

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7080179号

(P7080179)

(45)発行日 令和4年6月3日(2022.6.3)

(24)登録日 令和4年5月26日(2022.5.26)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/0789(2010.01)

C 1 2 N 5/0789

Z N A

A 6 1 L 27/38 (2006.01)

A 6 1 L 27/38

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

請求項の数 7 (全152頁)

(21)出願番号 特願2018-548783(P2018-548783)
 (86)(22)出願日 平成29年3月15日(2017.3.15)
 (65)公表番号 特表2019-508055(P2019-508055
 A)
 (43)公表日 平成31年3月28日(2019.3.28)
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/022534
 (87)国際公開番号 WO2017/161001
 (87)国際公開日 平成29年9月21日(2017.9.21)
 審査請求日 令和2年2月14日(2020.2.14)
 (31)優先権主張番号 62/308,324
 (32)優先日 平成28年3月15日(2016.3.15)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 62/309,140
 (32)優先日 平成28年3月16日(2016.3.16)
 最終頁に続く

(73)特許権者 596115687
 ザ チルドレンズ メディカル センター
 コーポレーション
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2
 1 1 5 , ポストン , シャタック・ストリ
 ート 5 5
 (74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74)代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74)代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100142929
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 造血幹細胞の増大に関する方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

造血幹細胞集団を、(i) ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質、ならびに、(ii) ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、TGF 受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

【請求項 2】

前記造血幹細胞集団を、UM171、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシブロミンからなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodax (登録商標) からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触

させる工程をさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記造血幹細胞集団を、SB203580、SB202190、CHIR99021、または塩化リチウムと接触させる工程をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記造血幹細胞集団を、SR1と接触させる工程をさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

造血幹細胞集団を、以下の(i)～(iii)のいずれかに記載の作用物質と接触させる工程であって、該作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、請求項1に記載の方法；

(i) ポマリドミド、A83-01、およびUM171、

(ii) ポマリドミド、A83-01、およびSR1、または

(iii) ポマリドミド、A83-01、UM171、およびSR1。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、米国特許法第119条(e)の下で、2016年3月15日に出願された米国特許仮出願第62/308,324号および2016年3月16日に出願された米国特許仮出願第62/309,140号の

恩典を主張する。これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

技術分野

本明細書に記載の技術は、造血幹細胞のエキスピボでの増大、富化、および富化のための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

造血幹細胞には、かなり大きい治療上の可能性があるが、診療所での用途を妨げてきた制約は、これらの細胞を十分な数で入手することに関連する難しさであった。特に、造血幹細胞はエキスピボで維持、増殖、および増大しにくい。治療法としての造血幹細胞(HSC)の用途をさらに発展させるために克服すべき別の課題は、これらの細胞をエキスピボで培養した時に起こり得る多分化能の消失である。現在、これらの細胞の多分化能および造血機能を保存する、HSCのエキスピボでの維持、増殖、および増大のための組成物および方法が必要とされている。造血幹細胞のエキスピボでの維持、増殖、増大、および富化を可能にする多数の化合物を本発明者らが発見したことが本明細書において説明される。本発明の組成物および方法は、これらの細胞を維持するため、増殖するため、および増大させるための戦略を提供することによって、また、インビトロで、およびレシipientに移植された時にエキスピボ培養細胞が自己複製し、多数の異なる血球タイプに分化する能力を保存しながら、HSCについて不均一な細胞集団を富化することによって従来のHSC療法が突きつけてきた課題に対処する。

【発明の概要】

【0004】

第1の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法を提供する。

【0005】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバ

10

20

30

40

50

ー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法を提供する。

【0006】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法を提供する。

10

【0007】

一部の態様において、造血幹細胞集団におけるNotch標的遺伝子の発現を、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団と比べて増加させるのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質は存在する。

【0008】

一部の態様において、Notch標的遺伝子は、Hes1およびMycからなる群より選択される。

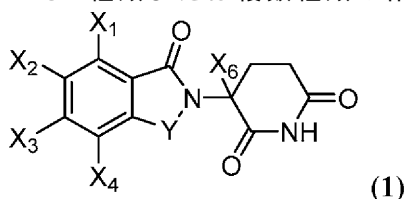
【0009】

一部の態様において、ikarosファミリーメンバー転写因子は、ikaros、aiolos、およびheliosからなる群より選択される。一部の態様において、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質は、ikarosファミリーメンバー転写因子のユビキチン結合を促進する。

20

【0010】

一部の態様において、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質は、式(1)によって表される化合物を含む：



30

式中、

Yは、C=OまたはCH₂であり；

X₁、X₂、X₃、およびX₄のそれぞれは、独立して水素または-NHX₅であり；

X₅は、水素または1～8個の炭素原子のアルキル基であり；かつ

X₆は、水素、1～8個の炭素原子のアルキル基、ベンジル基、またはハロゲン原子である。

【0011】

一部の態様において、式(1)によって表される化合物は、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される。

40

【0012】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程を含む。一部の態様において、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物はUM171を含む。

【0013】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、TGFシグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む。TGFシグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質はTGF受容体阻害物質を含んでもよい。一部の

50

態様において、TGF 受容体阻害物質は、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される。一部の態様において、TGF 受容体阻害物質はA83-01である。

【0014】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程を含む。一部の態様において、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質はヒストンメチル化を活性化するか、ヒストンメチル化を維持するか、またはヒストン脱メチル化を阻害する。例えば、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質はヒストンデメチラーゼ阻害物質を含んでもよい。一部の態様において、ヒストンデメチラーゼ阻害物質は、LSD1阻害物質、例えば、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるLSD1阻害物質である。一部の態様において、LSD1阻害物質はトラニルシプロミンである。

10

【0015】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程を含む。一部の態様において、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質はヒストンアセチル化を活性化するか、ヒストンアセチル化を維持するか、またはヒストン脱アセチル化を阻害する。一部の態様において、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質は、ヒストン脱アセチル化阻害物質、例えば、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質を含む。一部の態様において、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質はトリコスタチンAである。

20

【0016】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、

a. p38シグナル伝達の阻害;および

b. 古典的Wntシグナル伝達の活性化

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程を含む。

【0017】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、例えば、SR1と接触させる工程を含む。

30

【0018】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンメチル化の調節;

b. TGF シグナル伝達の阻害;

c. p38シグナル伝達の阻害;

d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;

e. ヒストンアセチル化の調節;および

f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

40

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の化合物および1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスビボで作製する方法を提供する。

【0019】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンメチル化の調節;

b. TGF シグナル伝達の阻害;

50

- c . p38シグナル伝達の阻害;
- d . 古典的Wntシグナル伝達の活性化;
- e . ヒストンアセチル化の調節;および
- f . アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の化合物および1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法を提供する。

【0020】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

- a . ヒストンメチル化の調節;
- b . TGF シグナル伝達の阻害;
- c . p38シグナル伝達の阻害;
- d . 古典的Wntシグナル伝達の活性化;
- e . ヒストンアセチル化の調節;および
- f . アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが1種類または複数種類の化合物および1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法を提供する。

【0021】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a . ヒストンメチル化の調節;
- b . TGF シグナル伝達の阻害;
- c . p38シグナル伝達の阻害;
- d . 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e . ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法を提供する。

【0022】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a . ヒストンメチル化の調節;
- b . TGF シグナル伝達の阻害;
- c . p38シグナル伝達の阻害;
- d . 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e . ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法を提供する。

【0023】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナ

10

20

30

40

50

ル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF β シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法を提供する。

10

【0024】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法を提供する。

【0025】

さらなる局面において、前記方法は、造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法を提供する。

20

【0026】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法を提供する。

30

【0027】

一部の態様において、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質は、式(1)によって表される。一部の態様において、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質は、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される。

【0028】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程を含む。

40

【0029】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF β 受容体阻害物質と接触させる工程を含む。

【0030】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質と接触させる工程を含む。

【0031】

50

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質と接触させる工程を含む。

【0032】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに

b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 β -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程を含む。

【0033】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、例えば、SR1と接触させる工程を含む。

【0034】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、BMPシグナル伝達を阻害する化合物と接触させる工程を含む。

【0035】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の化合物および1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法を提供する。

【0036】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の化合物および1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法を提供する。

【0037】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

10

20

30

40

50

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが1種類または複数種類の化合物および1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法を提供する。

【0038】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

10

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法を提供する。

20

【0039】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法を提供する。

30

【0040】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

40

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法を提供する。

【0041】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法を提供する。

【0042】

50

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法を提供する。

【0043】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが第1の作用物質および第2の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法を提供する。

10

【0044】

一部の態様において、式(1)によって表される化合物は、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される。

【0045】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程をさらに含む。

【0046】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質と接触させる工程をさらに含む。

20

【0047】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質と接触させる工程を含む。

【0048】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質と接触させる工程を含む。

30

【0049】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団を、
a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに
b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物
からなる群より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程を含む。

【0050】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞集団をSR1と接触させる工程を含む。

【0051】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物、ならびに

40

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群

50

より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物、ならびに1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法を提供する。

【0052】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、UM171、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、UM171および1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法を提供する。

【0053】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたがUM171および1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法を提供する。

【0054】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
 c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;
 d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに
 e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質
 からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、SR1および1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスビボで作製する方法を提供する。

10

【0055】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、SR1と、ならびに
 a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;
 b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
 c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;
 d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに
 e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質
 からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、SR1および1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスビボで富化する方法を提供する。

20

【0056】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、SR1と、ならびに
 a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;
 b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
 c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;
 d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに
 e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質
 からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたがSR1および1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスビボで維持する方法を提供する。

30

40

【0057】

一部の態様において、7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触されていない造血幹細胞集団と比べて10%また

50

はそれ以上、細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

【0058】

一部の態様において、7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

【0059】

一部の態様において、7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触されていない造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について細胞集団を富化するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

【0060】

一部の態様において、7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について細胞集団を富化するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

【0061】

一部の態様において、第1の造血幹細胞集団は、3日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す。

【0062】

一部の態様において、造血幹細胞はヒト細胞などの哺乳動物細胞である。一部の態様において、造血幹細胞はCD34+細胞である。一部の態様において、CD34+細胞の少なくとも10%は、CD34+細胞、CD34+CD38-細胞、CD34+CD38-CD90+細胞、CD34+CD38-CD90+CD45RA-細胞、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+細胞である。一部の態様において、造血幹細胞はヒト臍帯血に由来する。一部の態様において、造血幹細胞はヒトの動員末梢血に由来する。一部の態様において、造血幹細胞はヒト骨髓に由来する。一部の態様において、造血幹細胞はヒトから新たに単離されたものである。一部の態様において、造血幹細胞は以前に凍結保存されていたものである。一部の態様において、哺乳動物細胞はマウス細胞である。

【0063】

一部の態様において、造血幹細胞は2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養される。一部の態様において、造血幹細胞は2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する。一部の態様において、造血幹細胞は1種類または複数種類の作用物質または化合物と同時に接触される。一部の態様において、造血幹細胞は異なる時間に1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触される。

【0064】

一部の態様において、造血幹細胞は、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、造血幹細胞機能的能力を維持する。一部の態様において、造血幹細胞は、2日間(例えば、3日間、5日間

10

20

30

40

50

、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、移植後に造血幹細胞機能的能力を維持する。

【0065】

一部の態様において、造血幹細胞は、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、長期生着能を維持する。

【0066】

一部の態様において、造血幹細胞は患者に移植されると、好中球、血小板、赤血球、単球、マクロファージ、抗原提示細胞、小グリア細胞、破骨細胞、樹状細胞、およびリンパ球(例えば、ナチュラルキラー細胞、T細胞(例えば、CD4+細胞またはCD8+細胞)、およびB細胞)からなる群より選択される細胞集団の回復を生じさせる。

10

【0067】

一部の態様において、造血幹細胞は、移植されたレシピエントにおいて造血組織に局在して生産的造血を再度確立することができる。

【0068】

一部の態様において、造血幹細胞は、プラスチック表面上で、またはビトロネクチン、フィブロネクチン、もしくはマトリゲルを含む支持体上で培養される。

【0069】

一部の態様において、造血幹細胞は2~20%酸素の存在下で培養される。一部の態様において、造血幹細胞は2~12%酸素の存在下で培養される。一部の態様において、造血幹細胞は約5%酸素の存在下で培養される。

20

【0070】

一部の態様において、造血幹細胞は、1種類または複数種類の作用物質または化合物で処理される前に、単核細胞画分中に元々存在する。一部の態様において、造血幹細胞は、1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する前に、CD34+、CD34+CD38-、CD34+CD38-CD90+、CD34+CD38-CD90+CD45RA-、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+EPCR+富化細胞画分中に元々存在する。一部の態様において、造血幹細胞は、1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する前に、非富化細胞画分中に元々存在する。

【0071】

別の局面において、本発明は、

a. ポリヌクレオチドを造血幹細胞集団に挿入する工程;および

b. 上記態様のいずれか1つの方法に従って造血幹細胞集団を増大させるか、または上記態様のいずれか1つの方法に従って造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持する工程を含む、ポリヌクレオチドを造血幹細胞集団に導入する方法を提供する。

30

【0072】

一部の態様において、上記の工程(a)は工程(b)より先行する。一部の態様において、工程(b)は工程(a)より先行する。

【0073】

一部の態様において、前記方法は、細胞中で核酸を切断する1種類または複数種類の試薬、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ、転写アクチベーター様ヌクレアーゼ、CRISPR関連タンパク質、またはメガヌクレアーゼを提供する工程を含む。

40

【0074】

一部の態様において、前記方法は、造血幹細胞を、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、またはボックスウイルス)、および転位因子(例えば、piggybacトランスポゾンまたはsleeping beautyトランスポゾン)からなる群より選択されるベクターと接触させる工程を含む。

【0075】

一部の態様において、前記方法は、エレクトロポレーション、Nucleofection(商標)、ま

50

たはスクイズポレーション(squeeze-poration)によって造血幹細胞にポリヌクレオチドを導入する工程を含む。

【 0 0 7 6 】

一部の態様において、前記方法は、細胞を、カチオン性ポリマー(例えば、ジエチルアミノエチル-デキストラン)、カチオン性脂質、リン酸カルシウム、活性化デンドリマー、および磁気ビーズからなる群より選択される形質転換物質と接触させる工程を含む。

【 0 0 7 7 】

一部の態様において、前記方法は、マイクロインジェクションまたはレーザーフェクション(laserfection)によってポリヌクレオチドを造血幹細胞に導入する工程を含む。

【 0 0 7 8 】

一部の態様において、ポリヌクレオチドは、プロモーター配列、エンハンサー配列、またはサイレンサー配列からなる群より選択される制御配列を含む。

【 0 0 7 9 】

一部の態様において、ポリヌクレオチドは、タンパク質およびRNA(mRNA、tRNA、siRNA、miRNA、shRNA)からなる群より選択される分子をコードする。一部の態様において、ポリヌクレオチドは、化学修飾されたRNAである。

【 0 0 8 0 】

一部の態様において、前記方法は、増大した造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む。

【 0 0 8 1 】

別の局面において、本発明は、

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 上記態様のいずれか1つの方法に従って造血幹細胞集団を増大させる工程;

c. 任意で、造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、およびリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 増大した造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法を提供する。

【 0 0 8 2 】

別の局面において、本発明は、

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 上記態様のいずれか1つの方法に従って造血幹細胞集団を富化する工程;

c. 任意で、造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、およびリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 造血幹細胞について富化された細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む、レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法を提供する。

【 0 0 8 3 】

別の局面において、本発明は、

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 上記態様のいずれか1つの方法に従って造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持する工程;

c. 任意で、造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、およびリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT

10

20

30

40

50

細胞に分化させる工程;ならびに

d. 造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法を提供する。

【0084】

別の局面において、本発明は、

a. 上記態様のいずれか1つの方法によって作製された造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 任意で、造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、およびリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

c. 造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法を提供する。

【0085】

一部の態様において、レシピエントはヒトである。

【0086】

一部の態様において、造血幹細胞は、ヒトドナーから単離された1つまたは複数の造血幹細胞に由来する。一部の態様の場合では、造血幹細胞はドナーの動員末梢血に由来する。

【0087】

一部の態様において、ドナーは、CXCR4アンタゴニスト(例えば、AMD3100)、G-CSF、およびGRO からなる群より選択される1種類または複数種類の動員物質を以前に投与されたことがある。

【0088】

一部の態様において、造血幹細胞は、プロスタグランジン、例えば、dmPGE2またはその類似体とさらに接触される。

【0089】

一部の態様において、造血幹細胞は、Notchシグナル伝達アゴニストとさらに接触される。

【0090】

一部の態様において、造血幹細胞はSIRT1阻害物質とさらに接触される。一部の態様において、前記阻害物質またはSIRT1は、ニコチンアミド、カンピノール、およびその類似体からなる群より選択される。

【0091】

一部の態様において、レシピエントは、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、骨髄異形成症候群(MDS)、多発性骨髄腫、再生不良性貧血、骨髄機能不全、骨髄増殖性疾患、例えば、骨髄線維症、本態性血小板減少症、または真性赤血球増加症、ファンコーニ貧血、先天性角化不全症、分類不能型免疫不全(Common variable immune deficiency)(CVID、例えば、CVID1、CVID2、CVID3、CVID4、CVID5、およびCVID6)、血球貪食性リンパ組織球症、固形腫瘍、例えば、神経芽細胞腫、生殖細胞腫瘍、乳癌、ウィルムス腫瘍、髓芽細胞腫、および神経外胚葉性腫瘍、自己免疫疾患、例えば、強皮症、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、またはI型糖尿病、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、またはタンパク質欠乏症、例えば、副腎脳白質ジストロフィー(ALD)、異染性白質ジストロフィー(MLD)、血友病AおよびB、ハーラー症候群、ハンター症候群、ファブリー病、ゴーシェ病、表皮水疱症、アミロイドーシス、グロバイド細胞白質ジストロフィー、サンフィリポ症候群、ならびにモルキオ症候群からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である。

【0092】

一部の態様において、レシピエントは、鎌状赤血球性貧血、サラセミア、サラセミア、サラセミア、ヘモグロビンE/サラセミア、ヘモグロビンS/サラセミア、ヘモグロビンC/サラセミア、ヘモグロビンD/サラセミア、慢性肉芽腫症(X連鎖性慢性肉芽腫症、常染色

10

20

30

40

50

体劣性(AR)慢性肉芽腫症、慢性肉芽腫症AR I NCF1、慢性肉芽腫症AR CYBA、慢性肉芽腫症AR II NCF2、慢性肉芽腫症AR III NCF4)、X連鎖重症複合免疫不全(SCID)、ADA SCID、IL7-RA SCID、CD3 SCID、Rag1/Rag2 SCID、Artemis SCID、CD45 SCID、Jak3 SCID、先天性顆粒球減少症、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN1、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN2、家族性血球貪食性リンパ組織球症(FHL)、家族性血球貪食性リンパ組織球症2型(FHL2、パーフォリン変異)、無グロブリン血症(X連鎖性無グロブリン血症)、ウィスコット・オールドリッチ症候群、チェディアック・東症候群、赤血球ビルビン酸キナーゼ欠損症による溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症、X連鎖性副腎脳白質ジストロフィー(X-ALD)、X連鎖性リンパ球増殖性疾患、単中心性キャッスルマン病(Unicentric Castleman's Disease)、多中心性キャッスルマン病(Multicentric Castleman's Disease)、先天性無巨核球性血小板減少症(Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia)(CAMT)I型、細網異形成症、ファンコーニ貧血、後天性特発性鉄芽球性貧血、全身性肥満細胞症、フォン・ヴィルブランド病(VWD)、先天性赤血球異形成貧血2型、軟骨毛髪形成不全症候群、遺伝性球状赤血球症、ブラックファン・ダイヤモンド症候群、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、血小板減少-橈骨欠損症候群、大理石骨病、小児型大理石骨病、ムコ多糖症、レッシュ・ナイハン症候群、糖原貯蔵症、先天性肥満細胞症、オーメン症候群、X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症(X-linked Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy)(IPEX)、FOXP3変異を特徴とするIPEX、X連鎖多発性内分泌障害・免疫機能不全・下痢症候群(X-linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea)(XPID)、X連鎖自己免疫・アレルギー性調節異常症候群(X-Linked Autoimmunity-Allergic Dysregulation Syndrome)(XLAAD)、IPEX様症候群、高IgM 1型、高IgM 2型、高IgM 3型、高IgM 4型、高IgM 5型、X連鎖性高免疫グロブリンM、裸リンパ球症候群I型、および裸リンパ球症候群II型(裸リンパ球症候群II型、MHCクラスI欠損症;裸リンパ球症候群II型、相補群A;裸リンパ球症候群II型、相補群C;裸リンパ球症候群II型、相補群D;裸リンパ球症候群II型、相補群E)からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である。

【0093】

一部の態様において、レシピエントは、造血リンパ組織悪性腫瘍(hematolymphoid malignancy)、非造血リンパ組織悪性腫瘍、もしくはタンパク質欠乏症に罹患しているヒト患者であるか、または(例えば、移植された組織もしくは細胞に対する寛容を誘導する)組織移植レシピエントもしくは細胞移植レシピエントである。

【0094】

一部の態様において、造血幹細胞は自己由来または同系である。一部の態様において、造血幹細胞は同種異系である。

【0095】

別の局面において、本発明は、

- a. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と、
 - b. TGF β シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質;
 - c. 表1に列挙した1種類または複数種類の化合物;
 - d. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質;
 - e. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質;および
 - f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質
- のうちの1つまたは複数とを含む、組成物を提供する。

【0096】

一部の態様において、ikarosファミリーメンバー転写因子は、ikaros、aiolos、およびheliosからなる群より選択される。

【0097】

一部の態様において、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減さ

10

20

30

40

50

せる1種類または複数種類の作用物質は、ikarosファミリーメンバー転写因子のユビキチン結合を促進する。一部の態様において、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質は、式(1)によって表される化合物を含む。一部の態様において、式(1)によって表される化合物は、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される。

【0098】

一部の態様において、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物は、UM171を含む。

【0099】

一部の態様において、TGF β シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質は、TGF β 受容体阻害物質を含む。一部の態様において、TGF β 受容体阻害物質は、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される。一部の態様において、TGF β 受容体阻害物質はA83-01である。

【0100】

一部の態様において、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質は、ヒストンメチル化を活性化するか、ヒストンメチル化を維持するか、またはヒストン脱メチル化を阻害する。一部の態様において、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質は、ヒストンデメチラーゼ阻害物質を含む。一部の態様において、ヒストンデメチラーゼ阻害物質は、LSD1阻害物質である。一部の態様において、LSD1阻害物質は、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される。一部の態様において、LSD1阻害物質はトラニルシプロミンである。

【0101】

一部の態様において、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質は、ヒストンアセチル化を活性化するか、ヒストンアセチル化を維持するか、またはヒストン脱アセチル化を阻害する。一部の態様において、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質は、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質を含む。一部の態様において、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質は、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される。一部の態様において、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質はトリコスタチンAである。

【0102】

一部の態様において、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質は、SR1を含む。

【0103】

別の局面において、本発明は、

- a. 表1に列挙した1種類または複数種類の化合物と、
 - b. TGF β シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質；
 - c. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；
 - d. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；および
 - e. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質
- のうちの1つまたは複数とを含む、組成物を提供する。

【0104】

別の局面において、本発明は、

- a. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と、
 - b. TGF β シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質；
 - c. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；および
 - d. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質
- のうちの1つまたは複数とを含む、組成物を提供する。

【0105】

10

20

30

40

50

別の局面において、本発明は、

- a. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と、
 - b. TGF 受容体阻害物質；
 - c. 表1に列挙した化合物；
 - d. ヒストンデメチラーゼ阻害物質；
 - e. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質；および
 - f. アリール炭化水素受容体阻害物質
- のうちの1つまたは複数とを含む、組成物を提供する。

10

【0106】

一部の態様において、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質は、式(1)によって表される。一部の態様において、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質は、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される。

【0107】

一部の態様において、表1に列挙した化合物はUM171である。

【0108】

一部の態様において、TGF 受容体阻害物質は、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される。

20

【0109】

一部の態様において、ヒストンデメチラーゼ阻害物質は、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される。

【0110】

一部の態様において、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質は、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される。

【0111】

一部の態様において、前記組成物は、

- a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物；ならびに
 - b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 β -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物
- からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質を含む。

30

【0112】

一部の態様において、アリール炭化水素受容体阻害物質はSR1である。

【0113】

一部の態様において、前記組成物は、BMPシグナル伝達を阻害する化合物を含む。

【0114】

別の局面において、本発明は、

- a. 表1に列挙した化合物と、
 - b. TGF 受容体阻害物質；
 - c. ヒストンデメチラーゼ阻害物質；
 - d. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質；および
 - e. アリール炭化水素受容体阻害物質
- のうちの1つまたは複数とを含む、組成物を提供する。

40

【0115】

別の局面において、本発明は、

- a. アリール炭化水素受容体阻害物質と、
- b. TGF 受容体阻害物質；

50

- c. 表1に列挙した化合物;
 - d. ヒストンデメチラーゼ阻害物質;および
 - e. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質
- のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物を提供する。

【0116】

別の局面において、本発明は、

- a. 式(1)によって表される化合物と、
- b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
- c. UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物;
- d. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;
- e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに
- f. SR1

のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物を提供する。

【0117】

一部の態様において、式(I)によって表される化合物は、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される。

【0118】

一部の態様において、前記組成物は、

- a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物、ならびに
 - b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 α -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物
- からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質を含む。

【0119】

別の局面において、本発明は、

- a. UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と、
- b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
- c. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;
- d. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに
- e. SR1

のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物を提供する。

【0120】

別の局面において、本発明は、

- a. SR1と、
- b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
- c. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;ならびに
- d. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群

より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物を提供する。

【0121】

一部の態様において、1種類または複数種類の作用物質または化合物は、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する。一部の態様において、1種類または複数種類の作用物質または化合物は、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する。一部の態様において、1種類または複数種類の作用物質または化合物は、少なくとも2日間造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持するのに十分な量で存在する。

10

【0122】

一部の態様において、1種類または複数種類の作用物質または化合物は水溶液中に存在する。一部の態様において、1種類または複数種類の作用物質または化合物は凍結乾燥固体として存在する。

【0123】

一部の態様において、7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

20

【0124】

一部の態様において、7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について細胞集団を富化するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

【0125】

一部の態様において、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養状態の細胞と接触した後、移植後の造血幹細胞の長期生着能を維持するのに十分な量で、1種類または複数種類の作用物質または化合物は存在する。

30

【0126】

別の局面において、本発明は、本発明の上記態様のいずれか1つの組成物を含む、細胞培養培地を提供する。一部の態様において、細胞培養培地は血清を実質的に含まない。

【0127】

一部の態様において、前記組成物は、1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触している造血幹細胞集団をさらに含む。

【0128】

一部の態様において、造血幹細胞は1種類または複数種類の作用物質または化合物の存在下で2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養されている。

40

【0129】

別の局面において、本発明は、造血幹細胞集団を、(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質と接触させる工程であって、該第1の作用物質および該第2の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに全体として十分な量で存在する前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスビボで作製する方法を提供する。

50

【0130】

別の局面において、本発明は、1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質; および(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質と接触させる工程であって、該第1の作用物質および該第2の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに全体として十分な量で存在する前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスビボで富化する方法を提供する。

【0131】

別の局面において、本発明は、第1の造血幹細胞集団を、(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質; および(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質と接触させる工程であって、該造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該第1の作用物質および該第2の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスビボで維持する方法を提供する。

【0132】

別の局面において、本発明は、上記の態様のいずれか1つの方法によって作製された造血幹細胞集団を提供する。

【0133】

別の局面において、本発明は、上記の態様のいずれか1つの組成物を含む、キットを提供する。キットは、添付文書、例えば、キットの使用者に、エキスビボでの造血幹細胞集団の増大、富化、または該細胞集団の造血幹細胞機能的能力の維持について説明する添付文書を含んでいてもよい。一部の態様において、添付文書は、使用者に、造血幹細胞におけるポリヌクレオチドの発現について説明する。一部の態様において、添付文書は、使用者に、造血幹細胞またはその子孫の患者への投与について説明する。

【0134】

定義

便宜上、明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲で使用するいくつかの用語および句の意味が以下で示される。特に定めのない限り、または文脈から暗に示されていない限り、以下の用語および句は、以下で示される意味を含む。定義は、特定の態様の説明を助けるために示され、本発明の範囲が特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本発明を限定することを目的としない。特に定義のない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する当業者に一般的に理解されているものと同じ意味を有する。当技術分野における用語の用法と、本明細書において示された用語の定義との間に明らかな矛盾があれば、本明細書において示された定義が優先されるものとする。

【0135】

本明細書で使用する、造血幹細胞または造血前駆細胞の「増大した集団」という用語は、集団中の造血幹細胞の量が、本明細書に記載のように1種類または複数種類の作用物質(例えば、ikarosファミリー転写因子のレベルを低減させるか、TGFシグナル伝達を調節するか、リジンメチル化を調節するか、p38シグナル伝達を調節するか、古典的Wntシグナル伝達を調節するか、ヒストンメチル化を調節するか、またはヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質)が投与される前のHSC数よりも多い(例えば、少なくとも10%多い、少なくとも20%多い、少なくとも30%多い)ような、少なくとももう1つの造血幹細胞を含む細胞集団を指す。

【0136】

本明細書で使用する、細胞におけるikarosファミリー転写因子のレベルを低減させることができる作用物質には、ikaros、aiolos、およびheliosなどのikarosファミリー転写因子の活性濃度を低減させることができる任意の化合物または物質(例えば、低分子、タンパク

10

20

30

40

50

質、干渉RNA、メッセンジャーRNA、または他の天然化合物もしくは合成化合物、あるいは組成物、例えば、複数の物質で構成されるウイルスまたは他の材料)が含まれる。ikaros転写因子のレベルを低減させることができる例示的な作用物質には、ikarosファミリー転写因子のポリユビキチン化を媒介する、セレブロン含有ユビキチンE3リガーゼなどのユビキチンリガーゼを活性化する化合物が含まれる。ikarosファミリー転写因子のポリユビキチン化は、タンパク質分解による転写因子の分解につながる。ikarosファミリー転写因子のレベルを低減させることができる化合物には、例えば、US5,798,368;US5,955,476;US6,281,230;およびUS6,335,349に記載されている、サリドマイド、ポマリドミド、およびレナリドミドが含まれる。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0137】

本明細書で使用する、ヒストン脱メチル化を阻害する作用物質は、ヒストンデメチラーゼまたはヒストン脱メチル化につながる中間体の形成を触媒する他の酵素の活性を弱めることまたは阻止することができる物質または組成物(例えば、低分子、タンパク質、干渉RNA、メッセンジャーRNA、または他の天然化合物もしくは合成化合物、あるいは組成物、例えば、複数の物質で構成されるウイルス材料または他の材料)を指す。阻害は直接的な相互作用によって行われてもよく、間接的な手段を介して、例えば、細胞において産生されるヒストンデメチラーゼの量を低減することによって、またはヒストンデメチラーゼとメチル化ヒストン基質との相互作用を阻害することによって行われてもよい。ヒストンデメチラーゼには、リジン特異的デメチラーゼ、例えば、LSD1およびLSD2、ならびに他のFAD依存性ヒストンデメチラーゼが含まれる。ヒストンデメチラーゼには、二価鉄(Fe^{2+})を利用して、ヒストン残基の酸化的脱メチル化を触媒するジオキシゲナーゼ、例えば、AlkB、およびJumonji C(JmjC)ドメイン含有ヒストンデメチラーゼ、例えば、JHDM1、JHDM2、およびヒストンデメチラーゼのJMJD2スーパーファミリーメンバーも含まれる。メチル化ヒストン残基を、後で酸化的脱メチル化を受ける反応性中間体に変換する他の酵素にはモノアミンオキシダーゼが含まれる。ヒストン脱メチル化阻害物質はヒストンデメチラーゼに直接結合し、酵素活性部位での結合においてメチル化ヒストン基質と競合してもよい。または、ヒストン脱メチル化を阻害する作用物質は、活性部位から離れた場所でヒストンデメチラーゼに結合し、例えば、酵素のコンホメーション変化を誘導することによって酵素とメチル化ヒストン基質との相互作用を破壊または阻止してもよく、例えば、酵素補因子を不活化することまたは移動させることによって触媒サイクルを破壊または阻止してもよい。

20

30

【0138】

ヒストン脱メチル化を阻害する作用物質は、当技術分野において公知の、または本明細書に記載のヒストン脱メチル化アッセイ法から確かめられた時に、 $100\text{ }\mu\text{M}$ 以下(例えば、 $1\text{ nM} \sim 100\text{ }\mu\text{M}$)の最大半量阻害濃度(half-maximal inhibitory concentration)(IC_{50})で脱メチル化ヒストン残基の形成を弱めることまたは阻止することができる。ヒストン脱メチル化阻害物質の生物学的活性を解明するのに使用することができる例示的なアッセイ法には、特に、US8,735,622に記載のように細胞に基づく増殖阻害アッセイおよび解離増強ランタニド蛍光アッセイ法(dissociation-enhanced lanthanide fluorescence assay)、WO2014/151945に記載のように時間分解型蛍光共鳴エネルギー転移アッセイ法、ならびにWO2010/043866に記載のように質量分析法に基づくアッセイ法および共役-酵素ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼアッセイ法(coupled-enzyme formaldehyde dehydrogenase assay)が含まれるが、それに限定されるわけではない。

40

【0139】

本明細書で使用する、TGF β シグナル伝達経路を阻害する作用物質とは、SMAD転写コアクチベータータンパク質の作用により転写される1つまたは複数の遺伝子の転写を弱めることまたは阻止することができる物質または組成物(例えば、低分子、タンパク質、干渉RNA、メッセンジャーRNA、または他の天然化合物もしくは合成化合物、あるいは組成物、例えば、複数の物質で構成されるウイルス材料または他の材料)を指す。TGF β シグナル伝

50

達経路を阻害する作用物質は、この経路内の1つまたは複数の点において、SMAD誘導性遺伝子転写につながるシグナル伝達カスケードを破壊してもよい。例えば、TGFシグナル伝達経路阻害物質は、TGFまたはTGFスーパーファミリーリガンド、例えば、アクチビン、Nodal、骨形成タンパク質(BMP)、増殖分化因子(GDF)、またはミューラー管阻害因子(Mullerian inhibitory factor)(MIF)がその内因性受容体に結合するのを破壊または阻止し、従って、受容体関連SMADタンパク質のリン酸化および活性化を阻害してもよい。TGFシグナル伝達経路阻害物質は、例えば、SMADタンパク質に結合し、SMADタンパク質とヌクレオポリンとの相互作用を阻止または破壊することによって、1種類または複数種類のSMADタンパク質の核への移動を阻止することによって機能してもよい。TGFシグナル伝達経路阻害物質は、1種類または複数種類のSMADタンパク質と、受容体活性化のためのSMADアンカー(SMAD Anchor for Receptor Activation)(SARA)との相互作用を安定化してもよい。この安定化により、細胞質内にSMADタンパク質が隔離され、核への移動が組織される。TGFシグナル伝達経路阻害物質の他の例には、SMADタンパク質に結合し、SMADタンパク質をDNA結合転写因子から隔離し、従って、標的遺伝子の転写を阻止する物質、例えば、ニューロゲニンが含まれる。代替のTGFシグナル伝達経路阻害物質には、1種類または複数種類のSMADタンパク質のユビキチン結合を促進し、それによって、このタンパク質に、プロテアソームによる分解のための印を付け、標的遺伝子転写を阻止する物質が含まれる。

【0140】

TGFシグナル伝達経路阻害物質の阻害活性を確かめるのに使用することができる例示的なアッセイ法には、特に、WO2006/012954に記載のように、電気泳動移動度シフト解析、抗体スーパーシフトアッセイ法、ならびにTGF誘導性遺伝子レポーターアッセイ法が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0141】

本明細書で使用する、p38シグナル伝達経路を阻害する作用物質とは、p38マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK、例えば、p38、p38、p38、もしくはp38)またはこれらの酵素の1つもしくは複数の活性化に直接的または間接的に関与する任意のタンパク質の活性を弱めることまたは阻止することができる物質または組成物(例えば、低分子、タンパク質、干渉RNA、メッセンジャーRNA、または他の天然化合物もしくは合成化合物、あるいは組成物、例えば、複数の物質で構成されるウイルス材料または他の材料)を指す。p38シグナル伝達経路を阻害する作用物質には、IL-1Rなどのサイトカイン受容体に結合し、この受容体を介したp38 MAPキナーゼ活性化を阻止するモノクローナル抗体などの物質が含まれてもよい。または、p38シグナル伝達経路阻害物質はp38タンパク質に直接結合し、MAPキナーゼによるp38活性化ループのリン酸化を弱めてもまたは阻止してもよい。または、p38シグナル伝達経路を阻害する作用物質は、MAPK複合体のスキヤフォールドとして役立つ、TNF受容体関連因子(TRAF)のリジン残基におけるポリユビキチン鎖の形成を破壊してもよい。他のp38シグナル伝達経路阻害物質には、活性化ループから離れた部位においてMAPキナーゼのリン酸化を促進し、p38との会合を阻止するもの、ならびに活性化ループ内にあるMAPキナーゼをアセチル化し、従って、MAPキナーゼのリン酸化と、同時に発生する活性化を阻止するものが含まれる。

【0142】

p38シグナル伝達経路を阻害する作用物質の阻害活性を確かめるのに使用することができる例示的なアッセイ法には、特に、WO2006/012954に記載のように、蛍光異方性競合結合アッセイ法(fluorescence anisotropy competitive binding assay)、ならびに時間分解型蛍光共鳴エネルギー転移アッセイ法が含まれるが、それに限定されるわけではない。

【0143】

本明細書で使用する、ヒストン脱アセチル化を阻害する作用物質とは、直接的な相互作用を介して、または間接的な手段を介して、例えば、細胞において産生されるヒストンデアセチラーゼの量を低減することによって、またはヒストンデアセチラーゼとアセチル化ヒ

10

20

30

40

50

ストン基質との相互作用を阻害することによって、ヒストンデアセチラーゼの活性、さらに具体的には、その酵素活性を弱めることまたは阻止することができる物質または組成物(例えば、低分子、タンパク質、干渉RNA、メッセンジャーRNA、または他の天然化合物もしくは合成化合物、あるいは組成物、例えば、複数の物質で構成されるウイルス材料または他の材料)を指す。ヒストンデアセチラーゼ酵素活性を阻害するとは、ヒストンデアセチラーゼがヒストン残基(例えば、ヒストンタンパク質内の、モノメチル化、ジメチル化、もしくはトリメチル化したリジン残基;モノメチル化アルギニン残基、または対称性/非対称性ジメチル化アルギニン残基)からのアセチル基の除去を触媒する能力を低減することを意味する。好ましくは、ヒストン脱アセチル化を阻害する作用物質が、別の関連しない生物学的効果を生じるのに必要な阻害物質の濃度より低い濃度で、ヒストンデアセチラーゼがヒストン残基からアセチル基を除去する能力を低減するように、このような阻害は特異的である。

10

【0144】

本明細書で使用する「ヒストンデアセチラーゼ」および「HDAC」という用語は、ヒストンのN末端にあるリジン残基の α -アミノ基からのアセチル基の除去を触媒する酵素ファミリーのいずれか1つを指す。文脈によって特に定めのない限り、「ヒストン」という用語は、任意の種に由来する、H1、H2A、H2B、H3、H4、およびH5を含む任意のヒストンタンパク質を指すことが意図される。ヒトHDACタンパク質または遺伝子産物には、HDAC-1、HDAC-2、HDAC-3、HDAC-4、HDAC-5、HDAC-6、HDAC-7、HDAC-8、HDAC-9、HDAC-10、およびHDAC-11が含まれるが、これに限定されない。

20

【0145】

本明細書で使用する、 β -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する作用物質には、 β -カテニンリン酸化またはユビキチン結合を阻害する作用物質が含まれる。これらの作用物質は、例えば、 β -カテニンを、ユビキチン結合のための基質およびプロテアソームを介した分解のための基質にする、(例えば、残基Ser33、Ser37、および/またはThr41にある)セリン残基および/またはスレオニン残基のリン酸化の触媒作用を弱めることによって、 β -カテニン分解の速度または程度を低減することができる任意の物質(例えば、低分子、タンパク質、干渉RNA、メッセンジャーRNA、または他の天然化合物もしくは合成化合物、あるいは組成物、例えば、ウイルス材料または複数の物質で構成される他の材料)でよい。機能的 β -カテニンの半減期を延ばすことによって、これらの作用物質は、 β -カテニン転写コアクチベーターの作用により転写される遺伝子の転写の速度または程度の同時に発生する増加を促進する。 β -カテニンリン酸化を阻害する例示的な作用物質には、リン酸化において β -カテニンと競合する基質を供給することによってグリコーゲン合成酵素キナーゼ3(GSK3)の阻害を組織化するシグナル伝達カスケードである古典的 β -カテニン/Wntシグナル伝達経路のアゴニストが含まれる。

30

【0146】

本明細書で使用する「Wntシグナル伝達アゴニスト」とは、古典的Wntシグナル伝達経路のアゴニストを指す。この経路のアゴニストには、Wntタンパク質、または哺乳動物細胞の核内にある β -カテニンの濃度の上昇を促進するように、FrizzledおよびLRP5/6補助受容体タンパク質に直接結合する他の化合物がさらに含まれる。または、 β -カテニン/Wnt経路アゴニストは、Wntタンパク質に結合して、Wntタンパク質を内因性Wnt補助受容体から隔離する、1種類または複数種類の分泌型Frizzled関連タンパク質(SFRP)またはWnt阻害タンパク質(WIF)を阻害することによって機能してもよい。

40

【0147】

β -カテニン/Wnt経路アゴニストの活性を確かめるのに使用することができる例示的な方法には、US2014/0044763に記載のように、TCF/LEFファミリー転写因子の制御下にあるレポーター遺伝子の発現のモニタリング、ならびにTOPFlashルシフェラーゼレポーターアッセイ法が含まれるが、これに限定されるわけではない。

【0148】

本明細書で使用する、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する化合物には、アリ

50

ール炭化水素受容体とその活性化リガンドとの結合によって伝えられるシグナル伝達カスケードを阻害する作用物質が含まれる。アリール炭化水素受容体は、アゴニストリガンドに結合すると核に移動し、特異な配列モチーフを含有する標的遺伝子、例えば、上流ダイオキシン応答配列を含有するチトクロムP450A1酵素をコードする遺伝子の転写を促進するサイトゾルリガンド誘導性転写因子である。アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する作用物質の例には、アリール炭化水素受容体に直接結合し、従って、この受容体との結合においてアリール炭化水素受容体リガンドと競合する化合物、例えば、SR1を含んでもよいアリール炭化水素受容体阻害物質が含まれる。アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する作用物質のさらなる例には、活性アリール炭化水素受容体の核への移動を妨害する作用物質、およびアリール炭化水素受容体と、標的遺伝子のDNA(例えば、XRE 10 部位を含有するプロモーター領域)との相互作用を阻害する作用物質が含まれる。

【0149】

本明細書で使用するNotchシグナル伝達アゴニストは、Notch経路機能の活性化を促進する作用物質である。本明細書で使用する「Notch経路機能」という用語は、Notchの細胞内ドメインの核移行、RBP-J またはそのショウジョウバエ(*Drosophila*)ホモログSuppressor of Hairlessの核移行、Enhancer of Split複合体のbHLH遺伝子、例えば、Mastermindの活性化、HES-1遺伝子またはKBF2(CBF1とも呼ばれる)遺伝子の活性化、ショウジョウバエ神経芽細胞分離(neuroblast segregation)の阻害、およびNotchと、Deltaタンパク質、Jagged/Serrateタンパク質、Fringe、Deltex、またはRBP-J /Suppressor of Hairless、またはそのホモログもしくは類似体との結合を含むが、これに限定されない、Notchシグナル伝達経路によって媒介される機能を指す。Notchシグナル伝達カスケードおよびNotchシグナル伝達によってもたらされる表現型は、例えば、Kopan et al., Cell 137:216 (2009)およびJarriault, et al., Molecular Cell. Biology 18:7423 (1998)に記載されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。Notchアゴニストの例は、例えば、US2014/0369973およびUS7,399,633に記載されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。例示的なNotchアゴニストには、Notchタンパク質、ならびにその類似体、誘導体、および断片;Notchシグナル伝達経路を伝える他のタンパク質、ならびにその類似体、誘導体、および断片;Notch受容体活性を刺激する活性化抗体、およびアゴニスト活性を保持している、その抗原結合断片;Notchシグナル伝達を増強するタンパク質をコードする核酸;ならびにNotch 30 経路活性が促進されるように、Notchタンパク質またはNotch経路にある他のタンパク質に結合するかまたは他のやり方で相互作用するタンパク質、その誘導体、および類似体が含まれるが、これに限定されるわけではない。このようなアゴニストには、Notchタンパク質およびNotch細胞内ドメインを含有するその誘導体、前述のものをコードするNotch核酸、ならびにNotchリガンドのNotch相互作用ドメイン(例えば、DeltaまたはSerrateの細胞外ドメイン)と接触するタンパク質が含まれるが、これに限定されない。他のアゴニストにはRBPJ /Suppressor of HairlessまたはDeltexが含まれるが、これに限定されない。さらに、Fringeを、例えば、Deltaタンパク質と共に用いてNotch活性を増強することができる。これらのタンパク質、その断片および誘導体は組換えにより発現および単離されてもよく、当技術分野において公知のペプチド合成法およびタンパク質合成法を用いて化学合成されてもよい。 40

【0150】

本明細書で使用する「阻害物質」という用語は、標的タンパク質またはシグナル伝達経路の活性を低減することができる任意の天然または合成の化合物を指す。阻害物質は、例えば、ペプチド、タンパク質、抗体、ペプチドミメティック、アミノ酸、アミノ酸類似体、ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド類似体、アプタマー、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、有機化合物、または無機化合物でもよい。阻害物質は標的タンパク質の活性を直接的または間接的に弱めてもまたは阻止してもよい。直接的阻害は、例えば、タンパク質に結合し、タンパク質が内因性分子、例えば、酵素、基質、または他の結合パートナーと相互作用するのを阻止し、それによって、タンパク質の活性を減らすことによって得るこ 50

【 0 1 5 1 】

30

【 0 1 5 2 】

40

【 0 1 5 3 】

50

きる。例えば、もっと成熟した分化細胞は、この細胞が発現する細胞表面分子によって、除かれるように選択される。任意で、血液製剤は、CD34+細胞を正に選択することによって分画される。CD34+細胞は、自己複製、多分化能が可能であり、移植レシピエントに再導入されると、造血幹細胞ニッチに帰り、生産的造血および持続的造血を再度確立することができる造血幹細胞の亜集団を含む。このような選択は、例えば、市販の磁気抗CD34ビーズ(Dynal, Lake Success, NY.)を用いて成し遂げられる。未分画の血液製剤は、任意で、ドナーから直接得られるか、または冷凍保存貯蔵庫から取り出される。造血幹細胞はまた、任意で、分化した胚性幹細胞、分化した人工多能性幹細胞、または他のリプログラミングされた成熟細胞タイプからも得ることができる。

【0154】

本明細書で使用する「幹細胞」または「未分化細胞」という用語は、自己複製の性質を有し、複数の細胞タイプに分化する発生能を有する、未分化状態または部分的に分化した状態にある細胞を指す。幹細胞はその機能的能力を維持しながら、増殖し、かつもっと多くのこのような幹細胞を生じることができる。幹細胞は非対称的に分裂することができる、これは義務的非対称分化(obligatory asymmetrical differentiation)と知られ、一方の娘細胞は親幹細胞の機能的能力を保持し、他方の娘細胞は、親細胞とは異なる他の何らかの特異的な機能、表現型、および/または発生能を発現する。親の発生能を有する1つまたは複数の細胞も保持しながら、増殖し、かつ1つまたは複数の成熟した細胞タイプに後で分化する子孫を生じるように娘細胞そのものを誘導することができる。分化した細胞は、それ自体が多能性細胞に由来する多能性細胞などに由来してもよい。または、集団中の幹細胞の一部は2つの幹細胞に対称的に分裂することができる。従って、「幹細胞」という用語は、特定の状況下では、幹細胞よりも特殊化または分化した表現型に分化する発生能を有し、ある特定の状況下では、実質的に分化することなく増殖する能力を保持している細胞の任意のサブセットを指す。一部の態様において、幹細胞という用語は、一般的に、子孫(子孫細胞)が、分化によって、例えば、胚細胞および組織の徐々に進行する多様化において起こるように、完全にそれぞれ異なる特徴を獲得することによって特殊化する、多くの場合、様々な方向に特殊化する、天然の親細胞を指す。分化した細胞の中には、より優れた発生能のある細胞を生じる能力を持つものもある。このような能力は天然でもよく、様々な因子で処理することによって人為的に誘導されてもよい。幹細胞として始まった細胞は、分化した表現型に進む可能性があるが、「逆戻り」し、次いで、幹細胞表現型を再発現するように誘導することができる。この用語は、当業者によって「脱分化」または「リプログラミング」または「逆分化(retrodifferentiation)」と呼ばれることが多い。

【0155】

本明細書で使用する「ホーミング能」とは、幹細胞が、骨髄などの生産的造血を支持することができるインビボ部位に局在する能力を指す。

【0156】

本明細書で使用する、特定の細胞タイプにおいて「富化された」細胞集団とは、特定のタイプの細胞の相対的割合が、以前の細胞集団と比較して(例えば、ikarosファミリー転写因子のレベルを低減させる作用物質、TGFβシグナル伝達を阻害する作用物質、またはリジン脱メチル化を阻害する作用物質を用いて処理される前の細胞集団と比較して)増加している集団を指す。

【0157】

「多能性の」という用語は、「多能性細胞」に関して用いられる時、複数の異なる造血細胞タイプに分化する発生能を有する細胞を指す。造血幹細胞は多能性であり、多くの異なるタイプの血球(赤血球、白血球、血小板など)を形成することができるが、ニューロンを形成することができない。

【0158】

本明細書で使用する「多分化能を保存する」または「多分化能を維持する」という句は、細胞集団の多分化能の程度が、ある期間にわたって保存されるプロセスを指す。細胞集団の多分化能の程度は、細胞集団が分化することができる分化した細胞タイプの数および同

10

20

30

40

50

一性を表している。例えば、エキスピボで(例えば、培養状態で)2日間にわたって維持されている多分化能を示す細胞集団は、細胞培養期間の初めに分化することができたので、少なくとも、同数の異なる細胞タイプに分化することができる。

【0159】

本明細書で使用する「動員物質」とは、対象の骨髄から末梢血への造血幹細胞の移動を誘導することができる作用物質である。例示的な動員物質には、CXCR4アンタゴニスト、例えば、AMD3100、ならびにGCSFおよびGROが含まれる。

【0160】

本明細書で使用する、細胞集団を1種類または複数種類の作用物質と「接触させる」工程は、様々なやり方で成し遂げることができる。例えば、造血幹細胞集団は、造血幹細胞を、ikarosファミリー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質、TGFシグナル伝達を阻害する作用物質、リジン脱メチル化を阻害する作用物質、p38シグナル伝達を阻害する作用物質、古典的Wntシグナル伝達を活性化する作用物質、またはヒストンアセチル化を調節する作用物質(例えば、サリドマイド、ボマリドミド、レナリドミド、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、ALK5阻害物質II(E-616452)、LY364947、A83-01、トリコスタチンA、トラニルシプロミン、SB203580、CHIR99021、DMH1、酢酸ナトリウム、およびistodax)の存在下で、ある期間にわたって、例えば、2日間またはそれを上回る日数にわたって培養することによって、これらの作用物質と接触されてもよい。複数種類の作用物質が細胞集団と接触される時に、細胞が作用物質に同時に曝露されるように、作用物質と一緒に細胞培養培地に存在することができる。または、作用物質は連続して細胞培養培地に添加されてもよい。例えば、1種類または複数種類の作用物質は、特定のレジメンに従って、例えば、異なる作用物質が培養期間中に異なる時間に培養培地に添加されるように、培養中の細胞集団に添加されてもよい。

【0161】

本明細書で使用する「生着能」という用語は、造血幹細胞および前駆細胞が天然で循環しているか、移植によって提供されたかに関係なく、このような細胞が組織を再構築する能力を指すのに用いられる。この用語は、生着、例えば、細胞の組織ホーミングおよび関心対象の組織内での細胞のコロニー形成を取り囲むか、またはその下地を作る全ての事象を包含する。生着効率または生着速度は、当業者に公知の任意の臨床的に許容されるパラメータを用いて評価または定量することができ、例えば、競合的再構築単位(competitive repopulating unit)(CRU)の評価;幹細胞が帰ったか、コロニー形成したか、もしくは生着した組織におけるマーカーの組み込みまたは発現、あるいは疾患進行、造血系および前駆細胞の生存、またはレシピエントの生存による対象の進行の評価を含んでもよい。一態様において、生着は移植後期間に末梢血中の白血球数を測定することによって確かめられる。または、生着は、骨髄吸引液試料中のドナー細胞による骨髄細胞の回復を測定することによって評価することができる。

【0162】

本明細書で使用する「自己複製」という用語は、幹細胞が、最初の幹細胞と同じ表現型、特徴、および機能的能力を有する娘幹細胞を生じる能力を指す。特に、本明細書で使用する自己複製とは、未分化多能性幹細胞状態を維持しながら増殖を続ける能力と定義される。

【0163】

本明細書で使用する、ドナーから「新たに単離」された細胞集団とは、注入前に凍結保存および解凍されることなくドナーから単離されている細胞集団を指す。細胞集団はドナーから単離され、2つの中間集団に分離されてもよく、中間集団の一方は患者に注入されてもよく、中間集団の他方は凍結保存されてもよい。この場合、患者に注入される中間集団は新たに単離されたとみなされる。細胞集団は患者に注入される前にエキスピボで培養されれば、ドナーから新たに単離されたとみなされる。例えば、この培養工程は、結果として生じた細胞が患者に投与される前に造血幹細胞集団を増大させるため、富化するため、および/または維持するために行われてもよい。これらの場合、結果として生じた細胞は、

患者に投与される細胞が患者に注入される前に凍結保存および解凍されていなければ、ドナーから新たに単離されたとみなされる。

【0164】

「減少させる」、「低減した」、「低減」、または「阻害する」という用語は全て、統計的に有意な量分だけ減少させることを意味するために本明細書において用いられる。一部の態様において、「低減する」、「低減」、または「減少させる」、または「阻害する」は、典型的には、参照レベル(例えば、ある特定の処理がない)と比較して少なくとも10%減少させることを意味し、例えば、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%減少させること、またはそれを超えて減少させることを含んでもよい。本明細書で使用する「低減」または「阻害」は、参照レベルと比較した完全な阻害または低減を包含しない。「完全な阻害」とは、参照レベルと比較して100%阻害することである。

10

【0165】

本明細書で使用する「CRU(競合的再構築単位)」とは、インビボ移植後に検出することができる長期生着幹細胞の測定単位を指す。

【0166】

本明細書で使用する「調節する」という用語は、特定の生物学的活性を変えること、または特定の生物学的活性の変化を誘導することを意味する。調節には、(例えば、シグナル伝達カスケードを開始するように、受容体がシグナル伝達経路を伝えないように受容体を活性化することによって、生物学的活性を弱める内因性阻害物質を活性化することによって、または特定の生物学的機能を阻害するタンパク質の活性を阻害することによって)活性を刺激または阻害することが含まれるが、これに限定されない。特定のシグナル伝達経路を伝えるタンパク質を調節すると、活性(例えば、ikarosファミリーメンバー媒介性転写、TGFシグナル伝達、リジン脱メチル化、p38シグナル伝達、Wntシグナル伝達、ヒストンメチル化、もしくはヒストンアセチル化)の増加もしくは減少、別のタンパク質に対する経路の中のある、あるタンパク質の親和性の変化、または経路もしくは経路内にあるタンパク質の活性に関連する構造特性、機能的特性、もしくは免疫学的特性の別の変化が起こることがある。

20

30

【0167】

「増加した」、「増加させる」、「増強する」、または「活性化する」という用語は全て、統計的に有意な量分だけ増加させることを意味するために本明細書において用いられる。一部の態様において、「増加した」、「増加させる」、「増強する」、または「活性化する」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10%増加させること、例えば、参照レベルと比較して少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、もしくは少なくとも約40%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約60%、もしくは少なくとも約70%、もしくは少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%増加させること、または100%まで、もしくは100%を含めて増加させること、または10~100%増加させること、あるいは参照レベルと比較して少なくとも約2倍、もしくは少なくとも約3倍、もしくは少なくとも約4倍、もしくは少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍増加させること、または2倍~10倍もしくはそれより多く増加させることを意味することがある。マーカーの文脈において、「増加」とは、このようなレベルの統計的に有意な増加である。

40

【0168】

本明細書で使用する「対象」とはヒトまたは動物を意味する。通常、動物は、脊椎動物、例えば、霊長類、げっ歯類、家畜、または狩猟動物である。霊長類には、チンパンジー、カニクイザル(cynomologous monkey)、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが含まれる。げっ歯類には、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、およびハムスターが含まれる。家畜および狩猟動物には、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、パイソン、水牛

50

、ネコ種、例えば、飼いネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、鳥類種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚類、例えば、マス、ナマズ、およびサケが含まれる。一部の態様において、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、ヒトである。「個体」、「患者」、および「対象」という用語は本明細書において同義に用いられる。

【0169】

本明細書で使用する「レシピエント」とは、造血幹細胞集団または分化した細胞の集団を含有する移植片などの移植片を受け取る患者である。レシピエントに投与される移植細胞は、例えば、自己由来細胞でもよく、同系細胞でもよく、同種異系細胞でもよい。

【0170】

本明細書で使用する「ドナー」とは、1つもしくは複数の細胞またはその子孫がレシピエントに投与される前に、1つもしくは複数の細胞が単離されるヒトまたは動物である。1つもしくは複数の細胞は、例えば、1つもしくは複数の細胞またはその子孫がレシピエントに投与される前に、本発明の方法に従って増大するか、富化されるか、または維持される造血幹細胞集団でもよい。

【0171】

好ましくは、対象は哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシでもよいが、これらの例に限定されない。疾患および/または処置の動物モデルに相当する対象として、ヒト以外の哺乳動物を都合よく使用することができる。対象は雄でもよく雌でもよい。

【0172】

本明細書で使用する「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、隣接する残基の -アミノ基とカルボキシ基との間でペプチド結合によって互いにつながれた一連のアミノ酸残基を指定するために本明細書において同義に用いられる。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、そのサイズまたは機能に関係なく、修飾アミノ酸(例えば、リン酸化アミノ酸、糖化アミノ酸、グリコシル化アミノ酸など)およびアミノ酸類似体を含むアミノ酸のポリマーを指す。「タンパク質」および「ポリペプチド」は、比較的大きいポリペプチドに関して用いられることが多いのに対して、「ペプチド」という用語は、小さなポリペプチドに関して用いられることが多い。だが、当技術分野における、これらの用語の使い方は重複する。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、遺伝子産物およびその断片を指している時に、本明細書において同義に用いられる。従って、例示的なポリペプチドまたはタンパク質は、遺伝子産物、天然タンパク質、ホモログ、オルソログ、パラログ、断片および他の同等物、前述の変種、断片、および類似体を含む。

【0173】

本明細書で使用する「ポリヌクレオチド」、「核酸」、または「核酸配列」という用語は、リボ核酸、デオキシリボ核酸、またはその類似体の単位を組み込んでいる任意の分子、好ましくはポリマー分子を指す。核酸は一本鎖でも二本鎖でもよい。一本鎖核酸は、変成した二本鎖DNAのうちの一方の核酸鎖でもよい。または、一本鎖核酸は、どの二本鎖DNAにも由来しない一本鎖核酸でもよい。一局面において、核酸はDNAでもよい。別の局面において、核酸はRNAでもよい。別の局面において、核酸は、化学修飾されたRNAでもよい。例えば、核酸は、化学修飾されたメッセンジャーRNAでもよい。別の局面において、核酸は、天然または合成のヌクレオチド類似体を用いて合成されたRNAでもよい。適切な核酸分子は、ゲノムDNAまたはcDNAを含むDNAである。他の適切な核酸分子は、mRNA、tRNA、siRNA、miRNA、またはshRNAを含むRNAである。

【0174】

本明細書で使用する「siRNA」という用語は、例えば、Bass, Nature 411: 428 (2001); Elbashir et al., Nature 411: 494 (2001); WO2000/044895; WO2001/036646; WO1999/032619; WO2000/001846; WO2001/029058; WO1999/007409; および WO2000/044914 に開示されるように、RNA干渉または「RNAi」が可能な二本鎖核酸分子を指す。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。本明細書で使

10

20

30

40

50

用するsiRNA分子は、RNAだけを含む分子に限定されず、化学修飾されたヌクレオチド、およびRNAi能力または活性を有する非ヌクレオチドをさらに包含する。

【0175】

本明細書で使用する「miRNA」という用語は、典型的には、長さが18~23ヌクレオチドの小さなノンコーディング一本鎖RNAのクラスを指す。miRNA分子は、特定のタンパク質をコードするmRNAの安定性および翻訳を調節することによって遺伝子発現を制御することができる。miRNAはまた、ヘテロクロマチン形成およびゲノム再編成などの他の核プロセスにも影響を及ぼす。

【0176】

本明細書で使用する「shRNA」(低分子ヘアピン型RNA)という用語は、一部がヘアピン構造をとる、siRNAを含むRNA二重鎖を指す。二重鎖部分に加えて、ヘアピン構造は、二重鎖を形成する2本の配列間に配置されたループ部分を含むことがある。ループは長さが異なってもよい。例えば、ループは長さが5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、または13ヌクレオチドでもよい。ヘアピン構造はまた3'オーバーハング部分または5'オーバーハング部分も含有してよい。例えば、オーバーハングは3'オーバーハングでも5'オーバーハングでもよく、長さが0ヌクレオチド、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、または5ヌクレオチドでもよい。

【0177】

本明細書で使用する「薬学的組成物」という用語は、薬学的に許容される担体、例えば、製薬産業において一般的に用いられる担体と組み合わせた活性作用物質を指す。「薬学的に許容される」という句は、適切な医学的判断の範囲内にあり、過度の毒性、過敏、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症を引き起こすことなくヒトおよび動物の組織との接触における使用に適しており、妥当なベネフィット/リスク比に見合った化合物、材料、組成物、および/または剤形を指すために本明細書において用いられる。

【0178】

本明細書で使用する「投与する」という用語は、望ましい部位における作用物質の少なくとも部分的な送達をもたらす方法または経路によって、本明細書において開示された化合物、細胞、または細胞集団を対象に配置することを指す。本明細書において開示された化合物または細胞を含む薬学的組成物は、対象において効果的な処置をもたらす任意の適切な経路によって投与することができる。

【0179】

「統計的に有意な」または「有意に」という用語は統計的有意性を指し、一般的に、2標準偏差(2SD)または2SD超の差を意味する。

【0180】

作業実施例を除き、または特に定めのない限り、本明細書において用いられる成分の量または反応条件を表す数字は全て、全ての場合において「約」という用語により修飾されていると理解しなければならない。本明細書で使用する「約」という用語は±10%のずれを示す。

【0181】

本明細書で使用する「含む(comprising)」または「含む(comprises)」という用語は、組成物、方法、および方法または組成物に必要な不可欠なその各成分に関して用いられるが、必要不可欠であっても必要不可欠でなくても、明記されていない要素の包含を認める。

【0182】

「からなる」という用語は、本明細書に記載の組成物、方法、およびその各成分を指し、態様の説明において列挙されなかった、あらゆる要素を排除する。

【0183】

本明細書で使用する「から本質的になる」という用語は、ある特定の態様に必要な要素を指す。この用語があると、この態様の基本的かつ新規の、または機能的な特徴に大きく影響を及ぼさない要素が存在することが可能になる。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 4 】

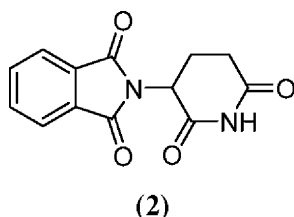
「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」という単数形の用語は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り複数の指示物を含む。同様に、「または」という語句は、特に文脈によってはっきりと規定されていない限り「および」を含むことが意図される。本明細書に記載のものと同様のまたは等価な方法および材料を本開示の実施または試験において使用することができるが、適切な方法および材料を以下で説明する。「例えば(e.g.)」という略語は、ラテン語の*exempli gratia*に由来し、非限定的な例を示すために本明細書において用いられる。従って、「例えば(e.g.)」という略語は「例えば(for example)」という用語と同義である。

【 0 1 8 5 】

本明細書において特に定義のない限り、本願に関連して用いられる科学用語および技術用語は、本開示が属する当業者に一般的に理解されている意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載の特定の方法、プロトコル、および試薬などに限定されず、従って、変更してもよいことが理解されるはずである。本明細書において用いられる専門用語は特定の態様の説明だけを目的とし、本発明の範囲の限定を目的とせず、本発明の範囲は特許請求の範囲によってのみ定義される。免疫学および分子生物学における一般用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, 発行所 Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, 発行所 Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); および Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 発行所 VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, 発行所 Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305); Lewin's Genes XI, 発行所 Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; および Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737)において見られる。これらの内容は全て、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【 0 1 8 6 】

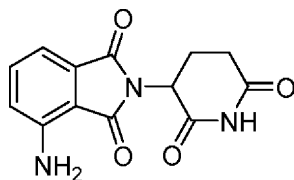
本明細書で使用する「サリドマイド」は、以下の式(2)の構造を有する化合物を指す。



【 0 1 8 7 】

本明細書で使用する「ポマリドミド」は、以下の式(3)の構造を有する化合物を指す。ポマリドミドの合成および生物学的活性は、例えば、US6,335,349に記載されている。この

開示は参照により本明細書に組み入れられる。

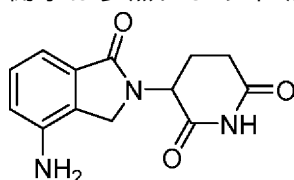


(3)

【 0 1 8 8 】

本明細書で使用する「レナリドミド」は、以下の式(4)の構造を有する化合物を指す。レナリドミドの合成および生物学的活性は、例えば、US6,281,230に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

10

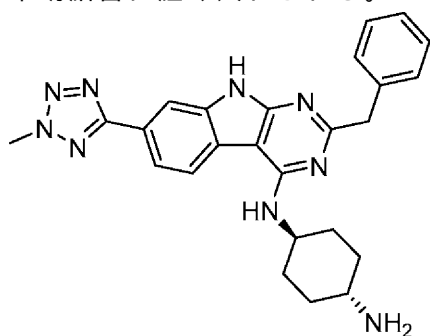


(4)

【 0 1 8 9 】

本明細書で使用する「UM171」は、以下の式(5)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩、例えば、その塩酸塩または臭化水素酸塩を指す。UM171の合成および生物学的活性は、例えば、US2015/0011543に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

20



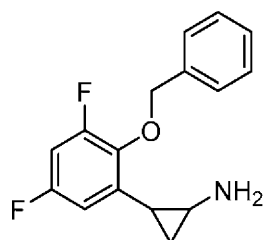
(5)

30

【 0 1 9 0 】

本明細書で使用する「LSD1阻害物質II S2101」は、式(6)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。LSD1阻害物質II S2101の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、WO1998/009625;WO2003/016309;WO2004/087646;WO2005/033066;WO2006/034769;WO2007/068330;WO2009/147217;WO2014/194280;US2013/0178520;US5,426,196;EP764640;およびEP764632を参照されたい。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

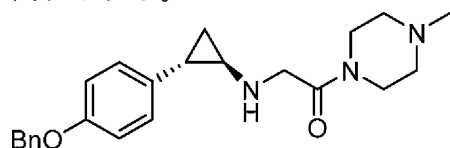
40



(6)

【 0 1 9 1 】

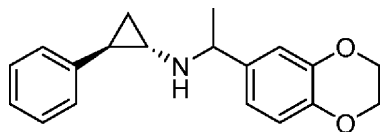
本明細書で使用する「LSD1阻害物質IV RN-1」は、式(7)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。LSD1阻害物質IV RN-1の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、WO2015/003643;WO2014/205266;WO2014/19428;WO2012/122405;WO2014/018375;WO2009/147217;WO2007/068330;WO2006/034769;WO2005/033066;WO2004/087646;WO2003/016309;WO1998/009625;WO1997/010822;WO1997/010825;WO1995/017408;およびUS2013/0178520を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。



(7)

【 0 1 9 2 】

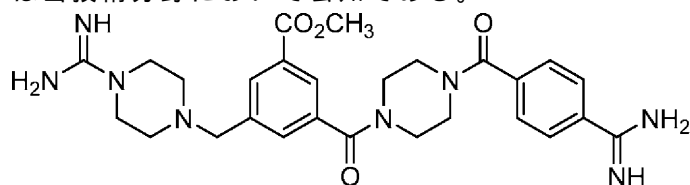
本明細書で使用する「LSD1阻害物質LSD1-C76」は、式(8)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。LSD1阻害物質LSD1-C76の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。



(8)

【 0 1 9 3 】

本明細書で使用する「LSD1阻害物質III CBB1007」は、式(9)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。LSD1阻害物質III CBB1007の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。

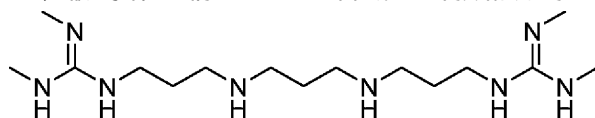


(9)

【 0 1 9 4 】

本明細書で使用する「LSD1阻害物質I」は、式(10)の構造を有する化合物またはその薬学

的に許容される塩を指す。LSD1阻害物質Iは当技術分野ではBHC110阻害物質I、ヒストンリジンデメチラーゼ阻害物質III、および/またはKDM1阻害物質Iとも呼ばれる。LSD1阻害物質Iの合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。

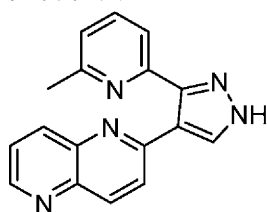


(10)

10

【 0 1 9 5 】

本明細書で使用する「ALK5阻害物質II」(「RepSox」または「E-616452」とも呼ばれる)は、式(11)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。ALK5阻害物質II(E-616452)は当技術分野ではトランスフォーミング成長因子- β I型受容体キナーゼ阻害物質IIまたはRepsoxとも呼ばれる。



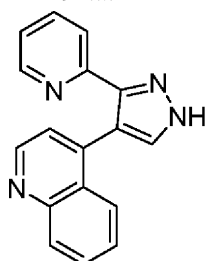
(11)

20

【 0 1 9 6 】

本明細書で使用する「LY364947」は、式(12)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。LY364947は当技術分野ではALK5阻害物質I TbR-I阻害物質トランスフォーミング成長因子- β I型受容体キナーゼ阻害物質とも呼ばれる。LY364947およびALK5阻害物質IIの合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、US6,028,072;WO2002/062794;WO2004/026302;WO2004/026306;WO2004/072033;WO2007/088651;WO2007/070866;WO2007/039151;およびWO2007/052943を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30



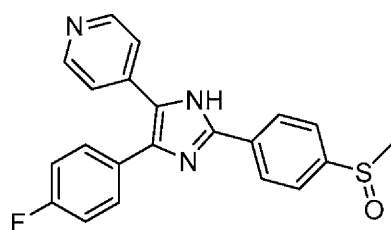
(12)

40

【 0 1 9 7 】

本明細書で使用する「A83-01」は、式(13)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。A83-01の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、US2003/0064997;US2003/0064997;US2003/0064997;US5,777,097;US5,871,934;GB2306108;WO1993/014081;WO1995/003297;WO1997/33883;WO1997/35855;およびWO1993/014081を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

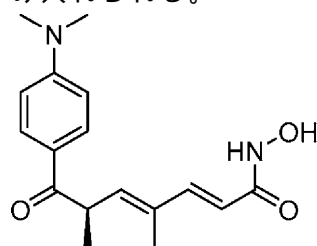
50



(13)

【 0 1 9 8 】

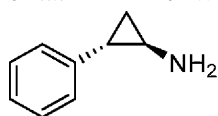
本明細書で使用する「トリコスタチンA」は、式(14)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。トリコスタチンAの合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、US4,690,918;US4,946,999;EP0827946;JP07206670;およびJP60149520を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。



(14)

【 0 1 9 9 】

本明細書で使用する「トラニルシプロミン」は、式(15)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。トラニルシプロミンの合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、US2,993,931;US2,997,422;US3,011,945;US3,079,403;US3,134,676;およびUS3,244,596を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。



(15)

【 0 2 0 0 】

本明細書で使用する「SB203580」は、式(16)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。SB203580の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は、当技術分野において公知である。例えば、WO2007/070866;WO2008/022182;WO2010/065917;WO2010/077955;およびWO2010/102267を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

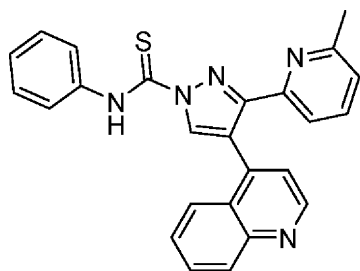
10

20

30

40

50

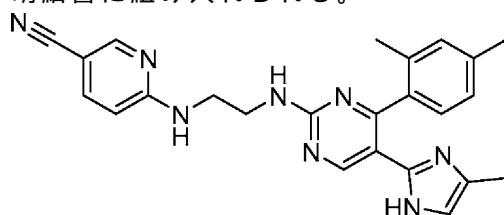


(16)

10

【 0 2 0 1 】

本明細書で使用する「CHIR99021」は、式(17)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。CHIR99021の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、WO1999/065897;WO2002/020495;WO2005/003948;WO2006/001863;WO2006/117212;WO2007/016485;WO2007/075911;WO2007/083978;およびUS2002/0156087を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。



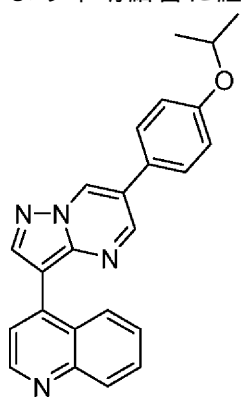
(17)

20

【 0 2 0 2 】

本明細書で使用する「DMH1」は、式(18)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。DMH1の合成、ならびに類似する生物学的活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、WO2012/115120;WO2013/016452;WO2013/163228;WO2013/166488;WO2014/138088;WO2014/176606;WO2014/200115;WO2014/062138;US2014/0248696;およびUS8,822,684を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

30



(18)

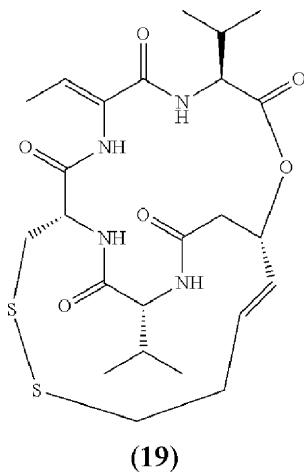
40

【 0 2 0 3 】

本明細書で使用する「istodax」または「ロミデスピン」は、式(19)の構造を有する化合物またはその薬学的に許容される塩を指す。istodaxの合成、ならびに類似する生物学的

50

活性を有する化合物を含む、関連化合物、例えば、誘導体の構造および合成は当技術分野において公知である。例えば、WO14/102731;WO12/009336;WO13/106696;WO02/20817;US4,977,138;US7,611,721;US7,608,280;およびUS2012/046442;およびJ. Am. Chem. Soc. 118:7237-7238, 1996を参照されたい。これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。



10

【 0 2 0 4 】

本発明の様々な局面の説明の中で他の用語が本明細書において定義される。

20

[本発明1001]

造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

[本発明1002]

造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

30

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

[本発明1003]

造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法。

40

[本発明1004]

前記造血幹細胞集団におけるNotch標的遺伝子の発現を、前記第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団と比べて増加させるのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質が存在する、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

前記Notch標的遺伝子が、Hes1およびMycからなる群より選択される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記ikarosファミリーメンバー転写因子が、ikaros、aiolos、およびheliosからなる群

50

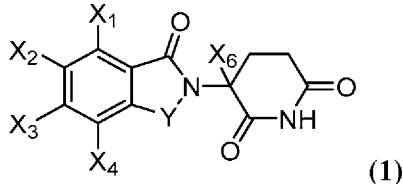
より選択される、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、該ikarosファミリーメンバー転写因子のユビキチン結合を促進する、本発明1001～1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される化合物を含む、本発明1001～1007のいずれかの方法：



10

式中、

Yは、C=OまたはCH₂であり；

X₁、X₂、X₃、およびX₄のそれぞれは、独立して水素または-NHX₅であり；

X₅は、水素または1～8個の炭素原子のアルキル基であり；かつ

X₆は、水素、1～8個の炭素原子のアルキル基、ベンジル基、またはハロゲン原子である。

20

[本発明1009]

式(1)によって表される前記化合物が、ボマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、本発明1008の方法。

[本発明1010]

前記造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程をさらに含む、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

表1に列挙した前記1種類または複数種類の化合物がUM171を含む、本発明1010の方法。

30

[本発明1012]

前記造血幹細胞集団を、TGFシグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

TGFシグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質が、TGF受容体阻害物質を含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

前記TGF受容体阻害物質が、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記TGF受容体阻害物質がA83-01である、本発明1014の方法。

40

[本発明1016]

前記造血幹細胞集団を、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンメチル化を活性化するか、ヒストンメチル化を維持するか、またはヒストン脱メチル化を阻害する、本発明1016の方法。

[本発明1018]

ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンデメチラ

50

ーゼ阻害物質を含む、本発明1016または1017の方法。

[本発明1019]

前記ヒストンデメチラーゼ阻害物質がLSD1阻害物質である、本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記LSD1阻害物質が、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記LSD1阻害物質がトラニルシプロミンである、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記造血幹細胞集団を、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1001~1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンアセチル化を活性化するか、ヒストンアセチル化を維持するか、またはヒストン脱アセチル化を阻害する、本発明1022の方法。

[本発明1024]

ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストン脱アセチル化阻害物質を含む、本発明1022または1023の方法。

[本発明1025]

前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質が、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質がトリコスタチンAである、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記造血幹細胞集団を、

a. p38シグナル伝達の阻害;および

b. 古典的Wntシグナル伝達の活性化

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1001~1026のいずれかの方法。

[本発明1028]

前記造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1001~1027のいずれかの方法。

[本発明1029]

アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質がSR1を含む、本発明1028の方法。

[本発明1030]

造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンメチル化の調節;

b. TGF β シグナル伝達の阻害;

c. p38シグナル伝達の阻害;

d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;

e. ヒストンアセチル化の調節;および

f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

[本発明1031]

10

20

30

40

50

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;
- e. ヒストンアセチル化の調節;および
- f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

10

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

[本発明1032]

第1の造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;
- e. ヒストンアセチル化の調節;および
- f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

20

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法。

[本発明1033]

造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

30

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

40

[本発明1034]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富

50

化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

[本発明1035]

第1の造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGFシグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

[本発明1036]

造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

[本発明1037]

造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

[本発明1038]

第1の造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

[本発明1039]

セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される、本発明1036～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、ボマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

前記造血幹細胞集団を、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF受容体阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

前記造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1042のいずれかの方法。

[本発明1044]

前記造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

前記造血幹細胞集団を、

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに

b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

前記造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

アリール炭化水素受容体を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質がSR1を含む、本発明1046の方法。

[本発明1048]

前記造血幹細胞集団を、BMPシグナル伝達を阻害する化合物と接触させる工程をさらに含む、本発明1036～1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGFシグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

[本発明1050]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGFシグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

10

20

30

40

50

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

[本発明1051]

第1の造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

- a. ヒストンデメチラーゼ;
- b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;
- c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;
- d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;
- e. ヒストンデアセチラーゼ;および
- f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

[本発明1052]

造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF β シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

[本発明1053]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF β シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

[本発明1054]

第1の造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF β シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類また

10

20

30

40

50

は複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

[本発明1055]

造血幹細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

[本発明1056]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

[本発明1057]

第1の造血幹細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが第1の作用物質および第2の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

[本発明1058]

式(1)によって表される前記化合物が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、本発明1055～1057のいずれかの方法。

[本発明1059]

前記造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と接触させる工程をさらに含む、本発明1055～1058のいずれかの方法。

[本発明1060]

前記造血幹細胞集団を、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1055～1059のいずれかの方法。

[本発明1061]

前記造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1055～1060のいずれかの方法。

[本発明1062]

前記造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、本発明1055～1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

前記造血幹細胞集団を、
a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに
b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物
からなる群より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程をさらに含む、本発明1055～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

前記造血幹細胞集団をSR1と接触させる工程をさらに含む、本発明1055～1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と;ならびに
 a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より
 選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される
 TGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カ
 テニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる
 群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質
 からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、
 該UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物、および該1種類または複数種
 類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程
 を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

[本発明1066]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、UM171、その構造類似体、ま
 たは表1に列挙した化合物と;ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LS
 D1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より
 選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される
 TGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カ
 テニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる
 群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質
 からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、
 該UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物、および該1種類または複数種
 類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在
 する、前記工程

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

[本発明1067]

第1の造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と;な
 らびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LS
 D1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より
 選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される
 TGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カ
 テニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる
 群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質
 からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、

10

20

30

40

50

該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該UM171および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

[本発明1068]

造血幹細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該SR1および該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

[本発明1069]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該SR1および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

[本発明1070]

第1の造血幹細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

10

20

30

40

50

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、
該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件
下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該SR1および該1種類または複数種類の作用物質
と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機
能的能力を示す、前記工程
を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持す
る方法。

[本発明1071]

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、
15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、該1種類または複数種類の作用
物質または化合物と接触されていない造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、前記
細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または
化合物が存在する、本発明1001~1070のいずれかの方法。

10

[本発明1072]

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、
15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシ
グナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、
カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ
以上、前記細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用
物質または化合物が存在する、本発明1001~1070のいずれかの方法。

20

[本発明1073]

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、
15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、該1種類または複数種類の作用
物質または化合物と接触されていない造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血
幹細胞について前記細胞集団を富化するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作
用物質または化合物が存在する、本発明1001~1070のいずれかの方法。

[本発明1074]

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、
15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシ
グナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、
カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ
以上、造血幹細胞について前記細胞集団を富化するのに十分な量で、前記1種類または複
数種類の作用物質または化合物が存在する、本発明1001~1070のいずれかの方法。

30

[本発明1075]

前記第1の造血幹細胞集団が、3日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7
日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の
後、前記対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を
示す、本発明1003、1032、1035、1038、1051、1054、1057、1067、および107
0のいずれかの方法。

[本発明1076]

前記造血幹細胞が哺乳動物細胞である、本発明1001~1075のいずれかの方法。

40

[本発明1077]

前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、本発明1076の方法。

[本発明1078]

前記造血幹細胞がCD34+細胞である、本発明1077の方法。

[本発明1079]

前記CD34+細胞の少なくとも10%が、CD34+細胞、CD34+CD38-細胞、CD34+CD38
-CD90+細胞、CD34+CD38-CD90+CD45RA-細胞、またはCD34+CD38-CD90+CD45R
A-CD49F+細胞である、本発明1078の方法。

[本発明1080]

50

前記造血幹細胞がヒト臍帯血に由来する、本発明1076～1078のいずれかの方法。

[本発明1081]

前記造血幹細胞がヒトの動員末梢血に由来する、本発明1076～1078のいずれかの方法。

[本発明1082]

前記造血幹細胞がヒト骨髓に由来する、本発明1076～1078のいずれかの方法。

[本発明1083]

前記造血幹細胞がヒトから新たに単離されたものである、本発明1076～1082のいずれかの方法。

[本発明1084]

前記造血幹細胞が以前に凍結保存されていたものである、本発明1076～1083のいずれかの方法。

10

[本発明1085]

前記哺乳動物細胞がマウス細胞である、本発明1076の方法。

[本発明1086]

前記造血幹細胞が、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養される、本発明1001～1085のいずれかの方法。

[本発明1087]

前記造血幹細胞が、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する、本発明1001～1086のいずれかの方法。

20

[本発明1088]

前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と同時に接触される、本発明1001～1087のいずれかの方法。

[本発明1089]

前記造血幹細胞が、異なる時間に前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触される、本発明1001～1087のいずれかの方法。

[本発明1090]

前記造血幹細胞が、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、造血幹細胞機能的能力を維持する、本発明1001～1089のいずれかの方法。

30

[本発明1091]

前記造血幹細胞が、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、移植後に造血幹細胞機能的能力を維持する、本発明1090の方法。

[本発明1092]

前記造血幹細胞が、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、長期生着能を維持する、本発明1001～1091のいずれかの方法。

40

[本発明1093]

患者に移植されると、前記造血幹細胞が、好中球、血小板、赤血球、単球、マクロファージ、抗原提示細胞、小グリア細胞、破骨細胞、樹状細胞、およびリンパ球からなる群より選択される細胞の集団の回復を生じさせる、本発明1001～1092のいずれかの方法。

[本発明1094]

前記リンパ球が、ナチュラルキラー細胞、T細胞(例えば、CD4+細胞またはCD8+細胞)、およびB細胞からなる群より選択される、本発明1093の方法。

[本発明1095]

前記造血幹細胞が、移植されたレシピエントにおいて造血組織に局在して生産的造血を再度確立することができる、本発明1001～1094のいずれかの方法。

50

[本発明1096]

前記造血幹細胞が、プラスチック表面上で、またはビトロネクチン、フィブロネクチン、もしくはマトリゲルを含む支持体上で培養される、本発明1001～1095のいずれかの方法。

[本発明1097]

前記造血幹細胞が、2～20%酸素の存在下で培養される、本発明1001～1096のいずれかの方法。

[本発明1098]

前記造血幹細胞が、2～12%酸素の存在下で培養される、本発明1097の方法。

[本発明1099]

前記造血幹細胞が、約5%酸素の存在下で培養される、本発明1098の方法。

[本発明1100]

前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物で処理される前に、単核細胞画分中に元々存在する、本発明1001～1099のいずれかの方法。

[本発明1101]

前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する前に、CD34+、CD34+CD38-、CD34+CD38-CD90+、CD34+CD38-CD90+CD45RA-、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+EPCR+富化細胞画分中に元々存在する、本発明1001～1099のいずれかの方法。

[本発明1102]

前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する前に、非富化細胞画分中に元々存在する、本発明1001～1099のいずれかの方法。

[本発明1103]

a. ポリヌクレオチドを造血幹細胞集団に挿入する工程:ならびに
b. 本発明1001、1030、1033、1036、1049、1052、1055、1065、および1068のいずれかの方法に従って該造血幹細胞集団を増大させるか、または本発明1003、1032、1035、1038、1051、1054、1057、1067、および1070～1102のいずれかの方法に従って該造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持する工程を含む、該ポリヌクレオチドを該造血幹細胞集団に導入する方法。

[本発明1104]

(a)が(b)より先行する、本発明1103の方法。

[本発明1105]

(b)が(a)より先行する、本発明1103の方法。

[本発明1106]

前記細胞中で核酸を切断する1種類または複数種類の試薬を提供する工程を含む、本発明1103～1105のいずれかの方法。

[本発明1107]

前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の試薬がジンクフィンガーヌクレアーゼを含む、本発明1106の方法。

[本発明1108]

前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の試薬が転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼを含む、本発明1106の方法。

[本発明1109]

前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の試薬がCRISPR関連タンパク質を含む、本発明1106の方法。

[本発明1110]

前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の作用物質がメガヌクレアーゼを含む、本発明1106の方法。

[本発明1111]

前記造血幹細胞を、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、パル

10

20

30

40

50

ポウウイルス、コロナウイルス、ラウドウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、またはポックスウイルス)、および転位因子(例えば、piggybacトランスポゾンまたはsleeping beautyトランスポゾン)からなる群より選択されるベクターと接触させる工程を含む、本発明1103～1110のいずれかの方法。

[本発明1112]

エレクトロポレーション、Nucleofection(商標)、またはスクイズポレーション(squeeze-poration)によって前記ポリヌクレオチドを前記造血幹細胞に導入する工程を含む、本発明1103～1110のいずれかの方法。

[本発明1113]

前記細胞を、カチオン性ポリマー(例えば、ジエチルアミノエチル-デキストラン)、カチオン性脂質、リン酸カルシウム、活性化デンドリマー、および磁気ビーズからなる群より選択される形質転換物質と接触させる工程を含む、本発明1103～1110のいずれかの方法。

10

[本発明1114]

マイクロインジェクションまたはレーザーフェクション(laserfection)によって前記ポリヌクレオチドを前記造血幹細胞に導入する工程を含む、本発明1103～1110のいずれかの方法。

[本発明1115]

前記ポリヌクレオチドが、プロモーター配列、エンハンサー配列、またはサイレンサー配列からなる群より選択される制御配列を含む、本発明1103～1114のいずれかの方法。

20

[本発明1116]

前記ポリヌクレオチドが、タンパク質およびRNA(mRNA、tRNA、siRNA、miRNA、shRNA)からなる群より選択される分子をコードする、本発明1103～1115のいずれかの方法。

[本発明1117]

前記ポリヌクレオチドが、化学修飾されたRNAである、本発明1103～1115のいずれかの方法。

[本発明1118]

増大した前記造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程をさらに含む、本発明1103～1117のいずれかの方法。

30

[本発明1119]

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;
b. 本発明1001、1030、1033、1036、1049、1052、1055、1065、1068、および1071～1102のいずれかの方法に従って該造血幹細胞集団を増大させる工程;
c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 増大した該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

40

[本発明1120]

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;
b. 本発明1002、1031、1034、1037、1050、1053、1056、1066、1069、および1071～1102のいずれかの方法に従って該造血幹細胞集団を富化する工程;
c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

50

d. 造血幹細胞について富化された該細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

[本発明1121]

a. 造血幹細胞集団を提供する工程:

b. 本発明1003、1032、1035、1038、1051、1054、1057、1067、および1070 ~ 1102のいずれかの方法に従って該造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持する工程:

c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

10

d. 該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

[本発明1122]

a. 本発明1001 ~ 1102のいずれかの方法によって作製された造血幹細胞集団を提供する工程:

b. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

20

c. 該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

[本発明1123]

前記レシピエントがヒトである、本発明1118 ~ 1122のいずれかの方法。

[本発明1124]

前記造血幹細胞が、ヒトドナーから単離された1つまたは複数の造血幹細胞に由来する、本発明1123の方法。

30

[本発明1125]

前記造血幹細胞が、前記ドナーの動員末梢血に由来する、本発明1124の方法。

[本発明1126]

前記ドナーが、CXCR4アンタゴニスト(例えば、AMD3100)、G-CSF、およびGRO からなる群より選択される1種類または複数種類の動員物質を以前に投与されたことがある、本発明1125の方法。

[本発明1127]

前記造血幹細胞が、プロスタグランジンとさらに接触される、本発明1001 ~ 1126のいずれかの方法。

[本発明1128]

40

前記プロスタグランジンが、dmPGE2またはその類似体である、本発明1127の方法。

[本発明1129]

前記造血幹細胞が、Notchシグナル伝達アゴニストとさらに接触される、本発明1001 ~ 1128のいずれかの方法。

[本発明1130]

前記造血幹細胞が、SIRT1阻害物質とさらに接触される、本発明1001 ~ 1129のいずれかの方法。

[本発明1131]

前記阻害物質またはSIRT1が、ニコチンアミド、カンビノール、およびその類似体からなる群より選択される、本発明1130の方法。

50

[本発明1132]

前記レシピエントが、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、骨髄異形成症候群(MDS)、多発性骨髄腫、再生不良性貧血、骨髄機能不全、骨髄増殖性疾患、例えば、骨髄線維症、本態性血小板減少症、または真性赤血球増加症、ファンコーニ貧血、先天性角化不全症、分類不能型免疫不全(Common variable immune deficiency)(CVID、例えば、CVID1、CVID2、CVID3、CVID4、CVID5、およびCVID6)、血球貪食性リンパ組織球症、固形腫瘍、例えば、神経芽細胞腫、生殖細胞腫瘍、乳癌、ウィルムス腫瘍、髄芽細胞腫、および神経外胚葉性腫瘍、自己免疫疾患、例えば、強皮症、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、またはI型糖尿病、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、またはタンパク質欠乏症、例えば、副腎脳白質ジストロフィー(ALD)、異染性白質ジストロフィー(MLD)、血友病AおよびB、ハーラー症候群、ハンター症候群、ファブリー病、ゴーシェ病、表皮水疱症、アミロイドーシス、グロボイド細胞白質ジストロフィー、サンフィリポ症候群、ならびにモルキオ症候群からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である、本発明1118～1131のいずれかの方法。

10

[本発明1133]

前記レシピエントが、鎌状赤血球性貧血、サラセミア、サラセミア、サラセミア、ヘモグロビンE/サラセミア、ヘモグロビンS/サラセミア、ヘモグロビンC/サラセミア、ヘモグロビンD/サラセミア、慢性肉芽腫症(X連鎖性慢性肉芽腫症、常染色体劣性(AR)慢性肉芽腫症、慢性肉芽腫症AR I NCF1、慢性肉芽腫症AR CYBA、慢性肉芽腫症AR II NCF2、慢性肉芽腫症AR III NCF4)、X連鎖重症複合免疫不全(SCID)、ADA SCID、IL7-RA SCID、CD3 SCID、Rag1/Rag2 SCID、Artemis SCID、CD45 SCID、Jak3 SCID、先天性顆粒球減少症、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN1、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN2、家族性血球貪食性リンパ組織球症(FHL)、家族性血球貪食性リンパ組織球症2型(FHL2、パーフォリン変異)、無グロブリン血症(X連鎖性無グロブリン血症)、ウィスコット・オールドリッチ症候群、チェディアック・東症候群、赤血球ビルビン酸キナーゼ欠損症による溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症、X連鎖性副腎脳白質ジストロフィー(X-ALD)、X連鎖性リンパ球増殖性疾患、単中心性キャスルマン病(Unicentric Castleman's Disease)、多中心性キャスルマン病(Multicentric Castleman's Disease)、先天性無巨核球性血小板減少症(Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia)(CAMT)I型、細網異形成症、ファンコーニ貧血、後天性特発性鉄芽球性貧血、全身性肥満細胞症、フォン・ヴィルブランド病(VWD)、先天性赤血球異形成貧血2型、軟骨毛髪形成不全症候群、遺伝性球状赤血球症、ブラックファン・ダイヤモンド症候群、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、血小板減少-橈骨欠損症候群、大理石骨病、小児型大理石骨病、ムコ多糖症、レッシュ・ナイハン症候群、糖原貯蔵症、先天性肥満細胞症、オーメン症候群、X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症(X-linked Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy)(IPEX)、FOXP3変異を特徴とするIPEX、X連鎖多発性内分泌障害・免疫機能不全・下痢症候群(X-linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea)(XPID)、X連鎖自己免疫・アレルギー性調節異常症候群(X-Linked Autoimmunity-Allergic Dysregulation Syndrome)(XLAAD)、IPEX様症候群、高IgM 1型、高IgM 2型、高IgM 3型、高IgM 4型、高IgM 5型、X連鎖性高免疫グロブリンM、裸リンパ球症候群I型、および裸リンパ球症候群II型(裸リンパ球症候群II型、MHCクラスI欠損症;裸リンパ球症候群II型、相補群A;裸リンパ球症候群II型、相補群C;裸リンパ球症候群II型、相補群D;裸リンパ球症候群II型、相補群E)からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である、本発明1118～1131のいずれかの方法。

20

30

40

[本発明1134]

前記レシピエントが、造血リンパ組織悪性腫瘍(hematolymphoid malignancy)、非造血リンパ組織悪性腫瘍、もしくはタンパク質欠乏症に罹患しているヒト患者であるか、または(例えば、移植された組織もしくは細胞に対する寛容を誘導する)組織移植レシピエン

50

トもしくは細胞移植レシピエントである、本発明1118～1131のいずれかの方法。

[本発明1135]

前記造血幹細胞が自己由来または同系である、本発明1118～1134のいずれかの方法。

[本発明1136]

前記造血幹細胞が同種異系である、本発明1118～1134のいずれかの方法。

[本発明1137]

a. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と、

b. TGF シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質;

c. 表1に列挙した1種類または複数種類の化合物;

d. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質;

e. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質;および

f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質

のうちの1つまたは複数と

を含む、組成物。

[本発明1138]

前記ikarosファミリーメンバー転写因子が、ikaros、aiolos、およびheliosからなる群より選択される、本発明1137の組成物。

[本発明1139]

細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、該ikarosファミリーメンバー転写因子のユビキチン結合を促進する、本発明1137または1138の組成物。

[本発明1140]

細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される化合物を含む、本発明1137～1139のいずれかの組成物。

[本発明1141]

式(1)によって表される前記化合物が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、本発明1140の組成物。

[本発明1142]

表1に列挙した前記1種類または複数種類の化合物がUM171を含む、本発明1137～1141のいずれかの組成物。

[本発明1143]

TGF シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質が、TGF 受容体阻害物質を含む、本発明1137～1142のいずれかの組成物。

[本発明1144]

前記TGF 受容体阻害物質が、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、本発明1143の組成物。

[本発明1145]

前記TGF 受容体阻害物質がA83-01である、本発明1144の組成物。

[本発明1146]

ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンメチル化を活性化するか、ヒストンメチル化を維持するか、またはヒストン脱メチル化を阻害する、本発明1137～1145のいずれかの組成物。

[本発明1147]

ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンデメチラーゼ阻害物質を含む、本発明1146の組成物。

[本発明1148]

前記ヒストンデメチラーゼ阻害物質がLSD1阻害物質である、本発明1147の組成物。

[本発明1149]

10

20

30

40

50

前記LSD1阻害物質が、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される、本発明1148の組成物。

[本発明1150]

前記LSD1阻害物質がトラニルシプロミンである、本発明1149の組成物。

[本発明1151]

ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンアセチル化を活性化するか、ヒストンアセチル化を維持するか、またはヒストン脱アセチル化を阻害する、本発明1137～1150のいずれかの組成物。

[本発明1152]

ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質を含む、本発明1151の組成物。

[本発明1153]

前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質が、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される、本発明1152の組成物。

[本発明1154]

前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質がトリコスタチンAである、本発明1153の組成物。

[本発明1155]

アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質がSR1を含む、本発明1137～1154のいずれかの組成物。

[本発明1156]

a. 表1に列挙した1種類または複数種類の化合物と、
b. TGFシグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質；
c. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；
d. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；および
e. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

[本発明1157]

a. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と、
b. TGFシグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質；
c. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；および
d. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

[本発明1158]

a. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と、
b. TGF受容体阻害物質；
c. 表1に列挙した化合物；
d. ヒストンデメチラーゼ阻害物質；
e. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質；および
f. アリール炭化水素受容体阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

[本発明1159]

セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される、本発明1158の組成物。

[本発明1160]

セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作

10

20

30

40

50

用物質が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、本発明1159の組成物。

[本発明1161]

表1に列挙した前記化合物がUM171である、本発明1158～1160のいずれかの組成物。

[本発明1162]

前記TGF 受容体阻害物質が、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、本発明1158～1161のいずれかの組成物。

[本発明1163]

前記ヒストンデメチラーゼ阻害物質が、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される、本発明1158～1162のいずれかの組成物。

10

[本発明1164]

前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質が、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される、本発明1158～1163のいずれかの組成物。

[本発明1165]

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに
b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物
からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質をさらに含む、本発明1158～1164のいずれかの組成物。

20

[本発明1166]

前記アリール炭化水素受容体阻害物質がSR1である、本発明1158～1165のいずれかの組成物。

[本発明1167]

BMPシグナル伝達を阻害する化合物をさらに含む、本発明1158～1166のいずれかの組成物。

[本発明1168]

a. 表1に列挙した化合物と、
b. TGF 受容体阻害物質;
c. ヒストンデメチラーゼ阻害物質;
d. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質;および
e. アリール炭化水素受容体阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

30

[本発明1169]

a. アリール炭化水素受容体阻害物質と、
b. TGF 受容体阻害物質;
c. 表1に列挙した化合物;
d. ヒストンデメチラーゼ阻害物質;および
e. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

40

[本発明1170]

a. 式(1)によって表される化合物と、
b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
c. UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物;
d. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LS

50

D1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1

のうちの1つまたは複数とを含む、組成物。

[本発明1171]

式(1)によって表される前記化合物が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、本発明1170の組成物。

10

[本発明1172]

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに

b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質をさらに含む、本発明1170または1171の組成物。

[本発明1173]

a. UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と、

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

20

c. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

d. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

e. SR1

のうちの1つまたは複数とを含む、組成物。

[本発明1174]

a. SR1と、

30

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;ならびに

d. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

のうちの1つまたは複数とを含む、組成物。

[本発明1175]

40

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、本発明1137~1174のいずれかの組成物。

[本発明1176]

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、本発明1137~1174のいずれかの組成物。

[本発明1177]

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、少なくとも2日間前記造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持するのに十分な量で存在する、本発明1137~1174のいずれかの組成物。

[本発明1178]

50

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、水溶液中に存在する、本発明11137~11177のいずれかの組成物。

[本発明11179]

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、凍結乾燥固体として存在する、本発明11137~11177のいずれかの組成物。

[本発明11180]

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、前記細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、本発明11137~11179のいずれかの組成物。

10

[本発明11181]

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について前記細胞集団を富化するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、本発明11137~11179のいずれかの組成物。

[本発明11182]

20

2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養状態の前記造血幹細胞と接触した後、移植後の該造血幹細胞の長期生着能を維持するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、本発明11137~11179のいずれかの組成物。

[本発明11183]

本発明11137~11182のいずれかの組成物を含む、細胞培養培地。

[本発明11184]

血清を実質的に含まない、本発明11183の細胞培養培地。

[本発明11185]

30

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触している造血幹細胞集団をさらに含む、本発明11137~11184のいずれかの組成物。

[本発明11186]

前記造血幹細胞が、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって前記1種類または複数種類の作用物質または化合物の存在下で培養されている、本発明11185の組成物。

[本発明11187]

造血幹細胞集団を、

(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および

40

(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質

と接触させる工程であって、該第1の作用物質および該第2の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに全体として十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

[本発明11188]

1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、

(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および

50

(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質と接触させる工程であって、該第1の作用物質および該第2の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに全体として十分な量で存在する、前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

[本発明1189]

第1の造血幹細胞集団を、

(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および

(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質と接触させる工程であって、該造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該第1の作用物質および該第2の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法。

10

[本発明1190]

本発明1001~1102および1187~1189のいずれかの方法によって作製された、造血幹細胞集団。

20

[本発明1191]

本発明1137~1182、1185、および1186のいずれかの組成物を含み、添付文書をさらに含む、キット。

[本発明1192]

前記添付文書が、前記キットの使用者に、エクスピボでの造血幹細胞集団の増大、富化、または該細胞集団の造血幹細胞機能的な能力の維持について説明する、本発明1191のキット。

[本発明1193]

前記添付文書が、前記使用者に、前記造血幹細胞におけるポリヌクレオチドの発現について説明する、本発明1191のキット。

30

[本発明1194]

前記添付文書が、前記使用者に、前記造血幹細胞またはその子孫の患者への投与について説明する、本発明1191のキット。

【図面の簡単な説明】

【0205】

【図1】ヒトの動員末梢血から単離し、示された濃度のサリドマイド、レナリドミド、またはボマリドミドの存在下で14日間培養した造血幹細胞の解析から得られた、一連の蛍光活性化細胞選別(FACS)の図および棒グラフを示す。*は、対照のDMSO培養細胞に対する統計的に有意な増加を示す。

【図2】ヒト臍帯血から単離し、示された試薬の存在下で12日間培養した造血幹細胞の培養後に存在する、生細胞の量を示す棒グラフである。

40

【図3】ヒト臍帯血から単離し、示された試薬の存在下で12日間培養した造血幹細胞の培養後に存在する、CD34+細胞の量を示す棒グラフである。

【図4】ヒト臍帯血から単離し、示された試薬の存在下で12日間培養した造血幹細胞の培養後に得られた、細胞集団中に存在するCD34+細胞のパーセンテージを示す棒グラフである。

【図5】臍帯血から単離し、示された試薬の存在下で12日間培養した造血幹細胞の培養後に存在する、造血幹細胞(細胞系-、CD34+、CD38-、CD45RA-、CD90+、CD49f+として定義した)の量を示す棒グラフである。

【図6】ヒト臍帯血から単離し、示された試薬の存在下で12日間培養した造血幹細胞の培

50

養後に得られた、総コロニー数およびコロニーの組成を示す棒グラフである。細胞を、methocult培地(H4434、Stem Cell Technologies)中に播種し、播種の16日後にコロニーを記録した、試薬名は、図2～5に示されたとおりである。

【図7】ヒトの動員末梢血から単離し、示された試薬の存在下で21日間培養したCD34+細胞の解析から得られた、一連のFACSの図を示す。試薬名は、図2～5に示されたとおりである。

【図8】ヒトの動員末梢血から単離し、示された試薬の存在下で21日間培養した造血幹細胞の解析から得られた、一連のFACSの図を示す。試薬名は、図2～5に示されたとおりである。

【図9】ヒト末梢血由来の、かつ示された試薬の存在下での21日間の細胞の培養由来の、500個の出発CD34+細胞(上)または50個の出発造血幹細胞(下)から得られた細胞集団中に存在する、造血幹細胞の量を示す一連の棒グラフである。試薬名は、図2～5に示されたとおりである。

10

【図10-1】ヒトの動員末梢血から取得し、示された試薬の存在下で14日間培養した造血幹細胞の解析から得られた、一連のFACSの図を示す。試薬名は、図2～5に示されたとおりである。

【図10-2】図10-1の説明を参照のこと。

【図11】ヒトの動員末梢血から単離し、示された試薬の存在下で14日間培養した造血幹細胞から得られた、表現型Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+CD49F+CD41-を有する造血幹細胞の量を示す棒グラフである。

20

【図12-1】ヒト臍帯血から取得し、示された試薬の存在下で14日間培養したCD34+細胞の解析から得られた、一連のFACSの図を示す。試薬名は、図2～5に示されたとおりである。W3は、A83-01、トラニルシプロミン、およびトリコスタチンAの混合物を示す。

【図12-2】図12-1の説明を参照のこと。

【図12-3】図12-1の説明を参照のこと。

【図13】ヒト臍帯血から単離したCD34+細胞の示された試薬の存在下での14日間の培養後の、総細胞収量(左)および造血幹細胞収量(右)を示す一連の棒グラフを示す。試薬名は、図2～5に示されたとおりである。試薬名は、図2～5および12に示されたとおりである。

30

【図14-1】ヒト骨髓から取得し、示された試薬の存在下で14日間培養した造血幹細胞の解析から得られた、一連のFACSの図を示す。

【図14-2】図14-1の説明を参照のこと。

【図15】ヒト骨髓からの造血幹細胞の単離、およびこれらの細胞の示された試薬の存在下での14日間の培養から得られた、造血幹細胞の総量を示す棒グラフである。

【図16-1】ヒトの動員末梢血から取得し、示された試薬の存在下で14日間培養した造血幹細胞の解析から得られた、一連のFACSの図を示す。

【図16-2】図16-1の説明を参照のこと。

【図16-3】図16-1の説明を参照のこと。

【図17】ヒトの動員末梢血からの造血幹細胞の単離、およびこれらの細胞の示された試薬の存在下での14日間の培養から得られた細胞集団中に存在する、表現型造血幹細胞の総量を示す棒グラフである。

40

【図18】示された試薬の存在下で21日間培養した、ヒトの動員末梢血由来の造血幹細胞の培養物から得られた、コロニーの量および組成を示す棒グラフである。細胞を、15日目に開始して3日ごとに継代した。示された数の細胞を、21日間培養物から単離して、methocult培地(H4434、Stem Cell Technologies)中に播種し、播種の16日後にコロニーを記録した。

【図19】ヒトの動員末梢血からの造血幹細胞の単離、およびこれらの細胞の示された試薬の存在下での21日間の培養から得られた、正規化されたコロニーの量を示す棒グラフである。細胞を、15日目に開始して3日ごとに継代した。細胞を、21日間培養物から単離し

50

て、methocult培地(H4434、Stem Cell Technologies)中に播種し、播種の16日後にコロニーを記録した。総コロニー数を示す。

【図20】図20A～20Bは、12日間の培養の後のCD34+臍帯血細胞の絶対数および細胞充実性における変化倍率を図示する。CD34+富化臍帯血細胞は、AllCellsから入手した。1万個の細胞を、組換えヒトSCF、TPO、IL-3、およびFLT3L(全て100 ng/ml)を含有するStemSpan SFEMII中で培養した。細胞を、ビヒクル対照(DMSO)または示された低分子を伴うサイトカイン含有培地で培養した。培地を、3日ごとに交換した。12日目に、細胞を収集し、計数して、フローサイトメトリーによって解析した。図20Aは、12日間の培養の後の生細胞の絶対数を図示する。いかなる有意な差も、一元配置分散分析を用いて検出されなかった。図20Bは、10,000個の記述細胞からの変化倍率を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

10

【図21】増大したCD34+臍帯血細胞についての代表的なドットプロットおよびゲーティング戦略を図示する。示された化合物における培養後12日目に、試料をフローサイトメトリーによって解析した。プロットは、生細胞ゲート(PI-)およびシングルレットゲートを通して事前にゲーティングした試料を示す。Lin-CD34+CD45RA-CD90+およびLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCとして定義した、免疫表現型造血幹細胞(HSC)についてのゲーティング戦略を示す。パーセンテージは、親(事前)ゲートの頻度を示す。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

20

【図22】図22A～22Bは、12日間の培養の後のLin-CD34+細胞の頻度を図示する。図22Aは、示された化合物における12日間の培養の後のLin-CD34+細胞の頻度のプロットを図示する。図22Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的有意性の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図23】12日間の培養の後のLin-CD34+細胞の絶対数を図示する。プロットは、示された化合物における12日間の培養の後のLin-CD34+細胞の絶対数を示す。いかなる有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較を用いて検出されなかった。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

30

【図24】図24A～24Bは、12日間の培養の後のLin-CD45RA-CD90+ HSCの頻度を示す。図24Aは、示された条件での12日間の培養の後の各ウェルにおける免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+)の頻度のグラフを図示する。図24Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的有意性の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較に基づく。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図25】図25A～25Bは、12日間の培養の後のLin-CD45RA-CD90+ HSCの絶対数を示す。図25Aは、示された条件での12日間の培養の後の各ウェルにおける免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+)の絶対数のグラフを図示する。図25Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的有意性の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較に基づく。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

40

【図26】図26A～26Bは、12日間の培養の後のLin-CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの頻度を示す。図26Aは、示された条件での12日間の培養の後の1ウェルあたりのLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの頻度のグラフを図示する。図26Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的有意性の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較に基づく。POM

50

、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM 171;APSR1、A + POM + SR1。

【図 2 7】図27A～27Bは、12日間の培養の後の、CD34+富化CBから生じたLin-CD45R A-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの絶対数を示す。図27Aは、示された条件での12日間の培養の後の1ウェルあたりのLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの絶対数のグラフを図示する。図27Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的有意性の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較に基づく。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;A P、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図 2 8】新鮮なCD34+臍帯血細胞および低分子の存在下で12日間培養した細胞のコロニー形成能を示す。0日目に、50個の新鮮細胞を、メチルセルロース培地に三連でプレートのティングした。三連の培養物を、3つの別々の日に設定した。サイトカインおよび低分子を含有する培地中でのCD34+富化臍帯血細胞の12日間の培養の後に、ウェルの1/20,000を、サイトカインを含有するメチルセルロース培地(Stem Cell Technologies)中にプレートのティングした。下のパネルにおけるコロニーの総数は、ウェル全体のコロニー形成能の推定値を得るために、 $\times 20,000$ で計数したコロニーの数で計算している。全ての条件について、プレートのティング後14日目に、コロニーを計数して記録した。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図 2 9】図29A～29Bは、増大したヒトCD34+臍帯血細胞のHSC機能を測定する移植アッセイ法を示す。図29Aは、新鮮なおよび増大したヒトCD34+富化臍帯血細胞の機能を試験するためのインビボ実験設計を示す模式図を示す。0日目(培養開始)に、30,000個または10,000個のCD34+富化臍帯血細胞を、亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエント中に注射したか、または、示された化合物における12日間の増大のために、10,000個の細胞を1ウェルあたりにプレートのティングした。示された化合物における培養後12日目に、10,000個の出発細胞同等物を、それぞれの亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中に注射した。マウスから4週間ごとに24週間にわたって採血し、末梢血における生着を、ヒトCD45+細胞についてのフローサイトメトリーによって解析した。図29Bは、新鮮細胞および培養細胞についての、移植後4、8、12、16、20、および24週間でのNSGマウスの末梢血におけるヒトCD45+キメラリズムを図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図 3 0】図30A～30Cは、移植後4週間での末梢血解析を示す。図30Aは、移植後4週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメラリズムを示すプロットを図示する。図30Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図30Aにおけるデータについての統計的に有意なp値の表を図示する。図30Cは、移植後4週間での末梢血におけるヒトCD45+ B細胞(CD19+)、T細胞(CD3+)、および骨髄系細胞(CD33+)の頻度を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図 3 1】図31A～31Bは、移植後8週間での末梢血解析を示す。図31Aは、移植後8週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメラリズムを示すプロットである。図31Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図31Aにおけるデータについての統計的に有意なp値の表を図示する。図31Cは、移植後8週間での末梢血におけるヒトCD45+ B細胞(CD19+)、T細胞(CD3+)、および骨髄系細胞(CD33+)の頻度を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図 3 2】図32A～32Cは、移植後12週間での末梢血解析を示す。図32Aは、移植後12週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメラリズムのプロットを図示する。図32Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図32Aにおけるデータについての統計的に有意なp値の表を図示する。図32Cは、移植後12週間での末梢血におけるヒトCD4

10

20

30

40

50

5+ B細胞(CD19+)、T細胞(CD3+)、および骨髓系細胞(CD33+)の頻度を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図33】図33A~33Cは、移植アッセイ法が、移植後16週間で、APを用いて増大させた細胞、APUを用いて増大させた細胞、およびAPSR1を用いて増大させた細胞についてHSC維持を示すことを示す。図33Aは、移植後16週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメリズムを図示する。図33Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図33Aにおけるデータについての統計的に有意なp値の表を図示する。図33Cは、移植後16週間での末梢血におけるヒトCD45+ B細胞(CD19+)、T細胞(CD3+)、および骨髓系細胞(CD33+)の頻度を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

10

【図34】図34A~34Bは、移植アッセイ法が、移植後16週間で、APを用いて増大させた細胞、APUを用いて増大させた細胞、およびAPSR1を用いて増大させた細胞についてHSC維持を示すことを示す。図34Aは、移植後20週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメリズムのプロットを図示する。いかなる統計的有意性も検出されなかった。いかなる統計的に有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて検出されなかった。図34Bは、移植後20週間での末梢血におけるヒトCD45+B細胞(CD19+)、T細胞(CD3+)、および骨髓系細胞(CD33+)の頻度を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

20

【図35】図35A~35Cは、移植アッセイ法が、移植後16週間で、APを用いて増大させた細胞、APUを用いて増大させた細胞、およびAPSR1を用いて増大させた細胞についてHSC維持を示すことを示す。図35Aは、移植後24週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメリズムのプロットを図示する。図35Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図35Aにおけるデータについての統計的に有意なp値の表を図示する。図35Cは、移植後24週間での末梢血におけるヒトCD45+ B細胞(CD19+)、T細胞(CD3+)、および骨髓系細胞(CD33+)の頻度を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図36】図36A~36Cは、新鮮なヒトCD34+臍帯血細胞、または化合物を用いて増大させたヒトCD34+臍帯血細胞を移植したNSGマウスの骨髓解析を示す。図36Aは、ヒトCD34+臍帯血試料の増大後の、骨髓でのヒトキメリズムを評価するための実験設計を示す模式図を示す。0日目(培養開始)に、30,000個または10,000個のCD34+富化臍帯血細胞を、亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエント中に注射したか、または、10,000個の細胞を1ウェルあたりにプレーティングして、示された化合物において12日間増大させた。示された化合物における培養後12日目に、10,000個の出発細胞同等物を、それぞれの亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中に注射した。全骨髓解析を移植後26週間で行って、ヒト生着をフローサイトメトリーによって解析した。図36Bは、移植後26週間でのヒトCD45+細胞の骨髓キメリズムのプロットを図示する。図36Cは、10K個の新鮮細胞またはDMSOを用いた細胞 対 化合物を用いて増大させた細胞についての全ての統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

30

40

【図37】図37A~37Cは、新鮮なヒトCD34+臍帯血細胞または化合物を用いて増大させたヒトCD34+臍帯血細胞を移植したNSGマウスの骨髓解析を示す。図37Aは、増大したヒトCD34+臍帯血試料の実験設計を示す模式図を図示する。培養開始の0日目に、30,000個または10,000個のCD34+富化臍帯血細胞を、亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエント中に注射したか、または、1ウェルあたり10,000個の細胞を、示された化合物において12日間培養した。示された化合物における培養後12日目に、10,000個の出発細胞同等物を、それぞれの亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中に注射した。全骨髓解析を移植後26週間で行って、ヒト生着をフローサイトメトリーによって解析した

50

。図37Bは、移植後26週間での骨髄におけるヒトCD45+Lin-CD34+ HSPCの骨髄キメリズムのプロットを図示する。図37Cは、10K個の新鮮細胞またはDMSOを用いた細胞対化合物を用いて増大させた細胞についての全ての統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図38】図38A～38Dは、新鮮なヒトCD34+臍帯血細胞または化合物を用いて増大させたヒトCD34+臍帯血細胞を移植したNSGマウス由来のヒトB細胞および骨髄系細胞についての骨髄解析を示す。図38Aは、移植後26週間でのヒトCD45+CD19+ B細胞の骨髄キメリズムのプロットを図示する。図38Bは、図38Aにおける10K個の新鮮細胞またはDMSOを用いた細胞対化合物を用いて増大させた細胞についての全ての統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。図38Cは、移植後26週間での骨髄におけるヒトCD45+CD33+骨髄系細胞の頻度を図示する。図38Dは、図38Cにおける10K個の新鮮細胞またはDMSOを用いた細胞対化合物を用いて増大させた細胞についての全ての統計的に有意なp値を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図39】図39A～39Bは、APが機能的なヒト造血幹細胞を増大させることを示す限界希釈解析を図示する。図39Aは、新鮮なヒトCD34+臍帯血試料および増大したヒトCD34+臍帯血試料の限界希釈解析の実験設計を示す模式図を図示する。0日目(培養開始)に、30,000個、10,000個、1000個、300個、または50個の新鮮なCD34+富化臍帯血細胞を、亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエント中に注射したか、または、1ウェルあたり10,000個の細胞を、示された化合物において12日間培養した。示された化合物における培養後12日目に、10,000個、1000個、または50個の出発細胞同等物を、それぞれの亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中に注射した。全骨髄解析を移植後26週間で行って、ヒト生着をフローサイトメトリーによって解析した。図39Bは、95%信頼区間でのこれらのデータについての限界希釈解析のチャート(低値および高値)、ならびに新鮮細胞と比較した各条件での機能的増大における変化倍率を図示する。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図40】増大したCD34+臍帯血細胞についての代表的なドットプロットおよびゲーティング戦略を図示する。示された化合物における培養後12日目に、試料をフローサイトメトリーによって解析した。プロットは、生細胞ゲート(PI-)およびシングレットゲートを通して事前にゲーティングした試料を示す。Lin-CD34+CD45RA-CD90+およびLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+としての免疫表現型造血幹細胞(HSC)についてのゲーティング戦略を示す。パーセンテージは、親集団における細胞の頻度を示す。POM、ポマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;AU、A + UM171;ASR1;A + SR1;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1;APUSR1、A + POM + UM171 + SR1。

【図41】12日間の培養の後の細胞の絶対数のグラフを図示する。示された条件での10,000個のCD34+富化臍帯血細胞の12日間の培養の後の、生細胞の総数を図示する。いかなる有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づいて、DMSOを用いて増大させた細胞と低分子を用いて増大させた細胞との間に検出されなかった。

【図42】図42A～42Bは、12日間の培養の後のLin-CD34+細胞の絶対数を図示する。図42は、示された培地条件での12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化臍帯血細胞から生じたヒト細胞系-CD34+ HSPCの絶対数のプロットを図示する。図42Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図42Aにおけるデータについての有意なp値の表を図示する。

【図43】図43A～43Bは、12日間の培養の後のLin-CD34+CD45RA-前駆細胞の絶対数

を示す。図43Aは、示された培地条件での10,000個のCD34+富化臍帯血細胞の12日間の培養の後に生じた、ヒト細胞系-CD34+CD45RA- HSPCの絶対数のプロットを図示する。図43Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図43Aにおけるデータについての統計的に有意なp値の表を図示する。

【図44】図44A~44Bは、12日間の培養の後のLin-CD45RA-CD90+ HSCの絶対数を示す。図44Aは、示された条件での12日間の培養の後に各ウェルにおいて10,000個のCD34+富化臍帯血細胞から生じた、免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+)の絶対数を図示する。図44Bは、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定に基づく、図44Aにおけるデータについての全ての統計的に有意なp値の表を図示する。

【図45】12日間の培養の後のLin-CD45RA-CD90+ HSCについての倍数変化のグラフを図示する。グラフは、新鮮細胞と比較した培養細胞におけるHSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+)の絶対数における倍数変化を示す。HSC-exp、HSC増大条件。

10

【図46】図46A~46Bは、12日間の培養の後のLin-CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの絶対数を示す。図46Aは、示された条件での12日間の培養の後に各ウェルにおいて10,000個のCD34+富化臍帯血細胞から生じた、免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+)の絶対数を図示する。図46Bは、図46Aに示されたDMSOを用いて増大させた細胞対化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図47】細胞系-CD34+HECA+臍帯血細胞の頻度を図示する。示された化合物における培養後12日目の、HECA+であるヒト細胞系-CD34+細胞の頻度。いかなる統計的に有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて検出されなかった。

20

【図48】図48A~48Bは、ヒト細胞系-CD34+細胞上のHECA染色の平均蛍光強度を図示する。データは、皮膚リンパ球抗原上のシアロフコシル化グリカンおよびシアリルルイスx(sLex)を認識する抗体クローンHECA-452を用いた、免疫表現型Lin-CD34+ HSPC上のHECA MFI染色を示す。CLAは、E-セレクトリンに結合し、臍帯血前駆細胞の移植後の骨髄へのホーミングを増加させることが示されている。図48Aは、Lin-34+細胞の表面上のHECAの平均蛍光強度を図示する。図48Bは、化合物を用いて増大させた細胞と比較した、DMSOを用いて培養した細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図49】細胞系-CD34+CD45RA-CD90+HECA+ HSCの頻度を図示する。グラフは、示された化合物における12日間の培養の後のHECA+Lin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの頻度を示す。いかなる統計的に有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて検出されなかった。

30

【図50】図50A~50Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、APを用いて増大させた細胞、APUを用いて増大させた細胞、APSR1を用いて増大させた細胞、APUSR1を用いて増大させた細胞由来のLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSC上のHECA発現の有意な増加を示す。図50Aは、Lin-34+CD45RA-CD90+細胞の表面上のHECAの平均蛍光強度のグラフである。図50Bは、化合物を用いて増大させた細胞と比較した、DMSOを用いて培養した細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

40

【図51】CD34+富化臍帯血細胞の増大後の化合物中止についての模式的実験設計を図示する。模式図は、低分子の中止のための培養プロトコルを表す。簡潔に言うと、臍帯血由来のヒトCD34+富化細胞を、Alicellsから入手した。D0に、10,000個の新鮮なCD34+臍帯血細胞を、亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中に注射したか、または、1万個の細胞を、組換えヒトSCF、TPO、IL-3、およびFLT3L(全て100 ng/ml)ならびにビヒクル対照(DMSO)もしくは示された低分子を含有するStemSpan SFEMII中で培養した。培地を、3日ごとに交換した。12日目に、収集して洗浄した。細胞の半分を、計数、解析のため、および10,000個の出発細胞同等物の亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中への注射のために使用した。細胞の残りの半分(10,000個の出発細胞同等物/ウェル)を、サイトカインを加えたStemSpan SFEM II培地(低分子またはDM

50

SOなし)中に再懸濁して、さらに3日間培養した。15日目に、再プレーティングした細胞を収集し、計数し、フローサイトメトリーによって解析して、10,000個の出発細胞同等物を、亜致死性の放射線を照射したNSGマウス中に注射した。

【図5 2】低分子での増大後(D12)または低分子の除去後(D15)に生じた総生細胞を図示する。臍帯血由来のCD34+細胞を、AllCellsから入手した。1万個の細胞を、組換えヒトSCF、TPO、IL-3、およびFLT3L(全て100 ng/ml)を含有するStemSpan SFEMII中で培養した。細胞を、ビヒクル対照(DMSO)または示された低分子を含有する培地で培養した。培地を、3日ごとに交換した。12日目に、細胞を収集し、計数して、フローサイトメトリーによって解析した。細胞の半分を、サイトカインのみを含有する培地(化合物なし)に再プレーティングして、さらに3日間増大させた。15日目に、残った細胞を収集し、計数して、フローサイトメトリーによって解析した。12日間の培養の後の生細胞の絶対数を、グラフに示す。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。統計値は、二元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

10

【図5 3】12日目(化合物を用いて増大)または15日目(化合物撤廃)に移植したNSGマウスにおけるヒトCD45+末梢血キメリズムを図示する。移植後16週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメリズムを、新鮮細胞、培養のD12に移植した細胞(増大)、または培養のD15に移植した細胞(化合物中止後)について示す。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図5 4】12日目(化合物を用いて増大)または15日目(化合物中止)に移植したNSGマウスの骨髄におけるヒトCD45+細胞を図示する。臍帯血由来のCD34+細胞を、AllCellsから入手した。1万個の細胞を、組換えヒトSCF、TPO、IL-3、およびFLT3L(全て100 ng/ml)を含有するStemSpan SFEMII中で培養した。細胞を、ビヒクル対照(DMSO)または示された低分子を含有する培地で培養した。培地を、3日ごとに交換した。12日目に、細胞を収集して、細胞の半分を、サイトカインのみを含有する培地(化合物なし)に再プレーティングして、さらに3日間増大させた。15日目に、残った細胞を収集し、計数して、フローサイトメトリーによって解析した。注射を、1日目(10,000個の新鮮CD34+ CB細胞)、12日目(1匹のマウスあたり10,000個の出発細胞同等物)、および15日目(10,000個の出発細胞同等物、化合物撤廃条件)に行った。移植後18週間でのヒトCD45+細胞の骨髄キメリズムを示す。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

20

30

【図5 5】12日目(化合物を用いて増大)または15日目(化合物撤廃)に移植したNSGマウスの骨髄におけるヒトCD45+CD34+ HSPCを図示する。移植後18週間でのヒトCD45+細胞系-CD34+ HSPCの骨髄キメリズムを示す。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図5 6】図56A～56Bは、12日目(化合物を用いて増大)または15日目(化合物撤廃)に移植したNSGマウスの骨髄におけるヒトCD45+CD19+ B細胞およびCD45+CD33+骨髄系細胞を示す。グラフは、移植後18週間での、ヒトCD45+CD19+ B細胞の骨髄キメリズム(図56A)およびヒトCD45+CD33+骨髄系細胞の骨髄キメリズム(図56B)を図示する。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

40

【図5 7】図57A～57Bは、低分子での12日間の増大後の、CD34+動員末梢血細胞の絶対数および全体的な細胞充実性における変化倍率を示す。CD34+富化ヒト動員末梢血を、AllCellsから入手した。1万個の細胞を、組換えヒトSCF、TPO、IL-3、およびFLT3L(全て100 ng/ml)を含有するStemSpan SFEMII中で培養した。細胞を、ビヒクル対照(DMSO)または示された低分子を含有する培地で培養した。培地を、3日ごとに交換した。12日目に、細胞を収集し、計数して、フローサイトメトリーによって解析した。図57Aは、12日間の培養の後の生細胞の絶対数のグラフを図示する。いかなる統計的に有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて検出されなかった。図57Bは、10,000個の出発細胞と比較して増大細胞について比較した、総細胞における変化倍率を

50

図示する。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図58】増大したCD34+動員末梢血(mPB)HSCについての代表的なドットプロットおよびゲーティング戦略を図示する。示された化合物における培養後12日目に、試料をフローサイトメトリーによって解析した。プロットは、生細胞ゲート(PI-)およびシングレットゲートを通して事前にゲーティングした試料を示す。Lin-CD34+CD45RA-CD90+およびLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCとしての、免疫表現型造血幹細胞(HSC)についてのゲーティング戦略を示す。パーセンテージは、親集団における細胞の頻度を示す。

【図59】図59A~59Bは、CD34+富化mPB細胞を12日間増大させた後のLin-CD34+細胞の頻度を示す。図59Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化mPB細胞から生じたLin-CD34+細胞の頻度のプロットを図示する。図59Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

10

【図60】図60A~60Bは、CD34+富化mPB細胞を12日間増大させた後のLin-CD34+細胞の絶対数を示す。プロットは、示された化合物における12日間の培養の後のLin-CD34+細胞の絶対数を示す(図60A)。図60Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的に有意なp値を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図61】図61A~61Bは、CD34+ mPB細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの頻度を示す。図61Aは、示された条件での12日間の培養の後に、各ウェルにおいて10,000個のCD34+富化mPB細胞から生じた免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+)の頻度を図示する。図61Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的に有意なp値を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

20

【図62】図62A~62Bは、CD34+富化mPB細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの絶対数を示す。図62Aは、示された条件での12日間の培養の後に、各ウェルにおいて10,000個のCD34+富化mPB細胞から生じた免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+)の絶対数のプロットを図示する。図62Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的に有意なp値を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

30

【図63】図63A~63Bは、CD34+富化mPB細胞を12日間増大させた後のLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの頻度を示す。図63Aは、示された条件での12日間の培養の後に、各ウェルにおいて10,000個のCD34+富化mPB細胞から生じた免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+)の頻度を図示する。図63Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図64】図64A~64Bは、CD34+ mPB細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの絶対数を示す。図64Aは、示された条件での12日間の培養の後に、各ウェルにおいて10,000個のCD34+富化mPB細胞から生じた免疫表現型HSC(Lin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+)の絶対数を図示する。図64Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞の統計的に有意なp値の表を図示する。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

40

【図65】図65A~65Bは、増大したヒトCD34+動員末梢血細胞についての移植アッセイ法を示す。図65Aは、増大したヒトCD34+動員末梢血細胞のインビボ解析のための実験設計を示す模式図を図示する。0日目(培養開始)に、30,000個または10,000個のCD34+富化動員末梢血細胞を、亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエント中に注射したか、または、示された化合物における12日間の増大のために、10,000個の細胞を1ウェルあた

50

りにプレーティングした。示された化合物における培養後12日目に、10,000個の出発細胞同等物を、それぞれの亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントマウス中に注射した。マウスから4週間ごとに20週間にわたって採血し、生着をフローサイトメトリーによって解析した。図65Bは、移植後20週間でのヒトCD45+細胞の末梢血キメリズムのプロットを図示する。いかなる有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて、10K個の新鮮細胞またはDMSO培養細胞と化合物培養細胞との間に検出されなかった。

【図66】図66A～66Bは、低分子での12日間の増大後の、CD34+富化骨髓細胞の絶対数および全体的な細胞充実性における変化倍率を示す。CD34+富化骨髓細胞を、AllCellsから入手した。1万個の細胞を、組換えヒトSCF、TPO、IL-3、およびFLT3L(全て100 ng/ml)を含有するStemSpan SFEMII中で培養した。細胞を、ビヒクル対照(DMSO)または示された低分子を含有する培地で培養した。培地を、3日ごとに交換した。12日目に、細胞を収集し、計数して、フローサイトメトリーによって解析した。図66Aは、12日間の培養の後の生細胞の絶対数のグラフを図示する。いかなる統計的に有意な差も、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて、DMSOを用いて増大させた細胞と化合物を用いて増大させた細胞との間に検出されなかった。図66Bは、各条件での、10,000個の出発細胞と比較した総生細胞における増大倍率を図示する。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図67】増大したCD34+動員末梢血(mPB)HSCについての代表的なドットプロットおよびゲーティング戦略を図示する。示された化合物における培養後12日目に、試料をフローサイトメトリーによって解析した。プロットは、生細胞ゲート(PI-)およびシングレットゲートを通して事前にゲーティングした試料を示す。Lin-CD34+CD45RA-CD90+およびLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCとして定義した、免疫表現型造血幹細胞(HSC)についてのゲーティング戦略を示す。パーセンテージは、親集団における細胞の頻度を示す。POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【図68】図68A～68Bは、CD34+富化骨髓細胞を低分子で12日間増大させた後のLin-CD34+細胞の頻度を示す。図68Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化骨髓細胞から生じたLin-CD34+細胞の頻度のグラフを図示する。図68Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図69】図69A～69Bは、CD34+骨髓細胞を12日間培養した後のLin-CD34+細胞の絶対数を示す。図69Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化骨髓細胞から生じたLin-CD34+細胞の頻度を図示する。図69Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図70】図70A～70Bは、CD34+骨髓細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの頻度を示す。図70Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化骨髓細胞から生じたLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの頻度を図示する。図70Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図71】図71A～71Bは、CD34+骨髓細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの絶対数を示す。図71Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化骨髓細胞から生じたLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSCの絶対数を図示する。図71Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析および

10

20

30

40

50

びチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図72】図72A～72Bは、CD34+骨髄細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの頻度を示す。図72Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+富化骨髄細胞から生じたLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの頻度を図示する。図72Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【図73】図73A～73Bは、CD34+骨髄細胞を12日間培養した後のLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの絶対数を示す。図73Aは、示された化合物における12日間の培養の後の、10,000個のCD34+骨髄細胞から生じたLin-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCの絶対数を図示する。図73Bは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較した、化合物を用いて増大させた細胞についての統計的に有意なp値の表である。統計値は、一元配置分散分析およびチューキーの多重比較検定を用いて作成した。

【0206】

図20A～73Bについて:POM、ボマリドミド;SR1、StemRegenin 1;A、A83-01;AP、A + POM;APU、A + POM + UM171;APSR1、A + POM + SR1。

【発明を実施するための形態】

【0207】

詳細な説明

本発明は、造血幹細胞機能的能力を有する造血幹細胞集団のエキスピボでの増大、富化、および維持が、これらの細胞を、ikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質、例えば、ikaros転写因子のポリユビキチン化を触媒するユビキチンリガーゼを活性化する化合物と接触させることによって成し遂げられ得るという発見に基づく。これらの生物学的活性を示す例示的な化合物には、特に、サリドマイドおよびその誘導体、例えば、ボマリドミドおよびレナリドミドが含まれる。

【0208】

本明細書に記載の方法を用いて、造血幹細胞(HSC)は、これらの細胞を、ikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる作用物質と、任意で1種類または複数種類のさらなる作用物質、例えば、TGFシグナル伝達を阻害することができる、リジンメチル化を調節する(例えば、上方制御するかまたは下方制御する)ことができる、ヒストンアセチル化を調節することができる、p38シグナル伝達を阻害することができる、および古典的Wntシグナル伝達を活性化することができる1種類または複数種類の作用物質と組み合わせてインキュベートすることによって、増大させてもよい。本明細書に記載の方法はまた、細胞集団を、ikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる作用物質と、任意で上記のさらなる作用物質の1つまたは複数と組み合わせてインキュベートすることによって、HSCについて細胞集団を富化するのに使用することもできる。さらに、本明細書に記載の方法は、HSC集団を、ikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる作用物質と、任意で上記のさらなる作用物質の1つまたは複数と組み合わせてインキュベートすることによって、HSC集団の造血幹細胞機能的能力を維持するのに使用することができる。

【0209】

上記の生物学的事象を調節する、多種多様な構造的および機能的に異なる作用物質が当技術分野において公知である。例えば、これらの作用物質は、ある特定の経路内の特定の事象をアゴナイズまたはアンタゴナイズすることができる低分子(例えば、シグナル伝達カスケードを伝えるタンパク質の酵素活性を阻害する低分子)でもよい。これらの作用物質はまた、特定のタンパク質に競合的に結合し、そのタンパク質とそのコグネイト結合パートナーとの会合を立体的に妨げることによって特定の相互作用(例えば、リガンド-受容体相互作用)を破壊する抗体、例えば、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片でもよい。大きい分子表面で起こるタンパク質間相互作用をアンタゴナイズするのに、他の作用物質、例えば、治療用タンパク質および構造的に制約された(structurally constrained)ペプチ

10

20

30

40

50

ドが位相幾何学的によく適しており、従って、シグナル伝達経路内の、従来の低分子治療剤では破壊することが困難であった標的において介入することができる阻害物質のクラスである。他のクラスの阻害物質には、相補的水素結合を介してmRNAポリヌクレオチドに結合することによって、例えば、標的mRNAの分解を誘導することによって、またはリボソーム集合体の核形成を立体的に妨げることによって標的遺伝子の発現を弱めることができる干渉RNA分子が含まれる。以下のセクションは、造血幹細胞の増大、富化、および造血幹細胞機能的能力の維持を促進するために、本発明の組成物および方法と共に有用な作用物質のタイプの例を示す。

【0210】

ikarosファミリーメンバーアンタゴニスト

10

ikarosファミリー転写因子アンタゴニストには、細胞(例えば、ヒト細胞などの哺乳動物細胞)における、ikaros、aiolos、およびheliosなどのikarosファミリー転写因子の濃度を低減させることができる化合物が含まれる。ikarosファミリー転写因子のアンタゴニストにはまた、そのような転写因子のDNAに対する結合を直接破壊し、それによって、転写因子の活性を弱めることができる分子も含まれる。例えば、上記に列挙したものなどのikarosファミリー転写因子は、例えば、MycおよびHes1などのNotch標的遺伝子の文脈において、転写リプレッサーとして機能し得る。ikarosファミリー転写因子の活性を破壊することによって、これらの遺伝子の転写およびコードされるタンパク質の発現が増加し得る。

【0211】

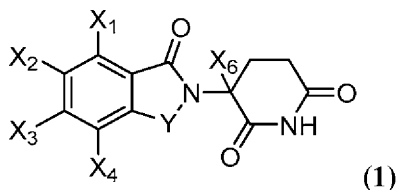
ikarosファミリー転写因子をアンタゴナイズすることによってNotch標的遺伝子の発現を上方制御することができる作用物質には、例えば、ikarosファミリー転写因子のタンパク質分解によって、ポリユビキチン化、および究極的な分解を促進する化合物が含まれる。そのような化合物は、ikarosファミリー転写因子のユビキチン結合を触媒するユビキチンリガーゼを活性化することによって機能し得る。例えば、ikarosファミリー転写因子のレベルを低減させることができる作用物質には、E3ユビキチンリガーゼを形成し、ikaros転写因子のポリユビキチン化を促進するタンパク質である、セレブロンに結合して活性化する化合物が含まれる。セレブロン含有E3リガーゼ複合体の活性を促進し得る例示的なセレブロンリガンドには、サリドマイド、ポマリドミド、レナリドミド、およびその誘導体が含まれる。これらの化合物およびその構造類似体が、HSC集団の増大、HSC集団の富化、およびHSC集団の造血幹細胞機能的能力の維持を成し遂げるために、本明細書に記載の方法で使用されてもよい。サリドマイド、ポマリドミド、およびレナリドミド、ならびにその構造類似体は、例えば、US5,798,368;US5,955,476;US6,281,230;およびUS6,335,349に記載されている。これらのそれぞれの開示は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

【0212】

例えば、セレブロン含有E3ユビキチンリガーゼの活性化により、細胞におけるikarosファミリー転写因子のレベルを低減させることができる例示的な化合物には、式(1)によって表される化合物が含まれる：



40

式中、

Yは、C=OまたはCH₂を表し；

X₁、X₂、X₃、およびX₄のそれぞれは、独立して水素または-NHX₅であり；

X₅は、水素または1～8個の炭素原子のアルキル基であり；かつ

X₆は、水素、1～8個の炭素原子のアルキル基、ベンジル基、またはハロゲン原子である。

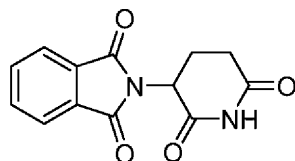
【0213】

50

細胞におけるikarosファミリー転写因子のレベルを低減させることができる化合物にはまた、式(1)の化合物の薬学的に許容される塩も含まれる。

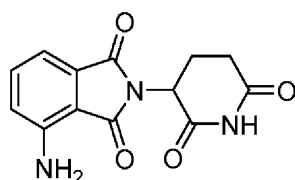
【 0 2 1 4 】

例えば、本明細書に記載の方法で使用され得る、細胞におけるikarosファミリー転写因子のレベルを低減させることができる化合物には、サリドマイド、ボマリドミド、およびレナリドミドが含まれる。これらの構造を以下に提供する。



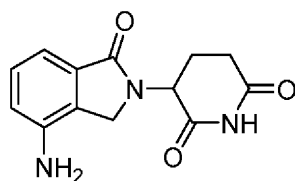
10

サリドマイド(ラセミ混合物)



ボマリドミド(ラセミ混合物)

20



レナリドミド(ラセミ混合物)

【 0 2 1 5 】

30

UM171およびその構造類似体

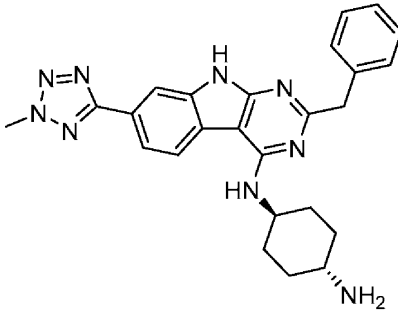
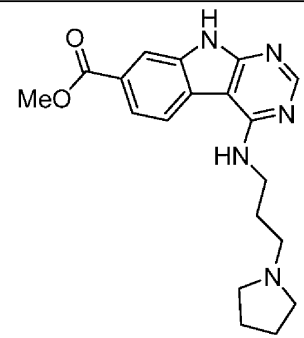
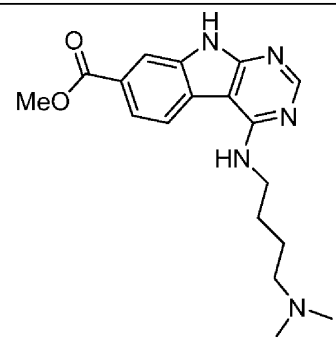
本発明の方法と共に使用することができるさらなる作用物質には、造血幹細胞の増大を誘導することが示されている低分子であるUM171が含まれる。UM171は、例えば、Fares et al. Science 345:1509 (2014)に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。造血幹細胞を増大させるのに、富化するのに、および維持するのに使用することができる他の作用物質には、UM171類似体、例えば、US2015/0011543の式(I)、(II)、(III)、(IV)、(V)、および(VI)のいずれか1つに従うUM171構造類似体が含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。例えば、本明細書に記載の組成物および方法と共に使用することができるUM171類似体には、以下の表1に列挙した化合物が含まれる。

40

【 0 2 1 6 】

(表1) UM171およびその構造類似体

50

化合物番号	分子構造
5 (UM171)	 <chem>C1=CN2C(=N1)C(=CN2)Cc3ccccc3N[C@@H]4CCCC[C@H]4N</chem>
20	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ccncc3n2NCCC[N+]1CCCC1</chem>
21	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ccncc3n2NCCCCN(C)C</chem>

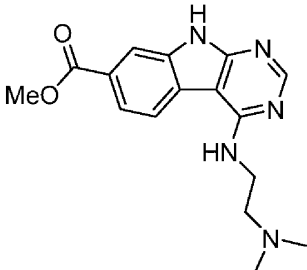
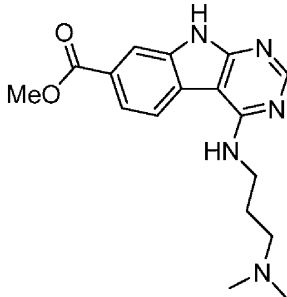
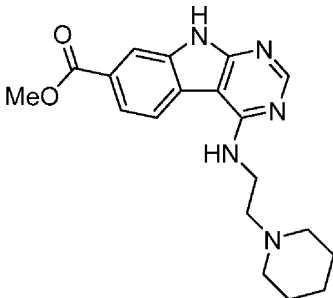
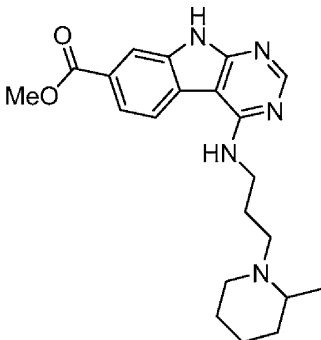
10

20

30

40

50

22	 <chem>CN(C)CCNC1=C2N=CN=C2C(=C1)C3=CC=CC=C3C(=O)OC</chem>
23	 <chem>CN(C)CCCN1C=NC2=C(N1)C=CC=C2C(=O)OC</chem>
24	 <chem>C1CCNCC1NCCNC2=C3N=CN=C3C(=C2)C4=CC=CC=C4C(=O)OC</chem>
25	 <chem>CN1CCCCC1N(CCCCN2C=NC3=C(N2)C=CC=C3C(=O)OC)C</chem>

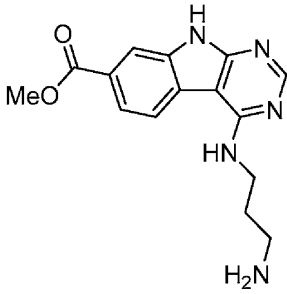
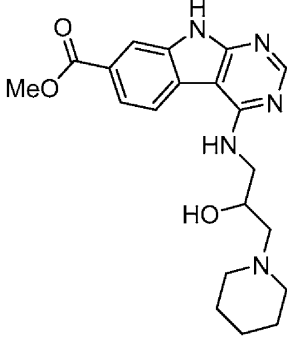
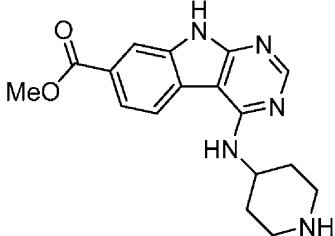
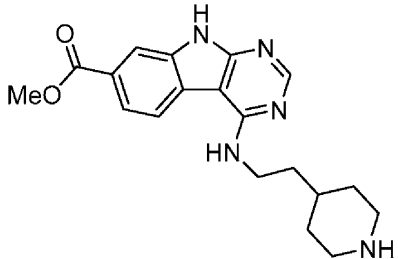
10

20

30

40

50

26	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncnc3n2NCCCN</chem>
27	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncnc3n2NCC(O)CN4CCCC4</chem>
28	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncnc3n2Nc4ccncc4</chem>
29	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncnc3n2NCCc4ccncc4</chem>

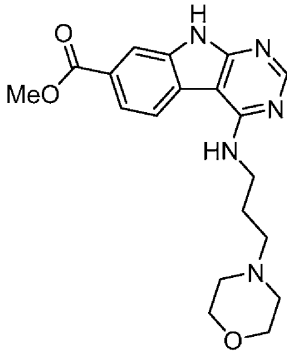
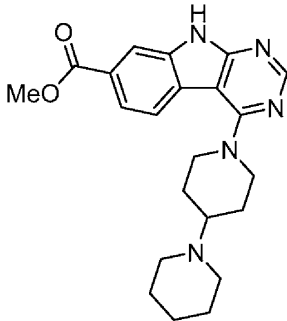
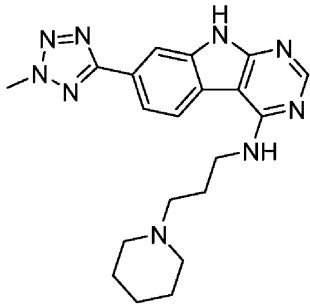
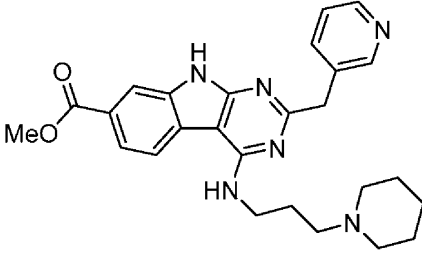
10

20

30

40

50

30	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncnc3n2NCCN4CCOCC4</chem>	10
31	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3ncnc3n2N4CCN(C4)C5CCNCC5</chem>	20
32	 <chem>C1=NN=C(N1)c2ccc3c(c2)c4ncnc4n3NCCCN5CCNCC5</chem>	30
33	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3nc(nc3n2)CCc4cccnc4NCCCN5CCNCC5</chem>	40

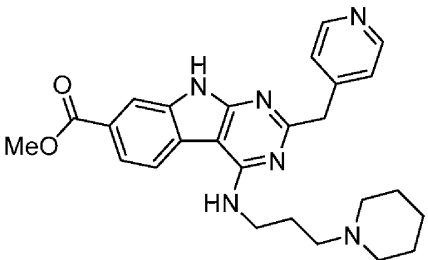
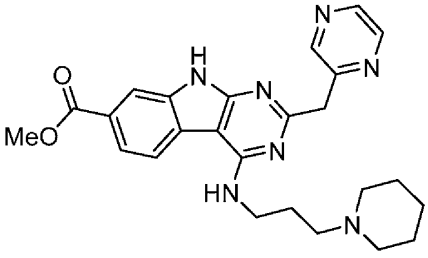
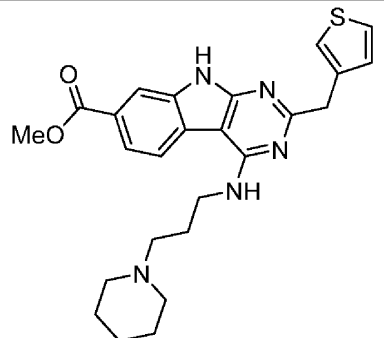
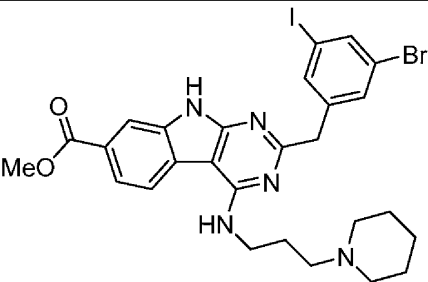
10

20

30

40

50

34	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC(C=C3)CNC4CCCN4CC5=CC=CC=N5</chem>
35	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC(C=C3)CNC4CCCN4CC5=CN=CN=C5</chem>
36	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC(C=C3)CNC4CCCN4CC5=CSC=C5</chem>
37	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC(C=C3)CNC4CCCN4CC5=CC=C(C=C5)C(I)C(Br)</chem>

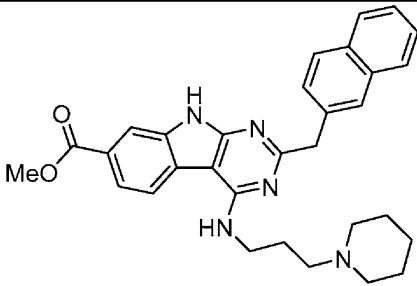
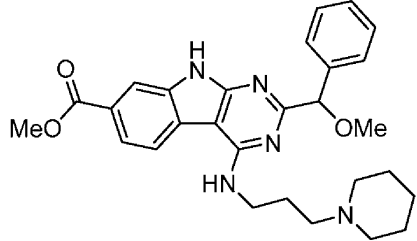
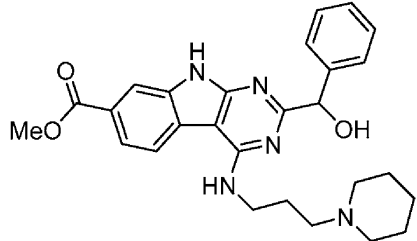
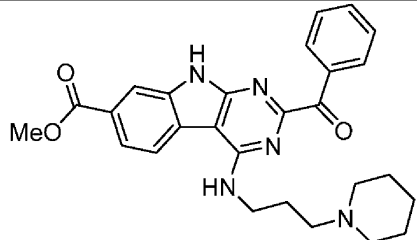
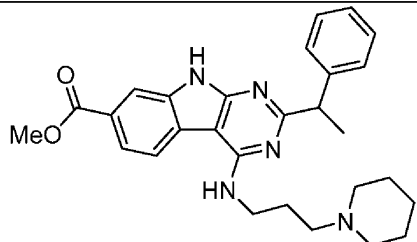
10

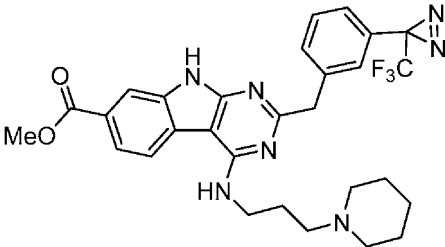
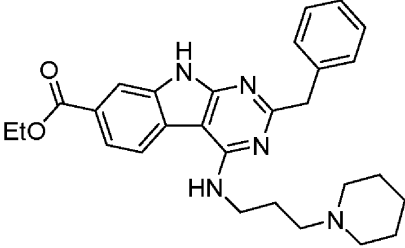
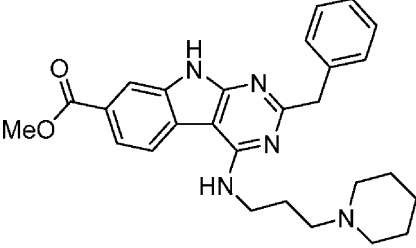
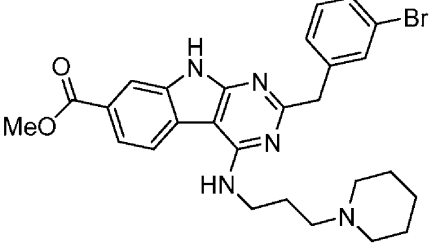
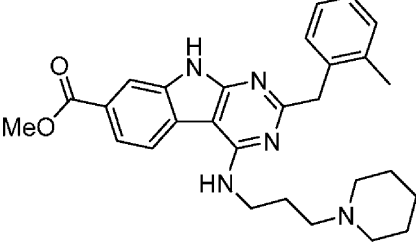
20

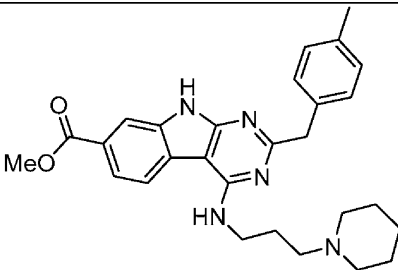
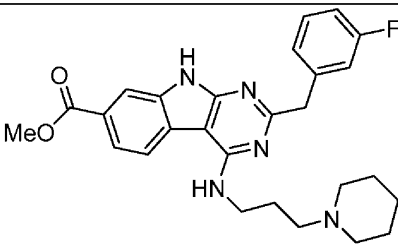
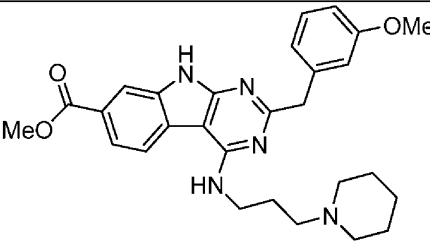
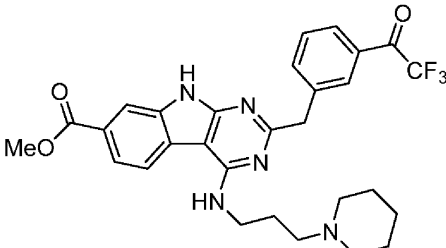
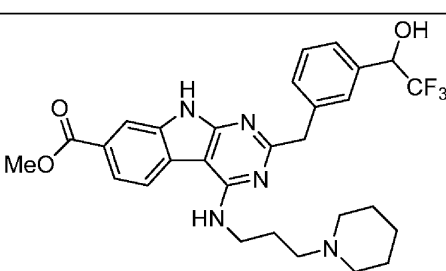
30

40

50

38		
39		10
40		20
41		30
42		40

43		
44		10
45		20
46		30
47		40

48	
49	
50	
51	
52	

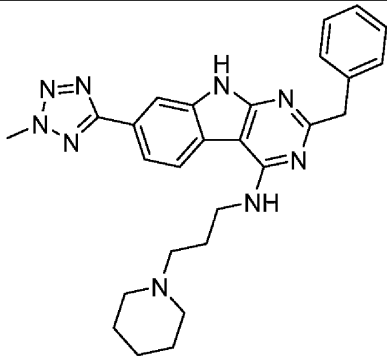
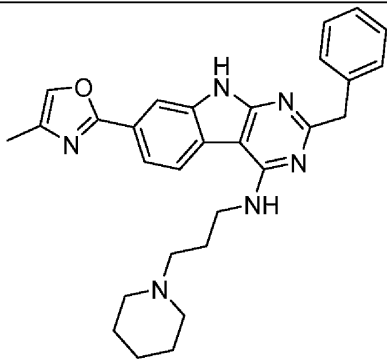
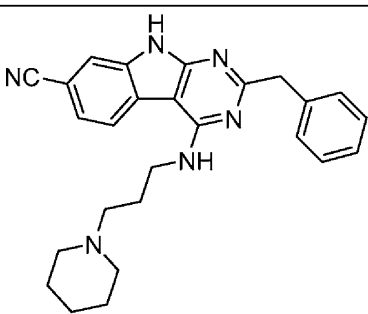
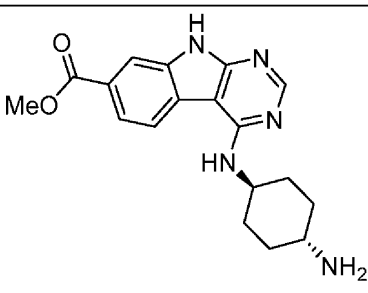
10

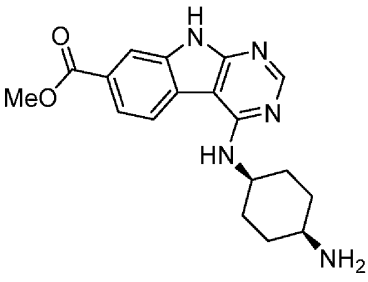
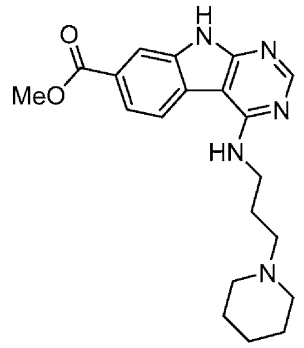
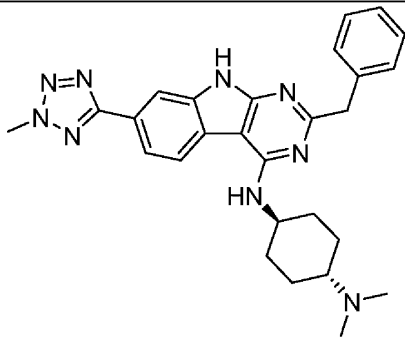
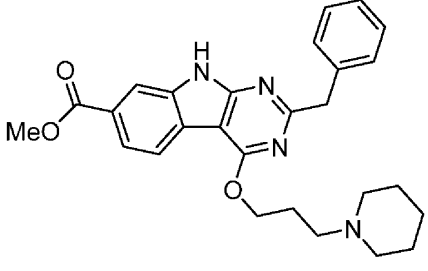
20

30

40

50

53	 <chem>C1=NN=N1c2ccc3c(c2)c4c(c3)nnc4Cc5ccccc5NCCCN6CCCCC6</chem>	10
54	 <chem>Cc1cc2ocn2c1c3c4c(c3)c5c(c4)nnc5Cc6ccccc6NCCCN7CCCCC7</chem>	20
55	 <chem>N#Cc1ccc2c(c1)c3c(c2)c4c(c3)nnc4Cc5ccccc5NCCCN6CCCCC6</chem>	30
56	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)c4c(c3)nnc4N[C@@H]5CCCCC5N</chem>	40

57	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC=NC=C3N[C@H]4CCCC[C@H]4N</chem>
58	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC=NC=C3NCCCN4CCNCC4</chem>
59	 <chem>CN1C=NC2=C(N1)C3=CC=CC=C3C=C2N[C@H]4CCCC[C@@H]4N(C)C</chem>
60	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C3=NC=NC=C3C(OC4CCNCC4)C5=CC=CC=C5</chem>

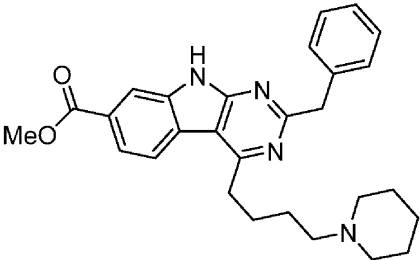
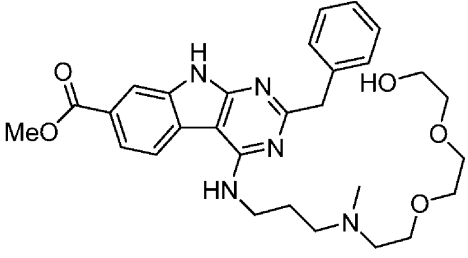
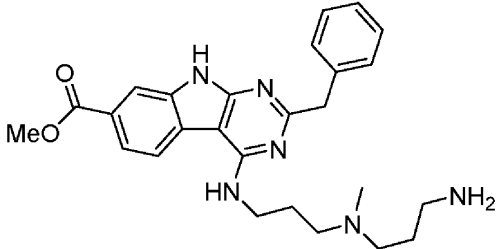
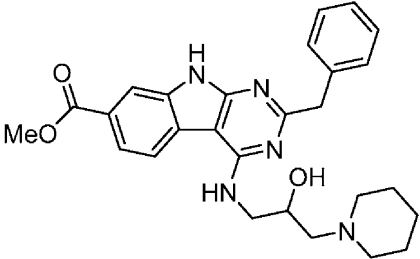
10

20

30

40

50

61	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)n(CCNCCN4CCCCC4)c3Cc5ccccc5</chem>
62	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)n(CCNCCN(C)CCOCCOCC4Cc5ccccc54)c3Cc6ccccc6</chem>
63	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)n(CCNCCN(C)CCN)cc3Cc4ccccc4</chem>
64	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c3c(c2)n(CCN(CCOCCN4CCCCC4))cc3Cc5ccccc5</chem>

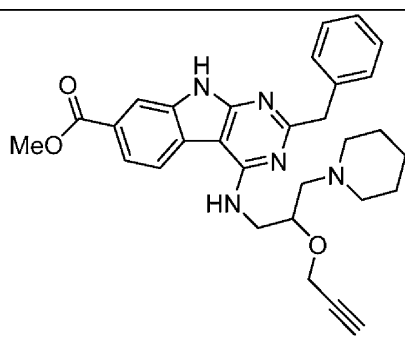
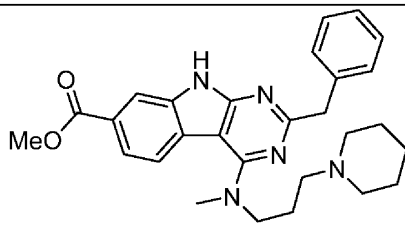
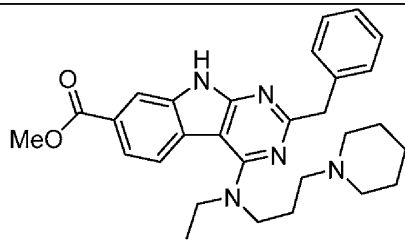
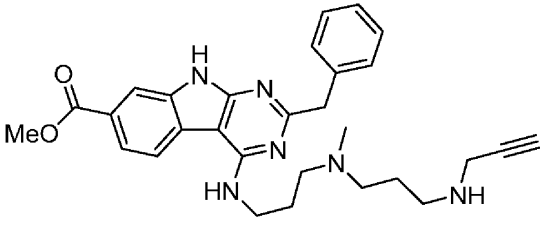
10

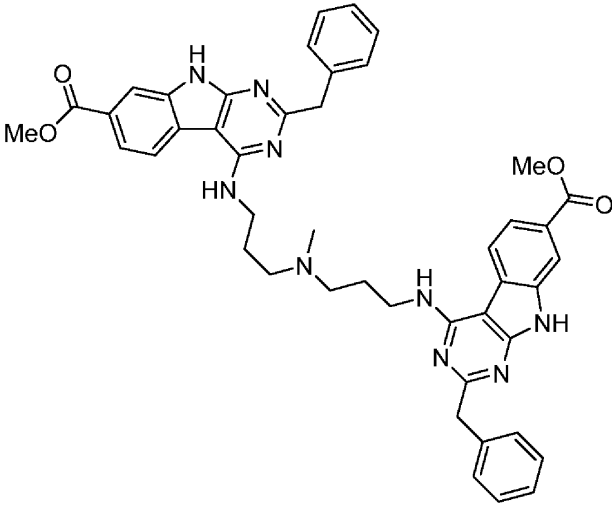
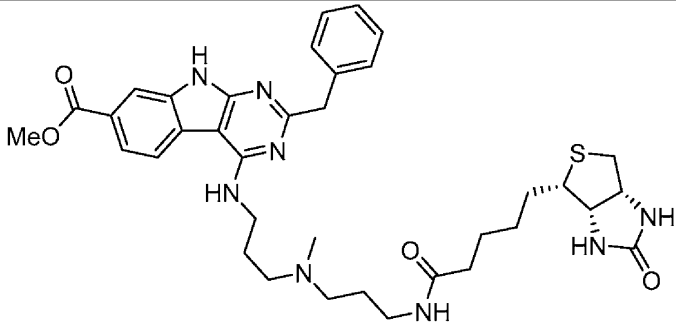
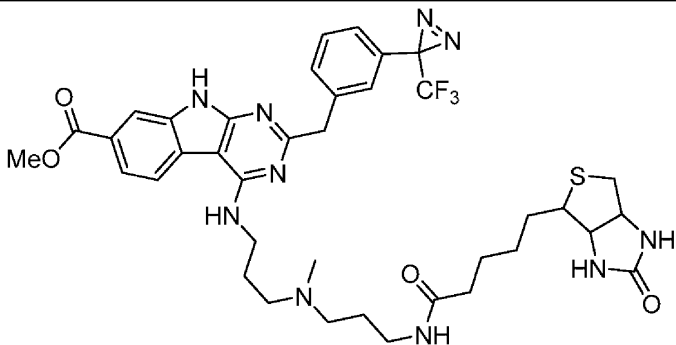
20

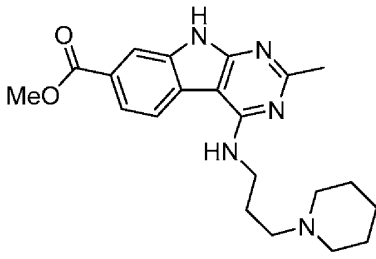
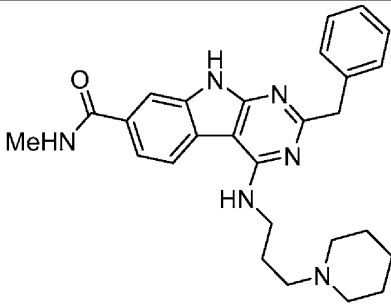
30

40

50

65	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)N3C(=N2C(=N3)CN(C2)COC#C)C4CCCCN4</chem>	10
66	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)N3C(=N2C(=N3)CN(C)CCN4CCCC4)C5CCCCN5</chem>	20
67	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)N3C(=N2C(=N3)CN(CC)CCN4CCCC4)C5CCCCN5</chem>	30
68	 <chem>COC(=O)c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)N3C(=N2C(=N3)CN(C)CCN(C)CCNC#C)C4CCCCN4</chem>	40

69		10
70		20
71		30

72	
73	

10

【 0 2 1 7 】

20

低分子

本明細書に記載の方法と共に様々な低分子を使用することができる。これらの低分子の中には酵素-基質相互作用のモジュレーターが含まれる。例えば、トラニルシプロミンおよびその誘導体は、N-メチル化ヒストンテール残基の酸化的脱メチル化を触媒するために、LSD1などのヒストンデメチラーゼが利用するFAD補因子のイソアロキサジン部分と共有結合付加物を形成することによって、これらの酵素に不可逆的に結合し、これらの酵素を阻害することができる阻害物質の頑強なクラスである。本発明の組成物および方法と共に有用な、ヒストン脱メチル化の例示的な低分子阻害物質には、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I(BHC110阻害物質I、ヒストンリジンデメチラーゼ阻害物質III、および/またはKDM1阻害物質Iとも呼ばれる)、ならびに前記のトラニルシプロミンが含まれる。さらに、ヒストンデメチラーゼを阻害するのに有用な低分子の例には、US2013/0095067に記載のように、フェネルジン、プロパルギルアミン、およびその誘導体が含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。他のトラニルシプロミン誘導体は、例えば、US2014/0163041に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

30

【 0 2 1 8 】

ヒストンメチル化を調節するのに使用することができる低分子のさらなる例には、BIX01294(例えば、WO2014/057997に記載のH3K9メチル化阻害物質);UNC0638(例えば、WO2013/050422に記載のH3K9メチル化阻害物質)、これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる;およびCARM1阻害物質(PRMT阻害物質V、3,5-bis(3-ブ

40

【 0 2 1 9 】

TGF シグナル伝達の低分子阻害物質のいくつかの構造的に異なるクラスが報告されている。これらの作用物質は、これらの分子のコア分子スキャフォールドに基づいて分類することができる。例えば、TGF シグナル伝達阻害物質は、分子のコア構造断片として、ジヒドロピリピラゾール(dihydropyrrlipyrazole)、イミダゾール、ピラゾロピリジン(pyrazolopyridine)、ピラゾール、イミダゾピリジン、トリアゾール、ピリドピリミジン、ピロロピラゾール、イソチアゾール、またはオキサゾール官能基を含有してもよい。TGF シグナル伝達の低分子阻害物質の非限定的ないくつかの例には、ALK5阻害物質II(E-61645

50

2とも呼ばれる)、LY364947(ALK5阻害物質I、TbR-I阻害物質、トランスフォーミング成長因子- β I型受容体キナーゼ阻害物質とも呼ばれる)、A83-01、およびDMH1が含まれる。本明細書に記載される組成物および方法と共にTGF β シグナル伝達を調節するのに使用することができる低分子の他の例には、SB431542(4-(5-ベンゾール[1,3]ジオキソール-5-イル-4-ピルジン(pyridin)-2-イル-1H-イミダゾール-2-イル)-ベンズアミド水和物、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド水和物、4-[4-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド水和物、Alk5阻害物質)、ガルニセルチブ(Galunisertib)(LY 2157299、Alk5阻害物質)、LY2109761(4-[2-[4-(2-ピリジン-2-イル-5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[1,2-b]ピラゾール-3-イル)キノリン-7-イル]オキシエチル]モルホリン、Alk5/TGF β RII阻害物質)、SB525334(6-[2-tert-ブチル-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-4-イル]キノキサリン、Alk5阻害物質)、GW788388(N-(オキサリ-4-イル)-4-[4-(5-ピリジン-2-イル-1H-ピラゾール-4-イル)ピリジン-2-イル]ベンズアミド、Alk5阻害物質)、K02288(3-[6-アミノ-5-(3,4,5-トリメトキシフェニル)ピリジン-3-イル]フェノール、Alk4/Alk5阻害物質)、SD-208(2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-N-ピリジン-4-イルプテリジン-4-アミン、Alk5阻害物質)、EW-7197(N-((4-([1,2,4]トリアゾール[1,5-a]ピリジン-6-イル)-5-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-イミダゾール-2-イル)メチル)-2-フルオロアニリン、Alk4/Alk5阻害物質)、およびLDN-212854(5-[6-[4-(1-ピペラジニル)フェニル]ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]-キノリン、Alk4/Alk5阻害物質)が含まれる。

【0220】

低分子TGF β モジュレーターのさらなる例には、TGF β 受容体のアンタゴニスト、例えば、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5ナフチリジン(naphththyridine)、[3-(ピリジン-2-イル)-4-(4-キノイル)]-1H-ピラゾール、および3-(6-メチルピリジン-2-イル)-4-(4-キノリル)-1-フェニルチオカルバモイル-1H-ピラゾールが含まれる。他の低分子阻害物質には、Halder et al. Neoplasia 7:509 (2005))に記載される、SB-431542、(4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド、TGF β 受容体ALK5の低分子阻害物質であるSM16、この構造を以下に示した(Fu et al. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 28: 665 (2008))、SB-505124(Dacosta Byfield et al. Molecular Pharmacology 65:744 (2004)に記載のAlk4/Alk5阻害物質。構造を以下に示した)、および6-プロモ-インディルピン-3'-オキシム(US8,298,825に記載)が含まれるが、これに限定されない。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

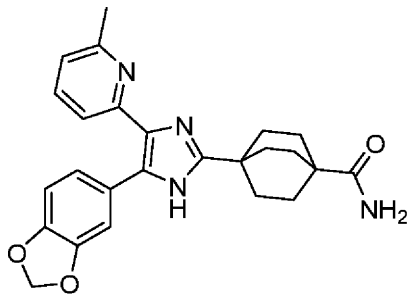
10

20

30

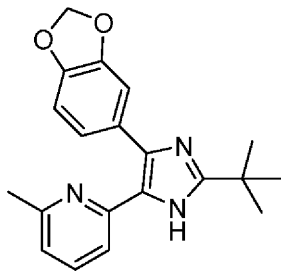
40

50



SM16

10



SB-505124

20

【 0 2 2 1 】

TGF- シグナル伝達阻害物質のさらなる例は、例えば、Callahan et al. Journal of Medicinal Chemistry 45:999 (2002); Sawyer et al. Journal of Medicinal Chemistry 46:3953 (2003); Gellibert et al. Journal of Medicinal Chemistry 47:4494 (2004); Tojo et al. Cancer Science 96:791 (2005); Petersen et al. Kidney International 73:705 (2008); Yingling et al. Nature Reviews Drug Discovery 3:1011 (2004); Byfield et al. Molecular Pharmacology 65:744 (2004); Dumont et al. Cancer Cell 3:531 (2003); WO2002/094833; WO2004/026865; WO2004/067530; WO2009/032667; WO2004/013135; WO2003/097639; WO2007/048857; WO2007/018818; WO2006/018967; WO2005/039570; WO2000/031135; WO1999/058128; US6,509,318; US6,090,383; US6,419,928; US7,223,766; US6,476,031; US6,419,928; US7,030,125; US6,943,191; US2005/0245520; US2004/0147574; US2007/0066632; US2003/0028905; US2005/0032835; US2008/0108656; US2004/015781; US2004/0204431; US2006/0003929; US2007/0155722; US2004/0138188; および US2009/0036382 に記載されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

30

【 0 2 2 2 】

本明細書に記載される組成物および方法と共に有用な別のクラスの低分子には、骨形成タンパク質(BMP)シグナル伝達モジュレーターが含まれる。BMPはリガンドのTGF スーパーファミリーのメンバーであり、BMPシグナル伝達モジュレーター、例えば、Alk2、Alk3、およびAlk6の阻害物質を、例えば、造血幹細胞を増大させるため、造血幹細胞を富化するため、および/または造血幹細胞を多能性状態で維持するために使用することができる。例示的なBMP阻害物質には、DMH1(4-[6-(4-イソプロポキシフェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]キノリン)、4-[6-[4-(1-メチルエトキシ)フェニル]ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]-キノリン)、K02288(3-(6-アミノ-5-(3,4,5-トリメトキシフェニル)ピリジン-3-イル)フェノール)、LDN-212854(5-[6-[4-(1-ピペラジニル)フェニル]ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]-キノリン)、LDN-193189(4-[6-[4-(1-ピペラジニル)フェニル]ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]-キノリン)、LDN-214117(1-(4-(6-メチル-5-(3,4,5-トリメトキシフェニル)ピリジン-3-イル)フェニル)ピペラジン)、およびML347

40

50

(5-[6-(4-メトキシフェニル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン-3-イル]キノリン)が含まれる。

【0223】

造血幹細胞の増大、造血幹細胞の富化、および造血幹細胞の造血幹細胞機能的能力の維持を促進するために、受容体型チロシンキナーゼ、例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)および血小板由来成長因子(PDGF)シグナル伝達の阻害物質も使用することができる。例えば、本明細書に記載の方法と共に有用な例示的なVEGF/PDGF阻害物質は、ABT-869(リニファニブ(Linifanib)、1-[4-(3-アミノ-1H-インダゾール-4-イル)フェニル]-3-(2-フルオロ-5-メチルフェニル)尿素)である。

【0224】

本明細書に記載される組成物および方法と共に有用な他の低分子には、DNMT1、DNMT3a、およびDNMT3Bの化学モジュレーターを含むDNAメチル化阻害物質が含まれる。造血幹細胞を増大させるため、造血幹細胞を富化するため、および造血幹細胞の造血幹細胞機能的能力を維持するために使用することができる、これらの標的の例示的な阻害物質はRG108(N-フタリル-L-トリプトファン)である。

【0225】

現在までに、ピリジニルイミダゾール化合物SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリジル)1H-イミダゾール)およびSB202190(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)1H-イミダゾール)を含む、p38 MAPKの様々な低分子阻害物質も報告されている。これらの化合物は、
-または
-アイソフォームの酵素活性を破壊することなく、p38 MAPK
-および
-アイソフォーム
を選択的にアンタゴナイズする阻害物質のクラスである。これらの化合物はUS6,602,896に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。p38 MAPK阻害物質の他の例には、例えば、US2014/0127231に記載のように、SB203580、BIRB796(ドラマピモド(Doramapimod))、VX702、SB202190、LY2228820、VX745、ピノレルピン(ナベルピン)、PH797804、パマピモド(pamapimod)、CMPD-1、EO1428、JX401、ML3403、RWJ67657、SB239063、SCIO469塩酸塩、SKF86002二塩酸、SX011、およびTAK715が含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。本発明の組成物および方法と共に有用なp38阻害物質のさらなる例には、ペキシメチニブ(Pexmetinib)(ARRY-614)、PH-797804(3-(3-プロモ-4-((2,4-ジフルオロベンジル)オキシ)-6-メチル-2-オキソピリジン-1(2H)-イル)-N,4-ジメチルベンズアミド)、ロスマピモド(Losmapimod)(GW856553X)、およびスケピノン(Skepinone)-Lが含まれる。

【0226】

-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害することができる低分子作用物質には、
-カテニンリン酸化を促進するタンパク質の活性を弱めることができる作用物質が含まれる。このような阻害物質は、この転写因子の核濃度を高めるのに役立ち、様々な例が当技術分野において公知である。
-カテニンリン酸化阻害物質には、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3(GSK3)を阻害する化合物、例えば、前記のCHIR99021、ならびに6-プロモ-インディルピン-3'-オキシム(Meijer et al. Chemistry and Biology 10:1255 (2003); Goessling et al. Cell 136:1136 (2009))、AR-A014418(Bhat et al. Journal of Biological Chemistry 278:45937 (2003)、および有機金属GSK-3阻害物質DW21(Williams et al. Angewandte Chemie International Edition 44:1984 (2005))が含まれる。これらの開示は参照により本明細書に組み入れられる。造血幹細胞を増大させるため、造血幹細胞を富化するため、および造血幹細胞の造血幹細胞機能的能力を維持するために本明細書に記載される組成物および方法と共に有用な、Wntシグナル伝達の他の低分子モジュレーターには、GSK3aおよびGSK3bの阻害物質、例えば、CHIR99021および塩化リチウムが含まれる。

【0227】

ヒストン脱アセチル化も低分子治療剤を用いた標的化に適用することができる。ヒドロキサム酸は、ヒストンデアセチラーゼの活性部位の内部にある、カチオン亜鉛に結合する例えばヒドロキサメート官能基によってヒストンデアセチラーゼを阻害する、ヒストンデア

10

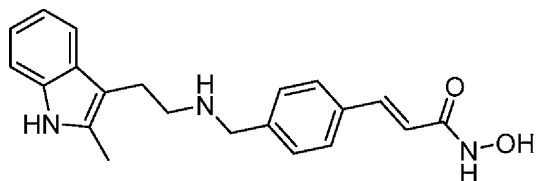
20

30

40

50

セチラーゼの特に頑強なクラスである。例示的な阻害物質には、前記のトリコスタチンA、ならびにポリノスタット(Marks et al., Nature Biotechnology 25 : 84 (2007); およびStenger, Community Oncology 4 : 384-386 (2007)に記載のN-ヒドロキシ-N'-フェニル-オクタンジアミン。この開示は参照により本明細書に組み入れられる)が含まれる。他のヒストンデアセチラーゼ阻害物質には、パノビノスタット(Panobinostat)が含まれる。この構造を以下に示す。

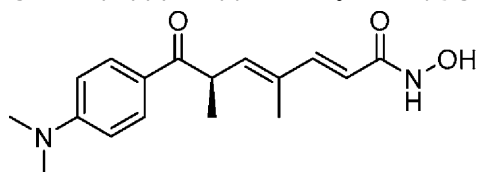


パノビノスタット

10

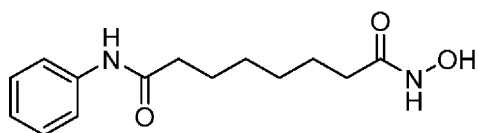
【 0 2 2 8 】

ヒストンデアセチラーゼのヒドロキサム酸阻害物質のさらなる例には、例えば、Bertrand, European Journal of Medicinal Chemistry 45:2095 (2010)に記載される、以下に示した化合物が含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。



トリコスタチンA

20

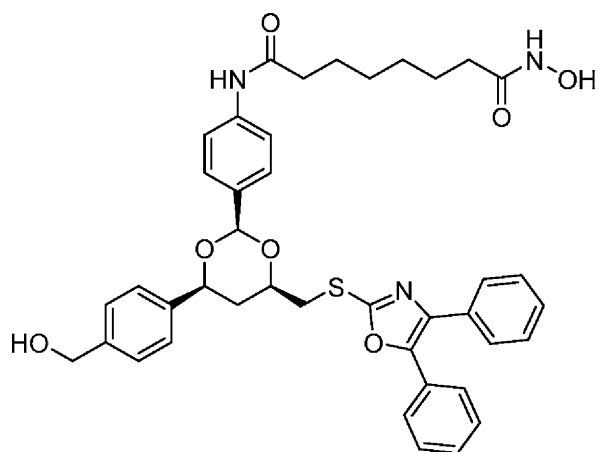


SAHA

30

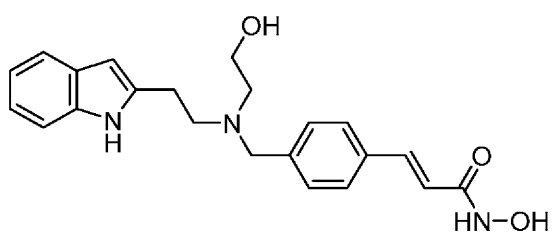
40

50



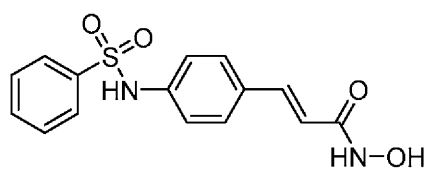
ツバシン

10



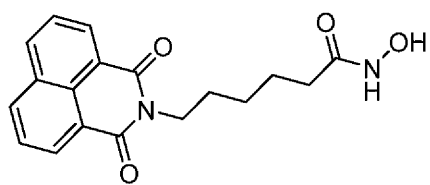
LAQ824

20



スルホンアミド

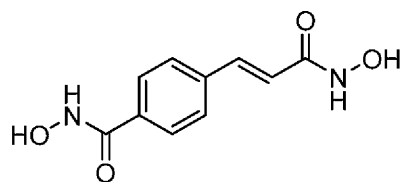
30



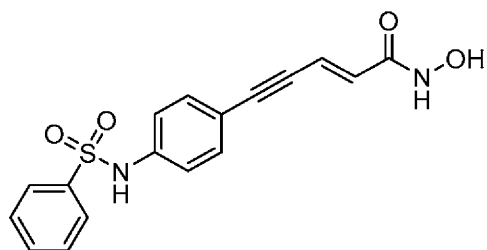
スクリプタイド

40

50



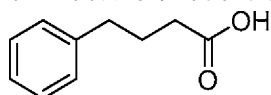
CBHA



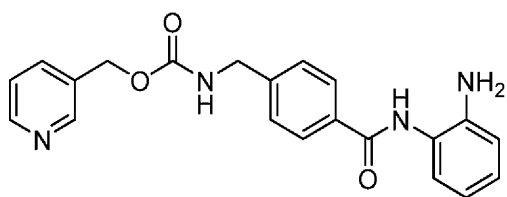
オキサムフラチン

【 0 2 2 9 】

バルプロ酸(Gottlicher et al. EMBO Journal 20: 6969 (2001)およびBalasubramanian et al. Cancer Letters 280: 211 (2009)に記載のモセチノスタット(Mocetinostat)(N-(2-アミノフェニル)-4-[[[4-ピリジン-3-イルピリミジン-2-イル)アミノ]メチル]ベンズアミドを含む、ヒドロキサメート置換基を含有しない他のヒストンデアセチラーゼ阻害物質も開発されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。ヒストンデアセチラーゼを阻害するために、ヒドロキサメートとは異なる化学官能性を利用する他の低分子阻害物質には、以下に示した低分子阻害物質が含まれる。



フェニル酪酸



MS-275

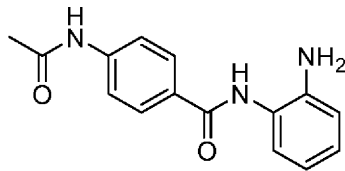
10

20

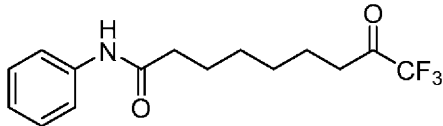
30

40

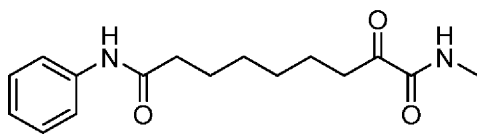
50



CI-994



トリフルオロメチルケトン

 α -ケトアミド

【 0 2 3 0 】

造血幹細胞を増大させるため、造血幹細胞を富化するため、および造血幹細胞の造血幹細胞機能的能力を維持するために有用なヒストンアセチル化の化学モジュレーターのさらなる例には、HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC8、HDAC9、HDAC10、Sirt1、Sirt2、および/またはHATのモジュレーター、例えば、ブチリルヒドロキサム酸、M344、LAQ824(ダシノスタット(Dacinostat))、AR-42、ベリノスタット(Belinostat)(PXD101)、CUDC-101、スクリプタイド、フェニル酪酸ナトリウム、タスキニモド(Tasquinimod)、クイシノスタット(Quisinostat)(JNJ-26481585)、プラシノスタット(Pracinostat)(SB939)、CUDC-907、エンチノスタット(Entinostat)(MS-275)、モセチノスタット(Mocetinostat)(MGCD0103)、ツバスタチン(Tubastatin)A HCl、PCI-34051、ドロキシノスタット(Droxinostat)、PCI-24781(アベキシノスタット(Abexinostat))、RGFP966、ロシリノスタット(Rocilinostat)(ACY-1215)、CI994(タセジナリン(Tacedinaline))、ツバシン、RG2833(RGFP109)、レスミノスタット(Resminostat)、ツバスタチン(Tubastatin)A、BRD73954、BG45、4SC-202、CAY10603、LMK-235、ネキシツラスタット(Nexturastat)A、TMP269、HPOB、カンビノール、およびアナカルジン酸が含まれる。

【 0 2 3 1 】

抗体および他の治療用タンパク質

抗体は、受容体-リガンド相互作用などの細胞外タンパク質-タンパク質相互作用を標的とするのに独特に適している化学的空間領域である。これらの作用物質は、表層部の裂け目の内部ではなく、広大な表面に起こる相互作用を阻害するのに有益な大きい分子容積を有する。阻害性抗体は、細胞外受容体とコグネイトリガンドとの相互作用を立体的に妨げ、従って、細胞外受容体を不活性コンホメーションに維持するように細胞外受容体に結合することによって機能してもよい。例えば、TGF 受容体活性を弱めることができる阻害性抗体には、レルデリムマブ(Lerdelimumab)、およびTGF 受容体II型に結合する抗体が含まれる。他の例には、ヒトTGF の全アイソフォームに結合し、これらをアンタゴナイズする抗体であるGC-1008、ならびにマウスTGF の全アイソフォームに結合する抗体であるID11が含まれる。これらの抗体は、例えば、US8,603,818に記載される。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0232】

Wntシグナル伝達カスケードを伝えることによって、 β -カテニンリン酸化を阻害するアンタゴニスト抗体も開発されている。このような抗体は、FrizzledなどのWnt受容体およびLRPファミリータンパク質に結合し、GKS3による β -カテニンリン酸化を阻害する別個の分子事象を含むWntシグナル伝達経路の伝播を刺激する、同時に発生するコンホメーション変化を誘発し得る。例えば、Wntシグナル伝達のアゴニストとして抗体1D9が開発されており、US2014/0044717に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0233】

造血幹細胞を増大させるため、造血幹細胞を富化するため、および造血幹細胞の造血幹細胞機能的能力を維持するための生物学的プロセスを阻害するために、他のクラスの治療用タンパク質をさらに使用することができる。重要なタンパク質間相互作用をアンタゴナイズまたは刺激するために、シグナル伝達事象を調節する内因性タンパク質が、エクスピボで、これらの事象を弱め、それによって、コグネイトリガンドに対する、これらのタンパク質の天然親和性を強化するのに用いられてもよい。例えば、この目的のために、TGF活性を負に制御する細胞外マトリックスプロテオグリカンであるデコリン(Decorin)、ならびにレフティー1、レフティー2、フォリスタチン、ノギン(Noggin)、コーディン、ケルベロス(Cerberus)、ジャームリン(Germlin)、インヒビン、シスタチンC、組換えマウスレフティー1(ACVR2B阻害物質)、ならびにR-Smadタンパク質のリン酸化を阻止するのに役立つか、またはTGF受容体I型の分解を促進するようにユビキチンリガーゼをTGF受容体I型に動員するのに役立つSmadタンパク質Smad6およびSmad7を含む、TGFシグナル伝達カスケードをアンタゴナイズする様々なタンパク質を使用することができる。これらのタンパク質はUS8,298,825に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0234】

造血幹細胞を増大させるため、造血幹細胞を富化するため、および造血幹細胞の造血幹細胞機能的能力を維持するために用いられ得る別のTGFシグナル伝達モジュレーターは組換え両生類TGF- β 5(ACVR2A、ACVR2B、TGFRIIアクチベーター)である。

【0235】

前記の負のフィードバックタンパク質に加えて、 β -カテニンリン酸化を阻害するようにWntシグナル伝達を誘導することができるタンパク質も述べられている。例えば、Rスポンジン(上衣板特異的スポンジン)タンパク質は β -カテニンシグナル伝達を活性化することも知られている。Rスポンジンタンパク質はWntタンパク質と配列類似性を有さず、Frizzled非依存的機構を介してWntシグナル伝達を増強するように見える。このタンパク質は、Kazanskaya, O., et al., Dev. Cell 7, 525-534 (2004)に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0236】

干渉RNA

RNA干渉(RNAi)は、アンタゴニストRNA(例えば、内因性mRNA配列と水素結合を介して相補的に塩基対合することができるオリゴヌクレオチドを含有する二本鎖RNA)が細胞内遺伝子発現を弱める能力を利用した阻害性療法である。機構的には、この現象は、相補的mRNAが分解されることで、またはmRNA転写物におけるリボソーム形成が立体的に阻害されることで働くことが多い。dsRNAの長い配列は、公知のリボヌクレアーゼであるダイサーによって真核細胞の細胞質内で切断されて、siRNAとして知られる短い21~25ヌクレオチドの低分子干渉RNAになることが多い。その後、これらのsiRNAはタンパク質成分と集合してRNA誘導サイレンシング複合体(RISC)になり、このプロセスにおいて巻き戻る。次いで、活性化されたRISCは、siRNAアンチセンス鎖とmRNAとの間の塩基対合相互作用によって相補的転写物に結合する。結合したmRNAは切断され、mRNAが配列特異的に分解されることで遺伝子サイレンシングが起こる。RISCを介した遺伝子サイレンシングの基礎をなす分子事象は、例えば、US6,506,559; Fire et al., Nature 391(19):306-311

10

20

30

40

50

(1998); Timmons et al., Nature 395:854 (1998);および Hannon, RNAi A Guide to Gene Silencing, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2003)に記載されている。これらの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0237】

重要なことに、本明細書に記載される組成物および方法と共に有用なsiRNA分子は、RNAだけを含有するsiRNA分子に限定される必要はなく、例えば、RNA干渉をもたらす化学修飾ヌクレオチドおよび非ヌクレオチド、ならびにリボース糖が別の糖分子またはその類似体と取り替えられた分子を含んでもよい。さらに、ヌクレオチド残基間の非天然結合、例えば、ホスホジエステラーゼを介した分解を受けにくいホスホロチオエート結合を使用することができる。本明細書に記載される組成物および方法と共に有用なRNAオリゴヌクレオチドはまた、反応性官能基またはレポーター基、例えば、フルオロフォアを用いて誘導体化されてもよい。特に有用な誘導体は、RNA鎖の1つまたは複数の末端、典型的には、センス鎖の3'末端において修飾される。例えば、当技術分野において公知の標準的な求核置換法によって、3'末端にある2'-ヒドロキシルを様々な基を用いて容易に、かつ選択的に誘導体化することができる。他の有用なRNA誘導体は、修飾された炭水化物部分を有するヌクレオチド、例えば、オリゴヌクレオチドに高い構造安定性を付与する2'-O-アルキル化残基または2'-O-メチルリボシル誘導体および2'-O-フルオロリボシル誘導体を組み込んでいる。siRNAの核酸塩基も化学修飾されてもよい。例えば、標的mRNAとの水素結合相互作用の強度を調節するために、siRNA分子に、5-プロモウラシルおよび5-インドウラシルなどのハロゲン化塩基を組み込むことができる。核酸塩基はまた戦略的にアルキル化されてもよい。例えば、グアノシン残基の代わりに7-メチルグアノシンを組み込むことができる。標的遺伝子発現の阻害を促進する非天然塩基も干渉RNAに組み込まれてもよい。他のsiRNA修飾には、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジンまたはロックド核酸(LNA)ヌクレオチド、およびホスホジエステルまたは様々な数のホスホロチオエート結合を含有するRNA二重鎖が含まれる。このような修飾は、例えば、Braasch et al., Biochemistry 42: 7967 (2003)に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0238】

合成siRNA分子は、当業者に公知の多数の技法を用いて得ることができる。例えば、siRNA分子は、当技術分野において公知の方法を用いて、例えば、適切に保護されたリボヌクレオチドホスホリアルミダイトと従来の固相オリゴヌクレオチド合成を用いて化学合成することができるか、または組換えにより産生することができる(例えば、Elbashir et al. Nature 411:494 (2001); Elbashir et al. Genes & Development 15:188 (2001); Harborth et al. Journal of Cell Science 114:4557 (2001); Masters et al. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 98:8012 (2001); およびTuschl et al. Genes & Development 13:3191 (1999)を参照されたい。これらの開示は参照により本明細書に組み入れられる)。さらに、プラスミドベクター、レトロウイルス、およびレンチウイルスによってコードされるステムループ構造としてdsRNAを発現させることができる(例えば、Paddison et al. Genes and Development 16:948 (2002); McManus et al. RNA 8:842 (2002); Paul et al. Nature Biotechnology 20:505 (2002); Miyagishi et al. Nature Biotechnology 20:497 (2002); Sui et al. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99:5515 (2002); Brummelkamp et al. Cancer Cell 2:243 (2002); Lee et al. Nature Biotechnology 20:500 (2002); Yu et al. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99:6047 (2002); Zeng et al. Molecular Cell 9:1327 (2002); Robinson et al. Nature Genetics 33:401 (2003); Stewart et al. RNA 9:493 (2003)を参照されたい。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる)。

【0239】

本発明の方法によって述べられた生物学的プロセスをアンタゴナイズするために、RNA干渉機構によって働く様々な阻害性物質が開発されている。例えば、ヒトTGF β RII配列に由来するTGF β 受容体II型siRNAポリヌクレオチド(Genbankアクセッション番号: M85079

10

20

30

40

50

)が報告されている。TGF 受容体II型遺伝子内の特定の標的配列に対して以下のsiRNA二重鎖配列が開発され、様々な全細胞モデルにおいて、この受容体の発現をノックダウンするのに用いられている。これらのsiRNA配列はUS8,067,389に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。他のオリゴヌクレオチドに基づくTGF シグナル伝達モジュレーター、例えば、siRNAおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドが、US 5,731,424;US6,124,449;US2008/0015161;US2006/0229266;US2004/0006030;US2005/0227936;およびUS2005/0287128に記載されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。TGF R発現またはALK5発現を標的化するのに有用なsiRNAは容易に設計および試験することができる。siRNA配列およびsiRNA配列の予測変数のデータベースが確立されている(Chalk et al. (Nucleic Acids Research 33: D131 (2005)、この開示は参照により本明細書に組み入れられる)。このデータベースを用いて、特定のsiRNA-標的mRNA相互作用の熱力学的パラメータを予測し、オフターゲット相互作用について、設計されたsiRNA配列の特性を評価することができる。このデータベースは電子的情報源としてwww.siRNA.cgb.ki.seで入手することができる。

10

標的配列

5' → 3' および

siRNA 二重鎖

ヌクレオチド番号

20

Nt 529

UCCUGCAUGAGCAACUGCAdTdT

AATCCTGCATGAGCAACTGCA dTdTAGGACGUACUCGUUGACGU

(SEQ ID NO: 1)

(SEQ ID NO: 2および3)

Nt 1113

GGCCAAGCUGAAGCAGAACdTdT

AAGGCCAAGCTGAAGCAGAAC dTdTCCGGUUCGACUUCGUCUUG

(SEQ ID NO: 4)

(SEQ ID NO: 5および6)

30

Nt 1253

GCAUGAGAACAUACUCCAGdTdT

AGCATGAGAACATACTCCAG dTdTCGUACUCUUGUAUGAGGUC

(SEQ ID NO: 7)

(SEQ ID NO: 8および9)

Nt 948

GACGCGGAAGCUCAUGGAGdTdT

AAGACGCGGAAGCTCATGGAG dTdTCUGCGCCUUCGAGUACCUC

(SEQ ID NO: 10)

(SEQ ID NO: 11および12)

40

【 0 2 4 0 】

コンホメーションが制約されたペプチド

ペプチドに基づく治療剤は、多くの場合、他の手段では阻害することが困難だったタンパク質間相互作用の阻害に有用な化合物の新たに出現したクラスである。コンホメーションが制限されたペプチドには治療用途に特別の利点がある。なぜならこれらの化合物は、例えば、特定のファーマコフォアが関心対象のタンパク質と空間的に相互作用しやすくなっ

50

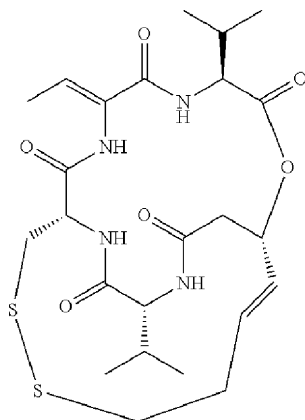
ている構造的に予め組織化されたエピトープを提示することによって、高い標的親和性および選択性を示すことが多いからである。制約されたペプチドは、プロテアーゼが内部アミド結合に到達するのを制限することによって、制約されていない(例えば、直鎖)対応物と比べてプロテアーゼ抵抗性が高いなどの、さらなる利益を特徴とすることが多い。水素結合ドナーおよびアクセプターが水性溶媒から隔離されるために、これらの化合物の細胞透過能力も直鎖ペプチドの細胞透過能力より往々にして高い。本発明の組成物および方法と共に有用な例示的な制約されたペプチド阻害物質には、ヘリックスの同じ面にある残基間に共有結合架橋を挿入することによって構造的に堅くなっているヘリックスを特徴とすることが多いオレフィン「ステープルド(stapled)」ペプチドが含まれる。このクラスの制約されたペプチドは、例えば、Walensky et al. *Journal of Medicinal Chemistry* 57:6275 (2014)に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。アキシン(Axin)/ γ -カテニン相互作用を破壊することによって機能する、 γ -カテニンリン酸化のステープルドペプチド阻害物質が開発されている。アキシンは、 γ -カテニンを、GSK3を含むタンパク質複合体に固定するのに役立ち、この会合は、アキシンのヘリックス領域を、 γ -カテニン表面にある表層部ポケットに挿入することによって媒介されることが示されている。残基R8((S)- γ -(7-オクテニル)アラニン)とS5((S)- γ -(4-ペンテニル)アラニン)におけるオレフィン架橋によってヘリックスコンホメーションに構造的に制限された、配列

Ac-PQR₈ILDQHVSRVMK-NH₂ (SEQ ID NO: 13)

のステープルドペプチドが報告されている(例えば、Cui et al. *Cell Research* 23: 581 (2013)を参照されたい。この開示は参照により本明細書に組み入れられる)。このペプチドは γ -カテニン表面での結合においてアキシンと競合し、GSK3含有複合体から、このタンパク質を遊離させ、従って、この転写因子の核濃度を増やすのに役立つ。

【0241】

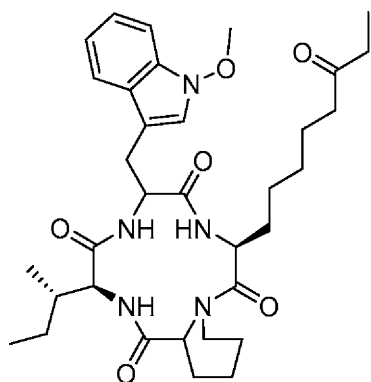
制約されたペプチドはまた、N末端とC末端との間で共有結合により環化することでも開発されている。このクラスの例示的な阻害物質には、これらのペプチドを大環状にするラクトン部分の特徴とするデブシペプチドが含まれる。本明細書に記載される組成物および方法と共に有用なデブシペプチド阻害物質には、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質、例えば、ロミデスピン(istodaxとも呼ばれる; 構造を以下に示した)が含まれる。ロミデスピンは、例えば、Vinodhkumar et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62:85 (2008)に記載され、この開示は参照により本明細書に組み入れられる。



ロミデスピン

【0242】

ヒストンデアセチラーゼのデブシペプチド阻害物質のさらなる例には、Bertrand, *European Journal of Medicinal Chemistry* 45:2095 (2010)に記載のアピシジン(Apicidin)が含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。



アピシジン

10

【0243】

エクスピボ培養中に造血幹細胞の増大、富化、および維持を誘導するのに使用することができるさらなる作用物質

エクスピボ培養中に造血幹細胞を増大させるため、富化するため、および/または維持するために、他の化合物をさらに使用することができる。これらの化合物の例には、アリール炭化水素受容体(AHR)のアンタゴニスト、例えば、ヒトCD34+末梢血および臍帯血造血幹細胞の増大および自己複製を促進する低分子であるStemRegenin 1(SR1)が含まれる。SR1は、例えば、US2014/0369973; Boitano et al. Science 1345 (2010);およびSmith et al. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 338:318 (2011)に記載されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

20

本発明の組成物および方法と共に使用することができる他のAHR阻害物質には、SR1類似体、例えば、6-アミノプリンコアの周りに様々なアリール置換基および脂肪族置換基を含有するSR1類似体(例えば、US2014/0369973に記載のもの。この開示は参照により本明細書に組み入れられる)が含まれる。AHRアンタゴニストのさらなる例には、例えば、WO2004/041758に記載のように、スチルベン誘導体(E)-1-(4'-トリフルオロメチルフェニル)-2-(3,5-ジトリフルオロメチルフェニル)-エテン、(E)-1-(4'-メトキシフェニル)-2-(3,5-ジクロロフェニル)-エテン、および(E)-1-(4'-クロロフェニル)-2-(3,5-ジクロロフェニル)-エテンが含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。AHR阻害に

30

有用な、さらなるスチルベン誘導体には、例えば、WO1999/056737に記載のように、3,5,4'-トリヒドロキシスチルベン(例えば、リスベラトロール、特に、trans-リスベラトロール);3,4,3',5'-テトラヒドロキシスチルベン(ピセアタンノールとも呼ばれる);2,3',4',5'-テトラヒドロスチルベン(オキシリスベラトロール(oxyresveratrol)とも呼ばれる);ならびに4,4'-ジヒドロキシスチルベンおよびグリコシド(例えば、そのガラクトシド、ラクトシド、マンノシド、ピセオシド(piceoside)、およびフルクトシド)が含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。別の例示的なAHRアンタゴニストは、例えば、Kim et al. Molecular Pharmacology 69:1871 (2006)ならびにWO2009/115807において詳述される、2-メチル-2H-ピラゾール-3-カルボン酸-(2-メチル-4-o-トリルアゾフェニル)-アミド(CH-223191とも呼ばれる)。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる)である。

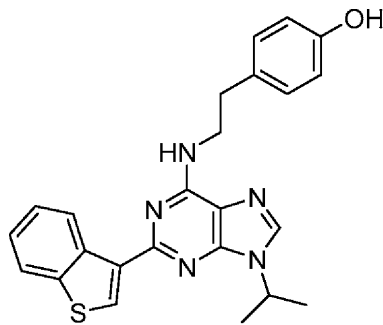
40

【0244】

本明細書に記載される組成物および方法と共にさらに使用することができるさらなる化合物にはプロスタグランジンが含まれる。特に有用なプロスタグランジンには、例えば、US8,551,782およびUS8,168,428に記載のプロスタグランジンdmPGE2が含まれる。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。本明細書に記載の組成物および方法と共に使用することができるさらなる化合物には、サーチュイン(Sirtuin)1(SIRT1)タンパク質の阻害物質、例えば、ニコチンアミド(例えば、Peled et al. Experimental Hematology 40:342 (2012)に記載)およびカンビノール(例えば、Lugrin et al. Bi

50

ochimica Biophysica Acta 1833:1498 (2013)に記載)が含まれる。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。



SR1

10

【0245】

本明細書に記載される組成物および方法と共に使用することができるさらなる作用物質には、Notchシグナル伝達経路のアクチベーターが含まれる。Notchシグナル伝達アゴニストには、Notch活性を媒介する、トポリズミック(toporythmic)タンパク質の一部を含有するタンパク質、例えば、Delta、Serrate、およびJagged(例えば、Lindsell et al., Cell 80: 909 (1995)を参照されたい。この開示は参照により本明細書に組み入れられる)、ならびに前述のタンパク質をコードする核酸、ならびにこれらのタンパク質の活性または遺伝子発現を制御するタンパク質、その核酸、低分子、または誘導体が含まれるが、これに限定されない。Notchシグナル伝達アゴニストには、機能的に活性のある断片、例えば、Notchタンパク質との結合を媒介するNotchリガンド断片を含む、タンパク質またはその誘導体もしくは断片も含まれる。

20

【0246】

Notch活性は、Notchリガンド(例えば、DeltaリガンドおよびSerrateリガンド)がNotch受容体の細胞外部分に結合することによって促進される。内因性Notchリガンドは、典型的には、隣接する細胞に膜結合される。従って、本明細書に記載される組成物および方法と共に使用するためのNotchリガンドは、可溶性タンパク質因子として溶解状態で造血幹細胞とインキュベートされてもよく、固体表面(例えば、組織培養プレート、ビーズ、またはナノマトリックス(nanomatrix))に固定化されてもよい。例えば、細胞の表面に発現している完全長Notchリガンドは、このリガンドがNotch受容体と接触すると、隣接する細胞にあるNotchシグナル伝達カスケードの活性化を誘導する。従って、本明細書に記載される組成物および方法と共に使用するためのNotchシグナル伝達アゴニストには、細胞外ドメインまたはNotch結合部分を含有する可溶性の、任意で、切断型のDeltaまたはSerrate(例えば、Jagged)分子、ならびに表面、例えば、組織培養プレート、水混和性ビーズ、またはナノマトリックスの固体表面に固定化された形のこれらのタンパク質が含まれる。このような可溶性タンパク質は、US2014/0369973に記載のように、抗体もしくは相互作用タンパク質、例えば、DeltaもしくはSerrateと一緒に融合タンパク質として発現される、エピトープタグ(例えば、抗体9E10によって認識されるmycエピトープタグ)に対して作られた抗体、またはDeltaもしくはSerrateと一緒に融合タンパク質として発現される、エピトープタグ(例えば、プロテインAが結合する、免疫グロブリンエピトープタグ)と相互作用するタンパク質によって固体表面に固定化することができる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。例示的なNotchシグナル伝達アゴニストには、US2011/0091448に記載のように、notchポリペプチド、deltexポリペプチド、mastermindポリペプチド、splitポリペプチド、hairlessポリペプチド、RBP-J ポリペプチド、またはhes1ポリペプチドが含まれる。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0247】

造血幹細胞と接触する、および例えば、細胞中のikaros転写因子メンバーのレベルを低下させる1種類または複数種類の作用物質と接触している、さらなる化合物として、作用物

50

質、例えば、前記の作用物質(例えば、AHRアンタゴニスト、例えば、SR1、任意で、AHRアンタゴニスト、dmPGE2、Notchシグナル伝達アゴニスト、および/またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミドもしくはカンビノールと組み合わせて)が含まれてもよい。例えば、これらのIkaros調節性作用物質の1つまたは複数と接触している造血幹細胞は、AHRアンタゴニスト、dmPGE2、Notchシグナル伝達アゴニスト、および/またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミドもしくはカンビノールの1つまたは複数が培養期間中に様々な時間に造血幹細胞に導入されるように、別個のインキュベーションレジメンに従って、これらの化合物とさらに接触されてもよい。または、これらの作用物質は、望ましい時に、造血幹細胞と同時にインキュベートされてもよい。

【0248】

10

説明のための例として、表2は、本明細書に記載の組成物および方法における使用のために企図される、ある特定の例示的な化合物の組み合わせを図示する。本明細書において以下に提供する組み合わせは、限定的であるように意図されない。

【0249】

(表2)

20

30

40

50

例示的な化合物の組み合わせ	
ikarosファミリー転写因子阻害物質； ヒストンメチル化モジュレーター； TGF β シグナル伝達阻害物質； p38シグナル伝達阻害物質； 古典的Wntシグナル伝達アクチベーター； ヒストンアセチル化モジュレーター； アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質；ならびに UM171および/またはその構造類似体	10
ikarosファミリー転写因子阻害物質； TGF β シグナル伝達阻害物質； アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質； UM171および/またはその構造類似体	
ikarosファミリー転写因子阻害物質； TGF β シグナル伝達阻害物質； アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質； UM171および/またはその構造類似体；ならびに以下の うちの1つまたは複数： ヒストンメチル化モジュレーター； p38シグナル伝達阻害物質； 古典的Wntシグナル伝達アクチベーター；および ヒストンアセチル化モジュレーター；	20
ikarosファミリー転写因子阻害物質；および アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質；	
ikarosファミリー転写因子阻害物質； TGF β シグナル伝達阻害物質；ならびに UM171および/またはその構造類似体	
ikarosファミリー転写因子阻害物質； TGF β シグナル伝達阻害物質；および アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質	30
ikarosファミリー転写因子阻害物質； TGF β シグナル伝達阻害物質；および アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質	
ikarosファミリー転写因子阻害物質； TGF β シグナル伝達阻害物質；および アリール炭化水素受容体シグナル伝達阻害物質	40

【 0 2 5 0 】

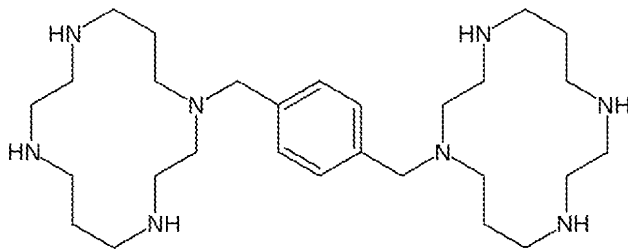
造血幹細胞の動員

本発明の組成物および方法と共に使用するための造血幹細胞は、様々な細胞タイプから生じてよい。例えば、本明細書において列挙された増大、富化、および造血幹細胞機能的能力の維持の方法において使用されるべき造血細胞は、これらの細胞が、例えば、セレブロン活性化作用物質(例えば、サリドマイド、ポマリドミド、またはレナリドミド)などの、細胞におけるikarosファミリー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質で処理される前に、単核細胞から得られてもよい。ヒト造血幹細胞は、任意で、これらの作用物質の1つまたは複数で処理される前のCD34+細胞でもよい。例えば、ヒト

造血幹細胞は、これらの作用物質の1つまたは複数で処理される前の、CD34+細胞、CD34+CD38-細胞、CD34+CD38-CD90+細胞、CD34+CD38-CD90+CD45RA-細胞、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+細胞を含む細胞表面表現型を有する集団内にあってもよい。

【0251】

造血幹細胞はさらに、ヒト骨髓に由来してもよい。または、造血幹細胞はヒト臍帯血に由来してもよく、動員末梢血に由来してもよい。ヒト末梢血から得られた造血幹細胞は様々な戦略の1つによって動員することができる。骨髓から末梢血への造血幹細胞の動員を誘導するのに使用することができる例示的な作用物質には、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)受容体4(CXCR4)アンタゴニスト、例えば、AMD3100(プレリキサフォア(Plerixafor)およびMOZOBIL(商標)(Genzyme, Boston, MA)とも知られる)ならびに顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が含まれ、これらの組み合わせは臨床実験においてCD34+細胞を急速に動員することが示されている。さらに、ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド2(CXCL2。GROとも呼ばれる)は、骨髓から末梢血に造血幹細胞動員を誘導することができる別の作用物質である。本発明の組成物および方法と共に使用するための造血幹細胞の動員を誘導することができる作用物質は互いに組み合わせて用いられてもよい。例えば、CXCR4アンタゴニスト(例えば、AMD3100)、CXCL2、および/またはG-CSFは、骨髓から末梢血への造血幹細胞の動員を誘導するために対象に連続して投与されてもよく、1つの混合物にして同時に投与されてもよい。これらの作用物質を造血幹細胞動員の誘導物質として使用することは、例えば、Pelus, Current Opinion in Hematology 15:285 (2008)に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。



AMD3100

【0252】

造血幹細胞における標的遺伝子発現の調節

本明細書に記載される組成物および方法は、造血幹細胞集団における標的遺伝子の発現を制御するための戦略をさらに提供する。例えば、造血幹細胞集団は、本明細書に記載される方法に従ってエキスピボで増大してもよい、富化されてもよい、または維持されてもよく、さらに、例えば変化した遺伝子発現パターンを示すように遺伝子組換えされてもよい。または、細胞集団は造血幹細胞について富化されてもよく、造血幹細胞集団は多能性状態で維持されてもよく、細胞は、当技術分野において公知の確立したゲノム編集法を用いて、さらに改変されてもよい。例えば、造血幹細胞内での外因性遺伝子の発現を促進するために、または内因性遺伝子の発現を阻害するためにゲノム編集手順が用いられてもよい。造血幹細胞集団は、本明細書において列挙された本明細書に記載される方法に従って増大するか、富化されるか、または多能性状態で維持され、その後に、望ましい標的遺伝子を発現するように遺伝子組換えされてもよい。または、これらの細胞の集団は、最初に、遺伝子組換えされてもよく、次いで、増大するか、富化されるか、または多能性状態で維持されてもよい。標的遺伝子の発現を容易にする目的で、このような遺伝子を細胞(例えば、哺乳動物細胞、例えば、マウス細胞またはヒト細胞)のゲノムに組み込むために数多くのいろいろな方法が確立している。

【0253】

標的遺伝子をコードするポリヌクレオチド

造血幹細胞における標的遺伝子の発現を容易にするのに使用することができるプラットフォーム

フォームの一例は、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを細胞の核ゲノムに組み込むことによるものである。外因性遺伝子を真核生物ゲノムに導入するために様々な技法が開発されている。このような技法の1つは、標的遺伝子をウイルスベクターなどのベクターに挿入することを伴う。本発明の組成物および方法と共に使用するためのベクターは、形質転換、トランスフェクション、直接的な取り込み、プロジェクティルボンバードメント(projectile bombardment)、およびリポソームへのベクターのカプセル化を含む様々な方法によって細胞に導入することができる。細胞をトランスフェクトまたは形質転換する適切な方法の例には、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、感染、リポフェクション、および直接的な取り込みが含まれる。このような方法は、例えば、Green, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth Edition, Cold Spring Harbor University Press, New York (2014); および Ausubel, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York (2015) においてさらに詳述される。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0254】

外因性遺伝子はまた、細胞膜リン脂質に向かう、関心対象の遺伝子を含むベクターを用いることによって哺乳動物細胞に導入することもできる。例えば、ベクターは、ベクター分子を、全ての細胞膜リン脂質に対して親和性を有するウイルスタンパク質であるVSV-Gタンパク質に連結することによって、細胞膜の細胞外表面にあるリン脂質に標的化することができる。VSV-Gタンパク質を含むウイルスベクターは、例えば、US5,512,421; および US5,670,354 においてさらに詳述される。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0255】

哺乳動物RNAポリメラーゼが、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを認識して、これに結合することは、遺伝子発現が起こるための重要な分子事象である。従って、RNAポリメラーゼを動員し、転写開始点において転写複合体の集合を促進する転写因子に対して高親和性を示す配列エレメントをポリヌクレオチドの中に含めてもよい。このような配列エレメントには、例えば、特異的な転写開始因子が認識および結合し、最終的には、RNAポリメラーゼが認識および結合することができる配列である哺乳動物プロモーターが含まれる。または、哺乳動物細胞において標的遺伝子を安定発現するために、ウイルスゲノムに由来するプロモーターを使用することができる。これらの酵素の哺乳動物発現を促進するのに使用することができる機能的ウイルスプロモーターの例には、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウイルス(EBV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、およびサイトメガロウイルス(CMV)プロモーターが含まれる。さらなるウイルスプロモーターには、シミアンウイルス40に由来するSV40後期プロモーター、パキウイルス多角体エンハンサー/プロモーターエレメント、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV tk)プロモーター、およびカリフラワーモザイクウイルスに由来する35Sプロモーターが含まれる。本発明の組成物および方法と共に使用するための適切なファージプロモーターには、US5,547,892に記載のように、大腸菌(*E.coli*)T7およびT3ファージプロモーター、*S.チフィリウム*(*typhimurium*)ファージSP6プロモーター、*B.サブティリス*(*subtilis*)SP01ファージおよび*B.サブティリス*ファージphi29プロモーター、ならびにN4ファージおよびK11ファージプロモーターが含まれるが、これに限定されない。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

【0256】

標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドが細胞のゲノム(例えば、造血幹細胞の核ゲノム)に組み込まれると、当技術分野において公知の方法によって、このポリヌクレオチドの転写を誘導することができる。例えば、発現は、哺乳動物細胞を外部化学試薬、例えば、転写因子および/またはRNAポリメラーゼと哺乳動物プロモーターとの結合を調節し、従っ

50

て、遺伝子発現を制御する作用物質に曝露することによって誘導することができる。化学試薬は、例えば、哺乳動物プロモーターに結合したリプレッサータンパク質を除去することによって、RNAポリメラーゼおよび/または転写因子と哺乳動物プロモーターとの結合を容易にするのに役立つ。または、化学試薬は、哺乳動物プロモーターの下流に配置された遺伝子の転写速度が化学試薬の存在下では増加するように、RNAポリメラーゼおよび/または転写因子に対する哺乳動物プロモーターの親和性を増強するのに役立つ。上述の機構によってポリヌクレオチド転写を増強する化学試薬の例にはテトラサイクリンおよびドキシサイクリンが含まれる。これらの試薬は市販されており(Life Technologies, Carlsbad, CA)、確立したプロトコールに従って遺伝子発現を促進するために哺乳動物細胞に投与することができる。

10

【0257】

本発明の組成物および方法と共に使用するためにポリヌクレオチドに含まれ得る他のDNA配列エレメントにはエンハンサー配列が含まれる。エンハンサーは、転写開始部位での転写因子およびRNAポリメラーゼの結合に好ましい三次元方向をDNAがとるように、関心対象の遺伝子を含むポリヌクレオチドのコンホメーション変化を誘導する別のクラスの制御エレメントである。従って、本発明の組成物および方法と共に使用するためのポリヌクレオチドは、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含み、哺乳動物エンハンサー配列をさらに含む。現在、哺乳動物遺伝子に由来する多くのエンハンサー配列が公知であり、例には、哺乳動物グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインシュリンをコードする遺伝子に由来するエンハンサーが含まれる。本発明の組成物および方法と共に使用するためのエンハンサーには、真核細胞に感染することができるウイルスの遺伝物質に由来するエンハンサーも含まれる。例には、複製起点の後期側にあるSV40エンハンサー(bp100~270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物遺伝子転写の活性化を誘導するさらなるエンハンサー配列は、Yaniv, et al., Nature, 297:17 (1982)に開示される。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。エンハンサーはスプライスされて、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターに、例えば、この遺伝子の5'側または3'側の位置に入れられてもよい。好ましい方向で、エンハンサーはプロモーターの5'側に配置され、次に、プロモーターは、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドに対して5'側に配置される。

20

30

【0258】

速い転写速度および翻訳速度を促進することに加えて、造血幹細胞における外因性遺伝子の安定発現を、この遺伝子を含むポリヌクレオチドを細胞の核DNAに組み込むことによって成し遂げることができる。外因性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを哺乳動物細胞の核DNAに送達する、および組み込むための様々なベクターが開発されている。発現ベクターの例は、例えば、WO1994/11026に開示される。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。本発明の組成物および方法と共に使用するための発現ベクターは、標的遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列、ならびに、例えば、これらの酵素の発現および/または哺乳動物細胞ゲノムへの、これらのポリヌクレオチド配列の組み込みに用いられる、さらなる配列エレメントを含有する。標的遺伝子の発現に使用することができる、ある特定のベクターには、遺伝子転写を誘導する制御配列、例えば、プロモーターおよびエンハンサー領域を含有するプラスミドが含まれる。標的遺伝子を発現させるための他の有用なベクターは、これらの遺伝子の翻訳速度を増強するか、または遺伝子転写に起因するmRNAの安定性もしくは核外輸送を改善する、ポリヌクレオチド配列を含有する。これらの配列エレメントは、発現ベクターに載せて運ばれる遺伝子の効率的な転写を誘導するために、RNA転写物内に、核外輸送、サイトゾル半減期、およびこれらの分子のリボソーム親和性を増強する特徴、例えば、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域、配列内リボソーム進入部位(IRES)、ならびにポリアデニル化シグナル部位をコードすることが多い。例示的な発現ベクターはまた、このようなベクターを含有する細胞を選択するためのマーカーをコードするポリヌクレオチドも含有してよい。適切なマーカーの非限定的な例には、抗

40

50

生物質、例えば、アンピシリン、クロラムフェニコール、カナマイシン、またはノーセオスリシン(nourseothricin)に対する耐性をコードする遺伝子が含まれる。

【0259】

標的遺伝子の発現のためのベクター

ウイルスゲノムは、外因性遺伝子を哺乳動物細胞に効率的に送達するのに使用することができる豊富なベクター供給源を提供する。ウイルスゲノムは遺伝子送達に特に有用なベクターである。なぜなら、このようなゲノムに含まれるポリヌクレオチドは、典型的には、一般的な形質導入または特殊な形質導入によって哺乳動物細胞の核ゲノムに組み込まれるからである。これらのプロセスは天然のウイルス複製サイクルの一部として行われ、遺伝子組み込みを誘導するために追加のタンパク質または試薬を必要としないことが多い。ウイルスベクターの例には、レトロウイルス、アデノウイルス(例えば、Ad5、Ad26、Ad34、Ad35、およびAd48)、パルボウイルス(例えば、アデノ随伴ウイルス)、コロナウイルス、マイナス鎖RNAウイルス、例えば、オルソミクソウイルス(例えば、インフルエンザウイルス)、ラプトウイルス(例えば、狂犬病ウイルスおよび水疱性口内炎ウイルス)、パラミクソウイルス(例えば、麻疹およびセンダイ)、プラス鎖RNAウイルス、例えば、ピコルナウイルスおよびアルファウイルス、ならびにヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス1型および2型、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス)ならびにボックスウイルス(例えば、ワクシニア、改変ワクシニアアンカラ(MVA)、鶏痘、およびカナリアボックス)を含む二本鎖DNAウイルスが含まれる。他のウイルスには、例えば、ノーウォークウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、パポバウイルス、ヘパドナウイルス、および肝炎ウイルスが含まれる。レトロウイルスの例には、トリ白血病肉腫ウイルス、哺乳動物C型、B型ウイルス、D型ウイルス、HTLV-BLV群、レンチウイルス、スプーマウイルスが含まれる(Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996。この開示は参照により本明細書に組み入れられる)。ウイルスベクターの他の例には、マウス白血病ウイルス、マウス肉腫ウイルス、マウス乳癌ウイルス、ウシ白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス、トリ白血病ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、ヒビ内因性ウイルス、テナガザル白血病ウイルス、マソン・ファイザー(Mason Pfizer)サルウイルス、サル免疫不全ウイルス、サル肉腫ウイルス、ラウス肉腫ウイルス、およびレンチウイルスが含まれる。ベクターの他の例は、例えば、US5,801,030に記載されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0260】

さらなるトランスフェクション方法

ポリヌクレオチド、例えば、DNAまたはRNA(例えば、mRNA、tRNA、siRNA、miRNA、shRNA、化学修飾RNA)を哺乳動物細胞に導入するのに使用することができる他の技法は当技術分野において周知である。例えば、エレクトロポレーションを用いて、静電ポテンシャルを加えることによって哺乳動物細胞を透過処理することができる。このように外部電場に加えられた哺乳動物細胞、例えば、造血幹細胞は、後で、外因性核酸を取り込みやすくなる。哺乳動物細胞のエレクトロポレーションは、例えば、Chu et al. Nucleic Acids Research 15:1311 (1987)に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。同様の技法であるNucleofection(商標)では、真核細胞の核への外因性ポリヌクレオチドの更新(update)を刺激するために電場印加を利用する。この技法を行うのに有用なNucleofection(商標)およびプロトコールは、例えば、Distler et al. Experimental Dermatology 14:315 (2005)ならびにUS2010/0317114に詳述されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0261】

造血幹細胞のトランスフェクションに有用なさらなる技法にはスクイーズポレーション法が含まれる。この技法は、印加されたストレスにตอบสนองして形成する膜の孔を通して外因性DNAが取り込まれるのを刺激するために細胞の迅速な機械的変形を誘導する。この技術は

10

20

30

40

50

、核酸を造血幹細胞などの細胞に送達するためにベクターが必要とされない点で有利である。スクイズポレーションは、例えば、Sharei et al. *Journal of Visualized Experiments* 81:e50980 (2013)に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0262】

リポフェクションは、造血幹細胞のトランスフェクションに有用な別の技法である。この方法は、核酸をリポソームに積み込む工程を伴う。このリポソームは、リポソーム外部に向かって、カチオン性官能基、例えば、第4級アミンまたはプロトン化アミンを提示することが多い。細胞膜がアニオン性であるので、これにより、リポソームと細胞との間の静電相互作用が促進され、最終的に、例えば、リポソームと細胞膜との直接的な融合によって、または複合体のエンドサイトーシスによって外因性核酸が取り込まれる。リポフェクションは、例えば、US7,442,386に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。外来核酸の取り込みを誘発するために細胞膜とのイオン相互作用を利用する同様の技法には、細胞とカチオン性ポリマー-核酸複合体との接触が含まれる。細胞膜との相互作用に好ましい正電荷を付与するようにポリヌクレオチドと会合する例示的なカチオン性分子には、活性化デンドリマー(例えば、Dennig, *Topics in Current Chemistry* 228:227 (2003)に記載される。この開示は参照により本明細書に組み入れられる)およびジエチルアミノエチル(DEAE)-デキストランが含まれる。トランスフェクション剤としての、この使用は、例えば、Gulick et al. *Current Protocols in Molecular Biology* 40:1:9.2:9.2.1 (1997)に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。磁気ビーズは、この方法では、核酸の取り込みを誘導するために磁場印加を利用するので、穏やかで、かつ効率的なやり方で造血幹細胞をトランスフェクトするのに使用することができる別のツールである。この技術は、例えば、US2010/0227406に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0263】

造血幹細胞による外因性核酸の取り込みを誘導するのに有用な別のツールは、細胞を穏やかに透過処理し、ポリヌクレオチドが細胞膜に浸透するようにするために、特定の波長の電磁放射線に細胞を曝露することを伴う技法であるレーザーフェクションである。この技法は、例えば、Rhodes et al. *Methods in Cell Biology* 82:309 (2007)に詳述されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0264】

マイクロベシクルは、本明細書に記載の本発明の方法に従って造血幹細胞ゲノムを改変するのに使用することができる可能性のある別のビヒクルである。例えば、遺伝子または制御配列などの関心対象のポリヌクレオチドを共有結合によって組み込むために細胞ゲノムを調製する目的で、糖タンパク質VSV-Gと、例えば、ゲノム改変タンパク質、例えば、ヌクレアーゼとの同時過剰発現によって誘導されたマイクロベシクルを用いて、内因性ポリヌクレオチド配列の部位特異的切断を後で触媒するタンパク質を細胞に効率的に送達することができる。真核細胞の遺伝子組換えのための、ジェシクルとも呼ばれる、このような小胞の使用は、例えば、Quinn, TP, et al. *Genetic Modification of Target Cells by Direct Delivery of Active Protein* [abstract]. In: *Methylation changes in early embryonic genes in cancer* [abstract], in: *Proceedings of the 18th Annual Meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy*; 2015 May 13, Abstract No. 122に詳述されている。

【0265】

遺伝子編集法による標的遺伝子の組み込み

ウイルスベクターに加えて、外因性遺伝子を造血幹細胞に組み込むのに使用することができる様々なさらなるツールが開発されている。標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを造血幹細胞に組み込むのに使用することができる、このような方法の1つはトランスポゾンを使用することを伴う。トランスポゾンは、トランスポザーゼ酵素をコードし、5'切除部位および3'切除部位に隣接する関心対象のポリヌクレオチド配列または遺伝子を含む

するポリヌクレオチドである。トランスポゾンが細胞に送達されると、トランスポザーゼ遺伝子の発現が開始し、トランスポゾンから関心対象の遺伝子を切断する活性酵素を生じる。この活性は、トランスポザーゼがトランスポゾン切除部位を部位特異的に認識することによって媒介される。ある特定の場合では、これらの切除部位は末端反復でもよく逆位末端配列でもよい。関心対象の遺伝子はトランスポゾンから切除されると、哺乳動物細胞の核ゲノム内に存在する同様の切除部位の、トランスポザーゼによって触媒される切断によって哺乳動物細胞ゲノムに組み込むことができる。これにより、切断された核DNAの相補的な切除部位に関心対象の遺伝子が挿入され、その後に、関心対象の遺伝子を哺乳動物細胞ゲノムのDNAにつなぐホスホジエステル結合の共有結合連結によって組み込みプロセスが完了する。ある特定の場合では、トランスポゾンは、標的遺伝子をコードする遺伝子が最初にRNA生成物に転写され、次いで、DNAに逆転写された後に、哺乳動物細胞ゲノムに組み込まれるようなレトロトランスポゾンでもよい。例示的なトランスポゾン系には、piggybacトランスポゾン(例えば、WO2010/085699において詳述される)およびsleeping beautyトランスポゾン(例えば、US2005/0112764において詳述される)が含まれる。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0266】

標的遺伝子を造血幹細胞ゲノムに組み込むのに有用な別のツールは、元々、ウイルス感染に対する細菌および古細菌の適応防御機構として進化した系である、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)(CRISPR)/Cas系である。CRISPR/Cas系は、プラスミドDNA内の回文配列リピート配列と、関連するCas9ヌクレアーゼを含む。この一組のDNAとタンパク質は、最初に、外来DNAをCRISPR遺伝子座に組み込むことによって、標的配列の部位特異的なDNA切断を誘導する。次に、これらの外来配列を含有するポリヌクレオチドと、CRISPR遺伝子座のリピート-スパーエメントはガイドRNAを作り出すために宿主細胞内で転写され、その後に、ガイドRNAは標的配列にアニールして、この部位にCas9ヌクレアーゼを局在化することができる。このように、高度に部位特異的なcas9を介したDNA切断は外来ポリヌクレオチドにおいて起こすことができる。なぜなら、cas9を標的DNA分子に近づける相互作用はRNA:DNAハイブリダイゼーションによって支配されるからである。結果として、理論上では、関心対象の任意の標的DNA分子を切断するようにCRISPR/Cas系を設計することができる。この技法は真核生物ゲノムを編集するために利用されており(Hwang et al. Nature Biotechnology 31:227 (2013))、DNAを切断した後に、標的遺伝子をコードする遺伝子を組み込むために造血幹細胞ゲノムを部位特異的に編集する効率的な手段として使用することができる。遺伝子発現を調節するためにCRISPR/Casを使用することは、例えば、US8,697,359において説明されている。この開示は参照により本明細書に組み入れられる。造血幹細胞においてゲノムDNAを部位特異的に切断した後に関心対象の遺伝子を組み込むための代替方法には、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)と転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)を使用することが含まれる。CRISPR/Cas系とは異なり、これらの酵素は、特異的な標的配列に局在させるためにガイドポリヌクレオチドを含有しない。その代わりに、標的特異性は、これらの酵素内のDNA結合ドメインによって制御される。ゲノム編集用途におけるZFNとTALENの使用は、例えば、Urnov et al. Nature Reviews Genetics 11:636 (2010)およびJoung et al. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14:49 (2013)に記載されている。これらの両方の開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0267】

標的遺伝子をコードするポリヌクレオチドを造血幹細胞ゲノムに組み込むのに使用することができるさらなるゲノム編集法には、ゲノムDNAを部位特異的に切断するように合理的に設計することができるARCUS(商標)メガヌクレアーゼを使用することが含まれる。このような酵素について証明されている、規定された構造活性相関を考慮すると、標的遺伝子をコードする遺伝子を哺乳動物細胞ゲノムに組み込むために、これらの酵素を使用することは有利である。DNAの望ましい場所を選択的に切断して、標的遺伝子を造血幹細胞の核

10

20

30

40

50

DNAに部位特異的に組み込むのを可能にするヌクレアーゼを作り出すために、単鎖メガヌクレアーゼを、ある特定のアミノ酸位置において改変することができる。これらの単鎖ヌクレアーゼは、例えば、US8,021,867およびUS8,445,251において広範に説明されている。これらのそれぞれの開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【0268】

造血幹細胞の分化の誘導

ある特定の場合では、本発明の方法に従って造血幹細胞集団を増大させるか、富化するか、または維持し、その後に、これらの細胞が造血レパートリーの血球に分化するのを誘導した後に、結果として生じた細胞をレシピエントに注入することが望ましい場合がある。これは、特定の血球タイプを、この血球タイプを必要とするレシピエントに投与するのに有用なパラダイムである。本発明の方法に従って増大し、富化され、かつ/または維持されている造血幹細胞集団は、これらの細胞が造血系統の細胞に分化するのを刺激するために、様々な条件、例えば、当技術分野において公知の条件に供されてもよい。例えば、確立したプロトコルを用いて、多数の血球タイプの1つ、例えば、リンパ系共通前駆細胞、骨髄系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髄球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、例えば、NK細胞、B細胞、およびT細胞に分化するように造血幹細胞を誘導することができる。

【0269】

造血幹細胞療法の適応症

本発明の組成物および方法の使用によって作製された(例えば、増大した、富化された、または多分化能状態に維持された)造血幹細胞は様々なヒト疾患を処置するのに使用することができる。患者に投与される造血幹細胞またはその子孫は自己由来でもよく、同系でもよく、同種異系でもよく、インビボで造血幹細胞の増大を促進する1種類または複数種類の作用物質と共に投与されてもよい。例えば、造血幹細胞またはその子孫は、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、骨髄異形成症候群(MDS)、多発性骨髄腫、再生不良性貧血、骨髄機能不全、骨髄増殖性疾患、例えば、骨髄線維症、本態性血小板減少症、または真性赤血球増加症、ファンコーニ貧血、先天性角化不全症、分類不能型免疫不全(CVID、例えば、CVID 1、CVID 2、CVID 3、CVID 4、CVID 5、およびCVID 6)、血球貪食性リンパ組織球症、固形腫瘍、例えば、神経芽細胞腫、生殖細胞腫瘍、乳癌、ウィルムス腫瘍、髄芽細胞腫、および神経外胚葉性腫瘍、自己免疫疾患、例えば、強皮症、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、またはI型糖尿病、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、またはタンパク質欠乏症、例えば、副腎脳白質ジストロフィー(ALD)、異染性白質ジストロフィー(MLD)、血友病AおよびB、ハーラー症候群、ハンター症候群、ファブリー病、ゴーシェ病、表皮水疱症、アミロイドーシス、グロバイド細胞白質ジストロフィー、サンフィリポ症候群、ならびにモルキオ症候群などの疾患を処置するために患者(例えば、ヒト患者)に投与されてもよい。

【0270】

造血幹細胞またはその子孫はまた、遺伝的血液障害、例えば、鎌状赤血球性貧血、サラセミア、サラセミア、サラセミア、ヘモグロビンE/サラセミア、ヘモグロビンS/サラセミア、ヘモグロビンC/サラセミア、ヘモグロビンD/サラセミア、慢性肉芽腫症(X連鎖性慢性肉芽腫症、常染色体劣性(AR)慢性肉芽腫症、慢性肉芽腫症AR I NCF1、慢性肉芽腫症AR CYBA、慢性肉芽腫症AR II NCF2、慢性肉芽腫症AR III NCF4)、X連鎖重症複合免疫不全(SCID)、ADA SCID、IL7-RA SCID、CD3 SCID、Rag1/Rag2 SCID、Artemis SCID、CD45 SCID、Jak3 SCID、先天性顆粒球減少症、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN1、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN2、家族性血球貪食性リンパ組織球症(FHL)、家族性血球貪食性リンパ組織球症2型(FHL2、パーフォリン変異)、無グロブリン血症(X連鎖性無グロブリン血症)、ウィスコット・オールドリッチ症候群、チ

10

20

30

40

50

エディアック・東症候群、赤血球ピルビン酸キナーゼ欠損症による溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症、X連鎖性副腎脳白質ジストロフィー(X-ALD)、X連鎖性リンパ球増殖性疾患、単中心性キャッスルマン病、多中心性キャッスルマン病、先天性無巨核球性血小板減少症(CAMT)I型、細網異形成症、ファンコーニ貧血、後天性特発性鉄芽球性貧血、全身性肥満細胞症、フォン・ヴィルブランド病(VWD)、先天性赤血球異形成貧血2型、軟骨毛髪形成不全症候群、遺伝性球状赤血球症、ブラックファン・ダイヤモンド症候群、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、血小板減少-橈骨欠損症候群、大理石骨病、小児型大理石骨病、ムコ多糖症、レッシュ・ナイハン症候群、糖原貯蔵症、先天性肥満細胞症、オーメン症候群、X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症(IPEX)、FOXP3変異を特徴とするIPEX、X連鎖多発性内分泌障害・免疫機能不全・下痢症候群(XPID)、X連鎖自己免疫・アレレギー性調節異常症候群(XLAAD)、IPEX様症候群、高IgM 1型、高IgM 2型、高IgM 3型、高IgM 4型、高IgM 5型、X連鎖性高免疫グロブリンM、裸リンパ球症候群I型、および裸リンパ球症候群II型(裸リンパ球症候群II型、MHCクラスI欠損症;裸リンパ球症候群II型、相補群A;裸リンパ球症候群II型、相補群C;裸リンパ球症候群II型、相補群D;裸リンパ球症候群II型、相補群E)を処置するためにヒト患者に投与することもできる。本発明の組成物および/または方法によって増大した、富化された、または維持された造血幹細胞集団ならびにその子孫はまた、造血リンパ組織悪性腫瘍、非造血リンパ組織悪性腫瘍、またはタンパク質欠乏症に罹患している患者を処置するのに使用することもできる。他の態様において、患者は組織移植レシピエントでも細胞移植レシピエントでもよく、造血幹細胞またはその子孫は、移植された組織または細胞に対する寛容を誘導するために投与される。

10

20

【0271】

本願全体を通して引用された、参照文献、発行された特許、公開された特許出願、および同時継続中の特許出願を含む、特許および他の刊行物は全て、説明および開示する目的で、例えば、本明細書に記載の技術と共に用いられ得る、このような刊行物に記載の方法を説明および開示する目的で参照により本明細書に明確に組み入れられる。これらの刊行物は本願の出願日前の刊行物の開示のためだけに提供される。この点に関して、先行発明によって、または他の任意の理由により本発明者らがこのような開示に先行する権利がないと認められると解釈されるものは何もない。日付に関する記載またはこれらの文書の内容に関する表記は全て出願人が入手可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正確さに関する是認を構成するものではない。

30

【0272】

本開示の態様の説明は網羅的であることも、開示された厳密な形態に本開示を限定することも意図されない。本開示の特定の態様および実施例は例示目的で本明細書において説明されたが、関連する技術分野の当業者が認めるように、様々な等価な修正が本開示の範囲内で可能である。例えば、方法の工程または機能が、ある特定の順序で示されたが、代わりの態様が異なる順序で機能を果たしてもよく、実質的に同時に機能が成し遂げられてもよい。本明細書において提供される本開示の開示は、適宜、他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載の様々な態様を組み合わせ、さらなる態様を提供することができる。必要であれば、上記の参照文献および出願の組成物、機能、および概念を用いるように、本開示の局面を修正して、本開示のなおさらなる態様を提供することができる。さらに、生物学的機能同等性の考えにより、種類または量の点で生物作用または化学作用に影響を及ぼすことなくタンパク質構造にいくらかの変化を加えることができる。詳細な説明を考慮して、これらの変更および他の変更を本開示に加えることができる。このような修正は全て、添付の特許請求の範囲の中に含まれることが意図される。

40

【0273】

前述のどの態様の特定の要素も他の態様の要素と組み合わせることができるか、または他の態様の要素の代わりに使用することができる。さらに、これらの態様の文脈において、本開示のある特定の態様に関連する利点が説明されたが、他の態様もこのような利点を示してもよく、全ての態様が、必ず、本開示の範囲内にある、このような利点を示す必要があるとは限らない。

50

【 0 2 7 4 】

本明細書に記載される技術のいくつかの態様は、以下の番号付された項目のうちのいずれかに従って定義することが

1. 造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

2. 造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

10

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

3. 造血幹細胞集団を、細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

4. 前記造血幹細胞集団におけるNotch標的遺伝子の発現を、前記第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団と比べて増加させるのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質が存在する、項目1～3のいずれか一つに記載の方法。

20

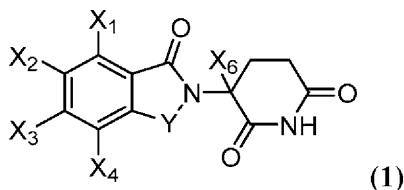
5. 前記Notch標的遺伝子が、Hes1およびMycからなる群より選択される、項目4に記載の方法。

6. 前記ikarosファミリーメンバー転写因子が、ikaros、aiolos、およびheliosからなる群より選択される、項目1～5のいずれか一つに記載の方法。

7. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、該ikarosファミリーメンバー転写因子のユビキチン結合を促進する、項目1～6のいずれか一つに記載の方法。

30

8. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される化合物を含む、項目1～7のいずれか一つに記載の方法：



式中、

40

Yは、C=OまたはCH₂であり；

X₁、X₂、X₃、およびX₄のそれぞれは、独立して水素または-NHX₅であり；

X₅は、水素または1～8個の炭素原子のアルキル基であり；かつ

X₆は、水素、1～8個の炭素原子のアルキル基、ベンジル基、またはハロゲン原子である。

9. 式(1)によって表される前記化合物が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、項目8に記載の方法。

10. 前記造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、および表1に列挙した化合物より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程をさらに含む、項目1～9のいずれか一つに記載の方法。

11. 表1に列挙した前記1種類または複数種類の化合物がUM171を含む、項目10に記載

50

の方法。

12. 前記造血幹細胞集団を、TGF シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目1～11のいずれか一つに記載の方法。

13. TGF シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質が、TGF 受容体阻害物質を含む、項目12に記載の方法。

14. 前記TGF 受容体阻害物質が、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、項目13に記載の方法。

15. 前記TGF 受容体阻害物質がA83-01である、項目14に記載の方法。

16. 前記造血幹細胞集団を、ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目1～15のいずれか一つに記載の方法。

17. ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンメチル化を活性化するか、ヒストンメチル化を維持するか、またはヒストン脱メチル化を阻害する、項目16に記載の方法。

18. ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンデメチラーゼ阻害物質を含む、項目16または17に記載の方法。

19. 前記ヒストンデメチラーゼ阻害物質がLSD1阻害物質である、項目18に記載の方法。

20. 前記LSD1阻害物質が、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される、項目19に記載の方法。

21. 前記LSD1阻害物質がトラニルシプロミンである、項目20に記載の方法。

22. 前記造血幹細胞集団を、ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目1～21のいずれか一つに記載の方法。

23. ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンアセチル化を活性化するか、ヒストンアセチル化を維持するか、またはヒストン脱アセチル化を阻害する、項目22に記載の方法。

24. ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストン脱アセチル化阻害物質を含む、項目22または23に記載の方法。

25. 前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質が、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される、項目24に記載の方法。

26. 前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質がトリコスタチンAである、項目25に記載の方法。

27. 前記造血幹細胞集団を、

a. p38シグナル伝達の阻害;および

b. 古典的Wntシグナル伝達の活性化

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目1～26のいずれか一つに記載の方法。

28. 前記造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目1～27のいずれか一つに記載の方法。

29. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質がSR1を含む、項目28に記載の方法。

30. 造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンメチル化の調節;

b. TGF シグナル伝達の阻害;

c. p38シグナル伝達の阻害;

d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;

e. ヒストンアセチル化の調節;および

f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類

10

20

30

40

50

の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

31. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;
- e. ヒストンアセチル化の調節;および
- f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

10

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

32. 第1の造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;
- e. ヒストンアセチル化の調節;および
- f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達の阻害

20

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

33. 造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

30

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

40

34. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

50

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

35. 第1の造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF β シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1つまたは複数の作用を示す1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程

10

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

36. 造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

37. 造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

20

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

38. 第1の造血幹細胞集団を、セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

30

39. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される、項目36~38のいずれか一つに記載の方法。

40. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、ボマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、項目39に記載の方法。

41. 前記造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と接触させる工程をさらに含む、項目36~40のいずれか一つに記載の方法。

42. 前記造血幹細胞集団を、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF β 受容体阻害物質と接触させる工程をさらに含む、項目36~41のいずれか一つに記載の方法。

40

43. 前記造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシブロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、項目36~42のいずれか一つに記載の方法。

44. 前記造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、項目36~43のいずれか一つに記載の方法。

45. 前記造血幹細胞集団を、

- a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに

50

b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 β -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目36~44のいずれか一つに記載の方法。

46. 前記造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程をさらに含む、項目36~45のいずれか一つに記載の方法。

47. アリール炭化水素受容体を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質がSR1を含む、項目46に記載の方法。

48. 前記造血幹細胞集団を、BMPシグナル伝達を阻害する化合物と接触させる工程をさらに含む、項目36~47のいずれか一つに記載の方法。

49. 造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

50. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

51. 第1の造血幹細胞集団を、表1に列挙した1種類または複数種類の化合物、ならびに

a. ヒストンデメチラーゼ;

b. TGF β シグナル伝達を伝えるタンパク質;

c. p38シグナル伝達を伝えるタンパク質;

d. β -カテニン分解を促進するタンパク質;

e. ヒストンデアセチラーゼ;および

f. アリール炭化水素受容体

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の化合物および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法。

10

20

30

40

50

52. 造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

10

53. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

20

54. 第1の造血幹細胞集団を、アリール炭化水素受容体を阻害する1種類または複数種類の作用物質、ならびに

- a. ヒストンメチル化の調節;
- b. TGF シグナル伝達の阻害;
- c. p38シグナル伝達の阻害;
- d. 古典的Wntシグナル伝達の活性化;および
- e. ヒストンアセチル化の調節

からなる群より選択される1種類または複数種類のタンパク質の作用を阻害する1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法。

30

55. 造血幹細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエクスピボで作製する方法。

56. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエクスピボで富化する方法。

40

57. 第1の造血幹細胞集団を、式(1)によって表される化合物と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが第1の作用物質および第2の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エクスピボで維持する方法。

58. 式(1)によって表される前記化合物が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、項目55~57のいずれか一つに記載の方法。

59. 前記造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と

50

接触させる工程をさらに含む、項目55～58のいずれか一つに記載の方法。

60. 前記造血幹細胞集団を、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質と接触させる工程をさらに含む、項目55～59のいずれか一つに記載の方法。

61. 前記造血幹細胞集団を、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、項目55～60のいずれか一つに記載の方法。

62. 前記造血幹細胞集団を、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質と接触させる工程をさらに含む、項目55～61のいずれか一つに記載の方法。

10

63. 前記造血幹細胞集団を、

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに
b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物

からなる群より選択される1種類または複数種類の化合物と接触させる工程をさらに含む、項目55～62のいずれか一つに記載の方法。

64. 前記造血幹細胞集団をSR1と接触させる工程をさらに含む、項目55～63のいずれか一つに記載の方法。

65. 造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と;ならびに

20

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

30

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物、および該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

66. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と;ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

40

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、

50

該UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物、および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

67. 第1の造血幹細胞集団を、UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と;ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

f. SR1を含む、アリール炭化水素受容体阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該UM171および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

68. 造血幹細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該SR1および該1種類または複数種類の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

69. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、-カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該SR1および該1種類または複数種類の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、前記工程を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスビボで富化する方法。

70. 第1の造血幹細胞集団を、SR1と、ならびに

a. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;

c. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;

d. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 β -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物;ならびに

e. トリコスタチンA、バルプロ酸、プチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質と接触させる工程であって、該第1の造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該第1の造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該SR1および該1種類または複数種類の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を少なくとも2日間エキスビボで維持する方法。

71. 7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、該1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触されていない造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、前記細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目1~70のいずれか一つに記載の方法。

72. 7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、前記細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目1~70のいずれか一つに記載の方法。

73. 7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、該1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触されていない造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について前記細胞集団を富化するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目1~70のいずれか一つに記載の方法。

74. 7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニストと接触された、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンピノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について前記細胞集団を富化するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目1~70のいずれか一つに記載の方法。

75. 前記第1の造血幹細胞集団が、3日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、前記対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力より優れた造血幹細胞機能的能力を示す、項目3、32、35、38、51、54、57、67、および70のいずれか一つに記載の方法。

10

20

30

40

50

76. 前記造血幹細胞が哺乳動物細胞である、項目1～75のいずれか一つに記載の方法。
77. 前記哺乳動物細胞がヒト細胞である、項目76に記載の方法。
78. 前記造血幹細胞がCD34+細胞である、項目77に記載の方法。
79. 前記CD34+細胞の少なくとも10%が、CD34+細胞、CD34+CD38-細胞、CD34+CD38-CD90+細胞、CD34+CD38-CD90+CD45RA-細胞、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+細胞である、項目78に記載の方法。
80. 前記造血幹細胞がヒト臍帯血に由来する、項目76～78のいずれか一つに記載の方法。
81. 前記造血幹細胞がヒトの動員末梢血に由来する、項目76～78のいずれか一つに記載の方法。 10
82. 前記造血幹細胞がヒト骨髓に由来する、項目76～78のいずれか一つに記載の方法。
83. 前記造血幹細胞がヒトから新たに単離されたものである、項目76～82のいずれか一つに記載の方法。
84. 前記造血幹細胞が以前に凍結保存されていたものである、項目76～83のいずれか一つに記載の方法。
85. 前記哺乳動物細胞がマウス細胞である、項目76に記載の方法。
86. 前記造血幹細胞が、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養される、項目1～85のいずれか一つに記載の方法。
87. 前記造血幹細胞が、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する、項目1～86のいずれか一つに記載の方法。 20
88. 前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と同時に接触される、項目1～87のいずれか一つに記載の方法。
89. 前記造血幹細胞が、異なる時間に前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触される、項目1～87のいずれか一つに記載の方法。
90. 前記造血幹細胞が、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、造血幹細胞機能的能力を維持する、項目1～89のいずれか一つに記載の方法。 30
91. 前記造血幹細胞が、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、移植後に造血幹細胞機能的能力を維持する、項目90に記載の方法。
92. 前記造血幹細胞が、2日間(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)の培養の後、長期生着能を維持する、項目1～91のいずれか一つに記載の方法。
93. 患者に移植されると、前記造血幹細胞が、好中球、血小板、赤血球、単球、マクロファージ、抗原提示細胞、小グリア細胞、破骨細胞、樹状細胞、およびリンパ球からなる群より選択される細胞の集団の回復を生じさせる、項目1～92のいずれか一つに記載の方法。 40
94. 前記リンパ球が、ナチュラルキラー細胞、T細胞(例えば、CD4+細胞またはCD8+細胞)、およびB細胞からなる群より選択される、項目93に記載の方法。
95. 前記造血幹細胞が、移植されたレシピエントにおいて造血組織に局在して生産的造血を再度確立することができる、項目1～94のいずれか一つに記載の方法。
96. 前記造血幹細胞が、プラスチック表面上で、またはビトロネクチン、フィブロネクチン、もしくはマトリゲルを含む支持体上で培養される、項目1～95のいずれか一つに記載の方法。
97. 前記造血幹細胞が、2～20%酸素の存在下で培養される、項目1～96のいずれか一つに記載の方法。
98. 前記造血幹細胞が、2～12%酸素の存在下で培養される、項目97に記載の方法。 50

99. 前記造血幹細胞が、約5%酸素の存在下で培養される、項目98に記載の方法。

100. 前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物で処理される前に、単核細胞画分中に元々存在する、項目1~99のいずれか一つに記載の方法。

101. 前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する前に、CD34+、CD34+CD38-、CD34+CD38-CD90+、CD34+CD38-CD90+CD45RA-、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+、またはCD34+CD38-CD90+CD45RA-CD49F+EPCR+富化細胞画分中に元々存在する、項目1~99のいずれか一つに記載の方法。

102. 前記造血幹細胞が、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触する前に、非富化細胞画分中に元々存在する、項目1~99のいずれか一つに記載の方法。

10

103.

a. ポリヌクレオチドを造血幹細胞集団に挿入する工程;ならびに

b. 項目1、30、33、36、49、52、55、65、および68のいずれか一つに記載の方法に従って該造血幹細胞集団を増大させるか、または項目3、32、35、38、51、54、57、67、および70~102のいずれか一つに記載の方法に従って該造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持する工程

を含む、該ポリヌクレオチドを該造血幹細胞集団に導入する方法。

104. (a)が(b)より先行する、項目103に記載の方法。

105. (b)が(a)より先行する、項目103に記載の方法。

106. 前記細胞中で核酸を切断する1種類または複数種類の試薬を提供する工程を含む、項目103~105のいずれか一つに記載の方法。

20

107. 前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の試薬がジンクフィンガーヌクレアーゼを含む、項目106に記載の方法。

108. 前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の試薬が転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼを含む、項目106に記載の方法。

109. 前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の試薬がCRISPR関連タンパク質を含む、項目106に記載の方法。

110. 前記細胞中で核酸を切断する前記1種類または複数種類の作用物質がメガヌクレアーゼを含む、項目106に記載の方法。

111. 前記造血幹細胞を、ウイルスベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、ピコルナウイルス、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、またはポックスウイルス)、および転位因子(例えば、piggybackトランスポゾンまたはsleeping beautyトランスポゾン)からなる群より選択されるベクターと接触させる工程を含む、項目103~110のいずれか一つに記載の方法。

30

112. エレクトロポレーション、Nucleofection(商標)、またはスクイズポレーション(squeeze-poration)によって前記ポリヌクレオチドを前記造血幹細胞に導入する工程を含む、項目103~110のいずれか一つに記載の方法。

113. 前記細胞を、カチオン性ポリマー(例えば、ジエチルアミノエチル-デキストラン)、カチオン性脂質、リン酸カルシウム、活性化デンドリマー、および磁気ビーズからなる群より選択される形質転換物質と接触させる工程を含む、項目103~110のいずれか一つに記載の方法。

40

114. マイクロインジェクションまたはレーザーフェクション(laserfection)によって前記ポリヌクレオチドを前記造血幹細胞に導入する工程を含む、項目103~110のいずれか一つに記載の方法。

115. 前記ポリヌクレオチドが、プロモーター配列、エンハンサー配列、またはサイレンサー配列からなる群より選択される制御配列を含む、項目103~114のいずれか一つに記載の方法。

116. 前記ポリヌクレオチドが、タンパク質およびRNA(mRNA、tRNA、siRNA、miRNA、shRNA)からなる群より選択される分子をコードする、項目103~115のいずれか一

50

つに記載の方法。

117. 前記ポリヌクレオチドが、化学修飾されたRNAである、項目103~115のいずれか一つに記載の方法。

118. 増大した前記造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程をさらに含む、項目103~117のいずれか一つに記載の方法。

119.

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 項目1、30、33、36、49、52、55、65、68、および71~102のいずれか一つに記載の方法に従って該造血幹細胞集団を増大させる工程;

c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 増大した該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

120.

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 項目2、31、34、37、50、53、56、66、69、および71~102のいずれか一つに記載の方法に従って該造血幹細胞集団を富化する工程;

c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 造血幹細胞について富化された該細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

121.

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 項目3、32、35、38、51、54、57、67、および70~102のいずれか一つに記載の方法に従って該造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持する工程;

c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

122.

a. 項目1~102のいずれか一つに記載の方法によって作製された造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

c. 該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程

を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

123. 前記レシピエントがヒトである、項目118~122のいずれか一つに記載の方法。

10

20

30

40

50

124. 前記造血幹細胞が、ヒトドナーから単離された1つまたは複数の造血幹細胞に由来する、項目123に記載の方法。

125. 前記造血幹細胞が、前記ドナーの動員末梢血に由来する、項目124に記載の方法。

126. 前記ドナーが、CXCR4アンタゴニスト(例えば、AMD3100)、GCSF、およびGRO からなる群より選択される1種類または複数種類の動員物質を以前に投与されたことがある、項目125に記載の方法。

127. 前記造血幹細胞が、プロスタグランジンとさらに接触される、項目1~126のいずれか一つに記載の方法。

128. 前記プロスタグランジンが、dmPGE2またはその類似体である、項目127に記載の方法。

129. 前記造血幹細胞が、Notchシグナル伝達アゴニストとさらに接触される、項目1~128のいずれか一つに記載の方法。

130. 前記造血幹細胞が、SIRT1阻害物質とさらに接触される、項目1~129のいずれか一つに記載の方法。

131. 前記阻害物質またはSIRT1が、ニコチンアミド、カンピノール、およびその類似体からなる群より選択される、項目130に記載の方法。

132. 前記レシピエントが、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、骨髄異形成症候群(MDS)、多発性骨髄腫、再生不良性貧血、骨髄機能不全、骨髄増殖性疾患、例えば、骨髄線維症、本態性血小板減少症、または真性赤血球増加症、ファンコーニ貧血、先天性角化不全症、分類不能型免疫不全(Common variable immune deficiency)(CVID、例えば、CVID1、CVID2、CVID3、CVID4、CVID5、およびCVID6)、血球貪食性リンパ組織球症、固形腫瘍、例えば、神経芽細胞腫、生殖細胞腫瘍、乳癌、ウィルムス腫瘍、髄芽細胞腫、および神経外胚葉性腫瘍、自己免疫疾患、例えば、強皮症、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、またはI型糖尿病、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、またはタンパク質欠乏症、例えば、副腎脳白質ジストロフィー(ALD)、異染性白質ジストロフィー(MLD)、血友病AおよびB、ハーラー症候群、ハンター症候群、ファブリー病、ゴーシェ病、表皮水疱症、アミロイドーシス、グロボイド細胞白質ジストロフィー、サンフィリポ症候群、ならびにモルキオ症候群からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である、項目118~131のいずれか一つに記載の方法。

133. 前記レシピエントが、鎌状赤血球性貧血、サラセミア、サラセミア、サラセミア、ヘモグロビンE/サラセミア、ヘモグロビンS/サラセミア、ヘモグロビンC/サラセミア、ヘモグロビンD/サラセミア、慢性肉芽腫症(X連鎖性慢性肉芽腫症、常染色体劣性(AR)慢性肉芽腫症、慢性肉芽腫症AR I NCF1、慢性肉芽腫症AR CYBA、慢性肉芽腫症AR II NCF2、慢性肉芽腫症AR III NCF4)、X連鎖重症複合免疫不全(SCID)、ADA SCID、IL7-RA SCID、CD3 SCID、Rag1/Rag2 SCID、Artemis SCID、CD45 SCID、Jak3 SCID、先天性顆粒球減少症、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN1、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN2、家族性血球貪食性リンパ組織球症(FHL)、家族性血球貪食性リンパ組織球症2型(FHL2、パーフォリン変異)、無グロブリン血症(X連鎖性無グロブリン血症)、ウィスコット・オールドリッチ症候群、チェディアック・東症候群、赤血球ピルビン酸キナーゼ欠損症による溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症、X連鎖性副腎脳白質ジストロフィー(X-ALD)、X連鎖性リンパ球増殖性疾患、単中心性キャッスルマン病(Unicentric Castleman's Disease)、多中心性キャッスルマン病(Multicentric Castleman's Disease)、先天性無巨核球性血小板減少症(Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia)(CAMT)I型、細網異形成症、ファンコーニ貧血、後天性特発性鉄芽球性貧血、全身性肥満細胞症、フォン・ヴィルブランド病(VWD)、先天性赤血球異形成貧血2型、軟骨毛髪形成不全症候群、遺伝性球状赤血球症、ブラックファン・ダイヤモンド症候群、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、血小板減少-橈骨欠損症候群、大理石骨病、小児型大理石骨病、ムコ多糖症、レッシュ・ナイハン症候群、糖原貯蔵症、先天性肥満細胞

10

20

30

40

50

症、オーメン症候群、X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症(X-linked Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy)(IPEX)、FOXP3変異を特徴とするIPEX、X連鎖多発性内分泌障害・免疫機能不全・下痢症候群(X-linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea)(XPID)、X連鎖自己免疫・アレルギー性調節異常症候群(X-Linked Autoimmunity-Allergic Dysregulation Syndrome)(XLAAD)、IPEX様症候群、高IgM 1型、高IgM 2型、高IgM 3型、高IgM 4型、高IgM 5型、X連鎖性高免疫グロブリンM、裸リンパ球症候群I型、および裸リンパ球症候群II型(裸リンパ球症候群II型、MHCクラスI欠損症;裸リンパ球症候群II型、相補群A;裸リンパ球症候群II型、相補群C;裸リンパ球症候群II型、相補群D;裸リンパ球症候群II型、相補群E)からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である、項目118~131のいずれか一つに記載の方法。

10

134. 前記レシピエントが、造血リンパ組織悪性腫瘍(hematolymphoid malignancy)、非造血リンパ組織悪性腫瘍、もしくはタンパク質欠乏症に罹患しているヒト患者であるか、または(例えば、移植された組織もしくは細胞に対する寛容を誘導する)組織移植レシピエントもしくは細胞移植レシピエントである、項目118~131のいずれか一つに記載の方法。

135. 前記造血幹細胞が自己由来または同系である、項目118~134のいずれか一つに記載の方法。

136. 前記造血幹細胞が同種異系である、項目118~134のいずれか一つに記載の方法。

137.

20

a. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる1種類または複数種類の作用物質と、

b. TGF シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質;

c. 表1に列挙した1種類または複数種類の化合物;

d. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質;

e. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質;および

f. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質のうちの1つまたは複数と

を含む、組成物。

138. 前記ikarosファミリーメンバー転写因子が、ikaros、aiolos、およびheliosからなる群より選択される、項目137に記載の組成物。

30

139. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、該ikarosファミリーメンバー転写因子のユビキチン結合を促進する、項目137または138に記載の組成物。

140. 細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される化合物を含む、項目137~139のいずれか一つに記載の組成物。

141. 式(1)によって表される前記化合物が、ボマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、項目140に記載の組成物。

142. 表1に列挙した前記1種類または複数種類の化合物がUM171を含む、項目137~141のいずれか一つに記載の組成物。

40

143. TGF シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質が、TGF受容体阻害物質を含む、項目137~142のいずれか一つに記載の組成物。

144. 前記TGF 受容体阻害物質が、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、項目143に記載の組成物。

145. 前記TGF 受容体阻害物質がA83-01である、項目144に記載の組成物。

146. ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンメチル化を活性化するか、ヒストンメチル化を維持するか、またはヒストン脱メチル化を阻害する、項目137~145のいずれか一つに記載の組成物。

147. ヒストンメチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストン

50

デメチラーゼ阻害物質を含む、項目146に記載の組成物。

148. 前記ヒストンデメチラーゼ阻害物質がLSD1阻害物質である、項目147に記載の組成物。

149. 前記LSD1阻害物質が、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される、項目148に記載の組成物。

150. 前記LSD1阻害物質がトラニルシプロミンである、項目149に記載の組成物。

151. ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンアセチル化を活性化するか、ヒストンアセチル化を維持するか、またはヒストン脱アセチル化を阻害する、項目137~150のいずれか一つに記載の組成物。

10

152. ヒストンアセチル化を調節する前記1種類または複数種類の作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ阻害物質を含む、項目151に記載の組成物。

153. 前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質が、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される、項目152に記載の組成物。

154. 前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質がトリコスタチンAである、項目153に記載の組成物。

155. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する前記1種類または複数種類の作用物質がSR1を含む、項目137~154のいずれか一つに記載の組成物。

156.

20

a. 表1に列挙した1種類または複数種類の化合物と、
b. TGF シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質；
c. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；
d. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；および
e. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

157.

a. アリール炭化水素受容体シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質と、
b. TGF シグナル伝達を阻害する1種類または複数種類の作用物質；
c. ヒストンメチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質；および
d. ヒストンアセチル化を調節する1種類または複数種類の作用物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

30

158.

a. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する1種類または複数種類の作用物質と、
b. TGF 受容体阻害物質；
c. 表1に列挙した化合物；
d. ヒストンデメチラーゼ阻害物質；
e. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質；および
f. アリール炭化水素受容体阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

40

159. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、式(1)によって表される、項目158に記載の組成物。

160. セレブロンを含むユビキチンリガーゼ複合体を活性化する前記1種類または複数種類の作用物質が、ポマリドミド、レナリドミド、およびサリドマイドからなる群より選択される、項目159に記載の組成物。

161. 表1に列挙した前記化合物がUM171である、項目158~160のいずれか一つに記

50

載の方法。

162. 前記TGF 受容体阻害物質が、ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択される、項目158～161のいずれか一つに記載の方法。

163. 前記ヒストンデメチラーゼ阻害物質が、LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択される、項目158～162のいずれか一つに記載の方法。

164. 前記ヒストンデアセチラーゼ阻害物質が、トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択される、項目158～163のいずれか一つに記載の組成物。

10

165

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに
b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 α -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物
からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質をさらに含む、項目158～164のいずれか一つに記載の組成物。

166. 前記アリール炭化水素受容体阻害物質がSR1である、項目158～165のいずれか一つに記載の組成物。

167. BMPシグナル伝達を阻害する化合物をさらに含む、項目158～166のいずれか一つに記載の組成物。

20

168.

a. 表1に列挙した化合物と、
b. TGF 受容体阻害物質;
c. ヒストンデメチラーゼ阻害物質;
d. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質;および
e. アリール炭化水素受容体阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

169.

a. アリール炭化水素受容体阻害物質と、
b. TGF 受容体阻害物質;
c. 表1に列挙した化合物;
d. ヒストンデメチラーゼ阻害物質;および
e. ヒストンデアセチラーゼ阻害物質
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

30

170.

a. 式(1)によって表される化合物と、
b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF 受容体阻害物質;
c. UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物;
d. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;
e. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに
f. SR1
のうちの1つまたは複数と
を含む、組成物。

40

171. 式(1)によって表される前記化合物が、ボマリドミド、レナリドミド、およびサリ

50

ドマイドからなる群より選択される、項目170に記載の組成物。

172.

a. SB203580を含む、p38シグナル伝達を伝えるタンパク質を阻害する化合物;ならびに
b. CHIR99021、塩化リチウム、BIO、およびFGF2からなる群より選択される、 β -カテニン分解を促進するタンパク質を阻害する化合物

からなる群より選択される1種類または複数種類の作用物質をさらに含む、項目170または171に記載の組成物。

173.

a. UM171、その構造類似体、または表1に列挙した化合物と、

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF β 受容体阻害物質;

c. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;

d. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質;ならびに

e. SR1

のうちの1つまたは複数と

を含む、組成物。

174.

a. SR1と、

b. ALK5阻害物質II、LY364947、DMH1、およびA83-01からなる群より選択されるTGF β 受容体阻害物質;

c. LSD1阻害物質IV RN-1、LSD1阻害物質II S2101、LSD1阻害物質LSD1-C76、LSD1阻害物質III CBB1007、LSD1阻害物質I、およびトラニルシプロミンからなる群より選択されるヒストンデメチラーゼ阻害物質;ならびに

d. トリコスタチンA、バルプロ酸、ブチリルヒドロキサム酸、およびistodaxからなる群より選択されるヒストンデアセチラーゼ阻害物質

のうちの1つまたは複数と

を含む、組成物。

175.

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、増大した造血幹細胞集団

を作製するのに十分な量で存在する、項目137~174のいずれか一つに記載の組成物。

176.

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに十分な量で存在する、項目137~174のいずれか一つに記載の組成物。

177.

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、少なくとも2日間前記造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的能力を維持するのに十分な量で存在する、項目137~174のいずれか一つに記載の組成物。

178.

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、水溶液中に存在する、項目137~177のいずれか一つに記載の組成物。

179.

前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が、凍結乾燥固体として存在する、項目137~177のいずれか一つに記載の組成物。

180.

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンビノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、前記細胞集団の増大を刺激するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目137~179のいずれか一つに記載の組成物。

181.

7日間またはそれを上回る日数の培養の後(例えば、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数の培養の後)、プロスタグランジン、N

10

20

30

40

50

otchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質、例えば、ニコチンアミド、カンビノール、もしくはその類似体と接触された造血幹細胞集団と比べて10%またはそれ以上、造血幹細胞について前記細胞集団を富化するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目137~179のいずれか一つに記載の組成物。

182. 2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって培養状態の前記造血幹細胞と接触した後、移植後の該造血幹細胞の長期生着能を維持するのに十分な量で、前記1種類または複数種類の作用物質または化合物が存在する、項目137~179のいずれか一つに記載の組成物。

183. 項目137~182のいずれか一つに記載の組成物を含む、細胞培養培地。

10

184. 血清を実質的に含まない、項目183に記載の細胞培養培地。

185. 前記1種類または複数種類の作用物質または化合物と接触している造血幹細胞集団をさらに含む、項目137~184のいずれか一つに記載の組成物。

186. 前記造血幹細胞が、2日間またはそれを上回る日数(例えば、3日間、5日間、7日間、10日間、12日間、14日間、15日間、20日間、またはそれを上回る日数)にわたって前記1種類または複数種類の作用物質または化合物の存在下で培養されている、項目185に記載の組成物。

187. 造血幹細胞集団を、

(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および

20

(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質

と接触させる工程であって、該第1の作用物質および該第2の作用物質が、増大した造血幹細胞集団を作製するのに全体として十分な量で存在する、前記工程

を含む、増大した造血幹細胞集団をエキスピボで作製する方法。

188. 1つまたは複数の造血幹細胞を含有する造血細胞集団を、

(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および

(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質

30

と接触させる工程であって、該第1の作用物質および該第2の作用物質が、造血幹細胞について富化された細胞集団を作製するのに全体として十分な量で存在する、前記工程

を含む、造血幹細胞について細胞集団をエキスピボで富化する方法。

189. 第1の造血幹細胞集団を、

(1)細胞におけるikarosファミリーメンバー転写因子のレベルを低減させる第1の作用物質;および

(2)SR1もしくはその類似体、プロスタグランジン、Notchシグナル伝達アゴニスト、またはSIRT1阻害物質からなる群より選択される第2の作用物質

と接触させる工程であって、該造血幹細胞集団が、2日後またはそれ以降に、該造血幹細胞集団と同じ条件下でかつ同じ時間にわたって培養されたが該第1の作用物質および該第2

40

の作用物質と接触されていない対照造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力より優れた造血幹細胞機能的な能力を示す、前記工程

を含む、造血幹細胞集団の造血幹細胞機能的な能力を少なくとも2日間エキスピボで維持する方法。

190. 項目1~102および187~189のいずれか一つに記載の方法によって作製された、造血幹細胞集団。

191. 項目137~182、185、および186のいずれか一つに記載の組成物を含み、添付文書をさらに含む、キット。

192. 前記添付文書が、前記キットの使用者に、エキスピボでの造血幹細胞集団の増大、富化、または該細胞集団の造血幹細胞機能的な能力の維持について説明する、項目191に

50

記載のキット。

193. 前記添付文書が、前記使用者に、前記造血幹細胞におけるポリヌクレオチドの発現について説明する、項目191に記載のキット。

194. 前記添付文書が、前記使用者に、前記造血幹細胞またはその子孫の患者への投与について説明する、項目191に記載のキット。

a. 造血幹細胞集団を提供する工程;

b. 項目1、30、33、36、49、52、55、65、68、および71~102のいずれか一つに記載の方法に従って該造血幹細胞集団を増大させる工程;

c. 任意で、該造血幹細胞を、リンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞に分化させる工程;ならびに

d. 増大した該造血幹細胞集団またはその子孫をレシピエントに導入する工程を含む、該レシピエントを造血幹細胞またはその子孫で処置する方法。

195. 項2、31、34、37、50、53、56、66、69、および71~102のいずれか一つに記載の方法に従って富化された造血幹細胞集団;または

項目2、31、34、37、50、53、56、66、69、および71~102のいずれか一つに記載の方法に従って富化された造血幹細胞集団から分化した;分化したリンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞の集団

を含む、レシピエントの造血幹細胞またはその子孫での処置における使用のための組成物。

196. その機能的能力が、項目3、32、35、38、51、54、57、67、および70~102のいずれか一つに記載の方法に従って維持されている造血幹細胞集団;または

その機能的能力が、項目3、32、35、38、51、54、57、67、および70~102のいずれか一つに記載の方法に従って維持されている造血幹細胞集団から分化した;分化したリンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞の集団

を含む、レシピエントの造血幹細胞またはその子孫での処置における使用のための組成物。

197. 項目1~102のいずれか一つに記載の方法に従って作製された造血幹細胞集団;または

項目1~102のいずれか一つに記載の方法に従って作製された造血幹細胞集団から分化した;分化したリンパ系共通前駆細胞、骨髓系共通前駆細胞、巨核球-赤血球前駆細胞、顆粒球-巨核球前駆細胞、顆粒球、前骨髓球、好中球、好酸球、好塩基球、赤血球、網状赤血球、栓球、巨核芽球、血小板産生巨核球、血小板、単球、マクロファージ、樹状細胞、小グリア細胞、破骨細胞、ならびにリンパ球、NK細胞、B細胞、および/またはT細胞の集団

を含む、レシピエントの造血幹細胞またはその子孫での処置における使用のための組成物。

198. 前記レシピエントがヒトである、クレーム195~197のいずれか一つに記載の組成物。

199. 前記造血幹細胞が、ヒトドナーから単離された1つまたは複数の造血幹細胞に由来する、クレーム198に記載の組成物。

200. 前記造血幹細胞が、前記ドナーの動員末梢血に由来する、クレーム199に記載の組成物。

201. 前記ドナーが、CXCR4アンタゴニスト(例えば、AMD3100)、G-CSF、およびGRO からなる群より選択される1種類または複数種類の動員物質を以前に投与されたことがある、クレーム199に記載の組成物。

10

20

30

40

50

202. 前記造血幹細胞が、プロスタグランジンとさらに接触される、クレーム195～201のいずれかに記載の組成物。

203. 前記プロスタグランジンが、dmPGE2またはその類似体である、クレーム202に記載の組成物。

204. 前記造血幹細胞が、Notchシグナル伝達アゴニストとさらに接触される、クレーム195～203のいずれかに記載の組成物。

205. 前記造血幹細胞が、SIRT1阻害物質とさらに接触される、クレーム195～204のいずれかに記載の組成物。

206. 前記阻害物質またはSIRT1が、ニコチンアミド、カンピノール、およびその類似体からなる群より選択される、クレーム205に記載の組成物。

207. 前記レシピエントが、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ性白血病(CLL)、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、骨髄異形成症候群(MDS)、多発性骨髄腫、再生不良性貧血、骨髄機能不全、骨髄増殖性疾患、例えば、骨髄線維症、本態性血小板減少症、または真性赤血球増加症、ファンコーニ貧血、先天性角化不全症、分類不能型免疫不全(Common variable immune deficiency)(CVID、例えば、CVID1、CVID2、CVID3、CVID4、CVID5、およびCVID6)、血球貪食性リンパ組織球症、固形腫瘍、例えば、神経芽細胞腫、生殖細胞腫瘍、乳癌、ウィルムス腫瘍、髄芽細胞腫、および神経外胚葉性腫瘍、自己免疫疾患、例えば、強皮症、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、またはI型糖尿病、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、またはタンパク質欠乏症、例えば、副腎脳白質ジストロフィー(ALD)、異染性白質ジストロフィー(MLD)、血友病AおよびB、ハーラー症候群、ハンター症候群、ファブリー病、ゴーシェ病、表皮水疱症、アミロイドーシス、グロバイド細胞白質ジストロフィー、サンフィリポ症候群、ならびにモルキオ症候群からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である、クレーム195～206のいずれかに記載の組成物。

208. 前記レシピエントが、鎌状赤血球性貧血、サラセミア、サラセミア、サラセミア、ヘモグロビンE/サラセミア、ヘモグロビンS/サラセミア、ヘモグロビンC/サラセミア、ヘモグロビンD/サラセミア、慢性肉芽腫症(X連鎖性慢性肉芽腫症、常染色体劣性(AR)慢性肉芽腫症、慢性肉芽腫症AR I NCF1、慢性肉芽腫症AR CYBA、慢性肉芽腫症AR II NCF2、慢性肉芽腫症AR III NCF4)、X連鎖重症複合免疫不全(SCID)、ADA SCID、IL7-RA SCID、CD3 SCID、Rag1/Rag2 SCID、Artemis SCID、CD45 SCID、Jak3 SCID、先天性顆粒球減少症、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN1、先天性顆粒球減少症-先天性好中球減少症-SCN2、家族性血球貪食性リンパ組織球症(FHL)、家族性血球貪食性リンパ組織球症2型(FHL2、パーフォリン変異)、無グロブリン血症(X連鎖性無グロブリン血症)、ウィスコット・オールドリッチ症候群、チェディアック・東症候群、赤血球ピルピン酸キナーゼ欠損症による溶血性貧血、発作性夜間血色素尿症、X連鎖性副腎脳白質ジストロフィー(X-ALD)、X連鎖性リンパ球増殖性疾患、単中心性キャッスルマン病(Unicentric Castleman's Disease)、多中心性キャッスルマン病(Multicentric Castleman's Disease)、先天性無巨核球性血小板減少症(Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia)(CAMT)I型、細網異形成症、ファンコーニ貧血、後天性特発性鉄芽球性貧血、全身性肥満細胞症、フォン・ヴィルブランド病(VWD)、先天性赤血球異形成貧血2型、軟骨毛髪形成不全症候群、遺伝性球状赤血球症、ブラックファン・ダイヤモンド症候群、シュワックマン・ダイヤモンド症候群、血小板減少-橈骨欠損症候群、大理石骨病、小児型大理石骨病、ムコ多糖症、レッシュ・ナイハン症候群、糖原貯蔵症、先天性肥満細胞症、オーメン症候群、X連鎖免疫調節異常・多発性内分泌障害腸症(X-linked Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy)(IPEX)、FOXP3変異を特徴とするIPEX、X連鎖多発性内分泌障害・免疫機能不全・下痢症候群(X-linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea)(XPID)、X連鎖自己免疫・アレルギー性調節異常症候群(X-Linked Autoimmunity-Allergic Dysregulation Syndrome)(XLAAD)、IPEX様症候群、高IgM 1型、高IgM 2型、高IgM 3型、高IgM 4型

10

20

30

40

50

、高IgM 5型、X連鎖性高免疫グロブリンM、裸リンパ球症候群I型、および裸リンパ球症候群II型(裸リンパ球症候群II型、MHCクラスI欠損症;裸リンパ球症候群II型、相補群A;裸リンパ球症候群II型、相補群C;裸リンパ球症候群II型、相補群D;裸リンパ球症候群II型、相補群E)からなる群より選択される疾患に罹患しているヒト患者である、クレーム195~207のいずれかに記載の組成物。

209. 前記レシピエントが、造血リンパ組織悪性腫瘍(hematolymphoid malignancy)、非造血リンパ組織悪性腫瘍、もしくはタンパク質欠乏症に罹患しているヒト患者であるか、または(例えば、移植された組織もしくは細胞に対する寛容を誘導する)組織移植レシピエントもしくは細胞移植レシピエントである、クレーム195~208のいずれかに記載の組成物。

10

210. 前記造血幹細胞が自己由来または同系である、クレーム195~209のいずれかに記載の組成物。

211. 前記造血幹細胞が同種異系である、クレーム195~210のいずれかに記載の組成物。

【実施例】

【0275】

実施例1. CD34+細胞のエキスピボでの増大のための細胞培養プロトコール

造血幹細胞、例えば、CD34+造血幹細胞は、本明細書に記載の組成物および方法を用いて、エキスピボで増大させ、富化し、かつ維持することができる。本実施例は、これらの組成物および方法と共に使用することができるサンプルプロトコールを提供する。

20

【0276】

1日目に、CD34富化臍帯血細胞(AllCells)を解凍し、10,000個の細胞を、ペニシリン/ストレプトマイシン(100U/ml、Gibco)、hSCF(100ng/ml)、hTPO(100ng/ml)、hIL3(100ng/ml)、hFLT3L(100ng/ml)、ならびに以下の最終濃度の低分子の様々な組み合わせ(全てのストック溶液はDMSOを溶媒として調製した):A83-01(1μM、Tocris)、ボマリドミド(2μM、Selleckchem)、UM171(35nM、ApexBio)、トラニルシプロミン塩酸塩(6μM、Cayman Chemical)、トリコスタチンA(25nM、Cayman Chemical)、およびDMSO(0.1%、Sigma)を加えたStemSpan SFEM II(Stemcell Technologies)で構成される300μlの培地において、1ウェル(48ウェル組織培養プレート)あたりにプレーティングする。

30

【0277】

4日目に、あらゆるウェルを、(24ウェル組織培養プレートにおいて)4ウェルに分ける。各ウェルは、500μlの最終体積のそれぞれの培地を含有する。

【0278】

7日目、9日目、および12日目に、あらゆるウェルを、(24ウェル組織培養プレートにおいて)2ウェルに分ける。各ウェルは、500μlの最終体積のそれぞれの培地を含有する。

【0279】

14日目に、それぞれの出発ウェルに由来する全ての細胞(10,000個のCD34富化臍帯血細胞の総子孫)を、独立して組み合わせて(以下「試料」)、洗浄し、FACS緩衝液(カルシウムを含まないDPBS、2mMEDTA、1%BSA)中に懸濁する。各試料のおよそ1/175を、免疫表現型決定および細胞計数のために取っておく。移植には、1種類の試料を、1匹の亜致死性の放射線を照射したNSGレシピエントあたりに注射する。

40

【0280】

上記のプロトコールに従って培養された造血細胞は、増大し、造血幹細胞について富化され、維持された造血幹細胞機能的能力を示し得る。図1~19は、本明細書に記載の方法に従って培養された造血細胞の解析から得られたFACS実験の結果を説明する。

【0281】

実施例2.

CD34+臍帯血細胞を、本明細書に記載の化合物の様々な組み合わせの存在下で、インビトロで培養した。Lin-CD34+細胞およびLin-細胞のパーセンテージおよび総数は、POM、(

50

ポマリドミド);SR1(StemRegenin 1);A(A83-01)、U(UM171);AP(A + POM);APU(A + POM + UM171)およびAPSR1(A + POM + SR1)の存在下で増加した(図21;図22A ~ 22B; 図23A ~ 23B)。試験した全ての条件は、HSCおよび前駆細胞の両方を含むCD34+細胞数を増加させる。Lin-CD45RA-CD90+ HSCのパーセンテージおよび総数は、POM;AP;APU;およびAPSR1の存在下で増加した(図24、25)。Lin-CD45RA-CD90+CD49f+EPCR+ HSCのパーセンテージは、POM;AP;APU;およびAPSR1の存在下で増加した(図26、27)。重要なことに、これらの細胞は、インビトロで12日間の培養の後に、HSCに関連する免疫表現型マーカーを保持しており、HSC数を増大する。ビヒクル対照細胞(DMSO)において見られるように、これらの細胞は、インビトロの12日間の培養の後に数に限りがあった。さらに、免疫表現型HSCの増大は、POMおよびAの両方の存在下で有意であった。

10

【0282】

様々な化合物の存在下での細胞のコロニー形成能を、図28A ~ 28Bに図示する。コロニー形成能は、増大した細胞の機能的な能力を測定する。重要なことに、このデータは、培養細胞が、全ての血液系統に分化することができ、従って機能が損なわれていないことを示す。

【0283】

実施例3 .

本明細書に記載の様々な化合物およびその組み合わせの存在下で増大したヒトCD34+臍帯血細胞のHSC機能を測定するために、本明細書において移植アッセイ法を実施した(図29 ~ 38)。これらの図は、増大したHSCが、異種移植モデルにおいてヒト細胞の長期の多系統(B細胞、T細胞、および骨髄系細胞)再構成を提供するように機能することを示す。移植アッセイ法の最中に、注目されるいかなる有害事象もなかった。

20

【0284】

APの存在下での培養は、機能的なヒト造血幹細胞を増大させる(図39A ~ 39B)。限界希釈アッセイ法は、化合物処理細胞における機能的HSCの数を測定する。このデータは、新鮮細胞と比較して機能的HSCの2倍の増大があることを示し、APがHSCを増大させることを示す。これらのアッセイ法において、注目されるいかなる有害事象もなかった。

【0285】

実施例4 .

CD34+臍帯血細胞は、本明細書に記載のある特定の化合物およびその組み合わせの存在下で増大した。12日間の培養の後の、ある特定の細胞タイプの数測定した(図40 ~ 47)。免疫表現型Lin-CD34+ HSPCのHECA染色を実施し、DMSO処理細胞と比較してUM171処理細胞、APU処理細胞、およびAPSR1処理細胞においてHECA発現の有意な増加があったことが示された。また、HECAは、DMSOを用いて増大させた細胞と比較して、APを用いて増大させた細胞、APUを用いて増大させた細胞、APSR1を用いて増大させた細胞、APUSR1を用いて増大させた細胞由来のLin-CD34+CD45RA-CD90+ HSC上で有意に増加していた(図49)。増加したHECA発現は、臍帯血細胞の骨髄への短期ホーミングを増加させることが示されている。これは、前駆細胞およびHSCが生着するのに重要である。このデータは、培養細胞が、新鮮細胞と比較して類似するかまたはより良好なHECAの発現を有することを示し、それらが効率的に骨髄にホーミングできることを示唆する。

30

【0286】

実施例5 .

CD34+富化臍帯血細胞の増大後に、化合物中止を行った(図51)。中止の日および化合物中止後3日目に、移植実験を実施した。図52 ~ 56は、化合物中止後に、増大した細胞が、化合物中止を受けなかった細胞において観察された活性を一般的に保持していたことを示す。これは、化合物が、培養細胞の生着および多系統再構成能に有害な影響を及ぼさないことを示唆する。移植アッセイ法の最中に、注目されるいかなる有害事象もなかった。

【0287】

実施例6 .

動員末梢血からのヒトCD34+細胞の増大を示した(図57A ~ 57B、58)。増大した細胞集団における、ある特定の細胞タイプの頻度を測定した(図59A ~ 64B)。移植アッセイ法を、

50

増大した細胞で実施した(図65A～65B)。これは、化合物が、ヒト造血幹細胞移植療法に関連する複数のドナー供給源から前駆細胞、HSCを増大できることを示す。また、これらの化合物は、インビトロ再構成アッセイ法によってアッセイした際に、HSC機能を阻害しない。移植アッセイ法の最中に、注目されるいかなる有害事象もなかった。

【0288】

実施例7.

骨髄からのヒトCD34+細胞の増大が示された(図66A～67)。増大した細胞集団における、ある特定の細胞タイプの頻度を測定した(図68A～73B)。これは、化合物が、診療所における造血幹細胞移植処置に関連する複数の供給源から前駆細胞およびHSCを増大できることを示す。

10

20

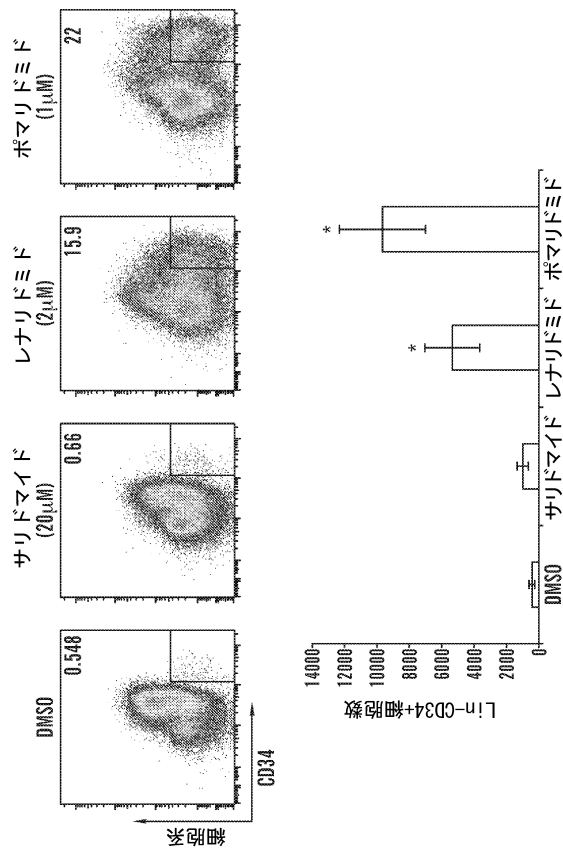
30

40

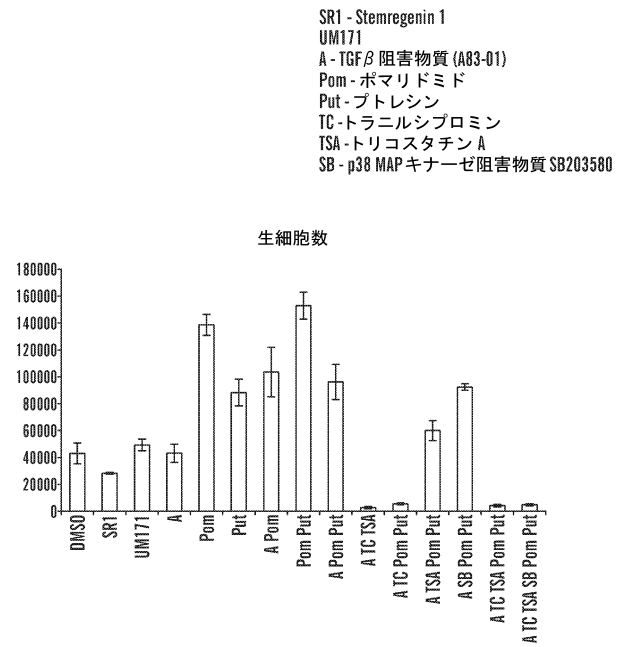
50

【図面】

【図 1】



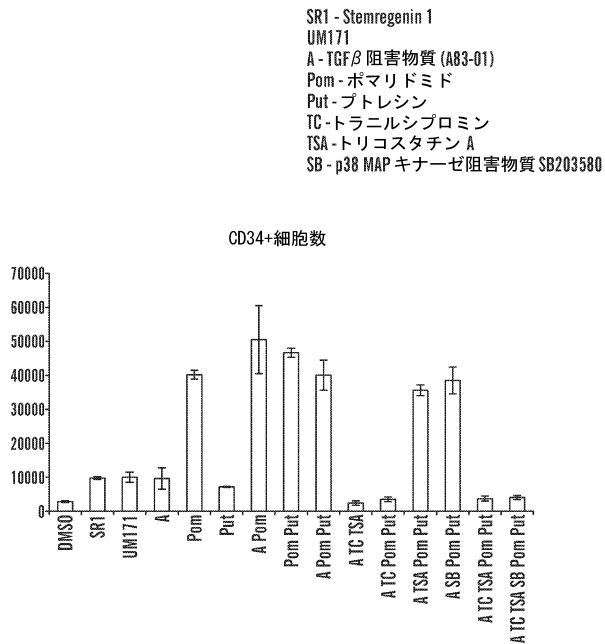
【図 2】



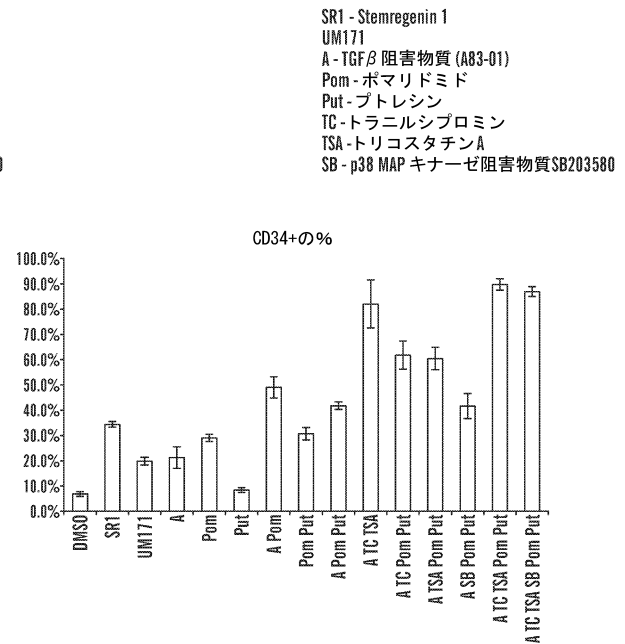
10

20

【図 3】



【図 4】

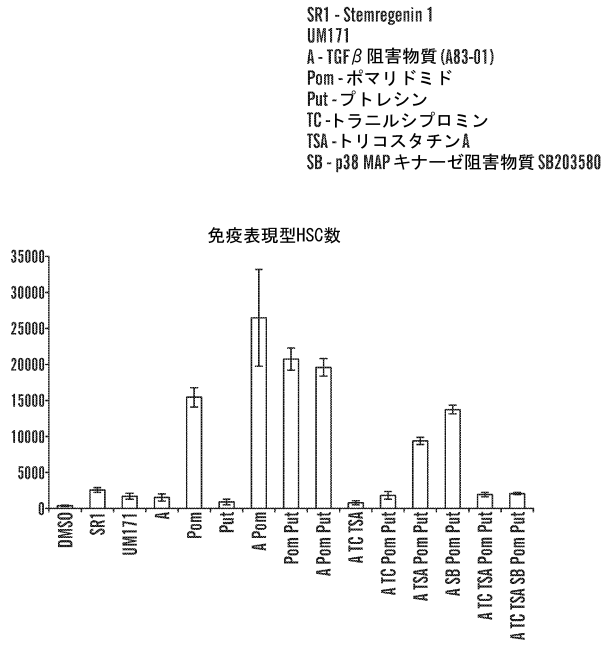


30

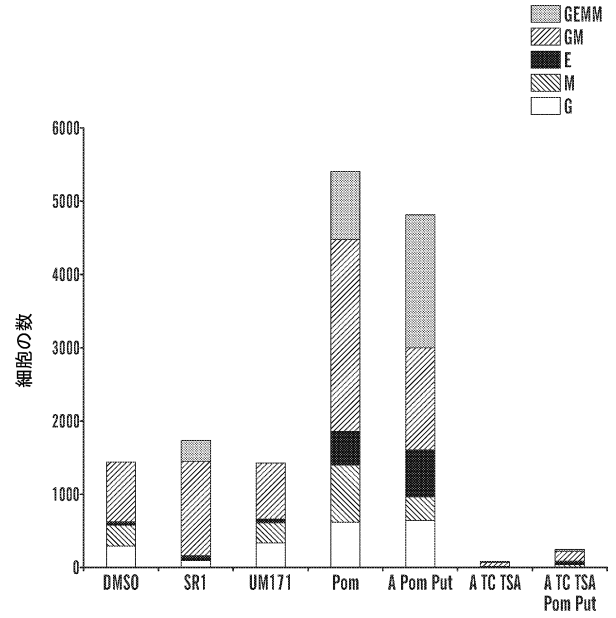
40

50

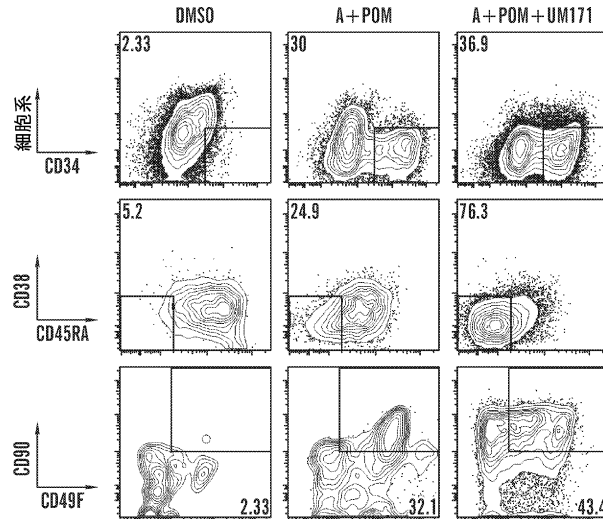
【図 5】



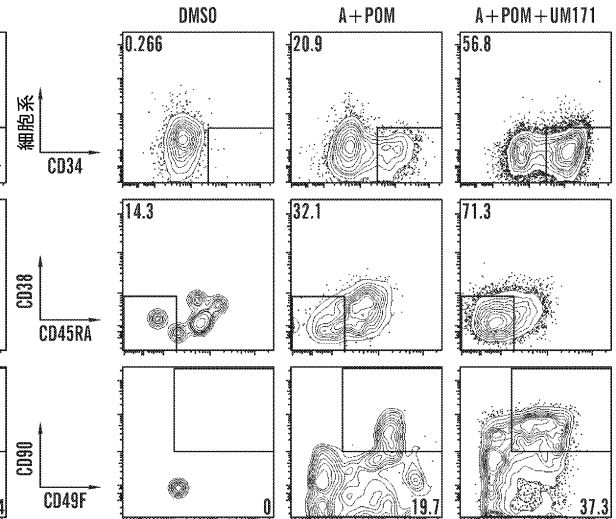
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

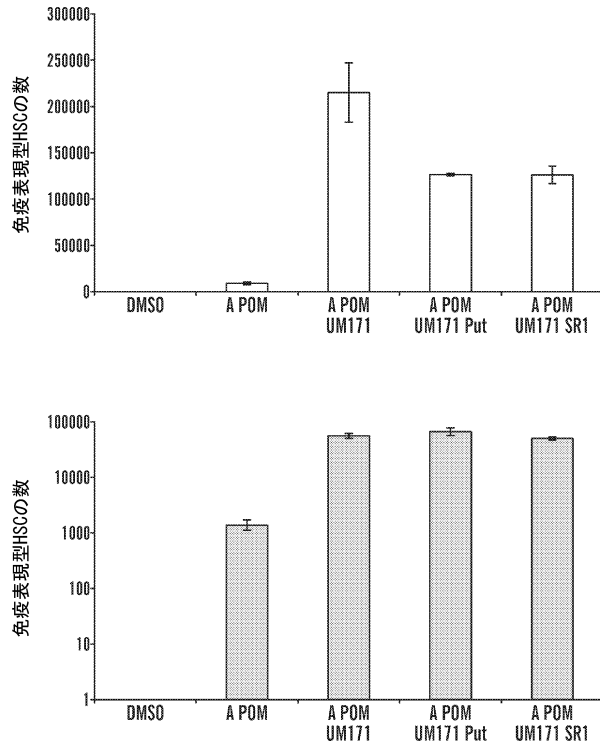
20

30

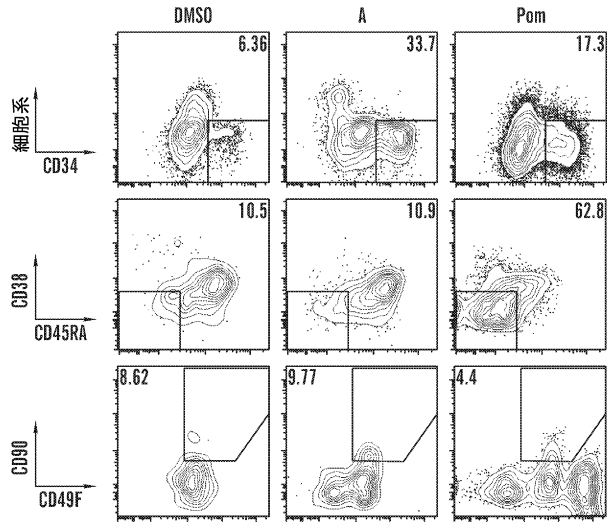
40

50

【図 9】



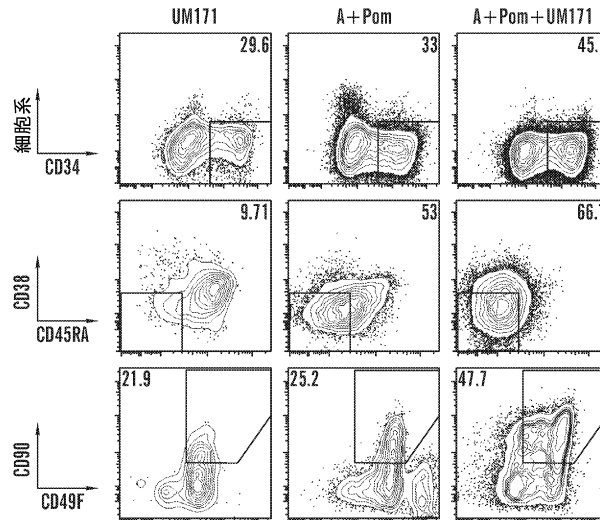
【図 10 - 1】



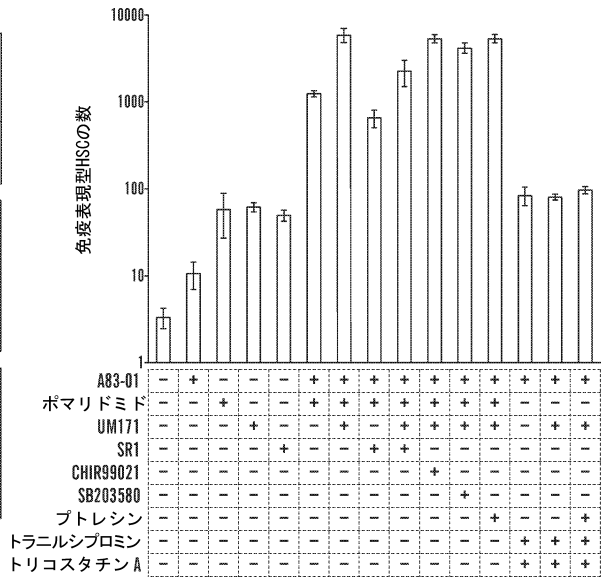
10

20

【図 10 - 2】



【図 11】

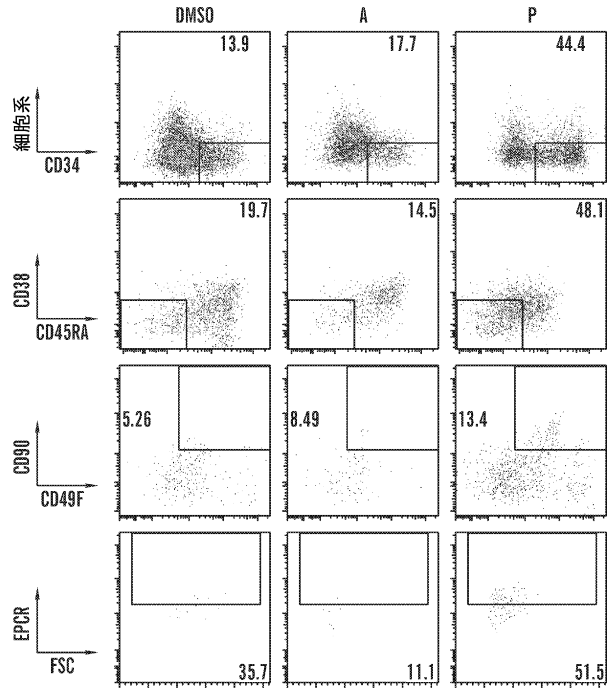


30

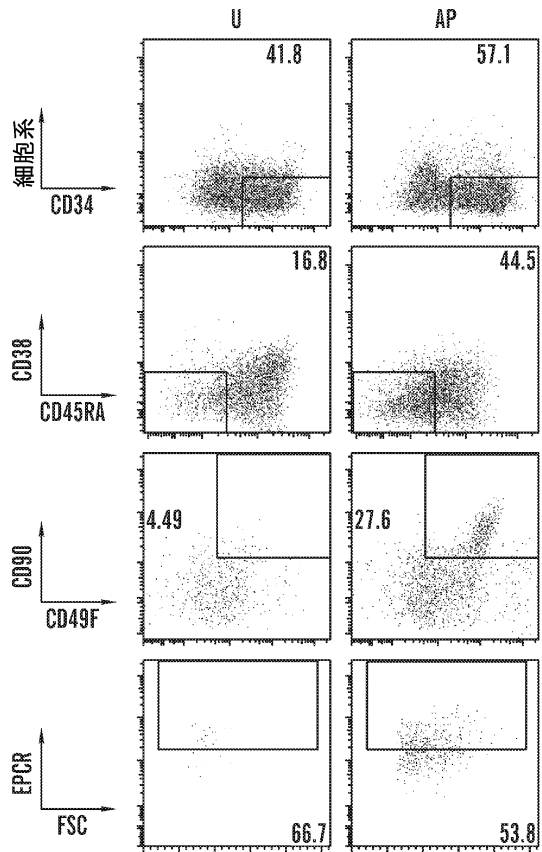
40

50

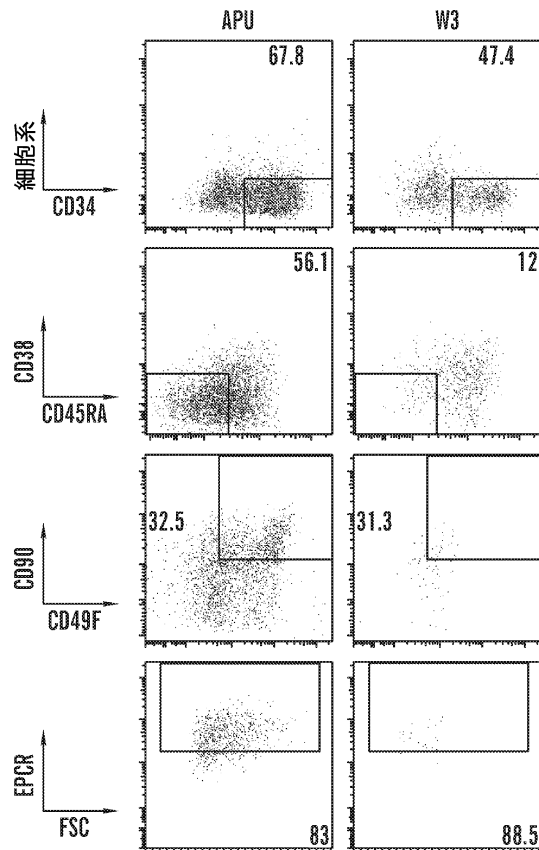
【図 1 2 - 1】



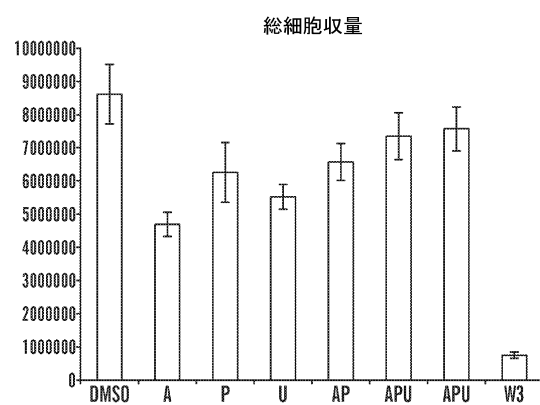
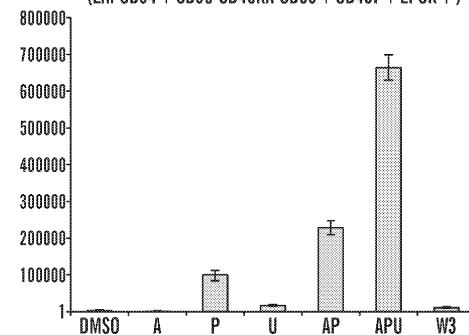
【図 1 2 - 2】



【図 1 2 - 3】



【図 1 3】

免疫表現型HSC収量
(Lin-CD34 + CD38-CD45RA-CD90 + CD49F + EPCR +)

10

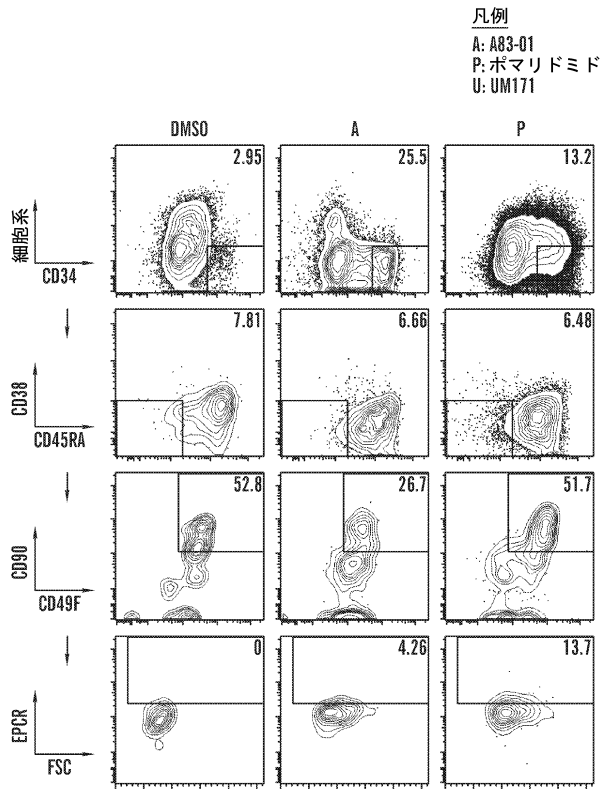
20

30

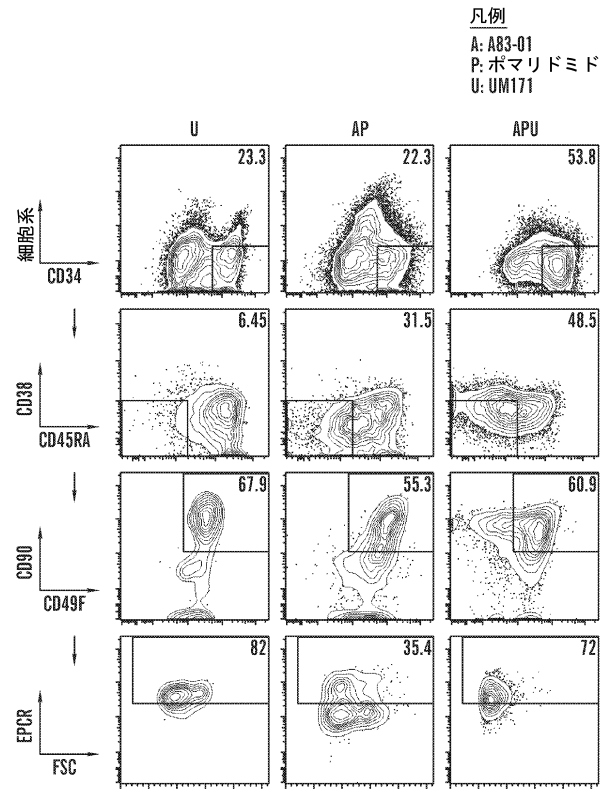
40

50

【図 14 - 1】



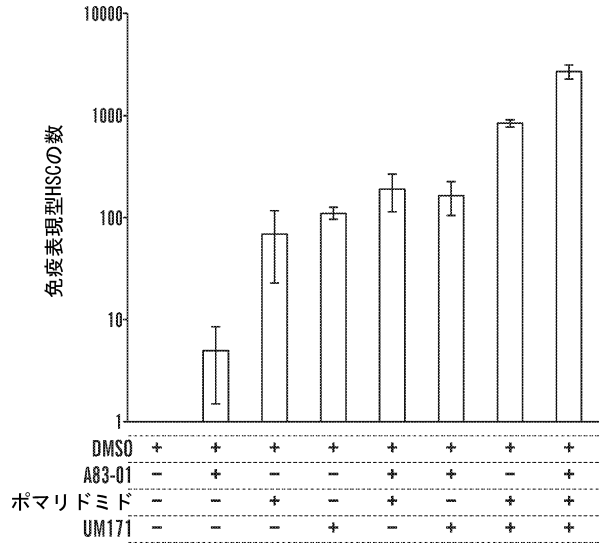
【図 14 - 2】



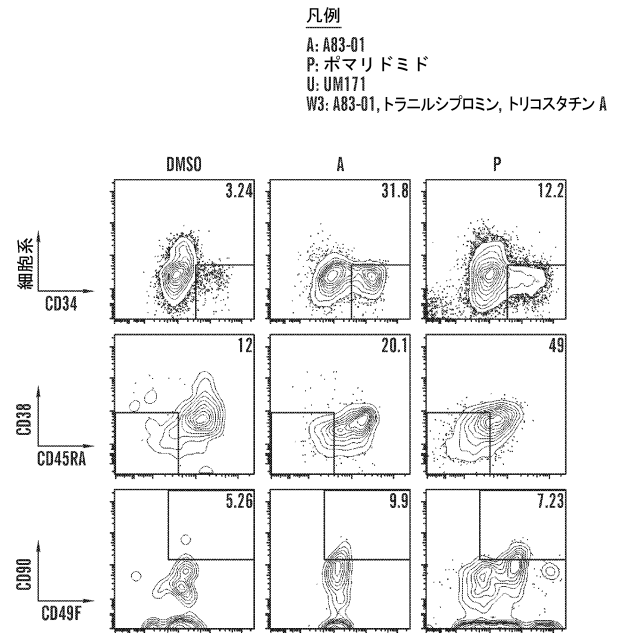
10

20

【図 15】



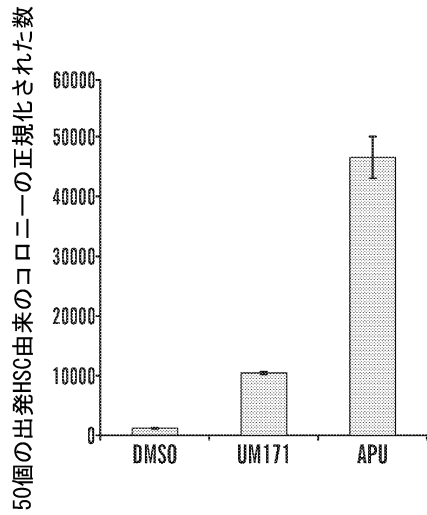
【図 16 - 1】



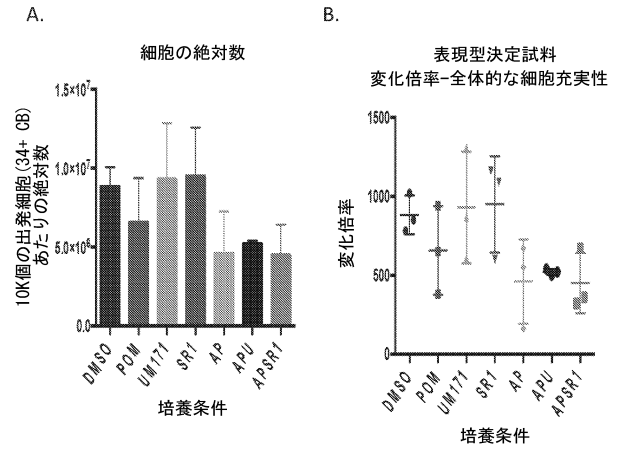
30

40

【図 19】

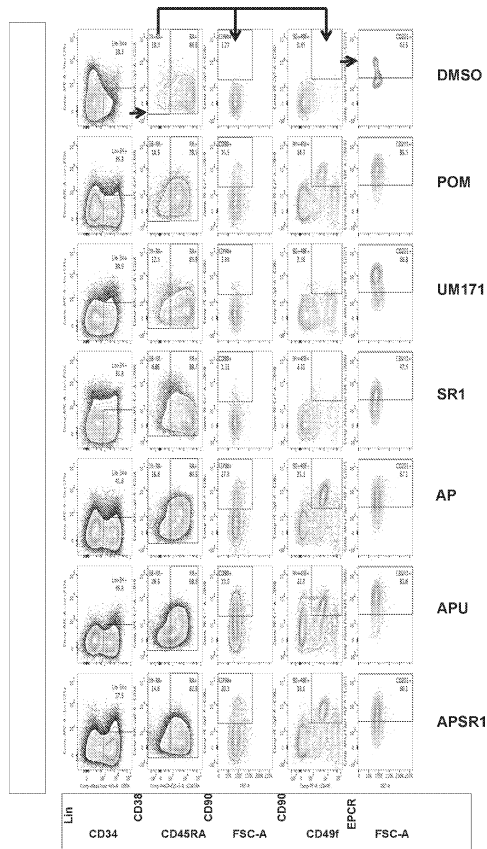


【図 20】

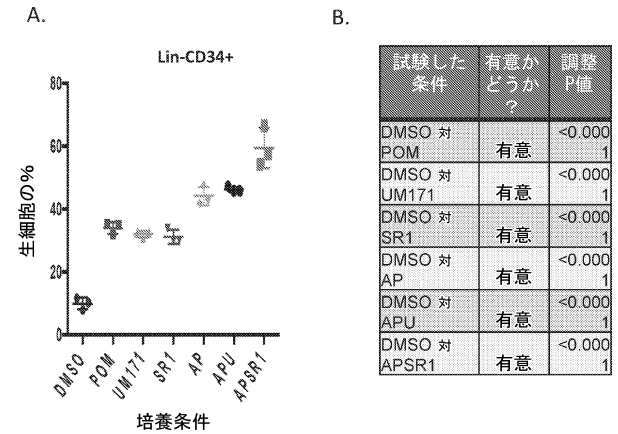


10

【図 21】



【図 22】



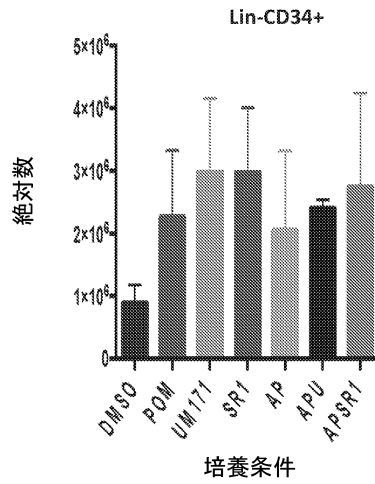
20

30

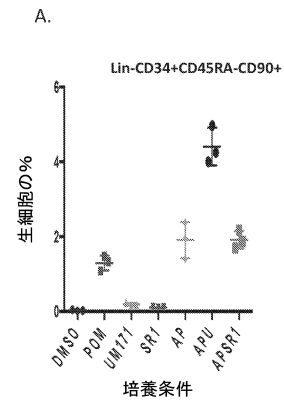
40

50

【図 2 3】



【図 2 4】

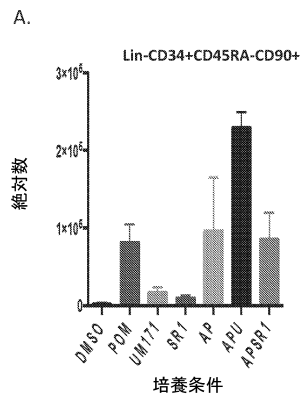


B.

試験した条件	有意かどうか？	調整 P 値
DMSO 対 POM	有意	0.0015
DMSO 対 AP	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001
DMSO 対 APSR1	有意	<0.0001

10

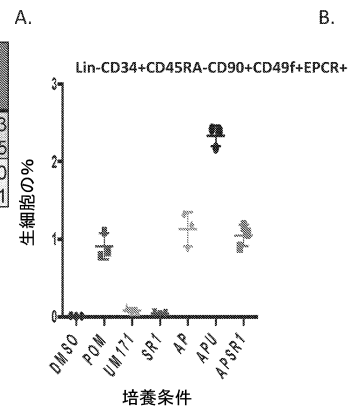
【図 2 5】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整 P 値
DMSO 対 AP	有意	0.0335
DMSO 対 APU	有意	<0.0001

【図 2 6】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整 P 値
DMSO 対 POM	有意	<0.0001
DMSO 対 AP	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001
DMSO 対 APSR1	有意	<0.0001

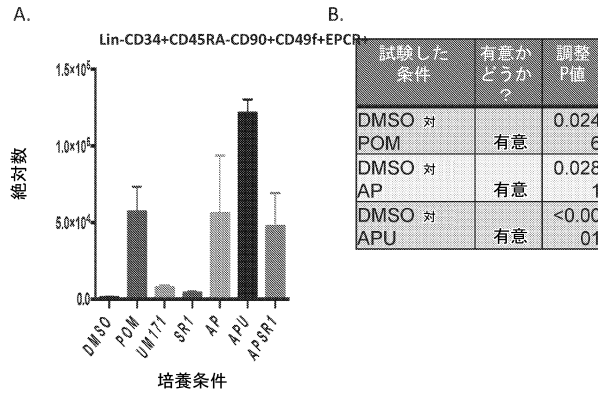
20

30

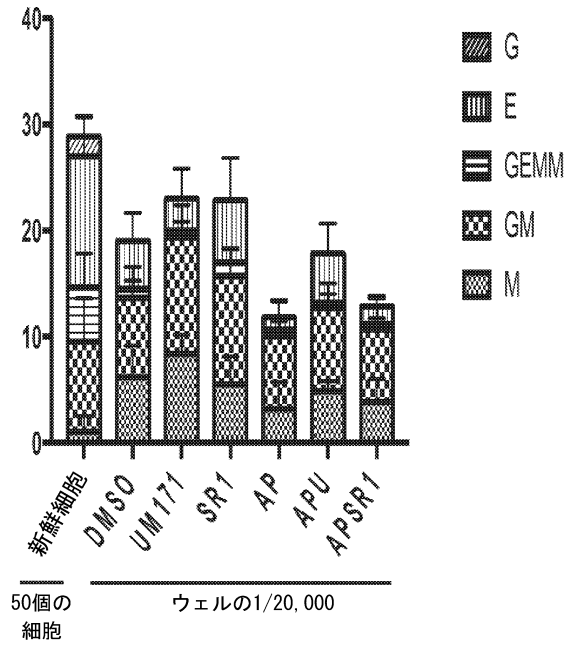
40

50

【図 27】

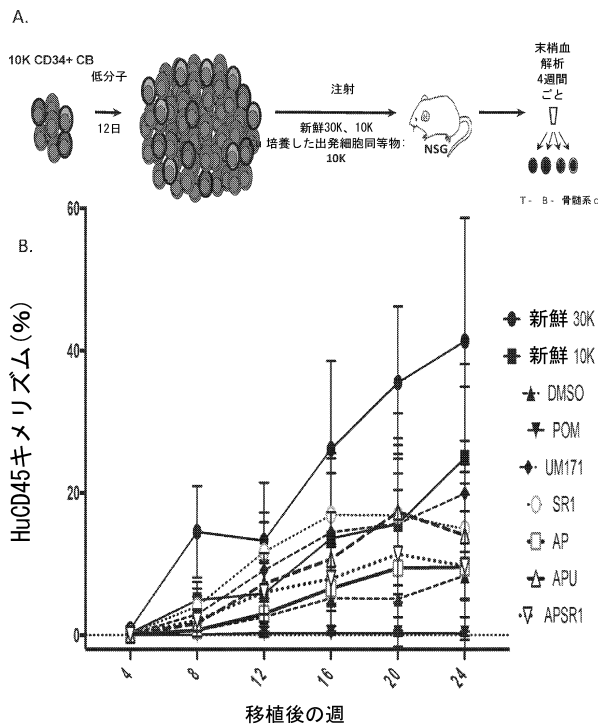


【図 28】

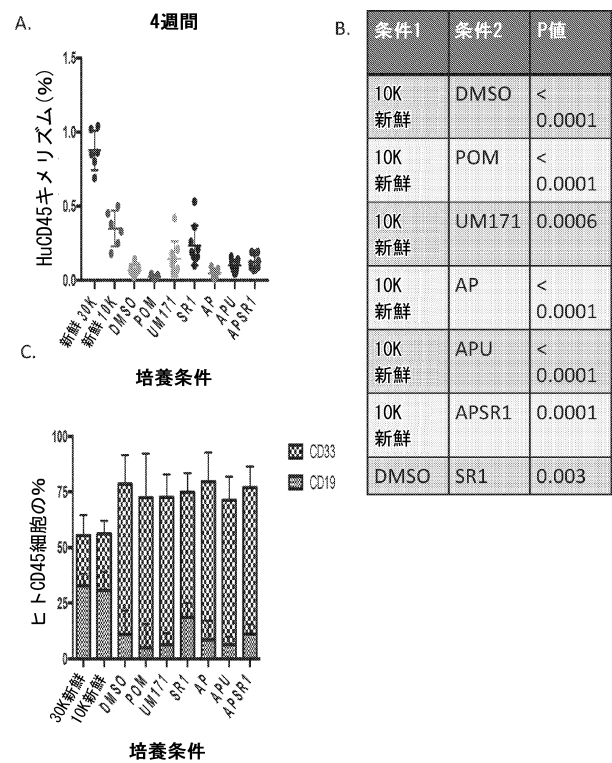


10

【図 29】



【図 30】



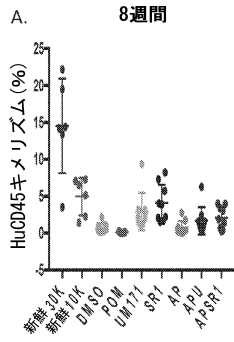
20

30

40

50

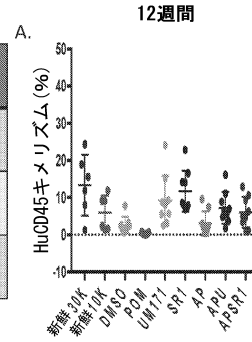
【図 3 1】



B.

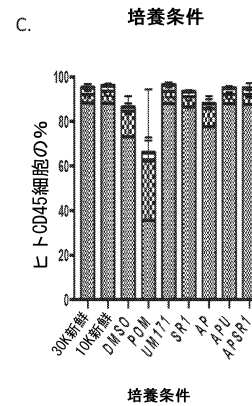
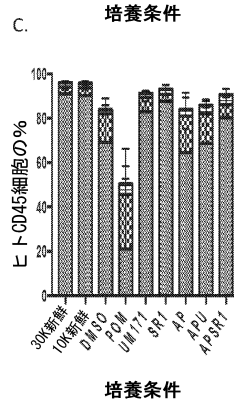
条件1	条件2	P値
10K 新鮮	DMSO	0.0383
10K 新鮮	POM	0.0106
10K 新鮮	AP	0.0417

【図 3 2】

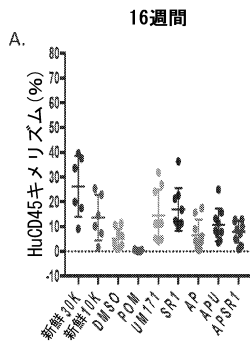


B.

条件1	条件2	P値
DMSO	SR1	0.032



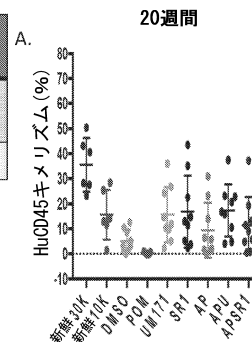
【図 3 3】



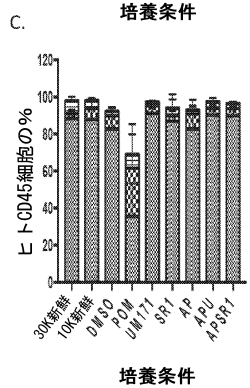
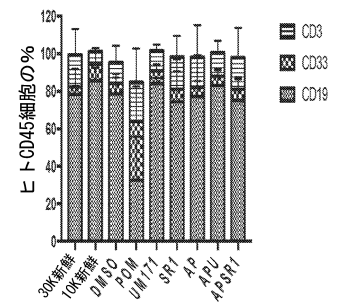
B.

条件1	条件2	P値
10K 新鮮	POM	0.0275
DMSO	SR1	0.0323

【図 3 4】



B.



培養条件

培養条件

10

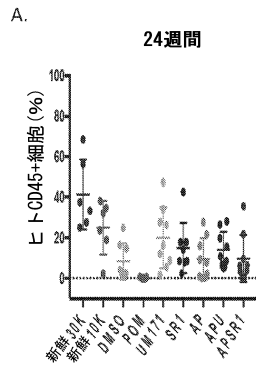
20

30

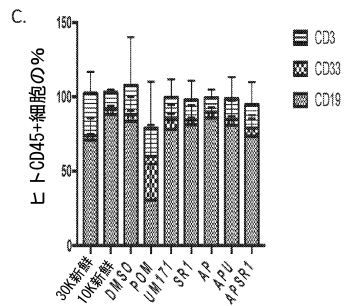
40

50

【図 3 5】

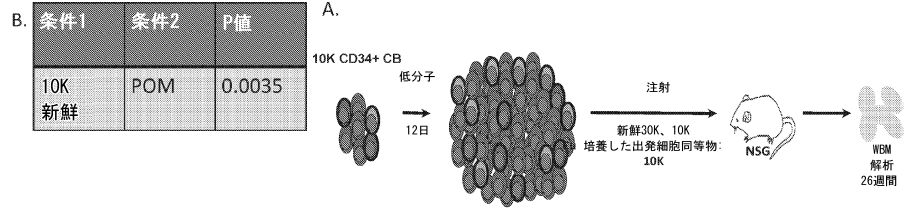


細胞系再構成



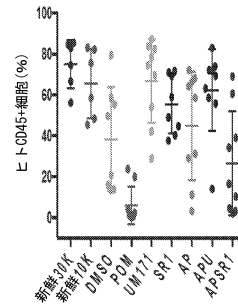
CD3
CD33
CD19

【図 3 6】



B.

ヒトCD45+細胞

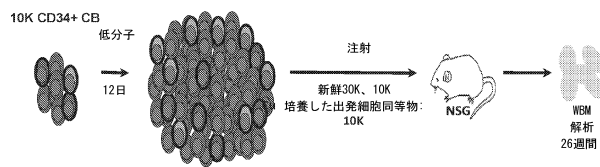


C.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
新鮮10K 対 POM	有意	<0.0001
新鮮10K 対 APSR1	有意	0.0141
DMSO 対 POM	有意	0.0384

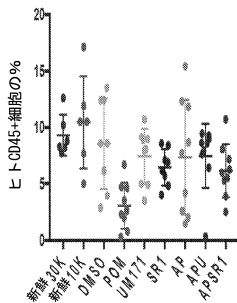
【図 3 7】

A.



B.

ヒトCD45+Lin-CD34+細胞



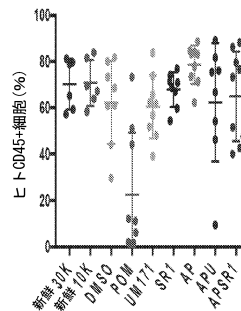
C.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
新鮮10K 対 POM	有意	0.0010
DMSO 対 POM	有意	0.0163

【図 3 8】

A.

ヒトCD45+CD19+細胞

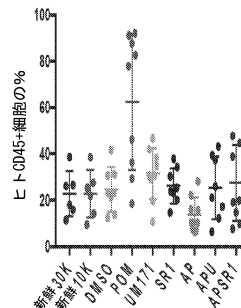


B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
新鮮10K 対 POM	有意	<0.0001
DMSO 対 POM	有意	0.0004

C.

ヒトCD45+CD33+細胞



D.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
新鮮10K 対 POM	有意	0.0001
DMSO 対 POM	有意	<0.0001

10

20

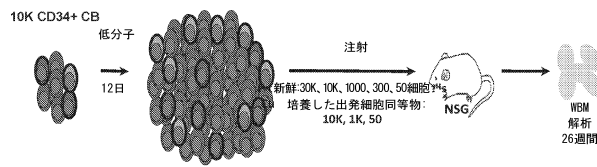
30

40

50

【図 39】

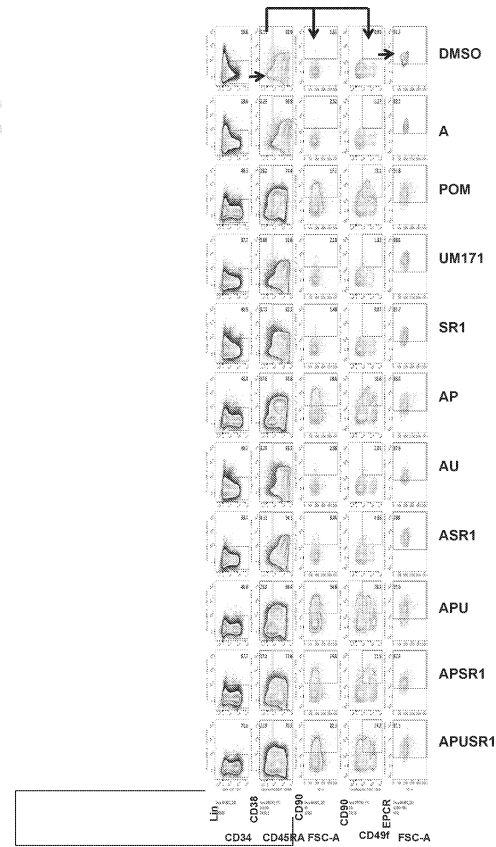
A.



B.

群	推定値 (1/ 幹細胞)			変化 倍率
	低値	高値	推定値	
新鮮	1222	651.1	347.1	1.00
DMSO	1023	472.2	217.9	1.38
POM	1180	548.3	254.9	1.19
AP	801	328.5	134.7	1.98
UM171	106	45.5	19.6	14.31
AP + UM171	702	291	120.6	2.24
SR1	230	85	31.5	7.66
AP + SR1	1023	472.2	217.9	1.38

【図 40】

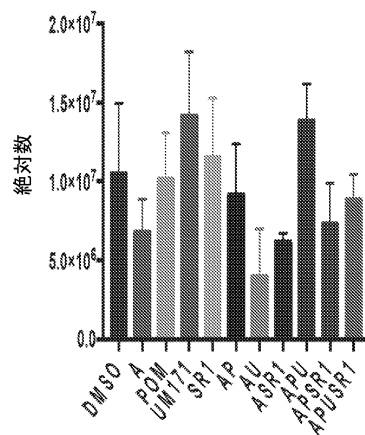


10

20

【図 41】

総収量

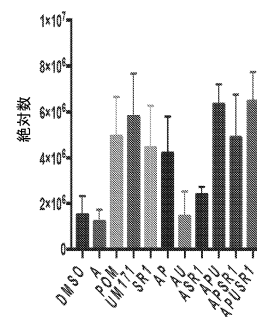


【図 42】

A.

B.

Lin-CD34+細胞



条件1	条件2	P値
DMSO	UM171	0.0426
DMSO	APU	0.0187

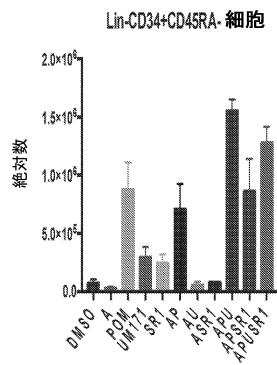
30

40

50

【図 4 3】

A.

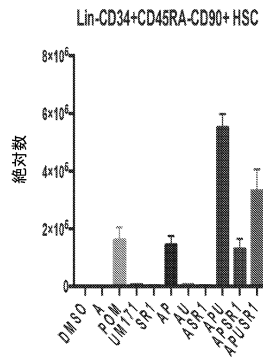


B.

条件1	条件2	P値
DMSO	POM	<0.0001
DMSO	AP	0.0008
DMSO	APU	<0.0001
DMSO	APSR1	<0.0001
DMSO	APUSR1	<0.0001

【図 4 4】

A.



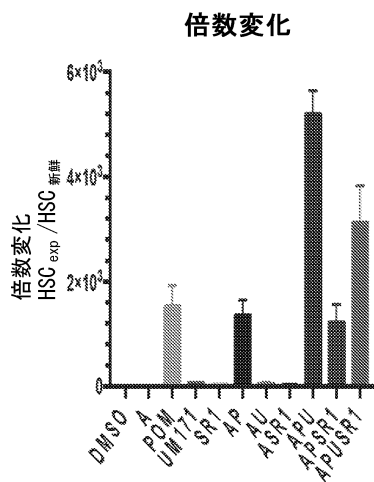
B.

条件1	条件2	P値
DMSO	POM	0.0003
DMSO	AP	0.0011
DMSO	APU	<0.0001
DMSO	APSR1	0.0038
DMSO	APUSR1	<0.0001

10

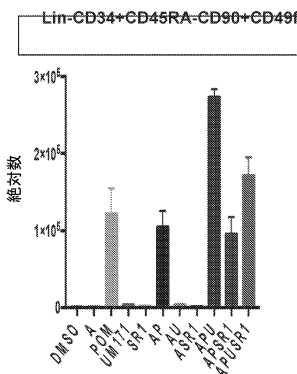
【図 4 5】

A.



【図 4 6】

A.



B.

条件1	条件2	P値
DMSO	POM	<0.0001
DMSO	AP	<0.0001
DMSO	APU	<0.0001
DMSO	APSR1	<0.0001
DMSO	APUSR1	<0.0001

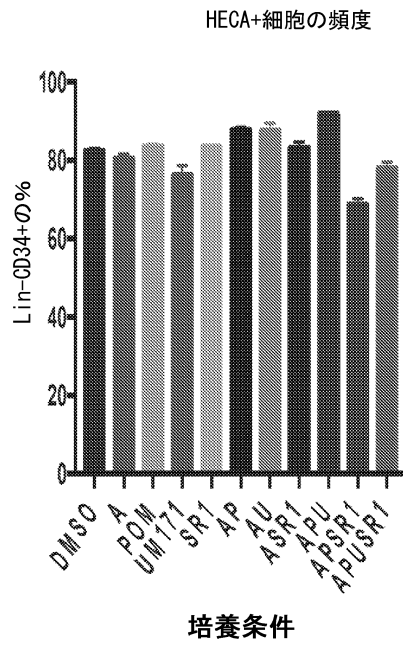
20

30

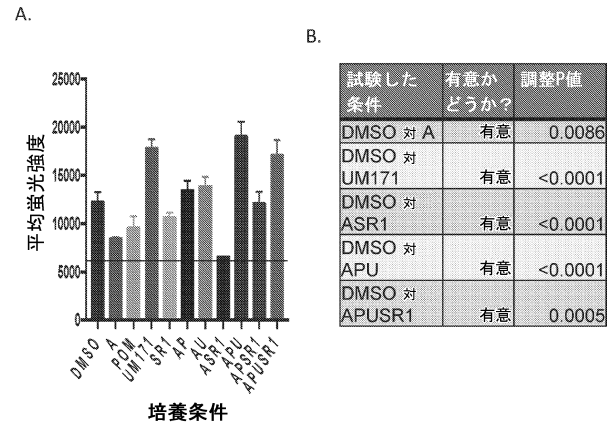
40

50

【図 4 7】

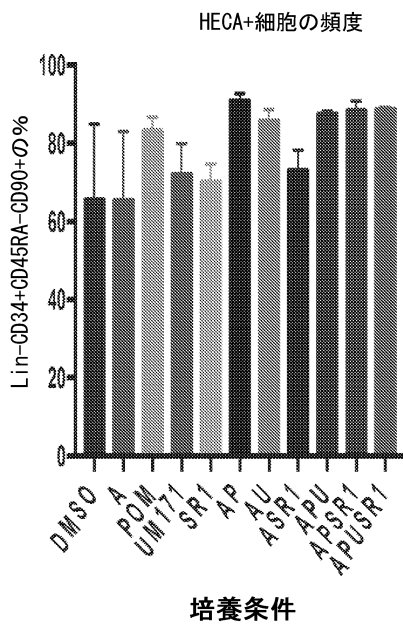


【図 4 8】

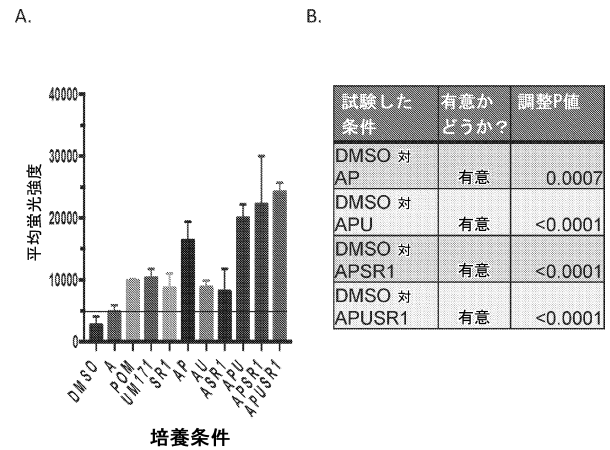


10

【図 4 9】



【図 5 0】



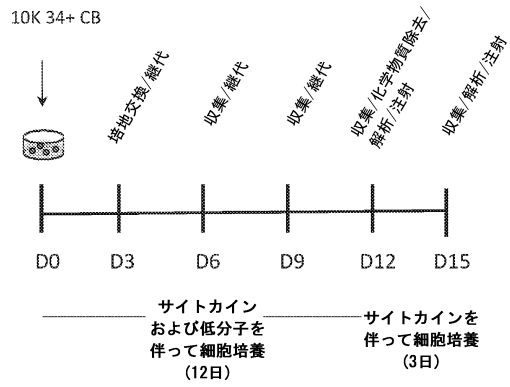
20

30

40

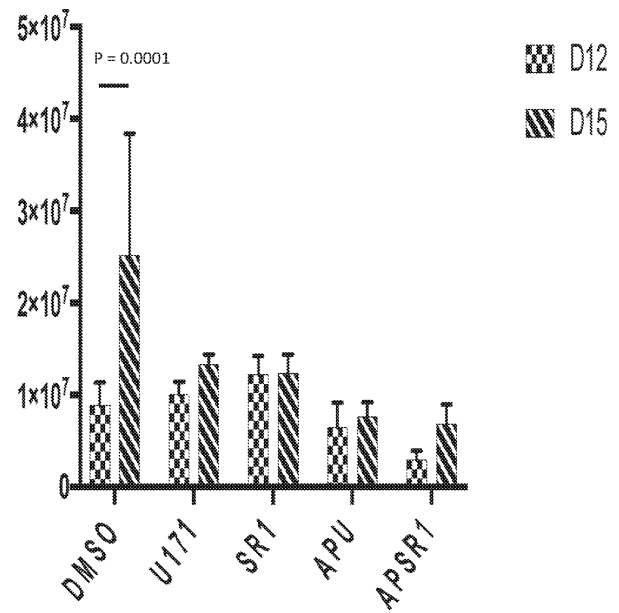
50

【図 5 1】



【図 5 2】

細胞収量

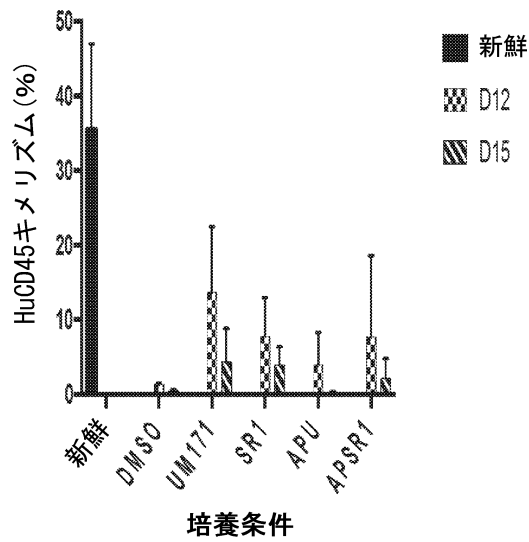


10

20

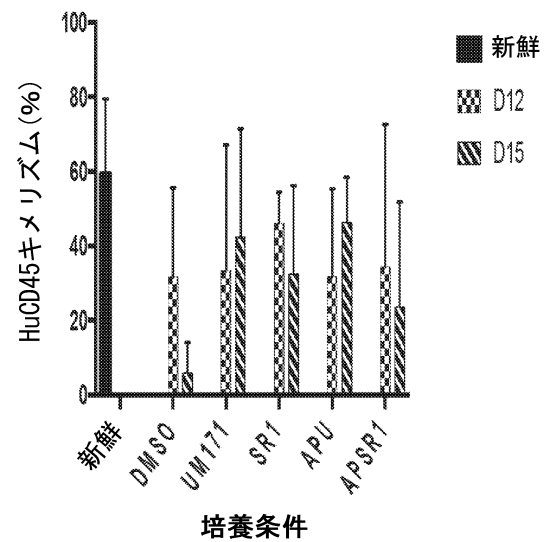
【図 5 3】

16週採血データ



【図 5 4】

huCD45+細胞の頻度

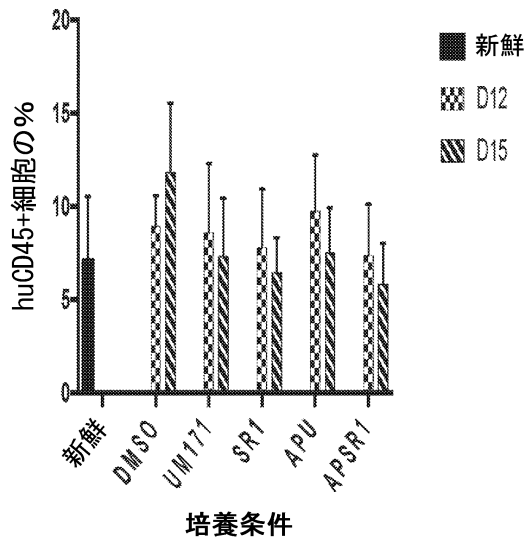


30

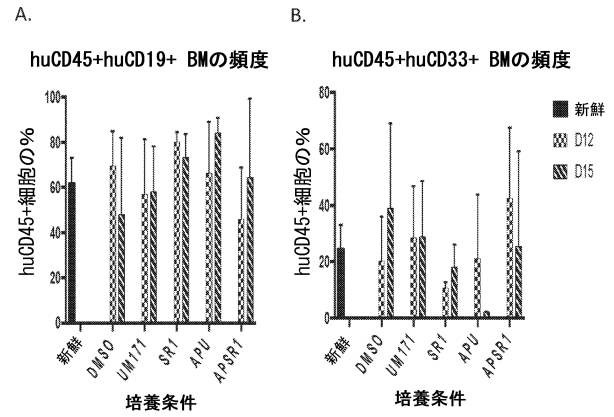
40

50

【図 5 5】

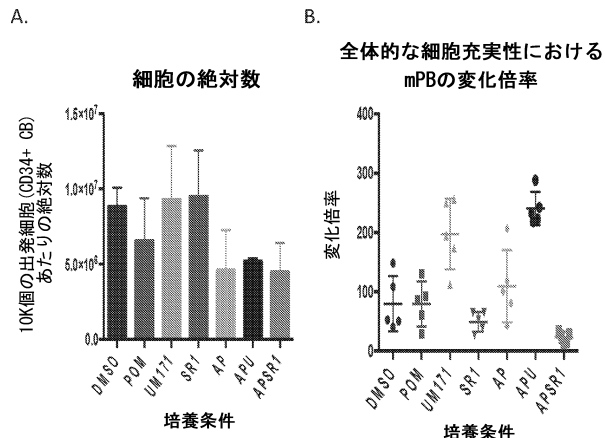
hCD45+Lin⁻CD34⁺前駆細胞の頻度

【図 5 6】

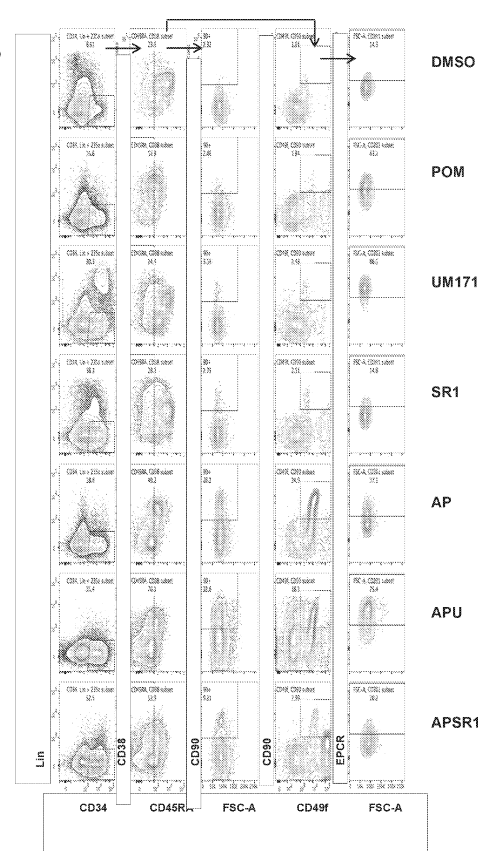


10

【図 5 7】



【図 5 8】

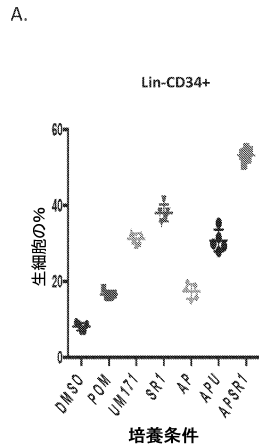


30

40

50

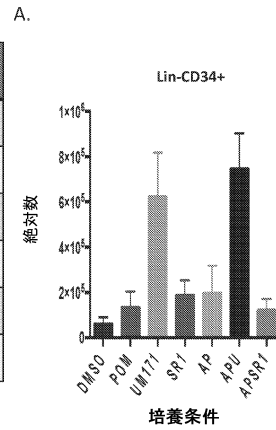
【図 59】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
DMSO 対 POM	有意	<0.0001
DMSO 対 UM171	有意	<0.0001
DMSO 対 SR1	有意	<0.0001
DMSO 対 AP	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001
DMSO 対 APSR1	有意	<0.0001

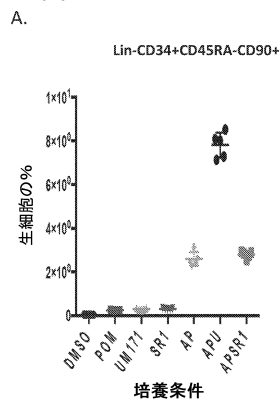
【図 60】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
DMSO 対 UM171	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001

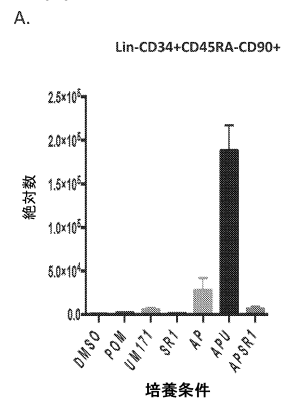
【図 61】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
DMSO 対 AP	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001
DMSO 対 APSR1	有意	<0.0001

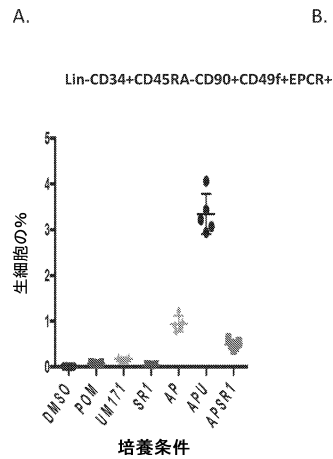
【図 62】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
DMSO 対 AP	有意	0.0227
DMSO 対 APU	有意	<0.0001

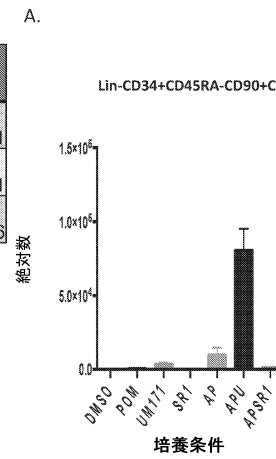
【図 63】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
DMSO 対 AP	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001
DMSO 対 APSR1	有意	0.0036

【図 64】



B.

試験した条件	有意かどうか？	調整P値
DMSO 対 APU	有意	<0.0001

10

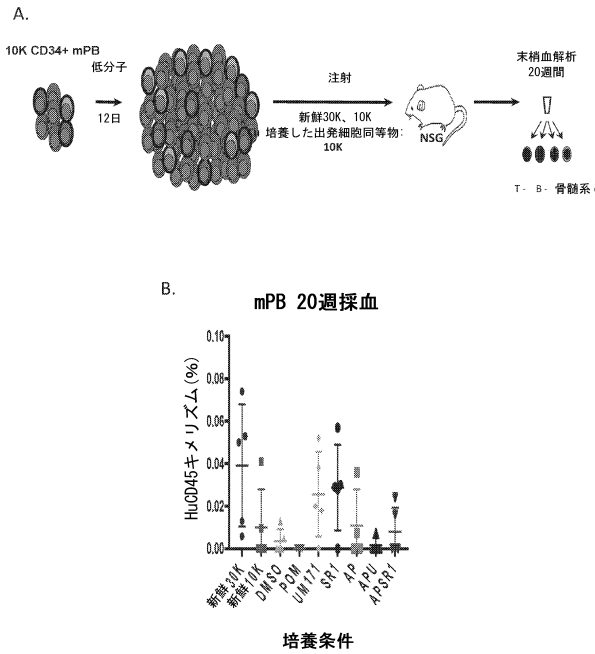
20

30

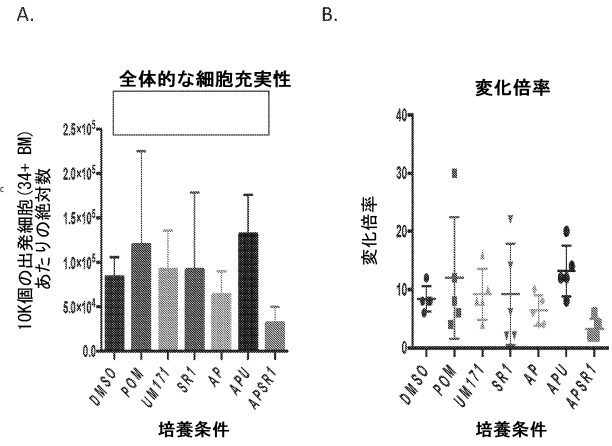
40

50

【図 6 5】

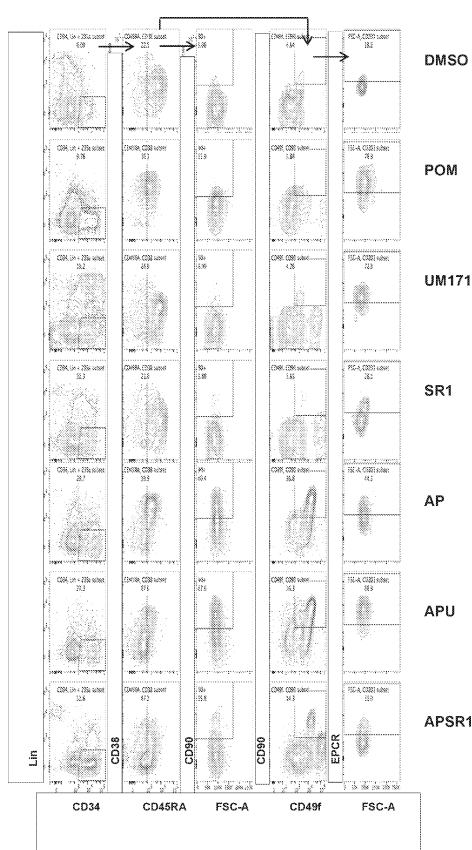


【図 6 6】

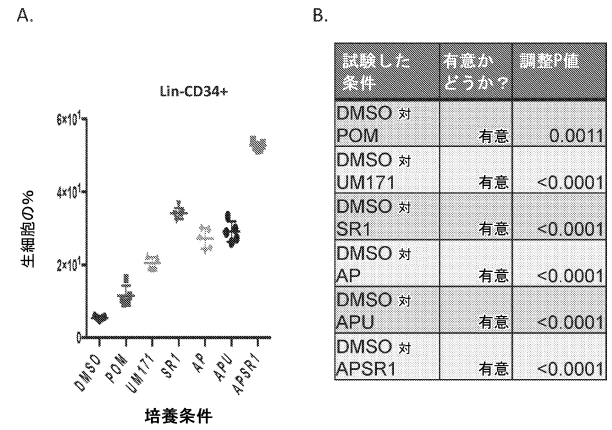


10

【図 6 7】



【図 6 8】



20

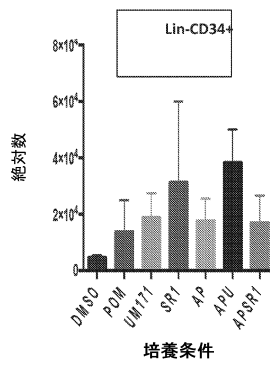
30

40

50

【図 69】

A.

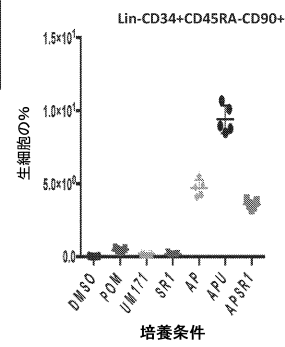


B.

試験した条件	有意かどうか?	調整P値
DMSO 対 APU	有意	0.0092

【図 70】

A.



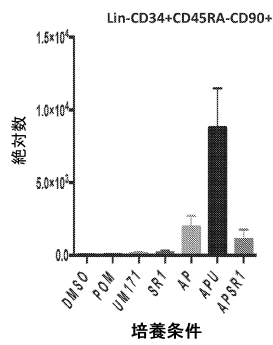
B.

試験した条件	有意かどうか?	調整P値
DMSO 対 AP	有意	<0.0001
DMSO 対 APU	有意	<0.0001
DMSO 対 APSR1	有意	<0.0001

10

【図 71】

A.

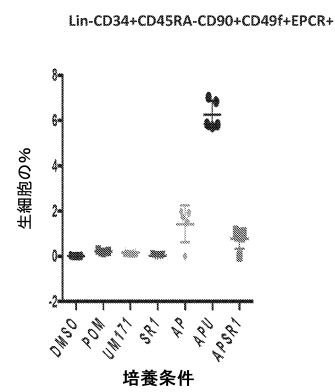


B.

試験した条件	有意かどうか?	調整P値
DMSO 対 APU	有意	<0.0001

【図 72】

A.



B.

試験した条件	有意かどうか?	調整P値
DMSO 対 AP	有意	0.0002
DMSO 対 APU	有意	<0.0001

20

30

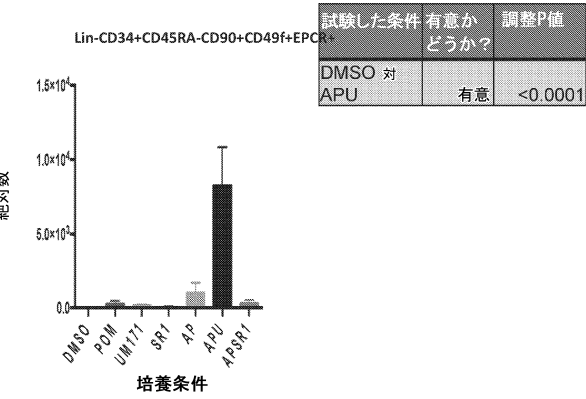
40

50

【図 7 3】

A.

B.



10

【配列表】

0007080179000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ロッシ デリック ジェイ .

アメリカ合衆国 0 2 4 5 9 マサチューセッツ州 ニュートン マドック ストリート 3 6

(72)発明者 蝦名 渉

アメリカ合衆国 0 2 1 1 5 マサチューセッツ州 ボストン アベニュー ルイ パスツール 1 0 7
ボックス 1 5 1 5

審査官 小田 浩代

(56)参考文献

Moutouh-de Parseval, L. A. et al. , Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34+ cells , J. Clin. Invest. , 2008年 , Vol. 118(1) , pp. 248-58

Fares, I. et al. , Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal , Science , 2014年 , Vol. 345(6203) , pp. 1509-1512

サリドマイドの標的タンパク質「セレブロン」の三次元構造を解明, 奈良先端科学技術大学院大学[online] , 2014年 , <http://www.naist.jp/pressrelease/2014/08/002155.html> , [retrieved on 3/4/2021]

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

P u b M e d