



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월13일
(11) 등록번호 10-2765799
(24) 등록일자 2025년02월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2025.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2025.01)
A61K 38/2013 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0001983
- (22) 출원일자 2019년01월07일
심사청구일자 2019년01월07일
- (65) 공개번호 10-2019-0093500
- (43) 공개일자 2019년08월09일
- (30) 우선권주장
1020180012942 2018년02월01일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
Markus Granzin et al., ONCOIMMUNOLOGY 2016,
VOL.5, NO.9, e1219007*
WO2017037083 A1
US20140120072 A1
WO2015154012 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
주식회사 엔케이맥스
경기도 성남시 분당구 돌마로 172, 1층 및 6층(정
자동, 분당서울대병원 헬스케어혁신파크)
- (72) 발명자
박상우
경기도 성남시 분당구 동관교로 123, 106동 1602
호
김용만
경기도 성남시 분당구 돌마로 119(정자동 193),
805동 1401호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인에스알비

전체 청구항 수 : 총 22 항

심사관 : 윤미란

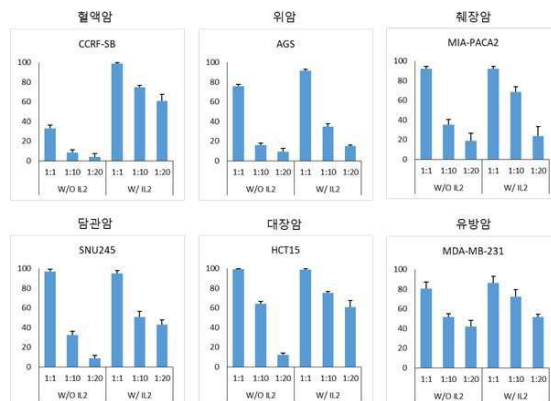
(54) 발명의 명칭 CD56+ 자연살해세포를 포함하는 항암용 조성물

(57) 요약

본 발명은 말초혈액(Peripheral blood)-유래 CD56+ 자연살해세포(Natural killer cell) 및 사이토카인(Cytokine)을 포함하는 항암용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 조성물은 고순도의 자연살해세포를 포함하면서도 T 세포를 포함하지 않으므로, 자가 치료뿐만 아니라 동종 치료에도 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자
정재섭
서울특별시 구로구 천왕로 56, 310동 902호

이용희

서울특별시 성동구 살곶이길 50 마장동 현대아파트
102동 2704호

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는 세포치료제 조성물:

치료학적 유효량으로 포함되는 CD56+ 자연살해세포들(natural killer cells; NK cells), CD3-/CD56+ 자연살해 세포들, 또는 CD56+ 자연살해세포들 및 CD3-/CD56+ 자연살해세포들;

상기 세포치료제 조성물 내의 상기 자연살해세포들의 순도는 상기 세포치료제 조성물 내의 전체 세포에서 적어도 90%이고,

50-50,000 IU/mL의 농도의 IL-2; 및

약학적으로 허용되는 담체,

상기 세포치료제 조성물은 자연살해세포 치료를 필요로 하는 인간 암 환자에게 투여하기 적합한 형태이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치료학적 유효량은 인간 환자의 체중 kg 당 1×10^6 내지 1×10^{11} 자연살해세포들인 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 4°C인 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 IL-2는 50-1,000 IU/mL로 존재하는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 IL-21을 포함하지 않는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 2 내지 8°C인 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 4°C인 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 IL-2는 500 IU/mL로 존재하는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 암은 혈액암, 위암, 췌장암, 담관암, 대장암, 유방암, 간암, 난소암, 폐암, 신장암, 전립선암 및 신경아세포종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 T 세포들을 포함하지 않는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 11

다음을 포함하는 세포치료제 조성물:

인간 대상체의 체중 kg 당 1×10^6 내지 1×10^{11} 자연살해세포들;

상기 자연살해세포들은 말초혈액단핵세포들 (Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)로부터 유래한 CD56+ 세포들, CD3-/CD56+ 세포들, 또는 CD56+ 세포들 및 CD3-/CD56+ 세포들인 것이고, 상기 자연살해세포들의 순도는 상기 세포치료제 조성물 내의 전체 세포에서 적어도 90%이고, T 세포들은 상기 세포치료제 조성물 내의 1% 미만이고,

50-50,000 IU/mL의 농도의 IL-2; 및

하트만 용액 (Hartmann's solution), 알부민 및 DMSO를 포함하면서, IL-21을 포함하지 않는 약학적으로 허용되는 담체,

상기 세포치료제 조성물은 자연살해세포 치료를 필요로 하는 인간 암 환자에게 투여하기 적합한 형태이다.

청구항 12

다음을 포함하는 세포치료제 조성물:

CD56+ 자연살해세포들, CD3-/CD56+ 자연살해세포들, 또는 CD56+ 및 CD3-/CD56+ 자연살해세포들;

상기 자연살해세포들의 순도는 상기 세포치료제 조성물 내의 전체 세포에서 적어도 90%이고,

50-50,000 IU/mL의 농도의 IL-2; 및

DMSO를 포함하면서, IL-21을 포함하지 않는 약학적으로 허용되는 담체;

상기 세포치료제 조성물은 자연살해세포 치료를 필요로 하는 인간 암 환자에게 투여하기 적합한 형태이다.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 IL-2는 50-1,000 IU/mL로 존재하는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 하트만 용액을 추가로 포함하는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 알부민을 추가로 포함하는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 IL-2는 500 IU/mL로 존재하는 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 2 내지 8°C인 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 세포치료제 조성물은 4°C인 것인, 세포치료제 조성물.

청구항 20

다음을 포함하는 세포치료제 조성물:

CD56+ 자연살해세포들, CD3-/CD56+ 자연살해세포들, 또는 CD56+ 및 CD3-/CD56+ 자연살해세포들;

상기 세포치료제 조성물 내의 상기 자연살해세포들의 순도는 상기 세포치료제 조성물 내의 전체 세포에서 적어도 90%이고,

500-50,000 IU/mL의 농도의 IL-2;

약학적으로 허용되는 담체;

상기 세포치료제 조성물은 자연살해세포 치료를 필요로 하는 인간 암 환자에게 투여하기 적합한 형태이다.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 자연살해세포들은 적어도 24시간 동안 보관되어있던 것인 세포치료제 조성물.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 자연살해세포들은 적어도 48시간 동안 보관되어있던 것인 세포치료제 조성물.

청구항 23

제1항 내지 제15항, 제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 인간 IL-2인 것인, 세포치료제 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 CD56+ 자연살해세포를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인체는 면역 반응에 의해 병원체로부터 보호되고 있고, 면역 시스템은 많은 면역관련 세포와 사이토카인 등에 의해 구성되어 있다. 이러한 면역시스템에서 중요한 역할을 하는 것이 백혈구, 특히 림프구이다. 림프구를 구성하는 세포로는 대표적으로 선천성 면역계와 후천성 면역계가 있다.

[0003] 자연살해세포(Natural killer cell, NK cell)는 대표적인 선천 면역세포 중 하나로, 다양한 기전을 통해 암 세포나 바이러스에 감염된 세포를 직접적으로 공격하여 사멸시키는 기능을 가지며, 전체 림프구에서 5~10 % 비율로 소량 존재하지만 정상 세포에서 돌연변이와 같은 이상이 감지되었을 때 가장 처음으로 방어하여 이를 제거하는 강력한 기능을 갖는다. 또한 다른 면역세포의 기능 조절에도 매우 중요한 역할을 담당하여 선천 면역세포이면서도 획득 면역세포를 자극하여 더 강력한 방어 작용을 한다. 정상인의 경우, 유전 및 환경적 요인으로 인하여 정상 세포의 돌연변이가 계속 축적되어 발생된 종양 및 암세포는 상기 자연 살해 세포에 의해 1차적으로 제거 되지만, 암 환자의 경우 자연살해세포의 수와 그 기능이 극히 감소되어 있다. 따라서, 자연살해세포를 효과적으로 확장 및 증식시켜 사용하는 것이 중요하다.

[0004] 또한, 자연살해세포를 확장 및 증식시키는 것뿐만 아니라, 확장 증식된 자연살해세포를 실제로 사용할 때까지 그 기능을 높게 유지시키는 것도 중요하다. 이에, 자연살해세포의 증식을 촉진시키고, 자연살해세포에서 유래하는 TNF-, INF- 및 GM-CSF와 같은 사이토카인의 생산을 증가시킬 뿐만 아니라, 자연살해세포의 암세포 살상능을 증가시킬 수 있는 조성물의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국내공개특허 제10-2013-0086820호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명본 발명자들은 동종 치료에 효과적으로 사용 가능한 자연살해세포를 포함하는 항암용 세포치료제 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell)로부터 분리된 CD56+ 자연살해세포에 특정 사이토카인을 첨가하는 경우, 높은 생존률과 높은 항암 활성도를 보임을 구

명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 말초혈액(Peripheral blood)-유래 CD56+ 자연살해세포(Natural killer cell) 및 사이토카인(Cytokine)을 포함하는 항암용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 동종 치료에 효과적으로 사용 가능한 자연살해세포를 포함하는 항암용 세포치료제 조성물을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell)로부터 분리된 CD56+ 자연살해세포에 특정 사이토카인을 첨가하는 경우, 높은 생존률과 높은 항암 활성도를 보임을 규명하였다.

[0009] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0011] 본 발명의 일 양태는 말초혈액(Peripheral blood)-유래 CD56+ 자연살해세포(Natural killer cell) 및 사이토카인(Cytokine)을 포함하는 항암용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

[0012] 본 명세서에서 용어 "말초혈액(peripheral blood)-유래"는 "말초혈액 전혈(whole blood)" 또는 "말초혈액으로부터 백혈구성분채집술(Leukapheresis)을 이용하여 분리한 백혈구(Leukocytes)"로부터 유래된 것을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 명세서에서 용어 "백혈구성분채집술(Leukapheresis)"은 채혈한 혈액에서 백혈구(Leukocytes)를 선택적으로 제거(분리)한 후 다시 환자에게 수혈하는 것으로, 상기 방법에 의해 분리된 백혈구의 경우, 피콜-하이팩 밀도 구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method) 등과 같은 별도의 방법 없이 본 발명에 사용될 수 있다.

[0014] 상기 말초혈액-유래 CD56+ 자연살해세포는 말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell)-유래 CD56+ 자연살해세포일 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 용어 "말초혈액단핵세포(Peripheral blood mononuclear cell)"는 "PBMC", "단핵세포(Mononuclear cell)" 또는 "단핵구"와 동일한 의미로 사용될 수 있고, 이는 항암면역치료를 위하여 통상적으로 사용되는 말초혈액(Peripheral Blood)으로부터 분리된 단핵세포(Mononuclear Cell)를 의미한다. 말초혈액단핵세포는 채혈한 사람의 혈액을 피콜-하이팩 밀도 구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method) 등과 같은 공지의 방법을 사용하여 수득할 수 있다.

[0016] 상기 말초혈액단핵세포는 정상인, 암의 위험성을 갖는 환자 또는 암 환자로부터 얻은 것일 수 있다. 본 발명에서 사용되는 말초혈액단핵세포는 반드시 자가 유래일 필요는 없으며, 동종 유래의 말초혈액단핵세포라면 본 발명에 따른 항암면역치료를 위한 고순도 자연살해세포의 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "CD56+ 자연살해세포"는 "CD56+ NK 세포", "CD56 자연살해세포" 또는 "CD3-/CD56+ NK 세포" 와 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[0018] 상기 CD56+ 자연살해세포는 필요에 따라, 세포 표면의 CD56 당단백질이 발현되는 세포, 및 CD56 당단백질이 발현되는 동시에 CD3 당단백질이 비발현되는 세포를 포함할 수 있다. 같은 면역세포라도 세포 표면에 붙어있는 CD 종류와 발현율에 차이가 있어 그 기능이 달라질 수 있다.

[0019] 상기 CD56+ 자연살해세포는 예를 들어, PBMC에 CD56 마이크로비즈(microbeads)를 첨가하여 비특이적 결합(Non-specific binding)을 제거한 CD56+ NK 세포, 및/또는 PBMC에 CD3 마이크로비즈를 첨가하여 특이적 결합(Specific binding)을 제거한 후, CD56 마이크로비즈를 첨가하여 비특이적 결합을 제거한 CD3-/CD56+ NK 세포 일 수 있다.

[0020] 본 명세서에서 용어 "사이토카인(Cytokine)"은 말초혈액단핵세포를 자연살해세포로 유도하는데 사용 가능한 면역 활성화 사이토카인을 의미한다.

[0021] 상기 사이토카인은 IL(Interleukin)-2, IL-15, IL-21, Flt3-L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand), SCF(Stem Cell Factor), IL-7, IL-18, IL-4, type I interferons, GM-CSF(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 및/또는 IGF 1(Insulin-like growth factor 1)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기 사이토카인은 18-180,000, 20-100,000, 50-50,000, 50-1,000, 50-900, 50-800, 50-700, 50-600, 50-550, 100-550, 150-550, 200-550, 250-550, 300-550, 350-550, 400-550 또는 450-550 IU/mL의 농도로 사용될 수 있

다. 상기 범위에서 사용되는 경우 항암 조성물 내 세포의 사멸을 억제하고, 항암 활성도를 높일 수 있다.

- [0023] 상기 조성물은 사이토카인으로 IL-2을 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 CD56+ 자연살해세포는 영양세포(방사선 조사된 Jurkat 세포 및 방사선 조사된 EBV-LCL 세포)와 공배양하는 방법을 통해 수득될 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 "영양세포(Feeder cell)"는 분열 증식하지 못하나 대사활성이 있어, 여러 가지 대사물질을 생산함으로써 목적 세포의 증식을 돕는 세포를 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 "Jurkat 세포"는 또는 "Jurkat 세포주"는 혈액암(immortalized acute T cell leukemia) 세포주로 University of California at San Francisco의 Dr. Arthur Weiss가 개발한 세포주이다. 다양한 케모카인 수용체가 발현하고 있으며 IL-2를 생산할 수 있는 세포로서, 이는 세포 표면에 자연 살해세포 활성억제 인자인 MHC class I을 높이 발현하기 때문에 항암면역치료를 위한 영양세포(feeder cell)의 후보로 가능성이 전혀 대두되지 못했던 세포주였다. 본 발명에 사용되는 Jurkat 세포는 ATCC로부터 입수할 수 있다(ATCC TIB-152).
- [0027] 본 명세서에서 용어 "EBV-LCL 세포" 또는 "EBV-LCL 세포주"는 엡스테인 바르 바이러스가 형질전환된 임파구 연속 세포주(EBV-LCL, Epstein-Barr virus transformed lymphocyte continuous line, D.M. Koelle et al., J Clin Invest, 1993: 91: 961-968)로, 시험관 내에서 사람의 B 세포에 Epstein-Barr Virus를 감염시켜서 만든 B 세포주이다. 본 발명에서 사용되는 EBV-LCL 세포는 PBMC에서 EBV를 감염시키는 과정 중에 사이클로스포린 A를 넣어주는 방법을 통하여 통상의 실험실에서 직접 제조하여 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 EBV-LCL 세포는 예를 들어, 하기와 같은 방법으로 제조할 수 있다:
- [0029] 30×10^6 의 PBMC를 배양배지 9mL에 넣고, 이를 T25 배양 플라스크에 넣은 후, EBV 상층액을 9mL 첨가한다. $50 \mu\text{g/mL}$ 농도의 사이클로스포린 A $80 \mu\text{L}$ 를 첨가한 후 37°C 에서 배양한다. 배양 7일 후 상층액을 1/2 제거한 후 새로운 배양배지를 넣어주고 $40 \mu\text{L}$ 의 사이클로스포린 A를 첨가한다. 배양 28일까지 매 7일에 한번 7일째와 같은 과정을 반복한다. 세포주는 배양 28일 후부터 사용 가능하며, 이 때부터 배양 배지에 사이클로스포린 A를 넣지 않고 배양한다.
- [0030] 상기 Jurkat 세포 및 EBV-LCL 세포는 방사선 조사를 통해 영양세포로 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 방사선 조사된 Jurkat 세포 및 방사선 조사된 EBV-LCL 세포는 1:0.1-5, 1:0.1-4, 1:0.1-3, 1:0.1-2, 1:0.1-1.5, 1:0.5-1.5 또는 1:0.75-1.25의 함량비로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 방사선 조사된 Jurkat 세포 및 방사선 조사된 EBV-LCL 세포는 각각 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-150, 70-130, 80-120 또는 90-110 Gy 방사선을 처리하여 수득할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 공배양은 0-45, 0-42, 0-40, 0-35, 0-30, 0-20, 0-19, 0-18, 0-17, 0-16, 0-15 또는 0-14일 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 공배양은 말초혈액단핵세포와 영양세포(Jurkat 세포 및 EBV-LCL 세포)를 1:1-100, 1:1-90, 1:1-80, 1:1-70, 1:10-65, 1:20-65, 1:30-65, 1:40-65, 1:50-65 또는 1:55-65의 혼합비로 포함하여 수행될 수 있으며, 이때 사용 가능한 배지는 말초혈액단핵세포의 자연살해세포로의 유도 및 증식에 사용하고 있는 통상의 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 그 외 온도 등의 배양 조건은 통상의 말초혈액단핵세포의 배양 조건을 따를 수 있다.
- [0035] 본 발명의 생산방법에 의해 생산된 자연살해세포는 전체 세포에서 CD56+ 자연살해세포의 비율(순도)이 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상일 수 있다.
- [0036] 상기 암은 혈액암, 위암, 췌장암, 담관암, 대장암, 유방암, 간암, 난소암, 폐암, 신장암, 전립선암 또는 신경아세포종 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 조성물은 T 세포(T cell)를 포함하지 않을 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 "T 세포(T cell)"는 흉선에서 유래하는 림프구로, 면역에서의 기억 능력을 가지며 B 세포(B cell)에 정보를 제공하여 항체 생성을 도울 뿐만 아니라 세포의 면역에 주된 역할을 하는 세포이다. 이러한 T 세포는 서로 다른 항원들 사이에서 아주 작은 차이를 구별해 낼 수 있어 동종 항원에 대한 면역반응을 유도하므로, 자가 치료는 가능하나 동종 치료에 사용되기엔 한계가 있다.
- [0039] 따라서, 본 발명의 세포치료제 조성물은 T 세포를 포함하지 않아, 동종 이식이 가능하다.

- [0040] 본 명세서에서 용어 "세포치료제"란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식·선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 미국은 1993년부터, 우리나라는 2002년부터 세포치료제를 의약품으로 관리하고 있다. 이러한 세포치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며, 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역세포 치료제로 분류할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0042] 본 발명의 세포치료제 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제나 슈크로오스, 알부민 등이 있다. 적합한 보존제로는 DMSO, glycerol, ethylene glycol, sucrose, trehalose, dextrose, polyvinylpyrrolidone 등이 있다.
- [0043] 본 발명의 세포치료제 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다.
- [0044] 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다. '치료학적으로 유효한 양'은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 세포치료제 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 세포치료제 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 세포치료제 조성물은 체중 kg당 1×10^6 내지 5×10^8 세포수의 세포치료제가 포함될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 양태는 말초혈액(Peripheral blood)-유래 CD56+ 자연살해세포(Natural killer cell) 및 사이토카인(Cytokine)을 포함하는 항암용 세포치료제 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0047] 상기 개체는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 의미하며, 바람직하게는 인간을 의미다.
- [0048] 상기 치료방법에 있어서, 성인의 경우 본 발명의 세포치료제 조성물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 조성물에 포함되는 세포치료제는 체중 kg당 1×10^6 내지 1×10^{11} , 예를 들면, 1×10^6 내지 1×10^8 세포수를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0049] 상기 치료방법에서 본 발명의 세포치료제 조성물은 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0051] (a) 본 발명은 말초혈액(Peripheral blood)-유래 CD56+ 자연살해세포(Natural killer cell) 및 사이토카인(Cytokine)을 포함하는 항암용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.
- [0052] (b) 본 발명의 조성물은 고순도의 자연살해세포를 포함하면서도 T 세포를 포함하지 않으므로, 자가 치료뿐만 아니라 동종 치료에도 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 CD56+ NK 세포의 순도를 확인한 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 CD56+ NK 세포의 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 CD56+ NK 세포의 IL-2 사용에 의한 항암 활성도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 CD56+ NK 세포의 IL-2 사용에 의한 항암 활성도를 비교한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 CD56+ NK 세포의 IL-2 사용에 의한 항암 활성도를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0056] **실시예 1. PBMC-유래 CD56+ NK 세포의 제조(IL-2의 사용)**
- [0057] 먼저, 피콜-하이팩 밀도 구배 분리법(Ficoll-Hypaque density gradient method)을 이용하여 혈액으로부터 PBMC를 분리한 후 세포를 계수하였다.
- [0058] 상기 계수된 PBMC에 MACS 버퍼(1x PBS+0.5% HSA)를 첨가하여 세포를 부유하고, PBMC 1.0x10⁷ 세포당 1-20 μL가 되도록 CD56 마이크로비즈(microbeads)(Miltenyi Biotec)를 첨가 후, 5-30분 동안 2-8℃로 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후, MACS 버퍼를 넣어 섞어준 다음 원심분리(600xg)하여 세포를 침전시켰다.
- [0059] 원심분리 후, 상층액을 제거하고 MACS 버퍼를 넣어 세포를 부유하고, MACS 분리기(separator)에 결합된 컬럼에 넣었다. MACS 버퍼를 컬럼에 통과시켜 비특이적 결합(Non-specific binding)을 제거하였다. MACS 분리기에서 컬럼을 분리하여 15 mL 코니칼 튜브(conical tube)로 옮긴 후, MACS 버퍼를 추가하여 컬럼에 붙어있는 CD56+ 세포를 분리하였다.
- [0060] 상기 분리된 CD56+ 세포를 미리 준비된 100 Gy 방사선 조사된 영양세포(Jurkat 세포 및 EBV-LCL 세포)와 함께 IL-2가 500 IU/mL 농도로 첨가된 FBS 10%를 함유하는 RPMI-1640 배지에 넣은 후 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 공배양하였다. 이때, (CD56+ 세포 또는 CD3-/CD56+ 세포):(Jurkat 세포):(EBV-LCL 세포)는 1:30:30의 비율로 배양하였다.
- [0061] 배양 6일째 세포 수 1.0x10⁵-2.0x10⁶/mL 기준으로 350mL 백(bag)에 접종하여 4일 동안 추가 배양하고, 배양 10일째 세포 수 1.0x10⁵-2.0x10⁶/mL 기준으로 1 L 백에 접종 후 4일 동안 추가 배양하였다. 마지막으로 배양 14일째에 세포수 1.0x10⁵-2.0x10⁶/mL 기준으로 1L 백에 접종 후 3-6일 동안 추가 배양하였다.
- [0063] **실시예 2. PBMC-유래 CD56+ NK 세포의 제조(IL-2 및 IL-21 조합의 사용)**
- [0064] 상기 실시예 1에서 500 IU/mL 농도의 IL-2 대신 IL-2 및 IL-21이 각각 500IU/mL 및 50ng/mL의 농도로 첨가된 것을 제외하고, 상기 실시예 1-1의 방법과 동일하게 NK 세포를 제조하였다.
- [0066] **실험예 1. NK 세포의 순도 확인**
- [0067] 각 NK 세포를 FACS 염색 버퍼로 1회 세척하여 100 μL에 부유한 후, 형광이 결합된 CD56/CD3/CD20/CD14 단클론항체를 혼합하고 암 조건에서 20-30분 동안 2-8℃로 보관하였다. 추가 1회 세척 후 300-500 μL의 FACS 염색 버퍼에 세포를 부유한 후, 유세포 분석기의 CD56-FITC/CD3-PE/CD20-PerCP5/CD14-APC 패널을 사용하여 튜브당 10,000-100,000개의 세포를 획득하여 분석하였다.
- [0068] 이때, CD56+ NK 세포의 순도는 FSC/SSC 게이팅(gating) 후 CD3-/CD56+ 영역에 들어오는 세포의 비율로 정의하였고, CD3-/CD56+ 영역의 세포에서 CD20 및 CD14이 발현되지 않음을 추가로 확인하였다.
- [0069] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 실시예 1(W/O IL-21의 CD56) 및 2(W/ IL-21의 CD56)의 NK 세포의 순도는 각각 99.0% 및 99.5%에 달하는 것을 알 수 있었다.

[0071] **실험예 2. NK 세포의 생존율 확인**

[0072] 상기 실시예 1의 배양 14-20일째의 CD56+ NK 세포를 3회 세척 후 2×10^7 /mL이 되도록 1% 알부민이 포함된 용액 (생리식염수 및 하트만 용액)에 부유하였다. 4°C에서 48시간 동안 보관 후, 세포 생존율을 측정하였다.

[0073] 또한, IL-2에 의한 효과를 비교하기 위하여, 상기 CD56+ NK 세포를 알부민이 포함된 용액에 부유한 후 IL-2를 500 IU/mL의 농도로 첨가하고 4°C에서 48시간 동안 보관 후, 세포 생존율을 측정하였다.

[0074] 상기 각 조성물 100 μL를 취하여 총 2×10^6 CD56+ NK 세포를 확보한 후, 1mL의 FACS 염색 버퍼로 1회 세척하고, 원심분리하여 100 μL의 annexin V 결합 버퍼에 부유하였다. 부유액에 Annexin V-FITC 및 7-AAD(Biolegend)를 5 μL씩 첨가한 후 잘 혼합하여 암 조건 하에 15 분간 실온에서 반응시켰다. 유세포분석 전 Annexin V 결합 버퍼를 400 μL 첨가하여 5초간 혼합한 후 튜브당 10,000-100,000 개의 세포를 획득하여 분석하였다. Annexin V-FITC 및 7-AAD로 염색하지 않은 시험관을 음성 대조군으로 하여 cut-off를 결정하였고, 생존율은 세포 중 Annexin V-FITC 또는 7-AAD가 음성인 세포의 분율을 퍼센트로 나타내었다.

[0075] 도 2에서 확인할 수 있듯이, IL-2를 함께 처리한 경우(W/ IL2), CD56+ NK 세포의 세포 사멸이 억제됨을 확인하였다.

[0077] **실험예 3. NK 세포의 암세포 살상능 확인**

[0078] 암세포주들은 실험에 사용하기 전 하기의 조건으로 부유하여 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 3일 간격으로 1주 이상 계대배양하여 준비하였다:

[0079] -CCRF-SB(혈액암), AGS(위암) 및 MIA-PACA2(췌장암): RPMI 배지+10% FBS,

[0080] -SNU245(담관암), HCT15(대장암) 및 NIH:OVCAR-3(난소암): RPMI 배지+10% FBS+25 mM HEPES,

[0081] -MDA-MB-231(유방암): DMEM 배지+10% FBS.

[0082] 상기 암세포주들(혈액암 세포주 제외)을 트립신을 이용하여 떼어내어 5×10^4 /mL이 되도록 배지에 부유시킨 후, 24-웰 플레이트에 웰당 1 mL씩 접종하여 하루 동안 부착시켰다. 부유배양세포인 혈액암 세포주는 NK 세포와의 구별을 위하여 세포를 녹색형광으로 표지 후, 5×10^4 /mL이 되도록 배지에 부유하여 24-웰 플레이트에 웰당 1 mL씩 접종하였다.

[0084] 먼저, 상기 암세포주들 중 AGS(위암), MIA-PACA2(췌장암), SNU245(담관암), HCT15(대장암) 및 MDA-MB-231(유방암) 세포를 24-웰 플레이트에 접종 하루 후, CD56+ NK 세포(실시예 1)를 넣어 살상능을 관찰하였으며, CD56+ NK 세포(Effector 세포) 및 암세포주(Target 세포)의 비율은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0085]

Effector : Target	Effector 세포	Target 세포
0 : 1	0	5×10^4
1 : 1	5×10^4	5×10^4
1 : 10	5×10^3	5×10^4
1 : 20	2.5×10^3	5×10^4

[0086] 상기 Target 세포와 Effector 세포가 접종된 플레이트를 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 1-3일 동안 배양하였으며, 이때, IL-2에 의한 항암 활성화도 증가 여부를 관찰하기 위하여 실험군에는 500 IU/ml의 IL-2를 더 첨가하였다. 음성 대조군에는 CD56+ NK 세포(Effector 세포)를 넣지 않아 항암 활성화 반응이 없도록 하였다.

[0087] 배양 1-3일 후 RPMI로 3회 세척하여 부유 형태로 존재하는 CD56+ NK 세포를 제거한 후, 트립신을 이용하여 웰에 남아 있는 암세포주를 떼어내 트립린 블루로 염색하여 계수하였다. 혈액암 세포주는 상기의 방식으로 측정할 수 없으므로, Target 세포와 Effector 세포가 접종된 플레이트를 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 1-3일 배양 후, 24웰 내 존재하는 녹색형광 표지된 세포를 유세포 분석기를 이용하여 계수하였다.

[0088] 암세포주에 대한 살상능(cytotoxicity)은 하기의 계산식 1을 이용하여 계산하였다.

[0089] [계산식 1]

[0090] 살상능(cytotoxicity)=
$$100 - \left[\frac{(CD56 + NK \text{ 세포가 처리된 암세포주 계수 값의 평균})}{(\text{음성대조군 계수 값의 평균})} \times 100 \right]$$

[0091] 도 3에서 확인할 수 있듯이, CD56+ NK 세포만 처리한 경우(W/O IL2)에 비하여, IL-2를 함께 처리한 경우(W/IL2) 암세포 살상능이 증가함을 알 수 있었다.

[0093] 다음으로, 상기 암세포주들 중 NIH:OVCEAR(난소암) 세포를 24-웰 플레이트에 접종 하루 후, CD56+ NK 세포(실시예 1)를 넣어 살상능을 관찰하였으며, CD56+ NK 세포(Effector 세포) 및 암세포주(Target 세포)의 비율은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0094]

Effector : Target	Effector 세포	Target 세포
0 : 1	0	5 x 10 ⁴
1 : 1	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴
1 : 10	5 x 10 ³	5 x 10 ⁴
1 : 20	2.5 x 10 ³	5 x 10 ⁴

[0095] 상기 Target 세포와 Effector 세포가 접종된 플레이트를 37±1℃에서 1일 동안 배양하였으며, 이때, IL-2에 의한 항암 활성화도 증가 여부를 관찰하기 위하여 실험군에는 500 IU/ml의 IL-2를 더 첨가하였다. 음성 대조군에는 CD56+ NK 세포(Effector 세포)를 넣지 않아 항암활성 반응이 없도록 하였다.

[0096] 배양 1일 후 RPMI로 3회 세척하여 부유 형태로 존재하는 CD56+ NK 세포를 제거한 후, 웰에 남아 있는 암세포주를 카메라를 이용하여 촬영하였다.

[0097] 도 4에서 확인할 수 있듯이, CD56+ NK 세포만 처리한 경우(-IL2)에 비하여, IL-2를 함께 처리한 경우(+IL2) 암세포 살상능이 증가함을 알 수 있었다.

[0099] 마지막으로, 상기 암세포주들 중 AGS(위암) 세포를 24-웰 플레이트에 접종 하루 후, CD56+ NK 세포(실시예 1)를 넣어 살상능을 관찰하였으며, CD56+ NK 세포(Effector 세포) 및 암세포주(Target 세포)의 비율은 하기 표 3과 같다.

표 3

[0100]

Effector : Target	Effector 세포	Target 세포
0 : 1	0	5 x 10 ⁴
1 : 1	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴
1 : 10	5 x 10 ³	5 x 10 ⁴
1 : 20	2.5 x 10 ³	5 x 10 ⁴

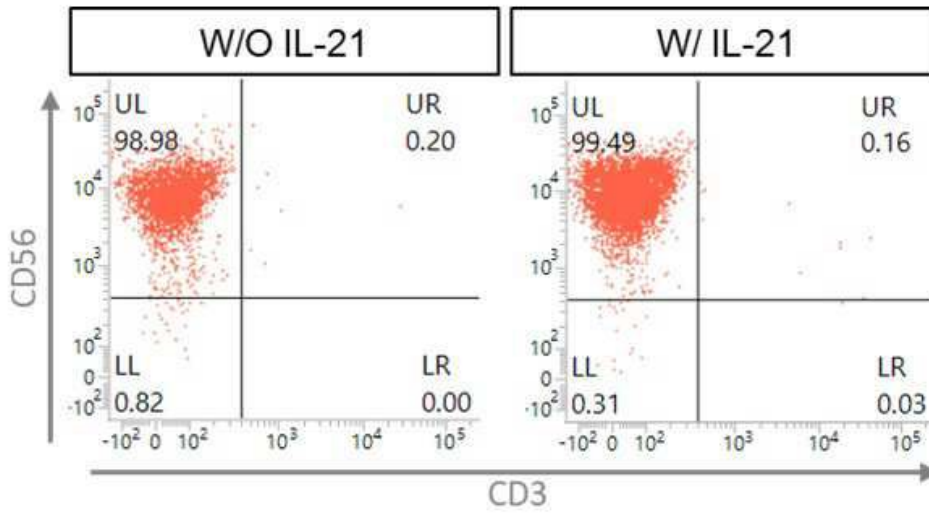
[0101] 상기 Target 세포와 Effector 세포가 접종된 플레이트를 37±1℃에서 1일 동안 배양하였으며, 이때, IL-2에 의한 항암 활성화도 증가 여부를 관찰하기 위하여 실험군에는 500 IU/ml의 IL-2를 더 첨가하였다. 음성 대조군에는 CD56+ NK 세포(Effector 세포)를 넣지 않아 항암활성 반응이 없도록 하였다.

[0102] 배양 1일 후 RPMI로 3회 세척하여 부유 형태로 존재하는 CD56+ NK 세포를 제거한 후, 웰에 남아 있는 암세포주를 카메라를 이용하여 촬영하였다.

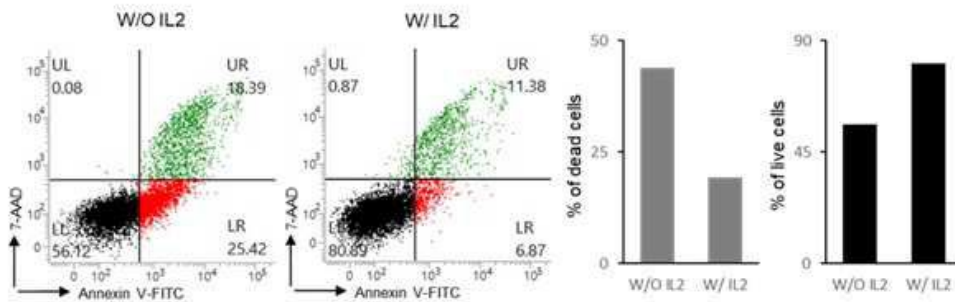
[0103] 도 5에서 확인할 수 있듯이, CD56+ NK 세포만 처리한 경우(-IL2)에 비하여, IL-2를 함께 처리한 경우(+IL2) 암세포 살상능이 증가함을 알 수 있었다.

도면

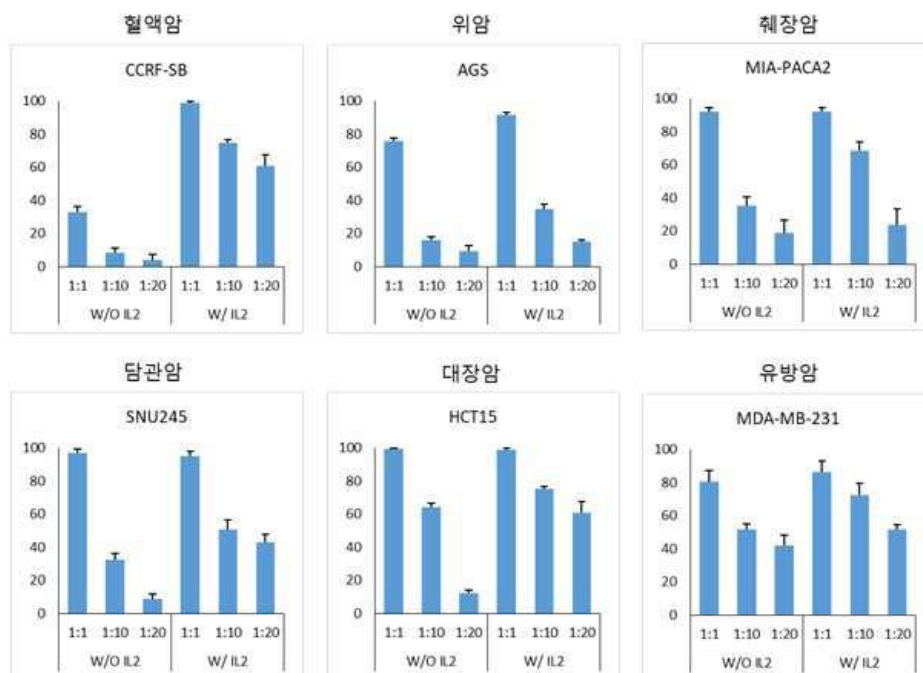
도면1



도면2

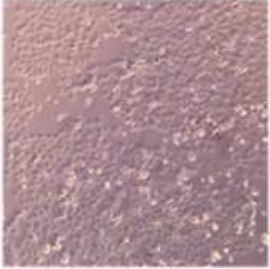









도면3




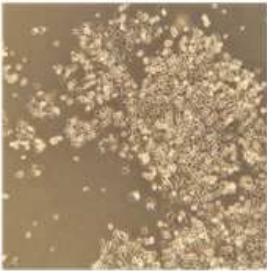
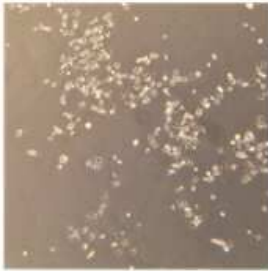




도면4

NIH:OVCEAR (Ovary/adenocarcinoma)

	-IL2 (24hr)	+IL2 (24hr)
None		
(E:T) 1:1		
0.1:1		
0.05:1		

도면5

AGS (Stomach/adenocarcinoma)

	-IL2 (24hr)	+IL2 (24hr)
None		
(E:T) 1:1		
0.1:1		
0.05:1		

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 23

【변경전】

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 인간 IL-2인 것인, 세포치료제 조성물.

【변경후】

제1항 내지 제15항, 제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2는 인간 IL-2인 것인, 세포치료제 조성물.