



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0111762
(43) 공개일자 2021년09월13일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 5/0783</i> (2010.01) <i>C07D 401/12</i> (2006.01)
 <i>C07D 401/14</i> (2006.01) <i>C07D 473/30</i> (2006.01)
 <i>C07D 487/04</i> (2006.01) <i>C07D 491/048</i> (2006.01)
 <i>C07D 495/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 5/0646</i> (2013.01)
 <i>C07D 401/12</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7020212
 (22) 출원일자(국제) 2019년11월29일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년06월29일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2019/063876
 (87) 국제공개번호 WO 2020/113182
 국제공개일자 2020년06월04일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/774,114 2018년11월30일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 셀룰라리티 인코포레이티드
 미국 뉴저지주 07932 플로햄 파크 파크 애비뉴 170</p> <p>(72) 발명자
 하리리, 로버트 제이.
 미국 07059 뉴저지주 워런 테크놀로지 드라이브 33 셀룰라리티, 인코포레이티드 내
 장, 샤오쿠이
 미국 07059 뉴저지주 워런 테크놀로지 드라이브 33 셀룰라리티, 인코포레이티드 내
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 이상남</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 95 항

(54) 발명의 명칭 **신규 방향족 화합물을 사용한 자연 살해 세포 및 ILC3 세포의 증식**

(57) 요약

줄기세포 동원 인자를 포함하는 배지로 3-단계 확장 및 분화 방법을 사용하여 자연살해(NK) 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 또한, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 사용하여 종양 세포 증식을 억제하는 방법, 및 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

(52) CPC특허분류

C07D 401/14 (2013.01)

C07D 473/30 (2013.01)

C07D 487/04 (2013.01)

C07D 491/048 (2013.01)

C07D 495/04 (2013.01)

C12N 2500/30 (2013.01)

C12N 2501/145 (2013.01)

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자

강, 린

미국 07059 뉴저지주 워런 테크놀로지 드라이브 33
셀룰라리티, 인코포레이티드 내

반 데르 토우, 윌리엄

미국 07059 뉴저지주 워런 테크놀로지 드라이브 33
셀룰라리티, 인코포레이티드 내

보스키나리안-베르세, 바네사

미국 07059 뉴저지주 워런 테크놀로지 드라이브 33
셀룰라리티, 인코포레이티드 내

귀, 수안

미국 07932 뉴저지주 플로람 파크 파크 애비뉴 170
셀룰라리티, 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

자연살해 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법으로서,

(a) 줄기세포 동원제(stem cell mobilizing agent) 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell) 또는 전구세포(progenitor cell)를 배양하여 제1 세포 집단(first population of cell)을 생산하는 단계;

(b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제 및 저분자량 헤파린(LMWH)의 각각을 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계

를 포함하되, 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-인 자연살해 세포를 포함하며, 상기 자연살해 세포의 적어도 80%가 살아있는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제3 세포 집단은 CD94+ 또는 CD16+인 자연살해 세포를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제3 세포 집단은 CD94- 또는 CD16-인 자연살해 세포를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제3 세포 집단은 CD94+ 또는 CD16+인 자연살해 세포를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제3 세포 집단은 CD94- 또는 CD16-인 자연살해 세포를 포함하는, 방법.

청구항 6

자연살해 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법으로서,

(a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계;

(b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계

를 포함하되, 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제3 배지는 줄기세포 인자(SCF)를 결여하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제3 배지는 LMWH를 결여하는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, (d) 상기 제3 세포 집단으로부터 CD11a+ 세포를 분리시켜 제4 세포 집단을 생산하는 추가의 단

계를 포함하고;

상기 제4 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함하는, 방법.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 퍼포린(perforin) 및 EOMES(eomesodermin)을 발현하는, 방법.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 ROR γ t 또는 IL1R1을 발현하지 않는, 방법.

청구항 12

ILC3 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법으로서,

(a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여, 제1 세포 집단을 생산하는 단계;

(b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계

를 포함하되; 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제3 배지는 줄기세포 동원제를 포함하는, 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 제3 배지는 SCF를 포함하는, 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 제3 배지는 줄기세포 동원제 및 SCF를 포함하는, 방법.

청구항 16

ILC3 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법으로서,

(a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계;

(b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계;

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH 각각을 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및

(d) 상기 제3 세포 집단으로부터 CD11a- 세포를 분리시켜 제4 세포 집단을 생산하는 단계

를 포함하되; 상기 제4 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함하는, 방법.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t 및 IL1R1을 발현하는, 방법.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포는 퍼포린 또는 EOMES를 발현하지 않는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지는 데설페이트화된(desulphated) 글리코사미노글리칸을 결여하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 포유동물 세포인, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 영장류 세포인, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 개과(canine) 세포인, 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 설치류 세포인, 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 인간, 영장류, 개과 또는 설치류 이외의 포유동물로부터의 세포인, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 CD34+ 조혈 줄기세포인, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반 세포인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 태반 세포는 인간 태반 관류액(human placental perfusate)으로부터 얻어지거나 얻어질 수 있는, 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 태반 세포는 인간 태반 관류액으로부터 단리된 핵화된(nucleated) 세포로부터 얻어지거나 얻어질 수 있는, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 제대혈(umbilical cord blood)로부터 얻어지거나 얻어질 수 있는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태아 간 세포인, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 동원된(mobilized) 말초 혈액 세포인, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 골수 세포인, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Tpo는 상기 제1 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 Tpo는 상기 제1 배지 중에 약 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 Tpo는 상기 제1 배지 중에 약 25 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지 중에 10 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지 중에 약 20 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 10 U/ml 내지 10,000 U/ml의 농도로 존재하고; 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 300 U/ml 내지 3,000 U/ml의 농도로 존재하고; 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 10 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 약 1,000 U/ml의 농도로 존재하고, 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 약 20 ng/ml의 농도로 존재하는, 방법.

청구항 43

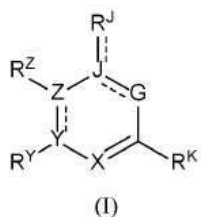
제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Tpo, IL-2 및 IL-15는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 규정되지 않은 성분 속에 포함되지 않는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Tpo, IL-2 및 IL-15는 혈청 속에 포함되지 않는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기세포 동원제는 하기 구조를 갖는 화학식 (I)의 화합물인, 방법:



식 중,

각각의 는 독립적으로 단일 결합 또는 이중결합을 나타내고;

R^J 는 $-NR^aR^b$, $-OR^b$ 및 $=O$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며; R^J 가 $=O$ 이면, G 와 J 를 연결하는 는 단일 결합을 나타내고, G 는 N 이고, N 은 R^G 로 치환되고; 다르게는 G 와 J 를 연결하는 는 이중결합을 나타내고, G 는 N 이고;

R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬이고;

R^b 는 R^c 또는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

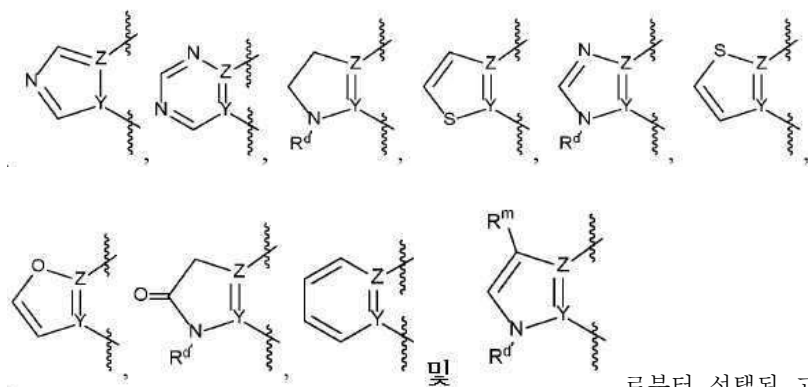
R^c 는 $-OH$, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$, $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$; $-C(=O)NH_2$; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^K 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; 치환된 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^G 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

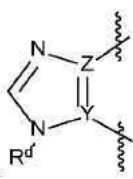
R^Y 및 R^Z 는 각각 독립적으로 존재하지 않거나 또는 수소, 할로, C_{1-6} 알킬, $-OH$, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$, $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

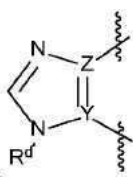
또는 R^Y 와 R^Z 는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해져서



로부터 선택된 고리를 형성하되, 상기 고리는 C_{1-4} 알킬,

C₁₋₄ 할로알킬, 할로, 사이아노, -OH, -O-(C₁₋₄ 알킬), -N(C₁₋₄ 알킬)₂, 비치환 C₆-C₁₀ 아릴, 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C₆-C₁₀ 아릴, 및 -O-(C₁₋₄ 할로알킬)로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치



환되고; R^y와 R^z가 함께 취해져서 를 형성한다면, R^j는 -OR^b 또는 =O이고;

R^d는 수소 또는 C₁-C₄ 알킬이고;

R^m은 C₁₋₄ 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고;

J는 C이고; 그리고

X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 N 또는 C이되, 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다.

청구항 46

제45항에 있어서,

R^a는 수소이고;

R^b는 -(C₁-C₄ 알킬)-R^c이고;

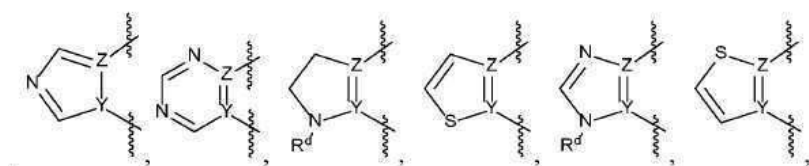
R^c는 -C(=O)NH₂; 비치환 C₆₋₁₀ 아릴; 치환된 C₆₋₁₀ 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환되고, 각각의 E는 독립적으로 -OH, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 할로알킬, -O(C₁-C₄ 알킬) 및 -O(C₁-C₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

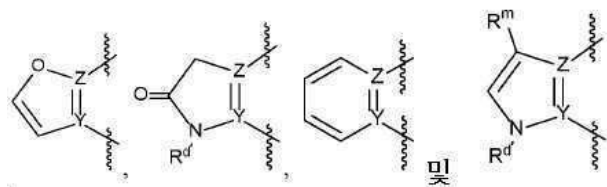
R^k는 수소, 비치환 C₁₋₆ 알킬; -NH(C₁₋₄ 알킬); -N(C₁₋₄ 알킬)₂, 비치환 C₆₋₁₀ 아릴; 치환된 C₆₋₁₀ 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q로 치환되고, 각각의 Q는 독립적으로 -OH, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 할로알킬, 할로, 사이아노, -O-(C₁₋₄ 알킬) 및 -O-(C₁₋₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^g는 -(C₁₋₄ 알킬)-C(=O)NH₂이고;

R^y 및 R^z는 각각 독립적으로 존재하지 않거나 또는 수소, C₁₋₆ 알킬 및 -NH(C₁₋₄ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되거나;

또는 R^y와 R^z는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해져서





로부터 선택된 고리를 형성하되, 상기 고리는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-OH$, $-O-(C_{1-4}$ 알킬), $-N(C_{1-4}$ 알킬) $_2$, 비치환 C_6-C_{10} 아릴, 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 및 $-O-(C_{1-4}$ 할로알킬)로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치환되고;

R^d 는 C_1-C_4 알킬이고;

R^m 은 사이아노이고;

그리고

X , Y 및 Z 는 각각 독립적으로 N 또는 C이되, 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워지는, 방법.

청구항 47

제45항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 페닐, 치환된 페닐, 인돌릴 및 $-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

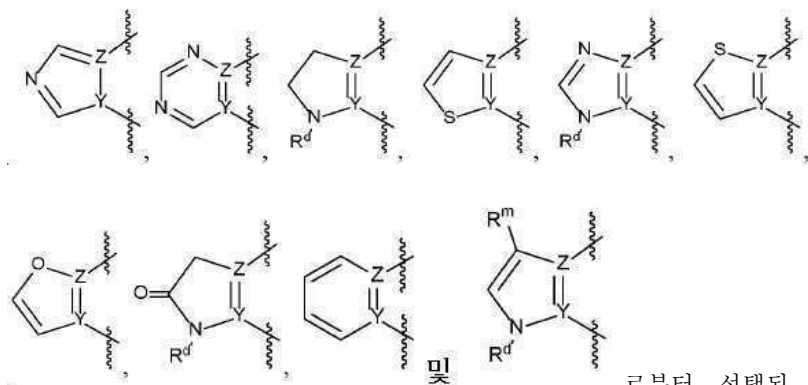
R^k 는 수소, 메틸, 치환된 피리딘일, 비치환 벤조티오페닐 및 $-NH(C_1-C_4$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^G 는 $-CH_2CH_2-C(=O)NH_2$ 이고;

R^Y 는 $-NH(C_1-C_4$ 알킬)이고;

R^Z 는 존재하지 않거나 또는 수소이거나;

또는 R^Y 와 R^Z 는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해져서



로부터 선택된 고리를 형성하되, 상기 고리는 C_1-C_4 알킬, $-N(C_1-C_4$ 알킬) $_2$, 사이아노, 비치환 페닐, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치환되고;

R^d 는 C_1-C_4 알킬이고;

R^m 은 사이아노이고; 그리고

X는 N 또는 CH인, 방법.

청구항 48

제45항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 페닐, 치환된 페닐, 인돌릴 및 $-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되되; 상기 치환된 페닐은 1개의 치환체 E로 치환되고, E는 $-OH$ 이고;

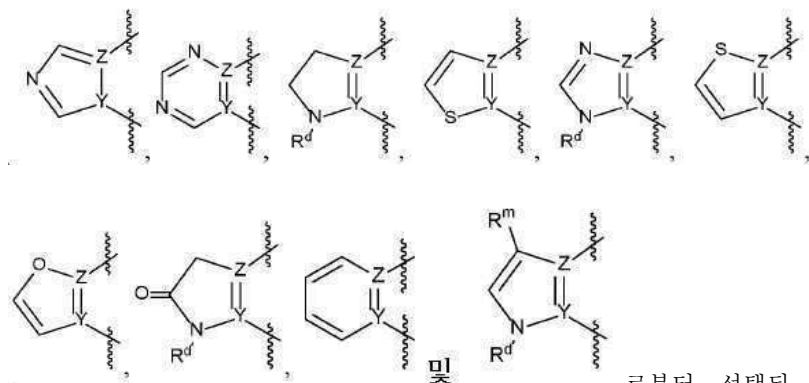
R^k 는 수소, 메틸, 치환된 피리딘일, 비치환 벤조티오펜 및 $-NH(sec\text{-부틸})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되되; 상기 치환된 피리딘일 모이어티는 1개의 치환체 Q로 치환되고, Q는 C_1-4 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^G 는 $-CH_2CH_2-C(=O)NH_2$ 이고;

R^Y 는 $-NH(아이소프로필)$ 또는 $-NH(sec\text{-부틸})$ 이고;

R^Z 는 존재하지 않거나 또는 수소가거나;

또는 R^Y 와 R^Z 는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해져서



로부터 선택된 고리를 형성하되, 상기 고리는 C_1-C_4 알킬, 사이아노, 비치환 페닐 및 4-플루오로페닐로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치환되고;

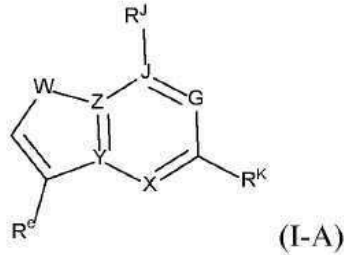
R^d 는 아이소프로필이고;

R^m 은 사이아노이고; 그리고

X는 N 또는 CH인, 방법.

청구항 49

제45항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은, 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 하기 화학식 (I-A)의 구조를 갖는, 방법:



식 중,

R^J 는 $-NR^aR^b$ 이고;

R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬이고;

R^b 는 R^c 또는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환되고, 각각의 E는 독립적으로 -OH, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^K 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q로 치환되고, 각각의 Q는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

Y 및 Z는 각각 C이고;

X는 N 또는 CH이고;

W는 O 또는 S이고; 그리고

R^E 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환되고, 각각의 E는 독립적으로 -OH, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및

O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며, 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 할로알킬, 할로, 사이아노, -O-(C₁₋₄ 알킬) 및 -O-(C₁₋₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

R^e는 C₁₋₄ 알킬인, 방법.

청구항 51

제49항에 있어서,

R^a는 수소이고;

R^b는 -(CH₂-CH₂)-**R^c**이고;

R^c는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 상기 치환된 페닐은 1개의 치환체 **E**로 치환되고, **E**는 -OH이고;

R^k는 비치환 벤조티오페닐 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택되며; 상기 치환된 피리딘일은 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, **Q**는 C₁₋₄ 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

R^e는 아이소프로필인, 방법.

청구항 52

제49항에 있어서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인, 방법:

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-7-아이소프로필-2-(5-메틸피리딘-3-일)티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;

5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴;

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;

4-(2-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;

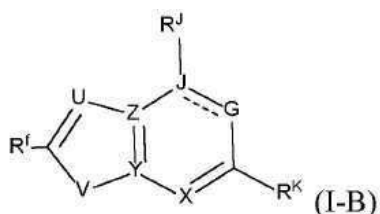
N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-메틸피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민; 및

5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴.

청구항 53

제45항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은, 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 하기 화학식 (I-B)의 구조를 갖는, 방법:



식 중,

R^a는 수소 또는 C₁₋₄ 알킬이고;

R^b 는 R^c 또는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 $-OH$, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$, $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$; $-C(=O)NH_2$; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^k 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; 치환된 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^G 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^f 는 수소, C_{1-4} 알킬, 비치환 C_{6-10} 아릴, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

U 는 N 또는 CR^U 이고;

V 는 S 또는 NR^V 이고;

R^U 는 수소, C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^V 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬이고;

U 가 CR^U 이고 V 가 NR^V 인 경우, R^U 는 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고;

Y 및 Z 는 각각 C이고; 그리고

X 는 N 또는 CH인, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 $-C(=O)NH_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어

진 군으로부터 선택되되; 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 **Q** 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 할로알킬, 할로, 사이아노, -O-(C₁₋₄ 알킬) 및 -O-(C₁₋₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^g는 C₁₋₄ 알킬 또는 -(C₁₋₄ 알킬)-C(=O)NH₂이고;

R^f는 수소, 비치환 페닐, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

Y 및 **Z**는 각각 C이고; 그리고

X는 CH인, 방법.

청구항 55

제53항에 있어서,

R^a는 수소이고;

R^b는 -(CH₂-CH₂)-**R**^c이고;

R^c는 -C(=O)NH₂, 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 상기 치환된 페닐은 1개의 치환체 **E**로 치환되고, **E**는 -OH이고;

R^k는 비치환 벤조티오펜 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택되되; 상기 치환된 피리딘일은 1개의 치환체 **Q**로 치환되고, **Q**는 C₁₋₄ 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^g는 -(CH₂CH₂)-C(=O)NH₂이고;

R^f는 수소, 페닐 및 플루오로페닐로 이루어진 군으로부터 선택되고;

Y 및 **Z**는 각각 C이고; 그리고

X는 CH인, 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인, 방법:

3-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-9*H*-퓨린-6-일)옥시)프로판아마이드;

3-(2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-6-옥소-6,9-다이하이드로-1^H-퓨린-1-일)프로판아마이드;

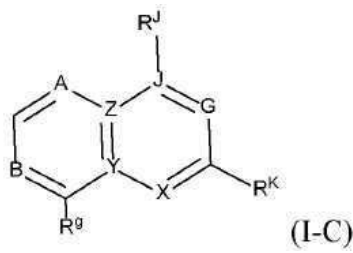
2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-5-카보나이트릴;

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-메틸-6-페닐티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민; 및

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(4-플루오로페닐)티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민.

청구항 57

제45항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은, 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 하기 화학식 (I-C)의 구조를 갖는, 방법:



식 중,

R^J 는 $-NR^aR^b$ 이고;

R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬이고;

R^b 는 R^c 또는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^K 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

A는 N 또는 CH이고;

B는 N 또는 CH이고;

R^g 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

Y 및 **Z**는 각각 C이고; 그리고

X는 N 또는 CH인, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^k 는 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 Q 개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

R^g 는 수소 또는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 인, 방법.

청구항 59

제57항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 상기 치환된 페닐은 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^k 는 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; 비치환 벤조티오페닐; 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택되; 상기 치환된 피리딘일은 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

R^g 는 수소 또는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 인, 방법.

청구항 60

제57항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-(CH_2CH_2)-R^c$ 이고;

R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택되; 상기 치환된 페닐은 1개의 치환체 E 로 치환되고, E 는 $-OH$ 이고;

R^k 는 $-NH(sec\text{-부틸})$; 비치환 벤조티오페닐, 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택되; 상기 치환된 피리딘일은 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

R^g 는 수소 또는 $-N(CH_3)_2$ 인, 방법.

청구항 61

제57항에 있어서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인, 방법:

4-(2-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-8-(다이메틸아미노)피리미도[5,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;

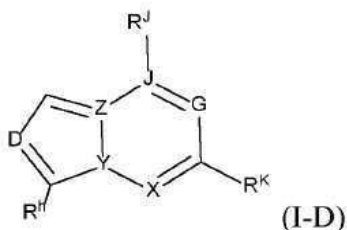
N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퀴나졸린-4-아민;

5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퀴나졸린-2-일)니코티노나이트릴; 및

N^4 -(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)- N^2 -(*sec*-부틸)퀴나졸린-2,4-다이아민.

청구항 62

제45항에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은, 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 하기 화학식 (I-D)의 구조를 갖는, 방법:



식 중,

R^J 는 $-NR^aR^b$ 이고,

R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬이고;

R^b 는 R^c 또는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, $-O(C_1$ - C_4 알킬) 및 $-O(C_1$ - C_4 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^K 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며; 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4}$ 알킬) 및 $-O-(C_{1-4}$ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^h 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬이고;

D는 N 또는 CH이고;

Y는 N이고;

Z는 C이고; 그리고

X는 N 또는 CH인, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-R^c$ 이고;

R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는

비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 할로알킬, -O(C₁-C₄ 알킬) 및 -O(C₁-C₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^k 는 비치환 C₆₋₁₀ 아릴; 치환된 C₆₋₁₀ 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 할로알킬, 할로, 사이아노, -O-(C₁₋₄ 알킬) 및 -O-(C₁₋₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고; 그리고

R^h 는 수소 또는 C₁₋₄ 알킬인, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 -(C₁-C₄ 알킬)- R^c 이고;

R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 상기 치환된 페닐은 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C₁-C₄ 알킬, C₁-C₄ 할로알킬, -O(C₁-C₄ 알킬) 및 -O(C₁-C₄ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^k 는 비치환 벤조티오펜이고; 그리고

R^h 는 수소 또는 C₁₋₄ 알킬인, 방법.

청구항 65

제62항에 있어서,

R^a 는 수소이고;

R^b 는 -(CH₂-CH₂)- R^c 이고;

R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택되되; 상기 치환된 페닐은 1개의 치환체 **E**로 치환되고, **E**는 -OH이고;

R^k 는 비치환 벤조티오펜이고; 그리고

R^h 는 수소 또는 C₁₋₄ 알킬인, 방법.

청구항 66

제62항에 있어서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인, 방법:

N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-아민; 및
4-(2-((6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-일)아미노)에틸)페놀.

청구항 67

제65항에 있어서, 상기 화합물은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인, 방법:

5-(2-((2-(1H-인돌-3-일)에틸)아미노)-6-(*sec*-부틸아미노)피리미딘-4-일)니코티노나이트릴;

4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-6-(아이소프로필아미노)피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;

4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필-6,7-다이하이드로-5H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀; 및

2-(벤조[b]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-5,7-다이하이드로-6H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-온.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지가 LMWH를 포함하지 않는, 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지가 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지가 Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함하는, 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 자연살해 세포의 집단.

청구항 72

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 ILC3 세포의 집단.

청구항 73

종양 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 상기 종양 세포를 복수의 자연살해 세포 및/또는 ILC3 세포와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 자연살해 세포는 제70항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 접촉이 시험관내(*in vitro*)에서 일어나는, 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 상기 접촉이 생체내(*in vivo*)에서 일어나는, 방법.

청구항 76

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 급성 골수성 백혈병(AML) 세포인, 방법.

청구항 77

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부암 세포 또는 육종 세포인, 방법.

청구항 78

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포 또는 망막아세포종 세포인, 방법.

청구항 79

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 고품 종양 세포인, 방법.

청구항 80

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 간 종양 세포인, 방법.

청구항 81

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 폐 종양 세포인, 방법.

청구항 82

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 췌장 종양 세포인, 방법.

청구항 83

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 신장 종양 세포인, 방법.

청구항 84

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포는 교모세포종 다형성(GBM) 세포인, 방법.

청구항 85

제73항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되는, 방법.

청구항 86

제73항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되지 않은 방법.

청구항 87

자연살해 세포로서, 말초 혈액 자연살해 세포에서의 마커의 발현보다 더 낮은, FGFBP2, GZMH, CCL3L3, GZMM, CXCR4, ZEB2, KLF2, LITAF, RORA, LYAR, CNOT1, IFNG, DUSP2, ATG2A, CD7, PMAIP1, PPP2R5C, NR4A2, ZFP36L2, PIK3R1, KLRF1, SNHG9, MT2A, RGS2, CHD1, DUSP1, EML4, ZFP36, ZC3H12A, DNAJB6, SBDS, IRF1, TSC22D3, TSPYL2, PNRC1, ISCA1, JUNB, WHAMM, RICTOR, TNFAIP3, EPC1, MVD, CLK1, ARL4C, REL, KMT2E, YPEL5, AMD1, BTG2 및 IDS로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 및/또는 말초 혈액 자연살해 세포에서의 마커의 발현보다 더 높은, NDFIP2, LINC00996, MAL, CCL1, MB, SPINK2, C15orf48, CAMK1, KLRC1, TNFSF10, TNFRSF18, IL32, CAPG, AC092580.4, S100A11, TNFRSF4, ENO1, FCER1G, CCND2, KRT81, MRPS6, ANXA2, PTGER2, GLO1, HAVCR2, PYCARD, LAT2, SLC16A3, COTL1, PKM, TALDO1, CD96, NCR3, KRT86, STMN1, LTB, ARPC1B, ARPC5, FKBP1A, TIMP1, GZMK, CD59, PGK1, RGS10, EVL, RAC2, LGALS1, ITGB7, TUBB, PGAM1, PRF1, GZMB, IL2RB, KLRC2 및 KLRB1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현을 특징으로 하는, 자연살해 세포.

청구항 88

제87항에 있어서, 말초 혈액 자연살해 세포에서의 마커의 발현보다 더 낮은, FGFBP2, GZMH, CCL3L3, GZMM, CXCR4, ZEB2, KLF2, LITAF, RORA, LYAR, CNOT1, IFNG, DUSP2, ATG2A, CD7, PMAIP1, PPP2R5C, NR4A2, ZFP36L2, PIK3R1, KLRF1, SNHG9, MT2A, RGS2, CHD1, DUSP1, EML4, ZFP36, ZC3H12A, DNAJB6, SBDS, IRF1, TSC22D3, TSPYL2, PNRC1, ISCA1, JUNB, WHAMM, RICTOR, TNFAIP3, EPC1, MVD, CLK1, ARL4C, REL, KMT2E, YPEL5, AMD1, BTG2 및 IDS로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현을 특징으로 하는, 자연살해 세포.

청구항 89

제87항 또는 제88항에 있어서, FGFBP2, GZMH, CCL3L3, GZMM, CXCR4, ZEB2, KLF2, LITAF, RORA, LYAR, CNOT1, IFNG, DUSP2, ATG2A, CD7, PMAIP1, PPP2R5C, NR4A2, ZFP36L2, PIK3R1, KLRF1, SNHG9, MT2A, RGS2, CHD1, DUSP1, EML4, ZFP36, ZC3H12A, DNAJB6, SBDS, IRF1, TSC22D3, TSPYL2, PNRC1, ISCA1, JUNB, WHAMM, RICTOR,

TNFAIP3, EPC1, MVD, CLK1, ARL4C, REL, KMT2E, YPEL5, AMD1, BTG2 및 IDS로 이루어진 군으로부터 선택된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 발현이 말초 혈액 자연살해 세포에서의 상기 마커의 발현보다 더 낮은, 자연살해 세포.

청구항 90

제87항에 있어서, 말초 혈액 자연살해 세포에서의 마커의 발현보다 더 높은, NDFIP2, LINC00996, MAL, CCL1, MB, SPINK2, C15orf48, CAMK1, KLRC1, TNFSF10, TNFRSF18, IL32, CAPG, AC092580.4, S100A11, TNFRSF4, ENO1, FCER1G, CCND2, KRT81, MRPS6, ANXA2, PTGER2, GLO1, HAVCR2, PYCARD, LAT2, SLC16A3, COTL1, PKM, TALDO1, CD96, NCR3, KRT86, STMN1, LTB, ARPC1B, ARPC5, FKBP1A, TIMP1, GZMK, CD59, PGK1, RGS10, EVL, RAC2, LGALS1, ITGB7, TUBB, PGAM1, PRF1, GZMB, IL2RB, KLRC2 및 KLRB1로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현을 특징으로 하는, 자연살해 세포.

청구항 91

제87항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, NDFIP2, LINC00996, MAL, CCL1, MB, SPINK2, C15orf48, CAMK1, KLRC1, TNFSF10, TNFRSF18, IL32, CAPG, AC092580.4, S100A11, TNFRSF4, ENO1, FCER1G, CCND2, KRT81, MRPS6, ANXA2, PTGER2, GLO1, HAVCR2, PYCARD, LAT2, SLC16A3, COTL1, PKM, TALDO1, CD96, NCR3, KRT86, STMN1, LTB, ARPC1B, ARPC5, FKBP1A, TIMP1, GZMK, CD59, PGK1, RGS10, EVL, RAC2, LGALS1, ITGB7, TUBB, PGAM1, PRF1, GZMB, IL2RB, KLRC2 및 KLRB1로 이루어진 군으로부터 선택된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 발현이 말초 혈액 자연살해 세포에서의 상기 마커의 발현보다 더 높은, 자연살해 세포.

청구항 92

제87항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 조혈 줄기세포-유래 자연살해 세포인, 자연살해 세포.

청구항 93

제87항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 CD34+ 조혈 줄기세포-유래 자연살해 세포인, 자연살해 세포.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 상기 조혈 줄기세포는 태반-유래 조혈 줄기세포인, 자연살해 세포.

청구항 95

제87항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연살해 세포는 제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는, 자연살해 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

줄기세포 동원 인자(stem cell mobilizing factor)를 포함하는 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포의 집단으로부터 자연살해(NK) 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단을 생산하는 방법, 예컨대, 태반, 예를 들면, 태반 관류액(placental perfusate)(예컨대, 인간 태반 관류액) 또는 다른 조직, 예를 들면, 제대혈 또는 말초 혈액의 세포로부터의 조혈 줄기세포 또는 전구세포로 출발하여 줄기세포 동원 인자를 포함하는 배지 중에서 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하는 3-단계 방법이 본 명세서에 제공된다. 예컨대, 종양 세포의 증식을 억제하거나, 병원체 감염, 예컨대, 바이러스 감염을 저해하기 위해, 태반 관류액, 본 명세서에 기재된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및/또는 NK 전구세포를 사용하는 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및/또는 NK 전구세포는 하나 이상의 면역조절 화합물과 함께 사용되고/되거나 치료된다.

배경 기술

[0002]

자연살해(NK) 세포는 선천적인 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구(lymphocyte)이다.

[0003] NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유도된 사이토카인에 대한 반응시 활성화된다. NK 세포의 세포독성 활성화는 2 가지 유형의 표면 수용체에 의해 주로 조절되며, 일부 수용체, 예컨대, CD94 및 2B4(CD244)가 리간드 상호작용에 의존하는 방식으로 작용할 수 있지만, 상기 표면 수용체는 "활성화 수용체" 또는 "저해성 수용체"인 것으로 간주될 수 있다.

[0004] 다른 활성화 중에서, NK 세포는 종양의 숙주 거부에 역할을 담당하며 바이러스-감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 자연살해 세포는 주조직적합 복합체(major histocompatibility complex: MHC) 단백질을 결여하거나, 감소된 수준을 나타내는 세포에 의해 활성화될 수 있다. 변경된 또는 감소된 수준의 자가-부류 I MHC 발현을 갖는 암 세포는 NK 세포 민감성의 유도를 초래한다. 활성화되고 확장된 NK 세포, 및 일부 경우에, 말초 혈액으로부터의 LAK 세포는 진전된 암을 지닌 환자의 생체외(ex vivo) 치료요법 및 생체내(in vivo) 치료 둘 다에서 사용되어 왔으며, 백혈병; 유방암; 및 특정 유형의 림프종과 같은 골수 관련 질환에 대해 일부 성공하였다.

[0005] 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포를 사멸시키는데 있어서 NK 세포의 유리한 특성에도 불구하고, 살종양 기능을 보유한 자연살해 세포를 생산하여 확장시키는 효율적인 방법을 개발하는 것이 당해 분야에서 요구되고 있다.

[0006] NK 세포는 선천성 림프계 세포(ILC)이다. 선천성 림프계 세포는 발달을 위해 전사 인자 ID2에 있어 이들의 의존성을 통해 관련되어 있다. ILC3 세포로 공지된 ILC의 하나의 유형은 문헌에 ROR γ t를 발현하고 IL-22를 생산하는 것으로, 그리고 퍼포린(perforin), 그랜자임 및 사멸 수용체와 같은 명백한 세포독성 효과가 없이, 성체의 면역 반응에 있어 역할을 담당하는 것으로 기술되어 있다(Montaldo *et al.*, 2014, *Immunity* 41:988-1000; Killig *et al.*, 2014, *Front. Immunol.* 5:142; Withers *et al.*, 2012, *J. Immunol.* 189 (5):2094-2098).

발명의 내용

[0007] 자연살해(NK) 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하기 위하여, 세포, 예를 들어, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포, 예컨대, CD34⁺ 조혈 줄기세포를 확장시키고 분화시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 특히, 본 발명은, 조혈 전구세포로부터 분화된 NK 및/또는 ILC3 세포의 증가된 집단을 생산하기 위하여 조혈 줄기세포 및 전구세포의 증식/확장을 촉진시키는 신규한 방향족 화합물(줄기세포 동원제/인자)에 초점을 맞추고 있다. 이러한 화합물, 및 이의 합성 및 검증은 공동 출원된 출원 제____호(참조에 의해 본 명세서에 인용됨)에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0008] 일 양상에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 3개의 단계(및 본 명세서에서 "3-단계 방법"으로 언급됨)을 포함하는 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 제공된 3-단계 방법에 의해 생산된 자연살해 세포 및/또는 ILC3 세포가 본 명세서에서 "3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포", "3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포", 또는 "3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포"로 언급된다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 하나 이상의 추가의 또는 중간 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 세포가 접촉(예컨대, 배양)되는 어떠한 제4 또는 중간 단계도 포함하지 않는다.

[0009] 일 양상에서, NK 세포의 생산 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 줄기세포 동원제(stem cell mobilizing agent) 및 트롬보포이에틴(thrombopoietin: Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단(first population of cell)을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서, 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제 및 (선택적으로) 저분자량 헤파린(low-molecular weight heparin: LMWH)을 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며, 여기서 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁺인 자연살해 세포를 포함하고, 자연살해 세포의 적어도 70%, 예를 들어, 80%는 살아있다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(leukemia inhibiting factor: LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여하고 있다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여하고 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 있고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여하고 있다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD16⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94⁺ 또는 CD16⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는

CD94⁻ 또는 CD16⁻인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94⁺ 및 CD16⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94⁻ 및 CD16⁻인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 및 제3 배지 중 적어도 1개, 2개 또는 모두 3개는 배지 GBGM®이 아니다. 소정의 실시형태에서, 제3 배지는 첨가된 데설페이트화된(desulphated) 글리코사미노글리칸을 결여하고 있다. 소정의 실시형태에서, 제3 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여하고 있다.

[0010] 일 양상에서, NK 세포의 생산 방법이 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0011] 일 양상에서, NK 세포의 생산 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 인자(SCF) 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0012] 일 양상에서, NK 세포의 생산 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 SCF, 줄기세포 동원제, 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0013] 일 양상에서, NK 세포의 생산 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) 상기 제3 세포 집단으로부터 CD11a⁺ 세포를 단리시켜 제4 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제4 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁺인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저

분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

- [0014] 소정의 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 퍼포린 및 에오메소터민(eomesodermin: EOMES)을 발현한다. 소정의 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 RAR-관련 오판 수용체 감마(RAR-related orphan receptor gamma: ROR γ t) 또는 인터류킨-1 수용체 1(interleukin-1 receptor 1: IL1R1)을 발현하지 않는다.
- [0015] 일 양상에서, ILC3 세포의 생산 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.
- [0016] 일 양상에서, ILC3 세포를 생산하는 방법이 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기세포 동원제, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.
- [0017] 일 양상에서, ILC3 세포의 생산 방법이 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.
- [0018] 일 양상에서, ILC3 세포의 생산 방법이 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기세포 동원제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

- [0019] 일 양상에서, ILC3 세포의 생산 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) 제3 세포 집단으로부터 CD11a⁻ 세포를 분리시켜 제4 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제4 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁻인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.
- [0020] 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t 및 IL1R1을 발현한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 퍼포린 또는 EOMES를 발현하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 첨가된 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다.
- [0021] 소정의 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 포유동물 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 인간 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 영장류 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 개과(canine) 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 설치류 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 인간, 영장류, 개과 또는 설치류 이외의 포유동물로부터의 세포이다.
- [0022] 소정의 양상에서, 제1 배지 중에서 배양된 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포이다. 소정의 양상에서, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반 조혈 줄기세포 또는 전구세포이다. 소정의 양상에서, 태반 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반 관류액으로부터 얻어지거나 얻어질 수 있다(예컨대, 태반 관류액으로부터 분리되어 핵화된 세포로부터 얻어지거나 얻어질 수 있다). 소정의 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 제대혈로부터 얻어지거나 얻어질 수 있다. 소정의 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태아 간 세포이다. 소정의 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 동원된 말초 혈액 세포이다. 소정의 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 골수 세포이다.
- [0023] 소정의 양상에서, 3-단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함한다. 소정의 양상에서, 제3 단계에서 사용된 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 이외에, 저분자량 헤파린(LMWH), Flt-3 리간드(Flt-3L), 줄기세포 인자(SCF), IL-6, IL-7, 과립구 집락-자극 인자(G-CSF) 또는 과립구-대식세포-자극 인자(GM-CSF) 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지는 첨가된 LMWH를 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지는 첨가된 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지는 LMWH를 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지는 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 제3-단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 제3-단계 방법에서 사용된 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 Tpo는 제1 배지 중에 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 50 ng/ml, 20 ng/ml 내지 30 ng/ml 또는 약 25 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제1 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 1U/ml 내지 10U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6는 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제1 배지 중에서, Flt-3L은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6는 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제1 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 4U/ml 내지 5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6는 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/

ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제1 배지 중에서, Flt-3L는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제1 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 약 4.5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L는 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 .25 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제1 배지 중에, Flt-3L은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 약 .25 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지는 GBGM®가 아니다.

[0024]

소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 양상에서, 제2 배지는 첨가된 LMWH를 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 제2 배지는 첨가된 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 제2 배지는 LMWH를 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에서 사용된 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에서 사용된 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml, 10 ng/ml 내지 30 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 1U/ml 내지 10U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 제2 배지 중에 4U/ml 내지 5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제2 배지 중에, Flt-3L는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 제2 배지 중에 4U/ml 내지 5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 제2 배지 중에 약 4.5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L는 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제2 배지 속에서, Flt-3L는 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 약 0.25 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는 GBGM®이 아니다.

[0025]

소정의 양상에서, 줄기세포 동원 인자는 이하에 기재된 바와 같은 화학식 (I), (I-A), (I-B), (I-C) 또는 (I-D)를 갖는 화합물이다.

[0026]

소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 이외에, SCF, IL-6, IL-7,

G-CSF 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 이외에, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 10 U/ml 내지 10,000 U/ml의 농도로 존재하고, 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 100 U/ml 내지 10,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 300 U/ml 내지 3,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 10 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 약 1,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 약 20 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지 중에서, SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지 중에서, SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지 중에, SCF는 약 22 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 약 20 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 GBGM®이 아니다.

[0027] 소정의 양상에서, 제3 배지는 100 ng/ml의 IL-7, 1000 ng/ml의 IL-2, 20 ng/ml의 IL-15, 및 줄기세포 동원제를 포함하고 SCF를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 1000 ng/ml의 IL-2, 20 ng/ml의 IL-15 및 줄기세포 동원제를 포함하고 SCF를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 20 ng/ml의 IL-15, 및 줄기세포 동원제를 포함하고 SCF를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 100 ng/ml의 IL-7, 22 ng/ml의 SCF, 1000 ng/ml의 IL-2, 및 20 ng/ml의 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 22 ng/ml의 SCF, 1000 ng/ml의 IL-2 및 20 ng/ml의 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 22 ng/ml의 SCF, 1000 ng/ml의 IL-2 및 20 ng/ml의 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 22 ng/ml의 SCF 및 1000 ng/ml의 IL-2를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다.

[0028] 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0029] 일반적으로, 특별하게 인용된 배지 성분은 상기 배지의 정의되지 않은 성분 중에 가능한 성분, 예컨대, 혈청을 언급하지 않는다. 예를 들면, 상기 Tpo, IL-2 및 IL-15는 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 정의되지 않은 성분 내에 포함되지 않는데, 예컨대, 상기 Tpo, IL-2 및 IL-15는 혈청 내에 포함되지 않는다. 또한, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및/또는 GM-CSF는 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 정의되지 않은 성분 내에 포함되지 않는데, 예컨대, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및/또는 GM-CSF는 혈청 내에 포함되지 않는다.

[0030] 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 인간 혈청-AB를 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 1% 내지 20%의 인간 혈청-AB, 5% 내지 15%의 인간 혈청-AB, 또는 약 2, 5 또는 10%의 인간 혈청-AB를 포함한다.

[0031] 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 2-머캅토에탄올을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 겐타마이신을 포함한다.

[0032] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양되기 전에 상기 제1 배지 중에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20일 동안 배양된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 상기 제3 배지 중에서의 상기 배양되기 전에 상기 제2 배지 중에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20일 동안 배양된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 상기 제3 배지 중에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 동안, 또는 30일 초과 동안

배양된다.

- [0033] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에서 7 내지 13일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지 중에서 2 내지 6일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생산하며; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지 중에서 10 내지 30일 동안 배양되는데, 즉, 세포는 총 19 내지 49일 동안 배양된다.
- [0034] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에서 8 내지 12일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지 중에서 3 내지 5일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생산하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지 중에서 15 내지 25일 동안 배양되는데, 즉, 세포는 총 26 내지 42일 동안 배양된다.
- [0035] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에 약 10일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지 중에서 약 4일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생산하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지 중에서 약 21일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 약 35일 동안 배양된다.
- [0036] 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 및 제3 배지 중에서의 상기 배양은 모두 정적 배양 조건, 예컨대, 배양 접시 또는 배양 플라스크 속에서 수행된다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 적어도 하나에서의 상기 배양은 스피너 플라스크(spinner flask) 속에서 수행된다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양은 정적 배양 조건 하에서 수행되고, 상기 제3 배지 중에서의 상기 배양은 스피너 플라스크 속에서 수행된다.
- [0037] 소정의 양상에서, 상기 배양은 스피너 플라스크 속에서 수행된다. 다른 양상에서, 상기 배양은 G-Rex 장치 속에서 수행된다. 또 다른 양상에서, 상기 배양은 WAVE 생물반응기 속에서 수행된다.
- [0038] 소정의 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 초기에 상기 제1 배지 내에 1×10^4 내지 1×10^5 개의 세포/ml로 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 초기에 상기 제1 배지 내에 약 3×10^4 개의 세포/ml로 접종된다.
- [0039] 소정의 양상에서, 상기 제1 세포 집단은 초기에 상기 제2 배지 내에 5×10^4 내지 5×10^5 개의 세포/ml로 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 제1 세포 집단은 초기에 상기 제2 배지 내에 약 1×10^5 개의 세포/ml로 접종된다.
- [0040] 소정의 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내에 1×10^5 내지 5×10^6 개의 세포/ml로 접종된다. 소정의 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 1×10^5 내지 1×10^6 개의 세포/ml로 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 5×10^5 개의 세포/ml로 접종된다. 보다 구체적인 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 스피너 플라스크 속에서 상기 제3 배지 내로 약 5×10^5 개의 세포/ml로 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내에 약 3×10^5 개의 세포/ml로 접종된다. 보다 구체적인 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 정적 배양으로 상기 제3 배지 내에 약 3×10^5 개의 세포/ml로 접종된다.
- [0041] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 7-아미노악티노마이신 D(7AAD) 염색(staining)에 의해 측정된다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 아넥신-V(annexin-V) 염색에 의해 측정된다. 구체적인 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 7-AAD 염색 및 아넥신-V 염색 둘 다에 의해 측정된다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 트립신 블루 염색에 의해 측정된다.

- [0042] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 5,000배 초과 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 초과 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 초과 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 초과 ILC3 세포를 생산한다.
- [0043] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 70%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 75%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다.
- [0044] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다.
- [0045] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3-CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3-CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3-CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3-CD11a- ILC3 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다.
- [0046] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내(In vitro)에서 10:1의 비로 공배양(co-culturing)하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다.
- [0047] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 10:1의 비로 공배양하는 경우, 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다.
- [0048] 소정의 양상에서, 상기 제3 배양 단계 후, 상기 제3 세포 집단, 예컨대, 상기 자연살해 세포 집단은 냉동보존된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 배양 단계 후, 상기 제4 세포 집단, 예컨대, 상기 자연살해 세포 집단은 동결건조된다.
- [0049] 소정의 양상에서, 자연살해 세포를 포함하는 세포, 즉, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법으로 생산된 자연살해 세포를 포함하는 세포 집단이 본 명세서에 제공된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법으로 생산된 단리

된 자연살해 세포 집단이 본 명세서에 제공된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 20%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 40%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 60%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 80%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 인간용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0050] 소정의 양상에서, ILC3 세포, 즉, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 자연살해 세포를 포함하는 세포의 집단이 본 명세서에 제공된다. 구체적인 실시형태에서, ILC3 세포를 포함하는 세포의 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 인간용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0051] 일 실시형태에서, 단리된 NK 전구세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 NK 전구세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 실시형태에서, NK 전구세포 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 인간용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0052] 다른 실시형태에서, 단리된 성숙한 NK 세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 성숙한 NK 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 실시형태에서, 성숙한 NK 세포 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 인간용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0053] 다른 실시형태에서, 단리된 ILC3 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 ILC3 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 인간용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0054] 다른 실시형태에서, 세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 세포 집단은 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된 제3 세포 집단이다. 다른 실시형태에서, 세포 집단이 본 명세서에 제공되고, 여기서 상기 세포 집단은 본 명세서에 기재된 방법으로 생산된 제4 세포 집단이다.

[0055] 다른 실시형태에서, 단리된 NK 세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 활성화되고, 여기서 상기 활성화된 NK 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 NK 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 인간용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

[0056] 따라서, 다른 양상에서, 종양 세포 증식을 억제하거나, 바이러스 감염을 치료하거나, 암, 예컨대, 혈액암 및 고형 종양을 치료하기 위한 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단의 용도가 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예컨대, 본 명세서에 기재된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드와 접촉되거나, 이와 함께 사용된다. 소정의 실시형태에서, NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예컨대, 본 명세서에 기재된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드로 치료되거나 이와 함께 사용된다.

[0057] 구체적인 실시형태에서, 상기 암은 고형 종양이다. 다른 실시형태에서, 상기 암은 혈액암이다. 구체적인 실시형태에서, 암은 교모세포종, 주요 도관 암종(primary ductal carcinoma), 백혈병, 급성 T 세포 백혈병, 만성 골수성 림프종(CML), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 폐 암종, 결장 선암종, 조직구성 림프종, 결장직장 암종, 결장직장 선암종, 전립선암, 다발골수종 또는 망막아세포종이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 암은 AML이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 암은 다발경화증이다.

[0058] 다른 구체적인 실시형태에서, NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 얻어진다. 일 실시형태에서, NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터 얻어진다. 일 실시형태에서, NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 제대혈로부터 얻어진다. 일 실시형태에서, NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 말초 혈액으로부터 얻어진다. 다른 구체적인 실시형태에서, NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는, 태반 관류액 및 제대혈, 예컨대, 관류액과 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 세포와 조합된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 얻어지는 태반 이외의 태반으로부터 단리된다. 소정의 실시형태에서, 조합된 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 혼주(pooling)시키거나 조합함으로써 얻어질 수 있다. 소정의 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 조합된 세포를 얻기 위해 용적당 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1,

35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다. 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5 또는 3:1 내지 1:3의 비로 조합된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 8.5:1.5(85%:15%)의 비로 조합된다.

[0059] 소정의 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 조합된 세포를 얻기 위해 전체 핵화된 세포(total nucleated cell: TNC) 함량에 의해 측정된 것으로서 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다. 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3로 조합된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다.

[0060] 따라서, 일 실시형태에서, 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단으로부터의 세포 유효량을 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 암은 고형 종양이다. 소정의 실시형태에서, 암은 혈액암이다. 구체적인 실시형태에서, 혈액암은 백혈병이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 혈액암은 림프종이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 혈액암은 만성 림프구성 백혈병이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 혈액암은 만성 골수성 백혈병이다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되었다. 다른 양상에서, 상기 자연살해 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 동결보존되지 않았다.

[0061] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은, 상기 투여 전에, 면역조절 화합물, 예컨대, 본 명세서에 기재된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드로 치료되어 왔다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 치료되어 왔다. 다른 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18 또는 IL15 중 하나 이상으로 사전치료되어 왔다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 방법은 개체에게 (1) 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 유효량의 단리된 NK 세포 집단; 및 (2) 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 투여하는 단계를 포함한다. 이와 관련하여 "유효량"은 NK 세포 집단 및 선택적으로, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드(thalidomide)가 투여되지 않았던 암 또는 감염을 지닌 개체와 비교하여 상기 암 또는 상기 감염의 하나 이상의 증상에 있어서 검출 가능한 개선을 야기하는, NK 세포 집단 중의 세포, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드의 양을 의미한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 면역조절 화합물은 레날리도마이드(lenalidomide) 또는 포말리도마이드(pomalidomide)이다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 개체에게 항암제, 예컨대, 하기 기재된 항암제 중 하나 이상을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0062] 다른 실시형태에서, 치료학적 유효량의 NK 세포 집단을 종양 세포에 근접하도록 하는, 예컨대, 종양 세포를 NK 세포 집단 속의 세포와 접촉시키는 방법을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 이후에, 달리 나타내지 않는 한, 용어 "근접성"(proximity)은 바람직한 결과를 유발하기에 충분한 근접성을 지칭하는데; 예컨대, 소정의 실시형태에서, 용어 근접성은 접촉을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 시험관내에서 일어난다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 생체외에서 일어난다. 다른 실시형태에서, 상기 접촉은 생체내에서 일어난다. 복수의 NK 세포는 치료학적 유효량의 NK 세포 집단이 종양 세포와 근접하도록 하는, 예컨대, 종양 세포를 NK 세포 집단 속의 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부암 세포 또는 육종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포 또는 망막아세포종 세포이다.

[0063] 일 실시형태에서, 종양 세포를 복수의 자연살해 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용하기 위한 복수의 자연살해 세포가 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 자연살해 세포는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 인간 개체에서 일어난다. 소정의 실시형

태에서, 상기 방법은 상기 자연살해 세포를 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 다발골수종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 급성 골수성 백혈병(AML) 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 재발된/난치성 AML을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 AML에 대해 적어도 하나의 비-선천성 림프 세포(ILC) 치료제로 실패한 AML을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 65세 이상이고 첫번째 차도(remission) 중에 있다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 상기 NK 세포의 투여 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부암 세포 또는 육종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포, 간 종양 세포, 폐 종양 세포, 췌장 종양 세포, 신장 종양 세포 또는 교모세포종 다형성(glioblastoma multiforme: GBM) 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 항-CD33 항체, 항-CD20 항체, 항-CD138 항체 또는 항-CD32 항체와 함께 투여된다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되었거나 또는 냉동보존되지 않았다.

[0064] NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드(scaffold)를 사용하여 수행된다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한 것이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터(catheter)를 통한다. 구체적인 실시형태에서, NK 세포의 주사는 국소 주사이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종) 내로 직접 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 투여이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통해서이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 주사에 의한 투여는 복강경검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명 또는 영상의학에 의해 보조된다.

[0065] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 면역조절 화합물, 예컨대 본 명세서의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드, 및/또는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 치료된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 IL2, IL12, IL18 또는 IL15 중 하나 이상으로 치료된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 유효량의 면역조절 화합물, 예컨대, 본 명세서의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드는 또한 종양 세포와 근접하게 되는데, 예컨대, 종양 세포는 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉된다. 이와 관련하여, "유효량"은 NK 세포 집단, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접하게 되지 않은 종양 세포의 동일한 수와 비교하여 상기 종양 세포의 검출 가능한 억제를 야기하는, NK 세포 집단 중 세포의 양, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드의 양을 의미한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 방법은 유효량의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물을 종양 세포와 근접하게 하거나, 예컨대, 상기 종양 세포를 항암 화합물과 접촉시키는 단계를 더 포함한다.

[0066] 상기 방법의 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 혈액암 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 다른 실시형태에서, 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포(AML), 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 교모세포종 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막아세포종 세포, 결장직장 암종 세포, 전립선 암 세포 또는 결장직장 선암종 세포이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 AML 세포이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 다발 골수종 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 접촉하거나 또는 근접하게 되는 것은 시험관내에서 일어난다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 접촉하거나 또는 근접하게 되는 것은 생체외에서 일어난다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 접촉하거나 또는 근접하게 되는 것은 생체내에서 일어난다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 생체내 접촉 또는 근접하게 되는 것은 인간에서 일어난다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포 간 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 폐 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 췌장 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 신장 종양 세포이다. 구

체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 교모세포종 다형성(GBM) 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 항-CD33 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 항-CD20 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 항-CD138 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 항-CD32 항체와 함께 투여된다.

[0067] 다른 양상에서, 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) NK 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 체대혈 NK 세포, 또는 체대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위해, 예컨대, 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생산하기 위해 본 명세서에 기재된 방법들 중 어느 것에 의해 생산되었다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 확장되었다. 다른 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 NK 세포는 서로 독립적으로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서 상기 NK 세포 집단은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법으로 생산된다.

[0068] 다른 양상에서, 급성 골수성 백혈병(AML)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 NK 세포(IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18를 사용한 사전치료에 의해 선택적으로 활성화됨)를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서 AML을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18 또는 IL15 중 하나 이상으로 사전 치료된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 체대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 체대혈 NK 세포 또는 NK 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본 명세서에 설정된 바와 같은 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생산하기 위한, 본 명세서에 기재된 방법들 중 어느 것에 의해서 생산되었다. AML을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법으로 생산된다. 특수한 실시형태에서, 앞서의 방법으로 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아기 AML을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 AML에 대한 적어도 하나의 비-자연살해 또는 비-선천성 림프 세포 치료제에 실패한 AML을 갖는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 65세 이상이고 첫번째 차도 상태에 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 상기 자연살해 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화된다. 다른 양상에서, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 치료학적 유효 투여량의 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법으로 생산된 NK 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서 상기 CLL을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 체대혈 NK 세포, 또는 체대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 방법들 중 어느 것에 의해서 생산되었다. 상기 방법들 중 어느 것의 구체적인 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 플루다라빈, 및 확장된 NK 세포는 상기 개체에게 별도로 투여된다. CLL을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0069] 다른 실시형태에서, 치료학적 유효량의 ILC3 세포 집단을 종양 세포에 근접시키는 단계, 예컨대, 종양 세포를 ILC3 세포 집단 속의 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 이후에, 달리 나타내지 않는 한, 용어 "근접성"은 바람직한 결과를 유발하기에 충분한 근접성을 말하며, 예컨대, 소정의 실시형태에서, 용어 근접성은 접촉을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 시험관내에서 일어난다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 생체외에서 일어난다. 다른 실시형태에서, 상기 접촉은 생체내에서 일어난다. 복수의 ILC3 세포는 치료학적 유효량의 ILC3 세포집단이 종양 세포와 근접하도록 함, 예컨대, 종양 세포를 ILC3 세포 집단 속의 세포와 접촉시킴을 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부 암 세포, 또는 육종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포이다.

- [0070] 일 실시형태에서, 종양 세포를 복수의 ILC3 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 사용하기 위한 복수의 ILC3 세포가 본 명세서에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 인간 개체에서 일어난다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 ILC3 세포를 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 다발성 골수종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 급성 골수성 백혈병(AML) 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 재발된/난치성 AML을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 AML에 대해 적어도 하나의 비-선천성 림프 세포(ILC) 치료제로 실패한 AML을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 65세 이상이고 첫 번째 차도 중에 있다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 상기 ILC3 세포의 투여 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부 암 세포, 또는 육종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포, 간 종양 세포, 폐 종양 세포, 췌장 종양 세포, 신장 종양 세포 또는 교모세포종 다형성 (GBM) 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD33 항체, 항-CD20 항체, 항-CD138 항체 또는 항-CD32 항체와 함께 투여된다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되지 않았다.
- [0071] ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드를 사용하여 수행된다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터를 통한다. 구체적인 실시형태에서, ILC3 세포의 주사는 국소 주사이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종)내로 직접 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 투여이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통해서이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 주사에 의한 투여는 복강경검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명, 또는 영상의학에 의해 보조된다.
- [0072] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 ILC3 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 면역조절 화합물, 예컨대 본 명세서의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드, 및/또는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 치료된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 치료된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 유효량의 면역조절 화합물, 예컨대, 본 명세서의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드는 또한 종양 세포와 근접하게 되는데, 예컨대, 종양 세포는 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉된다. 이와 관련하여, "유효량"은 ILC3 세포 집단, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접하게 되지 않은 종양 세포의 동일한 수와 비교하여 상기 종양 세포의 검출 가능한 억제를 야기하는, ILC3 세포 집단 중 세포의 양, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드의 양을 의미한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 방법은 유효량의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물을 종양 세포와 근접하게, 예컨대, 상기 종양 세포를 항암 화합물과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0073] 당해 방법의 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 혈액암 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 다른 실시형태에서, 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포(AML), 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 교모세포종 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막아세포종 세포, 결장직장 암종 세포, 전립선 암 세포, 또는 결장직장 선암종 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 접촉하거나 또는 근접하게 되는 것은 시험관내에서 일어난다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 접촉하거나 또는 근접하게 되는 것은 생체외에서 일어난다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 접촉하거나 또는 근접하게 되는 것은 생체내에서 일어난다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 생체내 접촉 또는 근접하게 되는 것은 인간에서 일어난다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 간

종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 폐 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 췌장 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 신장 종양 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 종양 세포는 교모세포종 다형성(GBM) 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD33 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD20 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD138 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD32 항체와 함께 투여된다.

[0074] 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위해, 예컨대, 3-단계 방법을 사용하여 ILC3 세포 집단을 생산하기 위해 본 명세서에 기재된 방법들 중 어느 것에 의해 생산되었다. 다른 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 상기 투여 전에 확장되었다. 다른 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 ILC3 세포는 서로 독립적으로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법으로 생산된다.

[0075] 다른 양상에서, 급성 골수성 백혈병(AML)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 ILC3 세포(IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18를 사용한 사전치료에 의해 선택적으로 활성화됨)를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개체에서 AML을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18 또는 IL15 중 하나 이상으로 사전치료되었다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본 명세서에 설정된 바와 같은 3-단계 방법을 사용하여 ILC3 세포 집단을 생산하기 위한, 본 명세서에 기재된 방법 중 어느 것에 의해서 생산되었다. AML을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단은 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법으로 생산된다. 특수한 실시형태에서, 앞서의 방법으로 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML 또는 소아기 AML을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 AML에 대한 적어도 하나의 비-자연살해 또는 비-선천성 림프 세포 치료제에 실패한 AML을 갖는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 65세 이상이고 첫번째 차도 상태에 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 상기 ILC3 세포를 투여받기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다. 다른 양상에서, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 치료학적 유효 투여량의 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법으로 생산된 ILC3 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개체에서 상기 CLL을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 ILC3 세포 집단을 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 방법들 중 어느 것에 의해서도 생산되었다. 상기 방법들 중 어느 것의 구체적인 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 플루다라빈, 및 확장된 ILC3 세포는 상기 개체에게 별도로 투여된다. CLL을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단은 본 명세서에 기재된 바와 같은, 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0076] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 냉동보존되는데, 예컨대, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 냉동보존된다. 특징의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 냉동보존 배지, 예컨대, 본 명세서에 기재된 냉동보존 배지 중에서 냉동보존된다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 전구세포 집단 및/또는 NK 세포 집단의 냉동보존은 (1) 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 전구세포 집단 및/또는 NK 세포 집단을 포함하는 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 냉동보존 배지를 가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 냉동보존된 샘플을 -80°C 이하로 저장하는 단계를 포함한다.

[0077] 상기 치료 또는 종양 억제의 방법의 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 다른 자연살해 세포, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 단리되거나, 상이한 방

법에 의해 조혈 세포로부터 생산된 자연살해 세포와 조합된다. 구체적인 실시형태에서, 자연살해 세포 집단은 다른 공급원으로부터, 또는 상이한 방법에 의해 제조된 자연살해 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0078] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단은 냉동보존, 예컨대, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 냉동보존된다. 특정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단은 냉동보존 배지, 예컨대 본 명세서에 기재된 냉동보존 배지 중에서 냉동보존된다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 전구세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단의 냉동보존은 (1) 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 전구세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 포함하는 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터 세포 현탁액 용액에 냉동보존 배지를 가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 냉동보존된 샘플을 -80°C 이하로 저장하는 단계를 포함한다.

[0079] 상기 치료 또는 중앙 억제 방법의 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 다른 ILC3 세포, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 단리되거나, 상이한 방법에 의해 조혈 세포로부터 생산된 ILC3 세포와 조합된다. 구체적인 실시형태에서, ILC3 세포 집단은 다른 공급원으로부터, 또는 상이한 방법에 의해 제조된 ILC3 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0080] 다른 양상에서, 화학치료요법 후 위장관을 보수하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 복수의 ILC3 세포는 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 화학치료요법 후 위장관을 보수하는 방법에서 사용될 수 있으며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0081] 다른 양상에서, 방사선에 대해 개체를 보호하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 복수의 ILC3 세포는 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방사선에 대해 개체를 보호하는 방법에서 사용될 수 있고, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 상기 방법의 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 골수 이식에 대한 보조제(adjutant)로서 사용될 수 있다.

[0082] 다른 양상에서, 개체의 가슴샘을 재구성하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 복수의 ILC3 세포는 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 개체의 가슴샘을 재구성하는 방법에서 사용될 수 있으며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0083] 다른 양상에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 단리된 NK 세포를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 조혈 세포, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초 혈액으로부터 단리된 조혈 줄기세포 또는 전구세포로부터 생산된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 조성물 중의 세포의 적어도 70%를 구성한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 조성물 중의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 구성한다. 소정의 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD3^{-} 및 CD56^{+} 이다. 소정의 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포의 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD16^{-} 이다. 소정의 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%는 CD94^{+} 이다.

[0084] 소정의 양상에서, $\text{CD56}^{+}\text{CD3}^{-}$ $\text{CD117}^{+}\text{CD11a}^{+}$ 인 자연살해 세포의 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 자연살해 세포는 퍼포린 및/또는 EOMES를 발현하고, $\text{ROR}\gamma\text{t}$, 아틸 탄화수소 수용체 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 퍼포린 및 EOMES를 발현하고, $\text{ROR}\gamma\text{t}$, 아틸 탄화수소 수용체, 또는 IL1R1 중 어느 것도 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 또한 T-bet, GZMB, NKp46, NKp30 및 NKG2D를 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 CD94를 발현한다. 소정의

양상에서, 상기 자연살해 세포는 CD94를 발현하지 않는다.

[0085] 소정의 양상에서, CD56+CD3- CD117+CD11a-인 ILC3 세포의 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하고, CD94, 퍼포린 및 EOMES 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체 및 IL1R1을 발현하고, CD94, 퍼포린 또는 EOMES 중 어느 것도 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 또한 CD226 및/또는 2B4를 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 또한 IL-22, TNF α 및 DNAM-1 중 하나 이상을 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 CD226, 2B4, IL-22, TNF α 및 DNAM-1을 발현한다.

[0086] 소정의 양상에서, 자연살해 세포 및 ILC3 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포를 상기 제3 세포 집단으로부터 분리하는 단계; 및 (e) CD11a+ 세포를 상기 CD11a- 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비에서 합하여 제4 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt-3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 50:1의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 20:1의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 10:1의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 5:1의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 1:1의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 1:5의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 1:10의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 1:20의 비로 조합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포와 CD11a- 세포는 1:50의 비로 조합된다.

[0087] 소정의 양상에서, 상기 집단 중 복수의 NK 세포는 마이크로RNA인 dme-miR-7, hsa-let-7a, hsa-let-7c, hsa-let-7e, hsa-let-7g, hsa-miR-103, hsa-miR-106a, hsa-miR-10b, hsa-miR-1183, hsa-miR-124, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1255A, hsa-miR-126, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-144, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-155, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-181a, hsa-miR-182, hsa-miR-192, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-200a, hsa-miR-20a, hsa-miR-214, hsa-miR-221, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c, hsa-miR-31, hsa-miR-335, hsa-miR-374b, hsa-miR-454, hsa-miR-484, hsa-miR-513C, hsa-miR-516-3p, hsa-miR-520h, hsa-miR-548K, hsa-miR-548P, hsa-miR-600, hsa-miR-641, hsa-miR-643, hsa-miR-874, hsa-miR-875-5p 및 hsa-miR-92a-2 중 하나 이상을 말초 혈액 자연살해 세포보다 검출 가능하게 더 높은 수준으로 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 집단 중 복수의 NK 세포는 마이크로RNA인 miR188-5p, miR-339-5p, miR-19a, miR-34c, miR-18a, miR-500, miR-22, miR-222, miR-7a, miR-532-3p, miR-223, miR-26b, miR-26a, miR-191, miR-181d, miR-322 및 miR342-3p 중 하나 이상을 말초 혈액 자연살해 세포보다 검출 가능하게 더 낮은 수준으로 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 집단 중 복수의 NK 세포는 마이크로RNA인 miR-181a, miR-30b 및 miR30c 중 하나 이상을 말초 혈액 자연살해 세포와 동일한 수준으로 발현한다.

[0088] 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 단일 개체로부터 유래되는데, 즉, 조혈 줄기 및 전구세포는 단일 개체로부터 유래된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 적어도 2명의 상이한 개체로부터의 자연살해 세포를 포함하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 전구세포는 적어도 2명의 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 이들에 대한 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개체 이외의 상이한 개체로부터 유래되는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 전구세포는 이들에 대한 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개체 이외의 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 당해 NK 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉하지 않거나 근접하게 되지 않은 동등한 수의 자연살해 세포, 즉, NK 세포보다 검출 가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양 및 시간으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마

이드와 접촉되거나 근접하게 된다. 다른 구체적인 실시형태에서, NK 세포를 포함하는 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 면역조절 화합물은 하기 기술된 화합물, 예컨대 아미노-치환된 아이소인돌린 화합물이다. 소정의 실시형태에서, 면역조절 화합물은 레날리도마이드이다. 소정의 실시형태에서, 면역조절 화합물은 포말리도마이드이다.

[0089] 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포를 포함하는 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하나 이상의 하기 기재된 항암 화합물을 포함한다.

[0090] 보다 구체적인 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및 다른 공급원 으로부터 유래되거나 다른 방법에 의해 제조된 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 공급원 은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 다른 공급원은 말초 혈액이다. 보다 구체 적인 실시형태에서, NK 세포는 다른 공급원으로부터 유래되거나, 다른 방법에 의해 제조된 자연살해 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0091] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포와 동일한 개체로부터 유래된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 이외의 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 속의 세 포 모두, 또는 실질적으로 모두(예컨대, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 다른 구체적인 실시형 태에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모계 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상 기 태반 관류액 중 태아 세포는 상기 관류액 속에 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만의 세포를 포함한다. 다 른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 태반 혈관화를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득한다. 다른 구체 적인 실시형태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 적혈구 를 제거하기 위해 처리된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예컨대, 하기 기술 된 면역조절 화합물, 예컨대, 아미노-치환된 아이소인돌린 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조 성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0092] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및 태반 관 류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포와 동일한 개체로부 터 유래된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포와는 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 유래된다. 태반 관류액을 포 함하는 상기 실시형태 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2명의 개체 로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 실시형태들 중 어느 것의 다른 보다 구체 적인 실시형태에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 적어도 2명의 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형 태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물들 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0093] 다른 양상에서, 단리된 NK 세포 집단, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법 중 어느 실시형태에 의해 생산 된, 단리된 NK 세포 집단을 포함하는 조성물, 예컨대, 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 구체적인 실시 형태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조혈 세포, 예컨대, 태반으로부터, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈, 및/또 는 말초 혈액으로부터 단리된 조혈 줄기세포 또는 전구세포로부터 생산된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물 중의 세포의 적어도 70%를 차지한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물 속에 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 다른 구체적인 실시 형태에서, 상기 NK 세포는 조성물 속에 세포의 적어도 70%를 차지한다. 소정의 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 $CD3^{-}$ 및 $CD56^{+}$ 이다. 소정의 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포의 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 $CD16^{-}$ 이다. 소정의 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%는 $CD94^{+}$ 이다.

- [0094] 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물 속의 상기 단리된 NK 세포는 단일 개체로부터 유래되는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 전구세포는 단일 개체로부터 유래된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포는 적어도 2명의 상이한 개체로부터의 NK 세포를 포함하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 전구세포는 적어도 2명의 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물 속의 상기 단리된 NK 세포는 이에 대해 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개체 이외의 상이한 개체로부터 유래되는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 전구세포는 이에 대해 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개체 이외의 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 상기 NK 세포가 동등한 수의 자연살해 세포, 즉, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉하지 않거나 근접하지 않은 NK 세포보다 검출 가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 검출 가능하게 발현하기에 충분한 양으로 및 시간 동안 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉하거나 근접한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 면역조절 화합물은 하기 기술된 화합물이다.
- [0095] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.
- [0096] 보다 구체적인 실시형태에서, 조성물은 다른 공급원으로부터, 또는 다른 방법으로 제조된 NK 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 체대혈이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 다른 공급원은 말초 혈액이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포 집단은 다른 공급원으로부터 유래되거나, 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.
- [0097] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 NK 세포 집단 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 유래된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과는 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 속의 세포의 모두, 또는 실질적으로 모두(예컨대, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 태아 세포는 상기 태반 관류액 속의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 태반 혈관화를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하기 위해 처리된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예컨대, 하기 기술된 면역조절 화합물, 예컨대, 아미노-치환된 아이소인돌린 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.
- [0098] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 NK 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 유래된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과는 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 여기서 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 유래된다. 태반 관류액을 포함하는 상기 실시형태들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2명의 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 실시형태들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 적어도 2명의 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물 중 하나 이상을 포함한다.
- [0099] **3.1. 전문 용어**
- [0100] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "면역조절 화합물" 및 "IMiDTM"은 탈리도마이드를 포함하지 않는다.
- [0101] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "레날리도마이드"는 3-(4'-아미노아이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-다이온 (화학 초록 서비스 명칭: Chemical Abstracts Service name) 또는 2,6-피페리딘다이온, 3-(4-아미노-1,3-다이

하이드로-1-옥소-2H-아이소인돌-2-일)-(순수 및 응용 화학의 국제 연합(IUPAC) 명칭)을 의미한다. 본 명세서에 사용된 것으로서 "포말리도마이드"는 4-아미노-2-(2,6-다이옥소피페리딘-3-일)아이소인돌-1,3-다이온을 의미한다.

- [0102] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포를 언급하는 경우 "다능성(multipotent)"은 세포가 다른 세포형의 세포로 분화하는 능력을 가짐을 의미한다. 소정의 실시형태에서, "다능성 세포"는 포유동물 신체의 대략 260개 세포형의 서브세트(subset)로 성장하는 능력을 지닌 세포이다. 만능 세포(pluripotent cell)와는 달리, 다능성 세포는 세포형 모두를 형성하는 능력을 지니지 않는다.
- [0103] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "공급자 세포"는 제2 유형의 세포와 함께 공배양되어 제2 유형의 세포가 유지되고, 아마도 증식될 수 있는 환경을 제공하는 하나의 유형의 세포를 지칭한다. 특정 이론에 얽매이지 않고, 공급자 세포는 예를 들면, 펩타이드, 폴리펩타이드, 전기 시그널, 유기 분자(예컨대, 스테로이드), 핵산 분자, 성장 인자(예컨대, bFGF), 다른 인자(예컨대, 사이토카인), 및 대사 영양인자를 표적 세포에게 제공할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 공급자 세포는 단층으로 성장한다.
- [0104] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 추가의 변형없이, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 "자연살해 세포" 또는 "NK 세포"는 어떠한 조직 공급원으로부터의 자연살해 세포도 포함한다.
- [0105] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 추가의 변형없이, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 "ILC3 세포"는 어떠한 조직 공급원으로부터의 ILC3 세포도 포함한다.
- [0106] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "태반 관류액"은 태반, 예컨대, 인간 태반의 적어도 일부분을 통해, 예컨대, 태반 혈관화를 통해 통과한 관류 용액을 의미하며, 태반을 통과하는 동안 관류 용액에 의해 수집된 복수의 세포를 포함한다.
- [0107] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 단리되거나, 단리 가능한, 핵화된 세포, 예컨대, 종 핵화된 세포를 의미한다.
- [0108] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "종양 세포 억제", "종양 세포 증식의 억제" 등은, 예컨대, 종양 세포의 상기 집단 속의 종양 세포 중 하나 이상을 사멸시킴, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 또는 NK 세포 집단을 종양 세포의 집단과 근접하게 함으로써, 예컨대, 종양 세포의 집단을 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 또는 NK 세포 집단과 접촉시킴으로써, 종양 세포의 집단의 성장을 지연시킴을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 접촉은 시험관내 또는 생체외에서 일어난다. 다른 실시형태에서, 상기 접촉은 생체내에서 일어난다.
- [0109] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "조혈 세포"는 조혈 줄기세포 및 조혈 전구세포를 포함한다.
- [0110] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "정의되지 않은 성분"은 이의 구성성분이 일반적으로 제공되거나 정량화되지 않는 성분을 언급하는 배양 배지 분야에서의 기술 용어이다. "정의되지 않은 성분"의 예는 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예컨대, 인간 혈청 AB) 및 태아 혈청(예컨대, 태아 소 혈청 또는 태아 송아지 혈청)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0111] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "+"는, 특수한 세포 마커의 존재를 나타내는데 사용된 경우, 세포 마커가 동형 대조군보다 형광성 활성화된 세포 분류에 검출 가능하게 존재하거나 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경 이상으로 검출 가능함을 의미한다.
- [0112] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "-"는, 특수한 세포 마커의 존재를 나타내는데 사용된 경우, 세포 마커가 동형 대조군보다 형광성 활성화된 세포 분류에 검출 가능하게 존재하지 않거나 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경 이상으로 검출 가능하지 않음을 의미한다.

도면의 간단한 설명

- [0113] 도 1은 화합물 CRL1 내지 CRL11에 대한 NK 세포의 확장을 도시한다.
- 도 2는 화합물 CRL12 내지 CRL22에 대한 NK 세포의 확장을 도시한다.
- 도 3은 SR1 양성 대조군과 비교된 NK 세포의 확장을 도시한다.
- 도 4는 NK 세포가 유래되는 CD34+ 세포의 확장을 도시한다.

도 5는 확장된 NK 배양액의 세포독성을 도시한다.

도 6은 PNK 세포가 세포독성 머시너리를 암호화하는 유전자를 고도로 발현하는 것을 도시한다. 도 6A: CYNK 세포를 말초 혈액 유래 NK 세포(PB-NK)와 1:1비율로 배합하고, 10X Genomics Chromium 플랫폼 및 Illumina 시퀀싱을 이용해서 단일 세포 수준에서 유전자 발현을 분석하였다. 생물정보학 분석은 10X Genomics Cell Ranger 분석 파이프라인을 활용하였다. 전사체 분석은 그랜자임 B(GZMB) 발현 세포로 제한되었다. 도 6B: PNK 및 PB-NK 세포를 별개의 집단으로서 묘사하는 대표적인 tSNE 플롯. 도 6C: 선택된 NK 세포-연관 유전자의 tSNE 플롯. 데이터는 두 공여체를 대표한다.

도 7은 PNK 및 PB-NK 세포가 NK 세포 수용체를 암호화하는 유전자를 차별적으로 발현하는 것을 도시한다. 선택된 NK 세포 수용체 유전자의 발현은 말초 혈액 NK 세포(PB-NK) 및 CD11a+-비드-정제된 PNK 세포에서 실시간 정량적 PCR에 의해 분석되었다. 대안적인 명칭은 선택된 마커에 대한 히스토그램 위쪽에 나타내었다. 데이터는 CYNK 및 PBNK 세포에 대한 3명의 공여체(n=3)의 평균±SD를 나타낸다. * p<0.05, ** p<0.005, *** p<0.001.

도 8은 PB-NK 및 CYNK 세포에 대한 게이팅 전략을 도시한다. CYNK 및 PBMC 세포를 해동시키고 NK 세포 수용체를 표적화하는 형광단-결합된 항체로 염색하였다. 해당 도면은 CYNK 및 PB-NK 세포의 식별을 위한 대표적인 도트 플롯 및 게이팅 전략을 입증한다. 집단의 추가의 특성규명에 대해서는 도 9를 참조한다.

도 9는 CYNK 및 PB-NK 세포에 대한 표면 단백질의 차별적인 발현을 도시한다. CYNK 및 PB-NK 세포는 도 8에 나타난 바와 같이 사전 게이팅되었다.

도 10은 CYNK 세포가 표면 단백질 발현에 기초하여 PB-NK 세포로부터 구별되는 세포 집단을 형성하는 것을 도시한다. tSNE 플롯은 각각의 표면 마커에 기초한 CYNK 및 PB-NK 세포의 차별적인 클러스터링을 입증한다. tSNE 플롯은 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 유세포분석(flow cytometry) 데이터로부터 생성되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포로부터 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하고 확장시키는 신규한 방법이 본 명세서에 제공된다. 또한 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포로부터 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는 방법, 예컨대, 3-단계 방법이 본 명세서에 또한 제공된다. NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 조혈 세포(예컨대, CD34+ 조혈 줄기 세포)는 임의의 공급원, 예를 들면, 태반, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장 또는 간으로부터 얻어질 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단은 확장된 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 및/또는 조혈 전구세포로부터 생산된다. 일 실시형태에서, 조혈 세포는 이러한 세포의 공급원은 이러한 세포, 예컨대, 태반, 예를 들어, 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장, 간(예컨대, 태아 간) 및/또는 골수의 공급원으로부터 수집된다.

[0115] NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 조혈 세포는 어떠한 동물 종으로부터도 얻어질 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 포유동물 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 인간 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 영장류 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 개과 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 설치류 세포이다.

[0116] 5.1. 조혈 세포

[0117] 본 명세서에 개시된 방법에서 유용한 조혈 세포는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 분화될 수 있는 임의의 조혈 세포, 예컨대, 전구체 세포, 조혈 전구세포, 조혈 줄기세포 등일 수 있다. 조혈 세포는, 예컨대, 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 간 등 또는 이들의 조합 등과 같은 조직 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 조혈 세포는 태반으로부터 얻어질 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 태반 관류액으로부터 얻어진다. 일 실시형태에서, 조혈 세포는 제대혈로부터 얻어지지 않는다. 일 실시형태에서, 조혈 세포는 말초 혈액으로부터 얻어지지 않는다. 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 태아 세포와 모체 조혈 세포의 혼합물, 예컨대, 모체 세포가 조혈 세포의 총 수의 5% 초과를 차지하는 혼합물을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 적어도 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5%의 태아 세포를 포함한다.

[0118] 다른 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반 관류액, 제대혈, 태아 간, 동원된 말초 혈액, 또는 골수로부터 얻어진다. 다른 구체적인 실시형태에서, NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집

단이 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산되는 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 태반 관류액과 제대혈, 예컨대, 관류액으로서 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 조합된 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 제대혈은 이로부터 상기 태반 관류액이 얻어지는 태반 이외의 다른 태반으로부터 분리된다. 소정의 실시형태에서, 조합된 세포는 제대혈과 태반 관류액을 혼주시키거나 조합함으로써 얻어질 수 있다. 소정의 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 용적당 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합되어 조합된 세포를 얻는다. 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 조합된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 8.5:1.5(85%:15%)의 비로 조합된다.

[0119] 소정의 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 총 핵화된 세포(TNC) 함량당 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합되어 조합된 세포를 얻는다. 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 조합된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 제대혈과 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다.

[0120] 다른 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 상기 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단이 생산되는 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 제대혈 및 태반 관류액 둘 다를로부터 기원하지만, 여기서 상기 제대혈은 이로부터 상기 태반 관류액이 얻어지는 태반 이외의 태반으로부터 분리된다.

[0121] 소정의 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}$ 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 방법에서 유용한 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{+}$ 또는 $CD34^{+}CD38^{-}$ 이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}Lin^{-}$ 이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD2^{-}$, $CD3^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$, $CD19^{-}$, $CD24^{-}$, $CD56^{-}$, $CD66b^{-}$ 및/또는 글리코포린 A⁻ 중 하나 이상이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD2^{-}$, $CD3^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$, $CD19^{-}$, $CD24^{-}$, $CD56^{-}$, $CD66b^{-}$ 및 글리코포린 A⁻이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}CD33^{-}CD117^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}CD33^{-}CD117^{-}CD235^{-}CD36^{-}$ 이다.

[0122] 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD45^{+}$ 이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD45^{+}$ 이다. 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 $Thy-1^{+}$ 이다. 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}Thy-1^{+}$ 이다. 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD133^{+}$ 이다. 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD133^{+}$ 또는 $CD133^{+}Thy-1^{+}$ 이다. 다른 구체적인 실시형태에서, $CD34^{+}$ 조혈 세포는 $CXCR4^{+}$ 이다. 다른 구체적인 실시형태에서, $CD34^{+}$ 조혈 세포는 $CXCR4^{-}$ 이다. 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 KDR(혈관 성장 인자 수용체 2)에 대해 양성이다. 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}KDR^{+}$, $CD133^{+}KDR^{+}$ 또는 $Thy-1^{+}KDR^{+}$ 이다. 특정의 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 알데하이드 탈하이드로게나제(ALDH⁺)에 대해 양성이고, 예컨대, 세포는 $CD34^{+}ALDH^{+}$ 이다.

[0123] 특정의 다른 실시형태에서, $CD34^{+}$ 세포는 $CD45^{-}$ 이다. 구체적인 실시형태에서, $CD34^{+}$ 세포, 예컨대, $CD34^{+}$, $CD45^{-}$ 세포는 miRNAs hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, hsa-miR-520a, hsa-miR-337, hsa-miR-422a, hsa-miR-549 및/또는 hsa-miR-618 중 하나 이상 또는 모두를 발현한다.

[0124] 소정의 실시형태에서, 조혈 세포는 $CD34^{-}$ 이다.

- [0125] 조혈 세포는 또한 계통 구속(lineage commitment)을 나타내는 특정의 마커를 결여할 수 있거나, 발달 행위를 결여할 수 있다. 예를 들면, 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 HLA-DR⁻이다. 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 CD34⁺HLA-DR⁻, CD133⁺HLA-DR⁻, Thy-1⁺HLA-DR⁻ 또는 ALDH⁺HLA-DR⁻이다. 다른 실시형태에서, 조혈 세포는 계통 마커 CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A 중 하나 이상, 또는 모두에 대해 음성이다.
- [0126] 따라서, 조혈 세포는 비분화된 상태를 나타내는 마커의 존재, 또는 적어도 일부 계통 분화가 일어남을 나타내는 계통 마커의 부재를 기준으로 본 명세서에 개시된 방법에서 사용하기 위해 선택될 수 있다. 특이적인 마커의 존재 또는 부재를 기준으로 하여, 조혈 세포를 포함하는 세포의 분리 방법은 하기에 상세히 논의한다.
- [0127] 본 명세서에 제공된 방법에서 사용된 조혈 세포는 실질적으로 균질한 집단, 예컨대, 단일 조직 공급원으로부터 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 조혈 세포를 포함하는 집단, 또는 동일한 조혈 세포-관련 세포 마커를 나타내는 조혈 세포를 포함하는 집단일 수 있다. 예를 들면, 다양한 실시형태에서, 조혈 세포는 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터 적어도 약 95%, 98% 또는 99%의 조혈 세포를 포함할 수 있다.
- [0128] 본 명세서에 제공된 방법에서 사용된 조혈 세포는 1명의 개체, 예컨대, 하나의 태반으로부터 또는 복수의 개체로부터 얻어질 수 있거나, 예컨대, 혼주될 수 있다. 조혈 세포가 복수의 개체로부터 얻어져 혼주되는 경우, 조혈 세포는 동일한 조직 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 따라서, 다양한 실시형태에서, 혼주된 조혈 세포는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터 모든 것, 태반 혈액으로부터 모든 것, 제대혈로부터 모든 것, 말초 혈액으로부터 모든 것 등이다.
- [0129] 본 명세서에 개시된 방법에서 사용된 조혈 세포는 소정의 실시형태에서, 2개 이상의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함할 수 있다. 예를 들면, 소정의 실시형태에서, 2개 이상의 공급원으로부터의 조혈 세포를 본 명세서의 방법에서 사용하기 위해 합하는 경우, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 자연살해 세포를 생산하는데 사용된 복수의 조혈 세포는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함한다. 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 조혈 세포는 태반으로부터 및 제대혈로부터; 태반 및 말초 혈액으로부터; 태반 및 태반 혈액, 또는 태반 및 골수로부터의 조혈 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 조혈 세포는 제대혈로부터의 조혈 세포와 함께 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함하며, 여기서 상기 제대혈 및 태반은 동일한 개체로부터 유래되는데, 즉, 여기서 관류액 및 제대혈은 일치된다. 조혈 세포가 2개의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함하는 실시형태에서, 공급원으로부터의 조혈 세포는 예를 들면, 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1의 비로 조합될 수 있다.
- [0130] 5.1.1. 태반 조혈 줄기세포
- [0131] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법에서 사용된 조혈 세포는 태반 조혈 세포이다. 일 실시형태에서, 태반 조혈 세포는 CD34⁺이다. 구체적인 실시형태에서, 태반 조혈 세포는 주로(예컨대, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%의) CD34⁺CD38⁻ 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 태반 조혈 세포는 주로(예컨대, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%의) CD34⁺CD38⁺ 세포이다. 태반 조혈 세포는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 임의의 수단에 의해, 예컨대, 관류에 의해 출산 후 포유류(예컨대, 인간) 태반으로부터 얻어질 수 있다.
- [0132] 다른 실시형태에서, 태반 조혈 세포는 CD45⁻이다. 구체적인 실시형태에서, 조혈 세포는 CD34⁺CD45⁻이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 태반 조혈 세포는 CD34⁺CD45⁺이다.
- [0133] 5.2. 자연살해 및/또는 ILC3 세포 및 자연살해 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 생산
- [0134] 본 방법에 의한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 생산은 조혈 세포의 집단을 확장시키는 것을 포함한다. 세포 확장 동안에 조혈 세포 집단내의 복수의 조혈 세포는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 분화된다. 일 양상에서, NK 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또

는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계, 이어서 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-인 자연살해 세포를 포함하며, 상기 자연살해 세포의 적어도 70%, 예를 들어, 적어도 80%는 살아있다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD16-인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94+ 또는 CD16+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94- 또는 CD16-인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94+ 및 CD16+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 자연살해 세포는 CD94- 및 CD16-인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0135] 일 양상에서, NK 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0136] 일 양상에서, NK 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 인자(SCF) 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0137] 일 양상에서, NK 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 SCF, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지 및 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0138] 일 양상에서, NK 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포

이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포를 제3 세포 집단으로부터 분리시켜 제4 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제4 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0139] 전술한 실시형태 중 임의의 것의 소정의 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 퍼포린 및 EOMES를 발현한다. 소정의 실시형태에서, 상기 자연살해 세포는 ROR γ t 또는 IL1R1을 발현하지 않는다.

[0140] 일 양상에서, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0141] 일 양상에서, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기세포 동원제, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0142] 일 양상에서, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 형성하는 단계; 및 (c) SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0143] 일 양상에서, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을

을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기세포 동원제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하여 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0144] 일 양상에서, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) 상기 제3 세포 집단으로부터 CD11a- 세포를 분리시키거나, CD11a+ 세포를 제거하여 제4 세포 집단을 생산하는 단계를 포함하며; 여기서 제4 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0145] 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t 및 IL1R1을 발현한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 퍼포린 또는 EOMES를 발현하지 않는다.

[0146] 5.2.1. 3-단계 방법을 사용한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 생산

[0147] 일 실시형태에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는 3-단계 방법이 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 조혈 세포의 확장 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 밀리리터당 약 2×10^4 내지 약 6×10^6 개의 세포로 유지시킴을 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 내로 1×10^4 내지 1×10^5 개의 세포/㎖로 초기에 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 내로 약 3×10^4 개의 세포/㎖로 초기에 접종된다.

[0148] 소정의 양상에서, 상기 제1 세포 집단은 초기에 상기 제2 배지 내로 5×10^4 내지 5×10^5 개의 세포/㎖로 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 제1 세포 집단은 초기에 상기 제2 배지 내에 약 1×10^5 개의 세포/㎖로 접종된다.

[0149] 소정의 양상에서 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 1×10^5 내지 5×10^6 개의 세포/㎖로 접종된다. 소정의 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 1×10^5 내지 1×10^6 개의 세포/㎖로 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 5×10^5 개의 세포/㎖로 접종된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 5×10^5 개의 세포/㎖에서 회전 플라스크 속에 접종된다. 구체적인 양상에서, 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 3×10^5 개의 세포/㎖로 접종된다. 보다 구체적인 양상에서 상기 제2 세포 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 3×10^5 개의 세포/㎖에서 정적 배양물 속에 접종된다.

[0150] 특정의 실시형태에서, 3-단계 방법은 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포를 제1 배지 중에서 규정된 시간 동안, 예컨대, 본 명세서에 기재된 바와 같이 배양하여 제1 세포 집단을 얻는 것을 포함하는 제1 단계("단계 1")를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지는 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, LMWH, Flt-3L, SCF,

IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함하는 제1 배지 각각을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 첨가된 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 LMWH를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 백혈병 저해 인자(LIF), 대식세포 억제 단백질-1알파(MIP-1 α) 또는 둘 다를 결여한다.

[0151] 소정의 실시형태에서, 후속적으로, "단계 2"에서 상기 세포는 제2 배지 중에서 규정된 기간 동안, 예컨대, 본 명세서에 기재된 바와 같이 배양되어, 제2 세포 집단을 생산한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, 각각의 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제2 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제2 배지는 헤파린, 예컨대, LMWH를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, 각각의 Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF), 대식세포 억제 단백질-1알파(MIP-1 α) 또는 이들 둘 다를 결여한다.

[0152] 소정의 실시형태에서, 후속적으로, "단계 3"에서 상기 세포는 제3 배지 중에서 규정된 기간 동안, 예컨대, 본 명세서에 기재된 바와 같이 배양되어 제3 세포 집단, 예컨대, 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 외에, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 외에, 각각의 SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L 중 하나, 둘 또는 3개 모두를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제3 배지는 첨가된 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제3 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제3 배지는 헤파린, 예컨대, LMWH를 결여한다.

[0153] 구체적인 실시형태에서, 상기 3-단계 방법은 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된다. 소정의 실시형태에서, 상기 3-단계 방법은 기질 공급인자 세포 지지체의 부재하에서 수행된다. 소정의 실시형태에서, 상기 3-단계 방법은 외인성으로 첨가된 스테로이드(예컨대, 코르티손, 하이드로코르티손, 또는 이의 유도체)의 부재하에서 수행된다.

[0154] 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제1 배지는 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함한다. 소정의 양상에서, 제3-단계 방법에서 사용된 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, 저분자량 헤파린(LMWH), Flt-3 리간드(Flt-3L), 줄기세포 인자(SCF), IL-6, IL-7, 과립구 집락-자극 인자(G-CSF), 또는 과립구-대식세포-자극 인자(GM-CSF) 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 양상에서, 제3-단계 방법에서 사용된 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 제3 단계에서 사용된 제1 배지는, 줄기세포 동원제 및 Tpo 외에, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 양상에서, 제1 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 양상에서, 제1 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 양상에서, 제1 배지는 LMWH를 결여한다. 구체적인 양상에서, 제1 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 소정의 양상에서, 상기 Tpo는 제1 배지 중에 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 50 ng/ml, 20 ng/ml 내지 30 ng/ml, 또는 약 25 ng/ml의 농도로 존재한다. 다른 양상에서, 상기 Tpo는 제1 배지 중에 100 ng/ml 내지 500 ng/ml, 200 ng/ml 내지 300 ng/ml, 또는 약 250 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제1 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 1U/ml 내지 10U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제1 배지 중에서, Flt-3L은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50

ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제1 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 4U/ml 내지 5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제1 배지 중에서, Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제1 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 약 4.5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 .25 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제1 배지 중에서, Flt-3L은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 약 .25 ng/ml의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 겐타마이신과 같은 항생제; 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올과 같은 항산화제; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 소정의 실시형태에서, 제1 배지용 기재를 제공하는 배지는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예컨대, SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코스 또는 저 글루코스 DMEM), Advanced DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640과 같은 상업적으로 입수 가능한 세포/조직 배양 배지이거나; GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코스 또는 저 글루코스 DMEM), Advanced DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분과 같이, 공지된 세포/조직 배양 배지 중에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지는 GBGM®이 아니다. 상기 실시형태들 중 어느 것의 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 LIF, MIP-1α, 또는 이들 둘 다를 결여한다.

[0155]

소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에서 사용된 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에서 사용된 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에서 사용된 제2 배지는, 줄기세포 동원제 및 IL-15 외에, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 양상에서, 상기 제2 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 양상에서, 제2 배지는 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 양상에서, 제2 배지는 LMWH를 결여한다. 구체적인 양상에서, 제2 배지는 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 소정의 양상에서, IL-15는 상기 제2 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml, 10 ng/ml 내지 30 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 상기 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 1U/ml 내지 10U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제2 배지에서, Flt-3L은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 상기 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 제2 배지 중에 4U/ml 내지 5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제2 배지에서, Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다.

다. 소정의 양상에서, LMWH가 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 제2 배지 중에 4U/ml 내지 5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제2 배지 중에서, Flt-3L은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, LMWH가 제2 배지 중에 존재할 경우, LMWH는 제2 배지 중에 약 4.5U/ml의 농도로 존재하고; Flt-3L은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제2 배지 중에서, Flt-3L은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/ml의 농도로 존재하며; G-CSF는 약 0.25 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 젠타마이신과 같은 항생제; 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올과 같은 항산화제; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 소정의 실시형태에서, 제2 배지용 기재를 제공하는 배지는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예컨대, SCGM™, STEMMACTM, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코스 또는 저 글루코스 DMEM), Advanced DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640와 같은 상업적으로 입수 가능한 세포/조직 배양 배지이거나; 또는 GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코스 또는 저 글루코스 DMEM), Advanced DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분과 같이, 공지된 세포/조직 배양 배지 중에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제2 배지는 GBGM®가 아니다. 상기 실시형태들 중 어느 것의 구체적인 실시형태에서, 제1 배지는 LIF, MIP-1α, 또는 이들 둘 다를 결여한다.

[0156]

소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, SCF 및 LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, SCF, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 줄기세포 동원제, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 줄기세포 동원제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15 외에, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15 외에, 각각의 SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및 GM-CSF를 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 10 U/ml 내지 10,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 100 U/ml 내지 10,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 300 U/ml 내지 3,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 10 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 중에 약 1,000 U/ml의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 중에 약 20 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지 중에서, SCF는 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 1 ng/ml 내지 50 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/ml 내지 0.50 ng/ml의 농도로 존재하며; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.1 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지 중에서, SCF는 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/ml 내지 0.06 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 20 ng/ml 내지 30 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/ml 내지 0.30 ng/ml의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/ml 내지 0.5 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지 중에서, SCF는 약 22 ng/ml의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/ml의 농도로 존재하며; IL-7은 약 20 ng/ml의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/ml의 농도로 존재

하며; GM-CSF는 약 0.01 ng/ml의 농도로 존재한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 100 ng/ml의 IL-7, 1000 ng/ml의 IL-2, 20 ng/ml의 IL-15, 및 10의 줄기세포 동원제를 포함하고 SCF를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 1000 ng/ml의 IL-2, 20 ng/ml의 IL-15, 및 줄기세포 동원제를 포함하고 SCF를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 20 ng/ml의 IL-15, 및 줄기세포 동원제를 포함하고 SCF를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 100 ng/ml의 IL-7, 22 ng/ml의 SCF, 1000 ng/ml의 IL-2, 및 20 ng/ml의 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 22 ng/ml의 SCF, 1000 ng/ml의 IL-2, 및 20 ng/ml의 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 소정의 양상에서, 상기 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 22 ng/ml의 SCF, 1000 ng/ml의 IL-2, 및 20 ng/ml의 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 소정의 양상에서, 제3 배지는 20 ng/ml의 IL-7, 22 ng/ml의 SCF, 및 1000 ng/ml의 IL-2를 포함하고 줄기세포 동원제를 결여한다. 상기 실시형태 중 어느 것의 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지는 LIF, MIP-1 α, Flt-3L 중 하나, 둘 또는 3개 모두를 결여한다.

[0157] 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 젠타마이신과 같은 항생제; 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토포탄올과 같은 항산화제; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 소정의 실시형태에서, 제3 배지용 기재를 제공하는 배지는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예컨대, SCGM™, STEMMACTM, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코스 또는 저 글루코스 DMEM), Advanced DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640와 같은 상업적으로 입수 가능한 세포/조직 배양 배지이거나; GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코스 또는 저 글루코스 DMEM), Advanced DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분과 같이, 공지된 세포/조직 배양 배지 중에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 GBGM®가 아니다.

[0158] 일반적으로, 특별히 인용된 배지 성분은 상기 배지의 정의되지 않은 성분 중의 가능한 구성성분을 지칭하지 않는다. 예를 들면, 상기 Tpo, IL-2 및 IL-15는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 정의되지 않은 성분 내에 포함되지 않고, 예컨대, 상기 Tpo, IL-2 및 IL-15는 혈청 내에 포함되지 않는다. 또한, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및/또는 GM-CSF는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 규정되지 않은 성분 내에 포함되지 않고, 예컨대, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF 및/또는 GM-CSF는 혈청 내에 포함되지 않는다.

[0159] 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 인간 혈청-AB를 포함한다. 소정의 양상에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 1% 내지 20%의 인간 혈청-AB, 5% 내지 15%의 인간 혈청-AB, 또는 약 2, 5 또는 10%의 인간 혈청-AB를 포함한다.

[0160] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 상기 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20일 동안 배양된다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 상기 3-단계 방법에서, 세포는 상기 제2 배지 중에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20일 동안 배양된다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 상기 3-단계 방법에서, 세포는 상기 제3 배지 중에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일, 또는 30일 초과 동안 배양된다.

[0161] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에서 7 내지 13일 동안 배양되어, 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양 전에, 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지 중에서 2 내지 6일 동안 배양되어 상기 제3 배지 중에서 배양 전에 제2 세포 집단을 생산하며; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지 중에서 10 내지 30일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 19 내지 49일 동안 배양된다.

[0162] 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에서 8 내지 12일 동안 배양되어, 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양 전에, 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지 중에서 3 내지 5일 동안 배양되어 상기 제3 배지 중에서의 상기 배양 전에, 제2 세포 집단을 생산하며; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지 중에서 15 내지 25일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 26 내지 42일 동안 배양된다.

- [0163] 구체적 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 상기 제1 배지 중에서 약 10일 동안 배양되어, 상기 제2 배지에서의 상기 배양 전에, 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지 중에서 약 4일 동안 배양되어 상기 제3 배지에서의 상기 배양 전에, 제2 세포 집단을 생산하며; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지 중에서 약 21일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 약 35일 동안 배양된다.
- [0164] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 7-아미노악티노마이신 D(7AAD) 염색으로 측정한다*. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 아넥신-V 염색으로 측정한다*. 구체적 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 7-AAD 염색 및 아넥신-V 염색 둘 다를 측정한다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포의 생존능은 트립신 블루 염색에 의해 측정된다.
- [0165] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 내로 초기 접종된 조혈 줄기세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다.
- [0166] 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 70%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다.
- [0167] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3-CD11a+ 자연살해 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다.
- [0168] 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 개시된 3-단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 자연살해 세포를 생산한다.
- [0169] 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 자연살해 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 상기 자연살해 세포를 생산한다.
- [0170] 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에

서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다. 소정의 양상에서, 3-단계 방법은 ILC3 세포 및 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 상기 ILC3 세포를 생산한다.

[0171] 소정의 양상에서, 상기 제3 배양 단계 후, 상기 제3 세포 집단, 예컨대, 상기 자연살해 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단은 동결보존된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 단계 후, 상기 제4 세포 집단, 예컨대, 상기 자연살해 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단은 동결보존된다.

[0172] 소정의 양상에서, 자연살해 세포, 즉, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 자연살해 세포를 포함하는 세포의 집단이 본 명세서에 제공된다. 따라서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 분리된 자연살해 세포 집단이 본 명세서에 제공된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 20%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 40%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 60%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 80%의 CD56+CD3- 자연살해 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 60%의 CD16- 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 80%의 CD16- 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 20%의 CD94+ 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 자연살해 세포 집단은 적어도 40%의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0173] 소정의 양상에서, CD56+CD3- CD117+CD11a+인 자연살해 세포의 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 자연살해 세포는 퍼포린 및/또는 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체(AHR) 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 퍼포린 및 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체 또는 IL1R1 중 어느 것도 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 또한 T-bet, GZMB, NKp46, NKp30 및 NKG2D를 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 CD94를 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 자연살해 세포는 CD94를 발현하지 않는다.

[0174] 소정의 양상에서, CD56+CD3- CD117+CD11a-인 ILC3 세포의 집단이 본 명세서에 제공되고, 여기서 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하고, CD94, 퍼포린 및 EOMES 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체 및 IL1R1을 발현하고, CD94, 퍼포린 또는 EOMES 중 어느 것도 발현하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 CD226 및/또는 2B4를 추가로 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 IL-22, TNF α 및 DNAM-1 중 하나 이상을 추가로 발현한다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 CD226, 2B4, IL-22, TNF α 및 DNAM-1을 발현한다.

[0175] 소정의 양상에서, 자연살해 세포 및 ILC3 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포를 제3 세포 집단으로부터 분리하는 단계; 및 (e) 상기 CD11a+ 세포를 CD11a- 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 혼합하여 제4 세포 집단을 생산하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 증강성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 50:1의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 20:1의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 10:1의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기

CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 5:1의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:1의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:5의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:10의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:20의 비로 배합된다. 소정의 양상에서, 상기 제4 세포 집단에서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:50의 비로 배합된다.

5.3. 줄기세포 동원 인자

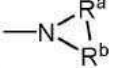
5.3.1. 화학 정의

본 명세서에 기재된 줄기세포 동원 인자의 개시내용의 이해를 촉진하기 위하여, 다수의 용어가 하기 정의되어 있다.

일반적으로, 본 명세서 및 본 명세서에 기재된 생물학, 세포 생물학, 생화학, 유기 화학, 의학 화학, 및 약리학에서 실험실 과정에 사용된 명명법은 당해 분야에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 달리 정의하지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 분야에서의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

용어 "약" 또는 "대략"은 당해 값이 판단되거나 측정되는 방법에 일부 의존하는, 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 측정된 특수 값에 대해 허용되는 오차를 의미한다. 소정의 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 1, 2, 3, 또는 4의 표준 편차를 의미한다. 소정의 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 제공된 값 또는 범위의 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% 또는 0.05% 이내를 의미한다.

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 임의의 "R"기(들), 예컨대, 제한 없이, R^a, R^b, R^c, R^d, R^e, R^f, R^g, R^h, R^m, Rⁿ, R^j, R^k, R^u, R^v, R^y 및 R^z는 표시된 원자에 부착될 수 있는 치환체를 나타낸다. R기는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다. If 2개의 "R"기가 "함께 취해진(taken together)" 것으로 기술된 경우, R기 및 이들이 부착되는 원자들은 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클을 형성할 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, NR^aR^b 기 중의 R^a 및 R^b는 "함께 취해진" 것으로 나타낼 경우, 이것은 이들이 서로 공유 결합되

어 고리  를 형성하는 것을 의미한다.

또한, 2개의 "R"기가 이들이 부착되는 원자(들)와 "함께 취해져서" 대안으로서 고리를 형성하는 것으로 기술된 경우, R기는 앞서 정의된 변수 또는 치환체로 제한되지 않는다.

하나의 기가 "선택적으로 치환된"으로 기술된 경우는 언제든지, 그 기는 표시된 치환체의 하나 이상으로 치환될 수 있거나 비치환될 수 있다. 마찬가지로, 하나의 기가 "비치환 또는 치환된"으로 기술된 때에, 치환된 경우, 치환체(들)는 1개 이상의 표시된 치환체로부터 선택될 수 있다. 치환체가 표시되지 않은 경우, 이것은, 표시된 "선택적으로 치환된" 또는 "치환된" 기가 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아실알킬, 하이드록시, 알콕시, 알콕시알킬, 아미노알킬, 아미노산, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬), 헤테로사이클릴(알킬), 하이드록시알킬, 아실, 사이아노, 할로젠, 티오카보닐, O-카바밀, N-카바밀, O-티오카바밀, N-티오카바밀, C-아미도, N-아미도, S-설펜아미도, N-설펜아미도, C-카복시, O-카복시, 아이소사이아나토, 티오사이아나토, 아이소티오사이아나토, 아지도, 나이트로, 실릴, 설펜릴, 설펜닐, 설펜닐, 할로알킬, 할로알콕시, 트라이할로메탄설펜닐, 트라이할로메탄설펜아미도, 아미노, 단일-치환된 아미노기 및 이-치환된 아미노기로부터 개별적으로 그리고 독립적으로 선택된 1개 이상의 기(들)로 치환될 수 있는 것을 의미한다.

본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "a" 및 "b"가 정수인 "C_a 내지 C_b"는 알킬, 알켄일 또는 알킨일기 중의 탄소 원자의 수, 또는 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로알리사이클릴기의 고리 중의 탄소 원자의 수를 지칭한다. 즉, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬의 고리(들), 사이클로알켄일의 고리(들), 아릴의 고리(들), 헤테로아릴의 고리(들) 또는 헤테로알리사이클릴의 고리(들)는 "a" 내지 "b"개(들 다 포함)의 탄소 원자를 함유할 수 있다. 따라서, 예를 들어, "C₁ 내지 C₄ 알킬"기는 1 내지 4개의 탄소를 갖는 모든 알킬기, 즉, CH₃-, CH₃CH₂-, CH₃CH₂CH₂-, (CH₃)₂CH-, CH₃CH₂CH₂CH₂-, CH₃CH₂CH(CH₃)- 및 (CH₃)₃C-를 지칭한다. "a"

및 "b"가 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로알리사이클릴기와 관련하여 지칭되지 않는 경우, 이러한 정의에 기술된 최광의의 범위가 가정되어야 한다.

- [0185] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알킬"은 완전 포화 (이중 또는 삼중 결합이 없는) 탄화수소기를 포함하는 직쇄 또는 분지쇄의 탄화수소 사슬을 지칭한다. 알킬기는 1 내지 20개의 탄소 원자를 가질 수 있다(본 명세서에서 이것이 나타날 때는 언제든지, "1 내지 20"과 같은 수치 범위가 그 주어진 범위 내의 각 정수를 지칭하고; 예컨대, "1 내지 20개의 탄소 원자"는 알킬기가 1개의 탄소 원자, 2개의 탄소 원자, 3개의 탄소 원자 등, 최대 20개까지의 탄소 원자로 이루어질 수 있는 것을 의미하지만, 이러한 정의는 또한 수치 범위가 지정되지 않은 "알킬"이란 용어의 경우도 커버한다). 알킬기는 또한 1 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 중간 크기 알킬일 수 있다. 알킬기는 또한 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킬일 수도 있다. 화합물 중의 알킬기는 " C_1 - C_4 알킬" 또는 유사한 명칭으로 지칭될 수 있다. 단지 예로서, " C_1 - C_4 알킬"은 알킬 사슬 내에 1 내지 4개의 탄소 원자가 있는 것을 나타내며, 즉, 알킬 사슬은 메틸, 에틸, 프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸, sec-부틸 및 t-부틸로부터 선택된다. 전형적인 알킬기는, 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 삼차 부틸, 펜틸 및 헥실을 포함하지만, 결코 이들로 제한되지 않는다. 알킬기는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0186] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알켄일"은 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬 내에 1개 이상의 이중결합을 함유하는 알킬기를 지칭한다. 알켄일기의 예는 알렌일, 비닐메틸 및 에텐일을 포함한다. 알켄일기는 비치환될 수 있거나 또는 치환될 수 있다.
- [0187] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알킨일"은 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소 사슬 내에 1개 이상의 삼중 결합을 함유하는 알킬기를 지칭한다. 알킨일의 예는 에틴일 및 프로핀일을 포함한다. 알킨일기는 비치환될 수 있거나 또는 치환될 수 있다.
- [0188] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "사이클로알킬"은 완전 포화된(이중 또는 삼중 결합이 없는) 단환식 또는 다환식 탄화수소 고리계를 지칭한다. 2개 이상의 고리로 구성된 경우, 고리는 접합된 형식으로 함께 연결될 수 있다. 사이클로알킬기는 고리(들) 내에 3 내지 10개의 원자 또는 고리(들) 내에 3 내지 8개의 원자를 함유할 수 있다. 사이클로알킬기는 비치환될 수 있거나 또는 치환될 수 있다. 전형적인 사이클로알킬기는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 및 사이클로옥틸을 포함하지만, 결코 이들로 제한되지 않는다.
- [0189] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "사이클로알켄일"은 적어도 하나의 고리 내에 1개 이상의 이중결합을 함유하는 단환식 또는 다환식 탄화수소고리계를 지칭하지만; 하나 초과가 있는 경우, 이중결합은 모든 고리를 통해서 완전 비편재된 파이-전자계를 형성할 수 없다(다르게는 그 기는 본 명세서에서 정의된 바와 같이 "아릴"일 것이다). 사이클로알켄일기는 고리(들) 내에 3 내지 10개의 원자 또는 고리(들) 내에 3 내지 8개의 원자를 함유할 수 있다. 2개 이상의 고리로 구성된 경우, 이 고리는 접합된 방식으로 함께 연결될 수 있다. 사이클로알켄일기는 비치환될 수 있거나 또는 치환될 수 있다.
- [0190] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "아릴"은 모든 고리를 통해서 완전 비편재된 파이-전자계를 갖는 탄소환식 (모든 탄소) 단환식 또는 다환식 방향족고리계(2개의 탄소환식 고리가 화학 결합을 공유하는 접합된 고리계를 포함함)를 지칭한다. 아릴기 내의 탄소 원자의 수는 다양할 수 있다. 예를 들어, 아릴기는 C_6 - C_{14} 아릴기, C_6 - C_{10} 아릴기 또는 C_6 아릴기일 수 있다. 아릴기의 예는 벤젠, 나프탈렌 및 아줄렌을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 아릴기는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0191] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "헤테로아릴"은, 질소, 산소 및 황을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 탄소 이외의 원소인 1, 2, 3개 이상의 헤테로원자를 함유하는 단환식 또는 다환식 방향족고리계(완전 비편재된 파이-전자계를 갖는 고리계)를 지칭한다. 헤테로아릴기의 고리(들) 내의 원자의 수는 다양할 수 있다. 예를 들어, 헤테로아릴기는 고리(들) 내에 4 내지 14개의 원자, 고리(들) 내에 5 내지 10개의 원자 또는 고리(들) 내에 5 내지 6개의 원자를 함유할 수 있다. 또한, 용어 "헤테로아릴"은, 2개의 고리, 예컨대, 적어도 1개의 아릴 고리 및 적어도 1개의 헤테로아릴 고리, 또는 적어도 2개의 헤테로아릴 고리가 적어도 1개의 화학 결합을 공유하는 접합된 고리계를 포함한다. 헤테로아릴 고리의 예는 본 명세서에 기재된 것들 및 하기의 것들을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 퓨란, 피라잔, 티오펜, 벤조티오펜, 프탈라진, 피롤, 옥사졸, 벤즈옥사졸, 1,2,3-옥사다리아졸, 1,2,4-옥사다리아졸, 티아졸, 1,2,3-티아다리아졸, 1,2,4-티아다리아졸, 벤조티아졸, 이미다졸, 벤즈이미다졸, 인돌, 인다졸, 피라졸, 벤조피라졸, 아이소옥사졸, 벤즈아이소옥사졸, 아이소티아졸, 트리아졸, 벤

조트라이아졸, 티아다리아졸, 테트라졸, 피리딘, 피리다진, 피리미딘, 피라진, 퓨린, 프테리진, 퀴놀린, 아이소퀴놀린, 퀴나졸린, 퀴녹살린, 신놀린 및 트라이아진. 헤테로아릴기는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.

[0192] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로알리사이클릴"은, 1 내지 5개의 헤테로원자와 함께 탄소 원자가 하기 고리계를 구성하는, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 내지 최대 18-원 단환식, 이환식 및 삼환식 고리계를 지칭한다. 헤테로사이클은, 그러나 완전 비편재된 파이-전자계가 모든 고리를 통해서 일어나지 않도록 하는 방식으로 위치된 1개 이상의 불포화 결합을 선택적으로 함유할 수 있다. 헤테로원자(들)는, 산소, 황 및 질소를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 탄소 이외의 원소이다. 헤테로사이클은, 그 정의가 락탐, 락톤, 환식 이미드, 환식 티오이미드 및 환식 카바메이트와 같은 옥소계 및 티오계를 포함하게 만들도록, 1개 이상의 카보닐 또는 티오카보닐 작용기를 더 함유할 수 있다. 2개 이상의 고리로 구성된 경우, 그 고리는 접합된 방식으로 함께 연결될 수 있다. 부가적으로, 헤테로사이클릴 내의 임의의 질소는 사차화될 수 있다. 헤테로사이클릴 또는 헤테로지환식 기는 비치환될 수 있거나 또는 치환될 수 있다. 이러한 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로알리사이클릴"기의 예는 본 명세서에 기재된 것들 및 하기의 것들을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 1,3-다이옥신, 1,3-다이옥산, 1,4-다이옥산, 1,2-다이옥솔란, 1,3-다이옥솔란, 1,4-다이옥솔란, 1,3-옥사티안, 1,4-옥사티인, 1,3-옥사티올란, 1,3-다йти올, 1,3-다йти올란, 1,4-옥사티안, 테트라하이드로-1,4-티아진, 1,3-티아진, 2H-1,2-옥사진, 말레이미드, 석신이미드, 바비투르산, 티오바비투르산, 다이옥소피페라진, 히단토인, 다이하이드로유라실, 트라이옥산, 헥사하이드로-1,3,5-트라이아진, 이미다졸린, 이미다졸리딘, 아이소옥사졸린, 아이소옥사졸리딘, 옥사졸린, 옥사졸리딘, 옥사졸리디논, 티아졸린, 티아졸리딘, 몰폴린, 옥시란, 피페리딘 *N*-옥사이드, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 피롤리돈, 피롤리다이온, 4-피페리돈, 피라졸린, 피라졸리딘, 2-옥소피롤리딘, 테트라하이드로피란, 4H-피란, 테트라하이드로티오피란, 티아몰폴린, 티아몰폴린 설폭사이드, 티아몰폴린 설폰, 및 이들의 벤조-접합된 유사체(예컨대, 벤즈이미다졸리디논, 테트라하이드로퀴놀린 및 3,4-메틸렌다이옥시페닐).

[0193] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "아르알킬" 및 "아릴(알킬)"은 저급 알킬렌기를 통해서 치환체로서 연결된 아릴기를 지칭한다. 아르알킬 중 저급 알킬렌 및 아릴기는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다. 그 예는 벤질, 2-페닐알킬, 3-페닐알킬 및 나프틸알킬을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0194] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "헤테로아르알킬" 및 "헤테로아릴(알킬)"은, 저급 알킬렌기를 통해서 치환체로서 연결된 헤테로아릴기를 지칭한다. 헤테로아르알킬 중의 저급 알킬렌 및 헤테로아릴기는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다. 그 예는 2-티엔일알킬, 3-티엔일알킬, 퓨릴알킬, 티엔일알킬, 피롤릴알킬, 피리딜알킬, 아이소옥사졸릴알킬, 이미다졸릴알킬 및 이들의 벤조-접합된 유사체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0195] "헤테로알리사이클릴(알킬)" 및 "헤테로사이클릴(알킬)"은 저급 알킬렌기를 통해서 치환체로서 연결된 헤테로사이클릭 또는 헤테로알리사이클릴기를 지칭한다. 헤테로알리사이클릴(알킬) 중 저급 알킬렌 및 헤테로사이클릴은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다. 그 예는 테트라하이드로-2H-피란-4-일(메틸), 피페리딘-4-일(에틸), 피페리딘-4-일(프로필), 테트라하이드로-2H-티오피란-4-일(메틸) 및 1,3-티아지난-4-일(메틸)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0196] "저급 알킬렌기"는, 이들의 말단 탄소 원자를 통해서 분자 단편을 연결하는 결합을 형성하는, 직쇄 -CH₂- 테더링 기(tethering group)이다. 그 예는 메틸렌(-CH₂-), 에틸렌(-CH₂CH₂-), 프로필렌(-CH₂CH₂CH₂-) 및 부틸렌(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 저급 알킬렌기는 저급 알킬렌기의 하나 이상의 수소를 "치환된"의 정의하에 열거된 치환체(들)로 교체함으로써 치환될 수 있다.

[0197] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알콕시"는 식 -OR을 지칭하되, 여기서 R은 본 명세서에서 정의된 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)이다. 알콕시의 비제한적인 일람은 메톡시, 에톡시, *n*-프로폭시, 1-메틸에톡시(아이소프로폭시), *n*-부톡시, 아이소-부톡시, *sec*-부톡시, *tert*-부톡시, 페녹시 및 벤족시를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 알콕시는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.

[0198] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "아실"은, 카보닐기를 통해서 치환체로서 연결된 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)을 지칭한다. 그 예는 폼일, 아세틸, 프로파노일, 벤조일 및 아크틸을 포함한다. 아실은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.

- [0199] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "아실알킬"은, 저급 알킬렌기를 통해서 치환체로서 연결된 아실을 지칭한다. 그 예는 아릴-C(=O)-(CH₂)_n- 및 헤테로아릴-C(=O)-(CH₂)_n-을 포함하되, 여기서 n은 1 내지 6의 범위의 정수이다.
- [0200] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "알콕시알킬"은 저급 알킬렌기를 통해서 치환체로서 연결된 알콕시를 지칭한다. 그 예는 C₁₋₄ 알킬-O-(CH₂)_n-을 포함하되, 여기서 n은 1 내지 6의 범위의 정수이다.
- [0201] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "아미노알킬"은 저급 알킬렌기를 통해서 치환체로서 연결된 선택적으로 치환된 아미노기를 지칭한다. 그 예는 H₂N(CH₂)_n-을 포함하되, 여기서 n은 1 내지 6의 범위의 정수이다.
- [0202] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "하이드록시알킬"은 수소 원자 중 1개 이상이 하이드록시기로 대체된 알킬기를 지칭한다. 예시적인 하이드록시알킬기는 2-하이드록시에틸, 3-하이드록시프로필, 2-하이드록시프로필 및 2,2-다이하이드록시에틸을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 하이드록시알킬은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0203] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "할로알킬"은, 수소 원자 중 1개 이상이 할로젠으로 교체된 알킬기(예컨대, 모노-할로알킬, 다이-할로알킬 및 트라이-할로알킬)를 지칭한다. 이러한 기는, 클로로메틸, 플루오로메틸, 다이플루오로메틸, 트라이플루오로메틸, 클로로-플루오로알킬, 클로로-다이플루오로알킬 및 2-플루오로아이스부틸을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 할로알킬은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0204] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "할로알콕시"는, 수소 원자 중 1개 이상이 할로젠으로 교체된 알콕시(예컨대, 모노-할로알콕시, 다이-할로알콕시 및 트라이-할로알콕시)를 지칭한다. 이러한 기는, 클로로메톡시, 플루오로메톡시, 다이플루오로메톡시, 트라이플루오로메톡시, 클로로-플루오로알킬, 클로로-다이플루오로알킬 및 2-플루오로아이스부톡시를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 할로알콕시는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0205] "설페닐"기는 "-SR"기를 지칭하되, 여기서 R은 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. 설페닐은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0206] "설퍼닐"기는 "-S(=O)-R"기를 지칭하되, 여기서 R은 설페닐에 대해서 정의된 바와 같은 것일 수 있다. 설퍼닐은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0207] "설포닐"기는 "SO₂R"기를 지칭하되, 여기서 R은 설페닐에 대해서 정의된 바와 같은 것일 수 있다. 설포닐은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0208] "O-카복시"기는 "RC(=O)O-"기를 지칭하되, 여기서 R은 본 명세서에서 정의된 바와 같은 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. O-카복시는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0209] 용어 "에스터" 및 "C-카복시"는 "-C(=O)OR"기를 지칭하되, 여기서 R은 O-카복시에 대해서 정의된 바와 같은 것일 수 있다. 에스터 및 C-카복시는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0210] "티오카보닐"기는 "-C(=S)R"기를 지칭하되, 여기서 R은 O-카복시에 대해서 정의된 바와 같은 것일 수 있다. 티오카보닐은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0211] "트라이할로메탄설포닐"기는 "X₃CSO₂-"기를 지칭하되, 여기서 각각의 X는 할로젠이다.
- [0212] "트라이할로메탄설포아미도"기는 "X₃CS(O)₂N(R_A)-"기를 지칭하되, 여기서 각각의 X는 할로젠이고, R_A는 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)이다.
- [0213] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 용어 "아미노"는 -NH₂기를 지칭한다.
- [0214] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 용어 "하이드록시"는 -OH기를 지칭한다.
- [0215] "사이아노"기는 "-CN"기를 지칭한다.

- [0216] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 용어 "아지도"는 $-N_3$ 기를 지칭한다.
- [0217] "아이소사이아나토"기는 $-NCO$ 기를 지칭한다.
- [0218] "티오사이아나토"기는 $-CNS$ 기를 지칭한다.
- [0219] "아이소티오사이아나토"기는 $-NCS$ 기를 지칭한다.
- [0220] "카보닐"기는 $C=O$ 기를 지칭한다.
- [0221] "S-설폰아미도"기는 $-SO_2N(R_A R_B)$ 기를 지칭하되, 여기서 R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. S-설폰아미도는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0222] "N-설폰아미도"기는 $RSO_2N(R_A)-$ 기를 지칭하되, 여기서 R 및 R_A 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. N-설폰아미도는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0223] "O-카바밀"기는 $-OC(=O)N(R_A R_B)$ 기를 지칭하되, 여기서 R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. O-카바밀은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0224] "N-카바밀"기는 $ROC(=O)N(R_A)-$ 기를 지칭하되, 여기서 R 및 R_A 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. N-카바밀은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0225] "O-티오카바밀"기는 $-OC(=S)N(R_A R_B)$ 기를 지칭하되, 여기서 R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. O-티오카바밀은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0226] "N-티오카바밀"기는 $ROC(=S)N(R_A)-$ 기를 지칭하되, 여기서 R 및 R_A 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. N-티오카바밀은 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0227] "C-아미도"기는 $-C(=O)N(R_A R_B)$ 기를 지칭하되, 여기서 R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. C-아미도는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0228] "N-아미도"기는 $RC(=O)N(R_A)-$ 기를 지칭하되, 여기서 R 및 R_A 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. N-아미도는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0229] "유레아"기는 $N(R)-C(=O)-NR_A R_B$ 를 지칭하되, 여기서 R 은 수소 또는 알킬일 수 있고, R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, 알킨일, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 사이클로알킬(알킬), 아릴(알킬), 헤테로아릴(알킬) 또는 헤테로사이클릴(알킬)일 수 있다. 유레아는 치환될 수 있거나 또는 비치환될 수 있다.
- [0230] 본 명세서에서 이용되는 바와 같은 용어 "할로젠 원자" 또는 "할로젠"은, 주기율표의 7칼럼의 방사성-안정 원자들, 예컨대, 플루오린, 염소, 브로민 및 요오드 중 어느 하나를 의미한다.
- [0231] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "-----"은, 달리 기술되지 않는 한, 단일 또는 이중결합을 나타낸다.
- [0232] 치환체의 수가 특정되지 않은 경우(예컨대, 할로알킬), 존재하는 1개 이상의 치환체가 있을 수 있다. 예를 들어, "할로알킬"은 동일한 또는 상이한 할로젠 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 다른 예로서, " C_1-C_3 알콕시페닐"은 1, 2 또는 3개의 원자를 함유하는 동일한 또는 상이한 알콕시기 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0233] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, 임의의 보호기, 아미노산 및 기타 화합물에 대한 약어는, 달리 나타내지 않

는 한, 이들의 통상적인 용법, 인정된 약어 또는 생화학적 명명법에 대한 IUPAC-IUB 위원회(Commission on Biochemical Nomenclature)(문헌[Biochem. 11:942-944 (1972)] 참조)에 따른다.

[0234] 소정의 실시형태에서, "광학적으로 활성인" 및 "거울상이성질체적으로 활성인"은 약 50% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.5% 이상 또는 약 99.8% 이상의 거울상이성질체 과량(enantiomeric excess)을 갖는, 분자의 집단을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 화합물은, 당해 2개의 거울상이성질체의 총 중량을 기준으로 하여, 약 95% 이상의 목적하는 거울상이성질체 및 약 5% 이하의 거의 바람직하지 않은 거울상이성질체를 포함한다.

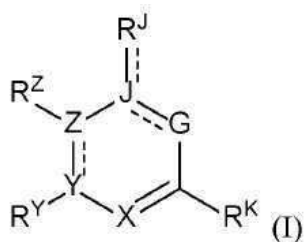
[0235] 광학 활성 화합물을 기술하는데 있어서, 접두사 R 및 S는 이의 카이럴 중심 (들)에 대하여 광학적으로 활성인 화합물의 절대 구조를 나타내는데 사용된다. (+) 및 (-)는 광학적으로 활성인 화합물의 광학 회전, 즉, 편광의 평면이 광학적으로 활성인 화합물에 의해 회전되는 방향을 나타내는데 사용된다. (-) 접두사는 광학적으로 활성인 화합물이 좌선성임을, 즉, 화합물이 편광의 평면을 좌측으로 또는 반시계 방향으로 회전시킴을 나타낸다. (+) 접두사는 광학적으로 활성인 화합물이 우회전성임을, 즉, 화합물이 편광의 평면을 우측 또는 시계 방향으로 회전시킴을 나타낸다. 그러나, 광학 회전의 부호, (+) 및 (-)는 화합물의 절대적인 구조, R 및 S와 관련되지 않는다.

[0236] 용어 "동위원소 변이체"는 이러한 화합물을 구성하는 원자 중 하나 이상에서 동위원소의 비천연 비율을 함유하는 화합물을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 수소(^1H), 중수소(^2H), 삼중수소(^3H), 탄소-11(^{11}C), 탄소-12(^{12}C), 탄소-13(^{13}C), 탄소-14(^{14}C), 질소-13(^{13}N), 질소-14(^{14}N), 질소-15(^{15}N), 산소-14(^{14}O), 산소-15(^{15}O), 산소-16(^{16}O), 산소-17(^{17}O), 산소-18(^{18}O), 플루오린-17(^{17}F), 플루오린-18(^{18}F), 인-31(^{31}P), 인-32(^{32}P), 인-33(^{33}P), 황-32(^{32}S), 황-33(^{33}S), 황-34(^{34}S), 황-35(^{35}S), 황-36(^{36}S), 염소-35(^{35}Cl), 염소-36(^{36}Cl), 염소-37(^{37}Cl), 브로민-79(^{79}Br), 브로민-81(^{81}Br), 요오드-123(^{123}I), 요오드-125(^{125}I), 요오드-127(^{127}I), 요오드-129(^{129}I), 및 요오드-131(^{131}I)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 하나 이상 동위원소의 비천연 비율을 함유한다. 소정의 실시형태에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 안정한 형태, 즉, 비-방사활성이다. 소정의 실시형태에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 수소(^1H), 중수소(^2H), 탄소-12(^{12}C), 탄소-13(^{13}C), 질소-14(^{14}N), 질소-15(^{15}N), 산소-16(^{16}O), 산소-17(^{17}O), 산소-18(^{18}O), 플루오린-17(^{17}F), 인-31(^{31}P), 황-32(^{32}S), 황-33(^{33}S), 황-34(^{34}S), 황-36(^{36}S), 염소-35(^{35}Cl), 염소-37(^{37}Cl), 브로민-79(^{79}Br), 브로민-81(^{81}Br) 및 요오드-127(^{127}I)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 동위원소의 비천연 비율을 함유한다. 소정의 실시형태에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 불안정한 형태, 즉, 방사활성이다. 소정의 실시형태에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 삼중수소(^3H), 탄소-11(^{11}C), 탄소-14(^{14}C), 질소-13(^{13}N), 산소-14(^{14}O), 산소-15(^{15}O), 플루오린-18(^{18}F), 인-32(^{32}P), 인-33(^{33}P), 황-35(^{35}S), 염소-36(^{36}Cl), 요오드-123(^{123}I), 요오드-125(^{125}I), 요오드-129(^{129}I) 및 요오드-131(^{131}I)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 동위원소의 비천연 비율을 함유한다. 본 명세서에 제공된 화합물에서, 숙련가의 판단에 따라 실현가능한 경우, 어떠한 수소도, 예를 들면, ^2H 일 수 있거나, 어떠한 탄소도 예를 들면, ^{13}C 일 수 있거나, 어떠한 질소도 예를 들면, ^{15}N 일 수 있거나, 어떠한 산소도, 예를 들면, ^{18}O 일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 비천연 비율의 중수소(D)를 함유한다.

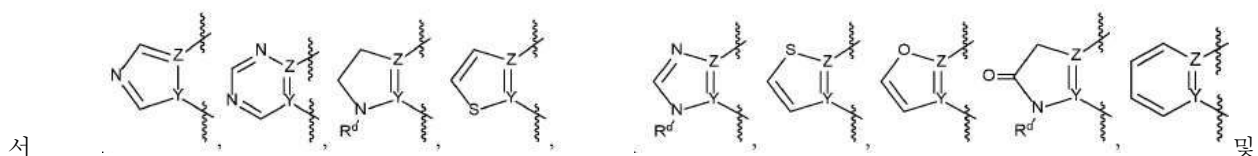
[0237] 용어 "용매화물"은 화학량론적 양 또는 비-화학량론적 양으로 존재하는, 용질, 예컨대, 본 명세서에 제공된 화합물의 하나 이상의 분자, 및 용매의 하나 이상의 분자에 의해 형성된 복합체 또는 응집체를 지칭한다. 적합한 용매는 물, 메탄올, 에탄올, *n*-프로판올, 아이소프로판올, 및 아세트산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 용매는 약제학적으로 허용된다. 일 실시형태에서, 복합체 또는 응집체는 결정성 형태로 존재한다. 다른 실시형태에서, 복합체 또는 응집체는 비결정성 형태로 존재한다. 용매가 물인 경우, 용매화물은 수화물이다. 수화물의 예는 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 사수화물, 및 오수화물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

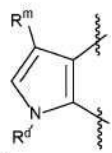
[0238] 어구 "거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성질체의 혼합물, 또는 이의 동위원소

[0241] 본 명세서에 개시된 몇몇 실시형태는, 하기 구조를 갖는 화합식 (I)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다:

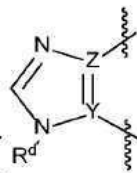


[0242] 식 중, 각각의 ----- 는 독립적으로 단일 결합 또는 이중결합을 나타낼 수 있고; R^{J} 는 $-\text{NR}^{\text{a}}\text{R}^{\text{b}}$, $-\text{OR}^{\text{b}}$ 및 $=\text{O}$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 R^{J} 가 $=\text{O}$ 이면, G 와 J 를 연결하는 ----- 는 단일 결합을 나타내고, G 는 N 이고, N 은 R^{G} 로 치환되고; 다르게는 G 와 J 를 연결하는 ----- 는 이중결합을 나타내고, G 는 N 이고; R^{a} 는 수소 또는 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬일 수 있고; R^{b} 는 R^{c} 또는 $-(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 알킬})-\text{R}^{\text{c}}$ 일 수 있고; R^{c} 는 $-\text{OH}$, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 알킬})$, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 할로알킬})$; $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^{c} 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환될 수 있고, 각각의 E 는 독립적으로 $-\text{OH}$, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 할로알킬, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 알킬})$ 및 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^{K} 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; 치환된 C_{1-6} 알킬; $-\text{NH}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$; $-\text{N}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^{K} 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환될 수 있고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-\text{OH}$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^{G} 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^{Y} 및 R^{Z} 는 각각 독립적으로 존재하지 않을 수 있거나 또는 수소, 할로, C_{1-6} 알킬, $-\text{OH}$, $-\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$, $-\text{NH}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$, 및 $-\text{N}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나; 또는 R^{Y} 와 R^{Z} 는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해져





로부터 선택된 고리를 형성하되; 상기 고리는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-OH$, $-O-(C_{1-4}$ 알킬), $-N(C_{1-4}$ 알킬) $_2$, 비치환 C_6-C_{10} 아릴, 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 및 $-O-(C_{1-4}$ 할로알킬)로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치환될 수 있고; 그리고 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 가



를 형성하면, R^J 는 $-OR^b$ 또는 $=O$ 일 수 있고; R^d 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; R^m 은 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; J 는 C일 수 있고; 그리고 X , Y 및 Z 는 각각 독립적으로 N 또는 C일 수 있되, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다.

[0244]

몇몇 실시형태에서, $-----$ 은 단일 결합을 나타낼 수 있다. 다른 실시형태에서, $-----$ 은 이중결합을 나타낼 수 있다. 몇몇 실시형태에서, Y 와 Z 를 연결하는 $-----$ 은 단일 결합을 나타낼 수 있다. 다른 실시형태에서, Y 와 Z 를 연결하는 $-----$ 은 이중결합을 나타낼 수 있다. 몇몇 실시형태에서, G 와 J 를 연결하는 $-----$ 이 단일 결합을 나타내는 경우, G 는 N일 수 있고, N은 R^G 로 치환된다. 다른 실시형태에서, G 와 J 를 연결하는 $-----$ 이 이중결합을 나타내는 경우, G 는 N일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, G 와 J 를 연결하는 $-----$ 이 이중결합을 나타내는 경우, J 와 R^J 를 연결하는 $-----$ 은 단일 결합일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, G 와 J 를 연결하는 $-----$ 이 이중결합을 나타내는 경우, J 와 R^J 를 연결하는 $-----$ 은 이중결합이 아닐 수 있다. 몇몇 실시형태에서, J 와 R^J 를 연결하는 $-----$ 이 이중결합을 나타내는 경우, 이어서 G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 단일 결합일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, J 와 R^J 를 연결하는 $-----$ 이 이중결합을 나타내는 경우, G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합이 아닐 수 있다.

[0245]

몇몇 실시형태에서, R^J 는 $-NR^bR^b$ 일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^J 는 $-OR^b$ 일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^J 는 $=O$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $=O$ 인 경우, 이어서 G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 단일 결합을 나타내고, G 는 N이고, N은 R^G 로 치환된다. 몇몇 실시형태에서, R^G 는 $-CH_2CH_2-C(=O)NH_2$ 이다.

[0246]

몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^a 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 예를 들어, R^a 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다.

[0247]

몇몇 실시형태에서, R^b 는 R^c 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있다. 예를 들어, R^b 는 $-CH_2-R^c$, $-CH_2CH_2-R^c$, $-CH_2CH_2CH_2-R^c$, 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 $-C(=O)NH_2$ 일 수 있다.

[0248]

몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-OH$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-C(=O)NH_2$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내

지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 모이어티가 치환된 것으로 표시되는 경우, 그 모이어티는 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 치환체 E 로 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 -OH일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 할로알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 -O(C_1-C_4 알킬)일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 -O(C_1-C_4 할로알킬)일 수 있다.

[0249] 몇몇 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. R^c 모이어티가 치환된 것으로 표시되는 경우, 그 모이어티는 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 치환체 E 로 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 -OH일 수 있다. 다른 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 할로알킬일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, E 는 -O(C_1-C_4 알킬)일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, E 는 -O(C_1-C_4 할로알킬)일 수 있다.

[0250] 몇몇 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 페닐일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 나프틸일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 하이드록시페닐일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^b 가 $-CH_2CH_2-R^c$ 인 경우, R^c 는 인돌릴일 수 있다.

[0251] 몇몇 실시형태에서, R^K 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 비치환 C_{1-6} 알킬일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, R^K 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸, tert-부틸, 펜틸 (분지쇄 및 직쇄), 또는 헥실 (분지쇄 및 직쇄)일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 치환된 C_{1-6} 알킬일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, R^K 는 $-NH(CH_3)$, $-NH(CH_2CH_3)$, $-NH$ (아이소프로필), 또는 $-NH(sec\text{-부틸})$ 일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 일 수 있다.

[0252] 몇몇 실시형태에서, R^K 는 비치환 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. R^K 모이어티가 치환된 것으로 표시되는 경우, 그 모이어티는 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 치환체 Q 로 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, Q 는 -OH일 수 있다. 다른 실시형태에서, Q 는 C_{1-4} 알킬일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Q 는 C_{1-4} 할로알킬일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Q 는 할로일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Q 는 사이아노일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Q 는 -O(C_{1-4} 알킬)일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Q 는 -O(C_{1-4} 할로알킬)일 수 있다.

[0253] 몇몇 실시형태에서, R^K 는 페닐 또는 나프틸일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 벤조티오펜일일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 벤조티오펜일일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 벤조티오펜일일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^K 는 피리딘일일 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, R^K 는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환된 피리딘일일 수 있다. 예를 들어, R^K 는 메틸피리딘일, 에틸피리딘일, 사이아노피리딘일, 클로로피리딘일, 플루오로피리딘일 또는 브로모피리딘일일 수 있다.

[0254] 몇몇 실시형태에서, R^G 는 수소일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^G 는 C_{1-4} 알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^G

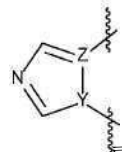
는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 일 수 있다.

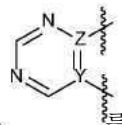
[0255]

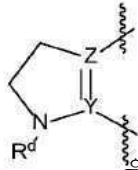
몇몇 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 존재하지 않을 수 있다. 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 할로일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 C_{1-6} 알킬일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 $-OH$ 일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 예를 들어, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 $-NH(CH_3)$, $-NH(CH_2CH_3)$, $-NH(\text{아이소프로필})$, 또는 $-NH(\text{sec-부틸})$ 일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^Y 및 R^Z 는 독립적으로 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 일 수 있다.

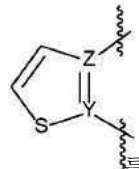
[0256]

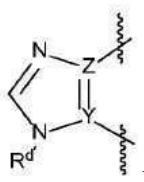
몇몇 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 고리를 형성할 수 있다. 몇

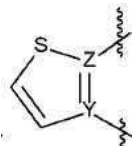
몇 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 를 형성한다. 다른

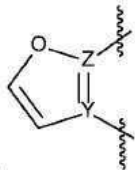
실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 를 형성한다. 다른 실

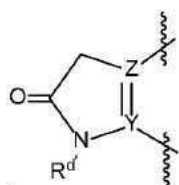
시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 를 형성할 수 있다.

또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 를 형성할 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어

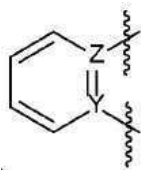
를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연

결되어 를 형성할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는

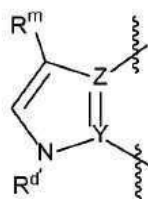
함께 연결되어 를 형성할 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취



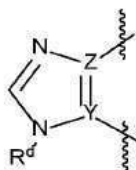
해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 R^d 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들



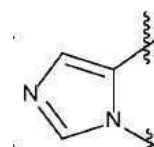
과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 R^d 를 형성할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되



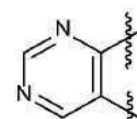
는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 R^d 를 형성할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 고리를 형성할 수 있을 경우, 해당 고리는 C₁-C₄ 알킬, -N(C₁-C₄ 알킬)₂, 사이아노, 비치환 페닐, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 치환될 수 있다.



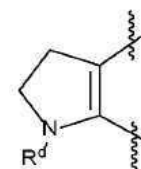
[0257] 몇몇 실시형태에서, 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 가 R^d 를 형성할 경우, R^J 는 $-OR^b$ 또는 =O일 수 있다.



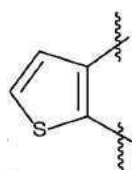
[0258] 몇몇 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 R^d 를 형성할 수



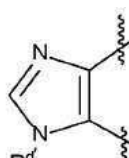
있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 R^d 를 형성

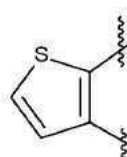


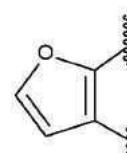
할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 R^d 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어

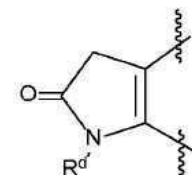


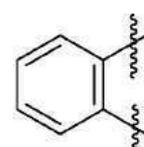
R^d 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결

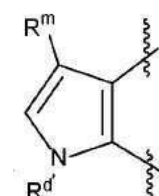

 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함

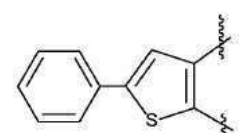

 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와

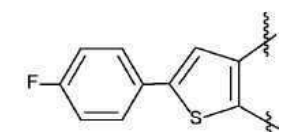

 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해

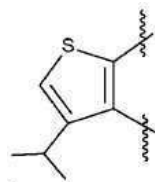

 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과


 를 형성할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원

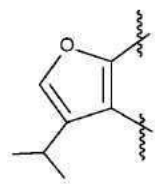

 를 형성할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이들이 부착
 되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어 고리를 형성할 수 있고, 해당 고리는 C₁-C₄ 알킬, -N(C₁-C₄
 알킬)₂, 사이아노, 비치환 페닐, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는
 3개의 기로 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는


 일 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는

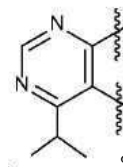

 일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



일 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



일 수 있다. 다른 실시형태에서, 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



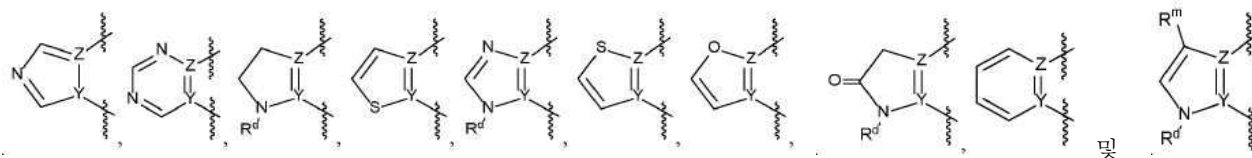
일 수 있다.

[0259] 몇몇 실시형태에서, R^d 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^d 는 C_1 - C_4 알킬일 수 있다. 예를 들어 R^d 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^d 는 할로일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^d 는 사이아노일 수 있다.

[0260] 몇몇 실시형태에서, R^m 은 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^m 은 C_1 - C_4 알킬일 수 있다. 예를 들어 R^m 은 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^m 은 할로일 수 있다. 예를 들어, R^m 은 플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^m 은 사이아노일 수 있다.

[0261] 몇몇 실시형태에서, X, Y 및 Z는 각각 독립적으로 N 또는 C일 수 있되, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다. 몇몇 실시형태에서, X는 N일 수 있고, Y는 N일 수 있고, Z는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, X는 N일 수 있고, Y는 N일 수 있고, Z는 CH일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, X는 N일 수 있고, Y는 CH일 수 있고, Z는 N일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, X는 CH일 수 있고, Y는 N일 수 있고, Z는 N일 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, X는 CH일 수 있고, Y는 CH일 수 있고, Z는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, X는 CH일 수 있고, Y는 N일 수 있고, Z는 CH일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, X는 N일 수 있고, Y는 CH일 수 있고, Z는 CH일 수 있다. 다른 실시형태에서, X는 CH일 수 있고, Y는 CH일 수 있고, Z는 CH일 수 있다.

[0262] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고, 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환되고, 각각의 E는 독립적으로 $-OH$, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q로 치환되고, 각각의 Q는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^g 는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^Y 및 R^Z 는 각각 독립적으로 존재하지 않을 수 있거나 또는 수소, C_{1-6} 알킬 및 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있거나; 또는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 함께 연결되어

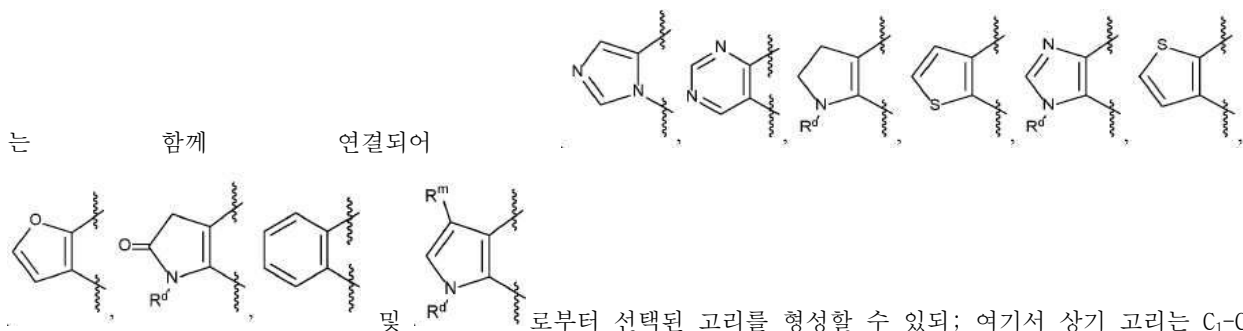


로부터 선택된 고리를 형성할 수 있되; 여기서 상기 고리는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-OH$, $-O-(C_{1-4}$ 알킬), $-N(C_{1-4}$ 알킬) $_2$, 비치환 C_6-C_{10} 아릴, 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_6-C_{10} 아릴 및 $-O-(C_{1-4}$ 할로 알킬)로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치환될 수 있고; R^d 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; R^m 은 사이아노일 수 있고; 그리고 X , Y 및 Z 는 각각 독립적으로 N 또는 C일 수 있되, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다.

[0263]

몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 페닐, 치환된 페닐, 인돌릴 및 $-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 수소, 메틸, 치환된 피리딘일, 비치환 벤조티오펜일 및 $-NH(C_1-C_4$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^g 는 $-CH_2CH_2-C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^y 는 $-NH(C_1-C_4$ 알킬)일 수 있고; R^z 는 존재하지 않을 수 있거나 또는 수소; 또는 이들이 부착되는 원자들과 함께 취해진 R^y 와 R^z

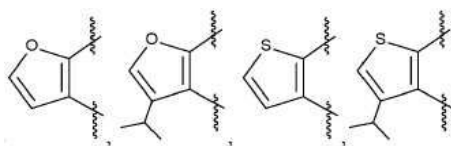
는 함께 연결되어



로부터 선택된 고리를 형성할 수 있되; 여기서 상기 고리는 C_1-C_4 알킬, $-N(C_1-C_4$ 알킬) $_2$, 사이아노, 비치환 페닐, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 기로 선택적으로 치환될 수 있고; R^d 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; R^m 은 사이아노일 수 있고; 그리고 X 는 N 또는 CH일 수 있다.

[0264]

몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 또는 R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 $-OH$ 이고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 또는 R^k 는, 1개 이상의 Q 로 치환된, O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고, 여기서 Q 는 사이아노, 할로, 또는 C_1-C_4 알킬로부터 선택될

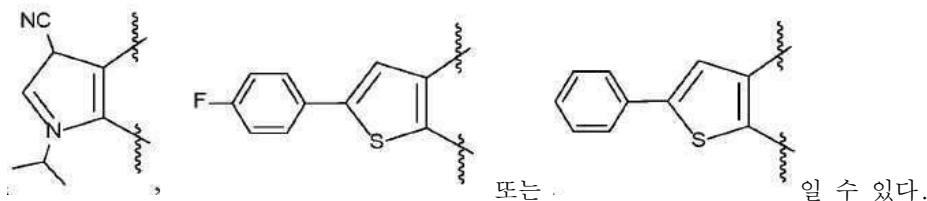


수 있고; 함께 취해진 R^y 와 R^z 는 일 수 있다.

[0265]

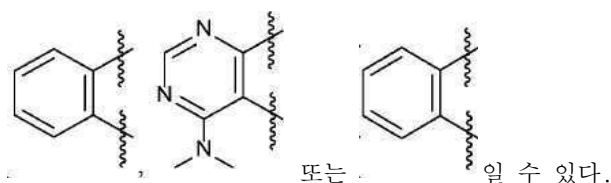
몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있거나; 또는 R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수

있고, 여기서 E 는 -OH이고; R^K 는 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 그리고 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



[0266]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $\equiv$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있거나; 또는 R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 -OH이고; R^K 는 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 그리고 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는

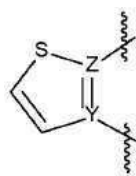


[0267]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $\equiv$ 는 이중결합일 수 있고, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는, 1개 이상의 E 로 치환된; 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, E 는 -OH일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^Y 는 $-NH(C_{1-4}$ 알킬)일 수 있고; R^Z 는 수소일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; Z 는 C일 수 있고; 그리고 Y 와 Z 를 연결하는 $\equiv$ 는 이중결합일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-6-(아이소프로필아미노)피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0268]

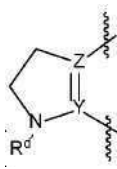
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $\equiv$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고, R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 -OH일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지



10-원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 이고; 여기서 고리는 C_1-C_4 알킬로 치환되고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0269]

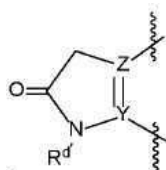
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $\equiv$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고, R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 -OH일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지



10-원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 이고; R^d 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필-6,7-다이하이드로-5H-피콜로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0270]

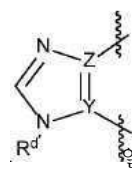
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고, R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 $-OH$ 일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지



10-원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 이고; R^d 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 2-(벤조[b]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페틸)아미노)-7-아이소프로필-5,7-다이하이드로-6H-피콜로[2,3-d]피리미딘-6-온일 수 있다.

[0271]

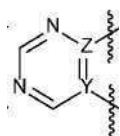
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-OR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의



원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 이고; R^d 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C이다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 3-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-9H-퓨린-6-일)옥시)프로판아마이드일 수 있다.

[0272]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 $-OH$ 이고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴이고; 함께



취해진 R^Y 와 R^Z 는 이고; 상기 고리는 $-N(C_{1-4} 알킬)_2$ 로 치환되고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C이다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-8-(다이메틸아미노)피리미도[5,4-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

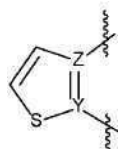
[0273]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이

상의 Q로 치환되고, Q는 사이아노이고; R^Y 는 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 일 수 있고; R^Z 는 존재하지 않을 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 C일 수 있고; Y는 C일 수 있고; Z는 N일 수 있고; 그리고 Y와 Z를 연결하는 ===== 은 이중결합일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 5-(2-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)-6-(*sec*-부틸아미노)피리미딘-4-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0274]

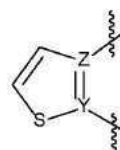
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 은 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 비치환 C_{1-6} 알킬일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



일 수 있고; 여기서 고리는 비치환 C_6-C_{10} 아릴로 치환되고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-메틸-6-페닐티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0275]

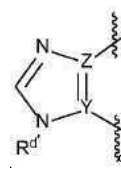
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 일 수 있는 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 은 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 수소일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



일 수 있고; 여기서 고리는 치환된 C_6-C_{10} 아릴로 치환되고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(4-플루오로페닐)티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0276]

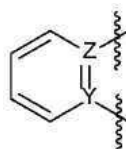
몇몇 실시형태에서, R^J 가 =O인 경우; G는 R^G 로 치환된 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 은 단일 결합일 수 있고; R^G 는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자



를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 일 수 있고; R^d 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 3-(2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-6-옥소-6,9-다이하이드로-1*H*-퓨린-1-일)프로판아마이드일 수 있다.

[0277]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 은 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되, 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이

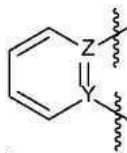


상의 Q로 치환되고, Q는 할로일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는

N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퀴나졸린-4-아민일 수 있다.

[0278]

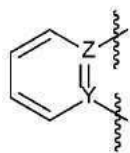
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G는 N이고; G와 J를 연결하는 ===== 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q로 치환



되고, Q는 사이아노일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 ===== 이고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퀴나졸린-2-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0279]

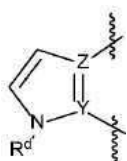
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 $-\text{NH}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$ 일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는



===== 일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 N^4 -(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)- N^2 -(*sec*-부틸)퀴나졸린-2,4-다이아민일 수 있다.

[0280]

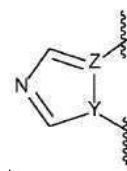
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 는 J 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 1개 이상의 E로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E는 -OH이고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-



원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 ===== 일 수 있고; 여기서 고리는 사이아노로 치환되고; R^d 는 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-5-카보나이트릴일 수 있다.

[0281]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 ===== 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의

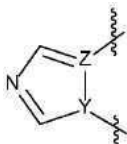


원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 ===== 일 수 있고; 여기

서 고리는 C₁₋₄ 알킬로 치환되고; J는 C일 수 있고; X는 C일 수 있고; Y는 N일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있되, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필피마다조[1,5-a]피라진-8-아민일 수 있다.

[0282]

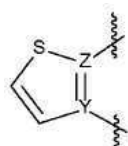
몇몇 실시형태에서, R^J가 -NR^aR^b인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 는 이중결합일 수 있고; R^a는 수소일 수 있고; R^b는 -CH₂CH₂-R^c일 수 있고; R^c는 1개 이상의 E로 치환된, 치환된 C₆₋₁₀ 아릴일 수 있고, 여기서 E는 -OH이고; R^K는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원



헤테로아릴일 수 있고; 함께 취해진 R^Y와 R^Z는 일 수 있고; 해당 고리는 C₁₋₄ 알킬로 치환될 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 C일 수 있고; Y는 N일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있되, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 4-(2-((6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필피마다조[1,5-a]피라진-8-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0283]

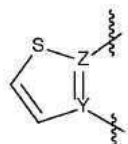
몇몇 실시형태에서, R^J가 -NR^aR^b인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 는 이중결합을 나타내고; R^a는 수소일 수 있고; R^b는 -CH₂CH₂-R^c일 수 있고; R^c는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1



개 이상의 Q로 치환되고, Q는 사이아노이고; 함께 취해진 R^Y와 R^Z는 이고; 여기서 고리는 C₁₋₄ 알킬로 치환되고; J는 C일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 5-(4-((2-(1H-인돌-3-일)에틸)아미노)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0284]

몇몇 실시형태에서, R^J가 -NR^aR^b인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 는 이중결합을 나타내고; R^a는 수소일 수 있고; R^b는 -CH₂CH₂-R^c일 수 있고; R^c는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1

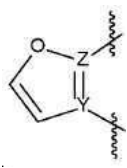


개 이상의 Q로 치환되고, Q는 할로이고; 함께 취해진 R^Y와 R^Z는 일 수 있고; 여기서 고리는 C₁₋₄ 알킬로 치환되고; J는 C일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0285]

몇몇 실시형태에서, R^J가 -NR^aR^b인 경우; G는 N일 수 있고; G와 J를 연결하는 는 이중결합일 수 있고; R^a는 수소일 수 있고; R^b는 -CH₂CH₂-R^c일 수 있고; R^c는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의

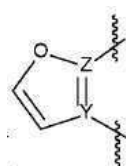
원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이



상의 Q 로 치환되고, Q 는 할로이고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0286]

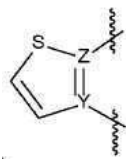
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이



상의 Q 로 치환되고, Q 는 C_1-C_4 알킬이고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-메틸피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0287]

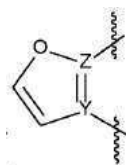
몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이



상의 Q 로 치환되고, Q 는 C_1-C_4 알킬이고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 일 수 있고; 여기서 고리는 C_1-C_4 알킬로 치환되고, J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-7-아이소프로필-2-(5-메틸피리딘-3-일)티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0288]

몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N이고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이



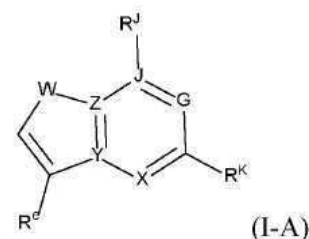
상의 Q 로 치환되고, Q 는 사이아노이고; 함께 취해진 R^Y 와 R^Z 는 일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0289]

몇몇 실시형태에서, 본 명세서에서는 화학식 (I)의 화합물이 제공되되, 해당 화합물은 하기로부터 선택될 수 있

다:

- [0290] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-6-(아이소프로필아미노)피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;
- [0291] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;
- [0292] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필-6,7-다이하이드로-5*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;
- [0293] 2-(벤조[b]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-5,7-다이하이드로-6*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-6-온;
- [0294] 3-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-9*H*-퓨린-6-일)옥시)프로판아마이드;
- [0295] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-8-(다이메틸아미노)피리미도[5,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;
- [0296] 5-(2-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)-6-(*sec*-부틸아미노)피리미딘-4-일)니코티노나이트릴;
- [0297] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-메틸-6-페닐티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민;
- [0298] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(4-플루오로페닐)티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민;
- [0299] 3-(2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-6-옥소-6,9-다이하이드로-1*H*-퓨린-1-일)프로판아마이드;
- [0300] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퀴나졸린-4-아민;
- [0301] 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퀴나졸린-2-일)니코티노나이트릴;
- [0302] *N*⁴-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-*N*²-(*sec*-부틸)퀴나졸린-2,4-다이아민;
- [0303] 2-(벤조[b]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-5-카보나이트릴;
- [0304] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-*a*]피라진-8-아민;
- [0305] 4-(2-((6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-*a*]피라진-8-일)아미노)에틸)페놀;
- [0306] 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴;
- [0307] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;
- [0308] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;
- [0309] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-메틸피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;
- [0310] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-7-아이소프로필-2-(5-메틸피리딘-3-일)티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민;
- [0311] 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴; 및 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염.
- [0312] 화학식 (I-A)



- [0313] 본 명세서에서 제공되는 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 화학식 (I-A):
- 의 구조를 가질 수 있고, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다: 식 중, R^J 는 $-NR^aR^b$ 일 수 있고; R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬일 수 있고; R^b 는 R^c 또는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로

이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; Y 및 Z 는 각각 C일 수 있고; X 는 N 또는 CH일 수 있고; W 는 O 또는 S일 수 있고; 그리고 R^c 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0314] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^a 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0315] 몇몇 실시형태에서, R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있다. 예를 들어, R^b 는 $-CH_2-R^c$, $-CH_2CH_2-R^c$, $-CH_2CH_2CH_2-R^c$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있다.

[0316] 몇몇 실시형태에서, R^c 는 -OH일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-C(=O)NH_2$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 모이어티가 치환된 것으로 표시된 경우, 모이어티는 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 치환체 E 로 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 -OH일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 할로알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 페닐일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^c 는 하이드록시페닐일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, R^c 는 인돌일 수 있다.

[0317] 몇몇 실시형태에서, R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 Q 로 치환될 수 있고, 각각의 Q 는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^k 는 피리딘일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^k 는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환된 피리딘일 수 있다. 예를 들어, R^k 는 메틸피리딘일, 에틸피리딘일, 사이아노피리딘일, 클로로피리딘일, 플루오로피리딘일 또는 브로모피리딘일일 수 있다.

[0318] 몇몇 실시형태에서, R^c 는 수소일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 예를 들어, R^c 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다.

[0319] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되

고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4$ 알킬) 및 $-O(C_1-C_4$ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4}$ 알킬) 및 $-O-(C_{1-4}$ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 그리고 R^e 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0320]

몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(CH_2-CH_2)-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 페닐은 1개의 치환체 E 로 치환되고, R^k 는 비치환 벤조티오 페닐 및 치환된 피리딘릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 피리딘일은 1개의 치환체 Q 로 치환되고, Q 는 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 그리고 R^e 는 아이소프로필일 수 있다.

[0321]

몇몇 실시형태에서, W 가 O 인 경우, R^j 는 $-NR^aR^b$ 일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_1-C_4 알킬 및 $-O(C_1-C_4$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-C_{1-4}$ 알킬, 할로, 사이아노 및 $-O-(C_{1-4}$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; Y 및 Z 는 각각 C 일 수 있고; X 는 N 또는 CH 일 수 있고; 그리고 R^e 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0322]

몇몇 실시형태에서, W 가 S 인 경우, R^j 는 $-NR^aR^b$ 일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_1-C_4 알킬 및 $-O(C_1-C_4$ 알킬)일 수 있고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-C_{1-4}$ 알킬, 할로, 사이아노 및 $-O-(C_{1-4}$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; Y 및 Z 는 각각 C 일 수 있고; X 는 N 또는 CH 일 수 있고; 그리고 R^e 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0323]

몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N 일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 C_1-C_4 알킬이고; W 는 S 일 수 있고; R^e 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C 일 수 있고; X 는 N 일 수 있고; Y 는 C 일 수 있고; 그리고 Z 는

C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-7-아이소프로필-2-(5-메틸피리딘-3-일)티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0324] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 사이아노이고; W 는 S일 수 있고; R^E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0325] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 할로이고; W 는 S일 수 있고; R^E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0326] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고, R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 $-OH$ 일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; W 는 S일 수 있고; R^E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 4-(2-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0327] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 할로이고; W 는 O일 수 있고; R^E 는 수소일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0328] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 C_1-C_4 알킬이고; W 는 O일 수 있고; R^E 는 수소일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-메틸피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0329] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 가 N이고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N

및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 Q로 치환되고, Q는 사이아노이고; W는 O일 수 있고; R^e 는 수소일 수 있고; J는 C일 수 있고; X는 N일 수 있고; Y는 C일 수 있고; 그리고 Z는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물은 5-(4-((2-(1H-인돌-3-일)에틸)아미노)퓨로[3,2-d]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0330] 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-A)의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0331] N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-7-아이소프로필-2-(5-메틸피리딘-3-일)티에노[3,2-d]피리미딘-4-아민;

[0332] 5-(4-((2-(1H-인돌-3-일)에틸)아미노)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴;

[0333] N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-4-아민;

[0334] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;

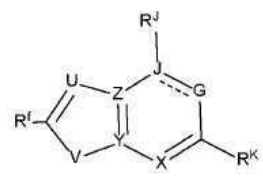
[0335] N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퓨로[3,2-d]피리미딘-4-아민;

[0336] N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-2-(5-메틸피리딘-3-일)퓨로[3,2-d]피리미딘-4-아민; 및

[0337] 5-(4-((2-(1H-인돌-3-일)에틸)아미노)퓨로[3,2-d]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴.

[0338] 화학식 (I-B)

[0339] 본 명세서에서 제공되는 다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 화학식 (I-B):



(I-B)의 구조를 가질 수 있고, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다: 식 중, R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬일 수 있고; R^b 는 R^c 또는 $-(C_1$ - C_4 알킬)- R^c 일 수 있고; R^e 는 -OH, -O(C_1 - C_4 알킬), -O(C_1 - C_4 할로알킬); -C(=O)NH₂; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환되고, 각각의 E는 독립적으로 -OH, C_1 - C_4 알킬, C_1 - C_4 할로알킬, -O(C_1 - C_4 알킬) 및 -O(C_1 - C_4 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; 치환된 C_{1-6} 알킬; -NH(C_{1-4} 알킬); -N(C_{1-4} 알킬)₂, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q로 치환되고, 각각의 Q는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, -O(C_{1-4} 알킬) 및 -O(C_{1-4} 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^f 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(C_{1-4}$ 알킬)-C(=O)NH₂로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^f 는 수소, C_{1-4} 알킬, 비치환 C_6 - C_{10} 아릴, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_6 - C_{10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; U는 N 또는 CR^U일 수 있고; V는 S 또는 NR^V일 수 있고; R^U는 수소, C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^V는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬일 수 있고; U가 CR^U이고 V가 NR^V인 경우, R^U는 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택되고; Y 및 Z는 각각 C일 수 있고; 그리고 X는 N 또는 CH일 수 있다.

- [0340] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^a 는 C_1 - C_4 알킬일 수 있다.
- [0341] 몇몇 실시형태에서, R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있다. 예를 들어, R^b 는 $-CH_2-R^c$, $-CH_2CH_2-R^c$, $-CH_2CH_2CH_2-R^c$ 또는 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^b 는 $-(CH_2CH_2)-R^c$ 일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^b 는 $-(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2$ 일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^b 는 $-(CH_2CH_2)-(인돌릴)$ 일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^b 는 $-(CH_2CH_2)-(하이드록시페닐)$ 일 수 있다.
- [0342] 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-OH$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 $-C(=O)NH_2$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴. 몇몇 실시형태에서, R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^c 모이어티가 치환된 것으로 표시된 경우, 그 모이어티는 1개 이상, 예를 들어, 1, 2, 3 또는 4개의 치환체 E 로 치환될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 $-OH$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 C_1-C_4 할로알킬일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, E 는 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 일 수 있다.
- [0343] 몇몇 실시형태에서, R^K 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 C_1 - C_4 알킬일 수 있다. 예를 들어, R^K 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^K 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다; 여기서 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 Q 로 치환될 수 있고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^K 는 벤조티오펜일일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^K 는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환된 피리딘일일 수 있다. 예를 들어, R^K 는 메틸피리딘일, 에틸피리딘일 사이아노피리딘일, 클로로피리딘일, 플루오로피리딘일 또는 브로모피리딘일일 수 있다.
- [0344] 몇몇 실시형태에서, R^G 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^G 는 $-(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2$ 일 수 있다.
- [0345] 몇몇 실시형태에서, R^f 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^f 는 C_{1-4} 알킬일 수 있다. 예를 들어, R^f 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^f 는 비치환 C_6-C_{10} 아릴일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^f 는 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_6-C_{10} 아릴일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^f 는 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^f 는 플루오로페닐일 수 있다.
- [0346] 몇몇 실시형태에서, U 는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, U 는 CR^U 일 수 있다.
- [0347] 몇몇 실시형태에서, V 는 S일 수 있다. 다른 실시형태에서, V 는 NR^V 일 수 있다.
- [0348] 몇몇 실시형태에서, R^U 는 수소일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^U 는 C_{1-4} 알킬일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^U 는 할로일 수 있다. 예를 들어, R^U 는 플루오로, 클로로, 브로모 또는 아이오도일 수 있다. 또 다른 실시형태에

서, R^U 는 사이아노일 수 있다.

[0349] 몇몇 실시형태에서, R^V 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^V 는 C_{1-4} 알킬일 수 있다. 예를 들어, R^V 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, Y 및 Z는 각각 C일 수 있고, X는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, Y 및 Z는 각각 C일 수 있고, X는 CH일 수 있다.

[0350] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환될 수 있고, 각각의 E는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 Q로 치환되고, 각각의 Q는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^g 는 C_{1-4} 알킬 또는 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 이고; R^f 는 수소, 비치환 페닐, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 페닐로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; Y 및 Z는 각각 C일 수 있고; 그리고 X는 CH일 수 있다.

[0351] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(CH_2-CH_2)-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$, 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 페닐은 1개의 치환체 E로 치환되고, E는 -OH 일 수 있고; R^k 는 비치환 벤조티오펜 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 피리딘일은 1개의 치환체 Q로 치환되고, Q는 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^g 는 $-(CH_2CH_2)-C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^f 는 수소, 페닐 및 플루오로페닐로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; Y 및 Z는 각각 C일 수 있고; 그리고 X는 CH일 수 있다.

[0352] 몇몇 실시형태에서, V가 S인 경우, R^a 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬일 수 있고; R^b 는 R^c 또는 $-(CH_2-CH_2)-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E로 치환되고, 각각의 E는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬 및 $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; 치환된 C_{1-6} 알킬; $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; 및 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q로 치환되고, 각각의 Q는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, 할로, 사이아노 및 $-O(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^g 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(C_{1-4} \text{ 알킬})-C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^f 는 수소, C_{1-4} 알킬, 비치환 C_{6-10} 아릴, 및 1 내지 5개의 할로 원자로 치환된 C_{6-10} 아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; U는 CR^U 일 수 있고; R^U 는 수소, C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; Y 및 Z는 각각 C일 수 있고; 그리고 X는 N일 수 있다.

[0353] 몇몇 실시형태에서, V가 NR^V 인 경우, R^a 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬일 수 있고; R^b 는 R^c 또는 $-(CH_2-CH_2)-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$; 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의

원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 E 로 치환되고, 각각의 E 는 독립적으로 $-OH$, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 및 $-O(C_1-C_4)$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 Q 로 치환되고, 각각의 Q 는 독립적으로 $-OH$, C_{1-4} 알킬, 할로, 사이아노 및 $-O-(C_{1-4})$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^6 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-(C_{1-4})$ 알킬)- $C(=O)NH_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^f 수소일 수 있고; U 는 N 또는 CR^u 일 수 있고; R^u 는 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^v 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; Y 및 Z 는 각각 C 일 수 있고; 그리고 X 는 N 또는 CH 일 수 있다.

[0354] 몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-OR^b$ 인 경우; G 는 N 일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 $-C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; U 는 N 일 수 있고; V 는 NR^v 일 수 있고; R^v 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; R^f 는 수소일 수 있고; J 는 C 일 수 있고; X 는 N 일 수 있고; Y 는 C 일 수 있고; 그리고 Z 는 C 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-B)의 화합물은 3-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-9*H*-퓨린-6-일)옥시)프로판아마이드일 수 있다.

[0355] 몇몇 실시형태에서, R^j 가 $=O$ 인 경우; G 는 R^6 으로 치환된 N 일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 단일 결합일 수 있고; R^6 는 $-(C_{1-4})$ 알킬)- $C(=O)NH_2$ 일 수 있고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; U 는 N 일 수 있고; V 는 NR^v 일 수 있고; R^v 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; R^f 는 수소일 수 있고; J 는 C 일 수 있고; X 는 N 일 수 있고; Y 는 C 일 수 있고; 그리고 Z 는 C 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-B)의 화합물은 3-(2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-6-옥소-6,9-다이하이드로-1*H*-퓨린-1-일)프로판아마이드일 수 있다.

[0356] 몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N 일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 1개 이상의 E 로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 E 는 $-OH$ 이고; R^k 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; U 는 CR^u 일 수 있고; R^u 는 사이아노일 수 있고; V 는 NR^v 일 수 있고; R^v 는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; R^f 는 수소일 수 있고; J 는 C 일 수 있고; X 는 N 일 수 있고; Y 는 C 일 수 있고; 그리고 Z 는 C 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-B)의 화합물은 2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-5-카보나이트릴일 수 있다.

[0357] 몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N 일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 O , N 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 비치환 C_{1-6} 알킬일 수 있고; U 는 CR^u 일 수 있고; R^u 는 수소일 수 있고; V 는 S 일 수 있고; R^f 는 페닐일 수 있고; J 는 C 일 수 있고; X 는 N 일 수 있고; Y 는 C 일 수 있고; Z 는 C 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-B)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-메틸-6-페닐티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0358] 몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 일 수 있는 경우; G 는 N 일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $-----$ 는 이중결합일 수 있

고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{R}^c$ 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^k 는 수소일 수 있고; U 는 CR^u 일 수 있고; R^u 는 수소일 수 있고; V 는 S일 수 있고; R^f 는 플루오로페닐일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-B)의 화합물은 N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(4-플루오로페닐)티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민일 수 있다.

[0359] 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-B)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0360] 3-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-9*H*-퓨린-6-일)옥시)프로판아마이드;

[0361] 3-(2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-6-옥소-6,9-다이하이드로-1*H*-퓨린-1-일)프로판아마이드;

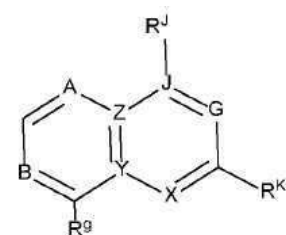
[0362] 2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-5-카보나이트릴;

[0363] N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-메틸-6-페닐티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민; 및

[0364] N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(4-플루오로페닐)티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민.

[0365] 화학식 (I-C)

[0366] 본 명세서에서 제공되는 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은, 화학식 (I-C):



(I-C)의 구조를 가질 수 있고, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다:

식 중, R^j 는 $-\text{NR}^a\text{R}^b$ 일 수 있고; R^a 는 수소 또는 $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬일 수 있고; R^b 는 R^c 또는 $-(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 알킬})-\text{R}^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬, $\text{C}_1\text{-C}_4$ 할로알킬, $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 알킬})$ 및 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 수소, 비치환 C_{1-6} 알킬; $-\text{NH}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$; $-\text{N}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})_2$, 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-\text{O}(\text{C}_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; **A**는 N 또는 CH일 수 있고; **B**는 N 또는 CH일 수 있고; R^9 는 수소, C_{1-4} 알킬 및 $-\text{N}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; **Y** 및 **Z**는 각각 C일 수 있고; 그리고 **X**는 N 또는 CH일 수 있다.

[0367] 몇몇 실시형태에서, R^k 는 $-\text{NH}(\text{C}_{1-4} \text{ 알킬})$ 일 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, R^k 는 $-\text{NH}(\text{CH}_3)$, $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{NH}(\text{아이소프로필})$, 또는 $-\text{NH}(\text{sec-부틸})$ 일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, R^k 는 비치환 벤조티오페닐일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^k 는 치환된 피리딘일일 수 있다. 예를 들어, R^k 는 메틸피리딘일, 에틸피리딘일, 사이아노피리딘일, 클로로피리딘일, 플루오로피리딘일 또는 브로모피리딘일일 수 있다.

[0368] 몇몇 실시형태에서, **A**는 N일 수 있고 **B**는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, **A**는 N일 수 있고, **B**는 CH일 수

있다. 또 다른 실시형태에서, **A**는 CH일 수 있고 **B**는 N일 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, **A**는 CH일 수 있고 **B**는 CH일 수 있다.

[0369] 몇몇 실시형태에서, R^f 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^f 는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 일 수 있다. 소정의 실시형태에서, R^f 는 $-N(CH_3)_2$ 일 수 있다.

[0370] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 헤테로아릴은 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 그리고 R^g 는 수소 또는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 일 수 있다.

[0371] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(C_1-C_4 \text{ 알킬})-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 페닐은 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, $-O(C_1-C_4 \text{ 알킬})$ 및 $-O(C_1-C_4 \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 $-NH(C_{1-4} \text{ 알킬})$; 비치환 벤조티오펜; 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 피리딘일은 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, 할로, 사이아노, $-O-(C_{1-4} \text{ 알킬})$ 및 $-O-(C_{1-4} \text{ 할로알킬})$ 로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 그리고 R^g 는 수소 또는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 일 수 있다.

[0372] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-(CH_2CH_2)-R^c$; R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 페닐은 1개의 치환체 **E**로 치환되고, **E**는 -OH일 수 있고; R^k 는 $-NH(sec\text{-부틸})$; 비치환 벤조티오펜, 및 치환된 피리딘일로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 피리딘일은 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 C_{1-4} 알킬, 할로 및 사이아노로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 그리고 R^g 는 수소 또는 $-N(CH_3)_2$ 일 수 있다.

[0373] 몇몇 실시형태에서, **A**가 C이고 **B**가 C인 경우, R^j 는 $-NR^aR^b$ 일 수 있고; **G**는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 1개 이상의 **E**로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 **E**는 -OH; 또는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴이고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^g 는 수소일 수 있고; **J**는 C일 수 있고; **X**는 N일 수 있고; **Y**는 C일 수 있고; 그리고 **Z**는 C이다.

[0374] 몇몇 실시형태에서, R^j 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; **G**는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 1개 이상의 **E**로 치환된, 치환된 C_{6-10} 아릴일 수 있고, 여기서 **E**는 -OH이고; R^k 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴이고; **A**는 N일 수 있고; **B**는 N일 수 있고; R^g 는 $-N(C_{1-4} \text{ 알킬})_2$ 일 수 있고; **J**는 C일 수 있고; **X**는 N일 수 있고; **Y**는 C일 수 있고; 그리고 **Z**는 C이다.

몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-C)의 화합물은 4-(2-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-8-(다이메틸아미노)피리미도[5,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0375] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; R^K 는 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 할로일 수 있고; A 는 CH일 수 있고; B 는 CH일 수 있고; R^E 는 수소일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-C)의 화합물은 *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퀴나졸린-4-아민일 수 있다.

[0376] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N이고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^K 모이어티는 1개 이상의 Q 로 치환되고, Q 는 사이아노일 수 있고; A 는 CH일 수 있고; B 는 CH일 수 있고; R^E 는 수소일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-C)의 화합물은 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퀴나졸린-2-일)니코티노나이트릴일 수 있다.

[0377] 몇몇 실시형태에서, R^J 가 $-NR^aR^b$ 인 경우; G 는 N일 수 있고; G 와 J 를 연결하는 $=====$ 는 이중결합일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 $-CH_2CH_2-R^c$ 일 수 있고; R^c 는 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; R^K 는 $-NH(C_{1-4}$ 알킬)일 수 있고; A 는 CH일 수 있고; B 는 CH일 수 있고; R^E 는 수소일 수 있고; J 는 C일 수 있고; X 는 N일 수 있고; Y 는 C일 수 있고; 그리고 Z 는 C일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-C)의 화합물은 N^4 -(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)- N^2 -(*sec*-부틸)퀴나졸린-2,4-다이아민일 수 있다.

[0378] 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-C)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0379] 4-(2-((2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-8-(다이메틸아미노)피리미도[5,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀;

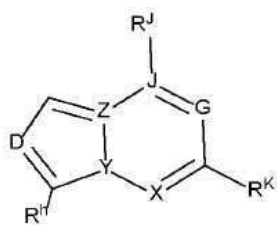
[0380] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퀴나졸린-4-아민;

[0381] 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퀴나졸린-2-일)니코티노나이트릴; 및

[0382] N^4 -(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)- N^2 -(*sec*-부틸)퀴나졸린-2,4-다이아민.

[0383] 화학식 (I-D)

[0384] 본 명세서에서 제공되는 또 다른 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물은 화학식 (I-D):



(I-D)의 구조를 가질 수 있고, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다: 식 중 R^J 는 $-NR^aR^b$ 일 수 있고; R^a 는 수소 또는 C_1 - C_4 알킬일 수 있고; R^b 는 R^c 또는 $-(C_{1-4}$ 알킬)- R^c 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; 0, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를

갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, -O(C_1-C_4 알킬) 및 -O(C_1-C_4 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, 각각의 **Q**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, 할로, 사이아노, -O(C_1-C_4 알킬) 및 -O(C_1-C_4 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^h 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있고; **D**는 N 또는 CH일 수 있고; **Y**는 N일 수 있고; **Z**는 C일 수 있고; 그리고 **X**는 N 또는 CH일 수 있다.

[0385] 몇몇 실시형태에서, R^h 는 수소일 수 있다. 다른 실시형태에서, R^h 는 C_1-C_4 알킬일 수 있다. 예를 들어, R^h 는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소-프로필, n-부틸, 아이소-부틸 또는 tert-부틸일 수 있다.

[0386] 몇몇 실시형태에서, **D**는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, **D**는 CH일 수 있다.

[0387] 몇몇 실시형태에서, **D**가 N인 경우, **Y**는 N일 수 있고, **Z**는 C일 수 있고; 그리고 **X**는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, **D**가 N인 경우, **Y**는 N일 수 있고, **Z**는 C일 수 있고; 그리고 **X**는 CH일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, **D**가 CH인 경우, **Y**는 N일 수 있고, **Z**는 C일 수 있고; 그리고 **X**는 N일 수 있다. 다른 실시형태에서, **D**가 CH인 경우, **Y**는 N일 수 있고, **Z**는 C일 수 있고; 그리고 **X**는 CH일 수 있다.

[0388] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 -(C_1-C_4 알킬)- R^c 일 수 있고; R^c 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^c 모이어티는 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, -O(C_1-C_4 알킬) 및 -O(C_1-C_4 할로알킬)일 수 있고; R^k 는 비치환 C_{6-10} 아릴; 치환된 C_{6-10} 아릴; O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; 및 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 치환된 5- 내지 10-원 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있되; 여기서 치환된 것으로 표시된 R^k 모이어티는 1개 이상의 치환체 **Q**로 치환되고, each **Q**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, 할로, 사이아노, -O(C_1-C_4 알킬) 및 -O(C_1-C_4 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 그리고 R^h 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0389] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 -(C_1-C_4 알킬)- R^c ; R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 치환된 페닐은 1개 이상의 치환체 **E**로 치환되고, 각각의 **E**는 독립적으로 -OH, C_1-C_4 알킬, C_1-C_4 할로알킬, -O(C_1-C_4 알킬) 및 -O(C_1-C_4 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; R^k 는 비치환 벤조티오펜일일 수 있고; 그리고 R^h 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0390] 몇몇 실시형태에서, R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 -(CH₂-CH₂)- R^c ; R^c 는 치환된 페닐 및 비치환 인돌릴로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있고; 여기서 치환된 페닐은 1개의 치환체 **E**로 치환되고, **E**는 -OH일 수 있고; R^k 는 비치환 벤조티오펜일일 수 있고; 그리고 R^h 는 수소 또는 C_1-C_4 알킬일 수 있다.

[0391] 몇몇 실시형태에서, **D**가 N이고; R^j 가 -NR^aR^b인 경우; **G**는 N일 수 있고; R^a 는 수소일 수 있고; R^b 는 -CH₂CH₂- R^c 일 수 있고; R^c 는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테

로아릴; 또는 1개 이상의 **E**로 치환된, 치환된 C₆₋₁₀ 아릴일 수 있고, 여기서 **E**는 -OH이고; **R^k**는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; **R^h**는 C₁₋₄ 알킬일 수 있고; **J**는 C; **X**는 C일 수 있고; **Y**는 N일 수 있고; 그리고 **Z**는 C일 수 있고, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다.

[0392] 몇몇 실시형태에서, **R^j**가 -NR^aR^b인 경우; **G**는 N일 수 있고; **R^a**는 수소일 수 있고; **R^b**는 -CH₂CH₂-R^c일 수 있고; **R^c**는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴, 또는 1개 이상의 **E**로 치환된, 치환된 C₆₋₁₀ 아릴일 수 있고, 여기서 **E**는 -OH이고; **R^k**는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴; **D**는 N일 수 있고; **R^h**는 C₁₋₄ 알킬일 수 있고; **J**는 C일 수 있고; **X**는 C일 수 있고; **Y**는 N일 수 있고; 그리고 **Z**는 C일 수 있고, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-D)의 화합물은 N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-아민일 수 있다.

[0393] 몇몇 실시형태에서, **R^j**가 -NR^aR^b인 경우; **G**는 N일 수 있고; **G**와 **J**를 연결하는 **-----**는 이중결합일 수 있고; **R^a**는 수소일 수 있고; **R^b**는 -CH₂CH₂-R^c일 수 있고; **R^c**는 1개 이상의 **E**로 치환된, 치환된 C₆₋₁₀ 아릴일 수 있고, 여기서 **E**는 -OH이고; **R^k**는 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 4개의 원자를 갖는 비치환 5- 내지 10-원 헤테로아릴일 수 있고; **D**는 N일 수 있고; **R^h**는 C₁₋₄ 알킬일 수 있고; **J**는 C일 수 있고; **X**는 C일 수 있고; **Y**는 N일 수 있고; 그리고 **Z**는 C일 수 있고, 여기서 임의의 탄소 원자의 원자가는 필요에 따라서 수소 원자로 채워진다. 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-D)의 화합물은 4-(2-((6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-일)아미노)에틸)페놀일 수 있다.

[0394] 몇몇 실시형태에서, 화학식 (I-D)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다:

[0395] N-(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-아민; 및 4-(2-((6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-일)아미노)에틸)페놀.

[0396] 본 명세서에 제공된 화합물은 단일의 거울상이성질체 또는 단일의 부분입체이성질체와 같은 거울상이성질체적으로 순수할 수 있거나, 거울상이성질체의 혼합물, 예컨대, 2개의 거울상이성질체의 라세미 혼합물; 또는 2개 이상의 부분입체이성질체의 혼합물일 수 있다. 이와 같이, 당해 분야의 통상의 기술자는 이의 (R) 형태의 화합물의 투여가 생체내에서 에피머화를 겪는 화합물로 인하여, 이의 (S) 형태의 화합물의 투여와 동일함을 인식할 것이다. 개개 거울상이성질체의 제조/단리를 위한 통상의 기술은 적합한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 합성, 아카이럴(achiral) 출발 물질로부터의 비대칭 합성, 또는 거울상이성질체성 혼합물의 분해, 예를 들면, 카이럴성 크로마토그래피, 재결정화, 분해, 부분입체이성질체성 염 형성, 또는 부분입체이성질체성 부가물로의 유도체 화에 이은 분리를 포함한다.

[0397] 5.4. NK 세포의 단리

[0398] 자연살해 세포를 단리시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 자연살해 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포를 단리시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, NK 세포는 예를 들면, 일 실시형태에서, CD56 및 CD3에 대한 항체를 사용하여, 세포를 염색하고, CD56⁺CD3⁻ 세포에 대해 선택함으로써 단리되거나 농축될 수 있다. 소정의 실시형태에서, NK 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 총 세포와 비교하여 CD56⁺CD3⁻ 세포에 대해 농축된다. NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 시판되는 키트, 예를 들면, NK 세포 단리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 단리될 수 있다. NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포를 포함하는 세포의 집단 중 NK 세포 이외의 다른 세포를 제거함으로써 단리할 수 있거나 농축할 수 있다. 예를 들면, NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포는, 예컨대, CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR 및/또는 CD235a(글리코포린 A) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하여, 비-NK 세포 마커를 나타내는 세포를 고갈시켜 단리시키거나

농축시킬 수 있다. 음성 단리는 상업적으로 입수 가능한 키트, 예컨대, NK 세포 음성 분리 키트(Dynal Biotec h)를 사용하여 수행할 수 있다. 이들 방법에 의해 분리된 세포를 추가로 분류하여, 예컨대, CD11a⁺ 및 CD11a⁻ 세포, 및/또는 CD117⁺ 및 CD117⁻ 세포, 및/또는 CD16⁺ 및 CD16⁻ 세포, 및/또는 CD94⁺ 및 CD94⁻를 분리할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법으로 생산된 세포를 분류하여 CD11a⁺ 및 CD11a⁻ 세포를 분리할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, CD11a⁺ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 전체 세포와 비교하여 CD11a⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 실시형태에서, CD11a⁻ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 전체 세포와 비교하여 CD11a⁻ 세포에 대해 농축된다. 소정의 실시형태에서, 세포를 분류하여 CD117⁺ 및 CD117⁻ 세포를 분리한다. 구체적인 실시형태에서, CD117⁺ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD117⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 실시형태에서, CD117⁻ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD117⁻ 세포에 대해 농축된다. 소정의 실시형태에서, 세포를 분류하여 CD16⁺ 및 CD16⁻ 세포를 분리한다. 구체적인 실시형태에서, CD16⁺ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD16⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 실시형태에서, CD16⁻ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD16⁻에 대해 농축된다. 소정의 실시형태에서, 세포를 분류하여 CD94⁺ 및 CD94⁻ 세포를 분리한다. 구체적인 실시형태에서, CD94⁺ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD94⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 실시형태에서, CD94⁻ 세포가 분리된다. 소정의 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD94⁻ 세포에 대해 농축된다. 소정의 실시형태에서, 단리는 자기 분리(magnetic separation)를 사용하여 수행된다. 소정의 실시형태에서, 단리는 유세포분석법을 사용하여 수행된다.

[0399] ILC3 세포를 분리시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포를 분리시키는데 사용될 수 있다. 예를 들면, ILC3 세포는 세포, 일 실시형태에서, CD56, CD3, 및 CD11a에 대한 항체를 사용하여 세포를 염색하고 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻ 세포에 대해 선택함으로써 분리시키거나 농축시킬 수 있다. ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포를 포함하는 세포의 집단 중 ILC3 세포 이외의 세포를 제거함으로써 분리할 수 있거나 농축할 수 있다. 예를 들면, ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포는, 예컨대, CD3, CD4, CD11a, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD94, CD123, HLA DR 및/또는 CD235a(글리코포린 A) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하여 비-ILC3 세포 마커를 나타내는 세포를 고갈시킴으로써 분리할 수 있거나 농축시킬 수 있다. 이들 방법에 의해 분리된 세포는 추가로 분류하여, 예컨대, CD117⁺ 및 CD117⁻ 세포를 분리할 수 있다. NK 세포는, 일 실시형태에서, CD56, CD3, CD94, 및 CD11a에 대한 항체를 사용하여 세포를 염색하고, CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺ 세포에 대해 선택함으로써 분리시키거나 농축시킬 수 있다. NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 또한, NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 세포를 포함하는 세포의 집단 중 NK 세포 이외의 세포를 제거함으로써 분리시키거나 농축시킬 수 있다. 소정의 실시형태에서, NK 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺ 세포에 대해 농축된다.

[0400] 일 실시형태에서, ILC3 세포는 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 소정의 실시형태에서, ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻에 대해 농축된다. 일 실시형태에서, ILC3 세포는 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 소정의 실시형태에서, ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺ 세포에 대해 농축된다. 일 실시형태에서, ILC3 세포는 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺CD11R1⁺ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 소정의 실시형태에서, ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방

법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117^{+}CD11R1^{+}$ 세포에 대해 농축된다.

[0401] 일 실시형태에서, NK 세포는 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 소정의 실시 형태에서, NK 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$ 에 대해 농축된다. 일 실시형태에서, NK 세포는 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}CD117^{-}$ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 소정의 실시형태에서, NK 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}CD117^{-}$ 세포에 대해 농축된다.

[0402] 세포 분리는, 예컨대, 유세포분석법, 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting: FACS), 또는, 일 실시형태에서, 특이적인 항체와 접합된 마이크로비드를 사용하는 자기 세포 분류법에 의해 달성될 수 있다. 세포는 하나 이상의 특이적인 항체, 예컨대, 항-CD56 항체를 포함하는 자기 비드(예컨대, 약 0.5 내지 100 μm 직경)에 결합하는 이들의 능력을 기준으로 입자를 분리하는 방법인, 자기 활성화된 세포 분류(MACS)를 사용하여 분리될 수 있다. 자기 세포 분리는, 예컨대, AUTOMACS™ 분리기(Miltenyi)를 사용하여 수행하여 자동화할 수 있다. 특수한 세포 표면 분자 또는 항원을 특이적으로 인식하는 항체의 공유 결합 첨가를 포함하는, 다양한 유용한 변형은 자기 미세구에서 수행할 수 있다. 이후에, 비드를 세포와 혼합하여 세포가 결합하도록 한다. 세포는 이후에 자기장에 통과시켜 특이적인 세포 표면 마커를 가진 세포를 분리시킨다. 일 실시형태에서, 이들 세포를 이후 분리하고 추가의 세포 표면 마커에 대해 항체에 커플링된 자기 비드와 재-혼합시킨다. 세포를 다시 자기장에 통과시키고 항체 둘 다에 결합된 세포를 분리시킨다. 이러한 세포를 이후에 클론 단리를 위한 미세액가 접시(microtiter dish)와 같은 별개의 접시 내로 희석시킬 수 있다.

[0403] 5.5. 대반 관류액

[0404] NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 조혈 세포, 예컨대, 어떠한 공급원, 예컨대, 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장, 간 등으로부터 조혈 줄기세포 또는 전구세포로부터 생산될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조혈 줄기세포는 태반 관류액 및 태반 관류액을 생성하는데 사용된 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 조합된 조혈 줄기세포이다. 태반 관류액은 예를 들면, 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,468,276호 및 미국 특허 출원 공개 제2009/0104164호(이들의 개시내용은 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용됨)에 개시된 방법에 의해 얻어질 수 있는 태반 관류액 세포를 포함한다.

[0405] 5.5.1. 세포 수집 조성물

[0406] 조혈 줄기세포 또는 전구세포가 분리될 수 있거나, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 제공된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 함께, 종양 세포, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체의 종양 억제 또는 치료에 유용한 태반 관류액 및 관류액 세포를 태반 세포 수집 조성물을 사용하여 포유동물, 예컨대, 인간 산후 태반의 관류에 의해 수집할 수 있다. 관류액은 어떠한 생리학적으로 허용되는 용액, 예컨대, 염수 용액, 배양 배지, 또는 보다 복잡한 세포 수집 조성물을 사용한 태반의 관류에 의해 태반으로부터 수집할 수 있다. 태반을 관류하고 관류 세포를 수집 및 보존하는데 적합한 세포 수집 조성물은 관련 미국 특허 출원 공개 제2007/0190042호(이의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용됨)에 상세히 기술되어 있다.

[0407] 세포 수집 조성물은 줄기세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 어떠한 생리학적으로 허용되는 용액, 예를 들면, 염수 용액(예컨대, 인산염 완충 식염수, 크렙스 용액(Kreb's solution), 개질된 크렙스 용액, 이글스 용액(Eagle's solution), 0.9% NaCl 등), 배양 배지(예컨대, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0408] 세포 수집 조성물은 태반 세포를 보존하는, 즉, 태반 세포가 죽는 것을 방지하거나, 태반 세포의 사멸을 지연시키거나, 수집 시간으로부터 배양 시간까지 죽는 세포의 집단 속의 태반 세포의 수를 감소시키는 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은, 예컨대, 세포자멸사(apoptosis) 저해제(예컨대, 카스파제 저해제 또는 JNK 저해제); 혈관확장제(예컨대, 황산마그네슘, 항고혈압 약물, 심방 나트륨이뇨 펩타이드(ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코프로핀-방출 호르몬, 나트륨 나이트로프루사이드, 하이드랄라진, 아데노신 트라이포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포다이에스테라제 저해제 등); 피사 저해제(예컨대, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜타아미노-말레이미드, 피롤리딘 다이티오키바메이트, 또는 클로나제팜); TNF- α 저해제; 및/또는 산소-보유 퍼플루오로탄소(예컨대, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

- [0409] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-붕해 요소, 예컨대, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 하이알루로니다제, RNase, 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 이러한 효소는 콜라게나제(예컨대, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스톨리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 썬몰라이신, 엘라스타제, 트립신, LIBERASE, 하이알루로니다제 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0410] 세포 수집 조성물은 살세균학적으로 또는 제균적으로 유효한 양의 항생제를 포함할 수 있다. 특정의 비-제한적 실시형태에서, 항생제는 마크롤라이드(예컨대, 토브라마이신), 세팔로스포린(예컨대, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록신, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 페니실린(예컨대, 페니실린 V) 또는 퀴놀론(예컨대, 오픈록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특수한 실시형태에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 세균, 예컨대, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.
- [0411] 세포 수집 조성물은 또한 다음 화합물들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아데노신(약 1mM 내지 약 50mM); D-글루코스(약 20mM 내지 약 100mM); 마그네슘 이온(약 1mM 내지 약 50mM); 일 실시형태에서, 내피 통합성 및 세포 생존능을 유지하기에 충분한 양으로 존재하는, 분자량이 20,000 달톤 초과인 거대분자(예컨대, 약 25 g/ℓ 내지 약 100 g/ℓ, 또는 약 40 g/ℓ 내지 약 60 g/ℓ에서 존재하는 합성 또는 천연적으로 발생하는 콜로이드, 텍스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 다당류); 항산화제(예컨대, 약 25 μM 내지 약 100 μM로 존재하는 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E); 환원제(예컨대, 약 0.1mM 내지 약 5mM로 존재하는 N-아세틸시스테인); 세포내로 칼슘 도입을 방지하는 제제(예컨대, 약 2 μM 내지 약 25 μM로 존재하는 베라파밀); 니트로글리세린(예컨대, 약 0.05 g/ℓ 내지 약 0.2 g/ℓ); 일 실시형태에서, 잔류 혈액의 응고를 방지하는데 도움이 되기에 충분한 양으로 존재하는 항응고제(예컨대, 약 1000 단위/ℓ 내지 약 100,000 단위/ℓ로 존재하는 헤파린 또는 히루딘); 또는 아밀로라이드 함유 화합물(예컨대, 약 1.0 μM 내지 약 5 μM로 존재하는 아밀로라이드, 에틸 아이소프로필 아밀로라이드, 헥사메틸렌 아밀로라이드, 다이메틸 아밀로라이드 또는 아이소부틸 아밀로라이드).
- [0412] 5.5.2. 태반의 수집 및 취급
- [0413] 일반적으로, 인간 태반은 출생 후 이의 압박방출에 직후에 회수된다. 일 실시형태에서, 태반은 사전 동의 후 및 환자의 완전한 의학적 병력이 취해진 후 환자로부터 회수되며 태반과 연관된다. 일 실시형태에서, 의학적 병력은 분만 후 지속된다.
- [0414] 관류액의 회수 전에, 제대혈 및 태반 혈액을 제거한다. 소정의 실시형태에서, 회수 후, 태반 속의 제대혈을 회수한다. 태반을 통상의 제대혈 회수 공정에 적용시킬 수 있다. 전형적으로, 침 또는 캐놀라(cannula)를 중력의 도움으로 사용하여 태반을 방혈시킨다(예컨대, Anderson의 미국 특허 제5,372,581호; Hessel 등의 미국 특허 제5,415,665호 참조). 침 또는 캐놀라를 일반적으로 제대 정맥에 두고 태반을 온화하게 마사지하여 태반으로부터 제대혈이 빠져나오는 것을 돕는다. 이러한 제대혈 회수는 상업적으로 수행할 수 있다(예컨대, LifeBank Inc.(뉴저지주 시더 놀스 소재), ViaCord, Cord Blood Registry and CryoCell). 일 실시형태에서, 태반은 추가의 조작 없이 중력 배출시켜 제대혈 회수 동안 조직 파괴를 최소화한다.
- [0415] 전형적으로, 태반은 분만실 또는 출생실로부터 다른 위치, 예컨대, 제대혈의 회수 및 관류액의 수집을 위한 실험실로 수송된다. 태반은 예를 들면, 태반을 클램핑된 근접한 탯줄과 함께 멸균 zip-록 플라스틱 백(zip-lock plastic bag) 속에 둥으로써, 멸균되고, 열적으로 단열된 수송 장치(태반을 20 내지 28℃의 온도에서 유지시킴) 속에서 수송될 수 있다. 다른 실시형태에서, 태반은 실질적으로 미국 특허 제7,147,626호에 기재된 바와 같이 제대혈 수집 키트 속에서 수송된다. 일 실시형태에서, 태반은 분만 후 4 내지 24시간 내에 실험실로 전달된다. 소정의 실시형태에서, 근접한 탯줄은 예를 들면, 제대혈 회수 전에 태반 원반내로 4 내지 5cm(센티미터) 내에서 클램핑된다. 다른 실시형태에서, 근접한 탯줄은 제대혈 회수 후 그러나 태반의 추가의 가공 전에 클램핑된다.
- [0416] 관류액의 수집 전에, 태반은 멸균 조건 하에 그리고 실온 또는 5 내지 25℃(섭씨)의 온도에서 저장될 수 있다. 태반은 태반을 관류하기 전 48시간 이상, 또는 4 내지 24시간의 기간 동안 저장하여 어떠한 잔류 제대혈도 제거할 수 있다. 태반은 항응고제 용액 속에 5℃ 내지 25℃(섭씨)의 온도에서 저장할 수 있다. 적합한 항응고제 용액은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 헤파린 또는 와파린 나트륨의 용액을 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 항응고제 용액은 헤파린의 용액(예컨대, 1:1000 용액 중 1% w/w)을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 방혈된 태반은 태반 관류액이 수집된 후 36시간 이하 동안 저장된다.

- [0417] 5.5.3. 태반 관류
- [0418] 포유동물 태반을 관류하고 태반 관류액을 수집하는 방법은, 예컨대, Hariri의, 미국 특허 제7,045,148호 및 제 7,255,879호에, 그리고 미국 특허 제8,057,788호로 허여된 것으로서 미국 특허 출원 공개 제2009/0104164호, 제 2007/0190042호 및 제20070275362호에 개시되어 있으며, 이들의 개시내용은 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.
- [0419] 관류액은 태반 혈관화를 통한, 관류 용액, 예컨대, 염수 용액, 배양 배지 또는 위에서 기술한 세포 수집 조성물의 제대배양에 의해 얻어질 수 있다. 일 실시형태에서, 포유동물 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥 중 하나 또는 둘 다를 통해 관류 용액을 통과시켜 관류시킨다. 태반을 통한 관류 용액의 유동은, 예컨대, 태반으로의 중력 유동을 사용하여 달성할 수 있다. 예를 들면, 관류 용액을 펌프, 예컨대, 연동 펌프를 사용하여 태반을 통해 가압한다. 제대 정맥은, 예컨대, 멸균 튜빙(tubing)과 같은 멸균 연결 장치에 연결된, 캐놀라, 예컨대, TEFLON® 또는 플라스틱 캐놀라를 사용하여 캐놀라시킬 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 매니폴드(perfusion manifold)에 연결된다.
- [0420] 관류액의 제조 시, 태반은 제대 동맥과 제대 정맥이 태반의 최고점에 위치하는 방식으로 배향시킬 수 있다. 태반은 태반 혈관화를 통해서, 또는 태반 혈관화 및 주변 조직을 통해서 관류 용액을 통과시켜 관류할 수 있다. 일 실시형태에서, 제대 동맥 및 제대 정맥을 유연한 연결기를 통해 관류 용액의 저장기에 연결된 피펫에 동시 연결시킨다. 관류 용액은 제대 정맥 및 동맥내로 통과된다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 태반의 주변 조직으로부터 스며나오고/나오거나 태반의 주변 조직내로 통과하여, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적합한 개방 혈관 속에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구(umbilical cord opening)를 통해 도입되어 모체 자궁 벽과 마주하고 있는 태반의 벽 내 개구부로 유동하거나 이의 밖으로 스며들 수 있다. 다른 실시형태에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하여 제대 동맥으로부터 수집되거나, 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집되는데, 즉, 태반 혈관화(태아 조직)만을 통해 통과된다.
- [0421] 일 실시형태에서, 예를 들면, 제대 동맥과 제대 정맥은, 예컨대, 유연한 연결기를 통해 관류 용액의 저장기에 연결된 피펫에 동시 연결된다. 관류 용액은 제대 정맥 및 동맥 내로 통과한다. 관류 용액은 혈관의 벽으로부터 주변 조직 내로 스며나오고/나오거나 통과하여, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적합한 개방 혈관 속에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구부를 통해 도입되어 모체 자궁 벽과 마주하고 있는 태반의 벽 속의 개구부 밖으로 스며나오도록 한다. "팬(pan)" 방법으로 지칭될 수 있는, 당해 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.
- [0422] 다른 실시형태에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하여 제대 동맥으로부터 수집되거나, 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로(closed circuit)" 방법으로 언급될 수 있는, 당해 방법으로 수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 전적으로 태아의 것이다.
- [0423] 폐쇄 회로 관류 방법은, 일 실시형태에서, 다음과 같이 수행될 수 있다. 출산 후 태반을 출생 후 약 48시간 내에 얻는다. 제대를 클램핑하고 클램프 위에서 절단한다. 제대를 폐기하거나 가공하여 예컨대, 제대 줄기세포를 회수하고/하거나 생체물질의 생산을 위해 제대 막을 가공할 수 있다. 양막을 관류 동안 보유하거나, 용모막으로부터, 예컨대 손가락으로 둔적 박리(blunt dissection)를 사용하여 분리할 수 있다. 양막이 관류 전 용모막으로부터 분리된 경우, 이는 예컨대 폐기하거나, 가공하여 예컨대 효소 분해에 의해 줄기세포를 얻거나, 예컨대, 양막 생체물질, 예컨대, 미국 특허 출원 공개 제2004/0048796호에 기술된 생체물질을 생산할 수 있다. 모든 가시성 혈액 응괴 및 잔류 혈액을, 예컨대, 멸균 거즈를 사용하여 세정한 후, 제대 혈관을, 예컨대, 제대 막을 부분 절단하여 제대의 횡단면을 노출시킴으로써 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예컨대, 각각의 혈관의 절단 말단을 통해 폐쇄된 알리게이터 클램프(Closed alligator clamp)를 전진시켜 개방시킨다. 장치, 예컨대, 관류 장치 또는 연동 펌프(peristaltic pump)에 연결된 플라스틱 튜빙을 이후에 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적합한 어떠한 펌프, 예컨대, 연동 펌프일 수 있다. 멸균 수집 저장기, 예컨대, 250ml 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 이후에 태반 정맥 내로 삽입한다. 달리는, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥에 삽입하고, 수집 저장기(들)에 연결된 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 둘 다에 삽입한다. 이후에, 태반을 관류 용액의 용적, 예컨대, 약 750ml의 관류 용액으로 관류한다. 이후에, 관류액 속의 세포를, 예컨대, 원심분리에 의해 수집한다.
- [0424] 일 실시형태에서, 근접한 제대는 관류 동안 클램핑되며, 보다 구체적으로, 태반 원반내로 4 내지 5cm(센티미터) 이내의 제대 삽입으로 클램핑될 수 있다.

- [0425] 방혈 공정 동안 포유동물 태반으로부터의 관류액의 제1 수집은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적색 혈액 세포로 착색된다. 관류액은 관류가 진행되면서 더 무색으로 되고 잔류 제대혈 세포가 태반에서 세척되어 나온다. 일반적으로 30 내지 100ml의 관류액이 태반으로부터 혈액을 초기에 플러쉬(flush)하는데 적절하지만, 보다 더 적은 관류액을 관찰 결과에 따라 사용할 수 있다.
- [0426] 소정의 실시형태에서, 제대혈은 관류 전에 태반으로부터 (예컨대, 중력 배수에 의해) 제거되지만, 태반은 잔류 혈액을 제거하기 위한 용액으로 플러쉬(예컨대, 관류)되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 제대혈은 관류 전 (예컨대, 중력 배수에 의해) 태반으로부터 제거되며, 태반은 잔류 혈액을 제거하기 위한 용액으로 플러쉬(예컨대, 관류)된다.
- [0427] 태반을 관류하는데 사용된 관류액의 용적은 수집될 태반 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반으로부터 제조될 수집 수 등에 따라 변할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 관류액의 용적은 50ml 내지 5000ml, 50ml 내지 4000ml, 50ml 내지 3000ml, 100ml 내지 2000ml, 250ml 내지 2000ml, 500ml 내지 2000ml, 또는 750ml 내지 2000ml일 수 있다. 전형적으로, 태반은 방혈 후 700 내지 800ml의 관류액으로 관류된다.
- [0428] 태반을 수시간 또는 수일에 걸쳐 복수의 횡수로 관류시킬 수 있다. 태반이 복수의 횡수로 관류되는 경우, 이는 용기 또는 다른 적합한 베셀(vessel) 속에서 무균 조건 하에 유지되거나 배양되고, 세포 수집 조성물, 또는 표준 관류 용액(예컨대, 항응고제(예컨대, 헤파린, 와파린 나트륨, 코우마린, 비스하이드록시코우마린)의 존재 또는 부재하에, 및/또는 항미생물제(예컨대, β -머캅토에탄올(0.1mM); 스트렙토마이신(예컨대, 40 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서), 페니실린(예컨대, 40 U/ml에서), 암포테리신 B(예컨대, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서)와 같은 항생제의 존재 또는 부재하에 인산염 완충 식염수("PBS")와 같은 정상의 염수 용액)로 관류된다. 일 실시형태에서, 단리된 태반은 관류액의 수집 없이 일정 기간 동안 유지되거나 배양되므로, 태반은 관류 및 관류액의 수집 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간, 또는 2 또는 3일 이상 동안 유지되거나 배양된다. 관류된 태반은, 함께 하나 이상의 추가의 시간(들), 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 시간 이상 동안 유지될 수 있고, 예컨대, 700 내지 800ml의 관류액으로 두번째 관류될 수 있다. 태반은 1, 2, 3, 4, 5회 이상, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 1회씩 관류될 수 있다. 일 실시형태에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예컨대, 태반 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 핵화된 세포의 수가 100개의 세포/ml 이하가 될 때까지 반복된다. 상이한 시점에서의 관류액은 개별로 추가로 가공되어 세포의 시간-의존성 집단, 예컨대, 총 핵화된 세포를 회수할 수 있다. 상이한 시점에서의 관류액은 또한 혼주(pooling)될 수 있다.
- [0429] 5.5.4. 태반 관류액 및 태반 관류액 세포
- [0430] 전형적으로, 1회 태반 관류로부터의 태반 관류액은 이로부터 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생산될 수 있는 조혈 세포를 포함하는, 약 1억 내지 약 5억개의 핵화된 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 CD34^+ 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 포함한다. 이러한 세포는, 보다 구체적인 실시형태에서, $\text{CD34}^+\text{CD45}^-$ 줄기 또는 전구세포, $\text{CD34}^+\text{CD45}^+$ 줄기 또는 전구세포 등을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 관류액 또는 관류액 세포는 이로부터 조혈 세포의 단리 전에 동결보존된다. 특정의 다른 실시형태에서, 태반 관류액은 다음을 포함하거나 관류액 세포는 다음을 포함한다: 태아 세포만, 또는 태아 세포와 모체 세포의 조합.
- [0431] 5.6. NK 세포
- [0432] 5.6.1. 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포
- [0433] 다른 실시형태에서, 단리된 NK 세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 기술된 3-단계 방법에 따라 생산된다.
- [0434] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 단리된 NK 세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포 집단은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 전구세포 집단, 예컨대, NK 전구세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계보다 더 짧은 기간인 것을 제외하고는 동일한 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 전구세포 집단보다 더 큰 퍼센트의 CD3-CD56^+ 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단은 약 70% 이상, 구체적인 실시형태에서, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 CD3-CD56^+ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태

에서, 상기 NK 세포 집단은 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단은 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%의 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다.

[0435] 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 NKp46⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD16⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD16⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD94⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD94⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD11a⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 NKp30⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD161⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 DNAM-1⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 T-bet⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다.

[0436] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 CD117⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 NKG2D⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 NKp44⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 CD244⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 퍼포린을 발현하는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 EOMES를 발현하는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 그랜자임 B를 발현하는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 IFN γ , GM-CSF 및/또는 TNF α 를 분비하는 세포를 포함한다.

[0437] 5.7. ILC3 세포

[0438] 5.7.1. 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포

[0439] 다른 실시형태에서, 단리된 ILC3 세포 집단이 본 명세서에 제공되고, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 기술된 3-단계 방법에 따라 생산된다.

[0440] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 단리된 ILC3 세포 집단이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포 집단은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 전구세포 집단, 예컨대, ILC 전구세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계가 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계보다 더 짧은 기간이었음을 제외하고는 동일한 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 전구세포 집단보다 더 높은 퍼센트의 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단은 약 70% 이상, 몇몇 실시형태에서, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단은 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단은 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%의 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다.

[0441] 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 NKp46⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD16⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 IL1R1⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD94⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 ROR γ t⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD11a⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다.

포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포는 또한 T-bet⁺인 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포를 포함한다.

[0442] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 CD117⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 NKG2D⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 NKp30⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 CD244⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 DNAM-1⁺인 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 AHR를 발현하는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 퍼포린을 발현하지 않는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 EOMES를 발현하지 않는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 그랜자임 B를 발현하지 않는 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 IL-22 및/또는 IL-8을 분비하는 세포를 포함한다.

[0443] 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 세포 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 또는 1:50의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 50:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 20:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 10:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 5:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 1:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 1:5의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 1:10의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 1:20의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 1:50의 비로 포함한다.

[0444] 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 조합하여 조합된 세포의 집단을 생산함으로써 생산된다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 50:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 20:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 10:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 5:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:5의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:10의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:20의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:50의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 포함한다.

[0445] 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 세포 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40 또는 1:50의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 50:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 20:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 10:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 5:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 1:1의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 1:5의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 1:10의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 1:20의 비로 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포의 집단은 NK 세포와 ILC3 세포를 1:50의 비로 포함한다.

[0446] 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 세포 집단은 NK 세포를 ILC3 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 조합하여 조합된 세포의 집단을 생산함으로써 생산된다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 50:1의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 20:1의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 10:1의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 5:1의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:1의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:5의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:10의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:20의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다. 소정의 양상에서, 본 명세서에 기재된 조합된 세포의 집단은 1:50의 비로 조합된 NK 세포와 ILC3 세포를 포함한다.

[0447] 5.8. 태반 관류액과 조합된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포

[0448] 예컨대, 종양 세포의 증식 또는 복수의 종양 세포를 억제하는데 사용하기 위한, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 부착성 태반 세포와 조합된, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따른 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함하는 조성물이 본 명세서에 추가로 제공된다.

[0449] 5.8.1. NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 관류액 또는 관류액 세포의 조합

[0450] 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과, 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합을 포함하는 조성물이 본 명세서에 추가로 제공된다. 일 실시형태에서, 예를 들면, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단으로 보충된 태반 관류액의 용적이 본 명세서에 제공된다. NK 세포 및 ILC3 세포로 보충된 태반 관류액의 용적의 구체적인 실시형태에서, NK 세포 및 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 비로 존재한다. 구체적인 실시형태에서, 예를 들면, 각각의 밀리리터의 태반 관류액은 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 보충된다. 다른 실시형태에서, 태반 관류액 세포는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 보충된다. 특정의 다른 실시형태에서, 태반 관류액 세포가 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 합해지는 경우, 태반 관류액 세포는 일반적으로 세포의 총 수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 이상, 또는 미만을 차지한다. 특정의 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 복수의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 자연살해 세포와 조합되는 경우, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 집단은 일반적으로 세포의 총 수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 이상 또는 미만을 차지한다. 특정의 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 사용하여 태반 관류액을 보충하는 경우, 세포가 현탁되는 용액(예컨대, 염수 용액, 배양 배지 등)의 용적은 관류액 및 세포의 총 용적의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 이상 또는 미만을 차지하며, 여기서 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 보충 전 밀리리터당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 세포로 현탁된다.

[0451] 다른 실시형태에서, 세포의 상기 조합 중 어느 것도 궁극적으로 제대혈 또는 제대혈로부터의 핵화된 세포와 조합된다.

[0452] 2개 이상의 공급원, 예컨대, 2개 이상의 태반, 및 조합된, 예컨대 혼주된 것으로부터 얻어진 혼주된 태반 관류액이 추가로 본 명세서에 제공된다. 이러한 혼주된 관류액은 각각의 공급원으로부터의 대략 동일한 용적의 관류액을 포함할 수 있거나, 각각의 공급원으로부터의 상이한 용적을 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터의 상대적인 용적은 무작위로 선택될 수 있거나, 예컨대, 하나 이상의 세포 인자, 예컨대, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬 등의 농도 또는 양; 각각의 공급원으로부터의 관류액 속의 태반 세포의 수; 또는 각각의 공급원으로부터의 관류액의 다른 특징을 기본으로 할 수 있다. 동일한 태반의 복수의 관류로부터의 관류액은 유사하게 혼주될 수 있다.

[0453] 유사하게, 2개 이상의 공급원, 예컨대, 2개 이상의 태반으로부터 얻어지고 혼주된 태반 관류액 세포, 및 태반-유래 중간체 자연살해 세포가 본 명세서에 제공된다. 이러한 혼주된 세포는 2개 이상의 공급원으로부터의 대략

적으로 동일한 수의 세포, 또는 혼주된 공급원 중 하나 이상으로부터의 상이한 수를 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터의 세포의 상대적인 수는, 예컨대, 혼주될 세포 중 하나 이상의 특이적인 세포 유형의 수, 예컨대, CD34⁺ 세포의 수 등을 기준으로 선택될 수 있다.

[0454] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 이러한 세포와 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합이 추가로 본 명세서에 제공되며, 이들은, 예컨대, 제공된 수의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 또는 제공된 용적의 관류액으로부터 예측될 종양 억제제의 정도 또는 양(즉, 잠재능)을 측정하기 위해 검정된다. 예를 들면, 세포의 분취량 또는 샘플 수를 공지된 수의 종양 세포와 당해 종양 세포가 달리 증식할 수 있는 조건 하에서 접촉시키거나 근접시키고, 태반 관류액, 관류액 세포, 태반 자연살해 세포, 또는 이들의 조합물의 존재하에서 종양 세포의 증식률을 시간에 걸쳐(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10주 이상) 관류액, 관류액 세포, 태반 자연살해 세포, 또는 이들의 조합물의 부재하에서 동일한 수의 종양 세포의 증식과 비교한다. 세포의 잠재능은, 예컨대, 종양 세포 성장을, 예컨대, 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 등까지 억제하는데 요구되는 세포의 수 또는 용액의 용적으로서 표현할 수 있다.

[0455] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 약제학적 등급의 투여 가능한 단위로 제공된다. 이러한 단위는 별개의 용적, 예컨대, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml, 50ml, 55ml, 60ml, 65ml, 70ml, 75ml, 80ml, 85ml, 90ml, 95ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 350ml, 400ml, 450ml, 500ml 등으로 제공될 수 있다. 이러한 단위는 다른 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 관류액 세포와 조합된 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 규정된 수, 예컨대, 밀리리터당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 이상의 세포를 함유하도록 제공될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 단위는 밀리리터당 약, 적어도 약, 또는 최대한 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 이상의 NK 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 이러한 단위는 규정된 수의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및/또는 다른 세포 중 어느 것을 함유하도록 제공될 수 있다.

[0456] 다른 실시형태에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 다른 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 관류액 세포 또는 관류액의 조합은 수용체에 대해 자가 조직이거나(즉, 수용체로부터 얻어짐), 수용체에 대해 동종이계(즉, 적어도 하나의 다른 상기 수용체로부터 얻어짐)이다.

[0457] 소정의 실시형태에서, 각각의 세포 단위는, 당해 단위가 단위 내 세포의 특수한 유형, 및/또는 제공된 수의 세포의 잠재능, 또는 단위의 제공된 밀리리터의 수를 강화하는지, 즉, 단위의 세포가 특수한 유형 또는 유형들의 종양 세포의 증식을 측정가능하게 억제하는지에 상관없이, 용적, 세포의 수, 세포의 유형 중 하나 이상을 규정하기 위해 표지된다.

[0458] 5.8.2. NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 부작성 태반 줄기세포의 조합

[0459] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 단독으로 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 함께, 단리된 부작성 태반 세포, 예컨대, 이들의 개시내용이 전문으로 본 명세서에 참조에 의해 인용된, Hariri의 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,255,879호, 및 미국 특허 출원 공개 제2007/0275362호에 기재된 바와 같은 태반 줄기세포 및 태반 다능성 세포로 보충된다. 구체적인 실시형태에서, NK 세포 및 ILC3 세포, 상기 NK 세포 및 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 비로 존재한다. "부작성 태반 세포"는 조직 배양 표면, 예컨대, 조직 배양 플라스틱에 대해 부작성임을 의미한다. 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법에 유용한 부작성 태반 세포는 일반적으로 영양막, 배아 배 세포 또는 배아 줄기세포가 아니다.

[0460] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 단독으로, 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 함께, 예컨대, 밀리리터당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 부작성 태반 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 ,

1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 부착성 태반 세포로 보충된다. 조합된 부착성 태반 세포는, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 또는 40의 집단 배가를 위해 배양된 예컨대, 부착성 태반 세포일 수 있다.

[0461] 단리된 부착성 태반 세포는, 1차 배양물속에서 배양되거나 세포 배양물 속에서 확장되는 경우, 조직 배양 기질, 예컨대, 조직 배양 용기 표면(예컨대, 조직 배양 플라스틱)에 부착한다. 배양물 속의 부착성 태반 세포는 중심 세포체로부터 확장하는 복수의 세포질 공정과 함께, 일반적으로 섬유아세포성, 방사상 외관으로 추정된다. 그러나, 부착성 태반 세포는, 부착성 태반 세포가 섬유아세포보다 보다 더 큰 수의 이러한 공정을 나타내므로, 동일한 조건 하에서 배양된 섬유아세포로부터 형태학적으로 구별 가능하다. 형태학적으로, 부착성 태반 세포는 배양물 속에서 보다 둥글거나, 자갈형의 형태학으로 추정되는 조혈 줄기세포와는 또한 구별 가능하다.

[0462] 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에 유용한 상기 단리된 부착성 태반 세포, 및 부착성 태반 세포의 집단은 부착성 태반 세포를 포함하는 세포, 또는 세포의 집단을 확인하고/하거나 단리시키는데 사용될 수 있는 복수의 마커를 발현한다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에 유용한 부착성 태반 세포, 및 부착성 태반 세포 집단은 태반, 또는 이의 어떠한 부위(예컨대, 양막, 융모막, 양막-융모막 원반, 태반 반엽, 제대 등)으로부터 직접 수득된 부착성 태반 세포 및 부착성 태반 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 부착성 태반 줄기세포 집단은, 일 실시형태에서, 배양물 속의 부착성 태반 줄기세포의 집단(즉, 2개 이상), 예컨대, 용기, 예컨대, 백 속의 집단이다.

[0463] 부착성 태반 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, 및 CD200, 및/또는 OCT-4를 발현하며, CD34, CD38 또는 CD45를 발현하지 않는다. 부착성 태반 줄기세포는 또한 HLA-ABC(MHC-1) 및 HLA-DR을 발현할 수 있다. 이들 마커를 사용하여 부착성 태반 세포를 확인하고, 다른 세포 유형으로부터 부착성 태반 세포를 구별할 수 있다. 부착성 태반 세포는 CD73 및 CD105를 발현하므로, 이들은 간엽성 줄기세포-유사 특징을 갖는다. CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현의 결여는 부착성 태반 줄기세포를 비-조혈 줄기세포로서 확인한다.

[0464] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 단리된 부착성 태반 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출 가능하게 억제한다.

[0465] 소정의 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 분리된 태반 줄기세포이다. 특정의 다른 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 분리된 태반 다능성 세포이다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 측정된 것으로서 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 태반 줄기세포이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다능성 부착성 태반 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 중성 표현형의 세포, 골원성 표현형의 세포, 또는 연골원성 표현형의 세포로 분화되는 잠재능을 갖는다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 보다 구체적인 실시형태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD80^-$ 및 $CD86^-$ 이다.

[0466] 일 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD200^+$, $HLA-G^+$ 이다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$ 이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 다른 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하

는 경우, 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

- [0467] 다른 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 CD73+, CD105+, CD200+이다. 상기 집단의 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 HLA-G+이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우, 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.
- [0468] 다른 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 CD200+, OCT-4+이다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD73+ 및 CD105+이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 HLA-G+이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38-, CD45-, CD73+, CD105+ 및 HLA-G+이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.
- [0469] 다른 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 CD73+, CD105+ 및 HLA-G+이다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 부작성 줄기세포는 또한 OCT-4+이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 부작성 줄기세포는 또한 CD200+이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 부작성 줄기세포는 또한 CD34-, CD38-, CD45-, OCT-4+ 및 CD200+이다.
- [0470] 다른 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 CD73+, CD105+ 줄기세포이고, 여기서 상기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 OCT-4+이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 OCT-4+, CD34-, CD38- 및 CD45-이다.
- [0471] 다른 실시형태에서, 부작성 태반 줄기세포는 OCT-4+ 줄기세포이고, 여기서 상기 부작성 태반 줄기세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하는 경우 하나 이상의 배아-유사체를 생산하고, 여기서 상기 줄기세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출 가능하게 억제하는 것으로 확인되었다.
- [0472] 다양한 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%는 OCT-4⁺이다. 상기 집단의 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD73+ 및 CD105+이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 줄기세포는 CD200+이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 또한 CD73+, CD105+, CD200+, CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 확장되며, 예를 들면, 적어도 1회, 적어도 3회, 적어도 5회, 적어도 10회, 적어도 15회, 또는 적어도 20회 계대배양된다.
- [0473] 상기 실시형태들 중 어느 것의 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 부작성 태반 세포는 ABC-p(태반-특이적인 ABC 수송인자 단백질; 예컨대, 문헌[Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58 (23):5337-9 (1998)] 참조)를 발현한다.
- [0474] 다른 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD200+, CD34- 및 CD133-이다. 다른 실시형태에서, 단리된 부작성 태반 세포는 IL-6, IL-8 및 단백질 화학주성 단백질(MCP-1)을 구성적으로 분비한다.
- [0475] 각각의 상기-언급된 단리된 부작성 태반 세포는 포유동물 태반으로부터 얻어지거나 직접 단리된 세포, 또는 배양되고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30회 이상 계대배양된 세포, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 기술된 단리된 부작성 태반 세포의 종양 세포 억제성 다수는 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 단리된 부작성 태반 세포를 포함할 수 있다.
- [0476] 5.8.3. 부작성 태반 세포 조건화된 배지를 포함하는 조성물

- [0477] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 및 추가로 조건화된 배지를 포함하는 조성물의 용도가 또한 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 조성물은 암 또는 바이러스 감염의 치료시 억제성이거나, 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포 및 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 비로 존재한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 부착성 태반 세포를 사용하여 종양 세포 억제성, 항암 또는 항바이러스인 조건화된 배지, 즉, 검출 가능한 종양 세포 억제 효과, 항암 효과 또는 항바이러스 효과를 갖는 세포에 의해 분비되거나 배출된 하나 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생산할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 조건화된 배지는 세포가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 동안 증식(즉, 배양)되는 배지를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조건화된 배지는 이러한 세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 합류성(confluence)으로, 또는 100% 합류성까지 성장되는 배지를 포함한다. 이러한 조건화된 배지를 사용하여 세포의 별개의 집단, 예컨대, 태반 세포, 또는 다른 종류의 세포를 지지할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조건화된 배지는 단리된 부착성 태반 세포, 예컨대, 단리된 부착성 태반 줄기세포 또는 단리된 부착성 태반 다능성 세포, 및 단리된 부착성 태반 세포 이외의 세포, 예컨대, 비-태반 줄기세포 또는 다능성 세포가 배양된 배지를 포함한다.
- [0478] 이러한 조건화된 배지는 종양 세포 억제성, 항암 또는 항바이러스인 조성물을 형성하는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 태반 관류액, 또는 태반 관류액 세포 중 어느 것, 또는 이들의 임의의 조합과 조합될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 용적당 절반 미만의 조건화된 배지, 예컨대, 용적당 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 이하의 조건화된 배지를 포함한다.
- [0479] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 단리된 부착성 태반 세포의 배양물로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되며, 여기서 상기 단리된 부착성 태반 세포는 (a) 기질에 부착하고; (b) $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이며; 여기서 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출 가능하게 억제하거나, 항암 또는 항바이러스성이다. 구체적인 실시형태에서, 단리된 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 태반 줄기세포이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 다능성 부착성 태반 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골원성 표현형의 세포, 또는 연골원성 표현형의 세포로 분화할 잠재력을 갖는다. 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 추가로 $CD200^{+}$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 보다 구체적인 실시형태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$, $CD90^{+}$, $CD45^{-}$ 부착성 태반 세포는 유세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD80^{-}$ 및 $CD86^{-}$ 이다.
- [0480] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 단리된 부착성 태반 세포의 배양물로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공되고, 여기서 상기 단리된 부착성 태반 세포는 (a) 기질에 부착하고; 및 (b) $CD200$ 및 HLA-G를 발현하거나, $CD73$, $CD105$, 및 $CD200$ 을 발현하거나, $CD200$ 및 OCT-4를 발현하거나, $CD73$, $CD105$, 및 HLA-G를 발현하거나, $CD73$ 및 $CD105$ 를 발현하고, 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 태반 줄기세포를 포함하는 태반 세포의 집단 내에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하거나, OCT-4를 발현하고 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우 태반 줄기세포를 포함하는 태반 세포의 집단 속에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하며; 여기서 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출 가능하게 억제하거나, 항암 또는 항바이러스성이다. 구체적인 실시형태에서, 조성물은 복수의 상기 분리된 태반 부착성 세포를 추가로

포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 복수의 비-태반 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 비-태반 세포는 CD34⁺ 세포, 예컨대, 말초 혈액 조혈 전구세포, 제대혈 조혈 전구세포, 또는 태반 혈액 조혈 전구세포와 같은 조혈 전구세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 간엽성 줄기세포, 예컨대, 골수-기원한 간엽성 줄기세포와 같은 줄기세포를 포함할 수 있다. 비-태반 세포는 또한 성체 세포 또는 세포주의 하나 이상의 유형일 수 있다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 항-증식제, 예컨대, 항-MIP-1α 또는 항-MIP-1β 항체를 포함한다.

[0481] 구체적인 실시형태에서, 위에서 기술된 세포 또는 세포 조합 중의 하나에 의해 조건화된 배양 배지는 단리된 부착성 태반 세포 대 종양 세포의 비가 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 또는 약 5:1인, 복수의 종양 세포와 함께 공-배양된 복수의 단리된 부착성 태반 세포로부터 얻어진다. 예를 들면, 조건화된 배양 배지 또는 상층액은 약 1×10^5 개의 단리된 부착성 태반 세포, 약 1×10^6 개의 단리된 부착성 태반 세포, 약 1×10^7 개의 단리된 부착성 태반 세포, 또는 약 1×10^8 개 이상의 단리된 부착성 태반 세포를 포함하는 배양물로부터 얻어질 수 있다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조건화된 배양 배지 또는 상층액은 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 개의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1×10^5 개의 종양 세포; 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 개의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1×10^6 개의 종양 세포; 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1×10^7 개의 종양 세포; 또는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1×10^8 개의 종양 세포를 포함하는 공-배양물로부터 얻어진다.

[0482] 5.9. 세포의 보존

[0483] 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 또는 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 포함하는 태반 관류액 세포는 보존될 수 있는데, 즉, 장기간 저장을 허용하는 조건 하에, 또는, 예컨대, 세포자멸사 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 둘 수 있다.

[0484] 태반 관류액은 태반의 적어도 일부분, 예컨대, 태반 혈관화를 통한 세포 수집 조성물의 계대배양에 의해 생산될 수 있다. 세포 수집 조성물은 관류액 속에 함유된 세포를 보존하는 작용을 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 이러한 태반 세포 수집 조성물은 이의 개시내용이 이의 전문으로 본 명세서에 참조에 의해 인용된, 관련 미국 특허 출원 공개 제20070190042호에 기재된 바와 같이, 세포자멸사 저해제, 괴사 저해제 및/또는 산소-보유 퍼플루오로탄소를 포함할 수 있다.

[0485] 일 실시형태에서, 관류액 또는 태반 세포의 집단은 포유동물, 예컨대, 인간의 출산 후 태반으로부터 관류액 또는 세포의 집단을 세포자멸사 및 산소-보유 퍼플루오로탄소의 저해제를 포함하는 세포 수집 조성물에 근접하도록 함으로써 수집되며, 여기서 상기 세포자멸사의 저해제는 세포자멸사의 저해제와 접촉하지 않거나 근접하지 않은 세포의 집단과 비교하여, 태반 세포, 예컨대, 부착성 태반 세포, 예를 들면, 태반 줄기세포 또는 태반 다능성 세포의 집단 속에서 세포자멸사를 감소시키거나 방지하기에 충분한 양 및 시간으로 존재한다. 예를 들면, 태반은 세포 수집 조성물로 관류될 수 있으며, 태반 세포, 예컨대, 총 핵화된 태반 세포가 이로부터 단리된다. 구체적인 실시형태에서, 세포자멸사의 저해제는 카스파제 저해제이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 세포자멸사의 저해제는 JNK 저해제이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 JNK 저해제는 부착성 태반 세포, 예컨대, 부착성 태반 줄기세포 또는 부착성 태반 다능성 세포의 분화 또는 증식을 조절하지 않는다. 다른 실시형태에서, 세포 수집 조성물은 별도의 상 속에 상기 세포자멸사의 저해제 및 상기 산소-보유 퍼플루오로탄소를 포함한다. 다른 실시형태에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸사의 저해제 및 상기 산소-보유 퍼플루오로탄소를 유액 속에 포함한다. 다른 실시형태에서, 세포 수집 조성물은 유화제, 예컨대, 레시틴을 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 세포자멸사 저해제 및 퍼플루오로탄소는 태반 세포를 세포 수집 조성물과 근접하도록 하는 시기에 약 0°C 내지 약 25°C에 존재한다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 세포자멸사 저해제 및 상기 퍼플루오로탄소는 태반 세포가 세포 수집 조성물과 근접하도록 하는 시기에 약 2°C 내지 약 10°C, 또는 약 2°C 내지 약 5°C의 온도에서 존재한다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 근접하도록 하는 것은 상기 세포의 집단의 수송 동안 수행된다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 근접하도록 하는 것은 상기 세포의 집단의 동결 및 해동 동안에 수행된다.

[0486] 다른 실시형태에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 수집하여 관류액 및/또는 세포를 세포자멸사의 저해제 및 산소-보존 화합물과 근접하도록 함으로써 보존시킬 수 있으며, 여기서 상기 세포자멸사의 저해제는 세포자멸사

의 저해제와 접촉하지 않거나 근접하지 않은 관류액 또는 태반 세포와 비교하여, 세포의 세포자멸사를 감소시키거나 방지하기에 충분한 양 및 시간 동안 존재한다. 구체적인 실시형태에서, 기관 보존 화합물은 UW 용액(미국 특허 제4,798,824호에 기술됨; VIASPAN™으로서 또한 공지됨; 또한 문헌[Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)] 참조) 또는 Stern 등의 미국 특허 제5,552,267호에 기술된 용액이며, 상기 문헌의 개시내용은 이의 전문으로 본 명세서에 참조에 의해 인용된다. 다른 실시형태에서, 상기 기관-보존 조성물은 하이드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노즈, 또는 이들의 조합이다. 다른 실시형태에서, 태반 세포 수집 조성물은 2개 상 또는 유액으로서 산소-보유 퍼플루오로탄소를 추가로 포함한다.

[0487] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 태반 세포는 세포자멸사 저해제 및 산소-보유 퍼플루오로탄소, 기관-보존 화합물, 또는 이들의 조합을 포함하는 세포 수집 조성물과 관류 동안 근접된다. 다른 실시형태에서, 태반 세포는 관류에 의한 수집 후 상기 세포 수집 화합물과 근접된다.

[0488] 전형적으로, 태반 세포 수집, 농축 및 단리 동안, 저산소증 및 기계적 응력으로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 당해 방법의 다른 실시형태에서, 태반 관류액 또는 태반 세포의 집단은 수집, 농축 또는 단리 동안 저산소증 조건에 상기 보존 동안 6시간 미만 동안 노출되며, 여기서 저산소증 조건은 정상의 혈액 산소 농도 미만인 산소의 농도이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액 또는 태반 세포의 집단은 상기 저산소증 조건에 상기 보존 동안 2시간 미만 동안 노출된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 세포의 집단은 상기 저산소증 조건에 수집, 농축 또는 단리 동안 1시간 미만, 또는 30분 미만 동안 노출되거나, 노출되지 않는다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 세포의 집단은 수집, 농축 또는 단리 동안 전단 응력에 노출되지 않는다.

[0489] 세포, 예컨대, 태반 관류액 세포, 조혈 세포, 예컨대, CD34⁺ 조혈 줄기세포; 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포; 본 명세서에 제공된 단리된 부착성 태반 세포는, 예컨대, 소형 용기, 예컨대, 앰플 또는 격벽이 있는 바이알(septum vial) 속에서 동결보존 배지 중에 동결보존될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 mL 당 약 1×10^4 내지 5×10^8 개의 세포의 농도로 동결보존된다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 mL 당 약 1×10^6 내지 1.5×10^7 개의 세포의 농도로 동결보존된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 세포는 mL 당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.5×10^7 개의 세포의 농도로 동결보존된다.

[0490] 적합한 동결보존 배지는 정상 염수, 예컨대, 성장 배지를 포함하는 배양 배지, 또는 세포 동결 배지, 예를 들면, 상업적으로 입수 가능한 세포 동결 배지, 예컨대, C2695, C2639 또는 C6039(Sigma); CryoStor® CS2, CryoStor® CS5 또는 CryoStor®CS10(BioLife Solutions)을 포함하는 배양 배지를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일 실시형태에서, 동결보존 배지는 DMSO(다이메틸설폭사이드)를, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 동결보존 배지는 추가의 제제, 예를 들면, 메틸셀룰로스, 텍스트란, 알부민(예컨대, 인간 혈청 알부민), 트레할로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10%의 DMSO, 약 25% 내지 75%의 텍스트란 및/또는 약 20 내지 60%의 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10%의 DMSO, 약 25% 내지 75%의 트레할로스 및/또는 약 20 내지 60%의 인간 HSA를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 텍스트란 및 40%의 HSA를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 텍스트란 (정상의 염수 중 10% w/v) 및 40%의 HSA를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 트레할로스 및 40%의 HSA를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 트레할로스(정상 염수 중 10% w/v) 및 40%의 HSA를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 동결보존 배지는 CryoStor® CS5를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 동결보존 배지는 CryoStor®CS10을 포함한다.

[0491] 본 명세서에 제공된 세포는 어떠한 다양한 방법에 의해서, 및 세포 배양, 확장 또는 분화의 어느 단계에서도 동결보존될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 제공된 세포는 원래의 조직 또는 기관, 예컨대, 태반 관류액 또는 제대혈로부터 단리 후, 또는 동안, 또는 상기 요약된 방법들의 제1, 제2, 또는 제3 단계 후 바로 동결보존될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포는 원래의 조직 또는 기관으로부터 단리 후 약 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45분내 또는 약 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 또는 24 시간 내에 동결보존된다. 소정의 실시형태에서, 상기 세포는 원래의 조직 또는 기관으로부터 단리 후 1, 2 또는 3일 내에 동결보존된다. 소정의 실시형태에서, 상기 세포는 전술한 바와 같은 제1 배지 중에서 배양된 후, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 동결

보존된다. 몇몇 실시형태에서, 상기 세포는 전술한 바와 같은 제1 배지 중에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안, 및 전술한 바와 같이 제2 배지 중에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 동결보존된다. 몇몇 실시형태에서, NK 세포를 본 명세서에 기재된 3-단계 방법으로 제조하는 경우, 상기 세포는 제1 배지 중에서 배양된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 동안; 및/또는 제2 배지 중에서 배양된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 동안; 및/또는 제3 배지 중에서 배양된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 동안 동결보존된다. 구체적인 실시형태에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 제조되며, 상기 세포는 제1 배지 중에서 배양된 후 10일 동안; 제2 배지 중에서 배양된 후 4일 동안; 및 제3 배지 중에서 배양된 후 21일 동안 배양된다.

[0492] 일 양상에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 동결보존하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은, 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻ 또는 CD16⁺, 및 CD94⁺ 또는 CD94⁻인 자연살해 세포를 포함하고, 여기서 당해 자연살해 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있음)을 생산하는 단계, 및 다음 상기 NK 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 동결보존 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80 $^{\circ}$ C 미만에서 저장하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0493] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁺인 자연살해 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음에, NK 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 동결보존 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80 $^{\circ}$ C 미만에서 저장하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0494] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 인자(SCF) 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁺인 자연살해 세포를 포함

함)을 생산하는 단계 및 다음에, NK 세포를 동결보존 배지 중에서 보존하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 상기 세포 현탁액 용액에 동결보존 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0495] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 SCF, 줄기세포 동원제, 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음에, NK 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 동결보존 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0496] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포를 상기 제3 세포 집단으로부터 분리시켜 제4 세포 집단(여기서 당해 제4 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 자연살해 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음, NK 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 동결보존 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0497] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a+인 ILC3 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음, ILC3 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF,

MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 동결보존된 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0498] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기세포 동원제, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 동결보존된 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0499] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 동결보존된 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0500] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기세포 동원제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56+, CD3- 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 동결보존된 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 소정의

실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0501] 일 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여, 제2 세포 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a⁻ 세포를 상기 제3 세포 집단으로부터 분리시켜 제4 세포 집단(여기서 당해 제4 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻ 및 CD11a⁻인 ILC3 세포를 포함함)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 중에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 핵판, 예컨대, 저분자량 핵판들을 포함하지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 동결보존된 배지를 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 얻는 단계; (3) 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 얻는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0502] 본 명세서에 제공된 세포는 조절된 속도의 동결기 속에서, 동결보존 동안 예컨대, 약 0.1, 0.3, 0.5, 1, 또는 2℃/분에서 냉각시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 동결보존 온도는 -80℃ 내지 약 -180℃, 또는 약 -125℃ 내지 약 -140℃이다. 동결보존된 세포는 사용을 위한 해동 전에 액체 질소로 이전될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 예를 들면, 애플이 약 -90℃에 이르면, 이들을 액체 질소 저장 구역에 이전시킨다. 동결보존된 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도에서 해동될 수 있으며, 보다 구체적으로 약 37℃의 온도로 해동될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 동결보존된 세포는 약 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 또는 24 시간 동안, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 동결보존된 후 해동된다. 소정의 실시형태에서, 동결보존된 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개월 동안 동결보존된 후 해동된다. 소정의 실시형태에서, 동결보존된 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10년 동안 동결보존된 후 해동된다.

[0503] 적합한 해동 배지는 정상 염수, 예를 들면, 성장 배지, 예컨대, RPMI 배지를 포함하는 플라스말라이트(plasmalyte) 배양 배지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 해동 배지는 배지 보충물(예컨대, 영양물, 사이토카인 및/또는 인자들) 중 하나 이상을 포함한다. 본 명세서에 제공된 세포를 해동시키는 데 적합한 배지 보충물은, 예를 들면, 인간 혈청 AB, 태아 소 혈청(FBS) 또는 태아 송아지 혈청(FCS)과 같은 혈청, 비타민, 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 아미노산(예컨대, L-글루타민), 지방산(예컨대, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린(예컨대, 재조합 인간 인슐린), 트랜스페린(철 포화된 인간 트랜스페린), β -머캅토에탄올, 줄기세포 인자(SCF), Fms-유사-타이로신 키나제 3 리간드(Flt3L), 사이토카인, 예컨대, 인터류킨-2(IL-2), 인터류킨-7(IL-7), 인터류킨-15(IL-15), 트롬보포이에틴(Tpo) 또는 핵판들을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 방법에서 유용한 해동 배지는 RPMI를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 약 0.5 내지 20%의 FBS를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 약 1, 2, 5, 10, 15 또는 20%의 FBS를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20%의 HSA를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 약 1, 2.5, 5, 10, 15 또는 20%의 HSA를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 RPMI 및 약 10%의 FBS를 포함한다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트 및 약 5%의 HSA를 포함한다.

[0504] 본 명세서에 제공된 동결보존 방법은 장기간 저장을 위해, 또는, 예컨대, 세포자멸사 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에서 허용되도록 최적화될 수 있다. 일 실시형태에서, 해동 후 세포는, 예컨대, 자동 세포 계수기 또는 트립판 블루 방법에 의해 측정된 것으로서, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 초과로 살아있는 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 해동 후 세포는 약 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 또는 25%의 사멸 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 해동 후 세포는 약 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 또는 25%의 초기 세포자멸사 세포를 포함한다. 다른 실시형태에서, 해동 후 세포의 약 0.5, 1, 5, 10, 15 또는 20%는, 예컨대, 세포자멸사 검정(예컨대, TO-PRO3 또는 AnnV/PI 세포자멸사 검정 키트)에 의해 측정된 것으로서, 해동 후 1, 2, 3, 4,

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 후에 세포자멸사를 겪는다. 소정의 실시형태에서, 해동 후 세포는 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 배양, 확장 또는 분화된 후 재-동결보존된다.

[0505] **5.10. NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함하는 조성물**

[0506] **5.10.1. 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포**

[0507] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 포함하는 조성물, 예컨대, 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초 혈액으로부터 단리된 예컨대, 조혈 줄기세포 또는 전구세포를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 조성물 중 세포의 적어도 50%를 차지한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 예컨대, $CD3^-CD56^+$ 세포는 조성물 중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 소정의 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 중 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하는 $CD3^-CD56^+$ 세포이다. 소정의 실시형태에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^+$ 이다.

[0508] 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 생체내에서 사용하기 위해 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 예컨대, 염수 용액 또는 생체내 투여용의 다른 허용된 생리학적으로 허용되는 용액 속에 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 본 명세서의 어딘가에 기술된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 중 어느 것도 포함한다.

[0509] 본 발명의 약제학적 조성물은 50% 이상의 생존 세포(즉, 집단 중 세포의 적어도 50%는 작용성이거나 살아있음)를 포함하는 세포의 집단을 포함한다. 바람직하게는, 집단 중 세포의 적어도 60%는 살아있다. 보다 바람직하게, 약제학적 조성물 속의 집단중 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%는 살아있다.

[0510] 본 발명의 약제학적 조성물은, 예컨대, 이식을 촉진시키는 하나 이상의 화합물; 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 등과 같은 안정화제를 포함할 수 있다.

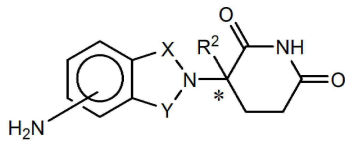
[0511] 주사가능한 용액으로 제형화되는 경우, 일 실시형태에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1.25%의 HSA 및 약 2.5%의 텍스트란을 포함한다. 세포 생성물의 투여에 적합한, 다른 주사가능한 제형을 사용할 수 있다.

[0512] 일 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 전신 또는 국소 투여에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 비경구 투여에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드를 통해 투여하기에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 주사에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 카테터를 통한 투여에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 국소 주사에 적합하다. 보다 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 고형 종양(예컨대, 육종)에 직접 국소 주사하기에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 주사기로 주사하기에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 안내된 전달을 통한 투여에 적합하다. 구체적인 실시형태에서, 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 복강경 검사법, 내시경술, 초음파술, 컴퓨터 단층촬영술, 자기 공명술 또는 방사선학에 의해 보조된 주사에 적합하다.

[0513] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함하는 조성물, 예컨대, 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물은 약제 등급의 투여 가능한 단위로 제공된다. 이러한 단위는 별개의 용적, 예컨대, 15ml, 20ml, 25ml, 30ml, 35ml, 40ml, 45ml, 50ml, 55ml, 60ml, 65ml, 70ml, 75ml, 80ml, 85ml, 90ml, 95ml, 100ml, 150ml, 200ml, 250ml, 300ml, 350ml, 400ml, 450ml, 500ml 등으로 제공된다. 이러한 단위는 규정된 수의 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 밀리리터당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , $1 \times$

10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 세포를 함유하도록 제공된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 단위는 밀리리터당 약, 최소 약 또는 최대 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 개 이상의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 이러한 단위는 규정된 수의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및/또는 다른 세포중 어느 것을 함유하도록 제공될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, NK 세포 및 ILC3 세포는 본 명세서에 제공된 비로 존재한다.

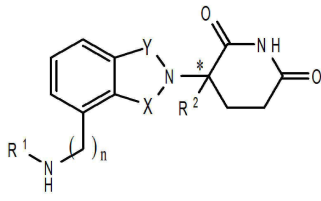
[0514] 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 단일 개체로부터 유래된다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 적어도 두 상이한 개체로부터의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 사용한 치료가 의도된 개체 이외의 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 상기 NK 세포가 동등한 수의 자연살해 세포, 즉, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉하지 않거나 근접하지 않는 NK 세포보다 검출 가능하게 더 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양 및 시간 동안 면역조절 화합물과 접촉되거나 근접하게 된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 면역조절 화합물은 하기 기술된 화합물이다. 예컨대, 이의 개시내용이 이의 전문으로 본 명세서에 참조에 의해 인용된, 미국 특허 제7,498,171호를 참조한다. 소정의 실시형태에서, 면역조절 화합물은 아미노-치환된 아이소인돌린이다. 일 실시형태에서, 면역조절 화합물은 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-다이하이드로아이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-다이온; 3-(4'아미노아이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-다이온; 4-(아미노)-2-(2,6-다이옥소(3-피페리딜))-아이소인돌린-1,3-다이온; 또는 4-아미노-2-(2,6-다이옥소피페리딘-3-일)아이소인돌-1,3-다이온이다. 다른 실시형태에서, 면역조절 화합물은 포말리도마이드, 또는 레날리도마이드이다. 다른 실시형태에서, 상기 면역조절 화합물은 다음 구조식을 갖는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라트레이트(clathrate), 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체의 혼합물이다:



[0515]

[0516] 식 중,

[0517] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, X 및 Y 중 다른 것은 C=O 또는 CH₂이고, R²는 수소 또는 저급 알킬이다. 다른 실시형태에서, 상기 면역조절 화합물은 다음 구조식을 갖는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라트레이트, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체의 혼합물이다:



[0518]

[0519] 식 중, X 및 Y 중 하나는 C=O이고 다른 것은 CH₂ 또는 C=O이며;

[0520] R¹은 H, (C₁-C₈)알킬, (C₃-C₇)사이클로알킬, (C₂-C₈)알켄일, (C₂-C₈)알킨일, 벤질, 아릴, (C₀-C₄)알킬-(C₁-C₆)헤테로사이클로알킬, (C₀-C₄)알킬-(C₂-C₅)헤테로아릴, C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)알킬-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)알킬-OR⁵, (C₁-C₈)알킬-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} 또는 (C₁-C₈)알킬-O(CO)R⁵이고;

- [0521] R^2 는 H, F, 벤질, (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알켄일 또는 (C_2-C_8) 알킨일이며;
- [0522] R^3 및 $R^{3'}$ 은 독립적으로 (C_1-C_8) 알킬, (C_3-C_7) 사이클로알킬, (C_2-C_8) 알켄일, (C_2-C_8) 알킨일, 벤질, 아릴, (C_0-C_4) 알킬- (C_1-C_6) 헤테로사이클로알킬, (C_0-C_4) 알킬- (C_2-C_5) 헤테로아릴, (C_0-C_8) 알킬- $N(R^6)_2$, (C_1-C_8) 알킬- OR^5 , (C_1-C_8) 알킬- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) 알킬- $O(CO)R^5$ 또는 $C(O)OR^5$ 이고;
- [0523] R^4 는 (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알켄일, (C_2-C_8) 알킨일, (C_1-C_4) 알킬- OR^5 , 벤질, 아릴, (C_0-C_4) 알킬- (C_1-C_6) 헤테로사이클로알킬 또는 (C_0-C_4) 알킬- (C_2-C_5) 헤테로아릴이며;
- [0524] R^5 는 (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알켄일, (C_2-C_8) 알킨일, 벤질, 아릴 또는 (C_2-C_5) 헤테로아릴이고;
- [0525] R^6 의 각각의 존재는 독립적으로 H, (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알켄일, (C_2-C_8) 알킨일, 벤질, 아릴, (C_2-C_5) 헤테로아릴, 또는 (C_0-C_8) 알킬- $C(O)O-R^5$ 이거나 R^6 기는 결합하여 헤테로사이클로알킬기를 형성하며;
- [0526] n은 0 또는 1이고;
- [0527] *은 카이럴성-탄소 탄소 중심을 나타낸다.
- [0528] 다른 실시형태에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조식을 갖는 화합물, 또는 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라트레이트, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체의 혼합물이다:
-
- [0529]
- [0530] 식 중,
- [0531] X 및 Y 중 하나는 C=O이고 다른 것은 CH_2 또는 C=O이며;
- [0532] R은 H 또는 CH_2OCOR' 이고;
- [0533] (i) 각각의 R^1 , R^2 , R^3 또는 R^4 는 서로 독립적으로 할로, 탄소수 1 내지 4의 알킬, 또는 탄소수 1 내지 4의 알콕시이거나 (ii) R^1 , R^2 , R^3 또는 R^4 중 하나는 니트로 또는 $-NHR^5$ 이고 R^1 , R^2 , R^3 또는 R^4 중 나머지는 수소이며;
- [0534] R^5 는 수소 또는 탄소수 1 내지 8의 알킬이고;
- [0535] R^6 은 수소, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 벤조, 클로로 또는 플루오로이며;
- [0536] R' 는 $R^7-CHR^{10}-N(R^8R^9)$ 이고;
- [0537] R^7 은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 $-(C_nH_{2n})-$ 이며, 여기서 n은 0 내지 4의 값이고;
- [0538] 각각의 R^8 및 R^9 는 서로 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 8의 알킬이거나, R^8 및 R^9 은 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌 또는 $-CH_2CH_2X_1CH_2CH_2-$ 이고, 여기서 X_1 은 $-O-$, $-S-$, 또는 $-NH-$ 이며;
- [0539] R^{10} 은 수소, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 또는 페닐이고;
- [0540] *는 카이럴성-탄소 중심을 나타낸다.
- [0541] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기재된 항암 화합물 중 하나 이

상을 포함한다.

[0542] 보다 구체적인 실시형태에서, 조성물은 다른 공급원으로부터 또는 다른 방법에 의해 제조된, NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 체대혈이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 다른 공급원은 말초 혈액이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물 중의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 다른 공급원으로부터, 또는 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0543] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 동일한 개체로부터 유래된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과는 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 속의 세포 모두, 또는 실질적으로 모두(예컨대, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 속의 태아 세포는 상기 관류액 속의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 태반 혈관화를 통해 0.9% NaCl 용액의 계대배양을 통해 얻어진다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하기 위해 처리된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예컨대, 하기 기술된 면역조절 화합물, 예컨대, 아미노-치환된 아이소인돌린 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하나 이상의 하기 기재된 항암 화합물을 포함한다.

[0544] 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 동일한 개체로부터 유래된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과는 상이한 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 조성물은 분리된 태반 관류액 및 분리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 분리된 관류액 및 상기 분리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 유래된다. 태반 관류액을 포함하는 상기 구현예들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2명의 개체의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 실시형태 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 분리된 태반 관류액 세포는 적어도 2명의 개체로부터 유래된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하나 이상의 하기 기재된 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0545] 5.11.3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 용도

[0546] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 제공된, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 암을 지닌 개체, 예컨대, 고형 종양 세포 및/또는 혈액 암 세포를 지닌 개체, 또는 바이러스 감염된 개체를 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 이러한 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 유효 투여량은 1×10^4 내지 5×10^4 , 5×10^4 내지 1×10^5 , 1×10^5 내지 5×10^5 , 5×10^5 내지 1×10^6 , 1×10^6 내지 5×10^6 , 5×10^6 내지 1×10^7 개 이상의 세포/kg의 체중의 범위이다. 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 또한 사용될 수 있다.

[0547] 5.11.1. 암을 지닌 개체의 치료

[0548] 일 실시형태에서, 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 상기 개체에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 상기 개체에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본

암은 전립선 암이다. 다른 실시형태에서, 암은 간암이다. 다른 실시형태에서, 암은 폐암이다. 다른 실시형태에서, 암은 신장암이다.

[0552] 소정의 실시형태에서, 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개체, 예컨대, 자연살해 세포가 결핍된 개체는 상기 투여 전 골수 이식을 받은 개체이다. 소정의 실시형태에서, 상기 골수 이식은 상기 암의 치료 시 시행되었다. 특정의 다른 실시형태에서, 골수 이식은 상기 암 이외의 상태의 치료 시 시행되었다. 소정의 실시형태에서, 개체는 상기 골수 이식 이외에 면역억제제를 제공받았다. 소정의 실시형태에서, 골수 이식을 받은 개체는 상기 투여 시기에 이식체 대 숙주 질환(GVHD)의 하나 이상의 증상을 나타내었다. 특정의 다른 실시형태에서, 골수 이식을 받은 개체는 GVHD의 증상이 만연하기 전에 상기 세포를 투여받는다.

[0553] 특정의 구체적인 실시형태에서, 암, 예를 들면, 혈액 암을 지닌 개체는 상기 투여 전에 TNF α 저해제, 예컨대, ETANERCEPT®(Enbrel)의 적어도 1회 용량을 제공받는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 상기 암의 진단 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 개월 내에 상기 용량의 TNF α 저해제를 제공받는다. 구체적인 실시형태에서, TNF α 저해제의 용량을 제공받은 개체는 급성 골수성 백혈병을 나타낸다. 보다 구체적인 실시형태에서, TNF α 저해제의 투여량을 제공받고 급성 골수성 백혈병을 나타내는 개체는 혈액 세포 속에서 5번 염색체의 롱 아암(long arm)의 결실을 추가로 나타낸다. 다른 실시형태에서, 암, 예를 들면, 혈액 암을 지닌 개체는 필라델피아 염색체(Philadelphia chromosome)를 나타낸다.

[0554] 특정의 다른 실시형태에서, 상기 개체에서 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양은 하나 이상의 항암 약물에 대해 난치성이다. 구체적인 실시형태에서, 암은 GLEEVEC®(이마티닙 메실레이트)에 대해 난치성이다.

[0555] 소정의 실시형태에서, 상기 개체에서 암, 예를 들면, 혈액 암은 적어도 하나의 항암 약물에 대해 반응하며; 당해 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 자연살해 세포, 예컨대, 태반 자연살해 세포, 예컨대, 태반-유래 중간체 자연살해 세포, 단리되고 조합된 자연살해 세포, 또는 NK 세포, 및/또는 이들의 조합, 및 선택적으로 면역조절 화합물이 보조 치료로서 또는 조합 치료요법으로서 상기 항암 약물과 함께 가해진다. 특정의 다른 실시형태에서, 암, 예를 들면, 혈액 암을 지닌 개체는 적어도 하나의 항암 약물로 치료되며, 상기 투여 전에 재발되었다. 소정의 실시형태에서, 치료될 개체는 난치성 암을 지닌다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 세포를 사용한 암 치료 방법은 암의 재발에 대해 보호(예컨대, 방지 또는 지연)한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 암 치료 방법은 1개월 이상, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 이상, 1년 이상, 2년 이상, 3년 이상, 또는 4년 이상 동안 암의 차도를 가져온다.

[0556] 일 실시형태에서, 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 상기 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) NK 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 조혈 세포로부터 생산된 제대혈 NK 세포, 또는 NK 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위해 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 다른 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 NK 세포는 각각 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특정의 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는, 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 당해 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94- 또는 CD94-인 자연살해 세포를 포함하고, 여기서 상기 자연살해 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아 있다)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0557] 다른 실시형태에서, 급성 골수성 백혈병(AML)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 상기 개체에게 NK 세포(IL2 단독, 또는 IL-15 단독, IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18을 사용한 사전치료에 의해 선택적으로 활성화됨)(여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서 AML를 치료하는데 효과적임)를 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시형태

태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 단리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 사전치료된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. AML을 지닌 개체의 치료 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생산된다. 특수한 실시형태에서, 앞서의 방법에 의해 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML을 포함한다. 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML의 치료를 위해 NK 세포를 투여하기 위한 당해 분야에 공지된 방법은 당해 목적을 위해 채택될 수 있다: 예컨대, 문헌[Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28:955-959](이들 각각은 이의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용됨) 참조. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 AML에 대한 적어도 하나의 비-자연살해 세포 치료제에 실패하였다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 65세 이상이고 처음 차도가 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 상기 자연살해 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다.

[0558] 일 실시형태에서, 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 상기 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) ILC3 세포(여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적임)를 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 다른 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 ILC3 세포는 각각 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는, 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻ 또는 CD16⁺, 및 CD94⁺ 또는 CD94⁻인 자연살해 세포를 포함하고, 여기서 상기 자연살해 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있음)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1α, 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1α를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0559] 다른 실시형태에서, 급성 골수성 백혈병(AML)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 상기 개체에게 ILC3 세포(IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18에 의한 전처리에 의해 선택적으로 활성화됨)(여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개체에서 AML을 치료하는데 효과적임)를 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 예비처리된다. 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. AML을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생산된다. 특수한 실시형태에서, 앞서의 방법으로 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML을 포함한다. 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML의 치료를 위해 ILC3 세포를 투여하기 위한 당해 분야에 공지된 방법은 당해 목적을 위해 채택될 수 있다: 예컨대, 문헌[Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28:955-959] 참조(이들 각각은 이의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 원용된다). 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 AML에 대한 적어도 하나의 비-자연살해 세포 치료제에 실패한 AML을 갖는다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 65세 이상이고 처음 차도가 있다. 구체적인 실시형태에서, 상기 개체는 상기 자연살해 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다.

[0560] AML을 지닌 개체를 치료하는 방법의 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는, 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세

포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 자연살해 세포를 포함하고, 여기서 상기 자연살해 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있음)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0561] 다른 실시형태에서, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 상기 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 펠팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) NK 세포, 예컨대, 전술한 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포(여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서 상기 CLL을 치료하는데 효과적임)의 치료학적 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 실시형태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 상기 방법 중 어느 것의 구체적인 실시형태에서, 상기 레날리도마이드, 펠팔란, 플루다라빈, 및 확장된 NK 세포는 상기 개체에게 별도로 투여된다. CLL을 지닌 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시형태에서, 상기 NK 세포는, 줄기세포 동원제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기세포 또는 전구세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 중에서 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기세포 동원제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 중에서 제2 세포 집단을 배양하여, 제3 세포 집단(여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 자연살해 세포를 포함하고, 여기서 상기 자연살해 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있음)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 저해 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt3L)를 결여한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α 및 Flt3L을 결여한다. 소정의 실시형태에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0562] 5.11.2. 종양 세포 증식의 억제

[0563] 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 또한 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을, 종양 세포와 근접시킴, 예컨대, 종양 세포를 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다. 따라서, 복수의 NK 세포가 치료학적 유효량의 NK 세포 집단을 종양 세포와 근접시키는 단계, 예컨대, 종양 세포를 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 선택적으로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 NK 세포와 근접하게 된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 면역조절 화합물, 예컨대, 전술한 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 NK 세포와 근접시킴으로써, 종양 세포의 증식이 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포와 근접하지 않은 동일한 유형의 종양 세포와 비교하여 검출 가능하게 감소되도록 한다. 선택적으로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포는 면역조절 화합물과 접촉시키거나 근접시킨 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 NK 세포와 근접시킨다.

[0564] 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 또한 본 명세서에 제공되며, 해당 방법은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 종양 세포와 근접시키는 단계, 예컨대, 종양 세포를 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포와 접촉시키는 단계 포함한다. 따라서, 복수의 ILC3 세포가 치료학적 유효량의 ILC3 세포 집단을 종양 세포와 근접시키는 단계, 예컨대, 종양 세포를 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포와 접촉시키는 단계를 포함하

는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 선택적으로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접하게 된다. 다른 구체적인 실시형태에서, 면역조절 화합물, 예컨대, 전술한 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접시킴으로써, 종양 세포의 증식이 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포와 근접하지 않은 동일한 유형의 종양 세포와 비교하여 검출 가능하게 감소되도록 한다. 선택적으로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포는 면역조절 화합물과 접촉시키거나 근접시킨 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접시킨다.

[0565] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 소정의 실시형태에서, 세포와 관련하여 "접촉시키는 것", 또는 "근접시키는 것"은, 일 실시형태에서 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 자연살해 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 집단, ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 ILC3 세포 집단, 및/또는 단리되어 조합된 자연살해 세포 및 종양 세포 사이의 직접적인 물리적, 예컨대, 세포-세포 접촉을 포함한다. 다른 실시형태에서, "접촉"은 동일한 물리적 공간 내에서의 존재를 포함하는데, 예컨대, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 자연살해 세포, 예컨대, 태반 중간체 자연살해 세포, 본 명세서에 기재된 자연살해 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 집단, 본 명세서에 기재된 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 ILC3 세포 집단, 및/또는 단리되어 조합된 자연살해 세포가 ILC3 세포 집단, 및/또는 단리되어 조합된 자연살해 세포가 레이트)에 놓여짐을 포함한다. 다른 실시형태에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 자연살해 세포, 태반 중간체 자연살해 세포, 또는 본 명세서에 기재된 자연살해 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 집단 또는 본 명세서에 기재된 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 따라 생산된 ILC3 세포 집단, 및 종양 세포의 "접촉"은, 예컨대, 태반 관류액 또는 세포, 예컨대, 태반 관류액 세포, 조합된 자연살해 세포, 자연살해 세포, 예컨대, 태반 중간체 자연살해 세포, 또는 ILC3 세포를 개체, 예컨대, 종양 세포를 포함하는 개체, 예컨대, 암 환자에게 주사하거나 주입시킴으로써 달성된다. 면역조절 화합물 및/또는 탈리도마이드와 관련하여 "접촉"은, 예컨대, 세포 및 면역조절 화합물 및/또는 탈리도마이드가 각각 서로 직접 물리적으로 접촉하거나 동일한 물리적 용적(예컨대, 세포 배양 용기 또는 개체) 내에 놓여짐을 의미한다.

[0566] 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 혈액 암 세포, 예컨대, 백혈병 세포 또는 림프종 세포이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 암은 급성 백혈병, 예컨대, 급성 T 세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병(AML) 세포, 급성 전골수구 백혈병 세포, 급성 골수아구성 백혈병 세포, 급성 거핵아구 백혈병 세포, 전구체 B 급성 림프아구 백혈병 세포, 전구체 T 급성 림프아구 백혈병 세포, 버킷 백혈병(버킷 림프종) 세포, 또는 급성 이종표현형 백혈병 세포; 만성 백혈병 세포, 예컨대, 만성 골수성 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 만성 단핵구 백혈병 세포, 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소림프구성 림프종 세포, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병 세포; 모발 세포 림프종 세포; T-세포 전림프구성 백혈병 세포; 또는 림프종 세포, 예컨대, 조직구 림프종 세포, 림프구형질세포의 림프종 세포(예컨대, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증 세포), 비장의 주변영역 림프종 세포, 혈장 세포 신생물 세포(예컨대, 혈장 세포 골수종 세포 세포, 형질세포종 세포, 단클론성 면역글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 외부결절성 가장자리 구역 B 세포 림프종(MALT 림프종) 세포, 결절성 가장자리 구역 B 세포 림프종(NMZL) 세포, 여포성 림프종 세포, 외투 세포 림프종 세포, 확산성 거대 B 세포 림프종 세포, 중격(흉선) 거대 B 세포 림프종 세포, 혈관내 거대 B 세포 림프종 세포, 원발성 삼출액 림프종 세포, T 세포 거대 과립구 림프구성 백혈병 세포, 응집성 NK 세포 백혈병 세포, 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포, 외부결절성 NK/T 세포 림프종 세포-비강 형 세포, 장질환-형 T 세포 림프종 세포, 간비장 T 세포 림프종 세포, 유약화 NK 세포 림프종 세포, 균상 식육종(세자리 증후군), 1차 피부 CD30-양성 T 세포 림프구성식 질환(예컨대, 1차 피부 역성형 거대 세포 림프종 또는 림프종양구진) 세포, 혈관면역모구 T 세포 림프종 세포, 말초 T 세포 림프종-규정되지 않은 세포, 역형성 거대 세포 림프종 세포, 호지킨 림프종 세포 또는 결절성 림프구가 우세한 호지킨 림프종 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 다발성 골수종 세포 또는 골수이형성 증후군 세포이다.

[0567] 구체적인 실시형태에서, 종양 세포는 고형 종양 세포, 예컨대, 암종 세포, 예를 들면, 선암종 세포, 부신피질 암종 세포, 결장 선암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 결장직장 암종 세포, 췌관 세포 암종 세포, 폐 암종 세포, 갑상선 암종 세포, 비인두 암종 세포, 흑색종 세포(예컨대, 악성 흑색종 세포), 비-흑색종 피부 암종 세포, 또는 상세포암종 암종 세포; 데스모이드 종양 세포; 결합조직성 소원형세포종양 세포; 내분비 종양 세포; 유잉 육종 세포; 생식 세포 종양 세포(예컨대, 고환암 세포, 난소암 세포, 융모암 세포, 내배엽종양 세포, 배아 세포종 세포 등); 간모세포종 세포; 간세포 암종 세포; 신경아세포종 세포; 비-형문근육종 연조직 육종 세포; 골육종 세포; 망막아세포종 세포; 형문근육종 세포; 또는 윌름스 종양 세포이다. 다른 실시형태에서, 고형 종양

은 체장암 세포 또는 유방암 세포이다. 다른 실시형태에서, 고형 종양은 속귀신경집종 세포; 별아교세포종 세포 (예컨대, 등급 I 킬로양별아교세포종 세포, 등급 II 저-등급 별아교세포종 세포; 등급 III 역형성 별아교세포종 세포; 또는 등급 IV 교모세포종 다형성 세포); 척색종 세포; 두개체두종 세포; 신경교종 세포(예컨대, 뇌 줄기 신경교종 세포; 상의세포종 세포; 복합 신경교종 세포; 시신경 교종 세포; 또는 뇌실막밑세포종 세포); 교모세포종 세포; 수모세포종 세포; 뇌수막종 세포; 전이성 뇌 종양 세포; 희소돌기아교세포종 세포; 송과체모세포종 세포; 뇌하수체 종양 세포; 원시 신경외배엽 종양 세포; 또는 신경초종 세포이다. 다른 실시형태에서, 종양 세포는 전립선 암 세포이다.

[0568] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "치료학적으로 유리한" 및 "치료학적 이점"은, 예컨대, 종양 크기에 있어서의 감소; 종양의 확장의 축소 또는 중지; 전이성 질환의 감소 또는 예방; 조직 샘플, 예컨대, 혈액 샘플 중 암 세포의 수에 있어서 단위 용적당 감소; 상기 개체가 갖는 특수한 암 또는 종양의 어떠한 증상에 있어서의 임상적 개선, 개체가 갖는 특수한 암의 특정 증상 등의 악화의 축소 또는 중지를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0569] 5.11.3. NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 다른 항암제를 사용한 암의 치료

[0570] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부일 수 있다. 마찬가지로, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부일 수 있다. 부가적으로 또는 추가로, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 다른 항암제를 포함하는 항암 치료요법을 보충하는데 사용될 수 있다. 이러한 항암제는 당해 분야에 잘 공지되어 있으며 소염제, 면역조절제, 세포독성제, 암 백신, 화학치료제, HDAC 저해제(예컨대, HDAC6i(ACY-241)) 및 siRNA를 포함한다. 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및 선택적으로 관류액, 관류액 세포, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 이외의 자연살해 세포 이외에, 암을 지닌 개체, 예컨대, 종양 세포를 지닌 개체에게 투여될 수 있는 구체적인 항암제는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 악시비신(acivicin); 아클라루비신(aclarubicin); 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 아드리아마이신; 아드루실(adrucil); 알데스류킨(aldesleukin); 알트레타민; 암보마이신(ambomycin); 아메탄트론 아세테이트; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제(예컨대, 에르위니아 크리스산(Erwinia chrysan)으로부터; 에르위나제(Erwinaze)); 아스페를린(asperlin); 아바스틴(베바시주맵); 아자시타딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트(batimastat) 벤조테파; 바이칼루타마이드; 비산트렌 하이드로클로라이드; 비스나피드 다이메실레이트(bisnafide dimesylate); 비젤레신(bizelesin); 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 나트륨(brequinar sodium); 브로피리민; 부설판; 캅티노마이신(cactinomycin); 칼루스테론; 카라세마이드; 카르베티머(carbetimer); 카보플라틴; 카무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신(carzelesin); 세데핀골(cedefingol); 셀레룩십(COX-2 저해제); 세루비딘(Cerubidine); 클로람부실; 시롤레마이신(cirolemycin); 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파마이드; 사이타라빈; 다카바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴(dexormaplatin); 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 다이아지쿠온; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미딘 하이드로클로라이드; 엘사미트루신(elsamitrucin); 엘스파르(Elspar); 엔레로플라틴(enloplatin); 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르볼로졸(erbulozole); 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포사이드; 에토포사이드 포스페이트; 에토포포스(Etopophos); 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈(fazarabine); 펜레티나이드(fenretinide); 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루오로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리엔 나트륨; 겐시타빈; 겐시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다마이신; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파마이드; 일모포신(ilmofofosine); 이프로플라틴; 이리노테칸; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오타이드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤라이드 아세테이트; 리아로졸(liarozole) 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로속산트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 마이탄신; 메클로레타민 하이드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌게스트롤 아세테이트(melengestrol acetate); 멜팔란; 메노가렐; 머캅토피린; 메토평렉세이트; 메토평렉세이트 나트륨; 메토프린; 메투레데파(meturedepa); 미틴도마이드; 미토카르신; 미토그로민; 미토길린; 미토말신(mitomalcin); 미토마이신; 미토스페르(mitosper); 미토탄; 미톡산트론 하이드로클로라이드; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란(oxisuran); 파클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트(peplomycin sulfate); 피포스파마이드; 피포브로만(pipobroman); 피포설판; 피록산트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신;

프로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카바진 하이드로클로라이드; 프로류킨(Proleukin); 푸리네톨(Purinethol); 푸로마이신; 푸로마이신 하이드로클로라이드; 피라조퓨린(pyrazofurin); 류마트렉스(Rheumatrex); 리보프린; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 술로페누르(sulofenur); 타블로이드(Tabloid); 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 탁소테레; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 템포포르핀; 테니포사이드; 테록시론; 테스톨락톤(testolactone); 티아미프린(thiamiprine); 티오구아닌; 티오데파; 티아조퓨린; 티라파자민; 토포사르(Toposar); 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트렉살(Trexall); 트라이시리빈 포스페이트; 트라이메트렉세이트; 트라이메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텔린; 투볼로졸 하이드로클로라이드; 우라실 머스타드; 우레데파; 바프레오타이드; 베르테포르핀; 빈블라틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈레우로신 설페이트(vinleurosine sulfate); 비노렐빌 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈줄리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 및 조루비신 하이드로클로라이드.

[0571]

다른 항암 약물은 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 20-에피-1,25 디하이드록시비타민 D3; 5-아자사이티딘; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실폴벤; 아테사이페놀; 아도젤레신; 알데스류킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레볼린산; 암루비신; 암사크린; 아나그렐라이드(anagrelide); 아나스트로졸; 안드로그라폴라이드; 혈관형성 저해제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-등쪽 화결정 형태형성 단백질-1(anti-dorsalizing morphogenetic protein-1); 안티안드로젠, 전립선 암종; 안티안드로젠; 안티네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 아피디콜린 글리시네이트; 세포자멸사 유전자 조절인자; 세포자멸사 조절인자; 아퓨린산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 데아미나제; 아술라크린(asulacriner); 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴(axinastatin) 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자타이로신; 박카틴(baccatin) III 유도체; 발라놀(balanol); 바티마스타트; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도체; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베타롤린산; bFGF 저해제; 바이칼루타마이드; 비산트렌; 비사지리디닐스페르민(bisaziridinylspermine); 비스나피드(bisnafide); 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도타민; 부티오닌 설포시민; 칼시포트라이올; 칼포스틴 C; 캄프토사르(camptosar)(캄프토(Campto)로도 불림; 이리노테칸) 캄프토텐 유도체; 카펙시타빈; 카복시아미드-아미노-트라이아졸; 카복시아미도트라이아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유도 저해제; 카르젤레신(carzelesin); 카제인 키나제 저해제(ICOS); 카스타노스페르민; CC-122; CC-220; CC-486; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로린; 클로로퀴녹살린 설포아미드; 시카프로스트(cicaprost); 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤프레타스타틴 A4; 콤프레타스타틴 유사체; 코나게닌; 크람베스시딘 816; 크리스나톨; 크립토파이신 8; 크립토파이신 A 유도체; 쿠라신 A; 사이클로펜탄트라퀴논; 사이클로플라탐; 사이페마이신; 사이타라빈 옥스포세이트; 세포상해 인자(cytolytic factor); 사이토스타틴; 다클릭시판; 데시타빈; 데하이드로디텐민 B; 데슬로렐린; 텍사메타손; 텍시포스파미드; 텍스라족산; 텍스베라파밀; 다이아지쿠온; 디렘민 B; 디독스; 다이에틸노르스페르민; 다이하이드로-5-아자사이티딘; 다이하이드로탁솔, 9-; 다이옥사마이신; 다이페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 돌라세트론; 독시플우리딘(doxifluridine); 독소루비신; 드롤록시펜; 드로나비놀; 두오카르마이신 SA; 에브셀렌; 에코무스틴; 에텔포신; 에드레콜로말; 에플로르니틴; 엘레벤; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테라이드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로젠 작용제; 에스트로젠 길항제; 에타니다졸; 에토포사이드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티나이드; 필그라스티م; 피나스테라이드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈(예컨대, 플루다라(Fludara)); 플루오로다우노루비신 하이드로클로라이드; 포르페니맥스; 포르메스탄; 포스트리예신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 나이트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 젤라티나제 저해제; 겐시타빈; 글루타티온 저해제; 헵셀팜(hepsulfam); 헤레굴린; 헥사메틸렌 비사세타마이드; 호모헤링토닌(HHT, 오마세탁신 메페크시네이트); 하이페리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이마티닙(예컨대, GLEEVEC®), 이미퀴모드; 면역자극성 펩타이드; 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 저해제; 인터페론 작용제; 인터페론; 인터류킨; 이오벤구아닌; 아이오도독소루비신; 이포메아놀(ipomeanol), 4-; 이로플라트(iroplact); 이르소글라딘; 아이소벤가졸; 아이소호호할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀라이드; 카할랄라이드 F; 라멜라린-N 트라이아세테이트; 란레오타이드; 레이나마이신; 레노그라스티م; 렌티담 설페이트; 램톨스타틴; 레트로졸; 백혈병 저해 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤라이드 + 에스트로젠 + 프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친지성 이당류 펩타이드; 친지성 백금 화합물; 리쏘클리나미드(lissoclinamide) 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로속산트론; 록소리빈; 루르토텐칸; 루테튬 텍사피린; 라이소필린(lysofylline); 용해성 펩타이드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜;

마스핀; 마트릴라이신 저해제; 매트릭스 메탈로프로테이나제 저해제; 메노가릴(menogaril); 메르바론(merbarone); 메테렐린; 메티오나제(methioninase); 메토클로프라마이드; MIF 저해제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스틴; 미토구아존; 미톨락톨(mitolactol); 미토마이신 유사체; 미토나파이드(mitonafide); 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린; 미톡산트론; 모파로텐; 몰그라모스틴; 항-EGFR 항체(예컨대, 얼비투스(Erbitux)(세특시맵)); 항-CD19 항체; 항-CD20 항체(예컨대, 리툽시맵); 항-CS-1 항체(예컨대, 엘로투주맵(BMS/AbbVie)); 항-CD38 항체(예컨대, 다라투무맵(젠맵(Genmab)/Janssen Biotech); 항-CD138 항체(예컨대, 인다툽시맵(Biotest AG Dreieich)); 항-PD-1 항체; 항-PD-L1 항체(예컨대, 두르발루맵(AstraZeneca)); 항-NKG2A 항체(예컨대, 모날리주맵(IPH2201; Innate Pharma)); 항-DLL4 항체(예컨대, 템시주맵(Oncomed/Celgene)); 항-DLL4 및 항-VEGF 이특이적 항체; 항-RSP03 항체; 항-TIGIT 항체; ICOS 작용제 항체; 항-다이시알로강글리오사이드(GD2) 항체(예컨대, 단클론성 항체 3F8 또는 ch14.18); 항-ErbB2 항체(예컨대, 허셉틴); 인간 융모성 생식선 자극호르몬; 모노포스포릴 지질 A+마이코박테룸 세포벽 sk; 모피다몰; 머스타드 항암제; 마이카페록사이드 B; 마이코박테리아 세포벽 추출물; 마이리아포론(myriaporone); N-아세틸디날린; N-치환된 벤즈아마이드; 나파렐린; 나그레스틴(nagrestip); 날록손+펜타조신; 나파빈; 나프터핀(naphterpin); 나르토그라스틴; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 닐루타마이드; 니사마이신; 산화질소 조절제; 나이트록사이드 항산화제; 니트룰린(nitruillyn); 오블리머센(GENASENSE®); O⁶-벤질구아닌; 옥트레오타이드; 오키세논(okicenone); 올리고뉴클레오타이드; 오나프리스톤; 온단세트론; 온단세트론; 오라신; 경구 사이토카인 유도제; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴(예컨대, 플록사틴(Floxatin)); 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도제; 팔라우아민(palauamine); 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙시트라이올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 페가스파르가제(pegaspargase); 펠테신; 펜토산 폴리설페이트 나트륨; 펜토스타틴; 펜트로졸; 퍼플루브론; 퍼포스파마이드; 페틸릴 알코올; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 저해제; 피시바닐; 필로카르핀 하이드로클로라이드; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노젠 활성화제 저해제; 백금 복합체; 백금 화합물; 백금-트라이아민 복합체; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아좀 저해제; 단백질 A-계 면역 조절인자; 단백질 키나제 C 저해제; 단백질 키나제 C 저해제, 미세조류; 단백질 타이로신 포스파타제 저해제; 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 저해제; 푸르푸린(purpurin); 피라줄로아크리딘; 피리독실화된 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체; raf 길항제; 랄리티트렉세드; 라모세트론; ras 파네실 단백질 트랜스퍼라제 저해제; ras 저해제; ras-GAP 저해제; 테메틸화된 레텔립틴; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레티나마이드; 로히투킨(rohitukine); 로무르타이드(romurtide); 로퀴니멕스; 루비기논 B1; 루복실; 사핀골; 사인토펜; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스틴; Sdi 1 모사제; 세무스틴; 노화 유도 저해제(senescence derived inhibitor) 1; 센스 올리고뉴클레오타이드; 신호 전달 저해제; 시조피란; 소부족산(sobuzoxane); 나트륨 보로캅테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베를; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스플레노펜틴; 스포기스타틴 1; 스쿠알라민; 스티피아마이드; 스트로멜라이신 저해제(stromelysin inhibitor); 설피노신; 초활성 혈관작용 장 펩타이드 길항제; 수라디스타(suradista); 수라민(suramin); 스와인소닌(swainsonine); 탈리무스틴; 타목시펜 메티오나이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로머라제 저해제; 테모포르핀; 테니포사이드; 테트라클로로데카옥사이드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모사제; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 작용제; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 주석 에틸 에티오프루린; 티라파자민; 티타노센 바이클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 해독 저해제; 트레티노인; 트라이아세틸우리딘; 트라이시리빈; 트라이메트렉세이트; 트립토렐린; 트로피세트론; 투로스테라이드; 타이로신 키나제 저해제; 티르포스틴; UBC 저해제; 우베니멕스; 비노생식동-유도 성장 저해 인자(urogenital sinus-derived growth inhibitory factor); 우로키나제 수용체 길항제; 바프레오타이드; 바리올린 B; 벡티빅스(Vectibix)(파니투무맵)벨라레솔; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐린; 빈잘틴(vinxaltine); 비탁신; 보로졸; 웰코보린(Welcovorin)(류코보린); 젤로다(Xeloda)(카펙시타빈); 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브(zilascorb); 및 지노스타틴 스티말라머(zinostatin stimalamer).

[0572]

본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 하나 이상의 면역 관문 조절인자(immune checkpoint modulator)를 포함하는 항암 치료요법 접종의 일부일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 CD28, OX40, 글루코코르티코이드-유도 종양-괴사 인자 수용체-관련 단백질(GITR), CD137(4-1BB), CD27, 헤르페스 바이러스 도입 매개체(Herpes Virus Entry Mediator: HVEM), T 세포 면역글로불린 및 류신-도메인 함유-3(TIM-3), 림프구-활성화 유전자 3(LAG-3), 세포독성 T-림프구-관련 항원-4(CTLA-4), T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 저해제(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(B and T Lymphocyte Attenuator: BTLA), PD-1, 및/또

는 PD-L1과 같은 면역 관문 분자를 조절한다. 소정의 실시형태에서, 면역 관문 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0573] 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 면역 관문 분자의 작용제이다. 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 CD28, OX40, 글루코코르티코이드-유도 종양 괴사 인자 수용체-관련 단백질(GITR), CD137(4-1BB), CD27, ICOS(CD278); 유도성 T-세포 공자극인자) 및/또는 헤르페스 바이러스 도입 매개체(HVEM)이다. 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0574] 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 면역 관문 분자의 길항제이다. 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 T 세포 면역글로불린 및 무친-도메인 함유-3(TIM-3), 림프구-활성화 유전자 3(LAG-3), 세포독성 T-림프구-관련 항원-4(CTLA-4), T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 저해제(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), PD-1, 및/또는 PD-L1이다. 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

[0575] 소정의 실시형태에서, 면역 관문 조절인자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항체-결합 단편은 PD-1에 결합한다. 소정의 실시형태에서, PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항체-결합 단편은 니블루맵(OPDIVO[®], BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538; Bristol-Myers Squibb, Ono Pharmaceuticals, Inc.), 캄브롤리주맵(KEYTRUDA[®], 캄브롤리주맵, MK-3475; Merck), 피딜리주맵(CT-011; Curetech, Medivation); MEDI0680(AMP-514; MedImmune, AstraZeneca); PDR-001(Novartis), SHR1210, 또는 INCSHR1210; Incyte, Jiangsu Hengrui)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PD-L1에 결합한다. 소정의 실시형태에서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 두르발루맵(MEDI4736; MedImmune, AstraZeneca), BMS-936559(MDX-1105; Bristol-Myers Squibb), 아벨루맵(MSB0010718C; Merck Serono, Pfizer), 또는 아테졸리주맵(MPDL-3280A; Genentech, Roche)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 LAG-3에 결합한다. 소정의 실시형태에서, LAG-3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 BMS-986016(Bristol-Myers Squibb), GSK2831781(GlaxoSmithKline) 또는 LAG525(Novartis)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CTLA-4에 결합한다. 소정의 실시형태에서, CTLA-4에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이필리무맵(YERVOY[™], BMS-734016, MDX010, MDX-101; Bristol-Myers Squibb), 또는 트레멜리무맵(CP-675,206; MedImmune, AstraZeneca)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 OX40에 결합한다. 소정의 실시형태에서, OX40에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 MEDI6469(MedImmune, AstraZeneca), MEDI0562(MedImmune, AstraZeneca) 또는 KHK4083(Kyowa Hakko Kirin)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 GITR에 결합한다. 소정의 실시형태에서, GITR에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 TRX518(Leap Therapeutics) 또는 MEDI1873(MedImmune, AstraZeneca)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD137(4-1BB)에 결합한다. 소정의 실시형태에서, CD137(4-1BB)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PF-2566(PF-05082566; Pfizer), 또는 우렐루맵(BMS-663513; Bristol-Myers Squibb)이다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD27에 결합한다. 소정의 실시형태에서, CD27에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 바릴루맵(CDX-1127; Celldex Therapies)이다.

[0576] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 레날리도마이드 또는 포말리도마이드를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 HDAC 저해제를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-CS-1 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-CD38 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-CD138 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-PD-1 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법

을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-PD-L1 항체를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-NKG2A 항체를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-CD20 항체(예컨대, 리툽시맵; RITUXAN®)를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 CC-122를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 CC-220을 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-DLL4 항체(예컨대, 렘시주맵)를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-DLL4 및 항-VEGF 이트이적인 항체를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-RSPO3 항체를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항-TIGIT 항체를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 ICOS 작용제 항체를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 호모해링토닌(예컨대, 오마세탁신 메페섹시네이트)를 포함하는 항암 치료요법 접생의 일부이다.

[0577] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포를 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)에 대한 항암 치료요법 접생의 일부이다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포를 사용한 암을 지닌 개체의 치료는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)에 대한 항암 치료요법 접생의 일부이다. 일 실시형태에서, ADCC 접생은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 하나 이상의 항체(예컨대, 앞서의 단락에서 기술된 항체)의 투여를 포함한다. 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 또는 다른 B-세포 악성종양(림프종 및 백혈병), 신경아세포종, 흑색종, 유방암, 및 두경부암을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 수개 유형의 암이 이러한 ADCC 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 구체적인 실시형태에서, ADCC 치료요법은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 다음의 항체, 항-EGFR 항체(예컨대, 엘비투스(세록시맵)), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체(예컨대, 리툽시맵), 항-디시알로강글리오사이드(GD2) 항체(예컨대, 단클론성 항체 3F8 또는 ch14.18), 또는 항-ErbB2 항체(예컨대, 허셉틴) 중 하나 이상의 투여를 포함한다. 일 실시형태에서, ADCC 접생은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD33 항체의 투여를 포함한다. 일 실시형태에서, ADCC 접생은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD20 항체의 투여를 포함한다. 일 실시형태에서, ADCC 접생은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD138 항체의 투여를 포함한다. 일 실시형태에서, ADCC 접생은 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD32 항체의 투여를 포함한다.

[0578] 5.11.4. 바이러스 감염의 치료

[0579] 다른 실시형태에서, 바이러스 감염을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 상기 개체에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 바이러스 감염을 지닌 개체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 상기 개체에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 투여함을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 개체는 자연살해 세포가 결핍되어 있는데, 예컨대, NK 세포 또는 개체의 바이러스 감염에 대해 다른 선천적인 림프 세포 결핍성이다. 특징의 구체적인 실시

형태에서, 상기 투여는 상기 개체에게 단리된 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 자연살해 세포, 예컨대, 태반 자연살해 세포, 예컨대, 태반-유래 중간체 자연살해 세포, 단리되고 조합된 자연살해 세포, 및/또는 이들의 조합 중 하나 이상을 투여하는 단계를 포함한다. 특정의 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 상기 투여 전에 면역조절 화합물, 예컨대, 상기 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 이와 근접하게 된다. 특정의 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 투여는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 외에, 면역조절 화합물, 예컨대, 상기 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드를 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 양은, 예컨대, 상기 바이러스 감염의 하나 이상의 증상의 검출 가능한 개선, 진행의 감소, 또는 이의 제거를 가져오는 양이다. 구체적인 실시형태에서, 바이러스 감염은 아데노비리다에(Adenoviridae), 피코르나비리다에(Picornaviridae), 헤르페스비리다에(Herpesviridae), 헤파드나비리다에(Hepadnaviridae), 플라비비리다에(Flaviviridae), 레트로비리다에(Retroviridae), 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae), 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae), 파필로마비리다에(Papillomaviridae), 라브도비리다에(Rhabdoviridae), 또는 토가비리다에(Togaviridae) 계열의 바이러스에 의한 감염이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 상기 바이러스는 인간 면역결핍성 바이러스(HIV), 콕삭키바이러스(Coxsackievirus), A형 간염 바이러스(HAV), 폴리오바이러스(poliovirus), 엡슈타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus)(EBV), 헤르페스 단순형(herpes simplex type) 1(HSV1), 헤르페스 단순형 2(HSV2), 인간 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus: CMV), 인간 헤르페스바이러스 8형(HHV8), 헤르페스 조스터 바이러스(herpes zoster virus)(바리셀라 조스터 바이러스(varicella zoster virus: VZV) 또는 쉥글스 바이러스(Shingles virus)), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV), E형 간염 바이러스(HEV), 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)(예컨대, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 인플루엔자 C 바이러스, 또는 토고토바이러스(Thogotovirus)), 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 파필로마바이러스, 광견병 바이러스, 또는 풍진 바이러스의 바이러스에 의한 감염이다.

[0580] 다른 보다 더 구체적인 실시형태에서, 상기 바이러스는 아데노바이러스 A종 혈청형 12, 18, 또는 31; 아데노바이러스 B종, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35 또는 50; 아데노바이러스 종 C, 혈청형 1, 2, 5 또는 6; 종 D, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 51; 종 E, 혈청형 4; 또는 종 F, 혈청형 40 또는 41이다.

[0581] 특정의 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 바이러스는 아포이 바이러스(Apoi virus: APOIV), 아로아 바이러스(Aroa virus: AROAV), 바가자 바이러스(bagaza virus: BAGV), 반지 바이러스(Banzi virus: BANV), 보우보우이 바이러스(Bouboui virus: BOUV), 카시파코레 바이러스(Cacipacore virus: CPCV), 카레이 아이슬랜드 바이러스(Carey Island virus: CIV), 카우본 리지 바이러스(Cowbone Ridge virus: CRV), 뎅기열 바이러스(Dengue virus: DENV), 에지 힐 바이러스(Edge Hill virus: EHV), 가드젯 굴리 바이러스(Gadgets Gully virus: GGYV), 일헤우스 바이러스(Ilheus virus: ILHV), 이스라엘 터키 뇌막뇌척수염 바이러스(Israel turkey meningoencephalomyelitis virus: ITV), 일본 뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus: JEV), 주그라 바이러스(Jugra virus: JUGV), 주티아파 바이러스(Jutiapa virus: JUTV), 카담 바이러스(kadam virus: KADV), 케도우고우 바이러스(Kedougou virus: KEDV), 코코베라 바이러스(Kokobera virus: KOKV), 코우탄고 바이러스(Koutango virus: KOUV), 키아사누르 포레스트병 바이러스(Kyasanur Forest disease virus: KFDV), 랑가트 바이러스(Langat virus: LGTV), 매반 바이러스(Meaban virus: MEAV), 모독 바이러스(Modoc virus: MODV), 몬타나 마이오티스 류코엔세팔리티스 바이러스(Montana myotis leukoencephalitis virus: MMLV), 머레이 밸리 뇌염 바이러스(Murray Valley encephalitis virus: MVEV), 엔타야 바이러스(Ntaya virus: NTAV), 옴스크 출혈열 바이러스(Omsk hemorrhagic fever virus: OHFV), 포와싼 바이러스(Powassan virus: POWV), 리오 브라보 바이러스(Rio Bravo virus: RBV), 로얄 팜 바이러스(Royal Farm virus: RFV), 사보야 바이러스(Saboya virus: SABV), 세인트 루이스 뇌염 바이러스(St. Louis encephalitis virus: SLEV), 살 비에자 바이러스(Sal Vieja virus: SVV), 산 페를리타 바이러스(San Perlita virus: SPV), 사우마레즈 리프 바이러스(Saumarez Reef virus: SREV), 세픽 바이러스(Sepik virus: SEPV), 템부수 바이러스(Tembusu virus: TMUV), 진드기-매개 뇌염 바이러스(Tick-borne encephalitis virus: TBEV), 타울레니이 바이러스(Tyulenyi virus: TYUV), 우간다 S 바이러스(Uganda S virus: UGSV), 우수투 바이러스(Usutu virus: USUV), 웨셀스브론 바이러스(Wesselsbron virus: WESSV), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus: WNV), 야오운데 바이러스(Yaounde virus: YAOV), 황열 바이러스(Yellow fever virus: YFV), 요코세 바이러스(Yokose virus: YOKV) 또는 지카 바이러스(Zika virus: ZIKV)이다.

[0582] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 및 선택적으로 태반 관류액 및/또는 관류액 세포는 바이러스 감염을 지닌 개체에게 하나 이상의 다른 항바이러스제를 포함하는 항바이러스 치료요법

접생의 일부로서 투여된다. 바이러스 감염을 지닌 개체에게 투여될 수 있는 구체적인 항바이러스제는 다음을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 이미퀴모드, 포도필록스, 포도필린, 인터페론 알파(IFN α), 레티콜로스(reticolas), 노독시놀-9, 아시클로비어, 팜시클로비어, 발라시클로비어, 간시클로비어, 시도포비어; 아만타딘, 리만타딘; 리바비린; 자나마비어 및 오셀타우마비르; 인디나비어, 넬피나비어 또는 사퀴나비어와 같은 프로테아제 저해제; 디다노신, 라미부딘, 스타부딘, 잘시타빈 또는 지도부딘과 같은 뉴클레오사이드 역전사효소 저해제; 및 네비라핀 또는 에파비렌즈와 같은 비-뉴클레오사이드 역전사효소 저해제.

[0583] 5.11.5. ILC3 세포에 대한 다른 치료 용도

[0584] 본 명세서에 기재된 바와 같은 모든 방법에 사용될 수 있는 ILC3 세포가 본 명세서에 제공된다. ILC3 세포가 사용될 수 있는 예시적인 방법은 다음의 양상에서 개시되어 있다.

[0585] 다른 양상에서, 화학치료요법 후 위장관을 회복시키는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0586] 다른 양상에서, 방사선에 대해 개체를 보호하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 소정의 양상에서, 상기 ILC3 세포는 골수 이식에 대한 보조제로서 사용된다.

[0587] 다른 양상에서, 개체의 가슴샘을 재구축하는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0588] 다른 양상에서, 개체에서 병원체에 대한 보호 면역성을 촉진시키는 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다. 소정의 양상에서, 병원체에 대한 보호 면역성을 촉진시키는 것은 장 감염을 치료하기 위해 수행된다. 소정의 양상에서, 보호 면역성을 촉진시키는 것은 장 감염을 예방하기 위해 수행된다. 소정의 양상에서, 장 감염은 시트로박터 로덴티움(*Citrobacter rodentium*)에 의한다.

[0589] 다른 양상에서, 종양 거부방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0590] 다른 양상에서, 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하여, 기관형성 동안 조직 온전성을 유지하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0591] 다른 양상에서, 조직 회복 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0592] 다른 양상에서, 염증의 조절 방법이 본 명세서에 제공되되, 해당 방법은 개체에게 복수의 ILC3 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 ILC3 세포는 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된다.

[0593] 5.11.6. 투여

[0594] 세포, 예컨대, 태반 관류액 세포, 예컨대, 태반 관류액으로부터 핵화된 세포, 조합된 자연살해 세포, ILC3 세포, 및/또는 단리된 자연살해 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단의 수의 측정, 및 면역조절 화합물, 예컨대, 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드의 양의 측정은 각각 서로 독립적으로 수행될 수 있다.

[0595] NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포의 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드를 사용하여 수행된다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한 주사이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터를 통한 주사이다. 구체적인 실시형태에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 주사는 국소 주사이다. 보다 구체적인 실시형태에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종)내 직접이다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 주사이다. 구체적인

실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통한다. 구체적인 실시형태에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 단리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 복강경검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명 또는 영상의학에 의해 보조된다.

[0596] 5.11.6.1. 세포의 투여

[0597] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 개체에 대해 검출 가능한 치료학적 이점을 가져오는 양 또는 수, 예컨대 유효량으로 사용, 예컨대, 개체에게 투여되며, 여기서 당해 개체는 바이러스 감염, 암, 또는 종양 세포를 갖는데, 예를 들면, 종양 세포, 고형 종양 또는 혈액 암을 갖는 개체, 예컨대, 암 환자이다. 이러한 세포는 이러한 개체에게 절대 수의 세포로 투여될 수 있는데, 예컨대, 상기 개체에게 약, 적어도 약, 또는 최대한 약, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} 또는 1×10^{11} 개의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이러한 개체에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있는데, 예컨대, 상기 개체에게 개체의 킬로그램당 약, 적어도 약, 또는 최대한 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} 또는 1×10^{11} 개의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 투여될 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이러한 개체에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있는데, 예컨대, 상기 개체에게 개체의 킬로그램당 약, 적어도 약, 또는 최대한 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 또는 5×10^8 개의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 투여된다. 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이러한 개체에게 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 선택적으로 태반 관류액 세포 및/또는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 이외의 자연살해 세포와 상기 개체 내의 복수의 종양 세포(예컨대, 추정된 수) 사이의 적절한 비에 따라 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 상기 개체에게 개체 속의 종양 세포의 수에 대해 약, 적어도 약, 또는 최대한 약 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1의 비로 투여될 수 있다. 이러한 개체에서 종양 세포의 수는, 예컨대, 개체로부터의 조직의 샘플, 예컨대, 혈액, 생검 등 속에서 종양 세포의 수를 계수함으로써 추정할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 예컨대, 고형 종양의 경우, 상기 계수는 종양 또는 종양들의 영상과 조합하여 수행하여 적절한 종양 용적을 수득한다. 구체적인 실시형태에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드, 예컨대, 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드는 상기 개체에게 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 선택적으로 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 이외의 태반 관류액 세포 및/또는 자연살해 세포에 추가하여 투여된다.

[0598] 소정의 실시형태에서, 예컨대, 개체에서 종양 세포의 증식을 억제하는 방법; 개체의 자연살해 세포가 결핍된 개체의 치료; 또는 바이러스 감염을 지닌 개체의 치료; 또는 암을 지닌 개체의 치료, 예컨대, 종양 세포, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개체의 치료는 종양 세포를 상기 개체, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포 중 하나 이상과 근접시키거나 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 상기 방법은 종양 세포를 개체, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 근접시키거나 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0599] 구체적인 실시형태에서, 예를 들면, 개체의 자연살해 세포가 결핍된 개체(예컨대, NK 세포의 수에 있어서의 결핍 또는 암, 종양 또는 바이러스-감염된 세포에 대한 NK 세포의 반응성)의 치료; 또는 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개체의 치료, 또는 종양 세포 증식의 억제는 상기 종양 세포를 단리된 태반 관류액 세포 또는 태반 관류액이 보충된 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 상기 개체와 근접시키거나 투여하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 밀리리터당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , $5 \times$

10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포가 밀리리터당 약, 또는 적어도 약, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 단리된 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 단리된 태반 관류액 세포로 보충된다. 다른 보다 구체적인 실시형태에서, 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포가 약, 또는 적어도 약, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000ml의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

[0600] 다른 구체적인 실시형태에서, 개체의 자연살해 세포가 결핍된 개체의 치료; 암을 지닌 개체의 치료; 바이러스 감염을 지닌 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제제는 상기 종양 세포를 상기 개체, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접시키거나 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 세포는 부착성 태반 세포, 예컨대, 부착성 태반 줄기세포 또는 다능성 세포, 예컨대, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포로 보충된다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 밀리리터당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 부착성 태반 줄기세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 부착성 태반 세포, 예컨대, 부착성 태반 줄기세포 또는 다능성 세포로 보충된다.

[0601] 다른 구체적인 실시형태에서, 개체의 자연살해 세포가 결핍된 개체의 치료; 암을 지닌 개체의 치료; 바이러스 감염을 지닌 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 사용하여 수행되며, 여기서 상기 세포는 관류액의 단위, 또는 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 또는 10^{11} 개의 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포당 조건화된 배지, 예컨대, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포, 예컨대, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.1, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10ml의 줄기세포-조건화된 배양 배지로 보충된다. 소정의 실시형태에서, 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포는 이의 개시내용이 이의 전문으로 본 명세서에 참조에 의해 인용된 미국 특허 제7,468,276호 및 제8,057,788호에 기술된 다능성 부착성 태반 세포이다. 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 방법은 종양 세포를 개체, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉시키거나 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0602] 다른 구체적인 실시형태에서, 상기 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 태반 관류액 세포로 보충된, 개체의 자연살해 세포가 결핍된 개체의 치료; 암을 지닌 개체의 치료; 바이러스 감염을 지닌 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제에서, 상기 관류액 세포는 상기 근접하기 전에 인터류킨-2(IL-2)와 일정 기간 근접한다. 소정의 실시형태에서, 상기 기간은 상기 근접 전 약, 최소 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48시간이다.

[0603] 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 선택적으로 관류액 또는 관류액 세포는 바이러스 감염을 지닌 개체, 암을 지닌 개체, 또는 종양 세포를 지닌 개체에게 항암 치료요법 과정 동안 투여될 수 있거나; 치료요법 동안 수회, 예컨대, 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23시간마다 1회, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 마다 1회, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 36주 이상마다 1회 투여될 수 있다. 세포 및 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드가 사용되는 실시형태에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드, 및 세포 또는 관류액은, 예컨대, 동일한 제형 속에서 함께; 예컨대 별개의 제형 속에서 별도로, 적절하게는 동시에 투여될 수 있거나; 별도로, 예컨대, 상이한 투여 스케줄로 또는 상이한 날에 투여될 수 있다. 유사하게, 세포 및 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물이 사용되는 실시형태에서, 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물, 및 세포 또는 관류액은, 예컨대, 동일한 제형 속

에서 함께; 예컨대 별개의 제형 속에서 별도로, 적절하게는 동시에 투여될 수 있거나; 별도로, 예컨대, 상이한 투여 스케줄로 또는 상이한 날에 투여될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 관류액 또는 관류액 세포는, 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 관류액, 또는 관류액 세포가 과거에 개체에게 투여되었는지의 여부와 상관없이 투여될 수 있다.

[0604] 6. 키트

[0605] 본 명세서에 기재된 하나 이상의 조성물, 예컨대, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 포함하는 조성물로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩(pack) 또는 키트가 본 명세서에 제공된다. 이러한 용기(들)와 선택적으로 관련된 것은 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 처방된 형태의 지시사항일 수 있으며, 이러한 지시사항은 인간 투여용 제조, 사용 또는 판매의 상 기 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0606] 본 명세서에 포함된 키트는 본 명세서에 기재된 방법, 예컨대, 종양 세포의 성장을 억제하는 방법 및/또는 암, 예컨대, 혈액 암을 치료하는 방법, 및/또는 바이러스 감염을 치료하는 방법에 따라 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 이의 조성물은 하나 이상의 용기에 포함한다. 구체적인 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 3-단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 또는 이의 조성물을 포함하는 키트가 본 명세서에 제공된다.

[0607] 7. 실시예

[0608] 7.1. 실시예 1: 조혈 줄기세포 또는 전구세포의 자연살해 세포를 생산하는 3-단계 방법

[0609] CD34⁺ 세포를 나타낸 일수 동안 다음의 배지 제형 속에서 배양하고, 세포의 분취량을 세포 수, 세포 생존능, 자연살해 세포 분화의 특성규명 및 기능적 평가를 위해 취한다.

[0610] 1 단계 배지: 90% 줄기세포 성장 배지(SCGM)(CellGro®), 10% 인간 혈청-AB를 25 ng/ml 또는 250 ng/ml의 재조합 인간 트롬보포이에틴(TPO), 25 ng/ml의 재조합 인간 Flt3L, 27 ng/ml의 재조합 인간 줄기세포 인자(SCF), 25 ng/ml의 재조합 인간 IL-7, 0.05 ng/ml 또는 0.025 ng/ml의 재조합 인간 IL-6, 0.25 ng/ml 또는 0.125 ng/ml의 재조합 인간 과립구 집락-자극 인자(G-CSF), 0.01 ng/ml 또는 0.025 ng/ml의 재조합 인간 과립구-대식세포 집락-자극 인자(GM-CSF), 0.10% 겐타마이신, 및 1 내지 10 μM의 스템레게닌-1(StemRegenin-1: SR-1) 또는 다른 줄기세포 동원제로 보충하였다.

[0611] 2 단계 배지: 90% SCGM, 10% 인간 혈청-AB를 25 ng/ml의 재조합 인간 Flt3L, 27 ng/ml의 재조합 인간 SCF, 25 ng/ml의 재조합 인간 IL-7, 20 ng/ml의 재조합 인간 IL-15, 0.05 ng/ml 또는 0.025 ng/ml의 재조합 인간 IL-6, 0.25 ng/ml 또는 0.125 ng/ml의 재조합 인간 과립구 집락-자극 인자(G-CSF), 0.01 ng/ml 또는 0.025 ng/ml의 재조합 인간 과립구-대식세포 집락-자극 인자(GM-CSF), 0.10%의 겐타마이신, 및 1 내지 10 μM의 SR1 또는 다른 줄기세포 동원제로 보충하였다.

[0612] 3 단계 배지: 90% STEMMACSTM, 10% 인간 혈청-AB, 0.025mM 2-머캅토에탄올(55mM)을 22 ng/ml의 재조합 인간 SCF, 1000 U/ml의 재조합 인간 IL-2, 20 ng/ml의 재조합 인간 IL-7, 20 ng/ml의 재조합 인간 IL-15, 0.05 ng/ml 또는 0.025 ng/ml의 재조합 인간 IL-6, 0.25 ng/ml 또는 0.125 ng/ml의 재조합 인간 과립구 집락-자극 인자(G-CSF), 0.01 ng/ml 또는 0.025 ng/ml의 재조합 인간 과립구-대식세포 집락-자극 인자(GM-CSF), 및 0.10% 겐타마이신으로 보충하였다.

[0613] 세포를 0일째에 3×10^4 개의 세포/ml로 1 단계 배지 중에 파종(seeding)하고, 세포를 CD34⁺ 및 CD45⁺ 계수로 순도에 대해 시험하고 7AAD 염색으로 생존능에 대해 시험한다. 5일째에, 세포를 계수하고 1 단계 배지와 함께 1×10^5 개의 세포/ml의 농도로 파종한다. 7일째에 세포를 계수하고 1 단계 배지와 함께 1×10^5 개의 세포/ml의 농도로 파종한다.

[0614] 10일째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 중에 1×10^5 개의 세포/ml의 농도로 파종한다. 12일째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 중에 3×10^5 개의 세포/ml의 농도로 파종한다. 14일째에, 세포를 계수하고 3 단계 배지 중에 파종한다. 세포를 35일까지 3 단계 배지에 유지한다.

[0615] 대안적으로, 다음의 프로토콜을 14일 전체를 통해서 사용한다: 세포를 0일째에 7.5×10^3 개의 세포/ml로 1 단계

배지에 파종하고, 세포를 CD34+ 및 CD45+ 계수로 순도에 대해 시험하고 7AAD 염색으로 생존능에 대해 시험한다. 7일째에, 세포를 계수하고 1 단계 배지와 함께 3×10^5 개의 세포/㎖의 농도로 파종한다. 9일째에 세포를 계수하고 2 단계 배지와 함께 3×10^5 개의 세포/㎖의 농도로 파종한다. 12일째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 중에서 3×10^5 개의 세포/㎖의 농도로 파종한다. 14일째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 중에 3×10^5 개의 세포/㎖의 농도로 파종한다.

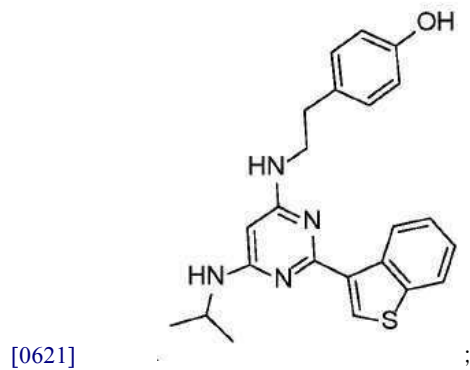
[0616] 세포의 계대로의 파종은 신선한 배지로 배양액의 희석에 의해 또는 세포의 원심분리 및 신선한 배지의 재현탁/첨가에 의해 수행된다.

[0617] 수거를 위해, 세포를 $400 \times g$ 에서 7분 동안 회전시킨 후, 동일한 용적의 플라스말라이트 A 속에서 펠렛의 현탁액을 넣는다. 현탁액을 $400 \times g$ 에서 7분 동안 회전시키고, 얻어지는 펠렛을 10% HSA(w/v), 60% 플라스말라이트 A(v/v) 속에 표적 세포 농도에서 현탁시킨다. 이후에, 세포를 $70 \mu m$ 메쉬(mesh)를 통해 염색하고, 최종 용기를 채우고, 세포의 분취량을 생존능, 세포독성, 순도 및 세포 수에 대해 시험하고, 나머지를 포장한다.

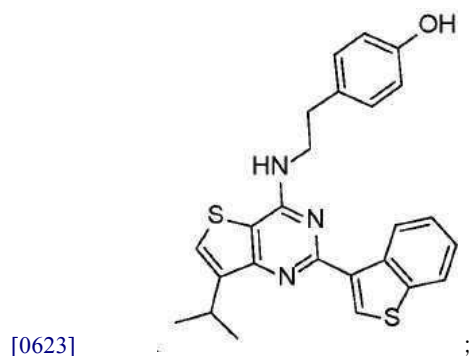
[0618] 7.2. 실시예 2: NK 세포의 확장을 위한 줄기세포 동원제의 선택

[0619] 이하의 화합물은 시험관내에서 NK 세포 집단의 확장을 촉진시키는 능력에 대해서 조사되었다:

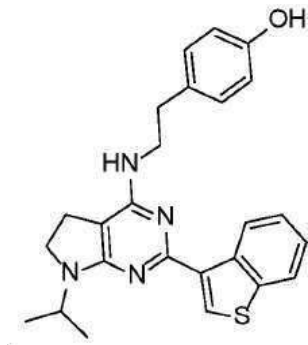
[0620] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-6-(아이소프로필아미노)피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀("CRL1")



[0622] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀("CRL2")

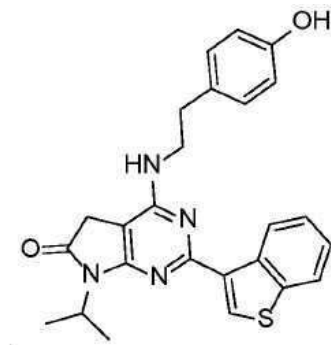


[0624] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-7-아이소프로필-6,7-다이하이드로-5H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀("CRL3")



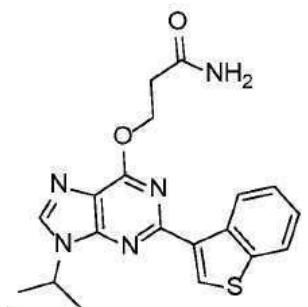
[0625]

[0626] 2-((벤조[b]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-5,7-다이하이드로-6H-피롤로[2,3-d]피리미딘-6-온("CRL4")



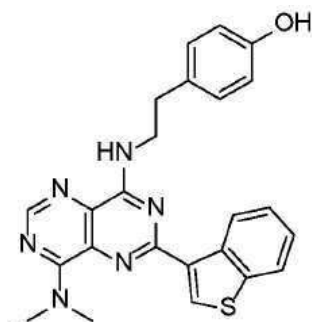
[0627]

[0628] 3-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-9H-퓨린-6-일)옥시)프로판아마이드("CRL5")



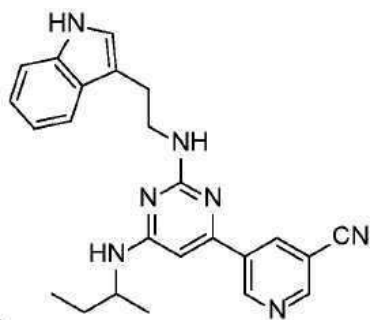
[0629]

[0630] 4-(2-((2-(벤조[b]티오펜-3-일)-8-(다이메틸아미노)피리미도[5,4-d]피리미딘-4-일)아미노)에틸)페놀("CRL6")



[0631]

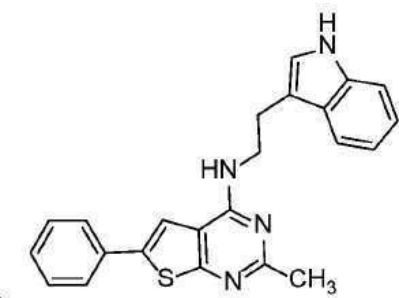
[0632] 5-(2-((2-(1H-인돌-3-일)에틸)아미노)-6-(sec-부틸아미노)피리미딘-4-일)니코티노나이트릴("CRL7")



[0633]

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-메틸-6-페닐티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민 ("CRL8")

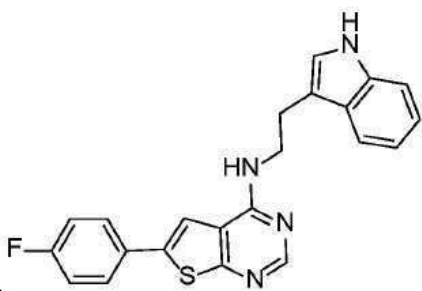
[0634]



[0635]

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-6-(4-플루오로페닐)티에노[2,3-*d*]피리미딘-4-아민 ("CRL9")

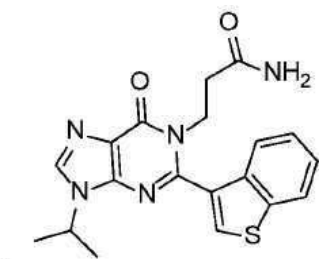
[0636]



[0637]

3-(2-(벤조[*b*]티오펜-3-일)-9-아이소프로필-6-옥소-6,9-다이하이드로-1*H*-퓨린-1-일)프로판아마이드 ("CRL10")

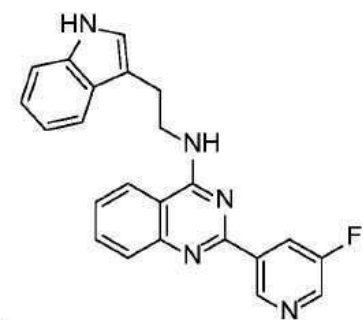
[0638]



[0639]

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퀴나졸린-4-아민 ("CRL11")

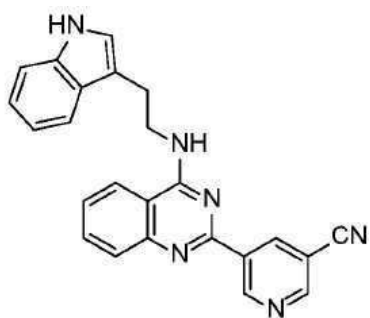
[0640]



[0641]

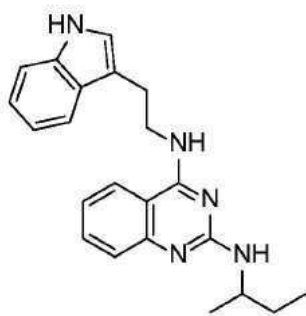
5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퀴나졸린-2-일)니코티노나이트릴 ("CRL12")

[0642]



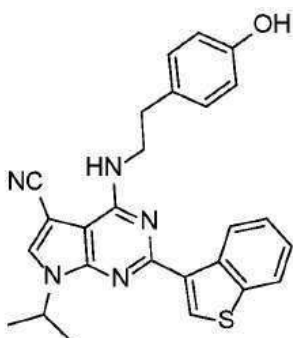
[0643] ;

[0644] N^4 -(2-(1H-인돌-3-일)에틸)- N^2 -(sec-부틸)퀴나졸린-2,4-다이아민 ("CRL13")



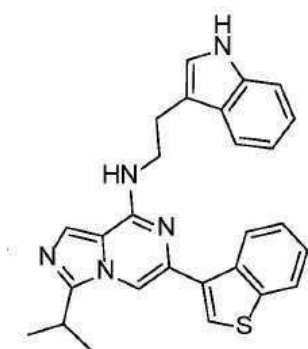
[0645] ;

[0646] 2-(벤조[b]티오펜-3-일)-4-((4-하이드록시페네틸)아미노)-7-아이소프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-카보나이트릴 ("CRL14")



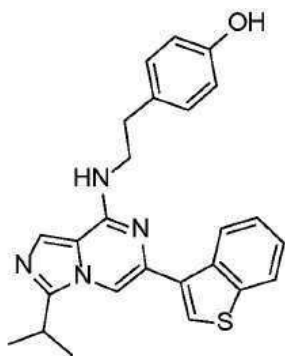
[0647] ;

[0648] N -(2-(1H-인돌-3-일)에틸)-6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-아민 ("CRL15")



[0649] ;

[0650] 4-(2-((6-(벤조[b]티오펜-3-일)-3-아이소프로필이미다조[1,5-a]피라진-8-일)아미노)에틸)페놀 ("CRL16")

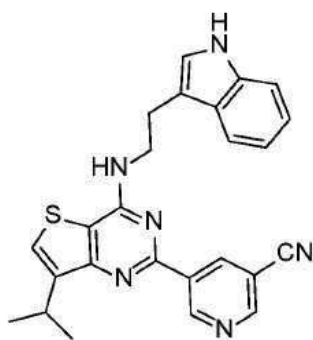


[0651]

;

[0652]

5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴("CRL17")

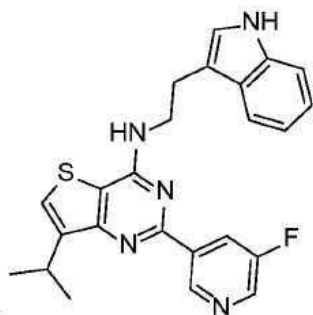


[0653]

;

[0654]

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)-7-아이소프로필티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민("CRL18")

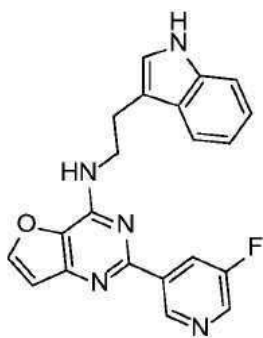


[0655]

;

[0656]

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-플루오로피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민("CRL19")

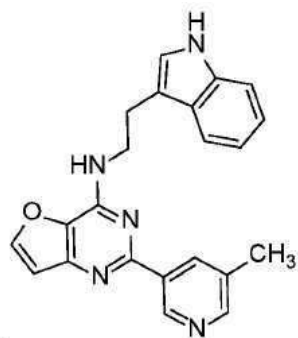


[0657]

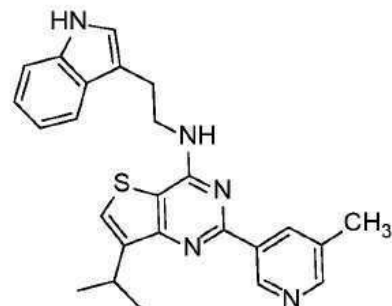
;

[0658]

N-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-2-(5-메틸피리딘-3-일)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-4-아민("CRL20")

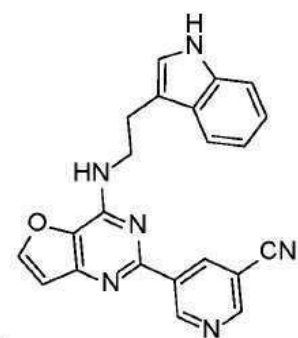


[0659] *N*-(2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)-7-아이소프로필-2-(5-메틸피리딘-3-일)티에노[3,2-*d*]피리미딘-4-아민("CRL21")



[0660] ; 및

[0661] 5-(4-((2-(1*H*-인돌-3-일)에틸)아미노)퓨로[3,2-*d*]피리미딘-2-일)니코티노나이트릴("CRL22")



[0662]

[0663] 7.3. 실시예 3: 3 단계 NK 세포의 특성규명

[0664] 방법

[0665] 트롬보포이에틴, SCF, Flt3 리간드, IL-7, IL-15 및 IL-2를 포함하는 사이토카인의 존재하에 UCB CD34+ 세포를 35일 동안 배양하여 실시예 1에 기재된 바와 같이, 3-단계 NK 세포를 생산하였다. 다색 유세포분석법을 사용하여 3-단계 NK 세포의 표현형 특성을 측정하였다.

[0666] 생물학적 시험의 경우, NK 세포 확장 및 분화에 대한 화합물의 효과를 평가하기 위하여 화합물을 배양액에 제공하였다. 구체적으로, CD34+ 세포의 공여체(StemCell Technology)를 해동시키고, NK 배양 프로토콜에 따라서 시험관내에서 확장시켰다. 처음 14일의 배양 동안, 각각의 CRL 화합물을 DMSO에 용해시키고, 10 μ M 농도로 배양액에 첨가하였다. SR1을 (10 μ M로) 양성 대조 화합물로서 제공한 한편, 어떠한 화합물도 없는 DMSO 단독을 음성 대조군으로서 제공하였다. 35일의 배양 말기에, K562 종양 세포주에 대한 세포의 세포 확장, 자연살해(NK) 세포 분화 및 세포독성이 특성 규명되었다. 많은 수의 화합물로 인해, 시험은 CRL1-11 및 CRL 12-22의 2가지 실험에서 수행되었다. 동일한 공여체가 각 실험에 사용되었다. 양성 대조군과 음성 대조군이 또한 두 실험에 포함되었다.

[0667] 결과

[0668] 세포 확장 데이터는 22가지 화합물 중 20가지가 10 μ M 농도에서 NK 확장을 지원한 것을 나타내었다. CRL7 및 CRL13을 제외하고, 나머지 화합물 모두는 35일에 걸쳐서 2,000 내지 15,000배의 NK 확장을 야기하였다(도 1 및 도 2). 모든 화합물 중에서, CRL19, 20 및 22가 세포 확장을 최상으로 지원했고, 이들은 35일째에 SR1에 비해서

유사한 수준의 확장을 입증하였다(도 3). 14일의 배양에서의 CD34 세포 확장은, 화합물의 대부분이 CD34 세포 확장을 지원했고 CRL19, 20 및 22가 14일에 최고 CD34 세포 확장을 달성한 유사한 경향을 나타내었다(도 4).

[0669] 세포독성 검정은 세포 기능을 평가하기 위하여 10:1 효과기 대 표적비에서 K562 종양 세포에 대한 화합물 배양된 세포를 이용해서 시행되었다(도 5). 그 결과는 화합물로 배양된 세포가 10:1의 E:T비에서 K562 세포의 30 내지 60%를 사멸시킨 것을 나타내었으며, 이것은 세포가 NK 기능을 제공하는 것을 나타낸다. 두 공여체의 경우, CRL17, 18, 19 및 21로 배양된 세포는 SR1로 배양된 것에 비해서 유사한 또는 더 큰 사멸 활성을 입증하였다.

[0670] 결론:

[0671] 요약하면, 본 발명자들은 CRL7 및 CRL13을 제외한 모든 화합물이 PNK-007 확장 및 분화를 지원하는 것을 발견하였다. 이들 화합물에 의한 확장은 35일에 걸쳐서 2,000 내지 15,000배의 범위이고, 배양액은 70%초과의 NK 세포를 달성하였다. 이들 화합물 중에서, CRL 19, 20 및 22는 PNK-007 배양액의 경우 SR1과 매우 유사한 확장, 분화 및 세포독성 프로파일을 입증하였다. CRL 17, 18 및 21은 SR1에 비해서 다소 적은 확장을 야기시켰지만, CD56+/CD11a+ 아집단을 증가시켰고, 또한 세포의 사멸 활성을 증가시켰다.

[0672] 7.4실시예 4: 3-단계 NK 세포의 추가의 특성규명

[0673] 방법

[0674] 세포: 냉동된 PBMC는 Stem Cell Technologies로부터 획득하였다. 말초 혈액 유래 NK(PB-NK) 세포는 제조사의 지시에 따라서 Human NK Cell Enrichment Kit(Stem Cell Technologies)를 이용해서 건강한 공여체의 신선한 혈액으로부터 분리시켰다. 제대혈-유래 CD34+ 줄기세포로부터 CYNK 세포를 생성하였다(문헌[Zhang et al. J Immunother Cancer. 2015] 참조). 간략화하면, CD34+ 세포를 35일 동안 트롬보포이에틴, SCF, Flt3 리간드, IL-7, IL-15 및 IL-2를 포함하는 사이토카인의 존재 하에 배양하였다. PBNK 및 CYNK 세포를 분석 때까지 저온보존하였다.

[0675] 자기-활성화 세포 분류(Magnetic-activated cell sorting): PNK 세포를 PE 마우스 항-인간 CD11a(BD)로 염색하고 CD11a+ PNK 세포를 제조사의 지시에 따라서 anti-PE MicroBeads(Miltenyi Biotec)를 이용해서 농축시켰다.

[0676] 단일 세포 RNA 시퀀싱: CYNK 세포를 PB-NK와 1:1 비율로 배합하고, 10X Genomics Chromium 플랫폼 및 Illumina 시퀀싱을 이용해서 유전자 발현을 단일 세포 수준으로 분석하였다. 생물정보학 분석은 10X Genomics Cell Ranger 분석 파이프라인을 이용하였다.

[0677] 유세포분석: 저온보존된 세포를 37℃ 수조에서 신속하게 해동시키고, RPMI1640 + 10% hiFBS(열 불활성화 소태아 혈청, Gibco)에서 1회 세척하고 나서, PBS 중 LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Stain으로 세척하였다. 세포를 FACS 완충액(PBS + 2% FBS)으로 세척하고 나서 블로킹 용액(Brilliant Stain 완충액, 마우스 IgG2a 아이소형 k 대조군 및 인간 BD Fc 블록(모두 BD사 제품))에서 인큐베이션하였다. 세포를 FACS 완충액으로 세척하고, 얼음 위에서 25분 동안 FACS 완충액 중에서 형광단-결합된 항체와 인큐베이션하였다. Fortessa X20 유세포분석기(BD) 상에서 분석하기 전에 세포를 FACS 완충액으로 세척하였다.

[0678] qRT-PCR: 제조사의 지시에 따라서 Quick-RNA Miniprep 키트(Qiagen)를 이용해서 세포로부터 RNA를 분리시켰다. 표준 반응에서 SuperScript IV 역전사효소(Thermo Fisher Scientific)를 이용해서 cDNA를 합성하였다. Taqman Gene 발현 검정(Applied Biosystems)을 이용해서 RT-PCR을 수행하였다. 발현 수준은 $\Delta\Delta Ct$ 방법을 이용해서 GAPDH(Hs02758991)에 대해서 계산되었다.

[0679] 결과

[0680] CYNK 세포는 시험관내에서 각종 종양 세포를 효과적으로 사멸시키지만, 세포사를 유도하기 위하여 CYNK 세포를 사용하는 기전은 불량하게 유지되는 것이 이해된다(참조). NK 세포 수용체를 활성화시키는 것을 설명하기 위하여, 세포내 신호전달 경로 및 분자 기전 CYNK 세포는 이들의 기능적 역할을 수행하기 위하여 사용되는데, 본 발명자들은 CYNK 세포를 말초 혈액 NK 세포(PB-NK)와 비교하기 위한 비편향 접근법으로서 단일-세포 RNA 침묵(scRNAseq)을 사용하였다(도 6A). 비편향된 전사 클러스터링은 CYNK 세포와 PB-NK 세포 간을 구별하는 2개의 명확한 시그니처(signature)를 드러내었다(도 6B). 표 1 및 표 2는 PB-NK 세포 및 CYNK 세포에서 각각 클러스터당 상위 50개의 상향 조절된 유전자를 열거한다. PB-NK 세포에서 더 높게 발현된 유전자 세트는, FGFBP2, 그랜자임(GZMH, GZMM), CXCR4, KLRF1, KLF2, IFNG를 비롯하여, NK 세포 기능적 역할과 연관된 유전자를 포함하였다(표 1).

- [0681] □ 섬유아세포 성장 인자-결합 단백질인 FGFBP2는, 세포독성 림프구에 의해 분비되는 것으로 알려져 있다.
- [0682] □ 그랜자임은 NK 세포 및 세포독성 T 림프구(참조)의 세포독성 과립에 저장된 세린 프로테아제의 군이다. GzmA 및 GzmB가 이들의 세포질로 방출 시 표적 세포사를 유도하고 광범위하게 연구된 반면, GzmH, GzmK 및 GzmM의 기능적 역할에 대해서는 덜 알려져 있다.
- [0683] □ CXCR4는 골수로의 NK 세포 귀소를 조절한다.
- [0684] □ KLRF1은, NK 세포 세포독성 및 사이토카인 분비를 유도하는, 활성화-유도 C-형 력틴(AICL)에 결합 시 활성화 되는 활성화 C-형 력틴-유사 면역수용체인 Nkp80을 암호화한다.
- [0685] □ 전사 인자 KLF2는, NK 세포 증식 및 생존을 둘 다 조절한다.
- [0686] □ NK 세포-유래 IFN- γ (IFNG 유전자)는, 수지상 세포 및 T 세포 반응을 조절함으로써 적응 면역 반응을 촉진시키는 활성화된 NK 세포로부터 분비된 주된 면역조절 인자이다.

표 1

PB-NK 클러스터당 상위 50 개의 상향 조절된 유전자.

	특성 ID	특성명	CYNK 평균값	PB-NK 평균값	PB-NK Log2 배수 변화	PB-NK P- 값
1	ENSG00000137441	FGFBP2	0.099352	2.935962	4.88363	4.09E-78
2	ENSG00000100450	GZMH	0.136708	2.484828	4.182845	2.49E-58
3	ENSG00000276085	CCL3L3	0.072152	1.251852	4.115143	2.13E-49
4	ENSG00000197540	GZMM	0.134235	1.982728	3.883559	1.40E-50
5	ENSG00000121966	CXCR4	0.403236	5.935725	3.879087	9.19E-51
6	ENSG00000169554	ZEB2	0.127877	1.860789	3.861967	7.03E-50
7	ENSG00000127528	KLF2	0.172475	1.92761	3.481483	1.86E-40
8	ENSG00000189067	LITAF	0.297791	3.231559	3.439184	1.06E-39
9	ENSG00000069667	RORA	0.101913	1.055542	3.371425	3.26E-37
10	ENSG00000145220	LYAR	0.142448	1.306592	3.196402	2.39E-33
11	ENSG00000125107	CNOT1	0.208595	1.809824	3.116348	3.39E-32
12	ENSG00000111537	IFNG	0.193317	1.639941	3.083863	1.11E-29
13	ENSG00000158050	DUSP2	0.40774	3.322164	3.025836	4.12E-30
14	ENSG00000110046	ATG2A	0.190226	1.508942	2.987028	3.39E-29
15	ENSG00000173762	CD7	0.492697	3.641922	2.885402	1.77E-27
16	ENSG00000141682	PMAIP1	0.252398	1.820017	2.849558	6.51E-26
17	ENSG00000078304	PPP2R5C	0.381864	2.591665	2.762207	6.15E-25
18	ENSG00000153234	NR4A2	0.399174	2.622622	2.715393	5.59E-24
19	ENSG00000152518	ZFP36L2	0.856899	5.585388	2.703993	4.72E-24
20	ENSG00000145675	PIK3R1	0.325168	2.078618	2.675822	2.70E-23
21	ENSG00000150045	KLRF1	0.191285	1.177103	2.620822	4.78E-22
22	ENSG00000255198	SNHG9	0.516983	2.951818	2.512937	1.34E-20
23	ENSG00000125148	MT2A	0.51504	2.913311	2.499426	9.06E-20
24	ENSG00000116741	RGS2	0.203737	1.147279	2.492865	1.51E-19
25	ENSG00000153922	CHD1	0.252574	1.350762	2.418474	9.42E-19
26	ENSG00000120129	DUSP1	2.078529	9.865317	2.24638	2.58E-16
27	ENSG00000143924	EML4	0.256284	1.150299	2.165756	7.80E-15
28	ENSG00000128016	ZFP36	2.22866	9.777355	2.132849	1.32E-14
29	ENSG00000163874	ZC3H12A	0.261759	1.120475	2.097382	7.47E-14

[0687]

30	ENSG00000105993	DNAJB6	0.6506	2.667169	2.035058	2.98E-13
31	ENSG00000126524	SBDS	0.534822	2.185078	2.030148	3.57E-13
32	ENSG00000125347	IRF1	1.450448	5.812277	2.002193	7.32E-13
33	ENSG00000157514	TSC22D3	1.103379	4.30409	1.963373	2.57E-12
34	ENSG00000184205	TSPYL2	0.592137	2.247746	1.924086	1.14E-11
35	ENSG00000146278	PNRC1	1.362312	5.156149	1.919832	7.77E-12
36	ENSG00000135070	ISCA1	0.27898	1.043084	1.90227	2.06E-11
37	ENSG00000171223	JUNB	4.09462	15.11622	1.883884	2.20E-11
38	ENSG00000156232	WHAMM	0.316425	1.146147	1.856513	7.14E-11
39	ENSG00000164327	RICTOR	0.318279	1.101977	1.791406	3.85E-10
40	ENSG00000118503	TNFAIP3	0.550807	1.902316	1.787777	3.93E-10
41	ENSG00000120616	EPC1	0.562199	1.846066	1.714953	2.17E-09
42	ENSG00000167508	MVD	0.309448	1.00722	1.702322	4.11E-09
43	ENSG00000013441	CLK1	0.690164	2.216412	1.682859	4.62E-09
44	ENSG00000188042	ARL4C	0.437325	1.388136	1.666056	8.18E-09
45	ENSG00000162924	REL	0.553809	1.736208	1.648145	1.14E-08
46	ENSG00000005483	KMT2E	0.79402	2.460289	1.631225	1.47E-08
47	ENSG00000119801	YPEL5	0.966141	2.98202	1.625617	1.70E-08
48	ENSG00000123505	AMD1	0.558578	1.664102	1.574595	6.03E-08
49	ENSG00000159388	BTG2	0.751541	2.22132	1.563151	7.55E-08
50	ENSG00000010404	IDS	0.723193	2.128073	1.556757	8.48E-08

[0688]

[0689]

NK 세포 기능적 역할과 연관된 인자를 암호화하는 CYNK 클러스터에서의 상위 차별적으로 발현된 유전자는 표면 수용체 및 공동-수용체(CD96, NCR3, CD59, KLRC1), TNFSF10, 면역 관문 유전자(TNFRSF18, TNFRSF4, HAVCR2), NK 세포 수용체 어댑터 분자 유전자(FCER1G 및 LAT2)를 포함한다(표 2).

표 2

CYNK 클러스터당 상위 50 개의 상향 조절된 유전자.

	특성 ID	특성명	PBNK 평균값	CYNK 평균값	CYNK Log2 배수 변화	CYNK P- 값
1	ENSG00000102471	NDFIP2	0.077391	1.45981	4.230949	1.69E-22
2	ENSG00000242258	LINC00996	0.063046	1.183921	4.222944	5.04E-22
3	ENSG00000172005	MAL	0.057005	1.03529	4.173813	1.35E-21
4	ENSG00000108702	CCL1	0.078524	1.334494	4.080611	5.11E-09
5	ENSG00000198125	MB	0.10193	1.683947	4.041355	1.45E-20
6	ENSG00000128040	SPINK2	0.087962	1.233641	3.804242	7.88E-19
7	ENSG00000166920	C15orf48	0.078901	1.018246	3.683547	6.40E-18
8	ENSG00000134072	CAMK1	0.151762	1.932724	3.667647	2.13E-18
9	ENSG00000134545	KLRC1	0.509273	4.740451	3.217889	9.47E-16
10	ENSG00000121858	TNFSF10	0.295975	2.682764	3.178801	6.44E-15
11	ENSG00000186891	TNFRSF18	1.182011	10.09017	3.093605	6.96E-15
12	ENSG00000008517	IL32	4.345617	37.08234	3.093395	6.60E-15
13	ENSG00000042493	CAPG	0.369213	3.112494	3.074529	9.91E-15
14	ENSG00000235576	AC092580.4	0.44736	3.660475	3.031759	2.23E-14
15	ENSG00000163191	S100A11	0.41527	3.364804	3.017543	2.42E-14
16	ENSG00000186827	TNFRSF4	0.135529	1.097816	3.01448	1.91E-13
17	ENSG00000074800	ENO1	2.166202	16.05066	2.889567	1.86E-13
18	ENSG00000158869	FCER1G	0.734274	5.393877	2.876632	2.43E-13
19	ENSG00000118971	CCND2	0.457175	3.324621	2.861636	3.21E-13
20	ENSG00000205426	KRT81	0.169883	1.187806	2.803005	3.69E-12
21	ENSG00000243927	MRPS6	0.358643	2.29304	2.675597	6.10E-12
22	ENSG00000182718	ANXA2	0.206125	1.282389	2.635118	3.48E-11
23	ENSG00000125384	PTGER2	0.175546	1.08713	2.628037	4.29E-11
24	ENSG00000124767	GLO1	0.214053	1.289543	2.588793	6.50E-11
25	ENSG00000135077	HAVCR2	0.175924	1.031051	2.548543	1.51E-10
26	ENSG00000103490	PYCARD	0.183097	1.070527	2.545209	1.34E-10
27	ENSG00000086730	LAT2	0.178566	1.04156	2.541707	1.53E-10
28	ENSG00000141526	SLC16A3	0.282006	1.622835	2.523282	1.73E-10
29	ENSG00000103187	COTL1	0.894342	5.013779	2.486834	1.45E-10
30	ENSG00000067225	PKM	1.099712	6.145949	2.482453	1.11E-10
31	ENSG00000177156	TALDO1	0.196687	1.084745	2.46115	4.23E-10
32	ENSG00000153283	CD96	0.368458	2.029162	2.460314	1.66E-10

[0690]

33	ENSG00000204475	NCR3	0.640272	3.472457	2.438804	2.31E-10
34	ENSG00000170442	KRT86	0.257845	1.372733	2.410873	1.02E-09
35	ENSG00000117632	STMN1	0.468878	2.413499	2.36315	1.22E-09
36	ENSG00000227507	LTB	3.831437	19.41653	2.341609	1.09E-09
37	ENSG00000130429	ARPC1B	0.570053	2.846585	2.31957	1.27E-09
38	ENSG00000162704	ARPC5	0.347317	1.717418	2.30484	1.66E-09
39	ENSG00000088832	FKBP1A	0.40017	1.978205	2.304629	1.60E-09
40	ENSG00000102265	TIMP1	0.385447	1.902345	2.302248	1.96E-09
41	ENSG00000113088	GZMK	0.290312	1.403201	2.27168	1.37E-08
42	ENSG00000085063	CD59	0.215186	1.035997	2.265377	7.12E-09
43	ENSG00000102144	PGK1	1.405879	6.735348	2.260328	2.92E-09
44	ENSG00000148908	RGS10	0.217451	1.014713	2.220352	1.33E-08
45	ENSG00000196405	EVL	1.186164	5.50471	2.214345	5.41E-09
46	ENSG00000128340	RAC2	1.063092	4.917253	2.209516	5.72E-09
47	ENSG00000100097	LGALS1	4.427539	20.46621	2.208968	6.05E-09
48	ENSG00000139626	ITGB7	0.50059	2.285445	2.19016	8.54E-09
49	ENSG00000196230	TUBB	1.062715	4.838214	2.186651	1.22E-08
50	ENSG00000171314	PGAM1	0.670096	3.046436	2.18433	8.56E-09

[0691]

[0692]

세포독성 반응이 CYNK 세포에서 어떻게 개시되는지를 더 잘 이해하기 위하여, 본 발명자들은, NK 세포 수용체 및 어댑터 분자에 주로 초점을 두고, 표적 검출에서부터 세포용해 반응으로 이어지는 잘 특성규명된 단백질을

암호화하는 수동으로 선별된 유전자의 발현을 구체적으로 분석하였다(표 3). 차별적 유전자 발현 분석은 CYNK 세포에서 2가지 주된 세포독성 분자인 퍼포린(PRF1)과 그랜자임 B(GZMB)의 높은 발현을 나타내었다. 마찬가지로, (NKp80을 암호화하는) KLRF1을 제외하고, CYNK 세포와 PB-NK 세포 간에 차별적으로 발현된 대부분의 수용체는 CYNK 세포 상에서 더 높게 발현되었다. 선택된 NK 세포 효과기 및 수용체 유전자의 발현은 도 6C에서 tSNE 플롯 상에서 시각화된다. NK 세포 세포독성 머시너리의 성분을 암호화하는 유전자의 상승된 발현은 광범위한 표적 세포에 대한 CYNK 세포의 높은 세포독성 활성과 잘 상관된다.

표 3

NK 세포 세포독성 기능을 조절하는 인자를 암호화하는 상위의 차별적으로 발현된 유전자들. 전체 클러스터 중에서 세포당 1 개 미만을 갖는 유전자는 배제되었다.

특성 ID			특성명	별칭	CYNK 평균값	PBNK 평균값	CYNK Log2 배수 변화	CYNK P- 값
1	ENSG00000134545	KLRC1	NKG2A, CD159a		4.740451	0.509273	3.217889	9.47E-16
2	ENSG00000121858	TNFSF10	TRAIL		2.682764	0.295975	3.178801	6.44E-15
3	ENSG00000186891	TNFRSF18	GITR		10.09017	1.182011	3.093605	6.96E-15
4	ENSG00000186827	TNFRSF4	CD134, OX40		1.097816	0.135529	3.014481	1.91E-13
5	ENSG00000135077	HAVCR2	TIM-3		1.031051	0.175924	2.548543	1.51E-10
6	ENSG00000153283	CD96	Tactile		2.029162	0.368458	2.460314	1.66E-10
7	ENSG00000204475	NCR3	CD337, NKp30		3.472457	0.640272	2.438804	2.31E-10
8	ENSG00000085063	CD59	MAC-IP, MIRL, 프로텍틴		1.035997	0.215186	2.265377	7.12E-09
9	ENSG00000139626	ITGB7			2.285445	0.50059	2.19016	8.54E-09
10	ENSG00000180644	PRF1			3.589295	0.887169	2.016259	8.95E-08
11	ENSG00000100453	GZMB			11.6194	3.515453	1.725026	4.27E-06
12	ENSG00000100385	IL2RB			2.568753	0.956632	1.424929	0.000126
13	ENSG00000205809	KLRC2	NKG2C, CD159c		1.419451	0.784861	0.854636	0.026587
14	ENSG00000111796	KLRB1	CD161		18.74844	10.45953	0.842324	0.027995
15	ENSG00000150045	KLRF1	NKp80		0.191285	1.177103	-2.62082	4.78E-22

[0693]

[0694]

본 발명자들은 이어서 scRNAseq 데이터세트(도 7)에서 고도로 그리고/또는 차별적으로 발현된 선택된 NK 세포-연관 유전자에 초점을 맞춘 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)에 의해 CYNK 및 PB-NK 세포의 전사 프로파일을 분석하였다. RNA는 단리 또는 배양 후 새롭게 해동된 미경험 세포로부터 추출하였다. qRT-PCR은 CYNK 및 PB-NK 세포들 다에서 하우스키핑 유전자인 GAPDH에 비해서 CD69, KLRK1 및 KLRB1의 높은 발현을 입증한 반면, NKG2D 및 CD161/KLRB1을 암호화하는 KLRK1 및 KLRB1은 각각 PB-NK 세포에서 유의하게 고도로 발현되었다. scRNAseq에 의해 초기에 보인 KLRF1 유전자에 의해 암호화된 NKp80의 유의하게 차별적인 발현(표 3)은, qRT-PCR에 의해 확인되었다. 마찬가지로, KLRD1은 CYNK 세포와 비교해서 PB-NK 상에서 더 높게 발현되었다. 종합하면, 데이터는, CYNK 세포와 비교된 경우, PB-NK 세포에 대한 저해성 살해 세포 력틴-유사 수용체(KLRB1, KLRD1, KLRF1)의 더 높은 발현을 나타낸다. 저해성 NKG2A 및 활성화 NKG2C를 암호화하는, 2개의 C-형 력틴 수용체 유전자 KLRC1 및 KLRC2는 CYNK 세포에서 보다 높게 발현되었다. 천연 세포독성 수용체(NCR) 중에서, (NKp44를 암호화하는) NCR2는 CYNK 세포에서 높은 발현으로 그리고 PB-NK 세포에서 거의 발현이 없이 차별적으로 발현되었다. 2개의 공동-활성화 NK 세포 수용체 유전자 CD244(2B4) 및 CD226(DNAM-1)은 CYNK 세포에 비해서 PB-NK에서 약간 더 높게 발현되었다. 전형적인 리간드-활성화 NK 세포 수용체 유전자와 함께, 본 발명자들은 또한 항체-의존적 세포-매개 세포독성을 필요로 하는 Fc 수용체 CD16을 암호화하는 FCGR3A의 발현을 분석하였다. scRNAseq 데이터가 qRT-PCR에 의해 FCGR3A의 상당한 차별적인 발현을 입증하지 않았던 반면, PB-NK 세포에서 고도로 그리고 CYNK 세포에서 매우 낮은 수준으로 발현되었다. scRNAseq에 의해 고도로 차별적으로 발현되고 CYNK 클러스터에서 상승된 2개의 유전자 TNFRSF18 및 TNFSF10의 발현은, 또한 qRT-PCR에 의해 분석되었다. PCR 데이터는, PB-NK 세포에서의 낮

은 수준의 발현에 비해서 CYNK 세포 상에서 각각 GITR 및 TRAIL을 암호화하는 이들 유전자의 높은 발현을 확인해준다.

[0695] 마지막으로, 본 발명자들은 유세포분석을 이용해서 표면 단백질 발현에 의해 PB-NK와 비교해서 CYNK 세포를 특성규명하였다. 각종 NK 세포 수용체를 표적화하는 항체는 scRNAseq 및 qRT-PCR에 의한 전사 특성규명에 기초하여 선택되었다(표 1 내지 3, 도 6 및 도 7). NK 세포는 높은 수준의 NK 세포 마커 CD56을 발현하고, T 세포, B 세포 및 골수성 세포 마커 CD3, CD19 및 CD14의 발현을 각각 결여한다(도 8). 대부분의 PB-NK 세포가 CD56을 낮은 수준으로 발현하는 한편, PB-NK 세포의 작은 서브셋이 CD56을 CYNK 세포에서 나타내는 수준에서 발현한다(도 9). NCR 분석은 CYNK 세포에서 Nkp44의 높은 발현을 입증하는 한편, Nkp44는 PB-NK에서 낮은 수준으로 발현되는데, 이는 본 발명자들의 전사 분석에도 잘 대응한다(도 7). Nkp80은, 한편으로는, PB-NK 세포에서 발현되었고 CYNK에서는 거의 발현되지 않았는데, 이는 또한 KLRF1 발현의 전사 데이터를 확인해준다(표 1 및 도 7). CD16은 사실상 CYNK 세포에서 발현되지 않았던 반면, 대부분의 PB-NK 세포는 CD16을 높은 수준에서 발현하였다. 따라서, CD16 단백질 발현은, 또한 전사 분석에도 잘 대응한다(표 1 및 도 7). 살해 세포 력틴-유사 수용체는 CYNK 세포와 PB-NK 세포 간에 비교 가능하였는데, CYNK 세포는 NKG2D, NKG2C, CD94(NKG2C) 및 NKG2A에 대해서 PB-NK 세포에 비해서 더 높은 평균 형광 강도를 입증하였다. TNFRSF18에 의해 암호화된 관문 저해 분자인 GITR은, PB-NK 세포 상에서 발현되지 않았지만 모든 CYNK 세포 상에서 고도로 발현되었는데, 이는 qRT-PCR 데이터에도 잘 상관되고 있다.

[0696] 본 발명자들은 유세포분석 데이터세트(도 8 및 도 9)를 사용해서 CYNK 및 PB-NK 세포 집단에 대한 표면 마커 발현의 비편향 분석을 수행하였다(도 10). 항체-염색된 CYNK 세포와 PBMC 세포를 얻기 위하여 혼합하고 유세포분석에 의해 분석하였다. tSNE 플롯으로부터, 당해 플롯 상에서 CD56- 및 CD3/CD14/CD19-양성 세포의 국제화에서 살펴볼 때, CYNK 및 PB-NK 세포 클러스터가 서로로부터 그리고 다른 말초 혈액 세포와는 별도로 클러스터링되는 것은 명백하다. Nkp44(CD336) 및 GITR(CD357)의 높은 발현은 CYNK 세포의 식별을 가능하게 하는데, 그 이유는 GITR이 PBMC 서브셋 내 임의의 세포 유형에서 사실상 발현되지 않기 때문이다. 다른 한편으로 PB-NK 세포는, CYNK 세포에서 발현되지 않는 CD16 및 Nkp80을 고도로 발현한다. 전체적으로 보아, 본 발명자들은 식별된 세포 표면 마커를 갖는데, 이는 CYNK 세포를 PB-NK로부터 높은 신뢰도로 구별할 수 있게 한다.

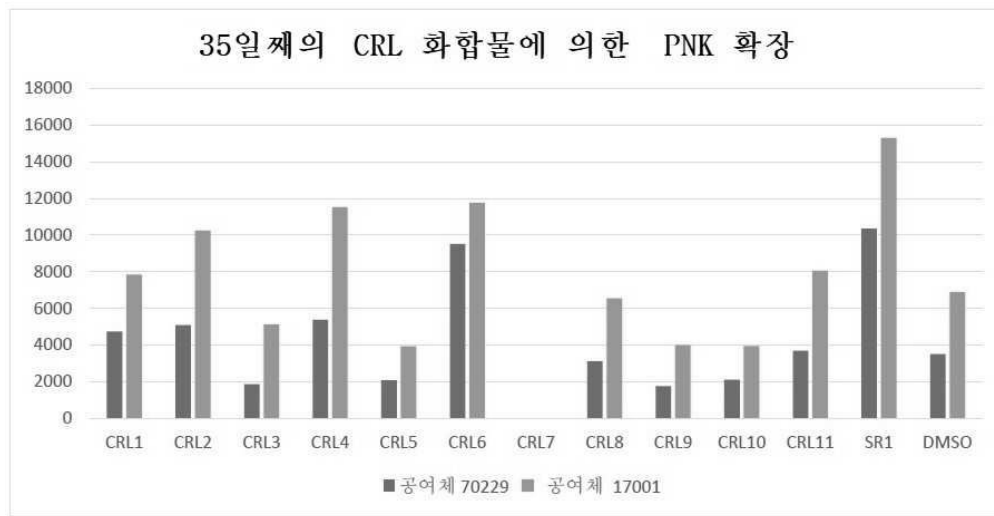
[0697] 평가:

[0698] 본 발명은 본 명세서에 기재된 소정의 실시형태에 의한 영역에 한정되지 않아야 한다. 실제로, 기술된 것들 외에 본 발명의 다양한 변형이 앞서의 설명 및 첨부된 도면으로부터 당해 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 영역내에 있는 것으로 의도된다.

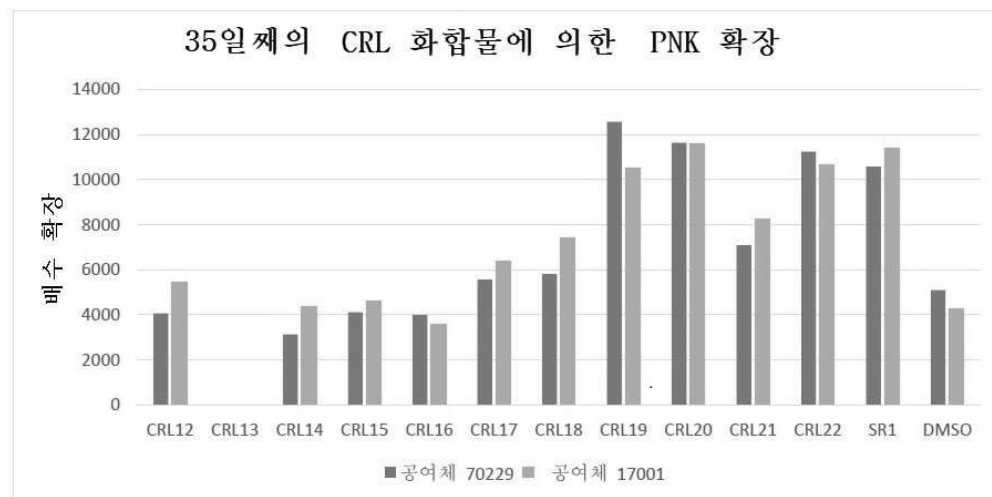
[0699] 본 명세서에 인용된 모든 참고 문헌은, 각각의 개개 공보, 특허 또는 특허권이 모든 목적을 위해 이의 전문으로 참고로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 나타낸 바와 동일한 정도로 이들의 전문으로 및 모든 목적을 위해 본 명세서에 참조에 의해 인용된다. 어떠한 공보의 인용도 출원일 전의 이의 개시내용에 대한 것이며 본 발명이 이러한 공보를 선행 발명으로서 선행 자격이 주어지지 않음을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

도면

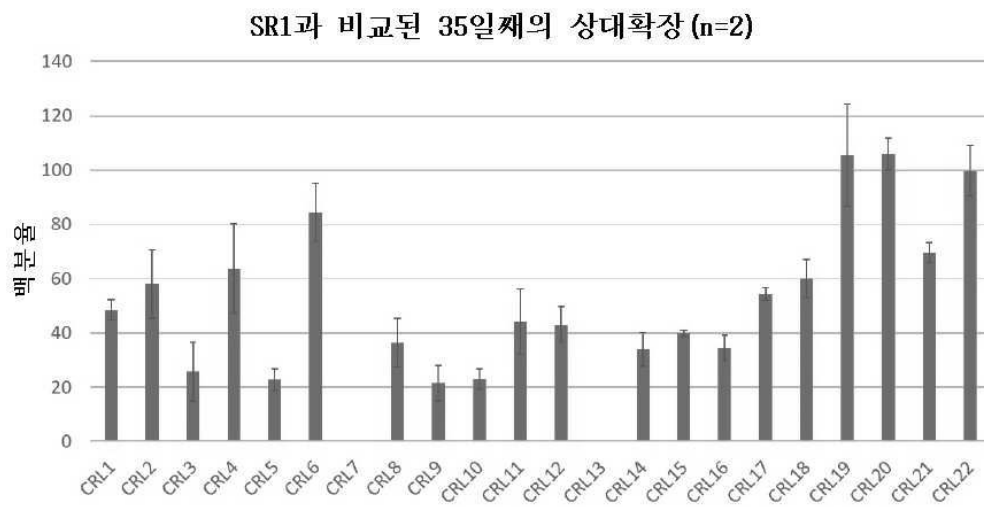
도면1



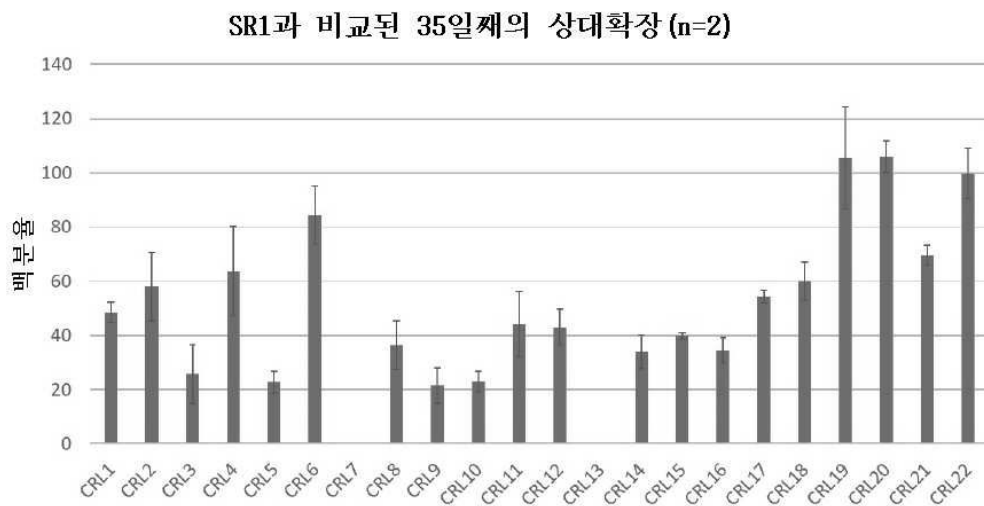
도면2



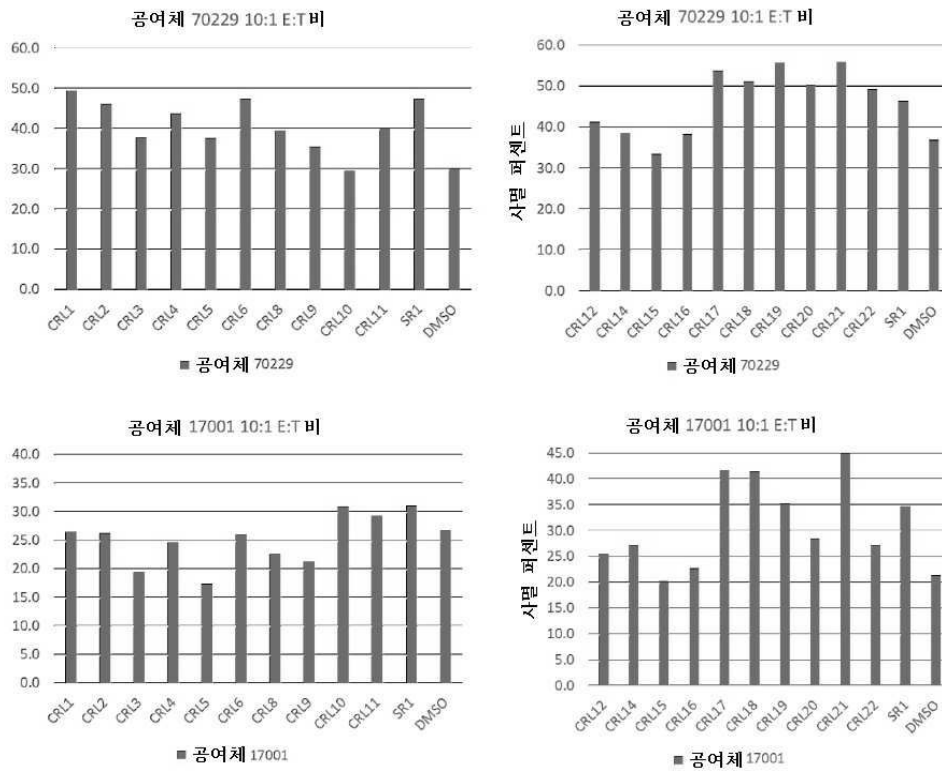
도면3



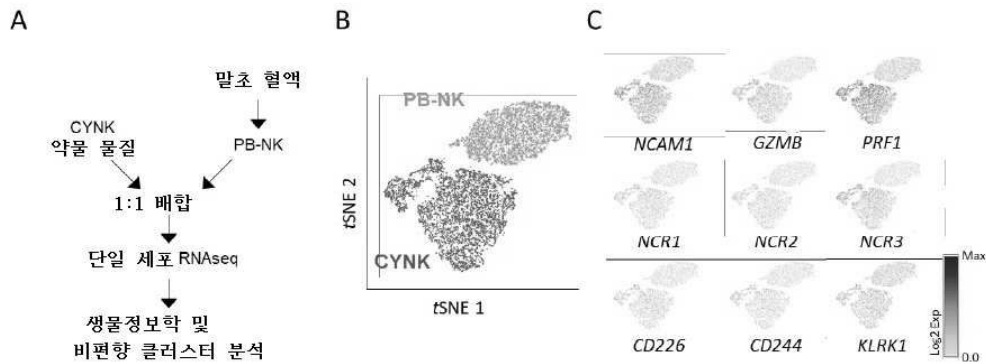
도면4



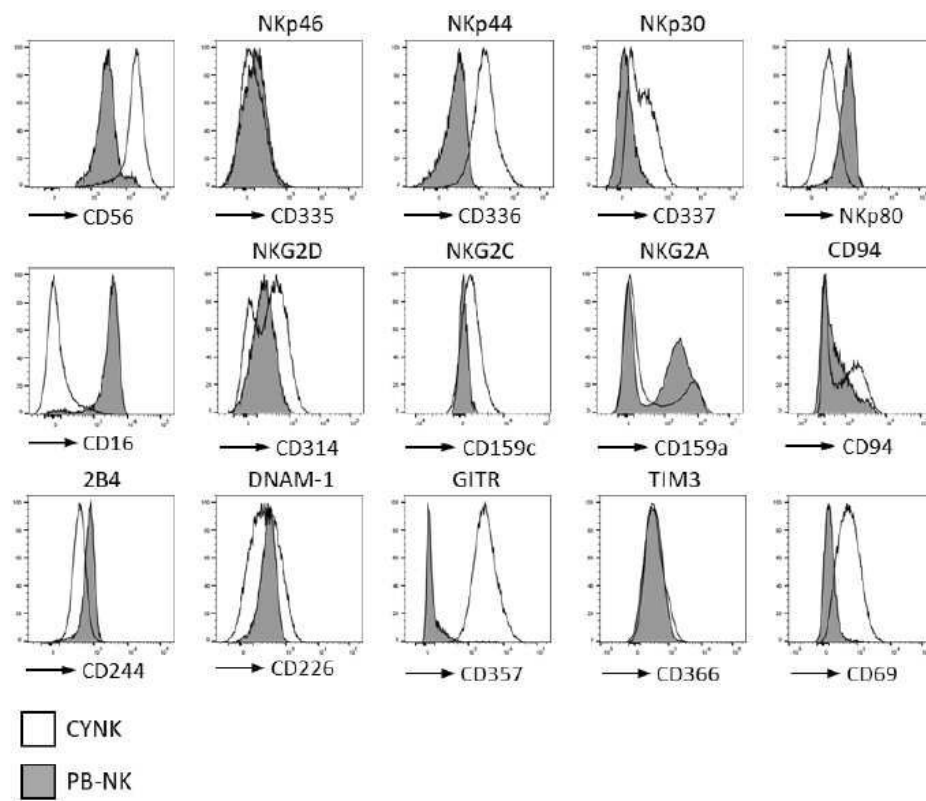
도면5



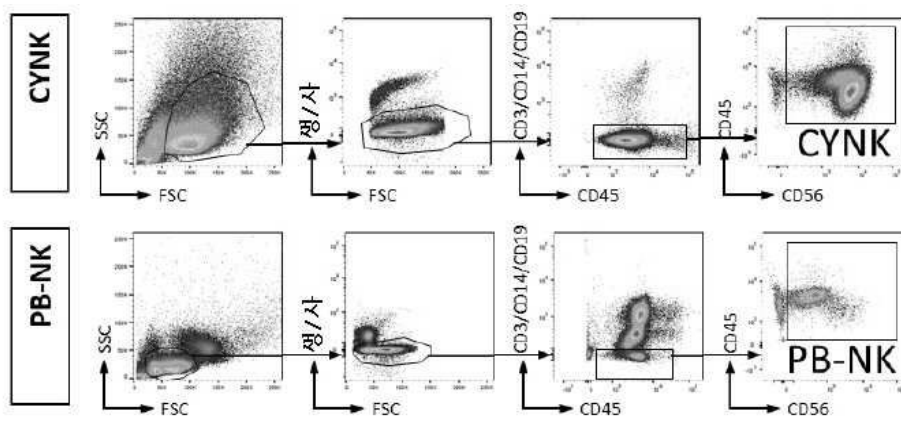
도면6



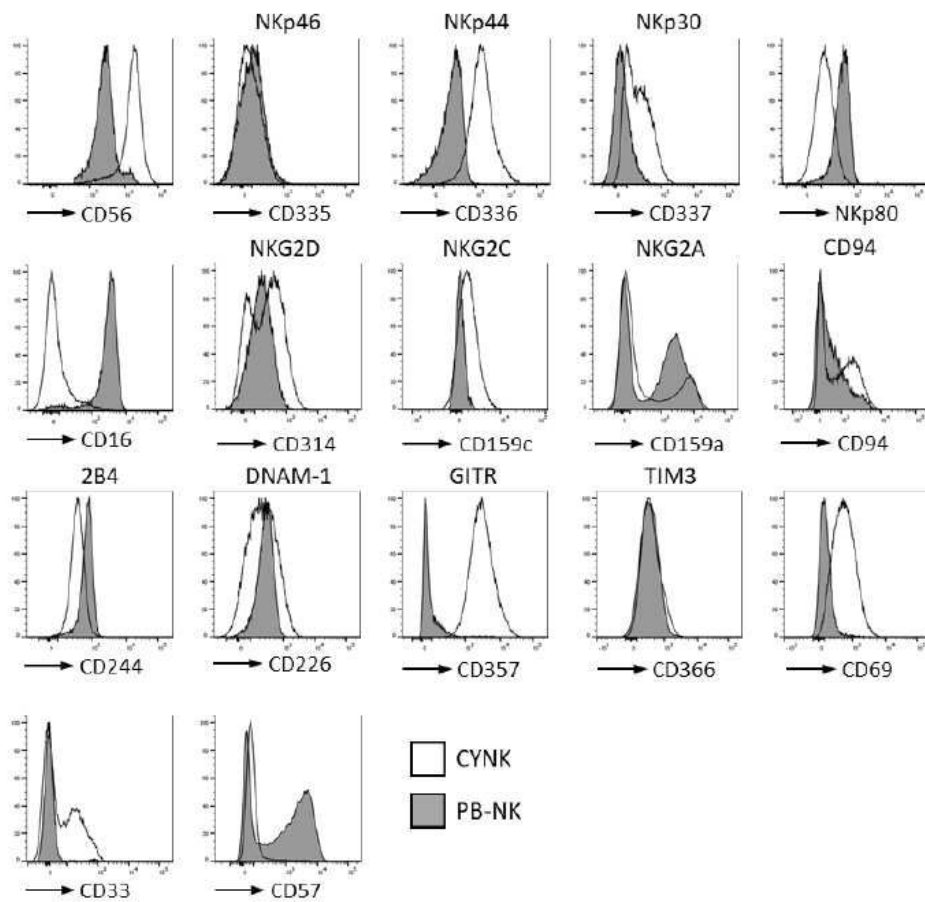
도면7



도면8



도면9



도면10

