

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522029

(P2017-522029A)

(43) 公表日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/077	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	4 C 0 8 7
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-502872 (P2017-502872)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月14日 (2015.7.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年1月31日 (2017.1.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/066083
 (87) 国際公開番号 W02016/008895
 (87) 国際公開日 平成28年1月21日 (2016.1.21)
 (31) 優先権主張番号 14177312.7
 (32) 優先日 平成26年7月16日 (2014.7.16)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507038825
 ヨハン ウォルフガング ゲーテ-ユニベ
 ルジテート フランクフルト アム マイ
 ン
 ドイツ, 6 0 3 2 3 フランクフルト
 アム マイン, テオドール-ヴェー
 -アドルノーブラッツ 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プールした複数の骨髄ドナーの単核細胞からの間葉系間質細胞バンクの生成

(57) 【要約】

本発明は改善された間葉系間質細胞 (MSC) 調製物及びそれを作製する方法に関する。本発明は、複数の非血縁 (第三者) 骨髄ドナーの骨髄単核細胞 (BM-MNC) をプールすることによってMSCをBM-MNCから単離するための新たな戦略を提供する。本発明の方法論に従って製造されたMSC調製物は、個々のドナーのMSC調製物又は複数のドナーから生成された個々のMSCのプールと比較して安定した増殖能及び増大した免疫抑制能を特徴とする。本発明によって調製されたMSCは造血幹細胞移植を受けたレシピエント、自己免疫障害の患者における移植片対宿主病 (GvHD) の治療等の医学的用途に、また再生医療における細胞ベースの療法として特に有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

間葉系間質細胞 (MSC) を単離する *in vitro* 方法であって、少なくとも2人の遺伝学的に異なるドナーから得られた骨髓サンプルをプールして、サンプル細胞プールを得ることと、その後、その後に間葉系間質細胞を前記サンプル細胞プールから単離することを含む、方法。

【請求項 2】

(a) 少なくとも2人の遺伝学的に異なるドナーから得られた多数の骨髓サンプルを準備する工程と、

(b) 前記骨髓サンプルをプールしてサンプル細胞プールを得る工程と、

(c) 任意に前記サンプル細胞プールを培養する工程と、

(d) 工程 (b) において得られた前記サンプル細胞プールから前記間葉系間質細胞を単離する工程と、

を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記骨髓サンプルが哺乳動物骨髓サンプルであり、前記間葉系間質細胞が哺乳動物間葉系間質細胞であり、又は該骨髓サンプルがヒト骨髓サンプルであり、該間葉系間質細胞がヒト間葉系間質細胞である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記骨髓サンプルが骨髓単核細胞サンプルである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記骨髓サンプルが少なくとも3人、又は少なくとも4人、又は少なくとも5人、又は少なくとも6人、又は少なくとも7人、又は少なくとも8人の遺伝学的に異なるドナーから得られたものである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

単離された前記間葉系間質細胞を保管するか、又は単離された該間葉系間質細胞を増加させる工程を更に含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

hTERT陰性かつ多遺伝子性であることを特徴とする、骨髓単核細胞 (BM-MNC) から単離されたMSCを含む間葉系間質細胞 (MSC) 調製物。

30

【請求項 8】

(a) 少なくとも95 %のCD73+細胞、1
及び / 又は、

(b) 少なくとも95 %のCD90+細胞、1
及び / 又は、

(c) 少なくとも95 %のCD105+細胞、1
及び / 又は、

(d) 少なくとも95 %のHLAクラスI+細胞、1
及び / 又は、

(e) 1 %未満のCD45+細胞、
及び / 又は、

(f) 1 %未満のCD14+細胞、
及び / 又は、

(g) 1 %未満のCD34+細胞、
及び / 又は、

(h) 5 %未満のHLA-DR+細胞、

を含む、請求項7に記載のMSC調製物。

40

【請求項 9】

(a)、(b) 及び (c)、及び / 又は (e)、(f) 及び (g) を含む、請求項8に記載のMSC調製物。

50

【請求項10】

請求項1~6のいずれか一項に記載の方法によって得ることができる、請求項7~9のいずれか一項に記載のMSC調製物。

【請求項11】

少なくとも2つの一遺伝子性の遺伝学的に異なる骨髄サンプルをプールした後、該骨髄サンプルに含有される間質細胞画分を単離する及び/又は増加させることによって得ることができる、少なくとも2人の遺伝学的に異なる骨髄ドナーに由来する骨髄サンプルを含む細胞組成物。

【請求項12】

間葉系間質細胞を単離する方法における少なくとも2人の遺伝学的に異なる骨髄ドナーから得られた骨髄単核細胞の混合物又は請求項11に記載の細胞組成物の使用。

10

【請求項13】

薬剤に使用される、請求項7~10のいずれか一項に記載のMSC調製物。

【請求項14】

多発性硬化症、1型糖尿病、関節リウマチ、ブドウ膜炎、自己免疫性甲状腺疾患、炎症性腸疾患（IBD）、強皮症、グレーブス病、狼瘡、クローン病、自己免疫性リンパ増殖性疾患（ALPS）、脱髄疾患、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性胃炎（AIG）、自己免疫性糸球体疾患、移植片対宿主病（GvHD）から選ばれる自己免疫疾患の治療に使用される、請求項7~10のいずれか一項に記載のMSC調製物又は請求項11に記載の細胞組成物。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は改善された間葉系間質細胞（MSC）調製物及びそれを作製する方法に関する。本発明は、複数の非血縁（第三者）骨髄ドナーの骨髄単核細胞（BM-MNC）をプールすることによってMSCをBM-MNCから単離するための新たな戦略を提供する。本発明の方法論に従って製造されたMSC調製物は、個々のドナーのMSC調製物又は複数のドナーから生成された個々のMSCのプールと比較して安定した増殖能及び増大した免疫抑制能を特徴とする。本発明によって調製されたMSCは造血幹細胞移植を受けたレシピエント、自己免疫障害の患者における移植片対宿主病（graft-versus-hostdisease）（GvHD）の治療等の医学的用途に、また再生医療における細胞ベースの療法として特に有用である。

30

【背景技術】

【0002】

間葉系間質細胞（MSC）は1970年代のFriedensteinet al.による発見以来、免疫調節能及び再生能に関してin vitro及びin vivoの両方で広範に調査されている。それらの同定及び予測単離のための独自の細胞表面マーカーがないにもかかわらず、過去10年間でMSCの多面的機能の解明に多大な進展が見られた。種々の製造業者による臨床的に使用されるMSCの効果を比較するために、国際細胞治療学会（International Society for Cellular Therapy）はMSCを規定するための一連の表現型基準及び機能基準を提案している。MSCの表面上でのHLAクラスII抗原及び共刺激分子の非存在、免疫調節能を有する無数の分子のパラクリン分泌、並びに多くの組織からの予測単離の容易さから、MSCは組織損傷、炎症プロセス及び自己免疫障害等の広範な臨床状態における細胞ベースの治療的戦略の非常に魅力的な供給源となっている。しかしながら、これら全ての臨床用途について適時に多数の「既製の」MSCが存在する必要がある。

40

【0003】

これまで、臨床研究の大半は単一骨髄ドナーから生成された間葉系間質細胞（MSC）を用いて行われていた。MSC調製物の効果はドナー間で著しく異なるため、これらの研究から得られた結果はかなりの程度まで非常に不均一であった。加えて、本発明者ら及び他の研究者らによりMSCがドナー間だけでなく、集団間でも大きな不均一性をクローンレベルで示すことが実証された。この顕著な不均一性は、同等の治療効力を有するMSC生成物を再現性よく生成するために用いることができる臨床製造プロトコルの開発において大きな

50

障害となる。

【0004】

骨髄サンプルからのヒト間葉系間質細胞の単離プロセスが特許文献1に記載されている。間葉系間質細胞に結合する抗体が、MSCを骨髄穿刺液又は粉碎骨材料から精製するために開発された。骨髄サンプルをFicoll勾配によって分離し、低密度画分を幹細胞単離に使用する。特許文献1では、組織培養プラスチック上の通常培地中で1日細胞を培養し、幹細胞を接着させた。その後培地を交換し、コンフルエントになるまで培地を4日毎に交換しながら細胞を培養し、MSCを得る。

【0005】

特許文献2は単一ドナーからの骨髄由来MSCの単離を開示している。特許文献2は、単一ドナーに由来するMSC調製物を臨床スケール調製物まで増加させることができることを教示している。

10

【0006】

MSC調製物を非血縁骨髄ドナー又は骨サンプルの個々の骨髄単核細胞画分から生成した後、プールすることで、同種異系造血幹細胞移植を受けた骨髄線維症の患者において致死的出血の治療が可能であることが知られている（非特許文献1）。この研究では、2人の異なるドナーに由来する臨床グレードMSC調製物を別個に組み合わせることで、応答の可能性が増大した。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0007】

【特許文献1】米国特許第5,486,359号

【特許文献2】国際公開第2012/048093号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】O Ringden and K LeBlanc, Bone Marrow Transplantation, 2011; 46:1158-1160

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

30

上記の従来技術に鑑みると、予測可能な増殖能及び免疫抑制能、並びに最小のバッチ間変動を有する臨床グレードMSC調製物を調製することが臨床的に引き続き必要とされる。したがって、本発明が解決しようとする課題は、改善された特徴を有する骨髄サンプルからのMSCの作製/単離のためのプロセスを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記の課題は第1の態様では、hTERT陰性かつ多遺伝子性であることを特徴とする、骨髄単核細胞（BM-MNC）から単離されたMSCを含む間葉系間質細胞（MSC）調製物によって解決される。好ましい実施の形態では、上記MSCは哺乳動物、好ましくはヒトMSCである。

【0011】

40

「一遺伝子性」という用語は、細胞のサンプル又は組成物を記載する状況で使用される場合、共通の供給源に由来する又は同じ遺伝的背景を有する細胞を指す。一方、「多遺伝子性」という用語は異なる供給源に由来し、異なる遺伝的背景を有する細胞の組成物を指す。本発明において、「多遺伝子性MSC調製物」は異なる遺伝的背景を有するMSC、例えば少なくとも2人の遺伝学的に異なる骨髄ドナーに由来するMSCを含む組成物である。

【0012】

本明細書に記載の発明において、「間葉系間質細胞」及び「間葉系幹細胞」という用語は、骨髄サンプルから単離された同じ多能性細胞画分の同義の記載と理解されるものとする。

【0013】

50

それらの同種抑制能に関してドナー間変動を最小限に抑えるために、本発明者らは、プールした8人の第三者健常ドナーの骨髄単核細胞 (BM-MNC) からGMPに準拠した無血清MSC-マスターセルバンクを確立する以下の独自の三段階技法を開発した：(i) 地方倫理委員会及びヘルシンキ宣言によって下された承認に完全に一致した、8人の第三者健常ドナーからの個々のBM-MNCの混合多遺伝子 (polygenic) の単離及び凍結保存、(ii) 融解後のプールしたBM-MNCからのMSCの生成及びバイアルにおける凍結保存、並びに(iii) それらの無血清増加及び「既製」臨床スケール用量の生成のためのMSCサンプルの融解。このように、本発明者らは、個々の骨髄ドナーから生成されたMSCと比較して一貫して高い同種抑制能及び一定の増殖能を有する臨床グレードMSC調製物の生成のための驚くほど効果的なプロトコルを開発した。したがって、このプロトコルは臨床研究者に移植片対宿主病及び他の炎症性障害の治療のための一貫した品質の臨床グレードMSCをもたらす。相当な初期費用にもかかわらず、このプロトコルは臨床グレードMSCの免疫抑制性能における一貫性、再現性及び信頼性を確実にする。

10

【0014】

また別の実施の形態は、上記MSCがTERT陰性であることを更に特徴とする本発明のMSC調製物に関する。TERTは酵素テロメラーゼの触媒サブユニットであるテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT、又はヒトではhTERTと略される) であり、テロメラーゼRNAコンポーネント (TERC) とともに不死化細胞の増殖能の維持に必要とされるテロメラーゼ複合体の最も重要な単位を構成する。本発明のMSC調製物は、hTERT発現の欠如と一致して不死でないMSCを含むことが示される。

20

【0015】

本発明の付加的な好ましい一実施の形態は、

(a) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のCD73+細胞、及び/又は、

(b) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のCD90+細胞、及び/又は、

(c) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のCD105+細胞、及び/又は、

(d) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のHLAクラスI+細胞、及び/又は、

30

(e) 10%未満、好ましくは1%未満、最も好ましくは0.1%未満のCD45+細胞、及び/又は、

(f) 10%未満、好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満のCD14+細胞、及び/又は、

(g) 10%未満、好ましくは1%未満、最も好ましくは0.5%未満のCD34+細胞、及び/又は、

(h) 10%未満、好ましくは5%未満、最も好ましくは1%未満のHLA-DR+細胞、を含む、本明細書に記載されるMSC調製物である。

【0016】

付加的な一実施の形態では、MSC調製物は、

40

(a) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のCD73+細胞、及び、

(b) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のCD90+細胞、及び、

(c) 少なくとも80%、好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%のCD105+細胞、を含む。

【0017】

付加的に、本発明のMSC調製物は、

(e) 10%未満、好ましくは1%未満、最も好ましくは0.1%未満のCD45+細胞、及び、

50

(f) 10 %未満、好ましくは1 %未満、最も好ましくは0.5 %未満のCD14+細胞、及び、
 (g) 10 %未満、好ましくは1 %未満、最も好ましくは0.5 %未満のCD34+細胞、
 を含み得る。

【0018】

本発明の課題は、少なくとも2人の遺伝学的に異なるドナーから得られた骨髄サンプルをプールして、サンプル細胞プールを得ることと、その後、間葉系間質細胞を上記サンプル細胞プールから単離することを含む、間葉系間質細胞を単離するin vitro方法によって更に解決される。

【0019】

本発明に従うMSCを骨髄サンプルから調製又は単離するプロセスは、遺伝学的に異なるドナーからの骨髄又は骨髄に由来する単核細胞画分をプールする工程を伴う。したがって、本発明の方法では少なくとも2つの遺伝学的に異なる骨髄サンプル又は遺伝学的に異なるBM-MNC画分をプールする。重要なことには、本発明の方法はBMサンプルが依然として異なる細胞型の混合物を含有する段階で遺伝学的に異なるBMサンプルをプールすることを含む。したがって、遺伝学的に異なるBM-MNCサンプルをプールした後、MSC画分を該サンプルから精製又は増加させるのが好ましい。MSCの単離の前に細胞をプールすることで、驚くほど改善された同種抑制能を有するMSC調製物がもたらされる。

【0020】

一実施の形態では、本発明による方法は、

(a) 少なくとも2人の遺伝学的に異なるドナーから得られた多数の骨髄サンプルを準備する工程と、
 (b) 上記骨髄サンプルをプールしてサンプル細胞プールを得る工程と、
 (c) 任意に、上記サンプル細胞プールを培養する工程と、
 (d) 工程(b)において得られた上記サンプル細胞プールから上記間葉系間質細胞を単離する工程と、
 を含む。

【0021】

好ましい一実施の形態では、方法は少なくとも2人の遺伝学的に異なるドナーから得られた多数の骨髄サンプルを準備する工程と、単核細胞画分を骨髄サンプルから単離する工程と、該骨髄単核細胞サンプルをプールしてBM-MNCプールを得る工程と、任意に該BM-MNCプールを培養する工程と、該BM-MNCプールから上記間葉系間質細胞を単離する工程とを含む。当然ながら、本明細書で上記及び下記に説明される本発明の方法の全ての付加的な特別な変形形態は、BM-MNCを骨髄サンプルから単離する工程を含むこの方法論の等しく好ましい実施の形態である。

【0022】

本発明における「サンプル細胞プール」という用語は、異なる遺伝的背景を有する骨髄由来細胞の混合物を指すものとする。したがって、本発明のサンプル細胞プールは多遺伝子性である。最も好ましくは、本発明に従うサンプル細胞プールはMSCが好ましくは80 %、好ましくは70%、60 %、50 %、40 %、30 %、20 %未満、最も好ましくは10 %未満、更により好ましくは5 %未満、1 %未満、最も好ましくは0.1 %未満の低パーセンテージまでしか存在しないことを特徴とする。

【0023】

本明細書で使用される「遺伝学的に異なる」という用語は、骨髄ドナー/被験体間にゲノムレベルで少なくとも1つの差異が存在することを示す。骨髄は2人、3人、4人、5人、6人、7人、8人、9人、10人、11人、12人、13人、14人、15人、16人、17人、18人、19人、20人、25人、30人、35人、40人、45人、50人、55人、60人、65人、70人、75人、80人、85人、90人、95人、100人又はより多くのドナーから採取することができる。4つ~8つの異なるドナーサンプルの使用が最も好ましい。

【0024】

本発明に従う「骨髄サンプル」は骨髄穿刺液又は海綿状骨片等の骨片であり得る。好ま

10

20

30

40

50

しい実施の形態では、骨髄サンプルは骨髄穿刺液である。骨髄サンプルを採取する方法は当業者に既知である。上記の本発明の骨髄サンプルは、好ましい一実施の形態において異なる細胞型の混合物を含む。例えば上記骨髄サンプルは各々、少なくとも1つの非接着性細胞画分及び少なくとも1つの接着性細胞画分を含む。特定の好ましい一実施の形態では、上記骨髄サンプルは骨髄単核細胞（BM-MNC）サンプル又は画分である。BM-MNCは骨髄から得られる。

【0025】

本発明における「骨髄単核細胞画分」（本明細書で「BM-MNC」とも称される）は、Bリンパ球、Tリンパ球及びNKリンパ球、初期骨髄性細胞、並びに非常に少数の内皮前駆細胞、造血幹/前駆細胞及び/又は間葉系間質細胞を含有する。

10

【0026】

本発明の好ましい実施の形態では、上記骨髄サンプルは哺乳動物骨髄サンプルであり、上記間葉系間質細胞は哺乳動物間葉系間質細胞である。該骨髄サンプルがヒト骨髄サンプルであり、該間葉系間質細胞がヒト間葉系間質細胞であるのがより好ましい。

【0027】

本発明のまた別の実施の形態は、方法が骨髄単核細胞（BM-MNC）を上記骨髄サンプルの各々から抽出してBM-MNCサンプルを得る工程（a'）を更に含み、工程（b）において該BM-MNCサンプルをプールして上記サンプル細胞プールを得る、MSCを単離する前述のプロセスに関する。上述のように、BM-MNC画分/サンプルはごく少数のMSCを含有する。したがって、本発明の好ましい一実施の形態では、プールされる上記BM-MNCサンプルは該サンプル中の全細胞当たりの間葉系間質細胞のパーセンテージが80%、好ましくは70%、60%、50%、40%、30%、20%未満、最も好ましくは10%未満、更により好ましくは5%未満、1%未満、最も好ましくは0.1%未満である。

20

【0028】

本明細書に記載の発明において、その実施の形態及び態様の全てで上記骨髄サンプル（又はBM-MNCサンプル）が少なくとも3人、より好ましくは少なくとも4人、より好ましくは少なくとも5人、より好ましくは少なくとも6人、より好ましくは少なくとも7人、最も好ましくは少なくとも8人の遺伝学的に異なるドナーから得られたものであるのが特に好ましい。言い換えると、MSC細胞調製物及びその作製方法は、特に好ましい一実施の形態において少なくとも3つ、より好ましくは少なくとも4つ、より好ましくは少なくとも5つ、より好ましくは少なくとも6つ、より好ましくは少なくとも7つ、最も好ましくは少なくとも8つの遺伝学的に異なる細胞サンプルをプールすることを含む。

30

【0029】

BM-MNCを骨髄サンプル、特に骨髄穿刺液から単離する方法は当業者に既知である。しかしながら、本発明の一実施の形態では、BM-MNCが骨髄サンプルからFicoll勾配等の細胞密度分離を用いて単離されたものであるのが好ましい。

【0030】

プールした後、得られる本発明のサンプル細胞プールを用いてMSCを単離及び精製する。MSCを骨髄サンプル又はBM-MNCから単離する方法も当該技術分野で既知である。好ましい本発明の方法は、培養容器から細胞培養培地を一定の間隔で吸引することで浮遊細胞を単純に除去することによる非接着性細胞と接着性細胞との分離である。培地を複数回交換することにより、非接着性細胞の画分が一貫して低減する一方で、接着性MSC画分はコンフルエントになるまで成長し続ける。これらの接着性細胞はMSCである。

40

【0031】

このため、一実施の形態では、本発明の方法の工程（d）が非接着性細胞を上記サンプル細胞プールの培養物から少なくとも1回除去する工程を含むか、又は該サンプル細胞プールを培養した後、少なくとも1つの検出可能な表面マーカー若しくは抗体を用いて上記MSCを精製するのが好ましい。

【0032】

付加的に、本発明の方法は上記単離間葉系間質細胞を保管するか、又は該単離間葉系間

50

質細胞を増加させる更なる工程を提供し得る。

【0033】

付加的な一態様では、本発明は臨床グレードMSC調製物を作製する方法を含む。この方法はMSCを単離する上述の方法工程を含むが、臨床的に適用可能なMSCの量を得るまでの単離MSCの増加を更に含む。本発明のMSCの増加はMSCを単離した直後に続いて行われるか、又は代替的には単離MSCを凍結保存によって保管し、細胞のアリコートを融解することで増加プロセスを開始する。MSCを増加させる方法は当該技術分野で既知であり、本願の実施例の項に例として説明される。

【0034】

本発明の別の態様は、少なくとも2人の遺伝学的に異なる骨髄ドナーに由来する骨髄サンプルを含む細胞組成物に関する。代替的には、本発明の細胞組成物は少なくとも2人の遺伝学的に異なる骨髄ドナーに由来するBM-MNCを含み得る。したがって、本発明の細胞組成物は好ましくは多遺伝子性である。

10

【0035】

一実施の形態では、本発明の細胞組成物は少なくとも2つの一遺伝子性及び遺伝学的に異なる骨髄サンプルをプールした後、該骨髄サンプル中に含有される幹細胞画分を単離する及び/又は増加させることによって得ることができる。その結果、プールすることにより細胞組成物が多遺伝子性となる。

【0036】

好ましい一実施の形態では、上記骨髄サンプルは骨髄単核細胞サンプルである。

20

【0037】

この態様の一実施の形態は、

(a) 各自が遺伝学的に異なる骨髄ドナーに由来する少なくとも2つの骨髄サンプルを得る工程と、

(b) 上記骨髄サンプルの各々から骨髄単核細胞画分を単離して、一遺伝子性骨髄単核細胞サンプルを得る工程と、

(c) 各々の骨髄サンプルから得られた上記一遺伝子性骨髄単核細胞サンプルをプールして、多遺伝子性細胞組成物を得る工程と、

を含む方法によって得ることができる本発明の細胞組成物に関する。

【0038】

本発明における「骨髄単核細胞画分」は骨髄に由来するこの細胞画分について知られる標準細胞組成物を含むことが理解される。この点で、上記一遺伝子性単核細胞サンプルをプールした後、細胞を精製する又は増加させる更なる工程を行い、好ましくは任意のMSCをそれから単離又は精製することが好ましい。

30

【0039】

本発明のまた別の態様は、間葉系間質細胞を単離する方法における少なくとも2人の遺伝学的に異なる骨髄ドナーから得られた骨髄単核細胞の混合物の使用を提供する。

【0040】

間葉系間質細胞を精製/単離する方法における本明細書で先に記載した細胞組成物の使用の態様が更に提供される。

40

【0041】

本発明の課題は、本明細書で上記に説明したMSCを単離/精製する方法によって得ることができる間葉系間質細胞によっても解決される。

【0042】

本明細書に記載のMSC調製物又はMSCは薬剤に使用されるのが好ましい。MSCは概して広範な医学的用途に使用される。以下の例に限定されることを意図するものではないが、本発明のMSCは好ましくは多発性硬化症、1型糖尿病、関節リウマチ、ブドウ膜炎、自己免疫性甲状腺疾患、炎症性腸疾患（IBD）、強皮症、グレーブス病、狼瘡、クローン病、自己免疫性リンパ増殖性疾患（ALPS）、脱髄疾患、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性胃炎（AIG）及び自己免疫性糸球体疾患等の自己免疫疾患の治療に使用される。特に、本発明のMSC

50

調製物は移植片対宿主病（GVHD）の治療に使用される。

【0043】

しかしながら、本明細書に記載の発明において、MSC調製物は好ましくは一過性、再発性又は寛解型の任意の再生疾患又は自己免疫疾患に有用である。本発明のMSC調製物の他の臨床用途は創傷治癒、角膜潰瘍、脳卒中、又は同種異系幹細胞移植における生着の促進である。

【0044】

MSC投与を伴う細胞療法は例えば、MSCを含有する組織（骨髄）を摘出する工程、MSCを本明細書に記載の方法に従って単離し、増加させる工程、及び生化学的操作又は遺伝子操作を行って又は行わずにMSCを被験体／患者に投与する工程に基づく。

10

【0045】

一態様では、本発明は本発明に従って作製された治療量のMSC調製物を投与する工程を含む、それを必要とする被験体を治療する方法を提供する。

【0046】

自己免疫疾患又は移植片対宿主病についての治療量は、約 1×10^5 細胞/kg～約 1×10^7 細胞/kgを含有し得る。別の実施の形態では、治療量は約 1×10^6 細胞/kg～約 5×10^6 細胞/kgである。別の実施の形態では、治療量は約 2×10^6 細胞/kg～約 8×10^6 細胞/kgである。別の実施の形態では、治療量は約 2×10^6 細胞/kg、又は約 $2 \times 10^6 \pm$ 約10%、約20%若しくは約30%細胞/kgである。別の実施の形態では、治療量は約 8×10^6 細胞/kg又は約 $8 \times 10^6 \pm$ 約10%、約20%若しくは約30%細胞/kgであり、その間の任意の量又は範囲を含む。本発明のMSC調製物を考えると、投与される間葉系間質細胞の数は患者の年齢、体重及び性別、治療される疾患、並びにその程度及び重症度を含む様々な要因によって決まる。

20

【0047】

本発明のMSCは様々な手順によって投与することができる。MSCは静脈内投与、動脈内投与又は腹腔内投与等によって全身的に投与することができる。間葉系間質細胞は、それを必要とする器官又は組織への直接注射によって投与することができる。間葉系間質細胞は局所的に適用することができる。間葉系間質細胞は、外科的処置中にそれを必要とする組織に直接適用することができる。

【0048】

本発明に従う間葉系間質細胞は、血管新生によって緩和、治療又は予防され得る任意の疾患又は障害の治療、緩和又は予防に用いることができる。このため、例えば間葉系間質細胞は四肢、すなわち腕、脚、手及び足、並びに頸部又は様々な器官に見られるものを含む動脈塞栓を治療するために動物に投与することができる。例えば、間葉系間質細胞を用いて脳に血液を供給する動脈の塞栓を治療することができ、それにより脳卒中を治療又は予防する。また、間葉系間質細胞を胎児及び生後角膜における血管の治療に使用することができ、糸球体構造化をもたらすために使用することができる。別の実施の形態では、間葉系間質細胞は内部及び外部の両方の創傷の治療、並びに糖尿病及び鎌状赤血球貧血等の疾患に起因する皮膚潰瘍を含むが、これらに限定されない足、手、脚又は腕に見られる皮膚潰瘍の治療に用いることができる。

30

【0049】

さらに、血管新生は胚着床及び胎盤形成に関与するため、間葉系間質細胞を用いて胚着床を促進し、流産を予防することができる。

40

【0050】

加えて、間葉系間質細胞を、ヒトを含む胎児被験体に投与して、胎児被験体における血管系の発生を促進することができる。

【0051】

別の実施の形態では、軟骨吸収及び骨形成を促進し、正確な成長板形態形成を促進するために、間葉系間質細胞を出生児又は胎児の被験体に投与することができる。

【0052】

間葉系間質細胞は、治療剤をコードする1つ又は複数のポリヌクレオチドを用いて遺伝

50

子操作することができる。ポリヌクレオチドは、適切な発現ビヒクルによって間葉系間質細胞に送達することができる。間葉系間質細胞を遺伝子操作するために用いることができる発現ビヒクルとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター及びアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。本発明のMSCは例えば、TERTを過剰発現することにより細胞を不死化するように遺伝子操作することができる。

【0053】

また、本発明のMSC調製物又は間葉系間質細胞は幹細胞移植に使用することができる。

【0054】

骨置換材料の作製における本発明のMSC調製物又はMSCの使用が更に提供される。

【0055】

本発明の別の態様は、MSCの単離/精製のための本明細書に記載の方法のいずれかによる方法工程を含む、間葉系間質細胞を含む薬剤を作製する方法である。

【0056】

別の実施の形態では、本発明のMSC又は本発明の方法を用いて作製されるMSCは、例えばそれぞれ骨形成、脂肪生成及び軟骨形成誘導培地等の適切な誘導培地で培養されるそれぞれの細胞分化誘導条件等の適切な培養条件下で骨芽細胞、脂肪細胞及び/又は軟骨細胞に分化することができる。一実施の形態では、適切な培養条件及び適切な誘導培地は実施例に指定されるものである。別の実施の形態では、好適な条件及び培地の例はAubin J E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* (1999) 72(3):396-410 (骨形成)、Falconi D, Oizumi K, Aubin J E. Leukemia inhibitory factor influences the fate choice of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells.* (2007)25(2):305-312 (脂肪生成)、及びZhang S, Uchida S, Inoue T, Chan M, Mockler E, Aubin J E. Side population (SP) cells isolated from fetal rat calvaria are enriched for bone, cartilage, adipose tissue and neural progenitors. *Bone.* (2006) 38(5):662-670 (軟骨形成)に開示されている。

【0057】

本発明の一態様では、本発明は培養培地及びその使用説明書の1つ又は複数を含む、本発明の方法を実行するためのキットを提供する。別の実施の形態では、本発明は本発明の単離間葉系間質細胞のサンプルと、任意に培養培地、及び/又は実験及び/又は移植における使用説明書とを含むキットを提供し得る。

【0058】

本明細書に記載される間葉系間質細胞(MSC)調製物は、多遺伝子性であり、以下の特徴の少なくとも1つを有する骨髄単核細胞(BM-MNC)から単離されたMSCを含むことを更に特徴とする：

(a) 一遺伝子性MSC(単一ドナーから生成された)におけるp21発現と比較して増大したp21発現、

(b) 一遺伝子性MSC(単一ドナーから生成された)におけるp53発現と比較して減少したp53発現、及び/又は、

(c) 一遺伝子性MSC(単一ドナーから生成された)におけるc-myc発現と比較して減少したc-myc発現。

【0059】

これらの特徴は、記載の本発明のMSC調製物と現行の技術水準の調製物とを区別する代替的又は付加的な構造的な特徴として用いられ得る。一実施の形態では、本発明のMSC調製物は、一遺伝子性MSC(単一ドナーから生成された)におけるp21発現と比較して増大したp21発現を有するMSCを含む。本発明のMSCは、一遺伝子性MSC(単一ドナーから生成された)におけるp53発現と比較して減少したp53発現を更に又は代替的に特徴とし得る。

【0060】

本発明は一実施の形態において、上記MSCが一遺伝子性MSC(単一ドナーから生成された)におけるc-myc発現と比較して減少したc-myc発現を更に又は代替的に特徴とするMSC調

10

20

30

40

50

製物に関する。

【0061】

特定の実施の形態では、上記のp21発現の増大は少なくとも2倍、好ましくは少なくとも3倍、より好ましくは少なくとも4倍であり、及び/又は上記のp53発現の減少は少なくとも10倍、好ましくは少なくとも20倍であり、及び/又は上記のc-myc発現の減少は少なくとも10倍、好ましくは少なくとも20倍、最も好ましくは検出不可である。

【0062】

本発明の好ましいMSC調製物は上述の特徴(a)~(c)の全てを有するMSCを含む。本発明の単離MSCは染色体5と染色体9との間に染色体転座を有する少なくとも1つのヒトMSCを含み、これは本発明のMSCの付加的な特性として用いられ得る。MSCは(a)及び(b)、(a)及び(c)、又は(b)及び(c)を特徴とするのが好ましい。最も好ましくは、上記MSCは(a)、(b)及び(c)を特徴とする。上記のp21、p53、c-myc及び/又はhTERTの発現の差異が本発明のMSCと単一ドナーから生成された一遺伝子性MSCとの間にあるMSC調製物も好ましい。

10

【0063】

ここで、本発明を添付の図面及び配列を参照して以下の実施例に更に説明するが、本発明はそれらに限定されない。本発明の目的上、本明細書で引用される全ての参考文献はその全体が引用することにより本明細書の一部をなす。

【図面の簡単な説明】

【0064】

【図1】骨髄の採取及び骨髄単核細胞の分離を示す図である。A) 骨髄を腸骨稜からの両側穿刺(bilateral aspiration)により全身麻酔下の8人の健常第三者ドナーから採取した。B) 骨髄サンプルをバッグに採取し、骨髄穿刺液1 ml当たり7%~12%のACD-A及び7 i.U.~12 i.U.のヘパリンで抗凝固処理した。C) 骨髄単核細胞を、Sepax II NeatCellプロセス(Biosafe, Switzerland)を用いたFicoll(GE Healthcare, Munich, Germany)密度遠心分離によって骨髄穿刺液から富化した(enriched)。D) BM-MNCを2回洗浄し、10%DMSO/5%HSA/X-vivoからなる凍結用培地に再懸濁した。E) 凍結用培地中の各骨髄ドナーからのBM-MNCを含有するバッグを、使用するまで液体窒素の気相中で凍結した。

20

【図2】骨髄単核細胞からのMSCバンクの生成を示す図である。A) 各ドナーの骨髄単核細胞を含有するバッグを+37で融解し、培地で2回洗浄した後、5%血小板溶解物を添加した一定容量のDMEMにプールした。全ての細胞を1枚の1-CellStackプレート及び11枚の2-CellStackプレートにプレーティングした。B) 72時間後に非接着性画分を除去し、接着性細胞を5%PLを添加したDMEM中で更に11日間、3日毎に培地を取り換えて更に培養した。MSCが出現し、80%コンフルエンスまで成長した後、トリプシン(TrypLE)を用いてMSCを剥離し、培地で洗浄した後に細胞ペレットを10%DMSO/5%HSA/DMEMからなる凍結用培地に再懸濁した。C) MSCを、各々が 1.5×10^6 の継代P1のMSCを含有する210本の凍結用バイアル内で凍結した。MSCの入ったこの一連のバイアルをMSCバンクと指定した。

30

【図3】MSC臨床最終生成物の生成を示す図である。A) MSCの入った3本の無作為に選ばれた凍結保存バイアルを、初期凍結保存の6週間~8週間後に融解した。B) これらを1枚の1-CellStack(636 cm²)にプレーティングし、10%血小板溶解物を含有するDMEM中で6日間~7日間培養した。培地を3日毎に取り換えた。C) (それらのコンフルエント成長に応じて)6日目又は7日目にMSC(P1の終了時)をトリプシンによって剥離させ、洗浄し、8枚の2-CellStackに 2×10^3 MSC/1 cm²の細胞濃度でプレーティングし、更に1週間増加させた。培地を3、4日毎に取り換え、週末(P2の終了時)にMSCをトリプシンによって剥離させ、2回洗浄し、細胞数を計数した。これらのMSCを凍結保存し、MSC臨床生成物として指定した。2、3週間後にそれらの増殖能、分化能及び同種抑制能に関する検証を行った。

40

【図4】MSCの表現型及びそれらの分化能を示す図である。A) 継代2の終了時にMSCバンクからのアリコートが増加によって生成したMSCを、表1に提示されるような蛍光色素とコンジュゲートしたマウス抗ヒト抗体で標識した。B) 組織特異的培養培地におけるMSCの培養は、脂肪細胞及び骨芽細胞へのそれらの分化を誘導した。

50

【図5】個々のドナーに由来するMSC及びMSC最終生成物の成長動態を示す図である。A) 各骨髄ドナーに由来する初期数 4.4×10^4 のMSCを、1継代(P2の開始から終了時まで)増加させた。同時に、MSCバンクからの4つのアリコートとともに、8人全てのドナーのMSCをプールし、P2の開始から終了時まで増加させた(MSCプール)。継代2の終了時にMSCをトリプシン処理し、それらの数を算出した; ns = 非有意。B) MSCバンクの10本のMSC凍結用バイアルを融解し、それらの増殖能を評定するために2継代にわたって増加させた。継代2の終了時の増加させた全てのバイアルの平均細胞数は $5.3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ MSCであった。C) MSCは1継代当たりおよそ4の集団倍加(PD)を示し、したがってPDの累積数(CPD)は 8.7 ± 0.4 PDであった。D) MSC最終生成物が不死細胞でないことを実証するために、それらの成長動態を12継代にわたって評定し、PDの数を推定した。図に示されるように、これらのMSCは継代9~継代12から複製することすらできなかった(n=3)。

【図6】個々のドナーから生成されたMSC及びMSC最終生成物の同種抑制能を示す図である。A) 継代0~継代8の個々のドナーのMSC、及び8人のドナーのMSCを増加前にプールすることによって生成したMSCプール(MSCプール)、及び1つのMSC最終生成物(MSC-140)を継代2の終了時まで増加させた。その後、MSCをトリプシン処理し、培地で2回洗浄し、トリパンプルーによる細胞数及び生存能力の決定後に、それらの同種抑制能を推定するためにMLRアッセイに使用した。6日目にBrdUを細胞に供給し、翌日に2人のHLA異種ドナーに由来する同種異系血液単核細胞の増殖の阻害を評価するためにアッセイを行った。B) 6つのMSC最終生成物(臨床用量)を融解し、洗浄後に細胞をMLRアッセイに直接使用した。これらの実験の目的は、融解したMSC最終生成物を患者に与えた場合に、2人の同種異系MNCドナーに由来する単核細胞のアロジーン(allogene)誘導増殖を抑制することが可能であるか否かを解明することであった。

【図7】臨床スケールMSC最終生成物の遺伝的特性化を示す図である。A) 継代2の終了時の臨床グレードMSC最終生成物の正常核型。B) プローブセット5p15(緑色)及び5q35(赤色)の二色ハイブリダイゼーション後の間期核から、染色体5の正常2倍体パターンが特定された。C) MYC分離プローブの三色ハイブリダイゼーション後の間期核から、ほぼ全ての細胞において2つの正常融合シグナルが示された。D) プローブセット5p15及び5q35の二色ハイブリダイゼーション後に正常2倍体及び異数体パターンを有するMSCの数。分析したMSCの総数は396であった。E) 染色体8q24に対するMYC分離プローブの三色ハイブリダイゼーション後に正常2倍体及び異数体パターンを有するMSCの数。分析したMSCの総数は356であった。

【図8】形質転換遺伝子の発現及びMSC最終生成物のキメラ分析を示す図である。A) 3つの臨床スケールMSC最終生成物における細胞形質転換に關与する遺伝子のRT-PCR分析。全RNAを3つのMSC最終生成物及び1人のドナー(対照)に由来するMSCから単離した。cDNAへの転写後に、これを使用してp21、p53及びc-mycの発現をPCRによって定量化した。B) 臨床スケールMSC最終生成物のSTR-PCR分析。臨床グレードMSC最終生成物のMSCからDNAを単離した後、核DNA上に見られる特定のSTR領域の評価に使用した。8人全てのドナーの遺伝子型がプールしたMNCから生成されたMSC最終生成物において示された。

【発明を実施するための形態】

【実施例】

【0065】

材料及び方法

原料採取

骨髄を腸骨稜からの両側穿刺により全身麻酔下で吸引した。骨髄を骨髄穿刺液1 ml当たり7%~12%のACD-A及び7 i.U.~12 i.U.のヘパリンで抗凝固処理した。

【0066】

感染性疾患の検査

感染性疾患マーカーパネルはJACIE及びドイツ幹細胞法(German Stem Cell Act)の最小必要要件を超えていた。このため、ドナーの精密検査の一環としてHiV1/2、抗HBc、HBs Ag、抗HCV、抗HTLV1/2(全てのIgM及びIgG)、抗A型肝炎IgM、抗トキソプラズマIgM、抗E

BV IgM、抗CMV IgM及びTPHAに対する血清反応陰性、並びにHiV、HAV、HBV、HCV及びParvoB 19に対するNATによる陰性の証拠を探索し、HiV1/2、抗HBc、HBsAg、抗HCV、CMV、TPHA及び記載のNATについての試験を骨髓提供日に繰り返した。全てのドナーが基準を満たしていた。さらに、CMVは細胞常在ウイルスであるため、骨髓細胞ペレットにおけるCMVゲノムに対する陰性を探索した（ゲーテ大学ウイルス学講座（Dept. of Virology, Goethe University）及びBioreliance, Glasgow, UK）。

【 0 0 6 7 】

処理施設

全てのプロセスを、ドイツ赤十字血液サービス（German Red Cross Blood Service）の一部であり、その品質管理システムに完全に組み込まれ、州政府からの正式な許可（ドイツ薬事法 § 20b/c（BMの採取及び検査）及び § 13（MSCの生成及び検査）による製造許可）を有する細胞治療学/細胞処理部門（Department of Cellular Therapeutics/Cell Processing）（GMP）のクリーンルームスイート（クラスA/B）において完全GMP基準下で行った。

10

【 0 0 6 8 】

骨髓処理

骨髓単核細胞を、Sepax II NeatCellプロセス（Biosafe, Switzerland）を用いたFicoll（GE Healthcare, Munich, Germany）密度遠心分離によって製造業者による説明のように骨髓穿刺液から富化した。全ての接続を滅菌チューブ溶接（TSCD, Terumo, Duesseldorf, Germany）によって確立することで、完全に閉じたプロセスを用いた。

20

【 0 0 6 9 】

濃縮血小板の採取及び血小板溶解物（PL）の生成

血小板溶解物の出発物質として、PASIII中のおよそ10%の血漿を含有する1日齢～2日齢のパフィーコートプール血小板を使用した。血小板はドイツの血液製剤ガイドラインに従って臨床使用が認められている。最大4つ～6つの濃縮血小板をプールして、1バッチの血小板溶解物を生成した。血小板をA/B環境で滅菌50 ml容ファルコンチューブに等分し、即座に-80℃で凍結した。個々のアリコートを少なくとも24時間後に融解し、プレーキ（加速8、プレーキ4）を用いて3774×gで10分間遠心分離した。上清（血小板溶解物）を採取し、細菌の非存在（BacTAlert, Biomerieux）、並びにMSCの前駆細胞の接着及びMSC増加を促進する可能性を含む持続放出検査に供した。

30

【 0 0 7 0 】

血小板溶解物の検査

a) MSCの前駆細胞の接着を促進する血小板溶解物の可能性

骨髓単核細胞（BM-MNC）を37℃で融解し、5%PLを添加したDMEMで2回洗浄し、最後の洗浄後に細胞ペレットを5 UIヘパリン/ml及び5%又は10%PLを添加したDMEMに再懸濁した。BM-MNCを $1.71 \times 10^5 / 1\text{cm}^2$ の密度でプレーティングし、37℃、5%CO₂及び飽和湿度で72時間インキュベートした。非接着性細胞画分を除去し、一方で接着性細胞を更に11日間更に培養した。培養培地を3、4日毎に取り換えた。紡錘状細胞（MSC）が70%～80%コンフルエントになった後、トリプシンによって酵素的に剥離させ、それらの数を計数した。この手順を両方の培地、すなわち5%PL又は10%PLのいずれかを添加したDMEMを用いて行った。

40

【 0 0 7 1 】

b) MSCを増加させるPLの能力

血小板溶解物の規格はドイツのガイドラインに挙げられるIDM適合標準（細菌の非存在、7日間で少なくとも2倍のMSCの凍結保存アリコートの増加）として定められている。これらの基準を満たす血小板のみを臨床MSCプロトコルの生成に使用した。

【 0 0 7 2 】

MSCバンク及び臨床グレード最終生成物の生成

a) MSCバンクの生成

各ドナーに由来する骨髓単核細胞を含有するバッグを、Plasmathermにおいて+37℃で融

50

解した。これらを5 %PLを添加したDMEMを用いて400gで10分間の遠心分離によって2回洗浄し、規定の容量のDMEM+5 %血小板溶解物で再懸濁した。この工程の後、各ドナーからの細胞懸濁液とともにプールし、細胞の数を細胞計数器 (Sysmex) によって計数した。その後、細胞懸濁液プールを11枚の2-CellSTACK (1枚の2-CellSTACK当たり: 250×10^6 のBM-MNC / 260 mlの培地) 及び1枚の単一CellSTACK (1枚の1-CellSTACK当たり: 125×10^6 のBM-MNC / 130 mlの培地) にプレーティングした。72時間後に培地交換バッグ (Macopharma, Langen, Germany) を使用して非接着性細胞を除去し、接着性細胞をMSCが80 % ~ 90 %コンフルエントになるまで更に11日間、5 %PLを添加したDMEMとともに更に培養した。この期間中に培地を3、4日毎に取り換えた。14日目に、MSCの剥離の前に各CellSTACKから5 mlの培養培地を取り、滅菌ボトルにプールし、好気性及び嫌気性の細菌及び真菌に対する滅菌性について試験した。その後、細胞を合成TrypLE (Life Technologies, Darmstadt, Germany) を用いて剥離させ、DMEM+5 %PLで洗浄した後、細胞を400 x gで7分間遠心分離した。細胞ペレットを規定の容量の培地に再懸濁し、細胞を、トリパンブルーを用いて血球計で計数した。合計で 320×10^6 の継代1のMSCが得られた。200万の細胞を、フローサイトメトリーを用いた表現型の決定に使用した。残りのMSCは400 x gで7分間遠心分離した。

10

20

30

40

50

【0073】

細胞を5 %HSA/DMEMに再懸濁し、それによりMSCの数を 3×10^6 細胞/mlに調整した。1容量の細胞懸濁液を20 %DMSO/5 %HSA/DMEMを含有する1容量の凍結用培地とゆっくりと混合した。したがって、MSCの最終濃度は 1.5×10^6 /ml (細胞懸濁液) となり、凍結用培地の最終濃度は10 %DMSO/5 %HSA/DMEMとなった。細胞を210本の凍結用バイアル (各々 1.5×10^6 の継代1のMSC) に分配した後、Cryoserve速度制御フリーザー (Schoellkrippen, Germany) を用いて確立されたプロトコルに従って凍結保存した。凍結したバイアルを液体窒素 (Tec-Lab, Idstein, Germany) の気相中で保管した。加えて、残りのMSCを凍結用培地と混合し、滅菌性 (好気性及び嫌気性の細菌及び真菌) について試験した。

【0074】

b) 臨床スケールMSC最終生成物の生成

臨床スケールMSC最終生成物を生成及び実証するために、MSCバンクバイアルをそれらの凍結保存の6週間~8週間後に無作為に連続して融解した。37 °Cでの融解後、MSCを10 %PLを含有する培養培地で洗浄し、細胞数生存能力を、トリパンブルー染色を用いて血球計で評定した。1つのMSCバンクバイアルの細胞を1枚の1-CellStack (636 cm^2) にプレーティングし、ヘパリン (5 IU/ml (培地)) 及びPL 10 % (V/V) を添加したDMEMとともに培養した。培地を4日目及び6、7日目に取り換え、細胞を、TrypLeを用いて剥離させた後、8枚の2-CellStack (各々 1272 cm^2) に継代2として密度 2×10^3 細胞/ cm^2 で更にプレーティングした。手順を継代1と同様に繰り返し、6、7日目にMSCを摘出した。0.5 %HSA/0.9 %NaClで洗浄した後、生存MSCをトリパンブルー染色によって計数した。さらに、臨床スケールMSCを凍結用培地 (5 %HSA及び10%DMSOを含む0.9 %NaCl) に最終継代2 MSCとして再懸濁し、各々 $4.2 \sim 5.5 \times 10^7$ のMSCを45 ml容量の凍結用培地に含有する4つ~7つの凍結用バッグ (cryobags) に分配した。サンプルをCryoserve速度制御フリーザー (Schoellkrippen, Germany) を使用して、確立されたプロトコルを用いて凍結保存し、液体窒素 (Tec-Lab, Idstein, Germany) の気相中で保管した。

【0075】

品質管理試験

全ての試験を、融解MSC最終生成物を用いて増加させずに臨床用途のために患者に投与される状態で行った。

【0076】

a) 細胞の計数及び融解MSCの生存能力

総細胞計数を、Neubauerチャンバ血球計を用いて行った。MSC生存能力はトリパンブルー染色を用いて評定した。

【0077】

b) 表現型特性化

フローサイトメトリー分析をMSCに対するISCT最小基準を用いて行った。融解MSCの表現型を決定するために、融解MSCを表1に提示される以下の蛍光色素コンジュゲートマウス抗ヒトモノクローナル抗体で染色した。

【0078】

表1. MSCの表現型の決定に使用した抗体

【表1】

Antibodies 抗体	Company 会社	Cat. Nr. カタログ番号	Clone クローン	Isotype アイソタイプ
IgG1 FITC	BioLegend	400109	MOPC-21	IgG1
IgG2a FITC	BioLegend	400209	MOPC-173	IgG2a
IgG1 PE	BioLegend	400113	MOPC-21	IgG1
IgG1 PerCP	BioLegend	400147	MOPC-21	IgG1
CD45 FITC	BioLegend	304005	HI30	IgG1
CD34 FITC	BioLegend	343603	561	IgG2a
CD14 FITC	BioLegend	325603	HCD14	IgG1
HLA-DR FITC	BioLegend	307603	L243	IgG2a
CD90 FITC	BioLegend	328107	5E10	IgG1
CD73 PE	BioLegend	344003	V B-CD73.3	IgG1
CD105 PE	BioLegend	323205	43A3	IgG1
Propidium iodide (PI) Staining Solution ヨウ化プロピジウム (PI) 染色溶液	BD Pharmingen	556463		

10

20

【0079】

d) MSC最終生成物の同種抑制能の評価

アロ抗原による反応に対するMSC最終生成物の免疫抑制効果を試験するために、混合リンパ球反応 (MLR) を用いた。健常非血縁ドナーからの末梢血単核細胞 (PB-MNC) をFicoll 1勾配 (密度1.077、Biochrom KG, Berlin, Germany) を用いて単離し、PBSで2回洗浄し、10 %FBS (Invitrogen) を含むRPMI-1640に再懸濁した。2人の非血縁ドナーのPB-MNCを黒色96ウェルプレートにおいて6日間、単独で (対照群) 又は第三者の致死量の放射線を照射した (30 Gy) MSC最終生成物と1:1のMSC:PB-MNC比 (1×10^5 MSC: 1×10^5 PB-MNC) で混合して培養した。融解の直後の6つのMSC最終生成物、及びBM-MNCをプールし、本発明者のマスターMSCバンクの生成の供給源とした8人全てのドナーのMSCを評定した。全てのMLRを96ウェルプレートにおいて三連で行った。6日目に、細胞を5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) とともに24時間インキュベートした。翌日、相対発光量 (RLU/s) を照度計1420 Multilabel Counter Victor 3 (PerkinElmer, Rodgau-Juegesheim, Germany) で測定した。PB-MNCの増殖レベルを7日目にBrdUアッセイを用いて決定した。同種異系MNCの増殖に対するMSC最終生成物の阻害効果は、以下の式を用いてパーセンテージとして算出した: $100 - [(MSCの存在下の同種異系PB-MNCの増殖 / MSCなしでのPB-MNCの増殖) \times 100]$ 。

30

【0080】

e) MSC最終生成物のin vitroでの老化の決定

MSC最終生成物が不死細胞でないことを実証するために、それらの成長動態を12継代にわたって評定した。各継代について、培地を3、4日毎に取り換え、それらの増殖能に応じたTrypLEによるMSCの剥離を行った。それらの成長動態をより正確に推定するために、集団倍加数 (PD) を以下の式を用いて算出した:

各々の二次培養物のPD: $[\log_{10}(NH) - \log_{10}(NI)] / \log_{10}(2)$ (式中、NH = 細胞摘出数、NI = 細胞の接種数)。

【0081】

f) MSC最終生成物の分化能

脂肪生成及び骨形成時の分化能を研究するために、継代2のMSC最終生成物を融解し、適切な組織特異的誘導培地中でメーカーの取扱説明書 (Miltenyi Biotec GmbH) に従って直

40

50

接培養した。

【0082】

脂肪生成

脂肪細胞を生成するために、融解MSCの数を1 mlのNHAdipoDiff培地当たり 5×10^4 細胞に調整した。次いで、1.5 mlのかかる細胞懸濁液を、5 %CO₂及び95 %超の湿度のインキュベーター内で35 mm細胞培養皿において37 °Cで培養した。培地を3日毎に取り換え、2、3週間後に大きな空胞が出現し始めた。30日目に脂肪細胞が球状になり、脂肪滴で満たされた。これを親油性赤色染料であるOil Red O (Millipore, Schwalbach, Germany) で染色した。

【0083】

骨形成

簡潔に述べると、融解MSCの濃度を1 mlのNHStoDiff培地当たり 3×10^4 細胞に調整した。次いで、1.5 mlのかかる細胞懸濁液を、5 %CO₂及び95 %超の湿度のインキュベーター内で35 mm細胞培養皿において37 °Cで培養した。培地を3日毎に取り換えた。10日目に、骨芽細胞をそれらの立方体状の外観及び新たに合成された骨基質との結合により形態学的に特定することができる。これらの細胞は、関与する骨形成原細胞がこの酵素を高レベルで発現するため、アルカリホスファターゼ染色 (Sigma, Deisenhofen, Germany) によって可視化される。この染色の結果として、骨芽細胞は濃紫色に染色された細胞として現れる。組織特異的染色を、Soft Imaging System F-View IIカメラ及びcellSens Dimension画像化ソフトウェアを備えるOlympusIX71顕微鏡を使用して評価した。

【0084】

g) 臨床グレードMSC最終生成物の遺伝的分析

臨床スケールMSC最終生成物の形質転換遺伝子の発現のRT-PCR分析

RNAをRNeasy mini kit (Qiagen) を用いて抽出し、続いて1 µgの全RNAによる逆転写 (transcription) をVerso cDNA Kit (Thermo Scientific) をランダムヘキサヌクレオチドとともにそれぞれメーカーの取扱説明書に従って用いて行った。c-myc、p21、p53及びGAPDH遺伝子については、Quanti Tect SYBRE green qPCR master Mix (Qiagen) を用いてEppendorf realplexでリアルタイムPCRを行った。hTERT及びABL遺伝子転写の検出は、Absolute qPCR ROX mix (Thermo Scientific) を用いてBiorad MyiQ Cyclorで行った。オリゴヌクレオチドはEurofinsMWGで購入した。プライマー配列及び反応ミックスの特異的活性化期間を除くPCR条件は他で詳細に公表されている。

【0085】

h) 間期蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)

間期FISH分析を、以下の染色体5及び染色体8のプロープを用いてメーカーの (manufacturer's) プロトコルに従って行った：染色体5p15 (hTERT) 及び5q35 (NSD1, Kreatech, Amsterdam, NL) の二色プロープ、並びに染色体8q24の三色分離プロープ (MYC, Kreatech, Amsterdam, NL)。ハイブリダイゼーションシグナルの評価は自動スポット計数システム (Applied Spectral Imaging, Edingen/Neckarhausen, Germany) で行った。各プロープについて300個を超える核をスキャンし、5 %の閾値を用いて分類した。

【0086】

文書

MSC細胞バンク、試験用の臨床試料及び公開用の臨床試料の生成の前に、プロセスを小規模培養物において形式的に実証し、これに基づいて製造指示書 (SOP)、バッチ記録、試験指示書及びプロトコル、並びに仕様書を形式的に規定した。MSC細胞バンク及び臨床試験に使用される臨床試料の製造許可は州政府から取得した。品質仕様書は、連邦医薬品庁 (Federal drug agency)、Paul Ehrlich Instituteから取得した公式報告書に従って作成された。

【0087】

統計分析

統計的有意性はGraphPad Prism 5ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA,

10

20

30

40

50

USA)を用いて分析した。スチューデントt検定を用いて有意性を評価した。0.05未満のP値を統計的に有意であるとみなした。

【0088】

実施例1：8人の健常第三者ドナーからの骨髄の採取及びBM-MNCの単離

書面によるインフォームドコンセントを得た後、ヘルシンキ宣言に完全に一致した地方倫理委員会による承認を受けたMSCバンク構築 (banking) の目的で、各骨髄ドナーから最大250 mlの付加的な骨髄穿刺液を採取した。合計で8人のドナーから1.66リットルの骨髄を得た。Ficoll勾配による骨髄単核細胞の単離のために、図1に示されるようにSepax装置を使用した。この単離手順後の骨髄1 ml当たりのBM-MNCの絶対数は $3.3 \times 10^6 \pm 6.3 \times 10^5$ 細胞であった。2回の洗浄工程後に8人のドナーから得られたBM-MNCの総数は 9.86×10^9 であった。これらの細胞を凍結用培地に再懸濁し、バッグに分配し、速度制御フリーザーを使用してこれを凍結した後、使用するまで液体窒素の気相中で保管した。

10

【0089】

実施例2：骨髄単核細胞からの間葉系間質細胞の生成 - MSCバンクの確立

MSCバンクを生成するために、8人のドナーに由来する骨髄単核細胞を融解し、洗浄し、5% PLを添加したDMEM中にプールした。MSCの前駆細胞の接着についての血小板溶解物の最適濃度を解明するために、BM-MNCを5%及び10%の両方の濃度のPLとともに培養した。得られる結果から、5%濃度の血小板溶解物が10%濃度のPLよりもBM-MNCの促進及びMSCの生成にはるかに効果的であることが実証された (図2A)。加えて、これら2つの濃度のPLのどちらがMSCの臨床スケール増加により良好であるかを求めた。10%濃度のPLが5%PLよりもMSCの増加に顕著に効果的であることが見出された (図2B)。さらに、どちらの場合も無濾過血小板溶解物が濾過したものよりもMSCの生成及び増加に効果的であった (図2C)。これらの予備実験からMSCバンクを確立する道が開かれた。したがって、各ドナーに由来するBM-MNCを方法の項に説明されるように融解し、2回洗浄した後、ともにプールし、その後14日間培養した。 9.89×10^9 のBM-MNCから 3.2×10^8 の継代1のMSCを生成することができた。これらのMSCはCD73、CD90及びCD105等の典型的なMSCのマーカーを発現するが、造血細胞マーカー、例えばCD14、CD34、CD45に対して陰性であった。これらはHLAクラスI抗原を発現せず、高レベルのHLAクラスI抗原を発現した。トリパンブルー染色によると、凍結前のこれらのMSCの生存能力は $95 \pm 5\%$ であった。

20

【0090】

MSCの総数を各々が 1.5×10^6 のMSC P1を含有する210本の凍結用バイアルに分配し、最終的に使用するまで液体窒素の気相中で凍結した。この一連のバイアルをMSCバンクと称した。

30

【0091】

実施例3：臨床スケールMSC最終生成物の生成及び検証

a) MSCバンクからのバイアルの融解

臨床スケールMSC最終生成物を生成し、それらの増殖能、分化能及び同種抑制能に関して試験するために、凍結保存の6週間～8週間後に本発明者らのバンクから無作為に選ばれた3本のMSCバイアルを融解した。3本の融解バイアルからの細胞の平均回収率は 1.39×10^6 生存細胞/バイアル ($1.23 \times 10^6 \sim 1.48 \times 10^6$ の範囲)であり、生存能力は 95.25% ($93.45\% \sim 96.9\%$ の範囲)であった。平均して、継代2の終了まで2週間にわたるこれらのMSCの増加は、 470×10^6 の生存MSC ($420 \sim 548 \times 10^6$ MSCの範囲)の生成をもたらした。これらのサンプルを使用するまでバッグ内で凍結し、臨床スケールMSC最終生成物と称した。

40

【0092】

b) MSC最終生成物の免疫表現型検査及びそれらの分化能

継代2の終了時での臨床最終生成物のMSCは、造血マーカーCD45、CD14、CD34について陰性であり、HLA-DRを発現しなかった。しかしながら、これらは高レベルのCD73、CD90及びCD105のような典型的なMSCマーカーを発現した。これらは組織特異的培地において骨芽細胞及び脂肪細胞へと分化することも可能であった (図4)。

【0093】

50

d) MSCの増殖動態及び老化

本発明者らのMSCバンクを確立するために8人のドナーに由来する骨髓単核細胞をプールすることの論拠を実証するために、8人の個々のドナーに由来するMSCのinvitro成長を、P2で各ドナーからプールしたMSC及び同じ継代の4つのMSC最終生成物の成長と比較した(図5A)。予想通りに、各骨髓ドナーのMSCは 0.3×10^6 (ドナー7) から 1.7×10^6 MSC (ドナー5) まで異なる成長動態を示した。8人のドナーのプールしたBM-MNCから生成されたMSC生成物の平均増殖動態は $1.0 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6$ MSCであり、これは8人のドナーの個々のMSCのプールから生成されたMSCの数である 1.1×10^6 と驚くほど良好に相関していた。より興味深いことに、どちらの値も継代内の4つのMSC最終生成物の増殖により得られたMSCの平均数である $1.085 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$ MSCと非常に良好に相関していた。これらの結果から、BM-MNCをプールすることによって増殖が良好なMSC及び不良のMSCの「算術平均」を生成することが可能であるという本発明者らの仮説が立証された。

【0094】

MSCバンクからの各々のMSC最終生成物がほぼ同じ増殖能を有するという予想を試験するために、臨床用途のためのP0から継代2の終了まで増加させた10アリのMSCバンクにおいてこれを分析した。図5Bに示されるように、継代2の終了時での全ての増加させた最終生成物の平均細胞数は $5.3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ MSCであり、最終生成物の極めて均一な増殖能が示された。同様に、P1及び継代2の終了時の集団倍加の数は幾分同じであり(4.3 PD/継代)、PDの累積数は9の値を超えなかった(8.7 ± 0.4)。MSCが不死でないことを試験するために、本発明者らのMSCバンクからの3つのMSC最終生成物を12継代にわたって増加させた。図5Dに示されるように、継代5から継代12までにMSCは複製老化を受け、PDの数が急速に減少しており、これらの細胞が実際に老化し、無制限には増殖しないことが示された。

【0095】

e) 混合リンパ球反応 (MLR) における個々のドナーから単離されたMSC及びMSC最終生成物の同種抑制能

MSCはin vitro又はinvivoで同種抑制特性を示すことが示されている。8人のドナーのBM-MNCのプールから生成されたMSCが個々のドナーから生成されたMSCの平均同種抑制能よりも高い同種抑制能を有し得るといふ本発明者らの仮説を試験するために、8人の個々のドナーに由来する継代2の増加させたMSC、及び8人のドナーのMSCを増加前にプールすることによって生成したMSCプール(MSCプール)、及び1つのMSC最終生成物(MNCプール由来MSCバンクから生成された: MSC-140)をMLRに使用した。予想通りに、個々のMSCの同種抑制能は非常に不均一であり、すなわちこれらのMSCは2人のHLA異種ドナーに由来する血液MNCのアロ抗原による増殖を全く異なって阻害した。この効果は20% (ドナー1及び8) ~ 約80% 阻害 (ドナー2及び3) の範囲であった(図6A)。8人のドナーに由来するMSCのプールから生成されたMSCの同種抑制能(MSCプール)は、8人のドナーのMSCの平均抑制能(8人のドナーの平均)に等しかった。しかしながら、本発明者らのMSCバンクからの増加させたMSC-140サンプルの同種抑制能は、MSCプール及び8人のドナーのMSCの平均同種抑制能よりも有意に高かった(それぞれ $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)。融解後の本発明者らのMSC臨床生成物がアロ反応の抑制において均一であるかを評定するために、MSCの入った6本の予備バイアルを融解し、患者にin vivoで投与される(administered)かのようにMLRアッセイにおいて直接試験した。図6Bに示されるように、これら6つ全ての臨床MSC生成物はinvitroで一定の同種抑制効果を示し、アロ反応の抑制におけるそれらの非常に均一な能力が示された。本明細書で用いられる標的エフェクター比での平均同種抑制能は $52 \pm 8.7\%$ であった。

【0096】

実施例4: 臨床グレードMSC最終生成物の遺伝的特性化

in vitro培養は通常、培養細胞の染色体異常の原因となる可能性があるため、本発明者らの臨床グレードMSC最終生成物がかかる変化を受けるか否かを求めた。およそ350バンド~400バンドの分解能での25回のMSC有糸分裂の染色体分析では、その全てにおいて正常な染色体数(正倍数性)が示された(図7A)。しかしながら、およそ300バンドの分解能を

10

20

30

40

50

用いることで、分析した25回の有糸分裂のうち4回で染色体5の短腕と染色体9の短腕との間に転座が見られた。崩壊点はバンド5p13及び19p13.3において局在化していた。染色体5 p15 (hTERT) 及び5q35 (NSD1) の二色プローブ、並びに染色体8q24の三色分離プローブを用いた蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 分析から、本発明者らのMSCバンクからの臨床グレードMSC最終生成物の大半が両方の染色体について正常2倍体パターンを有することが実証された (図7B、図7C)。プローブセット5p15 (緑色) 及び5q35 (赤色) の二色ハイブリダイゼーション後の間期核から、97.2 %の細胞が染色体5について正常2倍体パターンを示し、わずか約2.8 %が4倍体ハイブリダイゼーションパターンを示すことが特定された (図7D)。同様に、MYC分離プローブの三色ハイブリダイゼーション後の間期核 (図7C) では、97 %のMSCが染色体8q24について2つの正常融合シグナルを示し、3 %のMSCが4倍体シグナルパターンを有していた (図7E)。このため、非常にわずかなMSCしか *in vitro* で染色体異常を生じない。

【0097】

3つの臨床スケールMSC最終生成物におけるp53、p21及びMyc遺伝子発現の分析から、p21発現の2倍～5倍の増大、p53遺伝子発現の約6倍～10倍の低減及び癌原遺伝子c-mycの無発現が示された (図8A)。最も重要なことには、本発明者らのバンクからのMSCの老化挙動と一致して、3つのMSC最終生成物のいずれもhTERTを発現しないことが実証された (データは示さない)。

【0098】

本発明者らのバンクのMSCは8人の第三者ドナーのBM-MNCのプールから生成されるため、本発明者らはMSCの生成後の各ドナーの相対的寄与に関心を持った。一連の遺伝子マーカーを用いたSTR-PCRによるキメラ分析から、臨床スケールMSC最終生成物における異なる割合での8つのドナーの存在が示された (図8B)。原則として、臨床生成物における存在のパーセンテージは個々のドナーから生成されたMSCの増殖能と相関し、すなわち個別により良好に増加したMSCはMSC最終生成物中でもより高い割合で見られた。

【0099】

実施例5：本発明のMSC調製物で治療した患者の臨床例

患者1 1999年3月26日出生

障害：サラセミアメジャー

幹細胞移植を行った後、患者はおそらくは移植片対宿主病 (GvHD) との関連で免疫学的多漿膜炎に起因する腹水、関節の腫脹、心外膜液を発症した。本発明のMSCを1回投与することで、合併症なしに進行した。利尿剤との併用治療下で腹水、関節の腫脹及び心外膜液が消失した。

【0100】

患者2 2009年12月20日出生

障害：重度無顆粒球症

幹細胞療法 (SCT) の+12日後に、患者は皮膚に激症の (foudroyante) 急性GvHD (グレードIV) を示し、これは毎日の2 mg/kgのステロイド及び55 mg/kgのミコフェノール酸モフェチル (Mofetilmycophenolat) でも制御不可能であった。2012年11月22日にこの小児に本発明のMSCを与えた。

【0101】

MSC療法の後、GvHDはMSC投与の28日後に検出されなくなるまでゆっくりではあるが一貫して減少した。小児はMSCに非常に良好な耐容性を示し、投与後30日間にわたってウイルス、細菌又は真菌の感染を示さなかった。

【0102】

患者3 2010年3月25日出生

障害：急性リンパ芽球性白血病

2012年10月16日にHLA不適合血縁ドナーからのSCTが行われた。既にSCTの+14日後に、腸管にGvHDの初発症候が認められた。ミコフェノール酸モフェチル及びステロイドによる緊急療法を開始した。これにより症状の相対的改善がもたらされた。しかしながら、長期ス

テロイド投与にもかかわらずSCTの+35日後もグレードIIの腸管GvHDが残存していた。

【 0 1 0 3 】

したがって、本発明のMSCの投与により免疫抑制療法を強化するという決定が下された。2012年12月12日MSC投与が合併症なしに行われた。SCT投与後30日間にわたって感染は現れなかった。2013年1月15日には、患者に腸管GvHDの症候は観察されず、任意の治療を必要としない軽症の皮膚GvHDのみが残存していた。

【 0 1 0 4 】

患者4 1999年3月25日出生

障害：急性骨髄白血病

2012年9月19日にHLA不適合血縁ドナーからのSCT

幹細胞移植の5ヶ月後に、患者はスティーブンスジョンソン症候群の臨床症状を発症した。患者は記録時にこの臨床像の発症と関連する幾つかの投薬を受けていたため、それぞれの投薬を終了した（ポリコナゾール、ペニシリン、コトリモキサゾール）。アデノウイルス感染の検出のために、グルココルチコイドによる免疫抑制療法を実行しないことを決定した。患者はおそらくスティーブンスジョンソン症候群によって刺激された典型的なGvHD皮膚病変も発症した。したがって、CSAによる免疫抑制療法を開始した。炎症事象を遅らせるために、本発明のMSCを投与した。このMSC投与は良好な耐容性を示した。また、グルココルチコイド含有クリームを1日数回投与した。この療法下で、GvHD皮膚病変のほぼ完全な治癒が見られた。

【 符号の説明 】

【 0 1 0 5 】

図面英語

図1

Sacroiliacjoint 仙腸関節

Sacrum 仙骨

Ilium 腸骨

Pubis 恥骨

Ischium 坐骨

Symphysis pubis 恥骨結合

Obturator foramen 閉鎖孔

Anterior superior iliac spine 上前腸骨棘

Sacral promontary 仙骨岬角

図3

The end of P2 P2の終了時

MSC-Clinical product MSC臨床生成物

Evaluation of three randomly chosen MSC-clinical products 3つの無作為に選ばれたMSC臨床生成物の評価

図4

Events 事象

HLA-Class I HLAクラスI

Adipocytes 脂肪細胞

Osteoblasts 骨芽細胞

図5

MSCs (P2) from 4.4×10^4 MSCs 4.4×10^4 MSCからのMSC (P2)

Donor ドナー

Mean 平均

MSC-Pool MSCプール

4MSC-Aliquots of the MSC-Bank MSCバンクの4つのMSCアlicoート
 Number ofMSCs at the end of P2 P2の終了時のMSCの数
 Days inculture 培養日数
 Passage 継代
 Populationdoublings 集団倍加
 Number of PDs PDの数
 Number ofpassages 継代数

図6

Inhibition ofMNC-Proliferation MNC増殖の阻害
 Donor ドナー
 MSC-Pool MSCプール
 Mean of 8donors 8人のドナーの平均

10

図7

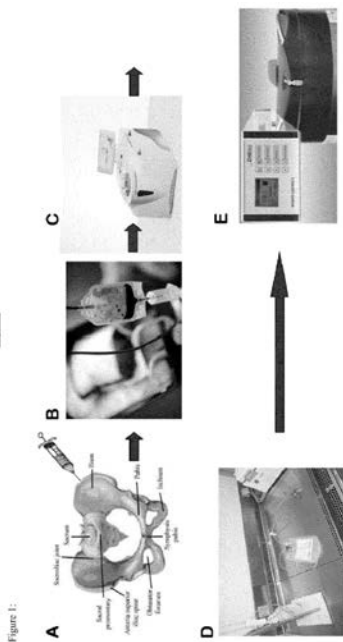
Cell number 細胞数
 Cell type(Classess) 細胞型 (クラス)

図8

Fold change 倍数変化
 Control 対照
 Donor-specificgenotype ドナー特異的遺伝子型
 Donor ドナー

20

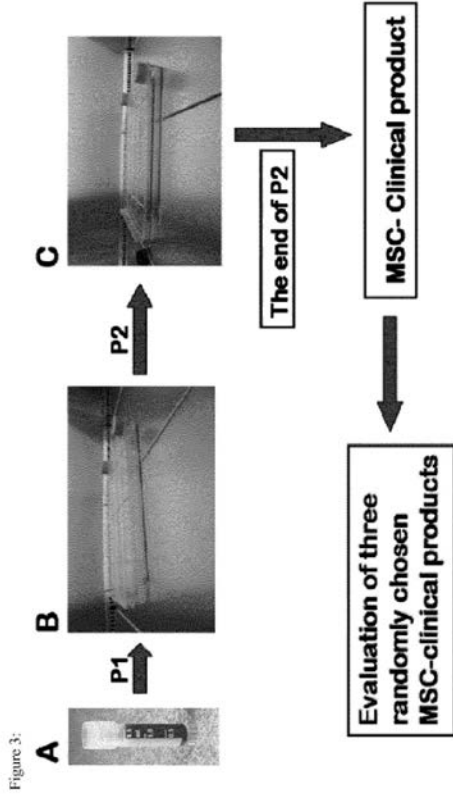
【 図 1 】



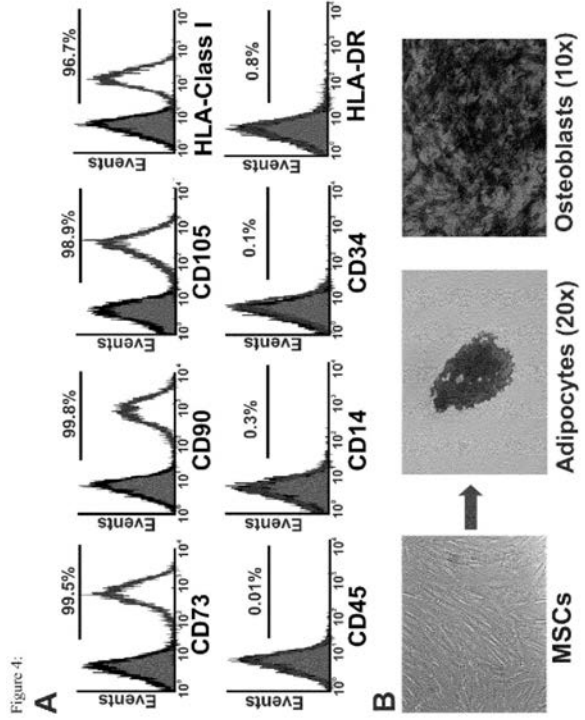
【 図 2 】



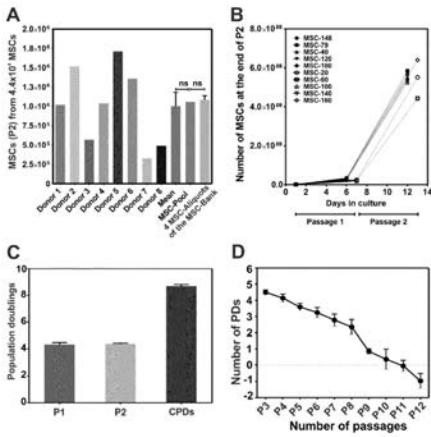
【 3 】



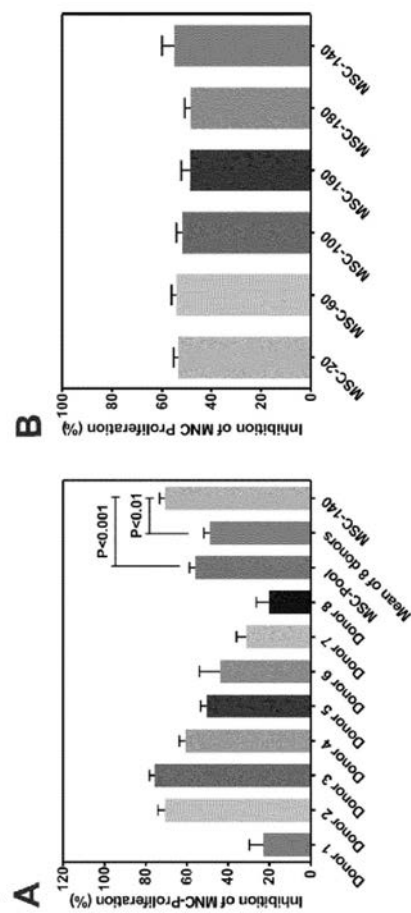
【 4 】



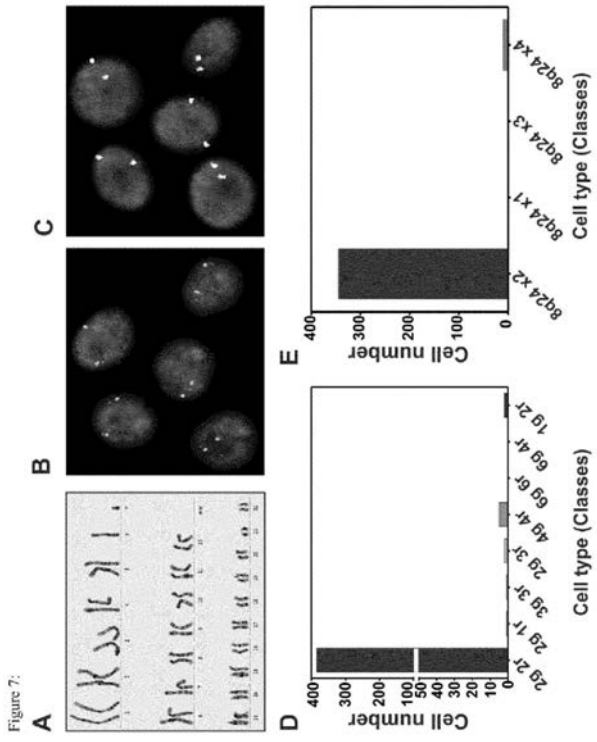
【 5 】



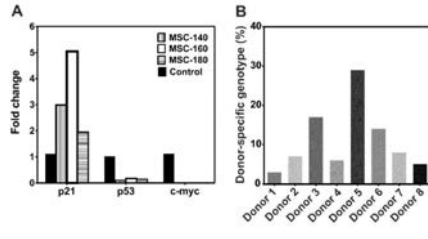
【 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/066083

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/0775 ADD.		
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) C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2011/064733 A1 (STEMPEUTICS RES PVT LTD [IN]; PAL RAKHI [IN]; GUPTA PAWAN KUMAR [IN];) 3 June 2011 (2011-06-03) figure 2 table 5 claim 3 page 8 page 1	7-14 1-6
X A	----- O RINGDÉN ET AL: "Pooled MSCs for treatment of severe hemorrhage", BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 46, no. 8, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 1158-1160, XP055140414, ISSN: 0268-3369, DOI: 10.1038/bmt.2010.262 cited in the application abstract ----- -/--	7-14 1-6
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"B" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 9 September 2015		Date of mailing of the international search report 25/09/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Loubradou-Bourges, N

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/066083

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KHUSHNUMA COOPER ET AL: "Establishment of a Mesenchymal Stem Cell Bank", STEM CELLS INTERNATIONAL, vol. 108, no. 10, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 792-8, XP055140441, ISSN: 1687-966X, DOI: 10.1016/j.trsl.2009.07.006 the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>THIRUMALA SREEDHAR ET AL: "Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 13, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 673-691, XP009180144, ISSN: 1744-7682, DOI: 10.1517/14712598.2013.763925 [retrieved on 2013-01-23] the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>SIMONE DAL POZZO ET AL: "High recovery of mesenchymal progenitor cells with non-density gradient separation of human bone marrow", CYTOTHERAPY, vol. 12, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 579-586, XP055140438, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.3109/14653241003709660 abstract</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/066083

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011064733 A1	03-06-2011	AU 2010325546 A1	07-06-2012
		CA 2777232 A1	03-06-2011
		CN 102639694 A	15-08-2012
		EP 2504426 A1	03-10-2012
		GB 2478825 A	21-09-2011
		JP 5762431 B2	12-08-2015
		JP 2013511976 A	11-04-2013
		NZ 599407 A	26-09-2014
		US 2011229965 A1	22-09-2011
		US 2015159138 A1	11-06-2015
		WO 2011064733 A1	03-06-2011

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	

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

(71) 出願人 511025329
 デーエルカー - ブルートシュペンデディーンスト・パーデン - ヴェルテンブルク - ヘッセン・ゲー
 ゲーエムベーハー
 DRK - BLUTSPENDEDIENST BADEN - WURTTENBERG - HESSEN
 N G G M B H
 ドイツ国、6 0 5 2 8 フランクフルト・アム・マイン、ザントホフシュトラッセ 1

(74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆

(74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子

(74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也

(74) 代理人 100152319
 弁理士 曾我 亜紀

(72) 発明者 パーダー, ペーター
 ドイツ, 6 3 3 0 3 ドライアイヒ, プッフヴァルトシュトラッセ 3

(72) 発明者 クシ, セリム
 ドイツ, 6 0 5 9 9 フランクフルト アム マイン, ヴィーナー シュトラッセ 7 5

(72) 発明者 クシ, ジーラフェテ
 ドイツ, 6 0 5 9 9 フランクフルト アム マイン, ヴィーナー シュトラッセ 7 5

(72) 発明者 ベーニツヒ, ハルヴァルト
 ドイツ, 6 0 4 3 7 フランクフルト, テンペルガッセ 2

F ターム (参考) 4B065 AA87X AA90X BC01 BC31 BD14 CA44 CA46
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB44 BB64 CA04 NA14 ZA02 ZA33 ZA68
 ZA81 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB15 ZC06 ZC35