

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6471302号
(P6471302)

(45) 発行日 平成31年2月20日 (2019. 2. 20)

(24) 登録日 平成31年2月1日 (2019. 2. 1)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/545	(2015. 01)	A 6 1 K 35/545
A 6 1 K 38/00	(2006. 01)	A 6 1 K 38/00
A 6 1 K 48/00	(2006. 01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 45/00	(2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 17/02	(2006. 01)	A 6 1 P 17/02

請求項の数 12 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-558732 (P2016-558732)
(86) (22) 出願日	平成27年3月24日 (2015. 3. 24)
(65) 公表番号	特表2017-510582 (P2017-510582A)
(43) 公表日	平成29年4月13日 (2017. 4. 13)
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/022285
(87) 国際公開番号	W02015/148534
(87) 国際公開日	平成27年10月1日 (2015. 10. 1)
審査請求日	平成28年11月1日 (2016. 11. 1)
(31) 優先権主張番号	61/969, 694
(32) 優先日	平成26年3月24日 (2014. 3. 24)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	14/577, 978
(32) 優先日	平成26年12月19日 (2014. 12. 19)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	516181907
	アドヴァンスト リジェン メディカル テクノロジーズ, エルエルシー アメリカ合衆国 テキサス州 77046 、ヒューストン, グリーンウェイ プラザ 3, スイート 1000
(74) 代理人	100107766
	弁理士 伊東 忠重
(74) 代理人	100070150
	弁理士 伊東 忠彦
(74) 代理人	100091214
	弁理士 大貫 進介

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞復元のための無細胞組成物及び同組成物の作成及び使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

動員された C D 4 5 + 幹細胞から誘導されたエキソソームと、
1 以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、
を含む、細胞復元のための医薬配合物。

【請求項 2】

抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤をさらに含む、請求項 1 に記載の配合物。

【請求項 3】

請求項 1 の配合物を含む、細胞復元のためのキット。

【請求項 4】

動員された C D 4 5 + 幹細胞から誘導された微細小胞と、
1 以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、
を含む、細胞復元のための医薬配合物。

【請求項 5】

抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤をさらに含む、請求項 4 に記載の配合物。

【請求項 6】

10

20

請求項 4 に記載の配合物を含む、細胞復元のためのキット。

【請求項 7】

動員された C D 4 5 + 幹細胞から誘導されたエキソソーム由来及び / 又は微小胞由来分子と、

1 以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、を含む、細胞復元のための医薬配合物。

【請求項 8】

前記エキソソーム由来及び / 又は微小胞由来の分子が、タンパク質、サイトカイン、微小胞、微小胞錯体、マイクロ RNA、巨大ノンコーディング RNA 又はそれらの組み合わせを含む、請求項 7 に記載の配合物。

10

【請求項 9】

請求項 7 に記載の配合物を含む、細胞復元のためのキット。

【請求項 10】

組換えタンパク質、組換え核酸、合成代謝物、および合成脂質からなる群から選択される材料と、

1 以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、を含む、細胞復元のための医薬配合物であって、

前記材料は、動員された C D 4 5 + 幹細胞から誘導されたエキソソーム又は微小胞から誘導され得る、医薬配合物。

【請求項 11】

20

抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤をさらに含む、請求項 10 に記載の配合物。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の配合物を含む、細胞復元のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、一般に、細胞機能の 1 以上の態様の改善及び / 又は復元のための組成物および方法に関する。より具体的には、本開示は、単離された復元要素を含む組成物に関する。

30

【背景技術】

【0002】

老化は、ほとんどの慢性疾患の重要な危険因子であり、先進国における罹患率と医療費の大多数に関しての主要な要因である。細胞老化に関連した低下した細胞機能は、高齢化哺乳動物細胞に典型的に関連する疾患及び機能障害をもたらす。細胞老化の強力な誘導物質は、直接 DNA 損傷、機能不全テロメア、破砕クロマチン、又は強力な分裂促進(mitogenic)シグナルに起因し得る(エピ)ゲノムストレスである。加えて、細胞老化は、少なくとも部分的には、老化関連分泌因子(SASF)によって媒介される慢性炎症を引き起こす可能性がある。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

細胞老化に関連した 1 以上のメカニズムに起因して、ネガティブに影響を受けた細胞機能を改善する組成物および方法に対する継続的な必要性が存在する。さらに、被験体の細胞の健康状態を改善するための組成物および方法に対する継続的な必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0004】

概要

動員(mobilized)幹細胞由来のエキソソームと、1以上の医薬的に許容可能な担体、アジ

50

ュバント、又はビヒクルとを含む医薬配合物(formulation)が、本明細書に開示される。

【0005】

また、動員幹細胞由来微小胞と、1以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルとを含む医薬配合物が本明細書に開示される。

【0006】

また、エキソソーム由来及び/又は微小胞由来分子と、1以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルとを含む医薬配合物が本明細書に開示される。

【図面の簡単な説明】

【0007】

本開示及びその利点をより完全に理解するために、添付の図面及び詳細な説明に関連した、以下の簡単な説明が参照される。ここで、類似の参照番号は、類似の部分を表す。

【図1】細胞サンプルを免疫表現型検査する(immunophenotyping)ための実施形態の図である。

【図2】トランスウェル共培養実験装置の実施形態の図である。

【図3】ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとの遺伝子発現分析のプロットである。

【図4】ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとのタンパク質発現分析のプロットである。

【図5A】図5Aおよび図5Bは、ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとの、示されたタンパク質の発現レベルのプロットである。

【図5B】図5Aおよび図5Bは、ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとの、示されたタンパク質の発現レベルのプロットである。

【図6】ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとの平均テロメアの長さのプロットである。

【図7】ベースラインのドナー細胞サンプルと復元された細胞サンプルについての遺伝子発現解析のプロットである。

【図8】ベースラインのドナー細胞サンプルと復元された細胞サンプルについてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図9A】ベースラインのドナー細胞サンプルとベースラインのレシーバ細胞サンプルについてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図9B】ベースラインのドナー細胞サンプルと復元された細胞サンプルについてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図10A】ベースラインのドナー細胞サンプルとベースラインレシーバ細胞サンプルR1についてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図10B】ベースラインのドナー細胞サンプルと復元された細胞サンプルR1-D1についてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図10C】ベースラインのドナー細胞サンプルと復元された細胞サンプルR1-D2についてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図10D】ベースラインのドナー細胞サンプルと復元された細胞サンプルR1-D3についてのタンパク質発現解析のプロットである。

【図11】マヌマイシン(manumycin)の存在下又は非存在下で復元された細胞中のタンパク質発現のレベルをプロットしたものである。

【図12】manumycinの存在下又は非存在下におけるドナー細胞サンプル・レシーバ細胞サンプルペアR1-D1から復元された細胞サンプルのためのテロメアの長さのプロットである。

【図13】実施例6からのサンプルについてのナチュラルキラー細胞アッセイの結果を示す。

【図14】実施例6からのサンプルについてのナチュラルキラー細胞アッセイの結果を示す。

【図15】実施例6からのサンプルについてのクローン原性(clonogenic)アッセイの結果

10

20

30

40

50

を示す。

【図16A】実施例6からのサンプルについてのフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【図16B】実施例6からのサンプルについてのフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【図16C】実施例6からのサンプルについてのフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【図16D】実施例6からのサンプルについてのフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

10

【0008】

詳細な説明

1つ以上の細胞機能を改善する、及び/又は復元させるための組成物および方法が、本明細書に開示される。これらの細胞の機能は、被験体(subject)における細胞の健康を促進することに、直接又は間接的に関連付けられてもよい。本明細書において用語「細胞の健康を促進する」は、細胞及び/又は細胞型の生存状態の感知された、及び/又は定量化できる改善につながる細胞機能のパラメータの変化を指す。細胞の生存状態は、例えば、細胞構造、膜組織、及び/又は完全性、動的なタンパク質集合体、分子の組織、及び外部シグナルに対する細胞応答などの(ただしこれらに限定されない)パラメータを評価するためのいずれの好適なメトリック(metric)を用いて評価することができる。本明細書に開示される組成物および方法は、いずれの好適な方法により評価されたように、細胞の生存状態を改善することができる。一実施形態において、本明細書に開示される組成物及び/又は方法を介して改善された及び/又は復元した細胞機能を有する被験体は、当該被験体の細胞及び/又は一般的な健康状態の1以上の態様において、感知された及び/又は定量化できる改善を示す。

20

【0009】

本明細書で使用する用語「被験体」は、治療、観察又は実験の対象(object)である動物を指す。ほんの一例として、被験体は、ヒトを含む(但し、それに限定されない)哺乳動物(但し、それに限定されない)であり得る。本明細書で使用する用語「治療する」(treat)、「治療すること」(treating)、又は「治療」(treatment)は、

30

疾患もしくは状態、又はその症状を、緩和すること、軽減すること、又は改善すること；

疾病もしくは状態、又はその症状を管理すること；

さらなる症状を予防すること；

症状の根本的な代謝原因を改善又は予防すること；

疾患又は状態を阻害すること、例えば、疾患又は状態の発症(development)を止めること；

疾患又は状態を軽減すること；

疾患又は状態の後退(regression)を引き起こすこと；

疾患又は状態によって引き起こされる状態を軽減すること；及び/又は

40

疾患もしくは状態の症状を止めること；

を包含する。用語「治療する」、「治療すること」又は「治療」は、予防的及び/又は治療的処置を包含する(但し、これらに限定されない)。「予防的処置」又は「治療的処置」は、開示された組成物のうちの1つ以上を、被験体へ投与することを意味する。それは望ましくない状態(例えば、医学的状态(medical condition)、疾患、障害、機能障害)の臨床症状の前に投与されるならば、処置(treatment)は予防的である。すなわち、それは、その望ましくない状態の発症から被験体を保護する。一方、望ましくない状態の症状の後に投与される場合、処置は治療的である(すなわち、既存の望ましくない状態又はそれからの副作用を減少、改善、又は維持することが意図されている)。これは、本明細書に開示の組成物および方法により、医学的状态のために予防的に処置された被験体が、それ

50

でもなお前記医学的状态を発症し得ることが考えられるが、予防的処置は、医学的状态の重症度及び／又は持続時間を軽減するという点で有益であり得る。本明細書で使用される治療はまた、本明細書における組成物のいずれの医薬的又は医学的使用を包含する。

【0010】

一実施形態において、被験体は、治療、予防、及び／又は医学的状态、障害、疾患、又は障害の1以上の症状を改善するのに十分な治療上有効な量で、本明細書に開示される組成物を投与される。以下では、簡単に、用語「医学的状态」、「障害」、「疾患」、および「障害」と互換的に使用されている「望ましくない状態」は、総称して「医学的状态」と呼ばれる。本明細書で使用される場合、本書で開示されたタイプの特定の組成物の投与による、医学的状态の症状の改善は、いずれかの軽減（持続的もしくは一過性であろうと）を意味する。これは、本書で開示されたタイプの組成物の投与に起因し得る、又は関連し得る。本明細書で使用される場合、「治療有効量」は、医学的状态の1つ又は複数の症状を治療、予防、及び／又は改善するために、本明細書に開示される組成物の十分な量を意味する。それはまた、産業及び／又は規制基準に基づくように、本明細書に開示される組成物の安全かつ許容可能な量を含んでもよい。当業者には理解されるように、特定の被験体のために、与えられた例において、「治療有効量」であることが証明されている量は、そのような投与量は、通常、当業者によって「治療有効量」とみなされているのだが、検討中の医学的状态のために同様の治療を受けた被験体の100%に対して有効でなくてもよい。特定の個人のために治療的に有効な量は、医学的状态の性質、病状の重症度、被験者体重、被験体の年齢および被験体の一般的健康状態などの多数の要因に応じて変化し得る。治療的有效量は、被験体に影響を与える特定の要因を考慮して、1以上の医療専門家によって最適化されることが期待される。

【0011】

本明細書で開示される1以上の組成物は、ヒト被験体から得た細胞及び／又は細胞物質を含むことができる。本書において用語「細胞物質」は、細胞由来の、細胞によって分泌され、それ以外の場合、現在又は以前に細胞と関連付けられている材料を指す。

【0012】

一実施形態では、本開示の方法は、

(i) ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとを得るステップと；

(ii) 前記ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとを特徴づけるため、1以上の分析技術を利用するステップと；

(iii) 復元細胞サンプルを生成するため、ドナー細胞サンプルの1以上の成分を、レシーバ細胞サンプルと接触させるステップと；

復元細胞サンプルを特徴づけるため、1以上の分析技術を利用するステップと；

(v) 被験体の治療のための復元細胞サンプルを利用するステップと；

を含む。

【0013】

代替的な実施形態において、本開示の方法は、

(i) ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとを得るステップと；

(ii) 復元細胞サンプルを生成するため、ドナー細胞サンプルの1以上の成分を、レシーバ細胞サンプルと接触させるステップと；

(iii) 被験体の治療のための復元細胞サンプルを利用するステップと；

を含む。

【0014】

さらに別の実施形態において、本開示の方法は、

(i) 第1の被験体からの第1の細胞サンプルを得るステップと；

(ii) 第2の被験体からの第2の細胞サンプルを得るステップと；

(iii) 復元中(restoring)組成物を製造するため、約24時間～約6週間の範囲の期間、第2の細胞サンプルの培地の少なくとも一部の存在下、第1の細胞サンプルを培養するステップと；

(i v) 復元された(restored)組成物を製造するために、約 6 週間～約 2 4 時間の範囲の期間、復元中組成物を第 2 の細胞サンプルと接触させるステップと；

を含む。

【 0 0 1 5 】

一実施形態において、ドナー細胞サンプルは、ドナー被験体により用意される一方、レシーバ細胞サンプルは、レシーバ被験体により用意される。いくつかの実施形態において、ドナー被験体およびレシーバ被験体は同一である。あるいは、ドナー被験体及びレシーバ被験体は異なる。一実施形態において、ドナー被験体の年齢 (x と表記) とレシーバ被験体の年齢 (y と表記) との差が、約 5 年以上、あるいは約 1 0 年以上、あるいは約 1 5 10
年以上、あるいは約 2 0 年以上、あるいは約 2 5 年以上、又はあるいは約 3 0 年以上であるように (但し、 y は x よりも大きい)、ドナー被験体は選択される。一実施形態において、ドナー被験体の年齢 (x と表記) とレシーバ被験体の年齢 (y と表記) との差が、約 5 年～約 7 5 年、あるいは約 1 0 年～約 6 0 年、あるいは約 1 5 年～約 5 0 年、あるいは約 2 0 年～約 4 0 年、又はあるいは約 2 0 年～約 3 0 年であるように (但し、 y は x よりも大きい)、ドナー被験体は選択される。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、ドナー被験体とレシーバ被験体との間の暦年齢の差は、約 1 6 年以上、あるいは約 1 6 年～約 3 0 年、あるいは約 1 6 年～約 5 0 年、又はあるいは約 1 6 年～約 3 0 年であり、且つ、 x は y よりも大きい。さらに別の実施形態において、ドナー被験体とレシーバ被験体との間の暦年齢の差は、約 3 6 5 日未満である。 20

【 0 0 1 7 】

一実施形態において、ドナー被験体とレシーバ被験体とは、親族 (consanguinity) 関係にある。あるいは、ドナー被験体とレシーバ被験体とは関係ない。一実施形態において、レシーバ被験体は、ドナー被験体においては存在しない、又は診断未確定である医学的状态を有する。上記開示された実施形態のいずれかにおいて、ドナー被験体とレシーバ被験体とは成人であり、すなわち、性的成熟に達していた。あるいは、上記の開示された実施形態のいずれかにおいて、ドナー被験体が性的成熟に達していた。あるいは、上記の開示された実施形態のいずれかにおいて、レシーバ被験体が性的成熟に達していた。

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、レシーバ被験体は、医学的状态の発症 (development) に関連する 1 以上の危険因子を有すると同定されている。さらに別の実施形態において、レシーバ被験体は、医学的状态と診断されなかった、及び / 又は医学的状态の発症に関連する 1 以上の危険因子を有すると同定されなかった。本明細書に開示される方法は、追加の治療が以前にあったか、又は現在使用されている医学的状态を有する被験体の治療に使用されてもよいことが企図される。一実施形態において、レシーバ被験体が、本明細書に開示される組成物及び方法を用いて被験体が治療されることになる医学的状态と関連していない医学的状态のために、レシーバ被験体が 1 以上の治療を受けたか、又は現在受けていることが、さらに企図される。一実施形態において、レシーバ被験体は、 1 以上の加齢性の (age-related) 医学的状态を有する。 30 40

【 0 0 1 9 】

一実施の形態において、ドナー細胞サンプル、受信細胞サンプル、又は両方は、ステージ B の準備 (preparation) を受けた被験体 (複数可) から得られる。いくつかの実施形態において、ドナー細胞サンプル、レシーバ細胞サンプル、又は両方は、ステージ A の準備及びステージ B の準備を受けた被験体 (複数可) から得られる。

【 0 0 2 0 】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル、受信細胞サンプル、又は両方は、ステージ A の準備を受けた被験体から得られる。本書において、被験体のステージ A 準備は、被験体から組成物 (すなわち、ドナー細胞サンプル又はレシーバ細胞サンプル) を得る前に、被験体の一般的な健康状態を向上させるため、方法及び / 又は組成物の利用を含む。 50

【0021】

被験者の一般的な健康状態を改善するための方法論の非限定的な例は、被験体への1以上の代謝メディエータの投与を包含する。本書において、代謝メディエータは、被験体において不十分な量で存在するとき、被験者の生理学のおよび/もしくは心理状態に有害である物質、又は、その存在が、被験者の生理学のおよび/もしくは心理状態にポジティブに影響を与える物質を指す。被験体から本明細書に開示されたタイプの1以上の組成物を得る前に、複数の代謝メディエータを被験体に投与してよい。

【0022】

一実施形態において、代謝メディエータは、栄養補助食品を含む。本明細書において、栄養補助食品は、天然源から誘導することができ、且つ、健康上の利点を提供する材料を意味する。被験体のステージA準備で使用するために好適な栄養補助食品の非限定的な例は、Cell Health InstituteからEVERYCELL（登録商標）、HEALTHYCELL、又はHEALTHYCELL PLUSとして市販されている。本開示における代謝メディエータ使用に適した追加の組成物は、その全体が本明細書に参照により援用される米国特許番号8,747,915及び8,974,839（発明の名称「多機能アンチエイジング管理のための栄養補助食品システム及び使用方法」）に記載されている。

10

【0023】

被験体のステージA準備で使用するために好適な方法論の非限定的な例は、本明細書に開示されたタイプのサンプルを得るステップの前に、及び/又はと同時に、被験者の身体

20

【0024】

の少なくとも1部分に、1以上のパルス電磁場（PEMF）を投与することを含む。PEMFは、成体幹細胞のホーミング、移植、及び/又は分化を促進するために使用することができる。

被験体のステージA準備は、被験体から本明細書に開示されたタイプの細胞サンプルを得るステップの前に、及び/又はと同時に、しばらくの間行われることができる。例えば、被験体のステージA準備は、被験体から本明細書に開示されたタイプの細胞サンプルを得るステップの前に、約48時間を超える期間、特定の投与量で（例えば、500mgを1日2回）被験体に栄養補助食品を投与することを含んでもよい。あるいは、被験体から本明細書に開示されたタイプの細胞サンプルを得るステップの前に、約48時間～約1年、あるいは約1週間～約9ヶ月、又はあるいは約1ヶ月～約6ヶ月の期間、栄養補助食品を投与する。いくつかの実施形態において、細胞サンプルの獲得の前に、同時に、又は後に、いずれの期間、被験体は投与されてもよく、又は被験体が、栄養補助食品を自己投与してもよい。

30

【0025】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル、受信機の細胞サンプル、又はその両方がステージBの準備を受けた被験体から得られる。一実施形態において、ステージBの準備の間に、被験体（ドナー及び/又はレシーバ）は、被験者の幹細胞を動員する(mobilizing)ための少なくとも1つのプロセスを受ける。本明細書において「幹細胞」は、それらの通常の意味を与えられ、高分化型(terminally differentiated)ではなく、及び従って他の種類の細胞を産生することができる細胞を意味する。幹細胞は、典型的には3種類に分けられ、分化全能性(totipotent)、多能性(pluripotent)および多分化能(multipotent)を包含する。「全能性幹細胞」は成長し、身体内のいずれのセルに分化することができ、したがって全ての生物に成長することができる。これらの細胞は、自己再生することができない。哺乳類において、受精卵や初期胚細胞は全能性である。「多能性幹細胞」とは、体内のいずれの分化した細胞を作製する能力を有する、真の幹細胞であるが、（栄養膜に由来する）、胚体外膜の作製に寄与することができない。「多能性幹細胞」は、成体組織を再生するために、自己複製、並びに分化する、クローン細胞である。「多能性幹細胞」はまた、「単能性」(unipotent)とも呼ばれ、もっぱら、細胞の特定の種類、例えば血液細胞又は骨細胞など、になることができる。

40

50

【 0 0 2 6 】

一実施形態において、ドナー及びレシーバ細胞サンプルは、起源が胚でもなければ、胚もしくは胎児組織由来でもない、幹細胞又は幹細胞材料を意味する、成体幹細胞及び／又は成体幹細胞材料を含む。代替実施形態において、ドナー細胞サンプルは、起源が胚ではないか、又は胚もしくは胎児組織由来である、幹細胞又は幹細胞材料を意味する、成体幹細胞及び／又は成体幹細胞材料を含む。一実施形態において、ドナー及びレシーバ細胞サンプルは、起源が胚である、及び／又は胚もしくは胎児組織由来である、幹細胞及び／又は幹細胞材料を含む。代替実施形態において、ドナー細胞サンプルは、起源が胚である、及び／又は胚もしくは胎児組織由来である、幹細胞及び／又は幹細胞材料を含む。

【 0 0 2 7 】

一実施形態において、ステージB準備は、被験体に有効量の動員剤(mobilizer)を投与することを含む。本明細書において、(交換可能に使用される)「動員剤」又は「造血幹細胞又は前駆細胞の動員剤」は、いずれの物質(それが、合成もしくは天然由来の小有機分子であろうと)、又は、例えば成長因子又はコロニー刺激因子又はその活性断片もしくはその模倣体などのポリペプチド、核酸、炭水化物、抗体、又は、末梢血中に骨髓由来幹細胞の遊走を増強するように作用する、いずれの他の作用剤(agent)を意味する。このような「動員剤」は、末梢血中の幹細胞(例えば、造血幹細胞又は造血前駆細胞/前駆細胞)の数を増大させることができ、従って、本明細書に開示される方法における使用のための幹細胞のよりアクセス可能な供給源を許す。採取するために利用可能であり、且つ、本開示のその他の態様と互換性のある、被験体における幹細胞の数を増大させるのに好適ないずれの動員剤を利用してよい。一実施形態において、動員剤は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)などのサイトカインである。本開示における使用に好適な動員剤の一商業例はNEUPOGEN(登録商標)(フィルグラスチム)であり、これは、Amgenから市販されている好中球減少症を治療するために使用される処方薬である。本開示において使用するのに好適な動員剤の別の例は、組換えメチオニルヒト幹細胞因子であり、AmgenからSTEMGEN(登録商標)として市販されている。本開示において使用するのに好適な動員剤のさらに別の例はプレリキサフォルであり、これは、CXCR4ケモカイン受容体の阻害剤であり、その同族リガンド、ストローマ細胞由来因子1(SCF-1)、の結合をブロックし、GenzymeからMOZOBIL(登録商標)として市販されている。

【 0 0 2 8 】

動員剤の有効量は、最高の医療行為と一致させ、且つ、例えば、限定はしないが、被験体の一般的な健康と体重(body mass)を包含する種々の要因を考慮して、当業者によって決定することができる。

【 0 0 2 9 】

当業者に知られているように、幹細胞は、脳、骨髓、末梢血、血管、骨格筋、皮膚、歯、心臓、腸、肝臓、卵巣上皮、および精巣などを包含する、種々の器官及び組織において確認されている。供給源としての骨髓を用いて幹細胞を取得する際、被験体のステージB準備の利用が行われるであろうと考えられる。幹細胞の供給源であることが知られている組織のいずれかから得られた幹細胞を含む細胞サンプルを用いて、本発明の方法の様々な実施形態を実施することは、本開示の範囲内である。このような実施形態において、被験体のステージB準備を実施しなくてもよい。

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、ドナー被験体、レシーバ被験体、又はその両方は、ステージAの準備を受ける。一実施形態において、ドナー被験体、レシーバ被験体、又はその両方は、ステージBの準備を受ける。一実施形態において、ドナー被験体、レシーバ被験体、又はその両方は、ステージAの準備を受けない。一実施形態において、ドナー被験体、レシーバ被験体、又はその両方は、ステージBの準備を受けない。一実施形態において、ドナー被験体、レシーバ被験体、又はその両方は、ステージA及びステージBの準備を受ける。

【 0 0 3 1 】

動員剤の投与に続いて、且つ、適切な時間が経過した後に、細胞サンプル（例えば、ドナー細胞サンプル又はレシーバ細胞サンプル）は被験者から採取されてもよい。1以上のユーザ及び/又はプロセスの目標を達成するために、被験体への動員剤の投与と細胞サンプルの採取との間の期間は、変えることができる。一実施形態において、被験体への動員剤の投与と細胞サンプルの採取との間の期間は、約24時間～約10日の範囲、あるいは約48時間～約7日間の範囲、又はあるいは約3日間～約5日間の範囲であり得る。

【0032】

一実施形態において、例えば、細胞サンプルは、アフェレーシス(apheresis)などの体外治療を使用して、いずれの好適な方法論を用いて被験体から採取される。アフェレーシスは、被験者の血液中の特定の部分のみを収集するために使用される方法である。これは、遠心分離又は血液の迅速な回転に基づいて動作する。経路は、被験体の血液のために設立され、アフェレーシスデバイスへの接続を可能にする。器具は、システムを介して血液や体液を移動するために、複数の小さなポンプを使用する。1つのポンプは、カテーテルの一方のアーム又は側から血液を引き出し、遠心分離機にそれを向ける。遠心分離機において、血液は赤血球、白血球、および血漿層に分離される。幹細胞を含む白血球層の一部と、血漿および赤血球の少量とを、収集袋に転換させる。血液の残部は、カテーテルの他方のアームもしくは第2の側における被験体に戻される。このような実施形態において、細胞サンプルは、被験体の各腕の静脈に配置された静脈針を用いて採取する。血液は、興味対象の細胞サンプルから分かれる(separates out)体外回路を通過した第1の静脈から除去されてよく、残りの材料は第2の静脈に戻されてよい。

【0033】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプルは、骨髓から直接採取される。例えば、細胞サンプルは、被験体の腸骨稜から採取されてもよい。このような実施形態において、細胞サンプルを得るための骨髓吸引は、皮膚の殺菌及び局所麻酔薬の投与などの標準的な予防措置を実施するステップに続いて、ヘルスケア提供者が被験体の後部腸骨稜の位置決めするステップを含むことができる。適所にスタイレットを有する好適な針を、上前腸骨棘の方を指して、皮膚及び皮下組織を貫通してゆっくりと前進させることができる。後腸骨稜に到達する際、十分な深さに到達するまで、そのエリアは針によって貫通されてもよい。一度針が配置されると、スタイレットを除去し、シリンジが取り付けられ、吸引を行ってもよい。

【0034】

一実施形態において、いくつかのユーザを得るため、及び/又は細胞サンプル中の所望の数の細胞を処理する(process)ため、複数の幹細胞の採集(collections)（例えば、骨髓穿刺）が行われる。例えば、収集された細胞の数は、約 $1 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^8$ 細胞/kg被験体体重の範囲、あるいは約 $2 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^8$ 細胞/kg被験体体重の範囲、又はあるいは約 $5 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^8$ 細胞/kg被験体体重の範囲であってもよい。本明細書に開示されるように採取された細胞サンプルを、本明細書に開示された方法でさらに処理することなく利用することができる。あるいは、本明細書に開示されるように採取された細胞サンプルを、本明細書に開示される組成物および方法論と互換のいずれの方法論を使用して、さらに処理することができる。あるいは、本明細書に開示されるように採取された細胞サンプルを、本明細書に開示される方法論および治療において利用される前に、ある期間にわたって保存してもよい。細胞サンプルの保存は、保存期間中、試料を安定化させるために、例えば、生体適合性溶液中の細胞サンプルの極低温(cryogenic)保存を含むことができる。「生体適合性溶液」は、本明細書に開示される細胞の復元方法において使用するため、又は他のいずれの他の後続の使用のため、細胞サンプル（例えば、ドナー及び/又はレシーバ）が懸濁している溶液を意味する。このような生体適合性溶液は、生理食塩水(saline)を含むことができ、さらに、防腐剤、抗菌剤等のような他の成分を含んでもよい。

【0035】

一実施形態において、本明細書に開示されるように採取した細胞サンプルは、前本明細

書に開示された方法で利用される前に、約 24 時間以上保存される。あるいは、本明細書に開示されているように採取した細胞サンプルは、前本明細書に開示された方法で利用される前に、約 1 時間～約 20 年間の範囲の期間にわたって、保存される。あるいは、本明細書に開示されているように採取した細胞サンプルの保存は、約 10 日～約 15 年間の範囲、あるいは約 30 日～約 10 年間の範囲、又はあるいは約 30 日～約 5 年間の範囲の期間であってよい。

【0036】

当業者によって理解されるように、採取されたようなドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプルは、不均一な細胞集団を含む。本明細書に開示された方法論の態様は、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプル中に存在する細胞の種類と量とを同定および定量するステップを含む。ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバサンプル中に存在する細胞の数およびタイプを特徴付けるのに適したいずれの方法を用いることができる。一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバサンプルを、免疫表現型検査によって特徴付ける。本明細書において、免疫表現型検査は、サンプル中の様々な集団の存在及び割合を同定する目的のための、細胞の不均一な集団の分析を指す。抗体は、これらの細胞によって発現させた特定の抗原（マーカーと呼ばれる）を検出することによって、細胞を同定するのに使用される。一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバサンプルは、フローサイトメトリーなどの技術を用いて免疫表現型検査することを特徴とする。代替実施形態において、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバサンプル中に存在する様々な細胞型の特徴付けは、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（R
T - P C R）又は免疫細胞化学などのいずれの好適な方法論を用いて行うことができる。

【0037】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプル中に存在する細胞又は細胞型の集団は、1 つ以上の細胞表面マーカーの有無に基づいて識別される。ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプル中の細胞（例えば、細胞型）の異なる集団の同定のためのフローサイトメトリープロトコルの一実施形態実 200 は、図 1 に示されている。図 1 を参照すると、細胞サンプル（ドナー及び／又はレシーバサンプル）210 は、フローサイトメトリーに供される。一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプル 210 は、第 1 のステージにおいて、C D 4 5 の有無に基づいて、造血細胞 220 と非造血細胞 230 とにソートされることができる。白血球共通抗原（L C A）、T 200、B 220、L Y 5、およびタンパク質チロシンホスファターゼ受容体タイプ C（P T P R C）としても知られている C D 4 5 は、白血球特異的な受容体様タンパク質チロシンホスファターゼファミリーの膜貫通糖タンパク質である。これは、すべての有核造血細胞上に発現され、細胞表面の面積の 10 % までをカバーすることができる。T 細胞及び B 細胞抗原受容体シグナル伝達の調節因子としての C D 4 5 の機能は、細胞増殖および細胞分化の調節因子である。

【0038】

一実施形態において、非造血幹細胞 230 として同定された C D 4 5 - 細胞は、C D 105 の有無に基づいてさらに特徴づけることができる。エンドグリン、H H T 1、O R W、および S H - 1 としても知られている C D 105 は、細胞表面上に位置するタイプ I 膜糖タンパク質であり、且つ、T G F 受容体複合体 (complex) の成分である。C D 105 は、造血および血管形成において役割を果たし得る。一実施形態において、C D 4 5 - 及び C D 105 + の両方である細胞集団（240）は、間葉系幹細胞および内皮前駆細胞の両方を有することを特徴とする。

【0039】

一実施形態において、C D 4 5 - および C D 105 + の両方であることが確認された細胞集団（240）は、間葉系幹細胞と内皮前駆細胞とにさらにソートされることができる。一実施形態において、間葉系幹細胞は、C D 4 5 -、C D 105 +、C D 29 + および C D 44 + であるとして識別される（250）。血小板 G P I I a、インテグリン 1、及び G P としても知られている C D 29 は、最晩期抗原受容体に関連したインテグリン単

位であり、且つ、細胞接着において機能する。ECMRII、H-CAM、Pgp-1、HUTCH-1、Hermes抗原、食細胞糖タンパク質I、細胞外マトリックス受容体III、GP90 リンパ球ホーミング/接着受容体、およびヒアルロン酸受容体としても知られているCD44は、細胞接着および遊走において機能する。一実施形態において、内皮前駆細胞は、CD45-、CD105+、及びCD31+(260)であると識別される。PECAM-1、endoCAM、血小板内皮細胞接着分子、およびPECA-1としても知られるCD31は、ヒトにおいて、染色体17上に見出されるPECAM1遺伝子によってコードされるタンパク質である。CD31は、細胞接着、活性化および遊走において機能すると考えられている。

【0040】

本開示の方法は、CD45+細胞中に存在する異なる造血細胞型を識別するステップ(220)をさらに含むことができる。一実施形態において、細胞の集団は、CD45+、CD34+及びCD38-であることに基づいて、原始造血幹細胞であると識別される(270)。一実施形態において、細胞集団は、CD45+、CD34+およびCD38+であることに基づいて、造血前駆細胞であると識別される(280)。gp105-120および造血前駆細胞抗原(HPCA-1)としても知られているCD34は、初期造血および血管組織において発現される一回通過膜貫通(single-pass transmembrane)シアロムチンタンパク質のファミリーのメンバーである。CD34は、細胞接着において機能すると考えられる。ADPリボシルシクラーゼ、T10、及び環状ADPリボースヒドロラーゼ1としても知られているCD38は、染色体4上に位置するCD38遺伝子によってコードされる多機能性エクトヌクレオチダーゼである。一実施形態において、細胞集団の少なくとも一部分は、CD45+およびCD34-であり(290)、且つ、分化した造血細胞として識別される。このような実施形態において、分化した造血細胞(290)は、Tリンパ球(300)又はナチュラルキラー細胞(310)であると、さらに定義してもよい。Tリンパ球は、CD45+、CD34-、及びCD3+であると特徴付けることができる。T3としても知られているCD3はタンパク質複合体であり、且つ、T細胞および他の細胞型との間の細胞接着において役割を果たす。ナチュラルキラー細胞は、CD45+、CD34-、およびCD56+であると特徴付けることができる。Leu-19、NKH-1、及び神経細胞接着分子(NCAM)としても知られているCD56は、細胞接着、神経突起成長、シナプス可塑性、及び学習および記憶において機能することができる血友病(hemophilic)結合糖タンパク質である。

【0041】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバサンプルは、本明細書に開示された方法を用いて特徴付けることができる。このような特徴付けは、非造血細胞、間葉幹細胞、内皮前駆細胞、造血細胞、原始造血幹細胞、造血前駆細胞、分化した造血細胞、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、又はそれらの組み合わせを、限定することなく包含する、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプル中の細胞集団の同定をもたらす。本明細書に記載の表面マーカーが、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプル中に存在する細胞集団を同定するための一方法を表すことが意図される。当業者によって理解されるように、多数のマーカー及び本明細書に開示されたもの以外のマーカーの組み合わせは、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプル内に存在する細胞集団を同定し、特徴付けるために利用されてもよい。さらに、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプル中に存在する種々の細胞集団の同定は、本明細書に記載の範囲に行ってもよく、追加の表面マーカーの有無の決定を含んでもよく、本明細書に開示されたよりも少ないマーカーを利用してもよく、又は、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプル内の細胞の少数集団が同定されるように、より低い程度で行ってもよい。一実施形態において、方法は、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプル中に存在する細胞の異なる集団の同定を除外するステップを含む。

【0042】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプルは、ステー

10

20

30

40

50

ジ B の準備を受けた被験体から得られる。このような実施形態において、ドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバ細胞サンプルは、細胞サンプル中に存在する老化細胞および非老化細胞の数に基づいて特徴付けることができる。本書において、非老化細胞は、複製老化を示すことなく、何度も分裂する能力を保持する細胞を指す。本書において、老化細胞は、継続的な生存率および代謝活性にもかかわらず、増殖能力の長期的な損失を有する細胞を指す。

【 0 0 4 3 】

老化細胞は、例えば、増殖の損失、形態学的変化、減少したテロメアの長さ、増大した S - G A L 活性、老化関連ヘテロクロマチンフォーカス (foci) (S A H F) の産生、増産老化に関連する分泌因子 (S A S F) の増大した産生、活性酸素種 (R O S) の増大した産生、増大した D N A 損傷、減少したシャペロン介在性オートファジー、又はそれらの組み合わせを包含する、さまざまなメトリック (metrics) を用いて同定することができる。記載された様々なメトリックの変化は、非老化細胞であることが確立されたのと同等の (comparable) 細胞型に対して評価されることが意図される。あるいは、細胞サンプルの特性は、対応する非老化細胞において分析されたメトリック (metric) のために確立された文献値と比較することができる。

【 0 0 4 4 】

非老化細胞は、それらのテロメアの長さ、及び細胞内に存在するテロメラーゼ活性のレベルを特徴としてよい。非限定的な例として、ドナー細胞サンプル中に存在する非老化細胞は、約 4 キロベース、あるいは 4 . 5 キロベース、又はあるいは 5 キロベース以上のテロメア長さによって特徴づけることができる。非老化細胞を示すテロメア長さは、細胞型に依存して変化し得ることは、当業者によって理解されるであろう。従って、特定の細胞型のために、非老化細胞のテロメアの長さ特性は、ルーチンの実験によって決定することができる。

【 0 0 4 5 】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバの細胞サンプルが採取された被験体のステージ B の準備は、非老化細胞の優先的動員をもたらす。非老化細胞の優先的動員の結果は、

- 9 0 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 1 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 2 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 3 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 4 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 5 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 6 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 7 % を超える非老化細胞、
- あるいは 9 8 % を超える非老化細胞、又は
- あるいは 9 9 % を超える非老化細胞、

を含むドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバ細胞サンプルであり得る。非老化細胞の百分率は、サンプル中に存在する細胞の総数に基づく。一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバ細胞サンプルは、サンプル中に存在する細胞の総数に基づき、約 9 0 % の非老化細胞 ~ 約 9 9 % の非老化細胞を含む。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態において、ドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバ細胞サンプル中に存在する非老化細胞は、いずれの好適な方法論を用いて同定することができる。このような実施形態において、非老化細胞、を含む、から本質的になる、又はからなるドナー細胞サンプル及び / 又は含むレシーバ細胞サンプルをもたらすために、本開示と互換性のある、いずれの好適なプロセスを使用して、非老化細胞を老化細胞から分離することができる。このような方法論は、特定の細胞表面マーカーの有無を有する非老化細胞の集団をさらに定義するように拡張することができ、特定のタイプの非老化細胞 (例えば、非老化の

10

20

30

40

50

間葉系幹細胞、非老化ナチュラルキラー細胞)、を含む、から本質的になる、又はからなる、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプルを生じることが企図される。

【0047】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプルは、細胞老化に関連する1以上の遺伝子及び/又はタンパク質の発現の程度について分析され得る。このような分析は、本明細書に開示された種類の復元(restoration)バイオマーカータンパク質パネル(RBPP)及び/又は復元バイオマーカー遺伝子発現パネル(RBGEPP)を用いて行うことができる。

【0048】

一実施形態において、RBPPは、細胞老化及び老化にリンクされている要因のための、複数の抗体プローブを含む。例えば、RBPPは、

5個以上の抗体プローブ、

あるいは10個以上の抗体プローブ、又は

あるいは20個以上の抗体プローブ、

を含むことができる。一実施形態において、RBPPは10~15個の抗体プローブを含む。本開示において使用に好適なRBPPの一例は、表1に列挙されたタンパク質に対する抗体プローブを含む、RBPP-X1と称するタンパク質アレイパネルである。

【0049】

【表 1】

名称	別名	略称
顆粒球コロニー刺激因子	コロニー刺激因子 3	G-CSF
ケモカインリガンド 26	エオタキシン-3、マクロファージ炎症性タンパク質4- α 、胸腺間質ケモカイン、及びIMAC	CCL26
肝細胞増殖因子	肝細胞分散因子 (HSF)	HGF
インスリン様増殖因子結合タンパク質1	胎盤性タンパク質12(PP12)	IGFBP-1
インスリン様増殖因子結合タンパク質4		IGFBP-4
インスリン様増殖因子結合タンパク質6		IGFBP-6
インスリン様増殖因子結合タンパク質ベータ	カタボリン	IL- β
マクロファージ炎症性タンパク質 3 (MIP3A)	ケモカインリガンド 20, 肝活性化制御ケモカイン (LARC)	MIP-3 α
幹細胞因子	KIT-リガンド, KL, 造血幹細胞因子	SCF
胸腺および活性化制御ケモカイン	ケモカインリガンド17 (CCL17)	TARC
トランスフォーミング成長因子 β 1		TGF- β 1
腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1A		sTNFR1
血管内皮増殖因子		VEGF

【0050】

一実施形態において、RBGEPは、5個以上の遺伝子プローブ、あるいは10個以上の遺伝子プローブ、又はあるいは20個以上の遺伝子プローブ、を含むことができる。一実施形態において、RBGEPは、10～15個の遺伝子プローブを含む。いくつかの実施形態において、RBGEPは、細胞周期の調節もしくはp53経路にリンクされている因子のための遺伝子プローブ、例えばIFBP3、CSC25C

10

20

30

40

50

、 A B L 1、 C D K N 2 B、 A L D H 1 A 3、 S I R T 1、 I N G 1、 C I T E D 2、 および C D K N 1 C など、を含む。 R B G E P は、炎症性プロセス過程の調節に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば C D K N 1 A、 I R F 3、 E G R 1、 I F N G、 C D K N 1 B、 N F K B 1、 S E R P I N G 2、 I G F B P 7、および I R F 7 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、DNA 損傷に関連するプロセスの調節に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば P C N A、 T E R T、及び T P 5 3 B P 1 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、酸化ストレスに関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば P R K C D、 S O D 1、及び N O X 4 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、細胞老化に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば C D K N 2 A、 C D K 6、 T W I S T、 A T M、 C C N D 1、 E T S 2、 R B L 2、 B M I 1、および E T S 1 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、MAPK 経路に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば H R A S と M A P 2 K 3 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、細胞骨格機能に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば、 V I M、 P I K 3 C A、および T H B S 1 など、を含むことができる。 R B G E P は、p 1 6 エフェクター経路に関連する因子の遺伝子プローブ、例えば T B X 3 及び T B X 2 など、をさらに含むことができる。 B G E P は、インスリンシグナル伝達に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば I G F B P 5 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、細胞接着に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば C D L 3 A 1、 C D 4 4、 T G F B 1 A、 C D L 1 A 1 および T G F B 1 など、をさらに含むことができる。 R B G E P は、p 5 3 のエフェクター経路に関連する因子のための遺伝子プローブ、例えば E 2 F 1 および M Y C など、をさらに含むことができる。 R B G E P - X 1 と称する、本開示における使用に好適な R B G E P の一例は、表 2 に列挙されたタンパク質に対する c D N A を含む遺伝子パネルである。

【 0 0 5 1 】

10

20

【表 2】

遺伝子	コードされたタンパク質
<i>IGFBP3</i>	インスリン様成長因子結合タンパク質 3
<i>HRAS</i>	形質転換タンパク質 p 2 1
<i>PRKCD</i>	プロテインキナーゼ C デルタ
<i>AKT1</i>	アルファセリン / スレオニンプロテインキナーゼ
<i>CHEK2</i>	チェックポイントキナーゼ 2
<i>MAPK14</i>	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ 1 4
<i>IGF1</i>	インスリン様成長因子
<i>TWIST1</i>	Twist 関連タンパク質 1
<i>CDC25C</i>	M-phase inducer phosphatase 3
<i>CCNA2</i>	cyclin-A2
<i>CDK5</i>	細胞分裂プロテインキナーゼ 6
<i>CCNE1</i>	G1/S-特異性 cyclin E1
<i>CHEK1</i>	チェックポイントキナーゼ 1

【 0 0 5 2 】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバの細胞サンプルの少なくとも一部分が、R B P P - X 1 アレイを利用するタンパク質アレイ分析、R B G E P - X 1 アレイを使用する遺伝子発現解析、又はその両方に供される。代替実施形態において、ドナー細胞サンプル及び / 又はレシーバ細胞サンプルの少なくとも一部分は、いずれの好適なタンパク質及び / 又は遺伝子アレイを利用する、タンパク質アレイ分析、遺伝子発現解析、又はその両方に供される。

【 0 0 5 3 】

一実施形態において、ドナー細胞サンプル、レシーバの細胞サンプル、又はその両方が、細胞サンプルの品質を特徴づけるために、少なくとも 1 つの分析技術に供される。本明細書において、細胞サンプルの「品質」は、サンプルの細胞の健康状態を特徴付けるために使用される因子を意味し、且つ、パラメータ、例えば、サンプル中に存在する細胞の数及び種類；サンプル中の非老化細胞の老化の比率；遺伝子の及び / 又はタンパク質バイオマーカーの群の発現の程度；サンプル中の細胞の平均のテロメアの長さ；及びサンプル中の細胞の先天性免疫機能の状態など；を含む。テロメアの長さは、いずれの好適な方法論、例えば、末端制限断片 (T R F) 分析を用いて決定することができる。先天性免疫機能は、いずれの好適な方法論、例えば、^{5 1} C r 細胞毒性放出ナチュラルキラー細胞アッセイなど、を用いて評価することができる。ドナー細胞サンプルの品質は、レシーバ細胞サンプル中の細胞の 1 以上の細胞機能を改善及び / 又は復元するための、サンプル中の細胞の能力の評価であり得る。レシーバ細胞サンプルの品質は、本明細書に開示される組成物

および方法を受けたとき、１以上の細胞機能の改善及び／又は復元を示すために、サンプル中の細胞の能力の評価であり得る。

【００５４】

ドナー細胞サンプルの品質は、１～１０の範囲の数値を割り当てられてもよい。ここで、レシーバ細胞サンプルの細胞機能の改善及び／又は復元における使用のためのポジティブな特性を表示するサンプルは、１０の値を有し、且つ、レシーバ細胞サンプルの細胞機能を改善／復元する能力に関連した最も少ない特性を示すサンプルは、１の値を有する。例えば、以下の因子の各々は、ドナー細胞サンプルの品質の特性にポジティブに計量することができる；比較的長いテロメアの長さ；細胞の生存を促進する遺伝子及び／又はタンパク質の発現の高レベル；約９０％以上の非老化細胞の存在；及び先天性免疫機能の高レ

10

【００５５】

レシーバ細胞サンプルの品質は、１～１０の範囲の数値を割り当てられてもよい。ここで、復元可能もしくは改善可能な細胞機能を有するサンプルは、１０の値を有し、且つ、細胞機能の大幅に改善及び／又は復元が不可能なサンプルは、１の値を有する。例えば、以下の因子の各々は、レシーバ細胞サンプルの品質の特性にポジティブに秤量することができる；比較的長いテロメアの長さ；老化促進遺伝子及び／又はタンパク質の発現の適度なレベル；及び、約９０％以上の非老化細胞の存在。これらの特性を表示するレシーバ細胞サンプルは、サンプルの品質値１０を与えてもよい

20

１０のサンプルの品質値を与えてもよいです。

【００５６】

本明細書に開示された品質メトリックを利用すると（例えば、テロメア長さ、非老化細胞のパーセンテージ）、本発明の態様は、ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルの品質を評価するステップと、開示された方法論における使用に好適なサンプルを同定するステップと、を含む。例えば、３未満の品質値を有するレシーバの細胞サンプルは、本開示の方法における使用のために不適切と見なされてもよい。同様に、３未満の品質値を有するドナー細胞サンプルは、本開示の方法論における使用に適さないとみなすことができる。いくつかの実施形態において、７以上の品質値を有するドナー細胞サンプルは、７以上の品質値を有するレシーバ細胞サンプルと共に、本開示の方法論において使用してよい。品質値は、ドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプルの品質を評価するために使用されるメトリックのいずれの数に基づいて割り当てることができる。その結果、品質値の割り当てを行うために使用されるパラメータに基づいて、特定の品質値に関連付けられた特性は異なってもよい。

30

【００５７】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の定性的および定量的特徴付けの１以上に供されたドナー細胞サンプル及び／又はレシーバ細胞サンプルは、いくつかのユーザを提供するため、及び／又は前もって決めたタイプ及び数の細胞を含有する所望のサンプルを処理するため、さらに処理される。本開示は、そのような特徴づけられたサンプルの利用を意図する。例えば、特徴づけられたサンプルは、１以上の医学的状態を改善するために被験体に投与される医薬配合物の成分であってもよい。

40

【００５８】

あるいは、ドナー細胞サンプルとレシーバの細胞サンプルは、本明細書に開示の復元方法に利用することができる。

【００５９】

一実施形態において、細胞復元の方法は、培養されたドナー細胞サンプルの媒体中に存在する可溶性因子及び／又は粒子を、レシーバの細胞サンプルと接触させるステップを含む。例えば、ドナー細胞サンプルは、約２４時間から約６週間、あるいは約１週間から約５週間、又はあるいは約２週間から約４週間の範囲の期間、適切な培地中で培養することができる。本明細書において、増殖培地としても知られている培養培地は、細胞の増

50

殖をサポートするために適切な栄養素を含む液体又はゲルを意味する。好適な培地は、本開示の恩恵を有する当業者によって選択することができる。その後、培地は、いずれの好適な方法論（例えば、濾過、遠心分離）を使用してドナー細胞サンプルから除去することができ、及びその後、細胞を含まない培地をレシーバ細胞サンプルと接触させる。

【0060】

代替的な実施形態において、細胞復元の方法は、ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとの両方のトランスウェル培養を確立するステップを含む。図2を参照すると、トランスウェル培養物400は、ドナー細胞がトランスウェルの基底(basal)面及び/又は頂端(apical)面の上の分子を取り込みおよび分泌することを可能にする、少なくとも1つの透過性の表面を有するインサート410を含んでもよい。トランスウェルのインサート410は、本明細書に開示する組成物および方法に適合するいずれの材料、例えば、ポリエチレンテレフタレート又はポリカーボネート等、から構成されてもよい。一実施形態において、トランスウェルインサート410は、 $0.4\mu\text{m} \sim 3.0\mu\text{m}$ 、あるいは $0.4\mu\text{m} \sim 2.0\mu\text{m}$ 、又はあるいは $0.4\mu\text{m} \sim 1.0\mu\text{m}$ の範囲のポアサイズを有する透過膜を含む。トランスウェルインサートは、トランスウェルの下側区画への、ドナー細胞サンプルから分泌又は放出された可溶性因子及び/又は粒子の移行を可能にするポアサイズを有してよい。下側コンパートメントにおいて、これらの材料は、レシーバ細胞サンプルに接触する。ドナー細胞サンプル420の少なくとも一部分を、トランスウェルインサート410に適用することができる一方、レシーバ細胞サンプルを、適量の培地とともにトランスウェル培養の下部コンパートメント内に配置される。ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルは、約24時間から約6週間、あるいは約1週間から約5週間、又はあるいは約2週間から約4週間の期間、トランスウェルにおいて培養することができる。適切なサイズの可溶性因子及び/又は粒子(440)は、透過膜を通過すること、且つ、トランスウェルの下側チャンバにおけるレシーバ細胞サンプルとの接触が許される。

【0061】

一実施形態において、ドナー細胞サンプルおよびレシーバ細胞サンプルは、トランスウェル培養から別々に回収される。トランスウェル培養物から回収されるようなドナー細胞サンプルを、以後、変更されたドナー細胞サンプル(ADCS)と名付ける。トランスウェル培養物から回収されるようなレシーバ細胞サンプルを、以後、を復元された組成物(RC)と名付ける。一実施形態において、ADC及び/又はRCは、本明細書に開示された方法論のいずれかを使用してさらに特徴付けることができる。いくつかの実施形態において、ADC及び/又はRCの少なくとも一部分は、さらに処理され、例えば、サンプルを凍結保存のために調製することができる。さらに別の実施形態において、RCの少なくとも一部分は、被験体を治療するために利用される。

【0062】

本書においてRCは、本明細書に開示された期間、ドナー細胞サンプルの可溶性因子と共に培養するステップ以降の、細胞性物質を指す。RCは、レシーバの細胞サンプルと比較した場合、以下のメトリック(metric)、先天性免疫機能、形態(morphology)、コロニー形成能、老化促進因子の発現低下；細胞生存性促進因子の発現増加、等、の1以上における改善を特徴とする。一実施形態において、RCは、レシーバ細胞サンプルよりもドナー細胞サンプルのものと定量的により類似する、細胞老化に関連する作用剤(agents)について、遺伝子発現およびタンパク質発現パターンを有する細胞の存在を特徴とする（例えば、CDKN2A、CDK6、TWIST、ATM、CCND1、ETS2、RBL2、BMI1、およびETS1）。

【0063】

一実施形態において、本明細書に開示された方法論は、RCの製造を含む。RCは、本明細書に開示される方法に供されるレシーバ細胞サンプルから、具体的には、レシーバ細胞サンプルの少なくとも一部分を復元することにより、誘導される。本明細書において「復元」とは、一つ以上の老化促進剤の発現が低減されるような、及び/又は1つ以上の細胞生存率/細胞機能促進剤の発現が増大するような、細胞（例えば、幹細胞）の改変を指

す。理論によって限定されることは望まないが、本明細書に開示される方法論および組成物は、

本明細書に開示される組成物及び方法を施していない別の同様の細胞型と比較した場合、改善された細胞の機能に関連付けられた少なくとも1つの特性をもたらす1以上の細胞型のエピジェネティックな改変を生じ得る。本明細書において「エピジェネティック」とは、DNA配列における変化(alternation)なしに起こる遺伝子活性及び発現の遺伝性変化を意味する。エピジェネティックな修飾の非限定的な例としては、翻訳後修飾、例えばDNAメチル化、クロマチンリモデリング、及びヒストン修飾など、を包含する。

【0064】

RCは、レシーバの細胞及び/又は細胞型の機能的状態の感知された及び/又は定量化可能な改善をもたらす、細胞及び/又は生物生理学のパラメータにおける、変化を示すことができる細胞を含む。ここで、感知された改善は、ドナー細胞の機能状態及び/又は細胞型に似ている(semblance)として定義されている復元された組成物は、細胞を含み、且つ、対応するレシーバの細胞サンプルから誘導されると理解すべきである。

10

【0065】

一実施形態において、RCは、例えば、細胞活力アッセイにより、定量されたような、組成物中の細胞及び/又は細胞型の生存状態を維持することを特徴とする。

【0066】

代替の実施形態において、RCは、例えば、細胞活力アッセイにより、定量されたような、細胞及び/又は細胞型の生存状態の増大を特徴とする。

20

【0067】

一実施形態において、RCは、レシーバ細胞サンプルと比較して、造血幹細胞、造血前駆細胞、間葉系幹細胞および内皮前駆細胞(本明細書において、「幹細胞プール」と呼ばれる)の百分率の変化の欠如を特徴とする。

【0068】

別の実施形態において、RCは、レシーバ細胞サンプルと比較して、幹細胞プールの増大を特徴とする。

【0069】

一実施形態において、RCは、例えば、ナチュラルキラー細胞の細胞毒性アッセイにより、定量されたようなレシーバ細胞サンプルと比較して、細胞性免疫機能の改善を示す細胞を特徴とする。

30

【0070】

一実施の形態において、RCは、対応するレシーバ細胞サンプルとの比較において、例えば、造血幹細胞クローン原性(clonogenic)アッセイにより、定量されたような細胞造血機能の改善を示す細胞を特徴とする。

【0071】

別の実施形態において、RCは、例えば、増加したリンパ球、CD4とCD8陽性T細胞との増大した比率、及び/又は改善された免疫監視により、定量されたような対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、被験体の系統的な(systematic)造血および免疫機能の改善を示す細胞を特徴とする。改善された免疫監視は、被験体における微生物感染及び腫瘍形成の減少した発生率によって決定することができる。改善された免疫監視はまた、被験体における癌の発症の減少した率(rate)により測定することができる。癌の発症の減少した率は、それにより、被験体に、長期の生物の生存可能性の増加を付与することになる。

40

【0072】

一実施形態において、RCは、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、例えば、テロメアの長さ及び/又はテロメラーゼ活性により、決定されたような複製ストレスの最小化を示す細胞を特徴とする。

【0073】

一実施形態において、RCは、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、老化関

50

連遺伝子の低下した発現を示す細胞を特徴とする。ここで、老化関連遺伝子は、例えば、定量的ポリメラーゼ連鎖反応により R B G E P として定義される。

【 0 0 7 4 】

一実施形態において、R C は、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、老化関連分泌因子の低下した発現を示す細胞を特徴とする。ここで、老化関連分泌因子は、表 1 に例示される。

【 0 0 7 5 】

一実施形態において、R C は、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、細胞のエピジェネティックなシグネチャの変化を示す細胞を特徴とする。ここで、エピジェネティックなシグネチャは、例えば、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) により決定される。

10

【 0 0 7 6 】

一実施形態において、R C は、例えば、C y t o - I D (登録商標) オートファジー検出キットにより定量され得る、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、タンパク質恒常性の率(rate)の増大を示す細胞を特徴とする。

【 0 0 7 7 】

一実施形態において、R C は、例えば、M i t o S O X (商標) レッドミトコンドリアスーパーオキシドインジケーターキットにより定量されたような、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、細胞の酸化ストレスの減少を示す細胞を特徴とする。

【 0 0 7 8 】

20

一実施形態において、R C は、例えば、蛍光定量的細胞老化 - G a l アッセイキットにより定量されたような、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、細胞の老化の減少を示す細胞を特徴とする。

【 0 0 7 9 】

一実施形態において、R C は、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、間葉系幹細胞機能の維持を示す細胞を特徴とする。ここで、間葉系幹細胞機能は、例えば、コロニー形成単位線維芽細胞 (C F U - F) アッセイ及び/又は脂肪生成、骨形成および軟骨形成システムへの系統特異的分化を受ける能力により定量される。

【 0 0 8 0 】

別の実施形態において、R C は、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、間葉系幹細胞機能の増大を示す細胞を特徴とする。

30

【 0 0 8 1 】

一実施形態において、R C は、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、血管内皮前駆細胞機能の維持を示す細胞を特徴とする。ここで、血管内皮前駆細胞機能は、例えば、管形成アッセイにより、定量化される。

【 0 0 8 2 】

別の実施形態において、R C は、対応するレシーバ細胞サンプルと比較した場合、増大した血管内皮前駆細胞機能を示す細胞を特徴とする。

【 0 0 8 3 】

レシーバ細胞サンプルと、ドナー細胞サンプル中に存在する可溶性因子及び/又は粒子 (例えば、透過性のトランスウェルインサートを通過する材料) との接触の後に続き、細胞の復元が生じる。したがって、復元(restoration)の方法は、ドナー細胞サンプルの培地中に存在する無細胞可溶性因子及び/又は粒子と、レシーバ細胞サンプルとの接触を含む。いくつかの実施形態において、ドナー細胞のサンプルは、好適な培地中で培養され、培地は、その後、レシーバの細胞サンプルの復元に利用される無細胞培地を形成するため、ドナー細胞から分離することができる。理論によって限定されることは望まないが、透過性のトランスウェルインサートを通過する、ドナー細胞サンプルの培地中に存在する無細胞可溶性因子及び/又は粒子は、パラクリン因子、微小胞、エキソソーム、細胞断片などを包含してよい。本書においてパラクリン因子は、隣接した(immediate)細胞外環境中に分泌され、且つ、標的細胞への短い距離にわたって拡散するシグナリング分子を意味す

40

50

る。微小胞は、一般に、種々の細胞型によって取り除かれる(shed)と考えられる原形質膜の小さい(例えば、50nm~100nm)の断片を意味する。エキソソームは、一般的に、生体分子、例えばタンパク質、脂質、およびRNAなどを含有してよい分泌された細胞外小胞(vesicles)を意味し、細胞シグナリングにおいて機能する。一実施形態において、レシーバの細胞サンプルに接触する、ドナー細胞サンプルの可溶性因子及び/又は粒子は、細胞外小胞を含む。エキソソームと微小胞は、膜の細胞および細胞質ゾルの(cytosolic)タンパク質、脂質、およびRNA間の転送のため、ヒビクル(vehicles)として働くことにより、細胞間コミュニケーションの重要なモードを表す細胞外小胞(EV)のより広範なグループに属している。

【0084】

一実施形態において、復元中(restoring)組成物の品質は、EVの放出を調節する1つ以上の材料の存在により調整することができる。例えば、1以上のEVの放出は、マヌマイシンAなどの小分子阻害剤の添加により阻害され得る。あるいは、EVの放出は、例えば、ATPによるプリン受容体の活性化、リボ多糖による活性化、細胞膜の脱分極、又は細胞内のCa²⁺濃度の増加により、促進され得る。

【0085】

本開示の意図された態様は、好適な培地中でドナー細胞サンプルを培養すること、次いで細胞を除去することにより生成された無細胞培地は、いずれの好適な方法論を使用して(例えば、エタノール沈殿、遠心分離勾配)、類似の(like)特性に基づき、個々の構成成分又は構成成分のグループを分離するため、さらに処理されてよいことである。一実施形態において、復元中組成物の個々の成分は、本明細書に開示されたタイプのレシーバ細胞サンプルの復元に影響を与えるそれらの能力について分析され得る。本開示は、細胞復元のための方法論において、1以上の単離された成分、又は成分の単離されたグループの利用を意図する。一実施形態において、本明細書に開示されたタイプのレシーバ細胞サンプルの復元に影響を及ぼす能力について、復元用組成物の個々の成分を分析することができる。本開示はさらに、細胞復元のための方法において、1以上の単離された構成成分又は単離された構成成分のグループの利用を企図する。一実施形態において、本明細書に開示されるタイプのレシーバ細胞サンプルの細胞復元は、ドナー細胞サンプルの培養培地から単離されたEV(例えば、エキソソーム/微小胞)を利用して行われる。別の実施形態において、本明細書に開示されたタイプのレシーバ細胞サンプルの細胞復元は、ドナー細胞サンプルの培養培地から単離された細胞の断片を利用して行われる。

【0086】

一実施形態において、RCは、それを必要とする被験体に投与するために配合物化する(formulated)ことができる。一実施形態において、被験体は、レシーバ被験体である。例えば、RCは、レシーバ被験体の全般的健康を改善するためにレシーバ被験体に投与される配合物の成分であってもよい。このような改善は、被験体の1以上の生理学的又は心理学的パラメータの定量的評価により同定することができる。代替案において、そのような改良は、被験体の1以上の生理学的又は心理学的パラメータの定性的評価により同定することができる。一実施形態において、レシーバ被験体は、RCを予防的に投与される。

【0087】

RCは、いずれの好適な方法論を介して被験体(例えば、レシーバ被験体)に投与することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法論は、被験体へのRCの全身投与を含む。例えば、RCは、所望のように、従来の非毒性の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、およびビヒクルを含有する投与単位配合物で全身投与することができる。特定の実施形態において、RCの投与は、静脈内注入、気管支内アドミニストレーション、動脈内注射、筋肉内注射、心臓内注射、皮下注射、腹腔内注射、腹腔内注入、経皮拡散、粘膜拡散、頭蓋内、髄腔内、又はそれらの組み合わせによるものであってもよい。RCを投与する手段は、注入を包含し得る(但し、これに限定されない)。全身投与(systemically)はまた、ポンプによる、静脈ラインによる、又はボーラス注射によるものを包含し得る。ボーラス注射は、皮下、筋肉内、又は腹腔内経路を包含することができる

10

20

30

40

50

。

【 0 0 8 8 】

本書で使用されるフレーズ「全身投与」又は「全身投与された」は、それが被験体の全身(system)に進入し、及び従って、代謝および他の同様のプロセス、を受けるような、本開示の1の(又は複数の)化合物、組成物、薬物、又は他の材料の投与、例えば、皮下投与、を意味する。

【 0 0 8 9 】

他の実施形態において、RCは、例えば注射、注入、移植(grafting)により、又は皮膚上へ(or epicutaneous)(但し、これらに限定されない)局所的に投与される。例えば、RCは、被験体における創傷部位の近位に投与することができ、且つ、創傷に関連する症状を改善するため、又は創傷治癒の速度を増加させるために機能する。さらに他の実施形態において、RCは、被験体からレシーバ細胞サンプルを採取するために利用される部位に、又はその近位に投与することができる。RCの投与は、本明細書に開示される組成物と適合するいずれの方法で、及び1以上のユーザ及び/又はプロセスの目標を達成するため、行うことができる。

【 0 0 9 0 】

別の実施形態において、被験体(例えば、レシーバ被験体)は、医学的状态の影響を改善するように設計された治療手順の1成分としてRCを投与される。このような実施形態において、治療的に有効な量で存在するRCは、医薬組成物中の活性作用剤として機能することができる。RCを含むそのような医薬組成物は、以下、細胞性物質ベースの医薬組成物(cellular material-based pharmaceutical compositions)、即ちCMBPCと呼ぶ。追加の活性作用剤が、医学的状态の治療のために有益と考えられるような、CMBPC中に存在してよい。追加の活性作用剤の例としては、：

(a) 抗菌剤；(b) ステロイド(例えば、ヒドロコルチゾン、トリアムシノロン)；(c) 鎮痛薬(例えば、アスピリン、NSAID、および局所麻酔薬)；(d) 抗炎症薬；(e) 成長因子；(f) サイトカイン；(g) ホルモン；及び(h) これらの組合せ；を包含する(ただし、これらに限定されない)。このような追加の活性作用剤はまた、治療的に有効な量で存在することができる。

【 0 0 9 1 】

CMBPC 医薬又は薬物内に含めるための追加の活性作用剤の例は、麻酔薬、催眠薬、鎮静剤及び睡眠誘導剤、抗精神病薬、抗うつ薬、抗アレルギー薬、抗狭心症薬、抗関節炎薬、抗喘息薬、抗糖尿病薬、下痢止め薬、抗痙攣薬、抗痛風薬、抗ヒスタミン薬、止痒剤、催吐剤、制吐剤、鎮痙剤、食欲抑制剤、神経活性物質、神経伝達物質のアゴニスト、アンタゴニスト、受容体遮断薬及び再取り込みモジュレーター、アドレナリン遮断薬、カルシウムチャネル遮断薬、ジスルフィラムおよびジスルフィラム様薬、筋弛緩剤、鎮痛薬、解熱薬、興奮剤、抗コリンエステラーゼ薬、副交感神経興奮薬、ホルモン、抗凝固薬、抗血栓薬、血栓溶解剤、免疫グロブリン、免疫抑制剤、ホルモンアゴニスト/アンタゴニスト、ビタミン、抗菌剤、抗腫瘍薬、制酸薬、消化剤、緩下剤、下剤、防腐剤、利尿剤、消毒剤、殺菌剤、外部寄生虫駆除剤、駆虫薬、重金属、重金属拮抗剤、キレート剤、ガスおよび蒸気、アルカロイド、塩、イオン、オートコイド、ジギタリス、強心配糖体、抗不整脈薬、抗高血圧薬、血管拡張薬、血管収縮薬、抗ムスカリン薬、神経節刺激剤、神経節ブロック薬、神経筋遮断剤、アドレナリン作動性神経阻害剤、抗酸化剤、ビタミン、化粧品、抗炎症剤、創傷ケア製品、抗血栓剤、抗腫瘍剤、抗血管形成剤、麻酔剤、抗原剤、創傷治癒剤、植物抽出物、成長因子、皮膚軟化剤、保湿剤、拒絶反応(rejection)/抗拒絶薬、殺精子剤、コンディショナー、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、抗生物質、トランキライザー、コレステロール低下薬、鎮咳薬、ヒスタミン遮断薬、およびモノアミン酸化酵素阻害剤、を包含する(ただし、これらに限定されない)。

【 0 0 9 2 】

CMBPC における使用に好適な具体的な化合物は、スルファジアジン銀、ナイスタチン、ナイスタチン/トリアムシノロン、バシトラシン、ニトロフラゾン、ニトロフラント

10

20

30

40

50

イン、ポリミキシシ（例えば、コリスチン、サーファクチン、ポリミキシシE、およびポリミキシシB）、ドキシサイクリン、抗菌ペプチド（例えば、天然および合成起源）、NEOSPORIN（登録商標）（すなわち、バシトラシン、ポリミキシシB、及びネオマイシン）、POLYSPORIN（登録商標）（すなわち、バシトラシンおよびポリミキシシB）を包含する。追加の抗菌剤は、局所抗菌薬（すなわち、防腐剤）を包含し、それらの例は、

銀塩、ヨウ素、塩化ベンザルコニウム、アルコール、過酸化水素、クロルヘキシジン、アセトアミノフェン；塩酸アルフェンタニル；アミノ安息香酸カリウム；アミノ安息香酸ナトリウム；Anidoxime；アニレリジン；アニレリジン塩酸塩；アニロパム塩酸塩；アニロラク；アンチピリン；アスピリン；ベノキサプロフェン；ベンジダミン塩酸塩；ピシファジン塩酸塩；プリフェンタニル塩酸塩；プロマジオロンマレイン酸塩；プロムフェナックナトリウム；ブプレノルフィン塩酸塩；ブタセチン；ブチキシレート（Butixirate）；ブトルファノール；ブトルファノール酒石酸塩；カルバマゼピン；カルバスピリン（Carbaspirin）カルシウム；カルピフェン塩酸塩；カルフェンタニルクエン酸塩；シプレファドールコハク酸塩；シラマドール；シラマドール塩酸塩；クロニキセリル；クロニキシシ；コデイン；リン酸コデイン；コデイン硫酸塩；コノルフォン（Conorphone）塩酸塩；シクラゾシン；デキソキサドロール塩酸塩；デクスぺメドラク；デゾシン；ジフルニサル；ジヒドロコデイン酒石酸水素塩；ジメファダン；ジピロン；ドクスピコミン塩酸塩；ドリニデン；エナドリル塩酸塩；エピリゾール；エルゴタミン酒石酸塩；エトキサゼン塩酸塩；エトフェナマート；オイゲノール；フェノプロフェン；フェノプロフェンカルシウム；クエン酸フェンタニル；フロクタフェニン；フルフェニサル；フルニキシシ；フルニキシシメグルミン；フルビルチンマレイン酸塩；フルプロクアゾン；フルラドリル塩酸塩；フルルビプロフェン；ヒドロモルフォン塩酸塩；イブフェナック；インドプロフェン；ケタゾシン；ケトルファノール；ケトロラクトロメタミン；レチミド（Letimide）塩酸塩；レボメタジル酢酸；レボメタジル酢酸塩酸塩；レボナントラドール塩酸塩；レボルファノール酒石酸塩；ロフェミゾール塩酸塩；ロフェンタニルシュウ酸塩；ロルシナドール；ロモキシカム；サリチル酸マグネシウム；メフェナム酸；メナビタン塩酸塩；メペリジン塩酸塩；メプタジノール塩酸塩；メサドン塩酸塩；メタジル酢酸塩；メトフォルイン；メトトリメブラジン；メトケファミド酢酸塩；ミンバン塩酸塩；ミルフェンタニル塩酸塩；モリナゾン；硫酸モルヒネ；モキサゾシン（Moxazocine）；ナビタン塩酸塩；ナルブフィン塩酸塩；ナルメキソン（Nalmexone）塩酸塩；ナモキシレート（Namoxyrate）；ナントラドール塩酸塩；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール；ネフォパム塩酸塩；ネキセリジン塩酸塩；ノラシメタドール塩酸塩；おくふえんたにる塩酸塩；オクタザミド；オルバニル；オキセトロンフマル酸塩；オキシコドン；オキシコドン塩酸塩；テレフタル酸オキシコドン；オキシモルホン塩酸塩；ペメドラク；ペンタモルフォン；ペンタゾシン；ペンタゾシン塩酸塩；ペンタゾシン乳酸塩；フェナゾピリジン塩酸塩；フェニラミドール塩酸塩；ピセナドール塩酸塩；ピナドリル；ピルフェニドン；ピロキシカムオラミン；マレイン酸ブラバドリル；プロジリジン塩酸塩；プロファドール塩酸塩；フマル酸プロピラルン（Propirarn）；プロボキシフェン塩酸塩；プロボキシフェンナブシレート；プロキサゾール；クエン酸プロキサゾール；プロキシソルファン酒石酸塩；ピロリフェン塩酸塩；レミフェンタニル塩酸塩；サルコレックス；マレイン酸サレタミド（Salethamide）；サリチルアミド；サリチル酸メグルミン；サルサレート；サリチル酸ナトリウム；メシル酸スピラドリル；スフェンタニル；スフェンタニルクエン酸塩；タルメタシン；タルニフルメート；タロサレート；コハク酸タザドレン；テブフェロン；テトリダミン；チフラクナトリウム；チリジン塩酸塩；チオピナク；メシル酸トナゾシン；トラマドール塩酸塩；トレフェンタニル塩酸塩；トロラミン；ベラドリル塩酸塩；ベリロパム塩酸塩；ボラゾシン（Volazocine）；メシル酸キソルファノール；キシラジン塩酸塩；メシル酸ゼナゾシン（Zenazocine）；ゾメピラックナトリウム；ズカプサイシン、A f l y z o s i n 塩酸塩；アリパミド；アルチアジド；アミキンシン塩酸塩；アムロジピンベシル酸；アムロジピンマレイン酸塩

10

20

30

40

50

; アナリチド酢酸塩; マレイン酸アチプロシン; ベルフォスジル; ベミトラジン; メシル
 酸ベンダカロール; ベンドロフルメチアジド; ベンズチアジド; ベタキソロール塩酸塩;
 ベタニジン硫酸塩; ベバントロール塩酸塩; ビクロジル塩酸塩; ビソプロロール; ビソプ
 ロロールフマル酸塩; プシンドロール塩酸塩; プピコミド; プチアジド; カンドキサトリ
 ル; カンドキサトリラート; カプトプリル; カルベジロール; セロナプリル; クロロチア
 ジドナトリウム; シクレタニン; シラザプリル; クロニジン; クロニジン塩酸塩; クロパ
 ミド; シクロペンチアジド; シクロチアジド; ダロジピン; デブリソキン硫酸塩; デラブ
 リル塩酸塩; ジアパミド; ジアゾキシド; ジレバロール塩酸塩; リンゴ酸ジルチアゼム;
 ジテキレン; ドキサゾシンメシル酸塩; E e a d o t r i l ; エナラプリルマレイン酸塩
 ; エナラプリラート; エナルキレン; エンドララジンメシル酸塩; エピチアジド; エプロ
 サルタン; エプロサルタンメシル酸塩; フェノルドパムメシル酸塩; フラボジロールマレ
 イン酸塩; フロルジピン; フロセキナン; フォシノプリルナトリウム; フォシノプリラ
 ート; グアナベンズ; グアナベンズ酢酸塩; グアナクリン硫酸塩; グアナドレル硫酸塩; G
 u a n c y d i n e ; グアネチジンモノー硫酸塩; グアネチジン硫酸塩; グアンファシン
 塩酸塩; グアニソキン硫酸塩; グアノクロル硫酸塩; グアノクチン塩酸塩; グアノキサベ
 ンズ; グアノキサン硫酸塩; グアノキシフェン硫酸塩; 塩酸ヒドララジン; ヒドララジン
 P o l i s t i r e x ; ヒドロフルメチアジド; インダクリノン; インダパミド; インド
 ラプリフ塩酸塩; インドラミン; インドラミン塩酸塩; インドレナート塩酸塩; ラシジピ
 ン; レニキンシン; レブクロマカリム; リシノプリル; ロフェキシジン塩酸塩; ロサルタ
 ンカリウム; ロスラジン塩酸塩; メブタメート; メカミラミン塩酸塩; メドロキサロール
 ; メドロキサロール塩酸塩; メタルチアジド; メチクロチアジド; メチルドパ; メチルド
 ペート塩酸塩; メチプラノロール; メトラゾン; メトプロロールフマル酸塩; メトプロロ
 ールコハク酸塩; メチロシン; ミノキシジル; モナテピルマレイン酸塩; ムゾリミン; ネ
 ビボロール; ニトレンジピン; オフォルニン; パージリン塩酸塩; パゾキシド; ベランセ
 リン塩酸塩; ペリンドプリルエルブミン; フェノキシベンズアミン塩酸塩; ピナシジル;
 ピボプリル; ポリチアジド; プラゾシン塩酸塩; プリミドロール; プリジジロール塩酸塩
 ; キナプリル塩酸塩; キナプリラート; キナゾシン塩酸塩; キネロラン塩酸塩; キンピロ
 ール塩酸塩; 臭化キヌクリウム; ラミプリル; インドジャボク (rauwolfia serpentina
); レセルピン; サプリサルタンカリウム; サララシン酢酸塩; ニトロプルシドナトリウ
 ム; ニトロプルシドナトリウム; スルフィナロール塩酸塩; タソサルタン; テルジピン塩
 酸塩; テモカプリル塩酸塩; テラゾシン塩酸塩; テルラキレン; チアメニジン; チアメ
 ニジン塩酸塩; T i e r y n a f e n ; チナビノール; チオダゾシン; チペントシン塩酸塩
 ; トリクロルメチアジド; トリマゾシン塩酸塩; カンシル酸トリメタファン; トリモキサ
 ミン塩酸塩; トリパミド; キシパミド; ザンキレン塩酸塩; ゾフェノプリラートアルギ
 ニン、アルクロフェナク; アルクロメタゾンジプロピオン酸塩; アルゲストンアセトニド;
 アルファアミラーゼ; A m e i n a f a l ; A m e i n a f i d e ; アンフェナクナトリ
 ウム; アミプリロース塩酸塩; アナキンラ; アニロラク; アニトラザフェン; アパゾン;
 バルサラジドナトリウム; ベンダザック; ベノキサプロフェン; ベンジダミン塩酸塩;
 プロメライン; プロペラモール; プデソニド; カルプロフェン; シクロプロフェン; シン
 タゾン; クリプロフェン; クロベタゾールプロピオン酸塩; クロベタゾン酪酸塩; クロピ
 ラック; クロチカゾンプロピオン酸塩; コルメタゾン酢酸塩; コルトドキソン; デフラザ
 コート; デソニド; デソキシメタゾン; デキサメタゾンジプロピオン酸塩; ジクロフェナ
 クカリウム; ジクロフェナクナトリウム; ジフロラゾン二酢酸塩; ジフルミドンナトリウ
 ム; ジフルニサル; ジフルブレドナート; ジフタロン; ジメチルスルホキシド; ドロシ
 ニド; エンドリゾン (Endrysone); エンリモマブ; エノリカムナトリウム; エピリゾール
 ; エトドラク; エトフェナマート; フェルピナク; F e n a m o l e ; フェンブフェン;
 フェンクロフェナク; フェンクロラック; フェンドサル; フェンピパロン; フェンチアザ
 ク; フラザロン; フルアザコルト; フルフェナム酸; フルミゾール; フルニソリド酢酸塩
 ; フルニキシム; フルニキシムメグルミン; フルオコルチンブチル; フルオロメトロン酢
 酸塩; フルカゾン; フルルビプロフェン; フルレトフェン; プロピオン酸フルチカゾン;

10

20

30

40

50

フラプロフェン；フルブフェン；ハルシノニド；ハロベタゾールプロピオン酸塩；ハロブレドン酢酸塩；イブフェナック；イブプロフェン；イブプロフェンアルミニウム；イブプロフェンピコノール；イロニダップ；インドメタシン；インドメタシンナトリウム；インドプロフェン；インドキソール；イントラゾール；イソフルプレドン酢酸塩；イソキセバック；イソキシカム；ケトプロフェン；ロフェミゾール塩酸塩；ロルノキシカム；ロテブレドノールエタポン酸塩；メクロフェナム酸ナトリウム；メクロフェナム酸；ジブチル酸メクロリゾン；メフェナム酸；メサラミン；メセクラゾン；スレブタン酸メチルプレドニゾン；モルニフルマート；ナブメトン；ナプロキセン；ナプロキセンナトリウム；ナプロキソール；ニマゾン；オルサラジンナトリウム；オルゴテイン；オルパノキシニン；オキサプロジン；オキシフェンブタゾン；パラニリン塩酸塩；ポリ硫酸ペントサンナトリウム；フェンブタゾングリセリン酸ナトリウム；ピルフェニドン；ピロキシカム；ピロキシカム桂皮酸塩；ピロキシカムオラミン；ピルプロフェン；プレドナゼート（Prednazate）；プリフェロン；プロドール酸；プロクアゾン；プロキサゾール；プロキサゾールクエン酸塩；リメキシロン；ロマザリット；サルコレックス；サルナセジン；サルサラート；塩化サングイナリウム；セクラゾン；セルメタシン；スドキシカム；スリンダク；スプロフェン；タルメタシン；タルニフルメート；タロサラート；テブフェロン；テニダブ；テニダブナトリウム；テノキシカム；テシカム；テシミド；テシミド；；チオピナク；ピバル酸チキソコルトール；トルメチン；トルメチンナトリウム；トリクロニド（Triclonide）；トリフルミダート；ジドメタシン；及びゾメピラックナトリウム；

を包含する。

【 0 0 9 3 】

一実施形態において、C M B P C は、医薬組成物の配合（formulation）に適したような追加の成分を含有してもよい。本明細書で使用される場合、「追加の成分」は、以下の一つ以上を包含する（ただし、これらに限定されない）：

賦形剤；界面活性剤；分散剤；不活性希釈剤；造粒剤および崩壊剤；結合剤；潤滑剤；甘味剤；香味剤；着色剤；防腐剤；ゼラチンのような生理学的に分解可能な組成物；水性ビヒクルおよび溶媒；油性ビヒクルおよび溶媒；懸濁剤；分散剤又は湿潤剤；乳化剤；粘滑剤；パフファ；塩；増粘剤；充填剤；乳化剤；抗酸化剤；抗生物質；抗真菌剤；安定化剤；および医薬的に許容可能なポリマー又は疎水性材料。

【 0 0 9 4 】

一般に、C M B P C は、所望の、慣用の非毒性の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、およびビヒクルを含有する配合の投与単位で全身投与することができ、又は注射、注入、又は移植などの（但し、これらに限定されない）手段により局所的に投与することができる。特定の実施形態において、C M B P C の投与は、静脈内注入、気管支内投与、動脈内注射、筋肉内注射、心臓内注射、皮下注射、腹腔内注射、腹腔内注入、経皮拡散、粘膜拡散、頭蓋内、髄腔内、又はそれらの組み合わせによるものであってもよい。C M B P C を投与する手段は、注入を包含してよい（但し、これに限定されない）。全身投与手段（systemically）はまた、例えば、ポンプによるもの、静脈ラインによるもの、又はボーラス注射によるもの、を包含してよい。ボーラス注射は、皮下、筋肉内、又は腹腔内経路を含むことができる。

【 0 0 9 5 】

本明細書中に提供される医薬用（例えば、C M B P C ）および予防用組成物の記述は、主にヒトへの倫理的投与に適する医薬組成物に向けられているが、そのような組成物は、すべての種類の動物に投与するのに一般的に適していることが当業者によって理解されよう。様々な動物への投与に適した組成物にするため、本書に開示されたタイプの、ヒトへの投与に適した組成物の改変は、ルーチン、もしあれば、実験によりこのような改変を設計及び実行することができる、通常のスキルの獣医薬理学者によって、達成することができる。本開示の医薬組成物の投与が意図される被験体は、ヒトおよび他の霊長類；商業的に適切な哺乳動物、例えばウシ、ブタ、ウマ、ヒツジなど、を包含する哺乳動物；愛玩動物、例えばネコおよびイヌなど；及び商業的に適切な鳥、例えば、ニワトリ、アヒル、ガ

10

20

30

40

50

チョウ、及び七面鳥など、を包含する鳥；を包含する(但し、これらに限定されない)。

【0096】

特定の態様において、CMBPC及び/又はRCの治療的に有効な用量は、被験体に送達される。治療有効用量は、種々の要因(例えば、被験体の体重)を使用して決定され、且つ、医学的状態の重症度もしくはフェーズ段階に基づいて、さらに改変されてもよい。使用CMBPC及び/又はRC中の細胞数は、レシーバ被験体の重量および状態、投与の頻度又は数、及び他の変数に依存するであろう。例えば、治療用量は、CMBPC及び/又はRCの1以上の投与であってもよい。

【0097】

一実施形態において、CMBPC及び/又はRCは、局所投与のため、クリーム、ローション、美容液、粉末、軟膏、又はドロップなどの形態に配合される(formulated)。局所投与用CMBPC及び/又はRCの配合物はまた、医薬的に許容可能な担体、保湿剤、油、脂肪、ワックス、界面活性剤、増粘剤、酸化防止剤、粘度安定剤、キレート剤、緩衝剤、防腐剤、香料、染料、低級アルカノール、保湿剤、皮膚軟化剤、分散剤、日焼け止め剤、例えば放射線遮断化合物又はUV遮断剤など、抗菌剤、抗真菌剤、殺菌剤、ビタミン類、抗生物質、抗ニキビ剤、ならびに、有意な悪影響を及ぼさない他の好適な材料など、を含有してもよい。還元された細胞を含む組成物において使用されてよい、非限定的な例示的な医薬的に許容可能な担体は、水、水と水混和性溶媒、例えば低級アルカノール又は植物油、との混合物、及び水溶性の眼科的に許容される非毒性ポリマー(例えば、メチルセルロースなどのセルロース誘導体)、グリセリン、プロピレングリコール、メチルパラベン、アルギン酸塩、ステアリン酸グリセリル、ステアリン酸PEG-100、セチルアルコール、プロピルパラベン、ブチルパラベン、ソルビトール、ポリエトキシ化モノステアリン酸アンヒドロソルビトール(TWEEN(登録商標))、白色ワセリン(VASELINE(登録商標))、トリエタノールアミン、エミュー油、アロエベラ抽出物、ラノリン、カカオ脂、LIPODERM(登録商標)塩基、等を包含してよい。一実施形態において、局所投与用に配合されたCMBPC及び/又はRCは、顔、手、及び首などを包含する皮膚の1以上の領域に適用することができる。

【0098】

一実施形態において、本明細書に開示される方法論は、予防的、緩和的、治癒的、又はそれらの組み合わせである治療法をもたらす。本明細書に開示されたタイプの方法論および組成物は、神経障害；自己免疫疾患；及び放射線露出オーバーに関連する疾患(慢性又は急性)を包含する、加齢に関連する医学的状態などの、細胞機能および生存率の低下に関連する多様な医学的状態の治療に利用することができる。

【0099】

本明細書に開示される方法論および組成物は、有害な細胞事象に関連する遺伝子の発現の同時減少とともに、改善された細胞健康に関連する遺伝子の増加した発現をもたらし得ると想定される。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法論および組成物は、有益な細胞事象に関連する遺伝子の増加した発現をもたらす。

【0100】

本開示の別の態様によれば、キットが提供される。本発明によるキットは、本明細書に開示される組成物(例えば、RC、無細胞培地)を含むパッケージ(複数可)又は容器を包含し、且つ、定義された培地と細胞培養培地補充物とを包含してよい。キットは、医学的状態の治療及び/又は予防のための指示書又はパッケージに関連する指示をさらに包含してもよい。用語「パッケージ」は、本明細書に提示された(幹細胞、培地、及び/又は培地補充物を包含する)組成物を含有するいずれの容器を意味する。例えば、パッケージは、箱又は包装であってもよい。医薬包装材料の例は、ブリスターパック、ボトル、チューブ、吸入器、ポンプ、バッグ、バイアル、コンテナ、シリンジ、瓶、ならびに、選択された配合物、及び投与および治療の意図されたモードに適したいずれの包装材料、を包含する(但し、これらに限定されない)。キットはまた、パッケージ内に含まれないが、パッケージの外側に取り付けられているアイテム、例えばピペット、を含めることができる。

キットは、治療を必要とする状態を有する被験体に、本開示の組成物を投与するための指示書(instructions)を任意に含んでもよい。キットはまた、米国食品医薬品局(FDA)などの規制当局により承認された、化合物の使用のための取扱説明を含むことができる。キットは、本発明の組成物のためのラベリングや製品インサートを任意に含んでもよい。パッケージ(単数又は複数)及び/又は任意の製品インサート(単数又は複数)は、それ自体が規制当局によって承認されてもよい。キットは、パッケージ内に、固相又は(例えば、提供される緩衝液のような)液相中の化合物を含むことができる。キットはまた、方法を実施するため、溶液を調製するための緩衝液と、一方の容器から他方の容器へ液体を移送するためのピペットと、を含むことができる。キットはまた、本書に記載されたように、併用療法において使用するための1つ以上の他の化合物を任意に含んでもよい。特定の実施形態において、パッケージ(複数可)は、静脈内投与のための容器である。

10

【0101】

一実施形態において、本明細書に開示されたタイプの復元方法を受けた被験体は、その後、しばらくの期間にわたって、モニタリングされ得る。被験体のモニタリングは、被験体の一般健康状態及び/又は医学的状态の定性的および定量的評価を含んでもよい。いくつかの実施形態において、被験体は、本明細書に開示されたタイプの複数の細胞復元方法を受けてよい。例えば、本明細書に開示されたタイプの細胞復元法を受けたレシーバ被験体は、しばらくの期間にわたって被験体の一般健康状態及び/又は医学的状态の定量的及び/又は定性的な改善を表わすことができる。続いて、レシーバ被験体は、被験体の一般健康状態及び/又は医学的状态の若干の低下を体験してもよく、且つ、別の細胞の復元処理を行ってもよい。細胞の復元プロセスは、

20

本書に開示された方法論を利用して、ドナー細胞サンプル及び/又はレシーバ細胞サンプルを得るステップと、

レシーバ細胞サンプルの細胞復元を行うステップと、

レシーバ被験体に復元された細胞サンプルを投与するステップと、
を含むことができる。あるいは、レシーバ被験体は、先の細胞復元プロセスから残存する復元された細胞サンプルの少なくとも一部分を投与されてよい。

【0102】

いくつかの実施形態において、被験者の評価は、本明細書に開示された分析(例えば、ナチュラルキラーアッセイ、テロメア長さ、遺伝子及びタンパク質バイオマーカー配列)に基づく決定を含む。このような実施形態において、被験体は、レシーバ細胞サンプルと、本明細書に開示されるように評価サンプルの品質を提供することができる。いくつかの実施形態において、復元後の(post-restoration)ある時点におけるレシーバ細胞サンプル品質値は、復元前の(pre-restoration)レシーバ細胞サンプル品質値と比較することができ、且つ、この情報は、追加の処理が必要であるかどうかを評価するために利用される。例えば、復元前のレシーバ細胞サンプル品質値5を有する被験体は、復元プロセスに続いて、約1年までの期間にわたり、復元後のレシーバ細胞サンプル品質値9を有することができる。1.5年後、被験体の復元後のレシーバ細胞サンプル品質値は、7に低下する一方、3年後、品質は5であり得る。このような場合、被験体は別のRCを投与されてよい。

30

40

【0103】

一実施形態において、細胞の復元のための方法は、ドナー細胞サンプルの培養培地中に存在する1つ以上の成分の単離を含む。そのような材料は、レシーバ細胞サンプルに対し、本明細書に開示されたタイプの細胞機能を復元するそれらの能力について、調査されることができる。一実施形態において、IRE(isolated restoring elements、単離された復元中要素)は、小胞体、又は小胞体から誘導される材料、例えばエキソソーム、エキソソーム複合体、タンパク質、サイトカイン、微小胞、微小胞錯体、マイクロRNA、大きな非コードRNA又はそれらの組み合わせなど、を含む。エキソソームは、由来の細胞及び組織に応じて変化するタンパク質分子の進化的に保存された共通のセット、ならびに

50

、mRNAおよび非コードRNA(ncRNA)の分子、例えばマイクロRNA(miRNA)及び長い非コードRNA分子(lncRNA)など、から構成される。エキソソームは、細胞材料の膜で保護された移動を介して、細胞外シグナル伝達のメディエータとして機能し、且つ、さまざまな役割、例えばアレルギーに対する寛容性の誘導、マウスにおける確立した腫瘍の根絶、およびナチュラルキラー細胞の阻害および活性化など、を果たしている可能性がある。当業者によって理解されるように、エキソソームおよび微小胞は、生体分子カーゴ(例えば、RNA、タンパク質)の担体として想定することができる。以下、簡単にするために、レシーバの細胞サンプル(例えば、エキソソーム)まで、本明細書に開示されたタイプの細胞機能を復元させる能力を有するドナー細胞サンプルから単離された担体が、分離された復元中要素(isolated restoring elements, IRE)とまとめて呼ばれる一方、このようなIRE(例えば、RNA)において存在するカーゴは、細胞復元の分子(molecules of cellular restoration, MCR)とまとめて呼ばれる。

10

【0104】

IREは、いずれの好適な方法論を用いてドナー細胞サンプルの培養培地(CM)から識別することができる。例えば、IREは、エキソソームの単離キットとして市販品で、超遠心分離又は沈殿/低速遠心分離のいずれかを介して、CMから単離することができる。

【0105】

一実施形態において、IREはまた、微粒子又はエクソソームとしても知られている微小胞(microvesicles)である。微小胞は、全ての細胞型から落ちた(shed)、通常0.2 μmより大きいサイズの、細胞膜の断片である。微小胞はまた、細胞内の通信において役割を果たしており、細胞間においてmRNA、miRNA、タンパク質、および脂質を輸送することができる。一実施形態において、本明細書に開示されたタイプのRCは、被験体への投与のために配合された、単離されたエキソソームと、医薬的に許容可能な担体とを含む混合物である。一実施形態において、本明細書に開示されたタイプのRCは、被験体への投与のために配合された、単離された微小胞と、医薬的に許容可能な担体とを含む混合物である。

20

【0106】

一実施形態において、単離されたエキソソーム及び/又は単離された微小胞は、本明細書に開示される組成物および方法論において利用され得る。あるいは、単離されたエキソソーム及び/又は単離された微小胞は、エキソソーム及び/又は微小胞に関連した材料を単離及び/又は特徴付けるための方法論にさらに供することができる。

30

【0107】

一実施形態において、本明細書に開示される方法は、単離されたエキソソーム及び/又は微小胞(すなわち、MCR)のカーゴ(すなわち、生化学的組成)の分析をさらに含む。いずれの好適な方法論は、エキソソーム及び/又は微小胞の生化学的組成を決定するために使用することができる。例えば、エキソソームの又は微小胞の材料は、抽出されてよく、且つ、抽出された材料は、例えば配列決定(sequencing)およびゲル分析のような技術によって特徴化を受ける。単離されたエキソソームの又は微小胞の材料は、RCのため、本明細書で先に開示されたものと同様の方法で細胞の復元を行う、これらの材料の能力を決定するため、調査されてよい。一実施形態において、単離されたエキソソーム及び/又は微小胞の生化学的組成の1以上の構成成分は、レシーバの細胞サンプルの細胞の復元を達成するために決定される。

40

【0108】

一実施形態において、本明細書に開示されたタイプのMCRは、単離された巨大分子、例えばタンパク質、ゲノムDNA(gDNA)、ミトコンドリアDNA(mtDNA)、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)、多糖類、サイトカイン、脂質、核酸、RNAなど、又はそれらの組み合わせ、を含むことができる。あるいは、本明細書に開示されたタイプのMCRは、小分子、例えば代謝産物、又は天然生成物、を含むことができる。一実施

50

形態において、M C Rは、細胞物質（例えば、ドナー細胞サンプル）から供給されてもよい。あるいは、M C Rは、巨大分子の場合には、自然界における組換え体であってもよく、小分子の場合には合成することができる。本開示における使用に好適な組成物の一実施形態は、それを必要とする被験体に投与するために配合されたM C Rを含む。このような材料は、R Cの1以上の実施形態の投与のため開示されたものと類似の方法で投与されてよい。例えば、それを必要とする被験体への投与に適した配合物は、I R E及び／又はM C Rおよび明細書に開示された医薬的に活性な材料の1以上（例えば、抗生物質）を含んでいてもよい

【0109】

非経口注射のためのI R E S及び／又はM C Rは、医薬的に許容可能な無菌の水性又は非水性溶液、分散液、懸濁液又は乳濁液、および滅菌注射用溶液もしくは分散液に再構成するための無菌粉末を含んでよい。好適な水性および非水性担体、希釈剤、溶媒又はビヒクルの例は、水、エタノール、ポリオール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロールなど）、それらの好適な混合物、植物油（オリーブ油など）、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルなど、を包含する。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には必要な粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【0110】

I R E及び／又はM C Rを含む組成物はまた、医薬的に許容可能な担体、保湿剤、油、脂肪、ワックス、界面活性剤、増粘剤、酸化防止剤、粘度安定剤、キレート剤、緩衝剤、防腐剤、香料、染料、低級アルカノール、保湿剤、皮膚軟化剤、分散剤、日焼け止め剤、例えば放射線遮断化合物又はUV遮断剤など、抗菌剤、抗真菌剤、殺菌剤、ビタミン類、抗生物質、抗ニキビ剤、ならびに局所組成物の活性に有意な悪影響を及ぼさない他の好適な材料をも含んでいてもよい。I R Eを含む組成物において使用してよい、非限定的な例示的な医薬的に許容可能な担体は、水、水と水混和性溶媒、例えば低級アルカノール又は植物油、との混合物、及び水溶性の眼科的に許容される非毒性ポリマー（例えば、メチルセルロースなどのセルロース誘導体）、グリセリン、プロピレングリコール、メチルパラベン、アルギン酸塩、ステアリン酸グリセリル、ステアリン酸P E G - 1 0 0、セチルアルコール、プロピルパラベン、ブチルパラベン、ソルビトール、ポリエトキシ化モノステアリン酸アンヒドロソルビトール（T W E E N（登録商標））、白色ワセリン（V A S E L I N E（登録商標））、トリエタノールアミン、エミュー油、アロエベラ抽出物、ラノリン、カカオ脂、L I P O D E R M（登録商標）塩基、等を包含してよい。

【0111】

微生物の作用の防止は、本明細書に開示された組成物のいずれかにおける種々の抗菌剤および抗真菌剤によって封入すること、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸など、により行うことができる。また、等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウムな、を含めることが望ましいかもしれない。

【0112】

一実施形態において、I R E及び／又はM C Rは、局所投与のための組成物として配合される。このような局所復元中組成物は、局所適用のための組成物の配合物に好適な添加剤を含むことができる。一実施形態において、局所復元中組成物は、顔、手や首などを包含する皮膚の1以上の領域に適用することができる。

【実施例】

【0113】

本開示の主題は一般的に記載されてきたが、以下の実施例は、本開示の特定の実施例として、及びその実践と利点を実証するために、与えられる。なお、実施例は例示のために与えられ、且つ、いずれかの方法で追従するための明細書又は特許請求の範囲を限定するものではないことを理解されたい。

【0114】

実施例 1

10

20

30

40

50

サンプルとテクニック

末梢血単核細胞を、動員剤 E U P O G E N (登録商標) (フィルグラスチム) の投与を含むステージ B の準備を受けた被験体から採取した。以下の実験のために、末梢血単核細胞 (1 被験者あたり $1 \times 5 \text{ mL}$ のバイアル) は、有核細胞の次の数字を含むことが見出された。:

【 0 1 1 5 】

【数 1】

被験体	おおよその年齢	性別	細胞数
R1	70	男性	1.8×10^8
R2	70	男性	2.7×10^8
R3	60	男性	2.2×10^8
D1	26	男性	3.3×10^8
D2	30	男性	1.8×10^8
D3	28	女性	1.9×10^8

10

20

【 0 1 1 6 】

採取後の細胞は、凍結保存され、そして、解凍時において、トリパンブルー色素排除と、フローサイトメトリーとにより、95% よりも大きいと、決定された。

【 0 1 1 7 】

幹細胞、前駆細胞および成熟細胞採取集団のパーセンテージを、フローサイトメトリーによって決定した。表 3 は、造血幹細胞 (HSC) および初期造血前駆細胞 (HPC) の平均パーセンテージは、全動員された細胞採取 (collection) について、それぞれ ~ 0.5% および 1.0% であると示す。

30

【 0 1 1 8 】

【表 3】

	造血細胞C D45 ⁺	造血幹細胞 CD34 ⁺ CD38 ⁻	造血 前駆細胞 CD34 ⁺ CD38 ⁺	T 細胞 CD3 ⁺	N K 細胞 CD56 ⁺
%全細胞集 団					
R1	64.4	0.5	0.3	39.6	4.2
R2	59.9	0.4	1.6	29.7	7.5
R3	86.3	0.4	0.3	56.7	2.9
D1	64.0	1.0	1.5	32.4	5.7
D2	59.9	0.3	0.8	36.0	4.1
D3	59.0	4.1	1.0	10.5	5.5
% 造血 (CD45 ⁺) 集団					
R1	100	0.7	0.4	61.5	6.5
R2	100	0.7	2.8	49.5	12.5
R3	100	0.4	0.4	65.7	3.4
D1	100	1.5	2.4	50.5	8.9
D2	100	0.5	1.3	60.1	6.9
D3	100	7.0	1.7	51.7	9.3

10

20

30

40

【 0 1 1 9 】

【表 4】

	非造血細胞 CD45 ⁻	間葉系幹細胞 CD29 ⁺ CD44 ⁺ CD105 ⁺	内皮 前駆細胞 CD31 ⁺ CD105 ⁺
%全細胞集団			
R1	17.9	0.11	0.06
R2	38.7	0.91	0.79
R3	11.1	0.22	0.18
D1	33.4	0.52	0.44
D2	26.7	0.69	0.65
D3	40.4	0.63	0.46
% 非造血細胞(CD45 ⁻) 集団			
R1	100	0.60	0.35
R2	100	2.34	2.05
R3	100	1.94	1.58
D1	100	1.57	1.32
D2	100	2.57	2.43
D3	100	1.56	1.14

10

20

30

40

【0120】

レシーバ細胞サンプル(すなわち、R1、R2、およびR3)は個別に、ドナー細胞サンプル(すなわち、D1、D2、及びD3)とペアにされ、そして、これらのペアは、トランスウェル培養細胞中で4週間、共培養した。細胞の形態(morphology)を、共培養中2週間において、及び4週間の共培養において調べた。遺伝子発現アレイ、タンパク質アレイ、およびテロメア長さ実験は、採取チューブからの新たに解凍した細胞(ベースラインドナー細胞サンプル又はベースラインレシーバ細胞サンプルと呼ぶ)を、4週間の調査終点における細胞(復元された細胞サンプルと呼ぶ)と、比較した。

【0121】

共培養の中間点で(すなわち、2週間)、ベースラインレシーバ細胞サンプルは、低い

50

生存可能性と一致する形態を示した。復元された細胞サンプルは、コロニー形成を含むロバスト細胞形態を示した。

【0122】

実施例 2

タンパク質アレイ配列の分析は、ベースラインドナー細胞サンプル又は基準レシーバ細胞サンプルからの馴化培地を用いて行われた。馴化培地は、類似の(like)細胞タンパク質抽出物と混合され、細胞の老化や老化にリンクされている68個の因子(老化関連分泌因子(SASF)とまとめて呼ばれる)のために、抗体プローブから構成された、カスタム設計されたアレイに適用された。定量的PCR遺伝子アレイ分析は、ベースラインサンプルから、又は共培養ドナーおよびレシーバサンプルからRNAを抽出することによって行われた。提示されたデータは、ベースライン、ドナー細胞サンプル、ベースラインレシーバ細胞サンプル、又は復元された細胞サンプルのいずれかのために決定された平均メトリックを表す。

【0123】

遺伝子アレイ分析の結果は、ベースラインドナー細胞サンプル及び基準レシーバ細胞サンプルについて、老化関連遺伝子の大部分において2倍未満の差(difference)があったことを実証した(図3及び4)。遺伝子発現解析のプロットとして示された図の全てにおいて、四角形は、細胞復元の後で低い方のレベルにおいて発現される遺伝子を表し、三角形は、細胞復元の後で高い方のレベルにおいて発現される遺伝子を表し、円は、その発現レベルが、細胞復元前の発現レベルと実質的に同様であると決定された遺伝子を表す。「実質的に同様である」という指定は、定性的であり、且つ、ラインに対して値が非常に近似していること(close proximity)を反映している。データは、ドナー細胞サンプルおよびレシーバ細胞サンプルの動員と収集のための、本明細書に開示された技術が、非老化細胞のために選び出すことを提案する。細胞内で、又は培地中に放出された、生成した老化関連因子のレベルを評価したタンパク質ベースのアレイの結果は、ドナー細胞サンプル及びレシーバ細胞サンプル中の老化関連因子の間に大差はないこと(little difference)を示した(図5)。ドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルとの間において平均テロメア長さは、有意な違いは見られなかった(図6)。

【0124】

結果は、被験体の年齢差にもかかわらず、ドナー細胞サンプルおよびレシーバ細胞サンプルについて、遺伝子発現プロファイルおよびタンパク質発現プロファイルは、同様であったことを実証する。さらに、ドナー被験体とレシーバ被験体との間の年齢差にもかかわらず、細胞は、同様のテロメアの長さを有していた。

【0125】

実施例 3

復元された細胞サンプルを、実施例2の遺伝子およびタンパク質アレイを用いて検討した。そして、図7および8にそれぞれ示されている。検討した復元細胞サンプルのそれぞれについて、ベースラインドナー細胞サンプルと比較した場合、(フィギュア(Figure)の上の「Xs」により指定されるように)試験した遺伝子の約半分が、復元された細胞サンプルにおける低い方のレベルにおいて発現した。低い方のレベルにおいて発現した遺伝子は、細胞機能を改善すること、及び細胞老化及び老化の程度を減少させることに関連する遺伝子であった。データは、復元された細胞サンプルの遺伝子発現プロファイルが、トランスウェル復元によって変更され、且つ、ベースラインレシーバ細胞サンプルのプロファイル(that)よりも、ベースラインドナー細胞サンプルのプロファイルにより近く近似したことを示唆する。データは、復元(restore)細胞サンプルが、レシーバの細胞サンプルと比較して、るレシーバ細胞及び/又は細胞型の老化関連遺伝子の低下した発現を示したことを実証する。ここで、老化関連遺伝子は、図7及び8に示すような定量的ポリメラーゼ連鎖反応により、RBGEPと定義される。

【0126】

さらに、クラスタリング分析の検査は、遺伝子のサブセット(遺伝子セットAとする)

10

20

30

40

50

の発現は、ベースラインレシーバ細胞サンプルにおいて、一貫して上昇したが、その発現は、復元された細胞サンプルにおいては減少したことを明らかにした。復元された細胞サンプルにおける遺伝子セット A の発現は、ベースラインドナー細胞サンプルにおいて観察されたものに匹敵するレベルまで減少した。同様に、図 9 A に示すように、タンパク質アレイの層化(stratification)は、13 個の因子を同定した。13 個の因子は、ベースラインドナー細胞サンプルのそれと比較した場合、ベースラインレシーバ細胞サンプルにおける同様の上昇傾向を示した。同様に、図 9 B に示すように、復元された細胞サンプルは、ベースラインドナー細胞サンプルのそれと匹敵する、同定された 13 個の因子の発現レベルを示す。これらの知見は、遺伝子及びタンパク質アレイ分析により、レシーバ細胞サンプルの復元を監視するための方法論を実証する。さらに、これらのデータは、復元された細胞サンプルが、図 9、10、11 におけるように抗体アレイ、又は酵素結合免疫吸着検定法によって測定されたように、ベースラインにおけるレシーバ細胞サンプルと比較して、老化に関連する分泌性因子の低下した発現を示した(ここで、老化に関連する分泌性因子は、表 1 において定義される)ことを実証する。

10

【0127】

実施例 4

ベースラインドナー細胞サンプルおよびレシーバ細胞サンプルの個々のペアの復元された細胞サンプルの遺伝子およびタンパク質アレイを調べた。具体的には、レシーバ細胞サンプル R 1 は、それぞれ D 1 (図 10 B)、D 2 (図 10 C)、および D 3 (図 10 D)からのドナー細胞サンプルとトランスウェル実験で共培養した。階層クラスタグラム(clustergrams)は、これらの同じ遺伝子が D 1、D 2 及び D 3 において低レベルから適度なレベルで発現される一方、調べた遺伝子の全てがレシーバ細胞サンプルにおいて上昇することを示した(図 10 A)。復元された細胞サンプルは、D 1、D 2、及び D 3 について観察された発現レベルに匹敵する遺伝子発現を有することが見出された。ドナー細胞サンプル D 1、D 2、又は D 3 とともに、レシーバ細胞サンプル R 2 又は R 3 を使って行った実験は、同様の結果を示した

20

【0128】

実施例 5

トランスウェル共培養実験において、透過膜を通過する可溶性粒子の性質を調べました。具体的には、トランスウェル共培養実験をマヌマイシン(manumycin)の存在下又は非存在下で行った。マヌマイシン、-[(1S, 5S, 6R)-5-ヒドロキシ-5-[(1E, 3E, 5E)-7-[(2-ヒドロキシ-5-オキソ-1-シクロペンテン-1-イル)アミノ]-7-オキソ-1, 3, 5-ヘプタトリエン-1-イル]-2-オキソ-7-オキサビシクロ[4.1.0]ヘプト-3-エン-3-イル]-2E, 4E, 6Rトリメチル, 2, 4-デカジエンアミド、は、強力かつ選択的なファルネシルトランスフェラーゼ(farnesyltransferase)阻害剤として作用する抗生物質である。マヌマイシンはまた、エキソソームの放出を阻害することが知られている。5 µM マヌマイシンの存在下で、共培養した復元された細胞は、マヌマイシン不在下で培養した復元された細胞よりも少ない強固な形態を示した。マヌマイシンの存在下で、共培養した復元された細胞サンプルの遺伝子発現解析は、マヌマイシンの不在下で観察されたものと同様の発現レベルの変化を示しませんでした。対照的に、マヌマイシンの存在下で、共培養した復元された細胞サンプルのタンパク質発現解析は、マヌマイシンの不在下で共培養した復元された細胞サンプルのタンパク質レベルと比較した場合、調べたすべてのタンパク質について上昇したレベルを見出した(図 11)。データは、開示された細胞復元プロセスを媒介する際のエキソソーム/微小胞の役割を示唆している。さらに、開示された細胞復元プロセスを媒介する際のエキソソーム/微小胞の役割のためのサポートが、図 12 に示される。図 12 は、マヌマイシンの存在もしくは不在下共培養された復元された細胞サンプルのためのテロメア長さを示す。マヌマイシンの存在下のテロメア長さは減少し、エキソソーム/微小胞が復元プロセスにおいて役割を果たすことを示唆する。

30

40

【0129】

50

実施例 6

ベースラインドナー細胞サンプルとレシーバ細胞サンプルの先天性免疫機能は、ナチュラルキラー細胞アッセイを用いて評価した(図13)。アッセイはまた、復元されたサンプルについて行った(図14)。復元された細胞サンプルは、接触させたレシーバの細胞サンプル・ドナー細胞サンプル、例えばR3-D2として記載されているレシーバの細胞サンプル3とドナー細胞サンプルD2、により同定される。データは、復元された細胞サンプルR1-D3、R1-D2、R3-D2、およびR2-D2が、適切な免疫機能を維持した一方、復元された細胞サンプルR1-D1は免疫機能を低下させたことを実証する。データは、D2及びD3場合、復元された細胞サンプルは、図13及び14に説明されるような、ナチュラルキラー細胞の細胞毒性アッセイ、及び/又はT細胞マイトジェン応答アッセイにより定量されるように、細胞性免疫機能の改善によって特徴付けられることを説明する。

【0130】

ベースラインドナー細胞サンプルおよびレシーバ細胞サンプルの造血機能は、クローン原性アッセイを用いて評価した(図15)。データは、復元された細胞サンプルR1-D3、R1-D2、R3-D2、およびR2-D2が、適切な造血機能を維持した一方、復元された細胞サンプルR1-D1は、造血機能が低下していたことを実証する。データは、図15において観察されるように、造血幹細胞のクローン原性アッセイによって定量化されるように、細胞の造血機能における改善により特徴付けられることを説明する。

【0131】

細胞集団分析を、レシーバ細胞サンプル、R1の細胞型の本来の分布は、ドナー細胞サンプルD2との4週間の復元処理によって変更されたかどうかを調べるために、フローサイトメトリーにより行った。図16A-16Dに示された結果は、内皮前駆細胞のパーセンテージにおけるいくつかの損失があったが(図16A)、間葉系幹細胞区画の拡大があったこと(図16B)を実証した。図16Cに示すように、非造血細胞のパーセンテージの組み合わせは(すなわち、図16A及びBから)、これらの集団の合計パーセンテージは、復元プロセス中に維持されたことを示した。同様に、図16Dに示すように、造血幹細胞および前駆細胞のパーセンテージはわずかに変更された。これらのデータは、本明細書に開示された方法論により調製された復元された組成物は、フローサイトメトリーによって、図16に観察されるような、ベースラインでのレシーバサンプルと比較して、細胞復元後のレシーバ細胞において、造血幹細胞、造血前駆細胞、間葉系幹細胞および内皮前駆細胞のパーセンテージの変化の欠如によって特徴づけられることを実証する。

【0132】

実施例 7

細胞復元におけるエキソソームの役割を調べた。エキソソームは、エキソソームを含まない培地で培養した細胞から採取した。血清を含有する完全培地は、100,000gで一晩超遠心によってエキソソームをクリアした後、40℃で保存した。培地を回収し、次にエキソソームを単離するために分画超遠心分離に供した。培地は、20分間2,000gでの遠心分離によって細胞をクリアした。上清は、残りの細胞残屑と大きな小胞を除去するために30分間、10,000gで遠心分離するための滅菌チューブに移した。上清を超遠心管に移し、80分間100,000gで遠心した。上清を廃棄し(disposed)、エキソソームペレットをPBSで洗浄した。最後のスピンは80分間100,000gで行われ、エキソソームペレットは、TEMのため、又はRNAの抽出のために100µL PBSに再懸濁した。小さいボリュームからのエキソソーム採取は、Invitrogen社からの合計エキソソーム単離キットを用いて実施した。単離プロトコールは、製造業者のガイドラインに従った。収集したエキソソームは、PBSで1回洗浄した。エキソソームサンプルを、100µg/mLの最終タンパク質濃度にPBSで希釈した。簡潔には、エキソソーム溶液20µLをformavar炭素被覆されたグリッド上に置いた。溶液は、濾紙でグリッドから吸い取り(wicked off)及び20µLのPTA(リンタンゲステン(phosphotungstic)酸)染色溶液を、その後、グリッド上に置き、濾紙

10

20

30

40

50

で吸い取った。グリッドは、J E O L 1 2 0 0 E X 電子顕微鏡でスコープし、高度な顕微鏡技術 (A M T カメラ) (Woburn, M A) を用いてデジタル画像を得た。

【 0 1 3 3 】

以下に列挙の実施形態は、非限定的な例として提供される。

【 0 1 3 4 】

第 1 の実施形態は、

(i) 第一の被験体からの第 1 の細胞サンプルを得るステップと、

(i i) 第 2 被験体からの第 2 の細胞のサンプルを得るステップと、

(i i i) 復元中組成物を製造するために、約 2 4 時間 ~ 約 6 週間の範囲の期間、第 2 の細胞サンプルの培地の少なくとも一部分の存在下で第 1 の細胞サンプルを培養するステップと、

(i v) 復元された組成物を製造するために、約 2 4 時間 ~ 約 6 週間の範囲の期間、復元中組成物と第 2 の細胞サンプルとを接触させるステップと、を含む方法である。

【 0 1 3 5 】

第 2 の実施形態は、第 1 の細胞サンプル、第 2 の細胞サンプル、復元された組成物、又はそれらの組み合わせを免疫表現型検査するステップ、をさらに含む、第 1 の実施形態の方法である。

【 0 1 3 6 】

第 3 の実施形態は、第 1 の被験体、第 2 の被験体、又はその両方が、親族 (consanguinity) 関係にある、第 1 ~ 第 2 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 3 7 】

第 4 の実施形態は、第 1 の被験体及び第 2 の被験体が、約 5 年 ~ 約 7 5 年だけ暦年齢が異なる、第 1 ~ 第 3 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 3 8 】

第 5 の実施形態は、第 2 の被験体が、第 1 の被験体において診断未確定とされる医学的状态を有する、第 1 ~ 第 4 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 3 9 】

第 6 の実施形態は、第 1 の被験体、第 2 の被験体、又はその両方が、ステップ (i) の前に動員剤を投与されている、第 1 ~ 第 5 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 0 】

第 7 の実施形態は、第 1 の細胞サンプルと第 2 の細胞サンプルが、成体幹細胞を含む、第 1 ~ 第 6 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 1 】

第 8 の実施形態は、第 1 の細胞サンプルと第 2 の細胞サンプルが、起源が胚性である幹細胞を排除する、第 1 ~ 第 7 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 2 】

第 9 の実施形態は、第 1 の細胞サンプル、第 2 の細胞サンプル、又はその両方は、被験体の末梢血から得られる、第 1 ~ 第 8 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 3 】

第 1 0 の実施形態は、第 1 の細胞サンプル、第 2 の細胞サンプル、又はその両方は、被験体の骨髓から直接採取される、第 1 ~ 第 9 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 4 】

第 1 1 の実施形態は、第 1 の細胞サンプル、第 2 の細胞サンプル、又はその両方が、非造血細胞、間葉幹細胞、内皮前駆細胞、造血幹細胞、初期 (primitive) 造血幹細胞、造血前駆細胞、分化した造血細胞、T リンパ球、ナチュラルキラー細胞、又はそれらの組み合わせを含む、第 1 ~ 第 1 0 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 5 】

第 1 2 の実施形態は、第 1 の細胞サンプル、第 2 の細胞サンプル、又はその両方が、非老化および老化細胞を含む、第 1 ~ 第 1 1 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 6 】

第 1 3 実施形態は、非老化細胞は、全細胞数に基づいて、約 9 9 % ~ 約 9 0 % の量で存在する、第 1 ~ 第 1 2 の実施形態のいずれの方法である。

【 0 1 4 7 】

第 1 4 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物である。

【 0 1 4 8 】

第 1 の実施形態の復元中組成物を含むキットである、第 1 5 の実施形態。

【 0 1 4 9 】

第 1 6 の実施形態は、被験体に、第 1 の実施形態の復元中組成物の効果量を投与するステップを含む方法である。

10

【 0 1 5 0 】

第 1 7 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物と、抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤(active)と、を含む医薬配合物である。

【 0 1 5 1 】

第 1 の実施形態から単離されたエキソソーム / 微小胞である、第 1 8 の実施形態。

【 0 1 5 2 】

第 1 9 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離された微小胞である。

【 0 1 5 3 】

第 2 0 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離された微小胞を含むキットである。

20

【 0 1 5 4 】

第 2 1 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離されたエキソソームを含むキットである。

【 0 1 5 5 】

第 2 2 の実施形態は、被験体に、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離されたエキソソームの効果量を投与するステップを含む方法である。

【 0 1 5 6 】

第 2 3 の実施形態は、被験体に、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離された微小胞の効果量を投与するステップを含む方法である。

30

【 0 1 5 7 】

第 2 4 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離されたエキソソームと、抗菌剤、ステロイド；鎮痛剤、抗炎症剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤(active)と、を含む医薬配合物である。

【 0 1 5 8 】

第 2 5 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離された微小胞と、抗菌剤、ステロイド；鎮痛剤、抗炎症剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤(active)と、を含む医薬配合物である。

【 0 1 5 9 】

第 2 6 の実施形態は、第 1 の実施形態の復元中組成物から単離された複数のエキソソームである。

40

【 0 1 6 0 】

第 2 7 の実施形態は、請求項 1 に記載の復元中組成物から単離された複数の微小胞である。

【 0 1 6 1 】

第 2 8 の実施形態は、請求項 1 に記載の復元中組成物を濾過することにより調製された無細胞培地であり、前記無細胞培地は細胞外小胞を含む。

【 0 1 6 2 】

第 2 9 の実施形態は、復元された(restored)組成物を製造するために、レシーバ細胞サンプルをドナー細胞サンプルと接触させるステップを含む方法であって、

50

前記復元された組成物は、ナチュラルキラー細胞アッセイによって決定されるように、自然免疫機能を有し、すなわち、レシーバ細胞サンプルの先天性免疫機能と比較したとき、増加し、且つ、

レシーバ細胞サンプルと接触させる前に、ドナー細胞サンプルへのマヌマイシン (mannumycin) A の添加は、前記復元された組成物の先天性免疫機能の増加を阻害する。

【0163】

第30の実施形態は、

動員された幹細胞から誘導されたエキソソームと、

1以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、を含む医薬配合物である。

10

【0164】

第31の実施形態は、抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤、；成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤をさらに含む、第30の実施形態の配合物である。

【0165】

第32の実施形態は、第30の実施形態の配合物を含むキットである。

【0166】

第33の実施形態は、被験体に第30の実施形態の配合物の効果量を投与するステップを含む方法である。

20

【0167】

第34の実施形態は、

動員された幹細胞から誘導された微細小胞と、

1以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、を含む医薬配合物である。

【0168】

第35の実施形態は、抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤、；成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤をさらに含む、第34の実施形態の配合物(formulation)である。

【0169】

第36の実施形態は、第34の実施形態の配合物を含むキットである。

30

【0170】

第37の実施形態は、被験体に、第34の実施形態の配合物の効果量を投与するステップを含む方法である。

【0171】

第38の実施形態は、

エキソソーム由来、及び/又は微細小胞由来分子と、

1以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、を含む医薬配合物である。

【0172】

第39の実施形態は、第38の実施形態の配合物であって、前記エキソソーム由来及び/又は微細小胞由来の分子が、タンパク質、サイトカイン、微細小胞、微細小胞錯体、マイクロRNA、巨大ノンコーディングRNA又はそれらの組み合わせを含む。

40

【0173】

第40の実施形態は、第38の実施形態の配合物を含むキットである。

【0174】

第41の実施形態は、被験体に、第38の実施形態の配合物の効果量を投与するステップを含む方法である。

【0175】

第42の実施形態は、

50

組換えタンパク質、組換え核酸、合成代謝物、および合成脂質からなる群から選択される材料と、

1以上の医薬的に許容可能な担体、アジュバント、又はビヒクルと、を含む、医薬配合物であって、

前記材料は、エキソソーム又は微細小胞から誘導され得る。

【0176】

第43の実施形態は、抗菌剤、ステロイド、鎮痛剤、抗炎症剤；成長因子、サイトカイン、ホルモン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される作用剤をさらに含む、第42の実施形態の配合物である。

【0177】

第44の実施形態は、第42の実施形態の配合物を含むキットである。

【0178】

第45の実施形態は、被験体に、請求項13に記載の配合物の効果量を投与するステップを含む方法である。

【0179】

第46の実施形態は、

(i)第1の被験体から第1の細胞サンプルを得るステップと；

(ii)復元中組成物を製造するため、約24時間～約6週間の範囲の期間、前記細胞サンプルを培養するステップと；

(iii)無細胞復元中組成物を製造するため、前記サンプルから細胞を除去するステップと；

を含む、方法である。

【0180】

第47の実施形態は、第2の被験体から得られた第2の細胞サンプルと、前記無細胞復元中組成物を接触させるステップをさらに含む、第46の実施形態の方法である。

【0181】

第48の実施形態は、前記第1の被験体、前記第2の被験体、又は両方が親族関係にある、第46の実施形態の方法である。

【0182】

第49の実施形態は、前記第1の被験体及び前記第2の被験体は、約5年～約75年だけ暦年齢が異なる、第46の実施形態の方法である。

【0183】

本開示の実施形態を示し、説明してきたが、本開示の精神および教示から逸脱することなく、当業者にその改変を行うことができる。本明細書に記載された実施形態は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。本開示について多くの変更および改変が可能であり、本発明の範囲内である。請求項のいずれの要素に関して「場合により(optionally)」という用語の使用は、被験体要素が必要とされるか、あるいは、必要とされないことを意味することが意図される。両方の選択肢は請求項の範囲内であることが意図される。comprises, includes, having等の、より広い用語の使用は、consisting of, consisting essentially of, comprised substantially of等のより狭い用語のサポートを提供するためである理解すべきである。

【0184】

従って、保護の範囲は、上記で述べた説明によって限定されるものではなく、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。範囲は、特許請求の範囲の被験体の全ての等価物を含む。それぞれ、すべてのクレームは、本発明の一実施形態として明細書中に組み込まれる。したがって、請求項はさらなる説明であり、且つ、本発明の好適な実施形態に加えられる。背景にある参考文献の議論は、特に本願の優先日後の公開日を有し得るいずれの参考文献は、それが本発明に対する先行技術であることを認めるものではない。本明細書に引用される全ての特許、特許出願、および刊行物の開示は、それらが本明細書に記載さ

10

20

30

40

50

れたものに補足的な例示的な手順又は他の詳細を提供する程度まで、参考として援用される。

【0185】

本出願からいずれ米国国内段階のために、本開示に記載のすべての刊行物および特許は、それらの刊行物に記載の構築物および方法論に記載および開示する目的のため、その全体が参照により本明細書に組み込まれ、本開示の方法に関連して使用されるかもしれない。上記および本文を通して考察されるいずれの刊行物及び特許は、本出願の出願日前のそれらの開示についてのみ提供される。本書における何事も、先行発明によるこのような開示に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。

【0186】

特に明記しない限り、いずれかのタイプの範囲が開示ないし特許請求される場合、その中にいずれの下位の範囲を含みながら、そのような範囲が合理的に包含することができる、個々の可能な数を開示もしくは特許請求することが意図される。測定値の範囲を説明するとき、このような範囲が合理的に包含することができることをすべての可能な数は、例えば、範囲の端点に存在するよりも、1桁目以上で範囲内の値を参照することができる。さらに、数値範囲が開示ないし特許請求される場合、出願人は、このような範囲が合理的に包含することができる各々可能な数を反映することを意図し、出願人はまた、範囲の開示が、その中に含まれるいずれの及び全ての下位範囲及び組合せを開示することを反映すること、及び交換可能であることを意図する。従って、開示の正確な量目未満を請求することを選択した理由の如何を問わず、出願人は、グループ内のいずれの下位範囲又は下位範囲の組み合わせを含め、任意のグループの任意の個々のメンバーを但し書除外(proviso out)する、又は排除する権利を留保する。

【符号の説明】

【0187】

- 210 5 mLのアフェレーシス試料中の全細胞
- 410 トランスウェルインサート
- 420 ドナー細胞
- 430 レシーバ細胞
- 440 可溶性因子/粒子

10

20

【 図 3 】

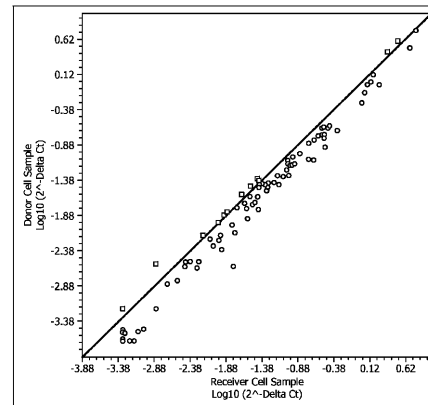


FIG. 3

400

Transwell Insert (410)

Donor Cells (420)

Receiver Cells (430)

Soluble Factors/Particles (440)

Cell Culture Well
細胞培養ウェル

【 図 5 A 】

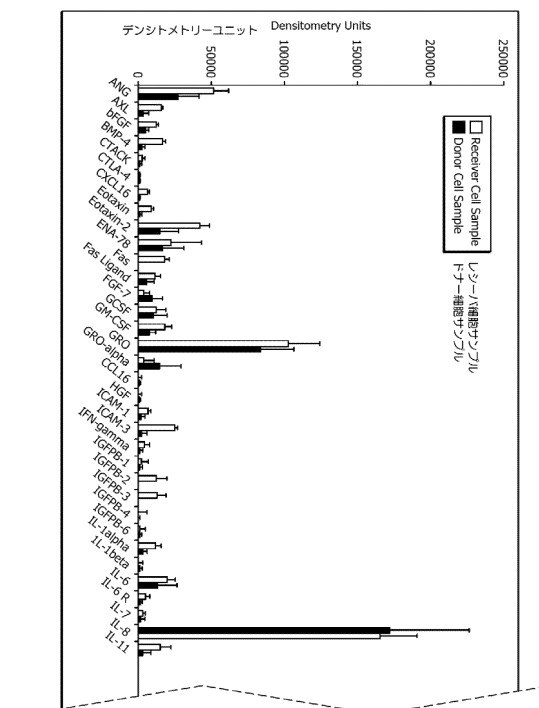
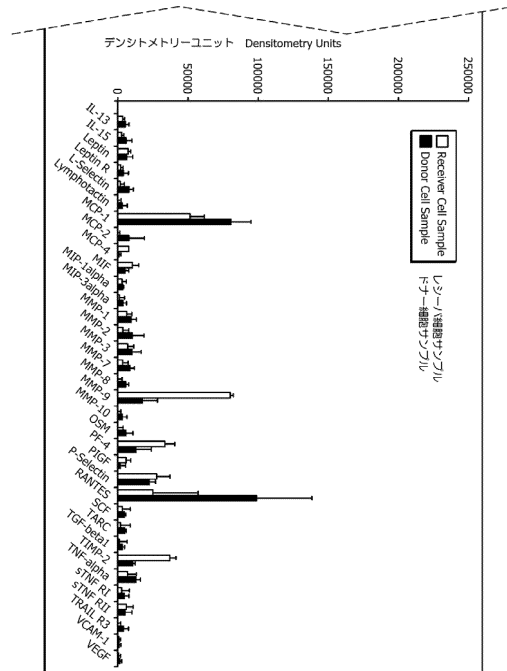
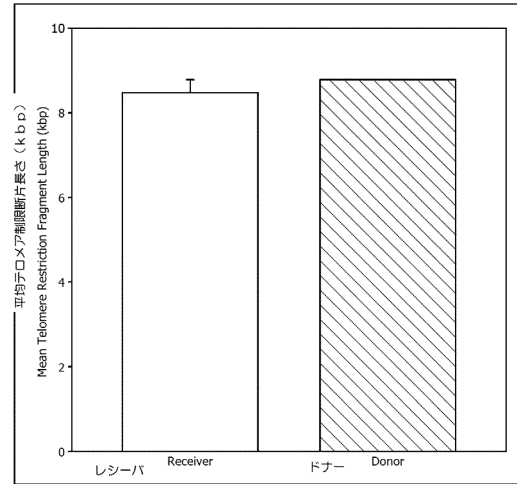


FIG. 4

【図 5 B】



【図 6】



【図 7】

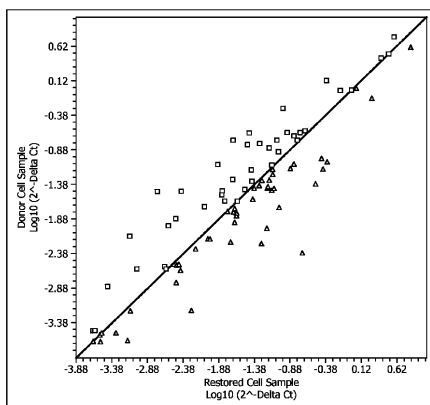


FIG. 7

【図 8】

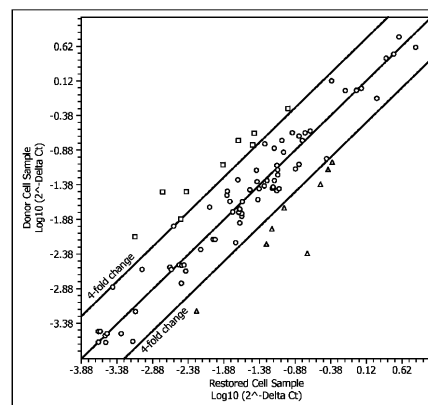
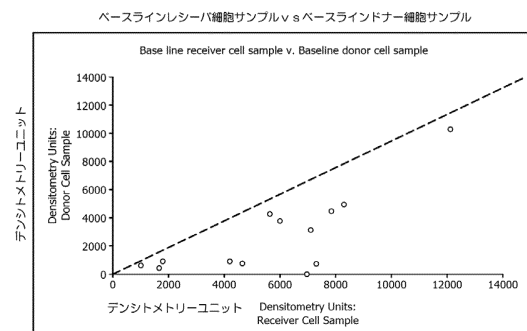
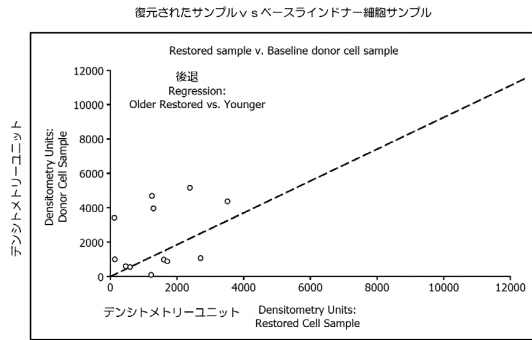


FIG. 8

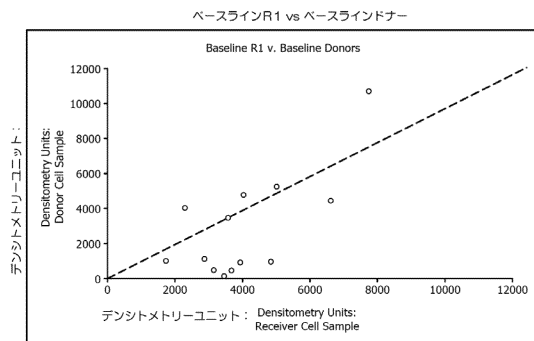
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 10 A】



【図 10 D】

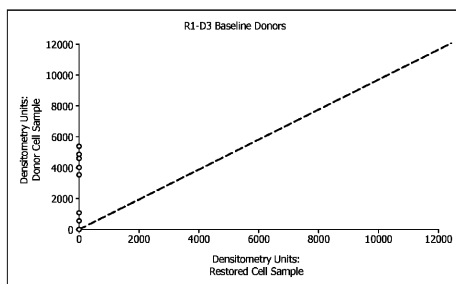
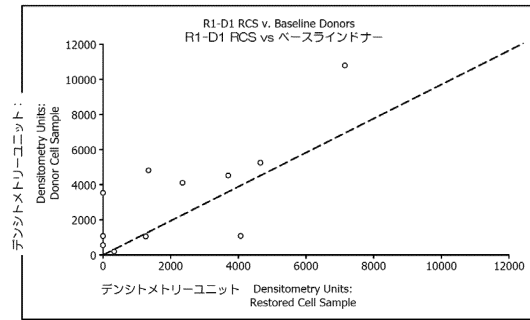


FIG. 10D

【図 10 B】



【図 10 C】

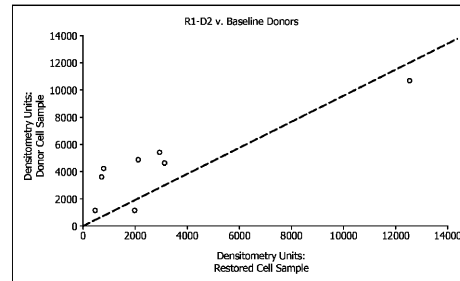
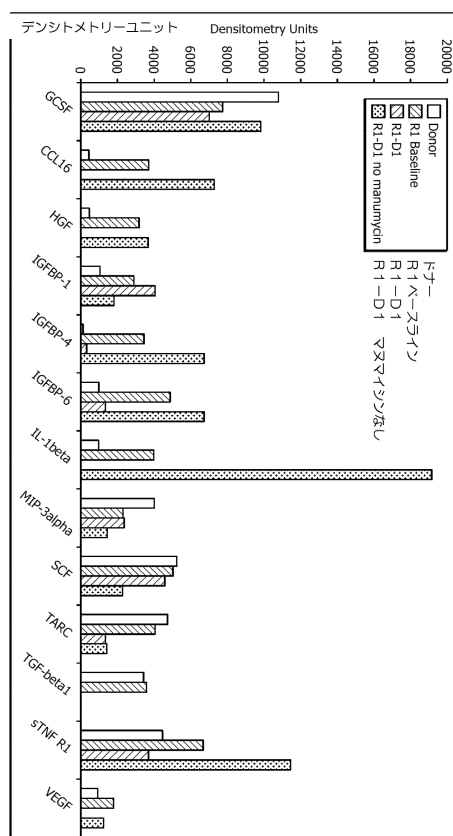
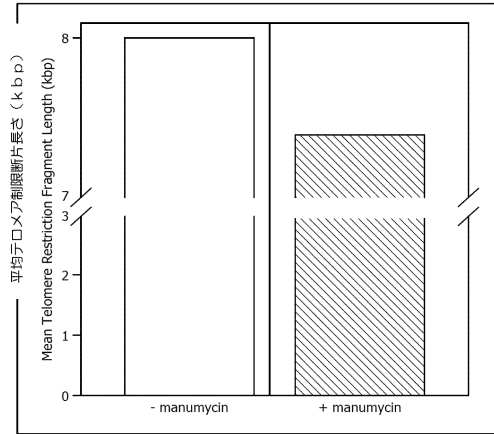


FIG. 10C

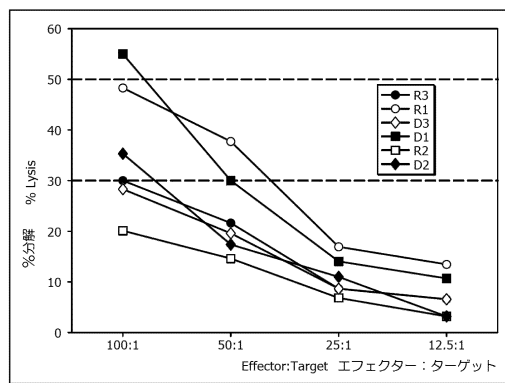
【図 11】



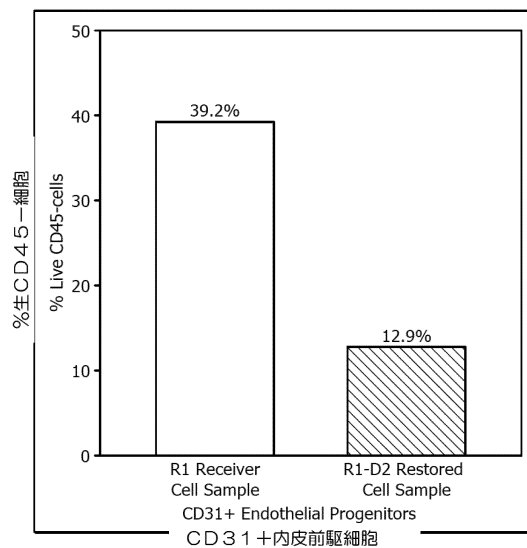
【図 1 2】



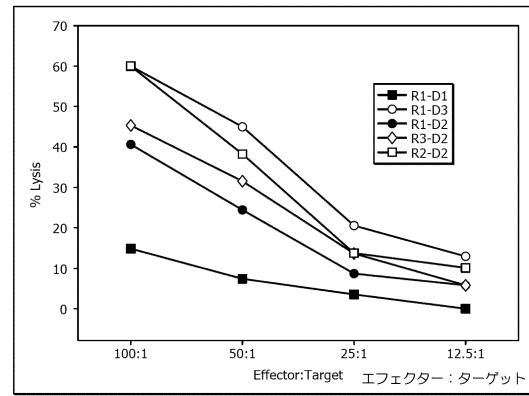
【図 1 3】



【図 1 6 A】



【図 1 4】



【図 1 5】

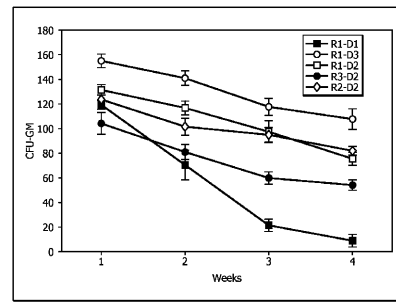
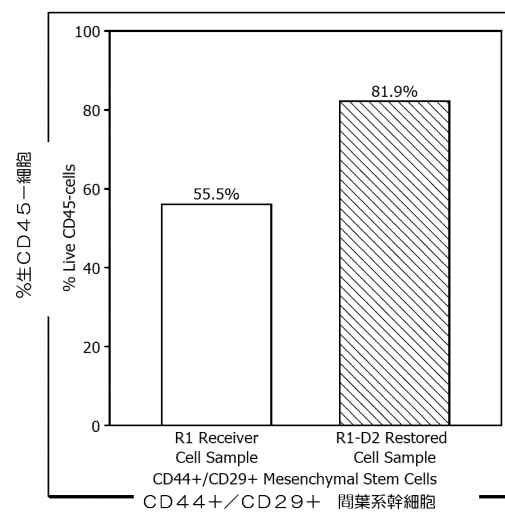
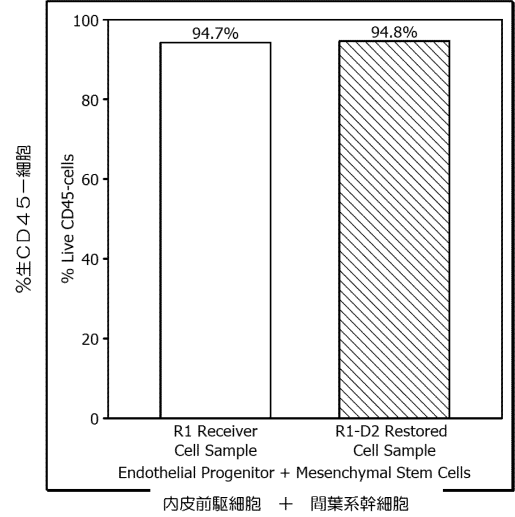


FIG. 15

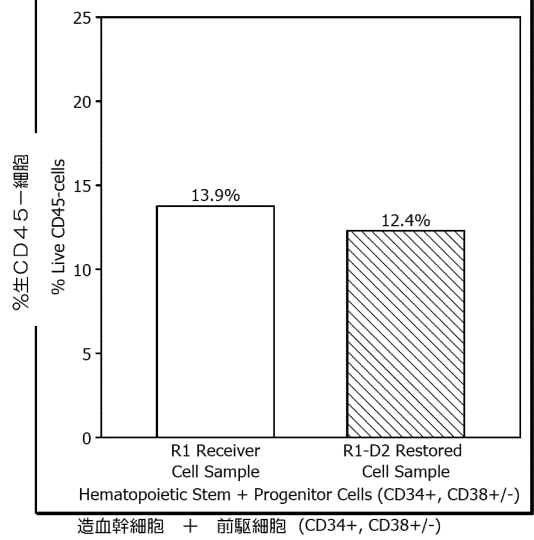
【図 1 6 B】



【図 16 C】



【図 16 D】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 7
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/074 (2010.01)		C 1 2 N 5/074	
C 0 7 K 14/52 (2006.01)		C 0 7 K 14/52	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)		C 0 7 K 14/475	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/09	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)		C 1 2 N 15/113	

(31)優先権主張番号 PCT/US2014/071667

(32)優先日 平成26年12月19日(2014.12.19)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 グレコ, スティーヴ

アメリカ合衆国 テキサス州 77006, ヒューストン, ヨーカム・ブルバード 4203,
#200

(72)発明者 ヴィンセント シー・ギアンパバ

アメリカ合衆国 07042 ニュージャージー州, モントクレア, ヴァレー・ロード 87

審査官 渡部 正博

(56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0093885(US, A1)

国際公開第2013/066368(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 35/00 - 35/768

A 6 1 K 45/00 - 45/08

A 6 1 P 1/00 - 43/00

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)