

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-119724

(P2015-119724A)

(43) 公開日 平成27年7月2日(2015.7.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 0 2 C	

審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 110 頁)

(21) 出願番号	特願2015-31420 (P2015-31420)	(71) 出願人	509087759
(22) 出願日	平成27年2月20日 (2015. 2. 20)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー
(62) 分割の表示	特願2011-506409 (P2011-506409)		テッド
原出願日	平成21年4月22日 (2009. 4. 22)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 4
(31) 優先権主張番号	12/108, 852		4 ホーシヤム・リッジビュードライブ 8 0
(32) 優先日	平成20年4月24日 (2008. 4. 24)	(74) 代理人	110000741
(33) 優先権主張国	米国 (US)		特許業務法人小田島特許事務所
		(72) 発明者	ジャネット・イー・デイビス
			アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5
			5 8 スキルマン・グランドビューロード 1
			9 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性細胞の処理

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 多能性細胞を処理し、増殖及び分化するための方法の提供。

【解決手段】 胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する多能性細胞を培養液中で G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で処理することによって、効率的に増殖させ、かつ分化させることができる。酵素活性阻害剤が、3 - [1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 H - インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - ピリジン - 3 - イル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオンであり、多能性マーカーを発現する細胞が、A B C G 2、クリプト、F o x D 3、C o n n e x i n 4 3、C o n n e x i n 4 5、O c t 4、S O X - 2、N a n o g、h T E R T、U T F - 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、T r a 1 - 6 0、及び T r a 1 - 8 1 からなる群から選択される多能性マーカーのうちの少なくとも1つを発現し、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性細胞を増殖及び分化するための方法であって、

a . 前記多能性細胞を培養する過程と、

b . 前記多能性細胞を G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で処理する過程とを含み、

ここで、前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が、3 - [1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 H - インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - ピリジン - 3 - イル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、

上記方法。

【請求項 2】

前記多能性細胞が胚幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記多能性細胞が、胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記多能性マーカーを発現する細胞が、A B C G 2、クリプト、F o x D 3、C o n n e x i n 4 3、C o n n e x i n 4 5、O c t 4、S O X - 2、N a n o g、h T E R T、U T F - 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、T r a 1 - 6 0、及び T r a 1 - 8 1 からなる群から選択される多能性マーカーのうち少なくとも 1 つを発現する、請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記多能性細胞が胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記多能性細胞が前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で 1 ~ 7 2 時間処理される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記多能性細胞が前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で 1 2 ~ 4 8 時間処理される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記多能性細胞が前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で 4 8 時間処理される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が濃度 1 0 0 n M ~ 1 0 0 μ M で用いられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が濃度 1 μ M ~ 1 0 μ M で用いられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が濃度 1 0 μ M で用いられる、請求項 1 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性細胞を処理するための方法を目的とし、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で多能性細胞を処理することによって、多能性細胞を培養液中で効率的に増殖させ、かつ分化させることができる。

【背景技術】

【0002】

I 型糖尿病のための細胞代替療法における進歩と、移植可能なランゲルハウス島の不足

50

により、インスリン産生細胞、又は移植に適した細胞の源を開発することに、興味の焦点が当てられている。1つの手法は、例えば、胚幹細胞等の多能性細胞から機能的細胞を生成することである。

【0003】

脊椎動物の胚発生において、多能性細胞は、原腸形成として公知のプロセスにて、3つの胚葉（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）を含む細胞のグループを生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓等の組織は、内胚葉から中間段階を経て発達する。このプロセスにおける中間段階は、胚体内胚葉の形成である。胚体内胚葉細胞は、HNF-3、GATA4、Mixl1、CXCR4及びSox-17などの多くのマーカーを発現する。

10

【0004】

膵臓の形成は、胚体内胚葉の膵臓内胚葉への分化により起こる。膵臓内胚葉の細胞は膵臓-十二指腸ホメオボックス遺伝子、PDX-1を発現する。PDX-1が存在しない場合、膵臓は、腹側芽及び背側芽の形成を越えて発達しない。したがって、PDX-1の発現は、膵臓の器官形成における重要な過程である。成熟した膵臓は、他の細胞型の中でも、外分泌組織及び内分泌組織を含む。外分泌組織及び内分泌組織は、膵臓内胚葉の分化によって生じる。

【0005】

移植に十分な量の細胞物質を生成するには、培養液中で効率的に増殖することができ、かつ関心対象の組織、例えば、機能的細胞に効率的に分化することができる、細胞物質の供給源が必要である。

20

【0006】

ヒト胚幹細胞を培養するための現行法は複雑であり、これらの方法は、細胞がその多能性を失わずに増殖するために、外生要因、つまり合成培地の使用を必要とする。更に、胚幹細胞の分化は、多くの場合、培養液中における細胞増殖の低下を引き起こす。

【0007】

一例を挙げれば、Cheon et al（非特許文献1）は、無フィーダー、無血清培養システムを開示し、ここで胚幹細胞は、胚幹細胞の自己複製を誘発することができる異なる増殖因子で補充された非血清代替（SR）培地中で維持される。

【0008】

別の例において、特許文献1は、未分化の霊長類始原幹細胞を含む幹細胞の培養に有用な合成培地を開示している。溶液において、培地は、培養されている幹細胞と比較して実質的に等張等浸透圧である。所定の培養において、特定の培地は、基本培地と、実質的に未分化の始原幹細胞の増殖の支持に必要な、ある量のbFGF、インスリン、及びアスコルビン酸の各々とを含有する。

30

【0009】

別の例において、特許文献2は、未分化の幹細胞を維持するための方法を開示し、同方法は、幹細胞を、細胞を未分化の状態に維持するのに十分な量のタンパク質のトランスフォーミング増殖因子-（TGF）ファミリーのメンバー、タンパク質の繊維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリーのメンバー、又はニコチンアミド（NIC）に、所望の結果を達成するのに十分な時間、暴露することを含む。

40

【0010】

グリコゲンシンターゼキナーゼ-3（GSK-3）の阻害剤は、成体幹細胞の拡散及び増殖を促進することで知られている。一例では、Tateishi et al.（非特許文献2）は、GSK-3阻害剤は、新生児又は成人の心臓から回収され、間葉系の特徴を有するヒト心臓幹細胞（hCSC）の増殖及び生存を亢進させることを示している。

【0011】

例えば、Rulifson et al（非特許文献3）は、Wntシグナルは島細胞の増殖を刺激すると記載している。

【0012】

50

別の例では、特許文献3は、骨髄成体多能性幹細胞を含む非胚幹細胞の培養液にGSK-3阻害剤を添加すると、増殖中の多能性表現型を維持させ、その結果よりロバストな分化応答をもたらすことを報告している。

【0013】

別の例では、特許文献4は、フィーダー細胞層を使用せずに胚幹細胞を維持するために、Wntの添加又はGSK-3酵素活性の小分子阻害剤の添加のいずれかによって、GSK-3を阻害する方法を用いている。

【0014】

別の例では、特許文献5は、c-mycの転写活性化及びc-mycタンパク質の安定化を通じて多能性細胞を安定させるために、GSK-3B阻害剤を添加することを報告している。

10

【0015】

別の例では、特許文献6は、マウス又はヒト胚幹細胞を含む多能性幹細胞の自己複製集団を維持するために、GSK-3阻害剤とgp130アゴニストとを含有する幹細胞培地の使用を報告している。

【0016】

別の例では、Sato et al. (非特許文献4)は、特定の薬理化合物を有するGSK-3阻害剤は、胚幹細胞の未分化の表現型を維持し、かつOct-3/4、Rex-1、及びNanogなどの多能性状態特異的転写因子の発現を持続させることができることを示している。

20

【0017】

別の例では、Maurer et al (非特許文献5)は、GSK-3阻害剤で処理された成体神経幹細胞は、特にカテニン標的遺伝子の転写を促進し、かつアポトーシスを減少させることによって、神経分化を亢進させることを示すことを明らかにしている。

【0018】

別の例では、Gregory et al (非特許文献6)は、GSK-3B阻害剤がインビトロでの骨形成を亢進させることを報告している。

【0019】

別の例では、Feng et al (非特許文献7)は、胚幹細胞の造血分化は、WntがGSK3の天然阻害剤である場合にはWnt/カテニン経路の抑制を伴うことを示している。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0020】

【特許文献1】米国特許出願公開第20050233446号

【特許文献2】WO2005086845

【特許文献3】WO2007016485

【特許文献4】US2006030042

【特許文献5】WO2006026473

【特許文献6】WO2006100490

40

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870、2005年10月19日

【非特許文献2】Biochemical and Biophysical Research Communications (2007) 352:635

【非特許文献3】PNAS 144, 6247~6252, (2007)

【非特許文献4】Nature Medicine (2004) 10:55~63

【非特許文献5】Journal of Proteome Research (2007) 6:1198~1208

50

【非特許文献6】Annals of the New York Academy of Sciences (2005) 1049: 97~106

【非特許文献7】Biochemical and Biophysical Research Communications (2004) 324: 1333~1339

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

したがって、膵臓内分泌細胞、膵臓ホルモン発現細胞、又は膵臓ホルモン分泌細胞に分化する可能性を維持する一方で、現在の临床上の必要性に対処するために増殖され得るように多能性幹細胞株を処理する方法を開発する重大な必要性が今尚存在している。

10

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明は、多能性細胞をGSK-3Bの酵素活性阻害剤で処理することによって、多能性細胞を増殖及び分化するための方法を提供する。

【0024】

一実施形態において、本発明は多能性細胞を増殖及び分化するための方法を提供し、該方法は：

- a. 多能性細胞を培養する過程と、
- b. 多能性細胞をGSK-3Bの酵素活性阻害剤で処理する過程と、を含む。

【0025】

一実施形態において、多能性細胞は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化される。

20

【0026】

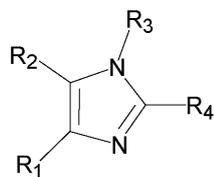
多能性細胞はヒト胚幹細胞であってもよく、又は60/913475に開示される方法に従ってヒト胚幹細胞から誘導した多能性マーカーを発現する細胞であってもよい。

【0027】

一実施形態において、GSK-3Bの酵素活性阻害剤は式(I)の化合物である。

【0028】

【化1】



式(I)

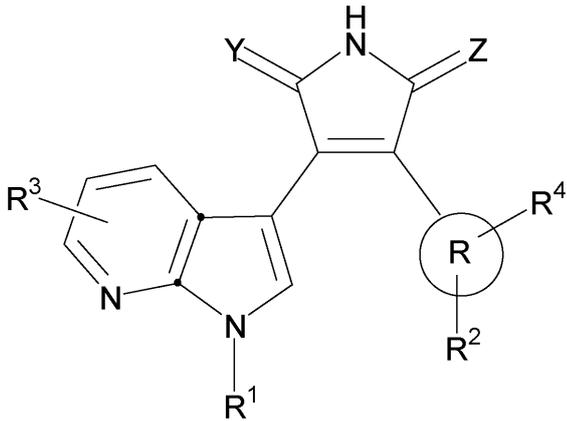
30

【0029】

一実施形態において、GSK-3Bの酵素活性阻害剤は、式(II)の化合物である。

【0030】

【化2】



式 (I I)

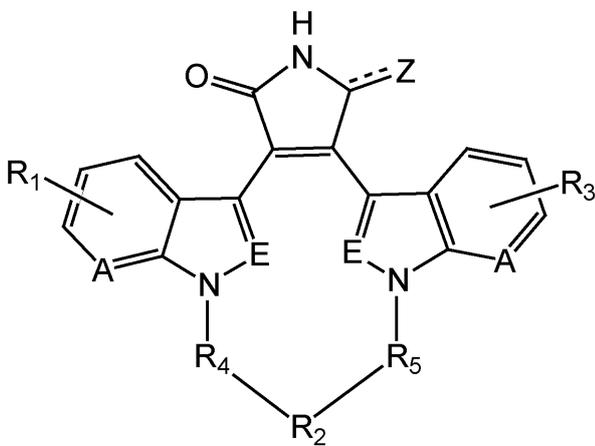
10

【0031】

一実施形態において、GSK-3Bの酵素活性阻害剤は、式(III)の化合物である。

【0032】

【化3】



式 (I I I)

20

30

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】化合物JNJ 17189731の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数(パネルA)、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現(パネルB)に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000(GE Healthcare)を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞(白色バー)、又はヒト胚幹細胞系H9細胞(黒色バー)から得た。

40

【図2】化合物JNJ 17163796の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数(パネルA)、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現(パネルB)に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000(GE Healthcare)を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞(白色バー)、又はヒト胚幹細胞系H9細胞(黒色バー)から得た。

【図3】化合物JNJ 17223375の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数(パネルA)、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現(パネルB)に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000(GE Healthcare)を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞(白色バー)、又はヒト胚幹細胞系H9細胞(黒色バー)から得た。

50

【図4】化合物JNJ 18157698の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現（パネルB）に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞（白色バー）、又はヒト胚幹細胞系H9細胞（黒色バー）から得た。

【図5】化合物JNJ 26158015の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現（パネルB）に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞（白色バー）、又はヒト胚幹細胞系H9細胞（黒色バー）から得た。

10

【図6】化合物JNJ 26483197の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現（パネルB）に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞（白色バー）、又はヒト胚幹細胞系H9細胞（黒色バー）から得た。

【図7】化合物JNJ 26483249の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現（パネルB）に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞（白色バー）、又はヒト胚幹細胞系H9細胞（黒色バー）から得た。

20

【図8】化合物JNJ 10220067の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるSox-17の発現（パネルB）に与える影響を示す。結果は、IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いて、ヒト胚幹細胞系H1細胞（白色バー）、又はヒト胚幹細胞系H9細胞（黒色バー）から得た。

【図9】実施例8に記載の方法に従って、示されている化合物で処理された細胞を用いた免疫蛍光染色法及びフローサイトメトリー分析によって測定された細胞の表面上におけるCXCR4の発現を示す。

【図10】実施例8に記載の方法に従って、示されている化合物で処理された細胞における、リアルタイムPCRによって測定されたHNF-3（パネルB）及びSox-17（パネルC）の発現を示す。

30

【図11】IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いた、示されている化合物の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞の数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるPdx-1の発現（パネルB）、に与える影響を示す。細胞は、実施例9に記載の方法に従って処理された。

【図12】リアルタイムPCRによって測定された、示されている化合物の濃度範囲が、Pdx-1の発現（白色バー）及びHNF-6（黒色バー）に与える影響を示す。細胞は、実施例9に記載の方法に従って処理された。

【図13】IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いた、示されている化合物の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞の数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるインスリンの発現（パネルB）に与える影響を示す。細胞は、実施例10に記載の方法に従って処理された。

40

【図14】リアルタイムPCRによって測定された、示されている化合物の濃度範囲が、Pdx-1の発現（白色バー）及びインスリン（黒色バー）に与える影響を示す。細胞は、実施例10に記載の方法に従って処理された。

【図15】IN Cell Analyzer 1000（GE Healthcare）を用いた、示されている化合物の濃度範囲が、観察される細胞核の数によって決定される細胞の数（パネルA）、及び免疫蛍光染色の強度によって決定されるインスリンの発現

50

(パネルB)に与える影響を示す。細胞は、実施例11に記載の方法に従って処理された。

【発明を実施するための形態】

【0034】

開示を分かりやすくするため、限定を目的とすることなく、本発明の詳細な説明を、本発明の特定の特徴、実施形態、又は応用を説明又は図示した以下の小項目に分ける。

【0035】

定義

幹細胞は、単一の細胞レベルにて自己複製し、分化して後代細胞を生成する、それら両方の能力で定義される未分化細胞であり、後代細胞には、自己複製前駆細胞、非再生前駆細胞、及び最終分化細胞が含まれる。幹細胞はまた、インビトロで複数の胚葉(内胚葉、中胚葉及び外胚葉)から様々な細胞系統の機能的細胞に分化する能力によって、また移植後に複数の胚葉の組織を生じ、胚盤胞への注入後、全部ではないとしても殆どの組織を提供する能力によっても、特徴付けられる。

10

【0036】

幹細胞は、それらの発達能力により：(1)全胚及び胚体外細胞型を生じる能力を意味する全能性、(2)全胚細胞型を生じる能力を意味する多能性、(3)細胞系統の小集合を生じるが、全て特定の組織、器官又は生理的システム内で生じる能力を有することを意味する多能性(例えば、造血幹細胞(HSC)は、HSC(自己複製)、血液細胞に限定された寡能性前駆細胞、並びに血液の通常の構成要素である全細胞型及び要素(例えば、血小板)を含む子孫を産生できる)、(4)多能性幹細胞と比較して限定された細胞系統の小集合を生じる能力を有することを意味する寡能性、並びに(5)1つの細胞系統を生じる能力を有することを意味する単能性(例えば、精子形成幹細胞)に分類される。

20

【0037】

分化は、非特殊化の(「中立の」)又は比較的特殊化されていない細胞が、例えば、神経細胞又は筋細胞等の特殊化した細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した、又は分化を誘発された細胞は、細胞系統内でより特殊化した(「傾倒した」)状況を呈している細胞である。分化プロセスに適用した際の用語「傾倒した」は、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合に分化し続ける分化経路の地点に進行しており、通常的环境下で異なる細胞型に分化し、又はより分化されていない細胞型に戻ることができない細胞を指す。脱分化は、細胞が細胞系統内で比較的特殊化されて(又は傾倒して)いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用される場合、細胞系統は、細胞の遺伝、即ちその細胞がどの細胞から来たか、またどの細胞を生じ得るかを規定する。細胞系統は、細胞を発達及び分化の遺伝的スキーム内に配置する。系統特異的なマーカーは、関心対象の細胞の表現型に特異的に関連した特徴を指し、中立細胞の関心対象系統への分化を評価する際に使用することができる。

30

【0038】

「**-細胞系統**」は、転写因子PDX-1と、次の転写因子、即ちNGN-3、Nkx2.2、Nkx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3、MAFA、Pax4、及びPax6うちの少なくとも1つとに関する遺伝子発現が陽性の細胞を指す。細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、**細胞**を含む。

40

【0039】

本明細書で言うところの「胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」とは、次のマーカー、即ちSOX-17、GATA-4、HNF-3、GSC、Cer1、ノーダル(Nodal)、FGF8、ブラキユリ(Brachyury)、Mix様ホメオボックスタンパク質、FGF4、CD48、エオメソダーミン(eomesodermin)(EOMES)、DKK4、FGF17、GATA-6、CXCR4、C-Kit、CD99、又はOTX2のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、原始線条前駆体細胞、原始線条細胞、中内胚葉細胞及び胚体内胚葉細胞を含む。

【0040】

50

本明細書で使用される場合、「膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現している細胞を指す：PDX-1、HNF-1、PTF-1、HNF-6、又はHB9。膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵臓内胚葉細胞を含む。

【0041】

本明細書で使用される場合、「膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現している細胞を指す：NGN-3、NeuroD、Islet-1、PDX-1、NKX6.1、Pax-4、Ngn-3、又はPTF-1。膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞としては、膵臓内分泌細胞、膵臓ホルモン発現細胞及び膵臓ホルモン分泌細胞、並びに細胞系統の細胞が挙げられる。

10

【0042】

本明細書で使用される場合、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を保持する細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカーを発現する：HNF-3、GATA-4、SOX-17、Cerberus、OTX2、グースコイド、C-Kit、CD99、及びMix11。

【0043】

本明細書で使用される場合、「胚体外内胚葉」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現している細胞の集団を指す：SOX-7、AFP、及びSPARC。

【0044】

本明細書で使用される場合、「マーカー」は、関心対象の細胞内で差別的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。本文脈において、差別的な発現は、陽性マーカーのレベルの増大及び陰性マーカーのレベルの減少を意味する。検出可能なレベルのマーカー核酸又はポリペプチドは、他の細胞と比較して関心対象の細胞内で十分高く又は低く、そのため当技術分野で公知の多様な方法のいずれかを使用して、関心対象の細胞を他の細胞から識別及び区別することができる。

20

【0045】

本明細書で使用される場合、「中内胚葉細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現している細胞を指す：CD48、eomesodermin (EOMES)、SOX-17、DKK4、HNF-3、GSC、FGF17、GATA-6。

30

【0046】

本明細書で使用される場合、「膵臓内分泌細胞」又は「膵臓ホルモン発現細胞」は、以下のホルモンの少なくとも1つを発現することができる細胞を指す：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチド。

【0047】

本明細書で使用される場合、「膵臓ホルモン分泌細胞」は、以下のホルモンの少なくとも1つを分泌できる細胞を指す：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチド。

【0048】

本明細書で使用される場合、「前原始線条細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現している細胞を指す：Nodal、又はFGF8。

40

【0049】

本明細書で使用される場合、「原始線条細胞」は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現している細胞を指す：ブラキュリ (Brachyury)、Mix-様ホメオボックスタンパク質、又はFGF4。

【0050】

一実施形態において、本発明は、多能性細胞をGSK-3Bの酵素活性阻害剤で処理することを含む、多能性細胞を増殖及び分化する方法を提供する。

【0051】

一実施形態において、本発明は、次の過程を含む、多能性細胞を増殖及び分化するため

50

の方法を提供する：

- c. 多能性細胞を培養する過程と、
- d. 多能性細胞を G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で処理する過程。

【 0 0 5 2 】

一実施形態において、多能性細胞は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化される。

【 0 0 5 3 】

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーは、S O X 1 7、G A T A 4、H n f - 3、G S C、C e r 1、N o d a l、F G F 8、ブラキュリ (Brachyury)、M i x - 様ホメオボックスタンパク質、F G F 4 C D 4 8、e o m e s o d e r m i n (E O M E S)、D K K 4、F G F 1 7、G A T A 6、C X C R 4、C - K i t、C D 9 9、及び O T X 2 からなる群から選択される。胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーの少なくとも1つを発現している多能性細胞から誘導される細胞が、本発明において想到される。本発明の一態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、原始線条前駆体細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、胚体内胚葉細胞である。

【 0 0 5 4 】

多能性細胞は、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で約 1 ~ 約 7 2 時間処理されてもよい。あるいは、多能性細胞は、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で約 1 2 ~ 約 4 8 時間処理されてもよい。あるいは、多能性細胞は、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で約 4 8 時間処理されてもよい。

【 0 0 5 5 】

一実施形態において、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤は、濃度約 1 0 0 n M ~ 約 1 0 0 μ M で使用される。あるいは、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤は、濃度約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M で使用される。あるいは、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤は、濃度約 1 0 μ M で使用される。

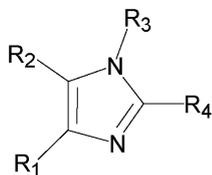
【 0 0 5 6 】

本発明の方法で使用するのに好適な化合物

一実施形態において、G S K - 3 B の酵素活性阻害剤は式 (I) の化合物：

【 0 0 5 7 】

【 化 4 】



式 (I)

[式 中、

R₁ はフェニル、置換フェニルであり、フェニル置換基は C₁ ~ 5 アルキル、ハロゲン、ニトロ、トリフルオロメチル及びニトリル、又はピリミジニルからなる群から選択され；

R₂ はフェニル、置換フェニル (ここでフェニル置換基は C₁ ~ 5 アルキル、ハロゲン、ニトロ、トリフルオロメチル、及びニトリル、からなる群から選択される)、又は任意に C₁ ~ 4 アルキルで置換されていてもよいピリミジニルであり、及び R₁ 及び R₂ の少なくとも一方はピリミジニルである、

R₃ は水素、2 - (トリメチルシリル) エトキシメチル、C₁ ~ 5 アルキルカルボニル、アリーロキシカルボニル、アリーロ C₁ ~ 5 アルキルオキシカルボニル、アリーロ C₁ ~ 5 アルキル、置換アリーロ C₁ ~ 5 アルキル (ここで1つ以上のアリーロ置換基は、独立して、C₁ ~ 5 アルキル、C₁ ~ 5 アルコキシ、ハロゲン、アミノ、C₁ ~ 5 アルキルアミノ、及び

10

20

30

40

50

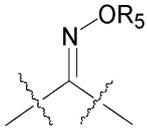
ジ C₁~₅アルキルアミノからなる群から選択される)、フタルイミド C₁~₅アルキル、アミノ C₁~₅アルキル、ジアミノ C₁~₅アルキル、スクシンイミド C₁~₅アルキル、C₁~₅アルキルカルボニル、アリールカルボニル、C₁~₅アルキルカルボニル C₁~₅アルキル及びアリールオキシカルボニル C₁~₅アルキルであり;

R₄は、- (A) - (CH₂)_q - Xであり;

Aは、ビニレン、エチニレン又は

【0058】

【化5】



であり、

R₅は、水素、C₁~₅アルキル、フェニル、及びフェニル C₁~₅アルキルからなる群から選択され;

qは0~9であり;

Xは、水素、ヒドロキシ、ビニル、置換ビニル(ここで1つ以上のビニル置換基はそれぞれ、フッ素、臭素、塩素、及びヨウ素からなる群から選択される)、エチニル、置換エチニル(ここでエチニル置換基は、フッ素、臭素、塩素、及びヨウ素からなる群から選択される)、C₁~₅アルキル、置換されたC₁~₅アルキル(ここで1つ以上のアルキル置換基はそれぞれ、C₁~₅アルコキシ、トリハロアルキル、フタルイミド、及びアミノからなる群から選択される)、C₃~₇シクロアルキル、C₁~₅アルコキシ、置換されたC₁~₅アルコキシ(ここでアルキル置換基は、フタルイミド及びアミノからなる群から選択される)、フタルイミドオキシ、フェノキシ、置換フェノキシ(ここで1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~₅アルキル、ハロゲン、及びC₁~₅アルコキシからなる群から選択される)、フェニル、置換フェニル(ここで1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~₅アルキル、ハロゲン、及びC₁~₅アルコキシからなる群から選択される)、アリール C₁~₅アルキル、置換アリール C₁~₅アルキル(ここで1つ以上のアリール置換基はそれぞれ、C₁~₅アルキル、ハロゲン、及びC₁~₅アルコキシからなる群から選択される)、アリールオキシ C₁~₅アルキルアミノ、C₁~₅アルキルアミノ、ジ C₁~₅アルキルアミノ、ニトリル、オキシム、ベンジルオキシイミノ(benzyloxyimino)、C₁~₅アルキルオキシイミノ、フタルイミド、スクシンイミド、C₁~₅アルキルカルボニルオキシ、フェニルカルボニルオキシ、置換フェニルカルボニルオキシ(ここで1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~₅アルキル、ハロゲン、及びC₁~₅アルコキシからなる群から選択される)、フェニル C₁~₅アルキルカルボニルオキシ(ここで1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~₅アルキル、ハロゲン、及びC₁~₅アルコキシからなる群から選択される)、アミノカルボニルオキシ、C₁~₅アルキルアミノカルボニルオキシ、ジ C₁~₅アルキルアミノカルボニルオキシ、C₁~₅アルキルカルボニルオキシ、置換されたC₁~₅アルキルカルボニルオキシ(ここで1つ以上のアルキル置換基はそれぞれ、メチル、エチル、イソプロピル、及びヘキシルからなる群から選択される)、フェノキシカルボニルオキシ、置換フェノキシカルボニルオキシ(ここで1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~₅アルキル、C₁~₅アルコキシ、及びハロゲンからなる群から選択される)、C₁~₅アルキルチオ、置換されたC₁~₅アルキルチオ(ここでアルキル置換基は、ヒドロキシ及びフタルイミドからなる群から選択される)、C₁~₅アルキルスルホニル、フェニルスルホニル、置換フェニルスルホニル(ここで1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、臭素、フッ素、塩素、C₁~₅アルコキシ、及びトリフルオロメチルからなる群から選択される);但し、Aが

【0059】

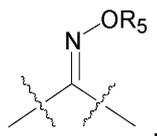
10

20

30

40

【化 6】



【0060】

q が 0、及び X が H の場合は、R₃ は 2 - (トリメチルシリル) エトキシメチルでなくともよい] ; 及びその薬学上許容し得る塩からなる群から選択される。

【0061】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、式中、R₁ は置換フェニル及び R₂ はピリミジン] - 3 - イルである。

10

【0062】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、式中、R₁ は 4 - フルオロフェニルである。

【0063】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、式中、R₃ は水素、アリール C₁ ~ 5 アルキル、又は置換アリール C₁ ~ 5 アルキルである。

【0064】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、式中、R₃ は水素又はフェニル C₁ ~ 5 アルキルである。

20

【0065】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、式中、A はエチニレン、及び q は 0 ~ 5 である。

【0066】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、式中、X は、スクシンイミド、ヒドロキシ、メチル、フェニル、C₁ ~ 5 アルキルスルホニル、C₃ ~ 6 シクロアルキル、C₁ ~ 5 アルキルカルボニルオキシ、C₁ ~ 5 アルコキシ、フェニルカルボニルオキシ、C₁ ~ 5 アルキルアミノ、ジ C₁ ~ 5 アルキルアミノ、又はニトリルである。

【0067】

式 (I) の化合物は、同一出願人による米国特許第 6, 214, 830 号に開示されており、該特許の完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0068】

本発明の実施例は式 (I) の化合物を含み、この化合物は次のものからなる群から選択される :

【0069】

【表 1】

化合物 名前

1	5(4)-(4-フルオロフェニル)-4(5)-(4-ピリジル)イミダゾール、
2	4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール、
3	5-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-4-(4-ピリジル)イミダゾール、
4	4-(4-フルオロフェニル)-2-ヨウ素-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール、
5	4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシブチン-1-イル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール、
6	4-(4-フルオロフェニル)-5-(4-ピリジル)-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-イミダゾール、
7	5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-イミダゾール、
8	5-(4-フルオロフェニル)-2-ヨウ素-4-(4-ピリジル)-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-イミダゾール、
9	5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-2-(トリメチルシリル)エチニル-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-イミダゾール、
10	2-(2-クロロピニル)-5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-イミダゾール、
11	5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-イミダゾール-2-カルボキシアリデヒド、
12	2-[2,2-ジプロモエチレン-1-イル]-5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-イミダゾール-2-カルボキシアリデヒド、
13	5(4)-(4-フルオロフェニル)-2-(3-ヒドロキシ-3-フェニルプロピン-1-イル)-4(5)-(4-ピリジル)イミダゾール、
14	5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-1-[2-(トリメチルシリル)エトキシメチル]-2-オキシイミノイミダゾール、
15	5-(4-フルオロフェニル)-4-(4-ピリジル)-2-イミダゾールオキシム、
16	2-(5-クロロペンチン-1-イル)-4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール、
17	4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-N-フェニルカルバモイルオキシブチン-1-イル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール、
17	2-(4-クロロブチン-1-イル)-4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール、及び
18	2-(4-ジメチルアミノブチン-1-イル)-4-(4-フルオロフェニル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール。

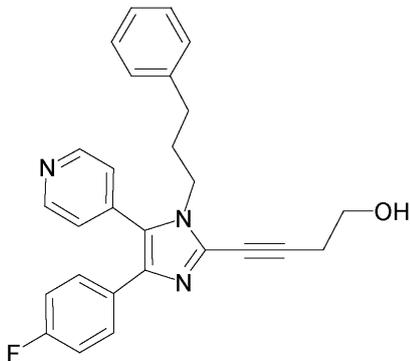
10

【0070】

本発明の実施例は式(I)の化合物を含み、この化合物は次の式の化合物5である。

【0071】

【化7】



化合物5

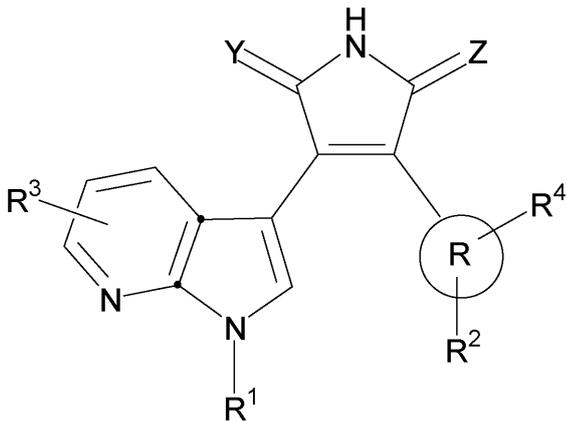
【0072】

一実施形態において、GSK-3Bの酵素活性阻害剤は式(II)の化合物：

【0073】

30

【化 8】



式 (I I)

[式中、

R は、 R_a 、 $-C_1 \sim 8$ アルキル - R_a 、 $-C_2 \sim 8$ アルケニル - R_a 、 $-C_2 \sim 8$ アルキニル - R_a 、及びシアノからなる群から選択され；

R_a は、シクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリールからなる群から選択され；

R^1 は、水素、 $-C_1 \sim 8$ アルキル - R^5 、 $-C_2 \sim 8$ アルケニル - R^5 、 $-C_2 \sim 8$ アルキニル - R^5 、 $-C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-C(O) -$ アリール - R^8 、 $-C(O) - O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-C(O) - O -$ アリール - R^8 、 $-C(O) - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-C(O) - NH$ (アリール - R^8)、 $-C(O) - N(C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-SO_2 - (C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-SO_2 -$ アリール - R^8 、 $-シクロアルキル - R^6$ 、 $-複素環 - R^6$ 、 $-アリール - R^6$ 、及び $-ヘテロアリール - R^6$ からなる群から選択され；ここで、複素環及びヘテロアリールは、複素環又はヘテロアリール環の炭素原子を通して 1 の位置のアザインドール窒素原子と結合しており；

R^5 は、水素、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - OH、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - NH_2 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - S - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $SO_2 - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $SO_2 - NH_2$ 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $SO_2 - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $SO_2 - N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-O - C(O)H$ 、 $-O - C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - C(O) - NH_2$ 、 $-O - C(O) - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - C(O) - N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O)H$ 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - CO_2H 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O) - O - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O) - NH_2$ 、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O) - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O) - N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-CO_2H$ 、 $-C(O) - O - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-C(O) - NH_2$ 、 $-C(NH) - NH_2$ 、 $-C(O) - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-C(O) - N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-SH$ 、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - S - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル - OH、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル - NH_2 、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル - $NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル - $N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-S - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-SO_2 - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-SO_2 - NH_2$ 、 $-SO_2 - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-SO_2 - N(C_1 \sim 8)$ アルキル) $_2$ 、 $-N - R^7$ 、シアノ、(ハロ) $_1 \sim 3$ 、ヒドロキシ、ニトロ、

10

20

30

40

50

オキソ、-シクロアルキル-R⁶、-複素環-R⁶、-アリアル-R⁶、及び-ヘテロアリアル-R⁶からなる群から独立して選択される1~2個の置換基であり；

R⁶は、水素、-C₁~₈アルキル、-C₂~₈アルケニル、-C₂~₈アルキニル、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₈)アルキル、-CO₂H、-C(O)-O-(C₁~₈)アルキル、-C(O)-NH₂、-C(NH)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₈アルキル)、-C(O)-N(C₁~₈)アルキル)₂、-SO₂-(C₁~₈)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₈アルキル)、-SO₂-N(C₁~₈アルキル)₂、-(C₁~₈)アルキル-N-R⁷、-(C₁~₈)アルキル-(ハロ)₁~₃、-(C₁~₈)アルキル-OH、-アリアル-R⁸、-(C₁~₈)アルキル-アリアル-R⁸、及び-(C₁~₈)アルキル-ヘテロアリアル-R⁸からなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基であり；但し、R⁶が炭素原子に結合されている場合には、R⁶は、-C₁~₈アルコキシ、-(C₁~₈)アルコキシ-(ハロ)₁~₃、-SH、-S-(C₁~₈)アルキル、-N-R⁷、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、及び-ヘテロアリアル-R⁸からなる群から更に選択され；

R⁷は、水素、-C₁~₈アルキル、-C₂~₈アルケニル、-C₂~₈アルキニル、-(C₁~₈)アルキル-OH、-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル、-(C₁~₈)アルキル-NH₂、-(C₁~₈)アルキル-NH(C₁~₈アルキル)、-(C₁~₈)アルキル-N(C₁~₈アルキル)₂、-(C₁~₈)アルキル-S-(C₁~₈)アルキル、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₈)アルキル、-C(O)-O-(C₁~₈)アルキル、-C(O)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₈アルキル)、-C(O)-N(C₁~₈アルキル)₂、-SO₂-(C₁~₈)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₈アルキル)、-SO₂-N(C₁~₈アルキル)₂、-C(N)-NH₂、-シクロアルキル-R⁸、-(C₁~₈)アルキル-複素環-R⁸、-アリアル-R⁸、-(C₁~₈)アルキル-アリアル-R⁸、及び-(C₁~₈)アルキル-ヘテロアリアル-R⁸からなる群から独立して選択される2個の置換基であり；

R⁸は、水素、-C₁~₈アルキル、-(C₁~₈)アルキル-(ハロ)₁~₃及び-(C₁~₈)アルキル-OHからなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基であり；但し、R⁸が炭素原子に結合されている場合には、R⁸は、-C₁~₈アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁~₈アルキル)、-N(C₁~₈アルキル)₂、シアノ、ハロ、-(C₁~₈)アルコキシ-(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ、及びニトロからなる群から更に選択され；

R⁹は、水素、-C₁~₈アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁~₈アルキル)、-N(C₁~₈アルキル)₂、シアノ、(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ、及びニトロからなる群から独立して選択される1~2個の置換基であり；

R²は、水素、-C₁~₈アルキル-R⁵、-C₂~₈アルケニル-R⁵、-C₂~₈アルキニル-R⁵、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₈)アルキル-R⁹、-C(O)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₈アルキル-R⁹)、-C(O)-N(C₁~₈アルキル-R⁹)₂、-C(O)-NH(アリアル-R⁸)、-C(O)-シクロアルキル-R⁸、-C(O)-複素環-R⁸、-C(O)-アリアル-R⁸、-C(O)-ヘテロアリアル-R⁸、-CO₂H、-C(O)-O-(C₁~₈)アルキル-R⁹、-C(O)-O-アリアル-R⁸、-SO₂-(C₁~₈)アルキル-R⁹、-SO₂-アリアル-R⁸、-シクロアルキル-R⁶、-アリアル-R⁶及び-(C₁~₈)アルキル-N-R⁷からなる群より独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1個の置換基であり；但し、R²が炭素原子に結合されている場合には、R²は、-C₁~₈アルコキシ-R⁵、-N-R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、-複素環-R⁶、及び-ヘテロアリアル-R⁶からなる群から更に選択され；

R³は、水素、-C₁~₈アルキル-R¹⁰、-C₂~₈アルケニル-R¹⁰、-C₂~₈アルキニル-R¹⁰、-C₁~₈アルコキシ-R¹⁰、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₈)アルキル-R⁹、-C(O)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₈アルキル-R⁹)、-C(O)-N(C₁~₈アルキル-R⁹)₂、-C(O)-シクロアルキル-R⁸、-C(O)-複素

10

20

30

40

50

環 - R⁸、 - C(O) - アリール - R⁸、 - C(O) - ヘテロアリール - R⁸、 - C(NH) - NH₂、 - CO₂H、 - C(O) - O - (C₁~₈)アルキル - R⁹、 - C(O) - O - アリール - R⁸、 - SO₂ - (C₁~₈)アルキル - R⁹、 - SO₂ - アリール - R⁸、 - N - R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、 - シクロアルキル - R⁸、 - 複素環 - R⁸、 - アリール - R⁸、及び - ヘテロアリール - R⁸からなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~3個の置換基であり；

R⁴は、水素、 - C₁~₈アルキル - R¹⁰、 - C₂~₈アルケニル - R¹⁰、 - C₂~₈アルキニル - R¹⁰、 - C₁~₈アルコキシ - R¹⁰、 - C(O)H、 - C(O) - (C₁~₈)アルキル - R⁹、 - C(O) - NH₂、 - C(O) - NH(C₁~₈アルキル - R⁹)、 - C(O) - N(C₁~₈アルキル - R⁹)₂、 - C(O) - シクロアルキル - R⁸、 - C(O) - 複素環 - R⁸、 - C(O) - アリール - R⁸、 - C(O) - ヘテロアリール - R⁸、 - C(NH) - NH₂、 - CO₂H、 - C(O) - O - (C₁~₈)アルキル - R⁹、 - C(O) - O - アリール - R⁸、 - SH、 - S - (C₁~₈)アルキル - R¹⁰、 - SO₂ - (C₁~₈)アルキル - R⁹、 - SO₂ - アリール - R⁸、 - SO₂ - NH₂、 - SO₂ - NH(C₁~₈アルキル - R⁹)、 - SO₂ - N(C₁~₈アルキル - R⁹)₂、 - N - R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、 - シクロアルキル - R⁸、 - 複素環 - R⁸、 - アリール - R⁸、及び - ヘテロアリール - R⁸からなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~4個の置換基であり；

R¹⁰は、水素、 - NH₂、 - NH(C₁~₈アルキル)、 - N(C₁~₈アルキル)₂、シアノ、(ハロ) ₁~₃、ヒドロキシ、ニトロ、及びオキソからなる群から独立して選択される1~2個の置換基であり；並びに

Y及びZは、O、S、(H, OH)、及び(H, H)からなる群から独立して選択され；但し、Y及びZの一方がOであり且つ他方がO、S、(H, OH)、及び(H, H)からなる群から選択される]；及びそれらの薬学上許容し得る塩である。

【0074】

本発明の実施形態は、式(II)の化合物を含み、式中、Rは、R_a、 - C₁~₄アルキル - R_a、 - C₂~₄アルケニル - R_a、 - C₂~₄アルキニル - R_a、及びシアノからなる群から選択される。

【0075】

本発明の実施形態は、式(II)の化合物を含み、式中、R_aは、複素環、アリール、及びヘテロアリールからなる群から選択される。

【0076】

一実施形態において、R_aは、ジヒドロ - ピラニル、フェニル、ナフチル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジニル、アザインドリル、インダゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、ジベンゾフリル、及びジベンゾチエニルからなる群から選択される。

【0077】

本発明の実施形態は、式(II)の化合物を含み、式中、R¹は、水素、 - C₁~₄アルキル - R⁵、 - C₂~₄アルケニル - R⁵、 - C₂~₄アルキニル - R⁵、 - C(O) - (C₁~₄)アルキル - R⁹、 - C(O) - アリール - R⁸、 - C(O) - O - (C₁~₄)アルキル - R⁹、 - C(O) - O - アリール - R⁸、 - C(O) - NH(C₁~₄アルキル - R⁹)、 - C(O) - NH(アリール - R⁸)、 - C(O) - N(C₁~₄アルキル - R⁹)₂、 - SO₂ - (C₁~₄)アルキル - R⁹、 - SO₂ - アリール - R⁸、 - シクロアルキル - R⁶、 - 複素環 - R⁶、 - アリール - R⁶及び - ヘテロアリール - R⁶からなる群から選択され；ここで、複素環及びヘテロアリールは、複素環又はヘテロアリール環の炭素原子を通して1の位置のアザインドール窒素原子と結合している。

【0078】

一実施形態において、R¹は、水素、 - C₁~₄アルキル - R⁵、 - アリール - R⁶、及び - ヘテロアリール - R⁶からなる群から選択され；ここで、ヘテロアリールは、ヘテロアリール環の炭素原子を通して1の位置のアザインドール窒素原子に結合されている。

【0079】

一実施形態において、 R^1 は、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル、 $-R^5$ 、及び $-ナフチル-R^6$ からなる群から選択される。

【0080】

本発明の実施形態は、式(I I)の化合物を含み、式中、 R^5 は、水素、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-OH、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-O-($C_1\sim_4$)アルキル、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-NH₂、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-NH($C_1\sim_4$ アルキル)、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-N($C_1\sim_4$ アルキル)₂、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-S-($C_1\sim_4$)アルキル、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-SO₂-($C_1\sim_4$)アルキル、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-SO₂-NH₂、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-SO₂-NH($C_1\sim_4$ アルキル)、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-SO₂-N($C_1\sim_4$ アルキル)₂、 $-O-C(O)H$ 、 $-O-C(O)-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-O-C(O)-NH_2$ 、 $-O-C(O)-NH(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-O-C(O)-N(C_1\sim_4)$ アルキル)₂、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-C(O)H、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-C(O)-(C₁~₄)アルキル、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-CO₂H、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-C(O)-O-($C_1\sim_4$)アルキル、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-C(O)-NH₂、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-C(O)-NH($C_1\sim_4$ アルキル)、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル-C(O)-N($C_1\sim_4$ アルキル)₂、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(NH)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-C(O)-N(C_1\sim_4)$ アルキル)₂、 $-SH$ 、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-S-($C_1\sim_4$)アルキル、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-O-($C_1\sim_4$)アルキル、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-O-($C_1\sim_4$)アルキル-OH、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-O-($C_1\sim_4$)アルキル-NH₂、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-O-($C_1\sim_4$)アルキル-NH($C_1\sim_4$ アルキル)、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-O-($C_1\sim_4$)アルキル-N($C_1\sim_4$ アルキル)₂、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル-NH($C_1\sim_4$ アルキル)、 $-SO_2-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NH(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-SO_2-N(C_1\sim_4)$ アルキル)₂、 $-N-R^7$ 、シアノ、(ハロ)_{1~3}、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、 $-シクロアルキル-R^6$ 、 $-複素環-R^6$ 、 $-アリール-R^6$ 、及び $-ヘテロアリール-R^6$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である。

【0081】

一実施形態において、 R^5 は、水素、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-N-R^7$ 、ヒドロキシ、及び $-ヘテロアリール-R^6$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である。

【0082】

一実施形態において、 R^5 は、水素、 $-O-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-N-R^7$ 、ヒドロキシ、 $-イミダゾリル-R^6$ 、 $-トリアゾリル-R^6$ 及び $-テトラゾリル-R^6$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である。

【0083】

本発明の実施形態は、式(I I)の化合物を含み、式中、 R^6 は、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル、 $-C_2\sim_4$ アルケニル、 $-C_2\sim_4$ アルキニル、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(NH)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-C(O)-N(C_1\sim_4)$ アルキル)₂、 $-SO_2-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NH(C_1\sim_4)$ アルキル)、 $-SO_2-N(C_1\sim_4)$ アルキル)₂、 $-(C_1\sim_4)$ アルキル-N- R^7 、 $-(C_1\sim_4)$ アルキル-(ハロ)_{1~3}、 $-(C_1\sim_4)$ アルキル-OH、 $-アリール-R^8$ 、 $-(C_1\sim_4)$ アルキル-アリール- R^8 及び $-(C_1\sim_4)$ アルキル-ヘテロアリール- R^8 からなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基である；但し、 R^6 が炭素原子に結合されている場合には、 R^6 は、 $-C_1\sim_4$ アルコキシ、 $-(C_1\sim_4)$ アルコキシ-(ハロ)_{1~3}、 $-SH$ 、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル、 $-N-R$

⁷、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、及び - ヘテロアリール - R⁸からなる群から更に選択される。

【0084】

一実施形態では、R⁶は水素である。

【0085】

本発明の実施形態は、式(I I)の化合物を含み、式中、R⁷は、水素、-C₁~₄アルキル、-C₂~₄アルケニル、-C₂~₄アルキニル、-(C₁~₄)アルキル-OH、-(C₁~₄)アルキル-O-(C₁~₄)アルキル、-(C₁~₄)アルキル-NH₂、-(C₁~₄)アルキル-NH(C₁~₄アルキル)、-(C₁~₄)アルキル-N(C₁~₄アルキル)₂、-(C₁~₄)アルキル-S-(C₁~₄)アルキル、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₄)アルキル、-C(O)-O-(C₁~₄)アルキル、-C(O)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₄アルキル)、-C(O)-N(C₁~₄アルキル)₂、-SO₂-(C₁~₄)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₄アルキル)、-SO₂-N(C₁~₄アルキル)₂、-C(N)-NH₂、-シクロアルキル-R⁸、-(C₁~₄)アルキル-複素環-R⁸、-アリール-R⁸、-(C₁~₄)アルキル-アリール-R⁸、及び-(C₁~₄)アルキル-ヘテロアリール-R⁸からなる群から独立して選択される2個の置換基である。

10

【0086】

一実施形態において、R⁷は、水素、-C₁~₄アルキル、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₄)アルキル、-C(O)-O-(C₁~₄)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₄アルキル)及び-SO₂-N(C₁~₄アルキル)₂からなる群から独立して選択される2個の置換基である。

20

【0087】

本発明の実施形態は、式(I I)の化合物を含み、式中、R⁸は、水素、-C₁~₄アルキル、-(C₁~₄)アルキル-(ハロ)₁~₃、及び-(C₁~₄)アルキル-OHからなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基である；但し、R⁸が炭素原子に結合されている場合には、R⁸は、-C₁~₄アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁~₄アルキル)、-N(C₁~₄アルキル)₂、シアノ、ハロ、-(C₁~₄)アルコキシ-(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ、及びニトロからなる群から更に選択される。

30

【0088】

一実施形態では、R⁸は水素である。

【0089】

本発明の実施形態は、式(I I)の化合物を含み、式中、R⁹は、水素、-C₁~₄アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁~₄アルキル)、-N(C₁~₄アルキル)₂、シアノ、(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ、及びニトロからなる群から独立して選択される1~2個の置換基である。

【0090】

一実施形態では、R⁹は水素である。

【0091】

本発明の実施形態は、式(I I)の化合物を含み、式中、R²は、水素、-C₁~₄アルキル-R⁵、-C₂~₄アルケニル-R⁵、-C₂~₄アルキニル-R⁵、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₄)アルキル-R⁹、-C(O)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₄アルキル-R⁹)、-C(O)-N(C₁~₄アルキル-R⁹)₂、-C(O)-NH(アリール-R⁸)、-C(O)-シクロアルキル-R⁸、-C(O)-複素環-R⁸、-C(O)-アリール-R⁸、-C(O)-ヘテロアリール-R⁸、-CO₂H、-C(O)-O-(C₁~₄)アルキル-R⁹、-C(O)-O-アリール-R⁸、-SO₂-(C₁~₄)アルキル-R⁹、-SO₂-アリール-R⁸、-シクロアルキル-R⁶、-アリール-R⁶、及び-(C₁~₄)アルキル-N-R⁷からなる群から選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1個の置換基である；但し、R²が炭素原子に結合されている場合には、R²は、-C₁~₄アルコキシ-R⁵、-N-R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、-複素

40

50

環 - R⁶、及び - ヘテロアリール - R⁶からなる群から更に選択される。

【0092】

一実施形態において、R²は、水素、- C₁~₄アルキル - R⁵、- C₂~₄アルケニル - R⁵、- C₂~₄アルキニル - R⁵、- CO₂H、- C(O) - O - (C₁~₄)アルキル - R⁹、- シクロアルキル - R⁶、- アリール - R⁶、及び - (C₁~₄)アルキル - N - R⁷からなる群から選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1個の置換基である；但し、R²が窒素原子に結合されている場合には、クオーターニウム塩 (quaterniumsalt) は形成されず；そして但し、R²が炭素原子に結合されている場合には、R²は、- C₁~₄アルコキシ - R⁵、- N - R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、- 複素環 - R⁶、及び - ヘテロアリール - R⁶からなる群から更に選択される。

10

【0093】

一実施形態において、R²は、水素、- C₁~₄アルキル - R⁵、及び - アリール - R⁶からなる群から選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1個の置換基である；但し、R²が窒素原子に結合されている場合には、クオーターニウム塩 (quaterniumsalt) は形成されず；そして但し、R²が炭素原子に結合されている場合には、R²は、- N - R⁷、ハロゲン、ヒドロキシ、及び - ヘテロアリール - R⁶からなる群から更に選択される。

【0094】

本発明の実施形態は、式 (I I) の化合物を含み、式中、R³は、水素、- C₁~₄アルキル - R¹⁰、- C₂~₄アルケニル - R¹⁰、- C₂~₄アルキニル - R¹⁰、- C₁~₄アルコキシ - R¹⁰、- C(O)H、- C(O) - (C₁~₄)アルキル - R⁹、- C(O) - NH₂、- C(O) - NH(C₁~₄アルキル - R⁹)、- C(O) - N(C₁~₄アルキル - R⁹)₂、- C(O) - シクロアルキル - R⁸、- C(O) - 複素環 - R⁸、- C(O) - アリール - R⁸、- C(O) - ヘテロアリール - R⁸、- C(NH) - NH₂、- CO₂H、- C(O) - O - (C₁~₄)アルキル - R⁹、- C(O) - O - アリール - R⁸、- SO₂ - (C₁~₈)アルキル - R⁹、- SO₂ - アリール - R⁸、- N - R⁷、- (C₁~₄)アルキル - N - R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、- シクロアルキル - R⁸、- 複素環 - R⁸、- アリール - R⁸、及び - ヘテロアリール - R⁸からなる群から独立して選択される、炭素原子に結合された1~3個の置換基である。

20

【0095】

一実施形態において、R³は、水素、- C₁~₄アルキル - R¹⁰、- C₂~₄アルケニル - R¹⁰、- C₂~₄アルキニル - R¹⁰、- C₁~₄アルコキシ - R¹⁰、- C(O)H、- CO₂H、- NH₂、- NH(C₁~₄アルキル)、- N(C₁~₄アルキル)₂、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、及びニトロからなる群から選択される、炭素原子に結合された1個の置換基である。

30

【0096】

一実施形態において、R³は、水素、- C₁~₄アルキル - R¹⁰、- NH₂、- NH(C₁~₄アルキル)、- N(C₁~₄アルキル)₂、ハロゲン、及びヒドロキシからなる群から選択される、炭素原子に結合された1個の置換基である。

【0097】

本発明の実施形態は、式 (I I) の化合物を含み、式中、R⁴は、水素、- C₁~₄アルキル - R¹⁰、- C₂~₄アルケニル - R¹⁰、- C₂~₄アルキニル - R¹⁰、- C₁~₄アルコキシ - R¹⁰、- C(O)H、- C(O) - (C₁~₄)アルキル - R⁹、- C(O) - NH₂、- C(O) - NH(C₁~₄アルキル - R⁹)、- C(O) - N(C₁~₄アルキル - R⁹)₂、- C(O) - シクロアルキル - R⁸、- C(O) - 複素環 - R⁸、- C(O) - アリール - R⁸、- C(O) - ヘテロアリール - R⁸、- C(NH) - NH₂、- CO₂H、- C(O) - O - (C₁~₄)アルキル - R⁹、- C(O) - O - アリール - R⁸、- SH、- S - (C₁~₄)アルキル - R¹⁰、- SO₂ - (C₁~₄)アルキル - R⁹、- SO₂ - アリール - R⁸、- SO₂ - NH₂、- SO₂ - NH(C₁~₄アルキル - R⁹)、- SO₂ - N(C₁~₄アルキル - R⁹)₂、- N - R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、- シクロアルキル - R⁸、- 複素環 - R⁸、- アリール - R⁸、及び - ヘテロアリール - R⁸からなる群から独

40

50

立して選択される、炭素原子に結合された 1 ~ 4 個の置換基である。

【0098】

一実施形態において、 R^4 は、水素、 $-C_1 \sim 4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $-C_2 \sim 4$ アルケニル $-R^{10}$ 、 $-C_2 \sim 4$ アルキニル $-R^{10}$ 、 $-C_1 \sim 4$ アルコキシ $-R^{10}$ 、 $-C(O)H$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim 4$ アルキル)、 $-N(C_1 \sim 4$ アルキル) $_2$ 、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、 $-シクロアルキル$ 、 $-複素環$ 、 $-アリール$ 、及び $-ヘテロアリール$ からなる群から独立して選択される、炭素原子に結合された 1 ~ 4 個の置換基である。

【0099】

一実施形態において、 R^4 は、水素、 $C_1 \sim 4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ $-R^{10}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim 4$ アルキル)、 $-N(C_1 \sim 4$ アルキル) $_2$ 、ハロゲン、及びヒドロキシからなる群から独立して選択される、炭素原子に結合された 1 ~ 4 個の置換基である。

10

【0100】

一実施形態において、 R^4 は、水素、 $C_1 \sim 4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $C_1 \sim 4$ アルコキシ $-R^{10}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim 4$ アルキル)、 $-N(C_1 \sim 4$ アルキル) $_2$ 、塩素、フッ素、及びヒドロキシからなる群から独立して選択される、炭素原子に結合された 1 ~ 4 個の置換基である。

【0101】

本発明の実施形態は、式 (II) の化合物を含み、式中、 R^{10} は、水素、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1 \sim 4$ アルキル)、 $-N(C_1 \sim 4$ アルキル) $_2$ 、シアノ、 $(ハロ)_1 \sim 3$ 、ヒドロキシ、ニトロ、及びオキソからなる群から独立して選択される 1 ~ 2 個の置換基である。

20

【0102】

一実施形態において、 R^{10} は、水素及び $(ハロ)_1 \sim 3$ からなる群から独立して選択される 1 ~ 2 個の置換基である。

【0103】

一実施形態において、 R^{10} は、水素及び $(フルオロ)_3$ からなる群から独立して選択される 1 ~ 2 個の置換基である。

【0104】

本発明の実施形態は、式 (II) の化合物を含み、式中、Y 及び Z は、O、S、 (H, OH) 、及び (H, H) からなる群から独立して選択される；但し、Y 及び Z の一方が O であり且つ他方が O、S、 (H, OH) 、及び (H, H) からなる群から選択される。

30

【0105】

一実施形態において、Y 及び Z は、O 及び (H, H) からなる群から独立して選択される；但し、Y 及び Z の一方が O であり且つ他方が O 及び (H, H) からなる群から選択される。

【0106】

一実施形態において、Y 及び Z は独立して O から選択される。

【0107】

式 (II) の化合物は、同一出願人による米国特許第 7, 125, 878 号に開示されており、該特許の完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0108】

本発明の実施例は式 (II) の化合物を含み、この化合物は次のものからなる群から選択される：

【0109】

【表 2 - 1】

化合物	名前
1	3-(2-クロロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
2	3-(2-クロロフェニル)-4-[1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
3	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1-ナフタレニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
4	3-[1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1-ナフタレニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
5	3-(5-クロロベンゾ[b]チエン-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
6	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1H-インダゾール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
7	3-(1-エチル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
8	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(2-メキシフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
9	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(3-メキシフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
10	3-(2-クロロ-4-フルオロフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
11	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-[2-(トリフルオロメチル)フェニル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
12	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(2-ピリジニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
13	3-[3-クロロ-5-(トリフルオロメチル)-2-ピリジニル]-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
14	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(2-チエニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
15	3-(2,5-ジクロロ-3-チエニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
16	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピラゾール-3-イル]-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
17	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1H-イミダゾール-2-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
18	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-イミダゾール-4-イル]-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
19	3-[1-(2-ヒドロキシエチル)-1H-イミダゾール-4-イル]-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
20	3-[1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-1H-インダゾール-3-イル]-4-[1-(2-ナフタレニル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
21	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-4-[1-(2-ナフタレニル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
22	3-[(E)-2-(4-フルオロフェニル)エチニル]-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、

10

20

【 0 1 1 0】

【表 2 - 2】

(上記表の続き)

化合物	名前
23	3-(3,4-ジヒドロ-2H-ピラン-6-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
24	4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-[3,3'-ビ-1H-ピロール]-2,5-ジオン、
25	3-(2-ベンゾフラン)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
26	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
27	2,5-ジヒドロ-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-カルボニトリル、
28	3-ジベンゾ[b,d]チエン-4-イル-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
29	3-(4-ジベンゾフラン)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
30	3-(2-ヒドロキシフェニル)-4-[1-(3-メキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
31	3-(3,4-ジメキシフェニル)-4-[1-(3-メキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
32	3-(3,4-ジヒドロキシフェニル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
33	3-(2-メキシフェニル)-4-[1-(2-ナフタレニル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
34	[3-[3-[2,5-ジヒドロ-4-(2-メキシフェニル)-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-イル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-1-イル]プロピル]-カルバミド酸2-メチルプロピルエステル、
35	3-[1-(3-アミノプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(2-メキシフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、
36	N-[3-[3-[2,5-ジヒドロ-4-(2-メキシフェニル)-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-イル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-1-イル]プロピル]-アセトアミド、
37	N-[3-[3-[2,5-ジヒドロ-4-(2-メキシフェニル)-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-イル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-1-イル]プロピル]-スルファミド、
38	3-(2-メキシフェニル)-4-[1-[3-(1H-テトラゾール-1-イル)プロピル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
39	3-(2-メキシフェニル)-4-[1-[3-(2H-テトラゾール-2-イル)プロピル]-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
40	3-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-ピラジン-2-イル-ピロール-2,5-ジオン、
41	3-(2,4-ジメキシ-ピリミジン-5-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-ピロール-2,5-ジオン、
42	4-[3-[4-(2,4-ジメキシ-ピリミジン-5-イル)-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル]-ピロロ[2,3-b]ピリジン-1-イル]-プチロニトリル、
43	4-[3-[4-(1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル]-ピロロ[2,3-b]ピリジン-1-イル]-プチロニトリル、及び
44	3-(2,4-ジメキシ-ピリミジン-5-イル)-4-(1-フェネチル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、

30

40

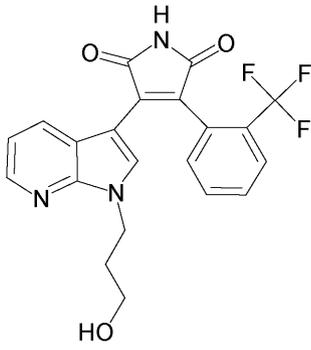
【 0 1 1 1】

本発明の実施例は式 (I I) の化合物を含み、この化合物は次のものから選択される：

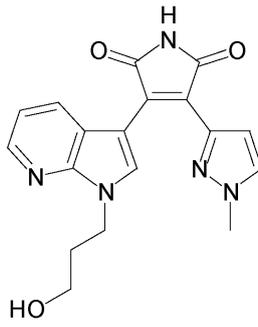
50

【 0 1 1 2 】

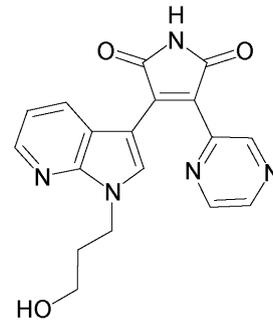
【 化 9 】



化合物 1 1

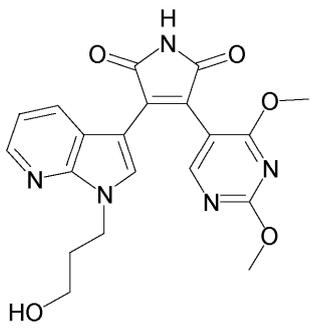


化合物 2 6

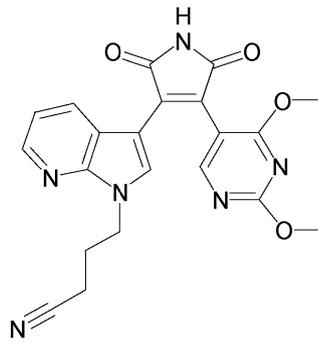


化合物 4 0

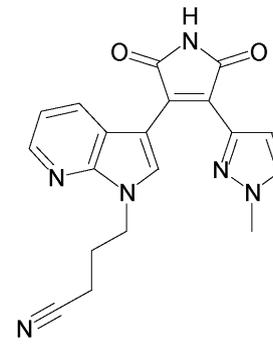
10



化合物 4 1

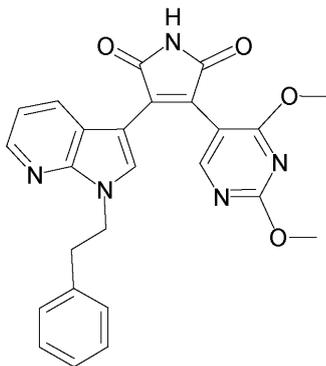


化合物 4 2



化合物 4 3

20



化合物 4 4

30

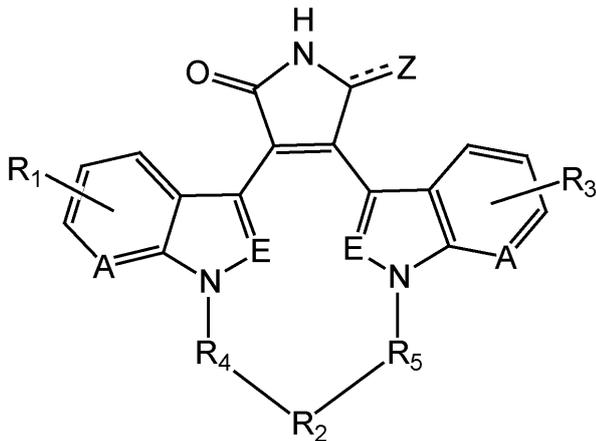
【 0 1 1 3 】

一実施形態において、GSK-3Bの酵素活性阻害剤は、式(I I I)の化合物：

40

【 0 1 1 4 】

【化10】



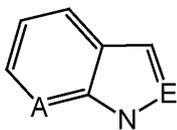
式(III)

【式中、

A及びEは、水素置換された炭素原子及び窒素原子からなる群から独立して選択され；
ここで、

【0115】

【化11】



は、1H-インドール、1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン、1H-ピラゾロ[3,4-b]ピリジン、及び1H-インダゾールからなる群から独立して選択され；

ZはOから選択され；あるいは、Zはジヒドロから選択され；ここで、それぞれの水素原子は単結合で結合されている；

R₄及びR₅は、場合によりオキソで置換されているC₁~₈アルキル、C₂~₈アルケニル、及びC₂~₈アルキニルから独立して選択され；

R₂は、-C₁~₈アルキル-、-C₂~₈アルケニル-、-C₂~₈アルキニル-、-O-(C₁~₈)アルキル-O-、-O-(C₂~₈)アルケニル-O-、-O-(C₂~₈)アルキニル-O-、-C(O)-(C₁~₈)アルキル-C(O)-(式中、上記のアルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも、C₁~₈アルキル、C₁~₈アルコキシ、C₁~₈アルコキシ(C₁~₈)アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C₁~₈)アルキル、-C(O)O-(C₁~₈)アルキル、-C₁~₈アルキル-C(O)O-(C₁~₈)アルキル、アミノ(水素及びC₁~₄アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~₈)アルキル(式中、アミノは、水素及びC₁~₄アルキルからなる群から独立して選ばれた置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ)₁~₃(C₁~₈)アルキル、(ハロ)₁~₃(C₁~₈)アルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシ(C₁~₈)アルキル及びオキソからなる群から独立して選ばれた1個~4個の置換基で場合により置換されている直炭素鎖であり；そして、式中、上記のアルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも、複素環、アリール、ヘテロアリール、複素環(C₁~₈)アルキル、アリール(C₁~₈)アルキル、ヘテロアリール(C₁~₈)アルキル、スピロシクロアルキル、及びスピロ複素環(式中、上記のシクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリール置換基のいずれも、C₁~₈アルキル、C₁~₈アルコキシ、C₁~₈アルコキシ(C₁~₈)アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C₁~₈)アルキル、アミノ(水素及びC₁~₄アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~₈)アルキル(式中、アミノは、水素及びC₁~₄アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ)₁~₃(C₁~₈)アルキル、(ハ

10

20

30

40

50

口)_{1~3}(C_{1~8})アルコキシ、ヒドロキシ及びヒドロキシ(C_{1~8})アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換されており;そして式中、上記の複素環置換基のいずれも場合によりオキソで置換されている)からなる群から独立して選択された1個~2個の置換基で場合により置換されている)、シクロアルキル、複素環、アリール、ヘテロアリール(式中、シクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリールは、C_{1~8}アルキル、C_{1~8}アルコキシ、C_{1~8}アルコキシ(C_{1~8})アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C_{1~8})アルキル、アミノ(水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C_{1~8})アルキル(式中、アミノは、水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選ばれた置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ)_{1~3}(C_{1~8})アルキル、(ハロ)_{1~3}(C_{1~8})アルコキシ、ヒドロキシ及びヒドロキシ(C_{1~8})アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換されており;そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)、- (O - (CH₂)_{1~6})_{0~5} - O -、- O - (CH₂)_{1~6} - O - (CH₂)_{1~6} - O -、- O - (CH₂)_{1~6} - O - (CH₂)_{1~6} - O - (CH₂)_{1~6} - O -、- (O - (CH₂)_{1~6})_{0~5} - NR₆ -、- O - (CH₂)_{1~6} - NR₆ - (CH₂)_{1~6} - O -、- O - (CH₂)_{1~6} - O - (CH₂)_{1~6} - NR₆ -、- (O - (CH₂)_{1~6})_{0~5} - S -、- O - (CH₂)_{1~6} - S - (CH₂)_{1~6} - O -、- O - (CH₂)_{1~6} - O - (CH₂)_{1~6} - S -、- NR₆ -、- NR₆ - NR₇ -、- NR₆ - (CH₂)_{1~6} - NR₇ -、- NR₆ - (CH₂)_{1~6} - NR₇ - (CH₂)_{1~6} - NR₈ -、- NR₆ - C(O) -、- C(O) - NR₆ -、- C(O) - (CH₂)_{0~6} - NR₆ - (CH₂)_{0~6} - C(O) -、- NR₆ - (CH₂)_{0~6} - C(O) - (CH₂)_{1~6} - C(O) - (CH₂)_{0~6} - NR₇ -、- NR₆ - C(O) - NR₇ -、- NR₆ - C(NR₇) - NR₈ -、- O - (CH₂)_{1~6} - NR₆ - (CH₂)_{1~6} - S -、- S - (CH₂)_{1~6} - NR₆ - (CH₂)_{1~6} - O -、- S - (CH₂)_{1~6} - NR₆ - (CH₂)_{1~6} - S -、- NR₆ - (CH₂)_{1~6} - S - (CH₂)_{1~6} - NR₇ -、及び - SO₂ - (式中、R₆、R₇、及びR₈は、水素、C_{1~8}アルキル、C_{1~8}アルコキシ(C_{1~8})アルキル、カルボキシル(C_{1~8})アルキル、アミノ(C_{1~8})アルキル(式中、アミノは、水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ヒドロキシ(C_{1~8})アルキル、複素環(C_{1~8})アルキル、アリール(C_{1~8})アルキル、及びヘテロアリール(C_{1~8})アルキル(式中、上記の複素環、アリール、及びヘテロアリール置換基は、C_{1~8}アルキル、C_{1~8}アルコキシ、C_{1~8}アルコキシ(C_{1~8})アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C_{1~8})アルキル、アミノ(水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C_{1~8})アルキル(式中、アミノは、水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ)_{1~3}(C_{1~8})アルキル、(ハロ)_{1~3}(C_{1~8})アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ(C_{1~8})アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換されており;そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)からなる群から独立して選択される)からなる群から選択され;但し、A及びEが水素置換された炭素原子から選択された場合には、R₂は、- C_{2~8}アルキニル -、- O - (C_{1~8})アルキル - O -、- O - (C_{2~8})アルケニル - O -、- O - (C_{2~8})アルキニル - O -、- C(O) - (C_{1~8})アルキル - C(O) - (式中、上記のアルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも、C_{1~8}アルキル、C_{1~8}アルコキシ、C_{1~8}アルコキシ(C_{1~8})アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C_{1~8})アルキル、- C(O)O - (C_{1~8})アルキル、- C_{1~8}アルキル - C(O)O - (C_{1~8})アルキル、アミノ(水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C_{1~8})アルキル(式中、アミノは、水素及びC_{1~4}アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ)_{1~3}(C_{1~8})アルキル、(ハロ)_{1~3}(C_{1~8})アルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシ(C_{1~8})アルキル及びオキソからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換された直炭素鎖であり;そして式中、上記のアルキル、アル

10

20

30

40

50

ケニル、及びアルキニル結合基のいずれも複素環、アリール、ヘテロアリール、複素環 ($C_1 \sim 8$) アルキル、アリール ($C_1 \sim 8$) アルキル、ヘテロアリール ($C_1 \sim 8$) アルキル、スピロシクロアルキル、及びスピロ複素環 (式中、上記のシクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリール置換基のいずれも、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$)

10

アルキルからなる群から独立して選択された 1 個 ~ 4 個の置換基で場合により置換されており;そして式中、上記の複素環置換基のいずれも場合によりオキソで置換されている)からなる群から独立して選択された 1 個 ~ 2 個の置換基で場合により置換されている)、シクロアルキル (式中、シクロアルキルは、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキルからなる群から独立して選択された 1 個 ~ 4 個の置換基で場合により置換されている)

20

)、 $- (O - (CH_2)_{1 \sim 6})_{1 \sim 5} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- (O - (CH_2)_{1 \sim 6})_{1 \sim 5} - NR_6 -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 -$ 、 $- (O - (CH_2)_{1 \sim 6})_{0 \sim 5} - S -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - S - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - S -$ 、 $- NR_6 - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_7 - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_8 -$ 、 $- NR_9 - C(O) -$ 、 $- C(O) - NR_9 -$ 、 $- C(O) - (CH_2)_{0 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{0 \sim 6} - C(O) -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{0 \sim 6} - C(O) - (CH_2)_{1 \sim 6} - C(O) - (CH_2)_{0 \sim 6} - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - C(O) - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - C(NR_7) - NR_8 -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - S -$ 、 $- S - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- S - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - S -$ 及び $- NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - S - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_7 -$ (式中、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は、水素、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、複素環 ($C_1 \sim 8$) アルキル、アリール ($C_1 \sim 8$) アルキル、及びヘテロアリール ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、上記の複素環、アリール及びヘテロアリール置換基は、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは水素及び水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキルからなる群から独立して選択された 1 個 ~ 4 個の置換基で場合により置換されており;そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)よりなる群より独立して選ばれ;そして式中、 R_9 は、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、複素環 ($C_1 \sim 8$) アルキル、アリール ($C_1 \sim 8$) アルキル及びヘテロアリール ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、上記の複素環、アリール及びヘテロアリール置換

30

40

50

基は、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル、カルボキシル($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ(水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ($C_1 \sim 8$)アルキル(式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、ヒドロキシ及びヒドロキシ($C_1 \sim 8$)アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換され；そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)よりなる群より独立して選ばれる)よりなる群より選ばれ；並びに

R_1 及び R_3 は、水素、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_2 \sim 8$ アルケニル、 $C_2 \sim 8$ アルキニル(式中、アルキル、アルケニル及びアルキニルは、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、アルコキシ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル、カルボキシル($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ(水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ($C_1 \sim 8$)アルキル(式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、(ハロ) $_1 \sim 3$ 、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシ($C_1 \sim 8$)アルキル及びオキソからなる群から選択された置換基で場合により置換されている)、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルキルカルボニル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルキルチオ、アリール、ヘテロアリール(式中、アリール及びヘテロアリールは $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、アルコキシ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル、カルボキシル($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ(水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ($C_1 \sim 8$)アルキル(式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ($C_1 \sim 8$)アルキルからなる群から選択された置換基で場合により置換されている)、アミノ(水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で場合により置換されている)、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、及びニトロ、からなる群から独立して選択される]；及びそれらの薬学上許容し得る塩である。

10

20

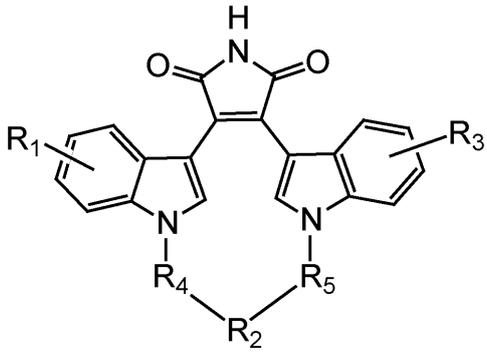
【0116】

一実施形態において、式(III)の化合物は、以下からなる群から選択される化合物

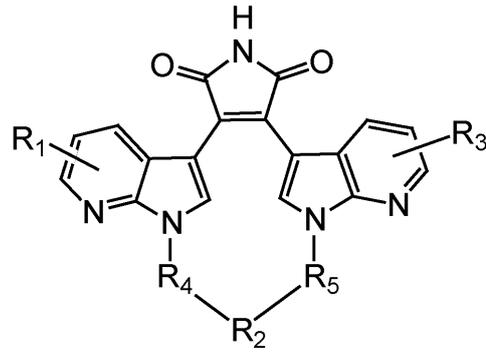
30

【0117】

【化 1 2】

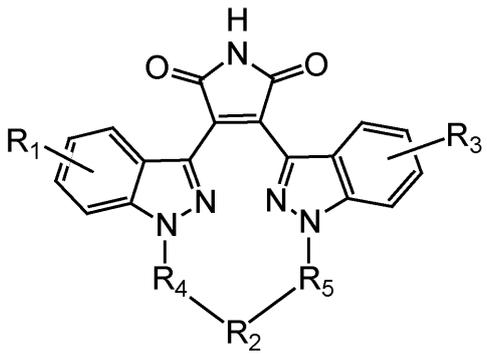


式 (I I I a)

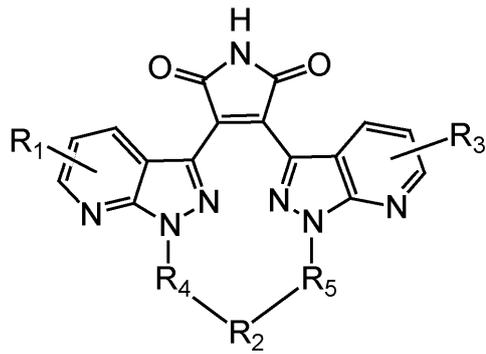


式 (I I I b)

10

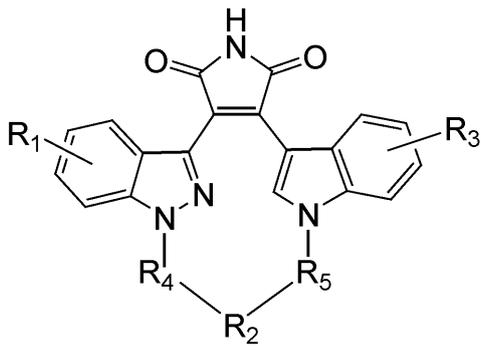


式 (I I I c)

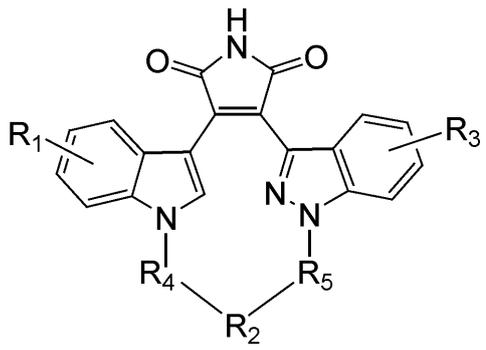


式 (I I I d)

20



式 (I I I e)

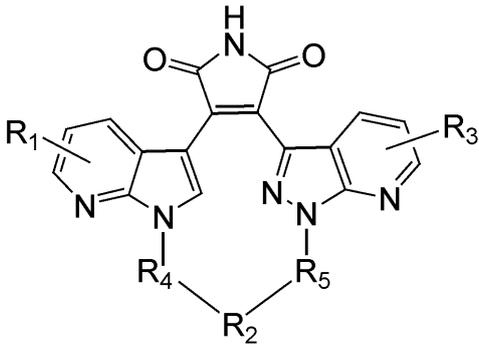


式 (I I I f)

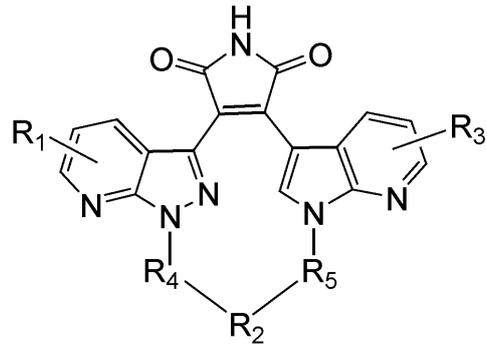
30

【 0 1 1 8】

【化 1 3】

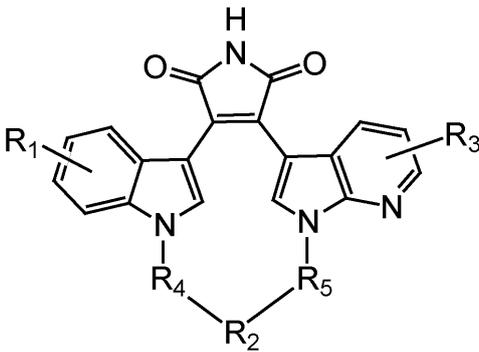


式 (III g)

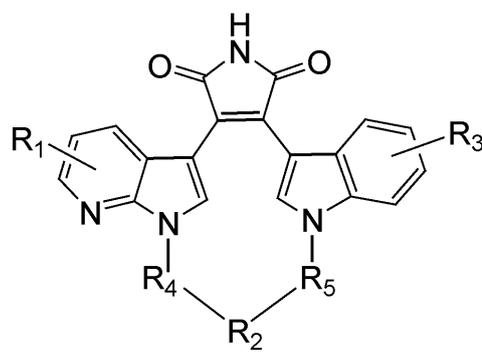


式 (III h)

10



式 (III i)

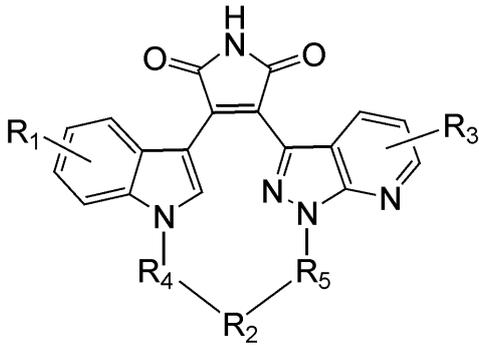


式 (III j)

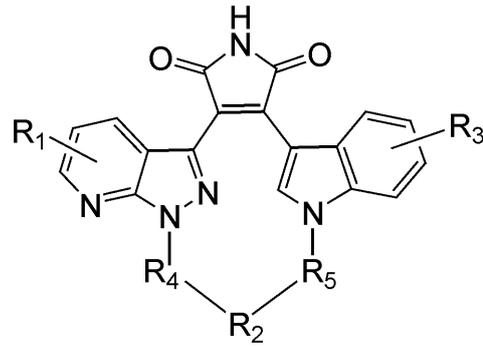
20

【0 1 1 9】

【化 1 4】

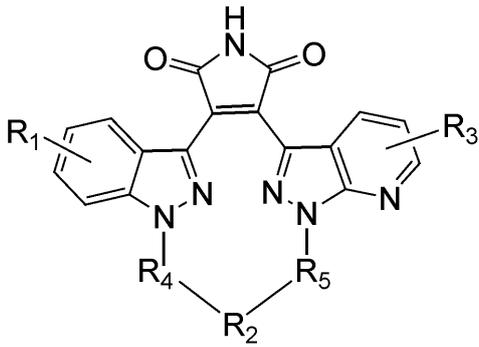


式 (III k)

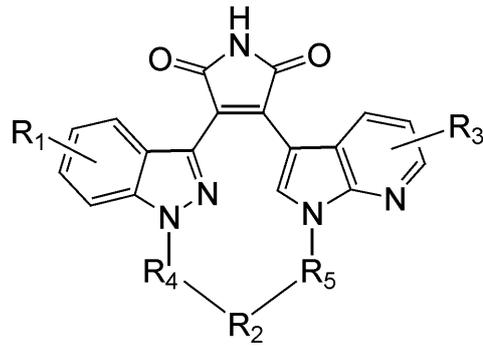


式 (III i)

10



式 (III m)



式 (III n)

20

(式中、すべてのその他の変数は前記に定義されている) ; 及びそれらの薬学上許容し得る塩である。

【0120】

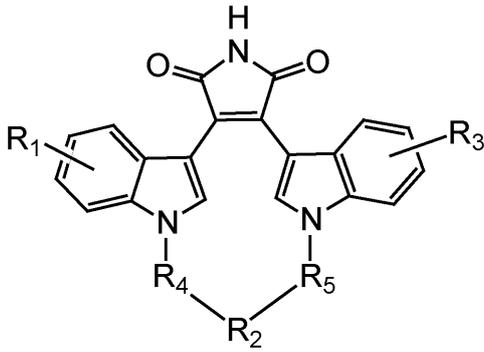
一実施形態において、式(III)の化合物は、以下からなる群から選択される化合物

:

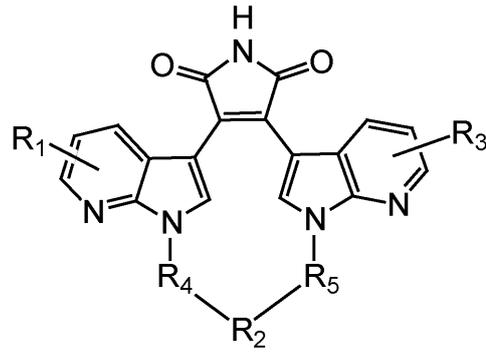
【0121】

30

【化 1 5】

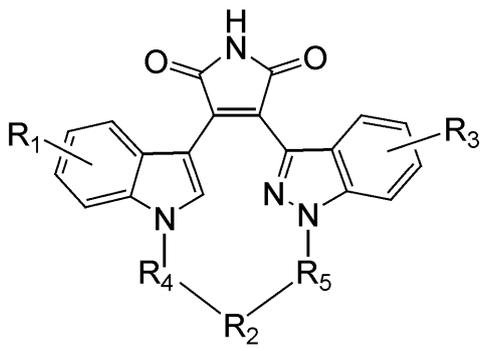


式 (I I I a)

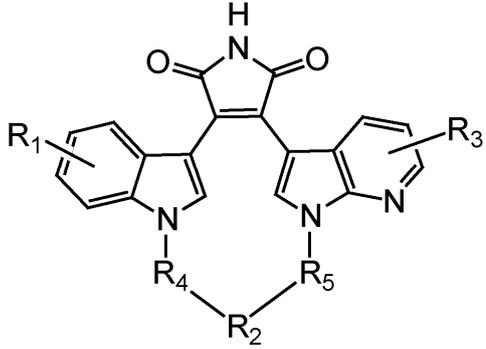


式 (I I I b)

10

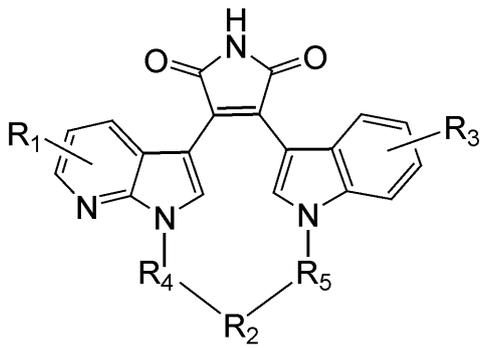


式 (I I I f)



式 (I I I i)

20



式 (I I I j)

30

(式中、すべてのその他の変数は前記に定義されている) ; 及びそれらの薬学上許容し得る塩である。

【 0 1 2 2】

式 (I I I) の化合物は、同一出願人による米国特許第 6 , 8 2 8 , 3 2 7 号に開示されており、該特許の完全な開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【 0 1 2 3】

本発明の実施例は式 (I I I) の化合物を含み、この化合物は次のものからなる群から選択される :

【 0 1 2 4】

【表 3 - 1】

化合物	名前
1	6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H-ジピリド[2, 3-k:3', 2'-q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19] トリオキサジアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
2	10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23-デカヒドロ-9, 4:24, 29-ジメテノ-1H-ジピリド[2, 3-n:3', 2'-t]ピロロ[3, 4-q][1, 4, 7, 10, 13, 22] テトラオキサジアザシクロテトラコシン-1, 3(2H)-ジオン、
3	10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26-ドデカヒドロ-9, 4:27, 32-ジメテノ-1H-ジピリド[2, 3-q:3', 2'-w]ピロロ[3, 4-t][1, 4, 7, 10, 13, 16, 25]ペンタオキサジアザシクロヘプタコシン-1, 3(2H)-ジオン、
4	6, 7, 9, 10, 12, 13-ヘキサヒドロ-20H-5, 23:14, 19-ジメテノ-5H-ジベンゾ[h, n]ピロロ[3, 4-k][1, 4, 7, 16]ジオキサジアザシクロオクタデシン-20, 22(21H)-ジオン、
5	6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19] トリオキサジアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
6	10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23-デカヒドロ-9, 4:24, 29-ジメテノ-1H-ジベンゾ[n, t]ピロロ[3, 4-q][1, 4, 7, 10, 13, 22] テトラオキサジアザシクロテトラコシン-1, 3(2H)-ジオン、
7	10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26-ドデカヒドロ-9, 4:27, 32-ジメテノ-1H-ジベンゾ[q, w]ピロロ[3, 4-t][1, 4, 7, 10, 13, 16, 25]ペンタオキサジアザシクロヘプタコシン-1, 3(2H)-ジオン、
8	12-ヒドロ-6H, 19H-5, 22:13, 18:7, 11-トリメテノピリド[2, 3-j]ピロロ[3, 4-m][1, 9]ベンゾジアザシクロヘプタデシン-19, 21(20H)-ジオン、
9	12-ヒドロ-6H, 19H-5, 22:13, 18-ジメテノ-7, 11-ニトリロピリド[2, 3-j]ピロロ[3, 4-m][1, 9]ベンゾジアザシクロヘプタデシン-19, 21(20H)-ジオン、
10	6, 7, 9, 10, 12, 13-ヘキサヒドロ-20H-5, 23:14, 19-ジメテノ-5H-ピリド[2, 3-k]ピロロ[3, 4-n][4, 7, 1, 10]ベンゾオキサジアザシクロオクタデシン-20, 22(21H)-ジオン、
11	6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H-ピリド[2, 3-n]ピロロ[3, 4-q][4, 7, 10, 1, 13]ペンツリオキサジアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
12	11-エチル-6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
13	6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-11-メチル-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
14	6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-11-(1-メチルエチル)-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
15	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16-デカヒドロ-8, 11, 14-トリメチル-6H, 23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H, 9H-ジベンゾ[n, t]ピロロ[3, 4-q][1, 4, 7, 10, 13]ペンタアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
16	6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-11-メチル-23H-5, 26-メテノ-17, 22-ニトリロ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、

10

20

【 0 1 2 5】

【表 3 - 2】

(上記表の続き)

化合物	名前
17	11-エチル-6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26-メテノ-17, 22-ニトリロ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
18	11-エチル-6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H, 9H-ジピリド[2, 3-k:3', 2'-q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
19	6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H-ジピリド[2, 3-k:3', 2'-q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサチアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
20	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16-デカヒドロ-(6H, 23H-5, 26:17, 22-ジメテノ)ジピリド[2, 3-n:3', 2'-t]ピロロ[3, 4-q][1, 7, 13]トリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
21	11-エチル-7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16-デカヒドロ-6H, 23H-5, 26:17, 22-ジメテノ)ジピリド[2, 3-n:3', 2'-t]ピロロ[3, 4-q][1, 7, 13]トリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15-デカヒドロ-22H-5, 25:16, 21-ジメテノ-5H-ジピリド[2, 3-m:3', 2'-s]ピロロ[3, 4-p][1, 6, 12]トリアザシクロエイコシン-22, 24(23H)-ジオン、
23	10-エチル-6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15-デカヒドロ-22H-5, 25:16, 21-ジメテノ-5H-ジピリド[2, 3-m:3', 2'-s]ピロロ[3, 4-p][1, 6, 12]トリアザシクロエイコシン-22, 24(23H)-ジオン、
24	7, 8, 9, 15, 16, 17, 18-ヘプタヒドロ-6H, 25H-5, 28:19, 24-ジメテノ-10, 14-ニトリロ)ジピリド[2, 3-b:3', 2'-h]ピロロ[3, 4-e][1, 10]ジアザシクロトリコシン-25, 27(26H)-ジオン、
25	7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16-ノナヒドロ-6H, 23H-5, 26:17, 22-ジメテノ)ジピリド[2, 3-b:3', 2'-h]ピロロ[3, 4-e][1, 10]ジアザシクロヘンエイコシン-12, 23, 25(24H)-トリオン、
26	7, 8, 9, 11, 12, 13, 14-ヘプタヒドロ-6H, 21H-5, 24:15, 20-ジメテノ)ジピリド[2, 3-b:3', 2'-h]ピロロ[3, 4-e][1, 10]ジアザシクロノナデシン-10, 21, 23(22H)-トリオン、
27	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15-デカヒドロ-7, 14-ジヒドロキシ-(7R, 14R)-22H-5, 25:16, 21-ジメテノ-5H-ジピリド[2, 3-b:3', 2'-h]ピロロ[3, 4-e][1, 10]ジアザシクロエイコシン-22, 24(23H)-ジオン、
28	6, 7, 9, 10, 12, 13-ヘキサヒドロ-20H-5, 23:14, 19-ジメテノ-5H-ジピリド[2, 3-h:3', 2'-n]ピロロ[3, 4-k][1, 4, 7, 16]ジオキサジアザシクロオクタデシン-20, 22(21H)-ジオン、
29	6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-11-(2-メチルエチル)-23H-5, 26-メテノ-17, 22-ニトリロ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、
30	6, 7, 10, 11, 12, 13, 15, 16-オクタヒドロ-11-(2-ヒドロキシエチル)-23H-5, 26:17, 22-ジメテノ-5H, 9H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 7, 4, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23, 25(24H)-ジオン、及び
31	6, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17-デカヒドロ-14-メチル-24H-5, 27:18, 23-ジメテノ-5H-ジベンゾ[l, r]ピロロ[3, 4-o][1, 4, 7, 11, 20]ジオキサトリアザシクロドコシン-24, 26(25H)-ジオン、

30

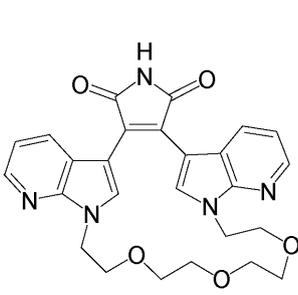
40

【 0 1 2 6】

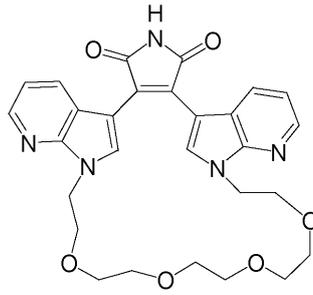
本発明の実施例は式 (I I I) の化合物を含み、この化合物は次のものからなる群から選択される。

【 0 1 2 7】

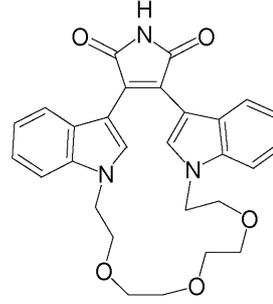
【化 1 6】



化合物 1

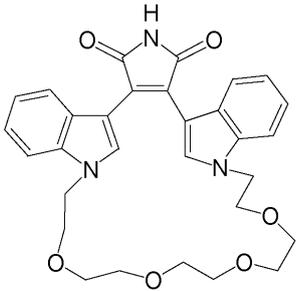


化合物 2



化合物 5

10



化合物 6

20

【 0 1 2 8】

本発明の別の実施例は、以下から成る群から選択される化合物を含む：

【 0 1 2 9】

【表 4 - 1】

化合物	名前
1a	追って提供される、
2a	3-[1-[3-[(2-ヒドロキシエチル)メチルアミノ]プロピル]-1H-インダゾール-3-イル]-4-[1-(3-ピリジニル)-1H-インドール-3-イル]-1H-ピロール-2,5-ジオン、
3a	3,5-ジクロロ-N-[3-クロロ-4-[(3,4,12,12a-テトラヒドロ-1H-[1,4]チアジノ[3,4-c][1,4]ベンゾジアゼピン-11(6H)-イル)カルボニル]フェニル]-ベンズアミド、
4a	3-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インドール-3-イル]-4-(1-ピリジン-3-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、
5a	3-(2-メトキシフェニル)-4-(1-ピリジン-3-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、
6a	6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリジニル]アミノ]エチル]アミノ]-3-ピリジンカルボニトリル、
7a	3-(5-クロロ-1-メチル-1H-インドール-3-イル)-4-[1-(3-イミダゾール-1-イル-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオン、
8a	3-(5-クロロ-1-メチル-1H-インドール-3-イル)-4-[1-(3-[1,2,3]トリアゾール-1-イル-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオン、
9a	3-[1-(3-ヒドロキシ-プロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、
10a	追って提供される、
11a	3-[1-(3-ヒドロキシ-3-メチル-ブチル)-1H-インダゾール-3-イル]-4-(1-ピリジン-3-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、
12a	3-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インダゾール-3-イル]-4-(1-ピリジン-5-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、
13a	3-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インドール-3-イル]-4-(1-ピリジン-5-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン、
14a	(11Z)-8,9,10,13,14,15-ヘキサヒドロ-2,6:17,21-ジ(メチノ)ピロロ[3,4-h][1,15,7]ジオキサザシクロトリコシン-22,24(1H,23H)-ジオン、
15a	3-(5-クロロ-1-ピリジン-3-イル-1H-インドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシ-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオン、
16a	3-(2-メトキシフェニル)-4-[1-(3-メトキシ-プロピル)-1H-ピロロ[3,2-c]ピリジン-3-イル]-ピロール-2,5-ジオン、
17a	3-[1-(3-ヒドロキシ-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-4-[1-(テトラヒドロ-ピラン-4-イル)-1H-インドール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオン、
18a	2-[3-[4-(5-クロロ-1-メチル-1H-インドール-3-イル)-2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル]-インダゾール-1-イル]-N-(2-ヒドロキシ-エチル)-アセトアミド、
19a	4-(3-クロロフェニル)-6-(3-ジメチルアミノ-プロピル)-5,6-ジヒドロ-4H-2,4,6-トリアザシクロペンタ[c]フッ素-1,3-ジオン、
20a	14-エチル-6,7,9,10,13,14,15,16-オクタヒドロ-12H,23H-5,26:17,22-ジメチノジベンゾ[k,q]ピロロ[3,4-n][1,4,7,10,19]ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン-23,25(24H)-ジオン、

30

40

【 0 1 3 0】

【表 4 - 2】

(上記表の続き)

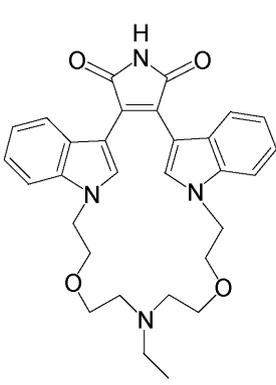
化合物	名前	
21a	14-ベンジル-6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16-オクタヒドロ-12H, 23H-5, 26:17, 22-ジ(メテノ)ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンイコシン-23, 25(24H)-ジオン、	
22a	3-(1-[2-[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エチル]-1H-インドール-3-イル]-4-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インドール-3-イル]-ピロール-2, 5-ジオン、	
23a	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13-オクタヒドロ-8, 11-ジメチル-5, 23:14, 19-ジメテノ-20H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10]テトラアザシクロオクタジシン-20, 22(21H)-ジオン、	
24a	7, 8, 9, 10, 12, 13, 16, 17, 18, 19-デカヒドロ-8, 17-ジメチル-15H, 26H-5, 29:20, 25-ジメテノ-6H-ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19, 22]ジオキサテトラアザシクロテトラコシン-26, 28(27H)-ジオン、	
25a	14-(2-フリルメチル)-6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16-オクタヒドロ-12H, 23H-5, 26:17, 22-ジ(メテノ)ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンイコシン-23, 25(24H)-ジオン、	
26a	14-(2-チエニルメチル)-6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16-オクタヒドロ-12H, 23H-5, 26:17, 22-ジ(メテノ)ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンイコシン-23, 25(24H)-ジオン、	10
27a	14-(1-ナフチルメチル)-6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16-オクタヒドロ-12H, 23H-5, 26:17, 22-ジ(メテノ)ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンイコシン-23, 25(24H)-ジオン、	
28a	14-(ピリジン-4-イルメチル)-6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 16-オクタヒドロ-12H, 23H-5, 26:17, 22-ジ(メテノ)ジベンゾ[k, q]ピロロ[3, 4-n][1, 4, 7, 10, 19]ジオキサトリアザシクロヘンイコシン-23, 25(24H)-ジオン、	
29a	3-[1-(2-[2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-ナフタレン-1-イルアミノ)-エトキシ]-エチル)-1H-インドール-3-イル]-4-[1-[2-(1, 2, 3, 4-テトラヒドロ-ナフタレン-1-イルアミノ)-エチル]-1H-インドール-3-イル]-ピロール-2, 5-ジオン、	
30a	3-[1-(3-ジメチルアミノフェニル)-1H-インドール-3-イル]-4-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2, 5-ジオン、	
31a	3-[5-クロロ-1-(6-ジメチルアミノピリジン-3-イル)-1H-インドール-3-イル]-4-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2, 5-ジオン、及び	
32a	5-(5-クロロ-3-[4-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インダゾール-3-イル]-2, 5-ジオキソ-2, 5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル]-インドール-1-イル)-ニコチン酸メチルエステル。	20

【 0 1 3 1 】

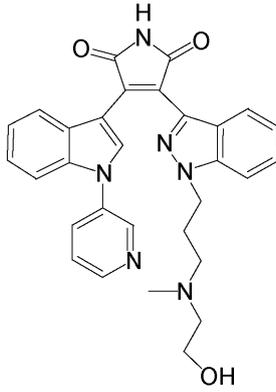
本発明の別の実施例は、以下からなる群から選択される。

【 0 1 3 2 】

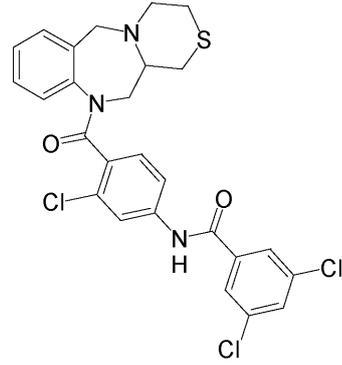
【化 1 7】



化合物 1 a

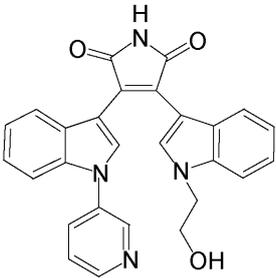


化合物 2 a

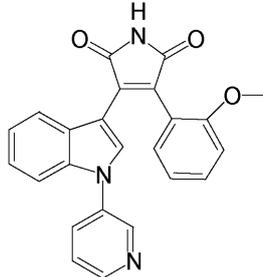


化合物 3 a

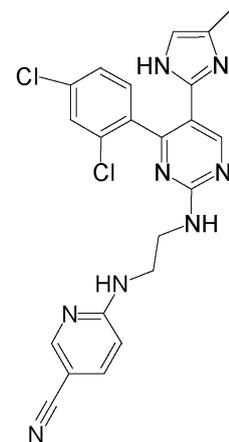
10



化合物 4 a

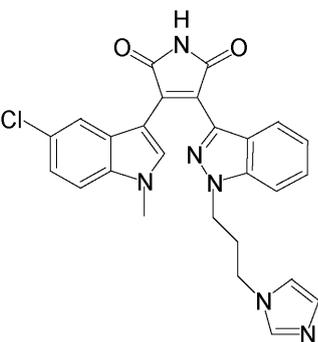


化合物 5 a

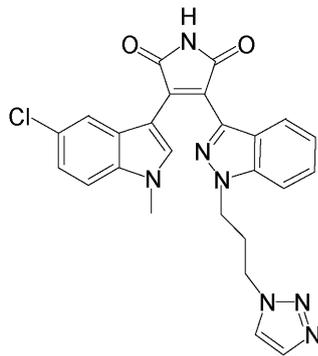


化合物 6 a

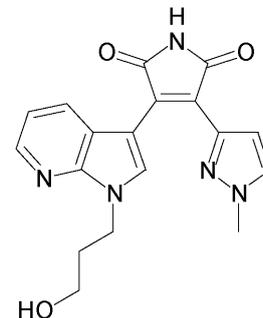
20



化合物 7 a



化合物 8 a



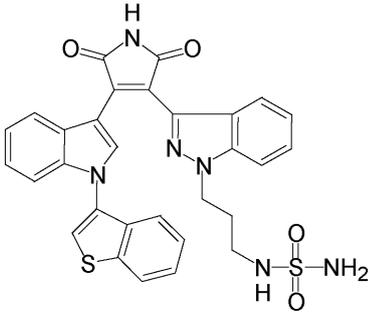
化合物 9 a

30

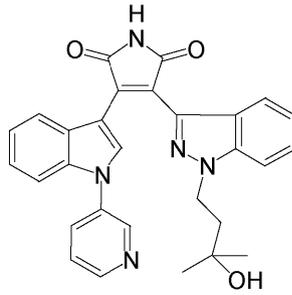
40

【 0 1 3 3】

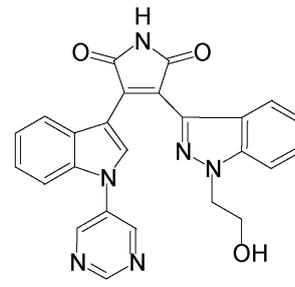
【化 1 8】



化合物 10 a

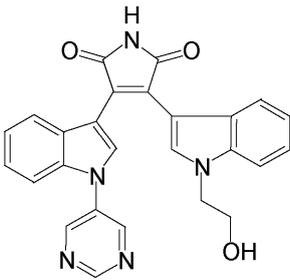


化合物 11 a

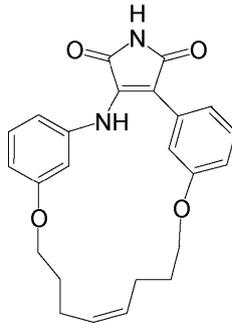


化合物 12 a

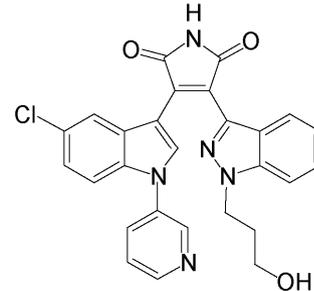
10



化合物 13 a

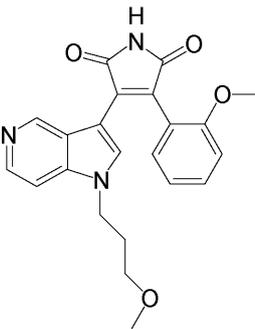


化合物 14 a

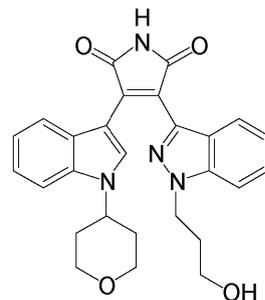


化合物 15 a

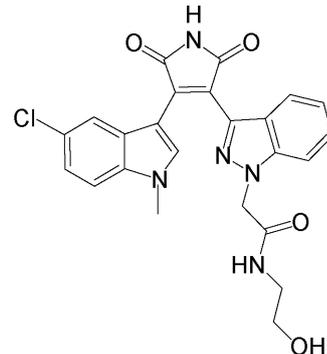
20



化合物 16 a



化合物 17 a

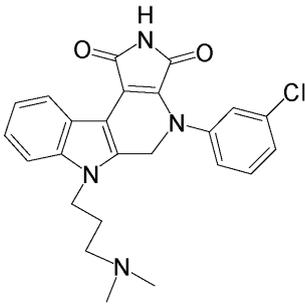


化合物 18 a

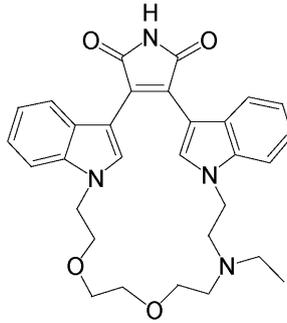
30

【 0 1 3 4】

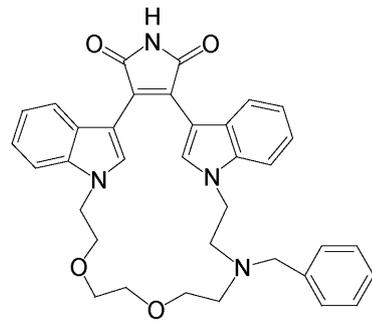
【化 1 9】



化合物 1 9 a

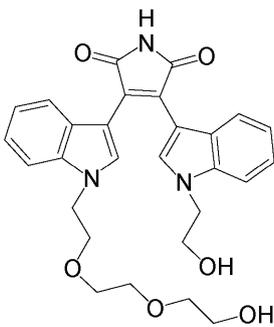


化合物 2 0 a

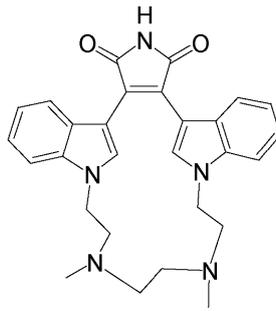


化合物 2 1 a

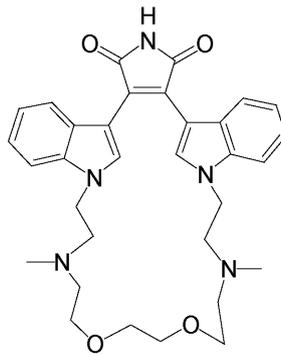
10



化合物 2 2 a

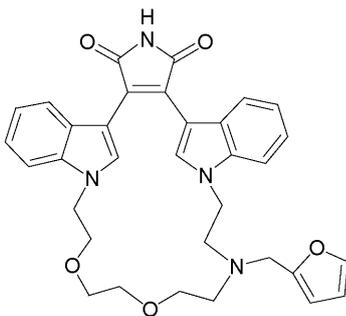


化合物 2 3 a

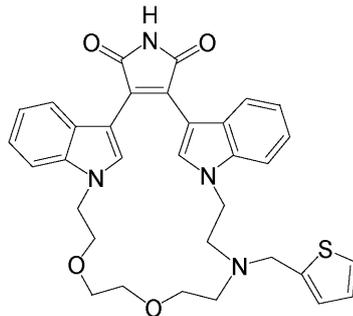


化合物 2 4 a

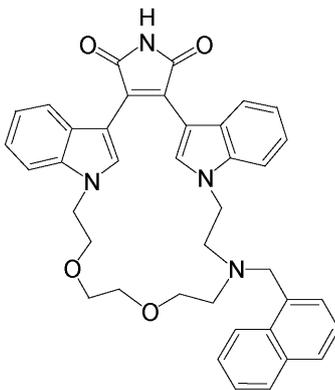
20



化合物 2 5 a



化合物 2 6 a

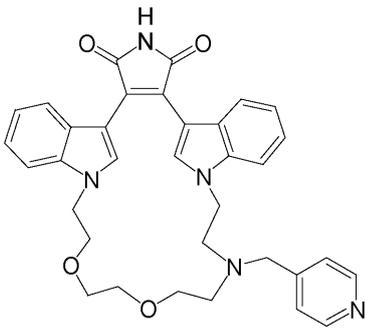


化合物 2 7 a

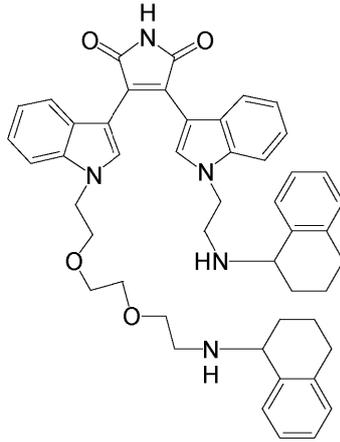
30

【 0 1 3 5】

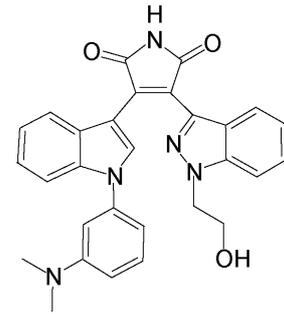
【化 2 0】



化合物 2 8 a

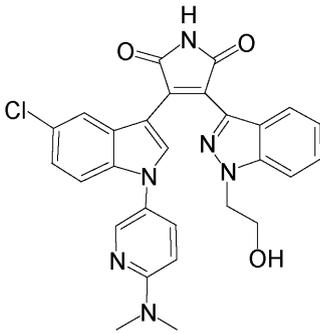


化合物 2 9 a

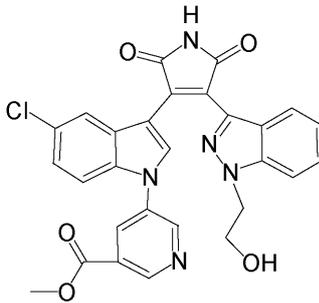


化合物 3 0 a

10



化合物 3 1 a



化合物 3 2 a

20

【 0 1 3 6】

本発明の方法による処理に好適な細胞

本発明で使用するのに好適な多能性細胞は、ABC G 2、クリプト、Fox D 3、Connexin 4 3、Connexin 4 5、Oct 4、SOX - 2、Nanog、h T E R T、U T F - 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、Tra 1 - 6 0、及び Tra 1 - 8 1 からなる群から選択される多能性マーカーの少なくとも1つを発現する。

30

【 0 1 3 7】

一実施形態において、多能性細胞は胚幹細胞である。代替的な実施形態において、多能性細胞は、胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞である。一実施形態において、胚幹細胞はヒト細胞である。

【 0 1 3 8】

ヒト胚幹細胞の分離、増殖及び培養

ヒト胚幹細胞の特長：ヒト胚幹細胞は、発生段階特異的胚性抗原（S S E A）3 及び 4 の1つ以上、及び Tra - 1 - 6 0 及び Tra - 1 - 8 1 と呼ばれる抗体を用いて検出可能なマーカーを発現し得る（Thomson et al.、Science 2 8 2 : 1 1 4 5 , 1 9 9 8）。インビトロでのヒト胚幹細胞の分化は、S S E A - 4、Tra - 1 - 6 0、及び Tra - 1 - 8 1 の発現（存在する場合）を消失させ、S S E A - 1 の発現を増大させる。未分化のヒト胚幹細胞は、通常、アルカリホスファターゼ活性を有し、この活性は、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、製造業者（Vector Laboratories、Burlingame Calif.）によって述べられるように Vector Red を基質として現像することによって検出することができる。未分化多能性幹細胞はまた、RT - PCR で検出されるように、一般に Oct - 4 及び T E R T も発現する。

40

50

【0139】

増殖したヒト胚幹細胞の他の望ましい表現型は、3つの全胚葉、即ち、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉組織の細胞に分化する可能性である。ヒト胚幹細胞の多能性は、例えば細胞をSCIDマウスに注入し、4%パラホルムアルデヒドを使用して、形成された奇形腫を固定した後、それらを3つの胚層からの細胞型の痕跡に関して組織学的に検査することにより確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を3つの胚葉に関連したマーカーの存在に関して評価することにより決定することができる。

【0140】

増殖させたヒト胚幹細胞系は、標準的なGバンド法を用いて核型を決定し、対応する霊長類種の公表されている核型と比較することができる。「正常な核型」を有する細胞を獲得することが望ましく、これは細胞が正倍数体であることを意味し、全ヒト染色体が存在しかつ著しく変更されてはいない。

10

【0141】

ヒト胚幹細胞の供給源：使用が可能なヒト胚幹細胞の種類としては、妊娠期間中の任意の時期（必ずしもではないが、通常は妊娠約10～12週よりも前）に採取した前胚性組織（例えば胚盤胞など）、胚性組織、胎児組織などの、妊娠後に形成される組織に由来するヒト胚細胞の樹立株が挙げられる。非限定的な例は、例えばヒト胚幹細胞株H1、H7、及びH9（WiCell）等のヒト胚幹細胞又はヒト胚生殖細胞の樹立株である。それらの細胞の最初の樹立又は安定化中に本開示の組成物を使用することも想定され、その場合、源となる細胞は、源となる組織から直接採取した一次多能性細胞であろう。フィーダー細胞の不在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞も好適である。例えば、BG01v（BresaGen、Athens、GA）等の変異ヒト胚幹細胞株も好適である。

20

【0142】

一実施形態において、ヒト胚幹細胞は、Thomsonら（米国特許第5,843,780号、Science 282:1145、1998年、Curr. Top. Dev. Biol. 38:133ff.、1998年、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844、1995年）に記載されているように調製される。

【0143】

ヒト胚幹細胞の培養：一実施形態において、ヒト胚幹細胞は、本質的にフィーダー細胞を含有しないが、それでもなお、実質的な分化を受けずにヒト胚幹細胞の増殖を支持する培養システムで培養される。分化をとまなわない無フィーダー細胞培養液中でのヒト胚幹細胞の増殖は、別の細胞種と予め培養することによって調整した培地を用いることで支持される。代替的に、無フィーダー培養液中での分化なしでのヒト胚幹細胞の増殖は、合成培地を使用して支持される。

30

【0144】

代替的な実施形態において、ヒト胚幹細胞は、様々な方法で胚幹細胞を支持する、初期培養されたフィーダー細胞層である。次に、ヒト胚を、本質的にフィーダー細胞を含有しないが、それでもなお、実質的な分化を受けずにヒト胚幹細胞の増殖を支持する培養システムに移す。

40

【0145】

本発明で使用するのに好適な馴化培地の例は、US20020072117、US6642048、WO2005014799、及びXu et al (Stem Cells 22:972~980、2004)に開示されている。

【0146】

本発明で使用するのに好適な合成培地の例は、US20070010011に見出すことができる。

【0147】

好適な培地は以下の構成要素、例えば、ダルベッコ修正イーグル培地（DMEM）、Gibco# 11965-092、ノックアウトダルベッコ修正イーグル培地（KO D

50

MEM)、Gibco# 10829-018、Ham's F12/50% DMEM 基本培地、200mM L-グルタミン、Gibco# 15039-027、非必須アミノ酸溶液、Gibco 11140-050、 β -メルカプトエタノール、Sigma # M7522、ヒト組み換え塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)、Gibco# 13256-029から作製されてもよい。

【0148】

一実施形態において、ヒト胚幹細胞は、本発明の方法により処理される前に、処理された好適な培養基質に播かれる。一実施形態において、処理は、例えば基底膜から誘導されたもの、又は接着分子受容体-リガンド結合の一部を形成し得るもの等の細胞外マトリクス成分である。一実施形態において、好適な培養基質は、Matrigel(登録商標)(Becton Dickinson)である。Matrigel(登録商標)は、Engelbreth-Holm-Swarm腫瘍細胞からの可溶性製剤であり、室温でゲル化して再構成された基底膜を形成する。

10

【0149】

他の細胞外マトリクス成分及び成分混合物は代替物として好適である。他の細胞外マトリクス成分及び成分混合物は、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、硫酸ヘパリンなどを、単独又は異なる組合せで含んでもよい。

【0150】

ヒト胚幹細胞は、細胞の生存、増殖、及び所望の特徴の維持を促進する培地の存在下、基質上に好適な分布にて播かれる。この特徴の全部は、播種分布に細心の注意を払うことから利益を得、当業者は容易に決定することができる。

20

【0151】

ヒト胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞の分離、増殖、及び培養

一実施形態において、多能性マーカーを発現する細胞は、次の過程を含む方法によってヒト胚幹細胞から誘導される：

- a. ヒト胚幹細胞を培養する過程、
- b. ヒト胚幹細胞を、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させる過程、及び
- c. 細胞を除去し、続いてこの細胞を、細胞を培養する前にタンパク質又は細胞外マトリクスで予め処理されていない組織培養基質上で、低酸素状態下で培養する過程。

30

【0152】

一実施形態において、多能性マーカーを発現する細胞は、次の過程を含む方法によってヒト胚幹細胞から誘導される：

- a. ヒト胚幹細胞を培養する過程、
- b. 細胞を除去し、続いてこの細胞を、タンパク質又は細胞外マトリクスで予め処理されていない組織培養基質上で、低酸素状態下で培養する過程。

【0153】

タンパク質又は細胞外マトリクスで予め処理されていない組織培養基質上における低酸素状態下での細胞培養

一実施形態では、細胞は、細胞外マトリクスでコーティングされていない組織培養基質上で、低酸素状態下で、約1~約20日間培養される。代替的な実施形態では、細胞は、細胞外マトリクスでコーティングされていない組織培養基質上で、低酸素状態下で、約5~約20日間培養される。代替的な実施形態では、細胞は、細胞外マトリクスでコーティングされていない組織培養基質上で、低酸素状態下で、約15日間培養される。

40

【0154】

一実施形態では、低酸素状態は約1% O_2 ~ 約20% O_2 である。代替的な実施形態では、低酸素状態は約2% O_2 ~ 約10% O_2 である。代替的な実施形態において、低酸素状態は約3% O_2 である。

【0155】

細胞は、血清と、アクチビンAと、Wntリガンドとを含有する培地で、タンパク質又

50

は細胞外マトリクスで予め処理されていない組織培養基質上で、低酸素状態下で培養される。あるいは、培地は、IGF-1を含有していてもよい。

【0156】

培地は、約2%～約5%の範囲内の血清濃度を有してもよい。代替的な実施形態において、血清濃度は約2%であってもよい。

【0157】

アクチビンAは、濃度約1pg/mL～約100μg/mLで使用されてもよい。代替的な実施形態において、濃度は、約1pg/mL～約1μg/mLであってもよい。別の代替的な実施形態において、濃度は、約1pg/mL～約100ng/mLであってもよい。別の代替的な実施形態において、濃度は、約50ng/mL～約100ng/mLであつてもよい。別の代替的な実施形態において、濃度は、約100ng/mLであってもよい。

10

【0158】

Wntリガンドは、Wnt-1、Wnt-3a、Wnt-5a及びWnt-7aからなる群から選択されてもよい。一実施形態において、Wntリガンドは、Wnt-1である。代替的な実施形態において、Wntリガンドは、Wnt-3aである。

【0159】

Wntリガンドは、濃度約1ng/mL～約1000ng/mLで使用されてもよい。代替的な実施形態において、Wntリガンドは、濃度約10ng/mL～約100ng/mLで使用されてもよい。一実施形態において、Wntリガンドの濃度は約20ng/mLである。

20

【0160】

IGF-1は、濃度約1ng/mL～約100ng/mLで使用されてもよい。代替的な実施形態において、GF-1は、濃度約10ng/mL～約100ng/mLで使用されてもよい。一実施形態において、IGF-1の濃度は約50ng/mLである。

【0161】

本発明の方法によって誘導される多能性マーカーを発現する細胞は、タンパク質又は細胞外マトリクスで予め処理されていない組織培養基質上において、低酸素状態下で、培養液中で増殖することができる。

【0162】

本発明の方法によって誘導される多能性マーカーを発現する細胞は、ABC G2、クリプト、FoxD3、Connexin43、Connexin45、Oct4、SOX-2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra1-60、及びTra1-81からなる群から選択される多能性マーカーの少なくとも1つを発現する。

30

【0163】

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞の更なる分化

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、当該技術分野の任意の方法によって、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させてもよい。

【0164】

例えば、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、D'AmourらNature Biotechnology 24、1392～1401(2006年)に開示されている方法に従って、臍臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。

40

【0165】

例えば、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞を、繊維芽細胞増殖因子及びKAAD-シクロパミンで処理した後、繊維芽細胞増殖因子及びKAAD-シクロパミンを含有する培地を除去し、続いて細胞をレチノイン酸と、繊維芽細胞増殖因子と、KAAD-シクロパミンとを含有する培地中で培養することにより、臍臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に更に

50

分化される。この方法の一例は、D'Amour et al, Nature Biotechnology, 24: 1392~1401, (2006)に開示されている。

【0166】

膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーは、Pdx1、HNF-1、PTF1a、HNF-6、HB9及びPROX1からなる群から選択される。本発明における使用に好適なものは、膵臓内胚葉系統の特徴を示す少なくとも1つのマーカーを発現する細胞である。本発明の一態様において、膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵臓内胚葉細胞である。

【0167】

膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞の更なる分化

膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、当技術分野の任意の方法により、膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化させてもよい。

【0168】

例えば、膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、D'AmourらNature Biotechnology 24、1392~1401(2006年)に開示されている方法に従って、膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化され得る。

【0169】

膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーは、NGN-3、NeuroD、Islet-1、Pdx-1、NKX6.1、Pax-4、Ngn-3、及びPTF-1からなる群から選択される。一実施形態において、膵臓内分泌細胞は、以下のホルモンの少なくとも1つを発現することができる。インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチド。本発明で使用するに好適なものは、膵臓内分泌系統の特徴を示すマーカーを少なくとも1つ発現する細胞である。本発明の一態様において、膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、膵臓内分泌細胞である。膵臓内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であってもよい。代替的に、膵臓内分泌細胞は、膵臓ホルモン分泌細胞であってもよい。

【0170】

本発明の一態様において、膵臓内分泌細胞は、細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞である。細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、Pdx1と、次の転写因子、即ち、NGN-3、Nkx2.2、Nkx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3、MAFA、Pax4、及びPax6の少なくとも1つを発現する。本発明の一態様では、細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞は、細胞である。

【0171】

胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現する細胞系統(linage)の検出

胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成は、以下の特定のプロトコルの前後に、マーカーの存在に関して試験することにより決定することができる。多能性幹細胞は、一般にそのようなマーカーを発現しない。したがって、多能性細胞の分化は、細胞がそれらの発現を開始した際に検出される。

【0172】

分化の効率は、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤(例えば、抗体等)に、処理した細胞集団を暴露することにより測定することができる。

【0173】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当技術分野にて標準的である。これらには、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、ノーザンブロット法、インサイツハイブリダイゼーション(例えば、Current Protocols in Molecular Biology(Ausubelら、eds. 2001年付録)参照)、及び切片材料の免疫組織学的解析等の免疫測定法、ウェスタンブロット、及び無傷細胞内に到達出来るマーカーに関して、フローサイト

10

20

30

40

50

メトリー分析 (FACS) (例えば、Harlow及びLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual、ニューヨーク: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998年) 参照) が含まれる。

【0174】

所定のタンパク質マーカーの検出に有用な抗体の例は、表IAに列挙されている。表IAに列挙した抗体により認識されるものと同じのマーカーに指向される代替的な抗体が利用可能であり、又は容易に開発し得ることに留意するべきである。それらの代替的な抗体を、本発明に従って単離された細胞内のマーカーの発現を評価するために、使用してもよい。

10

【0175】

例えば、多能性幹細胞の特徴は当業者に周知であり、多能性幹細胞の追加の特徴は、継続して同定されている。多能性幹細胞マーカーは、例えば、次のうちの1つ以上の発現を含む: ABCG2、クリプト、FoxD3、Connexin43、Connexin45、Oct4、Sox2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra1-60、Tra1-81。

【0176】

多能性幹細胞を本発明の方法で処理した後、処理した細胞集団を、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現される、例えばCXCR4等のタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤 (例えば、抗体等) に暴露することにより、分化した細胞を精製することができる。

20

【0177】

膵臓内胚葉系統 (lineage) に特徴的なマーカーを発現する細胞の検出

膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーは、当業者に周知であり、膵臓内胚葉系統の特徴を示す追加のマーカーが、継続して同定されている。これらのマーカーは、本発明に従って処理された細胞が分化して膵臓内胚葉系統の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用され得る。膵臓内胚葉系統に特異的なマーカーは、例えば、H1xb9、PTF-1a、PDX-1、HNF-6、HNF-1等の1つ以上の転写因子の発現を含む。

【0178】

分化の効率は、膵臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤 (例えば、抗体等) に、処理した細胞集団を暴露することにより測定することができる。

30

【0179】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当技術分野にて標準的である。これらには、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、ノーザンブロット法、インサイツハイブリダイゼーション (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、eds. 2001年付録) 参照)、及び切片材料の免疫組織学的解析等の免疫測定法、ウェスタンブロット、及び無傷細胞内に到達出来るマーカーに関して、フローサイトメトリー分析 (FACS) (例えば、Harlow及びLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual、ニューヨーク: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998年) 参照) が含まれる。

40

【0180】

所定のタンパク質マーカーの検出に有用な抗体の例は、表IAに列挙されている。表IAに列挙した抗体により認識されるものと同じのマーカーに指向される代替的な抗体が利用可能であり、又は容易に開発し得ることに留意するべきである。それらの代替的な抗体を、本発明に従って単離された細胞内のマーカーの発現を評価するために、使用してもよい。

【0181】

50

膵臓内分泌系統 (lineage) に特徴的なマーカーを発現する細胞の検出

膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーは、当業者に周知であり、膵臓内分泌系統の特徴を示す追加のマーカーが、継続して同定されている。これらのマーカーは、本発明に従って処理された細胞が分化して膵臓内分泌系統の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用され得る。膵臓内分泌系統に特異的なマーカーは、1つ以上の、例えば NGN-3、NeuroD、Islet-1等の転写因子の発現を含む。

【0182】

細胞系統の細胞に特徴的なマーカーは、当業者に周知であり、細胞系統の細胞の特徴を示す追加のマーカーが、継続して同定されている。これらのマーカーは、本発明に従って処理された細胞が分化して、細胞系統の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用し得る。細胞系統に特異的な特徴は、1つ以上の、中でも例えば、Pdx1 (膵臓及び十二指腸ホメオボックス遺伝子-1)、Nkx2.2、Nkx6.1、Isl1、Pax6、Pax4、NeuroD、Hnf1b、Hnf-6、Hnf-3、及びMafA等の転写因子の発現を含む。これらの転写因子は、内分泌細胞の確認に関して当技術分野にて定着している。例えば、Edlund (Nature Reviews genetics 3: 524~632 (2002年))を参照されたい。

10

【0183】

分化の効率は、膵臓内分泌系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤 (例えば、抗体等) に、処理した細胞集団を暴露することにより測定することができる。代替的に、分化の効率は、細胞系統に特徴的なマーカーを発現する細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤 (例えば、抗体等) に、処理した細胞集団を暴露することにより測定することができる。

20

【0184】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当技術分野にて標準的である。これらには、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、ノーザンブロット法、インサイツハイブリダイゼーション (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、eds. 2001年付録) 参照)、及び切片材料の免疫組織学的解析等の免疫測定法、ウェスタンブロット、及び無傷細胞内に到達出来るマーカーに関して、フローサイトメトリー分析 (FACS) (例えば、Harlow及びLane、Using Antibodies: A Laboratory Manual、ニューヨーク: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998年) 参照) が含まれる。

30

【0185】

所定のタンパク質マーカーの検出に有用な抗体の例は、表IAに列挙されている。表IAに列挙した抗体により認識されるものと同一のマーカーに指向される代替的な抗体が利用可能であり、又は容易に開発し得ることに留意するべきである。それらの代替的な抗体を、本発明に従って単離された細胞内のマーカーの発現を評価するために、使用してもよい。

40

【0186】

本発明を以下の実施例により更に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【実施例】

【0187】

(実施例1)

ヒト胚幹細胞の培養

幹細胞は、単一の細胞レベルにて自己複製し、分化して後代細胞を生成する、それら両方の能力で定義される未分化細胞であり、後代細胞には、自己複製前駆細胞、非再生前駆細胞、及び最終分化細胞が含まれる。幹細胞はまた、インビトロで複数の胚葉 (内胚葉、中胚葉及び外胚葉) から様々な細胞系統の機能的細胞に分化する能力によって、また移植

50

後に複数の胚葉の組織を生じ、胚盤胞への注入後、全部ではないとしても殆どの組織を提供する能力によっても、特徴付けられる。

【0188】

ヒト胚幹細胞株 H1、H7 及び H9 を WiCell Research Institute、Inc. (Madison, WI) から獲得し、供給元の研究所から提供された取扱説明書に従って培養した。手短には、細胞を、20% ノックアウト血清代替、100 nM MEM 非必須アミノ酸、0.5 mM β -メルカプトエタノール、4 ng/mL ヒト塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) を有する 2 mM L-グルタミン (全て Invitrogen/GIBCO より) で補充した DMEM/F12 (インビトロジェン/GIBCO) からなる ES 細胞培地中にてマウス胚線維芽細胞 (MEF) フィーダー細胞上で培養した。E13~13.5 マウス胚由来の MEF 細胞を Charles River から購入した。MEF 細胞を、10% FBS (Hyclone)、2 mM グルタミン、及び 100 mM MEM 非必須アミノ酸で補充した DMEM 培地中で増殖させた。サブコンフルエントな MEF 細胞培養物を 10 mg/mL のマイトマイシン C (Sigma, St. Louis, MO) により 3 時間処理して、細胞分割を停止させた後、トリプシン処理し、 $2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ で 0.1% ウシゼラチン-被覆皿上に播いた。継代 2~4 からの MEF 細胞をフィーダー層として使用した。MEF 細胞のフィーダー層に播いたヒト胚幹細胞を、加湿した組織培養インキュベーター内で 5% CO₂ 雰囲気中 37 °C で培養した。コンフルエントとなった際 (播いてから約 5~7 日後)、ヒト胚幹細胞を 1 mg/mL コラゲナーゼタイプ IV (インビトロジェン/GIBCO) により 5~10 分間処理し、次に 5 mL ピペットを使用して表面を穏やかに擦り落とした。細胞を 900 rpm で 5 分間回転させ、ペレットを再懸濁し、1:3~1:4 の細胞の比で新鮮培地に再び播いた。

10

20

【0189】

平行して、H1、H7、及び H9 ヒト胚幹細胞もまた、1:30 希釈の成長因子低減 Matrigel (商標) (BD Biosciences) でコーティングされているプレートに播種し、8 ng/mL の bFGF で補充された MEF 馴化培地で培養した。Matrigel (商標) 上で培養した細胞を、コラゲナーゼ IV (Invitrogen/GIBCO)、Dispase (BD Biosciences) 又は Liberase enzyme (Source) と共にルーチン的に継代させた。ヒト胚幹細胞培養物の一部を低酸素状態下 (約 3% O₂) でインキュベートした。

30

【0190】

(実施例 2)

ヒト胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞の誘導及び培養

ヒト胚幹細胞系 H1 及び H9 由来の種々の継代数 (継代 30~54) の細胞を、低酸素状態下 (約 3% O₂) で少なくとも 3 継代の間培養した。細胞は、8 ng/mL の bFGF で補充された MEF-CM 中で培養され、実施例 1 に従って Matrigel でコーティングされたプレートに播かれた。

【0191】

次に、細胞を、0.5% の FBS、20 ng/mL の WNT-3a (Catalog # 1324-WN-002, RD Systems, MN) 及び 100 ng/mL のアクチビン A (RD Systems, MN) で補充した DMEM/F12 培地で 2 日間処理し、続いて 2% の FBS 及び 100 ng/mL のアクチビン A (AA) で補充した DMEM/F12 培地で更に 3~4 日間処理した。このプロトコルは、胚体内胚葉マーカーの有意な増加をもたらした。

40

【0192】

次に、細胞は、TrypLE (商標) Express 溶液 (Invitrogen, CA) で 5 分間処理された。放出された細胞を DMEM-F12 + 2% FBS 培地で再懸濁し、遠心分離によって回収し、血球計を用いてカウントした。放出された細胞を、組織培養ポリスチレン (TCPS) で処理されたフラスコに、1000-10,000 細胞/cm² で播種し、DMEM-F12 + 2% FBS + 100 ng/mL アクチビン A + 2

50

0 ng/mL Wnt-3Aの中で、低酸素状態（約3% O₂）下において37℃で標準組織培養インキュベーター中で培養した。TCPSフラスコは、MATRIGEL又はその他の細胞外マトリクスタンパク質でコーティングされていなかった。培地は毎日交換された。いくつかの培養物において、培地は、10-50 ng/mLのIGF-I（インスリン成長因子-I、RD Systems, MNより入手）又は1X ITS（インスリン、トランスフェリン、及びセレン、Invitrogen, CAより入手）で更に補充された。培養条件の一部において、基本培地（DM-F12+2% FBS）は、0.1 mMのメルカプトエタノール（Invitrogen, CA）及び非必須アミノ酸（1X, NEAA, Invitrogen, CAより入手）で更に補充された。

【0193】

培養後5~15日目に、老化して見える多数の巨細胞に囲まれた明確な細胞群体が出現した。約50~60%コンフルエンスの時点で、TrypLE（商標）Express溶液に室温で5分間暴露させることによって培養物を継代させた。放出された細胞は、DMEM-F12+2% FBS培地で再懸濁し、遠心分離によって回収し、組織培養ポリスチレン（TCPS）で処理されたフラスコに10,000細胞/cm²でDMEM-F12+2% FBS+100 ng/mLアクチビンA+20 ng/mL Wnt-3A+/-50 ng/mL IGF-Iの中に播種した。この培地は以後「培養基」とも呼ぶ。

【0194】

（実施例3）

多能性マーカーを発現する細胞のヒト胚幹細胞の単個細胞浮遊液からの誘導

ヒト胚幹細胞系H1P33及びH9P45からの細胞を、低酸素状態（約3% O₂）下で少なくとも3継代の間培養した。細胞は、8 ng/mLのbFGFで補充されたMEF-CM中で培養され、実施例1に従ってMATRIGELコーティングされたプレートに播かれた。約60%コンフルエンスの時点で、培養物はTrypLE（商標）Express溶液（Invitrogen, CA）に5分間暴露された。放出された細胞をDMEM-F12+2% FBS培地で再懸濁し、遠心分離によって回収し、血球計を用いてカウントした。放出された細胞を、組織培養ポリスチレン（TCPS）で処理されたフラスコに、1000~10,000細胞/cm²で播種し、DM-F12+2% FBS+100 ng/mLアクチビンA+20 ng/mL Wnt-3A+50 ng/mL IGF-I+0.1 mMメルカプトエタノール（Invitrogen, CA）及び非必須アミノ酸（1X, NEAA, Invitrogen, CAより入手）の中で、低酸素状態（約3% O₂）下において37℃で標準組織培養インキュベーター中で培養した。TCPSフラスコは、MATRIGEL又はその他の細胞外マトリクスタンパク質でコーティングされていなかった。培地は毎日交換された。第1継代細胞をP1と呼ぶ。

【0195】

（実施例4）

ヒト胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞の増殖に有用な種々の培養基

ヒト胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞は、以下の培地組成物中において少なくとも2~30継代の培養に成功した。

1. DM-F12+2% FBS+100 ng/mL AA+20 ng/mL Wnt-3A
2. DM-F12+2% FBS+100 ng/mL AA+20 ng/mL Wnt-3A+50 ng/mL IGF-I
3. DM-F12+2% FBS+100 ng/mL AA+20 ng/mL Wnt-3A+10 ng/mL IGF-I
4. DM-F12+2% FBS+50 ng/mL AA+20 ng/mL Wnt-3A+50 ng/mL IGF-I
5. DM-F12+2% FBS+50 ng/mL AA+10 ng/mL Wnt-3A+50 ng/mL IGF-I
6. DM-F12+2% FBS+50 ng/mL AA+20 ng/mL Wnt-

10

20

30

40

50

3 A + 10 ng / mL IGF - I

7 . DM - F 1 2 + 2 % FBS + 100 ng / mL AA + 10 ng / mL Wnt
- 3 A + 10 ng / mL IGF - I

8 . HEScGRO合成培地 (Chemicon , CA)

【 0 1 9 6 】

上記で列挙された培地の基礎組成物は、RPMI、DMEM、CRML、Knockout (商標) DMEM、及びF12などの同様の培地で置き換えられてもよい。

【 0 1 9 7 】

(実施例 4)

GSK - 3 の酵素活性阻害剤が多能性マーカーを発現する細胞の生存率に与える影響
多能性マーカーを発現する細胞の誘導及び維持を、実施例2に記載された通りに行った
。細胞は、2% FCS (Invitrogen)、100 ng / mLアクチビンA、2
0 ng / mL Wnt - 3 a、及び50 ng / mL IGF (RD Biosystems)
で補充されたDMEM : F12で増殖させた。細胞を、Falconポリスチレンプラス
チックに密度10,000細胞/cm²で播種し、37、5%CO₂、低酸素において単層
培養で増殖させた。60~70%コンフルエンスに達した後、PBSで単層を洗い、かつ
TrypLE (Invitrogen)で3~5分間でインキュベートして剥離及び単一
細胞分散させることによって、細胞を継代させた。

10

【 0 1 9 8 】

小分子の商標ライブラリーからGSK - 3 Bの酵素活性を阻害する能力に関して選択さ
れた試験化合物を使用して、スクリーニングを行った。このライブラリーからの化合物は
、96ウェルプレートのフォーマットの50 mM HEPES、30% DMSO中の1
mMストックとして利用することができた。アッセイのため、多能性マーカーを発現する
細胞を洗浄し、カウントし、かつ、96ウェルの底が透明で色の濃いウェルプレート (C
ostar)にウェルあたり20,000細胞の播種密度で通常の培養液中に播いた。こ
の播種密度は、一晚培養物で最適な単層形成を得るために予め決定された。翌日、培養液
を除去し、細胞単層をPBSで3回すすぎ、試験化合物を、最終アッセイ濃度10 μMと
なるようにそれぞれアッセイ培地で希釈した80 μLアリコートでウェルに添加した。ア
ッセイ2日目に、培地を各ウェルから除去して、アッセイ培地で希釈した新しいアリコ
ートの試験化合物と交換した。1日目及び2日目のアッセイ培地は、0.5% FCS及び1
00 ng / mLアクチビンAで補充されたDMEM : F12で構成された。培養3日及び
4日目に、培地を各ウェルから除去して、2% FCS及び100 ng / mLアクチビン
Aで補充されたDMEM : F12 (試験化合物なし)と交換した。アッセイ4日目に、1
5 μLのMTS (Promega)を各ウェルに添加し、SpectraMax (Mol
ecular Devices)装置によって490 nmで光学密度を読み取りとる前に
、プレートを37で1.5~4時間インキュベートした。平均、標準偏差、及び変動係
数からなる統計的測定値を各二重セットごとに計算した。陽性対照 (培養1日及び2日目
にアクチビンA及びWnt3aで処理されたウェル) に対する各試験ウェルごとの毒性を
計算した。

20

30

【 0 1 9 9 】

表IIは、全スクリーニング結果を集めたものである。このアッセイでは多能性マ
ーカーを発現する細胞は当初コンフルエント単層として播かれたので、この結果は4日間の培
養期間にわたる毒性測定を表している。結果は対照の生存率の割合として表され、10 μ
Mスクリーニング濃度で使用されたある化合物の可変毒性を示している。この細胞を用い
たアッセイでは、化合物の割合が多いと、毒性は最小又は測定不可能となる。

40

【 0 2 0 0 】

選択した化合物の小パネルを、多能性マーカーを発現する細胞を用いて上記と同様のア
ッセイにおいて狭い用量漸増範囲にわたって繰り返し試験した。表IIIはこれらの結果
をまとめたものであり、様々な毒性及び非毒性化合物に対する可変用量漸増効果を示して
いる。

50

【0201】

(実施例5)

高含量スクリーニングアッセイを用いて測定したGSK-3の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞の分化及び増殖に与える影響

ヒト胚幹細胞(H9系)の維持を実施例1に記載の通りに実施した。細胞コロニーを、平均して4日ごとに継代させて未分化多能性状態のまま維持した。継代は、細胞培養物をコラゲナーゼ溶液(1mg/mL; Sigma-Aldrich)に37で10~30分間暴露し、続いてピペットの先端で穏やかに擦り落として細胞塊を回収することによって行われた。塊を重力によって沈降させ、続いて洗浄して残留コラゲナーゼを除去した。細胞塊を、ルーチン維持培養用に1:3の比、又は直接アッセイ用に1:1の比で分割した。用いたヒト胚幹細胞系は継代50未満の継代数に維持され、正常核型の表現型及びマイコプラズマ汚染の欠如に関してルーチン的に評価された。

10

【0202】

アッセイで用いる細胞塊を通常の培養液で均一に再懸濁し、MATRIGELでコーティングされた96ウェルPackard VIEWPLATES(PerkinElmer)に100µL/ウェルの容量で播いた。8ng/mLのbFGFで補充されたMEF調整培地を初期播種及び回収に用いた。各ウェルから使用済みの培養液を吸引し、かつ同量の新しい培地と交換することによって、毎日の栄養補給を行った。プレートは、アッセイ期間中ずっと加湿した箱の中に入れて37、5%CO₂に保たれた。

20

【0203】

小分子の商標ライブラリーからGSK-3Bの酵素活性を阻害する能力に関して選択された試験化合物を使用して、スクリーニングを行った。このライブラリーからの化合物は、96ウェルプレートのフォーマットの50mM HEPES、30%DMSO中の1mMストックとして利用することができた。スクリーニング化合物は三重又は二重セットで試験された。各ウェルから培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去して一次スクリーニングアッセイを開始した。0.5%FCS(Hyclone)と、100ng/mLアクチビンA(RD Biosystems)とで補充されたDMEM:F12基本培地(Invitrogen)と、試験化合物10µMとを含有するウェル当たり80~100µLの試験量を加え戻した。陽性対照ウェルは同じ基本培地を収容したが、試験化合物を10~20ng/mLのWnt3a(RD Biosystems)で置き換えた。陰性対照ウェルは、0.5%FCS及びアクチビンAのみ(AAのみ)を有する、あるいは、アクチビンA若しくはWnt3aなしに0.5%FCSを有する(未処理)基本培地を収容した。アッセイ2日目にウェルを吸引し、同一溶液を再度供給した。3日及び4日目に、全アッセイウェルは吸引され、2%FCS及び100ng/mLアクチビンAで補充された(試験化合物又はWnt3aを有さない)DMEM:F12に変更され、一方、平行陰性対照ウェルは、2%FCS及びアクチビンAのみ(AAのみ)を有する、あるいは、アクチビンAなしに2%FCSを有する(未処理)DMEM:F12に維持された。

30

【0204】

培養の最後に、96ウェルプレートの中の細胞を4%パラホルムアルデヒドで室温で20分間固定し、PBSで3回洗浄し、次に0.5%Triton X-100を用いて室温で20分間透明処理した。あるいは、細胞を氷冷70%エタノールで-20で一晩固定し、PBSで3回洗浄し、次に0.5%Triton X-100を用いて4で5分間透明処理した。固定及び透明処理の後、細胞をPBSで再度3回洗浄し、次に、室温で30分間PBS中において4%ニワトリ血清(Invitrogen)でブロックした。一次抗体(ヤギ抗ヒトSox17及びヤギ抗ヒトHnf-3; RD Systems)を4%ニワトリ血清で1:100に希釈し、細胞に室温で1時間添加した。Alexa Fluor 488共役二次抗体(ニワトリ抗ヤギIgG; Molecular Probes)をPBSで1:200に希釈し、細胞をPBSで3回洗浄した後に添加した。細胞核を対比染色するために、5mMのDraq5(Alexis Biochemica

40

50

1 s) を室温で5分間添加した。細胞をPBSで一度洗浄し、画像化するために100 mL / ウェルPBS中に放置した。

【0205】

Dracq5及びAlexa Fluor 488で染色された細胞用の二色性を利用するIN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare)を使用して細胞を撮像した。暴露時間は、陽性対照ウェル、及び未処理の陰性対照のみに関しては二次抗体を有するウェルを使用して最適化された。処理及び染色手順の間のあらゆる細胞消失を補償するために、1ウェル当たり12の領域を得た。Sox-17及びHnf-3に関する全細胞数及び全細胞強度を、IN Cell Developer Tool box 1.6 (GE Healthcare)ソフトウェアを使用して測定した。グレイスケール・レベル(基準線範囲100~300)及び核サイズに基づいて、細胞核のセグメンテーションを決定した。平均値及び標準偏差を複製に関して計算した。全タンパク質発現量は、細胞×細胞の面積の全蛍光量として定義される全強度又は積分強度として報告された。300~3000のグレイスケール範囲、及び0.4以上の形状因子の判定基準に基づいて背景を消去した。全強度データは、各ウェルごとの全強度をWnt3a / アクチピンA陽性対照の平均全強度で割って正規化された。各複製セットごとの平均値及び標準偏差に関する正規化データが計算された。

10

【0206】

表IVは、全スクリーニング結果をまとめて示している。表Vは、このスクリーニングのヒットの一覧である。強いヒットは対照値の120%以上と定義され、中程度のヒットは対照値の60~120%の区間内に含まれると定義されている。有意な数の化合物がこのアッセイにおいて両方の増殖反応を誘導する。同時に、Sox17及びHnf-3b転写因子のタンパク質発現量で測定した場合、有意な数の化合物がこのアッセイにおいて分化を誘発する。

20

【0207】

(実施例6)

プレートリーダーアッセイを用いて測定されたGSK-3の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞の増殖に与える影響

ヒト胚幹細胞(H9又はH1系)の維持を実施例1に記載の通りに実施した。細胞コーナーを、平均して4日ごとに継代させて未分化多能性状態のまま維持した。継代は、細胞培養物をコラゲナーゼ溶液(1mg/mL; Sigma-Aldrich)に37°Cで10~30分間暴露し、続いてピペットの先端で穏やかに擦り落として細胞塊を回収することによって行われた。塊を沈降させ、洗浄して残留コラゲナーゼを除去した。細胞塊を、ルーチン維持培養用に1:3の単層部分比、又は直接アッセイ用に1:1の比で分割した。これら実施例で用いたヒト胚幹細胞系は継代50未満の継代数に維持され、正常核型の表現型、並びにマイコプラズマ汚染の欠如に関してルーチン的に評価された。

30

【0208】

アッセイで使用する細胞塊を通常の培養液で均一に再懸濁し、MATRIGELでコーティングされた96ウェルPackard VIEWPLATES (PerkinElmer)に100µL / ウェルの容量で播いた。8ng/mLのbFGFで補充されたMEF調整培地を初期播種及び回収に用いた。各ウェルから使用済みの培養液を吸引し、かつ同量の新しい培地と交換することによって、毎日の栄養補給を行った。プレートは、アッセイ期間中ずっと加湿した箱の中に入れて37°C、5% CO₂に保たれた。

40

【0209】

各ウェルから培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去して一次スクリーニングアッセイを開始した。0.5% FCS (HyClone)と、100ng/mLアクチピンA (RD Biosystems)とで補充されたDMEM:F12基本培地(Invitrogen)と、試験化合物10µMとを含有するウェル当たり80~100µLの試験量を加え戻した。陽性対照ウェルは同じ基本培地を収容したが、10~20ng/mLのWnt3a (RD Biosystems)で置き換え

50

た。陰性対照ウェルは、アクチビンA又はWnt3aなしに0.5% FCSを有する基本培地を収容した。スクリーニング化合物は三重に試験された。アッセイ2日目にウェルを吸引し、同一溶液を再度供給した。3日及び4日目に、2% FCSを有するDMEM:F12基本培地に維持された陰性対照ウェルを除いて、全アッセイウェルは吸引されて、2% FCS及び100 ng/mLアクチビンAで補充されたDMEM:F12に変更された。

【0210】

アッセイ4日目に、15~20 µLのMTS (Promega)を各ウェルに添加し、プレートを37 °Cで1.5~4時間インキュベートした。Molecular Devicesの光分析装置のプレートリーダーを使用して、OD490における濃度計測定値を測定した。複製セットの平均測定値を標準偏差及び変動係数とともに計算した。増殖の目安として対照値の割合を計算するために、実験ウェルをアクチビンA/Wnt3a陽性対照と比較した。

10

【0211】

表VIは、全スクリーニング結果をまとめて示している。表VIIは、このスクリーニングのヒットの一覧である。強いヒットは対照値の120%以上と定義され、中程度のヒットは対照値の60~120%の区間内に含まれると定義されている。有意な数の化合物がこのアッセイにおいて増殖反応を誘導する。

【0212】

(実施例7)

GSK-3 酵素阻害剤がヒト胚幹細胞の分化及び増殖に与える影響：リード化合物の用量漸増

20

一次スクリーニングで同定されたヒットの活性を確認し、かつ用量漸増によって活性範囲を更に分析することが重要であった。一次スクリーニングヒットの選択的サブセットの新しいサンプルを乾燥粉末として入手し、可溶化して新しいストック試薬を作り、二次確認アッセイで希釈してヒト胚幹細胞への影響を評価した。

【0213】

2つの株のヒト胚幹細胞(H1及びH9)の培養を実施例1に記載の通りに実施した。細胞コロニーを、DMEM:F12で1:30に希釈されたMATRIGEL(商標)を用いてmatrigel(商標)(Invitrogen)でコーティングされたポリスチレンプラスチック上で未分化多能性状態のまま維持した。細胞は平均して4日ごとの酵素継代によって分割された。継代は、細胞単層をコラゲナーゼ溶液(1 mg/mL; Sigma-Aldrich)に37 °Cで10~60分間暴露し、続いてピペットの先端で穏やかに擦り落として細胞塊を回収することによって行われた。塊を重力によって沈降させ、続いて洗浄して残留コラゲナーゼを除去した。細胞塊を、維持培養用に1:3の比、又は後続アッセイ用に1:1の比で分割した。ヒト胚幹細胞系は継代50未満に維持され、正常核型の表現型及びマイコプラズマ汚染の欠如に関してルーチン的に評価された。

30

【0214】

アッセイ用細胞の調製：アッセイで用いるH1又はH9胚幹細胞系の細胞塊を培養液で均一に再懸濁し、Matrigel(商標)でコーティングされた96ウェルPackard VIEWPLATES(PerkinElmer)に100 µL/ウェルの容量で播いた。8 ng/mLのbFGFで補充されたMEF調整培地を初期播種及び増殖に用いた。各ウェルから使用済みの培養液を吸引し、かつ同量の新しい培地と交換することによって、毎日の栄養補給を行った。アッセイを開始する前に、培養物を播種後1~3日間増殖させた。プレートは、アッセイ期間中ずっと加湿した箱の中に入れられて37 °C、5% CO₂に保たれた。

40

【0215】

化合物及びアッセイ培地の調製：一次スクリーニングで得たヒットのサブセットを、追跡調査及び後続の二次アッセイに用いた。乾燥粉末として入手可能な12の化合物を、DMSO中に10 mMストックとして可溶化し、-20 °Cで脱水して使用するまで保管した

50

。アッセイ直前に、化合物ストックを0.5% FCS (HyClone) 及び100 ng/mL アクチビンA (RD Biosystems) で補充されたDMEM:F12基本培地 (Invitrogen) で1:1000に希釈して10 µM試験化合物を作った。これを更に、同様に0.5% FCS (HyClone) 及び100 ng/mL アクチビンA (RD Biosystems) で補充されたDMEM:F12基本培地で連続して倍数希釈して各化合物ごとに7点希釈曲線を作った。

【0216】

二次スクリーニングアッセイ：アッセイは、各ウェルの細胞単層から培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去して開始された。0.5% FCSと、100 ng/mL アクチビンAを有しWnt3aを有さない異なる濃度の阻害化合物とで補充された培地を含有するウェル当たり100 µLの試験量を加え戻した。陽性対照ウェルは、0.5% FCS及び20 ng/mL Wnt3a (RD Biosystems) を有するが、試験化合物のない状態の同じ基本培地を収容した。陰性対照ウェルは、0.5% FCSを有するが、アクチビンA、Wnt3a、又は試験化合物のない状態の同じ基本培地を収容した。アッセイ2日目に、アッセイウェルは吸引され、同一濃度の試験化合物又は対照溶液を再度供給された。3日及び4日目に、全アッセイウェルは吸引され、試験化合物又はWnt3aの両方がない状態で2% FCS及び100 ng/mL アクチビンAで補充されたDMEM:F12が供給された。平行陰性対照ウェルは、3日及び4日目は2% FCSを有するDMEM:F12に維持された。

10

【0217】

アッセイ評価：培養の最後に、96ウェルプレートの中の細胞をPBSで2回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで室温で20分間固定し、PBSで更に3回洗浄し、次に0.5% Triton X-100を用いて室温で20分間透明処理した。固定及び透明処理の後、細胞をPBSで再度3回洗浄し、次に、室温で30分間PBS中において4% ニワトリ血清 (Invitrogen) でブロックした。一次抗体 (ヤギ抗ヒトSox17; RD Systems) を4% ニワトリ血清で1:100に希釈し、細胞に室温で1時間添加した。Alexa Fluor 488 共役二次抗体 (ニワトリ抗ヤギIgG; Molecular Probes) をPBSで1:200に希釈し、細胞をPBSで3回洗浄した後各ウェルに添加した。細胞核を対比染色するために、2 µg/mLのHoechst 33342 (Invitrogen) を室温で10分間添加した。細胞をPBSで一度洗浄し、画像化するために100 µL/ウェルPBS中に放置した。

20

30

【0218】

Hoechst 33342 及びAlexa Fluor 488で染色された細胞用の51008bs二色性を利用するIN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を使用して細胞を撮像した。暴露時間は、陽性対照ウェル、及び未処理の陰性対照として二次抗体のみで染色されたウェルを使用して最適化された。処理及び染色手順の間のあらゆる細胞消失を補償するために、1ウェル当たり15の領域を得た。各ウェルごとの全細胞の数及び全Sox-17強度の測定値を、IN Cell Developer Toolbox 1.7 (GE Healthcare) ソフトウェアを使用して得た。グレイスケール・レベル (基準線範囲100~300) 及び核サイズに基づいて、細胞核のセグメンテーションを決定した。各複製セットごとの平均値及び標準偏差が計算された。全Sox17タンパク質発現量は、細胞×細胞の面積の全蛍光量として定義される全強度又は積分強度として報告された。300~3000のグレイスケール範囲、及び0.4以上の形状因子の判定基準に基づいて背景を消去した。全強度データは、各ウェルごとの全強度をWnt3a/アクチビンA陽性対照の平均全強度で割って正規化された。各複製セットごとの平均値及び標準偏差に関する正規化データが計算された。

40

【0219】

結果

この二次アッセイにおける用量漸増によって活性が確認され、かつ作用強度が測定され

50

た8つのGSK-3B酵素阻害剤に関する結果が示されている。示したデータは、細胞の数及びSox17に与える化合物の影響を示しており、それぞれのデータ点は二重セットからの平均であり、同一領域及びウェルからパラメータごとに見つけ出された。この実施例において、Sox17の発現は胚体内胚葉分化を示している。H1ヒト胚幹細胞系を用いた細胞の数及びSox17強度に関する結果はそれぞれ表VII及び表Iに示されている。H9ヒト胚幹細胞系に関する結果は表X及び表XIに示されている。陽性対照値は、細胞の数及びSox17強度に関して1.000に正規化された。陰性対照値は、両方の細胞株で、細胞の数は0.388未満、及びSox17強度は0.065未満であった。両方のヒト胚幹細胞系を比較し、かつ各化合物の用量漸増を含むこれらのデータの図式表現が、図1～図8に示されている。細胞の数はパネルAに示され、Sox17強度はパネルBに示される。これらのデータは、各化合物がhES細胞の増殖及び胚体内胚葉の分化を促進することができ、かつ活性の最適範囲を同定することができることを確認している。

10

【0220】

(実施例8)

GSK-3 酵素阻害剤が胚体内胚葉に関連した追加のマーカーの発現に与える影響
リード化合物は、転写因子Sox17に加えて、胚体内胚葉分化を示す他のマーカーもまた誘導することができることを証明することが重要であった。ヒットの選択サブセットを、CXCR4、表面受容体タンパク質、及び胚体内胚葉の分化にも関連する転写因子であるHNF-3 の発現を促進する能力に関して試験した。

20

【0221】

アッセイ用細胞の調製：アッセイで用いるH1ヒト胚幹細胞系からの細胞塊を培養液で均一に再懸濁し、Matrigel (商標)でコーティングされた(1:30希釈物)6ウェルプレート(Corning)に2mL/ウェルの容量で播いた。8ng/mLのbFGFで補充されたMEF調整培地を初期播種及び増殖に用いた。各ウェルから使用済みの培養液を吸引し、かつ同量の新しい培地と交換することによって、毎日の栄養補給を行った。アッセイを開始する前に、培養物を播種後1～3日間増殖させた。プレートは、アッセイ期間中ずっと37、5% CO₂に保たれた。

【0222】

化合物及びアッセイ培地の調製：一次スクリーニングで得た7つのヒットのサブセットを、追跡調査及び後続の二次アッセイに用いた。適切な化合物を、DMSO中に10mMストックとして可溶化し、-20 で脱水して使用するまで保管した。アッセイ直前に、化合物ストックを0.5% FCS (HyClone)及び100ng/mLアクチビンA (RD Biosystems)で補充されたDMEM:F12基本培地(Invitrogen)で1μM～5μMの範囲の最終濃度に希釈した。

30

【0223】

アッセイ：アッセイは、各ウェルの細胞単層から培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去して開始された。0.5% FCSと、100ng/mLアクチビンAを有しWnt3aを有さない異なる濃度の阻害化合物とで補充された培地を含有するウェル当たり2mLの試験量を加え戻した。陽性対照ウェルは、100ng/mLアクチビンAと20ng/mL Wnt3a (RD Biosystems)と0.5% FCSとを有するが試験化合物がない状態の同じ基本培地を収容した。陰性対照ウェルは、0.5% FCSを有するが、アクチビンA、Wnt3a、又は試験化合物がない状態の基本培地を収容した。アッセイ2日目にアッセイウェルを吸引し、同一濃度の試験化合物又は対照溶液を再度供給した。3日及び4日目に、全アッセイウェルは吸引され、試験化合物又はWnt3aの両方がない状態で2% FCS及び100ng/mLアクチビンAで補充されたDMEM:F12が供給された。平行陰性対照ウェルは、3日及び4日目は2% FCSを有するDMEM:F12に維持された。

40

【0224】

アッセイ評価：培養の最後に、細胞単層はPBSで洗浄され、TrypLE (商標)E

50

xpress 溶液 (Invitrogen, CA) で5分間インキュベートすることにより培養プレートから収集された。細胞をMEF調整培地で再懸濁し、2つの等しいサンプルに分割した。サンプルの1セットを様々な蛍光標識抗体で更に染色し、フローサイトメトリー (FACS) 分析を施した。サンプルの第2の並列セットに定量PCRを施した。

【0225】

FACS分析を受けた細胞をPBSで洗浄し、PBS及びBD FACS染色緩衝液で希釈した0.125%ヒトグロブリン (Sigma cat# G-4386) の中で4で15分間ブロックした。細胞のアリコート (それぞれ約105細胞) を、蛍光タグに直接結合され、かつCD9 PE (BD#555372)、CD9 PE (BD#555372)、又はCXCR-4 APC (RD Systems cat# FAB173A) に対する特異性を有する抗体で、4で30分間染色した。BD FACS染色緩衝液中における一連の洗浄後、生存率を評価するために細胞を7-AAD (BD#559925) で染色し、BD FACS Array装置 (BD Biosciences) 上で分析し、少なくとも10,000の事象を収集した。PE及びAPCのマウスIgG1kイソタイプコントロール抗体を用いて陽性細胞の割合をゲートした。

10

【0226】

定量PCR用の細胞を、RNAを抽出、精製しかつcDNAを合成するために処理した。RNAサンプルを、エタノール含有、高塩濃度緩衝液の存在下、シリカゲル膜 (RNeasyミニキット、(Qiagen, CA) に結合させた後、混入物を洗浄することにより精製した。RNAをTURBO DNA-フリーキット (Ambion, INC) を使用して更に精製し、次いで高品質RNAを水中に溶出した。収率及び純度を分光光度計のA260及びA280測定値によって評価した。Applied Biosystems, Inc. (ABI, CA) 大容量cDNAアーカイブキットを用いて精製したRNAからcDNAコピーを作製した。

20

【0227】

特に指定のない限り、リアルタイムPCR増幅及び定量化のための全ての試薬はABIから購入した。ABI PRISM 7900配列検出システムを使用して、リアルタイムPCR反応を行った。TAQMANUNIVERSAL PCR MASTER MIX (ABI, CA) を、20ngの逆転写RNAと共に、20µLの全反応容積にて使用した。各cDNAサンプルを2回使用 (run) して、ピペッティング誤差に関して補正した。プライマー及びFAM標識TAQMANプローブを濃度200nMで使用した。各標的遺伝子に関する発現レベルを、以前にABIにより開発されたヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 内在性対照を使用して正規化した。プライマー及びプローブの組合せを次に示す: CXCR4 (Hs00237052)、GAPDH (4310884E)、HNF3b (Hs00232764)、Sox17 (probe part# 450025, forward and reverse part# 4304971)。

30

【0228】

最初50で2分間、次いで95で10分間のインキュベーションの後、サンプルを2段階、即ち、-95で15秒間の変性過程と、その後の60で1分間のアニーリング/伸長過程と、で40回サイクルした。GENEAMP 7000配列検出システムソフトウェアを使用して、データ解析を行った。各プライマー/プローブセットに関して、増幅の指数関数領域の中央において蛍光強度が特定の値に到達したサイクル数としてのCt値を決定した。比較Ct法を使用して、相対的な遺伝子発現レベルを計算した。手短に言えば、各cDNAサンプルに関して、内在性対照Ct値を関心対象遺伝子のCtから減算して、DCt値 (Ct) を得た。標的の正規化した量を2-Ctとして計算し、増幅を100%効率と仮定した。最終的なデータを、標準物質サンプルに関して表した。

40

【0229】

結果

図9は、様々なGSK3阻害剤で処理した後にCXCR4表面受容体を発現する陽性細

50

胞の割合のFACS分析を示す。未処理の細胞集団（陰性対照）又はアクチビンA及びWnt3で処理されている細胞（陽性対照）に対する、各化合物の $1\mu\text{M} \sim 5\mu\text{M}$ の範囲の2種類の濃度が示されている。図10のパネルa、b、及びcは、やはり胚体内胚葉のマーカであると考えられるCXCR4、Sox17、及びHNF3に関するリアルタイムPCRデータを示している。FACS及びリアルタイムPCR分析は共に、未処理の対照細胞と比べて、分化した細胞ではこれらマーカのそれぞれの有意な増加が見られるを明示している。一部の例では、これらの胚体内胚葉マーカの発現レベルは陽性対照と等しく、分化のこの段階においてGSK3阻害剤がWnt3aに取って代わることができることを実証している。

【0230】

（実施例9）

GSK-3 酵素阻害剤が膵臓内胚葉の形成に与える影響

胚体内胚葉の誘導の間にGSK3 阻害剤で処理することが、例えば、膵臓内胚葉などの他の細胞型のその後の分化を阻害しないこと証明することが重要であった。ヒットの選択サブセットを、膵臓内胚葉に関連する鍵となる転写因子であるPDX1及びHNF6の発現を促進する能力に関して試験した。

【0231】

ヒト胚幹細胞（H1及びH9系）の維持を実施例1に記載の通りに実施した。細胞コロニーを、平均して4日ごとに継代させて未分化多能性状態のまま維持した。継代は、細胞培養物をコラゲナーゼ溶液（ $1\text{mg}/\text{mL}$ ；Sigma-Aldrich）に37で10～30分間暴露し、続いてピペットの先端で穏やかに擦り落として細胞塊を回収することによって行われた。塊を重力によって沈降させ、続いて洗浄して残留コラゲナーゼを除去した。細胞塊を、ルーチン維持培養用に1：3の比で、又は後続アッセイ用に1：1の比で分割した。用いたヒト胚幹細胞系は継代50未満に維持され、正常核型の表現型及びマイコプラズマ汚染の欠如に関してルーチン的に評価された。

【0232】

アッセイの細胞調製：アッセイで使用するH1ヒト胚幹細胞系の細胞塊を培養液で均一に再懸濁し、MATRIGEL（商標）でコーティングされた（1：30希釈）24ウェルプレート（black well；Arctic White）に $1\text{mL}/\text{ウェル}$ の容量で播いた。8ng/mLのbFGFで補充されたMEF調整培地をを初期播種及び増殖に用いた。2回目の実験において、H9系からのhES細胞の塊を96ウェルプレートの、マイトマイシンC（Sigma Chemical Co）で処理することによって予め不活性化されていたマウス胚性支持細胞（MEF）層に播いた。MEF単層上のhES細胞の培養液は、最小必須アミノ酸（Invitrogen）、L-グルタミン、及び2-メルカプトエタノールで補充された20% Knockout Serum Replacer（Invitrogen）を有するDMEM：F12で構成された。各ウェルから使用済みの培養液を吸引し、かつ同量の新しい培地と交換することによって、毎日の栄養補給を行った。アッセイを開始する前に、培養物を播種後1～3日間増殖させた。プレートは、アッセイ期間中37、5%CO₂に保たれた。

【0233】

化合物及びアッセイ培地の調製：一次スクリーニングで得た8つのヒットのサブセットを、追跡調査及び後続の二次アッセイに用いた。適切な化合物を、DMSO中に10mMストックとして可溶化し、-20で脱水して使用するまで保管した。アッセイ直前に、化合物ストックを添加剤を有する基本培地で $1\mu\text{M} \sim 5\mu\text{M}$ の範囲の最終濃度に希釈した。

【0234】

アッセイ：このアッセイでは、GSK3阻害剤は、胚体内胚葉分化過程の1日目及び2日目のみにWnt3aの代わりに含まれた。MATRIGEL（商標）上の胚幹細胞培養物は、各ウェルの細胞単層から培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することによって、実施例7及び8に記載の通りに開始された。胚体

10

20

30

40

50

内胚葉へ分化させるために、0.5% FCSを有するDMEM:F12培地と、100 ng/mLアクチビンAを有しWnt3aを有さない異なる濃度の阻害化合物とを含有する試験量(24ウェルプレートに関してはウェル当たり0.5 mL、96ウェルプレートに関してはウェル当たり100 µL)を加え戻した。陽性対照ウェルは、0.5% FCSと100 ng/mLアクチビンAと20 ng/mL Wnt3a(RD Biosystems)とを有するが試験化合物がない状態の同じ基本培地を収容した。陰性対照ウェルは、0.5% FCSを有するが、アクチビンA、Wnt3a、又は試験化合物のない状態の同じ基本培地を収容した。アッセイ2日目にアッセイウェルを吸引し、同一濃度の試験化合物又は対照溶液を再度供給した。3日及び4日目に、全アッセイウェルは吸引され、試験化合物又はWnt3aの両方がない状態で2% FCS及び100 ng/mLアクチビンAで補充されたDMEM:F12が供給された。平行陰性対照ウェルは、3日及び4日目は2% FCSを有するDMEM:F12に維持された。胚体内胚葉へ分化させるために、細胞を3日間処理し、2% FCSと、0.25 µM KAADシクロパミン(EMD Biosciences)と、20 ng/mL FGF7(RD Biosystems)とを含有するDMEM:F12基本培地を毎日供給した。次に、細胞を更に4日間処理し、1% B27(Invitrogen)と、0.25 µM KAADシクロパミンと、2 µMレチノイン酸(RA; Sigma-Aldrich)と、20 ng/mL FGF7とを含有するDMEM:F12を毎日供給した。平行陰性対照ウェルは、2% FCS(段階2)又は1% B27(段階3)を含有するがあらゆるその他の添加剤を含有しないDMEM:F12基本培地にずっと維持された。

10

20

【0235】

H9ヒト胚細胞の平行培養物はMEFフィーダー層の上で増殖され、膀胱内胚葉へと分化した。胚体内胚葉分化は、異なる濃度の阻害化合物と100 ng/mLアクチビンAと共に、1日目は血清を含有せず、2日及び3日目は0.2% FCSを含有するRPMI-1640(Invitrogen)からなる培地で細胞を培養することで達成された。陽性対照ウェルは、100 ng/mLアクチビンAと20 ng/mL Wnt3a(RD Biosystems)とを含有するが試験化合物が存在しない状態の(血清を有する又は有さない)基本培地を収容した。陰性対照ウェルは、アクチビンA、Wnt3a、又は試験化合物のない状態で血清を有する又は有さない同じ基本培地を収容した。アッセイ2日目にアッセイウェルを吸引し、同一濃度の試験化合物又は対照溶液を再度供給した。3日目に、全アッセイウェルは吸引され、試験化合物又はWnt3aの両方がない状態で2% FCS及び100 ng/mLアクチビンAで補充されたRPMI-1640が供給された。平行陰性対照ウェルは、3日目は2% FCSを含有するRPMI-1640基本培地に維持された。細胞を4日間処理し、2% FCSと0.25 mM KAADシクロパミン(EMD Biosciences)と、50 ng/mL FGF10(RD Biosystems)とを含有するRPMI-1640基本培地を毎日供給することによって、細胞を膀胱内胚葉に分化させた。続いて、細胞を3日間処理し、1% B27(Invitrogen)と0.25 mM KAADシクロパミンと2 mMレチノイン酸(RA; Sigma-Aldrich)と50 ng/mL FGF10とを含有するRPMI-1640を毎日供給した。平行陰性対照ウェルは、2% FCS(段階2)又は1% B27(段階3)を含有するがあらゆるその他の添加剤を含有しないRPMI-1640基本培地にずっと維持された。

30

40

【0236】

アッセイ評価：分化の最後に、細胞をリアルタイムPCRによって実施例8に記載の通りに遺伝子発現に関して検査した。高含量蛍光染色のため、6ウェルプレートの細胞をPBSで2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで室温で20分間固定し、PBSで更に3回洗浄し、次に0.5% Triton X-100を用いて室温で20分間透明処理した。固定及び透明処理の後、細胞を再度PBSで3回洗浄し、室温で30分間PBS中において4%ニワトリ血清(Invitrogen)でブロックした。一次抗体(ヤギ抗ヒトPdx1; Santa Cruz)を4%ニワトリ血清で1:100に希釈し、室温で2

50

時間細胞に添加した。Alexa Fluor 488 共役二次抗体（ニトリ抗ヤギ Ig G ; Molecular Probes）を PBS で 1 : 200 に希釈し、細胞を PBS で 3 回洗浄した後各ウェルに添加した。細胞核を対比染色するために、2 μ g / mL Hoechst 33342 (Invitrogen) を室温で 10 分間添加した。細胞を PBS で一度洗浄し、画像化するために 100 μ L / ウェル PBS 中に放置した。

【0237】

Hoechst 33342 及び Alexa Fluor 488 で染色された細胞用の 51008bs 二色性を利用する IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を使用して細胞を撮像した。暴露時間は、陽性対照ウェル、及び二次抗体のみで染色されたウェルを用いて最適化された。処理及び染色手順の間のあらゆる細胞消失を補償するために、1 ウェル当たり 15 の領域を得た。各ウェルごとの全細胞の数及び全 Pdx1 強度の測定値を、IN Cell Developer Tool box 1.7 (GE Healthcare) ソフトウェアを使用して得た。グレイスケール・レベル（基準線範囲 100 ~ 300）及び核サイズに基づいて、細胞核のセグメンテーションを決定した。各複製データセットに関して平均値及び標準偏差を計算した。全 Pdx1 タンパク質発現量は、細胞 \times 細胞の面積の全蛍光量として定義される全強度又は積分強度として報告された。300 ~ 3000 のグレイスケール範囲の判定基準に基づいて背景を消去した。全強度データは、各ウェルごとの全強度を Wnt3a / アクチビン A 陽性対照の平均全強度で割って正規化された。各複製セットごとの平均値及び標準偏差に関する正規化データが計算された。

10

20

【0238】

定量 PCR 用の細胞を RLT 緩衝液 (Qiagen) に溶解し、次に RNA を抽出、精製しかつ cDNA を合成するために処理した。RNA サンプルを、エタノール - 含有、高塩濃度緩衝液の存在下、シリカゲル膜 (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) に結合させた後、混入物を洗浄することにより精製した。RNA を TURBO DNA - フリーキット (Ambion, INC) を使用して更に精製し、次いで高品質 RNA を水中に溶出した。収率及び純度を分光光度計の A260 及び A280 測定値によって評価した。Applied Biosystems, Inc. (ABI, CA) 大容量 cDNA アーカイブキットを用いて精製した RNA から cDNA コピーを作製した。

30

【0239】

特に指定のない限り、リアルタイム PCR 増幅及び定量化のための全ての試薬は ABI から購入した。ABI PRISM 7900 配列検出システムを使用して、リアルタイム PCR 反応を行った。TAQMAN UNIVERSAL PCR MASTER MIX を、20 ng の逆転写 RNA と共に、20 μ L の全反応容積にて使用した。各 cDNA サンプルを 2 回使用 (run) して、ピペッティング誤差に関して補正した。プライマー及び FAM 標識 TAQMAN プローブを濃度 200 nM で使用した。各標的遺伝子に関する発現レベルを、以前に ABI により開発されたヒトグリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 内在性対照を使用して正規化した。プライマー及びプローブの組合せを次に示す：PDX1 (Hs00236830_m1)、GAPDH (4310884E)、及び HNF6 (Hs00413554_m1)。

40

【0240】

最初 50 で 2 分間、次いで 95 で 10 分間のインキュベーションの後、サンプルを 2 段階、即ち、- 95 で 15 秒間の変性過程と、その後の 60 で 1 分間のアニーリング / 伸長過程と、で 40 回サイクルした。GENE APO7000 配列検出システムソフトウェアを使用して、データ解析を行った。各プライマー / プローブセットに関して、増幅の指数関数領域の中央において蛍光強度が特定の値に到達したサイクル数としての Ct 値を決定した。比較 Ct 法を使用して、相対的な遺伝子発現レベルを計算した。手短に言えば、各 cDNA サンプルに関して、内在性対照 Ct 値を関心対象遺伝子の Ct から減算して、Ct 値 (Ct) を得た。標的の正規化した量を 2 - Ct として計算し、増幅を 100 % 効率と仮定した。最終的なデータを、標準物質サンプルに関して表した。

50

【0241】

結果

8つのGSK-3 酵素阻害剤に関する結果が示されている。高含量分析で得た図1に示されるデータは、H1hES細胞系の細胞の数(パネルA)及びPd \times 1強度(パネルB)に与える影響を示しており、それぞれのデータ点は二重サンプルセットからの平均であり、同一領域及びウェルからパラメータごとに見つけ出された。リアルタイムPCRで得た図12に示されるデータは、これら小分子阻害剤が2つの転写因子であるPd \times 1及びHNF6の誘導発現に与える影響を示している。これらの実施例において、Pd \times 1及びHNF6の発現は膵臓内胚葉分化を示している。これらのアッセイのGSK3 阻害化合物は、細胞系列へのコミットメントの早期段階中にWnt3aの代替となることができ、結果生じる細胞は、分化の続いて起こる後期段階中に膵臓内胚葉を形成する能力を維持する。

10

【0242】

(実施例10)

GSK-3 酵素阻害剤が膵臓内分泌細胞の形成に与える影響

胚体内胚葉の誘導の間にGSK3 阻害剤で処理することが、例えば、膵臓内分泌細胞又はインスリン産生細胞などの他の細胞型のその後の分化を阻害しないこと証明することが重要であった。ヒットの選択したサブセットを、膵臓ホルモンの発現を促進する能力に関して試験した。

20

【0243】

アッセイのための細胞調製：実施例9に記載した方法に従って得た膵臓内胚葉細胞(96ウェルプレート及び24ウェルプレート上で培養した)を、続いて、細胞を膵臓ホルモン発現細胞に分化させる薬剤にさらした。

【0244】

MATRIGEL(商標)上のH1ヒト胚幹細胞系の培養物のアッセイは、各ウェルの細胞単層から培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することによって、実施例7~9に記載の通りに開始された。胚体内胚葉へ分化させるために、0.5% FCSを有する培地と、100ng/mLアクチビンAを有しWnt3aを有さない異なる濃度の阻害化合物とを含有する試験量(24ウェルプレートに関してはウェル当たり0.5mL、96ウェルプレートに関してはウェル当たり100 μ L)を添加した。陽性対照ウェルは、0.5% FCSと100ng/mLアクチビンAと20ng/mL Wnt3a(RD Biosystems)を有するが、試験化合物のない状態の同じ基本培地を収容した。陰性対照ウェルは、0.5% FCSを有するが、アクチビンA、Wnt3a、又は試験化合物のない状態の同じ基本培地を収容した。アッセイ2日目にアッセイウェルを吸引し、同一濃度の試験化合物又は対照溶液を再度供給した。3日及び4日目に、全アッセイウェルは吸引され、試験化合物又はWnt3aの両方がない状態で2% FCS及び100ng/mLアクチビンAで補充されたDMEM:F12が供給された。平行陰性対照ウェルは、3日、4日、及び5日目は2% FCSを含有するDMEM:F12基本培地に維持された。胚体内胚葉へ分化させるために、細胞を3日間処理し、2% FCSと、0.25 μ M KAADシクロパミン(EMD Biosciences)と、20ng/mL FGF7(RD Biosystems)とを含有するDMEM:F12基本培地を毎日供給した。続いて細胞を4日間処理し、1% B27(Invitrogen)と、0.25 μ M KAADシクロパミンと、2 μ Mレチノイン酸(RA;Sigma-Aldrich)と、20ng/mL FGF7とを含有するDMEM:F12を毎日供給した。段階2及び3の間の平行陰性対照ウェルは、2% FCS又は1% B27を含有するがあらゆるその他の添加剤を含有しないDMEM:F12基本培地にずっと維持された。膵臓内胚葉の形成後、細胞を更に6日間継続して処理し、1% B27と、1 μ M DAPT(セクレターゼ阻害剤:EMD Biosciences)と、50ng/mL Exendin4(Sigma-Aldrich)とを含有するDMEM:F12基本培地を毎日供給した。次に、細胞を別の3日間連続して処

30

40

50

理し、1% B27、50 ng/mL Exendin4と、50 ng/mL IGF (RD Biosystems)と、50 ng/mL HGF (RD Biosystems)とを含有するDMEM:F12基本培地を毎日供給した。平行陰性対照ウェルは、1% B27を含有するがあらゆるその他の添加剤を含有しないDMEM:F12基本培地とずっと維持された。

【0245】

アッセイ評価：培養の最後に、高含量分析又はリアルタイムPCRによって評価するために細胞を実施例7及び8と同様に処理した。

【0246】

高含量蛍光染色のため、96ウェルプレートの細胞をPBSで2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで室温で20分間固定し、PBSで更に3回洗浄し、次に0.5% Triton X-100を用いて室温で20分間透明処理した。固定及び透明処理の後、細胞をPBSで再度3回洗浄し、次に、室温で30分間PBS中において4%ニワトリ血清 (Invitrogen) でブロックした。一次抗体 (モルモット抗ブタインスリン、ヒトインスリンと交差反応する; DakoCytomation) を4%ヤギ血清で1:500に希釈し、細胞に室温で1時間添加した。細胞をPBSで3回洗浄し、次に、4%ヤギ血清で1:100に希釈したAlexa Fluor 488共役二次抗体 (ヤギ抗モルモットIgG; 分子プローブ) で染色した。細胞核を対比染色するために、2 µg/mL Hoechst 33342 (Invitrogen) を室温で10分間添加した。細胞をPBSで一度洗浄し、画像化するために100 µL/ウェルPBS中に放置した。

【0247】

Hoechst 33342及びAlexa Fluor 488で染色された細胞用の51008bs二色性を利用するIN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare) を使用して細胞を撮像した。暴露時間は、陽性対照ウェル、及び二次抗体のみで染色されたウェルを用いて最適化された。処理及び染色手順の間のあらゆる細胞消失を補償するために、1ウェル当たり15の領域を得た。各ウェルごとの全細胞の数及び全インスリン強度の測定値を、IN Cell Developer Tool box 1.7 (GE Healthcare) ソフトウェアを使用して得た。グレイスケール・レベル (基準線範囲100~300) 及び核サイズに基づいて、細胞核のセグメンテーションを決定した。各複製セットごとの平均値及び標準偏差が計算された。全インスリンタンパク質発現量は、細胞×細胞の面積の全蛍光量として定義される全強度又は積分強度として報告された。300~3000のグレイスケール範囲の判定基準に基づいて背景を消去した。全強度データは、各ウェルごとの全強度をWnt3a/アクチビンA陽性対照の平均全強度で割って正規化された。各三重セットごとの平均値及び標準偏差に関する正規化データが計算された。

【0248】

定量PCR用の細胞をRLT緩衝液 (Qiagen) に溶解し、次にRNAを抽出、精製しかつcDNAを合成するために処理した。RNAサンプルを、エタノール-含有、高塩濃度緩衝液の存在下、シリカゲル膜 (Rneasy Mini Kit, Qiagen, CA) に結合させた後、混入物を洗浄することにより精製した。RNAをTURBO DNA-フリーキット (Ambion, INC) を使用して更に精製し、次いで高品質RNAを水中に溶出した。収率及び純度を分光光度計のA260及びA280測定値によって評価した。Applied Biosystems, Inc. (ABI, CA) 大容量cDNAアーカイブキットを用いて精製したRNAからcDNAコピーを作製した。

【0249】

特に指定のない限り、リアルタイムPCR増幅及び定量化のための全ての試薬はABIから購入した。ABI PRISM (登録商標) 7900配列検出システムを使用して、リアルタイムPCR反応を行った。TAQMAN (登録商標) UNIVERSAL PCR MASTER MIX (登録商標) (ABI, CA) を、20 ngの逆転写RNAと共に、20 µLの全反応容積にて使用した。各cDNAサンプルを2回使用 (run) して

10

20

30

40

50

、ピペッティング誤差に関して補正した。プライマー及びFAM-ラベルTAMAN（登録商標）プローブを、濃度200nMにて使用した。各標的遺伝子に関する発現レベルを、以前にABIにより開発されたヒトグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）内在性対照を使用して正規化した。プライマー及びプローブの組合せを次に示す：PDX1（Hs00236830_m1）、インスリン（Hs00355773）、及びGAPDH（4310884E）。

【0250】

最初50 で2分間、次いで95 で10分間のインキュベーション後、サンプルを2段階、即ち、-95 で15秒間の変性過程と、その後の60 で1分間のアニーリング/伸長過程と、で40回サイクルした。GENEAMP（登録商標）7000配列検出システムソフトウェアを使用して、データ解析を行った。各プライマー/プローブセットに関して、増幅の指数関数領域の中央において蛍光強度が特定の値に到達したサイクル数としてのCt値を決定した。比較Ct法を使用して、相対的な遺伝子発現レベルを計算した。手短には、各cDNAサンプルに関して、内在性対照Ct値を関心対象遺伝子のCtから減算して、Ct値（Ct）を得た。標的の正規化した量を 2^{-Ct} 、として計算し、増幅を100%効率と仮定した。最終的なデータを、標準物質サンプルに関して表した。

10

【0251】

結果

8つのGSK-3B酵素阻害剤に関する結果が示されている。高含量分析で得た図13に示されるデータは、H1hES細胞系の細胞の数（パネルA）及びインスリン強度（パネルB）に与える化合物の影響を示しており、それぞれのデータ点は三重セットからの平均であり、同一領域及びウェルからパラメータごとに見つけ出された。リアルタイムPCRで得た図14に示されるデータは、Pdx1及びインスリンに対する化合物の影響を示している。これらの実施例において、Pdx1及びインスリンの発現は膵臓内胚葉分化及びホルモン陽性細胞の生成を示している。これらのアッセイの選択GSK3阻害化合物は、インスリン免疫染色及びリアルタイムPCRの両方から明らかのように、細胞系列へのコミットメントの早期段階中にWnt3aの代替となることができ、分化の続いて起こる後期段階中に膵臓細胞の形成を誘導しかつ維持することができる。

20

【0252】

（実施例11）

膵臓内分泌細胞の形成に与えるGSK-3酵素阻害剤の相加効果

細胞運命決定の複数段階の間に添加される場合は、GSK3阻害剤で処理することにより膵臓細胞の分化を改善することができることを証明することが重要であった。ヒットの選択サブセットを、膵臓ホルモン陽性細胞に関連するインスリンの発現を促進するために逐次定期的な添加によって試験した。

30

【0253】

アッセイ用細胞の調製：アッセイのための細胞調製：実施例9及び10に記載した方法に従って得た膵臓内胚葉細胞を（96ウェルプレート上で培養した）、続いて、後細胞を膵臓ホルモン発現細胞に分化させる薬剤にさらした。

40

【0254】

MATRIGEL（商標）上のH1ヒト胚幹細胞系の培養物のアッセイは、各ウェルの細胞単層から培養液を吸引し、続いてPBSで3回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することによって、実施例7～9に記載の通りに開始された。胚体内胚葉へ分化させるために、0.5% FCSを有する培地と、100ng/mLアクチビンAを有しWnt3aを有さない異なる濃度の阻害化合物とを含有する試験量（96ウェルプレートに関してはウェル当たり100μL）を添加した。陽性対照ウェルは、試験化合物がない状態で基本培地と0.5% FCSと100ng/mLアクチビンAと20ng/mL Wnt3a（RDBiosystems）とを収容した。陰性対照ウェルは、0.5% FCSを有するが、アクチビンA、Wnt3a、又は試験化合物のない状態の同じ基本培地を収

50

容した。アッセイ2日目にアッセイウェルを吸引し、同一濃度の試験化合物又は対照溶液を再度供給した。3日、4日及び5日目に、全アッセイウェルは吸引され、試験化合物又はWnt3aの両方がない状態で2% FCS及び100ng/mLアクチビンAで補充されたDMEM:F12が供給された。平行陰性対照ウェルは、3日、4日及び5日目は2% FCSを有するDMEM:F12に維持された。胚体内胚葉へ分化させるために、細胞を3日間処理し、2% FCSと、0.25µM KAADシクロパミン(EMD Biosciences)と、20ng/mL FGF7(RD Biosystems)とを含有するDMEM:F12基本培地を毎日供給した。続いて細胞を4日間処理し、1% B27(Invitrogen)と、0.25µM KAADシクロパミンと、2µMレチノイン酸(RA; Sigma-Aldrich)と、20ng/mL FGF7とを含有するDMEM:F12を毎日供給した。平行陰性対照ウェルは、2% FCS又は1% B27を含有するがあらゆるその他の添加剤を含有しないDMEM:F12基本培地にずっと維持された。臍臓内胚葉の形成後、細胞を更に6日間継続して処理し、1% B27と、1µM DAPT(セクレターゼ阻害剤:EMD Biosciences)と、50ng/mL Exendin 4(Sigma-Aldrich)と、1µM TGFbeta R1阻害剤II(ALK5阻害剤:EMD Biosciences)とを含有するDMEM:F12基本培地を隔日で供給した。この6日間の間、GSK3阻害剤を、分化の開始時の前回の処理と同じ濃度を用いてそれぞれにウェルに加え戻した。次に、細胞を別の3日間連続して処理し、1% B27、50ng/mL Exendin 4と、50ng/mL IGF(RD Biosystems)と、50ng/mL HGF(RD Biosystems)と、1µM TGF R1阻害剤II(ALK5阻害剤;EMD Biosciences)とを含有するDMEM:F12基本培地を隔日で供給した。この3日間の間、GSK3阻害剤を、分化の開始時の前回の処理と同じ濃度を用いてそれぞれにウェルに加え戻した。陽性対照ウェルの平行セットを20ng/mL Wnt3aの存在下又は非存在下で処理した。平行陰性対照ウェルは、1% B27を含有するがあらゆるその他の添加剤を含有しないDMEM:F12基本培地にずっと維持された。

10

20

30

40

50

【0255】

アッセイ評価：アッセイ評価：培養の最後に、高含量分析によって評価するために細胞を上記実施例10と同様に処理した。

【0256】

高含量蛍光染色のため、96ウェルプレートの細胞をPBSで2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで室温で20分間固定し、PBSで更に3回洗浄し、次に0.5% Triton X-100を用いて室温で20分間透明処理した。固定及び透明処理の後、細胞をPBSで再度3回洗浄し、次に、室温で30分間PBS中において4%ニワトリ血清(Invitrogen)でブロックした。一次抗体(モルモット抗ブタインスリン、ヒトインスリンと交差反応する; DakoCytomation)を4%ニワトリ血清で1:500に希釈し、室温で1時間細胞に添加した。細胞をPBSで3回洗浄し、次に、4%ヤギ血清で1:100に希釈したAlexa Fluor 488共役二次抗体(ヤギ抗モルモットIgG; 分子プローブ)で染色した。細胞核を対比染色するために、2µg/mLのHoechst 33342(Invitrogen)を室温で10分間添加した。細胞をPBSで一度洗浄し、画像化するために100µL/ウェルPBS中に放置した。

【0257】

Hoechst 33342及びAlexa Fluor 488で染色された細胞用の51008bs二色性を利用するIN Cell Analyzer 1000(GE Healthcare)を使用して細胞を撮像した。暴露時間は、陽性対照ウェル、及び二次抗体のみで染色されたウェルを用いて最適化された。処理及び染色手順の間のあらゆる細胞消失を補償するために、1ウェル当たり15の領域を得た。各ウェルごとの全細胞の数及び全インスリン強度の測定値を、IN Cell Developer Too

l b o x 1 . 7 (G E H e a l t h c a r e) ソフトウェアを使用して得た。グレイスケール・レベル (基準線範囲 1 0 0 ~ 3 0 0) 及び核サイズに基づいて、細胞核のセグメンテーションを決定した。各複製データセットに関して平均値及び標準偏差を計算した。全インスリタンパク質発現量は、細胞 × 細胞の面積の全蛍光量として定義される全強度又は積分強度として報告された。3 0 0 ~ 3 0 0 0 のグレイスケール範囲の判定基準に基づいて背景を消去した。全強度データは、各ウェルごとの全強度を W n t 3 a / アクチビン A 陽性対照の平均全強度で割って正規化された。各三重セットごとの平均値及び標準偏差に関する正規化データが計算された。

【 0 2 5 8 】

結果

8 つの G S K - 3 B 酵素阻害剤に関する結果が示されている。高含量分析で得た図 1 5 に示されるデータは、H 1 h E S 細胞系の細胞の数 (パネル A) 及びインスリン強度 (パネル B) に与える化合物の影響を示しており、それぞれのデータ点は三重セットからの平均であり、同一領域及びウェルからパラメータごとに見つけ出された。この実施例では、インスリンの発現はホルモン陽性膵臓細胞への分化を示している。これらのアッセイの選択 G S K 3 B 阻害化合物は、細胞系列へのコミットメントの早期段階中に W n t 3 a の代替となることができ、後期段階で添加される場合、陽性対照サンプルに比べて高度のインスリン発現を促進すると思われる。

【 0 2 5 9 】

本明細書を通して引用された刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。以上、本発明の様々な態様を実施例及び好ましい実施形態を参照して説明したが、本発明の範囲は、上記の説明文によってではなく、特許法の原則の下で適切に解釈される以下の特許請求の範囲によって定義されるものである点は認識されるであろう。

【 0 2 6 0 】

【 表 5 】

表 I A : F A C S 及び免疫染色分析に使用される一次抗体のリスト。

抗体	供給元	アイソタイプ	クローン
SSEA-1	Chemicon (CA)	マウスIgM	MC-480
SSEA-3	Chemicon (CA)	マウスIgG3	MC-631
SSEA-4	Chemicon (CA)	ラットIgM	MC-813-70
TRA 1-60	Chemicon (CA)	マウスIgM	TRA 1-60
TRA 1-81	Chemicon (CA)	マウスIgM	TRA 1-81
TRA 1-85	Chemicon (CA)	マウスIgG1	TRA 1-85
AP	RD&Systems	マウスIgG1	B4-78
HNF3 β	RD&Systems	ヤギIgG	
PDX1	Santa Cruz Biotechnology, INC	ヤギIgG	A-17
GATA4	RD&Systems	ヤギIgG	
Sox17	RD&Systems	ヤギIgG	
CD9	BD	マウスIgG1	M-L13

【 0 2 6 1 】

【表 6】

表 I b : F A C S 及び免疫染色分析に使用される二次結合抗体のリスト

二次結合抗体	供給元	希釈
ヤギ抗-マウスIgG APCコンジュゲート	Jackson ImmunoResearch(PA)	1:200
ヤギ抗-マウスIgG PEコンジュゲート	Jackson ImmunoResearch(PA)	1:200
ロバ抗-ウサギPE又はAPCコンジュゲート	Jackson ImmunoResearch(PA)	1:200
ロバ抗-ヤギPE又はAPCコンジュゲート	Jackson ImmunoResearch(PA)	1:200
ヤギ抗-マウスIgM PE	SouthernBiotech(AL)	1:200
ヤギ抗-ラットIgM PE	SouthernBiotech(AL)	1:200
ヤギ抗-マウスIgG3 PE	SouthernBiotech(AL)	1:200

【 0 2 6 2 】

【表 7 - 1】

表 I I : G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が多能性マーカーを発現する細胞の生存率に与える影響

	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ5226780	0.785	0.790	0.788	0.00382	0.48	94.0
JNJ10179026	0.148	0.152	0.150	0.00247	1.65	4.8
JNJ17154215	0.427	0.462	0.444	0.02496	5.62	46.0
JNJ17205955	0.643	0.638	0.641	0.00368	0.57	73.5
JNJ180125	0.762	0.762	0.762	0.00007	0.01	90.4
JNJ18157646	0.850	0.824	0.837	0.01824	2.18	101.0
JNJ19370026	0.911	0.884	0.898	0.01881	2.10	109.5
JNJ19567340	0.723	0.743	0.733	0.01421	1.94	86.4
JNJ7830433	0.161	0.169	0.165	0.00559	3.39	6.9
JNJ10179130	0.767	0.789	0.778	0.01556	2.00	92.6
JNJ17154215	0.512	0.555	0.533	0.03048	5.72	58.4
JNJ17205955	0.282	0.293	0.288	0.00792	2.75	24.1
JNJ18014061	0.764	0.723	0.743	0.02892	3.89	87.9
JNJ18157698	0.853	0.858	0.855	0.00382	0.45	103.5
JNJ19376240	0.832	0.837	0.834	0.00361	0.43	100.6
JNJ19567405	0.726	0.725	0.725	0.00042	0.06	85.3
JNJ8706646	0.132	0.137	0.134	0.00368	2.74	2.6
JNJ10182562	0.797	0.793	0.795	0.00346	0.44	95.1
JNJ17157659	0.776	0.787	0.782	0.00792	1.01	93.2
JNJ17205994	0.164	0.148	0.156	0.01131	7.24	5.6
JNJ18014074	0.475	0.383	0.429	0.06548	15.26	43.8
JNJ18157698	0.823	0.774	0.798	0.03444	4.31	95.6
JNJ19386042	0.781	0.729	0.755	0.03649	4.83	89.5
JNJ19573541	0.143	0.149	0.146	0.00396	2.72	4.2
JNJ8710481	0.716	0.716	0.716	0.00014	0.02	84.1
JNJ10182562	0.804	0.802	0.803	0.00148	0.18	96.2
JNJ17163042	0.900	0.877	0.888	0.01626	1.83	108.2
JNJ17226703	0.824	0.799	0.812	0.01725	2.13	97.4
JNJ18018338	0.744	0.819	0.781	0.05261	6.73	93.2
JNJ18157711	0.952	0.966	0.959	0.00933	0.97	118.1
JNJ19410833	0.952	0.919	0.935	0.02277	2.43	114.8
JNJ19574867	0.776	0.777	0.777	0.00042	0.05	92.5
JNJ8710481	0.691	0.617	0.654	0.05254	8.03	75.4
JNJ10184655	0.162	0.134	0.148	0.02022	13.66	4.5
JNJ10166565	0.791	0.608	0.700	0.12947	18.50	81.8
JNJ17982133	0.153	0.129	0.141	0.01676	11.87	3.5
JNJ18018351	0.731	0.585	0.658	0.10317	15.68	75.9
DMSO	0.789	0.700	0.744	0.06279	8.44	88.0
JNJ19410859	0.909	0.675	0.792	0.16546	20.88	94.7
JNJ19574880	0.164	0.151	0.157	0.00926	5.89	5.8
JNJ10148307	0.706	0.672	0.689	0.02404	3.49	83.9
JNJ10222784	0.641	0.601	0.621	0.02878	4.63	73.7
JNJ17174664	0.882	0.748	0.815	0.09504	11.66	102.5
JNJ17989049	0.822	0.802	0.812	0.01400	1.72	102.1
JNJ18047991	0.777	0.764	0.771	0.00919	1.19	95.9
DMSO	0.798	0.771	0.785	0.01916	2.44	98.0

10

20

30

40

【表 7 - 2】
(表 I I の続き)

	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ19410872	0. 791	0. 789	0. 790	0. 00134	0. 17	98. 7
JNJ20948798	0. 628	0. 640	0. 634	0. 00806	1. 27	75. 6
JNJ10164830	0. 149	0. 135	0. 142	0. 00969	6. 81	2. 7
JNJ10222927	0. 803	0. 782	0. 792	0. 01492	1. 88	99. 1
JNJ17187027	0. 125	0. 129	0. 127	0. 00318	2. 51	0. 4
JNJ17994873	0. 315	0. 542	0. 428	0. 15995	37. 34	45. 2
JNJ18055726	0. 820	0. 748	0. 784	0. 05091	6. 49	97. 9
JNJ18157711	0. 154	0. 165	0. 160	0. 00806	5. 05	5. 3
JNJ19558929	0. 737	0. 730	0. 734	0. 00481	0. 66	90. 4
JNJ21192730	0. 659	0. 647	0. 653	0. 00813	1. 25	78. 5
JNJ10164895	0. 165	0. 154	0. 159	0. 00785	4. 93	5. 2
JNJ10231273	0. 637	0. 554	0. 595	0. 05876	9. 87	69. 9
JNJ17187053	0. 684	0. 588	0. 636	0. 06809	10. 71	76. 0
JNJ17994899	0. 750	0. 624	0. 687	0. 08945	13. 02	83. 5
JNJ18077800	0. 678	0. 618	0. 648	0. 04285	6. 61	77. 8
JNJ19363357	0. 777	0. 667	0. 722	0. 07757	10. 74	88. 7
DMSO	0. 799	0. 649	0. 724	0. 10564	14. 59	89. 0
JNJ21194667	0. 648	0. 625	0. 636	0. 01662	2. 61	76. 0
JNJ10172058	0. 601	0. 620	0. 611	0. 01308	2. 14	72. 2
JNJ10259847	0. 695	0. 702	0. 698	0. 00552	0. 79	85. 2
JNJ17193774	0. 568	0. 709	0. 639	0. 09956	15. 59	76. 4
JNJ17994912	0. 623	0. 765	0. 694	0. 10041	14. 46	84. 6
JNJ18157074	0. 758	0. 762	0. 760	0. 00297	0. 39	94. 3
JNJ19369233	0. 487	0. 434	0. 461	0. 03769	8. 18	49. 9
JNJ19567314	0. 690	0. 686	0. 688	0. 00262	0. 38	83. 7
JNJ21196227	0. 535	0. 550	0. 543	0. 01089	2. 01	62. 1
JNJ10178727	0. 743	0. 638	0. 691	0. 07446	10. 78	84. 1
JNJ10259847	0. 694	0. 603	0. 649	0. 06449	9. 94	77. 8
JNJ17200976	0. 160	0. 186	0. 173	0. 01824	10. 56	7. 2
JNJ17994925	0. 662	0. 566	0. 614	0. 06788	11. 05	72. 7
JNJ18157087	0. 600	0. 514	0. 557	0. 06102	10. 96	64. 2
JNJ19369246	0. 685	0. 524	0. 605	0. 11427	18. 90	71. 3
JNJ19567327	0. 731	0. 525	0. 628	0. 14552	23. 18	74. 7
JNJ24843611	0. 715	0. 596	0. 655	0. 08436	12. 87	78. 8
JNJ24843611	0. 592	0. 572	0. 582	0. 01393	2. 39	70. 0
JNJ25758785	0. 614	0. 611	0. 613	0. 00177	0. 29	74. 6
JNJ26064571	0. 766	0. 849	0. 807	0. 05869	7. 27	104. 3
JNJ26130403	0. 830	0. 813	0. 822	0. 01195	1. 45	106. 5
JNJ26170794	0. 727	0. 730	0. 728	0. 00198	0. 27	92. 2
JNJ26241774	0. 713	0. 836	0. 774	0. 08733	11. 28	99. 3
JNJ26367991	0. 726	0. 719	0. 722	0. 00523	0. 72	91. 3
JNJ26483310	0. 646	0. 681	0. 663	0. 02510	3. 78	82. 4
JNJ24326185	0. 651	0. 649	0. 650	0. 00120	0. 19	80. 3
JNJ25758850	0. 642	0. 622	0. 632	0. 01407	2. 23	77. 5
JNJ26067626	0. 843	0. 672	0. 758	0. 12099	15. 97	96. 7
JNJ26134771	0. 734	0. 815	0. 774	0. 05728	7. 40	99. 3
JNJ26170820	0. 823	0. 743	0. 783	0. 05699	7. 28	100. 6

10

20

30

40

【 0 2 6 4 】

【表 7 - 3】

(表 I I の続き)

	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ26241917	0. 871	0. 874	0. 872	0. 00219	0. 25	114. 2
JNJ26714220	0. 652	0. 642	0. 647	0. 00721	1. 12	79. 8
JNJ26483223	0. 617	0. 633	0. 625	0. 01174	1. 88	76. 5
JNJ24843572	0. 657	0. 655	0. 656	0. 00134	0. 20	81. 2
JNJ25758863	0. 684	0. 809	0. 746	0. 08803	11. 80	95. 0
JNJ26067652	0. 901	0. 735	0. 818	0. 11731	14. 34	106. 0
JNJ26150202	0. 791	0. 768	0. 779	0. 01591	2. 04	100. 1
JNJ26170833	0. 948	0. 764	0. 856	0. 12982	15. 17	111. 7
JNJ26243204	0. 821	0. 608	0. 714	0. 15033	21. 05	90. 1
JNJ26399906	0. 745	0. 685	0. 715	0. 04243	5. 94	90. 2
JNJ26483236	0. 624	0. 618	0. 621	0. 00417	0. 67	76. 0
JNJ24843585	0. 652	0. 624	0. 638	0. 01916	3. 00	78. 5
JNJ25873419	0. 773	0. 662	0. 718	0. 07792	10. 86	90. 6
JNJ26069901	0. 856	0. 834	0. 845	0. 01570	1. 86	110. 1
JNJ26153647	0. 828	0. 800	0. 814	0. 02008	2. 47	105. 4
JNJ26177086	0. 821	0. 841	0. 831	0. 01421	1. 71	108. 0
JNJ26247143	0. 816	0. 787	0. 802	0. 02072	2. 58	103. 5
JNJ26399906	0. 744	0. 737	0. 741	0. 00453	0. 61	94. 1
JNJ26483249	0. 699	0. 679	0. 689	0. 01464	2. 12	86. 3
JNJ25753520	0. 186	0. 208	0. 197	0. 01541	7. 83	11. 3
JNJ25887537	0. 665	0. 699	0. 682	0. 02432	3. 57	85. 2
JNJ26077883	0. 810	0. 683	0. 746	0. 09030	12. 10	95. 0
JNJ26158015	0. 141	0. 162	0. 151	0. 01506	9. 95	4. 3
DMSO	0. 784	0. 605	0. 695	0. 12671	18. 25	87. 1
JNJ26248729	0. 726	0. 590	0. 658	0. 09624	14. 63	81. 5
JNJ26399945	0. 635	0. 620	0. 628	0. 01068	1. 70	76. 9
JNJ26483249	0. 697	0. 695	0. 696	0. 00113	0. 16	87. 3
JNJ25753403	0. 154	0. 153	0. 154	0. 00042	0. 28	4. 5
JNJ25900641	0. 616	0. 645	0. 630	0. 02072	3. 29	82. 1
JNJ22791671	0. 909	0. 830	0. 869	0. 05614	6. 46	121. 0
JNJ26158054	0. 150	0. 150	0. 150	0. 00028	0. 19	3. 9
JNJ26177762	0. 981	1. 056	1. 018	0. 05303	5. 21	145. 3
JNJ26261105	0. 166	0. 189	0. 177	0. 01626	9. 19	8. 3
JNJ26399971	0. 718	0. 451	0. 584	0. 18887	32. 34	74. 6
JNJ26483262	0. 652	0. 647	0. 649	0. 00389	0. 60	85. 2
JNJ25757173	0. 503	0. 529	0. 516	0. 01860	3. 61	63. 5
JNJ25900654	0. 603	0. 609	0. 606	0. 00424	0. 70	78. 1
JNJ26116922	0. 856	0. 793	0. 824	0. 04419	5. 36	113. 7
JNJ26893438	0. 883	0. 848	0. 866	0. 02503	2. 89	120. 5
JNJ26184457	0. 779	0. 784	0. 781	0. 00368	0. 47	106. 7
JNJ26361712	0. 892	0. 914	0. 903	0. 01591	1. 76	126. 6
JNJ26399984	0. 544	0. 537	0. 540	0. 00460	0. 85	67. 5
JNJ26511901	0. 532	0. 682	0. 607	0. 10543	17. 37	78. 3
JNJ25757173	0. 665	0. 645	0. 655	0. 01400	2. 14	86. 1
JNJ25900706	0. 676	0. 677	0. 677	0. 00035	0. 05	89. 7
JNJ26120601	0. 935	0. 807	0. 871	0. 09115	10. 47	121. 3
JNJ26158093	0. 916	0. 859	0. 887	0. 03981	4. 49	124. 0

10

20

30

40

【 0 2 6 5 】

【表 7 - 4】

(表 I I の続き)

	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ26219050	0. 907	0. 891	0. 899	0. 01124	1. 25	125. 9
JNJ26361725	0. 909	0. 896	0. 902	0. 00919	1. 02	126. 4
JNJ26399997	0. 682	0. 797	0. 740	0. 08118	10. 98	99. 9
JNJ26511927	0. 679	0. 644	0. 661	0. 02510	3. 80	87. 2
JNJ25757238	0. 300	0. 223	0. 261	0. 05452	20. 88	22. 0
JNJ26047723	0. 183	0. 175	0. 179	0. 00573	3. 20	8. 6
JNJ26120614	0. 741	0. 728	0. 734	0. 00884	1. 20	99. 1
JNJ26158106	0. 935	0. 906	0. 921	0. 02051	2. 23	129. 4
JNJ26219063	0. 131	0. 128	0. 129	0. 00212	1. 64	0. 5
JNJ26366730	0. 138	0. 137	0. 138	0. 00092	0. 67	1. 9
JNJ26400049	0. 241	0. 227	0. 234	0. 01032	4. 41	17. 6
JNJ26941226	0. 604	0. 639	0. 622	0. 02475	3. 98	80. 7
JNJ25758707	0. 247	0. 182	0. 215	0. 04617	21. 52	14. 4
JNJ26054912	0. 659	0. 634	0. 647	0. 01718	2. 66	84. 8
JNJ26128726	0. 758	0. 575	0. 667	0. 12961	19. 44	88. 1
JNJ26161343	0. 166	0. 170	0. 168	0. 00276	1. 64	6. 9
JNJ26220454	0. 651	0. 559	0. 605	0. 06541	10. 81	78. 0
JNJ26367991	0. 803	0. 694	0. 748	0. 07693	10. 28	101. 3
JNJ26483197	0. 823	0. 634	0. 728	0. 13378	18. 37	98. 1
JNJ26511953	0. 624	0. 618	0. 621	0. 00431	0. 69	80. 6
RWJ351001	0. 639	0. 603	0. 621	0. 02553	4. 11	73. 6
RWJ382867	0. 143	0. 149	0. 146	0. 00403	2. 76	2. 9
RWJ682205	0. 817	0. 818	0. 818	0. 00071	0. 09	102. 8
RWJ665862	0. 742	0. 752	0. 747	0. 00679	0. 91	92. 2
RWJ670804	0. 856	0. 905	0. 881	0. 03479	3. 95	112. 1
RWJ673829	0. 650	0. 576	0. 613	0. 05268	8. 59	72. 4
RWJ675260	0. 768	0. 724	0. 746	0. 03097	4. 15	92. 2
RWJ675946	0. 556	0. 549	0. 553	0. 00537	0. 97	63. 4
RWJ351958	0. 227	0. 242	0. 235	0. 01103	4. 70	16. 1
RWJ395477	0. 634	0. 663	0. 649	0. 02044	3. 15	77. 7
RWJ447228	0. 141	0. 128	0. 135	0. 00919	6. 83	1. 3
RWJ666167	0. 847	0. 832	0. 840	0. 01110	1. 32	106. 0
RWJ670908	0. 803	0. 845	0. 824	0. 02998	3. 64	103. 7
RWJ673830	0. 860	0. 860	0. 860	0. 00035	0. 04	109. 1
RWJ675261	0. 528	0. 497	0. 513	0. 02227	4. 34	57. 5
RWJ675948	0. 683	0. 688	0. 686	0. 00332	0. 48	83. 1
RWJ447228	0. 611	0. 628	0. 620	0. 01202	1. 94	73. 3
RWJ414342	0. 719	0. 749	0. 734	0. 02143	2. 92	90. 3
RWJ553709	0. 916	0. 838	0. 877	0. 05487	6. 26	111. 6
RWJ666168	0. 771	0. 740	0. 755	0. 02178	2. 88	93. 5
RWJ670984	0. 820	0. 852	0. 836	0. 02305	2. 76	105. 5
RWJ674239	0. 971	0. 913	0. 942	0. 04137	4. 39	121. 2
RWJ675430	0. 839	0. 743	0. 791	0. 06746	8. 53	98. 8
RWJ676061	0. 562	0. 527	0. 544	0. 02440	4. 48	62. 2
RWJ352190	0. 678	0. 661	0. 670	0. 01195	1. 78	80. 8
RWJ414984	0. 722	0. 713	0. 717	0. 00658	0. 92	87. 9
RWJ659780	0. 802	0. 801	0. 802	0. 00106	0. 13	100. 4

10

20

30

40

【 0 2 6 6 】

【表 7 - 5】

(表 I I の続き)

	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
RWJ666205	0. 854	0. 857	0. 855	0. 00205	0. 24	108. 4
RWJ671232	0. 767	0. 798	0. 782	0. 02157	2. 76	97. 5
RWJ674240	0. 789	0. 776	0. 782	0. 00870	1. 11	97. 5
RWJ675266	0. 720	0. 709	0. 714	0. 00764	1. 07	87. 4
RWJ676085	0. 641	0. 618	0. 630	0. 01619	2. 57	74. 9
RWJ352244	0. 603	0. 584	0. 593	0. 01372	2. 31	69. 4
RWJ425264	0. 135	0. 158	0. 146	0. 01633	11. 18	3. 0
RWJ662440	0. 792	0. 572	0. 682	0. 15563	22. 83	82. 6
RWJ666213	0. 752	0. 593	0. 673	0. 11292	16. 79	81. 2
RWJ672667	0. 805	0. 598	0. 702	0. 14644	20. 87	85. 5
RWJ674241	0. 599	0. 504	0. 552	0. 06682	12. 11	63. 2
RWJ675366	0. 714	0. 593	0. 654	0. 08549	13. 08	78. 4
RWJ676137	0. 699	0. 698	0. 698	0. 00099	0. 14	85. 0
RWJ352628	0. 690	0. 674	0. 682	0. 01131	1. 66	83. 3
RWJ425268	0. 616	0. 634	0. 625	0. 01301	2. 08	74. 8
RWJ663860	0. 809	0. 817	0. 813	0. 00552	0. 68	103. 0
RWJ667045	0. 128	0. 133	0. 131	0. 00361	2. 76	0. 7
RWJ672932	0. 821	0. 811	0. 816	0. 00721	0. 88	103. 4
RWJ674320	0. 456	0. 474	0. 465	0. 01223	2. 63	50. 8
RWJ675369	0. 762	0. 766	0. 764	0. 00304	0. 40	95. 7
RWJ676139	0. 680	0. 663	0. 671	0. 01195	1. 78	81. 8
RWJ353258	0. 615	0. 635	0. 625	0. 01400	2. 24	74. 8
RWJ355923	0. 681	0. 698	0. 689	0. 01266	1. 84	84. 5
RWJ664545	0. 830	0. 807	0. 818	0. 01584	1. 94	103. 8
RWJ667046	0. 869	0. 849	0. 859	0. 01442	1. 68	109. 9
RWJ672934	0. 821	0. 841	0. 831	0. 01428	1. 72	105. 7
RWJ674817	0. 819	0. 840	0. 830	0. 01485	1. 79	105. 5
RWJ675430	0. 795	0. 793	0. 794	0. 00078	0. 10	100. 1
RWJ676431	0. 640	0. 636	0. 638	0. 00283	0. 44	76. 7
RWJ355131	0. 610	0. 628	0. 619	0. 01266	2. 05	73. 9
RWJ425271	0. 143	0. 144	0. 144	0. 00035	0. 25	2. 6
RWJ353709	0. 804	0. 903	0. 853	0. 07000	8. 20	109. 0
RWJ667069	0. 918	0. 854	0. 886	0. 04483	5. 06	113. 9
RWJ673313	0. 105	1. 080	0. 593	0. 68971	116. 37	70. 0
RWJ674855	0. 877	0. 860	0. 868	0. 01209	1. 39	111. 3
RWJ675578	0. 808	0. 695	0. 751	0. 07941	10. 57	93. 8
RWJ676432	0. 720	0. 697	0. 709	0. 01648	2. 33	87. 3
RWJ355923	0. 636	0. 621	0. 629	0. 01054	1. 68	75. 4
RWJ425348	0. 640	0. 634	0. 637	0. 00474	0. 74	76. 6
RWJ665436	0. 833	0. 833	0. 833	0. 00000	0. 00	106. 0
RWJ669182	0. 887	0. 846	0. 866	0. 02934	3. 39	111. 0
RWJ673515	0. 845	0. 877	0. 861	0. 02326	2. 70	110. 2
RWJ674855	0. 794	0. 784	0. 789	0. 00686	0. 87	99. 4
RWJ675605	0. 770	0. 786	0. 778	0. 01138	1. 46	97. 8
RWJ67657	0. 629	0. 659	0. 644	0. 02128	3. 30	77. 7
RWJ356205	0. 584	0. 558	0. 571	0. 01817	3. 18	66. 8
RWJ445224	0. 707	0. 679	0. 693	0. 01987	2. 87	85. 0

10

20

30

40

【 0 2 6 7 】

【表 7 - 6】

(表 I I の続き)

	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
RWJ665588	0. 727	0. 578	0. 652	0. 10536	16. 15	78. 9
RWJ669327	0. 742	0. 629	0. 685	0. 07969	11. 63	83. 8
DMSO	0. 653	0. 507	0. 580	0. 10310	17. 78	68. 0
RWJ675104	0. 722	0. 568	0. 645	0. 10904	16. 90	77. 9
RWJ675881	0. 643	0. 581	0. 612	0. 04384	7. 16	72. 9
RWJ676639	0. 608	0. 590	0. 599	0. 01245	2. 08	70. 9
JNJ26511966	0. 597	0. 610	0. 603	0. 00926	1. 54	71. 2
JNJ26511979	0. 687	0. 668	0. 677	0. 01336	1. 97	82. 4
JNJ26512005	0. 840	0. 832	0. 836	0. 00594	0. 71	106. 1
JNJ26533065	0. 831	0. 822	0. 826	0. 00587	0. 71	104. 7
JNJ26533091	0. 863	0. 856	0. 860	0. 00509	0. 59	109. 7
JNJ26533104	0. 886	0. 802	0. 844	0. 05954	7. 05	107. 3
JNJ26533156	0. 753	0. 687	0. 720	0. 04660	6. 47	88. 8
JNJ26714181	0. 455	0. 463	0. 459	0. 00587	1. 28	49. 6
JNJ26714194	0. 668	0. 678	0. 673	0. 00764	1. 13	81. 7
JNJ26714207	0. 181	0. 171	0. 176	0. 00658	3. 74	7. 2
JNJ26714220	0. 832	0. 842	0. 837	0. 00658	0. 79	106. 3
JNJ26875563	0. 795	0. 802	0. 798	0. 00445	0. 56	100. 5
JNJ22791671	0. 157	0. 140	0. 148	0. 01202	8. 11	3. 0
JNJ26893438	0. 153	0. 153	0. 153	0. 00035	0. 23	3. 7
JNJ26941226	0. 168	0. 154	0. 161	0. 00969	6. 02	4. 9
JNJ28572128	0. 670	0. 641	0. 655	0. 02079	3. 17	79. 1
RWJ67694	0. 706	0. 679	0. 693	0. 01888	2. 73	84. 7
RWJ676940	0. 788	0. 666	0. 727	0. 08627	11. 86	89. 8
RWJ677545	0. 879	0. 785	0. 832	0. 06640	7. 98	105. 6
RWJ678986	0. 168	0. 176	0. 172	0. 00537	3. 13	6. 6
RWJ680665	0. 946	0. 848	0. 897	0. 06972	7. 77	115. 3
RWJ680667	0. 187	0. 202	0. 194	0. 01089	5. 61	9. 9
RWJ680668	0. 906	0. 688	0. 797	0. 15394	19. 31	100. 3
RWJ680669	0. 715	0. 674	0. 694	0. 02850	4. 10	84. 9
RWJ680858	0. 695	0. 700	0. 697	0. 00339	0. 49	85. 3
RWJ680858	0. 665	0. 631	0. 648	0. 02369	3. 66	78. 0
RWJ680879	0. 590	0. 613	0. 601	0. 01655	2. 75	71. 0
RWJ680885	0. 681	0. 687	0. 684	0. 00382	0. 56	83. 3
RWJ680991	0. 829	0. 821	0. 825	0. 00530	0. 64	104. 5
RWJ680992	0. 822	0. 790	0. 806	0. 02270	2. 82	101. 6
RWJ680993	0. 671	0. 684	0. 677	0. 00912	1. 35	82. 3
RWJ681140	0. 686	0. 668	0. 677	0. 01266	1. 87	82. 3
RWJ681142	0. 212	0. 197	0. 204	0. 01047	5. 12	11. 5
RWJ681146	0. 666	0. 666	0. 666	0. 00007	0. 01	80. 7
RWJ681945	0. 736	0. 656	0. 696	0. 05643	8. 11	85. 1
RWJ68198	0. 726	0. 610	0. 668	0. 08217	12. 30	81. 0
JNJ28850601	0. 303	0. 310	0. 306	0. 00488	1. 59	26. 7
DMSO	0. 786	0. 659	0. 722	0. 09001	12. 46	89. 1
DMSO	0. 673	0. 649	0. 661	0. 01676	2. 53	79. 9
DMSO	0. 701	0. 686	0. 693	0. 01011	1. 46	84. 8

10

20

30

40

【 0 2 6 8 】

【表 8 - 1】

表 I I I : SK-3B の酵素活性阻害剤が多能性マーカーを発現する細胞の生存率に与える影響。

	化合物濃 (μ M)	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
EXPRES 01培地		0.6379	0.6180	0.6280	0.0141	2.2	74.6
処理せず		0.7412	0.7038	0.7225	0.0264	3.7	88.7
AAのみ		0.7674	0.8047	0.7861	0.0264	3.4	98.3
AA+Wnt3a		0.7754	0.8200	0.7977	0.0315	4.0	100.0
JNJ26512005	10	0.1412	0.1515	0.1464	0.0073	5.0	2.4
JNJ26512005	5	0.1501	0.1444	0.1473	0.0040	2.7	2.5
JNJ26512005	2.5	0.1541	0.4254	0.2898	0.1918	66.2	23.9
JNJ26533065	10	0.1272	0.1282	0.1277	0.0007	0.6	-0.4
JNJ26533065	5	0.5862	0.5880	0.5871	0.0013	0.2	68.4
JNJ26533065	2.5	0.7613	0.7603	0.7608	0.0007	0.1	94.5
JNJ26533156	10	0.1481	0.1592	0.1537	0.0078	5.1	3.5
JNJ26533156	5	0.1479	0.1639	0.1559	0.0113	7.3	3.8
JNJ26533156	2.5	0.2861	0.2477	0.2669	0.0272	10.2	20.4
JNJ26714194	10	0.2092	0.2426	0.2259	0.0236	10.5	14.3
JNJ26714194	5	0.6815	0.7128	0.6972	0.0221	3.2	84.9
JNJ26714194	2.5	0.7389	0.7870	0.7630	0.0340	4.5	94.8
JNJ26150202	10	0.1381	0.1398	0.1390	0.0012	0.9	1.3
JNJ26150202	5	0.7826	0.7578	0.7702	0.0175	2.3	95.9
JNJ26150202	2.5	0.8231	0.7742	0.7987	0.0346	4.3	100.1
JNJ26158015	10	0.1352	0.1326	0.1339	0.0018	1.4	0.5
JNJ26158015	5	0.2632	0.2604	0.2618	0.0020	0.8	19.7
JNJ26158015	2.5	0.4160	0.5314	0.4737	0.0816	17.2	51.4
RWJ670804	10	0.4447	0.4791	0.4619	0.0243	5.3	49.7
RWJ670804	5	0.6902	0.6884	0.6893	0.0013	0.2	83.8
RWJ670804	2.5	0.7476	0.7483	0.7480	0.0005	0.1	92.5
JNJ26170833	10	0.6790	0.6704	0.6747	0.0061	0.9	81.6
JNJ26170833	5	0.7833	0.7924	0.7879	0.0064	0.8	98.5
JNJ26170833	2.5	0.8155	0.8389	0.8272	0.0165	2.0	104.4
JNJ26177086	10	0.6533	0.6884	0.6709	0.0248	3.7	81.0
JNJ26177086	5	0.7697	0.7738	0.7718	0.0029	0.4	96.1
JNJ26177086	2.5	0.8119	0.8219	0.8169	0.0071	0.9	102.9
JNJ26177762	10	0.1242	0.1323	0.1283	0.0057	4.5	-0.4

10

20

30

【 0 2 6 9 】

【表 8 - 2】

(表 I I I の続き)

	化合物濃 (μ M)	未加工データ (二重)		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ26177762	5	0.1263	0.1303	0.1283	0.0028	2.2	-0.3
JNJ26177762	2.5	0.8480	0.7725	0.8103	0.0534	6.6	101.9
RWJ673515	10	0.1695	0.1890	0.1793	0.0138	7.7	7.3
RWJ673515	5	0.7217	0.7435	0.7326	0.0154	2.1	90.2
RWJ673515	2.5	0.7812	0.7221	0.7517	0.0418	5.6	93.1
EXPRES 01培地 処理せず		0.6294	0.6363	0.6329	0.0049	0.8	70.3
AAのみ		0.7156	0.7356	0.7256	0.0141	1.9	83.3
AA+Wnt3a		0.8732	0.9046	0.8889	0.0222	2.5	106.0
JNJ19370026	10	0.8415	0.8500	0.8458	0.0060	0.7	100.0
JNJ19370026	5	0.1403	0.1493	0.1448	0.0064	4.4	2.3
JNJ19370026	2.5	0.4434	0.3878	0.4156	0.0393	9.5	40.1
JNJ19370026	2.5	0.7734	0.8038	0.7886	0.0215	2.7	92.0
JNJ26483197	10	0.2993	0.3026	0.3010	0.0023	0.8	24.1
JNJ26483197	5	0.2993	0.3026	0.3010	0.0023	0.8	24.1
JNJ26483197	2.5	0.7023	0.6299	0.6661	0.0512	7.7	75.0
JNJ26483197	2.5	0.7835	0.8043	0.7939	0.0147	1.9	92.8
RWJ675605	10	0.7205	0.7369	0.7287	0.0116	1.6	83.7
RWJ675605	5	0.7769	0.8272	0.8021	0.0356	4.4	93.9
RWJ675605	2.5	0.8214	0.8640	0.8427	0.0301	3.6	99.6
RWJ675430	10	0.6275	0.5980	0.6128	0.0209	3.4	67.5
RWJ675430	5	0.7159	0.7222	0.7191	0.0045	0.6	82.3
RWJ675430	2.5	0.9245	0.9403	0.9324	0.0112	1.2	112.1
RWJ675948	10	0.7220	0.6670	0.6945	0.0389	5.6	78.9
RWJ675948	5	0.7526	0.7486	0.7506	0.0028	0.4	86.7
RWJ675948	2.5	0.7557	0.7390	0.7474	0.0118	1.6	86.3
JNJ26483249	10	0.8214	0.8636	0.8425	0.0298	3.5	99.5
JNJ26483249	5	0.7996	0.7873	0.7935	0.0087	1.1	92.7
JNJ26483249	2.5	0.8669	0.8195	0.8432	0.0335	4.0	99.6
RWJ67657	10	0.6195	0.5908	0.6052	0.0203	3.4	66.5
RWJ67657	5	0.8047	0.8319	0.8183	0.0192	2.4	96.2
RWJ67657	2.5	0.8041	0.7900	0.7971	0.0100	1.3	93.2
RWJ676639	10	0.1261	0.1520	0.1391	0.0183	13.2	1.5
RWJ676639	5	0.1303	0.1263	0.1283	0.0028	2.2	0.0
RWJ676639	2.5	0.4482	0.4051	0.4267	0.0305	7.1	41.6

10

20

30

【 0 2 7 0 】

【表 9 - 1】

表 I V : GSK-3 B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞の分化及び増殖に与える影響。

化合物名	増殖反応		Sox-17 の発現		増殖反応		Hnf-3b の発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA 対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA 対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA 対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA 対照と比較した率
JNJ26511966	1723	0.11244207	68870409	0.0708	1645	0.10460717	50143628	0.0453
JNJ26511979	1110	0.07245904	42978557	0.0442	94	0.00597755	0	0.0000
JNJ26512005	7990	0.52154188	339840000	0.3494	6833	0.43448539	231745000	0.2092
JNJ26533065	4914	0.32074548	238555000	0.2453	2907	0.18485899	82808745	0.0747
JNJ26533091	3056	0.19945819	153145000	0.1575	2643	0.16807097	122246784	0.1103
JNJ26533104	3960	0.25850251	47669463	0.0490	4641	0.29512575	210730000	0.1902
JNJ26533156	12243	0.79917096	699160000	0.7189	6536	0.41559887	248855000	0.2246
JNJ26714181	401	0.02614400	25580022	0.0263	27	0.00168516	0	0.0000
JNJ26714194	7958	0.51948561	351070000	0.3610	6992	0.44459636	288075000	0.2600
JNJ26714207	277	0.01808212	6558563	0.0067	12	0.00073130	535481	0.0005
JNJ26714220	1327	0.08662445	69037756	0.0710	1194	0.07589584	40478497	0.0365
JNJ26875563	791	0.05160259	24732475	0.0254	64	0.00406982	1092011	0.0010
JNJ22791671	0	0.00000000	0	0.0000	3	0.00019077	95784	0.0001
JNJ26893438	2	0.00013056	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
JNJ26941226	6	0.00035903	1092432	0.0011	2	0.00009539	150222	0.0001
JNJ28572128	2742	0.17899341	122926199	0.1264	3166	0.20132905	120729987	0.1090
JNJ28850601	33	0.00212155	3855900	0.0040	8	0.00050873	208129	0.0002
RWJ674817	2000	0.13055682	110080123	0.1132	116	0.00737655	4290889	0.0039
RWJ674855	3495	0.22814805	110559816	0.1137	438	0.02782105	24450647	0.0221
RWJ674855	3107	0.20278739	120998421	0.1244	6177	0.39276971	273965000	0.2473
RWJ675104	658	0.04295320	37841044	0.0389	646	0.04107977	31352380	0.0283
RWJ675260	5991	0.39108297	252690000	0.2598	8479	0.53915615	306520000	0.2767
RWJ675261	1953	0.12745610	88653625	0.0912	641	0.04076182	18162585	0.0164
RWJ675266	2024	0.13209087	128395000	0.1320	4923	0.31302661	232020000	0.2094

10

20

【 0 2 7 1】

【表 9 - 2】

(表 I V の続き)

化合物名	増殖反応		Sox-17 の発現		増殖反応		Hnf-3b の発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA 対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA 対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA 対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA 対照と比較した率
RWJ675366	2979	0.19446439	93454696	0.0961	3582	0.22775110	137054653	0.1237
RWJ675369	3703	0.24169332	138180000	0.1421	3980	0.25306032	139550000	0.1260
RWJ675430	21070	1.37538351	1089750000	1.1205	21203	1.34831961	1281000000	1.1562
RWJ675578	1297	0.08466610	47445962	0.0488	30	0.00190773	0	0.0000
RWJ675605	14529	0.94839741	1013360000	1.0419	9871	0.62767480	540725000	0.4881
RWJ675881	4063	0.26522619	207891758	0.2137	3973	0.25264697	177190000	0.1599
RWJ675946	1	0.00006528	0	0.0000	7	0.00041334	0	0.0000
RWJ675948	9716	0.63421242	572520000	0.5887	7650	0.48643922	329425000	0.2973
RWJ676061	916	0.05979503	0	0.0000	1076	0.06839210	40211776	0.0363
RWJ676085	738	0.04817547	30943000	0.0318	503	0.03198626	0	0.0000
RWJ676137	8367	0.54618448	373185000	0.3837	7976	0.50720168	260000000	0.2347
RWJ676139	20079	1.31069260	1104750000	1.1359	16884	1.07363836	1052345000	0.9499
RWJ676431	13789	0.90012403	789085000	0.8113	11369	0.72296588	547055000	0.4938
RWJ676432	16652	1.08698348	1045395000	1.0749	14950	0.95065340	854325000	0.7711
RWJ676657	6376	0.41618252	324450000	0.3336	6058	0.38523417	269025000	0.2428
RWJ676639	6470	0.42231869	327055000	0.3363	4357	0.27706591	109160000	0.0985
RWJ674817	2000	0.13055682	110080123	0.1132	116	0.00737655	4290889	0.0039
RWJ674855	3495	0.22814805	110559816	0.1137	438	0.02782105	24450647	0.0221
RWJ674855	3107	0.20278739	120998421	0.1244	6177	0.39276971	273965000	0.2473
RWJ675104	658	0.04295320	37841044	0.0389	646	0.04107977	31352380	0.0283
RWJ675260	5991	0.39108297	252690000	0.2598	8479	0.53915615	306520000	0.2767
RWJ675261	1953	0.12745610	88653625	0.0912	641	0.04076182	18162585	0.0164
RWJ675266	2024	0.13209087	128395000	0.1320	4923	0.31302661	232020000	0.2094
RWJ675366	2979	0.19446439	93454696	0.0961	3582	0.22775110	137054653	0.1237

30

40

【 0 2 7 2】

【表 9 - 3】

(表 I Vの続き)

化合物名	増殖反応		Sox-17の発現		増殖反応		Hnf-3bの発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率
RWJ675369	3703	0.24169332	138180000	0.1421	3980	0.25306032	139550000	0.1260
RWJ675430	21070	1.37538351	1089750000	1.1205	21203	1.34831961	1281000000	1.1562
RWJ675578	1297	0.08466610	47445962	0.0488	30	0.00190773	0	0.0000
RWJ675605	14529	0.94839741	1013360000	1.0419	9871	0.62767480	540725000	0.4881
RWJ675881	4063	0.26522619	207891758	0.2137	3973	0.25264697	177190000	0.1599
RWJ675946	1	0.00006528	0	0.0000	7	0.00041334	0	0.0000
RWJ675948	9716	0.63421242	572520000	0.5887	7650	0.48643922	329425000	0.2973
RWJ676061	916	0.05979503	0	0.0000	1076	0.06839210	40211776	0.0363
RWJ676085	738	0.04817547	30943000	0.0318	503	0.03198626	0	0.0000
RWJ676137	8367	0.54618448	373185000	0.3837	7976	0.50720168	260000000	0.2347
RWJ676139	20079	1.31069260	1104750000	1.1359	16884	1.07363836	1052345000	0.9499
RWJ676431	13789	0.90012403	789085000	0.8113	11369	0.72296588	547055000	0.4938
RWJ676432	16652	1.08698348	1045395000	1.0749	14950	0.95065340	854325000	0.7711
RWJ67657	6376	0.41618252	324450000	0.3336	6058	0.38523417	269025000	0.2428
RWJ676639	6470	0.42231869	327055000	0.3363	4357	0.27706591	109160000	0.0985
処理せず	3891	0.25396566	97657703	0.1004	6091	0.38733268	109336609	0.0987
AA	4348	0.28379790	104735084	0.1077	122	0.00775810	5341271	0.0048
AA/3a	15319	1.00000000	972595000	1.0000	15726	1.00000000	1107900000	1.0000
RWJ351001	738	0.44211577	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ351958	0	0.00000000	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
DMSO	56	0.03353293	454796	0.0148	211	0.16644754	4455058	0.1626
RWJ352190	1313	0.78642715	28506437	0.9266	5485	4.32684722	85245671	3.1115
RWJ352244	12	0.00738523	85949	0.0028	67	0.05259006	1300640	0.0475
RWJ352628	2899	1.73612774	32703235	1.0630	7460	5.88456482	149772525	5.4668
RWJ353258	562	0.33632735	11388240	0.3702	787	0.62108861	10743082	0.3921

10

20

【 0 2 7 3 】

【表 9 - 4】

(表 I Vの続き)

化合物名	増殖反応		Sox-17の発現		増殖反応		Hnf-3bの発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率
RWJ355131	118	0.07045908	2574279	0.0837	57	0.04522745	2584708	0.0943
RWJ355923	136	0.08163673	410648	0.0133	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ356205	19	0.01137725	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ382867	3	0.00159681	431883	0.0140	31	0.02419143	847186	0.0309
RWJ395477	33	0.01976048	0	0.0000	225	0.17749145	5223879	0.1907
RWJ414342	16	0.00978044	0	0.0000	496	0.39127005	8966327	0.3273
RWJ414984	26	0.01556886	459801	0.0149	189	0.14935577	1819533	0.0664
RWJ425264	1	0.00039920	0	0.0000	42	0.03339469	1605538	0.0586
RWJ425268	22	0.01297405	82062	0.0027	311	0.24506968	5749996	0.2099
RWJ425271	0	0.00000000	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ425348	26	0.01556886	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ445224	202	0.12095808	627280	0.0204	1079	0.85143308	14326715	0.5229
RWJ447228	3	0.00179641	0	0.0000	4	0.00315540	101114	0.0037
RWJ553709	1310	0.78423154	24382455	0.7926	3249	2.56323955	75834631	2.7680
RWJ659780	20	0.01177645	0	0.0000	425	0.33526164	8880858	0.3242
RWJ663860	9	0.00538922	37140	0.0012	134	0.10570602	2144545	0.0783
RWJ662440	7	0.00419162	48154	0.0016	5	0.00420720	170177	0.0062
RWJ664545	70	0.04191617	589594	0.0192	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ665436	1215	0.72774451	7568849	0.2460	0	0.00000000	0	0.0000
処理せず	1145	0.68542914	6979814	0.2269	実施せず			
AA	100	0.05988024	1264807	0.0411	51	0.04049435	923625	0.0337
AA/3a	1670	1.00000000	30764293	1.0000	1268	1.00000000	27396787	1.0000
RWJ665588	43	0.00510815	706614	0.0055	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ665862	7	0.00079815	102445	0.0008	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ666167	46	0.00546732	0	0.0000	46	0.00548446	818478	0.0044

30

40

【 0 2 7 4 】

【表 9 - 5】

(表 I V の続き)

化合物名	増殖反応		Sox-17の発現		増殖反応		Hnf-3bの発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率
RWJ666168	5	0.00059861	284777	0.0022	32	0.00385502	2309043	0.0124
RWJ666205	258	0.03092825	4009395	0.0312	391	0.04665766	14340307	0.0769
RWJ666213	62	0.00742278	782261	0.0061	112	0.01335347	2792473	0.0150
RWJ667045	36	0.00431000	312039	0.0024	2	0.00027820	1731575	0.0093
RWJ667046	59	0.00702371	397711	0.0031	103	0.01232017	3561761	0.0191
RWJ667069	22	0.00267380	770128	0.0060	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ669182	77	0.00925852	1631067	0.0127	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ669327	129	0.01540426	997629	0.0078	98	0.01164454	4138261	0.0222
RWJ670804	2386	0.28565728	20866647	0.1625	2594	0.30931563	61161468	0.3280
RWJ670908	172	0.02063213	625299	0.0049	133	0.01589699	3578458	0.0192
RWJ670984	8	0.00099769	394948	0.0031	530	0.06319053	16678849	0.0894
RWJ671232	17	0.00207519	0	0.0000	53	0.00627931	2270954	0.0122
RWJ672667	11	0.00127704	0	0.0000	36	0.00433193	2287281	0.0123
RWJ672932	2	0.00023944	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ672934	174	0.02087158	1451727	0.0113	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ673313	80	0.00961769	940367	0.0073	333	0.03970273	5586343	0.0300
RWJ673515	11886	1.42305850	223646667	1.7415	10331	1.23173834	309900000	1.6618
RWJ673829	545	0.06524862	5849381	0.0455	404	0.04820761	6738305	0.0361
RWJ673830	10	0.00115732	315367	0.0025	35	0.00421270	3072013	0.0165
RWJ674239	2473	0.29603320	80676667	0.6282	4209	0.50182815	143916667	0.7718
RWJ674240	8	0.00091787	233687	0.0018	6	0.00071536	0	0.0000
RWJ674241	1	0.00007981	1309298	0.0102	0	0.00000000	0	0.0000
RWJ674320	0	0.00003991	0	0.0000	0	0.00000000	0	0.0000
処理せず	7653	0.91619443	26272707	0.2046	12050	1.43665050	74453588	0.3993
AA	15	0.00175593	0	0.0000	210	0.02503776	3777945	0.0203

10

20

【 0 2 7 5】

【表 9 - 6】

(表 I V の続き)

化合物名	増殖反応		Sox-17の発現		増殖反応		Hnf-3bの発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率
AA/3a	8353	1.00000000	128424304	1.0000	8387	1.00000000	186480000	1.0000
RWJ355923	7319	0.91843393	387695000	1.0342	5436	1.07644321	437495000	0.9520
RWJ664545	6620	0.83065629	333205000	0.8889	4767	0.94395485	397435000	0.8649
RWJ353709	6217	0.78014807	337920000	0.9014	5013	0.99277156	437235000	0.9515
参照化合物	5934	0.74463546	363935000	0.9708	4122	0.81621943	348135000	0.7576
JNJ18157698	10447	1.31089221	382680000	1.0208	6908	1.36805624	560475000	1.2196
JNJ5226780	10963	1.37570586	296920000	0.7921	5679	1.12456679	463525000	1.0087
JNJ7830433	1766	0.22160873	162790000	0.4343	2184	0.43241905	189875000	0.4132
JNJ8706646	2914	0.36566696	230965000	0.6161	2776	0.54975740	125125000	0.2723
JNJ8710481	3600	0.45175053	276080000	0.7365	4121	0.81612041	294665000	0.6412
JNJ8710481	1977	0.24808633	164760000	0.4395	2266	0.44865828	152060000	0.3309
JNJ10148307	9964.5	1.25040783	363855000	0.9706	9728	1.92642836	635655000	1.3832
JNJ10164830	2536.5	0.31829590	179185000	0.4780	2397	0.47460145	150600000	0.3277
JNJ10164895	5706.5	0.71608734	319930000	0.8534	5096	1.00920883	341360000	0.7428
JNJ10172058	4645.5	0.58294642	257295000	0.6864	4507	0.89256362	312605000	0.6803
JNJ10178727	2892.5	0.36296900	213165000	0.5686	3043	0.60253490	269570000	0.5866
JNJ10179026	2460.5	0.30875894	203350000	0.5425	2410	0.47727498	209795000	0.4565
JNJ10179130	4783	0.60020078	306085000	0.8165	4556	0.90226755	326475000	0.7104
JNJ10182562	6916.5	0.86792571	377885000	1.0080	4504	0.89196950	365090000	0.7945
JNJ10182562	7370.5	0.92489647	365075000	0.9739	5300	1.04950985	399265000	0.8688
JNJ10184655	10533	1.32174677	475250000	1.2678	5186	1.02693336	404710000	0.8807
JNJ10222784	3513	0.44083323	242750000	0.6476	2522	0.49945539	214575000	0.4669
処理せず	実施せず				実施せず			
AA	実施せず				実施せず			
AA/3a	7969	1.00000000	374870000	1.0000	5050	1.00000000	459540000	1.0000

30

40

【 0 2 7 6】

【表 9 - 7】

(表 I V の続き)

化合物名	増殖反応		Sox-17の発現		増殖反応		Hnf-3bの発現	
	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率	全細胞	Wnt 3a/AA対照と比較した率	総強度	Wnt 3a/AA対照と比較した率
JNJ10222784	563	0.31250000	57351132	0.3295	1744	0.03386884	165365000	1.1010
JNJ10222927	158	0.08777778	14786632	0.0850	83	0.00161234	14201404	0.0946
JNJ10231273	3	0.00166667	0	0.0000	4	0.00007770	28439	0.0002
JNJ10259847	5	0.00277778	0	0.0000	10	0.00019426	0	0.0000
JNJ10259847	15	0.00805556	548982	0.0032	0	0.00000000	0	0.0000
JNJ17154215	24	0.01305556	689535	0.0040	11	0.00021368	0	0.0000
JNJ17154215	94	0.05194444	11142426	0.0640	12	0.00022340	1767033	0.0118
JNJ17157659	15	0.00805556	0	0.0000	21	0.00039823	4567590	0.0304
JNJ17163042	33	0.01805556	2188847	0.0126	69	0.00134038	13689421	0.0911
JNJ10166565	4	0.00194444	0	0.0000	3	0.00005828	291660	0.0019
JNJ17174664	88	0.04888889	7121122	0.0409	399	0.00774117	65100086	0.4335
JNJ17187027	11	0.00583333	1073763	0.0062	5	0.00008742	0	0.0000
JNJ17187053	8	0.00444444	0	0.0000	9	0.00016512	0	0.0000
JNJ17193774	109	0.06027778	15714170	0.0903	136	0.00263219	15725984	0.1047
JNJ17200976	5	0.00250000	125443	0.0007	5	0.00009713	0	0.0000
JNJ17205955	20	0.01083333	3135653	0.0180	8	0.00015541	0	0.0000
JNJ17205955	9	0.00472222	72387	0.0004	17	0.00033024	736311	0.0049
JNJ17205994	6	0.00305556	644015	0.0037	4	0.00007770	0	0.0000
JNJ17226703	77	0.04277778	12632849	0.0726	28	0.00054392	9312311	0.0620
JNJ17982133	14	0.00750000	887585	0.0051	1	0.00001943	52047	0.0003
JNJ17989049	23	0.01277778	2117429	0.0122	13	0.00024282	0	0.0000
処理せず	実施せず				432	0.00838222	42987388	0.2862
AA	147	0.08138889	20330009	0.1168	8	0.00014569	87206	0.0006
AA/3a	1800	1.00000000	174052346	1.0000	1478	0.02870158	150190000	1.0000

10

20

【 0 2 7 7 】

【表 10】

表 V : GSK-3B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞の分化及び増殖に与える影響。

増殖反応-強いヒット		Sox17発現-強いヒット		HNF3β発現-強いヒット	
化合物名	Wnt 3a/AA対照と比較した率	化合物名	Wnt 3a/AA対照と比較した率	化合物名	Wnt 3a/AA対照と比較した率
RWJ352628	5.8846	RWJ673515	1.7415	RWJ352628	5.4668
RWJ352190	4.3268	JNJ10184655	1.2678	RWJ352190	3.1115
RWJ553709	2.5632	Sox17発現-中程度のヒット		RWJ553709	2.7680
JNJ10148307	1.9264	RWJ676139	1.1359	RWJ673515	1.6618
RWJ673515	1.4231	RWJ675430	1.1205	JNJ10148307	1.3832
JNJ5226780	1.3757	RWJ676432	1.0749	JNJ18157698	1.2196
RWJ675430	1.3754	RWJ352628	1.0630	HNF3β発現-中程度のヒット	
JNJ18157698	1.3681	RWJ675605	1.0419	RWJ675430	1.1562
JNJ10184655	1.3217	RWJ355923	1.0342	JNJ10222784	1.1010
RWJ676139	1.3107	JNJ18157698	1.0208	JNJ5226780	1.0087
増殖反応-中程度のヒット		JNJ10182562	1.0080	RWJ355923	0.9520
JNJ5226780	1.1246	参照化合物	0.9708	RWJ353709	0.9515
RWJ676432	1.0870	JNJ10148307	0.9706	RWJ676139	0.9499
RWJ355923	1.0764	RWJ352190	0.9266	JNJ10184655	0.8807
RWJ676139	1.0736	RWJ353709	0.9014	JNJ10182562	0.8688
JNJ10182562	1.0495	RWJ664545	0.8889	RWJ664545	0.8649
JNJ10184655	1.0269	JNJ10164895	0.8534	RWJ674239	0.7718
JNJ10164895	1.0092	JNJ10179130	0.8165	RWJ676432	0.7711
RWJ353709	0.9928	RWJ676431	0.8113	参照化合物	0.7576
RWJ675605	0.9484	RWJ553709	0.7926	JNJ10164895	0.7428
RWJ664545	0.9440	JNJ5226780	0.7921	JNJ10179130	0.7104
JNJ10182562	0.9249	JNJ8710481	0.7365	JNJ10172058	0.6803
JNJ10179130	0.9023	JNJ26533156	0.7189	JNJ8710481	0.6412
RWJ676431	0.9001	JNJ10172058	0.6864	JNJ10178727	0.5866
JNJ10172058	0.8926	JNJ10222784	0.6476		
RWJ445224	0.8514	RWJ674239	0.6282		
参照化合物	0.8162	JNJ8706646	0.6161		
JNJ8710481	0.8161	RWJ675948	0.5887		
JNJ26533156	0.7992	JNJ10178727	0.5686		
RWJ352190	0.7864				
RWJ553709	0.7842				
RWJ665436	0.7277				
RWJ675948	0.6342				
RWJ353258	0.6211				
JNJ10178727	0.6025				

30

40

【 0 2 7 8 】

【表 1 1 - 1】

表 V I : G S K - 3 B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞の増殖に与える影響。

JNJ番号	未加工データ			平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	1. 1348	1. 0099	1. 1092	1. 0846	0. 0660	6. 1	116. 5
処理せず	0. 9344	0. 5977	0. 8454	0. 7925	0. 1745	22. 0	85. 2
AA/DMSO	0. 3878	0. 2434	0. 2252	0. 2855	0. 0891	31. 2	30. 7
AA/Wnt3a/DMSO	0. 6098	1. 0804	0. 7635	0. 8179	0. 2403	25. 8	100. 0
RWJ351001	0. 3418	0. 4276	0. 5751	0. 4482	0. 1180	26. 3	48. 2
RWJ351958	0. 1362	0. 1531	0. 1532	0. 1475	0. 0098	6. 6	15. 8
RWJ352190	1. 3764	1. 2753	1. 3208	1. 3242	0. 0506	3. 8	142. 3
RWJ352244	0. 6923	0. 5994	0. 6134	0. 6350	0. 0501	7. 9	68. 2
RWJ352628	1. 7896	1. 4721	2. 1908	1. 8175	0. 3602	19. 8	195. 3
RWJ353258	1. 7591	1. 6274	1. 6518	1. 6794	0. 0701	4. 2	180. 4
RWJ355131	0. 3702	0. 3193	0. 3368	0. 3421	0. 0259	7. 6	36. 8
RWJ355923	0. 5876	0. 6384	0. 9154	0. 7138	0. 1764	24. 7	76. 7
RWJ356205	0. 3074	0. 2328	0. 2920	0. 2774	0. 0394	14. 2	29. 8
RWJ382867	0. 1311	0. 1245	0. 1288	0. 1281	0. 0034	2. 6	13. 8
RWJ395477	0. 1270	0. 2778	0. 1916	0. 1988	0. 0757	38. 1	21. 4
RWJ414342	0. 2166	0. 3062	0. 2915	0. 2714	0. 0481	17. 7	29. 2
RWJ414984	0. 4362	0. 3728	0. 2481	0. 3524	0. 0957	27. 2	37. 9
RWJ425264	0. 1560	0. 1481	0. 1359	0. 1467	0. 0101	6. 9	15. 8
RWJ425268	0. 2932	0. 3883	0. 6258	0. 4358	0. 1713	39. 3	46. 8
RWJ425271	0. 1362	0. 1479	0. 1298	0. 1380	0. 0092	6. 7	14. 8
RWJ425348	0. 2198	0. 2159	0. 2300	0. 2219	0. 0073	3. 3	23. 8
RWJ445224	0. 7624	0. 2705	0. 2478	0. 4269	0. 2908	68. 1	45. 9
RWJ447228	0. 1239	0. 1233	0. 1269	0. 1247	0. 0019	1. 5	13. 4
RWJ553709	0. 1277	0. 1254	0. 6980	0. 3170	0. 3299	104. 1	34. 1
RWJ659780	0. 2665	0. 3215	0. 2605	0. 2828	0. 0336	11. 9	30. 4
RWJ662440	0. 2395	0. 3235	0. 1333	0. 2321	0. 0953	41. 1	24. 9
RWJ663860	0. 2646	0. 1873	0. 1293	0. 1937	0. 0679	35. 0	20. 8
RWJ664545	0. 3590	0. 2790	0. 1515	0. 2632	0. 1047	39. 8	28. 3
RWJ665436	0. 4690	0. 5805	0. 3349	0. 4615	0. 1230	26. 6	49. 6
JNJ番号	未加工データ			平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	1. 1525	1. 1269	1. 1140	1. 1311	0. 0196	1. 7	71. 0
処理せず	1. 2057	1. 2358	1. 3132	1. 2516	0. 0555	4. 4	78. 6
AA/DMSO	0. 2622	0. 2073	0. 2830	0. 2508	0. 0391	15. 6	15. 8
AA/Wnt3a/DMSO	1. 3943	1. 7976	1. 8000	1. 5922	0. 2136	13. 4	100. 0
RWJ665588	0. 1930	0. 2223	0. 2167	0. 2107	0. 0156	7. 4	13. 2
RWJ665862	0. 1757	0. 1813	0. 1835	0. 1802	0. 0040	2. 2	11. 3
RWJ666167	0. 1473	0. 1880	0. 1732	0. 1695	0. 0206	12. 2	10. 6
RWJ666168	0. 1330	0. 1362	0. 1867	0. 1520	0. 0301	19. 8	9. 5
RWJ666205	0. 8191	0. 5493	0. 6526	0. 6737	0. 1361	20. 2	42. 3
RWJ666213	0. 4008	0. 2779	0. 3869	0. 3552	0. 0673	18. 9	22. 3
RWJ667045	0. 1220	0. 1248	0. 1251	0. 1240	0. 0017	1. 4	7. 8
RWJ667046	0. 2883	0. 3308	0. 5503	0. 3898	0. 1406	36. 1	24. 5
RWJ667069	0. 2835	0. 4024	0. 5698	0. 4186	0. 1438	34. 4	26. 3

10

20

30

40

【 0 2 7 9 】

【表 1 1 - 2】
(表V I の続き)

JNJ番号	未加工データ			平均	S. D.	% CV	%対照
RWJ669182	0.3704	0.6073	0.5280	0.5019	0.1206	24.0	31.5
RWJ669327	0.2266	0.1815	0.2289	0.2123	0.0267	12.6	13.3
RWJ670804	1.0820	1.1862	1.1076	1.1253	0.0543	4.8	70.7
RWJ670908	0.3590	0.5457	0.6123	0.5057	0.1313	26.0	31.8
RWJ670984	0.2198	0.3564	0.3202	0.2988	0.0708	23.7	18.8
RWJ671232	0.2928	0.2920	0.3659	0.3169	0.0424	13.4	19.9
RWJ672667	0.3349	0.3013	0.3507	0.3290	0.0252	7.7	20.7
RWJ672932	0.1852	0.1924	0.2349	0.2042	0.0269	13.2	12.8
RWJ672934	0.2170	0.3003	0.1877	0.2350	0.0584	24.9	14.8
RWJ673313	0.3094	0.2515	0.1881	0.2497	0.0607	24.3	15.7
RWJ673515	1.8452	1.7710	1.5591	1.7251	0.1485	8.6	108.3
RWJ673829	0.7305	0.7067	0.6250	0.6874	0.0553	8.0	43.2
RWJ673830	0.2113	0.1800	0.1547	0.1820	0.0284	15.6	11.4
RWJ674239	1.5225	1.5912	0.1081	1.0739	0.8371	78.0	67.4
RWJ674240	0.4006	1.2807	0.1162	0.5992	0.6071	101.3	37.6
RWJ674241	0.1972	0.1839	0.1162	0.1658	0.0434	26.2	10.4
RWJ674320	0.1351	0.1318	0.1169	0.1279	0.0097	7.6	8.0
JNJ番号	未加工データ			平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	1.0568	1.0604		1.0586	0.0025	0.2	71.9
処理せず	1.1544	0.9576		1.0560	0.1392	13.2	71.7
AAのみ+DMSO	0.6329	0.8434		0.7382	0.1488	20.2	47.1
AA+Wnt3a+DMSO	1.2704	1.8669		1.4229	0.2960	20.8	100.0
RWJ674817	0.5617	0.2098		0.3858	0.2488	64.5	19.9
RWJ674855	0.6850	0.5853		0.6352	0.0705	11.1	39.2
RWJ674855	0.7496	0.9187		0.8342	0.1196	14.3	54.5
RWJ675104	0.2320	0.2124		0.2222	0.0139	6.2	7.3
RWJ675260	0.8079	1.4391		1.1235	0.4463	39.7	76.9
RWJ675261	0.8310	0.7318		0.7814	0.0701	9.0	50.5
RWJ675266	1.0646	1.1384		1.1015	0.0522	4.7	75.2
RWJ675366	0.6344	1.0400		0.8372	0.2868	34.3	54.8
細胞なし	0.1335	0.2070		0.1703	0.0520	30.5	3.3
RWJ675369	0.8643	0.4060		0.6352	0.3241	51.0	39.2
RWJ675430	1.7922	1.8533		1.8228	0.0432	2.4	130.9
RWJ675578	0.1914	0.2371		0.2143	0.0323	15.1	6.7
RWJ675605	1.8401	1.7563		1.7982	0.0593	3.3	129.0
RWJ675881	1.0301	1.0356		1.0329	0.0039	0.4	69.9
RWJ675946	0.1306	0.1338		0.1322	0.0023	1.7	0.3
RWJ675948	1.7143	1.6506		1.6825	0.0450	2.7	120.0
RWJ676061	0.4170	0.4956		0.4563	0.0556	12.2	25.4
RWJ676085	0.1772	0.2348		0.2060	0.0407	19.8	6.0
RWJ676137	1.0231	1.2392		1.1312	0.1528	13.5	77.5
RWJ676139	1.9718	2.0997		2.0358	0.0904	4.4	147.3

10

20

30

40

【 0 2 8 0 】

【表 1 1 - 3】
(表V I の続き)

JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
RWJ676431	1. 5168	1. 6872	1. 6020	0. 1205	7. 5	113. 8
RWJ676432	1. 6935	1. 9710	1. 8323	0. 1962	10. 7	131. 6
RWJ67657	1. 2655	1. 1829	1. 2242	0. 0584	4. 8	84. 7
RWJ676639	1. 3481	1. 3168	1. 3325	0. 0221	1. 7	93. 0
JNJ26511966	0. 6444	0. 7239	0. 6842	0. 0562	8. 2	43. 0
JNJ26511979	0. 2046	0. 3076	0. 2561	0. 0728	28. 4	9. 9
JNJ26512005	1. 3627	1. 0693	1. 2160	0. 2075	17. 1	84. 0
JNJ26533065	0. 8722	0. 9660	0. 9191	0. 0663	7. 2	61. 1
JNJ26533091	1. 0332	0. 4554	0. 7443	0. 4086	54. 9	47. 6
JNJ26533104	0. 8775	0. 7347	0. 8061	0. 1010	12. 5	52. 4
JNJ26533156	1. 7865	1. 2008	1. 4937	0. 4142	27. 7	105. 5
JNJ26714181	0. 2396	0. 1584	0. 1990	0. 0574	28. 9	5. 5
JNJ26714194	0. 8122	1. 0827	0. 9475	0. 1913	20. 2	63. 3
JNJ26714207	0. 1342	0. 1363	0. 1353	0. 0015	1. 1	0. 6
JNJ26714220	1. 0462	0. 5838	0. 8150	0. 3270	40. 1	53. 1
JNJ26875563	0. 4586	0. 2903	0. 3745	0. 1190	31. 8	19. 0
JNJ22791671	0. 1277	0. 1402	0. 1340	0. 0088	6. 6	0. 5
JNJ26893438	0. 1258	0. 1324	0. 1291	0. 0047	3. 6	0. 1
JNJ26941226	0. 1219	0. 1216	0. 1218	0. 0002	0. 2	-0. 5
JNJ28572128	0. 4223	0. 4721	0. 4472	0. 0352	7. 9	24. 7
JNJ28850601	0. 1514	0. 1396	0. 1455	0. 0083	5. 7	1. 4
JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	0. 7423	0. 7081	0. 7252	0. 0242	3. 3	87. 7
処理せず	0. 4936	0. 5689	0. 5313	0. 0532	10. 0	59. 8
AAのみ+DMSO	0. 1433	0. 1939	0. 1686	0. 0358	21. 2	7. 6
AA+Wnt3a+DMSO	0. 6808	0. 9406	0. 8107	0. 1837	22. 7	100. 0
JNJ17994873	0. 2447	0. 1331	0. 1889	0. 0789	41. 8	10. 6
JNJ17994899	0. 1537	0. 1302	0. 1420	0. 0166	11. 7	3. 8
細胞なし	0. 1163	0. 1147	0. 1155	0. 0011	1. 0	0. 0
JNJ17994912	0. 2994	0. 2592	0. 2793	0. 0284	10. 2	23. 6
JNJ17994925	0. 1353	0. 2121	0. 1737	0. 0543	31. 3	8. 4
JNJ180125	0. 1267	0. 1419	0. 1343	0. 0107	8. 0	2. 7
JNJ18014061	0. 1376	0. 1676	0. 1526	0. 0212	13. 9	5. 3
JNJ18014074	0. 1134	0. 1103	0. 1119	0. 0022	2. 0	-0. 5
JNJ18018338	0. 1318	0. 1478	0. 1398	0. 0113	8. 1	3. 5
JNJ18018351	0. 2569	0. 2124	0. 2347	0. 0315	13. 4	17. 1
JNJ18047991	0. 2674	0. 2636	0. 2655	0. 0027	1. 0	21. 6
JNJ18055726	0. 4357	0. 3467	0. 3912	0. 0629	16. 1	39. 7
JNJ18077800	0. 1265	0. 1588	0. 1427	0. 0228	16. 0	3. 9
JNJ18157074	0. 1662	0. 2521	0. 2092	0. 0607	29. 0	13. 5
JNJ18157087	0. 1596	0. 1566	0. 1581	0. 0021	1. 3	6. 1
JNJ18157646	0. 2725	0. 1636	0. 2181	0. 0770	35. 3	14. 8

10

20

30

40

【 0 2 8 1 】

【表 1 1 - 4】
(表V I の続き)

JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ18157711	1. 2256	1. 0636	1. 1446	0. 1146	10. 0	148. 0
JNJ18157711	0. 1134	0. 1070	0. 1102	0. 0045	4. 1	-0. 8
JNJ19363357	0. 1469	0. 1495	0. 1482	0. 0018	1. 2	4. 7
JNJ19369233	0. 1169	0. 1122	0. 1146	0. 0033	2. 9	-0. 1
JNJ19369246	0. 1595	0. 1422	0. 1509	0. 0122	8. 1	5. 1
JNJ19370026	1. 0484	1. 0749	1. 0617	0. 0187	1. 8	136. 1
JNJ19376240	0. 3012	0. 2347	0. 2680	0. 0470	17. 5	21. 9
JNJ19386042	0. 1267	0. 1510	0. 1389	0. 0172	12. 4	3. 4
JNJ19410833	1. 1902	1. 1487	1. 1695	0. 0293	2. 5	151. 6
JNJ19410859	0. 6400	0. 7076	0. 6738	0. 0478	7. 1	80. 3
JNJ19410872	0. 1701	0. 1752	0. 1727	0. 0036	2. 1	8. 2
JNJ19558929	0. 3435	0. 3488	0. 3462	0. 0037	1. 1	33. 2
JNJ19567314	0. 4032	0. 3548	0. 3790	0. 0342	9. 0	37. 9
JNJ19567327	0. 1602	0. 1502	0. 1552	0. 0071	4. 6	5. 7
JNJ19567340	0. 1604	0. 2079	0. 1842	0. 0336	18. 2	9. 9
JNJ19567405	0. 1646	0. 1592	0. 1619	0. 0038	2. 4	6. 7
JNJ19573541	0. 1779	0. 2273	0. 2026	0. 0349	17. 2	12. 5
JNJ19574867	0. 1225	0. 1443	0. 1334	0. 0154	11. 6	2. 6
JNJ19574880	0. 1300	0. 1291	0. 1296	0. 0006	0. 5	2. 0
JNJ20948798	0. 1263	0. 1336	0. 1300	0. 0052	4. 0	2. 1
JNJ21192730	0. 2778	0. 1326	0. 2052	0. 1027	50. 0	12. 9
JNJ21194667	0. 2569	0. 1219	0. 1894	0. 0955	50. 4	10. 6
JNJ21196227	0. 1640	0. 1158	0. 1399	0. 0341	24. 4	3. 5
JNJ24843611	1. 1486	0. 8970	1. 0228	0. 1779	17. 4	130. 5
JNJ24843611	0. 1358	0. 1201	0. 1280	0. 0111	8. 7	1. 8
JNJ24326185	0. 1257	0. 1257	0. 1257	0. 0000	0. 0	1. 5
JNJ24843572	0. 4676	0. 4803	0. 4740	0. 0090	1. 9	51. 6
JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	0. 6935	0. 7803	0. 7369	0. 0614	8. 3	104. 8
処理せず	0. 4735	0. 6069	0. 5402	0. 0943	17. 5	71. 5
AAのみ+DMSO	0. 1428	0. 1656	0. 1542	0. 0161	10. 5	6. 3
AA+Wnt3a+DMSO	0. 5702	0. 8468	0. 7085	0. 1956	27. 6	100. 0
JNJ24843585	0. 1599	0. 2380	0. 1990	0. 0552	27. 8	13. 8
JNJ25753520	0. 1287	0. 1244	0. 1266	0. 0030	2. 4	1. 6
細胞なし	0. 1241	0. 1100	0. 1171	0. 0100	8. 5	0. 0
JNJ25753403	0. 1235	0. 1152	0. 1194	0. 0059	4. 9	0. 4
JNJ25757173	0. 1199	0. 1278	0. 1239	0. 0056	4. 5	1. 1
JNJ25757173	0. 1174	0. 1162	0. 1168	0. 0008	0. 7	-0. 1
JNJ25757238	1. 1100	0. 9464	1. 0282	0. 1157	11. 3	154. 1
JNJ25758707	0. 1247	0. 1115	0. 1181	0. 0093	7. 9	0. 2
JNJ25758785	0. 2640	0. 1688	0. 2164	0. 0673	31. 1	16. 8
JNJ25758850	0. 2313	0. 1307	0. 1810	0. 0711	39. 3	10. 8

10

20

30

40

【 0 2 8 2 】

【表 1 1 - 5】
(表V Iの続き)

JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ25758863	0. 8639	0. 9218	0. 8929	0. 0409	4. 6	131. 2
JNJ25873419	0. 2540	0. 2320	0. 2430	0. 0156	6. 4	21. 3
JNJ25887537	0. 1809	0. 3077	0. 2443	0. 0897	36. 7	21. 5
JNJ25900641	0. 1892	0. 1872	0. 1882	0. 0014	0. 8	12. 0
JNJ25900654	0. 1967	0. 2492	0. 2230	0. 0371	16. 7	17. 9
JNJ25900706	0. 3346	0. 1619	0. 2483	0. 1221	49. 2	22. 2
JNJ26047723	0. 1106	0. 1138	0. 1122	0. 0023	2. 0	-0. 8
JNJ26054912	0. 1224	0. 1445	0. 1335	0. 0156	11. 7	2. 8
JNJ26064571	0. 1312	0. 1270	0. 1291	0. 0030	2. 3	2. 0
JNJ26067626	0. 1653	0. 2114	0. 1884	0. 0326	17. 3	12. 0
JNJ26067652	0. 1732	0. 1467	0. 1600	0. 0187	11. 7	7. 2
JNJ26069901	0. 1618	0. 2754	0. 2186	0. 0803	36. 7	17. 2
JNJ26077883	1. 0006	0. 9631	0. 9819	0. 0265	2. 7	146. 2
JNJ26116922	0. 6472	0. 4319	0. 5396	0. 1522	28. 2	71. 4
JNJ26120601	0. 1539	0. 1469	0. 1504	0. 0049	3. 3	5. 6
JNJ26120614	0. 1127	0. 1309	0. 1218	0. 0129	10. 6	0. 8
JNJ26128726	0. 6887	0. 5860	0. 6374	0. 0726	11. 4	88. 0
JNJ26130403	0. 1141	0. 1094	0. 1118	0. 0033	3. 0	-0. 9
JNJ26134771	0. 2774	0. 1690	0. 2232	0. 0767	34. 3	17. 9
JNJ26150202	0. 9482	1. 1150	1. 0316	0. 1179	11. 4	154. 6
JNJ26153647	0. 7687	0. 6804	0. 7246	0. 0624	8. 6	102. 7
JNJ26158015	0. 7125	0. 3347	0. 5236	0. 2671	51. 0	68. 7
JNJ26158054	0. 1446	0. 1221	0. 1334	0. 0159	11. 9	2. 7
JNJ26158093	1. 0968	1. 3108	1. 2038	0. 1513	12. 6	183. 8
JNJ26158106	0. 3167	0. 3415	0. 3291	0. 0175	5. 3	35. 8
JNJ26161343	0. 1261	0. 1144	0. 1203	0. 0083	6. 9	0. 5
JNJ26170794	0. 2223	0. 2930	0. 2577	0. 0500	19. 4	23. 8
JNJ26170820	0. 1265	0. 1236	0. 1251	0. 0021	1. 6	1. 3
JNJ26170833	1. 1940	0. 9431	1. 0686	0. 1774	16. 6	160. 9
JNJ26177086	1. 0689	0. 6879	0. 8784	0. 2694	30. 7	128. 7
JNJ26177762	1. 0444	0. 7603	0. 9024	0. 2009	22. 3	132. 8
JNJ26184457	0. 1443	0. 1209	0. 1326	0. 0165	12. 5	2. 6
JNJ26219050	0. 1152	0. 1309	0. 1231	0. 0111	9. 0	1. 0
JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	0. 7590	0. 7451	0. 7521	0. 0098	1. 3	98. 0
処理せず	0. 5687	0. 4490	0. 5089	0. 0846	16. 6	60. 4
AAのみ+DMSO	0. 1988	0. 1522	0. 1755	0. 0330	18. 8	8. 9
AA+Wnt3a+DMSO	0. 6837	0. 8460	0. 7649	0. 1148	15. 0	100. 0
JNJ26219063	0. 1911	0. 1101	0. 1506	0. 0573	38. 0	5. 0
JNJ26220454	0. 2772	0. 1151	0. 1962	0. 1146	58. 4	12. 1
細胞なし	0. 1278	0. 1084	0. 1181	0. 0137	11. 6	0. 0
JNJ26241774	0. 1443	0. 2120	0. 1782	0. 0479	26. 9	9. 3

10

20

30

40

【 0 2 8 3 】

【表 1 1 - 6】
(表V Iの続き)

JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
JNJ26241917	0. 4413	0. 2238	0. 3326	0. 1538	46. 2	33. 2
JNJ26243204	0. 1098	0. 1085	0. 1092	0. 0009	0. 8	-1. 4
JNJ26247143	0. 1389	0. 2147	0. 1768	0. 0536	30. 3	9. 1
JNJ26248729	0. 1852	0. 1342	0. 1597	0. 0361	22. 6	6. 4
JNJ26261105	0. 1114	0. 1295	0. 1205	0. 0128	10. 6	0. 4
JNJ26361712	0. 5375	0. 6158	0. 5767	0. 0554	9. 6	70. 9
JNJ26361725	0. 1259	0. 1441	0. 1350	0. 0129	9. 5	2. 6
JNJ26366730	0. 1206	0. 1312	0. 1259	0. 0075	6. 0	1. 2
JNJ26367991	0. 2269	0. 2857	0. 2563	0. 0416	16. 2	21. 4
JNJ26367991	0. 1140	0. 1079	0. 1110	0. 0043	3. 9	-1. 1
JNJ26399906	0. 9589	0. 8868	0. 9229	0. 0510	5. 5	124. 4
JNJ26399906	1. 0442	0. 9622	1. 0032	0. 0580	5. 8	136. 8
JNJ26399945	0. 1961	0. 1735	0. 1848	0. 0160	8. 6	10. 3
JNJ26399971	0. 5732	0. 5216	0. 5474	0. 0365	6. 7	66. 4
JNJ26399984	0. 1273	0. 1217	0. 1245	0. 0040	3. 2	1. 0
JNJ26399997	0. 5932	0. 6671	0. 6302	0. 0523	8. 3	79. 2
JNJ26400049	0. 1444	0. 1368	0. 1406	0. 0054	3. 8	3. 5
JNJ26483197	1. 0786	1. 0891	1. 0839	0. 0074	0. 7	149. 3
JNJ26483310	0. 5418	0. 2338	0. 3878	0. 2178	56. 2	41. 7
JNJ26483223	0. 1268	0. 2052	0. 1660	0. 0554	33. 4	7. 4
JNJ26483236	0. 1169	0. 1184	0. 1177	0. 0011	0. 9	-0. 1
JNJ26483249	0. 8618	1. 0400	0. 9509	0. 1260	13. 3	128. 8
JNJ26483249	0. 8430	1. 0187	0. 9309	0. 1242	13. 3	125. 7
JNJ26483262	0. 3659	0. 3168	0. 3414	0. 0347	10. 2	34. 5
JNJ26511901	0. 9184	0. 8116	0. 8650	0. 0755	8. 7	115. 5
JNJ26511927	0. 2384	0. 3156	0. 2770	0. 0546	19. 7	24. 6
JNJ26511953	0. 2297	0. 1469	0. 1883	0. 0585	31. 1	10. 9
RWJ67694	0. 1955	0. 1256	0. 1606	0. 0494	30. 8	6. 6
RWJ676940	0. 1658	0. 1704	0. 1681	0. 0033	1. 9	7. 7
RWJ677545	0. 1399	0. 1303	0. 1351	0. 0068	5. 0	2. 6
RWJ678986	0. 1234	0. 1236	0. 1235	0. 0001	0. 1	0. 8
RWJ680665	0. 1397	0. 2147	0. 1772	0. 0530	29. 9	9. 1
RWJ680667	0. 1218	0. 1310	0. 1264	0. 0065	5. 1	1. 3
RWJ680668	0. 1456	0. 1981	0. 1719	0. 0371	21. 6	8. 3
RWJ680669	0. 5412	0. 1898	0. 3655	0. 2485	68. 0	38. 2
RWJ680858	0. 1996	0. 1245	0. 1621	0. 0531	32. 8	6. 8
RWJ680858	0. 1418	0. 2014	0. 1716	0. 0421	24. 6	8. 3
RWJ680879	0. 1106	0. 1197	0. 1152	0. 0064	5. 6	-0. 5
RWJ680885	0. 1159	0. 1272	0. 1216	0. 0080	6. 6	0. 5
JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	0. 8077	0. 7210	0. 7644	0. 0613	8. 0	74. 7
未処理+DMSO	0. 4638	0. 4073	0. 4356	0. 0400	9. 2	36. 7

10

20

30

40

【 0 2 8 4 】

【表 1 1 - 7】
(表V I の続き)

JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
AA/Wnt3a	0. 8466	0. 9935	0. 9830	0. 2592	26. 4	100. 0
JNJ10222784	0. 8095	0. 9055	0. 8575	0. 0679	7. 9	85. 5
JNJ10222927	0. 3519	0. 4708	0. 4114	0. 0841	20. 4	33. 9
JNJ10231273	0. 1609	0. 1275	0. 1442	0. 0236	16. 4	3. 1
JNJ10259847	0. 5020	0. 2733	0. 3877	0. 1617	41. 7	31. 2
JNJ10259847	0. 3413	0. 4146	0. 3780	0. 0518	13. 7	30. 1
JNJ17154215	0. 1176	0. 1174	0. 1175	0. 0001	0. 1	0. 0
JNJ17154215	0. 1148	0. 1410	0. 1279	0. 0185	14. 5	1. 2
JNJ17157659	0. 2394	0. 2450	0. 2422	0. 0040	1. 6	14. 4
JNJ17163042	0. 3672	0. 3098	0. 3385	0. 0406	12. 0	25. 5
JNJ10166565	0. 2722	0. 1593	0. 2158	0. 0798	37. 0	11. 3
JNJ17174664	0. 5079	0. 4349	0. 4714	0. 0516	11. 0	40. 9
JNJ17187027	0. 1076	0. 1168	0. 1122	0. 0065	5. 8	-0. 6
JNJ17187053	0. 2569	0. 2151	0. 2360	0. 0296	12. 5	13. 7
JNJ17193774	0. 2846	0. 4376	0. 3611	0. 1082	30. 0	28. 1
JNJ17200976	0. 1168	0. 1136	0. 1152	0. 0023	2. 0	-0. 3
JNJ17205955	0. 1168	0. 1152	0. 1160	0. 0011	1. 0	-0. 2
JNJ17205955	0. 1137	0. 1195	0. 1166	0. 0041	3. 5	-0. 1
JNJ17205994	0. 1154	0. 1152	0. 1153	0. 0001	0. 1	-0. 3
JNJ17226703	0. 2188	0. 2353	0. 2271	0. 0117	5. 1	12. 6
JNJ17982133	0. 4588	0. 2521	0. 3555	0. 1462	41. 1	27. 5
JNJ17989049	0. 3081	0. 1961	0. 2521	0. 0792	31. 4	15. 5
JNJ番号	未加工データ		平均	S. D.	% CV	%対照
調整培地	0. 7914	1. 1189	0. 9552	0. 2316	24. 2	93. 3
処理せず	0. 4215	0. 5259	0. 4737	0. 0738	15. 6	39. 8
細胞なし	0. 1152	0. 1160	0. 1156	0. 0006	0. 5	0. 0
AA/Wnt3a	0. 7168	0. 8836	1. 0151	0. 2016	19. 9	100. 0
RWJ680991	0. 2882	0. 2308	0. 2844	0. 0499	17. 6	18. 8
RWJ680992	0. 3049	0. 2845	0. 3127	0. 0282	9. 0	21. 9
RWJ680993	0. 5403	0. 2570	0. 3855	0. 1332	34. 6	30. 0
RWJ681140	0. 7323	0. 3034	0. 4388	0. 2041	46. 5	35. 9
RWJ681142	0. 1185	0. 1216	0. 1199	0. 0018	1. 5	0. 5
RWJ681146	0. 2496	0. 2683	0. 2302	0. 0376	16. 3	12. 7
RWJ681945	0. 1548	0. 1356	0. 1513	0. 0134	8. 8	4. 0
RWJ68198	0. 1555	0. 1450	0. 1581	0. 0161	10. 2	4. 7
RWJ682205	0. 2347	0. 1920	0. 3785	0. 2589	68. 4	29. 2
RWJ447228	0. 1842	0. 2093	0. 3793	0. 2585	68. 2	29. 3
RWJ675430	0. 7223	0. 8707	0. 4291	0. 2452	57. 2	34. 8
RWJ355923	0. 6268	0. 3192	0. 3354	0. 1667	49. 7	24. 4

【 0 2 8 5 】

【表 1 2】

表VII：GSK-3Bの酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞の増殖に与える影響。

List強いヒット	
>=120%対照	
JNJ番号	%対照値
RWJ352628	195.3
JNJ26158093	183.8
RWJ353258	180.4
JNJ26170833	160.9
JNJ26150202	154.6
JNJ25757238	154.1
JNJ19410833	151.6
JNJ26483197	149.3
JNJ18157711	148.0
RWJ676139	147.3
JNJ26077883	146.2
RWJ352190	142.3
JNJ26399906	136.8
JNJ19370026	136.1
JNJ26177762	132.8
RWJ676432	131.6
JNJ25758863	131.2
RWJ675430	130.9
JNJ24843611	130.5
RWJ675605	129.0
JNJ26483249	128.8
JNJ26177086	128.7
JNJ26483249	125.7
JNJ26399906	124.4
RWJ675948	120.0

List中程度のヒット	
60~120%対照	
JNJ番号	%対照値
JNJ26511901	115.5
RWJ676431	113.8
RWJ673515	108.3
JNJ26533156	105.5
JNJ26153647	102.7
RWJ676639	93.0
JNJ26128726	88.0
JNJ10222784	85.5
RWJ67657	84.7
JNJ26512005	84.0
JNJ19410859	80.3
JNJ26399997	79.2
RWJ676137	77.5
RWJ675260	76.9
RWJ355923	76.7
RWJ675266	75.2
JNJ26116922	71.4
JNJ26361712	70.9
RWJ670804	70.7
RWJ675881	69.9
JNJ26158015	68.7
RWJ352244	68.2
RWJ674239	67.4
JNJ26399971	66.4
JNJ26714194	63.3
JNJ26533065	61.1

10

20

30

【 0 2 8 6 】

【表 1 3】

表 V I I I : G S K - 3 B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞系 H 1 細胞の増殖に与える用量依存的影響

濃縮	JNJ10220067		JNJ17163796		JNJ17189731		JNJ17223375		JNJ18157698	
[μ M]	セル番号	SD								
10	1.006	0.051	0.039	0.049	0.193	0.147	1.280	0.014	1.049	0.062
5	1.058	0.047	1.164	0.018	0.889	0.035	1.348	0.007	1.104	0.014
2.5	1.031	0.054	1.022	0.023	0.896	0.035	1.318	0.028	0.932	0.087
1.25	0.899	0.040	1.121	0.023	1.120	0.072	1.159	0.041	1.006	0.023
0.625	0.742	0.095	1.092	0.044	1.107	0.093	1.029	0.018	0.832	0.026
0.313	0.754	0.010	0.931	0.056	1.132	0.018	1.018	0.044	0.742	0.127
0.156	0.822	0.074	0.804	0.002	1.082	0.041	0.776	0.054	0.712	0.020
濃縮	JNJ26158015		JNJ26483197		JNJ26483249		JNJ17225871		JNJ17228458	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.001	0.001	0.096	0.103	0.058	0.074	0.290	0.307	0.000	0.000
5	0.034	0.035	0.262	0.268	0.173	0.207	0.458	0.263	0.089	0.067
2.5	0.566	0.461	0.592	0.019	0.428	0.326	0.640	0.104	0.438	0.050
1.25	0.897	0.103	1.124	0.101	0.850	0.238	0.739	0.129	0.636	0.016
0.625	0.921	0.122	1.106	0.056	0.910	0.061	0.805	0.036	0.736	0.025
0.313	1.028	0.069	0.888	0.213	0.868	0.131	0.785	0.094	0.791	0.038
0.156	1.027	0.067	0.890	0.079	0.742	0.051	0.774	0.027	0.832	0.005
濃縮	JNJ19370026		JNJ26150202		JNJ26170833		JNJ26177086		JNJ26177762	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.000	0.000	0.496	0.690	0.129	0.170	0.412	0.081	0.996	0.246
5	0.024	0.034	0.768	0.490	0.530	0.080	1.128	0.026	0.908	0.179
2.5	1.097	0.294	1.001	0.129	1.174	0.016	1.031	0.217	1.005	0.086
1.25	1.446	0.076	1.158	0.043	1.113	0.057	0.914	0.100	1.200	0.085
0.625	1.296	0.183	0.699	0.248	1.188	0.041	0.801	0.136	1.111	0.300
0.313	1.034	0.197	0.617	0.232	1.158	0.102	0.785	0.121	0.959	0.094
0.156	0.826	0.030	0.812	0.120	0.974	0.065	0.659	0.068	0.912	0.059
濃縮	JNJ26512005		JNJ26533065		JNJ26533156		JNJ26714194		JNJ3026582	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.000	0.000	0.021	0.027	0.002	0.002	0.052	0.067	0.053	0.024
5	0.000	0.000	0.339	0.254	1.011	0.499	1.161	0.134	0.905	0.036
2.5	0.192	0.233	1.350	0.170	1.724	0.042	1.293	0.020	1.019	0.015
1.25	0.552	0.458	1.277	0.101	1.652	0.032	1.213	0.087	1.163	0.062
0.625	0.895	0.054	0.713	0.151	1.357	0.023	1.025	0.045	1.231	0.152
0.313	0.734	0.075	0.665	0.207	1.213	0.177	1.241	0.031	1.216	0.007
0.156	0.594	0.078	0.469	0.465	1.206	0.142	1.041	0.007	1.103	0.065

10

20

30

【 0 2 8 7 】

【表 1 4】

表 I X : G S K - 3 B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞系 H 1 の細胞の分化に与える用量依存的影響

濃縮	JNJ10220067		JNJ17163796		JNJ171B9731		JNJ17223375		JNJ18157698	
[μ M]	Sox17強度	SD								
10	0.889	0.144	0.029	0.034	0.140	0.095	1.183	0.044	0.969	0.040
5	1.004	0.021	0.824	0.035	0.785	0.077	1.171	0.010	1.013	0.002
2.5	1.023	0.092	0.849	0.003	0.842	0.032	1.169	0.031	0.838	0.068
1.25	0.954	0.100	0.985	0.082	1.028	0.043	1.106	0.006	0.940	0.071
0.625	0.793	0.135	0.986	0.059	1.016	0.000	0.931	0.033	0.767	0.014
0.313	0.803	0.048	0.916	0.028	1.058	0.017	0.943	0.056	0.692	0.167
0.156	0.941	0.106	0.822	0.036	1.039	0.015	0.789	0.074	0.651	0.032
濃縮	JNJ26158015		JNJ26483197		JNJ26483249		JNJ17225871		JNJ17228458	
[μ M]	Sox17強度	SD								
10	0.001	0.001	0.034	0.027	0.054	0.063	0.267	0.280	0.000	0.001
5	0.017	0.020	0.071	0.054	0.141	0.169	0.402	0.229	0.056	0.035
2.5	0.200	0.157	0.497	0.076	0.373	0.326	0.605	0.041	0.286	0.034
1.25	0.792	0.066	0.993	0.144	0.783	0.282	0.686	0.185	0.587	0.023
0.625	0.624	0.118	1.061	0.066	0.887	0.062	0.786	0.061	0.695	0.001
0.313	0.934	0.127	0.937	0.136	0.859	0.176	0.780	0.132	0.753	0.098
0.156	0.986	0.055	0.888	0.062	0.666	0.015	0.782	0.061	0.816	0.043
濃縮	JNJ19370026		JNJ26150202		JNJ26170833		JNJ2G177086		JNJ26177762	
[μ M]	Sox17強度	SD								
10	0.000	0.000	0.491	0.681	0.281	0.358	0.330	0.059	0.701	0.307
5	0.035	0.049	0.158	0.224	0.460	0.189	0.846	0.036	0.728	0.146
2.5		0.192	0.800	0.201	1.018	0.139	0.887	0.191	0.928	0.019
1.25	1.238	0.030	0.910	0.045	0.960	0.106	0.819	0.179	1.159	0.093
0.625	0.997	0.095	0.567	0.190	1.050	0.038	0.755	0.126	1.136	0.186
0.313	0.791	0.172	0.515	0.276	1.032	0.063	0.667	0.125	1.006	0.009
0.156	0.669	0.037	0.708	0.148	0.950	0.087	0.628	0.053	0.922	0.096
濃縮	JNJ26512005		JNJ26533065		JNJ26533156		JNJ267U194		JNJ302G582	
[μ M]	Sox17強度	SD								
10	0.000	0.000	0.018	0.021	0.002	0.001	0.054	0.062	0.074	0.048
5	0.000	0.000	0.235	0.174	1.052	0.281	1.250	0.177	1.006	0.070
2.5	0.270	0.382	1.153	0.223	1.459	0.074	1.186	0.069	1.120	0.038
1.25	0.678	0.434	1.055	0.046	1.322	0.078	1.112	0.038	1.122	0.009
0.625	0.978	0.021	0.569	0.124	1.173	0.015	0.913	0.005	1.241	0.230
0.313	0.742	0.048	0.555	0.118	1.102	0.165	1.140	0.036	1.231	0.012
0.156	0.508	0.049	0.451	0.443	1.060	0.126	0.998	0.006	1.034	0.008

10

20

【 0 2 8 8 】

30

【表 15】

表 X : GSK-3B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞系 H9 細胞の増殖に与える用量依存的影響

濃縮	JNJ10220067		JNJ17163796		JNJ171B9731		JNJ17223375		JNJ18157698	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.164	0.209	0.001	0.000	0.049	0.028	0.123	0.106	0.770	0.077
5	0.147	0.141	0.616	0.497	0.583	0.155	0.954	0.146	0.496	0.011
2.5	0.140	0.112	1.295	0.402	1.108	0.170	0.795	0.101	0.384	0.247
1.25	0.307	0.198	1.233	0.058	1.195	0.147	0.541	0.851	0.395	0.002
0.625	0.138	0.071	0.606	0.121	1.108	0.014	0.332	0.849	0.221	0.009
0.313	0.063	0.008	0.397	0.020	0.887	0.078	0.206	0.085	0.172	0.071
0.156	0.069	0.001	0.214	0.025	0.699	0.109	0.142	0.039	0.138	0.048
濃縮	JNJ26158015		JNJ26483197		JNJ26483249		JNJ17225871		JNJ17228458	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.001	0.000	0.785	0.192	0.208	0.134	0.377	0.040	0.000	0.000
5	0.023	0.024	1.067	0.236	0.320	0.087	0.336	0.081	0.052	0.009
2.5	0.681	0.223	1.368	0.025	0.388	0.019	0.296	0.016	0.089	0.003
1.25	1.011	0.461	1.477	0.147	0.334	0.113	0.222	0.035	0.106	0.003
0.625	0.927	0.108	0.899	0.108	0.267	0.148	0.282	0.096	0.169	0.041
0.313	0.686	0.022	0.540	0.094	0.192	0.056	0.208	0.003	0.119	0.026
0.156	0.458	0.001	0.206	0.089	0.147	0.067	0.174	0.051	0.067	0.015
濃縮	JNJ19370026		JNJ26150202		JNJ26170B33		JNJ26177086		JNJ26177762	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.000	0.000	0.452	0.094	0.002	0.001	1.117	0.043	1.022	0.422
5	0.002	0.000	0.433	0.050	1.325	0.015	0.793	0.030	1.281	0.109
2.5		0.059	0.521	0.229	1.355	0.026	0.600	0.122	1.197	0.068
1.25	0.988	0.032	0.293	0.038	1.182	0.076	0.442	0.018	1.039	0.213
0.625	0.390	0.032	0.200	0.122	0.928	0.127	0.371	0.072	0.686	0.014
0.313	0.250	0.090	0.072	0.025	0.772	0.050	0.100	0.015	0.437	0.066
0.156	0.095	0.020	0.057	0.044	0.336	0.056	0.072	0.015	0.276	0.043
濃縮	JNJ26512005		JNJ26533065		JNJ26533156		JNJ267U194		JNJ3026582	
[μ M]	セル番号	SD								
10	0.007	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.038	0.004	0.001
5	0.002	0.001	0.127	0.069	0.415	0.023	0.382	0.110	0.017	0.003
2.5	0.001	0.001	0.151	0.059	0.425	0.082	0.345	0.001	0.033	0.037
1.25	0.090	0.097	0.108	0.051	0.325	0.042	0.284	0.076	0.044	0.028
0.625	0.248	0.058	0.230	0.168	0.314	0.062	0.266	0.021	0.100	0.099
0.313	0.264	0.048	0.086	0.033	0.267	0.098	0.347	0.084	0.057	0.032
0.156	0.133	0.069	0.063	0.004	0.218	0.012	0.192	0.014	0.070	0.048

10

20

30

【 0 2 8 9 】

【表 16】

表 X I : G S K - 3 B の酵素活性阻害剤がヒト胚幹細胞系 H 9 細胞の分化に与える用量依存的影響

濃縮	JNJ10220067		JNJ17163796		JNJ171B9731		JNJ17223375		JNJ18157698	
[μ M]	Sox17強度	SD								
0.157	0.051	0.003	0.132	0.003	0.678	0.093	0.116	0.047	0.095	0.025
0.313	0.052	0.008	0.311	0.005	0.951	0.010	0.155	0.071	0.110	0.030
0.625	0.103	0.058	0.453	0.076	1.160	0.013	0.277	0.061	0.154	0.013
1.25	0.312	0.255	1.012	0.051	1.042	0.134	0.459	0.066	0.317	0.062
2.5	0.100	0.062	0.986	0.269	0.869	0.158	0.726	0.079	0.297	0.235
5	0.105	0.089	0.480	0.423	0.432	0.111	1.114	0.066	0.353	0.080
10	0.121	0.141	0.002	0.002	0.022	0.005	0.140	0.110	0.694	0.123
濃縮	JNJ26158015		JNJ26483197		JNJ26483249		JNJ17225871		JNJ17228458	
[μ M]	Sox17強度	SD								
0.157	0.364	0.044	0.149	0.058	0.125	0.051	0.132	0.063	0.039	0.010
0.313	0.577	0.062	0.398	0.166	0.129	0.018	0.146	0.005	0.070	0.027
0.625		0.985	0.072	0.678	0.212	0.134	0.196	0.084	0.137	0.049
1.25	0.943	0.419	1.110	0.042	0.202	0.103	0.129	0.029	0.075	0.017
2.5	0.559	0.238	0.857	0.012	0.209	0.045	0.177	0.030	0.053	0.005
5	0.019	0.019	0.194	0.007	0.154	0.023	0.174	0.070	0.038	0.001
10	0.001	0.001	0.129	0.037	0.129	0.067	0.200	0.022	0.000	0.000
濃縮	JNJ19370026		JNJ26150202		JNJ26170B33		JNJ26177086		JNJ26177762	
[μ M]	Sox17強度	SD								
0.157	0.074	0.024	0.040	0.030	0.291	0.086	0.054	0.014	0.186	0.040
0.313		0.170	0.046	0.051	0.016	0.746	0.088	0.080	0.006	0.342
0.625	0.246	0.036	0.150	0.095	0.941	0.111	0.268	0.050	0.563	0.019
1.25	0.981	0.075	0.155	0.010	1.119	0.045	0.332	0.006	0.936	0.186
2.5	0.914	0.038	0.408	0.279	1.305	0.066	0.432	0.154	1.146	0.137
5	0.001	0.001	0.251	0.092	1.185	0.012	0.543	0.004	1.127	0.121
10	0.000	0.000	0.262	0.068	0.000	0.000	0.822	0.024	0.759	0.328
濃縮	JNJ26512005		JNJ26533065		JNJ26533156		JNJ267U194		JNJ3026582	
[μ M]	Sox17強度	SD								
0.157	0.085	0.041	0.049	0.011	0.173	0.009	0.146	0.041	0.059	0.051
0.313	0.240	0.030	0.068	0.010	0.203	0.061	0.282	0.135	0.054	0.040
0.625	0.165	0.043	0.222	0.201	0.220	0.070	0.202	0.013	0.073	0.066
1.25	0.114	0.134	0.076	0.034	0.202	0.002	0.165	0.030	0.053	0.035
2.5	0.001	0.001	0.120	0.066	0.299	0.019	0.205	0.002	0.042	0.049
5	0.001	0.001	0.087	0.036	0.300	0.095	0.234	0.078	0.016	0.001
10	0.009	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.028	0.004	0.003

10

20

【0290】

以下に本発明の主な特徴と態様を列挙する。

30

【0291】

1 .

多能性細胞を増殖及び分化するための方法であって、

a . 前記多能性細胞を培養する過程と、

b . 前記多能性細胞を G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で処理する過程と、を含む方法。

【0292】

2 .

前記多能性細胞が胚幹細胞である、1 . に記載の方法。

【0293】

3 .

前記多能性細胞が、胚幹細胞由来の多能性マーカーを発現する細胞である、1 . に記載の方法。

40

【0294】

4 .

前記多能性マーカーを発現する細胞が、A B C G 2、クリプト、F o x D 3、C o n n e x i n 4 3、C o n n e x i n 4 5、O c t 4、S O X - 2、N a n o g、h T E R T、U T F - 1、Z F P 4 2、S S E A - 3、S S E A - 4、T r a 1 - 6 0、及び T r a 1 - 8 1 からなる群から選択される多能性マーカーのうち少なくとも1つを発現する、3 . に記載の方法。

50

【 0 2 9 5 】

5 .

前記多能性細胞が胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞に分化される、1 . に記載の方法。

【 0 2 9 6 】

6 .

前記多能性細胞が前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で約 1 ~ 約 7 2 時間処理される、1 . に記載の方法。

【 0 2 9 7 】

7 .

前記多能性細胞が前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で約 1 2 ~ 約 4 8 時間処理される、1 . に記載の方法。

10

【 0 2 9 8 】

8 .

前記多能性細胞が前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤で約 4 8 時間処理される、1 . に記載の方法。

【 0 2 9 9 】

9 .

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が濃度約 1 0 0 n M ~ 約 1 0 0 μ M で用いられる、1 . に記載の方法。

20

【 0 3 0 0 】

1 0 .

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が濃度約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M で用いられる、1 . に記載の方法。

【 0 3 0 1 】

1 1 .

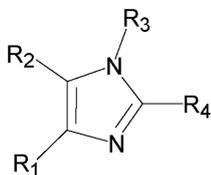
前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が濃度約 1 0 μ M で用いられる、1 . に記載の方法。

【 0 3 0 2 】

1 2 .

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が式 (I) の化合物である、1 . に記載の方法：

【 化 2 1 】



式 (I)

30

【 0 3 0 3 】

1 3 .

R₁が、フェニル、置換フェニル（ここで該フェニル置換基はC₁~₅アルキル、ハロゲン、ニトロ、トリフルオロメチル及びニトリルからなる群から選択される）、又はピリミジニルである、1 2 . に記載の方法。

40

【 0 3 0 4 】

1 4 .

R₂がフェニル、置換フェニル（ここで該フェニル置換基はC₁~₅アルキル、ハロゲン、ニトロ、トリフルオロメチル及びニトリルからなる群から選択される）、又は任意にC₁~₄アルキルで置換されていてもよいピリミジニルであり、及びR₁及びR₂の少なくとも一方はピリミジニルである、1 2 . に記載の方法。

50

【0305】

15.

R₃は水素、2-(トリメチルシリル)エトキシメチル、C₁~5アルキルカルボニル、アリーロキシカルボニル、アリールC₁~5アルキルオキシカルボニル、アリールC₁~5アルキル、置換アリールC₁~5アルキル(ここで該1つ以上のアリール置換基は、独立して、C₁~5アルキル、C₁~5アルコキシ、ハロゲン、アミノ、C₁~5アルキルアミノ、及びジC₁~5アルキルアミノからなる群から選択される)、フタルイミドC₁~5アルキル、アミノC₁~5アルキル、ジアミノC₁~5アルキル、スクシンイミドC₁~5アルキル、C₁~5アルキルカルボニル、アリールカルボニル、C₁~5アルキルカルボニルC₁~5アルキル及びアリーロキシカルボニルC₁~5アルキルアルキルである、12.に記載の方法。

10

【0306】

16.

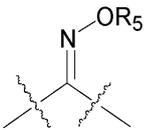
R₄が-(A)-(CH₂)_q-Xである、12.に記載の方法。

【0307】

17.

Aが、ビニレン、エチニレン、又は

【化22】



20

である、16.に記載の方法。

【0308】

18.

R₅が、水素、C₁~5アルキル、フェニル及びフェニルC₁~5アルキルからなる群から選択される、17.に記載の方法。

【0309】

19.

qが0~9である、16.に記載の方法。

【0310】

20.

Xが、水素、ヒドロキシ、ビニル、置換ビニル(ここで該1つ以上のビニル置換基はそれぞれ、フッ素、臭素、塩素、及びヨウ素から選択される)、エチニル、置換エチニル(ここで該エチニル置換基は、フッ素、臭素、塩素、及びヨウ素からなる群から選択される)、C₁~5アルキル、置換されたC₁~5アルキル(ここで該1つ以上のアルキル置換基はそれぞれ、C₁~5アルコキシ、トリハロアルキル、フタルイミド、及びアミノからなる群から選択される)、C₃~7シクロアルキル、C₁~5アルコキシ、置換されたC₁~5アルコキシ(ここで該アルキル置換基は、フタルイミド及びアミノからなる群から選択される)、フタルイミドオキシ、フェノキシ、置換フェノキシ(ここで該1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~5アルキル、ハロゲン、及びC₁~5アルコキシからなる群から選択される)、フェニル、置換フェニル(ここで該1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~5アルキル、ハロゲン、及びC₁~5アルコキシからなる群から選択される)、アリールC₁~5アルキル、置換アリールC₁~5アルキル(ここで該1つ以上のアリール置換基はそれぞれ、C₁~5アルキル、ハロゲン、及びC₁~5アルコキシからなる群から選択される)、アリーロキシC₁~5アルキルアミノ、C₁~5アルキルアミノ、ジC₁~5アルキルアミノ、ニトリル、オキシム、ベンジルオキシイミノ(Benzyloxyimino)、C₁~5アルキルオキシイミノ、フタルイミド、スクシンイミド、C₁~5アルキルカルボニルオキシ、フェニルカルボニルオキシ、置換フェニルカルボニルオキシ(ここで該1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、C₁~5アルキル、ハロゲン、及びC₁~5アルコキシからなる群から選択される)、フェニルC₁~5アルキルカルボニルオキシ(ここで該1つ以上のフェニル置換基は

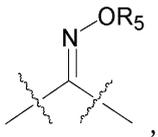
30

40

50

それぞれ、 $C_1 \sim 5$ アルキル、ハロゲン、及び $C_1 \sim 5$ アルコキシからなる群から選択される)、アミノカルボニルオキシ、 $C_1 \sim 5$ アルキルアミノカルボニルオキシ、ジ $C_1 \sim 5$ アルキルアミノカルボニルオキシ、 $C_1 \sim 5$ アルキルカルボニルオキシ、置換された $C_1 \sim 5$ アルキルカルボニルオキシ(ここで該1つ以上のアルキル置換基はそれぞれ、メチル、エチル、イソプロピル、及びヘキシルからなる群から選択される)、フェノキシカルボニルオキシ、置換フェノキシカルボニルオキシ(ここで該1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、 $C_1 \sim 5$ アルキル、 $C_1 \sim 5$ アルコキシ、及びハロゲンからなる群から選択される)、 $C_1 \sim 5$ アルキルチオ、置換された $C_1 \sim 5$ アルキルチオ(ここで該アルキル置換基は、ヒドロキシ及びフタルイミドからなる群から選択される)、 $C_1 \sim 5$ アルキルスルホニル、フェニルスルホニル、置換フェニルスルホニル(ここで該1つ以上のフェニル置換基はそれぞれ、臭素、フッ素、塩素、 $C_1 \sim 5$ アルコキシ、及びトリフルオロメチルからなる群から選択される);但し、Aが

【化23】



qが0、及びXがHの場合は、 R_3 は2-(トリメチルシリル)エトキシメチルでなくてもよい];及びその薬学上許容し得る塩、からなる群から選択される、16.に記載の方法。

【0311】

21.

R_1 が置換フェニルであり、 R_2 がピリミジン-3-イルである、12.に記載の方法。

【0312】

22.

R_1 が4-フルオロフェニルである、12.に記載の方法。

【0313】

23.

R_3 が、水素、アリール $C_1 \sim 5$ アルキル、又は置換アリール $C_1 \sim 5$ アルキルである、12.に記載の方法。

【0314】

24.

R_3 が水素又はフェニル $C_1 \sim 5$ アルキルである、12.に記載の方法。

【0315】

25.

Aがエチレンであり、qが0~5である、16.に記載の方法。

【0316】

26.

Xが、スクシンイミド、ヒドロキシ、メチル、フェニル、 $C_1 \sim 5$ アルキルスルホニル、 $C_3 \sim 6$ シクロアルキル、 $C_1 \sim 5$ アルキルカルボニルオキシ、 $C_1 \sim 5$ アルコキシ、フェニルカルボニルオキシ、 $C_1 \sim 5$ アルキルアミノ、ジ $C_1 \sim 5$ アルキルアミノ又はニトリルである、16.に記載の方法。

【0317】

27.

前記式1の化合物が、4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシブチン-1-イル)-1-(3-フェニルプロピル)-5-(4-ピリジル)イミダゾールである、12.に記載の方法。

【0318】

28.

前記GSK-3Bの酵素活性阻害剤が式(II)の化合物である、1.に記載の方法:

10

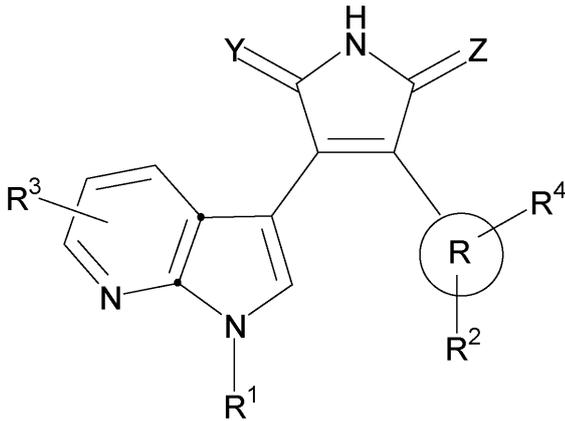
20

30

40

50

【化 2 4】



式 (I I)

10

【 0 3 1 9】

2 9 .

R が、 R_a 、 $-C_1 \sim 8$ アルキル - R_a 、 $-C_2 \sim 8$ アルケニル - R_a 、 $-C_2 \sim 8$ アルキニル - R_a 及びシアノからなる群から選択される、28 . に記載の方法。

【 0 3 2 0】

3 0 .

R_a が、シクロアルキル、複素環、アリール及びヘテロアリールからなる群から選択される、29 . に記載の方法。

20

【 0 3 2 1】

3 1 .

R^1 が、水素、 $-C_1 \sim 8$ アルキル - R^5 、 $-C_2 \sim 8$ アルケニル - R^5 、 $-C_2 \sim 8$ アルキニル - R^5 、 $-C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-C(O) -$ アリール - R^8 、 $-C(O) - O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-C(O) - O -$ アリール - R^8 、 $-C(O) - NH(C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-C(O) - NH$ (アリール - R^8)、 $-C(O) - N(C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9)₂、 $-SO_2 - (C_1 \sim 8)$ アルキル - R^9 、 $-SO_2 -$ アリール - R^8 、 $-$ シクロアルキル - R^6 、 $-$ 複素環 - R^6 、 $-$ アリール - R^6 及び $-$ ヘテロアリール - R^6 からなる群から選択され；ここで、複素環及びヘテロアリールは、複素環又はヘテロアリール環の炭素原子を通して1の位置のアザインドール窒素原子と結合する、28 . に記載の方法。

30

【 0 3 2 2】

3 2 .

R^5 が、水素、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - OH、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - NH₂、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - NH $(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - N $(C_1 \sim 8)$ アルキル)₂、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - S - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - SO₂ - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - SO₂ - NH₂、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - SO₂ - NH $(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - SO₂ - N $(C_1 \sim 8)$ アルキル)₂、 $-O - C(O)H$ 、 $-O - C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - C(O) - NH_2$ 、 $-O - C(O) - NH$ $(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - C(O) - N$ $(C_1 \sim 8)$ アルキル)₂、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - C(O)H、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - C(O) - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - CO₂H、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - C(O) - O - $(C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - C(O) - NH₂、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - C(O) - NH $(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - C(O) - N $(C_1 \sim 8)$ アルキル)₂、 $-C(O)H$ 、 $-C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-CO_2H$ 、 $-C(O) - O - (C_1 \sim 8)$ アルキル、 $-C(O) - NH_2$ 、 $-C(NH) - NH_2$ 、 $-C(O) - NH$ $(C_1 \sim 8)$ アルキル)、 $-C$ (

40

50

O) - N(C₁~₈アルキル)₂、-SH、-S-(C₁~₈)アルキル、-S-(C₁~₈)アルキル-S-(C₁~₈)アルキル、-S-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル、-S-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル-OH、-S-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル-NH₂、-S-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル-NH(C₁~₈アルキル)、-S-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル-N(C₁~₈アルキル)₂、-S-(C₁~₈)アルキル-NH(C₁~₈アルキル)、-SO₂-(C₁~₈)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₈アルキル)、-SO₂-N(C₁~₈アルキル)₂、-N-R⁷、シアノ、(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、-シクロアルキル-R⁶、-複素環-R⁶、-アリール-R⁶及び-ヘテロアリール-R⁶からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、31.に記載の方法。

10

【0323】

33.

R⁶が、水素、-C₁~₈アルキル、-C₂~₈アルケニル、-C₂~₈アルキニル、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₈)アルキル、-CO₂H、-C(O)-O-(C₁~₈)アルキル、-C(O)-NH₂、-C(NH)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₈アルキル)、-C(O)-N(C₁~₈)アルキル)₂、-SO₂-(C₁~₈)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₈アルキル)、-SO₂-N(C₁~₈アルキル)₂、-(C₁~₈)アルキル-N-R⁷、-(C₁~₈)アルキル-(ハロ)₁~₃、-(C₁~₈)アルキル-OH、-アリール-R⁸、-(C₁~₈)アルキル-アリール-R⁸及び-(C₁~₈)アルキル-ヘテロアリール-R⁸からなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基である；但し、R⁶が炭素原子に結合されている場合には、R⁶は、-C₁~₈アルコキシ、-(C₁~₈)アルコキシ-(ハロ)₁~₃、-SH、-S-(C₁~₈)アルキル、-N-R⁷、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ及び-ヘテロアリール-R⁸からなる群から更に選択される、31.に記載の方法。

20

【0324】

34.

R⁷が、水素、-C₁~₈アルキル、-C₂~₈アルケニル、-C₂~₈アルキニル、-(C₁~₈)アルキル-OH、-(C₁~₈)アルキル-O-(C₁~₈)アルキル、-(C₁~₈)アルキル-NH₂、-(C₁~₈)アルキル-NH(C₁~₈アルキル)、-(C₁~₈)アルキル-N(C₁~₈アルキル)₂、-(C₁~₈)アルキル-S-(C₁~₈)アルキル、-C(O)H、-C(O)-(C₁~₈)アルキル、-C(O)-O-(C₁~₈)アルキル、-C(O)-NH₂、-C(O)-NH(C₁~₈アルキル)、-C(O)-N(C₁~₈アルキル)₂、-SO₂-(C₁~₈)アルキル、-SO₂-NH₂、-SO₂-NH(C₁~₈アルキル)、-SO₂-N(C₁~₈アルキル)₂、-C(N)-NH₂、-シクロアルキル-R⁸、-(C₁~₈)アルキル-複素環-R⁸、-アリール-R⁸、-(C₁~₈)アルキル-アリール-R⁸及び-(C₁~₈)アルキル-ヘテロアリール-R⁸からなる群から独立して選択される2個の置換基である、33.に記載の方法。

30

【0325】

35.

R⁸が、水素、-C₁~₈アルキル、-(C₁~₈)アルキル-(ハロ)₁~₃及び-(C₁~₈)アルキル-OHからなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基である；但し、R⁸が炭素原子に結合されている場合には、R⁸は、-C₁~₈アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁~₈アルキル)、-N(C₁~₈アルキル)₂、シアノ、ハロ、-(C₁~₈)アルコキシ-(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ及びニトロからなる群から更に選択される、31.に記載の方法。

40

【0326】

36.

R⁹が、水素、-C₁~₈アルコキシ、-NH₂、-NH(C₁~₈アルキル)、-N(C₁~₈アルキル)₂、シアノ、(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ及びニトロからなる群から独立して

50

~ 2 個の置換基である、40. に記載の方法。

【0332】

42.

Y 及び Z が、O、S、(H, OH)、及び (H, H) からなる群から独立して選択される；但し、Y 及び Z の一方が O であり且つ他方が O、S、(H, OH)、及び (H, H) からなる群から選択される；及びそれらの薬学上許容し得る塩である、28. に記載の方法。

【0333】

43.

R が、R_a、-C₁~₄アルキル-R_a、-C₂~₄アルケニル-R_a、-C₂~₄アルキニル-R_a 及びシアノからなる群から選択される、28. に記載の方法。

10

【0334】

44.

R_a が、複素環、アリール及びヘテロアリールからなる群から選択される、29. に記載の方法。

【0335】

45.

R_a が、ジヒドロ-ピラニル、フェニル、ナフチル、チエニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジニル、アザインドリル、インダゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、ジベンゾフリル及びジベンゾチエニルからなる群から選択される、29. に記載の方法。

20

【0336】

46.

R¹ が、水素、-C₁~₄アルキル-R⁵、-C₂~₄アルケニル-R⁵、-C₂~₄アルキニル-R⁵、-C(O)-(C₁~₄)アルキル-R⁹、-C(O)-アリール-R⁸、-C(O)-O-(C₁~₄)アルキル-R⁹、-C(O)-O-アリール-R⁸、-C(O)-NH(C₁~₄アルキル-R⁹)、-C(O)-NH(アリール-R⁸)、-C(O)-N(C₁~₄アルキル-R⁹)₂、-SO₂-(C₁~₄)アルキル-R⁹、-SO₂-アリール-R⁸、-シクロアルキル-R⁶、-複素環-R⁶、-アリール-R⁶及び-ヘテロアリール-R⁶からなる群から選択され；ここで、複素環及びヘテロアリールは、複素環又はヘテロアリール環の炭素原子を通して1の位置のアザインドール窒素原子と結合している、28. に記載の方法。

30

【0337】

47.

R¹ が、水素、-C₁~₄アルキル-R⁵、-アリール-R⁶及び-ヘテロアリール-R⁶からなる群から選択され；ここで、ヘテロアリールは、ヘテロアリール環の炭素原子を通して1の位置のアザインドール窒素原子に結合されている、28. に記載の方法。

【0338】

48.

R¹ が、水素、-C₁~₄アルキル-R⁵及び-ナフチル-R⁶からなる群から選択される、28. に記載の方法。

40

【0339】

49.

R⁵ が、水素、-O-(C₁~₄)アルキル、-O-(C₁~₄)アルキル-OH、-O-(C₁~₄)アルキル-O-(C₁~₄)アルキル、-O-(C₁~₄)アルキル-NH₂、-O-(C₁~₄)アルキル-NH(C₁~₄アルキル)、-O-(C₁~₄)アルキル-N(C₁~₄アルキル)₂、-O-(C₁~₄)アルキル-S-(C₁~₄)アルキル、-O-(C₁~₄)アルキル-SO₂-(C₁~₄)アルキル、-O-(C₁~₄)アルキル-SO₂-NH₂、-O-(C₁~₄)アルキル-SO₂-NH(C₁~₄アルキル)、-O-(C₁~₄)アルキル-SO₂-N(C₁~₄アルキル)₂、-O-C(O)H、-O-C(O)-(C₁~₄)ア

50

ルキル、 $-O-C(O)-NH_2$ 、 $-O-C(O)-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-O-C(O)-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-C(O)H$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-C(O)-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-CO_2H$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-C(O)-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-C(O)-NH_2$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-C(O)-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-C(O)-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(NH)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-C(O)-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-SH$ 、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ アルキル、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ アルキル、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ アルキル、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-OH$ 、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ アルキル、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-NH_2$ 、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ アルキル、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-SO_2-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-SO_2-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-N-R^7$ 、シアノ、(ハロ) $_1\sim_3$ 、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、 $-シクロアルキル-R^6$ 、 $-複素環-R^6$ 、 $-アリーール-R^6$ 及び $-ヘテロアリーール-R^6$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、31.に記載の方法。

10

【0340】

20

50.

R^5 が、水素、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-N-R^7$ 、ヒドロキシ及び $-ヘテロアリーール-R^6$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、31.に記載の方法。

【0341】

51.

R^5 が、水素、 $-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-N-R^7$ 、ヒドロキシ、 $-イミダゾリル-R^6$ 、 $-トリアゾリル-R^6$ 及び $-テトラゾリル-R^6$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、31.に記載の方法。

【0342】

30

52.

R^6 が、水素、 $-C_1\sim_4\text{アルキル}$ 、 $-C_2\sim_4\text{アルケニル}$ 、 $-C_2\sim_4\text{アルキニル}$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(NH)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-C(O)-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-SO_2-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NH(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-SO_2-N(C_1\sim_4\text{アルキル})_2$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-N-R^7$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-(ハロ)_1\sim_3$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-OH$ 、 $-アリーール-R^8$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-アリーール-R^8$ 及び $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-ヘテロアリーール-R^8$ からなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1~4個の置換基である；但し、 R^6 が炭素原子に結合されている場合には、 R^6 は、 $-C_1\sim_4\text{アルコキシ}$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルコキシ})-(ハロ)_1\sim_3$ 、 $-SH$ 、 $-S-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-N-R^7$ 、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ及び $-ヘテロアリーール-R^8$ からなる群から更に選択される、31.に記載の方法。

40

【0343】

53.

R^6 が水素である、31.に記載の方法。

【0344】

54.

R^7 が、水素、 $-C_1\sim_4\text{アルキル}$ 、 $-C_2\sim_4\text{アルケニル}$ 、 $-C_2\sim_4\text{アルキニル}$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-OH$ 、 $-(C_1\sim_4\text{アルキル})-O-(C_1\sim_4\text{アルキル})$ 、 $-(C_1\sim_4)$

50

アルキル - NH₂、 - (C₁~₄) アルキル - NH (C₁~₄ アルキル)、 - (C₁~₄) アルキル - N (C₁~₄ アルキル)₂、 - (C₁~₄) アルキル - S - (C₁~₄) アルキル、 - C (O) H、 - C (O) - (C₁~₄) アルキル、 - C (O) - O - (C₁~₄) アルキル、 - C (O) - NH₂、 - C (O) - NH (C₁~₄ アルキル)、 - C (O) - N (C₁~₄ アルキル)₂、 - SO₂ - (C₁~₄) アルキル、 - SO₂ - NH₂、 - SO₂ - NH (C₁~₄ アルキル)、 - SO₂ - N (C₁~₄ アルキル)₂、 - C (N) - NH₂、 - シクロアルキル - R⁸、 - (C₁~₄) アルキル - 複素環 - R⁸、 - アリール - R⁸、 - (C₁~₄) アルキル - アリール - R⁸ 及び - (C₁~₄) アルキル - ヘテロアリール - R⁸ からなる群から独立して選択される 2 個の置換基である、33. に記載の方法。

【0345】

55.

R⁷ が、水素、 - C₁~₄ アルキル、 - C (O) H、 - C (O) - (C₁~₄) アルキル、 - C (O) - O - (C₁~₄) アルキル、 - SO₂ - NH₂、 - SO₂ - NH (C₁~₄ アルキル) 及び - SO₂ - N (C₁~₄ アルキル)₂ からなる群から独立して選択される 2 個の置換基である、33. に記載の方法。

【0346】

56.

R⁸ が、水素、 - C₁~₄ アルキル、 - (C₁~₄) アルキル - (ハロ)₁~₃ 及び - (C₁~₄) アルキル - OH からなる群から独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された 1 ~ 4 個の置換基である；但し、R⁸ が炭素原子に結合されている場合には、R⁸ は、 - C₁~₄ アルコキシ、 - NH₂、 - NH (C₁~₄ アルキル)、 - N (C₁~₄ アルキル)₂、シアノ、ハロ、 - (C₁~₄) アルコキシ - (ハロ)₁~₃、ヒドロキシ及びニトロからなる群から更に選択される、31. に記載の方法。

【0347】

57.

R⁸ が水素である、31. に記載の方法。

【0348】

58.

R⁹ が、水素、 - C₁~₄ アルコキシ、 - NH₂、 - NH (C₁~₄ アルキル)、 - N (C₁~₄ アルキル)₂、シアノ、(ハロ)₁~₃、ヒドロキシ及びニトロからなる群から独立して選択される 1 ~ 2 個の置換基である、31. に記載の方法。

【0349】

59.

R⁹ が水素である、31. に記載の方法。

【0350】

60.

R² が、水素、 - C₁~₄ アルキル - R⁵、 - C₂~₄ アルケニル - R⁵、 - C₂~₄ アルキニル - R⁵、 - C (O) H、 - C (O) - (C₁~₄) アルキル - R⁹、 - C (O) - NH₂、 - C (O) - NH (C₁~₄ アルキル - R⁹)、 - C (O) - N (C₁~₄ アルキル - R⁹)₂、 - C (O) - NH (アリール - R⁸)、 - C (O) - シクロアルキル - R⁸、 - C (O) - 複素環 - R⁸、 - C (O) - アリール - R⁸、 - C (O) - ヘテロアリール - R⁸、 - C O₂ H、 - C (O) - O - (C₁~₄) アルキル - R⁹、 - C (O) - O - アリール - R⁸、 - SO₂ - (C₁~₄) アルキル - R⁹、 - SO₂ - アリール - R⁸、 - シクロアルキル - R⁶、 - アリール - R⁶ 及び - (C₁~₄) アルキル - N - R⁷ からなる群より独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された 1 個の置換基である；但し、R² が炭素原子に結合されている場合には、R² は、 - C₁~₄ アルコキシ - R⁵、 - N - R⁷、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、 - 複素環 - R⁶ 及び - ヘテロアリール - R⁶ からなる群から更に選択される、28. に記載の方法。

【0351】

61.

10

20

30

40

50

R^2 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル $-R^5$ 、 $-C_2\sim_4$ アルケニル $-R^5$ 、 $-C_2\sim_4$ アルキニル $-R^5$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-シクロアルキル-R^6$ 、 $-アリーール-R^6$ 及び $-(C_1\sim_4)$ アルキル $-N-R^7$ からなる群より独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1個の置換基である；但し、 R^2 が窒素原子に結合されている場合には、クオーターニウム塩 (quaterniumsalt) は形成されず；そして但し、 R^2 が炭素原子に結合されている場合には、 R^2 は、 $-C_1\sim_4$ アルコキシ $-R^5$ 、 $-N-R^7$ 、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、オキソ、 $-複素環-R^6$ 及び $-ヘテロアリーール-R^6$ からなる群から更に選択される、28.に記載の方法。

【0352】

62.

R^2 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル $-R^5$ 及び $-アリーール-R^6$ からなる群より独立して選択される、炭素原子又は窒素原子に結合された1個の置換基である；但し、 R^2 が窒素原子に結合されている場合には、クオーターニウム塩 (quaterniumsalt) は形成されず；そして但し、 R^2 が炭素原子に結合されている場合には、 R^2 は、 $-N-R^7$ 、ハロゲン、ヒドロキシ及び $-ヘテロアリーール-R^6$ からなる群から更に選択される、28.に記載の方法。

【0353】

63.

R^3 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $-C_2\sim_4$ アルケニル $-R^{10}$ 、 $-C_2\sim_4$ アルキニル $-R^{10}$ 、 $-C_1\sim_4$ アルコキシ $-R^{10}$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)-(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-N(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-シクロアルキル-R^8$ 、 $-C(O)-複素環-R^8$ 、 $-C(O)-アリーール-R^8$ 、 $-C(O)-ヘテロアリーール-R^8$ 、 $-C(NH)-NH_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-O-アリーール-R^8$ 、 $-SO_2-(C_1\sim_8)$ アルキル $-R^9$ 、 $-SO_2-アリーール-R^8$ 、 $-N-R^7$ 、 $-(C_1\sim_4)$ アルキル $-N-R^7$ 、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、 $-シクロアルキル-R^8$ 、 $-複素環-R^8$ 、 $-アリーール-R^8$ 及び $-ヘテロアリーール-R^8$ からなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~3個の置換基である、28.に記載の方法。

【0354】

64.

R^3 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $-C_2\sim_4$ アルケニル $-R^{10}$ 、 $-C_2\sim_4$ アルキニル $-R^{10}$ 、 $-C_1\sim_4$ アルコキシ $-R^{10}$ 、 $-C(O)H$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim_4)$ アルキル)、 $-N(C_1\sim_4)$ アルキル) $_2$ 、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ及びニトロからなる群から選択される、炭素原子に結合された1個の置換基である、28.に記載の方法。

【0355】

65.

R^3 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim_4)$ アルキル)、 $-N(C_1\sim_4)$ アルキル) $_2$ 、ハロゲン及びヒドロキシからなる群から選択される、炭素原子に結合された1個の置換基である、28.に記載の方法。

【0356】

66.

R^4 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル $-R^{10}$ 、 $-C_2\sim_4$ アルケニル $-R^{10}$ 、 $-C_2\sim_4$ アルキニル $-R^{10}$ 、 $-C_1\sim_4$ アルコキシ $-R^{10}$ 、 $-C(O)H$ 、 $-C(O)-(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-NH_2$ 、 $-C(O)-NH(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-N(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-シクロアルキル-R^8$ 、 $-C(O)-複素環-R^8$ 、 $-C(O)-アリーール-R^8$ 、 $-C(O)-ヘテロアリーール-R^8$ 、 $-C(NH)-NH_2$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(O)-O-(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^9$ 、 $-C(O)-O-アリーール-R^8$ 、 $-SH$ 、 $-S-(C_1\sim_4)$ アルキル $-R^{10}$ 、 $-SO_2-(C_1\sim_4)$ アルキ

10

20

30

40

50

ル - R^9 、 $-SO_2$ -アリール - R^8 、 $-SO_2-NH_2$ 、 $-SO_2-NH(C_1\sim_4$ アルキル - $R^9)$ 、 $-SO_2-N(C_1\sim_4$ アルキル - $R^9)_2$ 、 $-N-R^7$ 、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、 $-シクロアルキル-R^8$ 、 $-複素環-R^8$ 、 $-アリール-R^8$ 及び $-ヘテロアリール-R^8$ からなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~4個の置換基である、28.に記載の方法。

【0357】

67.

R^4 が、水素、 $-C_1\sim_4$ アルキル - R^{10} 、 $-C_2\sim_4$ アルケニル - R^{10} 、 $-C_2\sim_4$ アルキニル - R^{10} 、 $-C_1\sim_4$ アルコキシ - R^{10} 、 $-C(O)H$ 、 $-CO_2H$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim_4$ アルキル)、 $-N(C_1\sim_4$ アルキル) $_2$ 、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、ニトロ、 $-シクロアルキル$ 、 $-複素環$ 、 $-アリール$ 及び $-ヘテロアリール$ からなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~4個の置換基である、28.に記載の方法。

10

【0358】

68.

R^4 が、水素、 $C_1\sim_4$ アルキル - R^{10} 、 $C_1\sim_4$ アルコキシ - R^{10} 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim_4$ アルキル)、 $-N(C_1\sim_4$ アルキル) $_2$ 、ハロゲン及びヒドロキシからなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~4個の置換基である、28.に記載の方法。

【0359】

69.

R^4 が、水素、 $C_1\sim_4$ アルキル - R^{10} 、 $C_1\sim_4$ アルコキシ - R^{10} 、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim_4$ アルキル)、 $-N(C_1\sim_4$ アルキル) $_2$ 、塩素、フッ素及びヒドロキシからなる群より独立して選択される、炭素原子に結合された1~4個の置換基である、28.に記載の方法。

20

【0360】

70.

R^{10} が、水素、 $-NH_2$ 、 $-NH(C_1\sim_4$ アルキル)、 $-N(C_1\sim_4$ アルキル) $_2$ 、シアノ、 $(ハロ)_1\sim_3$ 、ヒドロキシ、ニトロ及びオキソからなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、38.及び41.に記載の方法。

【0361】

71.

R^{10} が、水素及び $(ハロ)_1\sim_3$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、38.及び41.に記載の方法。

30

【0362】

72.

R^{10} 水素及び $(フルオロ)_3$ からなる群から独立して選択される1~2個の置換基である、38.及び41.に記載の方法。

【0363】

73.

Y及びZが、O、S、 (H, OH) 、及び (H, H) からなる群から独立して選択される；但し、Y及びZの一方がOであり且つ他方がO、S、 (H, OH) 、及び (H, H) からなる群から選択される、28.に記載の方法。

40

【0364】

74.

Y及びZが、O及び (H, H) からなる群から独立して選択される；但し、Y及びZの一方がOであり且つ他方がO及び (H, H) からなる群から選択される、28.に記載の方法。

【0365】

75.

Y及びZが独立してOから選択される、28.に記載の方法。

50

【 0 3 6 6 】

7 6 .

前記式 I I の化合物が、3 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル] - 4 - [2 - (トリフルオロメチル) フェニル] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、2 8 . に記載の方法。

【 0 3 6 7 】

7 7 .

前記式 I I の化合物が、3 - [1 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル] - 4 - (1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、2 8 . に記載の方法。

10

【 0 3 6 8 】

7 8 .

前記式 I I の化合物が、3 - [1 - (3 - ヒドロキシ - プロピル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル] - 4 - ピラジン - 2 - イル - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、2 8 . に記載の方法。

【 0 3 6 9 】

7 9 .

前記式 I I の化合物が、3 - (2 , 4 - ジメトキシ - プリミジン - 5 - イル) - 4 - [1 - (3 - ヒドロキシ - プロピル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル] - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、2 8 . に記載の方法。

20

【 0 3 7 0 】

8 0 .

前記式 I I の化合物が、4 - { 3 - [4 - (2 , 4 - ジメトキシ - プリミジン - 5 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 1 - イル } - ブチロニトリルである、2 8 . に記載の方法。

【 0 3 7 1 】

8 1 .

前記式 I I の化合物が、4 - { 3 - [4 - (1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 1 - イル } - ブチロニトリルである、2 8 . に記載の方法。

30

【 0 3 7 2 】

8 2 .

前記式 I I の化合物が、3 - (2 , 4 - ジメトキシ - プリミジン - 5 - イル) - 4 - (1 - フェネチル - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル) - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、2 8 . に記載の方法。

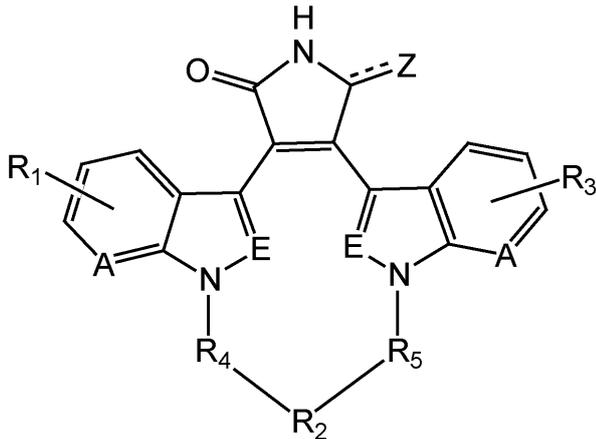
【 0 3 7 3 】

8 3 .

前記 G S K - 3 B の酵素活性阻害剤が式 (I I I) の化合物である、1 . に記載の方法

:

【化 2 5】



式 (III)

10

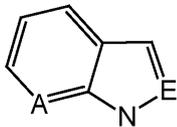
【0374】

84.

A 及び E が、水素置換された炭素原子及び窒素原子からなる群から独立して選択され；
ここで、

【化 2 6】

20



は、1H-インドール、1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン、1H-ピラゾロ[3,4-b]ピリジン及び1H-インダゾールからなる群から独立して選択される、83.に記載の方法。

【0375】

85.

Z が O から選択され；あるいは、Z がジヒドロから選択され；ここで、それぞれの水素原子が単結合で結合されている、83.に記載の方法。

30

【0376】

86.

R₄ 及び R₅ が、場合によりオキソで置換されている C₁~₈アルキル、C₂~₈アルケニル、及び C₂~₈アルキニルから独立して選択される、83.に記載の方法。

【0377】

87.

R₂ が、-C₁~₈アルキル-、-C₂~₈アルケニル-、-C₂~₈アルキニル-、-O-(C₁~₈)アルキル-O-、-O-(C₂~₈)アルケニル-O-、-O-(C₂~₈)アルキニル-O-、-C(O)-(C₁~₈)アルキル-C(O)-(式中、該アルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも、C₁~₈アルキル、C₁~₈アルコキシ、C₁~₈アルコキシ(C₁~₈)アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C₁~₈)アルキル、-C(O)O-(C₁~₈)アルキル、-C₁~₈アルキル-C(O)O-(C₁~₈)アルキル、アミノ(水素及びC₁~₄アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~₈)アルキル(式中、アミノは、水素及びC₁~₄アルキルからなる群から独立して選ばれた置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ)~₁~₃(C₁~₈)アルキル、(ハロ)~₁~₃(C₁~₈)アルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシ(C₁~₈)アルキル及びオキソからなる群から独立して選ばれた1個~4個の置換基で場合により置換されている直炭素鎖であり；そして、式中、該アルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも、複素環、アリール、ヘテロアリール、複素環(C₁~₈)アルキル、アリー

40

50

ル ($C_1 \sim 8$) アルキル、ヘテロアリール ($C_1 \sim 8$) アルキル、スピロシクロアルキル、及びスピロ複素環 (式中、該シクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリール置換基のいずれも、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは、水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、($ハロ$) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルキル、($ハロ$) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルコキシ、ヒドロキシ及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキルからなる群から独立して選択された 1 個 ~ 4 個の置換基で場合により置換されており；そして式中、上記の複素環置換基のいずれも場合によりオキソで置換されている) からなる群から独立して選択された 1 個 ~ 2 個の置換基で場合により置換されている)、シクロアルキル、複素環、アリー

ル、ヘテロアリール (式中、シクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリールは、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは、水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選ばれた置換基で置換されている)、ハロゲン、($ハロ$) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルキル、($ハロ$) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルコキシ、ヒドロキシ及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキルからなる群から独立して選択された 1 個 ~ 4 個の置換基で場合により置換されており；そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)、

$- (O - (CH_2)_{1 \sim 6})_{0 \sim 5} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- (O - (CH_2)_{1 \sim 6})_{0 \sim 5} - NR_6 -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 -$ 、 $- (O - (CH_2)_{1 \sim 6})_{0 \sim 5} - S -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - S - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - O - (CH_2)_{1 \sim 6} - S -$ 、 $- NR_6 -$ 、 $- NR_6 - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_7 - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_8 -$ 、 $- NR_6 - C(O) -$ 、 $- C(O) - NR_6 -$ 、 $- C(O) - (CH_2)_{0 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{0 \sim 6} - C(O) -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{0 \sim 6} - C(O) - (CH_2)_{1 \sim 6} - C(O) - (CH_2)_{0 \sim 6} - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - C(O) - NR_7 -$ 、 $- NR_6 - C(NR_7) - NR_8 -$ 、 $- O - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - S -$ 、 $- S - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - O -$ 、 $- S - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - S -$ 、 $- NR_6 - (CH_2)_{1 \sim 6} - S - (CH_2)_{1 \sim 6} - NR_7 -$ 、及び $- SO_2 -$ (式中、 R_6 、 R_7 、及び R_8 は、水素、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは、水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、複素環 ($C_1 \sim 8$) アルキル、アリール ($C_1 \sim 8$) アルキル、及びヘテロアリール ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、該複素環、アリール、及びヘテロアリール置換基は、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$) アルキル (式中、アミノは、水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、($ハロ$) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルキル、($ハロ$) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$) アルキルからなる群から独立して選択された 1 個 ~ 4 個の置換基で場合により置換されており；そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている) からなる群から独立して選択される) からなる群から選択され；但し、A 及び E が水素置換された炭素原子から選択された場合には、 R_2 は、 $- C_2 \sim 8$ アルキニル -、 $- O - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $O -$ 、 $- O - (C_2 \sim 8)$ アルケニル - $O -$ 、 $- O - (C_2 \sim 8)$ アルキニル - $O -$ 、 $- C(O) - (C_1 \sim 8)$ アルキル - $C(O) -$ (式中、該アルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$) アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$) アルキル、 $- C$ (

O) O - (C₁~8) アルキル、 - C₁~8 アルキル - C(O)O - (C₁~8) アルキル、アミノ(水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~8) アルキル(式中、アミノは、水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルキル、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシ(C₁~8) アルキル及びオキソからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換された直炭素鎖であり;そして式中、該アルキル、アルケニル、及びアルキニル結合基のいずれも複素環、アリール、ヘテロアリール、複素環(C₁~8) アルキル、アリール(C₁~8) アルキル、ヘテロアリール(C₁~8) アルキル、スピロシクロアルキル、及びスピロ複素環(式中、該シクロアルキル、複素環、アリール、及びヘテロアリール置換基のい
 10
 ずれも、C₁~8 アルキル、C₁~8 アルコキシ、C₁~8 アルコキシ(C₁~8) アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C₁~8) アルキル、アミノ(水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~8) アルキル(式中、アミノは水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルキル、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ(C₁~8) アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換されており;そして式中、該複素環置換基のい
 20
 ずれも場合によりオキソで置換されている)からなる群から独立して選択された1個~2個の置換基で場合により置換されている)、シクロアルキル(式中、シクロアルキルは、C₁~8 アルキル、C₁~8 アルコキシ、C₁~8 アルコキシ(C₁~8) アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C₁~8) アルキル、アミノ(水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~8) アルキル(式中、アミノは水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルキル、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ(C₁~8) アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換されている)、 - (O - (CH₂)₁~₆)₁~₅ - O - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - O - (CH₂)₁~₆ - O - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - O - (CH₂)₁~₆ - O - (CH₂)₁~₆ - O - (CH₂)₁~₆ - O - 、 - (O - (CH₂)₁~₆)₁~₅ - NR₆ - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - O - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - O - (CH₂)₁~₆ - NR₆ - 、 - (O - (CH₂)₁~₆)₀~₅ - S - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - S - (CH₂)₁~₆ - O - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - O - (CH₂)₁~₆ - S - 、 - NR₆ - NR₇ - 、 - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - NR₇ - 、 - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - NR₇ - (CH₂)₁~₆ - NR₈ - 、 - NR₉ - C(O) - 、 - C(O) - NR₉ - 、 - C(O) - (CH₂)₀~₆ - NR₆ - (CH₂)₀~₆ - C(O) - 、 - NR₆ - (CH₂)₀~₆ - C(O) - (CH₂)₁~₆ - C(O) - (CH₂)₀~₆ - NR₇ - 、 - NR₆ - C(O) - NR₇ - 、 - NR₆ - C(NR₇) - NR₈ - 、 - O - (CH₂)₁~₆ - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - S - 、 - S - (CH₂)₁~₆ - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - O - 、 - S - (CH₂)₁~₆ - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - S - 及び - NR₆ - (CH₂)₁~₆ - S - (CH₂)₁~₆ - NR₇ - (式中、R₆、R₇、及びR₈は、水素、C₁~8 アルキル、C₁~8 アルコキシ(C₁~8) アルキル、カルボキシル(C₁~8) アルキル、アミノ(C₁~8) アルキル(式中、アミノは水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ヒドロキシ(C₁~8) アルキル、複素環(C₁~8) アルキル、アリール(C₁~8) アルキル、及びヘテロアリール(C₁~8) アルキル(式中、該複素環、アリール及びヘテロアリール置換基は、C₁~8 アルキル、C₁~8 アルコキシ、C₁~8 アルコキシ(C₁~8) アルキル、カルボキシル、カルボキシル(C₁~8) アルキル、アミノ(水素及びC₁~4 アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ(C₁~8) アルキル(式中、アミノは水素及び水素及びC₁~4 アルキル)、ハロゲン、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルキル、(ハロ) ₁~₃ (C₁~8) アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ(C₁~8) アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換されており;そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)よりなる群より独立して選ばれ;そして式中、R₉
 30
 40
 50

は、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ ($C_1 \sim 8$)アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ヒドロキシ ($C_1 \sim 8$)アルキル、複素環 ($C_1 \sim 8$)アルキル、アリール ($C_1 \sim 8$)アルキル及びヘテロアリール ($C_1 \sim 8$)アルキル (式中、該複素環、アリール及びヘテロアリール置換基は、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$)アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、ヒドロキシ及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$)アルキルからなる群から独立して選択された1個~4個の置換基で場合により置換され;そして式中、複素環は場合によりオキソで置換されている)よりなる群より独立して選ばれる)よりなる群より選ばれる、83.に記載の方法。

【0378】

88.

R_1 及び R_3 が、水素、 $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_2 \sim 8$ アルケニル、 $C_2 \sim 8$ アルキニル (式中、アルキル、アルケニル及びアルキニルは、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、アルコキシ ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$)アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、(ハロ) $_1 \sim 3$ 、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、ヒドロキシ、ヒドロキシ ($C_1 \sim 8$)アルキル及びオキソからなる群から選択された置換基で場合により置換されている)、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルキルカルボニル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、 $C_1 \sim 8$ アルキルチオ、アリール、ヘテロアリール (式中、アリール及びヘテロアリールは $C_1 \sim 8$ アルキル、 $C_1 \sim 8$ アルコキシ、アルコキシ ($C_1 \sim 8$)アルキル、カルボキシル、カルボキシル ($C_1 \sim 8$)アルキル、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、アミノ ($C_1 \sim 8$)アルキル (式中、アミノは水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で置換されている)、ハロゲン、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルキル、(ハロ) $_1 \sim 3$ ($C_1 \sim 8$)アルコキシ、ヒドロキシ、及びヒドロキシ ($C_1 \sim 8$)アルキルからなる群から選択された置換基で場合により置換されている)、アミノ (水素及び $C_1 \sim 4$ アルキルからなる群から独立して選択された置換基で場合により置換されている)、シアノ、ハロゲン、ヒドロキシ、及びニトロ;及びそれらの薬学上許容し得る塩からなる群から独立して選択される、83.に記載の方法。

【0379】

89.

前記式 (III) の化合物が、6, 7, 9, 10, 12, 13, 15, 16 - オクタヒドロ - 2,3H - 5, 26 : 17, 22 - ジメテノ - 5H - ジピリド [2, 3 - k : 3', 2' - q] ピロロ [3, 4 - n] [1, 4, 7, 10, 19] トリオキサジアザシクロヘンイコシン - 2,3, 25 (2,4H) - ジオンである、83.に記載の方法。

【0380】

90.

前記式 (III) の化合物が、10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23 - デカヒドロ - 9, 4 : 24, 29 - ジメテノ - 1H - ジピリド [2, 3 - n : 3', 2' - t] ピロロ [3, 4 - q] [1, 4, 7, 10, 13, 22] テトラオキサジアザシクロテトラコシン - 1, 3 (2H) - ジオンである、83.に記載の方法。

【0381】

91.

前記式 (III) の化合物が、10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26 - ドデカヒドロ - 9, 4 : 27, 32 - ジメテノ - 1H - ジピリド

10

20

30

40

50

[2 , 3 - q : 3 ' , 2 ' - w] ピロロ [3 , 4 - t] [1 , 4 , 7 , 10 , 13 , 16 , 25] ペンタオキサジアザシクロヘプタコシン - 1 , 3 (2 H) - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0382 】

92 .

前記式 (I I I) の化合物が、 6 , 7 , 9 , 10 , 12 , 13 - ヘキサヒドロ - 20 H - 5 , 23 : 14 , 19 - ジメテノ - 5 H - ジベンゾ [h , n] ピロロ [3 , 4 - k] [1 , 4 , 7 , 16] ジオキサジアザシクロオクタデシン - 20 , 22 (21 H) - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0383 】

93 .

前記式 (I I I) の化合物が、 6 , 7 , 9 , 10 , 12 , 13 , 15 , 16 - オクタヒドロ - 23 H - 5 , 26 : 17 , 22 - ジメテノ - 5 H - ジベンゾ [k , q] ピロロ [3 , 4 - n] [1 , 4 , 7 , 10 , 19] トリオキサジアザシクロヘンエイコシン - 23 , 25 (24 H) - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0384 】

94 .

前記式 (I I I) の化合物が、 10 , 11 , 13 , 14 , 16 , 17 , 19 , 20 , 22 , 23 - デカヒドロ - 9 , 4 : 24 , 29 - ジメテノ - 1 H - ジベンゾ [n , t] ピロロ [3 , 4 - q] [1 , 4 , 7 , 10 , 13 , 22] テトラオキサジアザシクロテトラコシン - 1 , 3 (2 H) - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0385 】

95 .

前記式 (I I I) の化合物が化合物 1 a である、 83 . に記載の方法。

【 0386 】

96 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - [1 - [3 - [(2 - ヒドロキシエチル) メチルアミノ] プロピル] - 1 H - インダゾール - 3 - イル] - 4 - [1 - (3 - ピリジニル) - 1 H - インドール - 3 - イル] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0387 】

97 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 , 5 - ジクロロ - N - [3 - クロロ - 4 - [(3 , 4 , 12 , 12 a - テトラヒドロ - 1 H - [1 , 4] チアジノ [3 , 4 - c] [1 , 4] ベンゾジアゼピン - 11 (6 H) - イル) カルボニル] フェニル] - ベンズアミドである、 83 . に記載の方法。

【 0388 】

98 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - [1 - (2 - ヒドロキシ - エチル) - 1 H - インドール - 3 - イル] - 4 - (1 - ピリジン - 3 - イル - 1 H - インドール - 3 - イル) - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0389 】

99 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - (2 - メトキシ - フェニル) - 4 - (1 - ピリジン - 3 - イル - 1 H - インドール - 3 - イル) - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0390 】

100 .

前記式 (I I I) の化合物が、 6 - [[2 - [[4 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (4 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) - 2 - ピリミジニル] アミノ] エチ

10

20

30

40

50

ル]アミノ]-3-ピリジンカルボニトリルである、83.に記載の方法。

【0391】

101.

前記式(III)の化合物が、3-(5-クロロ-1-メチル-1H-インドール-3-イル)-4-[1-(3-イミダゾール-1-イル-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

【0392】

102.

前記式(III)の化合物が、3-(5-クロロ-1-メチル-1H-インドール-3-イル)-4-[1-(3-[1,2,3]トリアゾール-1-イル-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

10

【0393】

103.

前記式(III)の化合物が、3-[1-(3-ヒドロキシ-プロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル]-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

【0394】

104.

前記式(III)の化合物が化合物10aである、83.に記載の方法。

【0395】

105.

前記式(III)の化合物が、3-[1-(3-ヒドロキシ-3-メチル-ブチル)-1H-インダゾール-3-イル]-4-(1-ピリジン-3-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

20

【0396】

106.

前記式(III)の化合物が、3-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インダゾール-3-イル]-4-(1-ピリミジン-5-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

【0397】

107.

前記式(III)の化合物が、3-[1-(2-ヒドロキシ-エチル)-1H-インドール-3-イル]-4-(1-ピリミジン-5-イル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

30

【0398】

108.

前記式(III)の化合物が、(11Z)-8,9,10,13,14,15-ヘキサヒドロ-2,6:17,21-ジ(メテノ)ピロロ[3,4-h][1,15,7]ジオキサザシクロトリコシン-22,24(1H,23H)-ジオンである、83.に記載の方法。

40

【0399】

109.

前記式(III)の化合物が、3-(5-クロロ-1-ピリジン-3-イル-1H-インドール-3-イル)-4-[1-(3-ヒドロキシ-プロピル)-1H-インダゾール-3-イル]-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

【0400】

110.

前記式(III)の化合物が、3-(2-メトキシ-フェニル)-4-[1-(3-メトキシ-プロピル)-1H-ピロロ[3,2-c]ピリジン-3-イル]-ピロール-2,5-ジオンである、83.に記載の方法。

50

【 0 4 0 1 】

1 1 1 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - [1 - (3 - ヒドロキシ - プロピル) - 1 H - インダゾール - 3 - イル] - 4 - [1 - (テトラヒドロ - ピラン - 4 - イル) - 1 H - インドール - 3 - イル] - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

【 0 4 0 2 】

1 1 2 .

前記式 (I I I) の化合物が、 2 - { 3 - [4 - (5 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - インダゾール - 1 - イル } - N - (2 - ヒドロキシ - エチル) - アセトアミドである、 8 3 . に記載の方法。

10

【 0 4 0 3 】

1 1 3 .

前記式 (I I I) の化合物が、 4 - (3 - クロロ - フェニル) - 6 - (3 - ジメチルアミノ - プロピル) - 5 , 6 - ジヒドロ - 4 H - 2 , 4 , 6 - トリアザ - シクロペンタ [c] フッ素 - 1 , 3 - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

【 0 4 0 4 】

1 1 4 .

前記式 (I I I) の化合物が、 1 4 - エチル - 6 , 7 , 9 , 1 0 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 - オクタヒドロ - 1 2 H , 2 3 H - 5 , 2 6 : 1 7 , 2 2 - ジメテノジベンゾ [k , q] ピロロ [3 , 4 - n] [1 , 4 , 7 , 1 0 , 1 9] ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン - 2 3 , 2 5 (2 4 H) - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

20

【 0 4 0 5 】

1 1 5 .

前記式 (I I I) の化合物が、 1 4 - ベンジル - 6 , 7 , 9 , 1 0 , 1 3 , 1 4 , 1 5 , 1 6 - オクタヒドロ - 1 2 H , 2 3 H - 5 , 2 6 : 1 7 , 2 2 - ジ (メテノ) ジベンゾ [k , q] ピロロ [3 , 4 - n] [1 , 4 , 7 , 1 0 , 1 9] ジオキサトリアザシクロヘンエイコシン - 2 3 , 2 5 (2 4 H) - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

【 0 4 0 6 】

1 1 6 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - (1 - { 2 - [2 - (2 - ヒドロキシ - エトキシ) - エトキシ] - エチル } - 1 H - インドール - 3 - イル) - 4 - [1 - (2 - ヒドロキシ - エチル) - 1 H - インドール - 3 - イル] - ピロール - 2 , 5 - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

30

【 0 4 0 7 】

1 1 7 .

前記式 (I I I) の化合物が、 6 , 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 2 , 1 3 - オクタヒドロ - 8 , 1 1 - ジメチル - 5 , 2 3 : 1 4 , 1 9 - ジメテノ - 2 0 H - ジベンゾ [k , q] ピロロ [3 , 4 - n] [1 , 4 , 7 , 1 0] テトラアザシクロオクタデシン - 2 0 , 2 2 (2 1 H) - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

40

【 0 4 0 8 】

1 1 8 .

前記式 (I I I) の化合物が、 7 , 8 , 9 , 1 0 , 1 2 , 1 3 , 1 6 , 1 7 , 1 8 , 1 9 - デカヒドロ - 8 , 1 7 - ジメチル - 1 5 H , 2 6 H - 5 , 2 9 : 2 0 , 2 5 - ジメテノ - 6 H - ジベンゾ [k , q] ピロロ [3 , 4 - n] [1 , 4 , 7 , 1 0 , 1 9 , 2 2] ジオキサテトラアザシクロテトラコシン - 2 6 , 2 8 (2 7 H) - ジオンである、 8 3 . に記載の方法。

【 0 4 0 9 】

1 1 9 .

前記式 (I I I) の化合物が、 1 4 - (2 - フリルメチル) - 6 , 7 , 9 , 1 0 , 1 3

50

， 14 ， 15 ， 16 - オクタヒドロ - 12H ， 23H - 5 ， 26 : 17 ， 22 - ジ (メテノ) ジベンゾ [k ， q] ピロロ [3 ， 4 - n] [1 ， 4 ， 7 ， 10 ， 19] ジオキサトリアザシクロヘンイコシン - 23 ， 25 (24H) - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0410 】

120 .

前記式 (I I I) の化合物が、 14 - (2 - チエニルメチル) - 6 ， 7 ， 9 ， 10 ， 13 ， 14 ， 15 ， 16 - オクタヒドロ - 12H ， 23H - 5 ， 26 : 17 ， 22 - ジ (メテノ) ジベンゾ [k ， q] ピロロ [3 ， 4 - n] [1 ， 4 ， 7 ， 10 ， 19] ジオキサトリアザシクロヘンイコシン - 23 ， 25 (24H) - ジオンである、 83 . に記載の方法

10

【 0411 】

121 .

前記式 (I I I) の化合物が、 14 - (1 - ナフチルメチル) - 6 ， 7 ， 9 ， 10 ， 13 ， 14 ， 15 ， 16 - オクタヒドロ - 12H ， 23H - 5 ， 26 : 17 ， 22 - ジ (メテノ) ジベンゾ [k ， q] ピロロ [3 ， 4 - n] [1 ， 4 ， 7 ， 10 ， 19] ジオキサトリアザシクロヘンイコシン - 23 ， 25 (24H) - ジオンである、 83 . に記載の方法

【 0412 】

122 .

前記式 (I I I) の化合物が、 14 - (ピリジン - 4 - イルメチル) - 6 ， 7 ， 9 ， 10 ， 13 ， 14 ， 15 ， 16 - オクタヒドロ - 12H ， 23H - 5 ， 26 : 17 ， 22 - ジ (メテノ) ジベンゾ [k ， q] ピロロ [3 ， 4 - n] [1 ， 4 ， 7 ， 10 ， 19] ジオキサトリアザシクロヘンイコシン - 23 ， 25 (24H) - ジオンである、 83 . に記載の方法。

20

【 0413 】

123 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - [1 - (2 - { 2 - [2 - (1 ， 2 ， 3 ， 4 - テトラヒドロ - ナフタレン - 1 - イルアミノ) - エトキシ] - エトキシ } - エチル) - 1H - インドール - 3 - イル] - 4 - { 1 - [2 - (1 ， 2 ， 3 ， 4 - テトラヒドロ - ナフタレン - 1 - イルアミノ) - エチル] - 1H - インドール - 3 - イル } - ピロール - 2 ， 5 - ジオンである、 83 . に記載の方法。

30

【 0414 】

124 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - [1 - (3 - ジメチルアミノ - フェニル) - 1H - インドール - 3 - イル] - 4 - [1 - (2 - ヒドロキシ - エチル) - 1H - インダゾール - 3 - イル] - ピロール - 2 ， 5 - ジオンである、 83 . に記載の方法。

【 0415 】

125 .

前記式 (I I I) の化合物が、 3 - [5 - クロロ - 1 - (6 - ジメチルアミノ - ピリジン - 3 - イル) - 1H - インドール - 3 - イル] - 4 - [1 - (2 - ヒドロキシ - エチル) - 1H - インダゾール - 3 - イル] - ピロール - 2 ， 5 - ジオンである、 83 . に記載の方法。

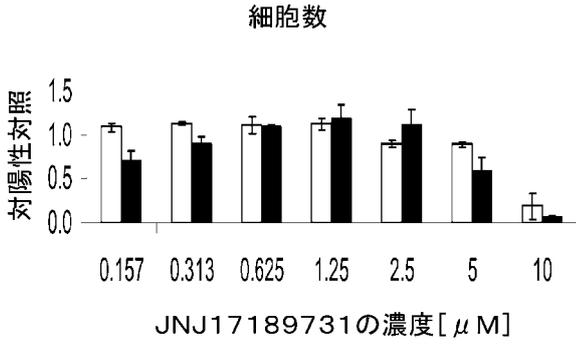
40

【 0416 】

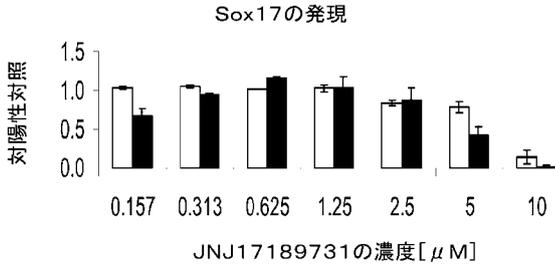
126 .

前記式 (I I I) の化合物が、 5 - (5 - クロロ - 3 - { 4 - [1 - (2 - ヒドロキシ - エチル) - 1H - インダゾール - 3 - イル] - 2 ， 5 - ジオキソ - 2 ， 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 3 - イル } - インドール - 1 - イル) - ニコチン酸メチルエステルである、 83 . に記載の方法。

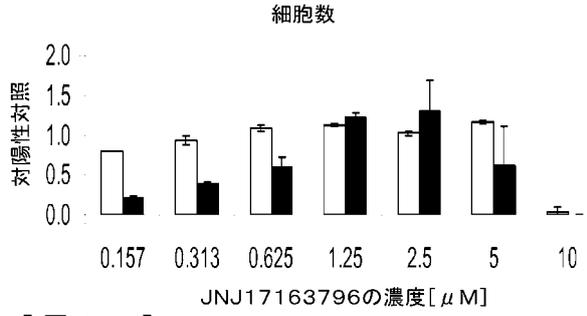
【図1A】



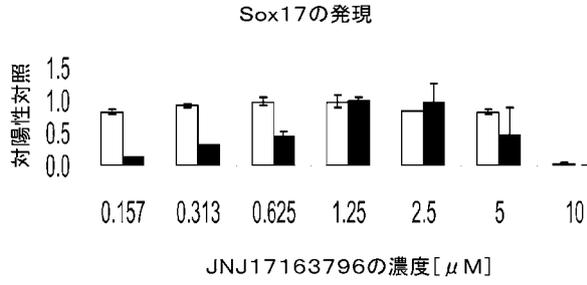
【図1B】



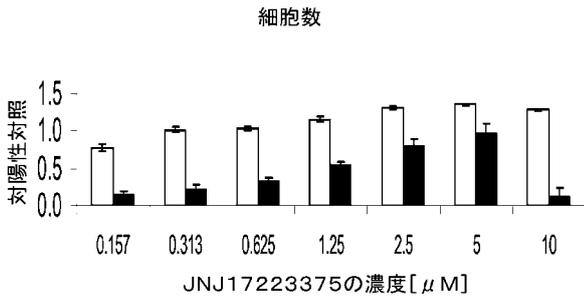
【図2A】



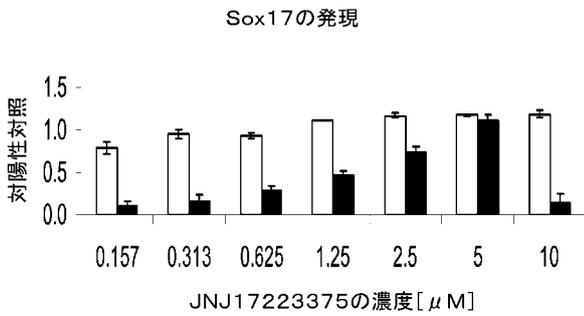
【図2B】



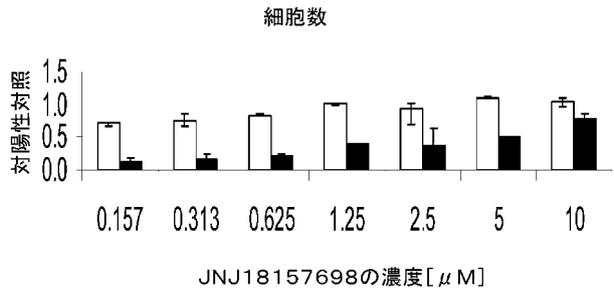
【図3A】



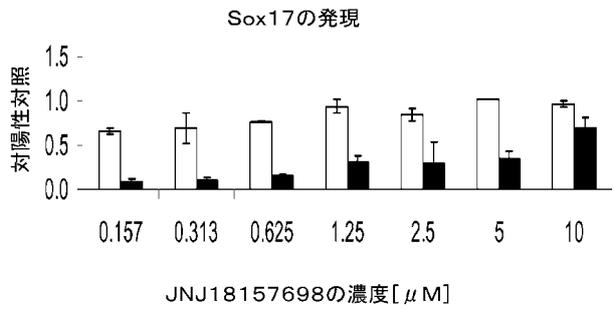
【図3B】



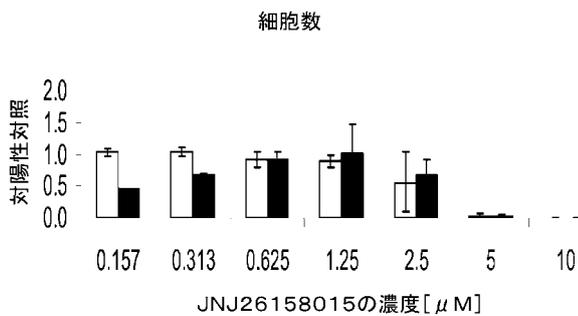
【図4A】



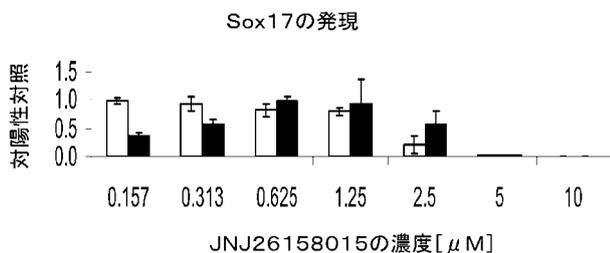
【図4B】



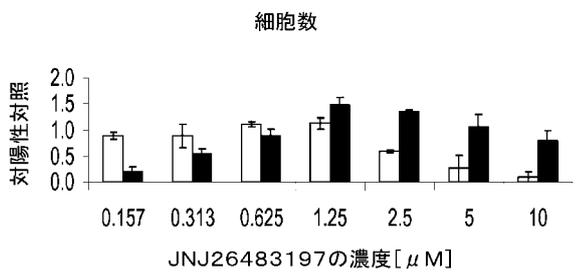
【 図 5 A 】



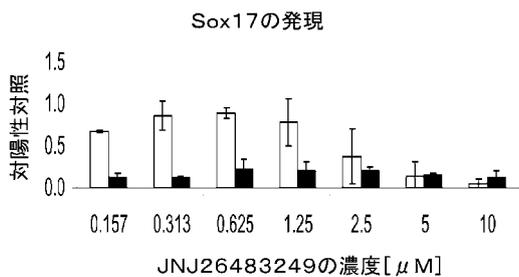
【 図 5 B 】



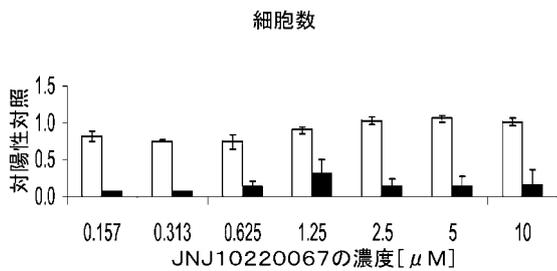
【 図 6 A 】



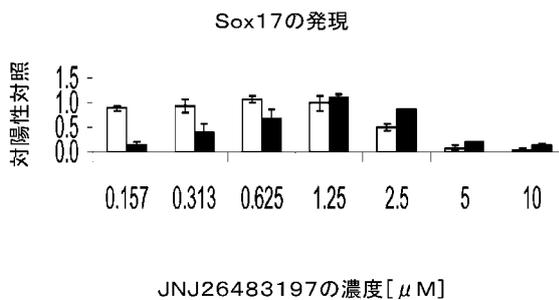
【 図 7 B 】



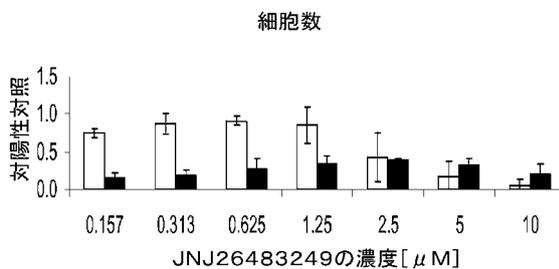
【 図 8 A 】



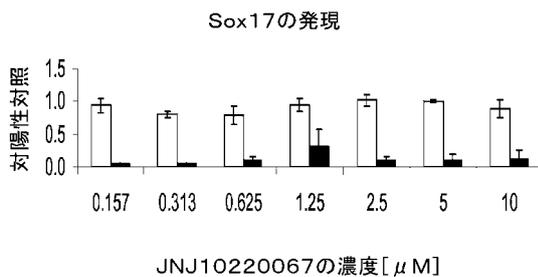
【 図 6 B 】



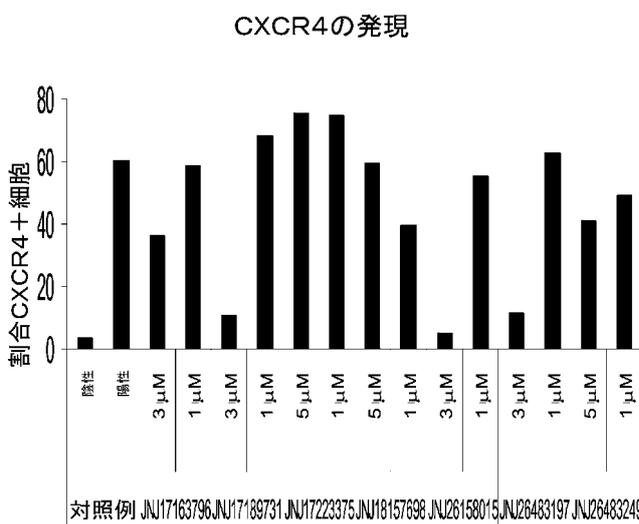
【 図 7 A 】



【 図 8 B 】

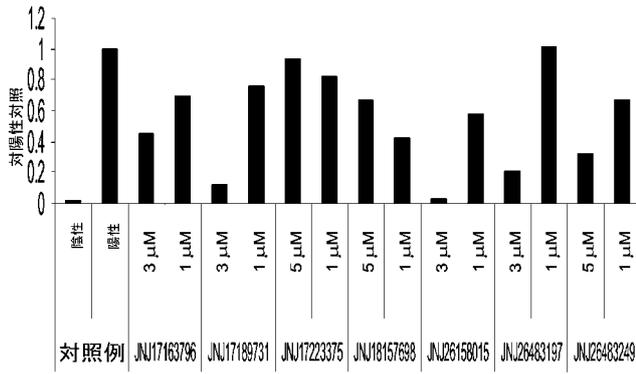


【 図 9 】



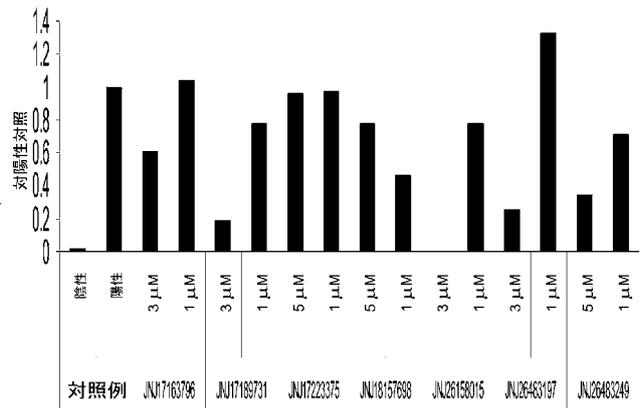
【図10A】

CXCR4 mRNAレベル



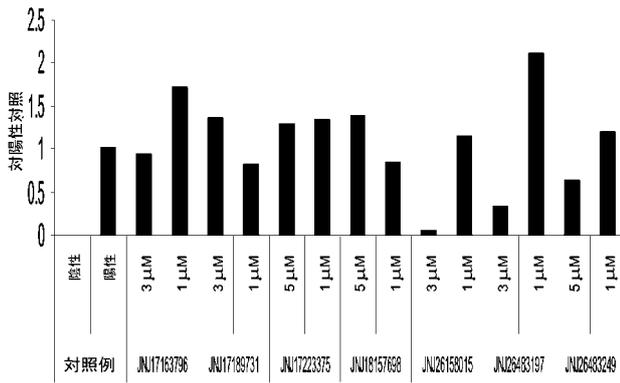
【図10B】

HNF3β mRNAレベル



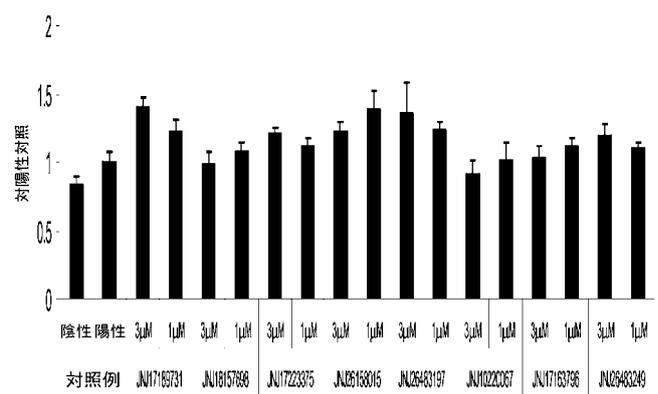
【図10C】

Sox17 mRNAレベル



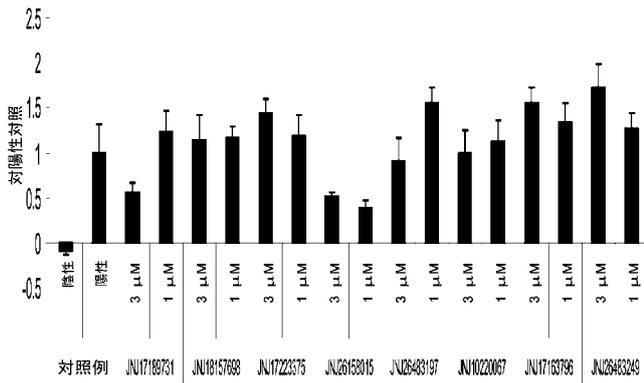
【図11A】

細胞数



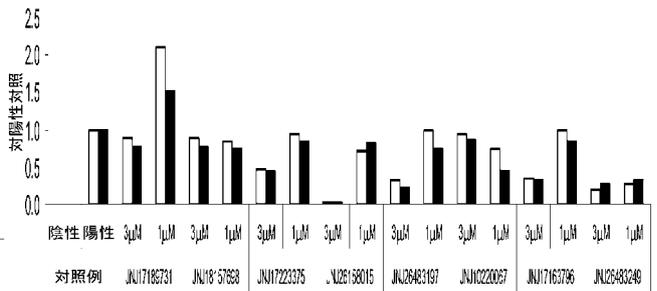
【 図 1 1 B 】

Pdx1の発現



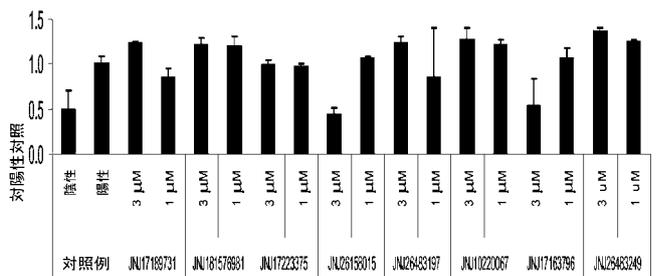
【 図 1 2 】

mRNAレベル



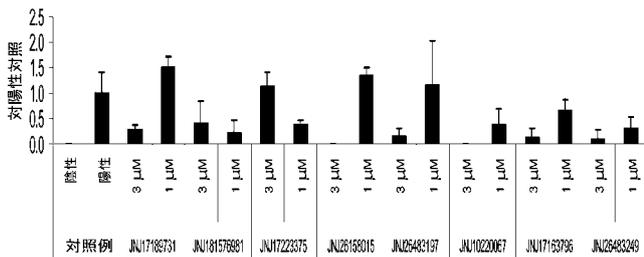
【 図 1 3 A 】

細胞数



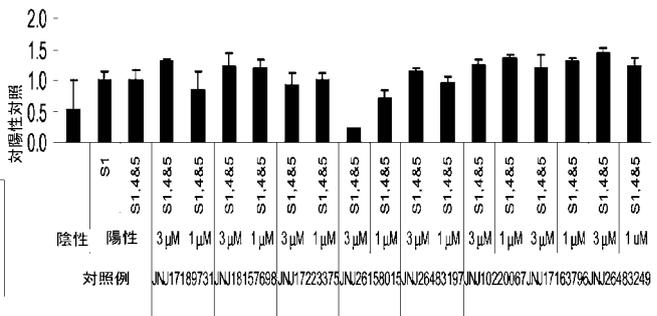
【 図 1 3 B 】

インスリンの発現



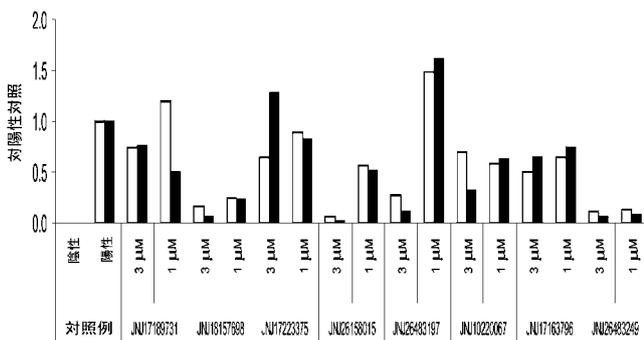
【 図 1 5 A 】

細胞数



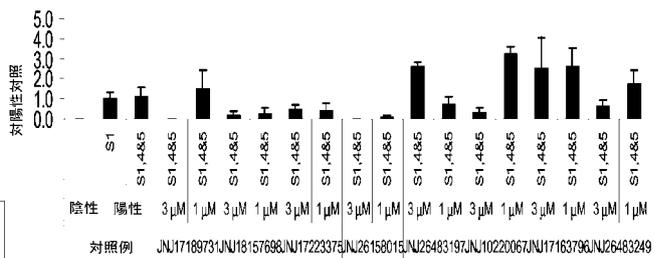
【 図 1 4 】

mRNAレベル



【 図 1 5 B 】

インスリンの発現



フロントページの続き

(72)発明者 ジアジアン・リウ

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 8 5 5 8 スキルマン・グランドビュロード 1 9 9

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC20 BA23 BA25 BB13 BB34 BB40 CA44 CA60