

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成31年2月21日 (2019.2.21)

【公表番号】特表2018-502115(P2018-502115A)

【公表日】平成30年1月25日 (2018.1.25)

【年通号数】公開・登録公報2018-003

【出願番号】特願2017-534937(P2017-534937)

【国際特許分類】

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/28 (2015.01)

A 6 1 K 35/50 (2015.01)

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0789 (2010.01)

【 F I 】

A 6 1 K 35/17

A 6 1 K 35/28

A 6 1 K 35/50

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 5/0789

【手続補正書】

【提出日】平成30年12月28日 (2018.12.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 4 1 3 】

本明細書で引用された全ての参考文献は、各々の個々の刊行物、特許、又は特許出願が、あらゆる目的のために、その全体として引用により具体的かつ個別に組み込まれることが示される場合と同じ程度に、あらゆる目的のために、引用により完全に本明細書中に組み込まれる。任意の刊行物の引用は、出願日前のその開示を目的としたものであり、本発明が先行発明を理由としてそのような刊行物に先行する資格がないという承認と解釈されるべきではない。

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成 1)

ナチュラルキラー細胞を含む細胞集団を産生する方法であって：

(a) 造血幹細胞又は前駆細胞を、幹細胞動員剤及びトロポポエチン (Tpo) を含む第1の培地中で培養して、第1の細胞集団を産生する工程；

(b) 該第1の細胞集団を、幹細胞動員剤及びインターロイキン-15(IL-15)を含み、かつTpoを欠いている第2の培地中で培養して、第2の細胞集団を産生する工程；並びに

(c) 該第2の細胞集団を、IL-2及びIL-15を含み、かつ幹細胞動員剤及びLMWHを欠いている第3の培地中で培養して、第3の細胞集団を産生する工程；

を含み、

ここで、該第3の細胞集団が、CD56+、CD3-、CD16-又はCD16+、及びCD94+又はCD94-であるナチュラルキラー細胞を含み、かつ該ナチュラルキラー細胞の少なくとも80%が生存している、前記方法。

(構成2)

前記造血幹細胞がCD34+造血幹細胞である、構成1記載の方法。

(構成3)

前記造血幹細胞が胎盤造血幹細胞である、構成1記載の方法。

(構成4)

前記胎盤造血幹細胞が、ヒト胎盤灌流液から入手されるか又は入手可能である、構成3記載の方法。

(構成5)

前記胎盤造血幹細胞が、ヒト胎盤灌流液から単離される有核細胞から入手されるか又は入手可能である、構成3記載の方法。

(構成6)

前記Tpoが、前記第1の培地中に、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成7)

前記Tpoが、前記第1の培地中に、20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在する、構成6記載の方法。

(構成8)

前記Tpoが、前記第1の培地中に、約25ng/mLの濃度で存在する、構成6記載の方法。

(構成9)

前記IL-15が、前記第2の培地中に、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成10)

前記IL-15が、前記第2の培地中に、10ng/mL～30ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成11)

前記IL-15が、前記第2の培地中に、約20ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成12)

前記IL-2が、前記第3の培地中に、10U/mL～10,000U/mLの濃度で存在し、かつ前記IL-15が、前記第3の培地中に、1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成13)

前記IL-2が、前記第3の培地中に、300U/mL～3,000U/mLの濃度で存在し、かつ前記IL-15が、前記第3の培地中に、10ng/mL～30ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成14)

前記IL-2が、前記第3の培地中に、約1,000U/mLの濃度で存在し、かつ前記IL-15が、前記第3の培地中に、約20ng/mLの濃度で存在する、構成1記載の方法。

(構成15)

前記Tpo、IL-2、及びIL-15が、前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地の不確定成分に含まれない、構成1～14のいずれか1記載の方法。

(構成16)

前記Tpo、IL-2、及びIL-15が血清に含まれない、構成1～14のいずれか1記載の方法。

(構成17)

前記幹細胞動員剤がアリール炭化水素受容体阻害剤である、構成1～14のいずれか1記載の方法。

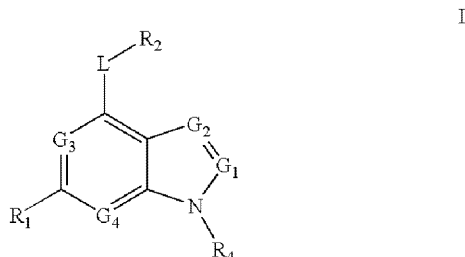
(構成18)

前記アリール炭化水素受容体阻害剤がレスベラトロールである、構成17記載の方法。

(構成19)

前記アリール炭化水素受容体阻害剤が、次式の化合物；又はその塩である、構成17記載の方法：

(化1)



(式中：

G_1 は、N及び CR_3 から選択され；

G_2 、 G_3 、及び G_4 は、CH及びNから独立に選択され；但し、 G_3 及び G_4 のうちの少なくとも1つはNであり；但し、 G_1 及び G_2 が両方ともNであることはなく；

Lは、 $--NR_{5a}(CH_2)_{0-3}--$ 、 $--NR_{5a}CH(C(O)OCH_3)CH_2--$ 、 $--NR_{5a}(CH_2)_2NR_{5b}--$ 、 $--NR_{5a}(CH_2)_2S--$ 、 $--NR_{5a}CH_2CH(CH_3)CH_2--$ 、 $--NR_{5a}CH_2CH(OH)--$ 、及び $--NR_{5a}CH(CH_3)CH_2--$ から選択され；ここで、 R_{5a} 及び R_{5b} は、水素及び C_{1-4} アルキルから独立に選択され；

R_1 は、水素、フェニル、チオフェニル、フラニル、1H-ベンゾイミダゾリル、イソキノリニル、1H-イミダゾピリジニル、ベンゾチオフェニル、ピリミジニル、1H-ピラゾリル、ピリジニル、1H-イミダゾリル、ピロリジニル、ピラジニル、ピリダジニル、1H-ピロリル、及びチアゾリルから選択され；ここで、 R_1 の該フェニル、チオフェニル、フラニル、1H-ベンゾイミダゾリル、イソキノリニル、1H-イミダゾピリジニル、ベンゾチオフェニル、ピリミジニル、1H-ピラゾリル、ピリジニル、1H-イミダゾリル、ピロリジニル、ピラジニル、ピリダジニル、1H-ピロリル、又はチアゾリルは、シアノ、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、 C_{1-4} アルコキシ、ハロ、ハロ置換 C_{1-4} アルキル、ハロ置換 C_{1-4} アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、 $--C(O)R_{8a}$ 、 $--S(O)_{0-2}R_{8a}$ 、 $--C(O)OR_{8a}$ 、及び $--C(O)NR_{8a}R_{8b}$ から独立に選択される1~3個のラジカルによって任意に置換されることができ；ここで、 R_{8a} 及び R_{8b} は、水素及び C_{1-4} アルキルから独立に選択され；但し、 R_1 及び R_3 が両方とも水素であることはなく；

R_2 は、 $--S(O)_2NR_{6a}R_{6b}$ 、 $--NR_{9a}C(O)R_{9b}$ 、 $--NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}$ 、フェニル、1H-ピロロピリジン-3-イル、1H-インドリル、チオフェニル、ピリジニル、1H-1,2,4-トリアゾリル、2-オキソイミダゾリジニル、1H-ピラゾリル、2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾイミダゾリル、及び1H-インダゾリルから選択され；ここで、 R_{6a} 、 R_{6b} 、及び R_{6c} は、水素及び C_{1-4} アルキルから独立に選択され；ここで、 R_2 の該フェニル、1H-ピロロピリジン-3-イル、1H-インドリル、チオフェニル、ピリジニル、1H-1,2,4-トリアゾリル、2-オキソイミダゾリジニル、1H-ピラゾリル、2-オキソ-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾイミダゾリル、又は1H-インダゾリルは、ヒドロキシ、ハロ、メチル、メトキシ、アミノ、 $--O(CH_2)_nNR_{7a}R_{7b}$ 、 $--S(O)_2NR_{7a}R_{7b}$ 、 $--OS(O)_2NR_{7a}R_{7b}$ 、及び $--NR_{7a}S(O)_2R_{7b}$ から独立に選択される1~3個のラジカルで任意に置換されており；ここで、 R_{7a} 及び R_{7b} は、水素及び C_{1-4} アルキルから独立に選択され；

R_3 は、水素、 C_{1-4} アルキル、及びビフェニルから選択され；かつ

R_4 は、 C_{1-10} アルキル、プロパ-1-エン-2-イル、シクロヘキシル、シクロプロピル、2-(2-オキソピロリジン-1-イル)エチル、オキセタン-3-イル、ベンズヒドリル、テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル、テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル、フェニル、テトラヒドロフラン-3-イル、ベンジル、(4-ペンチルフェニル)(フェニル)メチル、及び1-(1-(2-オキソ-6,9,12-トリオキサ-3-アザテトラデカン-14-イル)-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)エチルから選択され；ここで、該アルキル、シクロプロピル、シクロヘキシル、2-(2-オキソピロリジン-1-イル)エチル、オキセタン-3-イル、オキセタン-2-イル、ベンズヒドリル、テトラ

ヒドロ-2H-ピラン-2-イル、テトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル、テトラヒドロ-2H-ピラン-4-イル、フェニル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロフラン-2-イル、ベンジル、(4-ペンチルフェニル)(フェニル)メチル、又は1-(1-(2-オキソ-6,9,12-トリオキサ-3-アザテトラデカン-14-イル)-1H-1,2,3-トリアゾール-4-イル)エチルは、ヒドロキシ、 C_{1-4} アルキル、及びハロ置換 C_{1-4} アルキルから独立に選択される1~3個のラジカルで任意に置換されることができる。)

(構成20)

前記アリール炭化水素受容体阻害剤が、StemRegenin-1(SR-1)(4-(2-(2-(ベンゾ[b]チオフェン-3-イル)-9-イソプロピル-9H-プリン-6-イルアミノ)エチル)フェノール)である、構成15記載の方法。

(構成21)

前記アリール炭化水素受容体阻害剤が、化合物CH223191(1-メチル-N-[2-メチル-4-[2-(2-メチルフェニル)ジアゼニル]フェニル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド]である、構成17記載の方法。

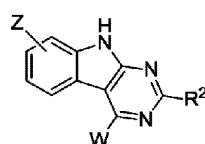
(構成22)

前記幹細胞動員剤がピリミド(4,5-b)インドール誘導体である、構成1~16のいずれか1記載の方法。

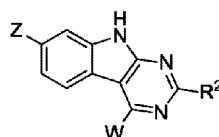
(構成23)

前記ピリミド(4,5-b)インドール誘導体が、以下のうちの1つもしくは複数:又はその塩もしくはプロドラッグである、構成22記載の方法:

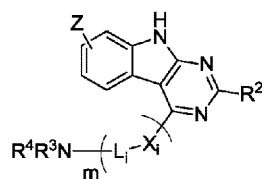
(化2)



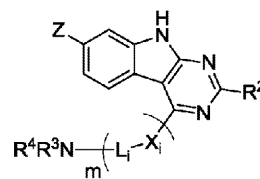
I



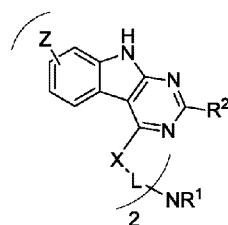
II



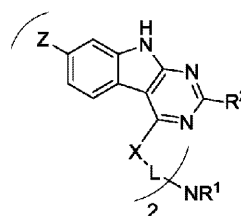
III



IV



V



VI

(式中:

Zは、

1) -P(O)(OR<1>)(OR<1>)、

2) -C(O)OR<1>、

3) -C(O)NHR<1>、

4) -C(O)N(R)R<1>、

5) -C(O)R<1>、

- 6) -CN、
7) -SR、
8) -S(0)2NH₂、
9) -S(0)2NHR<1>、
10) -S(0)2N(R)R<1>、
11) -S(0)R<1>、
12) -S(0)2R<1>、
13) -L、
14) 1つ、2つ、もしくは3つのR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-ベンジル、
15) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-ヘテロアリールであって、
該置換基が該L及び該ヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、
16) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-ヘテロシクリルであって、
該置換基が該L及び該ヘテロシクリル基の一方もしくは両方に結合しているもの、
17) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-アリールであって、該置換
基が該L及び該ヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、
18) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-ヘテロアリール、又は
19) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-アリール
 であり、ここで、各々の置換基は、それがまだ存在しないならば、該L基に任意に結合し
 ており、かつ(R<1>)及びR<1>が窒素原子に結合しているとき、任意に、それらは、該窒素
 原子と一緒にあって、N、O、及びSから選択される1以上の他のヘテロ原子を任意に含む3
 ~7員環を形成し、任意に、該環は、1以上のR<1>又はR<A>で置換されており；
 Wは、
1) -H、
2) -ハロゲン、
3) -OR<1>、
4) -L-OH、
5) -L-OR<1>、
6) -SR<1>、
7) -CN、
8) -P(0)(OR<1>)(OR<1>)、
9) -NHR<1>、
10) -N(R<1>)R<1>、
11) -L-NH₂、
12) -L-NHR<1>、
13) -L-N(R<1>)R<1>、
14) -L-SR<1>、
15) -L-S(0)R<1>、
16) -L-S(0)2R<1>、
17) -L-P(0)(OR<1>)(OR<1>)
18) -C(0)OR<1>、
19) -C(0)NH₂、
20) -C(0)NHR<1>、
21) -C(0)N(R<1>)R<1>、
22) -NHC(0)R<1>、
23) -NR₁C(0)R<1>、
-NHC(0)OR<1>、
-NR₁C(0)OR<1>、
-OC(0)NH₂、
-OC(0)NHR<1>、
-OC(0)N(R)R<1>、

-OC(0)R<1>、

-C(0)R<1>、

-NHC(0)NH₂、

-NHC(0)NHR<1>、

-NHC(0)N(R)R<1>、

-NR C(0)NH₂、

-NR C(0)NHR<1>、

-NR C(0)N(R)R<1>、

-NHS(0)2R<1>、

-NR S(0)2R<1>、

-S(0)2NH₂、

-S(0)2NHR<1>、

-S(0)2N(R)R<1>、

-S(0)R<1>、

-S(0)2R<1>、

-OS(0)2R₁、

-S(0)2OR<1>、

1つ、2つ、もしくは3つのR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-ベンジル

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-ヘテロアリールであって、該置換基が該L及び該ヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-ヘテロシクリルであって、該置換基が該L及び該ヘテロシクリル基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-アリールであって、該置換基が該L及びアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

-L-NR<1>(R<1>)、

-L-)2 NR<1>、

-L-(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-(N(R<1>)-L)_n-ヘテロアリールであって、該置換基が該L及びヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-(N(R<1>)-L)_n-ヘテロシクリルであって、該置換基が該L及びヘテロシクリル基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-(N(R<1>)-L)_n-アリールであって、該置換基が該L及びアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

-O-L-N(R)R<1>、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-O-L-ヘテロアリールであって、該置換基が該L及びヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-O-L-ヘテロシクリルであって、該置換基が該L及びヘテロシクリル基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-O-L-アリールであって、該置換基が該L及びアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

-O-L)2-NR<1>、

-O-L-(N(R)-L)_n-N(R)R<1>、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-O-L-(N(R<1>)-L)_n-ヘテロアリールであって、該置換基が該L及びヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-O-L-(N(R<1>)-L)_n-ヘテロシクリルであって、該置換基が該L及びヘテロシクリル基の一方もしくは両方に結合しているもの、

1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-O-L-(N(R<1>)-L)ⁿ-アリアル、
 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-S-L-ヘテロアリアル、
 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-S-L-ヘテロシクリル、
 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-S-L-アリアルであって、該置換基が該L及びアリアル基の一方もしくは両方に結合しているもの、

-S-L)² NR₁、

-S-L-(N(R₁)-L)''-N(R₁)R₁、

1以上のR<A>置換基で任意に置換された-S-L-(N(R<1>)-L)ⁿ-ヘテロアリアル、

1以上のR<A>置換基で任意に置換された-S-L-(N(R<1>)-L)ⁿ-ヘテロシクリル、

1以上のR<A>置換基で任意に置換された-S-L-(N(R<1>)-L)ⁿ-アリアル、

-NR<1>(R<1>)、

-(N(R₁)-L)ⁿ-N(R₁)R₁、

-N(R₁)L)²-NR₁、

76) -(N(R₁)-L)''-N(R₁)RA、

77) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-(N(R<1>)-L)ⁿ-ヘテロアリアル

、
 78) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-(N(R<1>)-L)ⁿ-ヘテロシクリル

、
 79) 1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-(N(R<1>)-L)ⁿ-アリアル、

80) 1以上のR<A>置換基で任意に置換された-ヘテロアリアル、又は

81) 1以上のR<A>置換基で任意に置換された-アリアル

であり、ここで、各々の置換基は、それがまだ存在しないならば、該L基に任意に結合しており、かつ2つのR<1>置換基が同じ窒素原子上に存在するとき、各々のR<1>置換基は、後に記載されるR<1>値のリストから独立に選択され、

ここで、nは、0、1、2、3、4、又は5のいずれかに等しい整数であり、

ここで、(R<1>)及びR<1>が窒素原子に結合しているとき、任意に、それらは、該窒素原子と一緒に、N、O、及びSから選択される1以上の他のヘテロ原子を任意に含む3~7員環を形成し、任意に、該環は、1以上のR<1>又はR<A>で置換されており、

Lは、

1) -C₁₋₆アルキル、

2) -C₂₋₆アルケニル、

3) -C₂₋₆アルキニル、

4) -C₃₋₇シクロアルキル、

5) -C₃₋₇シクロアルケニル、

6) ヘテロシクリル、

7) -C₁₋₆アルキル-C₃₋₇シクロアルキル、

8) -C₁₋₆アルキル-ヘテロシクリル、

9) アリアル、又は

10) ヘテロアリアル

であり、ここで、該アルキル、該アルケニル、該アルキニル、該シクロアルキル、該シクロアルケニル、該ヘテロシクリル、該アリアル、及び該ヘテロアリアル基は、各々独立に、1つ又は2つのR<A>置換基で任意に置換されており、

R_iは、

1) -H、

2) -C₁₋₆アルキル、

3) -C₂₋₆アルケニル、

4) -C₂₋₆アルキニル、

5) -C₃₋₇シクロアルキル、

6) -C₃₋₇シクロアルケニル、

7) -パーフルオロ化C₁₋₅、

8)-ヘテロシクリル、

9)-アリール、

10)-ヘテロアリール、

11)-ベンジル、又は

12)5-[(3aS,4S,6aR)-2-オキソヘキサヒドロ-1H-チエノ[3,4-d]イミダゾール-4-イル]ペンタノイル

であり、ここで、該アルキル、該アルケニル、該アルキニル、該シクロアルケニル、該バールフルオロ化アルキル、該ヘテロシクリル、該アリール、該ヘテロアリール、及び該ベンジル基は、各々独立に、1つ、2つ、又は3つのR<A>又はR<1>置換基で任意に置換されており、

R2は、

1)-H、

2)-C1-6アルキル、

3)-SR、

4)-C(0)R1、

5)-S(0)R1、

6)-S(0)2R<1>、

7)1つ、2つ、もしくは3つのR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-ベンジル、

8)1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-ヘテロアリールであって、該置換基が該L及び該ヘテロアリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

9)1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-ヘテロシクリルであって、該置換基が該L及び該ヘテロシクリル基の一方もしくは両方に結合しているもの、

10)1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-L-アリールであって、該置換基が該L及び該アリール基の一方もしくは両方に結合しているもの、

11)1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-ヘテロアリール、又は

12)1以上のR<A>もしくはR<1>置換基で任意に置換された-アリール

であり、ここで、各々の置換基は、それがまだ存在しないならば、該L基に任意に結合しており、

R<A>は、

1)-ハロゲン、

2)-CFs、

3)-OH、

4)-OR<1>、

5)-L-OH、

6)-L-OR<1>、

7)-OCFs、

8)-SH、

9)-SR1、

10)-CN、

11)-NO2、

12)-NH2、

13)-NHR<1>、

14)-NR<1>R<1>、

15)-L-NH2、

16)-L-NHR<1>、

17)-L-NR<4>R<1>、

18)-L-SR<1>、

19)-L-S(0)R<1>、

20)-L-S(0)2R<1>、

21)-C(0)OH、

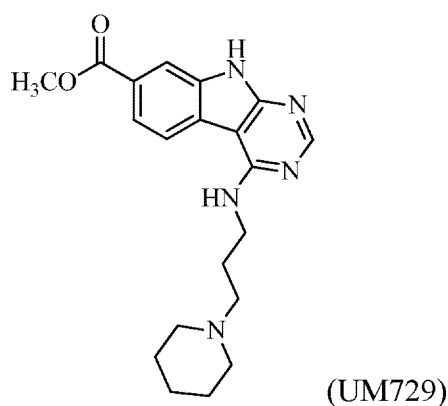
- 22) -C(0)OR<1>、
 23) -C(0)NH₂、
 24) -C(0)NHR<1>、
 25) -C(0)N(R<1>)R<1>、
 26) -NHC(0)R<1>、
 27) -NR₁C(0)R<1>、
 28) -NHC(0)OR<1>、
 29) -NR₁C(0)OR<1>、
 30) -OC(0)NH₂、
 31) -OC(0)NHR<1>、
 32) -OC(0)N(R)R<1>、
 33) -OC(0)R<1>、
 34) -C(0)R₁、
 35) -NHC(0)NH₂、
 36) -NHC(0)NHR₁、
 37) -NHC(0)N(R)R<1>、
 38) -NR C(0)NH₂、
 39) -NR C(0)NHR<1>、
 40) -NR₁C(0)N(R₁)R₁、
 41) -NHS(0)2R<1>、
 42) -NR S(0)2R<1>、
 43) -S(0)2NH₂、
 44) -S(0)2NHR<1>、
 45) -S(0)2N(R)R<1>、
 46) -S(0)R<1>、
 47) -S(0)2R<1>、
 48) -OS(0)2R<1>、
 49) -S(0)2OR<1>、
 50) -ベンジル、
 51) -N₃、又は
 52) -C(-N=N-)(CF₃)

であり、ここで、該ベンジル基は、1つ、2つ、又は3つのR<A>又はR<1>置換基で任意に置換されている。)。

(構成 2 4)

前記ピリミド(4,5-b)インドール誘導体が、下記化学構造を有する、構成22記載の方法：

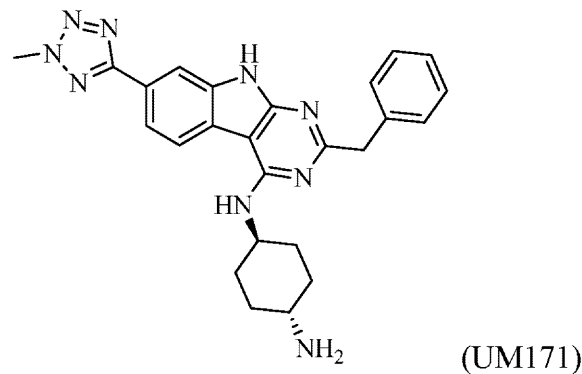
(化 3)



°

(構成 2 5)

前記ピリミド(4,5-b)インドール誘導体が、下記化学構造を有する、構成22記載の方法：
(化4)



。

(構成26)

前記第1の培地が、低分子量ヘパリン(LMWH)、Flt-3リガンド(Flt-3L)、幹細胞因子(SCF)、IL-6、IL-7、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、又は顆粒球マクロファージ刺激因子(GM-CSF)のうちの1つ又は複数をさらに含む、構成1~25のいずれか1記載の方法。

(構成27)

前記第1の培地が、LMWH、Flt-3L、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む、構成26記載の方法。

(構成28)

前記第1の培地中、前記LMWHが1U/mL~10U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lが1ng/mL~50ng/mLの濃度で存在し；前記SCFが1ng/mL~50ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が0.01ng/mL~0.1ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が1ng/mL~50ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが0.01ng/mL~0.50ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが0.005ng/mL~0.1ng/mLの濃度で存在する、構成26又は構成27記載の方法。

(構成29)

前記第1の培地中、前記LMWHが、該第1の培地中、4U/mL~5U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lが20ng/mL~30ng/mLの濃度で存在し；前記SCFが20ng/mL~30ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が0.04ng/mL~0.06ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が20ng/mL~30ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが0.20ng/mL~0.30ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが0.005ng/mL~0.5ng/mLの濃度で存在する、構成26又は構成27記載の方法。

(構成30)

前記第1の培地中、前記LMWHが、該第1の培地中、約4.5U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lが約25ng/mLの濃度で存在し；前記SCFが約27ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が約0.05ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が約25ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが約.25ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが約0.01ng/mLの濃度で存在する、構成26又は構成27記載の方法。

(構成31)

前記第2の培地が、LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFのうちの1つ又は複数をさらに含む、構成1~25のいずれか1記載の方法。

(構成32)

前記第2の培地が、LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々をさらに含む、構成1~19のいずれか1記載の方法。

(構成33)

前記第2の培地中、前記LMWHが1U/mL~10U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lが1ng/mL~50ng/mLの濃度で存在し；前記SCFが1ng/mL~50ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が0.01ng/mL~0.1ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が1ng/mL~50ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが0.01ng/mL~0.50ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが0.005ng/mL~0.1ng/mLの濃度で存在する、構成31又は構成32記載の方法。

(構成 3 4)

前記第2の培地中、前記LMWHが、該第2の培地中、4U/mL～5U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lが20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記SCFが20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が0.04ng/mL～0.06ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが0.20ng/mL～0.30ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが0.005ng/mL～0.5ng/mLの濃度で存在する、構成31又は構成32記載の方法。

(構成 3 5)

前記第2の培地中、前記LMWHが、該第2の培地中、約4.5U/mLの濃度で存在し；前記Flt-3Lが約25ng/mLの濃度で存在し；前記SCFが約27ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が約0.05ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が約25ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが約0.25ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが約0.01ng/mLの濃度で存在する、構成31又は構成32記載の方法。

(構成 3 6)

前記第3の培地が、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、又はGM-CSFのうちの1つ又は複数をさらに含む、構成1～25のいずれか1記載の方法。

(構成 3 7)

前記第3の培地が、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及びGM-CSFの各々を含む、構成36記載の方法。

(構成 3 8)

前記第3の培地中、前記SCFが1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が0.01ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が1ng/mL～50ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが0.01ng/mL～0.50ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが0.005ng/mL～0.1ng/mLの濃度で存在する、構成36又は構成37記載の方法。

(構成 3 9)

前記第3の培地中、前記SCFが20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が0.04ng/mL～0.06ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が20ng/mL～30ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが0.20ng/mL～0.30ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが0.005ng/mL～0.5ng/mLの濃度で存在する、構成36又は構成37記載の方法。

(構成 4 0)

前記第3の培地中、前記SCFが約22ng/mLの濃度で存在し；前記IL-6が約0.05ng/mLの濃度で存在し；前記IL-7が約20ng/mLの濃度で存在し；前記G-CSFが約0.25ng/mLの濃度で存在し；かつ前記GM-CSFが約0.01ng/mLの濃度で存在する、構成36又は構成37記載の方法。

(構成 4 1)

前記LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及び/又はGM-CSFが、前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地の不確定成分に含まれない、構成26～40のいずれか1記載の方法。

(構成 4 2)

前記LMWH、Flt-3、SCF、IL-6、IL-7、G-CSF、及び/又はGM-CSFが血清に含まれない、構成26～40のいずれか1記載の方法。

(構成 4 3)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のいずれかがヒト血清-ABを含む、構成1～42のいずれか1記載の方法。

(構成 4 4)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のいずれかが、1%～20%ヒト血清-ABを含む、構成43記載の方法。

(構成 4 5)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のいずれかが、5%～15%ヒト血清-ABを含む、構成43記載の方法。

(構成 4 6)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のいずれかが約10%ヒト血清-ABを含む、構成43記載の方法。

(構成 4 7)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のいずれかが2-メルカプトエタノールを含む、構成1～46のいずれか1記載の方法。

(構成 4 8)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のいずれかがゲンタマイシンを含む、構成1～46のいずれか1記載の方法。

(構成 4 9)

前記造血幹細胞を、前記第1の培地中で、7～13日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 0)

前記造血幹細胞を、前記第1の培地中で、8～12日間培養することを含む、構成49記載の方法。

(構成 5 1)

前記造血幹細胞を、前記第1の培地中で、約10日間培養することを含む、構成49記載の方法。

(構成 5 2)

前記第1の細胞集団を、前記第2の培地中で、2～6日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 3)

前記第1の細胞集団を、前記第2の培地中で、3～5日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 4)

前記第1の細胞集団を、前記第2の培地中で、約4日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 5)

前記第2の細胞集団を、前記第3の培地中で、10～30日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 6)

前記第2の細胞集団を、前記第3の培地中で、15～25日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 7)

前記第2の細胞集団を、前記第3の培地中で、約21日間培養することを含む、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 8)

前記第1の培地、第2の培地、及び第3の培地中での前記培養が全て静置培養条件下で行われる、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 5 9)

前記第1の培地、第2の培地、又は第3の培地のうちの少なくとも1つの中での前記培養がスピナーフラスコ中で行われる、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 6 0)

前記第1の培地及び前記第2の培地中での前記培養が静置培養条件下で行われ、前記第3の培地中での前記培養がスピナーフラスコ中で行われる、構成1～48のいずれか1記載の方法。

(構成 6 1)

前記造血細胞が、前記第1の培地中に、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 細胞/mLで最初に播種される、構成1～60のいずれか1記載の方法。

(構成 6 2)

前記造血細胞が、前記第1の培地中に、約 3×10^4 細胞/mLで最初に播種される、構成61記載の方法。

(構成 6 3)

前記第1の細胞集団が、前記第2の培地中に、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mLで最初に播種される、構成1～60のいずれか1記載の方法。

(構成64)

前記第1の細胞集団が、前記第2の培地中に、約 1×10^5 細胞/mLで最初に播種される、構成63記載の方法。

(構成65)

前記第2の細胞集団が、前記第3の培地中に、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLで最初に播種される、構成1～60のいずれか1記載の方法。

(構成66)

前記第2の細胞集団が、前記第3の培地中に、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mLで最初に播種される、構成65記載の方法。

(構成67)

前記第2の細胞集団が、前記第3の培地中に、約 5×10^5 細胞/mLで最初に播種される、構成65記載の方法。

(構成68)

前記第2の細胞集団が、前記第3の培地中に、約 3×10^5 細胞/mLで最初に播種される、構成65記載の方法。

(構成69)

前記第1の培地中に最初に播種される造血幹細胞の数と比較したとき、少なくとも5000倍多くのナチュラルキラー細胞を産生する、構成1～68のいずれか1記載の方法。

(構成70)

少なくとも10,000倍多くのナチュラルキラー細胞を産生する、構成69記載の方法。

(構成71)

少なくとも50,000倍多くのナチュラルキラー細胞を産生する、構成69記載の方法。

(構成72)

少なくとも75,000倍多くのナチュラルキラー細胞を産生する、構成69記載の方法。

(構成73)

少なくとも20%のCD56+CD3-ナチュラルキラー細胞を含むナチュラルキラー細胞を産生する、構成1～68のいずれか1記載の方法。

(構成74)

少なくとも40%のCD56+CD3-ナチュラルキラー細胞を含むナチュラルキラー細胞を産生する、構成1～68のいずれか1記載の方法。

(構成75)

少なくとも60%のCD56+CD3-ナチュラルキラー細胞を含むナチュラルキラー細胞を産生する、構成1～68のいずれか1記載の方法。

(構成76)

少なくとも80%のCD56+CD3-ナチュラルキラー細胞を含むナチュラルキラー細胞を産生する、構成1～68のいずれか1記載の方法。

(構成77)

前記ナチュラルキラー細胞とK562細胞をインビトロで10:1の比で共培養したとき、該ナチュラルキラー細胞が該K562細胞に対する少なくとも20%の細胞傷害性を示す、構成1～68のいずれか1記載の方法。

(構成78)

前記ナチュラルキラー細胞が前記K562細胞に対する少なくとも35%の細胞傷害性を示す、構成77記載の方法。

(構成79)

前記ナチュラルキラー細胞が前記K562細胞に対する少なくとも45%の細胞傷害性を示す、構成77記載の方法。

(構成80)

前記ナチュラルキラー細胞が前記K562細胞に対する少なくとも60%の細胞傷害性を示す

、構成77記載の方法。

(構成81)

前記ナチュラルキラー細胞が前記K562細胞に対する少なくとも75%の細胞傷害性を示す

、構成77記載の方法。

(構成82)

前記ナチュラルキラー細胞の生存が7-アミノアクチノマイシンD(7AAD)染色によって決定される、構成1~81のいずれか1記載の方法。

(構成83)

前記ナチュラルキラー細胞の生存がアネキシン-V染色によって決定される、構成1~81のいずれか1記載の方法。

(構成84)

前記ナチュラルキラー細胞の生存が7-AAD染色とアネキシン-V染色の両方によって決定される、構成1~81のいずれか1記載の方法。

(構成85)

前記ナチュラルキラー細胞の生存がトリパンブルー染色によって決定される、構成1~81のいずれか1記載の方法。

(構成86)

前記細胞集団を工程(c)の後に凍結保存することをさらに含む、構成1~81のいずれか1記載の方法。

(構成87)

前記ナチュラルキラー細胞を工程(c)の後に凍結保存することをさらに含む、構成1~81のいずれか1記載の方法。

(構成88)

構成1~81のいずれか1記載の方法によって產生されるナチュラルキラー細胞の集団。

(構成89)

構成1~81のいずれか1記載の方法によって產生される、ナチュラルキラー細胞を含む細胞の集団。

(構成90)

腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であって、該腫瘍細胞を複数のナチュラルキラー細胞と接触させることを含み、ここで、該ナチュラルキラー細胞が構成1記載の方法によって產生される、前記方法。

(構成91)

前記接触させることがインビトロで行われる、構成90記載の方法。

(構成92)

前記接触させることがインビボで行われる、構成90記載の方法。

(構成93)

前記接触させることがヒト個体で行われる、構成92記載の方法。

(構成94)

前記ナチュラルキラー細胞を前記個体に投与することを含む、構成92記載の方法。

(構成95)

前記腫瘍細胞が多発性骨髄腫細胞である、構成90~94のいずれか1記載の方法。

(構成96)

前記腫瘍細胞が急性骨髄性白血病(AML)細胞である、構成90~94のいずれか1記載の方法。

(構成97)

前記個体が再発性/難治性AMLを有する、構成96記載の方法。

(構成98)

前記個体が、AMLに対する少なくとも1つの非ナチュラルキラー細胞治療剤が奏効していないAMLを有する、構成96記載の方法。

(構成99)

前記個体が65歳以上であり、かつ第1寛解期にある、構成96記載の方法。

(構成100)

前記個体が、前記ナチュラルキラー細胞を投与する前に、フルダラビン、シタラビン、又は両方で馴化されている、構成96～99のいずれか1記載の方法。

(構成101)

前記腫瘍細胞が、乳癌細胞、頭頸部癌細胞、又は肉腫細胞である、構成90～93のいずれか1記載の方法。

(構成102)

前記腫瘍細胞が、原発性膵管癌細胞、白血病細胞、急性T細胞白血病細胞、慢性骨髄性リンパ腫(CML)細胞、慢性骨髄性白血病(CML)細胞、肺癌細胞、結腸腺癌細胞、組織球性リンパ腫細胞、結腸直腸癌細胞、結腸直腸腺癌細胞、又は網膜芽腫細胞である、構成90～93のいずれか1記載の方法。

(構成103)

前記ナチュラルキラー細胞が、前記接触させること又は前記投与することの前に凍結保存されたものである、構成90～102のいずれか1記載の方法。

(構成104)

前記ナチュラルキラー細胞が、前記接触させること又は前記投与することの前に凍結保存されなかったものである、構成90～102のいずれか1記載の方法。