

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-511005

(P2015-511005A)

(43) 公表日 平成27年4月13日(2015.4.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z 2GO45
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	4BO63
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
	GO 1 N 33/53	Y
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)		

(21) 出願番号 特願2014-560319 (P2014-560319)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月4日 (2013.3.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年8月18日 (2014.8.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2013/054244
 (87) 国際公開番号 W02013/131841
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
 (31) 優先権主張番号 61/607, 622
 (32) 優先日 平成24年3月7日 (2012.3.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/668, 489
 (32) 優先日 平成24年7月6日 (2012.7.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツァーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 催奇形リスクを決定する方法

(57) 【要約】

本発明は、多能性幹細胞を使用して、薬物によって誘導される催奇形のリスクを決定する方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

10

【請求項 2】

多能性幹細胞が霊長類起源のものである、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

多能性幹細胞が胚性幹細胞である、請求項1～2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

多能性幹細胞がH9ヒト胚性幹細胞である、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

多能性幹細胞が誘導多能性幹細胞である、請求項1～2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記中内胚葉マーカーの少なくとも1種がSOX17である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記中内胚葉マーカーの少なくとも1種がEOMESである、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記中内胚葉マーカーの少なくとも1種がT-ブラキュリである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

測定される中内胚葉マーカーが、SOX17のタンパク質発現のみである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

測定される中内胚葉マーカーが、SOX17およびEOMESのタンパク質発現のみである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

測定される中内胚葉マーカーが、SOX17およびT-ブラキュリのタンパク質発現のみである、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

タンパク質発現が免疫組織化学によって測定される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 13】

タンパク質発現がフローサイトメトリーによって測定される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

タンパク質発現が蛍光顕微鏡検査によって測定される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

多能性幹細胞の40～60%が中内胚葉へ分化した後、工程(1)が実施される、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

50

工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、アクチノマイシンD、トレチノイン、シタラピン、ノコダゾール、ロテノン、トレチノイン、イソトレチノイン、プロモデオキシウリジン、ドキシソルピシン、ドルソモルフィン、サリドマイド、5-フルオロウラシル、ダサチニブ、ソラフェニブ、バルプロ酸、スニチニブ、ジブラシドン、ミアンセリン、バンデタニブ、ジエチルスチルベストロール、6-アミノニコチンアミド、リタンセリン、およびゲフィチニブからなる群より選択される、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、サリドマイド、ミアンセリン、およびリタンセリンからなる群より選択される、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項18】

工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、エソメプラゾール、葉酸塩、カテキン、リスリド、ナイアシン、アスピリン、イブプロフェン、アシクロビル、ケタンセリン、ストレプトマイシン、メチルドパ、サッカリン、カフェイン、ペニシリン、およびテガセロッドからなる群より選択される、請求項1~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、葉酸塩およびメチルドパからなる群より選択される、請求項1~17のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項20】

工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、サリドマイド、ミアンセリン、およびリタンセリンからなる群より選択され、かつ公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、葉酸塩およびメチルドパからなる群より選択される、請求項1~15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

上記の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

30

本発明は、ヒト多能性幹細胞を使用して、薬物によって誘導される催奇形のリスクを決定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

後期の薬物失敗を減少させるため、薬物によって誘導される毒性を予測するための改善されたインビトロ系が、製薬産業およびバイオテクノロジー産業によって必要とされている。具体的には、ヒト細胞を利用し、動物研究への依存を低下させることができる予測ハイスループットインビトロモデルが必要とされている。

40

【0003】

起こり得る最も深刻な薬物の有害作用のうちの 하나가、催奇形である。残念ながら、薬物がヒト胎児への害を引き起こす可能性を有するか否かを予測することは、極めて困難であり、妊娠動物モデルの使用に主に依存している。現在、頑強な代替法の欠如のため、FDAは、生殖への害のリスクを評価するための動物研究のいくつかのフェーズを要求している(Bailey,G.P.,L.D.Wise,et al.(2009),"Pre- and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals."Birth Defects Research Part B:Developmental and Reproductive Toxicology 86(6):437-445(非特許文献1))。しかしながら、動物系への依存は、ヒト胎児の発達には有害であるが、げっ歯類などの他の動物種には有害でない、サリドマイドなどのヒト催奇形性物質を同定し得ないというリスクを抱えている(Sh

50

uey,D.and J.H.Kim(2011),"Overview:developmental toxicology-new directions."Birth Defects Research Part B:Developmental and Reproductive Toxicology,92(5):381-383 (非特許文献2))。

【 0 0 0 4 】

多能性幹細胞 (PSC) は、「ブランク」または「未分化」幹細胞状態を維持しつつ、ディッシュにおいて無限に増殖することができる。次いで、増殖条件を変化させることによって、細胞を人体の全ての組織へ「分化する」よう差し向けることが可能である。「分化」過程において、細胞は、胎児発達を調節する正常な遺伝プログラムによって制御される。多能性マウス胚性幹 (ES) 細胞を使用して、催奇形リスクについて化合物を特徴決定する方法は、Hans Spielmanの研究室によって開拓された (Spielmann,H.,I.Pohl,et al.(1997),"The embryonic stem cell test(EST),an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines:3T3 fibroblasts and embryonic stem cells."In vitro Toxicology 10:119-127 (非特許文献3))。胚性幹細胞試験またはESTと呼ばれるこの方法は、拍動心筋細胞が観察され得るまで、10日間、マウスES細胞を分化させることを含む。マウスES細胞およびマウス分化繊維芽細胞株の50%阻害分化および50%細胞傷害を示す薬物の濃度を比較する生物統計学的予測モデルの使用によって、催奇形リスクが評価される (Seiler,A.E.and H.Spielmann(2011),"The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro."Nat Protoc 6(7):961-78 (非特許文献4))。しかしながら、この方法は、比較的長いアッセイの長さ、細胞の分化のために必要とされる労働集約的な方法、「拍動」心筋細胞のスコア化の質的な性質、および生物統計学的予測モデルの中程度の精度などの多くの限界に苦しむ (Marx-Stoelting,P.E.Adriaens,et al.(2009),"A review of the implementation of the embryonic stem cell test(EST).The report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop."Altern Lab Anim 37(3):313-28 (非特許文献5))。さらに、マウスESTは、サリドマイドなどの公知のヒト催奇形性物質を正確に検出し得ない。

【 0 0 0 5 】

これらの限界のため、多くの独立の研究室が、催奇形リスクを評価するための改善されたインビトロ法を開発しようと努力している。より複雑なインビトロ系のみが、インビボ妊娠の甚大な生物学的複雑性の適切な予測性を提供するであろうという想定に基づき、これらの努力の大部分が、アッセイの複雑性を増加させることを目指している。例えば、マウスESTを改善する試みには、標準的な心筋細胞分化プロトコルにトキシコゲノミック (toxicogenomic) 分析を利用すること (Hewitt,M.,C.M.Ellison,et al.(2010),"Integrating (Q) SAR models,expert systems and read-across approaches for the prediction of developmental toxicity."Reproductive Toxicology 30(1):147-160 (非特許文献6) ; van Dartel,D.A.M.,J.L.A.Pennings,et al.(2010),"Monitoring Developmental Toxicity in the Embryonic Stem Cell Test Using Differential Gene Expression of Differentiation-Related Genes." Toxicological Sciences 116(1):130-139 (非特許文献7) ; Pennings,J.L.A.,D.A.M.van Dartel,et al.(2011),"Gene set assembly for quantitative prediction of developmental toxicity in the embryonic stem cell test."Toxicology 284(1-3):63-71 (非特許文献8) ; van Dartel,D.A.M.and A.H.Piersma (2011)."The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity."Reproductive Toxicology 32(2):235-244 (非特許文献9)) ; 内皮細胞もしくは骨細胞などの付加的な分化細胞型をアッセイに追加すること (Festag,M.,B.Viertel,et al.(2007),"An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells.II.Testing of compounds."Toxicology in Vitro 21(8):1631-1640 (非特許文献10) ; Buesen,R.,E.Genschow,et al.(2009),"Embryonic stem cell test remastered:comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro."Toxicol Sci 108(2):389-400 (非特許文献11) ; zur Nieden,N.I.,L.A.Davis,et al.(2010),"Comparing three novel endp

10

20

30

40

50

oints for developmental osteotoxicity in the embryonic stem cell test."Toxicology and Applied Pharmacology 247(2):91-97 (非特許文献12) ; または幹細胞分化中に培地へ分泌される代謝物質の変化を評価すること (West, P.R., A.M. Weir, et al. (2010), "Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics."Toxicology and Applied Pharmacology 247(1):18-27 (非特許文献13)) が含まれる。これらの方法のいくつかは予測性の増加をもたらしたが、これは、しばしば、アッセイスループットを犠牲にしている。

【 0 0 0 6 】

上記の努力とは対照的に、本明細書に記載された新規の方法は、幹細胞分化を2.5日に短縮し、唯一の終点として中内胚葉系統マーカーを調査するという、一見、反直感的なアプローチを利用する。従って、この新しいアプローチは、胎児発達のはるかに初期の一時的な段階を尋問する。ヒト多能性幹細胞を使用して、本発明者らは、この方法が、既存の方法と比較して優れたスループットおよび予測性を達成することを証明する。

10

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Bailey, G.P., L.D. Wise, et al. (2009), "Pre- and postnatal developmental toxicity study design for pharmaceuticals." Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology 86(6):437-445

【 非特許文献 2 】 Shuey, D. and J.H. Kim (2011), "Overview: developmental toxicology-new directions." Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 92(5):381-383

20

【 非特許文献 3 】 Spielmann, H., I. Pohl, et al. (1997), "The embryonic stem cell test (EST), an in vitro embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells." In vitro Toxicology 10:119-127

【 非特許文献 4 】 Seiler, A.E. and H. Spielmann (2011), "The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro." Nat Protoc 6(7):961-78

【 非特許文献 5 】 Marx-Stoelting, P.E. Adriaens, et al. (2009), "A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST). The report and recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop." Altern Lab Anim 37(3):313-28

30

【 非特許文献 6 】 Hewitt, M., C.M. Ellison, et al. (2010), "Integrating (Q) SAR models, expert systems and read-across approaches for the prediction of developmental toxicity." Reproductive Toxicology 30(1):147-160

【 非特許文献 7 】 van Dartel, D.A.M., J.L.A. Pennings, et al. (2010), "Monitoring Developmental Toxicity in the Embryonic Stem Cell Test Using Differential Gene Expression of Differentiation-Related Genes." Toxicological Sciences 116(1):130-139

【 非特許文献 8 】 Pennings, J.L.A., D.A.M. van Dartel, et al. (2011), "Gene set assembly for quantitative prediction of developmental toxicity in the embryonic stem cell test." Toxicology 284(1-3):63-71

【 非特許文献 9 】 van Dartel, D.A.M. and A.H. Piersma (2011). "The embryonic stem cell test combined with toxicogenomics as an alternative testing model for the assessment of developmental toxicity." Reproductive Toxicology 32(2):235-244

40

【 非特許文献 10 】 Festag, M., B. Viertel, et al. (2007), "An in vitro embryotoxicity assay based on the disturbance of the differentiation of murine embryonic stem cells into endothelial cells. II. Testing of compounds." Toxicology in Vitro 21(8):1631-1640

【 非特許文献 11 】 Buesen, R., E. Genschow, et al. (2009), "Embryonic stem cell test re-mastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro." Toxicol Sci 108(2):389-400

【 非特許文献 12 】 zur Nieden, N.I., L.A. Davis, et al. (2010), "Comparing three novel

50

endpoints for developmental osteotoxicity in the embryonic stem cell test."Toxicology and Applied Pharmacology 247(2):91-97

【非特許文献13】West, P.R., A.M. Weir, et al. (2010), "Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics."Toxicology and Applied Pharmacology 247(1):18-27

【発明の概要】

【0008】

本発明は、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法を提供する：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリなどの1種以上の発生的に制御されるマーカーのタンパク質発現を測定することによって、胚発生の進行を検出する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a) 公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b) 公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】インビボで催奇形性物質または非催奇形性物質のいずれかであることが証明された公知の化合物。

【図2】プロトコル法に記載されるようにして3日間分化させたH9ヒト胚性幹細胞株を示す時間経過。示された各日に、細胞を固定し、Sox17、EOMES、またはT-ブラキュリのいずれかに特異的な抗体によって染色した。DNA色素DAPIを、細胞核をマークするための対比染色として使用した。

【図3】パネルA：本発明において使用された3日間分化プロトコルを図示する実験設計。パネルB：Sox17染色の用量依存性の低下を証明する催奇形性物質処理の例。

【図4】細胞系統マーカーSox17、EOMES(中内胚葉マーカー)、ならびにOCT4(多能性細胞および神経系統のマーカー)の同時発現。パネルAは、中内胚葉系統をマークする、3日間の分化の後のSox17およびEOMESのオーバーラップする発現を示す。パネルBは、Sox17およびOCT4の核染色が主として相互に排他的であることを示す。パネルCおよびDは、催奇形性物質によって誘導されたSox17の相対的な低下およびOCT4染色の増加を例証しており、Sox17またはEOMES以外の細胞系統マーカーの相対発現が、催奇形リスクの尺度として使用され得ることを示唆している。

【図5】催奇形リスクについて未知の化合物を試験するための96ウェルプレートレイアウトの例。ボックス内の数字は、ある濃度の化合物をさす。例えば、1.1 = 濃度1の化合物1、2.1 = 濃度1の化合物2。さらに、P = (公知の催奇形性物質を含む)陽性対照およびD = DMSO(陰性対照)。

【図6-1】インビボで催奇形性または非催奇形性のいずれかであることが公知の75種の化合物についての実験的に決定されたSox17阻害IC50を示す表。これらのデータを使用して、本発明者らは、92%の精度で、非催奇形性化合物と催奇形性化合物を区別することができる、20μMというIC50カットオフを確立することができた。

【図6-2】インビボで催奇形性または非催奇形性のいずれかであることが公知の75種の化合物についての実験的に決定されたSox17阻害IC50を示す表。これらのデータを使用して、本発明者らは、92%の精度で、非催奇形性化合物と催奇形性化合物を区別することができる、20μMというIC50カットオフを確立することができた。

【図7】5μMまたは20μMのいずれかのIC50値に基づき、図6の結果から計算された適中率を示す表。個体によって使用される正確なIC50カットオフは、偽陽性対偽陰性の予測された比率の許容度に基づき選ばれるべきである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

発明の詳細な説明

本明細書において使用されるように、移行句においても、または特許請求の範囲の本文においても、「含む (comprise)」および「含む (comprising)」という用語は、無制限の意味を有していると解釈されなければならない。即ち、その用語は、「少なくとも有する」または「少なくとも含む」という語句と共に同義的に解釈されなければならない。過程に関して使用された時、「含む」という用語は、その過程が、示された工程を少なくとも含むが、付加的な工程を含んでいてもよいことを意味する。化合物または組成物に関して使用された時、「含む」という用語は、その化合物または組成物が、示された特色または成分を少なくとも含むが、付加的な特色または成分も含んでいてもよいことを意味する。

【0011】

「任意の」または「任意で」という用語は、本明細書において使用されるように、続いて記載されたイベントまたは状況が、起こってもよいが、起こらなくてもよく、その記載が、イベントまたは状況が起こる場合と、起こらない場合とを含むことを意味する。

【0012】

「約」という用語は、およそ、おおよそ、ほぼ、または大体を意味するため、本明細書において使用される。「約」という用語が、数的な範囲と共に使用される時、それは、述べられた数値の上下の境界を拡張することによって、その範囲を修飾する。一般に、「約」という用語は、20%の分散で、記述された値の上下に数値を修飾するため、本明細書において使用される。

【0013】

「多能性幹細胞」という用語は、本明細書において使用されるように、三つ全ての系統または胚葉（即ち、内胚葉、外胚葉、および中胚葉）の細胞型へ分化する細胞の能力を意味し、含む。複能性という用語は、当技術分野において理解されている意味を有し、複数の細胞型へ分化する細胞の能力を含む。複能性細胞は、多能性細胞より、分化する能力が制限されている場合があることも理解される。誘導幹細胞（「iSC」）という用語は、本明細書において使用されるように、誘導多能性幹細胞（「iPSC」）または誘導複能性幹細胞（「iMSC」）をさす。時に、「iPS」または「iPS細胞」という用語は「iPSC」の代わりに使用され得；同様に、時に、「iMS」または「iMS細胞」という用語は「iMSC」の代わりに使用され得。iPSCに適用可能な、本明細書に記載された方法および組成物は、iSCおよびiMSCにも適用可能である。

【0014】

「タンパク質発現の測定」という用語は、（例えば、抗体染色および抗体によって染色された細胞の特異的蛍光の定量化などの直接法による、またはタンパク質をコードするmRNAの量の測定による間接的な、細胞のウェルにおける）産生されたタンパク質の量の決定を意味する。

【0015】

「IC50」という用語は、本明細書において使用されるように、未処理の対照と比べて、測定された分化マーカーの50%の阻害をもたらす試験化合物の濃度を意味する。

【0016】

「発生的に制御されるマーカー」という用語は、発現が発生の間に変化する遺伝子を意味する。

【0017】

「中内胚葉マーカー」という用語は、発現が中胚葉細胞系統に見出されることが決定された遺伝子を意味する。本発明において有用な中内胚葉マーカーの例は、Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリである。

【0018】

「催奇形リスク」という用語は、化合物がインビボで催奇形性であるであろう計算されたリスクまたは確率を意味する。同様に、「非催奇形リスク」という用語は、化合物がインビボで催奇形性でないであろう計算されたリスクまたは確率を意味する。

【0019】

10

20

30

40

50

「Sox17」という用語は、SRYボックス17によってコードされた遺伝子または遺伝子産物をさす（SOX17、遺伝子ID 64321、ヒト相同体の遺伝子産物はSEQ ID NO:1に例示される）。

【0020】

「EOMES」という用語は、エオメソダーミンによってコードされた遺伝子または遺伝子産物をさす（EOMES、遺伝子ID 8320、ヒト相同体の遺伝子産物はSEQ ID NO:2に例示される）。

【0021】

「T-ブラキュリ」という用語は、T、ブラキュリ相同体（マウス）によってコードされた遺伝子または遺伝子産物をさす（T、遺伝子ID 6862、ヒト相同体の遺伝子産物はSEQ ID NO:3に例示される）。

【0022】

OCT4という用語は、POU5F1 POUクラス5ホメオボックス1によってコードされた遺伝子または遺伝子産物をさす（POU5F1、遺伝子ID : 5460、ヒト相同体の遺伝子産物はSEQ ID NO:4に例示される）。

【0023】

「ハイスループット」という用語は、本明細書において使用されるように、ロボット操作の能力を含む、複数の試料の容易な同時スクリーニングを可能にするアッセイ設計を意味する。ハイスループットアッセイのもう一つの所望の特色は、所望の分析を達成するため、試薬使用を低下させるかまたは操作の数を最小化するため最適化されているアッセイ設計である。アッセイフォーマットの例には、96ウェルまたは384ウェルのプレートが含まれる。プラスチックモールドおよび液体を扱う装置の小型化が進歩しているため、または改善されたアッセイ装置が設計されているため、より多数の試料が本発明の設計を使用して実施され得ることは、当技術分野において周知である。一つの態様において、細胞は、96ウェルまたは386ウェルのプレートなどの多数のウェルを含有しているマイクロタイタープレートにおいて培養され分析される。

【0024】

本明細書において使用される技術用語および科学用語は、他に定義されない限り、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味を有する。当業者に公知の様々な方法論および材料が、本明細書において参照される。薬理学の一般的な原理を記述している標準的な参考資料には、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed., McGraw Hill Companies Inc., New York (2001)が含まれる。当業者に公知の任意の適当な材料および/または方法が、本発明の実施において利用され得る。しかしながら、好ましい材料および方法が記載される。以下の説明および実施例において参照される材料、試薬等は、特記されない限り、商業的供給元から入手可能である。

【0025】

本願は、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法を提供する：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) 1種以上の発生的に制御されるマーカーのタンパク質発現を測定することによって、胚発生の進行を検出する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a) 公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b) 公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0026】

具体的な態様において、1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現が測定される。

【0027】

より具体的な態様において、測定される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現

は、Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される。

【0028】

より具体的な態様において、本願は、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法を提供する：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

10

【0029】

具体的な態様において、測定される少なくとも1種の中内胚葉マーカーはSOX17であり；より具体的な態様において、SOX17のタンパク質発現が、測定される唯一の中内胚葉マーカーである。

【0030】

他の具体的な態様において、測定される少なくとも1種の中内胚葉マーカーはEOMESであり；より具体的な態様において、EOMESのタンパク質発現が、測定される唯一の中内胚葉マーカーである。

20

【0031】

他の具体的な態様において、測定される少なくとも1種の中内胚葉マーカーはT-ブラキュリであり；より具体的な態様において、T-ブラキュリのタンパク質発現が、測定される唯一の中内胚葉マーカーである。

【0032】

他の具体的な態様において、測定される中内胚葉マーカーが、SOX17およびEOMESのタンパク質発現のみである。

【0033】

他の具体的な態様において、測定される中内胚葉マーカーが、SOX17およびT-ブラキュリのタンパク質発現のみである。

30

【0034】

具体的な態様において、多能性幹細胞は霊長類起源のものである。

【0035】

具体的な態様において、多能性幹細胞は胚性幹細胞に由来する。

【0036】

他の具体的な態様において、多能性幹細胞は誘導多能性幹細胞起源に由来する。

【0037】

具体的な態様において、催奇形リスクは、免疫組織化学によってマーカーのタンパク質発現の変化を定量化することによって評価される。

【0038】

他の具体的な態様において、催奇形リスクは、フローサイトメトリーによってマーカーのタンパク質発現の変化を定量化することによって評価される。

40

【0039】

他の具体的な態様において、催奇形リスクは、蛍光顕微鏡検査によってマーカーのタンパク質発現の変化を定量化することによって評価される。

【0040】

他の具体的な態様において、催奇形リスクは、タンパク質マーカーをコードするmRNAレベルの変化を定量化することによって、マーカーのタンパク質発現の変化を定量化することによって評価される。

【0041】

50

具体的な態様において、本発明の方法の工程(1)は、多能性幹細胞の40~60%が中内胚葉へ分化した後、実施される。

【0042】

具体的な態様において、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、図1にリストされた公知の催奇形性物質からなる群より選択される。

【0043】

他の具体的な態様において、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、図6にリストされた公知の催奇形性物質からなる群より選択される。

【0044】

具体的な態様において、工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、図1にリストされた公知の催奇形性物質からなる群より選択される。

10

【0045】

他の具体的な態様において、工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、図6にリストされた公知の催奇形性物質からなる群より選択される。

【0046】

より具体的な態様において、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、アクチノマイシンD、トレチノイン、シタラピン、ノコダゾール、ロテノン、トレチノイン、イソトレチノイン、プロモデオキシウリジン、ドキシソルピシン、ドルソモルフィン、サリドマイド、5-フルオロウラシル、ダサチニブ、ソラフェニブ、バルプロ酸、スニチニブ、ジブラシドン、ミアンセリン、バンデタニブ、ジエチルスチルベストロール、6-アミノニコチンアミド、リタンセリン、およびゲフィチニブからなる群より選択される。

20

【0047】

さらに具体的な態様において、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、サリドマイド、ミアンセリン、およびリタンセリンからなる群より選択される。

【0048】

具体的な態様において、工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、エソメプラゾール、葉酸塩、カテキン、リスリド、ナイアシン、アスピリン、イブプロフェン、アシクロビル、ケタンセリン、ストレプトマイシン、メチルドパ、サッカリン、カフェイン、ペニシリン、およびテガセロッドからなる群より選択される。

30

【0049】

より具体的な態様において、工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、葉酸塩およびメチルドパからなる群より選択される。

【0050】

より具体的な態様において、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、サリドマイド、ミアンセリン、およびリタンセリンからなる群より選択され、かつ公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物は、葉酸塩およびメチルドパからなる群より選択される。

【0051】

一つの態様において、方法はインビトロ法である。

40

【0052】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法が提供される：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキユリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定され

50

たIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0053】

一つの態様において、多能性幹細胞は霊長類起源のものである。

【0054】

一つの態様において、多能性幹細胞は胚性幹細胞である。

【0055】

一つの態様において、多能性幹細胞はH9ヒト胚性幹細胞である。

【0056】

一つの態様において、多能性幹細胞は誘導多能性幹細胞である。

10

【0057】

一つの態様において、中内胚葉マーカーの少なくとも1種はSOX17である。

【0058】

一つの態様において、中内胚葉マーカーの少なくとも1種はEOMESである。

【0059】

一つの態様において、中内胚葉マーカーの少なくとも1種はT-ブラキュリである。

【0060】

一つの態様において、測定される中内胚葉マーカーが、SOX17のタンパク質発現のみである。

【0061】

一つの態様において、測定される中内胚葉マーカーが、SOX17およびEOMESのタンパク質発現のみである。

20

【0062】

一つの態様において、測定される中内胚葉マーカーが、SOX17およびT-ブラキュリのタンパク質発現のみである。

【0063】

一つの態様において、タンパク質発現は免疫組織化学によって測定される。

【0064】

一つの態様において、タンパク質発現はフローサイトメトリーによって測定される。

【0065】

一つの態様において、タンパク質発現は蛍光顕微鏡検査によって測定される。

30

【0066】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法であって、多能性幹細胞の40~60%が中内胚葉へ分化した後、工程(1)が実施される、方法が提供される：

(1)中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；

(2)Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；

(3)該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の障害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに

40

(4)評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0067】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法であって、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、アクチノマイシンド、トレチノイン、シタラピン、ノコダゾール、ロテノン、トレチノイン、イソトレチノイン、プロモデオキシウリジン、ドキシソルピシン、ドルソモルフィン、サリドマイド、5-フルオロウラシル、ダサチニブ、ソラフェニブ、パルプロ酸、スニチニブ、ジブラシドン、ミアンセリン、バンデタニブ、ジエチルスチルベストロール、6-アミノニコチンアミ

50

ド、リタンセリン、およびゲフィチニブからなる群より選択される、方法が提供される：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0068】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法であって、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、サリドマイド、ミアンセリン、およびリタンセリンからなる群より選択される、方法が提供される：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0069】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法であって、工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、エソメブラゾール、葉酸塩、カテキン、リスリド、ナイアシン、アスピリン、イブプロフェン、アシクロビル、ケタンセリン、ストレプトマイシン、メチルドパ、サッカリン、カフェイン、ペニシリン、およびテガセロッドからなる群より選択される、方法が提供される：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0070】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法であって、工程(4)における公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、葉酸塩およびメチルドパからなる群より選択される、方法が提供される：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a)公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b)公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

【0071】

一つの態様において、以下の工程を含む、化合物の催奇形リスクを評価する方法であって、工程(4)における公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、サリドマイド、

10

20

30

40

50

ミアンセリン、およびリタンセリンからなる群より選択され、かつ公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物が、葉酸塩およびメチルドパからなる群より選択される、方法が提供される：

- (1) 中内胚葉へ分化中の多能性幹細胞と化合物を接触させる工程；
- (2) Sox17、EOMES、およびT-ブラキュリからなる群より選択される1種以上の中内胚葉マーカーのタンパク質発現を測定する工程；
- (3) 該1種以上のマーカーのタンパク質発現の50%の阻害をもたらす該化合物のIC50濃度を決定する工程；ならびに
- (4) 評価している該化合物の催奇形リスクを確立するため、工程(3)において決定されたIC50濃度を、(a) 公知の催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度および(b) 公知の非催奇形リスクを有する1種以上の化合物のIC50濃度と比較する工程。

10

【実施例】

【0072】

催奇形リスクを決定する一般的方法

本発明の方法は、定方向分化中の処理された多能性幹細胞と対照多能性幹細胞との間で、中内胚葉形成のレベルを比較することによって、薬物によって誘導される催奇形のリスクを評価する。従って、ヒト多能性幹細胞の分化を中内胚葉へ差し向けるための最適条件を最初に確立しなければならない。概念実証として、本明細書の実施例に記載されたプロトコルを使用して、H9ヒト胚性幹細胞株を使用して、初期検証を実施した。

20

【0073】

ベースラインの分化の最適化

第一に、3日間の分化において40~60%の中内胚葉形成を再現性よく達成する最適の初期細胞播種密度および増殖因子の濃度を同定した(図2を参照のこと)。中内胚葉を生成するための増殖因子処理の理想的な濃度および期間の軽微なプロトコル最適化によって、当業者は、大部分のヒト多能性細胞株で使用するためにこの方法を適応させることができる。方法は、薬物によって処理された試料と対照試料との間の中内胚葉形成の比率の比較に依存するため、40~60%の分化がこれらの研究のための出発点として選ばれたが、効率がウェル間で一貫している限り、中内胚葉細胞の正確な割合は重要ではないはずである。

30

【0074】

初期検証実験において、多様な系統マーカー、抗体、および定量法を調査した。それらの実験は、同時発現された中内胚葉系統マーカーSox17、T-ブラキュリ、およびEOMESが、発生の乱れをモニタリングするための情報を提供することを示した。図4に示されるように、OCT4などのSox17/EOMES/T-ブラキュリ陰性細胞を標識するその他のマーカーの定量化を、定方向分化を誘導するシグナル伝達経路の乱れを定量化するため、同様に使用し得ることも予測されるであろう。

40

【0075】

インビトロ/インビボ相関のための閾値濃度の確立

定方向分化のための条件を最適化した後、胎児への害を引き起こさないことが公知の化合物からの、公知の催奇形性化合物の層別化を可能にする用量応答関係を確立する。初期研究のため、本発明者らは、公知のインビボ効果を有する、30種の市販の化合物および40種の専有の化合物のパネルを使用した。中内胚葉へ分化中の細胞を含有している個々のウェルを、1日目および2日目に処理した(図3を参照のこと)。一枚のプレートにおいて、増加する濃度の各化合物を特定のウェルに適用した。さらに、各プレートは、陽性対照として、催奇形性であることが公知の化合物によって処理されたウェルを含有し、陰性対照として、溶媒によってのみ処理されたウェルも含有していた(図5のプレートマップの例を参照のこと)。

40

【0076】

定方向分化の終わりに、中内胚葉系統マーカーのレベルを定量化した。本明細書に記載された原理実証研究について、細胞における系統マーカーの発現を、免疫染色後のフローサイトメトリー分析、蛍光顕微鏡検査、またはプレートリーダーの使用による定量化によ

50

て、タンパク質レベルで測定した。これらの値から、DMSO対照と比べて、測定された分化マーカーの50%の阻害をもたらす各試験化合物の濃度を、各試験化合物について計算した (IC50)。インビボで催奇形性または非催奇形性のいずれかであることが公知の化合物のIC50値を調査することによって、非催奇形性化合物と催奇形性化合物を区別するIC50値を確立することが可能である。検証において調査されたH9細胞株(下記)については、20uMという濃度が、催奇形リスクを予測するため、>90%の精度を提供することが見出された(図6および7の表を参照のこと)。

【0077】

ハイスループットスクリーニングへのアッセイの適応

関心対象の多能性細胞株を使用して、催奇形リスクを測定するための所望の閾値が確立された後は、アッセイをよりハイスループットのリスク評価のために利用することができる。許容される予測性のレベルに相関する単一の濃度で、トリプリケートに、化合物を試験することができる。

【0078】

試験された化合物のための具体的なプロトコルおよび方法

基本的な試薬

試薬

16%ホルムアルデヒド溶液、10×10mlアンプル、Thermo、#28908

30%ウシ血清由来アルブミン溶液、Sigma、カタログ#A9576-50ML

100mlロバ血清、Millipore、#S30-100ML

免疫組織化学のためのヒトSOX17 NL557アフィニティ精製ポリクローナルAb、ヤギIgG、R&D systems, Inc. #NL1924R

hESC最適化マトリゲル(Matrigel)、5ml * LDEVフリー、BD Bioscience、#354277、細胞外基質

組換えヒト/マウス/ラットアクチビンA、R&D Systems, Inc. #338-AC-005

組換えヒトWnt-3a、R&D Systems, Inc. #5036-WN-010

EmbryoMax(登録商標)ES細胞最適化ウシ胎仔血清、500ml、Millipore、#ES009B(ES-009-B)

アキュターゼ(ACCUTASE)(商標)細胞剥離溶液、Stemcell Technologies、#07920、100ml

mTeSR(登録商標)1、StemCell Technologies、#05850 1キット、限定ヒト多能性幹細胞液体培地

Y-27632二塩酸塩一水和物((R)-(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサカルボキサミド二塩酸塩、Tocris

Advanced RPMI 培地1640(1×)、液体、グルタミン不含、フェノールレッド、500ml、Invitrogen、#12633-012、基本細胞増殖培地

グルタミン100×、#25030-081、Invitrogen

Image-iT(商標)FXシグナル増強剤、Invitrogen、#136933(任意)、蛍光色素シグナル増強剤

トリトンX-100、Sigma、#T8787

DAPI含有SlowFade(登録商標)Gold褪色防止用封入剤、Invitrogen、#S36938、蛍光色素シグナル保存剤

ジメチルスルホキシド(DMSO)、#494429 - Sigma

DE分化培地I(同日に新鮮に作成する):

Advanced RPMI 培地1640

グルタミン(1×、新鮮に添加する)

ヒトアクチビンA 100ng/ml

ヒトWnt3a 25ng/ml

DE分化培地II(同日に新鮮に作成する):

Advanced RPMI 培地1640

10

20

30

40

50

グルタミン (1×、新鮮に添加する)

ヒトアクチビンA 100ng/ml

0.1% ウシ胎仔血清 (FBS)

組織培養プレートのマトリゲルコーティング : 1:80希釈を使用してマトリゲルによって96ウェルをコーティングする

【0079】

プロトコル法

多能性幹細胞の調製 :

細胞培養。H9ヒトES細胞 (WiCell) を10uM Y-27632を含むmTeSR培地で解凍した。3百万個の細胞を、ES細胞最適化マトリゲル (BD Biosciences) によってあらかじめコーティングされた2枚の100mm組織培養等級ディッシュに播種した。Y-27632は播種の際にのみ必要とされ、播種後24時間以内に除去されるべきである。mTeSR培地を毎日交換した。細胞は3~4日以内にほぼコンフルエントになるはずである。

【0080】

アキュターゼおよび96ウェルプレートへの播種

細胞が約50%コンフルエントになった時、培地を除去し、PBSで濯ぎ、次いで、100mmプレート1枚当たり2mlのアキュターゼを添加した。細胞を3分以内に剥離するべきである。直ちに10uM Y-27632を含む8mlのmTeSRを添加し、(2×100mmプレートからの) 20mlを50mlチューブへ移した。6分間400×gでスピンドした。上清を除去した。Y-27632を含む10mlのmTeSRを添加した。細胞ペレットを懸濁させるために上下にピペティングした。生細胞数を計数し、百万細胞/mlで再懸濁させた。5000~50,000細胞/96ウェルで細胞を播種した。具体的な細胞株および細胞のロットによって、最適の細胞密度を達成するため、この数は変動し得る。これらの実験については、15,000細胞/ウェルを播種した。2~5日間、毎日、mTeSR培地を交換した。

【0081】

多能性幹細胞の定方向分化および分析

0日目。薬物を含む分化培地Iによる分化開始

細胞を96ウェルプレートに均等に分配しなければならない。細胞が96ウェルプレートのウェル内で約35%コンフルエントになった時(2~5日後)、分化を開始した。培地を除去し、Advanced RPMIで4~5回洗浄した。mTeSRは、細胞を未分化状態に維持する様々な因子を極めて高濃度で含有しているため、mTeSRを完全に洗浄除去することは、重要である。試験化合物を含むかまたは含まないDE分化培地Iを添加した。3分間500rpmでプレートをボルテックスした。24時間プレートを放置した。

【0082】

1日目。薬物を含む分化培地IIへの交換

プレートをAdvance RPMIで3回迅速に(およそ10分)洗浄した。化合物を含むかまたは含まないDE分化培地IIを添加した。3分間500rpmでプレートをボルテックスした。48時間プレートを放置した。細胞を、合計72時間、薬物によって処理したことに注意すること。

【0083】

3日目。中止および細胞の固定

1. 96ウェルプレートから培地を除去した。上部の細胞片または死細胞を除去するため、D PBSによって温和に3回ウェルを洗浄した。37℃に予熱されたPBSで新鮮に調製された3%ホルムアルデヒドを添加した。これを細胞に15分間添加した。長い固定は、高いバックグラウンドまたは抗原改変を引き起こす可能性がある。PBSを除去するため、PBSで3回洗浄した。

2. 15分間0.1%トリトンX-100を含むPBSによって細胞を透過性化した。

3. 96ウェル当たり30ulのImageIT-FX溶液を適用した。700rpmで1分間ボルテックスした。室温で30分間インキュベートした。

4. ブロッキング緩衝液(10%ロバ血清、0.3%トリトンX-100、1%BSAを含むPBS)で1回洗浄し、次いで、ブロッキング緩衝液を添加し、20分間放置した。

10

20

30

40

50

5. ブロッキング緩衝液中のSox17抗体（1:10希釈）を添加した。室温で3時間インキュベートした。
6. 1% BSAを含むPBSで4回洗浄した。
7. DAPIまたはヘキスト33242（いずれも5ug/mlの最終濃度）を含む1% BSAを含むPBSを5分間添加した。後にDAPIを含むSlowFadeを使用する場合には、この手順は必要ない。
8. 各96ウェルに30ulのDAPIを含むSlowFadeを添加した。

【0084】

データ分析

Envisionプレートリーダーによって557nmにおける蛍光強度を測定した。

【0085】

プロトコルおよび実施基準

上記実施例は、ヒト胚性幹細胞H9（Wisconsin Alumni Research Foundation、WARF）に適用される本発明を例示したものである。他の多能性幹細胞株へ方法を適用する時には、初期細胞播種密度、培地中の増殖因子の濃度、および分化の期間などの、株依存性の分化効率に影響する典型的な変数を決定しなければならない。上記のこの最適化過程において、本発明者らは、催奇形リスクの予測のための最適条件を同定するため、中内胚葉形成の効率、およびサリドマイドによって媒介される薬物効果をモニタリングした。

【0086】

上記の本発明は、明瞭および理解のため、例示および例によってある程度詳細に説明された。従って、上記説明は、例示的なものであって、限定的なものではないことが理解されなければならない。本願において引用された特許、特許出願、および刊行物は、全て、事実上、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

10

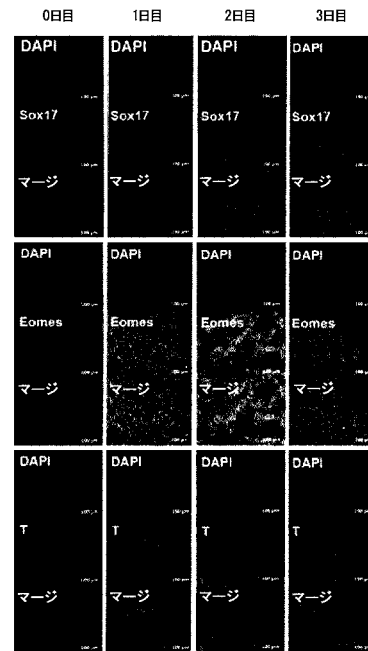
20

【図1】

化合物	式	MW	催奇形性物質
5-フルオロウラシル (5FU)	C ₉ H ₇ FN ₂ O ₂	130	はい
6-アミノニコチンアミド	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O	137	はい
アシクロビル (ACV)	C ₈ H ₁₂ N ₆ O ₃	225	いいえ
アクリノマイシンB	C ₂₆ H ₃₆ N ₁₀ O ₁₆	1255	はい
アスピリン	C ₉ H ₈ O ₄	180	いいえ
プロモチオキシプリン	C ₁₀ H ₁₁ BN ₂ O ₄	307	はい
カフェイン	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194	いいえ
カテキン	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290	いいえ
シタラビン (Ara-C)	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	280	はい
ダサチニブ	C ₂₂ H ₁₆ ClN ₂ O ₂ S	488	はい
ジエチルスチルベストロール	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268	はい
ドルゾモルフィン	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂ ·2HCl	472	はい
ドネソリドシン	C ₂₂ H ₂₉ NO ₁₁	544	はい
エゾメフロザール	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	713	いいえ
薬酸塩	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₆	441	いいえ
ゲフィチニブ	C ₂₂ H ₁₄ ClFN ₂ O ₂	447	はい
イブプロフェン	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206	いいえ
イマチニブ	C ₂₉ H ₃₂ N ₂ O	590	はい
イソトレチノイン	C ₂₀ H ₂₈ O	300	はい
ケタンセリン	C ₂₂ H ₂₇ FN ₂ O ₂	395	いいえ
リスリド	C ₂₂ H ₃₂ N ₄ O	454	いいえ
メチルドパ	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	238	いいえ
ミアセリン	C ₁₉ H ₂₅ N ₂	264	はい
ナイアシン	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	123	いいえ
ノコダゾール	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₃	301	はい
ヘキシリン		500	いいえ
リタンセリン	C ₂₂ H ₂₅ F ₃ N ₃ OS	478	はい
ロテノン	C ₁₅ H ₁₆ O ₆	394	はい
サツカリン	C ₈ H ₁₀ N ₂ S	183	いいえ
SB431542	C ₂₃ H ₂₄ N ₄ O ₃	384	はい
ソラフェニブ	C ₂₁ H ₁₆ ClF ₃ N ₂ O ₃	465	はい
ストレプトマイシン	C ₂₃ H ₃₈ N ₁₀ O ₁₂	582	いいえ
スーテント	C ₂₂ H ₂₇ FN ₂ O ₂	398	はい
テガセロッド	C ₁₉ H ₂₃ N ₃ O	338	いいえ
サリドマイド	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ O ₂	258	はい
トレチノイン	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	300	はい
バルプロ酸	C ₈ H ₈ O ₂	144	はい
バンダタニブ	C ₂₁ H ₁₆ BrFN ₂ O ₂	475	はい
ジブラシドン	C ₁₇ H ₁₅ ClN ₄ OS	413	はい

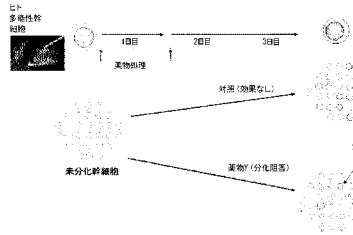
【図2】

A. H9 hESCの定方向分化後の中内胚葉マーカーのタンパク質発現

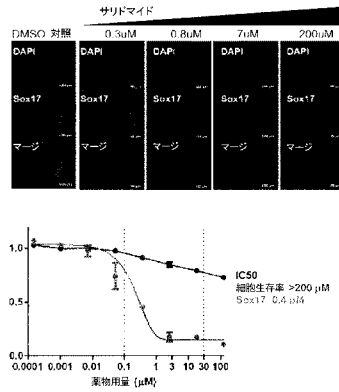
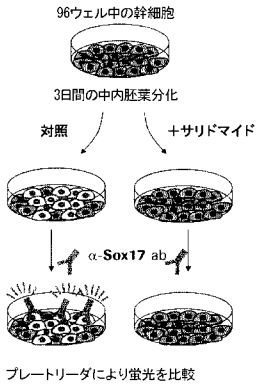


【図3】

A. 実験設計



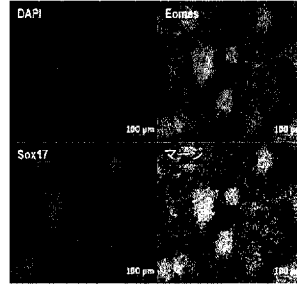
B. 催奇形性物質処理例



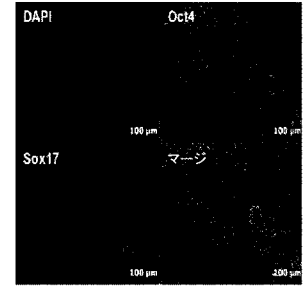
プレートリーダにより蛍光を比較

【図4】

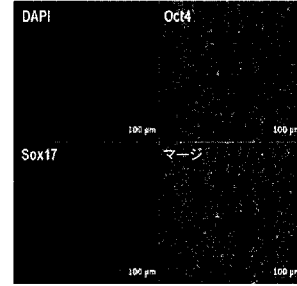
A. DMSO Sox17:EO/ES 同時染色



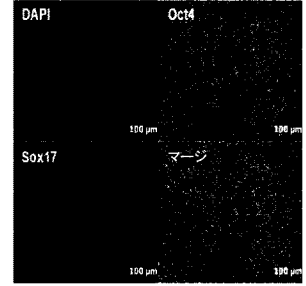
B. DMSO: Sox17:OCT 同時染色



C. サリドマイド15μM: Sox17:OCT4 同時染色



D. SD431542 2μM: Sox17:OCT4 同時染色



【図5】

プレートレイアウト例:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	注釈
A	P.1	1.1	2.1	3.1	1.1	2.1	3.1	1.1	2.1	3.1	P.1	D	
B	P.2	1.2	2.2	3.2	1.2	2.2	3.2	1.2	2.2	3.2	P.2	D	
C	P.3	1.3	2.3	3.3	1.3	2.3	3.3	1.3	2.3	3.3	P.3	D	
D	P.4	1.4	2.4	3.4	1.4	2.4	3.4	1.4	2.4	3.4	P.4	D	
E	P.5	1.5	2.5	3.5	1.5	2.5	3.5	1.5	2.5	3.5	P.5	D	
F	P.6	1.6	2.6	3.6	1.6	2.6	3.6	1.6	2.6	3.6	P.6	D	
G	P.7	1.7	2.7	3.7	1.7	2.7	3.7	1.7	2.7	3.7	P.7	D	
H	P.8	1.8	2.8	3.8	1.8	2.8	3.8	1.8	2.8	3.8	P.8	D	

96ウェルフォーマットプレート中の多能性幹細胞

【図6 - 1】

化合物	MW	機能または標的	20μM間値での結論	hEST ATPレベル
アクチノマイシジンD	1255	DNA転写抑制剤		<0.01
トレチノイン	300	分化制御剤		0.07
シタラビン (Ara-C)	280	抗腫瘍薬		0.08
SB431542	384	ALK阻害剤		0.08
ノコダゾール	301	抗腫瘍薬		<0.1
R-1	355	抗腫瘍薬		<0.1
ロテノン	394	広域スペクトル殺虫剤		<0.1
R-2	441	抗マラリア薬		<0.1
R-3	470	キナーゼ阻害剤		<0.1
イソレチノイン	300	Accutane, 13-シスレチノイン酸		0.2
プロモテオキシフリジン	307	ジミニンの類似体		0.2
R-4	479	オキシドスクアレニシクラセ阻害剤		0.2
ドネソリドゼン	544	抗腫瘍薬		0.3
ドルツモルフィン	472	腫瘍受容体阻害剤		0.32
サリドマイド	258	公知のヒト催奇形性物質		0.5
5-フルオロウラシル (5FU)	130	抗腫瘍薬		0.6
ダサチニブ	488	Sprycel, チロシンキナーゼ阻害剤		<1
ゾラフェニブ	465	Nexavar, チロシンキナーゼ阻害剤		<2
バルプロ酸	144	抗腫瘍薬		2.6
スチーント	398	スチニブ, Onxist 50ng		2.8
ジブラシジン	413	5-HT受容体アンタゴニスト		2.8
ミアンセリン	264	5-HT受容体アンタゴニスト		3.4
パンデタニブ	475	Zactima, Onxist 200ng/ml		3.5
ジェチルスチルベストロール	268	合成非ステロイド性エストロゲン		4.4
テガセロッド	338	5-HT受容体アンタゴニスト, 心毒性	偽陽性	4.6
R-5	415	RARアンタゴニスト		<5
R-6	496	アセクラーゼ		<5
R-7	463	ABCA1	偽陽性	5.3
6-アミノノチンアミド	137	ヒリジンスクレオチド誘導体		7.0
リタンセリン	478	5-HT受容体アンタゴニスト		7.3
R-8	496	Positor, カルシウム流入阻害剤		9.6
R-9	531	ニレスチリルニスチル転移タンパク質阻害剤	偽陽性	9.6
イレツサ	447	グラチニラ	偽陽性	10
R-10	632	W1受容体アンタゴニスト		10
R-11	390	CEFT 阻害剤		10.4
ゲフィチニブ	590	Gleevec, イマチニブ Cmax 1700ng		11
R-12	376	mGlu5		11.5
R-13	291	mGluR5 アンタゴニスト	偽陽性	12
R-14	454	A2Aアンタゴニスト		12
R-15	384	A2a 阻害剤	陰性	26
エゾメブラゾール	713	プロトンポンプ阻害剤	陰性	32
R-16	439	アセチルコリン	陰性	33
R-17	443	Gly11	陰性	32.8
炭酸塩	441	ビタミン	陰性	39.0
R-18	418	A2a 阻害剤	偽陽性	47
R-19	437	Trocade, MMP-1 阻害剤	偽陽性	47
R-20	194	TARR1 アゴニスト	陰性	65
R-21	377	CPT2 阻害剤	陰性	68

【図 6 - 2】

化合物	MW	機能または標的	20uM値での結論	hEST SOX17 ICS0	hEST ATPレベル
R-22	445	GABA	陽性	76.0	80.0
R-23	200	MAOB 阻害剤	陽性	>80	80.0
R-24	218	TAAR	陽性	>80	80.0
R-25	228	11β HSD1	陽性	>80	80.0
R-26	407	A2a 阻害剤	陽性	>80	80.0
R-27	418	ACE 阻害剤	陽性	>80	80.0
R-28	450	DPPIV 阻害剤	陽性	>80	80.0
R-29	467	PPARα/g M6	陽性	>80	80.0
R-30	520	第X因子	陽性	>80	80.0
R-31	568	CatS	陽性	>80	80.0
カテキル	290	アラキノイド	陽性	97.0	200.0
R-32	438	DPPIV 阻害剤	陽性	115	184
R-33	338	DPPIV 阻害剤	陽性	124	>200
リスリド	454	5-HT 受容体アンタゴニスト	陽性	137	122
R-34	282	糖系薬	陽性	160	171
ナイアシン	123	抗血小板薬	陽性	>200	>200
アスピリン	180	NSAIDs, Cox 阻害剤	陽性	>200	>200
イブプロフェン	206	NSAIDs, Cox 阻害剤	陽性	>200	>200
アシクロビル (ADV)	225	グアノシン類似体抗ウイルス薬	陽性	>200	>200
R-35	366	DPPIV 阻害剤	陽性	>200	>200
ケタンセリン	395	5-HT 受容体アンタゴニスト	陽性	>200	>200
R-36	482	GLYT-1 阻害剤	陽性	>200	>200
ストレプトマイシン	582	抗生物質	陽性	>200	>200
メテルドハ	238	降圧剤	陽性	272	462
ザッカリン	183	甘味剤	陽性	>400	>400
カフェイン	194	刺激物質	陽性	>400	>400
ペニシリン	500	抗生物質	陽性	>400	>400

【図 7】

5uM カットオフ	ゴールドスタンダードにより決定される状態				計
	真陰性	偽陽性	陽性選中率	感度	
判定結果	真陰性	偽陽性	陽性選中率	感度	75
	26	1	0.96	0.96	
	偽陰性	真陰性	陰性選中率	精度	
	11	37	0.77	0.84	
	感度	特異度	精度		
	0.70	0.97	0.84		
	FNR	FPR			
	0.30	0.03			

20uM カットオフ	ゴールドスタンダードにより決定される状態				計
	真陰性	偽陽性	陽性選中率	感度	
判定結果	真陰性	偽陽性	陽性選中率	感度	75
	35	4	0.90	0.94	
	偽陰性	真陰性	陰性選中率	精度	
	2	34	0.94	0.92	
	感度	特異度	精度		
	0.95	0.89	0.92		
	FNR	FPR			
	0.05	0.11			

【配列表】

2015511005000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/054244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N5/0735 C12N5/071 G01N33/50 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2008/107912 A2 (RELIANCE LIFE SCIENCES PVT LTD [IN]; KHANNA APAMA [IN]) 12 September 2008 (2008-09-12) claims 1-3, 5, 6, 15, 18-19, 22, 25; examples 2, 5-6; table 2 page 9, lines 24-25 page 10, lines 5-7 page 11, line 36 - page 12, line 3 page 13, lines 30-31 page 14, lines 5-11 page 18, lines 17-20 page 19, lines 1-29 page 20, lines 14-21 page 20, lines 30-32 page 21, lines 2-6 page 21, lines 13-16 page 24, lines 18-21 page 25, line 30 - page 26, line 29 ----- -/--	1-5,8, 12-21 6,7,9-11
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 24 June 2013		Date of mailing of the international search report 04/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Landré, Julien

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2013/054244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 2010/149346 A1 (GE HEALTHCARE UK LTD [GB]; TATNELL PETER JAMES [GB]; HORTON JEFFREY KE) 29 December 2010 (2010-12-29)</p> <p>example 2 page 1, lines 5-7 page 1, lines 19-21 page 2, line 30 - page 3, line 3 page 13, lines 26-29 page 23, lines 18-26</p> <p>-----</p>	4,6,7, 9-12,14, 15,17, 19,20
Y	<p>US 2011/287974 A1 (BENVENISTY NISSIM [IL] ET AL) 24 November 2011 (2011-11-24)</p> <p>paragraphs [0002], [0007] - [0012], [0054], [0064] - [0069], [0087], [0143], [0145]; figures 1A, 4B, 4D; table 2</p> <p>-----</p>	4,6,7, 9-12,14, 15,17, 19,20
Y	<p>US 2006/003313 A1 (D AMOUR KEVIN A [US] ET AL D AMOUR KEVIN ALLEN [US] ET AL) 5 January 2006 (2006-01-05)</p> <p>paragraphs [0012], [0075], [0078], [0132], [0147], [0198]; figures 1, 7, 11, 14; examples 4, 6; table 1</p> <p>-----</p>	4,6,7, 9-12,14, 15,17, 19,20
A	<p>ADLER ET AL: "First steps in establishing a developmental toxicity test method based on human embryonic stem cells", TOXICOLOGY IN VITRO, ELSEVIER SCIENCE, GB, vol. 22, no. 1, 19 December 2007 (2007-12-19), pages 200-211, XP022393683, ISSN: 0887-2333, DOI: 10.1016/J.TIV.2007.07.013 the whole document</p> <p>-----</p>	1-21
A	<p>MEHTA A ET AL: "Assessment of drug induced developmental toxicity using human embryonic stem cells", CELL BIOLOGY INTERNATIONAL, ACADEMIC PRESS, GB, vol. 32, no. 11, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 1412-1424, XP025574246, ISSN: 1065-6995, DOI: 10.1016/J.CELLBI.2008.08.012 [retrieved on 2008-08-20] the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2013/054244

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ANNA M WOBUS ET AL: "Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research", ARCHIVES OF TOXICOLOGY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE, vol. 85, no. 2, 12 January 2011 (2011-01-12), pages 79-117, XP019876617, ISSN: 1432-0738, DOI: 10.1007/S00204-010-0641-6 the whole document</p> <p>-----</p>	1-21
A	<p>SPIELMANN H ET AL: "THE EMBRYONIC STEM CELL TEST, AN IN VITRO EMBRYOTOXICITY TEST USING TWO PERMANENT MOUSE CELL LINES: 3T3 FIBROBLASTS AND EMBRYONIC STEM CELLS", IN VITRO TOXICOLOGY, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 1, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 119-127, XP009044393, ISSN: 0888-319X the whole document</p> <p>-----</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/054244

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008107912 A2	12-09-2008	NONE	

WO 2010149346 A1	29-12-2010	AU 2010265070 A1	19-01-2012
		CA 2764889 A1	29-12-2010
		CN 102483407 A	30-05-2012
		EP 2446266 A1	02-05-2012
		GB 2471389 A	29-12-2010
		JP 2012530502 A	06-12-2012
		KR 20120109461 A	08-10-2012
		SG 177388 A1	28-02-2012
		US 2012101005 A1	26-04-2012
		WO 2010149346 A1	29-12-2010

US 2011287974 A1	24-11-2011	NONE	

US 2006003313 A1	05-01-2006	US 2006003313 A1	05-01-2006
		US 2009311703 A1	17-12-2009
		US 2012276624 A1	01-11-2012

フロントページの続き

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャオ エリック
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 チャタム ローズ テラス 8

(72)発明者 カメオカ セイ
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 モントクレア グローブ ストリート 249

(72)発明者 コラヤ カイル エル.
アメリカ合衆国 ニュージャージー州 モントクレア ノース マウンテン アベニュー 174

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA40 BA13 BA14 BB20 BB25 CB01 CB17 DA36 DA80
FA16 FA29 FA37 FB03 FB12 GC15
4B063 QA01 QA05 QQ08 QR48 QR51 QR77 QS33 QS36 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015511005A5	公开(公告)日	2018-04-12
申请号	JP2014560319	申请日	2013-03-04
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	チャオエリック カメオカセイ コラヤカイルエル		
发明人	チャオ エリック カメオカ セイ コラヤ カイル エル.		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/06 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5073 G01N33/5014 G01N33/5017 G01N33/5023 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/50.Z C12Q1/06 G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB20 2G045/BB25 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA36 2G045/DA80 2G045/FA16 2G045/FA29 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/607622 2012-03-07 US 61/668489 2012-07-06 US		
其他公开文献	JP2015511005A JP6374324B2		

摘要(译)

本发明涉及使用多能干细胞测定药物诱发的致畸作用风险的方法。