

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6339581号
(P6339581)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/02 (2006.01)	C 12 Q 1/02
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V
	GO 1 N 27/62 X

請求項の数 15 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2015-540802 (P2015-540802)
(86) (22) 出願日	平成25年11月1日 (2013.11.1)
(65) 公表番号	特表2016-501516 (P2016-501516A)
(43) 公表日	平成28年1月21日 (2016.1.21)
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/067980
(87) 国際公開番号	W02014/071137
(87) 国際公開日	平成26年5月8日 (2014.5.8)
審査請求日	平成28年9月14日 (2016.9.14)
(31) 優先権主張番号	61/721,746
(32) 優先日	平成24年11月2日 (2012.11.2)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/827,407
(32) 優先日	平成25年5月24日 (2013.5.24)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	512088718 ステミナバイオマーカー ディスカバリ ー、 インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ウィスコンシン 537 19, マディソン, エス. ローザ ロード 504, スイート 150
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敏
(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト幹細胞およびメタボロミック比率を使用した医薬品のヒト発達毒性の予測

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験化合物を催奇形物質または非催奇形物質として分類し、又は、試験化合物の催奇形性を予測し、又は、試験化合物を催奇形物質として検証する方法であって、

未分化ヒト幹細胞様細胞(hSLC)を試験化合物存在下および試験化合物不在下で培養するステップと；

前記試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、前記試験化合物存在下で培養された未分化hSLCの培地中のオルニチンの倍数変化を判定するステップと；

前記試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、前記試験化合物存在下で培養された未分化hSLC培地中のシスチンの倍数変化を判定するステップと；

オルニチンの変倍数と、シスチンの倍数変化との比率を判定するステップとを含み、

0.88以下の比率が前記試験化合物の催奇形性を示唆し；

0.88を超える比率が前記試験化合物の非催奇形性を示唆する、方法。

【請求項 2】

試験化合物が催奇形性を示す曝露濃度を判定する方法であって、

一定濃度範囲の前記試験化合物中で、および前記試験化合物不在下で、未分化ヒト幹細胞様細胞(hSLC)を培養するステップと；

前記試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、各濃度の前記試験化合物中で培養した未分化hSLCの培地中のオルニチンの倍数変化を判定するステップと；

10

20

前記試験化合物不在下で培養された h S L C と比較した、各濃度の前記試験化合物中で培養した未分化 h S L C の培地中のシスチンの倍数変化を判定するステップと；

各濃度の前記試験化合物について、オルニチンの変化倍数と、シスチンの変化倍数との比率を判定するステップと
を含み、

所定の前記試験化合物濃度における 0 . 8 8 以下の比率が、その所定の濃度における前記試験化合物の催奇形性を示唆し；

所定の前記試験化合物濃度における 0 . 8 8 を超える比率が、その所定の濃度における前記試験化合物の非催奇形性を示唆する、方法。

【請求項 3】

10

シスチンおよび／またはオルニチンが、物理的分離法を使用して同定される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記物理的分離法が質量分析法を含んでなる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記質量分析法が、液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化質量分析法を含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

シスチンおよび／またはオルニチンが、比色分析または免疫学的アッセイを使用して測定される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記 h S L C が、ヒト胚性幹細胞 (h E S C) 、ヒト人工多能性 (i P S) 細胞、またはヒト胚様体を含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 h S L C が、一定濃度範囲の前記試験化合物中で培養される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 9】

前記一定濃度範囲が、(a) 連続希釈、又は、(b) 9 つの 3 倍希釈を含んでなる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

30

前記一定濃度範囲が、0 . 0 4 μ M ~ 3 0 0 μ M、4 μ M ~ 3 0 , 0 0 0 μ M、および 0 . 0 0 0 1 μ M ~ 1 0 μ M から選択される、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記一定濃度範囲の前記試験化合物が、前記試験化合物のヒト治療的 C_{max} を含んでなる、請求項 8 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 h S L C が、前記試験化合物のヒト治療的 C_{max} を含んでなる前記試験化合物濃度で培養される、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記試験化合物不在下で培養された h S L C と比較して、前記試験化合物存在下で培養された h S L C に伴う、1 つまたは複数の追加的な代謝産物を検出するステップとをさらに含んでなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記 1 つまたは複数の追加的な代謝産物が、アルギニン、A D M A 、および／またはシスタチオニンを含んでなる、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

アルギニンの変化倍数と、A D M A の倍数変化との比率を判定するステップとをさらに含み；

0 . 9 未満または 1 . 1 を超える比率が、前記試験化合物の催奇形性を示唆し；

0 . 9 ~ 1 . 1 の比率が、前記試験化合物の非催奇形性を示唆する、請求項 1 又は 2 に

50

記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

継続出願データ

本出願は、そのそれぞれを参照によって本明細書に援用する、2012年11月2日に出願された米国仮特許出願第61/721,746号明細書、および2013年5月24日に出願された米国仮特許出願第61/827,407号明細書の優先権を主張する。

【0002】

政府の資金提供

10

本発明は、国立科学財団(National Science Foundation)によって交付された補助金番号IIP-1058355の下で、政府の支援を受けて行われた。米国政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

先天異常は、全出生のおよそ3%で報告されており、米国における乳児死亡率の最大原因である(Hoyert et al., 2006, *Pediatrics*; 117: 168-183)。有毒化学物質および物理的因子への曝露は、全ての先天異常のおよそ3%の原因であると考えられる(National Research Council, 2000, "Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment," Washington, DC: The National Academies Press)。

20

【0004】

発達毒性は、先天異常を引き起こし得て、胚性致死、子宮内胎児発育遅延(IUGR)、異形態発生(骨格奇形など)、および機能毒性を生じ得て、それは自閉症などの認知障害をもたらし得るものと理解される。これらの障害の発生において、化学的曝露が果たし得る役割への懸念が増大している。実際に、全ての先天異常の5%~10%は、胎児の発達異常を誘発する既知の催奇形性薬剤への、子宮内曝露によって引き起こされると推定されている(Beckman and Brent, 1984, *Annu Rev Pharmacol*; 24: 483-500)。化学物質曝露が先天異常を引き起こす上で、重要なかつ予防可能な役割を果たすこともあるという懸念がある(Claudio et al., 2001, *Environ Health Perspect*; 109: A254-A261)。

30

【0005】

しかしこの懸念は、市場に出ている80,000種を超える化学物質に加えて、毎年導入されている新しい2,000種の化合物の発達毒性を試験するための堅固で効率的なモデルが欠如しているために、評価が困難である(General Accounting Office(GAO), 1994, *Toxic Substances Control Act: Preliminary Observations on Legislative Changes to Make TSCA More Effective, Testimony*, Jul. 13, 1994, GAO/T-RCED-94-263)。これらの化合物の5%未満が生殖結果について試験され、なおもより少数が発達毒性について試験されている(Environmental Protective Agency(EPA), 1998, *Chemical Hazard Data Availability Study*, Office of Pollution Prevention and Toxins)。動物モデル系を利用して、毒性を評価するいくつかの試みがなされているが(Piersma, 2004, *Toxicology Letters*; 149: 147-53)、子宮内のヒトに固有の感受性の差が、このようなモデルの予測有用性を制限する。

40

【0006】

50

毒性、特に発達毒性はまた、薬品開発過程を通じて、化合物の進展の大きな障害である。目下、毒性試験は、特に、ヒト胚および胎児の発達および器官形成に対する化合物曝露の悪影響を予測する手段として、動物モデルで実施される。研究中の新規薬剤の F D A 認可に寄与する、最も多く見られるモデルは、ウサギおよびラットにおける動物全身実験である (Piersma, 2004, *Toxicology Letters*; 149: 147 - 53)。生体内試験は、異なる妊娠段階および胚 / 胎児発達 (妊娠第 1 週目、器官形成段階、および全妊娠期間) における、妊娠動物への化合物投与に依存する。しかしこれらの生体内動物モデルは、生化学的経路の違いに起因する、発達中における、化合物に対する動物の応答とヒトの応答間の生物学的相関の欠如によって制限される。種の違いは、化合物の用量感度および薬物動態プロセッシングなどの動向において、顕在化することが多い。報告された文献によると、動物モデルは、化合物に対するヒト発達の応答を予測する上で、およそ 60% の効果がある (Greaves et al., 2004, *Nat Rev Drug Discov*; 3: 226 - 36)。したがってヒトを対象とする、予測的試験管内モデルに対する必要性がある。

【0007】

1960 年代のサリドマイドの悲劇は、前臨床発達毒性試験の重要性、可能な催奇形性化合物への応答における種間の顕著な差、そしてこのような化合物が発達中の胎児にいかに影響するかを強調した。齧歯類モデルにおけるサリドマイドの発達毒性試験は、ヒトにおける化合物の催奇形性可能性を示さなかった。子宮内曝露に続いて、10,000 人を超える小児が、重度の先天異常を持って誕生した。発達毒性を試験するための現行の前臨床モデルは、ヒトで観察される発達毒性と、様々な程度の一致を有し、ラットおよびウサギ (発達毒性試験のために最も一般的に使用される種) では、既知のヒト催奇形物質とおよそ 70 ~ 80% の一致を有する (Daston GP and Knudsen TB, 2010, "Fundamental concepts, current regulatory design and interpretation," In: Knudsen TB, Daston GP, editors. *Comprehensive Toxicology*. Vol 12, 2nd ed. New York: Elsevier. p 3 - 9)。これらの数十年来の生体内動物モデルは、多数の動物とキログラム単位の試験化合物を必要とし、時間もかかり高価である。これらのモデルのコストと複雑さのために、安全アセスメントは、化合物のライフサイクルにおいて、開発者が陽性発達毒性シグナルに反応するには遅すぎる時点で行われることが多く、化合物またはシリーズの開発の終了をもたらし得る。これらの動物モデルは、規制判断基準と見なされており、長きにわたって規制判断基準と見なされ続けてきたが、化合物に対する種応答の差が、発達毒性シグナルの見逃しと生物学的誤解釈をもたらすこともある。したがって、化学的曝露に関連する可能な発達毒性リスクを評価するために、ヒト細胞を使用した新規世代のツールの開発が必要とされる。適切な試験はまた、製品開発期間を短縮して、コストを抑制し、動物の利用を縮小させる要求に、先回りして応答する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、医薬品およびその他の化合物の発達毒性を、信頼性をもって判定するためには、妥当な予測的で正確な低成本かつ迅速なヒト試験管内試験に対する必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、未分化ヒト幹細胞様細胞 (h S L C) を試験化合物存在下および試験化合物不在下で培養するステップと；試験化合物不在下で培養された h S L C と比較した、試験化合物存在下で培養された未分化 h S L C の培地中のオルニチンまたはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；試験化合物不在下で培養された h S L C と比較した、試験化合物存在下で培養された未分化 h S L C 培地中のシスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；オルニチン

10

20

30

40

50

、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数と、シスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化との比率を判定するステップとを含み、約0.88以下の比率が試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.88を超える比率が試験化合物の非催奇形性を示唆する、催奇形物質または非催奇形物質として試験化合物を分類する方法を含む。

【0010】

本発明は、未分化ヒト幹細胞様細胞(hSLC)を試験化合物存在下および試験化合物不在下で培養するステップと；試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、試験化合物存在下で培養された未分化hSLCの培地中のオルニチンまたはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、試験化合物存在下で培養された未分化hSLC培地中のシスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；オルニチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数と、シスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化との比率を判定するステップとを含み、約0.88以下の比率が試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.88を超える比率が試験化合物の非催奇形性を示唆する、試験化合物の催奇形性を予測する方法を含む。

10

【0011】

本発明は、未分化ヒト幹細胞様細胞(hSLC)を試験化合物存在下および試験化合物不在下で培養するステップと；試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、試験化合物存在下で培養された未分化hSLCの培地中のオルニチンまたはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、試験化合物存在下で培養された未分化hSLC培地中のシスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；オルニチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数と、シスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化との比率を判定するステップとを含み、約0.88以下の比率が試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.88を超える比率が試験化合物の非催奇形性を示唆する、催奇形物質として試験化合物を検証する方法を含む。

20

【0012】

本発明は、一定濃度範囲の試験化合物中で、および試験化合物不在下で、未分化ヒト幹細胞様細胞(hSLC)を培養するステップと；試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、各濃度の試験化合物中で培養した未分化hSLCの培地中のオルニチンまたはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、各濃度の試験化合物中で培養した未分化hSLCの培地中のシスチンまたはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化を判定するステップと；各濃度の試験化合物について、オルニチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数と、シスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数との比率を判定するステップとを含み、所定の試験化合物濃度における約0.88以下の比率が、その所定の濃度における試験化合物の催奇形性を示唆し；所定の試験化合物濃度における約0.88を超える比率が、その所定の濃度における試験化合物の非催奇形性を示唆する、試験化合物が催奇形性である曝露濃度を判定する方法を含む。

30

【0013】

本発明の方法のいくつかの態様では、シスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失、および／またはオルニチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失が、物理的分離法を使用して同定される。いくつかの態様では、物理的分離法は、質量分析法を含む。いくつかの態様では、質量分析法は、液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化質量分析法を含む。

40

【0014】

本発明の方法のいくつかの態様では、シスチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失、および／またはオルニチン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失が、比色分析または免疫学的アッセイを使用して測定される。

50

【 0 0 1 5 】

本発明の方法のいくつかの態様では、h S L C は、ヒト胚性幹細胞 (h E S C s) 、ヒト人工多能性 (i P S) 細胞、またはヒト胚様体を含む。

【 0 0 1 6 】

本発明の方法のいくつかの態様では、h S L C は、試験化合物のヒト治療的 C_{max} を含む、試験化合物濃度で培養される。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法のいくつかの態様では、h S L C は、一定濃度範囲の試験化合物中で培養される。いくつかの態様では、一定濃度範囲は、連続希釈液を含む。いくつかの態様では、一定濃度範囲は、9つの3倍希釈液を含む。いくつかの態様では、一定濃度範囲は、約0.04 μ M～約300 μ M、約4 μ M～約30,000 μ M、および約0.0001 μ M～約10 μ Mを含む。いくつかの態様では、一定濃度範囲の試験化合物は、試験化合物のヒト治療的 C_{max} を含む。

10

【 0 0 1 8 】

本発明の方法のいくつかの態様では、方法は、試験化合物不在下で培養されたh S L C と比較して、試験化合物存在下で培養されたh S L C に伴う、1つまたは複数の追加的な代謝産物の検出をさらに含む。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な代謝産物は、アルギニン、A D M A 、シスタチオニン、および / またはその断片、付加物、欠損物または喪失を含む。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な代謝産物は、物理的分離法を使用して同定される。いくつかの態様では、物理的分離法は、質量分析法を含む。いくつかの態様では、質量分析法は、液体クロマトグラフィー / エレクトロスプレーイオン化質量分析法を含む。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加的な代謝産物は、比色分析または免疫学的アッセイを使用して測定される。

20

【 0 0 1 9 】

本発明の方法のいくつかの態様では、方法は、アルギニン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数と、A D M A 、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の倍数変化との比率を判定するステップとをさらに含み、少なくとも約0.9未満または少なくとも約1.1を超える比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し；少なくとも約0.9を超えて少なくとも約1.1未満の比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

30

【 0 0 2 0 】

「および / または」という用語は、1つまたは全ての列挙された構成要素、またはあらゆる2つ以上の列挙された構成要素の組み合わせを意味する。

【 0 0 2 1 】

「好みしい」および「好みしくは」という用語は、特定状況下で特定の利点をもたらしてもよい、本発明の実施形態を指す。しかしその他の実施形態もまた、同一またはその他の状況下で好みしくあってもよい。さらに1つまたは複数の好みしい実施形態の列挙は、その他の実施形態が有用でないことを暗示せず、その他の実施形態を本発明の範囲から排除することは意図されない。明細書に記載される実施形態、および「一実施形態」、「本発明の実施形態」、「実施形態」、「例証的実施形態」などへの言及は、記載される実施形態が、特定の特性、構造、または特徴を含んでもよいことを示すが、各実施形態は、必ずしも特定の特性、構造、または特徴を含まなくてもよい。さらにこのような語句は、必ずしも同一実施形態に言及しない。さらに特定の特性、構造、または特徴が、実施形態との関連で記述される場合、明示的に記述されるかどうかに関わらず、その他の実施形態との関連でこのような特性、構造、または特徴をもたらすことは、当業者の知識の範囲内にあるものと理解される。

40

【 0 0 2 2 】

「含んでなる」という用語、およびそのバリエーションは、これらの用語が説明および特許請求の範囲に現れた場合、限定的意味を有しない。本明細書で実施形態が、「含んでなる」という言葉で記述される場合は、「からなる」および / または「から本質的になる」によって記述される、その他の点では類似した実施形態もまた、必ず提供されるものと

50

理解される。

【0023】

特に断りのない限り、「a」、「an」、「the」、および「少なくとも1つ」は、同義的に使用されて、1つまたは2つ以上を意味する。

【0024】

説明を目的とする以下の記述では、特定の数字、パラメータ、および試薬は、本発明の完全な理解を提供するために記載される。しかし本発明は、これらの特定の詳細なしで実施できることが理解される。場合によっては、本発明を不明瞭にしないように、周知の特徴は省かれ、または簡易化され得る。

【0025】

10

また本明細書において、（例えば1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5などをはじめとする）終点による数値範囲の列挙は、その範囲内に包含される全ての数を含む。

【0026】

特に断りのない限り、明細書および特許請求の範囲で使用される、成分量、分子量などを発現する全ての数字は、全ての事例で「約」という用語によって修飾されるものと理解される。したがって、特にそうでないという断りのない限り、明細書および特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、本発明によって得ることが求められる所望の特性次第で変動してもよい、近似値である。

【0027】

20

不連続ステップを含む、本明細書で開示されるあらゆる方法では、ステップをあらゆる実現可能な順序で実施してもよい。そして必要に応じて、2つ以上のステップの任意の組み合わせを一斉に実施してもよい。

【0028】

本発明の上記の概要は、開示された各実施形態または本発明の全ての実施を記載するものではない。以下の説明が、より具体的に、例示的な実施形態を例証する。本明細書全体を通じていくつかの箇所において、様々な組み合わせで使用し得る実施例の一覧を通じて、指標が提供される。いずれの場合にも、記載される一覧は、代表的なグループとしてのみ機能し、排他的な一覧として解釈されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

30

【0029】

【図1A - 1B】第1相試験（図1A）で使用される単一曝露レベルで処置される非標的メタボロミクスのための、および第2相試験（図1B）で使用される複数曝露レベルで処置される標的生物マーカー実験のための、プレートデザイン。どちらのプレートにも、実験対照または参照処置（0.1%DMSO）が各プレート上に存在する、参照デザインが組み込まれる。培養液のみ（細胞なし）対照を使用して、試料マトリックスに対する試験化合物の影響を評価する。各ウェルは、個別サンプルとして分析される。黒い丸は細胞サンプルに相当し、黒い四角は培地対照サンプルを示す。

【図2】標的生物マーカーアッセイのグラフ表示。ヒト胚性幹（hES）細胞を4つの対数単位にわたる、9つの濃度の試験化合物に曝露させた。オルニチン/シスチン比（o/c比；灰色曲線）および細胞生存率（黒色曲線）の用量応答曲線は、4パラメータ対数ロジスティックモデルを使用して適合された。o/c比の用量応答曲線が催奇形性閾値（0.88；灰色線）を超える、補間点による濃度予測は、代謝搅乱が催奇形性可能性（すなわち催奇形可能性：o/c比、白丸）を有する曝露レベルを示す。細胞生存率（黒丸）からの催奇形可能性濃度は、細胞生存率用量応答曲線が催奇形性閾値を超える補間点である。催奇形可能性は、一方では、曝露が催奇形性を伴う様式で代謝を搅乱させず（淡色網掛けボックス）、他方では曝露が代謝中で潜在的に催奇形性移行を引き起こしてもよい（暗色網掛けボックス）曝露に基づく、両側毒性モデルを作り出す。x軸は、化合物濃度（μM）である。細胞生存率測定値およびo/c比測定値の双方は、y軸上の によって表わされる同一尺度上に存在する。o/c比のy軸の値は、参照処置正規化（倍数変化）値（

40

50

オルニチン / シスチン) の比率である。生存率測定の y 軸の値は、参照処置細胞生存率 R FU について正規化された処置細胞生存率 R FU である。

【図 3 A - 3 B】分類ウィンドウを設定するために治療的 C_{max} 濃度を利用する、既知のヒト催奇形物質および非催奇形物質の分類スキームのグラフ表示。 o / c 比の用量応答曲線(灰色曲線)は、4 パラメータ対数ロジスティックモデルを使用して適合させ、 o / c 比が催奇形性閾値を超える濃度(すなわち催奇形可能性、白丸)を補完するのに使用された。試験化合物は、催奇形可能性濃度が、ヒト治療的 C_{max} よりも高い場合に、非催奇形物質と予測された(図 3 A)。試験化合物は、催奇形可能性濃度が、ヒト治療的 C_{max} よりも低い場合に、催奇形物質と予測された(図 3 B)。ここで概説されるのと同じ論理が、生存率測定にも適用される。 x 軸は、化合物濃度(μM)である。 o / c 比の y 軸の値は、参照処置正規化(倍数変化)値(オルニチン / シスチン)の比率である。
10

【図 4 A - 4 C】第1相試験で評価された、オルニチン(図 4 A)、シスチン(図 4 B)、および o / c 比(図 4 C)の代謝搅乱。各点は、9つの独立した実験ブロックの平均値を表す。黒塗り点は催奇形物質を示し、白抜き点は非催奇形物質を示す。誤差棒は、標準誤差である。垂直の灰色線は、催奇形性閾値に相当する。 x 軸は、参照正規化された各代謝産物の倍数変化(図 4 A および 4 B)、または参照正規化されたオルニチン / シスチン比の値(図 4 C)である。 y 軸は、非催奇形物質および催奇形物質によって順序付けた処置である。白抜き矢印は、化合物が非催奇形物質に分類される範囲を示す。黒塗り矢印は、化合物が催奇形物質に分類される範囲を示す。

【図 5 A - 5 B】トレーニングセット(図 5 A)および試験セット(図 5 B)における、第2相で判定された o / c 比(TP)の化合物催奇形可能性濃度と、標的生物マーカーアッセイからの C_{max} 値の差の可視化。黒塗り点は催奇形物質に相当し、白塗り点は非催奇形物質に相当する。TP と C_{max} の間に 0 未満の差がある処置は催奇形物質に分類され、TP と C_{max} の間に 0 を超える差がある処置は非催奇形物質に分類される。 x 軸は、10 を底とする対数に変換された C_{max} 濃度値から減算された、10 を底とする対数に変換された催奇形可能性濃度値である(表 6 および 7 を参照されたい)。 y 軸は、非催奇形物質および催奇形物質によって順序付けた処置である。白抜き矢印は、化合物が非催奇形物質に分類される範囲を示す。黒塗り矢印は、化合物が催奇形物質に分類される範囲を示す。
20

¹エベロリムスの C_{max} は、アッセイで使用される最低曝露レベル未満であり、この化合物の o / c 比は催奇形性閾値未満で開始するので、これは催奇形物質に分類される。
30

【図 6 A - 6 B】トレーニングセット化合物の典型的なサブセットの標的生物マーカーアッセイ結果(表 6)。4つの既知のヒト催奇形物質: サリドマイド(図 6 A)、全トランス型レチノイン酸(図 6 B)、バルプロ酸(図 6 C)、5 - フルオロウラシル(図 6 D)、および2つの非催奇形物質: レチノール(図 6 E)およびサッカリン(図 6 F)について、生存率分析(黒色曲線)および o / c 比(灰色曲線)の用量応答曲線が示される。 x 軸は、化合物濃度(μM)である。細胞生存率測定値および o / c 比測定値はどちらも、 y 軸上にによって表わされる同一尺度上に存在する。 o / c 比の y 軸値は、参照処置正規化(倍数変化)値(オルニチン / シスチン)の比率である。生存率測定の y 軸値は、参照処置細胞生存率 R FU について正規化された処置細胞生存率 R FU である。垂直の黒色破線は化合物特異的 C_{max} を示し、灰色横線は催奇形性閾値(0.88)を示す。白丸は、 o / c 比の催奇形可能性濃度(TP)を表す。淡色および暗色網掛け領域は、化合物が、それぞれ非催奇形性または催奇形性と予測される濃度に相当する。点は平均値であり、誤差棒は標準誤差である。これらの数値の解釈は、図 2 および 3 に概説される。
40

【図 6 C - 6 D】同上。

【図 6 E - 6 F】同上。

【図 7 A - 7 B】2つの試験セット化合物(表 7): ロバスタチン(図 7 A)およびラパチニブ(図 7 B)における、ラット生体内発達毒性結果と比較した、標的生物マーカーアッセイ結果。生存率分析(黒色線)および o / c 比(灰色線)における、標的生物マーカーアッセイからの用量応答曲線が示される。 x 軸は、化合物濃度(μM)である。細胞生存率測定値および o / c 比測定値はどちらも、 y 軸上にによって表わされる同一尺度上
50

に存在する。 o/c 比の y 軸値は、参照処置正規化（倍数変化）値（オルニチン／シスチン）の比率である。生存率測定の y 軸値は、参照処置細胞生存率 R FU について正規化された処置細胞生存率 R FU である。垂直の黒色破線は化合物特異的 C_{max} を示し、灰色横線は催奇形性閾値（0.88）を示す。白丸は、 o/c 比の催奇形可能性濃度（TP）を表す。淡色および暗色網掛け領域は、化合物が、それぞれ非催奇形性または催奇形性と予測される濃度に相当する。灰色破線は、ラット生体内発達毒性試験で陽性結果が観察された濃度を表す。点は平均値であり、誤差棒は標準誤差である。これらの数値の解釈は、図 2 および 3 に概説される。

【図 8】未知の化合物に対する使用と対比させた、生物マーカーアッセイ開発を概説する略図。

10

【図 9】各トレーニングセット薬剤における、ADM A およびシスチン比の参照処置正規化比率を示す。

【図 10】各トレーニングセット薬剤における、シスタチオニンおよびシスチン比の参照処置正規化比率を示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、ヒト幹様細胞（hSLC）を使用して、医薬品およびその他の非医薬化合物の毒性、特に発達毒性、および催奇形性を判定するためのヒト特異的試験管内方法を提供する。本発明は、hSLC およびメタボロミクスを利用して、化合物のヒト発達毒性を予測するための予測的で定量的な完全ヒト試験管内スクリーニング法を提供する。本方法は、種間動物モデルに伴う限界を克服し、革新的で堅固な代案の試験管内モデル系を提供して、化学物質の発達毒性を予測する。より予測性の高い発達毒性スクリーニングを適用することで、先天異常の蔓延が低減し、医薬および化学物質の安全性が高まるであろう。

20

【0031】

本発明は、発達毒性可能性の初期シグナルとして使用し得る、培地中の代謝搅乱を測定することで、曝露に基づく試験管内アッセイを提供する。

【0032】

本発明の方法によって、多様なヒト幹様細胞（hSLC）のいずれかを使用して、化学物質の発達毒性を予測してもよい。ヒト幹様細胞としては、多能性未分化ヒト胚性幹細胞（hESC）、ヒト人工多能性（iPS）細胞、ヒト胚様体、および hSLC 由来系統特異的細胞が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

【0033】

hESC は、着床前ヒト胚から直接単離される多能性自己再生細胞であり、それは試験管内で器官形成を再現する。系統特異的前駆細胞は hESC に由来して、特異的細胞系統に入っているが、依然としてその特異的系統内の細胞型に関して多分化能を維持している。例えば神経性前駆体は、神経分化が決定付けられているが、その神経性細胞型については、依然として非制限的である。本明細書の用法では、「ヒト胚性幹細胞（hESC）」という用語は、発達中胚盤胞の内細胞塊に元来由来する未分化幹細胞、特に多能性未分化ヒト幹細胞、およびその部分的分化細胞型（例えば分化 hESC の下流始原細胞）を含むことが意図される。本明細書で提供されるように、hESC の試験管内培養物は、多能性で不死化されておらず、当該技術分野で十分に確立された方法を使用して、系統特異的細胞および分化細胞型を生じるように誘導し得る。本発明の方法実施で有用な hESC としては、例えば米国特許第 6,200,806 号明細書で Thomson らによって記載されるような着床前胚盤胞に由来するものが挙げられるが、これに限定されるものではない。以下、複数の hESC 系が、米国および英国幹細胞バンクで利用できる。使用される hESC としては、WA01、WA07、および WA09 の 3 種の hES 細胞系のいずれかが挙げられる。以前の研究は、既知のヒト催奇形結果がある化合物への曝露に続く、hES 細胞消耗培地の非標的メタボロミクスに基づく評価が、発達毒性スクリーニングとして利用し得る予測的シグネチャを生じることを確立している（そのそれぞれの内容全体を本明細書に援用する、Kleininstreuer et al., 2011, Toxicology

40

50

1 Appl Pharmacol; 257: 111-121; および West et al., 2010, Toxicol Appl Pharmacol; 247: 18-27)。

【0034】

ヒト人工多能性幹細胞(iPS)細胞は、特定遺伝子の強制発現の誘導によって、典型的に成人体細胞である非多能性細胞から、人工的に誘導される多能性幹細胞の一種である。iPS細胞は、特定の幹細胞遺伝子およびタンパク質発現、クロマチンメチル化パターン、倍加時間、胚様体形成、奇形腫形成、生存可能なキメラ形成、および発生能および分化能力などの多くの点で、胚性幹細胞などの天然多能性幹細胞と同一であると考えられる。iPS細胞は、例えば成人組織から(例えば骨髄などから得られる細胞から)、および単為発生によって得てもよい(例えばVrana et al., 2003, Colloquium; 100, Supp. 1: 11911-11916を参照されたい)。

ヒト胚様体は、ヒト胚性幹細胞に由来する細胞の凝集体である。細胞凝集は、懸滴、非組織培養処置プレート上の播種または攪拌フラスコによって強要され; いずれの方法も、細胞が表面に付着して典型的なコロニー増殖を形成するのを妨げる。凝集すると分化が開始し、細胞は限定的に胚発生を再現し始める。胚様体は、内胚葉、外胚葉、および中胚葉の全ての3胚芽層の細胞から構成される。

【0035】

本発明の細胞としては、hSLC由来系統特異的細胞が挙げられる。「hSLC由来系統特異的細胞」、「幹細胞前駆体」、「系統特異的細胞」、「hSLC由来細胞」、および「分化細胞」という用語は、本明細書の用法では、細胞が多分化能が減少した特異的系統に決定付けられるように、hSLCから分化した系統特異的細胞を包含することが意図される。例えば、hSLC由来系統特異的細胞は、hSLCに由来して、特異的細胞系統に入っているが、依然として、特異的系統内の細胞型に関しては多分化能を維持している。hSLC由来系統特異的細胞としては、例えば、神経性幹細胞、神経性前駆細胞、神経細胞、心臓幹細胞、心臓前駆細胞、心筋細胞などが挙げられる。いくつかの実施形態では、これらのhSLC由来系統特異的細胞は、最終細胞型に関して未分化のままである。例えば、ニューロン幹細胞はhSLCに由来して、神経細胞系に決定付けられるのに十分に分化している。しかしニューロン前駆体は、「幹細胞性」を維持し、それはあらゆるタイプの神経細胞に発達する可能性を維持する。追加的な細胞型としては、hESCまたは例えば神経細胞などの系統特異的前駆細胞に由来する、最終分化細胞が挙げられる。

【0036】

本発明の方法によって、例えば、Ludwig et al. (2006, Nat Methods; 3: 637-46)、米国特許出願第11/733,677号明細書(“Reagents and Methods for Using Human Embryonic Stem Cells to Evaluate Toxicity of Pharmaceutical Compounds and other Compounds”)、PCT/US2011/029471号明細書、および米国特許出願第13/069,326号明細書(“Predicting Human Developmental Toxicity of Pharmaceuticals Using Human Stem-Like Cells and Metabolomics”)で開示される方法をはじめとする、当該技術分野で周知の細胞培養法、および本明細書に記載されるもののいずれかを使用して、hSLCを培養してもよい。

【0037】

本発明のいくつかの態様では、hSLCは、試験化合物への曝露前および/またはその最中に、未分化状態を維持する。本発明のいくつかの態様では、hSLCは、試験化合物への曝露中に支持細胞層不在下で培養されてもよく、および/またはこのような曝露前に支持細胞層上で培養されてもよい。

【0038】

本発明の方法は、化合物曝露に続いて、hSLCからの消耗細胞培養液中で、評価され

10

20

30

40

50

る細胞代謝の変化をプロファイルする。この培地の代謝フットプリントは、「セクレトーム」と称される細胞代謝の機能測定値である。セクレトームは、細胞培養に続いて、消耗培地（本明細書で、「細胞培養上清」、「培養上清」、「上清」、「細胞上清」、「細胞培養液（複数）」、「培養液（複数）」、「細胞培養液（単数）」、「培養液（単数）」、「培地（複数）」、または「培地（単数）」と称されることもある）中に存在する、代謝産物を指す。セクレトームは、培地成分と、受動的および能動的に原形質膜を越えて輸送される代謝産物と、溶解時に放出される細胞内代謝産物と、酵素の細胞外代謝を通じて生成されるものを含む。未処置培養物と比較した、試験化合物曝露によって引き起こされるセクレトームの変化は、毒性の代謝シグネチャを生じる。セクレトームは、再現性ある試料採取が非常に容易であり、代謝終結に要する取り扱いが最小であり、細胞を破壊しないので細胞をその他のアッセイで使用でき、ハイスループット評価に適しており、経時的な代謝産物蓄積があるので強力なシグナルを測定し得るという、細胞培養液プロファイリングのためのいくつかのユニークな性質があることから、測定される。化合物曝露に続いて代謝変化を測定する能力は、ヒトの発達妨害と関連づけられる新規生物マーカーを同定して、これらの変化に基づく、発達毒性のための高度に予測的なモデルを開発する機会を提供した。

【0039】

代謝産物としては、糖類、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、ホルモン、ビタミン、オリゴペプチド（約100未満のアミノ酸長）、ならびにそのイオン性断片が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの態様では、代謝産物は、分子量が約3000ダルトン未満であり、より特には約50～約3000ダルトンである。

【0040】

本発明では、催奇形性化合物の不在下で培養されたhSLCと比較して、試験化合物存在下で培養されたhSLC中の代謝産物の変化倍数を判定してもよい。催奇形性化合物の代謝効果は、催奇形性化合物不在下で培養されたhSLC（またはいくつかの態様では、既知の非催奇形性化合物存在下で培養されたhSLC）と比較した、催奇形性化合物存在下で培養されたhSLC中の1つまたは複数の代謝産物の違いを指す。代謝産物は示差的に発現されてもよく、例えば代謝産物の発現は、催奇形性化合物への曝露時に増大または低下してもよい。

【0041】

いくつかの態様では、催奇形性化合物不在下で培養されたhSLCと比較した、試験化合物存在下で培養されたhSLC中の2種の代謝産物の倍数変化の比率を判定してもよい。例えば本発明によって、オルニチン対シスチン、非対称性ジメチルアルギニン（ADM A）対シスチン、および/またはシスタチオニン対シスチンの倍数変化における改変された比率が、試験化合物の発達毒性/催奇形性について予測的であってもよいと判定されている。これらの比率（ration）の1つ、2つ、または3つ全てのいずれかを利用して、化合物の発達毒性を判定してもよい。

【0042】

本発明によって、未処置培養物と比較した、試験化合物曝露によって引き起こされるセクレトームの変化は代謝シグネチャを生じ、それは細胞生存率を測定するために使用されてもよい。細胞培養に続いて消耗培地中で測定される細胞代謝変化は、細胞健康の機能的測定である。未処置培養物と比較した、被検物質への曝露によって引き起こされるセクレトームの変化は、代謝シグネチャを生じ、それを使用して、細胞培養中に存在する代謝的に生存可能な細胞数を推測し得る。本明細書に記載される分泌代謝産物の1つまたは複数を利用して、参照培養「対照群」中の細胞数と比較した、生細胞数を推測し得る。これらの代謝産物を利用して、細胞を破壊したまたは衝撃を与える必要なしに、細胞培養中の生細胞数を測定し得る。これらの代謝産物は、成長細胞の妨害を必要としない、新規生存率尺度として使用し得る。

【0043】

本発明によって、未処置培養物と比較した、一定濃度範囲の試験化合物への曝露によっ

10

20

30

40

50

て引き起こされるセクレトームの変化を使用して、試験化合物が催奇形性になる濃度を判定してもよい。化合物の催奇形性可能性は、胎児の曝露レベルと関連付けられている。したがって化合物は、曝露レベル次第で催奇形性および非催奇形性のどちらかと見なし得る。例えば、米国食品医薬品局(FDA)の最大推奨一日投与量(RDA; 8,000 IU)未満で服用されるレチノール(ビタミンA)は、発達中の胎児に対する有害効果を有しない。しかし高用量のレチノール(>25,000 IU/日)は、実験動物およびヒトの双方で13-시스レチノイン酸曝露に続いて見られるものに類似した、奇形を引き起こすことが示されている(Teratology Society, 1987, "Teratology Society position paper: recommendations for vitamin A use during pregnancy," *Teratology*; 35: 269-275)。10

【0044】

いくつかの態様では、化合物の催奇形性は、それらのIC₅₀またはEC₅₀用量レベルに相当する濃度、それらの循環用量に相当する濃度、母親循環に相当する濃度、および/または試験化合物のヒト治療的C_{max}に相当する濃度で、試験してもよい。このような投薬は、生体内で発達中のヒト胚の曝露レベルと、ヒトの発達に対する投薬化合物の有毒または催奇形性効果とを再現する。

【0045】

いくつかの態様では、試験化合物の一定濃度範囲にわたって、化合物の催奇形性を試験してもよい。このような範囲としては、例えば、約0.04 μM~約300 μM、約4 μM~約30,000 μM、および約0.0001 μM~約10 μMが挙げられる。このような範囲としては、例えば、5、6、7、8、9、10倍、またはそれ以上の希釈の連続希釈液が挙げられる。このような希釈は、例えば、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、またはそれ以上であってもよい。20

【0046】

本発明によって、発達毒性予測のための細胞生存率データに従って、個々の代謝産物および/または倍数変化の比率を利用してよい。本明細書に記載されるquick Predict法は、細胞培養に基づく9点用量曲線の評価を代謝指数と組み合わせて、被検物質が、7日間の時間枠内に発達毒性および細胞毒性を示してもよい用量を予測する。このアッセイワークフローは、従来の「オミクス」に基づく計算的アプローチに比べて、顕著な5倍の処理量増大をもたらす。以前記載されているdevToxアッセイ(例えば、PCT/US2011/029471号明細書および米国特許出願第13/069,326号明細書("Predicting Human Developmental Toxicity of Pharmaceuticals Using Human Stem-Like Cells and Metabolomics," West et al., 2010, *Toxicol Appl Pharmacol*; 247(1): 18-27、およびKleininstreuer et al., 2011, *Toxicol Appl Pharmacol*; 257(1): 111-121を参照されたい)では、幹細胞に、試験化合物が、(1)最低限の細胞死で最大の代謝応答を提供するメタボロミクス試験のための最適用量レベルを測定するために実施される、細胞生存率測定のための複数濃度で、そして(2)次に、最適濃度を判定した後に、最適濃度およびIC₅₀から誘導される3つの濃度で細胞の新しいバッチが添加され、ESI正イオン化極性およびESI負イオン化極性の双方を使用して、LC-MS分析のために培地が収集されるという2段階で、添加される。本発明のQuickPredict法では、複数濃度で投入された細胞を含有する第1段階の96ウェルプレートから培地を収集し、正極性ESIのみを使用して、はるかにより短いLC勾配(以前の方法の23分間にに対して6.5分間)を使用して、質量分光計上で直接分析される。いくつかの態様では、QuickPredict法は、より長いPhenomenex Luna HILIC 100×3mm 1.7 μMカラムでなく、Waters Acuity UPLC BEH Amide 2.1×50 1.7 μMカラムを利用してもよい。LC-MSデータは、18時間以内に304050

、（2種の試験化合物に対応する）2枚の96ウェルプレートについて得られ得る。

【0047】

例えば、いくつかの態様では、（例えば、約1.01、約1.02、約1.03、約1.04、約1.05、約1.06、約1.07、約1.08、約1.09、約1.1、約1.11、約1.12、約1.13、約1.14、約1.15、約1.16、約1.17、約1.18、約1.19、約1.2、約1.21、約1.22、約1.23、約1.24、約1.25、約1.26、約1.27、約1.28、約1.29、約1.3、約1.31、約1.32、約1.33、約1.34、約1.35、約1.36、約1.37、約1.38、約1.39、約1.4、約1.41、約1.42、約1.43、約1.44、約1.45、約1.46、約1.47、約1.48、約1.49、または約1.5をはじめとするが、これに限定されるものではない）約1を超える倍数変化比率および／または（例えば、約0.99、約0.98、約0.97、約0.96、約0.95、約0.94、約0.93、約0.92、約0.91、約0.9、約0.89、約0.88、約0.87、約0.86、約0.85、約0.84、約0.83、約0.82、約0.81、約0.8、約0.79、約0.78、約0.77、約0.76、約0.75、約0.74、約0.73、約0.72、約0.71、約0.7、約0.69、約0.68、約0.67、約0.66、約0.65、約0.64、約0.63、約0.62、約0.61、約0.6、約0.59、約0.58、約0.57、約0.56、約0.55、約0.54、約0.53、約0.52、約0.51、または約0.5をはじめとするが、これに限定されるものではない）約1未満の倍数変化比率などの約1以外の倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆する。

【0048】

例えば、いくつかの態様では、約0.9未満および／または約1.1を超える倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.9を超えるおよび／または約1.1未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.9以下および／または約1.1以上の倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.9を超えるおよび／または約1.1未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

【0049】

例えば、いくつかの態様では、約0.89未満および／または約1.11を超える倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.89を超えるおよび／または約1.11未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.89以下および／または約1.11以上の倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.89を超えるおよび／または約1.1未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

【0050】

例えば、いくつかの態様では、約0.88未満および／または約1.12を超える倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.88を超えるおよび／または約1.12未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.88以下および／または約1.12以上の倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.88を超えるおよび／または約1.12未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

【0051】

例えば、いくつかの態様では、約0.87未満および／または約1.13を超える倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.87を超えるおよび／または約1.13未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.87以下および／または約1.13以上の倍数変化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.87を超えるおよび／または約1.13未満の倍数変化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

【0052】

10

20

30

40

50

例えば、いくつかの態様では、約0.86未満および／または約1.14を超える倍数变化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.86を超えるおよび／または約1.14未満の倍数变化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.86以下および／または約1.14以上の倍数变化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.86を超えるおよび／または約1.14未満の倍数变化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

【0053】

例えば、いくつかの態様では、約0.85未満および／または約1.15を超える倍数变化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.85を超えるおよび／または約1.15未満の倍数变化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.85以下および／または約1.15以上の倍数变化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.85を超えるおよび／または約1.15未満の倍数变化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

10

【0054】

例えば、いくつかの態様では、約0.84未満および／または約1.16を超える倍数变化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.84を超えるおよび／または約1.16未満の倍数变化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。いくつかの態様では、約0.84以下および／または約1.16以上の倍数变化比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し、約0.84を超えるおよび／または約1.16未満の倍数变化比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。

20

【0055】

代謝産物、その断片、付加物、欠損物または喪失の判定は、物理的分離法を使用して同定されてもよい。いくつかの実施形態では、代謝産物、その断片、付加物、欠損物または喪失は、物理的分離法以外の手順を使用して同定されてもよい。このような測定方法としては、例えば、比色分析アッセイ、酵素分析法、または免疫学的アッセイが挙げられる。免疫学的アッセイとしては、例えば、IF、RIA、ELISA、およびその他の免疫測定法が挙げられる。代案としては、特定の生物マーカーは、例えば、リアルタイムPCR、RT-PCR、ノーザン分析、および原位置ハイブリダイゼーションをはじめとする、遺伝子発現解析によって同定し得る。

30

【0056】

「物理的分離法」という用語は、本明細書の用法では有毒、催奇形性または試験化合物に接触させたHPLC中で生成される小型分子に、変化および差異プロファイルを生じさせるのに十分であることが、当業者に知られている方法を指す。いくつかの実施形態では、物理的分離法は、糖類、有機酸、アミノ酸、脂肪酸、ホルモン、ビタミン、およびオリゴペプチド、ならびにそのイオン性断片、および低分子量化合物（好ましくは3000ダルトン未満、より特には50～3000ダルトンの分子量）をはじめとするが、これに限定されるものではない細胞代謝産物の検出を可能にする。例えば、質量分析法を使用し得る。特定の実施形態では、この分析は、液体クロマトグラフィー／エレクトロスプレーイオン化飛行時間質量分析法（LC／ESI-TOF-MS）によって実施してもよい。しかし本明細書に記載される代謝産物は、本明細書に記載されるもののいずれかをはじめとするが、これに限定されるものではない、代案の分光分析法またはその他の当該技術分野で公知の方法を使用して、検出し得るものと理解される。

40

【0057】

例えば生物マーカーは、LC／ESI-TOF-MSおよび／またはQTOF-MSをはじめとする方法によって同定される。メタボロミック生物マーカーは、それらの独自の分子量と、特定の有毒、催奇形性または試験化合物に応答してマーカーが検出される整合性とによって同定され；したがって生物マーカーに相当する根本的な化合物の実際の同一性は、本発明の実施に必要ではない。

【0058】

生物マーカーは、例えば、質量分析法などのMALDI/TOF（飛行時間）、SEL

50

D I / T O F 、液体クロマトグラフィー質量分析法 (L C - M S) 、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (G C - M S) 、高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (H P L C - M S) 、キャピラリー電気泳動法質量分析法、核磁気共鳴分光分析、タンデム質量分析法 (例えば、M S / M S 、M S / M S / M S 、E S I - M S / M S など) 、二次イオン質量分析法 (S I M S) 、および / またはイオン運動性分光分析 (例えば、G C - I M S 、I M S - M S 、L C - I M S 、L C - I M S - M S など) を使用して同定されてもよい。

【 0 0 5 9 】

いくつかの態様では、気相イオン分光光度計を使用してもよい。その他の態様では、レーザー脱離 / イオン化質量分析法を使用して、生物マーカーを同定してもよい。例えば最新のレーザー脱離 / イオン化質量分析法 (L D I - M S) は、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 (M A L D I) 质量分析法、および表面增强レーザー脱離 / イオン化 (S E L D I) の 2 つの主なバリエーションで実施してもよい。M A L D I では、マトリックスを含有する溶液に検体を混合し、一滴の液体を基材表面に載せる。次に生物マーカーと共に、基材溶液を共結晶化する。基材を質量分光計中に挿入する。レーザーエネルギーは基材表面に誘導されて、そこではタンパク質が顕著に断片化されることなく、脱離およびイオン化される。しかし M A L D I には、分析ツールとしての限界がある。それは、生体液の分画手段を提供せず、マトリックス材料は、特に低分子量分析物の検出に干渉し得る。S E L D I では、基材表面は、それが脱離過程に能動的に参加するように修飾される。一変法では、表面は、対象生物マーカーと選択的に結合する、吸着材および / または捕捉試薬で誘導体化される。別の変法では、表面は、レーザーが当たった際に脱着されないエネルギー吸収分子で誘導体化される。別の変法では、表面は、対象生物マーカーと結合し、またレーザー適用時に破壊される光分解結合も含有する、分子で誘導体化される。これらの各方法で、誘導体化剤は、一般に、サンプルが塗布される基材表面の特定位置に局在化する。例えば、S E L D I 親和性表面を使用して検体 (例えば生物マーカー) を捕捉し、捕捉された検体に基材含有液体を添加してエネルギー吸収材を提供することで、2 つの方法を併用し得る。

【 0 0 6 0 】

質量分析法からのデータは、質量クロマトグラムとして表されてもよい。「質量クロマトグラム」は、x 軸が時間を表し、y 軸がシグナル強度を表す、クロマトグラムとしての質量分析法データの代表である。一態様では、質量クロマトグラムは、全イオン電流 (T I C) クロマトグラムであってもよい。別の態様では、質量クロマトグラムは、基準ピーククロマトグラムであってもよい。その他の態様では、質量クロマトグラムは、選択的イオンモニタリング (S I M) クロマトグラムであってもよい。さらに別の態様では、質量クロマトグラムは、選択的反応モニタリング (S R M) クロマトグラムであってもよい。さらに別の態様では、質量クロマトグラムは、抽出イオンクロマトグラム (E I C) であってもよい。E I C では、単一特性が、実行全体にわたってモニターされる。分析中の各点で、特定検体の質量対電荷比の前後における、質量許容差ウィンドウ内の全強度または基準ピーク強度が、プロットされる。質量許容差ウィンドウの規模は、典型的に、データを収集する装置の質量精度および質量分解能に左右される。本明細書の用法では、「特性」という用語は、単一の小型代謝産物、または代謝産物断片を指す。いくつかの実施形態では、特性という用語はまた、さらなる調査時のノイズを含んでもよい。

【 0 0 6 1 】

当業者は、例えば、脱離源、質量分析器、検出、および様々なサンプル調製などの質量分光計のあらゆる構成要素を、本明細書に記載されるその他の適切な成分または調製物、または当該技術分野で公知のものと組み合わせ得ることを理解する。例えば、対照サンプルは、¹³C などの重原子を含有してもよく、その結果、同一質量分析法の実行中に、試験サンプルを既知の対照サンプルに混合できるようになる。良好な安定同位体の標識が、含まれる。

【 0 0 6 2 】

レーザー脱離飛行時間 (T O F) 质量分光計を使用してもよい。レーザー脱離質量分析

10

20

30

40

50

法では、結合マーカーのある基材が、吸気系統に装入される。マーカーは、イオン化源からのレーザーによって脱着され、気相にイオン化される。生じたイオンをイオン光学アセンブリーによって収集し、次に飛行時間質量分析器内で短高電圧場を通じてイオンを加速して、高真空チャンバーに流れ込ませる。高真空チャンバーの遠端では、加速イオンが、異なる時点で感度検出器表面に衝突する。飛行時間はイオン質量の関数であるので、イオン形成とイオン検出器衝撃の間の経過時間を使用して、特定質量電荷比がある分子の存在または不在を同定し得る。一態様では、MALDI-TOF質量分析法によって、生物マーカーのレベルを検出してよい。

【0063】

生物マーカーの検出法としてはまた、表面プラズモン共鳴(SPR)の使用も挙げられる。生物マーカーの脱離および同定のために、SPRバイオセンシング技術をMALDI-TOF質量分析法と合わせてもよい。

【0064】

統計解析のために、コンピュータを使用してもよい。統計解析のためのデータは、当該技術分野で公知の統計学的方法のためのソフトウェアを使用して、クロマトグラム(質量シグナルのスペクトル)から抽出し得る。統計は、個体群または実験に関する数値データを有効に活用する科学である。統計解析のための方法は、当該技術分野で周知である。

【0065】

例えば統計解析のために、Agilent Mass Profiler または Mass Profiler Professionalソフトウェアを使用してもよい。または統計解析のために、Agilent MassHunterソフトウェアQualソフトウェアを使用してもよい。代案の統計解析方法を使用し得る。このような統計学的方法としては、分散分析(ANOVA)、カイ二乗、相関、因子分析、マン・ホイットニーU、二乗加重導出(MSWD)、ピアソンの積率相関係数、回帰分析、スピアマンの順位相関係数、スチューデントのT検定、ウェルチのT検定、チューキー検定、および時系列分析が挙げられる。

【0066】

いくつかの態様では、質量分析法からのシグナルを異なる方法で変換して、方法の性能を改善し得る。個々のシグナルまたはシグナル分布要約(平均、中央値または分散など)のどちらでも、このように変換し得る。可能な変換としては、対数を取る、例えば平方根または逆数などのいくつかの正または負の出力を取る、または逆正弦を取るなどが挙げられる(*Myers, Classical and Modern Regression with Applications, 2nd edition, Duxbury Press, 1990*)。

【0067】

いくつかの態様では、試験化合物の催奇形性および非催奇形性を予測するために、統計学的分類アルゴリズムを使用して、分類モデルを作成し得る。機械学習に基づく分類指標は、機械知覚、医学的診断、バイオインフォマティクス、脳機械インターフェース、DNA配列分類、およびコンピュータ視覚における物体認識などの様々な分野で適用されている。学習に基づく分類指標は、いくつかの生物学的問題を解決する上で、高度に効率的であることが判明している。

【0068】

本明細書の用法では、「トレーニングセット」は、可能な予測的関係性を発見するために、情報科学の様々な領域で使用されるデータのセットである。トレーニングセットは、人工知能、機械学習、遺伝子プログラミング、知的システム、および統計で使用される。これらの全分野において、トレーニングセットは試験セットとほとんど同じ役割を有し、それと併せて使用されることが多い。

【0069】

本明細書の用法では、「試験セット」は、予測的相関の強度および効用を評価するために、情報科学の様々な領域で使用されるデータのセットである。試験セットは、人工知能

10

20

30

40

50

、機械学習、遺伝子プログラミング、知的システム、および統計で使用される。これらの全分野で、試験セットは、ほとんど同じ役割を有する。

【0070】

「感度」および「特異性」は、二成分分類試験の性能の統計学的尺度である。感度は、そのように正しく同定された実際の陽性の比率（例えば病状を有すると正しく同定された病人の割合）を測定する。特異性は、正しく同定された陰性の比率（例えば病状を有しないと正しく同定された健常者の割合）を測定する。これらの2つの尺度は、I種およびII種の誤りの概念と密接に関連する。理論的な最適予測は、100%感度（すなわち病人群からの全員を病人と予測する）と、100%特異性（すなわち健常者群からは誰も病気と予測しない）とを達成し得る。100%の特異性とは、試験が、例えば特定の疾患の試験において、疾患がない全員を疾患がないとして認識するなど、全ての実際の陰性を認識することを意味する。100%の感度とは、試験が、例えば全ての病人を病気として認識するなど、全ての実際の陽性を認識することを意味する。したがって高特異性試験とは対照的に、高感度試験の陰性結果は、疾患を除外するのに使用される。高特異性試験における陽性結果は、疾患の存在を確認し得る。しかし理論的な観点からは、100%特異的試験基準はまた、それによって試験が常に陰性を示すだけである、「偽の」試験キットのせいにもし得る。したがって特異性単独では、試験が陽性例をいかに良く認識するのかが分からぬ。感度の知識もまた必要である。あらゆる試験において、通常は、尺度間のトレードオフがある。例えば、特定の病状のある人々がその中で試験される診断アッセイでは、病状を有しないと正しく同定される健常者の一定割合を見逃すリスクを低下させるために（高感度）、病状を有すると正しく同定される病人の特定割合を見過ごすように、アッセイを設定してもよい（低特異性）。このトレードオフは、受信者動作特性（ROC）曲線を使用して、グラフで表し得る。

10

【0071】

測定系の「確度」は、その実際の（真の）値に対する測定量の近さの程度である。再現性または反復性とも称される測定系の「精度」は、無変化条件下の反復測定値が同一結果を示す程度である。2つの語は、口語用法では同義であり得るが、これらは科学的方法の文脈で意図的に対比される。測定系は、正確であるが精密でなく、精密であるが正確でなく、正確でも精密でもなく、または正確かつ精密であり得る。例えば、実験が系統的誤差を有する場合、サンプルサイズ増大させることは、一般に精度を増大させるが、確度は改善しない。系統的誤差の排除は、確度を改善するが、精度を変化させない。

20

【0072】

「予測可能性」（平凡さとも称される）という用語は、系の状態の正しい予測または予想を定性的または定量的に、行い得る程度である。完全な予測可能性は、厳密な決定論を暗示するが、予測可能性の欠如は、必ずしも決定論の欠如を暗示しない。予測可能性の限界は、情報欠如または過剰な複雑度などの要因によって引き起こされ得る。

30

【0073】

いくつかの態様では、本発明の方法は、少なくとも約80%の確度、少なくとも約85%の確度、少なくとも約90%の確度、または少なくとも約95%の確度で、試験化合物の催奇形性を予測してもよい。

40

【0074】

いくつかの態様では、本発明の方法は、少なくとも約80%の感度、少なくとも約85%の感度、少なくとも約90%の感度、または少なくとも約95%の感度で、試験化合物の催奇形性を予測してもよい。

【0075】

いくつかの態様では、本発明の方法は、少なくとも約80%の特異性、少なくとも約85%の特異性、少なくとも約90%の特異性、または少なくとも約95%の特異性で、試験化合物の催奇形性を予測してもよい。

【0076】

いくつかの態様では、本明細書に記載される方法は、シスチン測定を単独で、または本

50

明細書に記載される代謝産物の1つまたは複数をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様なその他の代謝産物のいずれかと組み合わされたシスチンを、利用してもよい。例えば、参照処置と比較して少なくとも10%の増大の閾値を使用して、シスチンの変化倍数の判定のみを使用して、催奇形物質を分類し得る。

【0077】

いくつかの態様では、本明細書に記載される方法は、オルニチン測定を単独で、または本明細書に記載される代謝産物の1つまたは複数をはじめとするが、これに限定されるものではない、多様なその他の代謝産物のいずれかと組み合わされたオルニチンを、利用してもよい。例えば、参照処置と比較して約20%の増大および/または18.5%の低下の閾値を使用して、オルニチンの変化倍数判定のみを使用して、催奇形物質を分類し得る。

10

【0078】

オルニチン対シスチン、非対称性ジメチルアルギニン(ADMA)対シスチン、および/またはシスタチオニン対シスチンの倍数変化における比率変化を判定するのに加えて、試験化合物不在下で培養されたhSLCと比較して、試験化合物存在下で培養されたhSLCに付随する1つまたは複数の追加的な代謝産物の変化倍数をさらに判定することで、本明細書に記載される方法の確度を改善してもよい。

【0079】

いくつかの実施形態では、方法は、アルギニン、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数と、ADMA、またはその断片、付加物、欠損物または喪失の変化倍数との比率の判定をさらに含んでもよい。いくつかの態様では、少なくとも約0.9未満または少なくとも約1.1を超える比率は、試験化合物の催奇形性を示唆し；少なくとも約0.9を超えて少なくとも約1.1未満の比率は、試験化合物の非催奇形性を示唆する。例えば、PCT/US2011/029471号明細書および米国特許出願第13/069,326号明細書(“Predicting Human Developmental Toxicity of Pharmaceuticals Using Human Stem-Like Cells and Metabolomics”),West et al., 2010, Toxicol Appl Pharmacol; 247(1):18-27、およびKleininstreuer et al., 2011, Toxicol Appl Pharmacol; 257(1):111-121を参照されたい。追加的な代謝産物としては、例えば、1つ以上の追加的な代謝産物、2つ以上の追加的な代謝産物、3つ以上の追加的な代謝産物、4つ以上の追加的な代謝産物、5つ以上の追加的な代謝産物、6つ以上の追加的な代謝産物、7つ以上の追加的な代謝産物、8つ以上の追加的な代謝産物、9つ以上の追加的な代謝産物、10個以上の追加的な代謝産物、11個以上の追加的な代謝産物、12個以上の追加的な代謝産物、13個以上の追加的な代謝産物、14個以上の追加的な代謝産物、または15個以上の追加的な代謝産物が挙げられる。

20

【0080】

1つまたは複数の追加的な代謝産物としては、例えば、アラニン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸代謝経路網；アルギニンおよびプロリン代謝経路網；アスコルビン酸およびアルダル酸代謝経路網；クエン酸回路；システインおよびメチオニン代謝経路網；ガラクトース代謝経路網；グルタチオン代謝経路網；グリオキシル酸およびジカルボン酸代謝経路網；ニコチン酸およびニコチニアミド代謝経路網；パントテン酸および補酵素A生合成経路；ペントースおよびグルクロン酸相互変換経路；ペントースリン酸経路；プロパン酸代謝経路網；ピルビン酸代謝経路網；および/またはビタミンB6代謝経路網から選択される代謝経路の代謝産物が挙げられる。

30

【0081】

例えば、1つのまたは追加的な代謝産物としては、例えば、ピルビン酸、L-バリン、マレイン酸ジメチル、パントイン酸、パントテン酸、ホスホパントニル-L-システイン、5,6-ジヒドロウラシル、N-カルバモイル-L-アラニン、および/または補

40

50

酵素 A などの、パントテン酸および補酵素 A 生合成経路の代謝産物が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

例えば、1つのまたは追加的な代謝産物としては、例えば、5 - オキソプロリン、L - グルタミン酸、グリシン、L - グルタミルシステイン、グリシン、デヒドロアスコルビン酸、グルタチオニルスペルミン、および / または L - オルニチンなどの、グルタチオン代謝経路網の代謝産物が挙げられる。

【 0 0 8 3 】

例えば、1つのまたは追加的な代謝産物としては、例えば、ピルビン酸、ジメチルアルギニン、L - アルギニン、L - シトルリン、グルタミン、アスパラギン酸、L - アルゴコハク酸、グアニジノ - 酢酸 - リン酸、フマル酸、サルコシン、2 - オキソアルギニン、ピルビン酸、5 - アミノ - ペンタン酸、リナチン、ピロール - 2 - カルボキシル酸、プロトレシン、6 - オキソ - 1 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロニコチン酸、2 , 6 - ジヒドロキシニコチン酸、フマル酸、および / または GABA などの、アルギニンおよびプロリン代謝経路網の代謝産物が挙げられる。

【 0 0 8 4 】

例えば、1つのまたは追加的な代謝産物としては、例えば、6 - オキソ - 1 , 4 , 5 , 6 - テトラヒドロニコチン酸、2 , 6 - ジヒドロキシニコチン酸、および / またはフマル酸などの、ニコチン酸およびニコチニアミド代謝経路網の代謝産物が挙げられる。

【 0 0 8 5 】

例えば、追加的な代謝産物としては、シスチン、N 1 - アセチルスペルミジン、非対称性ジメチルアルギニン、シスタチオニン、2 ' - デオキシウリジン、GABA、リンゴ酸、コハク酸、およびアスパラギン酸から選択される、1つ以上、2つ以上、3つ以上、4つ以上、または5つ以上の追加的な代謝産物が挙げられる。

【 0 0 8 6 】

例えば、追加的な代謝産物としては、メチルスルホニルアセトニトリル；アスパラギン酸、N - アセチルスペルミジン；ジメチル - L - アルギニン；L - シスタチオニン；GABA；フマル酸；バリン；コハク酸；アスパラギン酸；パントイン酸；215 . 1387 の m / z と 466 の RT と ESI (+) 極性とを有する代謝産物；234 . 8904 の m / z と 246 の RT と ESI (+) 極性とを有する代謝産物；251 . 0666 の m / z と 105 の RT と ESI (+) 極性とを有する代謝産物；および 403 . 0839 の m / z と 653 の RT と ESI (+) 極性とを有する代謝産物から選択される、あらゆる 1 つ以上、あらゆる 2 つ以上、あらゆる 3 つ以上、あらゆる 4 つ以上、あらゆる 5 つ以上、あらゆる 6 つ以上、あらゆる 7 つ以上、あらゆる 8 つ以上、あらゆる 9 つ以上、あらゆる 10 個以上、あらゆる 11 個以上、あらゆる 12 個以上、あらゆる 13 個以上、またはあらゆる 14 個以上の追加的な代謝産物が挙げられる。いくつかの態様では、15 種の代謝産物における全ての倍数変化が判定される。その内容全体をそれぞれ参照によって本明細書に援用する、PCT / US2011 / 029471 号明細書の表 11 、および米国特許出願第 13 / 069 , 326 号明細書 (" Predicting Human Developmental Toxicity of Pharmaceuticals Using Human Stem - Like Cells and Metabolomics ") を参照されたい。

【 0 0 8 7 】

hSCLC およびメタボロミクスに基づく本発明の方法は、化合物の毒性および催奇形性判定するために、マウスまたはゼブラフィッシュに基づくモデルを使用する他の試験に優る、顕著な利点を提供する。

【 0 0 8 8 】

本発明の方法を使用して、試験化合物を催奇形物質または非催奇形物質として分類し、試験化合物の催奇形性を予測し、および / または試験化合物を催奇形物質として検証してもよい。本発明の方法はまた、創薬の前臨床段階における、ハイスクループットスクリーニングツールの役割を果たしてもよい。さらにこのアプローチを使用して、ヒトの発達に対

10

20

30

40

50

する、環境（重金属、産業廃棄物）および栄養（アルコールなど）化学物質の有害効果を検出し得る。さらに本発明の方法は、医薬、生物工学および環境関係機関が、化合物開発およびヒト曝露臨界用量について政策決定をするのを補佐し得る。胚性幹細胞技術への化学生物学の組み込みは、ヒトの発達と疾患の理解を深めるユニークな機会もまた提供する。h S L C から分化した細胞のメタボロミクスは、同様の役割を果たし、特定の細胞または組織型に対してより大きな感度で、そしてヒト特異的様式で、毒性および疾病の機構を解明するのに有用なはずである。

【 0 0 8 9 】

本発明の h S L C 依存的方法を使用して生成される生物マーカーポートフォリオはまた、創薬において薬剤候補およびリード化合物を前臨床評価するためのハイスループットスクリーニング法で使用してもよい。この技術の実施には実験動物が必要でないため、現行の発達毒物学モデルと比較して、発明の方法のこの態様が、産業資源に与える影響は最小である。結果として得られる生産性に対する好ましい影響は、信頼度の増大と、不都合な発達影響に遭遇するリスクの低下をもって、製薬産業の研究チームが、化合物を選択して探究開発に進めることが可能にする。

10

【 0 0 9 0 】

本発明は、1つまたは複数の代謝産物を同定および / または測定するキットを含む。いくつかの態様では、キットは、物理的分離法によって代謝産物を判定するためのものであってもよい。いくつかの態様では、キットは、例えば、比色分析、酵素的、免疫学的手順などの、物理的分離法以外の手順によって代謝産物を判定するためのものであってもよい。いくつかの態様では、アッセイキットはまた、1つまたは複数の適切な陰性対照および / または陽性対照を含んでもよい。本発明の実施に必要な緩衝液および溶液などの他の試薬を含んでもよい本発明のキットもまた、含まれる。注意書きまたは印刷された使用説明書が、このような容器に任意選択的に付隨し得る。本明細書の用法では、「包装材料」という語句は、キット内容物を収容するのに使用される、1つまたは複数の物理的な構造体を指す。包装材料は、好ましくは無菌で汚染物質を含まない環境を提供する、周知の方法によって構築される。本明細書の用法では、「パッケージ」という用語は、固定された境界内にポリペプチドを保持できる、ガラス、プラスチック、紙、ホイルなどの固体マトリックスまたは材料を指す。本発明のキットは、使用説明書もまた含んでもよい。使用説明書は、典型的に、混合される試薬およびサンプルの相対量、試薬 / サンプル混和材料の保持時間、温度、緩衝液条件などの、試薬濃度または少なくとも1つのアッセイ法パラメータについて説明する実体のある表示を含む。

20

【 0 0 9 1 】

いくつかの態様では、キットは、本明細書に記載される1つまたは複数の精製代謝産物の特定セットを固体形態で含んでなる、第1の容器と、精製代謝産物の特定のサブセットを再懸濁するための生理学的に適切な緩衝液を含んでなる、第2の容器との基本的な構成要素を含んでなる、パッケージされた組み合わせであってもよい。

30

【 0 0 9 2 】

以下の実施例によって、本発明を例証する。特定の例、材料、量、および手順は、本明細書に記載される発明の範囲と精神に従って、広義に解釈されるものと理解される。

40

【実施例】

【 0 0 9 3 】

実施例 1

発達毒性スクリーニングのための新しいヒト胚性幹細胞に基づく生物マーカーアッセイの確立および評価

本実施例によって、ヒト胚性幹 (h E S) 細胞を使用する代謝生物マーカーに基づく試験管内アッセイを開発し、催奇形性を示唆する様式で、細胞代謝を攪乱させる試験化合物濃度を同定した。このアッセイは、可能なヒト発達毒物の早期発見段階検出を助けるようにデザインされる。この試験では、迅速な試験管内催奇形性アッセイを開発するために、h E S 細胞培養液からのメタボロミックデータを使用して、可能な生物マーカーを評価し

50

た。h E S 細胞は、既知のヒト催奇形性医薬品によって、それらの公開されたヒトピーク治療的血漿濃度と同等の濃度で処置した。2つの代謝産物生物マーカー（オルニチンおよびシスチン）が、発達毒性の指標として同定された。次に9点用量応答曲線を使用して、細胞毒性評価項目と共にこれらの代謝産物を使用する、標的曝露に基づく生物マーカーアッセイを開発した。別の試験化合物セットを使用して、新規アッセイの予測性を評価した。未知の発達毒性可能性がある化合物に、アッセイをどのように適用し得るかを例証するために、妊娠中のヒト曝露データがないが、動物発達毒性試験で陽性結果を示した、追加的な10種の化合物を評価した。新規アッセイは、77%の確度（57%の感度、100%の特異性）で、試験セット中の可能な発達毒物を同定した。アッセイは、既存の生体内モデルとの高度な一致（75%）を有し、新規アッセイが、発見段階試験の一部として、新規化合物の発達毒性可能性を予測して、必要な生体内試験の起りそうな結果のシグナルを提供し得ることが実証された。
10

【0094】

本実施例は、試験化合物が、発達毒性を予測する様式で代謝を搅乱させる曝露レベルを同定するようにデザインされた発達毒性試験のため、迅速で再現可能な生物マーカーに基づくスクリーニングの開発について説明する。試験化合物に応えた2つの代謝産物オルニチンおよびシスチンの搅乱は、9つの独立した実験的複製中で評価して、実験および液体クロマトグラフィー高分解能質量分析法（LC-HRMS）システムにおける、反復性を確実にした。オルニチン／シスチン比（o/c比）を使用して、我々は、9点用量応答曲線中の代謝および細胞生存率の変化を評価して、発達毒性可能性と関連付けられている様式で代謝を搅乱させる、試験化合物の曝露レベルを判定する、迅速な標的アッセイを開発した。化合物のトレーニングセットおよび試験セット中の既知のヒト催奇形物質に対するアッセイの予測性を評価するために、化合物が発達毒性可能性を有すると予測される場合の曝露レベルを、治療用量に統一して、化合物のヒトピーク血漿生体内濃度（C_{max}）に対してスコア付けした。この場合、C_{max}値は、ヒトが治療的状況下において常態で曝露される最大濃度であり、この曝露レベルで発達毒性の検出が期待されることから、アッセイ性能の解釈を助けるための基準点曝露レベルとして使用される。
20

【0095】

しかし化合物開発の発見段階におけるアッセイの適用は、このC_{max}情報を必要とせず、試験化合物の催奇形性可能性は、試験化合物が催奇形性を示唆する様式で代謝を搅乱させる曝露レベルに基づく。アッセイのデザインおよび感度は、厳密には細胞毒性に起因する代謝産物存在量変化の交絡効果を打ち消すことで、非細胞毒性レベルにおける試験化合物の催奇形性可能性を同定できるようにする。多様な曝露レベルにおいて細胞毒性不在下で発達毒性を同定する能力は、アッセイの重要な長所であり、それを既存の試験管内アッセイから際立たせる。
30

【0096】

有用な用語および定義

催奇形性閾値。奇形発生可能性に関連づけられる代謝搅乱の閾値。閾値は、トレーニングセット結果を使用した標的生物マーカーアッセイでは、経験的に0.88と判定された。この閾値を全ての試験セットに適用し、アッセイを使用して未知の化合物を評価した。
40

【0097】

オルニチン／シスチン比（O/C比）。処置×のシスチン（Cys）の倍数変化で除した、処置×のオルニチン（Orn）の倍数変化。

【数1】

$$\text{O/C比} = \frac{(\text{Orn}_x/\text{Orn}_{\text{DMSO}})}{(\text{Cyss}_x/\text{Cyss}_{\text{DMSO}})}$$

【0098】

10

催奇形可能性。o / c 比または細胞生存率の用量応答曲線が催奇形性閾値を超える、試験化合物の補間曝露レベル（濃度）。この濃度を超える曝露レベルは、催奇形性と関連付けられている。

【0099】

確度。評価した試験化合物数で除した正しい予測数。

【0100】

感度。催奇形物質の検出、真の陽性 / (偽陰性 + 真の陽性)。

【0101】

特異性。非催奇形物質の検出、真の陰性 / (真の陰性 + 擬陽性)。

【0102】

20

トレーニングセット。発達毒性の生物マーカーを同定するのに使用された、ヒト発達毒性情報が確立されている化合物セット。試験の双方の相でこの化合物セットを試験して、催奇形性閾値を設定するのに使用した。

【0103】

試験セット。生物マーカーの同定には使用されなかったが、発達毒性の生物マーカーの予測性を評価するのに使用された、十分に確立されたヒト発達毒性情報がある化合物セット。この化合物セットを使用して、トレーニングセットを使用した標的生物マーカーアッセイおよび催奇形性閾値セットの性能を評価した。

【0104】

30

適用セット。アッセイの適用を実証するのに使用された、不十分に定義されたヒト発達毒性情報がある化合物セット。この濃度におけるヒト催奇形性は未知であるので、これらの化合物は、それらの C_{max} に基づいて、催奇形物質または非催奇形物質に分類されない。

【0105】

材料と方法

標的生物マーカーに基づくアッセイの開発と評価は、2段階で実施した。最初の相（第1相）では、非標的メタボロミック法を使用して、トレーニングセットの9つの独立した実験的複製（実験ブロック）にわたって、2つの先に同定された予測的生物マーカー（オルニチンおよびシスチン、Kleinstreuer et al., 2011, Toxicol Appl Pharmacol; 257: 111-121）の予測可能性を特性解析した。2つ目の相（第2相）では、予測的生物マーカーを使用して、催奇形可能性に基づく化合物優先順位付けのための所要時間の短い標的曝露に基づくアッセイを開発した。新規アッセイの予測性は、元のトレーニングセットならびに独立した試験化合物セットを使用して評価した。

40

【0106】

試験化学的の選択および分類。合計46種の化合物を使用して、オルニチン、シスチン、およびo / c 比が、2つの実験段階で発達毒性を予測する能力を評価した。これらの46種の化合物は、トレーニングセット、試験セット、および適用セットと命名される3群に分けられた。トレーニングセットは、発達毒性の生物マーカーを同定するのに使用された、ヒト発達毒性情報が確立されている化合物セットであった。試験セットは、生物マ-

50

カーマーの同定には使用されなかったが、発達毒性の生物マーカーの予測性を評価するのに使用された、十分に確立されたヒト発達毒性情報がある化合物セットであった。適用セットは、アッセイの適用を実証するのに使用された、不十分に定義されたヒト発達毒性情報がある化合物セットであった。この濃度におけるヒト催奇形性は未知であるので、これらの化合物は、それらの C_{max} に基づいて、催奇形物質または非催奇形物質に分類されない。

【0107】

トレーニングセットは、23種の特徴がよく分かっている医薬化合物（11種の既知のヒト非催奇形物質および12種の既知のヒト催奇形物質、表2）からなり、計算モデルを構築して、催奇形性を予測する生物マーカーを同定するために以前使用された（Kleinsteuer et al., 2011, Toxicol Appl Pharmacol; 257: 111-121）。このトレーニングセットは、双方の実験段階で利用された。これらの試験で開発された標的生物マーカーアッセイの予測能力を評価するために、第2の実験段階で、13種の特徴がよく分かっている医薬化合物（6種の既知のヒト非催奇形物質および7種の既知のヒト催奇形物質、表3）の追加的な試験セットを使用して、新規アッセイの予測性を評価した。最後の化合物セット（適用セット、表4）は、10種の化合物からなり、それらはヒト妊娠中の曝露について利用できる確証的発達毒性データを有しないが、発達毒性可能性について利用できる動物データを有する。催奇形性分類を各化学物質に伴う観察されたヒトへのリスクに厳密に注目して、アッセイ開発に、化合物分類の二階級制度（催奇形物質および非催奇形物質）を適用した。化合物は、アンブレナビル、ボセンタン、エンタカポン（Toronto Research Chemicals, Toronto, Ontario, Canada）、ラパチニブ（Chemitek, Indianapolis, IN）、シドフォビルおよびラメルテオン（Selleck Chemicals, Houston, TX）を除いて、Sigma-Aldrich（St. Louis, MO）から購入された。

【0108】

【表1】

表1.トレーニングセット化合物の説明

化合物	薬理学/化学分類	FDA 妊娠 カテゴリー ^a	前臨床生体内および 既知のヒト発達影響 ^b	
ヒト 非催奇形物質				
アスコルビン酸	ビタミン	A	なし	
カフェイン	中枢神経系刺激物質	C	低用量:なし; 高用量:肢、 頭蓋顔面、胚毒性 ^c	
ジフェンヒドラミン	抗ヒスタミン剤/H1 ヒスタミン 受容体拮抗薬	B	なし	10
ドキシラミン	抗ヒスタミン剤/H1 ヒスタミン 受容体拮抗薬	B	なし	
葉酸	ビタミン	A	なし	
イソニアジド	抗菌性/抗結核性	C	なし	
レボチロキシン	合成ホルモン	A	なし	
ペニシリンG	抗生物質	B	なし	
レチノール	ビタミン	C	低用量:なし; 高用量:頭蓋 顔面、中枢神経系、心臓血 管、骨格	
サッカリン	人工甘味料	A	なし	
チアミン	ビタミン	A	なし	20
ヒト催奇形物質				
13-シス レチノイ ン酸	RAR/RXR リガンド	X	頭蓋顔面、肢、中枢神経系、 心臓血管、骨格	
5-フルオロウラシ ル	抗新生物/代謝拮抗剤	D	頭蓋顔面、中枢神経系、 骨格	
全トランス型レチ ノイン酸	RAR/RXR リガンド	D	頭蓋顔面、肢、中枢神経系、 心血管、骨格、胚毒性 ^c	
ブルファン	抗新生物/アルキル化	D	頭蓋顔面、肢、胚毒性 ^c	
カルバマゼピン	抗痙攣	D	頭蓋顔面、中枢神経系、 心臓血管	
シトシンアラビノ シド	抗新生物/代謝拮抗剤	D	肢	30
ジフェニルヒダン トイン	抗痙攣	D	頭蓋顔面、肢、心臓血管、 神経行動学的	
ヒドロキシ尿素	抗新生物/酵素阻害物質	D	中枢神経系、頭蓋顔面、肢、 心臓血管、胚毒性 ^c	
メトトレキサート	抗新生物/ジヒドロ葉酸還元酵素 阻害物質	X	頭蓋顔面、肢、骨格、中枢 神経系、胚毒性 ^c	
サリドマイド	免疫調節物質	X	頭蓋顔面、心臓血管、肢、 胚毒性 ^c	
バルプロ酸	抗痙攣/GABA 阻害物質	D	中枢神経系、頭蓋顔面、 心臓血管、骨格、神経行動 学的、胚毒性 ^c	
ワルファリン	抗凝固剤	X	中枢神経系、頭蓋顔面、 骨格、胚毒性 ^c	40

^aShuren(2008,Federal Register;73:30831-30868)に記載される FDA 分類要件。^b前臨床生体内および既知のヒト発達影響は、催奇形物質情報システム(TERIS、

www.depts.washington.edu/terisweb/teris/を参照されたい)、および Briggs et al.(2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed.Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins)から要約された。

^c催奇形効果に加えた胚毒性(例えば育成遅延、胚致死性)。

【表2】

表2.試験セット化合物の説明

化合物	薬理学/化学分類	FDA 妊娠 カテゴリー ^a	前臨床生体内およ び既知のヒト発達影響 ^b
ヒト非催奇形物質			
アセトアミノフェン	鎮痛剤	B	なし
アシクログアシン	抗ウイルス	B	なし
アモキシシリントラム	抗生物質	B	なし
ロラタジン	抗ヒスタミン剤/H1 受容体拮抗薬	B	なし
メトクロプロラム	鎮吐薬	B	なし
シタグリブチン	血糖降下	B	低用量:なし 高用量:骨格
ヒト催奇形物質			
アミノブテリン	抗新生物/ジヒドロ葉酸還元酵素阻 害物質	X	頭蓋顔面、肢、骨格、中枢 神経系
ボセンタン	降圧剤	X	頭蓋顔面、心臓血管
D-ベニシラミン	キレート剤	D	骨格
エベロリムス	免疫抑制	D	骨格、胚毒性 ^c
ラバチニブ	抗新生物/タンパク質キナーゼ阻 害物質	D	骨格、胚毒性 ^c
ロバスタチン	抗コレステロール	X	骨格、胚毒性 ^c
チオTEPA	抗新生物/アルキル化	D	骨格、胚毒性 ^c

^aShuren(2008,Federal Register;73:30831-30868)に記載されるFDA分類要件。

^b前臨床生体内および既知のヒト発達影響は、催奇形物質情報システム(TERIS、

www.depts.washington.edu/terisweb/teris/を参照されたい)、およびBriggs et al.(2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed.Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins)から要約された。

^c催奇形効果に加えた胚毒性(例えば育成遅延、胚致死性)。

【0110】

【表3】

表3.適用セット化合物の説明

化合物	薬理学/化学分類	FDA 妊娠 カテゴリー ^a	前臨床生体内発達影響 ^b
6-アミノニコチンア ミド	ニコチン酸拮抗薬	NA	頭蓋顔面
アバカビル	抗 HIV	C	骨格、胚毒性 ^c
アデフォビルピボキ シル	抗ウイルス	C	なし
アンプレナビル	抗 HIV	C	骨格、胚毒性 ^c
アルテスナート	抗マラリア	NA	心臓血管、骨格、胚毒性 ^{c,d}
シドフォビル	抗ウイルス	C	なし
エンタカボン	抗バーキンソン	C	日の欠陥
フルオキセチン	セロトニン再取り込み阻害物 質	C	胚毒性 ^c
ラメルテオン	鎮静剤/催眠剤	C	なし
ロシグリタゾン	血糖降下	C	胚毒性 ^c

^aShuren(2008,Federal Register;73:30831-30868)に記載されるFDA分類要件。^b前臨床生体内および既知のヒト発達影響は、催奇形物質情報システム(TERIS、

www.depts.washington.edu/terisweb/teris/を参照されたい)、およびBriggs et al.(2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed.Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins)から要約された。

^c催奇形効果に加えた胚毒性(例えば育成遲延、胚致死性)。^dClark,2009,Reprod Toxicol;28:285-296.

【0111】

未分化hES細胞系維持(第1相および第2相)。WA09hES細胞は、WiCell Research Institute(Madison, WI)から得られ、hESC-qualifiedマトリゲル(BD Biosciences, San Jose, CA)被覆6ウェルプレート上で、TeSR1培地(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)を使用して、支持細胞非含有条件で維持された。未分化幹細胞集団を維持するために、吸引を通じて分化コロニーを毎日除去し、培地を取り替えた。さらにhES細胞は、継代40代目までの実験のみで使用して、およそ10代の継代毎に核型分析して、遺伝子不安定性可能性を最小化およびモニターした。hES細胞は、Versene(Life Technologies, Grand Island, NY)を使用して、90~95%の密集度(およそ7日毎に)継代した。細胞培養物は、5%CO₂下で37℃に維持した。

【0112】

96ウェルhES細胞プレーティング(第1相および第2相)。全ての実験処置は、96ウェルプレート内で実施した。播種変動性を最小化して再現性を増大させるために、hES細胞は単一細胞懸濁液として播種し、化合物曝露中に未分化状態を維持した。96ウェルプレート内への播種前に、TrypLE(Life Technologies)を使用して、hES細胞を6-ウェルプレートから取り出した。細胞をDMEM/F12(Life Technologies)で洗浄し、10µMのY27632 Rho関連キナーゼ(ROCK)阻害因子(Merck KGaA/Calbiochem, Darmstadt, Germany)を含有するmTeSR1に再懸濁した。ROCK阻害因子を播種培地に入れて、解離誘発性アポトーシスを低下させることにより、播種効率を増大させる。hESC規格認定マトリゲル被覆された96ウェルプレートの内側の60ウェルに、ウェルあたり100,000個の細胞密度で播種した。プレートの外側のウェルには等容積の培地を入れて、プレート全域にわたる湿度差を最小化した。化合物曝露は、播種の24時間後から開始した。

【0113】

10

20

30

40

50

第1相hES細胞化合物曝露。hES細胞は、化合物の公開された治療的 C_{max} に相当する単一濃度の試験化合物で処置した。生理学的に妥当な曝露レベルと見なされ、化合物の発達への影響と関連付けられていることから、治療的 C_{max} を使用した(National Research Council, 2000, "Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment," Washington, DC: The National Academies Press)。6種の化合物(5-フルオロウラシル、アミノブテリン、ブスルファン、シトシンアラビノシド、ヒドロキシ尿素、およびメトトレキサート)では、 C_{max} 曝露レベルにおける30%を超える細胞毒性のために、 C_{max} 値の代わりに実験的に判定した IC_{30} を使用した。これは、試料採取時点で十分な細胞が存在して、LC-HRMS分析のためのシグナルを提供することを確実にするために実施した。試験化合物の曝露では、バルプロ酸を除く全ての化合物原液は、DMSO(Sigma-Aldrich)中で作成した。バルプロ酸は、この試験で使用される濃度ではDMSOに不溶性であったため、0.1%DMSOを含有するmTeSR1で希釀した。各96ウェルプレートは、試験化合物含有または非含有培地対照、0.1%DMSO溶媒対照細胞、および単一濃度の8種の異なる試験化合物に曝露させた細胞を含んだ(図1A)。培地対照を各プレートに含めて、試料マトリックスに対する試験化合物の影響を評価した。hES細胞を試験化合物に72時間曝露させて、培地と試験化合物を24時間毎に置換した。処置期間全体を通じて細胞をモニターし、分化が起きないことを確実にした。処置の72時間後、最後の24時間の処置期間からの消耗培地を収集して、アセトニトリルに添加し(Sigma-Aldrich、最終アセトニトリル濃度40%)、代謝過程を停止させ、タンパク質を溶液から沈殿させた。各96ウェルプレートからの個々のウェルは、別のサンプルとして収集し分析した。次にLC-HRMS分析のために調製するまで、これらのサンプルを-80で保存した。細胞生存率は、製造会社(Promega, Madison, WI)の使用説明書に従って、CellTiter-Fluor Cell Viability Assayを使用して評価した。処置中に6つの細胞サンプルの生存率相対蛍光単位(RFU)の変動係数(CV)が10%を上回り、Grubbの試験(www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfmを参照されたい)を使用して外れ値が同定されなければ、その化合物について分析を停止して細胞培養実験を繰り返すように、品質管理パラメータを設定した。外れ値が存在すれば、外れ値サンプルを分析から除去した。プレート上のDMSO対照細胞サンプルのCVが、品質管理パラメータの外側にあれば、全プレートを反復した。23種の各化合物へのhES細胞曝露を合計9回反復した。

【0114】

第2相hES細胞化合物曝露。元のトレーニングセットならびに独立した試験セット中で、標的生物マーカーアッセイの予測性を評価した(表2および3)。アッセイを適用化合物セット(表4)にさらに適用して、ヒト催奇形性が未知である場合の効用を実証した。ほとんどの化合物で使用された標準化合物曝露レベルは、0.04μM~300μMの範囲の9つの3倍希釀液であった(図1B)。その治療的 C_{max} が標準曝露範囲の外側であったため、バルプロ酸の曝露範囲は、4μM~30,000μMに増大させた。1μM未満の濃度で細胞毒性の化合物は、より低い曝露レベル(0.001μM~10μM)で反復した。アスコルビン酸、葉酸、およびバルプロ酸を除いて、各試験化合物の原液は、最大曝露レベルの1000倍の濃度で、100%DMSO中で調製した。これらの3種の化合物はDMSO中で完全に不溶性であり、原液は、0.1%DMSOを含有するmTeSR1中で調製した。原液は、mTeSR1培地中で1:1000に希釀し、引き続く希釀は、全ての処置においてDMSO最終濃度が0.1%になるように、0.1%DMSOを含有するmTeSR1中で実施した。hES細胞を72時間処置し、最後の24時間処置期間からの消耗培地を収集して、第1相の下に記載されるように、¹³C₆標識アルギニン(Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MD)を含有するアセトニトリルに添加した。消耗培地サンプルは、LC-HRMS分

析のために調製するまで、-80で保存した。CellTiter-Fluor細胞生存率アッセイを使用して、細胞生存率を評価した。LC-HRMS分析にかけるプレートでは、DMSO対照細胞の測定された生存率RFUのCVが10%を超えないという基準で、品質管理段階を含めた。Rパッケージ「drc」がある4パラメータ対数ロジスティックモデル(Ritz and Streibig, 2005, J Statistical Software; 12:1-22)を使用して、基準処置(0.1%のDMSO処置対照細胞)正規化データ(生存率RFU_{TrtX}/生存率RFU_{DMSO})に、用量応答曲線を適合させた。

【0115】

試料調製(第1相および第2相)。Millipore Multiscreen Ultra trace 1-10フィルタープレート(EMD Millipore, Billerica, MA)を使用して、消耗培地サンプルの高分子量構成物(>10KDa)を除去した。サンプル濾過前に、フィルタープレートを0.1%NaOHで洗浄して、既知の汚染物質ポリマーを除去した。次にプレートをHPLC等級水で2回水洗して、残留ポリマーおよびNaOHを除去した。消耗培地サンプルを洗浄フィルタープレートに入れた。第1相では、サンプルに¹³C₆標識アルギニンを添加した。サンプルを4および2,000×gで、200分間遠心分離した。濾液を収集して、Savant High Capacity Speedvac Plus Concentrator内で一晩濃縮した。¹³C₅標識グルタミン酸(Cambridge Isotope Laboratories)を含有する、水中の0.1%ギ酸:アセトニトリル中の0.1%ギ酸の1:1混合物中で、濃縮サンプルを再可溶化した。¹³C標識化合物を内標準として使用して、調製効率を追跡し、LC-HRMS性能を追跡した。

【0116】

第1相質量分析法。各システム毎に3つの複製を評価して、3つの別個のLC-HRMSシステム上で、9つの生物学的複製について、LC-HRMSデータを得た。各システムは、Agilent G6520A QTOF高分解能質量分光計(QTOF HRMS), Agilent G6530A QTOF HRMS、またはAgilent G6224A TOF HRMSシステムのいずれかと接続された、Agilent 1290 Infinity LCシステムからなった(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)。広範囲に及ぶ構造の生物学的小型分子の分離を容易にするために、そして親水性化学種の保持を増大させるために、親水性相互作用液体クロマトグラフィー(HILIC)を利用した。寸法3×100mmおよび粒度3μmのLuna HILICカラム(Phenomenex, Torrance, CA)を使用して、30に保った。サンプル(2μL)を注入し、データ取得時間は、水中の0.1%ギ酸(溶媒A)およびアセトニトリル中の0.1%ギ酸(溶媒B)による17分間の溶媒勾配を使用して、流速0.5ml/分で23分間であった。二重ESI源を使用して、エレクトロスプレーイオン化を用いた。装置のスキャン範囲は、70~1600Daであった。データ取得は、高解像度精密質量条件を使用して、MassHunter Acquisitionソフトウェア(バージョンB 04.00, Agilent Technologies)によって実施され、各セットサンプルは、最初にESI正極性下、次にESI負極性条件下で実行された。

【0117】

第2相質量分析法。データを得て、2つの装置プラットフォームを使用して、標的生物マーカーアッセイの性能を評価した。2つのシステムの内1つを使用して、各化合物について、超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)-HRMSデータ取得を実施した。システム1は、Agilent G6520A QTOF HRMSに接続されたAgilent 1290 Infinity LCシステムからなった。システム2は、Agilent G6224A TOF HRMSに接続された同一モデルのLCシステムを使用した。40に保たれるWaters Acuity UPLC BEH Amide 2.1×50mm 1.7μm粒度カラム(Waters, Milford, MA) 50

を代謝産物分離のために、適用した。水中の 0.1% ギ酸（溶媒 A）およびアセトニトリル中の 0.1% ギ酸（溶媒 B）による溶媒勾配を流速 1.0 ml / 分で使用して、2 μL のサンプルを注入した。正イオン化モードのみで操作される二重 ESI 源を使用して、エレクトロスプレーイオン化を用いた。装置の質量範囲を 60 ~ 1600 Da に設定して、MassHunter Acquisition ソフトウェア（バージョン B 04.00）を使用して、6.5 分にわたってデータを得た。サンプル中のシスチンおよびオルニチン代謝産物同定は、それらの衝突誘発分離質量スペクトルを標準試料（Sigma-Aldrich）と比較することで、あらかじめ確認した。

【0118】

ピーク検出（第 1 相および第 2 相）。MassHunter Qualitative Analysis ソフトウェアバージョン 5.0 (Agilent Technologies) を使用して、Agilent 生データファイルをオープンソース mzData ファイル形式に変換した。変換プロセスでは、質量中心データに脱アイソトープ化 (+1 電荷状態のみ) を実施して、絶対高が 200 未満のピークは分析から除外した。R パッケージ「xcms」を使用して、ピークの選択および特性の作成を実施した (Smith et al., 2006, Anal Chem; 78: 779 - 787)。質量特徴（ピーク）は、centwave アルゴリズムを使用して検出した。滞留時間中の逸脱は、LC-MS サンプルからのデータを整列させるための非線形クラスタリングアプローチに基づく、obiwarp アルゴリズムを使用して補正した。密度に基づくグループ化アルゴリズムを使用して、質量特性ビンまたはグループを作成した。データを質量特性にグループ化した後、反復ピーク充填を使用して、特性ビンの滞留時間と質量範囲に基づいて、欠損している特性を組み込んだ。特性強度は、特性抽出イオンクロマトグラムのメキシカンハット積算値に基づく。

【0119】

オルニチン / シスチン比計算。双方の試験相において、各 96 ウェルプレートのサンプルに参照処置 (0.1% DMSO) を含めて、経時的な LC-MS 装置応答の差を補償できるようにした。参照処置 (DMSO) サンプルの積分面積の中央値で、処置レベル内の各サンプルの積分面積を除算して、細胞培養サンプルプレート内の各サンプル中の双方の代謝産物について正規化値を得ることで、各代謝産物について相対的倍数変化を計算した。o / c 比は、参照正規化オルニチンを参照正規化シスチン値で除算することで、処置中の各試料について計算された。第 2 相では、R パッケージ「drc」を使用して、各濃度の o / c 比の平均値を使用して、用量応答の 4 パラメータ対数ロジスティックモデルを適合させた (Ritz and Streibig, 2005, J Statistical Software; 12: 1 - 22)。

【0120】

催奇形性閾値選択（第 1 相および第 2 相）。催奇形性分類は、発達毒性と関係する個々の代謝産物について、代謝搅乱閾値を同定し得るという前提に基づいた。この代謝変化閾値は催奇形性閾値と称され、非催奇形物質から催奇形物質を識別するのに必要な代謝搅乱の規模の尺度である。催奇形性閾値は、10% ~ 25% 变化の範囲を通じた反復によって、オルニチン、シスチン、および o / c 比について経験的に得られ、最大の確度と最大の感度でトレーニングセットを分類できる、片側または両側非対称閾値を同定する。片側および両側閾値の間で、分類確度と感度が同点であれば、単純にするために片側閾値に優先順位を与えた。第 1 相で実施されたアッセイは、各化合物を単一濃度のみで使用し、第 2 相で開発された標的生物マーカーアッセイは、曝露に基づくアプローチを利用したので、催奇形性閾値は各試験相について判定した。催奇形性閾値は、トレーニングセットからの結果のみを使用して、第 2 相で判定した。次に試験セットおよび適用セットからの結果に、この閾値を適用した。

【0121】

発達毒性可能性の第 1 相予測。処置サンプル中の存在量変化の平均が、代謝産物または o / c 比のどちらかについて、9 つの実験的複製にわたる参照処置 (DMSO) と比較し

10

20

20

30

40

50

て、試験濃度におけるそれぞれの催奇形性閾値を超えた場合、試験化合物を発達毒物に分類した。予測確度（正確な予測）、感度（真の陽性率）、および特異性（真の陰性率）は、化合物の既知のヒト催奇形性に対する、予測された結果の格付け（催奇形物質または非催奇形物質）に基づいた。

【0122】

発達毒性可能性の第2相予測。未知の発達毒性可能性がある試験化合物では、標的生物マーカーアッセイを利用して、試験化合物が、催奇形性を示唆する様式で代謝を攪乱させる曝露レベルが同定され、いかなる薬物動態情報（例えば C_{max} ）も必要ない。図2は、この状況でアッセイをどのように適用するかを図示する。試験化合物は、 o/c 比が催奇形性閾値（赤色ボックス、図2）を超える曝露レベルで、催奇形性であると見なされる。催奇形性閾値にある、 o/c 比または細胞生存率の4パラメータ対数ロジスティックモデルからの補間濃度は、試験化合物の催奇形可能性曝露レベルと見なされる（図2）。催奇形可能性濃度を超える曝露レベルは、発達毒性可能性を有すると予測される。

10

【0123】

トレーニングセットおよび試験セットにおけるアッセイの予測性を評価するために、 o/c 比から催奇形可能性濃度を判定し、細胞生存率を使用して、ヒト治療的 C_{max} 濃度と比較した試験化合物の催奇形性を分類する。適用セットでは、ヒトにおけるこれらの化合物の発達毒性可能性が未知であるため、このアプローチは適用されなかった。ヒト治療的 C_{max} を使用する催奇形物質または非催奇形物質としての試験化合物の格付けの論理は、曝露が奇形発生における決定的因子であり、既知のヒト催奇形物質は、治療的循環レベルで起きると思われる最大曝露未満で細胞代謝をおそらく攪乱させるであろうという、パラダイムに基づく。 o/c 比の攪乱が、化合物の C_{max} 濃度を超える濃度で示されれば（図3A）、通例の治療法で遭遇する可能性の高い範囲の外側で攪乱が観察されることから、それは非催奇形物質として格付けされる。化合物が、その治療的 C_{max} 未満の濃度で催奇形可能性を示せば、治療的濃度範囲内で奇形発生の徵候である代謝攪乱が示されることから、それは催奇形物質（図3B）に分類される。同じパラダイムを使用して、細胞生存率からの催奇形可能性濃度を使用して、化合物の催奇形性を予測した。アッセイの予測確度、感度、および特異性は、予測された結果を、化合物の既知のヒト催奇形性と比較することで計算した。

20

【0124】

標的生物マーカーアッセイとその他の発達毒性試験との比較。文献レビューは、標的生物マーカーアッセイで試験された化合物について、生体内齧歯類およびウサギモデル、および3種の試験管内スクリーニング（European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)）-マウス胚性幹細胞試験（mEST）、ゼブラフィッシュ胎児毒性試験（ZET）、および移植後ラット全胚培養（WEC）試験の評価）で、発達毒性予測を比較した。オリジナルの各著者の分類法を使用して、これらのアッセイで得られた予測が比較のために使用され、データは再解釈されなかった。別の試験管内システムは、この試験で使用される2クラス体系に対して、3クラスの分類体系（非催奇形物質、弱い/中等度の催奇形性物質、および強力な催奇形物質；Brown, 2002, Alternative Lab Anim; 30: 177-198）を用いる。したがって標的生物マーカーアッセイからの結果を他のモデルと比較するためには、これらのアッセイ結果からの予測を2クラス体系に修正する必要があった。弱い/中等度の催奇形物質または強力な催奇形物質であると予測された化合物は、どちらも予測催奇形物質と標識された。確度、感度、および特異性は、既知のヒト催奇形性に対する予測結果を格付けすることで、各アッセイについて計算された。これらの値は、別のモデル系で試験された特定化合物セットのための標的生物マーカーアッセイのために、さらに計算された。各比較に共通する処置内で、催奇形物質または非催奇形物質の分類を比較することで、標的生物マーカーアッセイとその他の上述のモデルの間の一致を評価した。

30

【0125】

40

50

結果

第1相モデルの確認および発達毒性の予測的代謝産物の特性解析。この試験の第1相を実施して、個々の代謝産物の予測性を確認した。予測的代謝産物の特性解析は、この試験の第2相に記載される新規標的生物マーカーアッセイの開発をもたらした。以前、23種の医薬化合物のトレーニングセット(表2)を利用して、試験管内催奇形性を予測する能力のある代謝シグネチャが同定された(Kleinsteuer et al., 2011, Toxicol Appl Pharmacol; 257: 111-121)。催奇形物質での処置時に統計学的に有意な変化を示し、非催奇形物質では応答がなかった代謝産物は、単純な倍数変化閾値を使用して、発達毒物を分類するそれらの能力について特性解析された。これらの代謝産物の内、オルニチンおよびシスチンが、発達毒性を高度に予測する、以前適用された代謝シグネチャの代表的な代謝産物として同定された。これらの2つの各代謝産物が発達毒物を分類する能力は、各代謝産物の参照処置(0.1% DMSO)と対比した、試験化合物で処置された細胞の倍数変化に基づいて催奇形性閾値を判定することで、特性解析された。閾値を使用して、トレーニングセット内の各代謝産物の分類確度を評価した。

【0126】

オルニチンおよびシスチンは、それぞれ、催奇形性と一貫した様式で、試験化合物が代謝を搅乱させる可能性を迅速に評価するのに適した特徴を示した。どちらの代謝産物もhES細胞からの消耗細胞培養液中に非常に豊富にあり、処置に応えてそれらの存在量に変化を示し、それは複数LC-HRMS装置上で再現性良く測定された。これらの初期観察、およびアプローチの再現性を確認するために、トレーニングセットの9つの独立した実験的複製(ブロック)を包含する試験において、代謝産物をさらに評価した。分泌代謝産物オルニチンは、オルニチン蓄積の18.5%低下または20%増大(図4A)のどちらかからなる両側閾値を使用して、83%の確度(表5)で非催奇形物質から催奇形物質を区別できた。シスチン(培地構成物)は、催奇形物質を分類する上で、最も予測的な個別代謝産物であり、参照処置と比較した10%増大の閾値(図4B)を使用して、83%の確度(表5)を有した。シスチンは、hES細胞中で細胞毒性引き起こさなかった(ヒドロキシ尿素、全トランス型レチノイン酸、13-シスレチノイン酸、カルバマゼピン、およびサリドマイドなどの)催奇形物質の大部分について、参照処置と比較して、存在量に有意な増大を示す。オルニチンは、(5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、メトトレキサート、およびバルプロ酸などの)細胞毒性処置によって低下したが、関連した非細胞毒性催奇形物質である全トランス型レチノイン酸および13-シスレチノイン酸に細胞を曝露させると、増大した。

【0127】

次に、オルニチンおよびシスチン比の倍数変化がそれらの個々の倍数変化よりもさらに予測的である可能性を評価した。オルニチン倍数変化をシスチン倍数変化で除した場合(すなわちo/c比)、得られた比率は、o/c比の12%低下の催奇形性閾値を使用して、トレーニングセット(図4C)の91%(表5)を正しく分類でき、ジフェニルヒダントインおよびワルファリンのみを誤分類した。オルニチンおよびシスチン単独の確度と比較して、o/c比の適用は、全体的な予測確度を8%上昇させ、オルニチンの高特異性およびシスチンの高感度(表5)を取り込んで、催奇形性のより正確な分類もたらす。

【0128】

【表4】

表4.非標的メタボロミクスに基づく発達毒性アッセイにおける催奇形性閾値および代謝
産物モデル測定基準

代謝産物	催奇形性閾値	正確度	感度	特異性
オルニチン	≤ 81.5%または≥ 120%	0.83	0.67	1.00
シスチン	≥ 110%	0.83	0.83	0.82
オルニチン/シスチン	≤ 88%	0.91	0.83	1.00

催奇形性閾値、奇形発生に伴う代謝混亂の臨界閾値、正確度、評価した試験化合物数で除した正確な
予測数、感度、催奇形物質の検出、特異性、非催奇形物質の検出。

10

【0129】

第2相開発および曝露に伴う発達毒性予測のための標的生物マーカーアッセイ評価。

標的LC-HRMS法開発。この試験の第2相では、第1相で確認された代謝産物を使用して、標的生物マーカーに基づくアッセイが開発された。毒性は、化学薬剤および曝露レベル双方の関数なので、o/c比の毒性閾値に伴う高レベルの予測性は、標的迅速催奇形性アッセイを開発する機会を提供する。その目的で短く再現可能な分析法を開発して、hES細胞消耗培地サンプル中のオルニチンおよびシスチン存在量の相対変化を短時間で分析するために、最適化した。対照的に、これまで使用してきた非標的メタボロミック方法は、より幅広い小型分子を分析するためにデザインされ、したがって時間のかかるクロマトグラフ分離が必要であった。以前のプラットフォームはまた、各サンプル毎に正イオン化および負イオン化様式の2つのデータ取得に依存した。オルニチンおよびシスチンのクロマトグラフ分離、イオン化、および検出のみに重点を置くことで、特に、hES細胞モデル系で観察されたこれらの代謝産物の相対変化をより迅速に測定するために、新規標的法がデザインされた。新規UPLC-HRMS法は、(前述のように調製された)消耗培地サンプルを使用して、オルニチンおよびシスチン測定のための追加的な速度、感度、および滞留時間再現性のために、開発および評価された。これは、アッセイ時間に顕著な短縮をもたらした。各サンプルのデータ取得時間は23分間から6.5分間に短縮された、LC-HRMS処理量に4倍の増大を提供した。正イオン化モードは、これらの代謝産物を検出するのにより好ましく、したがって負イオンモードに対する必要性が排除され、それはさらに各サンプルバッチ毎の総分析時間を半減し、したがって総装置処理量を8倍に増大させた。方法再現性は17バッチ全体で評価し、参照処置サンプル(DMSO処置細胞)を使用して、120日間にわたって実施した。内標準および内在性代謝産物の積分面積の平均CVは、それぞれ<5%および<8%であり、方法が再現可能な様式で実施されたことが示された。

20

【0130】

催奇形性閾値の同定。規定の催奇形性閾値を使用して、第1相で達成された高い分類確度に基づいて、9点濃度曲線を使用して、曝露範囲に基づく発達毒性可能性を分類した。催奇形性閾値は、最大感度で最大予測確度を生じる閾値を選択することで、第2相トレーニングセットデータを使用して最適化された。予測された催奇形可能性濃度を治療的 C_{max} と比較して、この新規アッセイデザインの性能と、分類確度を格付けした(図3、表6に記載される)。このアプローチによれば、参照処置と比較したo/c比の12%の低下が最適閾値であり、トレーニング化合物セットを96%確度で分類できた(表7、図5A)。アッセイは、全ての非催奇形物質(100%の特異性)を正しく分類し、既知のヒトの発達毒物の1つであるジフェニルヒダントインのみを誤分類した(92%の感度)。

30

【0131】

試験セット予測に基づく標的生物マーカーアッセイ性能の評価。トレーニングセットを使用して同定された催奇形性閾値を試験化合物セットに適用し、この試験で開発された標

40

50

的生物マーカーアッセイの予測性を評価した。試験セットは、既知のヒト催奇形性があるトレーニングセットに含まれない、B、DおよびXのFDA妊娠分類を有する、13種の化合物からなった。o/c比に関する各化合物の催奇形可能性濃度は、化合物の治療的C_{max}に対して格付けした。試験セットは、77%の確度で分類された（100%の特異性、57%の感度、表7）。o/c比は、催奇形物質ボセンタン、ラパチニブおよびロバスタチンを誤って分類した（表8、図5B）。エベロリムスのC_{max}はアッセイで使用される最低曝露レベル未満であり、この化合物のo/c比は催奇形性閾値未満から開始されたので、これは図5Bでは非催奇形物質の一員であるにもかかわらず、催奇形物質に分類されることに留意されたい。

【0132】

10

【表5-1】

表5.標的生物マーカーアッセイ結果:トレーニングセット

化合物	C _{max} (μM)	催奇形可能性 (μM) O/C 比	細胞生存率	O/C 比予測	生存率予測	C _{max} 参照
非催奇形物質						
アスコルビン酸	90	>300	>300	NON	NON	a
カフェイン	9.3	>300	>300	NON	NON	b
ジフェンヒドラ ミン	0.25	1.8	78.9	NON	NON	c
ドキシラミン	0.38	12.9	>300	NON	NON	c
葉酸	0.035	>300	>300	NON	NON	d
イソニアジド	51	165.4	>300	NON	NON	e
レボチロキシン	0.14	43.5	>300	NON	NON	f
ベニシリンG	134.6	>300	>300	NON	NON	g
レチノール	2.4	42.2	42.8	NON	NON	h
サッカリン	1.4	>300	>300	NON	NON	i
チアミン	0.67	>300	>300	NON	NON	j
催奇形物質						
13-シス レチノ イン酸	2.9	0.0007	>300	TER	NON	k
5-フルオロウラ シル	4.25	3	2	TER	TER	l
全トランス型レ チノイン酸	1.2	0.00004	114.5	TER	NON	m
ブルファン	49.6	0.6	3	TER	TER	n
カルバマゼピン	47	0.9	>300	TER	NON	o
シトシンアラビ ノシド	0.6	0.04	0.1	TER	TER	p
ジフェニルヒダ ントイン	79.3	263.3	288.7	NON	NON	q
ヒドロキシ尿素	565	5	251.6	TER	TER	r
メトトレキサ ト	0.2	0.05	0.05	TER	TER	s
サリドマイド	12.4	0.2	>300	TER	NON	t
バルプロ酸	1000	90.8	1113.7	TER	NON	u
ワルファリン	23.4	6.5	>300	TER	NON	v

C_{max}: 治療的ピーク血漿生体内濃度; 催奇形可能性、O/C 比または細胞生存率の用量応答曲線が催奇形性閾値を超える場合の補間濃度; NON: 可能な非催奇形物質; TER: 可能な催奇形物質。

C_{max} 値未満の曝露レベルで生じる O/C 比および生存率測定値の催奇形可能性値は、太字で示される。

a Padayatty et al., 2004, Ann Intern Med; 140:533-537.

b カフェイン薬理学(www.reference.medscape.com/drug/cafcit-nodoz-caffeine-342995 # 10 を参照されたい)。

c Luna et al., 1989, J Clin Pharmacol; 29:257-260.

d Ubeda et al., 2011, Nutrition; 27:925-930.

e イソニアジド(全身性)(www.drugs.com/mmx/isoniazid.html を参照されたい)。

【0133】

【表5-2】

- f Briggs et al., 2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- g ペニシリン G カリウム注射(製品情報、2012), Baxter Healthcare, Deerfield, Illinois.
- h アクアソール A(製品情報), Mayne Pharma, Paramus, New Jersey.
- i Vaisman et al., 2001, Arzneimittelforschung, 51:246-252.
- j Drewe et al., 2003, J Clin Pharm Ther, 28:47-51.
- k アキュテイン(製品情報、2010), Roche Laboratories, Nutley, New Jersey.
- l Oman et al., 2005, Cancer Chemother Pharmacol, 56:603-609.
- m Muindi et al., 1992, Cancer Res, 52:2138-2142.
- n ブスルフェクス(製品情報、2011), Otsuka America Pharmaceutical, Rockville, Maryland.
- o Mahmood and Chamberlin, 1998, Br J Clin Pharmacol, 45:241-246.
- p Weinstein et al., 1982, Blood, 59:1351-1353.
- q ジランチン(製品情報、2012), Pfizer, New York, New York.
- r Liebelt et al., 2007, Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 80:259-366.
- s Shoda et al., 2007, Mod Rheumatol, 17:311-316.
- t サリドマイド薬理学(www.reference.medscape.com/drug/thalomid-thalidomide-343211#10 を参照されたい)。
- u デバコン(製品情報、2013), AbbVie, North Chicago, Illinois.
- v Welle-Watne et al., 1980, Medd Norsk Farm Selsk, 42:103-114.

【0134】

10

【表6】

20

表6.標的生物マーカーアッセイからの細胞生存率と比較したオルニチン/シスチン比のモデル測定基準

アッセイ	正確度	感度	特異性
トレーニングセット			
O/C 比	0.96	0.92	1.00
細胞生存率	0.70	0.42	1.00
試験セット			
O/C 比	0.77	0.57	1.00
細胞生存率	0.62	0.29	1.00

正確度、評価した試験化合物数で除した正確な予測数;感度、催奇形物質の検出;特異性、非催奇形物質の検出。

【0135】

30

【表7】

表7.標的生物マーカーアッセイ結果:試験セット

化合物	C _{max} (μM)	催奇形可能性 (μM) O/C 比	細胞生存率	O/C 比予測	生存率予測	C _{max} 参照	
非催奇形物質							
アセトアミノフェン	116.4	>300	>300	NON	NON	a	10
アシクログアノシン	3	95.8	>300	NON	NON	b	
アモキシシリン	20.5	>300	>300	NON	NON	c	
ロラタジン	0.03	37.8	76.3	NON	NON	d	
メトクロプラミド	0.15	190.8	>300	NON	NON	e	
シタグリブチン	0.95	22.6	>300	NON	NON	f	
催奇形物質							
アミノブテリン	0.3	0.01	0.01	TER	TER	g	
ボセンタン	2	44.9	221.9	NON	NON	h	20
D-ベニシラミン	13.4	<0.04	>300	TER	NON	i	
エベロリムス	0.02	<0.04	5.2	TER	NON	j	
ラバチニブ	4.2	29	20.8	NON	NON	k	
ロバスタチン	0.02	1.3	4.1	NON	NON	l	
チオ TEPA	7	0.04	0.5	TER	TER	m	

C_{max}、治療的ピーク血漿生体内濃度、催奇形可能性、o/c 比または細胞生存率の用量応答曲線が催奇形性閾値を超える場合の補間濃度;NON、可能な非催奇形物質;TER、可能な催奇形物質。C_{max} 値未満の曝露レベルで起きた o/c 比の催奇形可能性値および生存率測定値は太字で示される。

a タイレノール(製品情報、2010),McNeil Consumer Healthcare,Fort Washington,Pennsylvania。

30

b Palma-Aguirre et al.,2007,Clin Ther;29:1146-1152.

c アモキシル(製品情報、2011),Dr Reddy's Laboratories,Bridgewater,New Jersey.

d Hilbert et al.,1987,J Clin Pharmacol;27:694-698.

e Leucuta et al.,2004,Rom J Gastroenterol;13:211-214.

f ジャヌビア(製品情報、2013),Merck,Whitehouse Station,New Jersey.

g Cole et al.,2005,Clin Cancer Res;11:8089-8096.

h van Giersbergen et al.,2007,Clin Pharmacol Ther;81:414-419.

i カブリミン(製品情報、2004),Merck,Whitehouse Station,New Jersey.

j エベロリムス(製品情報、2011),Novartis Sverige AB,Täby,Sweden.

k タイケルブ(製品情報、2013),GlaxoSmithKline,Research Triangle Park,North Carolina.

l Altoprev(製品情報、2012),Andrx Labs,Fort Lauderdale,Florida.

m チオ TEPA(製品情報、2001),Bedford Laboratories,Bedford,Ohio.

40

【0136】

オルニチン / シスチン比と細胞生存率の比較。o / c 比を構成する代謝産物は消耗細胞培養液中で評価されるので、処置細胞を利用して、細胞生存率分析を実行した。細胞生存率結果をo / c 比と比較して、比率の変化が細胞死に起因するのか、または細胞生存率変化とは無関係の代謝変化に起因するのかを判定した。o / c 比と同様のアプローチを使用して、生存率結果を評価して分類性能を判定した(図3)。トレーニングセットからのo / c 比結果を使用して判定された催奇形性閾値を使用して、細胞生存率用量応答曲線が催奇形性閾値を超える補間濃度に基づく細胞生存率によって、催奇形性を分類した(表6お

50

より 8)。これは、対照からの同等の変化レベルにおいて、 o/c 比および細胞生存率を直接比較できるようとする。細胞生存率は、トレーニングセットでは 70 % の確度を有し、試験セットでは 62 % の確度を有した(表 7)。細胞生存率アッセイは、トレーニングセットおよび試験セットの双方で、全ての非催奇形物質を正しく分類するのに成功したが、催奇形物質の分類では機能が不十分であり、トレーニングセット中の 12 種の化合物の内 5 種のみ(42 % の感度、表 7)、および試験セット中の 7 種の催奇形物質の内 2 種のみ(29 % の感度、表 7)を正しく分類した。細胞生存率によって正しく分類されたものは、分裂細胞を殺滅する抗新生物化合物である。

【 0137 】

トレーニングセットおよび試験セットに適用した場合、発達毒性の予測について、 o/c 比は、生存率単独よりも、それぞれ 26 % および 15 % さらに正確であった(表 7)。 o/c 比および細胞生存率アッセイはどちらも、 C_{max} に関して非催奇形物質を正しく分類し、100 % 特異性を有するが、これらは催奇形物質を識別するそれらの能力の点で異なる(表 7)。 o/c 比は、催奇形物質検出において、生存率単独よりも、トレーニングセットで感度が 50 % さらに高く、試験セットで感度が 28 % さらに高い(表 7)。さらに o/c 比は、細胞毒性および非細胞毒性双方に催奇形物質を正しく分類できる。 o/c 比によって提供される偽陰性の低下は、細胞生存率の変化とは独立して起こり得る代謝搅乱のアッセイの測定に関連している。

【 0138 】

図 6 中で強調表示されているのは、細胞生存率と比較した o/c 比性能に関する、アッセイのいくつかの特性を実証する結果の一部である。サリドマイド(図 6 A)および全トランス型レチノイン酸(図 6 B)は、細胞毒性不在下における発達毒性を示唆する、 o/c 比の変化を示す催奇形物質の例である。催奇形物質バルプロ酸(図 6 C)は、細胞毒性が観察されるはるか以前の曝露レベルで、 o/c 比の著しい変化を引き起こす細胞毒性催奇形物質の一例である。5-フルオロウラシル(図 6 D)は、細胞生存率の低下と直接相關する、 o/c 比の変化をもたらす抗新生物催奇形物質であり、代謝産物比の変化は、おそらく細胞死の直接的な結果である。レチノール(図 6 E)は、ヒトが常態で遭遇するよりもほぼ 20 倍高い曝露レベルにおいて、 o/c 比が細胞死と直接相關する、細胞毒性非催奇形物質の一例である。非催奇形物質サッカリン(図 6 F)は、この試験で調べた曝露では、 o/c 比または生存率の変化をもたらさない化合物である。

【 0139 】

ヒト催奇形性が未知の化合物への O/C 比適用。ヒト発達毒性の結果が未知である 10 種の化合物の適用セットに、標的生物マーカーアッセイを適用した。これらの化合物のヒト発達毒性は未知であるので、アッセイ性能を格付けするための C_{max} アプローチ(図 3 に示される)は適用されず、化合物は、図 2 に示されるように未知成分として処置された。結果は、工業環境で利用されるアッセイによって生成されるように提示される。 o/c 比および細胞生存率の催奇形可能性濃度は、表 9 に要約される。全ての 10 種の化合物は、催奇形性を示唆する o/c 比の変化を示したが、この変化が起きた濃度は化合物間で大幅に変動した。10 種の化合物の内 9 種は、試験された曝露範囲内で、細胞生存率の変化を示した(表 9)。10 種の化合物の内 7 種は、細胞毒性に先だってまたはその不在下で、 o/c 比の変化を引き起こした(太字の化合物、表 9)。齧歯類発達毒性試験は、10 種の化合物の内 7 種において、母親毒性不在下で、催奇形性および/または胎児毒性効果を同定した。その他の 3 種の化合物(アデフォビルピボキシル、シドフォビル、およびラメルテオン)は、母親毒性もまた引き起こす曝露レベルでのみ胎児毒性があつたため、効果が化合物曝露に起因するかどうかは不明である。

【 0140 】

【表8】

表8.標的生物マーカーアッセイ結果:適用セット

化合物	C _{max} (μ M)	催奇形可能性 O/C 比	細胞生存率	齧齒類生体内試験結果 ^a	C _{max} 参照
6-アミノニコチンアミド	NA	<0.04	24.5	+	d NA
アバカビル	14.9	95.1	94.1	+	i 10
アデフォビルジビボキシル ^c	0.03	0.0015	0.02	-	j
アンプレナビル	15.1	236.9	259.5	+	k
アルテスナート	73.9	0.64	0.58	+	l
シドフォビル ^e	41.2	0.3	1.9	-	m
エンタカポン	3.9	6.7	127	+	n
フルオキセチン	0.04	25.1	23	-	o
ラメルテオン ^h	0.02	34	>300	-	p
ロシグリタゾン	1.7	18.9	21.8	-	q

C_{max}:ヒトにおけるピーク血漿濃度;催奇形可能性、o/c 比または細胞生存率の用量応答曲線が催奇形性閾値を超える場合の補間濃度;NA:入手不能または未確定。細胞生存率の前に起きた o/c 比の催奇形可能性値は太字で示される。

20

^a特に断りのない限り、データは、Briggs et al.(2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed.Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins)から編纂された。

^b試験化合物は、母親毒性不在下で、構造的奇形を引き起こした場合に、催奇形性と見なされた。

^cこのカラムは、催奇形効果不在下における胎児毒性効果を照会する。試験化合物は、母親毒性不在下で育成遅延または胚致死性を引き起こせば、胎児毒性と見なされた。

^dShepard and Lemire,2007, "Catalog of teratogenic agents," 12th ed.Baltimore:The Johns Hopkins University Press.

^eアデフォビルジビボキシルは、母性毒性用量において催奇形性および胎児毒性であった。

^fClark,2009,Reprod Toxicol;28:285-296;および Shepard and Lemire,2007, "Catalog of teratogenic agents," 12th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

^gシドフォビルは、母性毒性用量において胎児毒性であった。

30

^hラメルテオンは、母性毒性用量において催奇形性であった。

i ザイアジエン(製品情報,2012),GlaxoSmithKline,Research Triangle Park,North Carolina.

j ヘプセラ(製品情報,2012),Gilead Sciences,Foster City,California.

k アジェネラーゼ(製品情報,2005),GlaxoSmithKline,Research Triangle Park,North Carolina.

l Miller et al.,2012,Malar J;11:255.

m ビスタイド(製品情報,2000),Gilead Sciences,Foster City,California.

n コムタン(製品情報,2010),Novartis Pharmaceuticals,East Hanover,New Jersey.

o サラフェム(製品情報,2013),Warner Chilcott,Rockaway,New Jersey.

p Karim et al.,2006,J Clin Pharmacol;46:140-148.

q アバンディア(製品情報,2011),GlaxoSmithKline,Research Triangle Park,North Carolina.

【0141】

アッセイ性能(その他のアッセイとの比較)。トレーニングセットおよび試験セットのo / c比に基づく発達毒性予測を、公開されたその他のモデル系からの結果と比較した(表10)。適用セット表10に提示されるモデル系からの発達毒性予測は、補遺の表1に要約される。合わせた36種のトレーニングおよび試験セット化合物について、標的生物マーカーアッセイと、それが比較される各モデル系との双方で評価された処置のみを使用して、モデル系対モデル系ベースで比較した。比較結果(表11)は、ここに記載されるo / c比が、考察された他のモデル系よりも、ヒト発達毒物のより正確な予測因子であることを示す。確度の上昇は、m E S T およびW E Cなどのその他の試験管内システムと比較して、特異性の顕著な増大ならびに感度の中程度の増大を伴う、各比較におけるo / c

40

50

比のより低い偽陽性率（特異性増大）に起因する。興味深いことに、o / c 比は、他のモデル系の大多数が分類できなかった、非催奇形物質カフェインおよびレチノール、および催奇形物質ワルファリンおよびD - ペニシラミンを正しく分類できた。o / c 比の催奇形性予測と生体内齶歯類およびウサギモデルならびにZETとの間には、高度な一致（75 %）がある（表11）。o / c 比とmEST およびWECとの間では、一致がより低い（それぞれ67 %および69 %、表11）。o / c 比とこれらの試験管内モデルとの間で一致がより低い理由は、標的生物マーカーアッセイの高い確度に起因する。

【0142】

【表9-1】

10

表9.標的生物マーカーアッセイ結果と公表された発達毒性アッセイ結果との比較トレーニングおよび試験セット

化合物	ヒト ^a	標的生物マーカーアッセイ結果					
		齶歯類 ^a	ウサギ ^a	mEST	ZET	WEC	
アセトアミノフェン	NON	NON	NA	NA	NON ^c	TER ^k	
アシクログアノシン	NON	NON	TER	NA	NA	TER ^l	
アモキシシリソ	NON	NON	NA	NA	NA	NA	
アスコルビン酸	NON	NON	NA	NON ^b	NON ^{c,d,e}	NON ^f	
カフェイン	NON	NON	TER	TER ^b	TER ^e	TER ^o	
ジフェンヒドラミン	NON	NON	NON	TER ^b	TER ^e	NON ^f	
ドキシラミン	NON	NON	NON	TER ^m	NA	NON ^f	
葉酸	NON	NON	NON ^g	NA	NA	NON ^h	
イソニアジド	NON	NON	NON	NON ^{b,i}	NON ^{c,n}	TER ^{f,j}	
レボチロキシン	NON	NON	NON	NA	NA	NA	
ロラタジン	NON	NON	NON	NON ⁱ	TER ^d	NON ^{f,j}	

【0143】

20

30

【表 9 - 2】

メトクロプラミド	NON	NON	NON	NON	TER ^{i,m}	NON ^d	NON ^{f,j}	
ベニシリンG	NON	NON	NON	NON	NON ^{b,i}	NON ^{c,e,n}	NON ^{f,j}	
レチノール	NON	NON	TER	TER	NON ^p	TER ^{c,n}	TER ^q	
サッカリン	NON	NON	NON	NON	NON ^{b,i}	NON ^{c,e}	NON ^j	
シタグリブチン	NON	NON	TER	NON	NA	NA	NA	
チアミン	NON	NON	NA	NA	NA	NA	NA	
13-シス レチノイン	TER	TER	TER	TER	TER ^p	TER ⁱ	TER ^s	10
5-フルオロウラシル	TER	TER	TER	TER	TER ^{b,i}	TER ^c	TER ^{fk}	
全トランス型レチノイン	TER	TER	TER	TER	TER ^{b,p}	TER ^{c,g,r}	TER ^{qs}	
アミノブテリン	TER	TER	TER	TER	NA	NA	NA	
ボセンタン	TER	NON	TER	NON	NA	NA	NA	
ブルスルファン	TER	TER	TER	TER	TER ⁱ	NA	TER ^j	
カルバマゼピン	TER	TER	TER	NA	TER ⁱ	TER ⁱ	TER ^j	
シトシン	TER	TER	TER	NA	TER ⁱ	TER ⁿ	TER ⁱ	
ジフェニルヒダントイン	TER	NON	TER	TER	TER ^{b,i}	NON ⁿ	TER ^{g,j}	
D-ベニシラミン	TER	TER	TER	NA	NON ^m	NON ^d	NON ^f	
エペロリムス	TER	TER	TER	NON	NA	NA	NA	
ヒドロキシ尿素	TER	TER	TER	TER	TER ^{b,j}	TER ^c	TER ^{f,j}	
ラバチニブ	TER	NON	TER	TER	NA	NA	NA	
ロバスタチン	TER	NON	TER	NON	TER ^m	TER ^d	NA	20
メトレキサート	TER	TER	TER	TER	TER ^{b,i}	TER ^d	TER ^f	
サリドマイド	TER	TER	NON ⁿ	TER	NA	TER ^d	TER ^f	
チオTEPA	TER	TER	TER	TER	NA	TER ^v	NA	
バルプロ酸	TER	TER	TER	TER ^u	TER ^{b,i}	TER ^{e,n}	TER ^{f,j}	
ワルファリン	TER	TER	TER	NON	NON ^{i,m}	TER ^d	NON ^j	
mEST、マウス胚性幹細胞試験;ZET、ゼブラフィッシュ胎児毒性試験;WEC、全胚培養;NON、非 確奇形物質;TER、確奇形物質;NA、入手不能。相反する予測があった場合、より最近の文献から の、または意見が一致しているより多くの文献からの分類を使用した。太字の結果は、既知のヒ ト発達毒性効果と異なる予測を示す。								
^a 特に断りのない限り、ヒト、齧歯類およびウサギへの影響は、Drugs in Pregnancy and Lactation(Briggs et al.,2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed.Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins);TERIS および/または ACToR データベース (www.actor.epa.gov/actor/faces/ACToRHome.jsp)から要約された。								
^b Genschow et al.,2004,Altern Lab Anim;32:209-244。								
^c Brannen et al.,2010,Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol;89:66-77。								
^d Gustafson et al.,2012,Reprod Toxicol;33:155-164。								
^e Selderslaghs et al.,2012,Reprod Toxicol;33:142-154。								
^f Zhang et al.,2012,Toxicol Sci;127:535-546。								
^g Hansen et al.,1993,Teratology;47:420。								
^h Hansen,1995,Teratology;51:12A。								
ⁱ Paquette et al.,2008,Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol;83:104-111。								
^j Thomson et al.,2011,Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol;92:111-121。								
^k Stark et al.,1990,J Pharmacol Exp Ther;255:74-82。								
^l Klug et al.,1985,Arch Toxicol;58:89-96。								
^m Marx-Stoelting et al.,2009,Altern Lab Anim;37:313-328。								
ⁿ McGrath and Li,2008,Drug Discov Today;13:394-401。								
^o Robinson et al.,2010,Toxicol Sci;118:675-685。								
^p Louisse et al.,2011,Toxicol Lett;203:1-8。								
^q Ritchie et al.,2003,Birth Defects Res A Clin Mol Teratol;67:444-451。								
^r Herrmann,1995,Toxicol In Vitro;9:267-283。								
^s Klug et al.,1989,Arch Toxicol;63:185-192。								
^t Madureira et al.,2011,Environ Toxicol Pharmacol;32:212-217。								
^u Jelovsek et al.,1989,Obset Gynecol;74:624-636。								
^v Weigt et al.,2011,Toxicology;281:25-36。								

【 0 1 4 4 】

【表10】

表10.共通処置に基づくその他のモデル予測と比較した、標的生物マーカーアッセイ予測の
モデル測定基準

モデル系	N	一致	Acc	TB_Acc	Sen	TB_Sen	Spec	TB_Spec
標的生物マー カーアッセイ	36	NA	0.89	NA	0.79	NA	1.00	NA
齧歯類	35	0.74	0.86	0.89	0.95	0.79	0.75	1.00
ウサギ	28	0.79	0.79	0.86	0.75	0.75	0.83	1.00
mEST	23	0.65	0.74	0.91	0.85	0.85	0.60	1.00
ZET	24	0.75	0.75	0.92	0.86	0.86	0.60	1.00
WEC	26	0.69	0.73	0.96	0.85	0.92	0.62	1.00

N、モデル系および標的生物マーカーアッセイ間で共通のアッセイした処置の数;TB、モデル系で評価された処置を使用した標的生物マーカーアッセイの結果;Acc、モデル系の正確度;TB_Acc、標的生物マーカーアッセイの正確度;Sen、モデル系の感度;TB_Sen、標的生物マーカーアッセイの感度;Spec、モデル系の特異性;TB_Spec、標的生物マーカーアッセイの特異性。

【表 1 1】

表 11. 標的生物マーカーアッセイ結果と公表された発達毒性アッセイ結果との比較: 適用セット

化合物	ヒト ^a	標的生物 マーカー ^b アッセイ ^b	齧歯類 ^a	ウサギ ^a	mEST	ZET	WEC
6-アミノニコチンアミド	NA	TER	TER	TER	TER ^c	NA	TER ^d
アバカビル	NA	NON	TER	NON	NA	NA	NA
アデフォビルジビボキシリル	NA	TER	NON	NON	NA	NA	NA
アンブレナビル	NA	NON	TER	TER	NA	NA	NA
アルテスナート	NA	TER	TER	TER	NA	NA	NA
シドフォビル	NA	TER	NON	NON	NA	NA	NA
エンタカポン	NA	TER	TER	NON	NA	NA	NA
フルオキセチン	NA	NON	TER	NON	TER ^e	NA	NON ^{f,g}
ラメルテオン	NA	NON	NON	NON	NA	NA	NA
ロシグリタゾン	NA	NON	TER	TER	NA	NA	NON ^h

mEST、マウス胚性幹細胞試験;ZET、ゼブラフィッシュ胎児毒性試験;WEC、全胚培養;NON、非確
奇形物質;TER、確奇形物質;NA、入手不能。相反するコードがあった場合、より最近の文献からの、
または意見が一致しているより多くの文献からの分類を使用した。

^a特に断りのない限り、ヒト、齧歯類およびウサギへの効果は、Drugs in Pregnancy and
Lactation(Briggs et al.,2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed.Philadelphia:Lippincott
Williams & Wilkins),TERIS および/または ACToR
database(www.actor.epa.gov/actor/faces/ACToRHome.jsp)から要約された。

^b方法セクションに記載され図 3 に示されるようにして入手できる場合は、処置の C_{max} を使用して、
標的生物マーカーアッセイの予測を行った。しかしアッセイの適用においては、 C_{max} は入手できない
ためこの方法は使用されない。

^cGenschow et al.,2004,Altern Lab Anim;32:209-244.

^dPiersma et al.,1995,Reprod Toxicol;9:275-280.

^ePaquette et al.,2008,Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol;83:104-111.

^fThomson et al.,2011,Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol;92:111-121.

^gZhang et al.,2012,Toxicol Sci;127:535-546.

^hChan and Lau,2006,Fertil Steril;86:490-492.

【0146】

考察

本アッセイは、より正確で迅速かつより安価な動物試験代替物に対する必要性に対処する
ために開発された。我々の目的は、目下要求される生体内試験に先立つ化合物の優先順位付けを助けるために、そして新興多層的試験ストラテジーの一部として、毒物学者に新しいおよび生物学的に適切なツールを提供することである。未分化 hES 細胞は、発達の最初期段階のヒト細胞に対する、試験化合物の発達上の有毒効果をモデル化するための単純で洗練された試験系に相当し、それは場合によっては、胎児発達後期における化合物の効果の暗示も同様にもたらし得る。hES 細胞に基づく発達毒性試験は、特に発達経路および薬物動態の種間の違いに起因する、偽陰性のリスクを低下させる (Scott et al., 2013, Toxicol Lett; 219: 49 - 58)。本実施例は、非標的メタボロミクスに基づく発達毒性アッセイを修正して、広範な曝露レベルにわたってヒトの有毒応答を正確にモデル化し得る、2つの生物学的に妥当な代謝産物に重点を置くことにより、複雑度を低下させ、処理量を増大させる。

【0147】

本実施例は、特定程度の代謝搅乱を使用して、試験化合物が発達毒性を引き起こす可能性を予測し得ることを実証する。本実施例のアッセイは、広範な曝露レベルにわたって細胞性応答を考察できるようにする、多重曝露アプローチを使用する。このアプローチに催

20

30

40

50

奇形性閾値を適用することで、増大する曝露レベルにおける代謝変化を使用して、催奇形可能性を示唆する様式で代謝が変化する濃度を同定できるようにした。ここで作成されたモデルは、オルニチンおよびシスチンの代謝比率の変化と細胞生存率とを比較して、代謝変化が催奇形性につながる可能性があり細胞死に関連する、曝露レベルを同定できるようにする。細胞生存率と代謝変化の総合評価によって、曝露が、細胞死または可能な胚毒性に起因する発達毒性をもたらし得る場合にも、このアッセイが同定できるようにする。 O/C 比は、トレーニングセットおよび試験セット中で、第2相の催奇形性閾値セットを使用して、催奇形物質と非催奇形物質と89%の総合確度で識別し得る(表11)。

【0148】

代謝産物は、恒常性維持およびシグナル伝達において重要な役割を果たすので、代謝産物の分析は、毒性機構の理解における重要なプロセスである。個々の代謝産物の搅乱は、正常な発達過程を妨害する能力を有する。代謝産物の存在量の変化は、化合物または化合物代謝産物と酵素とのアロステリックな相互作用、翻訳後修飾中の欠陥、タンパク質とタンパク質の相互作用妨害および/または輸送の変化などの、タンパク質および転写物の存在量から独立した機構によって、生じ得る。細胞培養系の消耗培地内で測定される代謝変化は、細胞代謝の機能的測定である、区別可能な「代謝フットプリント」をもたらし、それは処置への応答を使用して評価し得る。反応物質または生成物としてオルニチンおよびシスチンを含有する生化学的経路の搅乱は、奇形発生機構と実験的に関連付けられている。細胞外に、または我々のアッセイによって測定されるセクレトーム内では、培地の酸化状態のために、シスチンがシステインよりも優勢である。シスチンは、ひとたび細胞内環境に移入されると、システインに迅速に変換されて、反応性酸素種(ROS)を処理する細胞の調節能力の重要な構成要素である、シスチン/システインチオール酸化還元対の一部になる。奇形発生をもたらすこともある、分化、増殖、アポトーシス、およびその他の細胞事象を調節する能力に関する、その役割が検査されている(Hansen, 2006, Birth Defects Res C Embryo Today; 78: 293-307)。医薬品、農薬、および環境汚染物質をはじめとする広範囲の催奇形物質が、ROS作り出し、または細胞の酸化還元状態の適切な平衡を維持する細胞機構を妨害することが疑われ、それは発達毒性作用機序として、発達調節ネットワークに悪影響をもたらし得る(Hansen, 2006, Birth Defects Res C Embryo Today; 78: 293-307; Kovacic and Somanathan, 2006, Birth Defects Res C Embryo Today; 78: 308-325)。サリドマイド奇形発生の主な機序と、その種特異的発達毒性顕在化は、肢形成中のアポトーシス経路のROS関連上方制御に関連があるという仮説が立てられている(Hansen, 2006, Birth Defects Res C Embryo Today; 78: 293-307)。このアッセイにおけるシスチンの測定は、細胞の酸化還元状態に関する洞察を提供する。シスチンの取り込みが搅乱された場合、それは生物マーカーとして作用し得て、ROS関連経路を使用してシグナルを送る細胞能力の妨害を示唆する。

【0149】

このアッセイの第2の代謝産物は、培養中にhES細胞によって分泌されるオルニチンである。オルニチンは、アルギニンの尿素への異化作用の生成物として形成され、窒素排泄にとって重要であり、ポリアミンの前駆体である。オルニチン異化作用は、オルニチンデカルボキシラーゼ(ODC)の転写サブレッサーである催奇形物質、全トランス型レチノイン酸によって影響を受け、オルニチン分泌増大がもたらされ、それは次にポリアミン合成を阻害する(Mao et al., 1993, Biochem J; 295: 641-644)。ODCノックアウトマウスモデルでは、非常に初期の胚性段階の妨害がもたらされ、発達中の胚にとって致死性であることから、ODCが発達において重要な役割を果たすこともまた明らかである(Pegg, 2009, IUBMB Life; 61: 880-894)。オルニチンレベルの変化は、ヒトの発達中の細胞成長および分化にとって重要なポリアミン代謝に妨害をもたらし得る(Kalhan and Bier, 2010)

0 0 8 , A n n u R e v N u t r ; 2 8 : 3 8 9 - 4 1 0) 。

【 0 1 5 0 】

トレーニングセット中の 23 種の化合物の内 1 種のみ (ジフェニルヒダントイン) および試験セット中の 13 種の化合物の内 3 種のみ (ボセンタン、ラパチニブ、およびロバスタチン) が、標的生物マーカーアッセイで誤分類された (表 6 および 8)。これらの 4 種の化合物は全て、催奇形性を示唆する o/c 比の変化を示したが、催奇形可能性濃度は、曝露レベルの生物学的関連性のマーカーとして設定された治療的 C_{max} よりも高い。確立された C_{max} 値を有しないであろう発見化合物では、 o/c 比における変化を化合物の催奇形性可能性に関するシグナルとして使用し得る。疫学的研究がジフェニルヒダントインおよび先天異常間の関連性を示している一方で、妊娠中のボセンタン、ラパチニブおよびロバスタチン曝露に続く先天異常の発生を記載するような研究はなかった。妊娠中にボセンタンまたはラパチニブに曝露された乳児の先天異常に関する症例報告は公表されておらず、初期妊娠中のロバスタチン曝露に続く奇形を記載する描写する少数の報告のみがある (TERIS)。 10

【 0 1 5 1 】

生体内ラット発達毒性試験では、ロバスタチンについて、器官形成中に 1 日あたり 100 mg / kg 体重の最小毒性量 (LOAEL) が同定されている (Lankas et al., 2004, Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol; 71: 111-123)。興味深いことに、この曝露レベルは、1.5 μ M 前後の C_{max} をもたらし (Lankas et al., 2004, Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol; 71: 111-123)、これは、この試験で o/c 比によって同定された催奇形可能性に近い (1.3 μ M、表 7、図 7A)。ラパチニブは、AUC に基づくヒトの臨床曝露の約 3.3 倍の曝露レベルで器官形成中に投与すると、生体内で仔ラット死亡率を引き起こす (Brieggs GG, Freeman RK, Yaffe SJ, 2011, "Drugs in pregnancy and lactation," 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins)。この曝露レベルは、ラパチニブ曝露に続いて、hES 細胞中で細胞生存率が低下する濃度にほぼ等しい (図 7B)。催奇形性リスクを測定するために、動物モデルが目下使用されているが、それらの結果が、個々の化合物に関するヒトのリスクといかに良く相關するかは、依然として不明である。アッセイの主要目的は、ヒトにおける催奇形性可能性の予測でありながら、行政上の承認のために使用された生体内動物モデルとの一致を理解することもまた、重要である。これらは、標的生物マーカーアッセイで生成されたデータを、生体内発達毒性データとどのように相關させ得るかという、いくつかの例である。 30

【 0 1 5 2 】

この試験で評価された化合物では、標的生物マーカーアッセイは、生体内齧歯類およびウサギ試験と、約 75 % の確率で一致した (表 11)。試験管内系からの化合物濃度をヒトの曝露レベルに変換する方法の理解を改善する、重要な機会が依然としてある (Bhattacharya et al., 2011, PLoS One; 6: e20887)。適用セットを使用して、化合物の発見と開発中に行われた追加的アッセイと組み合わせた場合に、曝露範囲全体にわたって毒性可能性を測定することで、モデル応答を全体的な化合物リスクの観点から大局的に見る方法を実証した。このセット中の 10 種の化合物は、あらゆる新規化合物がそうであるように、未知のヒト発達毒性結果を有する。 o/c 比は、適用化合物セットの利用できる C_{max} と比較して、各化合物の催奇形可能性シグナルの妥当性の評価を開始した (補遺表 1)。ヒトにおける遭遇可能な曝露レベルを理解するために、治療的 C_{max} が使用された。しかしこれらの化合物のヒト催奇形性は未知であるので、アッセイの予測性を評価するのに、 C_{max} は使用しなかった。適用セットは、既知のヒト催奇形性がある化合物のアッセイ能力の評価とは対照的に、未知化合物のための標的生物マーカーアッセイの効用を実証することが意図される (図 8)。次に各化合物およびそのリスク可能性を開発して理解するために、あらゆる利用できる前臨床生体内所見 40

を使用する。このようなアプローチは、従来の化合物発見または前臨床開発プログラムの一部として、または早期意思決定を目的とするヒト細胞に基づくアッセイパネルを利用する新規パラダイムの一部として、アッセイの採択で使用し得る。

【0153】

標的生物マーカーアッセイの顕著な利点は、体内の各細胞型を再現でき、培養中で増殖する無制限の能力を有する、胚に由来するヒト細胞の使用である。その他の試験管内発達毒性アッセイで観察されることもある、発達毒性における種特異的差異の可能性は、排除される。ECVAMで評価されるmESTとは対照的に、ここで提示されるアッセイでは、hES細胞が胚体または心筋細胞などの特定系統に分化する必要がない。特定系統への分化は、異なる発達系統に影響を及ぼす催奇形物質を予測する、アッセイの可能性を制限することもある。本明細書に記載されるアッセイは、心臓血管、神経性および骨格をはじめとする複数系統に影響を及ぼすことが知られている化合物を正しく分類し得る（表2および3）。標的生物マーカーアッセイは、分析的に判定され、mEST、移植後ラットWECC試験、およびZETによって要求されるような、形態学のいかなる主観的解釈も必要でない、評価項目を提供する。mESTに対する最近の修正は、追加的な発達評価項目（すなわち神経および骨芽細胞の分化）を追加して、主観的評価の代わりに分子評価項目を実装することで、これらの制限に対処し始めている（Theunissen and Pietersma, 2012, Front Biosci; 17: 1965-1975で概説されている）。表10は、ここで説明される標的生物マーカーアッセイ結果と、5つのその他の発達毒性アッセイ結果との比較を提示し；標的生物マーカーアッセイは他のアッセイよりもさらに高い確度を有する（表11）。o/c比を使用してなされた予測のより高い確度は、他のアッセイに優る、特異性または非催奇形物質検出の増大に起因する。化合物が予測される方法において各モデル系の間に存在する差異に留意することが、重要である。表10に含まれる他のアッセイが、いずれもヒト曝露レベルに基づいて化合物を分類しないのに対し、我々の分類体系は、化合物の催奇形可能性を、既知のヒト発達毒性結果を有する化合物の既知の治療的C_{max}と直接比較する。予測する場合、胎児が遭遇する可能性が高い、化合物の実際の曝露レベルは、重要である。標的生物マーカーアッセイで試験された17種のヒト非催奇形物質の内9種は、治療的C_{max}を超える曝露レベルにおいて、o/c比の変化を引き起こした。適合種の中で、発達中の適合時間に、適合用量で投与されたあらゆる化合物が、催奇形性であると考えられる（Daston GP and Knudsen TB, 2010, "Fundamental concepts, current regulatory design and interpretation," In: Knudsen TB, Daston GP, editors. Comprehensive Toxicology. Vol 12, 2nd ed. New York: Elsevier. p 3-9）。催奇形性を示唆するレベルから、催奇形性を示唆しない曝露レベルを区別する標的生物マーカーアッセイの能力は、アッセイの重要な長所である。

【0154】

本明細書に記載される標的生物マーカーアッセイは、発達毒性を予測する顕著な見込みを示すが、hES細胞は、他の試験管内モデルと同様に、外来性化学物質による、正常なヒトの発達妨害に寄与する全ての事象を完全に再現し得ない。毒性の試験管内モデルは、吸収、分布、代謝および排泄（ADME）効果を含まず、それは未知の毒性物質が生体内でどのように作用するのか予測するのを困難にすることもある。代謝活性化が要求される場合、または発達毒性可能性について親化合物とあらゆる既知の代謝産物の双方とを試験する場合、外来性生体内活性化系を追加することで、代謝作用の不在を部分的に克服し得る。親化合物および代謝産物の双方を試験することは、どの作用因子が主催奇形物質であるのか識別するのを助け得て、それは試験化合物の発達毒性可能性を正確に予測するのに不可欠である。さらに母親-胎児相互作用および器官形成は、試験管内モデルを使用してモデル化され得ない。しかし試験管内アッセイを使用することの利点の1つは、化合物曝露からの母親毒性に起因する結果と、化合物に起因する有害転帰とを区別する能力で

10

20

30

40

50

ある。ヒトの発達に対する h E S 細胞の生理学的な関連性を考えると、ヒト胚に由来する細胞中の発達毒性試験は、動物モデル、またはその他の試験管内非ヒトアッセイの使用を通じて目下利用できる評価項目よりも、さらに信頼できる試験管内予測評価項目を生成すると期待できる。

【0155】

このアッセイは、種特異的誤解釈を低下させまたは排除し、第 2 の種に対する必要性を低下させるのを助け得て、ヒト集団に可能な不都合な応答が存在してもよい場合を規定することを目的とする、試験管内アッセイパネルの一部として含まれ得る。標的器官毒性の可能性を理解するのに使用される、その他の試験管内培養システムと良く似て、このアッセイは、発達毒性可能性を評価し得る。その長所の一部は、これが一定範囲の曝露レベルにわたって達成されることである。試験管内データに基づいて、安全限界を推定し、またはヒト応答を完全に予測する定義された方法がない一方で、このようなアッセイは、応答が期待されてもよい曝露範囲、ならびに応答が起きることが期待されない曝露範囲を定義するのを助け得る。次に結果は、試験のパネルに組み込み得て、それは総計で臨床安全限界を近似する。この情報は、化合物をその開発経路に沿って進捗させるかどうかを決定するのを助け得る。

【0156】

実施例 1 はまた、その内容全体を参照によって援用する、Smith et al., 2013, "Establishment and assessment of a new human embryonic stem cell-based biomarker assay for developmental toxicity screening," Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol; 98 (4) : 343 - 63 として公開されている。

【0157】

実施例 2

ADM A / シスチン比率

本発明によって、少数の代謝産物から得られるデータ分析が、催奇形性の非常に正確な予測因子の役割を果たし得るかどうか判定された。実施例 1 に記載されるようにして、トレーニングセットによる分泌特性および培地成分の個々の予測能力を評価するアルゴリズムを開発し、非常に簡略化された予測モデルを開発するのに使用し得る、いくつかの重要な特徴を同定して確認した。選択過程は、特性の予測能力、全体的強度、およびピーク形状に重点を置いて、標的 L C - M S によって、またはその他の検出システムによっても測定し得る、非常に良好に挙動する特性 / 代謝産物を同定した。d e v T O X 計算的モデルの開発で使用されたトレーニングセットおよび試験セット中で、催奇形物質および非催奇形物質の少なくとも 90 % を正確に同定し得る、いくつかの特性対およびいくつかの個々の特性を同定した。

【0158】

本実施例では、それらの豊富さ、理想的なピーク形状、そしてどちらも 93 % の確度を示すそれらの計算モデルと同様の性能測定基準の提示（表 14）から、シスチンおよび非対称性ジメチルアルギニン（ADM A）が、簡略化予測モデルのために選択された。この単純化モデルは、ADM A およびシスチンの参照処置（D M S O）正規化値の比率に基づく。この単純な比率は、非催奇形物質との比較で比率低下を一般に提示する、催奇形物質を識別できる。0.9 未満の比率が催奇形性を示すという基準を使用して、トレーニングセットの 9 つの独立した複製全体にわたって評価すると、これは非催奇形物質から催奇形物質を明らかに識別できる（図 9）。

【0159】

図 9 は、各トレーニングセット薬剤について、ADM A（分泌代謝産物）およびシスチン（培地構成物）の比率の参照処置正規化比率を示す。X 軸は、参照正規化された ADM A / シスチン比である。y 軸は、トレーニングセット医薬品である。灰色三角記号は催奇形物質を表し、黒色丸記号は非催奇形物質を表す。各記号の点は、独立した実験プロック

10

20

30

40

50

の培地の値を表す（ブロックあたり 6 つ）。十字線記号は、サンプル中央値を標識する。図 9 では、灰色垂直線は催奇形性閾値であり、灰色横線は中央絶対偏差であり、黒色垂直線は 1.0 を指す。最下部の矢印は、0.9（灰色線）のカットオフを使用して、催奇形物質と非催奇形物質を識別するのに使用された値を示す。

【0160】

【表 12】

表 12. 検証および試験セットモデル予測の比較

処置メタデータ			モデル予測			10
処置	用量	既知の効果	バージョン 2.0	バージョン 2.1	ADMA/シスチン	
*アモキシシリン	20.5	NON	NON	NON	NON	
アスコルビン酸	90	NON	NON	NON	NON	
カフェイン	9.3	NON	NON	NON	TER	
ジフェンヒドラミン	0.25	NON	NON	NON	NON	
ドキシラミン	0.38	NON	NON	NON	NON	
葉酸	0.035	NON	TER	NON	NON	
イソニアジド	51	NON	TER	TER	NON	
レボチロキシン	0.14	NON	TER	NON	NON	20
*メトクロラミド	0.15	NON	TER	NON	NON	
ペニシリン G	134.6	NON	NON	NON	NON	
レチノール	2.4	NON	TER	NON	NON	
サッカリン	1.4	NON	NON	NON	NON	
チアミン	0.67	NON	NON	NON	NON	
5FU	2.7	TER	TER	TER	TER	
*アキュテイン	2.9	TER	TER	TER	TER	
*アクロレイン	100	TER	TER	TER	TER	
アミノブテリン	0.008	TER	TER	TER	TER	
ブスルファン	5.3	TER	TER	TER	TER	30
カルバマゼピン	47	TER	TER	TER	TER	
シトシンアラビノシド	0.13	TER	TER	TER	TER	
ジフェニルヒダントイ						
ン	79.3	TER	NON	NON	NON	
ヒドロキシ尿素	118.5	TER	TER	TER	TER	
メトトレキサート	0.04	TER	TER	TER	TER	
レチノイン酸	1.2	TER	TER	TER	TER	
サリドマイド	12.4	TER	TER	TER	TER	
VPA	1000	TER	TER	TER	TER	
ワルファリン	23.4	TER	TER	TER	TER	40

トレーニングセットに含まれない処置は、星印および斜体で標識される。TER=催奇形物質、NON=非催奇形物質。

【0161】

実施例 3

シスタチオニン / シスチン比率

先の実施例に記載される手順に従って、シスタチオニン / シスチン倍数変化の比率の測定もまた、本明細書に記載される迅速な催奇形性スクリーニングにおいて、優れた予測性と全体能力を提供することもまた判定された。これは、図 10 に示される。図 10 では、灰色三角記号は催奇形物質を表し、黒色丸記号は非催奇形物質を表し、灰色垂直線は催奇

形性閾値であり、十字線記号はサンプル中央値を標識し、灰色横線は中央値絶対偏差であり、黒色垂直線は1.0を指す。

【0162】

実施例4

生存率解析

細胞培養（セクレトーム）に続いて消耗培地中で測定される細胞代謝変化は、細胞健康の機能的測定である。細胞培養「セクレトーム」は、細胞培養に続いて、消耗培地または細胞培養上清中に存在する代謝産物を指す。セクレトームは、培地成分と、原形質膜を越えて受動的におよび能動的に輸送される代謝産物と、溶解時に放出される細胞内代謝産物と、酵素の細胞外代謝を通じて生成されるものとを含んでなる。未処置培養物と比較した、実験的薬剤によって引き起こされるセクレトームの変化は、代謝シグネチャを生じ、それを使用して、細胞培養中に存在する代謝的に生存可能な細胞数を推測し得る。我々は、参照培養「対照群」の細胞数と比較して、生細胞数を推測するのに利用し得る、いくつかの分泌代謝産物を同定した。我々は、いくつかの分泌代謝産物を、市販キットを使用して実施した生存率解析の結果と比較して、9点濃度曲線の少なくとも2つの最大濃度で細胞毒性を観察した場合に、分泌される代謝産物の相対的存在量の低下が、0.86を超えるピアソン相関係数で（p値 << .001）、細胞生存率の測定値と直接相関することを発見した。これらの代謝産物をLC-MSまたはキットに基づく検出で利用して、細胞を破壊したまは影響を及ぼす必要なしに、細胞培養中の生細胞数を判定し得る。これらの代謝産物は、成長細胞の妨害を必要としない、新規生存率尺度として使用し得る。

10

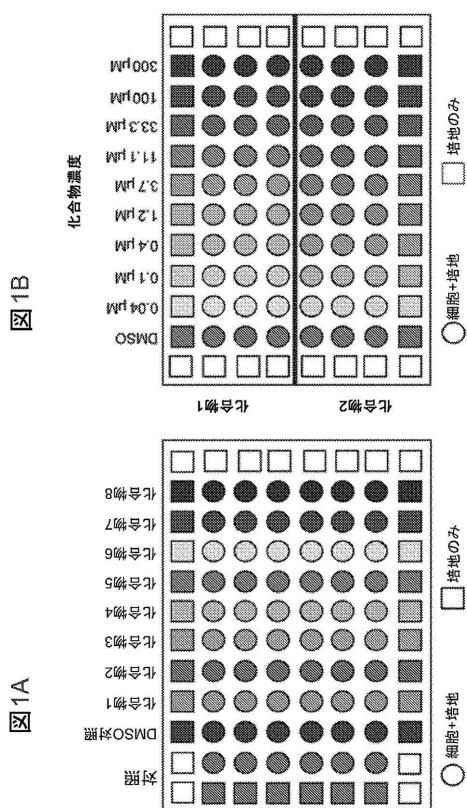
20

【0163】

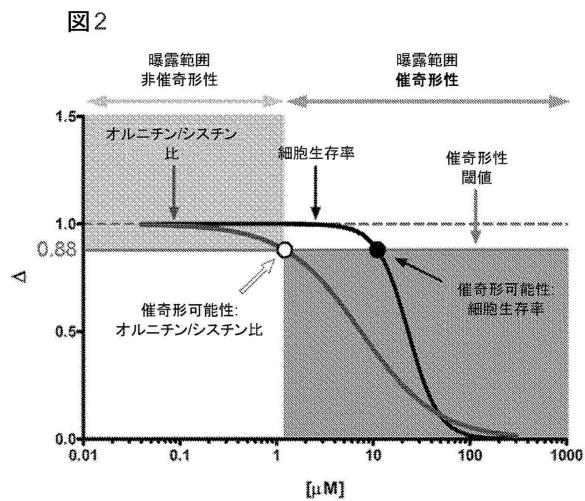
本明細書に引用される、全ての特許、特許出願、および文献、そして（例えば、GenBankおよびRefSeq中のスクレオチド配列提出物、および例えばSwissProt、PIR、PRF、PDB中のアミノ酸配列提出物、およびGenBankおよびRefSeq中の注釈付きコード領域からの翻訳物をはじめとする）電子的に入手可能な情報の完全な開示は、参照によって援用する。全ての見出しは、読者の便宜のためであり、そのように指定されない限り、見出しに続くテキストの意味を制限するために使用されるべきではない。本出願の開示と、参照によって本明細書に援用されるあらゆる文献の開示との間に何らかの矛盾が存在する場合、本出願の開示が優先されるものとする。前述の詳細な説明および実施例は、理解の明確さのためにのみ提供される。それからいかなる不必要的制限も、理解されるべきではない。当業者に明白な変動は、特許請求の範囲によって定義される本発明に含まれるので、本発明は、提示され説明される正確な詳細に制限されない。

30

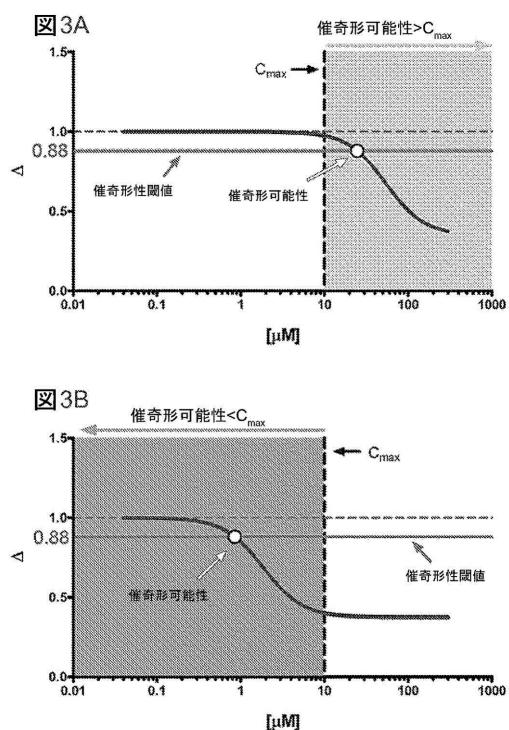
【図1A - 1B】



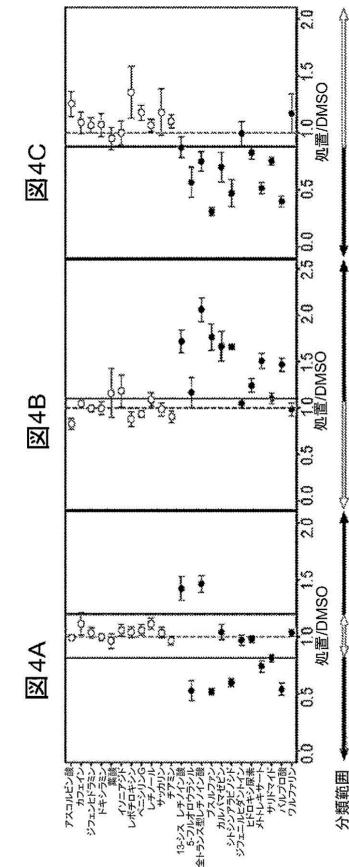
【図2】



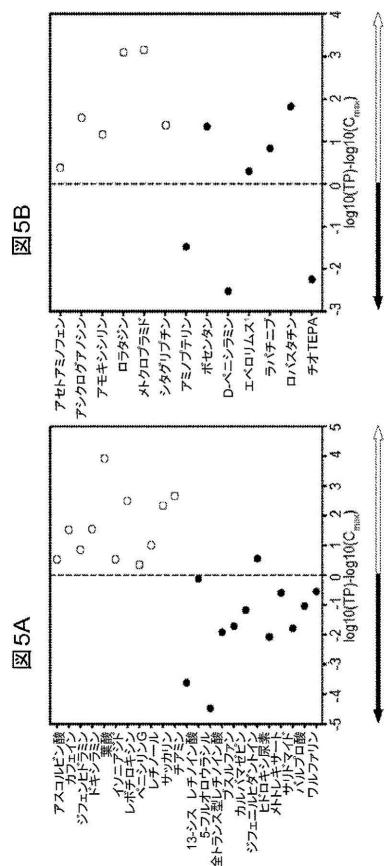
【図3A - 3B】



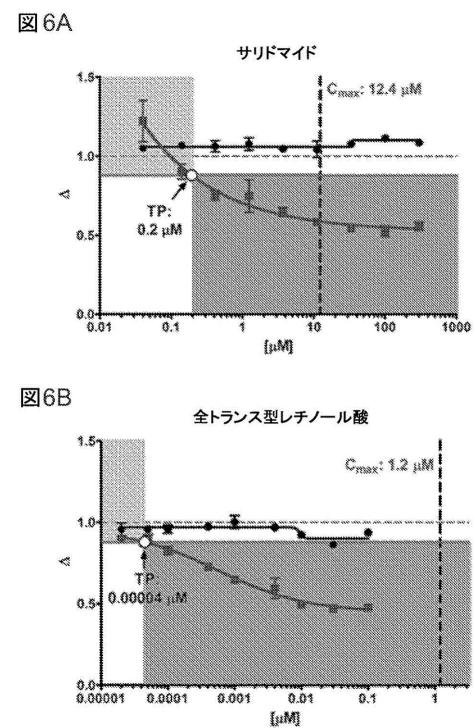
【図4A - 4C】



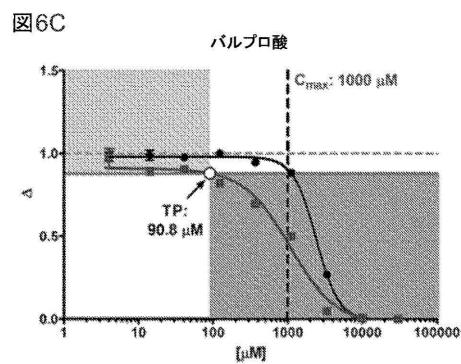
【図 5 A - 5 B】



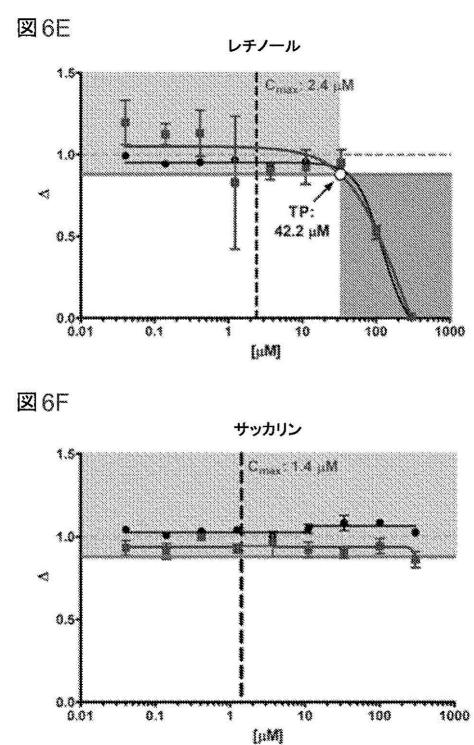
【図 6 A - 6 B】



【図 6 C - 6 D】



【図 6 E - 6 F】



【図 7A - 7B】

図 7A

ロバスタジン

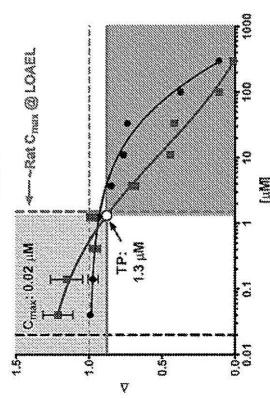
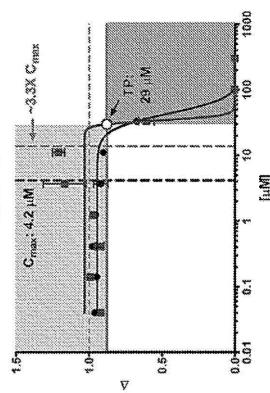


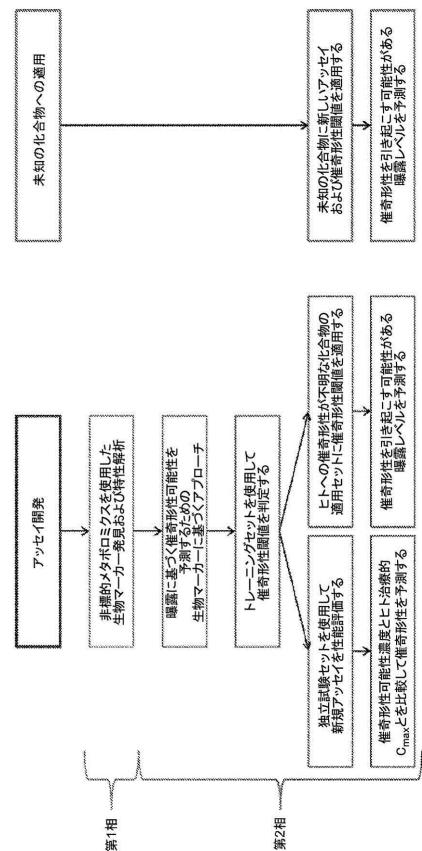
図 7B

ラバチニブ



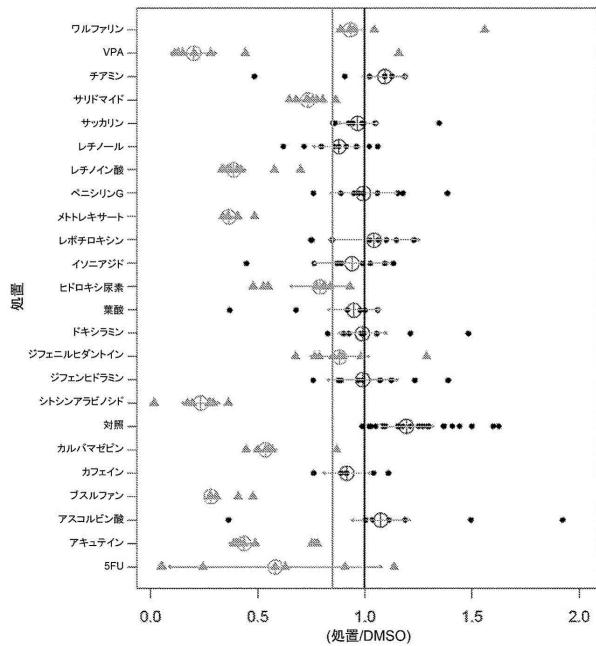
【図 8】

標的生物マーカーアッセイ



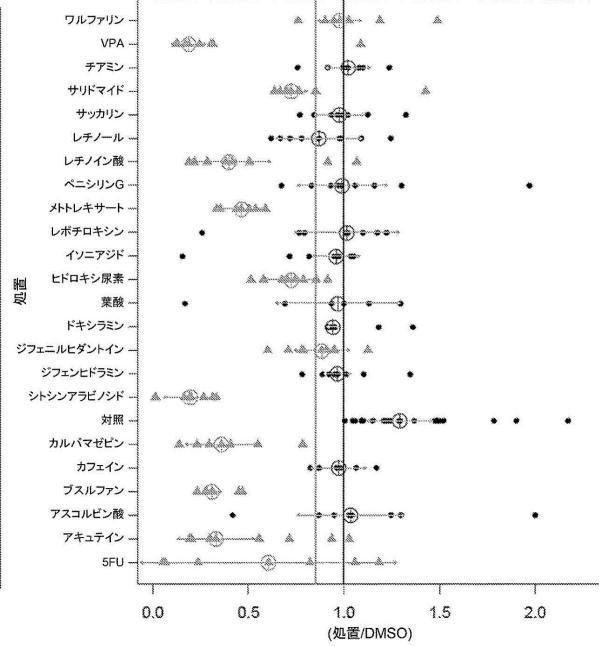
【図 9】

図 9



【図 10】

図10



フロントページの続き

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝
(72)発明者 アラン スミス
アメリカ合衆国, ウィスコンシン 53715, マディソン, エリン ストリート 1146
(72)発明者 ポール ウエスト
アメリカ合衆国, ウィスコンシン 53503, アリーナ, ハイウェイ 7540 14
(72)発明者 ジェシカ パルマー
アメリカ合衆国, ウィスコンシン 53561, メリマック, パラセイズ ストリート 217

審査官 藤井 美穂

(56)参考文献 国際公開第2011/119637 (WO, A1)
Toxicology and Applied Pharmacology, 2010年, Vol.247, pp.18-27
Birth Defects Research (Part B), 2013年10月, Vol.98, pp.343-363

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00 - 3/00
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)
PubMed
Caplus / WPIDS / MEDLINE / BIOSIS (STN)