

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6607675号
(P6607675)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 5/0789	(2010.01)	C 12 N 5/0789
A 61 K 35/15	(2015.01)	A 61 K 35/15
A 61 K 35/16	(2015.01)	A 61 K 35/16
A 61 P 9/00	(2006.01)	A 61 P 9/00
A 61 P 19/00	(2006.01)	A 61 P 19/00

A

Z

請求項の数 16 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-517958 (P2014-517958)
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日(2012.7.6)
(65) 公表番号	特表2014-520523 (P2014-520523A)
(43) 公表日	平成26年8月25日(2014.8.25)
(86) 國際出願番号	PCT/GB2012/051600
(87) 國際公開番号	W02013/005053
(87) 國際公開日	平成25年1月10日(2013.1.10)
審査請求日	平成27年5月26日(2015.5.26)
審判番号	不服2017-11079 (P2017-11079/J1)
審判請求日	平成29年7月26日(2017.7.26)
(31) 優先権主張番号	1111503.7
(32) 優先日	平成23年7月6日(2011.7.6)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)

(73) 特許権者 514002662

セル セラピー リミテッド
C E L L T H E R A P Y L I M I T E
D
英國 エスエー2 8ピーピー シングル
トン パーク スウォンジ スウォンジ
ユニバーシティー スクール オブ メデ
ィシン ルーム 137 ファースト フ
ロア インスティテュート オブ ライ
フ サイエンシズ (番地なし)
I n s t i t u t e o f L i f e S
c i e n c e s F i r s t F l o o r
, R o o m 1 3 7 S c h o o l o
f M e d i c i n e S w a n s e a
U n i v e r s i t y S i n g l e t o
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】中胚葉系列の前駆細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

中胚葉系列の前駆細胞の集団であって、

前記集団における細胞群は、

(a) 検出可能なレベルの CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD271、CD120a (腫瘍壞死因子(TNF) - 受容体1)、CD120b (TNF - 受容体2)、CD50 (細胞間接着分子-3、ICAM-3)、CD54 (ICAM-1)、CD58 (リンパ球機能関連抗原-1、LFA-1)、CD62E (E-セレクチン)、CD62L (L-セレクチン)、CD62P (P-セレクチン)、CD106 (血管細胞接着タンパク質、VCAM-1)、CD102 (ICAM-2)、CD166 (活性化白血球細胞接着分子)、CD104 (インテグリン-4)、CD123 (インターロイキン-3受容体)、CD124 (インターロイキン-4受容体)、CD126 (インターロイキン-6受容体)、CD127 (インターロイキン-7受容体) および線維芽細胞成長因子受容体 (FGFR) を発現し、および、

(b) 検出可能なレベルの CD14、CD34 および CD45 を発現しない、
集団。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の集団であって、

(a) 前記集団における細胞群は、検出可能なレベルの C-X-C ケモカイン受容体タイプ 1 (CXCR1) を発現する; または

(b) 前記集団における細胞群は、検出可能なレベルの C-X-C ケモカイン受容体タイプ 2 (CXCR2) を発現することを特徴とする、集団。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の集団であって、

前記集団における細胞群は、

(a) (i) インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、(ii) IGF-1 受容体、
(iii) C-C ケモカイン受容体タイプ 1 (CCR1)、(iv) ストロマ細胞由来因子-1 (SDF-1)、(v) 低酸素誘導因子-1 (HIF-1)、(vi) Akt 1 および (vii) 肝細胞増殖因子 (HGF) および / または顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のうちの 1 つまたは複数を検出可能なレベルで発現する、または (i) から (vii) のうちの 1 つまたは複数を過剰発現する；および / または

(b) (i) 血管内皮成長因子 (VEGF)、(ii) 形質転換成長因子 (TGF-)、(iii) インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、(iv) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(v) 腫瘍壞死因子 (TNF-)、(vi) インターフェロン (IFN-) および (vii) インターロイキン-1 (IL-1) のうちの 1 つまたは複数を検出可能なレベルで発現する、または (i) から (vii) のうちの 1 つまたは複数を過剰発現する

ことを特徴とする、

集団。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の集団であって、

(a) 前記細胞群は自己由来である；または

(b) 前記細胞群は同種異系である

ことを特徴とする、

集団。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の集団であって、

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の集団は、少なくとも約 5×10^5 細胞を含む、集団。

【請求項 6】

医薬組成物であって、

(a) 請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の集団、および、

(b) 薬学的に許容できる担体または希釈剤、

を含む、

医薬組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の、中胚葉系列の前駆細胞の集団を生産する方法であって、

(a) 单核細胞 (MC) が中胚葉系列の前駆細胞に分化するように、前記細胞に 0 % 酸素 (O₂) を供給する細胞インキュベーター内で、かつ、前駆細胞の付着を可能にする条件下で、MC を血小板溶解物とともに培養するステップ、および、

(b) 請求項 1、2、または 3 のいずれか一項に記載の発現パターンを有する前駆細胞を回収し、培養して、それにより、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の集団を生産するステップ、ここで、前記血小板溶解物は、(i) 多血小板血漿 (PRP) を液体窒素中に浸し、(ii) PRP を 37 度で解凍し、その後、(i) および (ii) をさらに 3 回繰り返すことによって PRP から作製されたものである

を含むことを特徴とする、

方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、
前記 M C は、末梢血単核細胞 (P B M C) であるか、または骨髄から単離されることを特徴とする、
方法。

【請求項 9】

請求項 7 または 8 に記載の方法であって、
前記 M C は、患者または同種異系ドナーから得られる
ことを特徴とする、
方法。

【請求項 10】

患者での損傷組織を修復する方法において使用するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の集団。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の集団であって、
a 前記組織は、中胚葉由来である；
b 前記組織は、心臓組織、網膜組織または骨組織である；
c 前記方法は、(a) 損傷した心臓組織を修復するためであり、そして、前記集団は、治療的に有効量の請求項 3 に記載の集団を含む、(b) 損傷した網膜組織を修復するためであり、そして、前記集団は、治療的に有効量の請求項 3 に記載の集団を含む、若しくは、(c) 損傷した骨組織を修復するためであり、そして、前記集団は、治療的に有効量の請求項 3 に記載の集団を含む；並びに / または
d 前記組織は、外傷または疾患により損傷している
ことを特徴とする、
集団。

【請求項 12】

治療が必要な患者での、心臓の外傷または疾患、または、骨の外傷または疾患を治療する方法において使用するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の集団。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の集団であって、
前記方法は、
(a) 心臓の外傷または疾患を治療するためであり、そして、前記集団は、治療的に有効量の請求項 3 に記載の集団を含む、または、
(b) 骨の外傷または疾患を治療するためであり、そして、前記集団は、治療的に有効量の請求項 3 に記載の集団を含む、
ことを特徴とする、
集団。

【請求項 14】

請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載の集団であって、
前記集団は、患者または同種異系ドナーから得られる M C を用いて生産されることを特徴とする、
集団。

【請求項 15】

患者での損傷組織の修復に用いるための医薬の製造における、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の集団の使用。

【請求項 16】

治療が必要な患者での、心臓の外傷または疾患、または、骨の外傷または疾患の治療に用いるための医薬の製造における、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の集団の使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、中胚葉系列の前駆細胞およびその治療用途に関する。

【背景技術】**【0002】**

間葉系幹細胞（M S C）は、多能性の、成体幹細胞である。M S Cは分化して、骨組織内にみられる異なる特殊化細胞を形成する。例えば、それらは、軟骨細胞（コンドロサイト）、骨細胞（骨芽細胞）および脂肪細胞（アディポサイト）に分化することができる。

【0003】

M S Cは、様々な治療、例えば、加齢黄斑変性（A M D）および心筋梗塞の治療に用いられる。患者に投与された時点で、M S Cは典型的に、損傷組織に移行し（または帰巢し）、そして、パラクリンシングナーリングを介して、そして、損傷組織内の隣接細胞の生存、修復および再生を促進することにより、その治療効果を発揮する。

【0004】

現在の治療は典型的に、M S Cサブタイプの混合物の注入を伴い、そのうちのいくつかは興味対象の組織に効率的に移行しない。このことは大量の細胞投与を要し、オフターゲットの副作用および量に関連する副作用をもたらし得る。M S Cは典型的に骨髄由来であり、したがって、大量に得ることは難しい。

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明者らは、驚くべきことに、特異的なマーカー発現パターンを有する、新しいクラスの中胚葉系列の前駆細胞（P M L）を同定した。本発明のP M Lの同質な集団は、単核細胞（M C）、例えば、末梢血M Cから単離することができる。P M Lは、損傷組織に効率的に移行して修復することができる。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

本発明は、中胚葉系列の前駆細胞を提供し、ここで、前記細胞は、（a）検出可能なレベルのC D 2 9、C D 4 4、C D 7 3、C D 9 0、C D 1 0 5およびC D 2 7 1を発現し、および、（b）検出可能なレベルのC D 1 4、C D 3 4およびC D 4 5を発現しない。

【0007】

また、本発明は、以下を提供する：

- 本発明の前駆細胞を2以上含む集団；
- （a）本発明の前駆細胞または本発明の集団、および、（b）薬学的に許容できる担体または希釈剤を含む医薬組成物；
- （a）単核細胞（M C）が中胚葉系列の前駆細胞に分化するのを誘導する条件下でM Cを培養するステップ、および、（b）本発明の発現パターンを有する前駆細胞を回収し、培養して、それにより、本発明の集団を生産するステップ、を含む、本発明の集団を生産する方法；
- 本発明の集団を患者に投与するステップ（前記集団は、治療的に有効数の細胞を含む）、および、それにより、患者での損傷組織を修復するステップ、を含む、患者での損傷組織を修復する方法；および
- 患者での損傷組織の修復に使用するための、本発明の集団。

【図面の簡単な説明】**【0008】**

【図1】本発明のP M Lでの、C D 4 4の存在およびC D 3 4の不存在を確認するR T - P C R ゲルを示す。

【図2】本発明のP M LのF A C S分析の結果を示す。これは、細胞が少なくともC D 7 3およびC D 9 0に関してポジティブであり、C D 1 4、C D 3 4およびC D 4 5に関してネガティブであることを確認する。

【図3】F A C S分析からのさらなる結果、すなわち、C D 9 0（上）およびC D 7 3（

10

20

30

40

50

下)に関するヒストグラムを示す。

【図4】染色された(図4a)および染色されていない(図4b)細胞での、CD14、CD34およびCD45の欠如に関するFACSヒストグラムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本開示の産物および方法の異なる応用が、当技術分野における特定のニーズに適合され得ることが理解されよう。また、本明細書中で用いられる専門用語は、本発明の特定の実施態様を説明する目的のためのみであり、限定を意図しないことも理解されよう。

【0010】

加えて、本明細書および添付の特許請求の範囲において用いられる、単数形「a」、「a n」、および「t h e」は、内容が明確に別段の指示をしない限り、複数形の指示対象を含む。したがって、例えば、「細胞(a c e l l)」との言及は、「複数の細胞(c e l l s)」を含み、「組織(a t i s s u e)」との言及は、2以上のそのような組織を含み、「患者(a p a t i e n t)」との言及は、2以上のそのような患者を含み、他も同様である。

【0011】

上記または下記のいずれにせよ、本明細書中に引用される全ての刊行物、特許および特許出願は、その全体で参照により本明細書に援用される。

【0012】

本発明のPML

20

本発明は、中胚葉系列の前駆細胞(PML)を提供する。前記PMLは、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271を発現するが、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45を発現しない。

【0013】

本発明のPMLは、非常に多くの利点を有する。重要な利点を本明細書に要約する。しかしながら、さらなる利点が以下の記述から明らかであろう。

【0014】

本発明のPMLは、患者での損傷組織を修復するために有利に用いられ得る。PMLは、効率的に損傷組織に移行し(または帰巣し)、組織において抗炎症効果を発揮することが可能である。このことは以下にさらに詳細に述べられる。PMLの最も重要な能力の一つは、負傷部位へ移行する(または帰巣する)ことであり、化学走性を含む。これはケモカイン-シグナリングに基づき、ローリング、付着および遊出のようなメカニズムを利用する。PMLの抗炎症効果は、損傷組織中の隣接細胞の生存、修復および再生を促進する。細胞はまた、血管新生因子、走化性因子および抗アポトーシス因子の分泌のような、バラクリン作用を発揮することができる。

30

【0015】

以下にさらに詳細に述べるように、PMLは、単核細胞(MC)、例えばヒト個体から採取した末梢MCから生産される。PMLはMCから生産されるので、それらは簡単に生産され得て(例えば末梢血から)、治療されるべき患者の自己由来であり得て、したがって、患者による免疫学的拒絶のリスクを回避する。

40

【0016】

様々なMCサンプル(すなわち様々な血液サンプル)を得ることができるので、原理的には、単一の個体から、無制限数のPMLを生産することが可能である。単一の個体から非常に多くの数のPMLを生産することが確実に可能である。したがって、本発明のPMLは、大量に作製することができる。

【0017】

本発明のPMLは、臨床的に意義のある条件で、例えば、微量のエンドトキシンおよび他の環境汚染物質、ならびに、ウシ胎仔血清のような動物産物の不存在下で生産される。このことは、本発明のPMLを、特に患者への投与に適切にする。

【0018】

50

本発明のPMLはMCから生産されるので、それらは実質的に同質であり、自己由来であり得る。それらはまた、間葉系幹細胞(MSC)でしばしば生じるドナー間のばらつきを回避する。本発明のPMLの非常に多くの集団は、化学療法または放射線療法のような任意の他の治療が始められる前に、患者から採取した単一サンプルから生産することができる。したがって、本発明のPMLは、これらの治療の任意の有害作用を回避することができる。

【0019】

本発明のPMLは、早急に作ることができる。PMLは、30日未満で、例えば約22日で、MCから生産することができる。

【0020】

MCからのPMLの生産は、ヒト胚性幹細胞(hESC)由来の間葉系幹細胞(MSC)の使用にかかるモラルおよび倫理的影響を回避する。

【0021】

本発明のPMLは典型的に、ヒトMCから生産される。したがって、本発明のPMLは典型的にヒトである。

【0022】

本発明のPMLは、系列限定的マーカーの発現、構造上および機能上の特性を含む、当技術分野で知られている標準的な方法を用いて、中胚葉系列の前駆細胞として同定することができる。PMLは、中胚葉系列の前駆細胞の特性として知られる細胞表面マーカーを、検出可能なレベルで発現する。特に、以下にさらに詳細に述べるマーカーに加えて、PMLは、- 平滑筋アクチン、I型コラーゲン鎖、GATA6、Mohawk、およびビメンチンを発現し得る(Sagi Bet al Stem Cells Dev. 2012 Mar 20; 21(5):814-28)。

【0023】

本発明のPMLは、インビトロで分化アッセイをうまく完了させて、それらが中胚葉系列であることを確認することができる。そのようなアッセイは、限定されないが、脂肪生分化アッセイ、骨形分化アッセイおよび神経分化アッセイを含む(Zaim Met al Ann Hematol. 2012 Aug; 91(8):1175-86)。

【0024】

本発明のPMLは、幹細胞ではない。特に、それらは間葉系幹細胞(MSC)ではない。インビトロで、例えば軟骨細胞または骨細胞に分化するのに適切な条件下にそれらをおくことができるが、それらはインビトロでは分化しない。本発明のPMLは、損傷組織に移行して損傷組織中でパラクリンシグナリングを発揮することにより、それらの効果を有する。特に、PMLは、好ましくは、損傷組織において抗炎症効果を誘導することが可能である。このことは以下にさらに詳細に述べられる。

【0025】

本発明のPMLは典型的に、紡錘形の形態により特徴付けられる。PMLは典型的に、線維芽細胞様であり、すなわち、それらは数個の長細い細胞突起を持つ小細胞体を有する。細胞は典型的に、約10~約20μmの直径である。

【0026】

本発明のPMLは、それらのマーカー発現パターンにより、公知のPMLから区別される。本発明のPMLは、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271を発現する。本発明のPMLは、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271のうちの1つまたは複数、例えば全てを発現し得る。本発明のPMLは、それらが、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271のうちの1つまたは複数を、他のPMLおよび/またはMSCよりも多く発現する場合、過剰発現する。本発明のPMLは、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45を発現しない。

【0027】

10

20

30

40

50

C D 2 9 (インテグリン 4) は、極後期抗原の受容体と関連するインテグリンユニットである。それは - 3 サブユニットと結合して、ネトリン - 1 およびリーリンと反応する 3 1 複合体を作ることが知られている。

【 0 0 2 8 】

C D 4 4 は、細胞間相互作用、細胞接着および遊走に関与する細胞表面糖タンパク質である。ヒトでは、C D 4 4 抗原は、染色体 1 1 上の C D 4 4 遺伝子によりコードされる。

【 0 0 2 9 】

エクト - 5' - ヌクレオチダーゼ (エクト - 5' - N T , E C 3 . 1 . 3 . 5) としても知られる C D 7 3 は、多くのタイプのヒトおよびマウスがんにみられる、グリコシルフォスファチジルイノシトール連結の 7 0 k D a の細胞表面エクトエンザイムである。

10

【 0 0 3 0 】

C D 9 0 (または T h y - 1) は、2 5 ~ 3 7 k D a の、重度に N - グリコシル化された、単一の V 様免疫グロブリンドメインを有するグリコホスファチジルイノシトール (G P I) アンカー型の保存された細胞表面タンパク質である。それは当初、胸腺細胞抗原として発見された。

【 0 0 3 1 】

C D 1 0 5 (またはエンドグリン) は、細胞表面上にある I 型膜糖タンパク質であり、T G F 受容体複合体の一部である。

【 0 0 3 2 】

低親和性神経成長因子受容体 (L N G F R) または p 7 5 N T R としても知られる C D 2 7 1 は、低親和性ニューロトロフィン受容体および腫瘍壊死因子受容体のスーパーファミリーに属する。

20

【 0 0 3 3 】

C D 1 4 は先天性の免疫系の構成要素であり、2 つの形態で存在する。それは、グリコシルフォスファチジルイノシトール尾部により膜中に固定されているか (m C D 1 4) 、または可溶性形態で現れる (s C D 1 4) かのいずれかである。可溶性 C D 1 4 は、m C D 1 4 のシェディング後に現れるか (4 8 k D a) 、または細胞内ベシクルから直接分泌される (5 6 k D a) かのいずれかである。

【 0 0 3 4 】

C D 3 4 は細胞表面糖タンパク質であり、細胞間接着因子としての機能を果たす。例えば、それは、幹細胞の、骨髄細胞外マトリックスへの付着または間質細胞への直接の付着を仲介する。

30

【 0 0 3 5 】

C D 4 5 は、赤血球 (e t h r o c y t e s) および血小板を除く造血細胞にあるタンパク質チロシンホスファターゼ (P T P) である。C D 4 5 は、マウスでの一般的な白血球抗原 ; T 2 2 0 および B 2 2 0 とも呼ばれる。タンパク質チロシンキナーゼは、ホスホチロシン残基の脱リン酸化を触媒する、受容体様で細胞質誘導酵素のファミリーを構成し、相同な触媒ドメインにより特徴付けられる。

【 0 0 3 6 】

当技術分野で知られている標準的な方法は、上記に (および以下に) 記述する様々なマーカーの検出可能な発現、低い発現またはそれらの欠如を判定するために用いられる。適切な方法は、限定されないが、免疫細胞化学、イムノアッセイ、フローサイトメトリー、例えば蛍光活性化セルソーティング (F A C S) 、およびポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 、例えば逆転写 P C R (R T - P C R) を含む。適切なイムノアッセイは、限定されないが、ウェスタンプロッティング、酵素結合免疫測定法 (E L I S A) 、酵素結合免疫吸着スポットアッセイ (E L I S P O T アッセイ) 、酵素増幅イムノアッセイ技術、放射性アレルゲン吸着 (R A S T) テスト、ラジオイムノアッセイ、ラジオバインディングアッセイおよび免疫蛍光を含む。ウェスタンプロッティング、E L I S A および R T - P C R は、すべて定量的であり、したがって、存在するならば様々なマーカーの発現レベルを測定するために用いることができる。F A C S の使用を実施例に開示する。本明細書に記

40

50

述される、様々なマーカーの全てに関する抗体および蛍光標識抗体は市販されている。

【0037】

本発明のPMLは、好ましくは、患者での特定の損傷組織に移行することが可能である。換言すれば、損傷組織を有する患者にその細胞が投与されると、その細胞は損傷組織に移行する（または帰巣する）ことが可能である。このことは、標準的な経路、例えば静脈を介してその細胞を注入することができ、それから、損傷部位を標的化することができることを意味するので、利点である。その細胞は損傷組織に送達される必要はない。損傷は、以下にさらに詳細に述べる外傷または疾患に起因してよい。

【0038】

本発明のPMLが損傷組織に移行する能力は、当技術分野で知られている標準的なアッセイを用いて測定され得る。適切な方法は、限定されないが、ゲノムの逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（レポーター遺伝子を伴うまたは伴わないRT-PCR）および標識技術を含む。

10

【0039】

RT-PCRは、患者内の本発明のPMLをトレースする最も直接的で単純な方法である。形質導入された導入遺伝子または個々のドナーマーカーをこの目的のために用いることができ、移植細胞特異的シグナルが様々な患者試験で得られている。結果は通常、半定量的である。

【0040】

あるいは、本発明のPMLは、目的の色素、例えば蛍光色素で染色してよく、色素からのシグナルを介して患者内でモニターしてよい。そのような標識の特定の方法を実施例に開示する。

20

【0041】

移行（または帰巣）は典型的に、損傷組織に到達する細胞数を測定することにより決定される。それはまた、肺（損傷組織よりもむしろ）に蓄積した細胞数を観測することにより、間接的に測定してよい。

【0042】

患者での特定の損傷組織に移行することができる本発明のPMLは、好ましくは、（a）C-X-Cケモカイン受容体タイプ1（CXCR1）を検出可能なレベルで発現し、または過剰発現し、および/または（b）CXCR2を検出可能なレベルで発現し、または過剰発現する。本発明のPMLは、さらに好ましくは、CXCR1およびCXCR2を検出可能なレベルで発現、または過剰発現する。損傷組織は、様々な可溶性炎症性因子、例えば、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）およびインターロイキン-8を放出し、これらの因子は、結合性CXCR1および/またはCXCR2に結合するが、本発明のPML（および他の炎症性細胞）を損傷組織に向けることができる。

30

【0043】

本発明のPMLは、他のPMLおよび/またはMSCより多くのCXCR1および/またはCXCR2を生産する場合、CXCR1および/またはCXCR2を過剰発現している。CXCR1および/またはCXCR2の発現は、上述のように測定され得る。本発明の、網膜に帰巣する細胞は、検出可能なレベルのCXCR1およびCXCR2を発現しない。このことは、以下にさらに詳細に述べられる。

40

【0044】

本発明のPMLが移行することができる特定の損傷組織は、好ましくは、心臓組織、網膜組織または骨組織である。網膜組織は、好ましくは黄斑である。

【0045】

特定の損傷組織が心臓組織または骨組織である場合、本発明のPMLは、好ましくは、C-X-Cケモカイン受容体タイプ4（CXCR4）を検出可能なレベルで発現し、または、過剰発現する。本発明のPMLは、他のPMLおよび/またはMSCよりも多くのCXCR4を発現する場合、CXCR4を過剰発現している。特定の損傷組織が心臓組織または骨組織である場合、本発明のPMLは、さらに好ましくは、（a）CXCR1および

50

C X C R 4 ; (b) C X C R 2 および C X C R 4 ; または (c) C X C R 1 、 C X C R 2 および C X C R 4 を検出可能なレベルで発現し、または過剰発現する。 C X C R 4 の発現は、上述のように測定され得る。

【 0 0 4 6 】

損傷した心臓組織は、炎症性ケモカインおよびサイトカイン、例えばストロマ細胞由来因子 - 1 (S D F - 1) 、インターロイキン - 8 (I L - 8) 、腫瘍壞死因子 - (T N F -) 、顆粒球コロニー刺激因子 (G - C S F) 、血管内皮成長因子 (V E G F) および肝細胞増殖因子 (H G F) を放出する。加えて、心筋梗塞は、 V E G F およびエリスロポエチン (E P O) のレベルを増加させる。 C X C R 4 はそのリガンド S D F - 1 に結合し、したがって、 C X C R 4 を発現する本発明の P M L は、損傷した心臓組織により生産される S D F - 1 の勾配に向かって移行する。骨など他の損傷組織もまた、 S D F - 1 を放出する。

【 0 0 4 7 】

特定の損傷組織が、黄斑のような網膜組織である場合、本発明の P M L は、好ましくは、検出可能なレベルの C X C R 4 、血管内皮成長因子 (V E G F) 、形質転換成長因子 1 (T G F - 1) 、インスリン様成長因子 - 1 (I G F - 1) 、線維芽細胞成長因子 (F G F) 、腫瘍壞死因子 (T N F -) 、インターフェロン (I F N -) 、インターロイキン - 1 (I L - 1) 、 C X C L 1 2 、 C D 1 0 9 、 C D 1 1 9 、活性化 B 細胞の核因子 - 軽鎖 - エンハンサー (N F B) 、 C D 1 4 0 a 、 C D 1 4 0 b 、 C D 2 2 1 、 C D 2 2 2 、 C D 3 0 4 、 C D 3 0 9 および C D 3 2 5 を発現する。本発明の、網膜に帰巢する P M L は、好ましくは、これらの因子のうちの 1 つまたは複数、または実に全てを、過剰発現する。 P M L は、他の P M L および / または M S C よりも多くの因子を発現する場合、これらの因子を過剰発現している。細胞マーカーに関する定量アッセイは上述のとおりである。

【 0 0 4 8 】

また、本発明の、網膜に帰巢する P M L は、好ましくは、検出可能なレベルの色素上皮由来因子 (P E D F) を発現し、または P E D F を過剰発現する。これらのマーカーの検出可能な発現は、上述のように測定され得る。本発明の P M L は、他の P M L および / または間葉系幹細胞 (M S C) よりも多くの P E D F を発現する場合、 P E D F を過剰発現している。

【 0 0 4 9 】

特異的な損傷組織が骨組織である場合、本発明の P M L は、好ましくは、検出可能なレベルの T G F - 3 、骨形成タンパク質 - 6 (B M P - 6) 、 S O X - 9 、コラーゲン - 2 、 C D 1 1 7 (c - k i t) 、ケモカイン (C - C モチーフ) リガンド 1 2 (C C L 1 2) 、 C C L 7 、インターロイキン - 8 (I L - 8) 、血小板由来成長因子 - A (P D G F - A) 、 P D G F - B 、 P D G F - C 、 P D G F - D 、マクロファージ遊走阻止因子 (M I F) 、 I G F - 1 、肝細胞増殖因子 (H G F) 、 P D G F - R 、 P D G F - R 、 C X C R 4 、 C - C ケモカイン受容体タイプ 1 (C C R 1) 、 I G F - 1 受容体 (I G F - 1 R) 、肝細胞増殖因子受容体 (H G F R) 、 C X C L 1 2 および N F B を発現する。本発明の骨に帰巢する P M L は、好ましくは、これらの因子のうちの 1 つまたは複数、または実に全てを、過剰発現する。 P M L は、他の P M L および / または M S C よりも多くの因子を発現する場合、これらの因子を過剰発現している。これらのマーカーの検出可能な発現は、上述のように測定され得る。

【 0 0 5 0 】

本発明の P M L は、好ましくは、患者の損傷組織において抗炎症効果を有することが可能である。また、本発明の P M L が抗炎症効果を有する能力は、当技術分野で知られている標準的なアッセイを用いて測定され得る。適切な方法は、限定されないが、サイトカインの分泌に関する酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) 、増強された混合白血球反応、および、フローサイトメトリーにより測定される共刺激分子と成熟マーカーの上方制御を含む。用いられ得る特定の方法を実施例に開示する。測定されるサイトカインは典型的に

10

20

30

40

50

、インターロイキン、例えばインターロイキン-8 (IL-8)、セレクチン、接着分子、例えば細胞間接着分子-1 (ICAM-1)、および化学誘引タンパク質、例えば単球走化性タンパク質-1 (MCP-1) および腫瘍壊死因子 (TNF-) である。これらのサイトカインに関するアッセイは市販されている。

【0051】

抗炎症性PMLは、好ましくは、検出可能なレベルのCD120a (腫瘍壊死因子 (TNF)-受容体1)、CD120b (TNF-受容体2)、CD50 (細胞間接着分子-3、ICAM-3)、CD54 (ICAM-1)、CD58 (リンパ球機能関連抗原-1、LFA-1)、CD62E (E-セレクチン)、CD62L (L-セレクチン)、CD62P (P-セレクチン)、CD106 (血管細胞接着タンパク質、VCAM-1)、CD102 (ICAM-2)、CD166 (活性化白血球細胞接着分子)、CD104 (インテグリン-4)、CD123 (インターロイキン-3受容体)、CD124 (インターロイキン-4受容体)、CD126 (インターロイキン-6受容体)、CD127 (インターロイキン-7受容体) および線維芽細胞成長因子受容体 (FGFR) を発現する。抗炎症性PMLは、好ましくは、これらの因子のうちの1つまたは複数、または実に全てを、過剰発現する。PMLは、他のPMLおよび/またはMSCよりも多くの、1つまたは複数の因子を発現する場合、これらの因子を過剰発現している。これらのマーカーの検出可能な発現は、上述のように測定され得る。

【0052】

本発明のPMLは、さらに好ましくは、患者での損傷組織に移行して、損傷組織において抗炎症効果を有することができる。このことは、損傷を効率的に修復することを可能にし、投与が必要な細胞数を減少させる。

【0053】

本発明のPMLは、上述のものに加えて、様々な異なる他のマーカーを発現する。これらのいくつかは、PMLが損傷組織に移行する能力を助け、そこで抗炎症効果を有する。任意の本発明のPMLは、さらに、(i)インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、(ii)IGF-1受容体；(iii)C-Cケモカイン受容体タイプ1 (CCR1)、(iv)ストロマ細胞由来因子-1 (SDF-1)、(v)低酸素誘導因子-1 (HIF-1)、(vi)Akt1 および(vii)肝細胞増殖因子 (HGF) および/または顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のうちの1つまたは複数を、検出可能なレベルで発現し得る。

【0054】

IGF-1受容体は、IGF-1勾配に向かう移行能力を促進する。IGF-1が移行を増大させるメカニズムの一つは、細胞表面上のCXCR4を上方制御することによるものであり、それは、SDF-1シグナリングに対して細胞をさらに感受性にさせる。このことは上述されている。

【0055】

CCR1はCCL7 (以前はMCP3として知られていた)に対する受容体であり、MSCの帰巣および生着能力を高め (したがって、本発明のPMLと同じ効果を有することが期待され得る)、そして、パラクリンシグナリングを介して、負傷した心筋での毛管密度を増大させることができる。

【0056】

HIF-1は、酸素送達を増大させかつ適応性の生存促進性の応答を促進する、パスウェイを活性化する。多くのHIF-1の標的遺伝子の中には、エリスロポエチン (EPO)、エンドセリンおよびVEGF (その受容体Flk-1を伴う) がある。HIF-1を発現または過剰発現するPMLは、例えば、より多くの治療サブタイプを促進し得る様々な血管原性成長因子のパラクリン刺激の発現を上方制御する。以下にさらに詳細に述べるように、本発明のPMLは、低酸素条件下 (20%未満の酸素)、例えば約2%または約0%酸素の条件下でそれらを培養することにより、より多くの治療サブタイプに事前調整することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

Akt1は、グルコース代謝、細胞増殖、アポトーシス、転写および細胞遊走のような複数の細胞のプロセスにおいて重要な役割を果たす細胞内セリン/トレオニンタンパク質キナーゼである。Akt1の過剰発現は、ラットのMSCがアポトーシスを受けるのを防ぐことが示されており、本発明のPMLにおいても同様の効果を有する。アポトーシスからの防御は、PMLの治療効果を高める。

【 0 0 5 8 】

MSCによるHGFの過剰発現は、カルシニューリン仲介のパスウェイおよび血管新生を介したアポトーシスの阻害により、虚血後の心不全を防ぐことが示されている。HGFおよびG-CSFは、この点について相乗効果を示す。また、HGFおよびその受容体c-metを高発現するMSCは、ホルモンのパラクリンおよびオートクリンシグナリングを介して獲得される、損傷組織への高い移行能力を有する。HGFおよび/またはG-CSFを発現する本発明のPMLに関しても同様である。

10

【 0 0 5 9 】

PMLは、上記の(i)～(viii)のうちの1つまたは複数を過剰発現し得る。本発明のPMLは、(i)～(viii)のうちの1つまたは複数を、他のPMLおよび/または間葉系幹細胞(MSC)よりも多く発現する場合、過剰発現している。細胞マーカーに関する定量分析は上述される。これらのマーカーの検出可能な発現およびそれらの発現レベルは、上述のように測定され得る。

【 0 0 6 0 】

20

任意の本発明のPMLは、(i)血管内皮成長因子(VEGF)、(ii)形質転換成長因子(TGF- β)、(iii)インスリン様成長因子-1(IGF-1)、(iv)線維芽細胞成長因子(FGF)、(v)腫瘍壞死因子(TNF- α)、(vi)インターフェロン(IFN- α)および(vii)インターロイキン-1(IL-1)のうちの1つまたは複数を、検出可能なレベルで発現し得る。VEGFを過剰発現する細胞由来の馴化培地は、ハムスターモデルにおいて心不全を緩和することが示されている。それ故に、VEGFを発現または過剰発現する本発明のPMLは、損傷した心臓組織の同様の効果を有する。

〔 0 0 6 1 〕

PMLは、(i)～(viii)のうちの1つまたは複数を過剰発現し得る。本発明のPMLは、(i)～(viii)のうちの1つまたは複数を、他のPMLおよび/または間葉系幹細胞(MSC)よりも多く発現する場合、過剰発現している。細胞マーカーに関する定量分析は上述される。これらのマーカーの検出可能な発現およびそれらの発現レベルは、上述のように測定され得る。

30

〔 0 0 6 2 〕

上記の (i) ~ (v i i) の定義の両方のセットでは、(i) ~ (v i i) のうちの 1 つまたは複数の任意の組み合わせが発現または過剰発現され得る。例えば、(i) ~ (v i i) の各定義に関して、PML は、(i) ; (i i) ; (i i i) ; (i v) ; (v) ; (v i) ; (v i i) ; (i) および (i i) ; (i) および (i i i) ; (i) および (i v) ; (i) および (v) ; (i) および (v i) ; (i) および (v i i) ; (i i) および (i i i) ; (i i) および (i v) ; (i i) および (v) ; (i i) および (v i) ; (i i) および (v i i) ; (i i i) および (i v) ; (i i i) および (v) ; (i i i) および (v i) ; (i i i) および (v i i) ; (i v) および (v) ; (i v) および (v i) ; (i v) および (v i i) ; (v) および (v i) ; (v) および (v i i) ; (v i) および (v i i) ; (i) 、 (i i) および (i i i) ; (i) 、 (i i) および (i v) ; (i) 、 (i i) および (v) ; (i) 、 (i i) および (v i) ; (i) 、 (i i) および (v i i) ; (i) 、 (i i) および (v i i) ; (i) 、 (i i i) および (v i) ; (i) 、 (i i i) および (v i i) ; (i) 、 (i i i) および (v i i) ; (i) 、 (i v) および (v) ; (i) 、 (i v) および (v i) ; (i) 、 (i v) および (v i i) ; (i) 、 (i v) および (v i i) ; (i) 、 (v) および (v i) ; (i) 、 (v) および (v i i) ; (i) 、 (v) および (v i i)

48

50

。 (i) ~ (viii) の各定義に関する組み合わせは、本リストから独立に選択可能である。

【0063】

上述の任意のマーカーに加えて、本発明のPMLは、好ましくは、LIFおよび/または血小板由来成長因子(PDGF)受容体もまた、検出可能なレベルで発現、または過剰発現する。PDGF受容体は、好ましくはPDGF-A受容体および/またはPSDF-B受容体である。これらの受容体を高発現するMSCは、血小板が活性化されている部位、例えば創傷および血栓性血管へ効率的に移行することができる。その受容体を発現または過剰発現しているPMLについても同様である。

【0064】

本発明のPMLは、好ましくは自己由来である。換言すれば、細胞は、好ましくは、その細胞が投与される患者由来である。あるいは、PMLは、好ましくは同種異系である。換言すれば、細胞は、好ましくは、その細胞が投与される患者と免疫学的に適合する患者由来である。

【0065】

本発明のPMLは、単離され、実質的に単離され、精製され、または実質的に精製されてよい。PMLは、任意の他の構成要素、例えば培養培地、本発明の他の細胞、または他の細胞種から完全にフリーである場合、単離され、または精製されている。PMLは、担体または希釈剤、例えば、その使用目的を妨げない培地と混合される場合、実質的に単離されている。あるいは、本発明のPMLは、成長マトリックスに存在してよく、または、後述のように表面上に固定化されてよい。

【0066】

本発明のPMLは、抗体に基づく技術を含む様々な技術を用いて単離してよい。細胞は、PML上に存在するこれらの表面マーカー(上記参照)へのモノクローナル抗体の結合に基づく、ネガティブおよびポジティブ選択技術を用いて単離してよい。それ故に、PMLは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)および磁気ビーズ分離を含む、任意の抗体に基づく技術を用いて分離してよい。

【0067】

以下にさらに詳細に述べるように、PMLは、エクスピードで処置されてよい。したがって、細胞は、治療薬または診断薬がロードまたはトランスフェクトされてよく、それから、本発明の方法で治療的に用いられてよい。

【0068】

本発明の集団

本発明はまた、2以上の本発明のPMLの集団を提供する。任意の数の細胞が、集団に存在してよい。本発明の集団は、好ましくは、少なくとも約 5×10^5 の本発明のPMLを含む。集団は、さらに好ましくは、少なくとも約 1×10^6 、少なくとも約 2×10^6 、少なくとも約 5×10^6 、少なくとも約 1×10^7 、少なくとも約 2×10^7 、少なくとも約 5×10^7 、少なくとも約 1×10^8 または少なくとも約 2×10^8 の本発明のPMLを含む。ある場合には、集団は、少なくとも約 1.0×10^7 、少なくとも約 1.0×10^8 、少なくとも約 1.0×10^9 、少なくとも約 1.0×10^{10} 、少なくとも約 1.0×10^{11} または少なくとも約 1.0×10^{12} の本発明のPML、またはそれ以上を含んでよい。

【0069】

本発明の集団は、後述のように治療に有利である。大量の本発明のPMLを含む集団を生産するこの能力は、本発明の重要な利点の一つである。本発明は、全てではなくてもほとんどが目的の組織に効率的に移行して、そこで抗炎症効果を有する細胞の集団での患者の治療を可能にする。このことは、少ない細胞の投与量の使用を可能にし、オフターゲットの副作用および量に関連する副作用を回避する。

【0070】

本発明の集団は、本発明のPMLに加えて、他の細胞を含んでよい。しかしながら、集

10

20

30

40

50

国内の少なくとも 70 % の細胞は、好ましくは本発明の P M L である。さらに好ましくは、集団内の細胞の少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 % または少なくとも約 99 % は、本発明の P M L である。

【 0 0 7 1 】

本発明の集団は、好ましくは同質である。換言すると、集団内の全ての P M L は、好ましくは、遺伝子型的に、および表現型的に同一である。集団は、好ましくは、上記で定義されるように自己由来または同種異系である。

【 0 0 7 2 】

しかしながら、集団は、半同種異系であってもよい。半同種異系の集団は、典型的に、集団が投与される患者と免疫学的に適合する 2 以上の患者由来の単核細胞から生産される。換言すれば、集団内の全ての細胞は、好ましくは、遺伝学的に同一、または十分に遺伝学的に同一であり、その集団は、集団が投与される患者と免疫学的に適合する。本発明の P M L は患者由来であり得るので、それらは、治療される患者の自己由来であり得る（すなわち、その患者と遺伝学的に同一であり、または、十分に遺伝学的に同一であり、その患者への投与に適合する）。

10

【 0 0 7 3 】

本発明の集団は、単離され、実質的に単離され、精製され、または実質的に精製されてよい。集団は、培地および他の細胞のような任意の他の構成要素から完全にフリーである場合、単離され、または精製されている。集団は、担体または希釈剤、例えば、その使用目的を妨げない培養培地と混合される場合、実質的に単離されている。他の担体および希釈剤は、以下にさらに詳細に述べられる。実質的に単離され、または実質的に精製された集団は、本発明の P M L 以外の細胞を含まない。一部の実施態様では、本発明の集団は、成長マトリックスに存在してよく、または後述のように表面上に固定化されてよい。

20

【 0 0 7 4 】

集団は典型的に、インピトロで培養される。細胞を培養する技術は、当業者によく知られている。細胞は、血清無しの培地で、37 °C、5 % CO₂ の標準的な条件下で培養してよい。細胞は、好ましくは、以下にさらに詳細に述べる低酸素条件下で培養される。細胞は、平板のウェル、例えば標準的な 6 ウェルプレートを含む、任意の適切なフラスコまたは容器内で培養してよい。そのようなプレートは、F i s h e r s c i e n t i f i c 、V W R s u p p l i e r s 、N u n c 、S t a r s t e d t またはF a l c o n から市販される。ウェルは典型的に、約 1 ml ~ 約 4 ml の容量を有する。

30

【 0 0 7 5 】

中に集団が収容され、または培養されるフラスコ、容器またはウェルは、P M L のハンドリングを促進するために変更してよい。例えば、フラスコ、容器またはウェルは、例えば、成長マトリックスを含むことにより、細胞の培養を促進するために変更してよい。フラスコ、容器またはウェルは、P M L の付着を可能にするために、または表面へのP M L の固定化を可能にするために、変更してよい。1つまたは複数の表面は、細胞外マトリックスタンパク質、例えばラミニンまたはコラーゲン、または、細胞に結合して表面（単数または複数）上にそれらを固定化または捕捉する任意の他の捕捉分子で被覆してよい。

40

【 0 0 7 6 】

集団は、本明細書に記載の任意の技術を用いて、エクスピボで修飾してよい。例えば、集団は、治療薬または診断薬がトランスフェクトされ、またはロードされてよい。集団は、それから、以下にさらに詳細に述べる治療方法で使用してよい。

【 0 0 7 7 】

本発明の P M L の生産方法

本発明はまた、本発明の集団、すなわち 2 以上の本発明の P M L の集団を生産するための方法を提供する。その方法は、単核細胞 (M C) が P M L へ分化するのを誘導する条件下で M C を培養するステップを含む。その方法は、以下の P M L を回収し、培養するステップを含む：

50

(a) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105 および CD 271 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない；

(b) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271 および CXCR1 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない；

(c) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271 および CXCR2 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない；

(d) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271、CXCR1 および CXCR2 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない；

(e) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271、CXCR1 および CXCR4 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない（これらの細胞は、心臓帰巣および骨帰巣の PML である）；

(f) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271、CXCR2 および CXCR4 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない（これらの細胞は、心臓帰巣および骨帰巣の PML である）；

(g) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271、CXCR1、CXCR2 および CXCR4 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない（これらの細胞は、心臓帰巣および骨帰巣の PML である）；

(h) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271、CXCR4、血管内皮成長因子 (VEGF)、形質転換成長因子 1 (TGF-1)、インスリン様成長因子 - 1 (IGF-1)、線維芽細胞成長因子 (FGF)、腫瘍壞死因子 (TNF-1)、インターフェロン (IFN-1)、インターロイキン - 1 (IL-1)、CXCL12、CD109、CD119、活性化 B 細胞の核因子 - 軽鎖 - エンハンサー (NF-B)、CD140a、CD140b、CD221、CD222、CD304、CD309 および CD325 を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない（これらの細胞は、網膜帰巣の PML である）；または

(i) 検出可能なレベルの CD 29、CD 44、CD 73、CD 90、CD 105、CD 271、TGF-3、骨形成タンパク質 - 6 (BMP-6)、SOX-9、コラーゲン - 2、CD117 (c-kit)、ケモカイン (C-Cモチーフ)リガンド12 (CCL12)、CCL7、インターロイキン - 8 (IL-8)、血小板由来成長因子 - A (PDGF-A)、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、IGF-1、肝細胞増殖因子 (HGF)、PDGF-R、PDGF-R、CXCR4、C-Cケモカイン受容体タイプ1 (CCR1)、IGF-1受容体 (IGF-1R)、肝細胞増殖因子受容体 (HGF-R)、CXCL12 および NF-B を発現し、検出可能なレベルの CD 14、CD 34 および CD 45 を発現しない（これらの細胞は、骨帰巣の PML である）。

【0078】

回収細胞は、本発明の細胞に関して上述の因子のいずれかを過剰発現し得る。上記の (a) ~ (i) のうちのいずれか一つに加えて、その方法は、好ましくは、以下の PML を回収し、培養するステップを含む：

(j) CD120a (腫瘍壞死因子 (TNF) - 受容体 1)、CD120b (TNF - 受容体 2)、CD50 (細胞間接着分子 - 3、ICAM-3)、CD54 (ICAM-1)、CD58 (リンパ球機能関連抗原 - 1、LFA-1)、CD62E (E-セレク

10

20

30

40

50

チン)、CD62L (L-セレクチン)、CD62P (P-セレクチン)、CD106 (血管細胞接着タンパク質、VCAM-1)、CD102 (ICAM-2)、CD166 (活性化白血球細胞接着分子)、CD104 (インテグリン-4)、CD123 (インターロイキン-3受容体)、CD124 (インターロイキン-4受容体)、CD126 (インターロイキン-6受容体)、CD127 (インターロイキン-7受容体)および線維芽細胞成長因子受容体 (FGFR) を検出可能なレベルで発現する;

(k) (i) インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、(ii) IGF-1受容体; (iii) C-Cケモカイン受容体タイプ1 (CCR1)、(iv) ストロマ細胞由来因子-1 (SDF-1)、(v) 低酸素誘導因子-1 (HIF-1)、(vi) Akt1 および (vii) 肝細胞増殖因子 (HGF) および / または顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) のうちの1つまたは複数を検出可能なレベルで発現する; 10

(l) (k) の (i) ~ (vii) のうちの1つまたは複数を過剰発現する;
(m) (i) 血管内皮成長因子 (VEGF)、(ii) 形質転換成長因子 (TGF-)、(iii) インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、(iv) 線維芽細胞成長因子 (FGF)、(v) 腫瘍壞死因子 (TNF-)、(vi) インターフェロン (IFN-) および (vii) インターロイキン-1 (IL-1) のうちの1つまたは複数を検出可能なレベルで発現する、

(n) (m) の (i) ~ (vii) のうちの1つまたは複数を過剰発現する。

【0079】

単核細胞 (MC) およびそれらを単離する方法は、当技術分野で知られている。MCは、骨髓から単離される初期のMCであってよい。MCは、好ましくは末梢血MC (PBM C)、例えば、リンパ球、単球および / またはマクロファージである。PBM Cは、Ficoll (登録商標) のような親水性多糖類を用いて血液から単離することができる。例えば、PBM Cは、実施例に開示するように、Ficoll-Paque (登録商標) (市販の密度培地) を用いて血液から単離してよい。 20

【0080】

培養する前に、MCを間葉系幹細胞濃縮カクテルに曝してよい。そのカクテルは、好ましくは、CD3、CD14、CD19、CD38、CD66b (それらは不要な細胞上に存在する) および赤血球の構成要素を認識する抗体を含む。そのようなカクテルは、不要な細胞を赤血球と架橋してイムノロゼット (immunorosette) を形成し、必要なMCから除去され得る。好ましいカクテルはRosetteSep (登録商標) である。 30

【0081】

MCが間葉系細胞 (主に中胚葉由来の組織) に分化するのを誘導するのに適切な条件は、当技術分野で知られている。例えば、適切な条件は、Capelli, C., et al. (Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of bone marrow aspirates or marrow filter washouts. Bone Marrow Transplantation, 2007.40:p.785-791) に開示されている。これらの条件は、MCが本発明によるPMLに分化するのを誘導するために用いてよい。 40

【0082】

その方法は、好ましくは、MCがPMLに分化するのを誘導するために、MCを血漿溶解物とともに培養するステップを含む。血小板溶解物とは、これらの血小板の溶解により放出された血小板に含まれる天然の成長因子の組み合わせをいう。溶解は、化学的方法 (すなわちCaCl₂)、浸透圧的方法 (蒸留H₂Oの使用) により、または凍結融解方法により、達成することができる。血小板溶解物は、米国特許第5,198,357号に記載のように、全血由来であることができる。血小板溶解物は、好ましくは、実施例に記載のように調製される。血漿溶解物は、好ましくは、ヒト血漿溶解物である。 50

【 0 0 8 3 】

好ましい実施態様では、本発明の方法のステップ(a)は、MCが中胚葉系列の前駆細胞に分化するのを誘導するのに十分な時間、血小板溶解物を含む培地中でMCを培養するステップを含む。十分な時間は、典型的に、約15～約25日、好ましくは約22日である。培地は、好ましくは、容量で約20%またはそれ未満、例えば容量で約15%またはそれ未満、または、容量で約10%またはそれ未満の血小板溶解物を含む。培地は、好ましくは、容量で約5%～約20%、例えば容量で約10%～約15%の血小板溶解物を含む。培地は、好ましくは、容量で約10%の血小板溶解物を含む。

【 0 0 8 4 】

別の好ましい実施態様では、本発明の方法のステップ(a)は、間葉系の濃縮カクテルにMCを曝すステップ、およびそれから、MCが中胚葉系列の前駆細胞に分化するのを誘導するのに十分な時間、血小板溶解物を含む培地でMCを培養するステップを含む。十分な時間は、典型的に、約15～約25日、好ましくは約22日である。

[0 0 8 5]

ステップ(a)では、培地は好ましくは最小必須培地(MEM)である。MEMは、Sigma-Aldrichを含む様々な供給源から市販される。培地は、好ましくは、ヘパリン、L-グルタミンおよびベニシリン/ストレプトアビシン(P/S)のうちの1つまたは複数をさらに含む。L-グルタミンは、Glutamax(登録商標)(Life Technologiesから市販される)で置き換えてよい。

[0 0 8 6]

上述のように、本発明のPMLのいくつかは、検出可能なレベルのCXCR4を発現する。CXCR4の発現はサイトカイン依存的であり、幹細胞因子(SCF)、インターロイキン-6(IL-6)、Flt-3リガンド、肝細胞増殖因子(HGF)およびIL-3に細胞を曝すと増加する。培地は、(i)SCF、(ii)IL-6、(iii)Flt-3リガンド、(iv)肝細胞増殖因子および(v)IL-3、例えば、(i);(ii);(iii);(iv);(v);(i)および(ii);(i)および(iii);(i)および(iv);(i)および(v);(ii)および(v);(iii)および(iv);(ii)および(v);(iii)および(v);(iv)および(v);(i)、(ii)および(iii);(i)、(ii)および(iv);(i)、(ii)および(v);(i)、(iii)および(iv);(i)、(iv)および(v);(i)、(ii)および(v);(i)、(iii)および(v);(i)、(ii)および(iv);(i)、(iii)および(iv);(i)、(ii)および(v);(i)、(iii)および(v);(i)、(iv)および(v);(i)、(ii)および(v);(i)、(iii)および(v);(i)、(iv)および(v);(i)、(ii)および(iv);(i)、(iii)および(iv);(i)、(ii)および(v);(i)、(iii)および(v);(i)、(iv)および(v);(i)、(ii)および(v);または(i)、(ii)、(iii)、(iv)および(v)のうちの1つまたは複数を含んでよい。(i)~(v)のいずれかは、約10~約150ng/mlで存在してよい。

〔 0 0 8 7 〕

ステップ(a)は、好ましくは、PMLが付着するのを可能にする条件下で、MCを培養するステップを含む。適切な条件は、上記にさらに詳細に記載されている。

[0 0 8 8]

ステップ(a)では、MCは、好ましくは低酸素条件下で培養される。MCは、好ましくは、約20%未満の酸素(O_2)で、例えば、約19%未満、約18%未満、約17%未満、約16%未満、約15%未満、約14%未満、約13%未満、約12%未満、約11%未満、約10%未満、約9%未満、約8%未満、約7%未満、約6%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満または約1%未満の酸素(O_2)で培養される。MCは、好ましくは、約0%～約19% O_2 で、例えば、約1%～約15% O_2 、約2%～約10% O_2 または約5%～約8% O_2 で培養される。MCは、最も好ましくは、約0% O_2 で培養される。上記に示される%酸素(または% O_2)に関する数字は、例えば細胞インキュベーターにより、培養中に細胞に供給されるガス中の酸素の容量での%に関する。酸素の一部はインキュベーター内に漏れ得て、または、ドアーが開いているときに入り得ることが可能である。

【0089】

ステップ(a)では、M Cは、最も好ましくは、血小板溶解物の存在下および低酸素条件下で培養される。この組み合わせは、損傷組織内の自然状態を模倣し、したがって、より健康でより治療的に強力な細胞をもたらす。従来の細胞培養は、20%または21%酸素(およそ大気の含有量)で行われるが、ヒト体内に、この酸素レベルを有する場所はない。肺内の上皮細胞は、この酸素レベルを「見る」が、酸素が溶解して肺を去る時点で、17%付近に減少する。それから、組織の大部分でさらにいっそう、約1~2%に減少するが、関節内の軟骨のような無血管組織では0.1%という低さになる。

【0090】

ステップ(b)では、その方法は、さらに、上述の必須マーカー発現パターンを有するPMLを回収し、培養することを含む。必須マーカー発現パターンを有するPMLは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)および磁気ビーズ分離を含む、任意の、抗体に基づく技術を用いて回収してよい。FACSが好ましい。

10

【0091】

ステップ(a)に関して開示された、PMLを培養するステップに関する任意の方法は、ステップ(b)に等しく適用する。特に、細胞は、ステップ(a)に関して上述のように、血小板溶解物存在下および低酸素条件下で、ステップ(b)において培養される。

【0092】

上述から明らかなように、本発明の方法は、臨床的に意義のある条件、すなわち、微量のエンドトキシンおよび他の環境汚染物質、例えば、リポ多糖類、リポペプチドおよびペプチドグリカンなどの不存在下で行われる。このことは、本発明のPMLを、特に患者への投与に適切にする。

20

【0093】

M Cは、好ましくは、患者または同種異系ドナーから得られる。本発明はまた、患者への投与に適切な、本発明の集団を生産するための方法を提供し、ここで、その方法は、M Cが中胚葉系列の前駆細胞に分化するのを誘導する条件下で、患者由来のM Cを培養するステップ、および、(b)上記定義の発現パターンを有する前駆細胞を回収し、培養して、それにより、患者への投与に適切な本発明の集団を生産するステップ、を含む。集団は患者の自己由来であり、したがって、移植のときに拒絶されない。本発明はまた、患者への投与に適切でありかつ本方法で生産される、本発明の集団を提供する。

30

【0094】

あるいは、本発明は、患者への投与に適切な本発明の集団を生産するための方法を提供し、ここで、その方法は、細胞が投与される患者と免疫学的に適合する異なる患者由来のM Cを、M Cが中胚葉系列の前駆細胞に分化するのを誘導する条件下で培養するステップ、および、(b)上記定義の発現パターンを有する前駆細胞を回収し、培養して、それにより、患者への投与に適切な本発明の集団を生産するステップ、を含む。集団は患者と同種異系であり、したがって移植のときの拒絶の可能性を減らす。本発明はまた、患者への投与に適切でありかつ本方法で生産される、本発明の集団を提供する。

【0095】

薬剤、方法および治療用途

40

本発明のPMLは、ヒトまたは動物の体の治療方法で用いてよい。したがって、本発明は、治療によるヒトまたは動物の体の治療方法での使用のための、本発明のPMLまたは本発明の集団を提供する。特に、本発明は、患者での損傷組織を修復するための、本発明のPMLの使用に関する。本発明はまた、患者での、心臓の外傷または疾患、加齢黄斑変性、または、骨の外傷または疾患を治療するための、本発明のPMLの使用に関する。

【0096】

本発明は、本発明の集団を患者に投与するステップ(前記集団は、治療的に有効数の細胞を含む)、および、それにより、患者での損傷組織を治療するステップ、を含む、患者での損傷組織を修復する方法を提供する。本発明はまた、患者での損傷組織の修復での使用のための本発明の集団を提供する。本発明はまた、患者での損傷組織を修復するための

50

薬剤の製造での本発明の集団の使用を提供する。

【0097】

組織は、好ましくは中胚葉由来である。組織は、さらに好ましくは、心臓組織、網膜組織または骨組織である。

【0098】

組織への損傷は、外傷または疾患に起因し得る。外傷または疾患は、好ましくは、患者での、心臓の外傷または疾患、加齢黄斑変性 (AMD)、または、骨の外傷または疾患である。本発明は、したがって、本発明の集団を患者に投与するステップ (前記集団は、治療的に有効数の細胞を含む)、および、それにより、患者での、心臓の外傷または疾患、加齢黄斑変性、または、骨の外傷または疾患を治療するステップ、を含む、患者での、心臓の外傷または疾患、加齢黄斑変性、または、骨の外傷または疾患を治療する方法を提供する。本発明はまた、患者での、心臓の外傷または疾患、加齢黄斑変性、または、骨の外傷または疾患の治療での用途のための、本発明の集団を提供する。本発明はまた、患者での、心臓の外傷または疾患、加齢黄斑変性、または、骨の外傷または疾患を治療するための薬剤の製造での、本発明の集団の使用を提供する。

10

【0099】

心臓の外傷または疾患は、好ましくは、心筋梗塞 (MI)、左室肥大、右室肥大、塞栓、心不全、先天性心臓欠損 (congenital heart deficit)、心臓弁膜症、不整脈、および、心筋炎から選択される。

【0100】

20

MIは、心筋により放出されるVEGFおよびEPOのレベルを増大させる。さらに、MIは、炎症性反応と関連し、また、梗塞組織は、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF)、インターロイキン (IL-6) およびKC/Gro-も放出する。CCL7 (以前はMCP3として知られていた)、CXCL1、CXCL2は、心筋梗塞 (MI) の後に心臓内で著しく上方制御され、梗塞心筋へのMSCの帰巣および生着の制御に関与し得る。

【0101】

心筋梗塞マウスモデルでは、IL-8は、まず、MI後の最初の2日に、遺伝子発現を高度に上方制御することが示された。驚くべきことに、IL-8発現は、主に梗塞領域および境界領域で増加し、残りの心筋では、非常に少なかった。CXCR2を活性化することにより、MIFは、ケモカイン様の機能を示し、そして、炎症性細胞動員およびアテローム発生の主なレギュレーターとしての役割を果たす。

30

【0102】

AMDは、乾燥AMDまたは湿潤AMDであってよい。乾燥AMDは、網膜の下の網膜色素上皮層の萎縮により生じ、それは、眼の中央部での光受容体 (杆体および錐体) の喪失を介して失明を引き起こす。湿潤AMDは、ブルッフ膜を介した、脈絡毛細管板での異常な血管増殖 (脈絡膜血管新生) に起因して失明を引き起こし、最終的に、黄斑下での血液およびタンパク質の漏出をもたらす。湿潤AMDは、黄斑での色素上皮由来因子 (PEDF) のレベルの減少と関連する。湿潤AMDの処置で用いられるPMLは、好ましくは、PEDFを検出可能なレベルで発現し、またはPEDFを過剰発現する。

40

【0103】

骨の疾患または外傷は、好ましくは、骨折、ソルター - ハリス骨折、若木骨折、骨棘、頭蓋骨癒合症、コフィン - ローリー症候群、進行性骨化性線維異形成症、線維性骨異形成症、フォング病 (Fong Disease) (または爪膝蓋骨症候群)、低ホスファターゼ症、クリッペル - ファイル症候群、代謝性骨疾患、爪膝蓋骨症候群、変形性関節症、変形性骨炎 (または骨パジェット病)、囊胞性線維性骨炎 (または線維性骨炎またはフォンレックリングハウゼン骨病)、恥骨骨炎、硬化性骨炎 (condensing osteitis) (または硬化性骨炎 (osteitis condensans))、硬化性腸骨炎、離断性骨軟骨炎、骨形成不全症、骨軟化症、骨髓炎、骨減少症、大理石骨病、骨粗鬆症、骨壊死、骨萎縮性骨化過剰症 (porotic hyperostosis)

50

、原発性副甲状腺機能亢進症、腎性骨ジストロフィー、骨がん、転移性がんと関連する骨病変、ゴーハム・スタウト病 (Gorham Stout disease) 、原発性副甲状腺機能亢進症、歯周病、および、関節置換の無菌的弛み (aseptic loosening) から選択される。骨がんは、ユーイング肉腫、多発性骨髄腫、骨肉腫 (骨の巨大な腫瘍) 、骨軟骨腫または破骨細胞腫であり得る。骨病変をもたらす転移性がんは、乳がん、前立腺がん、腎臓がん、肺がん、および / または、成人T細胞白血病であり得る。

【0104】

損傷組織が心臓組織または骨組織である場合は、集団内のPMLは、好ましくは、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD271、CXCR1、CXCR2およびCXCR4を発現し、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45を発現しない。損傷組織が骨組織である場合は、集団内のPMLは、さらに好ましくは、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD271、TGF-3、骨形成タンパク質-6 (BMP-6) 、SOX-9、コラーゲン-2、CD117 (c-kit) 、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド12 (CCL12) 、CCL7、インターロイキン-8 (IL-8) 、血小板由来成長因子-A (PDGF-A) 、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) 、IGF-1、肝細胞増殖因子 (HGF) 、PDGF-R、PDGF-R、CXCR4、C-Cケモカイン受容体タイプ1 (CCR1) 、IGF-1受容体 (IGF-1R) 、肝細胞増殖因子受容体 (HGF-R) 、CXCL12およびNF-Bを発現し、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45を発現しない。

【0105】

損傷組織が網膜組織である場合は、集団内のPMLは、好ましくは、検出可能なレベルのCD29、CD44、CD73、CD90、CD105、CD271、CXCR4、血管内皮成長因子 (VEGF) 、形質転換成長因子-1 (TGF-1) 、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) 、線維芽細胞成長因子 (FGF) 、腫瘍壊死因子 (TNF-) 、インターフェロン (IFN-) 、インターロイキン-1 (IL-1) 、CXCL12、CD109、CD119、活性化B細胞の核因子-4-軽鎖-エンハンサー (NF-B) 、CD140a、CD140b、CD221、CD222、CD304、CD309およびCD325を発現し、検出可能なレベルのCD14、CD34およびCD45を発現しない。

【0106】

全ての例において、本発明のPMLは、好ましくは、患者または同種異系ドナー由来である。本発明のPMLが患者に由来することは、患者の免疫系によりPML自体が拒絶されないことを確実にするであろう。ドナーとレシピエント間の任意の違いは、損傷組織の少なくとも一部が修復される前にではないが、最終的にPMLのクリアランスをもたらす。

【0107】

本発明は、患者に、治療的に有効数の本発明のPMLを、患者に投与することに関する。治療的に有効数は、損傷、疾患または外傷の症状のうちの1つまたは複数を改善する数である。治療的に有効数は、好ましくは、損傷組織を修復する数、または、疾患または外傷を治療する数である。適切な数は、以下にさらに詳細に述べられる。

【0108】

本発明のPMLは、任意の適切な患者に投与してよい。患者は一般に、ヒト患者である。患者は、幼児、子供または大人であってよい。患者は、損傷組織を有することが知られていてよく、または、損傷組織を有する疑いがある。患者は、関連のある疾患または外傷を起こしやすくてよく、または、そのリスクがあつてよい。例えば、患者は、遺伝学的に心不全にかかりやすくてよい。

【0109】

本発明は、損傷組織を修復するため、または疼痛緩和を与えるための、他の方法および

10

20

30

40

50

物質と組み合わせて用いてよい。ある場合には、本発明のPMLは、損傷組織を修復する目的または疼痛緩和を与える目的の他の物質と、同時に、連続して、または、別々に投与してよい。PMLは、損傷組織のための現存の治療と組み合わせて用いてよく、および、例えば、そのような治療と単にミックスしてよい。したがって、本発明は、損傷組織の現存の治療の有効性を高めるために用いてよい。

【0110】

本発明は、好ましくは、治療薬および/または診断薬がロードまたはトランスフェクトされたPMLの用途に関する。治療薬は、損傷組織の修復を補助してよい。蛍光分子のような診断薬は、患者でのPMLの位置を特定するのを補助してよい。PMLは、当技術分野で知られている任意の方法を用いてロードまたはトランスフェクトされてよい。PMLのローディングは、インピトロまたはエクスピボで行われてよい。それぞれの場合において、PMLは、培地で薬剤と単純に接触してよい。あるいは、PMLは、リポソームのようなデリバリービヒクルを用いて、薬剤がロードされてよい。そのようなビヒクルは当技術分野で知られている。

10

【0111】

PMLのトランスフェクションは、インピトロまたはエクスピボで行なわれてよい。あるいは、安定したトランスフェクションは、MC段階に行なわれてよく、導入遺伝子を発現するPMLがそれから分化するのを可能にする。PMLは、薬剤をコードする核酸でトランスフェクトされる。例えば、薬剤をコードするウイルス粒子または他のベクターを用いてよい。これを行うための方法は、当技術分野で知られている。

20

【0112】

その核酸は、PMLでの薬剤の発現を増大させる。核酸分子は、好ましくは、薬剤をコードする配列に作動可能に連結され、かつ、PMLにおいて活性であり、または、PMLにおいて誘導され得る、プロモーターを含む。

【0113】

特に好ましい実施態様では、薬剤をコードする核酸は、ウイルス粒子を介して送達されてよい。ウイルス粒子は、効率的なトランスフェクションを確実にするための標的化分子を含んでよい。標的化分子は、典型的に、その分子が、ウイルスをPMLに標的化することができるよう、ウイルス表面上に全体的に、または部分的に与えられる。

【0114】

30

任意の適切なウイルスを、そのような実施態様で用いてよい。ウイルスは、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス、または、単純ヘルペスウイルスであってよい。特に好ましい実施態様では、ウイルスはレンチウイルスであってよい。レンチウイルスは、遺伝子を送達する用途に適切な修飾HIVウイルスであってよい。レンチウイルスは、SIV、FIV、またはウマ伝染性貧血ウイルス(EQIA)に基づくベクターであってよい。ウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)であってよい。本発明で用いられるウイルスは、好ましくは複製欠損型である。

【0115】

ウイルス粒子を使用する必要はない。従来のプラスミドDNAまたはRNAトランスフェクションなど、本発明のPMLをトランスフェクトすることが可能な任意のベクターを用いてよい。

40

【0116】

核酸コンストラクトの取り込みは、様々な公知のトランスフェクション技術、例えばトランスフェクション剤の使用を含む技術によって、増強され得る。これらの試薬の例は、カチオン剤、例えば、リン酸カルシウムおよびDEAE-デキストラン、および、リポフェクタント(lipofectant)、例えば、リポフェクタミン(lipofectamine)、フュージーン(fugene)およびトランスフェクタム(transfectam)を含む。

【0117】

50

細胞は、適切な条件下でロードまたはトランスフェクトされてよい。細胞および薬剤またはベクターは、例えば、5分～10日間、好ましくは1時間～5日間、さらに好ましくは5時間～2日間、およびさらにより好ましくは12時間～1日、接触してよい。

【0118】

本発明はまた、上述の薬剤がロードまたはトランスフェクトされたPMLを提供する。そのようなPMLは、本発明の治療的実施態様で用いてよい。

【0119】

一部の実施態様では、MCは、患者から回収して、本発明を用いてPMLに変換して、インピトロでロードまたはトランスフェクトして、そしてそれから、その同一患者に戻してよい。そのような例では、本発明で用いられるPMLは自己由来細胞であり、その患者と完全一致である。好ましい例では、本発明で用いられる細胞は、患者から回収されて、エクスピボで用いられ、その後にその同一患者に戻される。

10

【0120】

【医薬組成物および投与】

本発明は、(a)本発明のPMLまたは本発明の集団、および、(b)薬学的に許容できる担体または希釈剤を含む医薬組成物をさらに提供する。その組成物は、本明細書に記載の任意のPMLまたは集団を含んでよく、および、一部の実施態様では、本明細書に記載の核酸分子、ベクター、またはウイルスを含んでよい。本発明は、有効量の本発明の医薬組成物を患者に投与するステップを含む、患者での損傷組織を修復する方法を提供する。上述の任意の治療的実施態様は、本実施態様に等しく適用する。

20

【0121】

本発明の様々な組成物は、任意の適切な方法を用いて製剤化されてよい。標準的な薬学的に許容できる担体および/または賦形剤での細胞の製剤化は、製剤分野での常法を用いて行なってよい。製剤の厳密な性質は、投与される細胞および所望の投与経路を含む様々な因子に依存する。適切な製剤タイプは、RemingtonのPharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, Eastern Pennsylvania, USAに完全に記載されている。

【0122】

細胞は、任意の経路で投与してよい。適切な経路は、限定されないが、静脈内、筋肉内、腹腔内または他の適切な投与経路を含む。損傷組織が網膜組織である場合は、細胞は、眼に投与してよい。損傷組織が心臓組織である場合は、細胞は、心内膜心筋、心筋上(epimyocardial)、心室内、冠動脈内、逆行性冠状静脈洞、動脈内、心膜内または静脈内の経路を介して投与してよい。損傷組織が骨である場合は、細胞は、骨内経路を介して、または、骨折のような外傷、または疾患の部位へ、投与してよい。細胞は、好ましくは静脈内投与される。

30

【0123】

組成物は、生理的に許容できる担体または希釈剤とともに調製してよい。典型的に、そのような組成物は、細胞の液体懸濁液として調製される。細胞は、薬学的に許容でき、かつ、活性成分と適合する、賦形剤と混合してよい。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール等およびそれらの組み合わせである。

40

【0124】

加えて、必要に応じて、本発明の医薬組成物は、少量の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、および/または、効果を高めるアジュバントを含んでよい。組成物は、好ましくは、ヒト血清アルブミンを含む。

【0125】

適切な担体または希釈剤の一つは、Plasma-Lyte A(登録商標)である。これは、静脈内投与のための、滅菌の、非発熱性の等張液である。各100mLは、526mgの塩化ナトリウム、USP(NaCl); 502mgのグルコン酸ナトリウム(C6H11NaO7); 368mgの酢酸ナトリウム三水和物、USP(C2H3NaO2

50

・ $3\text{H}_2\text{O}$ ）；37mgの塩化カリウム、U.S.P.（KCl）；および30mgの塩化マグネシウム、U.S.P.（MgCl₂·6H₂O）を含む。それは、抗菌剤を含まない。pHは水酸化ナトリウムで調整される。pHは7.4（6.5～8.0）である。

【0126】

P.M.L.は、投与製剤と適合する方法で、かつ治療的に有効量で投与される。投与されるべき量は、治療されるべき対象、対象の免疫系の能力および所望の修復度合に依存する。投与が必要なP.M.L.の正確な量は、熟練者の判断に依存してよく、および、各対象に特有であってよい。

【0127】

任意の適切な細胞数を、対象に投与してよい。例えば、患者のkgあたり少なくとも、または、約、 0.5×10^6 、 1.5×10^6 、 4.0×10^6 または 5.0×10^6 の細胞を投与してよい。例えば、少なくとも、または、約、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 の細胞を投与してよい。目安として、投与される本発明の細胞数は、 10^5 ～ 10^9 、好ましくは 10^6 ～ 10^8 であってよい。典型的に、最大で 2×10^8 までのP.M.L.が、各患者に投与される。本発明の集団に関して上述された、任意の具体的な数を投与してよい。細胞が投与され、または存在するような場合は、細胞の生存を促進するための培地が存在してよい。ある場合には、本発明の細胞は、凍結アリコート中に与えられてよく、DMSOのような物質が、凍結中の生存を促進するために存在してよい。そのような凍結細胞は、典型的に、解凍されて、それから、維持または投与のいずれかのために、バッファー中または培地中に置かれる。

【0128】

以下の実施例は、本発明を説明する。

【実施例】

【0129】

材料および方法

【0130】

患者から血液を採取した時点で、中胚葉起源の前駆細胞を、衛生的条件下で、幹細胞実験室において調製した；細胞または他の材料を含む開放容器は、ラミナーフローフード下で取り扱った。それぞれの調製ステップで、サンプルを抜き取り、幹細胞数および生存率を決定した。

【0131】

単核細胞を、Ficoll-Paque（登録商標）1.073密度遠心分離により全血から単離し、-MEM-P.L.中で5日間培養した。付着した細胞を回収して、それらの免疫表現型を、フローサイトメトリー分析により、多くの細胞マーカー（以下参照）に関する免疫蛍光染色により決定した。適切なアイソタイプコントロールを、それぞれの染色方法のために用いた。

【0132】

細胞生存率は、1%トリパンブルー溶液で評価した。細胞は、FACS（FACSCalibur, Beckton Dickinson）により計数される。細胞は、また、マイコプラズマ、生殖不能（グラム染色により評価される）、エンドトキシン、同一性、純度、および、生存率、および、染色体異常を除外するための核型分析に関して試験した。

【0133】

以下は、細胞をどのようにして実際に得たかを要約する。

1. 20mlの末梢血を患者から採取した。

2. 11.5mlの残存血液を、Ficoll-Paque（登録商標）1.073を通過させた。

3. これを遠心分離して単核細胞を得て、これらを、以下のいずれか：

4a. 0%酸素中で8日間、培養下で増殖させた、または

4b. ロゼット分離（Rosette Separation）を行い、それから、

10

20

30

40

50

0 % 酸素中で 8 日間、培養下で増殖させた。

5 . 培地を交換し、0 % 酸素中で 14 日間、細胞を培養した。

6 . 細胞を回収して、F A C S を行なった。

【 0 1 3 4 】

様々なマーカーを、R T - P C R および F A C S 分析を用いて調べた。調べた主なマーカーは、C D 1 4 、C D 2 9 、C D 3 4 、C D 4 4 、C D 4 5 、C D 7 3 、C D 9 0 、C D 1 0 5 、C D 2 7 1 、C D 1 8 1 、C D 1 8 2 および C D 1 8 4 であった。

【 0 1 3 5 】

以下は、用いられた実際のプロトコルである。

【 0 1 3 6 】

[多血小板血漿 (P R P) の調製]

1 . 血液サンプルを、2 本の 15 m l ファルコンチューブに、それぞれ > 8 m l に分けた。

2 . 120 × g で 15 分、ブレークなし、室温で (R T) 遠心分離した。

3 . 多血小板血漿 (P R P) の上清を、新しい 15 m l ファルコンチューブに移した。

4 . 移した P R P 量を記録した。

5 . P R P 量を、ハンクス平衡塩類溶液 (H B S S) で置換した。

【 0 1 3 7 】

[培養培地の調製]

1 . C e l l - D y n 機器を用いた自動血液分析のために、0 . 3 m l の P R P をエッペンドルフチューブに移した。理論上の血小板の最大数を計算した。

理論上の血小板の最大数 = 血小板濃度 × P R P 量

2 . 凍結保存 (- 80) のために、0 . 25 m l の P R P をエッペンドルフチューブに移した。

3 . 残存 P R P を、1610 × g 、10 分、R T 、ブレーク付きで遠心分離した。

4 . 血小板フリー血漿 (P F P) の上清を別のファルコンチューブ内へ取り出し、血小板ペレットを、 1×10^9 細胞 / m l の濃度を与える量の P F P で再懸濁した (理論上の血小板の最大数 ($1 . 5 \times 10^9$ を目標とする) を用いて 1×10^9 を獲得する) 。

5 . 凍結保存 (- 80) のために、残存 P F P を 0 . 25 m l アリコートでエッペンドルフチューブ内に移した。

6 . P R P ファルコンチューブの蓋を、パラフィルムで包んだ。

7 . ファルコンチューブを、液体窒素中に 5 分間浸した。

8 . ファルコンチューブを、解凍するまで 37 のウォーターバスに浸した。

9 . ステップ 7 およびステップ 8 を、さらに 3 回繰り返した。

10 . M E M 、5 U / m l のヘパリン、2 mM のグルタマックス (g l u t a m a x) 、1 % の P / S に対して 10 % の P L を加えることにより (すなわち、1 . 5 m l の P L を 13 . 5 m l の培地に加える) 、培養培地を作製した。

【 0 1 3 8 】

[M N C の単離]

1 . 希釈血液サンプル量 (16 . 5 m l) を、新しい 50 m l ファルコンチューブ内へ混合した。

2 . 血液サンプルを、さらに、H B S S で約 33 m l に、1 : 2 希釈した。

3 . 15 m l の F i c o l l - P a q u e P R E M I U M 1 . 0 7 3 を、2 本の新しい 50 m l ファルコンチューブに加えた。

4 . 希釈血液サンプルを、チューブを傾けてサンプルをゆっくりチューブの壁に対して排出させることにより、F i c o l l - P a q u e の上部に注意深く層化した。

5 . これを、400 × g 、35 分、ブレーク無し、R T で遠心分離した。

6 . 柔らかいバスツールピペットを用いて、混濁单核細胞層を乱さずに、出来る限り多くの上清 (H B S S) を捨てた。

10

20

30

40

50

7. 透明な F i c o l l - P a q u e の上部に存在する混濁单核細胞層を、新しい 50 m l チューブに吸引して、プールした。

8. 移した M N C の量を、10 m l ピペットにそれを吸引することにより、記録した。

9. その半量を、新しい 50 m l チューブに移した。

10. H B S S を含む少なくとも 3 倍のサンプル量、すなわち約 13 m l で、両チューブ内で M N C を希釈した。

11. 両チューブを、500 × g、15 分、ブレーキ付き、R T で遠心分離した。

12. 上清を捨てた。

13. チューブのうちの一つを、およそ 100 万 M N C / m l 、約 5 m l に再懸濁した。

【 0 1 3 9 】

[R o s e t t e - S e p 濃縮]

1. 2 つめの M N C ペレットを、最初の 0.75 m l アリコート由来の 660 μ L 全血で再懸濁した。

2. 33 μ L の R o s e t t e - S e p を加えて、ピッティングにより混合した。

3. これを、20 分間、室温でインキュベートした。

4. 700 μ L の H B S S を、合計サンプル量約 1.4 m l まで加えることにより、サンプルを 1 : 2 希釈した。

5. 1 m l の F i c o l l - P a q u e を、新しい 15 m l ファルコンチューブに加えた。

6. 希釈血液サンプルを、F i c o l l - P a q u e の上部に注意深く層化した。

7. これを、400 × g、35 分、ブレーキ無し、R T で遠心分離した。

8. その上清を、1 m l シングルチャンネルピペットでそれを吸引することにより捨てた。

9. F i c o l l 上部の混濁細胞層を、新しい 15 m l ファルコンチューブに移した。

10. 富化細胞の量を記録して、それらを H B S S を含む少なくとも 3 倍のサンプル量、すなわち約 3 m l で希釈した。

11. 細胞を、500 × g、15 分、ブレーキ付き、R T で、遠心分離した。

12. 上清を捨てた。

13. ペレットを 0.5 m l に再懸濁した。

【 0 1 4 0 】

[細胞培養]

1. 細胞を、自己由来または同種異系のいずれかの血小板溶解培地に、1.0 × 10⁵ 細胞のシーディング密度でまいた。

2. これを、適切な培地量で上いっぱいまで満たした。

3. 細胞を、37 °C 、 5% C O₂ で、8 日間インキュベートした。

4. 培地を 8 日目に換えて、細胞を 14 日目までインキュベートした。

5. コロニーを拾って新しい培養容器に移した。同種異系の血小板溶解培地を加えた。

6. 細胞の培養および継代を、およそ 5 × 10⁵ ~ 1 × 10⁶ の細胞が得られるまで続けた。

7. 細胞を回収してフローサイトメトリーにより分析し、そして、必要に応じて、細胞を凍結保存した。

【 0 1 4 1 】

[帰巣および抗炎症性テスト]

本発明により生産された細胞を、マウスにおいて、特定の損傷組織へ帰巣して、そこで抗炎症効果を誘導する、それらの能力に関して試験した。帰巣については、細胞は蛍光剤で標識して、マウス体内でのそれらの位置を、生物発光を用いて決定した。

10

20

30

40

50

【0142】

抗炎症効果については、インターロイキン（例えばIL-8）、セレクチン、接着分子（例えばICAM-1）および化学誘引タンパク質（例えばMCP-1およびTNF-）を含む、様々な炎症性マーカーに関する酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を行なつた。

【0143】

結果

[全ての細胞]

本発明により生産された、中胚葉系列の前駆細胞の全てが、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105およびCD271を発現したが、CD14、CD34およびCD45を発現しなかった。CD44の存在およびCD34の不存在を示す、例示的なRT-PCRゲルを図1に示す。

【0144】

例示的なFACSの結果のセットを、図2～図4に示す。これらは、細胞が、少なくともCD73およびCD90に関してポジティブで、CD14、CD34およびCD45に関してネガティブであることを確認する。

【0145】

細胞は典型的に、10～20 μmの直径である。細胞は典型的に、紡錘形の形態を有し、線維芽細胞様である（すなわち、それらは数個の長細い細胞突起を持つ小細胞体を有する）。

【0146】

[帰巣する細胞]

特定の損傷組織に帰巣することができる細胞は、ケモカイン受容体タイプ1および2（CXCR1およびCXCR2）を発現することが示された。

【0147】

損傷した心臓組織および骨組織に帰巣することができる細胞は、CXCR4を発現することが示された。

【0148】

損傷した網膜組織に帰巣することができる細胞は、CXCR4、血管内皮成長因子（VEGF）、形質転換成長因子-1（TGF-1）、インスリン様成長因子-1（IGF-1）、線維芽細胞成長因子（FGF）、腫瘍壞死因子（TNF-）、インターフェロン（IFN-）、インターロイキン-1（IL-1）、CXCL12、CD109、CD119、活性化B細胞の核因子-軽鎖-エンハンサー（NF-B）、CD140a、CD140b、CD221、CD222、CD304、CD309およびCD325を発現することが示された。

【0149】

損傷した骨組織に帰巣することができる細胞、および、その細胞は、検出可能なレベルのTGF-3、骨形成タンパク質-6（BMP-6）、SOX-9、コラーゲン-2、CD117（c-kit）、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド12（CCL12）、CCL7、インターロイキン-8（IL-8）、血小板由来成長因子-A（PDGF-A）、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）、IGF-1、肝細胞増殖因子（HGF）、PDGF-R、PDGF-R、CXCR4、C-Cケモカイン受容体タイプ1（CCR1）、IGF-1受容体（IGF-1R）、肝細胞増殖因子受容体（HGF-R）、CXCL12およびNF-Bを発現する。

【0150】

[抗炎症効果]

本発明により生産された細胞は、以下の抗炎症性マーカー：CD120a（腫瘍壞死因子（TNF）-受容体1）、CD120b（TNF-受容体2）、CD50（細胞間接着分子-3、ICAM-3）、CD54（ICAM-1）、CD58（リンパ球機能関連抗原-1、LFA-1）、CD62E（E-セレクチン）、CD62L（L-セレクチ

10

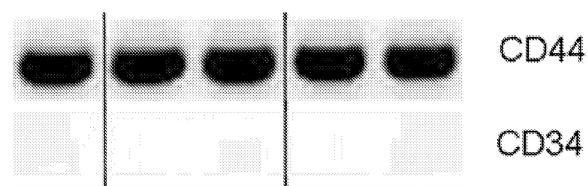
20

40

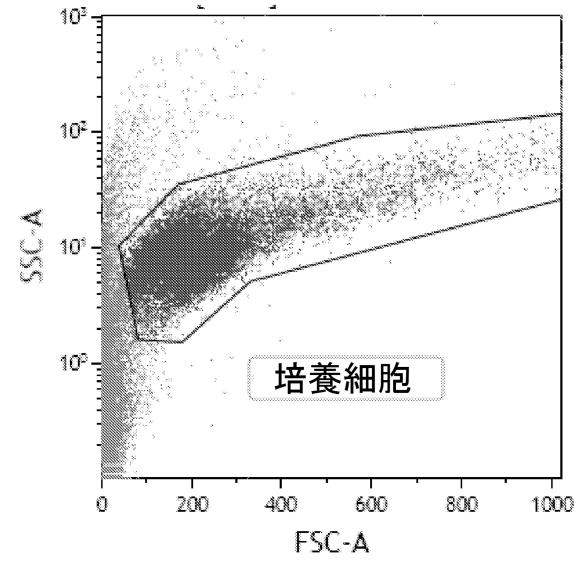
50

ン)、CD62P(P-セレクチン)、CD106(血管細胞接着タンパク質、VCAM-1)、CD102(ICAM-2)、CD166(活性化白血球細胞接着分子)、CD104(インテグリン-4)、CD123(インターロイキン-3受容体)、CD124(インターロイキン-4受容体)、CD126(インターロイキン-6受容体)、CD127(インターロイキン-7受容体)および線維芽細胞成長因子受容体(FGFR)を発現することが示された。

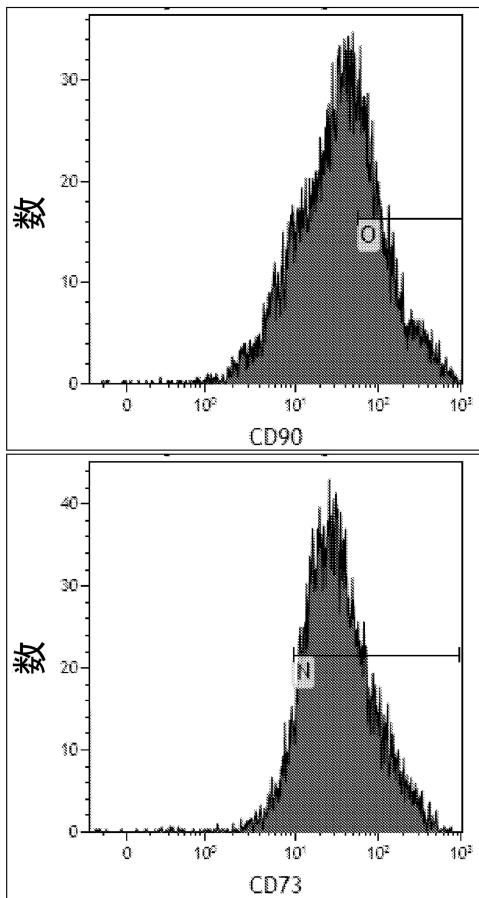
【図1】



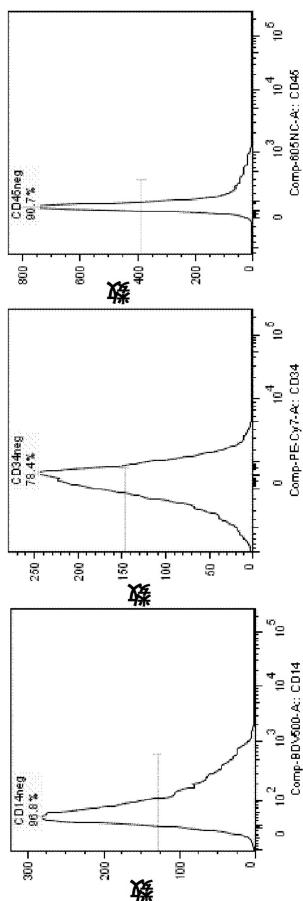
【図2】



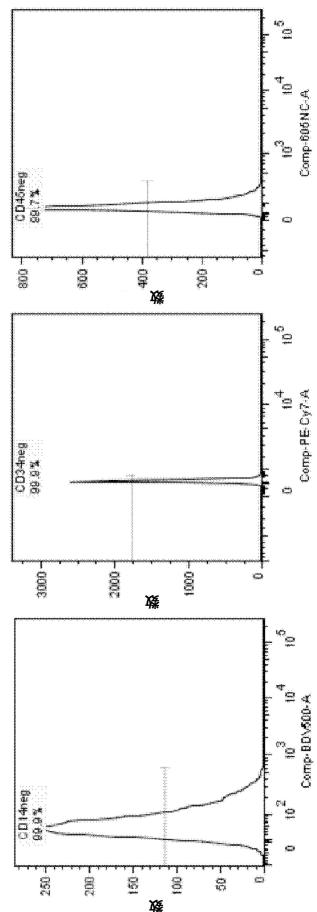
【図3】



【図4 a】



【図4 b】



フロントページの続き

(51) Int.CI. F I
 A 6 1 P 27/02 (2006.01) A 6 1 P 27/02

(31) 優先権主張番号 1111505.2
 (32) 優先日 平成23年7月6日(2011.7.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 1111509.4
 (32) 優先日 平成23年7月6日(2011.7.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)
 (31) 優先権主張番号 1111500.3
 (32) 優先日 平成23年7月6日(2011.7.6)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)

(73) 特許権者 514002662
 セル セラピー リミテッド
 C E L L T H E R A P Y L I M I T E D
 英国 エスエー2 8ピーピー シングルトン パーク スウォンジ スウォンジ ユニバーシティー スクール オブ メディシン ルーム 137 ファースト フロア インスティテュート オブ ライフ サイエンシズ(番地なし)
 Institute of Life Sciences First Floor, Room
 137 School of Medicine Swansea University Singleton Park Swansea SA2 8PP United Kingdom

(74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 濑田 あや子
 (74) 代理人 100185384
 弁理士 伊波 興一朗
 (74) 代理人 100137811
 弁理士 原 秀貢人
 (72) 発明者 ハウゼ, トーマス, アヴェレル
 スウェーデン王国 エス- 504 38 ボラス スカンガタン 16
 (72) 発明者 エヴァンズ, マーティン, ジョン
 英国 シーエフ15 8ピーキュー ラディル カーディフ モイクレア ウィンザー ロード(番地なし)
 (72) 発明者 レジナルド, アジャン
 英国 シーヴィ37 7イーイー ウオリックシャー ストラトフォード-アポン-エイヴォン フェルトン ウェイ 5
 (72) 発明者 ピーパー イーナ ローラ
 英国 エスエー3 5エーユー スウォンジ ベイズウォーター コート 3
 (72) 発明者 パーキンス ブライアン リー
 英国 エスエー3 5エーユー スウォンジ ベイズウォーター コート 3

合議体

審判長 長井 啓子

審判官 小暮 道明
審判官 常見 優

(56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0123498(US, A1)
特表2010-532370(JP, A)
EXPERIMENTAL HEMATOLOGY(2008)vol. 36, p. 1014 -
1021
Stem Cell Rev., 2007年12月, Vol. 3, p. 239 - 248
Stem Cells Dev., 2010年5月, Vol. 19, p. 693 - 706
Ann. N. Y. Acad. Sci., 2007年6月, Vol. 1106, p. 262 - 27
1
Stem Cell Rev., 2011年6月25日, Vol. 8, p. 243 - 250

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N5/
A61K35/
CAPplus/MEDLINE/WPIIDS/BIOSIS(STN)
JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)