

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6034406号
(P6034406)

(45) 発行日 平成28年11月30日(2016.11.30)

(24) 登録日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 35/407	(2015.01)	A 61 K 35/407
A 61 K 38/00	(2006.01)	A 61 K 37/02
A 61 K 31/5355	(2006.01)	A 61 K 31/5355
A 61 K 45/06	(2006.01)	A 61 K 45/06
A 61 P 7/02	(2006.01)	A 61 P 7/02

請求項の数 17 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-553633 (P2014-553633)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月15日 (2012.6.15)
 (65) 公表番号 特表2015-508054 (P2015-508054A)
 (43) 公表日 平成27年3月16日 (2015.3.16)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2012/061534
 (87) 國際公開番号 WO2013/110354
 (87) 國際公開日 平成25年8月1日 (2013.8.1)
 審査請求日 平成27年5月11日 (2015.5.11)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2012/051157
 (32) 優先日 平成24年1月25日 (2012.1.25)
 (33) 優先権主張国 歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 513186604
 ユニヴェルシテ カソリック ド ルーヴ
 アン
 UNIVERSITE CATHOLIQUE
 DE LOUVAIN
 ベルギー、ビー-1348 ルーヴアン-
 ラースーヴ、プラス ド リュニヴェルシ
 テ、1
 Place de l' Universi
 te, 1, B-1348 Louvain-la-Neuve, BELGIUM
 (74) 代理人 100065248
 弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞移植のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞懸濁液と、トロンビン阻害物質を含む水溶液とを含む組み合わせであって、
 (a) 前記細胞懸濁液が、ヒト成体肝臓由来前駆または幹細胞と、アンチトロンビン活性化物質でない少なくとも1つの直接的第Xa因子阻害物質とを含み、
 前記直接的第Xa因子阻害物質が、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシンからなる群から選択され、

(b) 前記水溶液が、ビバリルジンおよびヒルジンからなる群から選択される少なくとも1つのトロンビン阻害物質を含み、

(a) で規定される前記細胞懸濁液と、(b) で規定される前記水溶液とが、対象者への同時、別々または任意の順序での逐次的な投与のために構成される、

前記組み合わせ。

【請求項 2】

ヒト成体肝臓由来前駆もしくは幹細胞が、
 - アルファ平滑筋アクチン(ASMA)およびアルブミン(ALB)を発現し且つサイトケラチン-19(CK-19)を発現しないか、または、
 - 肝細胞マーカーを発現し且つ成熟肝臓細胞、インスリン生成細胞、骨原性細胞および上皮細胞に分化できる非卵形成体ヒト肝臓多能性前駆株化細胞、または、肝細胞マーカーを

10

20

発現し且つ成熟肝臓細胞、インスリン生成細胞、骨原性細胞および内皮細胞に分化できる非卵形成体ヒト肝臓多能性前駆株化細胞である

請求項1に記載の組み合わせ。

【請求項3】

前記細胞が、前記組み合わせにおいて $10^4/\text{ml} \sim 10^8/\text{ml}$ の濃度で存在する請求項1または2に記載の組み合わせ。

【請求項4】

前記細胞が、

- 初代細胞であるか、

- 株化細胞であるか、

- 貯蔵および/または増殖もしくは継代に供されたか、

- 1つ以上のタンパク質を発現するように誘導されているか、または

- 核酸で安定的または一過的に形質転換されている

請求項1～3のいずれか1項に記載の組み合わせ。

【請求項5】

(b)で規定される前記水溶液が、(a)で規定される前記細胞懸濁液とは別に保持され、かつ、(a)で規定される前記細胞懸濁液と同時または任意の順序で逐次的に対象者に投与されるよう構成される請求項1～4のいずれか1項に記載の組み合わせ。

【請求項6】

直接的第Xa因子阻害物質が、リバーコキサバンである請求項1～5のいずれか1項に記載の組み合わせ。

【請求項7】

トロンピン阻害物質が、ビバリルジンである請求項1～6のいずれか1項に記載の組み合わせ。

【請求項8】

免疫抑制剤をさらに含む請求項1～7のいずれか1項に記載の組み合わせ。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項10】

医薬品として用いるための請求項1～8のいずれか1項に記載の組み合わせまたは請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

細胞の移植において用いるため、または前記細胞の移植により引き起こされる血栓症もしくは血栓性合併症の処置もしくは予防において用いるため、または前記細胞の凝固促進活性のインビボでの阻害において用いるための、請求項1～8のいずれか1項に記載の組み合わせまたは請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項12】

直接的第Xa因子阻害物質が、約0.05 mg/kg～約10 mg/kgを含む細胞懸濁液により対象者に投与されるか又は約0.1 mg/kg～約5 mg/kgの静脈内投与により対象者に投与されるリバーコキサバンである請求項10または11に記載に用途のための組み合わせまたは医薬組成物。

【請求項13】

トロンピン阻害物質が、それぞれ細胞懸濁液の投与中に約0.50～約5.00 mg/kg体重で対象者に投与されるか又は細胞懸濁液の逐次的投与の間に約0.2～約0.6 mg/kg体重で対象者に投与されるビバリルジンである請求項10～12のいずれか1項に記載に記載の用途のための組み合わせまたは医薬組成物。

【請求項14】

ヒト成体肝臓由来前駆または幹細胞と、アンチトロンピン活性化物質でない少なくとも1つの直接的第Xa因子阻害物質と、少なくとも1つのトロンピン阻害物質とを含む細胞懸

10

20

30

40

50

濁液を提供することを含み、

- 前記直接的第Xa因子阻害物質が、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシンからなる群から選択され、且つ

- 前記少なくとも1つのトロンビン阻害物質が、ビバリルジンおよびヒルジンからなる群から選択される

前記細胞の凝固促進活性をインビトロで阻害する方法。

【請求項15】

請求項1～8のいずれか1項に記載の組み合わせと、場合によって1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む部品キットまたは製品。 10

【請求項16】

ヒト成体肝臓由来前駆または幹細胞の移植において用いるため、または前記細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症の処置もしくは予防において用いるため、またはインビボでの細胞の凝固促進活性の阻害において用いるための、アンチトロンビン活性化物質でない少なくとも1つの直接的第Xa因子阻害物質と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または前記組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物であって、

- 前記直接的第Xa因子阻害物質が、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシンからなる群から選択され、且つ 20

- 前記少なくとも1つのトロンビン阻害物質が、ビバリルジンおよびヒルジンからなる群から選択される

前記組み合わせまたは医薬組成物。

【請求項17】

請求項2～8のいずれか1項で規定される1以上の特徴をさらに含む請求項16に記載の使用のための組み合わせまたは医薬組成物。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全般的に組織再生、特に細胞移植の分野に関する。本発明は、細胞移植を改良するため、特に細胞移植に伴う凝固促進活性(procoagulant activity)を阻害するための組成物および方法に向けられる。

【背景技術】

【0002】

病気にかかったかまたは損傷を受けたかもしくは機能が損なわれた臓器により引き起こされる様々な状態は、臓器移植により処置できる。特に、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、腸および胸腺の移植は、妥当な成功率で日常的に行うことができる。臓器移植における主要な問題点は、しかし、いまだに、各レシピエント患者について適合するドナーを見出す必要性があることである。なぜなら、ドナーとレシピエントとの間の不適合性は、移植された臓器の拒絶をもたらし得るからである。移植片拒絶は、最も適当なドナー・レシピエントの一一致を決定するための血清型決定により、および免疫抑制薬の使用により低減することができるが、これらのアプローチは、いくらかの症例においては医療的緊急性によりあまり適切でないことがある。また、免疫抑制薬を生涯にわたって用いることは、副作用および服薬遵守の点でレシピエントに負担をもたらす。 40

【0003】

近年、様々な供給源の細胞を用いる細胞療法が、ヒトにおける再生医療のために用いられるようになっている。細胞の移植は、臓器移植にとって価値のある代替または追加(付属)療法をもたらし得る。さらに、全ての臓器が効率よく移植できるわけではないので、 50

細胞移植は、頻繁に、唯一の利用可能な治癒手段である。有利には、細胞移植において、適合性に関する合併症は、少なくとも理論的に、あまり問題ではなくなる可能性がある。例えば、移植される細胞は、時折、患者自身から単離または導くことができる(すなわち自家細胞移植)ので、拒絶の危険性が低減される。あるいは、同種異系または異種の移植細胞でさえ、容易に型決定して、細胞バンクまたはレジストリにおいて長期間貯蔵でき、ここから遺伝子的に一致するか少なくとも適合する細胞を、ほとんどのレシピエントについて得ることができる。

【0004】

患者への細胞の投与を企図する場合、患者と投与細胞との間の組織適合性を最大限にして、そのことにより患者の免疫系による投与細胞の拒絶(移植片対宿主拒絶)の機会を低減するように細胞または細胞培養物を選択することが好ましいことがある。例えば、有利には、細胞は、患者と同一のHLAハプロタイプ(1または好ましくは1より多いHLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-D、HLA-DR、HLA-DPおよびHLA-DQ；好ましくは1または好ましくは全てのHLA-A、HLA-BおよびHLA-C)を有するか、または患者にとって一般的なほとんどのHLA抗原対立遺伝子を有し、かつ患者が既に有する抗HLA抗体に対するHLA抗原をほとんど若しくは全く有していない細胞が典型的に選択できる。

10

【0005】

細胞移植による組織再生手順は、非常に多様な細胞供給源を用いて、一般的には増殖能を有する細胞を用いて行うことができる。例えば、様々なヒトの先天性代謝性疾患では、肝臓細胞移植が、少なくともいくらかの程度の代謝制御を回復できる。別の例では、膵島の門脈内移植は、1型糖尿病における血糖管理の改善およびインスリン非依存性をもたらす。例えば、非常に多くの細胞系統に分化できる多能性幹細胞、または1もしくはいくつかの細胞系統に拘束され(多分化能)、様々な程度の分化を示す前駆細胞を、細胞移植のための細胞供給源として用いることができる。

20

【0006】

いくらかの臨床上の成功にもかかわらず、現在の細胞移植療法は、さらなる改良を必要としている。臨床家および保健機関の間でのある懸念は、細胞の生着およびその他の合併症に対するあるいくらかの移植細胞の凝固促進活性の影響の可能性である。例えば、島細胞移植片の凝固促進活性は、移植片機能損失および門脈内血栓性事象を引き起こすと報告されている(BeuneuらDiabetes, 2004, 第53巻, 1407~11; MobergらLancet, 2002, 第360巻, 2039~45)。凝固促進活性は、単離初代肝細胞においても観察されている(StephennelらLiver Transpl., 2007, 第13巻, 599~606)。

30

【0007】

よって、当該技術において、細胞移植の成功および細胞生着能を改善し、特に細胞移植に伴う血栓形成促進性の合併症を低減するための緊急の必要性が持続的に存在する。

FurlaniらMicrovasc Res., 2009, 第77巻, 370~6は、SCIDマウスの精巣拳筋脈管構造への血管内投与の後のヒト間葉系幹細胞の動態について、生体内顕微鏡観察により研究した。著者らは、動脈内間葉系幹細胞注入が、細胞のサイズが比較的大きいために、遠位脈管構造における閉塞を導き得ることを提案した。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

網羅的なインビトロおよび臨床的評価を行って、本発明者らは、単離初代細胞、例えば肝細胞および島細胞について以前に報告された凝固促進活性が、幹細胞および前駆細胞、例えば間葉系幹細胞についても観察されることを学んだ。幹細胞および前駆細胞の凝固促進活性は、これらの細胞の移植について懸念となることがあり、特に望ましくない血流の変更、移植細胞損失、細胞生着能の低減および/または血栓性事象を引き起こすことがある。さらに、この凝固促進活性は、肝細胞移植についての従来の抗凝固剤である未分画ヘパリンによって制御できない。

【0009】

50

本発明者らは、よって、移植細胞の凝固促進活性を打ち消すための様式を探索し、凝固促進活性を有する細胞と第Xa因子阻害物質およびトロンビン阻害物質、好ましくは直接的第Xa因子阻害物質およびトロンビン阻害物質との併用または随伴投与が、有害な凝固促進効果を妨げるための特に効果的で安全な組み合わせを提供することを見出した。驚くべきことに、凝固促進活性を有する細胞と、第Xa因子阻害物質、好ましくは直接的第Xa因子阻害物質またはトロンビン阻害物質のいずれか単独との併用投与は、(直接的)第Xa因子阻害物質またはトロンビン阻害物質のそれぞれの生理的に許容できる濃度にて、血栓性事象を適切に妨げないが、第Xa因子阻害物質とトロンビン阻害物質、好ましくは直接的第Xa因子阻害物質とトロンビン阻害物質との組み合わせは、細胞療法により誘導される血栓症および血栓症に関連する合併症(例えば局所血栓症および局所炎症の誘導)を有利に妨げることができる。したがって、本発明者らは、移植細胞、特に幹細胞および前駆細胞の凝固促進活性を低減するために有用な、特に有利で、相乗的でさえある組み合わせ療法および臨床プロトコールを見出した。10

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって、ある態様は、凝固促進活性を有する細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせに関する。20

【0011】

別の態様は、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質と、成体肝臓前駆細胞、胰島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髄間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞および肝臓筋線維芽細胞を含むかまたはそれからなる群から選択され、より好ましくは、成体肝臓前駆細胞および肝臓筋線維芽細胞から選択される細胞とを含む組み合わせに関する。本明細書を通して用いる場合、胰島細胞は、アルファ細胞、ベータ細胞、デルタ細胞、PP細胞およびイプシロン細胞を包含し、特に好ましくは胰臓ベータ細胞のことをいうことがある。20

【0012】

当てはまる場合、上記の組み合わせは、細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質の別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成できる。さらに、上記の組み合わせにおける細胞、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)および/または少なくとも1つのトロンビン阻害物質は、混和してもよいか、または別々であってもよい。細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを組み合わせることを含む上記の組み合わせを生成する方法も開示される。30

【0013】

本明細書に記載されている細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせに言及する場合、または少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせに言及する場合、またはこのような組み合わせを含むかもしくは採用する任意の主題に言及する場合に本明細書をとおして意図するように、組み合わせの個別の構成成分は、対象者への別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成されるか、または別々、同時または任意の順序で逐次的に対象者に投与できる。一例では、細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質は全て、投与される細胞懸濁物に含まれてもよい。別の例では、細胞と少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)は、投与される細胞懸濁物に含まれるが、少なくとも1つのトロンビン阻害物質は、上記の細胞懸濁物とは別に保持され、上記の細胞懸濁物と同時または逐次的に対象者に投与してもよい。さらに別の例では、細胞と少なくとも1つのトロンビン阻害物質は、投与され4050

る細胞懸濁物に含まれるが、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)は、上記の細胞懸濁物とは別に保持され、上記の細胞懸濁物と同時または逐次的に対象者に投与してもよい。さらなる例では、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質はともに、細胞懸濁物とは別に保持され、上記の細胞懸濁物と同時または逐次的に、かつ互いに同時(単一組成物または別々の組成物で)または逐次的に対象者に投与してもよい。構成成分の投与が逐次的である場合、投与のタイミングは、構成成分の組み合わせによりもたらされる構成成分の所望の作用を可能にするように選択されることが理解される。例えば、細胞を含む組成物は、第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と同時、第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)の前、または第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)の後に投与してよい。細胞を含む組成物は、トロンビン阻害物質と同時、トロンビン阻害物質の前、またはトロンビン阻害物質の後に投与してもよい。さらなる例では、本明細書で教示する組成物の上記の構成成分のいずれも、画分で投与してもよい。例えば、第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)の画分および/またはトロンビン阻害物質の画分を、細胞(の画分)と同時、細胞(の画分)の前、または細胞(の画分)の後に投与してよい(この細胞組成物は、第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)および/またはトロンビン直接的阻害物質のさらなる画分を含むかまたは含まないことがある)。本明細書の以下において他の場所で記載する医薬組成物またはキットに対して、同様の考え方を必要な変更を加えて当てはめる。

【0014】

10

(a) 凝固促進活性を有する細胞、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質を含む組み合わせと、(b) 1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物がさらに開示される。

(a) 少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質と、成体肝臓前駆細胞、胰臓ベータ細胞のような胰島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髄間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞および肝臓筋線維芽細胞を含むかまたはそれからなる群から選択され、より好ましくは、成体肝臓前駆細胞および肝臓筋線維芽細胞から選択される細胞とを含む組み合わせと、(b) 1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物がさらに開示される。

医薬組成物は、細胞と、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質の別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成できる。上記の医薬組成物における細胞、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)および/または少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質は、混和してもよいか、または別々であってもよい。上記の異なる組み合わせを医薬組成物に対しても当てはめる。細胞と、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを、それぞれ別々にまたは混和して、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤と混和することを含む、上記の医薬組成物を生成する方法も開示される。

【0015】

30

凝固促進活性を有する細胞と、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせを含み、場合によって 1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む部品キットまたは製品(article of manufacture)も提供される。

少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質と、成体肝臓前駆細胞、胰臓ベータ細胞のような胰島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髄間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞および肝臓筋線維芽細胞を含むかまたはそれからなる群から選択され、より好ましくは、成体肝臓前駆細胞および肝臓筋線維芽細胞から選択される細胞とを含む組み合わせを含み、場合によって 1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む部品キットまたは製品も提供される。

部品キットまたは製品は、細胞と、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直

40

50

接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質の別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成できる。上記の部品キットまたは製品における細胞、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)および/または少なくとも1つのトロンビン阻害物質は、混和してもよいか、または別々であってもよく、特に、例えば別々の容器に含有されるように別々であってもよい。細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質と、場合によって1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを、部品キットまたは製品に含めることを含む、上記の部品キットまたは製品を生成する方法も開示される。本明細書に記載されている効能のいずれか1つおよびそのそれぞれにおいて用いるための部品キットまたは製品も開示される。

10

【0016】

以下の態様のいずれか1つおよびそのそれぞれがさらに開示される:

-医薬品として用いるための、凝固促進活性を有する細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ;

-医薬品として用いるための、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質と、成体肝臓前駆細胞、臍臓ベータ細胞のような臍島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髄間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞および肝臓筋線維芽細胞を含むかまたはそれからなる群から選択され、より好ましくは、成体肝臓前駆細胞および肝臓筋線維芽細胞から選択される細胞とを含む組み合わせ;

-本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植において用いるための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物;

20

【0017】

-本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植のための医薬品を製造するための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用;

-血栓症または血栓性合併症、特に本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症の処置において用いるための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物;

30

-血栓症または血栓性合併症、特に本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症の処置のための医薬品を製造するための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用;

-インピボでの本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の凝固促進活性の阻害において用いるための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物;

40

【0018】

-インピボでの本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の凝固促進活性の阻害のための医薬品を製造するための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用;

-インピトロでの本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有す

50

る細胞の凝固促進活性を阻害するための、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用；

-本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の凝固促進活性をインビトロで阻害するための方法であって、上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせを提供することを含む方法；

-本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞を、移植を必要とする対象者に移植する方法であって、上記の対象者に、治療または予防有効量の上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を投与することを含む方法；

【0019】

-処置を必要とする対象者における血栓症または血栓性合併症、特に本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症を処置する方法であって、上記の対象者に、治療または予防有効量の上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を投与することを含む方法；

-インビボで、阻害を必要とする対象者において、細胞、例えば本明細書に記載されている任意の細胞の凝固促進活性を阻害する方法であって、上記の対象者に、治療または予防有効量の上記の細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を投与することを含む方法。

【0020】

本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞と、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの、上記の効能のいずれか1つおよびそれそれにおける使用も提供される。

【0021】

さらなる態様は、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせに関する。当てはまる場合、上記の組み合わせは、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と少なくとも1つのトロンビン阻害物質の別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成できる。さらに、上記の組み合わせにおける少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と少なくとも1つのトロンビン阻害物質は、混和してもよいか、または別々であってもよい(上記のように)。少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と、少なくとも1つのトロンビン阻害物質とを組み合わせることを含む、上記の組み合わせを生成する方法も開示される。

【0022】

少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)、少なくとも1つのトロンビン阻害物質を含む組み合わせと、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物がさらに開示される。医薬組成物は、少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)と少なくとも1つのトロンビン阻害物質の別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成できる(上記のように)。上記の医薬組成物における少なくとも1つの第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)

10

20

30

40

50

と少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質は、混和してもよいか、または別々であってもよい。少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを、それぞれ別々にまたは混和して、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤と混和することを含む、上記の医薬組成物を生成する方法も開示される。

【 0 0 2 3 】

少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせを含み、場合によって 1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤をさらに含む部品キットまたは製品も提供される。部品キットまたは製品は、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質の別々、同時または任意の順序での逐次的な投与のために構成できる。上記の部品キットまたは製品における少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質は、混和してもよいか、または別々であってもよく、特に、例えば別々の容器に含有されるように別々であってもよい。少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質と、場合によって 1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを、部品キットまたは製品に含めることを含む、上記の部品キットまたは製品を生成する方法も開示される。本明細書に記載されている効能のいずれか 1 つおよびそのそれをおいて用いるための部品キットまたは製品も開示される。

【 0 0 2 4 】

次の態様のいずれか 1 つおよびそのそれをおいて用いるための部品キットまたは製品も開示される :

- 医薬品として用いるための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ ;
 - 凝固促進活性を有する細胞の移植において用いるための(すなわち細胞移植とともに)、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物 ;
 - 成体肝臓前駆細胞、臍臓ベータ細胞のような臍島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髓間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞および肝臓筋線維芽細胞を含むかまたはそれからなる群から選択され、より好ましくは、成体肝臓前駆細胞および肝臓筋線維芽細胞から選択される細胞の移植において用いるための(すなわち細胞移植とともに)、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物 ;

【 0 0 2 5 】

- 本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植のための医薬品を製造するための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用 ;

- 血栓症または血栓性合併症、特に本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症の処置において用いるための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物 ;

- 血栓症または血栓性合併症、特に本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症の処置のための医薬品を製造するための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用 ;

【 0 0 2 6 】

10

20

30

40

50

- インピボでの細胞、例えば本明細書に記載されている任意の細胞の凝固促進活性の阻害において用いるための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物；

- インピボでの細胞、例えば本明細書に記載されている任意の細胞の凝固促進活性の阻害のための医薬品を製造するための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用。

- インピトロでの細胞、例えば本明細書に記載されている任意の細胞の凝固促進活性を阻害するための、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの使用；

- 本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の凝固促進活性をインピトロで阻害するための方法であって、上記の細胞に、少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせを接触させることを含む方法；

【 0027 】

- 処置を必要とする対象者における血栓症または血栓性合併症、特に本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の移植により引き起こされる血栓症または血栓性合併症を処置する方法であって、上記の対象者に、治療または予防有効量の少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を投与することを含む方法；

- インピボで、阻害を必要とする対象者において、細胞の凝固促進活性を阻害する方法であって、上記の対象者に、治療または予防有効量の少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせ、または上記の組み合わせと、1 つ以上の医薬的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物を投与することを含む方法。

【 0028 】

好ましくは、上記の方法のいずれかは、(a) 少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)を含有する水溶液中に、本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の細胞懸濁物を含む組成物を調製するステップと、(b) 少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質を含有する(すなわち、組成物(a)とは異なるかまたは別の)水溶液を調製するステップと、(c) (a) で規定される組成物と、(b) で規定される溶液とを、同時、別々または逐次的に対象者に投与するステップとを含み得る。よって、上記の態様において好ましくは、(a) 少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)を含有する水溶液中に、本明細書に記載されている任意の細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞の細胞懸濁物を含む組成物が調製され、(b) 少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質を含有する(すなわち、組成物(a)とは異なるかまたは別の)水溶液が調製され、(c) (a) で規定される組成物と、(b) で規定される溶液とが、同時、別々または逐次的に対象者に投与される。

【 0029 】

少なくとも 1 つの第 Xa 因子阻害物質(好ましくは直接的第 Xa 因子阻害物質)と、少なくとも 1 つのトロンビン阻害物質とを含む組み合わせの、上記の効能のいずれか 1 つおよびそれぞれにおける使用も提供される。

【 0030 】

例えば全身、局部、臓器または組織内(例えば肝門脈、脾臓、脾臓、肝臓、腎臓被膜、腹膜および網膜囊(omental pouch))で、組成物を対象者に投与するための外科的器具またはデバイスを含み、本明細書に記載されている細胞、例えば特に本明細書で教示する凝固促進性細胞を含む組み合わせまたは医薬組成物をさらに含む機構(arrangement)であって、上記の組み合わせまたは医薬組成物の、例えば全身、局部、臓器または組織内での投与

10

20

30

40

50

のために適合されている機構も提供される。例えば、適切な外科的器具は、本明細書で教示する組み合わせまたは医薬組成物を含む液体組成物を、例えば全身、局部、臓器または組織内で注入することができる。

【0031】

本明細書をとおして意図する凝固促進活性を有する細胞は、凝固カスケードを活性化でき、凝固または血餅形成を誘導できる任意の細胞を包含する。凝固促進活性は、任意の既知の凝固試験、例えば限定することなく、トロンボエラストメトリー(thromboelastometry)を用いて簡便に決定できる。

例えば、標準的トロンボエラストメトリー試験において、細胞が、細胞を添加しない陰性対照よりも有意により短い(統計的有意性の適切な検定を当てはめて $p < 0.05$)凝固時間(CT)を示す場合に、細胞は、本発明の意味において凝固促進活性を有することができる。トロンボエラストメトリーは標準的実験室技術であるが、さらなる手引きのために、本明細書で意図する細胞の凝固促進性の性質を試験するための適切なトロンボエラストメトリーは、以下のとおりであり得る。

【0032】

測定は、ROTEM(登録商標)デルタ分析器(Pentapharm, Munich, Germany)で行ってよい。ROTEM(登録商標)は、血餅形成および血餅溶解の動態および特質をリアルタイムで評価する。凝固時間(CT)は、分析の開始から、血餅形成の開始まで、2 mmの振幅に達するまでの時間と定義される。短い休止期間の後に、300 μ lの全血を、37 $^{\circ}$ Cに予め温めたカップにピペットを用いて入れる。懸濁細胞(5 \times 10^{exp}5)を、その後、全血に加える(陰性対照:いずれの懸濁細胞も含まない等容量の懸濁媒体)。Owrenバッファー(例えばClin-Tech Ltd, UKから得ることができるもの)中で希釈した、組織因子(TF)を最終希釈 1:17000/0.35 μ Mで含有する20 μ lのトリガー試薬(例えばイノビン、Siemens, Marburg, Germany)を、細胞-血液混合物に加え、その後、20 μ lの0.2M CaCl₂を加える。カルシウムを加えた後に、測定を自動的に開始する。1800秒後に凝固が観察されないならば、トロンボエラストメトリーを停止する。

【0033】

本明細書で意図するように、本明細書で意図する細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞は、任意の起源のものおよび/または任意の分化状態のものであってよい。好ましくは、本明細書で意図する細胞、例えば凝固促進活性を有する細胞は、幹細胞および前駆細胞からなる群から選択される。より好ましくは、本明細書で意図する細胞、例えば凝固促進活性を有する細胞は、間葉系幹細胞である。これもまた好ましくは、本明細書で意図する細胞、例えば凝固促進活性を有する細胞は、成体肝臓由来前駆または幹細胞である。

【0034】

ある実施形態において、本明細書で意図する細胞、例えば凝固促進活性を有する細胞は、WO 2007/071339に全般的に記載される成体由来ヒト肝臓幹細胞、より具体的には、該文献に記載されるように、アルファ平滑筋アクチン(ASMA)およびアルブミン(ALB)を発現し、サイトケラチン-19 (CK-19)を発現しない成体肝臓を起源とするヒト前駆または幹細胞、さらにより具体的には、該文献に記載されるように、CD90、CD73、CD44、ビメンチン、ASMAおよびALBを発現し、CYP3A4を場合によって発現し、CK-19を発現しない成体肝臓を起源とするヒト前駆または幹細胞、さらにより具体的には、Najimiら、Cell Transplant, 2007, 第16巻, 717~28に記載される成体由来ヒト肝臓幹細胞 (ADHLSC)、さらにより具体的には、WO 2007/071339の出願人により2006年2月20日にブダペスト条約の下でBelgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMBP)に受託番号LMBP 6452CBの下で寄託された細胞である。

【0035】

ある実施形態において、本明細書で意図する細胞、例えば凝固促進活性を有する細胞は、WO 2006/126236に全般的に記載される非卵形成体ヒト肝臓由来多能性前駆細胞、より具体的には、該文献に記載されるように、肝細胞マーカーを発現し、成熟肝臓細胞、インスリン生成細胞、骨原性細胞および上皮細胞に分化できる成体組織から単離された非卵形ヒ

10

20

30

40

50

ト肝臓多能性前駆株化細胞、またはこれもまた具体的に、肝細胞マーカーを発現し、成熟肝臓細胞、インスリン生成細胞、骨原性細胞および内皮細胞に分化できる成体組織から単離された非卵形ヒト肝臓多能性前駆株化細胞、さらにより具体的には、HerreraらStem Cells, 2006, 第24巻, 2840~50に記載されるヒト肝臓幹細胞(HLSC)である。

【0036】

いずれの理論と結び付けられることも望まないが、凝固促進活性を有する細胞による組織因子(血小板組織因子、第III因子、トロンボキナーゼまたはCD142としても知られる)の発現は、上記の細胞の凝固促進活性の少なくとも部分的な原因因子であると考えられる(例えばBeuneuら2004, Mobergら2002およびStephennelら2007、既出を参照されたい)。したがって、ある実施形態において、凝固促進活性を有する細胞は、組織因子を発現する。好ましくは、凝固促進活性を有する細胞は、組織因子を構成的に発現する。

10

【0037】

本発明者らは、本発明で用いる特に好ましい凝固促進性細胞が、細胞による組織因子(TF)の発現とは独立して、凝固促進活性成分を含み得ることをさらに見出した。より具体的には、このような凝固促進性細胞は、トロンボエラストメトリーにより第VII因子欠損血漿において測定するか、またはトロンボエラストメトリーにより例えば細胞を抗TF抗体と予備インキュベートすることによりTF活性をブロックした場合の血液または正常血漿において測定すると、それらの凝固促進活性を少なくとも部分的に(例えば部分的にだけまたは全体的に)保持する。理論と結び付けられることを望まないが、第VII因子欠損血漿における細胞の測定可能な凝固促進活性は、残存する少量の第VII因子とも部分的に関連することがある。

20

【0038】

理論と結び付けられることを望まないが、本発明者らは、第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)とトロンビン阻害物質とをともに含む本発明に従う組成物が、第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)とトロンビン阻害物質との組織因子発現に対する相乗作用、および/または第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)とトロンビン阻害物質のそれぞれにより異なって、かつおそらく独立して調節される作用により、凝固促進性細胞に対する本願において請求する効果を少なくとも部分的に担うと仮定する。

【0039】

30

本明細書をとおして意図する第Xa因子阻害物質は、第Xa因子が媒介するプロトロンビンからトロンビンへの変換を直接的または間接的に阻害または妨げることができる物質である。

特に好ましくは、本明細書を通して開示する組み合わせ、組成物、キット、方法および使用のような態様および実施形態において、第Xa因子阻害物質は、「アンチトロンビン活性化物質以外の第Xa因子阻害物質」または「アンチトロンビン活性化物質でない第Xa因子阻害物質」ということがある。

本明細書を通して開示する組み合わせ、組成物、キット、方法および使用のような態様および実施形態は、直接的第Xa因子阻害物質を特に有利に採用する。本明細書をとおして意図する直接的第Xa因子阻害物質は、第Xa因子と直接結合でき、プロトロンビンからトロンビンへの変換を阻害または妨げることができる物質である。

40

直接的第Xa因子阻害物質の使用は、間接的第Xa因子阻害剤が複数の標的を有し、そのことによりその使用がオフターゲットの効果をもたらす可能性がある点で、間接的第Xa因子阻害剤の使用と比較して利点を提供できる。

ある実施形態において、直接的第Xa因子阻害物質は、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシンからなる群から選択され、好ましくは、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466からなる群から選択され、最も好ましくは、リバーロキサバンから選

50

択される。

本明細書を通して開示する組み合わせ、組成物、キット、方法および使用のような他の態様および実施形態は、間接的第Xa因子阻害剤を採用することがある。間接的第Xa因子阻害剤は、例えば、第X因子から第Xa因子への変換を阻害するか、またはそうでなければ第Xa因子と直接結合することなく第Xa因子を阻害する物質を含む。

【0040】

本明細書を通して意図するトロンビン阻害物質は、トロンビンと直接結合でき、トロンビンが媒介するフィブリノゲン活性化を阻害または妨げることができる物質である。

ある実施形態において、トロンビン阻害物質は、ビバリルジン、ヒルジン、レピルジン、デシリジン、アルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトランおよびダビガトランからなる群から選択され、好ましくはビバリルジンおよびヒルジンからなる群から選択され、さらにより好ましくはビバリルジンから選択される。有利には、ビバリルジンは、約35～約40分の比較的短い半減期を有するので、対象者が正常な止血状態に迅速に戻ることを可能にする。

【0041】

本発明の上記のおよび追加の態様、好ましい実施形態および特徴は、以下の項および添付の特許請求の範囲に記載される。本明細書に記載されているそれぞれの態様、実施形態または特徴は、そうでないことが明確に記載されない限り、任意のその他の態様、実施形態または特徴と組み合わせることができる。特に、本明細書に記載されている任意の特徴、特に、好ましいかまたは有利であると示す任意の特徴は、本明細書に記載されている任意のその他の特徴、特に好ましいかまたは有利であると示す任意のその他の特徴と組み合わせることができる。添付の特許請求の範囲の主題は、本明細書に具体的に組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】(A)組織因子(ExTem 20 μl)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁した細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。カルシウム再添加がなければ、凝固は誘導されない。肝細胞(白)、hALPC(黒)、対照(アルブミン)(灰色)。肝細胞 対 hALPC p<0.001; 肝細胞 対 対照 p<0.001; hALPC 対 対照 p<0.01; hALPC 対 肝細胞 対 対照: Kruskal-Wallis検定*** p<0.001。(B)組織因子(ExTem 20 μl)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁した細胞の存在下または非存在下でインキュベートした血液から得られた血漿(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。肝細胞(白)、hALPC(黒)、対照(アルブミン)(灰色)。肝細胞 対 hALPC p<0.05; 肝細胞 対 対照 p<0.01; hALPC 対 対照 p<0.01; hALPC 対 肝細胞 対 対照: Kruskal-Wallis検定*** p<0.001。血液および血漿における細胞(肝細胞およびhALPC)の凝固促進活性(PCA)は、イノビン(Innovin)を加えなかった場合に同等である。

【図2】組織因子(ExTem 20 μl)を加えずにカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁した細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。カルシウム再添加がなければ、凝固は誘導されない。肝細胞(白)、hALPC(黒)。

【図3】組織因子(ExTem 20 μl)を加えてカルシウム再添加した後の、hALPC培養物の上清の存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。カルシウム再添加がなければ、凝固は誘導されない。

【図4】組織因子(ExTem 20 μl)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁したhALPC、肝細胞、皮膚線維芽細胞、骨髄間葉系幹細胞(BMMSC)、骨髄造血幹細胞(BMHSC)、肝臓筋線維芽細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。線維芽細胞 対 対照 p<0.01; BMMSC 対 対照 p<0.01; 肝臓筋線維芽細胞 対 対照 p<0.01。

【図5】組織因子(ExTem 20 μl)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5% 50

に懸濁した細胞の存在下での第VII、V、XおよびII凝固因子欠損血漿(7d PI、5d PI、10d PI、2d PI) (300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。NI pl (正常血漿) 対 7d PI p<0.01; 7d PI 対 対照 p<0.01; NI PI 対 5d PI p<0.01; NI PI 対 10d PI p<0.001; NI PI 対 2d PI p<0.001。

【図6-1】(A)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%とヘパリン(Hepar)に懸濁したhALPCの存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。対照的に、エノキサパリン(Eno)またはフォンダパリヌクス(Fond)を、アルブミンに懸濁した細胞と接触している血液に即座に加えた。hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、hALPCとの比較。fは、対照との比較。(B)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁したhALPCの存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。ビバリルジン(Biva)またはヒルジン(Hir)を、血液に即座に加えた。hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、hALPCとの比較。fは、対照との比較。

【図6-2】(C)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%とヘパリン(Hepar)に懸濁した肝細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。対照的に、エノキサパリン(Eno)またはフォンダパリヌクス(Fond)を、アルブミンに懸濁した細胞と接触している血液に即座に加えた。肝細胞(白)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、肝細胞との比較。fは、対照との比較。(D)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁した肝細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。ビバリルジン(Biva)またはヒルジン(Hir)を、血液に即座に加えた。肝細胞(白)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、肝細胞との比較。fは、対照との比較。

【図6-3】(E)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%とヘパリン(Hepar)または血液に即座に加えたエノキサパリン(Eno)もしくはフォンダパリヌクス(Fond)に懸濁したhALPCの存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。抗凝固薬の組み合わせは、ビバリルジン(Biva)を血液に即座に加えた場合に得られた。hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、hALPCとの比較。fは、対照との比較。\$は、ビバリルジンとの比較。(F)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%とヘパリン(Hepar)または血液に即座に加えたエノキサパリン(Eno)もしくはフォンダパリヌクス(Fond)に懸濁した肝細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。抗凝固薬の組み合わせは、ビバリルジン(Biva)を血液に即座に加えた場合に得られた。肝細胞(白)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、肝細胞との比較。fは、対照との比較。\$は、ビバリルジンとの比較。

【図6-4】(G)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヘパリン(Hepar)を含むかまたは含まないヒトアルブミン5%に懸濁したhALPCの存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。エノキサパリン(Eno)またはフォンダパリヌクス(Fond)は、ヘパリンhALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)に懸濁したかまたはしていない細胞を含む血液に即座に加えた。対照 対 hALP C Hepar + Eno, p<0.01; 対照 対 hALPC Hepar + Fond, p<0.01。(H)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヘパリン(10 UI/ml) (Hepar)を含むかまたは含まないヒトアルブミン5%に懸濁したhALPC、肝細胞、皮膚線維芽細胞、骨髄間葉系幹細胞(BMMSC)、骨髄造血幹細胞(BMHSC)、肝臓筋線維芽細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。線維芽細胞Hepar 対 対照 n.s.; 肝臓筋線維芽細胞Hepar 対 対照 p<0.01。

【図6-5】(I)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヘパリン(10 UI/ml) (Hepar)を含むかまたは含まないヒトアルブミン5%に懸濁した肝臓筋線維芽細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイし

10

20

30

40

50

た凝固時間(CT)。抗凝固剤の組み合わせは、ヘパリンに懸濁した細胞と接觸している血液にビバリルジン(Biva)を即座に加えた場合に得られた。

【図7】組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%とリバーコキサバンに懸濁したヒト成体肝臓前駆細胞(hALPC)の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。抗凝固薬の組み合わせは、ビバリルジン(Biva)を血液に即座に加えた場合に得られた。hALPC(黒)、対照(アルブミン) (灰色)。*は、hALPCとの比較。fは、対照との比較。\$は、ビバリルジンとの比較。

【図8】カバーガラス上に置き、パラホルムアルデヒドにより固定したhALPC (A)に対し10 TFについての免疫蛍光を行った(倍率20×)。核は、DAPI (青色染色)により明らかにした。(B)陰性対照(1次抗体なし)。

【図9】慣習的なRT-PCRにより評価した、hALPCおよび肝細胞における組織因子および組織因子経路阻害物質(TFPI) mRNA発現。組織因子(TF)、選択的スプライシング組織因子(as TF)、組織因子経路阻害物質(TFPI)、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH) (技術対照)。

【図10】リアルタイム-PCRにより評価した、hALPCおよび肝細胞の組織因子mRNA (TFおよびas-TF)およびTFPI発現。hALPC細胞および肝細胞のうちのTF遺伝子(A)、選択的スプライシング形as-TF (B)およびTFPI遺伝子(C)のmRNAの半定量的発現。CAPAN-2細胞およびHUVECは、それぞれTF、asTFおよびTFPIの陽性対照である。

【図11】組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、細胞とTF抗体とのインキュベーション(TF+)またはインキュベーションなし(TF-)の後のヒトアルブミン5%に懸濁した細胞の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。肝細胞(白)、hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。hALPC TF- 対 hALPC TF+ p < 0.01; 肝細胞TF- 対 肝細胞TF+ p < 0.01; hALPC TF+ 対 対照 p < 0.001; 肝細胞 対 対照 有意性なし。

【図12】血液中のヘパリン(Hepar) (10 UI/ml、50 UI/mlおよび100 UI/ml)を補うかまたは補っていないアルブミンに懸濁した細胞の30分間のインキュベーションの後に、抗Xa活性(UI/ml)を、血液遠心分離の後に得られた血漿中で測定した。hALPC (黒)、肝細胞(He p) (白)、対照(灰色)。

【図13】(A)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、いくつかの濃度(Hepar-10UI/ml、Hepar 5x-50UI/ml、Hepar10x-100UI/ml)のヘパリン(Hepar)を含むかもしくは含まないヒトアルブミン5%に懸濁したhALPC (黒)の存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。対照(アルブミン) (灰色)。対照対 hALPC Hepar 5x p < 0.01。(B)組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、通常濃度もしくは通常濃度の5倍のフォンダパリヌクス(Fond)、エノキサパリン(Eno)を含むかまたは含まないヒトアルブミン5%に懸濁したhALPC (黒)の存在下あるいは非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。対照(アルブミン) (灰色)。対照 対 hALPC Fond 5x、p < 0.01; 対照 対 hALPC Eno 5x、p < 0.01; Fond 対 Fond 5x、n.s.; Eno 対 Eno 5x、n.s.

【図14】組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁したhALPCの存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。増加させた濃度のヒルジン(Hir) (2 × (Hir 2x)または5 × (Hir 5x))を血液に即座に加えた。hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。対照 対 hALPC Hir 2x、p < 0.01; hALPC 対 hALPC Hir 2x、p < 0.01; hALPC Hir 対 hALPCs Hir 2x、n.s.。

【図15】組織因子(ExTem 20 μL)を加えてカルシウム再添加した後の、ヒトアルブミン5%に懸濁したhALPCの存在下または非存在下でのクエン酸塩添加全血(300 μl)のROTEMによりアッセイした凝固時間(CT)。増加させた濃度のビバリルジン(Biva) (2 × (Biva 2x))を血液に即座に加えた。hALPC (黒)、対照(アルブミン) (灰色)。対照 対 hALPC Biva 2x、p < 0.01。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0043】

本明細書で用いる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明確にそうでないことを示さない限り、単数および複数の両方の言及を含む。

用語「含む(comprising)」、「含む(comprises)」および「含まれる(comprised of)」は、本明細書で用いる場合、「含む(including)」、「含む.includes)」または「含有する(containing)」、「含有する(contains)」と同義であり、包括的または拡張可能であり、追加の言及していないメンバー、要素または方法ステップを排除しない。この用語は、「からなる(consisting of)」および「から本質的になる(consisting essentially of)」も包含する。

10

【0044】

終点による数値範囲の言及は、それぞれの範囲内の包摂される全ての数および画分とともに、言及する終点を含む。

用語「1つ以上」、例えばメンバーの群のうちの1つ以上のメンバーは、それ自体明確であるが、さらなる例示のために、この用語は、なかでも、上記のメンバーのいずれか1つ、または上記のメンバーのいずれか2つ以上、例えば上記のメンバーのいずれか3、4、5、6もしくは7などおよび上記のメンバー全てまでについての言及を包含する。

測定可能な値、例えばパラメータ、量、時間などに言及する場合に本明細書で用いる用語「約」は、特定した値およびそこからの変動、特に特定した値およびそこからの+/-10%以下、好ましくは+/-5%以下、より好ましくは+/-1%以下、さらにより好ましくは+/-0.1%以下の変動(そのような変動が本発明において行われることが適当である限り)を包含することを意味する。修飾語「約」が言及する値自体も、具体的にそして好ましくは開示されることが理解される。

20

【0045】

本明細書で引用する全ての文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

そうでないと明記しない限り、技術的および科学的用語を含む本発明の開示において用いる全ての用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解される意味を有する。さらなる手引きのために、用語の定義を、本発明の教示をよりよく認識するために含める。

30

【0046】

本明細書に記載されている組み合わせ、組成物、キット、方法および使用における好ましい細胞は、成体肝臓前駆細胞、臍臓ベータ細胞のような臍島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髄間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞または肝臓筋線維芽細胞、より好ましくは成体肝臓前駆細胞または肝臓筋線維芽細胞、最も好ましくは成体肝臓前駆細胞である。

本明細書で用いる場合、用語「凝固促進活性を有する細胞」は、凝固力スケードを活性化し、凝固もしくは血餅形成を誘導できるかまたはそのような性質を有する細胞を包含する。

【0047】

本発明で意図する凝固促進活性を有する細胞は、任意の段階にて凝固力スケードを誘因でき、それにより最終的にフィブリノゲンが、架橋されて血餅になるフィブリンに変換される。例えばそして限定することなく、凝固促進活性を有する細胞は、組織因子を発現でき、その発現は、第X因子から第Xa因子への活性化を誘因し、これが次に、プロトロンビンからトロンビンへの切断を介して、フィブリンへのトロンビン媒介フィブリノゲン変換を介する血餅形成を導く。用語「凝固促進活性を有する細胞」は、「凝固促進性細胞」と交換可能に用いることができる。用語「凝固促進活性」は、「血栓形成促進活性」と交換可能に用いることができる。細胞の凝固促進活性は、特定の細胞の特徴、例えばそして限定することなく、特異的マーカー、例えば組織因子の発現の存在(または非存在)により決定でき、細胞の凝固促進活性は、例えばそして限定することなくトロンボエラストメトリーのような技術により等しく決定できる。簡単に述べると、トロンボエラストメトリーは

40

50

、血液(または拡張により、凝固カスケードの成分を含有する任意の試料、例えば血漿)における止血試験のための確立された粘弾性法であり、これにより試料中の弾性変化を血餅形成と相関させる。例えばそして限定することなく、トロンボエラストメトリー測定は、ROTEM(登録商標)デルタ分析器(Pentapharm, Munich, Germany)で行うことができる。あるいは、凝固促進活性は、Johanssonら(Diabetes, 2005, 54:1755~1762)に記載される配管ループ法(tubing loop method)により測定できる。凝固促進活性は、例えば、特異的サイトカインプロフィールからも明らかであり、それにより決定することもできる(例えばvan der Polら Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. Semin Thromb Hemost. 2001, 27:639~51で概説されている)。

【0048】

10

本発明で意図する凝固促進活性を有する細胞は、その移植のために特に適切であるかまたはそのために構成されてよい。細胞は、同種異系細胞(すなわち細胞が移植される対象者と同じ種の異なる個体から単離された)であってよいか、または代わりに自家細胞(すなわち細胞が移植される対象者と同じ対象者から単離された)であってよいか、または異種細胞(すなわち細胞が移植される対象者と異なる種の対象者から単離された)でさえあってよい。凝固促進性細胞は、初代細胞であってよいか、または代わりにインビトロでの操作に供された細胞であってよい。本明細書で用いる場合、用語「インビトロでの操作」は、体外での細胞の任意の種類の操作のことをいう。そのような操作の例は、限定することなく、細胞における効果を誘出する薬物もしくはその他の化合物の投与；特定の細胞構成成分の枯渇；遺伝子操作；遺伝子治療；安定的もしくは一過的トランスフェクション、(偽)ウイルス感染または形質転換；分化；脱分化；サブクローニングなどである。細胞の起源に關係なく、細胞は、移植の前に貯蔵(例えば凍結保存)および/または増殖もしくは継代に供することができるが明確である。細胞は、1つ以上の特異的タンパク質(細胞にとって自己ものであるか、すなわち自家であるか否かに関わらず)を発現するか、またはその発現を増加もしくは減少させる(または完全もしくは実質的に完全に遮断する)ように誘導してよい。インビトロでの操作の代わりに、移植される細胞は、ドナーからの単離前に操作に供することができる(例えば薬物処置、遺伝子治療など)。凝固促進活性を有する細胞は、株化細胞であってよい。

20

【0049】

30

ある実施形態において、本明細書で意図する凝固促進性細胞は、非造血(幹)細胞であってよい。なぜなら、上記の細胞は、凝固促進活性を示さない傾向があるからである。

細胞によりもたらされる機能を回復または改良するために細胞を移植することの他に、非限定的な例において、移植するために作製する細胞は、限定することなく、がん細胞(例えば動物モデルにおけるがんの研究のため)、細胞ベースのワクチンまたは免疫寛容剤(immunotolerance agents)などを含み得る。

【0050】

40

所望により、細胞に、対象者に導入する前に、興味対象の核酸を安定的または一過的に形質転換できる。興味対象の核酸配列は、それらに限定されないが、上記の細胞の成長、分化および/または機能を増強する遺伝子生成物をコードするものを含む。例えばそして限定することなく、肝臓細胞により通常発現されるタンパク質の発現系を、安定的または一過的な様式で、そのように形質転換された(好ましくは肝臓)細胞を用いるそのようなタンパク質の発現により利益を受ける疾患または状態、例えば肝臓代謝の先天性障害を処置する目的のために導入できる。細胞形質転換の方法は、当業者に知られている。

【0051】

本明細書で意図する細胞、例えば特に本明細書で意図する凝固促進性細胞は、特にヒトまたは非ヒト哺乳類もしくは靈長類起源の細胞を含む、好ましくは動物起源、より好ましくは温血動物、さらにより好ましくは脊椎動物、さらにより好ましくは哺乳動物、さらにより好ましくは靈長類起源のものであってよい。好ましい細胞、例えば凝固促進性細胞は、ヒト起源のものである。用語「哺乳類」は、本明細書をとおして用いる場合、それらに限定されないが、ヒト、家庭および農業の動物、動物園の動物、競技用動物、ペットの動

50

物、コンパニオン動物ならびに実験動物、例えばマウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ウシ(cattle)、ウシ(cows)、ヒツジ、ウマ、ブタならびに霊長類、例えば尻尾のあるサル(monkey)および尻尾のないサル(apes)を含むそのように分類される任意の動物を含む。

【0052】

本明細書で意図する細胞、特に本明細書で意図する凝固促進性細胞は、限定することなく、前駆細胞、幹細胞または部分的もしくは完全に分化した細胞、例えば終末分化細胞(すなわち有糸分裂後であり得る完全に専門化された細胞)を包含し得る。

好ましくは、本明細書で意図するように、細胞、例えば凝固促進性細胞、特に前駆または幹細胞は、成体起源のもの(例えば成体前駆または幹細胞)、すなわち胎仔段階またはより好ましくは生誕後(分娩後)の生物に存在するかまたはそれから得られる(例えばそこから取り出されるかまたは単離される)ものであってよい。

10

【0053】

例えばそして限定することなく、本明細書で意図する細胞の成体起源、例えば成体肝臓前駆細胞は、新生仔組織から、または任意のその後の発達段階の組織、例えばなかでもヒトの発達において幼児、小児、若年者、青年または成人と通常称する段階の組織からの起源のことをいうことができる。例えば、ヒト細胞(例えばヒト成体肝臓前駆細胞)について、成体起源は、好ましくは正期での生誕後の任意の時間での組織(例えば肝臓組織)からの起源のことをいいうことができ、例えば生誕後少なくとも1ヶ月齢、例えば生誕後少なくとも2ヶ月齢、少なくとも3ヶ月齢、例えば少なくとも4ヶ月齢、少なくとも5ヶ月齢、例えば少なくとも6ヶ月齢、例えば生誕後1年齢以上、5年齢以上、少なくとも10年齢以上、15年齢以上、20年齢以上または25年齢以上であってよい。

20

【0054】

用語「前駆体」または「前駆細胞」は、同義であり、全般的に、適当な条件下で、少なくとも1つより専門化された細胞型、例えばなかでも比較的より専門化された前駆細胞または最終的には終末分化細胞を生じることができる、専門化されていないかもしくは専門化の程度が比較的低い増殖能のある細胞のことをいう。前駆細胞は、例えば、前駆細胞が、細胞分裂を受ける前に分化して別の比較的より専門化された細胞になる場合に、または上記の他の細胞が、該前駆細胞の1回以上の細胞分裂および/もしくは分化の後に生成されるならば、上記の別の細胞を「生じる」ことができる。

30

【0055】

用語「幹細胞」は、全般的に、自己再生できる、すなわち適当な条件下で分化することなく増殖できる前駆細胞のことをいう。この用語は、実質的に無限の自己再生ができる、すなわち幹細胞の子孫の一部が、専門化されていないかまたは母幹細胞の専門化の程度が比較的低い表現型、分化能、および増殖能を保持する幹細胞、ならびに有限の自己再生を示す、すなわちさらなる増殖および/または分化についての幹細胞の子孫の能力が、母細胞と比較して明白に低減している幹細胞を包含する。

【0056】

前駆または幹細胞は、本明細書で意図する場合、多能性(すなわち、標準的な当該技術において受け入れられた試験、例えばなかでもSCIDマウスにおいて奇形腫を形成する能力、または組織培養において3つ全ての胚葉の同定可能な細胞を形成する能力により、適当な条件下で3つ全ての胚葉、すなわち内胚葉、中胚葉および外胚葉の誘導物である異なる細胞型の子孫を生成できる)、多分化能(すなわち、適当な条件下で生物の2以上の異なる臓器もしくは組織のそれぞれから少なくとも3つの細胞型の子孫を生成できる(上記の細胞型は、同じかまたは異なる胚葉を起源とし得る)が、生物の全ての細胞型を生じることができない)であり得るか、または1つだけもしくはいくつか(例えば1、2または3)の細胞系統に拘束され得る。

40

【0057】

原型の哺乳動物多能性幹細胞(mPS)は、任意の種類の哺乳動物胚性組織、例えば胚性、胎生または胎生前(pre-foetal)組織に由来してもよい。mPS細胞の定義に含まれるものは

50

、限定することなく、例えばEvansおよびKaufman 1981 (Nature 292: 154~6)ならびにMartin 1981 (PNAS 78: 7634~8)により記載されるマウス胚性幹細胞; 例えばIannacconeら 1994 (Dev Biol 163: 288~292)により記載されるラット多能性幹細胞; 例えばDoetschmanら 1988 (Dev Biol 127: 224~227)により記載されるハムスター胚性幹細胞; 例えばGravesら 1993 (Mol Reprod Dev 36: 424~433)により記載されるウサギ胚性幹細胞; 例えばNotarianniら 1991 (J Reprod Fertil Suppl 43: 255~60)およびWheeler 1994 (Reprod Fertil Dev 6: 563~8)により記載されるブタ多能性幹細胞; 例えばNotarianniら 1991 (既出)により記載されるヒツジ胚性幹細胞; 例えばRoachら 2006 (Methods Enzymol 418: 21~37)に記載されるウシ胚性幹細胞; 例えばThomsonら 1998 (Science 282: 1145~1147)に記載されるヒト胚性幹(hES)細胞; 例えばShambrookら 1998 (PNAS 95: 13726)に記載されるヒト胚性生殖(hEG)細胞; その他の靈長類からの胚性幹細胞、例えば、例えばThomsonら 1995 (PNAS 92: 7844~7848)に記載されるアカゲザル幹細胞または例えばThomsonら 1996 (Biol Reprod 55: 254~259)に記載されるマーモセット幹細胞により例示される、様々な型の胚性幹細胞である。10

【0058】

述べたように、原型「ヒトES細胞」は、Thomsonら 1998 (既出)により、および米国特許第6,200,806号に記載されている。この用語の範囲は、胚盤胞期のヒト胚に由来するか、または3つの胚葉への細胞の実質的な分化前の多能性幹細胞をカバーする。ES細胞、特にhES細胞は、胚盤胞の内部細胞塊または胚盤胞全体に典型的に由来する。桑実胚期からのhES株化細胞の誘導は、文書化されており、そのようにして得られたES細胞も本発明において用いることができる(Strelchenkoら 2004. Reproductive BioMedicine Online 9: 623~629)。述べたように、原型「ヒトEG細胞」は、Shambrookら 1998 (既出)により記載されている。このような細胞は、例えば、胎仔からの始原生殖細胞を含有する生殖隆起および腸間膜に由来してよい。ヒトにおいて、胎仔は、典型的に、受精後5~11週であってよい。20

【0059】

明示的にそうでないことが要求される場合以外は、用語mPS細胞は、それぞれの細胞の表現型の特徴を有する初代組織細胞および樹立系統、ならびに3つの胚葉のそれぞれの子孫を生成する能力をまだ有する、そのような初代細胞または株化細胞の誘導物を含み得る。

例示的であるが限定しないヒトES細胞の樹立系統は、NIHヒト胚性幹細胞レジストリ(<http://stemcells.nih.gov/research/registry>)に列挙される系統、およびその亜系統、例えばBresagen Inc. (Athens, GA)からの系統hESBGN-01、hESBGN-02、hESBGN-03およびhESBGN-04、Cellartis AB (Goteborg, Sweden)からの系統Sahlgrenska 1およびSahlgrenska 2、ES Cell International (Singapore)からの系統HES-1、HES-2、HES-3、HES-4、HES-5およびHES-6、MizMedi Hospital (Seoul, Korea)からの系統Miz-hES1、Technion - Israel Institute of Technology (Haifa, Israel)からの系統I 3、I 3.2、I 3.3、I 4、I 6、I 6.2、J 3およびJ 3.2、University of California (San Francisco, CA)からの系統HSF-1およびHSF-6、Wisconsin Alumni Research Foundation / WiCell Research Institute (Madison, WI)の系統H1、H7、H9、H13、H14、Cell & Gene Therapy Research Institute / Pochon CHA University College of Medicine (Seoul, Korea)からの系統CHA-hES-1およびCHA-hES-2、Geron Corporation (Menlo Park, CA)からの系統H1、H7、H9、H13、H14、H9.1およびH9.2、Goteborg University (Goteborg, Sweden)からの系統Sahlgrenska 4~Sahlgrenska 19、Maria Biotech Co. Ltd. (Seoul, Korea)からの系統MB01、MB02、MB03、National Centre for Biological Sciences (Bangalore, India)からの系統FCNCBS1、FCNCBS2およびFCNCBS3、ならびにReliance Life Sciences (Mumbai, India)からの系統RLS ES 05、RLS ES 07、RLS ES 10、RLS ES 13、RLS ES 15、RLS ES 20およびRLS ES 21を含む。その他の例示的な樹立hES株化細胞は、UK幹細胞バンク(<http://www.ukstemcellbank.org.uk/>)に寄託されたものおよびその亜系統、例えばKing's College London (London, UK)からの系統WT3およびUniversity of Newcastle (Newcastle, UK)からの系統hES-NCL1 (Strojkovicら 2004. Stem Cells 22: 790~7)を含む。さらなる例示的なES株化細胞は、304050

Cellartis AB (Goteborg, Sweden)からの系統FC018、AS034、AS034.1、AS038、SA111、SA121、SA142、SA167、SA181、SA191、SA196、SA203およびSA204ならびにその亜系統を含む。

【 0 0 6 0 】

用語「哺乳動物多能性幹細胞」には、さらに、なかでもYamanakaら2006 (Cell 126: 663 ~ 676)、Yamanakaら2007 (Cell 131: 861 ~ 872) およびLinら2009 (Nature Methods 6: 805 ~ 808) で教示される誘導性多能性幹(iPS)細胞の使用を含む、非多能性哺乳動物細胞、例えば体細胞性、特に成体体細胞性哺乳動物細胞の操作、なかでも遺伝的ならびに/または成長因子および/もしくは小分子により媒介される操作により得ることができるmPS細胞を含む。

10

【 0 0 6 1 】

本明細書で意図する好ましい細胞、例えば本明細書で意図する凝固促進性細胞は、間葉系幹細胞を含み得る。用語「間葉系幹細胞」または「MSC」は、本明細書で用いる場合、間葉系統の細胞、典型的には3以上の間葉系統、例えば骨細胞(骨)、軟骨細胞(軟骨)、筋細胞(筋肉)、腱細胞(腱)、線維芽細胞(結合組織)、脂肪細胞(脂肪)、間質原性(stromogenic) (骨髄基質)系統の細胞を生じることができる成体中胚葉由来幹細胞のことをいう。一般的に、しかし限定されないが、細胞が、標準的な当該技術において受け入れられた分化条件および細胞表現型評価方法、例えばPittengerら1999 (Science 284: 143 ~ 7) またはBarberiら (PLoS Med 2: e161, 2005) に記載されるものを用いて、脂肪細胞、軟骨細胞および骨細胞系統のそれぞれの細胞を形成できるならば、細胞は、MSCとみなすことができる。MSC細胞は、例えば骨髄、血液、臍帯、胎盤、胎生卵黄嚢、真皮、特に胎生および青年期皮膚(Youngら2001. Anat Rec 264: 51 ~ 62)、骨膜および脂肪組織(Zukら2001. Tissue Eng 7: 211 ~ 28) から単離してよい。ヒトMSC、それらの単離、インビトロ増殖および分化は、例えばPittengerら1999 (既出)、米国特許第5,486,359号;米国特許第5,811,094号;米国特許第5,736,396号;米国特許第5,837,539号;または米国特許第5,827,740号に記載されている。

20

【 0 0 6 2 】

この用語は、骨髄から得られるMSC(これは、一般的に「骨髄間葉系幹細胞」、「骨髄間質細胞」または「BMSC」とよばれる)も包含する。BMSCの単離のための骨髄の試料は、例えば腸骨稜、大腿骨、脛骨、脊椎、肋骨またはその他の髄様空間から得ることができる。好ましい実施形態では、本発明で用いるMSCまたはMSC集団は、骨髄を起源としてもよく、例えば骨髄試料から単離して場合によって増殖させてよい。骨髄を起源とするMSCおよびMSC集団は、他の組織を起源とするMSCとは異なりかつ/またはそれより好ましい特徴(例えばマーカープロフィール、機能、増殖、分化など)を有することができ、例えば限定することなく、より効率的および/またはより管理が容易に、ある細胞系統に分化できる。用語MSCおよびBMSCは、MSCまたはBMSCの子孫、例えば対象者の生体試料から得られるMSCまたはBMSCのインビトロまたはエクスピボ増殖により得られる子孫も包含する。

30

【 0 0 6 3 】

本明細書で意図するその他の細胞、例えば本明細書で意図する凝固促進性細胞は、限定することなく、筋肉組織(例えば衛星細胞)、内分泌組織(例えば脾臓、生殖腺、副腎、松果体、脳下垂体、甲状腺および副甲状腺)、神経組織(例えばニューロンのまたは膠組織)、血液および免疫系組織、上皮、肝臓、骨、軟骨、脂肪または内皮組織を含む組織から得られるかまたはそれに由来する(例えばそこから取り出されるかまたは単離される)成体前駆または幹細胞を含むことができる。

40

本明細書に記載されている特に好ましい細胞、例えば特に凝固促進活性を有する細胞は、成体肝臓由来前駆または幹細胞、より具体的には、発明の概要の項で詳述したような細胞である。

【 0 0 6 4 】

本明細書で用いる場合、成体肝臓由来前駆もしくは幹細胞、または成体肝臓前駆細胞または同様のものは、全般的に、前駆または幹細胞の特徴を有し、1つ以上の肝臓細胞型に

50

向かって分化できる、例えば少なくとも肝分化できるかもしくは肝分化だけができる(すなわち肝細胞または肝細胞様細胞に向かって分化する)肝臓起源の細胞のことをいうことができる。

【0065】

本明細書で意図する細胞、例えば部分的もしくは完全分化または成熟の凝固促進性細胞、例えば終末分化細胞(すなわち有糸分裂後であり得る完全に専門化された細胞)は、限定することなく、筋肉細胞(例えば心筋細胞、筋細胞、筋管、筋芽細胞、血管平滑筋細胞)、臍臓内分泌細胞(例えばベータ細胞、アルファ細胞、デルタ細胞、PP生成細胞またはイブシロン細胞)、神経細胞(例えばニューロン、膠細胞、例えば星状膠細胞、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞)、血液および免疫系の細胞(例えばBまたはTリンパ球、樹状細胞、顆粒球、マクロファージなど)、上皮細胞(例えばケラチノサイト、メラニン細胞、腎臓細胞、肺細胞)、肝臓の細胞(例えば肝細胞、卵形細胞)、骨の細胞(骨芽細胞、骨細胞、象牙芽細胞)、軟骨細胞、脂肪細胞、内皮細胞(例えば血管平滑筋細胞)を含み得る。融合細胞、例えば細胞ハイブリッドも意図する。

【0066】

本明細書に記載する特に好ましい細胞、例えば、特に凝固促進活性を有する細胞は、ランゲルハンス島細胞、特に臍臓ベータ細胞、例えば成体臍臓ベータ細胞または島細胞である。これらの細胞は、個別化した細胞(すなわち互いに完全にまたは実質的に完全に離されている)として移植できるが、完全なランゲルハンス島またはランゲルハンス島の画分を本発明に従う組成物において用いて、本明細書に記載されているようにして移植してよいことも構想される。

【0067】

本明細書で用いる場合、「直接的Xa阻害物質」と交換可能に用いられ、「キサバン」ともよばれる用語「直接的第Xa因子阻害物質」は、凝固カスケードにおいて第Xa因子に対して直接作用し、そのことによりプロトロンビンからトロンビンへの第Xa因子が媒介する変換を妨げる。本記載をとおして本明細書において意図する直接的第Xa因子阻害物質は、よって、例えばアンチトロンビン、例えばアンチトロンビン活性化物質(例えばヘパリン)により媒介される作用を有する阻害物質のような直接的第Xa因子阻害物質とは異なる。直接的第Xa因子阻害物質は、第Xa因子の触媒活性に、その基質プロトロンビン(すなわち第II因子)について、例えば第Xa因子の活性部位と結合することにより(または触媒部位の不活性化をもたらす立体変化を生じるような他の場所と結合する)干渉するか、あるいは代わりに(またはさらに)、第Xa因子とその基質プロトロンとのドッキングまたは相互作用に干渉でき、例えば第Va因子との会合および/またはプロトロンビナーゼ複合体の組み立てを妨げる、例えば競合阻害物質であってよい。抗第Xa因子活性は、当該技術において知られる適当なアッセイ、例えば適切な色素産生アッセイによりアッセイできる。好ましくは、本明細書をとおして本明細書において意図するように、直接的第Xa因子阻害物質は、第Xa因子と直接結合する。あるいくつかの実施形態では、第Xa因子阻害物質は、遊離の第Xa因子、プロトロンビナーゼと結合した第Xa因子(すなわちプロトロンビナーゼ複合体中で第Va因子と会合した第Xa因子)、および/またはフィブリンと結合した第Xa因子(すなわち、フィブリンと結合した第Xa因子および/またはプロトロンビナーゼ複合体)を阻害する。

【0068】

好ましくは、本明細書で意図する第Xa因子阻害物質、特に直接的第Xa因子阻害物質は、その他の凝固経路酵素および/または因子に対する作用(例えば結合または阻害)がないかまたは実質的ないという点において、第Xa因子の特異的阻害物質である。それらの結合パートナーであるトロンビンについて本明細書で意図するように(直接的)トロンビン阻害物質の結合および/または活性に関して、同じ考え方を必要な変更を加えて当てはめる。例えば、直接的第Xa因子阻害物質による別の凝固酵素および/または因子との結合またはその阻害は、第Xa因子との結合またはその阻害のそれぞれ少なくとも5倍、好ましくは少なくとも10倍、より好ましくは少なくとも50倍、さらにより好ましくは少なくとも100倍、さらにより好ましくは少なくとも1000倍、またはさらには少なくとも10,000倍低いこと

10

20

30

40

50

が好ましいことがある。結合は、例えば、適切な実験背景において平衡会合(K_a)または解離(K_d)または阻害(K_i)定数を決定することにより評価できる。好ましくは、第Xa因子についての第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)の K_i は、100 nM未満、より好ましくは50 nM未満、さらにより好ましくは20 nM未満、さらにより好ましくは10 nM未満、さらにより好ましくは5 nM未満、さらにより好ましくは2 nM未満、最も好ましくは1 nM未満、例えば0.9、0.8、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2または0.1 nM未満である。(直接的)トロンビン阻害物質の、それらの結合パートナーであるトロンビンに対する結合および/または阻害に関して、同様の考え方を必要な変更を加えて当てはめる。阻害は、適切な第Xa因子活性アッセイにより評価できる。本明細書で意図する第Xa因子阻害物質は、限定することなく、可逆的阻害物質および不可逆的阻害物質を含むことができる。本明細書で意図する第Xa因子阻害物質は、限定することなく、合成阻害物質、半合成阻害物質および自然に存在する阻害物質を含むことができる。10

【0069】

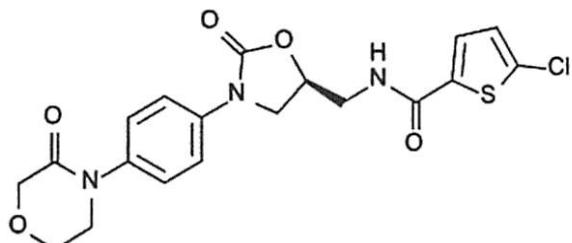
あるいくつかの実施形態では、本明細書で用いる直接的第Xa因子阻害物質は、リバーオキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9 065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシンからなる群から選択される。好ましくは、本明細書で用いる直接的第Xa因子阻害物質は、リバーオキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバンおよびYM466からなる群から選択される。最も好ましくは、本明細書で用いる直接的第Xa因子阻害物質は、リバーオキサバン(例えばXarelto(登録商標))である。さらなる実施形態では、直接的第Xa因子阻害物質は、Candiaら(2009), Expert Opin Ther Patents, 19(11):1 535 ~ 1580に列挙されるもの、例えば構造式1 ~ 160を有するこの参考文献における化合物のいずれかから選択される。本明細書に記載する任意の化合物の医薬的に許容できる塩も含まれることに注意されたい。20

【0070】

式(S)-5-クロロ-N-[[2-オキソ-3-[4-(3-オキソモルホリン-4-イル)フェニル]オキサゾリジン-5-イル]メチル]チオフェン-2-カルボキサミドを有するリバーオキサバン (BAY 59-7939; CAS No. 366789-02-8)は、例えばBayerにより商品名Xarelto(登録商標)の下で販売されている。30

リバーオキサバンの構造式を、以下に示す：

【化1】

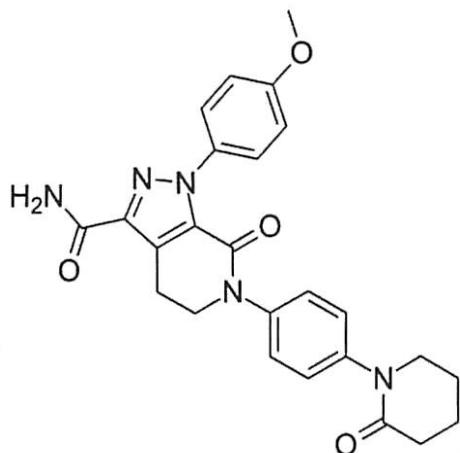


【0071】

式1-(4-メトキシフェニル)-7-オキソ-6-[4-(2-オキソピペリジン-1-イル)フェニル]-4,5-ジヒドロピラゾロ[5,4-c]ピリジン-3-カルボキサミドを有するアピキサバン (BMS-562247-01; CAS No 503612-47-3)は、例えばBristol-Myers Squibbにより商品名Eliquis(登録商標)の下で販売されている。40

アピキサバンの構造式を、以下に示す：

【化2】



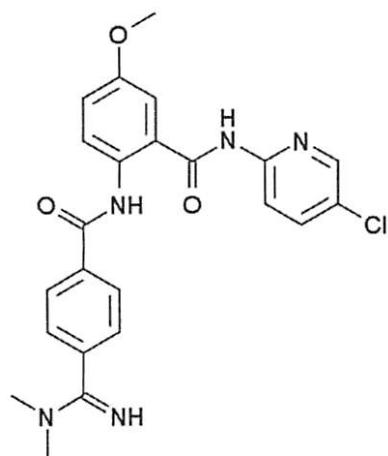
10

【0072】

式N-(5-クロロピリジン-2-イル)-2-([4-(N,N-ジメチルカルバミドイル)ベンゾイル]アミノ)-5-メトキシベンズアミドを有するベトリキサバン (PRT-054,021; CAS No. 330942-05-7)は、Portola Pharmaceuticalsにより開発された。

ベトリキサバンの構造式を、以下に示す：

【化3】



20

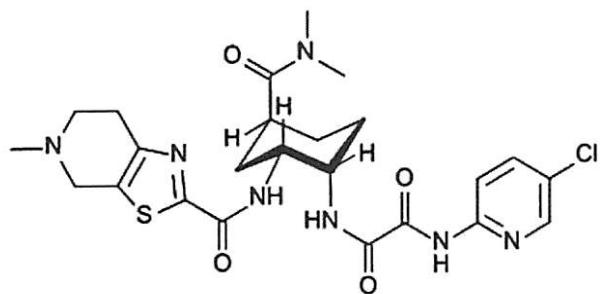
30

【0073】

N'-(5-クロロピリジン-2-イル)-N-[(1S,2R,4S)-4-(ジメチルカルバモイル)-2-[(5-メチル-6,7-ジヒドロ-4H-[1,3]チアゾロ[5,4-c]ピリジン-2-カルボニル)アミノ]シクロヘキシル]オキサミドを有するエドキサバン (DU-176b; CAS No. 912273-65-5)は、Daiichi Sankyoにより開発され、例えば商品名Lixiana(登録商標)の下で販売されている。

エドキサバンの構造式を、以下に示す：

【化4】



40

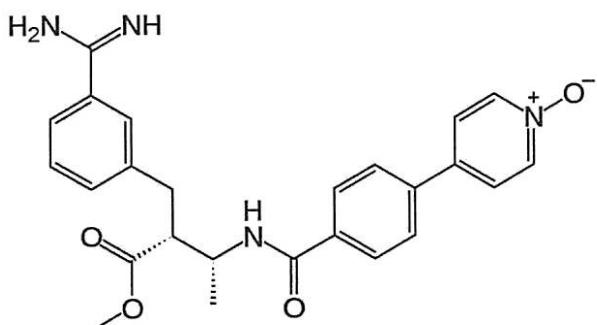
50

【0074】

式(2R,3R)-2-[3-[アミノ(イミノ)メチル]ベンジル]-3-[[4-(1-オキシドピリジン-4-イル)ベンゾイル]アミノ]ブタノエートを有するオタミキサバン (XRP0673A; CAS No. 193153-04-7)は、Sanofi-Aventisにより開発され、例えば商品名Preluent(登録商標)の下で販売されている。

オタミキサバンの構造式を、以下に示す：

【化5】



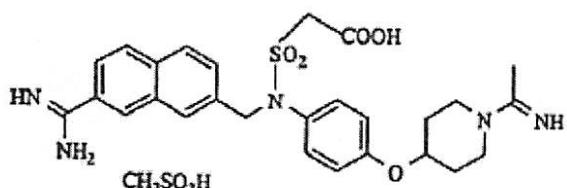
10

【0075】

式[N-[4-[(1-アセトイミドイル-4-ピペリジル)オキシ]フェニル]-N-[(7-アミジノ-2-ナフチル)メチル]スルファモイル]酢酸 メシレートを有するYM466 (YM-60828の異なる形の塩； CAS No. 179755-65-8)は、Yamanouchi Pharmaceuticalにより開発された。YM-60828も直接的第Xa因子阻害物質であり、以下の構造を有するYM466の二塩酸塩である。

YM466の構造式を、以下に示す：

【化6】



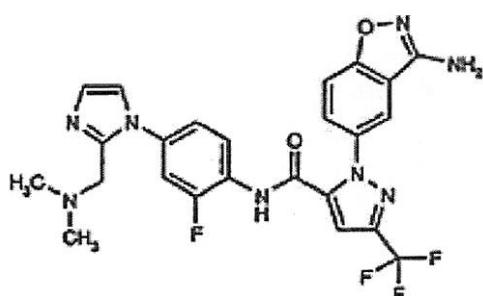
20

30

【0076】

ラザキサバン (DPC 906; CAS No. 218298-21-6; BMSにより開発)は、以下の式を有する：

【化7】

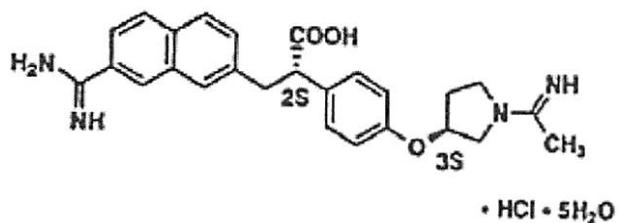


40

【0077】

DX9065a (CAS No. 155204-81-2; Daiichi Seiyakuにより開発)は、以下の式を有する：

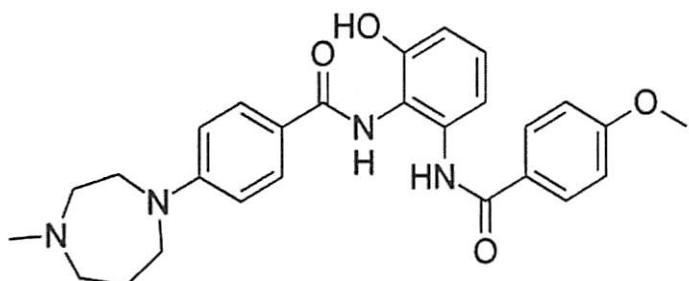
【化 8】



【 0 0 7 8 】

ダレキサバン(YM 150; CAS No. 365462-23-3; Astellasにより開発)は、以下の式を有する：

【化 9】



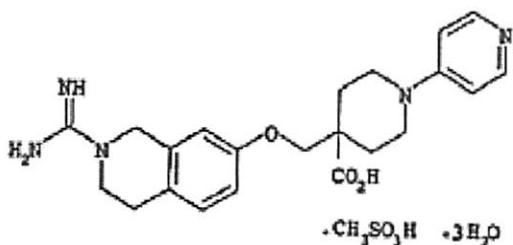
10

20

〔 0 0 7 9 〕

JTV 803 (CAS No. 247131-79-9; Japan Tobaccoにより開発)は、以下の式を有する：

【化 10】

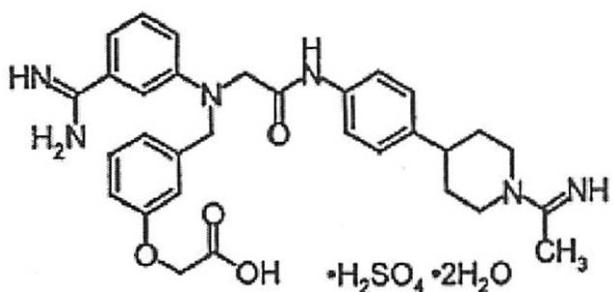


30

【 0 0 8 0 】

KFA 1411 (Kissei pharmaceuticalにより開発)は、以下の式を有する：

【化 1 1 】

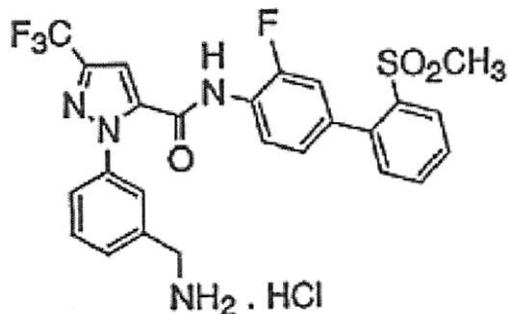


40

【 0 0 8 1 】

DPC 423 (CAS No. 209957-48-2; BMSにより開発)は、以下の式を有する：

【化12】

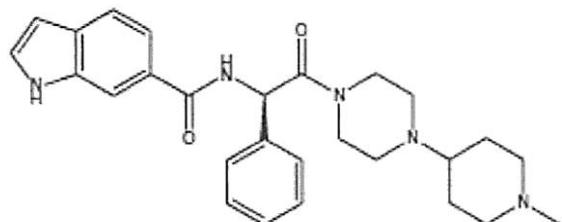


10

【0082】

LY517717 (CAS No. 313489-71-3; Lillyにより開発)は、以下の式を有する：

【化13】

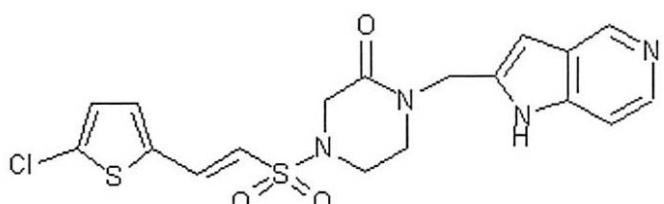


20

【0083】

RPR 209685 (CAS No. 234100-28-8; Aventisにより開発)は、以下の式を有する：

【化14】

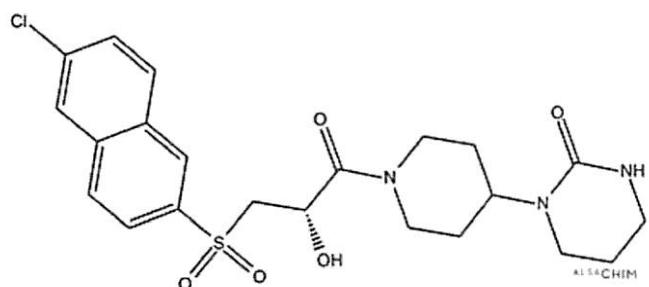


30

【0084】

レタキサバン(TAK442; CAS No. 870262-90-1; Takedaにより開発)は、以下の式を有する：

【化15】

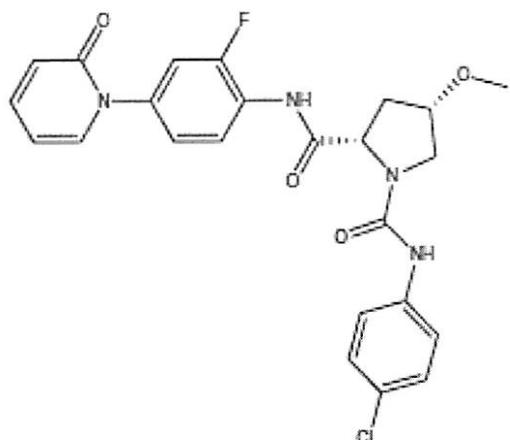


40

【0085】

エリバキサバン(D08913; PD-0348292; CAS No. 536748-46-6; Pfizerにより開発)は、以下の式を有する：

【化16】

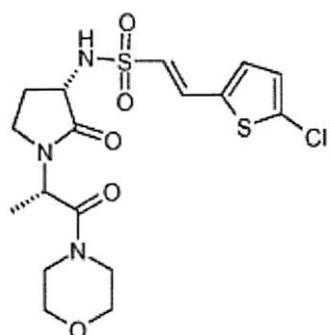


10

【0086】

GW813893 (CAS No. 478644-12-1; GSKにより開発)は、以下の式を有する：

【化17】



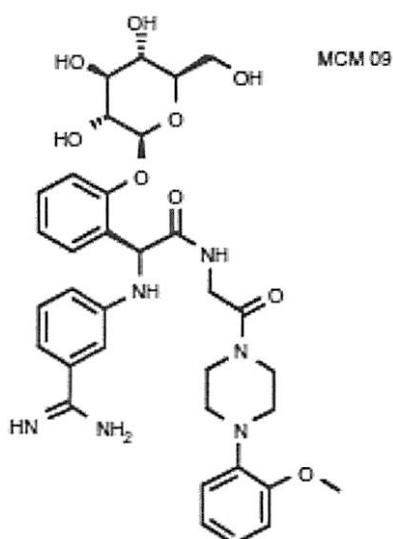
20

【0087】

MCM-09 (WO2016312; Morphochemにより開発)は、以下の式を有する：

【化18】

30



40

【0088】

本明細書で用いる場合、用語「トロンビン阻害物質」は、トロンビンと直接結合してそれを不活性化する化合物のことをいう。それ自体で、トロンビン阻害物質は、触媒標的、最も著しくはフィブリノゲンについての速度定数の減少により簡便に測定されるように、トロンビンの触媒活性を著しく減少させるかまたは理想的には完全にもしくは実質的に完

50

全に遮断する。トロンピン阻害物質によるトロンピン阻害は、可逆的または不可逆的であつてよく、好ましくは可逆的である。トロンピン阻害物質によるトロンピン阻害は、任意の手段により、例えばそして限定することなく、トロンピンの触媒部位への直接結合により達成できる。

【0089】

ある実施形態において、本発明によるトロンピン阻害物質は、ビバリルジン、ヒルジン、レピルジン、デシルジン、アルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトランおよびダビガトランからなる群から選択される。化学的に、ビバリルジン(CAS No. 128270-60-0)は、自然に存在する薬物であるヒルジンの合成同類物(congener)である。自然に存在するヒルジンは、典型的に、このタンパク質の様々なアイソフォームの混合物を含有する。よって、用語「ヒルジン」は、本明細書で用いる場合、特に、自然に存在するヒルジンアイソフォームの1次アミノ酸配列を有する任意のタンパク質、例えばなかでもHV1、HV2、HV3、P1またはP2を含む。組換えヒルジンを作製して、ヒルジンの均質調製物、例えばそして限定することなく、レピルジンおよびデシルジンを生成できる。本明細書で意図するヒルジンは、例えばアミノ酸置換、欠失、挿入、伸長、官能化または化学改変によるヒルジンの適切な誘導体または類似体も包含し(上記の誘導体は、トロンピン阻害物質活性を有する)、遺伝子工学により生成できる1より多いヒルジンのハイブリッドをさらに包含する。例えば、WO 91/17250は、HV1の最初の46残基とその後のHV2のアミノ酸47～65とから構成されるヒルジンについて記載している。

【0090】

好ましい実施形態において、トロンピン阻害物質は、ビバリルジン(例えばThe Medicines CompanyによりAngiomax(登録商標)またはAngiox(登録商標)として製造される)である。(天然または組換え)ヒルジンおよびヒルジン誘導体ならびにビバリルジンは当業者に知られているが、さらなる手引きのために、なかでもFentonらSemin Thromb Hemost., 1998, 第24巻, 87～91を参照されたい。

【0091】

記載するように、本明細書をとおして、第Xa因子阻害物質は、特に、「アンチトロンピン活性化物質以外の第Xa因子阻害物質」または「アンチトロンピン活性化物質でない第Xa因子阻害物質」ということがある。本明細書で意図するアンチトロンピン活性化物質は、アンチトロンピンとその任意の1つ以上の標的との結合を増加できる任意の物質を包含する。

いくつかの態様および実施形態において、アンチトロンピン活性化物質以外の第Xa因子阻害物質とトロンピン阻害物質に加えて、アンチトロンピン活性化物質も含む、本明細書において記載する組み合わせ、組成物、キット、方法および使用が企図される。

【0092】

本明細書で用いる場合、用語「アンチトロンピン活性化物質」は、アンチトロンピンを直接活性化する物質(agent)(例えば化合物、物質(substance)または分子)のことをいう。それ自体で、アンチトロンピン活性化物質は、その標的、例えばトロンピン、第Xa因子および/または第IXa因子に向かうアンチトロンピンの触媒(拮抗)活性を増加させる(すなわち速度定数の増加)。特に好ましくは、アンチトロンピン活性化物質は、少なくとも第Xa因子に向かうアンチトロンピンの触媒(拮抗)活性を増加させる。別の好ましい実施形態では、アンチトロンピン活性化物質は、それに限定されないが例えばフォンダパリヌクスのように、特異的に第Xa因子に向かうアンチトロンピンの触媒(拮抗)活性を増加させることができる。アンチトロンピン活性化物質によるアンチトロンピンの活性化は、任意の手段により、例えばそして限定することなく、触媒(標的結合)部位への近づきやすさおよび/または活性の増加を導く、直接結合およびアンチトロンピンの立体構造変化の誘導により達成できる。本明細書で用いる場合、「アンチトロンピン」は、既知のアンチトロンピンのいずれか、好ましくはアンチトロンピンIII(遺伝子記号SERPINC1)のことをいう。したがって、本明細書で用いる場合、「アンチトロンピン活性化物質」は、好ましくはアンチトロンピンIIIの活性化物質のことをいう。

10

20

30

40

50

【0093】

ある実施形態において、本発明によるアンチトロンビン活性化物質は、ヘパリンである。別の実施形態において、本発明によるアンチトロンビン活性化物質は、未分画ヘパリンおよび低分子量ヘパリンからなる群から選択される。さらなる実施形態において、本発明によるアンチトロンビン活性化物質は、フォンダパリヌクスであり、これは、2-デオキシ-6-O-スルホ-2-(スルホアミノ)-D-グルコピラノシル-(1-4)-O-D-グルコピランウロノシル-(1-4)-O-2-デオキシ-3,6-ジ-O-スルホ-2-(スルホアミノ)-D-グルコピラノシル-(1-4)-O-2-O-スルホ-L-イドピラノウロノシル-(1-4)-O-メチル-2-デオキシ-6-O-スルホ-2-(スルホアミノ)-D-グルコピラノシド、デカナトリウム塩と表すことができる。好ましい実施形態において、本発明によるアンチトロンビン活性化物質は、未分画ヘパリンである。本明細書で用いる場合、「未分画ヘパリン」は、特に、天然ヘパリンのことをいい、これは、様々な長さ(通常、約5～約40kDaの範囲である)の分子鎖からなる多分散物(polydisperse)である。本明細書で意図するように、任意の型のヘパリンを用いることができる。典型的に、製薬グレードのヘパリンは、屠殺された肉用動物の粘膜組織、例えばブタの腸またはウシの肺に由来する。本明細書で用いる場合、「低分子量ヘパリン」(LMWH)は、約8kDa未満の平均分子量を典型的に有するヘパリン(これらについて全ての鎖の少なくとも約60%が約8kDa未満の分子量を有する)のことをいう。LMWHは、ヘパリンポリマーの分画または解重合の様々な方法により得られる。LMWHの例は、限定することなく、アルデパリン、セルトパリン、エノキサパリン、パリナパリン、チンザパリン、ダルテパリン、レビパリンおよびナドロパリンを含む。
。

【0094】

本発明の原理を具体化する特に好ましい組み合わせまたは組成物は、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシンからなる群から選択され、好ましくは、リバーロキサバン、アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466からなる群から選択され、最も好ましくは、リバーロキサバンからなる群から選択される直接的第Xa因子阻害物質と、ビバリルジン、ヒルジン、レピルジン、デシリジン、アルガトロバン、メラガトラン、キシメラガトランおよびダビガトランからなる群から選択され、好ましくはビバリルジンおよびヒルジンからなる群から選択され、さらにより好ましくはビバリルジンからなる群から選択されるトロンビン阻害物質と、場合によって、成体肝臓前駆細胞、膵臓ベータ細胞のような膵島細胞、間葉系幹細胞(好ましくは骨髄間葉系幹細胞)、皮膚線維芽細胞または肝臓筋線維芽細胞、好ましくは成体肝臓前駆細胞または肝臓筋線維芽細胞、最も好ましくは成体肝臓前駆細胞からなる群から選択される細胞とを含むか、それから本質的になるかまたはそれからなることができる。

【0095】

本発明の原理を具体化するさらなる特に好ましい組み合わせまたは組成物、すなわち物質1、物質2および場合によって細胞を含むか、それから本質的になるかまたはそれからなる組み合わせまたは組成物を、表1に開示する。

【0096】

【表1-1】

表1

物質1	物質2	細胞
リバーロキサバン	ヒルジン	
リバーロキサバン	ビバリルジン	
アピキサバン	ヒルジン	
アピキサバン	ビバリルジン	
ベトリキサバン	ヒルジン	
ベトリキサバン	ビバリルジン	
エドキサバン	ヒルジン	
エドキサバン	ビバリルジン	
オタミキサバン	ヒルジン	
オタミキサバン	ビバリルジン	
YM466	ヒルジン	
YM466	ビバリルジン	
リバーロキサバン	ヒルジン	凝固促進性細胞
リバーロキサバン	ビバリルジン	凝固促進性細胞
アピキサバン	ヒルジン	凝固促進性細胞
アピキサバン	ビバリルジン	凝固促進性細胞
ベトリキサバン	ヒルジン	凝固促進性細胞
ベトリキサバン	ビバリルジン	凝固促進性細胞
エドキサバン	ヒルジン	凝固促進性細胞
エドキサバン	ビバリルジン	凝固促進性細胞
オタミキサバン	ヒルジン	凝固促進性細胞
オタミキサバン	ビバリルジン	凝固促進性細胞
YM466	ヒルジン	凝固促進性細胞
YM466	ビバリルジン	凝固促進性細胞
リバーロキサバン	ヒルジン	成体肝臓前駆細胞
リバーロキサバン	ビバリルジン	成体肝臓前駆細胞
アピキサバン	ヒルジン	成体肝臓前駆細胞
アピキサバン	ビバリルジン	成体肝臓前駆細胞
ベトリキサバン	ヒルジン	成体肝臓前駆細胞
ベトリキサバン	ビバリルジン	成体肝臓前駆細胞
エドキサバン	ヒルジン	成体肝臓前駆細胞
エドキサバン	ビバリルジン	成体肝臓前駆細胞
オタミキサバン	ヒルジン	成体肝臓前駆細胞
オタミキサバン	ビバリルジン	成体肝臓前駆細胞
YM466	ヒルジン	成体肝臓前駆細胞
YM466	ビバリルジン	成体肝臓前駆細胞
リバーロキサバン	ヒルジン	(骨髓)間葉系幹細胞
リバーロキサバン	ビバリルジン	(骨髓)間葉系幹細胞
アピキサバン	ヒルジン	(骨髓)間葉系幹細胞
アピキサバン	ビバリルジン	(骨髓)間葉系幹細胞
ベトリキサバン	ヒルジン	(骨髓)間葉系幹細胞

10

20

30

40

【0097】

【表1-2】

ベトリキサバン	ビバリルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
エドキサバン	ヒルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
エドキサバン	ビバリルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
オタミキサバン	ヒルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
オタミキサバン	ビバリルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
YM466	ヒルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
YM466	ビバリルジン	(骨髓)間葉系幹細胞	
リバーロキサバン	ヒルジン	皮膚線維芽細胞	10
リバーロキサバン	ビバリルジン	皮膚線維芽細胞	
アピキサバン	ヒルジン	皮膚線維芽細胞	
アピキサバン	ビバリルジン	皮膚線維芽細胞	
ベトリキサバン	ヒルジン	皮膚線維芽細胞	
ベトリキサバン	ビバリルジン	皮膚線維芽細胞	
エドキサバン	ヒルジン	皮膚線維芽細胞	
エドキサバン	ビバリルジン	皮膚線維芽細胞	
オタミキサバン	ヒルジン	皮膚線維芽細胞	
オタミキサバン	ビバリルジン	皮膚線維芽細胞	
YM466	ヒルジン	皮膚線維芽細胞	20
YM466	ビバリルジン	皮膚線維芽細胞	
リバーロキサバン	ヒルジン	肝臓筋線維芽細胞	
リバーロキサバン	ビバリルジン	肝臓筋線維芽細胞	
アピキサバン	ヒルジン	肝臓筋線維芽細胞	
アピキサバン	ビバリルジン	肝臓筋線維芽細胞	
ベトリキサバン	ヒルジン	肝臓筋線維芽細胞	
ベトリキサバン	ビバリルジン	肝臓筋線維芽細胞	
エドキサバン	ヒルジン	肝臓筋線維芽細胞	
エドキサバン	ビバリルジン	肝臓筋線維芽細胞	30
オタミキサバン	ヒルジン	肝臓筋線維芽細胞	
オタミキサバン	ビバリルジン	肝臓筋線維芽細胞	
YM466	ヒルジン	肝臓筋線維芽細胞	
YM466	ビバリルジン	肝臓筋線維芽細胞	
リバーロキサバン	ヒルジン	脾臓ベータ細胞	
リバーロキサバン	ビバリルジン	脾臓ベータ細胞	
アピキサバン	ヒルジン	脾臓ベータ細胞	
アピキサバン	ビバリルジン	脾臓ベータ細胞	
ベトリキサバン	ヒルジン	脾臓ベータ細胞	
ベトリキサバン	ビバリルジン	脾臓ベータ細胞	
エドキサバン	ヒルジン	脾臓ベータ細胞	40
エドキサバン	ビバリルジン	脾臓ベータ細胞	
オタミキサバン	ヒルジン	脾臓ベータ細胞	
オタミキサバン	ビバリルジン	脾臓ベータ細胞	
YM466	ヒルジン	脾臓ベータ細胞	
YM466	ビバリルジン	脾臓ベータ細胞	

【0098】

用語「細胞移植」は、その通常の意味を有し、特に、対象者への細胞の投与のことをいう。用語「細胞移植」は、「細胞療法」と交換可能に用いることができる。細胞移植は、当該技術において知られる任意の技術により行うことができる。例えばそして限定するこ

となく、細胞は、対象者に注入により移植できる。典型的に、細胞注入は、非経口的に、例えば血管内、皮下、皮内または筋肉内、好ましくは血管内で行うことができる。細胞は、例えはそして限定することなく、全身、局部または病変の部位にて投与できる。具体的な用途、標的組織、治療目的または細胞型により、投与の経路、ならびに処方、濃度などに関して調節できることが明らかである。

【0099】

本明細書で用いる場合、用語「血栓性合併症」または「凝固促進性合併症」は、特に、血餅形成自体とは別の、凝固促進活性を有する細胞の移植に伴う有害な影響または合併症のことをいうことがある。このような影響は、例えはそして限定することなく、細胞損失、細胞拒絶または炎症であり得る。細胞損失または細胞拒絶により、移植細胞損失または拒絶を意味する。これらの影響の結果は、投与した細胞の全量未満が移植後に意図する機能を行うために利用可能であるか、または極端な場合ではこれらのうちのどれもが利用可能でなくなるような、細胞移植効率または細胞生着能の低下である。細胞損失は、例えは、血餅への移植細胞の封入により生じることができる。細胞拒絶は、例えは、宿主の免疫応答により生じることができる。炎症応答は、例えは、凝固カスケードの活性化に伴うかまたはそれに起因することができる。代わりに、またはさらに、炎症は、細胞拒絶に伴うか、それに起因するかまたはそれを引き起こすことができる。

【0100】

本明細書で教示する組み合わせを含み、1つ以上のその他の成分をさらに含む組成物も提供される。例えは、細胞の生存性を維持または増強できる成分を含めてよい。例えはそして限定することなく、このような成分は、実質的に等張条件を確実にする塩、pH安定剤、例えはバッファー系(例えは、実質的に中性のpHを確実にするため、例えはリン酸塩または炭酸塩バッファー系)、担体タンパク質、例えはアルブミン、基本培地および/もしくは培地補充物を含む培地、血清もしくは血漿、栄養素、炭水化物源、保存剤、安定化剤、抗酸化剤または当業者に公知のその他の物質を含み得る。本明細書で教示する組み合わせの各成分を、上記のような1つ以上の追加の成分と混和することにより上記の組成物を生成する方法も開示される。組成物は、例えは液体であってもよいか、または半固体もしくは固体であってもよいか(例えは凍結組成物であってもよいか、またはゲルとして存在してもよいか、または固体支持体もしくは足場などの上に存在してもよい)。凍結保存剤、例えはなかでもDMSOは、当該技術において公知である。

【0101】

他の場所で述べたように、本明細書で教示する医薬組成物は、1つ以上の医薬的に許容できる賦形剤を含む。

用語「医薬的に許容できる」は、本明細書で用いる場合、当該技術と一致して、医薬組成物の他の成分と適合し、医薬組成物のレシピエントにとって有害でないことを意味する。

【0102】

本明細書で用いる場合、「担体」または「賦形剤」は、任意のおよび全ての溶剤、希釈剤、バッファー(例えは中性緩衝食塩水またはリン酸緩衝食塩水)、可溶化剤、コロイド、分散媒、ビヒクル、充填剤、キレート化剤(例えはEDTAまたはグルタチオン)、アミノ酸(例えはグリシン)、タンパク質、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、湿润剤、乳化剤、甘味料、着色料、香料、芳香付与剤(aromatisers)、増粘剤、デポー効果を達成するための物質、コーティング、抗真菌剤、保存剤、安定化剤、抗酸化剤、等張性調節剤、吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質にこのような媒体および物質を用いることは、当該技術において公知である。このような材料は、非毒性であり、細胞の活性に干渉しない。

【0103】

担体または賦形剤またはその他の材料の精密な性質は、投与の経路に依存する。例えは、組成物は、バイロジエンフリーであり、適切なpH、等張性および安定性を有する非経口的に許容できる水溶液の形であってよい。医薬製剤における一般的な原理について、読者は、Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunoth

10

20

30

40

50

erapy, G. MorstynおよびW. Sheridan編, Cambridge University Press, 1996;ならびにHematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. ListerおよびP. Law, Churchill Livingstone, 2000を参照されたい。

【0104】

本明細書に記載する第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)および/もしくはトロンビン阻害物質、またはこれを含む医薬組成物は、経口投与することもできる。当業者は、経口投与される、本明細書に記載されている第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)および/またはトロンビン阻害物質を含む組成物が、細胞を通常含まないことを理解しているが、細胞も含むそのような組成物は、例えば消化管適応症を処置する場合に構想できる。本明細書に記載するそれぞれの化合物は、同じ経路により投与できるか、または異なる経路により投与できる。例えば、そして限定することなく、細胞は、非経口投与でき、第Xa因子阻害物質(好ましくは直接的第Xa因子阻害物質)および/またはトロンビン阻害物質は、経口投与できる。

10

【0105】

液体医薬組成物は、液体担体、例えば水または医薬的に許容できる水溶液を一般的に含むことができる。例えば、生理食塩水、組織もしくは細胞培養培地、ブドウ糖もしくはその他の糖溶液、またはグリコール、例えばエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールを含めてよい。

組成物は、1つ以上の細胞保護分子、細胞再生分子、増殖因子、抗アポトーシス因子または細胞における遺伝子発現を調節する因子を含んでよい。このような物質は、細胞がその環境から独立することを可能にする。

20

【0106】

このような医薬組成物は、その中の細胞の生存性を確実にする成分をさらに含有できる。例えば、組成物は、所望のpH、より一般的には中性付近のpHを達成するために適切なバッファー系(例えばリン酸塩または炭酸塩バッファー系)を含むことができ、浸透圧ストレスを防ぐために細胞の等張条件を確実にするための十分な塩を含むことができる。例えば、これらの目的のために適切な溶液は、当該技術において知られるように、リン酸緩衝食塩水(PBS)、塩化ナトリウム溶液、リンゲル注射液または乳酸加リンゲル注射液であってよい。さらに、組成物は、担体タンパク質、例えばアルブミン(例えばウシまたはヒトアルブミン)を含むことができ、これは、細胞の生存性を増加できる。

30

【0107】

さらに適切な医薬的に許容できる担体または添加剤は、当業者に公知であり、例えば、タンパク質、例えばコラーゲンまたはゼラチン、炭水化物、例えばデンプン、多糖類、糖類(ブドウ糖、グルコースおよびスクロース)、セルロース誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウムもしくはカルシウム、ヒドロキシプロピルセルロースまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルファ化デンプン、ペクチン寒天、カラギーナン、クレイ、親水性ガム(アカシアガム、グーガム、アラビアガムおよびキサンタンガム)、アルギン酸、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、ポリグリコール酸およびポリ乳酸、デキストラン、ペクチン、合成ポリマー、例えば水溶性アクリルポリマーもしくはポリビニルピロリドン、プロテオグリカン、リン酸カルシウムなどから選択できる。

40

【0108】

所望により、細胞調製物は、支持体、足場、マトリクスまたは組織再生を改善できる材料上で投与できる。例えば、材料は、粒状セラミック、またはバイオポリマー、例えばゼラチン、コラーゲンもしくはフィブリノゲンであり得る。多孔性マトリクスは、標準的な技術に従って合成できる(例えばMikosら, Biomaterials 14: 323, 1993; Mikosら, Polymer 35:1068, 1994; Cookら, J. Biomed. Mater. Res. 35:513, 1997)。このような支持体、足場、マトリクスまたは材料は、生分解性または非生分解性であってよい。よって、細胞は、適切な基材、例えば多孔性または非多孔性基材上に移してかつ/またはその上で培養して、インプラントを提供できる。例えば、増殖した細胞、または培養皿において分化した細胞を、3次元固体支持体上に移して、必要であれば固体支持体を本発明の液体栄養

50

培地中でインキュベートすることにより、それらを複製し、かつ/または分化プロセスを継続させることができる。例えば細胞を含有する液体懸濁物に3次元固体支持体を含浸することにより、上記の細胞を上記の支持体上に移すことができる。このようにして得られた含浸支持体は、ヒト対象者に移植できる。このような含浸支持体は、それらを液体培地中に浸漬することにより再培養した後に、最終的に移植することもできる。3次元固体支持体は、ヒトに移植できるように生体適合性である必要がある。これは、生分解性または非生分解性であつてよい。

【0109】

細胞または細胞集団は、所望の細胞型、例えば肝細胞に向かう細胞の生存、成長、増殖および/または分化を許容する様式で投与できる。細胞または細胞集団は、意図する臓器、例えば肝臓に植え接ぐことができるか、またはその中に遊走および生着できる。他の場所、組織または臓器、例えば肝臓、脾臓、胰臓、腎臓被膜、腹膜または網(omentum)における細胞または細胞集団の生着が構想できる。

10

【0110】

ある実施形態において、上記で規定する医薬的細胞調製物は、液体組成物の形で投与できる。実施形態において、細胞またはそれを含む医薬組成物は、全身、局所、臓器内または臓器機能障害もしくは病変の部位にて投与できる。

好ましくは、医薬組成物は、治療有効量の所望の細胞を含むことができる。用語「治療有効量」は、研究者、獣医、医師またはその他の臨床家が調べようとする組織、系、動物またはヒトにおける生物学的または医学的応答を誘出でき、特に、処置される疾患もしくは状態の局所もしくは全身的症状または特徴の1つ以上を防止または緩和できる量のことをいう。

20

【0111】

本発明の組み合わせ、医薬組成物およびその他の関連する様様は、本明細書に記載されている細胞、例えば特に凝固促進性細胞の移植のため、さらにより具体的には対象者における上記の細胞の移植から利益を受けることができる疾患または状態の処置のために特に有用である。

注釈を付ける場合以外は、「対象者」または「患者」は、交換可能に用いられ、動物、好ましくは脊椎動物、より好ましくは哺乳類のことをいい、具体的に、ヒト患者および非ヒト哺乳類を含む。したがって、「対象者」または「患者」は、本明細書で用いる場合、本明細書で教示する組み合わせまたは組成物を投与できる任意の動物、哺乳動物もしくはヒト患者または対象者を意味する。好ましい患者は、ヒト対象者である。

30

【0112】

本明細書で用いる場合、「処置する」または「処置」は、治療的処置および予防的または防止的施策の両方のことをいい、ここで、その目的は、望ましくない生理的変化または障害を妨げるかまたは遅延させる(少なくする)ことである。有利なまたは所望の臨床結果は、それらに限定されないが、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の状態の安定化(すなわち悪化しない)、疾患増悪および合併症の出現の遅滞または遅延、疾患状態の改善または軽減を含む。「処置」は、処置を受けなかった場合に期待される生存と比較した生存の延長も意味できる。

40

【0113】

本明細書で用いる場合、「処置を必要とする対象者」のような句は、所定の状態、好ましくは上記の状態または疾患の処置から利益を受けると考えられる対象者、例えば哺乳動物またはヒト対象者を含む。このような対象者は、典型的に、限定することなく、状態を診断された対象者、上記の状態を有しやすいかもしくは発生しやすい対象者、および/または状態を妨げようとする対象者を含む。

【0114】

本明細書に記載されている組み合わせおよび医薬組成物は、単独で、またはそれぞれの障害についての任意の既知の治療もしくは活性化合物と組み合わせて用いることができる。投与は、本明細書の他の場所で記載するように、同時または任意の順序で逐次的であつ

50

てよい。

細胞が異種(すなわち自家でない)供給源に由来するならば、例えば免疫抑制剤、例えばシクロスボリンまたはタクロリムス(FK506)を用いる併用免疫抑制治療を典型的に行ってよい。

【0115】

例えばそして限定することなく、本明細書で意図する組み合わせまたは医薬組成物が肝臓細胞、例えば肝臓前駆または幹細胞(例えばADLSC細胞)または肝細胞を含有する場合、これらは、それらに限定されないが、なかでも、肝機能障害もしくは肝不全、肝炎および代謝の先天性障害を含む肝臓関連疾患の処置のために用いることができる。

肝臓の先天性代謝性機能障害の網羅的でない例は、フェニルケトン尿症およびその他のアミノ酸代謝異常症、血友病およびその他の凝固因子機能障害、家族性高コレステロール血症およびその他の脂質代謝障害、尿素サイクル障害、糖原病、ガラクトース血症、フラクトース血症、チロシン血症、タンパク質および炭水化物代謝機能障害、有機酸尿症、ミトコンドリア病、ペルオキシソームおよびリソソーム病、タンパク質合成異常、肝臓細胞トランスポーターの欠陥、グリコシル化の欠陥、クリグラー・ナジャー病などを含む。

【0116】

さらなる肝臓関連疾患または状態は、限定することなく、後天性進行性肝臓変性疾患、劇症肝不全および急性または慢性肝不全、ヒト肝臓指向性ウイルス感染(HBV、HAV、HCV、HEV、HDVなど)を含む。

肝臓量(mass)および/または機能の損失により代表され、本明細書に記載されている肝臓細胞を含む組み合わせまたは医薬組成物から利益を受けることができるその他の疾患状態または機能障害は、それらに限定されないが、アラジール症候群、アルコール性肝疾患(アルコール誘導性肝硬変)、a1-アンチトリプシン欠損症(全ての表現型)、高脂血症およびその他の脂質代謝障害、自己免疫性肝炎、バッド-キアリ症候群、胆道閉鎖症、I、IIおよびIII型進行性家族性胆汁うっ滞、肝臓のがん、カロリ病、クリグラー-ナジャー症候群、フラクトース血症、ガラクトース血症、炭水化物欠損グリコシル化欠陥、その他の炭水化物代謝障害、レフサム病およびその他のペルオキシソーム病、ニーマンピック病、ウォルマン病およびその他のリソソーム病、チロシン血症、トリプルHおよびその他のアミノ酸代謝性障害、デュビン-ジョンソン症候群、脂肪肝(非アルコール性脂肪性肝炎)、ギルバート症候群、糖原貯蔵症IおよびIII、ヘモクロマトーシス、A～G型肝炎、ポルフィリン症、原発性胆汁性肝硬変、硬化性胆管炎、チロシン血症、凝固因子欠損、血友病B、フェニルケトン尿症、ウィルソン病、劇症肝不全、肝切除後の肝不全、ミトコンドリア呼吸鎖疾患を含む。

【0117】

例えばそして限定することなく、組み合わせまたは医薬組成物、特に肝臓細胞を含むものは、注射(カテーテル投与も包含する)または移植、例えば局所注射、全身注射、脾臓内注射(Guptaら, Seminars in Liver Disease 12: 321, 1992も参照されたい)、門脈への注射、肝臓、例えば肝臓被膜下への注射、非経口投与または胚もしくは胎仔への子宮内注射により有利に投与できる。例えば、本明細書に記載されている肝臓細胞または肝臓由来細胞を含む組み合わせまたは医薬組成物は、肝臓細胞移植(LCT)による組織工学および細胞療法のために用いることができる。肝臓細胞移植および肝臓幹細胞移植(LSCT)は、肝臓へのアクセスと細胞の生着を導く任意の方法による、好ましくは門脈を介するが、直接の肝注射であってもよいか、または脾臓内注射による成熟肝細胞または肝臓前駆細胞の注入の技術のことをいう。別の例において、本明細書に記載されている間葉系幹細胞を含む組み合わせまたは医薬組成物は、任意の実質臓器修復(脳、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、肺、腸、膀胱、胆嚢)のため、免疫障害を制御するため、クローニング病およびその他の自己免疫疾患を制御するため、移植片対宿主疾患を制御するため、移植後の臓器拒絶を制御するために用いることができる。別の例において、本明細書に記載されている皮膚線維芽細胞を含む組み合わせまたは医薬組成物は、皮膚修復または骨基質形成のために用いることができる。さらなる例において、本明細書に記載されている肝臓筋線維芽細胞を含む組み

10

20

30

40

50

合わせまたは医薬組成物は、結合組織疾患からの損傷を処置もしくは修復するため、またはその他の細胞と組み合わせて足場を創出するために用いることができる。さらに別の例において、ランゲルハンス島細胞、例えば特に脾臓ベータ細胞、または完全なランゲルハンス島もしくはその画分を含む組み合わせまたは医薬組成物は、インスリン作用の妨害、例えばインスリン分泌の減少と関連する状態を処置するためまたは妨げるために、例えば糖尿病または前糖尿病状態、特にⅠ型糖尿病の処置のために用いることができる。

【0118】

自家単核骨髄細胞についての現在のヒトでの研究において、 $1 \sim 4 \times 10^7$ 細胞の範囲の経験的な用量を用いて見込みのある結果が得られている。しかし、投与細胞の量の最適化のために異なるシナリオが要求されることがある。つまり、投与される細胞の量は、処置される対象者により変動する。好ましい実施形態において、 $10^2 \sim 10^{10}$ または $10^2 \sim 10^9$ 、または $10^3 \sim 10^{10}$ 、または $10^3 \sim 10^9$ 、または $10^4 \sim 10^{10}$ 、または $10^4 \sim 10^9$ 、例えば $10^4 \sim 10^8$ 、または $10^5 \sim 10^7$ 、例えば 1×10^5 、約 5×10^5 、約 1×10^6 、約 5×10^6 、約 1×10^7 、約 5×10^7 、約 1×10^8 、約 5×10^8 、約 1×10^9 、約 2×10^9 、約 3×10^9 、約 4×10^9 、約 5×10^9 、約 6×10^9 、約 7×10^9 、約 8×10^9 、約 9×10^9 または約 1×10^{10} 細胞をヒト対象者に投与できる。さらなる実施形態において、体重1kgあたり $10^6 \sim 10^8$ 細胞、または体重1kgあたり $1 \times 10^7 \sim 9 \times 10^7$ 細胞、例えば体重1kgあたり約 1×10^7 、約 2×10^7 、約 3×10^7 、約 4×10^7 、約 5×10^7 、約 6×10^7 、約 7×10^7 、約 8×10^7 、約 9×10^7 または約 1×10^8 細胞をヒト対象者に投与できる。例えば、このような数の細胞または体重1kgあたりこのような数の細胞は、特に、対象者に投与される細胞の総数のことをいうことができ、その投与は、1日以上にわたって(例えば1、2、3、4または5日以上にわたって)投与される1回以上の用量に適切に分配できる(例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10回以上の用量に分配される)。しかし、治療有効用量の精密な決定は、患者のサイズ、年齢、組織損傷のサイズ、損傷が生じてからの時間を含む各患者に個別の因子に基づくことがあり、本開示および当該技術における知識から当業者が容易に確かめることができる。

【0119】

適切には、投与される組成物において、細胞は、約 $10^4/\text{ml} \sim \text{約}10^8/\text{ml}$ 、好ましくは約 $10^5/\text{ml} \sim \text{約}10^7/\text{ml}$ 、さらにより好ましくは約 $1 \times 10^6/\text{ml} \sim \text{約}1 \times 10^7/\text{ml}$ 、例えば約 $5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で存在できる。

上記で規定する1つ以上のその他の医薬的または生物学的活性成分と場合によって組み合わせて用いる、本明細書で開示する活性物質(例えば直接的第Xa因子阻害物質、トロンビン阻害物質)の投与量または量は、個別の症例に依存し、慣用であるように、個別の状況に適合させて、最適効果を達成する。つまり、これは、処置される障害の性質および重症度、ならびに処置されるヒトもしくは動物の性別、年齢、体重、食餌、全身の健康、個別の応答性、用いる化合物の効力、代謝安定性および作用期間、投与の形態および時間、排泄速度、治療が急性もしくは慢性もしくは予防的であるかどうか、または他の医薬的もしくは生物学的活性成分を投与するかどうか、または本発明の活性物質に加えて用いられるその他の治療に依存する。

【0120】

限定することなく、典型的な単回投与量は、上記の因子に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim \text{約}250 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重以上、好ましくは約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim \text{約}100 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重、より好ましくは約 $0.01 \text{ mg}/\text{kg} \sim \text{約}50 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重、さらにより好ましくは約 $0.01 \text{ mg}/\text{kg} \sim \text{約}10 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重、さらにより好ましくは約 $0.05 \text{ mg}/\text{kg} \sim \text{約}10 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重、または約 $0.05 \text{ mg}/\text{kg} \sim \text{約}1 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重の範囲であり得る。

数日以上にわたる反復投与のために、処置は、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続する。薬剤の好ましい投与量は、約 $0.05 \text{ mg}/\text{kg} \sim \text{約}10 \text{ mg}/\text{kg}$ の範囲であり得る。つまり、約 $0.5 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $2.0 \text{ mg}/\text{kg}$ 、 $4.0 \text{ mg}/\text{kg}$ または $10 \text{ mg}/\text{kg}$ (またはその任意の組み合わせ)の1回以上の用量を患者に投与できる。このような用量は、単回1日用量、1回以上に分けた1日用量、または例えば点滴を用いて本質的に継続して、または例えば毎週もしくは3週

10

20

30

40

50

間ごとに間欠的に投与してよい。

【0121】

実施形態において、直接的第Xa因子阻害物質、特にリバーロキサバンは、典型的に約1 μ g/mlを含む細胞懸濁物により対象者に投与してよい。直接的第Xa因子阻害物質、特にリバーロキサバンの静脈内投与が示される場合、典型的な用量は、約0.1～5mg/kg、例えば約0.1～3mg/kg、約0.1～2mg/kg、約0.1～1mg/kg、好ましくは約0.6mg/kgであってよい。1日投与量は、約1～50mg/日、例えば約1～40mg/日、約1～30mg/日、約5～30mg/日、好ましくは約10～20mg/日であってよい。当然のことながら、用量は、凝固試験に従って適合できる。

【0122】

好ましくは、トロンビン阻害物質は、対象者に、約0.05～約5mg/kg体重、より好ましくは約0.1～約3mg/kg体重、さらにより好ましくは約0.2～約2mg/kg体重で、より好ましくはビバリルジンについて約0.50～約3.00mg/kg体重、さらにより好ましくは約0.50～約2mg/kg体重、さらにより好ましくは約0.75～約1.75mg/kg体重、またはこれもまた好ましくは約1.75～約3.00mg/kg体重もしくはより好ましくは約2.25～約2.75mg/kg体重、例えば約2.50mg/kg体重で、より好ましくはヒルジンについて約0.2～約0.6mg/kg体重、さらにより好ましくは約0.3～約0.5mg/kg体重、さらにより好ましくは約0.4mg/kg体重で投与できる。

【実施例】

【0123】

本発明を、以下の実施例によりここで説明するが、これらの実施例は、本発明の範囲をいずれの様式によっても限定しない。

実施例1：材料および方法

ヒト試料についての全ての実験、およびヒトの適応外の抗凝固剤プロトコールの使用、およびインフォームドコンセントを含むプロトコールは、施設の倫理評論委員会により承認された。

【0124】

細胞調製物

hALPC細胞は、健常肝臓ドナー($n=6$ 、9～44歳)から、以前に記載されたようにして得た(Najimiら, Cell Transplant. 2007;16:717～728)。細胞は、新しくトリプシン処理したか、または4～6継代にて凍結保存/融解した後に研究した。細胞を、ヘパリンを10U/mlの濃度(明記する場合はそれ以上)で含有するかまたはしないアルブミン溶液に懸濁した。対照として、凍結保存/融解ヒト肝細胞($n=5$ 、16～44歳)も用いた。肝臓単離および肝細胞凍結保存/融解手順は、以前に詳述されたとおりであった(Sokalら, Transplantation. 2003;76:735～738)。

【0125】

骨髄試料は、8～67歳の3名の死後臓器ドナーの椎骨または腸骨稜の吸引により回収した。吸引液は、10%ハンクス平衡塩類溶液(Invitrogen, Merelbeke, Belgium)を含有するヘパリン添加シリングに回収し、以前に記載されたプロトコールに従って48時間以内に処理した(LysyらCell Prolif., 2008, 第41巻, 36～58)。

ヒト線維芽細胞は、皮膚生検(前腕の前中央側)により、18歳～35歳のボランティア($n=3$)から、書面でのインフォームドコンセントの後に、以前に記載されたようにして回収した(Lysyら, Hepatology. 2007;46:1574～1585)。

【0126】

ヒト肝臓非実質細胞は、我々の組織バンクにおいて行った肝臓単離、3名の異なるドナー(1つの新生児肝臓および2名の12歳ドナー)からの細胞懸濁物のろ過および2種類の速度の遠心分離の後に得た。次に、ヒト星状細胞を、確立されたプロトコールに従うNicode nz (Myegaard, Oslo, Norway)勾配遠心分離により単離した(Guimaraesら, J Hepatol. 2010;52(3):389～397)。活性化筋線維芽細胞は、単離星状細胞から得た。

【0127】

10

20

30

40

50

血液

血液は、29～40歳($n=5$)の男性ドナーから得た。

【0128】

hALPC懸濁物の凝固促進活性

測定は、ROTEM(登録商標)デルタ分析器(Pentapharm, Munich, Germany)で行った。ROTEMは、血餅形成および血餅溶解の動態および特質を、リアルタイムで評価する。凝固時間(CT)は、分析の開始から、血餅形成の開始まで、通常、2mmの振幅に達するまでの時間と定義される。血餅形成時間は、20mmの振幅に達するまでの期間と定義される。アルファ角は、中心線と、CTの終点である2mm振幅点を通る曲線の接線との間の角度と定義される。曲線の最大振幅は、最大血餅固さと定義される。最大溶解は、測定中に検出される最大線維素溶解を表す。我々は、CTに焦点を当てた。

【0129】

簡単に述べると、短い休止期間の後に、300 μ lの全血を、37℃に予め温めたカップにピペットを用いて入れた。懸濁細胞を、その後、全血に加えた(特に明記しない場合は $5 \times 10^{exp}5$ 細胞)。Owrenバッファー(Siemens, Marburg, Germany)で希釈した組織因子(TF)(イノビン、Siemens, Marburg, Germany。最終希釈1:17000/0.35 pM)を含有する20 μ lのトリガー試薬を細胞-血液混合物に次いで加え、その後、20 μ lの0.2M CaCl₂を加えることが必要であった。カルシウムを加えた後に、測定を自動的に開始した。細胞の凝固促進活性(PCA)は、イノビンを加えない場合にも決定した。この凝固モデルにおけるTFの役割を確実にするために、細胞を室温にて10分間、0.2 mg/mL mAb 抗ヒトTF IgG1 (American Diagnostica)または0.2 mg/mL mAbマウスIgG1 (クローン11711.11; RnD Systems, Abingdon, United Kingdom)のいずれかとプレインキュベートした後に、アルブミン5%で十分に洗浄し、トロンボエラストメトリー アッセイを行った。

【0130】

血漿アッセイのために、細胞(明記しない場合は $5 \times 10^{exp}5$ 細胞)を、3.8 mlのクエン酸塩添加血液中に37℃にて30分間インキュベートした。インキュベーションの後に、全血を4500 rpmにて10分間遠心分離した。300 μ lの得られた血漿は、次いで、カップへのピペット操作による添加とその後のイノビンおよびCaCl₂の添加の有無のプロトコールのための準備ができたことになる。

血漿欠乏アッセイのために、懸濁細胞(明記しない場合は $5 \times 10^{exp}5$ 細胞)を、300 μ lの血漿に加えた後に、イノビンおよびCaCl₂を加えた。

【0131】

PCAアッセイの変調のために、細胞を、未分画ヘパリン(ヘパリンLeo(登録商標), Leo)を含むかまたは含まないアルブミン5%に懸濁した。以下のものを、次いで、血液または血漿に加えた: 発表されたデータ(Samamaら(2010), Thromb Haemost, 103(4):815～825)に従う1 μ g/mlの濃度のリバーロキサバン(Xarelto(登録商標)、Bayer Schering)、5.7 μ g/mlの濃度(臨床用量外挿0.4 mg/kg)のヒルジン(Refludan(登録商標), Celgene Europe Limited)、10.7 μ g/mlの濃度(臨床用量外挿0.75 mg/kg)のビバリルジン(Angiox(登録商標), The Medicines Company)。用量外挿は、体重による循環血液容量(70 ml/kg)に基づいた。

1800秒後に凝固が観察されないならば、トロンボエラストメトリーを任意に停止した。

【0132】

配管ループ

全血実験プロトコールは、以前に記載されたモデルから適合させた(Johanssonら, Diabetes. 2005;54:1755～1762)。ポリ塩化ビニル配管(内径6.3 mm、長さ390 mm)で作製され、Corline ヘパリン表面で処理されたループを、Corline (Uppsala, Sweden)から購入した。ループに、リン酸緩衝食塩水に懸濁した細胞試料($5 \times 10^{exp}5$)を補ったあとに、血液を加えた。健常ボランティアからの5 mLの非抗凝固血液を、次いで、各ループに加えた。約45 mL/分の血流を生じさせるために、ループデバイスを、37℃のインキュベータ中の振とう器上に置いた。開始前および開始の30分後に、血液試料を、エチレンジアミン4酢酸

10

20

30

40

50

(最終濃度4.1 mmol/L)およびクエン酸塩(最終濃度12.9 mmol/L)試験管に回収した。血小板を、XE-2100オートメート(Sysmex, Japan)で計数し、Dダイマーを、免疫比濁アッセイ(Innovance Dダイマー, Siemens, Marburg, Germany)により、CA-7000 (Sysmex, Japan)で評価した。

【0133】

抗Xa活性測定

抗Xa活性測定は、CA7000 (Siemens, Marburg, Germany)に適合するBiophen ヘパリン(L RT)キットを用いて行った。簡単に述べると、アッセイは、内因性アンチトロンビンの存在下での、試験されるヘパリン(またはその他の抗Xa物質)による一定量の第Xa因子の阻害と、過剰の第Xa因子による第Xa因子特異的発色基質の加水分解に基づく発色動態法である。ヘパリン(10 UI/ml、50 UI/mlおよび100 UI/ml)を補ったかまたは補っていないアルブミンに懸濁した細胞の血液中での30分間のインキュベーションの後に、抗Xa活性を、血液遠心分離の後に得られた血漿において測定した。

10

【0134】

hALPC懸濁物のTFおよびTFPI発現

免疫蛍光研究を行って、TFの存在を評価した。このために、ヒト成体肝臓由来幹細胞を、カバーガラス上に置き、パラホルムアルデヒド4%(Merck, Darmstadt, Germany)で20分間固定した。次いで、これらの細胞を、Trisベースナトリウムバッファー(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4および150 mmol/L NaCl) (Organics [VWR], Leuven, Belgium)中のTriton X-100 (Sigma, Bornem, Belgium) 1%と15分間、次いでTrisベースナトリウムバッファー中のミルク3%と1時間インキュベートした。1次抗体であるマウスIgG1モノクローナル抗体(mAb)抗TF (免疫グロブリン[Ig]G1 n4508; American Diagnostica, Andrey, France)をTrisベースナトリウム中で希釈(1/50)し、細胞と1時間インキュベートした。用いた2次抗体は、フルオレセインイソチオシアネートコンジュゲート抗マウスIgG (Sigma)であった。核を、4-,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI; Sigma)染色により明示した。陰性実験対照を行った(1次または2次抗体の非存在下)。TFの存在は、フローサイトメトリー分析によっても確認した。膜結合形のTFを検出するために、細胞を、0.5%ウシ血清アルブミンを補ったリン酸緩衝食塩水(FACSバッファー)で洗浄し、4℃にて20分間、10%補体除去プールヒト血清を含有するFACSバッファーで希釈した、TFに対するフルオレセインイソチオシアネート FITC コンジュゲート IgG1 mAb no.4508CJ (American Diagnostica)または対応するアイソタイプ一致対照mAb (BD Biosciences, Erembogedem, Belgium)とインキュベートした。サイトソル形のTFを検出するために、細胞を、Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences)と室温にて20分間インキュベートし、Permwash (BD Biosciences)で洗浄した。試料を、次いで、室温にて20分間、permwashで希釈したFITCコンジュゲート抗TF mAbまたは対応するアイソタイプ一致対照mAb (BD Biosciences)とインキュベートした。細胞蛍光は、BD FACS CANTO IIフローサイトメータを用いて測定し、BD FACS Divaソフトウェアを用いて分析した。

20

免疫細胞化学またはフローサイトメトリー分析により組織因子経路阻害物質(TFPI)発現を評価するために、抗TFPI抗体は得られなかった。

30

【0135】

2つの形のTFおよびTFPIの存在を、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により分析した。メッセンジャーRNAを、 $0.5 \times 10^{exp} 6$ 細胞から、製造者の使用説明に従ってTripure単離試薬キット(Roche Applied Science, Brussels, Belgium)を用いて抽出した。1ステップRT-PCRを、サーモサイクラー装置(Applied Biosystems, Lennik, Belgium)上で、Invitrogenで合成したプライマーを用いて行った。TFまたはグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)についてのRT-PCRは、表2に詳述するプライマーを用いて行った。

40

【0136】

【表2】

表2

プライマー	配列	配列番号
TF センスプライマー	5-TGAATGTGACCGTAGAAGATGA-3	1
TF アンチセンスプライマー	5-GGAGTTCTCCTCCAGCTCT-3	2
TFPI センスプライマー	5-GGAAGAAGATCCTGGAATATCGAGG-3	3
TFPI アンチセンスプライマー	5-CTTGGTTGATTGCGGAGTCAGGGAG-3	4
GAPDH センスプライマー	5-CGGACTAACGGATTGGTCGTAT-3	5
GAPDH アンチセンスプライマー	5-AGCCTTCTCCATGGTGGT-3	6
As-TF センスプライマー	5-TCTTCAAGTTCAGGAAAGAAATATTCT-3	7
As-TF アンチセンスプライマー	5-CCAGGATGATGACAAGGATGA-3	8

【0137】

生成物を、1%アガロースゲル上の電気泳動により分離し、紫外線ランプの下で臭化工チジウムを用いて視覚化した。

TF、as-TF、TFPIおよびシクロフィリンAについてのリアルタイムRT-PCRも、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems, California, USA)上で、表Bに列挙するTaqMan(登録商標)遺伝子発現アッセイを用いて行った。TF発現のために、2つのアッセイ、すなわち膜形および可溶形(選択的スプライシング、asTF)の両方に存在する領域を増幅するもの(TF共通)と、膜形(古典的)のみに存在する領域を増幅する他方のもの(TF膜)とを用いた。パラメータCtは、各cDNA試料およびプライマー対について導き、シクロフィリンAのCtを減じてCtを得た。次いで、Ctを、校正物質遺伝子Ctを減じることにより得て、結果を、mRNA量の倍数変化として表した。asTF発現は、TF共通とTF膜との間のCtの差として算出した。プライマーは、表3に詳述するとおりであった。

【0138】

【表3】

表3

遺伝子	参照 TaqMan(登録商標)遺伝子発現アッセイ	アンプリコン長さ
TF 共通	Hs01076032_m1	69
TF 膜	Hs01076029_m1	85
TFPI	Hs01041344_m1	78
シクロフィリンA	Hs99999904_m1	98

CAPAN株化細胞をTF陽性対照として用い、HUVEC 株化細胞をTFPI陽性対照として用いた。

【0139】

患者への注入および抗凝固プロトコール

患者は、合計で22億のhALPCを2日間にわたる7回の注入で受ける。門脈へのカテーテル配置の前に、患者は、セファゾリン(1gr)を含む前投薬を受ける。カテーテルは、超音波制御の下に門脈系に配置する。ソルメドロール(80 mg)を注入前に注射する。免疫抑制処置は、6～8 ng/mlの血液レベルを目標にするタクロリムス(Prograft(登録商標), Aste

10

20

30

40

50

llas Pharma)で構成される。具体的な凝固予防が処方される。細胞を、アルブミン5%および1μg/mlの濃度のリバーロキサバンに懸濁する。細胞注入中に、対象者は、ビバリルジン(1.75mg/kg)を受ける。逐次的細胞注入の合間に、対象者は、トロンボエラストメトリー試験に応じて、2~4時間にわたってビバリルジン(0.25mg/kg)を受ける。

【0140】

統計

統計的有意差(*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001)は、Mann-Whitney検定により評価した。有意値は、第1種過誤を回避するためにBonferroni補正に従って調整した。Kruskal-Wallis検定は、1元ANOVA分析のために用いた。

【0141】

実施例2：成体由来ヒト肝臓間葉系幹細胞(hALPC)の凝固促進活性

ヒト成体肝臓前駆細胞(hALPC)の凝固促進活性(PCA)を、トロンボエラストメトリー法により、ヒト血液および血漿について証明した。hALPCの凝固時間(CT)は、トロンボエラストグラムにより評価されるように、肝細胞のものより小さかった(血液では、117.5±33.8秒(n=15)対285.8±87.0秒(n=11)、p<0.001)(血漿では、112.6±18.4秒(n=9)対363.0±180.1秒(n=5)、p<0.05)(図1Aおよび1B)。細胞を添加しない対照CTは、血液において646.2±111.7秒(n=15)、および血漿において781.9±150.5(n=9)にて測定された。外来のTFを加えなかった場合に、hALPCの同等のPCAが観察された(図2)。細胞が存在しないhALPC培養培地を、細胞の代わりにトロンボエラストグラムに配置した場合に、PCAは得られなかつた(図3)。

10

【0142】

hALPCのPCAを、配管ループモデルにおいても評価した。血小板計数の減少およびDダイマーレベルの増加が、hALPCを血液とインキュベートした後に観察された。295 000/μl~109 000/μl(実験1)および310 000/μl~134 000/μl(実験2)の血小板；100 ng/ml~700 ng/ml(実験2)および95 ng/ml~740 ng/ml(実験2)のDダイマー。

20

【0143】

実施例3：間葉系細胞の凝固促進活性

骨髄間葉系幹細胞(279.3±108.3秒(n=3))、皮膚線維芽細胞(121.8±26.53秒(n=3))および肝臓筋線維芽細胞(61.7±7.6秒(n=3))のPCAも、トロンボエラストメトリー法により、ヒト全血について証明した。骨髄造血幹細胞は、非凝固促進性細胞(590.7±25.3秒(n=3))の対照として用いた(図4)。

30

【0144】

実施例4：hALPCの凝固促進活性の変調

まず、凝固因子欠損血漿におけるhALPC PCAを分析した。TFの補因子である第VII因子欠損血漿を用いた場合に、PCA hALPCは、部分的にだけ減少したことが示された(298.3±42.3秒(n=3)、正常血漿中のPCAと比較してp<0.01)(図5)。第II因子(トロンビン)または第X因子欠損血漿において、わずかなレベルでの第V因子欠損血漿と同様に、hALPCのPCAは観察されなかつた(図5)。さらに、そして肝細胞PCAとは逆に(図6C)、hALPC PCAが、容量を5倍まで増加しても(図13)、未分画ヘパリン(225.8±149.8秒(n=15))、低分子量ヘパリン(112.3±22.5秒(n=3))またはフォンダパリヌクス(209.7±149.7秒(n=3))により完全には阻害されなかつたことが示された(図6A)。ヘパリンを、細胞の非存在下で用いた場合に、凝固は観察されなかつた。

40

【0145】

トロンビン阻害薬であるヒルジンまたはビバリルジンは、用量を増加しても(2倍または5倍)(図14および15)、hALPC PCAの部分的な制御だけを可能にした(それぞれ256.3±1.8秒(n=3)および380.8±114.7秒(n=4))(図6B)。肝細胞PCAは、トロンビン阻害薬であるヒルジンおよびビバリルジンにより制御された(図6D)。対照血液(細胞の非存在下)は、ビバリルジンを用いてCTが1075.0±107.2であり、ヒルジンを用いて測定可能な凝固は観察されなかつた。

抗ビタミンK薬(INR 2~3で処置された患者から得られた血液)は、対照(細胞の不在)

50

についてさえトロンボエラストメトリーにおいて影響を示さなかった(データは示さず)。

【0146】

ビバリルジンと未分画ヘパリン(1240.0 ± 338.7 秒($n=3$))またはエノキサパリン(725.0 ± 90.1 秒($n=3$))またはフォンダパリヌクス(909.0 ± 421.4 秒($n=3$))との併用が、アンチトロンピン活性化物質とトロンピン阻害物質との相乗的組み合わせであり、hALPCのPCAの変調を可能にすることが証明された(図6Eおよび6F)。ヘパリンとエノキサパリンまたはフォンダパリヌクスとを組み合わせた場合に、hALPC PCAの完全な変調は得られなかった(図6G)。

【0147】

同様の実験を用いて、未分画ヘパリンが、骨髓間葉系細胞、皮膚線維芽細胞のPCAを制御できるが、肝臓筋線維芽細胞PCAに対しては不活性であったことが証明された(図6H)。未分画ヘパリンとビバリルジンとの併用も、ビバリルジン単独とは対照的に、肝臓筋線維芽細胞のPCAを変調することが示された(図6I)。

【0148】

ビバリルジンと直接的抗血栓剤標的化第Xa因子(リバーコキサバン)との併用が、相乗的組み合わせであって、hALPCのPCAを変調することを次に証明した(図7)。リバーコキサバン単独の使用は、hALPCのPCAに対して効果がなかった。

PCAを有するその他の細胞(骨髓間葉系幹細胞、皮膚線維芽細胞、肝臓筋線維芽細胞)において同様の実験を行って、直接的第Xa因子阻害物質と直接的トロンピン阻害物質(ヒルジンまたはビバリルジン)との併用が、これらの細胞のPCAも変調できることを示す。

【0149】

異なる直接的第Xa因子阻害物質(アピキサバン、ベトリキサバン、エドキサバン、オタミキサバン、YM466、DX9065a、ラザキサバン、ダレキサバン、レタキサバン、LY517717、GW813893、YM-60828、エリバキサバン、JTV-803、KFA-144、DPC-423、RPR-209685、MCM-09およびアンチスタシン)を用いて同様の実験を行って、これらの直接的第Xa因子阻害物質と直接的トロンピン阻害物質(ヒルジンまたはビバリルジン)との併用が、これらの細胞のPCAも変調できることを示す。

特に、本明細書の他の場所の表1に示す直接的第Xa因子阻害物質と直接的トロンピン阻害物質との組み合わせを用いる実験も行って、これらの直接的第Xa因子阻害物質と直接的トロンピン阻害物質との併用が、これらの細胞のPCAも変調できることを示す。

【0150】

実施例5：hALPCはTFおよびTFPIを発現する

TF発現は、免疫蛍光により最初に記録された。図8に示すように、全ての細胞がTFを構成的に発現することが見出された(均一な細胞質染色)。hALPCのフローサイトメトリー分析により、TFについての陽性で特異的な染色が確認された(膜結合形について $94.9 \pm 1.0\%$ 、サイトソル形について $93.6 \pm 10.2\%$ 、それぞれ対照アイソタイプ $24.2 \pm 6.1\%$ および $7.6 \pm 5.8\%$ 、ならびにそれぞれ未標識細胞 $13.2 \pm 7.1\%$ および $3.7 \pm 4.1\%$ と比較； $n=3$)。

【0151】

TFおよびその阻害物質であるTFPIの発現をmRNAレベルにてRT-PCRを用いても評価した(図9)。TF mRNAの膜形および選択的スプライシングバリエントはともに、hALPCにおいて発現された。TFPIも発現された。さらなる実験において、リアルタイムRT-PCRを用いて、TF、as-TFおよびTFPI mRNAレベルを定量した。図10に示すように、膜TFバリエントが優勢に発現された($n=3$)。さらに、TFの発現は、肝細胞と比較して、hALPCについてより重要である($n=3$)。逆に、肝細胞によるTFPIの発現は、hALPCのものより高かった($n=3$)。

【0152】

PCAの誘導におけるTFの役割を、細胞を抗ヒトTF IgGとのプレインキュベーションにより決定した。図11に示すように、hALPCのPCAは、以前に証明されたように(Fisherら, Transplantation. 2000;69:303~307)、肝細胞とは対照的に、TFを遮断することによって部分的にだけ制御された(324.8 ± 11.4 秒($n=5$)、TF抗体の不在と比較して $p < 0.01$)。

図5にすでに示すように、第VII因子欠損血漿においてhALPC PCAの部分的制御だけが得

10

20

30

40

50

られた。

【0153】

実施例6：hALPCおよびヘパリン

ヘパリン単独ではhALPCに対して抗凝固効果が存在しないことと関連して、hALPC (0.05 ± 0.03 UI/ml)と10 UI/mlの濃度のヘパリンとのインキュベーション後に得られた血漿において、わずかな抗Xa活性だけが観察された(図12)。

【0154】

実施例7：細胞移植

ALDSCを、 5×10^6 細胞/mlの濃度で、重炭酸塩(0.84 g/l)、グルコース(2.5 g/l)およびリバーコキサバン(1 μ g/ml)を含有するハイブミン(Hibumin) (5%)の溶液に懸濁する。ALDSC懸濁物を、対象者に非経口的に注入する。細胞注入中に、対象者は、ビバリルジン(0.75 mg/kg)を受ける。逐次的注入の合間に、対象者は、ビバリルジン(0.25 mg/kg)を、トロンボエラストメトリー試験に依存して、2~4時間にわたって受ける。

【0155】

細胞移植の際の直接的第Xa因子阻害物質(例えばリバーコキサバン)とトロンビン阻害物質(例えばビバリルジン)との併用投与が、細胞移植効率および細胞生着能を改善することが明らかである。細胞移植の際の直接的第Xa因子阻害物質とトロンビン阻害物質との併用投与は、細胞の凝固促進活性を低減し、細胞移植関連血栓症および細胞移植関連合併症、例えば細胞損失、細胞拒絶および炎症を妨げる。

【受託番号】

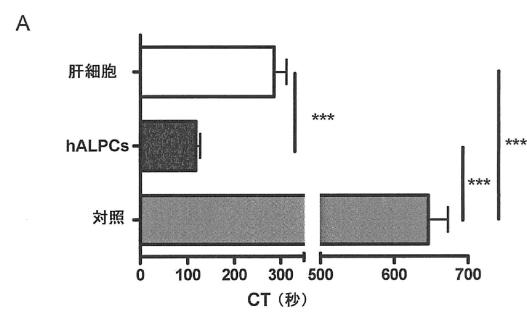
【0156】

L M B P 6 4 5 2 C B

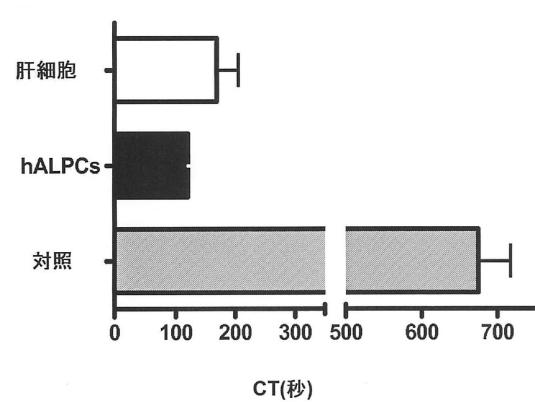
10

20

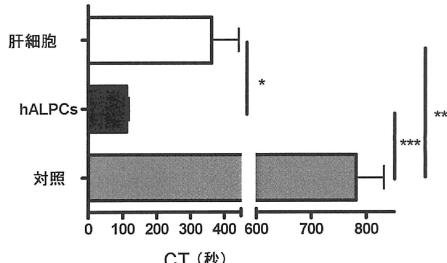
【図1】



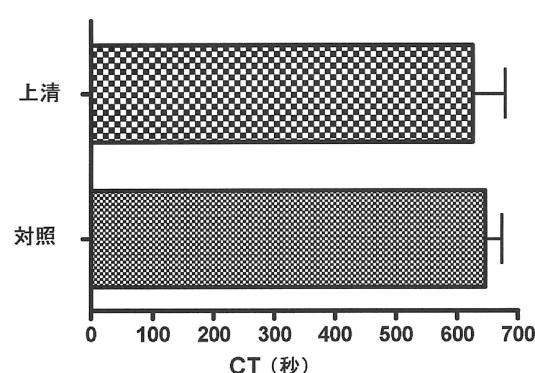
【図2】



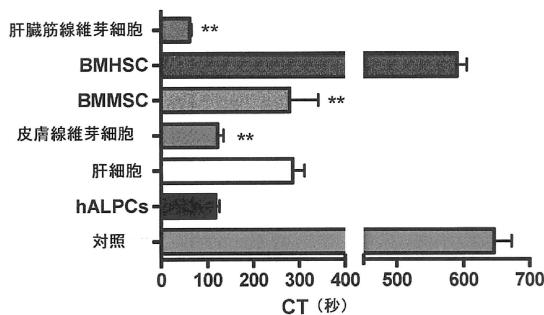
B



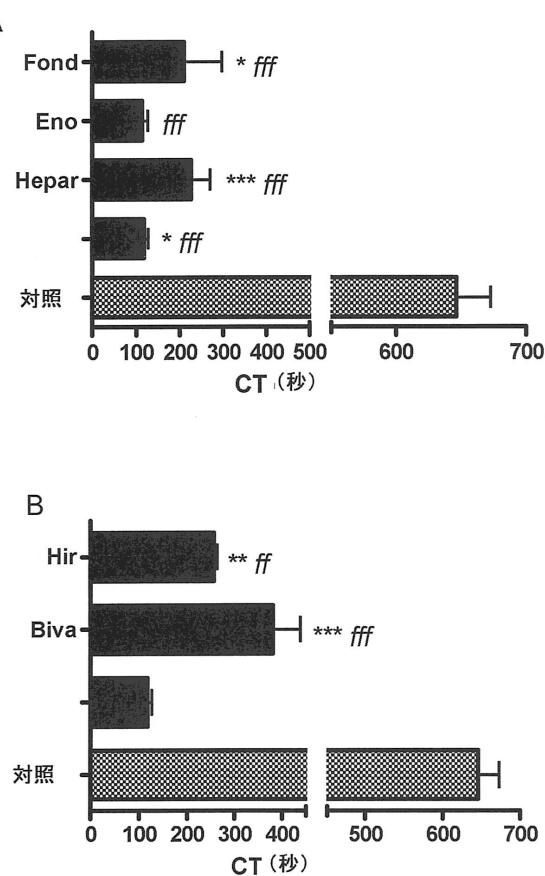
【図3】



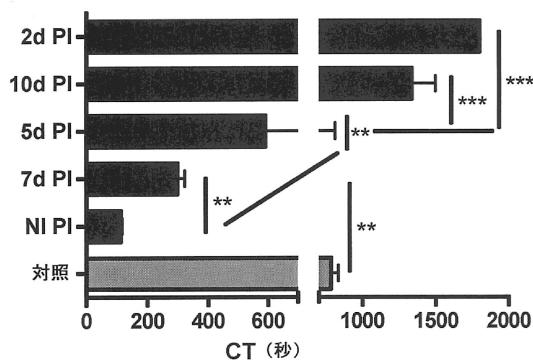
【図4】



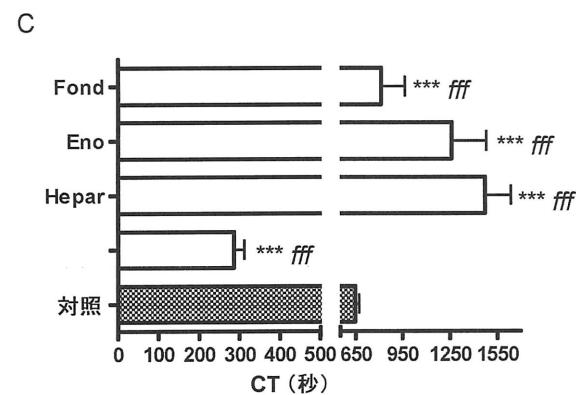
【図6-1】



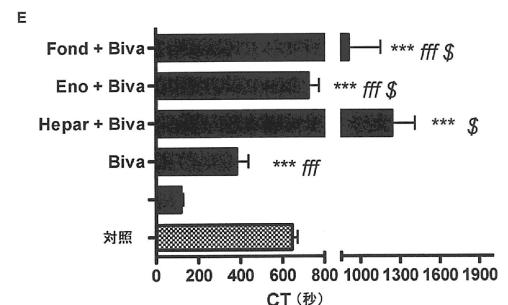
【図5】



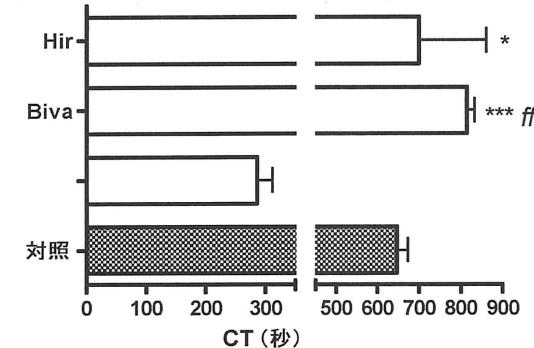
【図6-2】



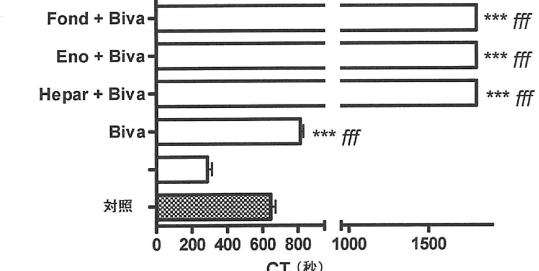
【図6-3】



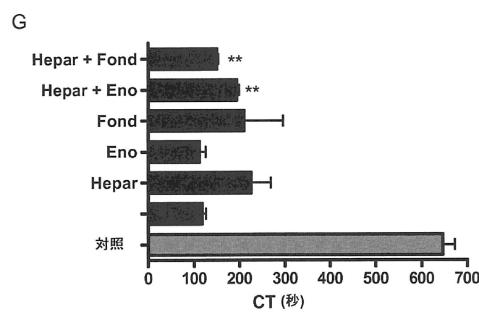
D



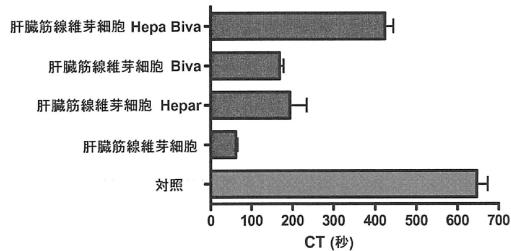
F



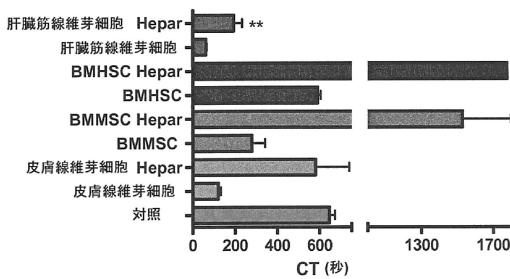
【図 6 - 4】



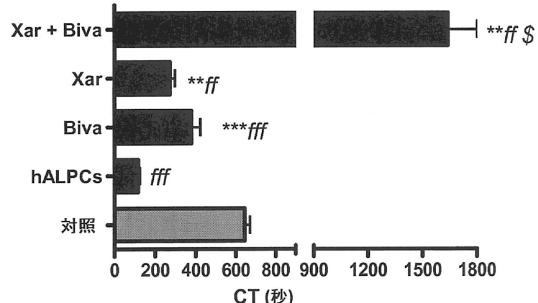
【図 6 - 5】



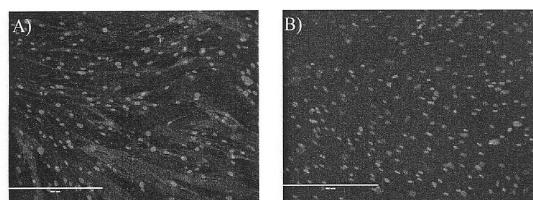
H



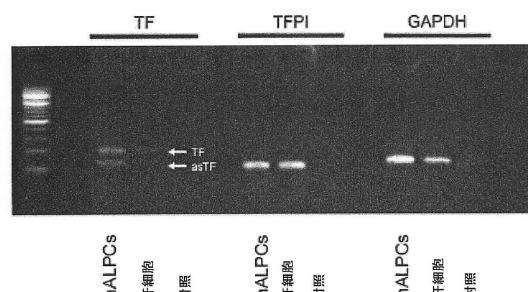
【図 7】



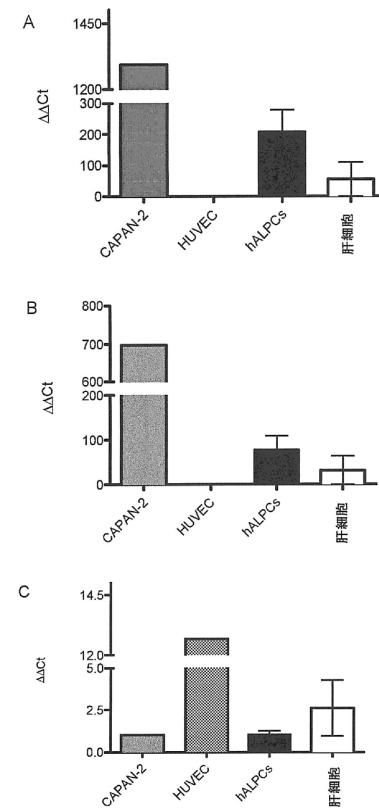
【図 8】



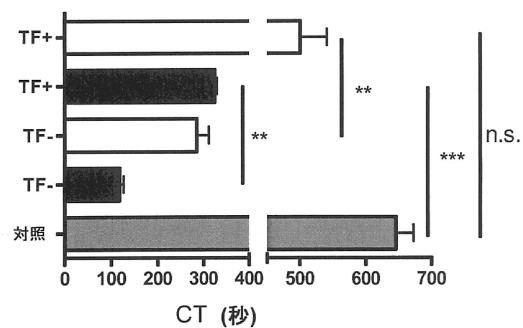
【図 9】



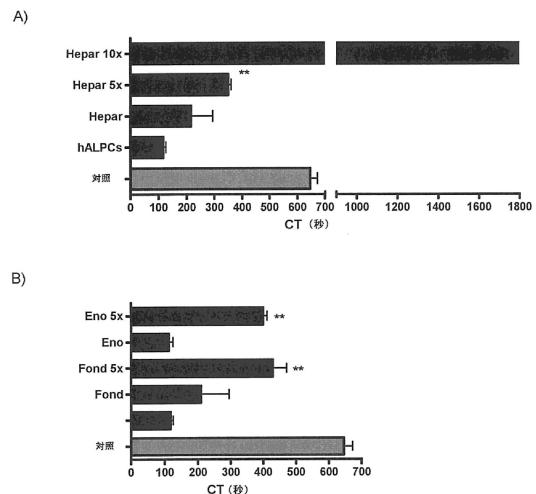
【図 10】



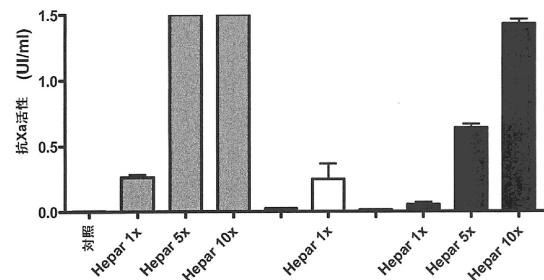
【図1-1】



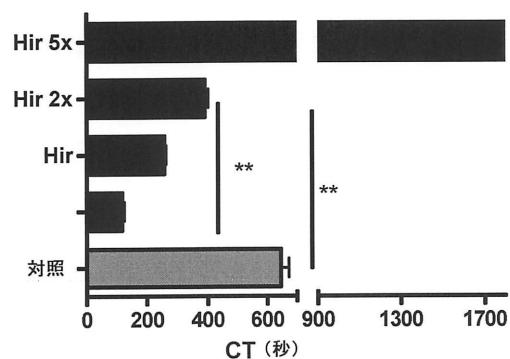
【図1-3】



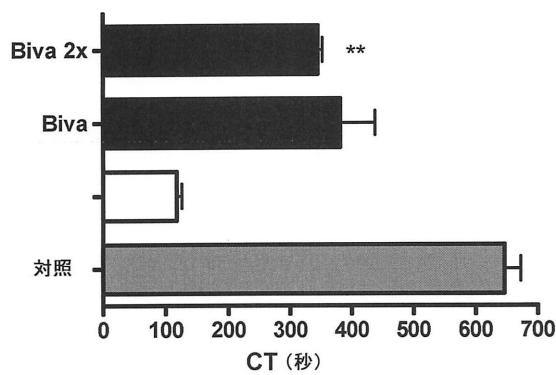
【図1-2】



【図1-4】



【図1-5】



【配列表】

0006034406000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 1/06 (2006.01) A 6 1 P 1/06
A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10

(74)代理人 100159385
弁理士 甲斐 伸二
(74)代理人 100163407
弁理士 金子 裕輔
(74)代理人 100166936
弁理士 稲本 潔
(74)代理人 100174883
弁理士 富田 雅己
(72)発明者 ステファン, グザヴィエ
ベルギー、ビー- 1330 リクサンサール、アベニュ アレクサンドル 16

(72)発明者 ソカル, エティエンヌ
ベルギー、ビー- 1560 フーイラールト、イーディー. ヴァンダーヴァレンストラート、30
エー
(72)発明者 ナジミ, ムスタファ
ベルギー、ビー- 1200 ブリュッセル、アベニュ ド ラ シャルミル、16 / 85
(72)発明者 エークハウト, ステファン
ベルギー、ビー- 7050 エルビスエル、シュマン ドゥ プランス、161
(72)発明者 ハーマンズ, セドリック
ベルギー、ブリュッセル 1150、ティル オー ピジョン、80

審査官 井上 明子

(56)参考文献 特表2004-503508 (JP, A)
特表2008-534552 (JP, A)
特表2009-520474 (JP, A)
Pediatr Transplantation, 2008年, Vol.12, p.6-13

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 6 1 K 35 / 00 - 35 / 768
A 6 1 K 38 / 00 - 38 / 58
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)