

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-516985

(P2016-516985A)

(43) 公表日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-562256 (P2015-562256)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月17日 (2014.3.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年10月27日 (2015.10.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/055282
 (87) 国際公開番号 W02014/140362
 (87) 国際公開日 平成26年9月18日 (2014.9.18)
 (31) 優先権主張番号 13382091.0
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513059353
 ティゲニクス、エセ、ア、ウ
 TiGenix, S. A. U.
 スペイン国 マドリッド エー28760
 、トレス カントス、1、マルコニ、パル
 ケ テクノロヒコ デ マドリッド
 (71) 出願人 513176270
 ティジェニクス エヌブイ
 ベルギー国 3001 ルーヴェン、ロ
 インセ ストラート 12 バス 2、ハ
 ースローデ リサーチパーク 1724
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100103447
 弁理士 井波 実

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞治療に対する臨床反応を決定するためのリンパ球バイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含んでなる医薬組成物の投与に対するヒト被験者の臨床予後を決定するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 種または 2 種以上のリンパ球マーカーを評価することによって、組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常の患者における、幹細胞、間質細胞、制御性 T 細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含む医薬組成物の投与に対する臨床反応を予測する方法。

【請求項 2】

組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常を有するヒト被験者を、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性 T 細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含む医薬組成物によって治療する方法であって、

i) 前記ヒト被験者から得られた血液試料中のリンパ球マーカーを評価することによって、前記患者が前記医薬組成物に対して応答者か不応答者かを決定し、

ii) 前記ヒト被験者が応答者であると決定された場合に限り、前記医薬組成物を投与することを含んでなる、方法。

10

【請求項 3】

前記リンパ球マーカーが、CD4 + リンパ球レベル、CD8 + リンパ球レベル、リンパ球の HLA - II レベルおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記全 T リンパ球の 35% ~ 55% の範囲内の値以下の CD4 + レベルを有する被験者が、応答者に分類される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記全 T リンパ球の 45% ~ 65% の範囲内の値以上の CD8 + レベルを有する被験者が、応答者に分類される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

1.5 以下の CD4 / CD8 + 比率を有する被験者が、応答者に分類される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

リンパ球 HLA - II を同種異系間葉系幹細胞と接触させた後に、リンパ球の HLA - II レベルの減少を示す被験者が、応答者に分類される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記幹細胞が、間葉系幹細胞である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記幹細胞は、多能性の間質細胞または間質幹細胞である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記間葉系幹細胞が、間葉系幹細胞由来の脂肪組織である、請求項 8 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記幹細胞が、同種異系幹細胞である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

幹細胞、間質細胞、制御性 T 細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含んでなる医薬組成物であって、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する 1 つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者が、T リンパ球の 35% ~ 55% の範囲内の値以下の CD4 + レベルを有する、医薬組成物。

【請求項 13】

幹細胞、間質細胞、制御性 T 細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含んでなる医薬組成物であって、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免

50

疫異常と関連する1つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者が、Tリンパ球の45%~65%の範囲内の値以上のCD8+レベルを有する、医薬組成物。

【請求項14】

幹細胞、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含んでなる医薬組成物であって、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者が、1.5以下のCD4+/CD8比率を有する、医薬組成物。

【請求項15】

幹細胞、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせを含んでなる医薬組成物であって、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者が、リンパ球のHLA-IIを同種異系間葉系幹細胞と接触させた後に、リンパ球のHLA-IIレベルの減少を示す、医薬組成物。

10

【請求項16】

ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者がTリンパ球の35%~55%の範囲内の値以下のCD4+レベルを有する医薬組成物を製造するための、幹細胞、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせの使用。

20

【請求項17】

ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者がTリンパ球の45%~65%の範囲内の値以上のCD8+レベルを有する医薬組成物を製造するための、幹細胞、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせの使用。

【請求項18】

ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者が1.5以下のCD4+/CD8比率を有する医薬組成物の製造のための、幹細胞、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせの使用。

30

【請求項19】

ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善のために用いられ、前記ヒト被験者がリンパ球のHLA-IIを同種異系間葉系幹細胞と接触させた後に、リンパ球のHLA-IIレベルの減少を示す医薬組成物の製造のための、幹細胞、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせの使用。

【発明の詳細な説明】

40

【背景技術】

【0001】

成体間葉系幹細胞(以下「MSCs」または「MSC」とも称される)は、種々の成体組織中で発見されてきた。MSCは、最初に骨髄中で同定され、現在は、脂肪組織、胎盤、臍帯、歯髄、滑膜などの中胚葉由来の他の組織中に存在することが認められている。多くの努力にもかかわらず、MSCのための排他的な個々の表面マーカーは、同定されていない。MSCは、国際細胞治療学会の3つの基準に従って定義される: a) プラスチックへの接着: MSCをプラスチックへの接着によって単離し、成長因子またはサイトカインのための追加要件なしに、培地を含有する血清中でインビトロ増殖することができる、b) 表面マーカーの特定の組み合わせの発現: MSCは、CD11b、CD14、CD31

50

、CD34およびCD45などの造血マーカーおよび内皮マーカーに陰性であり、HLAクラスI、CD73、CD90およびCD105を含む、種々のその他のマーカーに陽性である、c)分化可能性：MSCをその能力によってインビトロ同定して、間葉系細胞に分化させることができる(例えば、脂肪細胞、骨芽細胞および軟骨細胞への三血球系分化)。MSCは、初期段階で少なくとも3能性であり、インビトロ増殖プロセスの過程で、例えば、2能性または単能性細胞へと減少する場合がある。これらの主要特性は共有されるが、異なる供給源からのMSC間で差異が見られる。したがって、セクレトームは細胞型間で異なり、骨髄由来MSC(BM-MSC)および脂肪由来MSC(ASCs)は特定のRNAおよびタンパク質発現特性を示す。

【0002】

MSCは、再生医療における細胞治療のための、または虚血性疾患、炎症性疾患および免疫疾患などのその他の疾患を治療するための、有望なツールであると考えられている。最初は、インサイチュ分化がこのMSCの治療特性の基盤である(即ち、構造的な組織の再生)と考えられたが、現在は、抗線維性、抗アポトーシス性または血管新生促進性を有する栄養素を通じたこのMSCの免疫調節能およびパラクリン効果が、より可能性の高い治療効果の機構であると考えられている。

【0003】

MSCは、免疫調節性を示し、Bリンパ球、Tリンパ球、NK細胞、単核細胞由来の樹状細胞および好中球を含む多種多様な免疫細胞の機能(増殖、活性化およびエフェクター機能)を調節する。MSCの免疫調節活性に伴う特異的な分子機構および細胞機構は、依然として調査中であるが、細胞接触依存機構(即ち、Jagged1-Notch1相互作用を通して)、ならびに肝細胞増殖因子(HGF)、プロスタグランジン-E2(PGE2)、トランスホーミング増殖因子(TGF)-1、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、一酸化窒素(NO)、インターロイキン(IL)-10、IL-6、ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)またはHLA-G5を含む可溶性因子の放出を通してパラクリン効果の両方に依存する。更にまた、MSCは、制御性T細胞(Treg)の産生を通して免疫応答を調節することができる。これらの細胞は、CD4、CD25およびフォークヘッド型転写因子群p3(Foxp3)の発現によって定義され、免疫抑制能を通して自己免疫からの保護において中心的役割を果たす。

【0004】

この免疫調節能に加えて、MSCの臨床用途の更なる潜在的利点は、MSCの免疫原性が低いと考えられることである。これは、HLAクラスIの発現が低く、かつHLAクラスII、ならびに典型的な共刺激分子であるCD40、CD80およびCD86が検出可能でないという事実による。

【0005】

最初に報告された(1995年)MSCに関する臨床試験の1つは、血液学的悪性腫瘍を有する患者の治療における、骨髄由来間質前駆細胞療法であった。それ以来、多数の臨床試験が実施されてきており、MSC治療についての最初の製造承認がなされた。現在では、骨疾患(例えば、骨嚢胞、口蓋裂、骨壊死、脊椎固定)、軟骨障害(例えば、関節軟骨修復および半月板修復)、血液疾患(例えば、貧血、骨髄異形成症候群)、代謝性疾患(例えば、I型糖尿病およびII型糖尿病)、肝疾患(例えば、肝硬変および肝不全)、心臓血管疾患(例えば、AMI)、消化器疾患(例えば、IBDおよび痔瘻)、自己免疫疾患(例えば、関節リウマチおよびクローン病)、肺疾患(例えば、COPDおよびIPF)、神経疾患(例えば、MS、脳卒中および椎間板変性症)、腎疾患(例えば、腎不全および腎移植)、泌尿生殖器疾患(例えば、尿失禁および勃起障害)および眼科疾患(例えば、網膜色素変性症)を含む適応症の治療について、MSCを伴う数百の試験が報告されている。

【0006】

このような進行中の調査は、多種多様な疾患および障害を治療する際の間葉系幹細胞の潜在力を示すが、治療反応の予測のためのバイオマーカーの使用が、このような療法の開

10

20

30

40

50

発および使用に潜在的に役立ってもよい。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含む医薬組成物に対する臨床反応を予測するための新規の血液系マーカーを提供する。一つの実施形態では、前記マーカーは、CD3+細胞である。一つの実施形態では、前記マーカーは、CD4+リンパ球レベル、CD8+リンパ球レベル、リンパ球のHLA-IIレベルおよびこれらの組み合わせからなる群から選択される。本発明の更なる態様は、ヒト被験者を治療するための方法を提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】応答者群および不応答者群における、ベースライン時の患者PBMC中のCD4（%）およびCD8（%）である。

【図2】応答者群および不応答者群における、ベースライン時の患者PBMC中のCD4/CD8比率である。

【図3】応答者群および不応答者群における、ベースライン時のPBMCおよび15日後のPBMC中のHLA-II発現である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

20

定義

本発明の記載の理解を促すために、本発明との関係で、幾つかの用語および表現の意味が下記のように説明される。更なる定義が、必要に応じて明細書を通してなされる。

【0010】

用語「幹細胞」、間質細胞、制御性T細胞、および線維芽細胞は、これらの子孫を包含するものとし、このような子孫としては、エクスピボ培養したこれらの子孫が挙げられるが、これに限定されない。親集団からの任意数の継代後、子孫細胞を得てもよいと理解されよう。しかし、ある種の実施形態では、親集団からの約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、または約10継代後、子孫細胞を得てもよい。

30

【0011】

用語「同種異系」は、本発明で使用する場合、同種の異なる個体から、の意味であるものとする。遺伝子が1つまたは2つ以上の位置で同一でない場合、2つ以上の個体は互いに同種異系であるといわれる。

【0012】

用語「自己」は、本発明で使用する場合、同一の個体から、の意味であるものとする。

【0013】

用語「自己免疫疾患」は、被験者自身の細胞、組織および/または器官への被験者の免疫学的反応に起因する、細胞、組織および/または器官損傷で同定した被験者の症状を指す。本発明の方法または医薬組成物で治療することができる自己免疫疾患の例示的非限定例としては、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー、チャグ・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡、クレスト症候群、寒冷凝集素症、円板状ループス、本態性混合クリオグロブリン血症、線維筋痛症・線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギラン・バレー、橋本甲状腺炎、特発性肺胞線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、I型または免疫介在性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発

40

50

性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、サルコイドーシス、強皮症、全身性進行性硬化症、シェーグレン症候群、グッドパスチャー症候群、ステッフマン症候群、全身性エリテマトーデス、紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、疱疹状皮膚炎、血管炎などの血管炎、白斑、ウェゲナー肉芽腫症、抗糸球体基底膜抗体病、抗リン脂質抗体症候群、神経系の自己免疫疾患、家族性地中海熱、ランバート・イトン筋無力症候群、交感性眼炎、多腺性内分泌不全症、乾癬などが挙げられる。

【0014】

本明細書に記載される発明の目的上、免疫異常は、自己免疫疾患、および限定されないが、免疫介在性炎症性疾患などの免疫介在性疾患を含む。

10

【0015】

用語「炎症性疾患」は、例えば慢性炎症のような炎症で同定した、被験者の症状を指す。炎症性疾患の例示的非限定例としては、慢性ウイルスまたは細菌感染から生じるセリアック病、関節リウマチ(RA)、炎症性腸疾患(IBD)、ぜんそく、脳炎、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、炎症性骨溶解、クローン病、潰瘍性大腸炎、アレルギー性疾患、敗血症性ショック、肺線維症(例えば、特発性肺線維症)、炎症性血管炎(例えば、結節性多発動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、高安動脈炎、側頭動脈炎およびリンパ腫様肉芽腫症)、外傷後の血管形成術(例えば、血管形成術後の再狭窄)、未分化脊椎関節症、未分化関節症、関節炎、炎症性視骨溶解、慢性肝炎、および慢性炎症が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0016】

細胞集団に適用される用語「単離した」は、細胞集団が、ヒトからまたは動物体から単離され、インビボまたはインビトロ前記細胞集団に関する1つ以上の細胞集団を実質的に含まないことを指す。用語「MHC(主要組織適合性遺伝子複合体)」は、細胞表面上の抗原提示タンパク質をコードする遺伝子の部分集合を指す。ヒトでは、この遺伝子はヒト白血球抗原(HLA)遺伝子と称される。本明細書中、略称MHCまたはHLAは、互換的に用いられる。用語「被験者」は、動物、好ましくは非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットまたはマウス)および霊長類(例えば、サルまたはヒト)を含む哺乳類を指す。好ましい実施形態では、被験者はヒトである。

30

【0017】

用語「免疫調節」は、免疫機構の1つ以上の生物活性の抑制または減少を指し、このような免疫機構としては、免疫応答の下方調節および炎症症状、ならびにサイトカインプロファイル、細胞毒性および抗体産生の変化が挙げられるが、これらに限定されない。用語「抗原特異的な免疫調節」は、アロ抗原および自己抗原の両方を含む特異抗原(単数または複数)と関連する、免疫機構の1つ以上の生物活性の抑制または減少を指す。用語「免疫調節」は、抗原特異的な免疫調節を含むものとする。

【0018】

本明細書で使用する場合、細胞表面マーカーに関して使用されるような「陰性」または「-」は、細胞集団において、20%、10%未満、好ましくは9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%未満の細胞が前記マーカーを発現する、またはいずれの細胞も前記マーカーを発現しないことを意味する。細胞表面マーカーの発現は、例えば、特異的細胞表面マーカーのためのフローサイトメトリーを用いて、従来の方法および装置(例えば、当該技術分野において既知の、市販の抗体および標準プロトコルと共に使用される、ベックマン・コールターのエピクスXL FACSシステム)を使用して、同定してもよい。

40

【0019】

用語「間葉系幹細胞」(本明細書においては、また、「MSC」という)は、本発明で使用する場合、もともと間充織に由来し、複数の異なる種類の細胞を生じさせることができる、間質細胞を意味するものとする。この用語は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、または筋細胞の少なくとも1つに分化することが可能な細胞を指す。この用語は、本発明で

50

使用する場合、前記MSCの子孫、例えば、限定されないが、継代培養したそれらの子孫を含むものとする。

【0020】

本明細書で使用する場合、表現「有意な発現」またはその同義語「陽性」および「+」は、細胞表面マーカーに関して使用する場合、細胞集団において、20%超、好ましくは30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%超の細胞が前記マーカーを発現する、または更に当該細胞の全ての細胞が前記マーカーを発現することを意味するものとする。

【0021】

細胞表面マーカーの発現は、例えば、特異的細胞表面マーカーのためのフローサイトメトリーを用いて、従来法および装置（例えば、当該技術分野において既知の市販の抗体および標準プロトコルと共に使用される、ベックマン・コールターのエピクスXL FACSシステム）を使用して、フローサイトメトリーにおいて、バックグラウンドシグナルより上の特異的細胞表面マーカーのシグナルを示す従来法および装置（例えば、当該技術分野において既知の、市販の抗体および標準プロトコルと共に使用される、ベックマン・コールターのエピクスXL FACSシステム）を使用して、同定してもよい。バックグラウンドシグナルは、従来のFACS分析において、それぞれの表面マーカーを検出するために使用される特異抗体と同じアイソタイプの非特異抗体によって与えられる、シグナル強度として定義される。マーカーが陽性であるとみなされる場合、観察される特異的シグナルは、従来法および装置（例えば、当該技術分野において既知の、市販の抗体および標準プロトコルと共に使用されるベックマン・コールターのエピクスXL FACSシステム）を使用して、バックグラウンドシグナル強度よりも20%強い、好ましくは30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、500%、1000%、5000%、10000%またはそれ以上に強い。

【0022】

更に、前記細胞表面マーカーに対して、市販かつ既知のモノクローナル抗体（例えば、細胞受容体および膜貫通型タンパク質）を使用して、関連性のある細胞を同定することができる。

【0023】

用語「結合組織」は、間充織由来の組織を指し、このような結合組織としては、その細胞が細胞外マトリックス内に含まれることを特徴とする、幾つかの組織が挙げられる。結合組織の例としては、脂肪および軟骨組織が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

用語「線維芽細胞」は、本発明で使用する場合、滑膜細胞などの線維芽細胞を含むものとする。

【0025】

本明細書で使用する場合、用語「治療する」、「治療」、「治療すること」は、患者または被験者に関して直接的に使用するとき、前記治療を必要とする被験者へ医薬組成物を投与して、疾患または障害（移植された器官および組織の拒絶を含む、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患または免疫介在性疾患が挙げられるが、これらに限定されない）と関連する、1つ以上の症状を改善することを意味するものとする。

【0026】

用語「臨床応答」、「臨床反応」および「治療反応」は、疾患または障害と関連する1つ以上の症状の変化を意味するものとし、このような疾患または障害としては、移植された器官および組織の拒絶を含む、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患または免疫介在性疾患が挙げられるが、これらに限定されず、前記変化は、前記治療を必要とする被験者への医薬組成物の投与からもたらされる。

【0027】

用語「応答者」は、疾患または障害（移植された器官および組織の拒絶を含む、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患または免疫介在性疾患が挙げられるが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

れない)を有する個体、被験者または患者であることを意味するものとし、ここで、治療は、1つ以上のこれらの症状を改善するまたは和らげるか、さもなければ治療的有用性を提供し、前記変化は、前記治療を必要とする被験者への医薬組成物の投与からもたらされる。

【0028】

用語「組織損傷」は、本発明で使用する場合、軟部組織損傷および硬部組織損傷の両方を含むものとし、瘻孔、例えば、痔瘻、直腸腔瘻などを含むものとする。

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「治療」、「治療すること」は、損傷した組織に関して直接的に使用するとき、損傷した組織の再生、損傷した組織の修復または置換(例えば、癒痕組織)などの両方の直接的機序によって、ならびに、例えば炎症を軽減し、それによって組織形成を可能にする間接的機序を通して、このような損傷を改善することを意味するものとする。

10

【0030】

用語「併用療法」は、その他の有効な薬剤または治療法と共に、本発明の医薬組成物を使用して、本発明の方法で、障害と関連する1つ以上の症状を改善することを指し、このような障害としては、移植された器官および組織の拒絶を含む、炎症性疾患、自己免疫疾患または免疫介在性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。これらその他の薬剤または治療は、コルチコステロイドおよび非ステロイド性抗炎症化合物などの、このような障害の治療のための既知の薬剤および療法を含んでもよいが、これらに限定されない。

20

【0031】

予側方法

本発明は、血液系、好ましくはリンパ球マーカーを評価することによって、組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常に苦しむ患者の細胞療法に対する治療反応を予測するための方法を提供する。好ましい実施形態では、前記「細胞療法」は、幹細胞(好ましくは間葉系幹細胞)、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ(例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞)を含む、医薬組成物の投与である。これらの一実施形態では、前記患者は、組織の損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常を有するヒト被験者である。したがって、本発明は、組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常を有するヒト被験者の、幹細胞(好ましくは間葉系幹細胞)、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ(例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞)を含む、医薬組成物の投与に対する治療反応を予測するための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、前記ヒト被験者から得られた血液試料中のリンパ球またはCD3+細胞集団を測定し、そこから、幹細胞(好ましくは間葉系幹細胞)、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ(例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞)を含む医薬組成物の投与への臨床応答を予測することを含む。

30

【0032】

一実施形態では、本方法は、前記ヒト被験者から得られた血液試料中のCD4+リンパ球レベル、CD8+リンパ球レベル、リンパ球のHLA-IIレベルおよびこれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーを評価し、そこから、幹細胞(好ましくは間葉系幹細胞)、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ(例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞)を含む医薬組成物の投与への臨床応答を予測することを含む。

40

【0033】

一実施形態では、医薬組成物は、間葉系間質細胞および/または間葉系間質幹細胞、例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞を含む。一実施形態では、医薬組成物は、脂肪由来の間葉系間質細胞および/または間葉系間質幹細胞を含む。

【0034】

一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、ヒト被験者のPB

50

MCにおいて測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、ヒト被験者のリンパ球において測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、ヒト被験者のCD3+リンパ球において測定される。

【0035】

一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、全リンパ球集団の百分率、細胞数または比率として測定されてもよい。一実施形態において、マーカーは、CD4+レベルである。

【0036】

一実施形態では、マーカーは、CD4+レベルである。更なる実施形態では、CD4+レベルは、35%~55%、より好ましくは40%~50%の範囲内の値以下（例えば、約35%未満、約40%未満、約45%未満、約50%未満、約55%未満）であり、Tリンパ球集団内のCD4+細胞は、応答者であると予想されるヒト被験者と関連する。

10

【0037】

一実施形態において、マーカーは、CD8+レベルである。更なる実施形態では、CD8+レベルは、45%~65%、より好ましくは50%~60%の範囲内の値以上（例えば、約45%超、約50%超、約55%超、約60%超、約65%超）であり、Tリンパ球集団内のCD8+細胞は、応答者であると予想されるヒト被験者と関連する。

【0038】

一実施形態において、マーカーは、CD4+/CD8+細胞比率である。更なる実施形態では、CD4+/CD8+細胞比率は、1.5以下、より好ましくは1.2~0.5の範囲内の値以下、最も好ましくは1以下（例えば、約1.2未満、約1.1未満、約1未満、約0.9未満、約0.8未満、約0.7未満、約0.6未満）であり、応答者であると予想されるヒト被験者と関連する。

20

【0039】

一実施形態において、マーカーは、HLA-IIレベルである。更なる実施形態では、これらを同種異系間葉系幹細胞と接触させた後のリンパ球のHLA-IIレベルの減少は、応答者であると予想されるヒト被験者と関連する。

【0040】

HLA-IIレベルは、そのレベルの減少が基準値について少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（即ち、非存在）である場合に、減少したとみなされる。

30

【0041】

HLA-IIレベルが減少したかどうかを測定するのに使用される基準値は、例えば、同種異系幹細胞非刺激リンパ球のHLA-IIレベルである。更に、非刺激リンパ球のHLA-IIレベルを、治療を受けようとしている、同じ患者からの試料で測定することができる。あるいはまた、異なる個体からのリンパ球から、または2個体以上の集団の血液からプールされたリンパ球から、基準値を得ることができる。例えば、集団は、3、4、5、10、15、20、30、40、50またはそれ以上の個体を含むことができる。

40

【0042】

一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、医薬組成物の投与に先立って測定される。更なる実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、医薬組成物の投与の後で測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、医薬組成物の投与から少なくとも1日目、5日目、10日目、15日目または20日目に測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、医薬組成物の投与の前後両方で測定される。別の実施形態では、医薬組成物は、患者に複数回投与され、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルが、医薬組成物の投与の前および/または後で測定される。

50

【 0 0 4 3 】

治療方法

本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含む医薬組成物によって、組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常を有するヒト被験者を治療するための方法を提供する。

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、本方法は、i) 前記ヒト被験者から得られた血液試料中のCD3+細胞集団を測定することによって、患者が前記医薬組成物に対して応答者か不応答者かを決定すること、およびii) ヒト被験者が応答者であると決定された場合に限り、前記医薬組成物を投与することを含む。

10

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、本方法は、i) 前記ヒト被験者から得られた血液試料中のCD4+リンパ球レベル、CD8+リンパ球レベル、リンパ球のHLA-IIレベルおよびこれらの組み合わせからなる群から選択されるマーカーを評価することによって、患者が前記医薬組成物に対して応答者か不応答者かを決定すること、およびii) ヒト被験者が応答者であると決定された場合に限り、前記医薬組成物を投与することを含む。

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、患者は、以前に、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含む医薬組成物で治療されたことがない。代替的实施形態では、i) に先立って、患者は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含む医薬組成物を投与され、ヒト被験者が応答者であると同定された場合、前記医薬組成物の投与は、継続されるだけであるか、またはその2回目投与量が投与されるだけである。

20

【 0 0 4 7 】

一実施形態では、医薬組成物は、間葉系間質細胞および/または間葉系間質幹細胞、例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞を含む。一実施形態では、医薬組成物は、脂肪由来の間葉系間質細胞および/または間葉系間質幹細胞を含む。更なる実施形態では、前記間葉系間質細胞および/または間葉系間質幹細胞を、i) に先立って増殖させる。

30

【 0 0 4 8 】

一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、患者のPBMCにおいて測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、患者のリンパ球において測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、ヒト被験者のCD3+リンパ球において測定される。

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、全リンパ球集団の百分率、細胞数または比率として測定されてもよい。

【 0 0 5 0 】

一実施形態において、マーカーは、CD4+レベルである。更なる実施形態では、CD4+レベルは、35%~55%、より好ましくは40%~50%の範囲内の値以下（例えば、約35%未満、約40%未満、約45%未満、約50%未満、約55%未満）であり、Tリンパ球集団内のCD4+細胞は、応答者に分類されるヒト被験者と関連する。

40

【 0 0 5 1 】

一実施形態において、マーカーは、CD8+レベルである。更なる実施形態では、CD8+レベルは、45%~65%、より好ましくは50%~60%の範囲内の値以上（例えば、約45%超、約50%超、約55%超、約60%超、約65%超）であり、Tリンパ球集団内のCD8+細胞は、応答者に分類されるヒト被験者と関連する。

【 0 0 5 2 】

一実施形態において、マーカーは、CD4+/CD8+細胞比率である。更なる実施形

50

態では、CD4+/CD8+細胞比率は、1.5以下、より好ましくは1.2~0.5の範囲内の値以下、最も好ましくは1以下（例えば、約1.2未満、約1.1未満、約1未満、約0.9未満、約0.8未満、約0.7未満、約0.6未満）であり、応答者としてのヒト被験者と関連する。

【0053】

一実施形態において、マーカーは、HLA-IIレベルである。更なる実施形態では、これらを同種異系間葉系幹細胞と接触させた後のリンパ球のHLA-IIレベルの減少は、応答者に分類されるヒト被験者と関連する。

【0054】

HLA-IIレベルは、そのレベルの減少が基準値について少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（即ち、非存在）である場合に、減少したとみなされる。

10

【0055】

HLA-IIレベルが減少したかどうかを測定するのに使用される基準値は、例えば、同種異系幹細胞非刺激リンパ球のHLA-IIレベルである。更に、非刺激リンパ球のHLA-IIレベルを、治療を受けようとしている、同じ患者からの試料で測定することができる。あるいはまた、異なる個体からのリンパ球からまたは2個体以上の集団の血液からプールされたリンパ球から、基準値を得ることができる。例えば、集団は、3、4、5、10、15、20、30、40、50またはそれ以上の個体を含むことができる。

20

【0056】

一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、医薬組成物の投与に先立って測定される。一実施形態では、CD4+、CD8+またはHLA-IIレベルは、医薬組成物の投与から少なくとも1日目、5日目、10日目、15日目または20日目に測定される。

【0057】

医薬用途

一態様では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含み、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する、医薬組成物を提供する。

30

【0058】

一実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含み、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物を提供し、前記ヒト被験者は、Tリンパ球の35%~55%、より好ましくは40%~50%の範囲内の値以下（例えば、約35%未満、約40%未満、約45%未満、約50%未満、約55%未満）のCD4+レベルを有する。

40

【0059】

更なる実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）の、組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を有するヒト患者を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物の製造における使用を提供し、前記ヒト被験者は、Tリンパ球の35%~55%、より好ましくは40%~50%の範囲内の値以下（例えば、約35%未満、約40%未満、約45%未満、約50%未満、約55%未満）のCD4+レベルを有する。

50

【 0 0 6 0 】

一実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含み、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状の治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物を提供し、前記ヒト被験者は、Tリンパ球の45%~65%、より好ましくは50%~60%の範囲内の値を超えた（例えば、約45%超、約50%超、約55%超、約60%超、約65%超）のCD8+レベルを有する。

【 0 0 6 1 】

更なる実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）の、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物の製造における使用を提供し、前記ヒト被験者は、Tリンパ球の45%~65%、より好ましくは50%~60%の範囲内の値を超えた（例えば、約45%超、約50%超、約55%超、約60%超、約65%超の）CD8+レベルを有する。

10

【 0 0 6 2 】

一実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含み、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物を提供し、前記ヒト被験者は、1.5以下、より好ましくは1.2~0.5の範囲内の値以下、最も好ましくは1以下（例えば、約1.2未満、約1.1未満、約1未満、約0.9未満、約0.8未満、約0.7未満、約0.6未満）のCD4+/CD8+細胞比率を有する。

20

【 0 0 6 3 】

更なる実施形態では、本発明は幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）の、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する、治療のための医薬組成物の製造における使用を提供し、前記ヒト被験者は、1.5以下、より好ましくは1.2~0.5の範囲内の値以下、最も好ましくは1以下（例えば、約1.2未満、約1.1未満、約1未満、約0.9未満、約0.8未満、約0.7未満、約0.6未満）のCD4+/CD8+細胞比率を有する。

30

【 0 0 6 4 】

更なる実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）の、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物の製造における使用を提供し、前記ヒト被験者は、リンパ球を同種異系間葉系幹細胞と接触させた後、リンパ球のHLA-IIレベルの減少を示す。好ましい実施形態では、HLA-IIレベルの減少が、基準値について少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%（即ち、非存在）である場合に、減少したとみなされる。

40

【 0 0 6 5 】

HLA-IIレベルが減少したかどうかを測定するのに使用される基準値は、例えば、同種異系幹細胞非刺激リンパ球のHLA-IIレベルである。更に、非刺激リンパ球のH

50

HLA - IIレベルを、治療を受けようとしている、同じ患者からの試料で測定することができる。あるいはまた、異なる個体からのリンパ球からまたは2個体以上の集団の血液からプールされたリンパ球から、基準値を得ることができる。例えば、集団は、3、4、5、10、15、20、30、40、50またはそれ以上の個体を含むことができる。

【0066】

一実施形態では、本発明は、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を含み、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物を提供し、前記ヒト被験者は、リンパ球を同種異系間葉系幹細胞と接触させた後、リンパ球のHLA - IIレベルの減少を示す。

10

【0067】

更なる実施形態では、本発明は幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）の、ヒト被験者の組織損傷、虚血性異常、炎症性異常および/または免疫異常と関連する1つ以上の症状を治療、調節、予防、および/または改善する医薬組成物の製造における使用を提供し、前記ヒト被験者は、リンパ球を同種異系間葉系幹細胞と接触させた後、リンパ球のHLA - IIレベルの減少を示す。

【0068】

免疫表現型検査

HLA - II +、CD4 + および CD8 + リンパ球集団の測定のための方法は、当該技術分野において周知である。前記細胞の定量化のためのゴールドスタンダードは、フローサイトメトリーである。染色パネルは、前記リンパ球細胞集団の蛍光タグ検出のために市販されている。典型的には、それぞれの亜集団の百分率は、CD3集団内の特異マーカーを染色することによって測定される。百分率の細胞数への変換は、体積測定法を使用することによって、つまり、試料の固定体積を分析することまたは任意の所与の試料の体積を記録することのいずれかによって、実施することができる。あるいは、ビーズ系システムが、蛍光ビーズを使用して試料をスパイクし、このように試料体積を測定することによって、百分率を絶対細胞数へ変換することを可能にする。体積測定法またはビーズ系の方法は、シングルプラットフォーム法と称され、例えば、TruCount（ベクトン・ディッキンソン（Beckton Dickinson））およびFlowCount（ベクトン・コールター（Beckton Coulter））から市販されている。加えてまた、CD4 + 分析のための専用プラットフォーム、例えば、FACScount（ベクトン・ディッキンソン（Beckton Dickinson））が、入手可能である。リンパ球定量化のための代替手法は、FACS測定基準として全リンパ球計数を測定するための血液分析器（haematology analyser）の使用である。多くの場合デュアルプラットフォーム法と称される、全白血球ゲート（pan-leucogating）などの方法は、混合プラットフォーム法を使用したリンパ球亜集団の定量化で当技術分野において既知である。フローサイトメトリーに代えて、血球計算盤と顕微鏡検査を組み合わせ使用して使用する手動法が、知られている。市販のキットは、免疫磁性ビーズを利用しており、これによって細胞亜集団を単離し、続いて顕微鏡下で計数することができる。

20

30

40

【0069】

医薬組成物

一実施形態では、本発明の医薬組成物は、予防上または治療上有効量の幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）ならびに医薬キャリアを含む。一実施形態では、医薬組成物は、間葉系幹細胞または間質細胞、より好ましくは、脂肪由来の間葉系幹細胞または間質細胞を含む。

【0070】

50

一実施形態では、医薬組成物は、1回投与に必要な細胞数を含むであろう；一回の投与に適切な細胞数は、例えば、約100～約1億個、約1,000～約1千万個、約10,000～約百万個、約100～約1,000個、約1,000～約10,000個、約10,000～100,000個、約100,000～約百万個、約百万～約1千万個、約1千万～約1億個である。

【0071】

適切な医薬キャリアは、当技術分野において既知であり、動物で、より詳細にはヒトで使用するために、米国連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認されている、または米国薬局方もしくは欧州薬局方もしくは他の一般的に認められた薬局方に列挙されているものであることが好ましい。用語「キャリア」は、治療薬と共に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、ビヒクルまたは支持体を指す。組成物は、必要に応じ、少量のpH緩衝剤を含有することができる。適な医薬キャリアの例は、E W Martin著『Remington's Pharmaceutical Sciences』に記載されている。このような組成物は、被験者への適正投与のための形態を付与するように、予防上または治療上有効量の予防薬または治療薬を、好ましくは精製形態で、適切な量のキャリアと共に含有するであろう。その処方は、投与方法に適したものである必要がある。好ましい実施形態では、医薬組成物は、滅菌済みであり、被験者、好ましくは動物被験体、より好ましくは哺乳類被験体、最も好ましくはヒト被験者への適正投与のための適切な形態である。

10

【0072】

本発明の医薬組成物は、種々の形態であってよい。これらには、例えば、凍結乾燥標品、溶液または懸濁液、注射可能な溶液および注入可能な溶液などのような、半固体および液体の投薬形態が挙げられる。医薬組成物は、注射可能であることが好ましい。

20

【0073】

また、本発明の医薬組成物を、他の治療法、例えば、コルチコステロイド、非ステロイド性抗炎症化合物、または炎症治療において有用な他の剤と組み合わせてもよい。本発明の剤とこの他の療法または治療法との併用は、同時であっても、逐次的に施されてもよい、即ち、2つの治療を分割してもよく、したがって、前記本発明の療法または医薬組成物が、その他の療法の前後または治療法に付与されてもよい。主治医は、免疫調節細胞またはそれを含む医薬組成物を投与する適切な順序を、他の剤、療法または治療法と組み合わせ決定してもよい。

30

【0074】

本発明の医薬組成物は、幹細胞、間質細胞制御性T細胞、および/または線維芽細胞を含むことが好ましい。前記幹細胞または間質細胞は、間葉系幹細胞（以下「MSC」とも称される）であり、脂肪組織に由来する、好ましくはヒト脂肪組織（hASC）からの多能性間質細胞である脂肪由来幹細胞（以下「ASC」とも称される）であることが最も好ましい。

【0075】

本発明の方法で使用するMSCは、好ましくは結合組織、最も好ましくは間質組織に由来する。前記MSCは、好ましい実施形態では脂肪組織に、更に好ましい実施形態では脂肪組織の間質分画に由来する。代替的实施形態では、前記MSCは、硝子軟骨の軟骨細胞から得られる。更なる実施形態では、前記MSCは、皮膚から得られる。別の実施形態では、前記MSCは骨髄から得られる。

40

【0076】

MSCは、任意の好適な動物、最も好ましくはヒトからの、任意の好適な結合組織の供給源から得ることができる。前記細胞は、非病理的哺乳類供給源、好ましくは出生後の供給源（例えば、げっ歯類または霊長類）であることが好ましい。好ましい実施形態では、MSCは、脂肪組織の間質分画、硝子軟骨、骨髄または皮膚などの、結合組織の供給源から得られるが、これらに限定されない。本発明の方法のMSCを、非病理的な出生後のヒト間質脂肪組織から得ることが最も好ましい。

50

【0077】

本発明で使用する線維芽細胞は、細胞外マトリックスの合成および保存に関する間充織由来の結合組織であり、滑膜細胞などの線維芽細胞を含むものとする。線維芽細胞は、任意の好適な動物、最も好ましくはヒトから得ることができる。

【0078】

制御性T細胞（あるいは、サプレッサーT細胞として知られている）は、本発明で使用する場合、血液または脾臓などの、任意の好適な供給源に由来してもよい。制御性T細胞は、天然CD4 + Foxp3 + 細胞であってもよく、またはエキスビポ単離および/または増殖されてもよい。制御性T細胞をエキスビポ増殖するための方法は当技術分野において既知であり、全血から単離（例えば、PBMC分画の一部として）し、続いて、例えば、間葉系幹細胞またはラパマイシンを使用して増殖する方法が挙げられる。

10

【0079】

本発明に従って医薬組成物が投与されるときの対象であるレシピエントに関して、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞は、同種異系（ドナー）または自家移植（被験者）由来のいずれかであってもよい。当該方法の好ましい実施形態では、前記MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞は、同種異系由来である。

【0080】

本発明の方法で使用するMSCは、(i) 抗原提示細胞に特異的なマーカーを発現しない、(ii) IDO（インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ）を構成的に発現しない、(iii) IFN- γ による刺激に際してIDOを発現しない、およびMSCの場合、(iv) 少なくとも2つの細胞系譜に分化させる能力を提示する、ことによって同定されることが好ましい。

20

【0081】

MSCは、多能性幹細胞であり、増殖して、少なくとも2つ、より好ましくは3つ、4つ、5つ、6つ、7つまたはそれ以上の細胞系譜に分化する能力を有する。前記MSCを分化させることができる細胞系譜の例示的非限定例としては、骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、腱細胞、筋細胞、心筋細胞、造血支持間質細胞、内皮細胞、神経細胞、星状膠細胞、および肝細胞が挙げられる。従来の方法によって、MSCを増殖させ、誘導してその他の系譜の細胞へ分化させることができる。それらの細胞の未分化相当物から分化させた細胞を同定し、続いて単離する方法を、また、当該技術分野において周知の方法によって実施することができる。

30

【0082】

MSCは、エキスビポ培養細胞であることが好ましく、MSC集団の増殖のための方法は、当技術分野において既知である。単離後、MSCを保存して、細胞培地においてエキスビポ増殖することができる。このような培地は、例えば、抗生物質（例えば、ペニシリン100ユニット/mLおよびストレプトマイシン100 μ g/mL）を有する、または抗生物質を有さない、グルタミン2mMを有する、ウシ胎仔血清（FBS）を2%~20%添加した、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）で構成されていてもよい。使用される細胞について、必要に応じて、培地の濃度および/または培地添加物を変更するまたは調節することは、当業者の技能の範囲内に入る。血清は、多くの場合、生存能力および増殖のために必要な、細胞要因および細胞成分ならびに非細胞要因および非細胞成分を含有する。血清の例としては、ウシ胎仔血清（FBS）、ウシ血清（BS）、子ウシ血清（CS）、ウシ胎児血清（FCS）、新生仔ウシ血清（NCS）、ヤギ血清（GS）、ウマ血清（HS）、ブタ血清、ヒツジ血清、ウサギ血清、ラット血清（RS）などが挙げられる。また、前記MSCがヒト由来である場合、好ましくは自己由来のヒト血清を細胞培地に添加することは、本発明の範囲内である。補体カスケードの成分を不活性化する必要があると見なした場合、血清を、55~65 $^{\circ}$ Cで加熱不活性化することができる。また、血清濃度の調節および/または培地からの血清除去を使用して、1種または2種以上の所望の細胞型の生存を促進することができる。前記MSCは、約2%~約25%のFBS濃度から恩恵を受けるであろうことが好ましい。別の実施形態では、MSC

40

50

を、明確な組成の細胞培地において増殖させることができ、ここで、血清は、血清アルブミン、血清トランスフェリン、セレン、および組換え体タンパク質の組み合わせで置換され、このような血清としては、当技術分野において既知の通り、インスリン、血小板由来増殖因子（PDGF）、および塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0083】

多くの細胞培地は、既にアミノ酸を含有するが、幾つかは、細胞の培養に先立って添加を必要とする。このようなアミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-システイン、L-シスチン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-グリシンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0084】

また、通常、抗菌剤が細胞培養で使用され、細菌、マイコプラズマおよび真菌による汚染を軽減する。通常、使用される抗生物質または抗真菌薬は、ペニシリン/ストレプトマイシンの混合物であり、そしてまた、アンフォテリシン（ファンギゾン（登録商標））、アンピシリン、ゲンタマイシン、プレオマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、マイトマイシンなども含むことができるが、これらに限定されない。

【0085】

また、ホルモンを細胞培養で有利に使用することができ、このようなホルモンとしては、D-アルドステロン、ジエチルスチルベストロール（DES）、デキサメタゾン、エストラジオール、ヒドロコルチゾン、インスリン、プロラクチン、プロゲステロン、ソマトスタチン/ヒト成長ホルモン（HGH）などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0086】

一実施形態では、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）は、自家移植、同種異系または異種であってもよい。前記幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）は、投与されるまたは投与が意図される患者または被験者に対して、同種異系であることが特に好ましい。

【0087】

増殖細胞

一実施形態では、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）を、本発明の方法および組成物の使用に先立って増殖させてもよい。

30

【0088】

ある種の実施形態では、細胞を、少なくとも約15日、少なくとも約20日、少なくとも約25日、または少なくとも約30日間、培養してもよい。培養中の細胞の増殖は、細胞集団の細胞表現型の均一性を改善し、したがって、好ましい実施形態では、前記細胞は、実質的に均一になるまで培養される。

【0089】

ある種の実施形態では、細胞は、少なくとも3継代培養の間または「3回継代培養される」間、培養中に増殖する。他の実施形態では、細胞は少なくとも4回、少なくとも5回、少なくとも6回、少なくとも7回、少なくとも8回、少なくとも9回、または少なくとも10回継代培養される。細胞の多種系統分化可能性は、増殖中に、例えば、細胞が連続継代培養されるにつれて減少してもよいが、それにもかかわらず、このような子孫細胞は、本発明の実施形態の範囲内である、と理解されている。細胞増殖の方法は、当技術分野において既知であり、市販の2Dまたは3Dバイオリアクターの使用を含んでもよい。

40

【0090】

凍結保存細胞

一実施形態では、幹細胞（好ましくは間葉系幹細胞）、間質細胞、制御性T細胞、線維

50

芽細胞およびこれらの組み合わせ（例えば、多能性の間質細胞または間質幹細胞）は、本発明の方法および組成物の使用に先立って、凍結保存および解凍されてもよい。

【0091】

幹細胞の凍結保存の方法は、当技術分野において既知であり、凍結保存緩衝液または培地の使用を含んでもよい。このような緩衝液は、当技術分野において既知であり、市販されている。

【0092】

遺伝子組換え細胞

別の実施形態では、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞は、遺伝子組換えされた（例えば、外来核酸を形質導入またはトランスフェクトした）、またはそこから誘導した細胞であってもよい。

10

【0093】

例えば、前記細胞は、遺伝子組換えされ、例えば、前記酵素をコードする適切な核酸コンストラクトによるトランスフェクション、および所望により、好適なプロモーター配列によって、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）を構成的に発現する。細胞の遺伝子組換え技術は、当該技術分野において既知であり、当業者によって実施されてもよい。

【0094】

照射細胞

更に別の実施形態では、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞は、本発明の方法および組成物の使用に先立って、照射されてもよい。細胞の照射は、細胞の増殖能および寿命を減少させる。

20

【0095】

照射を、線照射装置などの好適な制御された電離放射線の供給源を使用して実施してもよい。照射条件を当業者によって実験的に調整し、必要な曝露時間を測定し、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞の長期の成長停止を引き起こす放射線量を付与しなければならない。一実施形態では、前記放射線量は、1~100 Gy、5~85 Gy、10~70 Gy、12~60 Gyからなる群から選択される範囲内であるが、前記放射線量は、15~45 Gy、典型的には、20~30 Gyまたは22~28 Gyであることが特に好ましい。

30

【0096】

CD26拮抗薬処理細胞

更に別の実施形態では、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞を、本発明の方法の使用に先立って、CD26拮抗薬または阻害剤で処理してもよい。CD26拮抗薬または阻害剤は、当技術分野において既知であり、アミノメチルピリジン、P32/98、NVDPDP728、PSN9301、イソロイシンチアゾリジド（thiazolidide）、デナグリブチン、シタグリブチン、ビルダグリブチン、サクサグリブチン、アログリブチン、ジプロチンAが挙げられるが、これらに限定されず、このような治療が当業者によって実施されてもよい。

【0097】

IFN- 刺激細胞

別の実施形態では、本発明の方法の使用に先立って、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞をインターフェロンで刺激してもよい。MSCを刺激するためのMSCのIFN- 処理は、当該技術分野において既知であり（例えば、Kramperaら、Stem Cells、2006 Feb; 24(2): 386-98）、当業者によって実施されてもよい。

40

【0098】

抗原刺激細胞

別の実施形態では、本発明の方法の使用に先立って、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞を抗原で刺激してもよい。MSCを刺激するためのMSCの抗原処理は

50

、当該技術分野において既知であり、当業者によって実施されてもよい。

【0099】

マイトマイシンC処理MSC

更に別の実施形態では、本発明の方法の使用に先立って、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞をマイトマイシンCで処理してもよい。MSCのマイトマイシンC処理は、当該技術分野において既知であり、当業者によって実施されてもよい。

【0100】

更に、必要に応じて、MSC、制御性T細胞、および/または線維芽細胞を、本発明の方法の使用に先立って、照射、IFN-刺激およびマイトマイシンC処理からなる群から選択される2つまたは3つの処理の組み合わせに課することができる。

10

【0101】

また、前記MSCの保存条件は、細胞が未分化形態のままであることを可能にする、細胞性因子を含有することができる。分化に先立って、細胞分化を阻害する添加物を培地から除去しなければならないことは、当業者には明らかである。全ての細胞が、これらの因子を必要とするとは限らないであろうことも、また明らかである。事実、これらの因子は、細胞の種類に応じて、不必要な効果を誘発する場合がある。

【0102】

本発明の各種実施形態が以下の実施例によって説明されるであろうが、これは、本明細書に記載される発明を限定するものではない。

20

【実施例】

【0103】

実施例1：

MSC療法応答者および不応答者におけるリンパ球バイオマーカーの評価

幹細胞療法は、組織損傷および炎症で同定した障害治療での使用に大きな可能性を有する。このような治療に関して、患者予後の決定において有用性を有する血液系マーカーを同定するために、クローン病患者の痔瘻は理想的なモデル障害であるが、それは、この痔瘻が炎症性疾患を有する患者の組織損傷で同定されるからである。患者血液試料のリンパ球分析を、同種異系増殖脂肪由来細胞(eASC)での治療の前後両方で実施した。

【0104】

材料および方法

30

患者集団

患者集団は、多施設第I/I相臨床試験(clinicaltrials.gov identifier NCT01372969)において治療された複雑肛門周囲瘻孔を有する、24人のクローン病患者で構成される。患者を、2,000万個のeASCの病変内投与によって治療した。瘻孔治癒を治療後12週間で測定し、不完全治癒の場合、4,000万個のeASCの2回目投与を実施した。試験中、ベースライン時および15日目の2つの時点で患者から全血を採取した。

【0105】

MRIをベースライン時に実施し、瘻管と関連する2cmを超える貯留を評価した。被験者を、全体で24週間追跡し、治癒を、12週目および24週目に放射線学的および臨床的評価を用いて評価した。

40

【0106】

12週目の瘻孔閉鎖を使用して、応答者として患者を定義し(n=9)、他の全ての患者を、不応答者として定義した(n=15)。瘻孔閉鎖は、自然におよび加圧に際しての両方で外口を通して瘻孔の膿が出ず、臨床評価中に外口が完全再上皮化し、かつMRIにより測定した場合、3軸で治療済み瘻管と直接関係する2cmを超える貯留がないこととして定義した。瘻孔を、2回の連続受診、即ち、10週目・12週目および22週目・24週目に評価し、誤った解釈を避け、治療法の決定を指導した。瘻孔評価を、主治医および独立した臨床医の両方が実施した。表1は、それぞれ個々の被験者の応答状態の概要およびその血液試料に実施された分析を示す。

50

【0107】

P B M C 単離

血液試料を、ベースライン時および15日目に患者から採取した。末梢血単核細胞(P B M C)を、F i c o l l - P a q u e P L U S (G Eヘルスケアバイオサイエンス株式会社、スウェーデン国ウプサラ)を使用して、供給元の手順に従って、血液試料から単離した。要約すると、血液試料を平衡塩類溶液で希釈し、F i c o l lを添加して、密度勾配を生じさせた。遠心分離後、単核細胞を含有する界面を収集した。純度をフローサイトメトリーによって検証した。

【0108】

間葉系幹細胞

同種異系 e A S C 医薬品は、健常人ドナーの皮下脂肪組織から抽出された、間葉に由来する生体成体幹細胞の細胞懸濁液で構成される。皮下脂肪組織は、健常人ドナーから吸引され、製造施設へ輸送された。供血、調達、試験を、指令2004/23/ECの要件に従って、したがって、指令2006/17/ECおよび指令2006/83/EC下で実施した。脂肪組織を0.075%コラゲナーゼ(タイプI、インビトロジェン、カリフォルニア州カールスパッド)で消化することによって、A S Cを単離し、続いて遠心分離を行った。得られた細胞ペレットを、再懸濁して、赤血球溶菌液(10%ウシ胎仔血清(F B S)、N H ₄ C l 160mMで処理された)中で溶解し、遠心分離した。細胞ペレットから得られた間質血管細胞群を、培地(ダルベッコ改変イーグル培地(D M E M)、10%F B Sを有する)で再懸濁し、培地および抗生物質を入れた細胞培養容器内に置き、5%CO₂、37℃、および加湿雰囲気中で培養した。24~28時間の平板培養後、培地を除去して付着していない細胞分画を除去した。A S Cをプラスチック培養皿に付着させ、インビトロ条件下で増殖させた。3~4日ごとに、90~95%コンフルエントになった後、培地を交換し、細胞をトリプシン/EDTAで剥がして収集し、遠心分離し、抗生物質なしで、必要とされる2倍になるまで増殖させた。次に、これらを収穫し、使用するまで凍結保存した。指定された投与日前に、投与に必要な投与量を提供するため、十分に凍結保存されたバイアルを解凍した。A S Cを、平板培養および培養によって、それらの凍結保存された状態から再生した(生存能力を確認するため)。バイアルを充填し、パッケージングした日に、培養液を、リン酸緩衝液およびトリプシン/EDTAで洗浄した。e A S Cを選択された賦形剤(ダルベッコ改変イーグル培地およびヒトアルブミン血清)中で直ちに再懸濁し、製剤を処方した。

【0109】

フローサイトメトリー

異なる蛍光色素で標識したC D 3、C D 4、C D 8、C D 2 5、F O X P 3、H L A - I Iに対する抗体(B Dバイオサイエンス)を使用した。アイソタイプ対照は、B Dバイオサイエンスからであった。細胞を収穫し、製造業者の指示に従って、適切な表面モノクローナル抗体で染色した。洗浄後、細胞を固定し、F A C S C a n t o (B Dバイオサイエンス)を使用して 10×10^3 イベントを得た。F A C S D i v aソフトウェアを、取得および分析に使用した。

【0110】

循環T細胞の免疫表現型検査

患者からの末梢血中の細胞レパートリーを、ベースライン時および15日目に研究した。末梢血単核球分画を、T (C D 3 + によって定義される)、ヘルパーT細胞(C D 3 + C D 4 + によって定義される)および細胞傷害性T細胞(C D 3 + C D 8 + によって定義される)の表現型分析のために選択した。

【0111】

リンパ球のH L A - I I 発現

患者のP B M C 試料のインビトロ共培養に際して、H L A - I Iの発現レベルを、医薬品の同種異系 e A S Cを用いて、ドナー e A S Cのインビボ免疫認識の指標として測定した。要約すると、e A S Cを、96ウェルプレート(3×10^3)に播種し、単独でまた

10

20

30

40

50

は試験の患者それぞれからのPBMCS (2×10^5)の存在下で、24時間培養した。培養した細胞を収穫した後、FACS分析を実施した。インビトロ培養後、eASC (対照)の有無にかかわらず、CD3およびHLA IIに対するモノクローナル抗体を使用して、T細胞上のHLA II発現を測定した。

【0112】

統計

対応のあるスチューデントのt検定を使用して、統計学的差異を解析した。0.05未満のp値を有意であるとみなした。

【0113】

結果

T細胞免疫表現型

研究の参加者の循環細胞レパトリを、フローサイトメトリーで分析した。応答者および不応答者の患者群の単離PBMCSにおいて、eASCで治療される前に収集した試料中のT細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞および制御性T細胞の分布率(リンパ球領域におけるCD3+集団)を研究した。T細胞区画の変動が、応答者群と不応答者群との間で観察された。

【0114】

図1に示すように、応答者群は、不応答者集団よりも、より低いレベルのCD4T細胞(CD3+細胞集団の $45.2 \pm 5\%$)、およびより高レベルのCD8T細胞(CD3+細胞集団の $54.8 \pm 5\%$)を提示した。不応答者集団は、比較的正規分布に近い、CD4およびCD8T細胞(全CD3+細胞集団の $34.99 \pm 7\%$ のCD8および $65.01 \pm 7\%$ のCD4)を提示した。したがって、 $45\% \sim 65\%$ 、より好ましくは $50\% \sim 60\%$ のCD8+リンパ球、および $35\% \sim 55\%$ 、より好ましくは $40\% \sim 50\%$ のCD4+リンパ球、の範囲内のカットオフ値が、応答者集団と不応答者集団との間を区別するのに適している。

【0115】

これらの値を発現する代替手段として、CD4/CD8比率を計算し、図2に示す。このデータは、不応答者集団では平均CD4/CD8比率が1.5を超えたが、応答者集団では、細胞傷害性細胞区画の増加およびヘルパー集団の減少によって平均比率1.5未満であることを示し、これにより、この患者群がより免疫活性化特性を有することを示した。

【0116】

リンパ球のHLA-II発現

ボランティアのPBMCS試料(eASC治療前後両方)のインビトロ共培養に際して、HLA-IIの発現レベルを、同種異系ドナーeASCを用いて、研究した。HLA-IIは、ドナーeASCのインビボ免疫認識の指標である。HLA-IIマーカーの発現割合を、図3に示す。応答者群の患者では、HLA-II発現の下方調節が有意であったことを示した。不応答者集団のベースライン時に、PBMCSにおいて、HLA-II発現は平均 22.93 、標準偏差 ± 9.5 であり、共培養したPBMCS+ASCsにおいては、平均 23.77 、標準偏差 ± 9.91 であった。応答者群では、PBMCSにおいて、HLA-II発現は平均 24.35 ± 12.51 であり、共培養したPBMCS+ASCsにおいては、驚くべきことに、平均が 17.73 まで減少し、標準偏差 ± 9.71 であった。

【0117】

更にまた、この下方調節は15日目にも観察され、これは、治療の初期段階に先立ってまたはその間の両方で、HLA-IIマーカーを、臨床反応の測定で使用してもよいことを示す。

10

20

30

40

【表 1】

表 1

患者	治療反応	CD4 アッセイ	CD8 アッセイ	HLA-II アッセイ
1	不応答者	✓	✓	✓
2		✓	✓	✓
3		X	x	✓
4		✓	✓	✓
5		✓	✓	✓
6		X	x	✓
7		✓	✓	✓
8		✓	✓	✓
9		✓	✓	✓
10		X	x	✓
11		✓	✓	✓
12		✓	✓	✓
13		✓	✓	✓
14		✓	✓	✓
15		✓	✓	✓
16	応答者	X	x	✓
17		✓	✓	✓
18		✓	✓	✓
19		✓	✓	✓
20		✓	✓	✓
21		X	x	✓
22		✓	✓	✓
23		✓	✓	✓
24		✓	✓	✓

10

20

30

40

【 図 1 】

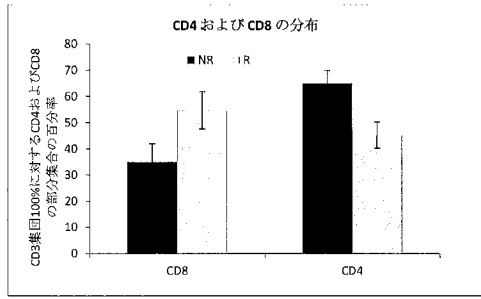
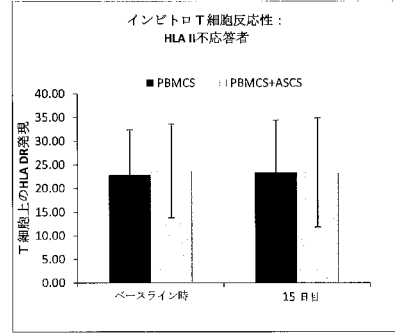


Fig. 1

【 図 3 】



【 図 2 】

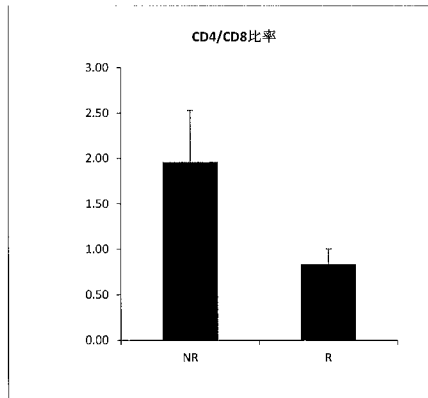


Fig. 2

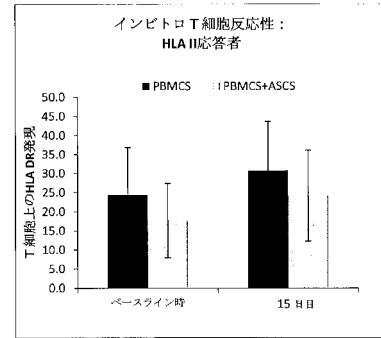


Fig. 3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/055282**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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.:

4-6, 12-14, 16-18(completely); 1-3, 8-11(partially)

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055282

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/569 A61K35/14
 ADD. A61P37/06

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)

G01N A61K

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, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>OLGA DELAROSA ET AL: "Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 23, no. 6, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 978-983, XP055096416, ISSN: 0958-1669, DOI: 10.1016/j.copbio.2012.05.005 p. 979 Box 1</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-6, 8-14, 16-18

 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

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

B document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 September 2014

Date of mailing of the international search report

18/02/2015

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

Schalich, Juliane

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055282

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>Clinical & Investigative Sciences Group (clinical And Laboratory Haematology) ET AL: "Conditioning Protocols - allogeneic transplantation", 23 September 2012 (2012-09-23), XP055137189, Retrieved from the Internet: URL:http://www.imperial.nhs.uk/prdcons/gro ups/public/@clinical/@cancer/documents/doc /hhnt_005219.pdf [retrieved on 2014-08-28] the whole document</p>	1-6, 8-14, 16-18
Y	<p>----- KRAMPERA MAURO ET AL: "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells", STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 24, no. 2, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 386-398, XP002422937, ISSN: 1066-5099 p. 396</p>	1-6, 8-14, 16-18
Y	<p>----- M KRAMPERA: "Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process", LEUKEMIA, vol. 25, no. 9, 1 September 2011 (2011-09-01), pages 1408-1414, XP055137780, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2011.108 p. 1911</p>	1-6, 8-14, 16-18
X,P	<p>----- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; October 2013 (2013-10), WANG DANDAN ET AL: "A CD8 T Cell-IFN-gamma-IDO Axis Is Required For Mesenchymal Stem Cell Suppression Of Human SLE", XP002729197, Database accession no. PREV201300782514 abstract & ARTHRITIS & RHEUMATISM, vol. 65, no. Suppl. 10, Sp. Iss. SI, October 2013 (2013-10), pages S674-S675, 77TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-COLLEGE-OF-RHEUMATOLOGY / 48TH ANNUAL MEETING OF THE ASSOCIATION; SAN DIEGO, CA, USA; OCTOBER 25 -30, 2013 ISSN: 0004-3591(print)</p>	1-6, 8-14, 16-18
	----- -/--	

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/055282

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>DELAROSA OLGA ET AL: "Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells", TISSUE ENGINEERING, LARCHMONT, NY, US, vol. 15, no. 10, 7 October 2009 (2009-10-07), pages 2795-2806, XP002563369, ISSN: 1076-3279, DOI: 10.1089/TEN.TEA.2008.0630 [retrieved on 2009-04-03] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-6, 8-14, 16-18</p>

International Application No. PCT/ EP2014/ 055282

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 4-6, 12-14, 16-18(completely); 1-3, 8-11(partially)

Method for predicting clinical response to the administration of MSC and treatment of a patient with MSC suffering from an inflammatory and/or an immune disorder by evaluating levels of CD8+ and/or CD4+ lymphocyte levels.

2. claims: 7, 15, 19(completely); 1-3, 8-11(partially)

Method for predicting clinical response to the administration of MSC and treatment of a patient with MSC suffering from an inflammatory and/or an immune disorder by evaluating levels of HLA-II.

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 K 35/35 (2015.01)	A 6 1 K 35/35	
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z
A 6 1 K 35/33 (2015.01)	A 6 1 K 35/33	
	G 0 1 N 33/53	K

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, LT, 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

(74) 代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(74) 代理人 100180873

弁理士 田村 慶政

(72) 発明者 デ ラ ロサ、オルガ

スペイン国 マドリッド エ - 2 8 7 6 0 トレス カントス、マルコニ 1、パルケ テクノロ
ヒコ デ マドリッド、ティゲニクス、エセ、ア、ウ

(72) 発明者 ロンバルド、エレウテリオ

スペイン国 マドリッド エ - 2 8 7 6 0 トレス カントス、マルコニ 1、パルケ テクノロ
ヒコ デ マドリッド、ティゲニクス、エセ、ア、ウ

(72) 発明者 デールマンズ、ウィルフレッド

ベルギー国 ベー - 3 0 0 1 ルーヴェン、ロマインセ ストラート 1 2 パス 2、ティジェ
ニクス エヌブイ

Fターム(参考) 4C087 AA01 AA02 BB37 BB63 ZA36 ZB07 ZB11 ZB21

专利名称(译)	用于确定对细胞疗法的临床反应的淋巴细胞生物标志物		
公开(公告)号	JP2016516985A	公开(公告)日	2016-06-09
申请号	JP2015562256	申请日	2014-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	茶增益尼克斯Essey金 茶杰弗里·尼克斯NV		
申请(专利权)人(译)	Tigenikusu , Essey , A , U Tijenikusu NV		
[标]发明人	デラロサオルガ ロンバルドエレウテリオ デールマンズウィルフレッド		
发明人	デラロサ、オルガ ロンバルド、エレウテリオ デールマンズ、ウィルフレッド		
IPC分类号	G01N33/53 A61P9/00 A61P29/00 A61P37/02 A61K35/28 A61K35/35 A61K35/17 A61K35/33		
CPC分类号	A61K35/17 A61K35/28 A61K35/33 A61P9/00 A61P9/10 A61P29/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 G01N33/56972 G01N2333/70514 G01N2333/70517 G01N2333/70539 G01N2800/52 A61K35/35		
FI分类号	G01N33/53.Y A61P9/00 A61P29/00 A61P37/02 A61K35/28 A61K35/35 A61K35/17.Z A61K35/33 G01N33/53.K		
F-TERM分类号	4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB63 4C087/ZA36 4C087/ZB07 4C087/ZB11 4C087 /ZB21		
代理人(译)	伊奈美稔 田村 庆政		
优先权	2013382091 2013-03-15 EP		
其他公开文献	JP6567430B2 JP2016516985A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明用于确定人类受试者的临床预后，所述人类受试者的药物组合物的给药包括干细胞（优选间充质干细胞），基质细胞，调节性T细胞，成纤维细胞及其组合。提供一种方法。

(21) 出願番号	特願2015-562256 (P2015-562256)	(71) 出願人	513059353
(86) (22) 出願日	平成26年3月17日 (2014.3.17)		
(85) 翻訳文提出日	平成27年10月27日 (2015.10.27)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/055282		
(87) 国際公開番号	W02014/140362		
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)		
(31) 優先権主張番号	13382091.0	(71) 出願人	513176270
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
			ティゲニクス、エセ、ア、ウ TiGenix, S. A. U. スペイン国 マドリッド エ-28760 、トレス カントス、1、マルコニ、バル ケ テクノロヒコ デ マドリッド
		(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100103447 弁理士 井波 実

最終頁に続く