

(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2019-517538

(P2019-517538A)

(43) 公表日 令和1年6月24日 (2019.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 7 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 1
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-563796 (P2018-563796)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月7日 (2017.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月5日 (2019.2.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/036452
 (87) 国際公開番号 W02017/214342
 (87) 国際公開日 平成29年12月14日 (2017.12.14)
 (31) 優先権主張番号 62/347, 075
 (32) 優先日 平成28年6月7日 (2016.6.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/442, 219
 (32) 優先日 平成29年1月4日 (2017.1.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 518199573
 バイオタイム、インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 94501 カリフォル
 ニア州、アラメダ、スイート 102、ア
 トランティック アベニュー 1010
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 ウェスト、マイケル ディー.
 アメリカ合衆国 94941 カリフォル
 ニア州、ミル バレー、ウェルスレイ ア
 ベニュー 438
 (72) 発明者 ラロック、ダナ
 アメリカ合衆国 94502 カリフォル
 ニア州、アラメダ、ボードウェル コート
 9

最終頁に続く

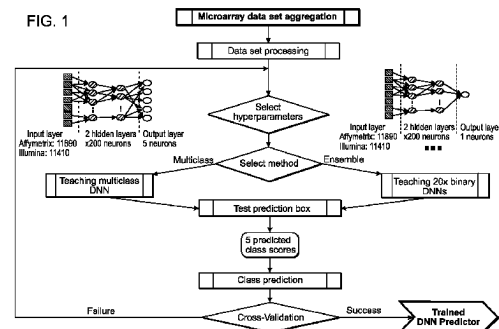
(54) 【発明の名称】 哺乳動物種における胚-胎仔移行を検出およびモジュレートするための改良された方法

(57) 【要約】

本発明の態様には、哺乳動物の胚から胎仔への発生の移行を調節する分子のモジュレーションに関連するアルゴリズム、方法および組成物が含まれる。他の方法では痕跡を残さずに再生することができない、胎仔および成体の組織における再生能力を増大させるためのかかるモジュレーションの利用のための方法および組成物もまた提示される。

【選択図】 図 1

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の1つ以上の細胞を1つ以上の誘導組織再生(iTR)因子と接触させることにより、該対象において損傷組織または加齢組織を再生させる方法。

【請求項 2】

前記の1つ以上のiTR因子が核酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸がRNAを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記の1つ以上のiTR因子が抗ミュラー管ホルモン(AMH)を含む、請求項 1 に記載の方法 10

【請求項 5】

前記対象の1つ以上の細胞を、0.05 mM～5 mMの濃度の前記抗ミュラー管ホルモン(AMH)と接触させる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記の1つ以上のiTR因子がGFER遺伝子によりコードされるタンパク質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象の1つ以上の細胞を、2 ng/mL～200 ng/mLの濃度の前記GFER遺伝子によりコードされるタンパク質と接触させる、請求項 6 に記載の方法。 20

【請求項 8】

前記の1つ以上のiTR因子がバルプロ酸を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象の1つ以上の細胞を、0.05 mM～5 mMの濃度のバルプロ酸と接触させる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記の1つ以上のiTR因子をヒドロゲルと組み合わせる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記iTR因子がGFERタンパク質レベルを増加させ、かつCOX7A1タンパク質レベルを低下させる、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 12】

前記iTR因子がLIN28Aの発現を増加させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記対象の1つ以上の細胞においてテロメラーゼの発現を増加させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記対象の1つ以上の細胞へのTERT遺伝子の投与がテロメラーゼの発現を増加させる、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記iTR因子がLIN28Aの発現を増加させ、かつテロメラーゼの発現を増加させる、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 16】

前記対象がヒトである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

対象の1つ以上の細胞において胚パターンの遺伝子発現を誘導することにより、該対象において損傷組織または加齢組織を修復する方法。

【請求項 18】

対象において損傷組織または加齢組織を再生させるためのキットであって、AMH、GFERタンパク質およびバルプロ酸iTF因子(iTR因子)のうちの1つ以上を含む、該キット。

【請求項 19】

前記iTR因子をヒドロゲルと組み合わせる、請求項18に記載のキット。

【請求項20】

対象の1つ以上の細胞を、多能性を誘導することができる薬剤と接触させることにより、該対象において組織を再生させる方法、ただし多能性それ自体は誘導されない、該方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全内容が本明細書中に組み込まれるものとする、2016年6月7 10
日出願の米国仮特許出願第62/347,075号の優先権およびその利益を主張するものである。

【0002】

本開示は、哺乳動物種における胚-胎仔移行を検出およびモジュレートするための改良された方法に関する。

【背景技術】

【0003】

幹細胞技術、例えばヒト多能性幹(hPS)細胞のin vitroでの単離および増殖における進 20
歩は、医学研究の重要な新規領域を構成している。hPS細胞は、未分化状態で増殖し、その後続いて複合組織を含むヒト体内のあらゆる全ての細胞型に分化するように誘導される、
実証された能力を有する。これにより、例えば、細胞の機能障害に起因する多くの疾患は
様々な分化型に由来するヒト胚性幹細胞の投与による治療に適している場合があること(T
homsonら、Science 282:1145-1147 (1998))が予想される。

【0004】

hPS細胞の所望の細胞型への分化に関しては、ヒト胚性前駆細胞の株をクローンとして
単離する可能性は、瘢痕を残さない方法での皮膚などの組織の再生に有用な出生前パター
ンの遺伝子発現を示す新規の高度に精製された細胞系譜を増やすための手段を提供する。
かかる細胞型は、研究における、および細胞ベースの治療法の創出のための、重要な用途
を有する(各々が参照により本明細書中に組み込まれる、2006年4月11日出願されかつ「
Novel Uses of Cells With Prenatal Patterns of Gene Expression」と題したPCT出願第 30
PCT/US2006/013519号、2006年11月21日出願されかつ「Methods to Accelerate the I
solation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Th
ereby」と題した米国特許出願第11/604,047号、および2009年7月16日出願されかつ「M
ethods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem C
ells and Cells Obtained Thereby」と題した米国特許出願第12/504,630号を参照されたい)。

【0005】

より最近になって、多能性幹細胞および誘導された胚様体の、3次元オルガノイドへのi
n vitro自己集合の能力が、移植用の組織の取得(Singhら、Stem Cells Dev. 2015. 24(23
) : 2778-95)ならびにヒト胚発生モデル化の両方のための潜在的経路として関心を集め 40
ている。胚細胞とは対照的に、胎仔および成体由来の細胞は、in vitroでの器官形成とin
vivoでの付加再生の能力の低下が示されることが多い。付加再生は、「付加再生」と称
されることもあり、比較的未分化な間充織の芽体が傷害の部位で増殖し、その後この細胞
が分化することで元の組織の組織構造を回復させる組織再生の一種を指す。付加再生能力
を喪失する発生上のタイミングを正確に決定することはできず、また恐らくは組織型によ
って異なるが、それでもやはり、胚-胎仔移行(EFT)、またはヒト発生の8週(カーネギー発
生段階23; O' Rahilly, R., F. Muller (1987) Developmental Stages in Human Embryos
, Including a Revision of Streeter's 'Horizons' and a Survey of the Carnegie
Collection. Washington, Carnegie Institution of Washington)は、有胎盤哺乳類にお
ける皮膚再生の喪失に時間的に対応していると考えられる(Walmsley, G.G.ら 2015. Scar 50

less Wound Healing: Chasing the Holy Grail Plast Reconstr Surg. 135(3):907-17)。
 種間の相関関係は、胚または幼生の状態における再生能力の増大を示し(Morgan, T.H. (1901). Regeneration (New York: The MacMillan Companyに概説されている)、またSanchez Alvarado, A., およびTsonis, P.A. (2006). Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models(Nat. Rev. Genet. 7, 873-884)は、組織再生が、
 癬痕化とは対照的に、胎仔または成体の表現型ではなく胚の表現型の存在を反映することを示唆している。一部の種の場合、発生上のタイミングにおける変化(異時性)は、幼生発生における発生停止(異時性)およびメキシコサラマンダー・アホロートル(A. mexicanum)で観察される四肢再生(Voss, S.R.ら、Thyroid hormone responsive QTL and the evolution of paedomorphic salamanders. Heredity (2012) 109, 293-298)の場合のような著
 しい再生能力と関連がある。対照的に、アフリカトゲマウス(カイロトゲマウス(Acomys cahirinus))などの一部の動物は、明らかな異時性の非存在下で皮膚再生の著しい能力を示し、これは恐らく、特徴付けられていない分子の変更を反映している(Gawriluk, T.R., 2016. Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. Nature Commun. 7:11164)。

【0006】

これらの観察結果にもかかわらず、付加再生において特定の分子の役割を試験するためのEFTのマーカーは限られている。本発明者らは、哺乳動物種におけるEFTのマーカーに関連する組成物および方法、ならびに組織再生をモジュレートする際のそれらの使用について以前に開示した(例えば2013年6月5日に出願された米国仮特許出願第61/831,421号、2014年6月3日に出願されたPCT特許出願PCT/US2014/040601および2015年12月7日に出願された米国特許出願第14/896,664号(これらの文献の開示内容は、参照によりその全てが本明細書中に組み込まれるものとする)を参照されたい)。それでもなお、EFTをモジュレートするためのさらなる分子調節因子および方法が、再生医療および癌における研究および治療のために必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】PCT出願第PCT/US2006/013519号

【特許文献2】米国特許出願第11/604,047号

【特許文献3】米国特許出願第12/504,630号

【特許文献4】米国仮特許出願第61/831,421号

【特許文献5】PCT特許出願PCT/US2014/040601

【特許文献6】米国特許出願第14/896,664号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Thomsonら、Science 282:1145-1147 (1998)

【非特許文献2】Singhら、Stem Cells Dev. 2015. 24(23): 2778-95

【非特許文献3】O' Rahilly, R., F. Muller (1987) Developmental Stages in Human Embryos, Including a Revision of Streeter's 'Horizons' and a Survey of the Carnegie Collection. Washington, Carnegie Institution of Washington

【非特許文献4】Walmsley, G.G.ら 2015. Scarless Wound Healing: Chasing the Holy Grail Plast Reconstr Surg. 135(3):907-17

【非特許文献5】Morgan, T.H. (1901). Regeneration (New York: The MacMillan Company

【非特許文献6】Sanchez Alvarado, A., およびTsonis, P.A. (2006). Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models(Nat. Rev. Genet. 7, 873-884

【非特許文献7】Voss, S.R.ら、Thyroid hormone responsive QTL and the evolution of paedomorphic salamanders. Heredity (2012) 109, 293-298

【非特許文献 8】Gawriluk, T.R., 2016. Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. Nature Commun. 7:11164

【発明の概要】

【0009】

異時性の調節因子の初期候補物質は線虫(*C. elegans*)で同定された。これらには *lin-28* / *let-7* が含まれていた(Ambros, V. および Horvitz, H. R. (1984). Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science 226, 409-416)。より最近になって、マウスにおけるパラログ *Lin28a* の遺伝子組換え発現は、創傷作成後の皮膚再生および切断指再生を増大させること、ならびに酸化的リン酸化のマーカーを増加させることが報告された(Shyh-Chang, N. ら 2013. *Lin28 Enhances Tissue Repair by Reprogramming Cellular Metabolism*. Cell 155, 778-792)。しかし、該マウスにおける再生能力は、カイロトゲマウスで観察される著しい付加再生に匹敵するものではない。*lin-28* / *let-7* 系は、多数の癌細胞型で活性化されることも観察されている(Jiang, S. および Baltimore, D. 2016. RNA-binding protein *Lin28* in cancer and immunity, Cancer Lett. 375(1):108-13)。癌における *LIN28* の異常発現は、恐らくは、EFT 時の再生能力の抑制という自然選択の理由が、大抵の脊椎動物において、この形質の選択は、傷害後の生存が制限される可能性があるものの、腫瘍抑制機構として機能しうる点にあることを示唆している。多くの癌がワールブルク効果などの胚の復帰突然変異を示すという周知の観察結果もまたこの仮説と一致する。かかる分子機構の完全な同定は、組織再生の基礎研究を促進するだけでなく、加齢変性疾患を含むがこれらに限定されない外傷または変性疾患に罹患した該組織の修復を促進するために「誘導組織再生」(iTR)を引き起こし、胎仔または成体の表現型のもののような比較的より成熟した表現型を示す細胞の作製のため、ならびに診断および治療を目的として前記の胚の表現型に戻った悪性または前悪性の細胞を同定および標的化しかつそれらの細胞をより成熟した胎仔または成体の表現型へと成熟させてそれらの増殖を停止させる、および／またはアポトーシスをモジュレートすることにより該悪性細胞を抗癌剤で処置する時期を管理するために、胚(すなわち、胎仔前または出生前の)細胞に「誘導組織成熟」(iTM)を引き起こすことができる薬剤のスクリーニングを可能にするための、*in vivo* で細胞および組織において該分子機構をモジュレートするための本発明の新規方法を促進する。かかる診断は、癌腫、腺癌、または肉腫が胚の表現型(胚-腫瘍(*embryo-onco*)表現型)に戻っているその程度の判定と、その後患者の癌をその表現型に適した薬剤、すなわちその特定の表現型の癌細胞の複製またはアポトーシスを阻害するのに有効である薬剤で処置することを含む。さらに、本発明は「誘導癌細胞成熟」(iCM)を引き起こすことができる方法および組成物を提供し、かかる薬剤は単一の薬剤としても、一般的に使用される化学療法剤などの他の治療薬と組み合わせとしても、非常に広範囲の悪性腫瘍の治療に役立つ可能性を有する。

【0010】

概要

本開示は、細胞が胚または胎仔または成体の表現型を示すかどうか、かかる胎仔または成体の細胞の相対成熟度、胚-胎仔移行(EFT)に関与する調節性非コードRNAおよびmRNA、組織再生の能力、ならびに癌を同定する際、完全には前記の瘢痕を残さない再生を生じ得ない細胞および組織においてiTRを引き起こすことを目標とした、哺乳動物細胞においてEFTを調節する分子経路をモジュレートすることができる薬剤をスクリーニングする際ならびに該薬剤を利用する際に有用な人工知能ソフトウェア(ディープラーニング)を作成するための有用な化合物、組成物、および方法を提供することにより、以前は胚または胎仔前パターンの遺伝子発現であった細胞から成体表現型を示す細胞を産生させるためにiTMを引き起こすことができる薬剤をスクリーニングおよび利用し、さらに癌を診断および処置するために胚の表現型に戻っている悪性細胞を検出および標的化し、さらにiCMを引き起こすことができる薬剤をスクリーニングする。

【0011】

本開示のある態様では、研究者が細胞および組織における遺伝子発現のパターンを胚または胎仔、または成体の供給源に属すると同定できるようにするディープラーニング（深層学習）のアルゴリズムを提供する。該アルゴリズムは、1)動物細胞から得たRNA発現データを照合するステップ、2)そのRNA発現プロファイルに基づいて、胚発生時系列のどこに該細胞が通常存在するかを同定するために人工知能アルゴリズムを訓練するステップ、および3)該RNAが由来する細胞を該時系列上に少なくとも90%の精度で割り当てるためにRNA発現プロファイルを試験するステップ、からなる動物細胞の発生状態の同定の方法を記述するものである。

【0012】

本開示の別の態様では、胚と胎仔または成体の供給源において示差的に発現される遺伝子の同定を可能にするディープラーニングのアルゴリズムを提供する。

【0013】

別の態様では、EFTの候補調節遺伝子が、マウスもしくはヒト供給源などの発生中の哺乳動物、または特定の細胞型の悪性対応物から得たRNAに対してスクリーニングされるかどうかを判定することにより該遺伝子がEFTを調節する分子経路において重要であると実証するための一連のスクリーニング基準を記載する。

【0014】

別の態様では、本開示は、霊長類種、より具体的には、ヒト種を含む哺乳動物種においてEFTを調節する遺伝子、RNAおよびタンパク質を同定する方法を提供し、ここで該遺伝子は、RNAシーケンシング技術、比較パスイメージ解析の遺伝子発現アレイベースの解析、およびディープニューラルネットワーク解析を利用して、発生の胎仔および成体段階と比較して発生の胚段階で示差的に発現されるmRNAおよび非コードRNAまたは該RNA中のスプライス変異体をコードする遺伝子の発現を比較することにより、同定される。より具体的には、該方法により、発生の出生前段階における、具体的には、胎仔および成体の細胞(EFTの後)と比較して発生の胚期(EFTより前)における多数の多様な体細胞型で示差的に発現されるmRNAおよび非コードRNAをコードする遺伝子を同定する。ヒト種の場合、胚から胎児(胎仔)への発生の移行は妊娠性発生の約8週で生じ、マウスでは該移行は約16日で生じ、またラット種では、約17.5日で生じる(www.php.med.unsw.edu.au/embryology/index)。

【0015】

本開示の別の態様では、哺乳動物の発生の胚期に特異的な遺伝子発現パターンを示す多能性幹細胞由来のクローン、オリゴクローン、プールされたクローン、またはプールされたオリゴクローン胚性前駆細胞株をコードRNAおよび非コードRNAの供給源として利用し、胎仔または成体由来の供給源から得た細胞および組織中のコードRNAおよび非コードRNAと比較することにより、mRNA、非コードRNAまたはスプライス変異体をコードする遺伝子、ならびに発生の胚期の細胞と比較した胎仔および成体の細胞におけるトランスクリプトームに基づくシグナル伝達経路変更を同定する。

【0016】

本開示の別の態様では、小分子薬物または他の薬剤で処理した細胞からの遺伝子発現データを解析することで、胎仔または成体由来の細胞においてiTRをもたらず胚パターンの遺伝子発現を誘導するのに有用な因子を同定するか、あるいは胚パターンの遺伝子発現を示す細胞の、成体パターンの発現を示す対応細胞への成熟を誘導する(iTMまたはiCM)。

【0017】

本開示の別の態様では、哺乳動物細胞は胎仔または成体由来の細胞であり、該細胞をin vitroでモジュレートすることによりEFTを変更し、得られた細胞をin vivoで組織に再導入して再生能力を増大させる。

【0018】

本開示の別の態様では、発生の胚期の多様な型の体細胞において示差的に発現される転写調節遺伝子を、TRに参与することができない成体細胞型などの、胚期後の発生の時期の多様な型の体細胞と比較することで、スプライス変異体における変更のその変更された発現が成体哺乳動物におけるin vivoでの組織再生能の抑制の原因となる遺伝子を同定する

10

20

30

40

50

。幾つかの実施形態では、その発現または抑制がiTRを生じうる遺伝子を同定する方法は、クローン、オリゴクローン、またはプールされたクローンもしくはプールされたオリゴクローンhPS細胞由来胚性前駆細胞株のトランスクリプトームを、胚性前駆体で一般に発現される遺伝子を同定するために多様な型の成体由来の細胞もしくは組織のトランスクリプトームと比較すること、または成体由来の細胞では発現されないかもしくは著しく低いレベルで発現される胚性前駆体のRNAスプライス変異体と比較すること、あるいは代替的に、成体由来の細胞で発現される遺伝子またはRNAを、クローン、オリゴクローン、またはプールされたクローンもしくはプールされたオリゴクローンhPS細胞由来胚性前駆細胞株では発現されないかまたは著しく低いレベルで発現されるスプライス変異体と比較することを含む。別の実施形態では、成体由来の細胞と比較して胚性前駆細胞でより高いレベルで発現されかつ発癌にも関与する候補iTR遺伝子、または成体由来の細胞と比較して胚性前駆細胞でより低いレベルで発現されかつ腫瘍抑制にも関与する遺伝子を候補iTR遺伝子として同定する。

10

【0019】

別の態様では、本開示は、iTR因子の投与のためのプロトコルを最適化する方法を提供し、ここで、該因子は他の条件では(つまり、iPS細胞を作成する際は)体細胞型に多能性を誘導することができる因子を含むものとし、該因子は、特定の細胞および組織型のために最適化された因子および/またはリプレッサーの組み合わせを同定するための、多様な細胞および組織型における遺伝子：OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、LIN28AおよびLIN28B、それらがコードするRNA、またはタンパク質の組み合わせを含む。

20

【0020】

別の態様では、本開示はiTR因子の投与の方法を提供し、ここで該因子は他の条件では(つまり、iPS細胞を作成する際は)体細胞型に多能性を誘導することができる因子を含むものとし、該因子は、in vitroで胎仔もしくは成体由来の細胞をその胚性対応物に戻すかまたはin vivoで病変組織において該組織中の細胞を多能性幹細胞に戻すことなく組織再生を誘導するための、遺伝子：OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、TER T、LIN28AおよびLIN28B、それらがコードするRNA、またはタンパク質の組み合わせを含む。

【0021】

別の態様では、本開示はiTRの化学的誘導因子の投与の方法を提供し、ここで該誘導因子は他の条件では(つまり、iPS細胞を作成する際は)体細胞型に多能性を誘導する効率を改善(改良)することができる誘導因子を含むものとし、該因子は、in vitroで胎仔もしくは成体由来の細胞をその胚性対応物に戻すため、またはin vivoで病変組織において該組織中の細胞を多能性幹細胞に戻すことなく組織再生を誘導するために投与される、グリコーゲンシンターゼ3(GSK3)のインヒビター、TGF- β シグナル伝達のインヒビター、HDACインヒビター、H3K4/9ヒストンデメチラーゼLSD1のインヒビター、Dot1Lのインヒビター、G9aのインヒビター、Ezh2のインヒビター、DNAメチルトランスフェラーゼのインヒビター、3'ホスホイノシチド依存性キナーゼ1のアクチベーター、解糖のプロモーター、RARアゴニスト、低酸素を模倣する作用物質、テロメラーゼのアクチベーター、またはMAPK/ERK経路のインヒビターの組み合わせを含む。

30

40

【0022】

別の態様では、本開示は、特定の細胞および組織型のために最適化された因子および/またはリプレッサーの組み合わせを同定するために、多様な細胞および組織型においてiTR遺伝子の組み合わせをスクリーニングする方法を提供する。

【0023】

別の態様では、本開示は、培養細胞においてiTR遺伝子の発現を改変することにより、他の方法では十分なTRを生じることができない組織に移植された場合にそれらがiTRに関与することができる状態にそれらに戻す方法を提供する。

【0024】

50

本開示の別の態様では、ヒト遺伝子TERTを含むがこれに限定されないテロメラーゼ触媒成分を、TRを誘導すべき標的細胞または組織において本開示のiTR遺伝子と組み合わせて一過性に発現させることにより、体細胞の増殖能を伸ばし、それによってTRを促進する。このテロメラーゼ活性とiTR遺伝子(例えば、LIN28A、LIN28B、またはPCDHA4、PCDHB10、PCDHB2、PCDHB9などの胚の状態と比較的高いレベルで発現されるクラスター型プロトカドヘリン遺伝子の α もしくは β クラスター)との同時発現は、短いテロメアを有し、ヒト種の場合がそうであるように、その生物の寿命の間に細胞の複製老化が起きる種において、特に有用である。本開示の別の態様では、ヒト遺伝子TERTを含むテロメラーゼ触媒成分を標的細胞または組織において(構成的に発現させるのではなく)一過性に発現させることにより、体細胞の増殖能を、該細胞を不死化させることなく伸ばす。

10

【0025】

本開示の別の態様では、ヒト遺伝子TERTを含むがこれに限定されないテロメラーゼ触媒成分を、TRを誘導すべき標的細胞または組織において本開示のiTRの化学的誘導因子と組み合わせて一過性に発現させることにより体細胞の増殖能を伸ばし、それによってTRを促進する。このテロメラーゼ活性とiTRの化学的誘導因子(例えば、グリコーゲンシンターゼ3(GSK3)のインヒビター、TGF- β シグナル伝達のインヒビター、HDACインヒビター、H3K4/9ヒストンデメチラーゼLSD1のインヒビター、Dot1Lのインヒビター、G9aのインヒビター、Ezh2のインヒビター、DNAメチルトランスフェラーゼのインヒビター、3'ホスホイノシチド依存性キナーゼ1のアクチベーター、解糖のプロモーター、RARアゴニスト、低酸素を模倣する作用物質、テロメラーゼのアクチベーター、またはMAPK/ERK経路のインヒビターの組み合わせ)との同時発現は、短いテロメアを有し、ヒト種の場合のようにその生物の寿命の間に細胞の複製老化が起きる種において特に有用である。本開示の別の態様では、ヒト遺伝子TERTを含むテロメラーゼ触媒成分を標的細胞または組織において(構成的に発現させるのではなく)一過性に発現させることにより、体細胞の増殖能を、該細胞を不死化させることなく伸ばす。

20

【0026】

別の態様では、本開示は、安定した再生能力を有する動物モデル、好ましくはマウスモデルを操作する手段を提供し、該マウスは一般的な実験用系統のマウスであり、それによって分子遺伝学研究および動物の前臨床試験を促進する。この安定して再生するマウスは、iTR RNA転写産物を発現するかまたはiTRを阻害する遺伝子、RNA、およびタンパク質の転写、安定性、もしくは翻訳を阻害するマウスを作製し、その著しく再生するマウスが所望の組織再生に関する胚パターンの遺伝子発現を十分な数有するように該マウスを互いに交配させる、および/または該マウス、もしくは該マウスの特定の組織をiTR遺伝子発現に全体的な変化を引き起こすことができる薬剤で処置することにより、作製される。

30

【0027】

ある実施形態では、加齢および加齢関連疾患の処置について記載する。

【0028】

異時性の誘導および体細胞発生の改変により、より大きな、またはより小さな動物を作成するか、または寿命を改変することができる。

【0029】

異時性、または発生の時系列の変更は、多数の種の場合に、得られる動物を著しく改変するために選択され、時には「ホープフル・モンスター」を生み出す。同様に、本開示のRNAレベルの変更もまた、発生タイミング、成体期の身体サイズ、ならびに寿命をモジュレートすることができる。

40

【0030】

iTR療法を利用して対処しうる加齢および加齢関連疾患の多数の態様が、本開示中に提示される。これらの加齢の兆候としては、加齢関連血管機能不全、例えば末梢血管、冠血管、および脳血管の疾患；筋骨格障害、例えば骨関節炎、椎間板変性、骨折、腱と靱帯の裂傷、および四肢再生；神経障害、例えば卒中および脊髄損傷；筋障害、例えば筋ジストロフィー、サルコペニア、心筋梗塞、および心不全；内分泌障害、例えばI型糖尿病、ア

50

ジソン病、甲状腺機能低下症、および下垂体機能不全；消化器障害、例えば膵外分泌機能不全；眼障害、例えば黄斑変性、網膜色素変性、および神経網膜変性障害；皮膚症状、例えば皮膚熱傷、裂傷、外科的切開、脱毛症、毛髪の灰色化、および皮膚老化；肺障害、例えば気腫および肺の間質性線維症；聴力障害、例えば聴力損失；ならびに血液障害、例えば再生不良性貧血および失敗した造血幹細胞移植が挙げられる。

【0031】

別の態様では、本開示は、*in vivo*で細胞におけるiTR遺伝子の発現を改変することにより、それらがiTRに関与できる状態にそれらを戻す方法を提供する。

【0032】

本開示の別の態様では、骨関節炎を含むがこれに限定されない変性疾患に罹患した組織においてiTRを引き起こす方法を提供し、ここで、その病変組織にiTRを生じさせる手段は、遺伝子発現ベクターまたはLIN28AもしくはLIN28BなどのLINファミリーのメンバーを含むがこれらに限定されない本明細書中に開示したiTR遺伝子の外因性発現をもたらすベクターを、ヒトTERTなどのテロメラーゼ触媒成分と共に利用するものとする。

【0033】

別の態様では、本開示は、以下(i)ならびに(ii)：(i)以下(a)～(c)：(a)精製された状態の、または他の分子との混合物としての、TR活性の候補モジュレーターまたは多数のモジュレーター；(b)TRを生じることができない体細胞、ここで、該細胞は胚パターンの遺伝子発現ではなく胎仔または成体パターンの遺伝子発現を示すものとする；(c)TRを生じることができない体細胞中または該体細胞の抽出物中に存在するレポーター構築物、ここで、胎仔および成体段階と比較して発生の胚期の体細胞において示差的に調節される遺伝子のプロモーターはレポーター遺伝子の発現を駆動するものとする、を含む組成物を提供すること；ならびに(ii)前記の候補モジュレーターまたは多数のモジュレーターが前記レポーター遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうかを判定すること、ここで、前記レポーター遺伝子の、前記候補モジュレーターの非存在下での該遺伝子の発現と比較して変更された発現は、その化合物がiTR活性をモジュレートすることを示すものとする、を含む、TR活性の候補大域(global)モジュレーターを同定する方法を提供する。

【0034】

幾つかの実施形態では、TRの候補モジュレーターを同定する方法は、TRのモジュレーターとして同定された候補化合物または多数の化合物を対象に投与することをさらに含む。

【0035】

幾つかの実施形態では、TRの候補大域モジュレーターを同定する方法は、TRのために候補化合物を胎仔または成体の供給源に由来する細胞に投与し、かつCOX7A1プロモーターにより駆動されるGFPから生成する蛍光などの容易に測定される読み出しの利用によりCOX7A1の発現を分析することをさらに含む。

【0036】

幾つかの実施形態では、TRの候補モジュレーターを同定する方法は、TRのために候補化合物を胎仔または成体の供給源に由来する細胞に投与し、かつCOX7A1遺伝子中のCpGアイランドのメチル化の程度のアッセイによりCOX7A1の発現を分析することをさらに含む。

【0037】

幾つかの実施形態では、化合物を同定する方法は、化合物を対象に投与することをさらに含む。幾つかの実施形態では、該対象は非ヒト動物、例えば、TRまたは創傷治癒のモデルとして機能する非ヒト動物である。幾つかの実施形態では、該対象はヒトである。

【0038】

別の態様では、本開示は、以下(a)および(b)：(a)iTRのモジュレーター；および(b)製薬上許容される担体、を含む医薬組成物を提供する。

【0039】

別の態様では、EFTを調節する遺伝子を、癌細胞が、該遺伝子の発現を胚の状態の発現から胎仔または成体の状態の発現に変更することによりiCMを引き起こす薬剤で処置されるように、変更する。

10

20

30

40

50

【0040】

別の態様では、EFTを調節する遺伝子を、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の使用により癌細胞が該遺伝子の発現という点で胚の状態の発現から胎仔または成体の状態の発現に変更されてiCMが生じるように、変更する。

【0041】

細胞生物学、細胞培養、分子生物学、微生物学、組換え核酸(例えば、DNA)技術、免疫学等のある特定の従来技術は、当業者の技能の範囲内にあり、本開示の態様において有用である場合がある。これらの技術のうちの幾つかの非限定的な説明は、以下の刊行物：Ausubel, F., ら、(編)、Current Protocols in Molecular Biology、Current Protocols in Immunology、Current Protocols in Protein Science、およびCurrent Protocols in Cell Biology、いずれもJohn Wiley & Sons, N.Y., editions as of 2008; Sambrook, Russell, およびSambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.sup.rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. およびLane, D., Antibodies--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Burns, R., Immunochemical Protocols (Methods in Molecular Biology) Humana Press; 第3版、2005, Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd およびC Dean, 編、Oxford University Press, 2000); Freshney, R. I., 「Culture of Animal cells, A Manual of Basic Technique」、第5版、John Wiley & Sons, Hoboken, N J, 2005)に見出される。本明細書中で言及した全ての特許、特許出願、ウェブサイト、データベース、科学論文、および他の刊行物は、参照によりその全内容が本明細書中に組み込まれるものとする。

【0042】

図面の簡単な説明

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を添付した本特許または特許出願公報の写しは、請求に応じて、かつ必要な手数料が支払われた場合に、米国特許商標庁により提供される。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、実験計画を示す図である。ラベル付きトランスクリプトームデータを使用することにより、1つの出力ニューロンを備えた20のディープニューラルネットワークのアンサンブル、および5つのニューロンを備えた多クラスディープニューラルネットワークを訓練し、各クラスにつき1つのニューロンをサンプルの「胚スコア」を予測するためのものとする。

【図2A】図2A～図2Dは、分類器の訓練および検証性能を示す図である。遺伝子(図2Aおよび図2B)ならびにパスウェイ(図2Cおよび図2D)レベルの入力データは、ラベル付き交差検証によりAffymetrix(左パネル)およびIllumina(右パネル)データから得られる。提示されているのは訓練、内部検証および外部検証のセットを元に取得したF1スコアである(採用した入れ子式交差検証プロトコルの詳細な説明については「方法」の章を参照されたい)。

【図2B】図2A～図2Dは、分類器の訓練および検証性能を示す図である。遺伝子(図2Aおよび図2B)ならびにパスウェイ(図2Cおよび図2D)レベルの入力データは、ラベル付き交差検証によりAffymetrix(左パネル)およびIllumina(右パネル)データから得られる。提示されているのは訓練、内部検証および外部検証のセットを元に取得したF1スコアである(採用した入れ子式交差検証プロトコルの詳細な説明については「方法」の章を参照されたい)。

【図2C】図2A～図2Dは、分類器の訓練および検証性能を示す図である。遺伝子(図2Aおよび図2B)ならびにパスウェイ(図2Cおよび図2D)レベルの入力データは、ラベル付き交差検証によりAffymetrix(左パネル)およびIllumina(右パネル)データから得られる。提示されているのは訓練、内部検証および外部検証のセットを元に取得したF1スコアである(採用した入れ子式交差検証プロトコルの詳細な説明については「方法」の章を参照されたい)

).

【図 2 D】図2A～図2Dは、分類器の訓練および検証性能を示す図である。遺伝子(図2Aおよび図2B)ならびにパスウェイ(図2Cおよび図2D)レベルの入力データは、ラベル付き交差検証によりAffymetrix(左パネル)およびIllumina(右パネル)データから得られる。提示されているのは訓練、内部検証および外部検証のセットを元を取得したF1スコアである(採用した入れ子式交差検証プロトコルの詳細な説明については「方法」の章を参照されたい)。

【図 3 A】図3は、DNNアンサンブルによる胚の状態の予測を示す図である。(図3A)は、Illuminaデータで訓練したDNNアンサンブルの検証混同行列性能を示す図である。

【図 3 B】図3は、DNNアンサンブルによる胚の状態の予測を示す図である。(図3B)は、Affymetrixデータで訓練したDNNアンサンブルの検証混同行列性能を示す図である。 10

【図 3 C】図3は、DNNアンサンブルによる胚の状態の予測を示す図である。(図3C)は、GBMおよびDNNの両分類器の上位15から取得した重要な4つの遺伝子の5グループにわたる発現レベルを示す図である。

【図 3 D】図3は、DNNアンサンブルによる胚の状態の予測を示す図である。(図3D)は、ESC細胞からの神経系分化の種々の段階から得たサンプルからなるAffymetrixプラットフォームデータセットGSE65369に対するAffymetrixおよびIllumina DNNアンサンブルを通じて取得した胚スコアである。

【図 4】図4は、DNNにより胚と成体の細胞型で示差的に発現されることが確認された上位50遺伝子を示す図である。 20

【図 5】図5は、DNNにより胚と成体の細胞型で示差的に発現されることが確認された遺伝子を示す図である(FDR P値<0.005)。

【図 6】図6A～図6Dは、マウス発生期の全マウス抽出物中のCox7a1、Naaladl1、Plpp7、およびLin28bについてRNA-seqにより測定したRNA発現を示す図である。時点は交尾後日数(dpc)を表している。

【図 7 A】図7A～図7Dは、ヒトES細胞(ES)におけるCOX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現、クローン胚性前駆細胞株(EP)、発生の異なる時点の胎児の上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および出生後の異なる年齢のヒトの上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および多能性への転写リプログラミングの前または後(iPS細胞)の成体由来皮膚線維芽細胞における平均値を示す図である。 30

【図 7 B】図7A～図7Dは、ヒトES細胞(ES)におけるCOX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現、クローン胚性前駆細胞株(EP)、発生の異なる時点の胎児の上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および出生後の異なる年齢のヒトの上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および多能性への転写リプログラミングの前または後(iPS細胞)の成体由来皮膚線維芽細胞における平均値を示す図である。

【図 7 C】図7A～図7Dは、ヒトES細胞(ES)におけるCOX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現、クローン胚性前駆細胞株(EP)、発生の異なる時点の胎児の上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および出生後の異なる年齢のヒトの上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および多能性への転写リプログラミングの前または後(iPS細胞)の成体由来皮膚線維芽細胞における平均値を示す図である。 40

【図 7 D】図7A～図7Dは、ヒトES細胞(ES)におけるCOX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現、クローン胚性前駆細胞株(EP)、発生の異なる時点の胎児の上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および出生後の異なる年齢のヒトの上腕に由来するin vitroで培養した初期継代線維芽細胞、および多能性への転写リプログラミングの前または後(iPS細胞)の成体由来皮膚線維芽細胞における平均値を示す図である。

【図 8 A】図8A～図8Dは、ヒトES細胞(ES)、クローン胚性前駆細胞株4D20.8、E3、および 50

SK5、類似成体対応物(それぞれMSC、前脂肪細胞、および骨格筋芽細胞)、ならびに前述の組織型にそれぞれ対応する肉腫における、COX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現を示す図である。

【図8B】図8A～図8Dは、ヒトES細胞(ES)、クローン胚性前駆細胞株4D20.8、E3、およびSK5、類似成体対応物(それぞれMSC、前脂肪細胞、および骨格筋芽細胞)、ならびに前述の組織型にそれぞれ対応する肉腫における、COX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現を示す図である。

【図8C】図8A～図8Dは、ヒトES細胞(ES)、クローン胚性前駆細胞株4D20.8、E3、およびSK5、類似成体対応物(それぞれMSC、前脂肪細胞、および骨格筋芽細胞)、ならびに前述の組織型にそれぞれ対応する肉腫における、COX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現を示す図である。

【図8D】図8A～図8Dは、ヒトES細胞(ES)、クローン胚性前駆細胞株4D20.8、E3、およびSK5、類似成体対応物(それぞれMSC、前脂肪細胞、および骨格筋芽細胞)、ならびに前述の組織型にそれぞれ対応する肉腫における、COX7A1(a)、NAALADL1(b)、PLPP7(c)、およびLIN28B(d)に関してIllumina遺伝子発現ビーズアレイにより測定したRNA発現を示す図である。

【図9】図9は、種々の肉腫における、胚マーカーLIN28Bと成体マーカーCOX7A1(a)、PLPP7(c)、およびNAALADL1(b)との逆相関を示す図である。 20

【図10】図10は、RNAシーケンシングにより同定された胚と成体の細胞の新規マーカーを示す図である。

【図11-1】図11は、多様な胚と成体の細胞型におけるAMH発現を示す図である。

【図11-2】図11は、多様な胚と成体の細胞型におけるAMH発現を示す図である。

【図12-1】図12は、多様な胚と成体の細胞型におけるLINC01021発現を示す図である。

【図12-2】図12は、多様な胚と成体の細胞型におけるLINC01021発現を示す図である。

【図13-1】図13は、多様な胚と成体の細胞型におけるRGPD1発現を示す図である。 30

【図13-2】図13は、多様な胚と成体の細胞型におけるRGPD1発現を示す図である。

【図14-1】図14は、多様な胚と成体の細胞型におけるZNF300P1発現を示す図である。

【図14-2】図14は、多様な胚と成体の細胞型におけるZNF300P1発現を示す図である。

【図15-1】図15は、多様な胚と成体の細胞型におけるLINC00654発現を示す図である。

【図15-2】図15は、多様な胚と成体の細胞型におけるLINC00654発現を示す図である。

【図16-1】図16は、多様な胚と成体の細胞型におけるPCDHGA12発現を示す図である。

【図16-2】図16は、多様な胚と成体の細胞型におけるPCDHGA12発現を示す図である。

【図17-1】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。 40

【図17-2】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-3】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-4】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7 50

7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-5】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-6】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-7】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-8】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図17-9】図17は、クラスター型プロトカドヘリン遺伝子座においてRNAシーケンシングにより決定されたリードを示す図である。RS-27は成体MSC細胞株であり、またRS-7は胚性血管内皮前駆細胞株である。

【図18】図18は、COX7A1マーカーを使用したスクリーニングを通じて見出された、iTRを促進することができる薬剤を示す図である。細胞株の下値は、該細胞株中のCOX7A1転写産物の比例減少値である。

【図19】図19は、COX7A1マーカーを使用したスクリーニングを通じて見出された、iCMを促進することができる薬剤を示す図である。細胞株の下値は、該細胞株中のCOX7A1転写産物の比例増加値である。

【図20】図20は、COX7A1マーカーを使用したスクリーニングを通じて見出された、iCMを促進できる追加の薬剤を示す図である。細胞株の下値は、該細胞株中のCOX7A1転写産物の比例増加値である。

【図21】図21は、胚スコア(ES)を算出するために使用する式を示す図である。

【図22】図22は、多層ニューラルネットワークの式を示す図である。

【図23-1】図23は、胎仔および成体に特異的な遺伝子COX7A1ならびに胚細胞において比較的高いレベルで発現されるPCDHB2の、クローン胚性前駆体(EP)細胞株30MV2および4D2 0.8ならびに類似の成体由来のヒト大動脈内皮細胞(HAEC)ならびに成体由来の間葉系幹細胞(MSC)におけるメチル化状態を示す図である。ヒストグラムの高さは、メチル化CpGの割合に相当する。

【図23-2】図23は、胎仔および成体に特異的な遺伝子COX7A1ならびに胚細胞において比較的高いレベルで発現されるPCDHB2の、クローン胚性前駆体(EP)細胞株30MV2および4D2 0.8ならびに類似の成体由来のヒト大動脈内皮細胞(HAEC)ならびに成体由来の間葉系幹細胞(MSC)におけるメチル化状態を示す図である。ヒストグラムの高さは、メチル化CpGの割合に相当する。

【図23-3】図23は、胎仔および成体に特異的な遺伝子COX7A1ならびに胚細胞において比較的高いレベルで発現されるPCDHB2の、クローン胚性前駆体(EP)細胞株30MV2および4D2 0.8ならびに類似の成体由来のヒト大動脈内皮細胞(HAEC)ならびに成体由来の間葉系幹細胞(MSC)におけるメチル化状態を示す図である。ヒストグラムの高さは、メチル化CpGの割合に相当する。

【図23-4】図23は、胎仔および成体に特異的な遺伝子COX7A1ならびに胚細胞において比較的高いレベルで発現されるPCDHB2の、クローン胚性前駆体(EP)細胞株30MV2および4D2 0.8ならびに類似の成体由来のヒト大動脈内皮細胞(HAEC)ならびに成体由来の間葉系幹細胞(MSC)におけるメチル化状態を示す図である。ヒストグラムの高さは、メチル化CpGの割合に相当する。

【図24A】図24A～図24Dは、図に示す遺伝子を発現する多様なレンチウイルス構築物で処理した成体由来の皮膚線維芽細胞(MDW)のRNAシーケンシングを示す図である。iTRマーカーCOX7A1およびCATと共に該細胞において外因的に発現されるLIN28Aの転写産物につ

10

20

30

40

50

いて示す値は、iPS細胞に完全にリプログラミングされた細胞と同様の様式で、ただしより低い程度までダウンレギュレートされた。遺伝子GFERはLIN28A発現に比例する様式でアップレギュレートされた。

【図 2 4 B】図24A～図24Dは、図に示す遺伝子を発現する多様なレンチウイルス構築物で処理した成体由来の皮膚線維芽細胞(MDW)のRNAシーケンシングを示す図である。iTRマーカーCOX7A1およびCATと共に該細胞において外因的に発現されるLIN28Aの転写産物について示す値は、iPS細胞に完全にリプログラミングされた細胞と同様の様式で、ただしより低い程度までダウンレギュレートされた。遺伝子GFERはLIN28A発現に比例する様式でアップレギュレートされた。

【図 2 4 C】図24A～図24Dは、図に示す遺伝子を発現する多様なレンチウイルス構築物で処理した成体由来の皮膚線維芽細胞(MDW)のRNAシーケンシングを示す図である。iTRマーカーCOX7A1およびCATと共に該細胞において外因的に発現されるLIN28Aの転写産物について示す値は、iPS細胞に完全にリプログラミングされた細胞と同様の様式で、ただしより低い程度までダウンレギュレートされた。遺伝子GFERはLIN28A発現に比例する様式でアップレギュレートされた。

【図 2 4 D】図24A～図24Dは、図に示す遺伝子を発現する多様なレンチウイルス構築物で処理した成体由来の皮膚線維芽細胞(MDW)のRNAシーケンシングを示す図である。iTRマーカーCOX7A1およびCATと共に該細胞において外因的に発現されるLIN28Aの転写産物について示す値は、iPS細胞に完全にリプログラミングされた細胞と同様の様式で、ただしより低い程度までダウンレギュレートされた。遺伝子GFERはLIN28A発現に比例する様式でアップレギュレートされた。

【図 2 5】図25は、Illumina遺伝子発現ビーズアレイによりアッセイした、多様な型の成体由来の骨髄(BM)および末梢血(PB)血液細胞と比較した際の、胎仔肝由来のCD34+造血幹細胞およびCD36+赤血球前駆細胞におけるLIN28AおよびLIN28Bの発現を示す図である。130を超える値の相対蛍光単位(RFU)を陽性とみなし、100未満の値のRFUを陰性とみなす。

【図 2 6】図26Aおよび図26Bは、Illumina遺伝子発現ビーズアレイによりアッセイした、気管支、肺、表皮、腎臓、肝臓、乳房、および真皮メラノサイトから得た多様な正常および悪性の上皮と比較した際の、対照胚性幹(ES)細胞、正常な成体間葉系幹細胞(MSC)、正常な血液細胞におけるCOX7A1およびLIN28Bの発現を示す図である。130を超える値の相対蛍光単位(RFU)を陽性とみなし、100未満の値のRFUを陰性とみなす。

【図 2 7 - 1】図27は、以下、すなわち成体由来のヒト間葉系幹細胞(hMSC)、正常なヒト関節軟骨細胞(NHAC)、正常なヒト二倍体線維芽細胞(NHDF)、正常なヒト骨芽細胞(NH0st)、および骨格筋細胞(SkMC)を含む正常な成体由来の間質細胞型、ならびに図に示す多様な肉腫株におけるCOX7A1の発現を示す図である。発現に関しては、75未満のRFUを陰性とみなし、90を超える値を陽性とみなす。

【図 2 7 - 2】図27は、以下、すなわち成体由来のヒト間葉系幹細胞(hMSC)、正常なヒト関節軟骨細胞(NHAC)、正常なヒト二倍体線維芽細胞(NHDF)、正常なヒト骨芽細胞(NH0st)、および骨格筋細胞(SkMC)を含む正常な成体由来の間質細胞型、ならびに図に示す多様な肉腫株におけるCOX7A1の発現を示す図である。発現に関しては、75未満のRFUを陰性とみなし、90を超える値を陽性とみなす。

【図 2 8】図28は、解糖ストレス試験の結果を示す図である。未分化の胚性脂肪生成細胞、すなわち、E3と示す白色脂肪細胞に対するクローンEP、皮下脂肪組織(SAT)に対する成体由来前脂肪細胞、ならびに脂肪肉腫細胞株CRL3043およびCRL3044を、並行して解糖ストレス試験に供した。解糖ストレス後の細胞外酸性化速度(ECAR)を示す。

【図 2 9】図29は、同数の臍帯由来および成体皮膚由来の間質線維芽細胞を播くことにより達成された密集度パーセントを示す図であり、該細胞はいずれも、10%FBSを添加したDMEM(CTRL)または10 ng/mLもしくは100 ng/mLの分泌型GFERを追加した同じ培地および血清による処理の80時間後に胎仔/成体マーカーCOX7A1を発現した。

【図 3 0】図30は、正常な増殖培地(10%FBSを添加したDMEM(CTRL))、またはcMYCもしくはSOX2のmRNAを添加した同一培地、またはcMYCもしくはSOX2のmRNAを添加しかつ0.5 mMの

10

20

30

40

50

バルプロ酸を添加した同一培地という条件での、MDW成体由来皮膚線維芽細胞における、胎仔／成体マーカーCOX7A1および線維症マーカーCOL1A1の発現に関するIllumina遺伝子発現ビーズアレイの値を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0044】

詳細な説明

略語

AC	-	成体由来細胞	
AMH	-	抗ミューラー管ホルモン	
ASC	-	成体幹細胞	10
cGMP	-	現行医薬品適正製造基準	
CM	-	癌成熟	
CNS	-	中枢神経系	
DMEM	-	ダルベッコ改変イーグル培地	
DMSO	-	ジメチルスルホキシド	
DNN	-	ディープニューラルネットワーク（深層ニューラルネットワーク）	
DPBS	-	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水	
ED細胞	-	胚由来細胞；hED細胞はヒトED細胞である	
EDTA	-	エチレンジアミン四酢酸	20
EFT	-	胚-胎仔移行	
EG細胞	-	胚性生殖細胞；hEG細胞はヒトEG細胞である	
EP	-	胚前駆体	
ES Cells	-	胚性幹細胞；hES細胞はヒトES細胞である	
ESC	-	胚性幹細胞	
FACS	-	蛍光活性化細胞選別	
FBS	-	ウシ胎仔血清	
FPKM	-	RNAシーケンシングで得られる、100万のマップされたリード当たりの1キロベースの転写産物当たりのフラグメント	
GFER	-	増殖因子、肝再生増強因子(ALR)	30
GFP	-	緑色蛍光タンパク質	
GMP	-	医薬品適正製造基準	
hED細胞	-	ヒト胚由来細胞	
hEG細胞	-	ヒト胚性生殖細胞は胎仔組織の始原生殖細胞に由来する幹細胞である。	
HESC	-	ヒト胚性幹細胞	
hiPS細胞	-	ヒト人工多能性幹細胞は、hES特異的転写因子、例えばSOX2、KLF4、OCT4、MYC、またはNANOG、LIN28、OCT4、およびSOX2への曝露後に体細胞から取得されるhES細胞と類似した性質を持つ細胞である。	
HSE	-	ヒト皮膚等価物は、細胞と、試験目的に応じて、または創傷修復を促進する治療用途のために製造された生体または合成マトリックスとの混合物である。	40
iCM	-	誘導癌成熟(Induced Cancer Maturation)。	
iPS細胞	-	人工多能性幹細胞は、ES特異的転写因子、例えばSOX2、KLF4、OCT4、MYC、またはNANOG、LIN28、OCT4、およびSOX2、SOX2、KLF4、OCT4、MYC、および(LIN28AもしくはLIN28B)、またはOCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、LIN28AおよびLIN28Bの他の組み合わせへの曝露後に体細胞から取得されるhES細胞に類似した性質を持つ細胞である。	
iTM	-	誘導組織成熟(Induced Tissue Maturation)	
iTR	-	誘導組織再生(Induced Tissue Regeneration)	
MEM	-	最少必須培地	50

MSC	-	間葉系幹細胞	
NT	-	核移植	
PBS	-	リン酸緩衝生理食塩水	
PS線維芽細胞	-	瘢痕化前の線維芽細胞は、妊娠初期の皮膚に由来するか、または 瘢痕を形成することなく皮膚創傷の迅速な治癒を促進するという点で出生前パターンの遺 伝子発現を示すED細胞に由来する線維芽細胞である。	
RFU	-	相対蛍光単位	
RNA-seq	-	RNAシーケンシング	
SFM	-	無血清培地	
TR	-	組織再生	10

【0045】

定義

用語「分析的リプログラミング技術」とは、体細胞の遺伝子発現のパターンを、iPS、ES、ED、ECまたはEG細胞の該パターンなどの、より多能性の状態の該パターンにリプログラミングするための様々な方法を指し、ここでリプログラミングは、複数かつ個別のステップで生じるものであって、体細胞の卵母細胞への導入およびその卵母細胞の活性化に単に依拠するものではない(2001年11月26日に出願された米国出願第60/332,510号、2002年11月26日に出願された第10/304,020号、2003年11月26日に出願されたPCT出願第PCT/US02/37899号、2005年8月3日に出願された米国出願第60/705625号、2005年8月20日に出願された米国出願第60/729173号、2006年7月5日に出願された米国出願第60/818813号、2006年8月3日に出願されたPCT/US06/30632を参照されたい(これらの文献の各々の開示内容は参照により本明細書中に組み込まれるものとする))。

20

【0046】

用語「割球／桑実胚細胞」とは、哺乳動物の胚の割球もしくは桑実胚細胞、またはそれらの細胞の分化誘導体を含むさらなる細胞と共に、または該細胞を用いずにin vitroで培養した割球もしくは桑実胚細胞を指す。

【0047】

用語「癌成熟」とは、最初は胚細胞のマーカーを発現する前悪性または悪性の癌細胞が、胎仔または成体の細胞のマーカーを発現するように変更されるような、前悪性または悪性の癌細胞における遺伝子発現の変更を指す。

30

【0048】

用語「遺伝子Xを発現する細胞」、「遺伝子Xが細胞(もしくは細胞集団)中で発現される」、またはその等価物とは、特定のアッセイプラットフォームを使用する細胞の分析が陽性の結果を提供したことを意味する。その逆もまた真である(すなわち、遺伝子Xを発現しない細胞、またはその等価物とは、特定のアッセイプラットフォームを使用する細胞の分析が陰性の結果を提供したことを意味する)。従って、本明細書中に記載した任意の遺伝子発現結果は、示される遺伝子のためのアッセイプラットフォーム(または複数のプラットフォーム)に用いた特定のプローブまたは複数のプローブと関係がある。

【0049】

用語「細胞株」とは、in vitroでの増殖および拡張が可能な細胞の、死に至る、または不死の集団を指す。

40

【0050】

用語「細胞の再構成」とは、機能細胞を取得するための、細胞の細胞質への核のクロマチンの導入を指す。

【0051】

用語「クローン(クローナル)」とは、全てがその元の単一細胞に由来しかつ他の細胞を含有しない細胞の集団への、単一細胞の拡張により取得される細胞の集団を指す。

【0052】

用語「コロニーin situ分化」とは、コロニーを未分化の幹細胞株として増殖させた培養容器から該コロニーを取り出さないかまたは脱凝集させない、in situでの細胞(例えば

50

、hES、hEG、hiPS、hECまたはhED)のコロニーの分化を指す。コロニーin situ分化は、胚様体を形成する中間ステップを利用しないものの、やはり攪拌培養の利用などの胚様体形成または他の凝集技術のコロニーin situ分化の期間に続いて行う場合がある。

【0053】

用語「細胞質ブレブ(cytoplasmic bleb)」とは、未処理の、または透過処理したがその他の点では未処理の形質膜により囲まれた、核を欠く細胞の細胞質を指す。

【0054】

用語「分化した細胞」とは、多能性幹細胞から本開示の方法により作製した細胞に関して使用する場合、親の多能性幹細胞と比較して、分化する能力が低下している細胞を指す。本開示の分化した細胞は、さらに分化しうる細胞を含む(すなわち、それらは最終分化していなくてもよい)。

10

【0055】

用語「胚」または「発生の胚段階」とは、細胞、組織または動物の発生の出生前段階、具体的には、胎仔および成体の細胞と比較した場合の、細胞の発生の胚期を指す。ヒトの場合、胚から胎児(胎仔)への発生の移行は出生前発生の約8週で生じ、マウスでは該移行は16日または約16日で生じ、またラット種では、交尾後約17.5日で生じる。(www.php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Mouse_Timeline_Detailed)。

【0056】

用語「胚性幹細胞」(ES細胞)とは、未分化状態を維持しながら(例えば、TERT、OCT4、およびSSEAならびにその種のES細胞に特異的なTRA抗原を発現する)細胞株として連続的に継代された胚盤胞、割球、または桑実胚の内部細胞塊に由来する細胞を指す。ES細胞は、卵細胞の精子もしくはDNAとの受精、核移植、単為生殖から、またはMHC領域に半接合性もしくは同型接合性を有するhES細胞を生成する手段により誘導してもよい。ES細胞は、歴史的には、着床前胚に移植すると全ての体細胞型ならびに生殖系列に分化することができる細胞と定義されているが、ヒトを含む多くの種からの候補ES培養物は、培養中はより平坦な外観を有し、また典型的には生殖系列分化に寄与せず、従って「ES様細胞」と称される。ヒトES細胞は実際には「ES様」とであると一般的には考えられるが、本出願では、本発明者らはES細胞という用語を、ES細胞株とES様細胞株の両方を指すように使用する。

20

【0057】

用語「TRの大域モジュレーター(global modulator)」または「iTRの大域モジュレーター」とは、胎仔または成体の供給源に由来する細胞において、COX7A1をダウンレギュレートしつつ同時にPCDHB2をアップレギュレートすることができるか、またはNAALADL1をダウンレギュレートしつつ同時にAMHをアップレギュレートすることができる薬剤、および組織損傷または変性疾患に応じて瘢痕を残さない組織再生の増加をもたらす遺伝子発現のパターンを誘導することができる薬剤を含むがこれらに限定されない、複数のiTR遺伝子またはiTM遺伝子をモジュレートすることができる薬剤を指す。

30

【0058】

用語「ヒト胚由来」(「hED」)細胞とは、内部細胞塊、胎盾、もしくは胚盤葉上層のものを含む割球由来細胞、桑実胚由来細胞、胚盤胞由来細胞、または原始内胚葉、外胚葉、中胚葉、および神経堤を含む初期胚の他の全能性もしくは多能性幹細胞、ならびに正常なヒト発生の最初の8週の等価物と相関がある分化の状態と一致するその誘導体を指すが、細胞株として継代されたhES細胞に由来する細胞は除く(例えば、Thomsonの米国特許第7,582,479号；第7,217,569号；第6,887,706号；第6,602,711号；第6,280,718号；および第5,843,780号を参照されたい)。hED細胞は、卵細胞の精子もしくはDNAとの受精、核移植、またはクロマチン移植、単為生殖を通じて単為生殖生物を形成するように誘導した卵細胞、分析的リプログラミング技術により、あるいはHLA領域に半接合性もしくは同型接合性を有するhES細胞を作成するための手段により産生された着床前胚から誘導してもよい。用語「ヒト胚性生殖細胞」(hEG細胞)とは、体内の様々な組織に分化できる、胎児組織の始原生殖細胞または卵母細胞および精原細胞などの成熟中もしくは成熟した生殖細胞に由来する多能性幹細胞を指す。またhEG細胞は、雌性発生または雄性発生手段、すなわち、多

40

50

能性細胞が雄性または雌性起源のDNAのみを含有する卵母細胞から誘導され、そのため全て雌性由来または雄性由来のDNAを含むことになる方法により作製された多能性幹細胞から誘導してもよい。

【0059】

用語「ヒト胚性幹細胞」(hES細胞)とは、ヒトES細胞を指す。

【0060】

用語「ヒト人工多能性幹細胞」とは、免疫不全マウスに移植した場合に3つ全ての胚葉を形成する能力を含む、hES細胞と類似した性質を持つ細胞を指し、ここで、かかるiPS細胞は、脱分化因子、例えばhES細胞特異的転写因子の組み合わせ：KLF4、SOX2、MYC；OCT4もしくはSOX2、OCT4、NANOG、およびLIN28；またはOCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、LIN28AおよびLIN28Bのうちの種々の組み合わせへの曝露後あるいはhES細胞と類似した性質を持つ多能性幹細胞状態を得るために体細胞を誘導する他の方法の後に、変化した体細胞系列の細胞から誘導される。しかし、体細胞核移植(SCNT)による体細胞のリプログラミングは、典型的には、iPS細胞ではなくNT-ES細胞と称される。

【0061】

用語「誘導癌成熟」とは、前悪性または悪性細胞の表現型に変化をもたらし、その結果、かかる誘導の後に、該細胞が発生の胚段階ではなく胎仔または成体の段階にあるその細胞型において通常発現されるマーカーを発現するようになる方法を指す。

【0062】

用語「誘導組織再生」とは、胎仔または成体哺乳動物の細胞の分子組成を変更し、その結果、該細胞がその組織への損傷の後に機能性組織を再生することができるようにするための本開示の方法の利用を指すが、ここで該再生は、その種の動物における正常な結果ではないものとする。

【0063】

用語「単離された」とは、(i)普通は人の手を必要とするプロセスにより、通常それと共に自然界に見出される少なくとも一部の他の物質から分離されている物質、(ii)人工的に作製された(例えば、化学合成された)物質、および／または(iii)人工的な環境もしくは状況(すなわち、通常は自然界に見出されない環境もしくは状況)に存在する物質を指す。

【0064】

用語「iCM因子」とは、治療効果のために腫瘍にCMをもたらす様式でCMアクチベーターおよびCMインヒビターのレベルを変更する分子を指す。

【0065】

用語「iCM遺伝子」とは、発現が変更されると、治療効果のために腫瘍にCMを引き起こしうる遺伝子を指す。

【0066】

用語「iTR因子」とは、自然にTRを生じることができない組織にTRをもたらす様式でTRアクチベーターおよびTRインヒビターのレベルを変更する分子を指す。

【0067】

用語「iTR遺伝子」は、発現が変更された場合に、誘導組織再生を、通常はかかる再生を生じることができない組織で引き起こしうる遺伝子を指す。

【0068】

用語「核酸」は「ポリヌクレオチド」と互換的に使用され、また様々な実施形態において、DNAおよびRNAなどのヌクレオシドの天然に存在する重合体、ならびに天然には存在しないヌクレオシドまたはヌクレオシド類似体の重合体を包含する。幾つかの実施形態では、核酸は標準ヌクレオシド(A、G、C、T、Uと略される)を含む。他の実施形態では、核酸は1つ以上の非標準ヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態では、1つ以上のヌクレオシドは、天然には存在しないヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体である。核酸は、修飾塩基(例えば、メチル化塩基)、修飾糖(2'-フルオロリボース、アラビノース、もしくはヘキソース)、修飾リン酸基または他のヌクレオシド間もしくはヌクレオシド類似体間の結

10

20

30

40

50

合(例えば、ホスホロチオエートもしくは5'-N-ホスホロアミダイト結合)、架橋型核酸、またはモルホリノを含みうる。幾つかの実施形態では、核酸は、DNAおよびRNAに見られるような、ホスホジエステル結合により連結されたヌクレオシドを含む。幾つかの実施形態では、少なくとも一部のヌクレオシドが非ホスホジエステル結合(複数可)により連結されている。核酸は一本鎖、二本鎖、または部分的に二本鎖でありうる。少なくとも部分的に二本鎖の核酸は、1つ以上のオーバーハング、例えば、5'および/または3'オーバーハング(複数可)を有しうる。RNA干渉(RNAi)との関連において有用であることが当分野で公知である核酸修飾(例えば、非標準ヌクレオシドの使用を含む、ヌクレオシドおよび/または骨格の修飾)、アプタマー、または研究もしくは治療を目的としたアンチセンスベースの分子は、本開示の様々な実施形態における使用が意図される。例えば、Crooke, S T (編) Antisense drug technology: principles, strategies, and applications, Boca Raton: CRC Press, 2008; Kurreck, J. (編) Therapeutic oligonucleotides, RSC biomolecular sciences. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008を参照されたい。幾つかの実施形態では、修飾により、核酸の半減期および/または安定性が、例えば、in vivoで、同一の長さおよび鎖状態(strandedness)のRNAまたはDNAと比較して増大する。幾つかの実施形態では、修飾により、核酸の免疫原性が同一の長さおよび鎖状態のRNAまたはDNAと比較して減少する。幾つかの実施形態では、核酸の一方または両方の鎖中のヌクレオシドの5%~95%が修飾されている。修飾は均一または不均一に位置していてもよく、また修飾の位置(例えば、中央付近、末端付近または末端部、交互(alternating)等)を、所望の特性(複数可)を増強するために選択することができる。核酸は検出可能な標識、例えば、蛍光色素、放射性原子等を含んでいてもよい。「オリゴヌクレオチド」とは、例えば、典型的には約4~約60ヌクレオチド長の、比較的短い核酸を指す。本明細書中でポリヌクレオチドに言及する際は、DNA、RNAの両方、ならびにいずれの場合も一本鎖および二本鎖形態の両方(および各一本鎖分子の相補体)が提供されることは理解されよう。「ポリヌクレオチド配列」とは、本明細書中で使用する場合、ポリヌクレオチド材料それ自体および/または特定の核酸を生化学的に特徴付ける配列情報(すなわち塩基の略語として使用される文字の連続)を指す場合がある。本明細書中に提示するポリヌクレオチド配列は、他に指示しない限り、5'から3'への方向で提示する。

【0069】

用語「オリゴクローン(オリゴクローナル)」とは、同一培養物中の他の細胞のものとは異なる形態または分化のマーカーの存在もしくは非存在などの類似した特徴を共有すると考えられる、細胞の小集団、典型的には2~1000個の細胞を起源とする細胞の集団を指す。オリゴクローン細胞を、これらの共通の特徴を共有していない細胞から単離し、増殖させて、類似した細胞の元の集団に本質的に完全に由来する細胞の集団を生成させることができる。

【0070】

用語「多能性幹細胞」とは、2つ以上の分化した細胞型に分化することができる動物細胞を指す。かかる細胞としては、hES細胞、割球/桑実胚細胞およびその誘導されたhED細胞、hiPS細胞、hEG細胞、hEC細胞、ならびに成体由来の細胞、例えば間葉系幹細胞、神経幹細胞、および骨髄由来幹細胞が挙げられる。多能性幹細胞は、遺伝的に改変されていても、または遺伝的に改変されていなくてもよい。遺伝的に改変された遺伝的に改変された細胞は、卵内でのその同定を容易にするための蛍光タンパク質などのマーカーを含んでいてもよい。

【0071】

用語「ポリペプチド」とは、アミノ酸の重合体を指す。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は、本明細書中では互換的に使用される。ペプチドは、典型的には約2~60アミノ酸長の、比較的短いポリペプチドである。本明細書中で使用するポリペプチドは、典型的には、標準アミノ酸(すなわち、タンパク質中に最も一般的に見出される20種のL-アミノ酸)を含有する。しかし、ポリペプチドは、ある特定の実施形態では、当分野で公知の1つ以上の非標準アミノ酸(天然に存在するものであっても、天然には存在しないもの

であってもよい)および／またはアミノ酸類似体を含む。ポリペプチド中のアミノ酸のうちの1つ以上が、例えば、炭水化物基、リン酸基、脂肪酸基、コンジュゲーション、機能付与等のためのリンカーなどの化学物質の付加により改変されていてもよい。共有結合または非共有結合で結合した非ポリペプチド部分を有するポリペプチドは、依然として「ポリペプチド」と見なされる。ポリペプチドは、天然の供給源から精製しても、組換えDNA技術を利用して製造しても、従来の固相ペプチド合成等の化学的手段を通じて合成してもよい。用語「ポリペプチド配列」または「アミノ酸配列」とは、本明細書中で使用する場合、ポリペプチド材料それ自体および／またはポリペプチドを生化学的に特徴付ける配列情報(すなわち、アミノ酸名の略語として使用される文字もしくは3文字表記の連続)を指す場合がある。本明細書中に提示するポリペプチド配列は、他に指示しない限り、N末端からC末端の方向に提示する。ポリペプチドは環状であっても、または環状部分を含むであってもよい。天然に存在するポリペプチドについて本明細書中で検討する際は、本開示が、そのあらゆるアイソフォーム(例えば、mRNAの選択的スプライシングもしくは編集の結果として、または1つの遺伝子の異なる対立遺伝子、例えば、1つ以上の一塩基多型により異なる対立遺伝子(典型的には、かかる対立遺伝子は、参照配列もしくはコンセンサス配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上同一である)の結果として同一遺伝子から生じる異なるタンパク質)に関連する実施形態を包含する、と理解されなければならない。ポリペプチドは、自身を分泌のために、もしくは特定の細胞内区画(例えば、核)に標的化する配列および／または翻訳後の修飾もしくは分解のために該ポリペプチドを標的化する配列を含んでいてもよい。特定のポリペプチドを、成熟ポリペプチドとなるために翻訳後切断または他のプロセッシングを受ける前駆体として合成してもよい。場合によっては、かかる切断は特定の活性化事象の際にのみ生じうる。関連があれば、本開示により、前駆体ポリペプチドに関する実施形態およびポリペプチドの成熟型に関する実施形態を提供する。

【0072】

用語「プールされたクローン」とは、クローン集団と類似しているが、全ての細胞が同一の元のクローンに由来する集団ではない、遺伝子発現のマーカーなどのマーカーの均一性を有する細胞の集団を生成するために2つ以上のクローン集団を混合することで取得される細胞の集団を指す。このプールされたクローン株は、単一遺伝子型または混合遺伝子型の細胞を含んでいてもよい。プールされたクローン株は、クローン株が比較的早期に分化するか、またはそれらの増殖寿命の早期に望ましくない形で変化する場合に特に有用である。

【0073】

用語「出生前」とは、有胎盤哺乳類の胚発生の段階を指し、この段階より前は、動物は子宮から離れて生存することができない。

【0074】

用語「始原幹細胞」とは、3つ全ての一次胚葉、すなわち内胚葉、中胚葉、および外胚葉、ならびに神経堤の細胞に分化することができる多能性幹細胞を集合的に指す。従って、始原幹細胞の例としては、ヒトまたは非ヒト哺乳動物のES細胞または細胞株、割球／桑実胚細胞およびその誘導されたED細胞、iPS、ならびにEG細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

用語「精製された」とは、それらが本来、または当初作成された際に関連している成分の大部分から分離されている薬剤または物質(例えば、化合物)を指す。一般に、かかる精製は人の手の動作を必要とする。精製された薬剤または物質は、部分的に精製されていても、実質的に精製されていても、または純粋であってもよい。かかる薬剤または物質は、例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または99%以上純粋であってもよい。幾つかの実施形態では、核酸またはポリペプチドは、該核酸または該ポリペプチドがそれぞれ、調製物中に存在する全核酸またはポリペプチド材料のうちの、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、9

8%、99%、またはそれ以上を構成するように精製される。純度は、例えば、乾燥重量、クロマトグラフィー・トレーシングにおけるピークのサイズ、分子存在量、ゲル上のバンドの強度、または分子存在量と相関する任意のシグナルの強度、または当分野で認められている任意の定量方法に基づくものでありうる。幾つかの実施形態では、水、緩衝剤、イオン、および／または小分子(例えばヌクレオチドもしくはアミノ酸などの前駆体)が、場合によっては、精製された調製物中に存在しうる。精製された分子は、該分子を他の物質(例えば、他の細胞材料)から分離することにより、または所望の程度の純度を達成するような様式で該分子を製造することにより、調製してもよい。幾つかの実施形態では、精製された分子または組成物とは、任意の当分野で認められている精製方法を利用して調製される分子または組成物を指す。幾つかの実施形態では、「部分的に精製された」は、細胞により産生された分子がもはや該細胞内に存在しないこと、例えば、該細胞が溶解されており、場合によっては、少なくとも一部の細胞材料(例えば、細胞壁、細胞膜(複数可)、細胞小器官(複数可))が除去されていることを意味する。

【0076】

用語「RNA干渉」(RNAi)は、本明細書中では一貫して、二本鎖RNA(dsRNA)が該dsRNAの鎖との相補性を有する対応mRNAの配列特異的分解または翻訳抑制を引き起こす現象を指すための当分野におけるその意味で使用される。dsRNAの鎖とmRNAとの相補性は100%である必要はないが、遺伝子発現の阻害(「サイレンシング」または「ノックダウン」とも称される)を媒介するのに十分であることだけは必要であることが理解されよう。例えば、相補性の程度は、鎖が、(i)RNA誘導サイレンシング複合体(RISC)においてmRNAの切断を導くことができるか、または(ii)mRNAの翻訳抑制を引き起こすことができるような程度である。ある特定の実施形態では、RNAの二本鎖部分は約30ヌクレオチド長未満、例えば、17~29ヌクレオチド長である。ある特定の実施形態では、dsRNAの第1鎖は標的mRNAに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%相補的であり、かつ該dsRNAの他方の鎖は該第1鎖に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、または100%相補的である。哺乳動物細胞では、RNAiを、適当な二本鎖核酸を細胞に導入するか、または後に細胞内でプロセシングされてそこにdsRNAを生じる核酸を細胞内で発現させることにより、達成してもよい。RNAiを媒介することができる核酸を、本明細書中では「RNAi剤」と称する。RNAiを媒介することができる例示的な核酸は、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、およびマイクロRNA前駆体である。これらの用語は周知であり、本明細書中では一貫して、当分野におけるそれらの意味で使用される。siRNAは、典型的には、互いにハイブリダイズして二重鎖を形成する2つの別個の核酸鎖を含む。それらはin vitroで、例えば、標準的な核酸合成技術を利用して合成することができる。siRNAは、典型的には、各鎖に16~30個、例えば、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30個のヌクレオチド(nt)を有する二本鎖オリゴヌクレオチドであり、ここで、該二本鎖オリゴヌクレオチドは15~29ヌクレオチド長の二本鎖部分を含み、かつ鎖の一方もしくは両方は、例えば、1~5ヌクレオチド長の3'オーバーハングを含んでいてもよく、または一方もしくは両方の末端は平滑でありうる。幾つかの実施形態では、siRNAは19~25 nt、例えば、21~23ヌクレオチド長の鎖を含み、ここで、一方もしくは両方の鎖は1~2個のヌクレオチドの3'オーバーハングを含む。siRNAの二本鎖部分の一方の鎖(「ガイド鎖」または「アンチセンス鎖」と称される)は、mRNA中の標的領域に対して実質的に(例えば、少なくとも80%以上、例えば、85%、90%、95%、または100%)相補的であり(例えば、3、2、1、または0個のミスマッチヌクレオチドを有し)、かつ他方の二本鎖部分は第1二本鎖部分に対して実質的に相補的である。多くの実施形態では、ガイド鎖はmRNA中の標的領域に対して100%相補的であり、かつ他方のパッセンジャー鎖は第1二本鎖部分に対して100%相補的である(様々な実施形態において、ガイド鎖の3'オーバーハング部分は、もし存在するならば、該ガイド鎖がmRNAにハイブリダイズする場合に該mRNAに対して相補的であっても、または相補的でなくてもよいことが理解されよう)。幾つかの実施形態では、shRNA分子はステムループを含む核酸分子であり、ここで、この二本鎖のステムは16~30ヌクレオチド長であり、かつループは約1~10ヌクレオチド長である。siRNAは多種多様な修飾ヌ

10

20

30

40

50

クレオシド、ヌクレオシド類似体を含むことが可能であり、また化学的または生物学的に修飾された塩基、修飾された骨格等を含むことができる。RNAiに有用であると当分野で認識されている任意の修飾を無制限に利用することができる。一部の修飾は、安定性、細胞の取込み、効力等の増加をもたらす。一部の修飾は、免疫原性またはクリアランスの低下をもたらす。ある特定の実施形態では、siRNAは約19~23(例えば、19、20、21、22、または23)ヌクレオチド長の二重鎖を含み、また場合によっては、デオキシリボヌクレオチドで構成されていてもよい1~5ヌクレオチド長の3'オーバーハングを1つまたは2つ含む。shRNAは、主に非自己相補領域により隔てられた2つの相補的な部分を含有する単一核酸鎖を含む。これらの相補的な部分はハイブリダイズして二重鎖構造を形成し、また該非自己相補領域は該二重鎖の一方の鎖の3'末端と他方の鎖の5'末端とを連結するループを形成する。shRNAは細胞内プロセッシングを受けてsiRNAを生成する。典型的には、前記ループは1~8、例えば、2~6ヌクレオチド長である。

10

【0077】

マイクロRNA(miRNA)は、配列特異的な様式で遺伝子発現を阻害する、約21~25個のヌクレオチド(哺乳動物系)の小さな、天然に存在する、非コードの、一本鎖RNAである。それらは、不完全な相補性の領域を1つ以上含むことが多い二重鎖を含有する短いヘアピン(約70ヌクレオチド長)からなる特徴的な二次構造を有する前駆体(プレmiRNA(pre-miRNA))から細胞内で生成され、該前駆体は同様に、より大きな前駆体(プリmiRNA(pri-miRNA))から生成される。天然に存在するmiRNAは、典型的にはその標的mRNAに対して部分的にのみ相補的であり、また翻訳抑制を介して作用することが多い。内因性miRNAまたはmiRNA前駆体をモデルにしたRNAi剤は、本開示のある特定の実施形態において有用である。例えば、siRNAは、1つの鎖が1つ以上のミスマッチまたはバルジを有する標的mRNAにハイブリダイズし、miRNAおよびその標的mRNAにより形成される二重鎖を模倣するように設計することができる。かかるsiRNAは、miRNA模倣物またはmiRNA様分子と称される場合がある。miRNA模倣物は、その構造が天然に存在するmiRNA前駆体の構造を模倣している前駆体核酸によりコードされていてもよい。

20

【0078】

ある特定の実施形態では、RNAi剤は、siRNA(例えば、互いにハイブリダイズできる2つの別個の鎖として)、shRNA、またはマイクロRNA前駆体の転写のための鋳型を含むベクター(例えば、プラスミドまたはウイルス)である。典型的には、siRNA、shRNA、またはmiRNA前駆体をコードする鋳型を、当分野で公知のように、発現制御配列(例えば、プロモーター)に動作可能に連結する。かかるベクターを使用することで、該鋳型を脊椎動物の細胞、例えば、哺乳動物の細胞に導入し、siRNA、shRNA、またはmiRNA前駆体の一過性の、または安定した発現をもたらすことができる。前駆体(shRNAまたはmiRNA前駆体)は細胞内でプロセッシングされてsiRNAまたはmiRNAを生成する。

30

【0079】

一般に、siRNAなどの小さいRNAi剤は、化学的に合成することができるか、または後にハイブリダイズする2つの別個の鎖として、もしくは後にプロセッシングされてsiRNAを生成するshRNAとして、DNA鋳型からin vitroもしくはin vivoで転写することができる。多くの場合、RNAi剤、特に修飾を含むRNAi剤は、化学的に合成される。オリゴヌクレオチドの化学合成法は当分野で周知である。

40

【0080】

用語「小分子」は、本明細書中で使用する場合、質量が約2キロダルトン(KDa)未満の有機分子である。幾つかの実施形態では、小分子は約1.5 KDa未満、または約1 KDa未満である。幾つかの実施形態では、小分子は約800ダルトン(Da)、600 Da、500 Da、400 Da、300 Da、200 Da、または100 Da未満である。多くの場合、小分子は少なくとも50 Daの質量を有する。幾つかの実施形態では、小分子は、複数の炭素-炭素結合を含有しており、またタンパク質との構造的相互作用(例えば、水素結合)に重要な1つ以上のヘテロ原子および/または1つ以上の官能基、例えば、アミン基、カルボニル基、ヒドロキシル基、またはカルボキシル基、および幾つかの実施形態では少なくとも2つの官能基を含みうる。小分

50

子は多くの場合、上記官能基のうちの1つ以上で置換されていてもよい、1つ以上の環式炭素もしくは複素環構造および／または芳香族もしくは多環芳香族構造を含む。幾つかの実施形態では、小分子は非重合性である。幾つかの実施形態では、小分子はアミノ酸ではない。幾つかの実施形態では、小分子はヌクレオチドではない。幾つかの実施形態では、小分子は糖ではない。

【0081】

用語「対象（被験体）」は、任意の多細胞動物でありうる。多くの場合、対象は脊椎動物、例えば、哺乳動物または鳥類である。例示的な哺乳動物としては、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ）、有蹄類（例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ヤギ種）、イヌ、およびネコが挙げられる。多くの場合、対象は、例えば、実験、診断、および／または治療目的で化合物を送達すべき個体、サンプルを取得するかまたは診断手順を実行する個体（例えば、組織損傷を評価するため、および／または本開示中に記載した化合物の効果を評価するために使用するサンプルまたは手順）である。

10

【0082】

用語「組織損傷」は、細胞、組織、器官、または他の身体構造物への任意のタイプの損傷または傷害を指すために本明細書中で使用する。該用語は、様々な実施形態において、疾患による変性、身体的外傷または手術による損傷、劇物への曝露により引き起こされる損傷、ならびに細胞、組織、器官、または他の身体構造物の構造および／または機能性の他の破壊を包含する。

20

【0083】

用語「組織再生」または「TR」とは、喪失、損傷、または変性後の、組織、器官、もしくは他の身体構造物、またはその一部の少なくとも部分的な再生、置換、回復、または再成長を指し、ここで該組織再生は、本開示中に記載した方法がなければ起こらないものとする。組織再生の例としては、組織または器官が、該組織もしくは該器官の正常なサイズまたはその傷害もしくは疾患前のサイズに近づくような、傷害を受けたかまたは罹患した器官のサイズおよび細胞数の増加を伴う、軟骨、骨、筋肉、腱、および靱帯の再成長を含む切断された指または四肢の再成長、傷害または疾患により失われた骨、軟骨、皮膚、または筋肉の瘢痕を残さない再成長が挙げられる。組織型に応じて、組織再生は、例えば、既存の細胞および／または組織の（例えば、細胞移動による）再配置、成体体性幹細胞もしくは他の前駆細胞の分裂およびその子孫の少なくとも一部の分化、ならびに／または細胞の脱分化、分化転換、および／もしくは増殖などの、様々な異なる機構を介して生じうる。

30

【0084】

用語「TRアクチベーター遺伝子」とは、胎仔および成体の細胞ではその発現の欠如が、しかし発生の胚期ではその発現が、TRを促進する遺伝子を指す。

【0085】

用語「TRインヒビター遺伝子」とは、胎仔および成体動物におけるその発現がTRを阻害する遺伝子を指す。

【0086】

用語「処置する」、「処置すること」、「治療」、「治療的」および対象に関する同様の用語は、対象の医学的および／または外科的管理を提供することを指す。処置としては、限定するものではないが、化合物または組成物（例えば、医薬組成物）の対象への投与を挙げることができる。本開示による対象の処置は、典型的には、例えば、組織損傷を受けたかまたは組織損傷を受けると予想される対象（例えば、手術を受ける対象）において再生を促進するために行われる。処置の効果としては、一般に、再生の増大、瘢痕化の減少、および／または組織損傷後の構造的もしくは機能的帰結の（処置を行わない場合の帰結と比較した際の）改善を挙げることができ、かつ／または変性疾患の重症度もしくは進行の逆転もしくは低減を挙げることができる。

40

【0087】

用語「変異体（バリエント）」とは、特定のポリペプチドに適用する場合、1つ以上の

50

アミノ酸の変更、例えば、付加(複数可)、欠失(複数可)、および／または置換(複数可)により、かかるポリペプチド(「元のポリペプチド」と称されることもある)とは異なっているポリペプチドを指す。時には、元のポリペプチドは、天然に存在するポリペプチド(例えば、ヒトもしくは非ヒト動物由来)またはそれと同一のポリペプチドである。変異体は、天然に存在するものであってもよいし、または例えば、組換えDNA技術もしくは化学合成を利用して作製してもよい。付加は、ポリペプチド内への挿入、またはN-もしくはC-末端での付加でありうる。幾つかの実施形態では、置換、欠失、または付加されるアミノ酸の数は、例えば、約1~30個、例えば、約1~20個、例えば、約1~10個、例えば、約1~5個、例えば、1、2、3、4、または5個でありうる。幾つかの実施形態では、変異体は、その配列が元のポリペプチドの配列に対して、元のポリペプチドの少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも150個のアミノ酸、またはそれ以上、最大で全長にわたり相同である(ただし元のポリペプチドと配列が同一ではない)ポリペプチドを含み、例えば、変異体ポリペプチドの配列は、元のポリペプチドの配列に対して、元のポリペプチドの少なくとも50個のアミノ酸、少なくとも100個のアミノ酸、少なくとも150個のアミノ酸、またはそれ以上、最大で全長にわたり、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である。幾つかの実施形態では、変異体は、元のポリペプチドに対して、元のポリペプチドの長さの少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%にわたり、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上同一であるポリペプチドを含む。幾つかの実施形態では、変異体は、少なくとも1つの機能または構造ドメイン、例えば、米国国立バイオテクノロジー情報センターの保存ドメインデータベース(CDD)(www.ncbi.nih.gov)においてそのように同定されているドメイン、例えば、NCBIが管理するドメイン(NCBI-curated domain)を含む。

【0088】

幾つかの実施形態では、変異体または断片の1つ、2つ以上、または全ての生物学的機能または活性は、元の分子の対応する生物学的機能または活性のそれと実質的に類似している。幾つかの実施形態では、機能的変異体は、元のポリペプチドの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上、例えば、ほぼ等しい活性を保持している。幾つかの実施形態では、変異体の活性は、元の分子の活性の最大約100%、約125%、または約150%である。他の非限定的実施形態では、特定の効果を生むために必要とされる変異体の量または濃度が同効果を生むために必要とされる元の分子の量または濃度の0.5~5倍以内であるならば、変異体または断片の活性は、元の分子の活性と実質的に類似しているとみなされる。

【0089】

幾つかの実施形態では、変異体中のアミノ酸「置換」は、1つのアミノ酸を、類似した構造的および／または化学的性質を有する別のアミノ酸と置き換えた結果、すなわち、保存的アミノ酸置換である。「保存的」アミノ酸置換は、関与する残基の側鎖のサイズ、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および／または両親媒性などの様々な性質のいずれかにおける類似性に基づいて行ってもよい。例えば、非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンが挙げられる。極性(親水性)の、中性アミノ酸としては、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが挙げられる。正に荷電した(塩基性)アミノ酸としては、アルギニン、リジンおよびヒスチジンが挙げられる。負に荷電した(酸性)アミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられる。特定のグループ内の、ある特定の置換、例えば、イソロイシンによるロイシンの置き換え(もしくはその逆)、スレオニンによるセリンの置き換え(もしくはその逆)、またはグリシンによるアラニンの置き換え(もしくはその逆)は特に興味深いものでありうる。当然、非保存的置換も機能の保持と両立することが多い。幾つかの実施形態では、置換または欠失は、活性にとって重要なアミノ酸を変更したり欠失させたりしない。

挿入または欠失は、サイズが約1~20個のアミノ酸、例えば、1~10個のアミノ酸であってもよい。幾つかの場合には、より大きなドメインを、機能に実質的に影響を及ぼすことなく除去しうる。本開示のある特定の実施形態では、変異体の配列は、天然に存在する酵素の配列にわずか計5、10、15、または20個のアミノ酸の付加、欠失、または置換を作製することにより取得することができる。幾つかの実施形態では、ポリペプチド中のアミノ酸のわずか1%、5%、10%、または20%が元のポリペプチドに対する挿入、欠失、または置換である。目的の活性を除去または実質的に低下させることなく、どのアミノ酸残基を置換、付加、または欠失させるかを決定する際の指針は、特定のポリペプチドの配列を相同ポリペプチド(例えば、他の生物由来のもの)の配列と比較し、高い相同性を有する領域(保存領域)に作製されるアミノ酸配列変化の数を最小限に抑えることにより、またはアミノ酸を相同配列中に見出されるアミノ酸と置き換えることにより取得してもよいが、これは、多様な種間で保存されているアミノ酸残基は保存されていないアミノ酸よりも活性にとって重要である可能性が高いからである。

10

【0090】

幾つかの実施形態では、ポリペプチドの変異体は異種ポリペプチド部分を含む。この異種部分は、元のポリペプチド中には存在しないかまたは元のポリペプチドと相同ではない配列を有することが多い。異種部分は、例えば、5~約5,000アミノ酸長、またはより長いものであってもよい。多くの場合、異種部分は5~約1,000アミノ酸長である。幾つかの実施形態では、異種部分は、異なるポリペプチド中に見出される配列、例えば、機能ドメインを含む。幾つかの実施形態では、異種部分は、ポリペプチドの精製、発現、可溶化、および/または検出に有用な配列を含む。幾つかの実施形態では、異種部分はポリペプチド「タグ」、例えば、アフィニティータグまたはエピトープタグを含む。例えば、タグはアフィニティータグ(例えば、HA、TAP、Myc、6×His、Flag、GST)、蛍光または発光タンパク質(例えば、EGFP、ECFP、EYFP、Cerulean、DsRed、mCherry)、溶解度向上タグ(例えば、SUMO タグ、NUS Aタグ、SNUTタグ、またはバクテリオファージT7のOcrタンパク質の単量体突然変異体)でありうる。例えば、Esposito DおよびChatterjee D K. Curr Opin Biotechnol. ; 17(4):353-8 (2006)を参照されたい。幾つかの実施形態では、タグは複数の機能を果たしうる。タグは比較的小さいことが多く、例えば、少数のアミノ酸から最大約100アミノ酸長である。幾つかの実施形態では、タグは100アミノ酸長より長く、例えば、最大で約500アミノ酸長、またはそれ以上である。幾つかの実施形態では、ポリペプチドは、例えば、N-またはC-末端融合物として、N-またはC-末端に位置するタグを有する。ポリペプチドは複数のタグを含みうる。幾つかの実施形態では、6×HisタグおよびNUSタグが、例えば、N末端に存在する。幾つかの実施形態では、タグは切断可能であり、そのため、タグをポリペプチドから、例えば、プロテアーゼにより除去することができる。幾つかの実施形態では、これは、元のポリペプチドに相同的な部分をコードする配列とタグとの間にプロテアーゼ切断部位をコードする配列を含めることにより達成される。例示的なプロテアーゼとしては、例えば、トロンビン、TEVプロテアーゼ、第Xa因子、PreScissionプロテアーゼ等が挙げられる。幾つかの実施形態では、「自己切断」タグを使用する。例えば、PCT/US05/05763を参照されたい。タグをコードする配列は、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関して5'または3'(または両方)に位置しうる。幾つかの実施形態では、タグまたは他の異種配列は、ポリペプチドリンカーによりポリペプチドの残りの部分と隔てられている。例えば、リンカーは、短いポリペプチド(例えば、15~25個のアミノ酸)でありうる。多くの場合、リンカーはセリン、グリシン、および/またはアラニンなどの小さいアミノ酸残基からなる。異種ドメインは、膜貫通ドメイン、分泌シグナルドメイン等を含みうる。

20

30

40

【0091】

本開示のある特定の実施形態では、場合によっては異種部分を除く断片または変異体は、存在するのであれば、元のポリペプチドとの十分な構造類似性を有し、そのためその3次元構造(実際の構造または予測される構造)を元のポリペプチドの構造に重ね合わせた場合、オーバーラップの容積が元のポリペプチドの構造の総容積の少なくとも70%、好まし

50

くは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%である。断片または変異体の部分的または完全な3次元構造は、タンパク質を結晶化させることにより決定してもよく、これは標準的な方法を利用して行うことができる。あるいは、同様に標準的な方法を利用してNMR溶液構造を作成することもできる。MODELER(Sali, A. およびBlundell, T L, J. Mol. Biol., 234, 779-815, 1993)などのモデリングプログラム、または任意の他のモデリングプログラムを利用して、予測される構造を作成することができる。関連ポリペプチドの構造または予測される構造が利用可能であるならば、モデルをその構造に基づくものとする。PROSPECT-PSPPスイートのプログラムを利用することができる(Guo, J T,ら、Nucleic Acids Res. 32 (Web Server issue):W522-5, Jul. 1, 2004)。本開示の実施形態がポリペプチドの変異体に関連している場合、該変異体をコードするポリヌクレオチドが提供されることは理解されよう。

10

【0092】

用語「ベクター」は、細胞への核酸分子の移入、例えば、運搬、輸送等を媒介することができる核酸もしくはウイルスまたはその部分(例えば、ウイルスのキャプシドもしくはゲノム)を指すために本明細書中で使用される。ベクターが核酸である場合、運搬される核酸分子は一般に、ベクター核酸分子に連結、例えば、挿入されている。核酸ベクターは、自律複製を指示する配列(例えば、複製起点)を含んでいてもよく、または宿主細胞DNAへの核酸の一部もしくは全部の組み込みを可能にするのに十分な配列を含んでいてもよい。有用な核酸ベクターとしては、例えば、DNAまたはRNAプラスミド、コスミド、および天然に存在するかもしれない改変されたウイルスゲノムまたはその部分あるいはウイルスキャプシドにパッケージングされうる核酸(DNAまたはRNA)が挙げられる。プラスミドベクターは、典型的には、複製起点および1つ以上の選択マーカーを含む。プラスミドは、ウイルスゲノムの一部または全部(例えば、ウイルスのプロモーター、エンハンサー、プロセッシングシグナルまたはパッケージングシグナル等)を含んでいてもよい。細胞に核酸分子を導入するために使用しうるウイルスまたはその部分は、ウイルスベクターと称される。有用なウイルスベクターとしては、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルスおよび他のボックスウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス)等が挙げられる。ウイルスベクターは、宿主細胞に導入される際に、感染性ウイルスの産生に十分なウイルスの遺伝情報を含んでいる、していてもよい、すなわち、ウイルスベクターは複製欠損性であってもよく、またかかる複製欠損性ウイルスベクターは、治療的使用にとって好ましい場合がある。十分な情報が欠けている場合、その情報は宿主細胞により、または細胞に導入された別のベクターにより供給されうるが、その必要はない。運搬される核酸は、天然に存在するかもしれない改変されたウイルスゲノムまたはその部分に組み込まれていてもよく、あるいは別個の核酸分子としてウイルスまたはウイルスキャプシド内に存在していてもよい。ウイルスゲノムの一部または全部を含むある特定のプラスミドベクター(典型的には、ウイルスキャプシドにパッケージングされうる核酸の転写を指示するのに十分なウイルスの遺伝情報、ならびに／または宿主細胞ゲノムに組み込まれうる核酸を生じさせる、および／もしくは感染性ウイルスを生じさせるのに十分なウイルスの遺伝情報を含む)もまた、時に当分野でウイルスベクターと称されることは理解されよう。ベクターは、該ベクターにより形質転換またはトランスフェクトされた、またはされていない細胞を同定および／または選択する際に適したマーカーをコードする1つ以上の核酸を含んでいる、していてもよい。マーカーとしては、例えば、抗生物質に対する耐性または感受性を増大または低下させるタンパク質(例えば、ピューロマイシン、ハイグロマイシンもしくはブラストサイジンなどの抗生物質に対する耐性を付与するタンパク質をコードする抗生物質耐性遺伝子)または他の化合物、その活性が当分野で公知のアッセイにより検出可能である酵素(例えば、βガラクトシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ)、および形質転換またはトランスフェクトされた細胞の表現型に検出可能な形で影響を及ぼすタンパク質またはRNA(例えば、蛍光タンパク質)が挙げられる。発現ベクターは、調節配列(複数可)、例えば、動作可能に連結された核酸の転写を指示するのに十分な、プロモーターなどの発現制御配列を含むベクター

20

30

40

50

である。調節配列は、エンハンサー配列または上流のアクチベーター配列もまた含みうる。ベクターは、場合によっては、5'リーダーまたはシグナル配列を含んでいてもよい。ベクターは、場合によっては、切断および／もしくはポリアデニル化シグナルならびに／または3'非翻訳領域を含んでいてもよい。ベクターは、発現させる核酸のベクターへの導入を促進するために、1つ以上の適切に配置された制限酵素部位を含むことが多い。発現ベクターは発現のための十分なシスエレメントを含み、発現に必要な、または発現に役立つ他のエレメントは、宿主細胞、またはin vitro発現系により供給されうる。

【0093】

様々な技術を、細胞に核酸分子を導入するために用いることができる。かかる技術としては、リン酸カルシウム、カチオン性脂質、カチオン性ポリマーなどの化合物を使用する、化学物質により促進されるトランスフェクション、リポソーム媒介トランスフェクション、電気穿孔、微粒子銃、またはマイクロインジェクションなどの非化学的方法、および目的の核酸分子を含有するウイルスによる感染(「形質導入」と称されることもある)が挙げられる。マーカーは、ベクターを取り込んだ、典型的には核酸を発現する細胞の同定および／または選択のために使用することができる。細胞を適当な培地で培養することにより、かかる細胞を選択し、場合によっては、安定した細胞株を樹立することができる。

【0094】

本開示をより詳細に記載する前に、本開示は記載した特定の実施形態に限定されるものではなく、従って、当然のことながら、変化しうる、と理解されなければならない。同様に、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるものであるため、本明細書中で使用する用語は単に特定の実施形態を説明するためのものであって、限定を意図したものではないことも理解されなければならない。

【0095】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限および下限の間の、文脈で別に明記しない限りは下限の単位の10分の1までの各介在値、およびその記述された範囲内の任意の他の記述された値または介在値は、本発明に包含される、と理解される。これらのより小さい範囲の上限および下限は、記述された範囲内の明確に除外された限界を条件として、独立してそのより小さな範囲に含まれていてもよく、それらもまた本発明に包含される。記述された範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた本発明に含まれる。

【0096】

ある特定の範囲は、本明細書中では、用語「約」が先行する数値と共に提示される。用語「約」は、本明細書中では、該用語が先行する正確な数、ならびに該用語が先行する数に近いまたは近似する数に文字上のサポートを提供するために使用される。ある数が具体的に記載された数に近いまたは近似するかどうかを判定する際、その近いまたは近似する無記載の数は、それが提示される文脈においては、具体的に記載された数の実質的等価物を提供する数であってもよい。

【0097】

別に定義しない限り、本明細書中で使用する全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野において通常の技術を有する者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中に記載した方法および材料と類似するかまたは等価である任意の方法および材料を本発明の実施または試験に利用することもできるが、本明細書中では代表的な例示的方法および材料を記載する。

【0098】

本明細書中で引用した全ての刊行物および特許は、あたかも個々の刊行物または特許が各々参照により組み込まれると明確かつ個別に示されているかのように、参照により本明細書中に組み込まれ、また刊行物が関連して引用される方法および／または材料を開示および説明するために、参照により本明細書中に組み込まれる。いかなる刊行物の引用も、出願日より前のその開示のためのものであり、本発明が先願発明によりかかる刊行物に先行する権利がないという承認として解釈されるべきではない。さらに、提供される刊行物

の日付は、実際の刊行日とは異なっている場合があり、別々に確認する必要がある場合がある。

【0099】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、文脈で別に明記しない限り、複数の指示対象を含むことに注意されたい。さらに、特許請求の範囲は、あらゆる任意の要素を除外するように起草しうることには注意されたい。従って、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連する「単に(solely)」、「のみ(only)」等の排他的な用語の使用、または「否定的な」限定の使用のための先行詞としての役割を果たすことが意図される。

【0100】

当業者であれば本開示を読めば明らかなように、本明細書中に記載および説明した個々の実施形態は各々、本発明の範囲および精神を逸脱することなく他の幾つかの実施形態のいずれかの特徴と容易に区別されるかまたは組み合わせることができる、別個の構成要素および特徴を有する。列挙した方法はいずれも、列挙した事象の順に、または論理的に可能な他のあらゆる順で、実行することができる。

【0101】

方法

後述の方法に加えて、瘢痕を残さない再生能力と一致する胚パターンの遺伝子発現を示す細胞の産生および使用における用途を見出す方法は、以下、すなわち2006年4月11日に
出願されかつ「Novel Uses of Cells With Prenatal Patterns of Gene Expression」と
題したPCT出願第PCT/US2006/013519号、2006年11月21日に
出願されかつ「Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby」と題した米国特許出願第11/604,047号、および2009年7月16日に
出願されかつ「Methods to Accelerate the Isolation of Novel Cell Strains from Pluripotent Stem Cells and Cells Obtained Thereby」と題した米国特許出願第12/504,630号(例えば、その開示は参照によりその全内容が組み込まれるものとする、2013年6月5日に
出願された米国仮特許出願第61/831,421号、2014年6月3日に
出願されたPCT特許出願第PCT/US2014/040601、および2015年12月7日に
出願された米国特許出願第14/896,664号を参照されたい)に見出すことができ、これらの文献は各々、参照によりその全内容が本明細書中に組み込まれるものとする。

【0102】

ディープラーニングアルゴリズムの設計：データの収集および統合

多様なプラットフォームからのマイクロアレイデータは、Gene Expression Omnibus (GEO)およびArrayExpressから作成またはダウンロードすることができる。集めたサンプルは、非限定的な例として、次の広範な細胞クラス：胚性幹細胞(ESC)、人工多能性幹細胞(iPSC)、胚性前駆細胞(EPC)、成体幹細胞(ASC)および多様な成体細胞型(AC)、のうちの1つに属していてもよい。非限定的な例として、サンプルは、次のマイクロアレイプラットフォーム：Illumina HumanHT-12 V4.0 (GPL10558)、Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947)、Affymetrix HT Human Genome U133A Array (GPL3921)、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Array Set HG-U133A (GPL4557)、Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array (GPL5188)、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (GPL570)、Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Array (GPL571)、Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array (GPL6244)、Affymetrix Human Genome U133A Array (GPL96)、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (GPL11670)、またはRNA-seqデータから取得したデータを含んでもよい。

【0103】

データ処理

AffymetrixおよびIlluminaデータ用の別個の処理パイプラインを利用してもよい。各データセットに対して、プローブデータを生ファイルから抽出し、これをその後遺伝子発現値に変換することができる。Affymetrix関連データセットの処理には凍結RMA(Frozen RMA (fRMA))法(McCall, M. N.,ら、Frozen robust multiarray analysis (fRMA). Biostatist

ics 11, 242-253 (2010) ; McCall, M. N., ら、The Gene Expression Barcode : leveraging public data repositories to begin cataloging the human and murine transcriptomes. Nucleic Acids Res. 39, D10-115 (2011) ; McCall, M. N., ら、Assessing affymetrix GeneChip microarray quality. BMC Bioinformatics 12, 137 (2011) ; McCall, M. N., ら、fRMA ST : frozen robust multiarray analysis for Affymetrix Exon and Gene ST arrays. Bioinformatics 28, 3153-3154 (2012))を利用することが可能であり、該方法によりマイクロアレイを個別に、または少しずつ解析し、その後データを解析のために組み合わせることができる。Illuminaデータに関しては、非正規化ファイルをその後の分位点正規化と併せて利用することができる。

【0104】

プローブ発現データを取得した後、該データを、Illuminaプラットフォームに関してはGEOから入手可能なアノテーションテーブル、またAffymetrixプラットフォームに関してはBioconductorからの「AnnotationDbi」パッケージを利用して遺伝子発現に変換することができる。かかるテーブルには、特定のマイクロアレイプラットフォームのためのプローブ-遺伝子マッピングが含まれている。複数のプローブが同一遺伝子にマッピングされる場合、それらのシグナルを平均化するための幾何平均を利用することができる。遺伝子に変換した後、全データセットを(AffymetrixおよびIlluminaプラットフォームに対して別々に)分位点(quantile)正規化アルゴリズムを用いて処理することができる。分類するサンプルは、訓練データセットに対して決定されたものと同じ一連の分位点を使用して正規化することができる。全てのターゲット・プラットフォームセット(AffymetrixおよびIllumina)に含まれる遺伝子を、各分類器の入力特徴として使用することができる。幾つかの機械学習法を、それらの性能について比較することができる。

【0105】

パスウェイ解析(経路解析)。

パスウェイレベルでの解析のために、各ケースサンプル群を、OncoFinder(Buzdin, A. ら Oncofinder, a new method for the analysis of intracellular signaling pathway activation using transcriptomic data. Front. Genet. 5, 55 (2014))と呼ばれるアルゴリズムを利用して独立して解析することができる。前処理した遺伝子発現データを入力データとすることで、該アルゴリズムはエラー率が低いクロスプラットフォーム・データセット比較を可能とし、また該アルゴリズムは数理的推定を利用して細胞内調節の機能的特徴を取得する能力を有する。調べたサンプル群各々に対して、該アルゴリズムはチューデントのt検定を利用して事例参照(case-reference)比較を実行し、有意に示差的に発現された遺伝子のリストを生成し、さらにパスウェイ活性化の質的尺度としての役割を果たす値であるパスウェイ活性化強度(PAS)を算出する。陽性および陰性のPAS値は、パスウェイのアップレギュレーションとダウンレギュレーションをそれぞれ示している。

【0106】

k近傍法(kNN) :

k近傍法は、回帰に利用可能な、単純なノンパラメトリック法(非パラメータ法)である。この方法の基礎をなす概念は、所与のオブジェクトの値をそのk個の最近傍の値の平均値として予測することである。最適なkの選択は、データの性質によって定義される。本発明では、該方法のサイキット・ラーン実装を利用することができる(Pedregosa, F. ら Scikit-learn : Machine Learning in Python. J. Mach. Learn. Res. 12, 2825-2830 (2011))。使用するための近傍の数が(5~20)、近傍重み付け(均一またはその距離に反比例)、およびメトリック(マンハッタン、ユークリッド、またはミンコフスキー、 $p=3$)であるハイパーパラメータを調整する。

【0107】

ロジスティック回帰(LR)。

ロジスティック回帰は、一連の独立変数 X_i に対する所与の変数 Y の従属をモデル化するために広く利用されている直接的なアプローチである。本発明ではサイキット・ラーン実装を利用する(Pedregosa, F. ら Scikit-learn : Machine Learning in Python. J. Mach.

10

20

30

40

50

Learn. Res. 12, 2825-2830 (2011))。最初に、白色化を伴う主成分分析を利用してデータの次元数を削減し、その後 L_2 正則化により多クラス分類器を訓練した。調整したハイパーパラメータは、主成分の数(100~500)、および正則化強度(0.1~100)であった。

【0108】

サポートベクターマシン(SVM)。

SVMはもう1つの古典的な機械学習アルゴリズムであり、その基本形では、多次元データを複数のクラスに分離する1組の超平面を構築する。非線形カーネルの使用により、SVMは非線形分類を行えるようになる。今回の研究では、本発明者らは該方法のサイキット・ラーン実装を利用した(Edgar, R. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res. 30, 207-210 (2002))。調整したハイパーパラメータは、カーネルのタイプ(線形、シグモイド、3次多項式、および動径基底関数(ガウシアン)カーネル)、ならびに正則化強度(0.1~100)であった。

【0109】

勾配ブースティングマシン(GBM)。

勾配ブースティングは、分類問題および回帰問題のために用いられる機械学習法である。この方法は、予測を生成するために、この場合の分類木のような、弱いモデルのアンサンブルを利用する。本発明者らは、勾配ブースティング分類器を実装するためにXGBoostライブラリ(Kolesnikov, N.ら ArrayExpress update--simplifying data submissions. Nucleic Acids Res. 43, D1113-6 (2015))を利用した。調整したハイパーパラメータは、成長させる木の数(10~100)、各木の最大深度(3~8)、サブサンプリング比率(0.5~1.0)、正則化パラメータ γ (さらに分割する閾値、0.5~1)および葉の重みの最小合計(最小の葉の重み、minimal child weight)(1~5)、およびステップサイズの縮小(0.005~0.05)であった。

【0110】

多クラスのディープニューラルネットワーク(DNN)。

入力層のニューロンの数は、使用した遺伝子の数と同じであった。調整したハイパーパラメータは、隠れ層の数(2~4)、各隠れ層におけるニューロンの数(100~500)、出力層を除く全ての層の活性化関数(ReLU、シグモイド、またはtanh)、 L_2 重み-正則化強度(0.01~0.05)、およびドロップアウト値(0.0~0.5)であった。出力層は、ソフトマックス活性化を利用する。このニューラルネットワークを、Adamオプティマイザー(McCall, M. N., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. Frozen robust multiarray analysis (fRMA). Biostatistics 11, 242-253 (2010))を利用して200エポック訓練した。

【0111】

ディープニューラルネットワークのアンサンブル(DNN ens.)。

各ネットワークの設計は、出力層がシグモイド活性化を用いるただ1つのニューロンを有することを除き、多クラスネットワークと同様である。DNNアンサンブルのハイパーパラメータの最適化を行うのは非常に計算コストが高いため、各ネットワークで、多クラスネットワークに最適であると確認されたハイパーパラメータのセット：200ニューロンからなる2層、ReLU活性化、ドロップアウト0.2、および L_2 重み正則化強度0.03、を使用した。本発明者らは、ペアワイズ(1対1)分類を実行するために、20のバイナリーネットワークを各対象プラットフォームセット(AffymetrixおよびIllumina)で訓練した。その後、本発明者らは、各クラスへの全アンサンブル投票を、4つの1対1ネットワークの和として評価した(これは、他の4つのクラスからのこのクラスのペアワイズ識別を行う)。

【0112】

分類器の訓練

上記ニューラルネットワークのいずれかを利用するためには、本発明者らは、該ネットワークを、選択したデータセットに対して訓練する必要がある。これを行うために、本発明者らは以下のスキームを採用した。

【0113】

最初に、本発明者らは、データセット(公開データリポジトリから収集したもの、なら

10

20

30

40

50

びにBioTime, Inc.により提供されたもの)を前処理することによりプローブデータを遺伝子に変換し、分位点正規化を適用する。

【0114】

その後、本発明者らは、入れ子式の交差検証(nested cross validation)アプローチを採用することによりハイパーパラメータを調整し、分類器性能のバイアスの無い推定を得る。外側と内側の両ループで、訓練セットまたは検証セットのいずれか(ただし両方ではない)に属する同一データセットからのサンプルを用いた、層化ラベル付き3分割交差検証を利用する。

【0115】

外側のループで、本発明者らはデータの一部を保留し、残りのサンプルを使用して分類器のハイパーパラメータを最適化する。その後本発明者らは、見出された最適ハイパーパラメータを用いて分類器を訓練し、さらに該分類器を保留データに対してテストすることにより、ハイパーパラメータが過学習していないことを確認する。ハイパーパラメータの調整は各分割に対して繰り返す。この結果を「外部検証(Ext. validation)」と称する。

【0116】

本発明者らは、ハイパーパラメータを最適化するために、Tree of Parzen Estimators(TPE)アルゴリズム(ハイパーオプト(hyperopt)パッケージに実装されている(Bergstra, J., Yamins, D. & Cox, D. D. Hyperopt: A Python library for optimizing machine learning algorithms; SciPy 2013. in Proceedings of the 12th Python In Science Conference 13-20 (2013)))を利用する。該アルゴリズムが試みる各パラメータセットに対し、本発明者らは3分割交差検証を行い、かつ平均検証スコアを最適化対象として使用する。最も良いハイパーパラメータセットのために、本発明者らは、その平均性能を訓練(「訓練(Training)」)セットおよび内側の交差検証ループ内の検証(「内部検証(Int. validation)」)セットに対して提示する。

【0117】

DNNアンサンブルの訓練および検証スコアのみを提示するが、これは計算コストが高いため本発明者らが該DNNアンサンブルのハイパーパラメータ推定を行っていないからである。

【0118】

【表1】

表1.

方法	Affymetrix	Illumina
kNN	$k=10$, 距離重み付け, $p=3$	$k=5$, 距離重み付け, $p=2$
LR	200 成分, $C=0.34$	200 成分, $C=0.24$
SVM	線形カーネル, $C=0.48$	RBF カーネル, $C=99.94$
GBM	30 の木、深度=5、サブサンプル 0.8、 $\gamma=0.6$, min_child_weight=2, eta=0.005	80 の木、深度=6、サブサンプル 0.5、 $\gamma=1.0$, min_child_weight=3, eta=0.05
DNN	2 隠れ層、100 ニューロン／層、ReLU 活性化、ドロップアウト 0.2、 L_2 0.03	2 隠れ層、200 ニューロン／層、ReLU 活性化、ドロップアウト 0.0、 L_2 0.04

【0119】

サンプルの胚スコアの決定

サンプルが胚の状態にどれだけ近いかを調べるために、本発明者らは、提案されたアプローチのうちの1つを基に構築された、ディープニューラルネットワーク予測器のアンサンブルを利用する。分類するサンプルを、適当なプラットフォームからの訓練サンプルと同じ前処理プロトコルに供する。遺伝子を、訓練したディープニューラルネットワーク予測器の入力に供給する。アンサンブルにより、本発明者らが図21に示す式で示される胚スコア(ES)を算出するために使用する、5つのスコア(各クラスにつき1つ)が生成する。(こ

ここで、 $Class_{1-5}$ は各クラスに対する予測器の出力であり、かつ w_{1-5} は選択したクラスに対する胚発生の任意の程度である(本発明者らは、 $w_{ESC}=1.0$ 、 $w_{iPSC}=0.9$ 、 $w_{EPC}=0.7$ 、 $w_{ASC}=0.5$ 、 $w_{AC}=0.0$ と割り当てた)。

【0120】

結果として、前記のシステムの出力は、各サンプルに対する胚スコアを算出した。

【0121】

どの遺伝子が細胞発生の各段階の優れたマーカーであるかを調べるために、本発明者らは、DNNの重み行列から各特徴の重要度を直接推定できる、Yacoub, M. & Bennani, Y. HVS: A Heuristic for Variable Selection in Multilayer Artificial Neural Network Classifier. in Intelligent Engineering Systems Through Artificial Neural Networks 527-532 (1997)に提案されている方法を利用した。この方法では、全ての入力特徴がはるばる出力層まで伝播するその大きさを測定する。多層ニューラルネットワークの場合、発現は図22に示すように記載することが可能であり、ここで w^l は層 l のDNN重み行列であり、 w_{ij}^l は層 l のニューロン i と j の間の結合重み値であり、 1^{l0} は全て 1 の出力層のサイズのベクトルであって、計算された入力特徴の重要度のベクトルに適合する。

【0122】

検証のために、本発明者らは、何回特定の特徴が木を分割するために使用されるか(Fスコア)を測定することによって、訓練した多クラスGBM分類器から遺伝子の重要度を測定した。

【0123】

本発明者らは、GBMまたはDNNにより採点した重要な遺伝子の間に有意な重複を見出し(図4)、このことは、両方法が、予測を行うために、類似したセットの遺伝子に対してかなりの程度まで応答することを示している。

【0124】

RNAi

非限定的な例として、dsRNAを、隣接するT7プロモーターを有するPCRで生成した鋳型を使用してin vitro転写反応物(Promega)から調製し、フェノール抽出およびエタノール沈殿により精製してから、水への再懸濁後にアニーリングさせた。未処置の実験動物に、誘導した組織傷害の後、手術の2時間後の最初の注入から開始して、 4×30 nLのdsRNAを3日連続して注入する。

【0125】

TRモジュレーションおよびiTRモジュレーター

本開示は、新規のiTRモジュレーターおよびその使用の方法を提供する。幾つかの態様では、本発明は、該iTRモジュレーターの濃度を変更する薬剤を、その必要がある多細胞生物に投与することを含む、再生を増強する新規方法を提供する。

【0126】

本出願人らは、アホロートルにおける切断四肢の再生、MRLもしくはアフリカトゲマウスにおける皮膚の再生、またはプラナリアにおける全身体部分の再生といった著しいTRの能力を示す原始的な動物が、単に各組織の正常な胚発生を繰り返すことによりそうしていると教示する。さらに、本出願人らは、TR抵抗性の哺乳動物、例えば殆どのマウス種およびヒトにおける、損傷組織を再生できない原因は、ある特定の胚性遺伝子転写がこれらのTR抵抗性動物におけるEFT時に変更されていることにありと教示する。さらに、本出願人らは、TR抵抗性動物におけるEFT時に変更されるこれらの遺伝子発現の胚特異的パターンの、特定のものの回復は、形成中心因子に対する応答を含む、任意の組織における再生の能力を誘導し、複雑な組織再生およびそれに伴う瘢痕形成の減少をもらしうると教示する。最後に、本出願人らは、哺乳動物種においてTRを誘導する新規の薬剤およびそれに関連する方法を教示する。該方法はin vivoで哺乳動物種における、特にホモサピエンス種におけるTRを促進する。

【0127】

胎仔および成体動物におけるその発現がTRを阻害する遺伝子を、本明細書中では「TRイ

10

20

30

40

50

ンヒビター」と称し、また胎仔および成体の細胞におけるその発現の欠如だけでなく発生の胚期におけるその発現もTRを促進する遺伝子を、本明細書中では「TRアクチベーター」と称する。集合的に、TRインヒビター遺伝子およびTRアクチベーター遺伝子を本明細書中ではiTR遺伝子と称する。TRをもたらず様式でTRアクチベーターおよびTRインヒビターのレベルを変更する分子を、本明細書中では「iTR因子」と称する。iTR遺伝子および、iTR遺伝子のタンパク質産物は、イソギンチャクから哺乳動物に及ぶ動物間で保存されていることが多い。本明細書中で言及する、遺伝子がコードするタンパク質配列、および遺伝子をコードする核酸(例えば、mRNA)の配列、例えば数多くの異なる非ヒト動物種に由来するそれらの配列は当分野で公知であり、また例えば、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)(www.ncbi.nih.gov)で利用可能なデータベースなどの、公的に利用可能なデータベース中に見出すことができる。

10

【0128】

TR阻害遺伝子COX7A1は、正常な組織においては上皮細胞ではなく間質細胞で主に発現されることが観察されたが、上皮培養物中でも低いレベルで発現された。新生物の場合、該遺伝子は、骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに一部の神経膠腫、癌腫、および腺癌などの多くの間質癌でダウンレギュレートされていることが観察された。このことは、ワールブルク効果として知られる、癌における解糖系の亢進という観察結果と一致するが、COX7A1発現の欠如はこれまでワールブルク効果に包含されていなかった。TR遺伝子は、成体における癌を予防するために部分的に胚から胎仔への発生の移行時に変更されることを本出願人らが提唱していることから、間質性腫瘍および一部のCNS腫瘍および上皮性腫瘍におけるCOX7A1の抑制は、間質細胞を胚の状態に戻し、それによって発癌を促進するであろう。発現が欠如しているかかる腫瘍におけるCOX7A1の発現の外因性誘導は、それ故に、部分的にはp53およびHIF1 α の活性を変更し、それによって細胞増殖を阻害しかつ癌細胞におけるアポトーシスを増加させることによる、治療効果を有するであろう。

20

【0129】

別の実施形態では、本発明は、癌細胞を検出する手段を提供する。研究者が大半の癌細胞型に関連する異常のマーカーを同定したことは滅多にない。本明細書中に記載した通り、胚とその胎仔および成体の対応物とを識別するマーカーを使用することにより、成体パターンを発現を示す正常細胞と、胚パターンを示す悪性細胞とを識別することができる。かかる検出方法は、胎仔/成体パターンではなく胚パターンの、COX7A1、NAALADL1、AMH、ならびにPCDHA4、PCDHB2、およびPCDHGA12を含むがこれらに限定されない α 、 β 、および γ クラスター型プロトカドヘリン遺伝子からの遺伝子の発現の検出を含むが、これらに限定されない。これは、悪性細胞(血液細胞を除く)を同定する際に有用であるだけでなく、その胎仔/成体パターンの発現を特徴とする、一般的に使用される化学療法薬に耐性を示す腫瘍を同定する際にも有用である。

30

【0130】

本開示は、iTR遺伝子をモジュレートする数多くの異なる方法、およびiTR遺伝子をモジュレートするのに有用な、様々な異なる化合物を提供する。一般に、iTR因子は、例えば、小分子、核酸、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、脂質、糖質等でありうる。本発明の幾つかの実施形態では、iTR因子は、細胞により産生されるTRインヒビターRNAの量を減少させることにより、および/またはTRインヒビター遺伝子の活性のレベルを低下させることにより、阻害する。TRインヒビターを標的とする場合、TRインヒビター遺伝子の産物のレベルを低減する因子を同定し、研究および治療に使用する。該TRインヒビター遺伝子は、図10中「胎仔/成体マーカー」の項目の下に列挙したTRインヒビター遺伝子のいずれか1つ、またはその組み合わせでありうる。TRインヒビター遺伝子RNAの量は、細胞によるTRインヒビターRNA合成の合成を阻害する(「TRインヒビター遺伝子発現を阻害する」とも称される)ことにより、例えば、TRインヒビター遺伝子をコードするmRNAの量を低減することにより、またはTRインヒビター遺伝子をコードするmRNAの翻訳を低減することにより、減少させることができる。かかる因子は、非限定的な例としては、図10中「胎仔/成体マーカー」の項目の下に列挙したTRインヒビター遺伝子内の配列を標的とする

40

50

RNAiでありうる。

【0131】

幾つかの実施形態では、TRインヒビター遺伝子発現をRNA干渉(RNAi)により阻害する。当分野で公知であるように、RNAiは、ある遺伝子との配列一致性を有する二本鎖RNAの細胞内の存在が、典型的には該遺伝子から転写されたmRNAの切断または翻訳抑制の結果として、該遺伝子の発現の配列特異的な阻害をもたらすプロセスである。RNAiによる発現の阻害を引き起こすのに有用な化合物(「RNAi剤」)としては、低分子干渉RNA(siRNA)、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、およびmiRNA様分子が挙げられる。

【0132】

当業者であれば、哺乳動物のTRインヒビター遺伝子(例えば、ヒトTRインヒビター遺伝子)の発現を阻害するのに有用なRNAi剤(例えば、siRNA)のための配列を、該TRインヒビター遺伝子が同定された後は、容易に設計することができる。幾つかの実施形態では、かかる配列を、「オフターゲット」効果を最小限に抑えるよう選択する。例えば、TRインヒビター遺伝子mRNA中に存在しかつ目的の種において発現される他のmRNA中には存在しない(または目的の種のゲノム中に存在しない)配列に相補的である配列を使用してもよい。位置特異的的化学修飾を利用することにより潜在的なオフターゲット効果を低減してもよい。幾つかの実施形態では、TRインヒビター遺伝子mRNAを標的とする少なくとも2つの異なるRNAi剤、例えばsiRNAを、組み合わせて使用する。幾つかの実施形態では、マイクロRNA(人工的に設計したマイクロRNAであってもよい)を使用することにより、TRインヒビター遺伝子発現を阻害する。

【0133】

本発明の幾つかの実施形態では、TRインヒビター遺伝子発現を、TRインヒビター遺伝子をコードするmRNAに完全に、または実質的に相補的である一本鎖オリゴヌクレオチドを含むアンチセンス分子を使用して阻害する。該オリゴヌクレオチドは、例えば、RNアーゼHによるmRNAの分解または立体障害による翻訳の阻止をもたらすTRインヒビター遺伝子mRNAにハイブリダイズする。本発明の他の実施形態では、リボザイムまたは三重鎖核酸を使用してTRインヒビター遺伝子発現を阻害する。

【0134】

本発明の幾つかの実施形態では、TRインヒビターのインヒビターは、TRインヒビタータンパク質の少なくとも1つの活性を阻害する。TRインヒビター活性は、該TRインヒビタータンパク質を、該TRインヒビタータンパク質と物理的に相互作用する化合物と接触させることにより、減少させることができる。かかる化合物は、例えば、TRインヒビタータンパク質の構造を(例えば、該構造を共有結合的に修飾することにより)変更する、および/またはTRインヒビタータンパク質と補因子もしくは基質などの1つ以上の他の分子(複数可)との相互作用を遮断する場合がある。幾つかの実施形態では、阻害または低減は、基準レベル(例えば、対照レベル)の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%の減少であってもよい。対照レベルは、前記因子の非存在下で生じるTRインヒビターのレベルであってもよい。例えば、TR因子は、TRインヒビタータンパク質のレベルを、試験した条件下、該因子の非存在下で生じるレベルの95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、40%、30%、25%、20%、10%、または5%以下まで低減する場合がある。幾つかの実施形態では、TRインヒビターのレベルは、試験した条件下、前記因子の非存在下で生じるレベルの75%以下まで低減される。幾つかの実施形態では、TRインヒビターのレベルは、試験した条件下、TR因子の非存在下で生じるレベルの50%以下まで低減される。幾つかの実施形態では、TRインヒビターのレベルは、試験した条件下、iTR因子の非存在下で生じるレベルの25%以下まで低減される。幾つかの実施形態では、TRインヒビターのレベルは、試験した条件下、iTR因子の非存在下で生じるレベルの10%以下まで低減される。幾つかの場合、対照レベルと比較したモジュレーション(例えば、阻害または低減)のレベルは、統計学的に有意である。本明細書中で使用する場合、「統計学的に有意」とは、適当な統計学的検定(例えば、ANOVA、t検定等)を利用した際の、0.05

未満のp値、例えば、0.025未満のp値または0.01未満のp値を指す。

【0135】

本発明の幾つかの実施形態では、ある化合物はTRインヒビタータンパク質を直接阻害する、すなわち、該化合物は、TRインヒビタータンパク質を、該TRインヒビターとiTR因子との物理的相互作用(結合)を伴う機構により阻害する。例えば、TRインヒビターのiTR因子への結合は、該TRインヒビターが反応を触媒するその能力に干渉しうるか、かつ／または該TRインヒビターの活性部位を塞ぎうる。様々な化合物を使用することにより、TRインヒビターを直接阻害することができる。TRインヒビターを直接阻害する例示的な化合物は、例えば、小分子、抗体、またはアプタマーでありうる。

【0136】

本発明の幾つかの実施形態では、iTR因子はTRインヒビターに共有結合的に結合する。例えば、かかる化合物は、酵素活性に必要とされるアミノ酸残基(複数可)を修飾する場合がある。幾つかの実施形態では、iTR因子は、TRインヒビターのアミノ酸側鎖と反応する、1つ以上の反応性官能基、例えば、アルデヒド、ハロアルカン、アルケン、フルオロホスホネート(例えば、アルキルフルオロホスホネート)、マイケルアクセプター、フェニルスルホネート、メチルケトン、例えば、ハロゲン化メチルケトンもしくはジアゾメチルケトン、フルオロホスホネート、ビニルエステル、ビニルスルホン、またはビニルスルホンアミドを含む。幾つかの実施形態では、iTR因子インヒビターはTRインヒビターと物理的に相互作用する化合物を含み、ここで該化合物は、反応性官能基を含む。幾つかの実施形態では、TRインヒビターと物理的に相互作用する化合物の構造を、反応性官能基を組み入れるために修飾する。幾つかの実施形態では、該化合物はTRインヒビターの基質類似体または遷移状態類似体を含む。幾つかの実施形態では、該化合物は、TRインヒビター活性部位の、またはその付近のTRインヒビターと相互作用する。

【0137】

他の実施形態では、iTR因子は、TRインヒビターならびに／またはTRインヒビターおよびTRインヒビター基質を含有する複合体と非共有結合的に結合する。幾つかの実施形態では、iTR因子はTRインヒビターの活性部位に非共有結合的に結合する、および／またはTRインヒビター活性部位への接近のために基質(複数可)と競合する。幾つかの実施形態では、iTR因子は、TRインヒビターに、試験した条件下、例えば、リン酸緩衝生理食塩水などの生理学的に許容しうる溶液中、約 10^{-3} M以下、例えば 10^{-4} M以下、例えば 10^{-5} M以下、例えば、 10^{-6} M以下、 10^{-7} M以下、 10^{-8} M以下、または 10^{-9} M以下の K_d で結合する。結合親和性は、例えば、当分野で公知である、表面プラズモン共鳴(例えば、Biacore systemを用いる)、等温滴定熱量測定、または競合的結合アッセイを利用して測定することができる。幾つかの実施形態では、該インヒビターはTRインヒビターの基質類似体または遷移状態類似体を含む。

【0138】

TRアクチベーターの活性を増大させる場合、図10中「胚マーカー」の項目の下に列挙したTRアクチベーター遺伝子の組み合わせのうちのいずれか1つを使用してもよい。これらの遺伝子の産物のレベルを、本明細書中に記載したベクターを使用して導入してもよい。

【0139】

他の実施形態では、iTR因子は、RNAを細胞に、直接、または細胞と十分な期間反応させることができれば多能性を誘導することができるがより少ない時間でiTRを引き起こしうる遺伝子発現構築物により、導入することができる構築物である。好ましくは、RNAは多能性へのリプログラミングに必要とされるRNAの全ては含まず、代わりにLIN28AまたはLIN28Bのみを、場合によってはテロメラーゼの触媒成分(TERT)のRNAなどのテロメア長を増加させる薬剤と共に含む。最も好ましくは、iTRを誘導するための薬剤は、場合によってはTERTをコードするRNAもしくは遺伝子などのテロメア長を増加させる薬剤と組み合わせた、ならびに／または本明細書中に開示した、iTRにとって重要な因子、例えば0.05~5mMのバルプロ酸、好ましくは0.5 mMのバルプロ酸、1~100 ng/mLのAMH、好ましくは10 ng/mLのAMH、および2~200 ng/mLのGFER、好ましくは20 ng/mLと組み合わせた、GFERなどのL

10

20

30

40

50

IN28AまたはLIN28Bコード化タンパク質により誘導される遺伝子／因子である。in vivoで投与する場合、かかる因子を、好ましくは徐放性ヒドロゲルマトリックス、例えば、HyStemマトリックスなどの化学的に修飾されかつ架橋されたヒアルロン酸およびコラーゲンからなるものとして投与する。

【0140】

iTR因子のためのレポーターベースのスクリーニングアッセイ

本発明は、iTR因子を、(a)本明細書中に記載したTRアクチベーター遺伝子のうちの1つのプロモーター（例えばCOX7A1のためのもの）によりその発現が駆動されるGFPまたはβガラクトシダーゼなどの容易に検出可能なマーカーを含むレポーター分子、を使用して同定する方法を提供する。本発明は、試験化合物がTRアクチベーター遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうか、および／またはTR阻害遺伝子の発現を阻害するかどうかを判定することを必要とするスクリーニングアッセイを提供する。本発明はさらに、この方法を実施するのに有用なレポーター分子および組成物を提供する。一般に、本発明の方法を利用して同定される化合物は、TRアクチベーターまたはインヒビター遺伝子をそれぞれ増加または減少させる機構のいずれかにより作用しうる。COX7A1プロモーターの場合、ヒト遺伝子の5'末端に隣接するプロモーター配列は、ATG翻訳開始コドンまで-756塩基の位置に特徴付けられている(Yu, M.,ら Biochimica and Biophysica Acta 1574 (2002) 345-353)。大抵のcDNAの転写開始部位は、該翻訳開始コドンの-55塩基の位置であることが認められた。

【0141】

COX7A1の発現は組織特異的であるものの、プロモーター、ならびに遺伝子配列の残りの部分は、多くのハウスキーピング遺伝子のプロモーターと同様に、CpGアイランドに存在する。CpGアイランドは、少なくとも200塩基の範囲にわたる、ゲノムにとっては平均的で予想される含有量のジヌクレオチドを上回る、豊富なCGジヌクレオチドを特徴とする。該プロモーターは、幾つかの調節結合部位配列、すなわち、-524位のMEF2、ならびにそれぞれ-58位、-279位、および-585位の3つのEボックス(E1、E2、およびE3と特徴付けられる)を含み、Eボックスはミオゲニン(myogenic)ファミリーの調節タンパク質のメンバーに結合するDNA結合部位(CAACTG)である。さらに、約-95~-68塩基の領域に、転写因子Sp1により認識されるものに類似した、複数のCGに富むセグメントが存在する。

【0142】

GRCh38.p7プライマリアセンブリで特徴付けられる遺伝子それ自体は、ヒト第18染色体上の36150922位と36152869位の間の1948塩基を占めており、4つのエキソンとその間に散在する3つのイントロンを含む。遺伝子配列は、そのプロモーター配列と共に、NCBIにおいて遺伝子座識別子(locus identifier)AF037372で公開されている。

【0143】

レポーター分子、細胞及び膜

一般に、本発明のレポーター分子において有用な検出可能な部分としては、検出可能な蛍光シグナル、化学発光シグナル又は生物発光シグナルを生成又は消光する発光化合物又は光吸収化合物が挙げられる。いくつかの実施形態において、TRアクチベーター遺伝子の活性化又はTR阻害遺伝子(TR抑制遺伝子)の阻害(抑制)は検出可能な部分の液体培地への放出をもたらし、培地(又はそのサンプル)中に存在する放出された検出可能な部分によって生成又は消光されるシグナルが検出される。いくつかの実施形態において、得られたシグナルは検出可能な部分の特性に変化を引き起こし、そのような変化は、例えば、光シグナルとして検出され得る。例えば、シグナルは、検出可能な部分による電磁放射線(例えば、スペクトルの赤外部分、可視部分又はUV部分内の波長を有する放射線)の放射又は吸収を変化させることができる。いくつかの実施形態において、レポーター分子は蛍光部分又は発光部分を含み、第2の分子は蛍光部分又は発光部分を消光する消光剤として機能する。そのような変化は、当分野で公知の装置及び方法を使用して検出することができる。

【0144】

本発明の多くの実施形態において、レポーター分子は、細胞によって発現され得る遺伝的にコード可能な分子であり、また検出可能な部分は、例えば、検出可能なポリペプチド

を含む。したがって、いくつかの実施形態において、レポーター分子は、蛍光ポリペプチド、例えば、緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質、サファイア色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、赤色蛍光タンパク質、オレンジ色蛍光タンパク質及びシアン蛍光タンパク質、並びにそれらの誘導体(例えば、高感度GFP)を含むポリペプチド;単量体赤色蛍光タンパク質及び誘導体、例えば「mFruits」として知られているもの、例えば、mCherry、mStrawberry、mTomatoなど、並びに発光タンパク質、例えばエクオリンである。(いくつかの実施形態において、蛍光又は発光は、1つ以上の追加の分子、例えばイオン、例えばカルシウムイオン、及び/又は補欠分子族、例えばセレンテラジンの存在下で生じることが理解されよう。)いくつかの実施形態において、検出可能な部分は、基質に作用して蛍光生成物、発光生成物、有色生成物又は他の検出可能な生成物を生成する酵素を含む。検出可能な部分として有用となり得る酵素の例は、ルシフェラーゼ; β -ガラクトシダーゼ;西洋ワサビペルオキシダーゼ;アルカリホスファターゼ;などが挙げられる。(酵素が反応生成物の検出によって検出されることは理解されよう。)いくつかの実施形態において、検出可能な部分は、第2の薬剤、例えば、標識された(例えば蛍光標識された)抗体などを使用して容易に検出することができるポリペプチドタグを含む。例えば、HA、Myc、又は各種の他のペプチドタグに結合する蛍光標識された抗体を利用することができる。したがって、本発明は、検出可能な部分を直接的に検出することができる(すなわち、それは第2の薬剤との相互作用を必要とすることなく検出可能なシグナルを生成する)実施形態、並びに検出可能な部分が第2の薬剤と相互作用し(例えば、結合及び/又は反応し)、そのような相互作用が、例えば検出可能なシグナルの生成を生じることにより、又は第2の薬剤が直接的に検出可能である理由により検出可能な部分を検出可能にする実施形態を包含する。検出可能な部分が第2の薬剤と相互作用して検出可能なシグナルを生成する実施形態において、第2の薬剤と反応し得る検出可能な部分が第2の薬剤による作用を受け、検出可能なシグナルを生成する。多くの実施形態において、シグナルの強度は、例えば、評価されるサンプル中に存在するか、画像化される領域内に存在する検出可能な部分の量の指標を提供する。いくつかの実施形態において、検出可能な部分の量は、任意選択で、シグナル強度に基づいた、例えば相対基準又は絶対基準に対して定量化される。

【0145】

本記載は、本発明のレポーターポリペプチドをコードする配列を含む核酸を提供する。いくつかの実施形態において、核酸は、本発明のレポーターポリペプチドの前駆体ポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリペプチドをコードする配列は、ポリペプチドをコードしているmRNAの転写を指示するのに適切な発現制御エレメント(例えば、プロモーター又はプロモーター/エンハンサー配列)に作動可能に連結される。本発明は、核酸を含む発現ベクターをさらに提供する。適切な発現制御エレメントの選択は、例えば、核酸が発現される細胞型及び種に基づき得る。当業者は、適切な発現制御エレメント及び/又は発現ベクターを容易に選択することができる。いくつかの実施形態において、発現制御エレメント(複数可)は調節可能であり、例えば誘導性又は抑制性である。細菌細胞における使用に適した例示的なプロモーターとしては、例えばLac、Trp、Tac、araBAD(例えばpBADベクター中)、ファージプロモーター、例えばT7又はT3が挙げられる。哺乳動物細胞における発現を指示するのに有用な例示的な発現制御配列としては、例えば、SV40の初期プロモーター及び後期プロモーター、アデノウイルス若しくはサイトメガロウイルス最初期プロモーター、又はウイルスプロモーター/エンハンサー配列、レトロウイルスLTR、哺乳動物遺伝子由来のプロモーター若しくはプロモーター/エンハンサー、例えばアクチン、EF-1アルファ、ホスホグリセリン酸キナーゼなどが挙げられる。調節可能な(例えば、誘導性又は抑制性)発現系、例えばTet-On系及びTet-Off系(テトラサイクリン及び類似体、例えばドキシサイクリンにより調節可能)、並びに小分子、例えばホルモン受容体リガンド(例えば、ステロイド受容体リガンド、これはステロイドであってもステロイドでなくてもよい)、金属調節系(例えばメタロチオネインプロモーター)などによって調節され得るその他のもの。

【0146】

本記載は、そのような核酸及び/又はベクターを含む細胞及び細胞株をさらに提供する。いくつかの実施形態において、細胞は真核細胞、例えば真菌細胞、植物細胞又は動物細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は脊椎動物細胞、例えば哺乳動物細胞、例えばヒト細胞、非ヒト霊長類細胞、又は齧歯動物細胞である。多くの場合、細胞は、細胞株のメンバー、例えば、培養中に無期限に増殖する能力を獲得した樹立細胞株又は不死化細胞株である(例えば、変異又は遺伝子操作の結果として、例えばテロメラーゼの触媒成分の構成的発現)。多数の細胞株が当分野において公知であり、本発明において使用することができる。哺乳動物細胞株としては、例えば、HEK-293(例えばHEK-293T)、CHO、NIH-3T3、COS及びHeLa細胞株が挙げられる。いくつかの実施形態において、細胞株は腫瘍細胞株である。他の実施形態において、細胞は非腫瘍形成性であり、及び/又は腫瘍由来ではない。いくつかの実施形態において、細胞は接着細胞である。いくつかの実施形態において、非接着細胞が使用される。いくつかの実施形態において、発現されるTRアクチベーター遺伝子又は発現されないTRインヒビター遺伝子のサブセットを自然に有することが明らかになっている細胞型又は細胞株の細胞が使用される。細胞が1つ以上のTRアクチベーター遺伝子又はインヒビター遺伝子を欠損している場合、その細胞に遺伝子操作を行い、そのようなタンパク質(複数可)を発現させることができる。いくつかの実施形態において、本発明の細胞株は単一細胞に由来する。例えば、細胞の集団は、レポーターポリペプチドをコードしている核酸をトランスフェクションすることができ、単一細胞由来のコロニーを培養で選択し増殖させることができる。いくつかの実施形態において、細胞は、レポーター分子をコードする発現ベクターを一過的にトランスフェクトされる。細胞は、異なる検出可能なポリペプチドを任意選択で発現する制御プラスミドをコトランスフェクトされ、トランスフェクション効率を(例えば、アッセイの多数回実行にわたって)制御することができる。

10

20

【0147】

TRアクチベーターポリペプチド及びTRインヒビターポリペプチド並びに核酸

TRアクチベーター遺伝子及びTRインヒビター遺伝子を図10に列挙する。それぞれ「胚マーカー」及び「胎児/成体マーカー」の項目下で列挙している。本発明の方法において有用なTRアクチベーターポリペプチド及びTRインヒビターポリペプチドは、様々な方法により取得することができる。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、組換えDNA技術を使用して産生される。組換えタンパク質発現に関する標準的な方法を使用することができる。TRアクチベーター遺伝子又はTRインヒビター遺伝子をコードしている核酸は、例えば、遺伝子を発現する細胞から、(例えば、PCR若しくは他の増幅方法により、又はクローニングにより)、或いはcDNA配列ポリペプチド配列に基づいた化学合成、又はin vitro転写により容易に取得することができる。当業者には、遺伝子コードの縮重により、遺伝子が多数の異なる核酸配列によってコードされ得ることが公知であろう。任意選択で、配列は、選択の宿主細胞における発現のためコドン最適化がなされる。遺伝子は、細菌、真菌、動物若しくは植物の細胞又は生物で発現させることができる。遺伝子は、自然にそれを発現する細胞から、又はタンパク質をコードしている核酸が一過的に若しくは安定的に導入された細胞から、例えば遺伝子をコードしている発現ベクターを含有する細胞から、単離することができる。いくつかの実施形態において、遺伝子は、培養中に細胞によって分泌され、培養培地から単離される。

30

40

【0148】

本発明のいくつかの実施形態において、TRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドの配列は、本発明のスクリーニング方法において使用される。天然に存在するTRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドは、そのゲノムがTRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドをコードする任意の種、例えばヒト、非ヒト霊長類、齧歯動物などに由来し得る。天然に存在するTRアクチベーター又はTRインヒビターと同一の配列のポリペプチドは、本明細書において、場合により「天然TRアクチベーター/インヒビター」と呼ばれることがある。本発明において使用するTRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドは、分泌シグナル配列又

50

はその一部を含んでいてもよく、含んでいなくてもよい。例えば、ヒトTRアクチベーター又はTRインヒビターのアミノ酸20~496(又は異なる種のTRアクチベーター若しくはTRインヒビターの対応するアミノ酸)を含むか又はそれらからなる成熟TRアクチベーター又はTRインヒビターを使用することができる。

【0149】

いくつかの実施形態において、TRアクチベーター又はTRインヒビターの変異体又は断片を含むか又はそれらからなるポリペプチドが使用される。TRアクチベーター変異体又はTRインヒビター変異体は、TRアクチベーター又はTRインヒビターに対して、1個以上のアミノ酸の置換、付加又は欠失により異なるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、TRアクチベーター変異体又はTRインヒビター変異体は、ヒトTRアクチベーター若しくはTRインヒビターの少なくともアミノ酸20~496又はマウスTRアクチベーター若しくはTRインヒビターのアミノ酸20~503の少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%と、(例えば、ヒト又はマウス由来の)TRアクチベーター又はTRインヒビターの少なくともアミノ酸20~496が少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、TRアクチベーター変異体又はTRインヒビター変異体は、ヒトTRアクチベーター若しくはTRインヒビターの少なくともアミノ酸20~496又はマウスTRアクチベーター若しくはTRインヒビターのアミノ酸20~503と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、TRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドは、ヒトTRアクチベーター若しくはTRインヒビターの少なくともアミノ酸20~496又はマウスTRアクチベーター若しくはTRインヒビターのアミノ酸20~503と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるポリペプチドを含む。TRアクチベーター変異体若しくはTRインヒビター変異体又は断片をコードする核酸は、例えば部位特異的突然変異誘発を使用し、例えば天然TRアクチベーター若しくはTRインヒビターをコードするDNAを改変することによって、又は他の標準的な方法によって容易に生成され、TRアクチベーター変異体若しくはTRインヒビター変異体又は断片を生成するために使用することができる。例えば、融合タンパク質は、TRアクチベーター又はTRインヒビターをコードする配列を、異種部分をコードしている配列を提供するベクターにクローニングすることによって生成することができる。いくつかの実施形態において、タグ付きTRアクチベーター又はTRインヒビターが使用される。例えば、いくつかの実施形態において、例えばそのC末端に6xHisタグを含むTRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドが使用される。

【0150】

試験化合物

広範囲の試験化合物を、iTR因子及びiTRのグローバルモジュレーターを同定するための本発明の方法において使用することができる。例えば、試験化合物は、遺伝子OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、LIN28A及びLIN28B単独のmRNA並びに種々の組合せを含めた、本明細書に記載のものを含むがこれらに限定されない、小分子、ポリペプチド、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、炭水化物、抗体又はハイブリッド分子であってもよく、また小分子化合物との種々の組合せ、例えば、以下の化合物の組合せであってもよい:CHIR99021を含むがこれらに限定されないグリコーゲンシンターゼ3(GSK3);SB431542、A-83-01、及びE616452を含むがこれらに限定されないTGF- β シグナル伝達のインヒビター;バルプロ酸、フェニル酪酸塩、及びn-酪酸塩を含むがこれらに限定されない、脂肪酸化合物を含むがこれらに限定されないHDACインヒビター;トラボキシンB及びデブシペプチドを含む環状テトラペプチド;ヒドロキサム酸、例えばトリコスタチンA、ポリノスタット(SAHA)、ペリノスタット(PXD101)、LAQ824、パノビノスタット(LBH589)、ベンザミド系エンジノスタット(MS-275)、CI994、モチエノスタット(MGCD0103);サーチェイン阻害剤ニコチンアミド、NADの種々の誘導体、ジヒドロクマリン、ナフトピラノン、及び2-ヒドロキシナフタレンアルデヒド、若しくはIV(HDAC11)脱アセチル化酵素を含む、クラスI(HDAC1、HDAC2、HDAC3及びHDAC8)、クラスIIA(HDAC4、HDAC5、HDAC7及びHDAC9)、ク

ラスIIB(HDAC6及びHDAC10)、クラスIII(SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6若しくはSIRT7)を特異的に標的とするもの;パルネートを含むがこれに限定されないH3K4/9ヒストンデメチラーゼLSD1のインヒビター;EPZ004777を含むがこれに限定されないDot1Lのインヒビター;Bix01294を含むがこれに限定されないG9aのインヒビター;DZNepを含むがこれに限定されないEZH2のインヒビター、RG108を含むがこれに限定されないDNAメチルトランスフェラーゼのインヒビター;5-アザ-2'-デオキシシチジン(商品名Vidaza及びAzadine);DNAメチル化を抑制し、脱メチル化の第一段階である5hmCを増加させるTet1を増加させ得るビタミンC;PS48を含むがこれに限定されない3'ホスホイノシチド依存性キナーゼ1のアクチベーター;ケルセチン及びフルクトース2,6-ビスホスフェート(ホスホフルクトキナーゼ1のアクチベーター)を含むがこれらに限定されない解糖の促進剤;ケルセチンを含むがこれに限定されないHIF1転写複合体の活性を促進する薬剤;AM580、CD437、及びTTNPBを含むがこれらに限定されないRARアゴニスト;レスベラトロールを含むがこれに限定されない低酸素症を模倣する薬剤;テロメラゼの触媒成分(TERT)の外因性発現を含むがこれに限定されないテロメラゼ活性を増加させる薬剤、LSD1のダウンレギュレーションを介したエピジェネティック修飾を促進する薬剤、リチウムを含むがこれに限定されないH3K4特異的ヒストンデメチラーゼ;又はPD032590を含むがこれに限定されないMAPK/ERK経路のインヒビター。このような化合物は、例えば、COX7A1若しくはNAALADL1又は本明細書に記載のiTRの他のインヒビターの低下した発現をアッセイすることにより、及び/又はPCDHB2若しくはAMH又は本明細書に記載のiTRの他のアクチベーターの増大した発現をアッセイすることにより、グローバルiTRのマーカーを使用して、in vitroで培養した細胞に対して、或いはin vivoでの損傷組織若しくは病変組織において、或いはin vivoでの動物の寿命のモジュレートにおいて、iTRの効果を最適化するために様々な組合せ、濃度で、また異なる期間、投与することができる。

【0151】

COX7A1、PLPP7、及びNAALADL1遺伝子の発現、並びにDNMT3B、及びHELLS又はTra-1-60、Tra-1-81、及びSSEA4をそれぞれ含む多能性の遺伝子発現又は遺伝子マーカーのTRパターンに関するin vitroアッセイを実施し、標的細胞を多能性に戻すことなく、iTR遺伝子発現のグローバルパターンを最適化する。スクリーニングされる個々の薬剤及び薬剤の組合せの例は、OCT4、SOX2、KLF4、MYC及びLIN28A;OCT4;KLF4;OCT4、KLF4;OCT4、KLF4、LIN28A;OCT4、KLF4、LIN28B;SOX2;MYC;NANOG;ESRRB;NT5A2;OCT4、SOX2、KLF4、及びLIN28A;OCT4、SOX2、KLF4、及びLIN28B;OCT4、KLF4、MYC及びLIN28Aであり;最初の4週間、それぞれの前述の薬剤の組合せを0.25mMのNaB、5 μ MのPS48、及び0.5 μ MのA-83-01と一緒にし、続いて0.25mMの酪酸ナトリウム、5 μ MのPS48、0.5 μ MのA-83-01、及び0.5 μ MのPD0325901で処理し、それらの各々を、iTR遺伝子発現のグローバルモジュレーションのマーカーについて0、1、2、4、7、10及び14日目にアッセイする。

【0152】

化合物は、天然起源から取得することができるか、又は合成的に生成することができる。化合物は、少なくとも部分的に純粋であってよく、又は成分が少なくとも部分的に未知であるか特性決定されていない抽出物若しくは他のタイプの混合物中に存在していてもよい。抽出物又はそれらの画分は、例えば、植物、動物、微生物、海洋生物、発酵ブロス(例えば、土壌、細菌又は真菌発酵ブロス)などから生成することができる。いくつかの実施形態において、化合物コレクション(「ライブラリー」)が試験される。ライブラリーは、例えば、100~500,000化合物又はそれ以上を含み得る。化合物は、マルチウェルプレート(例えば、384ウェルプレート、1596ウェルプレートなど)に配置されることが多い。それらは、溶媒(例えば、DMSO)に溶解させることができるか、又は乾燥形態で、例えば粉末若しくは固体として提供することができる。合成、半合成及び/又は天然の化合物のコレクションを試験することができる。化合物ライブラリーは、構造的に関連する、構造的に様々な、又は構造的に無関係な化合物を含み得る。化合物は、人工的であり得る(人間によって発明され、天然では確認されない構造を有する)か、又は天然に存在し得る。いくつかの実施形態において、ライブラリーは、「ヒット」又は「リード」として同定された

少なくともいくつかの化合物を他の創薬プログラム及び/又はそれらの誘導体中に含む。化合物ライブラリーは、天然産物、及び/又は非指向性若しくは指向性合成有機化学を使用して生成された化合物を含み得る。多くの場合、化合物ライブラリーは小分子ライブラリーである。目的の他のライブラリーとしては、ペプチド又はペプトイドライブラリー、cDNAライブラリー、抗体ライブラリー、及びオリゴヌクレオチドライブラリーが挙げられる。ライブラリーは対象を絞ることができる(例えば、同一コア構造を有する化合物、同一前駆体に由来する化合物、又は少なくとも1つの生化学活性を共通して有する化合物で主として構成される)。

【0153】

化合物ライブラリーは、多くの商品製造元、例えばTocris Bioscience、Nanosyn、BioFocus、及び政府機関から入手することができる。例えば、米国国立衛生研究所(NIH)分子ライブラリープログラムの構成機関である分子ライブラリー小分子リポジトリ(Molecular Libraries Small Molecule Repository, MLSMR)は、例えば高スループットスクリーニング(HTS)アッセイにおいて使用するための公知及び未知の生物活性を有する30万を超える化学的に多様な化合物のコレクションの同定、取得、維持、及び配布を目的としている(<https://mli.nih.gov/mli/>を参照されたい)。NIH Clinical Collection(NCC)は、ヒト臨床試験において使用された歴史がある約450小分子のプレートアレイである。これらの化合物は、既知の安全性プロファイルで高度に薬物様である。いくつかの実施形態において、「承認されたヒト用薬物」を含む化合物のコレクションが試験される。「承認されたヒト薬物」は、それらが市販されるようになる前に、政府規制機関、例えば、米国食品医薬品局(Food and Drug Administration)、欧州医薬品審査庁(European Medicines Evaluation Agency)、又は少なくとも治療薬の安全性の評価の責任を負う同様の機関によって、ヒトでの治療において使用が認可されている化合物である。試験化合物は、例えば、抗腫瘍剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗原虫剤、抗寄生剤、抗うつ剤、抗精神病剤、麻酔剤、抗狭心症剤、抗高血圧剤、抗不整脈剤、抗炎症剤、鎮痛剤、抗血栓剤、抗嘔吐剤、免疫調節剤、抗糖尿病剤、脂肪低下剤若しくはコレステロール低下剤(例えばスタチン)、抗癌剤、抗凝血剤、抗不安剤、催眠剤(睡眠誘導剤)、ホルモン剤又は抗ホルモン剤などを含み得る。いくつかの実施形態において、化合物は、少なくともいくつかの前臨床開発若しくは臨床開発がなされたもの、又は「薬物様」特性を有すると決定若しくは予測されたものである。例えば、試験化合物は、非ヒト動物における第I相試験又は少なくとも前臨床試験が完了し、安全性及び忍容性の証拠を示した可能性がある。

【0154】

いくつかの実施形態において、試験化合物は、化合物が投与され得る生物の細胞及び/又は化合物が試験され得る細胞に対して、使用される濃度で、又はいくつかの実施形態においては、使用される濃度の最大10倍、100倍若しくは1,000倍の高い濃度で実質的に非毒性である。例えば、細胞生存率及び/又は増殖に対して統計的に有意な影響はないか、或いは生存率又は増殖率の低下が様々な実施形態において1%、5%又は10%以下である可能性がある。細胞傷害性及び/又は細胞増殖に対する影響は、任意の様々なアッセイを使用して評価することができる。例えば細胞代謝アッセイ、例えばAlamarBlue、MTT、MTS、XTT、及びCellTitre Gloアッセイ、細胞膜完全性アッセイ、細胞ATPベース生存アッセイ、ミトコンドリアレダクターゼ活性アッセイ、BrdU、EdU、又はH3-チミジン取り込みアッセイを使用することができる。いくつかの実施形態において、試験化合物は、当分野において公知の又は使用されている細胞培養培地、例えば脊椎動物、例えば哺乳動物細胞の培養に適した養培培地中において確認される化合物ではなく、或いは試験化合物が当分野で公知の又は使用されている細胞培養培地中において確認される化合物である場合、試験化合物は、本発明の方法において使用される場合、異なる濃度で、例えばより高い濃度で使用される。

【0155】

iTRのグローバルモジュレーターのアッセイ:アッセイの実施及びコントロールの態様

上記の様々な本発明のスクリーニングアッセイは、試験化合物が活性TRインヒビターの

10

20

30

40

50

レベルを抑制するか、又は活性TRアクチベーターのレベルを増加させるかを決定することを含む。レポーター分子の発現に適した細胞は上記に記載されている。

【0156】

本発明のアッセイの実施において、アッセイ成分(例えば細胞、TRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチド、及び試験化合物)は、典型的には、複数の容器又は他の容器に分配される。細胞を入れることができる任意のタイプの容器又は物品を使用することができる。本発明の多くの実施形態において、容器は、マルチウェルプレート(「マイクロウェルプレート」、「マイクロタイタープレート」などとも呼ばれる)のウェルである。説明すると、用語「ウェル」は、本発明のスクリーニングの実施に使用することができる任意のタイプの容器又は物品、例えばアッセイ成分を含むことができる任意の容器又は物品を意味するために使用される。本発明は、ウェルの使用又はマルチウェルプレートの使用に限定されない、と理解されるべきである。いくつかの実施形態において、複数の物理的に離れた穴(又は他の封じ込めの特徴)が基板内又は基板上に存在する任意の製品を使用することができる。例えば、アッセイ成分は、流体液滴に封じ込めることができ、これらは任意選択で表面上に配列されていてもよく、また任意選択で、マイクロ流体デバイスのチャンネルなどに液滴を個別の位置に封じ込める耐水性物質により離すことができる。

【0157】

一般に、アッセイ成分は、任意の順序でウェルに加えることができる。例えば、細胞を最初に加え、試験化合物及び標的TRアクチベーター若しくはTRインヒビターポリペプチド又は発現構築物を有する細胞をウェルに添加する前に、選択した期間(例えば6~48時間)、培養中で維持することができる。いくつかの実施形態において、化合物は、細胞のポリペプチドを添加する前にウェルに加えられる。いくつかの実施形態において、レポーターポリペプチドの発現は、細胞をプレーティングした後、任意選択で試験化合物をウェルに加えた後、誘導される。いくつかの実施形態において、レポーター分子の発現は、レポーターポリペプチドをコードする発現ベクターを細胞にトランスフェクトすることによって達成される。いくつかの実施形態において、細胞は、レポーターポリペプチドを発現するように前もって遺伝子操作されている。いくつかの実施形態において、レポーター分子の発現は、調節可能な発現制御エレメントの制御下にあり、レポーター分子の発現の誘導は、細胞を、発現を誘導する(又は抑制解除する)薬剤と接触させることによって達成される。

【0158】

細胞、試験化合物又はポリペプチドを含むアッセイ組成物は、試験化合物が(その活性を抑制する試験化合物の非存在下において)標的TRアクチベーター又はTRインヒビターのレベル又は活性の増加又は低下を引き起こすことができる適切な期間維持される。細胞の数、TRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドの量、及び添加される試験化合物の量は、例えば因子、例えば、容器の大きさ、細胞型に依存し、当業者によって決定され得る。いくつかの実施形態において、TRアクチベーターポリペプチド又はTRインヒビターポリペプチドの試験化合物に対するモル濃度の比は、1:10~10:1である。いくつかの実施形態において、組成物が維持される細胞の数、試験化合物の量、及び時間の長さは、容易に検出可能なレベルのシグナルが試験化合物の非存在下において選択された時間の後に得られるように選択することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、化合物の添加時に、約25%~75%、例えば約50%のコンフルエンスにある。いくつかの実施形態において、1,000~10,000細胞/ウェル(例えば約5,000細胞/ウェル)は、96ウェルプレートのウェルあたり約100 μ lの培地にプレーティングされる。他の例示的な実施形態において、細胞は384ウェルプレートに、ウェルあたり500~2,000(例えば、約1000)細胞で約30~50 μ lの培地に播種される。いくつかの実施形態において、化合物は、複数の濃度(例えば2~10の異なる濃度)及び/又は複数の複製(例えば2~10の複製)で試験される。いくつかの又はすべての異なる濃度の複数の複製を実施することができる。いくつかの実施形態において、候補TR因子は、0.1 μ g/ml~100 μ g/ml、例えば1 μ g/ml及び10 μ g/mlの間の

濃度で使用される。いくつかの実施形態において、候補TR因子は複数の濃度で使用される。いくつかの実施形態において、化合物は、播種後6時間～1日(24時間)の間に、細胞に添加される。

【0159】

本発明の化合物のスクリーニング方法及び/又は特性決定方法のいずれかのいくつかの態様において、試験化合物は、所定濃度を達成するのに十分な量でアッセイ組成物に添加される。いくつかの実施形態において、濃度は最大約1nMである。いくつかの実施形態において、濃度は約1nM～約100nMである。いくつかの実施形態において、濃度は約100nM～約10 μ Mである。いくつかの実施形態において、濃度は少なくとも10 μ M、例えば10 μ M～100 μ Mである。アッセイ組成物は、その最後の成分を添加した後、様々な期間維持され得る。特定の実施形態において、アッセイ組成物は、すべての成分を添加した後、約10分間～約4日間、例えば1時間～3日間、例えば2時間～2日間、又は任意のその間の範囲若しくは特定の値で、例えば約4～8時間維持される。複数の異なる時点を試験することができる。試験化合物の追加のアリコートは、そのような期間内でアッセイ組成物に添加することができる。いくつかの実施形態において、細胞は、そのタイプの細胞の培養に適した細胞培養培地中に維持される。いくつかの実施形態において、無血清培地が使用される。いくつかの実施形態において、アッセイ組成物は、細胞培養培地の代わりに、細胞膜の完全性及び任意選択で細胞生存率を維持することと適合する、生理学的に許容される液体を含む。任意の適切な液体は、適当な浸透圧を有し、アッセイを実施するのに少なくとも十分な時間、細胞膜の適切な完全性と任意選択で細胞生存性を維持するのに適合していれば使用することができる。活性TRアクチベーターのレベルの増加又はTRインヒビターの低下を示す1つ以上の測定は、インキュベーション期間中に、又はその後に行うことができる。

【0160】

いくつかの実施形態において、iTRのグローバルモジュレーターである可能性についてスクリーニングされる化合物は、体細胞型において多能性を誘導する他の条件で可能な薬剤から選択される。そのような薬剤としては、以下の化合物が個別に又は組み合わせて挙げられる: 遺伝子OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、LIN28A及びLIN28Bの単独、又は小分子化合物との組合せ、例えば以下の化合物との組合せ: CHIR99021を含むがこれに限定されないグリコーゲンシンターゼ3(GSK3)のインヒビター; SB431542、A-83-01、及びE616452を含むがこれらに限定されないTGF- β シグナル伝達のインヒビター; パルプロ酸、フェニル酪酸塩、及びn-酪酸塩を含むがこれらに限定されない、脂肪酸化合物を含むがこれらに限定されないHDACインヒビター; トラボキシニンB及びデブシペプチドを含む環状テトラペプチド; ヒドロキサム酸、例えば、トリコスタチンA、ポリノスタット(SAH A)、ベリノスタット(PXD101)、LAQ824、パノビノスタット(LBH589)、ベンザミド系エンジノスタット(MS-275)、CI994、モチエノスタット(MGCD0103); サーチュインインヒビターのニコチノミド、NADの種々の誘導體、ジヒドロクマリン、ナフトピラノン、及び2-ヒドロキシナフタレンアルデヒド、若しくはIV(HDAC11)脱アセチル化酵素を含む、クラスI(HDAC1、HDAC2、HDAC3及びHDAC8)、クラスIIA(HDAC4、HDAC5、HDAC7及びHDAC9)、クラスIIB(HDAC6及びHDAC10)、クラスIII(SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6若しくはSIRT7)を特異的に標的とするもの; パルネートを含むがこれに限定されないH3K4/9ヒストンデメチラーゼLSD1のインヒビター; EPZ004777を含むがこれに限定されないDot1Lのインヒビター; Bix01294を含むがこれに限定されないG9aのインヒビター; DZNepを含むがこれに限定されないEZH2のインヒビター、RG108を含むがこれに限定されないDNAメチルトランスフェラーゼのインヒビター; 5-アザ-2'-デオキシシチジン(商品名Vidaza及びAzadine); DNAメチル化を抑制し、脱メチル化の第一段階である5hmCを増加させるTet1を増加させ得るビタミンC; PS48を含むがこれに限定されない3'ホスホイノシチド依存性キナーゼ1のアクチベーター; ケルセチン及びフルクトース2,6-ビスホスフェート(ホスホフルクトキナーゼ1のアクチベーター)を含むがこれらに限定されない解糖の促進剤; ケルセチンを含むがこれに限定されないHIF1転写複合体の活性を促進する薬剤; AM580、CD437、及びTTNPBを含むがこれらに限定されないRARアゴニスト; レスベラトロールを含むがこれに限定されない低酸素症を

模倣する薬剤;テロメラーゼの触媒成分(TERT)の外因性発現を含むがこれに限定されないテロメラーゼ活性を増加させる薬剤、LSD1のダウンレギュレーションを介したエピジェネティック修飾を促進する薬剤、リチウムを含むがこれに限定されないH3K4特異的ヒストンデメチラーゼ;又はPD032590を含むがこれに限定されないMAPK/ERK経路のインヒビター。このような化合物は、例えば、COX7A1若しくはNAALADL1又は本明細書に記載のiTRの他のインヒビターの低下した発現をアッセイすることにより、及び/又はPCDHB2若しくはAMH又は本明細書に記載のiTRの他のアクチベーターの増大した発現をアッセイすることにより、グローバルiTRのマーカーを使用して、in vitroで培養した細胞に対して、或いはin vivoでの損傷組織若しくは病変組織において、或いはin vivoでの動物の寿命のモジュレートにおいて、iTRの効果を最適化するために様々な組合せ、濃度で、また異なる期間、投与することができる。

10

【0161】

いくつかの実施形態において、典型的には各々が既知の同一性(例えば構造及び/又は配列)の個々の化合物は、複数のそれぞれのウェルに添加される。いくつかの実施形態において、2つ以上の化合物は、1つ以上のウェルに添加することができる。いくつかの実施形態において、未知の同一性の1つ以上の化合物を試験することができる。同一性は、続いて当分野で公知の方法を使用して決定することができる。

【0162】

様々な実施形態において、本発明の前述のアッセイ方法は、高スループットスクリーニング(HTS)の実施に適している。いくつかの実施形態において、本発明のスクリーニングアッセイは、高スループット又は超高スループットである(例えば、Fernandes, P.B., Curr Opin Chem. Biol. 1998, 2:597; Sundberg, S A, Curr Opin Biotechnol. 2000, 11:47を参照されたい)。高スループットスクリーニング(HTS)は、多くの場合、例えば並行して、非常に効率的に多数の化合物を試験することを含む。例えば、数万から数十万の化合物を短時間で、例えば数時間から数日でルーチン的にスクリーニングすることができる。いくつかの実施形態において、HTSは、1日あたり1,000~100,000種の化合物の試験を意味する。いくつかの実施形態において、超高スループットは、1日あたり100,000種を超える化合物、例えば、1日あたり最大100万種以上の化合物をスクリーニングすることを意味する。本発明のスクリーニングアッセイは、マルチウェルフォーマット、例えば96ウェル、384ウェルフォーマット、1,536ウェルフォーマット、又は3,456ウェルフォーマットで実施することができ、自動化に適している。いくつかの実施形態において、マイクロウェルプレートの各ウェルを使用し、異なる試験化合物に対する個別のアッセイを行うことができるか、或いは濃度又はインキュベーション時間の効果を観察しようとする場合、複数のウェルが単一の化合物のサンプルを含有することができ、少なくともいくつかのウェルは任意選択で空のままで、又は対照若しくは複製として使用する。典型的には、本明細書に開示されているアッセイのHTS実施は、自動化の使用を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のロボットを含む統合ロボットシステムは、複数のアッセイステーションの間で、化合物、細胞及び/又は試薬の添加、混合、インキュベーション及び読み出し又は検出のためにアッセイマイクロウェルプレートを移送する。いくつかの態様において、本発明のHTSシステムは、多数のプレートを同時に調製し、インキュベートし、解析することができる。適切なデータ処理及び制御ソフトウェアを使用することができる。高スループットスクリーニングの実施は、当分野において周知である。本発明を何ら限定するものではないが、本発明のHTSの実施形態において適用することができる特定の一般的な原理及び技術は、Macarron R & Hertzberg R P.及びDesign and implementation of high-throughput screening assays. Methods Mol Biol., 565:1-32, 2009及び/又はAn W F & Tolliday N J., Introduction: cell-based assays for high-throughput screening. Methods Mol Biol. 486:1-12, 2009、及び/又はこれらのいずれかの中の参考文献に記載されている。また例示的な方法は、William P. Janzen (2002)のHigh Throughput Screening: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)、及びHigh-Throughput Screening in Drug Discovery (Methods and Principles in Medicinal Chemistry) (2006)にも

20

30

40

50

開示されている。さらなる化合物は、例えば、最初のヒットと比較した場合に1つ以上の改善された薬物動態的特性及び/又は薬力学的特性を有してもよく、或いは単に異なる構造を有していてもよい。「改善（改良）された特性」は、例えば、化合物を、本明細書に記載の1つ以上の目的により効果的に、又はより好適にすることができる。いくつかの実施形態において、例えば、化合物は、目的の分子標的（例えば、TRアクチベーター又はTRインヒビター遺伝子産物）に対するより高い親和性、非標的分子に対するより低い親和性、より高い溶解性（例えば、水溶性の増加）、安定性の増加（例えば、血液、血漿及び/又は胃腸管における）、身体における半減期の増加、バイオアベイラビリティの増加、及び/又は副作用（複数可）の低減などが挙げられる。最適化は、ヒット構造の実験的変更（例えば、関連構造を有する化合物の合成、及びそれらの無細胞若しくは細胞ベースアッセイ又は非ヒト動物での試験）、並びに/又は計算手法を使用して達成することができる。そのような変更は、いくつかの実施形態において、1つ以上の特性を予測可能に変化させるための薬化学の確立された原則を利用することができる。いくつかの実施形態において、「ヒット」した1つ以上の化合物を同定し、系統的な構造的変化を施して、構造的にヒットに関連する化合物（例えば、精製されたリード化合物）の第2のライブラリーを作製する。次いで、第2のライブラリーを、本明細書に記載のいずれかの方法を使用してスクリーニングすることができる。

10

【0163】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、（例えば、血清中で）安定性を増強し、半減期を延長し、毒性若しくは免疫原性を低下させ、又は化合物に所望の特性を付与する部分を改変されるか又は組み込む。

20

【0164】

iTR、iTM、及びICM因子の使用

医薬組成物

iTR、iTM、及びiCM因子は、様々な使用を有する。そのような使用の非限定的な例は、本明細書において論じられている。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、器官又は組織の再生を増強する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、四肢、指、軟骨、心臓、血管、硬骨、食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、腸、直腸、肛門、内分泌腺（例えば甲状腺、副甲状腺、副腎、膵臓の内分泌部分）、皮膚、毛包、胸腺、脾臓、骨格筋、局所損傷心筋、平滑筋、脳、脊髄、末梢神経、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、精巣、輸精管、精囊、前立腺、陰茎、咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、腎臓、尿管、膀胱、尿道、眼（例えば網膜、角膜）、又は耳（例えばコルチ器官）の再生を増強する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、間質層、例えば、組織の実質組織を支持する結合組織の再生を増強する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、外科手術、例えば、罹患した又は損傷した組織、器官、又は他の構造、例えば四肢、指などの少なくとも一部の切除を伴う外科手術後の再生を増強する。例えば、このような外科手術は、肝臓、肺、腎臓、胃、膵臓、腸、乳腺、卵巣、精巣、硬骨、四肢、指、筋肉、皮膚などの少なくとも一部を切除するものであってよい。いくつかの実施形態において、手術は腫瘍を切除することである。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、外傷、外科手術、疾患及び火傷の後の皮膚の傷跡を残さない再生を促進する。

30

40

【0165】

再生の増強は、様々な実施形態において、以下のいずれか1つ以上を含むことができる：(a)再生速度の増加；(b)再生の程度の増加；(c)再生組織又は器官又は他の身体構造における適切な構造（例えば形状、パターン、組織構造、組織極性）の樹立の促進；(d)機能を保持及び/又は回復させる方法における新しい組織の成長の促進。再生を増強するためのiTR因子の使用は特に興味を持たれるが、本発明は、再生の検出可能な増強を必ずしも生じさせることなく、一般的に修復又は創傷治癒を増強するためのiTR因子の使用を包含する。したがって、本発明は、修復又は創傷治癒を増強する方法であって、iTR因子が、本明細書に記載のいずれかの方法に従ってそれを必要とする対象に投与される、方法を提供する。

【0166】

50

いくつかの実施形態において、本発明は、有効量のiTR因子を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における再生を増強する方法を提供する。いくつかの実施形態において、化合物(例えばiTR因子)の有効量は、基準値(例えば適切な対照値)と比較した場合、損傷組織の再生の速度又は程度の増加をもたらす量である。いくつかの実施形態において、基準値は、化合物の非存在下で(任意選択でプラセボの投与を伴う)再生の予想される(例えば平均又は典型的な)速度又は程度である。いくつかの実施形態において、iTR因子の有効量は、化合物の非存在下で予想される(例えば平均又は典型的な)構造的又は機能的転帰と比較した場合、改善された構造的及び/又は機能的転帰をもたらす量である。いくつかの実施形態において、有効量の化合物、例えばiTR因子は、芽体形成の増強及び/又は瘢痕化の低下をもたらす。再生の程度又は速度は、例えば、再生された組織の寸法(複数可)又は体積に基づいて評価することができる。構造的及び/又は機能的転帰は、例えば、視覚試験(任意選択で顕微鏡法若しくは画像技術、例えばX線、CTスキャン、MRIスキャン、PETスキャンの使用を含む)に基づいて、及び/又は組織、器官若しくは身体部分によって通常なされる1つ以上の生理学的過程若しくはタスク(複数可)を行うそのような組織、器官若しくは他の身体部分の能力を評定することによって評価することができる。典型的には、改善された構造的転帰は、iTR因子による治療の非存在下で予測される(例えば平均又は典型的)構造的転帰と比較した場合に、正常な構造(例えば、組織損傷の前に存在していた構造、又は正常な健常個体に存在する構造)により近いものである。当業者は、機能に関する適切なアッセイ又は試験を選択することができる。いくつかの実施形態において、対照値と比較した場合の再生速度又は程度の増加は、統計学的に有意(例えば、 p 値 <0.05 、若しくは p 値 <0.01)及び/又は臨床的に有意である。いくつかの実施形態において、対照値と比較した場合の構造的及び/又は機能的転帰の改善は、統計学的に有意及び/又は臨床的に有意である。「臨床的に有意な改善」とは、医師又は外科医の十分な判断の範囲内で、対象に有効な利益(例えば、治療を価値あるものにするのに十分な利益)を付与する改善を意味する。多くの実施形態において、(例えば治療目的で)特定の種の対象に投与されるiTRモジュレーター、例えばiTR因子は、その種の対象において発現される内在性TR遺伝子をモジュレートする、例えば抑制する化合物であることは理解されよう。例えば、対象がヒトである場合、ヒトTRインヒビター遺伝子産物の活性を抑制し、ヒトTRアクチベーター遺伝子産物の活性を活性化する化合物が典型的には投与され得る。

【0167】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、皮膚の再生を、例えば火傷(熱的又は化学的火傷)、擦傷傷害、又は皮膚損失を伴う他の状況、例えば感染、例えば壊死性筋膜炎若しくは紫斑症の後に増強する。いくつかの実施形態において、火傷は第2度火傷又は第3度火傷である。いくつかの実施形態において、皮膚損失の領域は、少なくとも 10cm^2 の面積を有する。一態様において、iTR因子は、移植皮膚の再生を増強する。一態様において、iTR因子は、過剰及び/又は病理学的な創傷収縮又は瘢痕化を低下する。

【0168】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して骨再生を、例えば非癒合骨折、インプラント固定、歯周若しくは歯槽堤増大、頭蓋顔面手術、又は新生骨の生成が適切であると考えられる他の状態などの状況において増強する。いくつかの実施形態において、iTR因子は、骨再生が望まれる部位に適用される。いくつかの実施形態において、iTR因子は、骨移植材料に組み込まれるか、又はそれらと組み合わせて使用される。骨移植材料としては、様々なセラミック材料及びタンパク質材料が挙げられる。骨移植材料としては、自己骨(例えば、腸骨稜、腓骨、肋骨などから採取した骨)、死体由来の同種骨、及び異種骨が挙げられる。合成骨移植材料としては、様々なセラミック、例えばリン酸カルシウム(例えば、ヒドロキシアパタイト及びリン酸三カルシウム)、バイオガラス、及び硫酸カルシウム、並びにタンパク質材料、例えば脱灰骨マトリックス(DBM)が挙げられる。DBMは、皮質骨組織を粉砕し(一般に $100\sim 500\mu\text{m}$ のふるい粒径に粉砕)、次いで、粉砕した組織を塩酸(一般に $0.5\sim 1\text{N}$)で処理することによって調製することができる。いくつかの実施形態において、iTR因子は、1つ以上の骨移植材料とともに対象に投与される。iTR因子は、(

iTR因子及び骨移植材料を含む組成物中の)骨移植材料と組み合わせることができ、又は、例えば移植片の配置後に別々に投与することができる。いくつかの実施形態において、本発明は、iTR因子を含む骨ペーストを提供する。骨ペーストは、骨欠損、例えば空隙、間隙、空洞、亀裂などに導入され、またそのような欠損を補充若しくは充填するために使用されるか、又は既存の骨構造に適用され得るように適切な粘稠度及び組成を有する製品である。骨ペーストは、典型的には、使用者が操作し、様々な形状に成形できるのに十分な可塑性を有する。このような治療の望ましい転帰は、例えばペーストが適用された形状を維持しながら、ペーストを置き換えるように骨が形成されることである。骨ペーストは、新しい骨形成の支持構造を提供し、骨形成を促進する物質(複数可)を含むことができる。骨ペーストは、多くの場合、上記のセラミック骨移植材料又はタンパク質骨移植材料(例えば、DBM、ヒドロキシアパタイト)の1つ以上に加えて、材料にペースト様又はパテ様の粘稠度を付与する1つ以上の成分、例えばヒアルロン酸、キトサン、デンプン成分、例えばアミロペクチンを含有する。

10

【0169】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、未分化胚様細胞からの骨前駆細胞の形成及び/若しくは補充を増強し、並びに/又は新生骨(骨芽細胞)を形成する細胞への骨前駆細胞の分化を増強する。

【0170】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、骨減少症又は骨粗鬆症を有する対象に、例えば、対象における骨再生を増強するように投与される。

20

【0171】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、関節(例えば、線維性、軟骨性又は滑膜関節)の再生を増強する。いくつかの実施形態において、関節は椎間板である。いくつかの実施形態において、関節は、股関節、膝関節、肘関節又は肩関節である。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、歯系及び/又は歯周組織又は構造(例えば、歯髄、歯周靱帯、歯、歯周骨)の再生を増強する。

【0172】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、CNS損傷及びPNS損傷におけるグリア瘢痕を低下する。

【0173】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、内科手術における癒着及び狭窄形成を低下する。

30

【0174】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、腱及び靱帯の修復における瘢痕化を低下し運動性を改善する。

【0175】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、眼を損傷した後の視力喪失を低下する。

【0176】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、細胞と組み合わせて対象に投与される。iTR因子及び細胞は、個別に、又は同一組成物中に含めて投与することができる。個別に投与される場合、それらは同じ場所又は異なる場所で投与することができる。細胞は、様々な実施形態において、自己、同種又は異種であり得る。細胞は、前駆細胞又は幹細胞、例えば成体幹細胞を含み得る。本明細書で使用される場合、幹細胞は、少なくとも以下の特性を有する細胞である:(i)自己再生、すなわち、未分化状態を維持しながら細胞分裂の多数のサイクルを通過する能力;及び、(ii)多能性又は多分化能、すなわち、いくつかの異なる細胞型(例えば、特定の組織又は器官の異なる細胞型の多数、大部分又は全部)の後代を生成する能力。成体幹細胞は、非胚性組織(例えば、胎児組織、出生後組織、又は成体組織)に由来する幹細胞である。本明細書で使用される場合、用語「前駆細胞」は、多能性幹細胞よりも分化しているが、完全に分化していない細胞多能性細胞を包含する。そのよ

40

50

うなより分化した細胞(胚性前駆細胞から生じ得る)は、胚性前駆細胞と比較した場合、自己再生能力が低下する。いくつかの実施形態において、iTR因子は、間葉前駆細胞、神経前駆細胞、内皮前駆細胞、毛包前駆細胞、神経冠前駆細胞、乳腺幹細胞、肺前駆細胞(例えば気管支肺胞幹細胞)、筋肉前駆細胞(例えば衛星細胞)、脂肪由来前駆細胞、上皮前駆細胞(例えば角化細胞幹細胞)、及び/又は造血前駆細胞(例えば造血幹細胞)と組み合わせで投与される。いくつかの実施形態において、細胞は、誘導された多能性幹細胞(iPS細胞)、又はiPS細胞から少なくとも部分的に分化した細胞を含む。いくつかの実施形態において、前駆細胞は成体幹細胞を含む。いくつかの実施形態において、細胞の少なくともいくつかは、分化細胞、例えば軟骨細胞、骨芽細胞、角化細胞、肝細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は筋芽細胞を含む。

10

【0177】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、対象に投与した後にin situで重合するか、又は架橋されるか、相転移し、典型的にはヒドロゲルを形成する1つ以上の化合物を含む組成物(例えば溶液)中に含めて投与される。組成物は、モノマー、ポリマー、開始剤、架橋剤などを含むことができる。組成物は、再生が必要な領域に(例えば注射器を使用して)適用され、in situでゲルが形成され、そこからiTR因子が経時的に放出され得る。ゲル化は、例えば、体液中のイオンとの接触により、又は温度若しくはpHの変化により、又は光により、又は反応性前駆体と(例えばマルチバレルシリンジを使用して)組み合わせることにより誘発され得る。(例えば、米国特許第6,129,761号; Yu L, Ding J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. Chem Soc Rev. 37(8):1473-81 (2008)を参照されたい)。いくつかの実施形態において、ヒドロゲルは、ヒアルロン酸、又はヒアルロン酸及びコラーゲンI含有ヒドロゲル、例えば本明細書に記載のHyStem-Cなどである。いくつかの実施形態において、組成物は細胞をさらに含む。

20

【0178】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、テロメラーゼの触媒成分を発現するベクターと組み合わせて対象に投与される。ベクターは、個別に、又は同一組成物中に含めて投与することができる。個別に投与される場合、それらは同じ場所又は異なる場所で投与することができる。ベクターは、治療した組織と同じ種又は他の種由来のテロメラーゼ触媒成分を発現し得る。iTR因子のテロメラーゼ触媒成分との前記同時投与は、標的組織が老化個体由来であり、前記個体がヒト種由来である場合に特に有用である。

30

【0179】

他の本発明の方法は、損傷のために喪失した組織又は器官を修復又は置き換えるための、生存機能組織、器官、又は細胞を含有する組成物のex vivo産生におけるiTR因子の使用を含む。例えば、個体(将来のレシピエント、同じ種の個体、又は異なる種の個体のいずれか)から取り出された細胞又は組織は、in vitroで、任意選択でマトリックス、足場(例えば、3次元足場)又はモールド(例えば、生体適合性の、任意選択で生分解性である材料、例えばHyStem-Cなどのポリマーを含む)と共に培養され、それらの機能組織又は器官への発達は、iTR因子を接触させることによって促進することができる。足場、マトリックス又はモールドは、天然に存在するタンパク質、例えばコラーゲン、ヒアルロン酸若しくはアルギン酸塩(若しくはこれらのいずれかの化学的に修飾された誘導体)、又は乳酸、カプロラクトン、グリコール酸などの合成ポリマー若しくはコポリマー、又は自己アセンブル性ペプチド、又は組織、例えば心臓弁、腸粘膜、血管、及び気管などに由来する脱細胞化されたマトリックスから少なくとも部分的に構成され得る。いくつかの実施形態において、足場はヒドロゲルを含む。足場は、特定の実施形態において、時間の経過とともに足場から拡散し得るiTR因子でコーティングされていても含浸されていてもよい。ex vivoで産生された後、組織又は器官は、対象内に又は対象上に移植される。例えば、組織又は器官は移植することができ、特定の組織、例えば皮膚などの場合、体表面に配置することができる。組織又は器官は、in vivoで継続して発達することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも部分的にex vivoで産生される組織又は器官は、膀胱、血管、骨、筋膜、肝臓、筋肉、皮膚パッチなどである。適切な足場は、例えば、細胞外マトリックス

40

50

ス(ECM)を模倣することができる。任意選択で、iTR因子は、ex vivoで生成された組織又は器官の移植前、移植中及び/又は移植後に、対象に投与される。いくつかの態様において、生体適合性材料は、使用される濃度でin vitroでの細胞に対して実質的に非毒性の物質であるか、又は生存の対象に投与される材料の場合、使用される量及び使用される場所において、対象の細胞に実質的に非毒性であり、対象に対して有意な有害性作用又は不都合な作用、例えば免疫反応又は炎症反応、許容不可能な瘢痕組織の形成などを誘発又は引き起こさない。特定の生体適合性材料が低いパーセンテージ、典型的には約5%、1%、0.5%又は0.1%未満の対象において、そのような有害反応を誘発し得ることは理解されよう。

【0180】

いくつかの実施形態において、iTR因子、又はiTR遺伝子発現のグローバルパターンを引き起こし得るものを含む因子の組合せでコーティング又は含浸されたマトリックス又は足場は、任意選択で細胞と組み合わせて、再生を必要とする対象に移植される。マトリックス又は足場は、再生が望まれる組織又は器官の形状であってもよい。細胞は、そのような組織若しくは器官を生じる1つ以上のタイプ及び/又はそのような組織若しくは器官で確認されるタイプ(複数可)の幹細胞であり得る。

【0181】

いくつかの実施形態において、iTR因子又は因子の組合せは、組織損傷の部位又はその近傍に直接投与される。「組織損傷の部位に直接」とは、化合物又は組成物を組織損傷の部位に注射、若しくは塗布、注入すること、又は組織損傷の部位を化合物若しくは組成物と直接接触させることを包含する。いくつかの実施形態において、投与が組織損傷部位の目に見える又は他の明白な縁から最大約10cm以内で行われるか、損傷した組織又は器官内の少なくとも一部に位置している血管(例えば動脈)に行われる場合、投与は「組織損傷の部位近傍」と考えられる。「組織損傷の部位近傍」の投与は、時には、損傷した器官内ではあるが損傷が明白ではない場所での投与である。いくつかの実施形態において、組織、器官、又は他の構造の損傷又は喪失の後に、iTR因子は、組織、器官又は他の構造の残りの部分に適用される。いくつかの実施形態において、iTR因子は身体に付着したままの切断された指又は肢の端部に適用され、喪失した部分の再生を増強する。いくつかの実施形態において、切断された部分は外科的に再付着され、iTR因子は創傷のいずれかの面又は両面に適用される。いくつかの実施形態において、iTR因子を投与して、移植された器官又はその一部の生着又は治癒又は再生を増強する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、神経再生を増強する。例えば、iTR因子は、切断された神経に、例えば、近位及び/又は遠位の断端近傍に注入することができる。いくつかの実施形態において、iTR因子は、人工神経管、神経末端及び介在する間隙が封入されている生物学的材料又は合成材料から構成される管内に配置される。1つ以上の因子はマトリックスに製剤化され、経時的にそれらの制御放出を促進することができる。前記マトリックスは、生体適合性であって、任意選択で生分解性の材料、例えば、架橋ヒアルロン酸、若しくはPEGDAで架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩を含むヒアルロン酸を含むようなポリマー、又はPEGDAにより架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩とカルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)との混合物を含み得る。

【0182】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、典型的には、0.05~5mMのバルプロ酸、好ましくは1~100ng/mL、好ましくは10ng/mLの範囲の濃度で、iTRを誘導するためにin vitro又はin vivoで細胞を曝露するのに十分な濃度で、カルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)を含むPEGDAにより架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩中に局在させ緩徐放出させるように製剤化されていてもよく、又は製剤化されていなくてもよい、抗ミューラー管ホルモン(AMH)である。

【0183】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、胚性組織において比較的高レベルで発現されるミトコンドリア膜間隙に局在する分泌型の短い形態又は長い形態のいずれかのGFER(肝再生のオーグメンター(Augmenter of Liver Regeneration)(ALR))であり、典型的には2

10

20

30

40

50

～200ng/mLの範囲、好ましくは20ng/mLの濃度の、iTRを誘導するためにin vitroの細胞又はin vivoで組織中の細胞を曝露するのに十分な濃度で、カルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)を含むPEGDAにより架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩中に局在させ緩徐放出させるように製剤化されていても、又はそうでなくてもよい。

【0184】

いくつかの実施形態において、iTR因子はバルプロ酸であり、典型的には0.05～5mMの範囲、好ましくは0.5mMの濃度の、iTRを誘導するためにin vitroの細胞又はin vivoで組織中の細胞を曝露するのに十分な濃度で、カルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)を含むPEGDAにより架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩中に局在させ緩徐放出させるように製剤化されていても、又はそうでなくてもよい。

10

【0185】

いくつかの実施形態において、iTR因子は、0.05～5mM、好ましくは0.5mMの濃度のバルプロ酸と、2～200ng/mL、好ましくは20ng/mLの濃度のGFERタンパク質(長型又は短型のいずれか)と、1～100ng/mL、好ましくは10ng/mLの濃度のAMHタンパク質の任意の組合せである。因子バルプロ酸、GFER及びAMHの前記組合せは、iTRを誘導するカルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)を含むPEGDAによって架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩中の局在及び徐放のために製剤化されていても、又はそうでなくてもよい。

【0186】

iTM因子及びiCM因子、例えば胎児細胞又は成体細胞由来のエキソソームは、生理学的溶液、例えば生理食塩水中に含めて投与され得るか、或いはiTM又はiCMを誘導するためにカルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)を含むPEGDAにより架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸中で徐放することができる。

20

【0187】

いくつかの実施形態において、主として発達の胚期に発現される遺伝子LIN28Bは、CD34+造血細胞を含む血液細胞型において外因的に発現され、それらの胎児肝臓由来の対応物の増殖能力及び生着能力に匹敵するin vivoでの骨髄へのそれらの増殖及び生着を促進する。

【0188】

いくつかの実施形態において、組織再生は、高浸透圧デキストロース、グリセリン、リドカイン、フェノール、局所麻酔フェノール、及びモルホリンを含むがこれらに限定されない増殖治療剤(proliferative agent); Klippel Trenaunay症候群、クモ状静脈、小静脈瘤、痔核及びハイドロセルを含む血管及びリンパ管の奇形(血管奇形)の治療に使用されるものを含むがこれらに限定されない硬化療法剤(sclerotherapy agents)であって、使用される薬剤がテトラデシル硫酸ナトリウム又はポリドカノールなどの薬剤を含み、硬化剤が血管に注入されるような硬化療法剤;並びに多血小板血漿由来因子の投与によって増強される。ここで、増殖治療因子、硬化療法因子又は多血小板血漿由来因子はマトリックス中で製剤化され、それらの効果を局在化するか、又は経時的にそれらの制御放出を促進する。前記マトリックスは、生体適合性であって、任意選択で生分解性の材料、例えば、架橋ヒアルロン酸、若しくはPEGDAで架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩を含むヒアルロン酸を含むようなポリマー、又はPEGDAにより架橋されたカルボキシメチルヒアルロン酸塩とカルボキシメチル修飾ゼラチン(HyStem-C)との混合物を含み得る。

30

40

【0189】

いくつかの実施形態において、iTR因子又は因子の組合せを使用して、毛包の生成及び/又は毛の成長を促進する。いくつかの実施形態において、iTR因子は、毛を正常に形成しない上皮細胞からの毛包の再生を誘発する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、男性又は女性における抜け毛、毛髪の薄毛化、部分的又は完全な脱毛症を治療する。いくつかの実施形態において、脱毛症は、例えば頭の頂部、後部及び/又は側部などで毛が成長しないことが多い、毛を有していないか、本質的に毛を有していないか、毛が不足している状態である。いくつかの実施形態において、毛の薄さは正常若しくは平均よりも毛が少ない状態であり、又はいくつかの実施形態において、過去の個体よりも毛が少ない

50

状態であり、又はいくつかの実施形態において、個体が望ましいと思うよりも少ない状態である。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して眉毛又はまつ毛の成長を促進する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、アンドロゲン性脱毛症又は「男性型脱毛」(これは男性及び女性に影響を及ぼす可能性がある)を治療する。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、頭皮の斑状脱毛を伴う円形脱毛症、全頭髮の喪失を伴う脱毛症、又は頭部及び身体からのすべての毛の喪失を伴う全身性脱毛症を治療する。いくつかの実施形態において、iTR因子は、毛の成長が望まれる部位、例えば、頭皮又は眉毛領域に適用される。いくつかの実施形態において、iTR因子をまぶたの縁部又はその近傍に適用し、まつ毛の成長を促進する。いくつかの実施形態において、iTR因子は液体製剤で適用される。いくつかの実施形態において、iTR因子は、クリーム、軟膏、ペースト、又はゲルで適用される。いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、火傷、外科手術、化学療法、又は毛若しくは毛がある皮膚の喪失を引き起こす他の事象の後の育毛を増強する。

10

【0190】

いくつかの実施形態において、iTR因子又は因子の組合せを加齢性変性変化に罹患した組織に投与し、若々しい機能を再生する。前記加齢性変性変化としては、非限定的な例として、加齢黄斑変性症、冠動脈疾患、骨粗鬆症、骨壊死、心不全、気腫、末梢動脈障害、声帯萎縮、聴力損失、アルツハイマー病、パーキンソン病、皮膚潰瘍、及び他の加齢性変性疾患が挙げられる。いくつかの実施形態において、前記iTR因子は、テロメラゼの触媒成分を発現するベクターと同時に投与され、細胞寿命を延長する。

20

【0191】

いくつかの実施形態において、1つ以上のiTR因子を投与して、傷害の原因、例えば化学療法、放射線又は毒素などによって喪失又は損傷された細胞の置き換えを増強する。いくつかの実施形態において、そのような細胞は、実質器官及び組織の間質細胞である。

【0192】

本発明の治療方法は、再生の増強が対象にとって有益である疾患又は状態に罹患している、又はそのリスクがある対象を同定又は提供するステップを含み得る。いくつかの実施形態において、対象は、傷害(例えば身体的外傷)又は組織若しくは器官の損傷を受けている。いくつかの実施形態において、損傷は四肢又は指に対するものである。いくつかの実施形態において、対象は、心臓血管系、消化系、内分泌系、筋骨格系、胃腸系、肝臓系、外皮系、神経系、呼吸系、又は泌尿器系に影響を及ぼす疾患に罹患している。いくつかの実施形態において、組織損傷は、組織、器官又は構造、例えば、軟骨、硬骨、心臓、血管、食道、胃、肝臓、胆嚢、膵臓、腸、直腸、肛門、内分泌腺、皮膚、毛包、歯、歯肉、唇、鼻、口、胸腺、脾臓、骨格筋、平滑筋、関節、脳、脊髄、末梢神経、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、精巣、輸精管、精囊、前立腺、陰茎、咽頭、喉頭、気管、気管支、肺、腎臓、尿管、膀胱、尿道、眼(例えば網膜、角膜)、又は耳(例えばコルチ器官)に対してである。

30

【0193】

いくつかの実施形態において、化合物又は組成物は、対象が組織損傷(例えば、傷害及び急性疾患に関連した事象、例えば心筋梗塞又は脳卒中)を被った後、約2、4、8、12、24、48、72又は96時間以内に少なくとも1回、及び任意選択でその後少なくとも1回、対象に投与される。いくつかの実施形態において、化合物又は組成物は、対象が組織損傷を被った後、約1~2週間、2~6週間又は6~12週間以内に少なくとも1回、及び任意選択でその後少なくとも1回、対象に投与される。

40

【0194】

本発明のいくつかの実施形態において、例えば、皮膚を除去すること、再生若しくはde novo発生が望まれる部位で少なくとも一部の組織を除去すること、再生若しくはde novo発生が望まれる関節若しくは骨表面を擦過すること、及び/又は対象に別の種類の創傷を負わせることによって、欠損した又は形成不全の組織、器官、又は構造の再生又はde novo発生を刺激又は促進することが有用であり得る。組織損傷後の再生の場合、損傷組織の

50

少なくとも一部を(例えば、外科的切除又は創面切除によって)除去することが望ましい場合がある。いくつかの実施形態において、iTR因子は、そのような除去又は擦傷の部位又はその近傍に投与される。

【0195】

いくつかの実施形態において、iTR因子を使用して、そのような組織又は器官が、先天性疾患、例えば遺伝性疾患の結果として少なくとも部分的に欠損している対象における組織又は器官の生成を増強する。多くの先天性奇形は、様々な組織、器官又は身体構造、例えば四肢若しくは指などの発育不全又は欠損をもたらす。他の例において、組織、器官又は他の身体構造の形成不全をもたらす発達障害は、出生後に明白になる。いくつかの実施形態において、iTR因子は、組織、器官又は他の身体構造の成長又は発達を刺激するために、組織、器官又は他の身体構造の発育不全又は欠損に罹患している対象に投与される。いくつかの態様において、本発明は、iTR因子を対象に投与することを含む、組織、器官又は他の身体構造の発育不全又は先天的欠損に罹患している対象における組織、器官又は他の身体構造の生成を増強する方法を提供する。いくつかの実施形態において、iTR因子は、対象に出生前に、すなわち子宮内に投与される。再生に関して本明細書に記載されている本発明の様々な態様及び実施形態は、組織、器官又は他の身体構造のこのようなde novo生成に適用することができ、本発明に包含される。

【0196】

いくつかの態様において、iTR因子を使用して、そのような組織が以前に存在しなかった場所で新しい組織成長が有用である様々な状況のいずれかにおける組織の生成を増強する。例えば、関節の間に骨組織を生成することは、脊椎又は他の関節の癒合にあってはしばしば有用である。

【0197】

iTR因子は、再生の様々な動物モデルにおいて試験することができる。一態様において、iTRのモジュレーターがマウスの種において試験される。例えば、マウスは、(例えば、組織断片の切開、切断、離断又は除去によって)創傷され得る。iTR因子を創傷の部位及び/又は除去された組織断片に適用し、再生に対するその効果を評価する。脊椎動物TRのモジュレーターの効果は、組織又は器官を再生するための様々な脊椎動物モデルにおいて試験することができる。例えば、ヒレ再生は、ゼブラフィッシュにおいて、例えば(Mathew L K, Unraveling tissue regeneration pathways using chemical genetics. J Biol Chem. 282(48):35202-10 (2007))に記載されているように評価することができ、四肢再生のモデルとして役立てることができる。組織及び器官、例えば心臓、肺、四肢、骨格筋、骨などの再生に対する治療効果の試験に有用な齧歯動物、イヌ、ウマ、ヤギ、魚、両生類及び他の動物モデルは、広く入手することができる。例えば、筋骨格系再生に関する種々の動物モデルは、Tissue Eng Part B Rev. 16(1) (2010)で論じられている。肝臓再生を試験するために一般的に使用される動物モデルは、齧歯類の肝臓の大部分の外科的除去を含む。肝臓再生に関する他のモデルとしては、毒素、例えば四塩化炭素によって誘発される急性又は慢性の肝障害又は肝不全が挙げられる。いくつかの実施形態において、皮膚創傷の毛再生又は治癒のモデルは、皮膚のパッチを、例えばマウスから切除することを含む。毛包の再生、毛の成長、再上皮化、腺形成などを評価することができる。

【0198】

本明細書に開示された、並びに/或いは本明細書に記載の方法及び/又はアッセイ系を使用して同定された化合物及び組成物は、任意の適切な手段、例えば経口、鼻腔内、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、非経口、腹腔内、髄腔内、気管内、眼内、舌下、腔内、直腸内、経皮により、又は吸入により、例えばエアロゾルとして投与することができる。選択される特定の様式は、当然、選択される特定の化合物、治療しようとする特定の状態、及び治療有効性に必要とされる投与量に依存する。本発明の方法は、一般的に言えば、臨床的に許容されない(例えば、医学的又は獣医学的に許容されない)副作用を引き起こすことなく許容レベルの有効性を生じる任意の様式を意味する、医学的又は獣医学的に許容される任意の投与様式を使用して実施することができる。1つ以上の化合物の適切な調製物、例

えば実質的に純粋な調製物は、1つ以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤などと組み合わせ、対象への投与に適した適切な医薬組成物を製造することができる。そのような薬学的に許容される組成物は、本発明の一態様である。用語「薬学的に許容される担体又は賦形剤」とは、組成物の活性成分(複数可)の生物学的活性又は有効性を有意に干渉せず、また使用又は投与される濃度で宿主に対して過度に毒性ではない担体(この用語は担体(複数)、媒体、希釈剤、溶媒、ビヒクルなどを包含する)又は賦形剤を意味する。他の薬学的に許容される成分もまた組成物中に存在させることができる。適切な物質及び薬学的に活性な化合物の製剤化のためのそれらの使用は、当分野で周知である(例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences", E. W. Martin, 19th Ed., 1995, Mack Publishing Co.:

Easton, Pa.,並びに薬学的に許容される物質及び様々な種類の医薬組成物を調製する方法のさらなる議論については、そのより新しい版又はバージョン、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy. 21st Edition. Philadelphia, Pa. Lippincott Williams & Wilkins, 2005を参照されたい)。さらに、本発明の化合物及び組成物は、目的の特定の疾患又は状態を治療するために当分野で使用されている任意の化合物又は組成物と組み合わせて使用することができる。

【0199】

いくつかの実施形態において、LIN28Bは、CD34+造血細胞を含む血液細胞型において外因的に発現され、胎児肝由来の対応物の増殖及び生着能力に匹敵するin vivoでの骨髄へのそれらの増殖及び生着を促進する。

【0200】

医薬組成物は、典型的には、意図した投与経路に適合するように製剤化される。例えば、非経口投与用の製剤は、滅菌水性溶液又は非水性溶液、懸濁液及びエマルジョンが含まれる。水性担体としては、生理食塩水及び緩衝媒体、例えば塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガーを含む、水、アルコール/水溶液、エマルジョン又は懸濁液が挙げられる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチル、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒;防腐剤、例えば抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン;抗酸化剤、例えばアスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウム;キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸;緩衝剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸、並びに、張度調整剤、例えば塩化ナトリウム又はデキストロースである。pHは、酸又は塩基、例えば塩酸又は水酸化ナトリウムなどで調整することができる。そのような非経口製剤は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨て注射器又は複数回投与バイアルに封入することができる。

【0201】

経口投与に関して、化合物は、活性化合物を、当分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって容易に製剤化することができる。このような担体によって、本発明の化合物を錠剤、丸薬、糖衣錠、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化することができる。経口剤形に適した賦形剤としては、例えば、増量剤、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトールを含む糖;セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び/又はポリビニルピロリドン(PVP)などである。

【0202】

吸入による投与に関して、本発明の組成物は、適切な噴射剤、例えば二酸化炭素、フルオロカーボンのガスを含む加圧式容器若しくはディスペンサー又はネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達することができる。液体又は乾燥エアロゾル(例えば、乾燥粉末、多孔質大粒子など)を使用することができる。また本発明は、鼻スプレー又は他の形態の経鼻投与を使用する組成物の送達を意図する。

【0203】

局所適用に関して、医薬組成物は、そのような組成物における使用に適した1つ以上の薬学的に許容される担体中に懸濁又は溶解された活性成分を含有する適切な軟膏、ローション、ゲル又はクリームに製剤化することができる。

【0204】

眼への局所送達に関して、薬学的に許容される組成物は、例えば点眼剤若しくは軟膏剤で使用するための、又は例えば注入により眼内投与するための、pH調整した等張性滅菌生理食塩水中の溶液又は微粉懸濁液として製剤化することができる。

【0205】

医薬組成物は、経粘膜送達又は経皮送達用に製剤化され得る。経粘膜投与又は経皮投与に関して、浸透させようとする関門に適切な浸透剤を、製剤で使用するすることができる。そのような浸透剤は、一般的に当分野において公知である。本発明の医薬組成物は、坐剤(例えば、従来の坐剤基剤、例えばココアバター及び他のグリセリドを使用したもの)として、又は直腸送達用の保持浣腸剤として製剤化することができる。

【0206】

いくつかの実施形態において、組成物は、身体からの速やかな排出に対して活性薬剤を保護することを目的とした1つ以上の薬剤、例えば、放出制御製剤、インプラント、マイクロカプセル化送達システムなどを含む。組成物は、(例えば、胃腸管又は血流中での)安定性を改善する及び/又は吸収を増強する薬剤を組み込むことができる。化合物は、粒子、例えば微粒子又はナノ粒子に封入又は組み込むことができる。生分解性で生体適合性のポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、PLGA、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリエーテル、及びポリ乳酸を使用することができる。そのような製剤の調製方法は、当業者には明白であろう。例えば、限定するものではないが、siRNAの送達に関して、多くの粒子、脂質及び/又はポリマーベースの送達システムが当分野において公知である。本発明は、このような組成物の使用を意図している。またリポソーム又は他の脂質ベースの粒子も、薬学的に許容される担体として使用することができる。

【0207】

そのような組成物において使用するための医薬組成物及び化合物は、規制機関によって規定された規格、基準、又はガイドラインを満たす条件下で製造され得る。例えば、そのような組成物及び化合物は、Good Manufacturing Practices(GMP)に従って製造されてもよく、及び/又はヒトに投与される医薬品に適した品質管理手順に供されてもよく、また医薬品、外科手術又は他の治療上有用な製品の規制を担当する政府規制機関によって承認されたラベルを付けて提供することができる。

【0208】

本発明の医薬組成物は、治療目的で対象に投与される場合、好ましくは、それらが投与される疾患又は状態を治療するのに十分な時間及び量で投与される。活性剤の治療有効性及び毒性は、細胞培養又は実験動物における標準的な薬学的手順によって評価することができる。細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータは、ヒト対象又は他の対象における使用に適した投薬量の範囲を定める際に使用することができる。ヒト投与に関する異なる投与量は、当分野で公知のヒトにおける臨床試験においてさらに試験することができる。使用される投与量は、最大許容投与量又はより少ない投与量であってもよい。医薬組成物中の活性剤の治療有効量は、約0.001mg/kg～約100mg/kg体重、約0.01～約25mg/kg体重、約0.1～約20mg/kg体重、約1～約10mg/kg体重の範囲内であり得る。他の例示的な投与量としては、例えば、約1µg/kg～約500mg/kg、約100µg/kg～約5mg/kgが挙げられる。いくつかの実施形態において、単一投与量が投与され、他の実施形態において複数投与量が投与される。当業者には、任意の特定の状況における適切な投与量が利用される薬剤(複数可)の効力に依存し、任意選択で特定のレシピエントに調整され得ることが理解されよう。対象に関する特定の投与量レベルは、使用される特定の薬剤(複数可)の活性、対象の特定の疾患又は状態及びその重症度、年齢、体重、一般的な健康状態などを含む様々な

因子に依存し得る。投与を容易にし、投与量を均一にするために、医薬組成物、特に経口組成物又は非経口組成物用のものを単位投与剤形に製剤化することが望ましい場合がある。単位投与剤形は、その用語が本明細書で使用される場合、治療しようとする対象に関する単位投与量として適した物理的に個別の単位を意味する。各単位は、適切な薬学的に許容される担体とともに所望の治療効果を生じるように計算された活性剤(複数可)の所定量を含有する。治療レジメンが、数日、数週間、数ヶ月又は数年にわたって延長することが可能な期間の複数回投与量、例えば単位剤形の投与を含み得ることは理解されよう。対象は、1日に1回以上の投与を受けることができ、又は治療期間内に1日おき、若しくはそれより少ない頻度で投与を受けることができる。例えば、投与は、隔週、毎週などである。投与は、例えば、組織若しくは器官の適切な構造及び/若しくは機能が少なくとも部分的に回復するまで、並びに/又は化合物の継続的投与がさらなる再生若しくは改善を促進するように見えなくなるまで続けることができる。いくつかの実施形態において、対象は、本発明の組成物の1投与量以上を対象自身に投与する。

10

【0209】

いくつかの実施形態において、2つ以上の化合物又は組成物は、例えば再生を増強する目的で、組み合わせて投与される。組み合わせて投与される化合物又は組成物は、同一組成物中で一緒に、又は個別に投与することができる。いくつかの実施形態において、「組み合わせて」の投与とは、第1及び第2の化合物又は組成物の投与に関して、(i)第2の化合物の投与量が、第1の薬剤の直近で投与された投与量の90%超が不活性形態まで代謝されるか、又は身体から排除される前に投与されるように実施される投与、或いは(ii)第1及び第2の化合物の投与量が相互に48、72、96、120又は168時間以内に投与されるように実施される投与、或いは(iii)薬剤が(例えば、連続的又は断続的な注入によって)重複の期間中に投与されるように実施される投与、或いは(iv)上記のいずれかの組合せが実施される投与、を意味する。いくつかの実施形態において、2つ以上のiTR因子、又はテロメラーゼの触媒成分及びiTR因子を発現するベクターが投与される。いくつかの実施形態において、iTR因子は、再生及び極性を促進するのに有用な、1つ以上の成長因子、成長因子受容体リガンド(例えばアゴニスト)、ホルモン(例えば、ステロイドホルモン若しくはペプチドホルモン)、又はシグナル伝達分子との組合せと組み合わせて投与される。特に有用であるのは、再生コンピテント細胞を組織化するのに有用な組織化中心分子、例えば、本発明の方法を使用して産生されるものである。いくつかの実施形態において、成長因子は、上皮成長因子ファミリーメンバー(例えば、EGF、ニューレグリン)、線維芽細胞成長因子(例えば、FGF1~FGF23のいずれか)、肝細胞成長因子(HGF)、神経成長因子、骨形成タンパク質(例えば、BMP1~BMP7のいずれか)、血管内皮成長因子(VEGF)、wntリガンド、wntアンタゴニスト、レチノイン酸、NOTUM、フォリスタチン、ソニックヘッジホッグ、又は他の組織化中心因子である。

20

30

【0210】

当業者には、本明細書に記載されている本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、又は日常的な実験のみを使用して確認することができよう。本発明の範囲は、本明細書又はそこに記載されている詳細に限定されることを意図されていない。「a」、「an」及び「the」などの冠詞は、文脈から逆のこと又はそうでないことが明白に示されない限り、1つ以上を意味し得る。ある特定の本発明の方法は、多くの場合、細胞の集団を使用して、例えばin vitro又はin vivoで実施される。したがって、「細胞」への言及は、細胞が細胞集団、例えば、実質的に遺伝的に同一である細胞を含むか又はそれらからなる集団のメンバーである実施形態を含むと理解されなければならない。しかし、本発明は、本発明の方法が個別の細胞に適用される実施形態を包含する。したがって、「細胞」への言及は、細胞の集団内の個別の細胞に適用可能な実施形態、及び個別の単離された細胞に適用可能な実施形態を含むものと理解されなければならない。

40

【0211】

群の1つ以上のメンバーとの間に「又は」を含む特許請求の範囲又は説明は、文脈から逆のこと又はそうでないことが明白に示されていない限り、1つの、複数の、又はすべて

50

の群のメンバーが所定の生成物又はプロセスに存在し、使用され、又は関連する場合に満たされると考えられる。本発明は、群のまさに1つのメンバーが所定の生成物又はプロセスに存在し、使用され、又は関連する実施形態を含む。また本発明は、群の複数の又はすべてのメンバーが所定の生成物又はプロセスに存在し、使用され、又は関連する実施形態を含む。本明細書に記載されているすべての実施形態は、本発明のすべての異なる態様に適用可能であると考えられる。また、任意の実施形態は、適切な場合、1つ以上の他のそのような実施形態と自由に組み合わせることができることも考えられる。さらに、本発明は、1つ以上の請求項(オリジナルの請求項であろうとその後追加された請求項であろうと)からの1つ以上の限定、要素、節、説明的用語などが別の請求項(オリジナルの請求項であろうとその後追加された請求項であろうと)に導入される、すべての変形、組合せ及び置き換えを包含するものと理解される。例えば、別の請求項に従属する任意の請求項は、同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項で確認される1つ以上の要素又は限定を含むように変更することができ、また異なる請求項に存在する要素に言及する任意の請求項は、そのような請求項と同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項で確認される1つ以上の要素又は限定を含むように変更することができる。さらに、請求項が組成物を詳述する場合、本発明は、例えば本明細書に開示の方法に従って組成物を製造する方法、及び例えば本明細書に開示の目的のために組成物を使用する方法を提供する。請求項が方法を詳述する場合、本発明は、方法の実施に適した組成物、及び組成物を製造する方法を提供する。また、請求項が組成物の製造方法を詳述する場合、本発明は別段の指示がない限り、又は当業者が矛盾若しくは不整合が生じることを認識しない限り、本発明の方法に従って製造される組成物、及びその組成物を使用する方法を提供する。要素がリストとして、例えばマーカッシュグループ形式で提示される場合、要素の各サブグループも開示され、また任意の要素(複数可)をグループから除くことができる。簡潔にするために、これらの実施形態のうちのいくつかだけが本明細書に具体的に詳述されているが、本発明はそのような実施形態のすべてを含む。また、一般的に、本発明又は本発明の態様が特定の要素、特徴などを含むと言及されている場合、本発明の特定の実施形態又は本発明の態様はそのような要素、特徴などからなるか、又はそれらから実質的になるものと理解されなければならない。

【0212】

数値範囲が本明細書で言及される場合、本発明は、終点が含まれる実施形態、両方の終点が除外される実施形態、及び1つの終点が含まれ他の終点が除外される実施形態を含む。両方の終点は、別段の指示がない限り含まれるものとする。さらに、別段の指示がない限り、又は文脈及び当業者の理解から明白でない限り、範囲として示される値は、本発明の異なる実施形態における記載された範囲内の任意の特定の値又は部分範囲をとることができ、文脈が明白に他のことを指示しない限り、その範囲の下限の単位の10分の1を意味するものとする。「Xより小さい」、「Xより大きい」、又は「少なくともX」などの語句が使用されている場合(ここでXは数字又は百分率である)、任意の適切な値が範囲の下限又は上限として選択され得る、と理解されるべきである。また、数値のリストが(「少なくとも」で始まるかどうかにかかわらず)記載されている場合、本発明は、リスト中の任意の2つの値によって定義される任意の介在値又は範囲に関連する実施形態を含むこと、また下限値を最小値とし、上限値を最大値としてもよい、と理解される。さらに、数字のリスト、例えばパーセンテージが「少なくとも」で始まる場合、その用語はリスト中の各数字に適用される。数値が「約」又は「およそ」で始まる本発明の任意の実施形態において、本発明は、正確な値が列挙される実施形態を含む。数値が「約」又は「およそ」で始まらない本発明の任意の実施形態において、本発明は、その値が「約」又は「およそ」で始まる実施形態を含む。「およそ」又は「約」は、一般に、別段の記載がない限り、又は文脈から明白でない限り(例えば、そのような数が100%の可能な値を許容できないほど超える場合)、いずれかの(その数より大きい又は小さい)方向の数の1%、又はいくつかの実施形態においては5%、又はいくつかの実施形態においては10%の範囲内にある数を含む。本明細書で使用される場合の「組成物」は、他に指示がない限り、1つ以上の成分を含

み得る。例えば、「アクチベーター又はTRアクチベーターを含む組成物」は、TRアクチベーターのアクチベーターからなるか又はそれらから本質的になり得、或いは1つ以上のさらなる成分を含有し得る。他に指示がない限り、本発明のいずれかの実施形態におけるインヒビター又はTRインヒビター(又は本明細書で言及されている他の化合物)は、TRアクチベーターのアクチベーターの存在を含む1つ以上のさらなる成分を含む組成物中に含めて使用又は投与され得る、と理解されなければならない。

【0213】

iTM因子及びiCM因子の起源

iTM因子及びiCM因子は、EFTのマーカーを欠損している胚細胞(例えば非限定的な例として、COX7A1を発現しない間質細胞)を様々な薬剤に曝露し、前記マーカー、例えばCOX7A1、又はレポーター構築物、例えばCOX7A1遺伝子プロモーターを使用して発現されるGFPの誘導をアッセイすることによって同定することができる。

【0214】

エキソソームは新たな増殖、移動及び分化の特性を付与するように細胞をリプログラミングすることができる強力なタンパク質及びRNA因子を有しているため、本発明者らは、それらが細胞の成長状態、すなわちiTM及びiCMをリプログラミングすることができるか否かについて試験した。したがって、本発明者らは、成体細胞由来のエキソソームを、胚細胞での成体遺伝子の誘導について試験した。本発明者らは、一連の15個のhESC由来クローン胚性前駆細胞株のIlluminaマイクロアレイ解析を使用した全RNA発現プロファイルを評価し、様々な解剖部位(図示せず)から取得した18個の初代内皮細胞株(新生児から成体)をこれらと比較した。本発明者らは、EFTを通過した細胞由来のエキソソームが、COX7A1の発現を、そのような発現を事前に欠損していた胚細胞において誘導することができること、及び本明細書に記載の他のマーカーを使用して細胞を成熟させることができることを決定した。

【0215】

(実施例)

[実施例1]

オンラインマイクロアレイデータ及び培養したクローン胚性前駆細胞株からのデータを用いたDNNトレーニング。

本発明者らは、公開データベースのGene Expression Omnibus(GEO)及びArrayExpressからのデータ、並びにBioTime, Inc.によって提供された追加のデータセットを使用した。集められた各サンプルは、以下の広範囲の細胞クラスのいずれかに属する:胚性幹細胞(ESC)、誘導多能性幹細胞(iPSC)、胚性前駆細胞(EPC)、成体幹細胞(ASC)及び成体細胞(AC)。この実施例におけるサンプルは、以下のマイクロアレイプラットフォームから取得した:Illumina HumanHT-12 V4.0 (GPL10558)、Illumina HumanHT-12 V3.0 (GPL6947)、Affymetrix HTヒトゲノムU133Aアレイ (GPL3921)、Affymetrix GeneChipヒトゲノムU133アレイセットHG-U133A(GPL4557)、Affymetrixヒトエクソン1.0 STアレイ (GPL5188)、AffymetrixヒトゲノムU133プラス2.0アレイ (GPL570)、AffymetrixヒトゲノムU133A 2.0アレイ (GPL571)、Affymetrixヒト遺伝子1.0 STアレイ (GPL6244)、AffymetrixヒトゲノムU133Aアレイ (GPL96)、AffymetrixヒトゲノムU133プラス2.0アレイ (GPL11670)。処理されたデータで作業する場合、同じベンダーによるプラットフォーム間は区別しなかった。細胞クラスの選択は、最も多様な幹細胞の発達段階を取得する必要性により動機付けられた。成体細胞は、以下の組織:腎臓、肝臓、筋肉、血液及び神経組織に由来する細胞を含んでいた。成体幹細胞は、脂肪由来幹細胞、上皮幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞及び神経幹細胞を含んでいた。

【0216】

本発明者らは、Affymetrix(4,822サンプル)及びIllumina(7,582サンプル)のマイクロアレイプラットフォームから12,404個の健常な未処置組織サンプルの転写プロファイルを集め、前処理した。収集したサンプルは、5つのカテゴリー:胚性幹細胞(ESC)、誘導多能性幹細胞(iPSC)、胚性前駆細胞(EPC)、成体幹細胞(ASC)及び成体細胞(AC)に割り当てた。収

集したサンプルの集団は、実質的に均質であった。

【0217】

各マイクロアレイプラットフォームに関して、次に本発明者らは個別に6つの異なる分類器:k近傍(K-nearest neighbors) (kNN)、PCAベースの次元縮小によるロジスティック回帰(LR)、サポートベクターマシン(SVM)、勾配ブースティングマシン(GBM)、マルチクラスディープニューラルネットワーク(DNN)、及び20のディープニューラルネットワークのアンサンブル(DNN ens.)をトレーニング(訓練)した。DNNアンサンブルを除いたすべての分類器については、本発明者らはハイパーパラメータ検索を実施し、DNNアンサンブルについては、単一DNNに対して得られた最適なネットワークハイパーパラメータを使用した。単一マルチクラスDNNの使用には多くの欠点があることが示されたため、本発明者らは、2つのクラスのディープニューラルネットワークのアンサンブルを使用する、より多くの計算量を必要とするがより正確な方法も開発した(図1)。本発明者らは、ペアワイズ(1対1)分類を実施するため、各標的プラットフォームセット(Affymetrix及びIllumina)に対して20バイナリーネットワークをトレーニングした。次いで、本発明者らは、各クラスについての全体的なアンサンブル票決を4つの1対1ネットワークの合計として評価した。これによりこのクラスが4つの他のクラスからペアで区別された。いずれかのクラスの偽陽性票決がこれによって最小限になり、胚スコアのより滑らかな分布が達成された。分類性能を図2に示す。

10

【0218】

Affymetrixマイクロアレイ遺伝子レベルデータでは、ディープニューラルネットワークアンサンブルはトレーニングデータセットで平均0.99 F1スコアに達し、検証データセットでは0.75であったが、他の方法では外的検証データセットで0.50~0.64 F1スコアに達した。Illuminaマイクロアレイ遺伝子レベルデータの場合、ディープニューラルネットワークは、トレーニングデータセットで平均0.99 F1スコアに達し、外的検証データセットでは0.83であったが、他の方法では外的検証データセットで0.52~0.58 F1スコアに達した。

20

【0219】

明らかなように、古典的な方法、例えばkNN及びLRなどは、SVM、XGB、DNNの方法よりもパフォーマンスが著しく劣っている。DNNアンサンブルを使用することにより、実質的により良好なパフォーマンス(Affymetrixに関しては約12%の相対的改善、及びIlluminaに関しては36%の相対的改善)が達成された。

30

【0220】

経路レベル解析に関しては、本発明者らは、本明細書に記載のOncoFinderと呼ばれる既に確立された経路解析方法を使用した。これは、生物学的機能に関する情報を維持し、次元縮小を可能にする。経路レベル(図3c、図3d)では、トレーニングセットの精度が低いにもかかわらず、DNNアンサンブルパフォーマンスが、検証セットで、それぞれAffymetrix及びIlluminaのプラットフォームに対してF1スコア0.74及び0.81の遺伝子レベルで達成されたのと同様であったことが明らかである。

【0221】

本発明者らは、ラベル付き交差検証手順を使用することの重要性に注目したい。同じデータセット由来のサンプルがトレーニングセットと検証セットの両方に存在する場合、分類器のパフォーマンスは大幅に過大評価される(すべての方法で0.9を超える検証パフォーマンス、データは示さず)。これは、バッチ効果が転写データにどの程度影響するか、また新しいデータセットに対する分類器挙動の不偏推定を得るために交差検証手順の注意深い選択が必要であることを強調している。

40

【0222】

DNNアンサンブルのアウトプットに基づいて、本発明者らは統合胚スコア(ES)を開発した。DNNアンサンブルに基づくスコアのパフォーマンスを調べるため、本発明者らは、神経分化の異なる段階に属するサンプルからなる転写データセットを使用した。このデータセットはAffymetrixプラットフォームにプロファイリングされており、本発明者らは分化

50

段階に伴うESの明らかな減少を観察することができる(図3d)。Affymetrixに基づくDNNアンサンブルに関して、ESスコアの最初の有意な低下は早期(14日目)及び中期(35日目)の放射状グリア細胞間で起こり、その後、再び低下し、後期放射状グリア細胞(80日目)及び長期神経前駆細胞(220日目)ではES~0.65あたりで横ばいになる。一方、IlluminaベースのDNNアンサンブルは極めて感度が高く、ESは細胞がヒトESCから分化したら直ちに低下した(H9株)。図3cに示すように、遺伝子COX7A1、PCDHB2、COMT、CAT、及びADIRF(c10orf116)は、胚細胞型vs成体細胞型で異なって発現された。

【0223】

哺乳動物EFTのマーカーとして遺伝子を検証するため、本発明者らは、内胚葉、中胚葉、外胚葉、及び神経堤の誘導物を示す15種の多様な成体由来細胞型、並びに17種のクローン胚性前駆細胞株のパネルにおいて、RNA-seqを使用して、図4に示した合計83種の識別(discriminator)遺伝子を試験した。t-検定を使用した解析は、FDR $P < 0.005$ の14種の次のマーカーを示した;すなわち、CAT、COMT、TRIM4、NAALADL1、MGMT、SPESP1、PLPP7、TSPYL5、PCDHB2、COX7A1、ZNF280D、DYNLT3、CYTH2、及びPLEKHA1(図5)。これら14種のマーカーのうち、11種の遺伝子CAT、COMT、TRIM4、NAALADL1、MGMT、SPESP1、PLPP7、TSPYL5、COX7A1、ZNF280D、及びDYNLT3は成体由来細胞における発現の増加を示し、2種の遺伝子PCDHB2、CYTH2、及びPLEKHA1は胚性前駆細胞における発現の増加を示した。胚再生能の可能性のある調節因子として既に同定されたLIN28Aは差次的に発現されず、一方、LIN28Bは胚性前駆細胞株のサブセット、特に血管内皮のマーカーを有するものにおいて発現されたが、それらの成体対応物においては発現されなかった。

【0224】

EFTのマーカーとしての13種の遺伝子をさらに検証するため、マウスEFTにまたがる胚の時点でマウス全体において発現レベルを測定した(カーネギー段階23/セイラー段階(Theiler Stage)24又はE16にほぼ対応すると推定される)。図6に示したとおり、遺伝子COX7A1、NAALADL1、及びPLPP7は、マウスEFTに近い時点で顕著なアップレギュレーションを示したが、遺伝子LIN28Bの発現は、同じ期間で低下した。

【0225】

ヒトの発達におけるマーカーを検証するため、本発明者らは、同一条件ですべて培養された胎児発達の開始(妊娠8週)から上腕の初期継代皮膚線維芽細胞を利用した。図7に示したIllumina遺伝子発現ビーズアレイに基づくデータは、COX7A1、NAALADL1、及びPLPP7遺伝子が発達の8週から再び誘導されたことを示し、おそらく最も顕著なマーカーはCOX7A1であり、これは胎児及び出生後の発達を通して発現において徐々に増加し、成体期には横ばいになるようであった。LIN28BはES細胞において最も高いレベルで発現され、胚性前駆細胞及び初期胎児発生からの線維芽細胞においては低いが検出可能なレベルで発現されたが、成体由来細胞においては発現されなかった。本発明に記載されているEFT遺伝子発現のすべてのパターンは、老化線維芽細胞由来iPS細胞において遺伝子発現の成体パターンから胚性パターンに効果的にリプログラミングされた。例えば、図7で明らかなように、60歳、61歳及び62歳のドナー由来の正常皮膚線維芽細胞は、比較的高いレベルのCOX7A1、NAALADL1及びPLPP7 mRNAを発現したが、多能性に転写的にリプログラミングされたもの(図7において「iPS細胞-60 Yr」、「iPS細胞-61 Yr」、「iPS細胞-62 Yr」と表記したもの)は、胚性(胎児前又は出生前)のパターンを発現した。iPS細胞へのリプログラミングは、本明細書に記載のように実施した。簡単に説明すると、成体由来のCOX7A1、NAALADL1及びPLPP7-発現ヒト線維芽細胞を、マトリゲルをコーティングした6ウェルプレート上に細胞をプレーティングし、mRNAをOCT4(POU5F1)、SOX2、KLF4、MYC及びLIN28にトランスフェクトする(0日目)ことにより多能性へリプログラミングした。1~12日目に、細胞にOCT4(POU5F1)、SOX2、KLF4、MYC及びLIN28カクテルを再度トランスフェクトした。12日目から14日目まで、多能性へのリプログラミングを、live-染色Tra-1-60抗体で確認し、iPS細胞コロニーを選んだ。

【0226】

次に、本発明者らは、3種類の肉腫(骨肉腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫)における遺伝子の

発現を調べた(図8を参照)。骨軟骨分化が可能な胚性前駆細胞、例えば4D20.8株は、高レベルの骨軟骨マーカーを発現しているにもかかわらず、前駆状態又は分化状態のいずれにおいてもCOX7A1、NAALADL1又はPLPP7発現の証拠を示さなかった。反対に、成体由来のMSCは、分化の前後で、COX7A1、NAALADL1及びPLPP7を発現した。骨肉腫において、その株は一般に遺伝子発現の胚性パターンを示した。例えば、4/5骨肉腫細胞株は、検出可能なCOX7A1転写物をほとんど又は全く示さなかった。同様に、E3と命名した脂肪生成分化が可能な胚性前駆細胞株は、脂肪分化の強固なマーカーを発現するにもかかわらず、COX7A1、NAALADL1又はPLPP7を誘導しなかったが、成体由来の皮下脂肪組織(SAT)脂肪前駆細胞は、比較的未分化の脂肪細胞及び完全に分化した脂肪細胞の両方において、COX7A1、NAALADL1及びPLPP7を発現した。しかし、試験した2種の脂肪肉腫細胞株において、マーカーは、遺伝子発現の胚性パターンを反映するようであり、例えば、両脂肪肉腫株は、COX7A1転写物を全く発現しないか又は非常に低レベルで発現した。最後に、5種の横紋筋肉腫細胞株を、SK5と命名した胚性筋芽細胞前駆細胞株及び成体由来筋芽細胞と比較して同様に試験した。骨格筋細胞及び心筋細胞において高度に発現されていると既に記載されているCOX7A1は、成体由来細胞において高レベルで発現されたが、胚性前駆細胞株SK5においては発現されず、横紋筋肉腫細胞株の4/5で発現されないか低レベルで発現され、またLIN28Bは、その株の3/5で比較的高いレベルで発現された。

【0227】

胚移行のマーカーとしての遺伝子COX7A1、NAALADL1及びPLPP7、並びに胚状態のマーカーとしての遺伝子LIN28Bの検証のさらなる証拠として、3つの遺伝子対(すなわち、LIN28B対COX7A1、NAALADL1又はPLPP7)が、様々な肉腫細胞株において、強いインバース一致(inverse agreement)をもって同定された。すなわち、一方の遺伝子が発現された場合は他方の遺伝子は発現されなかったか、又は両遺伝子が発現されなかった。発現は、100XYZより大きいXYZとして定義された。対の遺伝子を図9に示しているが、陰影領域は遺伝子の強いインバース一致を強調している。LIN28BとCOX7A1の間のインバース一致の割合は83.3%(95%CI: 66.4~92.7)、LIN28B及びNAALADL1は100%(95%CI: 88.6~100)であり、LIN28B及びPLPP7は73.3%(95%CI: 55.6~85.8)である。

【0228】

[実施例2]

hES細胞由来クローンEP細胞株においてiTmを生じ得るホルモン剤をスクリーニングするための胚マーカーPCDHB2及び胎児-成体マーカーCOX7A1の使用。

4D20.8と命名されたクローンEP細胞株は、参照により本明細書に組み入れられる(Westら、Regen. Med. (2008) 3(3), 287-308)に記載されているように、相対的未分化の状態連続的に継代した。相対的未分化の前駆状態において、4D20.8株は、相対的に高レベルのPCDHB2などの胚状態(胎児前状態)の細胞と一致するマーカーを発現するが、それらが由来するhES細胞と同様のCOX7A1のレベルは検出されない。8週間よりも長時間かけたP36へのin vitroでの連続的な継代の後、COX7A1発現の誘導は観察されず、PCDHB2発現の欠損はあったとしてもわずかであった。したがって、本発明者らは、連続的な継代及び単一な時間経過は、EP細胞を胎児移行に成熟させるのにそれだけでは十分ではないとの結論を下した。同様に、TGFβ3及びBMP4の存在下で、62日間マイクロマス条件下にて胚性前駆細胞株4D20.8を分化させると、同様にCOX7A1の誘導は生じず、PCDHB2発現の部分的な低下だけが生じた。

【0229】

したがって、4D20.8株は、iTmを促進し得る因子のスクリーニングに有用である。4D20.8又は他の胚性前駆細胞を以下のプールを含むホルモン因子に曝露し、RNAを2、4又は6週間後に細胞から回収し、成体マーカー、例えばCOX7A1の誘導又は胚マーカー、例えばPCDHB2の低下をアッセイする。スクリーニングされるホルモン因子は次のとおりである:

脳下垂体プール: 甲状腺刺激ホルモン(TSH) 1nM、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH) 5nM、黄体形成ホルモン(LH) 100ng/ml、卵胞刺激ホルモン(FSH) 10ng/ml、ソマトトロピン/成長ホルモン(GH) 1ng/ml、プロラクチン(PRL) 50ng/ml、メラノサイト刺激ホルモン(MSH) 1ng/

ml、オキシトシン10nM、アルギニン0.5mM、バソプレシン1uM。

視床下部プール:チロトロフィン放出ホルモン(TRH 1uM)、コルチコトロフィン放出ホルモン(CRH) 100nM、アルギニンバソプレシン(AVP) 1uM、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH) 1ug/ml、成長ホルモン放出ホルモン(GHRH) 10nM、ソマトスタチン1nM、プロラクチン放出因子(PRF) 10nM、ドーパミン50uM。

甲状腺/副甲状腺プール:T3 2nM、T4 10ng/ml、副甲状腺ホルモン50nM。

膵臓プール:インスリン5ng/ml、グルカゴン5ug/ml、ソマトスタチン1nM、膵臓ポリペプチド2ng/ml。

副腎プール:コルチゾール10nM、アルドステロン2ng/ml、デヒドロエピアンドロステロン10uM、エピネフリン1uM、ノルエピネフリン1uM。

生殖腺プール:テストステロン50ng/ml、エストロゲン5nM、プロゲステロン100nM。

胎盤プール:絨毛性ゴナドトロピン1ng/ml、ヒト絨毛性ソマトトロピン(hCS)、ヒト絨毛性コルチコトロピン(hCACTH)、絨毛性サイトロピン(hCT)。

プール1+2+3

プール1+2+5

プール1+2+3+5。

【0 2 3 0】

[実施例 3]

RNA-seqにより測定した場合に胚細胞vs成体細胞において差次的に発現される新規RNA。

RNAシーケンシングは、Illumina HiSeq4000プラットフォーム上で、最低2500万の100塩基対の対末端リードの深さまで実施した。データは、Tuxedo suiteプロトコル(Trapnell C.ら、Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks; Nat Protoc. 2012 Mar 1;7(3):562-78. doi: 10.1038/nprot.2012.016.)を使用して処理した。アラインメントデータは、提示されたデータ及びFPKM値を用いて、Integrative Genomics Viewer (Robinson、J.ら、Integrative Genomics Viewer, Nature Biotechnology 29, 24-26(2011))を使用して視覚化する。新規の胚特異的マーカー及び成体特異的マーカーを図10に示す。図11に示すように、成長因子AMHは、胚細胞において極めて高レベルで発現された。図12に示すように、非コードRNA LINC01021は、成体細胞と比較すると胚性前駆細胞においてより高レベルで発現され、RNAは前駆細胞の分化とともに普及率が低下した。図13に示すように、転写物RGPD1は、極めて高レベルのRGPD1転写物を発現する成体肝細胞を除き、成体細胞と比較すると胚において一般的により高レベルで検出された。図14に示すように、ZNF300P1からの転写物は、成体細胞型において(しかし肝細胞においてではない)一般的に発現されたが、ほとんどの胚性前駆細胞においては発現されなかった。図15に示すように、転写物LINC00654は、成体においては一般的に発現されたが、胚性前駆細胞においては発現されなかった。図16に示すように、PCDHGA12の転写物は、胚性前駆細胞と比較すると成体由来細胞において顕著に発現された。本明細書に記載されている他の遺伝子と同様に、胚性パターンの増加はiTRを促進し、成体パターンの増加はiTM及びiCMを促進した。

【0 2 3 1】

[実施例 4]

RNA-seqにより測定した場合に胚細胞vs成体細胞におけるクラスター化プロトコドヘリン遺伝子の差次的発現。

RNAシーケンシングは、Illumina HiSeq4000プラットフォーム上で、最低2500万の100塩基対の対末端リードの深さまで実施した。データは、Tuxedo suiteプロトコル(Trapnell C.ら、Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks; Nat Protoc. 2012 Mar 1;7(3):562-78. doi: 10.1038/nprot.2012.016.)を使用して処理した。アラインメントデータは、Integrative Genomics Viewer (Robinson、J.ら、Integrative Genomics Viewer, Nature Biotechnology 29, 24-26(2011))を使用して視覚化する。図17に示すように、胚細胞型vs成体細胞型におけるクラスター化プロトコドヘリン遺伝子座のエクソンからの読み取りにおいて多数の顕著な差

10

20

30

40

50

異が観察され、胚細胞は一般に α 遺伝子及び β 遺伝子からより多くの転写物を発現し、成体細胞は γ クラスター遺伝子からより多く発現した。本明細書に記載されている他の遺伝子と同様に、胚性パターンの増加はiTRを促進し、成体パターンの増加はiTM及びiCMを促進した。

【0232】

[実施例5]

本発明のマーカ―を使用するiTRを誘導し得る因子のスクリーニング。

肺がん(A549)、乳がん(MCF7)及び前立腺がん(PC3)細胞株を、生物学的に活性な小分子を含む多様な因子及び特定の遺伝子に対するRNAiに曝露し、COX7A1転写物の相対的なレベルの低下をiTRのマーカ―として使用した。図18に示すように、HSP90インヒビター、例えばラジシコール及びアルベスピマイシンは、HIF1A、クルクミン、アザシチジン(5-アザ-2'-デオキシシチジン)、並びにAurora B/Cキナーゼのインヒビター、例えばGSK1070916及びMK-5108、高度に選択的なAurora-Aキナーゼインヒビターに対するRNAiの作用と同様に、COX7A1発現を低下させる。

【0233】

[実施例6]

本発明のマーカ―を使用するiCMを誘導し得る因子のスクリーニング。

肺がん(A549)、乳がん(MCF7)及び前立腺がん(PC3)細胞株を、生物学的に活性な小分子を含む多様な因子及び特定の遺伝子に対するRNAiに曝露し、COX7A1転写物の相対的なレベルの増加をiCMのマーカ―として使用した。図19～図20に示すように、トリコスタチン-A、パノビノスタット、アピシジン及びジビノスタットを含む多数のヒストン脱アセチル化酵素インヒビターは、トリプトライド及び抗腫瘍活性を有することが報告されているポロ様キナーゼ1の強力な選択的なインヒビターであるBI 2536、並びにホスホイノシチド3-キナーゼの非特異的共有結合性インヒビターであるワートマニン、及びダクチノマイシン、フルクロキサシリン、ゲフィチニブ、ミトキサントロン、ビテキシン、ダウノルビシン、カルベノキソロン、スルマゾール、アルボシジブ、SN-38、テニボシド、カリクリン、スタウロスポリン、及びドキシソルビシンと同じく、がん細胞株においてCOX7A1発現を増加させた。したがって、これらの薬剤は、がん、特に、遺伝子発現の胚性パターンを呈する、本明細書に記載されているマーカ―を使用して決定されるこれらのがんの治療において治療上有用である。

【0234】

[実施例7]

細胞を多能性に復帰させないiPS細胞因子を使用する分化した胎児又は成体由来細胞におけるiTRの最適条件のスクリーニング。

上記の実施例1で示すように、遺伝子OCT4、SOX2、KLF4、MYC及びLIN28AのmRNAの使用によるなどの成体由来分化細胞の多能性への転写リプログラミングは、本発明に記載されているiTRに関連する複数の遺伝子発現変化のパターンを生じる。したがって、カクテルそれ自体は、変性疾患の面において組織再生を増加させるiTR剤として、実施例1に示したようなin vitroにおいてだけでなく、本明細書に記載されているようにin vivoにおいても使用することができる。しかし、そのようなリプログラミング因子のカクテルをin vivoで長期間投与することにより、in vivoでの細胞の多能性への復帰、それに続く奇形腫、異常な異所性組織、又は悪性腫瘍の出現の本質的なリスクを有する可能性があるため、細胞を完全に多能性にリプログラミングすることなく、in vitro及びin vivoで胎児由来細胞及び成体由来細胞において遺伝子発現のiTRパターンを安全に生じさせる方法を同定することが必要とされている。そのようなプロトコルは、EFTをトラバースした細胞のマーカ―を発現する、例えばCOX7A1、CAT及びNAALADL1を発現する前記胎児由来分化細胞又は成体由来分化細胞の後成的なリプログラミングの方法を提供し、その結果、前述の遺伝子のプロモーターが比較的高い程度までメチル化され、それにより、細胞が多能性に復帰することなく、又は外因性薬剤投与前の一次胚葉(すなわち中胚葉、外胚葉、内胚葉、神経堤)からそれらの最終結果を変化させることなく、細胞が遺伝子発現の胎児前(すなわちi

R)パターンに戻される。理想的には、そのようなスクリーニングは、標的組織における悪性腫瘍のリスクをさらに低減するために、iPS細胞生成因子を使用することなくiTRを生成することができる下流の調節因子をさらに同定する。

【0235】

そのような条件を同定するこの最適化プロトコルは、以下のように同定される。成体由来の正常皮膚線維芽細胞、及び個別に、テロメラーゼの触媒成分を発現するレンチウイルス(TERT)を用いて不死化されネオマイシン(G418)耐性を使用することにより選択された同一線維芽細胞に、それぞれ、OCT4、SOX2、KLF4、NANOG、ESRRB、NR5A2、CEBPA、MYC、LIN28A及びLIN28B遺伝子を単独で及び多様な組合せで発現するレンチウイルスベクターを、また以下の化合物の組合せのような小分子化合物:CHIR99021を含むがこれに限定されないグリコゲンシンターゼ3(GSK3)インヒビター;SB431542、A-83-01、及びE616452を含むがこれに限定されないTGF- β シグナル伝達のインヒビター;バルプロ酸、フェニル酪酸塩、及び酪酸塩を含むがこれらに限定されない脂肪酸化合物を含むがこれに限定されないHDACインヒビター;トラボキシニンB及びデブシペプチドを含む環状テトラペプチド;ヒドロキサム酸、例えば、トリコスタチンA、ポリノスタット(SAHA)、ベリノスタット(PXD101)、LAQ824、パノピノスタット(LBH589)、ベンザミド系エンジノスタット(MS-275)、CI994、モチエノスタット(MGCD0103);サーチュインインヒビターニコチノマイド、NADの多様な誘導体、ジヒドロクマリン、ナフトピラノン、及び2-ヒドロキシナフタレンアルデヒド、若しくはIV(HDAC11)脱アセチル化酵素を含む、クラスI(HDAC1、HDAC2、HDAC3、及びHDAC8)、クラスIIA(HDAC4、HDAC5、HDAC7、及びHDAC9)、クラスIIB(HDAC6及びHDAC10)、クラスIII(SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6若しくはSIRT7)を特異的に標的とするもの;パルネートを含むがこれに限定されないH3K4/9ヒストンデメチラーゼLSD1のインヒビター;EPZ004777を含むがこれに限定されないDot1Lのインヒビター;Bix01294を含むがこれに限定されないG9aのインヒビター;RG108を含むがこれに限定されないDNAメチルトランスフェラーゼのインヒビター、DZNepを含むがこれに限定されないEZH2のインヒビター;5-アザ-2'-デオキシシチジン(商品名Vidaza及びAzadine);DNAメチル化を抑制し、脱メチル化の第一段階である5hmCを増加させるTet1を増加させることができるビタミンC;PS48を含むがこれに限定されない3'ホスホイノシチド依存性キナーゼ1のアクチベーター;ケルセチン及びフルクトース2,6-ビスホスフェート(ホスホフルクトキナーゼ1のアクチベーター)を含むがこれらに限定されない解糖の促進剤;ケルセチンを含むがこれに限定されないHIF1転写複合体の活性を促進する薬剤;AM580、CD437、及びTTNPBを含むがこれらに限定されないRARアゴニスト;レスベラトロールを含むがこれに限定されない低酸素症を模倣する薬剤;LSD1のダウンレギュレーションを介してエピジェネティックな修飾を促進する薬剤、リチウムを含むがこれに限定されないH3K4特異的ヒストンデメチラーゼ;又はPD032590を含むがこれに限定されないMAPK/ERK経路のインヒビターとの多様な組合せをさらに感染させる。このような化合物は、例えば、COX7A1若しくはCAT又は本明細書に記載のiTRの他のインヒビターの低下した発現をアッセイすることにより、及び/又はPCDHB2若しくはAMH又は本明細書に記載のiTRの他のアクチベーターの増大した発現をアッセイすることにより、グローバルiTRのマーカーを使用して、in vitroで培養した細胞に対して、或いはin vivoでの損傷組織若しくは病変組織において、或いはin vivoでの動物の寿命のモジュレートにおいて、iTRの効果を最適化するために様々な組合せ、濃度で、また異なる期間、投与することができる。

【0236】

MDW細胞(正常及びTERT-不死化)は、10%FBSを含有するDMEM培地を入れた12ウェルプレートにおいて、 1×10^5 細胞/ウェルで播種した培養物にin vitroでプレーティングした。ポリブレンを培地に添加した(8ug/mLの最終濃度となるよう1mLのウイルス/培地に対して0.8 ul/mLのポリブレン(10ug/ulのストックで))。ウイルスをウェルあたり1mlで添加した。対照タイプ1(「エンブティウイルス」=GFPのみを発現するウイルス);対照タイプ2(非感染)については1つのウェルを使用した。2つの異なるタイプの細胞があったので(TERTの有無)、2セットの対照が存在した。培地を静かにかき混ぜて混合し、細胞を被覆した。ウイル

スを入れた細胞のプレートは、一晚37℃及び5%CO₂のインキュベーターに戻した。形質導入後の1日目に、ウイルス培地を除去し、10%FBSを補充した通常のDMEM培地と交換し、1日おきに供給し、次いでRNAをRNAシーケンシング用に回収した。

【0237】

遺伝子COX7A1、CAT、及びNAALADL1の発現、並びにDNMT3B、及びHELLS又はTra-1-60、Tra-1-81及びSSEA4を含む多能性の遺伝子発現又はタンパク質マーカーのiTRパターンに関するin vitroアッセイは、それぞれ、標的細胞を多能性に復帰させることなく、iTR遺伝子発現のグローバルパターンを最適化するために実施される。スクリーニングされる個々の薬剤及び薬剤の組合せの例は、OCT4、SOX2、KLF4、MYC及びLIN28A;OCT4;KLF4;OCT4、KLF4;OCT4、KLF4、LIN28A;OCT4、KLF4、LIN28B;SOX2;MYC;NANOG;ESRRB;NT5A2;OCT4、SOX2、KLF4及びLIN28A;OCT4、SOX2、KLF4及びLIN28B;OCT4、KLF4、MYC及びLIN28Aである。最初の4週間、0.25mMのNaB、5 µMのPS48及び0.5 µMのA-83-01と一緒に、前述の薬剤のそれぞれの組合せで、続いて0.25mMの酪酸ナトリウム、5 µMのPS48、0.5 µMのA-83-01及び0.5 µMのPD0325901で処理し、それらの各々について、iTR遺伝子発現のグローバルモジュレーションのマーカーを0、1、2、4、7、10、及び14日目にアッセイする。

【0238】

テロメア長が制限されている場合の遺伝子TERTの一過性発現などのテロメラーゼの触媒成分の発現の増加と組み合わせた場合に得られる最適化条件は、組織再生を誘導するin vitro又はin vivoでの胎児細胞又は成体細胞における、COX7A1、PLPP7、及びNAALADL1遺伝子発現の低下を含むがこれに限定されないiTRパターンの遺伝子発現を誘導する手段を提供する。

【0239】

図24に示すように、2つの製造業者、Genecopia(G)及び他の業者(0)からのLIN28Aを、Genecopoeiaベクターとともに使用し、最高発現レベルのLIN28Aを得た(「*」の印を記載)。より高いレベルのLIN28A発現との相関は、COX7A1が低レベル、GFERが高レベル、及びCATが低レベルであり、iTRへのシフトを示した。検出可能な多能性マーカー、例えばHELLS又はDNMT3Bは、これらの条件において存在しなかった。したがって、LIN28A単独、又はTERTと組み合わせたLIN28A、又はOCT4、KLF4、LIN28A、又はOCT4、KLF4、LIN28A及びTERTは、iTRを誘導することができた。

【0240】

[実施例8]

成体血液細胞幹細胞型及び前駆細胞型への胎児肝臓表現型の付与におけるLIN28Bの使用。

図24に示すように、遺伝子LIN28Bは、通常、ほとんどの組織において胚発生の初期段階においてのみ発現され(図7dに示した初期胎児皮膚細胞における最小限の発現)、Illumina遺伝子発現ビーズアレイによってアッセイした場合の様々なタイプの成体由来骨髄(BM)血液細胞及び末梢血(PB)血液細胞と比較して、胎児肝臓由来CD34+造血幹細胞及びCD36+赤血球前駆細胞において比較的高レベルで発現される。LIN28BのcDNAをマウス及びヒトのCD34+候補造血細胞において発現させ、in vitroでの細胞の相対的増殖を偽感染細胞(モック感染細胞)と比較し、LIN28B発現細胞の相対的生着を偽トランスフェクション細胞と比較し、LIN28Bが発現された場合の増殖及び生着に関して細胞に提供される有効性の程度をアッセイするために比較する。

【0241】

化学療法剤に対する感受性についてスクリーニングされた肉腫株は、COX7A1発現(ASPS-1株及びRh28 PX11/LPAM株)などの胎児状態又は成体状態のマーカーが、化学療法剤、例えばテニポシド、パクリタキセル、エトポシド、バルルビシン、マイトマイシンC、フロクスリジン、硫酸塩、クロファラビン、ビノレルビン、酒石酸塩、ダウノルビシンHClへの応答におけるアポトーシスに対して独自に耐性である(典型的には1~2桁高いIC50)ことを示す。したがって、本遺伝子の発現又はそのコードされたタンパク質若しくは遺伝子のメチル化状態の検出は、多様な腫瘍型の化学療法剤に対する応答を予測するのに有用である

。

【0242】

[実施例9]

iTRのマウスモデルの作製

Cox7a1遺伝子をBL6マウスでノックアウトし、動物を繁殖させ、ホモ接合型ノックアウト動物(ko/ko)を作製した。図28に示すように、図8のヒト未分化脂質生成細胞、すなわち、クローンEPからE3と命名された白色脂肪細胞、成体脂肪前駆細胞から皮下脂肪組織(SAT)、並びに脂肪肉腫細胞株CRL3043及びCRL3044を、同時に解糖ストレス試験に曝露した。観察された最も高い細胞外酸性化速度(ECAR)は、COX7A1を発現しない細胞型(すなわち、E3、CRL3043及びCRL3044)におけるものであり、COX7A1(成体由来)SAT細胞においては最も低い解糖シフトが観察され、COX7A1を発現しない細胞で起こる最も高いワールブルクシフトと一致した。次に、心臓由来のko/koマウス細胞を、ECARを測定する同じ解糖ストレス試験において、wt心臓細胞と比較した。図28に示すように、ホモ接合型Cox7a1 ko/ko細胞は、代謝においてウォールバーグシフトを示すwt細胞よりも高レベルの細胞外酸性化で解糖へのシフトを示す。ko/koマウスをイヤーパーンチアッセイ(耳穿孔アッセイ)に供した場合、ko/koマウスの耳は、wtマウスの耳と比較して創傷治癒の促進を示した。

10

【0243】

次いで、動物モデルにおけるTRの堅固性を高めるために、Cox7a1のホモ接合型ko/koのマウスを、Lin28aを含む他のiTR遺伝子を発現するマウスと交配させる。

【0244】

20

[実施例10]

iTR及びiCMに影響を与えるための様式としてのDNAメチル化のモジュレーション。

ヒトES細胞由来クローン胚性前駆細胞から血管内皮(30MV2)までのゲノムDNAのグローバルメチル化パターンを、成体由来ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)のものと比較し、それと並行して、ヒトES細胞由来クローン胚性前駆細胞から骨軟骨細胞(4D20.8)までのゲノムDNAのグローバルメチル化パターンを、成体由来の骨髄間葉系幹細胞(MSC)と比較した。CpGのシトシンがメチル化された読み取り値のパーセントにヒストグラム中のバーの高さが対応する図23に示すように、COX7A1遺伝子は、COX7A1発現を検出できなかった両方の法前駆細胞株において高度にメチル化されており、COX7A1を検出することができた対応する成体由来細胞型において比較的脱メチル化されている。同様の結果が遺伝子COMT、TRIM4、NAALADL1、TSPYL5、及びPLPP7において測定され、RG108を含むがこれに限定されないDNAメチルトランスフェラーゼのインヒビター;5-アザ-2'デオキシシチジン(商品名Vidaza及びAzadine)、ビタミンC(DNAメチル化を抑制し、脱メチル化の第1段階である5hmCを増加させるTet1を増加させる)は、iTRの有用なグローバルアクチベーターであり、ゲノムのこれらの領域においてメチル化を増加させるそれらの薬剤はiCMを誘導するのに有効であるという新規の証拠を提供した。

30

【0245】

[実施例11]

iTRを誘導するためのGFERタンパク質、AMHタンパク質、及びバルプロ酸の使用。

分泌タンパク質iTR因子GFER及びAMH、並びに薬剤バルプロ酸の同定は、in vitro及びin vitroでiTRを生成するための因子の新規カクテルを提供する。因子の効果を決定するために、培養した成体由来MDW線維芽細胞及び臍帯由来MSC(MSCwj)を様々な濃度の因子で処理し、スクラッチ試験した後の成長及び再成長の速度を実施した。

40

【0246】

繊維芽細胞株MDW(第5継代)を6ウェルプレートの複数のウェルに播種し、コンフルエントになるまで培養する。1.5mmの「スクラッチ」を200ulのピペットチップを使用して単層上に導入し、それにより培養表面から線維芽細胞を剥離した。0.5mMのバルプロ酸、10ng/mLのAMH、及び20ng/mLのGFERを含む因子を、10%FBSを補充したDMEM培地としての増殖培地に添加する。24時間後、剥離した表面の%を位相差顕微鏡法で測定した。増殖培地単独における対照MDW細胞は、「創傷した」領域の20%の被度を示した。バルプロ酸単独で処理し

50

た細胞は、25%再生し、創傷の再生が改善されたことを示し、補充AMH単独で処理した細胞は68%の再生を示した。GFER補充物で処理した細胞は、28%の再生を示した。バルプロ酸とAMHの両方で処理した細胞は、50%の再生を示した。バルプロ酸、AMH、及びGFERで処理した細胞は、50%の再生を示した。in vivoで投与された場合の因子の易変性及び拡散により、因子単独の製剤、又はヒドロゲル、例えば架橋ヒアルロン酸若しくは架橋ヒアルロン酸及びコラーゲン中で組み合わせた因子の製剤は、動物における組織再生を高めるように因子を送達する好ましい方法を提供する。或いは、COX7A1などの胎児/成体マーカーをそれぞれ発現する臍帯由来MSC(MSCwj)及び成体皮膚線維芽細胞(MDW)は、10%FBS及びAMHを補充したDMEM培地中、0、10.0及び100ng/mLの濃度でGFER単独の分泌型により処理し、80時間培養し、コンフルエンス%を測定する。図29に示すように、漸増用量のGFERの存在下で達成されるコンフルエントの用量依存的増加があり、胎児由来及び成体由来間質細胞におけるiTRの生成におけるその有用性の証拠を提供している。

10

【0247】

成体皮膚線維芽細胞(MDW(第6~7継代))をプレーティングし、GFP、cMYC、SOX2、又はcMYC+0.5mMバルプロ酸、又はSOX2+0.5mMバルプロ酸に関してmRNAの存在下で6日間インキュベートした。図30に示すように、0.5mMのバルプロ酸の添加は、COX7A1の発現の低下及び線維症マーカーCOL1A1の発現の低下によって決定されたとおり、iTRの証拠を示した。

【0248】

iTRの誘導は、ミトコンドリア膜間スペースのジスルフィドリレーシシステムとしても知られているMIA経路の構成要素の改変を介して、酸化リン酸化の状態から嫌氣的解糖状態への胎児細胞又は成体細胞の相対的シフトによって達成することができる。より具体的には、iTRへのこのシフトは、細胞におけるGFERタンパク質レベルを増加させるか、細胞におけるCOX7A1タンパク質レベルを低下させることにより、より好ましくは、細胞におけるGFERレベルを増加させ、COX7A1レベルを低下させることにより、胎児体細胞型又は成体細胞型において誘導することができる。この改変は、LIN28Aの発現によって、又は、COX7A1タンパク質レベルを低下させる薬剤とともにGFER若しくは細胞におけるGFERのレベルを上昇させる薬剤の外因性投与によって達成することができる。よりさらに好ましくは、ヒトにおいて、例えばLIN28Aの誘導発現と組み合わせることができるTERT遺伝子の投与などによってテロメラーゼ発現のレベルが増加した細胞におけるiTRの誘導である。

20

【0249】

また本開示は、哺乳動物の老化に介入する手段を記載しており、それによりiTRは老化関連変性疾患に罹患した組織における機能の回復に利用される。好ましくは、iTRは、テロメラーゼ活性の再発現を介してなどテロメアの延長と組み合わせて実施される。

30

【0250】

[実施例12]

iTM及びiCMを生成するための胎児細胞由来又は成体細胞由来エキソソームの使用。

成体細胞由来のエキソソームを、hES細胞由来クローン胚性血管内皮細胞株30-MV2-6を使用して、iTMを引き起こすそれらの能力について試験した。(例えば、いずれも参照により本明細書中に組み込まれる、国際公開第2013/036969号として公開された国際特許出願第PCT/2012/054525号、及び米国特許出願公開第2014-0349396号として公開された米国特許出願第14/238,160号を参照されたい。)一連の15個のhESC由来クローン胚性前駆細胞株のIlluminaマイクロアレイ解析を使用して全RNA発現をプロファイリングし、様々な解剖学的部位(図示せず)から得られた18個の一次内皮細胞株(新生児から成体)とこれらとを比較した。差次的に発現された遺伝子を、qPCRを使用して再試験し、胚性前駆細胞株の30-MV2-6と臍帯由来細胞株のHUVECとの間のRNAレベルの倍差を評価した。COX7A1は、胚性内皮細胞株30-MV2-6と比較すると、HUVECにおいて有意に高いレベルを有する2つの細胞株間の遺伝子発現での最大の倍差を示した。CAT及びTRIM4はより低い程度で誘導された。本発明者らは、HUVEC由来エキソソームを 1×10^9 粒子/mLの濃度で添加し24時間置いたエキソソーム枯渇培地中で、30-MV2-6細胞株をインキュベートした。陰性対照の30-MV2-6細胞は、等量のPBSを添加したエキソソーム枯渇培地中でインキュベートした。HUVECエキソソーム処

40

50

理した30-MV2-6細胞は、PBS対照における検出不可能な発現と比較してCOX7A1の検出可能な発現を示した。胚遺伝子のACP5及びLIN28Bは、胚性前駆細胞をHUVECエキソソームで処理した後、ダウンレギュレートされるようであった。この結果は、ある発達状態から異なる発達状態まで標的細胞をリプログラミングするエキソソームの能力を示す。この場合、成体細胞エキソソームによる処理は、レシピエント胚細胞において成体パターンに類似する遺伝子発現パターンをもたらす。重要なことには、COX7A1は、本発明者らが同定した最も厳密に制御される遺伝子である。これは、胎児細胞から成体細胞には存在するが多種多様の胚細胞株には存在しない、胎児移行への胚のマーカーを示す。胎児由来又は成体由来体細胞型由来のエキソソームのiTM及びiCMへの使用には、in vitro及びin vivoでEFTを成熟がん細胞型に導入し、それにより、p53の、核への移行及びp21などの遺伝子の発現の誘導への利用可能性を増大させることにおける実用的応用がある。

10

【0251】

本明細書中の記載から、本開示は複数の実施形態を包含し、それは以下を含むがこれらに限定されない、と理解される：

【0252】

対象の1つ以上の細胞を1つ以上の誘導組織再生(iTR)因子と接触させることにより、該対象において損傷組織または加齢組織を再生させる方法。

【0253】

前記の1つ以上のiTR因子が核酸を含む、任意の前記実施形態の方法。

【0254】

前記核酸がRNAを含む、任意の前記実施形態の方法。

20

【0255】

前記の1つ以上のiTR因子が抗ミュラー管ホルモン(AMH)を含む、任意の前記実施形態の方法。

【0256】

前記対象の1つ以上の細胞を、0.05 mM～5 mMの濃度の前記抗ミュラー管ホルモン(AMH)と接触させる、任意の前記実施形態の方法。

【0257】

前記の1つ以上のiTR因子が、GFER遺伝子によりコードされるタンパク質を含む、任意の前記実施形態の方法。

30

【0258】

前記対象の1つ以上の細胞を、2 ng/mL～200 ng/mLの濃度の前記GFER遺伝子によりコードされるタンパク質と接触させる、任意の前記実施形態の方法。

【0259】

前記の1つ以上のiTR因子がバルプロ酸を含む、任意の前記実施形態の方法。

【0260】

前記対象の1つ以上の細胞を、0.05 mM～5 mMの濃度のバルプロ酸と接触させる、任意の前記実施形態の方法。

【0261】

前記の1つ以上のiTR因子をヒドロゲルと組み合わせる、任意の前記実施形態の方法。

40

【0262】

前記iTR因子がGFERタンパク質レベルを増加させ、かつCOX7A1タンパク質レベルを低下させる、任意の前記実施形態の方法。

【0263】

前記iTR因子がLIN28Aの発現を増加させる、任意の前記実施形態の方法。

【0264】

前記対象の1つ以上の細胞においてテロメラーゼの発現を増加させることをさらに含む、任意の前記実施形態の方法。

【0265】

前記対象の1つ以上の細胞へのTERT遺伝子の投与がテロメラーゼの発現を増加させる、

50

任意の前記実施形態の方法。

【0266】

前記iTR因子がLIN28Aの発現を増加させ、かつテロメラーゼの発現を増加させる、任意の前記実施形態の方法。

【0267】

前記対象がヒトである、任意の前記実施形態の方法。

【0268】

対象の1つ以上の細胞において胚パターンの遺伝子発現を誘導することにより、該対象において損傷組織または加齢組織を修復する方法。

【0269】

対象において損傷組織または加齢組織を再生させるためのキットであって、AMH、GFERタンパク質およびバルプロ酸iTF因子（iTR因子）のうちの1つ以上を含む、該キット。

【0270】

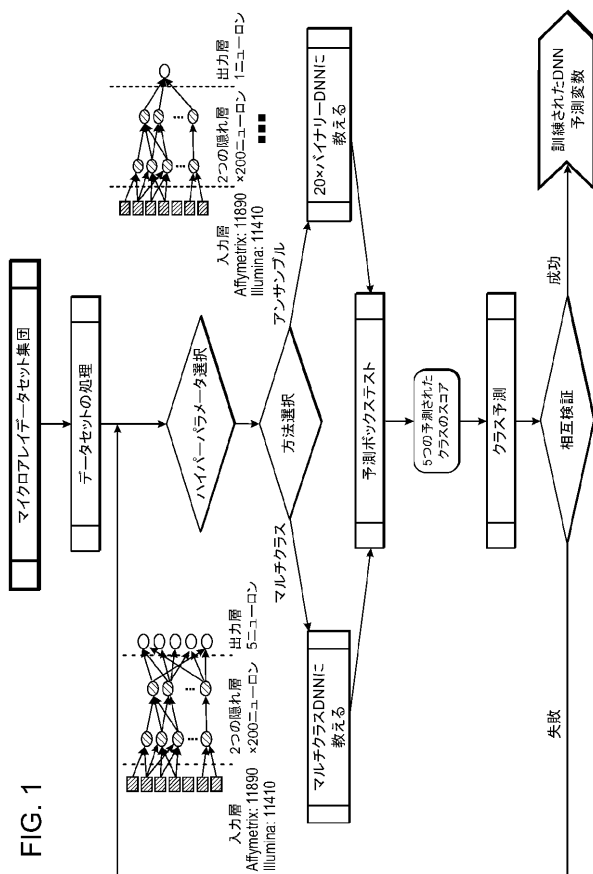
前記iTR因子をヒドロゲルと組み合わせる、任意の前記実施形態のキット。

【0271】

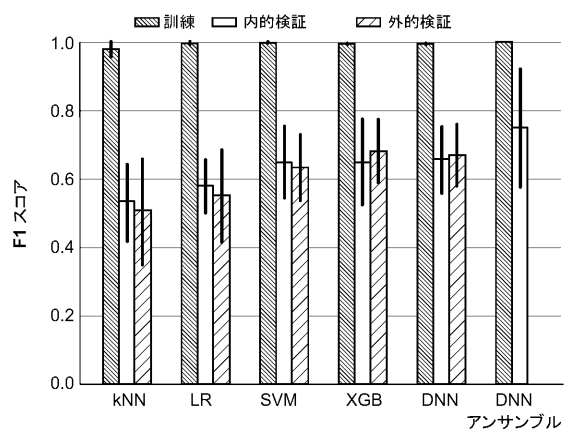
対象の1つ以上の細胞を、多能性を誘導することができる薬剤と接触させることにより、該対象において組織を再生させる方法であって、ここで多能性それ自体は誘導されないものとする、該方法。

10

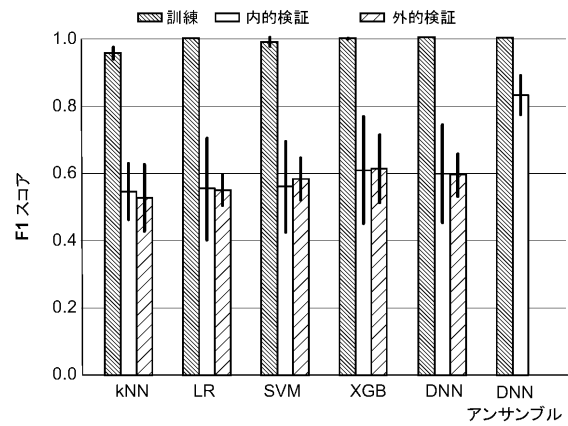
【図1】



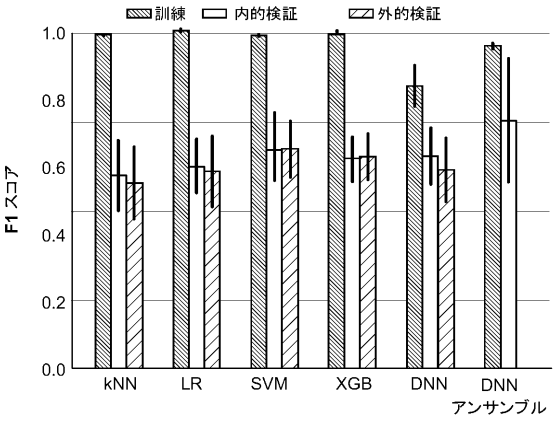
【図2A】



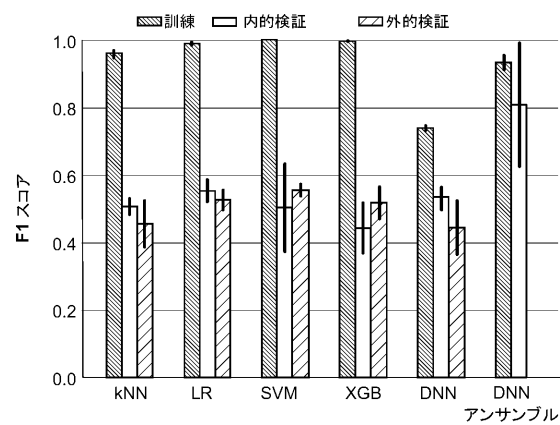
【図 2 B】



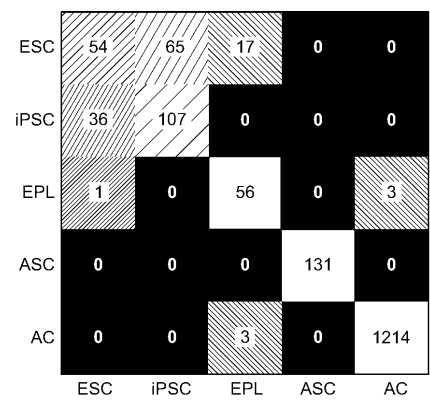
【図 2 C】



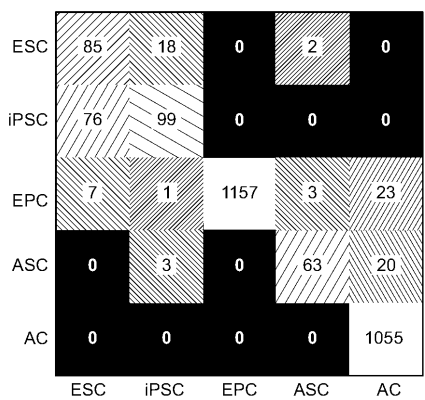
【図 2 D】



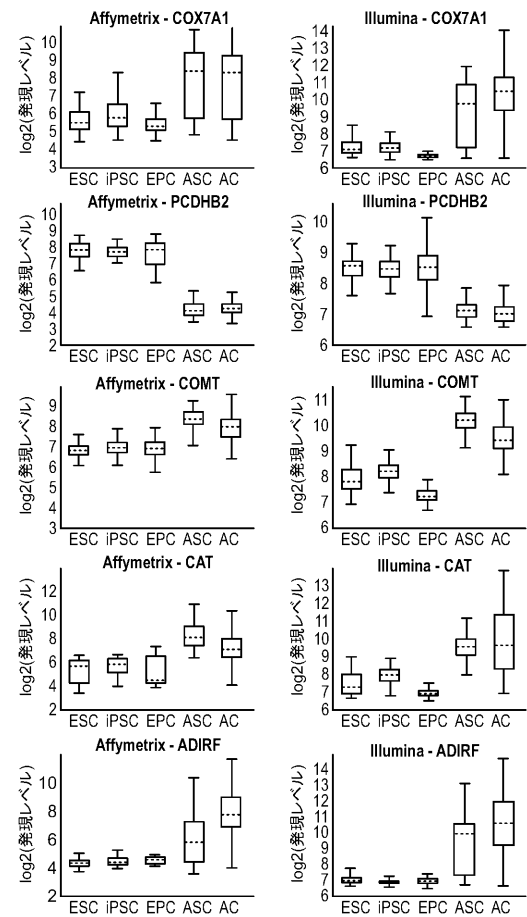
【図 3 A】



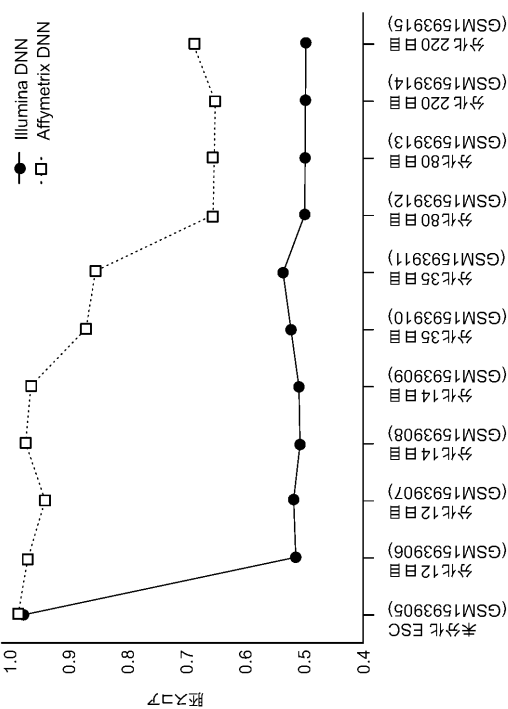
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 3 D】



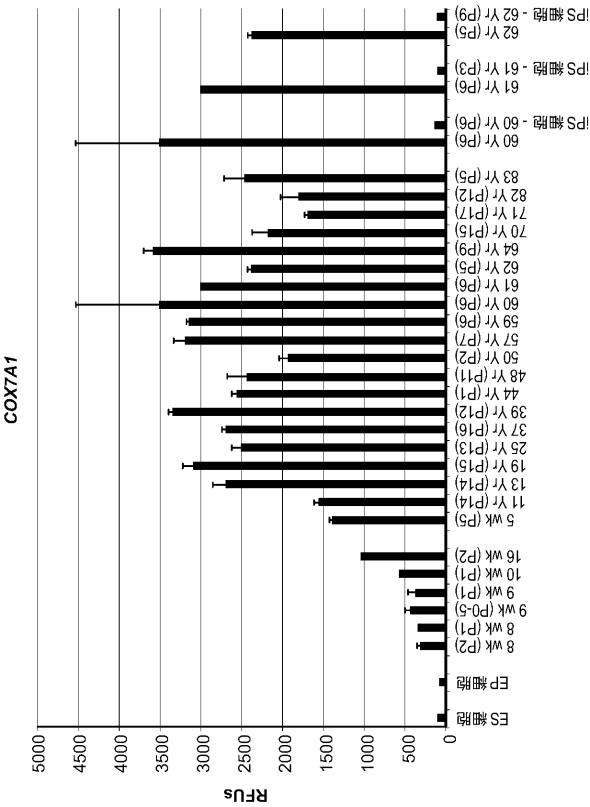
【図 4】

ランク	GBM	DNN	ランク	GBM	DNN
1	COMT	TSPYL5	26	PPAT	KIF18B
2	COX7A1	ZNF280D	27	GPX8	PPAPDC3
3	SYNC	COMT	28	RBM33	D2HGDH
4	TRIM4	COX7A1	29	MYB	MGMT
5	FRG1B	BMS1P5	30	DBT	VPS26A
6	PCDHB2	TRIM4	31	PARP3	PKIB
7	RPL13AP3	PDXDC1	32	TMSB4X	RRP7A
8	TMEM132D	PLD6	33	ANXA1	BHMT2
9	DIAPH2	ITPRIPL2	34	TCTA	DYNLT3
10	HNRNPUL1	CAT	35	ADIRF	GSTM5
11	NAALADL1	NAALADL1	36	TMEM179B	DNAJC28
12	CAT	ADIRF	37	PLD6	SLC24A3
13	TNFRSF14	PCDHB2	38	BOLA2	AHNAK2
14	CD14	CTSF	39	OSBPL1A	KAT2B
15	GPC2	FRG1B	40	RUNX1	ZNF738
16	KIAA0020	FARSB	41	GYPC	RFX7
17	SSR2	HSP90B3P	42	BMS1P5	DENND1B
18	LAMB2	HNRNPH1	43	ZNF562	PIP4K2A
19	DRAP1	FOXO2	44	CYTH2	UNK
20	MAPK1IP1L	UBA1	45	VAT1L	EPDR1
21	KIAA0125	QRFP	46	TUBA1A	PSG3
22	PLEKHA1	ITGA8	47	ARHGAP22	SPESP1
23	SPARC	TAF9B	48	ZNF280D	POLA1
24	ARID3B	ECHDC3	49	AEN	CYTH2
25	MAP7D1	FOXN3	50	TGIF2	FAM175A

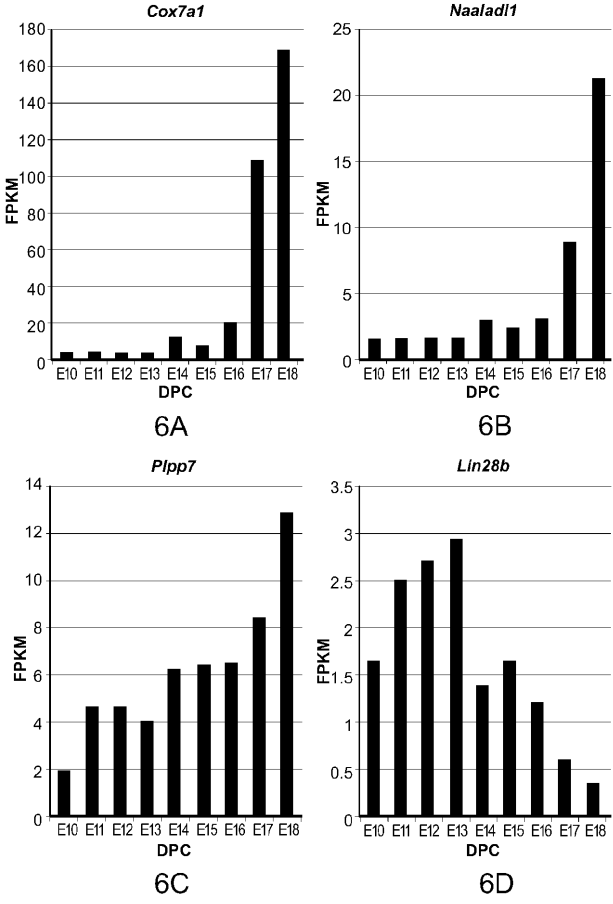
【図 5】

t-検定 p-value	P値	FDR P値	遺伝子id	記号	転写物id(複数可)
1	1.22E-09	7.08E-08	847	CAT	NM_001752
2	1.71E-09	7.08E-08	1312	COMT	NM_000754, NM_001135161, NM_001135162, NM_007310
3	1.59E-07	3.63E-06	10004	NAALADL1	NM_005468
4	1.75E-07	3.63E-06	89122	TRIM4	NM_033017, NM_033091
5	4.26E-07	7.07E-06	4255	MGMT	NM_002412
6	2.13E-06	2.94459E-05	246777	SPESP1	NM_145658
7	1.09974E-05	0.000130398	84814	PLPP7	NM_032728
8	3.94487E-05	0.000409281	85453	TSPYL5	NM_033512
9	0.00010423	0.000961233	56133	PCDHB2	NM_018936
10	0.00028107	0.002332884	1346	COX7A1	NM_001864
11	0.000329134	0.002483462	54816	ZNF280D	NM_001002843, NM_001002844, NM_017661
12	0.000484907	0.003300765	6990	DYNLT3	NM_006520
13	0.000516987	0.003300765	9266	CYTH2	NM_004228, NM_017457
14	0.000745773	0.004421366	59338	PLEKHA1	NM_001001974, NM_001195608, NM_021622

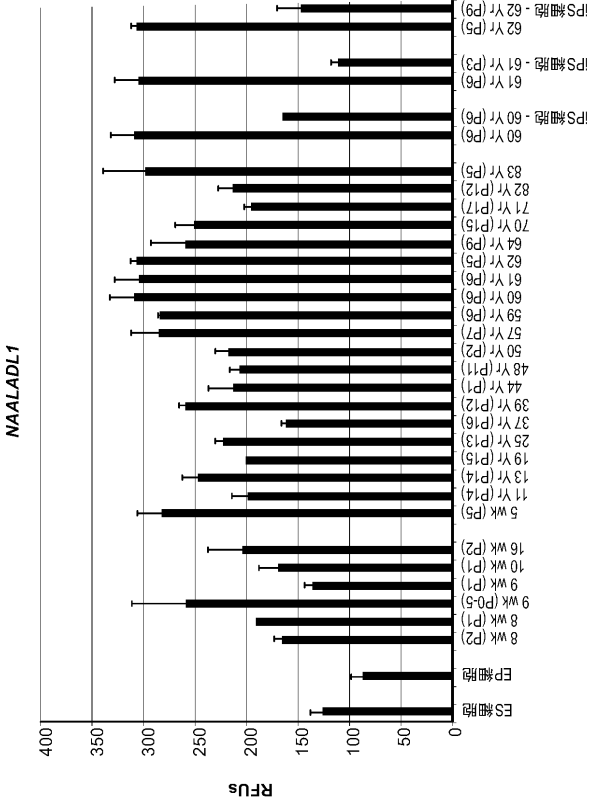
【図 7 A】

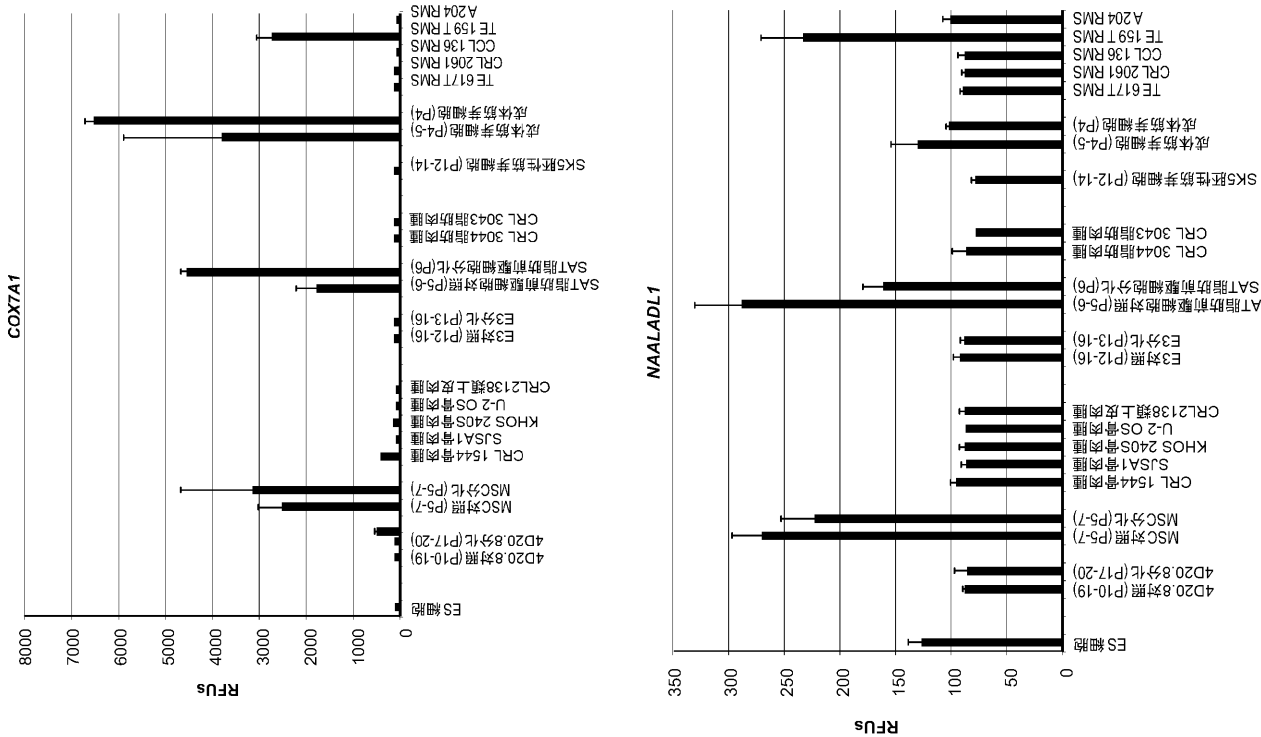


【図 6】

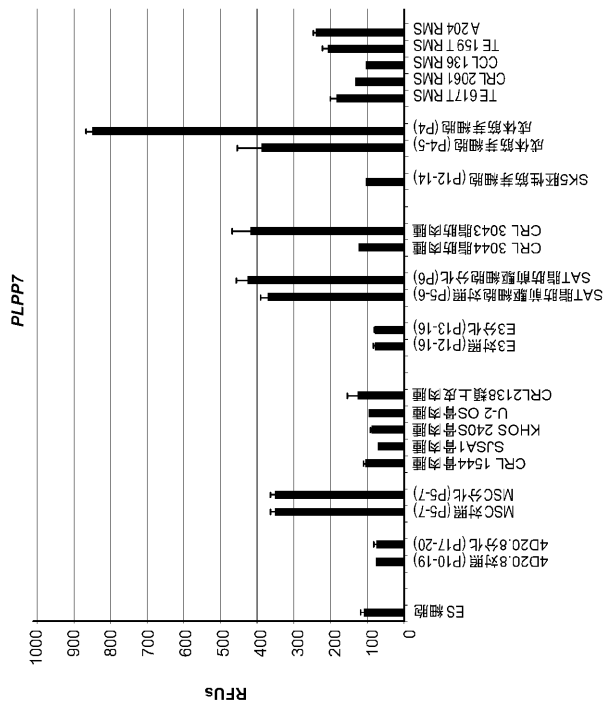


【図 7 B】

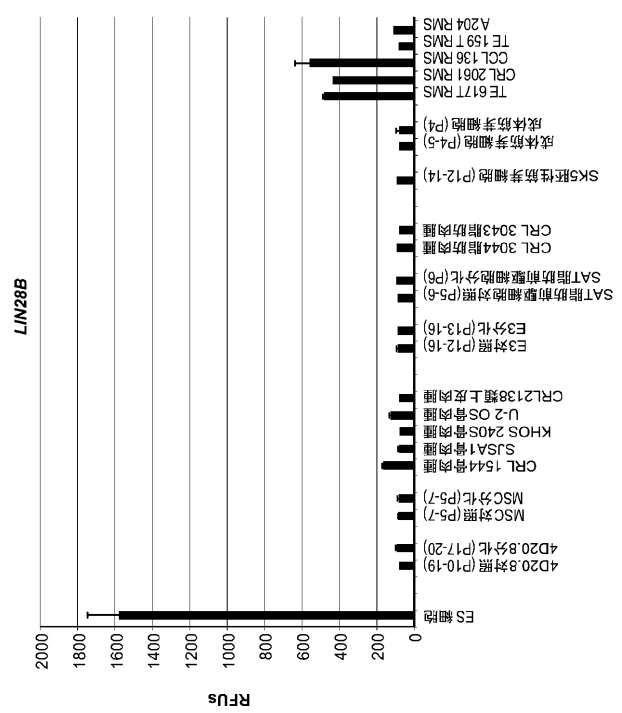




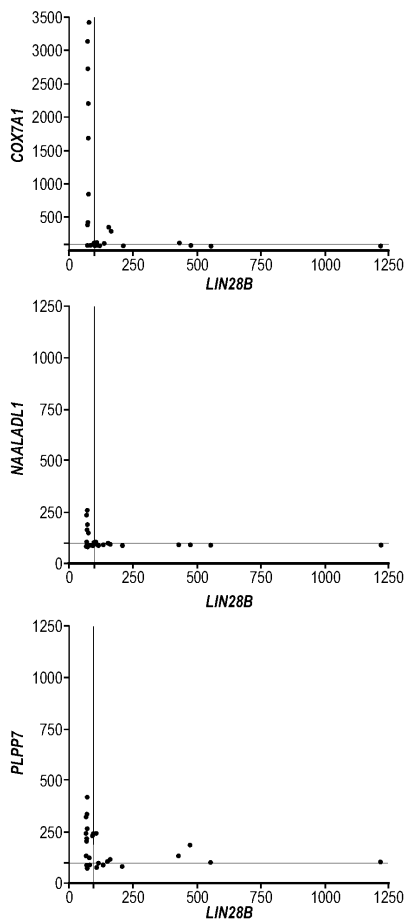
【図 8 C】



【図 8 D】



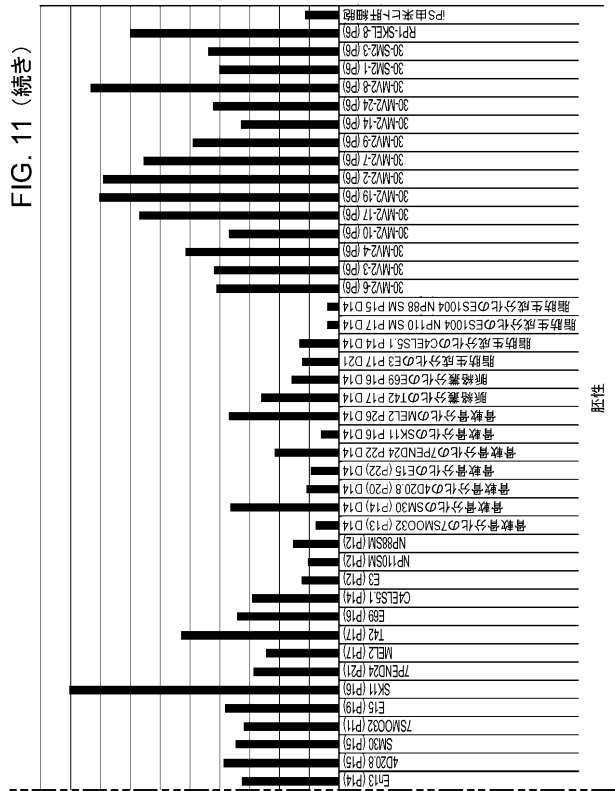
【図 9】



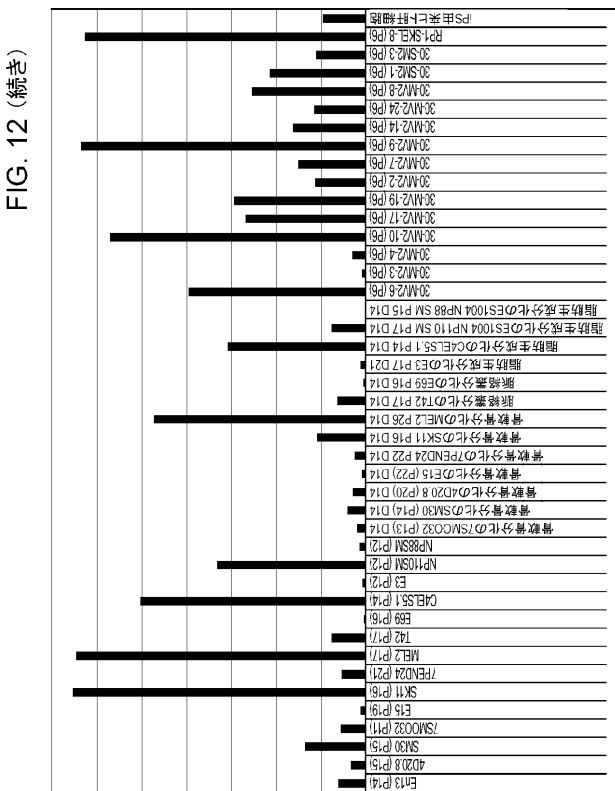
【図 10】

胚マーカー	胎児/成体マーカー	胚マーカー	胎児/成体マーカー
FAR2P1	SPESP1	PCDHB10	MIR4458HG
PCDHA10	KRBOX1	PAQR6	USP32P1
DOC2GP	COX7A1	PCDHGB4	COMT
PCDHA2	PCDHGA12	PCDHA3	PCDHGA6
PCDHA4	POMC	DPY19L2	
PCDHB2	NAALADL1	ZNF853	
PCDHA11	ZNF300P1	LINC00649	
AMH	LINC00654	GRIN3B	
LINC01021	PLPP7	ZCCHC18	
ALX1	ADIRF	H2BFXP	
PCDHGB6	PRR34	MN1	
ADGRV1	PTCHD3	DSG2	
FSIP2	PTCHD3P1	SLC01A2	
GDF1	CAT	PRR5L	
PCDHB5	MEG3	L3MBTL1	
B4GALNT4	TRIM4	RGPD1	
NAALAD2	LINC01116	LIN28B	
FOXDL4	PRSS3	TUBB2B	
C14orf39	LINC00839	ALDH5A1	
FAM157A	PCDHGB3	PCDHB14	
PLPPR3	ZNF572	PCDHA5	
PCDHB16	PCDHGA2	PCDHB9	
CPT1B	C10orf11	PCDHGA10	
FAM157B	PCDHGA9	ZNF497	
CHKB-CPT1B	PCDHGB5		
PCDHAC1	PCDHGA7		
TSPAN11	CCDC144B		

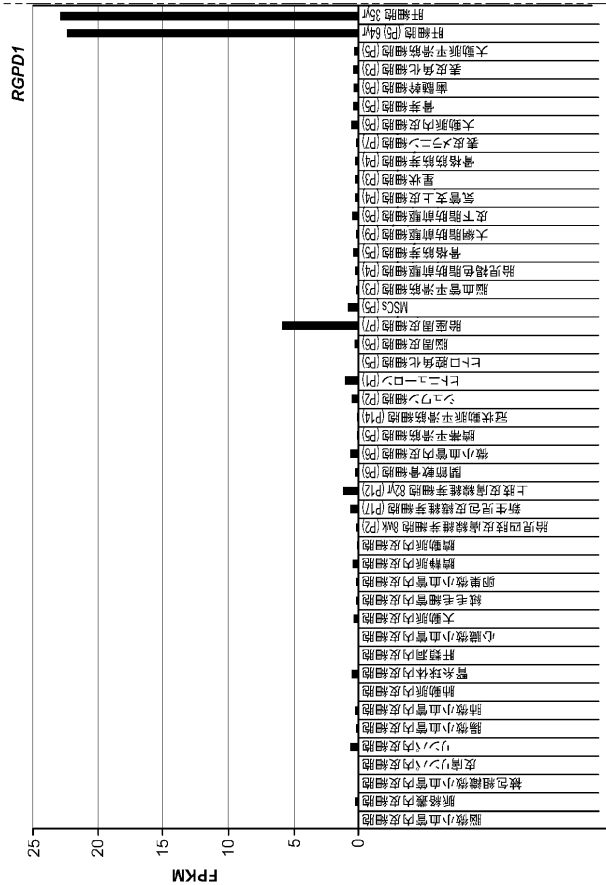
【図 1 1 - 2】



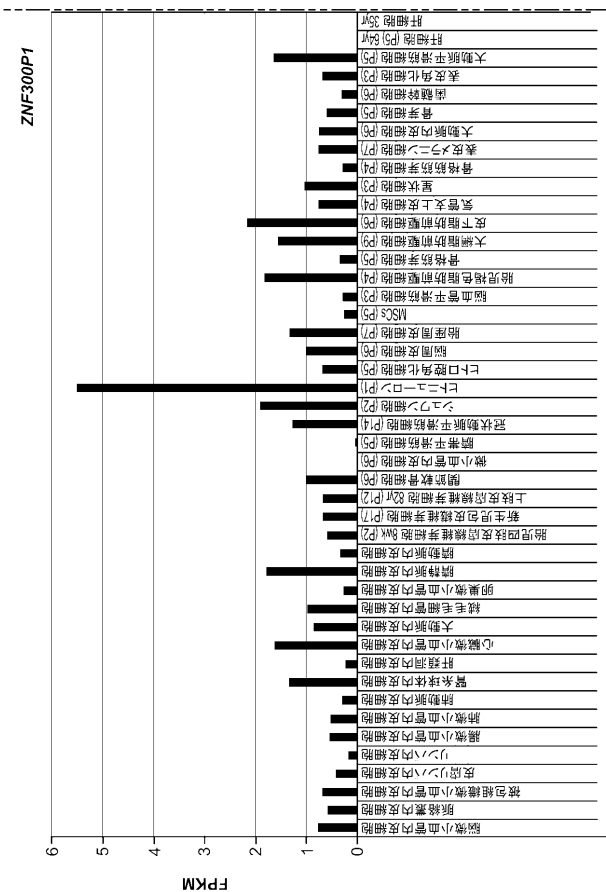
【図 1 2 - 2】



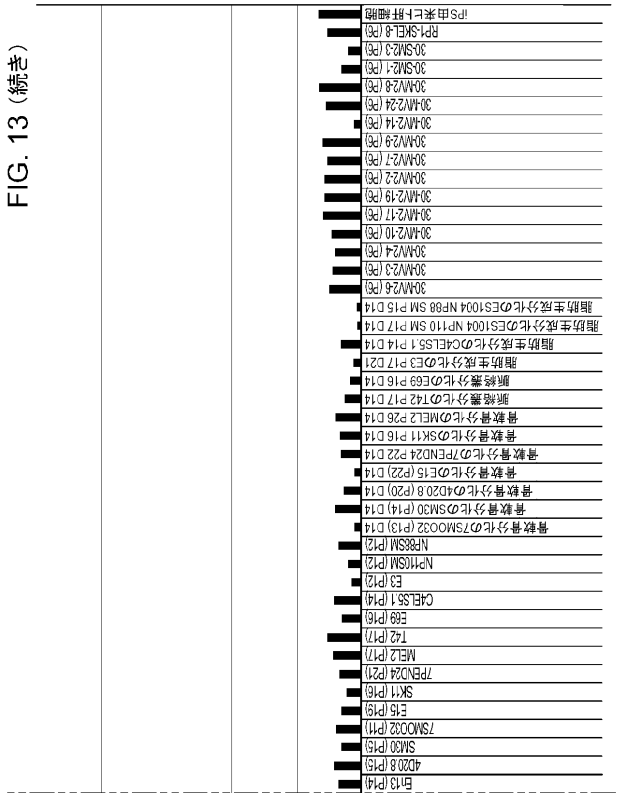
【図 13 - 1】



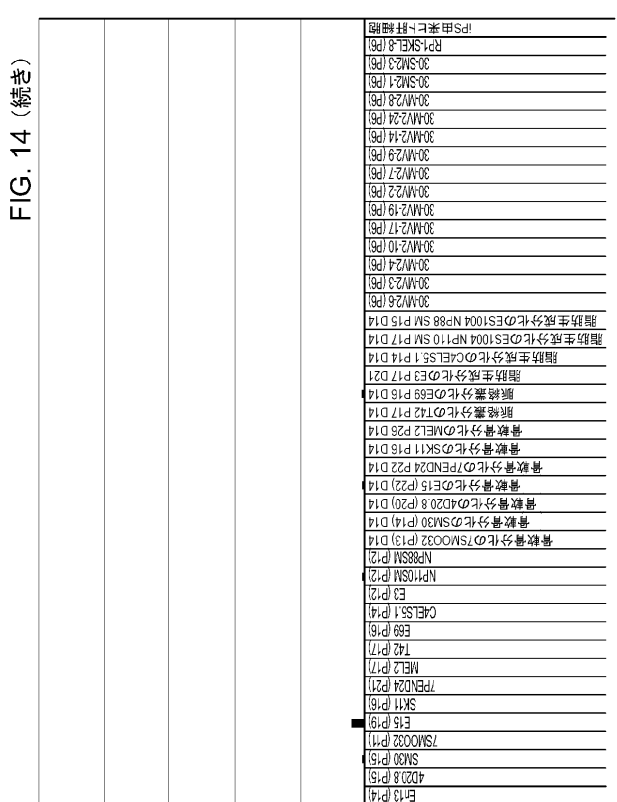
【図 14 - 1】



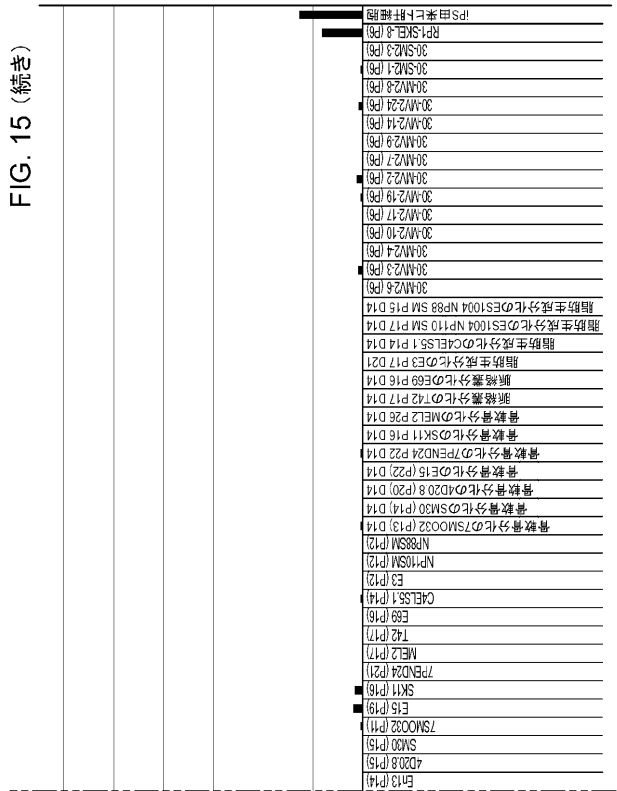
【図 13 - 2】



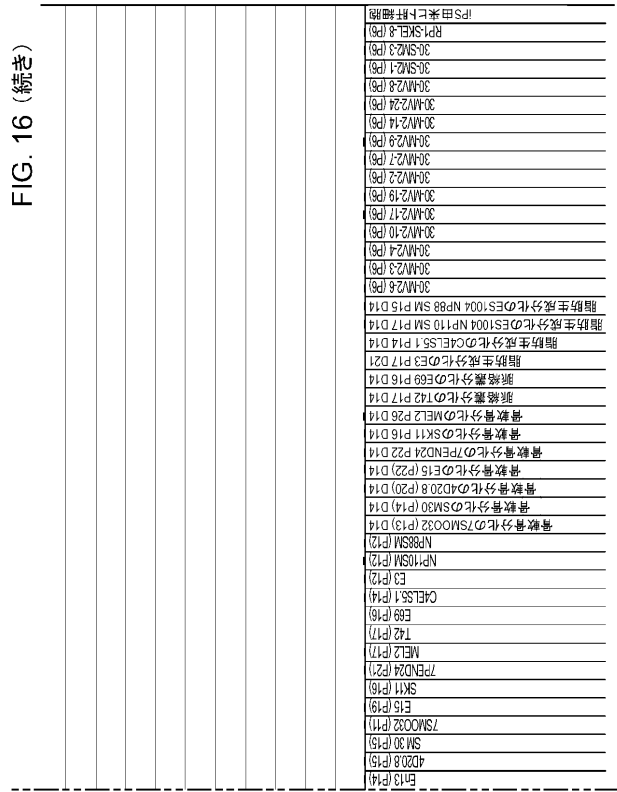
【図 14 - 2】



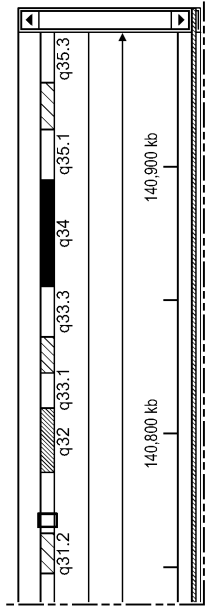
【図 15-2】



【 図 1 6 - 2 】



【 図 1 7 - 1 】



【 図 1 7 - 3 】

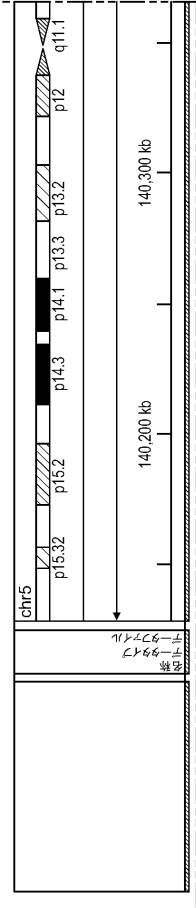
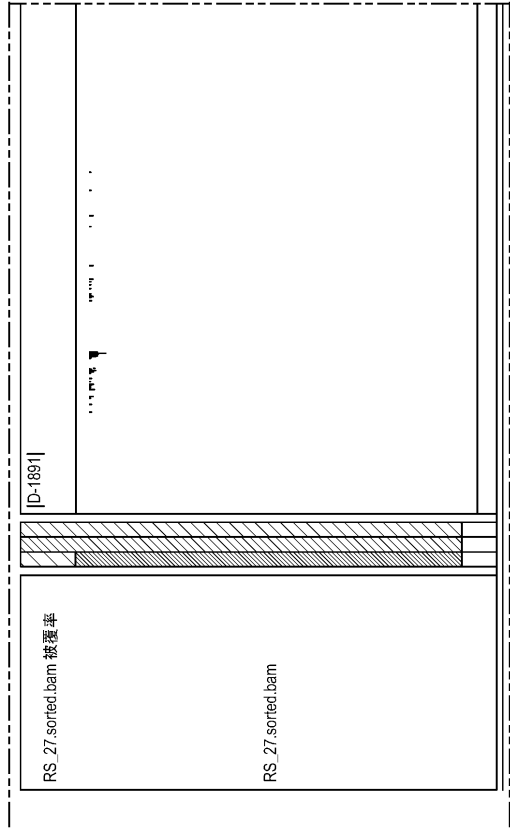


FIG. 17 (続き)

【 図 1 7 - 2 】



【 図 1 7 - 4 】

FIG. 17 (続き)

【図 17 - 5】

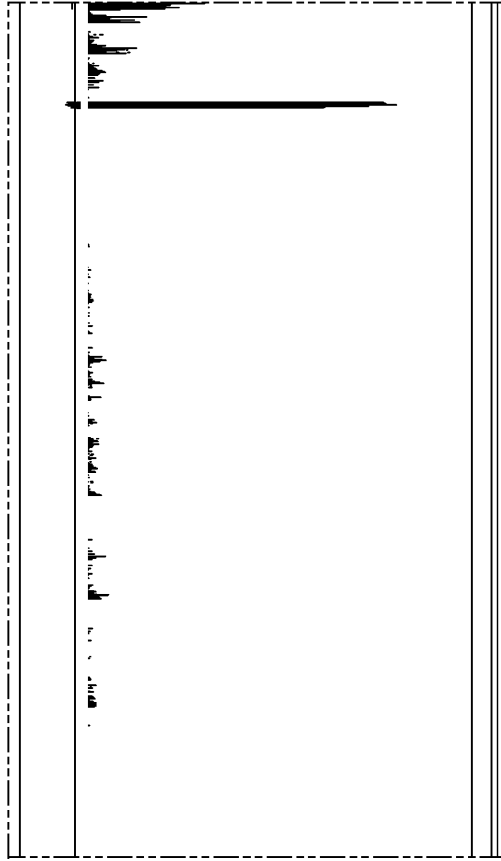


FIG. 17 (続き)

【図 17 - 6】

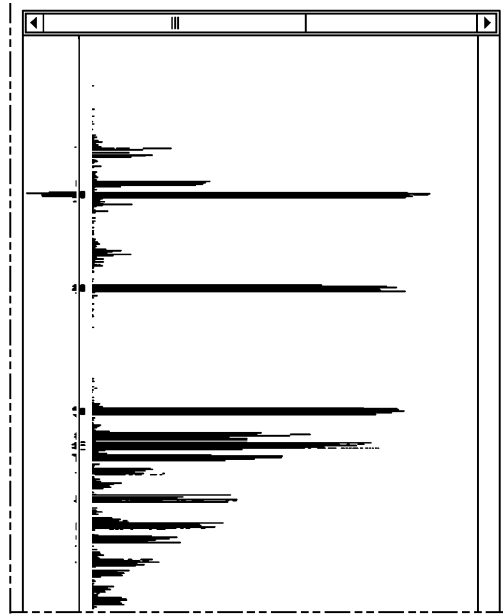


FIG. 17 (続き)

【図 17 - 7】

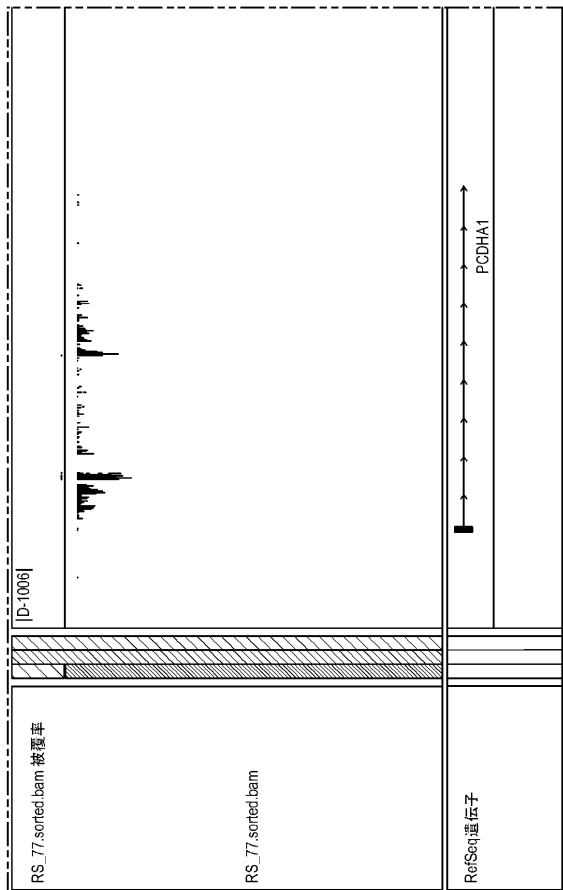


FIG. 17 (続き)

【図 17 - 8】

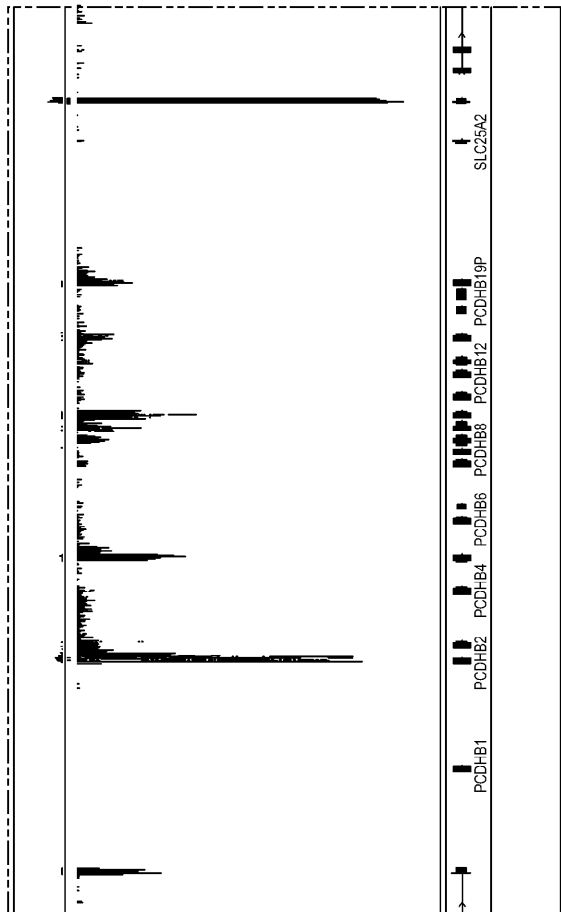


FIG. 17 (続き)

【図 17 - 9】

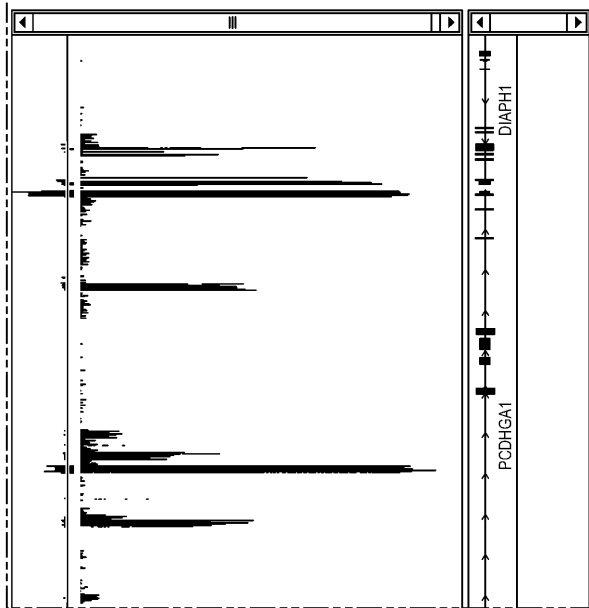


FIG. 17 (続き)

PubchemのCID	薬剤又は遺伝子の名称	BroadのID	肺がん (A549)	乳がん (MCF7)	前立腺がん (PC3)
-	Broad-Sai-595	BRD-K29107232	NA	-7.5	-3.2
-	-666	BRD2492+BRD3308	NA	-6.1	-4.1
44503248	BRD-K30409687	BRD-K30409687	NA	NA	-4.9
73707385	TL-AA09	BRD-K29830875	NA	-2.7	-5.9
44616431	SA-441145	BRD-K11889659	NA	NA	-4.0
-	シクロペンテン	BRD-K98109757	NA	-5.2	-2.5
54651178	BRD-K55288106	BRD-K55288106	NA	-4.6	-2.8
-	TNF	TRCN0000355913	NA	NA	-3.4
60184978	BRD-K75907833	BRD-K75907833	NA	NA	-3.2
23351218	ラジシコール	BRD-K33551950	NA	0.4	-6.6
-	FAM134C	TRCN0000145121	NA	NA	-3.1
5281767	クルクミン	BRD-K07572174	NA	NA	-3.0
60184964	BRD-K54127914	BRD-K54127914	NA	NA	-2.9
5281767	クルクミン	BRD-K07572174	NA	NA	-2.9
60184855	BRD-K27530838	BRD-K27530838	NA	NA	-2.8
-	TRAF6	TRCN0000356118	NA	NA	-2.7
11712649	MLN-8054	BRD-K83963101	NA	-2.4	-2.9
73265347	エチルエストラジオール	BRD-K88969189	NA	NA	-2.6
-	TRCN0000295864	TRCN0000295864	NA	NA	-2.5
60189085	BRD-K00505809	BRD-K00505809	NA	NA	-2.5
-	DDR1	TRCN0000121293	NA	NA	-2.5
-	BRD-K35832492	BRD-K35832492	3.7	-6.9	-4.2
9444	アザシチジン	BRD-K03406345	NA	-0.6	-4.3
-	TRCN0000049831	TRCN0000049831	NA	-2.5	-2.4
44503579	BRD-K82015643	BRD-K82015643	NA	NA	-2.4
-	BRD-K10436544	BRD-K10436544	1.7	-5.1	-3.8
-	ATXN1	TRCN0000003729	NA	NA	-2.4
-	SLITRK6	TRCN0000151460	NA	NA	-2.4
73707383	アルベスピマイシン	BRD-A06304526	NA	-2.2	-2.6
-	BDNF	TRCN0000058208	NA	NA	-2.3
60191269	BRD-K97873029	BRD-K97873029	NA	NA	-2.3
24748204	MK-5108 Auroraキナーゼ インヒビター	BRD-K53665955	0.2	-0.9	-6.2

【図 19】

PubchemのCID	薬剤又は遺伝子の名称	BroadのID	肺がん (A549)	乳がん (MCF7)	前立腺がん (PC3)
6376322	トリコスタテン-a	BRD-A19037878	16.8	47.4	11.4
5691	ワートマニン	BRD-A75409952	NA	NA	16.4
6918837	パノピノスタット	BRD-K02130563	11.8	22.5	8.9
6376322	トリコスタテン-a	BRD-A19037878	13.8	17.8	5.5
5702003	マイトマイシン-c	BRD-A48237631	NA	8.7	NA
444732	トリコスタテン-a	BRD-K68202742	6.5	16.4	0.4
-	アピシジン	BRD-K64606589	1.2	12.9	NA
16220015	トリプトライド	BRD-A13122391 TRCN000003366	10.9	6.3	3.0
-	NR2F6	2	NA	6.5	NA
5284640	フルベストラント	BRD-A83237092	NA	6.3	NA
5374464	シロリムス	BRD-A79768653	NA	NA	6.3
16220015	トリプトライド	BRD-A13122391	2.4	16.2	0.0
24360	カンプトテシン	BRD-K37890730	NA	11.4	0.7
45006140	ダクチノマイシン	BRD-A73909368	NA	11.2	0.5
6916127	ドキシソルピシン	BRD-A52530684	3.2	13.0	0.0
11364421	BI-2536	BRD-K64890080 TRCN000000097	0.8	10.1	5.1
-	ILK	0	11.2	4.6	0.0
123631	ゲフィチニブ	BRD-K64052750	NA	9.8	0.5
5458171	ミトキサントロン	BRD-K21680192	NA	6.9	3.3
6713996	フルクロキサシリン	BRD-A13650332	NA	4.9	5.1

【図 20】

PubchemのCID	薬剤又は遺伝子の名称	BroadのID	肺がん (A549)	乳がん (MCF7)	前立腺がん (PC3)
12043281	BRD-K88198340	BRD-K88198340	NA	0.2	9.7
444732	トリコスタテン-a	BRD-K68202742	4.1	10.1	0.5
6713958	ビテキシシン	BRD-A41941932 TRCN0000033263	NA	3.4	6.5
-	TRCN0000033263	3	NA	11.7	-1.8
6918837	パノピノスタット	BRD-K02130563	4.0	4.5	6.2
30323	ダウノルビシン	BRD-K43389675	3.6	1.3	9.6
56643191	BRD-K78843060	BRD-K78843060	0.5	0.4	13.1
4014291	SN-38	BRD-A36630025	NA	5.0	4.4
6602447	カルバノクソロン	BRD-A96702003	NA	5.7	3.6
443939	ドキシソルピシン	BRD-K92093830	6.1	6.7	1.1
55690	スルマゾール	BRD-A41722204	NA	5.3	3.9
5287969	アルボシジブ	BRD-K87909389	11.4	0.6	1.7
6708573	オレアナール酸	BRD-A41112154	NA	NA	4.4
9604992	ジビノスタット	BRD-K13810148	1.7	7.1	NA
19529	ジロキサニド	BRD-K10974103	NA	0.8	7.6
44259	スタウロスポリン	BRD-K17953061	6.1	5.6	0.9
16760037	カリクリン	BRD-A47513740	NA	6.0	2.3
54637856	BRD-K39597586	BRD-K39597586	NA	8.0	0.3
5702058	フルオロメトロン	BRD-A13133631	8.4	NA	-0.1
72067	テオコルチコシド	BRD-A11605036	NA	2.9	5.4

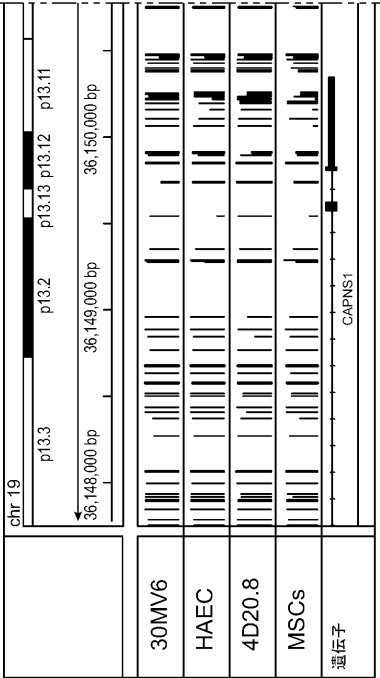
【図 2 1】

$$ES = \frac{\sum_{i=1}^5 Class_i w_i}{\sum_{i=1}^5 w_i}$$

【図 2 2】

$$f = \left[\prod_{l \in \text{層}} \hat{w}^l \right] \cdot 1^{|o|}, \text{ここで } \hat{w}_{ij}^l = |w_{ij}^l| / \sum_{j' \in I} |w_{ij'}^l|$$

【図 2 3 - 1】



【図 2 3 - 2】

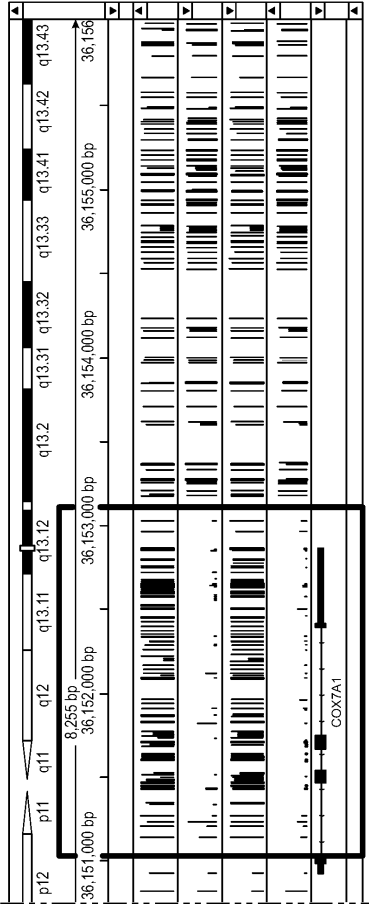


FIG. 23 (続き)

【図 2 3 - 3】

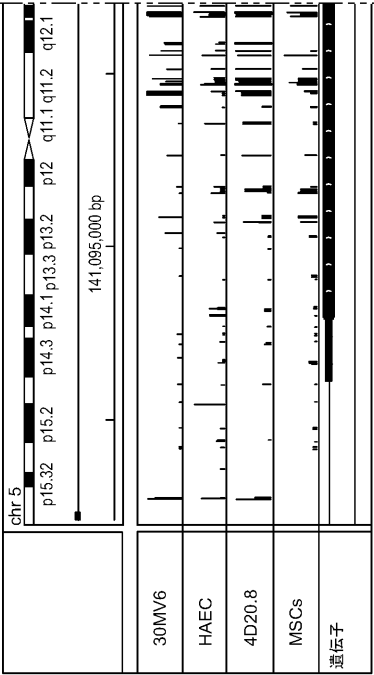


FIG. 23 (続き)

【図 2 3 - 4】

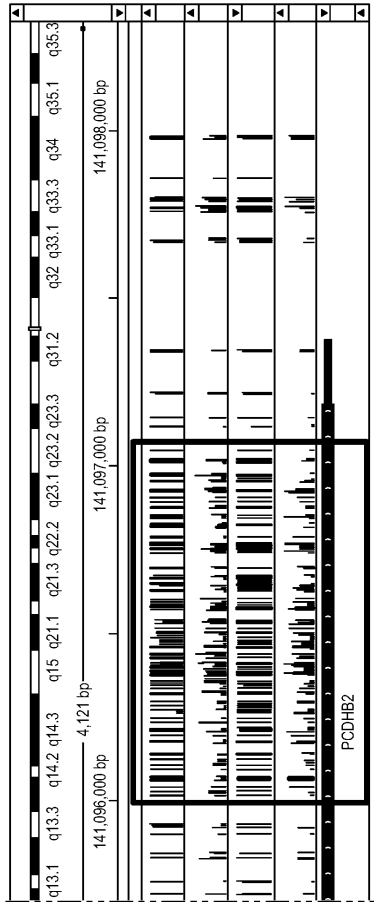
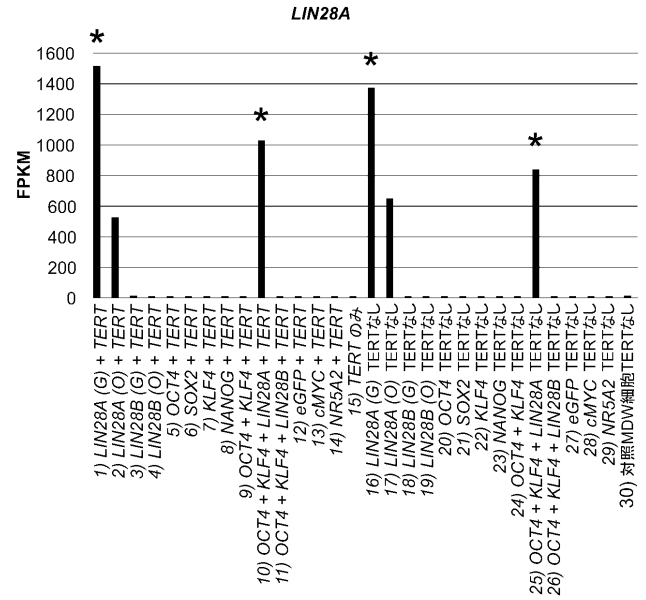
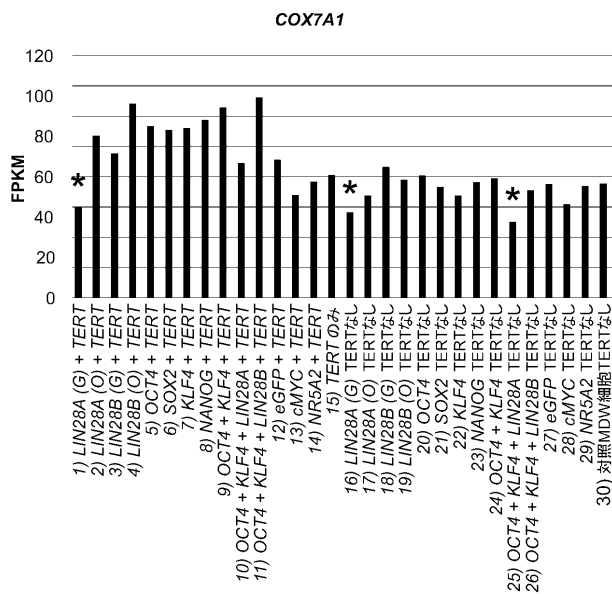


FIG. 23 (続き)

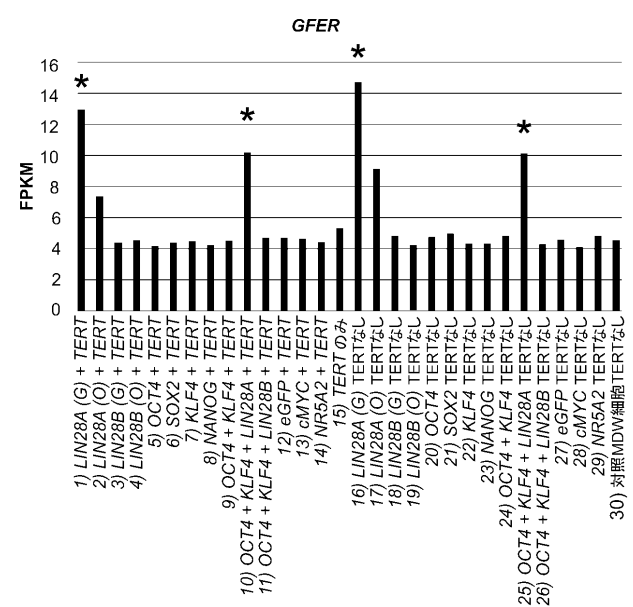
【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



【図 2 4 C】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/36452

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 31/713, A61K 31/715, A61K 38/00 (2017.01) CPC - A61K 31/715, C12N 15/113, C07K 16/18, C12N 2310/14, A61K 31/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
See Search History Document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2014/197421 A1 (BIOTIME INC.) 11 December 2014 (11.12.2014) p 5, in 9-10; p 25, in 32-34; p 30, in 26-32; p 42, in 14-16	1-3, 10, 12-17, 20 4-9, 11, 18-19
Y	US 2013/0202564 A1 (HAN et al.) 08 August 2013 (08.08.2013) para [0006], [0015], [0020]	4-5
Y	FRANCAVILLA et al., Transient GFER knockdown in vivo Impairs liver regeneration after partial hepatectomy. Int J Biochem Cell Biol. August 2014, Vol 53, pp 343-51. Especially Abstract; p 350, col 1, para 2	6-7, 11
Y	US 2011/0218143 A1 (KAUSHAL et al.) 08 September 2011 (08.09.2011) para [0005], [0010], [0032], [0038]	8-9, 18-19
☐ 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 August 2017		21 AUG 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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	31/7105	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	4 C 2 0 6	
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	38/22		
A 6 1 K	31/19	(2006.01)	A 6 1 K	31/19		
A 6 1 K	9/06	(2006.01)	A 6 1 K	9/06		
A 6 1 L	27/52	(2006.01)	A 6 1 L	27/52		
A 6 1 L	27/54	(2006.01)	A 6 1 L	27/54		
A 6 1 L	27/44	(2006.01)	A 6 1 L	27/44		
A 6 1 K	35/545	(2015.01)	A 6 1 K	35/545		
A 6 1 L	27/38	(2006.01)	A 6 1 L	27/38	3 0 0	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	19/00		
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	19/10		
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36		
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42		
A 6 1 L	27/20	(2006.01)	A 6 1 L	27/20		
A 6 1 L	27/24	(2006.01)	A 6 1 L	27/24		
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02		

(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,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LV,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

Fターム(参考) 4C076 AA09 BB11 BB21 BB32 CC09 CC29 EE37A EE37M EE43A EE43M
FF31 FF32
4C081 AB00 BA16 BB06 CD081 CD121 CD34 CE02 DA12 DC12
4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 BA03 DB01 MA01 MA02 MA28 MA55
MA63 MA65 NA12 NA14 ZA89 ZA96 ZA97 ZB22
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA02 MA04 MA05 MA28 MA55 MA63
MA65 NA12 NA14 ZA89 ZA96 ZA97 ZB22
4C087 AA01 AA02 BB64 MA01 MA02 MA28 MA55 MA63 MA65 NA12
NA14 ZA89 ZA96 ZA97 ZB22
4C206 AA01 AA02 DA03 MA01 MA02 MA04 MA05 MA48 MA75 MA83
MA85 NA12 NA14 ZA89 ZA96 ZA97 ZB22