(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-514393
(P2022-514393A)
(43)公表日　令和4年2月10日(2022.2.10)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*5/0783(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/0783		４Ｂ０６５
Ｃ１２Ｎ	*1/00 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/00	G	

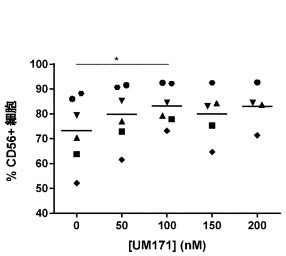
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全29頁）

(21)出願番号　特願2021-535699(P2021-535699)
(86)(22)出願日　令和1年12月20日(2019.12.20)
(85)翻訳文提出日　令和3年8月3日(2021.8.3)
(86)国際出願番号　PCT/CA2019/051875
(87)国際公開番号　WO2020/124256
(87)国際公開日　令和2年6月25日(2020.6.25)
(31)優先権主張番号　62/783,341
(32)優先日　平成30年12月21日(2018.12.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　518393115
ステムセル テクノロジーズ カナダ インコーポレイテッド
カナダ ブイ６エー １ビー６ ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ステーション ストリート １６１８ スイート ５００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名 雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部 俊
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ナチュラルキラー細胞に分化させるための培地および方法

(57)【要約】
NK前駆細胞をNK細胞へと分化させるための培地および方法が開示される。NK分化培地は、たとえばUM171またはUM729などの、ピリミドインドール化合物を含む。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ピリミドインドール化合物を含む、ＮＫ細胞分化培地。
【請求項２】
ピリミドインドール化合物がＵＭ１７１またはＵＭ７２９である、請求項１記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項３】
基礎培地をさらに含む、請求項１または２記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項４】
ＳＣＦ、ＦＬＴ３Ｌ、ＩＬ-２、ＩＬ-３、ＩＬ-１５、またはＩＬ-７のうちの１つまたは複数をさらに含む、請求項３記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項５】
間質細胞または間質細胞代替物との接触による馴化を受けない、請求項１～４のいずれか一項記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項６】
芳香族炭化水素受容体アンタゴニストを含まない、請求項１～５のいずれか一項記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項７】
無血清である、請求項１～６のいずれか一項記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項８】
ＮＫ前駆細胞を分化させる、請求項１～７のいずれか一項記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項９】
ＮＫ前駆細胞が、一次試料から単離されるかまたは一次試料に由来する、請求項８記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項１０】
ＮＫ前駆細胞が多能性幹細胞に由来する、請求項８または９記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項１１】
多能性幹細胞が人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）である、請求項１０記載のＮＫ細胞分化培地。
【請求項１２】
ＮＫ細胞に分化させるための方法であって、
ＮＫ前駆細胞の集団を提供する段階、ならびに；
ＮＫ細胞を産生するのに十分な、濃度および期間において、培養下のＮＫ前駆細胞の集団を、請求項１～１１のいずれか一項記載の培地に接触させる段階
を含む、方法。
【請求項１３】
ＮＫ前駆細胞の集団が、表現型マーカーに関して均一であるか、または表現型マーカーに関して不均一である、請求項１２記載の方法。
【請求項１４】
表現型マーカーがＣＤ７である、請求項１３記載の方法。
【請求項１５】
表現型マーカーがＣＤ５である、請求項１３または１４記載の方法。
【請求項１６】
接触させる段階の間に、ＮＫ細胞の出現頻度が増加する、請求項１２～１５のいずれか一項記載の方法。
【請求項１７】
接触させる段階の間に、ＮＫ細胞の数が増加する、請求項１２～１６のいずれか一項記載の方法。
【請求項１８】
接触させる段階の間に、ＮＫ前駆細胞の集団の出現頻度または数が増加または減少する、

請求項12～17のいずれか一項記載の方法。
【請求項１９】
提供する段階および接触させる段階に、間質細胞も間質細胞代替物も存在しない、請求項12～18のいずれか一項記載の方法。
【請求項２０】
提供する段階および接触させる段階に、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストが存在しない、請求項12～19のいずれか一項記載の方法。
【請求項２１】
ピリミドインドール化合物の濃度が10 nM～3 μMである、請求項12～20のいずれか一項記載の方法。
【請求項２２】
前記期間が少なくとも1週間である、請求項12～21のいずれか一項記載の方法。
【請求項２３】
前記期間が約2週間である、請求項22記載の方法。
【請求項２４】
NK細胞がCD56を発現する、請求項12～23のいずれか一項記載の方法。
【請求項２５】
NK細胞が細胞傷害性である、請求項12～24のいずれか一項記載の方法。
【請求項２６】
NK前駆細胞の集団が一次試料に由来する、請求項12～25のいずれか一項記載の方法。
【請求項２７】
細胞の集団が一次試料から単離される、請求項12～25のいずれか一項記載の方法。
【請求項２８】
一次試料が、臍帯血試料、骨髄試料、または末梢血試料である、請求項27記載の方法。
【請求項２９】
細胞の集団が、多能性幹細胞から分化する、請求項12～25のいずれか一項記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示の分野
本開示は、細胞の培養に関連し、かつより具体的には、免疫細胞様細胞（immune-like cell）の、または免疫系の細胞の培養に関連する。特に、本開示は、免疫細胞様細胞の、または免疫系の細胞の分化に関連する。
【背景技術】
【０００２】
背景
ナチュラルキラー（NK）細胞は、炎症誘発性（proinflammatory）サイトカインを分泌し、かつウイルスに感染した細胞および腫瘍細胞を溶解するというそれらの能力のために、感染および悪性病変に対する免疫において重要な役割を有するリンパ球である。NK細胞ベースのがん免疫療法は、成長中の分野である。同種ハプロ一致NK細胞は、移植片対宿主病（GVHD）を引き起こすことなく、白血病細胞に対して反応性である。「オフザシェルフ」の、キメラ抗原受容体（CAR）に関して遺伝子操作されたNK細胞は、自家CAR T細胞の望ましい代替物となり得る。
【０００３】
NK細胞の腫瘍殺傷特性に起因して、臨床上の必要性に、たとえば免疫療法への適用などにおける臨床上の必要性に対処するのに十分な量で、機能的なNK細胞を産生するための方法を開発することに、関心が集まっている。末梢血（PB）の、または臍帯血（CB）のNK細胞の拡大は、これらへの適用のために必要とされる十分な数のNK細胞を産生する一般的な方法であるが、これらの方法は、フィーダー細胞に依存するために困難であり、かつNK細胞の疲弊をもたらし得る。インビトロでの、造血幹・前駆細胞（hematopoietic

stem and progenitors）（HSPC）からのNK細胞の分化および拡大は、NK細胞のための、潜在的にはるかに大きい供給源を提供し得る。HSPCからのNK細胞のインビトロでの産生は、間質細胞との共培養を必要とし、かつ拡大率が低いために、同様の困難に直面している。さらに、拡大されたNK細胞は、それらの細胞傷害特性を保持していなければならない。

【０００４】

したがって、間質細胞を含まない培養システムにおいて、NK細胞の細胞傷害機能を維持しつつ、HSPCからNK細胞を産生および拡大するための、安定した方法が必要とされている。

【発明の概要】

【０００５】

本開示の概要

本開示は、分化したNK細胞を得るための、NK前駆細胞を分化させるための培地および方法に関連する。

【０００６】

本開示の1つの局面において、NK細胞分化培地が提供される。1つの態様において、NK細胞分化培地は、ピリミドインドール化合物を含む。1つの態様において、ピリミドインドール化合物は、UM171またはUM729のいずれかである。別の態様において、ピリミドインドール化合物の濃度は、10 nM～3 μMである。1つの態様において、NK細胞分化培地におけるUM171の濃度は、約100 nMである。1つの態様において、NK細胞分化培地におけるUM729の濃度は、約1 μMである。

【０００７】

1つの態様において、NK細胞分化培地は、基礎培地をさらに含む。基礎培地は、塩、緩衝剤、脂質、アミノ酸、微量元素、ある種のタンパク質等を含み得る。

【０００８】

1つの態様において、NK細胞分化培地には、以下のうちの1つまたはすべてが添加される：1種もしくは複数種のサイトカイン；1種もしくは複数種の成長因子；または他のタンパク質。1種または複数種のサイトカインは、SCF、FLT3L、IL-15、IL-2、IL-7、IL-3、IL-12、およびIL-21であり得る。1つの態様において、1種または複数種のサイトカインは、SCFまたはFLT3Lのいずれかと、IL-15であり得る。1つの態様において、NK細胞分化培地には、SCF、FLT3L、IL-15、IL-2、IL-7、IL-3、IL-12、およびIL-21のそれぞれが添加される。

【０００９】

1つの態様において、NK細胞分化培地には、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストは添加されない。別の態様において、NK細胞分化培地は、間質細胞または間質細胞代替物との接触による馴化を受けない。

【００１０】

別の態様において、NK細胞分化培地は、無血清である。

【００１１】

さらに別の態様において、NK細胞分化培地は、NK前駆細胞を分化させる。NK前駆細胞は好ましくは、一次試料から単離されるかもしくは一次試料に由来し、または多能性幹細胞に、たとえば人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）などに、由来する。

【００１２】

本開示の別の局面において、NK細胞に分化させるための方法が提供される。例示的な方法は、以下の段階を含み得る：

培養下のNK前駆細胞の集団を提供する段階、ならびに

NK細胞を産生するのに十分な、量、濃度、および期間において、培養下のNK前駆細胞の集団を、上述のようなNK細胞分化培地に接触させる段階。

【００１３】

1つの態様において、NK前駆細胞の集団をピリミドインドール化合物に接触させる段階は、約1週間である。1つの態様において、ピリミドインドール化合物に接触させる段階は、少なくとも1週間である。1つの態様において、ピリミドインドール化合物に接触させる段階は、1週間よりも長い。1つの態様において、ピリミドインドール化合物に接触させる段階は、約2週間である。1つの態様において、ピリミドインドール化合物に接触させる段階は、2週間よりも長い。

【００１４】

別の態様において、NK前駆細胞の集団は、表現型マーカーに関して均一であるか、または表現型マーカーに関して不均一である。1つの態様において、表現型マーカーはCD7である。別の態様において、表現型マーカーはCD5である。

【００１５】

別の態様において、接触させる段階の間に、NK細胞の出現頻度が増加する。

【００１６】

別の態様において、接触させる段階の間に、NK細胞の数が増加する。

【００１７】

別の態様において、接触させる段階の間に、NK前駆細胞の集団の出現頻度もしくは数が増加または減少する。

【００１８】

別の態様において、提供する段階および接触させる段階には、間質細胞も間質細胞代替物も存在しない。

【００１９】

別の態様において、提供する段階および接触させる段階には、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストは存在しない。

【００２０】

別の態様において、NK細胞はCD56を発現する。

【００２１】

別の態様において、NK細胞は細胞傷害性である。

【００２２】

別の態様において、NK前駆細胞の集団は、一次試料に由来する。

【００２３】

別の態様において、NK前駆細胞の集団は、一次試料から単離される。1つの態様において、一次試料は、臍帯血試料、骨髄試料、または末梢血試料である。

【００２４】

別の態様において、NK前駆細胞の集団を、多能性幹細胞から分化させる。

【００２５】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい態様を示すものである一方で、単なる例証として提供されていることが理解されるべきである、なぜならば、本発明の精神内および範囲内のさまざまな変更および改変は、この詳細な説明から当業者に明らかとなるからである。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

本明細書に記載されるさまざまな態様のより良い理解のため、およびこれらのさまざまな態様がどのように実施され得るのかをより明確に示すため、少なくとも1つの例示的態様を示す添付の図面であって、かつここに説明される添付の図面が、例として参照される。図面は、本明細書に記載される教示の範囲を限定することを意図するものではない。

【図１】図1は、NK前駆細胞からのCD56^{+} NK細胞の分化に対する、ピリミドインドール化合物の効果を示す。(A) ある範囲の濃度のUM171の存在下での14日間の培養における、NK前駆細胞を分化させた後のCD56^{+} NK細胞の出現頻度。100 nMにおいて、NK細胞の出現頻度は、UM171を欠く培養と比較して有意に増加する（対応のあるt検定：

p = 0.013）。(B) ある範囲の濃度のUM729の存在下での14日間の培養における、NK前駆細胞を分化させた後のCD56+ NK細胞の出現頻度。1 μMにおいて、CD56+ NK細胞の出現頻度は、UM729を欠く培養と比較して有意に増加する（対応のあるt検定：p = 0.017）。100 nM UM171の存在下での培養についての結果もまた示される。

【図２】図2は、NK前駆細胞からのCD56+ NK細胞の分化に対する、ピリミドインドール化合物の効果を示す。(A) ある範囲の濃度のUM171の存在下での14日間の培養における、NK前駆細胞を分化させた後の、投入された細胞（すなわち第0日の細胞）あたりのCD56+ NK細胞の産生量。(B) ある範囲の濃度のUM729の存在下での14日間の培養における、NK前駆細胞を分化させた後の、投入された細胞（すなわち第0日の細胞）あたりのCD56+ NK細胞の産生量。1 μMにおいて、CD56+ NK細胞の産生量は、UM729を欠く培養と比較して有意に増加する（対応のあるt検定：p = 0.032）。100 nM UM171の存在下での培養についての結果もまた示される。

【図３】図3は、NK前駆細胞からのCD56+ NK細胞の分化に対する、ピリミドインドール化合物の存在または非存在の効果を示す。(A) 図1(A)および図2(A)における100 nMのデータ点の結果は、UM171化合物を欠く標準（「STD」）培養に対して正規化された。n = 15、正規化されていないデータにおける、対応のあるt検定：出現頻度に関してp =0.0001、かつ産生量に関してp = 0.052（すなわち、STDに対する図2(A)のデータ点）。(B) 図1(B)および図2(B)における1 μMのデータ点の結果は、UM729化合物を欠くSTD培養に対して正規化された。n = 20、正規化されていないデータにおける、対応のあるt検定：出現頻度に関してp ＜ 0.0001、かつ産生量に関してp = 0.006。

【図４】図4は、分化したCD56+ NK細胞の表面上での、自然細胞傷害性受容体の発現を示す。(A) NKp46、(B) NKp44、および(C) NKp30の発現に関して、細胞はフローサイトメトリーによって解析された。

【図５】図5は、分化したCD56+ NK細胞による、より成熟したNK細胞に関連する表現型マーカーの発現を示す。(A) NKG2D、(B) CD16、(C) CD94、(D) KIR、および(E) 細胞内IFNγの発現に関して、細胞はフローサイトメトリーによって解析された。(E)におけるヒストグラムは、ゲーティングされた、PMA／イオノマイシンで刺激されたCD56+ NK細胞（黒線のみのヒストグラム）、および刺激されていないCD56+ NK細胞（灰色で塗りつぶされたヒストグラム）の重ね合わせを示す。

【図６】図6は、分化したCD56+ NK細胞が、T細胞マーカーを発現しないことを示す。(A) UM171の存在下で培養された、第1のドナーのNK前駆細胞は、CD3を発現しない。(B) UM171の存在下で培養された、第2のドナーのNK前駆細胞は、CD3を発現しない。(C) UM729の存在下で培養された、第2のドナーのNK前駆細胞は、CD3を発現しない。

【図７】図7は、分化したCD56+ NK細胞が細胞傷害性であることを示す。末梢血（PB）のNK細胞および単球もまた、それぞれ陽性対照および陰性対照として、5:1のエフェクター対標的比において、カルセインAM標識されたK562細胞と共培養された。結果は、K562細胞の特異的な溶解の%として表される：[(試験による放出 - 自然放出) x 100] / (最大放出 - 自然放出)。平均±標準偏差が示される（CB CD34+由来NK細胞：n = 18、PB NK細胞および単球：n = 7）。

【図８】図8は、ピリミドインドール化合物が、NK前駆細胞に対して特異的に影響を及ぼすが、CD34+ HSPCに対してはそうではないことを示す。臍帯血由来CD34+ HSPC細胞は第0日にプレーティングされ、そしてUM171が、異なる期間でNK分化培養に添加された：第0日～第14日（+/-）；第14日～第28日（-/+）；または第0日～第28日（+/+）。UM171非含有の培養もまた実施された：第0日～第28日（-/-）。NK細胞への分化に対するUM171添加の効果は、(A) CD56+ NK細胞の出現頻度に関して、および(B) 投入された細胞（すなわち第0日の細胞）あたりのCD56+ NK細胞の産生量に関して評価された。

【図９】図9は、CD34+ HSPCのNK前駆細胞への分化を、ピリミドインドール化合物が阻害することを示す。CD7+CD5+細胞は、UM171の存在下または非存在下で培養され

た後、NK細胞分化培養の第14日に解析された。CD34+細胞のNK前駆細胞への分化に対する、UM171添加の効果は、(A) CD7+CD5+ NK前駆細胞の出現頻度に関して、および(B) 投入された細胞あたりのCD7+CD5+ NK前駆細胞の産生量に関して評価された。

【図１０】図10は、14日間の培養後の、CD34+ HSPCから分化させた細胞の中間集団の表現型を示す。(A) CD56の発現に関して、細胞はフローサイトメトリーによって解析された。(B) NK前駆細胞のマーカーであるCD7およびCD5の発現に関して、または該発現の非存在に関して、CD56-細胞はフローサイトメトリーによって解析された。

【図１１】図11は、CD7+CD5+ NK前駆細胞およびCD7+CD5- NK前駆細胞のNK細胞への分化を、ピリミドインドール化合物が促進することを示す。図10(B)における、細胞の各集団 － CD7+CD5+、CD7+CD5-、CD7-CD5- － は、フローサイトメトリーによってソートされ、そしてUM729の存在下（四角形のデータ点）または非存在下（円形のデータ点）で、NK細胞分化培地において培養された。NK細胞への分化に対するUM729添加の効果は、(A) CD56+ NK 細胞の出現頻度に関して、および (B) 投入された前駆細胞（すなわちソートされた第14日の細胞）あたりのCD56+ NK細胞の産生量に関して評価された。水平線は、3人のドナーの平均である；各ドナーは、濃さの異なる記号によって表される。

【図１２】図12は、NK細胞への分化に対するピリミドインドール化合物の効果は、芳香族炭化水素受容体（AhR）アンタゴニストを用いた場合には再現されないことを示す。NK前駆細胞は、5 μM CH223191の存在下または非存在下のいずれかで培養された。NK細胞への分化に対するCH223191添加の効果は、(A) CD56+ NK細胞の出現頻度に関して、および(B) 投入された細胞（すなわち第0日の細胞）あたりのCD56+ NK細胞の産生量に関して評価された。

【図１３】図13は、NK前駆細胞のCD34-サブセットに対して、ピリミドインドール化合物が選択的に影響を及ぼすことを示す。第14日のNK前駆細胞のソートされた集団は、UM729の存在下（灰色の柱）または非存在下（白色の柱）でプレーティングされ、そして14日間培養された。NK細胞への分化に対するUM729添加の効果は、(A) CD56+ NK細胞の出現頻度に関して、および(B) 投入された前駆細胞あたりのCD56+ NK細胞の産生量に関して評価された。点のそれぞれは、個々の臍帯血ドナーを表す。

【図１４】図14は、4種類のPSC株である1C、M001、H1、およびF016に由来する、NK前駆細胞の集団が、ピリミドインドール化合物に応答することを示す。NK前駆細胞の集団へと分化させた、PSC由来CD34+細胞は、UM729の非存在下（-）または存在下（+）でプレーティングされ、そして14日間培養された。PSC由来NK細胞への分化に対するUM729添加の効果は、(A) CD56+ PSC由来NK細胞の出現頻度に関して、および(B) 投入されたCD34+細胞あたりのCD56+ PSC由来NK細胞の産生量に関して評価された。点のそれぞれは、個々の生物学的反復物（biological replicate）を表す。

【図１５】図15は、PSC由来CD34+細胞からのNK前駆細胞の集団の分化に対して、ピリミドインドール化合物が負の効果を有することを示す。4種類のPSC株である1C、M001、H1、およびF016に由来する、CD34+細胞は、UM729の非存在下（-）または存在下（+）でプレーティングされ、そして14日間培養された。PSC由来CD34+細胞のPSC由来NK前駆細胞の集団への分化に対する、UM729添加の効果は、(A) CD5+CD7+ PSC由来NK前駆細胞の出現頻度に関して、および(B) 投入された細胞あたりのCD5+CD7+ PSC由来NK前駆細胞の産生量に関して評価された。点のそれぞれは、個々の生物学的反復物を表す。

【発明を実施するための形態】

【００２７】

詳細な説明

本開示は、NK前駆細胞を分化させるための培地および方法に関連し、かつ分化したNK細胞を得るための方法に関連する。

【００２８】

本明細書において使用される場合、「造血幹・前駆細胞」または「HSPC」とは、自己複

製することが可能であり、および／または造血系列のより特化した細胞へと分化することが可能である、造血系列の細胞を意味する。HSPCは、以下から入手され得る：骨髄（BM）、臍帯血（CB）、胚から成体までの末梢血（PB）、胸腺、末梢リンパ節、消化管、扁桃、妊娠子宮、肝臓、または局在するHSPCの集団を有する任意の他の組織。HSPCはまた、多能性幹細胞から分化させてもよく、ここで該多能性幹細胞は、たとえば、人工多能性幹細胞、胚性幹細胞、ナイーブ型幹細胞、拡張された幹細胞（extended stem cell）等である。ヒトHSPCの際立った特徴は、膜貫通型リン酸化糖タンパク質であるCD34の発現であり、したがってHSPCは、$CD34^+$細胞と称され得る。ヒトHSPCは、CD45およびCD34の共発現によって定義され、かつ、たとえば、CD38、CD43、CD45RO、CD45RA、CD10、CD49f、CD59、CD90、CD109、CD117、CD133、CD166、HLA-DR、CD201、およびインテグリンα3などのマーカーの組み合わせによって、さらに定義され得、これらマーカーは、HSPCサブセットを識別するために使用され得る。HSPCは、たとえば、グリコホリンA、CD3、CD4、CD8、CD14、CD15、CD19、CD20、およびCD56などの、マーカーの発現を欠く可能性があり、またはこれらマーカーの発現がわずかしかない可能性がある；そのようなマーカーは、成熟血液細胞の特徴であり得る。

【００２９】

本明細書において使用される場合、「ナチュラルキラー細胞」または「NK細胞」とは、HSPCに由来し得る、造血系列のリンパ球の1タイプを意味する。より具体的には、NK細胞は、複能性リンパ系前駆細胞（multilymphoid progenitor）（MLP）または共通リンパ系前駆細胞（common lymphoid progenitor）（CLP）に由来し得る。NK細胞は、典型的には以下によって特徴付けられる：T細胞特異的マーカーおよびB細胞特異的マーカーの非存在；CD56およびCD16（低親和性Fcγ受容体3A、NK細胞のサブセット上に発現する）の発現；ならびに該細胞のエフェクター機能。より具体的には、NK細胞のエフェクター機能は、細胞傷害性、および／またはIFNγの産生を含み得る。NK細胞は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（killer immunoglobulin-like receptor）（KIR）と称される、活性化受容体および抑制性受容体の発現によって、さらに特徴付けられ得る。NK細胞が発現し得る他の活性化受容体は、NKG2D、および自然細胞傷害性受容体（NCR）を含み、NCRにはNKp30、NKp44、およびNKp46が含まれる。HSPCのNK細胞への分化は、通常は中間前駆細胞を経て、たとえばNK前駆細胞などを経て起こるが、HSPC（または$CD34^+$細胞）をNK細胞へと直接分化させることも可能であり得る。

【００３０】

本明細書において使用される場合、「ナチュラルキラー前駆細胞」または「NK前駆細胞」とは、HSPCと比べてより特化しているが、NK細胞へとさらに分化することができる、細胞タイプを意味する。NK前駆細胞は、HSPCの直接的な子孫であってよく、またはHSPCから遠く離れていてもよい。さらに、NK前駆細胞は、NK細胞へと直接分化させてよく、またはNK細胞になる前に、1つまたは複数の、分化のさらなる段階を経てもよい。NK前駆細胞の一例は、表現型マーカーであるCD7およびCD5が陽性の細胞である。別の例において、NK前駆細胞は、CD7が陽性であるがCD5は陰性である、という可能性がある。NK前駆細胞が発現し得る他の表現型マーカーは、CD10、CD45RA、CD34、CD38、CD161、CD122、CD117、および／またはインテグリンα4β7を含む。CD34は、NK前駆細胞において発現している可能性があり、または発現していない可能性がある。本明細書において、明確に指定されない限り、NK前駆細胞の集団とは、NK細胞へと分化することができる、細胞の均一な集団か、または細胞の不均一な集団を指し得る。

【００３１】

本明細書において使用される場合、「ピリミドインドール化合物」とは、NK前駆細胞の集団からNK細胞を分化させるために使用され得る、あるクラスの化合物を意味する。1つの態様において、ピリミドインドール化合物は、ピリミド[4,5-b]インドールであり得る。特定の態様において、ピリミドインドール化合物はUM171であり得、これは、式 C

$C_{25}H_{27}N_9$（X HBr［X H_2O］によって表され得るか、またはあるいは、(1r,4r)-N^1-(2-ベンジル-7-(2-メチル-2H-テトラゾール-5-イル)-9H-ピリミド[4,5-b]インドール-4-イル)シクロヘキサン-1,4-ジアミンと称され得るものである。別の特定の態様において、ピリミドインドール化合物はUM729であり得、これは、式 $C_{20}H_{25}N_5O_2$ ・ X HCl［X H_2O］によって表され得るか、またはあるいは、メチル 4-((3-(ピペリジン-1-イル)プロピル)アミノ)-9H-ピリミド[4,5-b] インドール-7-カルボキシラートと称され得るものである。UM171およびUM729は米国特許第9,409,906号に開示されており、かつUM729はSTEMCELL Technologiesから市販されている。

【００３２】

培地

本開示の培地は、HSPCをNK細胞へと分化させるために使用され得る、またはNK前駆細胞の集団をNK細胞へと分化させるために使用され得る、いかなる培地も含む。NK細胞へのそのような分化とは、HSPCのNK細胞への分化を指し得、これは、それらの間のNK前駆細胞の、1種または複数種の集団の誘導を含み得る。または、NK細胞への分化とは、NK前駆細胞の集団をNK細胞へと直接的または間接的に分化させるものであり得る。

【００３３】

本開示の培地は血清を含んでよく、または無血清であってもよい。1つの態様において、本開示の培地は無血清である。培地が無血清である場合、そのような培地中に血清代替物サプリメントを含有させることが必要であり得、これはたとえば、BIT 9500血清代替物（BIT 9500 Serum Substitute）（STEMCELL Technologies, カタログ番号09500）、または他の市販の血清代替物溶液などである。あるいは、本開示の任意の細胞を培養するかまたは分化させるために必要とされる、血清中に通常存在する成分が、許容される濃度で、培地へと個々に添加され得る。

【００３４】

本開示の培地は、本開示の細胞（たとえば、HSPC、NK前駆細胞、NK細胞）を培養するのに適切であるように調合された、基礎培地を含み得る。基礎培地は、造血系列の細胞の培養を支援する、任意の基礎培地であり得る。非限定的な例として、基礎培地は、以下のものであり得る：StemSpan（商標）SFEM（STEMCELL Technologies, カタログ番号09650）、StemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09655）、StemSpan（商標）-ACF（STEMCELL Technologies, カタログ番号09855）、StemSpan（商標）H3000（STEMCELL Technologies, カタログ番号09850）、または目的に適合する、任意の他の市販の基礎培地。そのような基礎培地を調合するために使用される、一般的な成分は、塩、緩衝剤、脂質、アミノ酸、微量元素、ある種のタンパク質等を含み得る。

【００３５】

本開示のNK細胞分化培地はまた、1種または複数種のピリミドインドール化合物をも含み得る。1つの態様において、NK細胞分化培地は、ピリミドインドール化合物を1種のみ含む。ピリミドインドール化合物の例は、UM171またはUM729のいずれかを含む。NK細胞分化培地中におけるピリミドインドール化合物の濃度は、該化合物の性質によって変化する。たとえば、いくつかのピリミドインドール化合物は、他のものよりも強力であり得る。たとえば、UM171は、UM729のおよそ10倍の効力を有することが報告されている。したがって、NK前駆細胞の集団からのNK細胞の分化において、同じ効果を観察するためには、UM171に対しておよそ10倍高濃度のUM729を含有させることが必要であり得る。1つの態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、1 nM～10 μMであり得る。さらに特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、5 nM～5 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、10 nM～3 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、30 nM～2 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、50 nM～1 μM

であり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、75 nM～500 nMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、90 nM～150 nMであり得る。

【００３６】

ピリミドインドール化合物がUM171である態様において、NK細胞分化培地におけるその濃度は、約10 nM～1000 nMであってよく、または約20 nM～500 nMであってよく、または約50 nM～200 nMであってよい。特定の態様において、NK細胞分化培地におけるUM171の濃度は、約100 nMである。

【００３７】

ピリミドインドール化合物がUM729である態様において、NK細胞分化培地におけるその濃度は、約50 nM～10 μMであってよく、または約100 nM～5 μMであってよく、または約250 nM～2.50 μMであってよい。特定の態様において、NK細胞分化培地におけるUM729の濃度は、約1 μMである。

【００３８】

本開示の細胞（たとえば、HSPC、NK前駆細胞、NK細胞）を培養するために、本開示のNK細胞分化培地にサプリメントをさらに添加することが必要であり得る。基礎培地に添加されるサプリメントは、培養されようとする細胞の特定のタイプに応じて変化し得る。一般的には、潜在的なサプリメントの非網羅的なリストは、1種もしくは複数種のサイトカイン、1種もしくは複数種の成長因子、または他のタンパク質を含む。

【００３９】

具体的には、SCF、FLT3L、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、およびIL-21を、NK細胞分化培地に含有させてよい。1つの態様において、NK細胞分化培地には、FLT3L、SCF、IL-3、IL-15、IL-2、IL7、IL-12、およびIL-21のそれぞれが添加される。1つの態様において、NK細胞分化培地には、FLT3L、SCF、IL-3、IL-2、IL-15、IL-7、IL-12、およびIL-21のうちの1つまたは複数が添加される。1つの態様において、NK細胞分化培地には、FLT3L、SCF、IL-15、およびIL-7のうちの1つまたは複数が添加される。1つの態様において、NK細胞分化培地には、FLT3LまたはSCFのいずれかと、IL-15が添加される。SCF、FLT3L、IL-3、IL-7、IL-2、IL-15、IL-12、およびIL-21のうちの1つまたは複数を含む、NK細胞分化培地の態様において、そのようなサイトカインは、約1～1000 ng/mLか、または約1～100 ng/mLか、または約5～50 ng/mLの濃度で存在し得、かつIL-2は、約50～1500 IU/mLで存在し得る。

【００４０】

いくつかの態様において、SCF、FLT3L、IL-3、IL-2、IL-7、IL-15、IL-12、およびIL-21のうちのいずれか1つまたは複数を含有させなくてもよいが、その場合、NK細胞分化培地の効力は損なわれ得る。1つの態様において、NK細胞分化培地を用いてNK前駆細胞の集団からNK細胞を分化させるために、NK細胞分化培地がIL-15を含有することが必要とされる。

【００４１】

さらに、本開示のNK細胞分化培地は、追加のサプリメントと相乗作用を示し得る。たとえば、一方では間質細胞が、本開示の細胞培養培地とともに使用され得る。間質細胞の非網羅的な例は、胚性肝臓細胞株であるEL08.1D2、AFT024細胞、OP9細胞、またはM2-10B4細胞を含む。他方で、間質細胞を含まない培養アプローチが、本開示の細胞培養培地とともに使用され得る。間質細胞を含まない培養システムは、間質細胞によって事前に馴化されている培地を利用してよく、またはそのようなシステムは、間質細胞代替物を利用してもよい。間質細胞代替物は、培養下の細胞へと適切なシグナルまたは結合部位を提供する、1種または複数種の定義された成分を含み得る。そのような成分を、培養容器の内側培養表面に適用されるコーティングに含有させてよく、または細胞培養培地中に懸濁される固体の表面に、たとえば、粒子、ビーズ、マイクロキャリア等に、含有させてもよい。そのような成分の非網羅的なリストは、以下を含み得る：全長であってもその断片

であってもよい、フィブロネクチンのコーティング、VCAM-1、固定化されたNotchリガンド、または、たとえばStemSpan（商標）リンパ系細胞分化コーティングサプリメント（Lymphoid Differentiation Coating Supplement）（STEMCELL Technologies, カタログ番号09925）などの、コーティング。または、間質細胞代替物により、そのような成分が可溶性の形態で細胞培養培地中に提供され得、これはたとえば、添加によって、または間質細胞によって事前に馴化されている培地として、提供され得る。

【００４２】

HSPCをNK前駆細胞へと分化させるためには、間質細胞または間質細胞代替物を含有させることが必要であり得るものの、間質細胞または間質細胞代替物は、NK前駆細胞をNK細胞へと分化させるためには必須でない場合があり得る。好ましい態様において、NK細胞分化培地（すなわち、NK前駆細胞をNK細胞へと分化させるための培地）は、間質細胞または間質細胞代替物との接触による馴化を受けない。したがって、そのようなNK細胞分化培地は、間質細胞または間質細胞代替物と以前に接触していないものであり得、またはこの先接触しないものであり得る。

【００４３】

ピリミドインドール化合物以外の化合物が、さまざまなタイプの造血細胞の培養において役割を果たしていることが報告されている。たとえば、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストのクラスの化合物を、NK細胞分化培地に含有させてよい。芳香族炭化水素受容体アンタゴニストのいくつかの例は、ステムレゲニン1（StemRegenin 1）（SR1）（STEMCELL Technologies, カタログ番号72342）またはCH223191（STEMCELL Technologies, カタログ番号72732）を含む。CH223191をNK細胞分化培地に含有させる態様においては、該化合物は、約100 nM～10 μMの範囲にわたる、または約500 nM～8 μMの範囲にわたる、または約1 μM～6 μMの範囲にわたる濃度で存在し得る。特定の態様において、CH223191の濃度は約5 μMである。

【００４４】

1つの態様において、NK細胞分化培地は、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストを含まない。

【００４５】

したがって、本開示の1つの局面において、NK細胞分化培地が提供される。NK細胞分化培地は、HSPCから、またはNK前駆細胞の集団から、NK細胞を分化させるために使用され得る。NK細胞分化培地は、基礎培地（上述のようなもの）、およびピリミドインドール化合物（上述のようなもの）を含み得る。1つの態様において、基礎培地はStemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09655）であり、かつピリミドインドール化合物はUM171またはUM729のいずれかである。そのようなNK細胞分化培地は無血清であるが、一方で、SCF、FLT3L、IL-15、IL-2、IL-3 IL-7、IL-12、およびIL-21のうちの1つまたは複数を、さらに含む。

【００４６】

有意な量の分化したNK細胞を得ることが重要である場合、HSPCをNK前駆細胞およびNK細胞へと分化させる前に、最初にHSPCを培養および拡大することが望ましい場合があり得る。

【００４７】

HSPCは、当技術分野において公知の、任意の公知の方法によって拡大され得る。1つの態様において、HSPCは、StemSpan（商標）CD34$^+$拡大サプリメント（CD34$^+$ Expansion Supplement）（STEMCELL Technologies, カタログ番号02691）か、またはStemSpan（商標）CC100（STEMCELL Technologies, カタログ番号02690）か、またはStemSpan（商標）CC110（STEMCELL Technologies, カタログ番号02697）が添加されたStemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09655）を、製造者のプロトコルにしたがって用いて、有意な数にまで拡大され得る。StemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09655）を用いて、かつ拡大サプリメントが添加された、HSPCの拡大は、または任意の

他の適切な培地を用いたHSPCの拡大は、ピリミドインドール化合物を、たとえばUM171またはUM729などを、培地に添加することによって、さらに増強され得る。

【００４８】

HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、該化合物の性質によって変化する。たとえば、いくつかのピリミドインドール化合物は、他のものよりも強力であり得る。たとえば、UM171は、UM729のおよそ10倍の効力を有することが報告されている。したがって、異なるピリミドインドール化合物を用いて同じ効果を観察するためには、UM171に対して10倍高濃度のUM729を含有させることが必要であり得る。1つの態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、1 nM～10 μMであり得る。さらに特定の態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、5 nM～5 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、10 nM～3 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、30 nM～2 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、50 nM～1 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、75 nM～500 nMであり得る。よりいっそう特定の態様において、HSPC拡大プロトコルにおけるピリミドインドール化合物の濃度は、90 nM～150 nMであり得る。

【００４９】

HSPCを拡大するための培地は、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストをさらに含み得る。芳香族炭化水素受容体アンタゴニストのいくつかの例は、ステムレゲニン1（SR1）（STEMCELL Technologies, カタログ番号72342）またはCH223191（STEMCELL Technologies, カタログ番号72732）を含む。CH223191をHSPC拡大培地に含有させる態様においては、該化合物は、約100 nM～10 μMの範囲にわたる、または約500 nM～8 μMの範囲にわたる、または約1 μM～6 μMの範囲にわたる濃度で存在し得る。特定の態様において、CH223191の濃度は約5 μMである。

【００５０】

HSPCは、上述のように拡大された場合でもそうでなくても、NK前駆細胞の一時的な集団を産生するために、第1の培地において培養され得る。第1の培地（すなわち、NK前駆細胞分化培地）は本質的に、NK細胞分化培地に関して上述したようなものであり得、かつピリミドインドール化合物の添加は任意である。そのような態様において、ピリミドインドール化合物は、UM171またはUM729であり得る。1つの態様において、NK前駆細胞培地には、ピリミドインドール化合物が添加されていない。

【００５１】

本開示のNK前駆細胞分化培地は、追加のサプリメントと相乗作用を示し得る。たとえば、一方では間質細胞が、そのような細胞培養培地とともに使用され得る。間質細胞の非網羅的な例は、胚性肝臓細胞株であるEL08.1D2、AFT024細胞、OP9細胞、またはM2-10B4細胞を含む。他方で、間質細胞を含まない培養アプローチが、そのような細胞培養培地とともに使用され得る。間質細胞を含まない培養システムは、間質細胞によって事前に馴化されている培地を利用してよく、またはそのようなシステムは、間質細胞代替物を利用してもよい。間質細胞代替物は、培養下の細胞へと適切なシグナルまたは結合部位を提供する、1種または複数種の定義された成分を含み得る。そのような成分を、培養容器の内側培養表面に適用されるコーティングに含有させてよく、または細胞培養培地中に懸濁される固体の表面に、たとえば、粒子、ビーズ、マイクロキャリア等に、含有させてもよい。そのような成分の非網羅的なリストは、以下を含み得る：全長であってもその断片であってもよい、フィブロネクチンのコーティング、VCAM-1、固定化されたNotchリガンド、または、たとえばStemSpan（商標）リンパ系細胞分化コーティングサプリメント（STEMCELL Technologies, カタログ番号09925）などの、コーティング。または、間質細胞代替物により、そのような成分が可溶性の形態で細胞培養培地中に提供さ

れ得、これはたとえば、添加によって、または間質細胞によって事前に馴化されている培地として、提供され得る。

【００５２】

1つの態様において、NK前駆細胞分化培地を間質細胞に接触させる（もしくは該培地は、間質細胞の培養によって馴化されている）か、または該培地は、間質細胞代替物を含む。たとえば、間質細胞代替物は以下のものであり得る：全長であってもその断片であってもよい、フィブロネクチンのコーティング、VCAM-1、固定化されたNotchリガンド、または、たとえばStemSpan（商標）リンパ系細胞分化コーティングサプリメント（STEMCELL Technologies, カタログ番号09925）などの、コーティング。

【００５３】

したがって、本開示の別の局面において、上述のとおりのNK前駆細胞分化培地が提供される。そのような培地は、HSPCをNK前駆細胞の集団へと分化させるために使用され得る。したがって、誘導されたNK前駆細胞は、分化したNK細胞を入手するために、NK前駆細胞分化培地中で培養され続けてよく、または誘導されたNK前駆細胞は、次に上述のNK細胞分化培地中で培養されてもよい。

【００５４】

方法

本開示の方法は、NK前駆細胞の集団からNK細胞を分化させるためのそのような段階を包含する。本開示の方法はまた、1種または複数種のNK前駆細胞中間集団を経る場合でも経ない場合でも、HSPCからNK細胞を分化させるためのそのような段階をも包含し得る。本明細書において開示される、NK細胞に分化させるための方法は、好ましくはインビトロ方法である。

【００５５】

本開示の方法は、細胞の適切な出発集団を提供することによって開始され得る。HSPCから開始される場合、HSPCは、商業的に購入されてよく、血液試料もしくは組織試料から単離されてよく、または多能性幹細胞から、たとえば人工多能性幹細胞などから、誘導されてもよい（すなわち、それらから分化させてもよい）。HSPCの供給源にかかわらず、混入細胞をできるだけ多く除去するための、1回または複数回の精製実験を実施することが必要であり得る。HSPCを含む試料から、任意の公知のアプローチによって、混入細胞が除去され得る。たとえば、そのような試料は、密度勾配遠心分離、または正の細胞選択および／もしくは負の細胞選択の対象とされ得る。例示的なアプローチは、RosetteSep（商標）試薬を用いる、たとえばRosetteSep（商標）臍帯血CD34プレエンリッチメントカクテル（Cord Blood CD34 Pre-Enrichment Cocktail）STEMCELL Technologies, カタログ番号15896C）を用いる、単核細胞の慣用の負の選択と、それに続く、適切なEasySep（商標）試薬を用いる、たとえばEasySep（商標）ヒトCD34ポジティブセレクションキットII（Human CD34 Positive Selection Kit II）（STEMCELL Technologies, カタログ番号17896）を用いる、$CD34^+$ HSPCの正の選択とを含み得る。

【００５６】

必要とされるNK細胞の数によっては、HSPCをNK細胞へと分化させる前に（1種または複数種のNK前駆細胞集団を経る場合でも経ない場合でも）、最初にHSPCを拡大することが望ましい場合があり得る。HSPCは、任意の公知のアプローチを用いて拡大され得る。HSPCを拡大するための例示的なアプローチは、適切な基礎培地と、StemSpan（商標）$CD34^+$拡大サプリメント（STEMCELL Technologies, カタログ番号02691）か、またはStemSpan（商標）CC100（STEMCELL Technologies, カタログ番号02690）か、またはStemSpan（商標）CC110（STEMCELL Technologies,カタログ番号02697）との存在下で、HSPCを培養することを含み得る。上述のアプローチを用いる場合、適切な基礎培地は、無血清拡大培地である以下を含み得る：StemSpan（商標）SFEM（STEMCELL Technologies, カタログ番号09650）、StemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09655）、StemSpan（商標）-AC

F（STEMCELL Technologies, カタログ番号09855）、StemSpan（商標）H3000（STEMCELL Technologies, カタログ番号09850）。

【００５７】

HSPCが事前の拡大の対象とされた場合でもそうでなくても、HSPCを、NK前駆細胞の集団へと分化させてよい。NK前駆細胞の集団は、細胞の均一な集団であってよく、または細胞の不均一な集団であってもよい。たとえば、NK前駆細胞の均一な集団は、$CD7^+CD5^+$との表現型によって、または$CD7^+CD5^-$との表現型によって、特徴付けられ得る。そして、NK前駆細胞の不均一な集団は、$CD7^+CD5^+$との表現型、$CD7^+CD5^-$との表現型、$CD7^-CD5^-$との表現型を有するそれら細胞を含み得る。1つの態様において、NK前駆細胞（たとえば、$CD7^+CD5^+$細胞、$CD7^+CD5^-$細胞、および／または$CD7^-CD5^-$細胞）は、$CD34^+$、または$CD34^-$のいずれかであってよい。

【００５８】

いくつかの態様において、HSPCからのNK前駆細胞の誘導は、必須というわけではない。1つの態様において、本開示の培地を用いて、HSPCをNK細胞へと直接分化させることが望ましい場合があり得る。1つの態様において、本開示の培地を用いて、多能性幹細胞をNK細胞へと直接分化させることが望ましい場合があり得、ここで該多能性幹細胞は人工多能性幹細胞を含むが、これに限定されない。1つの態様において、本開示の培地を用いて、特定の胚葉に対応する細胞を、NK細胞へと分化転換させることが望ましい場合があり得る。これらの態様のいくつかにおいて、追加の因子を、またはサイトカインおよび／もしくは転写因子を、タンパク質もしくは核酸の形でも、またはそのような転写因子の活性化物質の形でも、培地にさらに添加することが必要であり得る。

【００５９】

HSPCをNK前駆細胞の集団へと分化させる場合、これは、HSPCの集団を適切な培地に接触させることによって実施され得る。適切な培地は、HSPCをNK前駆細胞の集団へと分化させることができる、任意の公知の培地であり得る。1つの態様において、上述のように、HSPCをNK前駆細胞分化培地に接触させることによって、HSPCをNK前駆細胞の集団へと分化させる。異なる態様において、NK前駆細胞分化培地は、リンパ系前駆細胞拡大サプリメント（Lymphoid Progenitor Expansion Supplement）（STEMCELL Technologies, カタログ番号09915）を添加されたStemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09655）を含み得る。1つの態様において、NK前駆細胞分化培地に接触したHSPCは、StemSpan（商標）リンパ系細胞分化コーティングサプリメント（STEMCELL Technologies, カタログ番号09925）を用いて、またはHSPCをNK前駆細胞の集団へと分化させるために有用な、任意の他の公知のコーティングを用いて、培養され得る。

【００６０】

別の局面において、本開示の方法は、NK前駆細胞の集団を提供することによって開始してよい、ここで、たとえば該集団は、たとえば上述のようにNK前駆細胞分化培地を用いて、HSPCもしくは人工多能性幹細胞から分化させてよく、もしくはHSPCもしくは人工多能性幹細胞に由来してよく、または、たとえば該集団は、一次試料（たとえば、臍帯血、末梢血、骨髄、胸腺、子宮、肝臓、消化管、もしくは二次リンパ組織など）から、識別するための表現型マーカー（たとえば、CD7および／もしくはCD5 ± CD34）に基づいて、直接単離されてもよい。1つの態様において、そのようなNK前駆細胞の集団が、一次試料に由来するか、または多能性幹細胞に、たとえば人工多能性幹細胞もしくはES細胞などに由来する場合には、NK前駆細胞の集団を誘導することが可能であり得る（すなわち、該集団を分化させることが可能であり得る）。1つの態様において、NK前駆細胞の集団は、一次試料から単離され得る。細胞を単離するためのアプローチは、当技術分野において公知であり、かつ正の細胞選択もしくは負の細胞選択のいずれかを、または両方を含み得る。非限定的な例として、系列陽性細胞を（たとえばRosetteSep（商標）ヒト造血前駆細胞エンリッチメントカクテル（Human Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Cocktail）、STEMCELL Technologies, カタログ番号15066などを

用いて）枯渇させてよく、かつNK前駆細胞は、以下のマーカーの1つまたは複数を発現する細胞を選択することによって単離されてよい：CD34、CD38、CD45RA、CD10、CD7、およびCD5。したがって、1つの態様において、NK前駆細胞の集団は、CD7を発現する。別の態様において、NK前駆細胞の集団は、CD7およびCD5の両方を発現し得る。別の態様において、NK前駆細胞の集団は、CD7のみを発現してCD5を発現しない、という可能性がある。別の態様において、NK前駆細胞の集団は、CD34を発現している可能性があり、または発現していない可能性がある。

【００６１】

別の態様において、NK前駆細胞の集団は、多能性幹細胞（PSC）から分化し得る。PSC由来NK前駆細胞の分化には、1種または複数種の中間細胞集団の、たとえばPSC由来CD34^{+} HSPCなどの分化が必要であり得る。

【００６２】

NK前駆細胞の集団のNK細胞への分化は、NK細胞を産生するのに十分な、濃度および期間において、培養下のNK前駆細胞の集団をピリミドインドール化合物に接触させることによって、実施され得る。ピリミドインドール化合物を、NK前駆細胞の集団を支援する任意の培地に含有させてよい。1つの態様において、ピリミドインドール化合物を、本開示にしたがったNK細胞分化培地に含有させる。

【００６３】

上述のように、NK細胞分化培地中におけるピリミドインドール化合物の濃度は、該化合物の性質によって変化する。たとえば、いくつかのピリミドインドール化合物は、他のものよりも強力であり得る。たとえば、UM171は、UM729のおよそ10倍の効力を有することが報告されている。したがって、NK前駆細胞の集団からのNK細胞の分化において、同じ効果を観察するためには、UM171に対して10倍高濃度のUM729を含有させることが必要であり得る。1つの態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、1 nM～10 μMであり得る。さらに特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、5 nM～5 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、10 nM～3 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、30 nM～2 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、50 nM～1 μMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、75 nM～500 nMであり得る。よりいっそう特定の態様において、NK細胞分化培地におけるピリミドインドール化合物の濃度は、90 nM～150 nMであり得る。

【００６４】

上述されてもいるように、ピリミドインドール化合物がUM171である態様において、NK細胞分化培地におけるその濃度は、約10 nM～1000 nMであってよく、または約20 nM～500 nMであってよく、または約50 nM～200 nMであってよい。特定の態様において、NK細胞分化培地におけるUM171の濃度は、約100 nMである。

【００６５】

上述されてもいるように、ピリミドインドール化合物がUM729である態様において、NK細胞分化培地におけるその濃度は、約50 nM～10 μMであってよく、または約100 nM～5 μMであってよく、または約250 nM～2.50 μMであってよい。特定の態様において、NK細胞分化培地におけるUM729の濃度は、約1 μMである。

【００６６】

NK細胞分化培地の、他の潜在的な態様は、上述のようなものである。

【００６７】

ピリミドインドール化合物を含有するNK細胞分化培地は、NK前駆細胞の集団から分化するNK細胞の、出現頻度および／または産生量を増加させ得る。NK細胞への分化の間に、NK細胞の出現頻度および産生量が増加するにつれて、NK前駆細胞の出現頻度および／ま

たは産生量は減少し得る。したがって、培養下のNK前駆細胞の集団からNK細胞を分化させる効力を改善するためには、NK細胞分化培地にピリミドインドール化合物を含有させることが重要であり得る。ピリミドインドール化合物の効果は、NK前駆細胞に特異的であり得る、これは、たとえばHSPCからNK前駆細胞を分化させるための培地（たとえば、NK前駆細胞分化培地など）にピリミドインドール化合物を含有させると、それによって誘導されるNK前駆細胞の産生量および出現頻度に対して、全体的な阻害効果をもたらし得るためである。しかしながら、培養下のNK前駆細胞の集団からNK細胞を分化させるための培地（たとえば、NK細胞分化培地など）にピリミドインドール化合物を含有させると、多能性幹細胞の、たとえば人工多能性幹細胞またはES細胞などの、一次細胞であっても、またはそれらから分化した細胞であっても、HSPCの集団からNK前駆細胞を分化させるための培地（たとえば、NK前駆細胞分化培地）に含まれ得るピリミドインドール化合物の阻害効果が、救済または埋め合わされ得る。

【００６８】

NK細胞を産生するために、NK前駆細胞の集団を提供する段階、および培養下のNK前駆細胞のそのような集団をピリミドインドール化合物に接触させる段階によって、NK細胞を分化させる場合、該提供する段階および接触させる段階は、間質細胞もしくは間質細胞代替物の存在下で実施されてよく、またはそれらの非存在下で実施されてもよい。1つの態様において、間質細胞と間質細胞代替物の非存在下で、NK前駆細胞の集団をNK細胞へと分化させる。

【００６９】

さらに、NK細胞を産生するために、NK前駆細胞の集団を提供する段階、および培養下のNK前駆細胞のそのような集団をピリミドインドール化合物に接触させる段階によって、NK細胞を分化させる場合、該提供する段階および接触させる段階は、芳香族炭化水素受容体アゴニストの存在下で実施されてよく、またはその非存在下で実施されてもよく、これはたとえば、ステムレゲニン1（SR1）（STEMCELL Technologies, カタログ番号72342）またはCH223191（STEMCELL Technologies, カタログ番号72732）である。1つの態様において、芳香族炭化水素受容体アンタゴニストの非存在下で、NK前駆細胞の集団をNK細胞へと分化させる。

【００７０】

培養下のNK前駆細胞の集団をピリミドインドール化合物に接触させる段階は、NK前駆細胞の集団からNK細胞を産生するのに十分な、任意の長さの期間であり得る。基礎培地中のピリミドインドール化合物（または基礎培地中の、もしくはサプリメント添加基礎培地中の、他の成分）が経時的に枯渇し得ることを考慮すれば、一定の間隔で培地交換を実施することが必要であり得、これはたとえば、毎日、1日おき、2日ごと、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、7日ごと、もしくはより少ない頻度などであるか、または異なる頻度、これはたとえば、1～2日ごと、2～3日ごと、もしくは3～4日ごとなどである。実施される培地交換の回数は、NK細胞に分化させるための方法の継続期間と、直接的に相関し得る。1つの態様において、NK前駆細胞からNK細胞を分化させるための方法の継続期間（すなわち、NK前駆細胞の集団をピリミドインドール化合物に接触させることの継続期間）は、約1週間である。別の態様において、NK前駆細胞からNK細胞を分化させるための方法の継続期間は、少なくとも1週間である。別の態様において、NK前駆細胞からNK細胞を分化させるための方法の継続期間は、1週間よりも長い。別の態様において、NK前駆細胞からNK細胞を分化させるための方法の継続期間は、約2週間である。別の態様において、NK前駆細胞からNK細胞を分化させるための方法の継続期間は、2週間よりも長い。

【００７１】

培養下のNK前駆細胞の集団をピリミドインドール化合物に接触させることによって、NK細胞の出現頻度は増加し得る。NK細胞の出現頻度の増加とは、より早いある時点と比較した、ある時点での培養における全細胞の割合に対するNK細胞の割合の増加を意味する。たとえば、CD56の発現が、分化したNK細胞の尺度として使用される場合、所与の時

点でのNK細胞の出現頻度は、以下の式によって決定される： $CD56^+$細胞の数 /（$CD56^+$細胞の数 + $CD56^-$細胞の数）。

【００７２】

また、培養下のNK前駆細胞の集団をピリミドインドール化合物に接触させることによって、NK細胞の数（すなわち産生量）は増加し得る。NK細胞の数の増加とは、より早いある時点と比較した、ある時点におけるNK細胞の数の増加を意味する。たとえば、CD56の発現が、分化したNK細胞の尺度として使用される場合、所与の時点でのNK細胞の数は、$CD56^+$細胞の数を計数することによって決定される。

【００７３】

本明細書において開示される方法にしたがって分化させたNK細胞は、表現型マーカーであるCD56を発現し得る。たとえば、本開示の分化したNK細胞のうち、約40％が$CD56^+$であり得る。または、本開示の分化したNK細胞のうち、約50％が$CD56^+$であり得る。または、本開示の分化したNK細胞のうち、約60％が$CD56^+$であり得る。または、本開示の分化したNK細胞のうち、約70％が$CD56^+$であり得る。または、本開示の分化したNK細胞のうち、70％超が$CD56^+$であり得る。または、本開示の分化したNK細胞のうち、80％超が$CD56^+$であり得る。特定の態様において、本開示の分化したNK細胞のうち、〉70％が$CD56^+$であり得る。

【００７４】

本明細書において開示される方法にしたがって分化させたNK細胞はまた、自然細胞傷害性マーカーを発現し得、これはたとえば、NKp30、および／またはNKp44、および／またはNKp46などである。したがって、本開示の分化したNK細胞は、細胞傷害性であり得る。標準的な細胞傷害性アッセイにおいて、本開示の分化したNK細胞は、標的細胞に対して細胞傷害性を発揮し得る。特定の態様において、標的細胞はK562細胞株であり得、かつ本開示の分化したNK細胞は、成体ドナーの末梢血から単離されたNK細胞に匹敵する殺傷能力を獲得し得る。たとえば、成体ドナーの末梢血から単離されたNK細胞は、約90％、または約80％、または約70％、または約60％、または約50％、または約40％、または約30％の、特異的な溶解の％を達成し得る。特定の態様において、本開示の分化したNK細胞、および成体ドナーの末梢血から単離されたNK細胞は、それぞれ、約70％の殺傷能力を獲得する。いくつかの態様において、殺傷アッセイを実施する前に、分化したNK細胞を最初に活性化することが望ましい場合があり得る。当業者は、NK細胞をどうやって活性化させるかについてよく理解しており、これは、十分な長さの期間にわたり、NK細胞をIL-2またはIL-15に曝露することを含み得る。

【００７５】

本明細書において開示される方法にしたがって分化させたNK細胞はまた、成熟NK細胞に関連する他のマーカーを発現し得、これはたとえば、NKG2D、および／またはCD16、および／またはCD94、および／またはKIRなどである。

【００７６】

本明細書において開示される方法にしたがって分化させたNK細胞はまた、適切な刺激の際に、たとえばPMA／イオノマイシンを用いた適切な刺激の際に、IFNγを産生し得る。細胞内IFNγは、ブレフェルジンAを用いた処理の後で検出され得る。1つの態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約30％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約40％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約50％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約60％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約70％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約80％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の約90％が、細胞内IFNγを産生する。別の態様において、適切に刺激されている、本開示の分化したNK細胞の90％超が、細胞内IFNγを産生する。

【００７７】
重要なことに、本明細書において開示される方法にしたがって分化させたＮＫ細胞の大半は、Ｔ細胞系列に関連するいくつかのマーカーを発現しない。１つの態様において、本開示の分化したＮＫ細胞のうち、５％未満がＣＤ３を発現する。別の態様において、本開示の分化したＮＫ細胞のうち、４％未満がＣＤ３を発現する。別の態様において、本開示の分化したＮＫ細胞のうち、３％未満がＣＤ３を発現する。別の態様において、本開示の分化したＮＫ細胞のうち、２％未満がＣＤ３を発現する。別の態様において、本開示の分化したＮＫ細胞のうち、１％未満がＣＤ３を発現する。本開示の分化したＮＫ細胞中における、ＣＤ３発現の非存在、またはＣＤ３発現の本質的な非存在は、該細胞がＴ細胞でもＮＫＴ細胞でもないことを示唆する。

【００７８】
上述の方法を実施することによって、インビトロで分化させたＮＫ細胞を大量に入手することが可能であり得る。そのようなインビトロで分化させたＮＫ細胞は、その後の細胞療法への適用に使用され得る。そのようなインビトロで分化させたＮＫ細胞を使用する前に、そのようなＮＫ細胞を、たとえば遺伝子編集技術などによって、トランスジェニックＮＫ細胞とすることが望ましい場合があり得る。したがって、トランスジェニックＮＫ細胞を産生することが望まれる際には、本開示の培地および方法を用いてＮＫ前駆細胞の集団をＮＫ細胞へと分化させる前に、トランスジェニックＨＳＰＣまたはトランスジェニックＮＫ前駆細胞をクローナルに拡大することが望ましい場合があり得る。

【００７９】
以下の非限定的な実施例は、本開示の例証である。

【実施例】

【００８０】
実施例１：細胞の調製および培養
ヒトＣＢ試料はBloodworks NW（Seattle, WA）から入手し、そしてＣＤ３４$^{+}$細胞は、EasySep（商標）ヒト臍帯血ＣＤ３４ポジティブセレクションキットII（Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit II）（STEMCELL Technologies, カタログ番号17896）を用いて単離した。この方法で得られるＣＤ３４$^{+}$細胞の純度は、典型的には９０％超である。

【００８１】
２４ウェルプレートのウェルは、StemSpan（商標）リンパ系細胞分化コーティングサプリメント（STEMCELL Technologies, カタログ番号09925）を用いてコートされ、そして１ウェルにつき５０００個のＣＤ３４$^{+}$細胞がプレーティングされた。ＣＤ３４$^{+}$細胞は、リンパ系前駆細胞拡大サプリメント（STEMCELL Technologies, カタログ番号09915）を添加されたStemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09605、09655）において、３～４日ごとに培地交換を行いながら、１４日間まで培養された。

【００８２】
１４日間の培養後、ＣＤ３４$^{+}$細胞由来ＮＫ前駆細胞が採取された。コートされていない２４ウェル組織培養プレートに、１ウェルにつき５０,０００個のＮＫ前駆細胞がプレーティングされた。プレーティングされたＮＫ前駆細胞は、ＮＫ細胞分化サプリメント（NK Cell Differentiation Supplement）（STEMCELL Technologies, カタログ番号09950）を添加されたＮＫ細胞分化培地（すなわち、StemSpan（商標）SFEM II（STEMCELL Technologies, カタログ番号09605、09655）において２週間まで培養され、そして３～４日ごとに培地交換を行いながら、さらに２週間培養された。ＵＭ７２９またはＵＭ１７１は、第１４日～第２８日に、サプリメントを添加されているＮＫ細胞分化培地へと添加された。解析またはその後の適用のため、第２８日に細胞は採取された。

【００８３】
採取された細胞は染色され、そして、ＮＫ細胞系列マーカーであるＣＤ５６の発現に関して、フローサイトメトリーによって測定された。死細胞は、光散乱プロファイル、および７

-AAD染色またはDRAQ7染色によって除外された。図1および2における「0」との条件（x軸にプロットされている）での結果は、上述のプロトコルにしたがっているがUM171またはUM729が非存在である実験の結果として生じる、CD56+ NK細胞の出現頻度および産生量を示す。細胞数は、NucleoCounter NC250を用いて取得した。産生量は、結果的に生じた細胞の数を、最初に播種した細胞の数で割ることによって算定された。特定の細胞タイプの産生量は、全産生量に、細胞の出現頻度をかけることによって取得された。

【００８４】

実施例2：NK細胞への分化に対する、ピリミドインドール化合物の効果

NK細胞分化培地における、NK前駆細胞の2週間までの培養（すなわち、培養第14日～第28日）が、UM171もしくはUM729の存在下かまたはUM171もしくはUM729の非存在下で行われた点を除いて、実施例1に記載されるように細胞は培養された。

【００８５】

UM171およびUM729の効果は、以下の濃度の範囲にわたって試験された：UM171に関して、0 nM、50 nM、100 nM、150 nM、および200 nM；ならびにUM729に関して、0 μM、0.25 μM、0.5 μM、1 μM、および2 μM。これらの実験の結果は、図1および2に要約される。

【００８６】

CD56+ NK細胞の出現頻度は、UM171に関しては100 nMの濃度において（図1A）、およびUM729に関しては1 μMの濃度において（図1B）、最大となるように見受けられた。CD56+ NK細胞の産生量もまた、UM171に関しては100 nMの濃度において（図2A）、およびUM729に関しては1 μMの濃度において（図2A）、最大となるように見受けられた。これらの結果に基づき、UM171に関しては100 nmの濃度が、およびUM729に関しては1 μMの濃度が、さらなる実験のために選択された。

【００８７】

このように、NK前駆細胞の分化培養にUM171またはUM729を添加すると、これらの分子の濃度が増加するにつれて、CD56+ NK細胞の出現頻度は増加した：UM171に関しては最大で100 nM、かつUM729に関しては最大で1 μM。全体的に見て、NK細胞の平均の出現頻度および平均の産生量は、ピリミドインドール化合物を含まない培養条件と比較して、100 nM UM171を含む培養条件において（図3A）、または1 μM UM729を含む培養条件において（図3B）、平均で約30％および2倍増加した。

【００８８】

実施例3：分化したNK細胞における、自然細胞傷害性受容体の発現

1 μM UM729の存在下で、実施例1および2に記載されるようにCD56+ NK細胞を分化させ、そして第28日に、既知のNK細胞マーカーの発現に関してフローサイトメトリーによって解析した。細胞を、示されるNK細胞マーカーに対する蛍光コンジュゲート抗体を用いて、15分間にわたり4℃で染色した。非特異的な結合は、FcRブロッカー、および5％のヒト血清またはラット血清を用いてブロックされた。死細胞は、光散乱プロファイル、および7-AAD染色またはDRAQ7染色によって除外した。調製された試料を、フローサイトメトリーによって解析した。

【００８９】

結果は以下を示す：解析された細胞のおよそ70％は、CD56およびNKp46を共発現する（図4A）；解析された細胞のおよそ80％は、CD56およびNKp44を共発現する（図4B）；ならびに解析された細胞のおよそ80％は、CD56およびNKp30を共発現する（図4C）。

【００９０】

実施例4：分化したNK細胞における、より成熟したNK細胞に関連するマーカーの発現

1 μM UM729の存在下で、実施例1および2に記載されるようにCD56+ NK細胞を分化させ、そして第28日に、既知のNK細胞マーカーの発現に関してフローサイトメトリーによって解析した。本実施例において記載されるマーカーに関して、本質的に実施例3に記

載されるように細胞を染色した。KIR分子についての染色を、抗体の2種類のクローンの組み合わせを用いて実施し、ここで該抗体は180704およびHP-MA4であり、それぞれKIR分子の異なるサブセットを認識する。死細胞は、光散乱プロファイル、および7-AAD染色またはDRAQ7染色によって除外した。

【００９１】

結果は以下を示す：解析された細胞のおよそ50％は、CD56およびNKG2Dを共発現する（図5A）；解析された細胞のおよそ17％は、CD56およびCD16を共発現する（図5b）；解析された細胞のおよそ18％は、CD56およびCD94を共発現する（図5c）；ならびに解析された細胞のおよそ10％は、CD56およびKIRを共発現する（図5d）。

【００９２】

分化したCD56$^+$ NK細胞によるIFNγの産生もまた測定された。IFNγの細胞内染色のため、分化したCD56$^+$ NK細胞は、PMA／イオノマイシンを用いて2時間にわたり刺激された。ブレフェルジンAが添加され、そして細胞はさらに2時間インキュベートされた。細胞は採取され、そしてCD56、およびZombie NIR生死判定色素に関して染色され、その後、固定され、透過処理され、そして細胞内IFNγに関して染色された。図5Eにおける結果は、分化したCD56$^+$ NK細胞のおよそ58％が、刺激された際に細胞内IFNγを発現することを示す。

【００９３】

実施例5：分化した細胞における、T細胞マーカーの発現の欠如

ピリミドインドール化合物の存在下で、実施例1および2に記載されるようにCD56$^+$ NK細胞を分化させ、そして第28日に、T細胞マーカーの発現に関してフローサイトメトリーによって解析した。解析された細胞は、CD3に関して、本質的に実施例3に記載されるように染色された。死細胞は、光散乱プロファイル、および7-AAD染色またはDRAQ7染色によって除外された。

【００９４】

第1のドナーの臍帯血試料から分化させ、100 nM UM171の存在下で培養された細胞中で、CD3の発現は事実上存在しなかった（図6A）。同様に、第2のドナーの臍帯血試料から分化させ、100 nM UM171の存在下（図6B）、または1 μM UM729の存在下（図6C）で培養された細胞中で、CD3の発現は事実上存在しなかった。

【００９５】

これらの結果は、分化したCD56$^+$細胞が、T細胞でもNKT細胞でもないことを示唆する。

【００９６】

実施例6：分化したCD56$^+$ NK細胞は細胞傷害性である

1 μM UM729の存在下で、実施例1および2に記載されるようにCD56$^+$ NK細胞を分化させ、そして第28日に、K562標的細胞に対するその細胞傷害性に関して解析した。

【００９７】

細胞傷害性アッセイのため、インビトロで産生されたCD56$^+$ NK細胞は、カルセインAM標識されたK562細胞と、5:1のエフェクター細胞（NK細胞）対標的細胞（K562細胞）の比で4時間にわたり共培養され、そして上清は、殺傷された標的細胞からの蛍光カルセインの放出に関して解析された。

【００９８】

EasySep（商標）（STEMCELL Technologies, カタログ番号はそれぞれ17955および19359）を用いて単離された、末梢血（PB）のNK細胞および単球もまた、それぞれ陽性対照および陰性対照として、上述したのと同じ比において、標識されたK562細胞と共培養された。PB NK細胞は、ピリミドインドール化合物不含有である点以外は実施例2の培地において、一晩培養され、一方でPB単球は、StemSpan（商標）SFEM II単独において一晩培養された。

【００９９】

カルセインの自然放出を検出するため、カルセインAM標識されたK562標的のみを含む対照ウェルがセットアップされた。最大放出を測定するため、標識されたK562細胞は、

1% Triton（商標）X-100を用いて処理された。インキュベーション後、プレートは500 x gで5分間遠心分離され、そして100 μLの上清が黒色プレートに移され、そしてSpectraMax（登録商標）マイクロプレートリーダーを用いて解析された（励起 485 nm／蛍光 530 nm）。結果は、特異的な溶解の%として表される：[(試験による放出 - 自然放出) x 100] / (最大放出 - 自然放出)。

【０１００】

図7は、本明細書において記載されるように分化させたNK細胞は、K562標的細胞を殺傷することが可能であり、かつそれらの殺傷能力は、成人ドナーの末梢血から単離されたNK細胞のものと同様であることを示す。

【０１０１】

実施例7：ピリミドインドール化合物の効果は、NK前駆細胞に対して特異的である

$CD34^+$ CB細胞は、実施例1に記載されるように単離および培養された。$CD34^+$ HSPCのNK細胞への分化に対するUM171の効果を調べるために、第0日～第14日の培地に100 nM UM171がさらに添加された点を除き、実施例1および2のように、第0日～第14日の培養と第14日～第28日の培養とで異なる培地が使用された。

【０１０２】

これらの実験において、UM171は、異なる時点で培養に添加された：第0日～第14日（+/-）；第14日～第28日（-/+）；または第0日～第28日（+/+）。UM171非含有の培養もまたセットアップされた（-/-）。細胞は、第28日の時点のCD56の発現（図8）、または第14日の時点のCD7およびCD5の発現（図9）のいずれかに関して解析された。

【０１０３】

第14日～第28日の間にUM171に曝露された培養物（-/+）は、この期間にUM171を欠く培養物（-/-）と比較した場合に、NK細胞の出現頻度および産生量が増加し、かつ、第0日～第14日の間にUM171に曝露された培養物（+/-）は、第0日～第14日にUM171を欠く培養物（-/-）と比較して、$CD56^+$細胞の出現頻度および産生量が低下した（図8Aおよび図8B）。（+/+）との条件は、第14日～第28日の間にUM171を含有させると、第0日～第14日の培養物に対するこの化合物の効果を埋め合わせることができることを示す。

【０１０４】

図9Aおよび9Bは、第0日～第14日にUM171をさらに添加された培地における、$CD34^+$ HSPCの培養の結果を示す。第14日において、第0日～第14日の間にUM171を添加されなかった培養物と比較して、$CD7^+CD5^+$ NK前駆細胞の出現頻度および産生量における明らかな低下が観察された（図9Aおよび9B）。

【０１０５】

総合すると、これらのデータは、UM171は、$CD34^+$ HSPCからのNK前駆細胞の産生を促進しない（かつ実際には阻害し得る）（図8および9）が、UM171は、NK前駆細胞のNK細胞への分化を促進する（図8）ことを、証明する。

【０１０６】

実施例8：NK前駆細胞の表現型の特徴付け

実施例1に記載されるように、$CD34^+$ CB細胞は単離され、そして第14日の時点まで培養された。14日間の培養後の、CB $CD34^+$ HSPCに由来するNK前駆細胞は、マーカーであるCD5、CD7、およびCD56に対する抗体を用いて、本質的に実施例3に記載されるように染色された。BD FACSAria Fusion蛍光活性化セルソーターを用いて、$CD56^-$細胞がゲーティングされ、そして$CD7^+CD5^-$細胞、$CD7^+CD5^+$細胞、$CD5^-CD7^-$細胞がソートされた。

【０１０７】

2週間の培養後、CB $CD34^+$細胞から分化した細胞の大半は$CD56^-$であり（図10A）、かつこれらの細胞は、$CD7^+CD5^-$細胞、$CD7^+CD5^+$細胞、および$CD7^-CD5^-$細胞から本質的に構成される、不均一な集団を含む。

【０１０８】

第14日のNK前駆細胞の集団の、どのサブセットがピリミドインドール化合物の標的となるのかを調べるため、$CD7^+CD5^-$、$CD7^+CD5^+$、および$CD7^-CD5^-$である、ソートされた集団が、UM729非含有または含有NK細胞分化培地において、さらに14日間、それぞれ培養された。

【０１０９】

結果は、$CD7^+CD5^+$細胞および$CD7^+CD5^-$細胞がUM729に応答し、かつこれら細胞が、UM729を欠く培養条件と比較して高出現頻度（図11A）かつ高産生量（図11B）でNK細胞へと分化することを示す。$CD7^-CD5^-$細胞は拡大せず、かつ、UM729の存在下または非存在下のいずれにおいてもNK細胞に分化しなかった。UM729の存在下で、$CD7^+CD5^+$細胞は、$CD7^+CD5^-$細胞と比較して高出現頻度かつ高産生量でNK細胞を産生し、かつしたがって、この集団は、UM729に応答して$CD56^+$ NK細胞へと分化する、NK前駆細胞の主たる集団であるように見受けられる（図11）。

【０１１０】

<u>実施例9：芳香族炭化水素受容体アンタゴニストは、NK細胞への分化に負の影響を及ぼす</u>

ピリミドインドール化合物以外の化合物が、たとえば芳香族炭化水素受容体（AhR）アンタゴニストなどが、培養下のHSPCを拡大させることが報告されている。そこで、NK前駆細胞の分化に対するAhRアンタゴニストの効果もまた試験された。

【０１１１】

実施例1に記載されるように、$CD34^+$ CB細胞は単離され、そして第14日の時点まで培養された。第14日に、ピリミドインドール化合物を添加されていないが5 μM CH223191の存在下または非存在下である点を除いて、本質的に実施例1に記載されるように、NK前駆細胞はNK細胞分化培地においてさらに培養された。

【０１１２】

データは、NK前駆細胞の分化培養へのCH223191の添加が、$CD56^+$ NK細胞の出現頻度（図12A）および産生量（図12B）の減少をもたらすことを示す。これは、NK前駆細胞のNK細胞への分化に対する、観察された効果が、ピリミドインドール化合物に特異的であるが、AhRアンタゴニストについてはそうではないことを示唆する。

【０１１３】

<u>実施例10：$CD34^+$細胞のNK前駆細胞は、ピリミドインドール化合物に応答しない</u>

実施例1に記載されるように、$CD34^+$ CB細胞は単離され、そして第14日の時点まで培養された。14日間の培養後の、CB $CD34^+$ HSPCに由来するNK前駆細胞は、マーカーであるCD5、CD7、CD34、およびCD56に対する抗体を用いて、本質的に実施例3に記載されるように染色された。BD FACSAria Fusion蛍光活性化セルソーターを用いて、$CD56^-$細胞がゲーティングされ、そして$CD34^+CD7^+CD5^-$および$CD34^+CD7^+CD5^+$、ならびに$CD34^-CD7^+CD5^-$および$CD34^-CD7^+CD5^+$がソートされた。$CD7^-$細胞は、陰性対照としてソートされた。

【０１１４】

第14日のNK前駆細胞の集団の、どのサブセットがピリミドインドール化合物の標的となるのかを調べるため、$CD34^+CD7^+CD5^-$および$CD34^+CD7^+CD5^+$、ならびに$CD34^-CD7^+CD5^-$および$CD34^-CD7^+CD5^+$である、ソートされた集団が、UM729含有または非含有NK細胞分化培地において、さらに14日間、それぞれ培養された。

【０１１５】

結果は、$CD34^-CD7^+CD5^-$細胞および$CD34^-CD7^+CD5^+$細胞のみがUM729に応答し、かつこれら細胞が、UM729を欠く培養条件と比較して高出現頻度（図13A）かつ高産生量（図13B）でNK細胞へと分化することを示す。したがって、より未成熟な$CD34^+$ NK前駆細胞サブセットは、UM729の効果に対して応答性であるようには見受けられない。

【０１１６】

<u>実施例11：PSCからのNK細胞の分化に対する、ピリミドインドール化合物の効果</u>

3種類の人工多能性幹細胞（iPSC）株 － WLS-1C、STiPSC M001、およびSTiPS F

016 －、ならびに1種類の胚性幹細胞（ESC）株 － H1 － が、mTeSR（商標）1中で維持された。PSCは採取され、そしてアキュターゼを用いて単一細胞懸濁液へと解離され、そして37 μmリバーシブルストレーナー（STEMCELL Technologies）を用いて濾過された。

【０１１７】

細胞500個の凝集体を形成させるため、PSCの単一細胞懸濁液は、AggreWellプレート（STEMCELL Technologies）中に播種された。播種された細胞は、中胚葉分化培地および10 μM Y027632（STEMCELL Technologies）中で培養された。3日間の培養後（すなわち第3日に）、造血系列への分化を誘導するために、培地が交換された。7日間の培養後に（すなわち第10日に）、凝集体を採取し、そしてコラゲナーゼIIおよびトリプシン含有溶液を用いて解離させた。

【０１１８】

解離させた細胞は、EasySep（商標）ヒトCD34ポジティブセレクションキットII（STEMCELL Technologies, カタログ番号17856）を用いて、$CD34^+$細胞について富化された。$CD34^+$細胞をNK前駆細胞へと分化させるため、富化された$CD34^+$細胞は、StemSpan（商標）リンパ系前駆細胞拡大サプリメント（STEMCELL Technologies）を添加されたStemSpan（商標）SFEM II培地（STEMCELL Technologies）中において、StemSpan（商標）リンパ系細胞分化コーティングマテリアル（Lymphoid Differentiation Coating Material）（STEMCELL Technologies）でコートされたプレートへと、5 x 10^4 細胞/mLでプレーティングされ、そして14日間培養された。半量の培地交換が、3～4日ごとに実施された。

【０１１９】

14日間の培養後、NK前駆細胞の集団は、UM729の存在下または非存在下のいずれかで、NK細胞分化培地中において、コートされていないプレートへと1 x 10^5 細胞/mLで再プレーティングされ、そしてさらに14日間培養された。

【０１２０】

CD56に関して、本質的に実施例3に記載されるように細胞は染色され、そして$CD56^+$細胞の出現頻度に関して、および投入された5 x 10^4個のPSC由来$CD34^+$細胞あたりの$CD56^+$細胞の産生量に関して解析された。$CD56^+$細胞の出現頻度（図14A）および産生量（図14B）は両方とも、UM729の存在下でPSC由来NK前駆細胞集団を培養した後で、UM729の非存在下でそのような細胞を培養した場合と比較して増加した。したがって、PSC由来NK前駆細胞の培養において、第24日～第38日の間にUM729が存在すると、$CD56^+$細胞の出現頻度および産生量が増加する。

【０１２１】

<u>実施例12：ピリミドインドール化合物は、PSC由来$CD34^+$細胞のNK前駆細胞への分化を阻害する</u>

PSC由来$CD34^+$細胞は、実施例11に記載されるように産生させた。NK前駆細胞の集団の分化に対する、1μM UM729の存在または非存在の効果が評価された点を除いて、PSC由来$CD34^+$細胞は、実施例11に記載されるように培養された。

【０１２２】

本質的に実施例3に記載されるように、細胞はCD5およびCD7に関して染色され、そして$CD5^+CD7^+$細胞の出現頻度に関して、および投入された5 x 10^4個のPSC由来$CD34^+$細胞あたりの$CD5^+CD7^+$細胞の産生量に関して解析された。$CD5^+CD7^+$細胞の出現頻度（図15A）および産生量（図15B）は両方とも、UM729の存在下でPSC由来$CD34^+$細胞を培養した後で、UM729の非存在下でそのような細胞を培養した場合と比較して減少した。したがって、PSC由来$CD34^+$細胞の培養において、第10日～第24日の間にUM729が存在すると、$CD5^+CD7^+$ NK前駆細胞の出現頻度および産生量が減少する。

【０１２３】

本発明は、現時点で好ましい実施例と考えられるものを参照して記載されているが、本発明は、開示される実施例に限定されるものではないことが理解されるべきである。そうで

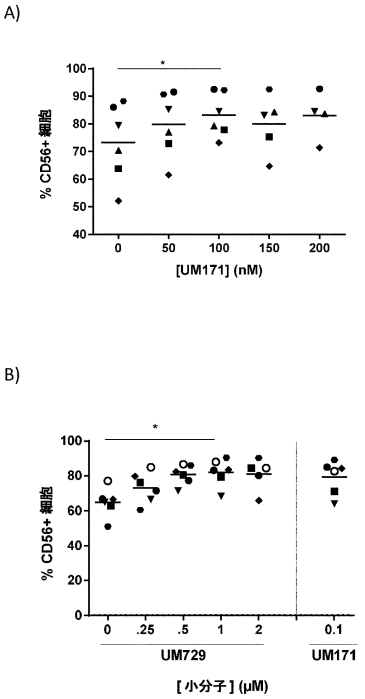
はなく、本発明は、添付の特許請求の範囲の精神内および範囲内に含まれる、さまざまな改変および等価の取り合わせを包含することが、意図される。

【０１２４】

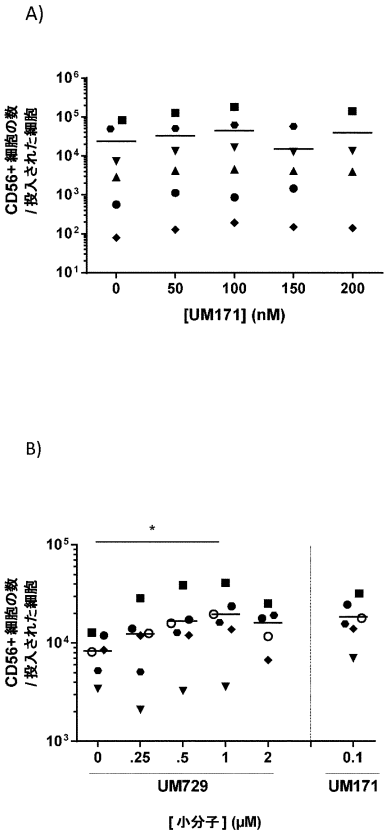
すべての刊行物、特許、および特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願がそれぞれ、その全体が参照により組み入れられるように具体的にかつ個々に示された場合と同程度に、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【図面】

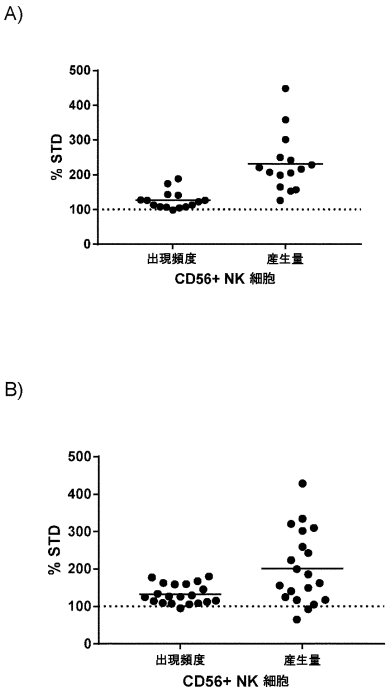
【図１】



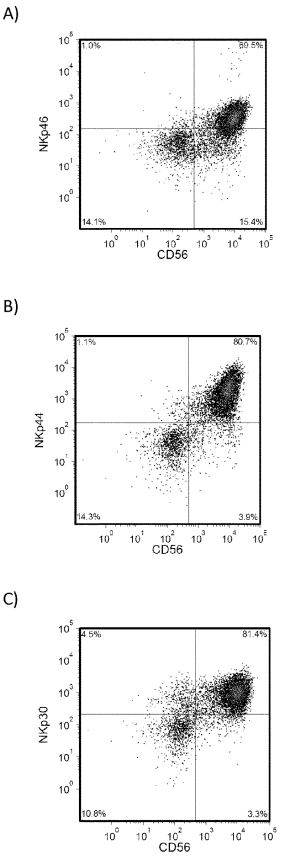
【図２】



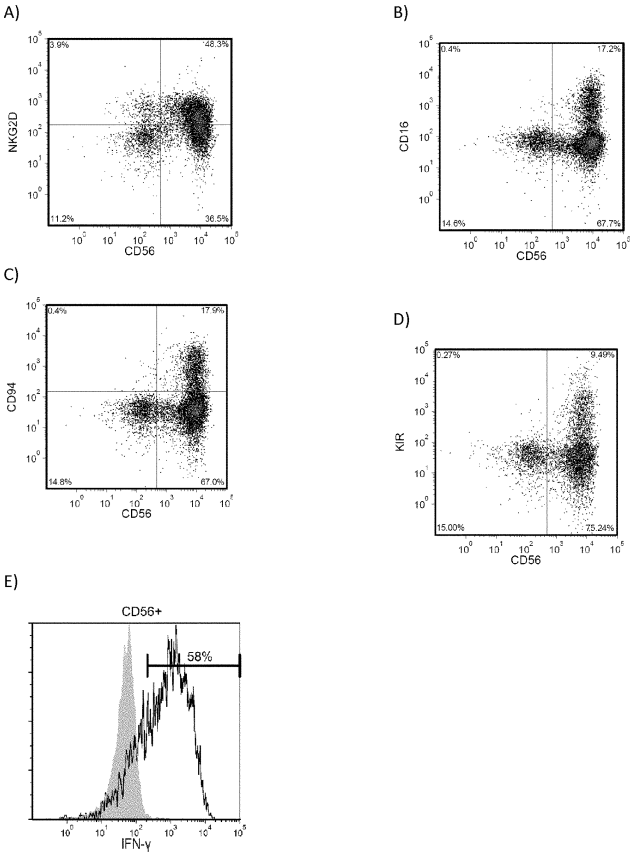
【図３】


A)
% STD
出現頻度
産生量
CD56+ NK 細胞
B)
% STD
出現頻度
産生量
CD56+ NK 細胞

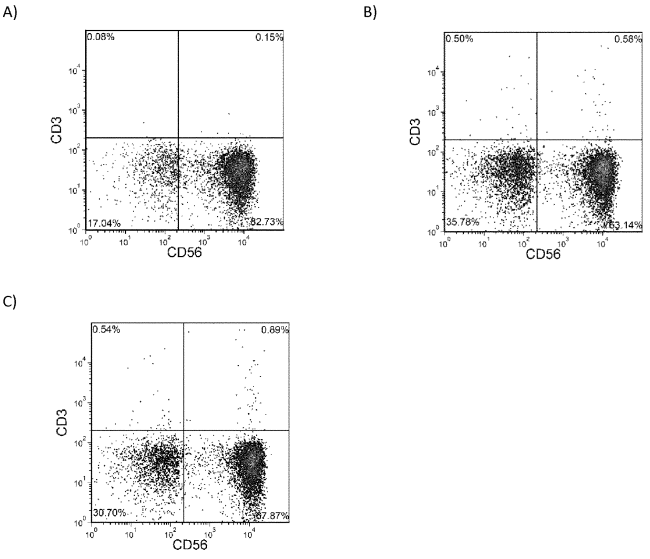
【図４】


A)
NKp46
CD56
B)
NKp44
CD56
C)
NKp30
CD56

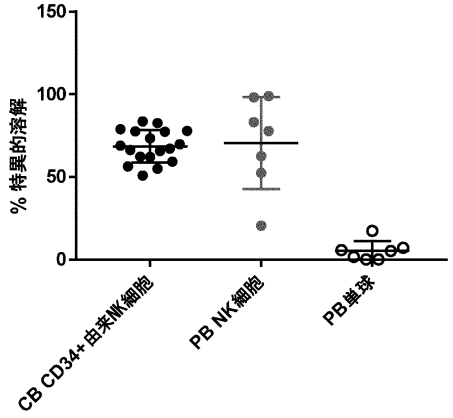
【図５】


A)
NKG2D
CD56
B)
CD16
CD56
C)
CD94
CD56
D)
KIR
CD56
E)
CD56+
58%
IFN-γ

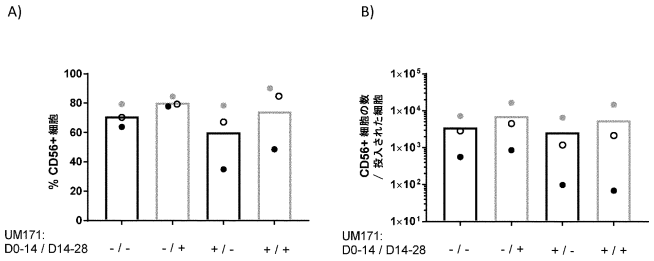
【図６】


A)
CD3
CD56
B)
CD3
CD56
C)
CD3
CD56

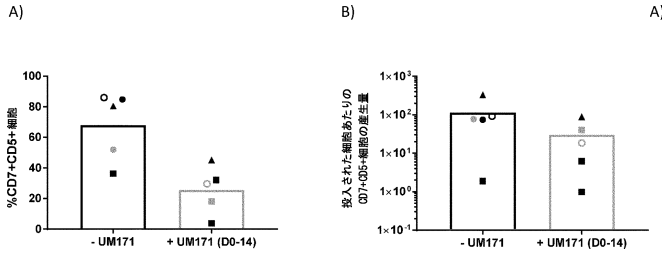
【図７】



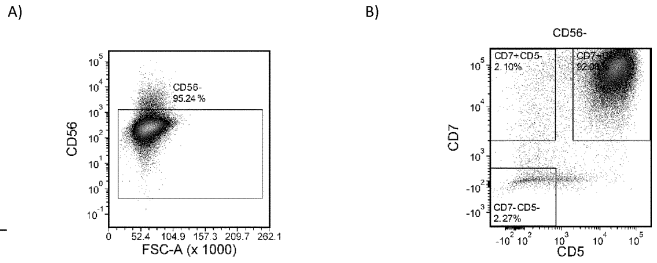
【図８】



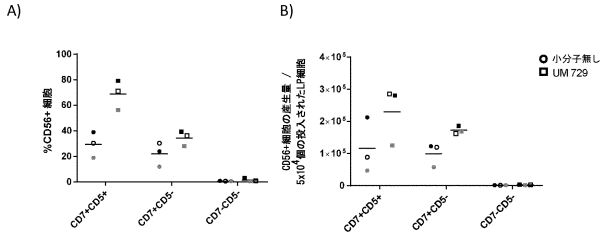
【図９】



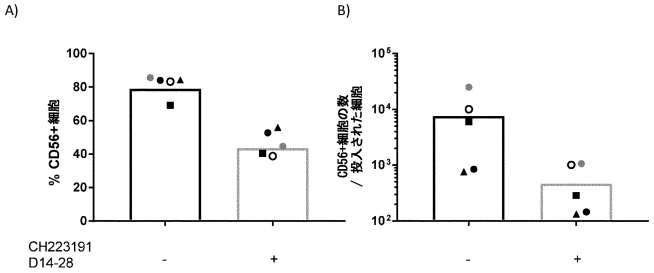
【図１０】



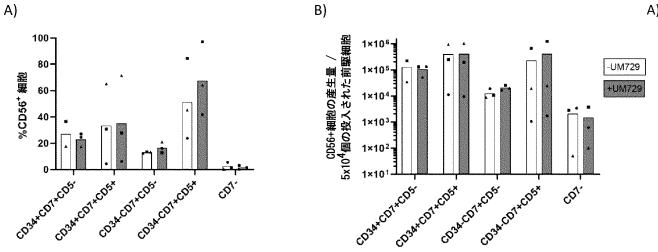
【図１１】



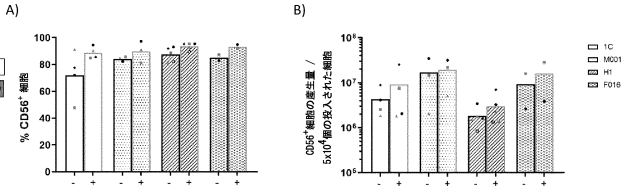
【図１２】



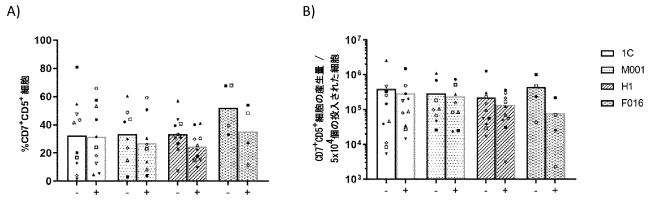
【図１３】


A)
B)
%CD56+細胞
CD56+細胞の産生量 / 5x10^4個の投入された前駆細胞
-UM729
+UM729
CD34+CD7+CD5-
CD34+CD7+CD5+
CD34-CD7+CD5-
CD34-CD7+CD5+
CD7-

【図１４】


A)
B)
% CD56+ 細胞
CD56+細胞の産生量 / 5x10^4個の投入された細胞
1C
M001
H1
F016

【図１５】


A)
B)
%CD7+CD5+細胞
CD7+CD5+細胞の産生量 / 5x10^4個の投入された細胞
1C
M001
H1
F016

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2019/051875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: ***C12N 5/0783*** (2010.01), ***C12N 5/02*** (2006.01), ***C12N 5/0789*** (2010.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Keywords used across the whole IPC

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: STN (CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, PQSCITECH, SCISEARCH, PCTFULL, CANPATFULL), Canadian Patent Database, Scopus, Google
Search terms: NK cell, NK progenitor, natural killer, differentiation, pyrimidoindole, UM171, UM729

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TABATABAEI-ZAVAREH, N et al. *Differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells to NK cells in a stroma-free, serum-free culture system.* Journal of Immunology, 1 May 2018 (01-05-2018), Vol. 200, Issue 1 Supplement, abstract 103.4, ISSN 1550-6606 *the whole document*	1-29
X	MESQUITTA, W-T et al. *Pyrimido-indole derivative, UM171 expands distinct types of myeloid and lymphoid progenitors from human pluripotent stem cells.* Blood, 29 November 2018 (29-11-2018), Vol. 132, Supplement 1: 3835 (abstract), ISSN 1528-0020 *the whole document*	1-4, 6, 8-18, 20-29
P, X	STEMCELL TECHNOLOGIES. *Expansion and Differentiation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Natural Killer Cells Using StemSpan™ Medium and Supplements.* Technical Bulletin, Document # DX22912, Version 1.0.1, November 2019 (11-2019) [online] Retrieved from https://www.stemcell.com/expansion-and-differentiation-of-hematopoietic-stem-and-progenitor-cells-into-natural-killer-cells-using-stemspan-medium-and-supplements.html	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"D"	document cited by the applicant in the international application	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"&"	document member of the same patent family
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 4 April 2020 (04-04-2020)	Date of mailing of the international search report 07 April 2020 (07-04-2020)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Julie Treadwell (819) 639-7663

フロントページの続き

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 タバタバエイーザバレ ヌーシン
カナダ ブイ６エー １ビー６ ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ステーション ストリート １６１８ スイート ５００
(72)発明者 ウォヌム アルベルトゥス ヴェルネルス
カナダ ブイ６エー １ビー６ ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー ステーション ストリート １６１８ スイート ５００

Ｆターム（参考） 4B065 AA92X AA94X AB01 BA01 BB13 BB19 CA44

【要約の続き】

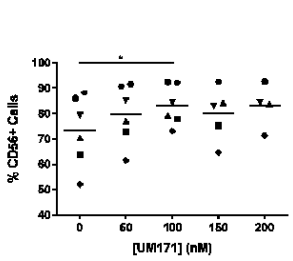


FIGURE 1