

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6861438号
(P6861438)

(45) 発行日 令和3年4月21日 (2021.4.21)

(24) 登録日 令和3年4月1日 (2021.4.1)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	C 1 2 N 15/85 Z
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00 F
A 6 1 K 35/44 (2015.01)	A 6 1 K 35/44

請求項の数 52 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-503175 (P2018-503175)	(73) 特許権者	516389363
(86) (22) 出願日	平成28年7月19日 (2016.7.19)		アンジオクライン・バイオサイエンス・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-526984 (P2018-526984A)		Angiocrine Bioscience, Inc.
(43) 公表日	平成30年9月20日 (2018.9.20)		アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、ソレント・バレー・ロード11575番、スウィート217
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/042873		
(87) 国際公開番号	W02017/015246	(74) 代理人	100106518
(87) 国際公開日	平成29年1月26日 (2017.1.26)		弁理士 松谷 道子
審査請求日	令和1年7月18日 (2019.7.18)	(74) 代理人	100138911
(31) 優先権主張番号	62/194,466		弁理士 櫻井 陽子
(32) 優先日	平成27年7月20日 (2015.7.20)	(74) 代理人	100165892
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 坂田 啓司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E T S 転写因子を発現する改変内皮細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E 4 O R F 1 + E T V 2 + 改変内皮細胞の単離された集団であって、該内皮細胞が分化した内皮細胞である、集団。

【請求項 2】

細胞が、E T V 2 ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む、請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団。

【請求項 3】

細胞が、アデノウイルス E 4 O R F 1 ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む、請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団。

【請求項 4】

核酸分子が、プラスミドベクターの形態で存在する、請求項 2 または 3 に記載の集団。

【請求項 5】

核酸分子が、改変内皮細胞のゲノム D N A に組み込まれない、請求項 2 または 3 に記載の集団。

【請求項 6】

核酸分子が、改変内皮細胞のゲノム D N A に組み込まれる、請求項 2 または 3 に記載の集団。

【請求項 7】

内皮細胞が、分化した内皮細胞に由来する、請求項 1 に記載の集団。

【請求項 8】

内皮細胞が、成体内皮細胞に由来する、請求項 1 に記載の集団。

【請求項 9】

内皮細胞が、胚内皮細胞ではない、請求項 1 に記載の集団。

【請求項 10】

内皮細胞が、ヒト内皮細胞である、請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団。

【請求項 11】

内皮細胞が、初代内皮細胞に由来する、請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団。

【請求項 12】

内皮細胞が、ヒト臍帯静脈内皮細胞（H U V E C）に由来する、請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団。 10

【請求項 13】

請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団を含む組成物。

【請求項 14】

担体溶液をさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

担体溶液が、生理食塩水である、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

幹細胞または前駆細胞をさらに含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 17】

幹細胞または前駆細胞が、造血幹細胞または前駆細胞（H S P C）である、請求項 16 に記載の組成物。 20

【請求項 18】

請求項 1 に記載の改変内皮細胞の集団、および対象への投与に適する担体溶液、を含む処置用組成物。

【請求項 19】

担体溶液が、生理食塩水である、請求項 18 に記載の処置用組成物。

【請求項 20】

幹細胞または前駆細胞をさらに含む、請求項 18 に記載の処置用組成物。

【請求項 21】

幹細胞または前駆細胞が、H S P C である、請求項 20 に記載の処置用組成物。 30

【請求項 22】

H S P C が、骨髓から得られるかまたは骨髓に由来する、請求項 17 に記載の組成物または請求項 21 に記載の処置用組成物。

【請求項 23】

H S P C が、末梢血から得られるかまたは末梢血に由来する、請求項 17 に記載の組成物または請求項 21 に記載の処置用組成物。

【請求項 24】

H S P C が、羊水から得られるかまたは羊水に由来する、請求項 17 に記載の組成物または請求項 21 に記載の処置用組成物。 40

【請求項 25】

H S P C が、臍帯血から得られる、請求項 17 に記載の組成物または請求項 21 に記載の処置用組成物。

【請求項 26】

細胞移植術における使用のための、請求項 18 に記載の処置用組成物。

【請求項 27】

H S P C 移植術における使用のための、請求項 18 に記載の処置用組成物。

【請求項 28】

培養において内皮細胞を維持するかまたは増殖させる方法であって、E T V 2 ポリペプチドをコードする核酸分子、および E 4 O R F 1 ポリペプチドをコードする核酸分子を、 50

内皮細胞へ導入して、E 4 O R F 1 + E T V 2 + 改変内皮細胞を作ることを含み、ここで、該改変内皮細胞は、培養において維持するかまたは増殖させることができる、方法。

【請求項 2 9】

改変内皮細胞を培養することをさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

血清の非存在下で改変内皮細胞を培養することをさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

外因性増殖因子の非存在下で改変内皮細胞を培養することをさらに含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

導入を、トランスフェクションによって行う、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

トランスフェクションを、リボソームによるトランスフェクション、ポリブレンによるトランスフェクション、D E A E デキストランによるトランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、および微粒子銃からなる群から選択される方法を使用して行う、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

導入を、ウイルスによる形質導入によって行う、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 5】

ウイルスによる形質導入を、レンチウイルスによる形質導入、アデノウイルスによる形質導入、レトロウイルスによる形質導入、アデノ随伴ウイルスによる形質導入、およびヘルペスウイルスによる形質導入からなる群から選択される方法を使用して行う、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 6】

内皮細胞が、初代内皮細胞である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 7】

内皮細胞が、ヒト内皮細胞である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 8】

内皮細胞が、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 9】

培養において造血幹細胞または前駆細胞 (H S P C)の集団を維持するかまたは増殖させる方法であって、(a) 請求項 1 に記載の E 4 O R F 1 + E T V 2 + 改変内皮細胞の集団を得るかまたは生成すること、および (b) 該改変内皮細胞を、H S P Cの集団とともに同じ培養容器中で培養すること、を含む方法。

【請求項 4 0】

改変内皮細胞が、培養容器の表面上にフィーダー細胞層を形成する、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

培養が、C D 4 5 R A - H S P C の選択的増殖をもたらす、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

培養が、C D 3 4 + H i g h , C D 4 5 R A - H S P C の選択的増殖をもたらす、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 3】

培養が、C D 4 5 R A - である H S P C の割合の増加をもたらす、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

培養が、C D 3 4 + H i g h , C D 4 5 R A - である H S P C の割合の増加をもたらす、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 5】

10

20

30

40

50

工程 (b) の培養を、血清の非存在下で行う、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 6】

工程 (b) の培養を、外因性増殖因子の非存在下で行う、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 7】

(a) E T V 2 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および (b) E 4 O R F 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、を含む核酸ベクター。

【請求項 4 8】

発現ベクターである、請求項 4 7 に記載の核酸ベクター。

【請求項 4 9】

E T V 2 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および E 4 O R F 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、別個のプロモーターの制御下にある、請求項 4 7 に記載の核酸ベクター。

10

【請求項 5 0】

E T V 2 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列および E 4 O R F 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が、同じプロモーターの制御下にある、請求項 4 7 に記載の核酸ベクター。

【請求項 5 1】

内皮細胞が、アデノウイルス E 4 領域全体を含まない、請求項 1 に記載の集団。

【請求項 5 2】

内皮細胞が、アデノウイルス E 4 O R F 2、E 4 O R F 3、E 4 O R F 4、および / または E 4 O R F 5 を含まない、請求項 1 に記載の集団。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、2015年7月20日に出願された米国仮特許出願第62/194,466号の優先権を主張し、該仮特許出願の内容は、参照によりその全体が本書に組み込まれる。

【0002】

参照による組み込み

30

参照による組み込みが認められる管轄のためには、本開示で引用される参照文献は全て、それらの全体が参照により本書に組み込まれる。さらに、本書中で引用または言及する製品についての製造者の指示書またはカタログはいずれも、参照により本書に組み込まれる。参照により本書に組み込まれる文書、またはその中の任意の教示は、本発明の実施において使用され得る。米国特許第8,465,732号に示される一般的な教示の多くを、本発明に関連して用いることができるか、または本発明に用いるために適応させることができる。したがって、米国特許第8,465,732号の全内容が、参照により本出願に明らかに組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

40

背景

E T V 2 (Lee et al., Cell stem cell, 2: 497-507 (2008)、Sumanas et al., Blood, 111: 4500-4510 (2008))、F L I 1 (Liu et al., Current Bio. 18: 1234-1240 (2008)) および E R G (McLaughlin et al., Blood, 98: 3332-3339 (2001)) を含む、E - 26ファミリーあるいは「E T S」ファミリーの転写因子 (T F) の成員は、血管発生および血管形成の調節に関連付けられている (De Val et al., Dev Cell, 16: 180-195 (2009)) ; Sato et al., Cell Struct Funct, 26: 19-24 (2001))。これらの T F は、内皮細胞 (E C) の発生および機能に関連する遺伝子の発現を直接的に調節する。成体 E C は、F L I 1、E R G (アイソフォーム 1 および 2)、E T S J、E T S 2、E l f 1、E l k 1、V E Z F および E T V 6 などの幾つかの E T S 因子を構成的に発現するが、E T V 2

50

は、胚発生中に一過的に発現され、成体 EC には存在しない (Kataoka et al., Blood, 18: 6975-6986 (2011); Lelievre et al., The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology, 33: 391-407 (2001))。発生中の血管の特異化において重要な役割を果たす (Liu et al., Circ Res, 103: 1147-1154 (2008); Pham et al., Dev Biol, 303: 772-783 (2007)) 他に、これらの TF の幾つかの一過的な発現は、多能性幹細胞を内皮細胞へ再プログラミングすることができるか、または他の (非多能性) 細胞型を内皮細胞へ再プログラミング / 分化転換することができることも示されている (例えば、Choi et al., Stem Cells 27, 559-567 (2009)、James et al., Nat. Biotech. 28, 161-166 (2010)、Prasain et al., Nat. Biotech. 32, 1151-1157 (2014)、Morita et al., PNAS, 112, 160-165 (2015)、Kurian et al., Nat. Methods 10, 77-83 (2013)、および Ginsberg et al., Cell, 151: 559-575 を参照)。しかしながら、本発明者らが知る限りでは、本発明より前には、ETS ファミリーの転写因子、特に ETV2 転写因子は、分化した内皮細胞、またはすでに内皮細胞系列への分化が方向付けられた内皮細胞に対して作用するとは考えられていなかった。同じく本発明より前には、本発明者らが知る限りでは、かかる因子を発現する内皮細胞が、幹細胞および前駆細胞などの他の細胞型の増殖を支持する能力に関して高められた性質を有し得るとの予測もなされていなかった。

【0004】

アデノウイルス初期 4 (E4) 領域は、少なくとも 6 つのオープンリーディングフレームを含有する (E4ORF)。E4 領域全体は、内皮細胞の血管形成を調節し生存を促進することが示されている (Zhang et al. (2004), J. Biol. Chem. 279(12):11760-66 を参照)。また、E4 領域全体の中で、内皮細胞におけるこれら生物学的効果に関与するのは、E4ORF1 配列であることも示されている。例えば、米国特許第 8,465,732 号を参照されたい。また、Seandel et al. (2008), "Generation of a functional and durable vascular niche by the adenoviral E4ORF1 gene," PNAS, 105(49):19288-93 を参照されたい。

【発明の概要】

【0005】

発明の概要

本発明は、一つには、ETS 転写因子 ETV2 は、内皮細胞において発現されると、特にアデノウイルス E4ORF1 ポリペプチドと同時に発現されると、ある予測されなかった効果を示す、という発見に基づく。E4ORF1 発現内皮細胞は、血清の非存在下でさえ、培養中に長期間維持することができること、および造血幹細胞および前駆細胞 (HSPC) などの他の細胞型の培養の支持のために使用できることがすでに知られていたが (Kobayashi et al., Nature Cell Biology 12, 1046-1056 (2010); Butler et al., Blood 120, 1344-1347 (2012) を参照)、ここでは、E4ORF1 および ETV2 の両方を発現する改変内皮細胞 (即ち、E4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞) もまた、HSPC 増殖を支持できること、さらに、HSPC を E4ORF1 + ETV2 + 内皮細胞と同時に培養すると、E4ORF1 + 内皮細胞または ETV2 + 内皮細胞のいずれかを使用する場合と比較して、より原始的な HSPC 集団の選択的増殖がもたらされ得ることが発見された。これらの発見に基づき、本発明は、E4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞、該細胞を含む組成物、ならびに該細胞を生成および使用する様々な方法を提供する。

【0006】

一実施形態では、本発明は、E4ORF1 + ETS + 改変内皮細胞の集団、即ちアデノウイルス E4ORF1 ポリペプチドおよび ETS 転写因子ポリペプチドを発現する改変内皮細胞の集団を提供する。適切な ETS 転写因子ポリペプチドとしては、FLI1、ERG (アイソフォーム 1 および 2)、ETSJ、ETS2、Elf1、Elk1、VEZF、ETV6 および ETV2 が挙げられる。好ましい実施形態では、ETS 転写因子は、ETV2 である。したがって、1 つの好ましい実施形態では、本発明は、E4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞の集団を提供する。幾つかのかかる実施形態では、改変内皮細胞は、挙げられた分子をコードする組換え核酸分子、例えば、ETS 転写因子ポリペプチド、

またはE T V 2 ポリペプチド、またはE 4 O R F 1 ポリペプチドをコードする組換え核酸分子を含む。幾つかのかかる実施形態では、組換え核酸分子は、プラスミドベクターの形態で存在する。幾つかのかかる実施形態では、組換え核酸分子は、改変内皮細胞のゲノムDNAに組み込まれる。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞の集団は、単離細胞集団である。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞の集団は、実質的に純粋な細胞集団である。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞の集団は、インビトロに、例えば細胞培養物中に存在する。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞の集団は、インビボに、例えば生存対象中に存在する。

【0007】

本発明の幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、分化した内皮細胞に由来する。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、成体内皮細胞に由来する。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、胚内皮細胞ではないか、または胚内皮細胞に由来しない。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、ヒト内皮細胞に由来する。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、初代内皮細胞に由来する。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に由来する。

【0008】

幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載する様々な内皮細胞集団を含む組成物を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、本明細書中に記載されるような改変内皮細胞の集団を含む組成物を提供する。幾つかの実施形態では、かかる組成物は、生理食塩水などの担体溶液を含んでもよい。幾つかの実施形態では、かかる組成物は、造血幹細胞または前駆細胞(HSPC)を包含するがそれに限定されない幹細胞または前駆細胞などの他の細胞型を含んでもよい。幾つかの実施形態では、HSPCは、遺伝的に修飾されている。幾つかの実施形態では、本発明が提供する組成物は、処置用組成物であり、細胞、担体溶液および/または他の構成成分(ヒト対象などの生存対象への投与に適するもの)を含む。幾つかの実施形態では、かかる組成物は、HSPC移植術などの細胞移植術において使用し得る。

【0009】

組成物(例えば処置用組成物)がHSPCを含む実施形態では、HSPCは、任意の適切な供給源から得るか、またはそれに由来し得る。例えば、一実施形態では、HSPCは、骨髓から得るか、または骨髓に由来する。別の実施形態では、HSPCは、末梢血から得るか、または末梢血に由来する。別の実施形態では、HSPCは、羊水から得るか、または羊水に由来する。さらに別の実施形態では、HSPCは、臍帯血から得る。

【0010】

幾つかの実施形態では、本発明は、培養において内皮細胞を維持するかまたは増殖させる方法を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、培養において内皮細胞を維持するかまたは増殖させる方法であって、ETS転写因子ポリペプチドをコードする核酸分子およびE 4 O R F 1 ポリペプチドをコードする核酸分子を内皮細胞へ導入して、E 4 O R F 1 + E T S + 改変内皮細胞を作ること(ここで、該改変内皮細胞は、培養において維持するかまたは増殖させることができる)、を含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、上述の転写因子の導入は、持続的な効果を有し得、かつ、例えば誘導プラスミド、精製タンパク質またはペプチド模倣体による発現によって、一過的に必要とされるのみであり得る。好ましい実施形態では、ETS転写因子はETV2であり、作られる改変内皮細胞はE 4 O R F 1 + E T S + 改変内皮細胞である。また、かかる方法はいずれも、続いて改変内皮細胞を培養することを含み得る。幾つかの実施形態では、かかる培養は、血清の非存在下で、または外因性増殖因子の非存在下で、または血清および外因性増殖因子の両方の非存在下で行い得る。幾つかの実施形態では、様々な核酸分子を「導入する」工程は、トランスフェクション、例えばリポソームによるトランスフェクション、ポリブレンによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、または微粒子銃によって行う。他の実施形態では、様々な核酸分子を「導入する」工程は、ウイルスによる

10

20

30

40

50

形質導入、例えばレンチウイルスによる形質導入、アデノウイルスによる形質導入、レトロウイルスによる形質導入、アデノ随伴ウイルスによる形質導入、またはヘルペスウイルスによる形質導入によって行う。幾つかの実施形態では、様々な核酸分子を「導入する」工程は、1つまたは複数の遺伝子編集技術を使用して、例えばジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Cas系、および/または改変メガヌクレアーゼ再改変ホーミングエンドヌクレアーゼを使用して行う。幾つかのかかる方法では、使用する内皮細胞は、初代内皮細胞である。幾つかのかかる方法では、使用する内皮細胞は、HUVECなどのヒト内皮細胞である。

【0011】

幾つかの実施形態では、本発明は、様々な同時培養方法を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、培養において「目的の細胞」の集団を維持するかまたは増殖させる方法であって、E4ORF1 + ETS + 改変内皮細胞(例えば、好ましくはE4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞)の集団を得るかまたは作ること、および改変内皮細胞を、目的の細胞の集団と同じ培養容器中で培養すること、を含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、かかる同時培養方法は、血清の非存在下で、または外因性増殖因子の非存在下で、または血清および外因性増殖因子の両方の非存在下で行い得る。幾つかのかかる実施形態では、改変内皮細胞は、培養容器の表面上にフィーダー細胞層を形成する。「目的の細胞」は、内皮細胞との同時培養を行うことが望ましい任意の細胞であり得る。例えば、一実施形態では、目的の細胞は、がん細胞、幹細胞、前駆細胞またはハイブリドーマ細胞であり得る。1つの好ましい実施形態では、目的の細胞は、HSPCである。重要なことに、本明細書中に記載する同時培養方法は、幾つかの他の方法と比較した場合にHSPCの増殖の改善をもたらすことができ、かつ、幾つかの他の方法と比較した場合に、より原始的なHSPCのより大きな増殖をもたらすことができることがわかった。したがって、幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する同時培養方法は、CD45RA-HSPC、例えばCD34 + high, CD45RA-HSPC、およびCD34 + high, CD38 - low, Lin-HSPCなどの、より原始的なHSPCを増殖させるために使用し得る。

【0012】

幾つかの実施形態では、本発明は、本発明の改変内皮細胞から得た馴化培地を用いる培養方法を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、目的の細胞の集団を維持するかまたは増殖させる方法であって、E4ORF1 + ETS + 改変内皮細胞(例えば、好ましくはE4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞)の集団の培養から馴化培地を得ること、および、目的の細胞を馴化培地と接触させること、を含む方法を提供する。同様に、一実施形態では、本発明は、目的の細胞の集団を維持するかまたは増殖させる方法であって、E4ORF1 + ETS + 改変内皮細胞(例えば、好ましくはE4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞)の集団を得るかまたは作ること、培養容器中で改変内皮細胞を培養すること、培養容器から馴化培地を収集すること、および、目的の細胞を馴化培地と接触させること、を含む方法を提供する。かかる方法はそれぞれ、続いて目的の細胞を培養することを含んでもよい。

【0013】

同様に、幾つかの実施形態では、本発明は、本発明の改変内皮細胞の培養から得る馴化細胞培養培地を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、E4ORF1 + ETS + 改変内皮細胞(例えば、好ましくはE4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞)の培養から得る馴化細胞培養培地を提供する。

【0014】

幾つかの実施形態では、本発明はまた、核酸ベクター分子を提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、ETS転写因子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、およびE4ORF1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の両方を含む核酸ベクターを提供する。好ましい実施形態では、本発明は、ETV2ポリペプチドをコードする核酸配

10

20

30

40

50

列、および E 4 O R F 1 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の両方を含む核酸ベクターを提供する。幾つかのかかる実施形態では、ベクターは、発現ベクターである。幾つかのかかる実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。幾つかのかかる実施形態では、2つのヌクレオチド配列は、別個のプロモーターの制御下にある。他の実施形態では、両方のヌクレオチド配列が、同じプロモーターの制御下にある。

【0015】

本明細書中に記載する細胞集団、組成物および方法は、様々な用途において有用であり得る（本特許開示の他のセクションにてさらに記載するように）。概して、本明細書において提供される改変内皮細胞ならびに関連する組成物および方法は、他の内皮細胞（例えば、ナイーブ内皮細胞、または E 4 O R F 1 + 内皮細胞）が現在使用されているかまたは使用され得る任意の適用のために使用することができ、そのような適用は、基礎科学研究適用、細胞培養方法（同時培養方法を包含する）、標的的発見、薬物の発見、ならびに薬物の有効性、毒性および/または安全性試験を包含するが、それに限定されない。例えば、幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、他の細胞型の培養を促進するために、例えば H S C などの様々な型の幹細胞または前駆細胞の増殖のために使用し得る。幾つかの実施形態では、本明細書において提供される改変内皮細胞は、インビボ細胞移植術を包含するがこれに限定されない処置用途において有用であり得る。例えば、幾つかの実施形態では、改変内皮細胞それ自体を、単独で、あるいは1つまたは複数のさらなる細胞型（H S C などの幹細胞または前駆細胞を包含するが、これに限定されない）と一緒に、対象に投与し得る。

【0016】

本発明のこれらの実施形態および他の実施形態は、本特許開示の他のセクションにおいてさらに記載される。さらに、当業者には明らかであろうが、本明細書中に記載する様々な実施形態のある特定の修飾および組み合わせは、本発明の範囲内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

図面の簡単な説明

【図1】図1A～1Cは、E 4 O R F 1 + E T V 2 -（図1A）、E 4 O R F 1 - E T V 2 +（図1B）、および E 4 O R F 1 + E T V 2 +（図1C）改変内皮細胞の、継代8（形質導入後に7回継代）における位相差顕微鏡画像を示す。

【図2】図2A～2Cは、E 4 O R F 1 + E T V 2 -（図2A）、E 4 O R F 1 - E T V 2 +（図2B）、および E 4 O R F 1 + E T V 2 +（図2C）内皮細胞の、H S P C との同時培養における10日後の位相差顕微鏡画像を示す。

【図3】図3は、E 4 O R F 1 単独（E 4 O R F 1 + E T V 2 -）、E T V 2 単独（E 4 O R F 1 - E T V 2 +）、または E 4 O R F 1 および E T V 2 の両方（E 4 O R F 1 + E T V 2 +）（x 軸上にバーの表示により示す）のいずれかを発現するように改変された内皮細胞が、同時培養した H S P C に及ぼす影響を示す。細胞は、10日間同時培養した。y 軸は、C D 4 5 + 細胞の数に対するパーセンテージとして表される C D 3 4 + H S P C の数を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

詳細な説明

本特許開示の「発明の概要」、「図面」、「図面の簡単な説明」、「実施例」および「特許請求の範囲」のセクションは、本発明の主な実施形態の幾つかについて説明するものである。本「詳細な説明」のセクションは、本発明の組成物および方法に関するある特定のさらなる説明を提供するものであり、本特許開示の全ての他のセクションと併せて読まれることが意図される。さらに、当業者に明らかであるように、本特許開示全体にわたって記載される種々の実施形態は、多様な方法で組み合わせることができるか、または組み合わせられることが意図される。本明細書中に記載する特定の実施形態のかかる組み合わ

せは、本発明の範囲内に含まれることが意図される。

【0019】

定義

ある特定の定義を以下に提供する。他の用語は、本特許開示の他の箇所で定義されるか、それらが使用される文脈から明確な意味を有するか、または当該技術分野におけるそれらの通常の意味に従って使用される。

【0020】

本明細書中で使用する場合、「約」および「およそ」という用語は、数値に関して使用する場合、記載する値の+または-20%以内を意味する。

【0021】

「培養すること」という用語は本明細書中で使用する場合、様々な種類の培地上または培地中での細胞の繁殖を指す。「同時培養すること」は、様々な種類の培地上もしくは培地中での2つまたはそれ以上の異なる型の細胞の繁殖を指し、例えば、幾つかの実施形態では、内皮細胞および造血幹細胞または前駆細胞(HSPC)が同時培養され得る。

【0022】

本明細書中で使用する場合、「有効量」という用語は、本明細書中に記載されるような特定の作用物質または細胞集団(例えば、ETV2またはE4ORF1ポリペプチド、ETV2またはE4ORF1ポリペプチドをコードする核酸分子、またはE4ORF1+ETV2+改変内皮細胞の集団)の量であって、本明細書中に記載する成果の1つまたは複数において検出可能な効果を達成するのに十分である量を指す。例えば、内皮細胞におけるETV2およびE4ORF1の発現の場合、内皮細胞へ導入/デリバリーされるべき核酸分子(例えば、ベクター中のもの)の有効量は、任意の適切な対照(例えば、E4ORF1-ETV2-内皮細胞)の内皮細胞生存または増殖と比較した場合に、内皮細胞生存または増殖の検出可能な増加をもたらす量であり得る。同時培養方法におけるE4ORF1+ETV2+内皮細胞の使用の場合、E4ORF1+ETV2+内皮細胞の有効量は、同時培養される細胞の検出可能な増殖をもたらす量であるか、または任意の適切な対照(例えば、E4ORF1-ETV2-内皮細胞)を用いて得られる増殖と比較した場合に、同時培養される細胞の増殖の増加をもたらす量であり得る。内皮細胞におけるETV2および/またはE4ORF1をコードする核酸分子の導入の場合、核酸分子(例えば、ベクター中のもの)の有効量は、任意の適切な対照(例えば、E4ORF1-ETV2-細胞)の内皮細胞生存または増殖と比較した場合に、内皮細胞生存または増殖の検出可能な増加をもたらす量であり得る。E4ORF1+ETV2+内皮細胞を対象へ投与することを含む方法の場合、有効量は、任意の適切な対照(例えば、E4ORF1-ETV2-内皮細胞)を投与したときと比較した場合に、1つまたは複数の望ましい生物学的または治療的指標の検出可能な改善(例えば、内皮細胞生着の改善、内皮/血管再生の改善、血管新生の改善、HSPCなどの同時投与される細胞型の生存または生着の改善など)をもたらす量であり得る。任意の個々の場合における適切な「有効量」は、経験的に、例えば用量漸増研究などの当該技術分野において公知の標準的な技法を使用して、決定してもよく、計画される使用、計画されるデリバリー/投与様式、所望のデリバリー/投与頻度等のような因子を考慮して決定してもよい。さらに、「有効量」は、内皮細胞または同時培養される細胞の効果を評価するための、本特許開示の実施例のセクションに記載されるアッセイなどのアッセイを使用して決定してもよい。

【0023】

「改変」という用語は、本明細書中で細胞に関して使用される場合、そこで記載される表現型(例えば、E4ORF1+ETV2+)を生じるように、またはそこで記載される核酸分子もしくはポリペプチドを発現するように、人間によって改変された細胞を指す。

「改変細胞」という用語は、自然に存在する細胞を包含することを意図せず、その代わりに、例えば、組換え核酸分子を含む細胞、または別の方法で人工的に(例えば、遺伝的修飾によって)変更された細胞(この変更は、例えば、細胞が、変更されなければ発現しないポリペプチドを発現するように、または細胞が、未改変の内皮細胞で観察されるよりも

10

20

30

40

50

実質的に高いレベルでポリペプチドを発現するように、なされる)を包含することが意図される。

【0024】

「増殖」または「増殖すること」という用語は、本明細書中で使用する場合、細胞または細胞培養の文脈では、初期集団の細胞からのある特定の型の細胞(例えば、内皮細胞またはHSC)の数の増加を指し、ここで初期集団の細胞は、同一であってもよいし、または同一でなくてもよい。増殖に使用される初期細胞は、増殖により生じる細胞と同じである必要はない。例えば、増殖細胞は、初期集団の細胞の成長および分化によって産生され得る。

【0025】

「遺伝子修飾(遺伝的修飾)」または「遺伝子修飾された」は、細胞の正常なヌクレオチド配列に対する、任意の付加、欠失または破壊を指す。幾つかの実施形態では、本明細書中に記載する内皮細胞は、ETS転写因子ポリペプチド(ETV2など)をコードする核酸分子およびアデノウイルスE4ORF1ポリペプチドをコードする核酸分子を含有することに加えて、望ましい場合には、1つまたは複数の他の遺伝的修飾を含んでもよい。「遺伝子修飾(遺伝的修飾)」という用語は、遺伝子デリバリーベヒクルの使用を含み、形質導入(インビボまたはインビトロのいずれかでの、ウイルスによるレシピエントへの核酸導入)、トランスフェクション(単離核酸の細胞による取込み)、リポソームによる導入、および当該技術分野で周知の他の手段を含むが、これらに限定されない。

【0026】

「造血幹細胞」または「HSC」という用語は、B細胞、T細胞、NK細胞、リンパ系樹状細胞、骨髄系樹状細胞、顆粒球、マクロファージ、巨核球および赤血球細胞を含む造血系の全ての細胞型へ最終的に分化することが可能な、クローン原性の自己再生多能性細胞を指す。造血系の他の細胞と同様に、HSCは、通常、細胞マーカーの特徴的なセットの存在によって規定される。

【0027】

「造血幹細胞または前駆細胞」または「HSPC」という用語は、本明細書中で使用する場合、上記で定義するようなHSC、ならびに造血系の全ての細胞型へ最終的に分化することが可能である多能性非自己再生前駆細胞、および造血系のある特定の細胞型へ分化することが可能な寡能性(oligopotent)および単能性前駆細胞を包含する。HSPCは、本明細書中で定義するようなCMP、MP、MEPおよびGMPを含む。

【0028】

本明細書中で使用する場合、「単離された」という用語は、生成物、化合物または組成物が、天然におけるか合成的にもたらされるかに関わらずその自然に生じる状態において伴う少なくとも1つの他の生成物、化合物または組成物から分離されていることを指す。

【0029】

本明細書中で使用する場合、「組換え」という用語は、分子生物学および遺伝子工学(分子クローニングなど)の方法を使用して人間によって(機械によることを包含する)生成され、そうでなければ自然には存在しないヌクレオチド配列を含む核酸分子を指す。したがって、組換え核酸分子は、自然に(例えば生物のゲノム中に)存在する核酸分子と区別されるべきである。したがって、対応するゲノムDNA配列中に見出されるような介在イントロン配列を伴わない、mRNA配列の相補的DNA、即ち「cDNA」のコピーを含む核酸分子は、組換え核酸分子とみなされ得る。例として、組換えE4ORF1核酸分子は、E4ORF1コード配列が、自然に存在するアデノウイルスゲノムにおいては通常連結されないプロモーターおよび/または他の遺伝子要素に作動可能に連結されたものを含み得る。同様に、組換えETV2核酸分子は、ETV2 cDNA配列(即ち、生物のゲノム中に自然には存在しない配列)を含み得、および/またはETV2コード配列が、自然に存在するアデノウイルスゲノムにおいては通常連結されないプロモーターおよび/または他の遺伝子要素に作動可能に連結されたものを含み得る。

【0030】

「自己再生」という用語は、分裂して親細胞と同一の（例えば、自己再生）特性を有する少なくとも1つの娘細胞を生成する、細胞の能力を指す。別の娘細胞は、特定の分化経路に進むものであり得る。例えば、自己再生造血幹細胞は、分裂して、娘幹細胞、および骨髓系またはリンパ系経路の分化に向かう別の娘細胞を形成する。委任前駆細胞は通常、自己再生能力を失っており、細胞分裂により、より分化の進んだ（即ち、限定された）表現型を示す2つの娘細胞を生成する。

【0031】

「対象」または「患者」という用語は本明細書中で互換的に使用され、特に示されている場合を除いて、ヒトおよび非ヒト霊長類、ならびにウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタおよび他の哺乳動物種などの哺乳動物を指す。

10

【0032】

「実質的に純粋」という語句は、細胞集団に関して本明細書中で使用する場合、総細胞集団を構成する細胞のうち、ある特定の型（例えば、1つもしくは複数の特定の細胞マーカーの発現、形態学的特性、または機能的特性によって決定される）の細胞、または2つもしくはそれ以上の異なる細胞型と一緒に使用される実施形態において複数の特定の型の細胞の集団の占める割合が、少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75~80%、より好ましくは少なくとも約85~90%、最も好ましくは少なくとも約95%であることを指す。したがって、「実質的に純粋な細胞集団」は、細胞集団において、特定の型でない細胞の占める割合が、約50%よりも少ない、好ましくは約20~25%よりも少ない、より好ましくは約10~15%よりも少ない、最も好ましくは約5%よりも少ないことを指す。

20

【0033】

核酸分子およびポリペプチド

本明細書中に記載する本発明の実施形態の幾つかは、E4ORF1+、ETS+、および/またはETV2+である改変内皮細胞を含む。E4ORF1+細胞は、アデノウイルスE4ORF1ポリペプチドを発現する。ETS+細胞は、ETS転写因子ポリペプチド（ETV2転写因子ポリペプチドなど）を発現する。ETV2+細胞は、ETV2転写因子ポリペプチドを発現する。これらのポリペプチドは、本明細書中ではまとめて「本発明のポリペプチド」と称される。

【0034】

「本発明のポリペプチド」は、核酸分子によってコードされる。したがって、幾つかの実施形態では、本発明は、アデノウイルスE4ORF1ポリペプチドをコードする核酸分子、ETS転写因子ポリペプチドをコードする核酸分子、および/またはETV2転写因子ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。かかる核酸分子は、本明細書中ではまとめて「本発明の核酸分子」と称される。

30

【0035】

本発明のポリペプチドおよび本発明の核酸分子は、本明細書中に記載されるかまたは当該技術分野で公知であるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を有してもよく、あるいはかかるアミノ酸またはヌクレオチド配列の変異体、誘導体、突然変異体または断片であるアミノ酸またはヌクレオチド配列を有してもよいが、但し、かかる変異体、誘導体、突然変異体または断片は、本明細書中に記載する機能的特性〔これには、（例えば無血清条件下に）培養において内皮細胞の維持または増殖を支持する能力、および/または培養において別の細胞型（例えばHSPC）の増殖を支持する能力が包含されるが、それらに限定されない〕の1つまたは複数を含むものであるか、またはそれを有するポリペプチドをコードするものである。

40

【0036】

ETV2ポリペプチドなどのETS転写因子ポリペプチドを含む実施形態では、ポリペプチドは、ヒト、非ヒト霊長類、ウサギ、ラット、マウス、ヤギまたはブタポリペプチドなどの、任意の哺乳動物ETS転写因子ポリペプチドであり得る。幾つかの好ましい実施形態では、ポリペプチドは、ヒトポリペプチドであり得る。かかるポリペプチドのアミノ

50

酸配列、およびかかるポリペプチドをコードする核酸配列は、当該技術分野において周知であり、Genbankデータベースなどの周知の公的に利用可能なデータベースにおいて入手可能である。

【0037】

アデノウイルスE4ORF1ポリペプチドを含む実施形態では、使用するポリペプチド配列は、ヒトアデノウイルス2、3、5、7、9、11、12、14、34、35、46、50または52型などの任意の適切なアデノウイルス型または株に由来し得る。幾つかの好ましい実施形態では、使用するポリペプチド配列は、ヒトアデノウイルス5型に由来する。かかるアデノウイルスポリペプチドのアミノ酸配列、およびかかるポリペプチドをコードする核酸配列は、当該技術分野において周知であり、Genbankデータベースなどの周知の公的に利用可能なデータベースにおいて入手可能である。例えば、適切な配列として、下記が挙げられる：ヒトアデノウイルス9（Genbank受託番号CAI05991）、ヒトアデノウイルス7（Genbank受託番号AAR89977）、ヒトアデノウイルス46（Genbank受託番号AX70946）、ヒトアデノウイルス52（Genbank受託番号ABK35065）、ヒトアデノウイルス34（Genbank受託番号AW33508）、ヒトアデノウイルス14（Genbank受託番号AW33146）、ヒトアデノウイルス50（Genbank受託番号AW33554）、ヒトアデノウイルス2（Genbank受託番号AP.sub.-000196）、ヒトアデノウイルス12（Genbank受託番号AP.sub.-000141）、ヒトアデノウイルス35（Genbank受託番号AP.sub.-000607）、ヒトアデノウイルス7（Genbank受託番号AP.sub.-000570）、ヒトアデノウイルス1（Genbank受託番号AP.sub.-000533）、ヒトアデノウイルス11（Genbank受託番号AP.sub.-000474）、ヒトアデノウイルス3（Genbank受託番号ABB17792）、およびヒトアデノウイルス5型（Genbank受託番号D12587）。

【0038】

幾つかの実施形態では、本発明のポリペプチドおよび核酸分子は、本明細書中に記載されるかまたは当該技術分野において（例えば、Genbankデータベースなどの、公的な配列データベースにおいて）公知であるのと同じアミノ酸またはヌクレオチド配列を有する。幾つかの実施形態では、本発明のポリペプチドおよび核酸分子は、かかる配列の変異体、誘導体、突然変異体または断片、例えばかかる配列に対して85%よりも大きい配列同一性を有する変異体、誘導体、突然変異体または断片であるアミノ酸またはヌクレオチド配列を有し得る。幾つかの実施形態では、変異体、誘導体、突然変異体または断片は、公知の配列に対して約85%の同一性、または公知の配列に対して約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%の配列同一性を有する。幾つかの実施形態では、公知のヌクレオチド配列の変異体、誘導体、突然変異体または断片であって、公知のヌクレオチド配列に対して、長さが、ヌクレオチド約50個分、またはヌクレオチド約45個分、またはヌクレオチド約40個分、またはヌクレオチド約35個分、またはヌクレオチド約30個分、またはヌクレオチド約28個分、ヌクレオチド26個分、ヌクレオチド24個分、ヌクレオチド22個分、ヌクレオチド20個分、ヌクレオチド18個分、ヌクレオチド16個分、ヌクレオチド14個分、ヌクレオチド12個分、ヌクレオチド10個分、ヌクレオチド9個分、ヌクレオチド8個分、ヌクレオチド7個分、ヌクレオチド6個分、ヌクレオチド5個分、ヌクレオチド4個分、ヌクレオチド3個分、ヌクレオチド2個分、またはヌクレオチド1個分異なるものが使用される。幾つかの実施形態では、公知のアミノ酸配列の変異体、誘導体、突然変異体または断片であって、公知のアミノ酸配列に対して、長さが、アミノ酸約50個分、またはアミノ酸約45個分、またはアミノ酸約40個分、またはアミノ酸約35個分、またはアミノ酸約30個分、またはアミノ酸約28個分、アミノ酸26個分、アミノ酸24個分、アミノ酸22個分、アミノ酸20個分、アミノ酸18個分、アミノ酸16個分、アミノ酸14個分、アミノ酸12個分、アミノ酸10個分、アミノ

10

20

30

40

50

酸 9 個分、アミノ酸 8 個分、アミノ酸 7 個分、アミノ酸 6 個分、アミノ酸 5 個分、アミノ酸 4 個分、アミノ酸 3 個分、アミノ酸 2 個分、またはアミノ酸 1 個分異なるものが使用される。

【 0 0 3 9 】

E 4 O R F 1 核酸またはアミノ酸配列が使用される実施形態において、いくつかの態様では、かかる配列は、アデノウイルス E 4 領域由来の他の配列を伴わずに使用され、例えば、E 4 領域全体のヌクレオチド配列の状況では使用されないか、または E 4 領域によってコードされる他のポリペプチドと一緒に使用されない。しかしながら、幾つかの他の態様では、かかる配列は、E 4 O R F 2、E 4 O R F 3、E 4 O R F 4 または E 4 O R F 5 配列などの E 4 領域由来の 1 つまたは複数の他の核酸またはアミノ酸配列、あるいはそれらの変異体、突然変異体または断片と併用され得る。例えば、E 4 O R F 1 配列は、他の配列、遺伝子またはコード領域（プロモーター、マーカー遺伝子、抗生物質耐性遺伝子等など）を含有するコンストラクト（ウイルスベクターなど）中に使用され得るが、ある特定の実施形態では、E 4 O R F 1 配列は、E 4 領域全体を含有しないかまたは E 4 O R F 2、E 4 O R F 3、E 4 O R F 4 および / または E 4 O R F 5 などの E 4 領域全体に由来する他の O R F を含有しないコンストラクト中に使用される。

10

【 0 0 4 0 】

本発明の核酸分子は、所望の用途に応じた様々な他の核酸配列、遺伝子もしくはコード領域 [例えば、抗生物質耐性遺伝子、レポーター遺伝子または発現タグ（例えば、G F P をコードするヌクレオチド配列など）]、または望ましい可能性がある任意の他のヌクレオチド配列もしくは遺伝子を含有するコンストラクト中に使用され得る。本発明のポリペプチドは、単独で、または融合タンパク質の一部として発現させることができる。

20

【 0 0 4 1 】

幾つかの実施形態では、本発明の核酸分子は、発現を可能にする 1 つまたは複数のプロモーターの制御下にあり得る。所望の細胞型において核酸配列の発現を駆動することが可能な任意のプロモーターを使用することができる。適切なプロモーターの例には、C M V、S V 4 0、R S V、H I V - L t r および M M L プロモーターがあるが、これらに限定されない。プロモーターはまた、アデノウイルスゲノム由来のプロモーター、またはその変異体であり得る。例えば、E 4 O R F 1 が使用される場合、プロモーターは、アデノウイルスにおける対応する遺伝子の発現の駆動に用いられるプロモーターであり得る。

30

【 0 0 4 2 】

幾つかの実施形態では、本発明の核酸分子は、核酸配列の発現を必要に応じてオンまたはオフにすることができるように、誘導プロモーターの制御下に置くことができる。例えばテトラサイクリン誘導発現系またはホルモン誘導発現系などの任意の適切な誘導発現系を使用し得る。例えば、本発明の核酸分子は、必要な時に発現させることができ、続いて所望の成果が達成されたら（例えば内皮細胞の十分な成長または増殖が達成されたら）、オフに切り替えることができる。発現をオンまたはオフにする能力は、インビボ適用のために特に有用であり得る。

【 0 0 4 3 】

本発明の核酸分子は、自然に存在するヌクレオチド、合成ヌクレオチド、またはそれらの組み合わせを含み得る。例えば、幾つかの実施形態では、本発明の核酸分子は、R N A、例えば細胞内で安定であり、細胞内で直接にタンパク質発現 / 産生を導くのに使用され得る合成修飾 R N A を含み得る。他の実施形態では、本発明の核酸分子は、D N A を含み得る。D N A が使用される実施形態では、D N A 配列は、細胞内で発現を可能にする（および / または促進、増強もしくは調節する）1 つまたは複数の適切なプロモーターおよび / または調節性要素に作動可能に連結されてもよく、また、1 つまたは複数の適切なベクターまたはコンストラクト中に存在してもよい。本発明のそれぞれの核酸分子は、同じ核酸コンストラクトに含ませて内皮細胞へ導入することができるか、または別個の核酸コンストラクトに含ませて導入することができる。

40

【 0 0 4 4 】

50

本発明の核酸分子は、トランスフェクション技術およびウイルスによる形質導入技術を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において公知の任意の適切な系を使用して、内皮細胞へ導入することができる。本発明に従って使用し得るトランスフェクション方法には、リポソームによるトランスフェクション、ポリブレンによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、マイクロインジェクション、および微粒子銃があるが、これらに限定されない。使用し得るウイルスによる形質導入方法には、レンチウイルスによる形質導入、アデノウイルスによる形質導入、レトロウイルスによる形質導入、アデノ随伴ウイルスによる形質導入およびヘルペスウイルスによる形質導入があるが、これらに限定されない。

10

【0045】

本発明はまた、本発明の核酸分子を含有する発現ベクターを含むベクターを提供する。例えば、一実施形態では、本発明は、ETS転写因子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、およびE4ORF1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する。幾つかのかかる実施形態では、ETS転写因子は、ETV2である。幾つかのかかる実施形態では、発現ベクターは、レンチウイルスベクターである。幾つかの実施形態では、ETS転写因子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、およびE4ORF1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、別個のプロモーターの制御下にある。幾つかの実施形態では、ETS転写因子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、およびE4ORF1ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、同じプロモーターの制御下にある（例えば、ETS配列とE4ORF1配列との間の内部リポソーム進入部位配列（IRES）による）。

20

【0046】

幾つかの実施形態では、ペプチド模倣体を使用し得る。ペプチド模倣体は、ポリペプチドを模倣するように設計された小タンパク質様鎖である。かかる分子は、本発明のポリペプチド（例えば、ETV2またはE4ORF1ポリペプチド）のいずれかを模倣するように設計され得る。ペプチドを修飾してペプチド模倣体を創出するか、またはペプチド模倣体を設計する多種多様な方法が、当該技術分野において公知であり、本発明のポリペプチドの1つのペプチド模倣体を創出するのに使用することができる。

【0047】

本発明のポリペプチドおよび核酸分子の取扱い、操作および発現は、分子生物学および細胞生物学の従来の技法を用いて行い得る。かかる技法は、当該技術分野において周知である。例えば、Sambrook, Fritsch and Maniatis eds., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989, Methods of Enzymologyのシリーズ (Academic Press, Inc.)、あるいはヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列の取扱い、操作および発現において用いる適当な技術に関するガイダンスの任意の他の標準的な教本の教示を参照し得る。E4ORF1配列の取扱いまたは発現に関するさらなる側面が、米国特許第8,465,732号に記載されており、その内容を引用により本明細書の一部とする。

30

【0048】

内皮細胞

幾つかの実施形態では、本発明は、E4ORF1 + ETV2 + 改変内皮細胞などの「改変内皮細胞」を提供する。改変内皮細胞は、当該技術分野で公知の内皮細胞の任意の適切な供給源に由来し得る。例えば、幾つかの実施形態では、内皮細胞は、血管内皮細胞である。幾つかの実施形態では、内皮細胞は、初代内皮細胞である。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、ヒトもしくは非ヒト霊長類細胞、またはウサギ、ラット、マウス、ヤギ、ブタもしくは他の哺乳動物細胞などの、哺乳動物細胞である。幾つかの実施形態では、内皮細胞は、初代ヒト内皮細胞である。幾つかの実施形態では、内皮細胞は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUEC）などの臍帯静脈内皮細胞（UEC）である。使用し得る他の適切な内皮細胞は、米国特許第8,465,732号（その内容を引用により本明細書の

40

50

一部とする)に、E 4 O R F 1 発現に適していると記載されているものを包含する。

【0049】

幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、特に挙げられる分子(例えば、E 4 O R F 1 および E T V 2)の発現に加えて、またそれとは別に、1つまたは複数の遺伝的修飾を含むように遺伝子修飾されている。例えば、かかる細胞は、内皮細胞を冒す疾患もしくは障害に関与するかまたは関与する疑いのある遺伝子を修正したもの、あるいは内皮細胞に供給するかまたは改変内皮細胞の使用によって投与もしくは送達することが望ましい可能性のある任意の他の遺伝子(例えば処置に有用な遺伝子)を含み得る。

【0050】

本発明の改変内皮細胞は、様々な形態で存在し得るか、または様々な形態で提供され得る。例えば、幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、単離された細胞集団などの、細胞の集団を含み得る。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、インビトロの細胞の集団を含み得る。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、実質的に純粋な細胞の集団を含み得る。例えば、幾つかの実施形態では、総細胞集団を構成する細胞の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75~80%、より好ましくは少なくとも約85~90%、最も好ましくは少なくとも約95%を、本発明の改変内皮細胞が占め得る。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞は、改変細胞および1つまたは複数のさらなる構成成分を含有する組成物の形態で提供され得る。例えば、幾つかの実施形態では、本発明は、本明細書中に記載されるような改変内皮細胞の集団を、生理食塩水、細胞懸濁培地、細胞培養培地などの担体溶液と共に含む組成物を提供し得る。幾つかの実施形態では、かかる組成物は、改変内皮細胞の集団、およびヒト対象などの対象への投与に適する担体溶液を含む処置用組成物であり得る。望ましい場合には、他の処置上許容される作用物質を含ませることができる。当業者は、目的の用途に応じて、処置用組成物中に含ませるのに適した作用物質を容易に選択することができる。

【0051】

幾つかの実施形態では、本発明の改変内皮細胞は、本発明の改変内皮細胞および1つまたは複数のさらなる細胞型を含有する組成物(例えば、処置用組成物)の形態で提供され得る。かかるさらなる細胞型は、例えば、改変内皮細胞の存在下で(例えば、本発明の改変内皮細胞を「フィーダー」細胞として使用して)維持、培養または増殖することができる細胞型、または本発明の改変内皮細胞と一緒に使用することが望ましい可能性がある任意の他の細胞型(例えば、インビトロモデル系における使用のため、または対象への同時投与における使用のため)であり得る。かかるさらなる細胞型の例には、改変内皮細胞を「フィーダー」細胞として使用して増殖させ得る造血幹細胞または前駆細胞(HSPC)などの幹細胞または前駆細胞があるが、これに限定されない。本発明の改変内皮細胞と一緒に供給または使用され得る細胞の他の例は、米国特許第8,465,732号(その内容を引用により本明細書の一部とする)に記載されている。

【0052】

方法および用途

本発明の改変内皮細胞は、多種多様な用途に使用することができる。同様に、かかる改変内皮細胞を作製するための本発明が提供する方法は、多種多様な状況において使用することができる。概して、本発明が提供する改変内皮細胞は、未改変内皮細胞が現在使用されているかもしくは使用され得る任意の用途、またはE 4 O R F 1 発現内皮細胞が現在使用されているかもしくは使用され得る任意の用途、例えば米国特許第8,465,732号(その内容を引用により本明細書の一部とする)に記載される用途に使用することができる。例えば、改変内皮細胞は、研究目的で、および/または処置目的で、例えば、内皮細胞の投与が望ましい可能性がある疾患、障害または状態(例えば心筋虚血などの虚血状態)、あるいは血管新生の増加が有益であり得るかまたはそれによって軽減され得る他の状態(例えば創傷治療)の治療または予防のために使用し得る。心筋虚血の処置の場合、細胞を、心臓に直接、または心臓の近傍に投与し得る。創傷の処置の場合、細胞を、創傷の部位(例えば皮膚創傷の場合は、皮膚)へ直接、または創傷の部位の近傍に投与し得る

。細胞は、単回用量または複数回用量で投与し得る。当業者は、所望の用途に応じて、適切な投与方法を選択することができる。

【 0 0 5 3 】

幾つかの実施形態では、本発明は、処置を必要とする対象を、該対象へ有効量の本発明の改変内皮細胞（またはかかる改変内皮細胞を含む組成物）を投与することによって処置する方法などの、様々な処置方法を提供する。かかる処置方法では、細胞を、当該技術分野において公知の任意の適切な手段を使用して、対象に投与することができる。例えば、細胞を、所望の位置にて、注射または注入によって血流または組織へ投与することができる。例えば、血管系の疾患、障害または状態の処置の場合、本発明による改変細胞を、血管系の罹患領域へ直接に、またはその近傍に投与し得る。幾つかの実施形態では、改変内皮細胞を、1つまたは複数のさらなる細胞型と一緒に投与し得る。かかるさらなる細胞型は、例えば、幹細胞または前駆細胞、例えばHSPCおよび遺伝的に修飾されていてもよい細胞型（例えば、遺伝的に修飾されたHSPC）であり得る。改変内皮細胞は、単回用量または複数回用量で投与することができる。当業者は、所望の用途に応じて、適切な投与方法および適切な投薬レジメンを選択することができる。

10

【 0 0 5 4 】

幾つかの実施形態では、本発明の改変内皮細胞は、インビボで、例えば研究目的で、または処置用に、作製し得る。例えば、幾つかの実施形態では、本発明は、処置を必要とする対象を処置する方法であって、かかる対象に、ETS転写因子ポリペプチド（例えば、ETV2）をコードする核酸分子およびEORF1ポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、適切なベクター中にあるもの、および/または適切なプロモーターの制御下にあるもの）の両方を有効量で投与して、対象の内皮細胞がインビボで、かかる核酸分子でトランスフェクトまたは形質導入されて改変内皮細胞になるようにすることを含む方法、などの、様々な処置方法を提供する。かかる方法では、ヌクレオチド分子を、当該技術分野において公知の任意の適切な手段を使用して、対象に投与し得る。例えば、ヌクレオチド分子（例えば、適切なベクター中の）を、所望の位置で、注射または注入によって血流または組織へ投与することができる。核酸分子を、単回用量または複数回用量で投与することができる。当業者は、所望の用途に応じて、適切な投与方法および適切な投薬レジメンを選択することができる。

20

【 0 0 5 5 】

幾つかの実施形態では、本発明の改変内皮細胞は、使用（例えば、処置のための使用）に先立って、複製できないように有糸分裂が不活性化される。これは、例えば、マイトマイシンCなどの化学物質を使用することによって、または改変内皮細胞を照射することによって達成することができる。

30

【 0 0 5 6 】

細胞培養方法

細胞を培養する方法は、当該技術分野において周知であり、任意の適切な細胞培養方法を使用することができる。例えば、本発明の改変内皮細胞は、他の内皮細胞を培養するのに有用であることが知られている方法、または例えば米国特許第8,465,732号（その内容を引用により本明細書の一部とする）に記載されるような、EORF1発現内皮細胞の培養に有用であることが知られている方法を使用して培養することができる。幾つかの実施形態では、本発明の改変内皮細胞は、血清の非存在下で、または外因性増殖因子の非存在下で、または血清および外因性増殖因子の両方の非存在下で培養し得る。また、本発明の改変内皮細胞は、冷凍保存し得る。R. Ian FreshneyによるCulture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th Edition (2000)（「Freshney」）（その内容を引用により本明細書の一部とする）に記載される方法などの、細胞培養および細胞冷凍保存のための様々な方法が当業者に公知である。

40

【 0 0 5 7 】

幾つかの実施形態では、本発明は、フィーダー細胞、馴化培地および細胞産物であって、本発明の改変内皮細胞を含むかまたはそれから誘導され、他の細胞型の生存または成長

50

を支持する（例えば同時培養方法において）のに有用であり得るものを提供する。例えば、一実施形態では、改変内皮細胞の集団を、HSPCおよび遺伝的に修飾されたHSPCなどの幹細胞または前駆細胞の成長を支持するフィーダー細胞として使用し得る。同様に、他の実施形態では、本発明は、本発明の改変内皮細胞の培養から得る馴化細胞培養培地、または本発明の改変内皮細胞の培養から得る細胞産物（例えば、総細胞溶解物、細胞分画、または特定の細胞産物）を提供し得る。

【0058】

幾つかの実施形態では、本発明は、目的の細胞の集団を培養するための同時培養方法を提供する。かかる「目的の細胞」には、がん細胞（初代がん細胞、がん幹細胞およびがん細胞株など）、ハイブリドーマ細胞、幹細胞または前駆細胞（胚幹細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）、および任意の胎児または成体組織に由来する幹細胞、例えば造血幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞、精原幹細胞、腸幹細胞、およびがん幹細胞など）、および通常フィーダー細胞を使用して培養するかまたはフィーダー細胞培養系を使用することが望ましい他の細胞型が包含されるが、これらに限定されない。かかる同時培養方法は、目的の細胞の集団、および本発明の改変内皮細胞の集団を、同じ培養容器中で一緒に培養することを含み得る。幾つかのかかる実施形態では、改変内皮細胞は、培養容器の表面上にフィーダー細胞層を形成し得、目的の細胞は、フィーダー細胞層上に配置され得る。別の実施形態では、本発明は、目的の細胞を培養する方法であって、目的の細胞の集団を、本発明の改変内皮細胞の培養から得る馴化培地と接触させることを含む方法を提供する。幾つかの実施形態では、本発明はまた、本発明の改変内皮細胞の培養から得る馴化細胞培養培地を提供する。

【0059】

キット

本発明はまた、本明細書中に記載する様々な方法を実施するための、または本発明が提供する改変内皮細胞を製造するためのキットを提供する。かかるキットは、ヌクレオチド配列（例えば、ベクター中の）、内皮細胞、改変内皮細胞の集団、対照の非改変内皮細胞、試料/標準の改変内皮細胞、改変内皮細胞またはその中で発現されるタンパク質もしくは核酸分子の検出のための手段または組成物（例えば、核酸プローブ、抗体等）、改変内皮細胞を維持もしくは増殖するのに有用な培地または組成物、改変内皮細胞によって馴化した培地、改変内皮細胞を対象に投与するための手段または組成物、またはそれらの任意の組み合わせを包含するがそれらに限定されない、本明細書中に記載する構成成分のいずれかを含有し得る。かかるキットはいずれも、使用説明書、容器、培養容器等を含んでもよい。キットにラベルを付けることができ、ラベルは、キットの内容物の使用に関する説明または他の情報を提供する任意の文書または記録物〔電子的またはコンピューターが読める形態（例えば、ディスク、光ディスク、メモリーチップまたはテープ）であり得る〕を含み得る。

【0060】

本発明のある特定の態様は、下記の非限定的な実施例においてさらに説明され得る。

【0061】

実施例

E4ORF1 + ETV2 + 内皮細胞の生成および使用

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUEC）を、（a）E4ORF1単独（E4ORF1 + ETV2 -）、（b）ETV2単独（E4ORF1 - ETV2 +）、または（c）E4ORF1およびETV2の両方（E4ORF1 + ETV2 +）のいずれかを発現するように改変した。Seandel et al., PNAS, 2008;105(49): pp.19288-93（その内容を引用により本明細書の一部とする）に記載されるようにして、アデノウイルスE4ORF1をコードする核酸分子を、レンチウイルスベクターによりHUECに導入した。ヒトETV2をコードする核酸分子（Genbank受託番号NM_01429）を、同じレンチウイルス系を使用して導入した（1つはE4ORF1用、1つはETV2用の、2つの別個のレンチウイルスコンストラクトを使用した）。レンチウイルスを1～5の感染多重度（MOI

）にてデリバリーした。E T V 2 発現は、P C Rによって確認した。E 4 O R F 1 発現は、表現型で確認した（報告されているように、E 4 O R F 1 + 内皮細胞は無血清培地中で生存できるのに対して、E 4 O R F 1 - 内皮細胞は無血清条件で死滅する）。改変内皮細胞を、抗生物質、H E P E S、F G F 2 サイトカイン、ヘパリンおよびG l u t a m a x を伴う血清含有M 1 9 9 培地（10% F B S）中で培養し、2 ~ 15 回の継代数で維持した。細胞が、少なくとも48 ~ 72 時間継代されず単一フラスコ中に存在した場合、培養培地を交換した。E 4 O R F 1 - E T V 2 + 内皮細胞（即ち、E T V 2 を発現するが、E 4 O R F 1 は発現しないもの）は、多回の継代において培養が維持され得ず、むしろ培養中に老化し始め内皮細胞表現型を失い始めたという点で、非形質導入（E 4 O R F 1 - E T V 2 - ）内皮細胞と同様に挙動することがわかった。一方、E 4 O R F 1 + E T V 2 + 内皮細胞は、無血清条件下でさえ、老化することなく、より多くの継代数で培養することができ、内皮細胞表現型を失うことなく活発に増殖し続けた。図1は、E 4 O R F 1 + E T V 2 - （図1 A）、E 4 O R F 1 - E T V 2 + （図1 B）、およびE 4 O R F 1 + E T V 2 + （図1 C）改変内皮細胞の、継代数8（レンチウイルス形質導入後に7回継代）における顕微鏡写真を示す。E 4 O R F 1 - E T V 2 + 内皮細胞が老化しているように見えるのに対して、E 4 O R F 1 + E T V 2 - およびE 4 O R F 1 + E T V 2 + 内皮は、健常で老化していないように見えることがわかる。E 4 O R F 1 - E T V 2 + 細胞は、ナイーブE 4 O R F 1 - E T V 2 - 内皮細胞との比較において、増殖の差を示さなかった。E 4 O R F 1 - E T V 2 + 内皮細胞は、最初の2 ~ 3 回の継代においてE 4 O R F 1 + E T V 2 - 細胞とほぼ同じ速度で増殖し、その後、増殖が低下して、継代数およそ8 ~ 10 において最終的な老化に至った。

10

20

【0062】

ヒト造血幹細胞および前駆細胞（H S P C）との同時培養に先立ち、様々な改変内皮細胞を、コンフルエントになるまで増殖させ、その後、サイトカイン補充なしの造血培地（S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s のS t e m s p a n（商標）培地）に一晩切り換えた。臍帯血のパフィーコートからH S P Cを得た。M i l t e n y i B i o t e c h の磁気カラムを使用して、パフィーコート試料からC D 3 4 + H S P Cを精製した。次いで、C D 3 4 + H S P Cを、50 n g / m l のサイトカインボラス（t p o / f l t 3 l / s c f）とともに、内皮細胞培養液に添加した。H S P Cの「サイトカイン単独」対照群は、同じ様式で（同じサイトカイン処理を伴って）処理したが、内皮細胞と同時培養しなかったものである。

30

【0063】

図2は、H S P Cとの同時培養における10日後の、E 4 O R F 1 + E T V 2 - （図2 A）、E 4 O R F 1 - E T V 2 + （図2 B）、およびE 4 O R F 1 + E T V 2 + （図2 C）内皮細胞の顕微鏡写真を示す。E T V 2 単独を発現する内皮細胞（E 4 O R F 1 - E T V 2 +）は、H S P C 同時培養および増殖プロセス中に著しい細胞死を起こしたのに対して、E 4 O R F 1 単独を発現する内皮細胞（E 4 O R F 1 + E T V 2 -）、またはE T V 2 およびE 4 O R F 1 の両方を発現する内皮細胞（E 4 O R F 1 + E T V 2 +）は、無血清培地の存在下でさえ、同時培養および増殖プロセスの大部分において、生存を維持し、ほとんどコンフルエントのままであった。同時培養の10日後に、総細胞数の測定を行い、C D 3 4、C D 4 5 R A、C D 3 8 およびC D 4 9 F マーカーを用いてフローサイトメトリーを行った。これにより、C D 3 4 + 細胞の数を、総細胞数に対するパーセンテージとして、または総C D 4 5 + 細胞数に対するパーセンテージとして計算することができた。

40

【0064】

この実験のデータを、図3に示す。E 4 O R F 1 単独を発現する内皮細胞はC D 3 4 + H S C の増殖を促進するが（これまでに実証されているように）、E 4 O R F 1 およびE T V 2 の両方を発現する内皮細胞はより一層効果的であり、E 4 O R F 1 単独を用いた場合に達成されるよりも一層大きなC D 3 4 + H S C 増殖をもたらすことがわかった。E 4 O R F 1 + E T V 2 - 同時培養群とE 4 O R F 1 + E T V 2 + 同時培養群との間の、この

50

HSPC増殖における差は、統計学的に有意であった。さらに、E4ORF1およびETV2と一緒に組み合わせることにより、E4ORF1またはETV2のいずれかを単独で用いる場合に観察されるよりも、「より原始的な」HSPCのより大きな増殖がもたらされることがわかった。ここで、「より原始的な」HSPCは、CD34+high、CD45RA-（そしてまた、CD38-、CD49F+）であった。より少なく原始的なHSPCは、CD45RA+、かつ、CD34+high（より少なく原始的）またはCD34+（より一層少なく原始的）のいずれかであった。（HSPCが原始的であるほど、CD34発現は高くなる。）

【0065】

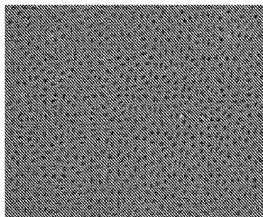
ETV2単独を発現する内皮細胞（E4ORF1-ETV2+）は、本明細書に記載する実験においてある程度までCD34+HSPCを増殖させる得ることがわかったが、観察される著しい老化および細胞死を考慮すると、かかる細胞は、臨床適用などの、より大規模な適用のためには、問題がある可能性が高い。一方、E4ORF1およびETV2の両方を発現する内皮細胞（E4ORF1+ETV2+）は、そのような不都合を伴わないので、大規模な内皮細胞培養または大規模な内皮細胞同時培養を必要とする適用（臨床適用を包含する）のための、類のない貴重な内皮細胞供給源を提供することができる。

【0066】

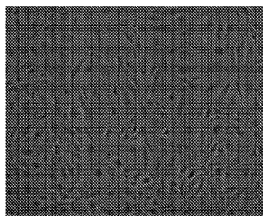
本発明は、特許請求の範囲によってさらに記述される。

【図1】

A.



B.



C.

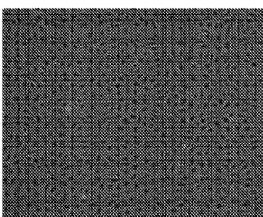
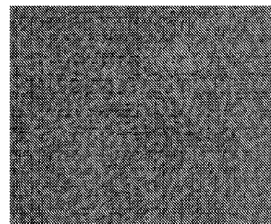


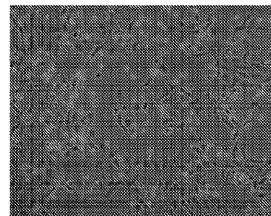
Fig. 1

【図2】

A.



B.



C.

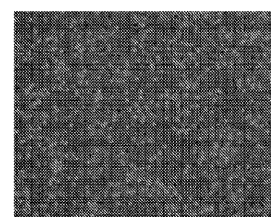


Fig. 2

【図 3】

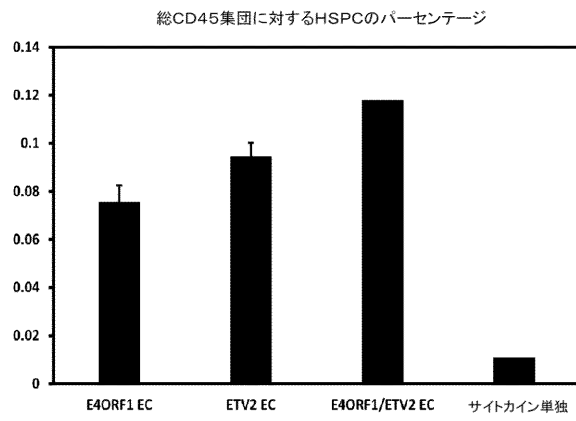


Fig. 3

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	35/51	(2015.01)	A 6 1 K	35/51	
A 6 1 K	35/50	(2015.01)	A 6 1 K	35/50	
A 6 1 K	35/28	(2015.01)	A 6 1 K	35/28	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/34	(2006.01)	C 1 2 N	15/34	
C 1 2 N	5/0789	(2010.01)	C 1 2 N	5/0789	
C 1 2 N	15/88	(2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z
C 1 2 N	15/86	(2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z
C 1 2 N	15/861	(2006.01)	C 1 2 N	15/861	Z
C 1 2 N	15/867	(2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	15/864	(2006.01)	C 1 2 N	15/864	1 0 0 Z
C 1 2 N	15/869	(2006.01)	C 1 2 N	15/869	Z
C 1 2 N	15/87	(2006.01)	C 1 2 N	15/87	Z
C 1 2 N	15/89	(2006.01)	C 1 2 N	15/89	Z

(72)発明者 ダニエル・ジョセフ・ノーラン

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、カーメル・マウンテン・ロード 3 5 7
0 番、スウィート 2 0 0

(72)発明者 ポール・ウィリアム・フィネガン

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、カーメル・マウンテン・ロード 3 5 7
0 番、スウィート 2 0 0

(72)発明者 マイケル・ダニエル・ギンズバーグ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、カーメル・マウンテン・ロード 3 5 7
0 番、スウィート 2 0 0

(72)発明者 クロード・ジェフリー・デイビス

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州サンディエゴ、カーメル・マウンテン・ロード 3 5 7
0 番、スウィート 2 0 0

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 3 5 1 8 6 (J P , A)

米国特許第 0 8 4 6 5 7 3 2 (U S , B 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 5 / 1 0
A 6 1 K 3 5 / 2 8
A 6 1 K 3 5 / 4 4
A 6 1 K 3 5 / 5 0
A 6 1 K 3 5 / 5 1
C 1 2 N 1 / 0 0
C 1 2 N 5 / 0 7 1
C 1 2 N 5 / 0 7 8 9
C 1 2 N 1 5 / 1 2
C 1 2 N 1 5 / 3 4
C 1 2 N 1 5 / 8 5
C 1 2 N 1 5 / 8 6
C 1 2 N 1 5 / 8 6 1

C 1 2 N 1 5 / 8 6 4

C 1 2 N 1 5 / 8 6 7

C 1 2 N 1 5 / 8 6 9

C 1 2 N 1 5 / 8 7

C 1 2 N 1 5 / 8 8

C 1 2 N 1 5 / 8 9

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)