(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-513735
(P2023-513735A)
(43)公表日　令和5年4月3日(2023.4.3)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　38/17　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	38/17	４Ｃ０７６
Ａ６１Ｐ　35/00　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ　47/62　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	47/62	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ　35/50　(2015.01)		Ａ６１Ｋ	35/50	
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	45/00	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全82頁）

(21)出願番号　特願2022-548856(P2022-548856)
(86)(22)出願日　令和3年2月12日(2021.2.12)
(85)翻訳文提出日　令和4年10月12日(2022.10.12)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/017773
(87)国際公開番号　WO2021/163419
(87)国際公開日　令和3年8月19日(2021.8.19)
(31)優先権主張番号　62/975,599
(32)優先日　令和2年2月12日(2020.2.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　515010361
ティッシュテック，インク．
アメリカ合衆国　３３１２６　フロリダ州　マイアミ　コーポレート　センター　ドライブ　７３００　スイート　７００
(74)代理人　100118902
弁理士　山本　修
(74)代理人　100106208
弁理士　宮前　徹
(74)代理人　100196508
弁理士　松尾　淳一
(74)代理人　100122644
弁理士　寺地　拓己
(72)発明者　ツェン，シェファー
アメリカ合衆国フロリダ州３３１２６，
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　がん細胞を死滅させるまたはがん細胞の成長を阻害する方法

(57)【要約】
ある特定の実施形態では、がん細胞を死滅させる方法で使用するための、単離された重鎖－ヒアルロナン／ペントラキシン３（「ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３」）複合体を含む組成物が本明細書で提供される。外科的手技の後の腫瘍を囲む領域を単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させるステップを含む、腫瘍のがん細胞再成長の阻害を必要とする個体において腫瘍のがん細胞再成長を阻害する方法も本明細書で提供される。前記方法の実施に使用するための組合せおよびキットも本明細書で提供される。
【選択図】図４Ａ

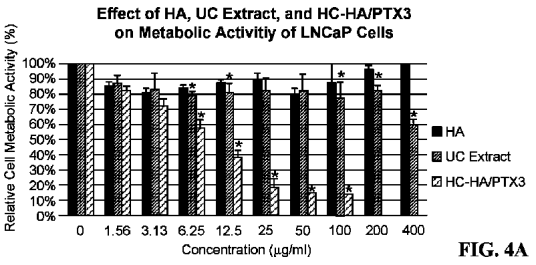


FIG. 4A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
外科的手技の後の腫瘍を囲む領域を単離された重鎖－ヒアルロナン／ペントラキシン３（ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体と接触させ、これにより腫瘍を囲む領域でがん細胞再成長を阻害するステップを含む、腫瘍のがん細胞再成長の阻害を必要とする個体において、腫瘍のがん細胞再成長を阻害する方法。
【請求項２】
外科的手技が腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
外科的手技が化学療法、免疫療法、または標的化療法を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項４】
腫瘍を囲む領域が切除縁を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
腫瘍を囲む領域が腫瘍周辺領域である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
腫瘍が固形腫瘍である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
腫瘍が、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんである、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
がんが手術不可能ながんである、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
がんが膵がんである、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
がんが前立腺がんである、請求項７に記載の方法。
【請求項１１】
がんが多形性神経膠芽腫である、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
がんが皮膚がんである、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
がんが結腸がんである、請求項７に記載の方法。
【請求項１４】
がんが肺がんである、請求項７に記載の方法。
【請求項１５】
がんが乳がんである、請求項７に記載の方法。
【請求項１６】
腫瘍を囲む領域を約１０マイクログラム～１００ミリグラムと接触させる、請求項１に記載の方法。
【請求項１７】
ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が胎児支持組織から単離される、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】

再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む、請求項１７に記載の方法。

【請求項２０】

再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３および腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）を含む、請求項１７に記載の方法。

【請求項２１】

ヒアルロナン（ＨＡ）が高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）である、請求項１に記載の方法。

【請求項２２】

ヒアルロナン（ＨＡ）が低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＡ）である、請求項１に記載の方法。

【請求項２３】

ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が冷凍保存される、請求項１に記載の方法。

【請求項２４】

ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が生細胞を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項２５】

治療剤を投与するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項２６】

治療剤が化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

治療剤を投与するステップが、腫瘍を囲む領域をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる、請求項２５に記載の方法。

【請求項２８】

治療剤を投与するステップが、腫瘍を囲む領域をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる、請求項２５に記載の方法。

【請求項２９】

治療剤を投与するステップが、腫瘍を囲む領域をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる、請求項２５に記載の方法。

【請求項３０】

がん細胞を死滅させることによって腫瘍細胞再成長を阻害する、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

がん細胞の死滅がアポトーシスまたは壊死による、請求項３０に記載の方法。

【請求項３２】

がん細胞の増殖を阻害することによって腫瘍細胞再成長を阻害する、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

がん細胞の代謝活性を阻害することによって腫瘍細胞再成長を阻害する、請求項１～２９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

外科的手技の前、その間、またはその後に、腫瘍または腫瘍を囲む領域を単離された重鎖－ヒアルロナン／ペントラキシン３（ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体と接触させ、これによりがん細胞を死滅させるステップを含む、腫瘍のがん細胞の死滅を必要とする個体において腫瘍のがん細胞を死滅させる方法。

【請求項３５】

外科的手技が腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法を含む、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】
外科的手技が化学療法、免疫療法、または標的化療法を含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
腫瘍を囲む領域が切除縁を含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３８】
腫瘍を囲む領域が腫瘍周辺領域である、請求項３４に記載の方法。
【請求項３９】
腫瘍が固形腫瘍である、請求項３４に記載の方法。
【請求項４０】
腫瘍が、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４１】
がんが手術不可能ながんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４２】
がんが膵がんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４３】
がんが前立腺がんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４４】
がんが多形性神経膠芽腫である、請求項３４に記載の方法。
【請求項４５】
がんが皮膚がんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４６】
がんが結腸がんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４７】
がんが肺がんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４８】
がんが乳がんである、請求項３４に記載の方法。
【請求項４９】
腫瘍を囲む領域を約１０マイクログラム～１００ミリグラムと接触させる、請求項３４に記載の方法。
【請求項５０】
ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである、請求項３４～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が胎児支持組織から単離される、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５３】
再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３および腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５４】
ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が冷凍保存される、請求項３４に記載の方法。

【請求項５５】
ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が生細胞を含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項５６】
ヒアルロナン（ＨＡ）が高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）である、請求項３４に記載の方法。
【請求項５７】
ヒアルロナン（ＨＡ）が低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＡ）である、請求項３４に記載の方法。
【請求項５８】
接触させるステップが、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を直接腫瘍に注射することを含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項５９】
治療剤を投与するステップをさらに含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項６０】
治療剤が化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される、請求項５９に記載の方法。
【請求項６１】
治療剤を投与するステップが、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる、請求項５９に記載の方法。
【請求項６２】
治療剤を投与するステップが、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる、請求項５９に記載の方法。
【請求項６３】
治療剤を投与するステップが、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる、請求項５９に記載の方法。
【請求項６４】
がん細胞の死滅がアポトーシスまたは壊死による、請求項３４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
[0001]本出願は２０２０年２月１２日に出願された米国仮出願第６２／９７５，５９９号に対する優先権およびその利益を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００２】
[0002]この明細書で言及される全ての刊行物、特許および特許出願は、各々の個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個々に示されるのと同程度に参照により本明細書に組み込まれる。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００３】
[0003]がん細胞を単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させるステップを含む、がん細胞の死滅を必要とする対象においてがん細胞を直接死滅させる方法が本明細書で開示される。一部の実施形態では、がん細胞は固形腫瘍に由来するまたは固形腫瘍内にある。一部の実施形態では、がん細胞は、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸

がんからなる群から選択されるがんに由来する。一部の実施形態では、がんは手術不可能である。一部の実施形態では、ＣＮＳがんは神経膠腫または転移性がんである。一部の実施形態では、神経膠腫は多形性神経膠芽腫または退形成星細胞腫である。一部の実施形態では、がんは肺がん、乳がん、結腸がんまたは皮膚がんである。一部の実施形態では、結腸がんは腺癌である。一部の実施形態では、皮膚がんは黒色腫である。一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を腫瘍、周囲組織、またはこれらの組合せに注射することを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、がん細胞の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の前、その間、またはその後に行われる。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３をがん細胞の外科的切除の切除縁に、または腫瘍の任意の残りの部分内に適用することを含む。一部の実施形態では、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３およびＴＳＧ－６を含む。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、ビヒクル、または担体を含む組成物に含まれる。一部の実施形態では、方法は、さらなる治療剤を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、治療剤は化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる。一部の実施形態では、血管新生は低減または阻害される。一部の実施形態では、がん細胞の死滅はアポトーシスまたは壊死による。

【０００４】

[0004]がん細胞を単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させるステップを含む、がん細胞の増殖の阻害を必要とする対象においてがん細胞の増殖を直接阻害する方法が本明細書で開示される。一部の実施形態では、がん細胞は固形腫瘍に由来するまたは固形腫瘍内にある。一部の実施形態では、がん細胞は、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんに由来する。一部の実施形態では、がんは手術不可能である。一部の実施形態では、ＣＮＳがんは神経膠腫または転移性がんである。一部の実施形態では、神経膠腫は多形性神経膠芽腫または退形成星細胞腫である。一部の実施形態では、がんは肺がん、乳がん、結腸がんまたは皮膚がんである。一部の実施形態では、結腸がんは腺癌である。一部の実施形態では、皮膚がんは黒色腫である。一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を腫瘍、周囲組織、またはこれらの組合せに注射することを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、がん細胞の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の前、その間、またはその後に行われる。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３をがん細胞の外科的切除の切除縁に適用することを含む。一部の実施形態では、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、

インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３およびＴＳＧ－６を含む。一部の実施形態では、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、ビヒクル、または担体を含む。さらなる実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、治療剤を投与することを含む組成物に含まれる。一部の実施形態では、治療剤は化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる。一部の実施形態では、血管新生は低減または阻害される。一部の実施形態では、増殖はＣＤ４４またはＲＨＡＭＭを発現する細胞において阻害される。

【０００５】

[0005]がん細胞を単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させるステップを含む、がん細胞の代謝活性の低減を必要とする対象においてがん細胞の代謝活性を直接低減する方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、がん細胞は固形腫瘍に由来するまたは固形腫瘍内にある。一部の実施形態では、がん細胞は、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんに由来する。一部の実施形態では、がんは手術不可能である。一部の実施形態では、ＣＮＳがんは神経膠腫または転移性がんである。一部の実施形態では、神経膠腫は多形性神経膠芽腫または退形成星細胞腫である。一部の実施形態では、がんは肺がん、乳がん、結腸がんまたは皮膚がんである。一部の実施形態では、結腸がんは腺癌である。一部の実施形態では、皮膚がんは黒色腫である。一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を腫瘍、周囲組織、またはこれらの組合せに注射することを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、がん細胞の外科的切除、冷凍切除、もしくはラジオ波焼灼療法の前、その間、またはその後に行われる、または腫瘍の任意の残りの部分内である。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３をがん細胞の外科的切除の切除縁に適用することを含む。一部の実施形態では、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３およびＴＳＧ－６を含む。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、ビヒクル、または担体を含む組成物に含まれる。さらなる実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、治療剤を投与することを含む組成物に含まれる。一部の実施形態では、治療剤は化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる。一部の実施形態では、血管新生は低減または阻害される。一部の実施形態では、代謝活性はＣＤ４４またはＲＨＡＭＭを発現する細胞において低減される。

【０００６】

[0006]腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の前、その間、またはその後の腫瘍の切除縁または任意の部分を単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させ、これにより切除縁においてがん細胞を死滅させるステップを含む、がん細胞を死滅させる方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、腫瘍は、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんである。一部の実施形態では、がんは手術不可能である。一部の実施形態では、ＣＮＳがんは神経膠腫または転移性がんである。一部の実施形態では、神経膠腫は多形性神経膠芽腫である。一部の実施形態では、がんは肺がん、乳がん、結腸がんまたは皮膚がんである。一部の実施形態では、結腸がんは腺癌である。一部の実施形態では、皮膚がんは黒色腫である。一部の実施形態では、腫瘍は前立腺がんである。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３およびＴＳＧ－６を含む。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、薬学的に許容される希釈剤、賦形剤、ビヒクル、または担体を含む組成物に含まれる。さらなる実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は治療剤を投与することを含む。一部の実施形態では、治療剤は化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる。一部の実施形態では、がん細胞の死滅はアポトーシスまたは壊死による。

【０００７】

[0007]一部の実施形態では、外科的手技の後の腫瘍を囲む領域を単離された重鎖－ヒアルロナン／ペントラキシン３（ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体と接触させ、これにより腫瘍を囲む領域のがん細胞再成長を阻害するステップを含む、腫瘍のがん細胞再成長の阻害を必要とする個体において腫瘍のがん細胞再成長を阻害する方法が本明細書で開示される。一部の実施形態では、外科的手技は、腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法を含む。一部の実施形態では、外科的手技は化学療法、免疫療法、または標的化療法を含む。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域は切除縁を含む。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域は腫瘍周辺領域である。一部の実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんである。一部の実施形態では、がんは手術不可能ながんである。一部の実施形態では、がんは膵がんである。一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。一部の実施形態では、がんは多形性神経膠芽腫である。一部の実施形態では、がんは皮膚がんである。一部の実施形態では、がんは結腸がんである。一部の実施形態では、がんは肺がんである。一部の実施形態では、がんは乳がんである。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域を約１０マイクログラム～１００ミリグラムと接触させる。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成され

たＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３および腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）を含む。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）である。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＡ）である。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は冷凍保存される。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は生細胞を含む。一部の実施形態では、方法は治療剤を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、治療剤は化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、腫瘍を囲む領域をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、腫瘍を囲む領域をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、腫瘍を囲む領域をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる。一部の実施形態では、方法は、がん細胞を死滅させることによって腫瘍細胞再成長を阻害する。一部の実施形態では、がん細胞の死滅はアポトーシスまたは壊死による。一部の実施形態では、方法は、がん細胞の増殖を阻害することによって腫瘍細胞再成長を阻害する。一部の実施形態では、方法は、がん細胞の代謝活性を阻害することによって腫瘍細胞再成長を阻害する。

【０００８】

[0008]一部の実施形態では、外科的手技の前、その間、またはその後の腫瘍または腫瘍を囲む領域を単離された重鎖－ヒアルロナン／ペントラキシン３（ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体と接触させ、これによりがん細胞を死滅させるステップを含む、腫瘍のがん細胞の死滅を必要とする個体において腫瘍のがん細胞を死滅させる方法が本明細書で開示される。一部の実施形態では、外科的手技は、腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法を含む。一部の実施形態では、外科的手技は化学療法、免疫療法、または標的化療法を含む。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域は切除縁を含む。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域は腫瘍周辺領域である。一部の実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍は、肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんである。一部の実施形態では、がんは手術不可能ながんである。一部の実施形態では、がんは膵がんである。一部の実施形態では、がんは前立腺がんである。一部の実施形態では、がんは多形性神経膠芽腫である。一部の実施形態では、がんは皮膚がんである。一部の実施形態では、がんは結腸がんである。一部の実施形態では、がんは肺がんである。一部の実施形態では、がんは乳がんである。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域を約１０マイクログラム～１００ミリグラムと接触させる。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、またはこれらの組合せである。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、インターα阻害剤（ＩαＩ）の重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＣ１、ＨＣ２、ＨＡ、ＰＴＸ３および腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）を含む。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は冷凍保存される。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は生細胞を含む。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）である。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は低

分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＡ）である。一部の実施形態では、接触させるステップは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を直接腫瘍に注射することを含む。一部の実施形態では、方法は治療剤を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、治療剤は化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、免疫療法、細胞療法、放射線療法、標的化薬物治療法、および抗生物質からなる群から選択される。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる前に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させた後に行われる。一部の実施形態では、治療剤を投与するステップは、がん細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させることと同時的に行われる。一部の実施形態では、がん細胞の死滅はアポトーシスまたは壊死による。

【図面の簡単な説明】

【０００９】

【図１】[0009] 図１ＡはＲＰＭＩ培地で培養した後のＬＮＣａＰ細胞の凝集を示す図である。[0010] 図１ＢはＲＰＭＩ培地で培養した後のＰＣ－３細胞の均一な分布を示す図である。

【図２Ａ】[0011]図２Ａ～図２Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＬＮＣａＰの形態および細胞代謝活性を示す図である。

【図２Ｂ】図２Ａ～図２Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＬＮＣａＰの形態および細胞代謝活性を示す図である。

【図２Ｃ】図２Ａ～図２Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＬＮＣａＰの形態および細胞代謝活性を示す図である。

【図２Ｄ】図２Ａ～図２Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＬＮＣａＰの形態および細胞代謝活性を示す図である。

【図３Ａ】[0012]図３Ａ～図３Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＰＣ－３の形態および代謝活性を示す図である。

【図３Ｂ】図３Ａ～図３Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＰＣ－３の形態および代謝活性を示す図である。

【図３Ｃ】図３Ａ～図３Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＰＣ－３の形態および代謝活性を示す図である。

【図３Ｄ】図３Ａ～図３Ｄは、一連の用量の純化されたＢＴＧｅｌまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の処理によるＰＣ－３の形態および代謝活性を示す図である。

【図４Ａ】[0013]ＵＣ抽出物、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３、および水中ＵＣ抽出物を使用するＨＡによる処理後のＬＮＣａＰ細胞におけるＷＳＴ－１アッセイデータを示す図である。

【図４Ｂ】[0014]ＵＣ抽出物、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３、および水中ＵＣ抽出物を使用するＨＡによる処理後のＰＣ－３細胞におけるＷＳＴ－１アッセイデータを示す図である。

【図５】[0015]図５ＡはＨＡによる処理後のＬＮＣａＰ細胞の形態を示す図である。図５ＢはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による処理後のＬＮＣａＰ細胞の形態を示す図である。図５Ｃは臍帯抽出物（ＵＣＥ）による処理後のＬＮＣａＰ細胞の形態を示す図である。

【図６】[0016]図６ＡはＨＡによる処理後のＰＣ－３細胞の形態を示す図である。図６ＢはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による処理後のＰＣ－３細胞の形態を示す図である。図６Ｃは臍帯抽出物（ＵＣＥ）による処理後のＰＣ－３細胞の形態を示す図である。

【図７】[0017]ラミニンおよびＩＶ型コラーゲン上で成長させたＬＮＣａＰ細胞が、他の表面上で成長させた細胞よりも細胞凝集を示すことを示す図である。

【図８Ａ】[0018]１０×および２０×倍率で撮ったＰｒＥＣ前立腺細胞株形態の明視野画像を示す図である。

【図８Ｂ】[0019]１０×および２０×倍率で撮ったＰＮＴ２前立腺細胞株形態の明視野画像を示す図である。

【図９】[0020]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のヒト初代正常前立腺細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケール

バー５０μｍ）を示す図である。
【図１０】[0021]図１０Ａは様々な濃度（０．７８、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって正常なヒト初代前立腺上皮細胞ＰｒＥＣにおいて評価した代謝活性（％）を示す図である。図１０Ｂは様々な濃度（０．７８、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって正常なヒト前立腺細胞株ＰＮＴ２において評価した代謝活性（％）を示す図である。ｐ値は未処理試料に対して両側ｔ検定によって計算された。
【図１１】[0022]図１１Ａは、様々な濃度（０．７８、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３との４８時間のインキュベーション後に正常な初代前立腺上皮細胞（ＰｒＥＣ）および細胞株（ＰＮＴ２）ならびに前立腺がん細胞株：ＰＣ３およびＬＮＣａＰにおいて評価した代謝活性（％）の比較分析を示す図である。図１１Ｂは、様々な濃度（０．７８、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３との４８時間のインキュベーション後に正常な初代前立腺上皮細胞（ＰｒＥＣ）および細胞株（ＰＮＴ２）ならびに前立腺がん細胞株：ＰＣ３およびＬＮＣａＰにおいて評価した対数スケールの代謝活性の比較分析を示す図である。
【図１２】[0023]図１２Ａは、様々な濃度のＨＡとの４８時間のインキュベーション後に正常な初代前立腺上皮細胞（ＰｒＥＣ）および細胞株（ＰＮＴ２）ならびに前立腺がん細胞株：ＰＣ３およびＬＮＣａＰにおいて評価した代謝活性（％）の比較分析を示す図である。図１２Ｂは、様々な濃度のＨＡとの４８時間のインキュベーション後に正常な初代前立腺上皮細胞（ＰｒＥＣ）および細胞株（ＰＮＴ２）ならびに前立腺がん細胞株：ＰＣ３およびＬＮＣａＰにおいて評価した対数スケールの代謝活性の比較分析を示す図である。
【図１３】[0024]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のＡ３７５（黒色腫）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。
【図１４】[0025]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のＨＴ－２９（結腸がん）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。
【図１５】[0026]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のＡ５４９（肺がん）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。
【図１６】[0027]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のＭＣＦ－７（乳がん）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。
【図１７Ａ】[0028]図１７Ａ～１７Ｄは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって４種のヒトがん細胞株：Ａ３７５（図１７Ａ）、ＨＴ－２９（図１７Ｂ）、ＭＣＦ－７（図１７Ｃ）、およびＡ－５４９（図１７Ｄ）において評価した代謝活性（％）を示す図である。
【図１７Ｂ】図１７Ａ～１７Ｄは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって４種のヒトがん細胞株：Ａ３７５（図１７Ａ）、ＨＴ－２９（図１７Ｂ）、ＭＣＦ－７（図１７Ｃ）、およびＡ－５４９（図１７Ｄ）において評価した代謝活性（％）を示す図である。
【図１７Ｃ】図１７Ａ～１７Ｄは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって４種のヒトがん細胞株：Ａ３７５（図１７Ａ）、ＨＴ－２９（図１７Ｂ）、ＭＣＦ－７（図１７Ｃ）、およびＡ－５４９（図１７Ｄ）において評価した代謝活性（％）を示す図である。
【図１７Ｄ】図１７Ａ～１７Ｄは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４

８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって４種のヒトがん細胞株：Ａ３７５（図１７Ａ）、ＨＴ－２９（図１７Ｂ）、ＭＣＦ－７（図１７Ｃ）、およびＡ－５４９（図１７Ｄ）において評価した代謝活性（％）を示す図である。

【図１８Ａ】[0029]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による様々な時点：それぞれ１５～３０分、１時間、５時間、２４時間および４８時間の処理後のＬＮＣ（輪部ニッチ細胞）の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図１８Ｂ】[0030]様々な濃度のＨＭＷ－ＨＡによる様々な時点：それぞれ１５～３０分、１時間、５時間、２４時間および４８時間の処理後のＬＮＣ（輪部ニッチ細胞）の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図１８Ｃ】[0031]１００μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のＬＮＣ（輪部ニッチ細胞）の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図１９】[0032]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって輪部ニッチ細胞において評価した代謝活性（％）を示す図である。

【図２０Ａ】[0033]図２０Ａおよび２０Ｂは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（図２０Ａ）およびＨＭＷ－ＨＡ（図２０Ｂ）による様々な時点の処理後のＨＴＭ（ヒト小柱メッシュ）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図２０Ｂ】図２０Ａおよび２０Ｂは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（図２０Ａ）およびＨＭＷ－ＨＡ（図２０Ｂ）による様々な時点の処理後のＨＴＭ（ヒト小柱メッシュ）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図２１】[0034]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによってヒト小柱メッシュ細胞において評価した代謝活性（％）を示す図である。

【図２２】[0035]図２２Ａは様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３で様々な時点で処理した後のヒト角膜線維芽細胞（ＨＣＦ）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。図２２Ｂは様々な濃度のＨＭＷ－ＨＡで様々な時点で処理した後のヒト角膜線維芽細胞（ＨＣＦ）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図２３】[0036]様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによってヒト角膜線維芽細胞細胞において評価した代謝活性（％）を示す図である。

【図２４】[0037]図２４Ａは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３との４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって評価した３種類のヒト正常初代間葉系細胞：ＨＣＦ、ＨＴＭおよびＬＮＣにおいて評価した代謝活性（％）の比較分析を示す図である。図２４Ｂは様々な濃度のＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって評価した３種類のヒト正常初代間葉系細胞：ＨＣＦ、ＨＴＭおよびＬＮＣにおいて評価した代謝活性（％）の比較分析を示す図である。

【図２５】[0038]ＬＮＣおよびＨＣＦ細胞の形態に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１００μｇ／ｍｌ）の一過性の効果を示し、ＨＴＭ細胞において対応する効果がないことを示す代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す図である。

【図２６Ａ】[0039]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡによる処理後のＡ３７５細胞形態の明視野画像を未処理細胞と比較して示す図である。

【図２６Ｂ】[0040]Ａ３７５細胞を使用するＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す図である。

【図２６Ｃ】[0041]Ａ３７５細胞を使用する片対数スケールのＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す図である。

【図２７Ａ】[0042]ＨＡまたはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による処理後の２つの倍率（１０×および２０×）のＰｒＥＣ細胞形態の明視野画像を示す図である。

【図２７Ｂ】[0043]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理後のＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示

す図である。
【図２７Ｃ】[００４４]ＨＡ処理後のＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す図である。
【図２８Ａ】[００４５]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３、ＨＭＷ－ＨＡによる処理後、または未処理のＰＮＴ２細胞形態の明視野画像を示す図である。
【図２８Ｂ】[００４６]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＡによる処理後のＰＮＴ２細胞のＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す図である。
【図２９Ａ】[００４７]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３、ＨＭＷ－ＨＡによる処理後、または未処理のＰＣ３細胞形態の明視野画像を示す図である。
【図２９Ｂ】[００４８]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＡによる処理後のＰＣ３細胞におけるＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す図である。
【図３０Ａ】[００４９]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３、ＨＭＷ－ＨＡによる処理後、または未処理のＬＮＣａＰ細胞形態の明視野画像を示す図である。
【図３０Ｂ】[００５０]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＡによる処理後のＬＮＣａＰ細胞におけるＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１０】
特定の専門用語
[００５１]特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、特許請求される主題が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書の開示全体を通して参照される全ての特許、特許出願、公開された出願および刊行物、ウェブサイトおよび他の公開された資料は、特に明記されない限り、それらの全体が参照により組み込まれる。本明細書の用語に複数の定義がある場合、このセクションのものが優先する。ＵＲＬまたは他のそのような識別子もしくはアドレスを参照する場合、そのような識別子は変わることがあり、インターネット上の特定の情報は移り変わり得るが、同等の情報は公知であり、インターネットおよび／または適当なデータベースを検索することなどによって容易にアクセスできることが理解される。それらを参照することは、そのような情報の入手可能性および公的流布を証明する。
【００１１】
[００５２]本明細書で使用される場合、範囲および量は、「約」特定の値または範囲として表され得る。約は正確な量または値も含み得る。したがって、「約５μｇ」は「約５μｇ」を意味し、「５μｇ」も意味する。一部の実施形態では、用語「約」は実験誤差内であると予想される量を含む。一部の実施形態では、用語「約」は、値＋／－値の２０％、１０％または５％を指す。
【００１２】
[００５３]本明細書で使用される場合、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体または単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはこれらの組合せを指す。本明細書で使用される場合、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体は、複合体の成分分子のｉｎ　ｖｉｔｒｏでの組立てによって形成されるＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体である。一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＡ、ＩαＩのＨＣ１およびＨＣ２、ならびにＰＴＸ３を含む。一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＡ、ＩαＩのＨＣ１およびＨＣ２、ＰＴＸ３、ならびにＴＳＧ－６を含む。ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を組み立てるプロセスは、生物学的供給源から単離された、精製された天然のタンパク質もしくは分子、組換え方法によって生成された組換えタンパク質、またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成による分子の合成による再構成を含む。一部の事例では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の組立てに使用される精製された天然のタンパク質は、他のタンパク質との複合体（すなわち多量体、多重鎖タンパク質または他の複合体）中のタンパク質である。一部の事例では、ＰＴＸ３は細胞から多量体（例えばホモ多量体）として精製され、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の組立てに用いられる。
【００１３】

[0054]本明細書で使用される場合、精製された天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体は、細胞、組織または生体液などの生物学的供給源から精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を指す。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は胎盤、羊膜、絨毛膜、臍帯、または臍帯の羊膜などの胎児支持組織から単離される。一部の実施形態では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は羊膜から単離される。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＡ、ＩαＩのＨＣ１、およびＰＴＸ３を含む。そのような複合体は一般的に、対象においてｉｎ　ｖｉｖｏで、またはヒトもしくは他の動物を含む対象に由来する細胞、組織、もしくは生体液においてｅｘ　ｖｉｖｏで組み立てられる。

【００１４】

[0055]本明細書で使用される場合、「ヒアルロナン」、「ヒアルロン酸」、または「ヒアルロナート」（ＨＡ）は、互換的に使用され、Ｄ－グルクロン酸およびＮ－アセチルグルコサミンの繰り返し二糖単位（Ｄ－グルクロノシル－Ｎ－アセチルグルコサミン）を有する実質的に非硫酸化された直鎖状グリコサミノグリカン（ＧＡＧ）を指す。

【００１５】

[0056]本明細書で使用される場合、高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）のような用語「高分子量」または「ＨＭＷ」は、約５００キロダルトン（ｋＤａ）を超える、例えば、約５００ｋＤａ～約１０，０００ｋＤａ、約８００ｋＤａ～約８，５００ｋＤａ、約１１００ｋＤａ～約５，０００ｋＤａ、または約１４００ｋＤａ～約３，５００ｋＤａなどである重量平均分子量を有するＨＡを指すことを意図する。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは３０００ｋＤａ以上の重量平均分子量を有する。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは３０００ｋＤａの重量平均分子量を有する。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは約３０００ｋＤａの重量平均分子量を有するＨｅａｌｏｎ（登録商標）である。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは約５００ｋＤａ～約１０，０００ｋＤａの分子量を有する。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは約８００ｋＤａ～約８，５００ｋＤａの分子量を有する。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは約３，０００ｋＤａの分子量を有する。

【００１６】

[0057]本明細書で使用される場合、低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＡ）のような用語「低分子量」または「ＬＭＷ」は、５００ｋＤａ未満、例えば、約４００ｋＤａ未満、約３００ｋＤａ未満、約２００ｋＤａ未満、約２００～３００ｋＤａ、または約１～３００ｋＤａなどである重量平均分子量を有するＨＡを指すことを意図する。

【００１７】

[0058]本明細書で使用される場合、ペントラキシン３またはＰＴＸ３タンパク質またはポリペプチドは、組換え生産されたタンパク質、合成生産されたタンパク質、天然ＰＴＸ３タンパク質、および細胞または組織から抽出されたＰＴＸ３タンパク質を含むが、これらに限定されない任意のＰＴＸ３タンパク質を指す。ＰＴＸ３は、天然または人工的に生産された二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、四量体、八量体、および他の多量体型を含むが、これらに限定されないＰＴＸ３の多量体型（例えばホモ多量体）を含む。

【００１８】

[0059]本明細書で使用される場合、「ヒアルロナン結合タンパク質」、「ＨＡ結合タンパク質」、または「ＨＡＢＰ」は、ＨＡに特異的に結合する任意のタンパク質を指す。

[0060]本明細書で使用される場合、「リンクモジュール」はヒアルロナン結合ドメインを意味する。

【００１９】

[0061]本明細書で使用される場合、「生物活性」は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体のｉｎ　ｖｉｖｏ活性あるいはｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３もしくはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体またはｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３もしくはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含有する組成物もしくは混合物のｉｎ　ｖｉｖｏ投与によりもたらされる生理的応答を指す。したがって生物活性は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体ならびにその組成物および混合物の治療効果および薬学

的活性を包含する。

【００２０】

[0062]本明細書で使用される場合、用語「対象」、「個体」および「患者」は互換的に使用される。これらの用語はいずれも医療専門家（例えば、医者、看護師、医師助手、用務員、ホスピス職員）の監視を必要とすると解釈されるべきでない。本明細書で使用される場合、対象は哺乳動物（例えば、ヒトまたは非ヒト動物）および非哺乳動物を含む任意の動物である。本明細書で提供される方法および組成物の一実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【００２１】

[0063]本明細書で使用される場合、用語「治療する」、「治療すること」または「治療」、および他の文法上の同等語は、疾患もしくは状態の１種もしくは複数の症状を緩和する、弱める、もしくは改善すること、疾患もしくは状態の１種もしくは複数の追加の症状の出現、重症度もしくは頻度を改善、防止、もしくは低減すること、疾患もしくは状態の１種もしくは複数の症状の根底にある代謝的原因を改善もしくは防止すること、疾患もしくは状態を阻害すること、例えば疾患もしくは状態の発症を阻止することなど、疾患もしくは状態を軽減すること、疾患もしくは状態の後退を引き起こすこと、疾患もしくは状態によって引き起こされた状態を軽減すること、または疾患もしくは状態の症状を予防的および／もしくは治療的に阻害することを含む。非限定的な例では、予防的利益について、本明細書で開示されるｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体、または組成物は、特定の障害を発症するリスクがある個体、特定の障害を発症しやすい、または障害の生理的症状の１種もしくは複数を報告している個体に投与される。

【００２２】

[0064]本明細書で使用される場合、「胎盤」は、発生中の胎児を母体の子宮壁につなげ、母体の血液供給により栄養素の取込み、老廃物の排出、およびガス交換を可能にする器官を指す。胎盤は３つの層からなる。胎児を囲む最も内側の胎盤層は羊膜と呼ばれる。尿膜は胎盤の中間層であり（胚の後腸に由来する）、臍から始まる血管がこの膜を横断する。胎盤の最も外側の層である絨毛膜は子宮内膜と接触する。絨毛膜および尿膜は融合し、絨毛尿膜を形成する。

【００２３】

[0065]本明細書で使用される場合、「絨毛膜」は胚外中胚葉および２層の栄養膜によって形成される膜を指す。絨毛膜は２つの層、栄養膜によって形成された外側および壁側中胚葉によって形成された内側からなり、羊膜は後者と接触している。栄養膜は、立方体またはプリズム状の細胞の内層である栄養膜細胞層またはラングハンス層、および細胞境界がない豊富に核形成した原形質の外層である栄養膜合胞体層で構成される。血管がない羊膜は絨毛膜の内層に接着している。

【００２４】

[0066]本明細書で使用される場合、「羊膜－絨毛膜」は羊膜および絨毛膜を含む産物を指す。一部の実施形態では、羊膜および絨毛膜は分離していない（すなわち羊膜は絨毛膜の内層に自然に接着している）。一部の実施形態では、羊膜は、初めは絨毛膜と分離しているが、後に処理中に絨毛膜と結合する。

【００２５】

[0067]本明細書で使用される場合、「臍帯」は発生中の胎児を胎盤につなぐ器官を指す。臍帯は、大部分がムコ多糖でできたゼリー状の物質であるワルトンゼリーからなる。それは、酸素を含む、栄養素が豊富な血液を胎児に運ぶ１つの静脈、および脱酸素化し、栄養素が枯渇した血液を運び出す２つの動脈を含有する。

【００２６】

[0068]本明細書で使用される場合、「胎盤の羊膜」（ＰＡＭ）は、胎盤に由来する羊膜を指す。一部の実施形態では、ＰＡＭは実質的に単離される。

[0069]本明細書で使用される場合、「臍帯の羊膜」（ＵＣＡＭ）は、臍帯に由来する羊膜を意味する。ＵＣＡＭは半透明膜である。ＵＣＡＭは複数の層を有する：上皮層、基

底膜、緻密層、線維芽細胞層、およびスポンジ層。それは血管または直接的な血液供給を欠く。一部の実施形態では、ＵＣＡＭはワルトンゼリーを含む。一部の実施形態では、ＵＣＡＭは血管および／または動脈を含む。一部の実施形態では、ＵＣＡＭはワルトンゼリーならびに血管および／または動脈を含む。

【００２７】

[0070]本明細書で使用される場合、用語「精製された」および「単離された」は、物質（例えばｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体）にその天然状態で通常付随する成分を実質的または本質的に含まない物質を意味する。一部の実施形態では、「精製された」または「単離された」は、物質（例えばｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体）が、その天然状態でそれに通常付随する成分を約５０％以上含まない、例えばその天然状態でそれに通常付随する成分を約５０％、約５５％、約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％、または約９９％含まないことを意味する。

【００２８】

治療の方法

[0071]ある特定の実施形態では、がん細胞を直接死滅させる、がん細胞の増殖を直接阻害する、がん細胞の代謝活性を低減する方法またはこれらの組合せを含む、治療を必要とする個体を治療する方法であって、個体に本明細書に記載のｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を投与するステップを含む方法が本明細書で開示される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞を直接死滅させるために使用される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞の増殖を直接阻害するために使用される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞の代謝活性を低減するために使用される。一部の実施形態では、細胞は固形腫瘍に由来するまたは固形腫瘍内にある。

【００２９】

[0072]一部の実施形態では、任意の適切な方法によって、個体に本明細書に記載のｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を投与するステップを含む、治療を必要とする個体を治療する方法。一部の実施形態では、それを必要とする個体はがんを有する。一部の実施形態では、それを必要とする個体は手術不可能ながんを有する。一部の実施形態では、それを必要とする個体は、膵がん、前立腺がん、および多形性神経膠芽腫からなる群から選択される手術不可能ながんを有する。一部の実施形態では、個体は固形腫瘍を有する。一部の実施形態では、個体は肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、および胃腸がんからなる群から選択されるがんを有する。

【００３０】

[0073]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、外科的手技の前、その間、または外科的手技の後に個体に投与される。一部の実施形態では、外科的手技は腫瘍の切除を含む。一部の実施形態では、外科的手技は腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法を含む。一部の実施形態では、外科的手技は化学療法、免疫療法、または標的化療法を含む。

【００３１】

[0074]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除後、最大１日、最大２日、最大３日、最大５日、または５日を超えて投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除後、１週間、２週間、１カ月、２カ月、３カ月、４カ月、５カ月、１年、２年、３年、４年、５年、または５年を超えて投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除

後に単回、または時間経過にわたって、例えば、毎日、毎週複数回、毎週、隔週、毎月もしくはより少ない頻度で投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除後に単回、または時間経過にわたって、例えば、毎日、毎週複数回、毎週、隔週、毎月もしくはより頻繁に投与される。

【００３２】

[0075]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除前に投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除前に最大１日、最大２日、最大３日、最大５日、または５日を超えて投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除前に単回、または時間経過にわたって、例えば、毎日、毎週複数回、毎週、隔週、毎月もしくはより少ない頻度で投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の切除前に単回、または時間経過にわたって、例えば、毎日、毎週複数回、毎週、隔週、毎月もしくはより頻繁に投与される。

【００３３】

[0076]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の外科的切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の間、またはその後に個体に投与される。一部の例では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍の外科的切除（例えば、全体または部分）、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の後の切除縁（例えば、外科的に除去された腫瘍の周りの見かけの組織の領域）に投与される。

【００３４】

[0077]一部の実施形態では、任意の適切な投与経路によって、個体にｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を投与するステップを含む、治療を必要とする個体を治療する方法。投与のための適切な方法は、治療される疾患または状態に依存する。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、治療の部位に局部的に投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍、腫瘍を囲む組織、または両方に注射される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍に注射される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍が外科的に除去されたまたは冷凍切除もしくはラジオ波焼灼療法で治療された後に、腫瘍を囲む領域に適用される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は全身投与される。本明細書で提供されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の投与の例示的な方法は、非経口、経腸、皮下、経皮（ｐｅｒｃｕｔａｎｅｏｕｓ）、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）、皮内、静脈内、局所、吸入、または植込みを含むが、これらに限定されない。

【００３５】

[0078]単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞を直接死滅させることが本明細書で実証される。ある特定の実施形態では、がん細胞を死滅させるための、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を含む調製物または組成物を含む、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、固形腫瘍におけるがん細胞を死滅させるための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、腫瘍が外科的に除去されたまたは冷凍切除もしくはラジオ波焼灼療法で治療された後に、腫瘍を囲む領域におけるがん細胞を死滅させるための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞の死滅を必要とする対象においてがん細胞を局部的に死滅させるための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞の死滅を必要とする対象においてがん細胞を全身的に死滅させるための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。

【００３６】

[0079]単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞の増殖を阻害することが本明細書で実証される。ある特定の実施形態では、がん細胞の増殖を阻害するための、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を含む調製物または組成物を含む、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、固形腫瘍におけるがん細胞の増殖を阻害するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、腫瘍が外科的に除去されたまたは冷凍切除もしくはラジオ波焼灼療法で治療された後に、腫瘍を囲む領域におけるがん細胞の増殖を阻害するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞の増殖の阻害を必要とする対象においてがん細胞の増殖を局部的に阻害するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞の増殖の阻害を必要とする対象においてがん細胞の増殖を全身的に阻害するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、増殖は５～９５％、１０～９０％、２０～８０％、３０～７０％、４０～６０％、５０～９５％、６５～８５％、または７５～９５％阻害されるまたは減少する。一部の実施形態では、増殖は少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９５％超阻害されるまたは減少する。一部の実施形態では、増殖は少なくとも５％阻害されるまたは減少する。一部の実施形態では、増殖は少なくとも１０％阻害されるまたは減少する。一部の実施形態では、増殖は少なくとも５０％阻害されるまたは減少する。

【００３７】

[0080]単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞の代謝活性を低減することが本明細書で実証される。ある特定の実施形態では、がん細胞における代謝活性を低減するための、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を含む調製物または組成物を含む、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、固形腫瘍におけるがん細胞の代謝活性を低減するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、腫瘍が外科的に除去されたまたは冷凍切除もしくはラジオ波焼灼療法で治療された後に、腫瘍を囲む領域におけるがん細胞の代謝活性を低減するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞の代謝活性の低減を必要とする対象においてがん細胞の代謝活性を局部的に低減するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞の代謝活性の低減を必要とする対象においてがん細胞の代謝活性を全身的に低減するための単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、代謝活性は５～９５％、１０～９０％、２０～８０％、３０～７０％、４０～６０％、５０～９５％、６５～８５％、または７５～９５％低減される。一部の実施形態では、代謝活性は少なくとも５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９５％超低減される。一部の実施形態では、代謝活性は少なくとも５％低減される。一部の実施形態では、代謝活性は少なくとも１０％低減される。一部の実施形態では、代謝活性は少なくとも５０％低減される。

【００３８】

[0081]ある特定の実施形態では、がん細胞死を増加させるための、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を含む調製物または組成物を含む、単離されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の使用が本明細書で提供される。一部の実施形態では、がん細胞死は約１０％～約２５％、約１０％～約５０％、約２０％～約９０％増加する。一部の実施形態では、がん細胞死は少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または９５％超増加する。一部の実施形態では、がん細

胞死はアポトーシスによって引き起こされる。一部の実施形態では、がん細胞死は壊死によって引き起こされる。

【００３９】

[0082]一部の実施形態では、がん細胞は固形腫瘍に由来するまたは固形腫瘍内にある。一部の実施形態では、固形腫瘍は肝臓がん、膵がん、膀胱がん、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌、卵巣がん、乳がん、黒色腫、胃がん、結腸がん、結腸直腸がん、中枢神経系（ＣＮＳ）がん、骨がん、リンパ腫、皮膚がん、頭頸部がん、腎臓がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、食道がん、甲状腺がん、唾液腺がん、副腎がん、または胃腸がんである。一部の実施形態では、がん細胞は液性腫瘍に由来する。一部の実施形態では、液性がんはリンパ腫または白血病である。一部の実施形態では、ＣＮＳがんは神経膠腫または転移性がんである。一部の実施形態では、神経膠腫は多形性神経膠芽腫または退形成星細胞腫である。一部の実施形態では、結腸がんは腺癌、カルチノイド腫瘍、原発性結腸直腸リンパ腫、間質腫瘍、または平滑筋肉腫である。一部の実施形態では、皮膚がんは黒色腫、基底細胞癌、または扁平上皮癌である。

【００４０】

単離されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生産する方法

[0083]一部の実施形態では、単離された天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３）複合体は、本明細書で提供される方法において使用される。

【００４１】

[0084]一部の実施形態では、単離されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は羊膜組織から単離される。一部の実施形態では、単離されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は羊膜または臍帯から単離される。一部の実施形態では、単離されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、新鮮な、冷凍された、もしくは事前に冷凍された胎盤の羊膜（ＰＡＭ）、新鮮な、冷凍された、もしくは事前に冷凍された臍帯の羊膜（ＵＣＡＭ）、新鮮な、冷凍された、もしくは事前に冷凍された胎盤、新鮮な、冷凍された、もしくは事前に冷凍された臍帯、新鮮な、冷凍された、もしくは事前に冷凍された絨毛膜、新鮮な、冷凍された、もしくは事前に冷凍された羊膜－絨毛膜、またはこれらの任意の組合せから単離される。そのような組織は、例えばこれらに限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、ウシまたはブタなどの任意の哺乳動物から得られ得る。

【００４２】

[0085]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は任意の適切な方法によって精製される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、遠心分離（例えば、超遠心分離、勾配遠心分離）、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、サイズ排除、およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー）、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、ゲル濾過、または差次的溶解度、エタノール沈殿またはタンパク質の精製のための任意の他の利用可能な技術によって精製される（例えば、全て参照により本明細書に組み込まれるＳｃｏｐｅｓ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９８７；Ｈｉｇｇｉｎｓ，Ｓ．Ｊ．およびＨａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．（編）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖ Ｐｒｅｓｓ、１９９９；ならびにＤｅｕｔｓｃｈｅｒ，Ｍ．Ｐ．、Ｓｉｍｏｎ，Ｍ．Ｉ．、Ａｂｅｌｓｏｎ，Ｊ．Ｎ．（編）、Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ Ｓｅｒｉｅｓ、１８２巻）、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９９７を参照されたい）。

【００４３】

[0086]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は抽出物から単離される。一部の実施形態では、抽出物は羊膜抽出物から調製される。一部の実施形態では、抽出物は臍帯抽出物から調製される。一部の実施形態では、臍帯抽出物は臍帯の間質および／またはワルトンゼリーを含む。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、超遠心

分離によって調製された抽出物に含有される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＣｓＣｌ／４～６Ｍのグアニジン ＨＣｌ勾配を使用する超遠心分離によって調製された抽出物に含有される。一部の実施形態では、抽出物は少なくとも２回の超遠心分離によって調製される。一部の実施形態では、抽出物は２回を超える超遠心分離によって調製される（すなわちｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３　2^{nd}）。一部の実施形態では、抽出物は少なくとも４回の超遠心分離によって調製される（すなわちｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３　4^{th}）。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体はＨＣ１、ＨＡ、ＰＴＸ３および／または小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。

【００４４】

[0087]一部の実施形態では、超遠心分離は、等張液中での抽出によって調製された抽出物に行われる。一部の実施形態では、等張液はＰＢＳである。例えば、一部の実施形態では、均質化された試料を生産するために、組織はＰＢＳ中で均質化される。次いで均質化された試料は、遠心分離によって可溶性部分および不溶性部分に分離される。一部の実施形態では、超遠心分離は、ＰＢＳで抽出された組織の可溶性部分に行われる。そのような実施形態では、ＰＢＳで抽出された組織の超遠心分離によって精製されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３可溶性複合体と呼ばれる。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ可溶性複合体は小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３可溶性複合体は、ＨＣ１、ＨＡ、ＰＴＸ３および／または小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。

【００４５】

[0088]一部の実施形態では、超遠心分離は、羊膜および／または臍帯組織の直接的なグアニジンＨＣｌ抽出（例えば４～６ＭのＧｎＨＣｌ）によって調製された抽出物に行われる。一部の実施形態では、次いでＧｎＨＣｌ抽出物組織は遠心分離され、ＧｎＨＣｌ可溶性およびＧｎＨＣｌ不溶性部分を生産する。一部の実施形態では、超遠心分離はＧｎＨＣｌ可溶性部分に行われる。そのような実施形態では、グアニジンＨＣｌで抽出された組織の超遠心分離によって精製されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３不溶性複合体と呼ばれる。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ不溶性複合体は小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３不溶性複合体はＨＣ１、ＨＡ、ＰＴＸ３および／または小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。

【００４６】

[0089]一部の実施形態では、超遠心分離は、ＰＢＳで抽出された組織の不溶性部分のさらなるグアニジンＨＣｌ抽出によって調製された抽出物に行われる。例えば一部の実施形態では、均質化された試料を生産するために、組織はＰＢＳ中で均質化される。次いで均質化された試料は、遠心分離によって可溶性部分および不溶性部分に分離される。次いで不溶性部分は、グアニジンＨＣｌ（例えば４～６ＭのＧｎＨＣｌ）中でさらに抽出され、遠心分離され、グアニジンＨＣｌ可溶性および不溶性部分を生産する。一部の実施形態では、超遠心分離はグアニジンＨＣｌ可溶性部分に行われる。そのような実施形態では、グアニジンＨＣｌで抽出された組織の超遠心分離によって精製されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３不溶性複合体と呼ばれる。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ不溶性複合体は小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３不溶性複合体は、ＨＣ１、ＨＡ、ＰＴＸ３および／または小分子ロイシンリッチプロテオグリカンを含む。

【００４７】

[0090]一部の実施形態では、単離されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３抽出物を精製する方法は、（ａ）単離された抽出物（例えば、本明細書に記載の可溶性または不溶性の方法によって調製された）をＣｓＣｌ／４～６Ｍのグアニジン ＨＣｌ中で、１．３５ｇ／ｍｌの初期密度で溶解し、ＣｓＣｌ混合物を生成するステップ、（ｂ）ＣｓＣｌ混合物を１２５，０００×ｇで４８時間１５℃で遠心分離し、第１の精製された抽出物を生成し、１２５

，０００×ｇで４８時間１５℃での第２の超遠心分離のために、ＨＡ含有画分をプールする／１．４０ｇ／ｍｌの初期密度に調整するステップ、（ｃ）精製された画分をプールし、蒸留水に対して透析し、ＣｓＣｌおよびグアニジンＨＣｌを除去し、透析物を生成するステップを含む。一部の実施形態では、単離された抽出物を精製する方法は、（ｄ）透析物を、１．３％（ｗ／ｖ）酢酸カリウムを含有する３体積の９５％（ｖ／ｖ）エタノールと０℃で１時間混合し、第１の透析物／エタノール混合物を生成するステップと、（ｅ）第１の透析物／エタノール混合物を１５，０００×ｇで遠心分離し、第２の精製された抽出物を生成するステップと、（ｆ）第２の精製された抽出物を抽出するステップとをさらに含む。一部の実施形態では、単離された抽出物を精製する方法は、（ｇ）第２の精製された抽出物をエタノール（例えば７０％エタノール）で洗浄し、第２の精製された抽出物／エタノール混合物を生成するステップと、（ｈ）第２の精製された抽出物／エタノール混合物を遠心分離し、第３の精製された抽出物を生成するステップと、（ｉ）第３の精製された抽出物を抽出するステップとをさらに含む。一部の実施形態では、単離された抽出物を精製する方法は、（ｊ）第３の精製された抽出物をエタノール（例えば７０％エタノール）で洗浄し、第３の精製された抽出物／エタノール混合物を生成するステップと、（ｋ）第３の精製された抽出物／エタノール混合物を遠心分離し、第４の精製された抽出物を生成するステップと、（ｌ）第４の精製された抽出物を抽出するステップとをさらに含む。一部の実施形態では、精製された抽出物はｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含む。

【００４８】

[0091]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一部の実施形態では、抗ＨＣ１抗体、抗ＨＣ２抗体または両方が生成され、固定の支持体に付けられる。一部の実施形態では、精製されないＨＣ－ＨＡ複合体（すなわち移動相）は支持体を通過する。ある特定の事例では、ＨＣ－ＨＡ複合体は抗体に結合する（例えば、（ａ）抗ＨＣ１抗体およびＨＣ１、（ｂ）抗ＨＣ２抗体およびＨＣ２、（ｃ）抗ＰＴＸ抗体およびＰＴＸ３、（ｄ）抗ＳＬＲＰ抗体およびＳＬＲＰ、または（ｅ）これらの任意の組合せの相互作用により）。一部の実施形態では、支持体は、任意の結合していないまたは緩く結合した分子を除去するために洗浄される（例えばＰＢＳで）。一部の実施形態では、次いで支持体は、支持体からのｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の溶出を可能にする溶液で洗浄される（例えば、１％ＳＤＳ、６Ｍのグアニジン－ＨＣｌ、または８Ｍの尿素）。

【００４９】

[0092]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、親和性クロマトグラフィーによって精製される。一部の実施形態では、ＨＡＢＰが生成され、固定の支持体に付けられる。一部の実施形態では、精製されないｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体（すなわち移動相）は支持体を通過する。ある特定の事例では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体はＨＡＢＰに結合する。一部の実施形態では、支持体は、任意の結合していないまたは緩く結合した分子を除去するために洗浄される（例えばＰＢＳで）。一部の実施形態では、次いで支持体は、支持体からのＨＣ－ＨＡ複合体の溶出を可能にする溶液で洗浄される。

【００５０】

[0093]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＡＢＰ親和性クロマトグラフィー、および抗ＨＣ１抗体、抗ＨＣ２抗体、抗ＰＴＸ３抗体、ＳＬＲＰもしくはＳＬＲＰの組合せに対する抗体、またはこれらの抗体の任意の組合せを使用する免疫親和性クロマトグラフィーの組合せによって精製される。

【００５１】

[0094]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、１種または複数の抗体を使用して、本明細書に記載の不溶性画分から精製される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、抗ＳＬＲＰ抗体を使用して、本明細書に記載の不溶性画分から精製される。

【００５２】

[0095]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、本明細書に記載の可

溶性画分から精製される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、抗ＰＴＸ３抗体を使用して、本明細書に記載の可溶性画分から精製される。

【００５３】

[0096]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は小分子ロイシンリッチプロテオグリカン（ＳＬＲＰ）を含む。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、クラスＩ、クラスＩＩまたはクラスＩＩＩ　ＳＬＲＰを含む。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、デコリンおよびビグリカンなどのクラスＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、フィブロモジュリン、ルミカン、ＰＲＥＬＰ（プロリンアルギニンリッチ末端ロイシンリッチタンパク質）、ケラトカン、およびオステオアドヘリンなどのクラスＩＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、エピフィカン（ｅｐｉｐｙｃａｎ）およびオステオグリシンなどのクラスＩＩＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、ビクニン、デコリン、ビグリカン、およびオステオアドヘリンの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチタンパク質はグリコサミノグリカンを含む。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンはケラタン硫酸を含む。

【００５４】

ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生産する方法

[0097]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、本明細書で提供される方法において使用される。そのような再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＳＬＲＰを含んでもよいまたは含まなくてもよい。

【００５５】

[0098]一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生成するための方法は、（ａ）ヒアルロナン（ＨＡ）をＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させ、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体を形成するステップと、（ｂ）ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下でＨＣ－ＨＡ複合体をペントラキシン３（ＰＴＸ３）と接触させるステップとを含む。そのような方法によって生産されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が本明細書で提供される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１はＨＡと共有結合を形成する。一部の実施形態では、方法のステップ（ａ）および（ｂ）は順次行われる。一部の実施形態では、方法は、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体をＰＴＸ３と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＷ）である。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＷ）である。

【００５６】

[0099]一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生成するための方法は、（ａ）高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）をＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させ、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体を形成するステップと、（ｂ）ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、ＨＣ－ＨＡ複合体をペントラキシン３（ＰＴＸ３）と接触させるステップとを含む。このような方法によって生産されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が本明細書で提供される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１はＨＡと共有結合を形成する。一部の実施形態では、方法のステップ（ａ）および（ｂ）は順次行われる。一部の実施形態では、方法は、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体をＰＴＸ３と接触させるステップを含む。

【００５７】

[00100]一部の実施形態では、ＩαＩタンパク質およびＴＳＧ－６タンパク質を、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１５：１、または２０：１（ＩαＩ：ＴＳＧ－６）のモル比でＨＭＷ　ＨＡに接触させる。一部の実施形態では、ＩαＩ：ＴＳＧ－６の比は、約１：１～約２０：１、例えば約１：１～約１０：１、例えば約１：１～約５：１、例えば約１：１～約３：１の範囲であ

る。一部の実施形態では、ＩαＩ：ＴＳＧ－６の比は３：１以上である。一部の実施形態では、ＩαＩ：ＴＳＧ－６の比は３：１である。

【００５８】

[00101]ある特定の事例では、ＴＳＧ－６はＩαＩと相互作用し、ＩαＩのＨＣ１およびＨＣ２と共有結合の複合体（例えば、ＨＣ１・ＴＳＧ－６およびＨＣ２・ＴＳＧ－６）を形成する。ある特定の事例では、ＨＡの存在下で、ＨＣはＨＡに転移され、ｒｃＨＣ－ＨＡを形成する。

【００５９】

[00102]一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）をＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも２時間またはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも２時間行われる。一部の実施形態では、ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、固定されたＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＷ）である。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＷ）である。

【００６０】

[00103]一部の実施形態では、高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）をＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも２時間またはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも２時間行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、固定されたＨＭＷ　ＨＡをＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。

【００６１】

[00104]一部の実施形態では、ＰＴＸ３をＨＣ－ＨＡ複合体に接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、ＰＴＸ３をＨＣ－ＨＡ複合体に接触させるステップは、少なくとも２時間またはより長く行われる。一部の実施形態では、ＰＴＸ３をＨＣ－ＨＡ複合体に接触させるステップは、少なくとも２時間行われる。一部の実施形態では、ＰＴＸ３をＨＣ－ＨＡ複合体に接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、ＰＴＸ３をＨＣ－ＨＡ複合体に接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。

【００６２】

[00105]一部の実施形態では、方法は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、ヒアルロナン（ＨＡ）をペントラキシン３（ＰＴＸ３）タンパク質、重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）を含むインターα阻害剤（ＩαＩ）タンパク質、ならびに腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）と同時に接触させるステップを含む。一部の実施形態では、ＨＡをＰＴＸ３、ＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、

ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＷ）である。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ　ＨＷ）である。

【００６３】

[00106]一部の実施形態では、方法は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）をペントラキシン３（ＰＴＸ３）タンパク質、重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）を含むインターα阻害剤（ＩαＩ）タンパク質、ならびに腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）と同時に接触させるステップを含む。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをＰＴＸ３、ＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。

【００６４】

[00107]一部の実施形態では、方法は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、ヒアルロナン（ＨＡ）をペントラキシン３（ＰＴＸ３）タンパク質、重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）を含むインターα阻害剤（ＩαＩ）タンパク質、ならびに腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）を任意の順番で逐次的に接触させるステップを含む。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをＰＴＸ３、ＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＷ）である。一部の実施形態では、ヒアルロナン（ＨＡ）は低分子量ヒアルロナン（ＬＭＷ ＨＷ）である。

【００６５】

[00108]一部の実施形態では、方法は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷ　ＨＡ）をペントラキシン３（ＰＴＸ３）タンパク質、重鎖１（ＨＣ１）および重鎖２（ＨＣ２）を含むインターα阻害剤（ＩαＩ）タンパク質、ならびに腫瘍壊死因子α刺激遺伝子６（ＴＳＧ－６）と任意の順番で逐次的に接触させるステップを含む。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをＰＴＸ３、ＩαＩおよびＴＳＧ－６と接触させるステップは、少なくとも１０分、少なくとも３０分、少なくとも１時間、少なくとも２時間、少なくとも３時間、少なくとも４時間、少なくとも５時間、少なくとも６時間、少なくとも１２時間、または少なくとも２４時間もしくはより長く行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは３７℃で行われる。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡ、ＰＴＸ３、ＩαＩ、およびＴＳＧ－６を接触させるステップは、ＰＢＳ中５ｍＭのＭｇＣｌ$_2$において行われる。

【００６６】

[00109]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の生産のための方法は、１種または複数の小分子ロイシンリッチプロテオグリカン（ＳＬＲＰ）の添加をさらに含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生成するための方法は、（ａ）ヒアルロナン（ＨＡ）をＩαＩと、およびＴＳＧ－６をＨＡに接触させ

、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体を形成するステップと、（ｂ）ＨＣ－ＨＡ複合体をペントラキシン３（ＰＴＸ３）と接触させるステップと、（ｃ）ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、ＨＣ－ＨＡ複合体を１種または複数のＳＬＲＰＳと接触させるステップとを含む。一部の実施形態では、再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生成するための方法は、（ａ）高分子量ヒアルロナン（ＨＭＷＨＡ）をＩαＩと、およびＴＳＧ－６をＨＡに接触させ、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体を形成するステップと、（ｂ）ＨＣ－ＨＡ複合体をペントラキシン３（ＰＴＸ３）と接触させるステップと、（ｃ）ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を形成するための適切な条件下で、ＨＣ－ＨＡ複合体を１種または複数のＳＬＲＰＳと接触させるステップとを含む。そのような方法によって生産されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が本明細書で提供される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１はＨＡと共有結合を形成する。一部の実施形態では、方法は、ＴＳＧ－６に予め結合したＨＣ－ＨＡ複合体をＰＴＸ３と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、方法のステップ（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）は順次行われる。一部の実施形態では、方法のステップ（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）は同時に行われる。一部の実施形態では、方法のステップ（ａ）が行われ、次いで方法のステップ（ｂ）および（ｃ）が順次行われる。一部の実施形態では、方法のステップ（ａ）が行われ、次いで方法のステップ（ｂ）および（ｃ）が同時に行われる。

【００６７】

[00110]一部の実施形態では、ＳＬＲＰはクラスＩ、クラスＩＩまたはクラスＩＩＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、ＳＬＲＰは、デコリンおよびビグリカンなどのクラスＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、フィブロモジュリン、ルミカン、ＰＲＥＬＰ（プロリンアルギニンリッチ末端ロイシンリッチタンパク質）、ケラトカン、およびオステオアドヘリンなどのクラスＩＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、エピフィカン（ｅｐｉｐｙｃａｎ）およびオステオグリシンなどのクラスＩＩＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンは、ビクニン、デコリン、ビグリカン、およびオステオアドヘリンの中から選択される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチタンパク質はグリコサミノグリカンを含む。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカンはケラタン硫酸を含む。

【００６８】

[00111]ＰＴＸ３

[00112]一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は細胞または複数の細胞（例えば組織抽出物）から単離される。ＰＴＸ３の発現に適した例示的な細胞は、哺乳動物細胞、霊長類細胞、ヒト細胞、齧歯類細胞、昆虫細胞、細菌、および酵母を含むが、これらに限定されない動物細胞、ならびに藻類、被子植物、裸子植物、シダ植物およびコケ植物を含むが、これらに限定されない植物細胞を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３はヒト細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は、ＰＴＸ３発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激された細胞から単離される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００６９】

[00113]一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は羊膜細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は臍帯由来の羊膜細胞から単離される。一部の実施形態では、羊膜細胞は、ＰＴＸ３発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００７０】

[00114]一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は臍帯細胞から単離される。一部の実施形態では、臍帯細胞は、ＰＴＸ３発現を上方制御するために１種

または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００７１】

[00115]一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は羊膜上皮細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は臍帯上皮細胞から単離される。一部の実施形態では、羊膜上皮細胞または臍帯上皮細胞は、ＰＴＸ３発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００７２】

[00116]一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は羊膜間質細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は臍帯間質細胞から単離される。一部の実施形態では、羊膜間質細胞または臍帯間質細胞は、ＰＴＸ３発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００７３】

[00117]一部の実施形態では、方法において使用するためのＰＴＸ３は、細胞から単離された天然のＰＴＸ３タンパク質である。一部の実施形態では、細胞はＰＴＸ３発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００７４】

[00118]一部の実施形態では、ＰＴＸ３は組換え技術によって調製される。一部の実施形態では、ＰＴＸ３は組換え発現ベクターから発現される。一部の実施形態では、ＰＴＸ３をコードする核酸は構成的プロモーターに動作可能に連結される。一部の実施形態では、ＰＴＸ３をコードする核酸は誘導性プロモーターに動作可能に連結される。一部の実施形態では、ＰＴＸ３はトランスジェニック動物において発現される。一部の実施形態では、ＰＴＸ３は組換えタンパク質である。一部の実施形態では、ＰＴＸ３は、細胞から単離された組換えタンパク質である。一部の実施形態では、ＰＴＸ３は、無細胞抽出物において生産された組換えタンパク質である。

【００７５】

[00119]一部の実施形態では、ＰＴＸ３は羊膜、臍帯、臍帯の羊膜、絨毛膜、羊水、またはこれらの組合せから精製される。一部の実施形態では、ＰＴＸ３は羊膜細胞から精製される。一部の実施形態では、羊膜細胞は羊膜上皮細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は臍帯上皮細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は羊膜間質細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は臍帯間質細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は、ＰＴＸ３発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００７６】

[00120]一部の実施形態では、ＰＴＸ３は細胞または複数の細胞（例えば組織抽出物）から単離されない。

[00121]一部の実施形態では、ＰＴＸ３は、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の形成を促すのに十分なＰＴＸ３の断片を含む。提供される方法において使用するためのＰＴＸ３のバリアントは、アミノ酸の置換え（置換）、欠失または挿入であるアミノ酸修飾を有するバリアントを含む。一部の実施形態では、そのような修飾は、ＰＴＸ３ポリペプチドの１種または複数の特性を改良し、例えば、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の１種または複数の治療特性（例えば、抗炎症、抗免疫、抗血管新生、抗瘢痕、抗接着、再生または本明細書に記載の他の治療活性）を改良する。

【００７７】

[00122]一部の実施形態では、ＰＴＸ３タンパク質は商業的供給源から得られる。ＰＴＸ３の例示的な商業的供給源は、ＰＴＸ３（カタログ番号１８２６－ＴＳ；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）であるが、これに限定されない。

【００７８】
[00123]一部の実施形態では、方法において使用されるＰＴＸ３タンパク質は多量体タンパク質である。一部の実施形態では、方法において使用されるＰＴＸ３タンパク質はホモ多量体である。一部の実施形態では、ホモ多量体は二量体、三量体、四量体、六量体、五量体、または八量体である。一部の実施形態では、ＰＴＸ３ホモ多量体は三量体、四量体、または八量体である。特定の実施形態では、ＰＴＸ３ホモ多量体は八量体である。一部の実施形態では、多量体化ドメインは、ＰＴＸ３タンパク質の多量体化を改良するために修飾される。一部の実施形態では、多量体化ドメインは、ＰＴＸ３と融合した場合にＰＴＸ３の多量体化を改良する異種の多量体化ドメイン（例えば、Ｆｃ多量体化ドメインまたはロイシンジッパー）で置き換えられる。
【００７９】
[00124]ＴＳＧ－６
[00125]一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は細胞または複数の細胞（例えば組織抽出物）から単離される。ＴＳＧ－６の発現に適した例示的な細胞は、哺乳動物細胞、霊長類細胞、ヒト細胞、齧歯類細胞、昆虫細胞、細菌、および酵母を含むが、これらに限定されない動物細胞、ならびに藻類、被子植物、裸子植物、シダ植物およびコケ植物を含むが、これらに限定されない植物細胞を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６はヒト細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は、ＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激された細胞から単離される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。
【００８０】
[00126]一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は羊膜細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は臍帯由来の羊膜細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は、ＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激された羊膜細胞から単離される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。
【００８１】
[00127]一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は臍帯細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は、ＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激された臍帯細胞から単離される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。
【００８２】
[00128]一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は羊膜上皮細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は臍帯上皮細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は、ＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激された羊膜上皮細胞または臍帯上皮細胞から単離される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。
【００８３】
[00129]一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は羊膜間質細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は臍帯間質細胞から単離される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は、ＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激された羊膜間質細胞または臍帯間質細胞から単離される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。
【００８４】
[00130]一部の実施形態では、方法において使用するためのＴＳＧ－６は、細胞から

単離された天然のＴＳＧ－６タンパク質である。一部の実施形態では、細胞はＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００８５】

[00131]一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は組換え技術によって調製される。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は組換え発現ベクターから発現される。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６をコードする核酸は構成的プロモーターに動作可能に連結される。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６をコードする核酸は誘導性プロモーターに動作可能に連結される。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６はトランスジェニック動物において発現される。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は組換えタンパク質である。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は細胞から単離された組換えタンパク質である。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は無細胞抽出物において生産された組換えタンパク質である。

【００８６】

[00132]一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は羊膜、羊膜、絨毛膜、羊水、またはこれらの組合せから精製される。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は羊膜細胞から精製される。一部の実施形態では、羊膜細胞は羊膜上皮細胞である。一部の実施形態では、羊膜上皮細胞は臍帯上皮細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は羊膜間質細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は臍帯間質細胞である。一部の実施形態では、羊膜細胞は、ＴＳＧ－６発現を上方制御するために１種または複数の炎症性サイトカインで刺激される。一部の実施形態では、炎症性サイトカインはＩＬ－１またはＴＮＦ－αである。

【００８７】

[00133]一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は細胞または複数の細胞（例えば組織抽出物）から単離されない。

[00134]一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は、ＨＡへのＩαＩのＨＣ１の転移を促すまたは触媒するのに十分であるＴＳＧ－６の断片を含む。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６はＴＳＧ－６のリンクモジュールを含む。

【００８８】

[00135]一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は親和性タグを含む。例示的な親和性タグは、ヘマグルチニンタグ、ポリ－ヒスチジンタグ、ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）タグを含むが、これらに限定されない。このような親和性タグは、精製での使用について当技術分野で周知されている。一部の実施形態では、このような親和性タグは、融合タンパク質として、または化学リンカーを介してＴＳＧ－６ポリペプチドに組み込まれる。一部の実施形態では、ＴＳＧ－６は親和性タグを含み、結合していないＴＳＧ－６は親和性精製によってｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体から除去される。

【００８９】

[00136]一部の実施形態では、ＴＳＧ－６タンパク質は商業的供給源から得られる。ＴＳＧ－６の例示的な商業的供給源はＴＳＧ－６（カタログ番号２１０４－ＴＳ　Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）であるが、これに限定されない。

【００９０】

[00137]ＩαＩ

[00138]一部の実施形態では、ＩαＩはＨＣ１鎖を含む。一部の実施形態では、ＩαＩはＨＣ１およびＨＣ２鎖を含む。一部の実施形態では、ＩαＩはＨＣ１およびＨＣ２鎖ならびにビクニンを含む。一部の実施形態では、ＩαＩはコンドロイチン硫酸鎖によって連結された、ＨＣ１およびＨＣ２鎖ならびにビクニンを含む。

【００９１】

[00139]一部の実施形態では、ＩαＩは生体試料から単離される。一部の実施形態では、生体試料は哺乳動物由来の生体試料である。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、生体試料は血液、血清、血漿、肝臓、羊膜、絨毛膜または羊水試料である。一部の実施形態では、生体試料は血液、血清、または血漿試料である。一

部の実施形態では、生体試料は血液試料である。一部の実施形態では、生体試料は血清試料である。一部の実施形態では、生体試料は血漿試料である。一部の実施形態では、ＩαＩはヒト血液、血漿または血清から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩはヒト血清から単離される。一部の実施形態では、ＩαＩは血清から単離されない。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは羊膜細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは臍帯細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは臍帯由来の羊膜細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは羊膜上皮細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは臍帯上皮細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは羊膜間質細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは臍帯間質細胞において生産される。一部の実施形態では、方法において使用するためのＩαＩは肝細胞において生産される。一部の実施形態では、ＩαＩは組換え技術によって調製される。

【００９２】

[00140]一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は生体試料から単離される。一部の実施形態では、生体試料は哺乳動物由来の生体試料である。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、生体試料は血液、血清、血漿、肝臓、羊膜、絨毛膜または羊水試料である。一部の実施形態では、生体試料は血液、血清、または血漿試料である。一部の実施形態では、生体試料は血液試料である。一部の実施形態では、生体試料は血清試料である。一部の実施形態では、生体試料は血漿試料である。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１はヒト血液、血漿または血清から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩはヒト血清から単離される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は血清から精製されない。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は組換え技術によって調製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は肝細胞から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は羊膜細胞から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は羊膜上皮細胞または臍帯上皮細胞から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ１は羊膜間質細胞または臍帯間質細胞から精製される。

【００９３】

[00141]一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は生体試料から単離される。一部の実施形態では、生体試料は哺乳動物由来の生体試料である。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、生体試料は血液、血清、血漿、肝臓、羊膜、絨毛膜または羊水試料である。一部の実施形態では、生体試料は血液、血清、または血漿試料である。一部の実施形態では、生体試料は血液試料である。一部の実施形態では、生体試料は血清試料である。一部の実施形態では、生体試料は血漿試料である。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２はヒト血液、血漿または血清から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２はヒト血清から単離される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２はヒト血清から単離される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は血清から単離されない。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は組換え技術によって調製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は肝細胞から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は羊膜細胞から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は羊膜上皮細胞または臍帯上皮細胞から精製される。一部の実施形態では、ＩαＩのＨＣ２は羊膜間質細胞または臍帯間質細胞から精製される。

【００９４】

[00142]ＨＡ

[00143]一部の実施形態では、ＨＡは細胞、組織または流体試料から精製される。一部の実施形態では、ＨＡは商業的供給業者（例えば、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈまたは　Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｏｐｔｉｃｓ、Ｉｒｖｉｎｅ、ＣＡ（例えばＨｅａｌｏｎ））から得られる。一部の実施形態では、ＨＡは商業的供給業者から粉末として得られる。一部の実施形態では、ＨＡは細胞において発現される。ＨＡの発現に適した例示

的な細胞は、哺乳動物細胞、霊長類細胞、ヒト細胞、齧歯類細胞、昆虫細胞、細菌、および酵母を含むが、これらに限定されない動物細胞、ならびに藻類、被子植物、裸子植物、シダ植物およびコケ植物を含むが、これらに限定されない植物細胞を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ＨＡはヒト細胞において発現される。一部の実施形態では、ＨＡはトランスジェニック動物において発現される。一部の実施形態では、ＨＡはヒアルロナンシンターゼ（例えば、ＨＡＳ１、ＨＡＳ２、およびＨＡＳ３）を発現する細胞から得られる。一部の実施形態では、細胞はＨＡシンターゼを発現する組換え発現ベクターを含有する。ある特定の事例では、ＨＡシンターゼがグルクロン酸およびＮ－アセチルグルコサミンを新生多糖に繰り返し付加することによってヒアルロナンを伸ばす一方で、ヒアルロナンは細胞膜を通して細胞外空間に押し出される。

【００９５】

[00144]方法において使用するためのＨＡは、一部の実施形態では、高分子量（ＨＭＷ）ＨＡである。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡの重量平均分子量は、約５００キロダルトン（ｋＤａ）を超え、例えば、約５００ｋＤａ～約１０，０００ｋＤａ、約８００ｋＤａ～約８，５００ｋＤａ、約１１００ｋＤａ～約５，０００ｋＤａ、または約１４００ｋＤａ～約３，５００ｋＤａなどである。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡの重量平均分子量は約３０００ｋＤａである。

【００９６】

[00145]追加の成分

[00146]一部の実施形態では、１種または複数の追加の成分が、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生成するために添加される。一部の実施形態では、小分子ロイシンリッチプロテオグリカン（ＳＬＲＰ）が、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を生成するために添加される。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはクラスＩ、クラスＩＩまたはクラスＩＩ　ＳＬＲＰである。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはデコリンおよびビグリカンなどのクラスＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはフィブロモジュリン、ルミカン、ＰＲＥＬＰ（プロリンアルギニンリッチ末端ロイシンリッチタンパク質）、ケラトカン、およびオステオアドヘリンなどのクラスＩＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはエピフィカン（ｅｐｉｐｙｃａｎ）およびオステオグリシンなどのクラスＩＩＩ　ＳＬＲＰの中から選択される。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはビクニン、デコリン、ビグリカン、およびオステオアドヘリンの中から選択される。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはグリコサミノグリカンを含む。一部の実施形態では、ＳＬＲＰはケラタン硫酸を含む。

【００９７】

[00147]一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは任意の適切な方法によって固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは、固体支持体、例えば、培養皿、ビーズ、カラムあるいは他の適切な表面、例えば、植込み型医療機器もしくはその一部の表面または後で本明細書に記載の植込み型医療機器に接続もしくはそれと結合される表面などに固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは化学結合などによって固体支持体に直接固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡをリンカーまたは中間タンパク質を介して固体支持体に間接的に結合させる。アミノ基とチオール基の共有結合を形成し、チオール基をタンパク質に導入するために使用される多数のヘテロ二官能性架橋試薬は、当業者に公知である。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは固体支持体への架橋により固体支持体に直接固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡは固体支持体に架橋することなく固体支持体に直接固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡはコーティング剤として固体支持体に直接固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡはＣｏｖａｌｉｎｋ（商標）－ＮＨ表面に固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡはコーティング剤として固体支持体に直接固定される。一部の実施形態では、ＨＭＷ　ＨＡはＣｏｖａｌｉｎｋ（商標）－ＮＨ表面に約１６時間４℃で固定される。

【００９８】

[00148]一部の実施形態では、方法は、固体支持体への直接結合により（すなわち中

間タンパク質なしで）ＨＭＷ　ＨＡを固体表面に固定するステップを含む。一部の実施形態では、固定されたＨＡをＩαＩ、ＴＳＧ－６、およびＰＴＸ３と接触させる前に、固体支持体は、結合していないＨＭＷ　ＨＡを除去するために洗浄される。一部の実施形態では、固定されたＨＡをＩαＩ、ＴＳＧ－６、およびＰＴＸ３と接触させる前に、固体支持体は、結合していないＨＭＷ　ＨＡを除去するために８ＭのＧｎＨＣｌおよびＰＢＳの洗浄液で洗浄される。

【００９９】

[00149]一部の実施形態では、方法は、中間タンパク質またはリンカーを介してＨＡを固体表面に固定するステップを含む。一部の実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。一部の実施形態では、中間タンパク質はＨＡ結合タンパク質（ＨＡＢＰ）である。一部の実施形態では、ＨＡＢＰを固体支持体に最初に結合させる（例えば、架橋、化学結合によって、または化学リンカーを介して）。一部の実施形態では、次いでＨＡＢＰを含む固体支持体をＨＡ（例えばＨＭＷ　ＨＡ）と接触させ、ＨＡへのＨＡＢＰの結合によりＨＡを固体支持体に固定する。一部の実施形態では、固定されたＨＭＷ　ＨＡをＩαＩ、ＴＳＧ－６、およびＰＴＸ３と接触させる前に、固体支持体は、結合していないＨＭＷ　ＨＡを除去するために洗浄される。一部の実施形態では、固定されたＨＡをＩαＩ、ＴＳＧ－６、およびＰＴＸ３と接触させる前に、固体支持体は、結合していないＨＭＷ　ＨＡを除去するために８ＭのＧｎＨＣｌおよびＰＢＳの洗浄液で洗浄される。

【０１００】

[00150]一部の実施形態では、方法は、固体支持体へのペプチドリンカーの結合およびペプチドリンカーへのＨＡの結合により、ＨＡを固体表面に固定するステップを含む。一部の実施形態では、ペプチドリンカーはプロテアーゼ切断部位を含む。

【０１０１】

[00151]一部の実施形態では、方法は、これに限定されないがジスルフィド化学リンカーなどの切断可能な化学リンカーの結合を介してＨＡを固体表面に固定するステップを含む。

【０１０２】

[00152]一部の実施形態では、方法において使用するために選択されるＨＡＢＰは、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の形成後にＨＡから解離されるＨＡＢＰである。一部の実施形態では、ＨＡＢＰはＨＡに非共有結合的に結合する。一部の実施形態では、方法は、１種または複数の解離剤を使用してｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体をＨＡＢＰから解離するステップをさらに含む。非共有結合の相互作用の破壊のための解離剤（例えば、グアニジン塩酸塩、尿素および様々な界面活性剤、例えばＳＤＳ）は当技術分野で公知である。一部の実施形態では、解離剤は尿素である。一部の実施形態では、解離剤はグアニジン塩酸塩である。一部の実施形態では、解離剤は約４Ｍ～約８Ｍのグアニジン－ＨＣｌである。一部の実施形態では、解離剤は約４Ｍ、約５Ｍ、約６Ｍ、約７Ｍ、約８Ｍのグアニジン－ＨＣｌである。一部の実施形態では、解離剤は、ｐＨ７．５のＰＢＳ中の約４Ｍ～約８Ｍのグアニジン－ＨＣｌである。

【０１０３】

[00153]一部の実施形態では、そのような解離剤は、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を中間ＨＡＢＰから解離するために用いられる。方法において使用するためのＨＡＢＰは、典型的には、ＨＡへの結合親和性が、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の組立てを可能にするのに十分強いように選択されるが、適切な解離剤でｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体から解離される。一部の実施形態では、解離剤はグアニジン塩酸塩である。

【０１０４】

[00154]本明細書で提供される方法と共に使用するための例示的なＨＡＢＰは、ＨＡＰＬＮ１、ＨＡＰＬＮ２、ＨＡＰＬＮ３、ＨＡＰＬＮ４、アグリカン、バーシカン、ニューロカン、ブレビカン、ホスファカン、ＴＳＧ－６、ＣＤ４４、スタビリン－１、スタビリン－２、またはＨＡに結合するのに十分なそれらの一部（例えばそれらのリンクモジュール）を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、ＨＡＢＰはバーシカンで

ある。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは組換えタンパク質である。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは組換え哺乳動物タンパク質である。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは組換えヒトタンパク質である。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは組換えバーシカンタンパク質またはＨＡに結合するのに十分なその一部である。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは組換えアグリカンタンパク質またはＨＡに結合するのに十分なその一部である。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは天然のＨＡＢＰまたはＨＡに結合するのに十分なその一部である。一部の実施形態では、天然のＨＡＢＰは哺乳動物組織または細胞から単離される。一部の実施形態では、ＨＡＢＰはウシの鼻軟骨から単離される（例えば、アグリカンおよびリンクタンパク質のＨＡ結合ドメインを含有する、ＳｅｉｋａｇａｋｕからのＨＡＢＰ）。

【０１０５】

[00155]一部の実施形態では、ＨＡＢＰは、ＨＡＰＬＮ１、ＨＡＰＬＮ２、ＨＡＰＬＮ３、ＨＡＰＬＮ４、アグリカン、バーシカン、ニューロカン、ブレビカン、ホスファカン、ＴＳＧ－６、ＣＤ４４、スタビリン－１、またはスタビリン－２のリンクモジュールを含む。一部の実施形態では、ＨＡＢＰはバーシカンのリンクモジュールを含む。一部の実施形態では、リンクモジュールを含むＨＡＢＰは組換えタンパク質である。一部の実施形態では、バーシカンのリンクモジュールを含むＨＡＢＰは組換えタンパク質である。

【０１０６】

[00156]一部の実施形態では、ＨＡＢＰなどの中間タンパク質は、フーリン、３Ｃプロテアーゼ、カスパーゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼまたはＴＥＶプロテアーゼなどの部位特異的プロテアーゼによって認識され、加水分解されるタンパク質分解性切断配列を含有する。そのような実施形態では、組み立てられたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、固定された複合体を、特定の切断配列を切断するプロテアーゼと接触させることによって、固体支持体から解放される。

【０１０７】

[00157]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は精製される。一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、任意の適切な方法または方法の組合せによって精製される。下に記載される実施形態は排他的であることを意図しておらず、例示的であるにすぎない。

【０１０８】

[00158]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、サイズ排除、およびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー）、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、ゲル濾過、遠心分離（例えば勾配遠心分離）、もしくは差次的溶解度、エタノール沈殿によって、またはタンパク質の精製のための任意の他の利用可能な技術によって精製される。

【０１０９】

[00159]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は免疫親和性クロマトグラフィーによって精製される。一部の実施形態では、抗体はｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の成分に対して生成され（例えば、抗ＨＣ１、抗ＰＴＸ３、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の１種または複数のＳＬＲＰに対する抗体、例えば、抗ビクニン、抗デコリン、抗ビグリカン、または抗オステオアドヘリン）、固体支持体に付けられる。一部の実施形態では、精製されないｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体（すなわち移動相）は支持体を通過する。ある特定の事例では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は抗体に結合する。一部の実施形態では、支持体は、任意の結合していないまたは緩く結合した分子を除去するために洗浄される（例えばＰＢＳで）。一部の実施形態では、次いで支持体は、支持体からのｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の溶出を可能にする溶液（例えば、１％ＳＤＳ、６Ｍのグアニジン－ＨＣｌ、または８Ｍの尿素）で洗浄される。一部の実施形態では、解離剤は解離されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体から除去される。一部の実施形態では、解離剤は、イオン交換クロマトグラフィー、透析、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、または透析濾過を含むが、これらに限定されない方法によって、解離されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体から除去される。

【０１１０】
[00160]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は親和性クロマトグラフィーによって精製される。一部の実施形態では、ＨＡＢＰは、複合体の精製のためにｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体に結合するために用いられ、固定の支持体に付けられる。一部の実施形態では、精製されないｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体（すなわち移動相）は支持体を通過する。ある特定の事例では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体はＨＡＢＰに結合する。一部の実施形態では、支持体は、任意の結合していないまたは緩く結合した分子を除去するために洗浄される（例えばＰＢＳで）。一部の実施形態では、次いで支持体は、支持体からのｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の溶出を可能にする溶液（例えば解離剤）で洗浄される。一部の実施形態では、解離剤は、イオン交換クロマトグラフィー、透析、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、または透析濾過を含むが、これらに限定されない方法によって、解離されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体から除去される。

【０１１１】
[00161]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ＨＡＢＰ親和性クロマトグラフィー、およびｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の１種または複数の成分に対する抗体を使用する免疫親和性クロマトグラフィーの組合せによって精製される。

【０１１２】
[00162]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の１種または複数の成分は、親和性タグ（例えば、ＰＴＸ３またはＨＣ１と親和性タグの融合タンパク質）を含む。ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の１種または複数の成分に組み込まれる例示的な親和性タグは、一部の実施形態では、ヘマグルチニンタグ、ポリ－ヒスチジン、ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、またはグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ配列を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、親和性タグのリガンドは固体支持体に付けられる。一部の実施形態では、精製されないｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は支持体を通過する。ある特定の事例では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体はリガンドに結合する。一部の実施形態では、支持体は、任意の結合していないまたは緩く結合した分子を除去するために洗浄される（例えばＰＢＳで）。一部の実施形態では、次いで支持体は、支持体からの本明細書で開示されるｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の溶出を可能にする溶液で洗浄される。一部の実施形態では、溶出剤は、イオン交換クロマトグラフィー、透析、タンジェンシャルフロー濾過（ＴＦＦ）、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、または透析濾過を含むが、これらに限定されない方法によって、解離されたｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体から除去される。

【０１１３】
[00163]一部の実施形態では、ＰＴＸ３、ＴＳＧ－６、および／またはＨＣ１は標識にコンジュゲートされる。「標識」は、標識されたポリペプチドを生成するためにポリペプチドに直接または間接的にコンジュゲートされる検出可能なコンパウンドまたは組成物を指す。一部の実施形態では、標識は、それ自体で検出可能である（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）または酵素標識の場合、検出可能である基質コンパウンド組成物の化学変化を触媒する。標識の非限定的な例は蛍光発生部分、色素、蛍光タグ、緑色蛍光タンパク質、またはルシフェラーゼを含む。

【０１１４】
[00164]ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の活性を判定する方法

[00165]本明細書で提供されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の特性は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏ方法を含む任意の適切な方法によって判定される。例示的なｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法は、本明細書で提供され、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が、固定されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体へのマクロファージの結合を促進する能力、マクロファージの凝集を阻害または低減する能力、好中球のアポトーシス、アポトー

シス性好中球のマクロファージ食作用、および刺激されたマクロファージのＭ２極性化を促進する能力を判定する細胞培養方法を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、アッセイで使用されるマクロファージは、ＬＰＳまたはＩＦＮ－γへの曝露などによって刺激される。一部の実施形態では、刺激されたマクロファージにおける遺伝子またはタンパク質発現は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体との接触後に判定される。ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の活性を判定するそのような方法において、適切な対照が比較のために用いられる。一部の実施形態では、対照は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体による処理がない（すなわち陰性対照）。

【０１１５】

[00166]一部の実施形態では、ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の活性は、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の活性と比較される。一部の実施形態では、天然のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は羊膜から単離される。

【０１１６】

[00167]一部の実施形態では、処理されたマクロファージにおける遺伝子発現は、ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロッティング、ウエスタンブロッティング、ドットブロッティング、免疫組織化学、クロマトグラフィーまたはタンパク質もしくは核酸を検出する他の適切な方法によって判定される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ２３、ＬＩＧＨＴおよびＳＰＨＫ１の発現のレベルが判定される。

【０１１７】

医薬組成物

[00168]ある特定の実施形態では、本明細書に記載のｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含む医薬組成物が本明細書で開示される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される方法によって生産されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含む医薬組成物が本明細書で開示される。一部の実施形態では、医薬組成物は、薬学的使用に適した調製物へのｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の処理を促す賦形剤および助剤を含む、１種または複数の生理的に許容される担体を使用する従来の様式で製剤化される。適正な製剤は、選択される投与経路に依存する。周知の技術、担体、および賦形剤のいずれもが、適切に、当技術分野で理解される通りに使用され得る。

【０１１８】

[00169]ある特定の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含む医薬組成物が本明細書で開示される。一部の実施形態では、医薬組成物は少なくとも１種の薬学的に許容される担体をさらに含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、アジュバント、賦形剤、保存剤、吸収遅延剤、充填剤、結合剤、吸着剤、緩衝剤および／または可溶化剤をさらに含む。本明細書で提供されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含有するように製剤化された例示的な医薬組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、顆粒剤、散剤、軟膏剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、チンキ剤、経皮系、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、パスタ剤、フォーム、ゲル剤、またはエアゾール剤を含むが、これらに限定されない。

【０１１９】

[00170]剤形

[00171]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は水性懸濁剤として投与される。一部の実施形態では、水性懸濁剤は、水、リンガー液および／または等張塩化ナトリウム溶液を含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は、甘味または着香剤、着色物質または色素、および必要なら乳化剤または懸濁化剤を、希釈剤、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、またはこれらの組合せと一緒に含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は懸濁化剤を含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤はカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル－

ピロリドン、トラガントガムおよび／またはアラビアゴムを含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は分散または湿潤剤を含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は、天然に存在するリン脂質、例えばレシチン、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合産物、例えばステアリン酸ポリオキシエチレン、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合産物、例えばヘプタデカエチレン－オキシセタノール、またはエチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合産物、例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレアート、またはエチレンオキシドと、脂肪酸およびヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの縮合産物、例えばポリエチレンソルビタンモノオレアートを含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は保存剤を含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は、ｐ－ヒドロキシ安息香酸エチルまたはｎ－プロピルを含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤は甘味剤を含む。一部の実施形態では、水性懸濁剤はスクロース、サッカリンまたはアスパルテームを含む。

【０１２０】

[00172]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は油性懸濁剤として投与される。一部の実施形態では、油性懸濁剤は、活性成分を植物油（例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油またはヤシ油）、または鉱油（例えば流動パラフィン）に懸濁することによって製剤化される。一部の実施形態では、油性懸濁剤は増粘剤（例えば、ミツロウ、固形パラフィンまたはセチルアルコール）を含む。一部の実施形態では、油性懸濁剤は甘味剤（例えば上記のもの）を含む。一部の実施形態では、油性懸濁剤は抗酸化剤（例えば、ブチルヒドロキシアニソールまたはアルファ－トコフェロール）を含む。

【０１２１】

[00173]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、非経口注射（例えば、動脈内、心臓内、皮内、十二指腸内、髄内、筋肉内、骨内、腹腔内、髄腔内、血管内、静脈内、硝子体内、硬膜外および／または皮下を含む注射または注入による）のために製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、無菌液剤、懸濁剤または乳剤として投与される。

【０１２２】

[00174]一部の実施形態では、非経口投与のための製剤は、一部の実施形態では、抗酸化剤、緩衝剤、静菌薬および／もしくは製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含有する、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３もしくはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の水性および／もしくは非水性（油性）無菌注射液剤、ならびに／または一部の実施形態では、懸濁化剤および／もしくは増粘剤を含む、水性および／もしくは非水性無菌懸濁剤を含む。一部の実施形態では、非経口投与のための製剤は、適切な安定剤または高度に濃縮された液剤の調製を可能にするために、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の溶解度を上げる薬剤を含む。

【０１２３】

[00175]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、活性成分が油性相に溶解された、水中油型マイクロエマルジョンとして投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、脂肪油（例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリド、またはリポソームに溶解される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、ダイズ油および／またはレシチンの混合物に溶解される。一部の実施形態では、油剤は水およびグリセロール混合物に導入され、処理されてマイクロエマルジョンを形成する。

【０１２４】

[00176]一部の実施形態では、非経口投与のために製剤化された組成物は、単一ボー

ラスショットとして投与される。一部の実施形態では、非経口投与のために製剤化された組成物は、連続静脈内送達機器（例えばＤｅｌｔｅｃ　ＣＡＤＤ－ＰＬＵＳ（商標）ｍｏｄｅｌ５４００静脈内ポンプ）により投与される。

【０１２５】

[00177]一部の実施形態では、注射のための製剤は、単位剤形で、例えば、保存剤が添加されたアンプルまたは複数用量容器で提供される。一部の実施形態では、注射のため製剤は、使用直前に無菌液体担体、例えば、食塩水または無菌発熱物質不含水の添加だけを必要とする、粉末の形態でまたは冷凍乾燥（凍結乾燥）状態で保存される。

【０１２６】

[00178]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は局所投与のために製剤化される。局所製剤は、軟膏剤、クリーム剤、ローション剤、液剤、パスタ剤、ゲル剤、フィルム剤、スティック剤、リポソーム、ナノ粒子を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、局所製剤は、貼付剤、包帯または創傷包帯の使用によって投与される。

【０１２７】

[00179]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、固体、架橋ゲル、またはリポソームの形態の組成物として製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、不溶性架橋ヒドロゲルとして製剤化される。

【０１２８】

[00180]一部の実施形態では、局所製剤はゲル化（または増粘）剤を含む。適切なゲル化剤は、セルロース、セルロース誘導体、セルロースエーテル（例えば、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース）、グアーガム、キサンタンガム、ローカストビーンガム、アルギン酸塩（例えばアルギン酸）、ケイ酸塩、デンプン、トラガント、カルボキシビニルポリマー、カラギーナン、パラフィン、ワセリン、アカシアゴム（アラビアゴム）、寒天、ケイ酸マグネシウムアルミニウム、アルギン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ヒバマタ、ベントナイト、カルボマー、カラギーナン、カルボポール、キサンタン、セルロース、結晶セルロース（ＭＣＣ）、セラトニア、ツノマタ属、デキストロース、ファーセレラン、ゼラチン、ガティガム、グアーガム、ヘクトライト、ラクトース、スクロース、マルトデキストリン、マンニトール、ソルビトール、ハチミツ、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、カラヤガム、ポリエチレングリコール（例えばＰＥＧ２００～４５００）、トラガントガム、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、エチルメチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリ（ヒドロキシエチルメタクリレート）、オキシポリゼラチン、ペクチン、ポリゲリン、ポビドン、炭酸プロピレン、メチルビニルエーテル／無水マレイン酸コポリマー（ＰＶＭ／ＭＡ）、ポリ（メトキシエチルメタクリレート）、ポリ（メトキシエトキシエチルメタクリレート）、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチル－セルロース（ＨＰＭＣ）、カルボキシメチル－セルロースナトリウム（ＣＭＣ）、二酸化ケイ素、ポリビニルピロリドン（ＰＶＰ：ポビドン）、またはこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。

【０１２９】

[00181]一部の実施形態では、本明細書で開示される局所製剤は軟化剤を含む。軟化剤は、ヒマシ油エステル、カカオ脂エステル、ベニバナ油エステル、綿実油エステル、トウモロコシ油エステル、オリーブ油エステル、タラ肝油エステル、アーモンド油エステル、アボカド油エステル、パーム油エステル、ゴマ油エステル、スクアレンエステル、ククイ油エステル、ダイズ油エステル、アセチル化モノグリセリド、エトキシ化モノステアリ

ン酸グリセリン、ラウリン酸ヘキシル、ラウリン酸イソヘキシル、パルミチン酸イソヘキシル、パルミチン酸イソプロピル、パルミチン酸メチル、オレイン酸デシル、オレイン酸イソデシル、ステアリン酸ヘキサデシル、ステアリン酸デシル、イソステアリン酸イソプロピル、イソステアリン酸メチル、アジピン酸ジイソプロピル、アジピン酸ジイソヘキシル、アジピン酸ジヘキシルデシル、セバシン酸ジイソプロピル、乳酸ラウリル、乳酸ミリスチル、および乳酸セチル、ミリスチン酸オレイル、ステアリン酸オレイル、およびオレイン酸オレイル、ペラルゴン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、イソステアリン酸、ヒドロキシステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リチノール酸、アラキドン酸、ベヘン酸、エルカ酸、ラウリルアルコール、ミリスチルアルコール、セチルアルコール、ヘキサデシルアルコール、ステアリルアルコール、イソステアリルアルコール、ヒドロキステアリルアルコール、オレイルアルコール、リシノレイルアルコール、ベヘニルアルコール、エルシルアルコール、２－オクチルドデカニルアルコール、ラノリンおよびラノリン誘導体、ミツロウ、鯨ロウ、ミリスチン酸ミリスチル、ステアリン酸ステアリル、カルナウバロウ、キャンデリラロウ、レシチン、ならびにコレステロールを含むが、これらに限定されない。

【０１３０】

[00182]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、１種または複数の天然のポリマーを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ケラチン、フィブリン、線維素原、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸である天然のポリマーを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、天然のポリマーで構成されたポリマーゲルを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、これらに限定されないが、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ケラチン、フィブリン、線維素原、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、およびこれらの組合せなどの天然のポリマーで構成されたポリマーゲルを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、架橋したポリマーを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、架橋していないポリマーを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、架橋していないポリマーおよび架橋したポリマーを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、架橋したヒアルロナンゲルを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、不溶性の架橋したＨＡヒドロゲルを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、架橋していないヒアルロナンゲルを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、コラーゲンマトリックスを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、フィブリンマトリックスを用いて製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、フィブリン／コラーゲンマトリックスを用いて製剤化される。

【０１３１】

[00183]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍またはそれに関連する組織への投与のために製剤化される。腫瘍への投与に適した製剤は、液剤、懸濁剤（例えば水性懸濁剤）、軟膏剤、ゲル剤、クリーム剤、リポソーム、ニオソーム、ファーマコソーム、ナノ粒子、または

これらの組合せを含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、固形腫瘍への注射のための本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍、周囲組織、またはこれらの組合せへの注射によって投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞または腫瘍の切除と同時的に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、がん細胞または腫瘍の切除の切除縁に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が投与される。

【０１３２】

[00184]本明細書で使用される場合、「デポー調製物」は、腫瘍またはそれに関連する組織（例えば切除縁）において（例えば、皮下に、筋肉内に、硝子体内に、または結膜下内に）植え込まれる制御放出製剤である。一部の実施形態では、デポー調製物は、生分解性ポリマー中で、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体のマイクロカプセル化マトリックス（マイクロカプセル化マトリックスとしても公知）を形成することによって製剤化される。一部の実施形態では、デポー調製物は、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体をリポソームまたはマイクロエマルジョン内に封入することによって製剤化される。

【０１３３】

[00185]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、直腸または膣投与のために製剤化される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は坐剤として投与される。一部の実施形態では、直腸投与に適した組成物は、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を、常温で固体であるが、直腸温度で液体であり、したがって、直腸で溶けて薬物を放出する適切な非刺激性賦形剤と混合することによって調製される。一部の実施形態では、直腸投与に適した組成物は、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を、カカオ脂、グリセリンゼラチン、水添植物油、様々な分子量のポリエチレングリコールの混合物またはポリエチレングリコールの脂肪酸エステルと混合することによって調製される。

【０１３４】

[00186]ある特定の実施形態では、本明細書に記載のｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、制御放出粒子、脂質複合体、リポソーム、ナノ粒子、マイクロスフェア、微粒子、ナノカプセルまたは皮膚への局部送達を増強または促す他の薬剤内に任意選択で組み込まれる。医薬調製物の従来のマイクロカプセル化プロセスの例は、そのような開示のために参照により本明細書に組み込まれる米国特許第３，７３７，３３７号に記載されている。

【０１３５】

[00187]投与量

[00188]投与される医薬組成物の量は、治療される個体に一部依存する。医薬組成物がヒト対象に投与される場合、１日投与量は通常、処方医師によって決定され、投与量は一般的に個体の年齢、性別、食事、体重、全体的な健康および応答、個体の症状の重症度、治療される正確な疾患または状態、治療される疾患または状態の重症度、投与時間、投与経路、組成物の性質、排出速度、薬物の組合せおよび処方医師の裁量に従って変動する。

【０１３６】

[00189]一部の事例では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、局部注射によって、腫瘍および／または周囲組織に直接投与される。一部の事例では、腫瘍は外科的に除去できない、または「手術不可能」である。一部の実施形態では、手術不可能な腫瘍は接近可能でない、または患者は手術に耐え

る能力を制限する医学的状態を有する。一部の事例では、腫瘍は、外科的除去が周囲組織に重大な損傷を与え得る、脊髄、脳、または他の組織などの繊細な場所にある。一部の事例では、例えばある特定の脳がんに関して、腫瘍は周囲組織に浸潤または侵入し、周囲組織を傷付けることなく外科的に抽出することが不可能である。手術不可能な腫瘍は、限定なしに、多形性神経膠芽腫などの中枢神経系（ＣＮＳ）がん、乳がん、膵がん、または膀胱がんから生じ得る。一部の事例では、がんは、身体の他の場所に多数の続発性腫瘍または転移を有する。続発性腫瘍の数が多すぎて安全に除去できないことがある。転移性がんの種類は、限定なしに、膀胱がん、乳がん、結腸がん、腎臓がん、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、直腸がん、胃がん、甲状腺がん、肝臓がん、または子宮がんを含む。

【０１３７】

[００１９０]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の投与される投与量は、約０．００１～約１０００ｍｇである。一部の実施形態では、投与されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は、約０．５～約５０ｍｇの範囲である。一部の実施形態では、投与されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は、約０．００１～約７ｇである。一部の実施形態では、投与されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は、約０．０１～約７ｇである。一部の実施形態では、投与されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は、約０．０２～約５ｇである。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は、約０．０５～約２．５ｇである。一部の実施形態では、投与されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の量は、約０．１～約１ｇである。

【０１３８】

[００１９１]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、疾患または状態の発生前、発生中または発生後に投与される。一部の実施形態では、併用療法は、疾患または状態の発生前、発生中または発生後に施される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、疾患または状態の発生前、発生中または発生後に併用療法で投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を含有する組成物を投与するタイミングは変動する。したがって、一部の例では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は予防薬として使用され、疾患または状態の発生を防止するために状態または疾患を発症する傾向を有する対象に継続的に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、症状の開始中または開始後可能な限り早く対象に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の投与は、症状の開始の最初の４８時間以内、好ましくは症状の開始の最初の４８時間以内、より好ましくは症状の開始の最初の６時間以内、最も好ましくは症状の開始の３時間以内に始められる。一部の実施形態では、初めの投与は、例えば、静脈内注射、ボーラス注射、５分～約５時間にわたる注入、丸剤、カプセル剤、経皮貼付剤、口腔送達、またはこれらの組合せなどの実用的な任意の経路による。本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、好ましくは、疾患または状態の開始が検出されたまたは疑われた後に実行可能となるとすぐに、例えば約１カ月～約３カ月など疾患の治療に必要な時間の長さで投与される。一部の実施形態では、治療の長さは各対象について変動し、長さは公知の基準を使用して決定される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３もしくはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体または複合体を含有する製剤は、少なくとも２週間、好ましくは約１カ月～約５年、より好ましくは約１カ月～約３年間投与される。

【０１３９】

[00192]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、単一用量で１日１回投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、複数用量で、１日当たり１回より多く投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、１日２回投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、１日３回投与される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、１日４回投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、１日４回より多く投与される。

【０１４０】

[00193]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は単一用量で投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法と共に単一用量で投与される。

【０１４１】

[00194]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、予防的および／または治療的処置のために投与される。治療的適用において、一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、疾患または状態をすでに患っている個体に、疾患または状態の症状を治癒するまたは少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で投与される。この使用に有効な量は、疾患または状態の重症度および経過、以前の療法、個体の健康状態、体重、および薬物に対する応答、および治療医師の判断に依存する。

【０１４２】

[00195]予防的適用において、一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、特定の障害のリスクがある個体に投与される。そのような量は、「予防有効量または用量」であると定義される。そのような使用において、正確な量も個体の健康状態、体重、および個体の他の身体的パラメーターに依存する。

【０１４３】

[00196]個体の状態が好転しない場合、医者の裁量で、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、個体の疾患または状態の症状を改善するまたはそうでなければ制御もしくは制限するために、慢性的に、つまり個体の生存期間全体を含む長期間投与される。

【０１４４】

[00197]一部の実施形態では、個体の状態が好転した場合、医者の裁量で、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３もしくはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は継続的に投与される、または投与される薬物の用量は一時的に低減されるもしくはある特定の長さの時間一時的に停止される（すなわち「休薬期間」）。一部の実施形態では、休薬期間の長さは、単なる例として２日、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１５日、２０日、２８日、３５日、５０日、７０日、１００日、１２０日、１５０日、１８０日、２００日、２５０日、２８０日、３００日、３２０日、３５０日、または３６５日を含む、２日～１年で変動する。一部の実施形態では、休薬期間中の用量低減は、単なる例として１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％を含む、１０％～１００％である。

【０１４５】

[00198]個体の状態の好転が生じたら、必要な場合に維持用量が投与される。一部の実施形態では、その後、投与量もしくは投与の頻度、またはその両方が、好転した疾患、障害または状態が保たれるレベルまで、症状に応じて低減される。一部の実施形態では、

個体は、症状の任意の再発時に長期的に間欠的治療を必要とする。
【０１４６】
[00199]一部の実施形態では、本明細書に記載の医薬組成物は、正確な投与量の単一投与に適した単位剤形である。単位剤形において、製剤は適当な量の本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含有する単位用量に分けられる。一部の実施形態では、単位投与量は、個別の量の製剤を含有する包装の形態である。非限定的な例は、包装された錠剤またはカプセル剤、およびバイアルまたはアンプル中の散剤である。一部の実施形態では、水性懸濁剤組成物は、単一用量の非再閉可能容器に包装される。一部の実施形態では、複数用量の再閉可能な容器が使用され、その場合は保存剤を組成物に含めることが典型的である。一部の実施形態では、非経口注射のための製剤は、保存剤が添加されたアンプルまたは複数用量容器を含むが、これらに限定されない単位剤形で提供される。
【０１４７】
[00200]一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域を、少なくともまたは約１マイクログラム（ｕｇ）、１０ｕｇ、２０ｕｇ、３０ｕｇ、４０ｕｇ、５０ｕｇ、６０ｕｇ、７０ｕｇ、８０ｕｇ、９０ｕｇ、１００ｕｇ、２００ｕｇ、３００ｕｇ、４００ｕｇ、５００ｕｇ、６００ｕｇ、７００ｕｇ、８００ｕｇ、９００ｕｇ、１０００ｕｇの、または１０００ｕｇを超えるＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域を、少なくともまたは約１ミリグラム（ｍｇ）、１０ｍｇ、２０ｍｇ、３０ｍｇ、４０ｍｇ、５０ｍｇ、６０ｍｇ、７０ｍｇ、８０ｍｇ、９０ｍｇ、１００ｍｇ、２００ｍｇ、３００ｍｇ、４００ｍｇ、５００ｍｇの、または５００ｍｇを超えるＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域を、約１～１０、１～２０、１～４０、１～６０、１～８０、１～１００、１～１５０、１～２００、１０～２０、１０～４０、１０～６０、１０～８０、１０～１００、１０～１５０、１０～２００、２０～４０、２０～６０、２０～８０、２０～１００、２０～１５０、２０～２００、４０～６０、４０～８０、４０～１００、４０～１５０、４０～２００、６０～８０、６０～１００、６０～１５０、６０～２００、８０～１００、８０～１５０、８０～２００、１００～１５０、１００～２００、または１５０～２００マイクログラム（ｕｇ）の範囲のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる。一部の実施形態では、腫瘍を囲む領域を、約１～１０、１～２０、１～４０、１～６０、１～８０、１～１００、１～１５０、１～２００、１０～２０、１０～４０、１０～６０、１０～８０、１０～１００、１０～１５０、１０～２００、２０～４０、２０～６０、２０～８０、２０～１００、２０～１５０、２０～２００、４０～６０、４０～８０、４０～１００、４０～１５０、４０～２００、６０～８０、６０～１００、６０～１５０、６０～２００、８０～１００、８０～１５０、８０～２００、１００～１５０、１００～２００、または１５０～２００ミリグラム（ｍｇ）の範囲のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる。
【０１４８】
[00201]本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体に適当な１日投与量は、例えば約０．０１～１００ｍｇである。ヒトを含むが、これに限定されない大型哺乳動物における指示される１日投与量は、１日に最大４回を含むが、これに限定されない分割用量でまたは延長放出形態で都合よく投与される、約１０ｕｇ～約１００ｍｇ、約０．５ｍｇ～約１００ｍｇの範囲である。経口投与のための適切な単位剤形は、約１～５０ｍｇの活性成分を含む。腫瘍および／または周囲組織への注射のための適切な用量は、注射当たり約０．１～約１００ｍｇの範囲である。個々の治療レジームに関する可変因子の数は多く、これらの推奨値からのかなりの逸脱は稀ではないので、前述の範囲は単なる提案である。一部の実施形態では、投与量は、使用されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の活性、治療される疾患または状態、投与の様式、個々の対象の必要、治療される疾患または状態の重症度、および実施者の判断に限定されないいくつかの可変因子に応じて変えられる。
【０１４９】

[００２０２]一部の実施形態では、このような治療レジメンの毒性および治療的有効性は、ＬＤ５０（集団の５０％に対して致死的な用量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効である用量）の決定を含むが、これらに限定されない、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定される。一部の実施形態では、毒性効果と治療効果の用量比は、治療指数であり、ＬＤ５０とＥＤ５０の比として表される。高い治療指数を示すｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体が好ましい。一部の実施形態では、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトにおいて使用するための様々な投与量を製剤化するのに使用される。本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の投与量は、好ましくは、最小の毒性を伴うＥＤ５０を含む様々な循環濃度内にある。一部の実施形態では、投与量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変動する。

【０１５０】

[００２０３]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の医薬組成物は、包装材料、予防および／または疾患もしくは状態の治療に有効である医薬組成物、ならびに医薬組成物が疾患または状態を治療するために使用されることを示すラベルを含有する製造品として包装される。一部の実施形態では、医薬組成物は、単一投与または複数投与のための医薬組成物の量を含有する単位剤形で包装される。一部の実施形態では、包装された組成物は、投与前に再構成される（例えば、水または食塩水で）、医薬組成物の凍結乾燥粉末を含有する。

【０１５１】

[００２０４]医療機器

[００２０５]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、植込み型医療機器の表面で直接組み立てられる、または植込み型医療機器のコーティング剤として製剤化される。これらに限定されないが、金属、ポリマー、セラミック、シリカおよび複合物表面などの表面へのヒアルロナンの共有結合のための方法は、当技術分野で周知されており、一部の実施形態では、そのような表面でのｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の組立てのための本明細書で提供される方法と共に用いられる（例えば、米国特許第５，３５６，４３３号、同第５，３３６，５１８号、同第４，６１３，６６５号、同第４，８１０，７８４号、同第５，０３７，６７７号、同第８，０９３，３６５号を参照されたい）。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、植込み型医療機器の表面またはその一部で直接組み立てられる。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法に従って生成されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を、精製し、次いで植込み型医療機器の表面またはその一部に直接結合させる。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法に従って生成されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、精製され、次いで医療機器またはその一部への結合のためのコーティング剤として製剤化される。一部の実施形態では、コーティング剤は表面に直接適用されるまたは前処理されたもしくはコーティングされた表面に適用され、前処理またはコーティングは、基質へのコーティング剤の接着を補助するように設計される。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法に従って生成されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を精製し、次いでｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の結合を促進する物質でコーティングされた医療機器またはその一部に結合させる。例えば一部の実施形態では、医療機器またはその一部は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体のヒアルロナンの共有結合のために官能基をその表面に提供する接着性ポリマーでコーティングされる。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体をポリマーコーティングに結合させるために、これに限定されないが、カルボジイミドなどのカップリング剤が用いられる。一部の実施形態では、光固定化は、本明細書で提供される方法に従って生成されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を医療機器またはその一部に共有結合させるために用いられる。一部の実施形

態では、本明細書で提供される方法に従って生成されたｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を、光化学的または熱化学的反応性基を含むスペーサー分子を使用して、医療機器またはその一部に結合させる。

【０１５２】

[00206]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含むコーティング製剤は、例えばディップコーティングによって基質に適用される。適用の他の方法は、噴霧、洗浄、蒸着、ブラシ、ローラー、カーテン、スピンコーティングおよび当技術分野で公知の他の方法を含むが、これらに限定されない。

【０１５３】

[00207]例示的な植込み型医療機器は、骨インプラント、創傷ドレーン、シャント、尿道挿入物、金属またはプラスチックインプラント、ステント、ステントグラフト、移植血管、ペレット、ウェーファー、植込み型薬物ポンプ、薬物送達系、微粒子、ナノ粒子、およびマイクロカプセルを含むが、これらに限定されない。

【０１５４】

[00208]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を、マイクロカプセルに結合させる、またはマイクロカプセル上で直接組み立てる。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、マイクロカプセルを形成するために使用される材料と組み合わされ、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含有するマイクロカプセルが生成される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、マイクロカプセルの内表面をコーティングするために使用される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、マイクロカプセルの外表面をコーティングするために使用される。一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、マイクロカプセルの内および外表面をコーティングするために使用される。

【０１５５】

組合せ

[00209]一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物および方法は、天然のまたは再構成されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体に加えて、第２のまたはさらなるまたは追加の治療剤と共に使用される。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物および方法は、２種以上の治療剤と共に使用される。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物および方法は、１種または複数の治療剤と共に使用される。一部の実施形態では、本明細書に記載の組成物および方法は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０種以上の治療剤と共に使用される。

【０１５６】

[00210]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の治療剤は、同じ剤形で投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の治療剤は、個別の剤形で投与される。

【０１５７】

[00211]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の治療剤は、同時的に（例えば、同時に、本質的に同時に、または同じ治療プロトコール内で）投与される。

【０１５８】

[00212]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の治療剤は逐次的に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、第２の治療剤の前または後に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の活性剤の投与の間の期間は、医薬品の効力、溶解度、バイオアベイラビリティ、血漿半減

期および動態プロファイルなどの各医薬品の特性に応じて、数分～数時間の範囲である。一部の実施形態では、標的分子濃度の概日変動は、最適な投与間隔を決定する。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の活性剤の投与の間のタイミングは、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約１週間、約２週間、約３週間、約１カ月、またはより長い。

【０１５９】

[00213]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の共投与は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を単独で投与する場合の必要投与量より少ないｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の必要投与量をもたらす。一部の実施形態では、第２の治療剤の共投与は、第２の薬剤を単独で投与する場合の必要投与量より少ない第２の薬剤の必要投与量をもたらす。併用治療レジメンにおいて使用するための薬物および他の薬剤の治療有効投与量を実験的に決定するための方法は、当技術分野で公知であり、記載されている。例えばメトロノミック投与の使用、すなわち毒性の副作用を最小にするためにより頻繁に、より少ない用量を提供することは、当技術分野で十分に記載されている。併用治療は、個体の臨床管理を手助けするために様々な時間に開始および終了する定期的な治療をさらに含む。

【０１６０】

[00214]一部の実施形態では、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および１種または複数の追加の治療剤の併用治療は改変される。一部の実施形態では、併用治療は改変され、これによりｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は、第２の治療剤の量に対して増加する。一部の実施形態では、併用治療は改変され、これによりｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量は第２の治療剤の量に対して減少する。一部の実施形態では、併用治療は改変され、これにより第２の治療剤の量は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量に対して増加した。一部の実施形態では、併用治療は改変され、これにより第２の治療剤の量は、ｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の量に対して減少した。

【０１６１】

[00215]一部の実施形態では、第２の治療剤は、細胞傷害剤、鎮痛薬、抗炎症薬、抗生物質、抗微生物剤、抗血管新生剤、化学療法剤、抗新生物剤、免疫療法、または放射線療法から選択される。一部の実施形態では、第２の治療剤は化学療法剤である。一部の実施形態では、第２の治療剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、エピポドフィロトキシン（ｅｐｉｄｏｐｈｙｌｌｏｔｏｘｉｎ）、抗新生物酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、プロカルバジン、ミトキサントロン、白金配位錯体、生体応答修飾物質および成長阻害剤、ホルモン／抗ホルモン治療剤、造血成長因子、アロマターゼ阻害剤、抗エストロゲン薬、抗アンドロゲン薬、コルチコステロイド、ゴナドレリンアゴニスト、微小管活性剤、ニトロソウレア、脂質またはタンパク質キナーゼ標的化剤、免疫調節薬（ＩＭｉＤ）、タンパク質または脂質ホスファターゼ標的化剤、抗血管新生剤、Ａｋｔ阻害剤、ＩＧＦ－Ｉ阻害剤、ＦＧＦ３調節剤、ｍＴＯＲ阻害剤、Ｓｍａｃ模倣薬、ＨＤＡＣ阻害剤、細胞分化を誘導する薬剤、ブラジキニン１受容体アンタゴニスト、アンジオテンシンＩＩアンタゴニスト、シクロオキシゲナーゼ阻害剤、ヘパラナーゼ阻害剤、リンホカイン阻害剤、サイトカイン阻害剤、ＩＫＫ阻害剤、Ｐ３８ＭＡＰＫ阻害剤、ＨＳＰ９０阻害剤、マルチキナーゼ阻害剤、ビスホスホネート、ラパマイシン誘導体、抗アポトーシス経路阻害剤、アポトーシス経路アゴニスト、ＰＰＡＲアゴニスト、ＲＡＲアゴニスト、Ｒａｓアイソフォームの阻害剤、テロメラーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、アミノペプチダーゼ阻害剤、ＳＨＩＰ活性化剤－ＡＱＸ－ＭＮ１００、Ｈｕｍａｘ－ＣＤ２０（オファツムマブ）、ＣＤ２０アンタゴニスト、ＩＬ２－ジフテリア（ｄｉｐｔｈｅｒｉａ）毒

素融合物、またはこれらの組合せから選択される。一部の実施形態では、抗微生物剤は抗ウイルス、抗菌または抗真菌剤である。非限定的で例示的な抗菌剤は、アミノグリコシド、ベータラクタム、キノロンまたはフルオロキノロン、マクロライド、スルホンアミド、スルファメトキサゾール（ｓｕｌｆａｍｅｔｈａｘｏｚｏｌｅ）、テトラサイクリン、ストレプトグラミン、オキサゾリジノン（例えばリネゾリド）、クリンダマイシン、リンコマイシン、リファマイシン、グリコペプチド、ポリミキシン（ｐｏｌｙｍｘｉｎ）、リポ－ペプチド抗生物質、ならびに薬理学的に許容されるナトリウム塩、薬理学的に許容されるカルシウム塩、薬理学的に許容されるカリウム塩、脂質製剤、上記の誘導体および／または類似体として分類されるものを含む。生来のペプチドまたはタンパク質の一部の例示的なクラスは、トランスフェリン、ラクトフェリン、デフェンシン、ホスホリパーゼ、リゾチーム、カテリシジン、サープロシジン、殺菌性透過性増強タンパク質、両親媒性アルファヘリックスペプチド、および他の合成抗微生物タンパク質である。一部の実施形態では、抗微生物剤は防腐剤である。

【０１６２】

[00216]一部の実施形態では、第２の治療剤は、ＡＲＲＹ－７９７、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、アクチノマイシンＣ$_2$、Ｃ$_3$、Ｄ、およびＦ$_1$、シクロホスファミド、メルファラン、エストラムスチン、メイタンシノール、リファマイシン、ストレプトバリシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、イダルビシン、デトルビシン、カルミノマイシン、エソルビシン、ミトキサントロン、ブレオマイシンＡ、Ａ$_2$、およびＢ、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、９－アミノカンプトテシン、１０，１１－メチレンジオキシカンプトテシン、９－ニトロカンプトテシン、ボルテゾミブ、テモゾロミド、ＴＡＳ１０３、ＮＰＩ００５２、コンブレタスタチン、コンブレタスタチンＡ－２、コンブレタスタチンＡ－４、カリケアマイシン、ネオカルシノスタチン、エポチロンＡ、Ｂ、Ｃ、および半合成バリアント、ハーセプチン、リツキサン、ＣＤ４０抗体、アスパラギナーゼ、インターロイキン、インターフェロン、ロイプロリド、およびペグアスパラガーゼ、５－フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、フトラフール（ｐｔｏｒａｆｕｒ）、５’－デオキシフルオロウリジン、ＵＦＴ、ＭＩＴＣ、Ｓ－１カペシタビン、ジエチルスチルベストロール、タモキシフェン、トレミフェン（ｔｏｒｅｍｅｆｉｎｅ）、トムデックス（ｔｏｌｍｕｄｅｘ）、チミタク、フルタミド、フルオキシメステロン、ビカルタミド、フィナステリド、エストラジオール、トリオキシフェン、デキサメタゾン、リュープロレリン（ｌｅｕｐｒｏｅｌｉｎ）酢酸塩、エストラムスチン、ドロロキシフェン、メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲステロール（ｍｅｇｅｓｔｅｒｏｌ）、アミノグルテチミド、テストラクトン、テストステロン、ジエチルスチルベストロール、ヒドロキシプロゲステロン、マイトマイシンＡ、ＢおよびＣ、ポルフィロマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、テトラプラチン、白金－ＤＡＣＨ、オルマプラチン、サリドマイド、レナリドミド、ＣＩ－９７３、テロメスタチン、ＣＨＩＲ２５８、Ｒａｄ００１、ＳＡＨＡ、チューバシン、１７－ＡＡＧ、ソラフェニブ、ＪＭ－２１６、ポドフィロトキシン、エピポドフィロトキシン、エトポシド、テニポシド、タルセバ、イレッサ、イマチニブ、ミルテホシン、ペリホシン、アミノプテリン、メトトレキサート、メトプテリン、ジクロロ－メトトレキサート、６－メルカプトプリン、チオグアニン、アザチオプリン、アロプリノール、クラドリビン、フルダラビン、ペントスタチン、２－クロロアデノシン、デオキシシチジン、シトシンアラビノシド、シタラビン、アザシチジン、５－アザシトシン、ゲムシタビン（ｇｅｎｃｉｔａｂｉｎｅ）、５－アザシトシン－アラビノシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ロイロシン、ロイロシジンおよびビンデシン、パクリタキセル、タキソテールおよび／またはドセタキセルから選択される。

【０１６３】

[00217]一部の実施形態では、第２の治療剤は、ナイアシン、フィブラート、スタチン、Ａｐｏ－Ａ１模倣ポリペプチド（例えばＤＦ－４、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ａｐｏＡ－Ｉ転写上方制御剤、ＡＣＡＴ阻害剤、ＣＥＴＰ調節剤、糖タンパク質（ＧＰ）ＩＩｂ／Ｉ

ＩＩａ受容体アンタゴニスト、Ｐ２Ｙ１２受容体アンタゴニスト、Ｌｐ－ＰＬＡ２阻害剤、抗腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）剤、インターロイキン－１（ＩＬ－１）受容体アンタゴニスト、インターロイキン－２（ＩＬ－２）受容体アンタゴニスト、インターロイキン－６（ＩＬ－６）受容体アンタゴニスト、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）受容体アンタゴニスト、インターロイキン－１７（ＩＬ－１７）受容体アンタゴニスト、インターロイキン－２３（ＩＬ－２３）受容体アンタゴニスト、細胞傷害剤、抗微生物剤、免疫調節剤、抗生物質、Ｔ細胞共刺激遮断薬、Ｂ細胞枯渇剤、免疫抑制剤、抗リンパ球抗体、アルキル化剤、代謝拮抗薬、植物アルカロイド、テルペノイド、トポイソメラーゼ阻害剤、抗腫瘍抗生物質、モノクローナル抗体、ホルモン療法（例えばアロマターゼ阻害剤）、またはこれらの組合せである。

【０１６４】

[00218]一部の実施形態では、第２の活性剤は、抗ＴＧＦ－β抗体、抗ＴＧＦ－β受容体遮断抗体、抗ＴＮＦ抗体、抗ＴＮＦ受容体遮断抗体、抗ＩＬ１β抗体、抗ＩＬ１β受容体遮断抗体、抗ＩＬ－２抗体、抗ＩＬ－２受容体遮断抗体、抗ＩＬ－６抗体、抗ＩＬ－６受容体遮断抗体、抗ＩＬ－１２抗体、抗ＩＬ－１２受容体遮断抗体、抗ＩＬ－１７抗体、抗ＩＬ－１７受容体遮断抗体、抗ＩＬ－２３抗体、または抗ＩＬ－２３受容体遮断抗体である。

【０１６５】

[00219]一部の実施形態では、第２の活性剤は、アレファセプト、エファリズマブ、メトトレキサート、アシトレチン、イソトレチノイン、ヒドロキシ尿素、ミコフェノール酸モフェチル、スルファサラジン、６－チオグアニン、ドボネックス、タクロネックス、ベタメタゾン、タザロテン、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブ、アバタセプト、リツキシマブ、トラスツズマブ、抗ＣＤ４５モノクローナル抗体ＡＨＮ－１２（ＮＣＩ）、ヨウ素－１３１抗Ｂ１抗体（Ｃｏｒｉｘａ Ｃｏｒｐ．）、抗ＣＤ６６モノクローナル抗体ＢＷ２５０／１８３（ＮＣＩ、Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｈｏｓｐｉｔａｌ）、抗ＣＤ４５モノクローナル抗体（ＮＣＩ、Ｂａｙｌｏｒ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ）、抗体抗ａｎｂ３インテグリン（ＮＣＩ）、ＢＩＷ－８９６２（ＢｉｏＷａ Ｉｎｃ．）、抗体ＢＣ８（ＮＣＩ）、抗体ｍｕＪ５９１（ＮＣＩ）、インジウムＩｎ１１１モノクローナル抗体ＭＮ－１４（ＮＣＩ）、イットリウムＹ９０モノクローナル抗体ＭＮ－１４（ＮＣＩ）、Ｆ１０５モノクローナル抗体（ＮＩＡＩＤ）、モノクローナル抗体ＲＡＶ１２（Ｒａｖｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ＣＡＴ－１９２（ヒト抗ＴＧＦ－ベータ１モノクローナル抗体、Ｇｅｎｚｙｍｅ）、抗体３Ｆ８（ＮＣＩ）、１７７Ｌｕ－Ｊ５９１（Ｗｅｉｌｌ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｃｏｒｎｅｌｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ）、ＴＢ－４０３（ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＡＢ）、アナキンラ、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリンＡ、レフルノミド、ｄ－ペニシラミン、アミトリプチリン、またはノルトリプチリン、クロラムブシル、ナイトロジェンマスタード、プラステロン、ＬＪＰ３９４（アベチムスナトリウム）、ＬＪＰ１０８２（Ｌａ Ｊｏｌｌａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ）、エクリズマブ、ベリムマブ（ｂｅｌｉｂｕｍａｂ）、ｒｈｕＣＤ４０Ｌ（ＮＩＡＩＤ）、エプラツズマブ、シロリムス、タクロリムス、ピメクロリムス、サリドマイド、抗胸腺細胞グロブリン－ウマ（Ａｔｇａｍ、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｕｐｊｏｈｎ）、抗胸腺細胞グロブリン－ウサギ（サイモグロブリン、Ｇｅｎｚｙｍｅ）、ムロモナブ－ＣＤ３（ＦＤＡ Ｏｆｆｉｃｅ ｏｆ Ｏｒｐｈａｎ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ）、バシリキシマブ、ダクリズマブ、リルゾール、クラドリビン、ナタリズマブ、インターフェロンベータ－１ｂ、インターフェロンベータ－１ａ、チザニジン、バクロフェン、メサラジン、アサコール、ペンタサ、メサラミン、バルサラジド、オルサラジン、６－メルカプトプリン、ＡＩＮ４５７（抗ＩＬ－１７モノクローナル抗体、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、テオフィリン、Ｄ２Ｅ７（Ｋｎｏｌｌ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ製のヒト抗ＴＮＦｍＡｂ）、メポリズマブ（抗ＩＬ－５抗体、ＳＢ２４０５６３）、カナキヌマブ（抗ＩＬ－１ベータ抗体、ＮＩＡ

ＭＳ）、抗ＩＬ－２受容体抗体（ダクリズマブ、ＮＨＬＢＩ）、ＣＮＴＯ３２８（抗ＩＬ－６モノクローナル抗体、Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）、ＡＣＺ８８５（完全ヒト抗インターロイキン－１ベータモノクローナル抗体、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＣＮＴＯ１２７５（完全ヒト抗ＩＬ－１２モノクローナル抗体、Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）、（３Ｓ）－Ｎ－ヒドロキシ－４－（｛４－［（４－ヒドロキシ－２－ブチニル）オキシ］フェニル｝スルホニル）－２，２－ジメチル－３－チオモルホリンカルボキサミド（アプラタスタット）、ゴリムマブ（ＣＮＴＯ１４８）、オネルセプト、ＢＧ９９２４（Ｂｉｏｇｅｎ　Ｉｄｅｃ）、セルトリズマブペゴル（ＣＤＰ８７０、ＵＣＢ　Ｐｈａｒｍａ）、ＡＺＤ９０５６（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ５０６９（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ９６６８（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ７９２８（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ２９１４（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ６０６７（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ３３４２（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、ＡＺＤ８３０９（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、［（１Ｒ）－３－メチル－１－（｛（２Ｓ）－３－フェニル－２－［（ピラジン－２－イルカルボニル）アミノ］プロパノイル｝アミノ）ブチル］ボロン酸（ボルテゾミブ）、ＡＭＧ－７１４、（抗ＩＬ１５ヒトモノクローナル抗体、Ａｍｇｅｎ）、ＡＢＴ－８７４（抗ＩＬ－１２モノクローナル抗体、Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｓ）、ＭＲＡ（トシリズマブ、抗ＩＬ－６受容体モノクローナル抗体、中外製薬）、ＣＡＴ－３５４（ヒト抗インターロイキン－１３モノクローナル抗体、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ）、アスピリン、サリチル酸、ゲンチジン酸、サリチル酸コリンマグネシウム、サリチル酸コリン、サリチル酸コリンマグネシウム、サリチル酸コリン、サリチル酸マグネシウム、サリチル酸ナトリウム、ジフルニサル、カルプロフェン、フェノプロフェン、フェノプロフェンカルシウム、フルルビプロフェン（ｆｌｕｒｏｂｉｐｒｏｆｅｎ）、イブプロフェン、ケトプロフェン、ナブメトン（ｎａｂｕｔｏｎｅ）、ケトロラク、ケトロラクトロメタミン、ナプロキセン、オキサプロジン、ジクロフェナク、エトドラク、インドメタシン、スリンダク、トルメチン、メクロフェナム酸、メクロフェナム酸ナトリウム、メフェナム酸、ピロキシカム、メロキシカム、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ、パレコキシブ、エトリコキシブ、ルミラコキシブ、ＣＳ－５０２（三共）、ＪＴＥ－５２２（日本たばこ産業株式会社）、Ｌ－７４５，３３７（Ａｌｍｉｒａｌｌ）、ＮＳ３９８（Ｓｉｇｍａ）、ベタメタゾン（セレストン）、プレドニゾン（デルタゾン）、アルクロメタゾン、アルドステロン、アムシノニド、ベクロメタゾン、ベタメタゾン、ブデソニド、シクレソニド、クロベタゾール、クロベタゾン、クロコルトロン、クロプレドノール、コルチゾン、コルチバゾール、デフラザコート、デオキシコルチコステロン、デソニド、デスオキシメタゾン、デスオキシコルトン、デキサメタゾン、ジフロラゾン、ジフルコルトロン、ジフルプレドナート、フルクロロロン、フルドロコルチゾン、フルドロキシコルチド、フルメタゾン、フルニソリド、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルオコルチン、フルオコルトロン、フルオロメトロン、フルペロロン、フルプレドニデン、フルチカゾン、ホルモコルタル、ホルモテロール、ハルシノニド、ハロメタゾン、ヒドロコルチゾン、アセポン酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンブテプラート、酪酸ヒドロコルチゾン、ロテプレドノール、メドリゾン、メプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、アセポン酸メチルプレドニゾロン、フランカルボン酸モメタゾン、パラメタゾン、プレドニカルバート、プレドニゾン、リメキソロン、チキソコルトール、トリアムシノロン、ウロベタゾール、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、アザチオプリン、メルカプトプリン、フルダラビン、ペントスタチン、クラドリビン、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、フロクスウリジン（ＦＵＤＲ）、シトシンアラビノシド、メトトレキサート、トリメトプリム、ピリメタミン、ペメトレキセド、パクリタキセル、ドセタキセル、エトポシド、テニポシド、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、マイトマイシン、トラスツズマブ、セツキシマ

ブ、リツキシマブ、ベバシズマブ、フィナステリド、ゴセレリン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、レトロゾール、ボロゾール、エキセメスタン、４－アンドロステン－３，６，１７－トリオン（「６－オキソ」；１，４，６－アンドロスタトリエン－３，１７－ジオン（ＡＴＤ）、ホルメスタン、テストラクトン、ファドロゾール、またはこれらの組合せである。

【０１６６】

[００２２０]一部の実施形態では、第２の治療剤は抗生物質である。一部の実施形態では、第２の治療剤は抗菌剤である。一部の実施形態では、第２の治療剤は、アミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、パロモマイシン、ゲルダナマイシン（ｇｅｌｄａｎｍｙｃｉｎ）、ハービマイシン、ロラカルベフ、エルタペネム、ドリペネム、イミペネム、シラスタチン、メロペネム、セファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファレキシン、セファクロル、セファマンドール、セフォキシチン、セフプロジル（ｄｅｆｐｒｏｚｉｌ）、セフロキシム、セフィキシム、セフジニル、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフタジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフェピム、セフトビプロル、テイコプラニン、バンコマイシン、アジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン、スペクチノマイシン、アズトレオナム、アモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メズロシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、ピペラシリン、チカルシリン（ｔｉｃａｒｃｉｌｌａｎ）、バシトラシン、コリスチン、ポリミキシンＢ、シプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン（ｔｒｏｖｆｌｏｘａｃｉｎ）、マフェニド、プロントジル、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルアミド（ｓｕｌｆａｎｉｍｉｌｉｍｄｅ）、スルファサラジン（ｓｕｌｆｓａｌａｚｉｎｅ）、スルフイソキサゾール（ｓｕｌｆｓｉｏｘａｚｏｌｅ）、トリメトプリム、デメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン（ｏｘｔｅｔｒａｃｙｃｌｉｎｅ）、テトラサイクリン、アルスフェナミン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、エタンブトール、ホスホマイシン、フシジン酸、フラゾリドン、イソニアジド、リネゾリド、メトロニダゾール、ムピロシン、ニトロフラントイン、プラテンシマイシン、ピラジナミド、キヌプリスチン（ｑｕｉｎｕｓｐｒｉｓｔｉｎ）／ダルホプリスチン、リファンピン、チニダゾール、およびこれらの組合せである。

【０１６７】

[００２２１]一部の実施形態では、第２の治療剤は放射線療法である。一部の実施形態では、第２の治療剤はｘ線療法または陽子線療法から選択される。一部の実施形態では、放射線療法は、外照射または近接照射療法であり得る。

【０１６８】

[００２２２]一部の実施形態では、第２の治療剤は標的化療法である。標的化療法は、特定の遺伝子、タンパク質またはがんの成長および生存に寄与する組織環境を標的化する。一部の実施形態では、標的化療法は１種または複数のモノクローナル抗体を含む。一部の実施形態では、標的化療法は小分子、例えば限定なしに、本明細書に記載の血管新生阻害剤を含む。一部の実施形態では、標的化療法は、本明細書に記載の１種または複数のモノクローナル抗体および１種または複数の小分子を含む。

【０１６９】

[００２２３]細胞との組合せ

[００２２４]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、細胞、複数の細胞、または組織と共投与される。

【０１７０】

[００２２５]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３または

ｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、治療用細胞と共投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、組織移植片と共投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、幹細胞移植片と共投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、臓器移植片と共投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、免疫細胞と共投与される。

【０１７１】

[00226]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法と同時的に（例えば、同時に、本質的に同時にまたは同じ治療プロトコール内で）投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の前または後に投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体の投与と腫瘍切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法の間の期間は、医薬品の効力、溶解度、バイオアベイラビリティ、血漿半減期および動態プロファイルなどの各医薬品の特性に応じて、数分～数時間の範囲である。一部の実施形態では、標的分子濃度の概日変動は、最適な投与間隔を決定する。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体および第２の活性剤の投与の間のタイミングは、約１時間未満、１日未満、１週間未満、または１カ月未満である。

【０１７２】

[00227]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法および免疫抑制剤と共投与される。一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、腫瘍切除、冷凍切除、またはラジオ波焼灼療法およびカルシニューリン阻害剤（例えば、シクロスポリンまたはタクロリムス）、ｍＴＯＲ阻害剤（シロリムス、エベロリムス）、抗増殖剤（アザチオプリンまたはミコフェノール酸）、コルチコステロイド（例えば、プレドニゾロンまたはヒドロコルチゾン）、モノクローナル抗ＩＬ－２Ｒα受容体抗体（例えば、バシリキシマブまたはダクリズマブ）、ポリクローナル抗Ｔ細胞抗体（例えば、抗胸腺細胞グロブリン（ＡＴＧ）または抗リンパ球グロブリン（ＡＬＧ））、化学療法薬、鎮痛薬、抗炎症薬、ステロイド、および抗生物質またはこれらの組合せと共投与される。

【０１７３】

[00228]一部の実施形態では、組織は本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体でコーティングされる。一部の実施形態では、複数の幹細胞は、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体でコーティングされる。一部の実施形態では、臓器は本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体でコーティングされる。一部の実施形態では、組織を本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体でコーティングすることは、組織が宿主免疫系によって作用されることを防止する。

【０１７４】

[00229]一部の実施形態では、臓器、組織、または複数の幹細胞を、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と接触させる。一部の実施形態では、臓器、組織、または複数の幹細胞を、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を含む組成物と接触させる。一部の実施形態では、組成物は約７．０～約７．５のｐＨを有する。一部の実施形態では、組成物は７．４のｐＨを有する。一部の実施形態では、組成物はカリウム、マグネシウム、

およびラフィノースをさらに含む。一部の実施形態では、組成物はアデノシン、グルタチオン、アロプリノール、およびヒドロキシエチルデンプンの少なくとも１種をさらに含む。一部の実施形態では、組成物は、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体を補充したＵＷ液である。

【０１７５】

[00230]一部の実施形態では、臓器、組織、または複数の幹細胞を、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体と約３０分、約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約１２時間、約２４時間、約３６時間、または約４８時間接触させる。一部の実施形態では、接触は、組織および血管コンディショニングを保護する温度（例えば周囲温度未満）で行われる。一部の実施形態では、接触は４℃で行われる。

【０１７６】

[00231]一部の実施形態では、本明細書で開示されるｎＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはｒｃＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３複合体は、それを必要とする対象に免疫細胞と共投与される。一部の実施形態では、免疫細胞は、それを必要とする対象に対して同種である。一部の実施形態では、免疫細胞は、それを必要とする対象に対して自原性である。一部の実施形態では、免疫細胞は、それを必要とする対象への投与前に遺伝子修飾される。一部の実施形態では、免疫細胞は、キメラ抗原受容体を含むように改変される（ＣＡＲ Ｔ細胞療法）。

【実施例】

【０１７７】

[00232]以下の実施例は、例示目的のためだけに含まれ、特許請求される主題の範囲を限定することを意図しない。

実施例１：冷凍保存されたＡＭおよびＵＣ抽出物または精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ＡＭ）への曝露後の前立腺がん細胞株の生存率および代謝活性を決定する

[00233]公開されたデータ（Ａｌｖｉｍら、「Ｔｈｅ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｒｉｓｋ ｏｆ ｔｕｍｏｒ ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｏｎ ａｆｔｅｒ ｕｓｅ ｏｆ ｄｅｈｙｄｒａｔｅｄ ｈｕｍａｎ ａｍｎｉｏｎ／ｃｈｏｒｉｏｎ ｍｅｍｂｒａｎｅ ａｌｌｏｇｒａｆｔ ｉｎ ａ ｐｏｓｉｔｉｖｅ ｍａｒｇｉｎ ｒｅｓｅｃｔｉｏｎ ｍｏｄｅｌ」、Ｔｈｅｒ Ａｄｖ Ｕｒｏ ２０１９、１１巻：１～１０）は、脱水されたヒト羊膜および絨毛膜同種移植片産物で処理されたマウスにおいて、処理なしのものと比較して部分切除後の速い腫瘍成長を示す。冷凍保存されたＡＭおよびＵＣ抽出物または精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ＡＭ）への曝露後の前立腺がん細胞株の生存率および代謝活性を決定するために実験を行った。

【０１７８】

[00234]冷凍保存されたＡＭおよびＵＣの抽出物または超遠心分離の２回以上の実行後の精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を調べて、それらがヒト前立腺がん細胞株、すなわちＰＣ－３およびＬＮＣａＰの増殖を阻害するかどうか、およびその全体的な細胞代謝活性を低減するかどうかを決定した。

【０１７９】

[00235]初めの実現可能性について、ＷＳＴ－１アッセイを使用して、精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３および純化されたＢＴＧＥＬ（すなわち、細片化されたＡＭおよびＵＣ）の効果を試験した。ＷＳＴ－１アッセイを使用して、総細胞代謝活性を定量化した。ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３の増幅

[00236]購入した冷凍ＰＣ－３（ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－１４３５（商標）、ロット番号７０００４０１３）およびＬＮＣａＰ（ＬＮＣａＰ ｃｌｏｎｅ ＦＧＣ ＡＴＣＣ（登録商標）ＣＲＬ－１７４０、ロット番号６４２０７６３７）を受け取り、液体窒素中に保存した。ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３の各バイアル（１ｍｌ、細胞の量は示さない）を２００×ｇで５分間遠心分離した。保存媒体を除去し、細胞を１ｍｌのＲＰＭＩ１６４０完全培地に再懸濁した。合計０．５ｍｌを１００ｍｍ培養皿（各細胞株について２つの培養皿）に移した。細胞を３７℃で５％CO_2と共にインキュベートした。３日後に

培地を交換し、細胞を４日間インキュベートし続け、その時細胞は７０％の集密度であった。ＬＮＣａＰは凝集体を形成する傾向があるが（図１Ａ）、ＰＣ－３は均一に分布した単一の細胞層として成長する（図１Ｂ）ことが認められた。細胞を０．２５％トリプシン－ＥＤＴＡ（カタログ番号２５２００－０５６、Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によって回収し、血球計算盤によって計数した。ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３の合計細胞は、それぞれ５．９２×１０^{6}および２．８８×１０^{6}であった。

【０１８０】

[00237]５％ＤＭＳＯを含むＲＰＭＩ１６４０完全培地に細胞を以下の通りに再懸濁した：

ＬＮＣａＰ：１０本の管、５．４×１０^{5}／管、管当たり０．５ｍｌ（約１．０８×１０^{6}／ｍｌ）、液体窒素タンク：Ｓ１Ｒ４Ｂ５、および

ＰＣ－３：１０本の管、２．６×１０^{5}／管、管当たり０．５ｍｌ（約５．２×１０^{5}／ｍｌ）、液体窒素タンク：Ｓ１Ｒ４Ｂ５。

【０１８１】

ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３の細胞代謝活性に対するｒＢＴＧｅｌおよびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の効果

[00238]増幅（上記）からの２．９×１０^{5}個のＬＮＣａＰ細胞または２．９×１０^{5}個のＰＣ－３細胞を１つの１００ｍｍ培養皿において継代し、４日間培養した。細胞を回収し（ＬＮＣａＰ：合計細胞は１．２４×１０^{6}個であり、生存率は９１％であった；ＰＣ－３：合計細胞は４．０８×１０^{6}個であり、生存率は９７％であった；したがって、ＰＣ－３細胞はＬＮＣａＰ細胞より速く成長し、ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３の細胞倍加時間がそれぞれ約６０時間および３３時間であるという報告と一致する）、９６ウェルプレートに１×１０^{4}／ｃｍ^{2}または３．２×１０^{4}／ｍｌで播種した（ＬＮＣａＰの１つのプレートおよびＰＣ－３の１つのプレート）。終夜のインキュベーション後、ＬＮＣａＰおよびＰＣ－３細胞（ｎ＝３）の両方を０、０．７８、１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、または１００μｇ／ｍｌのｒＢＴＧｅｌ（ドナー番号ＢＴＲ１６１８５７；ＨＡ：１７５μｇ／ｍｌ；タンパク質：１６５μｇ／ｍｌ）またはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ＡＭ／ＰＢＳの２回の超遠心分離のプールした画分３～９、安定性検証のためのドナー２、ＤＩ：ＴＧＬＰ１７Ｅ００２）（例えば、１０×用量の１１．１μｌを１００μｌ培地に添加し、ちょうどの用量を得る）で処理した。４８時間の処理後、細胞形態（図２Ａおよび２Ｂならびに図３Ａおよび３Ｂ）を顕微鏡画像によって記録し、次いで製造業者の指示書（ＯＤ４５０またはＯＤ４５０～ＯＤ６７０）に従って細胞代謝活性のためのＷＳＴ－１アッセイ（カタログ番号１０００８８８３、Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ａｎｎ　Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）に使用した（図２Ｃおよび２Ｄならびに図３Ｃおよび３Ｄ）。

【０１８２】

[00239]形態学的に、ＬＮＣａＰは小さいおよび大きい細胞クラスターとして成長した。４８時間の細胞の処理後、より高い用量の純化されたＢＴｇｅｌ（５０および１００μｇ／ｍｌ）は、ほとんどの紡錘様細胞を丸い細胞に変えたが、ほとんどの細胞は依然として結合しており、クラスターとして存在した。より低い細胞密度に基づいて、細胞死も生じた可能性があった。同様の形態学的変化が、はるかに低い用量のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（６．２５μｇ／ｍｌ以上）で生じた。これらのデータは、純化されたＢＴＧｅｌおよびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の両方がＬＮＣａＰの細胞代謝活性を阻害することを暗示する。純化されたＢＴＧｅｌは食塩水（約１５４ｍＭのＮａＣｌ）中で調製したが、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は蒸留水で十分に透析し、検出不可能な塩を含有した。したがって、凍結乾燥ＢＴＧｅｌは、細胞培養培地に添加した場合、培地中の塩濃度を上昇させた可能性があり、ＢＴＧｅｌが塩濃度を約３０ｍＭ以上上昇させた場合、細胞増殖を潜在的に低減した。純化されたＢＴＧｅｌは、０．７８、１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌとして添加した場合、培養培地中の塩濃度をそれぞれ６．２、１２．４、２４．７、４９．５、９８．９、１９７．９、３９５．８、７９１．５ｍＭ上

昇させた（塩濃度を得るために式、用量／１７５＊１５４／０．１１１を使用する；ＢＴＧｅｌのＨＡ濃度は１７５μｇ／ｍｌであり、食塩水は１５４ｍＭのＮａＣｌを含有し、各ウェル中の培地の総体積は０．１１１ｍｌである）。したがって、６．２５μｇ／ｍｌ以上の純化されたＢＴＧｅｌによる阻害は塩によって引き起こされ得るが、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による塩効果の懸念はないはずである。ＷＳＴ－１アッセイデータは、純化されたＢＴＧｅｌの用量が２５μｇ／ｍｌ以上である場合、ＬＮＣａＰの代謝活性が阻害されたこと（ｐ＜０．０５）を示した（図２Ｃ）。塩効果の懸念ゆえに、純化されたＢＴＧｅｌが、これらの用量でＬＮＣａＰの細胞代謝活性を阻害することができるかどうかは結論が出ない。対照的に、６．２５μｇ／ｍｌ以上のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＬＮＣａＰの代謝活性を阻害する（４０～８５％）（図２ＣおよびＤ）。

【０１８３】

[００２４０]形態学的に、ＰＣ－３はＬＮＣａＰより均一に分布した細胞として成長した。しかし、４８時間の細胞の処理後、より高い用量（５０および１００μｇ／ｍｌ）の純化されたＢＴＧｅｌは、より多くの丸みを帯びた細胞をもたらした。より低い細胞密度に基づいて、細胞死も生じた可能性があった。同様の形態学的変化は、はるかに低い用量のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１２．５μｇ／ｍｌ以上）で生じた。これらのデータは、純化されたＢＴＧｅｌおよびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の両方がＰＣ－３の増殖（生存能力）を阻害することを暗示する。しかし上記の通り、６．２５μｇ／ｍｌ以上の純化されたＢＴＧｅｌによる阻害は塩によって引き起こされた可能性があるが、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による塩効果の懸念はないはずである。ＷＳＴ－１アッセイデータは、純化されたＢＴＧｅｌの用量が６．２５μｇ／ｍｌ以上である場合、ＰＣ－３の増殖が阻害される（ｐ＜０．０５）ことを示した（図３Ｃ）。塩効果の懸念ゆえに、純化されたＢＴＧｅｌが、これらの用量でＰＣ－３の増殖を阻害することができるかどうかは結論が出ない。対照的に、３．１２５μｇ／ｍｌ以上のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、ＰＣ－３の増殖を阻害する（８～１００％）（図３ＣおよびＤ）。

【０１８４】

[００２４１]両方の処理群は、ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ前立腺がん細胞の代謝効果を有意に低下させる用量依存効果を有することが示された。形態に基づいて、より高い濃度についてのＷＳＴ－１読取り値に関連する細胞死があったようである。

【０１８５】

[００２４２]これらのデータは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３がＰＣ－３およびＬＮＣａＰがん形成を促進せず、前立腺切除術後の使用が可能になることを示した。さらに、ｒＢＴＧＥＬは抗がん効果を有することが示された。以下の実施例は、前立腺がん細胞の増殖に対する、潜在的な塩効果がないＵＣ抽出物の効果を扱う。

【０１８６】

[００２４３]結論

[００２４４]６．２５μｇ／ｍｌ以上の純化されたＢＴＧｅｌおよび３．１２５μｇ／ｍｌ以上のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、ＰＣ－３の増殖を阻害する。２５μｇ／ｍｌ以上の純化されたＢＴＧｅｌおよび６．２５μｇ／ｍｌ以上のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、ＬＮＣａＰの増殖を阻害する。塩効果の懸念ゆえに、純化されたＢＴＧｅｌ中の羊膜および臍帯（ＡＭＵＣ）または塩が、これらの用量で増殖を阻害することができるかどうかは結論が出ない。

【０１８７】

[００２４５]ＰＣ－３細胞は、より急速な倍加時間を有することが知られているので、ＰＣ－３を阻害するために、ＬＮＣａＰと比較して低い濃度のｒＢＴＧＥＬおよびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が必要とされ得る。したがって、陰性対照および処理群の差異はＰＣ－３において、より大きい。

【０１８８】

[００２４６]したがって、公開されたデータは、ある特定の胎児支持産物が、より速い腫瘍再発および成長に関連することを示しているにもかかわらず、ここではＡＭおよびＵＣ

産物が前立腺切除術後のがん再発を促進しないことが実証される。

【０１８９】

実施例２：冷凍保存ＵＣ抽出物、ＨＡ、および精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ＡＭ）への曝露後の前立腺がん細胞株の代謝活性を決定する。

[00247]実施例１の結果は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が、両方の細胞種において６．２５μｇ／ｍｌもの低い濃度で両方の前立腺細胞株の代謝活性を低減することを示す。加えて、ｒＢＴＧＥＬは２５μｇ／ｍｌ以上で活性を阻害することが示された。以下の研究は、より高い用量のｒＢＴＧｅｌ中の塩濃度がデータの解釈を混乱させている可能性を除外するために行った。

【０１９０】

[00248]同じＷＳＴ－１アッセイを使用して、水中のＵＣ抽出物を試験した。加えて、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を試験して、ＵＣ結果と比較した。ＨＡは対照群として使用した。ＨＡのμｇ／ｍｌに基づいて、一連の用量を試験した。

【０１９１】

[00249]９６ウェルプレート（１００ｕｌ／ウェル）（各群についてｎ＝３）において、ＰＣ３およびＬＮＣａＰ細胞を1×10^{4}／cm^{2}でプレーティングした。終夜のインキュベーション後、細胞を一連の用量（ＨＡ濃度によって定義される、０、１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００、２００および４００μｇ／ｍｌ、ｎ＝３）の水で抽出されたＵＣ、精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（ＡＭ／ＰＢＳの２回の超遠心分離のプールされた画分３～９、安定性検証のためのドナー２、ＤＩ：ＴＧＬＰ１７Ｅ００２、１７／０９／１９に調製した）およびＨＡで処理した。４８時間の処理後に細胞形態を記録し、次いで製造業者の指示書（ＯＤ４５０またはＯＤ４５０～ＯＤ６７０）に従って、細胞代謝活性について、ＷＳＴ－１（カタログ番号１０００８８８３、Ｃａｙｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）によって細胞を測定した。

【０１９２】

[00250]ＷＳＴ－１アッセイデータは、ＵＣ抽出物（≧１００μｇ／ｍｌ）およびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（≧６．２５μｇ／ｍｌ）で処理した場合、ＬＮＣａＰ細胞の代謝活性が有意に阻害されるが（ｐ＜０．０５）、ＨＡでは阻害されないことを示した（図４Ａを参照されたい）。同様に、ＰＣ－３細胞における代謝活性は、ＵＣ抽出物（≧２００μｇ／ｍｌ）およびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（≧１．５６μｇ／ｍｌ）によって有意に阻害されたが、ＨＡでは阻害されなかった（図４Ｂを参照されたい）。≧２５μｇ／ｍｌの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を用いたＬＮＣａＰ（図５Ａ～５Ｃ）およびＰＣ３（図６Ａ～６Ｃ）細胞の両方において、顕微鏡検査で細胞死が顕著に認められた。

【０１９３】

[00251]ＷＳＴ－１および形態学的評価によって決定された、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による代謝活性の明らかな阻害があった。形態に基づいて、より高い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に曝露された場合、ＰＣ３およびＬＮＣａＰ細胞は両方とも丸みを帯びるようになり、マトリックスにあまり接着せず、細胞が少なくなる。差異は、ＬＮＣａＰ細胞が、より高いＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３濃度で、小さい直径の丸みを帯びた細胞を有するクラスターとして凝集するが、ＰＣ３細胞は凝集しないことである。

【０１９４】

[00252]ＷＳＴ－１アッセイデータは、ＵＣ抽出物（≧１００μｇ／ｍｌ）およびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（≧６．２５μｇ／ｍｌ）で処理した場合、ＬＮＣａＰ細胞の代謝活性が有意に阻害されるが（ｐ＜０．０５）、ＨＡでは阻害されないことを示した。同様に、ＰＣ－３細胞における代謝活性は、ＵＣ抽出物（≧２００μｇ／ｍｌ）およびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（≧１．５６μｇ／ｍｌ）によって有意に阻害されたが、ＨＡでは阻害されなかった。≧２５μｇ／ｍｌの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を用いたＬＮＣａＰおよびＰＣ３細胞の両方において、顕微鏡検査で細胞死が顕著に認められた。

【０１９５】

[００２５３]考察

[００２５４]ＷＳＴ－１および形態学的評価によって決定された、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による代謝活性の明らかな阻害があった。形態に基づいて、より高い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に曝露した場合、ＰＣ３およびＬＮＣａＰ細胞は両方とも丸みを帯びるようになり、マトリックスにあまり接着せず、細胞が少なくなった。差異は、より高いＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３濃度で、ＬＮＣａＰ細胞が小さい直径の丸みを帯びた細胞を有するクラスターとして凝集するが、ＰＣ３細胞は凝集しないことであった。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に曝露した場合、なぜＬＮＣａＰは凝集したのに対しＰＣ３は凝集しなかったのかはわからないままであるが、ＬＮＣａＰ細胞はＰＣ３より速い凝集速度を有することが示された。これはそれらの結合依存性に起因する可能性があり、ＬＮＣａＰおよびＰＣ３は、それぞれ足場依存性および非依存性である。ＬＮＣａＰの場合、表面への結合は生存能力および増殖のために必要であり、脱離はアノイキスのプロセスにより細胞死を誘導する。文献は、様々なコーティング試薬（ポリ－ｌ－リシン、ポリ－ｌ－オルニチン、ヒト胎盤由来ＩＶ型コラーゲン、フィブロネクチン、およびラミニン）上で成長させたＬＮＣａＰの効果を比較し、ラミニンおよびＩＶ型コラーゲンが細胞凝集を促進することを示した（図７、２４時間で撮った）。この凝集は、本明細書で提供される実験において見られる形態と同様であり、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３がＬＮＣａＰの細胞表面結合を低減することを示唆し得る。表面電荷、トポグラフィー、疎水性／親水性、表面化学および表面エネルギーを含む様々な基質特性は細胞挙動に影響を及ぼすことができ、改変された細胞－基質相互作用は細胞内シグナルの生成に影響し得ることはよく知られている。実際、液体オーバーレイ技術は、非接着性を有する表面上で細胞を培養することによって凝集／スフェロイドを誘導するためにこの分野で一般に使用されており、したがって、細胞－細胞相互作用は、細胞と表面の間に確立されたものより著明である。結果として、細胞は凝集し、大部分の細胞株について１～３日でスフェロイドの形成に至る。

【０１９６】

[００２５５]結論

[００２５６]ＷＳＴ－１アッセイデータは、ＵＣ抽出物（≧１００μｇ／ｍｌ）およびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（≧６．２５μｇ／ｍｌ）で処理した場合、ＬＮＣａＰ細胞の代謝活性が有意に阻害されるが（ｐ＜０．０５）、ＨＡでは阻害されないことを示した。同様に、ＰＣ－３細胞における代謝活性は、ＵＣ抽出物（≧２００μｇ／ｍｌ）およびＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（≧１．５６μｇ／ｍｌ）によって有意に阻害されたが、ＨＡでは阻害されなかった。≧２５μｇ／ｍｌの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を用いたＬＮＣａＰおよびＰＣ３細胞の両方において、顕微鏡検査で細胞死が顕著に認められた。

【０１９７】

[００２５７]これらのデータは、ＵＣ抽出物による前立腺細胞における代謝活性の阻害が塩効果と独立していることを示した。さらに、ここではＡＭおよびＵＣ産物が、前立腺切除術後のがん再発を促進しないことが実証された。

【０１９８】

実施例３：正常な前立腺細胞／細胞株の形態および代謝活性に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの効果を決定し、前立腺がん細胞株と比較する。

[００２５８]前立腺上皮は、２つの組織学的に個別の層：分泌管腔層および基底細胞層からなる。ヒト正常前立腺上皮基底および管腔細胞を使用した。ヒト正常前立腺上皮基底細胞（ＰｒＥＣ）をＣｌｏｎｅｔｉｃｓ－ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ，Ｉｎｃ．（Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、ＭＤ、ＵＳＡ）から得、サプリメントおよび成長因子（ＢＰＥ、ヒドロコルチゾン、ｈＥＧＦ、エピネフリン、インスリン、トリヨードチロニン、トランスフェリン、ゲンタマイシン／アンホテリシンＢ、およびレチノイン酸）を含有するＰｒＥｇＭ　ＢｕｌｌｅｔＫｉｔを用いて前立腺上皮基本培地（両方ともＣｌｏｎｅｔｉｃｓ製）において培養した。

【０１９９】

[００２５９]ヒト正常前立腺管腔ＰＮＴ２細胞株をＳｉｇｍａ（カタログ９５０１２６１

３）から購入した。細胞株は、欠損した複製起点を含むＳＶ４０ゲノムを含有するプラスミドでのトランスフェクションによる正常成人前立腺上皮細胞の不死化によって確立した。ＰＮＴ２細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、Ｌ－グルタミン（２ｍＭ）、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）、およびストレプトマイシン（１００μｇ／ｍｌ）を補充したＲＰＭＩ１６４０培地（ＲＰＭＩ１６４０完全培地）において、３７℃で、加湿インキュベーター内、空気中５％ＣＯ２の雰囲気下で培養した。７０～８０％の集密度で、細胞を０．２５％（ｗ／ｖ）トリプシン－０．５３ｍＭのＥＤＴＡ溶液によって回収し、液体窒素気相において９５％完全培地および５％ＤＭＳＯ中で、アリコートで保存した。

【０２００】

【表１】

表 1: WST-1 アッセイによる細胞代謝分析:

試料		**ウェルの数**
刺激されていない細胞		
処理なし		3
処理なし+WST-1 溶液 [WST-1 対照]		3
刺激された細胞		
HC-HA/PTX3	1.56 μg/ml 48 時間	3
	3.13 μg/ml 48 時間	3
	6.25 μg/ml 48 時間	3
	12.5 μg/ml 48 時間	3
	25 μg/ml 48 時間	3
	50 μg/ml 48 時間	3
	100 μg/ml 48 時間	3
HA	1.56 μg/ml 48 時間	3
	3.13 μg/ml 48 時間	3
	6.25 μg/ml 48 時間	3
	12.5 μg/ml 48 時間	3
	25 μg/ml 48 時間	3
	50 μg/ml 48 時間	3
	100 μg/ml 48 時間	3

【０２０１】

[00260]細胞を、それらのそれぞれの成長培地中で復活させた。次いでＷＳＴ－１アッセイのために、細胞を９６ウェルプレート中３．２×１０^4／ｍｌで終夜プレーティングした（すなわち３２００個の細胞＋１００ｕｌ／ウェル）（各アッセイについてｎ＝３）。精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３［ＡＭ２Ｐ（Ｆ３～９）［ＴＧＡＭ１７Ｈ００８］

；ストック量＝６７μｇ］およびＨＭＷ－ＨＡ（Ｈｅａｌｏｎ；カタログ番号ＣＥ０３４４；ロット番号ＵＰ３０５８３；ストック濃度＝１０ｍｇ／ｍｌ）をそれぞれの培養培地で段階希釈し、前述の濃度を得た。細胞を一連の用量の精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＡで処理し、３７℃で４８時間維持した。処理前ならびに２４時間および４８時間の処理後の細胞形態を顕微鏡下で記録した（１０×および２０×倍率の明視野）。各細胞株の代謝活性を、ＷＳＴ－１（カタログ番号１０００８８８３、Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ａｎｎ　Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）によって、製造業者の指示書（ＯＤ４５０またはＯＤ４５０～ＯＤ６７０）に従って４８時間で測定した。

Ａ．正常ヒト前立腺細胞／細胞株の増幅

[00261]ヒト正常前立腺上皮基底細胞（ＰｒＥＣ）はヒト正常前立腺管腔細胞（ＰＮＴ２）より速く成長する。ＰｒＥＣでは倍加時間は１８～２４時間であるが、ＰＮＴ２ではそれはより長く約３６～４８時間である。

【０２０２】

[00262]１０×および２０×倍率で撮ったＰｒＥＣ（図８Ａ）およびＰＮＴ２（図８Ｂ）前立腺細胞株の明視野画像は正常前立腺細胞の形態を示す。

Ｂ．ヒト正常前立腺細胞形態に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡの効果

[00263]ＰｒＥＣ細胞は、典型的には速く増殖し、表面によく結合した。通常、細胞は互いによく接着した。

【０２０３】

[00264]２４時間のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理後：６．２５μｇ／ｍｌで、細胞は細胞間接着を喪失し；１２．５μｇ／ｍｌで、細胞間接着の喪失が増加し；２５μｇ／ｍｌで、細胞は徐々にそれらの形態を変化させ始め；５０μｇ／ｍｌで、細胞は徐々に丸く変わり、細胞－細胞接着を喪失し；１００μｇ／ｍｌで、細胞は丸くなり、サイズが小さくなったが、死滅しなかった。４８時間のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理後：３．１３μｇ／ｍｌで、細胞は解離し始め；２５μｇ／ｍｌで、細胞は互いに完全に解離し、凝集体で成長せず；５０μｇ／ｍｌで、細胞はストレスを受け、サイズが小さくなり、より小さくかつ丸くなり；１００μｇ／ｍｌで、細胞は次々に死滅し、細胞数は劇的に減った（図９）。

【０２０４】

[00265]ＨＡ処理の著しい効果は観察されなかった。

Ｃ．ヒト正常前立腺細胞代謝に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの効果

[00266]ＰｒＥＣおよびＰＮＴ２の代謝活性は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による処理後に用量依存様式で有意に低下した。対照的に、ＨＡは細胞代謝に対して著しい効果を有しなかった（図１０Ａおよび１０Ｂ）。これらの２種類の正常前立腺細胞の間で、ＰｒＥＣ（図１０Ａ）は、非常に低い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して感受性が高かった（１．５６および３．１２５μｇ／ｍｌ）。同じ低い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１．５６および３．１３μｇ／ｍｌ）はＰＮＴ２（図１０Ｂ）細胞代謝活性に影響しなかった。

【０２０５】

[00267]代謝活性（％）は、正常ヒト初代前立腺上皮細胞ＰｒＥＣおよび正常ヒト前立腺細胞株ＰＮＴ２において、ＷＳＴ－１アッセイによって、様々な濃度（０．７８、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＡとの４８時間のインキュベーション後に評価した。ｐ値は未処理試料に対して両側ｔ検定によって計算された。

Ｄ．ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡによる処理下の正常およびがん前立腺細胞／細胞株における細胞代謝活性の比較分析

[00268]正常前立腺細胞（ＰｒＥＣおよびＰＮＴ２）および前立腺がん細胞株（ＬＮＣａＰおよびＰＣ３）の両方の代謝活性に対する様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（図１１Ａおよび１１Ｂ）およびＨＡ（図１２Ａおよび１２Ｂ）の効果を比較した。正常およびがん細胞種は両方とも、同様の様式でＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡに反応した。２５μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３で、ＰｒＥＣ細胞およびＰＮＴ２細胞株は両方ともがん細胞株（ＬＮＣａＰおよびＰＣ３）と比較して低い感受性を示した。ＨＭＷ

－ＨＡによる処理後に、ＰｒＥＣ、ＰＮＴ２、ＰＣ３、およびＬＮＣａＰ細胞の代謝活性における著しい差異はなかった。

【０２０６】

[00269]図１１Ａ～１１Ｂおよび図１２Ａ～１２Ｂは、正常な初代前立腺上皮細胞（ＰｒＥＣ）および細胞株（ＰＮＴ２）ならびに前立腺がん細胞株：ＰＣ３およびＬＮＣａＰにおいて、ＷＳＴ－１アッセイによって、様々な濃度（０．７８、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後に評価した代謝活性（％）の比較分析を示す。片対数回帰分析は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が全ての種類の前立腺細胞の代謝活性を用量依存様式で線形に阻害するが、ＨＡは著しい効果を一切有しないことを実証した＊（ｐ＜０．０５）、＊＊（ｐ＜０．０１）、＊＊＊（ｐ＜０．００１）。

【０２０７】

[00270]全体として、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、正常およびがんを含む全ての種類のヒト前立腺細胞／細胞株の細胞代謝活性を用量依存様式で阻害したが、ＨＭＷ－ＨＡは著しい効果を有しなかった。２５μｇ／ｍｌまでの濃度で、ＰＮＴ２細胞株はＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して低い感受性を示したが（細胞代謝活性：６０％、ｐ＜０．００１）、がん細胞株（ＰＣ３およびＬＮＣａＰの両方）の代謝活性は２５％未満に低減した（ｐ＜０．００１）。

【０２０８】

実施例４：選択されたがん上皮細胞株の形態および代謝活性に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの効果を決定する。

[00271]上の実施例は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が２種の前立腺がん細胞株（ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ）の代謝活性を制御することを示した。この研究では、４種の異なるヒトがん細胞株：Ａ－３７５（黒色腫）、Ａ５４９（肺がん）、ＭＣＦ－７（乳がん）およびＨＴ－２９（結腸腺癌）の形態および代謝活性に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡ（対照として）の効果をＷＳＴ－１アッセイによって試験した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの濃度は、実施例１に示された結果に基づいて選択した。

【０２０９】

[00272]実施例１では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３－応答曲線が５０μｇ／ｍｌ以上の濃度でプラトーであることが認められた。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の５０μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌの濃度の間に代謝活性における著しい変動はなかった。したがって、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の最大濃度を１００μｇ／ｍｌで維持した。

【０２１０】

[00273]細胞を、５ｍｌの予め温めた新鮮な完全培養培地中で解凍し、再懸濁し、続いて２５０ｇで５分間遠心分離した。上澄みを慎重に除去し、細胞ペレットを１０ｍｌの予め温めた新鮮な完全培養培地中で再懸濁し、１００ｍｍ培養プレートに播種し、３７℃で維持した。５日間の培養後、Ａ－５４９、ＨＴ－２９およびＡ３５７細胞はほぼ７０～８０％の集密度であったが、ＭＣＦ－７細胞はゆっくり成長した。細胞プレートをインキュベーターから取り出し、培地を慎重に除去し、続いて３～５ｍｌのＤ－ＰＢＳで２回洗浄した。次いで、５ｍｌの０．２５％トリプシン－０．５３ｍＭのＥＤＴＡを使用して、各１００ｍｍプレートからの細胞を回収した。５～１０分後、５ｍｌの新鮮な培養培地を添加してトリプシン－ＥＤＴＡの効果を中和し、細胞を２５０ｇで５分間遠心分離した。遠心分離後、上澄みを慎重に除去し、細胞ペレットを２ｍｌの新鮮な培養培地で再懸濁した。各細胞株について、１０μｌの細胞懸濁液を１０μｌのトリパンブルーと混合して死細胞を染色し、生細胞数を顕微鏡下で血球計算盤によって計数した。この研究では、各細胞株につき１つである４つの９６ウェルプレートを使用した。播種する細胞数は、以前の実施例に基づいて決定した（播種細胞数：実施例１および２における1×10^4／cm^2）。９６ウェルプレートの各ウェル面積が０．３２cm^2であることを考慮すると、3.2×10^4／ｍｌ個の細胞が必要であった。各ウェルに１００μｌの培養培地中３２００個の細胞を播種した。細胞を以下の濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡ（対照として

）：０．７８、１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００（μｇ／ｍｌ）で、三連で処理した。２種の未処理試料を使用した：ＷＳＴ－１試薬なしの未処理およびＷＳＴ－１試薬ありの未処理（ＷＳＴ－１アッセイの対照として）。ピペット操作の失敗を避けるために、細胞を表２に示される通りに培養培地中８ｍｌの最終体積に希釈した。

【０２１１】

【表２】

表 2: 100μl の培養培地中 3200 個の細胞を得るための希釈スキーム

細胞株	細胞数	添加した細胞	総体積を 8ml にするために添加した培養培地。
MCF-7	25.2 X 10^4 /ml	1 ml	7 ml
HT-29	261.6 x 10^4 /ml	98 μl	7 ml 902 μl
A-549	105.8 x 10^4 /ml	242 μl	7 ml 758 μl
A-375	160.6 x 10^4 /ml	160 μl	7 ml 840 μl

【０２１２】

[00274]３７℃で終夜のインキュベーション後、明視野の顕微鏡下、倍率：それぞれ１０×および２０×で細胞形態をとらえた。精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３［ＡＭ２Ｐ（Ｆ３～９）；２０１８／０２／０２に精製した；ストック量＝２５．７８μｇ］およびＨＭＷ－ＨＡ（Ｈｅａｌｏｎ；カタログ番号ＣＥ０３４４；ロット番号ＵＰ３０５８３；使用期限：２０１８／１２；ストック濃度＝１０ｍｇ／ｍｌ）をそれぞれの培養培地で段階希釈して必要な濃度を得た（すなわち０．７８、１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）。細胞を一連の用量の精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＡで処理し、３７℃のインキュベーターで４８時間維持した。処理前ならびに２４時間および４８時間の処理後に、細胞形態を顕微鏡下で記録した（１０×および２０×倍率の明視野）。各細胞株の代謝活性をＷＳＴ－１（カタログ番号１０００８８８３、Ｃａｙｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）によって、製造業者の指示書（ＯＤ４５０またはＯＤ４５０～ＯＤ６７０）に従って４８時間で測定した。

【０２１３】

[00275]ヒトがん上皮細胞形態に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＭＷ－ＨＡの効果：

ａ．Ａ－３７５（黒色腫）：通常、細胞は速く増殖し、表面によく結合する。

【０２１４】

ｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理：２４時間後：２５（μｇ／ｍｌ）で：細胞は紡錘形になる傾向があった。５０（μｇ／ｍｌ）で：細胞は紡錘形に変わった。１００（μｇ／ｍｌ）で：細胞は丸く、死滅した。４８時間後：６．２５（μｇ／ｍｌ）で：細胞はわずかに緩い細胞間接着を示した。１２．５（μｇ／ｍｌ）で：細胞はさらに細胞間接着を喪失した。細胞は塊ではなく個々に成長する傾向があった。２５（μｇ／ｍｌ）で：＞８０％の細胞は縮み、紡錘形であり、残りの細胞は丸かった。５０（μｇ／ｍｌ）で：＞６０％の細胞は死滅し、丸く見え、残りの細胞は紡錘形であった。１００（μｇ／ｍｌ）で：全ての細胞は丸く見え、死滅した。図１３を参照されたい。

【０２１５】

ｉｉ．　ＨＡ処理：ＨＡの著しい効果は観察されなかった。

ｉｉｉ．　結果は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の濃度が上昇するにつれて、Ａ－３７５細胞は、以下のステップに従って用量依存様式で形態を大幅に変化させたことを示した：

[00276]正常上皮細胞は互いに接着した＞細胞は細胞間結合を喪失し、紡錘形に変わる。細胞の縮み＞細胞は丸く変わり、死滅する。

ａ．　ＨＴ－２９（結腸がん）：細胞は通常丸く、凝集体で成長する。各凝集体はボールのように見える。

【０２１６】

ｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理：２４時間後：５０（μｇ／ｍｌ）で：細胞は接着を喪失し、分離した。１００（μｇ／ｍｌ）で：細胞は丸いビーズ様の形状に見え、あまり生き残らなかった。４８時間後：１．５６（μｇ／ｍｌで）：細胞間接着は徐々に失われた。６．２５（μｇ／ｍｌ）で：＜１０個の細胞は、各塊で互いに接着した。細胞は細胞間接着をさらに喪失した。２５（μｇ／ｍｌ）で：細胞は凝集体ではなく単独で成長する傾向があった。５０（μｇ／ｍｌ）で：細胞は単独で成長した。１００（μｇ／ｍｌ）で：単独の細胞は円形であり、あまり生き残らなかった。図１４を参照されたい。

【０２１７】

ｉｉ．　ＨＡ処理：ＨＡの著しい効果は観察されなかった。

ｉｉｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の濃度が上昇するにつれて、用量依存様式で大幅にＨＴ－２９細胞は形態を以下のステップで変化させた：

[00277]＞２０個の細胞は互いに接着した。ブドウのように見える。＞細胞間接着は徐々に緩くなる＞　＜１０個の細胞は各塊で互いに接着する＞細胞は徐々に塊から出る。凝集体ではなく、細胞間および細胞－マトリックス接着性は低下する。＞単独の丸い細胞はあまり生き残らない。

ａ．　Ａ５４９（肺がん）：通常、細胞は上皮であり、急速に増殖する。

【０２１８】

ｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理：２４時間後：２５（μｇ／ｍｌ）で：細胞形態は紡錘形にわずかに変化した。５０（μｇ／ｍｌ）で、細胞はさらに紡錘形になる傾向がある。１００（μｇ／ｍｌ）で：全ての細胞が死滅してはいない。死細胞は丸い。４８時間後：１２．５（μｇ／ｍｌ）で：細胞形態は紡錘形にわずかに変化した。５０（μｇ／ｍｌ）で：細胞はさらに紡錘形になる傾向がある。１００（μｇ／ｍｌ）で：全ての細胞が死滅してはいない。死細胞は丸い。図１５を参照されたい。

【０２１９】

ｉｉ．　ＨＡ処理：ＨＡの著しい効果は観察されなかった。

ｉｉｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理下で、大幅にＡ－５４９細胞は、それらの形態を以下のステップで変化させた：

[00278]細胞は増殖する。細胞間接着。＞細胞は丸く、ドット様である。死滅した

ａ．　ＭＣＦ－７（乳がん）：通常、細胞は上皮である。ゆっくりの成長。互いに接着した。凝集体で成長する。

【０２２０】

ｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理：２４時間後：５０μｇ／ｍｌまで効果なし。１００（μｇ／ｍｌ）で：丸いビーズ様細胞は死滅している。４８時間後、効果は同じであった。図１６を参照されたい。

【０２２１】

ｉｉ．　ＨＡ処理：ＨＡの著しい効果は観察されなかった。

ｉｉｉ．　ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３処理下、大幅にＭＣＦ－７細胞はそれらの形態を以下のステップで変化させた：

[00279]細胞は凝集体で成長する＞細胞は解離した。死滅した。

【０２２２】

[00280]がん細胞株の代謝活性に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＭＷ－ＨＡの効果：

[00281]Ａ３７５：Ａ－３７５細胞代謝は、用量依存様式で有意に低下した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による４８時間の処理後、細胞代謝は１．５６μｇ／ｍｌ以降から有意に変化した。ＨＡの著しい効果は観察されなかった。（図１７Ａ）

[00282]ＨＴ－２９：ＨＴ－２９細胞代謝は用量依存様式で有意に低下した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による４８時間の処理後、細胞代謝活性は６．２５μｇ／ｍｌ以降から有

意に変化した。ＨＡの著しい効果は観察されなかった。（図１７Ｂ）
[00283]Ａ５４９：Ａ５４９細胞代謝は用量依存様式で有意に低下した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による４８時間の処理後、細胞代謝活性は０．７８μｇ／ｍｌ以降から変化した。ＨＡの著しい効果は観察されなかった。（図１７Ｄ）
[00284]ＭＣＦ－７：ＭＣＦ－７はＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して最小の感受性を示した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の有意な効果は高い濃度（５０μｇ／ｍｌ）で観察することができたが、効果はＡ３７５およびＨＴ－２９のような他の細胞株について観察されたものほど強くなかった。（図１７Ｃ）
[00285]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、細胞凝集、細胞間結合、細胞形状および細胞接着、したがって試験した４種類全てのがん細胞の細胞代謝活性を用量依存様式で阻害した。対照的に、ヒアルロナンは４つの全ての細胞種の細胞形態および代謝活性に対する著しい効果を有しなかった。これらの効果はかなり早く、例えば２４時間で生じ、これはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が、ＣＤ４４と結合すると、細胞骨格／膜相互作用における変化をもたらすことを強く示唆し、これは特異的であり、ＨＭＷ　ＨＡと異なる。
【０２２３】
[00286]４種の細胞株のうちＡ３７５およびＨＴ－２９はＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対してＡ５４９およびＭＣＦ－７より感受性が高かった。ＭＣＦ－７はＣＤ４４を著しく発現しないので、これらの４種の腫瘍細胞間の差異はＣＤ４４発現の程度と関連する可能性があった。
【０２２４】
[00287]細胞間および基質接着における変化は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３との接触時にＡ３７５およびＨＴ－２９の間で異なる。Ａ３７５について、形態学的変化は脱離後に見られた：細胞は最初に紡錘形に変わり、次いで丸くなる。対照的に、ＨＴ－２９は形態学的変化を一切示さなかった。細胞は初めから円形のままであった。高い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３下で、それらは細胞間結合を徐々に喪失した。これらの結果は、様々な種類のがんにおいて、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が異なる経路によって細胞接着シグナル伝達を制御し得ることを示唆する。
【０２２５】
[00288]これらのがん細胞株において観察された主な事象は、細胞形状変化につながり、細胞死につながる、細胞代謝活性の阻害であった。
実施例５：間葉系細胞に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの効果を決定する。
【０２２６】
[00289]実施例２および４では、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、正常前立腺上皮細胞の形態および代謝活性に、腫瘍細胞のものと同様に影響することが確認された。このような効果が正常間葉系細胞にも当てはまるかどうかに対処するために、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が一連の間葉系細胞の形態および代謝活性に対しても同様の効果を発揮するかどうかを調べた。
【０２２７】
[00290]３種の正常間葉系初代細胞を使用した：それぞれ（ａ）輪部ニッチ細胞（ＬＮＣ）、（ｂ）ヒト小柱メッシュ（ＨＴＭ）、および（ｃ）ヒト角膜線維芽細胞（ＨＣＦ）。細胞をそれらのそれぞれの成長培地において培養した。ＬＮＣをＨＳＣＭ培地において５％マトリゲル（血清なし）上で培養した。ＨＴＭ細胞をＥＳＣＭ培地において、５％ＦＢＳを含む５％マトリゲル上で培養した。ＨＣＦ細胞をＤＭＥＭにおいて１０％ＦＢＳを含むプラスチック上でのみ培養した。細胞を６ウェルプレートの各ウェル上で培養した。ＬＮＣおよびＨＴＭ細胞について、ウェルを最初に１０００μｌの５％マトリゲルでコーティングし、３７℃で１時間インキュベートした。その後、細胞を１０００μｌの培養培地において各ウェルに播種した。細胞が十分な集密度を達成した後に、それらをトリプシン処理し、続いて２００ｇで５分間の短時間の遠心分離をした。培地を除去し、細胞ペレットに新鮮な培養培地を補充した。９６ウェルプレートの選択したウェルを５０μｌの５％マトリゲルでコーティングし、３７℃で１時間インキュベートした。その後、ＬＮＣ

およびＨＴＭ細胞をマトリゲルでコーティングした９６ウェルプレートに播種し、終夜のインキュベーションのために３７℃で維持した。各ウェルにおいて、３２００個の細胞を１００μｌの培養培地に播種した。翌日、細胞を一連の用量（ＨＡ濃度によって定義される、例えば、０、１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ、ｎ＝３）の精製されたＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡで処理した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの濃度は、実施例３で行ったように段階希釈によって計算した。細胞形態を１５～３０分、１時間、５時間、２４時間および４８時間の処理後にそれぞれ記録した。４８時間のインキュベーション後、細胞代謝活性をＷＳＴ－１（カタログ番号１０００８８８３、Ｃａｙｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）によって、製造業者の指示書（ＯＤ４５０またはＯＤ４５０～ＯＤ６７０）に従って測定した。

【０２２８】

[00291]輪部ニッチ細胞（ＬＮＣ）形態における変化を２５～１００μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３を用いて１５分以内に観察した。しかし、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３とのより長いインキュベーション（１時間）後に細胞は元の形状に再び戻った。細胞形態はさらに変化しなかった（図１８Ａを参照されたい）。

【０２２９】

[00292]高い用量のＨＭＷ－ＨＡ（１００μｇ／ｍｌ）で処理した細胞はさらに縮み、糸のようになった（図１８Ｂ）。ＬＮＣは、１００μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３で４８時間処理した場合、平らになったが、比較的短くなった。図１８Ｃは、１００μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３またはＨＭＷ－ＨＡとの４８時間のインキュベーション後のＬＮＣ（輪部ニッチ細胞）の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す。

【０２３０】

[00293]ＬＮＣはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して代謝的にかなり耐性であった。４８時間のインキュベーション後、全体の細胞代謝活性は約７５％のままであり、ＬＮＣに対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の効果がほとんどないことを表すが、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３濃度の徐々の上昇に伴い、細胞代謝活性は迅速に低下する。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の有意な効果は１２．５μｇ／ｍｌの濃度で始まった。ＨＭＷ－ＨＡで処理している間は、ＬＮＣの代謝活性における著しい変化は検出されなかった。図１９は、様々な濃度（１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって輪部ニッチ細胞において評価した代謝活性（％）を示す。ｐ値は未処理試料に対して両側スチューデントのｔ検定によって計算された。

【０２３１】

[00294]ヒト小柱メッシュ（ＨＴＭ）細胞は、ＬＮＣと比較してＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して、より耐性である。ＨＴＭ細胞において短時間内での形態学的変化は観察されなかった。様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３との４８時間のインキュベーション中に細胞形状は変化しなかった。培養培地中の５％ＦＢＳは、細胞をＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して、より耐性にし得る。ＨＭＷ－ＨＡで処理している間に、細胞形態は変化しなかった。図２０Ａおよび２０Ｂは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（図２０Ａ）およびＨＭＷ－ＨＡ（図２０Ｂ）で様々な時点：それぞれ１５～３０分、１時間、５時間、２４時間、および４８時間の処理後のＨＴＭ（ヒト小柱メッシュ）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す。

【０２３２】

[00295]ＨＴＭ細胞は、細胞形態において観察される通り（図２０Ａ）、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して非常に耐性であった。４８時間のインキュベーション後、全体の細胞代謝活性は７５％超のままであり、ＨＴＭに対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の効果がほとんどないことを表すが、最高濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１００μｇ／ｍｌ）で、細胞代謝活性の有意な低下（ｐ＝０．０４）が明らかであった。ＨＭＷ－ＨＡで処理している間

、ＨＴＭの代謝活性における著しい変化は検出されなかった（図２０Ｂ）。
【０２３３】
[00296]図２１は、様々な濃度（１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによってヒト小柱メッシュ細胞において評価した代謝活性（％）を示す。ｐ値は未処理試料に対して両側スチューデントのｔ検定によって計算された。示される通り、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＭＷ－ＨＡはＨＴＭに対してほとんど効果を有しなかった。
【０２３４】
[00297]ヒト角膜線維芽細胞（ＨＣＦ）の形態に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の効果は、ＬＮＣに対するものとほぼ同様であった。１００μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による処理後１５～３０分以内に細胞は丸くなったが、１時間までにそれらの元の形態に回復して戻った。その後、細胞形状は、高い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３とのより長いインキュベーション（４８時間）においてさえ、もはや変化しなかった。ＨＭＷ－ＨＡは、ＨＣＦ細胞形態に対して著しい効果を有しなかった。図２２Ａおよび２２Ｂは、様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（図２２Ａ）およびＨＭＷ－ＨＡ（図２２Ｂ）で様々な時点：それぞれ１５～３０分、１時間、５時間、２４時間および４８時間処理した後のヒト角膜線維芽細胞（ＨＣＦ）細胞の代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）を示す。
【０２３５】
[00298]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＨＣＦ細胞の細胞代謝活性を用量依存様式で阻害したが、ＨＭＷ－ＨＡは著しい効果を有しなかった。有意な阻害は１２．５μｇ／ｍｌ以降の濃度で観察された。図２３は、様々な濃度（１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡとの４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによってヒト角膜線維芽細胞細胞において評価した代謝活性（％）を示す。ｐ値は、未処理試料に対して両側スチューデントのｔ検定によって計算された。
【０２３６】
[00299]全体として、細胞代謝活性が用量依存様式でＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３によって有意に阻害されたにもかかわらず、ヒト正常間葉系初代細胞は上皮細胞（正常およびがん）と比較してＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して、より耐性を示した（表３）。ＨＭＷ－ＨＡは、初代間葉系細胞の細胞形態および代謝活性に対して際立った効果を有しなかった。３種類の間葉系細胞のうち、ＨＴＭは高い濃度（１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して、より強固であったが（代謝活性：８４．８％、ｐ＝０．０４）、同じ濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＨＣＦ（５０％、ｐ＝０．０１）およびＬＮＣ（６１．４％、ｐ＝０．０４）の代謝活性をより抑制することができた。図２４Ａおよび２４Ｂは、様々な濃度（１．５６、３．１２５、６．２５、１２．５、２５、５０、１００μｇ／ｍｌ）のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（図２４Ａ）およびＨＡ（図２４Ｂ）との４８時間のインキュベーション後にＷＳＴ－１アッセイによって評価した、３種類のヒト正常初代間葉系細胞：ＨＣＦ、ＨＴＭおよびＬＮＣにおいて評価した代謝活性（％）の比較分析を示す。ｐ値は未処理試料に対して両側スチューデントのｔ検定によって計算された。＊はｐ＜０．０５を示す。
【０２３７】
[00300]ＬＮＣおよびＨＣＦはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して感受性が高く、細胞形状は高い用量のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３で非常に急速に変化したが（１５～３０分以内）、より長くは持続しなかった。１時間以内に細胞はそれらの正常な形状に回復して戻り、その後、細胞形態は、高い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３との長いインキュベーション（４８時間）でさえ、もはや影響されなかった。対照的に、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３は、より短いおよびより長いインキュベーション期間の両方での高い濃度で、ＨＴＭ細胞形状を変えることができなかった。代表的な明視野顕微鏡画像（スケールバー５０μｍ）（図２５）は

、短時間でＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１００μｇ／ｍｌ）を負荷している間の間葉系細胞（ＬＮＣおよびＨＣＦ）の形態学的異常および急速な回復を示す。ＨＴＭ細胞は他の正常な間葉系細胞のようにＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に反応しない。

【０２３８】

【表３】

表 3. 高い濃度の HC-HA/PTX3(例えば 100μg/ml)で 48 時間処理している間の間葉系および上皮細胞の差異。

特徴	間葉系細胞	上皮細胞
効果の時間	非常に急速	ゆっくり、長い時間がかかる
細胞形状	最初の 15 分以内に任意の変化が生じ、1 時間以内に元の形状に戻る。	細胞形状変化は後に生じ、持続性である。
細胞生存率	高い	低い
全体的な細胞代謝活性	高い	低い
細胞増殖速度	高い	低い

【０２３９】

実施例６：ヒト正常およびがん細胞における細胞増殖を抑制することにおけるＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の役割を決定する。

[00301]本発明者らは実施例４において、Ａ３７５（黒色腫）細胞の代謝活性（ＷＳＴ－１によって測定した）および形態がＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３に対して感受性であることを観察した。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の濃度が上昇するにつれて、代謝活性は阻害され、細胞形態は上皮の形状から紡錘形に変化し、次いで丸くなり、細胞間および細胞－マトリックス接着が失われた。細胞代謝活性は細胞増殖速度と正比例するので、細胞増殖を抑制することにおけるＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の役割は、増殖している細胞のＤＮＡ含有量を定量化することによって決定される。細胞増殖中に細胞ＤＮＡに組み込まれた５－ブロモ－２’－デオキシウリジン（ＢｒｄＵ）は、ＢｒｄＵ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（カタログ番号６８１３；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ＵＳＡ）によって抗ＢｒｄＵ抗体を使用して検出される。

【０２４０】

[00302]Ａ３７５細胞が２４時間の処理後にＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の２５μｇ／ｍｌ以降から開始する著しい形態学的変化を示した実施例４における結果を考慮して、細胞は以下の濃度：０、２５、５０および１００μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３で２４時間処理した。実施例５に示される通りの細胞形態および代謝活性に対する著しい効果の欠如ゆえに、１００μｇ／ｍｌのＨＡを対照として使用した。このパイロット研究に基づいて、増殖アッセイプロトコールを最適化し、ヒト前立腺細胞（正常およびがん）に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の効果を判定するために適用した。試験群は表４に示される。

【０２４１】

[00303]Ａ３７５細胞を９６ウェルプレートに播種し（１００μｌ培養培地中３２００個の細胞／ウェル）、終夜インキュベートした。細胞を前述の濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡで４８時間処理した。各ウェル中１０μｌの１０×ＢｒｄＵ溶液および細胞をインキュベーター内に４時間置いた。培地を除去し、固定／変性溶液を１００μｌ／ウェルで添加し３０分間おいた。溶液を除去し、１×検出抗体溶液を１００μｌ／ウェルで添加し１時間おいた。溶液を除去し、洗浄バッファーで３回適切に洗浄し、１×ＨＲＰコンジュゲート二次抗体溶液を１００μｌ／ウェルで３０分間室温で添加した。溶液を除

去し、洗浄バッファーで３回適切に洗浄し、ＴＭＢ基質を１００μｌ／ウェルで３０分間室温で添加した。停止液を１００μＬ／ウェルで添加し、吸光度を４５０ｎｍで読み取った。

【０２４２】

【表４】

表 4: 実験設計- A375 細胞

試料	ウェルの数
細胞株 ＝A375	
刺激されていない細胞	
処理なし	3
処理なし+1×BrdU 溶液 [BrdU 対照]	3
刺激された細胞	
HA (100 μg/ml) 24 時間	3
HC-HA/PTX3 (25 μg/ml) 24 時間	3
HC-HA/PTX3 (50 μg/ml) 24 時間	3
HC-HA/PTX3 (100 μg/ml) 24 時間	3

【０２４３】

[00304]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの抗増殖活性をＡ３７５（黒色腫）細胞において研究した。様々な濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（２５、５０および１００μｇ／ｍｌ）および１００μｇ／ｍｌのＨＡとの４８時間のインキュベーションは、実施例４で観察されたのと同じ効果をＡ３７５細胞形態に対して示した（図２６Ａ）。ＢｒｄＵ組込みアッセイは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３がＡ３７５細胞成長を用量依存様式で有意に阻害するが（ｐ＜０．００５）、ＨＡは著しい寄与を有しないことを明らかにする（図２６Ｂ）。統計的有意性（ｐ値）はスチューデントのｔ検定から計算された。片対数線形回帰分析は、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３がＡ３７５細胞成長に対する直線的な阻害効果を有することを決定する（R^2＝０．９６８１）。（図２６Ｃ）

ＢｒｄＵ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ（カタログ番号６８１３；Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、ＵＳＡ）による前立腺細胞株の細胞増殖分析

【０２４４】

【表５】

表 5: 実験設計- PrEC、PNT2、PC-3 および LNCaP 細胞

試料	ウェルの数
細胞または細胞株=PrEC、PNT2、PC-3 および LNCaP	
刺激されていない細胞	
処理なし	3
処理なし+1×BrdU 溶液 [BrdU 対照]	3
刺激された細胞	
HA (100 μg/ml) 48 時間	3
HC-HA/PTX3 (1.56 μg/ml) 48 時間	3
HC-HA/PTX3 (3.13 μg/ml) 48 時間	3
HC-HA/PTX3 (6.25 μg/ml) 48 時間	3
HC-HA/PTX3 (12.5 μg/ml) 48 時間	3
HC-HA/PTX3 (25 μg/ml) 48 時間	3

【０２４５】

[00305]ＰｒＥＣ、ＰＮＴ２、ＰＣ－３およびＬＮＣａＰ細胞を９６ウェルプレートにおいて３．２×１０^{3}個の細胞／ウェルで播種し、終夜インキュベートした。次いで表５に示される通りに、細胞を５つの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１．５６、３．１３、６．２５、１２．５および２５μｇ／ｍｌ）および１００μｇ／ｍｌのＨＭＷ－ＨＡで４８時間三連で処理した。最後に、１０μＭのＢｒｄＵをウェルに添加し、細胞を４時間インキュベートした。培地を除去し、固定／変性溶液を１００μｌ／ウェルで添加し３０分間おいた。溶液を除去し、１×検出抗体溶液を添加し、１×ＨＲＰコンジュゲート二次抗体溶液を１００μｌ／ウェルで３０分間室温で添加した。溶液を除去し、洗浄バッファーで３回適切に洗浄し、ＴＭＢ基質を１００μｌ／ウェルで３０分間室温で添加した。停止液を１００μＬ／ウェルで添加し、吸光度を４５０ｎｍで読み取った。

【０２４６】

[00306]明視野位相差顕微鏡検査によるＰｒＥＣ細胞の細胞形態分析（図２７Ａ）およびＢｒｄＵ組込みアッセイは、ＰｒＥＣ細胞に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の抗増殖効果を実証する。ＨＡは細胞増殖を阻害しない。この実験では、使用したＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の最大濃度は２５μｇ／ｍｌであった。１２．５および２５μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３で、Ｏ．Ｄ．値はマイナスになり、ウェル内に細胞がなかったことを示す。分析手順における逸脱ゆえに、これらのデータはＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３曝露に由来する効果を示していない可能性がある。

【０２４７】

[00307]図２７Ａおよび２７Ｂは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３がＰｒＥＣ細胞増殖を用量依存様式で阻害したが、ＨＭＷ－ＨＡ（図２７Ｃ）は、ＢｒｄＵ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ＃６８１３（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、ＵＳＡ）によって検出される通り、細胞増殖に対して著しい効果を有しなかったことを示す。図２７Ａは２つの倍率（１０×および２０×）でのＰｒＥＣ細胞形態の明視野画像を示し、図２７ＢおよびＣはＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す。統計的有意性（ｐ値）はスチューデントのｔ検定から計算された。

【０２４８】

[00308]ＰＮＴ２細胞の明視野位相差顕微鏡検査およびＢｒｄＵ組込みアッセイによる細胞形態分析は、ＰＮＴ２細胞に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の抗増殖効果を実証した。ＨＡは細胞増殖を阻害しなかった。通常、細胞は凝集体で成長する。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の濃度が上昇するにつれて、それは細胞－細胞接着を阻害した（図２８Ａ）。Ｂｒｄ

Ｕアッセイにおいて、高い標準誤差ゆえに、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の有意な効果は観察されなかった（図２８Ｂ）。ｐ値は０．０５を超えた。ＢｒｄＵデータは、先のＷＳＴ－１データとの類似性を示した。

【０２４９】

[00309]ＢｒｄＵ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ ＃６８１３（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、ＵＳＡ）によって検出された通り、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＰＮＴ２細胞増殖を用量依存様式で阻害したが、ＨＭＷ－ＨＡは細胞増殖に対して著しい効果を有しなかった。ＰＮＴ２細胞を９６ウェルプレートにおいて３．２×10^3個の細胞／ウェルで播種し、終夜インキュベートした。次いで細胞を５つの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１．５６、３．１３、６．２５、１２．５および２５μｇ／ｍｌ）および２つの濃度のＨＭＷ－ＨＡ（２５および１００μｇ／ｍｌ）で４８時間三連で処理した。最後に、１０μＭのＢｒｄＵをウェルに添加し、細胞を４時間インキュベートした。

【０２５０】

[00310]実施例７で観察された通り、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＰＣ－３前立腺がん細胞株に対する抗増殖効果を有したが、ＨＡは有しなかった。ＢｒｄＵアッセイは、２５μｇ／ｍｌの濃度で、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３がＰＣ－３の増殖を有意に阻害したことを示す（ｐ＝０．０４）。ＢｒｄＵデータは、ＷＳＴ－１データとの類似性を示した。

【０２５１】

[00311]ＢｒｄＵ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ ＃６８１３（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、ＵＳＡ）によって検出された通り、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＰＣ３細胞増殖を用量依存様式で阻害したが、ＨＭＷ－ＨＡは細胞増殖に対して著しい効果を有しなかった。ＰＣ３細胞を９６ウェルプレートにおいて３．２×10^3個の細胞／ウェルで播種し、終夜インキュベートした。次いで細胞を５つの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１．５６、３．１３、６．２５、１２．５および２５μｇ／ｍｌ）および２つの濃度のＨＭＷ－ＨＡ（２５および１００μｇ／ｍｌ）で４８時間三連で処理した。最後に、１０μＭのＢｒｄＵをウェルに添加し、細胞を４時間インキュベートした。図２９ＡはＰＣ３細胞形態の明視野画像を示す。図２９ＢはＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す。

【０２５２】

[00312]ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３による処理下、ＬＮＣａＰの細胞形態は用量依存様式で変化した。驚くべきことに、がん細胞であるにもかかわらずＬＮＣａＰは、ＰＣ－３またはＰＮＴ２またはＰｒＥＣ細胞ほど速く増殖しなかった。この観察は、全ての細胞種のＢｒｄＵデータにおいて十分に裏付けられた。未処理条件下では、ＬＮＣａＰ細胞のＯ．Ｄ．値は０．５になったが、残りの他の細胞についてそれは＞０．７５であった。興味深いことに、ＬＮＣａＰの場合、細胞は高い濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３でさえ、凝集体で成長し続けたが、それらの形態は変化し、したがってこれは、細胞－細胞接着よりむしろ細胞－マトリックス結合に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の高い効果を表す。ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３の濃度３．１３および１２．５μｇ／ｍｌならびに１００μｇ／ｍｌのＨＡでの高い標準誤差は誤ったグラフを表した。ブランク試料におけるピペット操作の失敗ゆえに、２５μｇ／ｍｌのＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３でＯ．Ｄ．値はマイナスであった（図３０Ａを参照されたい）。対象ウェルにおいて十分な細胞を可視化することができた（図３０Ｂを参照されたい）。

【０２５３】

[00313]ＢｒｄＵ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ ＃６８１３（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ、ＵＳＡ）によって検出された通り、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３はＬＮＣａＰ細胞増殖を用量依存様式で阻害したが、ＨＭＷ－ＨＡは細胞増殖に対して著しい効果を有しなかった。ＬＮＣａＰ細胞を９６ウェルプレートにおいて３．２×10^3個の細胞／ウェルで播種し、終夜インキュベートした。次いで細胞を５つの濃度のＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３（１．５６、３．１３、６．２５、１２．５および２５μｇ

／ｍｌ）および２つの濃度のＨＭＷ－ＨＡ（２５および１００μｇ／ｍｌ）で４８時間三連で処理した。最後に、１０μＭのＢｒｄＵをウェルに添加し、細胞を４時間インキュベートした。図３０ＡはＬＮＣａＰ細胞形態の明視野画像を示す。図３０ＢはＢｒｄＵ細胞増殖アッセイ曲線を示す。

【０２５４】

[00314]４種類の前立腺上皮細胞／細胞株（正常およびがんの両方）についてのＢｒｄＵアッセイは、ＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３が細胞増殖を用量依存様式で阻害するが、ＨＭＷ－ＨＡは阻害しないことを示唆した。技術的失敗ゆえに、ＰｒＥＣおよびＬＮＣａＰの結果は、ＷＳＴ－１アッセイデータおいて観察されたのと同じ効果を反映しない。しかし、対応する細胞形態画像は、前立腺細胞に対するＨＣ－ＨＡ／ＰＴＸ３およびＨＡの効果が以前の実験で観察されたのと同様であることを支持した。

【０２５５】

[00315]好ましい実施形態が本明細書で示され、記載されたが、そのような実施形態が単なる例として提供されることは当業者に明らかである。今や多数の変形、変更、および置換が行われ得る。本明細書に記載の実施形態の様々な代替物が、記載されている方法の実施において用いられ得ることが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲が実施形態の範囲を定義すること、およびこれらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにそれらの均等物がそれにより包含されることが意図される。

【図面】

【図１】

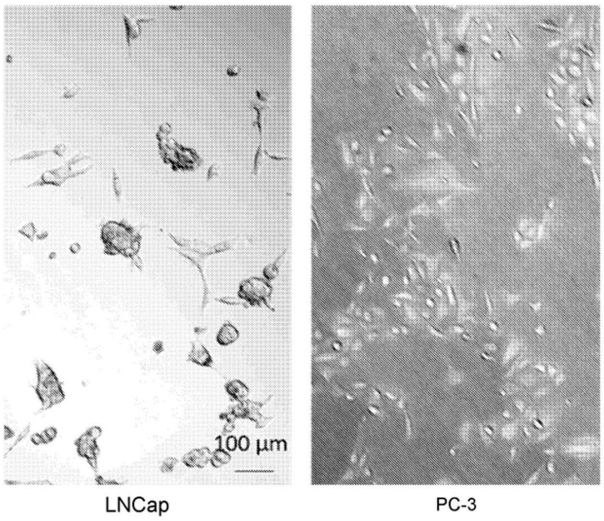
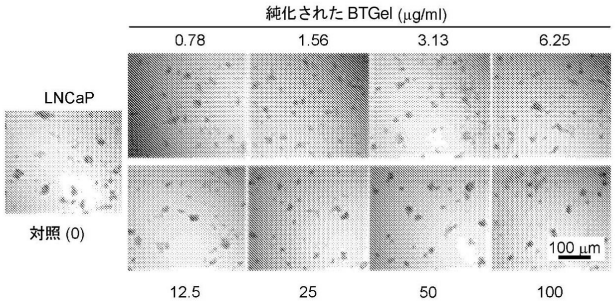
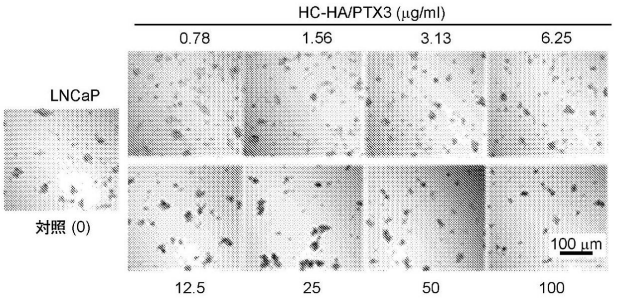


図１Ａ　図１Ｂ

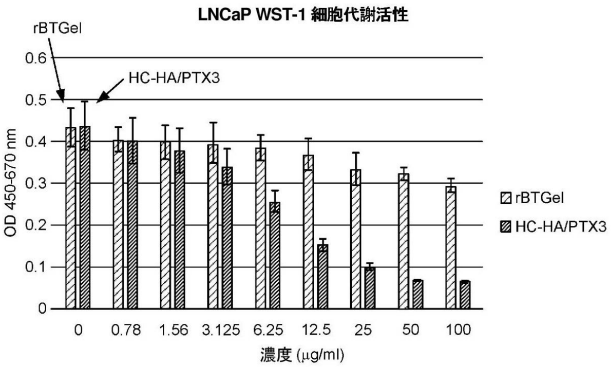
【図２Ａ】



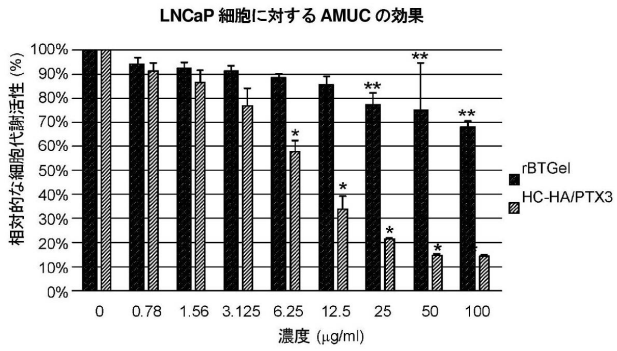
【図２Ｂ】



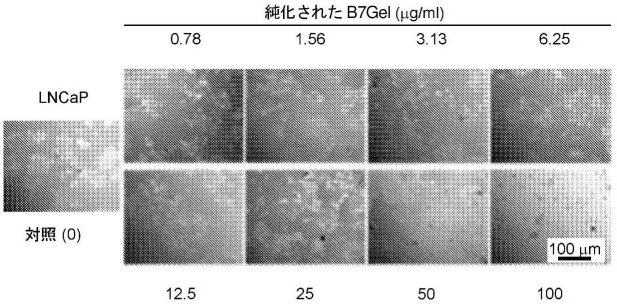
【図２Ｃ】



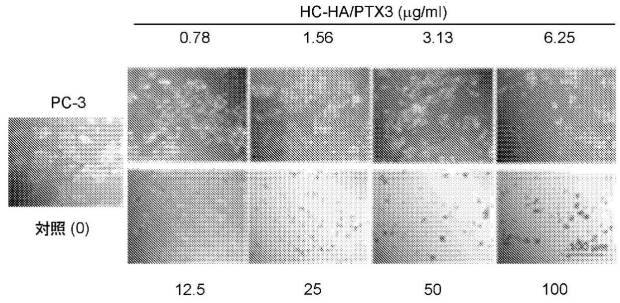
【図２Ｄ】



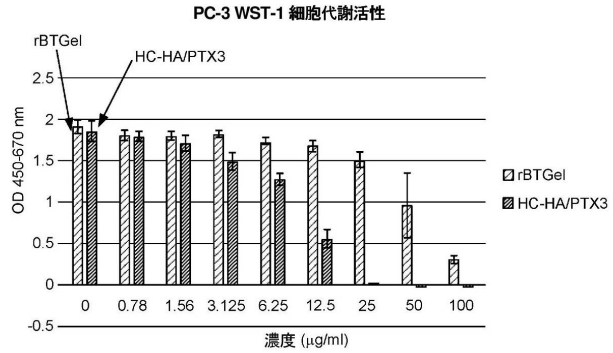
【図３Ａ】



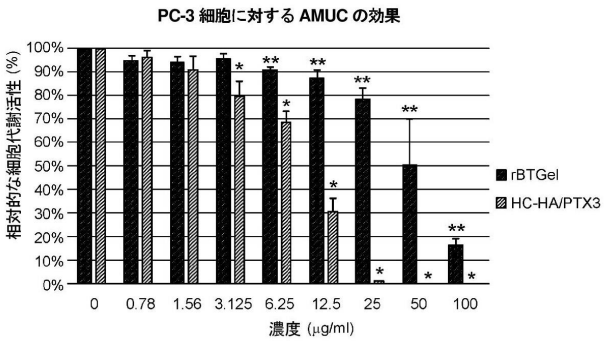
【図３Ｂ】



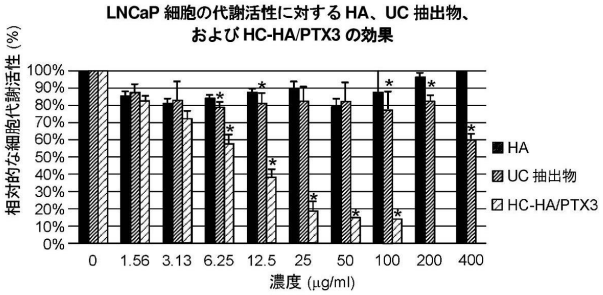
【図３Ｃ】



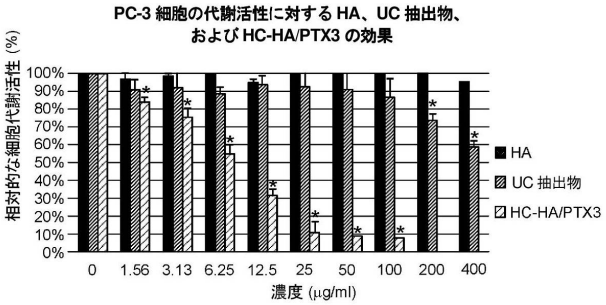
【図３Ｄ】



【図４Ａ】



【図４Ｂ】



【図５】

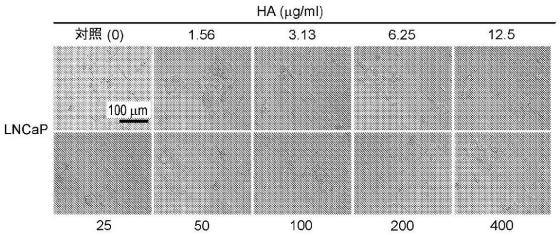


図5A

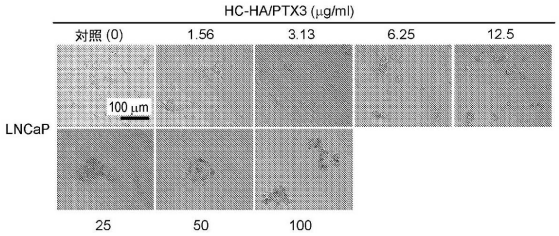


図5B

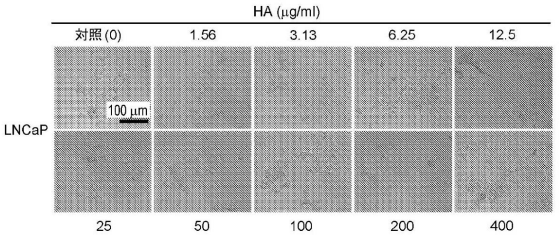


図5C

【図６】

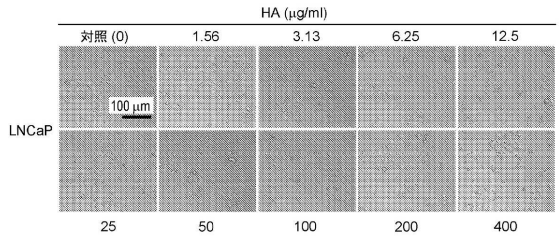


図6A

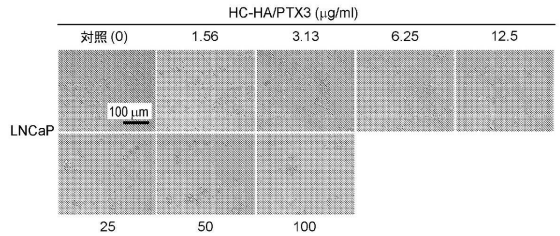


図6B

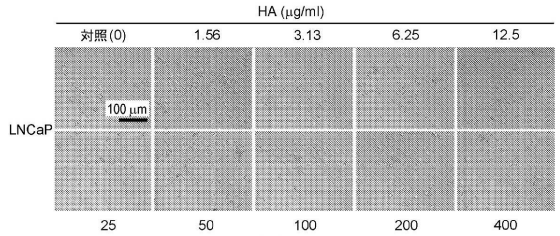
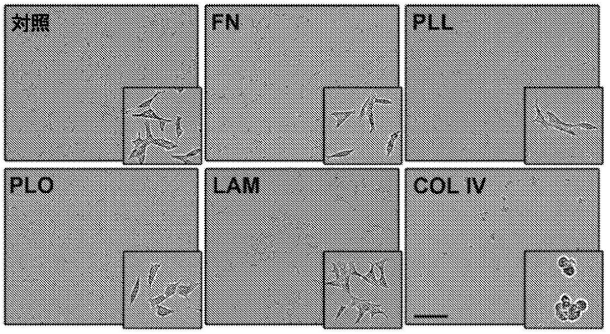
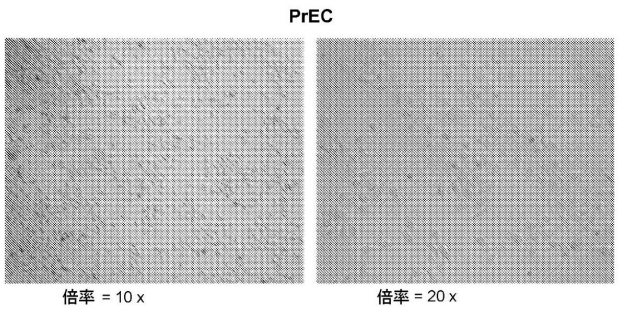


図6C

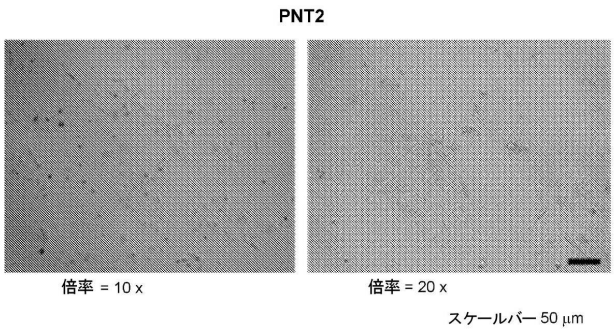
【図７】



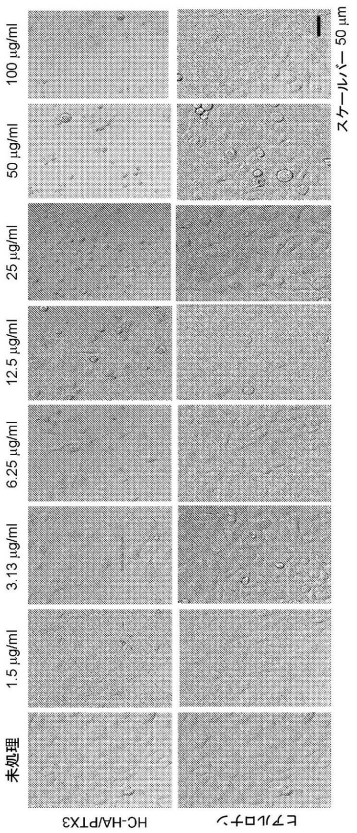
【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【図９】



【図１０】

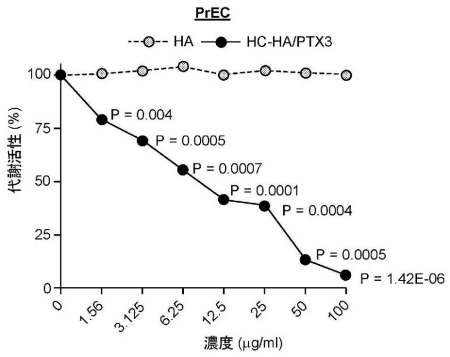


図10A

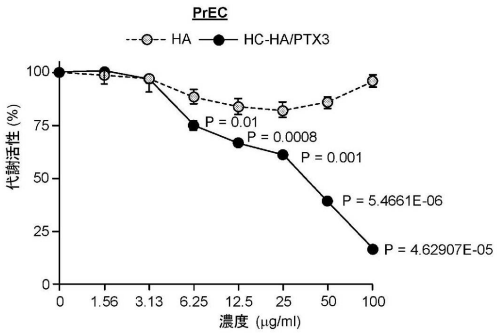


図10B

【図１１】

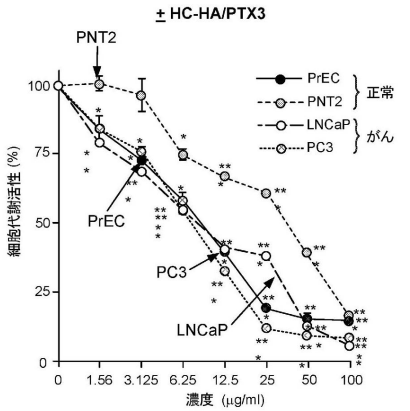


図11A

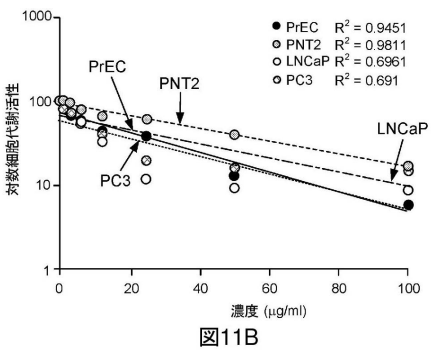


図11B

【図１２】

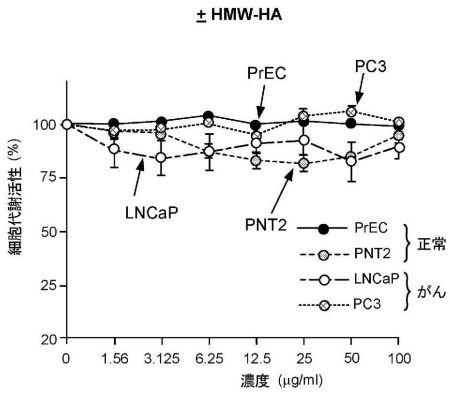


図12A

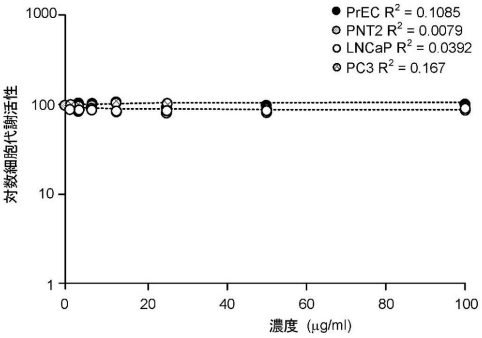
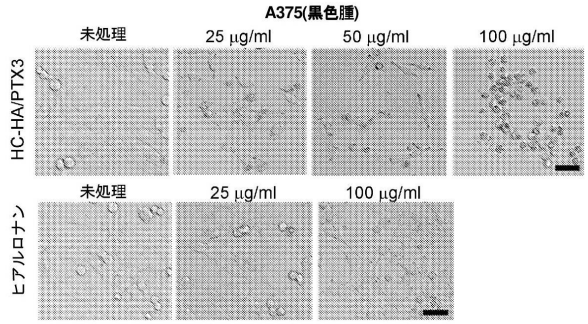
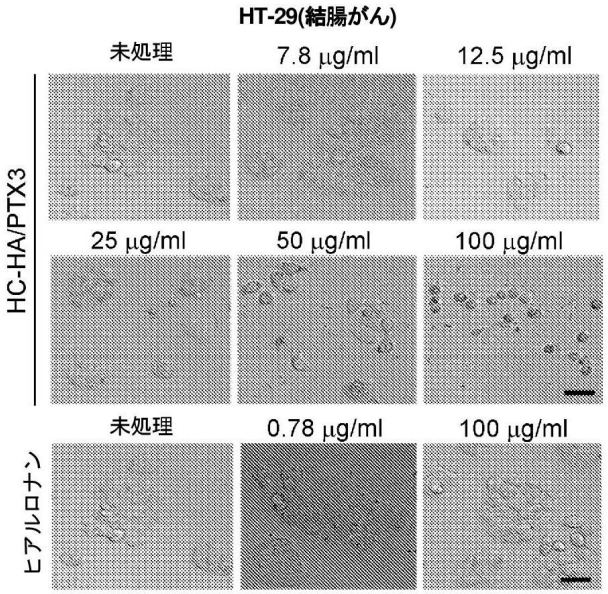


図12B

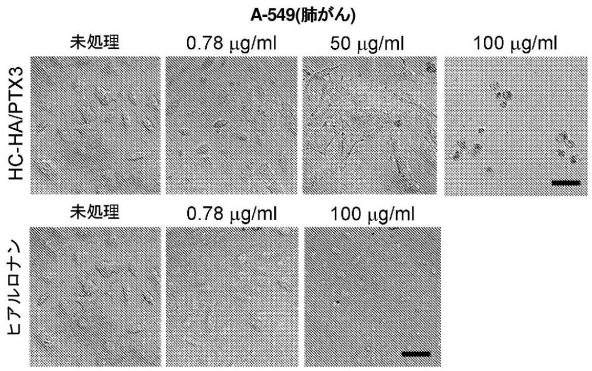
【図１３】



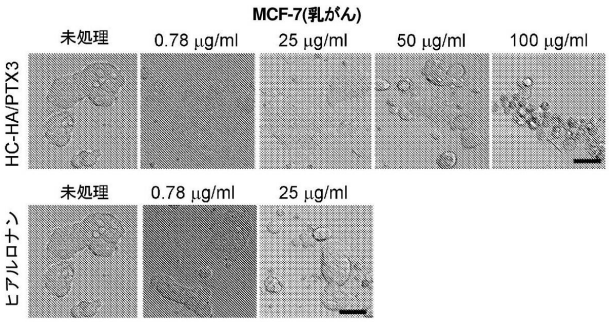
【図１４】



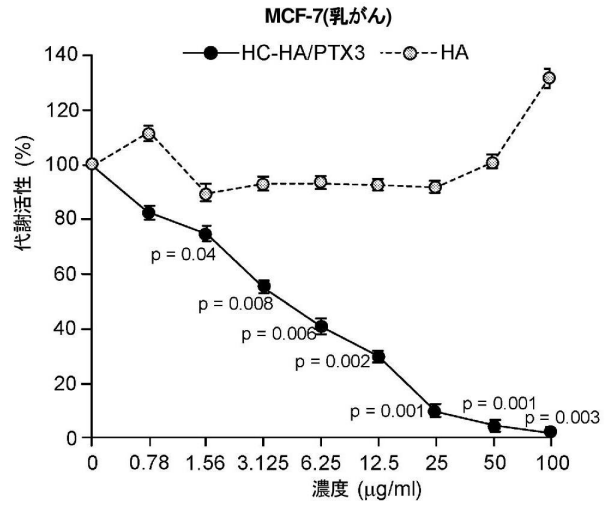
【図１５】



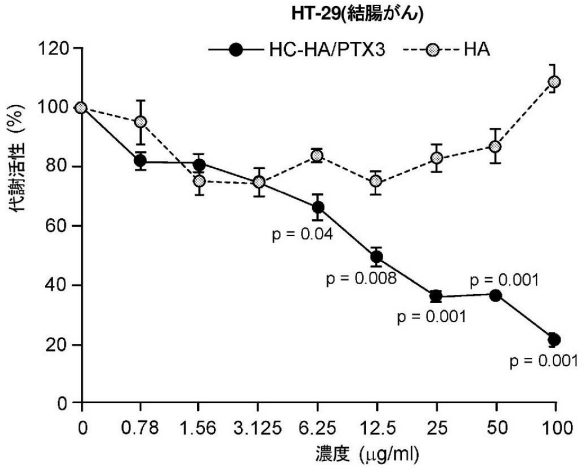
【図１６】



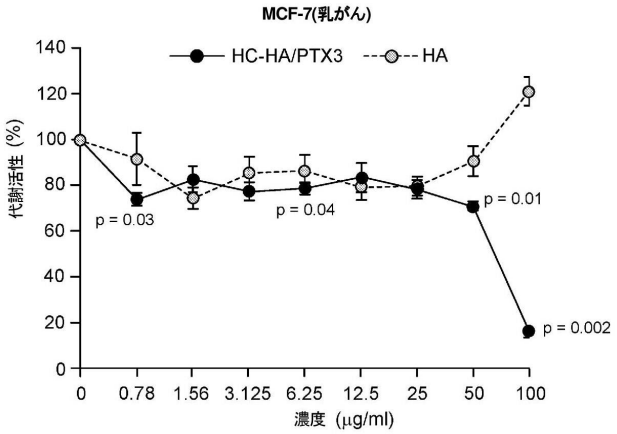
【図１７Ａ】



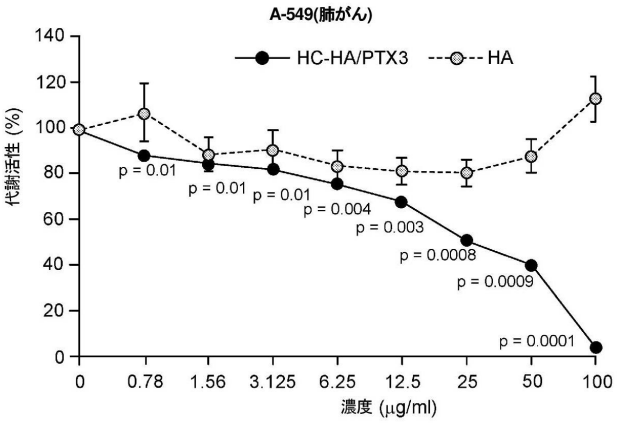
【図１７Ｂ】



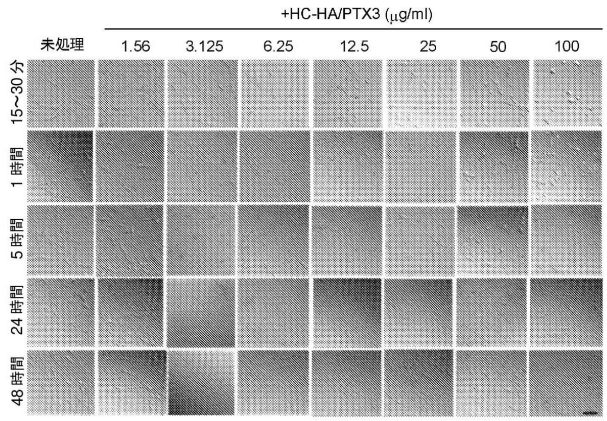
【図１７Ｃ】



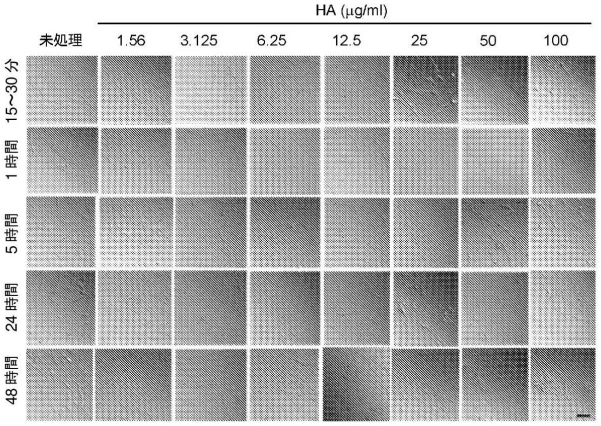
【図１７Ｄ】



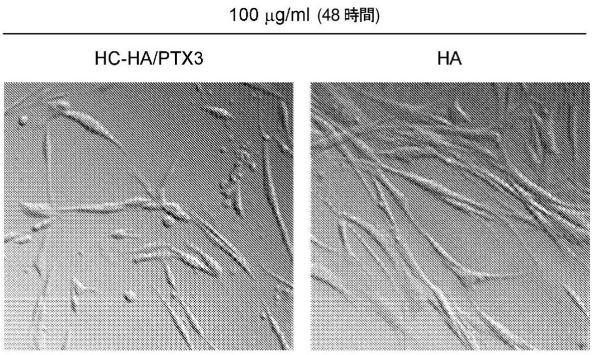
【図１８Ａ】



【図１８Ｂ】



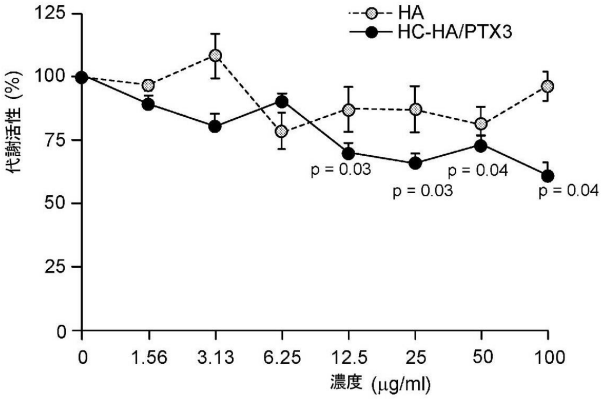
【図１８Ｃ】



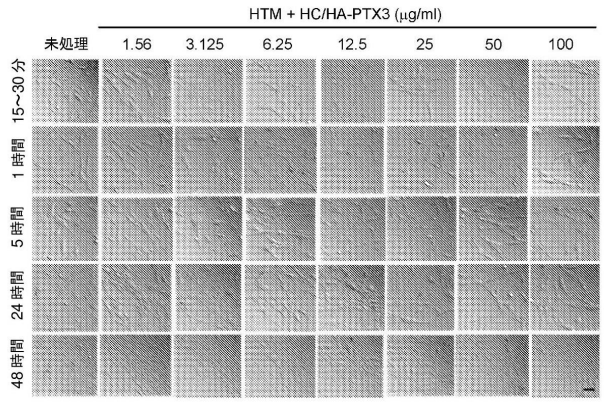
より平らになった。
比較的短い。

より細く、縮み、糸のよう

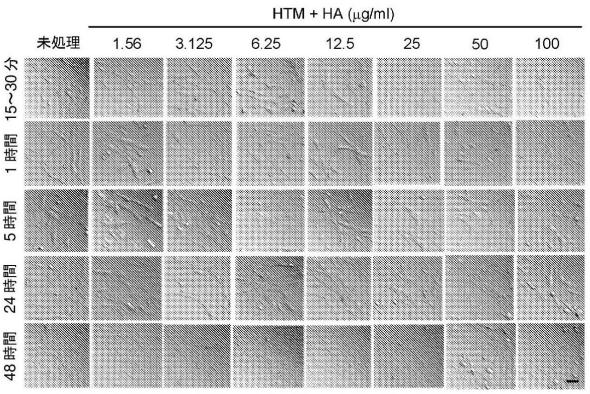
【図１９】



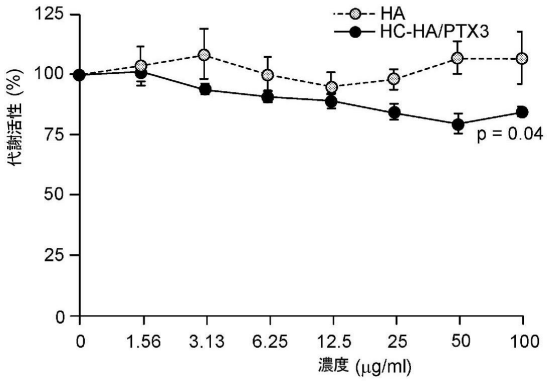
【図２０Ａ】



【図２０Ｂ】



【図２１】



【図２２】

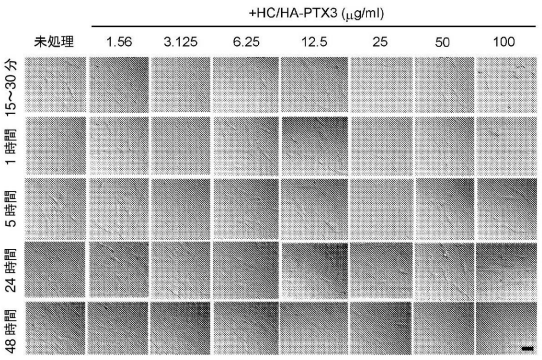


図22A

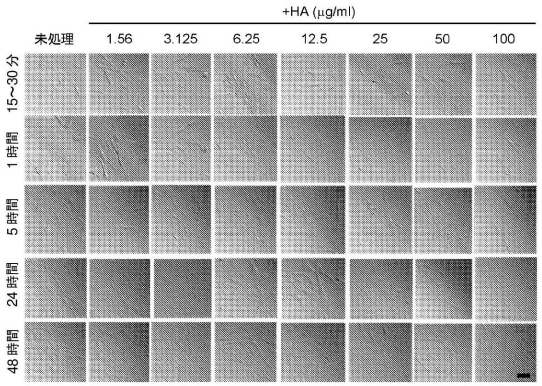
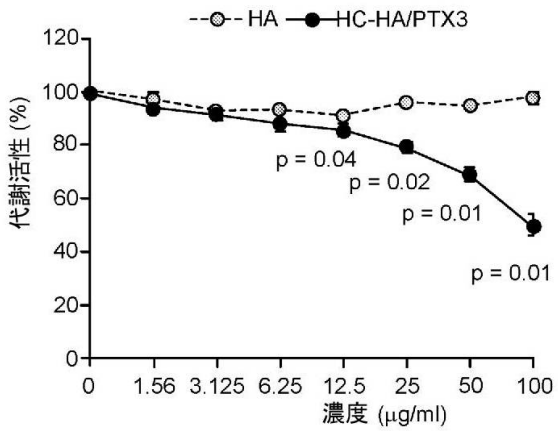


図22B

【図２３】



【図２４】

図24A

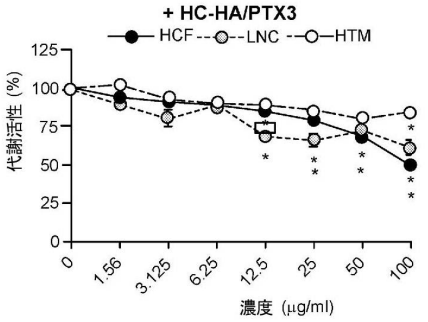
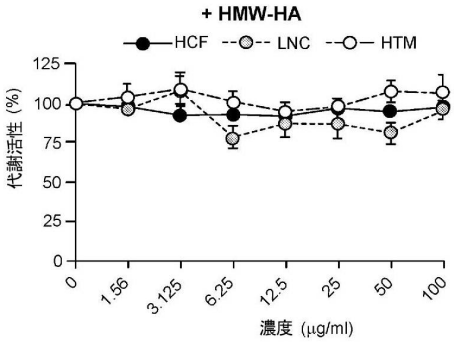
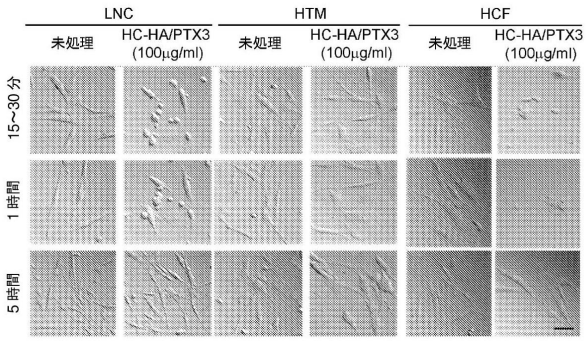


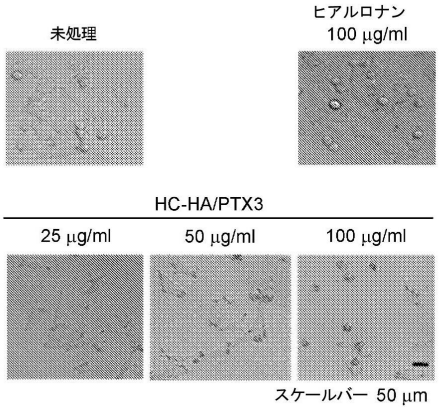
図24B



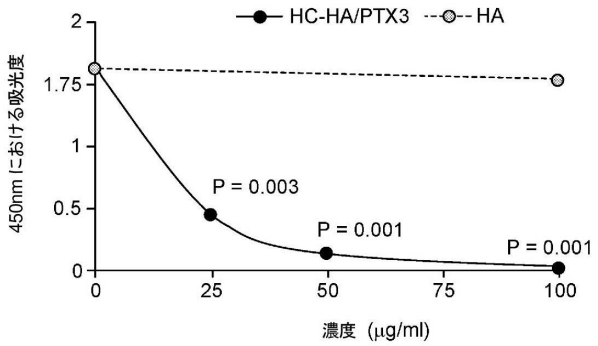
【図２５】



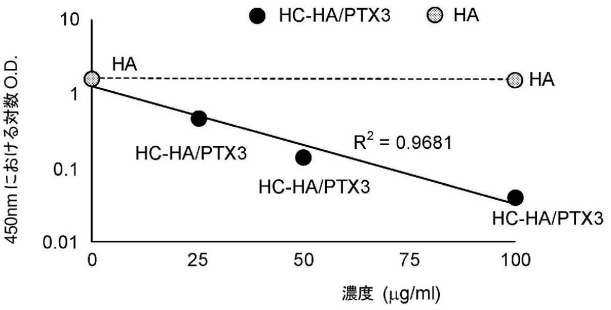
【図２６Ａ】



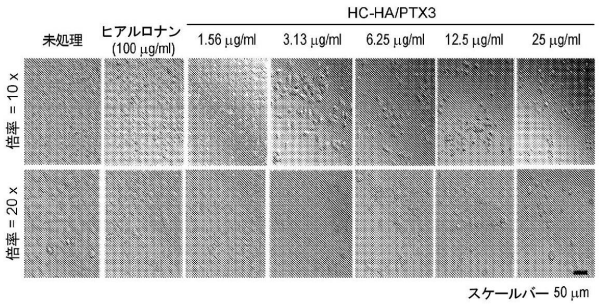
【図２６Ｂ】



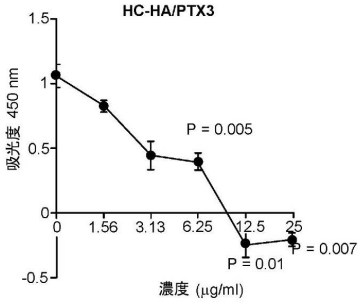
【図２６Ｃ】



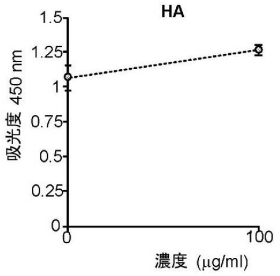
【図２７Ａ】



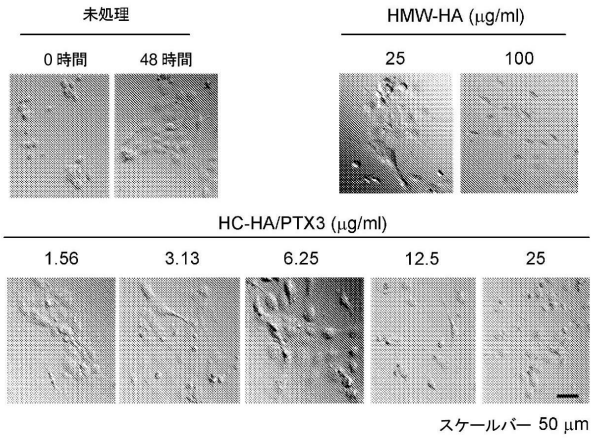
【図２７Ｂ】



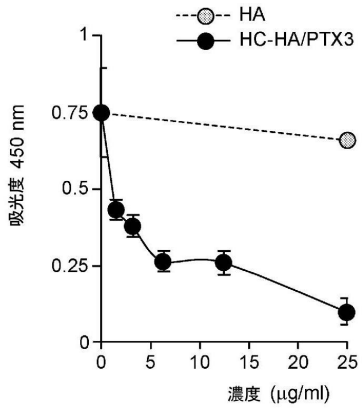
【図２７Ｃ】



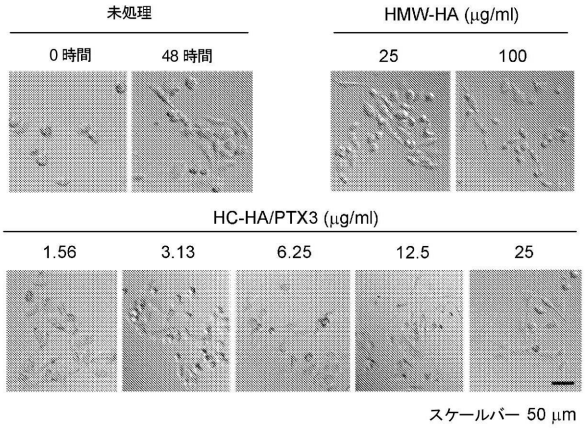
【図２８Ａ】



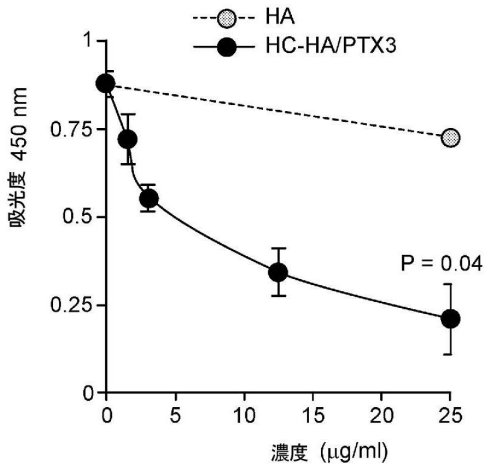
【図２８Ｂ】



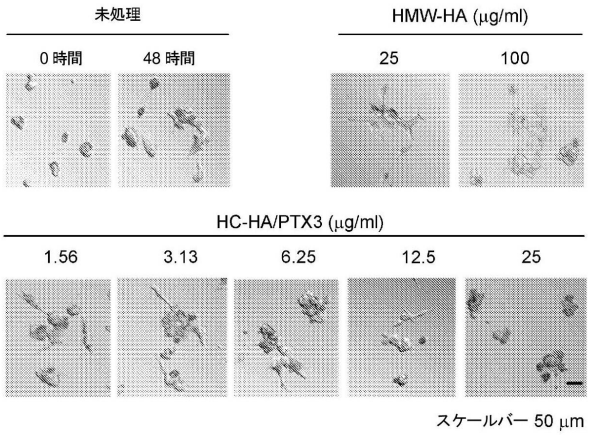
【図２９Ａ】



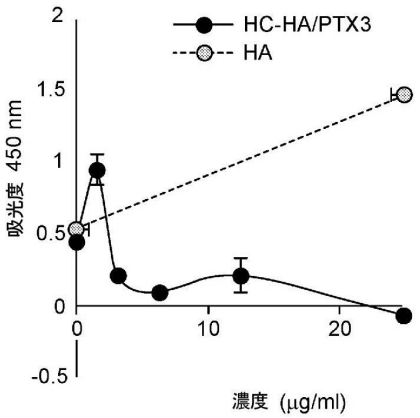
【図２９Ｂ】



【図３０Ａ】



【図３０Ｂ】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/17773

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C07K 14/47, C12N 5/09, A61P 35/00 (2021.01)
CPC - C07K 14/47, C12N 5/09, A61P 35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2019/0169231 A1 (TISSUE TECH, INC.) 06 June 2019 (06.06.2019) abstract; para [0005]-[0006], [0008], [0045]-[0046], [0049], [0057], [0169], [0173], [0335], [0356]-[0357], [0369], [0372], [0379], [0383], [0424], [0463], [0615], [0628], [0630], [0632]-[0633], [0734]; claim 18	1-3, 6-7, 9-10, 12-16, (17-20)/(1-3, 6-7, 9-10, 12-16), 21-29, 34-36, 39-40, 42-43, 45-47, 49, (50-53)/(35-36, 39-40, 42-43, 45-49), 54-64 --- 4-5, 8, 11, (17-20)/(4-5,8,11), 37-38, 41, (50-53)/(37-38,41,43,44,47)
Y	VAN DER SANDEN et al., Glioma Recurrence following Surgery: Peritumoral or Perilesional? Frontiers in Neurology. 31 March 2016, Vol. 7, No. 52, page 1; pg 1, para 2	4-5, (17-20)/(4-5), 37-38, (50-53)/(37-38)
Y	GOUGH et al., Adjuvant therapy with agonistic antibodies to CD134 (OX40) increases local control following surgical or radiation therapy of cancer in mice. Journal of Immunotherapy. October 2010, Vol. 33, No. 8, pages 798-809; abstract; pg 10, para 1	8, (17-20)/(8), 41, (50-53)/(41, 43)
Y	CHEN et al., Influence of Hyaluronic Acid Transitions in Tumor Microenvironment on Glioblastoma Malignancy and Invasive Behavior. Frontiers in Materials. 26 June 2018, Vol. 5, No. 39, pages 1-11; abstract; pg 2, col 2, para 1	11, (17-20)/11, 44, (50-53)/44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 April 2021	MAY 03 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Lee Young Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/17773

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 30-33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

フロントページの続き

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

マイアミ，コーポレート・センター・ドライブ　７３００，スウィート　７００

(72)発明者　へ，フア

アメリカ合衆国フロリダ州３３１２６，マイアミ，コーポレート・センター・ドライブ　７３００，スウィート　７００

(72)発明者　タイ，ショーン

アメリカ合衆国フロリダ州３３１２６，マイアミ，コーポレート・センター・ドライブ　７３００，スウィート　７００

(72)発明者　バス，カウスタフ

アメリカ合衆国フロリダ州３３１２６，マイアミ，コーポレート・センター・ドライブ　７３００，スウィート　７００

Ｆターム（参考）　4C076　BB11 CC41 EE59

4C084　AA02 BA37 BA44 CA29 MA66 NA05 NA14 ZA082 ZB072 ZB112 ZB261 ZB262 ZB352 ZC752

4C087　AA01 AA02 BB58 MA66 NA14 ZB26