

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/037706

発行日 平成29年3月2日 (2017.3.2)

(43) 国際公開日 平成27年3月19日 (2015.3.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 D 277/82 (2006.01)	C 0 7 D 277/82 C S P	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 3 3
A 6 1 K 31/428 (2006.01)	A 6 1 K 31/428	4 C 0 8 6
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

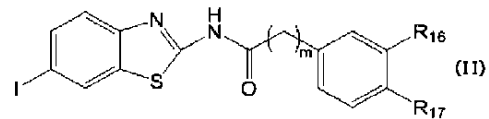
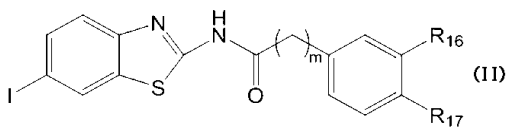
出願番号 特願2015-536642 (P2015-536642)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/074233	
(22) 国際出願日 平成26年9月12日 (2014.9.12)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-190462 (P2013-190462)	(74) 代理人 100101454 弁理士 山田 卓二
(32) 優先日 平成25年9月13日 (2013.9.13)	(74) 代理人 100062144 弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100106518 弁理士 松谷 道子
	(74) 代理人 100138911 弁理士 櫻井 陽子
	(72) 発明者 中辻 憲夫 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞の心筋分化を促進する化合物

(57) 【要約】

本発明は、式 (I I)



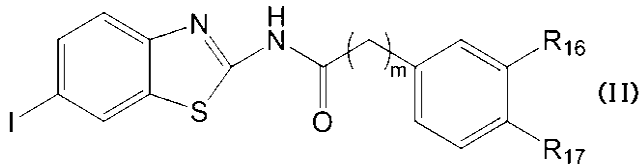
[式中、mは1～4であり、
R₁₆ および R₁₇ は、それぞれ独立してメトキシ基、
エトキシ基、およびプロポキシ基から選択される] を有
する化合物またはその塩に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (II)

【化 1】



[式中、m は 1 ~ 4 であり、

R₁₆ および R₁₇ は、それぞれ独立してメトキシ基、エトキシ基、およびプロポキシ基から選択される]

を有する化合物またはその塩。

【請求項 2】

R₁₆ がメトキシ基である、請求項 1 記載の化合物またはその塩。

【請求項 3】

R₁₇ がメトキシ基またはプロポキシ基である、請求項 2 記載の化合物またはその塩。

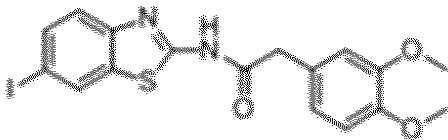
【請求項 4】

m が 1 ~ 3 である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の化合物またはその塩。

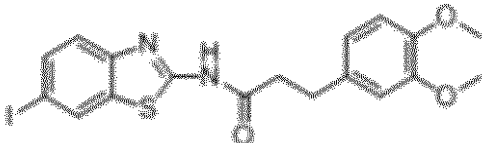
【請求項 5】

以下のいずれかの式を有する化合物またはその塩。

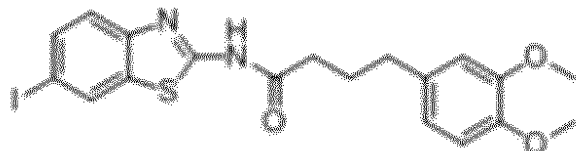
【化 2】



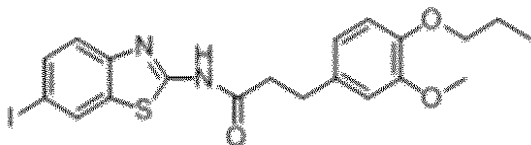
【化 3】



【化 4】



【化 5】



【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進剤。

【請求項 7】

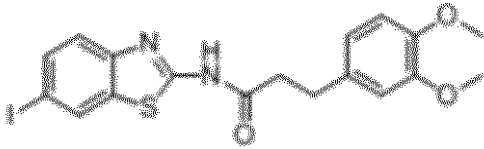
10

20

30

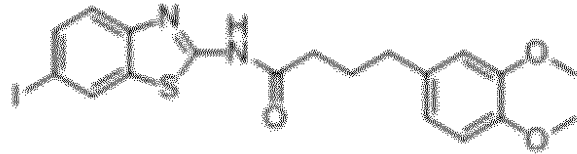
40

【化 6】



または

【化 7】



10

を含む、請求項 6 に記載の多能性幹細胞の心筋分化促進剤。

【請求項 8】

前記化合物の最終濃度が $0.4 \sim 2 \mu\text{M}$ となるよう多能性幹細胞の心筋分化培地に添加される、請求項 6 または 7 に記載の多能性幹細胞の心筋分化促進剤。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進用キット。

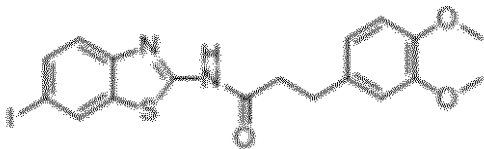
【請求項 10】

20

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

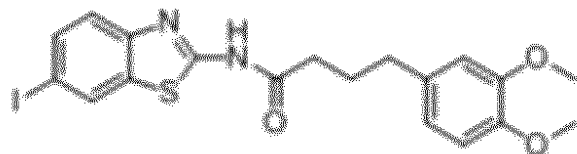
【請求項 11】

【化 8】



または

【化 9】



30

を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記培地が前記化合物を $0.4 \sim 2 \mu\text{M}$ で含む、請求項 10 または 11 に記載の方法。

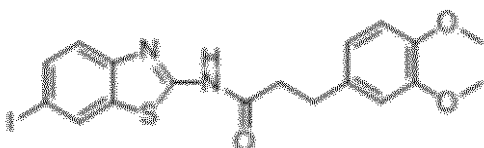
【請求項 13】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法。

40

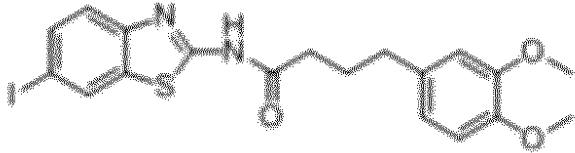
【請求項 14】

【化 10】



または

【化 1 1】



を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記培地が前記化合物を 0.4 ~ 2 μM で含む、請求項 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性幹細胞の心筋分化を促進する化合物およびその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

心臓疾患は世界の死因 1 位であり、重症心不全患者においては心移植が現在唯一の治療法であるが、心移植はドナー不足という問題を抱えている。心移植に代わる治療法として、多能性幹細胞 (iPS / ES 細胞等) 由来の心筋細胞移植が有望視されており、早急な実現化が望まれている。

【0003】

20

iPS 細胞由来の分化心筋細胞を再生医療に応用するためには、効率性と安全性向上が必須である。効率性については、分化誘導できる心筋細胞の数が少ないことや、培養液中の増殖因子などのタンパク質が非常に高価でコスト効率が悪いという問題がある。安全性については、心筋細胞の純度が低く、心筋以外の増殖性細胞が混入するため癌化リスクがあることが問題となる。

【0004】

これらの問題を解決するため、本発明者らは、多能性幹細胞の心筋分化促進活性を有する化合物を開発した (特許文献 1、非特許文献 1)。中でも、新規化合物 KY02111 は、既知の心筋分化促進化合物やタンパク質と比べて非常に強い効果を有する。

【0005】

30

KY02111 は、多能性幹細胞の心筋分化促進剤として非常に有用であるが、十分な心筋分化促進効果を得るためには比較的高濃度で培養液に添加しなければならない。更なるコスト削減と安全性向上の面から、より低濃度で心筋分化促進効果を示す化合物が望ましい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】国際出願公開第 2012 / 026491 号公報

【特許文献 2】国際出願公開第 2013 / 111875 号公報

【非特許文献】

40

【0007】

【非特許文献 1】Minami, I., et al., Cell Reports, Volume 2, Issue 5, 1448-1460, 2012

【非特許文献 2】Graichen, R., et al., Differentiation 76, 357-370, 2008

【非特許文献 3】Hao, J., et al., PLoS One 3, e2904, 2008

【非特許文献 4】Wang, H., Hao, J., and Hong, C.C., ACS Chem. Biol. 6, 192-197, 2011

【非特許文献 5】Ren, Y., et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 51, 280-287, 2011

【非特許文献 6】Willems, E., et al., Circ. Res. 109, 360-364, 2011

【非特許文献 7】Lian, X., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, E1848-E1857, 2012

50

012

【 0 0 0 8 】

上記文献はいずれも、参照により本明細書の一部をなす。

【 発 明 の 概 要 】

【 発 明 が 解 決 し よ う と す る 課 題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、KY02111よりも高効率かつ低コストに多能性幹細胞の心筋分化を可能とする化合物を提供することを目的とする。

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

【 0 0 1 0 】

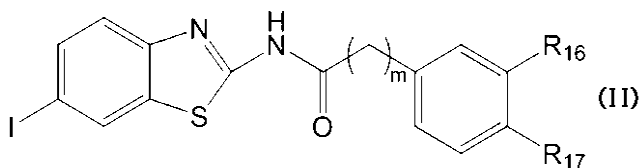
本発明者は、KY02111のCl基を他のハロゲン基等に置換した化合物や、炭素鎖の炭素数(n)を変えた化合物を合成し、それらの化合物の心筋分化促進効果を比較することにより、KY02111よりも極めて低濃度で心筋分化促進効果を示す化合物を見出し、本発明を完成した。

【 0 0 1 1 】

本発明は、以下を提供する。

1. 式 (II)

【 化 1 】



[式 中 、 m は 1 ~ 4 で あり 、

R₁₆ および R₁₇ は、それぞれ独立してメトキシ基、エトキシ基、およびプロポキシ基から選択される]

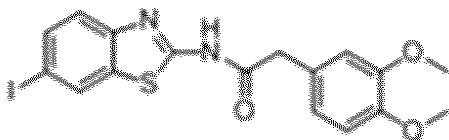
を有する化合物またはその塩。

2. R₁₆ がメトキシ基である、前記1記載の化合物またはその塩。3. R₁₇ がメトキシ基またはプロポキシ基である、前記2記載の化合物またはその塩。

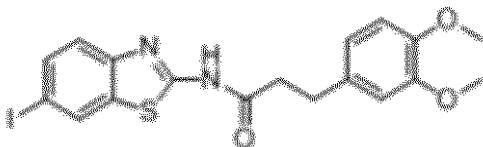
4. m が1~3である、前記1~3のいずれかに記載の化合物またはその塩。

5. 以下のいずれかの式を有する化合物またはその塩。

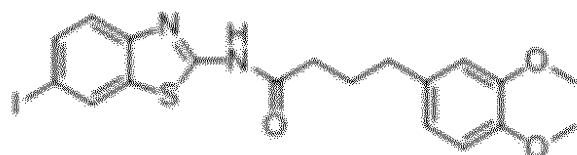
【 化 2 】



【 化 3 】



【 化 4 】



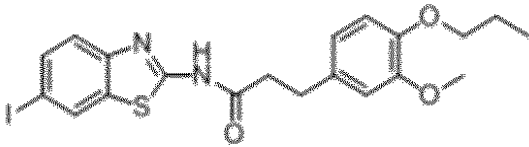
10

20

30

40

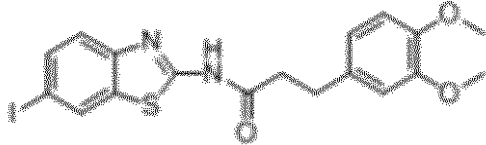
【化 5】



6. 前記 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進剤。

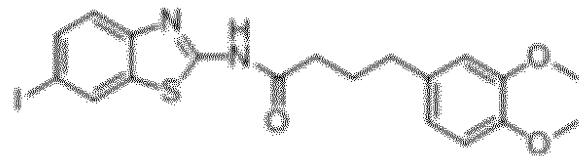
7.

【化 6】



または

【化 7】



を含む、前記 6 に記載の多能性幹細胞の心筋分化促進剤。

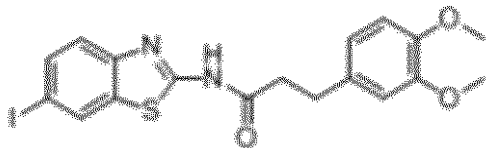
8. 前記化合物の最終濃度が 0.4 ~ 2 μM となるよう多能性幹細胞の心筋分化培地に添加される、前記 6 または 7 に記載の多能性幹細胞の心筋分化促進剤。

9. 前記 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進用キット。

10. 前記 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を心筋細胞に分化誘導する方法。

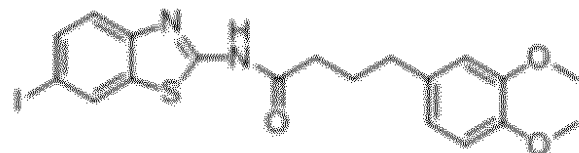
11.

【化 8】



または

【化 9】



を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、前記 10 に記載の方法。

12. 前記培地が前記化合物を 0.4 ~ 2 μM で含む、前記 10 または 11 に記載の方法。

13. 前記 1 ~ 5 のいずれかに記載の化合物またはその塩を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法。

14.

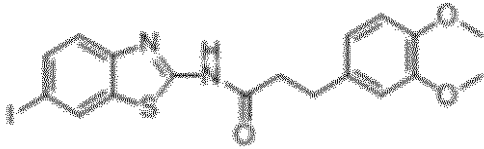
10

20

30

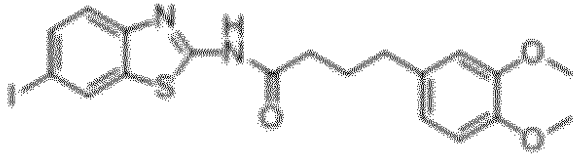
40

【化 1 0】



または

【化 1 1】



10

を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、前記 1 3 に記載の方法。

1 5 . 前記培地が前記化合物を 0 . 4 ~ 2 μ M で含む、前記 1 3 または 1 4 に記載の方法。

【発明の効果】

【0 0 1 2】

本発明により、より高効率かつ低コストに多能性幹細胞から心筋細胞を生産することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

20

【0 0 1 3】

【図 1】サル E S 細胞における心筋分化効果解析のプロトコール。

【図 2】R₇ 基の置換体と心筋分化効果の構造活性相関。

【図 3】ヨウ素置換体の炭素鎖の炭素数 (n) の構造活性相関。

【図 4】ヨウ素置換体の炭素鎖 n = 2 と n = 3 の比較。

【図 5】ヨウ素置換体の R₂ 基および R₃ 基の構造活性相関。

【図 6】ヨウ素置換体 S O 2 0 3 1 (K Y 0 2 - I) のヒト E S / i P S 細胞における心筋分化効果。

【図 7】ヨウ素置換体 S O 2 0 3 1 (K Y 0 2 - I) の培地への溶解性。A : 血清含有培地 (20 μ M)。B : 血清不含培地 (20 μ M)。C : 血清不含培地 (3 μ M)。

30

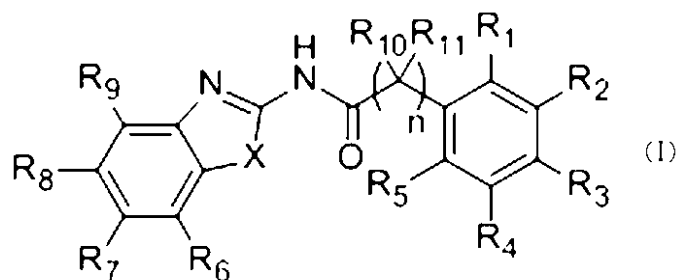
【発明を実施するための形態】

【0 0 1 4】

国際出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 6 4 9 1 号公報 (参照により本明細書の一部をなす) に開示される化合物の一般式は、以下のとおりである。

式 (I) :

【化 1 2】



40

[式中、

R₁ - R₅ は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基；又は基 - N R_{1 2} R_{1 3} (R_{1 2} 及び R_{1 3} は、各々独立して、水素原子

50

、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖または分岐アルキル基である)である、ここで $R_1 - R_5$ のうち隣接する 2 つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_6 - R_9$ は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基；基 $-C(O)A$ で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基 (A は、非置換又は炭素数 1 ~ 5 の直鎖または分岐アルキル基で置換された飽和または不飽和 5 または 6 員環であり、該環は窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から独立に選択される 1 または 2 個の原子を含んでいてもよい)；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基；又は基 $-NR_{12}R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖または分岐アルキル基である)である、ここで $R_6 - R_9$ のうち隣接する 2 つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_{10} - R_{11}$ は、各々独立して、水素原子；又は炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基である、

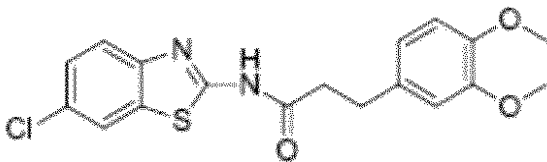
X は、 $-CR_{14}$ (R_{14} は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基である)；酸素原子；硫黄原子；セレン原子；又は基 $-NR_{15}$ (R_{15} は、水素原子、炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基、又は炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アシル基である)である、および

n は、0 から 6 の整数である]。

【0015】

KY02111 は、以下の式を有する化合物である。

【化13】

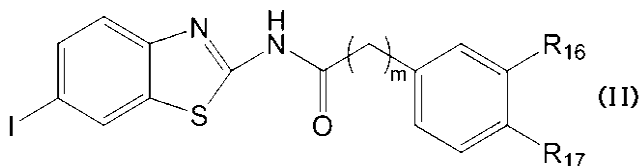


【0016】

一方、本発明の化合物は、

式 (II)

【化14】



[式中、m は 1 ~ 4 であり、

R_{16} および R_{17} は、それぞれ独立してメトキシ基、エトキシ基、およびプロポキシ基から選択される]

を有する化合物である。

【0017】

好ましい態様において、 R_{17} は、メトキシ基、エトキシ基、またはプロポキシ基であり、 R_{16} は、メトキシ基である。更に好ましい態様において、 R_{17} は、メトキシ基またはプロポキシ基であり、 R_{16} は、メトキシ基である。

【0018】

好ましい態様において、m は 1 ~ 3 であり、より好ましくは 2 または 3 である。

【0019】

好ましい態様において、本発明の化合物は、以下から選択される。

10

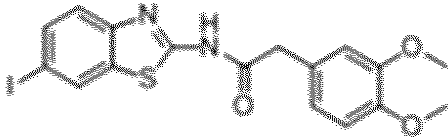
20

30

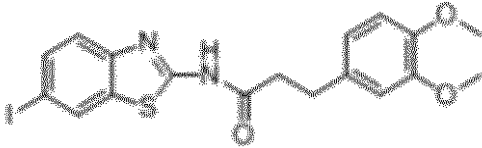
40

50

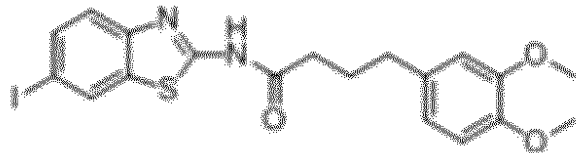
【化 1 5】



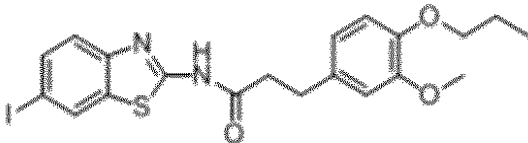
【化 1 6】



【化 1 7】



【化 1 8】



【0020】

本発明の化合物の塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩が挙げられる。

【0021】

本発明の化合物は、実施例に記載の方法に準じて、合成することができる。

【0022】

本発明において「多能性幹細胞」とは、成体を構成する全ての細胞に分化することができる多分化能 (pluripotency) と、細胞分裂を経てもその多分化能を維持することができる自己複製能を有する細胞を意味する。「多能性幹細胞」には、胚性幹細胞 (ES細胞)、胚性生殖細胞 (EG細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) が含まれる。「多能性幹細胞」の生物種は特に限定はされないが、好ましくは哺乳類であり、より好ましくは齧歯類または霊長類である。本発明は、サルまたはヒトの多能性幹細胞、特に ES細胞または iPS細胞に好適である。

【0023】

ES細胞は、初期胚に由来する多能性幹細胞であり、胚盤胞の内部細胞塊または着床後の初期胚のエピブラストから樹立することができる。ES細胞としては、ヒト (Thomson J. A. et al., Science 282: 1145-1147 (1998)、Biochem Biophys Res Commun. 345(3), 926-32 (2006); アカゲザルおよびマーモセット等の霊長類 (Thomson J. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844-7848 (1995); Thomson J. A. et al., Biol. Reprod. 55: 254-259 (1996)); ウサギ (特表 2000-508919号); ハムスター (Doetshman T. et al., Dev. Biol. 127: 224-227 (1988)); ブタ (Evans M. J. et al., Theriogenology 33: 125128 (1990); Piedrahita J.A. et al., Theriogenology 34: 879-891 (1990); Notarianni E. et al., J. Reprod. Fert. 40: 51-56 (1990); Talbot N. C. et al., Cell. Dev. Biol. 29A: 546-554 (1993)); ヒツジ (Notarianni E. et al., J. Reprod. Fert. Suppl. 43: 255-260 (1991)); ウシ (Evans M. J. et al., Theriogenology 33: 125-128 (1990); Saito S. et al., Roux. Arch. Dev. Biol. 201: 134-141 (1992)); ミンク (Sukoyan M. A. et al., Mol. Reorod. Dev. 33: 418-431 (1993)) (これら文献は参照により本明細書の一部をなす) などの ES細胞が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 4 】

E G 細胞は、始原生殖細胞に由来する多能性幹細胞であり、例えば、ヒト E G 細胞 (Shambloott, et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95: 13726-13731 (1998)) (参照により本明細書の一部をなす) が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

本発明において「i P S 細胞」とは、体細胞や組織幹細胞などの多能性幹細胞以外の細胞から誘導された多能性幹細胞を意味する。i P S 細胞の作製方法は、例えば、W O 2 0 0 7 / 0 6 9 6 6 6、W O 2 0 0 9 / 0 0 6 9 3 0、W O 2 0 0 9 / 0 0 6 9 9 7、W O 2 0 0 9 / 0 0 7 8 5 2、W O 2 0 0 8 / 1 1 8 8 2 0、Cell Stem Cell 3(5): 568-574 (2008)、Cell Stem Cell 4(5): 381-384 (2009)、Nature 454: 646-650 (2008)、Cell 136(3): 411-419 (2009)、Nature Biotechnology 26: 1269-1275 (2008)、Cell Stem Cell 3: 475-479 (2008)、Nature Cell Biology 11: 197-203 (2009)、Cell 133(2): 250-264 (2008)、Cell 131(5): 861-72 (2007)、Science 318 (5858): 1917-20 (2007) (これら文献は参照により本明細書の一部をなす) に記載される。しかしながら、人工的に誘導された多能性幹細胞であれば、いかなる方法で作製された細胞も本発明の「i P S 細胞」に含まれる。

10

【 0 0 2 6 】

本発明の化合物は、多能性幹細胞の心筋分化培地に、最終濃度が 0.1 ~ 20 μ M、好ましくは 0.1 ~ 10 μ M、より好ましくは 0.4 ~ 2 μ M、更に好ましくは 0.4 ~ 1 μ M となるよう添加される。心筋分化培地は、一般的に多能性幹細胞の心筋分化に使用される組成であればよく、特に限定はされないが、例えば I M D M 培地を基本とした心筋分化培地 (実施例で使用している下記の組成のもの)、D M E M を基本とした心筋分化培地 (D M E M / F 1 2 培地 (Sigma) 2 0 0 m l、ウシ胎児血清 (GIBCO) 5 0 m l、MEM non-essential amino acid solution (Sigma) 2.5 m l、ペニシリン - ストレプトマイシン (GIBCO) 2.5 m l、2 0 0 m M L - グルタミン 2.5 m l、2 - メルカプトエタノール)、または StemPro-34SFM (GIBCO) + B M P 4 (1 0 n g / m l) のような培地が例示される。

20

【 0 0 2 7 】

本発明の化合物は、一般的に多能性幹細胞の心筋分化に適した培養方法において用いることができる。培養方法としては、例えば、接着培養法、浮遊培養法、懸濁培養法等が挙げられる。

30

【 0 0 2 8 】

心筋分化培地における培養 (心筋分化培養) の開始後、本発明の化合物を含む培地中で多能性幹細胞を培養する時期および期間は、使用する多能性幹細胞の種類や心筋分化培地の組成などにより適宜変更されうる。例えば、霊長類の多能性幹細胞の場合、特にサルまたはヒト E S 細胞または i P S 細胞を実施例に記載の I M D M 培地を基本とした心筋分化培地で培養する場合、心筋分化培養の 2 ~ 1 4 日目までのうち 2 日間以上 (具体的には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または 1 2 日間)、好ましくは 3 ~ 1 0 日間、より好ましくは 4 ~ 1 0 日間、さらに好ましくは 4 ~ 8 日間、さらに好ましくは 4 ~ 6 日間、培養すればよい。特に、心筋分化培養の 1 0 日目までのうち 4 ~ 6 日間、例えば心筋分化培養の 3 ~ 9 日目、3 ~ 8 日目、3 ~ 7 日目、4 ~ 1 0 日目、4 ~ 9 日目、または 4 ~ 8 日目に、本発明の化合物を含む培地中で多能性幹細胞を培養することが好ましい。

40

【 0 0 2 9 】

本発明の化合物は、ニトロピン、サイトカイン (b F G F、B M P 4、V E G F、D K K 1 および アクチピン A の組み合わせ)、W n t シグナル阻害剤などの別の心筋分化促進因子と共に使用してもよい。「W n t シグナル阻害剤」とは、W n t シグナル経路を阻害する物質を意味し、例えば、I W P 2、X A V 9 3 9、および I W R 1 などの化合物、並びに I G F B P 4、および D k k 1 などのタンパク質が含まれる。本発明における「心筋分化促進因子」には、心筋分化促進効果を有するあらゆる物質が含まれる。

50

【0030】

本発明の化合物は、(1)多能性幹細胞を1以上のWntシグナル活性化剤を含む培地中で培養する工程、および(2)工程(1)で得られた細胞を本発明の化合物を含む培地中で培養する工程を含む方法において、使用することができる。

【0031】

「Wntシグナル活性化剤」とは、Wntシグナル経路を活性化する物質を意味する。Wntシグナル活性化剤としては、例えばBIOおよびCHIR99021などのGSK3阻害剤が例示される。上記方法においては、2以上、例えば2、3、または4種類のWntシグナル活性化剤を併用してもよい。

【0032】

上記方法によれば、血清を含まない培地(血清不含培地)であっても効率的に多能性幹細胞の心筋分化を誘導することができる。血清不含培地を用いる場合、培地はアルブミンを含むことが好ましく、培養方法としては、接着培養法、浮遊培養法、懸濁培養法等を用いることができるが、接着培養法を用いることが好ましい。アルブミンとしては、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミンが挙げられる。接着培養法においては、ゼラチンまたはラミニン(例えば、ヒトラミニン211)をコートした培養ディッシュを用いることができる。アルブミンを含む血清不含培地を用いた場合、血清、サイトカイン、支持細胞等、アルブミン以外のタンパク質や、使用する多能性幹細胞とは異なる生物種に由来する成分(すなわち、異種成分)の非存在下で多能性幹細胞心筋分化を誘導することができる。

【0033】

上記方法において、心筋分化培養の開始から工程(1)および(2)の開始までの期間、および工程(1)および(2)の培養期間は適宜変更されうる。工程(2)は、工程(1)の終了直後から開始してもよいし、工程(1)の終了から一定期間後に開始してもよい。Wntシグナル活性化剤および本発明の化合物は、多能性幹細胞の心筋分化の初期段階および中期段階にそれぞれ添加すればよい。ここで、多能性幹細胞の心筋分化の初期段階とは、中胚葉マーカー遺伝子の発現上昇が起こる、多能性幹細胞から中胚葉への分化誘導期を意味し、中期段階とは、中胚葉から心筋への分化誘導期を意味する。中胚葉マーカー遺伝子としては、T、MIXL1、NODAL等が挙げられる。例えば、霊長類の多能性幹細胞の場合、特にサルまたはヒトES細胞またはiPS細胞の場合、心筋分化培養の0~2日目または0~3日目に、すなわち心筋分化培養開始から2または3日間、工程(1)を実施し、次いで、心筋分化培養の14日目までのうち2日間以上(具体的には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12日間)、好ましくは3~10日間、より好ましくは4~10日間、さらに好ましくは4~8日間、さらにより好ましくは4~6日間、工程(2)を実施すればよい。ここで、工程(2)は、心筋分化培養の10日目までのうち4~6日間、例えば心筋分化培養の3~9日目、3~8日目、3~7日目、4~10日目、4~9日目、または4~8日目に実施することが好ましい。

【0034】

Wntシグナル活性化剤の濃度は、特に限定はされない。Wntシグナル活性化剤としてBIOまたはCHIR99021を使用する場合、最終濃度100nM~100μM、好ましくは1μM~10μMで使用すればよい。本発明の化合物は、最終濃度が0.1~20μM、好ましくは0.1~10μM、より好ましくは0.4~2μM、更に好ましくは0.4~1μMとなるよう添加すればよい。

【0035】

本発明の化合物は、心筋細胞の製造に用いることができる。心筋細胞への分化は、例えば、拍動心筋細胞の数、心筋マーカーの発現、イオンチャネルの発現、電気生理学的刺激に対する反応等により確認することができる。心筋マーカーとしては、MHC、MH C、cTnT、アクチニン、およびNKX2.5が挙げられる。また、イオンチャネルとしては、HCN4、Nav1.5、Cav1.2、Cav3.2、HERG1b、およびKCNQ1が挙げられる。本発明の方法により得られた心筋細胞は、インビトロにおける薬剤安全性試験に、あるいは心臓疾患などに対する移植用心筋細胞として、使用するこ

10

20

30

40

50

とができる。

【0036】

本発明はまた、本発明の化合物またはその塩を含む多能性幹細胞の心筋分化促進剤および心筋分化促進用キットを提供する。本発明のキットは、本発明の化合物に加えて別の心筋分化促進因子を含んでもよい。本発明の化合物と別の心筋分化促進因子とは、別々の容器に保存されていても、同一の容器に保存されていてもよい。

【0037】

本発明はまた、本発明の化合物またはその塩を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を心筋細胞に分化誘導する方法、および本発明の化合物またはその塩を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法を提供する。本発明の方法は、本発明の化合物の使用法の説明に準じて実施することができる。

10

【0038】

本発明はまた、多能性幹細胞の心筋分化促進剤または心筋分化促進用キットの製造のため、本発明の化合物またはその塩の使用を提供する。

【0039】

本発明を以下の実施例によりさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0040】

1. サルES細胞における心筋分化効果解析の方法

20

式(I)のR₇基に相当するKY02111のCl基を他のハロゲン基等に置換した化合物を合成し、既報のとおり(Cell Reports, Volume 2, Issue 5, 1448-1460, 25 October 2012、国際出願公開第2012/026491号公報；参照により本明細書の一部をなす)、サルES細胞において濃度依存的に心筋分化効果を確認した。具体的には、心筋分化マーカーであるMHC遺伝子のプロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するベクターをサルES細胞(カニクイザルCMK6.4株)に導入し、6ウェルプレート(旭硝子/5816-006:Ezviewカルチャープレート)に4.0×10⁵細胞/ウェルにて播種し、IMDM培地を基本とした心筋分化培地(IMDM培地(Sigma)200ml、ウシ胎児血清(GIBCO)50ml、MEM非必須アミノ酸溶液(Sigma)2.5ml、ペニシリン-ストレプトマイシン(GIBCO)2.5ml、200mM L-グルタミン2.5ml、2-メルカプトエタノール2μl)にて培養して、分化誘導開始後4~8日に化合物を添加した。10日目にGFP蛍光量をMetamorphイメージングシステムで解析した。

30

【0041】

2. R₇基の置換体と心筋分化効果の構造活性相関

上記1の解析の結果、R₇基にH<F<CH₃<Cl<Br<Iの順に心筋分化効果が高くなるという構造活性相関が導かれた(図2)。特に、ヨウ素置換体であるSO2031(以下、KY02-Iとも記載する)は、R₇基がCl基であるKY02111と比較して、0.1μM、1μM、10μM、30μMにおいて、それぞれ約16倍、6.3倍、2.1倍、1.5倍の心筋分化効果が得られた。また、SO2031(KY02-I)は、R₇基がBr基であるSO087と比較しても、0.1μM、1μM、10μM、30μMにおいて、それぞれ約5.2倍、2倍、1.6倍、1.1倍の心筋分化効果が得られた。これらの結果から、特に低濃度ではヨウ素置換体の化合物が最も高い効果を持つことが明らかとなった。

40

【0042】

3. ヨウ素置換体の炭素鎖の炭素数の構造活性相関

KY02-Iの炭素鎖の炭素数(n)を変えたものを合成し、心筋分化効果を確認した(図3)。その結果、炭素鎖n=0のSO3030(KY00-I)についてはほとんど活性を示さなかったが、炭素鎖n=1のSO3031(KY01-I)、n=2のSO2031(KY02-I)、n=3のSO3042(KY03-I)に関しては、KY02111

50

よりも高い心筋分化促進効果が見られた。また、 $0.1 \mu\text{M}$ の低濃度においては、炭素鎖 $n = 1$ の $\text{SO}3031$ (KY01-I) よりも、炭素鎖 $n = 2$ と $n = 3$ の $\text{SO}2031$ (KY02-I) と $\text{SO}3042$ (KY03-I) の方が高い効果 (それぞれ 2.7倍、2.8倍) を持つことが分かった。さらに、 $10 \mu\text{M}$ と $30 \mu\text{M}$ の高濃度においては、 $\text{SO}2031$ (KY02-I) より $\text{SO}3042$ (KY03-I) の方が僅かに高い分化効果 (約 1.3倍) を持つ傾向が見られた。

【0043】

4. ヨウ素置換体の炭素鎖 $n = 2$ と $n = 3$ の比較

炭素鎖 $n = 2$ の $\text{SO}2031$ (KY02-I) と炭素鎖 $n = 3$ の $\text{SO}3042$ (KY03-I) の心筋分化促進効果を、図3に示す結果とは別に、再度濃度依存的に確認した (図4)。その結果、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.4 \mu\text{M}$ 、 $2 \mu\text{M}$ においては2つの化合物の分化促進効果に差がなかったが、比較的高濃度の $10 \mu\text{M}$ では $\text{SO}3042$ の方が僅かに効果が高かった (約 1.1倍)。図3の結果と合わせると、高濃度では $n = 3$ の $\text{SO}3042$ (KY03-I) の方が僅かに効果が高いと考えられた。

10

【0044】

5. ヨウ素置換体の R_2 基および R_3 基の構造活性相関

式(I)の一般式の R_2 基および R_3 基 (KY02111のジメトキシ基) を置換した化合物を合成し、心筋分化効果を確認した (図5)。その結果、ジメトキシ基構造を失った化合物は、 R_2 のメトキシ基をプロポキシ基に置換した $\text{SO}2077$ を除き、いずれも分化促進効果が低くなった。 $\text{SO}2077$ は、ジメトキシ基を有する $\text{SO}2031$ (KY02-I) と同等の活性が見られた。

20

【0045】

6. ヨウ素置換体 $\text{SO}2031$ (KY02-I) のヒトES/iPS細胞における心筋分化効果

ヒトES細胞 (KHES-3株) および iPS細胞 (IMR90-1株) を用いて、 $\text{SO}2031$ (KY02-I) の心筋分化促進効果を確認した (図6)。心筋分化誘導は、既報の方法に従って行った (Cell Reports, Volume 2, Issue 5, 1448-1460, 25 October 2012、参照により本明細書の一部をなす)。具体的には、培地成分は、IMDM (Sigma) (1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco)、2 mM L-グルタミン (Sigma)、0.5 mM L-カルニチン (Sigma)、0.001% 2-メルカプトエタノール (Gibco)、および0.4% ヒト血清アルブミン (Sigma)含有) を用いた。培養プレートは超低接着培養ディッシュ (Corning) を用いて、浮遊培養系にて心筋分化を行った。最初の2日間は Wnt 活性剤である $\text{CHIR}99021$ を $3 \mu\text{M}$ 添加し、培養後3日目から8日目まで $\text{SO}2031$ (KY02-I) を $2 \mu\text{M}$ 添加した。心筋分化効率は、心筋特異的マーカー分子である心筋トロポニンT (cTnT) の抗体を用いてフローサイトメリーにより心筋細胞の割合を計算することで求めた。その結果、ヒト iPS細胞 (IMR90-1株) においては、 $\text{SO}2031$ (KY02-I) 添加により心筋細胞の割合が 3.7% から 56.8% まで増加し、ヒトES細胞 (KHES-3株) においては、 $\text{SO}2031$ (KY02-I) 添加により心筋細胞の割合が 17.9% から 77.9% まで増加した。このことから、サルES細胞だけではなくヒトES/iPS細胞においても、ヨウ素置換体である $\text{SO}2031$ (KY02-I) が比較的低濃度で、かつサイトカインや成長因子の刺激なしでも心筋分化を効率的に促進することが分かった。

30

40

【0046】

7. ヨウ素置換体 $\text{SO}2031$ (KY02-I) の培地への溶解性

$\text{SO}2031$ (KY02-I) を 20% 血清含有培地 (IMDM培地 (Sigma) 200 ml、ウシ胎児血清 (GIBCO) 50 ml、MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma) 2.5 ml、ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO) 2.5 ml、200 mM L-グルタミン 2.5 ml、2-メルカプトエタノール $2 \mu\text{l}$) に $20 \mu\text{M}$ で、または血清不含培地 (IMDM培地 (Sigma) 200 ml、MEM非必須アミノ酸溶液 (Sigma) 2.5 ml、ペニシリン-ストレプトマイシン (GIBCO) 2.5 ml、200 mM L-グルタミン 2.5 ml、

50

5 ml、2-メルカプトエタノール 2 μ l) に 3 μ M または 20 μ M で溶解させ、24 時間後に観察した (図 7)。いずれの培地でも大きな結晶の析出は観察されず (図 7 A ~ C)、また、血清不含培地でも、十分な心筋分化促進効果が得られる 3 μ M では、結晶の析出はほとんど観察されなかった (図 7 C)。結晶が析出しないことにより、培地中の濃度が析出により下がることがなく安定に維持される。また、析出した結晶が細胞に傷害を与える可能性がなく、さらに細胞内に残存した結晶が移植適用時に持ち越されてホストに毒性を与えたりする危険性がない。

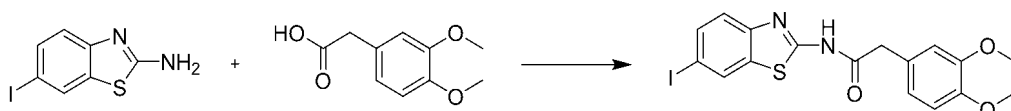
【0047】

8. 製造例

SO3031 (KY01-I)

10

【化19】



2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾール (200 mg, 0.723 mmol)、3,4-ジメトキシフェニル酢酸 (157 mg, 0.795 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン (139 μ l, 0.803 mmol)、O-(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (360 mg, 0.870 mmol) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2-(2-(3,4-ジメトキシフェニル)アセトアミド)-6-ヨードベンゾチアゾールを 167 mg、収率 50% で得た。

20

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 12.61 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.73-7.69 (m, 1H), 7.54 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.97-6.84 (m, 3H), 3.75-3.72 (m, 8H).

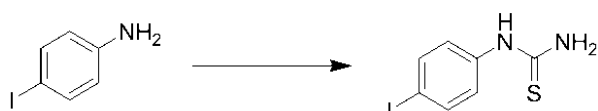
MS (ESI) Found; 455 [M+H] $^+$

【0048】

SO2031 (KY02-I)

30

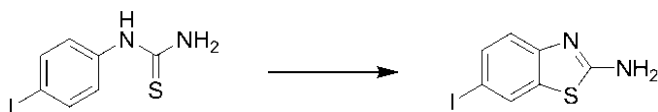
【化20】



4-ヨードアニリン (1.00 g, 4.57 mmol) のジクロロメタン (3 ml) 溶液に、チオカルボニルジイミダゾール (976 mg, 5.47 mmol) を加えて 1.5 時間、室温にて攪拌した。25% アンモニア水 (3 ml) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下で留去し、析出物を濾過して 1-(4-ヨードフェニル)チオウレアを 889 mg、収率 59% で得た。

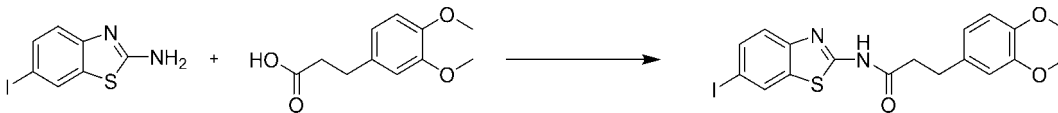
【化21】

40



1-(4-ヨードフェニル)チオウレア (889 mg, 3.19 mmol) のクロロホルム (7 ml) 懸濁液に、臭素 (328 μ l, 6.40 mmol) を加えて加熱還流し、6 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を留去し、ジクロロメタンを加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去後、析出物を濾過して 2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾールを 650 mg、収率 73% で得た。

【化 2 2】



2 - アミノ - 6 - ヨードベンゾチアゾール (1 0 0 m g , 0 . 3 6 2 m m o l) 、 3 - (3 , 4 - ジメトキシフェニル) プロピオン酸 (9 1 . 4 m g , 0 . 4 3 5 m m o l) の N , N - ジメチルホルムアミド (2 m l) 溶液に、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (6 9 . 4 μ l , 0 . 3 9 8 m m o l) 、 O - (6 - クロロベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (1 8 0 m g , 0 . 4 3 5 m m o l) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2 - (3 - (3 , 4 - ジメトキシフェニル) プロパンアミド) - 6 - ヨードベンゾチアゾールを 8 3 m g 、収率 4 8 % で得た。

10

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 12.42 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.85-6.83 (m, 2H), 6.75-6.72 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.90-2.76 (m, 4H).

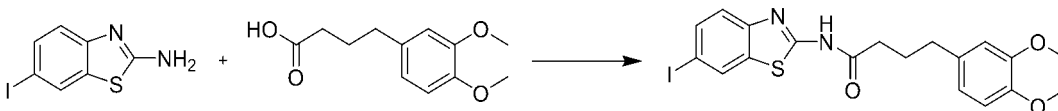
MS (ESI) Found; 469 [M+H]⁺

【 0 0 4 9 】

20

S O 3 0 4 2 (K Y 0 3 - I)

【化 2 3】



2 - アミノ - 6 - ヨードベンゾチアゾール (2 5 0 m g , 0 . 9 0 5 m m o l) 、 4 - (3 , 4 - ジメトキシフェニル) ブタン酸 (2 2 4 m g , 0 . 9 9 5 m m o l) の N , N - ジメチルホルムアミド (3 m l) 溶液に、N , N - ジイソプロピルエチルアミン (1 7 4 μ l , 0 . 9 9 5 m m o l) 、 O - (6 - クロロベンゾトリアゾール - 1 - イル) - N , N , N ' , N ' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (4 5 0 m g , 1 . 0 9 m m o l) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2 - (4 - (3 , 4 - ジメトキシフェニル) ブタンアミド) - 6 - ヨードベンゾチアゾールを 1 3 1 m g 、収率 3 0 % で得た。

30

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 12.37 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.86-6.79 (m, 2H), 6.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.58-2.48 (m, 4H), 1.96-1.86 (m, 2H).

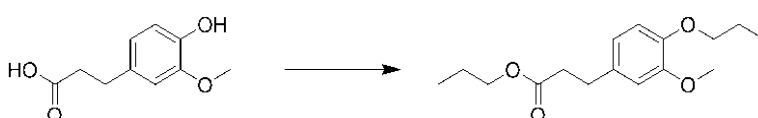
MS (ESI) Found; 483 [M+H]⁺

40

【 0 0 5 0 】

S O 2 0 7 7

【化 2 4】



4 - ヒドロキシ - 3 - メトキシフェニルプロピオン酸 (5 0 0 m g , 2 . 5 4 m m o l) の N , N - ジメチルホルムアミド (5 m l) 溶液に、炭酸カリウム (8 8 1 m g , 6 . 3 7 m m o l) 、 1 - プロモプロパン (6 9 2 μ l , 7 . 6 5 m m o l) を加えて、室温にて終夜攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、水、飽和塩化ナトリウム水溶液

50

にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン/酢酸エチル = 4/1）にて精製し、プロピル 3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロパノートを 590 mg、収率 82% で得た。

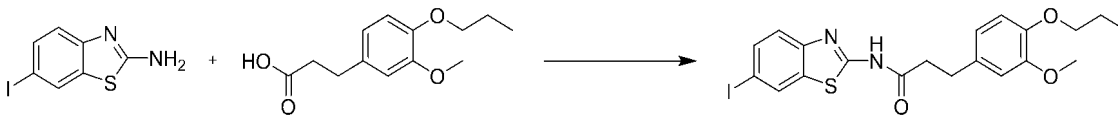
【化 2 5】



プロピル 3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロパノート (590 mg, 2.10 mmol) を 1,4-ジオキサンに溶かし、5 mol/l 水酸化ナトリウム水溶液 (1.68 ml) を加えて室温にて終夜攪拌した。反応終了後、6 mol/l 塩酸を加えて、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で溶媒を留去し、3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロピオン酸を 438 mg、収率 87% で得た。

10

【化 2 6】



2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾール (200 mg, 0.723 mmol)、3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロピオン酸 (200 mg, 0.839 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液に、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (140 μ l, 0.803 mmol)、*O*-(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-*N,N,N',N'*-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (360 mg, 0.870 mmol) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2-(3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロパンアミド)-6-ヨードベンゾチアゾールを 217 mg、収率 60% で得た。

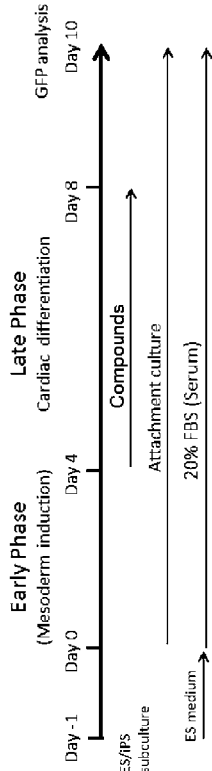
20

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): 12.42 (s, 1H), 8.38-8.37 (m, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 6.85-6.82 (m, 2H), 6.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.86-3.82 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.87-2.78 (m, 4H), 1.72-1.65 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

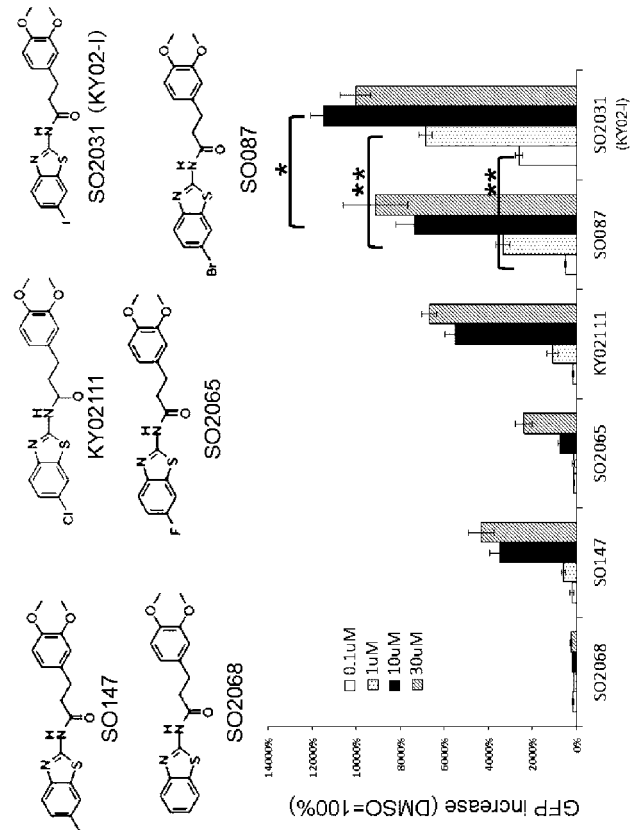
30

MS (ESI) Found; 497 [M+H] $^+$

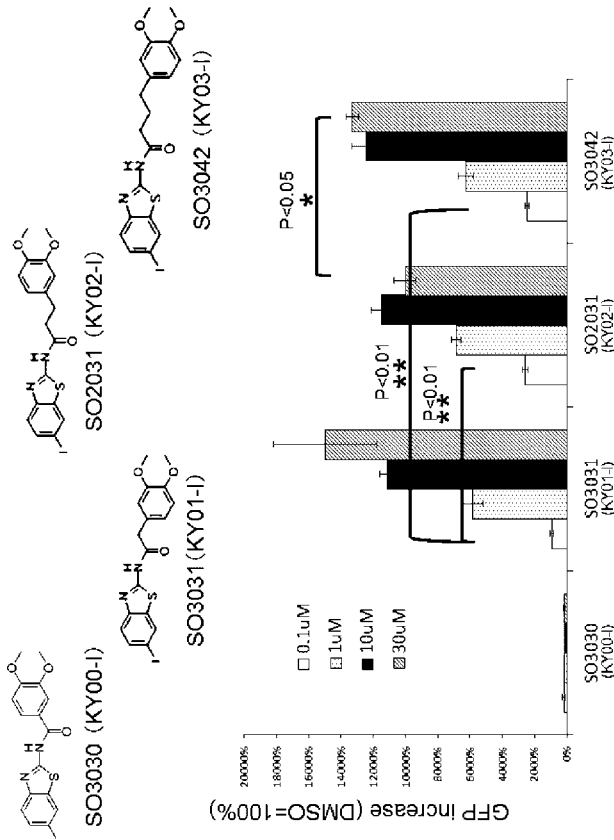
【 1 】



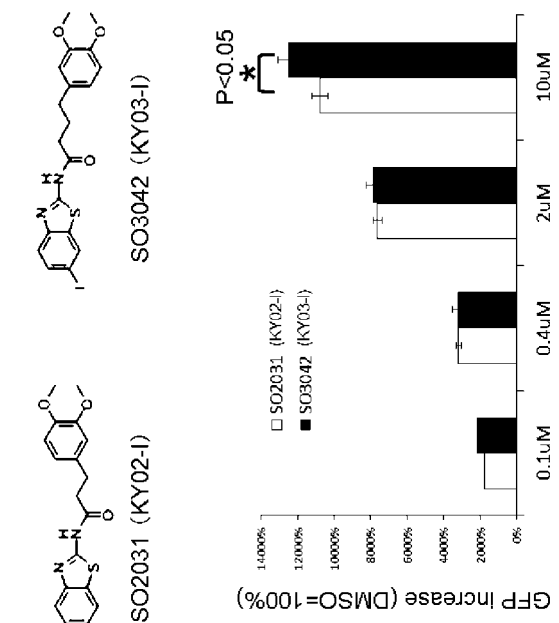
【 2 】



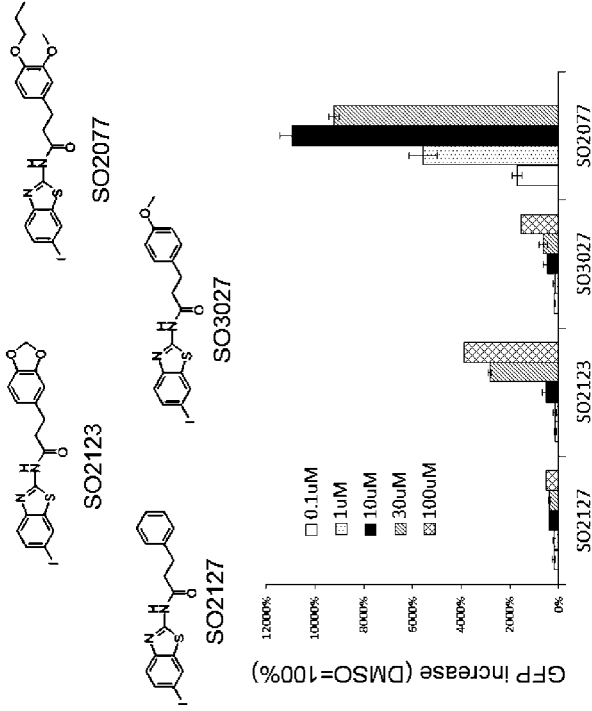
【 3 】



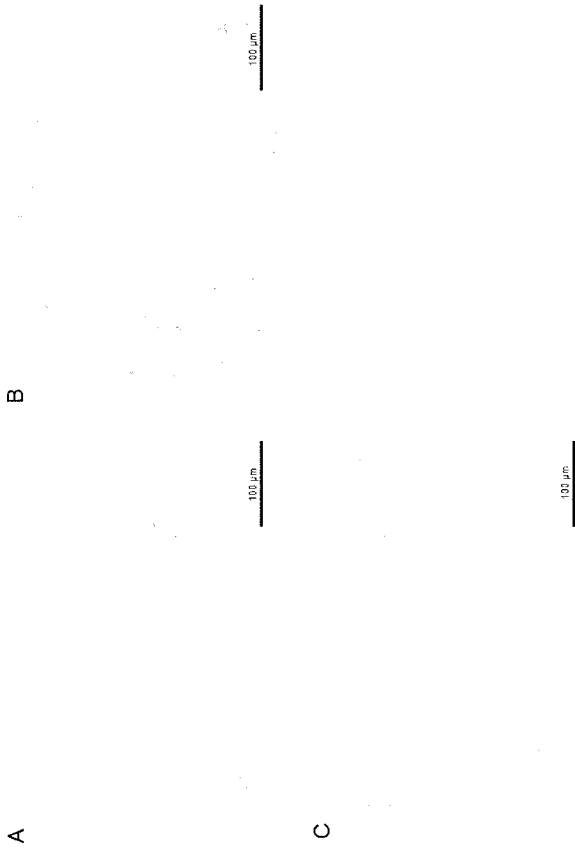
【 4 】



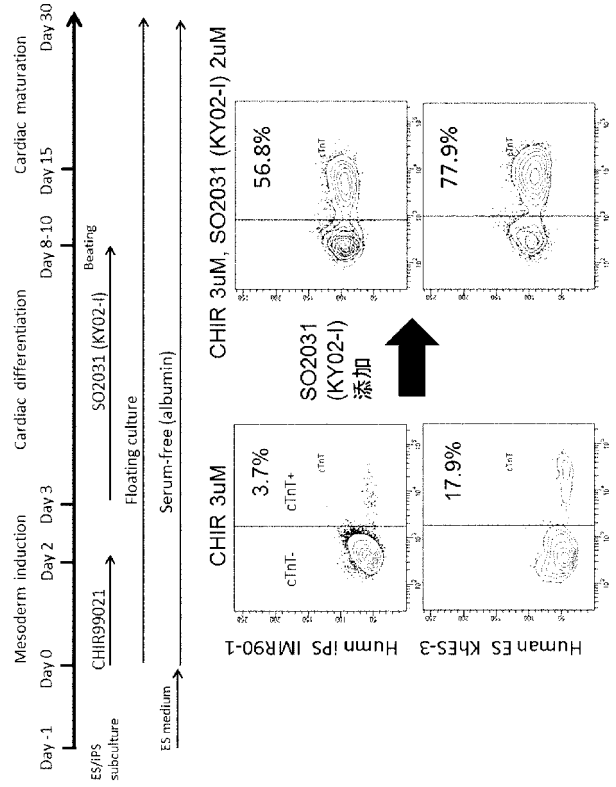
【 5 】



【 7 】



【 6 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/074233
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D277/82(2006.01)i, A61K31/428(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i 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) C07D277/82, A61K31/428, A61P43/00, C12N5/0735, C12N5/074 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) REGISTRY (STN), CAPLUS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	US 2014/0127807 A1 (Kyoto University), 08 May 2014 (08.05.2014), claims & CN 103209968 A & EP 2610249 A1 & US 2013/0183753 A1 & WO 2012/026491 A1	1-15
E, X	WO 2014/136519 A1 (Kyoto University), 12 September 2014 (12.09.2014), claims; paragraph [0059] (Family: none)	1-15
A	WO 2013/111875 A1 (Kyoto University), 01 August 2013 (01.08.2013), claims (Family: none)	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 21 November, 2014 (21.11.14)		Date of mailing of the international search report 09 December, 2014 (09.12.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/074233

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MINAMI, I. et al., A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, Cell Reports, 2012, Vol.2, Issue 5., pp.1448-1460	1-15
A	WO 2011/002950 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE), 06 January 2011 (06.01.2011), claims; page 14, compound 8 & US 2011/0158911 A1 & US 2012/0115157 A1 & US 2013/0295017 A1 & WO 2012/082331 A1	1-15
A	JP 2-17181 A (Pfizer Inc.), 22 January 1990 (22.01.1990), claims & CN 1037898 A & EP 343893 A1 & JP 6-78331 B2 & KR 10-1991-0006864 B1 & US 4970318 A	1-15
A	JP 63-190880 A (Nippon Tokushu Noyaku Seizo Kabushiki Kaisha), 08 August 1988 (08.08.1988), claims & EP 261459 A2	1-15

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 4 2 3 3	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D277/82(2006.01)i, A61K31/428(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(2010.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07D277/82, A61K31/428, A61P43/00, C12N5/0735, C12N5/074			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) REGISTRY (STN) CAplus (STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
P, X	US 2014/0127807 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 2014.05.08, 請求の範囲 & CN 103209968 A & EP 2610249 A1 & US 2013/0183753 A1 & WO 2012/026491 A1	1-15	
E, X	WO 2014/136519 A1 (国立大学法人京都大学) 2014.09.12, 請求の範囲、段落[0059] (ファミリーなし)	1-15	
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 21.11.2014		国際調査報告の発送日 09.12.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 江間 正起	4 P 4048
		電話番号 03-3581-1101 内線 3492	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 4 2 3 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2013/111875 A1 (国立大学法人京都大学) 2013.08.01, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-15
A	MINAMI, I. et al., A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions, Cell Reports, 2012, Vol.2, Issue 5., pp.1448-1460	1-15
A	WO 2011/002950 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 2011.01.06, 請求の範囲、第 14 頁の化合物 8 & US 2011/0158911 A1 & US 2012/0115157 A1 & US 2013/0295017 A1 & WO 2012/082331 A1	1-15
A	JP 2-17181 A (ファイザー・インコーポレイテッド) 1990.01.22, 特許請求の範囲 & CN 1037898 A & EP 343893 A1 & JP 6-78331 B2 & KR 10-1991-0006864 B1 & US 4970318 A	1-15
A	JP 63-190880 A (日本特殊農薬製造株式会社) 1988.08.08, 特許請求の範囲 & EP 261459 A2	1-15

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 N 5/16 (2006.01) C 1 2 N 5/16

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

(72) 発明者 南 一成
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72) 発明者 上杉 志成
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72) 発明者 大塚 慎也
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 BA30 BB13 BD34 CA44
 4C033 AE05 AE14 AE17 AE20
 4C086 AA01 AA02 BC84 MA01 MA04 NA14 ZB21

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。