

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5705127号
(P5705127)

(45) 発行日 平成27年4月22日 (2015. 4. 22)

(24) 登録日 平成27年3月6日 (2015. 3. 6)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 35/28 (2015. 01)	A 6 1 K 35/28
A 6 1 K 35/16 (2015. 01)	A 6 1 K 35/16
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10 1 0 3

請求項の数 19 (全 92 頁)

(21) 出願番号	特願2011-539647 (P2011-539647)	(73) 特許権者	511134481
(86) (22) 出願日	平成21年12月2日 (2009. 12. 2)		アモーサイト インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2012-510521 (P2012-510521A)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
(43) 公表日	平成24年5月10日 (2012. 5. 10)		7 6 0 1 ハッケンサック メイン スト
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/066354		リート 2 1 コート プラザ サウス
(87) 国際公開番号	W02010/065601		イースト ウィング スイート 3 0 4
(87) 国際公開日	平成22年6月10日 (2010. 6. 10)	(74) 代理人	100092093
審査請求日	平成23年9月9日 (2011. 9. 9)		弁理士 辻居 幸一
審判番号	不服2013-10737 (P2013-10737/J1)	(74) 代理人	100082005
審判請求日	平成25年6月7日 (2013. 6. 7)		弁理士 熊倉 禎男
(31) 優先権主張番号	61/169, 850	(74) 代理人	100084663
(32) 優先日	平成21年4月16日 (2009. 4. 16)		弁理士 箱田 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100093300
(31) 優先権主張番号	61/119, 552		弁理士 浅井 賢治
(32) 優先日	平成20年12月3日 (2008. 12. 3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 梗塞領域灌流改善組成物および血管損傷修復の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性心筋梗塞後の不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の医薬組成物であって、前記組成物が、

(a) 治療量の無菌的単離走化性造血幹細胞生成物であって、前記治療量の無菌的単離走化性造血幹細胞生成物が、 $CD34^+$ 細胞を濃縮した増殖させていない単離自己由来単核細胞集団を含む前記生成物であって

(b) 安定化量の血清；および

(c) 治療量の適合性薬剤を含み、前記適合性薬剤はアンギオテンシン変換酵素阻害剤、ベータブロッカー、利尿剤、抗不整脈剤、サイトカイン、抗狭心症薬、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、血管作用性薬剤、抗凝固剤、フィブリン溶解剤、および高コレステロール血症薬又はそれらの組み合わせを含み；

ここで、前記医薬組成物はカテーテルを介して1以上の輸液期日に非経口的に投与する為に製剤されており；

$CD34^+$ 細胞を濃縮した単離単核細胞集団がさらにCXCR-4媒介走化性活性を有するSDF-1移動性 $CD34^+/CXCR-4^+$ 細胞の亜集団を含むことを特徴とし、治療量はCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 個のSDF-1移動性 $CD34^+/CXCR-4^+$ 細胞の亜集団を含み、(i)灌流を改善することにより心筋細胞死を減少させること、(ii)心筋細胞のアポトーシスを減少させること及び(iii)現存する心筋細胞および梗塞領域におけるそれらの機能の保存に有効であり；

10

20

安定化量の血清はC X C R - 4 媒介走化性活性、並びにS D F - 1 移動性C D 3 4⁺/C X C R - 4⁺細胞の亜集団の造血コロニー形成活性の保持に有効であり、及び

治療量の適合性薬剤は、現存する心筋細胞の機能を促進して、心筋細胞死による心筋細胞機能の喪失を代償することが出来;

前記増殖させていない単離自己由来単核細胞集団が、カテーテル通過時及びin vitro検査時に更に増殖させていない単離自己由来単核細胞集団の入手後少なくとも24時間、以下の特性を有することを特徴とする

- (i) 少なくとも70%のカテーテルを通過した細胞がC D 3 4⁺細胞であり;
- (ii) 少なくとも0.5 × 10⁶個のカテーテルを通過した細胞がC X C R - 4 媒介走化性活性を有するS D F - 1 移動性C D 3 4⁺/CXCR-4⁺有能細胞であり、
- (iii) カテーテルを通過した細胞が少なくとも70%の生存率を有し; 及び
- (iv) カテーテルを通過した細胞の少なくとも一部がin vitroで造血細胞コロニーを形成することができる、前記医薬組成物。

10

【請求項2】

前記治療量の走化性造血幹細胞生成物が、CXCR-4 媒介走化性活性を有する少なくとも0.5 × 10⁶のS D F - 1 移動性C D 3 4⁺/CXCR-4⁺有能細胞の亜集団をさらに含む、少なくとも10 × 10⁶のC D 3 4⁺細胞を含む、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記治療量の組成物が、成分(a) + (b)からなる組成物よりも、または成分(c)単独からなる組成物よりもさらに梗塞領域損傷を軽減するのに効果的である、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の組成物。

20

【請求項4】

増殖させていない単離自己由来単核細胞集団が、対象動物から入手した骨髓吸引物の細胞性成分から精製される、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

増殖させていない単離自己由来単核細胞集団が、末梢血から精製される、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記増殖させていない単離自己由来単核細胞集団が、カテーテル通過時及びin vitro検査時に更に増殖させていない単離自己由来単核細胞集団の入手後少なくとも48時間に以下の特性を有することを特徴とする: (a) カテーテルを通過した細胞の少なくとも一部がin vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに

30

(b) 少なくとも0.5 × 10⁶個のカテーテルを通過した細胞がC X C R - 4 媒介走化性活性を有するS D F - 1 移動性C D 3 4⁺/CXCR-4⁺有能細胞である、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記増殖させていない単離自己由来単核細胞集団が、カテーテル通過時及びin vitro検査時に更に増殖させていない単離自己由来単核細胞集団の入手後少なくとも72時間に以下の特性を有することを特徴とする: (a) カテーテルを通過した細胞の少なくとも一部がin vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに

40

(b) 少なくとも0.5 × 10⁶個のカテーテルを通過した細胞がC X C R - 4 媒介走化性活性を有するS D F - 1 移動性C D 3 4⁺/CXCR-4⁺有能細胞である、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

前記組成物がカテーテルにより血管内を経由して梗塞関連動脈へ投与するために製剤されている、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

50

前記組成物がカテーテルを介して心筋層へ投与するために製剤されている、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 0】

治療量の前記組成物が、コントロールと比較したとき梗塞領域における微細血管の血流を改善すること、梗塞領域の損傷面積を減少させること、梗塞量を減少させること、心筋組織の少なくとも 1 つの虚血性梗塞周囲ゾーンの灌流を増加させること、心筋組織の少なくとも 1 つの梗塞周囲ゾーン内の活動休止心筋層への灌流を増加させること又はそれらの組み合わせに効果的である、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 1】

少なくとも 1 つの適合性薬剤が、チロシンキナーゼレセプターアゴニストニューレグリン 1 を含む、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

適合性薬剤が胎盤増殖因子、カテコールアミン、エンドテリン 1、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 、アンジオテンシン II、ホルボルエステル、ニューロペプチド Y、活性型形質転換増殖因子 $\beta 1$ 、 G_q 蛋白、ジアシルグリセロール、サリューシン α 、サリューシン β 、インスリン様増殖因子 1、ミオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子、マクロファージコロニー刺激因子、チアゾリジンジオン、血管内皮増殖因子、ニューレグリン 1、腫瘍壊死因子様低アポトーシスインデューサーまたはその組み合わせを含む、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

血管内皮増殖因子が VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C および VEGF-D から成る群から選択される、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記カテコールアミンがノルエピネフリンである、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記チアゾリジンジオンがロシグリタゾンである、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 6】

サイトカインが血管内皮増殖因子 (VEGF)、胎盤増殖因子 (PIGF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 及びマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) からなる群から選択される少なくとも 1 つである 不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

少なくとも 1 つの適合性薬剤が胎盤増殖因子を含む 不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

増殖させていない単離自己由来単核細胞集団を入手時に $CD 3 4^+$ 細胞を濃縮する前に複数のアリコットに分割し、-86°C で保存する、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

一度凍結保存し、解凍した増殖させていない単離自己由来単核細胞集団の複数のアリコットのうち少なくとも 1 つについて $CD 3 4^+$ 細胞を濃縮することができ、前記医薬組成物は $CD 3 4^+$ 細胞を濃縮した単離単核細胞集団がさらに少なくとも 0.5×10^6 の $CXC R-4$ 媒介走化性活性を有する $SDF-1$ 移動性 $CD 3 4^+ / CXC R-4^+$ 細胞の亜集団を含むことを特徴とし、；及び前記 一度凍結保存し、解凍した増殖させていない単離自己由来単核細胞集団が、カテーテル通過時及び in vitro 検査時に更にアリコットの解凍後少なくとも 24 時間に以下の特

10

20

30

40

50

性を有することを特徴とする：

- (1) 少なくとも 0.5×10^6 個のカテーテルを通過した細胞が CXCR-4 媒介走化性活性を有する SDF-1 移動性 $CD34^+$ /CXCR-4⁺ 有能細胞であり、；
- (2) カテーテルを通過した細胞が少なくとも 70% の生存率を有し；及び
- (3) カテーテルを通過した細胞の少なくとも一部が in vitro で造血細胞コロニーを形成することができる、不利な心室再造形の治療又は修復において使用する為の請求項 18 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、走化性造血幹細胞生成物を含む梗塞領域灌流改善組成物、および正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞の余波における梗塞領域損傷の修復で前記を血管再生対象動物で使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

心周期

“拡張期”という用語は、心臓腔がその間血液で満たされる、心臓腔の正常な収縮後拡張を指す。“収縮期”という用語は、心臓（特に心室）の収縮を指し、それによって血液は大動脈および肺動脈から駆動され、それぞれ全身循環および肺循環をめぐる。

“心周期”という用語は、1 回の心拍の開始から次の心拍の開始までに発生する冠状動脈血流または血圧に関する全てのまたはいずれかの機械的事象を指すために用いられる。血圧は心周期を通して上昇または下降する。心周期の頻度は心拍数である。心拍 1 回毎に以下の 5 つの主要な期が含まれる：(1) “後期拡張期”（半月弁が閉じ、房室 (AV) 弁が開き、全心臓が弛緩するときである）；(2) “心房収縮期”（左心房および右心房の心筋層が収縮し、AV 弁が開き、血液が心房から心室へ流れるときである）；(3) “等容性心室収縮期”（心室が収縮を開始し、AV および半月弁が閉じ、体積に変化がないときである）；(4) “心室駆出”（心室が空であるがなお収縮が続き、半月弁が開いているとき）；(5) “等容性心室弛緩”（圧が低下し、血液が心室に入らず、心室が収縮を停止して弛緩を開始し、大動脈内の血液が半月弁を押しつけるために半月弁が閉じるとき）。心周期は、洞房結節および房室結節内に見出される特殊化した心臓細胞によって生じる一連の電気刺激によって統合される。

【0003】

冠状動脈血流

冠状動脈を流れる血流は拍動性で、特徴的な相を示す収縮期流および拡張期流成分を有する。収縮期流（心周期の収縮またはポンプ期と関連する）は迅速で短い逆行性応答を示す。拡張期流（心周期の弛緩または充填期と関連する）は心筋収縮後の弛緩期で生じ、収縮期レベルを越える急激な増加および大動脈拡張期圧の低下と平行する緩徐な低下を示す。心拍毎に壁内の冠状動脈血の体積は変化し、心筋層は筋肉の収縮によって生じる体積の変化を調節する。冠状静脈流は冠状動脈流と協調せず、主に収縮期に生じ、拡張期にはほとんど存在しない。

各心拍について血圧は収縮期圧と拡張期圧間で変化する。“収縮期圧”という用語は動脈の最高圧を指し、前記は心室が収縮する心周期のほぼ最後に生じる。“拡張期圧”という用語は動脈の最低圧を指し、前記は心室が血液で満たされる心周期のほぼ最初に生じる。

冠状動脈流は相を有するだけでなく、血管のタイプおよび心筋層の分布にしたがって変化する。冠状細動脈はそれらの全長にわたって特殊化した調節性エレメントを有するようであり、それらエレメントは統合された態様で“連続して”作動する。多数の機能的な“弁”で構成される系は、冠状循環の厳密な制御を可能にする。最小の細動脈は代謝性ストレス時に拡張し、毛細血管の抵抗性の低下および心筋灌流の増加をもたらす。狭窄または血管の狭細は、狭窄症の形態学的特徴に直接関連する血流に対する抵抗を生じる。狭窄

10

20

30

40

50

より先の膨張圧の降下のために上流の細動脈圧が低下するので、上流のわずかに大きい細動脈の筋原性拡張が生じ、更なる抵抗の低下を引き起こす。もっとも大きな細動脈の流れの増加は剪断ストレスを増大させ、流量媒介拡張の引き金となり、このネットワークによる抵抗を更に低下させる。

【0004】

心臓の動および静脈のこの脈打つ流量の特徴は心筋層内のコンプライアンスに依存する。“コンプライアンス”という用語は、膨張または圧縮力が除かれたときその本来の体積に戻ろうとする反動に抵抗する中空器官の傾向の大きさを指す。コンプライアンスが強ければ強いほど、素材の弾性は強い。コンプライアンスは以下の等式を用いて算出される。式中、 ΔV は体積の変化であり、 ΔP は圧の変化である： $C = \Delta V / \Delta P$

10

貯蔵所としての心臓の容量は冠状血管への流入に対する抵抗細動脈によって制御される。放出口抵抗は壁内心臓静脈と関連する。心筋層内の毛細血管の抵抗は動脈および静脈の両方の応答に影響を与えるが、主として放出口抵抗と協調して機能する。

冠状動静脈の全抵抗のほぼ75%が動脈系で生じ、前記はコンダクタンス(R1)、細動脈前(R2)並びに細動脈および心筋層内毛細血管(R3)を含む。ヒトの正常な心外膜冠状動脈は、典型的には直径が0.3から5mmで、容易に感知できるような抵抗を血流に与えない。通常、大きな心外膜血管の抵抗(R1)は、アテローム硬化症性閉塞が管腔を損なうまでは極めて小さい。毛細血管前細動脈(R2)(サイズが100から500 μm)は、心外膜毛細血管から心筋層毛細血管を連結する抵抗性血管であり、冠状血流の主要な制御因子である。それら抵抗性血管は全冠状抵抗のほぼ25%から35%に該当する。毛細血管前細動脈の遠位血管(直径100 μm 未満)(冠状動静脈血流の代謝性調節主要部位)は、冠状血流抵抗の40-50%を生じる。1平方ミリメートル当たり約4000の毛細血管を有する密なネットワークは筋細胞の各々が毛細血管に隣接することを可能にする。毛細血管は均質に開いている(開放、自由な通過を意味する)とはかぎらない。なぜならば、毛細血管前の括約筋は心筋層の必要に応じて流量を調節するからである。

20

いくつかの症状、例えば左心室肥大、心筋虚血または糖尿病は微細循環抵抗(R3)を障害し、酸素要求増加時に冠状動静脈流の最大絶対増加を鈍化させえる。

【0005】

虚血

心臓の酸素貯蔵は貧弱なので、心筋層はほぼ完全に好気性代謝に依存する。心筋の酸素供給は心筋層の酸素(エネルギー)要求に応答して上下する。“自動調節”という用語は、駆動力の変化にもかかわらず一定レベルで心筋灌流を維持する能力を指す。自動調節は、広範囲の平均大動脈圧にわたって比較的一定レベルで冠状動静脈灌流を維持する。大動脈圧がその上限または下限を超過するとき、冠状血流は急激に降下するか、または相対的に増加する。

30

心臓は、十分量の酸素の供給を受け、灌流不足を防ぐ必要がある。狭窄から遠位にある灌流圧の低下が抵抗血管の自動調節拡張によって代償されないとき、虚血(血液供給および酸素の欠乏を意味する)が生じる。一般にもっとも供給が少ないゾーンはもっとも遠くに存在するので、虚血は一般に血液供給からもっとも遠く離れた領域に出現する。

冠状動脈の完全なまたは完全に近い閉塞後、心筋灌流は、側副枝(心外膜動脈を互いに連結する血管チャンネル)を経由して生じる。側副枝チャンネルは急性期に形成されるか、または冠状動脈疾患の出現前に未発達な状態で予め存在しえる。予め存在する側副枝は、直径が20 μm から200 μm の範囲の薄い壁をもつ構造物で、種々の種で多様な密集度を有する。予め存在する側副枝は通常閉じられ機能しない。なぜならば、側副枝が連結する動脈間の流れを駆動する圧力勾配が存在しないからである。冠状動静脈閉塞後、遠位圧が急激に降下し、予め存在する側副枝が実質的に即座に開く。

40

【0006】

“心筋虚血”という用語は心筋層細胞への血液供給および酸素の低下を指す。心筋虚血の進行は以下の2つのメカニズムに帰せられている：(1)心筋の酸素要求の増加、および(2)心筋灌流および酸素分配の低下(JT Willerson et al. JACC, 1986, 8(1))

50

: 2 4 5 - 5 0)。心筋虚血は一般に心内膜下領域で最初に出現しさらに範囲が拡大する。なぜならば、これらより深層の心筋層は血液供給からもっとも遠く、酸素要求がより強いからである。

一過性虚血、活動休止心筋層および心筋梗塞は臨床的に別個の状態である。

一過性虚血：本明細書で用いられる“一過性虚血”という用語は、休息時または運動時の冠状動脈の可逆性（筋細胞が傷害を乗り切ることを意味する）狭細を指し、この場合血栓またはプラークの断裂はないが血液供給は十分ではない。心臓の酸素要求が増加するたびに、酸素要求と供給との間で不均衡が発生する。一過性虚血は、代謝および生化学的変化で始まり、心室弛緩障害および拡張期機能不全、収縮期機能障害、およびSTセグメントの変化を伴う心電図異常、続いて左心室同期性不全、減動、無動および運動障害を伴う末期拡張圧の増加、最終的に狭心症の疼痛症状に至る連鎖事象をもたらす。たとえ虚血筋細胞が冠状動静脈流の数秒以内の停止により生理学的変化および代謝変化を受けたとしても（T波およびときにSTセグメント異常をもたらす（ただし血清酵素上昇はない））、細胞死はこの虚血からは発生しない（RA Kloner and RB Jennings, Circulation, 2001, 104:2981-89）。いったん血流が再起すれば、筋細胞の収縮機能の完全な回復をもたらされる。

狭心症ペクトリス（胸痛）は一過性虚血の症状であるかもしれないが、一般的に一過性虚血は対象動物の79%で無症状である（STセグメントの少なくとも1mmの低下が存在するが症状（例えば胸痛）を伴わないことを意味する）。大半の固定的狭心症患者では、結果として心拍数、血圧もしくは収縮性状態の増加または前記の組合せを生じる、例えば身体的骨折りまたは感情は、きつく狭まった（狭窄した）冠状動脈による酸素デリバリーで適切な配分を受けることなく心筋の酸素要求を増加させる。1つまたは2つ以上の抗狭心症薬で処置された固定的狭心症患者の40%以上が無症状狭心症を頻繁に起こす（前記無症状狭心症は、高リスクの冠状動静脈系事象および心臓死を予想させることが示された；PC Deedwania, EV Carbajal, Arch Intern Med, 1991, 150:2373-2382）。

【0007】

慢性心筋虚血：本明細書で用いられる“慢性心筋虚血（CMI）”という用語は、冠状血管の狭細による心筋虚血の長期化した亜急性または慢性状態を指し、そのような血管では心筋層は“活動を休止して”（心筋層はその収縮性、したがってその心筋酸素要求をダウンレギュレートまたは低下させることを意味する）、灌流減少に適応し、それによって細胞の生存率を温存しアポトーシスを回避する。心筋層がそのようなふるまう基本的メカニズムはあまりよく理解されていない。この活動休止心筋層は、適切な血液供給の回復に関して正常なまたは正常に近い機能に復帰することができる。しかしながら、いったん冠状血流が正常または正常に近い状態に回復し虚血が消散したとしても、活動休止心筋層はなお収縮しない。虚血消散後の心機能の緩徐な復帰をもたらす、この流量-機能ミスマッチは人事不省と称された。機能が回復する時間は極めて多様で数日から数カ月の範囲にあり、多数のパラメーター（最初の虚血発作の持続時間、最初の発作時の虚血の重症度、および動脈流の復帰の適切性を含む）に左右される。多数の研究によって活動休止心筋層の炎症の証拠が提供された（G Heusch et al. AM J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288:984-99）。心筋活動休止のブタモデルで実施された研究（この研究では、平均休止LAD冠状血流が24時間から4週間基準線の約60%に低下した）は、狭窄LADによって供給を受けた活動休止領域でアポトーシスの筋細胞を実験に用いた全てのブタで検出し、機能のダウンレギュレーションは、活動休止心筋層におけるアポトーシスにより徐々に進行する筋細胞死の予防に適切ではないことが示唆された（C Chen et al. J Am Coll Cardiol, 1997, 30:1407-12）。冠状動脈バイパス術を受けているヒト患者の生検でも同様に筋細胞のアポトーシスが、活動休止心筋層における重要な現象として認められた（このアポトーシスは左心室機能の回復に負の影響を与える）（A Angelini et al. Eur J Heart Failure, 2006, 9(4):377-83）。

【0008】

急性心筋梗塞 (AMI) : 別のタイプの発作はAMI時に発生する。AMIは、虚血性梗塞 (心筋が死ぬまでそれが持続することを意味する) を生じる冠状血管の管腔における急激な変化である。肉眼検査では、心筋梗塞は以下の2つの主要なタイプに分けることができる: 経壁性梗塞 (心筋の壊死は心室壁の厚さの全部またはほぼ全部を含む) および心内膜下 (非経壁) 梗塞 (心筋壊死は心内膜、壁内心筋層またはその両方を含むが、心室壁から心外膜に至る途中の全てに及ぶことはない。プラーク断裂の結果として管腔内に血栓が形成されるために、STセグメントの上昇を伴う血管の完全な閉塞がしばしば存在する。長期化した虚血発作はアポトーシス性および壊死性の心筋細胞死をもたらす (以下を参照されたい: J Kajstura et al. Lab Invest, 1996, 74:86-107)。壊死は完全な筋細胞膜および細胞内巨大分子を含み、したがって血清の心マーカー (例えば心臓特異的トロポニン) および酵素 (例えば血清のクレアチンキナーゼ (CK)) が放出される。さらにまた、筋肉の厚さ全部の損傷のために患者は心電図 (ECG) の変化を示すことができる。ST上昇心筋梗塞 (STEMI) は、ST非上昇心筋梗塞よりも大きな損傷である。ECGにおけるSTセグメント上昇およびQ波 (心筋梗塞を強く示唆する2つの特徴) は、心筋梗塞症例の約半分のみに提示時に認められる。

【0009】

急性心筋梗塞は一般的で、米国だけで年間発生率は110万症例と報告されている (EM Antman, E Braunwald, Acute Myocardial Infarction, Principles of Internal Medicine, 15th Ed., E. Braunwald et al. (Ed), New York: McGraw-Hill, 2001)。前臨床および臨床データは、心筋梗塞後の心筋層の筋肉細胞の激しい消失および付随する梗塞周囲ゾーンの低灌流が、心臓機能の迅速な縮小 (長期間持続する可能性がある) を引き起こす一連の事象をもたらすことを示している。心筋細胞消失の程度は、冠状動脈閉塞の持続時間、既存の冠状循環側副枝、および心臓の微細血管系の状態に左右される (Paul et al. Am Heart J, 1996, 131:710-15; MA Pfeffer, E Braunwald, Circulation, 1990, 81:1161-72; I Sheilban et al. J Am Coll Cardiol 2001, 38:464-71; E Braunwald, MR Bristow, Circulation 2000, 102:IV-14-23; Rich et al. Am J Med 1992, 92:7-13; Ren et al. Histochem 2002, 49:71-79; T. Hirai et al. Circulation 1989, 79:791-96; M Ejiri et al. J Cardiology 1990, 20:31-37)。心筋細胞は実質的に再生能力をもたないので、心筋梗塞は、収縮筋肉細胞の消失および非機能性線維性瘢痕形成のために永久的な心不全をもたらす (NG Frangogiannis et al. Cardiovascular Res 2002, 53(1):31-47)。さらにまた、生存活性を有する心筋の代償性肥大は微細血管の機能不全をもたらす、前記機能不全は、心筋の活動休止および梗塞周囲ゾーンの肥大心筋細胞のアポトーシスを引き起こすことによって心機能の更なる消滅をもたらす。

【0010】

心筋梗塞の生存者では、残存心機能は、心室再造形の程度 (損傷後の心臓のサイズ、形状および機能における変化 (典型的には機能の進行性低下) を意味する) によって影響される。心室の局所解剖学 (心室の形状、構造または形態学) における変化は、心筋梗塞後の梗塞心臓組織と健常な心臓組織の両方で生じる (MA Pfeffer, E Braunwald, Circulation 1990, 81:1161-72)。心室拡張 (心室の引伸ばし、拡大または拡張を意味する) は、全体的な心機能の低下を引き起こし、さらに梗塞のサイズ、梗塞の治癒および心室壁ストレスによって影響を受ける。再造形を最小限に止める最近の努力は、血栓溶解剤および機械的介入を用いる迅速な再灌流 (血流の回復を意味する) を介して梗塞サイズを限定することによって成功している。前記機械的介入にはステントの設置が含まれ (ただし前記に限定されない)、負荷前療法の慎重な使用および適切な負荷後管理による心室壁ストレスの低下が前記と平行して実施される (上掲書)。これらの介入にも関わらず、実質的パーセンテージの患者が、心筋梗塞後に臨床的に関連する長期の心機能不全を経験する (I Sheilban et al. J Am Coll Cardiol, 2001, 38:464-71)。心室壁ストレスを最小限にするための梗塞関連動脈循環の血管再生および適切な医薬管理にもか

かわらず、これらの患者の有意なパーセンテージの者が、心室再造形、永久的心機能不全、および進行性心機能悪化を経験し、その結果として心臓障害（死を含む）を起こすリスクが生涯にわたって増加し続ける（Paul et al. *Am Heart J* 1996, 131:710-15; MA Pfeffer, E Braunwald, *Circulation* 1990, 81:1161-72）。

【0011】

細胞レベルでは、心筋梗塞直後に一過性広汎性心機能不全が均質に生じる。短時間の（すなわち3分から5分）冠状動脈閉塞の状況で、エネルギー代謝が障害され、即時再灌流にもかかわらず48時間まで持続しえる明瞭な心機能不全がもたらされる。このいわゆる“人事不省心筋現象”は再灌流に続いてまたは再灌流後に発生し、反応性酸素種の結果であると考えられる。この過程は一過性であり、炎症性応答を伴わない（NG Frangogiannis et al. *Cardiovascular Res*, 2002, 53(1):31-47）。血管再生の成功後、人事不省からの顕著な回復が3から4日以内に発生するが、完全な回復にははるかに長期間を要することがある（R Boli, *Prog Cardiovascular Disease* 1998, 40(6):477-515; K Sakata et al. *Ann Nucleic Med* 1994, 8:153-57; KC Wollert et al. *Lancet* 2004, 364:141-48）。

より重大な持続時間（すなわち5分を越えて持続する）の冠状動脈閉塞は心筋虚血をもたらし、再灌流直後に始まって数週間まで持続しえる重大な炎症性応答をともなう（NG Frangogiannis et al. *Cardiovascular Res* 2002, 53(1):31-47; NG Frangogiannis et al. *Circulation* 1998, 98:687-798）。

再灌流に続く炎症プロセスは複雑である。初期に前記は心筋の損傷に関与するが、後には治癒および瘢痕形成をもたらす。この複雑なプロセスは2つの期として生じるようである。第一のいわゆる“激烈（hot）”期（最初の5日間）では、反応性酸素種（虚血性心筋組織中の）および補体活性化は白血球のための走化性シグナルを生成し（走化性は、自動性細胞、生物または部分が好ましいと考える環境条件に向かい、不快と感じる周囲環境から離れる定方向性運動である）、さらにサイトカインカスケード開始させる（DJ Lefer DN Granger, *Am J Med* 2000, 4:315-23; NG Frangogiannis et al. *Circulation* 1998, 7:699-710）。マスト細胞の脱顆粒化、腫瘍壊死因子アルファ（TNF α ）放出、並びにインターロイキン6（IL-6）、細胞内接着分子1（“ICAM-1”またはCD-54、典型的には内皮細胞および免疫系細胞上で発現されるレセプター）、セレクチン（L、EおよびP）およびインテグリン（CD11a、CD11bおよびCD18）発現の増加は、いずれも虚血性心筋層における好中球の蓄積および脱顆粒化に寄与するように思われる（NG Frangogiannis et al. *Circulation* 1998, 7:699-710; KM Kurrelmeier et al. *Proc Natl Acad Sci* 2000, 10:5456-61; LA Lasky, *Science* 1992, 258:964-69; XL Ma et al. *Circulation* 1993, 88(2):649-58; PJ Simpson et al. *J Clin Invest* 1998, 2:624-29）。好中球は、微細血管の閉塞および心筋細胞へのリガンド特異的接着後の好中球呼吸系バースト経路の活性化により、心筋細胞損傷および心筋細胞死に決定的に関与する（ML Entman et al. *J Clin Invest* 1992, 4:1335-45）。“激烈”期の間、血管新生は血管抑制物質（インターフェロンガンマ誘発性タンパク質（IP 10）を含む）の放出により抑制される（NG Frangogiannis et al. *FASEB J* 2001, 15:1428-30）。

【0012】

第二期では、心臓修復プロセスが開始し（約6日目から約14日目）、これは最終的には瘢痕形成に至り（約14日目から約21日目）、続いて心室再造形に至る（約21日目から約90日目）。再灌流後まもなく、単球が梗塞心筋層に浸潤する。補体（C5a）、形質転換増殖因子B1（“TGF-B1”）および単球走化性タンパク質1（“MCP-1”）によって誘引されて、単球はマクロファージに分化し、このマクロファージは、死亡組織の掃除、細胞外マトリックス代謝の調節および線維芽細胞増殖の誘発によって治癒プロセスを開始する（HH Birdshall et al. *Circulation* 1997, 3:684-92）。リンパ球浸潤によるインターロイキン10（IL-10）の分泌もまた、炎症性サイトカインをダウンレギュレートしさらに組織の再造形に影響を及ぼすことによって治癒を促進する（NG Frang

ogiannis et al. J Immunol 2000, 5:2798-2808)。マスト細胞もまた、線維性瘢痕組織の形成に加わることによって心筋層修復の後期に必要なとされるようである。幹細胞因子 (SCF) はマスト細胞の強力な誘引因子である。心筋梗塞のイヌモデルで、SCF mRNAが虚血性心筋セグメントでアップレギュレートされることが示され、したがってSCF mRNAは虚血性心筋部位でのマスト細胞の蓄積に寄与するかもしれない (NG Frangogiannis et al. Circulation 1998, 98:687-798)。マスト細胞生成物 (TGF-B、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) およびゼラチナーゼAおよびBを含む) は線維芽細胞増殖を誘発し、細胞外マトリックス代謝に影響を及ぼし、さらに血管新生を誘発する (KC Fang et al. J Immunol 1999, 162:5528-35; S Takeshi et al. Cardiology 2000, 93:168-74)。

10

【0013】

心筋梗塞に続いて、新血管形成が、炎症プロセスの“激烈”期が収まった後で発生し (約5日目)、これはVEGFのレベル上昇と符合する (VEGFは約7日目に最盛期に達し、徐々に終息して約14日目から約21日目で基線に達する)。治癒プロセスのこの期では、梗塞部位に内皮プレカーサー細胞 (EPC) が動員され補充される (S Shintani et al. Circulation 2001, 103:2776-79)。理論に拘束されないが、ケモカイン間質細胞由来因子1 (SDF-1) (前記はCD34+細胞によって発現されるCXCR-4ケモカインレセプターのリガンドである) もまた、虚血損傷領域への細胞の帰巢で役割を果たすと提唱されている (DJ Ceredini et al. Nature Medicine 2004, 10:858-63; A Askari et al. Lancet 2003, 362:687-703; J Yamaguchi et al. Circulation 2003, 107:1322-34)。SDF-1は造血において役割を果たし、さらに、造血プロジェニターの遊走、帰巢および生存に必要とされることが知られているが、さらにSDF-1は虚血部位へのEPCの補充を増大させることによってin vivoでの虚血性新血管形成に関与しているが (Yamaguchi et al. Circulation 2003, 107:1322-1328)、新血管形成におけるSDF-1の役割は確かではない。SDF-1の関与を示唆する証拠が存在する。例えば、SDF-1遺伝子発現は、低酸素症誘発性因子1 (HIF-1) によって低酸素症 (組織における酸素の欠乏) 時にアップレギュレートされる。さらにまた、CD34+細胞は梗塞心筋層を含む虚血領域 (SDF-1に富む) へ帰巢することができる (Askari et al. Lancet 2003, 362:697-703)。さらにまた、VEGF-2を発現する実質的に全ての細胞がCD34およびCXCR-4を同時発現するが、CD34+CXCR-4+細胞の約1%から約2%のみがVEGF-2を同時発現する。

20

30

【0014】

梗塞周囲境界ゾーン

冠状動脈閉塞によって生じた機能不全の心筋ゾーンは梗塞領域を越えて広がり、外見的には正常な隣接組織で構成される変わりやすい境界部を含む (Q Hu et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006, 291:H648-657)。この虚血性であるが生命活性を有する梗塞周囲組織ゾーンは、壊死が進行する中心帯を周囲の正常な心筋層から分離させる。この梗塞周囲ゾーンは梗塞サイズの酵素的パラメーターと相関性を示さず、小さな梗塞で実質的に大きい (A Stork et al. European Radiol 2006, 16(10):2350-57)。

40

浮腫および境界ゾーンの血管の圧縮による虚血は結末にとって非常に重要かもしれない。例えば、AMIの後で一過性虚血が境界ゾーンで発生し、経皮的冠状動脈介入 (梗塞関連動脈を切開する) は梗塞周囲ゾーンの状態に悪影響を及ぼしえることが知られている。平均血液流量の中間レベルは、梗塞境界の正常に灌流が行われている心筋領域と混ざりあった虚血組織の半島の混合の結果として存在しえると提唱されている (Q Hu et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006, 291:H648-657)。しかしながら、この混ざりあった冠状微細血管の境界部 (イヌでは幅が3mmを越えない) は、梗塞周囲の比較的広い領域の心筋層機能不全を説明することができない (RH Murdock Jr et al. Cir Res 1983, 52:451-59; AJ Buda et al. J Am Coll Cardiol 1986, 8:150-58)。この梗塞周囲心筋層の長期間にわたる進行性機能不全は、代償性再造形からA

50

MI後の進行性心不全への転換に寄与するのかもしれない。

【0015】

今日まで、血管機能不全、具体的には心筋梗塞後の重大な血管機能不全による長期間の悪影響を予防する理想的な治療法は存在しない。大血管の血管再生（ステントの設置の成功を意味する）は有望であるように思われるが、今日までの研究は、そのような応用は代償性心筋肥大によって強いられる要求の高まりに答えるには不十分であることを示している。結果として、梗塞の拡大および線維性置換が、大血管の血管再生、血管壁ストレスの適切な医学的管理、および潜在的な自然力による（最適には及ばないが）CD34⁺細胞媒介新血管形成（心筋梗塞の内在的原因に関連する見解の1つはこれら細胞を動員する能力は生物学的に限界があるということである）にもかかわらず普遍的に発生する。

10

内皮および心筋のプレカーサー細胞の梗塞後心筋損傷を限定する能力および心室再造形を限定または予防する能力を評価することに強い関心が生じている。有意な量の前臨床データおよびいくつかの臨床データが、新血管形成、限定的心筋形成（主として融合による）、および心筋梗塞ゾーンにおける筋肉温存に寄与する多様な細胞プレカーサー（具体的には造血細胞）を用いる細胞療法の安全性および潜在能力を明らかにした。例えば以下の文献を参照されたい：Jackson et al. J Clin Invest 2001, 107:1395-1402；JM Edelberg et al. Cir Res 2002, 90:e89-e93；V Schichinger et al. New Engl J Med 2006, 355(12):1210-21（骨髄由来プロジェニター細胞を使用）；B Assmus et al. New Engl J Med 2006, 355(12):1222-32（骨髄由来プロジェニター細胞を使用）；ただし以下も参照されたい：K Lunde et al. New Engl J Med 2006, 355(12):1199-209（骨髄由来プロジェニター細胞を使用）。どんな環境下でどの程度左心室の再造形が可逆性であるのかは不明である。

20

【0016】

骨髄は、多様なプレカーサーおよび成熟細胞タイプから成り、前記には造血細胞（成熟血液細胞のプレカーサー）および間質細胞（広域結合組織細胞のプレカーサー）が含まれ、その両方が他の細胞タイプに分化することができるようである（JS Wang et al. Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 122:699-705；S Tomita et al. Circulation 1999, 100(Suppl II):247-256；T Saito et al. Tissue Eng 1995, 1:327-43）。未改変（すなわち分画されていない）骨髄または血液由来細胞はいくつかの臨床研究で用いられてきた（例えば以下を参照されたい：K Hamano et al. Japan Circ J 2001, 65:845-47；BE Strauer et al. Circulation 2002, 106:1913-18；Assmus et al. Circulation 2002, 106:3009-3017；N Dobert et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004, 8:1146-51；KC Wollert et al. Lancet 2004, 364:141-48）。骨髄の単核細胞分画は間質細胞、造血プレカーサーおよび内皮プレカーサーを含むので、観察された作用に対するこれら集団の各々の相対的貢献度は、存在するとしても不明である。

30

CD34は、ヒト骨髄、血液および胎児肝臓に由来する造血幹細胞およびプロジェニター細胞で選択的に発現される造血幹細胞抗原である（Yin et al. Blood 1997, 90:5002-5012；S Miaglia et al. Blood 1997, 90:5013-21）。CD34を発現する細胞はCD34⁺と称される。間質細胞はCD34を発現せず、したがってCD34⁻と称される。ヒト血液から単離されたCD34⁺細胞は心筋細胞、内皮細胞および平滑筋細胞にin vivoで分化することができる（以下を参照されたい：Yeh et al. Circulation 2003, 108:2070-73）。CD34⁺細胞は、骨髄から誘導される有核細胞のほぼ1%を占める。CD34抗原はまた未成熟内皮細胞プレカーサーによって発現され、一方、成熟内皮細胞はCD34を発現しない（M Peichev et al. Blood 2000, 95:952-58）。in vitroでは、成人骨髄に由来するCD34⁺細胞は、大部分の顆粒球／マクロファージプロジェニター細胞（CFU-GM）、いくつかのコロニー形成ユニット混合物（CFU-Mix）および原始赤血球系プロジェニター細胞（バースト形成ユニット、赤血球またはBFU-E）の小集団を生じる（Yeh et al. Circulation 2003, 108:2070-73）。CD34⁺細胞はまた、新しい心筋の筋肉に分化するか（ただし頻度は低い）、またはその発

40

50

達に寄与する潜在能力を有するかもしれない。

免疫磁性ビーズ分離を用いた技術が開発され、高度に精製され生存活性を有するCD3 4⁺細胞集団が骨髓単核細胞から単離された。米国特許5,536,475号、5,035,994号、5,130,144号、4,965,205号（前記文献のそれぞれの内容は参照により本明細書に含まれる）を参照されたい。2つの臨床的研究が、心筋梗塞後の骨髓由来CD3 4⁺細胞の臨床的応用を支持している（以下を参照されたい：C Stamm et al. Lancet 2003, 361:45-46；B Herenstein et al. Blood Supplement, Abs 2004, 2696）。

【0017】

動物モデル

AMI後の好ましい治療法は、不利な再造形および機能不全をもたらす回復時の細胞の死滅を停止させるか、または死滅細胞を心筋細胞に置き換えるであろう。VEG-F発現のタイミングの制御を可能にする条件付けトランスジェニック系がマウスで報告されている（D May et al. Proc Natl Acad Sci 2008, 105(1):282-87）。前記の系を用いて、心室の低灌流および心筋虚血の調節可能な状態が創出された。大部分の心筋細胞が活動休止しながらなお検出可能な細胞死が存在しない状態にさせる条件下では、心筋細胞の機能不全（活動休止）は、微細血管密度の減少の程度と直線関係にあることが見出された。これはAMIにより誘発される心室再造形のモデルにはならない（前記心室再造形は、梗塞拡大、炎症、瘢痕形成および筋細胞肥大のプロセスのために複雑である）。

マウスの大腿動脈を結紮して末梢動脈疾患を模した後肢虚血モデルは、末梢動脈疾患（PAD）（末梢血管疾患（PVD）とも呼ばれる）の見本である。PAD（一般的には脚に血液を供給する動脈に影響を与え、腕および脚の大血管の閉塞によって引き起こされる全ての疾患を含む）は、アテローム性硬化症、狭窄をもたらす炎症プロセス、塞栓症または血栓形成から生じえる。動脈の狭窄または閉塞による血流の制限で、患者はしばしば歩行における筋肉痛（断続的跛行）を訴える。血流の更なる減少はいずれも休息時の虚血性疼痛を引き起こす。この状態は慢性肢虚血と称され、酸素要求が休息時に維持されえないことを意味している。続いて潰瘍形成および壊疽がつま先（血液供給からもっとも遠い）に併発し、治療しなければ支配肢は失われえる。

【0018】

肢虚血の治療法は、側副枝の発達および血液供給の補給という目標を有する。骨髓由来CD3 4⁺単核細胞がそのような後肢虚血モデルで試験されたが、後肢虚血モデルは心臓で生じるもののモデルではない。

もっとも近縁な動物のモデル（ブタモデル）は、以下の理由からヒトの疾患の良好なモデルではない：（i）全ての実験は概ねアテローム性硬化症ではない動物で実施される、（ii）動物は血管形成術で処置されない、（iii）正常なブタは血管に塞栓を生じない、（iv）ブタの血液循環はヒトのものと厳密には同じではない、（iv）梗塞周囲境界ゾーンは同じでない可能性がある。

CD3 4⁺細胞をG-CSFで動員し、5日後にアフエレーシスを実施し、続いてノガ（Noga）マッピングを基にして心臓の虚血領域に注入した時、狭心症の症状におけるわずかな改善が最近報告された。

本発明は、心筋梗塞後の梗塞領域の灌流改善療法である。フェースI試験のデータは、少なくとも 1.0×10^6 の単離された自己由来CD3 4⁺造血幹細胞（CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD3 4⁺細胞の亜集団を含む）で治療された対象動物は、5百万の細胞を投与された対象動物およびコントロールと比較して、SPECT総合重症度スコア（Total Severity Score）で測定した時、6カ月で休息時灌流速度の顕著な改善を体験することを示す証拠を提供した（-256に対して+13、 $p=0.01$ ）。

【発明の概要】

【0019】

本発明は、梗塞領域の損傷を治療する医薬組成物および、対象動物にカテーテルを介し

10

20

30

40

50

て非経口的に無菌的医薬組成物を投与することによって、正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞の余波の梗塞領域損傷を血管再生対象動物で治療または修復する方法を提供する。前記無菌的医薬組成物は、第一の治療薬剤として治療的に有効な量の増殖させていない無菌的な単離された走化性造血幹細胞生成物および場合によって治療的に有効な量の少なくとも1つの適合しえる第二の治療薬剤を含む。前記無菌的な単離走化性造血幹細胞生成物の梗塞領域改善量は自己由来の単離CD3 4⁺細胞の濃縮集団を含み、前記濃縮集団は、自己由来単離CD3 4⁺造血幹細胞の濃縮集団が、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも0.5 x 10⁶の有能CD3 4⁺細胞を提供することができるように、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。

10

【0020】

ある特徴にしたがえば、本発明は、正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞に続く梗塞領域の損傷を血管再生対象動物で治療または修復する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：

(a) 以下の(i) - (iii)を含む無菌的医薬組成物を、カテーテルを介して非経口的に対象動物に投与する工程：(i) 第一の治療薬剤として梗塞領域灌流改善量の増殖させていない無菌的な単離された造血幹細胞生成物であって、前記梗塞領域灌流改善量の走化性造血幹細胞生成物が自己由来単離CD3 4⁺造血幹細胞の濃縮集団を含み、前記濃縮集団が、自己由来単離CD3 4⁺造血幹細胞の濃縮集団が、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも0.5 x 10⁶の有能CD3 4⁺細胞を提供することができるように、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能CD3 4⁺細胞の亜集団を含む、前記無菌的単離走化性造血幹細胞生成物；(ii) 安定化量の血清であって、前記安定化量の血清が20% (v/v) を越える前記血清；および(iii) 場合によって、治療の有効量の少なくとも1つの適合しえる第二の治療薬剤：および

20

(b) コントロールと比較して、少なくとも1つの梗塞領域で灌流を改善する工程であって、前記工程において、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD3 4⁺細胞の濃縮集団の少なくとも70%の細胞が、カテーテル通過時およびin vitro検査時にCD3 4⁺細胞であり、さらに前記工程において、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD3 4⁺細胞の濃縮集団が、カテーテル通過時およびin vitro検査時に(1) CXCR-4媒介走化性活性を維持し、(2) 少なくとも約70%の生存率を有し、さらに(3) CXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD3 4⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手後少なくとも24時間in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに前記工程において、投与工程(a)は1つまたは2つ以上の輸液期日で実施され、さらに前記工程において、第一の輸液期日は1回目および2回目で規定される特定の時間間隔を含み、前記1回目は梗塞領域での最盛期炎症性サイトカインカスケード産生後であり、2回目は梗塞領域における心筋瘢痕形成前である、前記工程。

30

【0021】

本方法のある実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善量の走化性造血幹細胞生成物は、10 x 10⁶の単離された自己由来CD3 4⁺造血幹細胞の濃縮集団を含み、前記濃縮集団は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する0.5 x 10⁶の有能CD3 4⁺細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、前記梗塞領域においてアポトーシスによる心筋細胞の減少を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、コントロールと比較したとき急性心筋梗塞後の不利な心室再造形を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、急性心筋梗塞後の心臓筋肉機能の進行性低下を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、心筋組織の少なくとも1つの虚血性梗塞周囲ゾーンの低灌流を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、梗塞周囲境界ゾーンの心筋活動休止を含む。別の実施態様にしたがえば、本方法はさらに第二の無菌的医薬組成物の第二の凍結融解アリコットを第二の輸液期日に投与する工程を含み、前記第二の凍結融解アリコットは、(i) CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する

40

50

少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む自己由来単離CD34⁺造血幹細胞の凍結融解濃縮集団；および (ii) 安定化量の血清であって、前記安定化量の血清が20% (v/v) を越える前記血清を含み、前記工程において、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む第二のアリコットの凍結融解濃縮集団は、カテーテル通過時およびin vitro検査時に、(1) CXCR-4媒介活性を維持し、(2) 少なくとも70%のCD34⁺細胞を含み、(3) 少なくとも70%の生存率を有し、さらに(4) 第二のアリコットの融解後少なくとも24時間in vitroで造血細胞コロニーを形成することができる。別の実施態様にしたがえば、本方法はさらに、場合によって、無菌的医薬組成物の第三の凍結融解アリコットを第三の輸液期日に投与する工程を含み、前記第三のアリコットは、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む自己由来単離CD34⁺造血幹細胞の凍結融解濃縮集団；(ii) 安定化量の血清であって、前記安定化量の血清が20% (v/v) を越える前記血清を含み、前記工程において、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む第三のアリコットの凍結融解濃縮集団は、カテーテル通過時およびin vitro検査時に、(1) CXCR-4媒介活性を維持し、(2) 少なくとも70%のCD34⁺細胞を含み、(3) 少なくとも70%の生存率を有し、さらに(4) 第三のアリコットの融解後少なくとも24時間in vitroで造血細胞コロニーを形成することができる。別の実施態様にしたがえば、第二の輸液期日は第一の輸液期日の約30日後である。別の実施態様にしたがえば、第三の輸液期日は第一の輸液期日の約60日後である。

【0022】

別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a) in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに(b) (a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を入手後少なくとも48時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a) in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに(b) (a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を入手後少なくとも72時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団は、(a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手後少なくとも24時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、前記方法はさらに、組成物を血管内から梗塞関連動脈へデリバリーする工程を含む。別の実施態様にしたがえば、前記方法はさらに、カテーテルから心筋層へ組成物をデリバリーする工程を含む。別の実施態様にしたがえば、前記カテーテルは流量制御カテーテルである。別の実施態様にしたがえば、前記カテーテルはバルーン拡張カテーテルである。別の実施態様にしたがえば、前記カテーテルは少なくとも約0.36mmの内径を有する。

【0023】

別の実施態様にしたがえば、第一の輸液期日の特定の時間間隔の1回目は心筋梗塞後少なくとも約5日である。別の実施態様にしたがえば、第一の輸液期日の特定の時間間隔の2回目は心筋梗塞後約14日未満である。別の実施態様にしたがえば、第一の輸液期日の特定の時間間隔の1回目は心筋梗塞後少なくとも約5日であり、第一の輸液期日の特定の時間間隔の2回目は心筋梗塞後約14日未満である。別の実施態様にしたがえば、最適な第二の治療薬剤は、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤である。別の実施態様にしたがえば、前記最適な第二の治療薬剤は、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、ベータブロッカー、利尿剤、抗不整脈剤、抗狭心症薬、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、血管作用性薬剤、抗凝固剤、フィブリン溶解剤、および高コレステロール血症薬から成る群から選択される。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、ニューレグリン1を含む。別の実施態様にしたがえば、前記方法は、成分(i) + (ii) よりも、また

は成分 (iii) 単独よりもさらに多く梗塞領域損傷を軽減する。別の実施態様にしたがえば、前記方法は、コントロールと比較したとき梗塞領域の微細血管の血流を改善する。別の実施態様にしたがえば、前記方法は、コントロールと比較したとき梗塞損傷面積を減少させる。別の実施態様にしたがえば、前記方法は、コントロールと比較したとき梗塞量を減少させる。別の実施態様にしたがえば、前記方法は、コントロールと比較したとき心筋組織の少なくとも1つの虚血性梗塞周囲ゾーンの灌流を増加させる。別の実施態様にしたがえば、前記方法は、コントロールと比較したとき、心筋組織の少なくとも1つの梗塞周囲ゾーン内の活動休止心筋層への灌流を増加させる。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-CおよびVEGF-Dから成る群から選択される血管内皮増殖因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は胎盤増殖因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はカテコールアミンを含む。別の実施態様にしたがえば、カテコールアミンはノルエピネフリンである。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はエンドテリン1を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はアンギオテンシンIIを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はホルボルエステルを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はニューロペプチドYを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は活性化形質転換増殖因子 $\beta 1$ を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は G_q を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はジアシルグリセロールを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はサリューシン α を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はサリューシン β を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はインスリン様増殖因子1を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はミオスタチンを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は顆粒球コロニー刺激因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はマクロファージコロニー刺激因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は腫瘍壊死因子様低アポトーシスインデューサー (TWEAK) を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はチアゾリジンジオンを含む。別の実施態様にしたがえば、チアゾリジンジオンはロシグリタゾンである。

【0024】

別の実施態様にしたがえば、本発明は、正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞に続く梗塞領域損傷を血管再生対象動物で治療する医薬組成物を提供し、前記組成物は、

(a) 梗塞損傷改善量の無菌的な単離された走化性造血幹細胞生成物であって、前記梗塞領域損傷改善量の無菌的単離走化性造血幹細胞生成物が自己由来単離CD3⁺4⁺細胞の濃縮集団を含み、前記濃縮集団は、自己由来単離CD3⁺4⁺造血幹細胞の濃縮集団が、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD3⁺4⁺細胞を提供することができるように、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能CD3⁺4⁺細胞の亜集団を含む、前記梗塞損傷改善量の無菌的単離走化性造血幹細胞生成物；

(b) 安定化量の血清であって、前記安定化量の血清が20% (v/v) を越える前記血清；および

(c) 治療的に有効な量の心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤を含み、ここで、前記組成物は対象動物にカテーテルを介して非経口的に投与され；

CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団の少なくとも70%の細胞が、カテーテル通過時およびin vitro検査時にCD34⁺細胞であり；さらに

CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団は、カテーテル通過時およびin vitro検査時に（1）CXCR-4媒介走化性活性を維持し、（2）少なくとも約70%の生存率を有し、さらに（3）CXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手後少なくとも約24時間in vitroで造血細胞コロニーを形成することができる、前記医薬組成物。

【0025】

ある実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善量の走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む、少なくとも 10×10^6 の単離された自己由来CD34⁺造血幹細胞の濃縮集団を含む。別の実施態様にしたがえば、前記組成物は、成分（i）+（ii）よりも、または成分（iii）単独よりもさらに多く梗塞領域損傷を軽減する。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は梗塞領域におけるアポトーシスによる心筋細胞の減少を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、コントロールと比較したとき急性心筋梗塞後の不利な心室再造形を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、急性心筋梗塞後の心臓筋肉機能の進行性低下を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、心筋組織の少なくとも1つの虚血性梗塞周囲ゾーンの低灌流を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は、梗塞周囲境界ゾーンの心筋の活動休止を含む。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団は、対象動物から入手した骨髓吸引物の細胞性成分から精製される。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団は、末梢血から精製される。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、（a）in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに（b）（a）でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手した後少なくとも約48時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、（a）in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに（b）（a）でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手した後少なくとも約72時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、（a）でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手した後少なくとも約24時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、組成物はカテーテルにより血管を介して梗塞関連動脈へ投与される。別の実施態様にしたがえば、組成物はカテーテルを介して心筋層へ投与される。別の実施態様にしたがえば、組成物は、コントロールと比較したとき梗塞領域における微細血管の血流を改善する。別の実施態様にしたがえば、組成物は、コントロールと比較したとき心筋組織の少なくとも1つの虚血性梗塞周囲ゾーンの灌流を増加させる。別の実施態様にしたがえば、組成物は、コントロールと比較したとき心筋組織の少なくとも1つの梗塞周囲ゾーン内の活動休止心筋層への灌流を増加させる。別の実施態様にしたがえば、組成物は、コントロールと比較したとき梗塞領域の損傷面積を減少させる。別の実施態様にしたがえば、組成物は、コントロールと比較したとき梗塞量を減少させる。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、ベータブロッカー、利尿剤、抗不整脈剤、抗狭心症薬、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、血管作用性薬剤、抗凝固剤、フィブリン溶解剤、および高コレステロール血症薬から成る群から選択される。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は、チロシンキ

10

20

30

40

50

ナーゼレセプターアゴニスト、ニューレグリン1を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-CおよびVEGF-Dから成る群から選択される血管内皮増殖因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は胎盤増殖因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はカテコールアミンを含む。別の実施態様にしたがえば、カテコールアミンはノルエピネフリンである。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はエンドテリン1である。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はプロスタグランジンF_{2α}を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はアンギオテンシンIIを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はホルボルエステルを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はニューロペプチドYを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は活性化形質転換増殖因子β1を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はG_qタンパク質を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はジアシルグリセロール(DAG)を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はサリューシンαを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はサリューシンβを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はインスリン様増殖因子1を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はミオスタチンを含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は顆粒球コロニー刺激因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はマクロファージコロニー刺激因子を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は腫瘍壊死因子様低アポトーシスインデューサー(TWEAK)を含む。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤はチアゾリジンジオンを含む。別の実施態様にしたがえば、チアゾリジンジオンはロシグリタゾンである。

10

20

【図面の簡単な説明】

30

【0026】

【図1】本発明の走化性造血細胞生成物の72時間における機能的生存活性は48時間における機能的生存活性と比較して良好であること示す。

【図2】本発明のCD34+細胞を含む処方化した走化性造血幹細胞生成物の遊走効率を示す。

【図3】ヒト血清中で処方化したCD34+細胞の安定性改善を示す。

【図4】4(A)は、積(CD34+の用量×SDFグラディエントで可動性を示すCD34+細胞の%)に対してLV量のパーセントとしての梗塞サイズにおける変化を示す。4(B)は、積(CD34+の用量×SDFグラディエントで可動性を示すCD34+細胞の%)に対して灌流の障害(RTSS)における変化を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、増殖させていない無菌的な単離走化性造血幹細胞生成物を含む梗塞領域灌流改善組成物並びに、梗塞領域損傷の治療のためにおよび正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞の余波における心臓機能の改善のために血管再生対象動物で前記を使用する方法を提供する。

【0028】

用語解説

“形質転換増殖因子β1”(TGF-β1)という用語は、多くの細胞タイプで増殖、分化および他の機能を制御する多機能タンパク質を指す。多くの細胞がTGF-β1を合成し、前

50

記に対して特異的なレセプターを有する。前記は多くの他の増殖因子を正の方向および負の方向で調節し、さらに骨芽細胞の骨形成の強力な刺激因子として対応骨芽細胞で走化性、増殖および分化を引き起こし、骨の再造形で重要な役割を有する (KD Schluter and HM Piper, FASEB J 1999, 13:S17-S22)。

本明細書で種々の文法形で用いられる“投与する”という用語は提供または適用を意味する。本明細書で用いられる“投与”という用語は、in vivo投与とともに組織にex vivoで直接投与することを含む。一般的に、組成物は、所望される医薬的に許容できる非毒性担体、アジュバントおよび賦形剤を含む投薬ユニット処方物として非経口的にまたは局所的に全身的に投与するか、または例えば注射、インプラント、移植、局所適用または非経口的手段（ただしこれらに限定されない）によって末梢から投与することができる。細胞を投与する手段は輸液を含むことができるが、ただし前記に限定されない。

10

本明細書で用いられる“余波”という用語は、ある事象から生じるからまたはある事象に続く結果または成り行きを指す。

本明細書で用いられる“血管形成”という用語は、血管の発生および成長のプロセスを指す。

“アンギオテンシンII”という用語は、アンギオテンシン変換酵素（またはACE）の作用によってアンギオテンシンIから生成されるポリペプチドホルモンを指す。

【0029】

“アポトーシス”または“プログラムされた細胞死”という用語は、生物の損傷を伴わない多様な形態学的変化を生じる一連の生化学的事象を含み、生物学的ホメオスタシスに寄与する高度に調節された能動的プロセスを指す。前記多様な形態学的変化は、水疱形成、細胞膜の変化（例えば膜の不均整および接着の消失）、細胞委縮、核の断片化、クロマチン凝縮および染色体の断片化を含む。

20

アポトーシスによる細胞死は、多くの多様な因子によって誘発され、多様なシグナリング経路（いくつかはカスパーゼプロテアーゼ（システインプロテアーゼ類）に依存し他はカスパーゼ非依存性である）を必要とする。アポトーシスによる細胞死は、アポトーシスシグナリング経路の活性化をもたらす、多くの多様な細胞性刺激（細胞表面レセプター、ストレスに対するミトコンドリア応答および細胞傷害性T細胞を含む）が引き金となる。

アポトーシスに関与するカスパーゼは、タンパク質分解カスケードでアポトーシスシグナルを伝達する。カスパーゼは他のカスパーゼを切断および活性化し、このカスパーゼは続いて細胞死をもたらす他の細胞標的を分解する。カスケードの上流端のカスパーゼはカスパーゼ8およびカスパーゼ9を含む。カスパーゼ8は、Fasのような致死ドメイン（DD）をもつレセプターとの応答に関与する最初のカスパーゼである。

30

TNFレセプターファミリーのレセプターは、アポトーシスの誘発とともに炎症シグナリングと密接に関係する。Fasレセプター（CD95）は、他の細胞の表面で発現されるFasリガンドによってアポトーシスシグナリングを媒介する。Fas-FasL相互作用は免疫系で重要な役割を果たし、この系の欠如は自己免疫を生じ、Fas媒介アポトーシスは自己反応性リンパ球を除去することを示唆している。Fasシグナリングはまた免疫監視に関与し、形質転換細胞およびウイルス感染細胞を除去する。別の細胞上のオリゴマー化したFasLとFasとの結合は、シグナリングアダプター（FAF、FADDおよびDAXを含む）と相互作用する致死ドメイン（DD）と称される細胞質ドメインを介してアポトーシスシグナリングを活性化し、カスパーゼタンパク質分解カスケードを活性化する。カスパーゼ8およびカスパーゼ10がまず初めに活性化され続いて下流のカスパーゼおよび細胞死を招く多様な細胞質基質が切断および活性化される。

40

【0030】

ミトコンドリアは、ミトコンドリアタンパク質を細胞質に放出することによりアポトーシスシグナリング経路に参加する。チトクロームc（電子伝達で重要なタンパク質）は、アポトーシスシグナルに応答してミトコンドリアから放出され、Apaf-1（ミトコンドリアから放出されるプロテアーゼ）を活性化する。活性化Apaf-1はカスパーゼ9および残りのカスパーゼ経路を活性化する。Smac/DIABLOがミトコンドリアから放出され、IAPタン

50

パク質を阻害する（IAPは通常はカスパーゼ9と相互作用してアポトーシスを阻害する）。Bcl-2ファミリータンパク質によるアポトーシスの調節は、ファミリーメンバーがミトコンドリア膜を通り抜け、チトクロームcおよび他のタンパク質の放出を調節する複合体を形成するときには生じる。アポトーシスを引き起こすTNFファミリーレセプターはカスパーゼカスケードを直接活性化するが、Bid（Bcl-2ファミリーメンバー）もまた活性化することができる（Bidはミトコンドリア媒介アポトーシスを活性化する）。Bax（また別のBcl-2ファミリーメンバー）はこの経路によって活性化されてミトコンドリア膜に局在化し、その透過性を高め、チトクロームcおよび他のミトコンドリアタンパク質を放出させる。Bcl-2およびBcl-xLは孔の形成を妨げ、アポトーシスを阻害する。チトクロームcと同様に、アポトーシス刺激によってミトコンドリアから放出されるAIF（アポトーシス誘発因子）は、ミトコンドリアで見出されるタンパク質である。チトクロームcはカスパーゼ依存アポトーシスシグナリングと関連するが、一方、AIF放出はカスパーゼ非依存性アポトーシスを刺激し、核に移動しそこでAIFはDNAと結合する。AIFによるDNA結合はクロマチンの凝縮を刺激し、おそらくヌクレアーゼの補充によってDNA断片化を刺激する。

【0031】

ミトコンドリアストレス経路はミトコンドリアのチトクロームc放出で開始し、前記は続いてApaf-1と相互作用してカスパーゼ9の自己切断および活性化を引き起こす。カスパーゼ3、6および7は下流のカスパーゼであって、上流のプロテアーゼによって活性化され、それら自身で作用して細胞標的を切断する。

細胞傷害性T細胞によって放出されるグランザイムBおよびパーフォリンタンパク質は標的細胞でアポトーシスを誘発し、膜貫通孔を形成しアポトーシスの引き金となるが、これはおそらくカスパーゼの切断を介するとされるが、ただしグランザイムB媒介アポトーシスのカスパーゼ非依存性メカニズムも提唱されている。

アポトーシスシグナリング経路によって活性化されヌクレオソームラダーを生成する多数のヌクレアーゼによる核ゲノムの断片化は、アポトーシスの細胞性応答の特徴である。アポトーシスに関与する1つのヌクレアーゼは、DNA断片化因子（DFF）（カスパーゼ活性化DNase（CAD））である。DFF/CADは、アポトーシス時にその関連阻害因子ICADのカスパーゼプロテアーゼによる切断を介して活性化される。DEF/CADは、クロマチン成分（例えばトポイソメラーゼIIおよびヒストンH1）と相互作用して、クロマチン構造を凝縮させ、さらにおそらくCADをクロマチンに補充する。別のアポトーシス活性化プロテアーゼはエンドヌクレアーゼG（EndoG）である。EndoGは核ゲノムでコードされるが、正常細胞ではミトコンドリアに局在する。EndoGは、ミトコンドリアゲノムの複製とともにアポトーシスでも役割を果たす可能性がある。アポトーシスシグナリングはミトコンドリアのEndoGの放出を引き起こす。EndoGおよびDFF/CAD経路は非依存性である。なぜならば、EndoG経路はDFFを欠く細胞でも生じるからである。

【0032】

低酸素症は、再酸素投与が続く低酸素症も同様にチトクロームc放出およびアポトーシスの引き金となりえる。グリコーゲンシンターゼキナーゼ（GSK-3）（大半の細胞タイプで普遍的に発現されるセリン-スレオニンキナーゼ）は、ミトコンドリアの細胞死経路を活性化する多くの刺激によりアポトーシスを媒介または強化するようである（RD Loberg et al. J Biol Chem 2002, 277(44):41667-673）。前記は、カスパーゼ3の活性化を誘発すること、および前アポトーシス腫瘍サプレッサー遺伝子p53を活性化することが示された。さらにまた、GSK-3は、前アポトーシスBcl-2ファミリーメンバー、Bax（凝集およびミトコンドリアでの局在化時にチトクロームc放出を誘発する）の活性化および移転を促進すると提唱された。AktはGSK-3の重要な調節因子であり、GSK-3のリン酸化および不活化はAktの抗アポトーシス作用のいくつかを媒介する可能性がある。

本明細書で用いられる“バイオマーカー”という用語は、疾患リスク、重要な病理学的プロセス、疾患の診断およびステージ、予後、治療の応答、再発および臨床的結果を客観的に測定するインジケータを指す。バイオマーカーは、遺伝子、遺伝的変異、RNA、タ

10

20

30

40

50

ンパク質および代謝物の形を採ることができる。疾患の進行または軽減を忠実に反映または予測するバイオマーカーは、疾患の診断並びに疾患の重症度、開始のリスク、および進行の評価で有用でありえる。

“c-キット”という用語は、幹細胞因子（一定のタイプの細胞を増殖させる物質）と結合する、いくつかの細胞の表面上のタンパク質を指す。このレセプターの改変形はいくつかのタイプの癌と密接に関係する可能性がある。

【0033】

“心バイオマーカー”という用語は、診断および予後のために用いられる心臓機能、損傷、機能不全と密接に関係する酵素、タンパク質およびホルモンを指す。様々な心バイオマーカーが、それらのレベルが体内で上昇し、最盛期に達し、さらに下降する種々の一定時間を有し、それら時間を心臓発作の進行の追跡のためだけでなく、発作が始まった時を概算し再発についてモニターするために用いることを可能にする。検査のいくつかは心臓に特異的であるが、他の検査は骨格筋損傷とともに上昇する。従来の心バイオマーカーにはCK（クレアチンホスホキナーゼまたはクレアチンキナーゼ）およびCK-MB（クレアチンキナーゼ-ミオグロビンレベル（骨格筋と心筋の区別に役立つ））、トロポニン（トロポニンIまたはTの血中レベルは心臓発作後1-2週間高いままである、トロポニンは一般的に他の筋肉の損傷によって影響を受けない）、ミオグロビン（筋肉（特に心筋）が損傷を受けたか否かを決定する）、およびBNP（脳のナトリウム排泄増加ペプチド）またはNT-proBNP（N-末端プロホルモン脳ナトリウム排泄増加ペプチド（心不全および当該心不全の重症度の診断に役立つ）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

“心カテーテル挿入”という用語は、カテーテルを動脈から心臓へ、さらに冠状動脈へ通す手順を指す。この手順によって、冠状動脈および左心室（心臓の主要なポンプ室）の血管造影図（すなわちx線画像）が作成され、前記を用いて肺動脈の圧を測定し、さらに心機能をモニターすることができる。

【0034】

“カテコールアミン”という用語は、カテコール（ $C_6H_4(OH)_2$ ）環を有する任意のアミン類を指す。カテコールアミンの非限定例にはドーパミン、アドレナリンおよびノルエピネフリン（ノルアドレナリン）が含まれる。

分化クラスター（または名称クラスター）（しばしばCDと略記される）は、白血球細胞上に存在する細胞表面分子の識別および解明のために用いられるプロトコルである。CD分子は多数の態様で作用し、細胞にとって重要なレセプターまたはリガンド（レセプターを活性化する分子を意味する）としてしばしば作用する。シグナルカスケードは通常細胞の行動を変化させながら開始する。いくつかのCDタンパク質は細胞シグナリングで役割をもたないが、他の機能（例えば細胞接着）を有する。

本明細書で用いられる“細胞表面マーカー”という用語は、特定タイプの細胞の表面で見出される抗原決定基またはエピトープを指す。細胞表面マーカーは、細胞タイプの特徴の決定、その識別および最終的にその単離を容易にすることができる。

本明細書で用いられる“CD34+細胞”という用語は、ヒト骨髄に由来する造血幹細胞およびプロジェニター細胞を指し、前記細胞は、造血幹細胞抗原について“陽性”すなわち前記抗原を“発現”し、少なくともその亜集団はCXCR4を発現し、損傷領域に遊走することができる。

“CD38”は、マクロファージ、樹状細胞、並びに活性化BおよびNK細胞上に存在するタンパク質マーカーを指し、前記はリンパ球と内皮細胞との接着を媒介する。

“CD45”および“共通白血球抗原”という用語は、赤血球および血小板を除く造血細胞に分布するタンパク質チロシンホスファターゼ（PTP）を指す。

“CD59”という用語はグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）結合膜糖タンパク質を指し、前記は補体媒介溶解からヒト細胞を保護する。

本明細書で用いられる“CXCR-4”という用語は、Gタンパク質結合ケモカインレセプターを指す。

【0035】

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる“サイトカイン”という用語は細胞によって分泌される可溶性小タンパク質を指し、前記は他の細胞に対して多様な作用を有する。サイトカインは、増殖、成長、創傷治癒および免疫応答を含む多くの重要な生理学的機能を媒介する。それらは、細胞膜に分布するそれらの細胞特異的レセプターと結合することによって作用し、それによってそれぞれ別個のシグナルトランスダクションカスケードを当該細胞で開始させ、最終的に標的細胞で生化学的および表現型の変化をもたらすであろう。一般的には、サイトカインは局所的に作用する。それらには、I型サイトカイン（いくつかの造血細胞増殖因子と同様にインターロイキンの多くを包含する）；II型サイトカイン（インターフェロンおよびインターロイキン10を含む）；腫瘍壊死因子（“TNF”）関連分子（TNF α およびリンホトキシンを含む）；免疫グロブリンスーパーファミリーメンバー（インターロイキン1（“IL-1”）を含む）；およびケモカイン（広範囲の免疫および炎症機能で重要な役割を果たす分子ファミリー）が含まれる。同じサイトカインが、1つの細胞で当該細胞の状況に応じて異なる作用を有することができる。サイトカインはしばしば他のサイトカインの発現を調節し、前記他のサイトカインのカスケードの引き金となる。

10

“コロニー刺激因子”という用語は白血球細胞の産生の制御に必要なサイトカインを指す。このタイプには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）が含まれる。

【0036】

“ジアシルグリセロール”（DAG）は、グリセロール分子とエステル結合を介して共有結合した2つの脂肪酸鎖から成るグリセリドを指す。ジアシルグリセロールはまた、C1およびC2位の両方に多くの異なる組み合わせの脂肪酸を結合させることができる。

20

“エンドテリン”という用語は、血管内皮によって合成および放出され、さらに内皮機能のマーカーである血管収縮ペプチドを指す。

“処方物”および“組成物”という用語は本明細書では相互に用いられ、全ての活性および不活性な含有物を含む本発明の生成物を指す。“活性な”という用語は、目的の治療効果に必要な本発明の組成物の含有物、成分または構成要素を指す。本明細書で用いられる“医薬処方物”または“医薬組成物”という用語は、標的状態または疾患を予防し、強度を軽減し、治癒させるか、あるいは治療する処方物または組成物を指す。

“Gq”タンパク質という用語は、ホスホリパーゼCを活性化し多様な細胞性シグナリング経路に加わるヘテロトリマーのGタンパク質サブユニットを指す。

30

“造血幹細胞”という用語は血液または骨髄から単離される細胞を指し、前記細胞は、それ自体再生し、多様な特殊化細胞に分化し、骨髄から循環血中に動員され、プログラムされた細胞死（アポトーシス）を経ることができる。本発明のいくつかの実施態様では、ヒト対象に由来する造血幹細胞は少なくとも1つのタイプの細胞表面マーカー（CD34、CD38、HLA-DR、c-キット、Sca-1、Thy-1および／またはCXCR-4または前記の組合せを含むが、ただしこれらに限定されない）を発現する。

“HLA-DR”という用語は、抗原提示細胞、B細胞、単球、マクロファージおよび活性化T細胞を含む、いくつかの細胞タイプに存在するヒトのクラスII組織適合抗原を指す。

“インスリン様増殖因子”（IGF-1）という用語は、増殖および発育に関与するタンパク質ファミリーのメンバーである、機能および構造がインスリンと同様なタンパク質を指す。

40

【0037】

本明細書で用いられる、“単離する”およびその多様な文法形は、タンパク質、分子、物質、核酸、ペプチド、細胞または粒子を、夾雑物または通常結合されてある他の物質から本質的に自由な形で取り出し、分離し、または入手することに該当する。

本明細書で用いられる“インターロイキン”という用語は、白血球によって他の白血球との連絡手段として分泌されるサイトカインを指す。

“VEGF”、“VEGF-1”または“血管内皮増殖因子1”という用語は本明細書では相互に用いられ、内皮細胞の多数の機能（増殖、遊走、侵襲、生存および透過性を含む）を媒介するサイトカインを指す。“VEGF-2”という用語は、血管内皮細胞および平滑筋細胞

50

の増殖の調節因子を指す。VEGF-2はヒト血管内皮細胞の増殖を刺激するが、血小板由来増殖因子によって誘発されるヒト大動脈平滑筋細胞の増殖を阻害する。

本明細書で用いられる“ケモカイン”という用語は、白血球にシグナルを発して特定の方向に移動させる走化性サイトカイン類を指す。

“走化性”という用語は、運動能力を有する細胞または部分が、化学物質濃度の勾配にしたがい好ましいと考える環境条件に向かい、および／または不快と感じる周囲環境から離れる定方向性運動である。本発明のある特徴では、本発明の有能CD34+CXCR-4+細胞は遊走することができる（それら細胞がある場所、位置または領域から別の場所に移動できることを意味する）。ある実施態様では、それらの遊走は走化性によって駆動される。

【0038】

“全血球算定”（CBC）という用語は、血液細胞タイプの各々の量および質について詳細な情報を提供する検査室試験を指す。前記は通常3つの主要な血液細胞（赤血球、白血球および血小板）の各々の測定、並びにヘモグロビンおよびヘマトクリットの測定を含む。“ヘモグロビン”（HGB）は血液1デシリットル中のヘモグロビン数（g/dL）を指す。健康な成人対象動物の正常なヘモグロビンレベルは、男性で約14g/dLから約18g/dL、女性で約12g/dLから約16g/dLである。大雑把な指針として、ヘモグロビンは一般的にヘマトクリットの約1/3であるはずである。“ヘマトクリット”（HCT）は、全血液体積のパーセンテージとしての赤血球の比率を指す。ヒト対象の正常なヘマトクリットは男性について約40%から約55%で、女性について約35%から約45%である。“赤血球数”（RBC）はある量の血液中の赤血球総数を指す。ヒト対象の正常範囲は、男性について約4,500,000細胞/mm³から約6,000,000細胞/mm³で、女性について約4,000,000細胞/mm³から約5,500,000細胞/mm³である。“白血球数”（WBC）はある量の血液中の白血球細胞または白血球の総数を指す。ヒト対象の正常範囲は約4.5 x 10³細胞/mm³から約約10.8 x 10³細胞/mm³である。

【0039】

本明細書で用いられる“疾患”または“異常”という用語は、健康が損なわれることまたは機能が異常な状態を指す。本明細書で用いられる“症候群”という用語は、いくつかの疾患または状態を示す症状のパターンを指す。本明細書で用いられる“状態”という用語は健康の多様な状態を指し、内在する任意のメカニズム、または健全な組織並びに器官の異常、損傷および助長作用によって引き起こされる異常または疾患を含むことが意図される。

本明細書で用いられる“炎症”という用語は感染および損傷に対する応答を指し、前記応答では、解毒および修復に必要な細胞が炎症媒介物質によって損傷部位に動員される。

開始物質に関係なく、急性炎症を伴う生理学的変化は以下の4つの特色を包含する：（1）血管拡張（血流の正味の増加をもたらす）は、急性組織損傷のもっとも初期の身体応答の1つである；（2）炎症刺激に応答して、細静脈の内側を覆う内皮細胞は収縮し、細胞内結合部を広げてギャップを生じ、血管透過性の増加をもたらす（血管から血漿タンパク質および血液細胞の漏出を可能にする）；（3）炎症はしばしば炎症部位での白血球、特に好中球（多形核細胞）の強い浸潤を特徴とする。これらの細胞は、血管壁または非損傷組織に有害物質を放出することによって組織の損傷を助長する；および（4）発熱（特異的刺激に応答して白血球から放出される発熱因子によって生じる）。

【0040】

炎症過程では、身体的ジストレスを引き起こす物質を封じ込めさらにこれを排除しようとして、炎症性応答における可溶性炎症媒介物質は、全身的態様で細胞性成分と共同して働く。媒介物質に関連して本明細書で用いられる“炎症性”または“免疫炎症性”という用語は、炎症過程における分子性媒介物質を指す。これらの可溶性で拡散性分子は、組織損傷および感染部位で局所的に、およびより遠位部位の両方で作用する。いくつかの炎症性媒介物質は炎症過程によって活性化されるが、他の媒介物質は、急性炎症に対する応答でまたは他の可溶性炎症媒介物質によって細胞性供給源から合成および／または放出される。炎症性応答の炎症媒介物質の例には、血漿プロテアーゼ、補体、キニン、凝固および

フィブリン溶解タンパク質、脂質媒介物質、プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子（PAF）、ペプチドおよびアミン（ヒスタミン、セロトニンおよびニューロペプチドを含むがただし前記に限定されない）、並びに前炎症性サイトカイン（インターロイキン-1、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-8、腫瘍壊死因子（TNF）、インターフェロン-ガンマおよびインターロイキン-12を含むがただし前記に限定されない）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

“当日”という用語は、対象動物からの有能CD3⁺CD4⁺細胞の濃縮集団を含む調製物の無菌的条件下での入手完了と前記調製物からの有能CD3⁺CD4⁺細胞の無菌的精製の開始との間の時間間隔を指す。“当日外”という用語は、対象動物からの有能CD3⁺CD4⁺細胞の濃縮集団を含む調製物の無菌的条件下での入手完了と走化性造血細胞生成物を含む処方化医薬組成物の対象動物への輸液との間の時間間隔を指す。

10

【0041】

本明細書で用いられる“輸液する”または“輸液”という用語は、血液以外の液体を対象動物（ヒトを含む）の血管に治療目的で導入することを指す。

血清を含まない本発明の“輸液溶液”は、25 USPユニット/mLのヘパリンおよび1%のヒト血清アルブミン（HAS）が補充されたリン酸緩衝生理食塩水を含む。いくつかの実施態様では、輸液溶液は血清が補充されている。いくつかの実施態様では前記血清は自己由来である。

“損傷”という用語は、物質または力（物理的でも化学的でもよい）によって対象動物の身体の構造または機能に対して引き起こされた損害または傷害を指す。“血管損傷”という用語は、血管系（すなわち血管ネットワーク、液体（例えば血液またはリンパ（ただし前記に限定されない））を運ぶ血管のネットワークを意味する）に対する損傷を指す。

20

本明細書で用いられる“限定する”という用語は、範囲、程度または量の制限または拘束を指す。

本明細書で用いられる“マクロファージ”という用語は、骨髄の単球系幹細胞から発生する単核で活発な食細胞活性を示す細胞を指す。これらの細胞は体内に広く分布し、形態学および自動性において多様性を示す。食細胞活性は典型的には血清認識因子（ある種の免疫グロブリン及び補体系の成分を含む）によって媒介されるが、前記活性はまた非特異的でもある。マクロファージはまた、抗体の産生および細胞媒介免疫応答（特にリンパ球への抗原提示）の両方で必要とされる。マクロファージは多様な免疫調節分子を分泌する。

30

【0042】

“microbe（微生物）”および“microorganism（微生物）”は相互に用いられ、極めて小さく裸眼でははっきりと見ることができない生物を指し、顕微鏡的細菌、菌類（粘菌）、藻類、原生動物およびウイルスが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

本明細書で用いられる、その多様な文法形の“調節する”という用語は、ある種の量または割合を調節し、変更し、適合させ、操作しまたは調整することを意味する。そのような調節は任意の変化（検出不能の変化を含む）であってもよい。

“心筋梗塞”という用語は心筋の死または永久的損傷を指す。大半の心臓発作は、心筋への血液および酸素の流れを遮断し当該領域の心臓細胞の死をもたらす、冠状動脈の閉塞によって引き起こされる。損傷した心筋はその収縮能力を失い、残った心筋が弱った領域を代償する。本発明は、本発明の治療に対する対象動物の適切性の評価に関連する工程を含む。前記工程は、心臓が拍動しているときのそのサイズ、形状および機能を観察し、心臓のリズムの変化を検出し、損傷した組織並びに遮断された動脈を検出および評価するための検査を用いることによって実施される。そのような検査の例には心電図検査、心エコー検査、冠状血管造影法および心室造影核検査法が含まれるが、ただしこれらに限定されない。心バイオマーカーもまた、本発明の治療に対する対象動物の適切性の評価に用いられる。

40

“ミオスタチン”（MSTN）という用語は、骨形態発生タンパク質（BMP）ファミリーおよびTGF- β スーパーファミリーのメンバーであるタンパク質を指す。このタンパク質グル

50

ープは多塩基性タンパク質分解プロセッシング部位を特徴とし、前記部位は切断されて7つの保存されたシステイン残基を含む成熟タンパク質を生じる。このファミリーのメンバーは、胚組織および成熟組織の両方で細胞増殖および分化の調節因子である。

【0043】

“ニューロペプチドY”という用語は、中枢神経系で広く発現されるニューロペプチドを指し、前記は、多くの生理学的プロセス（皮質興奮性、ストレス応答、食物摂取、日周期リズムおよび心脈管機能を含む）に影響を及ぼす。前記はGタンパク質結合レセプターを介して機能して、アデニルシクラーゼを阻害し、活性化されたマイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）を阻害し、細胞内カルシウムレベルを調節し、カリウムチャネルを活性化する。

10

本明細書で用いられる“灌流”という用語は、生物学的組織中の毛細血管床への動脈血による栄養デリバリープロセスを指す。灌流（F）は式 $F = (P_A - P_V) / R$ を用いて算出できる。式中、 P_A は平均動脈圧であり、 P_V は平均静脈圧であり、Rは血管抵抗である。組織の灌流は、例えば磁気共鳴画像化（MRI）技術（ただし前記に限定されない）によってin vivoで測定することができる。そのような技術は、コントラスト薬剤注入および動脈スピン標識（ALS）の使用を含む（ASLでは、動脈血はそれが対象組織に入る前に磁気タグを付され、標識の量が測定されコントロールの記録と比較される）。

“胎盤増殖因子”（PIGF）という用語は、血管内皮増殖因子ファミリーのメンバーであるサイトカインを指す。

“ホルボルエステル”という用語は、ジテルペンのチグリアンファミリーメンバーである天然の植物由来有機化合物を指す。

20

本明細書で用いられる“有能”または“有能性”という用語は、本発明の走化性造血幹細胞生成物の必要とされる生物学的活性を指す。すなわち、本発明の有能CD34+CXCR-4+細胞は生存活性を維持し、CXCR-4媒介走化性運動能力を有し、さらにin vitro CFUアッセイで増殖（すなわち造血細胞コロニーを形成）することができる。

【0044】

本明細書で用いられる“プロスタグランジン”という用語は、プロスタン酸（炭素20をもつ構造、5員シクロペンタン環を含む脂肪酸）の誘導体である、生理学的に活性な物質グループの任意の物質を指す。

本明細書で用いられる“プロジェニター細胞”という用語は骨髄の未成熟細胞を指し、前記は添加した増殖因子とともに培養皿で骨髄細胞懸濁物を増殖させることによって単離することができる。プロジェニター細胞は成熟して、血液細胞に成熟するプレカーサー細胞になる。プロジェニター細胞は、コロニー形成ユニット（CFU）またはコロニー形成細胞（CFC）と称される。プロジェニター細胞の固有の系統枝は接尾辞によって示される。例えばCFU-E（赤血球）、CFU-GM（顆粒球／マクロファージ）およびCFU-GEMM（多能性造血プロジェニター）であるが、ただしこれらに限定されない。

30

“軽減する”という用語は、その多様な文法形で用いるとき本明細書ではより小さな範囲、サイズ、量、程度または強度へと緩和、減少または低下させることを指すために用いられる。

名詞として本明細書で用いられる“修復”という用語は、機能を回復させる任意の修正、補強、再調節、矯正、補完、健全化、再生、修繕、継ぎ合わせなどを指す。動詞として用いられるときは、前記は、修正する、補強する、再調節する、矯正する、補完する、健全化する、再生する、修繕する、継ぎ合わせること、あるいは機能を回復させることを意味する。いくつかの実施態様では、“修復”は完全な修復および部分的な修復を含む。

40

【0045】

“サリューション”という用語は、別にスプライスされたTOR2A（ねじれ失調症ファミリーのタンパク質をコードする遺伝子）のmRNAから翻訳される、28アミノ酸（サリューション α ）または20アミノ酸（サリューション β ）の生物活性ペプチドを指す。サリューションは細胞内 Ca^{2+} を増加させ、多様な遺伝子をアップレギュレートし、細胞の有糸分裂誘導を誘発する。

50

“Sca-1”または“幹細胞抗原-1”という用語は、間葉系幹細胞の自己再生能力に影響を及ぼすシグナリング経路の表面タンパク質成分を指す。

“幹細胞”という用語は、自己再生能力とともに高い増殖潜在能力を有する未分化細胞を指し、前記細胞は、2つ以上の別個の細胞表現型へ最終的に分化することができる娘細胞を生じることができる。

“ステント”という用語は、動脈を押し広げるために用いられる細いチューブを指すために用いられる。ステントを小さな直径になるように折りたたみ、バルーンカテーテルの上に置いて、単径部（大腿動脈）または腕（上腕動脈）の主要動脈から挿入し、動脈の狭細／遮断部分まで進める。前記が正確な位置に到達したとき、バルーンをわずかに膨らませ一切のプラークを通り道から押し出し動脈を拡張させる（バルーン血管形成術）。バルーンを膨らませたとき、ステントを拡張させ、適正な位置に固定し、足場を形成して動脈の開放を維持する。ステントは当該動脈内に永久的に留まる。ある種の対象動物では、ステントは、バルーン血管形成術またはカテーテルを用いる他の方法の後で生じる再狭細を軽減する。ステントはまた、動脈がバルーンカテーテルによって裂傷または損傷を受けた場合、正常な血流の回復および動脈開放の維持に役立つ。再閉鎖（再狭窄）はステント術に関する問題でありえる。薬剤溶出ステントは、徐放性薬剤で被覆したステントである。これらの薬剤は血管を再閉鎖させないように役立ちえる。

【0046】

“対象動物”および“患者（畜）”は本明細書では相互に用いられ、哺乳動物起源の動物種（ヒトを含む）が含まれる。

本明細書で用いられる“感受性対象動物”という用語は、リスクを有する集団のメンバーを指す。

“チアゾリジンジオン”（TZD）という用語は、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター（PPAR）（細胞核内レセプター分子の一群）と結合する化合物類を指す。このクラスの化合物のメンバーは親化合物チアゾリジンジオンの誘導体であり、ロシグリタゾン、ピオグリタゾンおよびトログリタゾンが含まれる。

“Thy-1”という用語は、げっ歯類およびヒトの免疫細胞並びにニューロンで発現されるIgスーパーファミリー細胞表面糖タンパク質Thy-1を指し、前記は、細胞接着並びにT細胞の分化、増殖およびアポトーシスにおけるシグナルトランスダクションで機能すると仮説が立てられている。

本明細書で用いられるように、“治療する(treat)”または“治療(treating)”は相互に用いられ、以下を含む：症状の進行の廃止(abrogate)（停止(abolish, do away with)）、実質的抑制、遅らせるかまたは逆転させること、症状の臨床的もしくは美学的徴候の実質的緩和（改善）、症状の臨床的もしくは美学的徴候の出現の実質的予防、有害な刺激からの保護とともに以下の1つもしくは2つ以上の達成：（a）異常、疾患または状態の重症度の軽減；（b）治療される異常、疾患または状態に特徴的な徴候の発達の制限；（c）治療される異常、疾患または状態に特徴的な徴候の悪化の制限；（d）以前に当該異常、疾患または状態を有した患者で当該異常、疾患または状態の再発の制限；および（e）以前に当該異常、疾患または状態について無症状であった患者で徴候の再発の制限。

【0047】

“腫瘍壊死因子様低アポトーシスインデューサー”（TWEAK）という用語は、TNF- α 増殖因子ファミリーのメンバーを指し、前記はII型トランスメンブレンタンパク質として生成され、156アミノ酸の可溶性サイトカインにプロセッシングされる（Y Chicheportiche et al. J Biol Chem, 1997, 272:32401-410）。TWEAKは多数の生物学的活性を有し、前記活性には、細胞増殖および血管形成の刺激、炎症性サイトカインの誘発、およびいくつかの実験的条件下でのアポトーシスの刺激が含まれる（SR Wiley et al. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(3-4):241-9）。さらにTWEAKは心筋増殖の正の調節因子である（T Novoyatieva et al. Cardiovasc Res 2009, Nov 26, PMID:19887380）。TWEAKは、これらのプロセスを線維芽細胞増殖因子誘発性

分子14 (FN14) レセプターを介して媒介する (以下を参照されたい: N Harada et al. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299:488-93; M Nakayama et al. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 306:819-825)。前記レセプターは、多様な下流のシグナリングカスケードを介してシグナルを発すると提唱されている、厳密に調節され誘発されるレセプターである (T Ando et al. Arthritis Res Ther, 2006, 8:R146; SA Brown et al. Biochem J 2003, 371:395-403; T Saitoh et al. J Biol Chem 2003, 278:36005-36012; C Dogra et al. FASEB J 2007, 21:1857-69、前記文献の各々は参照により本明細書に含まれる)。

“血管不全”という用語は不十分な血流量を指す。

【0048】

本発明は、梗塞領域灌流改善医薬組成物並びに正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞の余波における梗塞領域損傷の治療および修復方法を提供する。

ある特徴では、本発明は、正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞に続く血管再生対象動物の梗塞領域損傷を治療するための医薬組成物を提供する。前記組成物は、(a) 梗塞領域改善量の無菌的な単離された走化性造血幹細胞生成物であって、前記梗塞領域改善量の無菌的な単離走化性造血幹細胞生成物は 10×10^6 の自己由来単離CD34⁺細胞の濃縮集団を含み、前記濃縮集団は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む、前記梗塞領域改善量の無菌的な単離走化性造血幹細胞生成物；

(b) 安定化量の血清であって、前記安定化量の血清が20% (v/v) を越える前記安定化量の血清；および

(c) 治療的に有効な量の心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤を含み、ここで、前記組成物は対象動物にカテーテルを介して非経口的に投与され；さらにCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団の少なくとも70%の細胞が、カテーテル通過時およびin vitro検査時にCD34⁺細胞であり；さらに

CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団は、カテーテル通過時およびin vitro検査時に(1) CXCR-4媒介走化性活性を維持し、(2) 少なくとも約70%の生存率を有し、さらに(3) CXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手後少なくとも約24時間in vitroで造血細胞コロニーを形成することができる。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する薬剤は、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、ベータブロッカー、利尿剤、抗不整脈剤、抗狭心症薬、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、血管作用性薬剤、抗凝固剤、フィブリン溶解剤、および高コレステロール血症薬から成る群から選択される。別の実施態様にしたがえば、心筋細胞の増殖を促進する少なくとも1つの適合性薬剤は、チロシンキナーゼレセプターアゴニストニューレグリン1である。心筋細胞の増殖を促進する付加される適合性活性薬剤には、血管内皮増殖因子(VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D)、胎盤増殖因子(PIGF)、カテコールアミン(例えばノルエピネフリンであるが、ただしこれに限定されない)、エンドテリン1、プロスタグランジンF_{2α}、アンギオテンシンII、ホルボルエステル、ニューロペプチドY、活性な形質転換増殖因子β1(TGF-β1)、G_qタンパク質、ジアシルグリセロール(DAG)、サリューシンα、サリューシンβ、インスリン様増殖因子1(IGF-1)、ミオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子様低アポトーシスインデューサー(TWEAK)、チアゾリジンジオン(例えばロシグリタゾンであるが、ただし前記に限定されない)および前記の変種または組換え誘導体が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0049】

ある実施態様にしたがえば、前記組成物は、成分(a) + (b) または成分(c) 単独の組成物よりもさらに梗塞領域損傷を軽減する。いくつかの実施態様では、前記組成物は、コントロールと比較したとき梗塞領域内の微細血管の血流を改善する。いくつかの実施態

10

20

30

40

50

様では、前記梗塞領域損傷は、コントロールと比較して梗塞領域におけるアポトーシスによる心筋細胞の減少を含む。いくつかの実施態様では、前記梗塞領域損傷は、LVEFの降下またはLVESVの増加によって測定される心室再造形を含む。いくつかの実施態様では、前記梗塞領域損傷は、AMIから生じる心臓筋肉機能の進行性低下を含む。いくつかの実施態様では、前記梗塞領域損傷は、コントロールに比して梗塞周囲境界ゾーンにおける低灌流を含む。いくつかの実施態様では、前記梗塞領域損傷は、コントロールに比して梗塞周囲境界ゾーンにおける心筋の活動休止を含む。いくつかの実施態様では、前記組成物は、コントロールと比較して、心筋組織の少なくとも1つの虚血性梗塞周囲ゾーンの灌流を増加させる。いくつかの実施態様では、前記組成物は、コントロールと比較して、心筋組織の少なくとも1つの梗塞周囲ゾーン内の活動休止心筋への灌流を増加させる。いくつかの実施態様では、前記組成物は、コントロールに比して梗塞面積を減少させる。いくつかの実施態様では、前記組成物は、コントロールに比して梗塞量を減少させる。

【0050】

別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団は、当該対象動物から入手した骨髓吸引物の細胞成分から精製される。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団は、末梢血から精製される。ある実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a) in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに(b) (a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手した後少なくとも約48時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。ある実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a) in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに(b) (a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手した後少なくとも約72時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。ある実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手した後少なくとも約24時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。

【0051】

ある実施態様にしたがえば、走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から採集した骨髓から単離または精製することによって調製される。別の実施態様にしたがえば、走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団を末梢血から単離または精製することによって調製される。

本発明にしたがえば、CD34⁺細胞が濃縮された走化性造血幹細胞生成物は、少なくとも約70%純粋なCD34⁺細胞を含む。いくつかの実施態様では、CD34⁺細胞が濃縮された走化性造血幹細胞生成物は、少なくとも約75%純粋なCD34⁺細胞を含む。いくつかの実施態様では、CD34⁺細胞が濃縮された走化性造血幹細胞生成物は、少なくとも約80%純粋なCD34⁺細胞を含む。いくつかの実施態様では、CD34⁺細胞が濃縮された走化性造血幹細胞生成物は、少なくとも約85%純粋なCD34⁺細胞を含む。いくつかの実施態様では、CD34⁺細胞が濃縮された走化性造血幹細胞生成物は、少なくとも約90%純粋なCD34⁺細胞を含む。いくつかの実施態様では、CD34⁺細胞が濃縮された走化性造血幹細胞生成物は、少なくとも約95%純粋なCD34⁺細胞を含む。

別の実施態様では、CD34⁺細胞の少なくとも約70%は、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも約24時間生存活性を有する。別の実施態様では、CD34⁺細胞の少なくとも約75%は、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも約24時間生存活性を有する。別の実施態様では、CD34⁺細胞の少なくとも約80%は、CD34⁺細胞の濃

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

物から入手した少なくとも約 1.6×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 1.7×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 1.8×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 1.9×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 2×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 2.5×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 3×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 3.5×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 4×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 4.5×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 5×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 5.5×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。別の実施態様にしたがえば、梗塞領域灌流改善組成物はさらに、対象動物から入手した少なくとも約 6×10^7 の CD3 4+細胞を含み、前記は CXCR-4 を発現しさらに CXCR-4 媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む。

【0054】

CD3 4+細胞は、当業者に公知の任意の技術によって濃縮／選別することができる。例えば、いくつかの実施態様では、CD3 4+細胞を含む骨髓細胞の集団は、蛍光活性化細胞分類 (FACS) によって CD3 4 細胞抗原および CXCR4 細胞抗原を発現する細胞について濃縮される。いくつかの実施態様では、骨髓の CD3 4+細胞は、正または負の免疫分離技術によって濃縮／選別される。いくつかの実施態様では、骨髓から造血幹細胞の単離および／または精製は、サイズおよび細胞密度、代謝性色素の流出、または細胞傷害性薬剤に対する耐性による細胞分画方法を基にする。ある実施態様では、例えば骨髓の CD3 4+細胞は、モノクローナル抗 CD3 4 抗体および免疫磁性分離技術を用いて濃縮／選別される。

選別した CD3 4+細胞は当業界で公知の技術によって確認し、定量し、特徴を決定することができる。例えば、いくつかの実施態様では、骨髓中のおよび走化性造血幹細胞中の CD3 4+7 細胞のパーセンテージは FACS 分析によって決定することができる。別の実施態様では、CD3 4 タンパク質の発現はウェスタンブロットによって定量される。“ウェスタンブロット”という用語は複合混合物でタンパク質を識別する方法を指し、タンパク質はゲル媒体中で電気泳動により分離され、ゲルからタンパク質結合シートまたはメンブレンに移され、分離タンパク質を含む前記シートまたはメンブレンは特異抗体に暴露される。前記特異抗体は問題のタンパク質と結合し、その所在場所を決定し、さらにその可視化を

可能にする。例えば、モノクローナル抗CD 3 4 抗体を用いてメンブレンに付着したCD 3 4 タンパク質をin situで検出することができる。

【0055】

別の実施態様では、単離CD 3 4+細胞におけるCD 3 4 mRNAおよびDNAの発現を定量することができる。本明細書で用いられる“ノザンプロット”という用語は、電気泳動によって標本のRNAをその成分部分にゲル上で分離させ、mRNAをその電気泳動の位置に固定できるように特殊な改変を施した紙支持体に移す技術を指す。CD 3 4 関連配列は、レポーター分子（例えば放射能標識であるがただし前記に限定されない）を含むプローブを用いて識別される。別の実施態様では、CD 3 4 および／またはCXCR 4 の発現レベルは、定量的もしくは半定量的PCRまたはリアルタイムPCR（“RT-PCR”）によって決定される。略語の“PCR”はポリメラーゼ連鎖反応を指し、前記はDNAの量を増幅し、したがってDNAの単離、クローン化および配列決定をより容易にする技術である。例えば以下を参照されたい：米国特許5,656,493号、5,333,675号、5,234,824号および5,187,083号（前記文献の各々は参照により本明細書に含まれる）。リアルタイムPCRはDNAを同時に定量および増幅する方法であり、前記方法によってDNAはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって特異的に増幅され、それぞれの増幅の後で当該DNAは定量される。

【0056】

本発明の走化性造血幹細胞生成物の選別CD 3 4+造血幹細胞は、CXCR- 4 を発現しさらにCXCR- 4 媒介走化性活性を有するCD 3 4+細胞の亜集団を含む。ある実施態様では、本発明の造血幹細胞生成物は、CXCR- 4 を発現しさらにCXCR- 4 媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 のCD 3 4+細胞の亜集団が存在しえるように、最低数の単離CD 3 4+造血幹細胞を含む。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約2%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約3%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約4%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約5%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約6%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約7%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約8%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約9%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約10%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約11%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約12%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約13%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約14%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約15%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約16%が、CD 3 4+細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、CD 3 4+CXCR- 4+細胞のCXCR- 4 媒介走化性活性の少なくとも約17%が、CD 3 4+細胞の濃縮集

10
20
30
40
50

【 0 0 5 7 】

50

40

50

50

とも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約32%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約33%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約34%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約35%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約40%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約45%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約50%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約55%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約60%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約65%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約70%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約75%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約80%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約85%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約90%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、CD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約95%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。

別の実施態様では、平均してCD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約17%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも24時間保持される。別の実施態様では、平均してCD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約17%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも48時間保持される。別の実施態様では、平均してCD34⁺CXCR-4⁺細胞のCXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約17%が、CD34⁺細胞の濃縮集団を入手した後少なくとも72時間保持される。別の実施態様では、走化性造血細胞生成物中のCD34⁺CXCR-4⁺細胞は、CD34⁺細胞の濃縮集団の入手後少なくとも72時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも約2%を保持する。

【0059】

本発明の医薬組成物はさらに、梗塞領域灌流改善組成物の体積で少なくとも10%の濃度の血清を含む。ある実施態様では、血清は自己由来である。別の実施態様では、血清は合成または組換え血清である。別の実施態様では、梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最低濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して少なくとも約10%である。別の実施態様では、梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最低濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して少なくとも約15%である。別の実施態様では、梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最低濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して少なくとも約20%である。別の実施態様では、梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最低濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して少なくとも約21%である。別の実施態様では、梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最低濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して少なくとも約22%

50

【 0 0 6 0 】

50

mLとして表して約25%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約24%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約23%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約22%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約21%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約20%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約15%である。別の実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物に存在する血清の最高濃度は、組成物の最終体積100cc当たりのmLとして表して約10%である。

10

【0061】

いくつかの実施態様では、梗塞領域灌流改善組成物は、賦形剤、担体またはベヒクル（溶媒を含むがただし前記に限定されない）とともに処方することができる。本明細書で用いられる“賦形剤”、“担体”または“ベヒクル”という用語は、本明細書に記載した走化性造血幹細胞生成物の処方および投与に適した担体物質を指す。本明細書で有用な担体およびベヒクルには、毒性がなく他の成分と相互作用しない当業界で公知の任意の物質が含まれる。本明細書で用いられる“医薬的に許容できる担体”という語句は、本発明の走化性造血幹細胞生成物の安定性および生体利用性が保持される本発明の組成物の処方および投与のために使用しえる実質的に毒性のない任意の担体を指す。

20

医薬的に許容できる担体は、治療される哺乳動物への投与が適切であるように純度は十分に高く毒性は十分に低くなければならない。前記担体はさらに活性物質の安定性および生体利用性を維持しなければならない。医薬的に許容できる担体は液体でも固体でもよく、所定の組成物の活性物質および他の成分と混合したとき所望のかさ、粘稠度を提供するために、想定される投与の予定される態様にしたがって選択される。例えば、医薬的に許容できる担体は、結合剤（例えば予めゼラチン化されたトウモロコシ澱粉、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）、充填剤（例えばラクトースおよび他の糖、微晶質セルロース、ペクチン、ゼラチン、硫酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、リン酸水素カルシウムなど）、滑沢剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化シリコン、ステアリン酸、金属ステアレート、水素添加植物油、トウモロコシ澱粉、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）、崩壊剤（例えば澱粉、澱粉グリコール酸ナトリウムなど）、または湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウムなど）が可能であるが、ただしこれらに限定されない。本発明の組成物のために適切な他の医薬的に許容できる担体には、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。そのような担体溶液はまた緩衝液、希釈剤および他の適切な添加材を含むことができる。本明細書で用いられる“緩衝液”という用語は、その化学的な構成物質がpHを有意に変化させることなく酸または塩基を中和する溶液または液体を指す。本発明が意図する緩衝液の例には、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、リンゲル溶液、5%デキストロース水（D5W）および通常／生理食塩水（0.9%のNaCl）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。いくつかの実施態様では、輸液溶液は対象動物の組織に対して等張である。いくつかの実施態様では、輸液溶液は対象動物の組織に対して高浸透圧性である。非経口投与用の本発明の組成物は、医薬的に許容できる担体、例えば無菌的水溶液、通常的溶媒（例えばアルコール）中の非水性溶液、または液体油基剤中の溶液を含むことができる。

30

40

【0062】

いくつかの実施態様では、本発明の梗塞領域灌流改善組成物の担体は、放出物質（例え

50

ば持続放出、遅延放出担体）を含むことができる。そのような実施態様では、より効率的な投与を提供するために（例えば頻度の減少および／または組成物の投与量の減少、操作の容易さの改善をもたらす）、および治療され予防されまたは促進される疾患、異常、状態、徴候に対する効果を延長または遅延させるために、担体は、活性物質を持続的にまたは遅延させて放出することができる任意の素材でありえる。そのような担体の非限定的な例には、リポソーム、ミクロソーム、微小海綿、微小球体、または天然および合成ポリマーのマイクロカプセルなどが含まれる。リポソームは、多様なリン脂質、例えばコレステロール、ステアリルアミンまたはフォスファチジルコリンから形成することができる。

本発明の梗塞領域灌流改善組成物は、無菌的で注射可能な水性または油性懸濁物の形で非経口的に投与することができる。本明細書で用いられる“非経口的な”または“非経口的に”という用語は、注入（すなわち注射による投与）（輸液技術を含むが、ただし前記に限定されない）によって身体に導入することを指す。走化性造血幹細胞生成物を含む本発明の梗塞領域灌流改善組成物は、選択した解剖学的構造へ液体組成物（すなわち流動することができる組成物）をデリバリーできるように適応させたバルーンカテーテルによって対象動物にデリバリーされる。

【0063】

本発明の無菌的な梗塞領域灌流改善組成物は、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒中の無菌的溶液または懸濁物でありえる。一般的には溶液は2つまたは3つ以上の物質の均質な混合物と考えられ、前記はしばしば（必然的というわけではないが）液体である。溶液中では、溶質（または溶解された物質）分子は溶媒分子間に均質に分布する。懸濁物は、微細に分割された物質種が別の物質種と一緒に存在する分散物（混合物）であり、前記物質種は急速に沈殿しないように非常に微細に分割され混合されている。日常生活で、もっとも一般的な懸濁物は固体が液体の水に存在するものである。用いることができる許容可能なベヒクルおよび溶媒はとりわけ水、リンゲル溶液および等張の塩化ナトリウム（生理食塩水）溶液である。いくつかの実施態様では、高浸透圧溶液が用いられる。さらにまた、無菌的固定油が溶媒または分散媒体として通常的に用いられる。非経口的投与のために特に適切な賦形剤は、溶液（好ましくは油性または水性溶液）、懸濁物、乳化物またはインプラントから成る。水性懸濁物は懸濁物の粘性を高める物質を含むことができる。前記には、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび／またはデキストランが含まれる。

本発明の梗塞領域灌流改善組成物は当業界で公知の技術を用いて容易に調製することができる。前記技術は、例えば以下に記載されている：Remington's Pharmaceutical Sciences, 18版または19版、Mack Publishing Company of Eaton (Pa)刊（前記文献は参照により本明細書に含まれる）。

【0064】

本明細書で用いられる“治療的に有効”、“梗塞領域改善量”、“灌流改善量”または“医薬的に有効な量”という用語は、対象動物へのその投与の後で治療的效果または有益な効果がもたらされる本発明の組成物の量を指す。梗塞領域改善効果、灌流改善効果、治療的または医薬的效果は疾患または異常を治癒させること、最少化させること、予防することまたは緩和させることであるか、または他の任意の梗塞領域改善効果、灌流改善効果、治療的または医薬的に有益な効果を有することでもよい。前記物質の濃度はその梗塞領域改善効果、灌流改善効果、治療的または医薬的效果を表出するために選択されるが、重要な副作用を回避するために本発明の範囲内および医師の慎重な判定内において十分に低く選択される。組成物の有効量は、治療される生物学的対象の年齢および身体的状態、症状の重症度、治療の期間、併用療法の性質、輸液のタイミング、用いられる具体的な化合物、組成物または他の活性成分、利用される具体的な担体などにしたがって変動する。

当業者は、所定の強さの効果を誘引する投薬ユニット（使用ユニットを意味する）中の用量（以後“ユニット用量”と称する）を決定することにより、本発明の組成物の医薬的に有効な量を決定することができる。“用量-強度関係”という用語は、個々のレシピエントにおける効果の強さが用量と一致する態様を指す。一般的に示される効果の強度は最

大強度の50%である。対応する用量は50%有効用量または個体ED₅₀と呼ばれる。“個体”という用語の使用によって、本明細書で用いる効果の強度を基準にするED₅₀が中間有効用量（またED₅₀と略記される）（前記は集団内の応答データの頻度から決定される）と区別される。本明細書で用いられる“有効性”という用語は所望の応答を達成するための本発明の組成物の特性を指し、さらに“最大有効性”は達成可能な最大効果を指す。具体的な異常または状態の治療に有効な、本発明の医薬組成物中の走化性造血幹細胞生成物の量は異常または状態の性質に左右され、標準的な臨床的技術によって決定することができる（例えば以下を参照されたい：Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Joel G Harman, Lee E Limbird, Eds; McGraw Hill, New York, 2001; THE PHYSICIAN'S DESK REFERENCE, Medical Economics Company, Inc., NJ Oradell, 1995; および DRUG FACTS AND COMPARISONS, FACTS AND COMPARISONS, INC., St. Louis, Mo., 1993）。本発明の処方物に用いられるべき正確な用量はまた、投与ルートおよび疾患または異常の重篤度に左右され、医師の判定および各対象動物の周囲状況にしたがって決定されるべきである。対象動物は本発明の医薬組成物の多重投与により利益を受けえると考えられる。

10

【0065】

別の実施態様では、本発明の医薬組成物は、医師の裁量による非経口投与のために、投薬ユニット当たり、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 のCD34⁺細胞の亜集団を有する少なくとも 10×10^6 のCD34⁺造血幹細胞を含む。

20

本発明の別の特徴では、本発明の梗塞領域灌流改善医薬組成物は1つまたは2つ以上の適合性活性成分を含むことができる。前記成分の目的は、本発明の単離走化性造血幹細胞生成物によって提供される医薬効果に加えて別の医薬効果を梗塞領域改善組成物に提供することである。本明細書で用いられる“適合性”とは、通常の使用条件下で各活性成分または組成物の有効性を実質的に低下させる相互作用が存在しないような態様で、そのような組成物の活性成分を互いに組に合わせることができることを意味する。いくつかの実施態様では、前記併用療法はその必要がある対象動物に梗塞領域灌流改善組成物を投与することを含み、前記組成物は、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤、ベータ-ブロッカー、利尿剤、抗不整脈剤、抗狭心症薬、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、血管作用性薬剤または筋変力性物質、抗凝固剤、フィブリン溶解剤、および高コレステロール血症薬から成る群から選択される薬剤と組み合わせられた、本発明の走化性造血幹細胞生成物を含む。

30

【0066】

いくつかの実施態様では、チロシンキナーゼレセプターアゴニストはニューレグリン1である。ニューレグリン1（NRG1）は表皮増殖因子レセプターファミリー（ErbB1、2、3および4から成る）のレセプターチロシンキナーゼのアゴニストである（SJ Fuller et al. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44:831-54）。NRG1とErb4との結合はそのキナーゼ活性を増加させ、Erb2とのヘテロダイマー形成またはErb4とのホモダイマー形成および細胞内シグナルトランスダクション経路の刺激をもたらす（上掲書）。NRG1レセプターサブユニットErb2およびErb4はまた分化心筋細胞で発現される（上掲書）。最近、NRG1は、分化心筋細胞の分裂休止状態の停止を誘発することによって分化単核心筋細胞の増殖をin vivoで誘発することがマウスで示された（K Bersell et al. Cell 2009, 138:257-70）。未分化の幹細胞およびプロジェニター細胞はこの増殖に寄与しなかった（上掲書）。2カ月齢のマウスの左腹側下降冠状動脈（LAD）を永久的に結紮し、1週間後からNRG1を毎日12週間投与するマウスモデルを用いたとき、NRG1の12週間投与は心筋機能の持続的改善をもたらすことが示された（前記は、拍出比、梗塞瘢痕サイズの減少および心筋細胞肥大の緩和によって判定された）（上掲書）。

40

急性心筋梗塞後、虚血の結果としての壊死性細胞死に加えて、進行性のアポトーシス性細胞死および心筋細胞活動休止が一緒になって心臓機能の低下をもたらす、この心臓機能の低下は時間の経過にしたがって悪化し、最終的には心臓にとって極めて不利益な事象を

50

引き起こしえる。いったん失われると、心筋細胞は有意に再生して心臓機能を回復することはない。炭素 14 による心筋細胞の年月日の決定によって、心筋の再生能力は年間 1 % 未満であることが示された (O Bergman, Science 2009, 324:98-101)。

【0067】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物はさらに約 0.5 % から約 5 % のアルブミンを含む。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 0.5 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 0.75 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.0 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.25 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.5 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.75 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 2.0 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 2.5 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 2.75 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 3.0 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 3.5 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 4.0 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 4.5 % である。いくつかの実施態様では、アルブミンの最少量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 5.0 % である。

【0068】

いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 5.0 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 4.75 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 4.5 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 4.25 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 4.0 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 3.75 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 3.5 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 3.25 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 3.0 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 2.75 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 2.0 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.75 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.5 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1.25 % である。いくつかの実施態様では、本発明の組成物中のアルブミンの最大量は組成物の体積 100 cc 当たりの mL として表して約 1 % である。いくつかの実施態様では、前記アルブミ

ンはヒトアルブミンである。いくつかの実施態様では、前記アルブミンは組換えヒトアルブミンである。

【0069】

本発明の方法

別の特徴では、本発明は、その必要がある対象動物の治療のための走化性造血幹細胞生成物を含む梗塞領域灌流改善医薬組成物を調製する方法を提供する。前記方法は以下の工程を含む：

(1) 無菌的条件下で走化性細胞入手プロセスによって対象動物から有能CD3⁺4⁺細胞の濃縮集団を含む調製物を入手する工程；

(2) CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む有能CD3⁺4⁺細胞を前記調製物から無菌的に精製する工程；

(3) 前記精製有能CD3⁺4⁺細胞を無菌的に処方して走化性造血幹細胞生成物を形成する工程；

(4) 走化性活性を有する有能CD3⁺4⁺CXCR-4⁺細胞の亜集団を含む前記走化性造血幹細胞生成物を無菌的に処方して医薬組成物を形成する工程；

(5) 前記医薬組成物の無菌性を判定する工程；

(6) 対象動物への輸液に適切な無菌的医薬組成物を放出する工程；

(7) 治療的に有効な量の前記医薬組成物をデリバリー装置にローディングする工程；および

(8) 走化性造血幹細胞生成物を含む前記無菌的医薬組成物の治療的に有効な量を含むデリバリー装置を、場合によって、対象動物への輸液のための心臓カテーテル挿入施設に輸送する工程。

ある実施態様では、工程(2)は入手工程(1)の完了から約12時間から約24時間以内に開始される。別の実施態様では、放出工程(6)は、入手工程(1)の完了から約48時間から約72時間以内に前記無菌的処方細胞生成物が対象動物に輸液できる場合にのみ続行される。別の実施態様では、工程(2)は入手工程(1)の完了から約12時間から約24時間以内に開始され、さらに放出工程(6)は、入手工程(1)の完了から約48時間から約72時間以内に前記無菌的処方細胞生成物が対象動物に輸液できる場合にのみ続行される。

【0070】

ある実施態様では、工程(5)(すなわち医薬組成物の無菌性の判定工程)はさらに以下の工程を含む：(i) 有能CD3⁺4⁺CXCR-4⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物を遠心して、細胞ペレットおよび上清を形成し(細胞ペレットは有能CD3⁺4⁺CXCR-4⁺細胞含む)；(ii) 細胞ペレットをかき乱すことなく上清を無菌的に取り出し；さらに(iii) 上清が微生物によって汚染されているか否かを分析し、それによって細胞ペレットの無菌性をその細胞内容物を消耗させることなく決定する。

ある実施態様では、工程(a)の走化性細胞入手プロセスは、有能CD3⁺4⁺細胞の濃縮集団を含む調製物を対象動物の骨髄から無菌的条件下で入手するために用いられるミニ骨髄採集技術である。骨髄採集技術のために、本方法の工程(a)はさらに以下の工程を含む：(i) 対象動物から骨髄を採集する前に採集シリンジにヘパリンを予めローディングする工程；(ii) 採集シリンジおよびミニ骨髄採集技術を用いて対象動物の左背側腸骨稜および右背側腸骨稜から骨髄を吸引して採集骨髄を形成する工程；および(iii) 採集骨髄を収集バッグに注入する工程。ある実施態様では、工程(i)の採集シリンジおよび工程(iii)の収集バッグは0.9%の通常生理食塩水を含み保存料を含まないヘパリン添加溶液を含む。ヘパリン添加生理食塩水溶液のヘパリン最終濃度は約20ユニット/mLから約25ユニット/mLである。

【0071】

場合によって、本発明のある実施態様では、採集骨髄は、骨髄採集施設とは異なる処理施設に輸送される。ある実施態様では、採集骨髄の処理施設への輸送方法は以下の工程を含む：(a) 採集骨髄を収集バッグに入れる工程；(b) 前記収集バッグを二次バッグに入

れる工程；(c) 前記収集バッグを収納した前記二次バッグを凍結ウェットアイスおよび少なくとも1枚の気泡緩衝材を入れた内部区画を含む輸送容器に入れる工程；(d) 前記輸送容器の内部区画に温度タグモニターを添付する工程；(e) 前記輸送容器を封印する工程；および(f) 前記輸送容器を処理施設に輸送する工程。

別の特徴では、本発明は、正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞に続く梗塞領域の損傷を血管再生対象動物で治療または修復する方法を提供する。前記方法は、

(a) 無菌的な医薬組成物をカテーテルから非経口的に対象動物に投与する工程であって、前記医薬組成物が、(i) 第一の治療薬剤として、梗塞領域灌流改善量の増殖させていない無菌的な単離された走化性造血幹細胞生成物であって、前記梗塞領域灌流改善量の走化性造血幹細胞生成物が少なくとも 10×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞の濃縮集団を含み、前記濃縮集団が、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む、前記造血幹細胞生成物、(ii) 安定化量の血清であって、前記安定化量の血清が20% (v/v) を越える前記血清、および(iii) 場合によって、治療的に有効な量の少なくとも1つの適合しえる第二の治療薬剤を含む、前記投与工程；および

(b) コントロールと比較して、少なくとも1つの梗塞領域で灌流を改善する工程を含み、
前記方法で、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団の少なくとも70%の細胞が、カテーテル通過時およびin vitro検査時にCD34⁺細胞であり、さらにCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集団が、カテーテル通過時およびin vitro検査時に(1) CXCR-4媒介走化性活性を維持し、(2) 少なくとも約70%の生存率を有し、さらに(3) CXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手後少なくとも約24時間in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに投与工程(a)が1つまたは2つ以上の輸液期日において実施され、第一の輸液期日は1回目および2回目で規定される特定の時間間隔を含み、前記1回目は梗塞領域における最盛期炎症性サイトカインカスケード産生後であり、2回目は梗塞領域における心筋瘢痕形成前である。

【0072】

ある実施態様にしたがえば、治療的有效量の走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む少なくとも 15×10^6 の単離CD34⁺造血幹細胞を含む。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a) in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに(b) (a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を入手後少なくとも48時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団は、(a) in vitroで造血細胞コロニーを形成することができ、さらに(b) (a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を入手後少なくとも72時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。別の実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団は、(a)でCXCR-4を発現する有能細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団を対象動物から入手後少なくとも24時間、CXCR-4媒介走化性活性の少なくとも2%を維持する。

いくつかの実施態様にしたがえば、随意である第二の治療薬は、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、ベータブロッカー、利尿剤、抗不整脈剤、抗狭心症薬、チロシンキナーゼレセプターアゴニスト、血管作用性薬剤、抗凝固剤、フィブリン溶解剤、および高コレステロール血症薬から成る群から選択される。いくつかの実施態様にしたがえば、チロシンキナーゼレセプターアゴニストはニューレグリン1である。いくつかの実施態様にしたがえば、梗塞領域損傷は急性心筋梗塞に続く心臓筋肉機能の進行性低下である。

【0073】

別の実施態様にしたがえば、本方法は、少なくとも1つの梗塞領域損傷を(i) + (ii)の組成物成分または(iii)の成分のみよりも強く緩和させる。いくつかの実施態様にしたがえば、前記梗塞領域損傷は梗塞領域のアポトーシス性心筋細胞減少を含む。いくつかの実施態様にしたがえば、前記梗塞領域損傷は急性心筋梗塞後の不利な左心室再造形を含む。いくつかの実施態様にしたがえば、前記梗塞領域損傷は、急性心筋梗塞から生じる心臓筋肉機能の進行性低下を含む。いくつかの実施態様にしたがえば、本方法は、コントロールに比して、心筋組織の少なくとも1つの虚血性梗塞周囲ゾーンの灌流を増加させる。いくつかの実施態様にしたがえば、本方法は、コントロールに比して、心筋組織の少なくとも1つの梗塞周囲ゾーンの活動休止心筋への灌流を増加させる。いくつかの実施態様にしたがえば、前記梗塞領域損傷は、コントロールと比して梗塞周囲境界ゾーンにおける低い灌流を含む。いくつかの実施態様にしたがえば、前記梗塞領域損傷は、コントロールと比して梗塞周囲境界ゾーンにおける心筋活動休止を含む。いくつかの実施態様にしたがえば、前記方法は、コントロールと比較して梗塞領域の微細血管の血流を改善する。いくつかの実施態様にしたがえば、本方法は、コントロールと比較して梗塞面積を減少させる。いくつかの実施態様にしたがえば、本方法は、コントロールと比較して梗塞量を減少させる。

10

【0074】

本発明のある実施態様にしたがえば、その必要がある対象動物は心筋梗塞の血管再生患者である。本実施態様で用いられる“血管再生”という用語はステントの設置の成功を指す。例えば、非検査室試験、心カテーテル挿入、炎症性サイトカインの測定および心バイオマーカーの測定を用いる冠状血管不全の臨床評価を用いて、本発明の方法の医薬組成物を投与する適切な時期を決定することができる。いくつかの実施態様では、最盛期の炎症性サイトカインカスケード産生の検出は、個々の対象動物でもっとも決定的な枠内で投与を調節することを可能にする。いくつかの実施態様では、最盛期の炎症性サイトカインカスケード産生は、血漿または尿中の適切なサイトカインのレベルを測定することによって決定される。他の実施態様では、適切なサイトカインのレベルは免疫化学的に、例えばサンドイッチ酵素免疫アッセイによって、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって、またはマルチ複合ビーズキットによって測定される。

20

ある実施態様にしたがえば、組成物は、最盛期炎症性サイトカインカスケード産生の後の第一の輸液期日に対象動物に投与される。いくつかの実施態様では、組成物は、血管再生心筋梗塞患者に梗塞後約5日から約14日の第一の輸液期日に投与される。第一の輸液期日に血管再生心筋梗塞患者に組成物を投与する最短期間は、約5、6、7、8、9、10、11、12、13または14日である。第一の輸液期日に組成物を投与する最長期間は、約14、12、11、10、9、8、7、6または5日である。

30

【0075】

いくつかの実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能CD34⁺細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の濃縮集団におけるCD34⁺細胞の最低数は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞の十分な数を提供して梗塞領域灌流改善効果を生じる細胞数である。したがって、本発明は、CXCR-4の発現およびCXCR-4媒介可動性を例えばCXCR-4+自動性細胞の選別および濃縮によって増加させることができるいくつかの実施態様では、より少ない数のCD34⁺細胞が梗塞領域灌流改善効果を生じるために必要であると予想する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも1 x 10⁵の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞の濃縮集団が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも5 x 10⁵の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも9 x 10⁵の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-

40

50

4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 1×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 2×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 3×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 4×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介自動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 5×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介運動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 6×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介運動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 7×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介運動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 8×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介運動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、少なくとも 9×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞が、梗塞領域灌流改善効果を生じるために十分な数の、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介運動性を有する有能CD34⁺細胞を提供する。

【0076】

いくつかの実施態様にしたがえば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含むCD34⁺細胞の梗塞領域灌流改善量（CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む、少なくとも 10×10^6 の自己由来単離CD34⁺造血幹細胞の濃縮集団を含む）が、第二の輸液期日に輸液される。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも5日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも6日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも7日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも8日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも9日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも10日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも11日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも12日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも13日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも14日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも15日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも16日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第二の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも17日後である。いくつかのそのよ

10

20

30

40

50

30

50

のそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも38日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも39日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも40日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも45日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも50日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも55日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも60日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも61日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも62日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも63日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも64日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも65日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも66日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも67日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも68日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも69日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも70日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも75日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも75日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも80日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも85日後である。いくつかのそのような実施態様にしたがえば、前記第三の輸液期日は第一の輸液期日の少なくとも90日後である。

【0078】

いくつかの実施態様では、本発明の医薬組成物をその必要がある対象動物にデリバリーするために用いられる装置は、輸液シリンジ、4方向ストップコックおよびバルーンカテーテルを含む。ある実施態様では、前記デリバリー装置は以下を含む：(a) 走化性造血幹細胞生成物を含む医薬組成物を収納する、無菌的な4方向ストップコックと結合させた輸液デバイス；(b) フラッシュ溶液を含む、無菌的な4方向ストップコックと結合させたフラッシュデバイス；および(c) 無菌的な4方向ストップコックによってデリバリー装置と結合させたカテーテル。ある実施態様にしたがえば、前記輸液装置は任意の適切な素材で作製されたシリンジである。適切な4方向ストップコックの本体および取っ手は同じまたは別個の素材で作製することができる。適切な4方向ストップコックの例には、ポリカーボネートの本体/ポリカーボネートの取っ手をもつストップコック、ポリエチレンの本体/ポリエチレンの取っ手をもつストップコック、ポリカーボネートの本体/ポリエチレンの取っ手をもつストップコックまたは使い捨てストップコックが含まれるが、ただし前記に限定されない。別の実施態様では、あるデバイスがさらにストップコックに結合されて、デリバリーされる溶液にかかる圧を調節する。いくつかの実施態様では、一体となったフラッシュデバイスまたはシリンジがストップコックに結合される。ある実施態様では、カテーテルはバルーンカテーテルである。“バルーンカテーテル”という用語は、その先端の“バルーン”を膨らませることができる“軟らかく”薄い可撓性チューブタイプを指す。前記をカテーテル挿入手順で用いて体内の狭い開口部または通路を拡張させる。しばしば膨らませたバルーンカテーテルを適切な位置に置き、膨らませて必要な手順を実施し、再びしばしば膨らませて取り出す。

【0079】

CD3⁺4⁺CXCR-4⁺細胞を含む本発明の走化性造血幹細胞生成物の生存率および潜在的有効性は、それらがカテーテルを通過するときにそれらの潜在能力を維持している細胞に依存する。本発明の方法で用いられるカテーテルは少なくとも0.36mmの内径を有する。少なくとも0.36mmの内径を有する任意のタイプのカテーテルが、本発明の医薬組成物のデリバリーに有効でありえる。

例えば、流量コントロールカテーテル（冠状動脈の血液の排出速度を遅くする）は、細胞が血管壁から組織に移動する時間を与える。

いくつかの実施態様では、カテーテルはバルーンカテーテルである。例えば、以下の製造業者（Cordis、Boston Scientific、MedtronicおよびGuidant）から入手可能な、内径が約0.36mmの下記のバルーン拡張カテーテル（ただし前記に限定されない）を拡張させた。

【0080】

表1：IRAによる選別CD3⁺4⁺細胞の輸液のために有効なバルーンカテーテル

製造業者	名称とモデル番号	バルーン寸法	管腔内径
Cordis	Raptor OTW 579-130	15mm x 3.0mm	0.36mm (0.14 in.)
Boston Scientific	OTW Maverick 20620-1530	15mm x 3.0mm	0.36mm (0.14 in.)
Medtronic	OTW Sprinter SPR 3015W	15mm x 3.0mm	0.36mm (0.14 in.)
Guidant	Voyager OTW 1009443-15	15mm x 3.0mm	0.36mm (0.14 in.)

【0081】

さらにまた、バルーンに隣接して液体デリバリー口を有し、バルーンが血管壁を押し広げて膨張し、前記デリバリー口（デリバリー口はバルーンの遠位側に位置しえる）から観てバルーンと逆の血行力学からデリバリー部位を隔離することができるようになっているカテーテルが報告されている。さらにまた、バルーンカテーテルの基部側に配置された脇口で終わる管腔を有するバルーンカテーテルが開示されている。これらのバルーンカテーテルは一般的には“バルーン/デリバリー”カテーテルと称されることがあるが、ただし特定の参考文献は異なるキーワードを用いることがある。例えば、米国特許5,415,636号（Forman）（前記文献は参照により本明細書に含まれる）を参照されたい。

いくつかの実施態様では、正常な疾患プロセスから生じる急性心筋梗塞の余波における梗塞領域の損傷を治療または修復する方法は、血管内に（血管内部を意味する）バルーンカテーテルを挿入して梗塞領域に梗塞領域灌流改善医薬組成物を投与することを含む。いくつかの実施態様では、血管形成術に続いて、デリバリーバルーンカテーテルが、大腿動脈を介して所望の冠状動脈（例えば左腹側下降冠状動脈）へ挿入される。いくつかの臨床条件は、治療を容易にするためにバルーンカテーテルおよび液体デリバリーカテーテルの両方を要求する。いくつかの実施態様では、直接細胞を心筋層に注入するためにカテーテルが用いられる。

【0082】

ある範囲の値が提供される場合は、当該範囲の最大限と最小限の間および他の指定された任意の値または当該指定された範囲内に介在する各値は、そうではないことを文脈が明確に示さないかぎり前記最小限の最小整数の10分の1まで、本発明の範囲内に包含されると理解される。これらのより狭い範囲の最大限および最小限（前記はこれらより狭い範囲にそれぞれ別個に含まれる）もまた、当該指定範囲の特に除外された任意の限界を除き本発明の範囲内に包含される。指定の範囲が一方の限界または両方の限界を含む場合、一方または両端を除外してこれら内包される限界の範囲がまた本発明に包含される。

別に規定しないかぎり、本明細書で用いられる全ての技術用語および学術用語は、本発明が属する業界の者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。本明細書に記載した方法および材料と類似または等価のいずれの方法および材料もまた本発明の実施または試験に用いることができるが、好ましい方法および材料をこれから述べる。本明細書に記載した全ての刊行物は、当該刊行物の引用に関係がある方法および／または材料の開示または

10

20

30

40

50

説明のために参照により本明細書に含まれる。

本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられるように、単数形の“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かぎり対応する複数形を含む。本明細書で用いられる全ての技術用語および学術用語は同じ意味を有する

本明細書に引用した参考文献の各々は参照によりその全体が本明細書に含まれる。本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前にそれら刊行物が出版されたことを開示するためにのみ提供される。本明細書に記載のいずれのものも、本発明が、先行発明を理由としてそのような刊行物に先行する権利を与えられないことを容認するものと解されてはならない。さらにまた、提供した刊行期日は、実際の刊行期日（それぞれ別個に確認する必要があるかもしれない）とは異なる可能性がある。

10

【0083】

実施例

以下の実施例は、本発明をいかに製造および使用するかについて完全な開示および説明を当業者に提供するために提示され、さらに、発明者が彼らの発明とみなすものの範囲を制限しようとするものではなく、また下記の実験が実施した実験の全てでありそれ以外に存在しないと言おうとするものでもない。使用した数字（例えば量、温度など）に関して正確を期せんと欲するが、いくつかの実験誤差および偏差は考慮されるべきである。特段の指示がなければ、比は重量比であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧は大気または大気に近い。

フェースI臨床試験プロトコル

20

【実施例1】

【0084】

実施例1：適切な対象動物の選別

心筋梗塞を示唆する症状および臨床所見を示す対象動物／患者に院内指針にしたがって緊急時診断および臨床措置を施した。経壁（壁を貫通することを意味する）心筋梗塞が確認される場合、最初の症状の時期およびステント設置成功の時期を記録した。血管再生対象動物に適切な医療措置を施し、院内指針にしたがって左心室壁のストレスを減少させた。本実施態様で用いられる“血管再生”という用語は、ステント設置の成功を指す。

全てのタイプのステント（薬剤溶出ステント（例えばパクリタキセルまたはシロリムス）を含む）が、梗塞関連血管（“IRA”）の血管再生での使用に適切である。細胞生成物の輸液のためにバルーンカテーテルを用いる以前の研究では、ステント設置のための参照血管の直径についての限界を全く報告していない。この研究はIRA循環に細胞生成物を分配し、さらに非常に小さな血管を損傷する可能性を制限しようとして設計されたので、本発明では、本発明の走化性造血幹細胞生成物の輸液の前にステントが設置されることが必要であった。

30

ステント関連薬剤の効果はステントと血管壁との接触部位でもっばら生じる。バルーン拡張の結果、細胞輸液時にステントの先の血流が制限される、したがって走化性造血幹細胞生成物中のCD34⁺細胞に対する有意な薬剤媒介副作用は予想されなかった。さらにまた、以前の臨床試験で、薬剤溶出ステント設置後96時間まで、パクリタキセルまたはシロリムスの全血レベルは検出限界未満であることが示された。したがって、CXCR-4を発現しCXCR-4媒介走化性活性を有する輸液CD34⁺細胞が遊走しようとする心筋部位における組織レベルは極めて低いと予想された（以下を参照されたい：J Sousa et al. Circulation 2003, 107:2274-79, 2383-89）。

40

【0085】

血管再生中に、対象動物の心臓機能および灌流を標準的な方法で評価した。心筋梗塞後の心臓機能の対応する測定には、心臓駆出率、心室体積、安静時灌流および梗塞サイズが含まれる。

“駆出率”（“EF”）という用語は、収縮時に心室から放出される血液のパーセンテージを指す。より具体的には各拍動により駆出される拡張期終期体積の割合である。すなわち、前記は拡張期終期体積（EDV）で割った心拍血液量（SV）である。収縮直前の心室内

50

血液体積は拡張期終期体積として知られており、一方、収縮の終わりに心室に残留する血液体積は収縮期終期体積として知られている。拡張期終期体積と収縮期終期体積との間の差が心拍血液量（各拍動で駆出される血液体積）である。健常な70kg（154ポンド）の男性では、SVはほぼ70mLで左心室EDVは120mLであり、駆出率は70/120または0.58（58%）となる。55-60%の範囲内のEFは正常と考えられる。右心室の駆出率（“RVEF”）は通常狭い限界内で左心室の駆出率（“LVEF”）と等しい。

心エコー検査、放射性核種によるスキャンニング（例えばマルチゲートドアクイジッションスキャン（MUGA）、心室、心房のポンプ機能および心臓収縮態様を評価する核スキャン）、および左心室造影が容易に利用でき、左心室駆出率（“LVEF”）の正確な測定値が得られた。心エコー検査を利用し、バイプレーン・エリア・レングス（biplane area length）法を用いることによって収縮期終期および拡張期終期体積を決定した。

梗塞後期間の心機能における他の測定には、心拍血液量インデックスおよび環状面線維短縮速度の査定が含まれる（Strauer et al. Circulation 2002, 106:1913-18）。心拍血液量（SV）は、左心室が1回の拍動で駆出する血液量であり、拍動当たりのミリリットル（mL/拍動）で測定される。SVは、身体表面積（BSA）でSVを割り拍動インデックス（SI）を得ることによって患者の身体サイズを指数化することができる。

【0086】

梗塞心筋層の修復の査定もまた、タリウムシンチグラフィー（上掲書）を用いる梗塞周囲領域灌流評価を含んでいた。

磁気共鳴画像化（MRI）は、この設定で心機能および生存率（梗塞サイズ）を査定するための有用なツールである（以下を参照されたい：A Yin et al. Blood 1997, 90:5002-5012）。

ステント設置成功の次の日、臨床試験の適格性について対象動物を判定し、適切な場合には、臨床試験参加のために対象動物にインフォームドコンセントが提供された。ステント設置成功前3日未満の間症状を示した対象動物は、除外する前に臨床試験の適格性について査定した。適格性基準（上記参照）を満たすことが判明した対象動物には参加についてインフォームドコンセントが提供された。

同意した対象動物は、ステント設置後96時間以降に試験参加心エコー検査を受けた。対象動物は、（i）心エコー検査でLVEFが50%に等しいかまたは前記未満であり、さらに（ii）断片的心室壁異常がIRAで観察される場合に臨床試験の継続が適切であるとされた。

適格対象動物は直ちに基準心機能および灌流査定を完了させた。具体的には、基準心機能には、安静時および低用量ドブタミンを用いる経胸腔心エコー検査が含まれ、駆出率、収縮期終期および拡張期終期体積、壁運動スコアインデックス並びに生存率を含む心機能が査定される。

【0087】

心エコー検査：試験進行スクリーニングのためにステント設置4日後に心筋収縮心エコー検査を用い、左心室機能不全の患者（心エコー駆出率は50%以下）を確認した。

心臓灌流：灌流は、基準時および6ヶ月後に安静時および静脈内アデノシン投与後の日常的テクネチウム（Tc-99m）Sestamibi放射性核種スキャンを用いて査定した。灌流障害サイズは、安静時一光子放出コンピュータ連動断層撮影（SPECT）を用い安静時総合重症度スコア（RTSS）として概算した。エモリー心臓ツールボックス（Emory Cardiac Toolbox）を画像定量化に用い、評価には17セグメントモデルを用いた。中核監査室は、試験群について知らされていない解釈員を用いて灌流試験を査定した。灌流改善は半定量的関係（はい/いいえ）で表した。灌流改善を示すと判定された患者のパーセンテージを用量グループ間で比較した。

MRI：左心室収縮期終期および拡張期終期体積（LVESVおよびLVEDV）、左心室駆出率（LVEF）、並びに基準時、3カ月および6カ月時の梗塞サイズの評価のために、全ての登録対象動物が心臓のガドリニウム強化磁気共鳴画像化（MRI）を受けた。対象動物は、スキャンニング時にガドリニウムコントラストを受けた。MRIは息継ぎ停止技術を用いた。全

体的および局所的LV機能を得るために、ガドリウム画像化と同様に定常状態の首振り運動画像化を実施した。左心室の収縮期終期および拡張期終期体積、LVEF、LV拡張期終期寸法、梗塞領域の収縮期および拡張期の壁の厚さ、並びに梗塞サイズが、25%未満、26%–50%、51%–75%および76%を越えると報告された梗塞の経壁範囲を用いたAHA/AVV 17セグメントモデルにより報告された。中核監査室は、試験群について知らされていない解釈員によりMRIを査定した。

【0088】

この試験のために選別された対象動物は以下の臨床基準の全てを満たさなければならない（“包含基準”）：

－年齢は18–75歳；

10

－ACC/AHA基準を満たす急性STセグメント上昇心筋梗塞であり、承認から3日以内に胸部痛の症状があること。これらの基準（四肢誘導で1mmを越えるST上昇または2つ以上の胸部誘導で2mmを越えるST上昇、およびトロポニン、クレアチンキナーゼMB（CPK MB）またはその両方のレベルの増加）は、ニューヨーク心臓協会（NYHA）の心不全クラスI、IIまたはIII（報告されるべきもの）を含む；

－経皮冠状動脈介入（PCI）について適格であること；

－MRIについて適格であること；

－光子放出コンピュータ連動断層撮影（SPECT）画像化について適格であること；

－心パラメーターを適切に査定する能力に関して、承認のための心エコー検査を精査した後での心エコー検査室の結論であること；

20

－試験参加時の心エコー検査図（ステント設置後96時間から144時間（すなわち約4日から約6日））、LVEFは心エコー検査で50%未満または50%に等しく、再灌流後の心エコー検査によりIRA循環で断片の心室壁異常があること；

－対象動物は書面によるインフォームドコンセントを提供する能力を有し、必要とされる全ての試験追跡査定に参加する意思があることを示していること；

－対象動物は、ヘモグロビン含有量（Hgb）が10グラム/dLより高く、白血球数（WBC）が3500細胞/mm³より多く、血小板数が100,000細胞/mm³より多く、さらに国際標準化比（INR、血液凝固試験）が骨髓採集前日に2.0より低いこと；

－対象動物は、骨髓採集の7日以内に血清クレアチニンが2.5未満、全ビリルビンが2.0未満であること；

30

－疾患が2つ以上の血管に存在するとき、IRAおよび標的病巣は明瞭に識別可能であること；

－再灌流および冠状動脈内ステント設置が成功し、心筋梗塞血栓崩壊（TIMI）は2または3流路でIRAは再灌流後に20%未満の狭窄であること；

－対象動物は、有意識下鎮静、ミニ骨髓採集および走化性造血幹細胞生成物輸液のための第二のカテーテル挿入の実施に適格であると考えられること；

－使用されたステントのタイプおよび挿入の日時が記録されていること；

－薬剤溶出ステントはパクリタキセルまたはシロリムスタイプに限定されていたこと；

－包含される対象動物は、少なくとも1年の生存が予想されていること、および血管再生後に多重血管疾患を有していないこと、または試験の参加から6か月以内に介入を必要とすると予想されていないこと。

40

下記の基準のいずれか1つを満足させる対象動物はこの試験について適格ではなく排除された（“除外基準”）：

－経皮介入、有意識下鎮静、MRI、SPECT画像化またはミニ骨髓採集の候補ではない対象動物；

－血管再生の4日以上前に生じた、硝酸塩によって緩和されない持続的胸部痛の病歴があること；

－梗塞関連冠状動脈の再灌流が成功しなかったか、またはステント設置が成功しなかった対象動物；

－承認心エコー検査を精査した後で、試験は心パラメーターの査定に適切ではないとの

50

心エコー検査検査室が決定したこと；

－心起源ショックを提示している対象動物（血管収縮薬または大動脈内カウターパルセーションにより収縮期圧が80未満）；

－2mmを越える標的病巣の側枝を有し、血管再生後に開口部の狭細が直径の50%を超える狭窄を有する対象動物；

－アスピリン、クロピドグレルまたはチクロピジンを投与できない対象動物；

－ワルファリンが投与されている対象動物はINRが2または2未満であること（INRという用語はINR国際標準化比を指し、前記は世界保健機構（WHO）および血液凝固試験の結果の報告のための血栓症およびうっ血に関する国際委員会（International Committee on Thrombosis and Hemostasis for reporting the results of blood coagulation (clotting) tests）により設立されたシステムである）；

－重篤な大動脈狭窄の対象動物；

－重篤な免疫不全状態（例えばAIDS）の対象動物；

－活発な医療措置を必要としている肝硬変の対象動物；

－活発な治療を必要としている悪性疾患の対象動物（基底細胞皮膚癌を除く）；

－現行のアルコールおよび／または他の薬物中毒が報告されている対象動物；

－ミニ骨髄採集の7日以内の妊娠検査が陰性であった場合を除き妊娠の可能性がある女性；

－試験参加時心エコー検査図（ステント設置後96から144時間）で50%を超える駆出率を有する対象動物；

－3カ月以内にポストインデックス手順の抗血小板療法が予定されている対象動物；

－その後の6ヶ月間に引き続いて介入予定が必要とされている血管再生後のマルチ血管疾患を有する対象動物；

－進行中の調査試験に参加している対象動物；

－全身的抗生物質を必要としている活発な細菌感染を示す対象動物。

心臓機能および心臓灌流の基準判定は、予定されたミニ骨髄採集および走化性造血幹細胞生成物輸液（上記参照）の1日前に入手された。ミニ骨髄採集（“MMH”）は心臓機能および心臓灌流の基準判定の次の日に実施された。

【実施例2】

【0089】

実施例2：心臓カテーテル挿入

無菌的調製およびドレーピング

聞き取り者がインフォームドコンセントを入手した後で各対象動物を心臓カテーテル挿入室に入れた。対象動物はこの心臓カテーテル挿入室で無菌的調製物およびドレーピングを与えられた。

心臓カテーテル挿入

血管への接近は右または左の単径部を用いて標準的技術により達成した。鞘を大腿動脈または右もしくは左上腕動脈に設置した。右および左冠状動脈の標準像を入手することによって、冠状動脈造影試験を実施した。複数の像を入手して、以前にステントが挿入された梗塞関連動脈を確認した。全ての対象動物はカテーテル挿入時に通常技量の標準的医療が施された。

【実施例3】

【0090】

実施例3：CD34⁺細胞を続いて濃縮することができる走化性造血幹細胞生成物を得るための入手工程

CD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物を入手するために適切ないずれの入手プロセスも本発明の範囲内であると考えるが、以下の実施例では本明細書でミニ骨髄採集技術と称するそのような1つのプロセスを説明する。

採集シリンジの調製

骨髄採集の前に、保存料を含まない約2mLのヘパリン添加生理食塩水溶液（約100ユ

10

20

30

40

50

ニット/mLから約125ユニット/mL、APP Cat No 42592Bまたは等価物)をローディングした40本の10ccシリンジを無菌条件下で調製した。無菌的な通常の0.9%食塩水(“通常生理食塩水” Hospira Ca No 7893-09または等価物)の100mLバッグ2袋の各々に、各バッグから10ccから12.5ccの通常生理食塩水を除去した後でヘパリンを無菌口から注入し、約100ユニット/mL(U/mL)から約125ユニット/mL(U/mL)の最終ヘパリン濃度を得た。保存料を含まない2mLのヘパリン溶液(約100U/mLから約125U/mL)を無菌的条件下で40本の10ccシリンジの各々に加え、続いて採集場所へ輸送するために前記を無菌的バッグに入れた。

実施例1に記載した書面によるインフォームドコンセントを入手した後で、骨髄採集のために対象動物の準備を整えた。標準的な院内手順および指針を用いて有意識下での鎮静を提供した。骨髄採集は無菌的条件下で実施した。本明細書で用いられる“無菌的条件”という用語は、適切な手術前洗浄並びに採集実施医および助手の無菌的マスクおよび手袋とともにガウンの着用を含む。

採集方法(手術室の外で実施することができる)は以下のとおりである: 無菌的準備およびドレーピング後に、各腸骨稜につき最低限10mLの1%リドカイン溶液を用いて各腸骨稜を麻酔した。麻酔領域は直径10cm未満の円形領域であった。腸骨稜を貫通するまで採集針を挿入した。キャップとスタイレットを取り除き、2mLのヘパリン溶液を含む10mLの採集シリンジに2mLの骨髄を採集した。続いてこのシリンジを取り外し無菌的な場所に置いた。スタイレットを再度挿入し、採集針をわずかに先行させ続いて90°回転させた。続いてスタイレットを取り除き、無菌的な場所から回収した採集シリンジに新たに2mLの骨髄を吸引した。採集シリンジが、約20U/mLから約25U/mLの最終ヘパリン濃度にある合計10mLのヘパリン添加骨髄を得るために8mLの骨髄を含むまで、前記手順をさらに2回繰り返した。最後に、一杯になった採集シリンジを採集助手に手渡し、振り動かしさらに下記のように収集バッグに注入した。続いて採集医は、以前にヘパリン溶液でフラッシュしておいた他の採集針を取りこのプロセスを繰り返した。

一杯になった採集シリンジを以下のように無菌的な収集バッグに注入した。採集助手は一杯になった採集シリンジを手渡され、前記シリンジの中身をバッグに結合させた無菌的アダプターから500mLの収集バッグに入れてシリンジを空にした。続いて、採集針をフラッシュシリンジ中でヘパリン溶液を用いてフラッシュし、前記を無菌的な場所に戻した。

採集プロセスは、約19本のシリンジで収集し収集バッグにその中身を完全に移すまで一方の腸骨稜で繰り返された。他方の腸骨稜で同じプロセスをもう一方の約19本のシリンジが一杯になるまで繰り返した。両方の腸骨稜から吸引した合計38本(理想的には各腸骨稜から19本)の8mL吸引物によって、最終体積380mL(ヘパリン濃度は約20U/mLから約25U/mL)中に採集された骨髄302mLが得られた。

収集バッグを連結チューブで3回強く縛り、さらに結び目の遠位部を鉗子で挟むことによって封じた。このバッグに“ヒト骨髄収集物”と適切にラベルを付し、さらに採集手順の結果(収集した最終体積および方法に関する問題を含む)をメイヨー臨床リスクスコア(Mayo Clinical Risk Score (MCRS))事例報告用紙に記録した。完結させたラベルを骨髄バッグに添付した。続いてこのバッグを無菌的な運搬バッグに入れ、処理施設に輸送した。

【実施例4】

【0091】

実施例4: 輸送に向けた骨髄生成物の準備

ある実施態様では、採集骨髄は以下のように処理施設に輸送される。臨床現場が骨髄調製物の輸送の準備をするとき、24時間通知が処理施設に提供される。処理室は、処理室への当日配達のための集荷に向けて最速時間で輸送を手配する。骨髄収集後直ちに、骨髄生成物は供給された輸送コンテナに入れられる。この輸送コンテナは、その底に2つの凍結ウェットアイスの小ブロックおよびウェットアイスの上に1枚の気泡緩衝材を含んでいる。骨髄生成物を二次バッグに入れ、この二次バッグを気泡緩衝材上に置く。温度タグモ

ニター（内部温度をモニターするために用いられるセンサー）を箱の内部に添える。続いて、輸送コンテナを完全に封じる前に、生成物の上にもう1枚の気泡緩衝材を置く。

【実施例5】

【0092】

実施例5：採集骨髓生成物からCD34⁺細胞の選別

採集骨髓生成物からCD34⁺細胞を単離した。ある実施態様では、CD34⁺細胞は、抗CD34モノクローナル抗体（Mab）（Dynabeads（商標）M-450ヒツジ抗マウスIgG）およびIsolex 300i磁性細胞選別システム（Baxter Healthcare Corp. Cat No 4R9734）のPR34⁺（商標）幹細胞放出剤成分を用いて、以下に記載されように単離された：米国特許5,536,475号、5,035,994号、5,130,144号、4,965,204号、5,968,753号、6,017,719号、6,251,295号、5,980,887号、6,676,937号、米国特許出願公開公報No. 2003/0232050およびIsolex 300i パッケージ挿入物（前記文献の各々は参照により本明細書に含まれる）。この作業系は本発明の骨髓のCD34⁺細胞単離のために改案されている。

処理室に到着したとき、採集骨髓生成物（収集バッグに収納されている）を直ちに点検して、何らかの漏出がないかバッグを調べた。収集物は外見的に塊をもたず自由に流動しているべきでさらに溶血はあってはならない。バッグの完全性が何らかの態様で損なわれていたならば、その収集物は使用されなかった。

骨髓生成物は約12時間から約24時間以内に点検して処理された。300mLから400mLのトランスファーバック溶器を入手し、血漿トランスファーセットを溶器のサンプリング口に取り付けた。骨髓生成物を収集バッグからトランスファーバック容器に移した。溶器を20回逆さまにすることによって、プールした骨髓収集生成物を完全に混合した。

続いて前記プールした骨髓収集生成物から分析のためにサンプリングした。ある実施態様にしたがえば、生成物から合計2.0mL体積を取り出し、以下のようにアリコットに分割した：0.3mLを用いて、血液学アナライザーによる全血球算定（CBC）を2回実施した；グラム染色（Gram Stain Kit, VWR, Cat No BB231401）によるグラム陽性およびグラム陰性細菌の検出のために0.2mLを75 x 100mmのガラス試験管に入れた；無菌チェックとして、0.6mLを好気性細菌増殖アッセイ用トリプシン処理大豆ブロス（TSB）（VWR, Cat No 29446-184）ボトルに入れ、0.6mLを嫌気性細菌増殖アッセイ用液体チオグリコレート培養液（FTM）（VWR Cat # 29446-138）ボトルに入れた；さらにCD34⁺細胞一覧解析および細胞生存率のフロー分析に0.3mLを用いた。

収集物の重さを電子秤で秤量し、さらに収集バッグの適切な風袋重量を記録した。骨髓生成物の体積と生成物の重量との関係は以下のように表すことができる：

$$\text{体積 (mL)} = [\text{生成物の重量 (gm)} - \text{バッグの風袋重量 (gm)}] \div 1.06 \text{ (gm/mL)} \quad (\text{式1})$$

骨髓生成物中の全有核細胞（TNC）の数は、以下の関係にしたがいCBCからえられる白血球（WBC）数を用いて計算した：

$$\text{TNC} = \text{WBC} / \mu\text{L} \times 1000 \times \text{生成物の体積 (mL)} \quad (\text{式2})$$

骨髓生成物中のCD34⁺細胞の数は以下の関係から計算した：

$$\text{骨髓生成物中の全CD34}^+\text{細胞} = \text{CD34}^+\text{細胞数} / \mu\text{L} \times 1000 \times \text{生成物の体積 (mL)} \quad (\text{式3})$$

骨髓収集生成物の赤血球（RBC）体積は以下の関係から計算した：

$$\text{RBC体積 (mL)} = \text{生成物体積 (mL)} \times \text{ヘマトクリット (\%)} / 100 \quad (\text{式4})$$

RBC体積の最初の計算に続いて、骨髓生成物を二重に包み、100gで20分、ブレーキを“off”に設定して20℃で遠心した。遠心後、骨髓容器を注意深く遠心機から取り出し、サンプリング口を下に向けてクラス100生物学的安全キャビネット内につり下げた。血漿トランスファーセットをバッグの中央のサンプル口に注意して設置し、RBC分画をシリンジに引き入れた。残りのRBCをMMHから取り出すまで、前記手順を次の新しいシリンジを用いて繰り返した。MMHは洗浄工程から調製される。洗浄工程は、ブレーキを“off”

にした20℃、1000gで10分の遠心から始まり、続いて血漿を圧搾する。いずれもこのプロセスのより早い段階で調製したPBSを基剤とする洗浄緩衝溶液（PBS中の1% HSAおよび0.41%クエン酸ナトリウム（Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含まない））の洗浄用調製物で実施される。洗浄緩衝液の添加に続いて、ブレーキを“off”の位置にして20℃で1000gにて10分、細胞を再び遠心する。この（最後の）遠心の後、血漿圧搾装置を用いて細胞を圧搾し、上清を取り除き、60mLシリンジを用いて150mLのPBS洗浄溶液を生成物バッグに移す。パックされた細胞を手でもみほぐして再懸濁させる。この洗浄工程に続いて、RBC完全除去および有核細胞（NC）回収を以下のように計算する。RBC完全除去骨髓生成物のTNCは以下の関係から決定した：

$$\text{RBC完全除去生成物の全TNC} = \text{RBC完全除去生成物のWBC} / \mu\text{L} \times$$

$$1000 \times \text{RBC完全除去MMHの体積 (mL)} \quad (\text{式5})$$

RBC完全除去生成物のTNC回収（元の生成物における総数の少なくとも80%でなければならない）は以下の関係から計算した：

$$\text{TNC回収} = \text{RBC完全除去生成物のTNC} \div \text{未処理生成物のTNC} \times 100\% \quad (\text{式6})$$

全RBCの体積は上記のように計算した。RBC完全除去生成物中のRBCの体積は20mL以下であるべきである。

本発明のある実施態様にしたがえば、Isolex 300iシステムを用いて、以下の処理工程にしたがいRBC除去生成物またはそのRBC体積が20mL未満の骨髓生成物を処理した：

- (i) 骨髓を自動洗浄して血小板を除去した；
- (ii) Isolex 300i CD34モノクローナル抗体（Mab）とインキュベートすることにより、CD34陽性（CD34⁺）細胞を特異的に標識した；
- (iii) 緩衝溶液で前記細胞懸濁物を洗浄することによって、未結合試薬を除去した；
- (iv) 感作CD34⁺細胞（CD34 Mabで標識されたCD34⁺細胞を意味する）をダイナビーズ（Dynabeads）M-450ヒツジ抗マウスIgGで捕捉した；
- (v) 選別カラムを用いて、CD34⁺細胞を捕捉した磁性標識ダイナビーズを所望されない細胞から分離した（前記所望されない細胞は選別カラムから洗い流し、陰性分画バッグに集めた）；さらに

(vi) PR34+幹細胞放出剤がCD34⁺細胞をカラムから遊離させ、CD34⁺細胞は最終生成物バッグに集められた。このシステムは数回洗浄工程を実施し、液体の大半を緩衝液廃棄バッグに廃棄した。

Isolex(商標)選別CD34⁺分画を以下のようにアッセイして、WBCおよびCD34⁺細胞の収量を決定した。最終生成物バッグ中の細胞を混合することによって、CD34陽性分画の体積を決定した（バッグを手で穏やかにもみほぐし、均一な細胞分布を担保した）。トランスファーセットを最終生成物バッグのサンプリング口に挿入し、60mLシリンジを結合させた。全体積の測定のために細胞懸濁物をシリンジに引き出した（一時に最大50mL）。

3mLまたは5mLシリンジを用い、品質管理試験のために最終生成物バッグから2mLのサンプルをトランスファーセットを用いて取り出した。小分けにしたサンプルの体積およびこれらのサンプルについて実施した解析に関しては先に記載した（すなわち、CBCに0.3mL、グラム染色に0.3mL、CD34⁺細胞の一覧解析および細胞生存率に0.2mL）。

CD34陽性分画の全TNCは以下の関係から決定した：

$$\text{陽性分画の全TNC} = \text{陽性分画のWBC} / \mu\text{L} \times 1000 \times \text{陽性分画の体積 (mL)} \quad (\text{式7})$$

陽性分画のTNC回収（元の生成物における総数の少なくとも5%未満でなければならない）は以下の関係から計算した：

$$\text{TNC回収} = \text{陽性分画の全TNC} \div \text{未処理生成物の全TNC} \times 100\% \quad (\text{式8})$$

陽性分画中の生存CD34⁺細胞の総数は以下の関係から決定した：

$$\text{陽性分画中の全生存CD34}^+\text{細胞} =$$

$$\text{最終生成物のCD34}^+\text{細胞数} / \mu\text{L} \times 1000 \times \text{最終生成物体積 (mL)} \quad (\text{式9})$$

陽性分画のCD34⁺細胞回収は以下の関係から計算した：

$$\text{CD34}^+\text{細胞回収} =$$

陽性分画の全CD3 4⁺細胞÷未処理生成物全CD3 4⁺細胞×100% (式10)

【実施例6】

【0093】

実施例6：輸注に向けた選別CD3 4⁺細胞の準備

走化性造血幹細胞生成物のサンプルを取り出し、WBC数（フローサイトメトリーによる）、グラム染色および無菌性について分析した。

抗CD3 4および抗CD4 5抗体を用いる二重標識によるCD3 4^{bright}およびCD4 5^{dim}蛍光を特色とするフローサイトメトリー分析（Beckman Coulter, PN IM3 6 3 0）によって、CD3 4⁺細胞の性状を調べた。CD3 4⁺細胞およびCD4 5⁺細胞の生存率を死細胞（DNA挿入染料7-アミノアクチノマイシンD（7AAD）を取り込む）を排除することによって決定した。以下を参照されたい：Brocklebank AM, Sparrow RL. Cytometry. 2001; 46: 254-261; Barnett D, et al.. Br. J Haematol. 1999, 106:1059-1062; Sutherland, et al., J Hematotherapy 1996, 5:213-226; および米国特許4,520,110号、同4,859,582号、同5,055,556号；欧州特許76.695号；カナダ特許1,179,942号（PE, APC）；米国特許4,876,190号（PerCP）、米国特許5,268,486号、同5,486,616号、同5,569,587号、同5,569,766号、同5,627,027号（Cy）；米国特許4,714,680号、同4,965,204号、同5,035,994（CD3 4）；米国特許5,776,709号（溶解/無洗浄方法）；米国特許5,723,218号および同5,187,288号（Tru COUNT チューブ）（前記文献の各々の内容は参照により本明細書に含まれる）。 10

任意のサイトメーターまたは等価装置をCD3 4⁺細胞の一覧解析および生存率の分析の実施に用いることができる。ある実施態様では、BD FACSCalibur(商標)フローサイトメーターを処理室で利用し、さらに装置のセットアップおよびモニタリングにBD FACSComp(商標)ソフトを装置のセットアップおよびモニタリングに用いた。テンプレートおよび凡例標識一覧はデータ取得および解析のために予めインストールした。使用前に、試薬、すなわちCD4 5 FITC/CD3 4 PE、ステム-カウントフルオロスフェア、濃縮塩化アンモニウム溶解溶液および7AAD生存活性染料を室温に戻した。CD3 4⁺細胞コントロールを陽性コントロールとして使用し、装置がCD3 4⁺細胞の解析のためにセットアップされていることを確認し、結果を製造業者が予め決定したCD3 4パーセント範囲と比較した。 20

未処理骨髓生成物およびIsolex(商標)処理走化性造血幹細胞生成物を多くの異なる方法で分析することができる。ある実施態様では、例えばサンプルを受け取ると直ぐに、サンプルのWBC数が2×10⁷細胞/mLより高い場合、サンプルはシース（Sheath）液で希釈されて約2×10⁷ WBC/mLの細胞数が達成される。100 μLの希釈生成物を2本の15×100 mmチューブに分注する。マイクロピペットを用いて、20 μLのCD4 5 FITC/CD3 4 PEおよび7-AAD生存活性染料試薬を各チューブに添加し、サンプルを穏やかに渦攪拌する。チューブをアルミフویلで蓋をし、周囲温度で15から20分放置する。1.5 mLの1×溶解溶液を各チューブに添加してRBCを溶解し、穏やかに渦攪拌する。チューブを周囲温度で10分インキュベートし、遮光する。データ取得が実施されるまで、サンプルを約2℃から約8℃で（すなわち氷浴で）遮光しながら保存する。データ取得は、溶解緩衝液添加から1時間以内に実施されねばならない。データ取得前にステム-カウントフルオロスフェアを完全に逆さまにして（10回）再懸濁する。100 μLのフルオロスフェアを各チューブに添加し、気泡を生じないように注意しながら穏やかに渦攪拌する。生成物中のCD3 4⁺細胞の絶対数を以下の関係から計算する： 30

$$\text{生存CD3 4}^+\text{細胞数}/\mu\text{L生成物} = \text{LCD3 4} \times \text{FAC} \quad (\text{式11})$$

式中、LCD3 4は生存CD3 4⁺/全CD4 5⁺が生じる事象の平均数であり、“FAC”はフルオロスフェアアッセイ検出濃度であり、Fは計測されたフルオロスフェアシングレットの平均数である。 40

CD3 4⁺陽性分画の体積を計算して、要求される用量のために必要なCD3 4⁺細胞の数を得た。必要な陽性分画の体積（mL）は以下のように規定される：

$$\text{要求されるCD3 4}^+\text{細胞投与量} \div \text{全CD3 4}^+\text{細胞}/1 \mu\text{L陽性分画} \times 1000 \quad (\text{式} \quad 50$$

1 2)

適切な細胞数を50mLの円錐チューブに分配し、500gで10分遠心する。30mLの血清学用ピペットを用いて上清を取り出して廃棄物として廃棄し、一方、このプロセスの間にチューブの底の細胞ペレットを分散させないように注意した。輸液溶液(20mL)をこのCD34⁺細胞陽性分画に添加し、10mLの血清学用ピペットを用いピペッティングを繰り返して細胞を分散させた。再懸濁細胞を500gで10分遠心した。30mLの血清学用ピペットを用いて(細胞ペレットを乱すことなく)、上清/輸液溶液を50mLの円錐チューブに移し、“陽性分画上清”というラベルを添付した。上清を含むチューブを渦攪拌し溶液を均一にした。10mLの血清学用ピペットを用いて、この均一化した10mLの上清をCD34⁺細胞陽性分画チューブに戻した。上清チューブの残りの上清10mLを無菌試験に用いた(5mLをそれぞれTSB(トリプシン処理大豆ブロス)ボトルおよびFTM(チオグリコレート液)ボトルに加えた)。10mLシリンジ(輸液シリンジ)に結合させた先端が丸い針でゆっくりと数回CD34⁺細胞陽性分画中の細胞を出し入れして再懸濁した。この細胞懸濁物をシリンジに取り入れ、一切の気泡を吸引して除き、先端が丸い針を取り除いた。この輸液シリンジを4方向ストップコックの輸液口に結合させた。

10

本発明の走化性造血幹細胞生成物は、以下の基準が満たされた場合にのみ輸液のために放出された：

—CD34⁺細胞純度が少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%である；

—選択した陽性分画についてグラム染色の結果が陰性である；

20

—エンドトキシンレベルが約0.5エンドトキシンユニット/mL未満である；

—“走化性造血幹細胞生成物”の生存CD34⁺細胞収量が治療グループの必要な用量を満たす；

—CD34⁺細胞が7-AADによって少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%の生存率を示す；

—“陽性分画上清”のUSP無菌検査の結果が陰性である(14日後)；および

—骨髓CD34⁺細胞選別が骨髓採集の完了から約12時間から約24時間以内に開始された。

グラム染色およびエンドトキシンを含む、幹細胞生成物の無菌性判定は輸液のための生成物の放出前に実施された。USP無菌性(細菌および真菌)培養を実施し、結果は主要な研究員に報告された。USP無菌性の結果が陽性の事例では、当該対象者および待機の主治医に直ちに通報し、入手可能な時には当該生物の同定および感受性を提供し、さらに適切な抗微生物治療および治療結果の参考書類が調査現場およびスポンサーによって記録される。

30

これらの放出基準を満たした後、走化性造血幹細胞生成物を輸液のために放出し、さらにカテーテル挿入施設への輸送のために梱包した。サンプルもまたin vitro試験のために送られた。生成物は、CD34⁺細胞選別が骨髓採集の完了から約12時間から約24時間以内に開始された場合にのみ、さらにそれが骨髓採集の完了から約48時間から約72時間以内に輸液されえる場合にのみ放出された。

【実施例7】

40

【0094】

実施例7：CD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物の処方

走化性造血幹細胞生成物は、1%HSA(ヒトアルブミンUSP, Alpha, Cat# 521303) (“輸液溶液”) および少なくとも20%の自己由来血清を補充した10mLの生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム、注射用、USP, Hospira, Cat# 7983-09) 中で処方された。さらにまた、生成物の処理中に使用され残留したいくつかの微量物質(量は決定されていない)が、走化性造血幹細胞生成物に存在する。これらの物質には以下が含まれる：ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水(Ca⁺⁺、Mg⁺⁺非含有)(D-PBS)(Baxter, Cat# ED R9865)、クエン酸ナトリウム(Baxter/Fenwal, Cat# 4B7867)、ヘタスターチ(Abbott Laboratories, Cat# 0074-7248-03)、IVIg(Gammagard(商標) Immu

50

ne Globulin Intravenous, Baxter, Cat# 060384) およびIsolex(商標) 300i幹細胞試薬キット (Baxter, Cat# 4R9734) (抗CD34モノクローナル抗体、幹細胞遊離薬剤およびヒツジ抗マウス磁性ビーズを含む)。

【実施例8】

【0095】

実施例8：走化性造血幹細胞生成物のカテーテル挿入施設への輸送

放出基準を満たした走化性造血幹細胞生成物は、管理された無菌的環境（例えば最低限クラス100,000細胞処理施設（クラス10,000が好ましいが必要というわけではない））内に配置されたクラス100生物学的安全キャビネット中の無菌的な10ccシリンジにローディングされた。HASを補充した10mLのPBSに走化性造血幹細胞生成物を懸濁し、容器に放出基準にしたがってラベルを付した。臨床試験は、各グループ5人の対象者から成る4つの用量グループを含む。第一のグループは約 5×10^6 CD34⁺細胞を投与され、第二は約 10×10^6 CD34⁺細胞を、第三は約 20×10^6 CD34⁺細胞を、さらに第四は約 30×10^6 CD34⁺細胞を投与された。割り当てたグループの用量に合致するには不十分なCD34⁺細胞量をもつ群2-4の対象者は、その前のもっとも可能性が高いCD34⁺細胞用量のグループに加えられた。ローディングされた輸液シリンジを、フラッシュシリンジとともに4方向ストップコックに結合させて蓋をした（安全装置を適用して漏れを防いだ）デリバリー装置を二重無菌バッグ中に封印し、心臓カテーテル挿入施設への輸送のために堅牢な輸送ボックスに入れた。走化性造血幹細胞生成物の放出およびグループの割り当てに続いて、走化性造血幹細胞生成物をカテーテル挿入現場に輸送した。いくつかの実施態様では、走化性造血幹細胞生成物は、血管内に、すなわち梗塞関連動脈直接輸液によって投与された。いくつかの実施態様では、走化性造血幹細胞生成物は非経口的に心筋層に投与された。

【実施例9】

【0096】

実施例9：走化性造血幹細胞生成物の冠状動脈内輸液

走化性造血幹細胞生成物が輸液のために放出された細胞処理施設（上記参照）からの通知に際して、対象動物／患者は、走化性造血幹細胞生成物の到着に一致する時間にカテーテル挿入施設に到着するように予定が組まれた。

走化性造血幹細胞生成物の輸液直前に、心臓酵素（脳ナトリウム排泄増加ペプチド（BNP）、トロポニンおよびCPK MB）、全血球算定、全化学検査パネル（腎および肝機能検査）およびEKGを実施した。ニューヨーク心臓協会（NYHA）の機能分類システムによる心不全ステージの臨床評価が記録された。

走化性造血幹細胞生成物および輸液のための最終品質保証の通知（ファクシミリによる）を受け取ったときに、対象者に上記に詳述したように心カテーテル挿入を実施した。冠状動脈造影を実施して、梗塞関連動脈の開存性（開口状態、遮断からの解放を意味する）および心筋梗塞血栓崩壊（TIMI）血管造影流量について判定した。ステントを挿入した梗塞関連動脈部分にワイヤー越しにバルーンカテーテルを配置した。走化性造血幹細胞生成物輸液に適合する内径が約0.36mmの任意の適切なバルーン拡張カテーテルを用いることができる。適切な位置に配置した後、バルーンワイヤーを取り除いた。走化性造血幹細胞生成物デリバリー装置を輸送ケースから取り出した。

デリバリー装置は無菌バッグ内にあり、安全ブロックが輸液シリンジ（走化性造血幹細胞生成物を含む）およびフラッシュシリンジに結合されていた。前記装置は、輸液シリンジ（10mLの走化性造血幹細胞生成物を含む）およびフラッシュシリンジ（6mLのフラッシュ溶液を含む）から成り、前記両シリンジは無菌的な4方向ストップコックに結合されていた。デリバリー装置全体を穏やかに振って、輸液溶液中のCD34⁺細胞を再懸濁させた。フラッシュシリンジを用いて装置内の全気泡を排除し（空気塞栓症の予防のため）、続いてデリバリー装置をバルーン拡張カテーテルにストップコックを介して結合させた。

対象動物への輸液による走化性造血幹細胞生成物のデリバリーは以下のように実施された。第一に、フラッシュシリンジ（6mL溶液）とバルーンカテーテルの中央管腔との間で

ストップコックを開き、（安全装置を外した後で）カテーテルの中央内腔に1 mLのフラッシュ溶液を15秒かけて輸液した。第二に、冠状動脈内皮への損傷を回避するためにステント内でバルーンを2気圧で膨張させ、続いてストップコックバルブを調節し（安全装置を外した後で）膨張バルーンに対して遠位側に走化性造血幹細胞生成物を輸液する。バルーンを膨張させたままで、輸液シリンジから約3 ccから約4 ccを約30秒から約45秒（時間を測り、記載しておく）の時間をかけて手動で輸液した。合計して約2分から約3分（輸液の時間を含む）バルーンを膨張させたままにしてCD34⁺細胞の接着を可能にし、さらに液の逆流を防止する。輸液と輸液の間には、バルーンを3分間しばませて血流を回復させる（再灌流）。一般的には、輸液シリンジを空にするために3回の輸液が必要である。第三に、走化性造血幹細胞生成物の輸液が完了しバルーンをしばませたとき、ストップコックのバルブを調節して、フラッシュシリンジの液を輸液シリンジに充填した。最後に、バルーンを膨張させて（約2分から約3分）、4 mLのフラッシュ溶液（このときは輸液シリンジに存在する）を約30秒から約45秒の時間をかけて輸液し、一切の残留CD34⁺細胞をシリンジおよびカテーテルからIRA循環に追い出した。続いてカテーテルを取り除いた。

10

走化性造血幹細胞生成物の輸液後の最初の24時間に、輸液関連の虚血（不適切な血流）の判定を実施した。約12時間から約24時間のEKGおよび8時間毎に約24時間実施した心臓酵素（BNP、トロポニンおよびCPK MB）の化学分析を入手した。不整脈判定（24時間ホルターモニター）は、走化性造血幹細胞生成物の輸液後直ちに実施した。走化性造血幹細胞生成物の輸液後に対象者を退院させる前に、全体的および局所的左心室機能の評価のために日常的な経胸腔心エコー検査を実施した。

20

安全性評価のために追加される経過観察来院には、生成物投与から1週間および2週間の来院が含まれていた。来院時判定には、総合的な診療歴および健康診断、EGK、全血球算定、全化学検査パネル（腎および肝機能検査）、並びに血清心臓マーカー（BNP、トロポニンおよびCPK MB）の測定が含まれていた。NYHA機能クラスの臨床評価を第1週および第2週に記録した。

走化性造血幹細胞生成物の輸液から4週間後に、EKGおよび心臓酵素（BNP、トロポニンおよびCPK MB）を入手した。24時間ホルターモニターを用いて不整脈を判定した。NYHA機能クラスの臨床評価を第1週および第2週に記録した。症状限定ブルースプロトコルを用いる足踏み車運動試験も同様に実施した。

30

走化性造血幹細胞生成物の輸液から約3カ月および約6カ月後に、24時間ホルターモニターを実施した。NYHA機能クラスの臨床評価を記録した。走化性造血幹細胞生成物の輸液から約6カ月後に、ブルースプロトコルを用いる症状限定足踏み車運動試験を記録した。

走化性造血幹細胞生成物の輸液から約12カ月後の安全性評価には、総合的な診療歴および健康診断、EGK、全血球算定、全化学検査パネル（腎および肝機能検査）、並びに血清心臓マーカー（BNP、トロポニンおよびCPK MB）の測定が含まれる。24時間ホルターモニターを実施しNYHA機能クラスの臨床評価を記録する。

【0097】

統計分析：

40

いくつかの実施態様では、有対設計（この場合、各対象者はその者自身がコントロールとして機能する）を用いた。各対象者について治療前および治療後の相違を、数字で表示される4つの心機能（すなわち心筋収縮能力；収縮期終期体積；拡張期終期体積および灌流）の各々について分析した。直線回帰解析を用いて用量レベル増加の有意さを判定した。ゼロ仮説は、回帰直線の勾配はゼロに等しい（用量レベルは独立変数として機能し、“治療後”－“治療前”の差は非独立変数として機能する）ということである。偽のゼロ仮説を排斥する力は、用量と心機能改善との間の0.5という高い相関性に対して0.05アルファレベルの有意さで0.68である。回帰直線の勾配周辺の95%信頼区間を用いて、用量レベル増加における医学的有意さを判定した。回帰直線の勾配はゼロと有意には相違しないが、回帰直線の切片はゼロと異なる場合、全ての処置グループをひとまとめにし

50

、有対t検定を実施して全体的な治療の有効性を判定した。ゼロ仮説は、差の平均はゼロに等しいということである。

基準の臨床的及び身上調査的特徴を、連続変数についてはスチューデントt検定をおよび絶対変数については χ^2 乗検定を用いて治療グループによって比較した。不利な現象についての偶発率は χ^2 乗検定を用いて治療グループ間で比較した。有効性の測定のために、心機能および局所心筋灌流における基準から6カ月経過観察までの対毎の差を、スチューデントt検定を用いて治療グループとコントロールグループ間で比較した。治療グループによる有効性変数の分布をボックスプロットグラフで調べた。post-hoc解析で、治療応答における用量閾値の影響を、コントロールと5百万細胞グループの対象者をひとまとめにして、それらを1千万および1千5百万細胞グループの対象者とスチューデントt検定を用いて比較することによって調べた。さらにまた、結果の測定に対する細胞の特徴の影響を調べた。問題の変数の対の各々について、Pearsonプロダクト-モーメント相関係数(r)を対応するp-値とともに計算した。

10

テールdsttを用いてゼロ仮説を試験するために、タイプ1(アルファ)誤差を0.05に設定した。二次エンドポイントの解析は性質として実地調査的であるので、報告されたアルファ誤差に対して、多数の比較のための調整を実施しなかった。いずれの分析変数における数値の消失についてもその帰属を詮索せず、試験から取り除いた患者は取り除いた時点で削除した。全ての統計プログラムおよび解析はSASバージョン9.1(Carey, North Carolina)を用いて実施した。

適格性を有するがCD34⁺細胞を投与されなかった併存グループ(非治療コントロール)を治療グループと同様に評価し、心機能/灌流における有意な改善について判定した。各試験現場では治療および非治療コントロールの発生を交互に入れ換えた。コインの裏表を用いて、最初の(治療または非治療)対象者を各現場で決定した。治療グループと非治療グループ間で結果を比較した。中核研究室は治療または非治療に関して情報を提供されなかった。

20

臨床成果と細胞含有量(CD34⁺)および/またはin vitroコロニー増殖(CFU-GM、CFU-GEMM、BFU-E)、CXCR-4運動性、およびCXCR-4および/またはVEGF表面抗原の発現との間に相関性が存在するか否かを決定するために、査定を実施した(図4および下記考察を参照されたい)。

計画にしたがって、総数20名の対象者に本発明の走化性造血幹細胞生成物を投与した。4つの用量グループ(約 5×10^6 、約 10×10^6 、約 20×10^6 、約 30×10^6 のCD34⁺細胞)が存在するはずであった。いずれかの対象者の走化性造血幹細胞生成物の含有量が割り当てグループに対して十分ではない場合には、当該対象者はその前のもっとも可能性が高い用量のグループに再度割り当てた。輸液で入手できるCD34⁺細胞が 5×10^6 よりも少ない対象者は試験から除外され、反復カテーテル挿入を受けず、20人の対象者の試験グループの部分として数えなかった。さらにまた、本発明の走化性造血幹細胞生成物が放出基準を満たさなかった場合、対象者は当該細胞生成物を投与されず、試験の候補者として数えられず、その次の対象者に置き換えられた。任意の用量グループで、対象者が、(おそらく)当該細胞生成物の輸液の結果と考えられる急性の(輸液直後から約7日を意味する)予想されない毒性を示した場合、用量増加を停止し、3人の追加の対象者を当該用量レベルに加えた。他の予想しない毒性が認められなかった場合は、用量増加を再開させたが、20人の対象者の総数を越えることはなかった。別の毒性が当該用量レベルで生じた場合、その後の対象者はいずれもその下の用量レベルに加えた。

30

40

本発明の走化性造血幹細胞生成物は、その前の用量グループの対象者の全員が生成物投与後2週間の経過観察判定を終了するまで、より高い用量グループのいずれの対象者にも投与されなかった。

【実施例10】

【0098】

実施例10：予備試験の実験結果

一連の予備的前臨床試験を以下の目標を達成するために実施した：

50

- (1) ミニ骨髄採集 (MMH) のための製造プロセスの最適化；
 (2) 持ち込まれるMMH生成物および使用現場に送られる造血細胞生成物の安定性の評価；
 (3) カテーテルの許容内径および安全性の評価；
 (4) 試験に用いようとするカテーテルと細胞生成物との適合性の評価；
 (5) 安定性検査に最終造血細胞生成物の見本として最終造血細胞生成物の上清を使用することの適格性の評価。

試験1：ミニ骨髄採集 (MMH) のための製造プロセスの最適化

典型的な骨髄生成物から採集される生存活性を有するCD34細胞の収量における重要な製造変数の影響を評価した。総数6名の45歳以上（45－57歳の範囲）および3人の30歳未満（21－28歳の範囲）の志願ドナーが、平均45mL（31mL－54mLの範囲）の骨髄提供に同意し、手順について書面によるインフォームドコンセントを提供した。用いた骨髄吸引技術は臨床スケールのMMH（上記実施例3を参照されたい）で実施したものと同一であった。表2に示すように、志願ドナーから収集したミニ骨髄採集（“MMH”）由来細胞の有核（NC）およびCD34+細胞の細胞数は年齢と関係を有するようであった。

【0099】

表2：MMHの有核細胞収量におけるドナーの年齢の影響

ドナー	ドナー年齢グループ					
	45歳以上（45－57）			30歳未満（23－28）		
	MMHの 体積(mL)	生存率 (%)	CD34細胞 (10^5 /細胞)	MMHの 体積(mL)	生存率 (%)	CD34細胞 (10^5 /細胞)
1	31.30	83.85	1.27	48.00	96.90	7.98
2	43.50	97.42	3.89	50.60	96.28	11.60
3	51.50	85.74	1.37	39.90	87.17	5.99
4	47.50	80.95	1.76	—	—	—
5	53.70	98.21	5.58	—	—	—
6	44.90	96.36	4.48	—	—	—
平均	45.40	90.42	3.06	46.17	93.45	8.52

【0100】

年長ドナー（N=6）由来の骨髄生成物の平均細胞数は、1mL当たり有核細胞 28.4×10^6 （ 15.8×10^6 － 49.5×10^6 の範囲）（“NC/mL”）であり、平均生存率は7-AAD染料排除およびフローサイトメトリーにより決定したとき90.42%（80.95%－98.21%の範囲）で、CD34+の含有量は 3.06×10^5 /mL（ 1.27×10^5 /mL－ 5.58×10^5 /mLの範囲）であった。若年対象者のグループ（N=3）では、骨髄吸引から収集された平均細胞数は 46.2×10^6 NC/mL（ 39.9×10^6 NC/mL－ 50.6×10^6 NC/mLの範囲）であり、平均7-AAD生存率は93.5%（87.17%－96.90%の範囲）で、全CD34+の含有量は 8.5×10^5 /mL（ 5.99×10^5 CD34+細胞/mL－ 5.58×10^5 CD34+細胞/mLの範囲）であった。

赤血球完全除去およびCD34選別

【0101】

表3：年長グループ（45－57）ドナー由来MMHのRBC完全除去後のCD34+細胞の回収

	ドナー					
	1	2	3	4	5	平均
RBC完全除去の方法	ヘタスターチ	バッフィーコート	バッフィーコート	バッフィーコート	バッフィーコート	—
MMHのCD34 ⁺ 細胞(%) : RBC完全除去前	1.09	1.64	1.63	1.45	1.99	1.58
MMHのCD34 ⁺ 細胞(%) : RBC完全除去後	1.33	1.55	1.51	1.61	1.84	1.57
RBC完全除去後のCD34 ⁺ 細胞回収 (%)	65.68	92.36	80.66	78.79	81.67	79.83

10

【0102】

表3に示すように、年長のドナーから収集したMMH由来骨髓生成物の赤血球の完全除去後に、最初のMMHに由来するCD34細胞の平均79.83%（65.68%—92.36%の範囲）が回収された。最初のCD34細胞純度（1.58%、1.09%—1.99%の範囲）と赤血球完全除去後のそれ（1.57%、1.33%—1.84%の範囲）との間に有意

20

走化性定量のためのアッセイ方法

CXCR-4によって媒介されるCD34⁺細胞のin vitro遊走活性の測定に用いられるアッセイ（文献（Jo et al., J Clin Invest, 2000, 105:101-111）に記載されたアッセイの改案である）は、CD34⁺細胞のトランスメンブレン遊走を基にしている。トランスウェルポリスチレンプレート（直径6.5mm、孔サイズ5μm、Costar）の上部小室から下部小室へのCD34⁺細胞のトランスメンブレン遊走は下部小室に置いたSDF-1によって誘発される。下部小室の生存活性を有する遊走CD34⁺細胞の数はCD34/CD45抗体および7-AADを用いるフローサイトメトリー分析によって決定される。CD34⁺細胞の偶発的遊走コントロールは、SDF-1を下部小室に置かずに実施される。

30

【0103】

表4：年長グループ（45歳—57歳）ドナー由来MMHのIsolex処理直後のCD34⁺細胞回収、純度、CXCR-4遊走活性、生存率および造血細胞CFUの増殖

	ドナー					
	1	2	3	4	5	平均
4—8℃での貯蔵時間	0	0	0	12	10.50	—
CD34 ⁺ 細胞回収(%)	32.36	29.09	15.31	43.60	40.20	32.11
CD34 ⁺ 細胞純度(%)	76.76	73.64	71.66	72.52	72.01	73.32
CD34 ⁺ 細胞生存率	98.49	93.80	97.38	98.28	98.39	97.27
CD34 ⁺ 細胞CXCR-4媒介遊走活性(%)	22.10	2.60	22.00	19.90	19.70	17.26
造血細胞CFU/100培養CF34 ⁺ 細胞	27.5	25.0	18.9	17.0	21.00	21.9

40

【0104】

表4に示すように、Isolexシステム（前記システムは免疫磁性Dynabeads(商標)および抗CD34mAbを含む）を用いたCD34選別の後で、平均32.11%（15.31%—43.60%の範囲）のCD34細胞が回収され、平均純度は73.32%（71.66%—73.64%の範囲）で平均生存率は97.27%（93.80%—98.49%の範囲）であっ

50

た。さらにまた、これらのCD3⁺4⁺細胞は、選別直後に平均して17.26%（2.60%－22.10%の範囲）のCXCR-4遊走活性を示し、さらにMethoCult培養で造血細胞コロニーを形成することができた（21.89コロニー/プレート100CD3⁺4⁺細胞（17.0コロニー/プレート100CD3⁺4⁺細胞－27.5コロニー/プレート100CD3⁺4⁺細胞））。

【0105】

試験2：持ち込まれるミニ骨髓採集物および使用現場に送られる走化性造血細胞生成物の安定性の評価

持ち込まれるMMHおよび使用現場に送られる本発明の走化性造血幹細胞生成物の安定性の評価のために、健常な志願者を用い一連の実験を実施した。持ち込まれる生成物および使用現場に送られる生成物の機能的な生存活性の判定を、細胞生存率（7-AAD）、SDF-1/CXCR-4媒介CD3⁺4⁺細胞遊走、およびメチルセルロース中で造血細胞コロニーを形成する能力（CFUコロニー形成能）によって評価した。

10

輸送およびロジスティックな目的のため並びに臨床スケジュールとの調整のために、持ち込まれる生成物の安定性を評価するために、MMH生成物を表示のように4℃または8℃で保存した。輸送およびロジスティックな目的のために、使用現場に送られる生成物の安定性を評価するために、MMHに続いて濃縮した単離CD3⁺4⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物を表示のように4℃または8℃で保存した。

予備的試験では、細胞を直ちに処理するか、または処理前に4－8℃で12時間維持して、輸液に適した細胞生成物の製造における輸送およびロジスティック期間の影響を評価した。処理前の貯蔵期間（持ち込まれる生成物の期限の満了）にかかわらず、結果は有意には変動しなかった（データは示されていない）。

20

別の実験シリーズでは、MMHに続いてそれぞれ約36時間および約48時間で輸液される生成物をシミュレートするために、再判定の前12時間および24時間の間約4℃から約8℃で細胞を貯蔵した。

【0106】

表5：MMHのIsolex処理から13－13.5時間後のCD3⁺4⁺細胞の生存率、増殖およびCXCR-4遊走活性

	ドナー		
	1	2	平均
CD34 ⁺ 細胞生存率 (%)	97.59	96.90	97.24
CD34 ⁺ 細胞CXCR-4遊走活性 (%)	7.70	7.50	7.60
造血細胞CFU/培養100CD34 ⁺ 細胞	18.00	25.00	21.5

30

【0107】

表5に示すように、走化性造血幹細胞生成物の単離CD3⁺4⁺細胞は、97.24%（96.90%－97.59%の範囲）の平均生存率および7.60%（7.50%－7.70%の範囲）の平均CXCR-4媒介遊走能力を有していた。表6に示すように、平均26.3時間（26.0時間－26.5時間の範囲）の貯蔵後、これらの細胞は、96.81%（96.39%－97.22%の範囲）の平均生存率および4.75%（4.50%－5.00%の範囲）の平均CXCR-4媒介遊走能力を有していた。さらにまた、これらの細胞はなおin vitroで造血細胞コロニーを形成するそれらの能力を維持していた。

40

【0108】

表6：MMHのIsolex処理から26.0－26.5時間後のCD3⁺4⁺細胞の生存率、増殖およびCXCR-4遊走活性

	ドナー		
	1	2	平均
CD34 ⁺ 細胞生存率 (%)	97.22	96.39	96.81
CD34 ⁺ 細胞CXCR-4遊走活性 (%)	4.50	5.00	4.75
造血細胞CFU/培養100CD34 ⁺ 細胞	28.00	14.00	21.00

【0109】

したがって、CD34⁺細胞の選別から平均13.3時間後（MMH後26.0－26.5時間を表す）、CD34⁺細胞集団は97.24%の平均生存率（96.90%－97.59%の範囲）を有し、7.60%（7.50%－7.70%の範囲）の平均CXCR-4媒介遊走活性を示した。MMHから平均26.3時間（26.0時間－26.5時間の範囲）後に、細胞の平均生存率は96.81%（96.39%－97.2%の範囲）で、4.75%（4.50%－5.00%の範囲）の平均CXCR-4媒介遊走能力を維持していた。

10

この生成物を含む本発明の組成物の処方は、MMH収集から平均8時間後（8.63±1.80、N=4）に実施され、輸液はMMHから24時間以内に実施された。

その後の実験では、4つのMMH生成物（A－D）を収集し、CD34⁺細胞をIsolex工程によって単離する前に平均12.8時間（12.5時間－13時間の範囲）、4℃で貯蔵した。このグループ（“当日12時間”グループを表す：生成物は約12時間の当日内に処方されたことを意味する）を、MMH採集から“24時間”（22.9時間±1.63、N=4）、“33時間”（33.38時間±1.11、N=2）、“48時間”（48.33時間±0.82、N=4）後の当日外機能的生存活性に対して評価した。データ（表7－9に要約されている）は、濃縮CD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物は、MMHの後で（1）高い生存率（平均生存率は90.0%を超える、表7）、（2）それらのSDF-1/CXCR-4媒介遊走能力の76.85%（±21.66）（表8）、および（3）in vitroで造血細胞コロニーを形成する能力（表9）をそれぞれ維持することを示している。

20

【0110】

表7：MMH後の時間の関数としてのCD34⁺細胞の生存率：12時間当日および48時間当日外（全ての時点はMMHの完了から測定）

MMH後の時間(SD)	CD34 ⁺ 細胞				
	A	B	C	D	平均 (SD)
	98.22	97.13	97.60	99.00	97.99 (0.29)
24	95.32	97.76	—	—	96.54 (1.73)
33	91.92	96.32	95.90	80.00	91.04 (7.62)

30

【0111】

表8は、MMH後の時間（12時間当日および48時間当日外（全ての時点はMMHの完了から測定））の関数としてのSDF-1/CXCR-4媒介CD34⁺細胞遊走（%遊走CD34⁺細胞）を示す。CD34⁺細胞の遊走能力に対するMMH後の時間の影響を決定する目的のために、時点“X”は参照点と考えた。なぜならば、これは、完成された処方物として細胞が対象者に戻されると合理的に予想できるMMH後のもっとも早い時点を表していると決定されたからである。その後の時点（Y=33時間、Z=48時）の残存する遊走活性は、24時間（X）の時点の後に残存するパーセント遊走活性として計算された。

40

【0112】

表8：MMH後の時間の関数としてのSDF-1/CXCR-4媒介CD34⁺細胞遊走（%遊走CD34⁺細胞）：12時間当日および48時間当日外（全ての時点はMMHの完了から測定）

MMH後の時間 (h)	遊走CD34 ⁺ 細胞 (%)				
	A	B	C7	D	平均 (SD)
24 (X)	20.00	18.50	21.50	36.00	24 (8.09)
% 残存	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00 (0)
33 (Y)	21.80	10.50	—	-	16.15 (7.99)
*% 残存	109.00	56.76	—	-	82.88 (36.94)
48 (Z)	8.80	17.00	17.50	31.00	18.58 (9.19)
@% 残存	44.00	91.89	81.40	86.00	75.85 (21.66)

$$* = (Y \div X) \times 100\%$$

$$@ = (Z \div X) \times 100\%$$

10

表9は、MMH後の時間（12時間当日および48時間当日外（全ての時点はMMHの完了から測定））の関数としての、プレートされた100個の生存活性を有するCD34⁺細胞当たりのコロニー形成ユニット（CFU）の数を示す。

【0113】

表9：プレートされた100個の生存活性を有するCD34⁺細胞当たりのMMH後の時間の関数としてのコロニー形成ユニット（CFU）数

MMH後の時間 (h)	プレートされた生存活性を有する100個の CD34 ⁺ 細胞当たりのCFU数				
	A	B	C	D	平均 (SD)
24	13.00	30.00	37.00	39.00	29.75 (11.81)
33	12.00	34.00	—	—	23.00 (15.56)
48	15.00	30.00	20.00	8.00	28.25 (14.57)

20

【0114】

それぞれ12時間（当日）および48時間（当日外）（12/48）のCD34⁺細胞を含む本発明の走化性造血幹細胞生成物の当日および当日外安定性パラメーターの両方を、それぞれ24時間（当日）および72時間（当日外）（24/72）に延長するために、CD34細胞をMMH採集から約12時間後（12時間当日）およびMMH採集から約24時間後（24時間当日）に精製し、MMHから検査／予想輸液時間まで合計時間約48時間および72時間で機能的生存活性について分析した（それぞれ48時間当日外および72時間当日外）。具体的には、本発明の2つのMMH/走化性造血幹細胞生成物の機能的生存活性の特徴を48時間および72時間に評価した。さらに、得られた結果を以前の12/48時点で得られら同じ指標と比較した（表7-9）。

30

表10-12は、33時間（32.5時間±0.71、N=2）、48時間（49時間の1データポイントによる）、および72時間（72.5時間±0.71、N=2）において、本発明の走化性造血幹細胞生成物の単離CD34⁺細胞は、（1）90%を超える生存率（表10）、（2）それらのSDF-1/VEGF/CXCR-4媒介遊走能の102.19±32.69%（表11）、および（3）in vitroで造血細胞コロニーを形成するそれらの能力（表12）を維持していた。

【0115】

40

表10：MMH後の時間関数としてのCD34⁺細胞生存率：24時間当日および72時間当日外（全ての時点はMMHの完了から測定）

MMH後の時間 (h)	CD34 ⁺ 細胞生存率 (%)		
	A	B	平均 (SD)
33	98.00	99.00	98.50 (0.71)
48	—	97.00	97.00 (—)
72	91.00	97.00	94.00 (4.24)

【0116】

50

表 1 1 : SDF- 1 /CXCR- 4 媒介CD 3 4⁺細胞遊走 (MMH後の時間の関数としての遊走CD 3 4⁺細胞集団の%) : 2 4 時間当日および7 2 時間当日外 (全ての時点はMMHの完了から測定)

MMH後の 時間 (h) (SD)	遊走CD34 ⁺ 細胞 (%)		
	A	B	平均 (範囲)
33	8.20	14.05	11.13 (2.93)
%残存	100.00	100.00	100.00 (0.00)
48	—	18.61	18.61 (—)
%残存	—	132.46	132.46 (—)
72	5.70	18.95	12.33 (6.63)
%残存	69.51	134.88	102.19 (32.69)

10

【0 1 1 7】

表 1 1 の%残存比は上記の表 8 のように決定した。

【0 1 1 8】

表 1 2 : プレートされた1 0 0 個の生存活性を有するCD 3 4⁺細胞当たりのMMH後の時間の関数としてのCFUの数 : 2 4 時間当日および7 2 時間当日外 (全ての時点はMMHの完了から測定)

MMH後の 時間(h) (SD)	プレートされた100個の生存活性を有するCD34 ⁺ 細胞当たりのCFU数		
	A	B	平均 (範囲)
33	26.00	28.50	22.25 (1.25)
48	—	16.80	16.80 (—)
72	14.50	27.50	21.00 (6.5)

20

【0 1 1 9】

MMH後8時間 (8.6時間±1.80、N=4)、12時間 (12.87時間±1.92、N=4)、32時間 (33.5時間の1時点)、48時間 (47.50時間±2.5、N=2) および72時間 (71.5時間±0.50、N=2) の本発明の単離CD 3 4⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物 (“臨床生成物”) の機能的生存活性パラメーターの更なる評価は、72時間後に (1) その生存率 (表 1 3)、(2) SDF- 1 /CXCR- 4 媒介遊走能 (表 1 4) および (3) in vitroで造血細胞コロニーを形成する能力 (表 1 5) を24時間の時点と同等に維持することを示している。

30

【0 1 2 0】

表 1 3 : 臨床生成物におけるMMH後の時間関数としてのCD 3 4⁺細胞生存率

MMH後の 時間(h) (SD)	CD34 ⁺ 細胞生存率 (%)				
	A	B	C	D	平均 (SD)
8	98.30	99.08	90.00	96.45	95.96 (4.12)
12	98.89	96.96	99.00	99.43	98.57 (1.10)
33	—	93.42	—	-	93.42
48	—	93.15	91.58	—	92.37 (1.11)
72	—	91.25	89.25	—	90.30 (1.48)

40

【0 1 2 1】

表 1 4 : 臨床生成物のSDF- 1 /CXCR- 4 媒介CD 3 4⁺細胞遊走 (MMH後の時間の関数としての遊走CD 3 4⁺細胞%)

MMH後の時間 (h)	遊走CD34 ⁺ 細胞 (%)				
	A	B	C	D	平均 (SD)
12 (X)	14.31	13.08	9.74	31.73	17.97 (11.34)
%残存	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0 (0)
33 (Y)	—	6.17	—	—	6.17
*%残存	—	47.17	—	—	47.17
48 (Y)	—	4.88	8.21	—	6.55 (2.35)
*%残存	—	37.30	84.29	—	60.79 (23.49)
72 (Y)	—	3.7	6.6	—	5.15 (2.05)
*%残存	—	28.29	21.19	-	24.74 (3.55)

10

$$* = (Y \div X) \times 100\%$$

全ての残存比は上記の表8のように計算した。

【0122】

表15：臨床生成物におけるプレートされた100個の生存活性を有するCD34⁺細胞当たりのMMH後の時間の関数としてのCFUの数

MMH後の時間 (h)	プレートされた生存活性を有する100個の CD34 ⁺ 細胞当たりのCFU数				
	A	B	C	D	平均 (SD)
12.	98.14	33.30	24.00	22.50	44.49 (36.09)
33	—	16.50	—	—	16.5
48	—	19.56	20.50	—	20.03 (0.66)
72	—	20.45	21.19	—	20.82 (1.10)

20

【0123】

これらのデータに基づけば、本発明のCD34⁺細胞の臨床生成物のために当日から24時間（12時間から）および当日外から72時間（48時間から）への延長は正当化される。

図1は、72時間における本発明の走化性造血細胞生成物の機能的生存活性が、48時間で評価された同じ指標と同等であることを示している。

30

試験3：カテーテルの安全性

有能CD34⁺細胞を含む本発明の走化性造血細胞生成物の生存率および潜在的有効性は、それらがカテーテルを通過するときにそれらの潜在能力を維持している細胞に依存する。本発明の方法で用いられるカテーテルは少なくとも0.36mmの内径を有する。少なくとも0.36mmの内径を有するいずれのタイプのカテーテルも、本発明の医薬組成物のデリバリーに有効でありえる。

ある実施態様では、カテーテルはバルーンカテーテルである。バルーンカテーテルの安全性試験を実施して、高い細胞濃度および反復灌流が、細胞生存率、細胞回収またはカテーテルの完全性に悪影響を与えるか否かを決定した。適切な数の細胞を入手するために非動員性末梢血プロジェニターを用いて分析を実施した。選別CD34⁺細胞を含む本発明の細胞生成物をIRAから輸液することについてカテーテルを査定した。検査した内径が0.36mmのカテーテルのいずれも、選別CD34⁺細胞の生存率、培養における増殖、またはCXC R-4アッセイでの運動性に悪影響を与えなかった。

40

【0124】

表16：カテーテルによる輸液の前後におけるCD34⁺細胞の生存率

カテーテル	条件	生存率 (%)				
		1	2	3	4	5
—	輸液前	81.45				
Raptor	1回目の輸液後	84.29	70.94	87.89	88.02	84.68
	2回目の輸液後	83.00	87.44	86.39	79.91	83.18
Sprinter	1回目の輸液後	93.39	91.09	84.13	88.28	81.68
	2回目の輸液後	91.89	91.08	84.88	77.65	77.73
Voyager	1回目の輸液後	94.21	86.21	83.08	77.53	69.68
	2回目の輸液後	88.03	84.71	79.27	78.11	76.80
Maverick	1回目の輸液後	90.00	89.76	90.79	85.49	81.31
	2回目の輸液後	90.94	87.38	81.98	80.09	85.47

10

【0125】

表16に示したように、検査した全てのカテーテルで、平均CD3⁺4⁺細胞生存率はカテーテルを通過した後70%かまたは70%を越えていた。

CD3⁺4⁺細胞生成物の輸液は用いたカテーテルの安全性を損なうものではなく、細胞生成物の有意な部分がカテーテルの内壁に付着しないことを示すために、臨床で用いられる濃度よりも相当に高い細胞濃度を有するCD3⁺4⁺細胞生成物を繰り返し輸液してカテーテルを試した。4銘柄のカテーテル（Sprinter、Voyager、MaverickおよびRaptor）を、各タイプにつき5つのカテーテルを用いて評価した。分析を実施するために非動員性アフェレーシス生成物を用いて分析を実施した。臨床試験のために治療用量として予定される用量より3倍高い細胞濃度（すなわち10mLの輸液溶液中にCD3⁺4⁺細胞を含む 1.6×10^6 の有核細胞）を各カテーテルに2回通過させた。カテーテル通過後の平均CD3⁺4⁺細胞回収は100.59%（76.99%から228.70%の範囲）であった。

20

有核細胞による2回の灌流後に、メチレンブルー色素漏出検査を用いて完全性について20本のカテーテルの全てを検査した。漏出の証拠はなく、接触点およびカテーテルチップは精査時に正常であった。

表17aおよび17bに示すように、カテーテルから細胞を灌流させることによる細胞への影響は、これら検査したカテーテル間で、カテーテルの型および構造と無関係のようであり、さらに、処理前および／またはCD3⁺4⁺細胞選別後および灌流前に細胞を貯蔵した時間とも無関係であり、カテーテルに灌流させたCD3⁺4⁺細胞の96.0%（80.8%—102.2%の範囲）（表17b）およびCD4⁺5⁺細胞の86.36%の平均回収を含む最終処方物がもたらされた。さらにまた、細胞の平均生存率は96.5%（92.5%—98.6%、N=16）であり、細胞は、CXCR-4遊走能力（データは示されていない）および、メチルセルロース中で造血細胞コロニーを形成するそれらの能力（播種された100個の細胞当たり平均25.8CFU（21.0%—30.5%の範囲））を維持した。

30

【0126】

【表 1】

表 17a : カテーテルによる輸液後の CD45 細胞の回収および生存率

カテーテル	条件	1		2		3		4		5		平均	
		回収 ^a	生存率 の減少 ^b	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少
Raport	1 回目輸液後	69.68%	-1.35%	78.67%	2.08%	72.14%	-4.55%	80.54%	1.83%	73.21%	-2.13%	74.85% (30.83%)	-0.82% (2.53%)
	2 回目輸液後	97.91%	-8.55%	81.84%	-4.76%	142.98%	3.28%	107.82%	-8.48%	94.08%	0.08%	104.93% (47.60%)	-3.69% (4.94%)
Sprinter	1 回目輸液後	76.74%	-0.60%	68.56%	4.01%	72.63%	5.29%	73.61%	6.06%	66.83%	8.31%	71.67% (29.48%)	4.61% (3.51%)
	2 回目輸液後	78.82%	2.86%	85.40%	0.98%	90.29%	-1.02%	82.22%	6.50%	91.61%	0.00%	85.67% (35.30%)	1.86% (2.76%)
Voyager	1 回目輸液後	87.38%	1.58%	83.93%	-0.36%	103.58%	0.93%	95.82%	4.52%	131.55%	-4.39%	100.45 (44.39%)	0.46% (2.91%)
	2 回目輸液後	82.70%	7.01%	69.34%	15.90%	69.54%	10.40%	89.04%	0.27%	69.03%	7.50%	75.93% (32.11%)	8.22% (6.09%)
Maverick	1 回目輸液後	73.97%	1.58%	87.01%	0.42%	78.31%	0.69%	75.53%	2.61%	77.22%	2.95%	78.41% (32.33%)	1.65% (1.21%)
	2 回目輸液後	152.35%	-5.06%	73.44%	2.78%	80.85%	-3.92%	97.10%	-2.97%	91.11%	-2.07%	98.97% (49.11%)	-2.25% (2.85%)
全カテーテルの平均												86.36%	1.26%

^a CD45⁺細胞の回収 = (輸液後の CD45 細胞の数 ÷ 輸液前の CD45 細胞の数) × 100%^b CD45⁺細胞の生存率の減少 = [1 - (輸液後の CD45⁺細胞の生存率 ÷ 輸液前の CD45⁺細胞の生存率)] × 100%

【表 2】

表 17b : カテーテルによる輸液後の CD34 細胞の回収および生存率

カテーテル	条件	1		2		3		4		5		平均	
		回収 ^a	生存率 の減少 ^b	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少	回収	生存率 の減少
Rapor	1 回目輸液後	116.49%	-3.48%	121.62%	12.91%	110.89%	-7.91%	97.55%	-8.06%	96.14%	-3.97%	108.54% (45.46%)	-2.10% (7.79%)
	2 回目輸液後	91.66%	1.53%	85.18%	-23.26%	122.47%	1.71%	111.33%	9.21%	98.96%	1.78%	101.92% (43.73%)	-1.81% (11.14%)
Sprinter	1 回目輸液後	89.19%	-14.66%	83.34%	-11.83%	102.72%	-3.29%	84.57%	-8.39%	88.65%	-0.28%	89.69% (37.26%)	-7.69% (6.16%)
	2 回目輸液後	103.52%	1.61%	99.82%	0.01%	82.11%	-0.89%	114.87%	12.05%	100.45%	4.84%	100.15% (42.22%)	3.52% (4.90%)
Voyager	1 回目輸液後	81.02%	-15.67%	96.08%	-5.84%	90.16%	-2.00%	82.73%	4.82%	89.32%	14.46%	87.86% (36.28%)	-0.85% (10.13%)
	2 回目輸液後	106.48%	6.56%	81.66%	1.74%	95.04%	4.58%	94.81%	-0.75%	91.01%	-10.23%	93.80% (39.12%)	0.38% (5.86%)
Maverick	1 回目輸液後	76.99%	-10.50%	101.79%	-10.21%	98.62%	-11.46%	112.58%	-4.96%	96.05%	0.18%	97.21% (41.34%)	-7.39% (5.34%)
	2 回目輸液後	228.70%	-1.05%	88.66%	2.65%	103.35%	9.70%	89.35%	6.31%	117.63%	-5.12%	125.54% (73.48%)	2.50% (5.33%)
全カテーテルの平均												100.59%	-1.68%

^a CD34⁺細胞の回収 = (輸液後の CD34 細胞の数 ÷ 輸液前の CD34 細胞の数) × 100%^b CD34⁺細胞の生存率の減少 = [1 - (輸液後の CD34⁺細胞の生存率 % ÷ 輸液前の CD34⁺細胞の生存率 %)] × 100%

【0128】

総合すれば、これらの実験は、CD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物の少なくと

10

20

30

40

50

も約0.36mmの内径を有する心カテーテルの連続通過は、カテーテルの完全性またはCD34⁺細胞の能力（すなわちCD34⁺細胞生存率、CFUコロニー増殖またはCD34⁺細胞CXC R+媒介遊走能力／運動性）に悪影響を与えないことを示している。

【0129】

試験4：細胞生成物とカテーテルの適合性

CD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物と前記細胞生成物のデリバリーのためにこの試験で用いることができる各カテーテルとの適合性をさらに検査するために、各カテーテルタイプを何度か通過させた後で細胞生成物を検査し、治療プロトコル中に予想されるストレス条件よりもさらに厳しい条件による影響を評価した。

MMH採集から48時間後に、個々のドナーから入手した約 5.73×10^6 CD34⁺細胞から約 21.10×10^6 CD34⁺細胞の範囲を含む走化性造血幹細胞生成物を、3つのカテーテル（Sprinter、VoyagerまたはMaverick）（各ドナーに対し同じ銘柄で1つのタイプのカテーテル）に連続して通過させ、この細胞生成物をCD34⁺細胞の回収、コロニー形成および生存率について査定した。

表18に示すように、検査した3つ全てのカテーテルについて生存活性を有するコロニー形成細胞が全実験で回収された（細胞回収99%、99%および106%）。

【0130】

表18：カテーテルの連続輸液後のCD34⁺細胞回収および無菌性

条件	パラメーター	使用カテーテル		
		Sprinter	Voyager	Maverick
輸液前	CD34 ⁺ 細胞収量	9.72×10^6	2.11×10^7	5.73×10^6
1回目カテーテル	CD34 ⁺ 細胞回収	111%	103%	99%
2回目カテーテル	CD34 ⁺ 細胞回収	94%	104%	97%
3回目カテーテル	CD34 ⁺ 細胞回収	99%	99%	106%
	無菌性（好気性及び嫌気性微生物）	陰性	陰性	陰性

【0131】

表19に示すように、3回目のカテーテル通過後のCD34⁺細胞の平均生存率は、輸液前の細胞生成物の96.01%（94.18%－97.93%の範囲）に対して94.000%（93.55%－94.40%の範囲）であった。

【0132】

表19：カテーテルの連続輸液後のCD34⁺細胞生存率

条件	CD34 ⁺ 細胞生存率			
	Sprinter	Voyager	Maverick	平均
輸液前	94.18%	95.91%	97.93%	96.01%
1回目のカテーテル後	94.73%	96.31%	95.45%	95.50%
2回目のカテーテル後	95.34%	95.72%	95.01%	95.36%
3回目のカテーテル後	93.55%	94.40%	94.04%	94.00%

【0133】

表20に示すように、3回目のカテーテル通過後のCD34⁺細胞に由来するコロニー形成ユニット（CFU）増殖は、輸液生成物（すなわちCD34⁺細胞を含む輸液される走化性造血幹細胞生成物）の95.27%（43.47%－163.64%の範囲）であった。

【0134】

表20：カテーテルの連続輸液後のCD34⁺細胞のCFU増殖

10

20

30

40

条件	100個の培養CD34 ⁺ 細胞当たりのCFU		
	Sprinter	Voyager	Maverick
輸液前	30.5	11.5	11.0
1回目のカテーテル後	22.0	14.0	22.0
2回目のカテーテル後	20.5	4.0	19.0
3回目のカテーテル後	24.0	5.0	18.0
輸液前生成物に対する 3回目カテーテル後の回収	78.69%	43.47%	163.64%
平均回収	95.27%		

10

【0135】

CD34⁺細胞の運動性および培養で増殖する能力に対するカテーテル灌流の影響を決定するために一連の実験を実施し、この実験では健常なドナーから入手したMMH細胞はIsolex処理の開始前に12または24時間4℃で貯蔵された。Isolex処理前に約12時間貯蔵しておいた単離CD34⁺細胞生成物を、処理の終わりから約36時間経過するまで4℃で貯蔵した（MMHから合計約48時間後）。この時点で前記細胞を、内径（i.d.）0.36mmの心バルーンカテーテルによる灌流の前および後のSDF-1/CXCR-4運動性およびCFU増殖について査定した。同様に、Isolex処理前に24時間貯蔵した細胞を、続いてIsolex処理の終わりから48時間経過するまで（合計72時間）4℃で貯蔵し、続いて査定を実施した。

20

表21の結果は、CD34⁺ CXCR-4媒介細胞運動性も培養で増殖する細胞の能力も、少なくとも0.36mmの内径のカテーテルによる灌流によっていずれの時点でも悪影響を受けないことを示している

【0136】

表21：MMHから持ち込み12時間／送り出し48時間および持ち込み24時間／送り出し72時間：カテーテル灌流前（“PRE”）およびカテーテル灌流後（“POST”）のSDF-1/CXCR-4運動性（遊走CD34⁺細胞の%集団）およびCFU（プレートした100個の生存活性を有するCD34⁺細胞当たり）

MMH後の時間 (h) 持ち込み／送り出し	SDF-1/CXCR-4運動性//プレートした100個の生存活性を有するCD34 ⁺ 細胞当たりのCFU数				
	A	B	C	D	E
12/48 PRE	2.7 // 14	8.8 // 15	15.8 // 16	—	—
12/48 POST	3.4 // 15	18.9 // 13	17.6 // 8	—	—
24/72 PRE	—	—	—	34 // 37	18.9 // 27.5
24/72 POST	—	—	—	34 // 43	23.5 // 24

30

【0137】

血清の安定化作用

以下のデータによって、選別CD34⁺細胞の遊走能力に対する血清の安定化作用の重要性が確認される。

40

表22に示すように、走化性造血幹細胞生成物を無血清で処方化したとき、検査したサンプルの全て（カテーテル輸液前のサンプルを含む）についてCXCR-4遊走活性は観察されなかった。

【0138】

表22：血清の非存在下でのカテーテルの連続輸液後のCD34⁺細胞の走化性

条件	遊走 (%)		
	Sprinter	Voyager	Maverick
輸液前	0.0	0.0	0.1
1回目のカテーテル後	0.0	0.0	0.0
2回目のカテーテル後	0.0	0.0	0.1
3回目のカテーテル後	0.0	0.0	0.0

【0139】

図2および3はさらに、Isolex選別CD3⁺4⁺細胞は、ヒト血清の存在下で処方されたときそれらの遊走能力をより長期間保持することを示している。Isolex処理の後、選別CD3⁺4⁺細胞を含む骨髓由来造血幹細胞生成物は、(1)リン酸緩衝生理食塩水(ダルベッコーリン酸緩衝生理食塩水(Ca⁺⁺、Mg⁺⁺を含まない)；Baxter Cat No EDR9865) (“PBS”)に1%ヒト血清アルブミン、25U/mLのヘパリンナトリウムおよび種々の濃度(約0%、約10%、約20%、または約70%)の自己由来血清を含むもの；または(2)通常生理食塩水(0.9%)に1%ヒト血清アルブミン、25U/mLのヘパリンナトリウムおよび(約0%または約10%)の自己由来血清を含むもので処方された。SDF-1/CXCR-4媒介CD3⁺4⁺細胞遊走能力を、最終生成物の貯蔵時の種々に時点、および臨床プロトコルで予想されるのと同じ速度および時間で細胞をカテーテルを通過させた後で評価した。これらの処方物のいずれも、それらがカテーテルを通過した後、CD3⁺4⁺細胞生存率またはCD3⁺4⁺細胞の回収に影響を与えなかった。

選別CD3⁺4⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物が、(i)PBS-血清または生理食塩水-血清のどちらで処方されたか、および(ii)直ちにカテーテルを通過させたか、または長期の安定性検査貯蔵期間(約4℃から約8℃)の後でカテーテルを通過させたかに関係なく、それらは、平均96.6%(92.5%–98.6%の範囲)の生存率および11.4%(2.4%–30.6%の範囲)の平均CXCR-4媒介遊走能力を維持し、採集から運動性分析まで合計48時間であった。

【0140】

図2のパネル(a)に示すように、約25時間でPBS単独で処方した細胞はそのCXCR-4遊走能力の約10%を保持し、約48時間で0近くに降下した。パネル(b)に示すように、通常生理食塩水のみで処方した細胞は、もし存在するとしてもほんのわずかしその遊走能力を保持しなかった。パネル(c)および(d)に示すように、少なくとも約10%の血清を含むPBSで処方した細胞は、その遊走能力の10–15%を約55時間まで維持し(c)、一方、生理食塩水および少なくとも約10%の血清で処方した細胞はその遊走能力の20%を約50時間まで保持した。パネル(e)および(f)に示すように、さらに高い濃度の血清を補充したPBSでは細胞はより長期間より高い遊走能力を保持した。

図3に示すように、選別CD3⁺4⁺細胞を含む本発明の生成物は、10%血清中で処方したとき、そのCD3⁺4⁺ CXCR-4媒介遊走能力の14.25%、<1%、6%および5.8%を、採集後それぞれ約24時間後、約32時間後、約48時間後および約56時間後に保持していた。図3はさらに、選別CD3⁺4⁺細胞を含む本発明の生成物は、20%の血清中で処方したとき、そのCD3⁺4⁺ CXCR-4媒介遊走能力の18.25%、10.25%、17%および11%を、採集後それぞれ約24時間後、約32時間後、約48時間後および約56時間後に保持していた。したがって、本明細書で用いられる“安定化量”という用語は、選別CD3⁺4⁺細胞を含む本発明の生成物の処方に含まれるとき、これらの細胞がそのCXCR-4媒介走化性活性および造血細胞コロニー形成能力保持することを可能にする血清の量を指す。

【0141】

試験5：最終生成物

300mLのMMHから得られるCD3⁺4⁺細胞の収量は限られているために、最終細胞生成物の無菌性は最終生成物の処方物から取り出した上清を用いて判定し、輸液用細胞生成物を

温存した。輸液のために使用するシリンジに細胞生成物をローディングするために用いる態様と同一の態様で、上清サンプルをローディングした（上記参照）。

そのようなサンプルは最終細胞生成物の処方物を表していることを示すために、最終生成物を遠心する前に、輸液溶液中の選別CD3⁺4⁺細胞にC.スポロゲネス（*C. sporogenes*）（13 CFU/mL）、P.エルギノーザ（*P. aeruginosa*）（2 CFU/mL）、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）（18 CFU/mL）、A.ニゲル（*A. niger*）（17 CFU/mL）、C.アルビカンス（*C. albicans*）（3 CFU/mL）および枯草菌（*B. subtilis*）（17 CFU/mL）を接種した。遠心後、細胞ペレットおよび無細胞上清分画の両方の無菌性をUSP好気性および嫌気性検査を用いて判定した。

【0142】

表23：無菌性試験に用いた細菌および真菌：微生物学的環境によって調製した各微生物供給源バイアルは400個の微生物/mLを含んでいたが、各々の種から得られるCFU数は変動する

微生物	微生物総数/mL	総CFU/mL	接種サンプル(21mL)の1mL当たりの予想されるCFU
C.スポロゲネス	400	279	13
P.エルギノーザ	400	36	2
黄色ブドウ球菌	400	371	18
A.ニゲル	400	356	17
C.アルビカンス	400	62	3
枯草菌	400	349	17

【0143】

表24に示すように、全ての検査サンプルの細胞ペレット分画および懸濁物分画の両方が接種微生物の増殖を示し、一方、非接種コントロールは全く増殖を示さなかった。さらにまた、全ての検査微生物について、細胞ペレット分画検査と懸濁物分画検査との間で明白に区別しえる増殖速度は観察されなかった。処理手順の各工程前およびカテーテルによる最終灌流後に採取したサンプルはいずれも微生物汚染について陰性であった。

【0144】

表24：個々の微生物種（21 mLのNCサンプル中の400個の微生物）を接種した有核細胞（NC）サンプルの14日間無菌性検査

接種微生物サンプル	培養液タイプ	サンプル分画	検査 1	検査 2	検査 3
C.スポロゲネス	FTM ^a	細胞ペレット	陽性	陽性	陽性
		上清	陽性	陽性	陽性
黄色ブドウ球菌	FTM	細胞ペレット	陽性	陽性	陽性
		上清	陽性	陽性	陽性
P.エルギノーザ	FTM	細胞ペレット	陽性	陽性	陽性
		上清	陽性	陽性	陽性
A.ニゲル	TSB ^b	細胞ペレット	陽性	陽性	陽性
		上清	陽性	陽性	陽性
C.アルビカンス	TSB	細胞ペレット	陽性	陽性	陽性
		上清	陽性	陽性	陽性
枯草菌	TSB	細胞ペレット	陽性	陽性	陽性
		上清	陽性	陽性	陽性
陽性コントロール： C.スポロゲネス	FTM	細胞懸濁物	陽性		
陽性コントロール： 黄色ブドウ球菌	FTM		陽性		
陽性コントロール： P.エルギノーザ	FTM		陽性		
陽性コントロール： A.ニゲル	TSB		陽性		
陽性コントロール： C.アルビカンス	TSB		陽性		
陽性コントロール： 枯草菌	TSB		陽性		
陰性コントロール： 微生物無し	FTM	細胞懸濁物	陰性		
陰性コントロール： 微生物無し	TSB		陰性		

^aチオグリコレート液体培地

^bトリプシン消化大豆ブロス

【0145】

前臨床試験要旨

総合すれば、これらの前臨床データは、記載した製造および検査手順によって、バルーンカテーテルによる通常的な液体輸液の使用に付随する問題以外のまた別の安全性の問題を生じることのない態様で、輸送およびカテーテル灌流に耐える適切な安定性を有する適切な数の生存活性を有する細胞を作製することができることを示している。

【実施例11】

【0146】

実施例11：フェース1有効性データ

以下のフェース1有効性データは、 10×10^6 以上の単離CD34⁺細胞内には、心筋細胞死および心室再造形と密接に結びついたその後の変化を予防する生物学的作用（パラクリンおよび新血管形成性）を達成するために十分な、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞が存在することを示している。

実施例1の開示にしたがえば、合計31人の対象者がこの試験に同意し、適格性を有し、登録された。長期間低灌流（血液供給遮断を意味する）を特徴とするST上昇心筋梗塞（STEMI）から5日後に、フェースI試験に登録された前記31人の患者を自己由来幹細胞採

集治療グループまたはコントロールグループにランダムに割り当てた。登録された31人の患者のうち、16人を治療グループに、15人をコントロール群に置いた。各センターの第一の対象者を治療またはコントロールに任意抽出し、その後の各患者を交互に治療またはコントロールグループに登録した。対象者を治療に割り当てたならば、全ての包含基準／排除基準に適合し続けるかぎり、前記対象者は治療相で維持された。コントロールに割り当てられた対象者は追跡相に進めた。いずれの身上調査的または臨床的特徴基準でもグループ間で有意な相違は存在しなかった。登録した患者は34から71歳で、87%が男性で、77%が白人で、61%がNYHAクラスIIまたはIIIに49%がNYHAクラスIに含まれ、74%が左腹側下降冠状動脈の梗塞を経験し、さらに55%が薬剤溶出ステントを施されていた。スクリーニングのための心エコー検査で入手したLVEFは25%から50%の間で変動した。

10

実施例3に記載したように、ステント交換後5－8日以内にミニ骨髄採集の方法によってCD34⁺細胞を骨髄から単離した。続いて、実施例4に記載したように採集骨髄をcGMP細胞処理施設に輸送し、さらに実施例5に記載したように単離した。

【0147】

最初に計画したとおり、さらに実施例8に記載したように、この試験では4つの用量グループが存在するはずであった（5百万、1千万、15百万および2千万CD34⁺細胞）。しかしながら、CD34⁺細胞選別後に15百万を超える細胞を確実に得ることは不可能であった。したがって登録はグループ3の最後で終了し、 1.5×10^6 が査定される最高の細胞用量であった。

20

細胞生成物の放出およびグループの割り当ての後、直接梗塞関連動脈輸液のために性状調査現場へCD34⁺細胞生成物を輸送した。治療輸液は、ステント交換後6－9日（およびミニ骨髄採集の48時間以内に）実施した。対象者は、もっぱらCD34⁺細胞生成物が前記施設に到着後に性状調査室に入り、輸液のための最終放出を投与された。

用量グループは、グループ1および2の5人の対象者、グループ3の6人の対象者、並びに15人のコントロール対象者から成っていた。グループ1のために、本発明の走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む 5×10^6 の単離CD34⁺造血幹細胞を含んでいた（“5M”と表示される）。グループ2のために、本発明の走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む 10×10^6 の単離CD34⁺造血幹細胞を含んでいた（“10M”と表示される）。グループ3のために、本発明の走化性造血幹細胞生成物は、CXCR-4を発現しCXCR-4媒介走化性活性を有する少なくとも 0.5×10^6 の有能CD34⁺細胞の亜集団を含む 1.5×10^6 の単離CD34⁺造血幹細胞を含んでいた（“15M”と表示される）。コントロール対象者（すなわちCD34⁺細胞輸液を受けない対象者）は、心臓機能（駆出率、収縮期終期および拡張期終期体積、心室壁運動スコアインデックス）または6カ月経過観察で梗塞領域灌流に有意な改善があることは期待されなかった。

30

(i) CXCR-4を発現し、さらに(ii) CXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団は、非常に低いレベルで（平均0.84%、0から2.39%の範囲）VEGFR-2を発現した。有能CD34⁺細胞の亜集団はCXCR-4を同時発現するが（CXCR-4同時発現：CD34⁺細胞の平均60.63%、中央値52%、31－98%の範囲、SDF-1グラディエントで遊走する能力を有する）、CD34⁺細胞の2.5%未満がVEGFR-2を同時発現するので（機能的にはこれらの細胞はVEGFR-2である）、すなわち、VEGFR-2は梗塞周囲ゾーンに細胞を駆動させる因子ではない。

40

【0148】

本発明の無菌的医薬組成物は、実施例9に記載したように、グループ1、2および3の各対象者にSTEMI後7から11日にカテーテルにより非経口的に梗塞関連動脈を介して輸液によってデリバリーされた。前記無菌的医薬組成物は、(a)治療的に有効な量の無菌的な走化性造血幹細胞生成物であって、前記走化性造血幹細胞生成物がCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む単離CD34⁺細胞の濃縮集

50

団を含み、カテーテル通過時に有能性を保持する、前記治療的有効量の造血幹細胞生成物、および(b)安定化量の血清を含んでいた。

心臓機能経過観察は、輸液後3カ月および6カ月で実施した。心臓梗塞領域灌流は輸液後6カ月で査定した。各対象者の試験治療の状態について情報提供されていない中核研究室施設が、灌流および経過観察機能検査の両方を査定した。これらの結果が基準インデックスと比較された。長期経過観察外来診察を12カ月実施し、電話による対象者との問診は2年から5年の間毎年実施されるであろう。12カ月经過観察心エコー検査では、多くの対象者が分節性壁運動異常(この患者集団では珍しくはない)を示し、さらに対象者のいずれも臨床的に有意な胸膜滲出を示さなかった。12カ月经過観察心エコー検査ではいずれも重篤な所見を示さなかった。2年間の電話による経過観察問診を終了した対象者について重篤な所見は報告されず、したがってこの時点では長期安全性に関する問題は認められなかった。

10

心臓能力の測定である安静時総合重症度スコア(RTSS)、パーセント梗塞(“%梗塞”)、収縮期終期体積(ESV)および駆出率(“EF”)を治療後3カ月および治療後6カ月に査定してコントロールと比較し、コントロールと比較した組成物の有効性を判定した。

【0149】

SPECTスキャン：本明細書で用いられる、一光子放出コンピュータ連動断層撮影(SPECT)スキャンは核画像化検査の1タイプであり、前記は放射性物質および心臓の三次元画像を作製する特殊なカメラを使用して、心臓へ向かう血流を示す。一般的には、“安静時重症度スコア”(RTSS)は、SPECTスキャンで吸収されないテクネチウムの量を基準とするスコアである。安静時重症度スコアから得られるデータは心臓の灌流(すなわち微細血管レベルの血流)および筋肉の機能を表す。略記すれば、SPECTスキャンで用いられるテクネチウムは、健常な灌流心筋によって吸収される。したがって、心筋が健常であり適切な血流が存在する場合は、筋肉はテクネチウムを吸収するであろう。心筋が活動を休止しているかまたはアポトーシスを示している場合、テクネチウム吸収は減少するかまたは全く生じない。

20

パーセント梗塞(MRI)：梗塞サイズは、患者がAMIから回復する程度を決定する。心臓の左心室の30%以上に損傷を有する患者は、損傷がそれより少ない患者と比較して前記損傷により1年以内に死亡する確率は2倍であり、より大きな梗塞はしばしばより侵襲的治療を必要とする。コンピュータによる方法で、損傷組織と非損傷組織間でMRIシグナル強度を比較することによって損傷組織量が計算される。筋肉構造が破壊されているために損傷した心臓組織は非損傷組織よりも密度が高く、MRIは多様な密度の組織を識別することができる。本明細書で用いられる“パーセント(%)梗塞”という用語は、残りの心臓と比較した梗塞面積を指す。この試験の目的のためには、20%を越える%梗塞は有意と考える。

30

心筋灌流における変化と心臓機能

結果は表25に示される。

【0150】

【表 3】

表 25 : 灌流の定量的測定と左心室機能

心機能試験		コントロール	治療群 (5 百万)	治療群 (1 千万)	治療群 (15 百万)	全治療群 N=16	P 値 (全治 療群対コン トロール)	P 値 (コン トロール 対 10+15 百万)	合併コント ロール (コン トロール+5 百 万)	合併治療群 (1 千万+15 百 万)	P 値 (コン トロール+5 百 万対 10+15 百 万)
SPECT RTSS (灌流)		n=13	n=5	n=5	n=4	n=14	n=13	n=9	N=18	n=9	
	基準値	259+/-282	714+/-657	998+/-753	585+/-439	778+/-619			385+/-449	814+/-635	
	6 カ月	273+/-394	722+/-520	635+/-531	462+/-289	616+/-448			398+/-465	558+/-425	
	差	14.4+/-210	7.8+/-216	-362+/-306	-122+/-260	-162+/-293	0.08	0.02	13+/-205	-255+/-297	0.01
	P 値 6 カ月 の変化	0.80	0.94	0.05	0.41	0.06			0.79	0.03	
MRI		n=10	n=5	n=4	n=2	n=11	n=10	n=6	n=15	n=-386	
	基準値	53.2+/-10	46.96+/-13	47.3+/-10	49.9+/-7	47.6+/-10			51.1+/-11	48.2+/-9	
	3 カ月の差	-1.0+/-5.4	1.8+/-6.7	3.4+/-5.1	-3.3+/-2.7	1.4+/-5.8			-0.02+/-5.8	1.1+/-5.5	
	P 値 3 カ月 の変化	0.57	0.57	0.26	0.32	0.41			-99	0.61	
	6 カ月	54.2+/-11	46.794+/-13	54+/-11	50.1+/-6	50.1+/-11			51.8+/-12	52.7+/-8	
	差	1.0+/-7.8	-0.02+/-13	6.7+/-4	0.2+/-0.8	2.5+/-9	0.70	0.33	0.7+/-9	4.5+/-5	0.35
	P 値 6 カ月 の変化	0.68	0.99	0.04	0.78	0.39			0.77	0.05	
EDV (mL)	基準値	154.7+/-55	153.3+/-30	176.6+/-51	175.7+/-12	165.8+/-36.1			154.2+/-47	176.4+/-39.9	
	6 カ月	154.1+/-55	176.3+/-53	182.4+/-58	180.1+/-41	179.2+/-48			161.5+/-53.3	181.7+/-48.7	
	差	-0.56+/-20	23+/-37	5.83+/-29	4.39+/-29	13.4+/-31	0.24	0.61	7.3+/-28.1	5.4+/-25.9	0.88
	基準値	76.1+/-45	81+/-23	97+/-46	88+/-18	88+/-30			78+/-38	94+/-37	
	6 カ月	74.3+/-44	95+/-46	87+/-46	91+/-32	91.5+/-40			81.3+/-44	88.5+/-38	
	差	-1.84+/-17	14+/-25	-9.9+/-18	2.69+/-13	3.4+/-22	0.55	0.66	3.6+/-21	-5.7+/-16	0.34
	基準値	16.64+/-8	18.8+/-8.6	33.2+/-14	11.7+/-1	22.7+/-13			17.3+/-8.2	26+/-16	
梗塞サイズ (LV 量の%)	6 カ月	9.95+/-9	16.2+/-10.9	22.3+/-12	11.1+/-2	17.5+/-11			12+/-9.8	18.5+/-11	
	差	-6.7+/-5	-2.6+/-5.9	-10.9+/-3	-0.57+/-1	-5.2+/-6	0.57	0.79	-5.3+/-5.8	-7.5+/-5.7	0.45

【0151】

コントロールグループの 2 人の患者 (辞退) および 15 百万グループの 2 人の患者 (1

10

20

30

40

50

人は輸液後に死亡、1人は輸液前に急性ステント再狭窄)で、6カ月のSPECTスキャンは実施されなかった。MRIについては、コントロールグループの5人の患者(1人が死亡、2人が辞退、2人が冠状動脈内デバイス(ICD))、1千万グループで1人(ICD)および15百万グループで3人(1人が死亡、1人が基準画像不明確、1がICD)で画像化が完了しなかった。グループ間の比較は、試験を完了した患者のデータのみを使用する。表25に示すように、コントロール患者は、治療グループ患者よりも小さい基準灌流障害サイズ(RTSS) ($p \leq 0.04$) およびLV量のパーセントとしてより低い梗塞サイズ ($p \leq 0.03$) を示した。

表25に示すように、コントロール (259 ± 282 から 273 ± 394 、 $p=0.80$) および5百万のCD34⁺細胞を投与された患者 (714 ± 654 から 722 ± 520 、 $p=0.94$) ではSPECT RTSSとして測定される灌流障害は、基準値と比較して6カ月で変化がなかった。対照的に、1千万および15百万のCD34⁺細胞を投与された患者は、心筋灌流障害の緩和を示した(それぞれ 998 ± 753 から 635 ± 531 、 $p=0.57$ および 584 ± 439 から 462 ± 289 、 $p=0.41$)。灌流障害の緩和は有意であり (-255 ± 297 、 $p=0.03$)、さらにコントロールと比較したとき ($p=0.02$) およびコントロールと5百万グループとの併合 ($p=0.01$) と比較したとき、千万を超えるCD34⁺細胞を投与された患者間で有意に大きかった。注目に値することには、千万を超えるCD34⁺細胞を投与されたとき10人の患者のうち9人(90%)が、コントロール(13人の内7人のみ(54%)) および5百万のCD34⁺細胞を投与された患者(5人の患者のうち2人(40%))と比較してRTSSが降下した。RTSSが降下しなかった15百万グループの1人の患者は、そのCD34⁺SDF-1運動性が1.0%未満であった唯一の治療患者(全グループにおいて)であった(0.43%)。

コントロールと比較して治療グループでは心筋灌流障害の緩和がより大きい傾向が認められた($p=0.08$)。post-hoc解析で、より高用量(1千万および15百万細胞)を投与された対象者と低用量(5百万細胞)またはコントロール療法との間の心筋灌流における変化が調べられた。1千万以上のCD34⁺細胞を投与された患者は、5百万細胞または無細胞療法を与えられた者と比較してRTSSにおいて有意な改善を示した($p=0.02$)。身上調査的特徴、基準の心室機能不全または基準の梗塞サイズによって結果は影響を受けなかった。

表25に示すように、コントロールグループと比較したとき、治療グループで6カ月後にこれらパラメーターの変化に有意な差は存在しなかった。灌流の改善が2つのより高用量レベルでのみ観察されたので、post-hoc解析では、高用量CD34⁺細胞輸液(1千万または15百万細胞)を投与された患者と低用量輸液(5百万細胞)およびコントロールとの間で心臓機能における変化を調べた。コントロールおよび5百万細胞グループではLVEFの変化はなかったが($+0.7\%$ 、 $p=0.68$)、1千万以上のCD34⁺細胞を投与された患者ではLVEFで強い改善傾向が認められた($+4.5\%$ 、 $p=0.059$)。収縮期終期体積、拡張期終期体積および梗塞サイズの減少における変化に同様な傾向が観察されたが、これらの変化は統計的に有意なレベルに達しなかった。

【0152】

SDF-1グラディエントにおけるCD34⁺細胞の運動性

輸液されたCD34⁺細胞のCXCR-4の発現またはSDF-1運動性が結果に影響を与えるのかを究明するために、CXCR-4およびSDF-1運動性を発現する輸液細胞の数とRTSSおよび梗塞サイズにおける変化との間の関係を判定した。結果は以下の図4に示されている。

【0153】

図4(A)は、CD34⁺用量 x SDFグラディエントで可動性を示すCD34⁺細胞の%に対するLV量のパーセントとして表した梗塞サイズの変化を示す。4(B)は、CD34⁺用量 x SDFグラディエントで可動性を示すCD34⁺細胞の%に対する灌流障害(RTSS)の変化を示す。全治療グループにおいて、輸液されたCD34⁺/SDF-1可動性細胞の量(CD34⁺細胞とSDF-1可動性の積)とRTSS ($r^2=0.45$ 、 $p=0.011$) およびLV量のパーセントとしての梗塞サイズ ($r^2=0.49$ 、 $p=0.015$) の両方の減少との間に有意な相関性が存在し、よ

り大きなSDF-1運動性が梗塞サイズのより大きな減少および梗塞領域灌流の改善と密接に関係することが示唆される。しかしながら、輸液されるCD34⁺/CXCR-4⁺細胞数、輸液されるCD34⁺/VEGF⁺細胞またはコロニー形成(CFU)能とRTSSまたは梗塞サイズの変化との間には有意な相関性は存在せず、おそらくCXCR-4発現とSDF-1運動性との間には相関性が存在しないためであろう。LVEFまたはLVESVと細胞の特徴との間には有意な相関性は確認されなかった(データは示されていない)。

【0154】

考察

これらの結果は、1千万以上のCD34⁺細胞のIRA輸液は安全であり、基準値と比較して6カ月時におけるRTSSの有意な減少(31%)と密接な関係にあることを示している。対照的に、5百万細胞を投与された患者およびコントロールはRTSSで有意な変化を示さなかった。RTSSは、SPECTによって査定される灌流障害の程度および重症度の合成関数であり、さらに同一個体の反復測定における10%以上の相違の検出を有効にする心筋細胞生存率の潜在的な指標でもある。さらにまた用量閾値効果を支持するものとして、コントロール、5百万CD34⁺細胞投与患者、およびコントロールと5百万グループとの併合と比較したとき、1千万以上のCD34⁺細胞を投与された患者でLVEFにおける改善傾向が認められた。ステント設置後のより大きな梗塞サイズは(特により広範囲の灌流障害を伴う場合)、時間の経過につれて低下するLVEFおよび増加するLVESVとして現れる不利な心室再造形のより高い確率をもたらす。この記載した試験では、1千万以上のCD34⁺細胞を投与された患者は基準時により大きな梗塞サイズおよびより高いRTSSを有していた。しかしながら、それにもかかわらず、これらの患者でより強いRTSSの減少およびLVEFの改善(傾向)が認められた。さらにまた、5百万とコントロールとの併合グループの患者では、平均LVEFは3カ月時または6カ月時に改善されず、LVESVは基準値から着実に増加し、不利な心室再造形と一致していた。驚くべきことに、1千万以上のCD34⁺細胞を投与された患者では、より大きな梗塞および灌流障害で開始したにもかかわらず、LVEFは3カ月時に改善し6カ月時では改善の程度はさらに大きくなり、一方、LVESVは最初の3カ月の間悪化した後は3カ月から6カ月で改善し、総合すれば継続する治療効果を示唆した。

表26に示すように、1千万および15百万グループでは、いずれの患者も1%を超えるLVEFの降下を示さなかった(すなわち、いずれも臨床的に問題となるLVEFの降下を示さなかった)が、一方コントロールの30%および5百万グループの40%が降下を示した(-2.9から-17.4%の範囲)。このことは、本発明の走化性造血幹細胞生成物は心室の再造形(6カ月時にLVEFの降下で臨床的に出現)を予防することができるという結論と一致する。

【0155】

表26: RTSSおよびLVEFにおける6カ月変化

10

20

30

患者	RTSS 6カ月変化	LVEF 6カ月変化
グループ1		
1	-71	18.2%
2	164	5.2%
3	46	1.6%
4	-322	-12.7%
5	222	-12.4%
グループ2		
1	-859	
2	-97	7.7%
3	-427	6.0%
4	-294	11.4%
5	-137	1.8%
グループ3		
1		
2	263	0.8%
3	-274	
4	-287	
5	-190	-0.4%
コントロール		
1	-210	-2.98%
2	-99	4.60%
3	342	2.12%
4	0	
5	-250	3.24%
6	528	5.90%
7	-54	
8	13	4.60%
9	-30	-17.43%
10	1	
11	-584	-3.70%
12	78	11.20%
13	-93	2.90%
14	-38	
15	-1266	

10

20

30

【0156】

輸液される細胞の数の他に、記載データは、患者の用量閾値は輸液細胞の数および運動性に左右され、さらに運動性は時間経過とともに降下し、骨髓採集完了後24時間から48時間では中央値として57%降下、72時間ではさらに11%降下することを示している。実際、1千万以上の細胞を投与された患者では、RTSSの減少を示さなかった1人の患者は、検査した全患者のうちで最も低いCD34⁺細胞運動性を示した(0.43%)

40

【実施例12】

【0157】

実施例12：走化性造血幹細胞生成物の対象者への多重投与

梗塞周囲虚血性境界ゾーンにおける血液供給は不十分で、前記境界ゾーンの心筋細胞を危険にさらす。走化性造血幹細胞生成物の多重投与は、境界ゾーンの細胞を支援することによって、梗塞周囲心筋層の生存活性を温存／回復させることができる。

50

本発明の特徴にしたがえば、組成物の第一のアリコットは第一の輸液期日に投与され、組成物の第二のアリコットは第二の輸液期日に投与され、組成物の第三のアリコットは第三の輸液期日に投与される。第二および第三の輸液期日のスケジュール設定は、与えられた患者について主治医が当該患者の医学的査定にしたがって決定する。ある実施態様にしたがえば、組成物は、第一の輸液期日に、第一の輸液期日から30日後の第二の輸液期日に、さらに第一の輸液期日から60日後の第三の輸液期日に投与される。

心筋梗塞を示唆する症状および臨床的所見を有する適格性があり、さらに試験に含まれることについて適切である対象者／患者が実施例1に記載したように選別され、実施例2に記載したようにカテーテルが挿入されるであろう。いくつかの実施態様では、有能CD34⁺細胞を含む骨髄が前記対象者／患者から実施例3に記載したように入手され、採集骨髄が実施例4に記載したように処理施設に輸送されるであろう。CD34⁺細胞が実施例5に記載したように骨髄生成物から選別されるであろう。

Isolex 300iシステムを用いて、以下の処理工程にしたがってRBC完全除去生成物またはそのRBC体積が20mL未満の骨髄生成物が処理されるであろう：

- (i) 骨髄を自動洗浄して血小板を除去する；
- (ii) Isolex 300i CD34モノクローナル抗体 (Mab) とインキュベートすることにより、CD34陽性 (CD34⁺) 細胞を特異的に標識する；
- (iii) 緩衝溶液で前記細胞懸濁物を洗浄することによって、未結合試薬を除去する；
- (iv) 感作CD34⁺細胞 (CD34 Mabで標識されたCD34⁺細胞を意味する) をダイナビーズ (Dynabeads) M-450 ヒツジ抗マウスIgGで捕捉する；
- (v) 選別カラムを用いて、CD34⁺細胞を捕捉した磁性標識ダイナビーズを所望されない細胞から分離する (前記所望されない細胞は選別カラムから洗い流し、陰性分画バッグに集める) ；さらに
- (vi) PR34⁺幹細胞放出剤がCD34⁺細胞をカラムから遊離させ、CD34⁺細胞は最終生成物バッグに集められる。このシステムは数回洗浄工程を実施し、液体の大半を緩衝液廃棄バッグに廃棄する。

実施例6に記載したように、続いてIsolex(R)選別CD34⁺分画をアッセイしてWBCおよびCD34⁺細胞収量が決定されるであろう。実施例7に記載したように、少なくとも10 x 10⁶のCD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物の第一のアリコットが処方され、実施例8に記載したようにカテーテル挿入施設に輸送され、さらに第一の輸液期日に実施例9に記載したように患者に輸液されるであろう。各アリコット当たり少なくとも10 x 10⁶のCD34⁺細胞を含む走化性造血幹細胞生成物の少なくとも2つの追加のアリコットがその後続く投与のために-70℃で凍結されるであろう (下記“凍結保存試験”を参照されたい)。

【0158】

凍結保存実験

この試験は、走化性造血幹細胞生成物製造プロセスにおけるIsolex使用部分の凍結保存MMH CD34⁺細胞の効果的濃縮能力を評価するために実施した。プロトコルは、凍結保存MMHの濃縮に由来するCD34⁺細胞の収量、生存率、機能性および安定性を評価するために設計された。この実験は、走化性造血幹細胞生成物に対する、IsolexによるCD34選別の前のRBC削減MMHの凍結保存の影響を評価し説明するために設計された。

以下の実験条件が適用された：

(1) 実験設計の要件を満たすために (すなわちMMHとRBC完全除去手順の開始との間に24時間の間隔を設けること)、適切な細胞収量を提供するために3つのレプリケートの各々に2つのMMH。

(2) 実験コントロール：新しく調製した走化性造血幹細胞生成物、MMHから48時間後および72時間後にカテーテルにより走化性造血幹細胞生成物を灌流させた後で生成物の性状を完全に調べる。

(3) 実験：凍結保存MMHに由来する走化性造血幹細胞生成物、MMHから48時間後および72時間後 (凍結保存MMHが保存されていた時間を差し引く (24時間を越えると規定

10

20

30

40

50

される)) にカテーテルにより走化性造血幹細胞生成物を灌流させた後で生成物の性状を完全に調べる。

【0159】

実験設計

目的の実験を実施するために十分なCD34⁺細胞を得るために、2人のドナーが要求されるであろう。80mL以上のMMHおよび30mL以上の末梢血が各ドナーから収集されるであろう。

持ち込まれるものの貯蔵：サンプルは、RBC削減手順の開始前24時間2から8℃で貯蔵されるであろう。

RBC削減の後で、両ドナー由来のMMHはプールされ、続いて2つの等しい部分に分割されるであろう。一方の分画は生の（非凍結）生成物コントロールとして用いられ、他方は凍結保存試験に用いられるであろう。

凍結保存試験のために、RBC削減MMHは-86℃のフリーザーで凍結され、続いて液体ヘタスターチ源を含む凍結保護剤（0.9%塩化ナトリウム中の6%ヘタスターチ（Hospira製））を使用し液体窒素フリーザー（LNF）の蒸気相（-150℃以下）で凍結保存されるであろう。凍結保護剤の調製および凍結並びにRBC削減MMHの凍結保存の手順は以下のとおりである。145mLの25%HSA（ヒト血清アルブミン、Baxter, 060-998または等価物）および71.4mLのDMSOを、500mLの6%ヘタスターチ（Hospira, 0074-7248-03または等価物）の1つのバッグに移す。完全な凍結保護剤は10%のDMSO、4.2%のヘタスターチおよび5%のHSAを含む。このヘタスターチバッグを約10回逆さまにして混合する。この調製凍結保護剤を少なくとも2時間かつ調製から24時間を越えない時間2-8℃の冷蔵庫に貯蔵する。ヒトプロジェニター細胞生成物におけるDMSO、ヘタスターチおよびHASの最終濃度がそれぞれ5%、2.1%および2.5%となるように、必要な体積の凍結保護剤をMMH調製物に移した。凍結保護剤が添加されたMMH生成物のサンプルを、トリパンプルー排除分析（生存率）、WBC数および無菌性のために収集する。調製した凍結バッグの管を加熱して封じ、調製凍結バッグの各々についてMMH生成物の体積を測定し、この凍結バッグを凍結箱／カセット内に置く。この凍結箱／カセットを-86℃のメカニカルフリーザー内に水平に置く。このMMH生成物は、6カ月までの短期間貯蔵のために-86℃のメカニカルフリーザーで貯蔵することができる。長期貯蔵のためには、カセットを-86℃メカニカルフリーザーから取り出し、分析用のMMH生成物サンプルとともに液体窒素の蒸気相での貯蔵のために液体窒素フリーザー（LNF）に入れる。

コントロール（非凍結）および凍結保存（融解後）サンプルの両方が、本質的に上記実施例5に記載したように処理されるであろう。2本の10mLシリンジ中のサンプルは選別CD34⁺細胞から調製されるであろう。生成物の完全な性状決定は以下の時点で実施されるであろう：(i) MMHから48時間後にカテーテルによる生成物の灌流後；および(ii) MMHから72時間後にカテーテルによる生成物の灌流後。凍結保存サンプルの場合、例えば“収集の72時間”という用語は、収集から試験時間までの時間を意味し、RBC完全除去骨髓の凍結および凍結保存の間の時間を除く。

造血幹細胞生成物のCD34⁺細胞の品質についての重要な決定因子には以下が含まれる：(i) CD34⁺細胞一覧および7-AAD生存率；(ii) SDF-1/CXCR-4媒介CD34⁺細胞遊走活性；(iii) CD34⁺細胞上のCXCR-4細胞表面抗原の発現；および(iv) 造血プロジェニター細胞コロニー（CFU）の増殖。この実験は3回繰り返されるであろう。

【0160】

結果の要旨

実験は上記に記載した方法にしたがって実施された。使用した方法論および材料に由来する偏差はいずれも、下記に提供される関連する結果のセクションで詳細に述べる。

表27はこの実験で使用した骨髓のドナーに関する関連情報の要旨である。

【0161】

表27：凍結保存実験の骨髓ドナーの年齢および性別

	実験 1		実験 2		実験 3	
ドナー	1	2	3	4	5	6
年齢	26	26	22	62	32	24
性別	F	F	F	F	F	F

【0162】

表28は、2-8℃の冷蔵庫で24時間貯蔵した後のサンプル体積、RBC含有量および収量、処理前MMH中の細胞の生存率および純度の要旨である。

【0163】

表28：2-8℃での24時間貯蔵後-MMHの体積、細胞収量および品質

	実験1		実験2		実験3	
	ドナー1	ドナー2	ドナー3	ドナー4	ドナー5	ドナー6
体積(mL)	117	64	106	105	103	113
WBC/ μ L [#]	1.39E+04	1.26E+04	1.39E+04	1.44E+04	1.94E+04	2.45E+04
TNC [#]	1.62E+09	8.03E+08	1.47E+09	1.51E+09	1.99E+09	2.76E+09
HCT [#]	33.85%	33.40%	29.10%	27.85%	31.60%	32.60%
RBC体積(mL) [#]	39.44	21.38	30.85	29.24	32.55	36.84
CD45 ⁺ 細胞 生存率*	91.13%	91.72%	90.58%	93.17%	94.11%	95.8%
生存CD34 ⁺ 細胞/ μ L*	149.18	148.38	140.89	114.45	150.80	203.76
CD34 ⁺ 細胞 生存率*	94.14%	98.90%	98.35%	97.24%	98.89%	98.78%
CD34 ⁺ 細胞 の純度*	1.44%	1.32%	1.23%	0.97%	1.21%	0.88%
CXCR4発現 CD34 ⁺ 細胞~	77.68%	77.03%	71.88%	64.57%	75.75%	68.36%
CD34 ⁺ 細胞 の総数*	1.74E+07	9.50E+06	1.49E+07	1.20E+07	1.55E+07	2.30E+07

[#]血液アナライザーによる測定

*サンプルのCD45-FITC/CD34-PE抗体および7-AAD染色を用いたフローサイトメトリー分析による測定

~サンプルのCD34-FITCおよびCXCR4-PE抗体染色を用いたフローサイトメトリーによる測定

【0164】

各実験で各ドナーペア由来のMMHをRBC削減後にプールした。

表29は、RBC削減後にプールしたMMHのRBC含有量、生存率および細胞回収を示す。

【0165】

表29：RBC削減後-RBC含有量および細胞の品質

10

20

30

40

	実験 1	実験 2	実験 3
	ドナー 1 および 2	ドナー 3 および 4	ドナー 5 および 6
RBC体積	15.35 ml	13.80 ml	20.85 ml
TNC回収#	76.95%	85.93%	89.37%
CD45+細胞生存率	84.97%	93.35%	95.60%
CD34+細胞回収#	72.89%	84.00%	88.36%
CD34+細胞生存率	93.99%	97.92%	98.95%
CXCR4発現CD34+細胞	71.33%	64.89%	74.64%

#処理前サンプルと比較

10

【0166】

RBC削減後に、プールしたMMHサンプルの各々を2つの等しい部分に分割した。一方を生（非凍結）コントロールとして用い、他方を凍結保存試験のために用いた。

凍結保存のために、等体積の冷却凍結保護剤と混合したMMHを250mLの凍結細胞容器に平らにローディングし、メカニカルフリーザー（-86℃）で凍結し、続いてプロトコルにしたがいLNFの蒸気相中にて凍結保存状態で貯蔵した。表30は融解および洗浄後のMMHから得られたデータを示す。

【0167】

表30：融解および洗浄後のMMH—細胞品質および細胞の回収

凍結保存サンプルの融解および洗浄			
	実験1	実験2	実験3
融解前の貯蔵期間	10日	8日	8日
洗浄媒体	PBS作業溶液*	2%デキストラン~	8.3%デキストラン®
RBC体積	0.39 ml	1.11 ml	0.38 ml
TNC回収#	36.11%	50.73%	28.61%
CD45+細胞生存率	61.85%	32.18%	43.97%
CD34+細胞回収#	52.43%	46.29%	15.72%
CD34+細胞生存率	94.36%	86.11%	81.76%
CD34+細胞純度	2.40%	1.29%	1.88%
CXCR4発現CD34+細胞	51.42%	50.74%	37.85%

20

30

#凍結保存前のRBC削減MMHと比較。

*PBS作業溶液は、PBS（Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含まない）中に1%HSAおよび0.41%クエン酸ナトリウム（w/v）を含んでいた。この溶液による細胞の洗浄はプロトコルで指示されたものにしがって実施した。

~この溶液は、PBS（Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含まない）中に2%デキストラン40、1%HSAおよび0.4%クエン酸ナトリウム（w/v）を含んでいた。融解サンプルをこの溶液の200mLで希釈し、続いて2回、各回この溶液の200mLを用いて洗浄した。遠心は20℃で600g、10分に設定した。洗浄細胞をIsolexプロセスのために150mLのPBS作業溶液で再懸濁した。

40

@この溶液は、生理食塩水中に8.3%のデキストラン40および4.2%のHSAを含んでいた。洗浄手順は、本質的に2%デキストラン40洗浄溶液について述べた通りであった。

表31は、Isolex処理に続いて非凍結および凍結保存MMHから調製した走化性造血幹細胞生成物のCD34+細胞の品質および回収の要旨である

【0168】

表31：Isolex後—細胞の品質および細胞の回収

	実験1		実験2		実験3	
MMH源	非凍結	凍結	非凍結	凍結	非凍結	凍結
CD34 ⁺ 細胞回収 [#]	47.28%	37.88%	35.94%	49.29%	44.05%	82.25%
CD34 ⁺ 細胞生存率 [#]	99.37%	96.89%	98.97%	95.05%	98.26%	95.38%
CD34 ⁺ 細胞純度 [#]	87.51%	83.95%	86.47%	81.91%	81.71%	50.87%
生存活性を有する CD34 ⁺ 細胞の総数	4.63E+06	1.95E+06	4.07E+06	2.58E+06	7.50E+06	2.20E+06

[#]非凍結サンプルについてはRBC削減サンプルとの比較、および凍結サンプルについては融解洗浄後サンプルとの比較である。

【0169】

RBC削減MMHをプールした各ペアのIsolex処理後に、等しい数のCD34⁺細胞を含む2つの走化性造血幹細胞生成物（“AMR-001”）（各々10mLシリンジ中にある）を調製した。両方のAMR-001サンプルを安定性試験のために2-8℃で貯蔵した。MMHから48時間および72時間に（凍結保存MMHサンプルについては、凍結保存時間は含まなかった）、調製したAMR-001を、臨床用AMR-001で実施されるような態様でバルーン拡張カテーテルにより灌流させた。CD34⁺細胞の完全な性状決定を灌流AMR-001サンプルで実施し、結果は表32、33、34および35で提示されている。表36は使用したバルーン拡張カテーテルを示している。

【0170】

表32：カテーテルによる輸液後—CD34⁺細胞純度、生存率および回収

実験	カテーテル灌流AMR-001				
	MMH源	非凍結		凍結	
	MMH後の時間	48h	72h	48h	72h
1	CD34 ⁺ 細胞回収 [#]	101.73%	92.32%	91.71%	69.35%
	CD34 ⁺ 細胞生存率	99.08%	98.13%	94.98%	91.80%
	CD34 ⁺ 細胞純度	85.92%	84.93%	82.94%	74.24%
	CD34 ⁺ 細胞総数	2.36E+06	2.14E+06	8.92E+05	6.74E+05
2	CD34 ⁺ 細胞回収 [#]	95.65%	89.20%	77.10%	74.01%
	CD34 ⁺ 細胞生存率	98.29%	97.29%	89.47%	82.82%
	CD34 ⁺ 細胞純度	81.49%	82.42%	75.30%	70.50%
	CD34 ⁺ 細胞総数	1.95E+06	1.81E+06	9.96E+05	9.56E+05
3	CD34 ⁺ 細胞回収 [#]	104.17%	101.99%	77.35%	79.12%
	CD34 ⁺ 細胞生存率	98.46%	97.51%	86.86%	85.59%
	CD34 ⁺ 細胞純度	83.18%	82.80%	47.81%	43.71%
	CD34 ⁺ 細胞総数	3.91E+06	3.83E+06	8.52E+05	8.71E+05

[#]灌流前の調製AMR-001との比較である。

【0171】

表33：カテーテルによる輸液後—CXCR4発現CD34⁺細胞（全CD34⁺細胞の%）

カテーテル 灌流	AMR-001サンプルのMMH源					
	実験1		実験2		実験3	
	非凍結	凍結	非凍結	凍結	非凍結	凍結
MMH後48h	66.52%	53.31%	57.64%	41.35%	60.14%	54.16%
MMH後72h	73.87%	53.89%	56.73%	44.07%	64.60%	50.67%

【0172】

表 3 4 : カテーテルによる輸液後一遊走CD 3 4⁺細胞 (全生存CD 3 4⁺細胞の%)

カテーテル 灌流	AMR-001サンプルのMMH源					
	実験1		実験2		実験3	
	非凍結	凍結	非凍結	凍結	非凍結	凍結
MMH後48h	18.81± 1.83%*	5.87± 1.98%	19.67± 10.43%	15.67± 2.24%	24.89± 1.93%	26.66± 1.53%
MMH後72h	(1.07%) [#]	(1.51%)	(1.06%)	(2.19%)	(1.44%)	(1.56%)

*SDF- 1 誘発遊走。全生存CD 3 4⁺細胞における遊走CD 3 4⁺細胞の% (3つのレプリケートの標準偏差を含む)。

[#]自然状態の遊走 (SDF- 1 を添加せず)

【0173】

表 3 5 : カテーテルによる輸液後一生存活性を有する100個の培養CD 3 4⁺細胞当たりのCFUの数

灌流	AMR-001サンプルのMMH源					
	実験1		実験2		実験3	
	非凍結	凍結	非凍結	凍結	非凍結	凍結
MMH後48h	24	15.5	31.5	14	38	15.5
MMH後72h	20.5	0.05	62.5	12	30.5	7

【0174】

表 3 6 : 使用したバルーン拡張カテーテル

実験	AMR-001 サンプルの MMH源	灌流時期 (MMH の 時間)	製造	バルーン 長さ/ 直径	カタログ 番号	ロット 番号	コメン ト
1	非凍結	48h	Sprinter	12/3.5mm	SPR3512W	258795	当日外
		72h	Sprinter	12/4.0mm	SPR4012W	254243	当日外
	凍結	48h	Sprinter	15/3.0mm	SPR3015W	412090	当日外
		72h	Voyager	15/3.0mm	1009443-15	8111462	—
2	非凍結	48h	Sprinter	15/3.5mm	SPR3515W	443152	当日外
		72h	Sprinter	15/3.5mm	SPR3515W	443152	当日外
	凍結	48h	Voyager	15/3.0mm	1009443-15	8111462	—
		72h	Voyager	15/3.0mm	1009443-15	8092561	—
3	非凍結	48h	Voyager	15/3.0mm	1009443-15	8111462	再使用*
		72h	Sprinter	15/3.0mm	SPR3015W	476734	当日外
	凍結	48h	Sprinter	15/3.0mm	SPR3015W	476734	当日外
		72h	Sprinter	15/3.0mm	SPR3015W	476734	当日外

*2回目の使用の前に、カテーテルおよび中央管腔を1回洗浄しさらに70%イソプロピルアルコール続いて無菌的PBSでフラッシュした。続いて中央管腔に空気を注入して内部の残留液体を除去した。前記洗浄手順はバイオセーフティーキャビネット内で実施した。

【0175】

考察

この試験の目的は凍結保存MMHから製造したAMR-001の品質を評価することであった。

非凍結MMH (コントロール) から製造したAMR-001のIsokex後のCD 3 4⁺細胞の回収は平均して34.6±4.35% (30.3%から39%の範囲) であって、これは臨床使用のためのAMR-001の製造のために許容される範囲内である。上記に提示したデータはプ

ロセス内検査のために取り出した細胞を考慮せずに概算されたもので、したがって実際のCD34⁺細胞回収は提示したものよりのわずかに高いであろうということは留意されるべきである。

カテーテル後CD34⁺細胞回収は、MMH後48時間で100.52±4.39%（95.65%から104.17%）およびMMH後72時間で94.50±6.67%（89.2%から101.99%）であった。MMH後72時間のCD34⁺細胞の生存率（表32）、CXCR-4発現（表33）、遊走活性（表34）およびCFU増殖（表35）における実質的な低下は、MMH後48時間までにモニターしたものと比較して存在しなかった。

凍結保存試験のために、移植用骨髄の凍結保存用プロトコルにしたがって、RBC削減MMHサンプルを凍結保存した。前記プロトコルでは、等体積の凍結保護剤（最終濃度5%DMSO、2.5%HSAおよび2.1%ヘタスターチ（6%ヘタスターチ液体供給源（Hospira）より）を有する）と混合されたサンプルは、-86℃で凍結され、続いて液体窒素フリーザー（LNF）の蒸気相で凍結保存される。

凍結保存および融解後、Isolex選別CD34⁺細胞の安定性、生存率、運動性および培養における増殖が維持される。したがって、凍結融解細胞は臨床使用の基準を満たす。

いくつかの実施態様では、第二のアリコットは凍結走化性造血幹細胞生成物を含む。いくつかの実施態様では、アリコットを第一の輸液期日から30日後に融解し、前記融解走化性造血幹細胞生成物のサンプルを取り出して、WBC数（フローサイトメトリー（CD34⁺細胞一覧および生存率用）により）、グラム染色および無菌性についてアッセイする。融解走化性造血幹細胞生成物は、以下の基準を満たす場合にのみ融解から1-2日後に輸液のために放出されるであろう。

—CD34⁺細胞純度が少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%である；

—選択した陽性分画についてグラム染色の結果が陰性である；

—エンドトキシンレベルが約0.5エンドトキシンユニット/mL未満である；

—“走化性造血幹細胞生成物”の生存CD34⁺細胞収量が治療グループの必要な用量を満たす；

—CD34⁺細胞が7-AADによって少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%の生存率を示す；

—“陽性分画上清”のUSP無菌検査の結果が陰性である（14日後）。

【0176】

グラム染色およびエンドトキシンを含む幹細胞生成物の無菌性判定が輸液のための生成物放出前に実施されるであろう。USP無菌性（細菌および真菌）培養が実施され、結果が筆頭研究員に報告されるであろう。USP無菌性の結果が陽性の場合、直ちに当該対象者および待機医師に通知され、入手可能な時には微生物の同定および感受性が提供され、適切な抗微生物治療および治療成果に関する参考書類が調査現場およびスポンサーによって記録されるであろう。

融解した走化性造血幹細胞生成物を含む第二のアリコットが、実施例7に記載したように処方され、実施例8に記載したようにカテーテル挿入施設に輸送され、さらに実施例9に記載したように第二の輸液期日に輸液されるであろう。いくつかの実施態様では、第二の輸液期日は第一の輸液期日から30日後である。

いくつかの実施態様では、凍結走化性造血幹細胞生成物を含む第三のアリコットは第一の輸液期日から60日後に融解され、融解した走化性造血幹細胞生成物を含む第三のアリコットのサンプルが取り出され、WBC数（フローサイトメトリー（CD34⁺細胞一覧および生存率用）により）、グラム染色および無菌性についてアッセイされる。本発明の融解走化性造血幹細胞生成物は、以下の基準を満たす場合にのみ融解から1-2日後に輸液のために放出されるであろう。

—CD34⁺細胞純度が少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%である；

—選択した陽性分画についてグラム染色の結果が陰性である；

- －エンドトキシンレベルが約0.5エンドトキシンユニット/mL未満である；
- －“走化性造血幹細胞生成物”の生存CD34⁺細胞収量が治療グループの必要な用量を満たす；
- －CD34⁺細胞が7-AADによって少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、または95%の生存率を示す；
- －“陽性分画上清”のUSP無菌検査の結果が陰性である（14日後）。

グラム染色およびエンドトキシンを含む幹細胞生成物の無菌性判定は輸液のための生成物放出前に実施されるであろう。USP無菌性（細菌および真菌）培養が実施され、結果が筆頭研究員に報告されるであろう。USP無菌性の結果が陽性の場合、直ちに当該対象者および待機医師に通知され、入手可能な時には微生物の同定および感受性が提供され、適切な抗微生物治療および治療成果に関する参考書類が調査現場およびスポンサーによって記録されるであろう。

融解した第三のアリコットの走化性造血幹細胞生成物が、実施例7に記載したように処方され、実施例8に記載したようにカテーテル挿入施設に輸送され、さらに実施例9に記載したように第三の輸液期日に輸液されるであろう。いくつかの実施態様では、第三の輸液期日は第一の輸液期日から60日後である。

本発明にしたがってAMI後に適切に時間を決めた有能細胞の1用量の投与は、心臓の主要病変（若死、心筋梗塞の再発、うっ血性心不全、重大な不整脈および急性冠状動脈症候群が含まれるが、ただしこれらに限定されない）の緩和をもたらしえると提唱する。

【実施例13】

【0177】

実施例13：走化性造血幹細胞生成物と心筋増殖を促進できる薬剤との同時投与

本発明は、灌流強化およびアポトーシス予防によるAMI後の心筋細胞減少の予防を示す。心臓機能の更なる回復は、心筋細胞の再生能力の顕著な増加を必要とする。再生心筋細胞は、持続可能な心筋細胞の増殖を可能にする適切な灌流を要求するか、あるいは活動休止またはアポトーシスを含む虚血の結果を被るであろう。

本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、(i) AMI後の心機能を回復させ、さらに(ii) 主要な心臓病変を予防することができると提唱される。ある実施態様では、本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、梗塞周辺ゾーンの灌流を増加させる。別の実施態様では、本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、活動休止心筋層における灌流を増加させる。別の実施態様では、本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、心筋細胞をアポトーシスから守る。別の実施態様では、本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、心筋細胞を活動休止から守る。別の実施態様では、本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、新しい心筋細胞を発生させ死んだ心筋細胞と置き換える。別の実施態様では、本発明の走化性造血幹細胞生成物および心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤を含む医薬組成物は、左心室の再造形を予防する。

ある実施態様では、心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤はニューレグリン1を含む。組換えヒトニューレグリン1が市場の供給源から入手されるであろう

(Cell Sciences, Novus Biologicals, R & D Systems, Raybiotech, Inc., Shenandoah Biotechnology, Spring Bioscience)。心筋細胞の増殖を促進するさらに別の適合性活性薬剤には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：血管内皮増殖因子（VEGF-A、VEGF-B、VEGF-CおよびVEGF-D）、胎盤増殖因子（PIGF）、カテコールアミン（例えばノルエピネフリンであるが、ただし前記に限定されない）（Adams, J.W., and Brown, J.H. Oncogene. 20(14):1626-1634, 2001; Laks, M.M., et al. Chest. 64:75-78, 1973）、エンドテリン-1（Adams, J.W., and Brown, J.H. Oncogene. 2

10

20

30

40

50

0(14):1626-1634)、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (Adams, J.W., and Brown, J. H. Oncogene. 20(14):1626-1634)、アンギオテンシンII (Adams, J.W., and Brown, J.H. Oncogene. 20(14):1626-1634)、ホルボルエステル (Schluter, K.D., and Piper, H.M. FASEB J. 13:S17-S22, 1999)、ニューロペプチドY (Schluter, K.D., and Piper, H.M. FASEB J. 13:S17-S22, 1999)、形質転換増殖因子 β 1 (TGF- β 1)、 G_q タンパク質 (Schluter, K.D., and Piper, H.M. FASEB J. 13:S17-S22, 1999; Adams, J.W., and Brown, J.H. Oncogene. 20(14):1626-1634)、ジアシルグリセロール (DAG) (Schluter, K.D., and Piper, H.M. FASEB J. 13:S17-S22, 1999)、サリューシン α (Yu, F., et al. Regul. Pep. 122(3):191-197, 2004)、サリューシン β (Yu, F., et al. Regul. Pep. 122(3):191-197, 2004)、インスリン様増殖因子1 (IGF-1) (Davis, M.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(21):8155-8160, 2006)、ミオスタチン (Sharma, M., et al. J. Cell. Physiol. 180(1):1-9, 1999)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) (Ohki, Y., et al. FASEB J. doi: 10.1096/fj.04-3496fje)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (Okazaki, T., et al. Am. J. Pathol. 171:1093-1103, 2007)、TWEAK、チアゾリジンジオン (例えばロシグリタゾンであるが、ただし前記に限定されない) (Duan, S.Z., et al. Circul. Res. 97:372-379, 2005)、および前記の変種または組換え誘導体。前記引用文献の各々は参照により本明細書に含まれる。

ニューレグリン1、血管内皮増殖因子 (VEGF-A、VEGF-B、VEGF-CおよびVEGF-D)、胎盤増殖因子 (PIGF)、カテコールアミン (例えばノルエピネフリンであるが、ただし前記に限定されない)、エンドテリン-1、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 、アンギオテンシンII、ホルボルエステル、ニューロペプチドY、活性な形質転換増殖因子 β 1 (TGF- β 1)、 G_q タンパク質、ジアシルグリセロール (DAG)、サリューシン α 、サリューシン β 、インスリン様増殖因子1 (IGF-1)、ミオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、TWEAK、チアゾリジンジオン (例えばロシグリタゾンであるが、ただし前記に限定されない)、および前記の変種または組換え誘導体の少なくとも1つの用量を増加させ本発明の走化性造血幹細胞生成物と混合し、カテーテルを通過させた後で生成物の生存率、無菌性、純度および有効性、平均生存率、遊走能力並びにCFU増殖が72時間貯蔵後にin vitroで検査されるであろう。有効性、純度および生存率が維持されていたならば、CXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む精製した無菌的なヒト由来CD34⁺細胞が、冠状動脈結紮および免荷後のNod SCIDマウス (AMI誘発モデル) の尾静脈から輸液されるであろう。心臓灌流、心臓筋肉機能、組織病理学、アポトーシスおよび癒痕における前記処置の影響が灌流後に査定され、コントロール (すなわち細胞を投与されないNod SCIDマウス) と比較されるであろう。先立って実施した実験は、コントロール動物と比較して、治療動物における灌流改善、ヒト血管の新生、アポトーシスの防止および心機能の温存を示した。次に、ニューレグリン1、血管内皮増殖因子 (VEGF-A、VEGF-B、VEGF-CおよびVEGF-D)、胎盤増殖因子 (PIGF)、カテコールアミン (例えばノルエピネフリンであるが、ただし前記に限定されない)、エンドテリン-1、プロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 、アンギオテンシンII、ホルボルエステル、ニューロペプチドY、活性な形質転換増殖因子 β 1 (TGF- β 1)、 G_q タンパク質、ジアシルグリセロール (DAG)、サリューシン α 、サリューシン β 、インスリン様増殖因子1 (IGF-1)、ミオスタチン、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、TWEAK、チアゾリジンジオン (例えばロシグリタゾンであるが、ただし前記に限定されない)、および前記の変種または組換え誘導体の少なくとも1つの用量を増加させ、本発明のCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む無菌的精製ヒト由来CD34⁺細胞に添加し、その結果が、コントロール動物および本発明のCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む無菌的精製ヒト由来CD34⁺細胞のみで処置した動物と比較されるであろう。

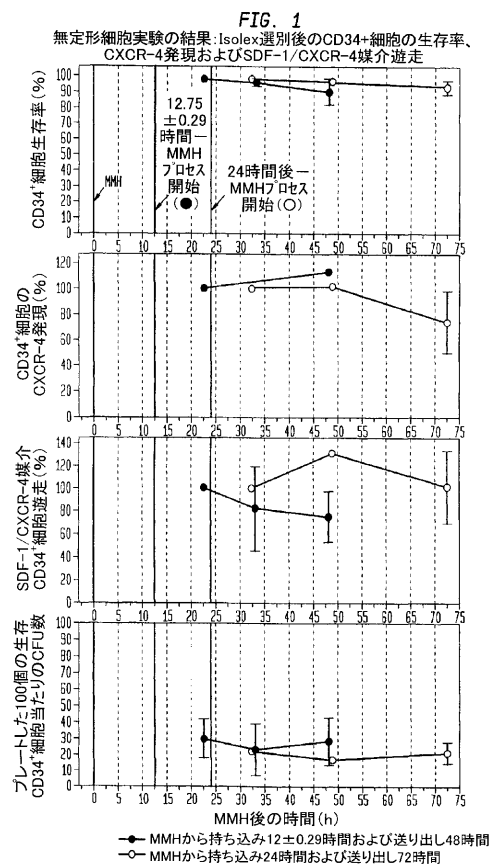
そのような前臨床モデルが、心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤

と併用された本発明のCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む無菌的精製ヒト由来CD34⁺細胞の相乗的で有益な作用を示したならば、用量上昇における安全性およびAMI患者における有効性試験が提唱される。この試験のために、患者には、本発明のCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む無菌的精製ヒト由来CD34⁺細胞が、心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤とともに、または前記適合性活性薬剤無しに投与されるであろう。前記心筋細胞増殖を促進する少なくとも1つの適合性活性薬剤は用量を増加させながら投与され、(i) 平均治療用量 (TMD) および (ii) 灌流および心臓機能が、本発明のCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む無菌的精製ヒト由来CD34⁺細胞の単独使用と比較して、ニューレグリン1と本発明のCXCR-4を発現しさらにCXCR-4媒介走化性活性を有する有能細胞の亜集団を含む無菌的精製ヒト由来CD34⁺細胞との併用によって強化されるか否かが決定されるであろう。

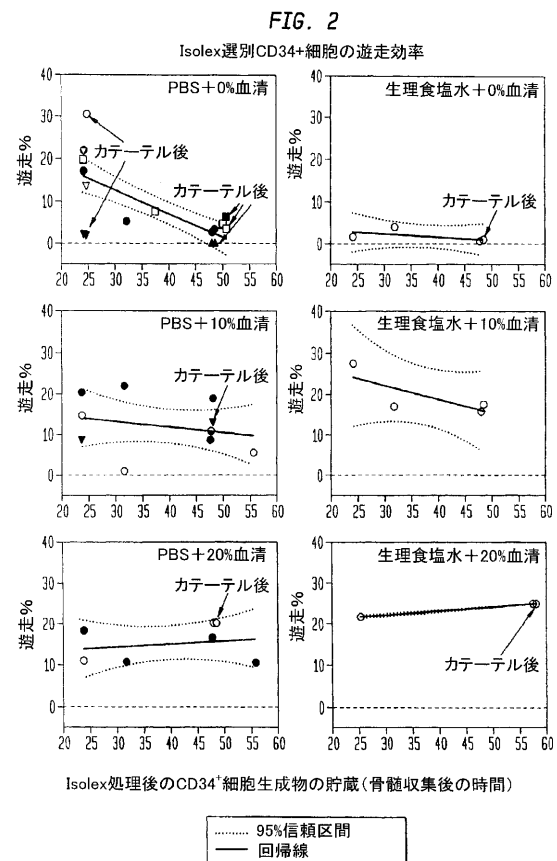
10

本発明はこれまでその特定の実施態様に言及しながら説明してきたが、種々の変更が可能であり、さらに本発明の真髄および範囲を逸脱することなく等価物で置き換えることが可能であることは理解されよう。さらにまた、具体的な状況、材料、物質の構成、プロセス、プロセス工程または工程を本発明の目的、精神および範囲に適合させるために、多くの改変を実施することが可能である。そのような改変のいずれも添付の請求の範囲内に包含されるものである。

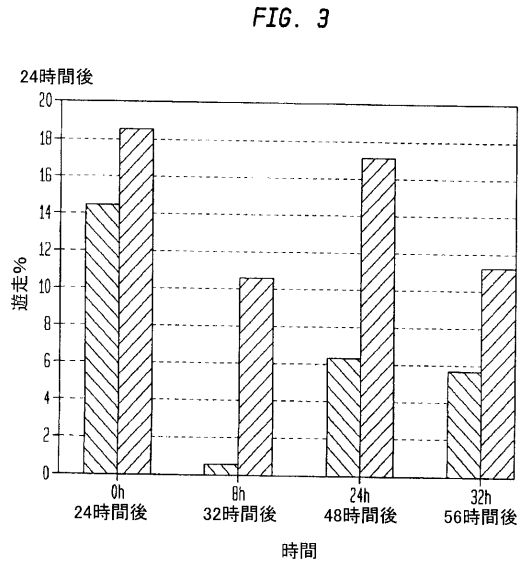
【図1】



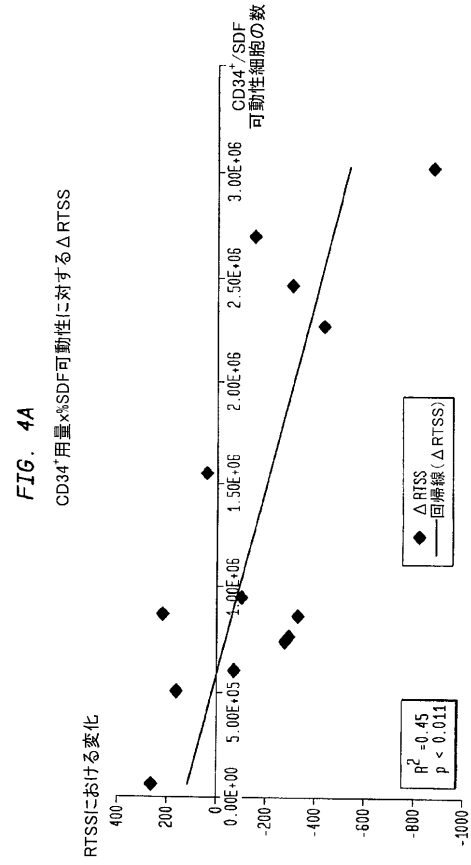
【図2】



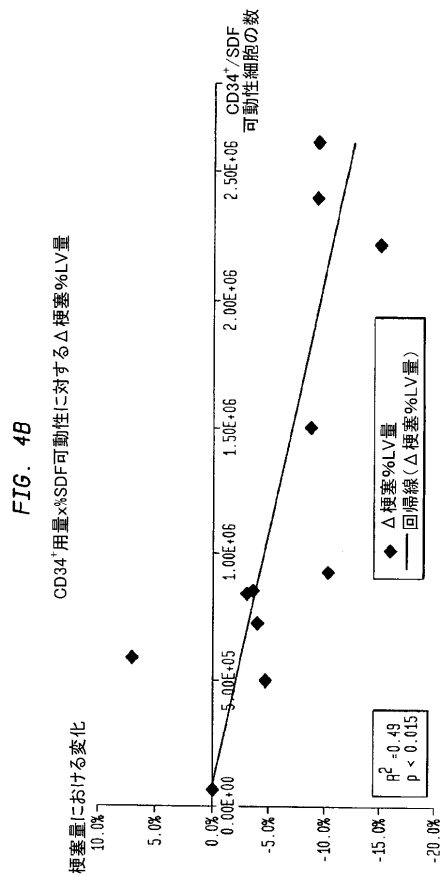
【図 3】



【図 4 A】



【図 4 B】



フロントページの続き

早期審査対象出願

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100156982

弁理士 秋澤 慈

(72)発明者 ペコラ アンドリュー

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 02481 ワイコフ ヒドゥン ヴァリー コート 4
24

(72)発明者 プレティ ロバート

アメリカ合衆国 コネチカット州 06877 リッジフィールド ナーサリー ロード 80

合議体

審判長 内田 淳子

審判官 横山 敏志

審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 国際公開第2007/055905 (WO, A2)

国際公開第2007/076701 (WO, A1)

国際公開第2006/060779 (WO, A2)

Blood, 2007年, 110 (11), p. 238A

CIRCULATION, 2006, 114 (18), Suppl. S, p. 669

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K35/00-35/76

A61P9/10

A61K45/00

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN)