

(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2019-503985

(P2019-503985A)

(43) 公表日 平成31年2月14日(2019.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4B064
<b>A61P 7/00 (2006.01)</b>	A61P 7/00	4B065
<b>A61P 9/00 (2006.01)</b>	A61P 9/00	4C087
<b>A61P 17/02 (2006.01)</b>	A61P 17/02	4H045
<b>A61P 39/02 (2006.01)</b>	A61P 39/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-522547 (P2018-522547)	(71) 出願人	506167421 グリコメテイクス、 インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成28年11月2日 (2016.11.2)		アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9708
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月19日 (2018.6.19)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/060014	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02017/079215	(72) 発明者	マグナニ, ジョン エル. アメリカ合衆国 メリーランド 20878, ゲーサーズバーグ, ドウ レーン 12819
(87) 国際公開日	平成29年5月11日 (2017.5.11)		
(31) 優先権主張番号	62/250,424		
(32) 優先日	平成27年11月3日 (2015.11.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】モノクローナル抗体、造血幹細胞の産生のための方法および組成物、ならびにそれらを使用する方法

(57) 【要約】

造血幹細胞 (HSC)、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別し、かつ/または単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための方法および組成物。さらに、HSCまたは遺伝的に修飾されたHSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCおよび/または遺伝的に修飾されたHSCを使用して、血液学的もしくは遺伝的な障害を有する患者、心血管障害を有する患者、創傷から回復中の患者、または化学療法もしくは放射線曝露から回復中の患者を処置するための方法および組成物が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト造血幹細胞（HSC）を識別かつ単離するために使用され得る抗体を生成するための方法であって、

2 - 3シアル酸付加されたラクト - ネオラクト型構造に結合し、

ヒトHSCを識別することができる

抗体について、抗体集団をスクリーニングするステップを含む、方法。

## 【請求項 2】

前記抗体集団が、CD34+ / CD38 - HSCに対して産生される、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記識別されたHSCが、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCである、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 4】

前記 2 - 3シアル酸付加されたラクト - ネオラクト型構造が、シアリル I、シアリル i、シアリルラクトース、シアリルラクト - N - テトラオース、シアリルラクト - N - ネオテトラオース、および N - アセチルシアリルラクトースアミンから選択される、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 2 - 3シアル酸付加されたラクト - ネオラクト型構造が、シアリルラクトースである、請求項 4 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記抗体が、ヒト幹細胞マーカー CD133 上の 2 - 3シアル酸付加されたラクト - ネオラクト型構造に結合する、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 7】

前記抗体が、3' SL - CD133 に特異的に結合し、ノイラミニダーゼで処理した 3' SL - CD133 には結合しない、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 8】

前記抗体が、in vivo モデルによって機能的に決定される通り、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCを単離するために使用することができる、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記 in vivo モデルが、亜致死的または致死的に照射されたマウスへの、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCの移植である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記抗体が、CD133 およびヒト - フコシダーゼで処理した CD133 に結合するか、またはそれらとの結合が増強しているが、ノイラミニダーゼで処理した CD133 には結合しない、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 11】

前記 in vivo モデルが、亜致死的または致死的に照射されたマウスへの、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCの移植である、請求項 10 に記載の方法。

40

## 【請求項 12】

前記HSCが、骨髄、動員末梢血、および臍帯血から選択される少なくとも1つの供給源から得られる、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 13】

前記HSCが、FACS選別、免疫磁気ビーズ、およびアフィニティマトリックスから選択される少なくとも1つの方法によって得られる、先行する請求項のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

前記ヒト幹細胞マーカー CD133 が、ヒトHSCまたはヒト造血前駆細胞から単離さ

50

れる、請求項 6 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって生成された抗体を使用して単離された、HSC 集団。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって生成された抗体を使用して、HSC を単離するステップと、

前記単離された HSC を遺伝的に修飾するステップと  
によって生成された、遺伝的に修飾された HSC 集団。

【請求項 17】

前記細胞が、骨髄、末梢血、白血球除去生成物、臍帯血、またはそれらの組合せから単離される、請求項 15 または 16 に記載の細胞集団。

【請求項 18】

請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の集団から分化した、リンパ系列の細胞集団。

【請求項 19】

請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の集団から分化した、赤血球系列の細胞集団。

【請求項 20】

請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載の集団から分化した、内皮前駆細胞集団。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法によって生成された、単離されたマウスモノクローナル抗体。

【請求項 22】

血液学的疾患を処置し、血液学的障害を処置し、血液学的状態を処置し、心血管障害を処置し、創傷を処置し、化学療法から救済し、かつ/または高線量放射線から対象を救済する方法であって、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の細胞集団を投与するステップを含む、方法。

【請求項 23】

請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の細胞集団を使用して、造血発生を再構築する方法。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法に従って生成された抗体を使用して、疾患、障害、または状態を診断する方法。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法に従って生成された抗体を使用して、HSC を精製する方法。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法に従って生成された抗体を使用して、リンパ腫を処置する方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法に従って生成された抗体を使用して、疾患、障害、または状態をモニタリングする方法。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法に従って生成された抗体を使用して、疾患、障害、または状態の処置をモニタリングする方法。

【請求項 29】

請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の細胞を使用して、進行性濾胞性リンパ腫を処置する方法。

【請求項 30】

請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の細胞を使用して、小児の血液学的疾患を処置する方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 3 1】  
請求項 1 5 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の細胞を使用して、血液学的障害を処置する方法。
- 【請求項 3 2】  
請求項 1 5 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の細胞を使用して、心血管障害を処置する方法。
- 【請求項 3 3】  
請求項 1 5 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の細胞を使用して、創傷治癒を促進する方法。
- 【請求項 3 4】  
前記疾患が、急性骨髄性白血病である、請求項 3 0 に記載の方法。 10
- 【請求項 3 5】  
請求項 1 6 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の細胞を使用して、遺伝的疾患、障害、または状態を処置する方法。
- 【請求項 3 6】  
血液学的疾患、障害、または状態を有する患者を処置する方法であって、ドナーから細胞集団を得るステップと、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法によって生成された抗体を使用して、前記細胞集団における H S C を識別するステップと、前記識別された H S C または前記識別された H S C から導出された細胞を、前記患者に投与するステップとを含む、方法。 20
- 【請求項 3 7】  
化学療法または放射線曝露から回復中の患者を処置する方法であって、ドナーから細胞集団を得るステップと、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法によって生成された抗体を使用して、前記細胞集団における H S C を識別するステップと、前記識別された H S C または前記識別された H S C から導出された細胞を、化学療法または放射線曝露から回復中の患者に投与するステップとを含む、方法。 30
- 【請求項 3 8】  
創傷を受けている患者の創傷治癒を促進する方法であって、ドナーから細胞集団を得るステップと、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法によって生成された抗体を使用して、前記細胞集団における H S C を識別するステップと、前記識別された H S C または前記識別された H S C から導出された細胞を、化学療法または放射線曝露から回復中の患者に投与するステップとを含む、方法。 40
- 【請求項 3 9】  
遺伝的疾患、障害、または状態を有する患者を処置する方法であって、ドナーから細胞集団を得るステップと、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法によって生成された抗体を使用して、前記細胞集団における H S C を識別するステップと、前記識別された H S C を、遺伝的に修飾するステップと、前記遺伝的に修飾された H S C または前記遺伝的に修飾された H S C から導出された細胞を、前記患者に投与するステップとを含む、方法。 40
- 【請求項 4 0】  
前記ドナーが、前記患者である、請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 4 1】  
前記ドナーが、前記患者ではない、請求項 3 6 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。 50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2015年11月3日に出願された米国仮出願番号第62/250,424号への米国特許法第119条(e)項の下の利益を主張しており、この仮出願は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

## 【0002】

本開示は、全体として、生化学、分子生物学、細胞生物学、および再生医療の分野に関する。本開示は、造血幹細胞(HSC)、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための方法および組成物を提供する。本開示はさらに、造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを使用して、血液学的疾患、障害もしくは状態を有する患者、または化学療法もしくは放射線治療から回復中の患者を処置するための方法および組成物を提供する。本開示はさらに、心血管障害の処置においてHSCを使用するための方法および組成物を提供する。本開示はさらに、創傷の処置において、および創傷治癒の促進のために、HSCを使用するための方法および組成物を提供する。本開示はさらに、遺伝子治療においてHSCを使用するための方法および組成物を提供する。

10

## 【背景技術】

## 【0003】

以下は、単に背景情報としてのみ提供され、論じられている任意の主題または言及されている任意の参考文献が、本開示に先行する技術であることを承認するものと解釈されるべきではない。本明細書で言及されているあらゆる刊行物および特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物または特許出願が、参照によって具体的にかつ個々に組み込まれると示されるのと同じ程度まで、参照によって組み込まれる。

20

## 【0004】

造血幹細胞(HSC)は、生涯にわたりすべての血液細胞系列を自己再生し、作製する能力を有する、単一細胞である。HSCは、自家および同種の両方の造血細胞移植を使用する造血再構築の成功において、重要な役割を演じている。参照によって本明細書に組み込まれるWeissman IL、Shizuru JA(2008年)The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases、Blood 112巻(9号):3543~53頁。造血細胞移植は、血液学的疾患、障害、または状態(例えば、サラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、骨髄腫)の処置、ならびに化学療法および高線量放射線からの救済において有望な治療手法である。造血細胞移植の潜在的な欠点は、再構築の様々な潜在的可能性を有するHSCおよび他の非HSCを含む造血細胞の混合物を含有するということである。これによって、手順による合併症および副作用が生じるおそれがある。例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCは、患者の潜在的に疾患の可能性がある他の細胞からは単離することができないので、普通、自家造血細胞移植は処置選択肢にならない。その代わりに、同種提供物が使用される。同種細胞を使用することによって、患者は、患者自身の自家提供物由来の疾患状態の細胞を患者の系に再導入することを回避することができるが、移植片対宿主病などの合併症の危険性がある。同種提供物でも、患者の健康な血液細胞集団を再構築する可能性が最も高い細胞だけを識別し、移植することによって、合併症を低減することができる。したがって、造血細胞移植などの処置において使用するためのHSC、特に再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離する必要がある。

30

40

## 【0005】

遺伝的に修飾されたHSCも、遺伝的疾患、障害、または状態、特に血液学的な遺伝的疾患、障害、または状態の処置において有望な治療手法を提供することができる。HSCは、ユニークな特徴(例えば、数々の細胞に自己再生し、分化する能力)を有しているので、遺伝的固定を患者に導入するための理想的な候補となっている。遺伝子治療では、遺

50

伝的疾患、障害、または状態に罹患している患者から得られた細胞は、治療遺伝子（単数または複数）を挿入するための公知の技術を使用して、遺伝的に修飾される（宿主細胞のゲノムに組み込まれるか、または外部エピソームもしくはプラスミドとして組み込まれる）。治療遺伝子によって、例えば、細胞にタンパク質を発現させるか、タンパク質の発現を妨害させるか、または遺伝的変異を修正させることができる。遺伝子治療の一般的な方法では、DNAなどの高分子をゲノムに挿入し、それによって変異遺伝子またはそうでなければ機能不全遺伝子を、機能的治療遺伝子で置き換えるベクターが使用されることを伴う。次に、遺伝的修飾を伴う細胞を、患者に移植して戻すことができ、その遺伝的に修飾された細胞は、治療遺伝子（単数または複数）を発現し、それによって疾患、障害、または状態を処置することができる。このような遺伝子治療の有効性は、遺伝的に修飾された細胞がどの程度原始的であるかに関係する。現在の方法の欠点は、多くの細胞の急速に分裂する性質および短寿命に関係する場合があります、それによって、遺伝子治療は長期的な利益を達成できなくなり、かつ/または患者は複数の処置を受けざるを得なくなる。

10

**【0006】**

HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCは、内皮前駆細胞（EPC）に分化することができる。いくつかの研究では、EPCは、新血管新生および再内皮化を促進し、それらが、心血管障害の治癒および創傷の回復に相関すると報告されている。例えば、参照によって本明細書に組み込まれるKrankel, N.ら、「Endothelial progenitor cells' as a therapeutic strategy in cardiovascular disease」、Curr. Vasc. Pharmacol., 2012年1月、第10巻(1号): 107~24頁を参照されたい。HSCから導出されたEPCは、例えば、心血管障害の処置もしくは創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）のために患者に投与することができる、かつ/または*in vivo*でEPCに分化させるために患者に投与することができる。HSCから導出されたEPCは、例えば、馴化血清を患者に投与できるように、血清または他の培地を馴化するために使用することもできる。しかし前述の通り、*in vivo*アッセイでHSCの再構築能力を直接的に試験することなくEPCを得るために、HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別するやり方は、まだ知られていない。

20

**【0007】**

HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCは、治療結果をもたらし、かつ/またはより好ましい（より速く、より長く継続する、より強力な）治療結果をもたらす可能性がより高いので、遺伝子治療のより良好な候補となっている。したがって、遺伝子治療において使用するためのHSC、特に再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離する必要がある。HSCは、骨髄、動員末梢血、および臍帯血を含めた様々な供給源から単離することができる。細胞ミックスからHSC集団を識別かつ単離するプロセスでは、CD34などのHSCに特異的なマーカーの使用、および制限用量の候補HSCを用いて、致死的に照射されたマウスを救済するなどの*in vivo*アッセイを伴うことができる。しかし、血液細胞株を再構築するHSCの能力は変わり、HSCに特異的なマーカーは、HSCだけを識別するが、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCの亜集団を識別することができない。*in vivo*アッセイでHSCの再構築能力を直接的に試験することなく、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別するやり方は、まだ知られていない。

30

40

**【0008】**

さらに、これまでは、あらゆるHSCがCD34マーカーを発現すると考えられた。しかし、ある特定のHSCは、CD34を発現しないという証拠がある。例えば、参照によって本明細書に組み込まれるNakauchi Hirimitsu, Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative, Nature medicine 4巻: 1009~1010頁(1998年)。したがって、CD34陰性HSCを識別する必要がある。

**【0009】**

臨床目的のために潜在的に可能なHSCを完全に開拓する試みは、HSCを特異的に有効に単離し、増殖させるマーカーに関する知識が限られていることによって阻まれてきた

50

。特に、*in vivo*アッセイなしに再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別する方法は、これまで知られていなかった。

以下は、これらの必要性の1つまたは複数に対処する手段として提供される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Weissman IL、Shizuru JA(2008年)The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases、Blood 112巻(9号):3543~53頁

10

【非特許文献2】Krankel, N.ら、「'Endothelial progenitor cells' as a therapeutic strategy in cardiovascular disease」、Curr. Vasc. Pharmacol.、2012年1月、第10巻(1号):107~24頁

【非特許文献3】Nakauchi Hirimitsu、Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative、Nature medicine 4巻:1009~1010頁(1998年)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

HSCを検出し、単離する助けにするために、これらの細胞表面における新しいマーカーを識別した。これらのマーカーは、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造(例えば、シアリルI、シアリルi、シアリルラクトース、シアリルラクト-N-テトラオース、シアリルラクト-N-ネオテトラオース、N-アセチルシアリルラクトースアミン)を含む。これらの構造は、初期原始造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCの表面に、例えば、ヒト幹細胞マーカーCD133などに存在する。これらの構造は、主に幹細胞上に発現し、前駆細胞上でフコシル化される。

20

【0012】

本開示によれば、初期原始造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための方法および組成物が提供される。ある場合には、抗体は、本明細書で識別される新しいマーカーの1つまたは複数に結合する。このような方法によって単離された細胞、およびこのような方法によって産生された抗体の両方のための、再生医療におけるいくつかの適用も提供される。

30

【0013】

一実施形態では、本明細書に開示される技術は、初期原始HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを検出し、単離するための診断抗体および治療抗体を速やかに開発するための新しい戦略、ならびにサラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、および骨髄腫を含めた血液の疾患、障害または状態の移植による処置を提供する。一実施形態では、HSCまたは抗体は、進行性濾胞性リンパ腫を処置するために使用される。別の実施形態では、HSCまたは抗体は、小児の血液学的疾患を処置するために使用される。一実施形態では、HSCまたは抗体は、成人の血液学的疾患を処置するために使用される。別の実施形態では、HSCまたは抗体は、急性骨髄性白血病を処置するために使用される。一実施形態では、HSCは、患者とは異なるドナーに由来する(すなわち、同種提供)。一実施形態では、HSCのドナーと患者は、同じ人物である(すなわち、自家提供)。

40

【0014】

一実施形態では、本明細書に開示される技術は、初期原始HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを検出し、単離するための診断抗体および治療抗体を速やかに開発するための新しい戦略、ならびにHSC、HSCから導出されたEPC、またはHSCから導出されたEPCによって馴化された培地を投与することによる、心血管疾患

50

の処置または創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）を提供する。一実施形態では、HSCは、患者とは異なるドナーに由来する（すなわち、同種提供）。一実施形態では、HSCのドナーと患者は、同じ人物である（すなわち、自家提供）。

【0015】

一実施形態では、本明細書に開示される技術は、初期原始HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを検出し、単離するための診断抗体および治療抗体の速やかな開発のため、遺伝的修飾のため、ならびに遺伝的に修飾されたHSCを移植することによる、遺伝的疾患、障害または状態、例えば、血液学的遺伝的疾患、障害または状態の処置のための、新しい戦略を提供する。一実施形態では、遺伝的に修飾されたHSCは、血液の疾患または障害、例えば鎌状赤血球、サラセミア、または重症複合免疫不全を処置するために使用される。

10

【0016】

一実施形態では、再構築の高い潜在的可能性を有する初期原始造血幹細胞を識別かつ単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための新規な手法が提供され、この方法は、動物をHSCで免疫付与し、次に2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造（例えば、シアリルI、シアリルi、シアリルラクトースシアリルラクト-N-テトラオース、シアリルラクト-N-ネオテトラオース、N-アセチルシアリルラクトースアミン）に結合する抗体の存在または生成について、それらの動物またはそれらの動物の細胞を選択することを含む。一部の実施形態では、動物は、CD34陽性のHSCで免疫付与される。別の実施形態では、抗体は、CD133表面上の2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造（例えば、シアリルI、シアリルi、シアリルラクトース、シアリルラクト-N-テトラオース、シアリルラクト-N-ネオテトラオース、N-アセチルシアリルラクトースアミン）への結合について選択される。

20

【0017】

別の実施形態では、この方法は、HSCから単離されたCD133で動物を免疫付与し、次に2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造（例えば、シアリルI（大文字I）、シアリルi（小文字i）、シアリルラクトース）に結合する抗体の存在または生成について、それらの動物またはそれらの動物の細胞を選択することを含む。一部の実施形態では、CD133は、CD34陽性（CD34<sup>+</sup>）HSCに由来する。別の実施形態では、抗体は、CD133表面上の2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造（例えば、シアリルI（大文字I）、シアリルi（小文字i）、シアリルラクトース）への結合について選択される。

30

【0018】

一実施形態では、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造（例えば、シアリルI（大文字I）、シアリルi（小文字i）、シアリルラクトース）に結合する抗体をスクリーニングすることができる抗体パネルを作製または提供することができる任意の他の方法（例えば、ファージディスプレイ）は、抗体供給源として使用することができる。

【0019】

一実施形態では、免疫動物は、マウス、ラット、ウサギ、または別の哺乳動物である。他の実施形態では、このような抗体は、例えば、参照によって本明細書に組み込まれるPCT国際公開第01/14424号および同第00/37504号に記載されている通り、非ヒト遺伝子導入動物において産生することができる。

40

【0020】

一実施形態では、抗体は、特異的抗原に対して実質的に均質な抗体集団である、モノクローナル抗体（mAb）である。MAbは、当業者に公知の方法によって得ることができる。例えば、参照によって本明細書に組み込まれるKohlerら（1975年）；米国特許第4,376,110号；Ausubelら（1987～1999年）；Harlowら（1988年）；およびColliganら（1993年）を参照されたい。本明細書で想定されるmAbは、IgG、IgM、IgE、IgA、およびそれらの任意のサブクラスを含めた、任意の免疫グロブリンクラスのものであってよい。mAbを生成するハイブリドーマは、in vi

50

troまたはin vivoで培養することができる。高力価のmAbは、in vivo生成によって得ることができ、この場合、高濃度の所望のmAbを含有する腹水を生成するために、個々のハイブリドーマ由来の細胞が、プリスチン(pristine)で刺激したBalb/cマウスに腹腔内注射される。例えば、アイソタイプIgMまたはIgGのmAbは、このような腹水から、または培養上清から、カラムクロマトグラフィー方法または当業者に周知の任意の他の方法を使用して精製することができる。

#### 【0021】

一実施形態では、抗体は、キメラ抗体である。キメラ抗体は、異なる動物種から導出された異なる部分を有する分子、例えばマウスmAbから導出された可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する分子である。実質的にヒト抗体(アクセプター抗体と呼ばれる)に由来する可変領域フレームワーク残基、および実質的にマウス抗体(ドナー抗体と呼ばれる)に由来する相補性決定領域を有する抗体も、ヒト化抗体と呼ばれる。キメラ抗体は、主に、例えば適用における免疫原性を低減し、生成収率を増大するために使用され、この場合、マウスmAbの方が、ハイブリドーマからの収率が高いが、ヒトにおける免疫原性の方が高く、したがって、ヒト/マウスキメラmAbが使用される。それらの生成のためのキメラ抗体および方法は、当技術分野で公知である(例えば、Betterら、1988年、Cabillyら、1984年、Harlowら、1988年、Liuら、1987年;Morrisonら、1984年;Boulianneら、1984年;Neubergerら、1985年;Sahaganら、1986年;Sunら、1987年;Cabillyら、欧州特許出願第125023号、同第171496号、同第173494号、同第184187号、同第173494号、PCT国際公開第86/01533号、同第97/02671号、同第90/07861号、同第92/22653号および米国特許第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、同第5,530,101号および同第5,225,539号を参照されたい)。

#### 【0022】

一実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、ヒト重鎖および軽鎖両方の定常領域を含む。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、例えば、マウスモノクローナル抗体であり得る親抗体の、かなりの割合の結合特性を保持している。本明細書に記載されるヒト化抗体は、人間の介入によって生成される。したがって、本明細書に記載されるヒト化抗体は、天然に生じることが期待されない。一実施形態では、ヒト化抗体は、当技術分野で周知の技術、例えばRoland KontermannおよびStefan DubeI編、Antibody Engineering、第2版、およびこの文献に引用されている参考文献に記載されている技術によって調製される。

#### 【0023】

一実施形態では、造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための細胞集団が提供される。一実施形態では、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造(例えば、シアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、シアリルラクトース)に結合する組換え抗体を生成するためにHSCが使用される。一実施形態では、組換え抗体は、CD133表面上の2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造(例えば、シアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、シアリルラクトース)に結合する。

#### 【0024】

一実施形態では、本明細書に記載の方法の1つに従って生成された抗体は、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造(例えば、シアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、シアリルラクトース)に対して特異性を有する。一実施形態では、本明細書に記載の方法の1つに従って生成された抗体は、3'シアリルラクトサミニル化CD133に結合し、ノイラミニダーゼで処理した3'シアリルラクトサミニル化CD133には結合しない。一実施形態では、抗体は、CD133およびヒト-フコシダーゼで処理したCD133に結合し、ノイラミニダーゼで処理したCD133には結合しない。

#### 【0025】

10

20

30

40

50

一実施形態では、幹細胞を生成するための方法であって、造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを単離し、次にそれらを*in vitro*で増殖させるステップを含む方法が提供される。

【0026】

一実施形態では、遺伝的に修飾された幹細胞を生成するための方法であって、造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを単離し、HSCを遺伝的に修飾し、次に遺伝的に修飾されたHSCを*in vitro*で増殖させるステップを含む方法が提供される。

【0027】

一実施形態では、本開示の方法の1つに従って識別されたHSC、本開示の方法の1つに従ってHSCから導出された幹細胞、および/または本開示の方法の1つに従ってHSCから繁殖させた、部分的もしくは完全に分化した細胞を含む組成物が提供される。一実施形態では、HSCから繁殖させたEPCを含む組成物が提供される。一実施形態では、HSCから繁殖させたEPCによって馴化された培地を含む組成物が提供される。

10

【0028】

一実施形態では、本開示の方法の1つに従って識別され、遺伝子治療で使用するために遺伝的に修飾されたHSC、本開示の方法の1つに従って遺伝的に修飾されたHSCから導出された、遺伝的に修飾された幹細胞、および/または本開示の方法の1つに従って遺伝的に修飾されたHSCから繁殖させた、部分的もしくは完全に分化した遺伝的に修飾された細胞を含む組成物が提供される。

20

【0029】

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って識別されたHSC、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞、および/または本開示の方法の1つに従ってHSCから繁殖させた、部分的もしくは完全に分化した細胞は、血液学的疾患、障害または状態（例えば、サラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、骨髄腫）の処置、ならびに化学療法および高線量放射線からの救済を含めた、様々な病状および状態の処置のための治療戦略で直接的に使用することができる。一実施形態では、HSCは、心血管障害の処置のための治療戦略で直接的に使用することができる。一実施形態では、HSCは、創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）のための治療戦略で直接的に使用することができる。一実施形態では、HSCから繁殖させたEPCは、心血管障害の処置のための治療戦略で直接的に使用することができる。一実施形態では、HSCから繁殖させたEPCは、創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）のための治療戦略で直接的に使用することができる。一実施形態では、HSCから繁殖させたEPCは、心血管障害の処置、創傷の処置、または創傷治癒の促進のための治療戦略で使用され得る培地を馴化するために使用することができる。

30

【0030】

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って識別され、遺伝的に修飾されたHSC、本開示の方法の1つに従って生成された遺伝的に修飾された幹細胞、および/または本開示の方法の1つに従って遺伝的に修飾されたHSCから繁殖させた、部分的もしくは完全に分化した遺伝的に修飾された細胞は、遺伝的疾患、障害または状態（例えば、鎌状赤血球、サラセミア、または重症複合免疫不全）の処置を含めた、様々な病状および状態の処置のための治療戦略で直接的に使用することができる。

40

【0031】

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞は、所望の系列の細胞に部分的または完全に分化することができ、そうして分化した細胞は、血液学的疾患、障害または状態（例えば、サラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、骨髄腫）の処置、ならびに化学療法および高線量放射線からの救済を含めた、様々な病状および状態の処置のための治療戦略で使用することができる。別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞は、心血管障害の処置、創傷の処置、または創傷治癒の促進のための治療戦略で使用され得るEPCに、部分的または完全に分化することができる。

【0032】

50

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された遺伝的に修飾された幹細胞は、所望の系列の遺伝的に修飾された細胞に部分的または完全に分化することができ、そうして分化した細胞は、遺伝的疾患、障害または状態（例えば、鎌状赤血球、サラセミア、または重症複合免疫不全）の処置を含めた、様々な病状および状態の処置のための治療戦略で使用することができる。

【0033】

本開示のさらなる目的および利点は、以下の説明において部分的に記載され、以下の説明から部分的に明らかとなるか、または本開示の実施によって知ることができる。本開示の目的および利点のいくつかは、特に添付の特許請求の範囲に記載される要素および組合せを用いることによって実現され、得られる。

10

【0034】

先の概要および以下の詳細な説明の両方は、単に例示的かつ説明的なものであり、特許請求される本開示を制限するものではないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1a】図1aは、シアリルI（大文字I）の化学構造を示す。

【0036】

【図1b】図1bは、シアリルi（小文字i）の化学構造を示す。

【0037】

【図2a】図2aは、N-アセチルシアリルラクトースアミンの化学構造を示す。

20

【0038】

【図2b】図2bは、シアリルラクト-N-テトラオースの化学構造を示す。

【0039】

【図2c】図2cは、シアリルラクト-N-ネオテトラオースの化学構造を示す。

【0040】

【図3】図3は、シアリルラクトースの化学構造を示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

ここで、本開示の本発明の実施形態（例示的な実施形態）について詳細に言及し、その例を、添付の図に示す。可能な限り、同じまたは類似の部分の指すために、図を通して同一参照番号が使用される。

30

【0042】

本明細書で使用される略語は、一般に、化学技術および生物学技術におけるそれらの従来の意味を有する。

【0043】

「抗体（単数）」、「抗体（複数）」、「ab」または「免疫グロブリン」という用語は、最も広範な意味で交換可能に使用され、所望の生物活性を示す限り、それらには、単離された、工学的に操作された、化学的に合成された、または組み換えられた抗体（例えば、全長または無傷モノクローナル抗体）を含めたモノクローナル抗体、および抗体断片も含まれる。一実施形態では、本開示は、モノクローナル抗体に関する。

40

【0044】

抗体分子は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質からなる。各重鎖は、重鎖可変領域（またはドメイン）（本明細書ではHCVRまたはVHと省略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つまたは4つのドメイン、CH1、CH2、CH3、およびCH4を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVRまたはVLと省略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLを含む。VHおよびVL領域は、さらに、超可変性領域、より保存されている領域が散在している相補性決定領域（CDR）と呼ばれる領域、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域に細分することができる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端まで、FR1、CDR1、

50

FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）、および古典的補体系の第1構成成分（C1q）を含めた、宿主組織または因子との免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

#### 【0045】

本開示による抗体の「抗原結合フラグメント」とは、抗体の標的に結合する能力を保持している任意のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質を示すことを企図する。一実施形態では、標的は、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI（大文字I、図1a参照）、シアリルi（小文字i、図1b参照）、N-アセチルシアリルラクトースアミン（図2a参照）、シアリルラクト-N-テトラオース（図2b参照）、シアリルラクト-N-ネオテトラオース（図2c参照）、およびシアリルラクトース（図3参照）から選択される。ある特定の実施形態では、抗原結合フラグメントは、組換えDNA技術によって生成される。さらなる実施形態では、結合フラグメントは、無傷抗体の酵素的または化学的な開裂によって生成される。結合フラグメントには、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、および単鎖抗体が含まれるが、それらに限定されない。

10

#### 【0046】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」または「Mab」という用語は、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体を指し、すなわち集団の個々の抗体は、微量で存在し得る天然に存在する可能な変異を除いて、同一である。典型的に、モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一エピトープを対象とする。このようなモノクローナル抗体は、B細胞の単クローンまたはハイブリドーマによって生成することができる。モノクローナル抗体は、組換えであってよく、すなわちタンパク質工学によって生成することもできる。モノクローナル抗体は、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。さらに、様々な決定因子またはエピトープを対象とする様々な抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一エピトープを対象とする。本開示は、細胞から精製によって単離されたもしくは得られた抗体、または遺伝的組換えもしくは化学合成によって得られた抗体に関する。

20

#### 【0047】

「抗原」という用語は、抗体などの選択的結合剤によって結合することができ、さらにその抗原のエピトープに結合することができる抗体を生成するために動物において使用することができる分子または分子の一部を指す。抗原は、1つまたは複数のエピトープを有することができる。抗原の例として、CD133分子の表面上の2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造（例えば、3'SL-CD133）、例えばシアリルI（大文字I、図1a参照）、シアリルi（小文字i、図1b参照）、N-アセチルシアリルラクトースアミン（図2a参照）、シアリルラクト-N-テトラオース（図2b参照）、シアリルラクト-N-ネオテトラオース（図2c参照）、およびシアリルラクトース（図3参照）が挙げられる。

30

#### 【0048】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる、例えばポリペプチド決定因子などの任意の決定因子を含む。ある特定の実施形態では、エピトープ決定因子には、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基が含まれ、ある特定の実施形態では、特異的な三次元構造的な特徴および/または特異的な電荷特徴を有することができる。エピトープは、抗体によって結合している抗原の領域である。ある特定の実施形態では、抗体は、タンパク質および/または巨大分子の複合混合物においてその標的抗原を優先的に認識する場合、抗原に特異的に結合するとされる。一実施形態では、抗体は、解離定数が、約1μMまたはそれ未満である場合、例えば解離定数が約100nMまたはそれ未満である場合など、例えば解離定数が約1nMまたはそれ未満である場合など、さらに例えば解離定数が約1

40

50

00 pM またはそれ未満である場合などに、抗原に特異的に結合するとされる。本明細書で使用される「特異的」および「特異的結合」という用語は、交換可能であり、所定の抗原、例えば、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリル I (大文字 I、図 1 a 参照)、シアリル i (小文字 i、図 1 b 参照)、N-アセチルシアリルラクトースアミン (図 2 a 参照)、シアリルラクト-N-テトラオース (図 2 b 参照)、シアリルラクト-N-ネオテトラオース (図 2 c 参照)、およびシアリルラクトース (図 3 参照) に結合している抗体を指す。典型的に、抗体は、 $10^{-6}$  M またはそれ未満の解離定数 (KD) で結合し、所定の抗原以外の非特異的抗原 (例えば、BSA、カゼイン、または任意の他の特異的ポリペプチド) に結合するために、その KD の少なくとも 2 分の 1 未満の KD で、所定の抗原に結合する。「抗原認識抗体」および「抗原に特異的な抗体」という句は、本明細書で「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と交換可能に使用される。

10

## 【0049】

本明細書で使用される「幹細胞」という用語は、特定の特殊機能を有する細胞型 (すなわち、高分化した細胞、例えば赤血球およびマクロファージ) を含めた他の細胞型に分化することができる細胞を指す。幹細胞は、それらの供給源 (成人/体細胞性幹細胞、胚性幹細胞) に従って、またはそれらの効力 (全能性、多能性 (pluripotent)、複能性 (multipotent) および単能性) に従って定義することができる。

## 【0050】

「造血幹細胞」または「HSC」という用語は、リンパ系細胞および骨髄細胞を含む赤血球および白血球細胞を含めたいくつかのタイプの血液細胞のいずれかに自己再生し、分化する能力を有する動物細胞、例えば哺乳動物 (ヒトを含む) 細胞を指す。HSC は、EPC に分化することもできる。HSC には、*in vivo* で長期間にわたる潜在的な生着可能性を有する造血細胞が含まれ得る。長期間にわたる潜在的な生着可能性 (例えば、長期造血幹細胞) は、動物モデルまたは *in vitro* モデルを使用して決定することができる。候補ヒト造血幹細胞集団の長期間にわたる潜在的な生着可能性のための動物モデルには、SCID-hu 骨モデル (Kyoizumi ら (1992 年) Blood 79 巻: 1704 頁; Murray ら、(1995 年) Blood 85 巻 (2 号) 368 ~ 378 頁) および子宮内ヒツジモデル (Zanjani ら、(1992 年) J. Clin. Invest. 89 巻: 1179 頁) が含まれる。ヒト造血発生の動物モデルの総説については、Srour ら、(1992 年) J. Hematother. 1 巻: 143 ~ 153 頁およびその文献に引用されている参考文献を参照されたい。幹細胞のための *in vitro* モデルは、5 ~ 8 週間後の間質共培養において生成されたクローン形成細胞の数の限界希釈分析に基づく、長期間培養開始細胞 (LTIC) アッセイである (Sutherland ら (1990 年) Proc. Nat'l Acad. Sci. 87 巻: 3584 ~ 3588 頁)。LTIC アッセイは、一般に使用される別の幹細胞アッセイ、敷石状 (cobblestone) 領域を形成する細胞 (CAFC) アッセイ、および *in vivo* での長期間にわたる潜在的な生着可能性と相関することが示されている (Breems ら (1994 年) Leukemia 8 巻: 1095 頁)。造血幹細胞の総説およびデータベースについては、Montrone C、Kokkaliaris KD、Loeffler D、Lechner M、Kastenmuller G、Schroeder T、Ruepp A. HSC-explorer: a curated database for hematopoietic stem cells. PLoS One. 2013 年 7 月 30 日; 8 巻 (7 号): e70348 頁. doi: 10.1371/journal.pone.0070348. Print 2013 年を参照されたい。

20

30

40

## 【0051】

本明細書で使用される「再構築の高い潜在的可能性を有する造血幹細胞」または「再構築の高い潜在的可能性を有する HSC」という用語は、(1) CD34 + HSC の母集団よりも自己再生することができる可能性が高く、(2) CD34 + HSC の母集団よりも自己再生能が高く (例えば、CD34 + HSC の母集団と比較して、より急速に、より効率的に、より数多く、および/またはより長期にわたって自己再生することができる)、(3) CD34 + HSC の母集団と比較して、赤血球および白血球細胞を含めたいくつかのタイプの血液細胞のいずれかに分化することができる可能性がより高く、(4) CD3

50

4 + HSCの母集団と比較して、赤血球および白血球細胞を含めたいくつかのタイプの血液細胞のいずれかへの分化能がより高く（例えば、CD34 + HSCの母集団と比較して、より数多くのタイプの血液細胞に分化することができ、好ましい比の血液細胞のタイプに分化することができ、かつ/またはより急速に、より効率的に、より数多く、および/もしくはより長期にわたって分化することができる）、（5）CD34 + HSCの母集団よりも、*in vivo*での長期間にわたる生着可能性が高く、（6）CD34 + HSCの母集団よりも、*in vivo*での長期間にわたる生着能が高く（例えば、CD34 + HSCの母集団と比較して、より急速に生着することができ、より数多くのタイプの宿主において生着することができ、より数多くの宿主位置において生着することができ、より長期間にわたって生着することができ、かつ/または宿主拒絶反応および/もしくは合併症をあまり伴わずに生着することができる）、（7）以下の実施例5により詳細に説明される通り、NOD/SCID IL2Ry<sup>nu11</sup>マウスにおいて生着すると、マウスのCD45 + 細胞が、少なくとも10%のキメラ現象を示し、（8）以下の実施例5により詳細に説明される通り、一次および二次NOD/SCID IL2Ry<sup>nu11</sup>マウスレシピエントにおいて生着すると、細胞が、一次レシピエントにおいて12週間またはそれよりも長く経過した後初めて著しい生着を示すが、二次レシピエントにおいて多系列の再構築を示し、ならびに/あるいは（9）それ以外では、動物または*in vitro*幹細胞アッセイ、例えばNOD/SCID IL2Ry<sup>nu11</sup>マウスを使用して潜在的な生着可能性を試験するアッセイにおいて、CD34 + HSCの母集団よりも優れている動物細胞、例えば哺乳動物（ヒトを含む）細胞を指す。これらの細胞は、本明細書に開示される方法によって動物から得られ、少なくとも非天然環境に存在することが理由で、天然に存在するHSC集団とは異なっている。天然に存在するHSC集団と比較したこれらの差異には、異なるマーカー、より長い寿命、異なる潜在的な分化可能性、および/または富化が含まれ得る。

10

20

#### 【0052】

本明細書で使用される「増殖」には、細胞数の任意の増大が含まれる。増殖には、例えば、培養を開始するために使用された細胞集団に存在するHSCの数を上回って、造血細胞の数が増大することが含まれる。

#### 【0053】

本明細書で使用される「単能性 (unipotent)」という用語は、1つの細胞型だけを生成することができるが、自己再生の特性を有しており、それによって非幹細胞とは区別される細胞を指す。

30

#### 【0054】

本明細書で使用される「複能性 (multipotent)」という用語は、「前駆細胞」という用語と同義に使用され、いくつかの異なる高分化細胞型のいずれか1つを生じることができる細胞を指す。これらの異なる細胞型は、通常、密接に関係している（例えば、赤血球、白血球細胞および血小板などの血液細胞）。例えば、間葉系幹細胞（骨髄間質細胞としても公知である）は、複能性細胞であり、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、脂肪細胞、神経細胞、および - 隣島細胞を形成することができる。

40

#### 【0055】

本明細書で使用される「多能性 (pluripotent)」という用語は、生物のいくつかまたは多くの細胞型を生じるが、すべてを生じるわけではない細胞を指す。多能性幹細胞は、成熟生物の体内の任意の細胞型に分化することができるが、それらが導出された細胞に脱分化できなくするように再プログラムされてはいない。理解される通り、「複能性」前駆細胞（例えば、神経幹細胞）は、多能性幹細胞が分化するよりも狭い、潜在的な分化可能性を有する。

#### 【0056】

本明細書で使用される「全能性 (totipotent)」という用語は、受精卵母細胞、ならびに受精卵細胞の最初の数回の分化によって生成された細胞（例えば、発生期の2細胞期および4細胞期における胚）を指す。全能性細胞は、特定の種の任意の細胞型に分化する能力

50

を有する。例えば、単一の全能性幹細胞は、完全な動物を生じることができ、同様に特定の種（例えば、ヒト）に見出される無数の細胞型のいずれかを生じることができる。

【0057】

「CD34」という用語は、ヒト骨髄、血液、および胎児肝から導出されたある特定の造血幹細胞および前駆細胞上に選択的に発現した、造血幹細胞抗原を指す。Yinら、Blood 90巻：5002～5012頁（1997年）；Miaglia, S.ら、Blood 90巻：5013～21頁（1997年）。CD34を発現する細胞は、CD34<sup>+</sup>と呼ばれる。間質細胞は、CD34を発現せず、したがってCD34<sup>-</sup>と呼ばれる。ヒト血液から単離されたCD34<sup>+</sup>細胞は、例えば、*in vivo*で、心筋細胞、内皮細胞、および平滑筋細胞に分化することもできる。Yehら、Circulation 108巻：2070～73頁（2003年）を参照されたい。CD34<sup>+</sup>細胞は、骨髄から導出された有核細胞のおよそ1%であり、CD34抗原は、未成熟内皮細胞先駆体によっても発現され、成熟内皮細胞は、CD34<sup>+</sup>を発現しない。Peichev, M.ら、Blood 95巻：952～58頁（2000年）。成人の骨髄から導出されたCD34<sup>+</sup>細胞は、*in vitro*で顆粒球/マクロファージ前駆細胞（CFU-GM）の大部分、いくつかのコロニー形成単位混合物（CFU-Mix）および原始赤血球前駆細胞の小集団（バースト形成単位、赤血球またはBFU-E）を生じる。Yehら、Circulation 108巻：2070～73頁（2003年）。またCD34<sup>+</sup>細胞は、低頻度ではあるが、新しい心筋に分化するか、または心筋の発生に寄与する潜在可能性を有することができる。

10

【0058】

造血細胞は、抗CD34抗体を使用して、CD34<sup>+</sup>幹細胞のために富化することができる。例えば、骨髄単核細胞からCD34<sup>+</sup>細胞の高度に精製された、生存可能な集団を単離するために、免疫磁気ビーズ分離を使用する技術が開発されている。例えば、米国特許第5,536,475号、同第5,035,994号、同第5,130,144号、および同第4,965,205号を参照されたい。

20

【0059】

しかし、証拠が増えることによって、すべての造血幹細胞がCD34を発現するわけではないことが示されている。例えば、Nakauchi Hirimitsu, Hematopoietic stem cells: Are they CD34-positive or CD34-negative, Nature medicine 4巻：1009～1010頁（1998年）。

30

【0060】

造血幹細胞を含む出発細胞集団は、想定された使用に応じて、当業者によって選択される。骨髄、末梢血、新生児臍帯血、胎盤または他の供給源、例えば肝臓、例えば胎児肝を含めた、造血幹細胞を含む様々な細胞供給源が、当技術分野において説明されている。

【0061】

HSCのさらなる富化は、CD38<sup>-</sup>でもあるCD34<sup>+</sup>細胞を選択することによって達成することができる。このような富化は、それに限定されるものではないが、望ましくない細胞集団へのCD38特異的抗体の結合に基づく選択を含めた、細胞の負の選択について刊行されているか、かつ/または商業的な方法論に従って行うことができる。代替の望ましくない細胞集団は、CD20、CD3、CD14、CD56、CD97および/またはCD235に対する抗体を使用して、幹細胞プールから除去することができる。

40

【0062】

「CD133」という用語は、あるクラスの新規なペントスパン膜タンパク質の中で、ヒトおよびマウスの両方において最初に識別されるものであるタンパク質プロミン-1を指し、元々、原始造血幹細胞および神経幹細胞のマーカーとして分類された。現在は、造血幹細胞のマーカーとしてのCD133の実用性が、研究によって確認されている。CD133に対する抗体は、当技術分野で広く利用可能である。

【0063】

HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離する方法

【0064】

50

一実施形態では、本開示は、ヒト造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離するために使用され得る抗体を生成するための方法であって、造血幹細胞に対して産生された抗体集団から、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造に結合し、ヒトHSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離することができる抗体をスクリーニングするステップを含む方法を提供する。

## 【0065】

一実施形態では、抗体集団を産生するために使用される造血幹細胞は、CD34+である。一実施形態では、抗体集団を産生するために使用される造血幹細胞は、CD34+/CD38-である。一実施形態では、抗体集団を産生するために使用される造血幹細胞は、CD34-である。

10

## 【0066】

一実施形態では、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造は、シアリルI（大文字I、図1a参照）、シアリルi（小文字i、図1b参照）、N-アセチルシアリルラクトースアミン（図2a参照）、シアリルラクト-N-テトラオース（図2b参照）、シアリルラクト-N-ネオテトラオース（図2c参照）、およびシアリルラクトース（図3参照）から選択される。

## 【0067】

一実施形態では、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造は、シアリルラクトース（図3参照）である。

20

## 【0068】

一実施形態では、抗体は、ヒト幹細胞マーカーCD133上に発現するかまたは存在する、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造に結合する。

## 【0069】

一実施形態では、抗体は、3'SL-CD133に特異的に結合する。

## 【0070】

一実施形態では、抗体は、3'SL-CD133に特異的に結合し、ノイラミニダーゼで処理した3'SL-CD133には結合しない。

30

## 【0071】

一実施形態では、抗体は、*in vivo*モデルによって機能的に決定される通り、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCを単離するために使用することができる。

## 【0072】

一実施形態では、*in vivo*モデルでは、試験細胞集団を、照射されたマウス（例えば、NOGマウスとしても公知のNOD/SCID IL2Ry<sup>n u 1 1</sup>マウス）に移植し、次に、それらの試験細胞集団の長期間にわたる潜在的な再増殖可能性を評価することを伴う。

## 【0073】

一実施形態では、抗体は、CD133およびヒト-フコシダーゼで処理したCD133に結合するか、またはそれらとの結合が増強しているが、ノイラミニダーゼで処理したCD133には結合しない。一実施形態では、この抗体は、*in vivo*モデルによって機能的に決定される通り、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCを単離するために使用することができる。一実施形態では、*in vivo*モデルでは、試験細胞集団を、照射されたマウス（例えば、NOGマウスとしても公知のNOD/SCID IL2Ry<sup>n u 1 1</sup>マウス）に移植し、次に、それらの試験細胞集団の長期間にわたる潜在的な再増殖可能性を評価することを伴う。

40

## 【0074】

一実施形態では、造血幹細胞は、骨髄から単離することができる。一実施形態では、これらの細胞は、末梢血から単離することができる。一実施形態では、これらの細胞は、白血球除去生成物から単離することができる。一実施形態では、これらの細胞は、臍帯血か

50

ら単離することができる。一実施形態では、これらの細胞は、供給源の組合せから単離することができる。

【0075】

一実施形態では、造血幹細胞は、FACS選別、免疫磁気ビーズ、および/またはアフィニティマトリックスによって単離することができる。

【0076】

一実施形態では、ヒト幹細胞マーカーCD133は、HSCから単離される。一実施形態では、ヒト幹細胞マーカーCD133は、CD34+HSCから単離される。一実施形態では、ヒト幹細胞マーカーCD133は、CD34+/CD38-HSCから単離される。

10

【0077】

本開示は、再構築の高い潜在的可能性を有する初期原始造血幹細胞を識別かつ単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための方法および組成物に関する。このような方法によって単離された細胞およびこのような方法によって産生された抗体の両方の、再生医療適用におけるいくつかの使用も提供される。

【0078】

一実施形態では、本明細書に開示される技術は、造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを検出し、単離するための診断抗体および治療抗体を速やかに開発するための、新しい戦略を提供する。一実施形態では、本明細書に開示される技術は、血液学的疾患および慢性疾患、例えば白血病、リンパ腫、および骨髄腫の処置、心血管障害の処置、または創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）のための、新しい戦略を提供する。一実施形態では、HSC、HSCから導出された細胞、または抗体は、進行性濾胞性リンパ腫を処置するために使用される。別の実施形態では、HSC、HSCから導出された細胞、または抗体は、小児の血液学的疾患を処置するために使用される。一実施形態では、HSC、HSCから導出された細胞、または抗体は、成人の血液学的疾患を処置するために使用される。別の実施形態では、HSC、HSCから導出された細胞、または抗体は、急性骨髄性白血病を処置するために使用される。一実施形態では、HSC、HSCから導出されたEPCを含めたHSCから導出された細胞、HSCから導出されたEPCによって馴化された培地、または抗体は、心血管障害を処置するために使用される。一実施形態では、HSC、HSCから導出されたEPC、HSCから導出されたEPCによって馴化された培地、または抗体は、創傷を処置し、かつ/または創傷治癒を促進するために使用される。一実施形態では、HSCは、増殖および繁殖の前に、ならびに/または処置に使用する前に、遺伝的に修飾される。

20

30

【0079】

一実施形態では、本開示は、造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを識別かつ単離するために使用され得る抗体に関する。一実施形態では、抗体は、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI（大文字I、図1a参照）、シアリルi（小文字i、図1b）、N-アセチルシアリルラクトースアミン（図2a参照）、シアリルラクト-N-テトラオース（図2b参照）、シアリルラクト-N-ネオテトラオース（図2c参照）、およびシアリルラクトース（図3参照）に特異的である。

40

【0080】

一実施形態では、造血幹細胞を識別かつ単離するために使用され得る抗体を発見し、生成するための細胞集団が提供される。一実施形態では、抗体を生成するために使用される細胞集団は、再構築の高い潜在的可能性を有する造血幹細胞を含む。

【0081】

一実施形態では、本開示は、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI（大文字I、図1a参照）、シアリルi（小文字i、図1b参照）、N-アセチルシアリルラクトースアミン（図2a参照）、シアリルラクト-N-テトラオース（図2b参照）、シアリルラクト-N-ネオテトラオース（図2c参照）、およびシアリ

50

ルラクトース（図3参照）に特異的な抗体であって、マウスにCD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup> HSCを注射し、得られた抗体を、マルチウェルプレート上にコーティングされた2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI（大文字I）、シアリルi（小文字i）、およびシアリルラクトースに結合する抗体についてスクリーニングするステップを含む方法によって生成される抗体を提供する。

#### 【0082】

本開示のモノクローナル抗体（MAb）は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば、KohlerおよびMilstein、1975年、Nature 256巻：495頁による標準の体細胞ハイブリダイゼーション技術を含めた様々な技術によって生成することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順を使用することができ、または例えばB-リンパ球のウイルス性もしくは発癌性の形質転換を含めた、モノクローナル抗体を生成するための他の技術を用いることができる。

10

#### 【0083】

当業者は、ヒトIg遺伝子座の大きい断片を用いて、マウス抗体生成におけるマウス株の欠損を工学的に操作することができ、したがって、このようなマウスは、マウス抗体がない状態でヒト抗体を生成する。大きいヒトIg断片は、膨大な可変的な遺伝子多様性、ならびに抗体生成および発現の妥当な調節を保存することができる。抗体の多様化および選択に関するマウス機構、ならびにヒトタンパク質に対する免疫寛容の欠如を活用することによって、これらのマウス株において再生成されたヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原を含めた目的の任意の抗原に対する高アフィニティー抗体をもたらす。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的なヒトMAbを生成し、選択することができる。

20

#### 【0084】

代替の実施形態では、本開示の抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株において発現させることができる。これらの実施形態では、適切な哺乳動物宿主細胞を形質変換するために、特定の抗体をコードする配列を使用することができる。これらの実施形態によれば、形質転換は、例えば、ウイルス（またはウイルスベクター）にポリヌクレオチドをパッケージングすること、および宿主細胞にウイルス（またはベクター）を形質導入することを含めた、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の方法を使用するか、または当技術分野で公知のトランスフェクション手順によって達成することができる。このような手順は、米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号、および同第4,959,455号によって例示されている。一般に、使用される形質転換手順は、形質転換される宿主に応じて変わり得る。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は、当技術分野で周知であり、それには、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、原形質融合、エレクトロポレーション、リボソームへのポリヌクレオチド（単数または複数）の被包、および核へのDNAの直接的なマイクロインジェクションが含まれるが、それらに限定されない。

30

#### 【0085】

一実施形態では、本開示は、3'-シアル酸付加されたラクトースに結合することができる抗体を提供する。一実施形態では、抗体は、ヒト造血幹細胞の表面上の3'-シアル酸付加されたラクトースに結合することができる。

40

#### 【0086】

別の実施形態では、本開示は、ヒト幹細胞マーカーCD133上に発現するかまたは存在する、2-3シアル酸付加された（sialyated）ラクト-ネオラクト型構造に特異的に結合することができる抗体を提供する。一実施形態では、このCD133は、HSCから単離される。一実施形態では、CD133は、再構築の高い潜在的な可能性を有する造血幹細胞から単離される。

#### 【0087】

ヒト幹細胞マーカーCD133上に発現した2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラ

50

クト型構造に特異的に結合することができるハイブリドーマ/抗体のスクリーニングは、当業者に利用可能な複数の技術のいずれかによって達成することができる。一実施形態では、スクリーニング方法は、アフィニティマトリックス上に固定された抗CD133抗体を使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、ヒト造血幹細胞および前駆細胞から抽出されたCD133分子を精製することを含む。別の実施形態では、次に、2-3シアル酸付加されたラクト構造を発現するCD133の特異的なグリコフォームは、アフィニティマトリックス上に固定されたMAAレクチン(Maakia amenuensis)を使用するレクチンアフィニティークロマトグラフィーによって、これらのCD133分子からさらに精製される。MAAレクチンは、2-3シアル酸付加されたラクト構造に結合する。

10

**【0088】**

一実施形態では、CD133の精製された特異的なグリコフォーム(例えば、3'シアル酸付加されたラクト/ネオラクト構造-CD133、または3'SL-CD133)は、マイクロタイタープレートのウェル中でコーティングされる。一実施形態では、3'SL-CD133でコーティングされたウェルの半分は、ノイラミニダーゼで処理される。ノイラミニダーゼは、スクリーニングされる望ましい抗体に結合するエピトープ上の末端シアル酸残基を切断する。次に、3'SL-CD133に特異的に結合し、ノイラミニダーゼで処理した3'SL-CD133には結合しないそれらの抗体は、精製および/またはクローン化される。

20

**【0089】**

一実施形態では、次に、3'SL-CD133に特異的に結合し、ノイラミニダーゼで処理した3'SL-CD133には結合しない抗体は、in vivoモデルによって機能的に決定される通り、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを単離するそれらの能力について試験される。

**【0090】**

別の実施形態では、精製されたCD133は、マイクロタイタープレートのウェル中でコーティングされる。CD133でコーティングされたウェルの半分は、ヒトフコシダーゼで処理される。フコシダーゼは、CD133上の望ましくないより分化した炭水化物構造(シアリルLex)上にあるルイスFコースを除去する。次に、ハイブリドーマは、CD133およびヒト-フコシダーゼで処理したCD133に結合するか、またはそれらの結合が増強されているが、ノイラミニダーゼで処理したCD133には結合しないそれらの能力について選択される。一実施形態では、次に、これらの抗体は、in vivoモデルによって機能的に決定される通り、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを単離するそれらの能力について試験することができる。

30

**【0091】**

一実施形態では、本開示は、ヒト造血幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCに関する。本開示は、治療における潜在的な使用可能性のために、このような細胞を単離する方法を提供する。

**【0092】**

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞を含む組成物が提供される。

40

**【0093】**

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞は、血液学的疾患、障害または状態(例えば、サラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、骨髄腫)を含めた様々な病状および状態の処置のための治療戦略で直接的に使用することができる。

**【0094】**

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞は、遺伝的疾患、障害または状態、例えば血液学的な遺伝的疾患、障害または状態(例えば、鎌状赤血球、サラセミア、または重症複合免疫不全)を含めた様々な病状および状態を処置するための遺伝子治療戦略で使用する前に、遺伝的に修飾することができる。

50

## 【 0 0 9 5 】

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された幹細胞は、所望の系列の細胞に部分的または完全に分化することができ、それらの細胞は、血液学的疾患、障害状態（例えば、サラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、骨髄腫）、心血管障害、または創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）を含めた様々な病状および状態の処置のための治療戦略で使用することができる。一実施形態では、細胞または抗体は、進行性濾胞性リンパ腫を処置するために使用される。別の実施形態では、細胞または抗体は、小児の血液学的疾患を処置するために使用される。一実施形態では、細胞または抗体は、成人の血液学的疾患を処置するために使用される。別の実施形態では、細胞または抗体は、急性骨髄性白血病を処置するために使用される。

10

## 【 0 0 9 6 】

別の実施形態では、本開示の方法の1つに従って生成された遺伝的に修飾された幹細胞は、所望の系列の遺伝的に修飾された細胞に部分的または完全に分化することができ、それらの遺伝的に修飾された細胞は、様々な病状および状態、例えば血液学的な遺伝的疾患、障害または状態（例えば、鎌状赤血球、サラセミア、または重症複合免疫不全）の処置のための治療戦略で使用することができる。

## 【 0 0 9 7 】

一実施形態では、初期原始HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCは、心血管障害の処置または創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）のために使用される。一実施形態では、EPCは、心血管障害の処置もしくは創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）に使用するために、または心血管障害の処置もしくは創傷の処置（例えば、創傷治癒の促進）に使用するための培地を馴化させるために、HSCから繁殖させることができる。

20

## 【 0 0 9 8 】

本明細書に記載される実施に従って遺伝的に修飾されたHSCの培養を含めた、HSCのex vivo培養に適した培養培地は、例えば米国特許第6,030,836号、およびJ. Hartshornら、「Ex Vivo Expansion of Hematopoietic Stem Cells Using Defined Culture Media」、Cell Technology for Cell Products、第III章、221~224頁に開示されている通り、当技術分野で周知である。このような培養培地には、容易に商業的に利用可能な周知のL-グルタミンを含む高グルコースダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)が含まれるが、それに限定されない。培地には、組換えヒト塩基性線維芽細胞成長因子(rhbgf)を補充することができ、培地は、血清、例えばヒト血清、および抗生物質を含有する。細胞培養物は、培養流体のpHを維持するために、CO<sub>2</sub>雰囲気中、例えば5%~12%に維持され、湿気のある雰囲気中、37°Cでインキュベートされる。化学的に定義付けられた適切な無血清培地は、米国特許出願第08/464,599号および国際公開第96/39487号に記載されており、「完全培地」は、米国特許第5,486,359号に記載されており、これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。化学的に定義付けられた培地は、ヒト血清アルブミン、ヒトEx Cyteリポタンパク質、トランスフェリン、インスリン、ビタミン、必須および非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン、ならびにマイトジェンを補充された、最小必須培地、例えばイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(Gibco)を含む。これらの培地は、分化なしに細胞成長を刺激する。本明細書で使用される場合、マイトジェンは、細胞の細胞分裂を刺激する薬剤を指す。このような薬剤は、細胞に、有糸分裂を誘発する細胞分裂を始めるように働きかける、化学的な、通常はいくつかの形態のタンパク質であり得る。培養培地の他の例として、RPMI 1640、イスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、およびOpti-MEM SFM(Invitrogen Inc.)が挙げられる。ヒト血清アルブミン、ヒトEx Cyteリポタンパク質、トランスフェリン、インスリン、ビタミン、必須および非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、グルタミン、ならびにマイトジェンを補充された、最小必須培地、例えばイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)(Gibco)を含む、化学的に定義付けられた培地も適して

30

40

50

いる。H S C は、実施例 6 に記載される方法に従って増殖させることもできる。

【 0 0 9 9 】

本開示の抗体および細胞の投与経路（純粋な抗体 / 細胞、標識された抗体 / 細胞、毒素に融合した抗体等であろうとなかろうと）は、公知の方法に従う。

【 0 1 0 0 】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物の pH、モル浸透圧濃度、粘度、透明性、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解または放出速度、吸着または浸透を修正し、維持し、または保存するための製剤化材料を含有することができる。このような実施形態では、適切な製剤化材料には、アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシン）；抗菌剤；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝液（例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、T r i s - H C l、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸）；増量剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（E D T A））；錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ - シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル - ベータ - シクロデキストリン）；充填剤；単糖；二糖；ならびに他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；着色剤、香味剤および希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；低分子量ポリペプチド；塩を形成する対イオン（例えば、ナトリウム）；防腐剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）；溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；懸濁化剤；界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック、P E G、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えばポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0、トリトン、トリメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール（tyloxapal））；安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）；浸透圧増強剤（例えば、アルカリ金属ハロゲン化物、例えば、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトール、ソルビトール）；送達ビヒクル；賦形剤；添加剤および / または薬学的アジュバントが含まれるが、それらに限定されない。Remington's Pharmaceutical Sciences、1 8 版（A. R. Gennaro. 編）、1 9 9 0 年、Mack Publishing Companyを参照されたい。

10

20

30

【 0 1 0 1 】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体および / または細胞を含む適切な医薬組成物は、例えば、所期の投与経路、送達型式および所望の投与量に応じて、当業者によって決定される。例えば、上記Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照されたい。ある特定の実施形態では、このような組成物は、本開示の抗体の物理的状態、安定性、i n v i v o 放出速度および i n v i v o クリアランス速度に影響を及ぼすことができる。

【 0 1 0 2 】

ある特定の実施形態では、医薬組成物における主なビヒクルまたは担体は、水性または非水性のいずれかの性質であり得る。例えば、適切なビヒクルまたは担体は、非経口投与のための組成物によく見られる他の材料を場合によって補充された、注射用の水、生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得る。血清アルブミンと混合された中性緩衝食塩水または生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。一部の実施形態では、医薬組成物は、約 pH 7 . 0 ~ 8 . 5 の T r i s 緩衝液、または約 pH 4 . 0 ~ 5 . 5 の酢酸緩衝液を含み、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含むことができる。本開示のある特定の実施形態では、組成物は、保存のために、所望の純度を有する選択された組成物を任意選択の製剤化薬剤と混合することによって、凍結乾燥させたケーキまたは水溶液の形態で調製することができる（上記Remington's Pharmaceutical Sciences）。さらに、ある特定の実施形態では、生成物は、スクロースなどの適正な添加剤を使用して、凍

40

50

結乾燥物として製剤化することができる。

【0103】

本開示の医薬組成物は、非経口送達のために選択することができる。この組成物は、吸入のため、または消化管を介する送達、例えば経口送達のために選択することができる。このような薬学的に許容される組成物の調製は、当業者の技術の範囲内である。

【0104】

製剤の構成成分は、投与部位に許容される濃度で存在することができる。ある特定の実施形態では、緩衝液は、組成物を、生理的 pH またはわずかにより低い pH、典型的に約 5 ~ 約 8 の pH 範囲内に維持するために使用される。

【0105】

非経口投与が企図される場合、本開示で使用するための治療組成物は、薬学的に許容されるビヒクルに所望の抗体および/または細胞を含む、発熱物質を含まない非経口で許容される水溶液の形態で提供することができる。非経口注射に適したビヒクルの一例は、抗体を適切に保存された無菌等張溶液として製剤化する無菌蒸留水である。ある特定の実施形態では、調製物は、所望の分子を、デポー注射によって送達され得る生成物を制御放出または持続放出することができる薬剤、例えば注射可能なマイクロスフェア、生体内分解性粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソームと共に製剤化することを含むことができる。ある特定の実施形態では、循環における期間の持続を促進する効果を有するヒアルロン酸を使用することもできる。ある特定の実施形態では、所望の抗体および/または細胞を導入するために、植込み型送達デバイスを使用することができる。

【0106】

本開示の医薬組成物は、吸入のために製剤化することができる。これらの実施形態では、抗体は、吸入のための乾燥粉末として製剤化される。一部の実施形態では、抗体吸入溶液は、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に製剤化することもできる。ある特定の実施形態では、溶液は、ネブライザーで投与することができる。したがって、肺への投与および製剤化方法は、化学的に修飾されたタンパク質の肺送達を記載している、参照によって組み込まれる国際公開第 94 / 20069 号にさらに記載されている。

【0107】

製剤が経口投与され得ることも企図される。この方式で投与される抗体は、固体剤形、例えば錠剤およびカプセル剤の配合において習慣的に使用される担体を用いて、またはそれなしに製剤化することができる。ある特定の実施形態では、カプセル剤は、胃腸管の地点において、バイオアベイラビリティが最大化され、全身循環前の分解が最小限に抑えられるときに、製剤の活性部分を放出するように設計することができる。抗体の吸収を容易にするための追加の薬剤が含まれ得る。賦形剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁化剤、錠剤崩壊剤、および結合剤を用いることもできる。

【0108】

本開示のいくつかの医薬組成物は、錠剤の製造に適した非毒性の添加剤と混合された、有効量の本明細書に記載される抗体の 1 つまたは複数を含む。錠剤を無菌水、または別の適正なビヒクルに溶解させることによって、溶液を、単位用量形態で調製することができる。適切な添加剤には、不活性賦形剤、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは重炭酸ナトリウム、ラクトースもしくはリン酸カルシウム、または結合剤、例えばデンプン、ゼラチンもしくはアカシア、または滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸もしくはタルクが含まれるが、それらに限定されない。

【0109】

持続送達または制御送達製剤を含む製剤を含めたさらなる医薬組成物は、当業者に明らかとなる。様々な他の持続送達または制御送達手段を製剤化するための技術、例えばリポソーム担体、生体内分解性微粒子または多孔質ビーズおよびデポー注射も、当業者に公知である。例えば、医薬組成物を送達するための多孔質ポリマー微粒子の制御放出を記載している、国際公開第 93 / 15722 号を参照されたい。持続放出調製物は、成型品、

10

20

30

40

50

例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態の、半透明ポリマーマトリックスを含むことができる。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許出願第058481号に開示されている通り）、L-グルタミン酸およびガンマエチル-L-グルタミン酸塩のコポリマー（Sidmanら、1983年、Biopolymers 22巻：547~556頁）、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）（Langerら、1981年、J. Biomed. Mater. Res. 15巻：167~277頁およびLanger、1982年、Chem. Tech. 12巻：98~105頁）、エチレン酢酸ビニル（上記Langerら）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願第133,988号）を含むことができる。持続放出組成物は、当技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得るリポソームを含むこともできる。

例えば、Eppsteinら、1985年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82巻：3688~3692頁；欧州特許出願第036,676号、同第088,046号、および同第143,949号を参照されたい。

#### 【0110】

*in vivo* 投与のために使用される医薬組成物は、典型的に、無菌調製物として提供される。滅菌は、無菌濾過膜を介して濾過することによって達成することができる。組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに、この方法を使用して滅菌を実施することができる。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液で保存することができる。非経口組成物は、一般に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルに入れられる。

#### 【0111】

医薬組成物を製剤化したら、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体として、または無水のもしくは凍結乾燥させた粉末として、無菌バイアルで保存することができる。このような製剤は、すぐに使用できる形態、または投与前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥形態）のいずれかで保存することができる。使用するのに適した医薬組成物には、本発明の抗体および/または細胞の1つまたは複数、それらの所期の目的を達成するのに有効な量で含有されている組成物が含まれる。より具体的には、治療有効量は、疾患の症状を防止、軽減もしくは寛解させるか、または処置を受ける対象の生存期間を延長するのに有効な、抗体および/または細胞の量を意味する。治療有効量の決定は、特に本明細書で提供される詳細な開示に照らして、当業者の技術の範囲に十分に含まれる。治療上有効な投与量は、*in vitro* および *in vivo* 方法を使用することによって決定することができる。

#### 【0112】

一実施形態では、本発明の抗体は、HSCを *in vivo* または *ex vivo* で検出するために利用することもできる。*in vivo* での検出は、本明細書に記載される抗体を標識し、標識された抗体を対象に投与し、次に対象を画像化することによって達成される。本開示による画像診断に有用な標識の例は、放射標識、例えば  $I^{123}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{111}$ 、 $Tc^{99m}$ 、 $P^{32}$ 、 $I^{125}$ 、 $H^3$ 、 $C^{14}$ 、および  $Rh^{188}$ 、蛍光標識、例えばフルオレセインおよびローダミン、核磁気共鳴活性標識、陽電子放出断層撮影（「PET」）走査装置によって検出可能な陽電子放出同位体、化学発光物（chemiluminescer）、例えばルシフェリン、および酵素的マーカー、例えばペルオキシダーゼまたはホスファターゼである。短距離放射線放出体、例えば短距離検出器プローブ、例えば経直腸プローブによって検出可能な同位体を用いることもできる。抗体は、当技術分野で公知の技術を使用して、このような試薬を用いて標識することができる。例えば、抗体の放射標識に関する技術に関して参照によって本明細書に組み込まれる、WenselおよびMeares、Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy、Elsevier、N.Y.（1983年）を参照されたい。また、参照によって本明細書に組み込まれるD. Colcherら、「Use of Monoclonal Antibodies as Radiopharmaceuticals for the Localization of Human Carcinoma Xenografts in Athymic Mice」、Meth. Enzymol. 121巻：802

10

20

30

40

50

～ 816 頁 ( 1986 年 ) も参照されたい。

【 0113 】

本開示に従って放射標識された抗体は、*in vitro* 診断試験のために使用することができる。抗体、その結合部分、プローブ、またはリガンドの比活性は、放射性標識の半減期、同位体純度、および標識が生物学的作用物質に組み込まれる方法に応じて決まる。イムノアッセイ試験では、比活性が高いほど、一般に感度が良好である。抗体を放射性同位体で標識するための手順は、一般に当技術分野で公知である。

【 0114 】

放射標識抗体は、患者に投与することができ、そこで放射標識抗体は、抗体が反応する抗原を担持する H S C に局在化され、公知の技術、例えば放射性核種 ( radionuclear ) 走査を使用して、例えば、ガンマカメラまたは放出断層撮影法を使用して *in vivo* で検出または「画像化」される。例えば、参照によって本明細書に組み込まれる A. R. Bradwell ら、「Developments in Antibody Imaging」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy、R. W. Baldwin ら ( 編 )、65 ~ 85 頁 ( Academic Press 1985 年 ) を参照されたい。あるいは、陽電子放出横断断層撮影法走査装置、例えばブルックヘブン国立研究所にある、放射標識が陽電子を放出する ( 例えば、 $C^{11}$ 、 $F^{18}$ 、 $O^{15}$ 、および  $N^{13}$  )、指定の *Pet VI* を使用することができる。

10

【 0115 】

フルオロフォアおよび発色団で標識された生物学的作用物質は、当技術分野で公知の標準部分から調製することができる。抗体および他のタンパク質は、約 310 nm までの波長を有する光を吸収するので、その蛍光部分は、310 nm を超える、例えば 400 nm を超える波長において実質的に吸収するように選択されるべきである。様々な適切な蛍光剤および発色団は、参照によって本明細書に組み込まれる Stryer、Science、162 巻：526 頁 ( 1968 年 ) および Brand, L. ら、Annual Review of Biochemistry、41 巻：843 ~ 868 頁 ( 1972 年 ) に記載されている。抗体は、従来の手順、例えば参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第 3,940,475 号、同第 4,289,747 号、および同第 4,376,110 号に開示されている手順によって、蛍光性発色団基で標識することができる。

20

【 0116 】

本開示による別の実施形態では、処置し、治療的処置の進行および / または有効性をモニタリングするための方法が提供される。

30

【 0117 】

本明細書に記載される治療方法のそれぞれの一実施形態では、対象は、最初に、H S C の増大または補充の必要性について診断される。本明細書に記載される治療方法のそれぞれの一実施形態では、対象は、血液細胞を増大する必要がある。別の実施形態では、対象は、血液学的疾患、障害または状態 ( 例えば、サラセミア、鎌状赤血球病、白血病、リンパ腫、骨髄腫等 ) から選択される疾患を有する。一実施形態では、細胞または抗体は、進行性濾胞性リンパ腫を処置するために使用される。別の実施形態では、細胞または抗体は、小児の血液学的疾患を処置するために使用される。一実施形態では、細胞または抗体は、成人の血液学的疾患を処置するために使用される。別の実施形態では、細胞または抗体は、急性骨髄性白血病を処置するために使用される。

40

【 0118 】

本明細書に記載される治療方法のそれぞれの一実施形態では、対象は、最初に、心血管障害、および / または H S C もしくは E P C の必要性について診断され、細胞または抗体は、心血管障害を処置するために使用される。別の実施形態では、対象は、創傷を受けており、細胞または抗体は、創傷を処置する ( 例えば、創傷治癒を促進する ) ために使用される。別の実施形態では、H S C から繁殖させた細胞を使用して、心血管障害を処置するか、または創傷を処置する ( 例えば、創傷治癒を促進する ) ために使用される培地を馴化する。

【 0119 】

50

本明細書に記載される治療方法のそれぞれの一実施形態では、対象は、最初に、遺伝的疾患、障害もしくは状態、および/または遺伝的に修飾されたHSCの必要性について診断される。一実施形態では、遺伝的に修飾されたHSCは、血液の疾患または障害、例えば鎌状赤血球、サラセミア、および重症複合免疫不全を処置するために使用される。

【0120】

本明細書の一実施形態では、再構築の高い潜在的可能性を有するヒトHSC集団を移植するための方法が記載される。本明細書の一実施形態では、再構築の高い潜在的可能性を有するヒトHSCから導出された細胞の集団を移植するための方法が記載される。本明細書の一実施形態では、再構築の高い潜在的可能性を有する遺伝的に修飾されたヒト造血幹細胞の集団を移植するための方法が記載される。

10

【0121】

本明細書に開示されるある特定の方法は、HSCのパーセンテージまたは数が多い方が、薬物を発見するため、またはヒト造血幹細胞移植における生着のため、例えば、細胞除去(cytoablative)治療後の患者を救済するための臨床研究において望ましい、任意の状況に適用できる。例えば、骨髄移植では、レシピエントに植え込まれるHSCの数またはパーセンテージが高いほど、レシピエントにおけるドナーHSCの生着パーセンテージが高いことが公知である。

【0122】

本明細書に開示されるある特定の方法は、遺伝的に修飾されたHSCが、薬物を発見するため、またはヒト造血幹細胞移植における生着のため、例えば遺伝子治療のための臨床研究において望ましい、任意の状況に適用できる。

20

【0123】

本明細書の一実施形態では、HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを含む、単離された細胞集団、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が記載される。

【0124】

本明細書の一実施形態では、HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCから繁殖させた細胞を含む、単離された細胞集団、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が記載される。

【0125】

本明細書の一実施形態では、遺伝的に修飾された造血性幹細胞、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを含む、単離された細胞集団、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が記載される。

30

【0126】

具体的な実施形態に応じて、本明細書に記載される医薬組成物は、例えば、HSCの増殖/自己再生/長期間培養開始コロニー形成能、またはこのような増殖から産生された細胞を刺激するか、または促進する薬剤を含むことができる。したがって、このような組成物を投与するための製剤は、具体的な実施形態に応じて決まる。増殖を促進する薬剤は、例えば、その薬剤に適した任意の経路によって投与することができる。投与経路には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、および皮下経路が含まれるが、それらに限定されない。投与経路には、例えば創傷部位への直接的な投与も含まれ得る。

40

【0127】

骨髄から循環へのHSCの動員を増大するための方法が存在するが、本明細書に開示される方法を、その動員方法と組み合わせると、収集する前にドナーの循環HSCおよび骨髄におけるHSCの量を増大することができる。さらに、本明細書に開示される方法は、細胞をドナーから収集した後、その細胞をレシピエントに移植する前にHSCの量を増大するために使用することができる。ドナーから収集されたHSCは、最初にex vivoで培養され、本明細書に開示される方法によって培養で増殖される。HSCの数が所望の量に達したら、培養したHSCを収集し、レシピエントに植え込むことができる。

50

## 【 0 1 2 8 】

一実施形態では、HSCは、対象から単離され、任意選択で数を増大するために培養され、収集され、同じ対象に移植して戻され、すなわち自家細胞移植される。一実施形態では、HSCは、対象から単離され、遺伝的に修飾され、任意選択で数を増大するために培養され、収集され、同じ対象に移植して戻され、すなわち自家細胞移植される。

## 【 0 1 2 9 】

別の実施形態では、HSCは、レシピエント対象と一致するHLA - タイプのドナーから単離され、ここでドナーとレシピエントは、2つの別個の個体である。これは、同種移植である。ドナー - レシピエントの抗原タイプの一致は、当技術分野で周知である。HLA - タイプには、HLA - A、HLA - B、HLA - C、およびHLA - Dが含まれる。典型的に、これらは、移植に必要な細胞表面抗原の一致の最小数を表す。

10

## 【 0 1 3 0 】

一実施形態では、HSCまたは遺伝的に修飾されたHSCを含む、単離された細胞集団は、移植の前に凍結保存される。

## 【 0 1 3 1 】

移植方法は、ドナーまたはレシピエントの性質によって制限されない。一部の実施形態では、ドナーおよびレシピエントは、共にヒトである。移植レシピエントは、ドナーと完全にまたは部分的に同種であり得る。移植は、自家であってもよい。移植レシピエントまたはドナーは、5歳未満、1～10歳、5～15歳、10～20歳、15～25歳、20～30歳、25～35歳、30～40歳、35～45歳、40～50歳、45～55歳、50～60歳、55～65歳、60～70歳、または70歳もしくはそれよりも高齢であってよい。

20

## 【 0 1 3 2 】

別の実施形態では、処置を受ける対象は、移植の補助物として、亜致死的または致死的線量の放射線を受けている（例えば、照射されている）。

## 【 0 1 3 3 】

本開示の他の実施形態は、本明細書に開示される本開示の明細書および実施を考慮することによって当業者に明らかとなる。

## 【 0 1 3 4 】

HSC、例えば、再構築の高い潜在的可能性を有するHSCは、診療所において数々の使い方があり得る。総説については、例えば、Weissman IL、Shizuru JA、The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases、Blood、2008年11月1日、112巻(9号)：3543～53頁を参照されたい。

30

## 【 0 1 3 5 】

ヒト治療における幹細胞移植の数々の具体的な使用例は、当技術分野に見出すことができる。例えば、Hematopoietic Stem Cell Transplantation、Anthony D. Ho、Rainer Haas、およびRichard E. Champlin編、Marcel Dekker Inc. 2000年；Schrauder A、von Stackelberg A、Schrappe M、Cornish J、Peters C、ALL-BFM Study Group、EBMT PD WP、I-BFM Study Group、Allogeneic hematopoietic SCT in children with ALL: current concepts of ongoing prospective SCT trials、Bone Marrow Transplant、2008年6月、41巻 付録2号：S71～4頁；Copelan EA、Hematopoietic stem-cell transplantation、N Engl J Med、2006年4月27日、354巻(17号)：1813～26頁；Kim SW、Hematopoietic stem cell transplantation for follicular lymphoma: optimal timing and indication、J Clin Exp Hematop、2014年、54巻(1号)：39～47頁；Choi SW、Reddy P、Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease、Nat Rev Clin Oncol、2014年9月、11巻、536～47頁；Rambaldi A、Biagi E、Bonini C、Biondi A、Introna M、Cell based strategies

40

50

to manage leukemia relapse: efficacy and feasibility of immunotherapy approaches、Leukemia、29巻：1～10頁、2014年7月8日、doi: 10.1038/leu.2014.189. [印刷前の電子出版]; Kekre N、Antin JH、Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match doesn't exist、Blood、2014年7月17日、124巻(3号)、334～343頁; および Tsirigotis P、Shimoni A、Nagler A、The expanding horizon of immunotherapy in the treatment of malignant disorders: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and beyond、Ann Med、2014年、46巻(6号)、384～396頁を参照されたい。

#### 【0136】

投与経路、体重当たりの移植細胞数、レシピエントの移植前処置および移植後処置、ならびにHSCまたは再構築の高い潜在的可能性を有するHSCの投与速度および投与頻度は、常法を使用して当業者によって決定され得る。一実施形態では、投与方法は、静脈内注入である。輸血/移植される細胞の数は、性別、年齢、体重、疾患または障害のタイプ、疾患または障害の段階、細胞集団における所望の細胞のパーセンテージ(例えば、細胞集団の純度)、および治療上の利益を得るのに必要な細胞数などの因子が考慮される。本明細書に記載される方法と共に、様々な補助的処置を使用することができる。一態様では、補助的処置には、中でも、抗真菌剤、抗菌剤、および抗ウイルス剤が含まれる。

#### 【0137】

前述の通り、治療効果を達成するのに必要な細胞の量は、特定の目的に合った従来の手順に従って、経験的に決定される。一般に、治療目的で細胞を投与するために、細胞は、薬理的に有効な用量で与えられる。「薬理的に有効な量」または「薬理的に有効な用量」とは、所望の生理的效果をもたらすのに十分な量、または例えば対象の生着もしくは生存のために所望の結果を達成することができる量である。治療上の利益は、改善が実現されるかどうかにかかわらず、基礎疾患または障害の進行を停止または緩徐することも含む。

#### 【実施例】

#### 【0138】

(実施例1)

免疫付与のためのヒトCD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>HSCの単離

陽性免疫磁気選択を使用して収集したヒトCD34<sup>+</sup>造血幹細胞を、Lonzaまたは任意の他の商業的供給源から得ることができる。この細胞は、例えば、骨髄、末梢血、白血球除去生成物、および/または臍帯血から導出することができる。一例では、低密度骨髄単核細胞(1.077g/mL未満)を、Ficoll-Hypaqueで分離する。CD34<sup>+</sup>細胞を、Cell Pro Inc(ワシントン州ボセル(Bothel))製の商業的に利用可能な細胞分離系キットを使用して富化し、リン酸緩衝食塩水(PBS)中1%BSAで2回洗浄し、 $2 \times 10^8$ 個の細胞/mLの濃度まで1%BSAに再懸濁させ、ビオチン化抗CD34 IgMモノクローナル抗体(MoAb)(12.8)と共に室温で25分間インキュベートする。細胞を、1%BSAで洗浄して非結合抗体を除去し、次に、5%BSAに $2 \times 10^7$ 個の細胞/mLで再懸濁させ、アビジンカラムに搭載する。吸着されたCD34<sup>+</sup>細胞を、ゲル床を手作業で圧搾することによって放出させ、20%FCSを含むIMDMに再懸濁させ、Coulterカウンター(Coulter Electronics、フロリダ州ハイアリア)で計数する。

#### 【0139】

あるいは、単核細胞を、Ficoll-Hypaque(Pharmacia、ニュージャージー州ピスカタウェイ)密度遠心分離を使用してヒト骨髄から単離する。次に、単核画分を、小型磁気作動型細胞選別機系(Miltenyi Biotec、カリフォルニア州オーバーン)を使用してCD34<sup>+</sup>細胞のために予め富化し、それによって85%～90%純粋なCD34<sup>+</sup>集団を得る。次に、得られた細胞を、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識抗CD34(HPCA2-FITC; Becton Dic

10

20

30

40

50

kinson、カリフォルニア州サンホセ)およびフィコエリトリン(PE)標識抗CD38(Leu 17-PE; Becton Dickinson)と共にインキュベートし、CD34+/CD38-細胞を、FACSVantage(Becton Dickinson)によって、99%よりも高い純度まで単離する。CD34+CD38-細胞は、高いCD34抗原発現、およびアイソタイプ対照の最大PE蛍光の半分に満たないCD38蛍光を伴うものとして得られる。

#### 【0140】

##### (実施例2)

CD133表面上の2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、およびシアリルラクトースに対する抗体を作製するためのCD133の単離

10

ヒト造血幹細胞および前駆細胞からのCD133の単離および精製は、当業者に公知のいくつかの方法のいずれかによって行うことができる。一例では、CD133+細胞(例えば、Miltenyi Biotec、カリフォルニア州オーバーン製の抗CD133でコーティングされた磁気ビーズ/Diamond CD133単離キットを使用して単離された)( $2 \times 10^9$ 個)を、PBSで洗浄し、抽出緩衝液で溶解する。細胞を、室温で5分間にわたって間欠的にボルテックスし、次に氷上で20分間静置する。細胞核およびデブリを、4において10,000gで10分間遠心分離によって除去する。溶菌液/上清を、0.2 $\mu$ mフィルタを介して濾過した後、洗浄緩衝液(0.125MのNaCl、25mMのトリス、pH8.0、0.01%NaN<sub>3</sub>、2.5mMのEDTA、および0.1%Brij)で平衡化した0.5mLの抗CD133アフィニティークラム上に搭載する。次に、カラムを洗浄緩衝液で十分に洗浄し、CD133抗原を、50mMのエタノールアミン、pH11.5、0.1%Brij、および0.01%NaN<sub>3</sub>で溶出する。HClを用いてpHを中性に調整する。残った汚染タンパク質の除去は、洗浄緩衝液で平衡化した床体積300 $\mu$ LのDEAEカラム上に抗原溶離液を通過させることを含む追加のクロマトグラフィー、および第2のアフィニティークロマトグラフィーステップによって、行うことができる。溶出されたCD133抗原の純度および識別は、例えば、SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析によって確認することができる。

20

#### 【0141】

##### (実施例3)

2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、およびシアリルラクトースに対する抗体の作製

30

一例では、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、およびシアリルラクトースに対するマウスモノクローナル抗体(Mabs)を作製するために、BALB/cマウスを、PBS 0.03mL、pH7.4中 $5 \times 10^5$ 個のCD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>HSCで、s.c.(例えば、足蹠)により週2回、少なくとも3回免疫付与する。最初の免疫付与は、完全フロイントアジュバント(Sigma、米国メリーランド州セントルイス)が存在する状態で行う。不完全フロイントアジュバント(Sigma)を、その後の免疫付与のために添加する。さらに、細胞を、1:100の植物性血球凝集素(PHA)と共に10分間インキュベートした後、注射することができる。融合の3日前に、免疫マウスを、 $5 \times 10^5$ 個のCD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>HSCで追加免疫する。およそ21日目に、脾細胞およびリンパ球を、それぞれ脾臓を灌流させ、近位リンパ節を切り刻むことによって免疫マウスから調製し、収集し、SP2/0-Ag14骨髓腫細胞(ATCC、米国メリーランド州ロックビル)に融合させる。融合プロトコールは、KohlerおよびMilstein(Nature、256巻:495~497頁、1975年)に記載されている通りであってよい。

40

#### 【0142】

次に、融合細胞を、HAT選択に付す。一般に、特にマウス起源のモノクローナル抗体またはそれらの機能的断片を調製するために、例えば、「抗体」マニュアル(HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Co

50

Id Spring Harbor NY、726頁、1988年)に記載されている技術を参照することが可能である。融合のおよそ10日後に、ハイブリッド細胞のコロニーをスクリーニングする。一次スクリーニングのために、ハイブリドーマの上清を、2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造、例えばシアリルI(大文字I)、シアリルi(小文字i)、およびシアリルラクトースの1つに対して生じたMa bの分泌について、ELISAによって評価する。一例では、上清を、ELISAプレート上にコーティングされたヒト血清アルブミン(HSA)にコンジュゲートした3'シアル酸付加されたラクトースに結合するが、HAS単独には結合しないものについて評価する。この試験の陽性反応体(reactor)を、増幅させ、クローン化し、一組のハイブリドーマを回収し、精製し、ヒト幹細胞

10

#### 【0143】

(実施例4)

ヒト幹細胞マーカーCD133上に発現した2-3シアル酸付加されたラクト-ネオラクト型構造に特異的に結合することができるハイブリドーマの選択

96ウェルプレートの各ウェルを、PBS(例えば、1μg/mL、50μL)中CD133(ヒト造血幹細胞および前駆細胞から抽出される)でコーティングし、37で1時間インキュベートする。次に、選択される抗体を含有するハイブリドーマ培養上清を、別々のウェルに添加し、37でさらに1時間インキュベートする。次に、ウェルをPBS-Tweenで洗浄し、標識二次抗マウス抗体(例えば、様々なアイソタイプのHRP

20

#### 【0144】

2-3シアル酸付加されたラクト構造を発現するCD133の特異的なグリコフォームは、レクチンアフィニティークロマトグラフィーによって、Maackia amurensis(MAA)レクチンを使用して精製することができる。MAAレクチンクロマトグラフィーゲルは、商業的供給源(例えば、EY Labs)から得ることができる。ゲルを、小型カラム(例えば、プラスチックミニカラム)に注ぎ、ゲル体積の10倍の緩衝液で洗浄する。ヒト造血幹細胞および前駆細胞から抽出したCD133を、カラムに適用し、非結合材料を、緩衝液を用いてカラムから洗浄する。次に、結合した材料を、選択緩衝液中、適正な炭水化物、例えば2-3シアリルラクト-ネオラクト型構造を用いて溶出する。

30

#### 【0145】

所望の抗体のいくつかは、3'シアル酸付加された-CD133(3'SL-CD133)に結合するが、ノイラミニダーゼで処理した3'SL-CD133には結合しない。このような抗体は、十分に確立された機能的in vivoモデルのいずれかを使用して、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCを単離するために試験することができる。

40

#### 【0146】

他の場合には、所望の抗体は、CD133(コーティングされたウェル)およびヒトフコシダーゼで処理したCD133(コーティングされたウェル)に結合するが、ノイラミニダーゼで処理したCD133には結合しない。このような抗体は、十分に確立された機能的in vivoモデルのいずれかを使用して、再構築の高い潜在的可能性を有する原始HSCを単離するために試験することができる。

#### 【0147】

(実施例5)

50

再構築の高い潜在的可能性を有するHSCを単離することができるハイブリドーマ/抗体のスクリーニング

単離された造血細胞集団の自己再生能力および再構築の潜在的可能性をアッセイするためのツールとして働く、当業者に公知のいくつかの方法が存在する。このような方法の1つは、試験細胞集団を、照射されたマウス(例えば、NOD/SCID IL2Ry<sup>nu11</sup>マウス)に移植し、次に、それらの試験細胞集団の長期間にわたる潜在的な再増殖可能性を評価することを伴う。例えば、Majeti R、Park CY、およびWeissman IL(2007年) Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood、Cell Stem Cell、1巻(6号): 635~645頁およびWang, J.C.、Lapidot, T.、Cashman, J.D.、Doedens, M.、Addy, L.、Sutherland, D.R.、Nayar, R.、Laraya, P.、Minden, M.、Keating, A.、Eaves, A.C.、Eaves, C.J.、およびDick, J.E.(1998年) High level engraftment of NOD/SCID mice by primitive normal and leukemic hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase、Blood 91巻、2406~2414頁を参照されたい。

【0148】

NOD/SCID IL2Ry<sup>nu11</sup>マウスを、Jackson Laboratory(メイン州バーハーバー)から得ることができる。新生仔および成体マウスを、移植前に、当技術分野で十分に説明されているGamma Cell 40セシウム源を使用して、それぞれ100ラッドまたは270ラッドで最長24時間にわたって垂致死的に照射する。次に、再構築の潜在的可能性について試験されるヒト細胞(例えば、前述の通りに調製した抗(2-3シアル酸付加されたラクト構造)抗体に結合するHSC)の単離集団を、生後最初の48時間以内に、心臓内もしくは顔面静脈注射によって新生仔に移植するか、または尾静脈注射によって成体(月齢2~4カ月)マウスに移植する。二次移植は、一次レシピエントマウスの大腿骨および脛骨由来の $5 \times 10^6$ 個の骨髓細胞を、3~5匹の致死的に照射されたNOD/SCIDマウスのそれぞれに移植することによって実施することができる。二次レシピエントマウス由来の末梢血細胞を、移植の1カ月後、2カ月後、3カ月後、4カ月後、および5カ月後に分析する。

【0149】

試験細胞をNOD/SCIDマウスに注射した後の様々な時点において(例えば12週~30週)、マウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、血液、骨髓(脛骨、大腿骨)、脾臓、リンパ節、および胸腺を回収する。次に、これらの組織を、ドナーのキメラ現象および白血球サブセットについて、当技術分野で周知の方法を使用してフローサイトメトリー分析に付す。例えば、骨髓を、0.1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに懸濁させる。骨髓細胞を、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)コンジュゲート抗ヒトCD45およびPEコンジュゲート抗マウスCD45で染色し、また、ヒト白血球サブセットを、以下のPEコンジュゲート抗体、CD3、CD14、CD16、CD20、CD41、およびCD56の1つで染色する。赤血球を、抗マウスTER119-FITCおよび抗ヒトグリコホリンA(GPA)-PE(CD235a)で染色し、赤血球サブセットを、ヒトCD45-FITCおよびCD71-PEで染色する。すべての抗体は、BD Biosciencesから購入することができる。あるいは、抗ヒト抗体、例えばPBコンジュゲートCD45、HI30; APC-Alexa Fluor 750コンジュゲートCD3、S4.1; APCコンジュゲートCD19、SJ25-C1; PEコンジュゲートCD13、TK1(Caltag); PEコンジュゲートCD33、P67.6、PEコンジュゲートGPA、GA-R2、APCコンジュゲートCD41a、HIP8(BD Biosciences)を使用して、系列分析を行うことができる。マウスの白血球および赤血球を、それぞれ、Alexa488またはPE-Cy7コンジュゲートCD45.1、クローンA20.1.7、およびPE-Cy5またはPE-Cy7コンジュゲートTer119(eBiosciences、カリフォルニア州サンディエゴ)の発現に基づいて識別する。R&D Systemsを含めた様々な販売業者が、系列分化マーカーの

10

20

30

40

50

数々のパネルを提供している。

【0150】

キメラ現象、またはヒト白血球再構築のレベルを、末梢血から、以下の通り算出することができる。

キメラ現象 = %CD45<sup>+</sup>ヒト細胞 / (%CD45<sup>+</sup>ヒト細胞 + %CD45<sup>+</sup>マウス細胞)

【0151】

これらの方法を使用すると、再構築の高い潜在的可能性を有する、識別されたHSCは、(1)少なくとも10%のキメラ現象を示すか、または(2)一次レシピエントにおいて12週間もしくはそれよりも長く経過して初めて著しい生着を示すが、二次レシピエントにおいて多系列の再構築を示す。

10

【0152】

(実施例6)

再構築の高い潜在的可能性を有するHSCの*ex vivo*増殖および分化

再構築の高い潜在的可能性を有する初期原始HSCを含むHSCは、様々な方法によって*ex vivo*で増殖させることができる。得られる細胞が所望の遺伝的修飾を含有するように、増殖前に、HSCを遺伝的に修飾することができる。商業的に利用可能な増殖培地およびプロトコルの例として、StemMACS(商標)HSC増殖培地(Miltenyi Biotec)、STEMGENIX HSC GEM/Stemline(商標)培地(SIGMA)、およびPromoCellのDXF培地(PromoCell GmbH)が挙げられる。他の増殖方法は、当技術分野で周知である。例えば、Walasek, MA, van Os R, およびde Haan G(2012年)Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities; Ann N Y, Acad Sci. 2012年8月、1266巻:138~50頁; およびRodriguez-Pardo VMおよびVernot JP, Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype CD34+c-kit+ in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion, Cell Mol Biol Lett, 2013年3月、18巻(1号):11~33頁を参照されたい。

20

【0153】

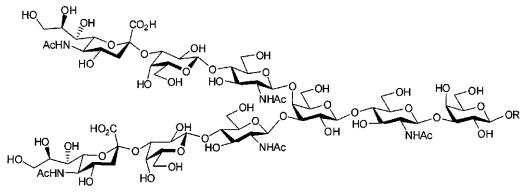
HSCは、様々な系列に分化することができる。総説については、例えば、Seita J, およびWeissman I.L.(2010年)Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation, Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2巻(6号):640~653頁を参照されたい。これらの系列のいくつかは、*in vitro*で分化することができる。例えば、BM由来のHSCから*in vitro*で単球性細胞を得るための方法が導出されている。Magga J, Savchenko E, Malm T, Rolova T, Pollari E, Valonen P, Lehtonen S, Jantunen E, Aarnio J, Lehenkari P, Koistinaho M, Muona A, Koistinaho J, Production of monocytic cells from bone marrow stem cells: therapeutic usage in Alzheimer's disease, J Cell Mol Med, 2012年5月、16巻(5号):1060~73頁。さらに、幹細胞は、骨、軟骨、および肺のための持続性先駆細胞を提供する方式で培養することができる。Pereira, R.F.ら、Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursors for bone, cartilage, and lung in irradiated mice, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92巻、4857~4861頁(1995年)。このような培養は、遺伝的に修飾された幹細胞を用いて実施することもできる。

30

40

【 図 1 a 】

FIG. 1A

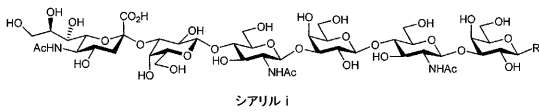


R

シアリル i

【 図 1 b 】

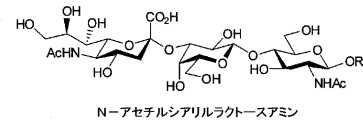
FIG. 1B



シアリル i

【 図 2 a 】

FIG. 2A

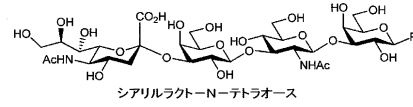


N-アセチルシアリラクトースアミン

R

【 図 2 b 】

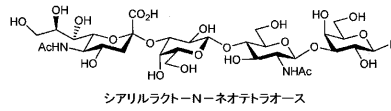
FIG. 2B



シアリラクト-N-ネオテトラオース

【 図 2 c 】

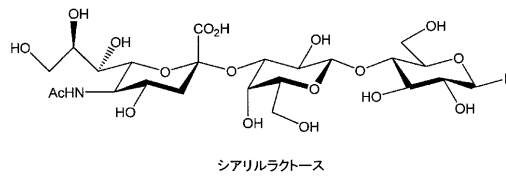
FIG. 2C



シアリラクト-N-ネオテトラオース

【 図 3 】

FIG. 3



シアリラクトース

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2016/060014
---------------------------------------------------

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV.	C07K16/28 A61K39/00 G01N33/563 G01N33/577 A61K39/395	
	G01N33/574	
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K A61K G01N		
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, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/145032 A1 (LAINE JARMO [FI] ET AL) 10 June 2010 (2010-06-10) par. 2, 7, 172, 627-666, 825-847, 1001-1003, 1070-1097, 1123-1136, 1306-1312, 1491-1513, 1639-1641, 1679, 1684, examples 18 and 22 and claims -----	1-15, 17-21,25
X	US 2010/292095 A1 (LAUKKANEN MARJA-LEENA [FI] ET AL) 18 November 2010 (2010-11-18)  par. 99, 103, 110, 123-127 130-148, 158, 201, 210  ----- -/--	1,4,14, 16,24, 27,28
<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 *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
23 January 2017		03/02/2017
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  Diez Schlereth, D

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/060014

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012/093782 A1 (GROVE ROBERT I [US] ET AL) 19 April 2012 (2012-04-19)	15,17, 22,23, 26, 29-32, 34-36,39
Y	par. 51-57, 88-91	37,38, 40,41
X	US 2010/303766 A1 (MIYAJI HIROMASA [JP] ET AL) 2 December 2010 (2010-12-02)	15,17, 22,25,33
Y	par. 125-127, 139, 156, 158	37,38, 40,41
X	WO 2012/045913 A1 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALVELU [FI]; GLYKOS FINLAND OY [FI]; PARTAN) 12 April 2012 (2012-04-12) pages 1, 3, 10	15,17,25
A	US 6 043 348 A (LAWMAN MICHAEL J P [US] ET AL) 28 March 2000 (2000-03-28) the whole document	26,29,32
A	ZHAO TING C ET AL: "Targeting human CD34+ hematopoietic stem cells with anti-CD45 x anti-myosin light-chain bispecific antibody preserves cardiac function in myocardial infarction", JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY, AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY, US, vol. 104, no. 6, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 1793-1800, XP002602577, ISSN: 8750-7587, DOI: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.01109.2007 [retrieved on 2008-02-21] the whole document	26,29,32
A	US 2012/129712 A1 (SATOMAA TERO [FI] ET AL) 24 May 2012 (2012-05-24) the whole document	26,29,32

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/060014

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010145032 A1	10-06-2010	US 2010145032 A1 WO 2008087259 A1	10-06-2010 24-07-2008
US 2010292095 A1	18-11-2010	AU 2008324073 A1 CA 2743032 A1 EP 2209809 A1 JP 2011504099 A US 2010292095 A1 WO 2009060129 A1	14-05-2009 14-05-2009 28-07-2010 03-02-2011 18-11-2010 14-05-2009
US 2012093782 A1	19-04-2012	US 2012093782 A1 WO 2010132315 A1	19-04-2012 18-11-2010
US 2010303766 A1	02-12-2010	CN 101848991 A EP 2184349 A1 KR 20100042654 A US 2010303766 A1 WO 2009020201 A1	29-09-2010 12-05-2010 26-04-2010 02-12-2010 12-02-2009
WO 2012045913 A1	12-04-2012	NONE	
US 6043348 A	28-03-2000	AU 7180398 A US 6043348 A US 6242579 B1 US 2002038003 A1 US 2003228291 A1 US 2005180980 A1 US 2008152647 A1 US 2014377172 A1 WO 9821334 A2	03-06-1998 28-03-2000 05-06-2001 28-03-2002 11-12-2003 18-08-2005 26-06-2008 25-12-2014 22-05-1998
US 2012129712 A1	24-05-2012	US 2012129712 A1 WO 2010122234 A1	24-05-2012 28-10-2010

## 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	35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K	35/51 (2015.01)	A 6 1 K 35/51	
A 6 1 K	35/15 (2015.01)	A 6 1 K 35/15	Z
C 1 2 N	5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/0789	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N	1/02 (2006.01)	C 1 2 N 1/02	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N	15/06 (2006.01)	C 1 2 N 15/06	1 0 0

(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, DJ, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

- 1 . T W E E N
- 2 . プルロニック
- 3 . B r i j

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 CE10 DA05 DA13 DA14 DA20  
 4B065 AA93X AA94X AC12 AC20 BA30 BD14 CA44  
 4C087 AA01 AA02 BB44 BB59 BB64 BB65 MA17 MA35 MA37 MA52  
 MA55 MA66 NA14 ZA36 ZA51 ZA89 ZB26 ZB27 ZC37  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 EA50 EA54 EA60  
 FA74 GA21

专利名称(译)	用于生产血液学干细胞的单克隆抗体，方法和组合物，以及使用它们的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019503985A</a>	公开(公告)日	2019-02-14
申请号	JP2018522547	申请日	2016-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	糖模拟物有限公司		
申请(专利权)人(译)	格力高类似物，公司		
[标]发明人	マグナニジョンエル		
发明人	マグナニ, ジョン エル.		
IPC分类号	C07K16/28 A61P7/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P39/02 A61K35/12 A61P35/00 A61P35/02 A61K35/51 A61K35/15 C12N5/0789 C12N5/10 C12N5/078 A01K67/027 C12N1/02 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08 C12N15/06		
CPC分类号	A61P7/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P35/00 A61P35/02 A61P39/02 C07K16/2896 C07K16/44 G01N33/5308 G01N33/56966 G01N33/57492 G01N2800/52 G01N2800/56 C12N5/0647		
FI分类号	C07K16/28 A61P7/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P39/02 A61K35/12 A61P35/00 A61P35/02 A61K35/51 A61K35/15.Z C12N5/0789 C12N5/10 C12N5/078 A01K67/027 C12N1/02 G01N33/53.Y C12N15/09.Z C12P21/08 C12N15/06.100		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA05 4B064/DA13 4B064/DA14 4B064/DA20 4B065/AA93X 4B065/AA94X 4B065/AC12 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BD14 4B065/CA44 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB44 4C087/BB59 4C087/BB64 4C087/BB65 4C087/MA17 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA36 4C087/ZA51 4C087/ZA89 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZC37 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA54 4H045/EA60 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	62/250424 2015-11-03 US		
其他公开文献	JP2019503985A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

**摘要(译)**  
 用于发现和产生可用于鉴定和/或分离造血干细胞 (HSC) 的抗体的方法和组合物，例如具有高重建潜力的HSC。此外，HSC或转基因HSC，例如具有高重建潜力的HSC和/或转基因HSC，用于治疗血液学或遗传性疾病提供了用于治疗患者，患有心血管疾病的患者，从伤口恢复的患者，或从化疗或放射暴露中恢复的方法和组合物。

(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2019-503985 (P2019-503985A)
	(43) 公表日	平成31年2月14日 (2019.2.14)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B064
A61P 7/00 (2006.01)	A61P 7/00	4B065
A61P 9/00 (2006.01)	A61P 9/00	4C087
A61P 17/02 (2006.01)	A61P 17/02	4H045
A61P 39/02 (2006.01)	A61P 39/02	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2018-522547 (P2018-522547)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成28年11月2日 (2016.11.2)	グリコメテックス、インコーポレイテッド
(23) 優先権主張日	平成30年6月19日 (2018.6.19)	アメリカ合衆国 メリーランド 2085 O、ロックビル、メディカル センター ドライブ 9708
(24) 国際出願番号	PCT/US2016/060014	(74) 代理人
(25) 国際公開番号	W02017/078215	100078282
(26) 国際公開日	平成29年5月11日 (2017.5.11)	弁理士 山本 秀策
(27) 優先権主張番号	62/250,424	100113413
(28) 優先日	平成27年11月3日 (2015.11.3)	弁理士 森下 夏樹
(29) 優先権主張国	米国 (US)	マグナニ、ジョン エル.
		アメリカ合衆国 メリーランド 2087 8、ケーズスバーク、ドウ レーン 12819
		(72) 発明者
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】	モノクローナル抗体、造血幹細胞の産生のための方法および組成物、ならびにそれらを使用する方法	