



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I888509 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 07 月 01 日

(21)申請案號：110109790

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 03 月 18 日

(51)Int. Cl. : C12N5/077 (2010.01)

A61K35/34 (2015.01)

A61P9/10 (2006.01)

(30)優先權：2020/03/19 日本

2020-050268

(71)申請人：日商千紙鶴治療公司 (日本) ORIZURU THERAPEUTICS, INC. (JP)

日本

(72)發明人：吉田善紀 YOSHIDA, YOSHINORI (JP) ; 渡邊幸造 WATANABE, KOZO (JP) ; 田中礼 TANAKA, AYA (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

WO 2016/131137A1

審查人員：蔡明憲

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：21 共 74 頁

(54)名稱

心肌細胞的精製方法

(57)摘要

本發明係提供一種包含心肌細胞之細胞集團的製造方法，該方法係包含：(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞之細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑(惟排除 EGF 受體阻礙劑)接觸的步驟，該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培養多能性幹細胞所獲得者；以及(2)培養該細胞集團的步驟。

The present invention provides a method for producing cell population comprising myocardial cells, which method comprises (1) a step of contacting a cell population with receptor-type tyrosine kinase inhibitor (exclusion of EGF receptor inhibitor), wherein the cell population is obtained by cultivating pluripotent stem cells in a differentiation medium for myocardial cells and comprises myocardial cells or myocardial progenitors, and other cells, and (2) a step of cultivating the cell population.

【發明摘要】**【中文發明名稱】** 心肌細胞的精製方法**【英文發明名稱】** METHOD FOR PURIFYING MYOCARDIAL CELL**【中文】**

本發明係提供一種包含心肌細胞之細胞集團的製造方法，該方法係包含：(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞之細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑(惟排除EGF受體阻礙劑)接觸的步驟，該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培養多能性幹細胞所獲得者；以及(2)培養該細胞集團的步驟。

【英文】

The present invention provides a method for producing cell population comprising myocardial cells, which method comprises (1) a step of contacting a cell population with receptor-type tyrosine kinase inhibitor (exclusion of EGF receptor inhibitor), wherein the cell population is obtained by cultivating pluripotent stem cells in a differentiation medium for myocardial cells and comprises myocardial cells or myocardial progenitors, and other cells, and (2) a step of cultivating the cell population.

【指定代表圖】 無**【代表圖之符號簡單說明】** 無**【特徵化學式】** 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 心肌細胞的精製方法

【英文發明名稱】 METHOD FOR PURIFYING MYOCARDIAL CELL

【技術領域】

【0001】 本發明係關於心肌細胞的製造方法及精製方法，更詳細而言，係關於使用受體型酪胺酸激酶阻礙劑之心肌細胞的製造方法及精製方法。

【先前技術】

【0002】 近年來，雖然心肌梗塞的發生率逐漸減少，但世界中包含心肌梗塞之心臟疾病依然為主要死亡原因。對於重症心衰竭患者心臟移植雖為目前唯一的治療法，但有心臟移植捐贈者不足的問題。所以，使用心肌細胞的細胞治療係作為改善心臟疾病的治療法而受到矚目。再者，亦著眼於使用心肌細胞的活體外(in-vitro)的藥效評估試驗、或藥劑安全性試驗的確立。因此，謀求穩定地供給可使用於細胞治療及活體外的試驗之均勻的心肌細胞。

【0003】 穩定地提供均勻的心肌細胞的方法之一可舉出：從幹細胞或心肌前驅細胞分化誘導心肌細胞的方法，並且為了有效地確立成為心肌細胞的分化誘導法，正進行各種努力。該分化誘導法已報導有：於包含EGFR阻礙劑的培養基中培養多能性幹細胞，藉此促進從多能性幹細胞分化誘導為心肌細胞的方法(專利文獻1)；誘導性富潛能幹細胞分化誘導成為心肌細胞後，使該心肌細胞與Neuregulin 1的拮抗劑或ErbB的拮抗劑接觸，藉此使心肌細胞成熟的方法(專利文獻2)；使肌肉母細胞等未分化前驅細胞與去乙酰基醇素阻礙劑接觸，藉此促進

該未分化前驅細胞的分化誘導的方法(專利文獻3)；使心肌前驅細胞等成體的前驅細胞與組蛋白去乙酰基化酵素(HDAC)阻礙劑接觸，藉此促進該前驅細胞的分化誘導的方法(專利文獻4)等。再者，亦已報導不經過從幹細胞的分化誘導過程的方法，例如，專利文獻5中揭示從纖維母細胞等體細胞，藉由直接重編程(direct programming)而製造心肌前驅細胞或心肌細胞的方法。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0004】

專利文獻1: 國際公開第2014/136519號

專利文獻2: 美國公開第2010/0183565號

專利文獻3: 國際公開第2003/033678號

專利文獻4: 國際公開第2009/073618號

專利文獻5: 國際公開第2015/038704號

【發明內容】

[發明欲解決之課題]

【0005】 本發明之課題係藉由與上述以往之方法不同的手段，提供一種包含高純度的心肌細胞的細胞集團之製造方法。再者，亦以提供一種從包含心肌細胞的細胞集團，以高純度精製心肌細胞的方法為課題。

[用於解決課題之手段]

【0006】 本發明者們為了解決上述課題進行致力研究的結果，獲得是否可不促進從未分化細胞成為心肌細胞的分化誘導，而是在已包含心肌細胞的細胞

集團內，藉由以心肌細胞以外的細胞中高度表現的蛋白質作為標的的阻礙劑，抑制該心肌細胞以外的細胞的增殖，或減少心肌細胞以外的細胞數，進而使該細胞集團中的心肌細胞的比例增加，亦即，精製心肌細胞的想法。據此，首先，使用包含從iPS細胞分化誘導而成之心肌細胞的細胞集團，進行單細胞RNA序列解析，簇集(Clustering)該細胞集團中的細胞。由簇集的結果發現，於心肌細胞以及其以外的細胞中，確認受體型酪胺酸激酶的表現有差異。因此，使用針對受體型酪胺酸激酶的阻礙劑，驗證細胞集團中所佔有的心肌細胞的比例變化時，發現藉由受體型酪胺酸激酶阻礙劑可成功地純化心肌細胞。本發明者們基於該等發現進一步重複研究的結果完成本發明。

【0007】亦即，本發明提供下列者。

[1] 一種包含心肌細胞之細胞集團的製造方法，係包含：

(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑(惟排除EGF受體阻礙劑)接觸的步驟，該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培養多能性幹細胞所得者；以及

(2) 培養該細胞集團的步驟。

[2] 如[1]記載的方法，其中，前述步驟(1)的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑的接觸，係從多能性幹細胞的分化誘導開始第4日以後進行。

[3] 如[1]或[2]記載的方法，其中，前述步驟(1)的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑的接觸係進行1日以上。

[4] 如[1]至[3]中任一項所記載之方法，其中，前述阻礙劑係針對選自由VEGF受體、PDGF受體、HGF受體及FGF受體所成群組中之至少1種受體型酪胺酸激酶的阻礙劑。

[5] 如[1]至[4]中任一項所記載之方法，其中，前述阻礙劑係選自由N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1,2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、N-{4-[(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1,1-二羧醯胺、AMG337、ASP5878、BGJ398、佛瑞替尼(Foretinib)、ZM323881、CP-673451、克萊拉尼(Crenolanib)及克唑替尼(Crizotinib)所成群組中之至少1種。

[6] 如[1]至[5]中任一項所記載之方法，其中，前述多能性幹細胞係誘導性富潛能幹細胞。

[7] 一種包含心肌細胞之細胞集團，係藉由[1]至[6]中任一項所記載之方法獲得者。

[8] 一種細胞移植療法劑，係含有[7]所記載之細胞集團而成者。

[9] 一種心肌細胞的精製方法，係包含：

(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的步驟，該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培養多能性幹細胞所得者；以及

(2) 培養該細胞集團的步驟。

[發明的效果]

【0008】 根據本發明，可提供一種以高純度包含心肌細胞的細胞集團。該細胞集團可適用於針對心臟疾病之。再者，亦提供一種從包含心肌細胞及心肌前驅細胞的細胞集團，以高純度精製心肌細胞的方法。

【圖式簡單說明】

【0009】

圖1顯示從iPS細胞分化誘導而成之心肌細胞的單細胞RNA定序數據所得之簇集的t-SNE繪圖與各簇集的肌節- α -肌動蛋白原(sarcomeric- α -actinin)與cTnT(心肌肌鈣蛋白T, Cardiac Troponin T)的表現量。於上方以圓所圈起的部分顯示非心肌細胞集團。中央及下方的係縱軸顯示基因表現量，橫軸的一致性(identity)量級係顯示圖1的簇集編號。各點顯示各個細胞，以框圍起的部分顯示非心肌細胞的簇集。

圖2-1係顯示從單細胞RNA定序數據所得之源自iPS細胞的心肌細胞的簇集結果之t-SNE繪圖與各細胞的VEGFR1、VEGFR2基因的表現。顯示基因表現的圖之濃灰色的點表示高表現量的細胞，淺灰色表示低表現量的細胞。表現高的細胞集團以圓圈起，集團名示於圖中(CM：心肌細胞(以下亦簡稱為CM)，SMC：類平滑肌細胞(以下亦簡稱為SMC)，END：內胚層譜系細胞(以下亦簡稱為END)，EC：類內皮細胞)。

圖2-2係顯示從單細胞RNA定序數據所得之源自iPS細胞的心肌細胞的簇集結果之t-SNE繪圖與各細胞的VEGFR3、PDGFRA、PDGFRB基因的表現。顯示基因表現的圖之濃灰色的點表示高表現量的細胞，淺灰色表示低表現量的細胞。表現高的細胞集團以圓圈起，集團名示於圖中(SMC：類平滑肌細胞(以下亦簡稱為SMC)，EC：類內皮細胞)。

圖2-3係顯示從單細胞RNA定序數據所得之源自iPS細胞的心肌細胞的簇集結果之t-SNE繪圖與各細胞的FGFR4、HGFR(c-Met)、EGFR1基因的表現。顯示基因表現的圖之濃灰色的點表示高表現量的細胞，淺灰色表示低表現量的細胞。表現高的細胞集團以圓圈起，集團名示於圖中(END：內胚層譜系細胞(以下亦簡稱為END))。

圖2-4係顯示從單細胞RNA定序數據所得之源自iPS細胞的心肌細胞的簇集結果之t-SNE繪圖與各細胞的EGFR3基因的表現。顯示基因表現的分區之濃灰色的點表示高表現量的細胞，淺灰色表示低表現量的細胞。表現高的細胞集團以圓圈起，集團名示於圖中(END：內胚層譜系細胞(以下亦簡稱為END))。

圖3係顯示源自iPS細胞的心肌細胞的CD326、CD31、CD49a表現所造成的細胞集團的分離結果。藉由流式細胞術，將心肌細胞率(TNNI1陽性率)89.6%(左端圖)的TNNI1報導子之源自iPS細胞的心肌細胞，分離為CD326陽性細胞(END，中左圖以框圍起的細胞)、CD326陰性CD31陽性細胞(EC，中右圖以框圍起的細胞)、CD326陰性CD31陰性CD49a陽性細胞(SMC，中右圖以框圍起的細胞)、CD326陰性CD31陰性CD49a陰性細胞(三重陰性(Triple Negative)：TN，中右圖中位於左下的細胞)。TN為99%以上者係心肌標記TNNI1陽性細胞(心肌細胞)(右端圖)。EC及SMC的百分比標示不只表示圖內的細胞，亦包含CD326陰性細胞的數值。

圖4係顯示化合物處理後的心肌細胞率。*：由於細胞數少而不實施測定。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示肌動蛋白原(Actinin)陽性細胞率(心肌細胞率)。

圖5係顯示化合物處理後的非心肌細胞率(END：內胚層譜系細胞，SMC：類平滑肌細胞，EC：類內皮細胞)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示非心肌細胞率。

圖6係顯示化合物處理後的心肌細胞率的平均值(標準偏差)(n=4)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖7係顯示化合物處理後的非心肌細胞率(END：內胚層譜系細胞，SMC：類平滑肌細胞，EC：類內皮細胞)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示非心肌細胞率。

圖8係顯示化合物處理後的心肌細胞率的平均值(標準偏差)(n=3)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖9係顯示將化合物未處理時的回收細胞數作為1時，化合物處理後的回收細胞數的相對比的平均值(標準偏差)($n=3$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示回收細胞數的相對比。

圖10係顯示化合物處理後的心肌細胞率的平均值(標準偏差)($n=4$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖11係顯示將化合物未處理時的回收細胞數作為1時，化合物處理後的回收細胞數的相對比的平均值(標準偏差)($n=4$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示回收細胞數的相對比。

圖12係顯示化合物處理後的心肌細胞率的平均值(標準偏差)($n=4$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖13係顯示化合物處理後的非心肌細胞率的平均值(標準偏差)($n=4$)(END：內胚層譜系細胞，SMC：類平滑肌細胞，EC：類內皮細胞)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示非心肌細胞率。

圖14係顯示將化合物未處理時的回收細胞數作為1時，化合物處理後的回收細胞數的相對比的平均值(標準偏差)($n=4$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示回收細胞數的相對比。

圖15係顯示化合物處理後的心肌細胞率(實驗編號1為 $n=2$ 的平均值，其餘為 $n=1$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖16係顯示化合物處理後的非心肌細胞率的平均值(END：內胚層譜系細胞，SMC：類平滑肌細胞，EC：類內皮細胞)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示非心肌細胞率。*：由於細胞數少而不實施測定。

圖17係顯示化合物處理後的心肌細胞率(實驗編號1為 $n=4$ 的平均值，實驗編號2、3為 $n=3$ 的平均值(標準偏差)，實驗編號4、5為 $n=1$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖18係顯示化合物處理後的非心肌細胞率(實驗編號1為 $n=4$ 的平均值，實驗編號2為 $n=3$ 的平均值(標準偏差)，實驗編號3為 $n=2$ 的平均值，實驗編號4、5為 $n=1$)(END：內胚層譜系細胞，SMC：類平滑肌細胞，EC：類內皮細胞)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示非心肌細胞率。

圖19係顯示化合物處理後的心肌細胞率的平均值(標準偏差)($n=4$ ，實驗編號2為 $n=3$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示心肌細胞率。

圖20係顯示化合物處理後的非心肌細胞率的平均值(標準偏差)($n=4$)(END：內胚層譜系細胞，SMC：類平滑肌細胞，EC：類內皮細胞)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示非心肌細胞率。

圖21係顯示將化合物未處理時的回收細胞數作為1時，化合物處理後的回收細胞數的相對比的平均值(標準偏差)($n=4$)。縱軸顯示實驗編號，橫軸顯示回收細胞數的相對比。

【實施方式】

【0010】 1. 包含心肌細胞的細胞集團的製造方法

本發明提供一種包含心肌細胞的細胞集團的製造方法(以下亦稱為「本發明的製法」)。本發明的製法係包含：(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞的細胞集團，與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的步驟；以及(2)培養該細胞集

團的步驟。本發明的製法中，上述(1)之「受體型酪胺酸激酶阻礙劑」係排除EGF受體阻礙劑。

【0011】本說明書中，「心肌細胞」意指肌節 α -肌動蛋白原(Sarcomeric α -actinin)、心肌肌鈣蛋白T(cTnT)、肌鈣蛋白第I型1(TNNI1)內之至少一者為陽性的細胞，較佳為肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞。再者，典型為具有自搏動能力的心肌細胞。再者，「心肌前驅細胞」意指前述心肌細胞的前驅細胞，係Nkx2.5、GATA4、MEF2C及MESP1內之至少1者為陽性的細胞。上述「其他細胞」意指不為心肌細胞及心肌前驅細胞之任一者的細胞(以下亦稱為「非心肌細胞」)，具體的細胞可列舉例如：平滑肌細胞、內皮細胞、幹細胞(例如多能性幹細胞)等。

【0012】本說明書中，「陽性」意指蛋白質或基因表現出藉由所屬技術領域習知的至少任一手法可檢出之量。蛋白質的檢出係可利用使用抗體的免疫學分析，例如ELISA、免疫染色、流式細胞術予以進行。再者，在表現於細胞內、不表現於細胞表面的蛋白質(例如轉錄因子或其次單元等)的情況，使該蛋白質與報導子蛋白質一起表現，藉由檢出該報導子蛋白質可檢出作為對象之蛋白質。基因的檢出係例如可利用RT-PCR、生物晶片(例如：微陣列)、RNAseq等核酸增幅方法及/或核酸檢出方法予以進行。蛋白質或基因的表現係可以一般手法判斷，例如利用流式細胞術的情況，相對表現量高時，可判斷蛋白質係以可檢出的程度表現。

【0013】本說明書中，「陰性」意指蛋白質或基因的表現量未達如上述之習知手法的全部或任一者的檢出下限值。蛋白質或基因的表現的檢出下限值雖可因各手法而不同，但可以一般手法判斷。

【0014】本說明書中，「細胞集團」意指包含同種類或不同種類的2種以上的細胞的集團。「細胞集團」亦意指同種類或不同種類的細胞的塊體(mass)。前述步驟(1)所使用之包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞的細胞集團，可藉由將多能性幹細胞於心肌細胞分化用培養基中培養而製造。因此，本發明的製法亦可於前述步驟(1)之前，包含步驟(0)從多能性幹細胞分化誘導心肌細胞或心肌前驅細胞的步驟。

【0015】本發明所使用之多能性幹細胞可列舉例如：誘導性富潛能幹細胞(induced pluripotent stem cell：iPS細胞)、胚性幹細胞(embryonic stem cell：ES細胞)、藉由核移植所得之源自純株(clone)胚胎的胚性幹細胞(nuclear transfer Embryonic stem cell：ntES細胞)、多能性生殖幹細胞(multipotent germline stem cell：mGS細胞)、胚胎生殖幹細胞(EG細胞)、Muse細胞(multi-lineage differentiating stress enduring cell)，較佳為iPS細胞(更佳為人類iPS細胞)。上述多能性幹細胞係ES細胞或源自人類胚胎之任意細胞時，該細胞可為破壞胚胎而製作成的細胞，亦可為不破壞胚胎而製作成的細胞，較佳為不破壞胚胎而製作成的細胞。上述多能性幹細胞較佳為源自哺乳動物(例如：小鼠、大鼠、倉鼠、天竺鼠、狗、猴子、猩猩、黑猩猩、人類)，更佳為源自人類。因此，本發明所使用之多能性幹細胞最佳為人類iPS細胞。

【0016】「誘導性富潛能幹細胞(iPS細胞)」意指藉由於哺乳動物體細胞或未分化幹細胞導入特定的因子(核初始化因子)並進行重編程所獲得之細胞。目前，「誘導性富潛能幹細胞(iPS細胞)」有各種各樣者，除了來自山中等人之藉由於小鼠纖維母細胞導入Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc之4因子所建立之iPS細胞(Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006)126：663-676)之外，亦可使用：於人類纖

維母細胞導入同樣的4因子所建立的源自人類細胞的iPS細胞(Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007)131:861-872.)、上述4因子導入後以Nanog的表現作為指標進行篩選所建立的Nanog-iPS細胞(Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.)、以不含c-Myc的方法所製作的iPS細胞(Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008)26, 101-106)、以無病毒法導入6因子所建立的iPS細胞(Okita K et al. Nat. Methods 2011 May ; 8(5) : 409-12 , Okita K et al. Stem Cells. 31(3):458-66.)。再者，亦可使用由Thomson等人所製作的導入OCT3/4・SOX2・NANOG・LIN28的4因子所建立的誘導性富潛能幹細胞(Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007)318:1917-1920.)、由Daley等人所製作的誘導性富潛能幹細胞(Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007)451 : 141-146)、由櫻田等人所製作的誘導性富潛能幹細胞(日本特開2008-307007號)等。

除此之外，亦可使用已公開之所有論文(例如，Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008)Vol 3, Issue 5, 568-574 ; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008)454, 646-650 ; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008)26, No 7, 795-797)、或專利(例如日本特開 2008-307007 號、日本特開 2008-283972 號、US2008-2336610、US2009-047263、WO2007-069666、WO2008-118220、WO2008-124133、WO2008-151058、WO2009-006930、WO2009-006997、WO2009-007852)所記載之所屬技術領域習知的誘導性富潛能幹細胞之任一者。誘導性富潛能幹細胞株可利用 NIH、理研、京都大學等所建立的各種 iPS 細胞株。例如，若為人類 iPS 細胞株，可列舉：理研的 HiPS-RIKEN-1A 株、HiPS-RIKEN-2A 株、HiPS-RIKEN-12A 株、Nips-B2 株；京都大學的 253G1 株、201B7 株、409B2 株、454E2 株、606A1 株、610B1 株、648A1 株；再生醫療用 iPS 細胞儲備等。

【0017】本說明書中，「體細胞」意指排除卵子、卵母細胞、ES細胞等生殖系列細胞或分化全能性細胞的所有動物細胞(較佳為包含人類之哺乳動物細胞)。體細胞雖無特別限定，包含胎兒(嬰兒)的體細胞、新生兒(嬰兒)的體細胞、及成熟健康或疾病性的體細胞之任一者，再者，包含初代培養細胞、繼代培養細胞以及純株化細胞之任一者。具體而言，體細胞可例示例如：(1)神經幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、齒髓幹細胞等組織幹細胞(體性幹細胞)；(2)組織前驅細胞；(3)淋巴球、上皮細胞、內皮細胞、肌肉細胞、纖維母細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃黏膜細胞、腸細胞、脾細胞、胰細胞(胰外分泌細胞等)、腦細胞、肺細胞、腎細胞及脂肪細胞等已分化的細胞等。

【0018】ES細胞係由人類或小鼠等哺乳動物的初期胚(例如囊胚)的內部細胞塊所建立，並且具有多能性及藉由自體複製之增殖能力的幹細胞。ES細胞係於1981年在小鼠中發現(M. J. Evans and M. H. Kaufman(1981), Nature 292 : 154-156)，之後，亦於人類、猴等靈長類建立ES細胞株(J. A. Thomson et al. (1998), Science 282 : 1145-1147 ; J. A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92 : 7844-7848 ; J. A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55 : 254-259 ; J. A. Thomson and V. S. Marshall(1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38 : 133-165)。ES細胞可由對象動物的受精卵的囊胚取出內部細胞塊，藉由於纖維母細胞的飼養細胞上培養內部細胞塊而建立。人類及猴的ES細胞的建立及維持的方法記載於例如：USP5,843,780 ; Thomson JA, et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 7844-7848 ; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282 : 1145-1147 ; Suemori H. et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345 : 926-932 ; Ueno M. et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 9554-9559 ; Suemori H. et al. (2001), Dev. Dyn., 222 : 273-279 ; Kawasaki 331883

第 12 頁，共 52 頁(發明說明書)

H. et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 : 1580-1585 ; Klimanskaya I. et al. (2006), *Nature*, 444 : 481-485等。或者是，ES細胞亦可僅使用囊胚期以前的卵裂期的胚的單一裂球建立(Chung Y. et al. (2008), *Cell Stem Cell* 2 : 113-117)，亦可使用停止發育的胚建立(Zhang X. et al. (2006), *Stem Cells* 24 : 2669-2676.)。「ES細胞」若為小鼠ES細胞，可利用inGenious targeting laboratory公司、理研(理化學研究所)等所建立之各種小鼠ES細胞株，若為人類ES細胞，可利用威斯康辛大學、NIH、理研、京都大學、國立成育醫療研究中心及Cellartis公司等所建立之各種人類ES細胞株。例如，人類ES細胞株可利用：ESI Bio公司所分讓的CHB-1至CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1至HUES28株等；WiCell Research所分讓的H1株、H9株等；理研所分讓的KhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等。

【0019】 nt ES 細胞(核轉移 ES 細胞)係藉由核移植技術所製作之源自純株胚的 ES 細胞，與源自受精卵的 ES 細胞具有幾乎相同的特性(Wakayama T. et al. (2001), *Science*, 292 : 740-743 ; S. Wakayama et al. (2005), *Biol. Reprod.*, 72 : 932-936 ; Byrne J. et al. (2007), *Nature*, 450 : 497-502)。亦即，藉由將未受精卵的核置換成體細胞的核而獲得之源自純株胚的囊胚的內部細胞塊，由該內部細胞塊所建立的 ES 細胞係 nt ES(nuclear transfer ES)細胞。為了 nt ES 細胞的製作，利用核移植技術(Cibelli J. B. et al. (1998), *Nature Biotechnol.*, 16 : 642-646)與 ES 細胞作製技術(上述)之組合(若山清香等人(2008)，*實驗醫學*，26 卷，5 號(增刊)，47 至 52 頁)。核移植中，於哺乳動物的已除核的未受精卵中，注入體細胞的核，藉由進行數小時培養而可進行初期化。

【0020】 mGS 細胞係源自睪丸的多能性幹細胞，係成為用以精子形成的起源的細胞。此細胞與 ES 細胞同樣地，可分化誘導成各種系列細胞，例如，具有移植至小鼠囊胚時可作出嵌合小鼠等的性質(Kanatsu-Shinohara M. et al. (2003b) *iol. Reprod.*, 69 : 612-616 ; Shinohara K. et al. (2004), *Cell*, 119 : 1001-1012)。
mGS 細胞係以包含源自神經膠細胞系的神經營養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor(GDNF))的培養液可自行複製，再者藉由與 ES 細胞同樣的培養條件下重複繼代，藉此可獲得生殖幹細胞(竹林正則等人(2008)，實驗醫學，26 卷，5 號(增刊)，41 至 46 頁，羊土公司(東京、日本))。

【0021】 EG 細胞係由胎生期的原生殖細胞所建立，並具有與 ES 細胞同樣多能性的細胞。可藉由於 LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)等物質的存在下培養原生殖細胞而建立(Matsui Y. et al. (1992), *Cell*, 70 : 841-847 ; J. L. Resnick et al. (1992), *Nature*, 359 : 550-551)。

【0022】 Muse 細胞係存在於生體內的非腫瘤性多能性幹細胞，例如，可利用 WO 2011/007900 所記載的方法製造。詳言之，將纖維母細胞或骨髓間質細胞進行長時間胰蛋白酶處理，較佳為 8 小時或 16 小時的胰蛋白酶處理後，以懸浮培養獲得具有多能性的細胞，該細胞係 Muse 細胞，且 SSEA-3 以及 CD105 為陽性。

【0023】 前述步驟(0)只要為可將多能性幹細胞分化誘導成心肌細胞或心肌前驅細胞，則無特別限制，例如，可藉由將多能性幹細胞於心肌細胞分化用培養基中培養，而分化誘導成心肌細胞或心肌前驅細胞。本發明之一態樣中，前述步驟(0)可包含(0-1)將多能性幹細胞分化誘導成中胚層系細胞的步驟、以及(0-2)將該中胚層系細胞分化誘導成心肌細胞或心肌前驅細胞的步驟。本說明書中，

「心肌細胞分化用培養基」意指包含細胞激素等促進分化誘導成心肌細胞的因子(以下有時稱為「心肌細胞分化誘導因子」)以及基礎培養基的培養基。上述心肌細胞分化誘導促進因子中，亦包含從多能性幹細胞分化誘導成心肌細胞或心肌前驅細胞的過程中，分化誘導成中間細胞(例如中胚層系細胞等)所必須的因子者。

【0024】 本發明所使用之基礎培養基例如包含：StemFit(例如：StemFit AK03N、StemFit AK02N)(味之素公司)、StemPro-34(Thermo Fisher Scientific 公司)、PECM(Primate ES Cell Medium)、GMEM(Glasgow Minimum Essential Medium)、IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、199 培養基、Eagle's 最小必須培養基(Eagle's Minimum Essential Medium)(EMEM)、 α MEM、Dulbecco's 修改 Eagle's 培養基(Dulbecco's modified Eagle's Medium)(DMEM)、Ham's F12 培養基、RPMI 1640 培養基、Fischer's 培養基(Fischer's medium)、以及其等的混合培養基等。

【0025】 基礎培養基中，可適宜地添加：ROCK 阻礙劑(例如：Y-27632、Fasudil/HA1077、SR3677、GSK269962、H-1152、Wf-536 等)、血清(例如：胎牛血清(FBS)、人類血清、馬血清等)或者血清替代物、胰島素、各種維生素(例如：維生素 C 類(例如：抗壞血酸))、L-麩胺酸、非必須胺基酸等各種胺基酸、2-巰基乙醇、硫甘油(例如： α -硫代甘油 (MTG, Monothioglycerol))、各種細胞激素、幹細胞因子(SCF(Stem cell factor))、活化素等)、各種荷爾蒙、各種增殖因子(白血病抑制因子(LIF)、鹼性纖維母細胞增殖因子(bFGF)、TGF- β 等)、各種細胞外基質、各種細胞接著分子、青黴素/鏈黴素、嘌呤黴素等抗生物質、酚紅等 pH 指示劑等。血清替代物包含：白蛋白、轉鐵蛋白、脂肪酸、胰島素、膠原蛋白前驅物、

微量元素、剔除血清替代物(Knockout Serum Replacement(KSR))、ITS-補充物以及該等之混合物等。

【0026】 本發明中之維生素 C 類意指 L-抗壞血酸及其衍生物，L-抗壞血酸衍生物意指生體內藉由酵素反應成為維生素 C 者。使用於本發明之抗壞血酸的衍生物可例示：磷酸維生素 C(例如：抗壞血酸-2 磷酸)、抗壞血酸葡萄糖苷、抗壞血酸乙基酯、維生素 C 酯、四己基癸酸抗壞血酯、抗壞血酸硬脂酸酯以及抗壞血酸-2 磷酸-6 棕櫚酸。較佳可列舉：磷酸維生素 C(例如：抗壞血酸 2-磷酸酯(Ascorbic acid 2-phosphate))，例如，磷酸-L-抗壞血酸 Na 或磷酸-L-抗壞血酸 Mg 等磷酸-L-抗壞血酸鹽。

【0027】 誘導性富潛能幹細胞或類胚胎體的培養，可為接著培養或懸浮培養。接著培養時，可使用經細胞外基質成分被覆之培養容器進行，亦可與餵養細胞共培養。餵養細胞雖無特別限定，可列舉例如：纖維母細胞(小鼠胚胎纖維母細胞(MEF)、小鼠纖維母細胞(STO)等)。餵養細胞較佳係以本身習知的方法，例如，放射線(伽瑪射線等)照射或抗癌劑(絲裂黴素 C 等)處理等予以不活化。細胞外基質成分可列舉：基底膠(matrigel)(Niwa A, et al. PLoS One. 6(7):e22261, 2011)、明膠、膠原蛋白、彈性蛋白等纖維性蛋白質；玻尿酸、硫酸軟骨素等糖胺聚糖或蛋白聚糖；纖網蛋白(Fibronectin)、玻連蛋白(Vitronectin)、層連結蛋白(Laminin)等細胞接著性蛋白質等。

【0028】 培養溫度的條件無特別限制，例如可為 37℃ 至 42℃ 左右，較佳為 37℃ 至 39℃ 左右。再者，亦可於低氧條件培養，本發明中所謂低氧條件可例示 15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%或其等以下之氧濃度。

【0029】所謂懸浮培養只要細胞以對於培養容器為非接著狀態進行培養，則無特別限定，可使用未經以使細胞的接著性提升為目的之人工處理(例如，藉由細胞外基膠等之被覆處理)之培養容器、或經人工抑制接著處理(例如，藉由聚羥基乙基甲基丙烯酸 (poly-HEMA)或非離子性的界面活性多元醇(Pluronic F-127等)之被覆處理)之培養容器進行。再者，例如，亦可使用一次性生物反應器(Single use bioreactor)(BIOTT 股份有限公司)、一次性生物反應器(ThermoFisher)、一次性生物反應器(Sartorius Stedim)、一次性生物反應器(GE Healthcare Life Science)等具備攪拌翼的培養器進行懸浮培養。使用之培養器的種類以及攪拌速度，係因應所培養的細胞種類，只要為所屬技術領域具有通常知識者可適宜地選擇。攪拌速度之例可列舉例如：0 至 100rpm、20 至 80rpm、或 45 至 65rpm，但不限定為該等。

【0030】再者，懸浮培養時，較佳是形成類胚胎體(EB)進行培養。因此，前述步驟(0)中，亦可包含從多能性幹細胞形成類胚胎體的步驟。該步驟中，較佳係將形成菌落(colony)之多能性幹細胞解離為單細胞後，使類胚胎體形成。解離多能性幹細胞的步驟中，係將彼此接著並形成集團之細胞解離(分離)為各個細胞。解離多能性幹細胞的方法可列舉例如：力學性解離的方法、使用具有蛋白質酶活性及膠原蛋白酶活性的解離溶液(例如，Accutase™ 以及 Accumax™ 等)或僅具有膠原蛋白酶活性的解離溶液的解離方法。較佳是採用使用具有蛋白質酶活性及膠原蛋白酶活性的解離溶液(特佳為 Accumax™)解離多能性幹細胞的方法。於上述步驟使用之培養基，較佳是包含硫甘油、L-麩胺酸以及/或抗壞血酸。

【0031】於上述步驟(0-1)使用之心肌細胞分化誘導因子可列舉：Wnt 信號活化物質、活化素 A、BMP4、bFGF，該等可單獨使用，亦可組合複數種使用。

本發明之一態樣中，使用活化素 A、BMP4 以及 bFGF 的組合。再者，於上述步驟(0-1)使用之培養基，較佳係包含硫甘油、L-麩胺酸以及/或抗壞血酸。

【0032】 本說明書中，「Wnt 信號活化劑」意指活化 Wnt 信號通路的物質。Wnt 信號活化劑例如可例舉：Wnt 蛋白質、GSK3 β 阻礙劑(例如：BIO、CHIR99021 等)等。該等可單獨使用，亦可組合複數種使用。使用 Wnt 信號活化劑時，培養基中之其濃度無特別限定。使用 BIO 或 CHIR99021 作為 Wnt 信號活化劑時，培養基中的最終濃度為 100nM 至 100 μ M，較佳係以 1 μ M 至 10 μ M 使用為較佳。

【0033】 使用活化素 A 時，培養基中之其濃度較佳為 1ng/ml 至 100ng/ml，可例示：1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml 以及 100ng/ml。

【0034】 使用 BMP4 時，培養基中之其濃度較佳為 1ng/ml 至 1 μ g/ml，可例示：1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、600ng/ml、700ng/ml、800ng/ml、900ng/ml 以及 1 μ g/ml。

【0035】 使用 bFGF 時，培養基中之其濃度較佳為 1ng/ml 至 100ng/ml，可例示：1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、

18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml 以及 100ng/ml。

【0036】 上述步驟(0-1)的期間只要在可獲得中胚層系細胞的限制下則無特別限定，較佳為 12 小時以上(例如：1 日、2 日或其以上)，可列舉 6 日以下(例如：5 日、4 日、3 日或其以下)。再者，亦可偵測是否獲得中胚層系細胞，此時，可藉由中胚層標記基因的表現確定。中胚層標記基因可列舉例如：T、MIXL1、NODAL 等。

【0037】 於上述步驟(0-2)使用之心肌細胞分化誘導因子可列舉例如：Wnt 阻礙劑、VEGF，該等可單獨使用，亦可組合複數種使用。再者，於上述步驟(0-2)使用之培養基，較佳係包含硫甘油、L-麩胺酸以及/或抗壞血酸。

【0038】 本說明書中，「Wnt 阻礙劑」意指阻礙由 Wnt 與受體結合而誘導 β 連環蛋白累積之信號傳達的物質，可為阻礙對屬於受體之 Frizzled 家族結合的物質，亦可為促進 β 連環蛋白分解的物質。Wnt 阻礙劑可列舉例如：DKK1 蛋白質(例如，人類的情況，NCBI 的登錄號(Accession number)：NM_012242)、硬化素(例如，人類的情況，NCBI 的登錄號：NM_025237)、IWR-1(Merck Millipore)、IWP-2(Sigma-Aldrich)、IWP-3(Sigma-Aldrich)、IWP-4(Sigma-Aldrich)、PNU-74654(Sigma-Aldrich)、XAV939(Sigma-Aldrich)以及其等之衍生物。其中，較佳為 IWP-3 或 IWP-4。Wnt 阻礙劑可僅使用 1 種，亦可組合複數種使用。

【0039】 使用 Wnt 阻礙劑時，培養基中之其濃度較佳為 1nM 至 50 μ M，例如：1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M，但不限定為該等。更佳為 1 μ M。

【0040】 使用 VEGF 時，培養基中之其濃度較佳為 1 至 100ng/ml，可例示：1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml 以及 100ng/ml。

【0041】 於上述步驟(0-2)，可進一步於基本培養基添加作為心肌細胞分化誘導因子之 BMP 阻礙劑以及/或 TGF β 阻礙劑。本說明書中，「BMP 阻礙劑」可列舉：腓蛋白(Chordin)、諾金(Noggin)、濾泡抑素(Follistatin)等蛋白質性阻礙劑；多索嗎啡(Dorsomorphin)(6-[4-(2-哌啶-1-基-乙氧基)苯基]-3-吡啶-4-基-吡唑并[1, 5-a]嘧啶)及其衍生物(P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116 : II_60 ; P. B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4 : 33-41 ; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3(8) : e2904)、LDN-193189(4-(6-(4-(哌嗪-1-基)苯基)吡唑并[1, 5-a]嘧啶-3-基)喹啉)等。其中，較佳為多索嗎啡(Dorsomorphin)。BMP 阻礙劑以及 TGF β 阻礙劑可僅使用 1 種，亦可組合複數種使用。

【0042】 使用 BMP 阻礙劑時，培養基中之其濃度較佳為 1nM 至 50 μ M，例如：1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M，但不限定為該等。

【0043】 本說明書中，TGF β 阻礙劑意指阻礙從與 TGF β 的受體結合至 SMAD 之持續的信號傳達的物質，可為阻礙與屬於受體之 ALK 家族結合的物質，亦可為阻礙因 ALK 家族所致之 SMAD 的磷酸化的物質。TGF β 阻礙劑可列舉例如：Lefty-1(NCBI 登錄號可例示小鼠：NM_010094，人類：NM_020997)、

SB431542、SB202190(以上參照 R. K. Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2 : 20)、SB505124(GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276(Lilly Research Laboratories)、A-83-01(WO 2009146408)以及該等之衍生物等。其中，較佳為 SB431542。

【0044】 使用 TGF β 阻礙劑時，培養基中之其濃度較佳為 1nM 至 50 μ M，例如：1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、5.2 μ M、5.4 μ M、5.6 μ M、5.8 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ M，但不限定為該等。

【0045】 上述步驟(0-2)的期間，只要在獲得心肌細胞或心肌前驅細胞的限制下則無特別限定，可列舉 1 日以上(例如：1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日或其以上)。再者，由於藉由長期間培養不會影響心肌細胞或心肌前驅細胞的建立，因而未特別設定上限，典型為 40 日以下。再者，可偵測是否獲得心肌細胞或心肌前驅細胞，此時，可藉由搏動心肌細胞的數目、心肌細胞或心肌前驅細胞的標記的表現、離子通道的表現、對於電生理學性刺激的反應等進行確認。

【0046】 再者，前述步驟(0)，亦可進一步包含步驟(0-3)於 VEGF 以及/或 bFGF 的存在下、或非存在下，培養於步驟(0-2)所獲得之心肌細胞或心肌前驅細胞的步驟。本步驟所使用之培養基，較佳是包含硫甘油、L-麩胺酸以及/或抗壞血酸。再者，本步驟所使用之培養基，亦可包含心肌成熟化化合物(例如：N-(1,1-二側氧-2,3-二氫-1H-1-苯并噻吩-5-基)-2-(4-{5-[1-側氧-5-(哌嗪-1-基)-1,3-二氫-2H-異呋[哌-2-基]-1H-苯并咪唑-2-基}苯氧基)乙醯胺)以及/或多重激酶阻礙劑(例

如：2-(4-{3-[3-(2-胺基-2-苯基乙氧基)-4-氟基苯基]吡唑并[1, 5-a]嘧啶-6-基}-1H-吡唑-1-基)-N-(2-甲氧基乙基)乙醯胺)。

【0047】 於步驟(0-3)使用 VEGF 時，培養基中之其濃度較佳為 1 至 100ng/ml，可例示：1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml 以及 100ng/ml。

【0048】 於步驟(0-3)使用 bFGF 時，培養基中之其濃度較佳為 1 至 100ng/ml，可例示：1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/ml 以及 100ng/ml。更佳為 5ng/ml。

【0049】 上述步驟(0-3)的期間無特別限制，可舉出 1 日以上(例如：1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、14 日、15 日、16 日、17 日、18 日、19 日、20 日、21 日、22 日、23 日、24 日、25 日、26 日、27 日、28 日或其以上)。再者，由於藉由長期間培養不會影響心肌細胞或心肌前驅細胞的建立，因而未特別設定上限，典型為 60 日以下。藉由進行上述步驟(0-3)，可提升分化成心肌細胞或心肌前驅細胞的效率。

【0050】 再者，進行上述步驟(0-2)或步驟(0-3)之前，亦可藉由與上述同樣的方法解離類胚胎體。

【0051】 上述中具體說明的方法僅為例示，不限定為上述方法者。例如，可列舉：將屬於源自小鼠的支持細胞之 END2 細胞及多能性幹細胞共培養的方

法(Mummery, C., et al., Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes : role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 107(21), 2733-40(2003))；藉由使用 BMP4、FGF2、胰島素及血清培養類胚胎體而誘導心肌細胞的方法(Paul, W B., et al., A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability. *PLoSone*. 6(4), e18293(2011).)等。再者，亦可使用：於接著培養不使用細胞激素而將心肌細胞分化誘導的方法(Lian X, et al., Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling., *Proc Natl Acad Sci USA*., 2012 July 3 ; 109(27) : E1848-57)、併用接著培養及懸浮培養且不使用細胞激素之分化誘導心肌細胞的方法(Minami I, et al., A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine-and xeno-free conditions., *Cell Rep.*, 2012 Nov 29 ; 2(5) : 1448-60)等。

【0052】 與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸前的細胞集團比較，藉由於上述方式所獲得之包含心肌細胞或心肌前驅細胞的細胞集團，使其接觸受體型酪胺酸激酶阻礙劑，其次培養該細胞集團，而可製造心肌細胞的純度高的細胞集團。亦即，使用受體型酪胺酸激酶阻礙劑，可精製心肌細胞。因此，於本發明之其他態樣，提供精製心肌細胞的方法(以下亦稱為「本發明的精製方法」)，該方法係包含：(1')使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及非心肌細胞的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的步驟該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培多能性幹細胞所獲得者；以及(2')培養該細胞集團的步驟。

【0053】 本說明書中，精製心肌細胞意指藉由受體型酪胺酸激酶阻礙劑，非心肌細胞的細胞數(「細胞數」意指活細胞數，以下相同)的減少比例超過心肌細胞的減少比例，或者利用非心肌細胞的增殖係受到阻礙而使心肌細胞的增殖比例提升，藉此增加細胞集團中的心肌細胞的比例(細胞集團中的心肌細胞數/細胞集團中的全細胞數)。因此，藉由從心肌前驅細胞成為心肌細胞的分化誘導促進或從心肌前驅細胞成為心肌細胞以外的細胞的分化誘導阻礙，進而區別心肌細胞的比例增加。雖不期望受到任何理論所拘束，因受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之細胞數的減少，推測係因受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之細胞的凋亡所誘導的結果。

【0054】 前述步驟(1)以及(1')中，包含心肌細胞或心肌前驅細胞的細胞集團，與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的其間雖無特別限定，例如，較佳為 1 小時以上(例如：2 小時、3 小時、5 小時、12 小時、1 日、2 日、3 日或其以上)。再者，由於藉由長期間培養不會影響心肌細胞或心肌前驅細胞的建立，因而未特別設定上限，典型較佳為 60 日以下(例如：50 日、40 日、30 日、20 日、14 日、13 日、12 日、11 日或其以下)。包含心肌細胞或心肌前驅細胞的細胞集團，與受體型酪胺酸激酶阻礙劑的接觸，係可藉由於包含該細胞集團的培養基中添加受體型酪胺酸激酶阻礙劑而進行，再者，亦可藉由於預先已添加受體型酪胺酸激酶阻礙劑的培養基，播種該細胞集團而進行。受體型酪胺酸激酶阻礙劑的接觸時間點，只要為細胞集團包含心肌細胞或心肌前驅細胞的時間點則無特別限定，例如，較佳於上述步驟(0-2)或(0-3)接觸，以多能性幹細胞的分化誘導開始日為基準時，較佳是從分化誘導開始第 4 日以後(例如：第 5 日、第 6 日、第 7 日或其以後)進行。

【0055】 本發明所使用之藉由受體型酪胺酸激酶阻礙劑而被阻礙之受體型酪胺酸激酶係可列舉：EGF 受體(亦稱為 ErbB 或 HER)(例如：ErbB1(EGFR)、ErbB2(HER2)、ErbB3(HER3)、ErbB4(HER4))、胰島素受體(例如：IR-A、IR-B)、類胰島素成長因子 1 受體、VEGF 受體(例如：VEGFR-1(Flt-1)、VEGFR-2(KDR/Flk-1)、VEGFR-3(Flt-4))、PDGF 受體(例如：PDGFR α 、PDGFR β)、HGF 受體(亦稱為 c-Met)、FGF 受體(例如：FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4)、CCK、NGF 受體(亦稱為 Trk 受體)(例如：TrkA、TrkB、TrkC)、Eph(Ephrin)受體(例如：EPHA1、EPHA2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EPHA6、EPHA7、EPHA8、EPHA9、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB5、EPHB6)、AXL(亦稱為 TAM 受體)、TIE(例如：TIE-1、TIE-2)、RYK、DDR(例如：DDR1)、RET、ROS、LTK、ROR(例如：ROR1、ROR2)、MuSK、LMR。其中，受體型酪胺酸激酶阻礙劑的標的較佳為 VEGF 受體、PDGF 受體、HGF 受體以及 FGF 受體。再者，雖然前述步驟(1)所使用之受體型酪胺酸激酶阻礙劑排除 EGF 受體阻礙劑，但於前述步驟(1')所使用之受體型酪胺酸激酶阻礙劑可使用 EGF 受體阻礙劑。

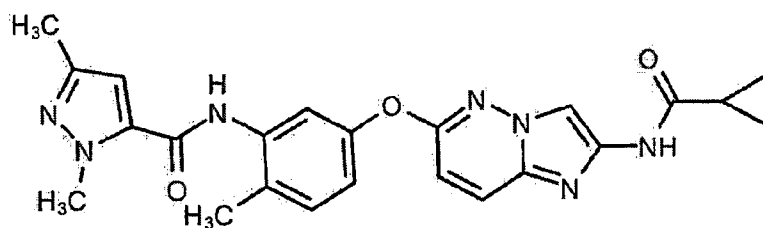
【0056】 本說明書中，受體型酪胺酸激酶阻礙劑只要是針對至少上述任一種受體型酪胺酸激酶具有阻礙活性，則可具有其他活性，例如，針對其他受體型酪胺酸激酶的阻礙活性等，再者亦可具有對 1 種受體型酪胺酸激酶具有特異性的阻礙活性。再者，排除 EGF 受體阻礙劑之受體型酪胺酸激酶阻礙劑，不是排除針對 EGF 受體以外的受體型酪胺酸激酶具有阻礙活性，且針對 EGF 受體具有阻礙活性者，本說明書中，「EGF 受體阻礙劑」係指與其他活性相比，EGF 受體阻礙活性為優位的物質，具體而言，至少 90%以上阻礙 EGF 受體的物質或 EGF 受體的 50%阻礙濃度為 10 μ M 以下的物質。

【0057】 本發明所使用之針對 EGF 受體的阻礙劑可列舉例如：西妥昔單抗 (Cetuximab)、厄洛替尼鹽酸鹽(Erlotinib HCl)(OSI-744)、吉非替尼 (Gefitinib)(ZD1839)、拉帕替尼(Lapatinib)(GW-572016)二甲苯磺酸鹽、阿法替尼 (Afatinib)(BIBW2992)、卡奈替尼(Canertinib)(CI-1033)、TAS6417、PD153035、MTX-211、HS-10296、西利替尼(Theliatinib)(HMPL-309)、拉帕替尼(Lapatinib)、AG-490(酪磷蛋白(Tyrphostin) B42)、CP-724714、達克替尼(Dacomitinib)(PF-00299804)、WZ4002、薩普替尼(Sapitinib)(AZD8931)、CUDC-101、AG-1478(酪磷蛋白 AG-1478)、PD153035 HCl、培利替尼(Pelitinib)(EKB-569)、AC480(BMS-599626)、AEE788(NVP-AEE788)、AP26113-類似物(ALK-IN-1)、OSI-420、WZ3146、HER2-抑制劑-1、WZ8040、AST-1306、羅西替尼(Rociletinib)(CO-1686)、金雀異黃酮(Genistein)、伐利替尼(Varlitinib)、埃克替尼(Icotinib)、TAK-285、WHI-P154、瑞香素(Daphnetin)、PD168393、酪磷蛋白 9、CNX-2006、AG-18、AZ5104、拉則替尼(Lazertinib)、AZD9291、CL-387785(EKI-785)、奧莫替尼(Olmutinib)(BI 1482694)、(-)-表沒食子兒茶素沒食子酸酯(Epigallocatechin Gallate)、厄洛替尼 (Erlotinib)、吉非替尼鹽酸鹽(Gefitinib hydrochloride)、阿法替尼(BIBW2992)二碼來酸 AZD3759、波奇替尼(Pozotinib)(HM781-36B)、布吉替尼(Brigatinib) (AP26113)、奧西替尼甲磺酸(Osimertinib mesylate)、那格替尼(Naquotinib) (ASP8273)、大黃酸(Chrysophanic Acid)、納札替尼(Nazartinib)(EGF816)、去甲基斑螫素(Norcantharidin)、利非拉芬妮(Lifirafenib)(BGB-283)、利多卡因鹽酸鹽 (Lidocaine hydrochloride)、紫鉚花素(Butein)、EAI045、杯萆甾酮(Cyasterone)、艾維替尼(Avitinib)(AC0010)等。

【0058】 針對胰島素受體或類胰島素成長因子 1 受體的阻礙劑可列舉例如：HNMPA、GSK1904529A、多維替尼(Dovitinib)(TKI-258)二乳酸、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、NVP-AEW541、多維替尼(TKI-258)、NVP-ADW742、林西替尼(Linsitinib)(OSI-906)、GSK1904529A、BMS-754807、TAE226(NVP-TAE226)、色瑞替尼(Ceritinib)(LDK378)等。

【0059】 針對 PDGFR α 的阻礙劑可列舉：N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1, 2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1, 3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺(式(I)的化合物)

【0060】



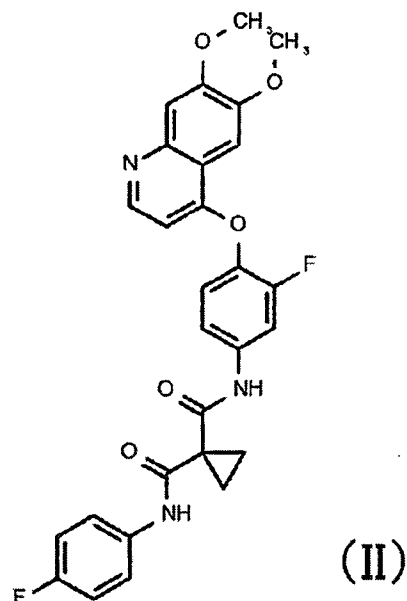
(I)

【0061】 普納替尼(Ponatinib)(AP24534)、替拉替尼(Telatinib)、阿莫替尼(Amuvatinib)(MP-470)、Ki8751、KRN 633、克萊拉尼(Crenolanib)(CP-868596)、阿昔替尼(Axitinib)、CP-673451、替沃札尼(Tivozanib)(AV-951)、尼達尼布(Nintedanib)(BIBF 1120)、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、多維替尼(TKI-258)二乳酸、馬賽替尼(Masitinib)(AB1010)等。針對 PDGFR β 的阻礙劑可列舉：N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1, 2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1, 3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、CP-673451、舒非替尼(Sunitinib)蘋果酸鹽、舒非替尼、TSU-68(SU6668, 奧蘭替尼(Orantinib))、MK-2461、索拉菲

尼(Sorafenib)甲苯磺酸鹽、利尼伐尼(Linifanib)(ABT-869)、阿昔替尼、克萊拉尼(Crenolanib)(CP-868596)、多維替尼(TKI-258)二乳酸、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、替沃札尼(AV-951)、尼達尼布(BIBF 1120)、馬賽替尼(AB1010)、KRN 633 等。

【0062】針對 VEGFR-1 的阻礙劑可列舉：N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1, 2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1, 3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、ZM 306416、阿昔替尼、莫替沙尼(Motesanib)二磷酸鹽(AMG-706)、利尼伐尼(ABT-869)、MGCD-265、西地尼布(Cediranib)(AZD2171)、佛瑞替尼(Foretinib)(GSK1363089)、OSI-930、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、帕唑帕尼(Pazopanib)HCl(GW786034 HCl)、帕唑帕尼(Pazopanib)、多維替尼(TKI-258)二乳酸、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、卡博替尼(Cabozantinib)(XL184, BMS-907351)、卡博替尼(Cabozantinib)蘋果酸鹽(XL184)、瑞格非尼(Regorafenib)(BAY 73-4506)、樂伐替尼(Lenvatinib)(E7080)、替沃札尼(AV-951)、尼達尼布(BIBF 1120)、AEE788(NVP-AEE788)、瓦他拉尼(Vatalanib)(PTK787)2HCl、KRN 633、布利尼布(Brivanib)(BMS-540215)、布利尼布(Brivanib)丙胺酸鹽(BMS-582664)等。針對 VEGFR-2 的阻礙劑可列舉：N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1, 2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1, 3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、N-{4-[(6, 7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1, 1-二羧醯胺(式(II)的化合物)

【0063】



【0064】卡博替尼(XL184, BMS-907351)、卡博替尼蘋果酸鹽 (XL184)、Ki8751、阿帕替尼(Apatinib)、普納替尼(AP24534)、ZM323881、LY2874455、索拉菲尼甲苯磺酸鹽、BMS-794833、戈伐替尼(Golitinib)(E7050)、RAF265(CHIR-265)、SKLB1002、凡得他尼(Vandetanib)(ZD6474)、CYC116、舒非替尼蘋果酸鹽、舒非替尼、PD173074、司馬沙尼(Semaxanib)(SU5416)、TSU-68(SU6668, 奧蘭替尼)、阿昔替尼、西地尼布(AZD2171)、佛瑞替尼(Foretinib)(GSK1363089)、MGCD-265、莫替沙尼二磷酸鹽(AMG-706)、利尼伐尼(ABT-869)、樂伐替尼(E7080)、瑞格非尼(BAY 73-4506)、替拉替尼、替沃札尼(AV-951)、OSI-930、多維替尼(TKI-258)二乳酸、尼達尼布(BIBF 1120)、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、布利尼布丙胺酸鹽(BMS-582664)、布利尼布(BMS-540215)、帕唑帕尼、帕唑帕尼 HCl(GW786034 HCl)、瓦他拉尼(PTK787)2HCl、ENMD-2076 L-(+)-酒石酸、ENMD-2076 L-(+)-酒石酸、AEE788(NVP-AEE788)、KRN 633 等。

針對 VEGFR-3 的阻礙劑可列舉：N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1,2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、SAR131675、阿昔替尼、

佛瑞替尼(Foretinib)(GSK1363089)、西地尼布(AZD2171)、替拉替尼、MGCD-265、樂伐替尼(E7080)、卡博替尼(XL184, BMS-907351)、卡博替尼蘋果酸鹽(XL184)、莫替沙尼二磷酸鹽(AMG-706)、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、多維替尼(TKI-258)二乳酸、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、尼達尼布(BIBF 1120)、替沃札尼(AV-951)、ENMD-2076 L-(+)-酒石酸、ENMD-2076、瑞格非尼(BAY 73-4506)、帕唑帕尼 HCl(GW786034 HCl)、帕唑帕尼、KRN 633、利尼伐尼(ABT-869)、AEE788(NVP-AEE788)、瓦他拉尼(PTK787)2HCl 等。

【0065】針對 HGF 受體的阻礙劑可列舉例如：N-{4-[(6, 7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1, 1-二羧醯胺、克唑替尼(Crizotinib)(PF-02341066)、卡博替尼(BMS-907351)、佛瑞替尼(Foretinib)(GSK1363089)、PHA-665752、SU11274、JNJ-38877618(OMO-1)、谷美替尼(Glumetinib)(SCC244)、奧曲替尼(Altiratinib)、SAR125844、SGX-523、BMS-777607、替萬替尼(Tivantinib)(ARQ 197)、JNJ-38877605、PF-04217903、MGCD-265 類似物、卡瑪替尼(Capmatinib)(INCB28060)、BMS-754807、BMS-794833、AMG-208、MK-2461、戈伐替尼(E7050)、AMG-458、NVP-BVU972、AMG 337、梅沙替尼(Merestinib)(LY2801653)、S49076、白頭翁皂苷(Pulsatilla saponin) D、去甲基斑蝥素、NPS-1034、塞沃替尼(Savolitinib)(AZD6094)等。

【0066】針對 FGFR1 的阻礙劑可列舉例如：ASP5878、普納替尼(AP24534)、PD173074、達努舍替(Danuserib)(PHA-739358)、布利尼布丙胺酸鹽(BMS-582664)、布利尼布(BMS-540215)、TSU-68(SU6668, 奧蘭替尼)、SSR128129E、AZD4547、BGJ398 (NVP-BGJ398)、LY2874455、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、多維替尼(TKI-258)二乳酸、

CH5183284(Debio-1347)、MK-2461、尼達尼布(BIBF 1120)等。針對 FGFR2 的阻礙劑可列舉例如：ASP5878、BGJ398(NVP-BGJ398)、AZD4547、LY2874455、CH5183284(Debio-1347)、尼達尼布 (BIBF 1120)、MK-2461 等。針對 FGFR3 的阻礙劑可列舉例如：ASP5878、BGJ398(NVP-BGJ398)、AZD4547、LY2874455、多維替尼(TKI-258)二乳酸、多維替尼(TKI258)乳酸鹽、多維替尼(TKI-258, CHIR-258)、CH5183284(Debio-1347)、MK-2461、尼達尼布(BIBF 1120)等。針對 FGFR4 的阻礙劑可列舉例如：ASP5878、LY2874455、AZD4547、CH5183284 (Debio-1347)、尼達尼布(BIBF 1120)等。

【0067】 針對 NGF 受體的阻礙劑可列舉例如：BMS-754807、GW441756、DS-6051b、GNF-5837、CH7057288、奧曲替尼、塞利替尼(Selitrectinib)(LOXO-195)、BMS-935177、恩曲替尼(Entrectinib)(RXDX-101)、西曲伐替尼(Sitravatinib)(MGCD516)、PF-06273340、貝札替尼(Belizatinib)(TSR-011)、拉羅替尼(Larotrectinib)(LOXO-101)硫酸鹽等。

【0068】 針對 Eph 受體的阻礙劑可列舉例如：NVP-BHG712、西曲伐替尼(MGCD516)等。

【0069】 針對 AXL 的阻礙劑可列舉例如：BMS-777607、貝姆替尼(Bemcentinib)(R428)、卡博替尼蘋果酸鹽(XL184)、UNC2250、杜伯替尼(Dubermatinib)(TP-0903)、UNC-2025、LDC1267、UNC2881、RXDX-106(CEP-40783)、S49076、西曲伐替尼(MGCD516)、2-D08、吉瑞替尼(Gilteritinib)(ASP2215)、NPS-1034 等。

【0070】 針對 TIE 的阻礙劑可列舉例如：MGCD-265 類似物、Tie2 激酶抑制劑、奧曲替尼、培克美替尼(Pexmetinib)(ARRY-614)等。

【0071】再者，其他的受體型酪胺酸激酶阻礙劑亦可適宜地選擇。受體型酪胺酸激酶阻礙劑較佳為：N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1,2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、N-{4-[(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1,1-二羧醯胺、AMG337、ASP5878、BGJ398、佛瑞替尼(Foretinib)、ZM323881、CP-673451、克萊拉尼(Crenolanib)或克唑替尼(Crizotinib)。受體型酪胺酸激酶阻礙劑可僅使用1種，亦可組合複數種使用。再者，為了得到更高純度的心肌細胞，亦可與受體型酪胺酸激酶阻礙劑同時或在前後的步驟使用其他藥劑(組蛋白去乙醯基化酵素阻礙劑等)。

【0072】上述阻礙劑可含有1種上述化合物或其鹽，亦可含有2種以上。上述化合物或其鹽可根據其本身習知的方法而分別製造。

【0073】上述化合物係鹽時，較佳為藥理學上可容許的鹽，如此之鹽可列舉例如：與無機鹼的鹽、與有機鹼的鹽、與無機酸的鹽、與有機酸的鹽、與鹼性或酸性胺基酸的鹽等。

與無機鹼的鹽的較佳例可列舉：鈉鹽、甲鹽等鹼金屬鹽；鈣鹽、鎂鹽等鹼土金屬鹽；鋁鹽；銨鹽等。

與有機鹼的鹽的較佳例可列舉：與三甲基胺、三乙基胺、吡啶、甲基吡啶、乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三羥甲基胺基甲烷[參(羥基甲基)甲基胺]、第三丁基胺、環己基胺、苄基胺、二環己基胺、N,N-二苄基乙二胺等的鹽。

與無機酸的鹽的較佳例可列舉：與鹽酸、氫溴酸、硝酸、硫酸、磷酸等的鹽。

與有機酸的鹽的較佳例可列舉：與甲酸、乙酸、三氟乙酸、酞酸、富馬酸、草酸、酒石酸、馬來酸、檸檬酸、琥珀酸、蘋果酸、甲磺酸、苯磺酸、對甲苯磺酸等的鹽。

與鹼性胺基酸的鹽的較佳例可列舉：與精胺酸、離胺酸、鳥胺酸等的鹽。

與酸性胺基酸的鹽的較佳例可列舉：與天冬胺酸、麩胺酸等的鹽。

【0074】 上述化合物亦可為水合物、非水合物、溶劑合物、無溶劑合物之任一者。

再者，上述化合物亦可為經同位素(例如， ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{125}I 等)等標識或置換的化合物。

上述化合物亦包含 ^1H 變換成為 $^2\text{H}(\text{D})$ 之重氫變換物。

上述化合物亦包含互變異構物。

上述化合物亦可為藥學上可容許的共結晶或共結晶鹽。在此，共結晶或共結晶鹽意指具有各別不同的物理特性(例如，結構、熔點、熔解熱、吸濕性、溶解性以及穩定性等)，於室溫由二種以上的獨特固體所構成之結晶性物質。共結晶或共結晶鹽可根據本身習知的共結晶化法製造。

【0075】 受體型酪胺酸激酶阻礙劑之培養基中的濃度可由所屬技術領域中具有通常知識者適宜地選擇，例如，較佳為 1nM 至 $10\mu\text{M}$ ，特佳為 10nM 至 $3\mu\text{M}$ ，具體而言，可列舉： 1nM 、 2nM 、 3nM 、 5nM 、 10nM 、 20nM 、 30nM 、 40nM 、 50nM 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$ 、 $0.3\mu\text{M}$ 、 $0.4\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $1.0\mu\text{M}$ 、 $1.5\mu\text{M}$ 、 $2\mu\text{M}$ 、 $3\mu\text{M}$ 、 $4\mu\text{M}$ 、 $5\mu\text{M}$ 、 $6\mu\text{M}$ 、 $7\mu\text{M}$ 、 $8\mu\text{M}$ 、 $9\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 。再者，亦可根據化合物的種類變更適宜的濃度，例如，使用 N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1,2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺時，較佳為 20nM 至 $10\mu\text{M}$ ；使用 N-{4-[(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1,1-二羧醯胺時，較佳為 $0.2\mu\text{M}$ 至 $10\mu\text{M}$ ；使用 AMG337 時，較佳為 $0.2\mu\text{M}$ 至 $10\mu\text{M}$ ；使用 ASP5878 時，較佳為 1nM 至 $1\mu\text{M}$ ；使用

BGJ398 時，較佳為 5nM 至 5 μ M；使用佛瑞替尼(Foretinib)時，較佳為 5nM 至 5 μ M；使用 ZM323881 時，較佳為 0.1 μ M 至 10 μ M；使用 CP-673451 時，較佳為 0.1 μ M 至 10 μ M；使用克萊拉尼(Crenolanib)時，較佳為 0.1 μ M 至 10 μ M；使用克唑替尼(Crizotinib)時，較佳為 0.1 μ M 至 10 μ M，但不限定為該等濃度。

【0076】 前述步驟(2)以及(2')中之細胞集團的培養方法係與上述(0-2)或(0-3)相同。培養期間也相同，只要至少於細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的期間持續培養即可。

【0077】 2. 包含心肌細胞的細胞集團

再者，本發明提供藉由本發明的製法或精製方法所獲得之包含心肌細胞的細胞集團(以下亦稱為「本發明的細胞集團」)。如上述，本發明的細胞集團係以高純度包含心肌細胞。高純度意指，細胞集團中的心肌細胞的比例(細胞集團中的心肌細胞數/細胞集團中的全細胞數)，具體而言，以 80%以上(例如：85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或其以上)的高純度含有。理所當然地，上述心肌細胞的比例，於上述細胞集團與間葉系幹細胞等其他細胞或細胞集團混合使用時，意指混合其他細胞或細胞集團之前的比例。較佳態樣中，本發明的細胞集團，係相較於利用以往的方法從多能性幹細胞誘導心肌細胞所獲得的細胞集團，以更高比例包含心肌細胞。該細胞集團亦可藉由細胞選別等進行精製，「本發明之細胞集團」亦包含如此經精製的細胞集團。

【0078】 3. 細胞移植療法劑

再者，本發明亦提供含有本發明之細胞集團所成之細胞移植療法劑(以下亦稱為「本發明的細胞移植療法劑」)。本發明之細胞移植療法劑可使用於自體移

植，亦可使用於異體移植。再者，亦可併用他其藥劑，例如免疫抑制劑。如上述，本發明之細胞集團以高純度包含心肌細胞，因此本發明之細胞集團適合使用為細胞移植療法劑的原料，本發明之細胞集團或本發明之細胞移植療法劑係對心臟疾病的治療或預防有用。因此，本發明亦包含心臟疾病的治療或預防方法，該方法係對成為治療或預防的對象的哺乳動物(例如：人類、小鼠、大鼠、猴、牛、馬、豬、犬等)投予或移植至有效量的本發明之細胞集團或細胞移植療法劑。成為治療或預防的對象之心臟疾病可列舉：心衰竭、缺血性心疾病、心肌梗塞、心肌症、心肌炎、肥大型心肌症、擴張相肥大型心肌症、擴張型心肌症等疾病或障礙所造成的缺損等，但不限定為該等。

【0079】 本發明之細胞集團使用於細胞移植療法劑時，由不引起排斥反應的觀點而言，期望使用包含源自與被移植的個體的 HLA 基因型相同或實質上相同的體細胞所建立的 iPS 細胞之細胞的細胞集團。在此，「實質上相同」係指 HLA 基因型與可抑制因免疫抑制劑對所移植的細胞造成的免疫反應的程度一致，例如，具有 HLA-A、HLA-B 以及 HLA-DR 的 3 基因座或加上 HLA-C 的 4 基因座為相同的 HLA 型的體細胞。再者，亦可以包埋於如聚乙二醇或矽之膠囊、多孔性容器等而迴避排斥反應的狀態進行移植。

【0080】 本發明之細胞集團，以常規手法與醫藥上可容許的載體混合等，製造成注射劑、懸濁劑、點滴劑等非經口製劑。該非經口製劑可含有之醫藥上可容許的載體可列舉例如：生理食鹽水、包含葡萄糖或其他輔助劑的等張液(例如 D-山梨醇、D-甘露醇、氯化鈉等)等注射用的水性液。本發明之細胞移植療法劑例如亦可與緩衝劑(例如，磷酸鹽緩衝液、乙酸鈉緩衝液)、無痛化劑(例如苯札氯銨、鹽酸普魯卡因等)、穩定劑(例如人類血清白蛋白、聚乙二醇等)、保存劑、抗

氧化劑等一起調配。本發明之移植療法劑製劑化成水性懸濁液劑時，可於上述水性液中成為約 1×10^6 至約 1×10^8 細胞/mL 的方式，使包含心肌細胞的細胞集團懸濁。再者，可與促進存活的支架材料一起投予。在此所謂的支架材料雖例示明膠等源自生體的成分或代替其之聚乳酸等合成聚合物，但不限定為該等。

【0081】 或者是，心臟疾病的治療亦可藉由將所得之心肌細胞片狀化，貼附於患者的心臟而進行。投予心肌片時，藉由以被覆所期望的部分的方式進行配置而達成。本文中，以被覆所期望的部分的方式進行配置，係可使用該技術領域習知的技術進行。進行配置時，所期望的部分較大時，亦可以包圍組織的方式配置。再者，為了得到所期望的效果，亦可對相同部分進行數次配置。進行數次配置時，為了使所期望的細胞存活於組織並進行血管新生，期望進行充分的時間。如此之心臟疾病的治療機制可藉由心肌片的存活而產生效果，亦可有不依賴於細胞存活的間接作用(例如，因分泌誘引物質所致之對於源自接受者的細胞的損傷部位作用的效果)。於心臟疾病的治療中，使用心肌片時，除了心肌細胞以外，亦可包含膠原蛋白、纖連蛋白、層連蛋白等細胞支架材料(scaffold)。或者是，除了心肌細胞之外，亦可包含任意細胞種類(亦可為複數)。心臟疾病的治療所使用之心肌細胞的細胞數，只要為所投予之心肌片於心臟疾病的治療中發揮效果的量則無特別限定，可配合患者的大小或軀體的大小而適宜地增減而調製。

【0082】 進一步的其他實施態樣中，本發明的細胞集團亦可利用於心臟疾病治療用的藥劑篩選及藥劑的心臟毒性評估。例如，於本發明的細胞集團投予試驗藥劑，研究心肌細胞的回應，藉此可進行試驗藥劑的效果及毒性的評估。

【0083】 本發明進一步具體地說明下述實施例，但本發明的範圍不限定於該等實施例。

[實施例]

【0084】 實施例 1. 從 iPS 細胞分化誘導為心肌細胞之細胞的單細胞 RNA 定序解析

使用國立大學法人京都大學 iPS 細胞研究所(CiRA)所製作之臨床用 iPS 細胞株的評估用株。iPS 細胞株的維持培養係根據以往的方法進行 (Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi : 10. 1002/stem. 1293)。成為心肌細胞的分化誘導係根據論文(Miki et al , Cell Stem Cell. 2015 Jun 4 ; 16. doi : 10. 1016/j. stem. 2015. 04. 005.)所記載的方法進行。針對分化誘導開始後第 22 日的心肌細胞使用 10XGenomics 公司的 Chromium 進行單細胞 RNA 定序解析。藉由軟體 (Cellranger , Seurat , Loupe Cell Browser)進行細胞簇集及各簇集的解析。從 iPS 細胞分化誘導成心肌細胞的細胞集團中，發現除了表現肌節- α -肌動蛋白原 (sarcomeric- α -actinin)及心臟肌鈣蛋白 T(cardiac Troponin T)的心肌細胞集團之外，亦存在不表現肌節- α -肌動蛋白原及心臟肌鈣蛋白 T 之 3 種非心肌細胞集團 (從基因表現推測為類平滑肌細胞(SMC)、類內皮細胞(EC)、內胚層譜系的細胞 (END))(圖 1)。

【0085】 實施例 2. 存在於從 iPS 細胞分化誘導成心肌之細胞集團中的非心肌細胞的解析

利用單細胞 RNA 定序數據之 Loupe Cell Browser 所進行的解析進行受體型酪胺酸激酶的基因表現的解析。其結果，發現 PDGFRA、PDGFRB、VEGFR1、VEGFR2、c-Met(HGFR)、FGFR4 等受體型酪胺酸激酶的基因表現於非心肌細胞集團中為高，於心肌細胞集團中則不高 (圖 2)。

【0086】 實施例 3. 藉由細胞表面標記進行之非心肌細胞的染色

製作於 TNNI1 基因座插入有 EmGFP(序列編號 1)、於 TNNI3 基因座插入有 mCherry(序列編號 2)之報導子蛋白質序列之雙重敲入(double knock-in)的人類 iPS 細胞株。人類 iPS 細胞株的製作係使用由 CTL 公司所購入之 PBMC(LP_167, Sample ID : 20130318)藉由附著型載體(episomal vector) (搭載基因 : OCT3/4、KLF4、SOX2、L-MYC、LIN28、小鼠 p53DD)而進行(參考文獻 ; Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi : 10. 1002/stem. 1293)。

【0087】 iPS 細胞株的維持培養係根據以往的方法進行(Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi : 10. 1002/stem. 1293)。

成為心肌細胞的分化誘導係根據論文(Miki et al, Cell Stem Cell. 2015 Jun 4 ; 16. doi : 10. 1016/j. stem. 2015. 04. 005.)所記載的方法以 6 孔盤(6 well plate)進行。若要簡潔說明，則是成為心肌細胞的分化誘導係將報導子 iPS 細胞株以 0. 5mM EDTA/PBS 稀釋為 1/2 之 TrypLE select(Life Technologies)處理 4 至 5 分鐘後，以細胞刮勺(IWAKI)剝離細胞，藉由抽吸液(Pipetting)解離成為單細胞。藉由 1,000rpm、5min 的離心去除培養基，所得細胞以 6 孔盤每 1 孔 2×10^6 cells 播種，於各孔以 1. 5mL/孔之方式添加培養基，該培養基係於 StemPro34 培養基添加有 1%L-麩胺酸、轉鐵蛋白 150 μ g/mL、抗壞血酸 50 μ g/mL(sigma)、硫代甘油 4×10^{-4} M、10 μ M Y-27632、2ng/mL BMP4(R&D)以及 0. 5%減低生長因子之基質膠(Growth Factor Reduced Matrigel)者，於 37°C、5%氧條件下培養，形成類胚胎體(第 0 日)。

翌日(第 1 日)，於各孔添加 1. 5mL 之培養基，該培養基係於 StemPro34 培養基中添加有 1%L-麩胺酸、轉鐵蛋白 150 μ g/mL、抗壞血酸 50 μ g/mL(sigma)、硫

代甘油 $4 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 2ng/mL BMP4(R&D)活化素 A 12ng/mL 、bFGF 5ng/mL 、BMP4 18ng/mL 者，於 37°C 、5%氧條件進一步培養 2 日。

後續(第 3 日)，傾斜靜置 6 孔盤使類胚胎體沉降，去除 80 至 90%的培養基後，於各孔添加 IMDM 1.5mL 。再次傾斜靜置孔盤使類胚胎體沉降，去除 80 至 90%的培養基後，於培養基中於 37°C 、5%氧條件下培養 3 日，該培養基係於 StemPro34 培養基添加有 1%L-麩胺酸、轉鐵蛋白 $150 \mu\text{g/mL}$ 、抗壞血酸 $50 \mu\text{g/mL}$ (sigma)、硫代甘油 $4 \times 10^{-4} \text{M}$ 、 10ng/mL VEGF、 $1 \mu\text{M}$ IWP-3、 $0.6 \mu\text{M}$ 多索嗎啡(Dorsomorphin)以及 $5.4 \mu\text{M}$ SB431542 者。

後續(第 6 日)，傾斜靜置 6 孔盤使類胚胎體沉降，去除 80 至 90%的培養基後，添加已添加有 1%L-麩胺酸、轉鐵蛋白 $150 \mu\text{g/mL}$ 、抗壞血酸 $50 \mu\text{g/mL}$ (sigma)、硫代甘油 $4 \times 10^{-4} \text{M}$ 以及 5ng/mL VEGF 之 StemPro34 培養基。於 37°C 、5%氧條件下培養 8 日。此期間中每 2 至 3 日交換 1 次相同條件的培養基。

【0088】在分化誘導第 15 日，將包含類胚胎體之細胞培養液以 200g 離心 1 分鐘後，以吸引器去除上清部分。加入 PBS，以 200g 離心 1 分鐘後，以吸引器去除上清部分。於各管添加 3mL 的溶液，該溶液係於 IMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Media)添加有 DNase $10 \mu\text{g/mL}$ 、Liberase $100 \mu\text{g/mL}$ 者，於 37°C 、通常氧條件下靜置 1 小時。1 小時後，將管以 400g 離心 5 分鐘，以不吸附類胚胎體的方式去除上清部分。於各管添加 2mL 的溶液，該溶液係於 Accutase(Thermo)添加有 DNase $10 \mu\text{g/mL}$ 者，於 37°C 、通常氧條件下靜置 10 分鐘。靜置後，藉由抽吸液(Pipetting)作成單一細胞(single cell)，於各管添加 2mL 之於 IMDM 添加有 DNase $10 \mu\text{g/mL}$ 之培養基後進行倒轉混合，調製出單細胞懸濁液。

將上述單細胞懸濁以 200xg 離心 5 分鐘後，去除上清部分，於-80℃凍結保存。

經凍結保存的細胞於 37℃的溫水浴進行溶解，以 400xg 離心 5 分鐘後，去除上清部分。

輕敲細胞顆粒(pellet)後，加入含有 1%BSA 之 PBS，以 300xg 離心 3 分鐘去除上清部分。於含有 1%BSA 之 PBS 使用 APCFire750 標識抗 CD326 抗體、PE 標識抗 CD49a 抗體、BV605 標識抗 CD31 抗體、DAPI 進行染色。去除 DAPI 陽性的死細胞之後，測定核細胞之各螢光色素的信號量，藉此測定出細胞集團的分離及各細胞集團的比例。

從上述報導子 iPS 細胞分化誘導成心肌之心肌細胞，係藉由該等 3 種表面標記的表現差異，主要分離為成 CD326 陽性細胞、CD326 陰性 CD31 陽性細胞、CD326 陰性 CD31 陰性 CD49a 陽性細胞、CD326 陰性 CD31 陰性 CD49a 陰性細胞之 4 種細胞集團。4 種細胞集團係表現該等 3 種表面標記之任一種或複數種的以 3 種非心肌細胞為主的集團(含有多數不表現心肌報導子基因的細胞之集團)、以及 3 種標記全為陰性之心肌細胞集團(表現心肌報導子基因之細胞集團)。3 種標記全為陰性的細胞集團係 99%以上為心肌細胞(表現心肌報導子基因之細胞)(圖 3)。

【0089】其次，著眼於由實施例 2 發現之受體型酪胺酸激酶，藉由受體型酪胺酸激酶阻礙劑，以各種條件驗證是否可純化受體型酪胺酸激酶的表現相對較低的心肌細胞(試驗例 1 至 9)。

下列試驗例 1 至 9 中，化合物 A 表示 N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1,2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺，化合物 B 表示

N-{4-[(6, 7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1, 1-二羧醯胺。

【0090】 試驗例 1. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞株係使用由 CTL 公司購入之 PBMC(LP_167, Sample ID : 20130318)並藉由附著型載體 (搭載基因; OCT3/4、KLF4、SOX2、L-MYC、LIN28、小鼠 p53DD)所製成(參考文獻; Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov29. doi : 10. 1002/stem. 1293)的細胞株(於利用細胞表面標記進行之非心肌細胞的染色中使用之報導子細胞的母株)。

iPS 細胞株的維持培養係根據以往的方法進行 (Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi : 10. 1002/stem. 1293)。成為心肌細胞的分化誘導係根據論文(Miki et al, Cell Stem Cell. 2015 Jun 4 ; 16. doi : 10. 1016/j. stem. 2015. 04. 005.)所記載的方法以 6 孔盤進行。VEGF 係於第 8 日(Day8)以後不添加之方式實施。

分化誘導第 8 日，將類胚胎體收集於 1 個離心管，於室溫靜置數分鐘使類胚胎體沈降，以吸引器去除上清部分，藉由添加培養基實施培養基交換。類胚胎體懸濁液移至 6 孔盤，將最終濃度的 100 倍濃度的評估化合物 (於下述表 1 顯示之實驗編號 2 至 8 的化合物及濃度)於各孔添加 100 分之 1 的量後，攪拌盤並進行細胞培養。

【0091】 [表 1]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	化合物 A	0.5
3	AMG337	2
4	ASP5878	0.02
5	ASP5878	0.05
6	ASP5878	0.12
7	BGJ398	0.2
8	BGJ398	1

【0092】 於分化誘導第 10 日，藉由傾斜靜置 6 孔盤數分鐘使類胚胎體沉降，以吸引器去除上清部分，藉由添加培養基實施各孔的培養基交換，於第 8 日同樣地以 100 分之 1 的量添加最終濃度的 100 倍濃度的評估化合物，實施化合物的添加。分化誘導第 13 日，傾斜 6 孔盤使類胚胎體沉降，以附有廣口徑的 1mL 移液管用吸管(Pipette tip)將類胚胎體移至 1.5mL 管。細胞的單細胞化係根據利用細胞表面標記進行之非心肌細胞的染色而實施，將單細胞懸濁液使用於心肌細胞標記陽性細胞率測定、以及非心肌細胞標記陽性細胞率測定。

【0093】 <心肌標記陽性細胞率(心肌細胞率)的測定>

上述單細胞懸濁液分注於 1.5mL 管後，以 400g 離心 3 分鐘，去除上清部分。細胞顆粒以 Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Solution(BD)再懸濁並於室溫靜置 15 分鐘，予以固定。於各管添加 1xPerm/Wash Buffer 1mL，以 1500g 離心 3 分鐘後，藉由去除上清部分而洗淨細胞。輕拍細胞顆粒後，添加

1xPerm/Wash Buffer 1mL，藉由進行同樣的操作而洗淨細胞。輕拍細胞顆粒後，於含有 1%BSA 之 1xPerm/Wash Buffer 使用抗肌節 α -肌動蛋白原(Sarcomeric α -actinin)抗體，以螢光色素 Alexa647 染色後，進一步以 DAPI(4',6-二甲脒基-2-苯基吡啶二鹽酸鹽)進行 DNA 染色。於藉由流式細胞數進行的測定中，測定去除死細胞(DNA 量係 Sub-G1 的細胞)之細胞集團的 Alexa647 螢光信號量，藉此進行肌節 α -肌動蛋白原陽性的細胞率解析。其結果，相較於未經化合物處理，藉由化合物 A(N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1, 2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺)、AMG337、ASP5878、BGJ398 的處理，心肌細胞率(肌動蛋白原陽性細胞率)增加(圖 4)。

【0094】 <非心肌細胞標記陽性細胞率(非心肌細胞率)的測定>

使用未凍結的單細胞懸濁液，根據利用細胞表面標記進行之非心肌細胞的染色，實施測定、解析。其結果，相較於未經化合物處理，藉由化合物 A、AMG337、ASP5878、BGJ398 處理，非心肌細胞率(CD326、CD31、CD49a 之任一者為陽性的細胞率)減少(圖 5)。

【0095】 試驗例 2. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞係使用與試驗例 1 相同的細胞株，成為心肌細胞的分化誘導亦以同樣的方法進行。培養基交換係於分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日實施，分化誘導第 8 日、第 10 日係以與試驗例 1 同樣的方法進行，分化誘導第 13 日係以與試驗例 1 的第 10 日同樣的方法進行。分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日係將評估化合物(下述表 2 所示之實驗編號 2、3 的化合物及濃度)的添加以與試

驗例 1 同樣的方法實施。惟，實驗編號 3 的 ASP5878 的添加係僅於分化誘導第 8 日及第 10 日實施。各實驗係各於 4 孔實施。

【0096】 [表 2]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	佛瑞替尼(Foretinib)	2
3	ASP5878	0.02

【0097】 於分化誘導第 16 日，以與試驗例 1 同樣的方法進行細胞的單細胞化、固定、心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞率)測定。其結果，相較於未經化合物處理，藉由佛瑞替尼(Foretinib)、ASP5878 處理，心肌細胞率增加(圖 6)。

【0098】 試驗例 3. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞株係使用由 CTL 公司購入之 PBMC(LP_140，Sample ID：20120808)，並藉由附著型載體 (搭載基因；OCT3/4，KLF4，SOX2，L-MYC，LIN28，mouse p53DD)所製成的(參考文獻；Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi：10. 1002/stem. 1293)細胞株。

iPS 細胞株的維持培養係根據以往的方法進行(Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi：10. 1002/stem. 1293)。成為心肌細胞的分化誘導係與實施例 1 同樣的方法進行。VEGF 係於第 10 日(Day10)以後不添加之方式實施。

培養基交換係於分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日實施，分化誘導第 8 日、第 10 日係以與試驗例 1 同樣的方法進行，分化誘導第 13 日係以與試驗例 1 的第 10 日同樣的方法進行。分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日係將評估化合物(下述表 3 所示之實驗編號 2 至 6 的化合物及濃度)的添加以與試驗例 1 同樣的方法實施。

【0099】 [表 3]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	化合物 A	0.5
3	佛瑞替尼(Foretinib)	2
4	ZM323881	2
5	克萊拉尼(Crenolanib)	1
6	克唑替尼(Crizotinib)	2

【0100】 分化誘導第 17 日，以與試驗例 1 同樣的方法進行細胞的單細胞化、非心肌細胞率(CD326、CD31、CD49a 之任一者為陽性的細胞率)測定。其結果，相較於未經化合物處理，藉由化合物 A、佛瑞替尼(Foretinib)、ZM323881、克萊拉尼(Crenolanib)、克唑替尼(Crizotinib)處理，非心肌細胞率減少(圖 7)。

【0101】 試驗例 4. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞係使用與試驗例 3 相同的細胞株，成為心肌細胞的分化誘導亦以同樣的方法進行。

培養基交換係於分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日實施，分化誘導第 8 日、第 10 日係以與試驗例 1 同樣的方法進行，分化誘導第 13 日係以與試驗例 1 之第 10 日同樣的方法進行。分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日係將評估化合物(下述表 4 所示之實驗編號 2、3 的化合物及濃度)的添加以與試驗例 1 同樣的方法實施。各實驗係各於 4 孔實施。

【0102】 [表 4]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	化合物 A	0.5
3	佛瑞替尼(Foretinib)	0.5

【0103】 於分化誘導第 17 日，進行細胞的單細胞化，進行細胞數測定及心肌細胞率測定。以與試驗例 1 同樣的方法進行固定、心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞率)測定。其結果，相較於未處理，藉由化合物 A、佛瑞替尼(Foretinib)處理，心肌細胞率增加(圖 8)。

【0104】 將上述之單細胞懸濁液於 1.5mL 管中以成為 5 倍稀釋的方式添加準備好的 IMDM 培養基並倒轉混合，以細胞計數裝置 NC-200(Chemometec)測定細胞數。其結果，相較於未處理，以佛瑞替尼(Foretinib)處理為 70%左右，回收與化合物 A 處理幾乎相同數目的細胞數(圖 9)。

【0105】 試驗例 5. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞係使用與試驗例 3 相同的細胞株，成為心肌細胞的分化誘導亦以同樣的方法進行。

培養基交換係於分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日實施，分化誘導第 8 日、第 10 日係以與試驗例 1 同樣的方法進行，分化誘導第 13 日係以與試驗例 1 之第 10 日同樣的方法進行。分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日係將評估化合物(下述表 5 所示之實驗編號 2 至 4 的化合物及濃度)的添加以與試驗例 1 同樣的方法實施。惟，實驗編號 4 之 ASP5878 的添加係僅於分化誘導第 8 日及第 10 日實施。各實驗係各於 4 孔實施。

【0106】 [表 5]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	克萊拉尼(Crenolanib)	1
3	化合物 B	2
4	ASP5878	0.02

【0107】 於分化誘導第 16 日，以與試驗例 1 同樣的方法進行細胞的單細胞化、固定、心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞率)測定。其結果，相較於化合物未處理，藉由克萊拉尼(Crenolanib)、化合物 B(N-{4-[(6, 7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1, 1-二羧醯胺)、ASP5878 處理，心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞率)增加(圖 10)。

【0108】 使用上述單細胞懸濁液，以試驗例 4 所記載的方法實施細胞數測定。其結果，未確認到因有無化合物處理而使可回收的細胞數有顯著變化(圖 11)。

【0109】 試驗例 6. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

使用以 CiRA 所製作之臨床用 iPS 細胞株。iPS 細胞株的維持培養係根據以往的方法進行 (Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi : 10. 1002/stem. 1293)。成為心肌細胞的分化誘導係根據論文(Miki et al , Cell Stem Cell. 2015 Jun 4 ; 16. doi : 10. 1016/j. stem. 2015. 04. 005.)所記載的方法進行。

培養基交換係於分化誘導第 8、10、14、17、21 日實施，分化誘導第 8 日、第 10 日係以與試驗例 1 同樣的方法進行，分化誘導第 14 日以後係以與試驗例 1 之第 10 日同樣的方法進行。

分化誘導第 14 日、第 17 日、第 21 日係將屬於評估化合物之一的化合物 A 的添加以與試驗例 1 同樣的方法實施。各實驗係各於 4 孔實施。

【0110】 [表 6]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	化合物 A	0.2

【0111】 以與試驗例 1 同樣的方法進行細胞的單細胞化、固定、心肌細胞率測定，以與試驗例 4 同樣的方法進行細胞數測定。其結果，相較於化合物未處理，藉由化合物 A 處理，心肌細胞率增加(圖 12)，非心肌細胞率減少(圖 13)。未確認到因有無化合物處理而使可回收的細胞數有顯著變化(圖 14)。

【0112】 試驗例 7. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞係使用 CiRA 所製作之臨床用 iPS 細胞株。使用與試驗例 6 相同的細胞株，成為心肌細胞的分化誘導亦以同樣的方法進行。

培養基交換係於分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日實施，分化誘導第 8 日、第 10 日係以與試驗例 1 同樣的方法進行，分化誘導第 13 日係以與試驗例 1 之第 10 日同樣的方法進行。分化誘導第 8 日、第 10 日、第 13 日係將評估化合物(下述表 7 所示之實驗編號 2 至 9 的化合物及濃度)的添加以與試驗例 1 同樣的方法實施(實驗編號 1 實施 2 孔，其他實施 1 孔)。

【0113】 [表 7]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	化合物 A	0.5
3	佛瑞替尼(Foretinib)	2
4	佛瑞替尼(Foretinib)	0.5
5	ZM323881	2
6	CP-673451	1
7	CP-673451	0.3
8	克唑替尼(Crizotinib)	2
9	克唑替尼(Crizotinib)	0.5

【0114】 於分化誘導第 17 日，以與試驗例 1 同樣的方法進行細胞的單細胞化、固定、心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原 actinin 陽性細胞率)測定、非心肌細胞率測定。相較於化合物未處理，藉由化合物 A、佛瑞替尼(Foretinib)、

ZM323881、CP-673451、克唑替尼(Crizotinib)處理，心肌細胞率增加(圖 15)，非
心肌細胞率減少(圖 16)。

【0115】 試驗例 8. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞係使用與試驗例 6 相同的細胞株，，成為心肌細胞的分化誘導亦以同樣的方法進行。

培養基交換係於分化誘導第 8、10、13、17、20 日實施，分化誘導第 8 日係以與試驗例 1 之第 8 日同樣的方法進行，分化誘導第 10 日以後係以與試驗例 1 之第 10 日同樣的方法進行。分化誘導第 8、10、13、17、20 日係按照表 8 所記載的條件以與試驗例 1 同樣的方法實施評估化合物克萊拉尼(Crenolanib)的添加。實驗編號 4 係從分化誘導第 8 日以後進行化合物的添加，實驗編號 2、3 係從分化誘導第 10 日以後進行化合物的添加，實驗編號 5 係從分化誘導第 13 日以後進行化合物的添加。實驗編號 1 係於 4 孔實施，實驗編號 2、3 係於 3 孔實施，實驗編號 4、5 係於 1 孔實施。

【0116】 [表 8]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)	添加開始日
1	未處理	-	-
2	克萊拉尼(Crenolanib)	0.2	第 10 日
3	克萊拉尼(Crenolanib)	1	第 10 日
4	克萊拉尼(Crenolanib)	1	第 8 日
5	克萊拉尼(Crenolanib)	1	第 13 日

【0117】 於分化誘導第 23 日，以與試驗例 1 同樣的方法進行細胞的單細胞化、固定、心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞率)測定、非心肌細胞率測定。藉由克萊拉尼(Crenolanib)處理，心肌細胞率增加(圖 17)，非心肌細胞率減少(圖 18)。

【0118】 試驗例 9. 由受體型酪胺酸激酶阻礙劑所致之心肌細胞純化作用的驗證

<成為心肌細胞的分化誘導>

人類 iPS 細胞係使用與試驗例 6 相同的細胞株，成為心肌細胞的分化誘導亦以同樣的方法進行。

培養基交換係於分化誘導第 8 日以與試驗例 1 之第 8 日同樣的方法進行，分化誘導第 10 日、第 13 日係以與試驗例 1 之第 10 日同樣的方法進行。分化誘導 8、10、第 13 日係將評估化合物(下述表 9 所示之實驗編號 2、3 的化合物及濃度)的添加以與試驗例 1 同樣的方法實施。各實驗編號以 4 孔實施。

【0119】 [表 9]

實驗編號	化合物	最終濃度(μ M)
1	未處理	-
2	佛瑞替尼(Foretinib)	0.5
3	克唑替尼(Crizotinib)	2

【0120】 於分化誘導第 17 日，以與試驗例 1 同樣的方法實施細胞的單細胞化、固定、心肌細胞率(肌節 α -肌動蛋白原陽性細胞率)測定、非心肌細胞率測定，以與試驗例 4 同樣的方法實施細胞數測定。相較於化合物未處理，藉由佛瑞替尼(Foretinib)、克唑替尼(Crizotinib)處理，心肌細胞率增加(圖 19)，非心肌細

胞率減少(圖 20)。相較於化合物未處理，藉由克唑替尼(Crizotinib)回收 8 成，藉由佛瑞替尼(Foretinib)處理而回收幾乎相同數目的細胞數(圖 21)。

【0121】 如上述顯示，藉由僅於培養基添加各種各樣的受體型酪胺酸激酶阻礙劑之簡便處理，即可於各種細胞株中純化類胚胎體中的心肌細胞。

【0122】 此外，將上述試驗例 1 至 9 所使用之成為各化合物標的之受體型酪胺酸激酶示於表 10。

【0123】 [表 10]

化合物	化合物 A	AMG337	ASP5878	BGJ398	佛瑞替尼(Foretinib)
標的	VEGFR1,2,3/ PDGFR α,β	c-Met (HGFR)	FGFR1-4	FGFR1-3	VEGFR1,2,3/ c-Met(HGFR)
化合物	ZM323881	CP-673451	克萊拉尼 (Crenolanib)	克唑替尼 (Crizotinib)	化合物 B
標的	VEGFR2	PDGFR α,β	PDGFR α,β	c-Met	c-Met(HGFR)

[產業上可利用性]

【0124】 根據本發明，可提供一種以高純度包含心肌細胞的細胞集團。由於該細胞集團可適合使用於針對心臟疾病之細胞移植療法及心臟疾病的治療劑的篩選，故為有用者。

【0125】 本申請係以於日本提出申請之日本特願 2020-050268(申請日：2020 年 3 月 19 日)為基礎，其內容係全部包含於本說明書者。

【符號說明】 無

【序列表】

- <110> 國立大學法人京都大學 (Kyoto University)
日商武田藥品工業股份有限公司 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED)
- <120> 心肌細胞的精製方法 (Method for purifying myocardial cell)
- <130> 093122
- <140> TW 110109790
- <141> 2021-03-18
- <150> JP2020-050268
- <151> 2020-03-19
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 720
- <212> PRT
- <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- <220>
- <223> EmGFP-編碼序列
- <400> 1

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly
1 5 10 15

Ala Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly
35 40 45

Gly Thr Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly
50 55 60

Ala Cys Gly Thr Ala Ala Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Ala
65 70 75 80

Gly Thr Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Gly Gly Cys
85 90 95

Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Thr Gly
100 105 110

Cys Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys Thr
115 120 125

Gly Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Thr Cys
130 135 140

Thr Gly Cys Ala Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys Ala Ala Gly Cys
145 150 155 160

Thr Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys
165 170 175

Cys Ala Cys Cys Cys Thr Cys Gly Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys
180 185 190

Thr Thr Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Cys
195 200 205

Ala Gly Thr Gly Cys Thr Thr Cys Gly Cys Cys Cys Gly Cys Thr Ala
210 215 220

Cys Cys Cys Cys Gly Ala Cys Cys Ala Cys Ala Thr Gly Ala Ala Gly
225 230 235 240

Cys Ala Gly Cys Ala Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys Ala
245 250 255

Ala Gly Thr Cys Cys Gly Cys Cys Ala Thr Gly Cys Cys Cys Gly Ala
260 265 270

Ala Gly Gly Cys Thr Ala Cys Gly Thr Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly
275 280 285

Cys Gly Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys Ala
290 295 300

Ala Gly Gly Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Thr Ala
305 310 315 320

Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly
325 330 335

Gly Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly
340 345 350

Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Ala Ala Cys Cys Gly
355 360 365

Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Cys
370 375 380

Ala Thr Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly
385 390 395 400

Ala Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Cys Thr Gly Gly Gly
405 410 415

Gly Cys Ala Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Ala Cys
420 425 430

Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys Ala Cys Ala
435 440 445

Ala Gly Gly Thr Cys Thr Ala Thr Ala Thr Cys Ala Cys Cys Gly Cys
450 455 460

Cys Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Cys
465 470 475 480

Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Cys Thr
485 490 495

Thr Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Ala Ala
500 505 510

Cys Ala Thr Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Gly Cys
515 520 525

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Cys
530 535 540

Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys
545 550 555 560

Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Gly Gly Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys
565 570 575

Cys Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly
580 585 590

Ala Cys Ala Ala Cys Cys Ala Cys Thr Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly
595 600 605

Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Thr Cys Cys Gly Cys Cys Cys Thr Gly
610 615 620

Ala Gly Cys Ala Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Cys Ala Ala Cys Gly
625 630 635 640

Ala Gly Ala Ala Gly Cys Gly Cys Gly Ala Thr Cys Ala Cys Ala Thr
645 650 655

Gly Gly Thr Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Thr Cys
660 665 670

Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Gly Gly Ala
675 680 685

Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Gly Gly Cys Ala Thr Gly Gly Ala
690 695 700

Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr Ala Ala
705 710 715 720

<210> 2
<211> 711
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<223> mCherry-編碼序列

<400> 2

Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Gly Cys Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly
1 5 10 15

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Ala Cys Ala Thr Gly Gly Cys
20 25 30

Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Cys
35 40 45

Ala Thr Gly Cys Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Cys
50 55 60

Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Thr
65 70 75 80

Gly Ala Ala Cys Gly Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Gly Thr Thr Cys
85 90 95

Gly Ala Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly
100 105 110

Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala
115 120 125

Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Cys
130 135 140

Gly Cys Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala
145 150 155 160

Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Cys Cys Cys Thr
165 170 175

Gly Cys Cys Cys Thr Thr Cys Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Cys
180 185 190

Ala Thr Cys Cys Thr Gly Thr Cys Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Thr
195 200 205

Thr Cys Ala Thr Gly Thr Ala Cys Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala
210 215 220

Gly Gly Cys Cys Thr Ala Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Ala Cys
225 230 235 240

Cys Cys Cys Gly Cys Cys Gly Ala Cys Ala Thr Cys Cys Cys Cys Gly
245 250 255

Ala Cys Thr Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Thr Cys
260 265 270

Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys Thr Thr Cys
275 280 285

Ala Ala Gly Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Gly Cys Gly Thr Gly Ala
290 295 300

Thr Gly Ala Ala Cys Thr Thr Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly
305 310 315 320

Cys Gly Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Ala Cys Cys Gly Thr Gly
325 330 335

Ala Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys
340 345 350

Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly Ala Gly Thr Thr
355 360 365

Cys Ala Thr Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly
370 375 380

Cys Thr Gly Cys Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr
385 390 395 400

Thr Cys Cys Cys Cys Thr Cys Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Cys Cys
405 410 415

Cys Gly Thr Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly
420 425 430

Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Gly
435 440 445

Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys Gly Ala Gly Cys Gly Gly Ala Thr
450 455 460

Gly Thr Ala Cys Cys Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys
465 470 475 480

Gly Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Ala Gly Ala
485 490 495

Thr Cys Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala Ala
500 505 510

Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys
515 520 525

Cys Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly
530 535 540

Thr Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala
545 550 555 560

Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr Gly
565 570 575

Cys Ala Gly Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Gly Cys Gly Cys Cys Thr
580 585 590

Ala Cys Ala Ala Cys Gly Thr Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Ala
595 600 605

Gly Thr Thr Gly Gly Ala Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Thr Cys Cys
610 615 620

Cys Ala Cys Ala Ala Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala
625 630 635 640

Cys Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Gly Ala Ala Cys Ala Gly Thr Ala
645 650 655

Cys Gly Ala Ala Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Gly Cys
660 665 670

Cys Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Ala Cys Cys Gly Gly Cys Gly
675 680 685

Gly Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala
690 695 700

Cys Ala Ala Gly Thr Ala Gly
705 710

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種包含心肌細胞的細胞集團的製造方法，係包含：

(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的步驟，其中，該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培養多能性幹細胞所得者；以及

(2)培養該細胞集團的步驟；

其中，前述阻礙劑為針對選自由VEGF受體、PDGF受體及HGF受體所成群組中之至少1種受體型酪胺酸激酶的阻礙劑，惟前述阻礙劑係排除PD173074。

【請求項2】 如請求項1所述之製造方法，其中，前述步驟(1)之細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑的接觸，係從多能性幹細胞的分化誘導開始第8日以後進行。

【請求項3】 如請求項1或2所述之製造方法，其中，前述步驟(1)之細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑的接觸係進行1日以上。

【請求項4】 如請求項1或2所述之製造方法，其中，前述阻礙劑係選自由N-[5-({2-[(環丙烷羰基)胺基]咪唑并[1,2-b]噻嗪-6-基}氧基)-2-甲基苯基]-1,3-二甲基-1H-吡唑-5-羧醯胺、N-{4-[(6,7-二甲氧基喹啉-4-基)氧基]-3-氟苯基}-N'-(4-氟苯基)環丙烷-1,1-二羧醯胺、AMG337、ASP5878、BGJ398、佛瑞替尼(Foretinib)、ZM323881、CP-673451、克萊拉尼(Crenolanib)及克唑替尼(Crizotinib)所成群組中之至少1種。

【請求項5】 如請求項1或2所述之製造方法，其中，前述多能性幹細胞係誘導性富潛能幹細胞。

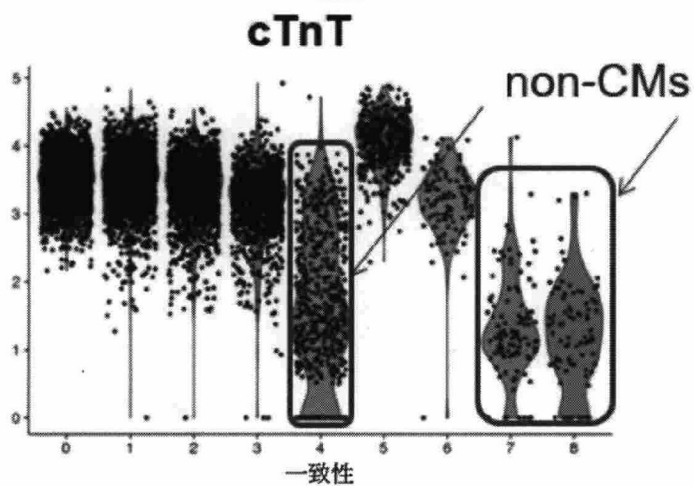
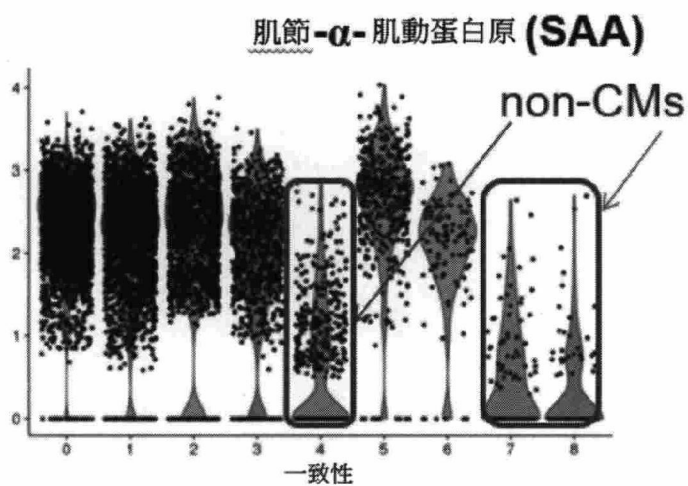
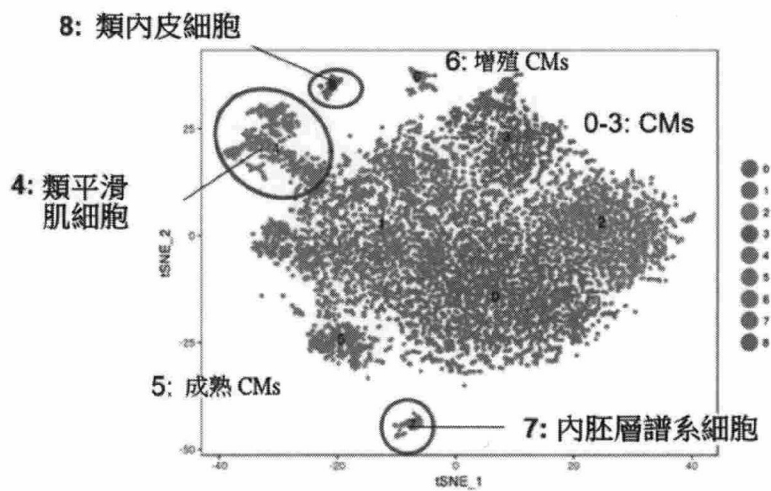
【請求項6】 一種心肌細胞的精製方法，係包含：

(1)使包含心肌細胞或心肌前驅細胞及其他細胞的細胞集團與受體型酪胺酸激酶阻礙劑接觸的步驟，其中，該細胞集團係於心肌細胞分化用培養基中培養多能性幹細胞所得者；以及

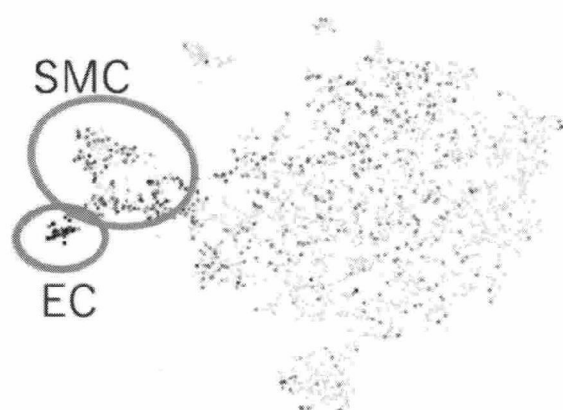
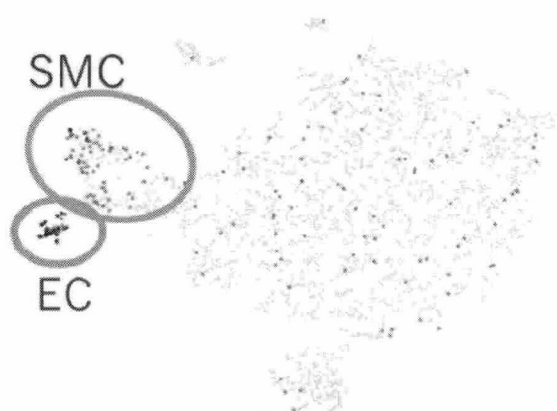
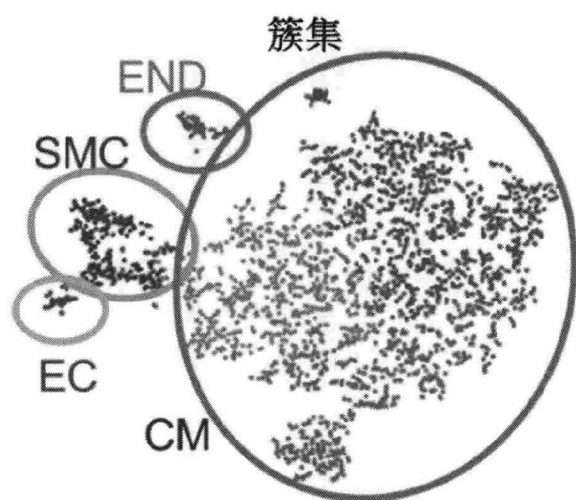
(2)培養該細胞集團的步驟；

其中，前述阻礙劑為針對選自由VEGF受體、PDGF受體及HGF受體所成群組中之至少1種受體型酪胺酸激酶的阻礙劑，惟前述阻礙劑係排除PD173074。

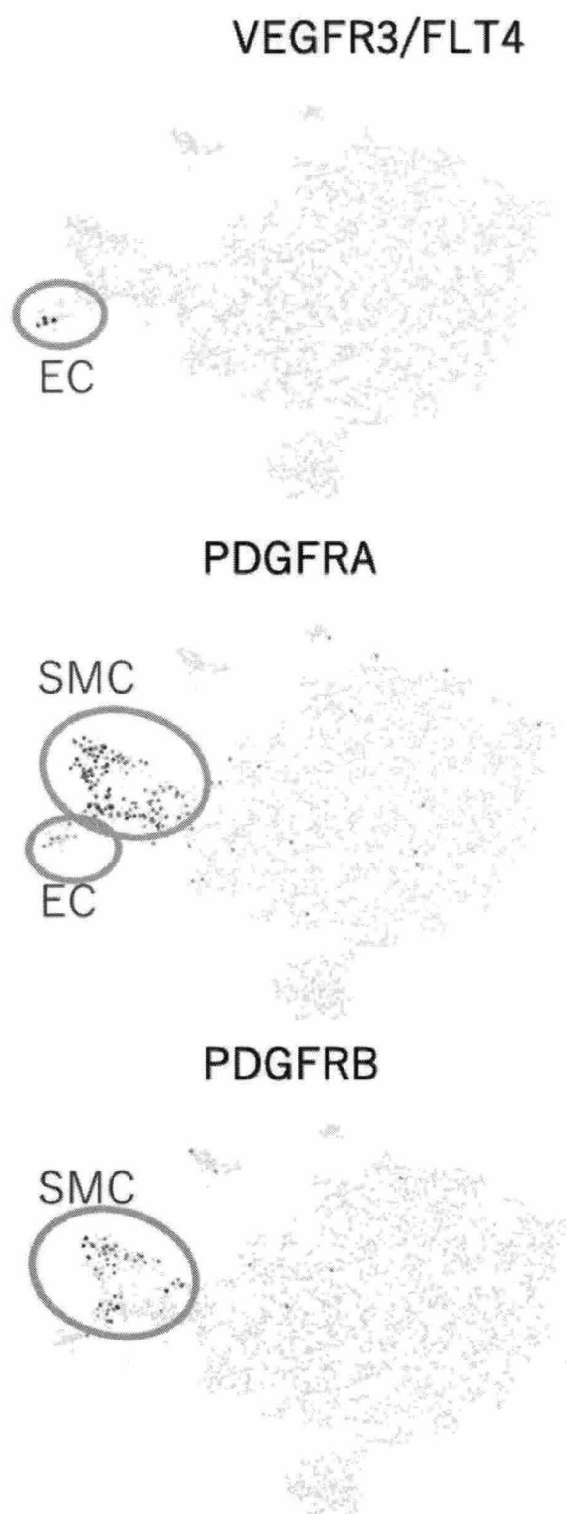
【發明圖式】



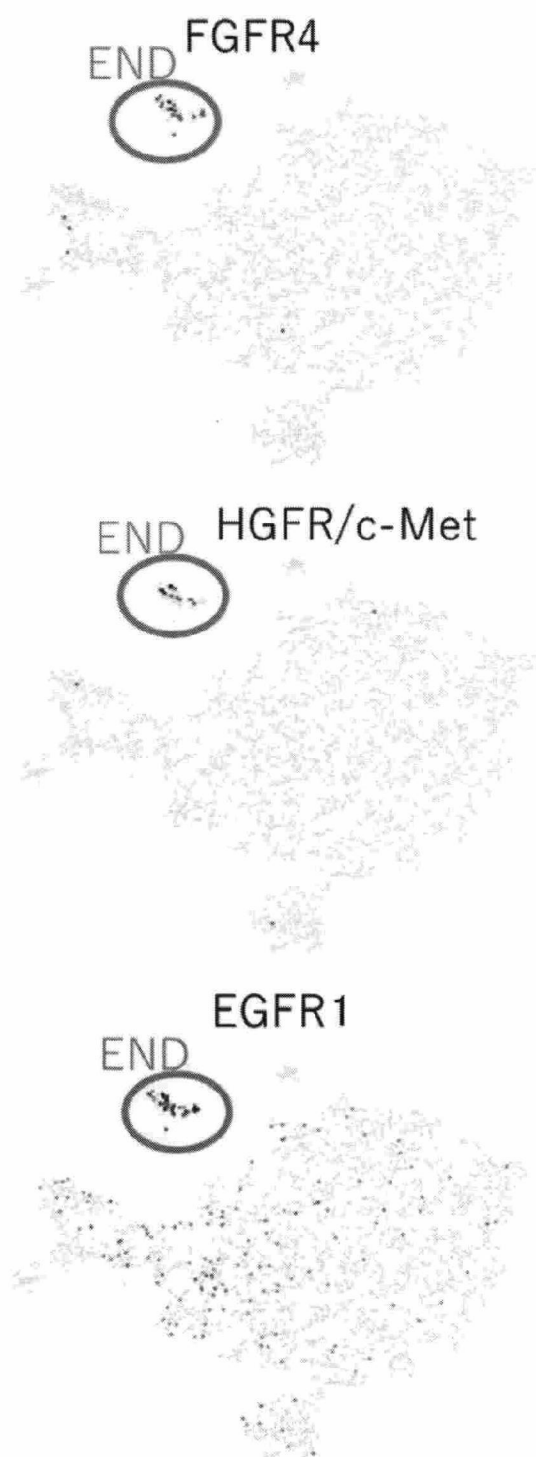
【圖1】



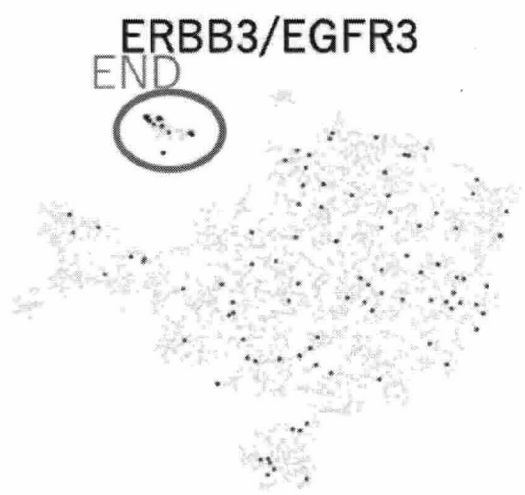
【圖2-1】



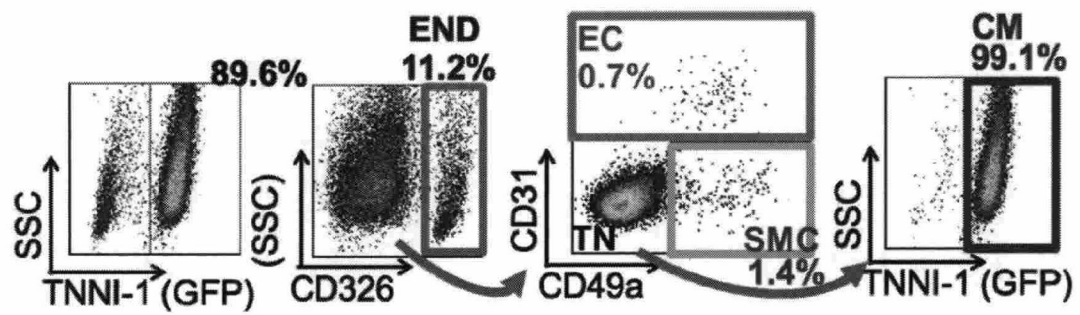
【圖2-2】



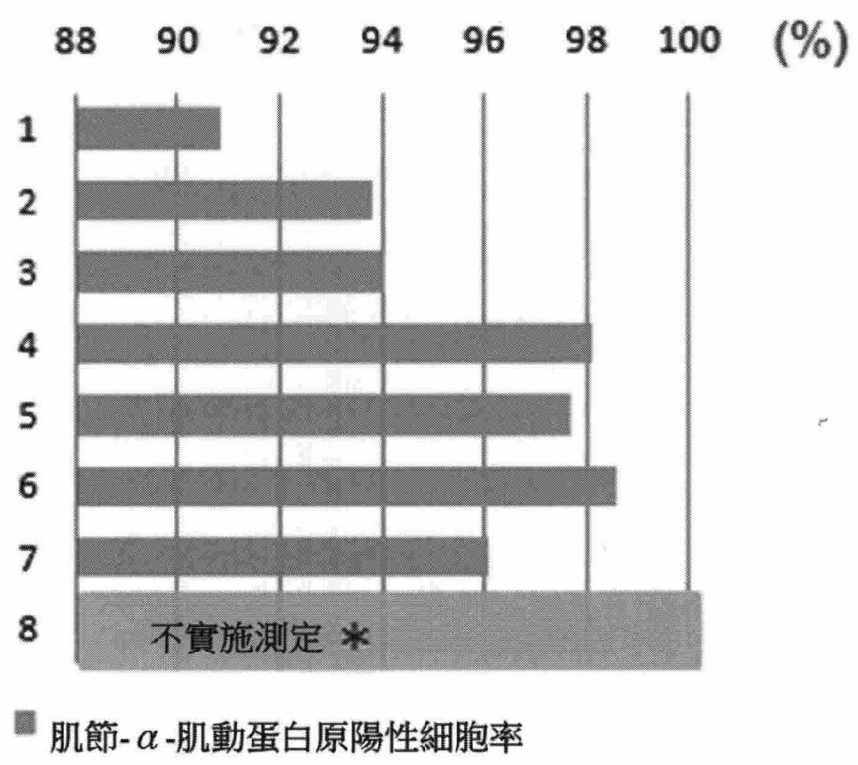
【圖2-3】



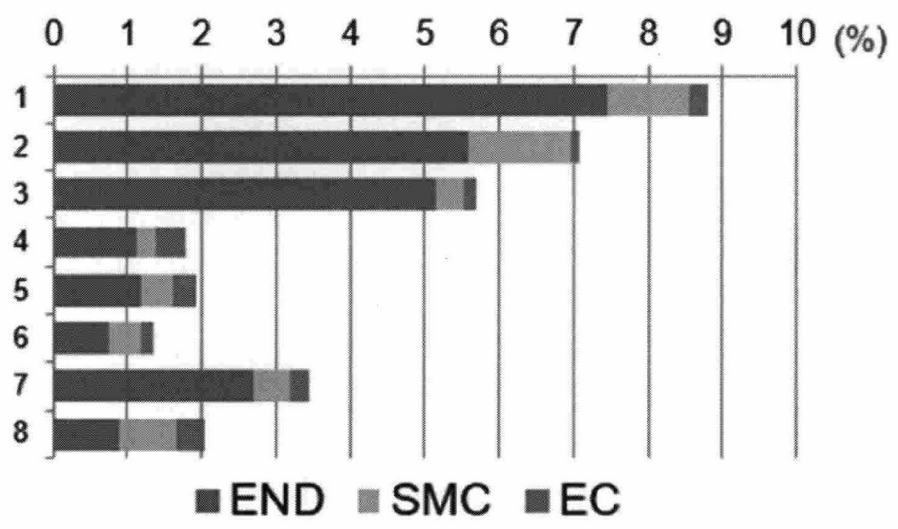
【圖2-4】



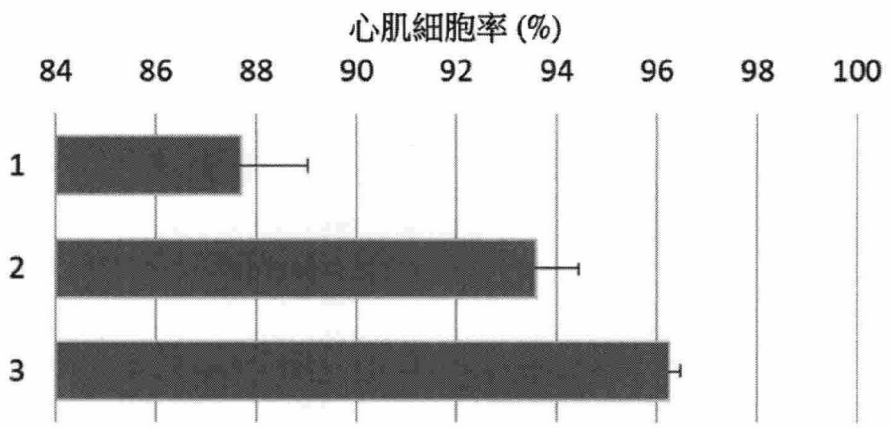
【圖3】



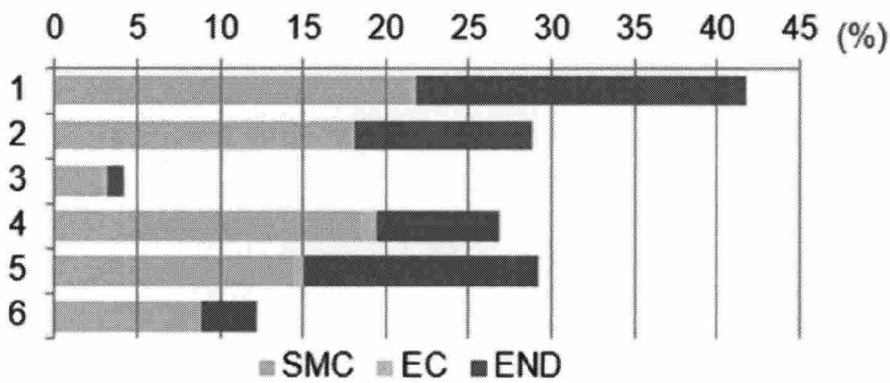
【圖4】



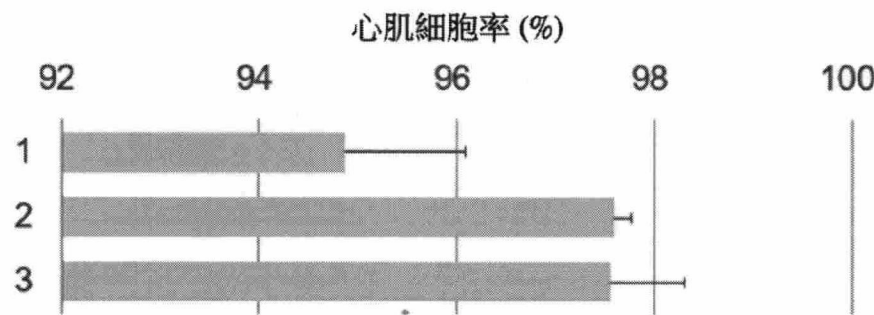
【圖5】



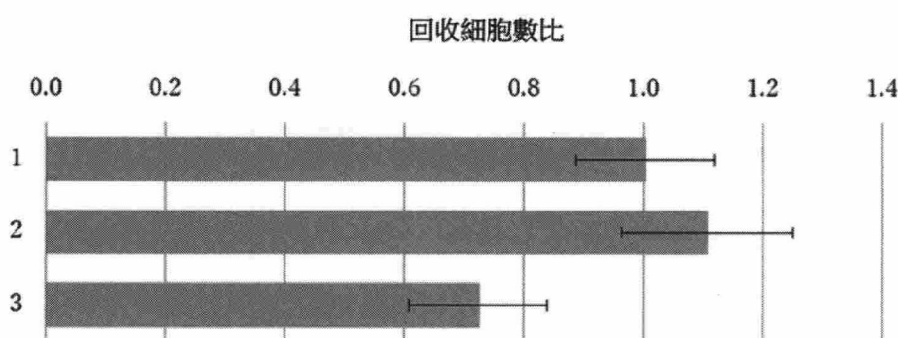
【圖6】



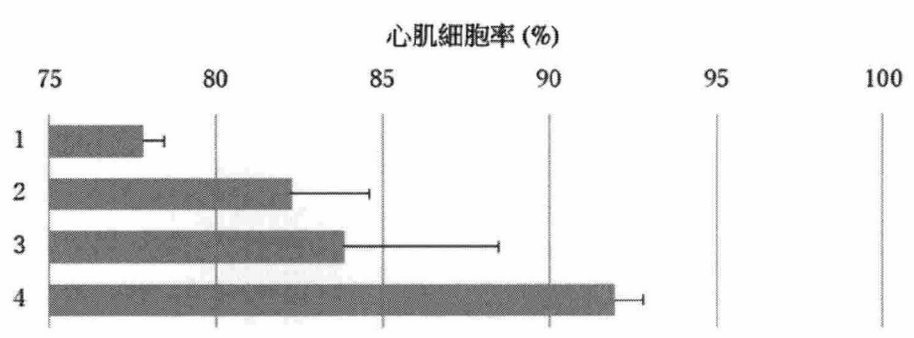
【圖7】



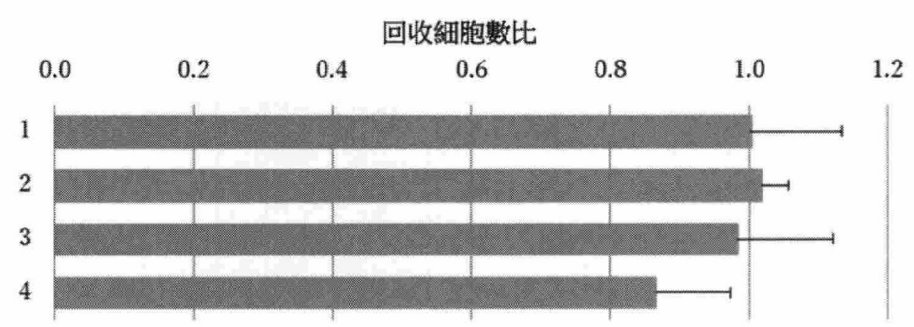
【圖8】



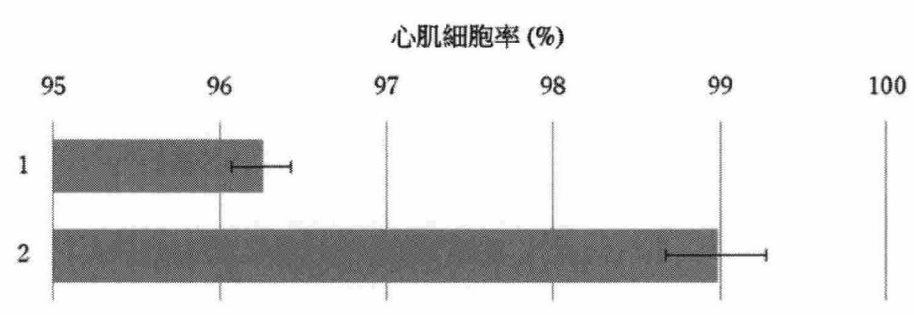
【圖9】



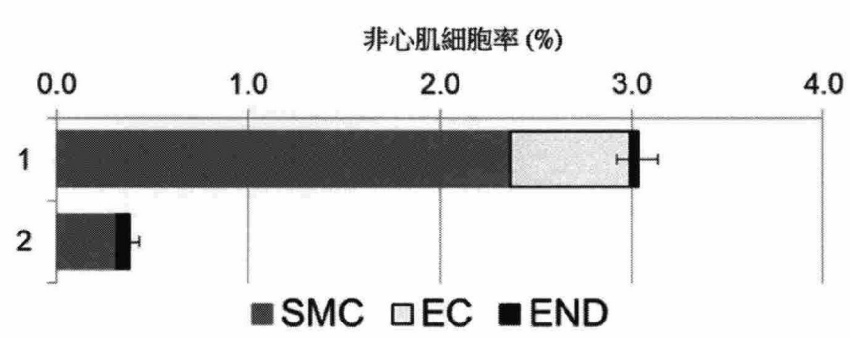
【圖10】



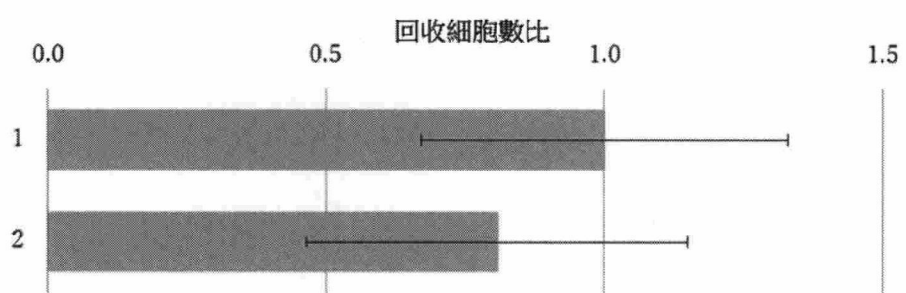
【圖11】



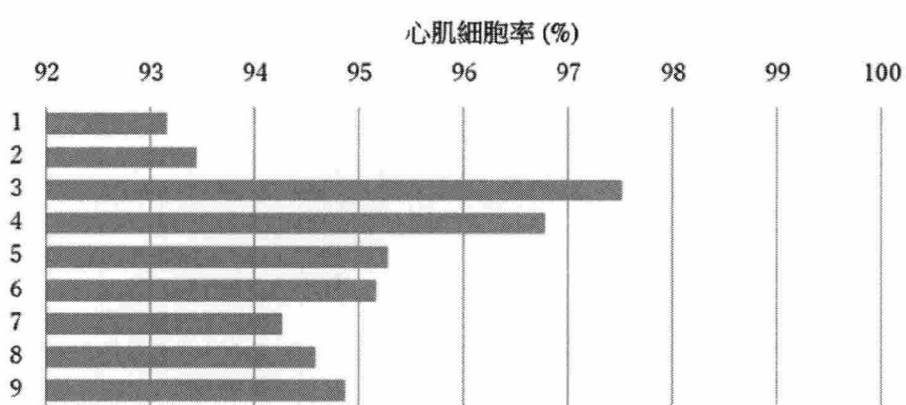
【圖12】



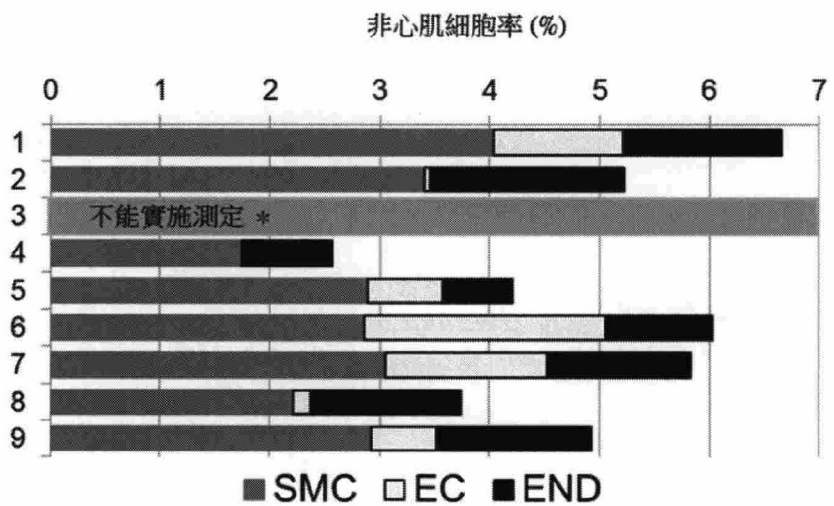
【圖13】



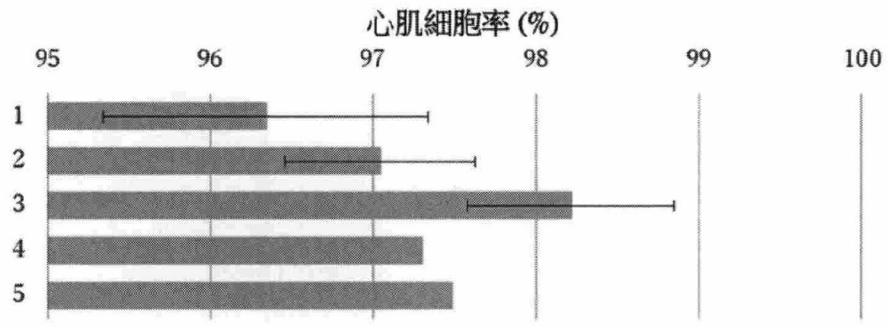
【圖14】



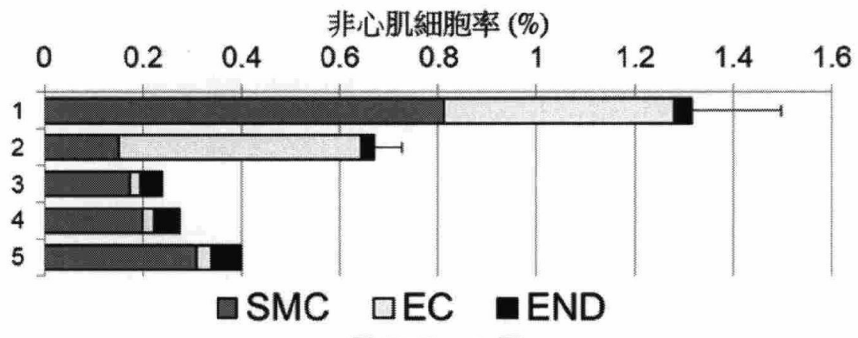
【圖15】



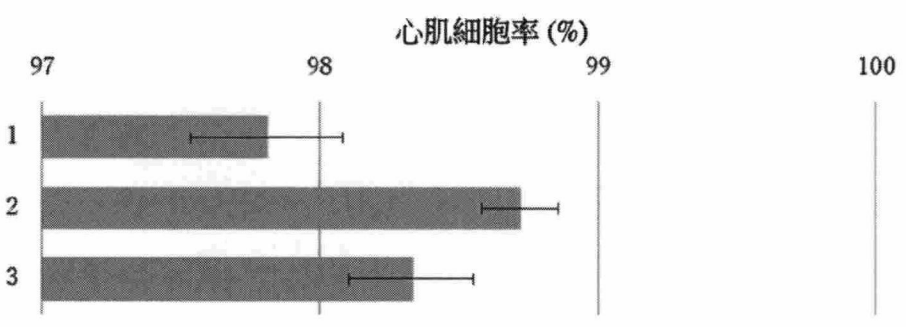
【圖16】



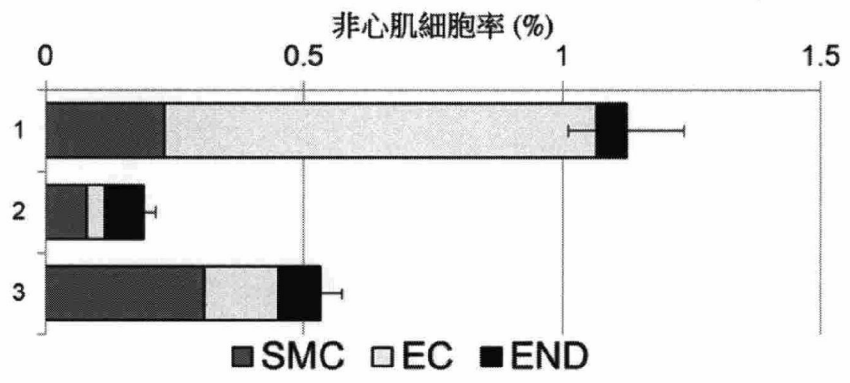
【圖17】



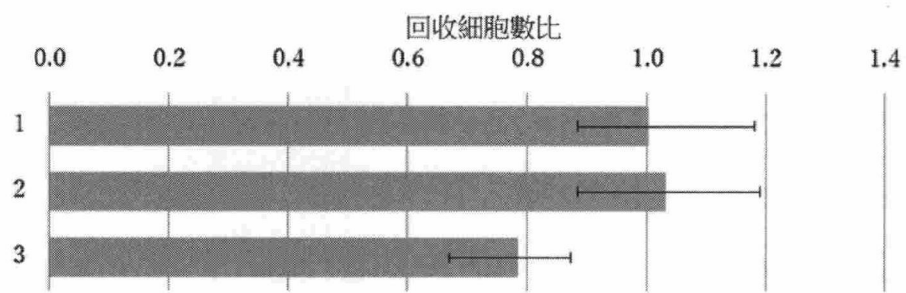
【圖18】



【圖19】



【圖20】



【圖21】