

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5519108号
(P5519108)

(45) 発行日 平成26年6月11日(2014.6.11)

(24) 登録日 平成26年4月11日(2014.4.11)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 35/28 (2006.01)	A 6 1 K 35/28	
A 6 1 K 35/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/48	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14	C
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 37/24	

請求項の数 28 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-538181 (P2007-538181)	(73) 特許権者	507135869
(86) (22) 出願日	平成17年10月25日(2005.10.25)		セルラント セラピューティクス、インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2008-517948 (P2008-517948A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア 94070, サン カルロス、インダストリアルロード 1531
(43) 公表日	平成20年5月29日(2008.5.29)	(74) 代理人	100099759
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/038500		弁理士 青木 篤
(87) 国際公開番号	W02006/047569	(74) 代理人	100077517
(87) 国際公開日	平成18年5月4日(2006.5.4)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成20年10月24日(2008.10.24)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	60/622, 318		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成16年10月25日(2004.10.25)	(74) 代理人	100087413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨髄細胞集団の増殖方法及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトにおける造血を一過性に再構成するための治療用組成物の製造方法であって、以下のステップ：

a) 複数の非血縁同種ドナー由来のCD34+CD90+ヒト造血幹細胞 (HSC) を含む開始細胞集団を、サイトカイン及び成長因子の混合物を含む培地中、エクスピボで培養して、骨髄球前駆 (MP) 細胞を含み、かつ、5%未満のCD34+CD90+HSCを含む増殖された細胞集団を生成し；そして

b) 前記増殖された細胞集団を、哺乳動物宿主への投与に好適な医薬として許容可能な媒体中に再懸濁する、
を含み、ここで、前記ドナーと前記ヒトの間に主要組織適合性複合体 (MHC) 遺伝子における少なくとも部分的な不一致が存在する、前記方法。

【請求項 2】

ヒトにおける造血を一過性に再構成するための治療用組成物の製造方法であって、以下のステップ：

a) 複数の非血縁同種ドナー由来のCD34+CD90+ヒト造血幹細胞 (HSC) を含む開始細胞集団を、サイトカイン及び成長因子の混合物を含む培地中、エクスピボで培養して、少なくとも50%の骨髄球前駆 (MP) 細胞を含む増殖された細胞集団を生成し；そして

b) 前記増殖された細胞集団を、哺乳動物宿主への投与に好適な医薬として許容可能な媒体中に再懸濁する、

を含み、ここで、前記ドナーと前記ヒトの間に主要組織適合性複合体（MHC）遺伝子における少なくとも部分的な不一致が存在する、前記方法。

【請求項 3】

前記再懸濁ステップの前に、前記増殖された細胞集団を凍結保存することをさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記開始細胞集団が先に凍結保存されている、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記同種ドナーが、MHC 遺伝子において、お互いに完全に不一致である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記培地が、動物血清、支持細胞又は細胞外マトリックスを含まない、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記サイトカイン及び成長因子の混合物が、SCF（幹細胞因子）、FL（FLT-3リガンド）及びTPO（トロンボポエチン）の組成を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記サイトカイン及び成長因子の混合物が、IL-3、IL-6 又は IL-11 或いはそれらの組み合わせから選ばれる追加の因子を含む、請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記サイトカイン及び成長因子の混合物が、SCF、FL、TPO 及び IL-3 の組成を有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記骨髓球前駆細胞が、前記増殖された細胞集団から前記再懸濁ステップの前に単離され、そして、前記再懸濁ステップに供される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記単離された骨髓球前駆細胞が、共通の骨髓球前駆細胞、顆粒球/マクロファージ前駆細胞又は巨核球/赤血球前駆細胞である、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法によって得られた、前記骨髓球前駆細胞を含む増殖された細胞集団を含む、ヒトにおける造血を一過性に再構成するための治療用組成物。

【請求項 13】

前記骨髓球前駆細胞が、前記増殖された細胞集団中の全細胞の少なくとも 75% を含む、請求項 12 に記載の治療用組成物。

【請求項 14】

前記骨髓球前駆細胞が、前記増殖された細胞集団中の全細胞の少なくとも 85% を含む、請求項 12 に記載の治療用組成物。

40

【請求項 15】

前記骨髓球前駆細胞が、増殖された細胞集団中の全細胞の少なくとも 95% を含む、請求項 12 に記載の治療用組成物。

【請求項 16】

ヒトにおける造血障害を改善するための、エキスビゴで増殖された細胞集団を含む治療用組成物であって、ここで前記増殖された細胞集団が、複数の非血縁同種ドナー由来の骨髓球前駆細胞を含み、かつ、5%未満のCD34+CD90+造血幹細胞（HSC）を含む、前記治療用組成物。

【請求項 17】

50

ヒトにおける造血障害を改善するための、エクスピボで増殖された細胞集団を含む治療用組成物であって、ここで、前記エクスピボで増殖された細胞集団が、少なくとも50%の複数の非血縁同種ドナー由来の骨髓球前駆細胞を含む、前記組成物。

【請求項18】

前記増殖された細胞集団が、凍結保存媒体中に凍結保存される、請求項16又は17に記載の治療用組成物。

【請求項19】

前記増殖された細胞集団が、医薬として許容可能な担体中に懸濁される、請求項16～18のいずれか1項に記載の治療用組成物。

【請求項20】

前記同種のドナーが、MHC遺伝子において完全に不一致である、請求項16～19のいずれか1項に記載の治療用組成物。

【請求項21】

前記骨髓球前駆細胞が、単離された共通の骨髓球前駆細胞、単離された顆粒球/マクロファージ前駆細胞又は単離された巨核球/赤血球前駆細胞である、請求項16～20のいずれか1項に記載の治療用組成物。

【請求項22】

請求項1～11のいずれか1項のステップa)により調製された骨髓球前駆細胞を含む細胞集団の、造血障害に罹ったヒト患者の治療において使用する治療用組成物の製造のための使用。

【請求項23】

前記治療用組成物が、単離されたHSC細胞と同時又はそれに続いて併用投与されるためのものである、請求項22に記載の使用。

【請求項24】

前記治療用組成物が、少なくとも1つの抗ウイルス化合物、抗真菌化合物、抗菌化合物、サイトカイン、又は成長因子とともに使用されるためのものである、請求項22に記載の使用。

【請求項25】

前記ヒト患者が造血幹細胞(HSC)移植を受けている、請求項22～24のいずれか1項に記載の使用。

【請求項26】

前記増殖された細胞集団が、HSC移植の後に投与される、請求項25に記載の使用。

【請求項27】

前記増殖された細胞集団が、HSC移植と同時に投与される、請求項25に記載の使用。

【請求項28】

前記ヒト患者が好中球減少症又は血小板減少症に罹っている、請求項22又は24に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本願は、その開示全体が参考文献として本明細書中に援用されている、2004年10月25日出願の「骨髓細胞集団の増殖方法及びその使用」と題された出願番号第60/622,318号に基づく、米国特許法第119条(e)項の利益を請求する。

【0002】

本開示は、造血系の短期の再構成のための組成物及び方法、並びに造血障害又は造血機能低下に関連した状態の治療のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

造血系幹細胞移植 (HSCT) は、さまざまな血液学的悪性腫瘍の標準的治療であり、いくつかの場合、特に該病気が化学療法に対して不応性である場合には唯一の実行可能な治療選択肢である。骨髄、末梢血、又は臍帯血は、造血幹細胞 (HSC) の典型的な供給源としての役割を果たすが、末梢血由来の細胞は、より速い生着特性を示し、サイトカインである G-CSF、GM-CSF 又は腫瘍縮小薬物によるドナーの治療によって動員されることができる。臍帯血は容易に利用可能であり、移植片対宿主拒絶反応の低い発生率を示すが、生着の遅さが特徴である。移植の前に、根底にある病気を治療しレシピエントをドナー HSC の生着に適したものとするために、レシピエントは骨髄破壊的用量の化学療法及び/または放射線照射を受ける。

【 0 0 0 4 】

一般に、2つのタイプ：自己及び同種の HSCT がある。自己移植は、骨髄破壊的治療のあとのレシピエント自身の細胞の輸注を含む。自己細胞移植は、移植片対宿主拒絶反応 (GVHD) のリスクを最小化し、そして合併症を減少させる。骨髄破壊的薬剤による化学療法が、HSC 製剤中の悪性腫瘍細胞を除去するために使用されるため、もし該病気が化学療法に対して不応性である場合には自己移植は問題がある。同種移植は、典型的にはレシピエントの NHC に一致するドナーを用いる、ドナー幹細胞の輸注を含む。同種移植の利益は、悪性腫瘍細胞に対して発生するかもしれない、付随する細胞性の移植片対宿主拒絶反応である。しかしながら、一致する非血縁ドナー (MUD) 移植片も、より強力な移植片対宿主反応を伴い、そしてしたがってより高い死亡率をもたらす。

【 0 0 0 5 】

骨髄破壊的治療及び HSCT に関連したいくつかのさらなる合併症があり、最も顕著には好中球減少症及び血小板減少症である。どちらの状態も、造血障害及び各障害に関連する最終的に分化した骨髄細胞を適切に補充する造血系の能力低下により生じる。好中球減少症及び血小板減少症は、致死量の電離放射線への故意でない曝露、先天的免疫不全、骨髄に影響するウイルス感染、および (ビタミン欠乏などの) 代謝障害などの造血障害の他の原因からも発生しうる。

【 0 0 0 6 】

好中球減少症は、白血球、特に、寿命が短く末梢血中で最も豊富な白血球である好中球の数が異常に少ないことを特徴とする。好中球及び他の多形核白血球は、さまざまなケモカインの作用を介して感染部位に遊走して、感染物質に対する決定的な免疫反応をおこす。移植後の造血系の回復に必要な期間の間、移植レシピエントは低いレベルの循環好中球を有し、そして細菌及び真菌感染、特に、シュードモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 及びアスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*) などの普通に存在する微生物による日和見感染を受けやすい。長期の好中球減少症、特にドナー HSC の生着の遅れにより生じるものは、感染の可能性を高め、そして高い死亡率と関連する。

【 0 0 0 7 】

好中球減少症の1つの標準的治療は、G-CSF の投与である。このサイトカインは、顆粒球の成長を促進し、好中球の免疫エフェクター反応を亢進する。G-CSF は、造血幹細胞移植後の回復を促進するが、患者中の応答性の造血幹細胞の数の低さにより、HSCT の非存在下で高用量の化学療法を受けた対象には有効ではない。

【 0 0 0 8 】

他の治療的アプローチは、感染に対する一時的な防御手段としての好中球の輸注 (顆粒球輸血) を含む。G-CSF 又は GM-CSF によるドナーの処置後、末梢血の白血球アフレーションにより細胞を集め、循環好中球レベルを高めるためにレシピエントに投与する (例えば、Lin, Y-W. et al., *J. Clin. Microbiol.* 41(10):4892-4893 (2003))。この方法で治療された対象は、生存率が増加するが、おそらく、移植後に分化した好中球の短い寿命又は好中球の活性に対する保存の悪影響によって、このアプローチの臨床的有効性は確かでない (McCullough, J. et al., *Transfusion* 23(1):20(1983))。さらに、好中球輸血の有効性は投与された細胞数と関連するため、通常は一致する兄弟又はハプロ一致する親か

10

20

30

40

50

らのドナー細胞の限られた利用可能性、および細胞の保存不可能性がこのアプローチの一般的な適用性を制限するかもしれない。

【0009】

血小板減少症は、骨髄球系列の他の最終的に分化した細胞である巨核球に関連する状態であって、血小板の異常に低いレベルを特徴とする。血小板は、血液凝固過程に必須であり、血管からの赤血球の漏出を制限するのに必要とされる。正常レベル未満の血小板は、出血のリスクの増加をもたらす、血小板レベルが臨界レベル未満に落ちると自然発生的な出血がおこるかもしれない。血小板減少症は、血小板産生障害及び/又は除去速度の増加から生じることができる。HSCT設定における血小板減少症の発症は、巨核球の成長障害によりもたらされ、そしてHSCの生着の遅れ、感染からの合併症、及びGVHDの発生により増大する。好中球減少症と同様に、生存を脅かす合併症を最小化するために、いかなる骨髄破壊的治療の後にも血小板減少症に対応することは重要である。

10

【0010】

血小板輸血は、血小板減少症を治療するための日常的な治療法であり、低レベルの血小板に関連する深刻な出血の問題を減らすのに有効である。MHCの一致したドナーからの血小板の使用は、ドナー血小板に対するいかなる有害な免疫反応も最小化する。しかしながら、感染及び血小板減少症の間関係は、好中球減少症が血小板減少状態を悪化させ、かかる患者におけるより頻繁な輸血を必要とすることを示唆する。さらに、好中球減少症を治療するためのG-CSF治療は、G-CSF投与に関係する血小板破壊の促進によって、血小板減少症について禁忌を示す。

20

【0011】

好中球減少症のための免疫保護性細胞の輸注及び血小板減少症のための血小板輸血は、依然としてこれらの状態の治療のための実行可能なアプローチであるが、防御の持続時間を増加させ、そして好中球減少症については投与する細胞のより一貫性のある供給を可能とすることが望ましい。さらに、両方の障害に別々でなく、同時に対処することのできる治療が造血障害のこれらの合併症の管理を改善するであろう。

【発明の開示】

【0012】

要約

本開示は、造血障害から生じる合併症の治療において有用な組成物及び方法を記載する。不十分な造血を有する対象において骨髄球系列の最終的に分化した細胞を生成する能力がないことは、多くの生命を脅かす状態、最も顕著には好中球減少症及び血小板減少症に導く。これらの状態に関連する細胞集団を一次的に置換することによって、分化した骨髄細胞の欠乏から生じる合併症は軽減されるか又は患者の内因性のもしくは再構成された造血形が再生可能なときまで予防される。

30

【0013】

したがって、1つの側面において、本発明は、以下の：a) エクスピボで造血幹細胞を含む開始細胞集団を好適な培地中で培養して、該細胞集団を増殖させ、そして該細胞集団内の骨髄球前駆細胞の数を増加させ；そしてb) 上記骨髄球前駆細胞を、哺乳動物宿主への投与に適した医薬として許容可能な媒体中に再懸濁する、を含む、哺乳動物宿主において造血を再構成するための治療用骨髄球前駆細胞組成物を製造する方法を提供する。有益には、本明細書中で示すとおり、最初の細胞集団は、同種のドナー又はより好ましくは複数の同種のドナーに由来することができ、エクスピボで増殖された1又は複数のドナーから得られた同種の骨髄球前駆細胞を生じる。ドナーはお互いに血縁があるか又は非血縁関係でもよく、移植設定においては、レシピエントに血縁があるか又は非血縁関係である。

40

【0014】

驚くべきことに、本明細書中でさらに実証されるとおり、本発明者らは、本発明の増殖された骨髄球前駆細胞は増殖後に凍結保存されることができ、かつ治療的設定において顆粒球/マクロファージ前駆体を含む造血の再構成においてそれらの機能を保持する。造血幹細胞がそれらの機能を凍結保存後に保持することが知られているにもかかわらず(例え

50

ば、米国特許第5,004,681号を参照)、それらのより分化した子孫の凍結保存は常に成功したのではなく、したがってそれらの臨床における細胞に基づく治療としての実際的な実施を複雑化した。本明細書中で提供される増殖された骨髄前駆体は、この有利な特徴を有し、好ましい実施態様においては、再懸濁及び患者への投与の前に凍結保存される。

【0015】

増殖のための最初の細胞集団は、末梢血、動員された末梢血、臍帯血、骨髄、及び/又は胎児肝臓などの造血幹細胞を有することが知られている他の器官に由来することができる。細胞集団は、所望の細胞マーカー表現型に基づいて、特に濃縮された又は実施的に純粋な集団としての、供給源から得られた細胞混合物又は単離された細胞であることができる(例えば、CD34⁺及び/又はCD90⁺及び/又はAC133⁺及び/又はALDH⁺細胞)。好ましくは、開始細胞集団は、特にヒト骨髄球前駆細胞の増殖のためには、細胞マーカーCD34⁺又はCD90⁺の存在に基づいてHSCについて濃縮され、そしてより好ましくは、該開始細胞集団は、CD34⁺及びCD90⁺の両方である精製されたHSCである。さらなる実施態様においては、細胞は細胞マーカー表現型Lin^{neg/low}も有してよい。

10

【0016】

他の側面においては、本発明は、本発明の方法により得られた増殖された骨髄球前駆細胞を含む治療用組成物を提供する。ある実施態様においては、該治療用組成物は、医薬として許容可能な担体中の増殖された骨髄球前駆細胞を含むか又はそれらから本質的に成る。他の実施態様においては、該治療用組成物は、凍結保存媒体中に凍結保存された増殖された骨髄前駆細胞を含むかまたはそれらから本質的に成る。好ましい実施態様においては、該増殖された骨髄球前駆細胞は、同種であり、さらにより好ましくは、該増殖された骨髄球前駆細胞は同種の骨髄球前駆細胞混合物である。同種の骨髄球前駆細胞混合物は、MHCにおいて少なくとも部分的な不一致を含んでよく、該MHCの不一致はさまざまなドナーのMHC間でも、またはドナーとレシピエントの間でも、又はMHCにおける全体又は完全な不一致でもよい。したがって、かかる同種の細胞の混合物は、いくつかの細胞間のMHCにおける部分的な不一致及び集団内の他の細胞間の完全な不一致を含んでもよい。特別な実施態様においては、MHCにおける一致又は部分的な不一致を有するために(骨髄球系列において初期に発生する前駆細胞集団などの)一時的に生着する前駆細胞が選択されるが、より分化した前駆細胞が部分的又は完全な不一致をMHCにおいて有する。

20

30

【0017】

さらなる実施態様においては、同種の骨髄球前駆細胞混合物は、単離された細胞の混合物である。これらは、単離されたCMP、単離されたGMP、単離されたMEP、又はそれらの組み合わせを含む。混合物のための細胞は、未増殖の骨髄球前駆細胞から得られるか又は本明細書に記載のエクスピボで増殖された細胞培養であることができる。同種の増殖された細胞の混合物のためには、同種の細胞は増殖の前または増殖の後に混合されてよい。

【0018】

他の側面においては、本開示は、それらの培養中でのエクスピボの増殖を介して骨髄球前駆細胞を生成する方法を提供する。該方法においては、細胞は造血幹細胞(HSC)などの骨髄球前駆細胞を産生することのできる細胞が、骨髄球前駆細胞の増殖を支援する、サイトカイン及び成長因子の混合物を含む培地と接触させられ、そして、細胞の増殖に好適な条件下で培養される。エクスピボでの増殖目的のための好適なサイトカインは、IL-1(すなわち、IL-1)、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF、及びそれらの類似体から選ばれる。エクスピボでの増殖目的のための好適な成長因子は、c-kitリガンド(SCF又はSF)、FLT-3リガンド(FL)、トロンボポエチン(TPO)、エリスロポエチン(EPO)及びそれらの類似体から選ばれる。本明細書中で使用される類似体は、天然の形態の特徴的生理活性を有する、サイトカイン及び成長因子の変異体を含む。

40

【0019】

好ましい実施態様においては、培地は、間質細胞又は他の支持細胞などの細胞に基づく増殖物質を含む、(定量的又は定性的に)定義されない成分を含まない既知組成培地であ

50

る。重要なことは、かかる物質を含むことは、製造及び制御の目途からは問題があり、所望の細胞タイプを適切に増殖させる代替既知組成培地の選択及び開発は、本発明の他のそして重要な寄与を表す。

【0020】

1つの実施態様においては、サイトカインと成長因子の混合物はその基本的な組成において、幹細胞因子(SCF)、FLT-3リガンド(FL)、及びトロンボポエチン(TPO)を含む。好ましい実施態様においては、サイトカインと成長因子の混合物は、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF、及びそれらの組み合わせ、特にIL-3、IL-6、IL-11及びそれらの組み合わせから選ばれる追加のサイトカインを含む。したがって、1つの実施態様においては、サイトカインと成長因子の混合物は、SCF、FL、TPO及びIL-3の組成を有するが、他の実施態様においては、該混合物は、SCF、FL、TPO、及びIL-6の組成を有する。追加のサイトカインの1つの組み合わせは、サイトカイン及び成長因子混合物がSCF、FL、TPO、IL-6及びIL-11の組成を有するような、IL-6及びIL-11である。

10

【0021】

サイトカイン及び成長因子の形態は、それらの天然物、組換え生成物、変異体又は類似体或いは、天然の形態に類似した生理活性を有する改変された形態である。サイトカインは、増殖に使用される細胞に対して活性を有するように入れられ、そしてしたがって一般にそれらの供給源は増殖に使用された最初の細胞の起源を反映するが、サイトカインの形態及び細胞起源の間のこの相関は厳密なものである必要はない。なぜなら、形態間の交差反応性は、さまざまなサイトカイン及び成長因子について知られており、かつ容易に試験することができるからである。したがって、1つの実施態様においては、使用されるサイトカインは組換えヒト(rhu) rhuIL-1、(すなわち、rhuIL-1)、rhuIL-3、rhuIL-6、rhuIL-11、rhuG-CSF、rhuGM-CSF、又はそれらの類似体である。同様に、使用される成長因子は、組換えヒトrhuSCF、rhuFL、rhuTPO、rhuEPO、またはそれらの類似体である。

20

【0022】

開始細胞集団は、骨髓球前駆細胞の増殖を定義されたレベルまで支援する条件下で培養される。本発明によって得られた、増殖された骨髓球前駆細胞は一般に、共通の骨髓球前駆細胞(CMP)、顆粒球/マクロファージ前駆細胞(GMP)、及び巨核球/赤血球前駆細胞(MEP)を含む。したがって、1つの側面においては、エクスピボで増殖された培養は、その中のCMP細胞集団が少なくとも約5倍、約10倍、約20倍又は少なくとも約30倍に増殖した、増殖されたCMPを含む。(細胞採取時などの)最終的な細胞培養調製物においては、増殖された培養は、培養中の全細胞の少なくとも約0.5%、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約5%、そして少なくとも約10%のCMP集団を含む。

30

【0023】

他の側面においては、エクスピボで増殖された培養は、その中のGMP細胞集団が少なくとも約10倍、約20倍、約40倍そして好ましくは少なくとも約80倍に増殖した、増殖されたGMPを含む。最終的な細胞培養調製物においては、増殖された培養は、培養中の全細胞の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、そして少なくとも約50%のGMP集団を含む。培養中のMEP細胞集団は、少なくとも約0.1倍、約2倍、約5倍、そして少なくとも約10倍増殖される。最終的な細胞培養調製物においては、増殖された培養は、培養中の全細胞の少なくとも約0.5%、約1%、約2%、そして少なくとも約5%のMEP集団を含む。

40

【0024】

合計で、最終的な細胞培養調製物中の骨髓球前駆細胞を合わせた全体は、増殖された培養中の全細胞の少なくとも約25%、少なくとも約40%、より好ましくは約50%超、さらにより好ましくは少なくとも約60%又は70%、最も好ましくは、少なくとも約80%又は90%、そして理想的には少なくとも約95%である。

【0025】

エクスピボの増殖により調製された細胞は、医薬として許容可能な担体中に再懸濁され、そして直接使用されるか、或いはFACSソーティング、磁性アフィニティー分離、および

50

イムノアフィニティーカラムなどの当業者に利用可能なさまざまな細胞精製技術による処理に供されることができる。増殖された培養から単離された細胞集団は、中でも、単離された骨髓球前駆細胞、単離されたCMP、単離されたGMP、及び単離されたMEPを含む。好ましくは、単離された細胞集団は、細胞の実質的に純粋な集団である。

【0026】

本明細書に記載の細胞は、治療的及び非治療的設定においてさまざまに応用される。治療的応用においては、細胞は造血の障害又は破壊を有する対象を治療するために使用される。細胞は、造血障害に関連する有害な状態の発生を少なくするための予防的な、又は既に造血障害に関連する合併症に罹患した対象を治療するための、治療的利益を与えるのに十分な量が静脈内輸注などによって、対象に投与される。さらなる側面においては、細胞は、HSCT設定において、HSCTと同時又はそれに続いて対象を治療するために使用される。

10

【0027】

好中球減少症および血小板減少症は、特にその状態が他の背景において起こりうるにもかかわらず対象が骨髓破壊的治療を受けた場合に、造血障害に関連する。本明細書中に記載された細胞は、該状態の発生を減少させるための予防手段として、又は対象が該障害で苦しんでいる場合に、これらの状態の治療に適用可能である。他の治療への応用として、治療剤の形態の細胞は増殖された又は未増殖の骨髓球前駆細胞を含む。好中球減少症および血小板減少症が特定の骨髓細胞タイプの不足と関連するため、選ばれた細胞集団は治療される特定の状態に合わせられる。1つの実施態様においては、細胞はCMPであり、これはCMPが究極的には好中球及び巨核球に成長するため、いずれの状態にも有用である。好中球減少症の状況下では、細胞はGMPであることができ、それは、GMPが究極的に好中球に成長するからである。血小板減少症の状況下では、細胞はMEPであることができ、それは、MEPが究極的に巨核球に成長するからである。当業者に明らかであるように、細胞集団の組み合わせは、これらの状態並びに上記の状態の治療における適用を見出す。単離されたGMP及びMEPの組み合わせは、好中球減少症および血小板減少症を同時に治療するために有用である。この組み合わせにCMPを加えると、CMPの一時的な生着により生じる延長された防御及びその後の好中球及び巨核球の産生を提供するはずである。他の組み合わせは、もし好中球減少症が治療の主要標的である場合にはCMP及びGMPを含むが、もし血小板減少症が治療の主要標的である場合にはCMP及びMEPをであってよい。

20

【0028】

細胞は本分野で周知の方法によって投与される。1つの実施態様においては、投与は静脈内輸注である。細胞の投与は単回投与又は連続的投与であることができる。連続的投与が含まれる場合、各投与には、異なる細胞数及び/又は異なる細胞集団が使用されてよい。したがって、1つの実施態様においては、最初の投与は、即時の治療的利益並びにより延長された効果を提供する細胞集団又は細胞集団の組み合わせ(CMP+GMP+好中球)によるが、第二の投与は、最初の投与の治療効果を拡張するための延長された効果を提供する細胞(CMPなど)を含む。これらのそして他の戦略は当業者には明らかである。

30

【0029】

さらなる実施態様においては、本明細書に記載の骨髓球前駆細胞が造血障害および/又は好中球減少症および血小板減少症の合併症に関連する状態を治療するのに有効である他の治療用化合物と組み合わせて使用される。1つの実施態様においては、該補助療法は、日和見感染又は対象において既に進行している感染を予防するための抗菌化合物、抗真菌化合物又は抗ウイルス化合物である。

40

【0030】

他の実施態様においては、補助療法は、骨髓経路における骨髓球前駆細胞の分化を増強する治療用化合物である。これらの補助療法は、内因性の又は治療の一部として対象に投与される骨髓球前駆細胞の分化及び動員を誘導する効果を有する。1つの実施態様においては、特に好中球減少症を治療又は予防するためには、G-CSF又はGM-CSFが細胞の投与と同時又はそれに続いて投与される。他の補助療法は、EPO又はTPOの投与を、特に血小板減少症の補助療法として含み、それは、EPOがMEKの前赤芽球への分化を誘導し、TPOが造血

50

幹細胞及び初期の骨髄球前駆細胞の巨核球及び成熟した血小板への成長及び分化を誘導すると見られるからである。

【 0 0 3 1 】

最後の側面においては、上記開示は、サイトカインと成長因子の混合物、増殖のための始原細胞、該エクスピボの増殖法を実施するための培地及び必要な他の成分を含むキットを提供する。好中球減少症および血小板減少症などの治療的応用のために、増殖された又は未増殖の細胞集団を使用することを目的とするキットが提供される。該キットは、例示的かつ非限定的に、緩衝剤、ラベル、試薬及び該キットの使用法の指導書をさらにふくんでよい。

【 0 0 3 2 】

好ましい実施態様の詳細な説明

本開示は、骨髄破壊的治療及び造血幹細胞移植、悪性疾患のための化学療法後に発生するか又は高用量の電磁放射線への故意でない曝露の結果としての、好中球減少症および血小板減少症などの造血系の欠損又は障害に関連する状態の治療に有用な細胞の生成方法を記載する。本明細書に記載の増殖された細胞は、幹細胞の最初の集団及び骨髄球前駆細胞と骨髄球前駆細胞の成長に許容的な定義されたサイトカインと成長因子の混合物を接触させることによって生成される。定義された培養条件下では、骨髄球前駆細胞は定義されたレベルまで選択的に増殖する。増殖された細胞はそのまま使用されるか又は精製されて、定義された細胞マーカー表現型及び特徴的な分化能力を有する単離された細胞を提供する。単離された細胞集団は、共通の骨髄球前駆体 (CMP)、顆粒球/マクロファージ前駆体 (GMP)、巨核球/赤芽球前駆体 (MEP) 及びそれらの組み合わせを含む。これらの骨髄球前駆細胞の免疫不全患者への輸注は、短期の生着及び/又は最終的に分化した骨髄球系列の細胞の産生をもたらす。これは、最終的に分化した細胞、特に好中球及び巨核球の一時的な、しかし延長された補充を提供し、これによって造血の欠損期間を補完する。

【 0 0 3 3 】

HSCT分野においては、増殖技術は主に移植及び永久的な造血の回復の目的のためにHSCの集団を増加させることを目的としてきた (Devine, S. M. et al, Bone Marrow Transplantation 31:241-252 (2003); Henschler, R. et al, Blood 84(9):2898-2903 (1994); Bhatia, M. et al., J. Exp.Med. 186:619-624 (1997))。採用されたサイトカイン及び成長因子の組み合わせは、一般に、HSCの選択的な増殖をおこすことを試みるが、骨髄球系列及びリンパ球系列の前駆細胞へのそれらの分化を制限する。HSCTの状況において増殖されたHSCの数は特に関係があり、それは特にドナーとレシピエントのMHCに不一致がある場合、輸注された細胞の生着特性及び移植レシピエントの生存は、輸注されるHSCの数の増加と相関するからである (Ketterer N. et al., Blood 91:3148-3155 (1998))。幹細胞の分化を誘導する培養条件は望ましくなく、それは、産生されるHSCの数がより少ないからである。HSCが自己更新する能力を有するため、いくつかの場合には、自己補充するHSC集団を選択するために長期の培養が使用される (Piacibillo, W. et al., Blood 93(11):3736-3749 (1999))。

【 0 0 3 4 】

対照的に、骨髄球前駆細胞は、限定された自己更新能力を有するか又は自己更新能力を有さず、したがって、HSCの増殖に好適な培養条件は、これらの細胞の増殖に最適なものではない。一方、培養細胞の(好中球及び巨核球などの)最終的に分化した細胞への急速な成長を促進するサイトカインの存在は望ましくない。なぜなら、これらの増殖された細胞集団は、骨髄分化経路の初期相において見出されるより分化していない前駆細胞の輸注によって提供される延長された防御を提供することができないからである (Reichle, A. et al., Bone Marrow Transplantation 32:299-305(2003); Zimmerman, T.M. et al., Bone Marrow Transplantation 26:505-510(2000); Reiffers, J. et al., Lancet 354:1092-1093 (1999))。したがって、本明細書に記載の増殖アプローチは、MP、特にCMP及びGMP細胞の数を増加させる一方、HSCの生成を制限する。増殖された細胞集団中に存在するHSCは、主に短期に再増殖する造血幹細胞 (ST-HSC) であり、一般に増殖細胞の10%未満、

10

20

30

40

50

より好ましくは5%未満、そして典型的には増殖された細胞集団の2~5%の範囲内にある。増殖方法は、自己又は同種移植設定において使用される細胞に適用可能である。

【0035】

有利には、増殖及び/又は治療のために利用可能な細胞の数をさらに増加させ、そして商業的に実行可能な広範囲の臨床応用を行うために、本明細書に記載の細胞集団は同種の骨髓球前駆細胞混合物を含むことが好ましい。典型的には、そのどちらもが移植レシピエントにおけるHSCの生着を遅らせうる、可能性のあるGVHD及び宿主-移植片拒絶反応によって、同種細胞はHSCTには使用されない。代わりに、MHCにおける部分的又は完全な一致を有する一人のドナーが一般的にHSCの供給源として使用される。しかしながら、HSCTの状況とは異なり、宿主のMHCと一致しない同種の骨髓球前駆細胞の使用は、それらの治療的有効性に対して有害ではない。なぜなら、永久的な生着は、目的でもこれらの分化した細胞の輸注によって生じる効果でもないからである。HSC及び特に長期に再増殖するHSCの損失も治療効果には有害でない。なぜなら、好中球減少症および/又は血小板減少症に対する一時的な防御が骨髓球前駆細胞により提供されるからである。同種の骨髓細胞混合物は、増殖された又は未増殖の細胞から調製されることができる。

10

【0036】

定義

本開示によれば、本明細書中の記載に使用される技術的および科学的用語は、特記されない限り、当業者に一般に理解される意味を有する。したがって、以下の用語は、以下の意味を有する。

20

【0037】

「同種の」は、同じ種に由来する、起源を有する、又はそのメンバーであることを意味し、ここで、該メンバーは遺伝的に関連するか又は遺伝的に関連しないが、遺伝的に類似する。「同種移植」は、ドナーからレシピエントへの細胞又は器官の移動をさし、ここで、レシピエントはドナーと同じ種である。

【0038】

「自己の」は、同じ対象又は患者に由来するか又は起源を有することを意味する。「自己移植」は、対象自身の細胞又は器官を採取すること及び再輸液又は移植をさす。自己細胞の排他的又は補充的使用は、宿主に細胞を戻す投与の多くの有害な効果、特に移植片体宿主拒絶反応を除去することができる。

30

【0039】

本明細書中で使用される「化学的に定義された」は、痕跡量の混入物をその成分中に含むかもしれないとしても故意に添加された未同定の捕足物をふくまない、定量的及び定性的に知られた化学組成の培地をさす。化学的に定義された培地は、動物血清、間質細胞などの支持細胞、及び線維芽細胞などに由来する細胞に基づく細胞外マトリックスを絶対に含まない。

【0040】

「骨髓球前駆細胞」は、最終的に分化した骨髓球系列の細胞のいずれかに究極的に成長することができるが、典型的にはリンパ球系列の細胞に分化しない、多能性又は単能性の前駆細胞をさす。したがって、「骨髓球前駆細胞」は、骨髓球系列中の任意の前駆細胞をさす。骨髓球系列の前駆細胞は、本明細書中で定義された少能性(oligopotent)CMP、GMP及びMEPを含むが、単能性の赤血球前駆体、巨核球前駆体、顆粒球前駆体及びマクロファージ前駆細胞も包含する。骨髓球前駆細胞の異なる細胞集団は、それらの分化能及び細胞マーカーの特徴的な組により他から識別可能である。

40

【0041】

「リンパ球前駆細胞」は、T細胞、B細胞、NK細胞又はリンパ球樹状細胞などの最終的に分化したリンパ球系列のいずれかの細胞に究極的に成長することができるが、典型的には骨髓球系列の細胞に分化しない、少能性又は単能性の前駆細胞をさす。骨髓球系列の細胞と同様に、リンパ球前駆細胞の異なる細胞集団は、それらの分化能及び細胞マーカーの特徴的な組により他から識別可能である。

50

【 0 0 4 2 】

「共通のリンパ球前駆細胞」又は「CLP」は、B細胞前駆体（BCP）、T細胞前駆体（TCP）、NK細胞及び樹状細胞を生じさせるその能力に特徴を有する少能性細胞をさす。これらの前駆細胞は、わずかな自己複製能力を有するか又は自己複製能力を有さないが、Tリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、及びリンパ球樹状細胞を生じさせることができる。

【 0 0 4 3 】

「共通の骨髄球前駆細胞」又は「CMP」は、顆粒球/単球（GMP）前駆細胞及び巨核球/赤血球（MEP）前駆細胞を生じさせるその能力に特徴を有する細胞をさす。これらの前駆細胞は、制限された自己複製能力を有するか又は自己複製能力を有さないが、骨髄球樹状細胞、骨髄球赤血球、巨核球、顆粒球/マクロファージ、顆粒球およびマクロファージ細胞を生じさせることができる。

10

【 0 0 4 4 】

「類遺伝子性の」は、同じ種のメンバーであるか、それに由来するか、または起源を有することを意味し、ここで、該メンバーは小さな遺伝子領域、典型的には単一の遺伝子座（すなわち、単一の遺伝子）を除いて遺伝的に同一である。「類遺伝子移植」は、ドナーからレシピエントへの細胞又は器官の移動をさし、ここで、該レシピエントは単一の遺伝子座以外はドナーと遺伝的に同一である。

【 0 0 4 5 】

「サイトカイン」は、自然の状態では細胞により作られ、そしてサイトカインを産生する細胞（すなわち、オートクリン因子）または他の細胞の生理学的状態に影響を及ぼす化合物又は組成物をさす。サイトカインは、組換え又は合成過程によって作られた任意の化合物又は組成物も包含し、ここで、これらの過程の産物は、天然の形態と同一又は類似した構造及び生理活性を有する。リンホカインは、リンパ球により産生された天然、合成又は組換え形態のサイトカインをさし、IL-1、IL-3、IL-4、IL-6、IL-11などを含むがこれらに限定されない。

20

【 0 0 4 6 】

細胞との関係における「増殖」は、同じでも同じでなくてもよい最初の細胞集団からの特徴的な細胞タイプの数の増加をさす。増殖に使用される始原細胞は、増殖により生成される細胞と同じである必要はない。例えば、増殖される細胞は最初の細胞集団の成長及び分化によって産生されてよい。増殖という用語から除外されるのは、細胞の分化能力を特徴付けるのに使用される制限的な希釈アッセイである。

30

【 0 0 4 7 】

細胞との関係における「機能的」は、定義された機能アッセイによって同定された、特定の細胞タイプに関連する通常の機能又は活性を遂行することができるか或いはそれを保持する細胞をさす。例えば、「機能的GMP細胞」は、究極的に顆粒球及びマクロファージに分化することのできる前駆細胞であって、ここで、最終的に分化した細胞は正常な顆粒球及びマクロファージのように機能する。

【 0 0 4 8 】

「移植片対宿主拒絶反応」又は「GVH」又は「GVHD」は、異なるMHCクラスのリンパ球が宿主中に導入され、宿主に対してドナーリンパ球が反応するとき起こる細胞の応答をさす。

40

【 0 0 4 9 】

「顆粒球/マクロファージ前駆細胞」または「GMP」は、共通の骨髄球前駆細胞に由来し、かつ顆粒球及びマクロファージ細胞を生じさせる能力を特徴とするが、典型的には骨髄球系列の赤血球又は巨核球細胞を生じさせない細胞をさす。

【 0 0 5 0 】

「成長因子」は、自然の状態では細胞増殖、細胞の生存、及び/又は分化に影響を与える化合物又は組成物をさす。示された効果を細胞に及ぼす一方、分泌、接着、外部刺激に対する応答などの他の生理学的過程にも影響することができる。多くの成長因子が細胞により作られるが、本明細書中で使用される成長因子は、組換え又は合成過程により作られる

50

任意の化合物又は組成物を包含し、ここで、これらの過程の産物は、天然の成長因子と同一又は類似の構造及び生理活性を有する。成長因子の例は、上皮成長因子（EGF）、線維芽細胞成長因子（FGF）、エリスロポエチン（EPO）、トロンボポエチン（TPO）、幹細胞因子（SCF）、及びflt-3リガンド（FL）、並びにそれらのアナログを含む。

【0051】

「単離された」は、それが自然のまたは合成により作られたかに係らず、天然の状態に関連している少なくとも1つの他の生成物、化合物又は組成物から分離された生成物、化合物又は組成物をさす。

【0052】

「造血幹細胞」又は「HSC」は、究極的にB細胞、T細胞、NK細胞、リンパ球樹状細胞、骨髓球樹状細胞、顆粒球、マクロファージ、巨核球、及び赤血球を含む造血系のすべての細胞タイプに分化することのできる、クローン原性の自己更新多能性細胞をさす。造血系の他の細胞のように、HSCは典型的には細胞マーカーの特徴的な組の存在によって定義される。HSCとの関連で使用される「濃縮された」は、単一の細胞マーカー、一般にCD34+、の存在に基づいて選択される細胞集団をさし、一方、HSCとの関連で使用される「精製された」は、2つ以上のマーカー、好ましくはCD34+ CD90+に基づく選択から生じる細胞集団をさす。

【0053】

「マーカー表現型タイピング」は、（分化状態及び/又は細胞タイプなどの）その表現型を決定するために、細胞上のマーカー又は抗原を同定することをさす。これは、細胞上に存在する抗原を認識する抗体を使用する免疫表現型タイピングによって行われることができる。抗体はモノクローナル又はポリクローナルであってよいが、一般には他の細胞マーカーと最小限の交差反応性を有するように選ばれる。一定の細胞分化又は細胞表面マーカーが細胞が由来する動物種に特有である一方、他の細胞マーカーは種間で共通であると理解される。種間で等価なこれらのマーカーは、（アミノ酸配列などの）構造に種の相違があっても同じマーカーによる同定を与えられる。細胞マーカーは、一定の状況では細胞分化（CD）マーカーとも呼ばれる細胞表面分子及び遺伝子発現マーカーを含む。遺伝子発現マーカーは、細胞のタイプ又は分化の状態の指標となる、発現された遺伝子の組である。部分的には、遺伝子発現プロファイルは、非細胞表面分子を含むかもしれないが、細胞表面マーカーを反映するであろう。

【0054】

「巨核球/赤血球前駆細胞」又は「MEP」は、共通の骨髓球前駆細胞に由来し、赤血球および巨核球を生じさせる能力を有することに特徴を有するが、典型的には顆粒球、マクロファージ、又は骨髓球樹状細胞を生じさせない細胞をさす。

【0055】

「不一致の同種の」は、定義された数のMHC抗原の血清学的又は分子的分析などの本分野で使用される標準的なアッセイによって典型的に決定される非同一の主要組織適合性複合体（MHC）抗原（すなわち、タンパク質）をさす。「部分的な不一致」は、メンバー間、典型的にはドナー及びレシピエント間で試験されたMHC抗原の部分的な一致をさす。例えば、「ハーフミスマッチ」は、2つのメンバー間で試験されたMHC抗原の50%が異なるMHC抗原タイプを示すことをさす。「全体の」又は「完全な」不一致は、試験されたすべてのMHC抗原が2つのメンバー間で異なることをさす。

【0056】

「骨髓破壊的」又は「骨髓破壊」は、典型的には細胞毒性物質又は放射線への曝露による、造血系の障害又は破壊をさす。骨髓破壊は、造血系を破壊する高用量の細胞毒性物質又は全身被爆によりもたらされた完全な骨髓破壊を包含する。それは、非骨髓破壊的条件により引き起こされた完全未満の骨髓破壊状態も含む。したがって、非骨髓破壊的調整は、対照の造血系を完全に破壊しない治療である。

【0057】

「好中球減少症」は、末梢血中の正常な数より少ない好中球及び他の多形核白血球をさ

10

20

30

40

50

す。典型的には、好中球減少症状態は、全白血球数に好中球のバンドのパーセンテージをかけることによって決定される、好中球絶対数(ANC)に基づいて診断される。臨床的には、異常なANCは、末梢血1mlあたり約1500細胞よりも少ない。好中球減少症の重篤度は、1mlあたり1000~1500細胞のANCについては軽度、1mlあたり500~1000細胞のANCについては中度、そして1mlあたり500細胞のANCについては重度と分類される。

【0058】

「自己更新」は、細胞が分割し、(自己更新などの)親細胞と同一の特徴を有する少なくとも1つの娘細胞を作り出す能力をさす。第二の娘細胞は特別な分化経路に取り組んでもよい。例えば、自己更新する造血幹細胞は分割しそして1つの娘幹細胞および骨髓球又はリンパ球経路中の分化に取り組む他の娘細胞を形成する。前駆細胞は典型的に自己更新能を喪失しており、細胞分割によってより分化した(すなわち、限定された)表現型を表す2つの娘細胞を生成する。

10

【0059】

「短期に再増殖する造血幹細胞」又は「ST-HSC」は、制限された短期の自己更新能を有し、かつ骨髓球及びリンパ球経路の細胞に分化するその能力に特徴を有する造血幹細胞をさす。ST-HSCは培養アッセイにおけるそれらの制限された長さの自己更新活性によって長期に再増殖する(LT)HSCから識別される(例えば、約8週間;Christensen, J.L. and Weissman, I.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001)を参照のこと)。

【0060】

20

細胞に関連する「ソーティング」は、(水簸又は他のサイズに基づく技術などの)物理的特徴或いは(側方散乱(SSC)及び前方散乱(FSC)を用いるソーティング、又は標識抗体を用いる蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)などの)マーカーの存在に基づいて細胞を分離すること、或いはソーティングのないFACSそして磁性細胞分離システムなどの免疫吸収技術を含む、細胞マーカーの存在に基づく細胞の分析をさす。

【0061】

「実質的に純粋な細胞集団」は、特定の細胞マーカー特性及び分化能を有する、全細胞集団の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75~80%、より好ましくは少なくとも約85~90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%を構成する細胞集団をさす。したがって、「実質的に純粋な細胞集団」は、特定のマーカー特性を示さず、且つ設計されたアッセイ条件下で分化能を示さない細胞を約50%未満、好ましくは約20~25%未満、より好ましくは約10~15%未満、そして最も好ましくは約5%未満含む細胞集団をさす。

30

【0062】

「対象」又は「患者」は、交換可能に使用され、そして、表示される以外はヒト及び非ヒト霊長類、並びにウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタ及び他の哺乳動物種などの哺乳動物をさす。

【0063】

「同系の」は、遺伝的に同一、特に抗原又は免疫反応に関して同一の同じ種に由来するか、起源を有するか、又はその種のメンバーであることをさす。これらは、一致するMHC型を有する同一の双子を含む。したがって、「同系移植」は、ドナーから、ドナーと遺伝的に同一のレシピエントに細胞又は器官を移すことをさす。

40

【0064】

「血小板減少症」は、正常な血小板計測数よりも低い、一般には約 $100 \times 10^9/L$ 未満であり、凝固時間を増加させ、かつ自然発生的な出血のリスクを増大させる、特に約 $10 \sim 50 \times 10^9/L$ 以下の血小板レベルをさす。該状態は、血小板が巨核球によるそれらの補充よりも早い速度で循環から失われるときに発生する。血小板減少症は、血小板合成の障害及び/又は血小板破壊速度の増加により生じうる。

【0065】

「異種の」は、ヒト及びヤギ、ヒト及びブタ、ヒト及びチンパンジーなどの異なる種に

50

由来するか、起源を有するか又はそのメンバーであることをさす。「異種移植」は、ドナーからドナーとは異なる種のレシピエントへ細胞又は器官を移すことをさす。

【0066】

細胞タイプ及び増殖のための細胞の供給源

本開示に関連する細胞タイプは、造血系、特に造血幹細胞及び骨髄球系列の細胞、である。本明細書中の細胞の記載は、これらの記載が本分野における現在の知識を反映し、そしてそれによって本発明が本明細書に記載の表現型マーカーのみに限定されないという理解のもとに、当業者に知られた記載を用いる。

【0067】

造血幹細胞 (HSC) は、自己更新可能であり、そして許容された条件下で造血系のすべてのタイプの細胞を生じさせる能力を特徴とする多能性幹細胞である。HSCの自己更新は、HSC細胞が分割しそして同じHSCの自己更新及び分化能を有する少なくとも1つの娘細胞を産生し；すなわち、細胞分割が更なるHSCを生じさせることをさす。自己更新は、造血系の補充のための未分化の幹細胞の連続的な供給源を提供する。HSCを同定するために有用なマーカー表現型は、本分野で一般的に知られている。ヒトHSCのためには、細胞マーカー表現型は、 $CD34^+CD38^-CD90^+$ (Thy1)⁺Lin⁻を含むことが好ましい。マウスHSCについては、例示的な細胞マーカー表現型は、 $Sca-1^+CD90^+$ (例えば、Spangrude, G.J. et al., Science 1:661-673(1998)を参照のこと) 又は $c-kit^+Thy1^0Lin^-Sca-1^+$ (Uchida, N. et al., J. Clin. Invest. 101(5):961-966(1998)を参照のこと) である。アルデヒドデヒドロゲナーゼ (Storms et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 96:9118-23を参照のこと) およびAC133 (Yin et al., Blood 90:5002-12(1997)を参照のこと) などの他のHSCマーカーも有益な用途を見出すことができる。

【0068】

HSCはリンパ球又は骨髄球前駆細胞を生じさせる。本明細書で使用される骨髄球前駆細胞は、最終的に分化した骨髄球系列の細胞のいずれかに分化することのできる細胞集団をさす。骨髄球前駆細胞に包含されるのは、共通の骨髄球前駆細胞 (CMP)、制限された自己更新能を有するか又は自己更新能を有さないことを特徴とするが、細胞分割して顆粒球/マクロファージ前駆細胞 (GMP) 及び巨核球/赤血球前駆細胞 (MEP) を形成することのできる細胞集団である。非自己更新細胞は、細胞分割して、親細胞タイプの分化能を持たないがその代わりに分化した娘細胞を作り出す、娘細胞を産生する。CMPを同定するのに有用なマーカー表現型は、本分野で一般的に知られたものを含む。マウス起源のCMP細胞については、該細胞集団は、マーカー表現型 $c-Kit^{high}(CD117)CD16^{low}CD34^{low}Sca1^{neg}Lin^{neg}$ に特徴を有し、さらにマーカー表現型 $FcyR^{0}IL-7R^{neg}(CD127)$ に特徴を有する細胞集団である。マウスCMP細胞集団は、B220、CD4、CD8、CD3、Ter119、Gr-1、及びMac-1を含むマーカーの発現の不存在にも特徴を有する。ヒト起源のCMP細胞集団については、該細胞集団は $CD34^+CD38^+$ に特徴を有し、そしてさらにマーカー表現型 $CD123^+(IL-3R^0)CD45RA^{neg}$ に特徴を有する。ヒトCMP細胞集団も、CD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56及びCD234aのないことに特徴を有する。さまざまな骨髄球前駆細胞についてのマーカー表現型が、例えば、米国特許第6,465,247号及び同第6,761,883号; Akashi, Nature 404:193-197(2000)に記載され、すべての文献は全体として参考文献として本明細書中に援用されている。

【0069】

骨髄球系列の他の前駆細胞は、顆粒球/マクロファージ前駆細胞である (GMP)。この前駆細胞集団の細胞は、(好塩基球、好酸球及び好中球などの) 顆粒球及びマクロファージを生じさせる能力に特徴を有する。他の前駆細胞と同様に、GMPは自己更新能を持たない。マウスGMPは、マーカー表現型 $c-Kit^{hi}(CD117)Sca-1^{neg}FcR^{hi}(CD16)IL-7R^{neg}CD34^{pos}$ を特徴とする。マウスGMPはマーカーB220、CD4、CD8、CD3、Gr-1、Mac-1及びCD90の発現を欠く。ヒトGMPは、マーカー表現型 $CD34^+CD38^+CD123^+CD45RA^+$ に特徴を有する。ヒトGMP細胞集団はマーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56及びCD235aのないことも特徴とする。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

考察に関して、CMPに由来する巨核球 / 赤血球前駆細胞 (MEP) は、巨核球前駆細胞及び赤血球前駆細胞に分化するその能力に特徴を有する。成熟した巨核球は、トロンボポエチンにより制御される発生プロセスである血小板形成の前駆体となる多能性細胞である。赤血球系細胞は、エリスロポエチンにより制御される過程を通じて赤血球前駆細胞から形成され、究極的に成熟した赤血球細胞に分化する。マウスMEPは、細胞マーカー表現型c-Kit^{hi}及びIL-7R^{neg}に特徴を有し、そしてさらにマーカー表現型Fc R^{lo}及びCD34^{low}に特徴を有する。マウスMEP細胞集団は、マーカーB220、CD4、CD8、CD3、Gr-1及びCD90のないことも特徴とする。マウスMEPについての他の例示的なマーカー表現型は、c-kit^{high}Sca-1^{neg}Lin^{neg}/lowCD16^{low}CD34^{low}である。ヒトMEPは、マーカー表現型CD34⁺CD38⁺CD123^{neg}CD45R^Anegに特徴を有する。ヒトMEP細胞集団は、マーカーCD3、CD4、CD7、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD19、CD20、CD56及びCD235aのないことも特徴とする。

10

【 0 0 7 1 】

骨髄球系列中のさらなる限定された前駆細胞は、顆粒球前駆細胞、マクロファージ前駆細胞、巨核球前駆細胞及び赤血球系前駆細胞である。顆粒球前駆細胞は、好酸球、好塩基球、好中球を含む顆粒球に最終的に分化するその能力に特徴を有する。GPは典型的に骨髄球系列の他の細胞に分化しない。巨核球前駆細胞 (MEP) については、これらの細胞は、最終的に巨核球に分化する能力を有するが、一般的には骨髄球系列の他の細胞には分化しないという特徴を有する (例えば、PCT国際特許出願公開第WO2004/024875号を参照のこと)。

20

【 0 0 7 2 】

リンパ球系列については、「リンパ球前駆細胞」は、最終的にリンパ球系列の任意の細胞に分化することのできる細胞をさす。リンパ球前駆細胞に包含されるのは、共通のリンパ球前駆細胞 (CLP)、制限された自己更新能を有するか自己更新能を有さないことを特徴とするが細胞分割してTリンパ球及びBリンパ球前駆細胞、NK細胞及びリンパ球樹状細胞を形成することのできる細胞集団である。CLPを同定するのに有用なマーカー表現型は、本分野で一般的に知られている。マウスのCLP細胞については、該細胞集団は、Kondo, M. et al., Cell 91:661-672(1997)に記載のマーカーの存在に特徴を有するが、ヒトCLPは、CD34⁺CD38⁺CD10⁺IL7R⁺のマーカー表現型が使用されることができ (参考文献として本明細書中に援用されている刊行物、Galy, A et al., Immunity, 3:459-473(1995); Akashi, K. et al., Int. J. Hematol. 69(4):217-226(1999))。

30

【 0 0 7 3 】

好ましいマウス細胞表面マーカーの概略を以下の表 1 に提供し、ここで、およその染色レベルが表のセルの色で示される：白は染色しないこと、薄いグレーは低レベルの染色、そして濃いグレーは中間又は高度の染色を示す。

【 0 0 7 4 】

【表 1】

表 1

HSC	CD117	CD90.1	Lin1	Sca-1		
CLP	CD117	CD90.1	Lin1	Sca-1	CD127	
MP	CD117	Sca-1	Lin2			
CMP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
GMP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
MEP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
MKP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9

40

Lin1 : CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, TER119

Lin2 : CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD90.1, CD127, TER119

50

【 0 0 7 5 】

好ましいヒト細胞表面マーカーの概略を以下の表 2 に提供し、ここで、およその染色レベルが表のセルの色で示される：白は染色しないこと、薄いグレーは低レベルの染色、そして濃いグレーは中間又は高度の染色を示す。

【 0 0 7 6 】

【表 2】

表 2

HSC	CD34	CD90	Lin1		
CLP	CD34	CD127	CD10	CD38/CD90	Lin
MP	CD34	CD90	Lin2		
CMP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123
GMP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123
MEP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123

Lin1 : CD2, CD3, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD56, CD235a

Lin2a : CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235a

Lin2b : CD10, CD11b, CD14, CD19, CD235a

【 0 0 7 7 】

多数の他の好適な細胞表面マーカーが当業者に現在知られており、又はいずれ同定されそして特徴づけされるであろう。そしてかかるマーカーは本明細書に記載の方法及び組成物において有益な用途を見出すであろう。例えば、mRNA発現のアレイ解析に基づいて、さまざまな骨髓球前駆細胞集団についていくつかのさらなる潜在的なマウスマーカーが最近同定された。例えば、Iwasaki-Arai et al., J. Exp. Med. 197:1311-1322(2003) ; Akashi, et al., Nature 404:193-197(2000) ; Miyamoto, et al., Dev. Cell 3:137-147(2002) ; Traver, et al., Blood 98:627-635(2001) ; Akashi, et al., Blood 101:383-390(2003) ; Tersikh, A., et al., Blood 102: 94-101(2003)を参照のこと。この同じタイプのmRNA発現分析に基づいて、Manz, et al. Proc. Natl Acad Sci USA 99:11872-11877 (2002)に記載のとおり、CD110、CD114、CD116、CD117、CD127、及びCD135などのさらなる細胞表面マーカーもヒトにおいて同定された骨髓球前駆細胞亜集団の1つ以上を単離するための用途を見出した。

【 0 0 7 8 】

本明細書に記載の方法のためには、増殖される細胞は、究極的に骨髓球系列の細胞、すなわち、顆粒球、マクロファージ、巨核球、赤血球系細胞、及び/又は骨髓球樹状細胞に分化することのできる細胞である。これらは、なかでもHSC及び骨髓球前駆細胞CMP、GMP及びMEPを含む。これらの細胞は関連した特徴、特に上記の分化能及び細胞マーカー特性を有する。1つの実施態様においては、増殖のための始原細胞は、マーカー表現型CD34⁺を有する細胞を含む。CD34マーカーは異なる前駆細胞中に見出されるため、増殖のための始原細胞集団は、CD34を発現する前駆細胞混合物であることができる。他の実施態様においては、細胞は細胞マーカー表現型Sca-1^{pos}、マウス及び他のげっ歯類において見出される細胞マーカーを含む細胞である。Sca-1^{pos}細胞についての選択も、細胞マーカー表現型を示す細胞の混合物をもたらすが、マウス骨髓球前駆細胞はSca-1^{neg}であるため、それは主にHSCを選択するだろう。したがって、げっ歯類骨髓球細胞の増殖についての他の実施態様においては、HSC、CMP及びGMPを含む細胞マーカー表現型Lin^{neg/low}が使用される。

【 0 0 7 9 】

さらなる側面においては、増殖のための始原細胞は単離された細胞である。これらは、指示されたサイトカイン及び成長因子混合物の存在下で、骨髓球系列の他の前駆細胞にさらに増殖するCMPに成長する、単離されたHSCを含む。他の実施態様においては、増殖のための始原細胞は、上記の分化能及び細胞マーカー表現型に特徴を有するCMPである。CMPは

10

20

30

40

50

、制限された自己更新能を有し、そしてしたがって、増殖して制限された数の細胞分割のためのさらなるCMPを生成する一方、GMP及びMEPにも分化することができる。

【0080】

増殖のための細胞は、骨髄、末梢血、臍帯血及び肝臓、特に胎児肝臓を含む、造血系及び骨髄球前駆細胞を含むことが知られている他の供給源から得ることができる。末梢血及び臍帯血は、HSC及び前駆細胞の豊富な供給源である。細胞は、本分野で知られ一般に実施される方法を用いて得られる。例えば、骨髄細胞の調製方法は、Sutherland et al., Bone Marrow Processing and Purging: A practical Guide (Gee, A.P. ed.), CRC Press Inc. (1991)中に記載されている。臍帯血又は胎盤臍帯血は、典型的には、臍帯静脈の穿刺によって満期産又は早産における胎盤剥離の前または後に得られる(例えば、Turner, C. W. et al., Bone Marrow Transplant. 10:89(1992); Bertolini, F. et al., J. Hematother. 4:29(1995))。HSC及び骨髄球前駆細胞も、好適な対象から引き出された血液が白血球を除去するが他の血液成分はドナーに戻す(Cobe BCT Spectra blood cell separatorsなどの)連続的なフロー遠心法によって処理される、白血球アフェレーシスによって末梢血から得られることができる。他のタイプの単離手順は、Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway NJ)などの密度の変化する媒体を介する遠心分離である。

10

【0081】

細胞は、本明細書に一般に記載されるとおりに、造血系を有する任意の動物種に由来する。好ましくは、好適な動物は、例示的かつ非制限的にげっ歯類、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウシ、(ヒトなどの)霊長類などを含む哺乳動物である。増殖されるための細胞は、単一の対象又は複数の対象から得ることができる。複数とは、少なくとも2(例えば、1超)のドナーをさす。細胞が複数のドナーから得られた場合、それらの関係は、本明細書に定義された同系、同種又は異種であってよい。本開示の好ましい実施態様は、以下にさらに記載されるように、本明細書に記載の増殖方法によって得られた同種の骨髄球前駆細胞の混合物を対象とする。以下にさらに検討するとおり、同種の細胞は、別々に増殖されそして増殖後に細胞が混合されるか又は増殖前に細胞が混合されてもよい。

20

【0082】

適用可能であれば、先のサイトカイン又は薬物の対象への投与により、幹細胞及び前駆細胞が骨髄から末梢血中へ動員されてよい(例えば、Lapidot, T. et al., Exp. Hematol. 30:973-981(2002))。動員を誘発することのできるサイトカイン及びケモカインは、例示的かつ非制限的に顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、エリスロポエチン(Kiessinger, A. et al., Exp. Hematol. 23:609-612(1995))、幹細胞因子(SCF)、AMD3100(AnorMed, Vancouver, Canada)、インターロイキン-8(IL-8)、及び(ペグフィルガストリム(pegfilgrastim)、ダルボポエチン(darbopoietin)などの)これらの因子の変異体を含む。G-CSF及びSCF又はGM-CSF及びG-CSFなどのサイトカイン及び/又はケモカインの組み合わせは、動員を促進するのに相乗的に作用することができ、そして、特に単一のサイトカイン又はケモカインによる効率的な動員を示さない対象のために末梢血中のHSC及び前駆細胞の数を増加させるのに使用されることができる(Morris, C. et al., J. Haematol. 120:413-423(2003))。

30

40

【0083】

細胞破壊性物質は、HSC及び前駆細胞を動員するためにも、誘導用量(すなわち、腫瘍縮小用量)で使用されることができ、単独又はサイトカインと併用されて有用である。この動員様式は、対象が骨髄破壊的治療を受ける場合に適用可能であり、かつより高用量の化学療法の前に実施される。動員のための腫瘍縮小性薬物は、なかでもシクロホスファミド、イフォスファミド、エトポシド、シトシンアラビノシド、及びカルボプラチンを含む(Montillo, M. et al., Leukemia 18:57-62(2004); Dasgupta, A. et al., J. Infusion Chemother. 6:12(1996); Wright, D. E. et al., Blood 97:(8):2278-2285(2001))。

【0084】

増殖のための細胞は、さらなる選択及び精製に供されてもよく、これは、実質的に純粹

50

な細胞集団を得るために正及び負の選択法を含むことができる。1つの側面においては、フローサイトメトリーとも呼ばれる蛍光活性化細胞分類（FACS）が異なる細胞集団を分類し分析するために使用される。HSC又は前駆細胞集団に特異的な細胞マーカーを有する細胞は、該細胞マーカーに結合する抗体又は典型的には抗体混合物で標識される。異なるマーカーに対する各抗体は、検出可能な分子、特に他の抗体に結合された他の蛍光色素から識別可能な蛍光色素に複合化される。標識された又は「染色された」細胞の流れは蛍光色素を励起する光源を通過し、特定の標識された抗体の存在を判定するために細胞からの発光スペクトルが検出される。本分野で多色蛍光細胞分類とも呼ばれる異なる蛍光色素の同時検出により、異なる細胞マーカーの組を表示する細胞が同定され、集団中の他の細胞から単離されることができる。例示的かつ非制限的に側方散乱（SSC）、前方散乱（FSC）、及び（プロピジウムヨウダイドなどによる）バイタルダイステイニングを含む他のFACSパラメータは、サイズ及びバイアピリティーに基づく細胞の選択を可能とする。FACSによるHSC及び前駆細胞の分類及び分析は、中でも、米国特許第5,137,809号、同第5,750,397号、同第5,840,580号、同第6,465,249号；Manz, M. G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11872-11877(2002)；及びAkashi, K. et al., Nature 404(6774):193-197(2000)に記載されている。蛍光活性化細胞分類についての一般的な指導は、例えば、Shapiro, H. M. Practical Flow Cytometry, 4thEd., Wiley-Liss (2003)及びOrmerod, M. G. Flow Cytometry: A Practical Approach, 3rd Ed., Oxford University Press (2000)に記載されている。

10

【0085】

20

始原細胞集団の他の単離方法は、特定の細胞表面マーカーと相互作用する抗体又はリガンドが結合した固体又は不溶性の物質を用いる。免疫吸着技術においては、細胞は、抗体を含む（ビーズのカラム、フラスコ、磁性粒子）基材と接触させられ、いかなる未結合の細胞も除去される。免疫吸着技術は、臨床での収集で多数の細胞を直接扱うためにスケールアップされることができる。好適な基材は、例示的かつ非制限的にプラスチック、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、アガロース、及び（Pharmacia Sepharose 6MBマクロビーズなどの）本分野で知られた他のものを含む。磁性又は常磁性ビーズを含む固体基材が使用される場合、ビーズに結合した細胞は磁気選別器によって容易に単離されることができる（例えば、Kato, K. and Radbruch, A., Cytometry 14(4):384-92(1993)；CD34⁺ direct isolation kit, Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germanyを参照のこと）。アフィニティクロマトグラフィーによる細胞の分離は、典型的に、細胞懸濁液をその表面に固定化された選択的リガンドを有する支持体を通過させることを含む。リガンドは、細胞上のその特異的標的分子と相互作用し、そしてマトリックス上に捕捉される。結合された細胞は、溶出剤の添加によってカラムのランニングバッファー中で放出され、そして遊離の細胞はカラムから洗浄されて均一な集団として採取される。当業者には明らかであるとおり、吸着技術は特定の抗体を使用するものに限定されず、非特異的吸着を使用してもよい。例えば、シリカへの吸着は、細胞調製物からの食細胞の除去のための単純な手順である。

30

【0086】

FACS及びバッチ式免疫吸着技術のほとんどは、正の及び負の選択手順の両方に応用可能である（例えば、米国特許第5,877,299号を参照のこと）。正の選択においては、所望の細胞が抗体で標識され、そして残りの非標識/非所望の細胞から取り除かれる。負の選択においては、非所望の細胞が標識され、除去される。使用可能な他のタイプの負の選択は、非所望の細胞を除去するために、抗体/補体処理又は免疫毒素を使用する。

40

【0087】

細胞の精製も上記の方法の組み合わせを含むと理解されるべきである。典型的な組み合わせは、非所望の細胞および細胞物質のバルクを除去するのに有効な最初の手順、例えば、白血球アフェレーシスを含んでよい。第二のステップは、基材に結合した抗体への免疫吸着により、1つ以上の前駆細胞に共通のマーカーを発現する細胞の単離することを含むことができる。例えば、抗-CD34抗体を含む磁性ビーズは、CD34抗原を共通して発現する

50

HSC、CMP、及びGMP細胞を結合しそして捕捉することができる。特定の細胞マーカーの組に対する抗体によるFACSソーティングなどの、異なる細胞タイプのより高度な分割を提供するさらなるステップは、所望の細胞の実質的に純粋な集団を得るために使用可能である。他の組み合わせは、抗-CD34抗体と結合した磁性ビーズを用いる最初の分離とそれに続くFACSによる精製のさらなるラウンドを含んでよい。

【0088】

細胞の分化能の決定、そしてしたがって幹細胞又は単離された前駆細胞のタイプの決定が、該細胞のさまざまな最終的に分化した細胞への成長を可能する条件に細胞を曝露することによって典型的に実施される。これらの条件は、一般に、骨髄球系列又はリンパ球系列の成長を許容する、培地中のサイトカイン及び成長因子の混合物を含む。コロニー形成性培養アッセイは、希釈を制限しそしてそれらの持続的成長から生じる細胞のタイプを評価することを介して、インビトロで細胞を培養することに依存する。このタイプの一般的アッセイは、サイトカインを補充したメチルセルロース培地に基づく（例えば、MethoCult, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada; Kennedy, M. et al., *Nature* 386:488-493 (1997)など）。造血経路における分化を許容するサイトカイン及び成長因子調製物は、Manz et al., *Proc Natl Acad. Sci. USA* 99(18): 11872-11877 (2002); 米国特許第6,465,249号; 及びAkashi, K. et al., *Nature* 404(6774):193-197 (2000)に記載されている。サイトカインは、SCF、FLT-3リガンド、GM-CSF、IL-3、TPO、及びEPOを含む。他のインビトロのアッセイは、造血を支援する間質細胞を典型的に使用する、長期培養始原細胞(LTC-IC)アッセイである（例えば、Ploemacher, R.E. et al., *Blood* 74:2755-2763 (1989); 及びSutherland, H.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3745 (1995)を参照のこと）。

【0089】

単離された細胞の分化能を決定するのに好適な他のタイプのアッセイは、宿主動物へのインビボでの細胞投与及び造血系の再生の評価に依存する。拒絶反応を制限し、同種又は異種の細胞移植片の受け入れを許容するために、レシピエントは免疫低下又は免疫不全状態である。この種類の有用な動物系は、NOD/SCID (Pflumio, F. et al., *Blood* 88:3731(1996); Szilvasym S. J. et al., "Hematopoietic Stem Cell Protocol," in *Methods in Molecular Medicine*, Humana Press (2002); Greiner, D.L. et al., *Stem Cells* 16(3):166-177(1998); Piacibello, W. et al., *Blood* 93:(11):3736-3749(1999))又はRag2欠損マウス(Shinkai, Y. et al., *Cell* 68:855-867(1992))である。輸注された細胞に起源を有する細胞は、宿主動物の骨髄、脾臓又は血液から細胞を回収し、典型的にはFACSアッセイによって特定の細胞マーカーを表示する細胞の存在を判定すること(すなわち、マーカー表現型のタイピング)によって評価される。移植された細胞に特異的なマーカーの検出は、内因性の細胞と移植された細胞の識別を可能とする。例えば、細胞マーカーのヒト形態(例えば、HLA抗原)に特異的な抗体は、それらが好適な免疫不全マウスに移植された場合にヒト細胞を同定する(例えば、上記のPiacibello, W. et al.を参照のこと)。

【0090】

上記の方法により得られた細胞の最初の集団は、増殖のために直接使用されるか又は後日の使用のために凍結される。細胞を凍結するためのさまざまな媒体及びプロトコールが本分野で知られている。一般に、凍結媒体は、約5~10%のDMSO、10~90%の血清アルブミン、及び50~90%の培地を含むであろう。細胞を保存するための他の有用な添加物は、例示的かつ非制限的に、トレハロースなどのジサッカライド(Scheinkonig, C. et al., *Bone Marrow Transplant.* 34(6):531-6 (2004))又はヘタスターチ(すなわち、ヒドロキシエチルスターチ)などの血漿増量剤を含む。いくつかの実施態様においては、リン酸緩衝食塩水などの等張性緩衝溶液が使用されてよい。例示的な凍結保存用組成物は、4%のHSA、7.5%のジメチルスルホキシド(DMSO)、及び2%のヘタスターチを含む。凍結保存のための他の組成物及び方法は本分野で周知であり、かつ記載されている(例えば、Broxmeyer, H.E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(2):645-650 (200

10

20

30

40

50

3)を参照のこと)。細胞は約 - 135 未満の最終温度で保存される。

【0091】

骨髄球前駆細胞のエクスピボでの増殖

上記で得られた細胞の最初の集団は、細胞を、骨髄球前駆細胞の増殖を許容するサイトカイン及び成長因子の混合物を含む培地に接触させることによって、エクスピボの培養中で増殖させられる。その自然の状況においてサイトカインは、典型的に、細胞により作られるタンパク質であって、細胞が他の細胞又はサイトカインを産生する細胞であるかに係らず、細胞の生理学的状態を調節するタンパク質である。リンパ球により作られるサイトカインはしばしばリンホカイン (IL) と記述されるが、本明細書中で定義されるサイトカインである。サイトカインは典型的には、サイトカインにより調節される細胞上の細胞受容体を介して作用する。同様に、成長因子も、その自然の状況において、典型的に細胞により作られる化合物であって、細胞が他の細胞又は成長因子を産生する細胞であるかに係らず、細胞の増殖及び分化に影響を与える化合物である。サイトカイン同様、成長因子は一般に、受容体を介して細胞に作用する。本開示中のサイトカイン又は成長因子は、しかしながら、排他的であることを意味せず、それは、一定のサイトカインは成長因子に類似して、細胞の増殖及び分化に効果を有するからである。したがって、本明細書中の特定のサイトカイン及び成長因子の記載は、本分野の既知の知識を反映するものであって、そして本開示を制限することを意味するものではない。

10

【0092】

本明細書に記載の増殖方法のために、サイトカイン及び成長因子は、CMP、GMP、及びMEP細胞などの骨髄球前駆細胞集団を増殖させるために選ばれる。これらの細胞が制限された自己更新能を有するか又は自己更新能を有さないため、培養条件はこれらの骨髄球細胞に成長する細胞の分割を支援する一方、骨髄球前駆細胞でない他の細胞タイプの成長及び増殖を最小化するために選ばれる。

20

【0093】

したがって、増殖条件のためのサイトカインは、一般に、IL-1 (すなわち、IL-1)、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、GM-CSF及びそれらの類似体から選ばれる。サイトカインの形態は天然物、組換え産物、変異体又はペプチド模倣物などの天然の形態と類似の生理活性を有する改変形態である。サイトカインは、融合タンパク質又は人工サイトカインの群から選ばれることもでき、好適な非制限的例は、PIXY321 (Curtis, B. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991 88:5809-5813)、GM-CSFとIL-3の合成ハイブリッドタンパク質であるEpo-IL-3 (Lu, L., et al., Exp. Hematol. 1995 23: 1130-1134)、IL-2-IL-6 (Zhao, C., et al., Stem Cells 1994. 12: 1130-1134) を含む。

30

【0094】

サイトカインの供給源は、増殖に使用される細胞上で活性であるように選ばれ、したがって、一般的に増殖に使用される始原細胞の起源を反映する。例えば、前駆細胞がヒト起源である場合、天然又は組換えのヒト形態のサイトカインが使用される。したがって、1つの実施態様においては、サイトカインは組換えヒトrhIL-1 (すなわち、rhIL-1)、rhIL-3、rhIL-6、rhIL-11、rhG-CSF、rhGM-CSF、及びそれらの類似体である。しかしながら、サイトカインの形態及び細胞の起源の間の関連は厳密なものではない。例えば、ヒトIL-6はマウス及びラット細胞において効果を誘発することができるが、マウスIL-6はヒト細胞には効果がない。このタイプの交差反応性は、当業者には明らかであり、知られた方法によって容易に試験可能である。特定のサイトカインの構造及び機能については、本分野の既知の知識を反映する以下の記載を参照のこと。

40

【0095】

IL-1は、(内皮細胞およびリンパ球の活性化などの)急性の炎症、骨形成及び骨のリモデリング、インスリン分泌及び発熱の上方及び下方制御における重要な役割を有する。サイトカインのIL-1ファミリーは、偽性3回軸 (pseudo three fold axis) を有する - バレルから成るといふ全体的な構造類似性を共有する (例えば、Priestle, J.P. et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 9667-71 (1989)を参照のこと)。本明細書に記載の方法に適

50

切なのは、IL-1 β であり、これは典型的にIL-1 とともにマクロファージにより分泌される。2つのアゴニストは前駆タンパク質（プロIL-1 β 及びプロIL-1 α ）の酵素切断に由来し、IL-1受容体に結合することによってそれらの生理学的効果を表す。IL-1 β のアミノ酸配列及び対応する核酸配列は例示的かつ非限定的に、マウス（Teford, J.L. et al., *Nucleic Acids, Res.* 14(24):9955-9963 (1986)）；ウサギ（Young PR and Sylvester D., *Protein Eng.* 2(7):545-51 (1989)）；ラット（寄託番号NP 113700[gi:13928692]）；ブタ（Heuther, M.J. et al., *Gene* 129(2):285-289 (1993)）；ウシ（Leong S. R., *Nucleic Acids Res.* 16:9054-9054(1988)）；ネコ（Daniel, S. L. et al., *Anim. Biotechnol.* 3:117-121(1992)）；ウマ（Howard, R.D. et al., *Am. J. Vet. Res.* 59:704-711(1998)）；ヒト（March, C.J. et al., *Nature* 315:641 (1985)）；及び組換えヒト（Meyers, C. et al., *J. Biol. Chem.* 262(23):11176-11181(1987)）を含む多様な供給源から既知である。IL-1 の変異体は、Boraschi, D. et al., *Frontiers in Bioscience* 1:270-308(1995)に記載されている。さまざまな組換え体も商業的に入手可能である（例えば、ヒトIL-1 β 、Promega, Madison, WI, USA、マウスIL-1 β 、Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada；及びラットIL-1 β 、Chemicon Int., Temacula, CA, USA）。IL-1 の変異体は、中でもGronenborn, A.M. et al., *Eur. J. Biochem.* 161(1):37-43 (1986)；Antoni, Ge et al., *J. Immunol.* 137(10):3201-4(1986)；Palaszynski, E.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147(1):204-11 (1987)；及びHuang, J.J. et al., *FEBS Lett.* 223(2):294-8 (1987)に記載されている。

【 0 0 9 6 】

マルチ-CSFとしても知られているIL-3は、多様なタイプの血液細胞および組織細胞のクローン増殖および分化、特に顆粒球およびマクロファージの分化及び機能、を刺激する、リンパ球、上皮細胞、及び星状細胞により分泌される多系列細胞サイトカイン/成長因子である。それは、造血コロニー刺激因子の1つであると考えられる（例えば、Wagemaker, G. et al, *Biotherapy* 2(4):337-45(1990)）。IL-3についてのアミノ酸及び核酸配列は、中でもマウス（Fung M. C. et al., *Nature* 307:233-237(1984)）；ラット（Cohen, D.R. et al., *Nucleic Acids Res.* 14:3541-3658(1986)）；ヒツジ（McInnes C.J. et al., *Gene* 139:289-290(1994)）；ウシ（Mwangi S.M. et al., *Gene* 162:309-312(1995)）；チンパンジー/サル（Burger H. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1217:195-198(1994)）；及びヒト（Yang Y.-C. et al., *Cell* 47:3-10(1986)；Otsuka T. et al., *J. Immunol.* 140:2288-2295(1998)）を含むさまざまな生物から同定されている。IL-3の変異体は、Lopez, A.F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24):11842-6 (1992)；Barry, S.C. et al., *J. Biol. Chem.* 269(11):8488-92(1994)；及びOlins, P.O. et al., *J. Biol. Chem.* 270(40):23754-60 (1995)に記載されている。

【 0 0 9 7 】

IL-6は、B-細胞刺激因子2（BSF-2）及びインターフェロン- γ 2として知られ、B細胞のイムノグロブリン分泌細胞への分化、骨髄腫/プラズマ細胞腫の成長、及び神経細胞分化に参与する。IL-6のIL-6受容体への結合は、クラスIサイトカイン受容体スーパーファミリーに共通する、マルチサブユニット複合体含有タンパク質GP130の生成を誘導する。IL-6は4つの螺旋の束から成る共通構造を有し、ここで、螺旋表面は受容体と相互作用する。IL-6のアミノ酸及び核酸配列は、中でもマウス（Chiu, C.P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(19):7099-103 (1988)）；ラット（Northemann, W. et al., *J. Biol. Chem.* 264(27):16072-82(1989)）；ウサギ（Perkins, H.D. et al., *Cytokine* 12(6):555-65(2000)）；ヒツジ（Ebrahimi, B. et al., *Cytokine.* 7(3):232-236(1995)）；ウシ（Droogmans, L. et al., *DNA Seq.* 2(6):411-3(1992)）；ウマ（Swiderski, C.E. et al., *Vet Immunol Immunopathol.* 77(3-4):213-20(2000)）；及びヒト（Hirano T. et al., *Nature* 324:73-76(1986)）について同定されている。IL-6の変異体は、Dagan, S. et al., *Protein Expr. Purif.* 3(4):290-4 (1992)；Zang, J.G. et al., *Eur. J Biochem.* 207(3):903-13 (1992)；及びSkelly, S.M. et al., *J. Biotechnol.* 34(1):79-86(1994)に記載されている。組換え体は、Stoyan, T. et al., *Eur J Biochem.* 216(1):239-45(1

993); Orita, T. et al., *J Biochem. (Tokyo)* 115(2):345-50 (1994)に記載され、そして商業的にも入手可能である。

【0098】

IL-11は構造的及び機能的に関連したサイトカインのIL-6群に属し、上記のとおり、その生理活性を表すのに膜貫通糖タンパク質gp130を用いる。IL-11はまた、脂肪生成阻害因子 (AGIF) 及びオプレレベキンとしても知られている。IL-11は、他のサイトカイン及び成長因子と相乗的に作用して、幹細胞の増殖及び前駆細胞への分化を刺激し、並びに巨核球形成及び血小板形成を促進する。それがインビボで生着を促進することができる一方、インビトロではIL-11は幹細胞の原始集団を維持することができるという、IL-11の反対の効果はインビボとインビトロで見られる。クラス1サイトカインとして、IL-11は4つの螺旋の束の構造を有すると考えられる。IL-11のアミノ酸及び核酸配列は、なかでも、マウス (Morris, J.C. et al., *Exp. Hematol.* 24:1369(1996)) ; 霊長類 (Paul, S.R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(19):7512-6(1990)) ; 及びヒト (Ohsumi, J et al., *FEBS Lett.* 288:13(1991)) について同定されている。IL-11の組換え体及び変異体は、Miyadai, K. et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60(3):541-2(1996); Tacken, I. et al., *Eur. J Biochem.* 265(2):645-55(1999)に記載されている。

10

【0099】

G-CSF又は顆粒球コロニー刺激因子は、骨髄の顆粒球産生を誘導し、そして好中球顆粒球前駆細胞および成熟好中球の生存、増殖、分化及び機能を促進するように作用する。それは、内皮細胞およびマクロファージなどの多数の異なる細胞タイプにより産生される。天然には糖タンパク質として生じるG-CSFの非グリコシル化形態は組換え技術によって完全に活性なものとされる。構造的に、G-CSFは4つの螺旋の束の存在によって示されるように、クラス1サイトカインファミリーに関連する (Hill, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(11):5167-71(1993); Lovejoy, B. et al., *J Mol Biol.* 234(3):640-53(1993))。G-CSFのアミノ酸及び核酸配列は、中でもマウス (Tsuchiyha, M. et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(20):7633-7(1986)) ; ラット (Han, S.W. et al., *Gene* 175(1-2):101-4(1996)) ; ウシ (Heidari, M. and Kehrl, M.E., *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73(2):183-91(2000)) ; ヒツジ (O'Brien, P.M; *DNA Seq.* 4(5):339-42(1994)) ; ネコ (Dunham, S.P. and Onions, D.E., *Cytokine* 14(6):347-51(2001)) ; ブタ (Kulmburg, P. et al., *Gene* 197(1-2):361-5(1997)) 及びヒト (Nagata, S. et al., *EMBO J.* 5:575-581(1986)) について同定されている。G-CSFの組換え体及び変異体は、Lu, H.S. et al., *Arch Biochem Biophys.* 268(1):81-92(1989); Kuga, T. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 159(1):103-11(1989); 及びFujii, I. et al., *FEBS Lett.* 410(2-3):131-5(1997)に記載され、そしてフィルグラスチム (filgrastim) ; レノグラスチム (lenograstim) ; プルリポエチン (pluripoietin) ; Neupogen (登録商標)、グラニューロカイン (granulokine) (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) 及びグラノサイト (granocyte) (Rhone-Poulenc) の商品名で商業的に入手可能である。

20

30

【0100】

コロニー刺激因子2としても知られるGM-CSF又は顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子は、顆粒球、マクロファージ、好酸球及び赤血球を含む、多様な系列からの造血前駆細胞の成長及び分化を刺激する。それは、4つの螺旋の束の構造を有するクラス1サイトカインファミリーの一部でもあり、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子受容体に結合することによってその生理学的効果を表す。GM-CSFについて知られたアミノ酸及び核酸配列は、中でもマウス (Gough, N.M. et al., *Nature* 309:763-767(1984)) ; ヒツジ (McInnes, C.J. and Haig, M.C.K., *Gene* 105:275-279(1991)) ; ウシ (Maliszewski, C.R., *Mol. Immunol.* 25:843-850(1988)) ; 及びヒト (Cantrell, M.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6250-6254(1985); Lee, F. et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(13):4360-4(1985)) を含む。GM-CSFの組換え体及び変異体は、Delamarter, J.F. et al., *EMBO J.* 4(10):2575-81(1985); Shanafelt A.B. and Kastelein, R.A., *Proc Natl Acad Sci USA* 86(13):4872-6(1989)に記載されており、モルグラモスチン及びサルグラモスチン

40

50

の商品名で商業的に入手可能である。

【0101】

増殖の目的のための成長因子は、幹細胞因子（SCF又はSF）、FLT-3リガンド（FL）、トロンボポエチン（TPO）、エリスロポエチン（EPO）及びそれらの類似体から選ばれる。サイトカインと同様、成長因子形態は、天然物又天然の因子に類似した生理活性を有する組換え体のいずれかである。したがって、1つの実施態様においては、成長因子は組換えヒト rhuSCF、rhuFL、rhuTPO、rhuEPO、及びそれらの類似体である。サイトカインの選択と同様、成長因子は増殖に使用される細胞上で活性であるように選ばれ、そしてしたがって一般に始原細胞の起源を反映するであろうが、関係は上記で記載したように厳密である必要はない。例えば、ラット及びマウスSCFはヒト細胞上で活性であるが、ヒトタンパク質はマウス又はラット細胞上ではもっと活性が低い。このタイプの交差反応性は、当業者には明らかとなるであろうし、知られた方法によって容易に試験されることができ。特定の成長因子の構造及び機能については、本分野の知られた知識を反映し制限的であることを意味しない、以下の記載を参照のこと。

10

【0102】

c-kitリガンド、マストセル成長因子又はSteel 因子としても知られるSCFは、造血ヒエラルキーの複数のレベルに作用し、細胞の生存、増殖、分化、吸着及び他のサイトカインと組み合わせた機能的活性化を促進する。骨髄球系列、特にマスト細胞の成長において特に重要であるが、多能性幹細胞及び前駆細胞、巨核球およびリンパ球前駆細胞の小集団にも作用する（Broudy, V.C. Blood 90(4):1345-1364(1997)）。SCFはその受容体、C-KIT に結合することによりその生理活性をあらわす。天然のSCFは、骨髄間質細胞により、そのどちらかが生理活性を有する膜貫通型または可溶性形態のいずれかとして合成される。SCFの全体構造は、逆平行の4つの螺旋の束を有する（Zhang, Z. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA97(14):7732-7(2000)）。SCFについて知られているアミノ酸及び核酸配列は、なかでもマウス（Lyman S.D. et al, Cell 75(6):1157-67 (1993),ラット（Martin, F. H. et al., Cell 63(1):203-11 (1990)）、ネコ（Dunham, S.P. and Onions, D.E, DNA Seq. 6(4):233-7(1996)）；ヒツジ（McInnes, C.J. et al, Cytokine 11(4):249-56 (1999)）；イヌ（Shin, I.S. et al., J Vet Sci. 2(3):159-66(2001)）；及びヒト（上記のMartin, F.H. et al.）を含む。組換えSCF及び変異体は、Jones, M.D. et al., J. Biol. Chem. 271:11301(1996)；Lu, H.S. et al., J. Biol. Chem. 271:11309(1996)；Langley, K. E. et al., Arch. Biochem. Biophys. 295:21(1992)；Lev, S. et al., Mol Cell Biol. 13(4):2224-34(1993)；及びLangley, K.E. et al., Arch. Biochem. Biophys. 311(1):55-61(1994)に記載されている。

20

30

【0103】

「FL」又は「SL サイトカイン」又は「FMS関連チロシンキナーゼ3リガンド」としても知られる「FLT-3リガンド」は、（「ACD135」又は「Aflk2」でもある）flt-3受容体に結合する因子であり、チロシンキナーゼ受容体分子は一般に造血幹細胞及びCD34+細胞を含む原始的前駆細胞上に見出される。それは、CD117（c-kit）などの他の因子と相乗して、インビトロでの造血幹細胞増殖を刺激し、インビボでの前駆細胞の増殖及び動員を刺激するLyman, S.D. and Williams, D.E., Curr. Opin. Hematol. 2(3):177-81 (1995)。（細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインからなる）完全長FLT-3リガンドおよび可溶性細胞外ドメインはどちらも生理活性を有する（Lyman, S.D. et al., Cell 75:1157 (1993); Lyman, S.D. et al., Blood 83:2795 (1994)）。好ましくは、FLT-3リガンドは完全長の細胞外ドメインのアミノ酸配列を含む可溶性形態である。可溶性flt-3リガンドの構造は、SCF及びG-CSFに類似した、2つの短いアルファ螺旋鎖の束の存在を明らかにした（Savvides, S.N. et al., Nat. Struct. Biol. 7(6):486-91(2000)）。FLのアミノ酸及び核酸配列は、なかでもマウス（Rosnet, O. et al., Oncogene. 6(9):1641-50 (1991)）；ネコ（Yang S. and Sim, G.K. DNA Seq. 11(1-2):163-6(2000)）；イヌ（上記のYang, S.,）；及びヒト（Rosnet, O. et al., Blood. 82(4):1110-9(1993)）について同定されている。FLT-3リガンドの組換え体及び変異体は、なかでもSudo, Y. et al., Blood 89:3

40

50

186(1997)及びMcClanahan, T. et al., Blood 88:3371-3382(1996)に記載されている。

【 0 1 0 4 】

巨核球成長及び分化因子(MGDF)又はc-Mplリガンドとしても知られるトロンボポエチン又は「TPO」は、巨核球の増殖及び分化を刺激し、そしてしたがってインビトロ及びインビボでの血小板の産生を促進する(例えば、Lok, S. et al., Stem Cells12(6):586-98(1994))。TPOはプロトオンコジーンc-mplによりコードされる、特定の細胞表面受容体への結合を介してその効果を表す。多くの他のサイトカインおよび成長因子と同様に、TPOは、逆平行の4つの螺旋の束の存在に特徴を有する(Feese, M.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(7):1816-21(2004))。トロンボポエチンについてのアミノ酸及び核酸配列は、中でも、マウス(Lok, S., Nature 369(6481):565-568(1994));ラット(Ogami, K. et al., Gene 158(2):309-10(1995));及びヒト(Foster, D.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(26):13023-13027(1994);Bartley, T. D. et al., Cell 77(7):1117-1124(1994))について知られている。TPOの組換え体及び変異体は、中でもSouryi, M. et al, Cell 63:1137-1147(1990);Gurney, A. L. et al., Blood 85(4):981-8(1995);Wada, T. et al., Biochem Biophys Res Commun. 213(3):1091-8(1995);Park, H. et al, J Biol Chem. 273(1):256-61(1998);及びJagerschmidt, A. et al., Biochem.J. 333(Pt3):729-34(1998)に記載されている。

10

【 0 1 0 5 】

エリスロポエチン又はEPOは、未成熟の赤血球の増殖及び成熟及び巨核球の成長を刺激することによって赤血球産生を制御する(例えば、Fisher, J.W. Proc. Soc. Exp. Biol Med. 216(3):358-69(1997))。それは、EPO受容体への結合によってその効果を表す。EPO合成の主要な部位が腎臓の腎皮質であるにもかかわらず、低レベルのEPOが肝臓及び骨髄中のマクロファージにより合成される。EPOは、4つの螺旋の束の存在に特徴を有し、構造的にTPOに類似している(Feese, M.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(7):1816-21(2004))。EPOについてのアミノ酸及び核酸配列は、中でも、マウス(Shoemaker, C.B. and Mitsock, L.D. et al., Mol Cell Biol. 6(3):849-58(1986));ラット(Nagao, M. et al., Biochim. Biophys. Acta. 1171(1):99-102(1992));ヒツジ(Fu, P. et al., Mol Cell Endocrinol. 93(2):107-16(1993));イヌ(Wen, D. et al., Blood 82(5):1507-16(1993));ウシ(Suliman, H.B. et al., Gene 171(2):275-80(1996));ウサギ(Vilalta A. et al., Biochem Biophys Res Commun. 284(3):823-7(2001));ブタ(Wen, D. et al, 上記;David R.B. et al, Domest. Anim. Endocrinol. 20(2):137-47(2001));サル(Lin, F.K. et al., Gene. 44(2-3):201-9(1986));及びヒト(Lin, F. K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(22):7580-7584(1985);Gasson, J.C. et al, Nature 315(6022):768-71(1985))について知られている。EPOの組換え体及び変異体は、Barbone, F.P. et al. Nephrol Dial Transplant. 14 Suppl 2:80-4(1999);Boissel, J.P. et al, J Biol. Chem. 268(21):15983-93(1993)に記載されている。EPOはEpogen(登録商標)(Amgen, Thousand Oaks, CA, USA)、Epogin(登録商標)(Chugai Pharmaceuticals, JAPAN)、Eprex(登録商標)(Janssen-Cilag, Saunderton, UK)、Recormon(登録商標)(Roche, Basel, Switzerland)、及びProcrit(登録商標)(Ortho Biotech., Bridgewater, NJ, USA)の商品名で商業的に入手可能である。

20

30

40

【 0 1 0 6 】

本明細書中で使用される変異体は、サイトカイン又は成長因子配列中の任意のアミノ酸の置換、欠失、挿入を含み、ここで、変異体は各サイトカイン又は成長因子に関連する生理活性を保持する。生理活性を保持する一方、1つ以上のアミノ酸残基の置換はすることができ、そして典型的には、本明細書中で「保存的置換」とも呼ばれる、相同のアミノ酸で1つのアミノ酸を置換することを含む。いくつかの場合には、非保存的置換も行われてよい。相同のアミノ酸は、側鎖のサイズ及び極性の程度に基づいて、(システイン、プロリン、アラニン、トレオニンなどの)小さな非極性アミノ酸;(セリン、グリシン、アスパラギン酸、アスパラギンなどの)小さな極性アミノ酸;(フェニルアラニン、メチオニン、ロイシン、イソロイシン、バリンなどの)大きな非極性アミノ酸に分類される。相同

50

のアミノ酸は、以下の：（グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどの）荷電していない極性R基；（アスパラギン酸、グルタミン酸などの）酸性アミノ酸；および（リジン、アルギニン、及びヒスチジンなどの）塩基性アミノ酸、にも群分けされることができる。保存的変異体の例は、イソロイシン、バリン、ロイシン、又はメチオニンなどの1つの疎水性残基の他への置換；1つのアルギニンをリジンへ、グルタミン酸をアスパラギン酸へ、又はグルタミンをアスパラギンへなどの、1つの極性残基の他の極性残基への置換；及び1つのヒドロキシル化アミノ酸であるセリン又はトレオニンの他への置換、を含む。

【0107】

欠失は、約1～約20残基にわたるが、いくつかの場合、特にサイトカイン又は成長因子が物理的に分離可能な構造及び/又は機能的ドメインを有する場合には欠失はもっと大きくてよい。例えば、FLの変異体は、切断された細胞外ドメインであり、これは上記のとおり、膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを含む配列から分離された場合、生理活性を保持する。さらに、アミノ酸はアミノ又はカルボキシル末端、或いはサイトカイン又は成長因子中に存在する、ペプチド領域を連結するアルファ螺旋又はベータシートなどのアミノ酸配列連結構造ドメインに付加されてもよい。サイトカイン及び成長因子のそれぞれについての変異体は、当業者に明らかであり、その例示的な参考文献が上に提供される。

【0108】

HSCの増殖を制限し、最終的に分化した骨髄球系列の細胞の産生を制限する一方、骨髄球前駆細胞を増殖させるために、サイトカイン及び成長因子の組み合わせが選ばれる。1つの実施態様においては、サイトカイン及び成長因子の混合物は、SCF、FL、及びTPOの基本的組成を有する。このサイトカイン及び成長因子の混合物は、HSCの制限された増殖を許容し、そしてHSC及び他の前駆細胞の、なかでもCMP、GMP及びMEPを含むMPへの分化に許容性である。

【0109】

さらなる側面においては、基本的組成に、IL-3、IL-6又はIL-11又はそれらの組み合わせを含む追加のサイトカインが補充される。したがって、1つの実施態様においては、サイトカイン及び成長因子の混合物は、SCF、FL、TPO、及びIL-3の組成を有し、サイトカイン混合物は効率的にヒト骨髄球前駆細胞を増殖させるようである。他の実施態様においては、サイトカイン及び成長因子の混合物は、SCF、FL、TPO及びIL-6の組成を有し、サイトカイン混合物はマウス骨髄球前駆細胞を効率的に増殖させるようである。さらに他の実施態様においては、サイトカイン及び成長因子の混合物は、SCF、FL、TPO、IL-6及びIL-11の組成を有する。

【0110】

好中球減少症及び/又は血小板減少症に対する即時の防御を促進するために、骨髄球系列のより成熟した細胞が望ましい場合、サイトカインG-CSF又はGM-CSFが上記のサイトカイン混合物に添加される。これは、骨髄球系列のさらに先にある前駆細胞への分化を促進する前に、より原始的な骨髄球前駆細胞の増殖を許容するために、G-CSF又はGM-CSFを含まない培地中での初期の増殖の後に行われることができる。

【0111】

特定の骨髄球前駆細胞の増殖を有利にするために、異なる上記サイトカイン及び成長因子の混合物が使用されてよいと解される。一定の細胞集団の優先的な増殖は、該細胞が1つの状態又は（好中球減少症および血小板減少症などの）状態の組み合わせを治療するのに使用され、治療効果の持続が望まれる場合、望ましいものである。例えば、CMPは顆粒球、マクロファージ、巨核球及び赤血球系細胞に分化することができるため、CMPの存在は好中球減少症および血小板減少症の延長された軽減を提供するであろう。一方、GMPは顆粒球及びマクロファージに分化するが巨核球には分化しないため、CMP及びMEPに比べてGMPの比率の大きい細胞集団は、好中球減少症を軽減するであろうが、血小板減少症に対する治療的影響はより小さいであろう。反対に、MEPは赤血球系細胞及び巨核球に分化するが、顆粒球及びマクロファージには分化しないため、CMP及びGMPに比べてMEPの比率の大きな

10

20

30

40

50

細胞集団は、血小板減少症を軽減するであろうが、好中球減少症に対する治療的影響はより小さいであろう。

【0112】

増殖培地中のサイトカイン及び成長因子の量は、細胞培養中の骨髓球前駆細胞の特定のレベルへの増殖を支援するのに十分な量である。代表的な実施態様として、SCFは、一般に少なくとも約1～約1000 ng/ml、そして好ましくは約50～約100 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。FLは、一般に少なくとも約1～約1000 ng/ml、そして好ましくは約30～約100 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。TPOは、一般に少なくとも約0.5～約500 ng/ml、そして好ましくは約5～約50 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。IL-1は、一般に少なくとも約1～約100 ng/ml、そして好ましくは約10～約50 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。IL-3は、一般に少なくとも約1～約100 ng/ml、及び好ましくは約10～約50 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。IL-11は、一般に少なくとも約1～約100 ng/ml、そして好ましくは約10～約50 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。G-CSFは、一般に少なくとも約1～約1000 ng/ml、そして好ましくは約10～約100 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。GM-CSFは、一般に少なくとも約1～約100 ng/ml、そして好ましくは約10～約100 ng/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。EPOは使用される場合、一般に少なくとも約1～約30 U/ml、そして好ましくは約3～約10 U/mlの、増殖を支援するのに十分な量で使用される。一般的な指針として、サイトカイン及び成長因子の混合物は、造血幹細胞の増殖を制限する一方、骨髓球前駆細胞の増殖を強化する。

【0113】

骨髓球前駆細胞の増殖は、骨髓球前駆細胞の増殖を支援するのに十分な、上記のサイトカイン及び成長因子の混合物を補充した基本培地中で実施される。基本培地は、アミノ酸、(ピルビン酸、グルコースなどの)炭素源、ビタミン、(アルブミンなどの)血清タンパク質、無機塩、二価カチオン、抗体、緩衝剤及び骨髓球前駆細胞の増殖を支援する好ましく定義された他の成分を含む。好適な基本培地は、例示的かつ非制限的に、RPMI培地、Iscove's培地、最小必須培地、Dulbeccos Modified Eagles Medium、及び本分野で知られた他のもの(例えば、米国特許第6,733,746号を参照のこと)を含む。商業的に入手可能な基本培地は、例示的かつ非制限的に、Stemline(商標)(Sigma Aldrich)、StemSpan(商標)(StemCell Technologies, Vancouver, Canada)、Stempro(商標)(Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)、HPGM(商標)(Cambrex, Walkersville, MD, USA)、QBSF(商標)(Quality Biological, Gaithersburg, MD, USA)、X-VIVO(Cambrex Corp. Walkersville, MD, USA)及びMesencult(商標)(StemCell Technologies, Vancouver, Canada)を含む。これら及び他の培地の処方当業者には明らかである。

【0114】

最初の細胞集団は、基本培地中のサイトカイン及び成長因子の混合物と接触させられ、そして骨髓球前駆細胞集団を増殖させるために培養される。増殖は約2日～約14日、好ましくは約4日～約10日、より好ましくは約4日～約8日の間行われ、及び/又は指示された倍率の増殖及び特徴的細胞集団が得られるまで行われる。

【0115】

1つの実施態様においては、最終的な細胞培養調製物は、少なくとも約0.5倍、約1倍、約5倍、約10倍、約20倍、又は好ましくは少なくとも約30倍増殖したCMP細胞集団を特徴とする。最終的な培養においては、骨髓球細胞集団は、培養中の全細胞の少なくとも約0.5%、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約5%、そして少なくとも約10%のCMPを含むであろう。

【0116】

他の実施態様においては、最終的な細胞培養調製物は、少なくとも約10倍、約20倍、約40倍、そして好ましくは少なくとも約80倍増殖したGMP細胞集団を特徴とする。最終的な培養においては、骨髓球細胞集団は、培養中の全細胞の少なくとも約10%、少

10

20

30

40

50

なくとも約20%、少なくとも約30%、そして少なくとも約50%のGMPを含むであろう。したがって、好ましい実施態様においては、細胞集団は優先的にGMP細胞に富むように増殖させられる。

【0117】

さらなる実施態様においては、最終的な細胞培養調製物は、少なくとも約0.1倍、約1倍、約2倍、約5倍、そして好ましくは少なくとも約10倍増殖したMEP細胞集団を特徴とする。最終的な培養においては、骨髄球細胞集団は、培養中の全細胞の少なくとも約0.5%、約1%、約2%、そして好ましくは少なくとも約5%のMEPを含むであろう。

【0118】

一般に、最終的な培養中では、HSC特性を有する細胞の増殖は約25倍未満、好ましくは約15倍未満、そしてより好ましくは約10倍未満、そして最も好ましくは約5倍未満に制限される。一般に、HSC細胞の数は、培養中の骨髄球前駆細胞（すなわち、CMP、GMP及びMEP）よりも少ない。

【0119】

実際的な理由によりあまり好ましくはないが、いくつかの場合には、造血がおこる骨髄の微小環境を近似するために、支持細胞を含む、より定義されない培地が使用されてよい。骨髄間質細胞、内皮細胞及び間葉細胞は、培養中の造血細胞の成長及び維持を支援する因子を産生することができ、骨髄球前駆細胞の増殖のために使用されることができる。支持細胞培養は、特定の骨髄球前駆細胞の増殖及び成長を促進するために、上記サイトカイン及び成長因子の混合物を補充されることもできる。支持細胞に基づく培養は、米国特許第5,879,940号；Dexter, T.M. et al., *J. Cell Physiol.* 91:335-344 (1976)；Okubo, T. et al., *Cell Structure and Function* 25:133-139 (2000)；Shapiro, F. et al., *J Hematother* 5(6):655-62 (1996)；Coutinho, L.H. et al., "Clonal and long term bone marrow cultures using human bone marrow," in *Haematology: A Practical Approach*, Testa, N.G. and Molineux, G. eds., Oxford University, Oxford, UK(1992)；すべての刊行物は参考文献として本明細書中に援用されている。典型的には、骨髄由来の単核細胞が（Iscove's Modified Dulbecco's Mediumなどの）好適な培地中で間質細胞層が形成するまで培養される。そして、培養は照射され、増殖のために使用される最初の細胞集団を蒔かれる。

【0120】

支持細胞培養に基づく他の方法は、Feugier, P. et al., *J Hematother Stem Cell Res* 11(1):127-38 (2002)に記載されている。この技術は、HSC及び/又は前駆細胞の成長を支援するのに十分なサイトカイン及び成長因子を発現するように改変された不死化骨髄内皮細胞を使用する。特定のサイトカイン及び成長因子をコードする組換え発現ベクターが不死化細胞系中に導入され、そして因子を産生する内皮細胞層を生成するために細胞が培養される。そして、細胞は照射され、そして増殖に使用される細胞が培養に蒔かれる。一般に、HSC及び前駆細胞は、これらの培養条件下で弱く吸着するか又は吸着せず、増殖された細胞を内皮細胞から洗浄することを許容している。本明細書の目的のためには、不死化細胞中に導入されたサイトカイン及び成長因子遺伝子は、骨髄球前駆細胞の増殖を支援するのに十分な組み合わせを反映するであろう。したがって、1つの実施態様においては、サイトカイン遺伝子は、IL-1（すなわち、IL-1 α ）、IL-3、IL-6、IL-11、G-CSF、又はCM-CSFをコードするものから選ばれる。同様に、成長因子遺伝子は、SCF、FL、TPO及びEPOをコードするものから選ばれる。

【0121】

上記にしたがって、1つの実施態様においては、SCF、FL及びTPOをコードする遺伝子を含む発現ベクターが支持細胞中に導入される。さらなる実施態様においては、成長因子と組み合わせた、IL-3、IL-6又はIL-11或いはそれらの組み合わせを含む追加のサイトカインをコードする遺伝子を含む発現ベクターが使用される。したがって、1つの実施態様においては、SCF、FL、TPO及びIL-3をコードする支持細胞中に遺伝子が導入される。さらなる実施態様においては、細胞に導入された遺伝子は、SCF、FL、TPO、及びIL-6をコードす

る。さらなる実施態様においては、該遺伝子は、SCF、FL、TPO、IL-6及びIL-11をコードする。遺伝子配列は、増殖に使用される細胞上で活性なサイトカイン及び成長因子の形態を発現するように選ばれ、そしてしたがって一般に増殖に使用される始原細胞の起源を反映する。例えば、前駆細胞がヒト起源である場合、ヒト形態のサイトカインをコードする核酸配列が使用される。増殖のための細胞がマウス起源である場合、マウス又は他のげっ歯類形態のサイトカインをコードする核酸配列が使用される。使用されることのできる核酸配列は、本分野で知られた変異体又は組換え体をコードするものを含む。骨髓球前駆細胞の増殖を支援するのに十分なさまざまな他の遺伝子の組み合わせが当業者に明らかである。

【 0 1 2 2 】

上記方法によって増殖された細胞はさらに精製することなく使用されるか、又はイムノアフィニティークロマトグラフィー、免疫吸着、FACSソーティング、又は上記の他の手順などの本分野で知られたさまざまな技術によって異なる細胞集団に分離される。好ましくは、FACSソーティング又は免疫吸着が使用される。例えば、FACSゲーティングストラテジーは、特徴的な前方散乱（細胞サイズ）及び側方散乱（細胞密度）パラメータに基づく生きた細胞についての最初の選択、及び骨髓球前駆細胞又は非骨髓球細胞についての細胞マーカー（例えば、Sca-1^{neg}c-kit^{hi}）の発現についての第二の選択を含む。

【 0 1 2 3 】

分離された細胞集団は、本明細書中で定義された、分離された骨髓球前駆細胞、分離されたCMP、分離されたGMP、分離されたMEPを含むことができる。いくつかの状況においては、増殖された培養から骨髓球前駆細胞を除去することによって、分離された非骨髓細胞集団が調製される。分離された細胞は一般に、実質的に純粋な細胞の集団であり、そして典型的には特徴的な細胞マーカー表現型及び分化能を有する指示された細胞を少なくとも約50%、好ましくは約75~80%、より好ましくは少なくとも約85~90%、そして最も好ましくは少なくとも約95%含む。

【 0 1 2 4 】

同種の骨髓球前駆細胞混合物

上記のとおり、治療目的のための十分な数の細胞を提供するために、そして商業的に実行可能な臨床用製品の製造を可能とするために、細胞集団は複数の同種ドナーから得られた同種の骨髓球前駆細胞混合物であることが好ましい。レシピエントのMHCと一致しない治療用細胞に対する免疫反応の可能性はあるが、本治療は、HSCによる造血の再構築によって得られるより永久的な保護とは反対の一時的な保護を提供することを意図する。

【 0 1 2 5 】

重要なことは、本明細書に記載のとおり、成熟リンパ球細胞を除去した単離された骨髓球前駆細胞の使用によって、GVHDの可能性が大いに最小化されることである。1つの実施態様においては、これは、投与の前にかかる細胞を増殖された細胞集団から除去することによって達成される。他のそして好ましい実施態様においては、これは、実質的に純粋なCD34⁺CD90⁺HSCで開始することによって達成される。

【 0 1 2 6 】

同種細胞混合物は、同種骨髓球前駆細胞混合物、単離されたCMP混合物、単離されたGMP混合物、単離されたMEP混合物、またはそれらの組み合わせを含む。混合物中の細胞は、移植レシピエントのMHCに対して完全に一致した同種、部分的に一致しない同種、及び/又は完全に一致しない同種細胞であることができ、そして通常は同じ親対立遺伝子を持つ同胞である血縁ドナーまたは非血縁ドナーからのものである。MHC不一致の程度の判定は、知られた、そして本分野で使用される標準的な試験を採用する。

【 0 1 2 7 】

例えば、ヒトにおいては、移植生物学において重要であることが確認された、MHC遺伝子の少なくとも6つの主要なカテゴリーがある。HLA-A、HLA-B、HLA-Cは、HLAクラスIタンパク質をコードするが、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DPはHLAクラスIIタンパク質をコードする。これらの各群内の遺伝子は、ヒト集団中に見出される多数のHLA対立遺伝子又は変異

10

20

30

40

50

体に反映されるように多様性が高く、そしてこれらの群において個体間の相違は移植細胞に対する免疫反応の強度と関連する。MHCの一致の程度を測定するための標準的な方法は、HLA-B及びHLA-DR又はHLA-A、HLA-B及びHLA-DR群内の対立遺伝子を調べる。したがって、試験は2つ又は3つのHLA群それぞれのうちの少なくとも4つ、そして好ましくは6つのMHC抗原について行われる。

【0128】

血清学的MHC試験においては、各HLA抗原タイプに対する抗体が1つの対象（例えばドナー）からの細胞と反応させられて、該抗体と反応するMHC抗原の存在又は不存在が判定される。これは、他の対象（例えば、レシピエント）の反応性プロフィールと比較される。抗体のMHC抗原との反応は、典型的には抗体を細胞とインキュベートし、そして細胞溶解を誘発するために補体を添加することによって測定される（すなわち、リンパ球毒性試験）。反応は、検査されそして反応中に溶解した細胞の量にしたがって等級付けされる（Mickelson, E. and Petersdorf, E.W., Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E. D. et al. eds., pg 28-37, Blackwell Scientific, Malden, MA (1999)）。他の細胞に基づくアッセイは、標識抗体を使用するフローサイトメトリー又は酵素免疫測定法（ELISA）を含む。

10

【0129】

MHCタイプを決定するための分子的方法は、一般に、HLAタンパク質をコードする特定の遺伝子配列を検出するために、合成プローブ及び/又はプライマーを使用する。合成オリゴヌクレオチドが、特定のHLAタイプと関連する制限酵素断片長の多様性を検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用されることができる（Vaughn, R.W., Methods in Molecular Biology: MHC Protocols 210:45-60 (2002)）。或いは、（ポリメラーゼ連鎖反応又は連結連鎖反応などにより）HLA配列を増幅するためにプライマーが使用されることができ、その産物は直接的なDNA配列決定、制限酵素断片多型分析（RFLP）、または一連の配列特異的オリゴヌクレオチドプライマー（SSOP）を用いるハイブリダーゼーションによってさらに調べられることができる（Petersdorf, E.W. et al., Blood 92(10):3515-20 (1998); Morishima, Y. et al., Blood 99(11):4200-6 (2002); and Middleton, D. and Williams, F., Methods in Molecular Biology: MHC Protocols 210:67-112 (2002)）。

20

【0130】

「一致した同種の」又は「不一致の同種の」という記載がヒトMHCについて与えられる一方、類似の分析がさまざまな動物種について行われることができると考えられる。これらは、例示的かつ非制限的に、マウス、ラット（Gill, T. J. et al., Transplant Proc. 27(2):1495-500 (1995)）、ウシ（Lewin, H.A. et al., Immunol Rev. 167:145-58(1999)）、イヌ（Wagner, J.L. et al., J. Hered. 90(1):35-8 (1999)）、ネコ（O'Brien, S. J. and Yuhki, N., Immunol Rev. 167:133-44 (1999)）、ブタ（Chardon, P. et al., Genet Sel Evol. 32(2):109-28 (2000)）、ウマ（Kydd, J. et al., Vet Immunol Immunopathol. 42(1):3-60(1994)）及び霊長類（Heise, E.R. et al., Genetica 73(1-2):53-68(1987)）を含む。

30

【0131】

骨髓球前駆細胞の同種混合物は、MHC中にさまざまな程度の一貫性を有することができる。したがって、1つの実施態様においては、一時的な生着及び分化を行う前駆細胞は、より即時の治療的利益を提供することを目的とする細胞よりもレシピエントとのより高度のMHCの一貫性を有するドナーから単離されることができる。例えば、CMPはレシピエントのMHCとの完全又は部分的な一貫性を有するドナー由来であってよいが、GMP及びMEPは不一致のドナー由来でよい。他の組み合わせは当業者に明らかとなるであろう。

40

【0132】

細胞の同種混合物は、さまざまな方法で作製されることができる。1つの実施態様においては、細胞は異なるドナーから得られて、培養中での増殖の前に混合される。他の実施態様においては、異なるドナーからの骨髓球前駆細胞が別々に増殖させられ、そして増殖

50

後に混合されて同種の前駆細胞混合物を生じる。他の側面においては、異なるドナーから骨髓球前駆細胞を得てレシピエントへの輸注の前に混合されることによって、同種細胞の混合物が未増殖の細胞から調製される。増殖された細胞又は未増殖の細胞が使用されるかに係らず、本明細書中の実施態様においては、潜在的に致死的な好中球減少及び/又は血小板減少状態由来の造血不全を有する哺乳動物対象を保護することにおいて、同種骨髓球前駆細胞が有効であることが示される。

【0133】

凍結保存された骨髓球前駆細胞

驚くべきことに、本明細書中で最初に示されるとおり、本明細書に記載の増殖された細胞集団は、凍結保存され、そして将来の使用のために貯蔵されることができ、その機能性をなお保持することができる。上記のように、細胞の凍結のためのさまざまな媒体及びプロトコールが本分野で知られている。一般に、細胞は濃縮され、凍結保護剤及び/又は安定化剤を補充した媒体中に懸濁され、凍結され、そして0以下の温度で貯蔵される。いくつかの実施態様においては、細胞は、-80などの-70以下の温度で貯蔵されるか、又は液体窒素中または液体窒素の蒸気相中で貯蔵される。細胞は本分野で知られた任意の凍結保存剤中に貯蔵されることができ、例えば、凍結保存剤はジメチルスルホキシド(DMSO)又はグリセロールであることができる。いくつかの実施態様においては、凍結媒体は約5~10%のDMSO、10~90%の血清アルブミン、及び50~90%の培地を含む。いくつかの実施態様においては、凍結保存媒体は、約7.5%のDMSO、約42.5%の血清アルブミン、及び約50%の培地を含むであろう。細胞は本分野で知られた任意の安定化剤中に貯蔵されることができ、例えば、安定化剤はメチルセルロース又は血清であることができる。

【0134】

凍結の前に、細胞はいくつかの別々の容器に分けられて細胞バンクを作ることができる。細胞は、例えば、ガラス又はプラスチックバイアル又はチューブ又はバッグに貯蔵されることができ、細胞が将来の使用のために必要である場合、(1つ以上の容器からの)凍結保存された細胞の一部が細胞バンクから選ばれ、融解され、そして使用されることができる。

【0135】

治療

本明細書に記載の方法によって調製された細胞は、病気又は骨髓破壊的治療によって引き起こされた造血障害に関連するさまざまな障害の治療に使用される。本明細書中で使用される「治療」は、治療的又は予防的処置、或いは病気、障害又は望ましくない状態のための抑制的手段を意味する。治療は、病気の重篤度を低下させ、病気の進行を止め、又は病気を除去するために、病気の発症前及び/又は臨床的症状又は病気若しくは状態の他の症状の顕在化の後に、適切な形態で対象細胞を投与することを包含する。病気の予防は、好ましくは障害に対する易罹病性の増加した対象において、障害または病気の発症を延期させるか又は遅らせることを含む。

【0136】

本明細書に記載の細胞による治療に適した状態は、循環好中球の量の減少を特徴とする好中球減少症、および末梢血中の血小板レベルが正常レベル未満であることを特徴とする血小板減少症を含む。どちらの状態も、後天的又は先天的な障害の結果でありうる。

【0137】

低い好中球数を生じることが知られている、造血幹細胞成長の欠陥は、中でも、細網異形成症、Fanconis's貧血、Chediak-Higashi症候群及び周期性好中球減少症を含む。血小板減少症については、低い血小板レベルは、中でもWiskott-Aldrich症候群、thrombocytopenia with absent radii (TAR)、及び全身性ループスエリテマトーデスにおいて顕在化する。後天的な好中球減少症及び血小板減少症は、血液の悪性腫瘍、ビタミン欠乏、電離放射線への曝露、(単核球症、CMV、HIVなどの)ウイルス感染、及びさまざまな細胞毒性薬による治療の後などの類似の環境下で発症する。

10

20

30

40

50

【0138】

本目的のためには、好中球減少症および血小板減少症並びにそれらに関連する合併症、特に骨髄破壊性の剤により治療されたか又はHSCTを受けた患者における日和見病原体による感染の発症を低下させるために予防的に細胞が使用されることができる。移植設定においては、骨髄球細胞は、レシピエント自身のHSC又は移植されたHSCが造血を回復しはじめ、好中球及び血小板レベルが十分に上昇するまで、幹細胞移植と同時又はそれに続いて使用されることができる。骨髄球前駆細胞の輸注は、治療される対象における好中球及び巨核球の数を増加させ、それによって一時的であるが、必要とされる防御を好中球減少期又は血小板減少期の間、提供する。より分化した好中球及び血小板とは反対に、骨髄球前駆細胞集団の使用は、一時的な骨髄球前駆細胞の生着及びインピボでのそれらの分化によって、より長期に続く保護を提供する。

10

【0139】

さらに、CMP、GMP、及びMEPの混合物を含む細胞は、いずれか1つの細胞集団の輸注により得られる防御よりも広い治療効果を生じる能力を有する。これは、細胞集団中のより分化した前駆体からの好中球及び/又は血小板レベルに対する迅速な効果から生じるが、必要とされる好中球及び巨核球を、より分化した細胞が使い果たされた後に供給するために、より原始的な骨髄球前駆細胞が生着しそして経時的に成長するからである。前駆細胞混合物を含む細胞集団の輸注は、既に好中球減少症又は血小板減少症にかかった対象に適しているが、単離された細胞集団の輸注は、好中球又は血小板レベルがまだ臨界レベル未満に低下していない患者における予防に適している。治療が検出可能な増加を末梢細胞の計測数又はANCに提供することができる一方、この増加は成功した一過性の生着又は有効性の信頼できる指標ではないことは注意すべきである。したがって、減少した感染率及び/又は増加した生存率などの他の尺度も、治療の有効性を判定するために使用されてよい。

20

【0140】

治療効果を達成するために必要な細胞の量は、特別な目的のための慣用手順にしたがって経験的に決定される。一般に、細胞を治療目的で投与するためには、細胞は薬理学的有効用量で与えられる。「薬理学的有効量」又は「薬理学的有効用量」は、所望の結果を達成することのできる所望の生理学的効果又は量を生じさせるのに、特に障害又は病気の状態の1つ以上の症状又は徴候を減少させるか又は取り除くことを含む、障害又は病気の状態を治療するために十分な量をさす。例示として、好中球減少症にかかった患者に細胞を投与することは、根底にある状態が根絶されるか又は軽減される場合のみならず、患者が病気に関連する症状の重さ又は持続時間の減少を報告した場合にも治療的利益を提供する。治療的利益は、改善が自覚されるか否かにかかわらず、根底にある病気又は障害の進行を停止させるか又は遅くすることも含む。上記で定義された薬理学的有効用量も、以下にさらに記載する、細胞と組み合わせて使用される治療用化合物にもあてはまる。

30

【0141】

輸注のための細胞は、さらなる精製をしない増殖された細胞集団、又は本明細書において記載した、定義された細胞マーカー表現型及び特徴的な分化能を有する単離された細胞集団を含む。細胞は自己のものであるか又はレシピエントに対して同種であることができるが、増殖された細胞は、単一の対象に由来することができる。したがって、1つの実施態様においては、治療用の細胞は単離された骨髄球前駆細胞を含むことができる。他の実施態様においては、細胞は、単離されたCMP、単離されたMEPまたはそれらの組み合わせを含む。他の実施態様においては、本明細書に記載されたとおり非骨髄系細胞を含む輸注に使用する細胞は、同種の骨髄球細胞の混合物を提供するために異なるドナーから得られることが好ましい。

40

【0142】

培養中での増殖なしにドナー対象から直接単離された細胞は、増殖された細胞と同じ治療目的のために使用されることができると理解される。好ましくは、単離された細胞は実質的に純粋な細胞集団である。これらの未増殖の細胞は、自己のものであることができ、

50

ここで、輸注される細胞は細胞破壊性の剤による治療の前などにレシピエントから得られる。他の実施態様においては、未増殖の細胞はレシピエントに対して同種であり、ここで、細胞はレシピエントのMHCに対して完全に一致又は部分的若しくは完全な不一致を有する。上記のとおり、単離された未増殖の細胞は、同種の骨髓球細胞混合物を提供するために異なるドナーから得ることが好ましい。

【0143】

適切な宿主への細胞の移植は、本分野で一般的に使用される方法によって達成される。好ましい投与方法は静脈内輸注である。輸血される細胞の数は、性別、年齢、体重、病気又は障害のタイプ、障害のステージ、(細胞集団の純度などの)細胞集団中の所望の細胞のパーセンテージ、治療的利益を生じるために必要とされる細胞数などの因子を考慮する。一般に、輸注される増殖された細胞の数は、約 1×10^4 ~ 約 1×10^5 細胞/kg、約 1×10^5 ~ 約 10×10^6 細胞/kg、好ましくは約 1×10^6 細胞 ~ 約 5×10^6 細胞/kg体重、又は必要に応じてそれ以上であることができる。いくつかの実施態様においては、細胞は医薬として許容可能な担体中で約 1×10^9 ~ 約 5×10^9 細胞である。細胞は1回の輸注で投与されるか、又は治療的效果を生じるのに十分な定義された期間にわたる連続的な輸注によって投与される。治療が連続的な輸注を含む場合、異なる細胞集団が輸注されることができる。以下にさらに記載される、医薬として許容可能な担体は、患者への細胞の投与に使用されることができる。これらは、典型的には例えば、(リン酸緩衝食塩水などの)緩衝食塩水又は補充されない基底細胞培養培地又は本分野で知られた培地を含む。

【0144】

補助的治療

上記増殖された又は未増殖の細胞とともにさまざまな補助的治療が使用されることができる。好中球減少症及び関連する状態を治療するためには、増殖された細胞が、輸注された細胞の治療的效果を促進するか又は好中球減少症から生じる合併症を治療するための他の剤及び化合物と併用して用いられる。1つの側面においては、補助療法は、中でも、抗真菌剤、抗細菌剤、及び抗ウイルス剤を含む。これらの細胞の使用はまた、感染の発生を減少させるための予防として又は血小板の破壊に導くいかなる進行中の感染にも取り組むために血小板減少症にも好適である。

【0145】

1つの側面においては、補助的に投与された剤は、抗真菌剤である。真菌感染は、骨髓破壊的治療又はHSCTを受けた患者の主要な問題であり、好中球減少症にかかった患者における死亡率の主要原因である。生着の遅れを有するレシピエント及びGVHDを発生する患者は、典型的に長期の好中球減少症を有し、したがって真菌感染のリスクが高い。真菌感染のタイプは多様であり、中でも、(カンジダ・クルセイ、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・アルピカンス、カンジダ・トロピカリスなどによる)カンジダ症、(アスペルギルス・フミガーツス、アスペルギルス・フラバスなどによる)アスペルギルス症、(リゾビウム・アルヒツス、アブシディア・コリンピフェラ、リゾムコール・パシラスなどによる)ムコール菌症、クリプトコッカス症、ヒストプラズマ・カプスラ-ツム、及びコクシジオイデス・イミチスを含む。

【0146】

補助投与のための抗真菌剤は一般に、全身性の抗真菌剤である。このタイプの1つの有用な抗真菌剤は、ポリエナムクロライド系抗生物質ファミリーからのアンフォテリシンBである。アンフォテリシンBは、デオキシコール酸との錯体として；硫酸コレステアリルを含むコロイド状懸濁液中；そして大豆レシチン、コレステロール及びジステアロイルホルファチジルグリセロールから作られたリポソーム中にカプセル化されるなどのさまざまな製剤中で利用可能である。他の製剤は本分野で知られている。

【0147】

他の抗真菌剤はフルシトシン、フッ化ピリミジンである。フルシトシンの真菌によるアミノ化は、5-フルオロウラシル、抗代謝剤かつDNA合成阻害剤である。フルシトシンは典型的には、クリプトコッカス感染及びカンジダ症に使用される。単独で使用されても、

10

20

30

40

50

フリシトシンは一般にアンフォテリシンBと併用して使用される。

【0148】

イミダゾール及びトリアゾールは広いクラスのアゾールベースの抗真菌剤を代表する。イミダゾール及びトリアゾールがステロール14-デメチラーゼを阻害し、エルゴステロールの生合成の障害及び電子輸送などの細胞膜に基づく活性の破壊を引き起こす。アゾールベースの抗真菌剤はカンジダ・アルビカンス、カンジダ・グラブラータ、及びカンジダ・ネオフォルマンなどの一定のタイプのカンジダ症に対して有効である。全身的な投与に適した、例示的なアゾール抗真菌剤は、中でも、ケトコンザオール、イトラカナゾール、フルコナゾール、エコナゾール、ポリコナゾール及びテルカナゾールを含む。

【0149】

真菌感染に加えて、好中球減少症患者は、さまざまな細菌病原体による感染に罹り易い。骨髄破壊的治療計画及びHSCTを行っている患者は、(ストレプトコッカス及びスタフィロコッカス・アウレウスなどの)グラム陽性及び(E.コリ、及びシュードモナス・アエルギノーサなどの)グラム陰性細菌の両方に感染する率が高い。敗血症は頻繁に発生する。さらに、遅れた生着及びストレプトコッカス・ニューモニエ又はヘモフィラス・インフルエンザなどの被包性細菌に対する免疫反応の回復の障害は、GVHDによる移植レシピエントの死亡率を増加させる。

【0150】

補助的抗細菌療法は、特定の細菌病原体に好適な任意の知られた抗体を使用することができる。これらは、広いスペクトルの抗体及びさらに標的化された抗細菌化合物の両方を含む。増殖された骨髄球細胞に好適な抗細菌剤のさまざまなクラスは、例示的かつ非制限的に、キノロン及びフルオロキノロン、ラクタム抗生物質、アミノグリコシド、テトラサイクリン、マクロライド、及びそれらのさまざまな同族体を含む。例示的なキノロン化合物は、シプロフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシン、ロメフロキサシン、及びモキシフロキサシンを含む。例示的なラクタム抗生物質は、(ペニシリンG、ペニシリンVなどの)ペニシリン、アンピシリン、カルペニシリン、メチシリン、カルバペネム、及び(セファロチン、セファマンドール、セファクロール、セフォニシド、セフォタン、セファトキシム、セフトチジム、セフトゾキシム、セフェピムなどの)セファロsporinを含む。例示的なアミノグリコシドは、ネオマイシン、ストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシンおよび及びネチルマイシンを含む。例示的なマクロライドは、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、及びアジスロマイシンを含む。他の抗生物質は当業者に明らかとなるであろう。

【0151】

ウイルス感染も骨髄破壊された患者及びHSCTにおいて問題である。一般に、ウイルス感染の増加したリスクは骨髄破壊的治療によりもたらされた細胞性免疫不全から生じる。これらの感染の多くが、血清陽性患者又は血清陽性ドナーの細胞中に存在する潜在的なウイルスの再活性化により起こる。一般に遭遇するウイルスは、中でも、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、バリセラゾスターウイルス、ヘルペスウイルス-6、エプスタインバーウイルス、アデノウイルスなどを含む。細胞輸注に付属して選択される抗ウイルス化合物は、患者が遭遇するウイルスに適したものである。有用な抗ウイルス化合物は、例示的かつ非制限的に、アシクロビル、シドフォビル、ガンシクロビル、イドクスウリジン、ペンシクロビル、パルガンシクロビル、バラシクロビル、ピダラピン、アマンタジン、リマンタジン、ザナミビル、フォミビルセン、イミキモド、及びリバビリンである。レトロウイルスに対する治療薬は、中でも、ヌクレオシドリバーシトランスクリプターゼ阻害剤(ジドブジン、ジダノシン、スタブジン、ザルシタピン、ラミピヅジンなど)、非ヌクレオシドリバーシトランスクリプターゼ阻害剤(ネビラピン、エファビレンツ、デルビルジンなど)及びプテロアーゼ阻害剤(サキニビル、インジナビル、リトナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、及びロピナビルなど)を含む。

【0152】

抗真菌剤、抗菌剤、及び抗ウイルス剤は、感染の発生を低下させるための予防として、

10

20

30

40

50

或いは病気の出現により使用されることができる。予防は、特に、免疫抑制患者に共通の真菌感染に対して処方され、血清陽性患者又は血清陽性の移植ドナーにおけるウイルス感染のために処方される。したがって、治療目的の実施態様は、増殖された又は単離された骨髓球前駆細胞及び抗真菌剤、抗菌剤又は抗ウイルス化合物の組み合わせを含む。

【0153】

血小板減少症及び関連する状態のためのさらなる補助的治療は、安全レベルまで血小板カウントを回復させるための一時的な手段として血小板を輸血することを含む。輸血は輸血された細胞により血小板産生が回復するまで続ける。

【0154】

更なる実施態様においては、補助的に投与される剤は、最終的に分化した骨髓球細胞、特に顆粒球、マクロファージ、巨核球及び赤血球の分化及び動員を促進する、サイトカイン又は成長因子である。顆粒球の成長を促進するために、サイトカイン、C-CSF、及びGM-CSFが使用されることができる。G-CSFはHSCTにおいて好中球の生着と産生を促進するのに有効である。他の実施態様においては、サイトカイン又は成長因子はトロンボポエチンである。TPOの投与は、移植された前駆細胞の生着を促進し、そして巨核球及び血小板の成長を促進する(Fox, N. et al., J. Clin. Invest. 110:389-394 (2002); Akahori, H. et al., Stem Cells 14(6):678-689 (1996))。

【0155】

当業者に明らかであるとおり、さまざまなビヒクル及び賦形剤及び投与経路が補助療法のために使用されることができる。代表的な製剤技術は、中でも、参考文献として本明細書中に援用されている、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed., Mack Publishing Co, Easton, PA(1995) 及びHandbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed, Kibbe, AH. Ed Washington DC, American Pharmaceutical Association (2000) に教示されている。

【0156】

医薬組成物は一般に、医薬として許容可能な担体及び薬理学的有効量の化合物又はその混合物、又は好適なその塩を含むであろう。医薬組成物は、散剤、粒剤、溶液、懸濁液、エアロゾル、固体、ピル、錠剤、カプセル、ジェル、局所クリーム、坐剤、経皮パッチ、及び本分野で知られた他の製剤として製剤されることができる。

【0157】

本明細書中で使用される「医薬として許容可能な担体」は、当業者に知られた医薬組成物の製剤化における任意の標準的な医薬として許容可能な担体を含む。したがって、医薬として許容可能な塩、又は結合体などとして存在する化合物自体は、医薬として許容可能な希釈剤；例えばリン酸緩衝食塩水(PBS)、水性エタノール、又はグルコース、マンニトール、デキストラン、プロピレングリコール、オイル(植物油、動物性油脂、合成油脂など)、微結晶セルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、リン酸カルシウム、ゼラチン、ポリソルベート80などの溶液中の製剤として又は適切な賦形剤中の固体製剤として製剤されることができる。

【0158】

医薬組成物はしばしば、さらに1つ以上の(中性緩衝食塩水又はリン酸緩衝食塩水などの)緩衝剤、(グルコース、マンノース、シュクロース、又はデキストランなどの)炭化水素、マンニトール、タンパク質、ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸、(アスコルビン酸、メタ亜硫酸ナトリウム、ブチル化ヒドロキシトルエン、ブチル化ヒドロキシアニソールなどの)抗酸化剤、静菌剤、EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤、製剤を等張、低張又はレシipientの血液に対してやや高張にする溶質、フレーバー剤、甘味料、及び適宜着色化合物を含む。

【0159】

当業者に知られた任意の好適な担体が組成物中で使用されることができる一方、担体のタイプは投与様式に依存して典型的に異なる。治療用組成物は、例えば経口、鼻腔内、粘

10

20

30

40

50

膜内、直腸内、腔内、局所、静脈内、腹腔内、皮内、皮下及び筋肉内投与を含む任意の好適な投与様式のために製剤されてよい。

【0160】

腸管外投与のためには、組成物は注射用剤型の生理学的に許容可能な希釈剤中の物質の溶液又は懸濁液であって、滅菌パイロジェンフリーの水、オイル、食塩水、グリセロール、ポリエチレングリコール又はエタノールなどの滅菌された液体であることのできる医薬担体を含むものであることができる。さらに、湿潤剤又は乳化剤、界面活性剤、pH緩衝物質などの助剤が組成物中に存在することができる。医薬組成物の他の成分は、石油、動物、植物、又は合成の起源のもの、例えば、ピーナツ油、大豆油、コーン油、綿実油、オレイン酸エチル、及びミリスチン酸イソプロピルなどである。

10

【0161】

本明細書に記載の医薬組成物は、密封されたアンプル又はバイアルなどの単位用量又は複数用量の容器中で提示されることができる。かかる容器は典型的には製剤を滅菌的及び安定に使用まで保存するような方法で密封される。一般に、製剤は上記の油性又は水性のビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンとして貯蔵されることができる。或いは、医薬組成物は、滅菌された液体担体を使用直前に添加することを必要とする、凍結乾燥した状態で貯蔵されることもできる。好ましい実施態様においては、医薬組成物は対象である好適な凍結保存媒体中に凍結保存された増殖された骨髓球前駆細胞を含み、これは融解され、そして患者への投与のために必要に応じて再懸濁される。

【0162】

宿主に投与される量は、投与されるもの、予防又は治療などの投与の目的、宿主の状態、投与様式、投与回数、投与の間隔などに依存して変化する。これらは、当業者により経験的に決定されることができ、治療への応答の程度に応じて調節されることができる。適切な用量を決定するのに考慮される因子は、対象のサイズ及び体重、対象の年齢及び性別、症状の重篤度、病気の状態、剤の送達方法、剤の半減期及び剤の有効性を含むがこれらに限定されない。考慮する病気の状態は、病気が急性又は慢性であるか、再発相又は寛解相か、そして病気の進行性を含む。

20

【0163】

治療的有效量のための用量及び投与回数を決定するのは、本分野における当業者の能力の範囲内にある。例えば、最初の有効量は、細胞培養又は他のインビトロのアッセイにより推定可能である。そして、用量は細胞培養アッセイにおいて決定された IC_{50} を含む循環中の濃度又は組織濃度を生じるために動物モデルにおいて配合される。

30

【0164】

さらに、毒性及び治療的有效性は一般に細胞培養アッセイによって及び/又は実験動物を用いて、典型的には LD_{50} （被験集団の50%に対する致死用量）及び ED_{50} （被験集団の50%における治療的有效性）を決定することによって、決定される。指針は、標準的な参考研究、例えば、Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed. (Hardman, JG. Et al, eds) McGraw-Hill, New York, NY (2001)中に見出される。

【0165】

本発明の目的のためには、投与方法が治療される状態、対象の抗体の形態、及び医薬組成物に依存して選ばれる。治療用化合物の投与は、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、およびおそらく特定の器官、例えば、脾臓又は骨髓への直接注入を含むがこれらに限定されない、さまざまな方法で行われることができるが、全身投与が好ましい。医薬組成物の投与は、単一の経路又はいくつかの経路により同時でもよい。

40

【0166】

組成物は、中でも治療される適応症及び処方医の判断に依存して、一日1回、一日2、3回又は数回、或いは一日さらに複数回投与されてよい。

【0167】

キット

50

本明細書に記載の組成物の他の実施態様は、増殖された及び/又は単離された骨髄球前駆細胞、サイトカイン及び(G-CSF、GM-CSF、TPOなどの)成長因子及び/又は補助的治療用化合物を含むキットである。ラベルが典型的にはキットに付随し、キット内容物の使用についての指示又は他の情報を提供する、(ディスク、光ディスク、メモリーチップ、又はテープなどの)電子的又はコンピュータにより読み取り可能な形態である任意の文章又は記録物を含む。

【実施例】

【0168】

実施例1：実験方法

マウスからのHSC細胞の調製

マウス骨髄細胞を得るために、動物を安楽死させて大腿/頸骨切除し、筋肉を取り除いた。乳棒及び乳鉢を用いて骨を粉々に破砕し、骨髄をナイロンスクリーンを通してろ過し、1200rpmで5分遠心分離した。細胞を1mlのACK溶液(0.3M NH₄Cl、0.2M KHCO₃、MiliQろ過した水)中に3~4分間、氷上で再懸濁し、チューブに染色媒(2%FCS及び2mM EDTA、w/oカルシウム、w/oマグネシウム、w/oフェノールレッドを含むHANKs緩衝食塩水)を満たすことによって洗浄した。細胞を遠心分離し、ろ過し、そして染色媒に再懸濁し、そしてマウスIgG(1mg/ml原液、Sigma, St Louis MO)を加えた。細胞を氷上で10~15分間インキュベートし、そして10µl/マウスのCD117マイクロビーズ(Miltenyi Biotech Auburn CA)と混合し、最終体積100µl/マウスの染色媒とした。細胞を氷上で25分間インキュベートした。細胞を洗浄し、最終体積約1ml/マウスで染色媒に再懸濁し、ナイロンスクリーンを通してろ過した。製造者の指示に従い、AutoMACs(Miltenyi Auburn, CA)を用いて細胞を濃縮する。

10

20

【0169】

濃縮後、細胞を約 1×10^8 細胞/mlで染色媒中に再懸濁し、以下のコンジュゲート抗体(eBioscience, San Diego, CA)をおよその濃度で加える:Sca-1 アロフィコシアニン(APC)、c-kitR-フィコエリトリン-シアニン7タンデム(PE-Cy7)、Thy-1.1フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、lineage(CD3、CD4、CD5、CD8、B220、mac-1、Gr-1、及びTer119)R-フィコエリトリン(PE)。

【0170】

細胞を氷上で25分間インキュベートし、洗浄し、遠心分離し、そして染色媒に再懸濁した。プロピジウムヨウダイド(PI)を添加して死細胞を除去した。マウスKTLS-HSC、c-kit^{high}Thy^{low}Sca-1^{pos}lineage^{neg}をFACSにより単離した。

30

【0171】

細胞培養及び増殖

Lin^{neg}/Thy^{low}KTLS-HSCをBAマウス(H2kb)からソーティングし、サイトカイン及び成長因子の組み合わせ、c-KitL、FL、TPO及びIL-6(X-Vivo15基本培地(Cambrex Bioscience, MD); penstrep(100x)、glutamax(100x)、2-メルカプトエタノール(5×10^{-5} M)、c-KitL(50ng/ml)、FL(30ng/ml)、TPO(5ng/ml)、及びIL-6(10ng/ml)(Biosource, Camarillo, CA and R & D Systems, Minneapolis, MN)を含む500µl/ウエルの血清フリー培地に蒔いた。細胞は、約10,000細胞/ウエルで24ウエル/プレートに蒔いた。細胞を7日間培養し、MPc(培養由来のMP)を得た。細胞に500µl/ウエルの培地を第2日、半分を第4日に与えて新鮮な培地に交換した。第5日に細胞を6ウエルプレートに移し、1mlの新鮮な培地を加えた。第7日に培養細胞を集め、そして2つの小さなアリコート进行分析のために取り出した。アリコートを30,000個のビーズと混合し、そしてMP(CMP/GMP/MEP)及びHSC含量について分析するために染色した。さらに、細胞をトリパンブルーで染色し、血球計上で計数した。分析データは、増殖倍率と総細胞数をHSCとMP(CMP/GMP/MEP)について計算するための情報を提供した。

40

【0172】

骨髄球細胞タイプについてのインビトロ培養の分析

6.7µMのビーズ懸濁液(Sepherotech, Libertyville, IL)を、4~5滴のビーズを

50

1 mlの染色媒 (SM) に加えることによって調製した。ビーズを血球計及びトリパンプル (1 : 10 希釈) を用いて計数した。ビーズは 2×10^6 ビーズ/ml 超の原液濃度であり、懸濁液を複数の日に使用する場合には毎日使用前に計数する。ピペットを用いて、20 k ビーズを各細胞ウエルに加えて分析した。ビーズ懸濁液を各サンプルにビーズを加えるまえにボルテックスにかけた。ウエルが複数のサンプルに分けられる場合、すなわち、3 サンプル、適切な数のビーズを、各サンプルが分析のために約 20 k ビーズのエンドポイントを有するようにさらに加えた (すなわち、通常のサンプルについて $3 \times 20 \text{ k}$ ビーズ = 60 k)。

【 0 1 7 3 】

IL7R染色による増殖された細胞集団中のマウスHSCの染色

細胞を各ウエルから取り出し、洗浄し、そして対応するコニカルFACSチューブに移した。細胞を5分間 1100 rpmで遠心分離し、そして上清を除いた。50 μ lのブロッキング抗体 (ラットIgG及びマウスIgG 1 : 50) を添加し、10分間インキュベートし、その後、50 ~ 100 μ lのCD117-ビオチン (2倍濃度) を各チューブに加えた。氷上、暗所での20分間のインキュベーション後、細胞を2 ~ 3mlのSMで洗浄し、遠心分離し、そして50 ~ 100 μ lの以下に示す、適切な濃度の抗体 (eBioscience, San Diego, CA) : ストレプトアビジンカスケードブルー (Molecular Probes, Eugene, OR)、Sca-1アロフィコシアニン (APC)、Thy-1.1フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、IL-7R R-フィコエリトリン (PE) 及びB220、Mac-1、GR-1 R-フィコエリトリン - シアニン7タンデム (PE-Cy7) を用いた抗体溶液中に懸濁した。氷上での25分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、遠心分離し、そしてPIを含む染色媒中に再懸濁した。細胞をHSCについてFACSにより分析した。

【 0 1 7 4 】

IL7R染色をしない増殖された細胞集団中のmHSCについての染色

細胞を各ウエルから取り出し、洗浄し、そして対応するコニカルFACSチューブに移した。細胞は5分間、1100 rpmで遠心分離し、そして上清を除去した。50 μ lのブロッキング抗体 (ラットIgG及びマウスIgG 1 : 50) を加え、そして、適切な濃度の以下の抗体 (eBioscience, San Diego, CA) : Sca-1アロフィコシアニン (APC)、Thy-1.1フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、c-kit 1フィコエリトリン - シアニン7タンデム (PE-Cy7)、B220、Mac-1、GR-1 R-フィコエリトリンを用いた50 ~ 100 μ lの抗体溶液中に懸濁した。25分間の氷上のインキュベーション後、細胞を洗浄し、遠心分離しそしてPIを含む染色媒中に再懸濁した。細胞をHSC及びFACSについて分析した。

【 0 1 7 5 】

細胞集団を増殖させた培養中の骨髓球前駆細胞の染色

HSC細胞の染色について上記したと同様に細胞を調製する。50 μ lのブロッキング抗体 (ラットIgG及びマウスIgG 1 : 50) とのインキュベーション後、50 ~ 100 μ lのCD117-ビオチン (2倍濃度) を各チューブに加え、その後氷上、暗所で20分間置いた。細胞を2 ~ 3mlのSMで洗浄し、遠心分離し、そして50 ~ 100 μ lの適切な濃度の以下の抗体 : ストレプトアビジンカスケードブルー (Molecular Probes, Eugene OR)、Sca-1アロフィコシアニン (APC)、CD34フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、2, 4G2 (Fc R) R-フィコエリトリン、及びB220、Mac-1、GR-1フィコエリトリン - シアニン7タンデム (PE-Cy7) (eBioscience, San Diego, CA) の抗体溶液中に再懸濁した。細胞をHSC分析について行ったと同様にFACS分析のために調製した。

【 0 1 7 6 】

成熟した前駆細胞サブセットについての増殖された細胞培養の染色

細胞を上記のように処理する。ブロッキング抗体とのインキュベーション後、50 ~ 100 μ lのCD3-ビオチン、CD4-ビオチン、及びCD-8ビオチン (2倍濃度) を各チューブに加えた。氷上、暗所で20分間インキュベートした。細胞を2 ~ 3mlの染色媒で洗浄し、そして50 ~ 100 μ lの抗体溶液 : ストレプトアビジンカスケードブルー (Molecular Probes, Eugene OR)、B220 (FITC)、Ter119 R-フィコエリトリン (PE) 及びMac-1、GR-

10

20

30

40

50

1 R-フィコエリトリン - シアニン7 タンデム (PE-Cy7) (eBioscience, San Diego, CA) 中に再懸濁した。氷上での25分間のインキュベーション後、細胞をFACS分析のために先に記載のとおり処理した。

【0177】

マウス骨髄球前駆細胞の単離 - lineage (系列) の枯渇

大腿及び頸骨を上記のとおり処理し、細胞を1mlの染色媒に再懸濁した。ブロッキング用のラット及びマウスIgG (1:50) を加え、混合物を氷上で10~15分間インキュベートした。細胞を計数し、そして、以下の所定の希釈度のビオチン化抗体: D3、CD4、CD5、CD8、CD127、Ter119、Thy-1.1及びGR-1を含む染色媒中、 10^8 細胞/mlとした。細胞を氷上で25分間インキュベーションし、洗浄し、遠心分離し、そして $40\mu\text{l}$ /マウスでストレプトアビジンビーズ (Miltenyi, Auburn, CA) 中に懸濁した。染色媒を最終体積 $100\mu\text{l}$ /マウスで加え、氷上で20分間インキュベーションし、細胞を2回洗浄し、 10^8 細胞/mlで染色媒に再懸濁した。これに続いて、ナイロンメッシュを通してろ過した。Lineage陽性細胞を、AutoMacs (Miltenyi, Auburn, CA) を製造者の指示に従い、高感度の枯渇モードで使用して枯渇させた。計数後、細胞を 1×10^8 細胞/mlで、以下の抗体: ストレプトアビジンフィコエリトリン - シアニン5 タンデム (PE-Cy5)、Sca-1アロフィコシアニン (APC)、CD34フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、2.4G2 R-フィコエリトリン (PE) 及びc-kitR-フィコエリトリン - シアニン7 タンデム (PE-Cy7) (Pharmingen and eBioscience San Diego CA) を適切な濃度で含む染色媒に再懸濁した。細胞を抗体とともに氷上で25分間インキュベートし、洗浄し、遠心分離し、そしてPIを含む染色媒に再懸濁した。その後、FACSソーティングを行う: CMPをlineage^{neg}/loc-kit^{pos}Sca-1^{neg}CD34^{pos}2.4G2^{low}に基づいてソーティングし、GMPをlineage^{neg}loc-kit^{pos}Sca-1^{neg}CD34^{pos}2.4G2^{pos}に基づいてソーティングし、そしてMEPをlineage^{neg}/loc-kit^{pos}Sca-1^{neg}CD34^{low}2.4G2^{low}に基づいてソーティングした。

【0178】

アスペルギルス・フミガーツス分生子の成長及び播種並びに真菌負荷分析

凍結孢子ストックからの孢子をSabouraudsデキストロース寒天 (SDA) 培養プレートを中心に置き、プレートを密閉し、そして37°Cで2~3日、定期的に汚染がないかをチェックしながらインキュベーションした。2~3日後、黒い孢子の菌叢がプレート上に形成した。プレートを5mlの0.05% Tween80を含むPBSで穏やかにすすぎ、孢子が溶液中に分散するまでプレートをそっとこすった。分生子懸濁液を滅菌ガーゼを通してろ過し、菌糸を除去して孢子ストックを作製した。溶液は孢子により色が濃く、 10^8 /mlもの分生子を含むことができる。孢子ストックを4°Cで保存する。孢子を滴定するために、連続的な希釈をPBS/Tween80中で行い、SDAプレート上に蒔いた。一夜のインキュベーション後、プレートをコロニー数について調べた。孢子の長期の貯蔵のためには、1容の採取された孢子ストックを1容の50%グリセロールと混合して-80°Cで貯蔵する。

【0179】

孢子のマウスへの注入は、(Sabourauds デキストロース寒天プレート上で滴定して) $1,000$ 個の分生子/mlを含む分生子溶液を用いて行う。致死的な照射およびHSC及び/又はMPの再構成後の作業孢子溶液 ($100\mu\text{l}$) を、典型的には8日の予備実験において目的のマウスに尾静脈を用いて静脈内注射した。投与後、残りの孢子溶液の $100\mu\text{l}$ アリコートにSabouraud デキストロース寒天プレートに蒔き、37°Cでインキュベートした。必要量の活性分生子が注射中に存在したかを確認するために翌日コロニーを計数した。

【0180】

真菌負荷分析

イソフルランを吸入させて麻酔した後、アスペルギルス尾静脈を用いて静脈内注射した。マウスをと殺し、調査のために肺を採取した。真菌の増殖を検出するために、肺をSabouraudデキストロース寒天プレート上で培養した。

【0181】

10

20

30

40

50

ドナー細胞の存在についての再構成マウスのスクリーニング

mHSC及び/又はmMPを移植したマウスのドナー細胞集団についてのスクリーニングを、約10～15滴の血液をPBS中5mM EDTA 0.5ml中に室温で集めることによって行った。1mlのPBS中2%デキストラン-500を加え、混合し、そして37℃で30～45分間インキュベートした。ほとんどの赤血球が沈降した。得られた上清を新たなチューブに移し、細胞を遠心分離によって集め(5分、1000rpm)、そして赤血球を1.0mlの1×ACKで、氷上、5～6分間溶解させた。この後、洗浄し、1200rpmで5分間遠心分離した。ペレットがまだ赤い場合は、洗浄ステップを繰り返した。細胞を50µl/チューブ中のラットIgG及びマウスIgG(1:50それぞれ)で10～15分、氷上でブロッキングした。ビオチン化Mac-1及びGR-1(eBioscience, San Diego, CA)を適切な濃度で加え、そして氷上、暗所で20分間インキュベートした。細胞を洗浄し、そして1200rpmで5分間遠心分離した。以下の抗体: ストレプトアビジンカスケードブルー(Molecular Probes, Eugene, OR)、CD45.1アロフィコシアニン(APC)、CD45.2フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、B220R-フィコエリトリンシアニンタンデム(PE-Cy7)及びCD3、CD4、CD8R-フィコエリトリン(PE)(eBioscience, San Diego, CA)を適切な濃度で加えた。氷上での25分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、遠心分離し、そしてPIを含むSM中に再懸濁した。細胞をFACSにより分析した。

【0182】

H2マーカーを用いる、ドナー細胞についての再構成マウスのスクリーニング

およそ10～15滴の血液を0.5mlのPBS中5mM EDTA中に集めた。1mlのPBS中2%デキストラン-500(RT)を加え、そして混合物を37℃で30～45分間インキュベートした。ほとんどの赤血球が沈降した。上清を新たなチューブに移し、細胞を遠心分離(5分、1000rpm)によって集めた。赤血球を1.0mlの1×ACK(0.3M NH₄Cl、0.2M KHCO₃)で、氷上、5～6分間溶解させ、洗浄し、そして1200rpmで5分間、遠心分離した。ペレットがまだ非常に赤い場合は、ステップ4～5を繰り返した。細胞を50µl/チューブ中のラットIgG及びマウスIgG(1:50それぞれ)で10～15分、氷上でブロッキングした。細胞を以下の抗体: Mac-1及びGR-1フィコエリトリン-シアニン7タンデム(PE-Cy7)、B220アロフィコシアニン(APC)、CD3、CD4及びCD8ビオチン(eBioscience, San Diego, CA)で、20分間染色した。

【0183】

移植のために使用したマウスのペアリングに依存して、MHCマーカーを標識するのに追加の抗体: H2Kd-PE(Balb/c)及びH2Kb-FITC(C57/B6)又はH2Db-PE(C57/B6)及びH2Dk-FITC(AKR)を用いる。1200rpmで5分間の遠心分離によって細胞を調製し、そしてストレプトアビジンカスケードブルー(Molecular Probes, Eugene, OR)で染色した。20分の氷上でのインキュベーション後、細胞を洗浄し、1200rpmで5分間遠心分離し、そしてPIで染色した。細胞をFACSによって分析した。

【0184】

実施例2. 好中球減少症マウスにおける、エキスビボで増殖された凍結保存同種骨髄球前駆細胞による致死的真菌に対する防御

この試験は、HSCがエキスビボにおいて多数の機能的骨髄球前駆細胞に増殖されうるか; エクスビボで増殖された骨髄球前駆細胞が同種好中球減少症マウスを致死的な真菌から、BMからソーティングされた骨髄球前駆細胞により提供されるのと同様に防御しうるか; そして骨髄球前駆細胞が活性を損失せずに凍結保存されうるかを調べた。

【0185】

図1は、例示的な実験計画である。図1Aは、ソーティングされ、そして分析された細胞集団、HSC及び前駆細胞を識別することのできる異なるマーカーの組み合わせを示す。CD117⁺、CD90.1^{lo}、Lin^{neg/lo}、及びSca-1⁺は、HSCを同定するために使用されることができ、CD117⁺、Lin^{neg/lo}及びSca-1^{neg}は、骨髄球前駆細胞集団の混合物を同定するために使用されることができ、個々の亜集団(CMP、GMP及びMEP)は、それらのCD16/CD34プロファイルによって同定されうる。図1Bは、培養中のHSCからの骨髄球前駆細胞の誘導を

10

20

30

40

50

示す。培養由来のMPcは、新鮮に又は凍結保存されて使用されることができる。図1Cは、好中球減少症マウスの真菌接種からの防御のための骨髓球前駆細胞の使用を示す。使用した菌株、感染時間、及び使用した細胞数などのいくつかのパラメータは実験ごとに異なる。典型的な実験は、BALB/c宿主及びC57BL/Ka MPドナーを使用する。

【0186】

マウス

C57BL/6 Ka、Thy-1.1、CD45.2マウスを繁殖させ、そしてResearch Animal Facility of Stem Cell Inc. Palo Alto, CAにおいて飼育した。BALB/cマウスをCharles River Laboratoriesから購入した。ドナーマウスは、6～8週齢、レシピエントマウスは8～16週齢で用いた。

10

【0187】

レシピエントマウスにCs照射装置で照射した。BALB/cレシピエントは全部で9.2 Gyを少なくとも3時間あけて2回受けた。すべてのマウスは酸性化した水で維持し、そして、日和見感染を減少させるために照射後の4週間は抗生物質を含む水に切り替えた(106 U/LポリミキシンBサルフェート及び1.1 g/Lネオマイシンサルフェート)。

【0188】

真菌感染

先に記載のアスペルギルス・フミガーツスの臨床的単離物(BitMansour A, et al, Blood 100, 4660-4667)をマウスを感染させるのに用いた。すなわち、真菌をSabouraud デキストロース寒天(BD Biosciences, Cockeysville, MD)に蒔き、そして少なくとも48時間、37℃でインキュベーションした。10 mlのPBS+0.05% Tween80を真菌菌叢上に注ぎ、分生子を採取した。そとこすった後、得られた溶液をろ過して菌糸を除き、そして得られた分生子溶液を4℃で維持した。一連の希釈をSabouraud 寒天プレート上でいい、分生子濃度を測定するのに用いた。A.フミガーツスを接種したマウスは、100～200の分生子をi.v.で尾静脈内に全部で150 µlの食塩水中で受容した。

20

【0189】

フローサイトメトリー

KTLS HSCを、マウスの大腿及び頸骨から骨髓を洗い出し、その後、赤血球を塩化アンモニウムで溶解することによって調製した。得られた細胞懸濁液をCD117⁺細胞について、AutoMacs 装置及びCD117-マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)を用いて濃縮した。濃縮した細胞をCD117PE-Cy7(2B8)、CD90.1^{FlTC}(HIS51)、LinPE(CD3(145-2C11))、CD4(L3T4)、CD8(53-7.3)、CD19(ID3)、B220(RA3-6B2)、CD11b(M1/70)、Gr-1(8C5)、TER119(TER119)、及びSca-1APC(D7)(EBioscience, San Diego, CA)について染色した。CD117⁺、CD90.1^{lo}、Lin^{neg/lo}及びSca-1^{neg}細胞は、Becton and Dickinson FACSAria. HSC二重にソーティングした(収率ソーティングの後に純度ソーティング)。(BALB/cなどの)CD90.2菌株からのHSCを、KLS細胞同様にCD90染色なしにソーティングした。

30

【0190】

骨髓由来の骨髓球前駆細胞、CMP、GMP及びMEPの混合物を、上記のようにCD117⁺について濃縮することによって、マウス骨髓からソーティングした。細胞を染色し、そしてCD117⁺、Lin^{neg/lo}、Sca-1^{neg}細胞をソーティングした。

40

【0191】

組織培養

10000のLin^{neg/lo}KTLS HSCをマウス骨髓からソーティングし、そして、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(Biosource)、1%Glutamax(Invitrogen)及び50 ng/mlのc-KitL、5 ng/mlのTpo、10 ng/mlのIL-6(Biosource)及び30 ng/mlのFlt3L(R&D Systems)を補充した0.5 mlのX-vivo 15(Cambrex)を含む24 ウエルプレート中に蒔いた。すべての成長因子はマウス組換え体である。培地を一日おきに加えた。50%の培地を第4日に交換し、その時に細胞を6 ウエルプレートに再び蒔いた。第7日の採取のときに、総培養体積は2 mlであり、2～7 × 10⁶細胞を含んだ。細胞を、成熟前駆細胞の存在について上記のとおり分析し、そして新鮮に又は凍結保存して使用した。培養細胞を

50

7.5% DMSO、42.5% ウシ胎児血清、及び50% Xvivo15培地中で凍結保存した。融解後、細胞を生細胞計数(トリパンブルー)を用いて定量し、続いてフローサイトメトリー分析して凍結融解過程が、照射マウス中に注射する前の前駆細胞プロフィールに影響しなかったことを確認した。

【0192】

エクスピボで機能的骨髄球前駆細胞へ増殖したHSC

臨床的に有用な治療法を開発するために、大量の骨髄球前駆細胞を生成することが望ましい。高度に精製されたKTLS HSCをソーティングし、そしてHSCに作用する成長因子を補充した血清フリー培地(X-vivo15)中に入れた。多くの異なるサイトカインの組み合わせを試験した(データは示さない)。KitL、Flt3L、Tpo及びIL-6は急速な増殖を誘発したが、10 蒔いたHSCの分化は遅く、C57BL/Ka由来のHSCについての総細胞増殖は1週間で平均500倍であった。7日間の培養の最後におけるフローサイトメトリー分析は、大きな比率を占める細胞は、さまざまな骨髄球前駆細胞(CMP、GMP及びMEP)並びにHSC(図2Bに示す)の表面表現型を有することを示した。図2Bは、C57BL/Ka細胞について観察した平均増殖数を示し、そして類似の全体的増殖がAKR、FVB、及びSJLを含むいくつかの他の系統からのHSCについて観察された。移植実験は、顕著な数のHSCが5日間の培養後に存在したが、C57BL/Ka HSCを7日間培養後にはわずかな機能的HSCしか残らなかったことを示す。

【0193】

平均して、 $CD117^{+}Lin^{neg/lo}$ ゲーティングにおいて組み合わせたさまざまな前駆細胞集団の増殖は、使用条件下で蒔いたKTLS-HSCの数を約100倍上回った。したがって、20 これらの培養条件下では、マウス骨髄から直接精製されるよりも顕著に多くのMPが得られた。さらに、単一細胞集団のメチルセルロース播種を用いて表面マーカー表現型により同定される前駆細胞集団は、予想された系列分化能を有する(データは示さない)。

【0194】

よく定義されたさまざまな骨髄球前駆細胞に加えて、これらの培養も、少数の比較的成熟した巨核球を含むより分化した細胞を含む。しかしながら、30 図2Aに見られるように、大多数の細胞は、骨髄球前駆細胞の徴候を示す一方、最終的に分化せずそして多くは幹細胞及び前駆細胞の芽細胞の特徴を保持する。図2Aは、May-Grunwald/Giemsa染色した、7日培養のサイトスピンを示し、ほとんどの細胞は未成熟であり、多くは明らかに骨髄球前駆細胞であった。少数の比較的成熟した巨核球が存在する。図2Bは、表面マーカープロフィールにより定義した、7日間の血清フリー培養中のHSCからの異なるタイプの前駆細胞の収率を示す。

【0195】

エクスピボで増殖させた骨髄球前駆細胞による、同種好中球減少症マウスの侵襲性アスペルギルスからの防御

骨髄由来の骨髄球前駆細胞を、好中球減少症マウスを真菌感染から防御するために使用した。この実施例は、培養由来の骨髄球前駆細胞が同種好中球減少症マウスを侵襲性の真菌感染から、骨髄由来の骨髄球前駆細胞同様に防御したことを示す。

【0196】

致命的照射を受けたマウス(BALB/c、CD90.2、CD45.2、H-2^d)において、40 200の同系BALB/c HSC($CD117^{+}$ 、 $Lin^{neg/lo}$ 、 $Sca-1^{neg}$ 、KLS)及びC57BL/Ka、H-2^d骨髄からの $CD117^{+}$ 、 $Lin^{neg/lo}$ 、 $Sca-1^{neg}$ 細胞としてソーティングされる 8×10^4 個の骨髄MP、又は 5×10^7 個の第7日目の培養由来のMP細胞のいずれかにより、再構成を実施した。最初の照射及びHSC/MP移植の7日後に、アスペルギルス・フミガーツス臨床単離物の150の分生子を、尾静脈注射してマウスを感染させた。実験を1群15匹で3回繰り返した(データは示さない)。図3のプールしたデータにより示すとおり、2/15の照射対照のみが30日を超えて生存し、使用した致命的照射量が比較的低いことを確認した。200のKLS HSCの第0日における注射(HSC-レスキュー群)は、照射したマウスを完全にレスキューしたが;これらのマウスのわずか17/44のみが150のA・フミガーツス分生子を注射されて生存した。対照的に、BM MPを受容した34/45のマウス(76%)及び培養50

由来の細胞を受容した32/45のマウス(71%)が真菌接種を生き残り、培養由来の細胞は死を予防した。統計学的分析(ログランク)は、BM MP細胞($p < 0.0001$)及び培養由来細胞($p = 0.0014$)の両方の、幹細胞のみの群に比較して有意な防御を示した。BM MP細胞を受容した群と培養由来の細胞を受容した群の間で30日生存において認識できる相違はなかった($p = 0.5164$)。したがって、エクスピボで増殖させた骨髓球前駆細胞は、好中球減少症マウスを侵襲性的アスペルギルス症から骨髓由来の骨髓球前駆細胞同様に防御する。

【0197】

凍結保存したエクスピボで増殖させた同種骨髓球前駆細胞が、アスペルギルスに対して好中球減少症マウスを保護する

成熟した顆粒球の輸注に比した骨髓球前駆細胞の使用の利益は、使用の前に前駆細胞が凍結保存可能であることである。凍結されたMP細胞は、貯蔵し、必要なときに融解することができた。

【0198】

この試験は、マウスMPcによる標準的な真菌実験を改変した。標準的には、C57BL/Ka HSCを、KitL、Flt3L、Tpo及びIL-6を補充したXvivo15中で7日間培養するように設計されている。第0日に宿主マウス(BALB/c)を致死的に照射し(2×4.4 Gy、4時間離して)そして同じ日にMPc培養からの 5×10^5 細胞及び200のBALB/c HSC(KLS)を注射した。第7日に、マウスに150のアスペルギルス・フミガーツス分生子をマウスに注射した。マウスを毎日検査し、30日の生存を判定した。

【0199】

本明細書に記載の実験は、以下の(i)MPcがいくつかの異なる場合で培養される(i i)より早期の培養は凍結され、液体窒素中に保存される(i i i)新鮮な及び凍結したMPcを比較する(i v)MPcの組成をフローサイトメトリーによって凍結前及び融解後に分析する、ことにおいて異なる。

【0200】

マウス細胞は、血清フリー又は血清を含む混合物である凍結保存媒体中で凍結されることが出来る。すべての研究実験について、血清を含む凍結保存媒体を使用した。血清を含む混合物:(全部で150ml)37.5mlの血清及び22.5mlのDMSOを含む。

1. 細胞をペレットとし
2. 細胞を血清フリー媒体に再懸濁し(IMDM又はXvivo)
3. 氷と水を入れた金属ボウルを用意し
4. 再懸濁した細胞を入れたチューブを氷水に入れ、そして、穏やかにチューブを混合しながら、ゆっくりと等体積の凍結保存用混合物を上から再懸濁した細胞に滴下し
5. 混合物をバイアルにピペットで入れ、そして-80の凍結装置に一夜置き
6. 長期貯蔵のために、バイアルを-180に移す。

【0201】

培養したマウス細胞の融解のためには:

1. バイアルを37の浴中で、内容物がほとんど融解するまで融解し、細胞を血清フリー媒体(IMDM又はXvivo)中に懸濁し
2. 細胞をゆっくりとDNaseを入れたバイアル中にピペットで入れ、小さなアリコートで最初のバイアル細胞計数のために取り出し
3. 穏やかにチューブを揺らして媒体と細胞をゆっくりと混合させながら、10mlの媒体(10%NCSを含むIMDM/DMEMなど)を細胞に滴下して加え
4. 細胞を沈降させ、そして染色媒(HBSS/2%NCS)に再懸濁し
5. 計数する。

【0202】

10

20

30

40

【表 3】

12/1/2004	第-14日。MPc培養を開始するためにBS. BA HSCをソーティングする（凍結MPc）。
12/8/2004	第-7日。MPcを採取し、フローにより分析し、細胞を凍結する（CD117+細胞をMCM/Terasaki プレートに蒔く）。
12/9/2004	BS. BA HSCをソーティングしてMPc培養を開始する（新鮮）。
12/16/2004	第0日。BALB/c HSCをソーティングし、MPc培養を採取し、65匹のBALB/cマウスに照射し、そして60匹のBALB/cマウスにMPc（新鮮又は凍結）及び/又は HSCを注射する。
12/23/2004	第7日。50匹の再構成マウスに150分生子のアスペルギルス・フミガーツスを注射する。
	第5日～第30日。毎日、生存および死んだマウスを記録する。
2005	4週に始めて、再構成のレベルについてマウスを試験する。

10

【 0 2 0 3 】

【表 4】

群	n	HSC	MPc	成長因子	真菌(分生子)	日
G1 新鮮なMPc	15	200	新鮮, 500, 000	No	150	7
G2 凍結 11/29 MPc	15	200	凍結 500, 000	No	150	7
G3 凍結 12/8 MPc	15	200	凍結 500, 000	No	150	7
G4 MPなし	10	200	0	No	150	7
G5 照射対照	5		0	No		7
合計	60	11, 000	3*7, 500, 000	None	8, 250	

20

【 0 2 0 4 】

MP-培養

CD117⁺CD90.1^{low}Lin^{neg}/lowSca-1⁺HSCをCD117濃縮BS. BA骨髄から以下に記載のとおり
 ソーティングした。マウスHSCの単離 - 直接結合させたc-kitマイクロビーズ。大腿及び頸
 骨を集め、筋肉を除く。乳棒及び乳鉢を用いて破碎する。ナイロンスクリーンを通して
 過する。5匹のマウス/チューブ(10本の肢及び10本の腕)。1200RPMで5分間
 遠心分離。1mlのACKに再懸濁して氷上に約3~4分置く。染色媒をチューブに満たして
 洗浄する。遠心分離する。細胞を計数する。マウスあたり約50~60µlの染色媒に再
 懸濁する。ろ過し、洗浄し、そしてさらに約40~50µlでろ過し、ラットIgG(1:5
 0)+マウスIgG(1:50)を10~15分加える。全BMの10µlを染色のために取り
 出す。10µl/マウスの抗c-kit抗体マイクロビーズ(CD117)を加える(ロット番号504
 0428046)。注:上腕骨を加える場合は、12µlのビーズ/マウスを使用する。氷上で2
 5分間インキュベートする。2回洗浄する。細胞を再懸濁し、ナイロンスクリーンを通し
 てろ過し、最終体積約0.5~1.0ml/マウスとし、洗浄し、そして更なる0.5mlで
 メッシュでろ過する。AutoMACs上で細胞を濃縮し、posseldsプログラムを使用する。或い
 は、3~4mlの染色媒で洗浄することによってMidiカラムを調製する。細胞をナイロンメ
 ヂッシュを通してろ過し、カラムに適用する。細胞をカラムの3倍量中でカラムに通す(1
 0マウス/カラムを超えない)。カラムを5~10mlの染色媒で洗浄する。カラムを磁石
 から取り除き、カラムの2倍量で細胞を洗い出す。(注:10匹のマウス=midi及び5匹
 のマウス=mini)計数し、遠心分離する。細胞を1×10⁸細胞/mlで染色媒+抗体に再懸

30

40

50

濁する。

【 0 2 0 5 】

【表 5】

抗体	ロット番号	タイター	
c-kit (2B8) ビオチン	E000225	1:400	Orc-kit
(2B8) PE-Cy7	E009158	1:400	
Sca-1 APC	E007871	1:200	
Thy-1.1 FITC	E008124	1:400	
Lineage PE :			
Ter 119	E005015	1:400	
CD3	E009288	1:100	
CD5	E004526	1:1600	
CD8	E009271	1:200	
B220	E007026	1:800	
CD4	E008789	1:3200	
Mac-1	E005858	1:6400	
GR-1	E008723	1:3200	

10

【 0 2 0 6 】

氷上で25分間インキュベートし、洗浄し、遠心分離する。c-kit ビオチンを使用する場合、SM(1×10^8 細胞/ml)に再懸濁する。ストレプトアビジンCy7-PE (ロット番号E006330) 1:800で氷上25分間、染色する。洗浄し、遠心分離し、染色媒+PI (1:1000)で染色し、FACSの前に濾過する。使用する色に基づいて比較用チューブを設定する。

20

【 0 2 0 7 】

【表 6】

抗体	ロット番号	タイター
B220-PE Cy7	E009142	1:400
B220-Bio	E004692	1:800
Cascade-Blue	65A1-1	1:400
B220-PE	E007026	1:400
B220-FITC	E005965	1:200
B220-APC	E011511	1:200
B220-Cy5PE	E004592	1:800
PI		1:1000
染色なし		

30

【 0 2 0 8 】

全BMの染色：細胞を遠心分離する。100 μ lのSM+抗体(上記を参照のこと)に再懸濁する。氷上で25分間インキュベートする。洗浄し、遠心分離する。(2B8-ビオチンを使用する場合、100 μ lに再懸濁し(10^7 細胞/100 μ l)、そしてストレプトアビジンCy7-PE 1:800で25分間、氷上で染色する)洗浄し、遠心分離し、SM+PI (1:1000)に再懸濁し、FACSの前にもろ過する。

40

【 0 2 0 9 】

MPC培養を開始するために、約 3×10^4 のHSCを使用した。以下に記載のとおり、Xvi vo15 + 2 ME + Pen/Strep + 50 ng/ml KitL + 30 ng/ml Flt3L + 5 ng/ml Tpo + 10 ng/ml IL-6中で、細胞を7日間培養した。

50

【0210】

マウスHSCから骨髓球前駆細胞への大規模培養

Lin^{neg}/lowKTLS-HSCをマウス骨髓からソーティングし、そしてPen/Strep、Glutamax及びβ-メルカプトエタノール並びにKitL、Flt-3L、Tpo及びIL-6を補充した500μl/ウエルのXvivo15中に蒔いた。細胞を7日間培養して、MPc(培養由来MP)を得た。予測したこの期間中の増殖は、C57BL/Ka細胞について全体で200~700倍の増殖で、CD117⁺Lin⁻ゲートに10~35%の細胞が分類された。細胞を2回ソーティングし、最初は収率で、そして最後は純度についてソーティングした。100,000のバルクのソーティングについては、最初のソーティングは約300,000の細胞を得た。24ウエルプレート中で、ウエルあたり500μlの媒体中の10,000KTLS-HCSを直接ソーティングした。滅菌水をプレートのウエルの外側に加えて蒸発を防いだ。細胞を37℃、5%CO₂、完全に加湿したインキュベータ中でインキュベートした。第2日に、500μlの新鮮な培地を各ウエルに加える。第4日に、培地の半分(500μl)を捨てる(細胞を除去しないように注意してピペットで上部から行う)。細胞を(P1000を用いてピペットで上下して)再懸濁し、そして500μlの新鮮な培地を入れた6ウエルプレートのウエルに移す。24ウエルプレート上の空のウエルを500μlの新鮮な培地で洗浄し、6ウエルプレートの同じウエルに移す。総体積はウエルあたり1.5mlとなる。いくつかの細胞は24ウエルプレートの底に付着するであろうが、これらは捨てる。第6日に、500μlの新鮮な培地を加える。第7日に、培養細胞を集め、そして分析する。さらに、細胞はトリパンブルーで染色し、そして血球計を用いて計数する。分析データは、増殖倍率及びHSCとMP(CMP/GMP/MEP)の総細胞数を計算するための情報を提供する。

10

20

【0211】

マウスHSCの骨髓球前駆細胞への大規模培養のための試薬：ペニシリン/ストレプトマイシン(100×)Biosource International Inc, Glutamax(100×)Invitrogen, β-メルカプトエタノール(1000×)Sigma Aldrich Fluka Inc. を補充したX-vivo15(Cambrex Bioscience 04-744Q)。成長因子は以下のものを含む：

【0212】

【表7】

	製造者	カタログ番号	原液	使用量
rmKitL	Biosource	PMC2115	25ng/μl	50ng/ml
rmFit3L	R&D	427-FL	25ng/μl	30ng/ml
rmTpo	Biosource	PMC1144	10ng/μl	5ng/ml
rmIL-6	Biosource	PMC0066	10ng/μl	10ng/ml

30

【0213】

100,000細胞のための培地(500μl/ウエル)は、5mlのコンプリートXvivo、5μlのIL-6、2.5μlのTPO、10μlのKitL、6μlのFlu3Lである。100mlのComplete Xvivoに対して100μlのβ-メルカプトエタノール、1mlのPen/Strep、1mlのGlutamaxを使用する。

40

【0214】

7日間の培養後、細胞を採取し、そして計数した。アリコートを下のように分析した。HSC/MPの分析は、4~5のspherotck(6.7μM)ビーズを1mlの染色媒(SM)に加えることによって行った。ビーズをトリパンブルー中に1:10に希釈し、そして血球計を用いて計数した。ビーズは、原液濃度が2×10⁶ビーズ/ml超でなければならない。各分析の前にビーズを計数する。サンプルあたり30,000のビーズを加える。小さなアリコートの細胞を分析チューブに移す。rlgG(1:50)及びmlgG(1:50)で、氷上、10分間ブロッキングする。MPチューブにCD117-BIOTINを1:200で加える。氷上

50

、暗所で20分間インキュベートする。HSC (1 : 400のCkit cy7-pE、1 : 200のSca-1APC、1 : 200のThy-1.1FITC、1 : 800のB220 PE、1 : 800のMac-1 PE、及び1 : 800のGR-1 PE) 及びMP (1 : 400のSA-カスケードブルー、1 : 200のSca-1 APC、1 : 25のCD34 FITC、1 : 50の2.4G2、1 : 800のB220 Cy7-PE、1 : 800のGR-1 Cy7-PE) 抗体混合物を調製する。すべてのチューブを2mlの染色媒で洗浄し、1100 rpmで5分間遠心分離。抗体混合物とともに氷上、暗所で20分間インキュベートする。細胞を染色媒で洗浄し、遠心分離する。細胞をPI培地中に再懸濁する (PI培地 (1 : 1000) 10 ml原液 : 10 mlの染色媒中、10 µlのPI)

【0215】

つまり、HSC、CMP、GMP、MEP及びより成熟した細胞 (CD11b⁺、Gr-1⁺、Ter119⁺) の存在を判定するためにフローサイトメトリー分析を行った。(May-Grunwald/Giemsa染色で染色される) サイトスピンを作製した。約3倍の7.5 × 10⁷の培養由来細胞が新鮮 (1 ×) 及び凍結 (2 ×) の注射に必要であった。

10

【0216】

MPcの凍結

上記したように、MPcは培養に由来する。細胞を凍結前にフローサイトメトリーにより分析した。さらに、単一のCD117⁺Lin⁻細胞を上記MPc培地 (Xvivo+KitL, Flt3L、Tpo及びIL-6) を入れたTerasaki プレートに蒔いた。コロニーを形成する細胞のパーセントを播種の1週間後に測定する。細胞を以下に記載のプロトコールにしたがって凍結した。細胞は血清フリー又は血清を含む混合物である凍結保存媒体中で凍結することができる。すべての実験のために、血清を含む凍結保存培地を使用した。血清を含む混合物 : (全部で150 ml) 37.5 mlの血清、90 mlのヘタスターチ、22.5 mlのDMSO。細胞をペレットとし、血清フリー培地 (IMDM又はXvivo) 中に再懸濁する。氷と水をいれた金属ボウルを用意する。再懸濁した細胞を入れたチューブを氷水の中に置き、ゆっくりと等体積の上記凍結保存混合物を上から再懸濁した細胞に滴下しながら、チューブを穏やかに混合する。混合物をピペットでバイアルにいれ、-80の凍結装置中に一夜おき、バイアルを長期貯蔵のために-180に移す。

20

【0217】

凍結MPcの融解

凍結したMPcを以下に記載のとおり融解した。バイアルを37の浴中で内容物がほとんど融解するまで融解した。細胞を血清フリーの培地 (IMDM又はXvivo) 中に再懸濁した。細胞をDNaseを入れたバイアルにピペットでゆっくりといれ、小さなアリコートで最初のバイアル細胞の計数のために取り出した。穏やかにチューブを揺らして培地と細胞をゆっくりと混合させながら、10 mlの培地 (10%のNCSを含むIMDM/DMEMなど) を滴下して細胞に加えた。約1 ml/分で培地を加える。細胞を沈降させ、そして染色媒 (HBSS/2% NCS) 中に再懸濁した。そして細胞を室温で30分放置することによって「休ませた」。しかるべく、細胞を計数/染色し、又は蒔く。

30

【0218】

この実験において、細胞の融解に続いて、細胞を約1時間休ませ、そしてバイアピリティを (i) トリパンプルー/血球計計測数 (ii) PI排除フローサイトメトリー分析によって測定する。さらに、単一のCD117⁺Lin⁻MPcを蒔き、そして培養した。

40

【0219】

BALB/c HSCソーティング

HSC, CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1^{pos}を5匹のBALB/cマウスから、上記のように用いてソーティングした。10,000 HSC (レシピエントあたり200) を必要とした。ソーティングしたBALB/cHSC培養由来のBS.BA MPcと所望の比率で混合し、致死的に照射されたBALB/cマウスへの注射に使用した。

【0220】

真菌の注射

第7日に、注射した生きた分生子数を定量するためにSabauroud-デキストロース寒天上

50

で注射溶液の一部を試験することを含み、マウスの尾静脈に以下に記載のとおり、150分生子のアスペルギルス・フミガーツスを注射する。アスペルギルスの注射については、各実験について注射の前に分生子の濃度を測定する。全部で150 μ lの体積(滅菌した1 \times PBS+0.05% tween+分生子)をマウスあたりで注射する。注射の間、分生子溶液を氷上に保ち、そしてそれぞれのシリンジを満たす前にボルテックスにかけた。シリンジからの150 μ lをSDAプレート上に蒔き、そして37 $^{\circ}$ Cでインキュベーションした。翌日、コロニー数を数え、注射した分生子の存在を確認した。

【0221】

培養由来の骨髓球前駆細胞が好中球減少症マウスにおいて侵襲性アルペルギルス症を防ぐその能力を保持することを実証するために、HSCを蒔き、上記のように培養した。7日後、培養を採取し、そしてフローサイトメリーで分析した。そして、細胞を上記のように凍結保存し、液体窒素の蒸気相中に保存した。少なくとも7日後、バイアルを37 $^{\circ}$ Cで急速に融解し、培地で2回洗浄した。アリコート用フローサイトメリー分析用に取り出し、そして残りの細胞を致命的に照射された同種宿主への注射のために使用した。図4Aは、新鮮なMPと使用の前に凍結保存した培養由来の骨髓球前駆細胞についての生存データを比較し、A.フミガーツス分生子を致命的照射の7日後に接種し、そして200の同系HSC及び新鮮な又は凍結保存後の500,000の同種の培養由来骨髓球前駆細胞で再構成したマウスの30日生存を比較した。500,000新鮮な細胞を受容した15匹のマウスの4つの群の真菌接種後の生存はHSCのみを受容したマウスのそれよりも有意に異なった($p=0.009$, t -検定)。同じことが、HSCのみの群に比較して、3群の15匹のマウスについての凍結保存した500,000の培養由来骨髓球前駆細胞にも真実である($p=0.0329$)。新鮮な又は凍結した骨髓球前駆細胞を受容する群の間で生存の相違はなく($p=0.7205$)、或いはHSCのみの群のどちらの場合も相違はなかった($p=0.5058$)。図4Bは、培養されたMP細胞のCD117Lin染色プロファイルの凍結前および融解後の比較であり、凍結/融解サイクルがCD117及びLin染色プロファイルに影響しないことを示す。類似の結果がマーカーについての分析においてえられた(データは示さない)。

【0222】

骨髓球前駆細胞による再構成は典型的に短期の生着をもたらす

図5は、5日間(2.25×10^5 細胞/マウス)、7日間培養(8×10^5 細胞/マウス)のいずれかでC57BL/ka細胞とともに培養した、再構成4週間後の末梢血中の生着レベルを例解する、同系MPcによる再構成を示す。図5に示すように、わずかな(5%)MP由来細胞が投与の1ヶ月後に循環中に存在する。MP由来細胞数は経時的に消失し、そして投与後8週間では4週間よりも低かった(データは示さない)。存在する細胞は、ほとんどがB-リンパ球である。MP-誘導性条件下で5日間培養されたHSCは、劇的に異なる再構成パターンを示す。4週間では、多くの循環細胞がMP-由来であり、そしてこれらは3つの主要な系列、骨髓細胞、B細胞及びT細胞、を表す細胞を含む。これは、残りの機能的HSCによる生着を示唆する。MP由来細胞の数は再構成の8週間後には顕著に低く、HSCの生着が主に8日間培養された細胞のST-HSC投与に限定され、精製した骨髓球前駆細胞に非常に似た生着パターンを示すことを示す。わずかなMP由来細胞が見られ、そしてこれらは主に長寿命のB-細胞を表す。したがって、ドナー由来の細胞の数及びタイプは培養の持続時間に関連し、7日間の培養の結果、輸注の8週間後に宿主においてわずかなMP由来細胞が検出された。

【0223】

図6は、培養由来の骨髓球前駆細胞による防御の用量応答性を示す。併合された、10の独立した実験からのデータ。用量は、MPc中の全細胞数(図6A)又はCD117+Lin-細胞(図6B)としてプロットした。これらの実験は、図5について上記したように実施した。BALB/cマウスは致命的に照射され、そしてBALB/c HSC及びC57BL/Ka MPcを注射され、次にA.フミガーツス分生子を第7日に接種した。

【0224】

培養された骨髓球前駆細胞が迅速に有効な防御を提供する

図7は、200の同系HSC及び250,000又は50,000の培養由来MPで再構成した致死的に照射したマウスに異なる時間で真菌を注射した、15の別々の実験からの生存データをくみあわせたものを示す。図7は、レシピエントマウスが照射後の最初の2日間の間、真菌接種に対して生存し；第3日までにマウスが感染性の接種に対して完全に易罹病性であったことを示す。

【0225】

混合した同種の培養骨髓球前駆細胞

実験の目的は、混合した同種MPcが(i)単一のドナーMPcと同程度に防御するか、(ii)マウスに悪影響を与えないか、について判定することであった。実験は、プールしたバッチ中のMPc及びアリコートとして凍結保存したMPcが臨床的に関連する治療剤であることを示す。

【0226】

この試験は、マウスMPcの標準的なFungus 実験を改変したものである。標準的な設計は、C56BL/Ka HSCをKitL、Fit3L、Tpo及びIL-6を補充したXvivo15中で7日間培養するものである。第0日に宿主マウス(BALB/c)を致死的に照射し(2×4.4 Gy、4時間あけて)、そして同じ日に、MPc培養からの5×10⁵細胞及び200のBALB/c HSC(KLS)を注射する。第7日に、マウスに150分生子のアスペルギルス・フミガーツスを静脈内注射する。マウスを毎日検査し、そして30日の生存を判定した。

【0227】

本明細書に記載の実験は、(i)HSCをソーティングし、そしてBS、BA、AKR、FVB及びSJLマウスから培養した(ii)より少ないMPc数を与えた(iii)真菌をより迅速に照射後に与える、において異なる。

【表8】

1/6/2005	第7日。4つの別々のMPc培養を開始するためにBS、BA、AKR、FVB及びSJL HSCをソーティングする。
1/13/2005	第0日。BALB/c HSCをソーティングし、MPc培養を採取し、51匹のBALB/c マウスに照射し、そして45匹のBALB/c マウスにMPc 及び/又はHSCを注射する。
1/20/2005	第7日。45匹の再構成マウスにアスペルギルス・フミガーツスの200分生子を注射する。
1/21/2004 ~2/13/2005	第8~30日。生存している及び死んだマウスを毎日記録する。
2005	4週間で開始して、再構成レベルを試験する。

【0228】

【表9】

群	n	HSC	BS、BA MPc	AKR/SJL/FVB	真菌	日
HSC MPなし	15	200	0	no	200分生子	7
BS、BA MPc	15	200	500,000	no	200分生子	7
MPc混合物	15	200	125,000	各125,000	200分生子	7
照射対照	5	0	0	no	0	n/a
合計	50	9,000	9,375,000	各1,875,000	9,000	

【0229】

宿主：BALB/c、H-2^d、CD90.2、CD45.2 (Charles Rivers Laboratories)。およそ56匹のマウスが必要であり、51匹は宿主として、5匹はHSC-ドナーとして。MPc：C57BL/Ka、H-2^b、CD90.1、CD45.1 (BS.BA, 自家繁殖)；MPc：AKR、H-2^k、CD90.1、CD45.2 (CRL)；MPc：SJL、H-2^s、CD90.2、CD45.1 (CRL)；MPc：FVB、H-2^q、CD90.1、CD45.2 (CRL)。8～10×10⁴のHSCを作製するのに十分な、各系統のおよそ5～10匹のマウスが必要である。より多くのBS.BA細胞が他の系統よりも必要とされる。

【0230】

MP-培養

CD117⁺CD90.1^{low}Lin^{neg}/lowSca-1⁺HSCをCD117濃縮BS.BA、AKR及びFVB骨髄から上記のとおりソーティングした。SJL HSCをCD117+Lin^{neg}/lowSca-1+細胞のようにソーティングした。およそ3×10⁴のHSCがMPc培養を開始するのに使用される。細胞をXvivo15+2ME+Pen/Strep+50ng/mlのKitL+30ng/mlのFlt3L+5ng/mlのTpo+10ng/mlのIL-6中で上記のとおり7日間培養した。7日後に、培養中から細胞を採取し、そして計数した。アリコート进行分析した。すなわち、HSC、CMP、GMP、MEP及びより成熟した細胞 (CD11b⁺、Gr-1⁺、Ter119⁺) の存在を判定するために、フローサイトメリー分析を実施した。(May-Grunwald/Giemsa 染色で染色する) サイトスピンを作製した。約1.5×10⁷の培養由来細胞が注射に必要であった。過剰の細胞は将来の使用のために凍結保存した。

10

【0231】

BALB/c HSCのソーティング

HSC、CD117⁺Lin^{neg}/lowSca-1^{pos}を5匹のBALB/cマウスからソーティングした。10,000のHSC (レシピエントあたり200) を必要とした。ソーティングしたBALB/c HSCを培養由来のBS.BA MPcと、所望の比率で混合し、そして致死的に照射したBALB/cマウスへ注射するために使用した。

20

【0232】

真菌の注射

マウスに、尾静脈からアスペルギルス・フミガーツスの150分生子を注射した。注射はこれらのマウスが真菌を通常の第7日でなく第4日に受容する点で異なる。注射した生きた分生子の数を定量するために、注射溶液の一部をSabaurou-デキストロース寒天上で試験することを含む他の手順は同じである。

【0233】

図8は、同種の培養由来MPの混合物による、好中球減少症マウスの防御を示す。結果は、同種MP細胞混合物の有効性を実証する。実験は、主要抗原及びマイナー抗原においてすべて不一致の4つの異なる菌株から増殖させた細胞を用いた。3つの系統 (C57BL/Ka、AKR及びFVB) からの凍結/融解した同種の混合MP細胞及び半分の細胞量は、長期の再構成なしに防御をもたらした (データは示さない)。

30

【0234】

不一致の同種培養由来前駆細胞の放射線防護能

この実験は、AKR MPcドナー及びC57/B6Kaレシピエントを使用した。MPは、マウス骨髄から直接ソーティングされるか又はソーティングしたHSCから培養中で誘導される。培養したMPは、KitL、Flt3L、TPO及びIL-6を含むX-vivo培地中の7日間の培養に由来する。7日間の培養後、c-kit陽性の前駆細胞の出現頻度を決定するために、細胞をFACSによって分析した。1用量の培養細胞を移植し、これは200,000または500,000のc-kit陽性 lineage 陰性前駆細胞を含んだ。図9Aは、完全にMHC不一致の同種MPを移植した致死的に照射したマウスからの30日の放射線防護データを示す。生存するマウスはわずかな検出可能なドナーキメラ化を有する (図9B)。

40

【0235】

新鮮な又は凍結保存した不一致の同種培養由来前駆細胞の放射線防護能の比較

この実験は、AKR MPcドナー及びC57/B6Kaレシピエントを使用した。MPは、ソーティングしたHSCからの培養に由来する。培養MPは、KitL、Flt3L、TPO及びIL-6を含むX-vivo培地中の7日にわたる培養から得た。7日の培養の後に、細胞を採取し、そしてc-kit陽性

50

前駆細胞の出現頻度を測定するためにFACSによって分析した。細胞は、致命的に照射したマウスに直接注射するか、又は注射の前に凍結及び融解する。1用量の培養細胞を移植し、それは200,000 c-kit陽性 lineage陰性前駆細胞を含んでいた。図10は、完全に不一致のMHCを有する同種MPを移植した、致命的に照射したマウスからの30日の放射線防護データを示す。凍結保存したMPは採取時に投与したMPと等価の防御をした。

【0236】

実施例3 フラスコ及びバッグ中のヒト造血幹細胞から生じた骨髓球前駆細胞

ヒトhpHSC(Mobilized Peripheral Blood (MPB)に由来するCD34+CD90+細胞)を健康なボランティアから得た。MPBを、Baxter Isolex 装置を用いてCD34+細胞について濃縮した。CD34濃縮細胞をさらに染色し、そして通常のBD FACSariaの改変Dakocytomation MoFloを用いてCD34+CD90+細胞(「hpHSC」)を得た。細胞を、新鮮で又は凍結保存後のいずれかで、Isolex CD34濃縮後又はMoFloによるCD34+CD90+ソーティング後のいずれかで使用する。

10

【0237】

ヒト細胞の凍結

細胞は、血清フリー又は血清を含む混合物である凍結保存媒体中で凍結することができる。すべての実験のために、我々は血清を含む凍結保存媒体を使用している。血清を含む混合物:(全部で150ml)37.5mlの血清、90mlのヘタスターチ、22.5mlのDM SO。細胞をペレットとし、そして血清フリー培地(IMDM 又はXvivo)中に再懸濁する。氷と水を入れた金属ボウルを用意する。再懸濁した細胞のチューブを氷水中に置き、そして、穏やかにチューブを混合しながら、等体積の凍結保存混合物を上方からゆっくりと滴下して、細胞を再懸濁する。バイアル中の混合物をピペットで凍結装置中に入れ、-80で一夜置き、そして長期貯蔵のためにバイアルを-180に移す。

20

【0238】

ヒト細胞の融解

バイアルを37の浴中で内容物がほとんど融解するまで融解する。細胞を血清フリー培地(IMDM又はXvivo)中に再懸濁する。細胞をDNaseを入れたバイアル中にピペットでゆっくりと入れ、最初のバイアル中の細胞計数のために小さなアリコートを取り出す。穏やかにチューブを揺らして培地と細胞をゆっくりと混合しながら、10mlの培地(10%NCSを含むIMDM/DMEMなど)を滴下して細胞に加える。培地を約1ml/分に加える。細胞を沈降させ、そして染色媒(HBSS/2%NCS)中に再懸濁し、それらを室温で30分放置することにより細胞を「休ませる」。

30

【0239】

hpHSCを、特記しない限り、Xvivo15+1%ペニシリン/ストレプトマイシン、1%Glutamax及び100ng/mlのKITL、100ng/mlのFLT3L、50ng/mlのTPO及び10ng/mlのIL-3中、ウェル、フラスコ又はバッグ中で培養する。サイトカインベース混合物は、rhKITL 100ng/ml(Amgen)原液:100µg/ml;rhTPO 50ng/ml(Biosource)原液:10µg/ml;rhFLT3L 100ng/ml(Amgen)原液:100µg/ml;rhIL-3 10ng/ml(Biosource)原液:10µg/mlである。いくつかの実験では、以下のサイトカイン:rhIL-6 10ng/ml、rhIL-11 10ng/ml、rhGM-CSF 10ng/ml、rhG-CSF 100ng/mlの追加の効果を試験した。アッセイは、細胞計数(トリパンブルー)及び典型的には、第5、8、11日にフローサイトメトリー(CD34、CD90、CD45RA、CD123、CD15、CD33、CD41、CD19)を含む。

40

【0240】

バッグ:7mlのVuelife bag(American Fluoroseal, カタログ番号1PF-0007)、32ml(2P-0032)、又は72ml(2P-0072)を使用した。

【0241】

バッグの取り扱い:ヒト細胞を扱うための標準的な注意をもって使用する。バッグは、サンプルを満たしそして出すための1つ(7mlバッグ)又は2つの口を有する。口は、サンプルが通り、そしてシリンジにつなぐためのルアーロックを有する。7mlバッグは一旦

50

約4ml超を満たすと、開けたときに十分な圧力下でリークし、それらはルアーロックを開ける前にクランプでとじる必要がある。バッグを満たし、そしてより多くの培地を加えるためにはシリンジを使用し、重力による流れでは不十分である。より大きなバッグは、重力による流れで簡単に満たすことができ、培地又は細胞を通常のピペットで加えるときにプランジャーのないシリンジを「漏斗」としてつなぐことができる。これらのバッグはロックを開ける前にクランプされる必要はなく、それらはただ高く保たれるだけでよい。

【0242】

培養：バッグを典型的にはSanyo インキュベータ中で培養する：37℃、5%CO₂及び1~20%O₂。バッグ培養には必要ではないが、インキュベータを完全に加湿する。バッグは通気性であるが、水透過性ではない。細胞濃度は典型的に、10⁵細胞/ml（範囲：10⁶細胞/ml~10⁴細胞/ml）。取り扱いの容易性及び滅菌性のために、バッグはペトリ皿中（直径15cm、7又は30mlバッグを保持可能）又は角皿（より大きなバッグ）においてよい。

10

【0243】

サンプリング：通常の細胞サンプルは、ルアーロックを取り付けた1mlのシリンジを用いてバッグからとりだすことができる。バッグの内容物（細胞はしわに集まる傾向がある、上記の写真のグレーの沈着物を参照のこと）を混合する。必要に応じて（7mlバッグ）クランプし、栓を（一つの）口から外す。1mlシリンジを取り付け、そしてバッグを逆さにする（シリンジが下になる）。クランプがある場合にはこれを外す。シリンジを数回満たした空にして、連結チューブ中の細胞を混合する。シリンジを空にし（プランジャーを完全に下ろして）そしてバッグを逆さにする（シリンジを上にして）。空気が上に上がるようにしてサンプル口のハードプラスチックチューブを密封し（部分的にそれをみたくても）、そしてサンプルをチューブへ引き込む。サンプルチューブ全部で約0.2mlが入る。必要に応じて再クランプし、そしてシリンジをはずし、栓を戻す。

20

【0244】

第3又は4日に、7mlバッグ中、GF含有培地中の細胞2mlに追加の培地（2~3ml）を加えて培養に補充する。いくつかの実験においては、72mlバッグ中で20mlの培地中の約4×10⁶細胞（細胞濃度2×10⁵/ml）。細胞密度が10⁶細胞/mlに近づいたら（およそ第4日）、細胞を希釈して密度を3×10⁵~2×10⁶細胞/mlに保つ。採取のために、培地を第4日及び第6日に（総体積72mlまで）加えて、第8日に凍結する。8日間で細胞は約1.5×10⁸細胞まで増殖した。スケジュールは、15ml中3,000,000細胞で開始することができ、第4日に15mlの培地を加え、続いて第6日に40mlの培地を加えることができる。

30

【0245】

分析：細胞サンプルを上記のように取り出す。培養の完全な分析は典型的には第5、8及び12日に行う。これは、フローサイトメトリー分析、35mm皿中のメチルセルコース中に500細胞を蒔き、そしてMay-Grunwald/Giemsaで染色したサイトスピン。細胞計数は毎日、血球計及びトリパンブルーを用いて行う。

【0246】

増殖データは、5の別々のドナーから得た。図11は、ドナー：1319からのバッグ及びフラスコにおける増殖データを示す。図11Aは、全体の増殖を示す。図11Bは、同一の培地/GF（Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO及びIL-3を補充したXvivo15）中で培養したドナーからの細胞（CD34+CD90+）の細胞密度データを示す。細胞は異なる密度及び異なるタイプのバッグ及びフラスコ中で培養する。開始密度は7mlAFCバッグ中、1×10⁵~1×10⁶細胞/mlである。破線は、更なる培地を受容しなかった培養が、達成することのできた最大密度について追跡されたことを示す。増殖速度は、AFCバッグ中で増殖した培養及び組織培養皿中で増殖した培養とで類似した。テフロン（登録商標）バッグ以外では、一定比率の細胞がフラスコのプラスチックに緩く吸着している。フラスコ及びバッグ中で増殖する細胞の位相差視野。細胞を蒔いた後の第8日においてドナー1319の培養はバッグ中の集合する傾向のある細胞の数が増加することを示し、見かけの密

40

50

度の大きさを説明している（データは示さない）。

【0247】

図12は、ヒトMP培養からの細胞であって成長因子で処理されたものの写真である。ドナー1319、細胞をフラスコ中で8日間培養し（Xvivo15+PenStrep, Glutamax, 100 ng/mlのKITL、100 ng/mlのFLT3L、50 ng/mlのTPO、及び10 ng/mlのIL-3、異なる成長因子（100 ng/mlのKITL、20 ng/mlのIL-3及び300 ng/mlのG-CSF）を含むT25フラスコに切り替えた）。図12は、移動後の異なる時点における細胞を示す（4～19日）。第12日に顆粒球のピークがあり、第19日までにはマクロファージのみが見られるようになる。ヒトMP培養は、形態学的に成熟した好中球及びマクロファージ並びに巨核球に分化することができる。

10

【0248】

ドナー1198及び1202からのバッグ中の増殖データ。これら2のドナーからの細胞はIsolex濃縮し、Dakocytomation MoFlo及び凍結保存後ソーティングを用いてhpHSC表現型（CD34+CD90+）についてソーティングする。細胞を融解し、そして示したとおりに7 ml AFCバッグに蒔く。培地：Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO及びIL-3を補充したXvivo15。図13Aは、全体の増殖を示し、図13Bは細胞密度データを示す。白いマークは同時により大きなバッグに蒔いた細胞を表す（以下を参照のこと）。 2×10^4 細胞/mlで蒔いた細胞と 2×10^5 細胞/mlで蒔いた細胞、或いは7 mlのAFCバッグと7.2 mlのAFCバッグに蒔いた細胞とでは相違は明らかでなかった。

【0249】

7.2 ml AFCバッグ中のドナー1176、1198、1202及び1207からの増殖データ。これら4のドナーからの細胞をDakocytomation MoFlo及び凍結保存後ソーティングを用いてhpHSC表現型（CD34+CD90+）についてソーティングする。細胞を融解し、そして示したとおりに7.2 ml AFCバッグに蒔く。培地：Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO及びIL-3を補充したXvivo15。図14Aは、全体の増殖を示し、図14Bは細胞密度データを示す。最初に蒔いた体積：20 ml中、約 4×10^6 細胞。最終培養体積1バッグあたり70 ml。全部で 1.56×10^6 細胞を4つのバッグに蒔いた。8日後に全部で 6.14×10^8 細胞を採取した（そして凍結保存した）。平均増殖率は40倍（30倍～60倍の範囲）であった。

20

【0250】

実施例4．ヒト骨髓球前駆細胞コロニーの形成及びインビボでのGCSFに対する応答
ヒト骨髓球前駆細胞の培養を、 2×10^6 の精製ヒトHSC（融解したhpHSC）で開始し、そして上記のSCF、Flt3L、TPO、IL-3を含む血清フリーExvivo15を入れた静的AFCバッグ中で培養した。第5、8、11、13及び15日に、MP細胞を採取し、そして3連でメチルセルロース中に蒔き、インビトロでコロニーを形成するそれらの能力を評価した。図15Aは、異なるタイプのコロニー（E:赤血球系；M:マクロファージ；G:顆粒球；GM:顆粒球/マクロファージ混合物；GEM:骨髓球/赤血球系混合物）に再分割したコロニー形成率をあらわし、いくつかの前駆細胞が培養中に存在するかを示している。

30

【0251】

図15Bは、コロニー形成率×総細胞計測数である、CFU（コロニー形成単位）の総数の増加を示す。CFUの相対数が、総細胞数の比較的強い増加によって低下しても、CFUは経時的に増加する。

40

【0252】

培養MPのFACS分析及び幹細胞/前駆細胞集団の経時的变化を図16に示す。示したプロットは、Live及びlineage陰性細胞であらかじめゲーティングする。第0日における開始集団はCD34+CD90+（右上部のゲート）であり、この集団は経時的に減少する。骨髓球前駆細胞は、おもにCD34+CD90-ゲート（左上部）中にあり、更なるデータはCD34low/-細胞が（低度であるが）コロニー形成し、そしてしたがって前駆細胞プール全体に寄与することを示す（データは示さない）。相対コロニー形成率に対するCD34+CD90-細胞の経時的相対数を、%CD34+細胞およびCFUの相関を決定するために、決定した（データは示さ

50

ない)。密な相関（データは示さない）は、CD34 FACS染色が前駆細胞の培養中の数の指標として使用可能であることを示唆する。

【0253】

図17は、IL-3及びIL-6の単独及び組み合わせのヒトMP細胞に対する効果を示す。図17Aは、1ml当たりの細胞密度及び細胞計測数を示し、図17Bは、細胞総数を示す。ヒト細胞をSCF/Flt3L/TPOを含むXvivo中で培養し、IL-3/IL-6(10~20ng/ml)を単独又は組み合わせて加えた(10~20ng/ml)。細胞計測数は、IL-3が培養中で増殖因子として作用することをあきらかにした。

【0254】

図18は、IL-3、IL-6又はこれら両方の組み合わせとともに培養したMP細胞のコロニー形成アッセイの結果を示す。図47A(第5日)、図47A(第8日)、及び図47C(第11日)は、IL-6の添加が、CFU数を増加させ、そしてMP細胞の前駆体能力を維持することを実証する。

【0255】

図19は、IL-3、IL-6又はこれら両方の組み合わせを含むMP培養中のCFUの絶対数を示す。IL-3及び/又はIL-6に応答したMPcからのCFUの総数の比較。IL-3の増殖効果及びIL-6の前駆体維持効果、これら2つのサイトカインの組み合わせは培養中のコロニー形成開始細胞の総数を増加させる。

【0256】

MPcを標準的条件下で5日間(図20A)又は8日間(図21B)培養した。G-CSFを第5日又は第8日(グラフ上の第0日)に培地に300ng/mlで加え、細胞増殖を経時的にモニターし、そしてG-CSFを受容しない(w/o)対照培養と比較した。データは、培養の後期に添加した場合、G-CSFが長期間にわたって細胞数を増加させるために使用可能であることを示す。また、我々のMPがG-CSFに対して応答性であり、顆粒球/neutrophilesmの前駆細胞に方向付けされるようであり、そしてG-CSFがMPc移植とともに患者中の好中球数を増加させることを示す。

【0257】

図21は、ヒトMP細胞のG-CSFに対するインビボでの応答性を示す図である。スキームは、インビボでのMPcの生着能、成長能及びG-CSFへの応答を評価するための、第8日のMPcのNOD/SCIDマウスへの移植実験を示す。

【0258】

図22は、ヒトMPcの移植後1週間の生着及びそれらのG-CSFへの応答をみるための、骨髄及び脾臓のFACS分析である。ドナー細胞を検出するために抗ヒトCD45抗体でサンプルを染色し、G-CSFを含む/含まない各組織についての2つの独立したサンプルを示す。骨髄は最も高度の再構成を示し、これはG-CSFの注射によって増加させることができる。

【0259】

図23は、NOD/SCIDマウスにおけるヒトMPc由来の細胞のFACS表現型である。示すプロットは、Live及びhuCD45+細胞で先にゲーティングされている。CD33は、初期の骨髄細胞のマーカーであり、ヒト細胞の大部分がCD33+であることは、ほとんどの細胞がその系列にささげられることを示す。CD14及びCD15はより成熟した骨髄球細胞を染色し、異質性の染色は、骨髄系列への参加と成熟を示す。同時に、ヒトB細胞(CD19)又はT細胞(CD3、示さない)は検出されなかった。

【0260】

本発明の特定の実施態様についての上記記載は、例示及び説明の目的で表された。それらは排他的又は本発明を開示された形態そのものに限定することを意図せず、明らかに多くの改変及び変更が上記教示に照らして可能である。実施態様は、本発明の原理及びその実際の応用を最もよく説明するため、それによって他の当業者が本発明及び考慮された特別な用途に合わせた多様な改変を有する多様な実施態様を最も良く利用することを可能とするために選ばれそして記載された。

【0261】

10

20

30

40

50

本明細書中で引用したすべての特許、特許出願、刊行物及び参考文献は、各文献又は特許出願が特別に及び個別に参考文献として援用されると示されるのと同程度に、明示的に参考文献として援用される。

【図面の簡単な説明】

【0262】

【図1】図1は、(A)ソーティングされ分析される細胞集団、(B)培養中のHSCからの骨髓球前駆細胞の分化、培養由来MP細胞が新鮮に又は凍結保存されて使用可能であること、(C)好中球減少症マウスを真菌接種から防御するための骨髓球前駆細胞の使用、を示す実験計画の図である。

【図2A】図2Aは、培養中のHSCからの骨髓球前駆細胞の分化を示す。

10

【図2B】図2Bは、培養中のHSCからの骨髓球前駆細胞の分化を示す。

【図3】図3は、同種の培養由来骨髓球前駆細胞による好中球減少症マウスの防御を示す。

【図4】図4は、新鮮な及び凍結保存された骨髓球前駆細胞の比較を示す。

【図5】図5は、マウス中の骨髓球前駆細胞による再構成を示す。

【図6A】図6Aは、培養由来骨髓球前駆細胞による防御の用量応答性を示す。

【図6B】図6Bは、培養由来骨髓球前駆細胞による防御の用量応答性を示す。

【図7】図7は、マウスにおける骨髓球前駆細胞を用いた有効な防御にかかる時間を示す。

【図8】図8は、同種の培養由来骨髓球前駆細胞混合物による好中球減少症マウスの防御を示す。

20

【図9A】図9Aは、完全にMHC不一致な同種の培養前駆細胞の放射防護能を示す。

【図9B】図9Bは、完全にMHC不一致な同種の培養前駆細胞の検出可能なドナーキメラ化を示す。

【図10】図10は、新鮮な及び凍結した、完全にMHC不一致な同種骨髓球前駆細胞を移植し、致死照射されたマウスの30日の放射線防護を示す。

【図11A】図11Aは、7mIAFCバッグ及びフラスコ中のヒト増殖データを示す。

【図11B】図11Bは、7mIAFCバッグ及びフラスコ中のヒト増殖データを示す。

【図12】図12は、成長因子で処理した、ヒト骨髓球前駆細胞培養からの細胞の写真を示す。

30

【図13A】図13Aは、7mIAFCバッグ中のヒト増殖データを示す。

【図13B】図13Bは、7mIAFCバッグ中のヒト増殖データを示す。

【図14A】図14Aは、72mIAFCバッグ中のヒト増殖データを示す。

【図14B】図14Bは、72mIAFCバッグ中のヒト増殖データを示す。

【図15A】図15Aは、ヒト骨髓球前駆細胞のコロニー形成を示す。

【図15B】図15Bは、ヒト骨髓球前駆細胞のコロニー形成を示す。

【図16】図16は、幹細胞集団及び前駆細胞集団についてのヒト骨髓球前駆細胞のFACS分析を示す。

【図17A】図17Aは、ヒト骨髓球前駆細胞に対する、IL-3、IL-6の単独又は組み合わせの効果を示す。

40

【図17B】図17Bは、ヒト骨髓球前駆細胞に対する、IL-3、IL-6の単独又は組み合わせの効果を示す。

【図18A】図18Aは、IL-3、IL-6又はその組み合わせを含む骨髓球前駆細胞培養のコロニー形成アッセイの結果を示す。

【図18B】図18Bは、IL-3、IL-6又はその組み合わせを含む骨髓球前駆細胞培養のコロニー形成アッセイの結果を示す。

【図18C】図18Cは、IL-3、IL-6又はその組み合わせを含む骨髓球前駆細胞培養のコロニー形成アッセイの結果を示す。

【図19】図19は、IL-3、IL-6又はその組み合わせを含む骨髓球前駆細胞培養中のCFUの絶対数を示す。

50

【図20A】図20Aは、G-CSFへのヒト骨髓球前駆細胞の応答性を示す。

【図20B】図20Bは、G-CSFへのヒト骨髓球前駆細胞の応答性を示す。

【図21】図21は、G-CSFヒト骨髓球前駆細胞のG-CSFに対するインビボにおける応答を示す図である。

【図22】図22は、ヒトMPcの移植1週間後の生着を示すマウス骨髓及び脾臓並びにそれらのG-CSFに対する応答を示すFACS分析である。

【図23】図23は、NOD/SCIDマウスにおけるヒト培養由来骨髓球前駆細胞のFACS表現型である。

【図1】

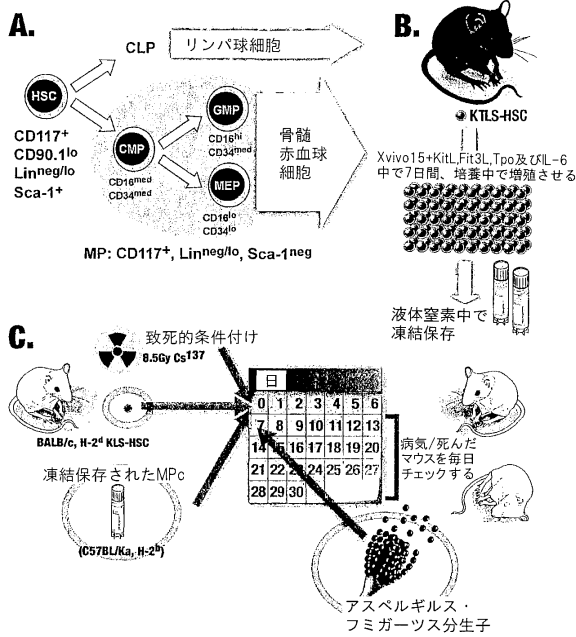


FIG._1

【図2A】

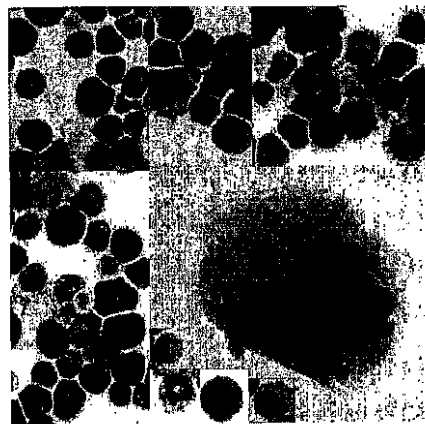


FIG._2A

【図2B】

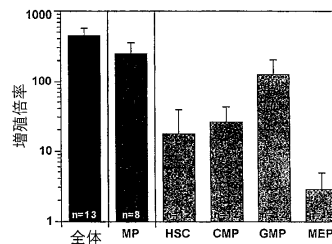


FIG._2B

【 図 3 】

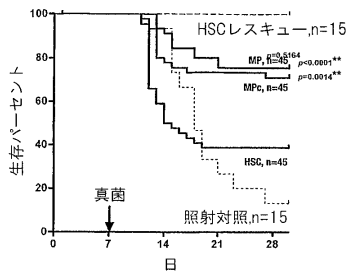


FIG._3

【 図 4 】

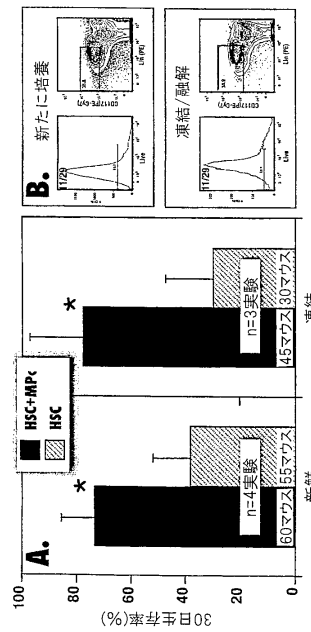


FIG._4

【 図 5 】

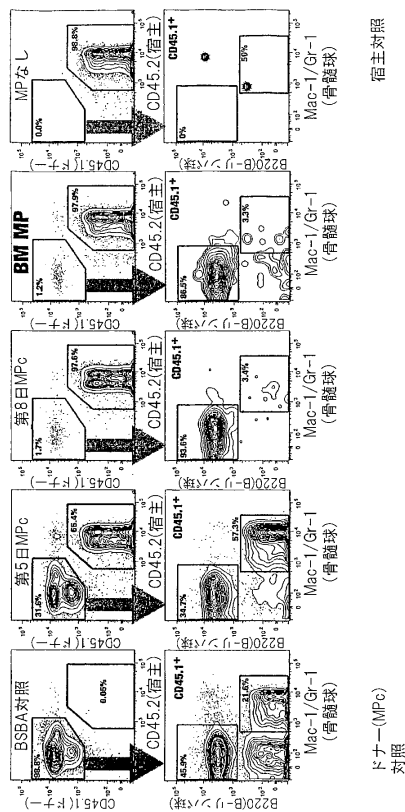
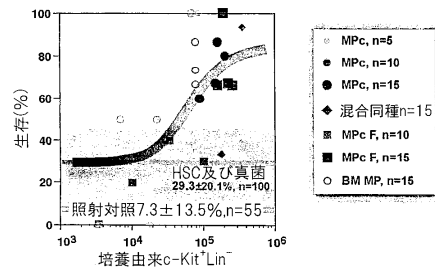


FIG._5

【 図 6 A 】



FIG_6A

【 図 6 B 】

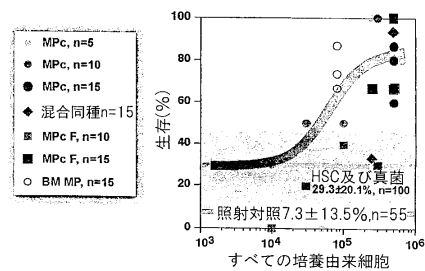
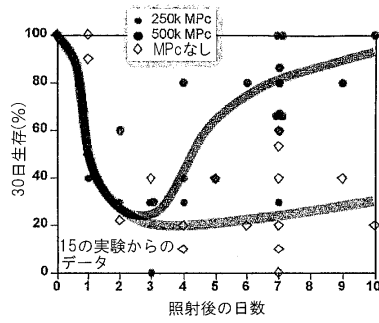


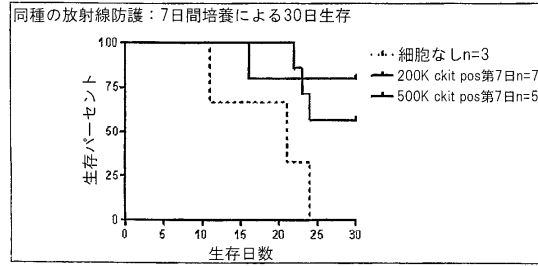
FIG._6B

【 図 7 】



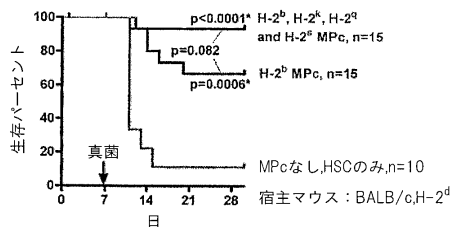
FIG_7

【 図 9 A 】



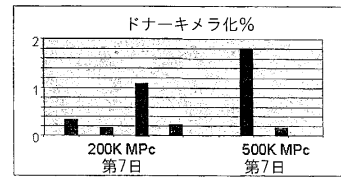
FIG_9A

【 図 8 】



FIG_8

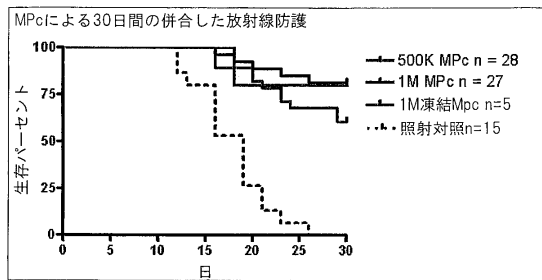
【 図 9 B 】



ドナー平均% (範囲)
 200K 0.46 (0.23-1.11%)
 500K 0.97 (0.16-1.78%)

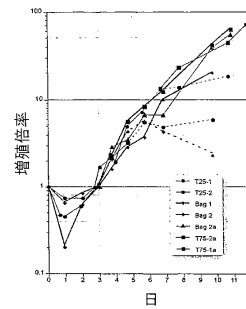
FIG_9B

【 図 10 】



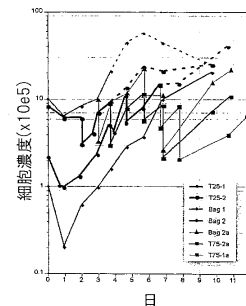
FIG_10

【 図 11 A 】



FIG_11A

【 図 11 B 】



FIG_11B

【 図 1 2 】

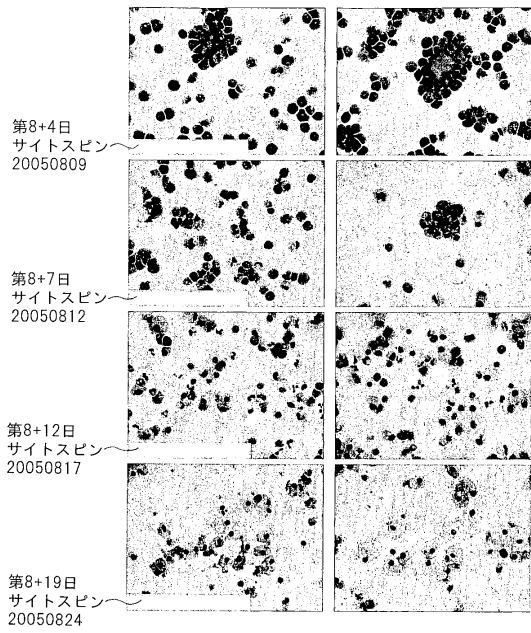


FIG._12

【 図 1 3 A 】

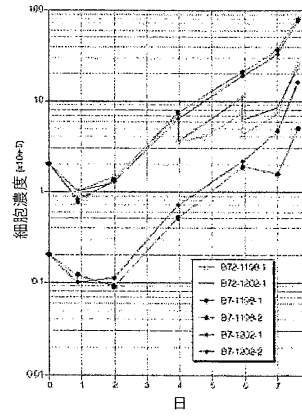


FIG._13A

【 図 1 3 B 】

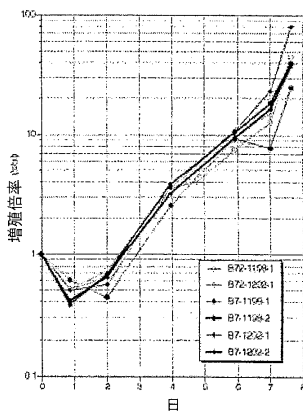


FIG._13B

【 図 1 4 A 】

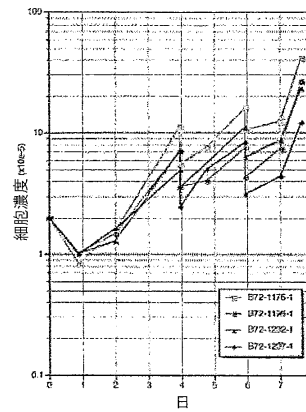


FIG._14A

【図14B】

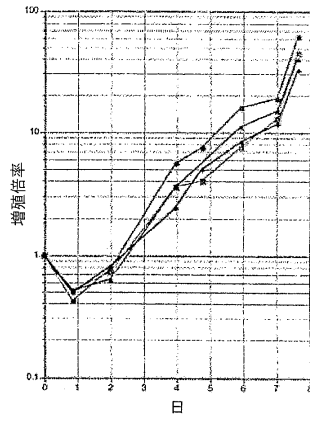


FIG. 14B

【図15A】

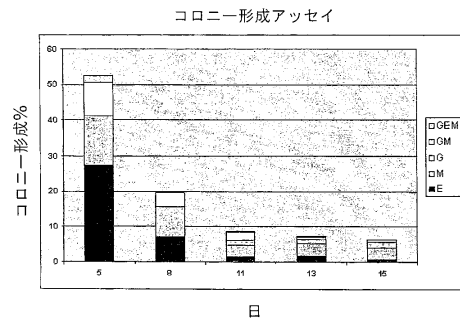


FIG. 15A

【図15B】

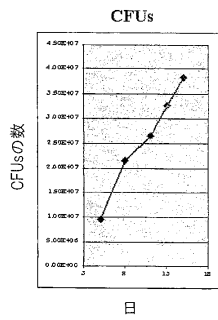


FIG. 15B

【図16】

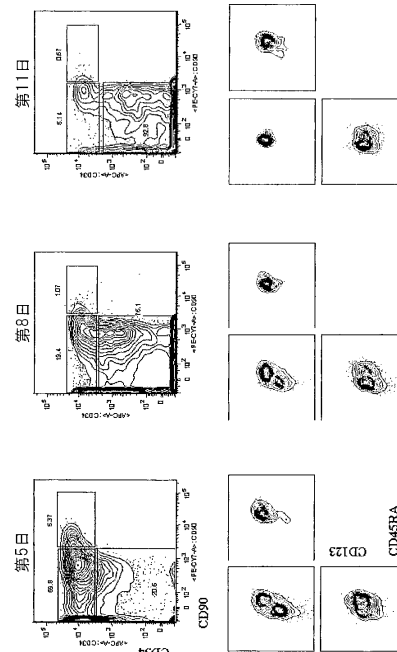
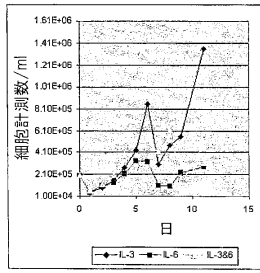


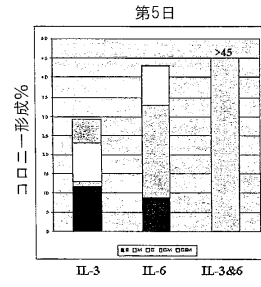
FIG. 16

【図 17 A】



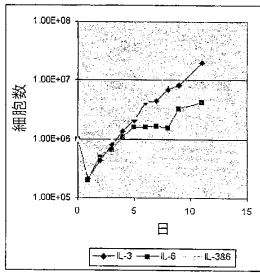
FIG_17 A

【図 18 A】



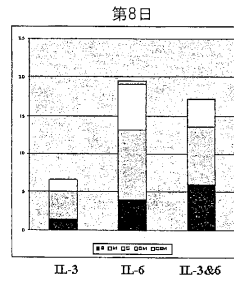
FIG_18A

【図 17 B】



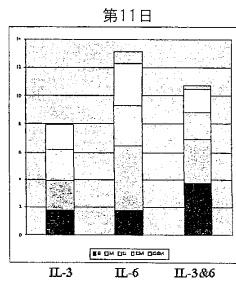
FIG_17 B

【図 18 B】



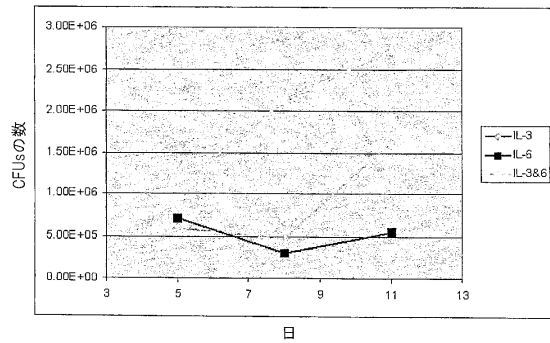
FIG_18B

【図 18 C】



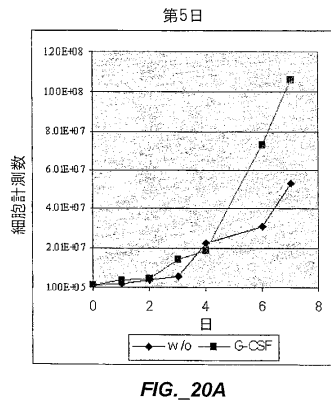
FIG_18C

【図 19】

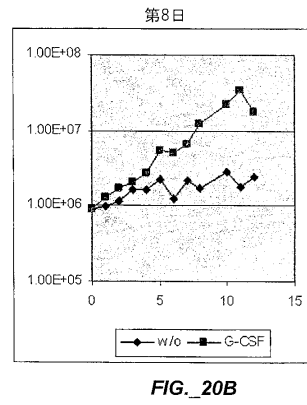


FIG_19

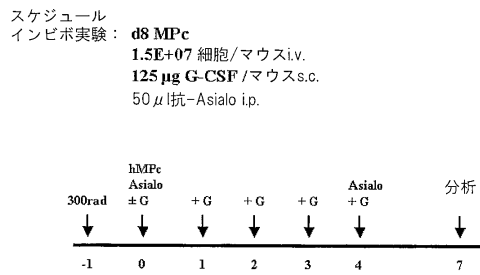
【 図 20 A 】



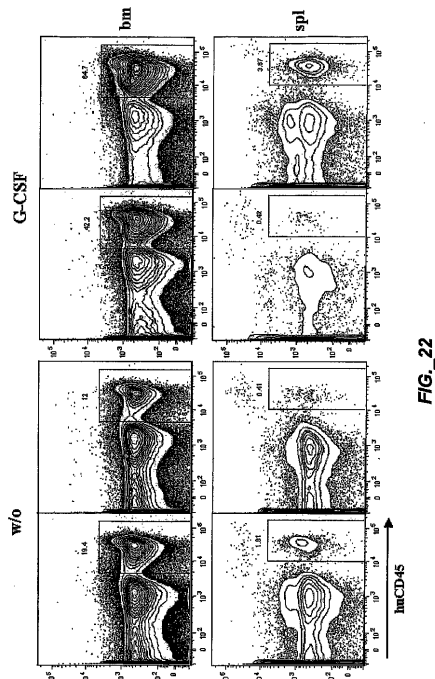
【 図 20 B 】



【 図 21 】



【 図 22 】



【 2 3 】

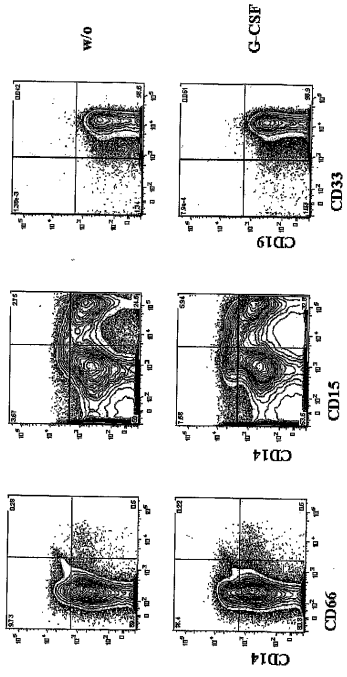


FIG. 23

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 35/18	(2006.01)	A 6 1 K 35/18
A 6 1 P 5/00	(2006.01)	A 6 1 P 5/00
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 7/04	(2006.01)	A 6 1 P 7/04
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/10	(2006.01)	A 6 1 P 31/10
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P 31/12

(74)代理人 100127085

弁理士 越阪部 倫子

(72)発明者 フォン, ティモシー シー .

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 5 6 , モラガ, サンドリンガム サウス ドライブ 1 7 0

(72)発明者 ドメン, アドリアヌス ヘールトルディス ウィルヘルムス

アメリカ合衆国, アリゾナ 8 5 7 1 6 , タクソン, イースト レスター ストリート 2 9 2 1

(72)発明者 クリステンセン, ジュリー リンネ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 0 0 6 , ボールダー クリーク, ローガン クリーク ロード 2 0 0

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献 国際公開第 0 1 / 0 0 0 0 1 9 (WO, A 1)

Kashiwakura I, et al., Basic fibroblast growth factor-stimulated ex vivo expansion of haematopoietic progenitor cells from human placental and umbilical cord blood, British Journal of Haematology, 2 0 0 3 年 8 月, Vol. 122, No. 3, p. 479-488

Jaroscak J, et al., Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastronReplicell System, Blood, 2 0 0 3 年 6 月 1 5 日, Vol. 101, No. 12, p. 5061-5067

Rappold I, et al., Functional and Phenotypic Characterization of Cord Blood and Bone Marrow Subsets Expressing FLT3 (CD135) Receptor Tyrosine Kinase, Blood, 1 9 9 7 年 7 月 1 日, Vol. 90, No. 1, p. 111-125

Reichle A, et al., Autologous tandem transplantation: almost complete reduction of neutropenic fever following the second transplantation by ex vivo expanded autologous myeloid postprogenitor cells, Bone Marrow Transplantation, 2 0 0 3 年 8 月, Vol. 32, No. 3, p. 299-305

Blair A, et al., Ex vivo expansion of megakaryocyte progenitor cells from normal bone marrow and peripheral blood and from patients with haematological malignancies, British Journal of Haematology, 2 0 0 2 年 3 月, Vol. 116, No. 4, p. 912-919

Drayer AL, et al., The in vitro effects of cytokines on expansion and migration of megakaryocyte progenitors, British Journal of Haematology, 2 0 0 0 年 6 月, Vol. 109, No. 4, p. 776-784

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 7 6

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 0 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)