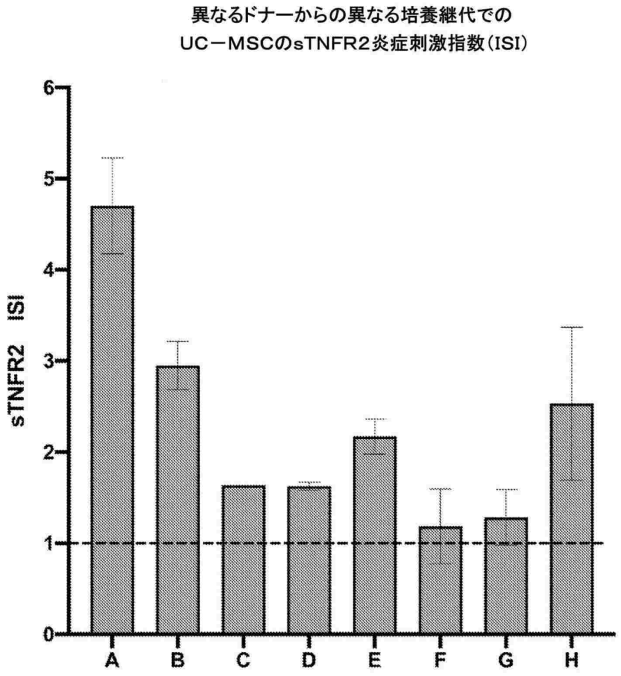


FIG. 7

【図８】

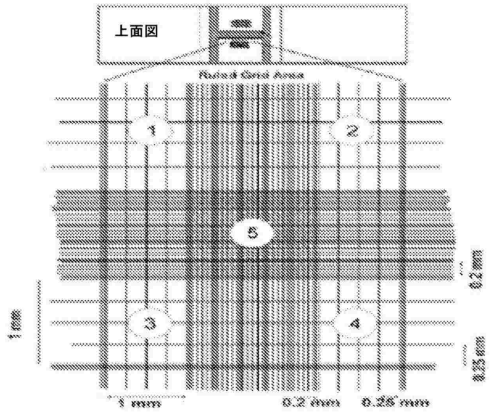


FIG. 8

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/11710

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C12N 5/0775, A61P 37/02 (2023.01)
ADD. A61K 49/00 (2023.01)
CPC - INV. C12N 5/0663
ADD. A61K 2035/122, A61K 2035/124
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.
Y	BELDI et al., TNFalpha/TNFR2 signaling pathway: an active immune checkpoint for mesenchymal stem cell immunoregulatory function. Stem Cell Research and Therapy, 2020, Vol. 11, No. 281, pages 1-15; Abstract; p2, col 1, para 1; p2, col 1, para 4; Fig. 3 legend	1-3
Y	US 2012/0020937 A1 (LEE et al.) 26 January 2012 (26.01.2012); para [0088], [0089]	1-3

☐ 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
29 March 2023	MAY 02 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/11710

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.: 4-20
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:

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.:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*35/28*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/28		
Ａ６１Ｋ	*35/35*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/35		
Ａ６１Ｋ	*35/48*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/48		
Ａ６１Ｋ	*35/51*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/51		
Ａ６１Ｋ	*35/50*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/50		
Ａ６１Ｐ	*31/14*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ｇ０１Ｎ	*33/53*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｙ	
Ｃ１２Ｑ	*1/02*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/02		

,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,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

弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
弁護士　山本 健策
(72)発明者　ランゾーニ， ジャコモ
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３７， マイアミ， ベイ ポイント ロード ５５０
(72)発明者　クロピス， ディミトリオス
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３７， マイアミ， ベイ ポイント ロード ５５０
(72)発明者　リコルディ， カミロ
アメリカ合衆国 フロリダ ３３１３７， マイアミ， ベイ ポイント ロード ５５０

Ｆターム（参考）　2G045　AA24 AA25 BB20 CB01 DA36 FB03
4B063　QA01 QA20 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR54 QR56 QS32 QX02
4C084　AA19 MA02 NA05 NA14 ZB07 ZB11 ZB21 ZB33
4C087　AA01 AA02 BB44 BB57 BB58 BB59 BB64 CA04 MA02 NA05
NA14 ZB07 ZB11 ZB21 ZB33