

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-519261

(P2021-519261A)

(43) 公表日 令和3年8月10日 (2021.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-551257 (P2020-551257)	(71) 出願人	507189666
(86) (22) 出願日	平成31年3月21日 (2019.3.21)		デューク ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	令和2年11月20日 (2020.11.20)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/023461		7705, ダラム, アーウィン ロード
(87) 国際公開番号	W02019/183415		2812 スイート 306
(87) 国際公開日	令和1年9月26日 (2019.9.26)	(74) 代理人	100094569
(31) 優先権主張番号	62/645,847		弁理士 田中 伸一郎
(32) 優先日	平成30年3月21日 (2018.3.21)	(74) 代理人	100103610
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 ▲吉▼田 和彦
(31) 優先権主張番号	62/782,480	(74) 代理人	100109070
(32) 優先日	平成30年12月20日 (2018.12.20)		弁理士 須田 洋之
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100119013
			弁理士 山崎 一夫
		(74) 代理人	100123777
			弁理士 市川 さつき
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 細胞リプログラミングのための組成物および方法

(57) 【要約】

本明細書では、細胞リプログラミングのための組成物および方法を開示する。該組成物は、1つまたは複数の m i R と、N F κ B の活性化剤とを含む。また、細胞または対象において心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節するための方法、および心筋細胞成熟を阻害するまたは下方調節するための方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) miR-1 (配列番号 11)、miR-133a (配列番号 14)、miR-208 (配列番号 18)、および miR-499-5p (配列番号 23)、ならびにそれらの組合せに対して少なくとも 80% 配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む 1 つまたは複数の miR と

(b) NFκB の活性化剤
とを含む、リプログラミング組成物。

【請求項 2】

NFκB の活性化剤が、TLR3 アゴニストを含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 3】

NFκB の活性化剤が、修飾された 5'-三リン酸、2'-フルオロ修飾非線状 RNA を含み、該 RNA が少なくとも 8 ヌクレオチド対形成の完全なまたは部分的なハイブリダイゼーションから形成されたステムループを含む、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

非線状 RNA が、ICR2 (配列番号 30)、ICR4 (配列番号 37)、ICR4A (配列番号 38)、ICR5X (配列番号 39)、または ICR5Y (配列番号 40) に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

非線状 RNA が、ICR2 (配列番号 30) に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の組成物。

20

【請求項 6】

非線状 RNA が、ICR4 (配列番号 37) に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

細胞質送達剤、リプログラミング培地、リプログラミング効率向上分子、またはそれらの任意の組合せをさらに含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

1 つまたは複数の miR が、miR-1 (配列番号 11)、miR-133a (配列番号 14)、miR-208 (配列番号 18)、および miR-499-5p (配列番号 23) から本質的になる、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 9】

1 つまたは複数の miR が、pre-miRNA の一部分を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

有効量の請求項 1～9 のいずれかに記載の組成物と 1 つまたは複数の薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 11】

細胞において心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節する方法であって、細胞が心筋細胞へリプログラミングされるような十分な時間、細胞を有効量の請求項 1 に記載のリプログラミング組成物と接触させることを含む、方法。

40

【請求項 12】

細胞が、線維芽細胞である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

細胞が、心臓線維性組織を含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

NFκB の活性化剤が、TLR3 アゴニストを含む、請求項 11～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

50

NFκBの活性化剤が修飾された5'-三リン酸、2'-フルオロ修飾非線状RNAを含み、該RNAが少なくとも8個のヌクレオチド対形成の完全なまたは部分的なハイブリダイゼーションから形成されたステムループを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

非線状RNAが、ICR2（配列番号30）、ICR4（配列番号37）、ICR4A（配列番号38）、ICR5X（配列番号39）、またはICR5Y（配列番号40）に対して少なくとも80%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

非線状RNAが、ICR2（配列番号30）に対して少なくとも80%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項16に記載の方法。

10

【請求項18】

非線状RNAが、ICR4（配列番号37）に対して少なくとも80%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項19】

組成物が、細胞質送達剤、リプログラミング培地、リプログラミング効率向上分子、またはそれらの任意の組合せをさらに含む、請求項11～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

1つまたは複数のmiRが、miR-1（配列番号11）、miR-133a（配列番号14）、miR208（配列番号18）、およびmiR-499-5p（配列番号23）から本質的になる、請求項11～19のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項21】

1つまたは複数のmiRが、プレ-miRNAの一部を含む、請求項11～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

対象において心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節する方法であって、(i)有効量の請求項1に記載の組成物、または(ii)有効量の請求項1に記載の組成物と1つもしくは複数の薬学的に許容される担体、賦形剤、もしくは希釈剤とを含む医薬組成物を、投与することを含む、方法。

30

【請求項23】

対象が、心臓血管系疾患を有するまたは心筋梗塞に罹患したことがある、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

NFκBの活性化剤が、TLR3アゴニストを含む、請求項22または23に記載の方法。

【請求項25】

NFκBの活性化剤が、修飾された5'-三リン酸、2'-フルオロ修飾非線状RNAを含み、該RNAが少なくとも8個のヌクレオチド対形成の完全なまたは部分的なハイブリダイゼーションから形成されたステムループを含む、請求項24に記載の方法。

40

【請求項26】

非線状RNAが、ICR2（配列番号30）、ICR4（配列番号37）、ICR4A（配列番号38）、ICR5X（配列番号39）、またはICR5Y（配列番号40）に対して少なくとも80%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

非線状RNAが、ICR2（配列番号30）に対して少なくとも80%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

非線状RNAが、ICR4（配列番号37）に対して少なくとも80%の配列同一性を

50

有するオリゴヌクレオチドを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

組成物が、細胞質送達剤、リプログラミング培地、リプログラミング効率向上分子、またはそれらの任意の組合せをさらに含む、請求項 22～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

1 つまたは複数の miR が、miR-1 (配列番号 11)、miR-133a (配列番号 14)、miR208 (配列番号 18)、および miR-499-5p (配列番号 23) から本質的になる、請求項 22～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 31】

1 つまたは複数の miR が、プレ-miRNA の一部分を含む、請求項 22～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

細胞において心筋細胞成熟を阻害するまたは下方調節する方法であって、細胞において心筋細胞成熟が阻害されるまたは下方調節されるような十分な時間、細胞を、TLR3 阻害剤、NFκB 阻害剤、ikkbk 阻害剤、またはそれらの組合せを含む、有効量の組成物と接触させることを含む、方法。

【請求項 33】

細胞が、心筋細胞分化決定前駆体である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

細胞が、線維芽細胞である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

組成物が、TLR3 阻害剤を含む、請求項 32～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 36】

TLR3 阻害剤が、TLR3 siRNA または CU-CPT-4a である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

組成物が、NFκB 阻害剤を含む、請求項 32～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

NFκB 阻害剤が、NFκB siRNA、RelA siRNA、または Bay 11-7085 である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

組成物が、ikkbk 阻害剤を含む、請求項 32～34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

ikkbk 阻害剤が、ikkbk siRNA である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

組成物が、細胞質送達剤、細胞用培地、またはそれらの任意の組合せをさらに含む、請求項 32～40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、それぞれの内容が全体として参照により本明細書に組み込まれている、2018年3月21日出願の米国仮特許出願第62/645,847号および2018年12月20日出願の同第62/782,480号の優先権の利益を主張するものである。

政府支援の記載

本発明は、National Institutes of Healthにより授与された5R01H731814-02、National Institutes of Healthにより授与されたDP2OD008586、およびNational Science Foundationにより授与されたCBET-1151035のもと

10

20

30

40

50

、政府支援によってなされた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

心臓疾患は、全世界で男女共に死因の第1位である。一般的に、心臓組織は、再生または自己複製のための能力が限られている。患者が心筋梗塞から回復した後、この器官には瘢痕が残り、心臓機能は低下する。損傷を受けた心臓などの器官を再生させる能力は、依然としてわかりにくい。したがって、当技術分野において、損傷を受けた器官の再生のための新規戦略を開発する必要に迫られている。

【発明の概要】

【0003】

本明細書において、細胞リプログラミングのための組成物および方法を開示する。本発明の一態様は、miR-1、miR-126、miR-133、miR-133a、mir-206、miR-208、miR-499、mir-499-5p、およびそれらの組合せに対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つまたは複数のmiRと、NFκBの活性化剤とを含む、リプログラミング組成物である。

本発明の別の態様は、有効量の請求項1に記載の組成物と1つまたは複数の薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤とを含む、医薬組成物である。

本発明の別の態様は、細胞において心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節する方法であって、細胞が心筋細胞へとリプログラミングされるような十分な時間、細胞を有効量の

本明細書に記載の組成物のいずれかと接触させることを含む、方法である。

本発明の別の態様は、対象において心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節する方法であって、(i)有効量の記載の組成物のうちのいずれか、または(ii)有効量の記載の組成物のうちのいずれかと1つまたは複数の薬学的に許容される担体、賦形剤、もしくは希釈剤とを含む医薬組成物のいずれか、を投与することを含む、方法である。

本発明の別の態様は、細胞において心筋細胞成熟を阻害するまたは下方調節する方法であって、細胞において心筋細胞成熟が阻害されるまたは下方調節されるような十分な時間、細胞をTLR3阻害剤、NFκB阻害剤、ikkb阻害剤、またはそれらの組合せを含む有効量の組成物と接触させることを含む、方法である。

本発明の非限定的な実施形態を添付の図面を参照しながら例として説明するが、これらの図面は概略図であり、一定の縮尺で描かれることを意図されていない。図では、例示した同一またはほぼ同一の構成要素は各々、通常、単一の数字によって表している。明瞭化するために、当業者に本発明を理解させるために例示が必要ではない場合、示した各図の構成要素のいずれも各本発明の実施形態の構成要素のいずれも、名称を表記しない。

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1A】図1A～図1E i i iは、TLR3阻害が、リプログラミングされた線維芽細胞の心筋細胞への成熟を阻害することを示す図である。新生仔心臓線維芽細胞を陰性対照miR(negmiR)またはmiR comboでトランスフェクトした。トランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、ビヒクルまたはTLR3薬理的阻害剤CURCPT-4a(10μM)のいずれかと共に、さらに4日間インキュベートした。TLR3薬理的阻害剤とのインキュベーションの後、細胞を、通常の増殖培地で、さらに6日間、培養した。定量的PCRを使用して、心筋細胞サルコメアの13種類の構成成分のmRNAレベルを解析した。図1Aは、qPCR解析のヒートマップの概略図である。発現値は、negmiRビヒクルサンプルの平均発現に対して正規化し、次いで平均した(N=3 技術的反復実験(線維芽細胞は、1回の同腹仔から得、3つのウェルへ播種した))。次いで、各遺伝子の平均をZスコアに変換した。クラスタリングおよび距離測定には、それぞれ重心リンクエッジおよびユークリッドの方法を用いた。

【図1B】図1B i i iは、新生仔心臓線維芽細胞を、陰性対照miR(negmiR)またはmiR comboでトランスフェクトしたことを示す図である。トランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞をビヒクルまたはTLR3薬理的阻害剤

10

20

30

40

50

C U-C P T-4 a (10 μ M) のいずれかと共に、さらに4日間インキュベートした。T L R 3 薬理的阻害剤とのインキュベーションの後、細胞を、通常の増殖培地で、さらに10日間培養した。図1 B i ~ 図1 B i i i は、q P C Rによって決定した、心筋細胞サルコメアの構成成分、M y h 6 (α ミオシン重鎖) (図1 B i)、A c t n 2 (α サルコメアアクチニン) (図1 B i i)、およびT n n i 3 (心臓トロポニン-I) (図1 B i i i) のRNAレベルを示すグラフである。N=4 独立した実験。

【図1 C】図1 C i および図1 C i i は、m i R c o m b o (図1 C i) またはm i R c o m b o およびT L R 3 アンタゴニスト (図1 C i i) を与え、固定し、抗A c t n 2 抗体 (赤) で染色した細胞の画像である。核は、D A P I (青) で染色した。スケールバー 50 μ m。図1 C i i i は、免疫染色の定量化を示すグラフである。A c t n 2 を発現する細胞を数え、全細胞集団に対する百分率で表した。N=6 独立した実験。

【図1 D】図1 D ~ 図1 E i i i は、新生仔心臓線維芽細胞を、まず対照s i R N A またはT L R 3 標的s i R N A のいずれかでトランスフェクトしたことを示すグラフである。2日後、細胞を、陰性対照m i R であるn e g m i R またはm i R c o m b o のいずれかで、再度トランスフェクトした。m i R N A でのトランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、通常の増殖培地で14日間、培養した。図1 D は、q P C RによるT L R 3 ノックダウンの定量化を示すグラフである。N=3 独立した実験。

【図1 E】図1 E i ~ 図1 E i i i は、q P C Rによって決定した、心筋細胞構造タンパク質M y h 6 (α ミオシン重鎖) (図1 E i)、A c t n 2 (α サルコメアアクチニン) (図1 E i i)、およびT n n i 3 (心臓トロポニン-I) (図1 E i i i) のRNAレベルを示すグラフである。N=4 独立した実験。データは、平均 $\pm$ S E Mとして表した。*** P<0.001、** P<0.01、* P<0.05、n s : 有意ではない。A、B、およびDについては、各群についてm i R c o m b o とn e g m i R との間の比較を行う。Cについては、対照s i R N A とT L R 3 標的s i R N A との間で比較を行う。

【図2 A】図2 A i ~ 図2 B i v は、T L R 3 阻害およびT L R 3 活性化のどちらも、初期の心臓リプログラミングには影響を与えないことを示すグラフである。図2 A i ~ 図2 A i v は、新生仔心臓線維芽細胞を、まず対照s i R N A またはT L R 3 標的s i R N A のいずれかでトランスフェクトしたことを示すグラフである。2日後、細胞を、陰性対照m i R であるn e g m i R またはm i R c o m b o のいずれかで、再度トランスフェクトした。m i R N A でのトランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、通常の増殖培地で3日間、培養した。心筋細胞分化系列決定因子G a t a 4 (図2 A i)、H a n d 2 (図2 A i i)、T b x 5 (図2 A i i i)、およびM e f 2 C (図2 A i v) のRNAレベルを、q P C Rによって決定した。N=9 独立した実験。m i R c o m b o + 対照s i R N A とm i R c o m b o + T L R 3 s i R N A との間で比較を行う、n s : 有意ではない。データは、平均 $\pm$ S E Mとして表した。

【図2 B】図2 B i ~ 図2 B i v は、新生仔心臓線維芽細胞を、陰性対照m i R (n e g m i R) またはm i R c o m b o でトランスフェクトしたことを示すグラフである。トランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、ビヒクルまたはT L R 3 アゴニストP o l y (I : C) L M W (低分子量P o l y (I : C)) と共に、さらに3日間インキュベートした。心筋細胞分化系列決定因子G a t a 4 (図2 B i)、H a n d 2 (図2 B i i)、T b x 5 (図2 B i i i)、およびM e f 2 C (図2 B i v) のRNAレベルを、q P C Rによって決定した。N=6 独立した実験。m i R c o m b o + ビヒクルとm i R c o m b o + T L R 3 アゴニストとの間で比較を行う、n s : 有意ではない。データは、平均 $\pm$ S E Mとして表した。

【図3 A】図3 A i ~ 図3 D i i i は、N F κ B が、m i R c o m b o リプログラミングに重要であることを示す図である。図3 A i ~ 図3 B i i i は、新生仔心臓線維芽細胞を、陰性対照m i R (n e g m i R) またはm i R c o m b o でトランスフェクトしたことを示す図である、トランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞をビヒクルまたはN F κ B アンタゴニストB a y 11-7085と共にインキュベートした。処理の1日後、培地を通常の増殖培地と交換し、細胞を、さらに12日間培養した。図3 A i ~ 図

10

20

30

40

50

3 A i i i は、q P C Rによって決定した、N F κ Bアンタゴニスト B a y 1 1 - 7 0 8 5による処理後の、心筋細胞構造タンパク質 M y h 6 (αミオシン重鎖) (図 3 A i)、A c t n 2 (αサルコメアアクチニン) (図 3 A i i)、および T n n i 3 (心臓トロポニン-I) (図 3 A i i i) の R N A レベルを示すグラフである。N = 3 独立した実験。

【図 3 B】図 3 B i ~ 図 3 B i i i は、m i R c o m b o (図 3 B i)、または m i R c o m b o および N F κ B 阻害剤 (図 3 B i i) を与え、固定し、抗 A c t n 2 抗体 (赤) で染色した細胞の画像である。核は、D A P I (青) で染色した。スケールバー 1 0 0 μ m。挿入写真は、5 倍拡大である。図 3 B i i i は、免疫染色の定量化を示すグラフである。A c t n 2 発現細胞を数え、全細胞集団に対する百分率で表した。N = 3 独立した実験。

【図 3 C】図 3 C ~ 図 3 D i i i は、新生仔心臓線維芽細胞を、マイクロ R N A (n e g m i R または m i R c o m b o) および s i R N A (対照 s i R N A または I k b k b 標的 s i R N A) でトランスフェクトしたことを示すグラフである。m i R N A でのトランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、通常の増殖培地で、4 日間 (ノックダウン効率を評価するため) または 1 4 日間 (心筋細胞構造タンパク質の R N A レベルを評価するため)、培養した。図 3 C は、q P C R による I k b k b ノックダウンの定量化を示すグラフである。N = 3 独立した実験。

【図 3 D】図 3 D i ~ 図 3 D i i i は、q P C R によって決定した、心筋細胞構造タンパク質 M y h 6 (αミオシン重鎖) (図 3 D i)、A c t n 2 (αサルコメアアクチニン) (図 3 D i i)、および T n n i 3 (心臓トロポニン-I) (図 3 D i i i) の R N A レベルを示すグラフである。N = 3 独立した実験。データは、平均 ± S E M として表した。各群について、m i R c o m b o と n e g m i R との間で比較を行う、** P < 0. 0 1、* P < 0. 0 5、n s : 有意ではない。

【図 4 A】図 4 A ~ 図 4 D i i i は、R e l A が N F κ B の作用を媒介することを示す図である。新生仔心臓線維芽細胞を、まず対照 s i R N A または N F κ B サブユニット R e l A 標的 s i R N A のいずれかでトランスフェクトした。2 日後、細胞を陰性対照 m i R である n e g m i R または m i R c o m b o のいずれかで、再度トランスフェクトした。m i R N A でのトランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、通常の増殖培地で、1 3 日間培養した。図 4 A は、q P C R による R e l A ノックダウンの定量化を示すグラフである。

【図 4 B】図 4 B i ~ 図 4 B i i i は、m i R c o m b o および対照 s i R N A (図 4 B i)、ならびに m i R c o m b o + R e l A s i R N A (図 4 B i i) を与え、固定し、抗 A c t n 2 抗体 (赤) で染色した細胞の画像である。核は、D A P I (青) で染色した。スケールバー 1 0 0 μ m。挿入写真は、5 倍の拡大である。図 4 B i i i は、免疫染色の定量化を示すグラフである。A c t n 2 発現細胞を数え、全細胞集団に対する百分率で表した。N = 3 独立した実験。

【図 4 C】図 4 C i ~ 図 4 C i i i は、q P C R によって決定した、心筋細胞構造タンパク質 M y h 6 (αミオシン重鎖) (図 4 C i)、A c t n 2 (αサルコメアアクチニン) (図 4 C i i)、および T n n i 3 (心臓トロポニン-I) (図 4 C i i i) の R N A レベルを示すグラフである。N = 3 独立した実験。

【図 4 D】図 4 D i ~ 図 4 D i i i は、q P C R によって測定した、内胚葉マーカー G a t a 6 (図 4 D i) および分化の一般的なマーカー T g f b 2 (図 4 D i i) の R N A レベルを示すグラフである。N = 3 独立した実験。データは、平均 ± S E M として表した。各群について、m i R c o m b o と陰性対照 m i R (n e g m i R) との間で比較を行う、** P < 0. 0 1、* P < 0. 0 5、n s : 有意ではない。

【図 5 A】図 5 A i ~ 図 5 B v i i i は、N F κ B サブユニット R e l A が、心筋細胞成熟遺伝子のプロモーターに結合することを示すグラフである。図 5 A i ~ 図 5 A v i i i は、新生仔心臓線維芽細胞を、n e g m i R または m i R c o m b o でトランスフェクトしたことを示すグラフである。7 日後、クロマチン D N A の C h I P 解析を行った。プ

ライマーは、示した心筋細胞サルコメア遺伝子 *Actn2* (図 5 A i)、*Myh6* (図 5 A i i)、*Mypn* (図 5 A i i i)、*Tnni3* (図 5 A i v)、*Ttn* (図 5 A v)、*Myoz2* (図 5 A v i)、*Tnncl* (図 5 A v i i)、および *Tnnt2* (図 5 A v i i i) の最初の 1 Kb を標的とするように設計した (−0.1 Kb で表した)。結果は、*negmiR* 対照のインプット率 (%) を 1 とした場合の *RelA* 結合の濃縮倍率として示した。N = 3 独立した実験。データは、平均 ± SEM として表した。*miR combo* と陰性対照 *miR (negmiR)* との間で比較を行う、** P < 0.01、* P < 0.05、ns : 有意ではない。

【図 5 B】図 5 B i ~ 図 5 B v i i i は、新生仔心臓線維芽細胞を、*miR combo* と対照 *siRNA* または *RelA* 標的 *siRNA* のいずれかによってトランスフェクトしたことを示すグラフである。7 日後、クロマチン DNA の ChIP 解析を行った。ライマーは、示した心筋細胞サルコメア遺伝子 *Actn2* (図 5 B i)、*Myh6* (図 5 B i i)、*Mypn* (図 5 B i i i)、*Tnni3* (図 5 B i v)、*Ttn* (図 5 B v)、*Myoz2* (図 5 B v i)、*Tnncl* (図 5 B v i i)、および *Tnnt2* (図 5 B v i i i) (−0.1 Kb で表した) の最初の 1 Kb を標的とするように設計した。結果は、クロマチンインプットに対する百分率として示している。N = 3 独立した実験。データは、平均 ± SEM として表した。

【図 6 A】図 6 A ~ 図 6 B は、マイクロ RNA が TLR3 を活性化することを示すグラフである。図 6 A は、新生仔心臓線維芽細胞を、*negmiR* または *miR combo* でトランスフェクトしたことを示すグラフである。細胞に脂質試薬だけを加えたモックトランスフェクションも用いた。トランスフェクションの 1 日後に、TLR3 への RNA 結合に干渉する TLR3 阻害剤 CU-CPT-4a を加えた。トランスフェクションの 4 日後に培地中の IL6 濃度を評価し、値は総タンパク質量 1 μg 当たりの pg IL6 として表した。N = 4 独立した実験。データは、平均 ± SEM として表した。それぞれモックトランスフェクト群に対して (* P < 0.05、ns : 有意ではない)、*negmiR* と *miR combo* との間で比較を行う († P < 0.05)。

【図 6 B】新生仔心臓線維芽細胞を、マイクロ RNA (モック、*miR combo*) および *siRNA* (非標的対照、TLR3 標的、*Ikbkb* 標的) でトランスフェクトしたことを示すグラフである。トランスフェクションの 4 日後に培地中の IL6 濃度を評価し、値は *miR combo* トランスフェクト細胞とモックトランスフェクト細胞との間の比率として表した。N = 3 独立した実験。データは、平均 ± SEM として表した。*miR combo* + 非標的対照 *siRNA* 群に対して比較を行う、** P < 0.01、* P < 0.05。

【図 7 A】図 7 A i ~ 図 7 D i i は、TLR3 アゴニストが、*miR combo* でリプログラミングされた心筋細胞の成熟を増進させることを示す図である。新生仔心臓線維芽細胞を、陰性対照 *miR (negmiR)* または *miR combo* でトランスフェクトした。トランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞をビヒクルまたは TLR3 アゴニスト Poly (I : C) LMW (低分子量 Poly (I : C)) と共に、さらに 4 日間インキュベートした。TLR3 アゴニストとのインキュベーションの後、細胞を、通常の増殖培地で、さらに 10 日間培養した。図 7 A i ~ 図 7 A i i i は、qPCR によって決定した、心筋細胞構造タンパク質 *Myh6* (αミオシン重鎖) (図 7 A i)、*Actn2* (αサルコメアアクチニン) (図 7 A i i)、および *Tnni3* (心臓トロポニン-I) (図 7 A i i i) の RNA レベルを示す図である。N = 5 - 14。

【図 7 B】図 7 B i ~ 図 7 B v i は、*miR combo* (図 7 B i、図 7 B i i、および 7 B i i i)、ならびに *miR combo* および TLR3 アゴニスト (図 7 B i v、図 7 B v、および 7 B v i) を与え、固定し、抗 *Actn2* 抗体 (赤) で染色した細胞の画像である。核は、DAPI (青) で染色した。N = 6 独立した実験。スケールバー 50 μm。挿入写真は、5 倍拡大でサルコメア構造を示している。

【図 7 C】免疫染色の定量化を示す図である。*Actn2* 発現細胞を数え、全細胞集団に対する百分率で表した。

10

20

30

40

50

【図7D】図7D i～図7D i iは、新生仔心臓線維芽細胞を、陰性対照mi R (n e g m i R)またはmi R c o m b oでトランスフェクトしたことを示す図である。トランスフェクションの翌日、培地を交換し、細胞を、分化培地(DMEM+2%FBS+ITS+AA)およびTLR3アゴニストPoly(I:C)LMWと共に、示した期間(図7D i)、インキュベートした。トランスフェクションの14日後、鼓動しているコロニーの数を数えた。N=4 独立した実験(図7D i i)。データは、平均±SEMとして表した。*各群について、ビヒクルとTLR3アゴニストとの間で比較を行う、*** $P<0.001$ 、** $P<0.01$ 、* $P<0.05$ 。†各群について、mi R c o m b oとn e g m i Rとの間で比較を行う、††† $P<0.001$ 、†† $P<0.01$ 、† $P<0.05$ 。

10

【図8】図8A～図8Dは、ICR2活性化心筋細胞成熟を、Act n 2(図8A)、My h 6(図8B)、Tnn i 3(図8C)、およびCac n a l c(図8D)の発現を測定することによってqPCRにより評価したグラフである。

【図9】図9A～図9Dは、ICR4活性化心筋細胞成熟を、Act n 2(図9A)、My h 6(図9B)、Tnn i 3(図9C)、およびCac n a l c(図9D)の発現を測定することによってqPCRにより評価したグラフである。

【図10】細胞数の変化を測定することにより、高用量のmi R c o m b oが正常な細胞機能を損なうことを示すグラフである。

【図11】図11A～図11Bは、 α -サルコメアアクチニンに対する抗体染色によって評価した、ICR2(図11A)およびPoly I C(図11B)によるmi R c o m b o媒介成熟を示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0005】

心筋細胞成熟は、パターン認識受容体アゴニストなどの先天免疫系のアゴニストによって増進もしくは上方調節され、またはアンタゴニストによって阻害もしくは下方調節されている可能性がある。実施例に示したように、心筋細胞成熟は、パターン認識受容体および関連したシグナル伝達経路を介して、分化決定された細胞前駆体において成熟の促進または遅延が効果的に制御されうる。

「パターン認識受容体」または「PRR」は、病原体および／または細胞損傷に一般的な分子を検出するタンパク質受容体である。これらのタンパク質は、樹状細胞、マクロファージ、単球、好中球、および上皮細胞などの主に先天免疫系の細胞によって発現されている。PRRは、微生物病原体と関連する、病原体関連分子パターン(PAMP)、および、細胞が損傷を受ける間または死ぬ間に放出される宿主の細胞成分に関連する、損傷関連分子パターン(DAMP)を同定するために使われる。PRRは、PAMPおよびDAMPに対する免疫応答を媒介し、炎症性サイトカインを放出させる。

30

【0006】

「病原体関連分子パターン」または「PAMP」は、外因性分子を同定することによって免疫応答を活性化する。PAMPの例としては、核酸、細菌性リポ多糖、エンドトキシン、細菌性フラジェリン、リポテイコ酸、ペプチドグリカン、および非メチル化CpGモチーフが挙げられるが、これらに限定されない。1つまたは複数の外因性分子に対する免疫応答の誘導は、感染の予防または感染からの回復を助けている。「損傷関連分子パターン」または「DAMP」は、宿主分子を同定することによって免疫応答を活性化する。DAMPの例としては、細胞の外に放出された核または細胞質ゾルタンパク質、および核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

40

Toll様受容体は、PRRの亜群である。「Toll様受容体」または「TLR」は、ロイシンリッチ反復配列である共通の構造的モチーフを共有する細胞外膜結合型PPRの1種である。PAMPまたはDAMPと相互作用するTLRは、NF κ Bを通してシグナル伝達を誘発し、その結果、炎症性サイトカインの増加をもたらす。TLRには、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TLR11、TLR12、およびTLR13が含まれる。「サイトカ

50

イン」には、典型的には約5～約20kDaの間の、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、および腫瘍壊死因子などの細胞シグナル伝達に係る広範な種類のタンパク質が含まれる。

【0007】

「NFκB」または「活性化B細胞の核内因子カッパ軽鎖エンハンサー」は、DNAの転写、サイトカイン生産、および細胞生存を制御するタンパク質複合体である。NFκBは、「即応性」の主要な転写因子、すなわち不活性状態で細胞中に存在し、活性化型となるために新たなタンパク質合成を要しない転写因子の部類に属しているため、細胞応答の調節において重要である。NFκBファミリーのタンパク質は、それらのN末端にRelホモロジドドメインを共有している。RelA、RelB、およびc-Relを含むNF-κBタンパク質のサブファミリーは、それらのC末端にトランス活性化ドメインを有する。対照的に、NF-κB1およびNF-κB2タンパク質は、p105およびp100の大きな前駆体として合成され、プロセッシングを受けて、それぞれ、成熟NF-κBサブユニットp50およびp52を生成する。

NFκBは、PAMPおよびDAMP、ならびに異種の核酸を含むその他の異種の化合物によって活性化される。「活性化剤」とは、酵素の活性を高める物質である。「NFκBの活性化剤」は、NFκBの活性を高める物質である。NFκBの活性化剤は、細胞と相互作用して、限定はされるが、TLRなどの様々なPPRとの相互作用またはより具体的にはTLR3との相互作用を含む様々な機序を通してNFκBの活性を高めることができる。「TLR3」または「Toll様受容体3」は、先天免疫系のPPRのToll様受容体ファミリーのメンバーである、TLR3遺伝子によってコードされている膜貫通型タンパク質である。TLR3は、ウイルス感染に関連したdsRNAなどの核酸を認識し、NFκBの活性化を誘導する。下記の実施例に示したように、NFκB活性化または阻害は、心筋細胞成熟を促進するまたは遅延させるのに効果的に用いることができる。

【0008】

心筋細胞成熟の増進または上方調節。

本発明の第1の態様は、前駆細胞のダイレクトリプログラミングによって心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節するための組成物および方法である。心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節するためのリプログラミング組成物は、(i)miR-1、miR-126、miR-133、miR-133a、mir-206、miR-208、miR-499、mir-4995p、およびそれらの組合せに対して少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む1つまたは複数のmiRと、(ii)NFκBの活性化剤とを含む。NFκBの活性化剤は、TLR経路アゴニスト、好適にはTLR3経路アゴニストであってもよい。「TLR経路アゴニスト」は、生物学的応答を誘導する、TLR受容体またはTLR経路関連物質と相互作用することができる組成物または物質である。「TLR3経路アゴニスト」は、生物学的応答を誘導する、TLR3またはTLR3経路関連物質と相互作用することができる、TLR経路アゴニストである。

【0009】

「miR」、別名「miRNA」または「マイクロRNA」は、典型的には約15～約25の間のヌクレオチドを有するRNAを含む小さな非コードRNAである。一部のmiRは、自身をフォールディングし戻して、dsRNAに似せることができる。miR-1、miR-126、miR-133、miR-133a、mir-206、miR-208、miR-499、mir-499-5pは、NFκBを活性化できる可能性がある。miR-1、miR-126、miR-133、miR-133a、mir-206、miR-208、miR-499、mir-499-5p、またはそれらの組合せは、NFκBを活性化するための使用に好適でありうるのだが、本明細書で使用される場合、「NFκBの活性化剤」としては、miR-1、miR-126、miR-133、miR-133a、mir-206、miR-208、miR-499、mir-499-5p、またはそれらの任意の組合せは除外する。細胞を心筋細胞および心筋細胞組織へダイレクトリプログラミングするためのmiRの使用は、2014年1月9日に公開された米国特

許公開第2014/0011281号、および米国特許公開第2018/0042969号に記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれている。

【0010】

これらの好ましいオリゴヌクレオチド構築物または構築物の組合せ（およびそれらの対応する成熟型）のヌクレオチド配列を以下に列記する。好例となるオリゴマー化合物（ステムループ前駆体）は、50～90ヌクレオチドの長さ（または、平均長が約70ヌクレオチドである、50～90ヌクレオチドの範囲内の任意の長さ）の範囲のサイズであり、好例となる成熟オリゴヌクレオチド化合物は、17～25サブユニットの長さであり、例えば、オリゴマー化合物は、17、18、19、20、21、22、23、24、または25サブユニットの長さである。例えば、ステムループ前駆体は約70ヌクレオチドであり、成熟ヌクレオチド生成物は約22ヌクレオチドの長さである。大文字で書かれていない「m i r -」はプレーm i R N Aを指し、一方、大文字で書かれた「m i R -」は成熟型を指す。プレーマイクロR N Aは、ステムループ二次構造を含む。

【0011】

表1：m i R

M m u - m i R - 1

ステムループ（配列番号1）

GCUUGGGACACAUACUUCUUUAUUGCCCAUAUGAACCGUCUAAGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAUUUCAGGC

成熟（配列番号2）

UGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU

M m u - m i R - 1 3 3 a

ステムループ（配列番号3）

GCUAAAGCUGGUAAAAUGGAACCAAAUCGCCUCUUCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCAACCAGCUGUAGC

成熟（配列番号4）

UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG

M m u - m i R - 2 0 6

ステムループ（配列番号5）

CCAGGCCACAUGCUUCUUUAUUAUCCUCAUAGAUUCUCAGCACUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGGUUUUGG

成熟（配列番号6）

UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG

M m u - m i R - 2 0 8 a

ステムループ（配列番号7）

UUCCUUUGACGGGUGAGCUUUUGGCCCGGGUUAUACCUGACACUCACGUUAAGACGAGCAAAAAGCUUGUUGGUCAGAG
GAG

成熟（配列番号8）

AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU

ヒトm i R - 1 - 1

ステムループ（配列番号9）

UGGAAACAUAUCUUCUUUAUUGCCCAUAUGGACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAUCUCA

ヒトm i R - 1 - 2

ステムループ（配列番号10）

ACCUACUCAGAGUACAUACUUCUUUAUGUACCCAUAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAUUUUUGG
UAGGC

m i R 1 両ステムループの成熟配列：（配列番号11）

UGGAAUGUAAAAGAAGUAUGUAU

ヒトm i R - 1 3 3 a

ヒトm i R - 1 3 3 a - 1

ステムループ（配列番号12）

ACAAUGCUUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAAUCGCCUCUUCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCAACCAGCUGUAGCUA
UGCAUUGA

ヒト *miR-133a-2*

ステムループ (配列番号 13)

GGGAGCCAAUUGC UUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAAUCGACUGUCCAAUGGAUUUGGUCCCCUUAACCAGCUG
UAGCUGUGCAUUGAUUGGCGCCG

miR-133a 両ステムループの成熟配列

(配列番号 14)

UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG

ヒト *miR-206*

ステムループ (配列番号 15)

UGC UUCCCCGAGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCCCCAU AUGGAUUACUUUGCU AUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGGUUUCGG
CAAGUG

miR-206 の成熟配列 (配列番号 16)

UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG

ヒト *miR-208a*

ステムループ (配列番号 17)

UGACGGGCGAGCUUUUGGCCCGGGUUAUACCUGAUGCUCACGUAAUAGACGAGCAAAAAGCUUGUUGGUCA

miR-208 の成熟配列 (配列番号 18)

AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU

ヒト *miR-138-1*

ステムループ (配列番号 19)

CCCUGGCAUGGUGUGGUGGGGCGAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGUUGCCAAUCAGAGAACGGCUACUUCACAACACCAG
GGCCACACCACACUACAGG

ヒト *miR-138-2*

ステムループ (配列番号 20)

CGUUGCUGCAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACGAGCAGCGCAUCCUCUUACCCGGCUAUUUCACGACACCAGGGUUGC
AUCA

miR-138-1 および *miR-138-2* 両方の成熟配列 (配列番号 21)

AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG

ヒト *miR-499-5p*

ステムループ (*Mmu-miR-499*) (配列番号 22)

GGGUGGGCAGCUGUUAAGACUUGCAGUGAUGUUUAGCUCCUCUGCAUGUGAACAUCACAGCAAGUCUGUGCUGCUGCCU

成熟 (*Mmu-miR-499* / *Hsa-miR-499-5p*; 配列は保存されている)
(配列番号 23)

UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU

ヒト *miR-126*

ステムループ (*Hsa-miR-126*) (配列番号 42)

CGCUGGGCAGCGGACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCA
CGGCA

miR-126 の成熟配列 (配列番号 43)

UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG

miR-126-5p の成熟配列 (配列番号 44)

CAUUAUUACUUUUGGUACGCG

【0012】

下記の実施例に示したように、高用量の *miR* は、正常な細胞機能を害しうる。驚くべきことに、結果として、*miR* を違う *NFκB* の活性化剤と組み合わせた場合、高用量の *miR* による有害作用なく、心筋細胞成熟を増進させるまたは上方調節することができることがわかった。好適には、細胞と接する1つまたは複数の *miR* は、約0.30mMより少ない量で存在し、好適には約0.28mM、0.26mM、0.24mM、0.22mM、0.20mM、1.8mM、1.6mM、0.14mM、0.12mM、または0.10mM以下の量で存在する。

10

20

30

40

50

【0013】

1つまたは複数のmiRは、好適には、miR-1、miR126、miR-133、miR-133a、mir206、miR-208、miR-499、およびmir-499-5pに対して少なくとも80%の配列同一性を有する、1つまたは複数のヌクレオチド配列を含む様々なmiRから選択されうる。好適には、1つまたは複数のmiRは、miR-1、miR126、miR-133、miR-133a、mir206、miR-208、miR-499、およびmir-499-5pに対して少なくとも85%、90%、95%、またはそれより高い配列同一性を有するヌクレオチド配列が含まれうる。好適には、複数のmiRの組合せは、miR-1、miR126、miR-133、miR-133a、mir206、miR-208、miR-499、およびmir-499-5pに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、またはそれより高い配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する任意の2つの、任意の3つの、または任意の4つのmiRが含まれうる。好適には、該組合せは、miR-1、miR-133a、miR208、およびmir-499-5pに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、またはそれより高い配列同一性を有する4つのmiRが含まれうる。好適には、該組合せは、miR-1、miR-133a、miR208、およびmir-499-5pから本質的になる4つのmiRが含まれうる。

【0014】

好適には、1つまたは複数のmiRは、mir1；mir1、mir133a、およびmir208；mir1、mir133a、およびmir206；mir1、mir133a、mir208、およびmir499-Sp；mir1、mir133a、mir206、およびmir499-Sp；mir1およびmir133；mir1およびmir138；mir1およびmir206；mir1およびmir208；mir133およびmir138；mir133およびmir206；mir133およびmir208；mir138およびmir206；mir138およびmir208；mir206およびmir208；mir1、mir138、およびmir208；mir1、mir206、およびmir208；mir138、mir206、およびmir208；mir1、mir133、およびmir206；mir1、mir133、およびmir208；mir1、mir138、およびmir206；mir133、mir138、およびmir208；ならびにmir133、mir138、およびmir206、を含む。ある実施形態において、1つまたは複数のmiRは、mir1；mir1、mir133a、およびmir208；mir1、mir133a、およびmir206；mir1、mir133a、mir208、およびmir499-Sp；mir1、mir133a、mir206、およびmir499-Sp；mir1およびmir133；mir1およびmir138；mir1およびmir206；mir1およびmir208；mir133およびmir138；mir133およびmir206；mir133およびmir208；mir138およびmir206；mir138およびmir208；mir206およびmir208；mir1、mir138、およびmir208；mir1、mir206、およびmir208；mir138、mir206、およびmir208；mir1、mir133、およびmir206；mir1、mir133、およびmir208；mir1、mir138、およびmir206；mir133、mir138、およびmir208；ならびにmir133、mir138、およびmir206、から本質的になる。

【0015】

下記の実施例では、「miR combo」とは、mir1、mir133a、mir208、およびmir499-5pの組合せであり、一方、「negmiR」とは、TLR3を標的としないmiRNAであり、陰性対照として使用される。

【0016】

好適には、組成物は、TLRアゴニストまたはTLR3アゴニストなどのNFκBの活性化剤を含む。TLR3アゴニストは、5'-三リン酸(triphosphate)、2

５’フルオロ修飾非線状RNAなどのRNA組成物を含んでいてもよい。５’三リン酸、２’フルオロ修飾非線状RNAは、２’フルオロ修飾ピリミジンまたは２’フルオロ修飾プリンを含む。２’フルオロ修飾は、少なくとも１つのピリミジンまたはプリンに存在していてもよく、すべてのピリミジン、すべてのプリン、またはすべてのピリミジンおよびプリンを含む、あらゆる数のピリミジンまたはプリンに存在していてもよい。好適には、２’フルオロ修飾は、ピリミジンおよび／またはプリンの１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは１００％で、またはそれらの間の任意の範囲で存在する。２’フルオロ修飾は、ウリジン、シチジン、グアニン、アデニンに、またはそれらの任意の組合せに存在していてもよい。幾つかの実施形態において、ウリジンのみが２’フルオロ修飾型である。一実施形態において、RNA中のすべてのウリジンは２’フルオロ修飾型であり、RNA中のすべてのシチジンは２’フルオロ修飾型であり、RNA中のすべてのグアニンは２’フルオロ修飾型であり、RNA中のすべてのアデニンは２’フルオロ修飾型であり、またはそれらの任意の組合せである。５’三リン酸、２’フルオロ修飾非線状RNAは、２０１３年１０月１１日公開の国際公開第２０１８／１８７３２８号に記載されており、その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれている。

10

RNA組成物は、硫黄原子でリン酸の非架橋酸素が置換されているホスホロチオエートで修飾されたヌクレオチドを含んでいてもよい。好適には、ホスホロチオエート修飾は、ヌクレオチドの１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、もしくは１００％で、またはそれらの間の任意の範囲で存在する。ある実施形態において、オリゴヌクレオチドの５’および／または３’末端の最後の３～５ヌクレオチドは、ホスホロチオエート修飾されている。他の実施形態において、オリゴヌクレオチドのすべてのヌクレオチドは、ホスホロチオエート修飾されている。

20

【００１７】

RNA組成物は、平滑末端ステムループ、５’オーバーハングを有するステムループ、３’オーバーハングを有するステムループ、または５’オーバーハングと３’オーバーハングの両方を有するステムループを含んでいてもよい。平滑末端ステムループは、相互にハイブリダイズすることができる５’末端ヌクレオチドと自身の３’末端相補体とを含み、ステムループを形成する。５’オーバーハングだけを有するステムループは、自身の相補体とハイブリダイズしてステムループを形成することができる３’末端ヌクレオチドを含んでいる。３’オーバーハングだけを有するステムループは、自身の相補体とハイブリダイズしてステムループを形成することができる５’末端ヌクレオチドを含んでいる。５’オーバーハングと３’オーバーハングの両方を有するステムループの場合、５’末端ヌクレオチドと３’末端ヌクレオチドはいずれもステムループの一部を形成することはない。

30

【００１８】

５’または３’オーバーハングは、RNA組成物が細胞増殖を阻害するまたは細胞死を誘導するのを可能にする、任意の長さであってもよい。好適には、５’および／または３’オーバーハングは、約１～約５０ヌクレオチドの長さでありうる。幾つかの実施形態において、５’および／または３’オーバーハングは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０ヌクレオチドの長さを含む約１～約１０ヌクレオチドの長さ、またはそれらの間の任意の長さの範囲である。他の場合において、５’および／または３’オーバーハングは、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、もしくは５０ヌクレオチドの長さを含む約１０～約５０ヌクレオチドの長さ、またはそれらの間の任意の長さの範囲である。

40

ある実施形態において、RNA組成物は、複数のステムループを含む。複数のステムループを有するRNA組成物は、第１のステムループ、第２のステムループ、およびステムループ間のスペーサーを最小限に含む。

50

【0019】

RNA組成物は、末端ヌクレオチドが自身の相補体とハイブリダイズして第1のステムループ、第2のステムループ、またはその両方を形成するのを可能にするヌクレオチド配列を含んでいてもよい。幾つかの実施形態において、RNA組成物は、自身の相補的なヌクレオチドとハイブリダイズして第1または第2のステムループのいずれかを形成することができる5'-三リン酸修飾末端ヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態において、RNA組成物は、自身の相補的なヌクレオチドとハイブリダイズしていずれかのステムループを形成することができる3'-末端ヌクレオチドを含む。

RNA組成物は、第1のステムループと第2のステムループとのどちらかもしくは両方に関連した5'-または3'-オーバーハングを含んでいてもよい。第1のステムループもしくは第2のステムループに関連した5'-または3'-オーバーハングは、RNA組成物が細胞増殖を阻害するまたは細胞死を誘導することを可能にする任意の長さであってもよい。好適には、5'-および/または3'-オーバーハングは、約1~約50ヌクレオチドの長さでありうる。幾つかの実施形態において、5'-および/または3'-オーバーハングは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10ヌクレオチドの長さを含む約1~約10ヌクレオチドの長さ、またはそれらの間の任意の長さの範囲である。他の場合において、5'-および/または3'-オーバーハングは、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50ヌクレオチドの長さを含む約10~約50ヌクレオチドの長さ、またはそれらの間の任意の長さの範囲である。

【0020】

スパーサーは、マルチステムループ組成物においてステムループを連結する。幾つかの実施形態において、スパーサーは、ssRNAのセグメント、dsRNAのセグメント、またはそれらの組合せを含む。dsRNAセグメントは、第2のヌクレオチド配列と完全にまたは部分的にハイブリダイズした、第1のヌクレオチド配列のセグメントのセグメントを含んでいてもよい。部分的なハイブリダイゼーションのみを有するスパーサーは、スパーサーに沿った相補的なヌクレオチド間でヌクレオチド対形成を妨げる、任意の数のヌクレオチド対ミスマッチを有していてもよい。好ましくは、スパーサーは、生理的条件下で熱力学的にまたは動力学的に安定が保たれている。場合によって、ステムループは、1、2、3、4、5、またはそれより多いヌクレオチド対ミスマッチを有する。

スパーサーは、実質的にIFN生産を誘導せず細胞傷害性の利点を提供する任意の好適な長さであってもよい。好適には、スパーサーの長さは、ssRNAセグメントに沿った約5~約100の間のヌクレオチド、dsRNAセグメントに沿ってハイブリダイズしたもしくはミスマッチした約5~約100の間のヌクレオチド対、またはそれらの組合せを含む。幾つかの実施形態において、スパーサーの長さは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、もしくは50ヌクレオチドの長さを含む約5~約50ヌクレオチド、またはそれらの間の任意の長さの範囲である。

【0021】

幾つかの実施形態において、スパーサーは、二次構造に関連していない。他の実施形態において、スパーサーは、二次構造に関連している。構造化されたスパーサーは、ステムループを含むことがあり、これによって、少なくとも第3のステムループを含むRNA組成物が生成される。第3のステムループは、ヌクレオチドの完全または部分的なハイブリダイゼーションから形成され、ヘアピン構造モチーフを生成しうる。ステムループは、約5~約30または約8~約25の間の任意の数のヌクレオチド対形成を含む、任意の好適な数のヌクレオチド対形成から形成されていてもよい。ある実施形態において、ステムル

ープは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30ヌクレオチド対形成、またはそれらの間の任意の数のヌクレオチド対形成を含む。部分的なハイブリダイゼーションのみを有するステムループは、ステムループが生理的条件下で安定を保っている限りステムに沿った相補的ヌクレオチド間のヌクレオチド対形成を妨げる、任意の数のヌクレオチド対ミスマッチを有していてもよい。場合によって、ステムループは、1、2、3、4、もしくは5ヌクレオチド対ミスマッチ、またはそれらの間の任意の範囲のヌクレオチド対ミスマッチを有する。

【0022】

好例となるRNAオリゴヌクレオチドを表2に示す。2' Fピリミジン含有5' ppp RNAを含む免疫原性がん細胞死滅RNA (ICR) と呼ぶRNA組成物を設計し、5' pppと、様々な長さの3' -オーバーハング型ヘアピン (ICR1、ICR1A、ICR1B、ICR1C)、平滑末端型ヘアピン (ICR2-3、ICR2、ICR2A、ICR2B)、5' オーバーハング型ヘアピン (ICR3、ICR3A、ICR3B、ICR3C)、複数のステムループを含むssRNA (ICR4、ICR4A)、および複数のステムループを含むdsRNA (ICR5、ICR5XとICR5Yとのハイブリダイゼーションから形成される) などの様々な予想される二次構造とを含有するように生成した。線状5' ppp ssRNA (ICR-L) および長いdsRNA (pIC) もまた、比較のために生成した。当業者には明らかなように、ICR1、ICR1A、ICR1B、ICR1C、ICR2A、ICR2B、ICR3、ICR3A、ICR3B、ICR3C、ICR4、ICR4A、ICR5X、およびICR5Yは各々、ICR2のオリゴヌクレオチド配列を含む。

【0023】

10

20

【表 1】

表2: 1本鎖RNA

RNA	配列(5'→3')	配列番号
ICR1	ggaug cggua ccuga cagca uccua	配列番号45
ICR1A	ggaug cggua ccuga cagca uccua aagug	配列番号24
ICR1B	ggaug cggua ccuga cagca uccua aagug gugga aguga g	配列番号25
ICR1C	ggaug cggua ccuga cagca uccua aagug gugga aguga gugag ugaaa uaaaa a	配列番号26
ICR2-3	ggacg uaccu gacgu cc	配列番号27
ICR2-2	ggauc guacc ugacg aucc	配列番号28
ICR2-1	ggauc gguac cugac agauc c	配列番号29
ICR2	ggaug cggua ccuga cagca ucc	配列番号30
ICR2A	ggacg augcg guacc ugaca gcauc gucc	配列番号31
ICR2B	ggaug cggua ccuga cagca uccac cuggg augcu gucag guacc gcauc c	配列番号32
ICR3	ggagc ggaug cggua ccuga cagca ucc	配列番号33
ICR3A	gggga ggaca gcgga ugcgg uaccu gacag caucc	配列番号34
ICR3B	ggaau gaggg gagga cagcg gaucg gguac cugac agcau cc	配列番号35
ICR3C	gggua aguga augag gggag gacag cggau gcggu accug acagc aucc	配列番号36
ICR4	ggaug cggua ccuga cagca uccua aacuc auggu ccaug uuugu ccaug gacca	配列番号37
ICR4A	ggaug cggua ccuga cagca uccua aacuc auggu ccaug uuugu ccaug gacca acua cagca uagua ugugu ugaua uaaug u	配列番号38
ICR5X	ggaug cggua ccuga cagca uccug aguuu aguug uugu	配列番号39
ICR5Y	ggaug cggua ccuga cagca uccac aacaa cuaaa cuca	配列番号40
ICR-L	gguuu uuuuu uuuuu uuuuu uuu	配列番号41

10

20

【0024】

幾つかの実施形態において、RNA組成物は、ステムループを形成することができるオリゴヌクレオチドを含む。幾つかの実施形態において、RNA組成物は、ICR2に対して少なくとも50%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドの完全なまたは部分的なハイブリダイゼーションから形成された、1つまたは複数のステムループを含む。特定の実施形態において、RNA組成物は、ICR2に対して少なくとも60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドの完全なまたは部分的なハイブリダイゼーションから形成された、1つまたは複数のステムループを含む。RNA組成物はまた、ICR2に対して少なくとも50%、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するオリゴヌクレオチドの完全なまたは部分的なハイブリダイゼーションから形成された、1つまたは複数のステムループから本質的になっていてもよい。

30

40

【0025】

幾つかの実施形態において、RNA組成物は、ICR1、ICR1A、ICR1B、ICR1C、ICR2A、ICR2B、ICR3、ICR3A、ICR3B、ICR3C、ICR4、ICR4A、ICR5X、またはICR5Yに対して少なくとも50%の配列同一性を有する、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、RNA組成物は、ICR1、ICR1A、ICR1B、ICR1C、ICR2A、ICR2B、ICR3、ICR3A、ICR3B、ICR3C、ICR4、ICR4A、IC

50

R 5 X、または I C R 5 Y のいずれかに対して少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する、1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含む。R N A 組成物はまた、I C R 1、I C R 1 A、I C R 1 B、I C R 1 C、I C R 2 A、I C R 2 B、I C R 3、I C R 3 A、I C R 3 B、I C R 3 C、I C R 4、I C R 4 A、I C R 5 X、または I C R 5 Y のいずれかに対して少なくとも 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する、1 つまたは複数のオリゴヌクレオチドから本質的になっていてもよい。

10

【0026】

幾つかの実施形態において、N F κ B の活性化剤は、R N A 生成物以外の物質であってもよい。好適には、N F κ B の活性化剤は、微生物（例えば、細菌またはウイルス）、微生物生成物（例えば、細菌生成物またはウイルス生成物）、サイトカイン、酸化ストレス、物理的ストレス、治療的に使用される薬物、修飾タンパク質、過剰発現させたタンパク質、過剰発現させたリガンド、アポトーシスメディエーター、マイトジェン、増殖因子、ホルモン、生理学的メディエーター、化学薬品であってもよい。好例となる N F κ B の活性化剤は、Pahl, H.L., Oncogene(1999)18, 6853-6866に記載されており、これは全体として参照により本明細書に組み込まれている。

20

T L R 経路アゴニストは、リプログラミング培地をさらに含んでもよい。リプログラミング培地は、体細胞をリプログラミングする、例えば線維芽細胞を心筋細胞へリプログラミングする量において、基本組織培養培地、インスリン・トランスフェリン・セレン（I T S）、またはアスコルビン酸を含む。リプログラミング培地は、ウシ血清アルブミン（B S A）または L - グルタミンをさらに含んでもよい。体細胞をリプログラミングする量のインスリン・トランスフェリン・セレンは、インスリンが 1 0 ナノモル～1 0 マイクロモルの量（例えば 1 0 0 n M）で存在すること、トランスフェリンが 1 リットル当たり 0 . 0 0 2 ～1 グラムの量（例えば 0 . 0 5 5 g / l）で存在すること、およびセレンが 1 リットル当たり 1 ～1 0 0 μ g の量（例えば 1 リットル当たり 6 . 7 μ g）で存在することの特徴とする。任意に、該培地は、0 . 2 m M ～2 0 m M L - グルタミン（例えば 2 m M）を含んでもよい。該培地はまた、例えば 1 0 0 ～5 0 0 μ M といった、5 0 μ M ～5 0 ミリモルのアスコルビン酸を、例えば 2 5 0 μ M アスコルビン酸を含んでもよい。細胞を心筋細胞および心筋細胞組織へダイレクトリプログラミングするためのリプログラミング培地の使用は、米国特許公開第 2 0 1 8 / 0 0 4 2 9 6 9 号に記載されており、その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれている。

30

【0027】

リプログラミング組成物は、1 つまたは複数のリプログラミング効率向上分子を含んでもよい。「リプログラミング効率向上分子」は、心筋細胞への変換の効率を高めるのに好適な分子である。好例となるリプログラミング効率向上分子には、バルプロ酸、骨形成タンパク質 4（B M P 4）、ヤヌスタンパク質チロシンキナーゼ（J A K）阻害剤 1、R G 1 0 8、R（+）B a y K 8 6 4 4、P S 4 8、および A 8 3 - 0 1 が含まれる。これらの薬剤は、対象に、T L R 経路アゴニストを送達する前に、後に、または T L R 経路アゴニストと一緒に、送達される（例えば、注入または注射される）。

40

リプログラミング組成物は、細胞質送達剤を含んでもよい。「細胞質送達剤」とは、膜を横切って、分子を、好適には核酸を輸送する薬剤である。好例となる細胞質送達剤には、D h a r m a F E C T などのトランスフェクション剤、リポソーム、合成ポリマー、細胞透過性ペプチド、ナノ粒子、ウイルス粒子、エレクトロポレーション緩衝液、ヌクレオフェクション試薬、またはそれらの任意の組合せが含まれるが、これらだけに限定されない。

【0028】

50

心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節する方法は、細胞が心筋細胞へとリプログラミングされるような十分な時間、細胞を有効量の記載の組成物のいずれかと接触させることを含む。好適には、細胞は、線維芽細胞、例えば心臓線維芽細胞もしくは真皮線維芽細胞であり、かつ／または心臓線維性組織を含む。

対象において心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節する方法は、有効量の記載の組成物のいずれかまたは記載の医薬組成物のいずれかを投与することを含む。好適には、対象は、症状を軽減するために、結果として生じる症状の原因作用を一時的または永続的に排除するために、かつ／または心臓線維性組織の結果として生じる症状の出現を予防するもしくは遅らせるまたは進行もしくは重症度を後退させるために、心筋細胞成熟を増進するまたは上方調節することを必要としている。好適には、細胞は、線維芽細胞、例えば心臓線維芽細胞もしくは真皮線維芽細胞であり、かつ／または心臓線維性組織を含む。

10

【0029】

心筋細胞成熟の阻害または下方調節

本発明の別の態様は、心筋細胞成熟を阻害するまたは下方調節するための組成物および方法である。心筋細胞成熟を阻害するまたは下方調節するための組成物は、TLR阻害剤、NFκB阻害剤、ikkb阻害剤、またはそれらの任意の組合せを含む。

「TLR阻害剤」は、生物学的応答を遮断するまたは弱める、TLR受容体と特異的に相互作用することができる組成物または物質である。TLR阻害剤は、TLR3阻害剤であってもよい。好適には、TLR阻害剤は、TLRアンタゴニストでありうる。「TLR経路アンタゴニスト」は、生物学的応答を遮断するまたは弱める、TLR受容体またはTLR経路関連物質と相互作用することができる組成物または物質である。「TLR3経路アンタゴニスト」は、生物学的応答を遮断するまたは弱める、TLR3またはTLR3経路関連物質と相互作用することができるTLR経路アンタゴニストである。好例となるTLRまたはTLR3阻害剤には、CU-CPT-4a、またはTLRタンパク質の翻訳に干渉するsiRNAが含まれるが、これらに限定されない。

20

「NFκB阻害剤」は、生物学的応答を遮断するまたは弱める、NFκBと特異的に相互作用することができる組成物または物質である。好例となるNFκB阻害剤には、Bay 11-7085、またはRelAなどのNFκBタンパク質の翻訳に干渉するsiRNAが含まれるが、これらに限定されない。

【0030】

30

「ikkb阻害剤」または「NFκBキナーゼサブユニットベータの阻害剤」は、生物学的応答を遮断するまたは弱める、ikkbと特異的に相互作用することができる組成物もしくは物質、またはikkbタンパク質の翻訳に干渉するsiRNAである。

好適には、TLR阻害剤は、TLR3阻害剤、例えば、TLR3活性化および／またはシグナル伝達を遮断することができる、抗体、shRNA低分子、またはその他の競合阻害剤である。好適には、TLR阻害剤は、実施例で使用したCU-CPT-4aなどのTLR3阻害剤である。

好適には、組成物は、細胞質送達剤、細胞用培地、またはそれらの任意の組合せをさらに含む。

心筋細胞成熟を阻害するまたは下方調節する方法は、細胞において心筋細胞成熟が阻害されるまたは下方調節されるような十分な時間、細胞を有効量の記載の組成物のいずれかと接触させることを含む。好適には、細胞は、線維芽細胞、例えば心臓線維芽細胞もしくは真皮線維芽細胞であり、かつ／または心臓線維性組織を含む。

40

【0031】

医薬組成物

本明細書において開示した方法において利用される組成物は、(a) 治療的有效量の、本明細書において開示したような1つまたは複数の化合物と(b) 1つまたは複数の薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤とを含む医薬組成物として、製剤化してもよい。医薬組成物は、約0.5~500mgまたは約1~100mgなど、約0.1~2000mgの範囲の本明細書において開示したような1つまたは複数の化合物を含んでいて

50

もよい。医薬組成物は、約 0.5～20 mg/kg 体重または約 0.1～10 mg/kg 体重など、約 0.1～100 mg/kg 体重の 1 日量で化合物を提供するように投与してもよい。幾つかの実施形態において、医薬組成物を患者に投与した後（例えば、投与の約 1、2、3、4、5、または 6 時間後）。作用部位における化合物の濃度は、該作用部位において少なくとも一部の細胞が心筋細胞へ成熟したまたは成熟することとなる場合、組成物の有効量である。

本明細書において開示した方法において利用される化合物は、担体を含む医薬組成物として製剤化してもよい。例えば、担体は、タンパク質、炭水化物、糖、タルク、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、炭酸カルシウム、およびデンプンゼラチンペーストからなる群から選択されうる。

10

【0032】

本明細書において開示した方法において利用される化合物は、1 つまたは複数の結合剤、充填剤、潤滑剤、懸濁化剤、甘味料、香味料、防腐剤、緩衝液、湿潤剤、崩壊剤、および発泡剤を含む医薬組成物として製剤化してもよい。

好適な希釈剤は、微結晶セルロース、ラクトース、第二リン酸カルシウム、サッカライド、および前記のいずれかの混合物などの、薬学的に許容される不活性充填剤を含んでもよい。

本明細書において開示した方法において利用される化合物は、任意の好適な経路を経る送達のための医薬組成物として製剤化してもよい。例えば、医薬組成物は、経口、静脈内、筋肉内、皮下、局所性、および経肺経路によって投与してもよい。

20

本明細書において開示した方法において利用される化合物は、当技術分野で周知の従来手順に従って、有効成分を標準的な医薬担体または希釈剤と組み合わせることによって調製された従来の剤形で投与してもよい。

該化合物を含む医薬組成物は、任意の適切な経路による投与、例えば、経口（頬側または舌下を含む）、直腸、経鼻、局所（頬側、舌下、または経皮を含む）、膣、または非経口（皮下、筋肉内、静脈内、または皮内を含む）経路による投与に適合させてもよい。そのような製剤は、薬学の技術分野で既知の任意の方法によって、例えば、有効成分を担体または賦形剤と会合させることによって調製してもよい。

【0033】

経口投与に適合させた医薬組成物は、カプセル剤もしくは錠剤；散剤もしくは顆粒剤；水性もしくは非水性液体の、水薬もしくは懸濁剤；食用泡もしくはホイップ；または水中油液体乳剤もしくは油中水液体乳剤などの、個別の単位として提供してもよい。

30

経皮投与に適合させた医薬組成物は、長期間、レシピエントの表皮に密着させたままにすることが意図された個別の貼付剤として提供してもよい。例えば、有効成分は、イオントフォレーシスによって貼付剤から送達してもよい。

非経口投与に適合させた医薬組成物には、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および製剤を所期のレシピエントの血液と等張にする溶質を含有しうる、水性および非水性滅菌注射液；ならびに、懸濁化剤および増粘剤を含みうる、水性および非水性滅菌懸濁剤が含まれる。製剤は、単位用量または多回用量の容器、例えば密封したアンプルおよびバイアルで提供してもよく、使用直前に、例えば注入用の水などの滅菌液体担体の添加のみ必要となる、凍結乾燥（freeze-dried）（凍結乾燥（lyophilized））状態で保管してもよい。即時調合注射液および懸濁剤を、滅菌した散剤、顆粒剤、および錠剤から調製してもよい。

40

【0034】

本明細書において開示した組成物および方法は、医薬組成物として投与してもよく、したがって、化合物を包含する医薬組成物は、本明細書において開示した組成物の実施形態であるとみなされる。そのような組成物は、薬学的に許容されるあらゆる物理的形態をとることができ、例として、そのような組成物によって医薬組成物の経口投与が可能となる。そのような医薬組成物は、有効量の開示の化合物を含有する。ここで有効量とは、投与されるべき化合物の 1 日量に関する。各投与単位は、所与の化合物の 1 日量を含んでいて

50

もよく、または各投与単位は、1日量の2分の1もしくは3分の1など、1日量の一部だけを含んでいてもよい。各投与単位に含まれるべき各化合物の量は、部分的には、治療のために選択された特定の化合物および所与の指標などのその他の因子が何であるかによって決定される。本明細書において開示した医薬組成物は、周知の手順を用いることによって、患者に投与した後、有効成分の迅速、徐放、または遅延放出が可能となるように製剤化してもよい。

【0035】

本明細書において開示した方法に従って使用される化合物は、単一の組成物または化合物の組合せとして投与してもよい。例えば、心筋細胞成熟のための組成物は、単一化合物として、または心筋細胞成熟のための別の化合物もしくは異なる薬理学的活性を有する別の化合物と組み合わせて投与してもよい。

上記で指摘したように、化合物の薬学的に許容される塩が、企図され、また開示した方法において利用される。「薬学的に許容される塩」という用語は、本明細書で使用される場合、生体に対して実質的に非毒性である化合物の塩を指す。典型的な薬学的に許容される塩には、本明細書において開示したような化合物と、薬学的に許容される鉱物または有機酸または有機もしくは無機塩基との反応によって調製されたこれらの塩が含まれる。そのような塩は、酸付加および塩基付加塩として既知である。当業者の読者であれば、本明細書において開示したような化合物のほとんどまたはすべてが塩を形成することができること、および、製薬の塩形態は遊離酸または塩基よりも容易に結晶化され精製されることが多いため一般的に使用されることを、理解するであろう。

酸付加塩を形成するために一般的に使用される酸には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、リン酸などの無機酸、およびp-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、シュウ酸、p-プロモフェニルスルホン酸、炭酸、コハク酸、クエン酸、安息香酸、酢酸などの有機酸が含まれる。好適な薬学的に許容される塩の例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、硫酸水素塩、亜硫酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、一水素リン酸塩、二水素リン酸塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、プロミド、ヨード、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、塩酸塩、二塩酸化合物、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオラート、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン-1, 4-ジオアート、ヘキシン-1, 6-ジオアート、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、キシレンスルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、アルファーヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、プロパンスルホン酸塩、ナフタレン-1-スルホン酸塩、ナフタレン-2-スルホン酸塩、マンデル酸塩などを挙げることができる。

【0036】

塩基付加塩には、アンモニウムまたはアルカリもしくはアルカリ土類金属の水酸化物、炭酸塩、重炭酸塩などの無機塩基からの誘導体が含まれる。そのような塩の調製において有用な塩基には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、炭酸カリウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムなどが含まれる。

本明細書において開示した化合物のうちの任意の塩の一部を形成する特定の対イオンは、全体としての塩が薬理学的に許容される限り、かつ、対イオンが全体としての塩に対して望ましくない特性をもたらさない限り、化合物の活性に対して重大である必要はない。望ましくない特性には、望ましくない溶解度または毒性が含まれる。

化合物の薬学的に許容されるエステルおよびアミドもまた、本明細書において開示した組成物および方法において使用することができる。好適なエステルの例としては、メチルエステル、エチルエステル、プロピルエステル、ドテシルエステル、ベンジルエステルなどのアルキル、アリール、およびアラルキルエステルが挙げられる。好適なアミドの例としては、メチルアミド、ジメチルアミド、メチルエチルアミドなどの非置換アミド、一置

換アミド、および二置換アミドが挙げられる。

【0037】

また、本明細書において開示した方法は、化合物、またはそれらの塩、エステル、および／もしくはアミドの溶媒和物形態を使用して実行してもよい。溶媒和物形態には、エタノール溶媒和物、水和物などが含まれる。

対象

本明細書で使用される場合、「対象」は、「患者」または「個体」と交換可能であり、動物を意味し、治療を必要とするヒトまたは非ヒト動物であってもよい。「治療を必要とする対象」には、本明細書において開示した組成物を用いる治療に対して応答性の疾患、障害、または状態を有する対象が含まれる。例えば、「治療を必要とする対象」には、アテローム性動脈硬化症などの心臓血管系疾患を有する対象、または心筋梗塞に罹患したことがある対象が含まれる。

10

【0038】

治療の方法

本明細書で使用される場合、「治療すること (treating)」または「治療すること (to treat)」という用語はいずれも、症状を軽減し、結果として生じる症状の原因作用を一時的または永続的に排除すること、および／または指定の疾患または障害の結果として生じる症状の出現を予防するもしくは遅らせるまたは進行もしくは重症度を後退させることを意味する。したがって、本明細書において開示した方法は、治療的および予防的投与の両方を包含する。

20

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、対象への単回または多回投与において、診断または治療下で対象において所望の効果をもたらす、化合物の量または用量を指す。開示した方法は、有効量の、心筋細胞成熟を誘導するまたは心筋細胞成熟を阻害するための開示された組成物（例えば、医薬組成物中に存在するものとしての）を投与することを含んでもよい。

有効量は、既知の技術を使用することによって、かつ類似の状況下で得られた結果を観察することによって、当業者としての担当の診断専門医によって容易に決定される。投与する化合物の有効量または用量の決定に際して、担当の診断専門医は、対象の種；対象の大きさ、年齢、および全般的な健康状態；関係した疾患または障害の、併発の程度または重症度；対象個々の反応；投与する特定の化合物；投与の方法；投与する製剤のバイオアベイラビリティ特性；選択する用量レジメン；併用薬剤の使用；ならびにその他の関連する状況などの、幾つかの因子を考慮することができる。

30

【0039】

典型的な1日量には、約0.01mg/kg～約100mg/kg（約0.05mg/kg～約50mg/kgおよび／または約0.1mg/kg～約25mg/kgなど）の本治療方法において使用される各化合物が含まれる。

組成物は、各化合物を個々に約1～約500mg含有する単位剤形で、または約5～約300mg、約10～約100mg、および／もしくは約25mgなどの単回単位剤形で製剤化してもよい。「単位剤形」という用語は、患者用の単位投与量として好適な物理的に分離した単位を指し、各単位は所望の治療効果を生み出すように計算された所定量の活性物質を、好適な医薬担体、希釈剤、または賦形剤と併せて含有する。

40

【実施例】

【0040】

（実施例）心筋細胞成熟にはTLR3活性化NFκBが必要である

TLR3阻害が心筋細胞成熟を遮断したことを実証する；心筋細胞系列に分化決定された前駆細胞は、成熟遺伝子を発現することができず、サルコメアは発生しなかった。TLR3の心筋細胞成熟に対する作用は、NFκBのRelAサブユニットに依存したことを確証するものである。重要なことには、成熟心筋細胞の発達を促進する条件下では、NFκBが心筋細胞成熟遺伝子のプロモーターにおいて著しく濃縮した。さらに、TLR3-NFκB経路の活性化によって心筋細胞成熟が増進された。したがって、本研究は、TL

50

R 3 - N F κ B 経路が、成熟心筋細胞へ分化決定された前駆体の成熟に不可欠であることを実証するものである。

緒言

心筋細胞は、心臓の必須構成成分である。遺伝子操作によって、異常な心臓形態形成を生じさせることができ、通常、その結果、胚致死性となる。この胚致死性は、出生前に診断するのは難しく、前駆体が心臓系列への分化を決定し、十分に機能的な心筋細胞へ成熟する過程を理解することを制限している。この障害のため、多くの研究者が培養皿の中での心筋細胞発達を繰り返すことに従事してきた。リプログラミング戦略を含む様々な方法が用いられている [1~8] [9~14]。

【0041】

*in vitro*でのモデリングによって、心筋細胞発達には、開始期および成熟期の2つの段階があることが示唆されている [15~18]。心筋細胞発達の開始期では、前駆細胞は、幾つかのいわゆるパイオニア転写因子を最初に発現する。これらのパイオニア転写因子は、顕著なエピジェネティックなリモデリングを誘導し、前駆体表現型が発現抑制され、心筋細胞系列への分化決定に不可欠な様々な遺伝子が活性化される。パイオニア転写因子は、Gata4、Tbx5、Mef2C、およびHand1が同定されており、その複合発現が心筋細胞系列への最初の分化決定に不可欠である [16]。心筋細胞発達の開始期における重要なエピジェネティックな機序は、ヒストンのメチル化である。H3K4がメチル化されるのに対し [19]、H3K27は脱メチル化される [14]。これらのエピジェネティック修飾は、協調して作用して、心筋細胞系列への分化決定を安定させるのに不可欠な数多くの遺伝子を活性化し、抑制する。心筋細胞発達の開始期における段階はよく知られているのに対して、心筋細胞成熟の過程は詳しく研究されていない。

近年、2つの研究で、TLR3が線維芽細胞のiPS [20] および内皮細胞 [21] へのリプログラミングに重要であることが示された。具体的には、TLR3の活性化は、DNAアクセシビリティを促進するエピジェネティックモディファイヤーの発現および活性、ならびに表現型の可変性における全般的変化を引き起こす。興味深いことに、TLR3は炎症反応において役割を果たしており、また、炎症は損傷に対する心臓応答において主要な役割を果たしていることは既知である [22、23]。本明細書では、心筋細胞成熟にはTLR3活性化NF κ Bが必要であることを示す。心筋細胞系列に分化決定された前駆細胞は、TLR3阻害剤またはTLR3ノックダウンによって、心筋細胞への成熟が妨げられた。さらなる実験によって、TLR3はNF κ Bを介して心筋細胞成熟を制御したことが実証される。NF κ Bの薬理的阻害、およびNF κ Bを活性化するIkbb (核内因子カッパBキナーゼの阻害剤) のノックダウンによって、心筋細胞成熟は妨げられた。さらに、心筋細胞形成を誘導する条件によって、NF κ Bが心筋細胞成熟遺伝子のプロモーターへ結合することが誘導された。さらに、マイクロRNAがTLR3を活性化することがわかった。

【0042】

材料および方法

化学製品：TLRアゴニストは、InvivoGenから購入した（マウスTLR1-9アゴニストキット、tlrl-kit1mw）。TLR3アンタゴニストCU-CPT-4a、NF κ BアンタゴニストBay 11-7085、およびAP1アンタゴニストSR 11302は、Tocrisから購入した。

【0043】

マイクロRNAトランスフェクション：マウス（C57BL/6）新生仔心臓線維芽細胞を、Jayawardenaらが略述した方法 [10] に従って2日齢マウス新生仔から分離した。分離後、線維芽細胞を、15% v/v FBS (Thermo Scientific Hycloneウシ胎仔血清、カタログ番号 SH30071.03、ロット番号 AXK49952)、および1% v/v ペニシリン/ストレプトマイシン (Gibco、カタログ番号 15140-122、100ユニットペニシリン、100ug/mlストレプトマイシン) を補充したDMEM (ATCC、カタログ番号 30-200

2) 含有増殖培地で培養した。線維芽細胞が70～80%コンフルエントに達すると、直ちに0.05%w/vトリプシン(Gibco、カタログ番号25300-054)を使用して細胞を継代した。新たに分離した線維芽細胞を、継代0と表示した。実験は、継代2の細胞を用いて行った。すべての実験について、細胞を5000細胞/cm²で増殖培地に播種した。24時間後、細胞を、トランスフェクション試薬(Dharmafect-I、ThermoScientific)だけで、トランスフェクション試薬+非標的マイクロRNA(negmiR)で、またはトランスフェクション試薬+我々の既報の心臓リプログラミングマイクロRNAの組合せ[9](miR combo、miR-1、miR-133、miR-208、miR-499)でトランスフェクトした。

【0044】

qPCR: 全RNAを、製造業者の使用説明書に従ってQuick-RNA Mini Prep Kit (Zymo Research)を使用して抽出した。全RNA(50ng~100ng)は、大容量cDNA逆転写キット(Applied Biosystems)を使用してcDNAに変換した。cDNAを、FAM結合遺伝子特異的プライマーおよびTaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)を含む標準的なqPCR反応で使用した。qPCR用に以下のプライマーを使用した: Gapdh (Mm99999915__m1)、Tnni3 (Mm00437164__m1)、Actn2 (Mm00473657__m1)、Myh6 (Mm00440359__m1)、Cacna1c (Mm00437917__m1)、Mef2c (Mm01340482__m1)、Tbx5 (Mm00803518__m1)、Gata4 (Mm00484689__m1)、および Hand2 (Mm00439247__m1)。

免疫蛍光法: 細胞は、既述のように[24]、2%v/vパラホルムアルデヒド(EMS)で固定した。固定した細胞を、抗体緩衝液(5%w/v BSA、0.1%v/v Tween-20、PBS中)で、室温で1時間、ブロッキングした。ブロッキングした後、細胞を、抗体緩衝液中で、 α -サルコメアアクチニン抗体(Sigma、A7811、1:100)と共に、4℃で一晩、インキュベートした。一晩インキュベートした後、細胞を抗体緩衝液で3回洗浄した。洗浄後、細胞を、抗体緩衝液で1:500希釈したAlexa-Fluor結合二次抗体(Invitrogen、ヤギ抗マウス594nm)と共に、室温で1時間、インキュベートした。核は、抗体緩衝液中で、室温で30分間、1 μ g/mlのDAPIで染色した。PBSで洗浄して未結合の複合体を除去した後、免疫蛍光を、Zeiss Axiovert 200倒立顕微鏡を使用して測定した。

【0045】

siRNAノックダウン: siRNAプール(4種の遺伝子標的siRNA)および陰性対照siRNAを、Dharmaconから購入した。siRNAを、ヌクレアーゼフリーの水で20 μ Mにし、分注し、使用するまで-80℃に保管した。トランスフェクションの1日前に、線維芽細胞を、12ウェルプレートヘウエル当たり20,000細胞で播種した。トランスフェクションの当日に、siRNAを、ヌクレアーゼフリーの水で5 μ Mに希釈した。各ウェルについて、siRNA作業液5 μ lをOptimem-Serum Free培地95 μ lで希釈した。別のチューブで、Dharmafect-I (Dharmacon) 5 μ lをOptimem-Serum Free培地95 μ lで希釈した。5分間インキュベートした後、2つの液を混合した。20分後、抗生物質欠失完全培地(800 μ l)を加え、トランスフェクション複合体を細胞に加えた。

【0046】

ChIPアッセイ: ChIPアッセイは、製造業者の使用説明書に従って実行した(Cell Signaling、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit #9003)。新生仔心臓線維芽細胞核を、4 $\times$ 10⁶細胞当たり0.1 μ l小球菌ヌクレアーゼで消化した(小球菌ヌクレアーゼの量は、製造業者の使用説明書に従って経験的に決定した)。免疫沈降は、ChIP検証済み抗体: (1)ウサギIgG対照(Cell Signaling、#2729)、(2)Histone

H3 (Cell Signaling、#4620)、および(3) RelA (Cell Signaling、#8242)を使用して行った。免疫沈降したDNAを、Myh6 (Qiagen、EpiTect ChIP qPCR Primer Assay For Mouse Myh6、NM_010856.3 (-) 08Kb #GPM1045733 (-) 08AおよびEpiTect ChIP qPCR Primer Assay For Mouse Myh6、NM_010856.3 (-) 01Kb #GPM1045733 (-) 01A)、Actn2 (Qiagen、EpiTect ChIP qPCR Primer Assay For Mouse Actn2、NM_033268.3 (-) 01Kb、#GPM1044781 (-) 01A)、およびTnni3 (Qiagen、EpiTect ChIP qPCR Primer Assay For Mouse Tnni3、NM_009406.3 (-) 01Kb、#GPM1052593 (-) 01A)のプロモーターのためのプライマーを用いて、qPCR (ThermoFisher、Power SYBR Green PCR Master Mix、#4367659)によって定量化した。PCR反応には、陽性対照Histone H3サンプルおよび陰性対照ウサギIgGサンプルを含めた。2%インプットクロマチンDNAの段階希釈(非希釈、1:5、1:25、1:125)を用いて検量線を作成し、増幅効率を決定した。インプット率(%)を算出し、陰性対照IgG値を減じた。データは、miR comboおよびnegmiR処理サンプルの間のインプット率(%)の変化倍率として示した。

【0047】

IL6 ELISA: IL6 ELISAキットは、R&D Systemsから入手した。IL6をアッセイする1日前に、新鮮な培地(1ml)を細胞に加えた。製造業者の使用説明書に従って、培地50ulをアッセイし、培養培地中のIL6の量(pg/ml)を検量線から決定した。次いで、IL6のpg/ml値を、各ウェル中の培地の全量(1ml)および全細胞タンパク質について調整して、細胞数の差を補正した[25]。

【0048】

リプログラミングされた拍動心筋細胞の作製: 分離したマウス(C57BL/6)新生仔心臓線維芽細胞(継代2)を、増殖培地中15000細胞/cm²で12ウェルディッシュに播種した。24時間後、増殖培地を除去し、上記のように、細胞をnegmiRまたはmiR comboでトランスフェクトした。1日後、トランスフェクション複合体を除去し、培地を、1ug/ml Poly(I:C)(LMW)含有リプログラミング用合成培地[12]と交換した。次の4日間、細胞に、新鮮な1ug/ml Poly(I:C)(LMW)含有リプログラミング用合成培地[12]を毎日与えた。この期間の後、細胞に、Poly(I:C)(LMW)を含有しないリプログラミング用合成培地[12]をさらに10日間与えた。培地は1日おきに交換した。拍動コロニーを、Zeiss Axiovert 200倒立顕微鏡を用いて確認した。

画像: 画像は、CorelDrawおよびZeissソフトウェア(Axiovision Rel4.8およびZen Blue)で処理した。

統計: すべての統計分析は、GraphPadを使用して行った。2つの条件を含む実験については、t検定を行った。3つ以上の条件の実験については、ANOVAを用いた後、各群間の比較にボンフェローニ事後検定を用いた。0.05未満のP値を有意であるとみなした。

【0049】

結果

TLR3阻害は心臓リプログラミングの成熟期を遮断する。分化決定された細胞が心筋細胞へと成熟する機序ははっきりしていない。近年、2つの研究によって、TLR3は、線維芽細胞をiPS[20]および内皮細胞[21]にリプログラミングするために重要であることが示された。さらに、TLR3は炎症を誘導し、炎症は損傷において重要であることは既知である。その結果として、我々は、TLR3が、成熟心筋細胞の発達においてこれまで未知の役割を果たしているのかどうかを自問した。受容体であるTLRは心臓

における炎症反応の重要なメディエーターであるため、TLR3に関心をもった。

まず、特異的TLR3薬理的阻害剤CU-CPT-4aを用いて我々の仮説を検証した[26、27]。特に、心臓リプログラミングの成熟期に関心をもった。この目的のために、心筋細胞サルコメアの機能に参与するその構成成分のmRNAレベルについて、最初のスクリーニングを行った。我々の既述のmiR comboを用いて、心臓リプログラミングを誘導した。miR comboは、in vitroおよびin vivoの両方において心臓リプログラミングを強く誘導する、4つのマイクロRNA (miR-1、-133、-208、-499)の組合せである[9、11~14]。図1Aに示したように、miR comboは、心筋細胞サルコメアの13種の構成成分の発現を有意に誘導した。miR comboの心筋細胞サルコメア遺伝子発現に対する作用は、TLR3薬理的阻害剤CU-CPT-4aによって完全に消失された(図1)。

10

【0050】

心筋細胞サルコメアの3つの構成成分：Myh6(αミオシン重鎖)、Actn2(αサルコメアアクチニン)、およびTnni3(心臓トロポニン-I)のmRNAレベルを測定することによって、最初のスクリーニングを検証した。最初のスクリーニングで観察されたように、TLR3の薬理的阻害によって、Myh6、Actn2、およびTnni3の発現に関して、miR comboリプログラミングは完全に阻害された(図1Bi~1Biii)。次いで、リプログラミングされた線維芽細胞の成熟に対するTLR3阻害の作用を、細胞レベルで評価した。組織化したサルコメアを有する成熟心筋細胞を生成するmiR comboの能力は、CU-CPT-4aによって完全に阻害された(図1Ci~1Ciii)。次いで、これらの結果を、siRNAが媒介したTLR3のノックダウンによって検証した。siRNAによるTLR3のノックダウンは強いものであり(図1D)、Myh6、Actn2、およびTnni3の発現に関して、miR comboリプログラミングを完全に抑制した(図1Ei~1Eiii)。

20

TLR3阻害およびTLR3活性化はどちらも心臓リプログラミングの開始期に影響を及ぼさない。これらの結果に続き、TLR3がリプログラミングされた細胞の成熟に影響を与える機序をさらに詳しく調べた。心臓が発達する間、前駆体が心筋細胞へ分化する開始期において、エピジェネティックな過程が作用して、心筋細胞分化系列決定因子Gata4、Hand2、Tbx5、およびMeis1の発現のスイッチを入れ、これらが発現される[28]。同様に、線維芽細胞でのこれらの心筋細胞分化系列決定因子の発現の増加は、心臓リプログラミングの開始期を意味している[1~6、9、12、14]。miR comboによって誘導された心筋細胞分化系列決定因子Gata4、Hand2、Tbx5、およびMeis1の発現は、TLR3ノックダウンによっても(図2Ai~2Aiv)TLR3活性化によっても(図2Bi~2Biv)影響を受けないことがわかった。このデータは、TLR3の心臓リプログラミングに対する作用は、心臓リプログラミングの開始期における変更のためではないことを示している。

30

【0051】

TLR3はNFκBのRelAサブユニットを介して心臓リプログラミングの成熟期を制御する。TLR3は、幾つかの転写因子活性化を媒介する[22]。これらの転写因子のうち、AP1およびNFκBの2つが、TLR3の作用の大部分を媒介している[22]。よって、TLR3はAP1および/またはNFκBを介してリプログラミングされた細胞の成熟に影響を与えるのではないかという仮説を立てた。AP1の薬理的阻害によって、miR comboが線維芽細胞をリプログラミングする能力に影響はなかった(データ非表示)。対照的に、NFκBの薬理的阻害によって、miR comboリプログラミングは、RNA(図3Ai~3Aiii)およびタンパク質(図3Bi~3Biii)の両レベルで完全に阻害された。

40

さらに、リプログラミングされた細胞の成熟におけるNFκBの役割を、NFκB活性化に不可欠なキナーゼである標的Ikbkbによって検証した[29]。Ikbkbのノックダウンは、強いものであった(図3C)。重要なことには、Ikbkbのノックダウンによって、miR comboリプログラミングは、心筋細胞成熟マーカーMyh6、

50

Actn2、およびTnni3（図3Di～3Diii）の発現に関して完全に阻害された。上記の研究と一致して、Ikbbノックダウンによって、心臓リプログラミングの開始期に影響はなかった（データ非表示）。さらに、Ikbbノックダウンによって、miR comboが媒介する内胚葉、外胚葉、および血管マーカーの抑制に影響はなかった（データ非表示）。

【0052】

NFκBタンパク質には、NF-κB1（p105/p50）、NF-κB2（p100/p52）、RelA（p65）、RelB、およびc-Relの5つがある。RelA、RelB、およびc-Relだけが転写を誘導する。RelAが最も高く発現されるRelタンパク質であるため、RelAに着目した。RelAのノックダウンは強固であることがわかり（図4A）、これによって、miR comboでトランスフェクトした線維芽細胞においてActn2（+）細胞出現が妨げられた（図4Bi～4Biii）。タンパク質レベルでの作用はmRNAレベルでも観察され、siRNAでRelAを標的化することによって、miR comboリプログラミングは、サルコメア関連遺伝子発現に関して、完全に阻害された（図4Ci～4Ciii）。RelAノックダウンによって、内胚葉マーカーGata6または一般的な分化マーカーTgfb2の発現に影響がなかったことも認められた（図4Di～4Dii）。

【0053】

最後に、RelAがどのように心筋細胞成熟遺伝子の発現を制御するのかを確かめたかった。よって、ChIPアッセイを用いて、miR comboが、RelAの心筋細胞サルコメアの構成成分のプロモーターへの結合を誘導するかどうかを確認した。miR combo処理の後、Actn2、Myh6、Mypn、およびTnni3プロモーターにおいて、RelAの有意な濃縮が観察された（図5Ai～5Aiv）。同様の濃縮が、Ttn、Myoz2、Tnnc1、およびTnnt2プロモーターについても観察されたが、これは $P < 0.05$ 有意性に達し得なかった（図5Av～5Aviii）。無関係の遺伝子RPL30の濃縮はみられなかった（データ非表示）。RelA標的ノックダウンによって、ChIPシグナルは完全に消失した。この結果から、RelAが、心筋細胞サルコメア遺伝子のプロモーターに実際に結合していたことが証明された（図5Bi～5Bviii）。

【0054】

マイクロRNAはTLR3を活性化する。薬理的阻害剤およびsiRNA媒介ノックダウン実験によって、miR comboがTLR3を活性化したことが示唆された。さらにこれを検証するために、細胞をマイクロRNAでトランスフェクトし、培地中へのIL6分泌を測定することによってTLR3活性を評価した。IL6分泌は、TLR3を含むTLRの活性の公認測定値である[30～37]。モックトランスフェクトした線維芽細胞と比較した場合、対照の非標的miRNA（negmiR）およびmiR comboはいずれも、IL6分泌を有意に誘導した（図6A）。negmiRとmiR comboとの間の比較によって、miR comboがより強く作用したことが示された。マイクロRNAによるIL6分泌の誘導は、TLR3依存性であり、RNAとTLR3との間の相互作用を阻害するTLR3阻害剤CU-CPT-4aの付加によって、negmiRおよびmiR comboのIL6分泌に対する作用は完全に除去された（図6A）。TLR3またはIkbb標的ノックダウンによって、miR comboが誘導したIL6分泌が阻害され、このことは、miR comboがTLR3-NFκB経路を活性化したことをさらに実証するものである（図6B）。

【0055】

TLR3の薬理的活性化はリプログラミングされた線維芽細胞の成熟を増進させる。TLR3がmiR comboリプログラミングを制御した機序を確認した後、次に、TLR3の刺激が、miR comboの能力を増強することができるかどうかを調べた。予想された通り、miR comboは、Myh6、Actn2、およびTnni3のRNAレベルを上昇させた（図7Ai～7Aiii）。miR comboのMyh6、A

c t n 2、および T n n i 3 発現に対する作用は、T L R 3 アゴニスト P o l y (I : C) の付加によって有意に増強された (図 7 A i ~ 7 A i i i)。興味深いことに、P o l y (I : C) はまた、対照 n e g m i R サンプルにおいても、M y h 6、A c t n 2、および T n n i 3 の発現を誘導した (図 7 A i ~ 7 A i i i)。P o l y (I : C) は心筋細胞分化系列決定因子の発現に影響していないことを考慮すると、この作用は、T L R 3 経路が心臓リプログラミングの成熟期を制御するということのさらなる証拠である。次いで、R N A レベルでの作用がタンパク質レベルでも観察されるか確認するために、免疫染色を行った。実際に、m i R c o m b o 処理に反応して形成した A c t n 2 (+) 細胞の数が、T L R 3 アゴニスト P o l y (I : C) によって増加したことがわかった (図 7 B i ~ 7 B v i、図 7 C には定量化を示した)。また、T L R 3 活性化によって、サルコメア成熟が増進されたことも認められた (図 7 B i ~ 7 B v i の挿入図を参照されたい)。

10

【 0 0 5 6 】

我々のこれまでの研究 [9] と一致して、線維芽細胞を m i R c o m b o でトランスフェクトした結果、自発的に拍動するコロニーの出現がもたらされたことがわかった (図 7 D i ~ 7 D i i)。自発的に拍動するコロニーを形成させる m i R c o m b o の能力は、T L R 3 アゴニスト P o l y (I : C) の付加によって 3 倍増加した (図 7 D i ~ 7 D i i)。重要なことには、トランスフェクションして 1 週間以内に、成熟した拍動コロニーが観察された。

考察

20

本研究では、T L R 3 活性化 N F κ B が、分化決定された前駆体の心筋細胞への成熟のために、重要な機序であることを実証する。

我々の研究では、特に心臓リプログラミングの成熟期における T L R 3 活性化 N F κ B の役割を明確に同定した。これは、T L R 3 活性化 N K κ B を i P S [2 0] または内皮細胞 [2 1] へのリプログラミングに関連付けた以前の研究とは異なる。これらの以前の研究では、T L R 3 - N F κ B が、D N A アクセシビリティの向上を促進するエピジェネティックモディファイヤーの発現および活性の全般的変化を引き起こすことを実証している。この開いたクロマチン構成では、山中因子による多能性プログラミングの活性化 [2 0]、または分化転換因子による内皮系列の誘導 [2 1] が促進される。これらの研究では、N F κ B の薬理的または分子アンタゴニストを使用して示したように、T L R 3 活性化によって誘導されるエピジェネティックな可塑性は、N F κ B が多分に媒介している。

30

【 0 0 5 7 】

心筋細胞前駆体の成熟における T L R の役割を調べることによって、本研究を拡大させた。T L R 3 活性化は、N F κ B の心筋細胞サルコメア遺伝子への直接的な結合を増加させたことがわかった。対照的に、T L R 3 は、前駆体の心筋細胞系列への分化決定において役割を果たしていなかったことがわかった。T L R 3 阻害またはノックダウンは、心筋細胞系列への分化決定のために不可欠な様々な転写因子の発現には影響を与えなかった。

上記のように、m i R c o m b o が、心筋細胞サルコメアの様々な構成成分のプロモーターへの R e l A の結合を誘導したことがわかった。古典的 R e l A 結合部位は、M y h 6 プロモーターには存在するが、A c t n 2、M y p n、および T n n i 3 遺伝子のプロモーターには存在しない。非古典的 R e l A 結合部位は、その他の遺伝子で同定されており [4 3]、また A c t n 2、M y p n、および T n n i 3 遺伝子プロモーターに存在する。しかしながら、R e l A は間接的な機序を通して心臓遺伝子発現に影響を与える可能性もある。R e l A および N F κ B は、エピジェネティックな装置の活性を調節することによるだけでなく、他のタンパク質への結合を通して遺伝子発現を調節することが示されている [4 4 ~ 4 6]。N F κ B の R e l A サブユニットは、心筋細胞成熟において、同様の役割を果たしている可能性がある。

40

【 0 0 5 8 】

我々の研究は、マイクロ R N A が T L R 3 を直接的に活性化することを示唆している。

50

幾つかのTLR：TLR3、TLR7、TLR8、およびTLR9が核酸に結合することが知られている[47]。TLR3は2本鎖(ds)RNAを認識するのに対し、TLR7およびTLR8は1本鎖RNAに結合する。対照的に、TLR9は、DNA分子の非メチル化CpG配列によって活性化される[47]。マイクロRNAがTLRに結合することを実証した報告数は限られている。マイクロRNAはdsRNA分子ではあるものの、マイクロRNA、miR-21、miR-29a、およびLet-7bは、TLR7およびTLR8に結合し、TLR7およびTLR8を活性化する[48、49]。TLR3に関して、マイクロRNAは有効な二量体化を誘導してTLR3の活性化を誘導するには小さすぎるかもしれないと、当初は示唆された[50]。しかしながら、この仮定は、我々の結果、ならびに植物由来のマイクロRNA、FvmiR168が樹状細胞のTLR3に結合するという最近の報告[51]の両方のかんがみて、見直す必要がありそうである。miR comboは、我々の研究で使用した陰性対照マイクロRNAより強力にTLR3を誘導したことがわかった。これは、マイクロRNAによるTLR3活性化が配列依存性であることを示唆しうるものである。この考えを支持するものとして、siRNAが媒介したTLRの活性化が配列依存性であることが示されている[52]。

10

【0059】

(実施例) TLR3活性化は心筋細胞成熟を増進させる

心臓線維芽細胞を、miR comboまたはneg miR (対照) でトランスフェクトし、様々な濃度のICR2 (図8A~8D) またはICR4 (図9A~9D) と共に、4日間インキュベートした。サルコメア機能に不可欠な遺伝子 (例えば、Actn2、Myh6、Tnni3) および心臓イオンチャンネルに不可欠な遺伝子 (Cacna1c) の発現を測定するqPCRによって、リプログラミングを評価した。14日目に遺伝子発現を評価した。ICR2が成熟を誘導したことをさらに確認するために、心臓線維芽細胞を、PolyICまたはICR2にmiR comboを加えて、14日間インキュベートした。サルコメアを、 α -サルコメアアクチニンの抗体染色によって可視化した (図11Aおよび11B)。

20

【0060】

(実施例) 高用量のmiR comboは正常な細胞機能を損なわせる

新生仔心臓線維芽細胞を、0.1mMまたは0.3mMのmiR comboでトランスフェクトした。同等濃度の非標的miRNAを対照として使用した。細胞数は、0日目および14日目のGAPDH発現から導いた変化倍率として表す (図10)。点線は、0日目の細胞数を示す。細胞数は、対照miRの濃度およびmiR comboの標準濃度いずれでも有意に増加した。高濃度のmiR comboでは、細胞増殖が阻害されるまたは細胞死の速度が速まることによって、正常な細胞数の成長が損なわれた。N=2。

30

参考文献

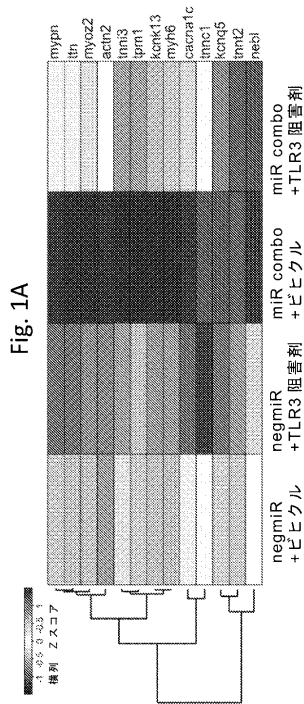
1. Qian L, Huang Y, Spencer CI, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 2012;485:593-598.
2. Fu JD, Stone NR, Liu L, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state. *Stem Cell Reports*. 2013;1:235-247.
3. Nam YJ, Song K, Luo X, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:5588-5593.
4. Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*. 2012;485:599-604. 10
5. Nam YJ, Lubczyk C, Bhakta M, et al. Induction of diverse cardiac cell types by reprogramming fibroblasts with cardiac transcription factors. *Development*. 2014;141:4267-4278.
6. Ifkovits JL, Addis RC, Epstein JA, et al. Inhibition of TGFbeta signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes. *PLoS One*. 2014;9:e89678.
7. Narita H, Shima F, Yokoyama J, et al. Engraftment and morphological development of vascularized human iPS cell-derived 3D-cardiomyocyte tissue after xenotransplantation. *Sci Rep*. 2017;7:13708. 20
8. Yamakawa H, Ieda M. Strategies for heart regeneration: approaches ranging from induced pluripotent stem cells to direct cardiac reprogramming. *Int Heart J*. 2015;56:1-5.
9. Jayawardena TM, Egemazarov B, Finch EA, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*. 2012;110:1465-1473.
10. Jayawardena T, Mirotso M, Dzau VJ. Direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes using microRNAs. *Methods Mol Biol*. 2014;1150:263-272. 30
11. Jayawardena TM, Finch EA, Zhang L, et al. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo: evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circ Res*. 2015;116:418-424.
12. Wang X, Hodgkinson CP, Lu K, et al. Selenium Augments microRNA Directed Reprogramming of Fibroblasts to Cardiomyocytes via Nanog. *Sci Rep*. 2016;6:23017.
13. Li Y, Dal-Pra S, Mirotso M, et al. Tissue-engineered 3-dimensional (3D) microenvironment enhances the direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes by microRNAs. *Sci Rep*. 2016;6:38815. 40

14. Dal-Pra S, Hodgkinson CP, Mirotso M, et al. Demethylation of H3K27 Is Essential for the Induction of Direct Cardiac Reprogramming by miR Combo. *Circ Res*. 2017.
15. Kathiriyia IS, Nora EP, Bruneau BG. Investigating the transcriptional control of cardiovascular development. *Circ Res*. 2015;116:700-714.
16. Bruneau BG. Signaling and transcriptional networks in heart development and regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5:a008292.
17. David L, Polo JM. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res*. 2014;12:754-761. 10
18. Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet*. 2013;14:427-439.
19. Liu Z, Chen O, Zheng M, et al. Re-patterning of H3K27me3, H3K4me3 and DNA methylation during fibroblast conversion into induced cardiomyocytes. *Stem Cell Res*. 2016;16:507-518.
20. Lee J, Sayed N, Hunter A, et al. Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell*. 2012;151:547-558. 20
21. Sayed N, Wong WT, Ospino F, et al. Transdifferentiation of human fibroblasts to endothelial cells: role of innate immunity. *Circulation*. 2015;131:300-309.
22. Hodgkinson CP, Ye S. Toll-like receptors, their ligands, and atherosclerosis. *ScientificWorldJournal*. 2011;11:437-453.
23. Lin YT, Verma A, Hodgkinson CP. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Curr Genomics*. 2012;13:633-645.
24. Hodgkinson CP, Naidoo V, Patti KG, et al. Abi3bp is a multifunctional autocrine/paracrine factor that regulates mesenchymal stem cell biology. *Stem Cells*. 2013;31:1669-1682. 30
25. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, et al. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2275-2281.
26. Cheng K, Wang X, Yin H. Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *J Am Chem Soc*. 2011;133:3764-3767.
27. Faksh A, Britt RD, Jr., Vogel ER, et al. TLR3 activation increases chemokine expression in human fetal airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310:L202-211. 40

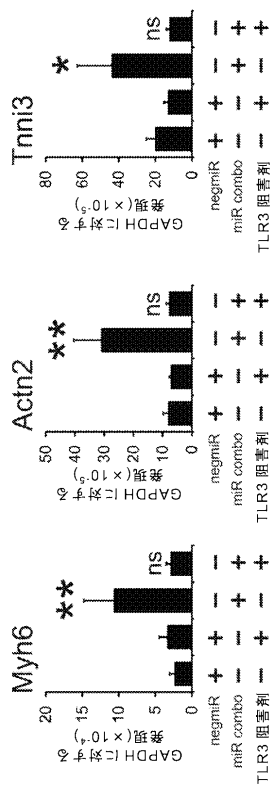
28. Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res.* 2002;90:509-519.
29. Banerjee A, Gerondakis S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:420-424.
30. Hahnlein JS, Ramwadhoebe TH, Semmelink JF, et al. Distinctive expression of T cell guiding molecules in human autoimmune lymph node stromal cells upon TLR3 triggering. *Sci Rep.* 2018;8:1736. 10
31. Bernard JJ, Cowing-Zitron C, Nakatsuji T, et al. Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med.* 2012;18:1286-1290.
32. Schaefer TM, Fahey JV, Wright JA, et al. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). *J Immunol.* 2005;174:992-1002.
33. Town T, Jeng D, Alexopoulou L, et al. Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *J Immunol.* 2006;176:3804-3812. 20
34. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Toll-like receptor 3 agonist poly(I:C)-induced antiviral response in human corneal epithelial cells. *Immunology.* 2006;117:11-21.
35. Lan T, Wang D, Bhagat L, et al. Design of synthetic oligoribonucleotide-based agonists of Toll-like receptor 3 and their immune response profiles in vitro and in vivo. *Org Biomol Chem.* 2013;11:1049-1058.
36. Mastri M, Shah Z, McLaughlin T, et al. Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303:C1021-1033. 30
37. Sironi M, Biasin M, Cagliani R, et al. A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol.* 2012;188:818-823.
38. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:117-129.
39. Nahrendorf M, Swirski FK. Innate immune cells in ischaemic heart disease: does myocardial infarction beget myocardial infarction? *Eur Heart J.* 2016;37:868-872.
40. Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Role of nuclear factor-kappa B activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol.* 2003;138:894-900. 40

41. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res.* 2011;108:1133-1145.
42. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4.
43. Wong D, Teixeira A, Oikonomopoulos S, et al. Extensive characterization of NF-kappaB binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. *Genome Biol.* 2011;12:R70. 10
44. Ashburner BP, Westerheide SD, Baldwin AS, Jr. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol.* 2001;21:7065-7077.
45. Yamit-Hezi A, Nir S, Wolstein O, et al. Interaction of TAFII105 with selected p65/RelA dimers is associated with activation of subset of NF-kappa B genes. *J Biol Chem.* 2000;275:18180-18187.
46. Islam KN, Mendelson CR. Potential role of nuclear factor kappaB and reactive oxygen species in cAMP and cytokine regulation of surfactant protein-A gene expression in lung type II cells. *Mol Endocrinol.* 2002;16:1428-1440. 20
47. Chen X, Liang H, Zhang J, et al. microRNAs are ligands of Toll-like receptors. *RNA.* 2013;19:737-739.
48. Fabbri M, Paone A, Calore F, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:E2110-2116.
49. Lehmann SM, Kruger C, Park B, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2012;15:827-835. 30
50. Wang Y, Liu L, Davies DR, et al. Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *J Biol Chem.* 2010;285:36836-36841.
51. Cavalieri D, Rizzetto L, Tocci N, et al. Plant microRNAs as novel immunomodulatory agents. *Sci Rep.* 2016;6:25761.
52. Judge AD, Sood V, Shaw JR, et al. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol.* 2005;23:457-462.
53. Matsumoto M, Tatematsu M, Nishikawa F, et al. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nat Commun.* 2015;6:6280. 40

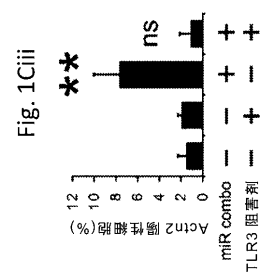
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 1 C】



【図 1 D】

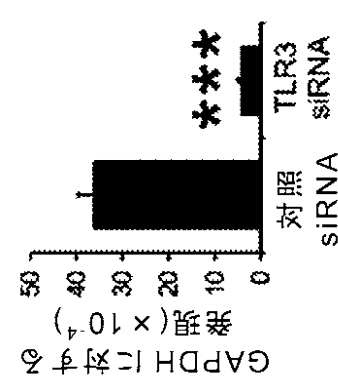


Fig. 1Ci



Fig. 1Cii



Fig. 1D

【図 1 E】

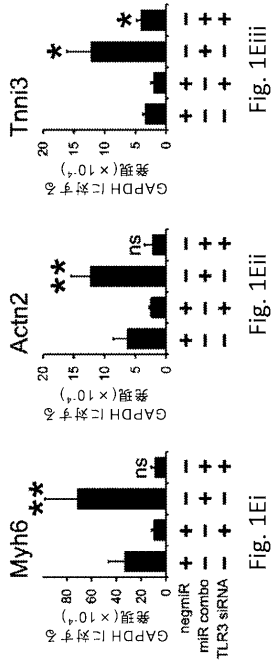


Fig. 1Ei

Fig. 1Eii

Fig. 1Eiii

【図 2 A】

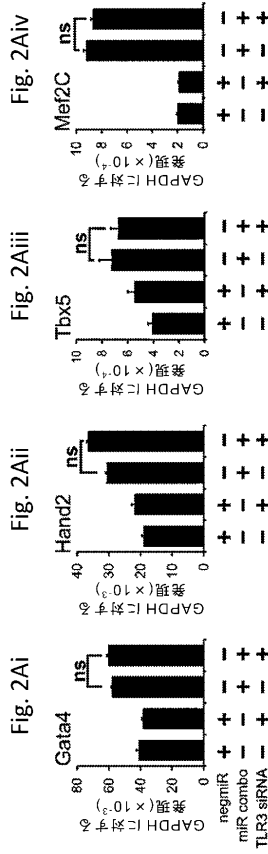


Fig. 2Ai

Fig. 2Aii

Fig. 2Aiii

Fig. 2Aiv

【図 2 B】

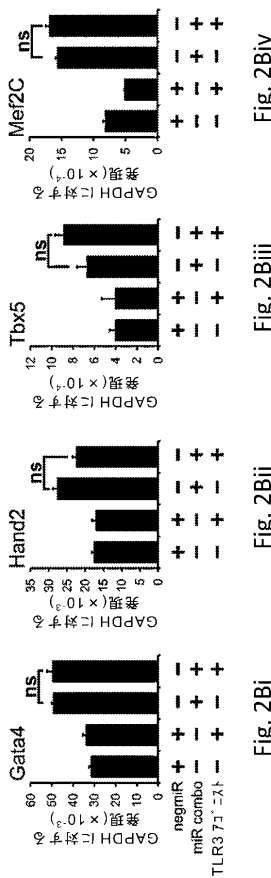


Fig. 2Bi

Fig. 2Bii

Fig. 2Biii

Fig. 2Biv

【図 3 A】

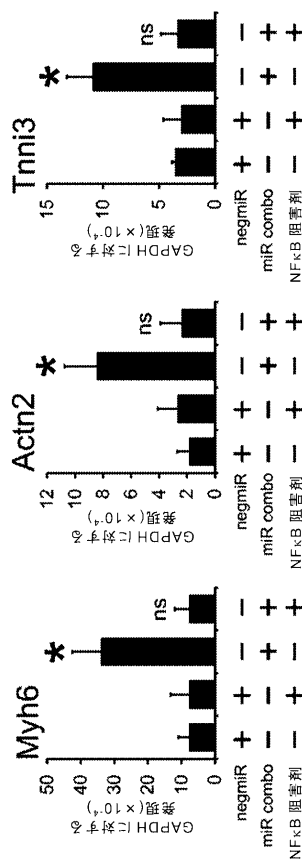
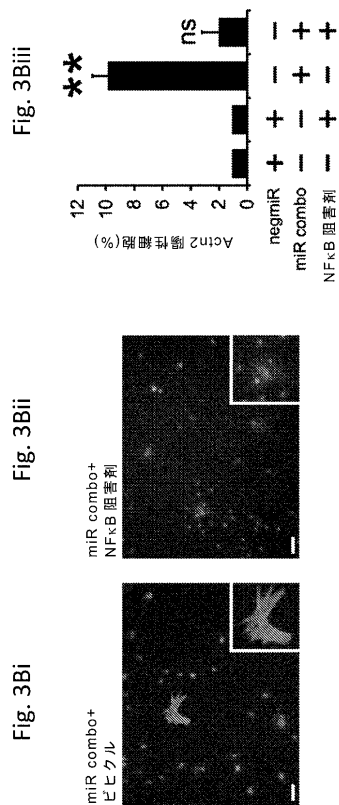


Fig. 3Ai

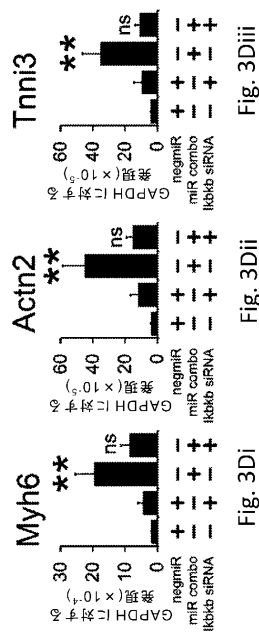
Fig. 3Aii

Fig. 3Aiii

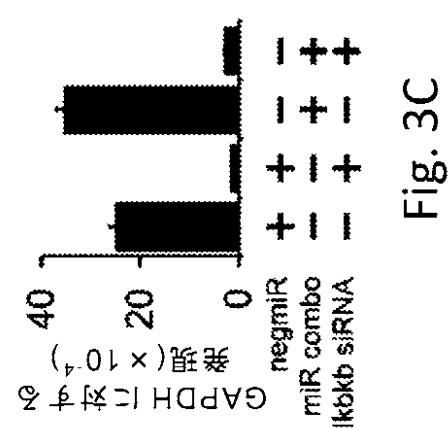
【図 3 B】



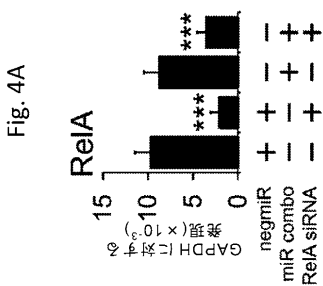
【図 3 D】



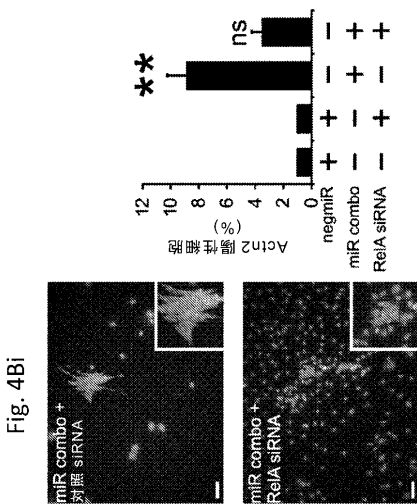
【図 3 C】



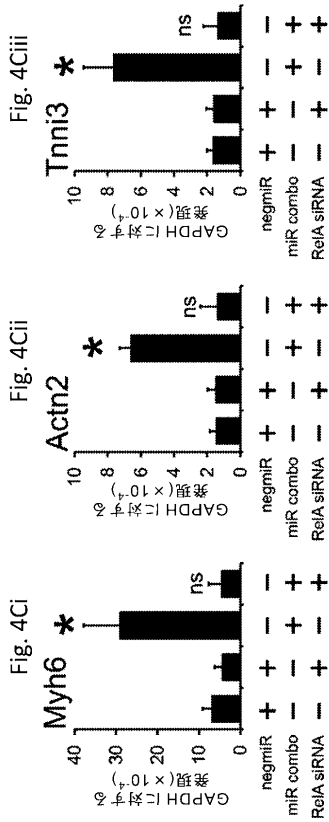
【図 4 A】



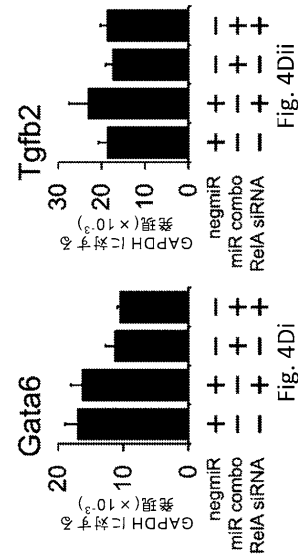
【図 4 B】



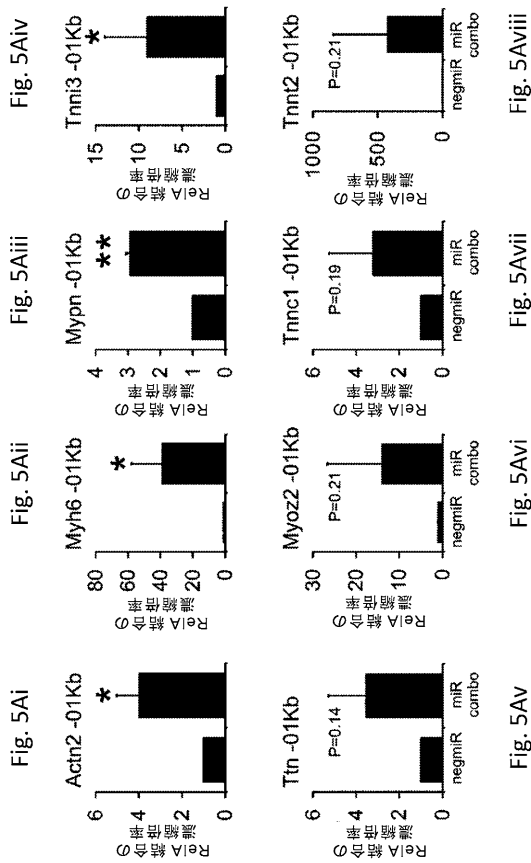
【図 4 C】



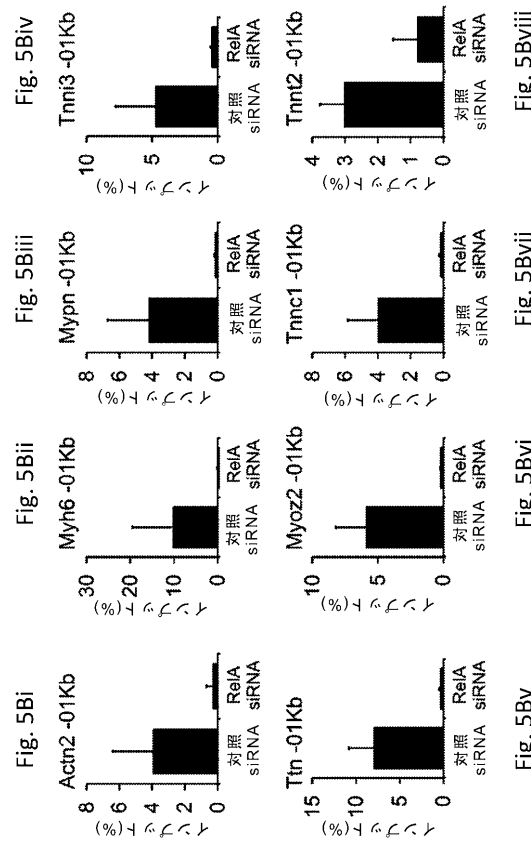
【図 4 D】



【図 5 A】

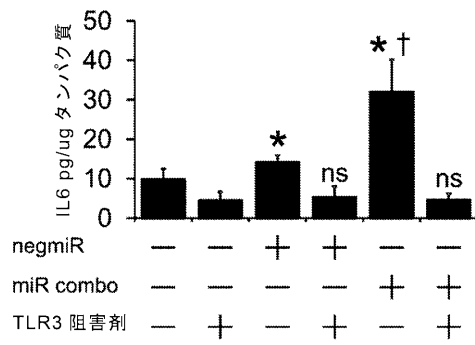


【図 5 B】



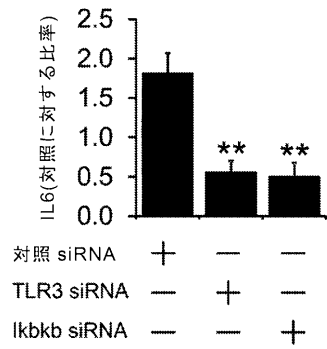
【図 6 A】

Fig. 6A



【図 6 B】

Fig. 6B



【図 7 A】

Fig. 7Aii

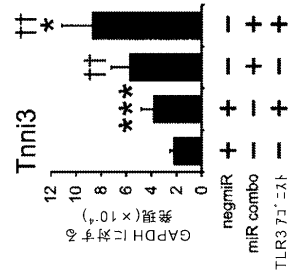


Fig. 7Aii

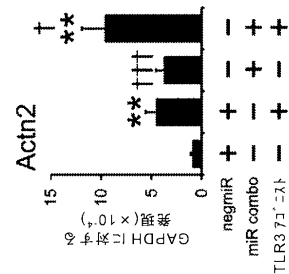
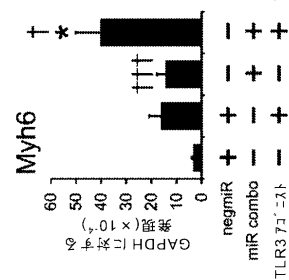


Fig. 7Ai



【図 7 B】

Fig. 7Biii



Fig. 7Bvi

Fig. 7Bii

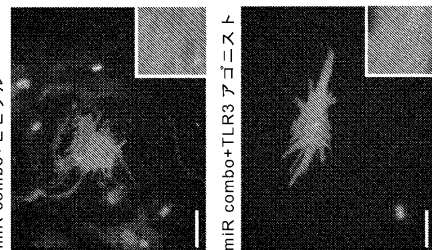


Fig. 7Bv

Fig. 7Bi



Fig. 7Biv

【図 7 C】

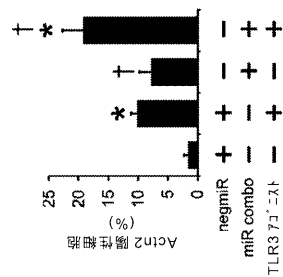


Fig. 7C

【図 7 D】

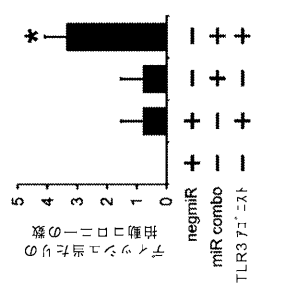


Fig. 7Dii

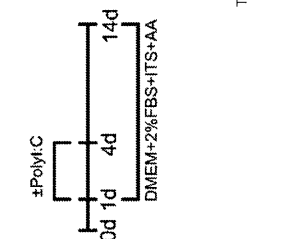


Fig. 7Di

fig. 9C

Condition	miRNA Concentration	Proliferation Rate (%)	Significance
対照	—	1.0	—
miR combo	0.1 μM	~4.2	*
	0.3 μM	~4.8	*
miR combo	+	~0.5	ns

The ICR2 logo is positioned vertically on the left side of the page. To its right is a large, grayscale, halftone-style image of a galaxy cluster, showing numerous bright, irregularly shaped galaxies of various sizes and orientations, some with prominent spiral or elliptical structures, set against a dark background.

Fig. 11A

【図 1 1 B】

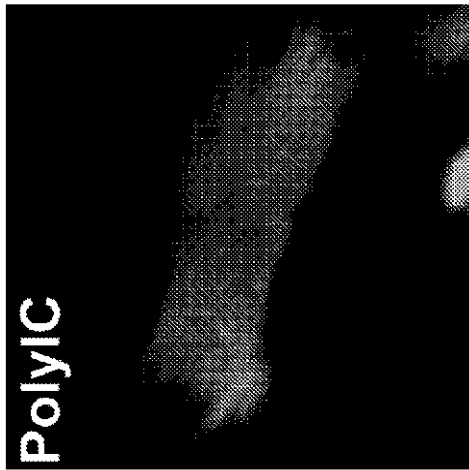


Fig. 11B

【配列表】

2021519261000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/23461

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 35/34, A61K 35/12, C12N 5/074 (2019.01)

CPC - A61K 35/34, A61K 35/12, A61P 9/00, C12N 5/00, C12N 5/0696, C12N 2506/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History Document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History Document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History Document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0011281 A1 (OZAU et al.) 9 January 2014 (09.01.2014); abstract; para [0008]; SEQ ID NO: 5	1-5
Y	WO 2013/109763 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 25 July 2013 (25.07.2013); Abstract; para [0048], [00160]	1-5
Y	US 2016/0030332 A1 (DUKE UNIVERSITY) 4 February 2016 (04.02.2016) abstract; para [0009]; SEQ ID NO: 16	3-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 2019

Date of mailing of the international search report

25 JUL 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSF: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/23461

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-10, 19-21, 29-31, 41
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-6, drawn to a reprogramming composition comprising one or more of miRs and an activator of NFkB. The composition will be searched to the extent that the miR encompasses miR-1 (SEQ ID NO: 11) and the activator of NFkB encompasses ICR2 (SEQ ID NO: 30). It is believed that claims 1-5 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NOs: 11 and 30. Additional miR(s) and activator(s) of NFkB will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected miR(s) and activator(s) of NFkB. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be miR-133a (SEQ ID NO: 14) and an activator of NFkB (ICR4, SEQ ID NO: 37) (Claims 1-4, 6).
*****Continued in Supplemental Box*****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5 limited to SEQ ID NOs: 11, 30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/23461

Continuation of Box No. III (Observations where unity of invention is lacking):

Group II: Claims 11-18, 22-28, 32-40, drawn to a method for modulating cardiomyocyte maturation in a cell.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I+ include the special technical feature of a composition which differs from the special technical feature of a method as disclosed by Groups II.

No technical features are shared between the nucleotide sequences of miRs or activators of NFkB of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II were considered to share the technical features of including: a miR and an activators of NFkB. These shared technical features are previously disclosed by US 2014/0011281 A1 to Dzau et al. (hereinafter "Dzau") and WO 2013/109763 A2 to the Board of Trustees of the Leland Stanford Junior University (hereinafter "Stanford").

Dzau teaches (instant claim 1) a reprogramming composition (Abstract "A method for promoting conversion of cells into cardiomyocytic tissue is carried out by contacting fibrotic tissue (e.g., scar tissue) with a microRNA oligonucleotide or combination of microRNA oligonucleotides. The methods lead to direct reprogramming of fibroblasts to cardiomyocytes or cardiomyoblasts.") comprising: (a) one or more miRs comprising a nucleotide sequence having at least 80% sequence identity to miR-1 (SEQ ID NO: 11) (nucleotides 1-22 of SEQ ID NO: 2 are 100% homologous to SEQ ID NO: 11).

Dzau does not specifically teach (b) an activator of NFkB. Stanford teaches wherein an activator of NFkB accelerates reprogramming of cells (Abstract "The nuclear reprogramming of somatic cells with non-integrating factors is shown to be greatly accelerated by activation of innate immune responses in the somatic cell. Methods of activating innate immunity include activation of toll-like receptors, e.g. TLR3. Somatic cells with activated innate immune responses can be reprogrammed to induced pluripotent cells or to transdifferentiated cells."; [00160] "This effect of Poly I:C to enhance transdifferentiation (Fig. 23E), was markedly reduced by the addition of p65 decoy suggesting that TLR3-induced activation of NFkB is involved in direct reprogramming."). Given that a TLR3 agonist has been shown to activate NFkB and accelerate cell reprogramming, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill in the art to include an activator of NFkB in the reprogramming composition taught by Dzau.

Dzau further teaches a method for enhancing or upregulating cardiomyocyte maturation in a cell (para [0011]. The methods lead to fibrotic tissue or other tissue types or cells being directly reprogrammed into cardiomyocytic tissue without a stem cell intermediary state. The treated tissue is characterized by an increased expression of a cardiomyocyte marker protein after having been contacted with the compositions.....compared to the level of the cardiomyocyte marker protein before the contacting step.....Exemplary marker proteins include cardiac troponin, sarcomeric actinin, L-type calcium channel, brachyury, Flk1, Isl1, Mesp1, Gata4, Mef2c, Hand2, and TroponinT2.).

The inventions of Groups I+ further share the technical features of a modified 5' - triphosphate, 2' -fluoro modified non-linear RNA, the RNA comprising a stem-loop formed from the complete or partial hybridization of at least 8 nucleotide pairings, which is disclosed by US 2016/0030332 A1 to Duke University (hereinafter "Duke Univ") (abstract, a composition including a 5' triphosphate, 2' fluoro-modified pyrimidine non-linear single stranded RNA at least 17 nucleotides long with a least 3 base pairings.).

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4 (continued):

Claims 7-10, 19-21, 29-31, 41 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 Z

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100137626

弁理士 田代 玄

(72)発明者 ホジキンソン コンラル

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27710 ダーラム デューク ユニバーシティ メディカル センター デパートメント オブ メディカル ディヴィジョン オブ カーディオロジー ジーエスアールビー ザ セカンド ルーム 4035

(72)発明者 ザウ ヴィクター

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27710 ダーラム デューク ユニバーシティ メディカル センター デパートメント オブ メディカル ディヴィジョン オブ カーディオロジー ジーエスアールビー ザ セカンド ルーム 4035

(72)発明者 リ ジェウ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27710 ダーラム デューク ユニバーシティ メディカル センター デパートメント オブ メディカル ディヴィジョン オブ カーディオロジー ディーユーエムシー 103035

(72)発明者 サレンジャー ブルース エイ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27710 ダーラム デューク ユニバーシティ メディカル センター デパートメント オブ サージェリー ディヴィジョン オブ サージカルサイエンス ディーユーエムシー 103035

Fターム(参考) 4C084 AA19 MA02 MA16 MA22 MA23 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52
MA55 MA57 MA59 MA60 MA63 MA65 NA05 NA14 ZA361 ZC022
ZC422 ZC751

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA36 ZC75