

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-531889

(P2016-531889A)

(43) 公表日 平成28年10月13日(2016.10.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/51 (2015.01)	A 6 1 K 35/51	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/50 (2015.01)	A 6 1 K 35/50	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-519848 (P2016-519848)	(71) 出願人	513302053
(86) (22) 出願日	平成26年10月2日 (2014.10.2)		アントフロゲネシス コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成28年5月30日 (2016.5.30)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/058774		7 0 5 9 ウォーレン テクノロジー ド
(87) 国際公開番号	W02015/051088		ライブ 3 3
(87) 国際公開日	平成27年4月9日 (2015.4.9)	(74) 代理人	100097456
(31) 優先権主張番号	61/886, 648		弁理士 石川 徹
(32) 優先日	平成25年10月3日 (2013.10.3)	(72) 発明者	ジョディ ビー. グルネイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 3 1
(31) 優先権主張番号	61/890, 057		シカゴ ノース オリファント アベニ
(32) 優先日	平成25年10月11日 (2013.10.11)		ュー 6 5 4 8
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	キアオクイ ズハング
			アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
			7 0 3 9 リビングストン マウントヘブ
			ン ドライブ 1 0
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト胎盤および造血細胞由来の細胞による治療

(57) 【要約】

本明細書で提供されるのは、ヒト胎盤灌流液由来の単核球および造血細胞を対象、例えば、ヒト対象に投与することを含む治療方法、それらを含む組成物、およびキメラリズムを確立し、組織（例えば、血液）を生着し、移植片対宿主病の重症度または持続期間を減少させ、代謝異常や血液悪性腫瘍などの血液学的疾患の症状を治療または寛解するためのそれらの使用である。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト臍帯血（UCB）細胞を対象に移植する方法であって、ヒト胎盤灌流液由来の単核球の集団と組み合わせてUCB細胞を投与することを含み、前記UCB細胞は、前記対象と非血縁である、前記方法。

【請求項 2】

ヒト臍帯血（UCB）細胞を対象に移植する方法であって、ヒト胎盤灌流液由来の単核球の集団と組み合わせてUCB細胞を投与することを含み、ヒト胎盤灌流液由来の前記細胞は、前記対象と非血縁である、前記方法。

【請求項 3】

ヒト臍帯血（UCB）細胞を対象に移植する方法であって、ヒト胎盤灌流液由来の単核球の集団と組み合わせてUCB細胞を投与することを含み、ヒト胎盤灌流液由来の前記細胞は、前記対象に適合しない、前記方法。

10

【請求項 4】

前記UCB細胞が、胎盤灌流液由来の前記単核球と非血縁である、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記UCB細胞が、胎盤灌流液由来の前記単核球に適合しない、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記UCB細胞が、胎盤灌流液由来の前記単核球と非血縁であるかまたは適合しない、請求項 1、2、または 3 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記UCB細胞が、前記対象に 3 / 6 ~ 6 / 6 HLA 適合している、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

1 単位のUCB細胞を投与する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

1 単位超のUCB細胞を投与する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

2 ~ 6 単位のUCB細胞を投与する、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記UCB細胞が、UCB中に存在する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

胎盤灌流液由来の前記単核球が、胎盤灌流液中に存在する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記胎盤灌流液が、部分的に放血させた胎盤から得られる、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記胎盤灌流液細胞の 2 % またはそれ以上が、CD34+である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記方法が、前記対象におけるキメリズムをもたらす、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記キメリズムが、UCB細胞またはそれに由来する子孫を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記キメリズムが、UCB細胞またはそれに由来する子孫と、胎盤灌流液細胞またはそれに由来する子孫とを含む、請求項15または16に記載の方法。

【請求項18】

1単位超のUCB細胞を投与し、前記方法が、前記対象におけるキメリズムをもたらす、前記キメリズムが、1単位超のUCB細胞またはそれに由来する子孫に由来する細胞を含む、請求項15～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記キメリズムが、胎盤灌流液細胞またはそれに由来する子孫を含む、請求項15～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記方法が、UCB細胞の生着をもたらす、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記方法が、胎盤灌流液細胞の生着をもたらす、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記方法が、移植片対宿主病の持続期間または重篤度を減少させる、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記対象が腫瘍を有し、前記方法が、移植片対腫瘍反応をもたらす、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記方法が、それを必要とする対象において、副腎脳白質ジストロフィー、ムコ多糖症、ニーマン-ピック病、異染性白質ジストロフィー、ウォルマン病、クラッペ病、ゴーシェ病、フコシドーシス、またはバッテン病などの代謝異常の症状の寛解をもたらす、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記方法は、それを必要とする対象において、骨髄異形成症候群、無巨核球性血小板減少症、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、鎌状赤血球病、ベータサラセミア、重症複合型免疫不全症、骨髄不全症、または貧血、例えば、重症再生不良性貧血またはダイアモンド・ブラックファン貧血などの血液学的疾患または悪性疾患の症状の寛解をもたらす、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記対象が、ヒト対象である、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記ヒト対象が、25歳またはそれよりも若い、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記ヒト対象が、乳児である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

造血細胞を対象に移植する方法であって、ヒト胎盤灌流液、例えば、ヒト胎盤灌流液由来の単核球と組み合わせて前記造血細胞を投与することを含む、前記方法。

【請求項30】

前記造血細胞が、骨髄またはそれに由来する細胞、末梢血またはそれに由来する細胞、または臍帯血またはそれに由来する細胞である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

対象における疾患の治療方法に使用される造血細胞であって、前記方法は、ヒト胎盤灌流液由来の単核球と組み合わせて前記造血細胞を投与することを含み、前記疾患が、代謝異常またはその症状、血液学的疾患または悪性疾患またはその症状、移植片対宿主病、または腫瘍である、前記造血細胞。

【請求項32】

10

20

30

40

50

前記造血細胞が、骨髓またはそれに由来する細胞、末梢血またはそれに由来する細胞、または臍帯血またはそれに由来する細胞である、請求項 3 1 に記載の使用のための造血細胞。

【請求項 3 3】

前記臍帯血細胞が前記対象と非血縁である、またはヒト胎盤灌流液由来の前記単核球が前記対象と非血縁である、またはヒト胎盤灌流液由来の前記単核球が前記対象に適合しない、請求項 3 2 に記載の使用のための造血細胞。

【請求項 3 4】

前記方法が、請求項 4 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載のものである、請求項 3 3 に記載の使用のための造血細胞。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(1. 技術分野)

本出願は、2013年10月11日出願の米国仮特許出願第61/890,057号、および2013年10月3日出願の米国仮特許出願第61/886,648号の利益を請求しており、それらの開示はそれらの全体において参照により本明細書に組み込まれている。

【0002】

本明細書で提供されるのは、ヒト胎盤灌流液および造血細胞由来の単核球を対象、例えば、ヒト対象に投与することを含む治療方法、それらを含む組成物、およびキメラズムを確立し、組織（例えば、血液）を生着し、移植片対宿主病の重症度または持続期間を減少させ、代謝異常や血液悪性腫瘍などの血液学的疾患の症状を治療または寛解するためのそれらの使用である。

20

【背景技術】

【0003】

(2. 背景技術)

同種造血幹細胞移植（HSCT）では、免疫系を再構成し、かつ、血球（造血）を形成することが可能な幹細胞をある個人から別の個人に移す。遺伝子型でヒト白血球抗原（HLA）が同一の血縁関係にあるドナー - 白人患者の約30%に使用可能なドナー - は、HSCTに対する最適なドナーと見なされる。残念なことに、多くの患者は、骨髓が完全に適合する家族または非血縁ドナーが利用可能ではなく、彼らの唯一の治療選択肢は、部分的に適合した血縁関係にあるドナー（PMRD）からの移植を有することであり、これは、移植片対宿主病（GVHD）およびその合併症（例えば、移植関連死）のリスクを伴う。

30

【0004】

臍帯血（UCB）は、HSCTで使用するのに適した細胞の別の供給源を表す。この臨床状況におけるUCBの利点の1つは、GVHDのリスクが軽減されることである。残念なことに、現在のUCB細胞移植療法にも、移植できる細胞の量が限られていることなどの欠点がある。大量のUCB細胞、例えば、1単位超の移植を必要とする場合、安全性や有効性が危険にさらされることがある。さらに、特に、HLA適合が不完全である場合には、生着不全やGVHDのリスクが存在する。骨髓または末梢血に対してUCBを用いるHSCTの別の欠点は、生着までの時間に遅れが生じ、レシピエントの死をもたらすことが多いことである。

40

【0005】

そのため、造血再構成用に設計された幹細胞移植療法の改善が必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

(3. 概要)

一態様では、本明細書で提供されるのは、ヒト胎盤灌流液（HPC）、例えば、ヒト胎

50

盤灌流液由来の単核球と組み合わせて造血細胞を投与することを含む、造血細胞を対象、例えば、ヒト対象に移植する方法である。本明細書に記載の造血細胞を移植する方法で使用する事ができる造血細胞の供給源としては、例えば、骨髓またはそれに由来する細胞、末梢血またはそれに由来する細胞、および臍帯血またはそれに由来する細胞が挙げられる。本明細書で用いる場合、造血細胞のこれらの供給源は、「H T細胞」と総称される。

【0007】

一態様では、本明細書で提供されるのは、H T細胞、例えば、ヒト臍帯血（U C B）細胞を対象に移植する方法であって、前記方法は、ヒト胎盤灌流液由来の単核球の集団と組み合わせてH T細胞、例えば、U C B細胞を投与することを含み、前記H T細胞、例えば、U C B細胞は、対象と非血縁である。一態様では、本明細書で提供されるのは、H T細胞、例えば、U C B細胞を対象に移植する方法であって、前記方法は、ヒト胎盤灌流液由来の単核球の集団と組み合わせてH T細胞、例えば、U C B細胞を投与することを含み、ヒト胎盤灌流液由来の前記細胞は、対象と非血縁である。一態様では、本明細書で提供されるのは、H T細胞、例えば、U C B細胞を対象に移植する方法であって、前記方法は、ヒト胎盤灌流液由来の単核球の集団と組み合わせてH T細胞、例えば、U C B細胞を投与することを含み、ヒト胎盤灌流液由来の前記細胞は、対象に適合しない。

10

【0008】

一態様では、本明細書で提供されるのは、対象における疾患の治療方法に使用される造血細胞であって、該方法は、ヒト胎盤灌流液由来の単核球と組み合わせて前記造血細胞を投与することを含み、該疾患は、代謝異常またはその症状、血液学的疾患または悪性疾患またはその症状、移植片対宿主病、または腫瘍である。造血細胞は、骨髓細胞またはそれに由来する細胞、末梢血細胞またはそれに由来する細胞、あるいはU C B細胞またはそれに由来する細胞であってもよい。一態様では、U C B細胞は、対象と非血縁である。一態様では、ヒト胎盤灌流液由来の単核球は、対象と非血縁である。一態様では、ヒト胎盤灌流液由来の単核球は、対象に適合しない。後述の実施態様は、開示の各態様のことを指す。

20

【0009】

ある実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞は、胎盤灌流液由来の前記単核球と非血縁である。ある実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞は、胎盤灌流液由来の前記単核球に適合しない。ある実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞は、胎盤灌流液由来の前記単核球と非血縁であるかまたは適合しない。特定の実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞は、対象に3 / 6 ~ 6 / 6 H L A 適合している。特定の実施態様では、H T細胞は、例えば、成人の供給源由来のH T細胞対象に6 / 8 ~ 8 / 8 H L A 適合している。

30

【0010】

ある実施態様では、1単位のH T細胞、例えば、U C B細胞を投与する。他の実施態様では、1単位超のH T細胞、例えば、U C B細胞を投与する。特定の実施態様では、2 ~ 6単位のH T細胞、例えば、U C B細胞を投与する。

【0011】

ある実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞は、血液、例えば、U C B中に存在する。ある実施態様では、胎盤灌流液由来の単核球は、胎盤灌流液中に存在する。

40

【0012】

ある実施態様では、胎盤灌流液は、部分的に放血させた胎盤から得られる。

【0013】

ある実施態様では、胎盤灌流液細胞の2 %またはそれ以上は、C D 3 4 + である。

【0014】

ある実施態様では、該方法は、対象におけるキメリズムをもたらす。特定の実施態様では、該キメリズムは、H T細胞、例えば、H T細胞、例えば、U C B細胞、またはそれに由来する子孫を含む。特定の実施態様では、1単位超のH T細胞、例えば、U C B細胞を投与し、該方法は、対象におけるキメリズムをもたらす、該キメリズムは、1単位超のH

50

T細胞由来の細胞、例えば、UCB細胞、またはそれに由来する子孫を含む。特定の実施態様では、キメリズムは、胎盤灌流液細胞またはそれに由来する子孫を含む。特定の実施態様では、キメリズムは、HT細胞、例えば、UCB細胞、またはそれに由来する子孫と、胎盤灌流液細胞またはそれに由来する子孫とを含む。

【0015】

ある実施態様では、該方法は、HT細胞、例えば、UCB細胞の生着をもたらす。特定の実施態様では、該方法は、胎盤灌流液細胞の生着をもたらす。

【0016】

ある実施態様では、該方法は、移植片対宿主病の持続期間または重篤度を減少させる。

【0017】

ある実施態様では、対象は腫瘍を有し、該方法は、移植片対腫瘍反応をもたらす。ある実施態様では、該方法は、腫瘍治療をもたらす。

【0018】

ある実施態様では、該方法は、それを必要とする対象において、副腎脳白質ジストロフィー、ムコ多糖症、ニーマン・ピック病、異染性白質ジストロフィー、ウォルマン病、クラッペ病、ゴーシェ病、フコシドーシス、またはパッテン病などの代謝異常の症状の寛解をもたらす。

【0019】

ある実施態様では、該方法は、それを必要とする対象において、骨髓異形成症候群、無巨核球性血小板減少症、急性リンパ性白血病、急性骨髓性白血病、鎌状赤血球病、ベータサラセミア、重症複合型免疫不全症、骨髓不全症、または貧血（例えば、重症再生不良性貧血またはダイヤモンド・ブラックファン貧血）などの血液学的疾患または悪性疾患の症状の寛解をもたらす。

【0020】

ある実施態様では、対象は、ヒト対象である。ある実施態様では、ヒト対象は、25歳またはそれよりも若い。特定の実施態様では、ヒト対象は、乳児である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

(4. 詳細な説明)

(4. 1. 造血細胞、例えば、臍帯血細胞、およびヒト胎盤灌流液由来の細胞を用いる方法)

一態様では、本明細書で提供されるのは、ヒト胎盤灌流液（HPC）、例えば、ヒト胎盤灌流液由来の単核球と組み合わせて造血細胞を投与することを含む、造血細胞を対象、例えば、ヒト対象に移植する方法である。本明細書に記載の造血細胞を移植する方法で使用する事ができる造血細胞の供給源としては、例えば、骨髓またはそれに由来する細胞、末梢血またはそれに由来する細胞、および臍帯血またはそれに由来する細胞が挙げられる。本明細書で用いる場合、造血細胞のこれらの供給源は、「HT細胞」と総称される。

【0022】

一実施態様では、本明細書で提供されるのは、ヒト胎盤灌流液（HPC）、例えば、ヒト胎盤灌流液由来の単核球と組み合わせてHT細胞、例えば、ヒト臍帯血細胞（UCB）細胞、例えば、ヒト臍帯血を投与することを含む、HT細胞、例えば、ヒト臍帯血細胞（UCB）細胞、例えば、ヒト臍帯血を対象、例えば、ヒト対象に移植する方法である。一実施態様では、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、ヒトUCBは、対象と非血縁である。特定の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞、例えば、ヒトUCBは、対象に部分的に不適合である。別の実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、対象と非血縁である。特定の実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、対象に部分的に不適合である。別の特定の実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、対象に適合しない。さらに別の実施態様では、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、ヒトUCBは、対象と非血縁であり、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、対象と非血縁である。さらに別の実施態様では、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、

10

20

30

40

50

ヒトUCBは、対象と非血縁であり、かつ、該対象に部分的に不適合であり、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、対象と非血縁であり、かつ、該対象に部分的に不適合であるかまたは不適合である。一実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、UCBと非血縁であり、かつ、不適合である。一実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、UCB、およびレシピエントと非血縁であり、かつ、不適合である。

【0023】

特に記載のない限り、UCBまたはHPCの文脈において本明細書で使用される「血縁関係にある」とは、自身または一親等もしくは二親等血縁者のことを言う。例えば、対象と血縁関係にあるUCBとは、対象自身由来のUCB、または対象の一親等もしくは二親等血縁者由来のUCBのことを言う。別の例では、HPCと血縁関係にあるUCBとは、同じドナー、または一親等もしくは二親等血縁者であるドナー由来のUCBおよびHPCのことを言う。同様に、特に記載のない限り、これらの文脈における「非血縁である」とは、二親等血縁者の関係よりも遠い関係のことを言う。

10

【0024】

特に記載のない限り、UCBまたはヒト胎盤灌流液由来の細胞（例えば、HPC）の文脈において本明細書で使用される「適合した」とは、HLA適合のことを言う。さらに、本明細書で使用される、UCBまたはヒト胎盤灌流液由来の細胞（例えば、HPC）の文脈において本明細書で使用される「部分的に不適合である」とは、3/6、4/6、または5/6のHLA遺伝子座で適合する状況のことを言い、または、例えば、成人の供給源由来のHT細胞に対する特定の実施態様では、6/8、7/8、または8/8のHLA遺伝子座で適合する状況のことを言う。また、特に記載のない限り、UCBまたはヒト胎盤灌流液由来の細胞（例えば、HPC）の文脈において本明細書で使用される「不適合である」または「適合しない」とは、0/6、1/6、または2/6のHLA遺伝子座での適合のことを言い、または、例えば、成人の供給源由来のHT細胞に対する特定の実施態様では、0/8、1/8、2/8、3/8、4/8、または5/8のHLA遺伝子座での適合のことを言う。「適合した」、「部分的に不適合であった」、および「不適合であった」とは、例えば、HT細胞、例えば、UCB細胞とHPCとの間、HT細胞、例えば、UCB細胞の単位間、および/または、HT細胞、例えば、UCB細胞、および/またはHPCと細胞のレシピエントである対象との間の関係のことを指すこともある。

20

30

【0025】

特に記載のない限り、本明細書で使用される（例えば、移植の文脈における）、UCBまたはそれに由来する細胞の「単位」とは、単一の臍帯由来のUCBまたはそれに由来する細胞のことを言う。ある実施態様では、そのような方法は、1単位のUCBまたはそれに由来する細胞を投与することを含む。別の実施態様では、本明細書に示される方法は、複数単位のUCBまたはそれに由来する細胞を投与することを含む。例えば、本明細書に示される方法は、2、3、または4単位のUCBまたはそれに由来する細胞を投与することを含むことができる。1単位超のHT細胞、例えば、UCB細胞を使用する例では、ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞の少なくとも一部分は、対象と、HPCと、および/または、HT細胞、例えば、UCB細胞（例えば、他のUCB細胞単位）の他の部分と非血縁であり得る。1単位超のHT細胞、例えば、UCB細胞を使用する例では、ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞の少なくとも一部分は、対象に、HPCに、および/または、HT細胞、例えば、UCB細胞（例えば、他のUCB細胞単位）の他の部分に不適合であるかまたは部分的に不適合であり得る。別の実施態様では、本明細書に示される方法は、1単位未満のHT細胞またはUCBまたはそれに由来する細胞を投与することを含むことができる。例えば、本明細書に示される方法は、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、または0.9単位のHT細胞またはUCBまたはそれに由来する細胞を投与することを含むことができる。特定の実施態様では、本明細書に示される方法は、複数投与にわたって特定数の単位（1未満、1、または2以上）を投与することを含むことができる。

40

50

【 0 0 2 6 】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、H T細胞、例えば、U C B細胞、例えば、U C Bと、H P C、例えば、ヒト胎盤灌流液との組み合わせを対象に投与することを含む、対象におけるキメリズムを誘発する方法であって、H T細胞、例えば、U C B細胞の少なくとも一部分は、対象に部分的に不適合であり、および/または、H P Cは、対象におけるキメリズムが起こるように、対象に不適合であるかまたは部分的に不適合である。特に記述がない限り、本明細書で使用される「キメリズム」とは、対象における非自己D N Aの存在、例えば、レシピエント対象に対して不適合であるかまたは部分的に不適合である細胞由来のD N Aの存在のことを言う。

【 0 0 2 7 】

10

そのような方法の一実施態様では、1単位超のH T細胞、例えば、U C B細胞を対象に投与し、例えば、2、3、または4単位のH T細胞、例えば、U C B細胞を対象に投与する。1単位超のH T細胞、例えば、U C B細胞を対象に投与する特定の実施態様では、キメリズムを誘発する方法は、複数のキメリズムをもたらすことができる、すなわち、1単位超および最大で全単位の投与したH T細胞、例えば、U C B細胞またはその子孫を伴うキメリズムをもたらし得る。

【 0 0 2 8 】

そのような方法の別の実施態様では、H P Cまたはその子孫を伴うキメリズムをもたらし得る。さらに別の実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞（1単位超のH T細胞、例えば、U C B細胞を投与する例では、複数のキメリズムを含む）またはその子孫、およびH P Cまたはその子孫を伴うキメリズムをもたらし得る。

20

【 0 0 2 9 】

そのような方法のさらに別の実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞は、対象と非血縁である。1単位超のH T細胞、例えば、U C Bを投与する例では、1単位以上のH T細胞、例えば、U C B細胞は、対象と非血縁であることがある。そのような方法の特定の実施態様では、H P Cは、対象と非血縁であり、かつ、さらに、H T細胞、例えば、U C B細胞と非血縁であり得る。さらにそのような方法の別の実施態様では、H T細胞、例えば、U C B細胞とH P Cの両方は、対象と非血縁である。

【 0 0 3 0 】

そのような方法のある実施態様では、キメリズム（H T細胞、例えば、U C B細胞、またはその子孫、またはH P Cまたはその子孫のいずれかまたは両方を含む）は、H T細胞、例えば、U C B細胞をH P Cと組み合わせて対象に投与した1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62日、またはそれ以上以内に対象において最初に検出される。

30

【 0 0 3 1 】

キメリズムは、当該技術分野で公知の方法を用いて検出することができる。例えば、キメリズムは、血液試料を用いて検出することができる。一実施態様では、キメリズムは、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）ベース方法を用いて、例えば、短縦列反復アッセイによって検出される。一実施態様では、造血幹細胞移植後のキメリズムに対する試験は、レシピエントとドナーの遺伝子プロファイルを識別することと、その後、レシピエントの血液、骨髓、または他の組織中における混合の度合いを評価することを伴う。D N Aによるキメリズム試験（生着分析）は、ヒト同一性試験で一般に用いられる方法を使用し、短縦列反復（S T R）遺伝子座と呼ばれるゲノム多型の分析により達成される。一実施態様では、末梢血ドナーキメリズム（U C Bおよび灌流液細胞）（全血、N KおよびT細胞）の定量（例えば、短縦列反復アッセイを用いて）は、7日目、14日目、30日目、60日目、100日目、および180日目（+ / - 10日）に評価し、ここで、末梢血レシピエントキメリズムの定量（例えば、短縦列反復アッセイを用いて）は、ベースラインでのドナ

40

50

ー細胞（UCBおよび灌流液細胞）のキメリズムに沿ったベースラインで評価する。

【0032】

さらに別の態様では、本明細書で提供されるのは、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、UCBと、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液との組み合わせを対象に投与することを含む、対象における細胞生着、例えば、血小板または好中球生着の方法であり、HT細胞、例えば、UCB細胞の少なくとも一部分は、対象に部分的に適合し、および/または、HPCは、対象において細胞生着が起こるように、対象に不適合であるかまたは部分的に不適合である。ある実施態様では、細胞生着は、HT細胞、例えば、UCB細胞またはその子孫の生着を含む。特定の他の実施態様では、細胞生着は、HPCまたはその子孫の生着を含む。さらに他の実施態様では、生着は、HT細胞、例えば、UCB細胞またはその子孫、およびHPCまたはその子孫の生着を含む。ある実施態様では、本明細書で提供される細胞生着の方法は、生着までの時間を短縮する。

10

【0033】

そのような方法の一実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞は、対象と非血縁である。特定の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞は、対象に部分的に不適合である。別の特定の実施態様では、HPCは、対象と非血縁であり、かつ、さらに、HT細胞、例えば、UCB細胞と非血縁であり得る。特定の実施態様では、HPCは、対象に部分的に不適合である。別の特定の実施態様では、HPCは、対象に適合しない。さらに別の実施態様では、UCB細胞は、対象と非血縁であり、HPCは、対象と非血縁である。さらに別の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞は、対象と非血縁であり、かつ、該対象に部分的に不適合であり、HPCは、対象と非血縁であり、かつ、該対象に部分的に不適合であるかまたは不適合である。ある実施態様では、本明細書に示される方法は、HT細胞、例えば、UCB細胞を単独で投与する場合と比べて、生着する能力が増したことを示す。

20

【0034】

生着は、当該技術分野で公知の方法を用いて検出することができる。例えば、一実施態様では、分画をもつ全血球数は、0日目から、好中球絶対数が最低値に到達した後に3日間 $>500/mm^3$ になり、かつ、血小板数が、3つの異なる日で3回連続した測定で、血小板輸血から最低7日間独立して $20,000/mm^3$ に到達するまで、1日~3日ごとに行ってもよい。本明細書で用いる場合、「好中球生着」とは、好中球数最低値の後に好中球絶対数が $500/mm^3$ を上回る最初の3日間のことを言う。本明細書で用いる場合、「血小板生着」とは、血小板が輸血なしで $20,000/mm^3$ となる7日間の後に、血小板数が $20,000/mm^3$ を示す最初の連続3日間のことを言う。

30

【0035】

ある実施態様では、対象における細胞生着は、HT細胞、例えば、UCB細胞をHPCと組み合わせて対象に投与した1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、または62日、または2カ月、2.5カ月、3カ月、またはそれ以上以内に検出される。

40

【0036】

ある実施態様では、本明細書に示される方法は、1単位のHT細胞、例えば、UCB細胞、例えば、UCBを投与することを含む。別の実施態様では、本明細書に示される方法は、複数単位のHT細胞、例えば、UCB細胞、例えば、UCBを投与することを含む。例えば、本明細書に示される方法は、2、3、または4単位のHT細胞、例えば、UCB細胞、例えば、UCBを投与することを含むことができる。

【0037】

さらに別の態様では、本明細書で提供されるのは、HT細胞、例えば、ヒトUCB細胞、例えば、UCBと、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液との組み合わせを対象に投与する

50

00, 000; 1:20, 000, 000; 1:50, 000, 000; または約1:100, 000, 000である。ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞のHPCに対する比率は、約20:1~約1:20であり、または約1:10、約1:5、約1:1、約5:1、または約10:1である。

【0043】

HT細胞、例えば、UCB細胞、およびHPCの投与は、当該技術分野で公知の任意の細胞投与技術を用いて行うことができる。一実施態様では、投与は、静脈、例えば、静脈内、例えば、IV、PICCライン、中心静脈ラインなどを介してである。例えば、HT細胞、例えば、UCB細胞、およびHPCは、注射または輸血を含む任意の薬学的または医学的に許容される様式で、対象に別々の組成物または単一組成物で投与してもよい。ある実施態様では、組成物（または複数）は、注射用組成物として配合してもよい（例えば、WO96/39101、その内容全体を文献引用によって本明細書に組み込んだものとする）。

10

【0044】

ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞、またはHPCを対象に非経口投与する。本明細書で使用される用語「非経口」には、皮下注射、静脈内、筋肉内、動脈内注射、または注入技術が含まれる。ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞、またはHPCを対象に静脈内投与する。特定の他の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞、またはHPCを対象に脳室内投与する。

【0045】

HT細胞、例えば、UCB細胞、およびHPCは、任意の薬学的に許容される担体に別々または一緒に含まれてもよい。HT細胞、例えば、UCB細胞、またはHPCは、任意の薬学的または医学的に許容される容器、例えば、血液バッグ、移動バッグ、プラスチック製チューブ、シリンジ、バイアルなどで運ぶ、保管する、輸送してもよい。

20

【0046】

HT細胞、例えば、UCB細胞、および/またはHPCの対象への投与は、1回または複数回で行ってもよい。ある実施態様では、投与は、1回で行う。ある実施態様では、投与は、複数回、例えば、2、3、4、またはそれ以上の回数で行う。ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞を複数回投与する。ある実施態様では、HPCを複数回投与する。

30

【0047】

ある実施態様では、本明細書に記載の方法に従って対象に投与される臍帯血またはそれに由来する細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）の量は、臍帯血中に存在する細胞の数に基づいて決定することができる。対象に投与されるUCBまたはそれに由来する細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）、および/または、ヒト胎盤灌流液またはHPCまたはそれに由来する全有核細胞の量または数は、臍帯血またはそれに由来する細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）、および/または、ヒト胎盤灌流液またはHPCまたはそれに由来する全有核細胞の供給源、治療される障害または状態の重症度または性質、並びに対象の年齢、体重、および健康状態などに依存する。ある実施態様では、対象のキログラム体重当たり約0.01~約0.1、約0.1~約1、約1~約10、約10~約10²、約10²~約10³、約10³~約10⁴、約10⁴~約10⁵、約10⁵~約10⁶、約10⁶~約10⁷、約10⁷~約10⁸、または約10⁸~約10⁹個の臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）、ヒト胎盤灌流液またはそれに由来する細胞（例えば、HPCまたは胎盤灌流液由来の全有核細胞）、または全臍帯血細胞および胎盤灌流液由来の細胞（例えば、HPCまたは全有核細胞）を投与する。種々の実施態様では、対象のキログラム体重当たり少なくとも約0.1、1、10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、または10⁹個の臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）、胎盤灌流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤灌流液由来の全有核細胞）、または臍帯血細胞および胎盤灌流液由来の細胞を投与する。

40

【0048】

50

特定の実施態様では、対象のキログラム体重当たり少なくとも約 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 、 3.5×10^6 、 4.0×10^6 、 4.5×10^6 、 5.0×10^6 、 5.5×10^6 、 6.0×10^6 、 6.5×10^6 、 7.0×10^6 、 7.5×10^6 、 8.0×10^6 、 8.5×10^6 、 9.0×10^6 、 9.5×10^6 、 1.0×10^7 、 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 、 4.0×10^7 、 4.5×10^7 、 5.0×10^7 、 5.5×10^7 、または 6.0×10^7 個の臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）、胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）、または臍帯血細胞および胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）を投与する。より具体的な実施態様では、対象のキログラム体重当たり少なくとも約 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 、 3.5×10^6 、 4.0×10^6 、 4.5×10^6 、または 5.0×10^6 個の胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）を投与する。より具体的な実施態様では、対象のキログラム体重当たり少なくとも約 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 、 4.0×10^7 、 4.5×10^7 、 5.0×10^7 、 5.5×10^7 、または 6.0×10^7 個の臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）を投与する。種々の実施態様では、対象のキログラム体重当たり多くとも約 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、または 10^9 個の臍帯血細胞、胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）、または臍帯血細胞および胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）を投与する。特定の実施態様では、対象のキログラム体重当たり多くとも約 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 、 3.5×10^6 、 4.0×10^6 、 4.5×10^6 、 5.0×10^6 、 5.5×10^6 、 6.0×10^6 、 6.5×10^6 、 7.0×10^6 、 7.5×10^6 、 8.0×10^6 、 8.5×10^6 、 9.0×10^6 、 9.5×10^6 、 1.0×10^7 、 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 、 4.0×10^7 、 4.5×10^7 、 5.0×10^7 、 5.5×10^7 、または 6.0×10^7 個の臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）、胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）、または臍帯血細胞および胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）を投与する。より具体的な実施態様では、対象のキログラム体重当たり多くとも約 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 、 3.5×10^6 、 4.0×10^6 、 4.5×10^6 、または 5.0×10^6 個の胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）を投与する。より具体的な実施態様では、対象のキログラム体重当たり多くとも約 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 、 4.0×10^7 、 4.5×10^7 、 5.0×10^7 、 5.5×10^7 、または 6.0×10^7 個の臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）を投与する。特定の実施態様では、対象のキログラム体重当たり、胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）よりも多くの臍帯血細胞（例えば、臍帯血由来の全有核細胞）を投与する。

【0049】

特定の実施態様では、対象のキログラム体重当たり、胎盤滲流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤滲流液由来の全有核細胞）よりも多くのHT細胞、例えば、臍帯血細胞（例えば、全有核HT細胞、例えば、臍帯血由来の細胞）を投与する。

【0050】

ある実施態様では、キログラム体重当たり少なくとも約 10^4 ~ 約 10^7 、例えば、 0.5×10^4 、 1.0×10^4 、 1.5×10^4 、 2.0×10^4 、 2.5×10^4 、 3.0×10^4 、 3.5×10^4 、 4.0×10^4 、 4.5×10^4 、 5.0×10^4 、 5.5×10^4 、 6.0×10^4 、 6.5×10^4 、 7.0×10^4 、 7.5×10^4 、8

0×10^4 、 8.5×10^4 、 9.0×10^4 、 9.5×10^4 、 0.5×10^5 、 1.0×10^5 、 1.5×10^5 、 2.0×10^5 、 2.5×10^5 、 3.0×10^5 、 3.5×10^5 、 4.0×10^5 、 4.5×10^5 、 5.0×10^5 、 5.5×10^5 、 6.0×10^5 、 6.5×10^5 、 7.0×10^5 、 7.5×10^5 、 8.0×10^5 、 8.5×10^5 、 9.0×10^5 、 9.5×10^5 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 、 3.5×10^6 、 4.0×10^6 、 4.5×10^6 、 5.0×10^6 、 5.5×10^6 、 6.0×10^6 、 6.5×10^6 、 7.0×10^6 、 7.5×10^6 、 8.0×10^6 、 8.5×10^6 、 9.0×10^6 、 9.5×10^6 、 1.0×10^7 、 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 、 4.0×10^7 、 4.5×10^7 、 5.0×10^7 、 5.5×10^7 、または 6.0×10^7 個の CD34+ 細胞を投与する。

そのような CD34+ 細胞は、臍帯血単独に由来してもよく、または臍帯血および胎盤灌流液に由来してもよい。ある実施態様では、CD34+ 細胞が臍帯血および胎盤灌流液に由来していた場合、全胎盤灌流液細胞に対する胎盤灌流液由来の CD34+ 細胞の割合は、全臍帯血細胞に対する臍帯血由来の CD34+ 細胞の割合よりも大きい。一実施態様では、胎盤灌流液細胞集団における CD34+ 細胞の割合は、臍帯血細胞集団における CD34+ 細胞の割合と比較して $0.1 \sim 0.5$ 、 $0.5 \sim 1.0$ 、 $1.0 \sim 1.5$ 、 $1.5 \sim 2.0$ 、 $2.0 \sim 2.5$ 、 $2.5 \sim 3.0$ 、 $3.0 \sim 3.5$ 、 $3.5 \sim 4.0$ 、 $4.0 \sim 4.5$ 、 $4.5 \sim 5.0$ 、 $5.0 \sim 5.5$ 、 $5.5 \sim 6.0$ 、 $6.0 \sim 6.5$ 、 $6.5 \sim 7.0$ 、 $7.0 \sim 7.5$ 、 $7.5 \sim 8.0$ 、 $8.0 \sim 8.5$ 、 $8.5 \sim 9.0$ 、 $9.0 \sim 9.5$ 、または $9.5 \sim 10.0$ 倍またはそれ以上高い。ある実施態様では、胎盤灌流液細胞の 0.1% 、 0.5% 、 1.0% 、 1.5% 、 2.0% 、 2.5% 、 3.0% 、 3.5% 、 4.0% 、 4.5% 、または 5.0% 、またはそれ以上は、CD34+ である。

【0051】

HT 細胞、例えば、UCB 細胞、例えば、UCB、および HPC、例えば、胎盤灌流液は、対象のサイズに適した容量で送達することができる。ヒト成人の一般的な血液量は、約 $85 \sim 100 \text{ mL/kg}$ 体重である。従って、ヒト成人の血液量は、約 40 mL から約 300 mL の範囲である。従って、種々の実施態様では、HT 細胞、例えば、UCB 細胞、例えば、UCB、および HPC、例えば、胎盤灌流液は、約 0.5 mL 、 1.0 mL 、 2 mL 、 3 mL 、 4 mL 、 5 mL 、 6 mL 、 7 mL 、 8 mL 、 9 mL 、 10 mL 、 11 mL 、 12 mL 、 13 mL 、 14 mL 、 15 mL 、 16 mL 、 17 mL 、 18 mL 、 19 mL 、 20 mL 、 21 mL 、 22 mL 、 23 mL 、 24 mL 、 25 mL 、 26 mL 、 27 mL 、 28 mL 、 29 mL 、または約 30 mL 、またはそれ以上の全容量で投与する。そのような容量の投与は、単一投与または複数投与であってもよい。そのような容量の臍帯血または臍帯血細胞、またはヒト胎盤灌流液またはそれに由来する細胞の数（例えば、HPC または胎盤灌流液由来の全有核細胞）を投与することができる時間は、例えば、 0.5 時間、 1 時間、 1.5 時間、 2 時間、 2.5 時間、 3 時間、 3.5 時間、 4 時間、またはそれ以上に変更可能である。

【0052】

ある実施態様では、 20 mL を下回る少量の輸血は、シリンジを用いて行われる。より大容量の輸血は、注入デバイスによって、例えば、 $1 \sim 4$ 時間以内で投与することができる。

【0053】

本明細書で提供される方法は、それを必要とする任意の対象で行うことができる。一態様では、対象は、造血の再構成、部分再構成、または増加を必要としている。ある実施態様では、対象は、ヒト対象である。ある実施態様では、対象は、成人ヒト対象である。ある実施態様では、対象は、 25 歳またはそれ以下である。ある実施態様では、対象は、乳児である。

【0054】

ある実施態様では、本明細書に示される方法、例えば、キメラリズムを誘発する移植方

法、および／または生着方法の前に、例えば、TBI、クロファラビン、および／または Ara-C を用いた骨髄破壊的前処置；例えば、ブスルファン、フルダラビン、および／またはアレムツズマブを用いた毒性軽減前処置（強度減弱型前処置とも呼ばれる）；放射線治療；化学療法；または免疫抑制療法または血球数を減少させる療法などの他の療法の1つ以上が対象には施されている。対象が上記の1つ以上を受けている特定の実施態様では、対象は、完全な骨髄破壊を示す。一実施態様では、少なくともいくつかの免疫系機能は保持される。

【0055】

特定の態様では、本明細書で提供される方法は、先天性代謝異常、副腎脳白質ジストロフィー、ムコ多糖症、ニーマン-ピック病、異染性白質ジストロフィー、ウォルマン病、クラッペ病、ゴーシェ病、フコシドーシス、またはバッテン病などの代謝異常の治療方法として、それを必要とする対象に使用することができる。

10

【0056】

別の特定の態様では、本明細書で提供される方法は、血液学的疾患または悪性疾患、例えば、リンパ造血系悪性疾患、骨髄異形成症候群、無巨核球性血小板減少症、白血病（例えば、急性リンパ性白血病（ALL）および急性骨髄性白血病（AML））、好中球減少症、鎌状赤血球病（例えば、鎌状赤血球貧血）、ベータサラセミア（例えば、ベータサラセミアメジャー）、重症複合型免疫不全症、骨髄不全症、または貧血（例えば、重症再生不良性貧血またはダイヤモンド・ブラックファン貧血）の治療方法として、それを必要とする対象に使用することができる。

20

【0057】

本明細書で用いる場合、「治療する（treat）」、「治療する（treating）」、および「治療（treatment）」という用語は、障害または状態、またはそのような障害または状態の任意のパラメータまたは症状の進行、重症度、および／または持続期間を低下または寛解させることを指す。治療は、対象が生存する場合、または治療される障害または状態が、治療の結果として何らかの形で測定可能に改善される場合に、効能を示すとみなすことができる。そのような改善は、例えば、1つまたは複数の測定可能な指標によって示すことができ、それらとして、例えば、特定の疾患、障害または状態に伴う生理的な状態または一連の生理的な状態の検出可能な変化が挙げられる。また、1つまたは複数の指標が、例えば、ほぼ同年齢の個体についての正常値の範囲内の値、またはそのような（1つもしくは複数の）指標が、治療がない場合に示すと予想されるよりも正常値に近い値に変化することによって、そのような治療に対して応答しているように見える場合に、治療は有効とみなされる。

30

【0058】

本明細書で提供される方法のある実施態様では、本明細書で提供される方法は、障害または状態の治療において、第1の療法を1つまたは複数の第2の療法と組み合わせて使用することができる。そのような第2の療法としては、これらに限定されないが、手術、ホルモン療法、免疫療法、光線療法、または特定の薬物を用いる治療が挙げられる。本明細書で提供される方法と組み合わせて使用することができる例示的な療法としては、環境温度の制御；酸素を用いる補助；人工呼吸器または換気装置；末梢血の輸血；鉄の補充；経静脈栄養；光線療法；手術；代謝異常または血液学的疾患（血液系腫瘍を含む）を治療するための薬剤；抗生物質または抗ウイルス薬；抗炎症剤（例えば、ステロイド系抗炎症性化合物、非ステロイド系抗炎症性（NSAID）化合物）；一酸化窒素；抗ヒスタミン剤；免疫抑制剤；および免疫調節化合物（例えば、TNF-阻害剤）が挙げられる。

40

【0059】

（4.2. ヒト胎盤灌流液細胞）

本開示に従って使用されるヒト胎盤灌流液（HPC）、例えば、ヒト胎盤灌流液由来の単核球は、任意の医学的または薬学的に許容される様式で収集してもよく、組成物、例えば、医薬組成物中に存在してもよい。ある実施態様では、本明細書で提供される組成物（例えば、医薬組成物、すなわち、ヒトへの投与に適した医薬品グレードの溶液）は、ヒト

50

胎盤灌流液を含む。ある実施態様では、組成物は、部分的に放血させた胎盤から得られるヒト胎盤灌流液を含む。ある実施態様では、組成物は、放血させた胎盤から得られるヒト胎盤灌流液を含む。ある実施態様では、組成物は、ヒト胎盤灌流液から単離した幹細胞などの細胞を含む。ある実施態様では、組成物は、ヒト胎盤灌流液から単離した有核細胞、例えば、単核球または全有核細胞を含む。

【0060】

一実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、無菌である。一実施態様では、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液の集団は、不均一である。

【0061】

特定の実施態様では、HPCまたはヒト胎盤灌流液は、標準的な方法に従って赤血球および/または顆粒球を除去することで処理し、有核細胞の集団を生成する。そのような濃縮した細胞集団は、凍結せずに使用してもよく、またはその後の使用のために凍結してもよい。細胞集団を凍結しようとする場合、標準的な凍結保存剤（例えば、DMSO、グリセロール、Epilife（商標）Cell Freezing Medium（Cascade Biologics））を、濃縮した細胞集団に添加してから、細胞集団を凍結する。

10

【0062】

ある実施態様では、胎盤灌流液由来の細胞は、胎盤灌流液由来の単核球を含む。ある実施態様では、胎盤灌流液由来の細胞は、胎盤灌流液由来の全有核細胞を含む。ある実施態様では、胎盤灌流液由来の細胞は、単一胎盤から得られる。ある実施態様では、胎盤灌流液由来の細胞は、2つ以上の胎盤から得られる。ある実施態様では、胎盤灌流液由来の細胞は、2つの胎盤から得られる。細胞が2つ以上の胎盤から得られる実施態様では、異なる胎盤由来の細胞は、互いに血縁関係にあるかまたは適合している必要はない。

20

【0063】

本明細書に記載のように、胎盤灌流液は、臍帯血を流し出しており、かつ、胎盤細胞を得るための灌流前に残留血液を除去するために灌流されている胎盤から得てもよい。胎盤灌流液は、臍帯血を流し出しているが、残留血液を除去するために灌流されていない胎盤から得てもよい。胎盤灌流液は、臍帯の0.5~6.0インチ、例えば、0.5~1.0、1.0~1.5、1.5~2.0、2.0~2.5、2.5~3.0、3.0~3.5、3.5~4.0、または4.0~6.0インチを除いた全てから分離されている胎盤から得てもよく、臍帯は、残余の臍帯血を含んでもよく、その一部は、灌流中に胎盤灌流液に入ることがあるため、胎盤灌流液に含まれる。胎盤灌流液は、臍帯血を流し出しておらず、かつ、残留血液を除去するための灌流もされていない胎盤から得てもよい。後者の2つの実施態様では、胎盤細胞、例えば、胎盤灌流液由来の有核細胞、例えば、HPCは、胎盤血液および/または臍帯血由来の有核細胞を含む。特定の実施態様では、本開示に従って使用される胎盤灌流液は、臍帯血を含まない。別の特定の実施態様では、本開示に従って使用される胎盤灌流液は、臍帯血を実質的に含まず、例えば、前記胎盤灌流液は、10%未満、5%未満、1%未満、0.5%未満、または0.1%未満の臍帯血を含む。一般に、灌流液由来の細胞が臍帯血細胞を含む場合、そのような細胞は、本明細書で提供される方法の目的上、HPC集団の一部であり、HT細胞、例えば、UCB細胞の一部ではないと見なされる。

30

40

【0064】

胎盤灌流液は、投与のために、単一の個人から（すなわち、単一の単位として）収集してもよく、または例えば、同じ個人または1人または複数の他の個人から他の単位と共にプールしてもよい。ある実施態様では、胎盤灌流液またはそれに由来する細胞を投与前に保管する。ある実施態様では、1単位の胎盤灌流液は、対象のキログラム体重当たり少なくとも約 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、または 3.0×10^6 個の胎盤灌流液由来の細胞、例えば、全有核細胞を投与するように十分な数の細胞を含有する。ある実施態様では、1単位の胎盤灌流液またはそれに由来する細胞を投与する。ある実施態様では、1単位未満を投与する。ある実施態様で

50

は、1単位超を投与する。

【0065】

胎盤灌流液を得るための胎盤は、出産および胎盤剥離に成功した後に回収することができる。ある実施態様では、胎盤は、正期産から得る。ある実施態様では、胎盤は、早産から得る。いくつかの実施態様では、胎盤は、妊娠約23～約25週で出生した乳児の胎盤である。いくつかの実施態様では、胎盤は、妊娠約26～約29週で出生した乳児の胎盤である。いくつかの実施態様では、胎盤は、妊娠約30～約33週で出生した乳児の胎盤である。いくつかの実施態様では、胎盤は、妊娠約34～約37週で出生した乳児の胎盤である。いくつかの実施態様では、胎盤は、妊娠約37～約42週で出生した乳児の胎盤である。

10

【0066】

本開示に従って使用されるヒト胎盤灌流液またはそれに由来する細胞は、一般に、細胞の対象レシピエントと非血縁である。本開示に従って使用されるヒト胎盤灌流液またはそれに由来する細胞は、一般に、細胞の対象レシピエントに不適合であるかまたは部分的に不適合である。

【0067】

本開示に従って使用されるヒト胎盤灌流液またはそれに由来する細胞は、任意の方法によって得ることができる。胎盤灌流液は、例えば、米国特許第7,045,148号、米国特許第7,255,879号、および/または米国特許第8,057,788号に開示されるように得ることができる。これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのような灌流は、例えば、灌流液を、胎盤脈管構造を強制的に通過させ、かつ胎盤、典型的には母側から滲出する灌流液を、胎盤を含むパン中に収集するパン法による灌流であってもよい。灌流は、例えば、灌流液を通過させ、胎盤の胎児脈管構造のみから収集する閉回路灌流であってもよい。例えば、米国特許第8,057,788号を参照されたい。この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。特定の実施態様では、そのような灌流は、連続的であってもよく、すなわち、胎盤を通過した灌流液を、胎盤灌流液由来の細胞（例えば、HPCまたは胎盤灌流液由来の全有核細胞）の単離に先立ってもう1回または複数回通過させてもよい。

20

【0068】

(4.3.臍帯血細胞)

本開示に従って使用される臍帯血（本明細書では、UCBまたは「臍帯血」とも呼ばれる）は、任意の医学的または薬学的に許容される様式で収集してもよいし、組成物、例えば、医薬組成物中に存在してもよい。臍帯血を収集するための種々の方法が記載されている。例えば、米国特許第6,102,871号；米国特許第6,179,819号；および米国特許第7,147,626号を参照されたい。これらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。臍帯血を収集するための従来の技術は、針またはカニューレの使用に基づいており、これは、重力の助けを借りて使用される。臍帯血は、例えば、血液バッグ、移動バッグ、または無菌のプラスチック製チューブの中に収集してもよい。

30

【0069】

いくつかの実施態様では、臍帯血は、商業的な臍帯血バンク（例えば、LifeBank USAなど）から得られる。別の実施態様では、臍帯血を、分娩後の哺乳動物の臍帯から収集し、直ちに（例えば、収集後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12時間以内に）使用する。他の実施態様では、対象を治療するために使用する臍帯血は、凍結保存されていた臍帯血である。臍帯血は、単一の臍帯または複数の臍帯から収集することができる。

40

【0070】

ある実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞は、対象および/またはHPCと非血縁である。別の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞は、対象および/またはHPCに部分的に不適合である。さらに別の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞

50

胞は、HPCに不適合である。さらに別の実施態様では、HT細胞、例えば、UCB細胞は、HPCと非血縁であり、かつ、不適合である。特定の実施態様では、UCBは、3/6、4/6、または5/6のHLA遺伝子座で対象に適合する。特定の実施態様では、HT細胞、例えば、成人の供給源由来のHT細胞は、6/8、7/8、または8/8のHLA遺伝子座で対象に適合する。

【0071】

いくつかの実施態様では、臍帯血は、早産の臍帯から調製する。他の実施態様では、臍帯血は、正期産の臍帯から調製する。ある実施態様では、臍帯血は、正期産の分娩後の哺乳動物の臍帯から得られる。他の実施態様では、臍帯血は、早産の分娩後の哺乳動物の臍帯から得られる。いくつかの実施態様では、臍帯は、妊娠約23～約25週で出生した乳児の臍帯である。いくつかの実施態様では、臍帯は、妊娠約26～約29週で出生した乳児の臍帯である。いくつかの実施態様では、臍帯は、妊娠約30～約33週で出生した乳児の臍帯である。いくつかの実施態様では、臍帯は、妊娠約34～約37週で出生した乳児の臍帯である。いくつかの実施態様では、臍帯は、妊娠約37～約42週で出生した乳児の臍帯である。

10

【0072】

臍帯血またはそれに由来する細胞（例えば、全有核細胞またはそれに由来する幹細胞）は、投与のために、単一の個人から（すなわち、単一の単位として）収集してもよく、または他の単位と共にプールしてもよい。ある実施態様では、臍帯血またはそれに由来する細胞（例えば、全有核細胞またはそれに由来する幹細胞）は、使用前に保管する。臍帯血を複数の臍帯からプールする場合、プールした臍帯血は、正期産のみに由来する臍帯血、正期産の組み合わせに由来する臍帯血、または早産のみに由来する臍帯血を含むことができる。例えば、未熟児の臍帯に由来する臍帯血は、例えば、他の未熟児に由来する臍帯血、正期産のみに由来する臍帯血、または早産の胎盤および正期産の胎盤の両方に由来する臍帯血の組み合わせと組み合わせることができる。自己由来の臍帯血または同種異系の臍帯血を含めて、臍帯血は、末梢血と組み合わせることできる。ある実施態様では、早産に由来する臍帯血を使用し、したがって、臍帯血は、正期産の臍帯血と比較して、単位体積当たり、比較的多数のCD34+幹細胞を含む。ある実施態様では、1単位の臍帯血は、対象のキログラム体重当たり少なくとも約 1.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 1.5×10^6 、 2.0×10^6 、 2.5×10^6 、 3.0×10^6 、 3.5×10^6 、 4.0×10^6 、 4.5×10^6 、 6.0×10^6 、 6.5×10^6 、 7.0×10^6 、 7.5×10^6 、 8.0×10^6 、 8.5×10^6 、 9.0×10^6 、 9.5×10^6 、 1.0×10^7 、 1.5×10^7 、 2.0×10^7 、 2.5×10^7 、 3.0×10^7 、 3.5×10^7 、 4.0×10^7 、 4.5×10^7 、 5.0×10^7 、 5.5×10^7 、または 6.0×10^7 個の前記臍帯血から得られる細胞、例えば、臍帯血由来の全有核細胞を投与するように十分な数の細胞を含有する。ある実施態様では、1単位の臍帯血またはそれに由来する細胞を投与する。ある実施態様では、1単位未満を投与する。ある実施態様では、1単位超を投与する、例えば、2つまたはそれ以上（例えば、2、3、4、5、6、またはそれ以上）の単位を投与する。

20

30

【0073】

(4.4. HT細胞、UCB、および胎盤灌流液の収集)

HT細胞、例えば、臍帯血細胞、例えば、UCB、およびHPC、例えば、ヒト胎盤灌流液は、当該技術分野で公知の方法を用いて、かつ、医師により確立された手順に従って得ることができる。

40

【0074】

一実施態様では、臍帯または臍帯血および/または胎盤を、インフォームドコンセントを得た患者から回収し、患者の妊娠の前、間および後の完全な病歴も得る。これらの診療記録を使用して、胎盤またはUCB、またはそこから収穫した細胞、例えば、HPCまたはHT細胞、例えば、UCB細胞のそれに続く使用を調整することができる。例えば、UCBまたは胎盤灌流液から得られたそのようなヒト細胞は、次いで、治療すべき対象のた

50

めの個別化医療のために容易に使用することができる。

【0075】

ある実施態様では、ヒト胎盤は、その娩出後間もなく回収する。ある実施態様では、臍帯血も回収する。特定の実施態様では、臍帯には、従来の臍帯血回収プロセスを施す。臍帯血は、商業的な臍帯血バンクサービス、例えば、LifeBankUSA、Cedar Knolls、N.J. から得ることもできる。

【0076】

ある実施態様では、臍帯血は、米国特許第7,147,626号に記載のような臍帯血収集キットを用いて収集する。この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0077】

一実施態様では、標準的なチャック、無菌のガーゼパッド、ポビドンヨードスワブ、無菌のアルコールパッド、プラスチック製臍帯血用クランプ、スライドクリップまたは止血用クランプ、および漏れ防止型ジッパー付き袋または小型の缶を含有する収集キットを使用する。胎盤の分娩前（子宮内での収集）、胎盤の分娩後（子宮外での収集）、または胎盤の分娩に先立つ帝王切開の間に収集を行うことができる。手短にいうと、臍帯上の遠位における静脈穿刺部位を滅菌する。大型の収集袋から伸びる収集チューブをクランプし、針からキャップを外し、針の先端面取り部を臍帯静脈に向かって、臍帯静脈にカニユーレ挿入する。クランプを外して、血液を流れさせ、収集袋をカニユーレ挿入部位より下まで下げ、血液が収集袋を重力によって満たすのを可能にする。血液の流れが止まったら、静脈穿刺部位をクランプし、臍帯静脈から針を引き抜く。収集袋にラベルを付け、断熱された発送容器中に入れる。臍帯血がクランプされた状態の胎盤を、漏れ防止型ジッパー付き袋中に置き、次いで、袋を適切に閉じ、ラベルを付ける。収集後、臍帯血細胞の生存率を、トリパンブルー染色後に血球計数器によって決定する。

【0078】

ある実施態様では、近位の臍帯を、例えば、臍帯血の回収前に胎盤（placental disc）中への挿入部の3～4インチ以内においてクランプする。他の実施態様では、近位の臍帯を、臍帯血の回収後ではあるが、胎盤を処理する前にクランプする。臍帯血を収集するための従来の技術を使用してもよい。一実施態様では、針またはカニユーレを使用して、重力の助けを借りて臍帯血を流し出す。

【0079】

哺乳動物の胎盤の灌流方法は、例えば、Haririの文献、米国特許第7,045,148号および同第7,255,879号、および「臓器の収集および保存のための改良組成物（Improved Composition for Collecting and Preserving Organs）」と題された米国特許出願公開第2007/0190042号に開示されている。これらの開示は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0080】

特定の実施態様では、胎盤は、約1時間～約72時間または約4時間～約24時間の期間にわたって保管し、それから、胎盤を灌流していずれの残余の臍帯血も除去してもよく、または残余の臍帯血を除去せずに胎盤を灌流してもよい。胎盤を、抗凝固溶液中で、約5～約25、例えば、室温付近の温度で保管してもよい。適切な抗凝固溶液は、当該技術分野ではよく知られている。例えば、ヘパリンまたはワルファリンナトリウムの溶液を使用することができる。一実施態様では、抗凝固溶液は、ヘパリン溶液（1:1000溶液中、1% w/w）を含む。ある実施態様では、胎盤は、HPC、例えば、ヒト胎盤灌流液を収集するまで、36時間以上は保管しない。

【0081】

一実施態様では、ヒト胎盤灌流液は、放血させたまたは部分的に放血させた胎盤を適切な灌流水溶液で灌流することで得られる。一態様では、胎盤は、完全に放血させずに適切な灌流水溶液で灌流する。灌流溶液は、任意の等張水溶液であってよい。一実施態様では

10

20

30

40

50

、抗凝固薬（例えば、ヘパリン、ワルファリンナトリウム）は、灌流溶液中に溶解している。そのような灌流のための等張水溶液は、当該技術分野ではよく知られており、それらとしては、例えば、栄養培地、生理食塩水、例えば、リン酸緩衝生理食塩水または0.9 N塩化ナトリウム溶液が挙げられる。使用する場合、灌流液は、いずれの残余の臍帯血の血餅形成も防止するのに十分な濃度で抗凝固薬を含むことができる。特定の実施態様では、1～100単位の濃度のヘパリンを用いる。別の特定の実施態様では、1 ml当たり1～10単位の濃度のヘパリンを用いる。一実施態様では、アポトーシス阻害剤、例として、フリーラジカル消去剤、詳細には、酸素フリーラジカル消去剤を、放血の間および直後に使用することができ、次いで、これらの薬剤は、胎盤から洗浄することができる。この実施態様によれば、単離した胎盤は、アポトーシスを防止または阻害するために、低温条件下で保管してもよい。

10

【0082】

ある実施態様では、胎盤は、灌流液で洗い流さずに、灌流前に全ての残留する臍帯血を除去する。他の実施態様では、胎盤灌流液由来の細胞を収集する前に、胎盤を、例えば、10～100 mlの灌流液で洗い流して、実質的に全ての残留する臍帯血を除去する。典型的には、灌流液を、胎盤中への重力による流れを使用して、臍帯動脈および臍帯静脈のいずれかまたは両方を通して通過させることによって、そのような洗い流しを行う。臍帯動脈および臍帯静脈が胎盤の最も高い点に位置するように、胎盤の位置を定める（例えば、胎盤をぶら下げる）ことができる。一実施態様では、臍帯動脈および臍帯静脈を、柔軟なコネクタを介して灌流液のリザーバに接続しているピペットに、同時に接続させる。灌流液を、臍帯静脈および臍帯動脈へと通過させ、妊娠中には母体の子宮に付着していた胎盤の表面から、適切な開放槽中に収集する。また、灌流液を、臍帯の開口部を通して導入し、母体の子宮壁と界面を形成していた胎盤壁中の開口部から流すまたは染み出させることもできる。

20

【0083】

一実施態様では、近位の臍帯を、灌流の間クランプし、例えば、臍帯の、胎盤中への挿入部の4～6インチ以内においてクランプする。

【0084】

一実施態様では、本質的に全ての残余の臍帯血を除去し、それに続いて、臍帯血の除去後に胎盤中に残留する胎盤細胞を収集または回収するのに十分な量の灌流液を使用する。

30

【0085】

ある実施態様では、約500ミリリットル（ml）～1.5リットル、例えば、750 ml～1リットルの灌流液は、胎盤を部分的または完全に放血させ、細胞、例えばHPCまたは全有核細胞の最初の集団を回収するために十分であるが、それより多いまたは少ない灌流液を、観察される結果に依存して使用してもよい。

【0086】

特定の実施態様では、本明細書に記載の方法で使用される胎盤灌流液は、臍帯血を含む。特定の実施態様では、本明細書に記載の方法で使用される胎盤灌流液は、臍帯血を含まない。別の特定の実施態様では、本明細書に記載の方法で使用される胎盤灌流液は、臍帯血を実質的に含まず、例えば、前記胎盤灌流液は、10%未満、5%未満、1%未満、0.5%未満、または0.1%未満の臍帯血を含む。

40

【0087】

別の実施態様では、灌流溶液を臍帯静脈を通して通過させ、臍帯動脈から収集するかまたは臍帯動脈を通して通過させ、臍帯静脈から収集する。そのような方法の代表的で非限定的な例としては、以下のように行うことができる。分娩後の胎盤は、出産後約48時間以内に得られる。臍帯はクランプし、クランプの上部で切断する。羊膜は灌流の間保持されていてもよく、または、例えば指による鈍的切開によって絨毛膜から分離してもよい。例えば、滅菌されたガーゼを用いて、認識できる全ての血塊および残留血液を胎盤から取り除いた後、例えば、臍帯の断面を露出させるために臍帯膜を部分的に切ることで、臍帯の管を露出させる。例えば、閉じたワニ口クランプを各管の切断した一端から前進させる

50

ことで、管は確認され、開かれる。その後、装置（例えば、灌流デバイスに接続されたプラスチック製チューブ）がそれぞれの胎盤動脈に挿入される。その後、滅菌された収集リザーバ、例えば、250 mL 採集袋などの血液バッグに接続されたプラスチック製チューブが、胎盤静脈に挿入される。あるいは、装置に接続されたチューブが胎盤静脈に挿入され、収集リザーバ（または複数）に接続されたチューブが胎盤動脈のうちの1つもしくは両方に挿入される。その後、胎盤には、一定量の灌流溶液、例えば、約750 mLの灌流溶液が灌流される。その後、灌流液中の細胞は、例えば、遠心分離によって収集することができる。

【0088】

別の特定の実施態様では、胎盤を、無菌の盆中に配置し、500 mLのリン酸緩衝生理食塩水を用いて洗浄する。次いで、洗浄液を捨てる。次いで、臍帯静脈に、無菌のチューブなどの無菌の接続装置に接続している、カニユーレ、例えば、TEFLON（登録商標）製またはプラスチック製のカニユーレを用いてカニユーレ挿入する。無菌の接続装置を、灌流マニフォールドに接続する。次いで、胎盤を含有する容器に蓋をし、胎盤を、室温（20～25）で、所望の期間、例えば、2～24時間、ある実施態様では、48時間以下にわたり維持する。胎盤を、連続的に灌流し、等しい体積の灌流液を導入し、溶出灌流液を除去または収集してもよい。あるいは、胎盤を、培養の間、定期的に、例えば、2時間毎に、4、8、12、および24時間に；または他の間隔で、ある体積の灌流液、例えば、100 mLの灌流液（1000単位/Lのヘパリンおよび/またはEDTAおよび/またはCPDA（クレアチンリン酸デキストロース）を補ったまたは補わない無菌の生理食塩水）で灌流してもよい。定期的な灌流の場合、胎盤が安定した体積の灌流液に常時浸かるように、等しい体積の灌流液を導入し、除去してもよい。

【0089】

胎盤、例えば、胎盤の反対表面で漏れ出る溶出灌流液を収集し、処理して、細胞、例えば、HPCを単離する。特定の実施態様では、胎盤細胞は、当業者に公知の技術、例えば、密度勾配遠心分離などの技術を用いて溶出灌流液から単離する。一実施態様では、HPCまたは胎盤灌流液由来の全有核細胞は、例えば、細胞デブリ、血清、または除核細胞から全有核細胞を分離するために、分画遠心法によって単離される。特定の実施態様では、胎盤細胞を、溶出灌流液から、例えば、約5000×g、室温で約15分間遠心分離することによって回収することができる。これによって、細胞が、汚染デブリおよび血小板から分離される。細胞ペレットを、例えば、2単位/mLヘパリンおよび2 mM EDTAを含有するIMDM無血清培地（Gibco BRL、NY）中に再懸濁させる。総単核細胞画分を、アフエレーシスを使用して、例えば、LYMPHOPREP（商標）（Nycomed Pharma、Oslo、ノルウェー）などの市販の収集キットを使用して単離することができる。次いで、細胞を、例えば、血球計数器を使用して数えてもよい。生存率を典型的には、トリパンブルー色素排除によって評価する。

【0090】

一実施態様では、単離した胎盤を、灌流液を収集せずに、一定期間にわたり灌流する。したがって、胎盤を、灌流液を収集する前に、2、4、6、8、10、12、20もしくは24時間にわたり、または数日間にもわたり灌流することができる。そのような実施態様では、例えば、灌流液を、胎盤中に導入し、胎盤の血管構造をある期間にわたり占有させてから収集してもよく、または循環灌流液の場合には、灌流液を、そのような期間にわたり再度循環させてもよい。

【0091】

一実施態様では、回収した有核細胞の数が100個の細胞/mL未満になるまで、胎盤の灌流および溶出灌流液の収集を1回または2回繰り返す。灌流液をプールし、軽く遠心分離して、血小板、デブリおよび脱核細胞膜を除去する。次いで、有核細胞を、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離によって単離する。

【0092】

他の実施態様では、胎盤から収集した細胞を、その後のある時期に使用するために凍結

10

20

30

40

50

保存する。幹細胞などの細胞を凍結保存する方法は、当該技術分野ではよく知られており、例えば、Boyseらの文献（1993年3月9日発行の米国特許第5,192,553号）またはHuらの文献（2000年12月7日公開のWO00/73421）の方法を使用する凍結保存がある。

【実施例】

【0093】

（5．実施例）

（5．1．実施例1：代謝異常を有する患者におけるヒト胎盤灌流液由来の非血縁臍帯血および不適合単核球の移植）

この実施例は、代謝異常を有する患者に対してヒト胎盤灌流液由来の非血縁な臍帯血（UCB）および不適合な単核球を安全かつ成功した投与を示す。

10

【0094】

患者は、進行性変異の副腎脳白質ジストロフィー（ALD）を有する11歳の男性であった。患者は、およそ-8日目に毒性軽減前処置を受けた。0日目に、患者は、単一単位の非血縁なUCBと、ヒト胎盤灌流液由来の（患者レシピエントまたはUCBのいずれかに）非血縁で、不適合な単核球の移植を注入によって受けた。特に、患者は、単一UCBドナー産物（6/6HLA適合；約 3.9×10^7 個の全細胞/kg；約 2.8×10^5 個のCD34⁺細胞/kg）および合わせられた約 0.6×10^7 個の細胞/kgの灌流液（約 0.3×10^5 個のCD34⁺細胞/kg）由来の全有核細胞投与（TNC）を受けた。

20

【0095】

移植後140日目に、1）患者は、血液中で評価したように、99%のUCB移植ドナーキメラリズムと0%の胎盤灌流液細胞キメラリズムで、UCBの完全生着を示し；2）患者は、GVHDの証拠を示さず、3）患者は、ALDの症状である神経変性の兆候を示さなかった。キメラリズムの試験は、移植後28日～42日の間にまず行った。

【0096】

非悪性疾患を有する子供における、ヒト胎盤灌流液由来の不適合で非血縁な単核球の注入と組み合わせた単一UCB移植は安全で良好な耐容性を示したことを、これらの結果は示している。さらに、評価した最後の時点（移植後140日）までに、そのようなALD患者において神経変性の検出が予測されていたが、神経変性は実際には検出されなかった。

30

【0097】

（5．2．実施例2：悪性疾患を有する患者における非血縁臍帯血とヒト胎盤灌流液由来の不適合単核球との移植（#1））

この実施例は、悪性疾患である急性リンパ性白血病（ALL）を有する患者に対して非血縁な臍帯血（UCB）とヒト胎盤灌流液由来の不適合で非血縁な単核球とを安全かつ成功した投与を示す。

【0098】

患者は、ALLを有する22歳の女性であった。非血縁なUCBと、ヒト胎盤灌流液由来の不適合で非血縁な単核球とを投与する前に、患者は、事前化学療法を受け、およそ-8日目に毒性軽減前処置を受けた。非血縁なUCBとヒト胎盤灌流液由来の不適合で非血縁な単核球とを投与する時点では、患者は完全な骨髓破壊を示した。0日目に、患者は、非血縁な臍帯UCB単位（両方の単位は、5/6HLA適合であり；1単位は、約 3×10^7 個の細胞/kg（約 1.9×10^5 個のCD34⁺細胞/kg）を含有し、他方は、約 2.5×10^7 個の全細胞/kg（約 1.42×10^5 個のCD34⁺細胞/kg）を含有する）と、ヒト胎盤灌流液由来の（患者レシピエントまたはUCBのいずれかに対して）不適合で非血縁な有核細胞（約 0.4×10^7 個の細胞/kgのTNC；約 0.4×10^5 個のCD34⁺細胞/kg）とを二重で受けた。

40

【0099】

両方のUCB単位由来の細胞と灌流液細胞の生着は、23日までに検出した。移植後7

50

0日目に、患者は、血液中で評価したように、65% / 34% / 1%のUCB（単位#1 / 単位#2） / 胎盤灌流液細胞ドナーキメリズムで、完全生着を示し続けた。さらに、アブレーション後の患者は約1%の免疫系を保持していたにもかかわらず、患者はGVHDを示さなかった。最後の評価（移植後100日を超えた）で、患者は生存していた。

【0100】

悪性疾患を有する患者における、ヒト胎盤灌流液由来の不適合で非血縁な単核球の注入と組み合わせた二重で部分的に不適合なUCB移植は安全で良好な耐容性を示したことを、これらの結果は示している。

【0101】

（5.3. 実施例3：悪性疾患を有する患者におけるヒト胎盤灌流液由来の非血縁臍帯血および不適合単核球の移植（#2））

10

この実施例は、悪性疾患である急性リンパ性白血病（ALL）を有する患者に対して不適合で非血縁な臍帯血（UCB）とヒト胎盤灌流液由来の不適合で非血縁な単核球との投与を評価するように設計されている。

【0102】

患者は、CR1（誘発不全）のALLを有する17歳の女性であった。患者は、およそ8日目に骨髓破壊的前処置または毒性軽減前処置を受けた。0日目に、患者は、非血縁な臍帯UCB単位（両方の単位は、4 / 6HLA適合であり；一方の単位は、約 2.7×10^7 個の細胞 / kg（約 3.6×10^5 個のCD34⁺細胞 / kg）を含有し、他方は、約 2.7×10^7 個の細胞 / kg（約 2.5×10^5 個のCD34⁺細胞 / kg）を含有する）と、ヒト胎盤灌流液由来の（患者レシピエントまたはUCBのいずれかに対して）不適合で非血縁な単核球（約 0.3×10^7 個の細胞 / kgのTNC；約 0.2×10^5 個のCD34⁺細胞 / kg）とを二重で受けた。生着を検出し、患者は安全性に関わる事件を示さなかった。最後の評価（移植後60日目）で、患者は、悪性度IIIまたはIVのGVHDのいずれも示さなかった。

20

【0103】

（5.4. 実施例4：ヒト単核胎盤灌流液細胞と組み合わせた非血縁および血縁の臍帯血の移植の臨床プロトコル）

本明細書に示されるプロトコルは、単一群非無作為化の予備研究であり、その主要な目的は、幹細胞移植を必要とする種々の悪性または非悪性疾患を有する以下のA群～D群における臍帯血と組み合わせたヒト単核胎盤灌流液細胞の移植の安全性を評価することである。この研究の第2の目的は、幹細胞移植で潜在的に治癒可能な種々の悪性または非悪性疾患を有する対象における造血生着、ドナーキメリズム、および免疫機能を評価することである。

30

【0104】

以下の群をこの研究で利用する：

【0105】

A群：（3人の対象）患者へのHLA適合が3 / 6の部分的に不適合で血縁関係にある臍帯血と、血縁関係にある灌流液細胞。UCBおよび灌流液細胞は、同じドナー由来であり、ドナーは、患者と血縁関係にある。

40

【0106】

B群：（12人の対象）患者へのHLA適合が4 / 6の非血縁の臍帯血と、非血縁の灌流液細胞。UCBは、非血縁ドナー由来であり、灌流液細胞は、別々の非血縁ドナー由来である。

【0107】

C群：（3人の対象）患者へのHLA適合が4 / 6であるが、灌流液細胞と血縁関係にある非血縁の臍帯血。UCBおよび灌流液細胞は、同じドナー由来であるが、ドナーは、患者と非血縁である。

【0108】

D群：（12人の対象）患者および互いのHLA適合が4 / 6である、二重で非血縁

50

な臍帯血単位と、非血縁の灌流液細胞。各UCB単位は、別々であり、患者に非血縁で部分的に不適合であるドナー由来であり、灌流液細胞ドナーは、患者またはいずれかのUCBドナーに非血縁である。

【0109】

全ての対象には、移植を必要とする疾患で規定されるように、完全な骨髄破壊または毒性の低減した移植前処置のいずれかを施した後、UCBの移植および灌流液細胞の注入を施す。標準的な手順を用いてUCB注入（または複数）を投与する。4時間の待期期間後に、UCB注入から毒性が進行していないことを確認するため、1単位の灌流液細胞を注入する（そのような単位は、対象が 2.5×10^6 個のTNC/kg体重を受けることができるように十分な数の細胞を含まなければならない）。灌流液細胞単位を解凍し、解凍を開始してから90分以内に注入を行う。標準治療のGVHD予防薬も投与する。

10

【0110】

この研究の実施中に、移植後最初の100日中にA群～D群の各々におけるGVHDの発生率、および（輸血中または輸血24時間以内に起こる）急性輸血反応の任意の発生率を評価することに重きを置きながら、全ての臨床検査の有害事象の発生率を収集する。移植前処置期間中、移植時、および移植後少なくとも6カ月間、対象をベースラインで評価する。対象の安全性を守るため、一時的な登録停止は、研究に登録したいずれの対象において指標となる1つまたは複数の重篤な有害事象の発生によってもたらされる。

【0111】

選択基準：診断に関わらず全ての対象に対する重要な選択基準としては：1）対象、親、または法定後見人は、インフォームドコンセント同意書を理解し、自発的に署名しなければならない；2）対象は、年齢に応じた同意書（該当する場合）を理解し、署名しなければならない；3）インフォームドコンセント同意書の署名時に55歳の年齢でなければならない；4）施設訪問スケジュールおよび他のプロトコル要件を忠実に守ることができなければならない；5）子供を設ける可能性がある女性（FCBP）は、前処置を開始する7日以内に血清または尿妊娠検査が陰性でなければならない；6）性的に活発なFCBPは、研究治療中に適切な避妊方法を使用することに同意しなければならない；7）3カ月を超える余命；8）適切な全般健康状態、例えば、a）ランスキー全身状態50%（子供）またはカルノフスキー全身状態70%（成人）、またはECOG全身状態0～2（成人）；b）予測された補正DLCO50%；c）推定された左室駆出率40%；d）クレアチニウムクリアランスまたは推定GFR $60 \text{ mL} / \text{分} / 1.73 \text{ m}^2$ ；e）血清ビリルビン $1.5 \times$ 正常上限値；f）トランスアミナーゼ $3 \times$ 正常上限値；g）制御されない感染がない；およびh）HIV陰性が挙げられる。対象によって示された疾患または障害に特異的なさらなる選択基準も満たされるであろう。

20

30

【0112】

除外基準：対象は、以下の基準のいずれか1つを満たす場合、この研究の対象外である：1）患者に過剰なリスクを課すであろう、この研究に参加している彼/彼女に悪影響を及ぼすであろう、または本研究からのデータを解釈する能力を狂わせる任意の病状、検査所見の異常、または精神疾患；2）ファンコニ貧血を有する患者は、この研究の対象外である；3）登録前6カ月以内の心筋梗塞；4）ニューヨーク心臓協会（NYHA）クラスIIIまたはIVの心不全；5）制御されない狭心症；6）重度の制御されない心室性不整脈；7）急性虚血の心電図証拠または活性伝導系異常；8）制御されない感染；9）幹細胞移植からの生存に不適合な主に予想される病気または臓器不全；10）妊娠中または授乳期の女性；11）対象が、前処置レジメンの開始前30日以内に他の治療薬を受けている。

40

【0113】

UCBおよび灌流液細胞要件：1）1つの血縁関係にある臍帯血単位は、5/6および6/6HLA適合である 3.5×10^7 個のTNC/kg体重と、3/6および4/6HLA適合である 5.0×10^7 個のTNC/kgとを含まなければならない（解凍前）（A群）；2）1つの非血縁なUCB単位は、5/6HLA適合または6/6HLA適

50

合である 3.5×10^7 個の TNC / kg 体重、または 4 / 6 HLA 適合である 5.0×10^7 個の TNC / kg 体重を含まなければならない (解凍前) (B 群) ; 3) 1つの非血縁な臍帯血単位は、4 / 6、5 / 6、または 6 / 6 HLA 適合である 5.0×10^7 個の TNC / kg 体重を含まなければならない (解凍前) (C 群) ; 4) 2つの非血縁な臍帯血単位は、両方の単位 (解凍前) を組み合わせて 5.0×10^7 個の TNC / kg を含み、かつ、互いにかつレシピエントへの HLA 適合が 4 / 6 でなければならない (D 群) ; 5) HPC 単位は、対象が 2.5×10^6 個の TNC / kg 体重を受けることができるのに十分な数の細胞を含まなければならない。

【0114】

HLA 分類および HLA 適合グレード : 1) 非血縁な臍帯血 / 適合した家族ドナー : HLA 分類は、クラス I A および B の血清学、および DRB 1 の高分解能 DNA 分類によって行う ; 2) 家族ドナーは、血清学による HLA A および B (クラス I) 抗原と、DNA 分類による HLA DRB 1 (クラス II) 抗原と 5 / 6 または 6 / 6 で適合した一親等血縁者でなければならない ; 3) 1つの血縁関係にある臍帯血単位は、5 / 6 および 6 / 6 HLA 適合である 3.5×10^7 個の TNC / kg 体重と、3 / 6 および 4 / 6 HLA 適合である 5.0×10^7 個の TNC / kg とを含まなければならない (解凍前) (A 群) ; 4) 1つの非血縁な UCB 単位は、5 / 6 HLA 適合または 6 / 6 HLA 適合である 3.5×10^7 個の TNC / kg 体重、または 4 / 6 HLA 適合である 5.0×10^7 個の TNC / kg 体重を含まなければならない (解凍前) (B 群) ; 5) 1つの非血縁な臍帯血単位は、4 / 6、5 / 6、または 6 / 6 HLA 適合である 5.0×10^7 個の TNC / kg 体重を含まなければならない (解凍前) (C 群) ; 6) 2つの非血縁な臍帯血単位は、両方の単位 (解凍前) を組み合わせて 5.0×10^7 個の TNC / kg を含み (解凍前)、かつ、互いにかつレシピエントへの HLA 適合が 4 / 6 でなければならない (D 群) ; 7) 2つの非血縁な臍帯血の移植では、選択された最初の単位は、利用可能な最善の HLA 適合臍帯血単位 (患者と 4 / 6) であり、互いの単位との HLA 適合が 4 / 6 である。

【0115】

移植前処置期間中、移植時、および移植後最長 6 カ月、全ての対象は、厳格な安全性評価を受けるであろう。実施された重要な評価としては、身体検査、血液学および臨床化学的判断、骨髓穿刺液、骨髓生検および末梢血分析、放射線検査、並びに GVHD、毒性、および感染に特に重点を置いた有害事象の完全モニタリングが挙げられる。

【0116】

好中球および血小板生着の血液学的評価 : 分画をもつ全血球数は、0 日目から、好中球絶対数が最低値に到達した後に 3 日間 $> 500 / \text{mm}^3$ になり、かつ、血小板数が、3つの異なる日で 3 回連続した測定で、血小板輸血から最低 7 日間独立して $20,000 / \text{mm}^3$ に到達するまで、1 日 ~ 3 日ごとに行う。好中球および血小板生着研究は、CRF の適切なページ上に記録される。「好中球生着」とは、好中球数最低値の後に好中球絶対数が $500 / \text{mm}^3$ を上回る最初の 3 日間のことを言う。「血小板生着」とは、血小板が輸血なしで $20,000 / \text{mm}^3$ となる 7 日間の後に、血小板数が $20,000 / \text{mm}^3$ を示す最初の連続 3 日間のことを言う。

【0117】

ドナーキメリズム : 末梢血ドナーキメリズム (UCB および灌流液細胞) (全血、NK および T 細胞) の定量は、7 日目、14 日目、30 日目、60 日目、100 日目、および 180 日目 (+ / - 10 日) に評価する。さらに、末梢血レシピエントキメリズムの定量は、ベースラインでのドナー細胞 (UCB および灌流液細胞) のキメリズムに沿ったベースラインで評価する。定量は、短縦列反復アッセイを用いて行う。

【0118】

骨髓穿刺液、骨髓生検、および末梢血分析 : 骨髓穿刺液および生検は、基礎疾患について容認された手順に従って行い、対象の疾患状態を評価する。これらの分析は、移植後 100 日目および 180 日目 \pm 10 日で行うと考えられる。

【 0 1 1 9 】

均等物：

本発明の範囲は、本明細書に記載の特定の実施態様によって制限されるものではない。実際に、本明細書に記載するものに加えて、本発明の種々の改変形態が、前述の説明から当業者には明らかになるであろう。そのような改変形態は、添付の特許請求の範囲に属することを意図する。

【 0 1 2 0 】

本明細書に引用した参考文献は全て、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願を具体的かつ個々に、その全体を全ての目的で参照により本明細書に組み込むのと同じ程度に、それらの全体が全ての目的で参照により本明細書に組み込まれている。

10

【 0 1 2 1 】

いずれの刊行物の引用も、本出願日前のその開示に関するものであり、これによって、本発明が、先行発明によるそのような刊行物に先行するものではないことを認めると解釈してはならない。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/058774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/44 (2014.01)

CPC - A61M 2202/0462 (2014.12)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - A61K 35/14, 35/28, 35/44, 35/50; C12N 5/073 (2014.01)

USPC - 424/529; 435/325, 363, 366, 372

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 35/00, 35/12; A61M 2202/0413, 2202/0462; C12N 5/0605 (2014.12) (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Orbit, Google Patents, PubMed

Search terms used: method transplanting human umbilical cord blood cells administered with mononuclear cells from placental perfusate
not related unrelated matched mismatched

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2002/064755 A2 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 22 August 2002 (22.08.2002) entire document	1-6, 29-33
A	US 8,329,488 B2 (TAKEBE) 11 December 2012 (11.12.2012) entire document	1-6, 29-33
A	US 8,455,250 B2 (HEIDARAN et al) 04 June 2013 (04.06.2013) entire document	1-6, 29-33
A	US 5,437,994 A (EMERSON et al) 01 August 1995 (01.08.1995) entire document	1-6, 29-33
A	US 5,806,529 A (REISNER et al) 15 September 1998 (15.09.1998) entire document	1-6, 29-33

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 December 2014

Date of mailing of the international search report

06 JAN 2015

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/058774

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-28, 34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 7/00 (2006.01)		A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)		A 6 1 P 7/06	

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

(72)発明者 ステイシー ハーブ
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 8 7 0 7 マウンテン トップ アイス ハウス ドライブ 7 2 8

(72)発明者 ロバート ジェイ . ハリリ
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 9 2 4 バーナーズビル メンダム ロード 3 4 1
 Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB58 BB59 MA02 NA14 ZA51 ZA55 ZB08 ZB26
 ZB27 ZC21