

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7635119号
(P7635119)

(45)発行日 令和7年2月25日(2025.2.25)

(24)登録日 令和7年2月14日(2025.2.14)

(51)国際特許分類

C 12 N 1/00 (2006.01)
C 12 N 5/071 (2010.01)

F I

C 12 N 1/00
C 12 N 5/071

F

請求項の数 19 (全60頁)

(21)出願番号 特願2021-520118(P2021-520118)
(86)(22)出願日 令和1年10月11日(2019.10.11)
(65)公表番号 特表2022-504764(P2022-504764)
A)
(43)公表日 令和4年1月13日(2022.1.13)
(86)国際出願番号 PCT/US2019/055940
(87)国際公開番号 WO2020/077266
(87)国際公開日 令和2年4月16日(2020.4.16)
審査請求日 令和4年10月7日(2022.10.7)
(31)優先権主張番号 62/744,395
(32)優先日 平成30年10月11日(2018.10.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 309004585
ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリ
カ アズ リブリゼンテッド バイ ザ セ
クレタリー、デパートメント オブ ヘル
ス アンド ヒューマン サービシーズ
THE U. S. A. AS REPRES
ENTED BY THE SECRET
ARY, DEPARTMENT OF H
EALTH AND HUMAN SER
VICES
アメリカ合衆国 20892 メリーラン
ド州 ベセスダ ロックレッジ ドライブ
6701 スイート 700 エムエスシー
7788 ナショナル インスティチュー
ト オブ ヘルス オフィス オブ テクノ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞培養のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

クロマン1 (Chroman1)と、
エムリカサン (Emricasan) およびエムリカサンの誘導体であるQ-VD-O
Phのうちの一方または両方とを含む培地組成物。

【請求項2】

トランス-ISRIB およびポリアミンのうちの1つまたは両方をさらに含む請求項1
に記載の培地組成物。

【請求項3】

前記培地組成物は、培地に取り込まれたとき、50nM~80μMの濃度のトランス-
ISRIBを提供するように配合される請求項2に記載の培地組成物。

【請求項4】

前記ポリアミンはスペルミンおよびスペルミジンを含み、前記培地組成物は、培地に取り
込まれたとき、0.5nM~1mMの濃度のスペルミン、および / または 0.5nM~1
mMの濃度のスペルミジンを提供するように配合される請求項2に記載の培地組成物。

【請求項5】

前記ポリアミンは、ブトレシンをさらに含み、前記培地組成物は、前記培地に取り込まれ
たとき、0.5nM~1mMの濃度のブトレシンを提供するように配合される、請求項
4に記載の培地組成物。

【請求項6】

10

20

前記培地組成物は培地に取り込まれたとき、4 nM ~ 80 μMの濃度のクロマン1を提供するように配合される、請求項1～5のいずれか1項に記載の培地組成物。

【請求項7】

前記培地組成物は、培地に取り込まれたとき、100 nM ~ 80 μMの濃度のエムリカサンおよび／またはQ-V D-O P hを提供するように配合される請求項1～6のいずれか1項に記載の培地組成物。

【請求項8】

インビトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成される成分と、クロマン1と、エムリカサンおよびエムリカサンの誘導体であるQ-V D-O P hのうちの一方または両方とを含む培地組成物。

10

【請求項9】

トランス-ISRIBをさらに含む、請求項8に記載の培地組成物。

【請求項10】

50 nM ~ 80 μMの有効濃度においてトランス-ISRIBを含み、トランス-ISRIBの前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のトランス-ISRIB濃度である請求項9に記載の培地組成物。

【請求項11】

スペルミンおよびスペルミジンを含むポリアミンをさらに含む請求項8～10のいずれか1項に記載の培地組成物。

20

【請求項12】

前記培地組成物は、0.5 nM ~ 1 mMの有効濃度のスペルミン、および／または0.5 nM ~ 1 mMの有効濃度のスペルミジンを含み、スペルミンおよびスペルミジンの各々の前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中の濃度である請求項11に記載の培地組成物。

【請求項13】

前記ポリアミンは、プロテシンをさらに含む請求項11または12に記載の培地組成物。

【請求項14】

前記培地組成物は0.5 nM ~ 1 mMの有効濃度のプロテシンを含み、プロテシンの前記有効濃度はさらなる希釈なしで使用される作業培地中の濃度である請求項13に記載の培地組成物。

30

【請求項15】

4 nM ~ 80 μMの有効濃度のクロマン1を含み、クロマン1の前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のクロマン1の濃度である、請求項8～14のいずれか1項に記載の培地組成物。

【請求項16】

100 nM ~ 80 μMの有効濃度でエムリカサンおよび／またはQ-V D-O P hを含み、エムリカサンおよび／またはQ-V D-O P hの前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のエムリカサンおよび／またはQ-V D-O P hの濃度である、請求項8～15のいずれか1項に記載の培地組成物。

40

【請求項17】

インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された前記成分は、1つ以上の緩衝液、無機塩、必須アミノ酸、炭水化物、脂肪酸、脂質、ビタミン、微量元素を含む請求項8～16のいずれか1項に記載の培地組成物。

【請求項18】

請求項1～7のうちのいずれか1項に記載の培地組成物とインビトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された培地成分とを含むキット。

【請求項19】

インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞の増殖のための培養容器、支持部または足場のうちの少なくとも1つをさらに含む請求項18に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】**【0001】**

本発明は、生化学、細胞生物学、生物工学、幹細胞生物学、再生医療の分野、および関連する分野に関し、限定するものではないが、多能性幹細胞、組織および器官を含む哺乳類細胞の培養に有用な組成物および方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

多能性は、幹細胞がヒトの体の任意の細胞タイプに分化することを可能にする注目に値する細胞状態である。多能性幹細胞、特に人工多能性幹細胞（iPSC）技術の出現は、創薬、疾患モデリング、および再生医療に対して大きな可能性を有する。iPSC技術は、非多能性細胞を多能性細胞にリプログラミングすることを含み、それによって任意の個体から多能性細胞の人工的な生成を可能にする。結果として生じるiPSCは、所望の遺伝的および/または免疫学的バックグラウンドを有してドナー細胞から生成され得るので、治療および研究目的のために魅力的である。iPSCの治療および研究可能性を完全に利用するために、それらの細胞培養条件は、化学的に定義された培地および十分に特徴づけられた試薬を必要とする。iPSC培養条件はまた、大規模な前臨床および臨床適用に適合可能であるべきである。そのような適用のいくつかの例は、細胞置換治療、遺伝子治療およびゲノム編集である。

10

【0003】

第1胚性幹細胞（ESc）株の樹立時から、多能性幹細胞は、細胞の解離およびルーチン的な継代に対して大いに影響を受けやすいことが知られていた。他のタイプの細胞培養と比較して、多能性幹細胞の培養は、長期間にわたって適度に高い細胞生存率を維持するため、および多能性幹細胞の未分化状態を維持するために、培養条件に特別の注意を払う必要がある。ヒト多能性幹細胞は、とりわけ細胞を酵素的に解離して単一の細胞にし、クローニングに必要とされる非常に低い細胞密度で、または1ウェルあたり単一の細胞条件の場合、細胞培養条件に対して特に影響を受けやすい。単一細胞クローニングのための現在入手可能な選択肢は、成果に乏しく、労働集約的である。単一細胞クローニングの結果の改善は、例えば、個別細胞治療による遺伝的欠陥の修正、疾患モデリングのための遺伝子変異の導入、または創薬用のレポーター細胞株作成のための導入遺伝子の導入などの前臨床研究および臨床適用のためのiPSCのゲノム編集など様々な適用に重要である。

20

【0004】

いくつかの化合物は、幹細胞培養の結果を改善することへの試みとして、細胞の培地サプリメントとして使用してきた。例えば、Y-27632と名付けられたRho-結合プロテインキナーゼ（ROCK）阻害剤は培養中の多能性幹細胞の生存を改善する。ブレビスタチン、チアゾビシン、ピリントグリン（pyrintegrin）およびピナシジルなどのいくつかの他の化合物も使用されるが、Y-27632は未だ幹細胞分野で最も広く使用される試薬である。特別なツールを使用した機械的な継代、非トリプシンプロテアーゼを使用した酵素的継代、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を使用した酵素フリーな継代などの様々な細胞継代方法が細胞培養中の細胞ストレスを軽減する目的で開発されてきた。この分野における多くの開発にもかかわらず、多能性幹細胞の培養中に生じる問題は未だ解決されていない。多能性幹細胞培養は挑戦的で、労働集約的で、人為的ミスを起こしやすく、再現が難しいままであった。多能性幹細胞の培養のための改善されたプロセスおよび組成物が必要とされているが、そのようなプロセスおよび組成物はまた、他の哺乳類細胞、組織および器官の培養を改善するために適合され得る。例えば、多くの広く使用される癌細胞株は、経時的に遺伝的变化を獲得しながら、培養中で長年維持され、これらの細胞株は忠実にインビオの癌細胞生物学を表していない可能性がある。同時に、原発腫瘍から細胞株を樹立することは、インビトロの細胞生存が低いことによって困難な課題であり得る。

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】**

40

50

【 0 0 0 5 】

したがって、原発腫瘍から新たな癌細胞株を樹立するための改善されたプロセスおよび組成物が必要とされている。

【課題を解決するための手段】**【 0 0 0 6 】**

本明細書に記載され、本発明の実施形態に含まれるのは、哺乳類細胞、組織および／または器官の培養中の増殖および維持に有用な方法、組成物およびキットである。多能性幹細胞は、細胞培養条件に対して大いに影響を受けやすく、酵素的な細胞の解離、凍結保存／解凍の有無に関わらずルーチン的な継代中、および2次元および3次元培養において分化が促されたとき、アポトーシスが起こる。発明者らは、特定の小さい化合物、その中にはクロマン1（Chromamn1）、エムリカサン（Emricasan）などのカスパーゼ-3阻害剤、トランス-ISRIBおよびポリアミン、および／またはそのような化合物の組み合わせがあるが、それらは、培養中の多能性幹細胞の生存を優位に改善することを発見した。この発見に関連して、発明者らは本明細書に記載される組成物、キット、および方法を考案し、それらは多能性幹細胞だけでなく、様々な他の哺乳類細胞、組織または器官の培養の結果を改善するために使用され得る。したがって、本明細書に記載される方法の様々な実施形態は、哺乳類細胞（限定するものではないが、多能性幹細胞を含む）組織および／または器官の培養に、発明者らによって考案された組成物および／またはキットを利用する。とりわけ、本明細書に記載される組成物、キット、および方法は、経済的な培養プロセスの開発、費用対効果の高い新たな細胞株の樹立、薬物および／または毒物学スクリーニングのための細胞培養のスケーラビリティ、細胞の拡大培養の堅牢性および標準化、細胞分化プロトコルの再現性の大幅な改善、および、個別化医療のための遺伝子治療およびゲノム編集などの細胞培養を含む適用の改善を可能にする。本発明の組成物、キット、および方法の利点は、本文書全体を通して説明され、添付の図面において示される。

10

【 0 0 0 7 】

本明細書に使用されるとき、用語「発明」、「本発明（“the invention”、“this invention”および“the present invention”）」は、本特許出願の主題および以下の特許請求の範囲の全てに広く言及することを意図している。これらの用語を含む記述は、本明細書に記載されている主題を制限しないこと、または、以下の特許請求の範囲の意味または範囲を制限しないことを理解されたい。本発明の対象となる実施形態は、この要約ではなく、特許請求の範囲によって定義される。この要約は、本発明の様々な態様の高レベルの概要であり、本文書および添付の図面に記載および図示されている概念のいくつかを導入している。この要約は、クレームされた主題の重要な、または、本質的な特徴を特定することを意図せず、または、クレームされた主題の範囲を決定するために分離して使用することも意図されていない。主題は、明細書全体の適切な部分、任意のまたは全ての図、および各クレームを参照して理解されたい。本文書は、本発明の様々な実施形態を説明し、参照している。特定の実施形態が、本発明の範囲を定義することを意図していない。むしろ、実施形態は、少なくとも本発明の範囲内に含まれる様々な方法、組成物、キット、システムなどの非限定的な例を提供するにすぎない。いくつかの本発明の実施形態は以下に要約され、他の実施形態は本文書の他の場所で説明および示されている。

20

30

【 0 0 0 8 】

例示的な本発明の実施形態は、クロマン1および／またはその誘導体、および1つ以上のエムリカサンおよび／またはその誘導体などのカスパーゼ-3阻害剤を含む組成物を含む。組成物は、トランス-ISRIBおよびポリアミンのうちの1つまたは両方をさらに含み得る。組成物の実施形態は、培地に取り込まれたとき、約4nM～約80μM、約4nM～約40μM、約10nM～約20μM、約20nM～約10μMまたは約30nM～約500nMの濃度のクロマン1および／またはその誘導体を提供するように配合され得る。組成物の実施形態は、培地に取り込まれたとき、約100nM～約80μM、約1

40

50

0.0 nM～約4.0 μM、約2.00 nM～約3.0 μM、約3.00 nM～約2.0 μMの濃度のエムリカサンおよび／またはその誘導体を提供するように配合され得る。組成物の実施形態は、培地に取り込まれたとき、約5.0 nM～約8.0 μM、約5.0 nM～約6.25 μM、約1.00 nM～約6.25 μM、または約2.00 nM～約6.25 μMの濃度のトランス-ISRIBを提供するように配合され得る。組成物の実施形態は、スペルミン、スペルミジン、およびブトレシンのうちの1つ以上を含むポリアミンを含み得、そのような実施形態は、培地に取り込まれたとき、約0.5 μM～1 mMの濃度のポリアミンを提供するように配合され得る。組成物の実施形態は、スペルミン、スペルミジン、およびブトレシンのうちの1つ以上を含むポリアミンを含み得、そのような実施形態は、培地に取り込まれたとき、約0.5 nM～1 mMの濃度のスペルミン、および／または約0.5 nM～1 mMの濃度のスペルミジン、および／または約0.5 nM～1 mMの濃度のブトレシンを提供するように配合され得る。

【0009】

例示的な本発明の実施形態は、インビトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された成分とクロマン1および／またはその誘導体とを含む培養培地組成物などの培地を含む。例えば、培地組成物の実施形態は、約4 nM～8.0 μM、4 nM～4.0 μM、1.0 nM～2.0 μM、2.0 nM～1.0 μMまたは3.0 nM～5.00 nMの有効濃度においてクロマン1および／またはその誘導体を含み得、クロマン1および／またはその誘導体の有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のクロマン1および／またはその誘導体の濃度である。培地組成物の実施形態は、エムリカサンおよび／またはその誘導体をさらに含み得る。例えば、培地組成物の実施形態は、約1.00 nM～8.0 μM、1.00 nM～4.0 μM、2.00 nM～3.00 μM、3.00 nM～2.0 μMの有効濃度においてエムリカサンを含み得、エムリカサンおよび／またはその誘導体の有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のエムリカサンおよび／またはその誘導体の濃度である。培地組成物の実施形態は、トランス-ISRIBをさらに含み得る。例えば、培地組成物の実施形態は、約5.0 nM～8.0 μM、5.0 nM～6.25 μM、1.00 nM～6.25 μM、または2.00 nM～6.25 μMの有効濃度においてトランス-ISRIBを含み得、トランス-ISRIBの有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のトランス-ISRIBの濃度である。培地組成物の実施形態は、スペルミン、スペルミジンおよびブトレシンのうちの1つ以上を含むポリアミンをさらに含み得る。そのような培地組成物の実施形態は、約0.5 nM～1 mMの有効濃度のスペルミン、約0.5 nM～1 mMの有効濃度のスペルミジン、約0.5 nM～1 mMの有効濃度のブトレシンを含み得、スペルミン、スペルミジンおよび／またはブトレシンのうちのそれぞれの有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中の濃度である。

培地組成物の実施形態において、インビトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成される成分は、緩衝液、無機塩、必須アミノ酸、炭水化物、脂肪酸、脂質、ビタミン、微量元素のうちの1つ以上を含み得る。培地組成物の実施形態は、使用される前に溶解されるように配合された液体または固体の培養培地濃縮物を包含する。培地組成物の実施形態はまた、さらなる希釈なしで使用されるように配合された培養培地などの培地を包含する。培地組成物の複数の実施形態は、液体、半固体、固体培地を包含する。培地組成物の複数の実施形態は、規定培地および非規定培地を含む。培地組成物の複数の実施形態は、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞、変異細胞（遺伝的に変異された細胞を含む）、ヒト細胞またはヒト由来の細胞のうちの1つ以上の培養または保存のために構成され得る。培地組成物の複数の実施形態は、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚のうちの1つ以上の培養または保存のために構成され得る。

【0010】

例示的な本発明の実施形態は、本発明の実施形態による組成物と、インビトロまたはエ

10

20

30

40

50

クスピボで少なくとも 1 つの哺乳類細胞を支持するように構成された培養培地成分などの培地とを含むキットを含む。いくつかの例示的な実施形態において、そのようなキットは、インピトロまたはエクスピボで少なくとも 1 つの哺乳類細胞の増殖のための培養容器、支持部または足場のうちの 1 つ以上をさらに含み得る。いくつかの例示的な実施形態において、そのようなキットは、インピトロまたはエクスピボでの少なくとも 1 つの哺乳類細胞の保存のための容器および他の構成要素のうちの 1 つ以上をさらに含み得る。

【 0 0 1 1 】

例示的な本発明の実施形態はまた、少なくとも 1 つの哺乳類細胞と、本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培地組成物とを含む組成物を含む。そのような実施形態に含まれる少なくとも 1 つの哺乳類細胞は、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞または改変された細胞（遺伝的に改変された細胞を含む）のうちの 1 つ以上であり得る。少なくとも 1 つの哺乳類細胞はまた、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚のうちの 1 つ以上であり得る。少なくとも 1 つの哺乳類細胞は、ヒト細胞および／またはヒト由来の細胞であり得る。少なくとも 1 つの哺乳類細胞は、解凍され得る。そのような組成物の複数の実施形態は、培地を含む容器を含み得る。そのような組成物の実施形態は、少なくとも 1 つの哺乳類細胞のための固体支持部および／または足場を含み得る。

【 0 0 1 2 】

例示的な本発明の実施形態はまた、様々な方法を含む。例えば、本発明の実施形態に含まれるのは、本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培地を調製する方法である。別の例において、本発明の実施形態に含まれるのは、インピトロまたはエクスピボで、本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培地で少なくとも 1 つの哺乳類細胞をインキュベートすることを含む、少なくとも 1 つの哺乳類細胞を培養する方法である。もう 1 つの例において、本発明の実施形態に含まれるのは、解離された哺乳類細胞から細胞のコロニーが確立されるまで、本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培養培地中で解離された哺乳類細胞をインキュベートすることを含む、哺乳類細胞のクローン集団を得る方法である。さらにもう 1 つの例において、本発明の実施形態に含まれるのは、胚様体が確立されるまで本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培養培地中で 1 つ以上の哺乳類細胞をインキュベートすることを含む胚様体を得る方法である。さらにもう 1 つの例において、本発明の実施形態に含まれるのは、器官の少なくとも一部が確立されるまで本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培養培地中で 1 つ以上の哺乳類細胞をインキュベートすることを含む、インピトロまたはエクスピボで器官の少なくとも一部を成長させる方法である。上記の方法において、本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培養培地は、液体、半固体、または固体培地であり得る。培養培地は、規定培地または非規定培地であり得る。本発明の実施形態にまた含まれるのは、本発明の実施形態のうちの 1 つ以上による培地中、細胞、複数の細胞、組織、胚様体、胚、オルガノイドまたは器官の少なくとも一部のうちの 1 つ以上をインキュベートすることを含む、インピトロまたはエクスピボで細胞、複数の細胞、組織、胚様体、胚、オルガノイドまたは器官の少なくとも一部を維持または保存する方法である。上記の維持または保存する方法は、氷点下の温度（凍結保存のために行われるように）を含む様々な温度で行われる。上記の方法は、必要に応じて、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞または改変細胞（遺伝的に改変された細胞を含む）、ヒト細胞またはヒト由来の細胞のうちの 1 つ以上に対して行われ得る。生細胞の培養、成長、維持または保存に関する上記の方法は、必要に応じて、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚のうちの 1 つ以上に行うことができる。上記の方法は、解凍した細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚に行うことができる。

【 図面の簡単な説明 】

10

20

30

40

50

【0013】

【図1】小分子の構造を示す図。

【図2】定量的ハイスループットスクリーニング(qHTS)に使用された手順の概略図。

【図3】スクリーニングされた化合物(X 軸上にプロットされる)によって達成された最大生存率の散布図。 Y 軸上にプロットされた生存率値は、 $10 \mu M Y - 27632$ において達成された生存率(100 % とみなす)に基づいて正規化された。

【図4】選択された R O C K 阻害剤クロマン1、ファスジルH C L、チアゾビピンおよび Y - 27632 の用量反応曲線の折れ線グラフを示す図。選択された R O C K 阻害剤のモル濃度が X 軸(対数目盛) 上にプロットされる。各濃度を 4 重反復実験で試験し、データは $10 \mu M$ の Y - 27632 から得られた平均 C e l l T i t e r G l o (商標) (C T G) 読み取り値に関して正規化した。このようにして、正規化されたデータが Y 軸上にプロットされる。

【図5】ビトロネクチンコーティングされた 6 ウェルプレートに播種された解離された H 9 細胞の生存(ヨウ化プロピジウム陽性の死細胞の数が減少)に対する Y - 27632 およびクロマン1の効果の比較を示す棒グラフを示す図。

【図6】R e a c t i o n B i o l o g y C o r p o r a t i o n (M a l v e r n , P A) によって行われた Hot S p o t キナーゼアッセイを使用して、 R O C K 1 および R O C K 2 に対するキナーゼアッセイで決定された Y - 27632 の半数阻害濃度(I C 50)を示す折れ線グラフの図。

【図7】R e a c t i o n B i o l o g y C o r p o r a t i o n (M a l v e r n , P A) によって行われた Hot S p o t キナーゼアッセイを使用して、 R O C K 1 および R O C K 2 に対するキナーゼアッセイで決定されたクロマン1の半数阻害濃度(I C 50)を示す折れ線グラフの図。

【図8】 $10 \mu M$ Y - 27632 および $50 nM$ クロマン1の阻害活性を要約する表を示す図。

【図9】クロマン1およびカスパーゼ阻害剤エムリカサンの組み合わせと、クロマン1および(-) - ブレビスタチンの組み合わせとの組み合わせ論的マトリックススクリーニングの結果を示す図。

【図10】クロマン1およびエムリカサンが組み合わされたとき、改善された細胞生存を示す棒グラフを示す図。 C e l l T i t e r - G l o (登録商標) アッセイを使用し、プレーティングの($100,000$ 細胞 / cm^2) 24 時間後に生存している H 9 細胞を定量化した。

【図11】24時間以上、細胞の挙動を監視するタイムラプス実験の位相差顕微鏡画像(I n c u C y t e Z o o m (商標) L i v e C e l l A n a l y s i s , S a r t o r i u s 、 D E) を示す図。

【図12】低細胞密度における解離された幹細胞の一次スクリーニングからのヒットの評価を示す棒グラフの図。

【図13】異なる小分子および小分子の組み合わせで処理したときの H 9 細胞のコロニー形成率およびコロニーサイズの棒グラフ。

【図14】図14において定量化した Y - 27632 および C E P T で得られたコロニーの代表的な顕微鏡画像を示す図。ウェル全体の画像(6 ウェルプレート)は、カルセイングリーン($0.5 \mu g / mL$; Thermo Fisher Scientific から入手)で撮影した。

【図15】1 細胞 / ウェル条件(96 ウェルプレート)としてプレーティングされた H 9 細胞を使用して行われた単一細胞クローニング実験の結果を要約する棒グラフを示す図。

【図16】胚様体形成に対する C E P T の優位性を示す代表的な顕微鏡画像を示す図。示される画像は、 H 9 細胞からの胚様体の代表的な位相差画像である。画像は、細胞プレーティング($20,000$ 細胞 / cm^2)の 24 時間後に撮影された。

【図17】Y - 27632 または C E P T のいずれかで処理された細胞から形成された単一の胚様体の直径の定量化を示す散布図。 単一の胚様体を生成するために、 H 9 細胞を A

10

20

30

40

50

c c u t a s eで解離し、5,000細胞／ウェルでA g g r e W e l l プレート（S tem C e l l T e c h n o l o g i e s、カタログ番号：34825）にプレーティングした。直径の定量化のために、画像はプレーティングの24時間後に撮影された。

【図18】Y - 27632と比較して、C E P Tが大脳オルガノイド形成を改善することを示す代表的な画像を示す図。

【図19】凍結保存された多能性幹細胞（H9）の解凍の改善を示す棒グラフを示す図。

【図20】様々なiPSC由来の分化細胞（N C A T Sの科学者によって生成されたiPSC由来のアストロサイトを除き、他のすべての細胞タイプはF u j i f i l m C e l l u l a r D y n a m i c s I n t e r n a t i o n a lから市販されている）のC E P Tで改善された解凍を示す棒グラフを示す図。

【図21】多電極アレイ（A x i o n B i o s y s t e m s）を使用した解凍後5日目のiPSC由来の心筋細胞（F u j i f i l m C e l l u l a r D y n a m i c s I n t e r n a t i o n a lから市販）の電気生理学的特性評価の結果を示す図。

【図22】複数のストレス機構からの解離された細胞のC E P T保護を示す代表的な顕微鏡画像を示す図。示されているスケールバーは10 μm。上側のパネル：ラミンB1 - G F P i P S C レポーター株（A l l e n I n s t i t u t e f o r C e l l S c i e n c e、シアトル、ワシントン州）の共焦点顕微鏡分析。細胞継代中（プレーティングの30分後）の核の形状の劇的な形態学的違いを示す。中央のパネル：O C T 4 発現細胞は、0 . 0 0 0 1 % v / v D M S O およびY - 27632（矢尻）に曝露したとき、場合に H 2 A X に対して免疫反応性だったが、C E P Tで処理した場合（プレーティングの3時間後）には免疫反応性がなかった。下側のパネル：アクチンおよびミオシンに対する免疫細胞化学によって測定された、細胞継代中（プレーティングの3時間後）の劇的な細胞骨格の違い。ストレスを受けた細胞は、0 . 0 0 0 1 % v / v D M S O の存在下で小胞形成（白い矢尻）を示したか、または、Y - 27632に曝露されたとき、コロニー縁に顕著なアクチнстレスファイバーの形成を示した（白い矢尻）。

【図23】Y - 27632またはC E P Tで処理されたh E S C (H9)を特徴付ける代表的なウエスタンプロットの画像を示す図。

【図24】Y - 27632またはC E P Tで処理されたh E S C (H9)を特徴付ける代表的なウエスタンプロットの画像を示す図。

【図25】h E S C (H9)のピューロマイシンのパルス・チェイス実験の結果を示す代表的な画像を示す図。これは、細胞継代中に強く損なわれたタンパク質合成がC E P Tによって救済されたことを示す（継代後3時間）。

【図26】D M S O およびY - 27632と比較して、C E P Tで継代されたh E S C (H9)でグルタチオンレベルが有意に高かったことを示す棒グラフを示す図（プレーティングの3時間後）。

【図27】C E P Tがゲノム編集効率を改善したことを見出す実験結果を示す図。

【図28】様々な試薬およびC E P Tの存在下でのヒト多能性幹細胞の生存率を比較した棒グラフを示す図。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の実施形態は、以下に議論される発見に基づいて少なくとも部分的には想定される。組み合わせ論的化学スクリーニングおよび続く実験的分析を使用することにより、発明者らは、R O C K 阻害剤クロマン1が予期せずに、一般に使用されるY - 27632およびブレビスタチン、チアゾビビン、ピナシジル、およびファスジルなどの他の公知のR O C K 阻害剤より有意に効力があり、かつ、より特異的であり、培養中のヒト多能性幹細胞（h P S C）の生存率を改善することを見出した。発明者らはまた、エムリカサンおよびエムリカサン関連化合物Q - V D - O P hがクロマン1と組み合わせて使用された場合、培養中のh P S Cの生存をさらに改善することを見出した。同時に、エムリカサン単独では、細胞生存の改善に十分ではなかった。クロマン1およびエムリカサン（またはQ - V D - O P h）の組み合わせは、細胞培養結果の改善に予期せずに有利な相乗効果を示し

10

20

30

40

50

た。単独でまたはエムリカサンと組み合わせて使用されるクロマン1の有用な、かつ、有利な特性は、多くの継代にわたるPSCのルーチン的な細胞培養中に実証され、PSCの正常な核型および発達可能性が損なわれていないことが示された。クロマン1またはクロマン1およびエムリカサンの組み合わせはまた、凍結保存されたヒトPSCを解凍したときに、劇的に、かつ、予期せずに細胞生存を改善した。さらにまた、クロマン1、または、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせの存在下で胚様体形成中の優れた細胞生存が達成された。クロマン1、または、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせの有意かつ有利な効果は、バルク培養または1ウェルあたり1胚様体条件のいずれかで浮遊性胚様体が生成されたときに実証された。クロマン1、または、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせの存在下のhPSCは、最小限の細胞死を経て、Y-27632中で成長した胚様体に比べてより高い質の胚様体を生じた。発明者らはまた、厳しい単一細胞クローニング実験において、追加の化合物および細胞培養条件が細胞生存のさらなる改善につながることを発見した。例えば、トランスISRIBおよび/またはポリアミンをクロマン1またはクロマン1およびエムリカサンの組み合わせとともに使用することで単一細胞クローニング中の細胞生存を改善した。それに加えて発明者らは、いくつかの実施形態において、エムリカサンは他のカスパーゼ-3阻害剤と置き換えることを発見した。

【0015】

上記の要約された実験的研究に基づいて、本文書の「小分子」セクションにおいて記載された各化合物または化合物の様々な組み合わせ（これは文脈に応じて活性剤として言及され得る）は、培養中および他の関連するプロセス中の哺乳類細胞の生存の改善に有用であることが想定された。したがって、発明者らによって様々な組成物および関連するプロセスおよびキットが想定された。非限定的な一例において、発明者らは、hPSCなどのPSCを含むがこれに限られない哺乳類細胞の培養に有用かつ有利な活性剤および関連するプロセスおよびキットを想定し、これらは、限定するものではないが、細胞リプログラミングプロトコル、新たなiPSC株の樹立、および、例えば、CRISP/R/Cas9、転写活性化様エフェクタースクリアーゼ（TALEN）またはジンクフィンガースクリアーゼ（ZFN）を使用する方法などの様々な方法を使用したゲノム編集などの様々な研究および臨床適用において用いられ得る。非限定的な別の例において、発明者らは、限定するものではないが、市販のニューロン、肝細胞、心筋細胞、またはキメラ抗原受容体（CAR）T細胞治療に関連する免疫応答性T細胞などの分化細胞の培養に有用な活性剤および関連するプロセスおよびキットを想定した。非限定的なさらに別の例において、発明者らは、限定するものではないが、新たに単離された初代細胞からの新たな細胞株、変異細胞（例えば、免疫治療に有用な遺伝子改変されたCAR-T細胞）の細胞株、および研究適用に有用な癌細胞の細胞株などの新たな細胞株の樹立のための活性剤および関連するプロセスおよびキットを想定した。

【0016】

本明細書に記載される様々な組成物および方法は、限定するものではないが、癌細胞株および非癌細胞株を含む初代細胞からの新たな細胞株の樹立、新たなiPSCのリプログラミングおよび樹立、非幹細胞および幹細胞（ESCs、iPSCs、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、および他の器官由来の幹細胞を含む成体幹細胞、または人工的に改変された細胞など）の培養の改善、細胞の凍結保存および解凍の改善、2次元培養および3次元培養における細胞の増殖および/または分化の改善（例えば、ニューロスフェアまたはオルガノイド）、器官および組織保存（例えば、限定するものではないが、移植前のエクスピボの器官および組織の保存）の改善、および様々な研究および臨床技術において培養された細胞のゲノム編集およびクローン選択の改善に有用であり得る。

【0017】

用語および概念

いくつかの用語および概念が以下に説明される。それらは、本文書の残りの部分および添付の図面と併せて、本発明の様々な実施形態の理解を容易にするように意図される。これらの用語および概念は、本発明の分野において受け入れられている慣習、および、本文

書および／または添付の図面にわたって提供される説明に基づいて、さらに明らかになり、理解され得る。いくつかの他の用語は、本文書の他のセクションおよび添付の図面において明示的または暗黙的に定義され得、本発明の分野において受け入れられている慣習、および、本文書および／または添付の図面にわたって提供される説明に基づいて使用され得、かつ理解され得る。明示的に定義されていない用語はまた、本発明の分野において受け入れられている慣習に基づいて定義され得、かつ、理解され得、本文書および／または添付の図面の文脈内で解釈され得る。

【 0 0 1 8 】

本明細書に使用されるとき、用語「*a*」、「*a n*」、および「*t h e*」は、特に明記されなければ、「1つ」、「1つ以上」、または「少なくとも1つ」を表す。

値を決定するために用いられる装置、方法のエラーの固有の変動、または研究対象間に存在する変動を値が含むことを示すために、用語「約」は、本明細書に使用される。例えば、用語「約」は、所定値からの±1%、±5%、±10%、±15%または±20%の変動を意味し得る。

【 0 0 1 9 】

本明細書に使用されるとき、用語「単離」、「分離」または「精製」および関連する用語は、サンプルから興味の対象の成分以外の全ての物質の除去を言及するために必ずしも使用されない。代わりに、いくつかの実施形態において、それらの用語は、サンプル中に存在する1つ以上の他の成分と比べて、興味の対象の1つ以上の成分の量を濃縮する手順に言及するために使用される。いくつかの実施形態において、「単離」、「分離」、または「精製」は、サンプルから1つ以上の成分の量を除去または減少するために使用され得る。例えば、「単離された細胞」という表現は、細胞培養物または有機体の他の細胞から実質的に分離または精製された細胞に言及し得る。

【 0 0 2 0 】

細胞または生物学的サンプルに言及する表現「に由来する」および関連する表現は、ある時点で述べられた供給源から得られた細胞またはサンプルを示す。例えば、有機体に由来する細胞は、個体から直接得られた（すなわち改変されていない）初代細胞を表すか、または、例えば、組換えベクターの導入によって、特定の条件下に曝すことまたは培養すること、または不死化によって改変され得る。いくつかの場合において、所与の供給源に由来する細胞は、細胞分裂および／または分化を経て、元の細胞がもはや存在しなくなるが、二次的な細胞は、同じ供給源から派生していると理解されるであろう。

【 0 0 2 1 】

用語「培養」「細胞培養」および関連する用語は、有機体の外側にある細胞または細胞集団に言及するために使用され得る。これらの細胞は、幹細胞、有機体から単離されたか、または細胞バンク、動物、または血液バンクから得られた初代細胞、または、そのような起源に由来する二次細胞であり得る。二次細胞は、長寿命の細胞培養のために不死化され得る。

【 0 0 2 2 】

初代細胞は、卵細胞、精子細胞、および幹細胞以外の成体または胎児の有機体の任意の細胞を含む。初代細胞の例は、限定するものではないが、皮膚細胞、骨細胞、血液細胞、内臓の細胞、および結合組織の細胞を含む。二次細胞は、初代細胞に由来し、長寿命のインビトロ細胞培養のために不死化され得る。

【 0 0 2 3 】

細胞、組織または器官の培養または培養プロセスに言及するとき、用語「培養（“*c u l t u r e*”、“*c u l t u r i n g*”）」、「増殖／成長（“*g r o w*”、“*g r o w i n g*”）」、「維持する（“*m a i n t a i n*”、“*m a i n t a i n i n g*”）」、「拡大培養する（“*e x p a n d*”、“*e x p a n d i n g*”）」などは、細胞または細胞群（この表現の範囲は、未分化または分化細胞の群または複数の未分化または分化細胞、胚、胚様体、組織、または器官を含む）が生存、増殖、分化および／または老化を避けるために好適な条件下、体の外側で（エクスピボおよび／またはインビトロ）維持されることを意味するため

10

20

30

40

50

に互換的に使用され得る。換言すれば、培養されている細胞または細胞群は、生存可能であり、培養によって細胞増殖、分化、または分裂につながり得る。上記の用語は、自然に老化する細胞もあるので、培養中のすべての細胞が生存し、増殖し、または分裂することを意味するのではない。細胞は通常、培地中で培養され、培地は培養の過程で変えられ得る。いわゆる2次元(2D)細胞培養物は、通常、基材(例えば、ビトロネクチン、ラミニン521、マトリゲル)でコーティングされ得るプラスチック容器中で平らな表面上で増殖する。3次元(3D)培養は、生物学的細胞が3次元すべてで増殖することができるか、またはその周囲と相互作用することができる培養である。3D培養は、限定するものではないが、プレート、フラスコ、バイオリアクタまたは小さいカプセルなどの様々な人工的な環境で増殖し得、細胞はその中でスフェロイドに増殖し得る。3D培養は、いわゆる足場なしおよび足場ベースの技術を含む。足場なし方法は、限定するものではないが、低接着プレート、ハンギングドロッププレート、マイクロパターン化表面、および回転バイオリアクタ、磁気浮上および磁気3Dバイオプリントの使用を採用する。足場は、細胞接着、および、いくつかの場合において分化のための機械的支持部を提供する構造または材料である。足場は、固体の足場、スポンジ(セルローススポンジなど)、タンパク質ベースの足場(コラーゲンまたはゼラチンベースの足場など)、ハイドロゲル、ナノファイバー足場、合成ポリマー足場(例えば、ポリカプロラクトン足場またはポリスチレン足場)を含む。一般に培養環境は、細胞増殖、細胞密度、および細胞接触のための基材、気相、培地、および温度などの要因の考慮を含む。培養中の細胞は、一般に、細胞増殖のために最適であると知られる条件下に維持される。そのような条件は、例えば、およそ37℃の温度およびおよそ5%のCO₂を含む湿気のある雰囲気を含み得る。インキュベーションの期間は、所望の結果に応じて大きく異なり得る。

【0024】

用語「培地」、「培養培地」、「培養液」、「増殖培地」および関連する用語および表現は、細胞(单一の細胞および複数の細胞を含む)、組織、器官、またはそれらの部分または胚性構造(限定するものではないが、桑実胚、卵割腔、胚盤胞または胚など)の生存および/または増殖をサポートする培地を表す。用語「培地」は、限定するものではないが、細胞、組織または器官培養のために使用される培地、および、細胞、組織、および器官の保存のために使用される培地を含む、様々なタイプの培地を包含する。例えば、用語「培地」は、細胞増殖および/または分化に使用される培地、細胞、組織、オルガノイド、器官または胚の増殖に使用される培地、および、移植前にエクスピボで、細胞、組織または器官の凍結保存および保存を含む、細胞、組織、オルガノイド、器官または胚の保存に使用される培地を包含する。培地は、通常、等張であり、液体、コロイド液体、ゲル、固体および/または半固体であり得る。培地は、細胞接着または支持のためのマトリックスを提供するように構成され得るか、または別個の支持部(培養容器表面または足場など)が提供され得る。培地は、細胞または複数の細胞の培養に必要な栄養的、化学的、および構造的なサポート成分を含み得る。既知組成培地(または「規定培地」)は、その化学的成分の全ての濃度が既知である培地である。対照的に、非規定培地は、完全には規定されていない組成物である、血清アルブミンまたは血清などの複雑な生物学的成分を含み得る。条件培地は、培養された細胞からの以前に使用された培地であると理解される。それは、培養された細胞によって培養液中に分泌された代謝物、増殖因子および細胞外マトリックスタンパク質を含み、それらはそのような条件培地のその後の使用に有益であり得る。

【0025】

表現「単一細胞クローニング」は、細胞のポリクローナルプールからモノクローナル細胞株を生成することを可能にするプロセスを表す。単一細胞クローニングは通常、単一細胞選別、クローニングシリンドラでの単離または限界希釈などの様々なアプローチによる個々の細胞の単離を含む。このようにして単離された細胞は、その後、培養中に増殖する。

【0026】

細胞培養の文脈において、用語「解離すること」は他の細胞から、または培養プレート表面などの表面から細胞を単離するプロセスを表し得る。例えば、細胞は機械的または酵

10

20

30

40

50

素的な方法によって器官または組織から解離され得る。別の例において、インビトロで凝集した細胞は、互いに解離され得る。さらに別の例において、接着細胞は、培養プレートまたは他の表面から解離される。解離は、細胞外マトリックス（ECM）および基材（例えば、培養表面）と細胞との相互作用の破壊、または、細胞間のECMの破壊を含み得る。

【0027】

「幹細胞」は、体細胞分裂を通じた自己複製の能力と組織または器官に分化する可能性とによって特徴づけられる細胞である。幹細胞の中で、胚性幹細胞と体性幹細胞とは区別され得る。例えば、哺乳類胚性幹細胞は、胚盤胞中に存在し、胚性組織を生じ得るが、体性幹細胞は、組織の再生および修復のために成体組織中に存在し得る。

【0028】

用語「細胞株」は、通常、多細胞有機体の单一の細胞から作られた細胞培養物を表す。細胞株の細胞は、比較的均一な遺伝子構成を有する。いくつかの細胞株は、幹細胞に由来する。いくつかの細胞株は、遺伝子変異（1つ以上の変異またはウイルス遺伝子の導入など）を経て、制御されていない増殖をするようになった自然発生の癌細胞に由来する。いくつかの細胞株は、様々な方法によって人工的に不死化された細胞に由来する。

【0029】

用語「自己複製」は、細胞に関連して使用するとき、分裂して、親細胞の自己複製の特徴を有する少なくとも1つの娘細胞を分裂及び生成する能力を説明するものであるが、他の娘細胞のうちの1つ以上は特定の分化経路に関わり得る。例えば、自己複製造血幹細胞は、1つの娘幹細胞および骨髄またはリンパ経路において分化に関わる別の娘細胞を、分裂して形成し得る。非自己複製細胞は、それでも娘細胞を生じるために細胞分裂を経ることができるが、親細胞のタイプの分化可能性をどちらも有さず、代わりに分化した娘細胞を生じる。

【0030】

用語「多能性の」「多能性」および関連する用語および表現は、3つの胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）全てからの細胞系譜に付随する特徴を集合的に実証する細胞タイプに、適切な条件下で分化することができる子孫を生じる能力を有する動物細胞または細胞集団を表す。例えば、表現「多能性幹細胞の特徴」は、多能性幹細胞またはその集団を他の細胞から区別する細胞または細胞集団の特徴を表す。3つの胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）全てからの細胞系譜に付随する特徴を集合的に実証する細胞タイプに、適切な条件下で分化することができる子孫を生じる能力は、多能性幹細胞の特徴である。細胞形態および分子マーカーの特定の組み合わせの発現および非発現はまた、多能性幹細胞の特徴である。多能性幹細胞（PSC）は、胚性幹細胞（ESC）および人工多能性幹細胞（iPSC）を含む。

【0031】

用語「幹細胞」および関連する用語および表現は、長期間分裂および自身の複製が可能であり、分化しておらず、分化した細胞タイプを生じることができる動物細胞を表すために本明細書に使用される。幹細胞は長期間分裂および自身の複製が可能である。通常自身を複製しない、例えば、筋肉細胞、血液細胞、または神経細胞と違って、幹細胞は多数回複製または増殖し得る。生じた細胞が親の幹細胞のように未分化であり続ける場合、その細胞は長期自己複製可能であると言われる。

【0032】

胚性幹細胞（ESC）は、胚に由来し、適切な条件下で、培養中それらは分化しない（未分化）ままである。胚性幹細胞株は、数か月から数年の間、分化することなく増殖することが可能な条件下で培養されたESCの株である。他の条件下、例えば、胚様体を形成するために細胞と一緒に凝集させると、それらは自発的に分化し始める。

【0033】

「胚様体」は、懸濁液中で培養された幹細胞から生じ得る細胞の丸い集まりである。胚様体は3つの胚葉すべてに由来する細胞タイプを含む。

「体性幹細胞」とも名付けられ得る「成体幹細胞」は、有機体において、組織または器

10

20

30

40

50

官内の分化細胞間で見られる幹細胞であり、分化して、組織または器官中の分化した細胞タイムのうちのいくつかまたはすべてを生じ得る。体性幹細胞は培養中で増殖し得る。分化した細胞に分化するとき、通常、体性幹細胞は「前駆」または「始原」細胞と呼ばれる中間細胞を生じる。体性幹細胞および始原細胞は、その分化能の程度に応じて「多分化能」または「少能性」として記載され得る。体性幹細胞のいくつかの例：すべてのタイプの血液細胞（赤血液細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、ナチュラルキラー細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球、およびマクロファージ）を生じる造血幹細胞、骨髄間質幹細胞および骨格幹細胞を含み、骨の細胞（骨芽細胞および骨細胞）、軟骨の細胞（軟骨細胞）、脂肪細胞（脂肪細胞）、および血液形成をサポートする間質細胞を生じ得る間葉系幹細胞；神経細胞（ニューロン）、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトを生じ得る神経幹細胞；吸収細胞、杯細胞、パネット細胞、および腸内分泌細胞を生じ得る消化管の内面の上皮幹細胞；表皮の基底層（およびケラチノサイトを生じ得る）および毛包の基部（および毛包と表皮の両方を生じ得る）で生じる皮膚幹細胞。組織特異的な始原細胞は、特定の器官または組織の細胞への分化に関する自己複製能のない細胞である。ある体性幹細胞タイプは、体性幹細胞の起源から予期されない器官または組織にみられる細胞タイプに分化し得る。この現象は、「トランス分化」と呼ばれる。

【0034】

表現「人工多能性幹細胞」（iPSC）は、非多能性細胞に人工的に誘導された多能性幹細胞を表す。例えば、ヒトiPSCは、ヒトの非多能性細胞から人工的に誘導される。iPSCは、多能性関連遺伝子、すなわち「リプログラミング因子」の特定のセットの産物を所与の細胞タイプに導入することによって、および／または非多能性細胞を特定の条件に曝すことによって得ることができる。

【0035】

用語「非多能性細胞」は多能性細胞ではない哺乳類細胞を表す。そのような細胞の例は、分化細胞、体性幹細胞、および始原細胞を含む。いくつかの非多能性細胞は、ある程度の分化能を維持し、いくつかの例は、体性幹細胞および始原細胞である。

【0036】

「細胞分化能」は、他の細胞タイプに分化する細胞の能力を説明する。細胞は、多能性細胞、多分化能細胞（いくつかだが全てではない細胞タイプに分化し得る、例えば、臍帯血幹細胞および間葉系幹細胞）または少能性細胞（少数の細胞タイプに分化する能力を有する、例えば、リンパ系細胞または血管幹細胞）として指定され得る。現在の理解では、分化能は連続体上に存在する。したがって、分化能に基づく細胞の区分間の境界は流動的であり得、必ずしも限定するものではない。

【0037】

用語「始原細胞」は、幹細胞の初期の子孫である細胞を表す。それらは通常、分化して1つ以上の種の細胞であるが非多能性である細胞を形成し得る。換言すれば、それらがなることができる種類に関して限定されている。始原細胞は有機体、培養中増殖した細胞、または幹細胞由来の細胞から得られた初代細胞であり得る。

【0038】

「分化」は、あまり特殊化されていない細胞がより特殊化された細胞タイプになるプロセスである。例えば、多細胞動物の初期発生は、胚性細胞の急速な増殖によって特徴づけられ、それらの細胞はその後分化して、多細胞動物の組織および器官を作る多くの分化したタイプの細胞を生じる。細胞が分化すると、その増殖速度は通常は減少する。いくつかのタイプの分化細胞は二度と分裂しないが、多くの分化細胞は、傷害または細胞死の結果として失われた細胞を置き換えるために必要に応じて増殖を再開することができる。いくつかの細胞は生涯を通じて継続的に分裂し、成体の多細胞動物においてターンオーバー率の高い細胞を置き換える。分化細胞の例は、限定するものではないが、骨髄、皮膚、骨格筋、脂肪組織および末梢血から選択される組織からの細胞を含む。例示的な分化細胞タイプは、限定するものではないが、線維芽細胞、肝細胞、筋芽細胞、ニューロン、骨芽細胞、破骨細胞、およびリンパ球を含む。

【 0 0 3 9 】

癌細胞は制御されていない増殖が可能な細胞であり、それによって癌細胞は有機体中で 固形腫瘍を形成、または、血液を大量流出させる。癌細胞は、通常、細胞培養物分裂に関与する遺伝子が、例えば、変異またはウイルス感染によって改変された場合に形成される。そのような改変は、自然にまたは人工的に誘導され得る。培養では、癌細胞を使用して 細胞培養物を生成することができる。例えば、自然に発生または誘発された癌から細胞を 単離することにより、不死化細胞株を作ることができる。そのような不死化細胞株のいくつかの例は、子宮頸部癌から得られたヒト HeLa 細胞、突然変異誘発後、分裂するこ とができる細胞を選択したマウス Raw 264.7 細胞である。

【 0 0 4 0 】

表現「改変細胞」および関連する用語および表現は、元の細胞またはそれらが由来する 細胞と比較して、任意の方法によって人工的に改変された細胞に由來した、または由来するすべての細胞を包含する。改変細胞は、初代細胞、二次細胞、幹細胞、培養された細胞 および / または他の改変細胞から作ることができる。改変は、限定するものではないが、 遺伝子改変または遺伝子操作を含み、この場合、改変細胞は「遺伝的に改変された」または「遺伝的に操作された」と表される。遺伝子改変は、改変している細胞に外来または異種核酸を取り込む結果になる様々な方法によって達成され得る。そのような方法のいくつかの例は、ウイルスまたはウイルスベクターによる形質導入、または細胞膜に一時的にでき た孔を通して単離された核酸のトランスクレプションである。他の改変は、起源細胞を 生物学的および非生物学的分子または因子、または、培養条件に曝すことを含む。改変細胞 のいくつかの例は、iPSC、遺伝子治療に使用されるもの（一例は、遺伝的に改変された免疫系細胞、CAR-T 細胞治療のために改変された T 細胞など；別の例は、遺伝子 編集された細胞、CRISPR/Cas9、TALEN または ZFN を使用して改変された細胞など）を含む遺伝的に改変された細胞である。

10

【 0 0 4 1 】

用語「容器」は、コンテナ、ディッシュ、プレート、フラスコ、ボトル、細胞培養チューブ、バイオリアクタなどを表し、エクスピボまたはインビトロで細胞、組織または器官 の培養、維持または増殖のために使用され得る。好適な容器は、例えば、マルチウェルプレート、マルチウェルプレートのウェル、ディッシュ、チューブ、フラスコ、ボトルおよ びリアクタを含む。

20

【 0 0 4 2 】

細胞に関して使用される用語「安定化する」および関連する用語および表現（例えば、「細胞を安定化する」）は、細胞死または老化などのネガティブな細胞応答の減少を表す。例えば、幹細胞および他の細胞は解離、単離、冷凍および / または解凍に応答して死に 得る。換言すれば、上記の条件は細胞生存率を低下させ得る。そこに記載される組成物、 方法およびキットの複数の実施形態は、細胞生存率の低下を軽減し、細胞生存を改善し得、これらは細胞安定化として記載され得る。

30

【 0 0 4 3 】**小分子**

用語「クロマン 1」は図 1 に示される構造を有する (3S) - N - { 2 - [2 - (ジメ チルアミノ)エトキシ] - 4 - (1H - ピラゾール - 4 - イル)フェニル } - 6 - メトキシ - 3 , 4 - ジヒドロ - 2H - 1 - ベンゾピラン - 3 - カルボキサミドを表す。クロマン 関連化合物または誘導体は、構造的に関連した化合物（クロマン部分含有 ROCK 阻害剤 ）である、そのうちのいくつかは、Chen ら「Chroman-3-amides as potent Rho kinase inhibitors」Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 18: 6406 - 6409 (2008) および Lograsso ら「Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Application to Inflammatory Disorders」Current Topics in Medicinal Chemistry 9: 704 - 723 (2009) に記載される。クロマン 1 およ

40

50

びその誘導体または関連化合物は塩として、または溶液中に供給され得る。

【0044】

用語「カスパーゼ阻害剤」は、カスパーゼの活性部位に可逆的または不可逆的に結合することによって作用する小分子を表す。それらは汎カスパーゼ阻害剤またはカスパーゼ特異的阻害剤として入手可能である。本発明のいくつかの実施形態において、カスパーゼ阻害剤はカスパーゼ-3阻害剤である。例示的なカスパーゼ-3阻害剤は、エムリカサン、Z-VAD-FMK (ベンジルオキシカルボニル-Va1-Ala-Asp(OMe)-フルオロメチルケトン)、Z-DQMD-FMK (Z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)フルオロメチルケトン)、Z-DEVD-FMK (ベンジルオキシカルボニル-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-フルオロメチルケトン)またはAc-DEVD-CHO (N-アセチル-Asp-Glu-Val-Aspアルデヒド)である。10

【0045】

用語「エムリカサン」は、図1に示される構造を有する3-(2-(2-tert-ブチルフェニルアミノオキサリル)アミノプロピオニルアミノ)-4-オキソ-5-(2,3,5,6-テトラフルオロフェノキシ)ペンタン酸を表す。エムリカサン関連化合物または誘導体は、構造的に関連した化合物 (Q-VD-OPh水和物など) であり、そのうちのいくつかはLintonら「First-in-Class Pan Caspase Inhibitor Developed for the Treatment of Liver Disease」J. Med. Chem. 48: 6779-6782、(2005)に記載されている。エムリカサン、その誘導体または関連化合物は塩として、または溶液中に供給され得る。20

【0046】

用語「ISRB」または「ISRB (トランス異性体)」と互換的に使用され得る用語「トランス-ISRB」は、図1に示される構造を有するN,N'-(1r,4r)-シクロヘキサン-1,4-ジイル)ビス(2-(4-クロロフェノキシ)アセトアミド)を表す。Sidrauskiらの「Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory」eLIFE 2:e00498 (2013)中に記載されるように、シス-ISRB (IC₅₀=600nM)よりトランス-ISRBは100倍効力があり (IC₅₀=5nM)、細胞の標的との立体特異的相互作用を示唆する。トランス-ISRBは塩として、または溶液中に供給され得る。30

【0047】

用語「ポリアミン」は、本明細書に使用されるとき、図1に示される構造を有するポリカチオンであるポリカチオンプトレシン、スペルミジン、およびスペルミンのうちの1つ以上を表し、これらはDNA、RNAおよびタンパク質などの負に帯電した高分子と相互作用することが知られている。

【0048】

本発明の様々な実施形態を記載するために本文書において使用されるとき、用語「含む ("comprising")」および関連する用語 ("comprise"、"comprise"など)は、非限定的であり、それらが追加の要素およびを除外せず、用語「含む ("including"、"containing")」または「有する」と同義であることを意味する。本発明の一実施形態が用語「含む」を使用して記載されるとき、用語、含む、が用語「からなる」または「本質的にからなる」と置換される実施形態を含むことが意図される。換言すれば、用語「含む」および関連する用語を使用する本文書において記載される本発明の実施形態の記載はまた、「含む」の代わりに「からなる」または「本質的にからなる」を使用した関連する実施形態の記載を提供する。用語「からなる」は、記載中に特定されていない任意の要素 (ステップ、成分など) を除外する。用語「本質的にからなる」は、本発明の基本的なおよび新規な特徴に実質的に影響を与えない、本明細書で特定されていない要素のみを除外することを意図している。4050

【0049】

組成物

いくつかの実施形態において、本発明は、様々なタイプの哺乳類細胞の培養に使用することができる組成物を提供する。本組成物は、R O C K 阻害剤 (R h o キナーゼ (R O C K) の活性を阻害する化合物) を含み得る。例えば、本発明の実施形態による組成物は、本文書の「小分子」セクションにおいて記載されるようにクロマン1または関連分子を含み得る。別の例において、本発明の実施形態による組成物はクロマン1を含み得る。本組成物は、カスパーーゼ阻害剤 (アポトーシスの開始および実行に関与する1つ以上の細胞質のアスパラギン酸特異的システインプロテアーゼの活性を阻害する化合物) をさらに含み得る。カスパーーゼ阻害剤は、本文書の「小分子」セクションにおいて記載されるように、エムリカサンまたは関連分子、または、任意のカスパーーゼ阻害剤であり得る。組成物の実施形態の一例は、R O C K 阻害剤およびカスパーーゼ阻害剤を含む。いくつかの他の例は、クロマン1または関連分子およびエムリカサンを含む組成物、クロマン1およびエムリカサンまたは関連分子を含む組成物、クロマン1およびエムリカサンを含む組成物、R O C K 阻害剤およびエムリカサンまたは関連分子を含む組成物、またはR O C K 阻害剤およびエムリカサンを含む組成物である。R O C K 阻害剤 (クロマン1または関連分子など) に加えて、またはR O C K 阻害剤およびカスパーーゼ阻害剤 (エムリカサンまたは関連分子など) に加えて、本発明の実施形態による本組成物は、トランス - I S R I B およびポリアミンのうちの1つまたは両方をさらに含み得る。本発明の実施形態の文脈において、上記したように、それらの成分のそれが別個にまたは成分の組み合わせは、「活性剤 ("active agent" または "active agents")」として言及され得る。

【0050】

本発明の実施形態による組成物の様々な配合物が想定される。例えば、本発明の実施形態による組成物のいくつかの実施形態は、例えば、培養培地などの培地、添加物として配合され得、培養培地に添加するとそれぞれの活性剤の有効濃度または有効量を提供するのに十分な量の1つ以上の活性剤を含む。本発明の実施形態の文脈において、有効濃度または有効量は、それぞれ、例えば、限定するものではないが、生存の改善 (生存率)、細胞安定化、増殖の改善、細胞死の減少、老化の減少、増殖の改善、分化の改善など、その組成物が曝露された細胞に所望の効果を引き出す1つ以上の活性剤の濃度または量である。

【0051】

例えば、1つ以上の本発明の実施形態による組成物は、培養培地などの培地に取り込まれたとき、約4nM～約80μM、約10nM～約20μM、約20nM～約10μMまたは約30nM～約500nM、例えば約4nM、5nM、30nM、55nM、80nM、105nM、130nM、155nM、180nM、205nM、230nM、255nM、280nM、305nM、330nM、355nM、380nM、405nM、430nM、455nM、480nM、500nM、525nM、550nM、575nM、600nM、625nM、650nM、675nM、700nM、725nM、750nM、775nM、800nM、825nM、850nM、875nM、900nM、925nM、950nM、975nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、11μM、12μM、13μM、14μM、15μM、16μM、17μM、18μM、19μM、20μM、21μM、22μM、23μM、24μM、25μM、26μM、27μM、28μM、29μM、30μM、31μM、32μM、33μM、34μM、35μM、36μM、37μM、38μM、39μM、40μM、45μM、45μM、45μM、50μM、55μM、60μM、65μM、70μM、75μMまたは80μMなどの濃度のクロマン1（またはその活性誘導体または関連化合物）を提供するように配合され得る。別の例において、本発明の実施形態による組成物は、培養培地などの培地に取り込まれたとき、約5nM～約100μM、約5nM～約80μM、約200nM～約30μM、約300nM～約20μM、例えば、約100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM、550nM、600nM、650nM、700nM、750n

10

20

30

40

50

M、800nM、850nM、1μM、1.5μM、2μM、2.5μM、3μM、3.5μM、4μM、4.5μM、5μM、5.5μM、6μM、6.5μM、7μM、7.5μM、8μM、8.5μM、9μM、9.5μM、10μM、10.5μM、11μM、11.5μM、12μM、12.5μM、13μM、13.5μM、14μM、14.5μM、15μM、15.5μM、16μM、16.5μM、17μM、17.5μM、18μM、18.5μM、19μM、19.5μM、20μM、21μM、22μM、23μM、24μM、25μM、26μM、27μM、28μM、29μM、30μM、31μM、32μM、33μM、34μM、35μM、36μM、37μM、38μM、39μM、40μM、45μM、45μM、50μM、55μM、60μM、65μM、70μM、75μM、80μM、75μM、80μM、85μM、90μM、95μMまたは100μMなどの濃度のエムリカサン（またはその活性誘導体または関連化合物）を提供するように配合され得る。もう1つの例において、本発明の実施形態による組成物は、培養培地などの培地に取り込まれたとき、約5nM～約80μM、約5nM～約50μM、約100nM～約6.25μM、または約200nM～約6.25μM、例えば、約50nM、100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM、550nM、600nM、650nM、700nM、750nM、800nM、850nM、1μM、1.25μM、1.5μM、1.75μM、2μM、2.25μM、2.5μM、2.75μM、3μM、3.25μM、3.5μM、3.75μM、4μM、4.25μM、4.5μM、4.75μM、5μM、5.25μM、5.5μM、5.75μM、6μM、6.25μM、6.5μM、7μM、7.5μM、8μM、8.5μM、9μM、9.5μM、10μM、10.5μM、11μM、11.5μM、12μM、12.5μM、13μM、13.5μM、14μM、14.5μM、15μM、15.5μM、16μM、16.5μM、17μM、17.5μM、18μM、18.5μM、19μM、19.5μM、20μM、21μM、22μM、23μM、24μM、25μM、26μM、27μM、28μM、29μM、30μM、31μM、32μM、33μM、34μM、35μM、36μM、37μM、38μM、39μM、40μM、45μM、45μM、50μM、55μM、60μM、65μM、70μM、75μMまたは80μMの濃度のトランス-ISRIBを提供するように配合され得る。さらにもう1つの例において、本発明の実施形態による組成物は、培養培地などの培地に取り込まれたとき、約0.5nM～1mM、例えば、約0.5nM、20.5nM、40.5nM、60.5nM、80.5nM、100.5nM、120.5nM、140.5nM、160.5nM、180.5nM、200.5nM、220.5nM、240.5nM、260.5nM、280.5nM、300.5nM、320.5nM、340.5nM、360.5nM、380.5nM、400.5nM、400.5nM、420.5nM、440.5nM、460.5nM、480.5nM、0.5μM、20.5μM、40.5μM、60.5μM、80.5μM、100.5μM、120.5μM、140.5μM、160.5μM、180.5μM、200.5μM、220.5μM、240.5μM、260.5μM、280.5μM、300.5μM、320.5μM、340.5μM、360.5μM、380.5μM、400.5μM、420.5μM、440.5μM、460.5μM、480.5μM、500.5μM、520.5μM、540.5μM、560.5μM、580.5μM、600.5μM、620.5μM、640.5μM、660.5μM、680.5μM、700.5μM、720.5μM、740.5μM、760.5μM、780.5μM、800.5μM、820.5μM、840.5μM、860.5μM、880.5μM、900.5μM、920.5μM、940.5μM、960.5μM、980.5μMまたは1mMの濃度のスペルミンを提供するためにポリアミンを含むように配合され得る。さらにもう1つの例において、本発明の実施形態による組成物は、培養培地などの培地に取り込まれたとき、約0.5μM～1mM、例えば、おおよそ0.5nM、20.5nM、40.5nM、60.5nM、80.5nM、100.5nM、120.5nM、140.5nM、160.5nM、180.5nM、200.5nM、220.5nM、240.5nM、260.5nM、280.5nM、300.5nM、320.5nM、340.5nM、360.5nM、380.5nM、400.5nM、420.5nM、440.5nM、460.5nM、480.5nM、500.5nM、520.5nM、540.5nM、560.5nM、580.5nM、600.5nM、620.5nM、640.5nM、660.5nM、680.5nM、700.5nM、720.5nM、740.5nM、760.5nM、780.5nM、800.5nM、820.5nM、840.5nM、860.5nM、880.5nM、900.5nM、920.5nM、940.5nM、960.5nM、980.5nMまたは1mMの濃度のスペルミンを提供するためにポリアミンを含むように配合され得る。

320.5 nM、340.5 nM、360.5 nM、380.5 nM、400.5 nM、
 420.5 nM、440.5 nM、460.5 nM、480.5 nM、0.5 μM、20
 .5 μM、40.5 μM、60.5 μM、80.5 μM、100.5 μM、120.5 μ
 M、140.5 μM、160.5 μM、180.5 μM、200.5 μM、220.5 μ
 M、240.5 μM、260.5 μM、280.5 μM、300.5 μM、320.5 μ
 M、340.5 μM、360.5 μM、380.5 μM、400.5 μM、420.5 μ
 M、440.5 μM、460.5 μM、480.5 μM、500.5 μM、520.5 μ
 M、540.5 μM、560.5 μM、580.5 μM、600.5 μM、620.5 μ
 M、640.5 μM、660.5 μM、680.5 μM、700.5 μM、720.5 μ
 M、740.5 μM、760.5 μM、780.5 μM、800.5 μM、820.5 μ
 M、840.5 μM、860.5 μM、880.5 μM、900.5 μM、920.5 μ
 M、940.5 μM、960.5 μM、980.5 μMまたは1 mMの濃度のスペルミジ
 ンを提供するためにポリアミンを含むように配合され得る。さらにもう1つの例において
 、本発明の実施形態による組成物は、培養培地などの培地に取り込まれたとき、約0.5
 μM~1 mM、例えば、おおよそ0.5 nM、20.5 nM、40.5 nM、60.5 n
 M、80.5 nM、100.5 nM、120.5 nM、140.5 nM、160.5 nM
 、180.5 nM、200.5 nM、220.5 nM、240.5 nM、260.5 nM
 、280.5 nM、300.5 nM、320.5 nM、340.5 nM、360.5 nM
 、380.5 nM、400.5 nM、420.5 nM、440.5 nM、460.5 nM
 、480.5 nM、0.5 μM、20.5 μM、40.5 μM、60.5 μM、80.5
 μM、100.5 μM、120.5 μM、140.5 μM、160.5 μM、180.5
 μM、200.5 μM、220.5 μM、240.5 μM、260.5 μM、280.5
 μM、300.5 μM、320.5 μM、340.5 μM、360.5 μM、380.5
 μM、400.5 μM、420.5 μM、440.5 μM、460.5 μM、480.5
 μM、500.5 μM、520.5 μM、540.5 μM、560.5 μM、580.5
 μM、600.5 μM、620.5 μM、640.5 μM、660.5 μM、680.5
 μM、700.5 μM、720.5 μM、740.5 μM、760.5 μM、780.5
 μM、800.5 μM、820.5 μM、840.5 μM、860.5 μM、880.5
 μM、900.5 μM、920.5 μM、940.5 μM、960.5 μM、980.5
 μMまたは1 mMの濃度のプロトレシンを提供するためにポリアミンを含むように配合され
 得る。
 10
 20
 30
 40

【0052】

1つ以上の活性剤に加えて、本発明の実施形態による培養培地添加剤などの培地添加剤
 は、限定するものではないが、D M E M / F 1 2 、アスコルビン酸、インスリン、セレン
 、トランスフェリン、N a H C O 3 、線維芽細胞成長因子2 (F G F - 2) 、形質転換増
 殖因子ベータ (T G F -) などの他の成分を含み得る。本発明の実施形態による培地添
 加剤は、培養培地などの培地に簡単に取り込まれるように配合される。例えば、本発明
 の実施形態による培地添加剤は、水性培養培地に簡単に溶解可能な粉末形態において、タ
 ブレットとして、またはカプセルとして提供され得る。別の例において、本発明の実施形
 態による培地添加剤は、培養培地などの培地に添加される濃縮溶液として、または懸濁液
 として提供され得る。

【0053】

本発明の実施形態による組成物のいくつかの他の実施形態は、上述の活性剤、および、
 それに加えてインピトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するよう
 に構成された成分を含む培地など、培地として配合され得る。培養培地などの培地の複数
 の実施形態は、R O C K 阻害剤 (R h o キナーゼ (R O C K) の活性を阻害する化合物)
 を含み得る。例えば、本発明の実施形態による培養培地などの培地は、本文書の「小分子」
 セクションにおいて記載されるようにクロマン1または関連分子を含み得る。別の例に
 において、本発明の実施形態による培養培地などの培地は、クロマン1を含み得る。培養培
 地などの培地は、カスパーゼ阻害剤をさらに含み得る。カスパーゼ阻害剤は、文書の「小
 50

分子」セクションにおいて記載されるようにエムリカサンまたは関連分子または任意の他のカスパーぜ阻害剤であり得る。培地の実施形態の一例は、ROCK阻害剤およびカスパーぜ阻害剤を含む。いくつかの他の例は、クロマン1または関連分子およびエムリカサンを含む培地、クロマン1およびエムリカサンまたは関連分子を含む培地、クロマン1およびエムリカサンを含む培地、ROCK阻害剤およびエムリカサンまたは関連分子を含む培地、またはROCK阻害剤およびエムリカサンを含む培地である。ROCK阻害剤（クロマン1または関連分子など）に加えて、または、ROCK阻害剤およびカスパーぜ阻害剤（エムリカサンまたは関連分子など）に加えて、本発明の実施形態による培地は、トランス-ISRIBおよびポリアミンのうちの1つまたは両方をさらに含み得る。

【0054】

調製形態において、本発明の実施形態による培養培地などの培地は、有効濃度または有効量の1つ以上の活性成分を含む。例えば、1つ以上の本発明の実施形態による培地は、約4nM～約80μM、約10nM～約20μM、約20nM～約10μMまたは約30nM～約500nM、例えば、約4nM、5nM、30nM、55nM、80nM、105nM、130nM、155nM、180nM、205nM、230nM、255nM、280nM、305nM、330nM、355nM、380nM、405nM、430nM、455nM、480nM、500nM、525nM、550nM、575nM、600nM、625nM、650nM、675nM、700nM、725nM、750nM、775nM、800nM、825nM、850nM、875nM、900nM、925nM、950nM、975nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、11μM、12μM、13μM、14μM、15μM、16μM、17μM、18μM、19μM、20μM、21μM、22μM、23μM、24μM、25μM、26μM、27μM、28μM、29μM、30μM、31μM、32μM、33μM、34μM、35μM、36μM、37μM、38μM、39μM、40μM、45μM、45μM、50μM、55μM、60μM、65μM、70μM、75μMまたは80μMなどの濃度でクロマン1（またはその活性誘導体または関連化合物）を含み得る。

別の例において、1つ以上の本発明の実施形態による培地は、約5nM～約100μM、約5nM～約80μM、約200nM～約30μM、約300nM～約20μM、例えば、約100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM、550nM、600nM、650nM、700nM、750nM、800nM、850nM、1μM、1.5μM、2μM、2.5μM、3μM、3.5μM、4μM、4.5μM、5μM、5.5μM、6μM、6.5μM、7μM、7.5μM、8μM、8.5μM、9μM、9.5μM、10μM、10.5μM、11μM、11.5μM、12μM、12.5μM、13μM、13.5μM、14μM、14.5μM、15μM、15.5μM、16μM、16.5μM、17μM、17.5μM、18μM、18.5μM、19μM、19.5μM、20μM、21μM、22μM、23μM、24μM、25μM、26μM、27μM、28μM、29μM、30μM、31μM、32μM、33μM、34μM、35μM、36μM、37μM、38μM、39μM、40μM、45μM、45μM、50μM、55μM、60μM、65μM、70μM、75μM、80μM、85μM、90μM、95μMまたは100μMなどの濃度でエムリカサン（またはその活性誘導体または関連化合物）を含み得る。

もう1つの例において、1つ以上の本発明の実施形態による培地は、約5nM～約80μM、約5nM～約50μM、約100nM～約6.25μM、または約200nM～約6.25μM、例えば、約50nM、100nM、150nM、200nM、250nM、300nM、350nM、400nM、450nM、500nM、550nM、600nM、650nM、700nM、750nM、800nM、850nM、1μM、1.25μM、1.5μM、1.75μM、2μM、2.25μM、2.5μM、2.75μM、3μM、3.25μM、3.5μM、3.75μM、4μM、4.25μM、4.5μM、4.75μM、5μM、5.25μM、5.5μM、5.75μM、6μM、6.25μM、6.5μM、6.75μM、7μM、7.25μM、7.5μM、7.75μM、8μM、8.25μM、8.5μM、8.75μM、9μM、9.25μM、9.5μMまたは10μMなどの濃度でエムリカサン（またはその活性誘導体または関連化合物）を含み得る。

10

20

30

40

50

5 μM、6.5 μM、7 μM、7.5 μM、8 μM、8.5 μM、9 μM、9.5 μM、
 10 μM、10.5 μM、11 μM、11.5 μM、12 μM、12.5 μM、13 μM
 、13.5 μM、14 μM、14.5 μM、15 μM、15.5 μM、16 μM、16.
 5 μM、17 μM、17.5 μM、18 μM、18.5 μM、19 μM、19.5 μM、
 20 μM、21 μM、22 μM、23 μM、24 μM、25 μM、26 μM、27 μM、
 28 μM、29 μM、30 μM、31 μM、32 μM、33 μM、34 μM、35 μM、
 36 μM、37 μM、38 μM、39 μM、40 μM、45 μM、45 μM、50 μM、
 55 μM、60 μM、65 μM、70 μM、75 μMまたは80 μMの濃度でトランス-
 ISRIBを含み得る。

さらにもう1つの例において、1つ以上の本発明の実施形態による培地は、約0.5 nM～1 mM、例えば、約0.5 nM、20.5 nM、40.5 nM、60.5 nM、80.5 nM、100.5 nM、120.5 nM、140.5 nM、160.5 nM、180.5 nM、200.5 nM、220.5 nM、240.5 nM、260.5 nM、280.5 nM、300.5 nM、320.5 nM、340.5 nM、360.5 nM、380.5 nM、400.5 nM、420.5 nM、440.5 nM、460.5 nM、480.5 nM、0.5 μM、20.5 μM、40.5 μM、60.5 μM、80.5 μM、100.5 μM、120.5 μM、140.5 μM、160.5 μM、180.5 μM、200.5 μM、220.5 μM、240.5 μM、260.5 μM、280.5 μM、300.5 μM、320.5 μM、340.5 μM、360.5 μM、380.5 μM、400.5 μM、420.5 μM、440.5 μM、460.5 μM、480.5 μM、500.5 μM、520.5 μM、540.5 μM、560.5 μM、580.5 μM、600.5 μM、620.5 μM、640.5 μM、660.5 μM、680.5 μM、700.5 μM、720.5 μM、740.5 μM、760.5 μM、780.5 μM、800.5 μM、820.5 μM、840.5 μM、860.5 μM、880.5 μM、900.5 μM、920.5 μM、940.5 μM、960.5 μM、980.5 μMまたは1 mMの濃度のスペルミンを培地中に生じるようにポリアミンを含み得る。

さらにもう1つの例において、1つ以上の本発明の実施形態による培地は、約0.5 nM～1 mM、例えば、おおよそ0.5 nM、20.5 nM、40.5 nM、60.5 nM、80.5 nM、100.5 nM、120.5 nM、140.5 nM、160.5 nM、180.5 nM、200.5 nM、220.5 nM、240.5 nM、260.5 nM、280.5 nM、300.5 nM、320.5 nM、340.5 nM、360.5 nM、380.5 nM、400.5 nM、420.5 nM、440.5 nM、460.5 nM、480.5 nM、0.5 μM、20.5 μM、40.5 μM、60.5 μM、80.5 μM、100.5 μM、120.5 μM、140.5 μM、160.5 μM、180.5 μM、200.5 μM、220.5 μM、240.5 μM、260.5 μM、280.5 μM、300.5 μM、320.5 μM、340.5 μM、360.5 μM、380.5 μM、400.5 μM、420.5 μM、440.5 μM、460.5 μM、480.5 μM、500.5 μM、520.5 μM、540.5 μM、560.5 μM、580.5 μM、600.5 μM、620.5 μM、640.5 μM、660.5 μM、680.5 μM、700.5 μM、720.5 μM、740.5 μM、760.5 μM、780.5 μM、800.5 μM、820.5 μM、840.5 μM、860.5 μM、880.5 μM、900.5 μM、920.5 μM、940.5 μM、960.5 μM、980.5 μMまたは1 mMの濃度のスペルミジンを培地中に生じるようにポリアミンを含み得る。

さらにもう1つの例において、1つ以上の本発明の実施形態による培地は、約0.5 nM～1 mM、例えば、おおよそ0.5 nM、20.5 nM、40.5 nM、60.5 nM、80.5 nM、100.5 nM、120.5 nM、140.5 nM、160.5 nM、180.5 nM、200.5 nM、220.5 nM、240.5 nM、260.5 nM、280.5 nM、300.5 nM、320.5 nM、340.5 nM、360.5 nM、380.5 nM、400.5 nM、420.5 nM、440.5 nM、460.5 nM、480.5 nM、0.5 μM、20.5 μM、40.5 μM、60.5 μM、80.5 μM、100.5 μM、120.5 μM、140.5 μM、160.5 μM、180.5 μM、200.5 μM、220.5 μM、240.5 μM、260.5 μM、280.5 μM、300.5 μM、320.5 μM、340.5 μM、360.5 μM、380.5 μM、400.5 μM、420.5 μM、440.5 μM、460.5 μM、480.5 μM

10

20

30

40

50

M、100 . 5 μM、120 . 5 μM、140 . 5 μM、160 . 5 μM、180 . 5 μM
 M、200 . 5 μM、220 . 5 μM、240 . 5 μM、260 . 5 μM、280 . 5 μM
 M、300 . 5 μM、320 . 5 μM、340 . 5 μM、360 . 5 μM、380 . 5 μM
 M、400 . 5 μM、420 . 5 μM、440 . 5 μM、460 . 5 μM、480 . 5 μM
 M、500 . 5 μM、520 . 5 μM、540 . 5 μM、560 . 5 μM、580 . 5 μM
 M、600 . 5 μM、620 . 5 μM、640 . 5 μM、660 . 5 μM、680 . 5 μM
 M、700 . 5 μM、720 . 5 μM、740 . 5 μM、760 . 5 μM、780 . 5 μM
 M、800 . 5 μM、820 . 5 μM、840 . 5 μM、860 . 5 μM、880 . 5 μM
 M、900 . 5 μM、920 . 5 μM、940 . 5 μM、960 . 5 μM、980 . 5 μM
 Mまたは1 mMの濃度のプロトレシンを培地中に生じるようにポリアミンを含み得る。

10

【0055】

本発明の実施形態による培地は、使用前に調製される粉末形態において、使用前に希釈される濃縮形態において、またはさらなる希釈なしに使用される形態において提供され得ることを理解されたい。上記の有効量は、希釈なしに使用できるその調製された「作業（“working”）」形態を参照する。例えば、本発明の実施形態による培地は、希釈なしに使用される「使用液」として供給される滅菌液であり得、この場合、培地は有効量の、上記の1つ以上の活性剤を含む。別の非限定的な例において、培地は、有効量の、1つ以上の活性剤を含むゲルであり得る。本発明の実施形態による培地は、液体（真溶液、懸濁液およびエマルジョンを含む）、半固体またはゲルなどの固体であり得る。本発明の実施形態による培地が粉末または濃縮物などのさらなる調製を必要とする形態において提供されるとき、1つ以上の活性剤は、培地が調製された後、好適な有効量を提供するように意図された量または濃度で含まれる。例えば、2×濃縮された培地は、培地の最終「作用」形態において含まれるように意図された1つ以上の活性剤の2倍の有効量を含み得る。

20

【0056】

上記の有効量の1つ以上の活性剤に加えて、本発明の実施形態による培地は、インピトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された成分を含む。胚性細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞、変更された細胞などの様々なタイプの哺乳類細胞を支持可能な培地のバリエーションが想定される。単一細胞、複数の細胞、細胞培養物、細胞凝集物、組織培養物、組織、器官、胞胚葉、胚様体またはヒト胚および非ヒト胚を含む胚を支持可能な培地のバリエーションが想定される。

30

【0057】

本発明の実施形態による培養培地などの培地は、哺乳類細胞の増殖および/または維持のための1つ以上の適切な栄養源を含み、適切なpHおよび浸透圧を維持する。培地は、天然成分、人工成分および/または合成成分を含み得る。天然成分の例は、生物学的流体（血漿、血清、リンパ液または羊水など）、組織抽出物（肝臓、脾臓、腫瘍、白血球、骨髄または動物胚の抽出物など）である。人工成分（「人工培地」）を含む培養培地の例はMEMおよびD MEMである。人工培養培地は、血清含有培養培地、血清フリー培養培地（定義された量の、精製された成長因子、リポタンパク質、および血清によって提供される他の成分を含み得る）、既知組成培地またはタンパク質フリーの培養培地であり得る。培養培地などの培地は、1つ以上の緩衝液、1つ以上の無機塩、必須アミノ酸、グルコースなどの1つ以上の炭水化物、脂肪酸、脂質、ビタミン、微量元素を含み得る。緩衝液の一例は、気体状のCO₂が培養物のCO₃²⁻/HCO₃⁻の含有量のバランスを取りいわゆる天然の緩衝系である。別例は、4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ペラジンエタノスルホン酸（HEPES）、双性イオン性緩衝剤を使用するものなど、化学的緩衝系である。培地は、フェノールレッドなどのpH指示薬を含み得、それは細胞増殖中のpHモニタリングを可能にする。培地中の無機塩または塩は、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンを供給し、浸透圧バランスを提供し、および細胞膜電位の制御を補助する。細胞が合成できない必須アミノ酸は、培地に含まれるが、必須でないアミノ酸も

40

50

また細胞増殖および生存率の改善のために含まれ得る。グルコース、ガラクトース、マルトースまたはフルクトースなどの炭水化物は、エネルギー源として含まれる。特に血清フリー培地には、脂肪酸および脂質だけでなく、アルブミン、トランスフェリン、またはフィブロネクチンなどのタンパク質およびペプチドもまた、含まれ得る。細胞の成長および増殖に必須なビタミンB群などのビタミンもまた含まれ得る。培地、特に血清振りの培地に添加される微量元素の例は、銅、亜鉛およびセレンである。培地の実施形態のいくつかの例は、限定するものではないが、Essential 8 Medium、CTS Essential 8 Medium、Essential 6 Medium、StemFlex Medium、CTS KnockOut SR Xeno-free Medium、KnockOut Serum Replacement、StemPro、mTeSR、mTeSR1、StemFit、Nutristem、NeurobasalまたはBrainPhysなどの有効量の本文書に記載された1つ以上の活性剤を含む市販の培地に基づく。

【0058】

本発明の実施形態による組成物は、本発明の一実施形態による培地と、少なくとも1つの哺乳類細胞とを含むインビトロまたはエクスピボ組成物を含む。そのような実施形態の少なくとも1つの哺乳類細胞は、同じタイプかまたは異なるタイプの1つの哺乳類細胞または複数の哺乳類細胞であり得る。例えば、哺乳類細胞は胚性細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞または改変された細胞であり得る。複数の哺乳類細胞は、多細胞、細胞培養物、細胞凝集物、組織培養物、組織、器官、胞胚葉、胚様体またはヒト胚および非ヒト胚を含む胚であり得る。少なくとも1つの哺乳類細胞は、解凍され得る。培地と少なくとも1つの哺乳類細胞とを含む本発明の実施形態のうちのいくつかは、バッグ、培養フラスコなどのフラスコ、培養ディッシュなどのディッシュ、チューブまたはリアクタなどの培地を含む容器をさらに含み得ることが理解される。培地と少なくとも1つの哺乳類細胞とを含む本発明の実施形態のうちのいくつかは、細胞のための支持部または足場をさらに含み得ることが理解される。培養培地と少なくとも1つの哺乳類細胞とを含む本発明の実施形態のうちのいくつかの非限定的な例は、E8 Essential培地および少なくとも1つの多能性幹細胞、mTeSR培地および少なくとも1つの多能性幹細胞、StemProおよび少なくとも1つの多能性幹細胞、E6 Essential培地および少なくとも1つの胚様体、Neurobasalおよび少なくとも1つのニューロン、BrainPhysおよび少なくとも1つのニューロンである。

【0059】

キット

細胞、組織または器官の培養、維持および/または保存のためのキットは、本発明の実施形態に含まれる。キットは、細胞（単一細胞および細胞群を含む）、組織または器官の培養、維持、または保存のための少なくともいくつかの構成要素を含む、一組の構成要素である。そのようなキットは、本文書の「小分子」セクションにおいて記載される1つ以上の活性剤を含む。キットは、1つ以上の以下のものをさらに含み得る：インビトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された培地、1つ以上の培養培地成分；培地を保持するための容器；フラスコ、ディッシュ、プレート（マルチウェルプレートを含む）またはリアクタなどの培養容器；細胞、組織または器官培養のための支持部または足場。キットは、1つ以上の哺乳類細胞を含み得る。キットに含まれる哺乳類細胞または細胞は、胚性細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞または改変された細胞のうちの1つ以上であり得る。1つ以上の哺乳類細胞は、冷凍形態または非冷凍形態において提供され得る。キットに含まれ得る他の成分の例は、小分子（例えば、WNT経路活性化のためのCHIR99021）または組換えタンパク質（例えば、WNT3A、ソニック・ヘッジホッグ、骨

10

20

30

40

50

形成タンパク質またはアクチビン A) を含む生物学的シグナリング経路のモジュレータを含み得る。いくつかのキットは、本文書の「組成物」セクションにおいて記載される 1 つ以上の組成物を含み得る。

【 0 0 6 0 】

例えば、キットは、本文書の「組成物」セクションにおいて記載される培地、細胞培養のための容器、および任意選択的に、キットに含まれる培地中で培養されるのに好適な 1 つ以上の哺乳類細胞を含み得る。キットは、本文書の「組成物」セクションにおいて記載される培養培地、細胞培養のための容器、少なくとも 1 つの足場の支持部、および任意選択的にキットに含まれる培養培地中で培養されるのに好適な 1 つ以上の動物細胞を含み得る。一例は、Essential 8 Medium と、本発明の実施形態による 1 つ以上の活性剤（培養培地中に含まれ得るか、または、使用前に培養培地に添加される個別のキット成分として供給され得る）と、ビトロネクチン、ラミニン 521 または Matrigel でコーティングされた様々なサイズの細胞培養プレートまたはフ拉斯コとを含むキットである。もう 1 つの例において、キットは本文書の「組成物」セクションにおいて記載される培地と、細胞、細胞群、組織、胚種（embryos）、器官または器官部分の培地中での維持または保存のための容器とを含み得る。

【 0 0 6 1 】

使用および方法

本文書にわたって記述された組成物およびキットの使用について、様々な使用法および方法（プロセス）が本発明の実施形態で想定され、含まれる。例えば、本文書の「小分子」セクションにおいて記載される化合物、「活性剤」とも表されるが、これらの様々な組み合わせは、限定するものではないが、幹細胞（例えば、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞および成体幹細胞）、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、細胞および様々なタイプの改変細胞（iPSC および遺伝的に改変された細胞または遺伝子操作された細胞を含む）を含む動物細胞の培養方法、維持方法、または保存方法において有利に使用され得る。本発明の実施形態による哺乳類細胞の培養方法、維持方法、または保存方法は、限定するものではないが、細胞の成長、細胞の増殖、細胞の分化、細胞の脱分化、細胞における分化能（多能性を含む）の誘導、培養中の細胞の単一細胞クローニング（培養）、凍結保存、および維持のうちの 1 つ以上を含む方法を含む。細胞、細胞群、組織、器官部分、器官または胚のエクスピリオ保存は、本発明の実施形態による方法に含まれる。本発明の実施形態による哺乳類細胞の培養方法は、出発材料、プロセス中間体または最終産物のうちの 1 つ以上として単一細胞または複数の細胞を使用し得る。複数の哺乳類細胞は、複数の細胞（例えば、解離された細胞の懸濁液または懸濁細胞培養液）、細胞培養物（接着または非接着細胞培養など）、凝集した細胞、組織培養物、組織（人工的に操作された培養組織を含む）、器官、胞胚葉、胚様体、またはヒト胚および非ヒト胚を含む胚であり得る。上に列挙した細胞および複数の細胞のカテゴリはオーバーラップし得る。本発明の方法の複数の実施形態は、非幹細胞および幹細胞（ESCs、iPSCs、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞および他の器官由来の幹細胞を含む成体幹細胞、または人工的に改変された幹細胞など）の両方の培養の適切なエンドポイント（例えば、細胞生存、細胞分化、または脱分化、細胞増殖など）によって測定される改善された結果につながり得る。

【 0 0 6 2 】

本発明の実施形態による方法の様々な使用および適用が想定される。一例において、本発明の実施形態による方法は、iPSC の作成および iPSC クローンの確立のためのプロセスを含む細胞のリプログラミングプロセスに組み込まれ得る。別の例において、本発明の実施形態による方法は、癌細胞および非癌細胞を含む初代細胞に由来する細胞株、および、ハイブリドーマ細胞株を含む新たな細胞株の樹立のプロセスに組み込まれ得る。本発明の方法にしたがって培養された哺乳類細胞は、培養前に解凍され得るか、または培養時に凍結され得る。したがって、本発明の方法のいくつかの実施形態は、解凍のステップ、冷凍のステップまたは両方を含み得る。したがって、いくつかの本発明の方法の実施形

10

20

30

40

50

態は、細胞の凍結保存および／または解凍のプロセスに組み込まれ得る。もう1つの例において、本発明の方法の実施形態は、組織、オルガノイドおよび器官の培養、成長および／または操作のために使用されるプロセスを含む、インビトロおよびエクスピボでの2次元および3次元培養における細胞の成長、増殖および／または分化のプロセスに組み込まれ得る。さらに別の例において、本発明の方法の実施形態は、インビトロおよび／またはエクスピボでの細胞、組織、オルガノイド、胚、器官部分またはオルガノイドの維持および保存のために使用されるプロセスを含む、インビトロおよび／またはエクスピボでのプロセス、すなわち細胞または細胞群の保存および／または維持に組み込まれ得る。いくつかの例において、インビトロおよび／またはエクスピボ維持または保存方法は、細胞、組織、オルガノイド、胚、器官部分またはオルガノイドのホストへの移植前に使用される。もう1つの例において、本発明の方法の実施形態は、哺乳類細胞のゲノム編集などの遺伝子改変のプロセスに組み込まれ得る。もう1つの例において、本発明の方法の実施形態は、単一細胞クローニングと呼ばれるプロセスおよび手順を含む哺乳類細胞のクローン選択のためのプロセスに組み込まれ得る。本発明の実施形態による方法は、有利には、前臨床研究および臨床適用のためのiPSCのゲノム編集など、様々なプロセスにおける単一細胞クローニングの結果の改善に使用され得る。そのような適用のいくつかの例は、個別細胞治療による遺伝的欠陥の修正、疾患モデリングのための遺伝子変異の導入、または創薬用のレポーター細胞株作成のための導入遺伝子の導入である。もう1つの例においては、本発明の方法の複数の実施形態は、哺乳類細胞から胚様体を生成するプロセスに組み込まれ得る。

10

20

【0063】

本発明の実施形態による方法は、とりわけ、体細胞（皮膚線維芽細胞または血液細胞など）からの新たなiPSC株の効率的な作成、iPSCまたは胚性幹細胞の増殖、拡大培養および／または分化、iPSCおよび／または胚性幹細胞（ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、網膜色素上皮、肝細胞、心筋細胞またはインスリンを産生可能な膵臓ペータ細胞など）から分化した異なる細胞タイプの効率的な利用、および／または患者試料からの新たな腫瘍細胞株の樹立に使用できる。本発明の実施形態による方法は、哺乳類細胞培養に通常使用される幅広い培地を使用できる。

30

【0064】

「活性剤」と表され得る本文書の「小分子」セクションにおいて記載される化合物の様々な組み合わせを含有する培養培地の製造方法、入手方法、または調製方法はまた、本発明の実施形態に含まれる。そのような方法は、本発明の実施形態による1つ以上の活性剤と培養培地の1つ以上の成分とを組み合わせる1つまたは複数のステップを含み得る。

【0065】

システム

本発明の方法を実行するためのシステムは、本発明の実施形態に含まれる。これらのシステムは、様々なステーションおよび／または構成要素を含む。本明細書に使用されるとき、用語「ステーション」は、広く定義され、任意の好適な装置またはアセンブリ、本発明の実施形態による方法を実行するために好適な装置または構成要素の集合体または集まりを含む。ステーションは、何らかの特定の方法で互いに一体的に接続または配置する必要はない。本発明の実施形態によるシステムは、互いに好適な配置のステーションを含み得る。例えば、ステーションは同じ部屋内にある必要さえない。しかし、いくつかの実施形態において、ステーションは互いに接続された一体的なユニットである。

40

【0066】

例えば、システムの一実施形態は、iPSCまたは胚性幹細胞または癌細胞株の増殖、拡大培養、および分化が可能なCompact Select（商標）（Sartorius、Wilmington、DE）などのロボットまたは自動細胞培養のためのステーションを含み得る。システムの一実施形態は、報告を作成するためのステーションを含み得る。システムの一実施形態は、データ分析のためのステーションまたは構成要素を含み得る。システムの一実施形態は、コンピュータ、プロセッサ、電子メモリ、ソフトウェア

50

命令などを含み得る。システムの一実施形態またはそのシステムの実施形態の一部は、コンピュータによって制御され得る。

【0067】

コンピュータ・ベースの計算およびツール

本文書に記載される方法は、コンピュータ・ベースの計算およびツールを含み得る。ツールは、有利には、従来設計の汎用のコンピュータシステム（「ホストコンピュータ」と呼ばれる）によって実行可能なコンピュータプログラムの形態において提供され得る。ホストコンピュータは、多くの異なるハードウェア構成要素で構成され得、多くの寸法およびスタイル（例えば、デスクトップPC、ラップトップ、タブレットPC、ハンドヘルドコンピュータ、サーバ、ワークステーション、メインフレーム）において作られ得る。モニタ、キーボード、ディスクドライブ、CDドライブおよび／またはDVDドライブなどの標準構成要素が含まれてよい。ホストコンピュータがネットワークに接続されている場合、接続は任意の好適な輸送媒体（例えば、有線メディア、光学メディアおよび／または無線メディア）および任意の好適な通信プロトコル（例えば、TCP/IP）を介して提供され得る。ホストコンピュータは、好適なネットワーキングハードウェア（例えば、モデム、イーサネット（登録商標）カード、Wi-Fiカード）を含み得る。ホストコンピュータは、UNIX（登録商標）、Linux（登録商標）、Microsoft Windows（登録商標）、Mac OS、または任意の他のオペレーティング・システムを含む、任意の様々なオペレーティング・システムを実装し得る。

10

【0068】

本発明の態様を実装するためのコンピュータコードは、PERL、C、C++、Java（登録商標）、JavaScript（登録商標）、VBScript、awk、またはホストコンピュータ上で実行可能な、または、ホストコンピュータ上で実行するためにコンパイルすることが可能な任意の他のスクリプトまたはプログラミング言語を含む様々な言語において書かれ得る。コードはまた、アセンブリ言語または機械語などの低水準言語において書かれ、または配布されてよい。

20

【0069】

ホストコンピュータシステムは、有利には、インターフェースを提供し、ユーザはそれを介してツールの操作を制御する。本明細書に記載される例において、ソフトウェアツールは、スクリプト（例えば、PERLを使用）として実装され、その実行は、Linux（登録商標）またはUNIX（登録商標）などのオペレーティング・システムの標準的なコマンドライン・インターフェースから、ユーザによって開始することができる。コマンドは必要に応じて、オペレーティング・システムに適合され得る。他の実施形態において、グラフィカルユーザインターフェースが提供されてよく、ユーザは、ポインティングデバイスを使用して操作を制御することができる。したがって、本発明は、任意の特定のユーザインターフェースに限定されない。

30

【0070】

本発明の様々な特徴を組み込んだスクリプトまたはプログラムは、ストレージおよび／または伝送用のさまざまなコンピュータ可読メディアにエンコードされ得る。好適なメディアの例は、磁気ディスクまたはテープ、コンパクトディスク（CD）またはDVD（デジタル多用途ディスク）などの光記録媒体、フラッシュメモリ、およびインターネットを含む様々なプロトコルに準拠した有線、光学、および／または無線ネットワークを介した伝送に適合したキャリア信号を含む。

40

【0071】

利点

本明細書に記載される組成物、キットおよび方法は、以前の既知の組成物、キットおよび方法に対するいくつかの大規模な改善を提供する。利点のうちの1つは、ROCKキナゼ阻害剤として使用したとき、クロマン1の予期しない分化能および特異性である。別の利点は、クロマン1およびカスパーゼ阻害剤エムリカサンまたはその誘導体Q-VD-OPhによって示される、ルーチン的な細胞培養中の細胞の生存、正常な核型の維持しなが

50

らの細胞拡大培養、解凍した凍結保存細胞の培養、および単層培養、胚様体、ニューロスフェアまたはオルガノイドの細胞分化を含む細胞培養の結果の改善の予期しない相乗効果である。もう1つの利点は、細胞培養結果、特に細胞選別、単一細胞クローニング、細胞リプログラミング、凍結保存および細胞解凍中に対する、クロマン1、エムリカサン、トランス-I S R I B およびポリアミンの組み合わせの予期しない優れた効果である。本発明の実施形態による活性剤の上記の予期しない利点は、細胞、組織および器官培養に使用する様々なプロセスおよび方法においてそれらの活性剤が有益に用いられることを可能にする。例えば、培養物の投薬は、低濃度の1つ以上の活性剤で実施することができ、したがって、とりわけ、大幅な経済的節約につながる。別の例において、本明細書に記載される組成物、方法およびキットは培養中の長期細胞株拡大培養の大変な改善結果を達成し、培養細胞の細胞機構に対する細胞培養添加剤のオフターゲット効果を最小限にする。ヒトプロテインキナーゼのセットに対するクロマン1の阻害活性のプロファイリングによって、Y-27632、チアゾビシン、ピリンテグリンおよびRevitacell(登録商標)(Thermo Fisher Scientific, Frederick, MD)およびCloneR(登録商標)(StemCell Technologies, バンクーバー、カナダ)などの現在使用されている添加物と比較して、培養培地添加物としての本化合物の優れた特性が実証された。本明細書に記載される組成物、キット、および方法はまた、単一細胞クローニングの大いに改善された結果を達成する。

【0072】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するのに役立つが、同時に、本発明の限定を構成することはない。それどころか、手段は、本明細書の説明を読んだ後、本発明の範囲から逸脱することなく当業者にそれ自体を示唆し得る様々な実施形態、修正および同等物であり得ることを明確に理解されたい。

【0073】

実施例1

単一細胞解離後のヒト多能性幹細胞の生存を促進する化合物の定量的ハイスループットスクリーニング

定量的ハイスループットスクリーニング(qHTS)を行い、単一細胞解離後の胚性幹細胞の生存を促進する化合物を同定した。図2にqHTS手順の概略図を示す。H9細胞(公式名称WA09、WiCell、Wisconsin)をAccutase(The Thermo Fisher Scientific)で酵素的に解離し、組換えビトロネクチンでコーティングされ、様々な濃度で15,333個の小分子化合物を含有する1536ウェルプレートに分配した。小分子化合物は、NCATS Pharmacologically Active Chemical Toolbox(NPACT)、NCATS Pharmaceutical Collection(NPC)、Mechanism Interrogation Plate(MIPE)、および、市販のライプラリであるTocris(Minneapolis, MN)のTocriscreen(登録商標)PlusおよびSigma-Aldrich(St. Louis, MI)のLOPAC1280(登録商標)を含む小分子ライプラリを元にしている。ジメチルスルホキシド(DMSO; 最終濃度0.4%)および10 μM Y-27632をそれぞれ陰性対照および陽性対照としてスクリーニングに使用した。播種後24時間で、生存している細胞の代わりに、細胞内のアデノシン三リン酸(ATP)レベルを計測するCellTiter-Glo(登録商標)発光細胞生存率アッセイ(Promega Corporation、Madison、WI)で細胞生存率を評価した。qHTS手順はInglesesら(2006)「Quantitative high-throughput screening: A titration-based approach that efficiently identifies biological activities in large chemical libraries」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(31):11473-11478(2006)において一般的に記載されている。

【0074】

図3は、スクリーニングされた化合物（X軸にプロットされる）によって達成された最大生存率の散布図である。スクリーニングされた全ての化合物は、所定の濃度で事前にブレーティングされた。図3の散布図を生成するために、生存値を $10\text{ }\mu\text{M}$ Y - 27632で得られた生存率に基づいて（100%として）正規化し、Y軸にプロットした。散布図中の異なるタイプのドットは、示されるように、用量曲線クラス1.1、1.2、2.1、および2.2で化合物を表す。「> 20%」とラベルされているドットは、20%カットオフより多い最大生存率につながったが、曲線クラス1.1、1.2、2.1または2.2に分類されなかった化合物を表す。20%生存率に設定した閾値によって、表1に列挙される128個の活性のある化合物を同定した。曲線の分類は、Huangら「Chemical genomics profiling of environmental chemical modulation of human nuclear receptors」Environ. Health. Perspect. 119(8):1142-1148(2011)、特に「qHTS Data Analysis」セクションおよび「Supplementary Materials」の表3において、説明される。10

【0075】

図4は、クロマン1、ファスジルHCL、チアゾビピンおよびY - 27632などのROCKを阻害することが知られる選択された活性化合物の用量反応曲線の折れ線グラフを示す。図4に示された直接比較によって、幹細胞分野において以前使用されていた他の3つのROCK阻害剤と比較してクロマン1の優位性が示された。選択されたROCK阻害剤のモル濃度をX軸（対数目盛）にプロットした。各濃度を4重反復実験で試験し、データを $10\text{ }\mu\text{M}$ のY - 27632から得られた平均CellTiterGlo（商標）（CTG）読み取り値に関して正規化した。このようにして、正規化されたデータをY軸にプロットした。用量反応実験により、クロマン1がY - 27632、チアゾビピンまたはファスジルより効力があることが明確に実証された。20

【0076】

図5は、細胞生存（ヨウ化プロピジウム陽性の死細胞の数が多い）についての $10\text{ }\mu\text{M}$ Y - 27632および 50 nM クロマン1の効果の直接比較を示す。H9細胞を標準的な手順にしたがって 0.5 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）またはAccutase（酵素的解離）で解離し、ビトロネクチンコーティングされた6ウェルプレートに播種した。細胞をブレーティングして12時間後に位相差および蛍光顕微鏡のデジタル画像を撮った（データは示していない）。蛍光顕微鏡画像を生成するために、生細胞をCalcein（ $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ；Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：C34852）で染色し、死細胞をヨウ化プロピジウム（PI； 500 nM ；Thermo Fisher Scientific、カタログ番号：P3566）で染色した。定量的分析のため、細胞を自動細胞カウンタ（Cellometer Auto 2000、Nexcelom）を使用して数えた。PI染色の結果を図5の右側のパネルに示される棒グラフに示す。上記の実験によって、Y - 27632処理は、クロマン1処理よりも多数の死細胞につながることが示された。30

【0077】

実施例2

クロマン1は、Y - 27632より効力があり、かつ、より特異的なROCK阻害剤である

実験的研究が行われ、クロマン1は、Y - 27632より効力があり、かつ、より特異的なROCK阻害剤であることが実証された。Y - 27632およびクロマン1それぞれの半数阻害濃度（IC₅₀）は、Reaction Biology Corporation（Malvern、PA）によって行われたHotSpotキナーゼアッセイを使用して、主な標的であるROCK1およびROCK2に対するキナーゼアッセイで決定された。結果を図6（Y - 27632）および図7（クロマン1）に示す折れ線グラフによつて示す。クロマン1は、Y - 27632より効力があるROCK阻害剤であることが決定40

10

20

30

40

50

された。

【0078】

キナーゼプロファイリング実験の結果を図8に示す。Y-27632およびクロマン1キナーゼプロファイリングは、Reaction Biology Corporationによって提供されたHot Spotキナーゼアッセイを使用して、ヒトキナーゼに対する阻害活性を試験することによって行われた。Y-27632は10 μMで試験され、クロマン1は50 nMで試験された。ヒトキナーゼの系統樹は、複数のヒトキナーゼドメイン(Manningら、「The protein kinase complement of the human genome」Science 298:1912-1934(2002))のタンパク質配列アラインメントに由来し、ClustalWソフトウェアによる近隣結合系統樹に基づいて生成された。キナーゼプロファイリングにより、試験した全てのヒトキナーゼで、より少ないオフターゲット阻害に基づくクロマン1のより高い特異性が明らかになった。元の活性の10%未満の値は、有意な阻害剤活性を表すと思われる(Anastassiadisら「Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity」Nat. Biotechnol. 29、1039-1045(2011)に基づく)。ROCK1およびROCK2は、Y-27632およびクロマン1の両方の主な標的として同定された。Y-27632は、PKC eta(PKCまたはPRKCHとしても知られる)、PKC epsilon(PKCまたはPRKCEとしても知られる)、PKC delta(PKCまたはPRKCDとしても知られる)、PKN1、PKN2およびPRKXを含むいくつかのオフターゲットを有することが示された。

【0079】

実施例3

組み合わせ論的マトリックススクリーニングおよびクロマン1およびエムリカサンでの改善された細胞生存

細胞生存における相乗効果のある化合物を同定するために、組み合わせ論的マトリックススクリーニングを行った。異なる作用機序を有する化合物に焦点を合わせ、29個の化合物を組み合わせ的なマトリックススクリーニングのために選択し、812セットの10 × 10 チェッカーボードマトリックス実験(データは示していない)となり、そのうちの4つを図9に示す。組み合わせ的なマトリックススクリーニングのための化合物の濃度を、単剤qHTS用量反応曲線に由来する傾きおよび効力(AC₅₀)に基づいて最適化し、マトリックススクリーニングが細胞生存率アッセイにおいて幅広い範囲の生物学的效果をカバーするようにした。単独で使用した10 μM Y-27632によって達成された細胞生存率を、100%細胞生存率の基準として設定し、全ての細胞生存値を正規化するために使用した。組み合わせ論的マトリックススクリーニングにより、カスパーゼ阻害剤エムリカサンおよびその誘導体Q-VD-OPhがクロマン1と相乗効果があるとして同定された。図9は、クロマン1とカスパーゼ阻害剤エムリカサンとの組み合わせ、およびクロマン1と(-)-プレビスタチンとの組み合わせの組み合わせ論的マトリックススクリーニングの結果を示す。プレビスタチンは非筋肉ミオシンIIA ATPaseの阻害剤であり、相乗効果のある化合物ペア(クロマン1およびエムリカサン)と相乗効果のない化合物ペア(クロマン1およびプレビスタチン)との違いを実証するために含められた。図9の上段に示される2つのマトリックスは10 μM Y-27632で達成された生存率(100%とみなす)に対して正規化された実際の細胞生存率データを示す。10 × 10 マトリックス内の数字は、示された組み合わせまたは単剤で達成された最大生存率を示す。化合物の各ペアで達成された最大生存率は、各10 × 10 マトリックスにおいて最大数で表され、その例を図9に示す。下段の2つのマトリックスは、最大単剤(highest-single agent(HSA))モデルを使用して計算された相乗効果マトリックスを示す。HAS相乗効果は、単剤単独と比較した化合物の組み合わせの生存促進効果を評価し、これは、組み合わせ外の細胞生存率と、試験した各濃度での最良の単剤からの

10

20

30

40

50

生存率の差として計算された。相乗効果は、組み合わせと単剤の最大応答との差として定義される（相乗効果 = 組み合わせ 最大（単剤 A、単剤 B））。

【0080】

図10は、クロマン1とエムリカサンとが組み合わされたときの改善された細胞生存率を示す。CellTiter-Glo（登録商標）アッセイを使用して、プレーティングの24時間後に生存しているH9細胞を定量化した（100,000細胞/cm²）。図11は、24時間の細胞挙動を監視するタイムラプス実験の位相差顕微鏡画像を示す（Incucyte Zoom（商標）Live Cell Analysis, Sartorius、DE）。画像を得るために、示された化合物（C+Eは50nM クロマン1および5μM エムリカサンの組み合わせを表す）の存在下、解離された単一細胞のH9細胞をピトロネクチンコーティングされたプレートに播種し、経時的に監視した。エムリカサン存在下でプレーティングの20分後に、細胞ストレスはすでに明らかであり、最終的に24時間で死細胞につながった。対照的に、クロマン1（細胞収縮性の阻害剤）単独で使用するとき、またはエムリカサンとの組み合わせにおいて使用するとき、プレーティングして20分で既に細胞接着を示した。上記の実験により、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせは、細胞接着および生存の最大効率のために必須であることが実証された。図11に示される実験的結果によって、エムリカサンは、カスパーゼ3の活性化を阻害することができるが、細胞収縮を妨げず、最終的に細胞死につながることが示された。したがって、カスパーゼ阻害剤エムリカサン単独の存在では、24時間を超えて細胞の生存率を改善するのに十分ではなかった。クロマン1を使用したROCKキナーゼ阻害がないと、細胞は収縮し続け、コーティング基材に接着せず、最終的に細胞死を起こした。

10

20

30

【0081】

実施例4

ルーチン的な継代および凍結保存細胞の解凍のクロマン1とエムリカサンとの組み合わせの処理後の改善された細胞生存率

以下に説明される実験的研究により、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせで処理された細胞の改善された細胞生存率が示された。一連の実験で、H9細胞が単一細胞に解離され、100,000細胞/cm²でピトロネクチンコーティングされたプレートに播種された。顕微鏡イメージング（Incucyte Zoom（登録商標）、データは示していない）によって経時的にカスパーゼ活性化とアポトーシスを継続的に監視するためにカスパーゼ3/7 green detection reagent（商品名）を使用した。大部分の細胞は、0.0001% v/v DMSOの存在下で、アポトーシスを起こした。10μM Y-27632の添加は効果があったが、50nM クロマン1の使用は、細胞生存率をさらに改善した。50nM クロマン1および5μM エムリカサンの組み合わせた使用は細胞生存率の効果を最大化した。CellTiter-Glo（登録商標）アッセイ（CTG）を使用し、播種24時間後に生存している細胞を計測した（データは示していない）。上述の解離されたH9細胞の実験的研究によって、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせは、陽性対照Y-27362または単独で使用されたクロマン1と比較して優れた細胞生存率につながったことが示された。

30

【0082】

別の一連の実験で、凍結されたH9細胞を解凍し、100,000細胞/cm²でピトロネクチンコーティングされたプレートに播種した。解離された細胞の上記の研究のように、カスパーゼ3/7 green detection reagent（商品名）を使用して、経時的にカスパーゼ活性化およびアポトーシスを監視した（データは示していない）。CTGアッセイを使用して、播種後24時間の生存している細胞を計測した。解凍した細胞の研究により、50nM クロマン1および5M エムリカサンの組み合わせは、陽性対照10μM Y-27362または単独で使用されたクロマン1と比較して優れた細胞生存率につながったことが示された。

40

【0083】

クロマン1単独、またはエムリカサンとの組み合わせを長期細胞培養に安全に使用する

50

ことができる事を実証するために、H9細胞の長期継代（40継代）を行った。各継代で、細胞を50nMクロマン1、または50nMクロマン1および5μMエムリカサンの組み合わせで24時間処理した。多能性細胞は、正常な核型を維持した。特定の抗体を使用した免疫細胞化学的分析により、長期拡大培養されたH9細胞が典型的な多能性関連遺伝子（OCT4、NANOG）を発現し、異なる系譜に分化可能であることが実証された。系譜マーカーを検出するために、細胞タイプ特異的なマーカーを使用して免疫細胞化学を行い、蛍光顕微鏡を使用して画像を生成した（データは示していない）。使用された系譜マーカーは、外胚葉のためにPAX6、中胚葉のためにBrachyuryおよび内胚葉のためにSOX17であった。

【0084】

10

実施例5

クロマン1およびエムリカサンの存在下で改善された細胞分化

胚様体形成アッセイによって、クロマン1およびエムリカサンの存在下で改善された細胞分化が実証された。一連の実験で、H9細胞をAccutaseで解離した。試験する異なる条件に、確実に同数の細胞を使用するために細胞をカウントした後、細胞を0.0001%v/v DMSO（陰性対照）、10μM Y-27632（陽性対照）、50nMクロマン1、5μMエムリカサンまたは50nMクロマン1および5μMエムリカサンの組み合わせの存在下で超低接着6ウェルプレートにプレーティングする。胚様体（EB）形成を細胞播種後24時間で調べた。プレートの顕微鏡検査によって、クロマン1およびエムリカサンの組み合わせは劇的にEB形成を改善し、かつ、DMSO、Y-27632、およびクロマン1と比較して死細胞の数および破片が減少する（データは示していない）ことが示された。

20

【0085】

30

異なる実験的アプローチにおいて（データは示していない）、定義された数のH9細胞をAggreWell（商標）プレート（StemCell Technologies、バンクーバー、カナダ）にプレーティングし、1ウェルあたり単一のEBを生成させた。胚様体（EB）形成を細胞播種後24時間で調べた。10μM Y-27632で処理したEBを死細胞が取り囲んでいたが、50nMクロマン1処理後、死細胞の量は有意に少なかった。5μMエムリカサン単独への曝露は、適切な細胞凝集およびEB形成につながらなかった。重要なことに、50nMクロマン1および5μMエムリカサンの組み合わせは、死細胞がほとんど検出されない高品質のEBを生成した。

30

【0086】

Accutaseで解離された多能性幹細胞（WA09、H9細胞とも呼ばれる、WI Cell、Madison、WIから入手）をAggreWell（商標）プレート（StemCell Technologies、バンクーバー、カナダ）に播種し、EBを生成させた。播種後24時間で明視野画像を撮影した。異なる処理条件下のEBの直径比較（データは示していない）により、50nMクロマン1単独または10μM Y-27632のいずれと比較しても、50nMクロマン1および5μMエムリカサンの使用は、より大きなEBを一貫して生成することが示された。

40

【0087】

Accutaseで解離されたH9細胞を96ウェルプレート（超低接着）に播種し、EBを生成させた。24時間後、カルセイン（緑色の染色、生細胞）およびPI（赤色の染色、死細胞）を細胞培養培地に添加し、ウェル内の生細胞および死細胞を可視化した。CTG計測による生細胞の定量によって、50nMクロマン1および5μMエムリカサンの組み合わせは、全ての試験した条件で最高の細胞生存率をもたらしたことが確かめられた。CTG計測（ATPレベル）（データは示していない）。

【0088】

実施例6

多能性細胞の改善された多系譜分化

50nMクロマン1および5μMエムリカサンの存在下の多能性細胞の改善された多

50

系譜分化が実験的に実証された（データは示していない）。Accutaseで解離された能性幹細胞（WiCellからのH9）を96ウェル超低接着プレートに播種し、EBを生成させ、Essential 6 Medium（Thermo-Fisher Scientific、Frederick、MD）中で培養し、自発的な分化を誘導させた。播種後7日目に個々に成長したEBに対して、外胚葉マーカーPAX6、中胚葉マーカーBrachyuryおよび内胚葉マーカーSOX17のmRNA発現をqPCRを使用して定量した。アクチンmRNA発現をEB間の細胞数の変動を正規化するために使用した。50nMクロマン1および5μMエムリカサンの組み合わせ（クロマン1+Emri）を使用したとき、全ての系譜固有のマーカーがより高いレベルで発現されていた。

【0089】

10

EB形成アッセイは、外胚葉、中胚葉および内胚葉への分化を実証することにより、多能性の測定を目的とした広く使用されているアプローチである。個々に成長したEBの分析および定量によってクロマン1およびエムリカサンを組み合わせた使用により、多系譜分化の3つのマーカー全て（PAX6、Brachyury、SOX17）を発現するEBの割合が実質的に増加することが示された（データは示していない）。この発見は、クロマン1およびエムリカサンの使用によって、EB形成アッセイの堅牢性を増大させ、細胞死による固有の系統的誤差が減少したことを示す。したがって、クロマン1およびエムリカサンを組み合わせた使用により、EB形成アッセイが改善され、多能性細胞株の真の分化能の分析を標準化するのに役立つ。

【0090】

20

実施例7

追加の細胞生存促進因子としてのトランス-ISRIBおよびポリアミンの同定

低細胞播種密度条件および単一細胞クローニングのためのクロマン1およびエムリカサンの使用の拡張および最大化のために、発明者らは、別の組み合わせ論的スクリーニング戦略を開発した。実験的研究が行われ、追加の細胞生存促進因子としてトランス-ISRIBおよびポリアミンを同定した。低細胞播種密度に付随する細胞ストレスを克服することができる化合物をスクリーニングするためにアッセイを開発した。本実験は、ウェルごとの単一細胞を検出するために、CTGアッセイの検出限界およびシグナル強度を定義することを目的とした。H9細胞（WiCellから入手）を使用した。実験の結果により、1536ウェルプレートの各ウェルに50個未満の細胞が播種されたとき、低播種密度に付随する細胞ストレスが明らかであることが示された（データをここに示す）。

30

【0091】

1ウェルに10個の細胞の播種密度を使用し、クロマン1およびエムリカサンとの潜在的な相乗効果のある追加の化合物をスクリーニングした。表2に、試験した化合物およびその濃度を示す。化合物は、50nMクロマン1および5μMエムリカサンの存在下で全て試験された。図12は、6ウェルフォーマットにおいてqHTSにより最初に同定された化合物の評価を示し、50nMクロマン1および5μMエムリカサンと組み合わせたトランス-ISRIBの細胞生存促進効果が実証された。解離した幹細胞を、X軸に示すウェルあたりの密度でビトロネクチンでコーティングされた1536ウェルプレートにプレーティングした。全てのプレートは二重反復実験で調製された。一方のセットのプレートを分配後すぐCTGで読み取り（r1）、他方の1セットを24時間後に読み取った（r2）。Y軸にプロットされたCTG倍率変化を、24時間以内の細胞生存および増殖を反映するためにr2のr1に対する比（r2/r1）として計算した。Y軸は、ベースラインとして使用されたクロマン1とエムリカサンと比較して、細胞の密集度によって測定された改善された細胞生存率の比を示す。X軸はクロマン1およびエムリカサンと組み合わせた化合物を示す。箱内の真ん中の線は細胞増殖の中央値である。箱の上ヒンジおよび下ヒンジは75%点および25%点を表すが、上部と下部のひげはボックスヒンジから、25%点と75%点との間の距離の1.5倍を超えない最大値または最小値まで伸びる。

40

【0092】

実験は、一次スクリーニングから得られた「ヒット」を評価して実施された。多能性幹

50

細胞 (W i C e l l から入手した H 9 細胞) を Try p L E (Thermo - Fisher) を使用して解離し、25 細胞 / cm² の密度で 6 ウェルプレートに播種した。50 nM クロマン 1、5 μM エムリカサン、ポリアミン (40 ng / mL プトレシン、4.5 ng / mL スペルミジン、8 ng / mL スペルミン) および 0.7 μM トランス - ISRIB の組み合わせ (この組み合わせは略語「C E P T」で呼ばれる) は、これらの実験で試験された他の条件と比較したとき、コロニーの数が最も多くなつた (データをここに示す)。

【0093】

図 13 は、次のように示される異なる小分子および小分子の組み合わせ (C E P T - 50 nM クロマン 1、5 μM エムリカサン、ポリアミン (40 ng / mL プトレシン、4.5 ng / mL スペルミジン、8 ng / mL スペルミン)、0.7 μM トランス - ISRIB、C + E - 50 nM クロマン 1、5 μM エムリカサン) ; C E T - 50 nM クロマン 1、5 μM エムリカサン、ポリアミン (40 ng / mL プトレシン、4.5 ng / mL スペルミジン、8 ng / mL スペルミン、Y - 27632 - 10 μM) で処理した H 9 細胞のコロニー形成率およびコロニーサイズを示す。図 14 は、Y - 27632 および C E P T で得られたコロニーの代表的な顕微鏡画像を示す。そのような顕微鏡画像を定量的に分析し、図 13 に示されるような棒グラフにプロットされるデータを生成した。ウェル全体の画像 (6 ウェルプレート) をカルセイングリーン (0.5 μg / mL; Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 : C 3 4 8 5 2) で撮影した。

10

20

30

【0094】

StemFlex 培地に 25 細胞 / cm² でビトロネクチン上にプレーティングされた hESC のコロニー数およびコロニーサイズに対する小分子の組み合わせおよびその効果の体系的な比較を行つた。コロニー形成率およびコロニーサイズの中央値の定量化は、プレーティングの 6 日後に行つた。C E T、C E P、および C E P T の組み合わせは、Y - 27632 および C + E と比較したとき、コロニー形成率およびコロニーサイズの中央値の両方に対して優れた効果を有することが示された。図 15 は、1 細胞 / well 条件として (96 ウェルプレート) プレーティングされた H 9 細胞を使用して行われた真の単一細胞クローニング実験の結果を示す。C E P T での処理は 10 μM における Y - 27632 での処理よりも有意に多くのクローンを生成した。

30

【0095】

上記の実験により、クロマン 1 およびエムリカサンの組み合わせに追加したとき、トランス - ISRIB およびポリアミンは、再現性のある効果およびさらに改善された細胞生存率を有することが実証された。

【0096】

実施例 8

C E P T の有益な効果

培養中、および、胚様体およびオルガノイド形成、および、組織分化などの様々な関連するプロセス中において hPSC の生存に対する C E P T の有益な効果を示す様々な実験が行われた。代表的な実験を以下に記載し、図 16 ~ 28 に結果を示す。

40

【0097】

図 16 は、H 9 細胞からの胚様体形成の結果に対する C E P T の優位性を示す。図 16 は、次のように示される異なる複数のサブリメント (C E P T - 50 nM クロマン 1、5 μM エムリカサン、ポリアミン (40 ng / mL プトレシン、4.5 ng / mL スペルミジン、8 ng / mL スペルミン)、0.7 μM トランス - ISRIB、C + E - 50 nM クロマン 1、5 μM エムリカサン; クロマン 1 - 50 nM クロマン 1、エムリカサン - 5 μM エムリカサン、トランス - IIRIB - 0.7 μM トランス - ISRIB; ポリアミン - 40 ng / mL プトレシン、4.5 ng / mL スペルミジンおよび 8 ng / mL スペルミン、Y - 27632 - 10 μM) を含む培地で増殖した H 9 細胞から形

50

成された胚様体の代表的な位相差顕微鏡画像を示す。上記の表記および濃度は、以下に記載される全ての実験においても使用される。画像は細胞プレーティング後(20,000細胞/cm²)24時間で撮影された。図17は、Y-27632またはCEPTのいずれかで処理された細胞から形成された単一の胚様体の直径の定量化を示す散布図を示す。単一の胚様体を生成するために、H9細胞をAccutaseで解離し、AggreWe11(商標)プレート(StemCell Technologies、カタログ番号:34825)に5,000細胞/ウェルでプレーティングした。画像は、プレーティング後24時間で撮影された。

【0098】

図18は、Y-27632と比較して、CEPTが大脳オルガノイド形成を改善することを示す代表的な画像を示す。大脳オルガノイドは、StemCell Technologies(バンクーバー、カナダ)から得たキットと、Y-27632またはCEPTで最初の24時間のみ処理したiPSC(LiPSC GR1.1)とを使用することにより生成した。30日目において、オルガノイドを固定し、切片化し、組織学ならびにヘマトキシリンおよびエオシン染色のために処理された。組織学的染色の結果を上段のパネルに示す。大脳オルガノイドにおける暗い領域は神経系の組織を示す。オルガノイドサイズは、Y-27632またはCEPTでの処理に依存し、それは60日目において明らかである。下側のパネルは、60日目におけるオルガノイド測定を示す。

【0099】

図19は、凍結保存された多能性幹細胞(H9)の改善された解凍を示す棒グラフである。細胞を解凍し、0.0001% v/v DMSO、Y-27632またはCEPTの存在下でE8培地中にプレーティングした。解凍後24時間でCellTiter Glo(登録商標)アッセイを使用し、生細胞を定量化した。図20は、様々なiPSC由来の分化細胞(すべてFujifilm Cellular Dynamics International(Madison、Wisconsin)から市販されている)のCEPTで改善された解凍を示す棒グラフである。Fujifilm Cellular Dynamics Internationalから得られたiPSC由来のヒト心筋細胞、Fujifilm Cellular Dynamicsから得られた肝細胞、研究室内で分化されたアストロサイト、Fujifilm Cellular Dynamics Internationalから得られた運動ニューロンの凍結されたバイアルを解凍し、0.0001% v/v DMSO、Y-27632、およびCEPTで24時間処理した。細胞生存をCellTiter Gloアッセイを使用して定量化した。プロットされたデータは平均値±s.d.(各群n=3ウェル)、*P<0.05、**P<0.005、***P<0.001、1元配置分散分析(one-way ANOVA)である。

【0100】

図21は、マルチ電極アレイ(Axon Biosystems、アトランタ、ジョージア)を使用した、解凍後5日目のiPSC由来的心筋細胞の電気生理学的特性評価の結果を示す。24時間のCEPT処理は、解凍からの回復および心筋細胞の機能的活性の改善に十分であった。図21の中央のパネルのデータは、平均値±s.d.(各群n=6ウェル)、**P=0.0029、***P=0.0001、one-way ANOVAを表す。図21の右のパネルは、平均±s.d.(各群n=6ウェル)、*P=0.0165、***P=0.0005、one-way ANOVAを表す。

【0101】

図22は、複数のストレス機構からの解離された細胞のCEPTの保護を示す代表的な顕微鏡画像を示す。示されるスケールバーは10 μMである。上側のパネルは、ラミンB1-GFP iPSCレポーター株(Alleen Institute for Cell Science、シアトル、ワシントン州)の共焦点顕微鏡分析を示し、細胞継代中(プレーティングして30分後)の核の形状における劇的な形態の違いを示している。中央のパネルは、OCT4を発現している細胞が0.0001% v/v DMSOおよびY-27632(矢尻)に曝露されたとき H2AXに対して免疫反応性があるが、CEPTで

10

20

30

40

50

処理したときはそうでないことを示す（プレーティング後3時間）。下側のパネルは、アクチンおよびミオシンに対する免疫細胞化学によって測定された細胞継代中（プレーティング後3時間）の劇的な細胞骨格の違いを示す。ストレスを受けた細胞は、0.0001% v/v DMSOの存在下小疱（白い矢尻）、またはY-27632に曝露されたとき、コロニー縁に顕著なアクチントレスファイバーの形成を示した（白い矢尻）。

【0102】

図23は、Y-27632またはCEPTで処理されたhESC(H9)を特徴付ける代表的なウエスタンプロットの画像を示す。いくつかの膜結合タンパク質（TJP1、CDH1、ANXA1、PXN）は、CEPT処理後、高レベルで発現されていた（プレーティング後24時間）。GAPDHをローディングコントロールおよびハウス・キーピングタンパク質コントロールとして使用した。

10

【0103】

図24は、Y-27632またはCEPTで処理されたhESC(H9)を特徴付ける代表的なウエスタンプロットの画像を示す。0.0001% v/v DMSOまたはY-27632で処理した細胞において、強いストレス応答が観察された（継代後3時間）。対照群（継代なし）と似て、H2AX（DNA損傷のマーカー）およびATF4（細胞ストレス応答のマスター・レギュレータ）の不在がCEPT処理した細胞において観察された。高レベルに観察されたスレオニン68のリン酸化CHK2は、細胞周期の停止を示す。eIF2Aの総発現レベルは影響を受けないまま、CEPT処理は、有意に少ないセリン51のリン酸化eIF2Aを示した。0.0001% v/v DMSOまたはY-27632の存在下で起こる高レベルのp-eIF2A(S51)により、細胞ストレスおよびタンパク質合成の停止が示された。

20

【0104】

図25は、hESC(H9)のピューロマイシンのパルス・チェイス実験の結果を示す代表的な画像を示し、細胞継代中に強く損なわれているタンパク質合成がCEPTによって救済される（継代後3時間）ことを実証している。GAPDHをローディングコントロールおよびハウス・キーピングタンパク質コントロールとして使用した。タンパク質合成を監視するために、細胞を2時間接着させた後、1 μMピューロマイシンでその後1時間パルスした。細胞を回収し、ウエスタンプロッティング用に処理し、ピューロマイシンに対する抗体（1:50；Sigma-Aldrich、MABE343）を使用した。

30

【0105】

図26は、0.0001% v/v DMSOおよびY-27632と比較してCEPTで継代されたhESC(H9)においてグルタチオンレベルが有意に高いことを示す棒グラフを示す（プレーティング後3時間）。グルタチオンは重要な細胞内抗酸化物質であり、低レベルのグルタチオンは酸化ストレスを示す。

【0106】

図27は、CEPTがゲノム編集効率を改善したことを示す。レポーターiPSC株をSchwinnら、「CRISPR-mediated tagging of endogenous proteins with a luminescent peptid e」ACS Chemical Biology 13: 467-474 (2018)に記載される方法によるCRISPR/Cas9ノックインによって生成した。iPSC株のOCT4遺伝子に発光ペプチドを導入し、Nano-Glo（登録商標）HiBiT検出システム（Promega、Madison、Wisconsin）を使用してシグナルを検出した。遺伝子編集中のCEPT処理は、Y-27632処理と比較して、遺伝子編集効率の増大につながった。上側のパネルの画像は、iPSCにCas9およびガイドRNAをトランスフェクションして24時間後に測定された発光強度を示す。下側のパネルの散布図は、発光シグナルの定量化を示す。対照には、「非編集iPSC」と「試薬のみ」が含まれた。

40

【0107】

図28は、様々な試薬およびCEPTの存在下のヒト多能性幹細胞の生存を比較する棒

50

グラフを示す。ヒト胚性幹細胞株 (WA 01、WA 09、HUES 53) および iPSC (LiPSC - GR1.1) を Accutase (Thermo Fisher Scientific) で解離し、同数の細胞を E 8 培地中、ビトロネクチンコーティングされた 384 ウエルプレートにプレーティングした。プレーティング後 24 時間で、CellTiter Glo (登録商標) アッセイを使用し、細胞の生存率を定量化した。よく知られている細胞株 - 細胞株間の変動性にも関わらず、いずれの場合でも C E P T は Y - 27 632 および市販の試薬 CloneR (商標) (StemCell Technologies)、RevitaCell (商標) (Thermo Fisher Scientific) および StemBoost (商標) Reprogramming Cocktail SMC4 (BioVision) よりも優れていることが示された。

10

【0108】

上記で引用されたすべての特許、特許出願、刊行物、および要約は、参照によりその全体が本明細書に援用される。本発明の様々な実施形態は、本発明の様々な目的を達成するために記載された。これらの実施形態は、本発明の原理の単なる例示であることを認識されたい。以下の特許請求の範囲で定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの修正および適合が当業者に簡単に明らかになるであろう。

[付記 1] クロマン 1 (Chromoman 1) および / またはその誘導体とエムリカサン (Emricasan) および / またはその誘導体とを含む組成物。

[付記 2] トランス - ISRIB およびポリアミンのうちの 1 つまたは両方をさらに含む付記 1 に記載の組成物。

[付記 3] 前記組成物は培地に取り込まれたとき、約 4 nM ~ 約 80 μM、4 nM ~ 約 40 μM、約 10 nM ~ 約 20 μM、約 20 nM ~ 約 10 μM または約 30 nM ~ 約 500 nM の濃度のクロマン 1 および / または前記その誘導体を提供するように配合される、付記 1 または 2 に記載の組成物。

[付記 4] 前記組成物は、培地に取り込まれたとき、約 100 nM ~ 約 80 μM、約 100 nM ~ 約 40 μM、約 200 nM ~ 約 30 μM、約 300 nM ~ 約 20 μM の濃度のエムリカサンおよび / または前記その誘導体を提供するように配合される付記 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の組成物。

[付記 5] 前記組成物は、培地に取り込まれたとき、約 50 nM ~ 約 80 μM、約 50 nM ~ 約 40 μM、約 50 nM ~ 約 20 μM、約 50 nM ~ 約 10 μM、約 50 nM ~ 約 6.25 μM、約 100 nM ~ 約 6.25 μM、または約 200 nM ~ 約 6.25 μM の濃度のトランス - ISRIB を提供するように配合される付記 2 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

[付記 6] 前記組成物はスペルミンおよびスペルミジンを含むポリアミンを含み、前記組成物は、培地に取り込まれたとき、約 0.5 nM ~ 1 mM の濃度のスペルミン、および / または約 0.5 nM ~ 1 mM の濃度のスペルミジンを提供するように配合される付記 2 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の組成物。

[付記 7] 前記ポリアミンは、プロテシンをさらに含み、前記組成物は、前記培地に取り込まれたとき、約 0.5 nM ~ 1 mM の濃度のプロテシンを提供するように配合される、付記 6 に記載の組成物。

[付記 8] インビトロまたはエクスピボで少なくとも 1 つの哺乳類細胞を支持するよう構成される成分とクロマン 1 および / またはその誘導体とを含む培地組成物。

[付記 9] 約 4 nM ~ 80 μM、4 nM ~ 40 μM、10 nM ~ 20 μM、20 nM ~ 100 μM または 30 nM ~ 500 nM の有効濃度のクロマン 1 および / または前記その誘導体を含み、クロマン 1 および / または前記その誘導体の前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のクロマン 1 および / または前記その誘導体の濃度である、付記 8 に記載の培地組成物。

[付記 10] エムリカサンおよび / またはその誘導体をさらに含む、付記 8 または 9 に記載の培地組成物。

[付記 11] 約 100 nM ~ 80 μM、100 nM ~ 40 μM、200 nM ~ 300

20

30

40

50

μM 、 $300\text{nM} \sim 20\mu\text{M}$ の有効濃度でエムリカサンを含み、エムリカサンおよび／または前記その誘導体の前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のエムリカサンおよび／または前記誘導体の濃度である、付記8～10のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記12] トランス-ISRIBをさらに含む、付記8～11のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記13] 約 $50\text{nM} \sim 80\mu\text{M}$ 、約 $50\text{nM} \sim 40\mu\text{M}$ 、約 $50\text{nM} \sim 20\mu\text{M}$ 、約 $50\text{nM} \sim 10\mu\text{M}$ 、約 $50\text{nM} \sim 6.25\mu\text{M}$ 、 $100\text{nM} \sim 6.25\mu\text{M}$ 、または $200\text{nM} \sim 6.25\mu\text{M}$ の有効濃度においてトランス-ISRIBを含み、トランス-ISRIBの前記有効濃度は、さらなる希釈なしで使用される作業培地中のトランス-ISRIB濃度ある付記8～12のいずれか1つに記載の培地組成物。
10

[付記14] スペルミンおよびスペルミジンを含むポリアミンをさらに含む付記8～13のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記15] 前記培地組成物は、約 $0.5\text{nM} \sim 1\text{mM}$ の有効濃度のスペルミン、および／または約 $0.5\text{nM} \sim 1\text{mM}$ の有効濃度のスペルミジンを含み、前記有効濃度のスペルミンおよびスペルミジンのそれぞれは、さらなる希釈なしで使用される作業培地中の濃度である付記8～14のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記16] ポリアミンは、プロテシンをさらに含む付記14または15に記載の培地。

[付記17] 前記培地組成物は約 $0.5\text{nM} \sim 1\text{mM}$ の有効濃度のプロテシンを含み、前記有効濃度のプロテシンはさらなる希釈なしで使用される作業培地中の濃度である付記16に記載の培地。
20

[付記18] インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された前記成分は、1つ以上の緩衝液、無機塩、必須アミノ酸、炭水化物、脂肪酸、脂質、ビタミン、微量元素を含む付記8～17のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記19] 前記培地組成物は、使用される前に溶解されるように配合された液体または固体の培地濃縮物である付記8～18のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記20] 前記培地組成物は、さらなる希釈なしで使用されるように配合された培地である付記8～18のいずれか1つに記載の培地組成物。
30

[付記21] 前記培地組成物は、液体、半固体または固体である付記8～18のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記22] 前記培地組成物は、規定培地組成物または非規定培地組成物付記8～21のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記23] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞、または改変された細胞である付記8～22のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記24] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚である付記8～23のいずれか1つに記載の培地組成物。
40

[付記25] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、ヒト細胞またはヒト由来の細胞である付記8～24のいずれか1つに記載の培地組成物。

[付記26] 付記1～7のうちのいずれか1つに記載の前記組成物とインビトロまたはエクスピボで少なくとも1つの哺乳類細胞を支持するように構成された培地成分とを含むキット。

[付記27] インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞の増殖のための培養容器、支持部または足場のうちの少なくとも1つをさらに含む付記26に記載のキット。

[付記28] 付記8～25のいずれか1つに記載の培地組成物、少なくとも1つの培
50

養容器、インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞の増殖のための支持部または足場を含むキット。

[付記29] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞と付記8～25のうちのいずれか1つに記載の培地とを含む組成物。

[付記30] 前記培地は、液体、半固体または固体である付記29に記載の組成物。

[付記31] 前記培地は、規定培地または非規定培地である付記29または30に記載の組成物。

[付記32] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞、または改変された細胞である付記29～31のいずれか1つに記載の組成物。
10

[付記33] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚である付記29～32のいずれか1つに記載の組成物。

[付記34] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、ヒト細胞またはヒト由来の細胞である付記29～33のいずれか1つに記載の組成物。

[付記35] 前記培地を含む容器をさらに含む付記29～34のいずれか1つに記載の組成物。

[付記36] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞のための固体支持部または足場をさらに含む付記29～35のいずれか1つに記載の組成物。

[付記37] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は解凍される付記29～36のうちのいずれか1つに記載される組成物。

[付記38] 培地のうちの1つ以上の成分を付記1～6のうちのいずれか1つに記載される前記組成物と組み合わせることを含む培地を調製する方法。

[付記39] 付記20に記載の前記培地中、インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞をインキュベートすることを含む少なくとも1つの哺乳類細胞を培養する方法。

[付記40] 前記インキュベートすることは、少なくとも細胞または組織培養物が確立されるまで行われる、付記39に記載の方法。

[付記41] 付記20に記載の前記培地中、解離された哺乳類細胞を、前記解離された哺乳類細胞から細胞のコロニーが確立されるまでインキュベートすることを含む哺乳類細胞のクローン集団を得る方法。
30

[付記42] 付記20に記載の前記培地中、1つ以上の哺乳類細胞を、胚様体が確立されるまでインキュベートすることを含む胚様体を得る方法。

[付記43] 付記20に記載の前記培地中、器官の少なくとも一部が確立されるまで1つ以上の哺乳類細胞をインキュベートすることを含むインビトロまたはエクスピボで前記器官の少なくとも一部を成長させる方法。

[付記44] 前記培地は液体、半固体または固体である付記39～43のいずれか1つに記載の方法。

[付記45] 前記培地は規定培地または非規定培地である付記39～44のいずれか1つに記載の方法。
40

[付記46] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞、または改変された細胞である付記39～45のいずれか1つに記載の方法。

[付記47] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚である付記39～45のいずれか1つに記載の方法。

[付記48] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞はヒトまたはヒト由来である付記39～47のいずれか1つに記載の方法。
50

[付記49] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は解凍される付記39～48のいずれか1つに記載の方法。

[付記50] 前記インキュベートすることは、前記培地を含む容器内で行われる付記39～49のいずれか1つに記載の方法。

[付記51] 容器は、前記少なくとも1つの哺乳類細胞のための固体支持部および/または足場を含む付記49に記載の方法。

[付記52] 付記20に記載の前記培地中、インビトロまたはエクスピボで前記少なくとも1つの哺乳類細胞をインキュベートすることを含む少なくとも1つの哺乳類細胞の維持または保存の方法。

[付記53] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、胚性幹細胞、非胚性幹細胞、多能性幹細胞、人工多能性幹細胞、多分化能幹細胞、成体幹細胞、始原細胞、分化細胞、単離された初代細胞、二次細胞、不死化細胞、細胞株細胞、生殖細胞、体細胞、改変された細胞、複数の細胞、細胞培養物、組織培養物、組織、器官、器官部分、胞胚葉、胚様体または胚である付記52に記載の方法。

[付記54] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は、ヒトまたはヒト由来である付記52または53に記載の方法。

[付記55] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は解凍される付記52～54のいずれか1つに記載の方法。

[付記56] 前記少なくとも1つの哺乳類細胞は凍結される付記52～54のいずれか1つに記載の方法。

【0109】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. qHTS によって同定された活性化合物

化合物	SMILES ¹	PubChem 物質 識別子 ²	CAS 登録番 号 ³	CC ⁴	AC ₅₀ ⁵ (μM)	有効性 ⁶	最大 ⁶
GSK-269962A	CC[N]1C2=C(C=NC(=C2)OC3=CC(=CC=C3)NC(=O)C4=CC=C(OCCN5CCOCC5)C=C4)N=C1C6=NON=C6N	137275847	850664-21-0	2	11.77	106	133.3
GSK-429286A	CC1=C(/C(CC(=O)N1)C2=CC=C(C=C2)C(F)(F)C(=O)NC3=C(F)C=C4[NH]N=CC4=C3	174006479	864082-47-3	1	3.317	126	129.3
Y-39983	C[C@H](N)C1=CC=C(C=C1)C(=O)NC2=C3C=C[NH]C3=NC=C2		173897-44-4	1	0.369	121	127
1-(3-メトキシペンジル)-3-(4-(ピリジン-4-イル)チアゾール-2-イル)尿素	COCl=CC(=CC=C1)CNC(=O)NC2=NC(=CS2)C3=CC=NC=C3		1342276-76-9	1	0.147	121	123.6
SR-3677	CN(C)CCOC1=CC(=C=C1NC(=O)C2COC3=CC=CC=C3O2)C4=C[NH]N=C4		1072959-67-1	1	0.585	118	122
SR-3677	CN(C)CCOC1=CC(=C=C1NC(=O)C2COC3=CC=CC=C3O2)C4=C[NH]N=C4	174006422	1072959-67-1	1	0.662	115	121.4
GSK-25	CC\1=C(C(N=C(/N1)C2=CC(=NC=C2)Cl)C3=C(F)C=C(Cl)C=C3)/C(=O)NC4=C(F)C=C5[NH]N=CC5=C4	174006433	874119-56-9	1	1.49	118	121.1
グリシル-H-1152	C[C@H]1CN(CCCN1[S+](O-)=O)C2=CC=CC3=C2C(=CN=C3)C)C(=O)CN	174006415	913844-45-8	1	3.317	120	120.9
AT-7867	C1C=CC=C(C=C1)C2(CCNCC2)C3=CC=C(C=C3)C4=C[NH]N=C4	174006525	857531-00-1	1	1.49	92.2	119.5
AT-7867	C1C=CC=C(C=C1)C2(CCNCC2)C3=CC=C(C=C3)C4=C[NH]N=C4		857531-00-1	1	0.521	104	118.4
AS 1892802	OC[C@H](NC(=O)NC1=CC=C(C=C1)C2=CC=NC=C2)C3=CC=CC=C3		928320-12-1	1	1.309	115	117.5
Y-39983	C[C@H](N)C1=CC=C(C=C1)C(=O)NC2=C3C=C[NH]C3=NC=C2	174006412	173897-44-4	1	0.743	113	116.8

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

SAR407899 (塩酸塩)	O=C1N\C=C/C2=CC(=CC=C12)OC3CCNC C3		92326 2-96-8	1	2.931	112	116.3
バリシチニブ	CC[S+](O-)(=O)N1CC(C#N)(C1)[N]2C=C(C=N2)C3=NC=NC4=C3C=C[NH]4	17400669 0	11875 94-9-7	3	37.22	147	114.7
GSK-25	CC\1=C(C(N=C/N1)C2=CC(-NC=C2)Cl)C3=C(F)C=C(Cl)C=C3/C(=O)NC4=C(F)C=C5[NH]N=CC5=C4		(87411 9-56-9)	1	0.185	113	113.3
グリシリル-H-1152	C[C@H]1CN(CCCN1[S+](O-)(=O)C2=CC=CC3=C2C(=CN=C3)C)C(=O)CN		[91384 4-45-8]	1	0.414	96.9	112.3
Y-27632	C[C@@H](N)C1CC[C@@H](CC1)C(=O)NC2=CC=NC=C2	90340876	33175 2-47-7	1	1.321	102	112.1
SB-747651-A	CC[N]1C(=NC2=CN=CC(=C12)CNC3CCNCC3)C4=NON=C4N	17400709 5	60737 2-46-3	1	2.957	68.7	111.1
クロマン1	COCC1=CC=C2OC[C@H](CC2=C1)C(=O)NC3=CC=C(C=C3OCCN(C)C)C4=C[NH]N=C4		12735 79-40-0	1	0.29	108	110.1
OXA 06 二塩酸塩	FC1=CC=CC=C1CNC C2=CC=C(C=C2)C3=C4C=C[NH]C4=NC=C3			1	0.736	110	108.2
(-)-ブレビスタチン	CC1=CC=C2\N=C/3N(CC[C@H]3(O)C(=O)C2=C1)C4=CC=CC=C4		85692 5-71-8	1	2.931	96	107.8
ファスジル塩酸塩	[O-][S+](=O)(N1CCCNCC1)C2=C3C=CN=C C3=CC=C2	12488325 5	10562 8-7-7	3	33.17	127	107.2
CCT-128930	NC1(CCN(CC1)C2=C3C=C[NH]C3=NC=N2)CC4=CC=C(Cl)C=C4	17400652 1	88549 9-61-6	3	11.77	133	106.8
ROCK 阻害剤	CC1=C[NH]C2=NC=C(=C12)OC3=C(F)C=C(NC4=NC(=NC(=C4)Cl)N)C=C3F		86701 7-68-3	1	0.21	59.8	103.2
RKI-1447	OC1=CC(=CC=C1)CN C(=O)NC2=NC(=CS2)C3=CC=NC=C3		13422 78-01-6	1	0.083	106	103.2
バリシチニブ	CC[S+](O-)(=O)N1CC(C#N)(C1)[N]2C=C(C=N2)C3=NC=NC4=C3C=C[NH]4		11875 94-9-7	2	8.26	114	102.7
KX1-004	OC1=CC(=CC=C1)CN C(=O)C2=CC3=CC(=CC=C3[NH]2)F		51805 8-84-9	1	3.289	103	102.2

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

1-(5-イソキノリニルスルホニル)-3-メチルピペラジン二塩酸塩	CC1CN(CCN1)[S+](O-)(=O)C2=C3C=CN=CC3=CC=C2	90341486		3	20.6	102	100.6
Y-27632	C[C@@H](N)C1CC[C@H](CC1)C(=O)NC2=CC=NC=C2	90340876	33175 2-47-7	2	7.308	96.2	95.49
オクラシチニブ(PF-03394197)	CN[S+](O-)(=O)C[C@H]1CC[C@H](CC1)N(C)C2=C3C=C[NH]C3=NC=N2		12083 19-26-9	3	20.75	99.9	93.79
Q-VD-OPh水和物	CC(C)C(NC(=O)C1=N C2=CC=CC=C2C=C1)C(=O)NC(CC(O)=O) C(=O)COC3=C(F)C=CC=C3F		11356 95-98-5	1	1.167	85.9	93.54
CCT-241533	CO C1=CC2=NC(=NC(=C2C=C1OC)N[C@@H]3CNC[C@H]3C(C)(C)O)C4=CC(=CC=C4O)F	17400696 9	12628 49-73-9	3	11.77	118	92.8
(-)ブレビスタチン	CC1=CC=C2N=C/3N(CC[C@H]3(O)C(=O) C2=C1)C4=CC=CC=C4	26753178	67428 9-55-5	3	33.17	105	90.71
AT-13148	NC[C@@H](O)(C1=CC=C(Cl)C=C1)C2=CC=C(C=C2)C3=C[NH]N=C3		10569 01-62-2	1	0.104	64.5	89.77
RO495	CC1=NC(=NC(=C1)N C2=CC(=CC=N2)NC(=O)C3=C(Cl)C=CC=C3Cl)N	13727604 4	12582 96-60-4	1	4.686	73.1	89.28
チアゾビビン	O=C(NCC1=CC=CC=C1)C2=CSC(=N2)NC3=CC=NC=N3		12260 56-71-8	1	0.414	80.6	88.3
HA-100	[O-][S+](=O)(N1CCNC C1)C2=C3C=CC=NC3=CC=C2	90341528		2	7.308	88.9	88.17
ルキソリチニブ、遊離塩基	N#CCC(C1CCCC1)[N] 2C=C(C=N2)C3=C4C=C[NH]C4=NC=N3		94167 8-49-5	3	10.4	48	87.05
1-(5-イソキノリニルスルホニル)-2-メチルピペラジン二塩酸塩	CC1CNCCN1[S+](O-)(=O)C2=C3C=CN=CC3=CC=C2	90341587		3	4.611	92.2	85.52
ピナシジル	CC(NC(=C1=CC=NC=C1)=N/C#N)C(C)(C)C	90341497		3	23.11	86.4	83.12
ルキソリチニブ	N#CC[C@H](C1CCC C1)[N]2C=C(C=N2)C3		10929 39-17-7	2	8.26	89.8	81.17

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	=NC=NC4=C3C=C[NH]4						
モメロチニブ	O=C(NCC#N)C1=CC=C(C=C1)C2=NC(=NC=C2)NC3=CC=C(C=C3)N4CCOCC4	137275866	10566 34-68-4	1	0.935	38.7	79.24
SB-747651-A	CC[N]1C(=NC2=CN=CC(=C12)NCN3CCNCC3)C4=NON=C4N		N.A.	1	0.585	35.5	78.33
エムリカサン	C[C@H](NC(=O)C(=O))NC1=CC=CC=C1C(CC(C)C(=O)N[C@@H](CC(O)=O)C(=O)CO C2=C(F)C(=CC(=C2F)F)F	174006947	25475 0-02-2	3	33.17	95.8	76.39
KRIBB11	CNC1=NC(=C(C=C1)[N+](O-)=O)NC2=CC=C3[NH]N=CC3=C2		[34263 9-96-7]	1	0.585	62.1	72.62
フルオキセチ ン塩酸塩	CNCCC(OC1=CC=C(C=C1)C(F)(F)F)C2=C C=CC=C2	90341619		4		0	70.37
STF-083010	OC1=CC=C2C=CC=C C2=C1/C=N/[S+](O-) (=O)C3=CC=CS3	137275985	30754 3-71-1	2	26.35	82.4	66.46
ルキソリチニブ	N#CC[C@H](C1CCC C1)[N]2C=C(C=N2)C3 =NC=NC4=C3C=C[NH]4	174006685	94167 8-49-5	3	11.77	80.4	63.7
dBET1	CC1=C(C)C\2=C(S1)[N]3C(=NN=C3[C@@H](CC(=O)NCCCCNC(=O)COC4=C5C(=O)N([C@H]6CCC(=O)NC6=O)C(=O)C5=CC=C4)N=C2C7=CC=C(CI)C=C7)C		17997 11-21-9	-1	0.004	-67.9	62.14
Rhodblock 6	O=C(NC1=CC2=C([NH]N=C2)C=C1)C3CC C3		88662 5-06-5	3	23.28	67.9	61.61
NCGC0024425 0	CN(C)C1=CC=C(NC2=N[N](C(=N2)N)C(=O)C3=C(F)C=CC=C3F)C=C1	174006689	12614 96-45-0	4	6.561	23.7	58.27
AMG-Tie2-1	CNC1=NC(=CC=N1)C2=CC=CN=C2OC3=C C(=CC=C3C)C(=O)NC4=CC=CC(=C4)C(F) (F)F	174006749	87022 3-96-4	2	18.65	54.5	57.84
インゲノールメ ブタート	C\C=C(C)/C(=O)O[C@H]1C(=C/C@@@23[C@H](C)C[C@@H]4[C@H]([C@H](C)C=C(CO)/C@H)(O)[C@]12O)C3=O)C4(C)C)C	174006398	75567- 37-2	1	0.118	41.4	57.64

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

TG-101348	CC1=C(NC2=CC(=CC=C2)[S+](O-)(=O)NC(C)(C)N=C(NC3=C C=C(OCCN4CCCC4)C=C3)N=C1	13727586 3	93609 1-26-8	3	33.17	67.3	55.15
モメロチニブ	O=C(NCC#N)C1=CC=C(C=C1)C2=NC(=NC=C2)NC3=CC=C(C=C3)N4CCOCC4		10566 34-68-4	4		0	53.99
LX-7101	CN(C)C(=O)OC1=CC=CC(=C1)NC(=O)C2(CN)CCN(CC2)C3=C4 C(=C[NH]C4=NC=N3)C		11921 89-69-7	4	2.328	21.6	53.74
レスタウルチニブ	C[C@@]12O[C@H](C[C@J1(O)CO][N]3C4=C(C=CC=C4)C5=C6C(=O)NCC6=C7C8=C(C=CC=C8)[N]2C7=C35	17400675 7	11135 8-88-4	4	1.177	7.59	52.98
SB-415286	OC1=C(Cl)C=C(NC2=C(\C(=O)NC2=O)C3=C(C=CC=C3)[N+]([O-])=O)C=C1	17400707 4	26421 8-23-7	3	33.17	65.1	52.48
(-)インドラクタム V	CC(C)[C@@H]1N(C)C2=C3C(=C[NH]C3=C=C2)C[C@@H](CO)NC1=O	17400721 8	90365-57-4	1	0.833	45.5	51.21
HA-1004 塩酸塩	NC(=N)NCCNO[S+](O-)C1=C2C=CN=CC2=CC=C1	90340739		1	5.174	50	50.05
Go-6976	C[N]1C2=C(C=CC=C2)C3=C4C(=O)NCC4=C5C6=C(C=CC=C6)[N](CCC#N)C5=C13	17400639 9	13619 4-77-9	2	4.686	37.3	49.06
ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート	CCCCCCCCCCCCCCC(=O)O[C@@H]1[C@H](C)[C@@H]2[O]C[C@H](C=C(CO)/C[C@H]3(O)[C@H]2C=C(C)/C3=O)[C@@H]4C(C)(C)[C@]14OC(C)=O	90341751		1	0.21	36.8	48.49
PF-956980	C[C@@H]1CCN(C[C@@H]1N(C)C2=C3C=C[NH]C3=NC=N2)C(=O)N4CCCC4		12628 32-74-5	3	23.28	53	47.75
CK-636	CC1=C(CCNC(=O)C2=CC=CS2)C3=CC=C=C3[NH]1		44263 2-72-6	4		0	47.74
AKT キナーゼ 阻害剤	CC[N]1C(=NC2=C1C(=CN=C2C#CCO)OCCN)C3=NON=C3N		84214 8-40-7	4		0	46.89

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

NU-6102	N[S+](O-)(=O)C1=C C=C(NC2=NC3=C([NH]C=N3)C(=N2)OCC4 CCCCC4)C=C1	17400698 6	44472 2-95-6	3	37.22	57.9	46.11
PF-06447475	N#CC1=CC=CC(=C1) C2=C[NH]C3=NC=NC (=C23)N4CCOCC4		15274 73-33-1	3	16.48	44.6	42.8
BMS-265246	CCCCOC1=C2C=N[NH]C2=NC=C1C(=O)C 3=C(F)C=C(C(C)C=C3F	17400709 7	58231 5-72-8	1	1.177	33.9	42.75
1,5-イソキノリ ンジオール	OC1=CC=CC2=C(O) N=CC=C12	90340598		3	18.36	42.2	41.01
NCGC0024425 0	CN(C)C1=CC=C(NC2 =N[N](C(=N2)N)C(=O) C3=C(F)C=CC=C3F) C=C1	17400668 9	12614 96-45-0	1	8.333	39.3	40.04
KW-2449	O=C(N1CCNCC1)C2=CC=C(C=C2)/C=C/C3 =N[NH]C4=C3C=CC=C4	17400655 4	10006 69-72-6	3	33.17	44.5	40.04
A-443654	CC1=N[NH]C2=C1C=C(C=C2)C3=CN=CC(=C3)OC[C@@H](N)C C4=C[NH]C5=C4C=C C=C5	17400649 0	55232 5-16-3	4		0	39.77
セルドウラチニ ブ	CC[S+](O-)(=O)N1C CN(CC1)C2=CC=C(N C3=NC(=C(C=N3)C(N)=O)NC4CC4)C=C2		11983 00-79-6	1	2.931	33.6	38.99
NCGC0038479 8-01	CC1(C)CC[C@@@]2(C C[C@]3(C)C(=C/CC4 [C@@]5(C)CC[C@H](O[C@@H]6OC[C@@ H](O)[C@H](O)[C@H] 6O)[C@](C)(C5CC[C @@]34C)C(O)=O)[C @@H]2C1)C(=O)O[C @@H]7O[C@H](CO[C @@H]8O[C@H](CO)C@@H)(O)[C@H](O)C@H]8O[C@@H]9O [C@H](CO)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]9O)[C @@H](O)[C@H](O)[C @@H](O)%10O[C@H](C O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]1O[C@H]1O[C @@H]1O		4		0	38.81	
PPY A	COCC1=C(C=CC=C1)C 2=C[NH]C3=NC=C(C=C23)C4=CC(=CN=C4) C(=O)N(C)C		[87563 4-01-8]	3	2.931	41.9	37.42

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

CP-673451	COCCOC1=CC=C2[N]](C=NC2=C1)C3=NC4 =C(C=CC=C4C=C3)N 5CCC(N)CC5	17400657 5	34378 7-29-1	4		0	35.65
SB-203580	C[S+](O-)C1=CC=C(C=C1)C2=NC(=C([NH]]2)C3=CC=NC=C3)C4 =CC=C(F)C=C4	12488698 4	15212 1-47-6	3	15.21	37.4	35.56
ソトラスタウリ ン	CN1CCN(CC1)C2=N C3=CC=CC=C3C(=N 2)C4C(C(=O)NC4=O) C5=C[NH]C6=CC=CC =C56	13727593 9	42563 7-18-9	2	16.63	36.5	35.9
NU-6102	N[S+](O-)C1=C C=C(NC2=NC3=C([N H]C=N3)C(=N2)OCC4 CCCCC4)C=C1		44472 2-95-6	3	5.212	43.8	34.8
CCT-241533	COCC1=CC2=NC(=NC(=C2C=C1OC)N[C@@@ H]3CNC[C@H]3C(C)(C)O)C4=CC(=CC=C4 O)F		14316 97-96- 9	3	5.212	43.3	34.35
TETRAC	OC(=O)CC1=CC(=C(OC2=CC(=C(O)C(=C2))I)C(=C1)I)I		67-30- 1	3	14.69	35.8	34.23
サイトカラシン B	C[C@@H]1CCC[C@ @H](O)/C=C/C(=O)O[C@]23[C@@H](C=C)\C(=C C1)[C@H](O)C(=C)C @H)(C)[C@H]2[C@ H]CC4=CC=CC=C4) NC3=O		14930- 96-2	3	7.495	43.2	34.14
デセルノチニ ブ	CC[C@@](C)(NC1=C C=NC(=N1)C2=C[NH] C3=C2C=CC=N3)C(=O) NCC(F)(F)F		94484 2-54-0	1	2.931	30.1	34.01
NCGC0034787 9-02	CC(C)CC(=O)OC1O\ C=C\CO[C@@@H]2O[C@H](CO)[C@@H](O))[C@H](O)[C@H]2O) C3CC(O)C(O)(CO)C1 3			4		0	30.87
XL-19	O=C(NC1=CC=C(C=C 1)C2=NC(=NC=C2)N C3=CC=C(C=C3)N4C COCC4)C5CCCN5		94575 5-56-6	3	23.28	35.5	29.98
IKK イプシロン -IN-1	N#CC1=CC(=CC=C1 OC2CCOCC2)C3=NC (=NC=C3)NC4=CC=C (C=C4)N5CCOCC5		12923 10-49- 6	2	14.69	30.6	28.74
TBB	BrC1=C(Br)C(=C2N= N[NH]C2=C1Br)Br	90341691		2	32.64	33.7	28.55

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

Streptomyces azureus から のチオストレプ トン	<chem>CCC(C)C1NC2\ C=C/C3=C(N=C(C=C3C(C)O)C(=O)OC(C)C4NC(=O)C5=CSC(=N5)C(NC(=O)C\ 6CSC(=N6)\ C(NC(=O)C(NC(=O)C7=CSC(=N7)C8(CCC(=N/C8C9=CSC4=N9)\ C%10=NC(=CS%10)C(=O)NC(=C)C(=O)NC(=C)C(N)=O)NC(=O)C(C)NC(=O)C(=C)NC(=O)C(C)NC1=O)C(C)O)=C\ C(C)(O)C(C)O)C2O</chem>		1393-48-2	2	14.69	30.2	28.41
ピリドン 6	<chem>CC(C)(C)C1=NC2=C([NH]1)C3=CC=C(F)C=C3C4=C2\ C=C/NC4=O</chem>	174006716	45708 1-03-7	4		0	28.9
トリプトリン	<chem>C1CC2=C(CN1)[NH]C3=CC=CC=C23</chem>			-1	9E-04	-33.1	27.93
ピリンテグリン	<chem>OC1=CC2=C(C=C1)N(CCC2)C3=NC(=NC=C3)NC4=CC=C(C=C4)[S+](O-)(=O)NCC5C C5</chem>		12284 45-38-2	2	3.289	31	27.85
CEP-33779	<chem>CN1CCN(CC1)C2=C C=CC(=C2)NC3=N[N]4C=CC=C(C5=CC=C(C=C5)[S+](C)([O-])=O)C4=N3</chem>	174006672	13461 68-57-7	1	5.899	25.5	27.79
トリン-1	<chem>CCC(=O)N1CCN(CC1)C2=C(C=C(C=C2)N3C(=O)\ C=C/C4=C3C5=CC(=CC=C5N=C4)C6=CN=C7C=CC=CC7=C6)C(F)(F)F</chem>	174006448	12229 98-36-8	2	10.49	31.2	27.66
URMC-099	<chem>CN1CCN(CC1)CC2=CC=C(C=C2)C3=CC4=C([NH]C=C4C5=CC=C6[NH]C=CC6=C5)N=C3</chem>		12295 82-33-5	2	5.212	33.6	27.06
NIDA-41020	<chem>COCC1=CC=C(C=C1)C2=C(C)C(=N)N2C3=C C=C(Cl)C=C3Cl)C(=O)NN4CCCC4</chem>		50248 6-89-7	2	23.28	30.5	26.91
NCGC0038528 4-01	<chem>CC(=CC[C@H]1C(=C)CC[C@H]2[C@H](C)(CO[C@H]3O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]3O)[C@H](O)CC[C@H]12C)=C\ CO[C@H]4O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]4O</chem>			-1	0.001	-31.2	26.38

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

ポドスボリン A	C/C=C/C(=O)[C@@@H](C)/C1=C/C(=O)/C2=C(/O[C@@@]3CC[C@H](O)C(C)(C)[C@@H]3CC[C@H](C)[C@@]4(C)C2)C1=O			4		0	26.17
H-89	[O-][S+](=O)(NCCNC\ C=C\ C1=CC=C(Br)C=C1)C2=CC=CC3=CN=CC=C23	124892364	127243-85-0	4	1.866	16.9	25.95
ML192	CC1=NC2=C(C3=C(CCCC3)S2)C(=N1)N4C CN(CC4)C(=O)C5=C C=CO5		460331-61-7	4	0.521	13.5	25.23
NCGC0038093 1-01	CC1(CCOC2OC(CO)C(O)C(O)C2O)CCC34 OC3(C1)C(O)CC5C(C)(CCCC45C)C(O)=O			2	11.43	28	24.96
グリチルリチン酸、アンモニウム塩	CC1(C)[C@H](CC[C@@@]2(C)C1CC[C@@]3(C)C\4CC[C@@]5(C)CC[C@@](C)(C)[C@H]5C4=C/C(=O)C23)C([O-])=O)O[C@H]6O[C@H]([C@H](O[C@H]7O[C@H]([C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]7O)C([O-])=O)[C@H](O)[C@H]6O)C([O-])=O		1405-86-3	2	14.69	26	23.95
NCGC0038465 5-01	CC(=O)O[C@H]1C(=O)[C@]2(C)C(O)C[C@H]3OC[C@@@]3(OC(C)=O)[C@H]2[C@H](OC(=O)C4=CC=CC=C4)[C@]5(O)C[C@H](O)C(=C1C5(C)C)C			2	1.739	29.1	23.91
CEP-28122	COCC1=C(NC2=NC(=C(Cl)C=N2)N[C@@@H]3[C@@@H]\4C[C@@H](\C=C4)C[C@@H]3C(N)=O)C=CC5=C1CC[C@H](CC5)N6CCOCC6		1354545-57-5	1	0.585	23.5	23.83

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

NCGC0038573 9-01	C[C@@H]1O[C@@H]](O[C@@H]2[C@@H] (O)[C@H](O)C@@ H](CO)O[C@H]2O[C @@H]3[C@@H](O)[C@ H]3O[C@H]4CC[C@] @]5(C)C(CC[C@]6(C) C5C\ C=C/7[C@@H]8 CC(C)(C[C@@H](O)[C@]8(C)CC[C@]67 C)C(O)=O)[C@@]4(C)CO)C(O)=O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]1O			2	3.126	24.5	23.02
AF38469	CC1=NC(=CC=C1)NC (=O)C2=CC=C(C=C2 C(O)=O)C(F)(F)F	15316 34-31- 7	2	5.212	29.6	22.96	10
(+)-パゴクロン	CC(C)CCC(=O)CC1N(C(=O)C2=CC=CC=C1 2)C3=CC=C4C=CC(= NC4=N3)Cl	13373 7-32-3	4		0	22.94	
NCGC0038486 0-01	CO C1=CC=C2[C@@ H]3OC4=C(C=CC(=C 4)O)[C@@H]3COC2= C1O		2	18.49	29.1	22.82	
NCGC0038693 2-01	CO C(=O)C1=C(N=CC (=C1)Br)N2CCC(NC3 CCCC3)C(O)C2		-1	0.004	-26.5	22.59	20
ドキソフィリン	CN1C(=O)N(C)C2=C([N](CC3OCCO3)C=N2)C1=O	69975- 86-6	4	0.521	12.1	22.52	
アロキサン	O=C1NC(=O)C(=O)C(=O)N1	11/3/2 244	2	5.212	27.2	22.45	
オキシフェンブ タゾン	CCCCC1C(=O)N(N(C 1=O)C2=CC=C(O)C= C2)C3=CC=CC=C3	7081- 38-1、 129- 20-4 [無水]	2	23.28	25.7	22.37	
ウルソル酸	C[C@@H]1CC[C@@] 2(CC[C@]3(C)\C(=C/ CC4[C@@]5(C)CC[C@ H](O)C(C)(C)C5CC[C@] @]34C)C2[C@H]1C)C(O)=O	77-52- 1	4	0.521	11.7	22.27	30
NCGC0038100 3-01	C[C@@H]1O[C@@H]](OC2C(O)C(O)C(CO) OC2O[C@@H]3[C@@H] (O)[C@H](O)[C@H] (O)[C@H]3O[C@H]4 CC[C@@]5(C)C(CC[C@] @]6(C)C5C\ C=C/7C 8CC(C)(C)CC(O)[C@] 8(C)CC[C@@]67C)C 4(C)C(O)=O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H]1O		2	2.483	24.5	22.06	40

【表 1 - 11】

BMS-863233 (XL-413)	C1C1=CC2=C(OC3=C2NC(=N\ C3=O)[C@H]4CCCN4)C=C1		11695 62-71-3	2	26.12	28.3	22.03
ダブルフェニブ	CC(C)(C)C1=NC(=C(S1)C2=NC(=NC=C2)N)C3=C(F)C(=CC=C3)N[S+](O-)(=O)C4=C(F)C=CC=C4F	17400640 4	40555 4-55-4	2	14.82	21.7	21.96
NCGC0016884 5-02	OCC(=C)C(=O)O[C@H]1CC(=C)[C@@H]2C[C@H](O)C(=C)[C@H]2[C@H]3OC(=O)C(=C)[C@H]13			2	3.613	27.1	21.8
19-ヒドロキシ サルメントゲニ ン	C[C@]12CC(O)C3[C@@H](CC[C@@H]4C[C@H](O)CC[C@]34CO)[C@H]1(O)CC[C@@H]2C5=C\ C(=O)OC5			4	0.004	-11.5	21.79
CCG-2046	CCCC1(C)C(C#N)(C#N)C1(C#N)C#N	90341808		2	20.6	23.7	21.78
チプラナビル	CCC[C@H]1(CCC2=CC=CC=C2)CC(=C([C@H](CC)C3=CC=CC(=C3)N[S+](O-)(=O)C4=CC=C(C=N4)C(F)(F)F)/C(=O)O1)O		17448 4-41-4	2	26.12	26.5	21.75
シタキセンタン ナトリウム	CC1=C(CC(=O)C2=C(C=CS2)[S](=O)(=O)[N-])C3=C(Cl)C(=NO3)C)C=C4OCOC4=C1		21042 1-74-2	2	26.12	27.1	21.69
VU 0285683	[F]C1=CC(=CC(=C1)C2=NC(=NO2)C3=NC=CC=C3)[C]#[N]		[32705 6-22-4]	4		0	21.28
CHIR-124	C1C1=CC\2=C(NC(=O)\ C(=C2N[C@H]3CN4CCC3CC4)C5=NC6=C([NH]5)C=CC=C6)C=C1	17400700 7	40516 8-59-4	4	0.235	12.4	21.27
チオグアニン	NC/1=N/C2=C([NH]C=N2)C(=S)N1	17400700 1	154- 42-7	4		0	21.27
ジヒドロセラス トロール	CC1=C2C\ C=C\ 3[C@@H](C)(CC[C@@H]4(C)[C@H]5C[C@@H](C)(C)C[C@]5(C)CC[C@]34C)C(=O)C2=CC(=C1O)O			2	14.69	26.1	21.22
CP-724714	COCC(=O)NC/C=C/C1=CC=C2N=CN=C(NC3=CC=C(OC4=CN=C(C)C=C4)C(=C3)C)C2=C1		38343 2-38-0	2	20.75	23.5	21.17
エダラボン	C\C1=N\N(C(=O)C1)C2=CC=CC=C2		89-25-8	4	0.521	11	20.97

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

アマチャヅル 抽出物	<chem>CC(C)=CCC[C@](C)(O)[C@@H]1O[C@H](CO[C@H](O)[C@H]2O[C@C@@H](C(O)[C@H]3O[C@H](O)[C@H]3C[C@]4(C)C[C@@H]3[C@H](O)C[C@@H]5[C@@@]6(C)C[C@H](O)[C@@H]7O[C@H](CO)[C@@H]7(O)[C@H](O)[C@H]7O)C(C)(C)[C@@H]6C[C@C@@H]4C</chem>		80321-63-7	4	0.256	11	20.39
オレアノール 酸	<chem>CC1(C)C[C@H](C2CC[C@]3(C)C(=C/C[C@@H]4[C@@@]5(C)CC[C@H](O)C(C)(C)[C@@H]5CC[C@@]34C)[C@@H]2C1)C(O)=O</chem>		508-02-1	4	0.37	-10.7	20.26

¹ 「簡略化された分子入力ラインエントリシステム」(SMILES)での化合物表記法、行表記は、短い ASCII 文字列を使用した化学種の構造を記述する。

² アメリカ合衆国国立衛生研究所(NIH)の一部の国立医学図書館の一部門であるアメリカ国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information (NCBI))によって維持される PubChem データベースの化合物識別子。

³ ケミカル・アブストラクツ・サービス (Chemical Abstracts Service (CAS)) によって割り当てられた一意の数値識別子。

⁴ Huang ら、*Environ. Health Perspect.* 119:1142–1148 (2011)において提供される分類に基づいた曲線クラス。

⁵ 50%有効性における濃度。曲線クラス (curve classes (CCs)) 4 および 5 では AC₅₀ は得られなかつた。

⁶ ヒル方程式を使用してフィッティングされた、ゼロおよび無限用量において予測された活性の間の活性範囲。有効性は CCs 4 および 5 では得られなかつた。

⁷ 全ての試験された濃度からの最大活性値。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2 クロマン 1 およびエムリカサンとの潜在的な相乗効果についてスクリーニングされた化合物

化合物	SMILES ¹	濃度 (μM)
イソトレチノイン	CC/C=C\ C(C)=C\ C=C\ C(C)=C/C(O)=O)C(C)(C)CC C1	0.707945784
パナゼピド	Fc6cccccc6C3=N[C@H](NC(=O)c1cc2cccccc2n1)C(=O)N 5CCc4cccc3c45	2.089296131
エルゴステロール	CC(C)[C@@H](C)C=C[C@@H](C)[C@H]1CC[C@H]2 \\C3=C\\C=C4\\C[C@@H](O)CC[C@]4(C)[C@H]3CC[C@]]12C	9.54992586
AC-261066	CCCCOCCOC1=C(C)SC(=N1)C2=CC=C(C(O)=O)C(=C 2)F	2.089296131
メチルナルトレキソン(臭化物)	C[N@+]1(CC[C@H]23[C@H]4OC5=C(O)C=CC(=C25) C[C@@H]1[C@H]3(O)CCC4=O)CC6CC6	17.7827941
MLS002707279-02	CC(=O)C1(C)CCC2C3C=C(C)C4=CC(=O)CCC4(C)C3C CC12C	0.707945784
バダデュスタット	OC(=O)CNC(=O)C1=NC=C(C=C1O)C2=CC=CC(=C2)C 	0.234422882
トランス-ISRIB	C1C=CC=C(OCC(=O)N[C@H]2CC[C@@H](CC2)NC(=O) COCC3=CC=C(Cl)C=C3)C=C1	0.707945784
CT-98014	NC1=NC(=CC=C1[N+](O-)=O)NCCNC2=NC=C([N]3C =CN=C3)C(=N2)C4=CC=C(Cl)C=C4Cl	0.316227766
KRIBB11	CNC1=NC(=C(C=C1)[N+](O-)=O)NC2=CC=C3[NH]N=CC3=C2	2.089296131
NCGC00386849-01	COCC1=C(C=CC=C1)C2=CC=C(C=C2)C3=C[N](N=N3)C (=O)N4CCCCC4CC5=CC=CC=C5	0.234422882
WAY 267464 二塩酸塩	C[N]1N=CC2=C1NC3=C(C=CC=C3)N(C2)C(=O)C4=CC =C(CNC(=O)N5CCN(CC5)CC6=CC(=CC(=C6)O)O)C(=C4)C	0.025703958
PTC-124	OC(=O)C1=CC=CC(=C1)C2=NOC(=N2)C3=CC=CC=C 3F	0.02630268
PF 05081090	COCC1=CC=C(C(=C1)F)C2=C\ C(=O)N(CC[C@](C)(C(=O)NO)[S+](C)(O-)=O)C=C2	0.231739465
クロルテトラサイクリン HCl	CN(C)[C@H]1[C@@H]2CC3\ C(=C(O)[C@]2(O)C(=O)) C(=C1O)C(N)=O)C(=O)C4=C(C(=CC=C4O)Cl)[C@@]3(C) C(O)	0.234422882
セフチオフル HCl	CO\\N=C(\\C(=O)N[C@H]1[C@H]2SC\\C(=C(N2C1=O)C O)=O)CSC(=O)C3=CC=CO3)C4=CSC(=N4)N	0.707945784
NCGC00386840-01	C[C@@H](N(C1CCCCC1)C(=O)C[N]2N=NC(=N2)C3=C C4=C(OCO4)C=C3)C(=O)NC5CCCC5	0.707945784
NCGC00385453-01	COCC1CC(OC(C)C1OC2CC(OC)C(OC3OC(C)C(OC4OC (CO)C(O)C(O)C4O)C(OC)C3O)C(C)O2)OC5CCC6(C)C 7CC(OC(=O)C(C)=C(C)C8(C)C(CCC8(O)C7C/C=C6/C 5)C)=O	0.006456542
ゾルミトリブタン	CN(C)CCC1=C[NH]C2=CC=C(C[C@H]3CO(=O)N3)C =C12	0.1
シクロスピリン A	CCC1NC(=O)C(C(O)C(C)C\\C=C\\C)N(C)C(=O)C(C(C)C) N(C)C(=O)C(CC(C)C)N(C)C(=O)C(CC(C)C)N(C)C(=O) C(C)NC(=O)C(C)NC(=O)C(CC(C)C)N(C)C(=O)C(=O)C(=O) C(CC(C)C)N(C)C(=O)CN(C)C1=O)C(C)C	0.02630268
NCGC00169917-02	COCC1=CC2=C(C(=C1)O)C(=O)C3(O2)C(C)CC(=O)/C=C C3/OC	0.695024318
PD-166793	CC(C)[C@H](C[S+](O-))C(=O)C1=CC=C(C=C1)C2=CC=CC C(Br)C=C2)C(O)=O	0.234422882

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

SB-206553	C[N]1C=CC2=CC3=C(CCN3C(=O)NC4=CC=CN=C4)C=C12	1.77827941
ジプラグルラント	FC1=C[N]2C=C(CCC#CC3=NC=CC=C3)N=C2C=C1	0.234422882
INF 4E	CCOC(=O)C(=C)C(O)C1=C(Cl)C=CC=C1	0.707945784
IWP-3	CC1=CC=C2N=C(NC(=O)CS\ C3=N\ C4=C(SCC4)/C(=O)N3C5=CC=C(F)C=C5)SC2=C1	0.316227766
NCGC00380777-01	CCC(C)(NC(=O)C(CCC(N)=O)NC(=O)C1CC(O)CN1C(=O)C(C)(C)NC(=O)C(C)(C)NC(=O)C(CC(C)C)NC(=O)CN C(=O)C(=O)C(C)(C)NC(=O)C(C)(C)NC(=O)C(C)(C) NC(=O)C(CC2=CC=CC=C2)NC(C)=O)C(C)C(=O)N3 CC(O)CC3C(=O)NC(C)(C)C(=O)NC(CO)CC4=CC=CC=C4	0.120226443
ゼストスponギン C	C1CCC[C@H]2CCCN3CC[C@H](CCCCCCC[C@H]4CCCN5CC[C@H](CC1)O[C@H]45)O[C@H]23	0.01
ネクロスルホンアミ ド	COCl=C(N[S+](O-))=O)C2=CC=C(NC(=O)\ C=C\ C3=C C=C(S3)[N+]([O-])=O)C=C2)N=CC=N1	0.077624712
カテプシン阻害 剤 1	C[N]1N=C(C=C1C(=O)N[C@H](CC2=CC=CC(=C2)Cl)C(=O)NCC#N)C(C)(C)C	0.707945784
N6-p-スルホフェニ ルアデノシンナトリ ウム塩	OC[C@H]1O[C@H]([C@H](O)[C@@H]1O)[N]2C=NC3=C(NC4=CC=C(C=C4)[S](O-)=O)N=CN=C23	1.77827941
ラドチニブ(IY- 5511)	CC1=C[N](C=N1)C2=CC(=CC(=C2)N=C(/O)C3=CC(=C(C)C=C3)NC4=NC=CC(=N4)C5=CN=CC=N5)C(F)(F)F	0.077624712
PF 750	O=C(NC1=CC=CC=C1)N2CCC(CC2)CC3=CC4=CC=C C=C4N=C3	0.695024318
TC LPA5 4	COCl=CC(=CC=C1)[N]2N=C(C=C2C3=CC(=C(C=C3)C 4CCCCC4)Cl)C(O)=O	2.089296131
ホノキオール	OC1=CC=C(C=C1CC=C)C2=CC(=CC=C2O)CC=C	0.1
ピフィスリン-u	N[S+](O-)=O)C#CC1=CC=CC=C1	0.077090347

¹ 「簡略化された分子入力ラインエントリシステム」(SMILES)での化合物表記法、行表記は、短い ASCII 文字列を使用した化学種の構造を記述する。

10

20

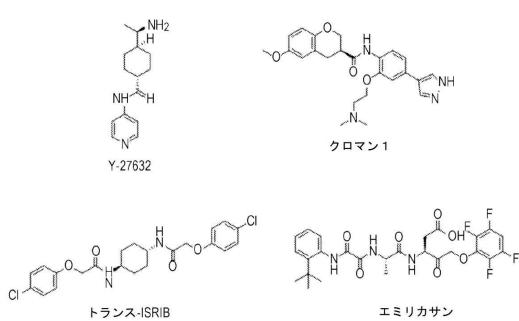
30

40

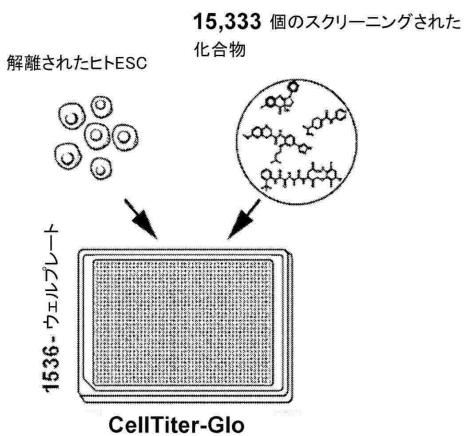
50

【図面】

【図 1】



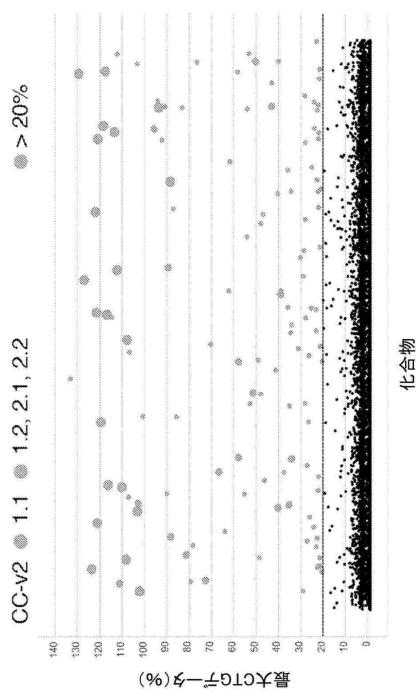
【図 2】



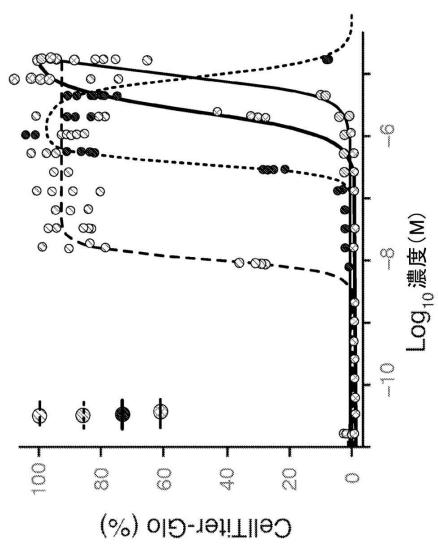
10

20

【図 3】



【図 4】

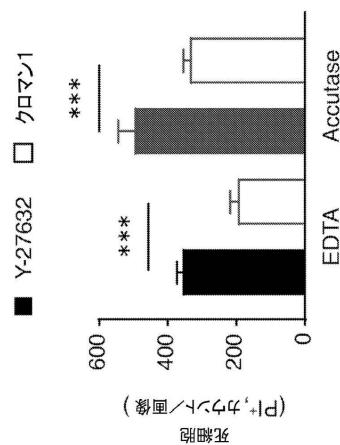


30

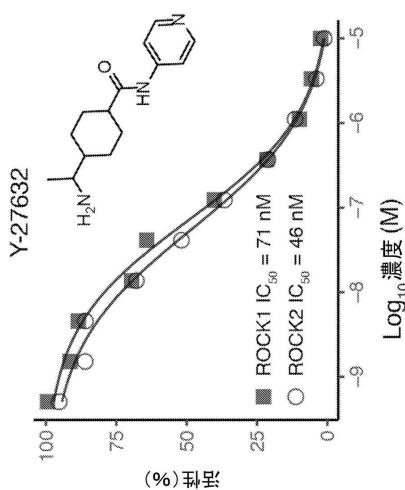
40

50

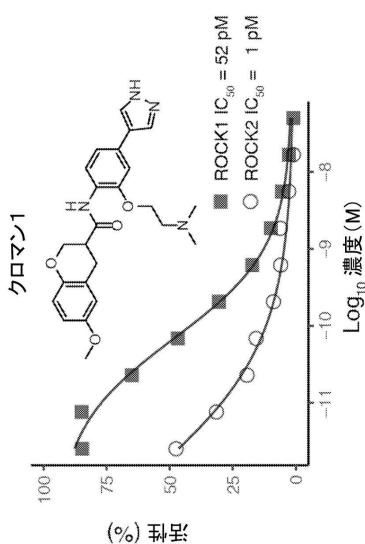
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

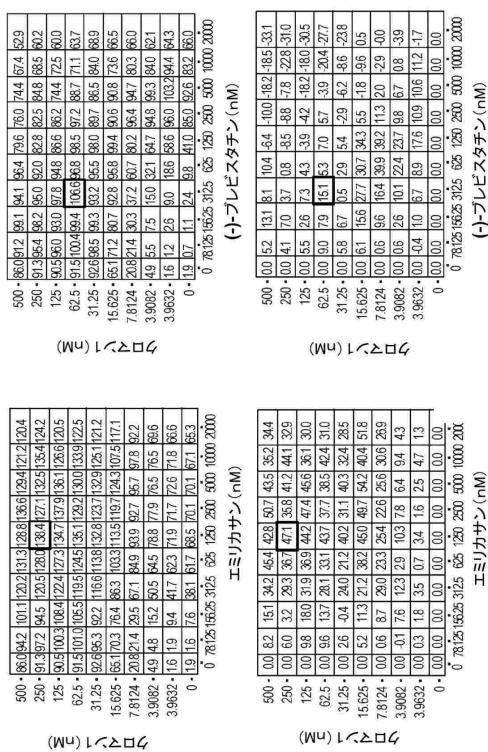
20

30

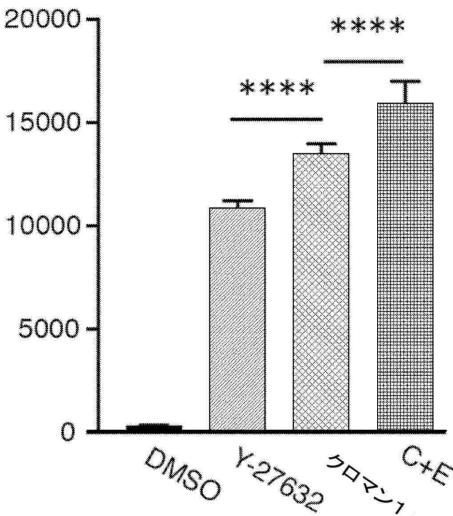
40

50

【図 9】



【図 10】

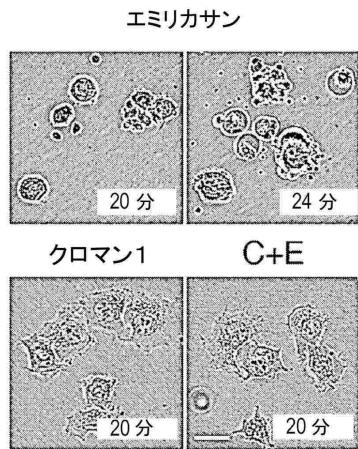


10

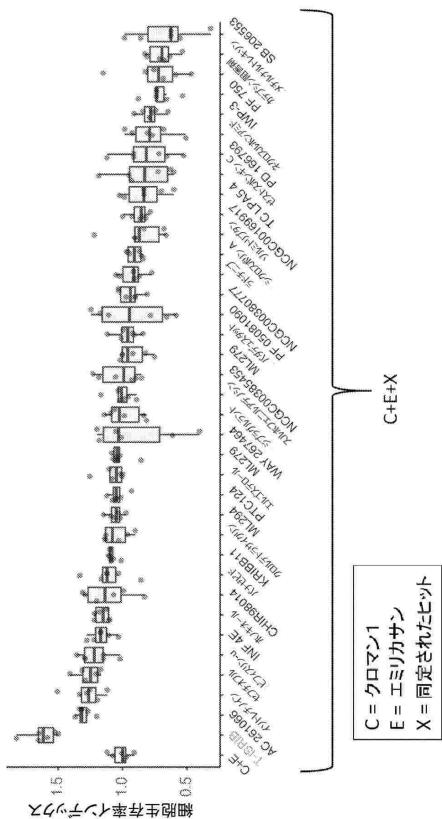
20

30

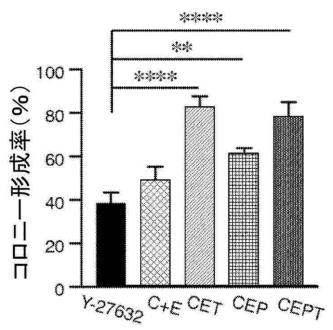
【図 11】



【図 12】

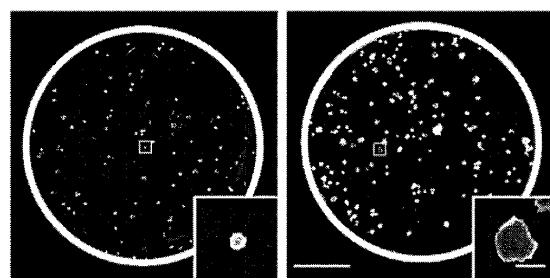


【図 13】



【図 14】

Y-27632 CEPT



10

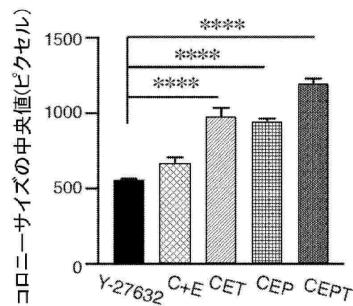
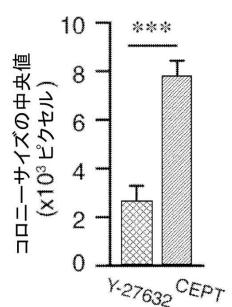
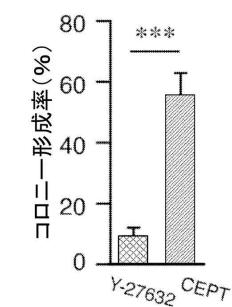


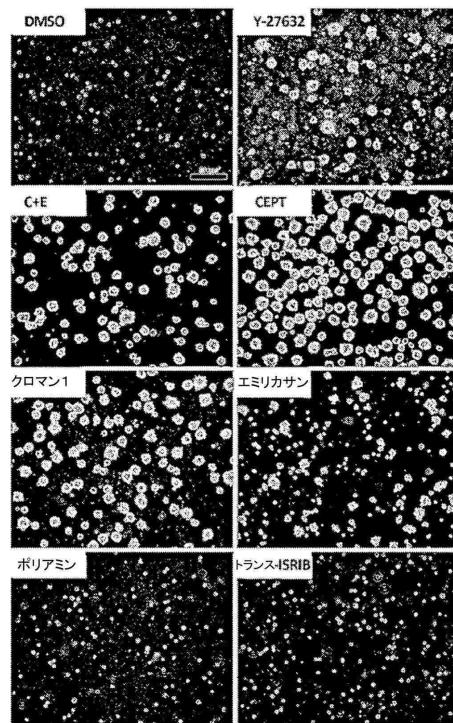
Figure 14

20

【図 15】



【図 16】

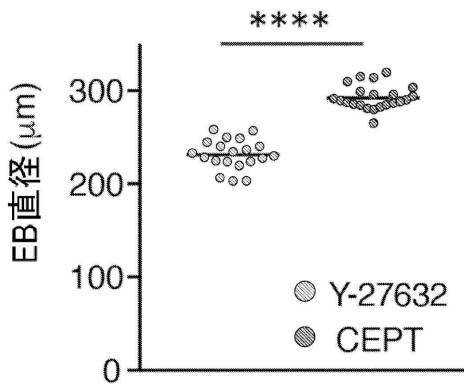


30

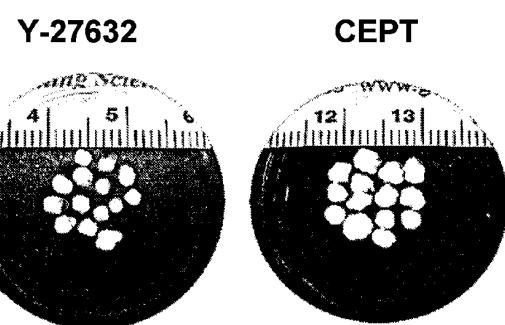
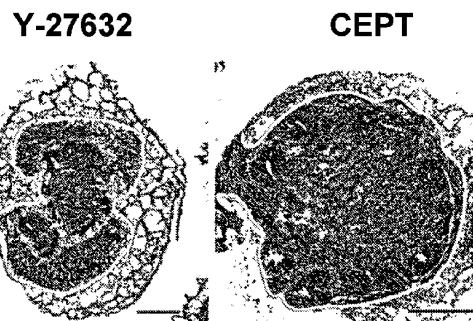
40

50

【図 17】



【図 18】

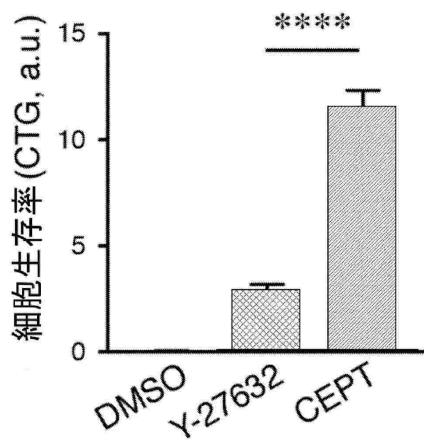


10

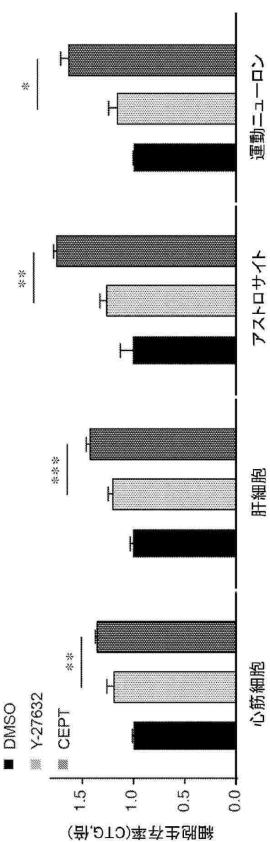
20

Figure 18

【図 19】



【図 20】

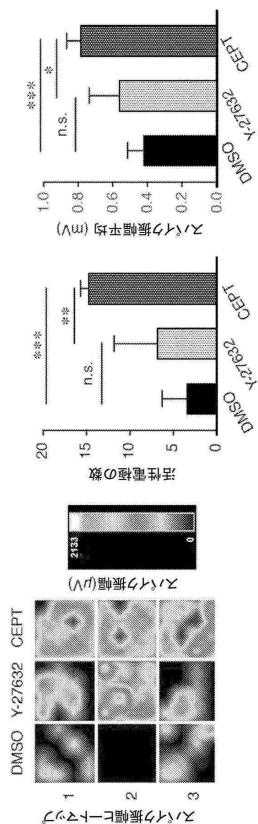


30

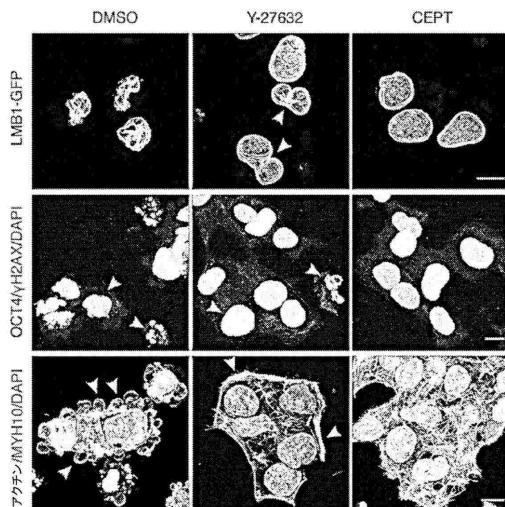
40

50

【図 2 1】



【図 2 2】



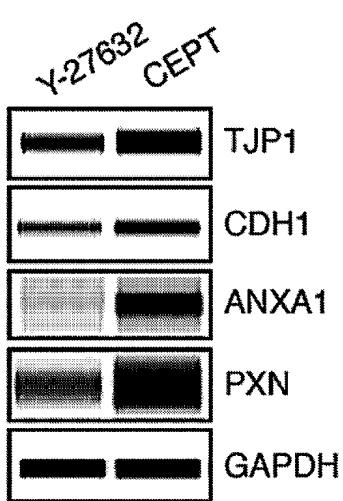
10

20

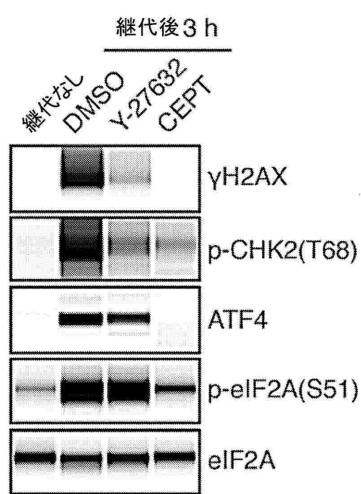
30

40

【図 2 3】

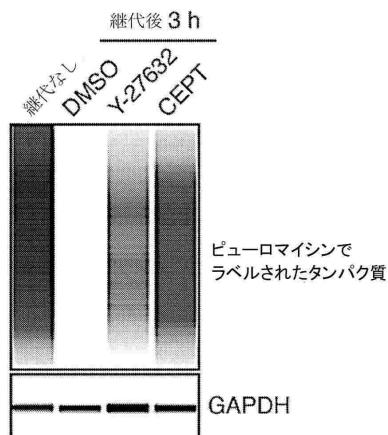


【図 2 4】

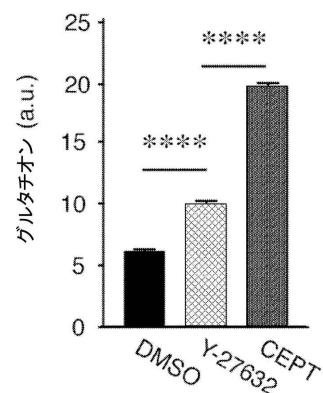
**Figure 23**

50

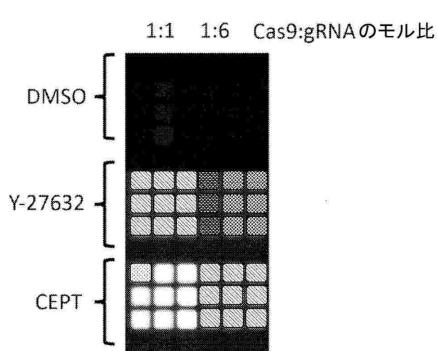
【図25】



【図26】



【図27】



【図28】

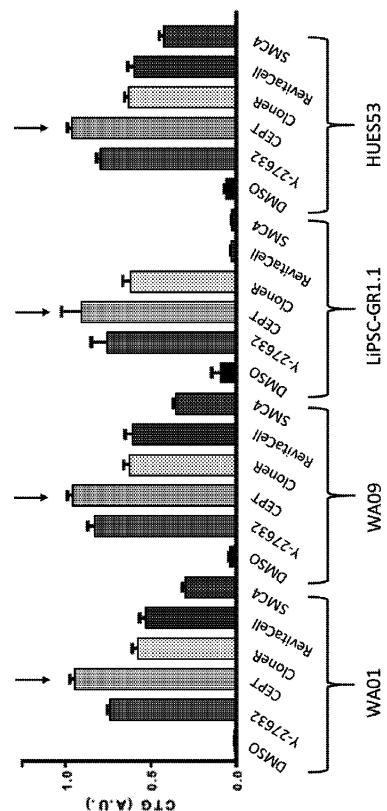


Figure 28

フロントページの続き

ロジー トランスファー
(74)代理人 100105957
弁理士 恩田 誠
(74)代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣
(74)代理人 100142907
弁理士 本田 淳
(74)代理人 100152489
弁理士 中村 美樹
(72)発明者 シンゲック、イリヤース
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州 ロックビル エグゼクティブ ブルバード 6011
スイート 325 オフィス オブ テクノロジー トランスファー
(72)発明者 チェン、ユー
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州 ロックビル エグゼクティブ ブルバード 6011
スイート 325 オフィス オブ テクノロジー トランスファー
(72)発明者 シメオノフ、アントン
アメリカ合衆国 20852 メリーランド州 ロックビル エグゼクティブ ブルバード 6011
スイート 325 オフィス オブ テクノロジー トランスファー
審査官 西澤 龍彦
(56)参考文献 国際公開第2012/061045 (WO, A2)
特開2008-099662 (JP, A)
国際公開第2018/116511 (WO, A1)
国際公開第2018/015879 (WO, A1)
中国特許出願公開第106963769 (CN, A)
米国特許出願公開第2017/0246181 (US, A1)
Yen Ting Chen et al., Asymmetric synthesis of potent chroman-based Rho kinase (ROCK-II) inhibitors, MedChemComm, 2011年, Vol. 2, pp. 73-75
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C 12 N
A 61 K
A 61 P
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)