

(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2008-524985
(P2008-524985A)

(43) 公表日 平成20年7月17日(2008.7.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z	4 C 0 8 7
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-540656 (P2007-540656)
 (86) (22) 出願日 平成17年11月14日 (2005.11.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年5月7日 (2007.5.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2005/055950
 (87) 国際公開番号 W02006/051112
 (87) 国際公開日 平成18年5月18日 (2006.5.18)
 (31) 優先権主張番号 F12004A000238
 (32) 優先日 平成16年11月15日 (2004.11.15)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

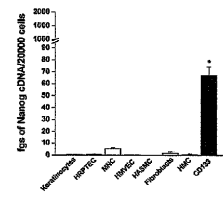
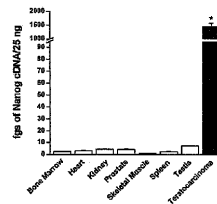
(71) 出願人 507147367
 アヅィエンダ オスペダリエローユニヴァ
 ーシタリア カレッジ
 イタリア国、50139 フィレンツェ、
 ヴィアーレ ピエラッチニ 17
 (74) 代理人 100065385
 弁理士 山下 穰平
 (72) 発明者 ロマグナニ・パオラ
 イタリア国、50139 フィレンツェ、
 ヴィア グロッコ 25
 (72) 発明者 アッヌンツィアト・フランセスコ
 イタリア国、50143 フィレンツェ、
 ヴィア アルチプレッシ 42

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞、その精製方法、同定方法及び使用

(57) 【要約】

循環する CD 1 4 + 細胞の新規の集団について開示し、この細胞は、CD 3 4 を低密度で表面に発現しており、幹細胞能を与えている。また、この細胞の精製方法、同定方法及び治療上の使用についても開示する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

幹細胞能を付与された成人細胞の同定方法であって、転写因子である NANOG の RNA 及び / 又はタンパク質の発現を測定することを特徴とする方法。

【請求項 2】

細胞表面上に CD14⁺ と CD34⁺ とが同時に存在することを特徴とする幹細胞集団。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の CD14⁺ CD34⁺ 幹細胞集団を末梢血から回収する方法であって、末梢血中に残存する単核細胞から前記の集団を単離するのに、細胞表面上に CD14 及び CD34 のマーカーが同時に存在することを検出することを用いることを特徴とする方法。

10

【請求項 4】

循環血、臍帯血、骨髓、胎盤、又はヒトの各組織から前記の回収を行うことを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の CD14⁺ CD34⁺ 細胞の精製方法であって：

血液の他の細胞成分からの単核細胞の単離が、密度勾配分離法（密度 = 1.077 g / L）により達成され、

末梢血の単核細胞の集団に存在する CD14⁺ 細胞の精製が、免疫磁気分離法により、達成され、

20

CD14⁺ CD34⁺ 細胞の回収が、CD14⁺ の集団と、蛍光色素を結合した抗 CD34 抗体と、ジゴキシゲンを結合した抗蛍光色素抗体と、ビオチンをコンジュゲートした抗ジゴキシゲニン抗体と、前もって抗ビオチン抗体をコンジュゲートした蛍光色素リゾーム（Ab-CMF L）とを最終的にインキュベートすることにより、得られる、ことを特徴とする方法。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の細胞の使用であって、

虚血、神経変性疾患若しくは脳血管疾患の処置、及び臓器障害（心臓、腎臓、肺、肝臓、若しくは膵臓障害、及び泌尿器、視覚、聴覚、嗅覚、皮膚及び / 又は粘膜、骨、及び / 又は軟骨性臓器及び組織）の治療、並びに血液病及び免疫不全疾患の処置に有用な医薬組成物（細胞治療）の調製への使用。

30

【請求項 7】

請求項 2 又は 5 に記載の集団のマーカー用の、特異的試薬のシリーズを有するキットであって、請求項 2 に記載の幹細胞集団の同定及び / 又は回収を可能とすることを特徴とするキット。

【請求項 8】

前記試薬は、抗体をコンジュゲートした磁性を有する蛍光リボソーム、又は請求項 2 に記載の細胞集団の表面上に発現する低いレベルの分子であっても検出可能なその他の二次反応物質と関連づけられた CD14 及び CD34 のマーカーに特異的な抗体又はプローブであることを特徴とする請求項 7 に記載のキット。

40

【請求項 9】

前記反応物質、抗体又はプローブは、以下のマーカー：NANOG、CD11c、CD16、CD105、CD31、CD86 及び HLA-DR に特異的であり、可能であれば、請求項 2 の細胞集団の検出及び / 又は回収を可能とするその他の二次反応物質と組み合わされていることを特徴とする請求項 7 に記載のキット。

【請求項 10】

虚血、神経変性疾患若しくは脳血管疾患の処置、及び臓器障害（心臓、腎臓、肺、肝臓、若しくは膵臓障害、及び泌尿器、視覚、聴覚、嗅覚、皮膚及び / 又は粘膜、骨、及び / 又は軟骨性臓器及び組織）の治療、並びに血液病及び免疫不全疾患の処置の方法であって

50

、請求項 2 に記載の幹細胞集団を用いて、 $1 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ 細胞の量で、患者を還流することを含むことを特徴とする方法。

【請求項 1 1】

還流の前に、幹細胞の増殖因子、及び / 又は組織特異的な分化を惹起する目的の因子を用いた増幅及び / 又は活性化のために、請求項 2 に記載の幹細胞を処置することを特徴とする請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

請求項 9 に記載の病態の処置用の細胞治療が適合しているかどうかの妥当性を評価する診断方法であって、患者中の細胞の量を、請求項 2 に従って同定することを特徴とする方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の幹細胞の集団、その精製、及び血管系の病態及びその他のヒトの病態の処置への使用に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、成人の末梢血が骨髄に由来する循環する細胞であって成熟内皮細胞 (ECS) に分化し得る、いわゆる内皮前駆細胞 (EPCs) を含有することは、公知である；この細胞は、新規の血管壁の形成に貢献する虚血部位に局在化し得る。この特性ゆえ、これらの細胞は、*in vivo* の動物モデルにおいても、急性の心筋梗塞及び慢性の虚血性心臓病の影響を受けた患者においても、組織修復に首尾よく使用されている。

20

【0003】

他方、最終的に分化して成熟した内皮細胞の虚血後の再還流が脈管化を増加させないことも知られており、従って、これらの細胞が分化能を欠失することは明らかである。

【非特許文献 1】Lasagni L. ら著、"An alternative spliced variant of CXCR3 mediates IP-10, Mige I-TAC induced-inhibition of endothelial cell growth and acts as functional receptor for PF-4"、*J. Exp. Med.*、2003 年、197 巻、p. 1537 - 1549

30

【非特許文献 2】Scheffold A. ら著、"High sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells"、*Nat. Med.*、2000 年、6 巻、p. 107 - 110

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

EPCs が CD133⁺ 細胞、CD34⁺CD14⁺ 細胞、及び CD14⁺CD34⁻ 細胞から得られることは、後者が幹細胞能を真に与えるかどうか未だ明確でないとしても、周知である。さらに、末梢血及び骨髄における内皮前駆体細胞の実際数は、未だ議論の対象である。

40

【0005】

虚血や病態、又は外傷性の障害で障害を受けた組織の再構築へのこれらの細胞への可能性のある重要性の点で、本技術分野において、深く検討することが明確に関心を集めている。

【0006】

また、NANOG と称される遺伝子について、未成熟の幹細胞の多分化能の再生及び持

50

続にキーとなる役割を演じることが言及されていることも周知である。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、組織の再構築療法に適用し得る幹細胞の新規の集団を使用することを可能にし、この細胞の同定及び回収を可能とする。さらに、本発明は、幹細胞能を付与された循環する細胞の百分率（及び絶対数）を評価する診断キット、及び治療目的でのこの細胞の精製用キットを実現可能とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

事実、NANOGがヒトの幹細胞を同定するための有用なマーカーであることを驚くべきことに発見した。この理由は、臍帯若しくは末梢血、又はCD34⁺細胞から得たCD133⁺細胞により発現されているためである。これらは、不便なことに、幹細胞能を付与されたヒトの細胞である。逆に、NANOGは、内皮細胞、上皮細胞及び平滑筋細胞、の初代培養、白血球、及びその他の終局的に分化した細胞種において、発現されていない（図1）。

10

【0009】

さらに、NANOGがEPCsを得るために培養された単核の循環細胞（mononucleated circulating cells; MNC）において高いレベルで発現されていることも発見した一方、この遺伝子の発現は、細胞が終局的に分化した細胞及び成熟した内皮細胞の発現型を獲得した場合、消失することも見出し、そのマーカーは、フォン・ヴィレブランド因子、KDR、及びTie-2である（図2）。EPCsは、リアルタイムRT-PCRによる定量分析で示すように、高いレベルで、NANOG、CD14⁺、CD34⁺及びCD105⁺を発現する（図3）。

20

【0010】

細胞蛍光を用いた表面分析により、これらの細胞は、CD14⁺、CD105⁺、CD11c⁺、CD31⁺、CD86⁺、HLA-DR⁺であり、本発明の細胞の表面上でのCD34⁺は、通常の細胞蛍光技術では、検出されなかった（表1）。

【0011】

【表1】

表面マーカー	MNCs	EPCs
CD1a	0.05±0.05	2.3±0.7
CD1c	1.75±0.2	0.5±0.1
CD3	58.1±0.1	7.9±0.9
CD11c	32.9±0.4	86.0±1.9
CD14	18.7±1.5	84.9±2.0
CD16	17.4±1.3	81.8±2.8
CD19	6.8±1.0	2.7±0.6
CD31	60.5±0.8	84.0±4.8
CD34	0.15±0.05	0.7±0.2
CD45	95.4±0.2	98.2±0.4
CD80	0.7±0.2	3.1±0.1
CD86	19.2±1.0	74.3±6.6
CD105	8.2±1.2	83.1±1.8
CD133	0.2±0.05	0.6±0.3
HLA-DR	38.3±0.2	86.5±3.2

30

40

【0012】

CD34が細胞表面に発現しているかどうかを発見するのに、対応するmRNAのレベ

50

ルが高いことを示唆することにより、より感受性の高い方法が適用されている。特に、抗体 (A b) を結合した磁性を有する蛍光リポソーム (m a g n e t o f l u o r e s c e n t l i p o s o m e s ; A b - C M F L) を使用した細胞蛍光技術がこの目的で使用されている。蛍光信号を約 100 ~ 1000 倍に増加させ得るこの技術により示されるのは、ほとんど全ての培養細胞が CD 14⁺ CD 34⁺ であることである (図 4)。

【0013】

上述したように、本発明の細胞集団は、その表面上に CD 14 及び CD 34 を同時に発現する細胞からなり、末梢血において、残存する単核細胞からこの集団を単離することが可能である。上述したように、循環血に加えて、本発明による細胞の単離は、臍帯血、骨髓、胎盤又はヒトの種々の組織から同時に行い得る。

10

【0014】

培養した CD 14⁺ CD 34⁺ E P C s の集団が末梢血に前もって存在する集団の選択に由来するかどうかを検証するため、密度勾配 (密度 = 1.077 g / L) 中での分離により、血液に存在する他の細胞要素から単核の細胞を単離した。CD 14⁺ 細胞は、磁性を有するカラムを含む正の分離法 (p o s i t i v e s e p a r a t i o n m e t h o d) により、末梢血の単核細胞の集団から精製された。一度細胞の数を同定すると、これらを、超常磁性のマイクロスフェアに結合された抗 CD 14 抗体を含有する緩衝液中でインキュベートし、磁場中のカラムに適用した。カラムを磁場から除いて溶出することにより、この CD 14⁺ 細胞分画を回収した。

【0015】

その後、精製された CD 14⁺ 細胞分画 (95% 以上同質) を、以下の抗体でインキュベートした：つまり、蛍光色素を結合した抗 CD 34 抗体、ジゴキシゲニンを結合した抗蛍光色素抗体、ビオチンを結合した抗ジゴキシゲニン抗体、及び最終的に、前もって抗ビオチン抗体を結合した蛍光を有するリポソーム (A b - C M F L) でインキュベートした。

20

【0016】

この処置の後、分配機能付き細胞蛍光計を用いて、これらの細胞を分析し、CD 14⁺ CD 34⁺ の細胞集団を単離した (純度は、98% 以上)。A b - C M F L 技術を用い、CD 34⁺ をも発現する CD 14⁺ 細胞の百分率を、24 ~ 40 歳の 10 人の健常人について、測定した。CD 14⁺ CD 34⁺ 細胞の百分率は、全ての白血球の 1.2 ~ 7.5 % であった。

30

【0017】

循環する CD 14⁺ CD 34⁺ 細胞が E P C s の初期の源であることを確認するため、単核の集団から CD 14⁺ 細胞を精製し、A b - C M F L 技術を用いて、CD 34⁺ 細胞と CD 34⁻ 細胞とに分割した。残存する CD 14⁻ CD 34⁻ 細胞の集団を、さらなるコントロールとして、評価した。その後、上記の手段により単離した上記の 3 つの集団を、定量 R T - P C R により、N A N O G の発現について、検討した。N A N O G の発現は、分割していない CD 14⁺ 細胞と比較して、CD 14⁺ CD 34⁺ 細胞において、有意に高いものとなり、CD 14⁺ CD 34⁻ 細胞において、有意に低いものとなった (図 5 (B))。

40

【0018】

CD 14⁺ CD 34⁺、CD 14⁺ CD 34⁻ 及び CD 14⁻ CD 34⁻ の集団を、上記の条件下で、V E G F 存在下で培養し、12 日目に、K D R や v W F などの典型的な内皮細胞マーカーの発現について、検討した。その結果、両方の集団において、0 日目においては、K D R 及び v W F の m R N A の発現は、全くないか極めて低いものであった。しかしながら、これらのマーカーの発現は、CD 14⁺ CD 34⁺ の集団において、漸次増加し、12 日目に最大となった一方、CD 14⁺ CD 34⁻ の集団及び CD 14⁻ CD 34⁻ の集団での全ての培養期間において、実質的に変化しないままであった。

【0019】

K D R 及び T i e - 2 の表面発現に関するフローサイトメーターでの検討により確認し

50

たのは、 $CD14^+CD34^+$ の集団の全ての細胞において、基本的にKDR及びTie-2の両方を発現していた一方で、 $CD14^+CD34^-$ の集団及び $CD14^-CD34^-$ の集団に由来する細胞では、これらのマーカーは、実質的に発現していないことであった(図6)。

【0020】

NANOGを発現するEPCs細胞は、 $CD14^+CD34^+$ が発現した。これらの細胞は、末梢血に前もって存在するNANOGを発現する循環する $CD14^+CD34^+$ 細胞の培養から選択したものに由来する。

【0021】

従って、NANOGの発現を特徴とする $CD14^+CD34^+$ の集団は、EPCsの主要な源であることは、明らかである。

10

【0022】

従って、血液からの回収、及びNANOGを発現する $CD14^+CD34^+$ 細胞の使用は、血管の障害の処置に重要であり得る。さらに、NANOGの発現を検討することは、幹細胞能を有する成人の細胞を同定する有用な方法に相当するかもしれない。多能性の幹細胞の特徴であるNANOGの発現で示唆されるのは、この幹細胞の集団が、臓器又は組織の障害を特徴とするその他の種類の病態にも治療上有用であるかもしれないことである。

【0023】

従って、本発明は、虚血、神経変性疾患、及び脳血管性疾患を処置するための細胞療法、及び臓器(心臓、腎臓、肺、腎臓、若しくは膵臓の障害、泌尿器、視覚、聴覚、嗅覚、皮膚及び/又は粘膜、骨、及び/又は軟骨性臓器及び組織)の障害の治療、並びに血液病及び免疫不全疾患の処置に有用であり得る医薬組成物にも関する。

20

【0024】

さらに、血液に存在する細胞の数を同定する能力は、患者において十分な細胞数が存在するか否かを基礎として、上述の病態の処置用の細胞治療が適合しているかどうかの妥当性を評価する興味ある診断方法に相当する。

【実施例】

【0025】

(実験部)

$CD14^+$ 細胞、又はHMVEC細胞(8×10^6 細胞/mL、細胞密度 2.5×10^6 細胞/cm²)を、ヒトフィブロネクチンをコートした培養ディッシュ上に播種し、EGM Single Quotes、VEGF($100\text{nm}/\text{mL}$)及び20%FCSを添加した基礎内皮用培地で保持した。

30

【0026】

この細胞から全RNAを抽出し、染色体DNAの混入物を除去するため、DNase Iで処理した。非特許文献1に記載の通り、Taq-Man RT-PCRを行った。

【0027】

Tie-2、KDRの同定、及びCD1aの定量は、その後、市販のキット(Applied Biosystems、Warrington、英国)を用いたTaq-Man アッセイにより、行った。

40

【0028】

HMVECから調製したmRNAの希釈系を用いて、標準曲線を描いた。異なるヒトの組織及び培養中でのNANOGのmRNAの発現の特異的且つ定量的同定に関し、12p13.31にマップされた、マウスのNANOGの遺伝子のヒトの相同分子種を検出し得る異なるオリゴヌクレオチド対を調製した。

【0029】

特異性を確保するため、NCBIにおいて、全ヒトゲノムからtBLASTn検索した上記のオリゴヌクレオチドで増幅される全配列を用いた。

【0030】

50

特異性を基礎に選択したオリゴヌクレオチド対を、VICで標識した蛍光プローブとともに、定量Taq-man RT-PCRアッセイに使用した。このオリゴヌクレオチドの特異性及び最適な増幅効率は、NANOGのcDNA配列を有するプラスミドで検討した。

【0031】

プライマー及びプローブは、以下の通りである。

【0032】

NANOG:VICプローブ、5'-TCCATCCTTGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT-3'

フォワード:5'-GATTTGTGGGCCTGAAGAAAAC-3'

リバース:5'-AGGAGAGACAGTCTCCGTGTGAG-3'

10

【0033】

同量のプラスミドDNAを用いた希釈系から得た標準曲線と、実験データとを比較して、mRNAのレベルを定量した。

【0034】

細胞表面の分子のフローサイトメトリー分析は、上述の文献に述べた通り行い、その後、Ab-CMFLを行った(非特許文献2参照)。

【0035】

この方法により、従来の方法と比較して、蛍光シグナルの強度を100~1000倍増加させることが可能となる。

20

【0036】

L-リジンでコートした基質上で、acLDLで二重標識したプローブを1時間存在下で、37、30分、接着細胞を培養させた;固定した後、FITCで標識したUlex EuropeusのアグルチニンIの存在下でサンプルをインキュベートした。サンプルを退色防止媒体中に載置し、従来共焦点顕微鏡で検討した。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】幹細胞能を付与されたヒトの細胞、及びその他の組織に由来する細胞における、異なるNANOGの発現を示す。

【図2】培養EPCsにおけるNANOGの発現を示す。

30

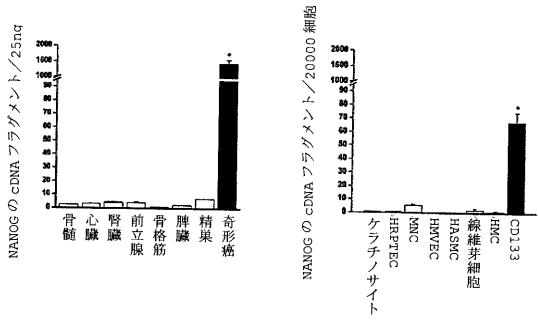
【図3】培養EPCsにおける、mRNAレベルでの種々のマーカーの発現を示す。

【図4】培養EPCsがCD14⁺CD34⁺細胞であることを示す。

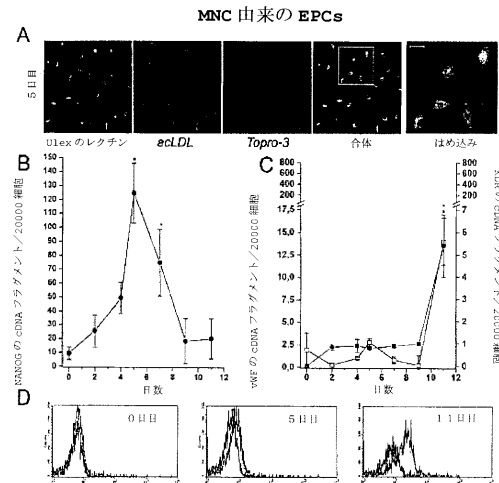
【図5】(A)は、循環するCD14⁺細胞からの、CD14⁺CD34⁻細胞、及びCD14⁺CD34⁺細胞の分離を示し、(B)は、CD14⁺CD34⁺、CD14⁺CD34⁻、及びCD14⁺の3つの異なる集団におけるNANOGの発現を示す。

【図6】CD14⁺CD34⁺、CD14⁺CD34⁻及びCD14⁻CD34⁻細胞の、内皮細胞への異なる分化能、及び内皮に特異的なマーカーの異なる発現能を示す。

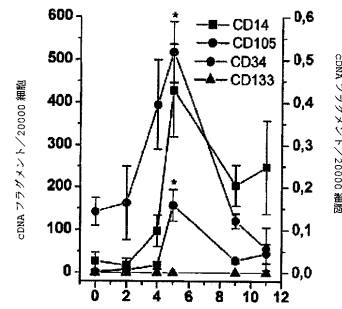
【 図 1 】



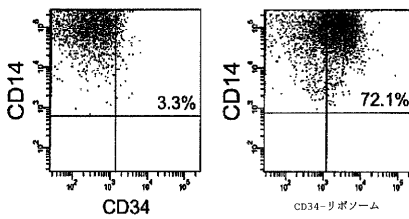
【 図 2 】



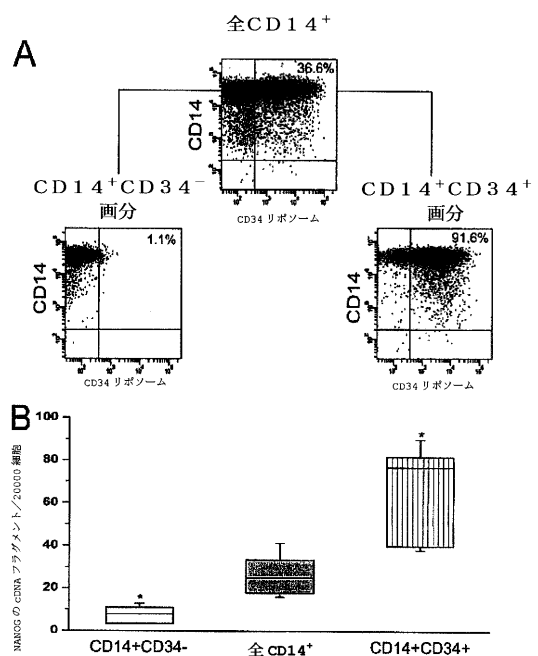
【 図 3 】



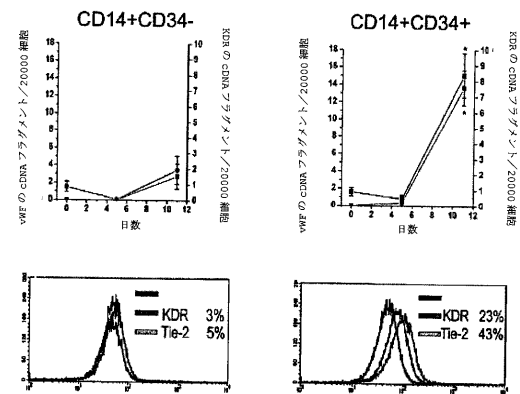
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【配列表】

2008524985000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成18年9月14日(2006.9.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

幹細胞能を付与された成人細胞であって、細胞表面にCD14⁺とCD34⁺とが同時に存在するとともに、幹細胞のマーカであるNANOGが存在することを特徴とする成人細胞。

【請求項2】

請求項1に記載の細胞の同定方法であって、転写因子であるNANOGのRNA及び/又はタンパク質の発現を測定することを特徴とする方法。

【請求項3】

請求項1に記載の幹細胞集団を末梢血から回収する方法であって、末梢血中に残存する単核細胞から前記の集団を単離するのに、細胞表面上にCD14及びCD34のマーカが同時に存在することを用いることを特徴とする方法。

【請求項4】

循環血、末梢血、臍帯血、骨髄、胎盤、又はヒトの各組織から前記の回収を行うことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

請求項3及び4に記載の方法であって：

血液の他の細胞成分からの単核細胞の単離が、密度勾配分離法(密度 = 1.077 g/L)により達成され、

末梢血の単核細胞の集団に存在するCD14⁺細胞の精製が、免疫磁気分離法により、達成され、

CD14⁺CD34⁺細胞の回収が、CD14⁺の集団と、蛍光色素を結合した抗CD34抗体と、ジゴキシゲニンを結合した抗蛍光色素抗体と、ビオチンをコンジュゲートした抗ジゴキシゲニン抗体と、蛍光色素リポソームとを最終的にインキュベートした後、前記のCD14⁺CD34⁺集団を単離するように分配型細胞蛍光計で精製することにより、得られる、

ことを特徴とする方法。

【請求項6】

請求項1に記載の細胞の使用であって、

虚血、神経変性疾患若しくは脳血管疾患の処置、及び心臓、腎臓、肺、肝臓、若しくは膵臓障害の処置、並びに泌尿器、視覚、聴覚、嗅覚、皮膚、及び粘膜、骨、及び軟骨性臓器及び組織の再構築、並びに血液病及び免疫不全疾患の処置に有用な医薬組成物(細胞治療)の調製への使用。

【請求項7】

請求項1に記載の集団のマーカ用の、特異的試薬のシリーズを有するキットであって、請求項5に記載の幹細胞集団の同定及び/又は回収を可能とすることを特徴とするキット。

【請求項8】

前記試薬は、抗体をコンジュゲートした磁性を有する蛍光リポソーム、又はその他の二次反応物質と関連づけられたCD14及びCD34のマーカに特異的な抗体又はプローブであることを特徴とする請求項7に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2005/055950
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/569 A61K35/00 C12N5/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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 practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HAMDI H K ET AL: "A genetic variant of ACE increases cell survival: a new paradigm for biology and disease" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 318, no. 1, 21 May 2004 (2004-05-21), pages 187-191, XP004504088 ISSN: 0006-291X left-hand column, line 3 - line 24; figure 4 abstract ----- -/--	1,7,9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2006		Date of mailing of the international search report 23/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rosin, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2005/055950

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	REHMAN J ET AL: "PERIPHERAL BLOOD ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS ARE DERIVED FROM MONOCYTE/MACROPHAGES AND SECRETE ANGIOGENIC GROWTH FACTORS" CIRCULATION, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, US, vol. 107, no. 8, 24 February 2003 (2003-02-24), pages 1164-1169, XP008022340 ISSN: 0009-7322	2-4, 6-9
X	abstract page 1166, left-hand column, paragraph 2; figure 3	5
X	page 1165, left-hand column, paragraph 1	5
A	ANNUNZIATO FRANCESCO ET AL: "Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 5 AUG 2002, vol. 196, no. 3, 5 August 2002 (2002-08-05), pages 379-387, XP002370078 ISSN: 0022-1007 page 380, right-hand column, paragraph 4	5
A	SCHEFFOLD A ET AL: "High-sensitive immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 107-110, XP002176627 ISSN: 1078-8956 figure 1	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/055950**Box 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.: 10, 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
2. Claims Nos.: 12
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2005/055950

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 10,11

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 12

Claim 12 is neither disclosed as required by Article 5 PCT nor supported by the description as required by Article 6 PCT. No disclosure is available on the number of CD14+/CD34+/nanog+ cells circulating in patients, because according to the description p4 lines 17-19 only healthy subjects were used to measure the percentage of CD14+/CD34+ cells. Furthermore no information is available on how the number of these cells could possibly have an influence on a pathologic condition nor is there any disclosure available that following the determination of the number of said cell population an evaluation of the appropriateness of adoption of a cell therapy could take place. The disclosure that can be found in the present application is a simple method that is more sensitive to detect surface marker expression of CD34 in CD14 positive cells. Accordingly, no search could be carried out for claim 12.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P	13/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/00	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N	33/544 (2006.01)	G 0 1 N 33/544	A
G 0 1 N	33/553 (2006.01)	G 0 1 N 33/553	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(72)発明者 マッジ・エンリコ

イタリア国、5 0 1 3 9 フィレンツェ、ヴィア ピエランドレア マッティオリ 5 1 番

(72)発明者 ロマグナニ・セルジオ

イタリア国、5 0 1 3 9 フィレンツェ、ヴィア バンティ 2 0 / ジー

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA15 BA63 BA80 CA09 CA12 DA02 HA12 HA15
 4B063 QA18 QQ08 QQ53 QQ79 QR32 QR48 QR55 QR66 QS32 QS33
 QX02
 4B065 AA90 AC12 BA25 CA24 CA44 CA46
 4C087 AA01 AA02 BB34 DA03 DA14 MA66 NA14 ZA01 ZA33 ZA34
 ZA36 ZA39 ZA59 ZA75 ZA81 ZA89

专利名称(译)	干细胞，纯化方法，鉴定方法和用途		
公开(公告)号	JP2008524985A	公开(公告)日	2008-07-17
申请号	JP2007540656	申请日	2005-11-14
申请(专利权)人(译)	Adzuienda Osupedariero - 盐湖乳木果塔利亚学院		
[标]发明人	ロマグナニパオラ アッヌンツィアトフランセスコ マッジエンリコ ロマグナニセルジオ		
发明人	ロマグナニパオラ アッヌンツィアト・フランセスコ マッジ・エンリコ ロマグナニセルジオ		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 C12N5/06 A61K35/14 A61P9/10 A61P9/00 A61P25/00 A61P13/12 A61P11/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P13/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P11/02 A61P37/00 G01N33/53 G01N33/544 G01N33/553 C12N15/09 A61K35/28		
CPC分类号	A61K35/28 A61P1/16 A61P1/18 A61P11/00 A61P11/02 A61P13/00 A61P13/12 A61P25/00 A61P27/02 A61P27/16 G01N33/56966 G01N2333/4706 G01N2333/70596		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA C12Q1/68.A C12N5/00.E A61K35/14.Z A61P9/10 A61P9/00 A61P25/00 A61P13/12 A61P11/00 A61P1/16 A61P1/18 A61P13/00 A61P27/02 A61P27/16 A61P11/02 A61P37/00 G01N33/53.Y G01N33/544.A G01N33/553 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA15 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QS32 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA90 4B065/AC12 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB34 4C087/DA03 4C087/DA14 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZA33 4C087/ZA34 4C087/ZA36 4C087/ZA39 4C087/ZA59 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZA89		
优先权	102004901260284 2004-11-15 IT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了新的循环CD14 +细胞群，具有CD34的低密度表面表达并具有茎容量，其纯化和鉴定方法及其治疗用途。

