

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024 년 5 월 16 일 (16.05.2024)



WIPO PCT



(10) 국제공개번호

WO 2024/101919 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/0783 (2010.01)

A61K 35/17 (2015.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/017981

(22) 국제출원일:

2023 년 11 월 9 일 (09.11.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2022-0149783 2022 년 11 월 10 일 (10.11.2022) KR

(71) 출원인: 의료법인 성광의료재단 (SUNGKWANG MEDICAL FOUNDATION) [KR/KR]; 06135 서울특별시 강남구 논현로 566, Seoul (KR).

(72) 발명자: 강은주 (KANG, Eunju); 04595 서울특별시 중구 다산로 32, 8동 1606호, Seoul (KR). 안희정 (AN,

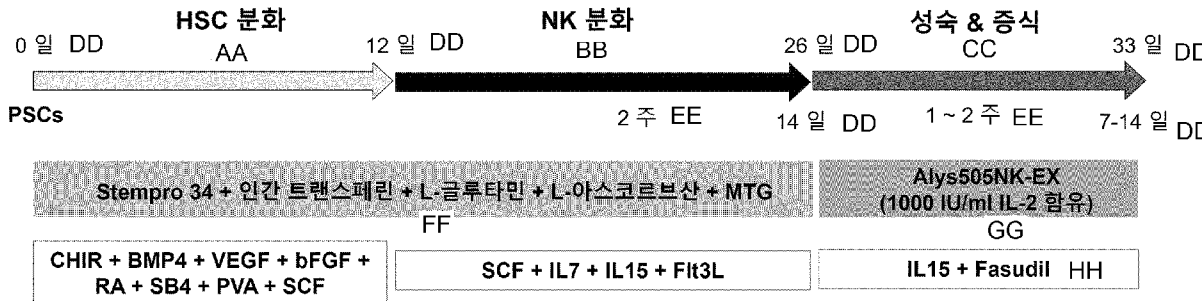
Hee Jung); 06331 서울특별시 강남구 삼성로 14, 413동 1403호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인더웨이브 (THEWAVE IP LAW FIRM); 06097 서울특별시 강남구 선릉로 602 6층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: MEDIUM COMPOSITION FOR INDUCING DIFFERENTIATION FROM PLURIPOTENT STEM CELLS INTO NATURAL KILLER CELLS AND DIFFERENTIATION METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물 및 이를 이용한 분화 방법



AA ... Differentiation of HSC

BB ... Differentiation into NK

CC ... Maturation & Proliferation

DD ... Days

EE ... Weeks

FF ... Stempro 34 + human transferrin + L-glutamine + L-ascorbic acid + MTG

GG ... Alys505NK-EX (containing 1000 IU/ml IL-2)

HH ... IL15 + Fasudil

(57) Abstract: The present invention relates to a medium composition for inducing differentiation from pluripotent stem cells into natural killer cells. The medium composition for inducing differentiation from pluripotent stem cells into natural killer cells, according to an aspect, has the effects of enhancing the efficiency of differentiation into natural killer cells, using no artificial feeder, and improving the expression of NK-specific markers that increase the ability of NK to kill cancer cells, without genetic manipulation.

(57) 요약서: 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 관한 것으로, 일 양상에 따른 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 의하면, 자연살해세포로의 분화 효율을 증진시킬 수 있고, 인위적 feeder를 사용하지 않고, 유전자 조작없이 NK의 암세포 살상력을 증가시키는 NK 특이 마커의 발현을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

[다음 쪽 계속]

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로 의 분화 유도용 배지 조성물 및 이를 이용한 분화 방법 기술분야

- [1] 본 발명은 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 암의 일반적인 치료법은 외과적 수술(surgery), 방사선 요법(radiation therapy), 항암화학요법(chemotherapy) 등이 있으며, 암의 종류 및 병기에 따라 단독 혹은 복합적으로 사용되고 있지만, 환자들에게 심한 부작용과 고통을 수반하는 실정이다. 완벽한 암 치료법은 정상 세포는 손상시키지 않고 암세포만 골라서 죽이는 방법일 것이다. 하지만, 기존 치료법은 정상 세포에 어느 정도 손상을 미친다. 최근 부각되고 있는 암 면역치료법(cancer immunotherapy)은 인체 고유의 면역 시스템을 활용하여 정상 세포의 손상을 최소화하여, 암세포를 보다 특이적으로 제거하는 치료법으로, 여러 세부 분야(항체 치료법, 면역세포 치료법, 바이러스 면역치료법, 나노 기술 면역치료법 등)의 연구가 활발히 진행되고 있다. 이 중 면역세포 치료는 환자의 혈액에서 얻어진 림프구(lymphocyte) 중, 자연살해세포(natural killer cell), 자연살생 T 세포(natural killer T cell), T 세포, B 세포, 수지상세포(dendritic cell) 등의 세포 수를 늘리고, 체외(in vitro)에서 기능을 강화하여, 이를 다시 환자 몸에 되돌림으로써, 암을 치료하는 방법이다. 이러한 면역세포를 이용한 치료법은 면역 반응 조절 치료에 좋은 효과를 보이고, 독성 및 안전성 면에서 우수하다고 평가되고 있다. 이 중 NK 세포는 선천면역(innate immunity)을 담당하는 중요한 세포로써, T 세포와 달리 간(liver), 골수(bone marrow)에서 성숙된다. 특히, 바이러스(virus)에 감염된 세포나 종양세포(tumor cells) 등 비정상세포를 스스로 식별하여 사멸시키는 기능을 가진다. 지난 10 여 년 동안 환자들의 면역 시스템을 이용한 종양 면역치료가 꾸준히 발전되어 왔고, 이를 이용한 '세포 치료제(cell therapy product)'도 상업화되고 있다. 세포 치료제는 자가(autologous), 동종(allogeneic), 혹은 이종(xenogeneic)의 세포를 체외(in vitro)에서 증식, 선별하는 방법을 통해서, 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 일련의 행위를 통하여 치료, 진단, 예방의 목적으로 사용하는 의약품으로 정의된다(식품의약품안전처 고시 제2003-26호 제2조).
- [3] 한편, 자연살해세포 자체의 치료적 이점 및 안전성에도 불구하고, 자연살해세포는 배양이 잘 되지 않는 세포로 알려져 있으며, 대량 증식이 어렵다는 한계가 있다. 또한, 전분화능 줄기세포를 이용하여 자연살해세포로 분화시키는 시도들이 있으나, 이러한 경우 자연살해세포로의 분화 효율이 낮고, 자연살해세포 특이적인 마커의 발현이 낮아 인위적인 유전자 조작을 통하여 발현을 높이는 방법들

이 시도되고 있다. 추가로, 자연살해세포로 분화를 유도하는 경우에 이종의 피더 세포(feeder cell)를 사용하는 경우가 많아 치료제로의 적용 시 상기 피더 세포가 최종 산물에 혼입되어 안전성에 문제를 야기할 수 있다.

[4] [선행기술문헌]

[5] [특허문헌]

[6] (특허문헌 1) 대한민국공개특허 제10-2022-0050672호

[7] (특허문헌 2) 대한민국공개특허 제10-2019-0060412호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 일 양상은 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물로써, GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도용 제1배지 조성물; 및 SCF(Stem Cell Factor), IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 제2배지 조성물을 포함하는 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 다른 양상은 상기 제1배지 조성물 및 상기 제2배지 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.
- [10] 다른 양상은 상기 제1배지 조성물의 존재 하에서 전분화능 줄기세포를 배양함으로써, 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화를 유도하는 제1단계; 및 상기 제2배지 조성물의 존재 하에서 조혈모세포를 배양함으로써, 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 제2단계;를 포함하는 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.
- [11] 다른 양상은 상기 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 제공하는 것이다.
- [12] 다른 양상은 상기 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [13] 일 양상은 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물로써, GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도용 제1배지 조성물; 및 SCF(Stem Cell Factor), IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을

포함하는 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 제2배지 조성물을 포함하는 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 다른 양상은 상기 제1배지 조성물 및 상기 제2배지 조성물을 포함하는 키트를 제공하는 것이다.

[15] 다른 양상은 상기 제1배지 조성물의 존재 하에서 전분화능 줄기세포를 배양함으로써, 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화를 유도하는 제1단계; 및 상기 제2배지 조성물의 존재 하에서 조혈모세포를 배양함으로써, 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 제2단계;를 포함하는 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[16] 다른 양상은 상기 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 제공하는 것이다.

[17] 다른 양상은 상기 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[18] 일 양상에 따른 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 의하면, 자연살해세포로의 분화 효율을 증진시킬 수 있고, 인위적 feeder를 사용하지 않고, 유전자 조작없이 NK 특이 마커의 발현을 향상시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 전분화능 줄기세포로부터 자연살해세포로 분화시키는 과정에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

[20] 도 2는 줄기세포로부터 자연살해세포로 분화를 유도한 뒤 자연살해세포에 특이적인 CD마커를 확인한 결과이다.

[21] 도 3a 및 3b는 자연살해세포의 표면 수용체 발현도 및 세포질 과립의 발현도를 확인한 결과이다(PSC-NK 세포: 실시예 1의 세포, primary NK 세포: 비교예 3의 세포).

[22] 도 4는 K562 세포(혈액암 세포) 및 A2780cis 세포(난소암 세포)에서 자연살해세포의 세포 독성을 평가한 결과이다(ES-NK: 실시예 1의 세포, Cryo NK92MI: NK92MI 세포).

[23] 도 5는 SKOV3 세포(난소암 세포주)에서 자연살해세포의 세포 독성을 평가한 결과이다(ESC-NK: 실시예 1의 세포, CD34+ derived NK: UCB에서 분리된 CD34+ 세포를 이용하여 생성된 유도만능줄기세포로부터 실시예 1의 방법에 따라 분화된 NK 세포), Cryo NK92MI: NK92MI 세포).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 일 양상은 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물으로써, GSK(Glycogen synthase kinase 3) 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth

Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta(Transforming growth factor-beta) 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor), 또는 이들의 조합을 포함하는 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도용 제1배지 조성물; 및 SCF, IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 제2배지 조성물을 포함하는 배지 조성물을 제공한다. 제1배지 조성물과 제2배지 조성물은 각각 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 및 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화를 위해 별개로 사용된다.

[25] 일 구현예에 있어서, 제1배지 조성물은 하기 조성물 중 하나 이상을 포함할 수 있다:

[26] (i) GSK 억제제를 포함하는 배지 조성물;

[27] (ii) BMP4, VEGF 및 bFGF를 포함하는 배지 조성물;

[28] (iii) VEGF, bFGF, TGF-beta 억제제 및 레티노산을 포함하는 배지 조성물; 및

[29] (iv) PVA, SCF 및 bFGF를 포함하는 배지 조성물.

[30] 이때 (i) 내지 (iv)의 배지 조성물 각각은 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화를 위해 별개로 또는 동시에 사용될 수 있다.

[31] 본 명세서에서 용어 "자연살해세포(Natural Killer cells)" 또는 "NK 세포"는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구로서, 대형과립림프구(large granular lymphocyte, LGL)로 정의되고 림프계 전구세포(common lymphoid progenitor, CLP) 생성 B 및 T 림프구로부터 분화된 제3의 세포를 구성한다. 상기 "자연살해세포" 또는 "NK 세포"는 성숙한 자연살해세포뿐 아니라, 자연살해 전구세포를 포함할 수 있다. 상기 자연살해세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 대한 반응으로 활성화되고, 자연살해 세포는 "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"로 표지되는, 세포의 세포 독성 활성을 제어하는 2가지 유형의 표면 수용체를 포함한다.

[32] 자연살해세포의 활성이란 자연살해세포가 갖는 기능의 작용이 발생 또는 증가되는 것을 의미하는 것으로, 병원세포, 비특이적 감염 병원균, 암세포 등을 감지하고 이를 제거 또는 살상하는 능력을 말한다.

[33] 일 구현예에 있어서, GSK 억제제는 하기 표 1에 기재된 물질을 포함할 수 있다.

[34] [표1]

GSK 억제제	
금속 이온	베릴륨, 구리, 리튬, 수은, 텅스텐, 아연 등
ATP-competitive	- 아미노피리미딘(CHIR99021, CHIR98014, CT98014, CT98023, CT99021, TWS119 등)- 해양 생물 유래(6-BIO, 디브로모칸, 타렐린, 하이메니알데신, 인디루빈, 메리디아닌 등) - 아릴린돌말레이미드(SB-216763, SB-41528 등), - 티아졸(AR-A014418, AZD-1080 등)

	- 파울로네스(알스터폴로네, 카즈폴로네, 쉐폴론 등), - 알로이신
Non-ATP competitive	- 해양생물 유래(만자민 A, 팔리누린, 트리칸틴 등)- 티아졸리딘디온(TDZD-8, NP00111, NP031115, 타이드글루시브 등) - 할로메틸케톤(HMK-32 등) - 펩티드(L803-mts, L807-mts 등) - Unknown Mechanism(COB-187, COB-152 등)

[35]

[36]

일 구현예에 있어서, TGF-beta 억제제는 4-{4-[3-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일]-피리딘-2-일}-N-(테트라히드로-2H-피란-4-일)벤즈아마이드 수화물(4-{4-[3-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)benzamide hydrate), 4-[3-(2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]-퀴놀린(4-[3-(2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-quinoline), 2-[3-(6-메틸-2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]-1,5-나프티리딘(2-[3-(6-Methyl-2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-1,5-naphthyridine), 4-(5-벤조[1,3]디옥솔-5-일-4-피리딘-2-일-1H-이미다졸-2-일)-벤즈아미드 수화물(4-(5-Benzol[1,3]dioxol-5-yl-4-pyridin-2-yl-1H-imidazol-2-yl)-benzamide hydrate), 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아마이드 수화물(4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide hydrate), 및 4-[4-(3,4-메틸렌디옥시페닐)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아마이드 수화물(4-[4-(3,4-Methylenedioxyphenyl)-5-(2-pyridyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide hydrate), 3-(6-메틸-2-피리디닐)-N-페닐-4-(4-퀴놀리닐)-1H-피라졸-1-카보티오아마이드(3-(6-Methyl-2-pyridinyl)-N-phenyl-4-(4-quinolinyl)-1H-pyrazole-1-carbothioamide), 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘(2-(3-(6-Methylpyridine-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naphthyridine), 4-[3-(2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]-퀴놀린(4-[3-(2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]-quinoline), 2-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-2-(1,1-디메틸에틸)-1H-이미다졸-5-일]-6-메틸-피리딘(2-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2-(1,1-dimethylethyl)-1H-imidazol-5-yl]-6-methylpyridine), 2-(5-클로로-2-플루오로페닐)-4-[(4-피리딜)아미노]프티리딘(2-(5-Chloro-2-fluorophenyl)-4-[(4-yrityl)amino]pteridine), 6-[2-tert-부틸-5-(6-메틸-피리딘-2-일)-1H-이미다졸-4-일]-퀴녹살린(6-[2-tert-Butyl-5-(6-methyl-pyridin-2-yl)-1H-imidazol-4-yl]-quinoxaline), 4-{4-[3-(피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일]-피리딘-2-일}-N-(테트라히드로-2H-피란-4-일)벤즈아마이드 수화물(4-{4-[3-(Pyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl]-pyridin-2-yl}-N-(tetrahydro-2H-pyran-4-yl)benzamide hydrate), 4-[2-플루오로-5-[3-(6-메틸-2-피리디닐)-1H-피라졸-4-일]페닐]-1H-피라졸-1-에탄올(4-[2-Fluoro-5-[3-(6-methyl-2-pyridinyl)-1H-pyrazol-4-yl]phenyl]-1H-pyrazole-1-ethanol), 3-[[5-(6-메틸-2-피리디닐)-4-(6-퀴녹살리닐)-1H-이미다졸-2-일]메틸]

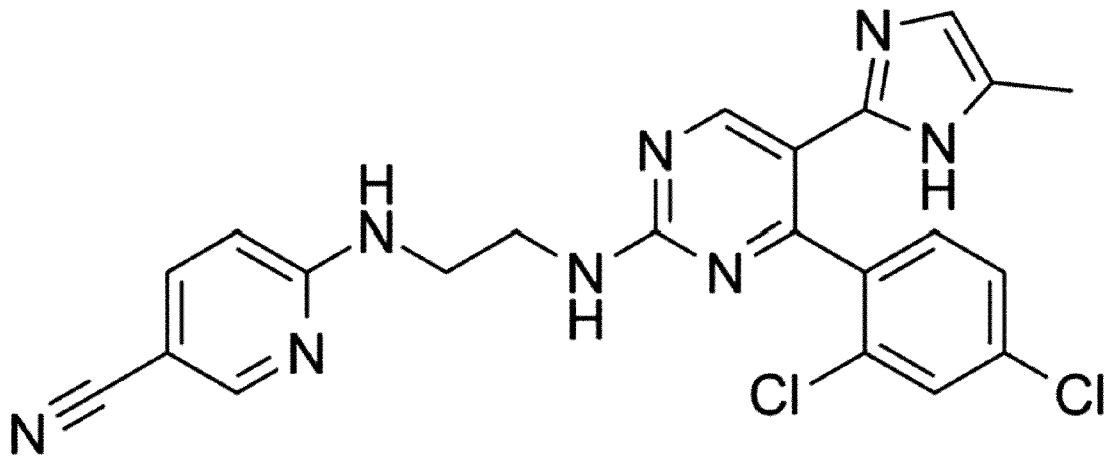
벤즈아마이드(3-[[5-(6-Methyl-2-pyridinyl)-4-(6-quinoxaliny)]-1H-imidazol-2-yl]methyl]benzamide) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[37]

[38] 본 발명의 용어 "CHIR99021"이란, 하기 화학식 1의 구조식을 갖는 화합물을 의미한다.

[39] [화학식 1]

[40]

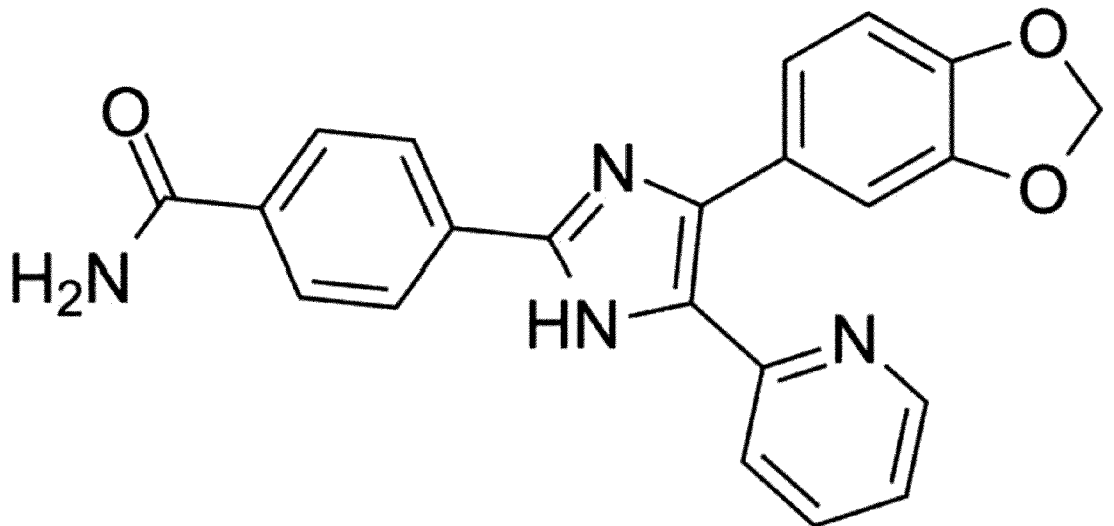


[41]

[42] 본 발명의 용어 "SB-431542"이란, 하기 화학식 2의 구조식을 갖는 화합물을 의미한다.

[43] [화학식 2]

[44]



[45] 본 발명에서 "배지"는 사용 목적에 따라 차이가 있으나 무기염류, 탄소원, 아미노산, 소 혈청알부민(BSA) 및 보조인자 등을 기본적으로 포함하는 동물세포 배양용 배지로서, 당업자들에게 잘 알려진 일반적인 배지를 모두 포함할 수 있다. 특히 바람직하게, 상기 배지는 무기염류로서 NaCl, KCl 및 NaHCO₃ 등을 포함하고, 탄소원으로서 글루코즈, 나트륨 피루베이트 및 젖산칼슘염 등을 포함하며,

아미노산으로서 글루타민을 비롯한 필수아미노산 및 비필수아미노산을 포함하며, 보조인자로서 기타 미량원소 및 완충액 등을 포함할 수 있다.

- [46] 상기 배지는 또한 항생제를 포함할 수 있다. 상기 배지로는 동물 세포 배양 용으로 공지되어 상업화된 여러 배지, 예를 들어, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), EDM(Endothelial differentiation medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등을 그대로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에 있어서, StemPro-34 SFM 배지가 사용될 수 있다.
- [47] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 GSK 억제제(예컨대, CHIR99021)의 농도는 0.1 내지 100 μ M, 0.1 내지 90 μ M, 0.1 내지 80 μ M, 0.1 내지 70 μ M, 0.1 내지 60 μ M, 0.1 내지 50 μ M, 0.1 내지 40 μ M, 0.1 내지 30 μ M, 0.1 내지 20 μ M, 0.1 내지 10 μ M, 1 내지 100 μ M, 2 내지 100 μ M, 3 내지 100 μ M, 4 내지 100 μ M, 1 내지 90 μ M, 2 내지 80 μ M, 3 내지 70 μ M, 4 내지 60 μ M, 4 내지 50 μ M, 4 내지 40 μ M, 4 내지 30 μ M, 4 내지 20 μ M, 4 내지 10 μ M, 또는 1 내지 10 μ M일 수 있다.
- [48] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 BMP4의 농도는 1 내지 1000 ng/ml, 1 내지 900 ng/ml, 1 내지 800 ng/ml, 1 내지 700 ng/ml, 1 내지 600 ng/ml, 1 내지 500 ng/ml, 1 내지 400 ng/ml, 1 내지 300 ng/ml, 1 내지 200 ng/ml, 1 내지 100 ng/ml, 10 내지 1000 ng/ml, 20 내지 1000 ng/ml, 30 내지 1000 ng/ml, 40 내지 1000 ng/ml, 10 내지 900 ng/ml, 20 내지 800 ng/ml, 30 내지 700 ng/ml, 40 내지 600 ng/ml, 40 내지 500 ng/ml, 40 내지 400 ng/ml, 40 내지 300 ng/ml, 40 내지 200 ng/ml, 40 내지 100 ng/ml 또는 10 내지 100 ng/ml일 수 있다.
- [49] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 VEGF의 농도는 1 내지 1000 ng/ml, 1 내지 900 ng/ml, 1 내지 800 ng/ml, 1 내지 700 ng/ml, 1 내지 600 ng/ml, 1 내지 500 ng/ml, 1 내지 400 ng/ml, 1 내지 300 ng/ml, 1 내지 200 ng/ml, 1 내지 100 ng/ml, 10 내지 1000 ng/ml, 20 내지 1000 ng/ml, 30 내지 1000 ng/ml, 40 내지 1000 ng/ml, 10 내지 900 ng/ml, 20 내지 800 ng/ml, 30 내지 700 ng/ml, 40 내지 600 ng/ml, 40 내지 500 ng/ml, 40 내지 400 ng/ml, 40 내지 300 ng/ml, 40 내지 200 ng/ml, 40 내지 100 ng/ml 또는 10 내지 100 ng/ml일 수 있다.
- [50] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 bFGF의 농도는 1 내지 1000 ng/ml, 1 내지 900 ng/ml, 1 내지 800 ng/ml, 1 내지 700 ng/ml, 1 내지 600 ng/ml, 1 내지 500 ng/ml, 1 내지 400 ng/ml, 1 내지 300 ng/ml, 1 내지 200 ng/ml, 10 내지 1000 ng/ml, 20 내지 1000 ng/ml, 30 내지 1000 ng/ml, 40 내지 1000 ng/ml, 10 내지 900 ng/ml, 20 내지 800 ng/ml, 30 내지 700 ng/ml, 40 내지 600 ng/ml, 40 내지 500 ng/ml, 40 내지 400 ng/ml, 40 내지 300 ng/ml, 40 내지 200 ng/ml 또는 10 내지 200 ng/ml일 수 있다.

- [51] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 레티노산의 농도는 0.05 내지 50 μM , 0.07 내지 50 μM , 0.09 내지 50 μM , 0.1 내지 50 μM , 0.3 내지 50 μM , 0.5 내지 50 μM , 0.7 내지 50 μM , 0.9 내지 50 μM , 0.05 내지 40 μM , 0.05 내지 30 μM , 0.05 내지 20 μM , 0.05 내지 10 μM , 0.05 내지 5 μM , 0.07 내지 40 μM , 0.09 내지 30 μM , 0.1 내지 20 μM , 0.3 내지 20 μM , 0.5 내지 10 μM , 0.7 내지 5 μM 또는 0.1 내지 10 μM 일 수 있다.
- [52] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 TGF-beta 억제제(예컨대, SB-431542)의 농도는 0.1 내지 500 μM , 0.1 내지 400 μM , 0.1 내지 300 μM , 0.1 내지 200 μM , 0.1 내지 100 μM , 1 내지 500 μM , 5 내지 500 μM , 5 내지 400 μM , 5 내지 300 μM , 5 내지 200 μM , 5 내지 100 μM , 5 내지 50 μM 또는 1 내지 100 μM 일 수 있다.
- [53] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 PVA의 농도는 0.002 내지 5%(w/v), 0.004 내지 2%(w/v), 0.01 내지 1%(w/v), 0.02 내지 0.8%(w/v), 0.02 내지 0.5%(w/v), 0.04 내지 0.3%(w/v), 0.05 내지 0.2%(w/v), 또는 0.07 내지 0.2%(w/v) 일 수 있다.
- [54] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물 중에 상기 SCF의 농도는 1 내지 1000 ng/ml, 1 내지 900 ng/ml, 1 내지 800 ng/ml, 1 내지 700 ng/ml, 1 내지 600 ng/ml, 1 내지 500 ng/ml, 1 내지 400 ng/ml, 1 내지 300 ng/ml, 1 내지 200 ng/ml, 5 내지 500 ng/ml, 10 내지 1000 ng/ml, 10 내지 500 ng/ml, 10 내지 250 ng/ml, 10 내지 100 ng/ml, 20 내지 100 ng/ml, 30 내지 80 ng/ml 일 수 있다.
- [55] 일 구체예에 있어서, 상기 제1배지 조성물 중에 GSK 억제제의 농도는 1 내지 10 μM , BMP4의 농도는 10 내지 100 ng/ml, VEGF의 농도는 10 내지 100 ng/ml, bFGF의 농도는 10 내지 200 ng/ml, 레티노산의 농도는 0.1 내지 10 μM , TGF-beta 억제제의 농도는 1 내지 100 μM , PVA의 농도는 0.01 내지 1%(w/v) 및 SCF의 농도는 5 내지 500 ng/ml 일 수 있다.
- [56] 일 구체예에 있어서, 제2배지 조성물 중에 상기 SCF의 농도는 1 내지 100 ng/ml, 1 내지 90 ng/ml, 1 내지 80 ng/ml, 1 내지 70 ng/ml, 1 내지 60 ng/ml, 1 내지 50 ng/ml, 1 내지 40 ng/ml, 1 내지 30 ng/ml, 3 내지 100 ng/ml, 5 내지 100 ng/ml, 7 내지 100 ng/ml, 9 내지 100 ng/ml, 11 내지 100 ng/ml, 13 내지 100 ng/ml, 15 내지 100 ng/ml, 3 내지 90 ng/ml, 5 내지 80 ng/ml, 7 내지 70 ng/ml, 9 내지 60 ng/ml, 11 내지 50 ng/ml, 13 내지 40 ng/ml, 15 내지 30 ng/ml 또는 1 내지 50 ng/ml 일 수 있다.
- [57] 일 구체예에 있어서, 제2배지 조성물 중에 상기 IL7의 농도는 1 내지 100 ng/ml, 1 내지 90 ng/ml, 1 내지 80 ng/ml, 1 내지 70 ng/ml, 1 내지 60 ng/ml, 1 내지 50 ng/ml, 1 내지 40 ng/ml, 1 내지 30 ng/ml, 3 내지 100 ng/ml, 5 내지 100 ng/ml, 7 내지 100 ng/ml, 9 내지 100 ng/ml, 11 내지 100 ng/ml, 13 내지 100 ng/ml, 15 내지 100 ng/ml, 3 내지 90 ng/ml, 5 내지 80 ng/ml, 7 내지 70 ng/ml, 9 내지 60 ng/ml, 11 내지 50 ng/ml, 13 내지 40 ng/ml, 15 내지 30 ng/ml 또는 1 내지 50 ng/ml 일 수 있다.

- [58] 일 구체예에 있어서, 제2배지 조성물 중에 상기 IL15의 농도는 1 내지 100 ng/ml, 1 내지 90 ng/ml, 1 내지 80 ng/ml, 1 내지 70 ng/ml, 1 내지 60 ng/ml, 1 내지 50 ng/ml, 1 내지 40 ng/ml, 1 내지 30 ng/ml, 1 내지 20 ng/ml, 3 내지 100 ng/ml, 5 내지 100 ng/ml, 7 내지 100 ng/ml, 9 내지 100 ng/ml, 3 내지 90 ng/ml, 5 내지 80 ng/ml, 7 내지 70 ng/ml, 9 내지 60 ng/ml 또는 1 내지 50 ng/ml일 수 있다.
- [59] 일 구체예에 있어서, 제2배지 조성물 중에 상기 FLT3L의 농도는 1 내지 100 ng/ml, 1 내지 90 ng/ml, 1 내지 80 ng/ml, 1 내지 70 ng/ml, 1 내지 60 ng/ml, 1 내지 50 ng/ml, 1 내지 40 ng/ml, 1 내지 30 ng/ml, 1 내지 20 ng/ml, 3 내지 100 ng/ml, 5 내지 100 ng/ml, 7 내지 100 ng/ml, 9 내지 100 ng/ml, 3 내지 90 ng/ml, 5 내지 80 ng/ml, 7 내지 70 ng/ml, 9 내지 60 ng/ml 또는 1 내지 50 ng/ml일 수 있다.
- [60] 일 구체예에 있어서, 상기 제2배지 조성물 중에 SCF의 농도는 1 내지 50 ng/ml, IL7의 농도는 1 내지 50 ng/ml, IL15의 농도는 1 내지 50 ng/ml 및 FLT3L의 농도는 1 내지 50 ng/ml일 수 있다.
- [61] 본 명세서에서 "양성 또는 +"는 세포 표지(마커)와 관련하여, 그 표지가 기준이 되는 다른 세포와 비교하였을 때 더 많은 양 또는 더 높은 농도로 존재하는 것을 의미하는 것일 수 있다. 세포는 어느 표지가 세포 내부 또는 표면에 존재하기 때문에 그 표지를 이용하여 그 세포를 하나 이상의 다른 세포 유형과 구별할 수 있으면, 그 표지에 대하여 양성이 될 수 있다. 또한, 세포가 배경 값보다 더 큰 값으로 신호, 예를 들면, 세포 측정 장치의 신호를 낼 수 있는 만큼의 양으로 그 표지를 가지고 있다는 것을 의미하는 것일 수 있다. 예를 들면, 세포를 CD56에 특이적인 항체로 검출 가능하게 표지 할 수 있고, 이 항체로부터의 신호가 대조군(예를 들면, 배경값)보다 검출 가능하게 더 크면, 그 세포는 "CD56에 대해 양성" 또는 "CD56+"으로 나타낼 수 있다. 용어, "음성 또는 -"는 특정 세포 표면 표지에 특이적인 항체를 사용하여도 배경 값에 비교하여 그 표지를 검출할 수 없음을 의미하는 것일 수 있다. 예를 들면, CD3에 특이적인 항체로 세포를 검출 가능하게 표지 할 수 없으면, 그 세포는 "CD3에 대해 음성" 또는 "CD3-"으로 나타낼 수 있다.
- [62] 일 구체예에 있어서, 본 발명의 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 배지 조성물에 의해 분화된 자연살해세포의 전체 세포 집단에서 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% 또는 99% 이상의 세포가 CD3에 대해 음성이고 CD56에 대해 양성인 것일 수 있다.
- [63] 일 구체예에 있어서, 본원의 자연살해세포 집단은
- [64] NKG2D가 CD3 CD56⁺ 세포 중 50%, 60%, 또는 64% 이상으로 발현되고/되거나,
- [65] Nkp30가 CD3 CD56⁺ 세포 중 50%, 70%, 80%, 또는 89% 이상으로 발현되고/되거나,
- [66] Nkp44가 CD3-CD56⁺ 세포 중 50%, 80%, 90%, 또는 94% 이상으로 발현되고/되거나,
- [67] Nkp46가 CD3 CD56⁺ 세포 중 50%, 60%, 또는 67% 이상으로 발현되고/되거나,

- [68] DNAM-1이 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 50%, 80%, 90%, 또는 94% 이상으로 발현될 수 있다.
- [69] 일 구체예에 있어서, 본원의 자연살해세포 집단은
- [70] NKG2A가 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 5%, 2%, 또는 1% 이하로 발현되고/되거나,
- [71] KIR2DL1가 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 5%, 2%, 또는 1% 이하로 발현되고/되거나,
- [72] KIR2DL2/3가 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 20%, 15%, 또는 10% 이하로 발현되고/되거나,
- [73] KIR3DL1이 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 10%, 6%, 5%, 또는 3% 이하로 발현될 수 있다.
- [74] 일 구체예에 있어서, 본원의 자연살해세포 집단은
- [75] 퍼포린이 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 50%, 80%, 90%, 또는 98% 이상으로 발현되고/되거나,
- [76] 그랜자임 비가 CD3⁺CD56⁺ 세포 중 50%, 80%, 90%, 또는 98% 이상으로 발현될 수 있다.
- [77] 일 구체예에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell; ESCs) 또는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)인 것일 수 있다. 구체적으로 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포는 인간 유래일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [78] 본 발명에서 '전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells; PSCs)'는 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 다능성(pluripotent)이거나 전능성(totipotent)이 있는 자가재생산능(self-renewal)을 갖는 줄기세포를 말하며, 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포를 포함할 수 있다. '배아줄기세포'는 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 초기 배아에서 내세포괴(inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것으로서, 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 다능성이거나 전능성이 있는 자가재생산능을 갖는다. 넓은 의미로는 배아줄기세포로부터 유래한 배아체(embryoid bodies)도 포함한다. '유도만능줄기세포'는 분화된 세포들로부터 인위적인 역분화 과정을 통해 다능성 분화능을 가지도록 유도된 세포들을 일컫는 말로서 역분화줄기세포라고도 한다. 인위적인 역분화 과정은 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 이용한 바이러스-매개 또는 비바이러스성 벡터; 또는 단백질 및 세포 추출물 등을 이용하는 비바이러스-매개 역분화 인자의 도입에 의해 수행되거나, 줄기 세포 추출물, 화합물 등에 의한 역분화 과정을 포함할 수 있다. 유도만능줄기세포는 배아줄기세포와 거의 같은 특성을 가지며, 구체적으로는 비슷한 세포 모양을 보여주며, 유전자 및 단백질 발현 패턴이 유사하며, *in vitro* 및 *in vivo*에서 전분화능을 가지며, 테라토마(teratoma)를 형성하고, 생쥐의 배반포(blastocyst)에 삽입시켰을 때, 키메라(chimera) 생쥐를 형성하고, 유전자의 생식선전이(germline transmission)가 가능하다.

- [79] 일 구체예에 있어서, 상기 배지 조성물은 IL15, ROCK(Rho-associated protein kinase) 억제제 또는 이들의 조합을 포함하는 자연살해세포의 성숙 및 증식용 제3 배지 조성물을 추가로 포함할 수 있다.
- [80] 일 구체예에 있어서, ROCK 억제제는 파수딜(Fasudil), AT-13148, BA-210, β -엘레멘(β -Elemene), 벨루모수딜(Belumodosudil), 크로만 1(Chroman 1), DJ4, GSK-576371, GSK429286A, H-1152, 하이드록시파수딜(Hydroxyfasudil), 이부프로펜(Ibuprofen), LX-7101, 네타르수딜(Netarsudil), RKI-1447, 리파수딜(Ripasudil), TCS-001, 티아조비빈(Thiazovivin), 베로수딜(Verosudil; AR-12286), Y-27632, Y-30141, Y-33075, Y-39983 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [81] 일 구체예에 있어서, 제3배지 조성물 중에 상기 ROCK 억제제(예컨대, 파수딜)의 농도는 1 내지 100 μ M, 1 내지 90 μ M, 1 내지 80 μ M, 1 내지 70 μ M, 1 내지 60 μ M, 1 내지 50 μ M, 1 내지 40 μ M, 1 내지 30 μ M, 1 내지 20 μ M, 3 내지 100 μ M, 5 내지 100 μ M, 7 내지 100 μ M, 9 내지 100 μ M, 3 내지 90 μ M, 5 내지 80 μ M, 7 내지 70 μ M, 9 내지 60 μ M 또는 1 내지 50 μ M일 수 있다.
- [82] 일 구체예에 있어서, 제3배지 조성물 중에 상기 IL15의 농도는 1 내지 200 μ g/ml, 1 내지 100 μ g/ml, 2 내지 200 μ g/ml, 5 내지 80 μ g/ml, 5 내지 60 μ g/ml, 5 내지 40 μ g/ml, 5 내지 30 μ g/ml, 10 내지 80 μ g/ml, 10 내지 60 μ g/ml, 10 내지 40 μ g/ml, 또는 10 내지 30 μ g/ml일 수 있다.
- [83] 일 구체예에 있어서, 상기 제3배지 조성물 중에 IL15의 농도는 2 내지 200 ng/ml 및 ROCK 억제제의 농도는 1 내지 100 μ g/ml일 수 있다.
- [84]
- [85] 다른 양상은 GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 제1배지 조성물의 존재 하에서 전분화능 줄기세포를 배양함으로써, 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화를 유도하는 제1단계; 및 SCF, IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 제2배지 조성물의 존재 하에서 조혈모세포를 배양함으로써, 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 제2단계;를 포함하는 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [86] 일 구체예에 있어서, 상기 제1단계에서 분화를 유도하는 동안 제1배지 조성물은 상이한 조성을 갖는 제1배지 조성물로 교체될 수 있다.
- [87] 일 구체예에 있어서, 제1배지 조성물은 하기 조성물 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [88] (i) GSK 억제제를 포함하는 배지 조성물;
- [89] (ii) BMP4, VEGF 및 bFGF를 포함하는 배지 조성물;
- [90] (iii) VEGF, bFGF, TGF-beta 억제제 및 레티노산을 포함하는 배지 조성물; 및

- [91] (iv) PVA, SCF 및 bFGF를 포함하는 배지 조성물.
- [92] 일 구체예에 있어서, 제1단계는 하기 단계를 포함할 수 있다:
- [93] (1) 세포를 GSK 억제제를 포함하는 배지 조성물에서 배양하는 단계:
- [94] (2) 세포를 BMP4, VEGF 및 bFGF를 포함하는 배지 조성물에서 배양하는 단계:
- [95] (3) 세포를 VEGF, bFGF, TGF-beta 억제제 및 레티노산을 포함하는 배지 조성물에서 배양하는 단계
- [96] (4) 세포를 PVA, SCF 및 bFGF를 포함하는 배지 조성물에서 배양하는 단계.
- [97] 이때 (1) 내지 (4) 단계는 순차적으로, 역순으로, 또는 동시에 수행될 수 있다. 상기 단계가 동시에 수행되는 경우 해당 단계들의 배지 조성물의 성분을 모두 포함하는 배지 조성물에서 세포를 배양할 수 있다.
- [98] 일 구체예에 있어서, bFGF는 각 단계별로 다른 농도로 배지 조성물에 포함될 수 있다.
- [99]
- [100] 일 구체예에 있어서, 상기 제1단계는 적어도 3일 이상, 3 내지 25일간, 5 내지 20일간 또는 12 내지 16일 간 수행될 수 있다.
- [101] 일 구체예에 있어서, 상기 (1) 단계는 1 내지 4일간, 상기 (2) 단계는 1 내지 4일간, 상기 (3) 단계는 0.5 내지 2일간, 및/또는 상기 (4) 단계는 2일 내지 24일간 수행될 수 있다.
- [102] 일 구체예에 있어서, 제2배지 조성물은 SCF, IL7, IL15 및 FLT3L를 포함할 수 있다.
- [103] 일 구체예에 있어서, 상기 제2단계는 적어도 3일 이상, 3 내지 25일간, 5 내지 20일간 또는 12 내지 16일 간 수행될 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 분화를 유도하는 방법은 IL15, ROCK 억제제(예컨대, 파수딜) 또는 이들의 조합을 포함하는 제3배지 조성물의 존재 하에서 자연살해세포를 배양함으로써, 자연살해세포를 성숙 및 증식하는 제3단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [104] 일 구체예에 있어서, 상기 제3단계는 적어도 1일 이상, 1 내지 28일간, 2 내지 25일간, 3 내지 21일, 5 내지 20일, 또는 7 내지 14일간 수행될 수 있다.
- [105] 일 구체예에 있어서, 본원의 배지 조성물은 각 성분을 다양한 농도 조합으로 포함할 수 있다.
- [106]
- [107] 다른 일 양상은 본원의 분화를 유도하는 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 제공한다. 상기 자연살해세포는 전술한 바와 같다.
- [108]
- [109] 다른 일 양상은 본원의 분화를 유도하는 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

- [110] 일 구체예에 있어서, 상기 분화를 유도하는 방법으로 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [111] 상기 "암"은 종양, 혈액암 또는 고형암을 포함하는 의미로서, 개체의 NK 세포의 시너지 활성을 손상시키거나 또는 특정 조건에서 표적 세포로서 NK 세포의 시너지 활성을 일으키지 않는 것을 포함한다. 일 구체예에서, 상기 암은 교종, 위장관기질종양, 백혈병, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 위암, 대장암, 전립선암, 난소암, 폐암, 후두암, 직장암, 간암, 담낭암, 췌장암, 신장암, 피부암, 골암, 근육암, 지방암, 섬유세포암, 혈액암, 림프종, 및 다발성골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [112] 본 명세서에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암의 발생을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [113] 본 명세서에서 용어 "치료"는 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방을 지칭하거나, 그를 포함하며, "유효 성분" 또는 용어 "약제학적 유효량"은 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방에 충분한 본원에서 제공되는 발명을 실시하는 과정에서 이용되는 조성물의 임의의 양을 의미할 수 있다.
- [114] 상기 조성물은 기존에 알려져 있는 다른 면역항원보강제를 추가로 포함할 수 있으며, 다른 면역항원보강제로는 바람직하게는 모노포스포릴 리피드 A(monophosphoryl lipid A, MPL) 및 GLA-SE(Glucopyranosyl Lipid Adjuvant, formulated in a stable nano-emulsion of squalene oil-in- water) 중 하나를 포함할 수 있다.
- [115] 상기 약학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥내, 피하, 복강 내, 흡입 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로써 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 일 양상에 따른 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 비제한적 예로서, 일 양상에 따른 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있다. 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때 예를 들어 약 1,000~10,000 세포/회, 1,000~100,000 세포/회, 1,000~1,000,000 세포/회, 1,000~10,000,000 세포/회, 1,000~100,000,000 세포/회, 1,000~1,000,000,000 세포/회, 1,000~10,000,000,000 세포/회로, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있고, 일정 시간 간격으로 여러 번 투여할 수 있다.

- [116] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 첨가물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 멸균수, 생리식염수, 관용의 완충제(인산, 구연산, 그 밖의 유기산 등), 안정제, 염, 산화방지제(아스코르브산 등), 계면활성제, 현탁제, 등장화제, 또는 보존제 등을 포함할 수 있다. 국소 투여를 위해, 생체고분자 (biopolymer) 등의 유기물, 하이드록시아파타이트 등의 무기물, 구체적으로는 콜라겐 매트릭스, 폴리락트산 중합체 또는 공중합체, 폴리에틸렌글리콜 중합체 또는 공 중합체 및 그의 화학적 유도체 등과 조합시키는 것도 포함할 수 있다. 일 구체예에 따른 약학적 조성물이 주사에 적당한 제형으로 조제되는 경우에는, 면역세포, 또는 그의 활성을 증가시키는 물질은 약학적으로 허용가능한 담체 중에 용해되어 있거나 또는 용해되어 있는 용액상태로 동결된 것일 수 있다.
- [117] 상기 약학적 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해 보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 환원제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., 1995]에 상세히 기재되어 있다. 상기 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.
- [118] 일 구체예에 있어서, 상기 분화를 유도하는 방법에 따른 방법으로 분화된 자연 살해세포 또는 그의 세포 집단을 유효성분으로 포함하는 감염성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [119] 본 명세서에서 용어 "질환"은 하나의 병리적 상태, 특히 암, 감염성 질환, 염증성 질환, 대사성 질환, 자가면역성 장애, 퇴행성 질환, 세포사멸 관련 질환 및 이식편 거부를 의미할 수 있다.
- [120] 본 명세서에서 용어 "감염성 질환"은 박테리아, 바이러스, 곰팡이 등과 같은 유기체에 의한 감염성 질환을 통칭할 수 있다. 예를 들어, HIV(Human Immunodeficiency Virus), EBV(Epstein-Barr virus), HHV(Human Herpes Virus), IAV(Influenza A virus), COV-19 와 같은 바이러스성 감염의 경우, 자연살해세포의 활성화 수용체인 NKp46, NKp44, 또는 NKp30 등이 바이러스의 당단백질(viral glycoprotein)과 결합 및 활성화되어 감염세포의 사멸을 유도할 수 있다. 또한, 예를 들어 CMV(Cytomegalovirus), EMCV(Encephalomyocarditis virus)와 같은 바이러스성 감염의 경우, 자연살해세포의 FASL, TRAIL 등이 바이러스 감염 세포에서 증가된 세포사멸수용체(death receptor)와 결합하여 감염세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[121]

- [122] 다른 일 양상은 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 키트로써, GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도용 제1배지 조성물; 및 SCF, IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 제2배지 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 제1배지 조성물, 제2배지 조성물, 및 각 성분 등에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [123] 본원에서 제1배지 조성물과 제2배지 조성물은 키트 내에 분리되어 포함될 수 있다. 또한, 제1배지 조성물이 (i) 내지 (iv)의 배지 조성물을 포함하는 경우 (i) 내지 (iv)의 배지 조성물도 서로 키트 내에 분리되어 포함될 수 있다.
- [124]
- [125] 다른 일 양상은 GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 제1배지 조성물의 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도 용도이다.
- [126] 다른 일 양상은 SCF, IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 제2배지 조성물의 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도 용도이다.
- [127] 다른 일 양상은 IL15, ROCK(Rho-associated protein kinase 억제제 또는 이들의 조합을 포함하는 제3배지 조성물의 자연살해세포의 성숙 및 증식 용도이다.
- [128] 제1배지 조성물, 제2배지 조성물, 제3배지 조성물 및 각 성분 등에 대해서는 전술한 바와 같다.

발명의 실시를 위한 형태

- [129] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [130] 본 발명의 명세서 및 청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 아니하며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.
- [131] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [132] 본 발명의 명세서 전체에 있어서, "A 및/또는 B"는, A 또는 B, 또는 A 및 B를 의미한다.
- [133]
- [134] **실시예 1: 인간 전분화능 줄기세포 유래 자연살해세포**
- [135] 전분화능 줄기세포로부터 자연살해세포로 분화시키는 과정에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다. 구체적으로 인간 전분화능 줄기세포를 배양하여 조혈모세포로 분화시키고, 조혈모세포를 배양하여 자연살해세포로 분화시켰다. 자연살해세포로 분화시킨 후 성숙 및 증식시켰다.
- [136] **1.1. 조혈모세포(hematopoietic stem cells; HSCs)로의 분화**
- [137] 인간 전분화능 줄기세포(Human pluripotent stem cells; hPSCs)를 stemMACS-iPS brew media로 2일 간 유지하였다. 분화 기본 배양액은 Stempro34-SFM(+stempro sup) + 200 µg/ml human Transferrin + 2 mM L-glutamine + 0.5 mM L-Ascorbic acid + 0.45 mM MTG(1-thioglycerol) + 1% penicillin/streptomycin 로 하였다.
- [138] 중간엽을 유도한다고 알려진 GSK 억제제인 CHIR99021를 5 µM 농도로 단독으로 2일간 처리하였다. 추가로 세포를 BMP4 50 ng/ml, VEGF 50 ng/ml 및 bFGF 100 ng/ml로 첨가한 분화 배양액에 2일 간 처리하였다. 그 후, 다음 하루 동안 VEGF 50 ng/ml, bFGF 50 ng/ml, SB-431542 10 µM 및 레티노산(Retinoic acid) 1 µM로 첨가한 배양액에서 배양하였다. 배양 후 5일째부터 12일째까지 PVA 0.1%(w/v, g/ml), SCF 50 ng/ml 및 bFGF 10 ng/ml로 첨가한 배양액에서 매일 배양액을 교체하면서 배양하였다.
- [139] **1.2. 자연살해세포로의 분화**
- [140] HSCs 유도 후 분화 기본 배양액은 HSC유도와 동일한 배양액을 사용하였다. 기본 배양액에 SCF 20 ng/ml, IL-7 20 ng/ml, IL-15 10 ng/ml 및 FLT3L 10 ng/ml로 첨가하여 2일에 한 번씩 배양액을 교체하면서 2주간 배양하였다.
- [141] **1.3. 자연살해세포의 성숙(maturation) 및 증식(expansion)**
- [142] 자연살해세포로 분화 후 부유한 세포만 수확하여 cell culture dish에 Alys505NK-EX(1000 IU/ml IL-2 함유) + 10%(w/v) FBS를 기본 배양액으로 하여, ROCK 억제제인 Fasudil을 10 µM로, IL-15를 20µg/ml로 첨가하여 1주에서 2주간 배양하였다.
- [143] 상기 방법을 통하여 실시예 1의 NK 세포를 수득하였다.
- [144]
- [145] **비교예 1 내지 4: 인간 말초혈액에서 분리된 자연살해세포**
- [146] 문헌[Jung, D., Baek, Y.S., Lee, I.J. et al. Ex vivo expanded allogeneic natural killer cells have potent cytolytic activity against cancer cells through different receptor-ligand interactions. *J Exp Clin Cancer Res* 40, 333 (2021)]에 개시된 방법에 따라 자연살해세포를 분리하였다.
- [147] **NK 세포의 분리**

- [148] 인간 말초혈액 단핵구(Peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 분리백혈구 성분채집술을 통해 4명의 건강한 기증자로부터 수집하였다. 모든 건강한 기증자는 연구를 수행하기 전에 서면 동의서를 제공하였다. CD3-CD56+ primary NK(pNK) 세포는 폐쇄 및 자동화 플랫폼인 Prodigy(Miltenyi Biotec)를 사용하여 anti-CD3 항체(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 및 anti-CD56 항체(Miltenyi Biotec)로 CD3-/CD56+ 선택을 통해 수득하였다.
- [149] 분리된 primary NK 세포를 비교예 1로 하였다. 분리한 primary NK세포를 동결보존한 세포를 비교예 2로 하였다.
- [150] **NK 세포의 활성화, 증식 및 동결**
- [151] NK 세포를 활성화시키는 γ -글로불린(Green-cross, 한국 용인) 및 anti-NKp46(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)이 코팅된 플라스크에 비교예 2의 NK 세포를 접종하고 1000 IU/mL 재조합 인간 IL-2(Novartis, Basel, Switzerland), 50 ng/mL 재조합 인간 IL-18(R&D system, Minneapolis, MN, USA) 및 5% 가열 불활성화 자가 혈장이 첨가된 Alys505NK-EX 무혈청 배지(CSTI, Sendai, Japan)에서 배양하였다. 새로운 배양 배지를 세포 밀도(2×10^6 cells/mL)에 따라 1 내지 3 일마다 첨가하였다. 6일째에 배양백(NIPRO, Osaka, Japan)에 세포를 옮겨 14일 동안 배양하였다. 배양된 NK 세포를 Cryostor CS5(BioLife Solutions, Bothell, WA, USA)로 동결보존하였다. 배양백에 옮겨 14일 동안 배양한 세포를 비교예 3으로 하였고, 비교예 3의 세포를 동결보존한 세포를 비교예 4로 하였다.
- [152]
- [153] **비교예 5: NK-92MI**
- [154] 인간 자연살해 세포주인 NK-92MI는 ATCC(American Type Culture Collection, USA)에서 구입하여 사용하였다.
- [155]
- [156] **실험예 1: NK 세포 특이 마커의 확인**
- [157] 실시예 1에서 수득한 세포가 NK 세포로 분화되었는지를 확인하기 위하여, NK 세포에 특이적인 CD마커를 FACS(형광표지세포분류기, Fluorescence-activated cell sorting, BD FACSCalibur™)를 이용하여 확인하였다. 구체적으로, 전체 NK 세포 분화 33일째 모든 세포를 수확하여 CD marker를 분석하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [158] 도 2에 나타낸 바와 같이, 분석된 97% 이상의 세포가 CD45 양성인 말초 백혈구로 분화되었으며, NK 세포 특이 마커인 CD3 CD56⁺ 세포가 97% 이상 확인되었다. 또한, NK 세포의 항체 의존성 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 기능을 유도하는 CD16이 56% 발현되었음을 알 수 있었다.
- [159] 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 조성물을 사용함으로써 인해 효과적으로 전분화능 줄기세포로부터 NK 세포로 분화시킬 수 있는 것을 알 수 있었다.
- [160]

[161] 실험예 2: NK 세포 표현형 확인

- [162] 상기 실시예 1에서 수득한 세포의 표면 수용체 발현도 및 세포질 과립의 발현도를 유세포분석으로 확인하였다. Primary NK 세포와의 비교를 위해 비교예 3 및 비교예 5의 세포를 이용하여 동일하게 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 3a 및 3b에 나타내었다.
- [163] 도 3a 및 3b에 나타낸 바와 같이, 실시예 1의 세포의 활성화 수용체(Activating receptor)의 발현은 CD56⁺ 세포 중 64% NKG2D, 89% NKp30, 94% NKp46, 및 94% DNAM-1의 발현이 확인되었고, 억제 수용체(Inhibitory receptor)의 발현은 CD56⁺ 세포 중 NKG2A와 KIR2DL1은 1% 이하로 발현이 확인되었고, 9% KIR2DL2/3 및 3% KIR3DL1의 발현이 확인되었다.
- [164] 세포질 과립(Cytolytic granule)인 퍼포린(Perforin)과 그랜자임 비(Granzyme B)의 경우 각각 98%, 99% 이상의 발현이 확인되었다.
- [165] 실시예 1의 세포는 비교예 3의 활성화된 primary NK 세포와 비교해서는 활성화 수용체가 64% 내지 94%로 다소 낮게 발현되었으나, 비교예 5의 NK-92MI (NKp46, 4%; NKp44, 27%; DNAM-1, 4%)와 비교하여서는 비교적 높은 발현율을 보였다. 실시예 1의 세포의 억제성 수용체의 경우 primary NK 세포 보다 훨씬 더 낮게 발현되었음을 알 수 있었다. 실시예 1의 세포의 세포질 과립은 높게 발현되어 primary NK 세포와 유사한 특징을 가지는 것을 알 수 있었다.
- [166] 이를 통해, 실시예 1의 NK 세포는 비교예 5의 NK 세포보다 우수한 특징을 가지며, 활성화된 비교예 3의 NK 세포와 유사하거나 더 우수한 특징을 가짐을 알 수 있었다.

[167]

[168] 실험예 3: 세포 독성 확인

[169]

[170] **3-1. K562 세포주 및 A2780cis 세포주**

- [171] 세포 독성은 NK 세포에 대한 감수성이 높아 NK 세포의 활성화 측정에 주로 사용되고 있는 K562 세포(인간 만성 골수성 백혈병 세포주) 및 시스플라틴-내성 난소암 세포 A2780cis(난소암 세포주)를 대상으로 수행하였다. 먼저, 타겟 암세포(K562 또는 A2780cis)를 수거하여 1500rpm으로 5분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 그 다음 세포 펠렛을 DPBS로 희석하여 세척하고, 세척한 후의 세포 펠렛을 페놀레드가 포함되지 않은 RPMI 배지에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 부유하였다. 조건 당 1×10^5 개의 세포를 준비하고, CFSE(Life technologies) 5 μ M의 농도로 5% CO₂ 조건에서 인큐베이터에서 10분간 정치하여 염색하였다. 이후 세포를 DPBS로 두 번 세척한 다음 페놀레드가 포함되지 않은 RPMI 배지에 10% FBS가 첨가된 배양액으로 희석하였다. 활성화 NK 세포는 타겟 세포와의 E:T(Effector cell:Target cell) 비율(0:1, 1:1, 5:1, 10:1)에 따라 준비하고, 24-웰 플레이트에 타겟 세포와 함께 분주하여 섞어주었다. 그 다음 활성화 NK 세포

와 타겟 세포를 4시간 동안 반응을 시키고, 반응이 끝나기 20분 전에 7AAD(7-Aminoactinomycin D)를 상기 세포에 처리하였다. 반응이 끝난 후에는 세포를 5 ml FACS 튜브에 수거하고, 유세포 분석기를 통하여 세포의 살상능을 분석하였다.

[172] 그 결과를 도 4 및 표 2에 나타내었다.

[173] 표 2에서 알 수 있듯이, 실시예 1의 NK 세포는 혈액암인 K562 세포주에 대하여 10:1 비율에서 91%의 세포독성을 보였으며, 항암제 내성 난소암 세포주인 A2780cis 세포주에서는 74%의 세포독성을 보이는 것으로 나타났다. 활성화된 비교예 3 및 비교예 4의 primary NK 세포는 K562 세포주에 대하여 10:1 비율에서 각각 93.22% 및 80.5%의 세포독성을 나타냈고, 비교예 2의 primary NK 세포는 K562 세포주에 대하여 10:1 비율에서 17.1%의 세포독성을 나타내었다. 상기 결과로부터 실시예 1의 NK 세포는 비교예 2 내지 4의 primary NK 세포와 비교하여 유사하거나 보다 우수한 세포 독성을 갖는 것을 알 수 있었다.

[174] 또한, 도 4에서 알 수 있듯이, 실시예 1의 세포는 비교예 5의 NK92MI 세포에 비하여 유의하게 세포독성이 높은 것으로 나타나, 실시예 1의 세포는 우수한 세포 독성을 갖는 것을 알 수 있었다.

[175] [표2]

세포 독성(%) (E:T=10:1)	실시예 1	비교예 2	비교예 3	비교예 4	비교예 5
K562	91.84	17.1	93.22	80.5	34.24
A2780cis	74.3	-	60.2	58.5	34.2

[176] -은 미측정을 의미함.

[177]

[178] 이를 통해 실시예 1의 NK 세포는 비교예 5의 다른 NK 세포보다 우수한 특징을 가지며, 비교예 3 및 4의 활성화된 primary NK 세포와 유사하거나 더 우수한 특징을 가짐을 알 수 있었다.

[179]

[180] 3-2. SKOV3 세포주

[181] 상기 실험예 3-1에 기재된 NK 세포의 활성 측정 방법(cytotoxicity assay)을 SKOV3 세포(난소암 세포주)를 대상으로 수행하였다. 구체적으로, 활성화 NK 세포와 SKOV3 세포를 E:T 비율(0:1, 1:1, 5:1, 10:1)로 반응시켜 NK 세포의 살상능을 분석하였다.

[182] 그 결과 Primary NK 세포나 NK92MI 세포의 경우 SKOV3 세포주에 대한 세포 독성 활성이 낮은 반면, 본 발명의 방법에 따라 분화된 실시예 1의 NK 세포(ESC-NK) 및 iPSC 유래 NK 세포(CD34+ derived NK 세포)는 E:T ratio 10:1 에서 SKOV3 세포주에 대한 세포 독성이 65~82%로 매우 높은 것으로 나타났다(도 5). 여기서

CD34⁺ derived NK 세포는 UCB에서 분리된 CD34⁺ 세포를 이용하여 생성된 iPSC로부터 실시예 1의 방법에 따라 분화된 NK 세포이다. 이러한 결과로부터 본 발명의 방법에 따라 ESC 또는 iPSC로부터 분화된 NK 세포는 다른 NK 세포보다 우수한 세포독성을 가짐을 알 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 키트로써, GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도용 제1배지 조성물; 및 SCF, IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 제2배지 조성물을 포함하는, 키트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 제1배지 조성물 중에 GSK 억제제의 농도는 1 내지 10 μ M, BMP4의 농도는 10 내지 100 ng/ml, VEGF의 농도는 10 내지 100 ng/ml, bFGF의 농도는 10 내지 200 ng/ml, 레티노산의 농도는 0.1 내지 10 μ M, TGF-beta 억제제의 농도는 1 내지 100 μ M, PVA의 농도는 0.01 내지 1%(w/v) 및 SCF의 농도는 5 내지 500 ng/ml인 것인, 키트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 제2배지 조성물 중에 SCF의 농도는 1 내지 50 ng/ml, IL7의 농도는 1 내지 50 ng/ml, IL15의 농도는 1 내지 50 ng/ml 및 FLT3L의 농도는 1 내지 50 ng/ml인 것인, 키트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 분화된 자연살해세포의 전체 세포 집단 내 90% 이상의 세포가 CD3에 대해 음성이고 CD56에 대해 양성인 것인, 키트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 전분화능 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell; ESCs) 또는 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells; iPSCs)인 것인, 키트.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1배지 조성물과 제2배지 조성물은 키트 내에 분리되어 포함되는, 키트.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, IL15, ROCK 억제제, 또는 이들의 조합을 포함하는 자연살해세포의 성숙 및 증식용 제3배지 조성물을 추가로 포함하는, 키트.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 제3배지 조성물 중에 상기 ROCK 억제제의 농도는 1 내지 50 μ M인 것인, 키트.
- [청구항 9] GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell

Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 제1배지 조성물의 존재 하에서 전분화능 줄기세포를 배양함으로써, 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화를 유도하는 제1단계; 및

SCF(Stem Cell Factor), IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 제2배지 조성물의 존재 하에서 조혈모세포를 배양함으로써, 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 제2단계;

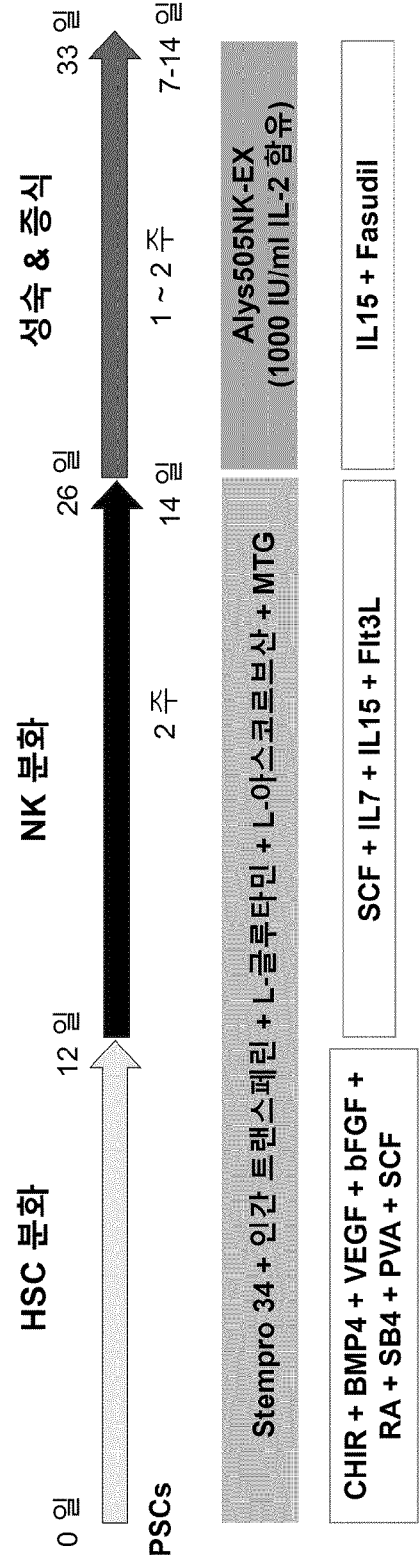
를 포함하는 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화를 유도하는 방법.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 제1단계는 5 내지 20일간 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 제2단계는 5 내지 20일간 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 12] 제9항에 있어서,
IL15, Rock 억제제, 또는 이들의 조합을 포함하는 제3배지 조성물의 존재 하에서 자연살해세포를 배양함으로써, 자연살해세포를 성숙 및 증식하는 제3단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 제3단계는 5 내지 20일간 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 14] 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단.
- [청구항 15] 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 암은 교종, 위장관기질종양, 백혈병, 유방암, 자궁암, 자궁경부암, 위암, 대장암, 전립선암, 난소암, 폐암, 후두암, 직장암, 간암, 담낭암, 췌장암, 신장암, 피부암, 골암, 근육암, 지방암, 섬유세포암, 혈액암, 림프종, 및 다발성골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 전분화능 줄기세포에서 분화된 자연살해세포 또는 그의 세포 집단을 유효성분으로 포함하는 감염성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 전분화능 줄기세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 조성물으로써,
GSK 억제제, BMP4(Bone Morphogenetic Protein 4), VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF(Basic Fibroblast Growth Factor), 레티노산(Retinoic acid), TGF-beta 억제제, PVA(polyvinyl alcohol), SCF(Stem Cell

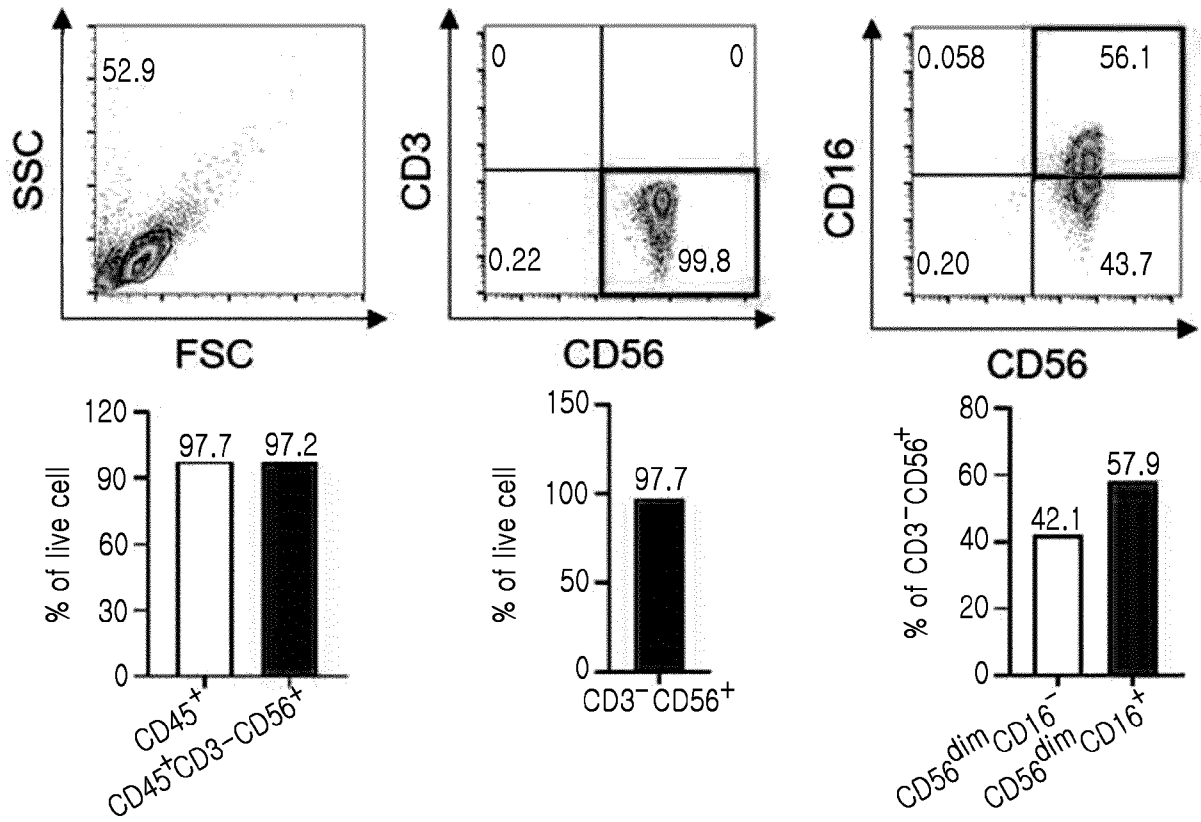
Factor) 또는 이들의 조합을 포함하는 전분화능 줄기세포에서 조혈모세포로의 분화 유도용 제1배지 조성물; 및

SCF(Stem Cell Factor), IL7(Interleukin7), IL15(Interleukin15), FLT3L(FMS-like tyrosine kinase 3 ligand) 또는 이들의 조합을 포함하는 조혈모세포에서 자연살해세포로의 분화 유도용 제2배지 조성물을 포함하는, 조성물.

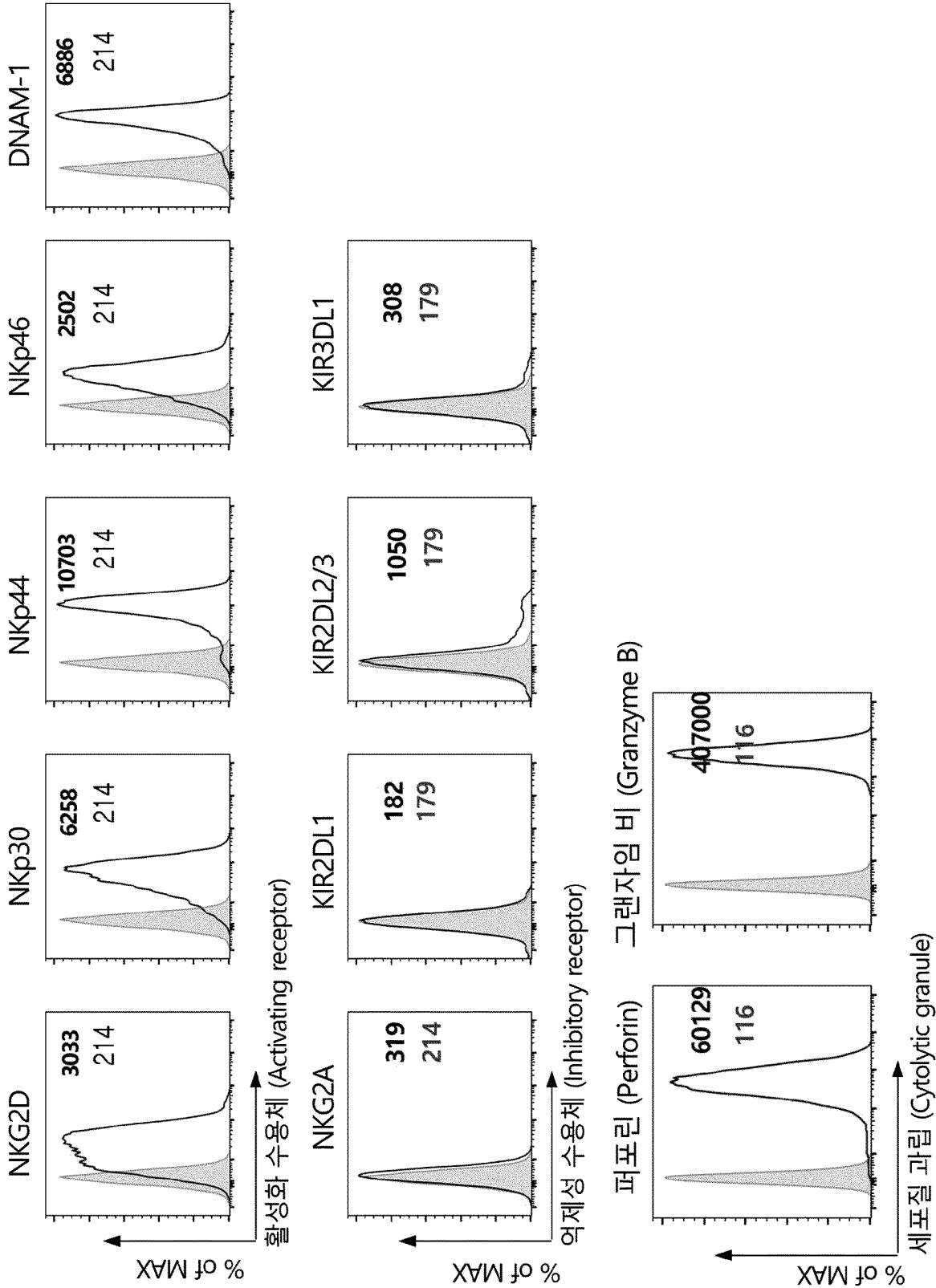
[도 1]



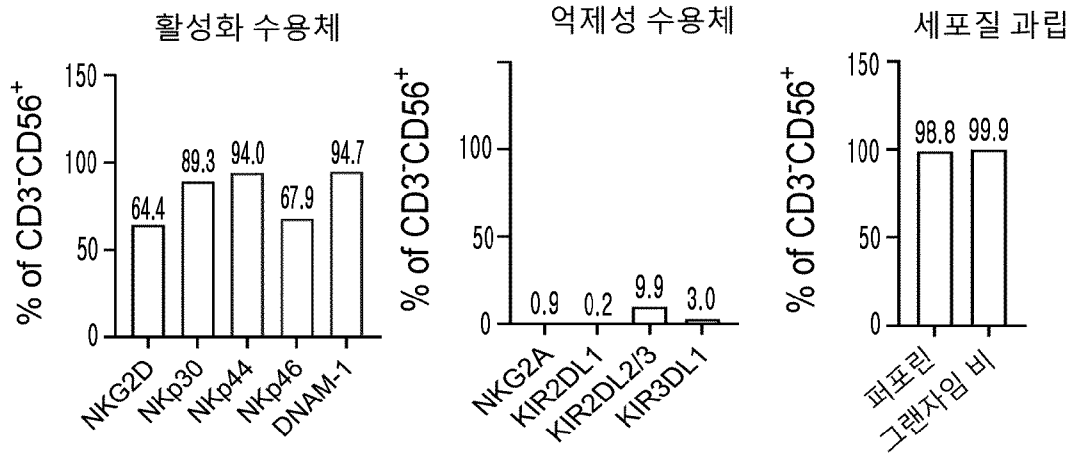
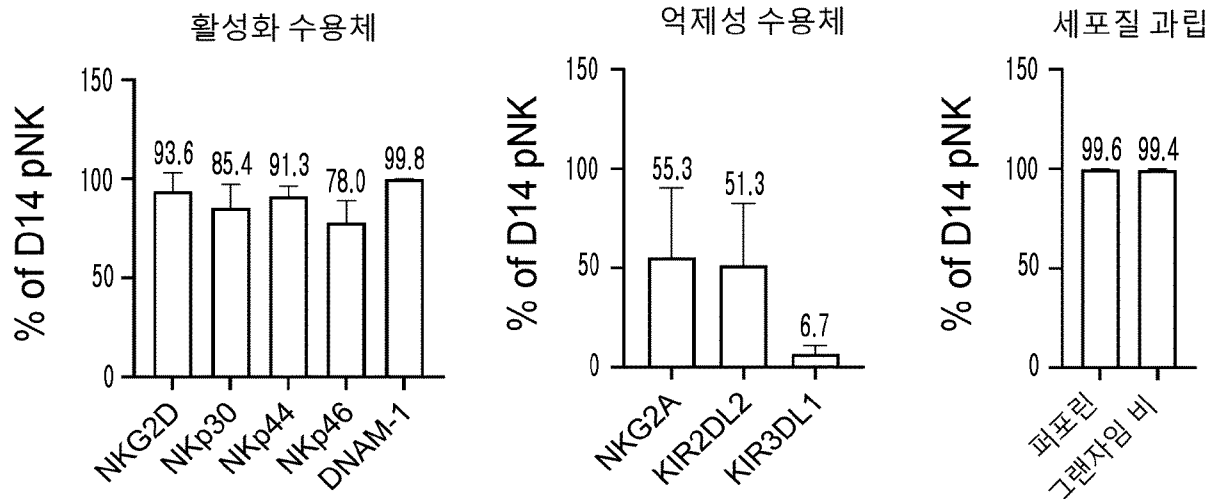
[도2]



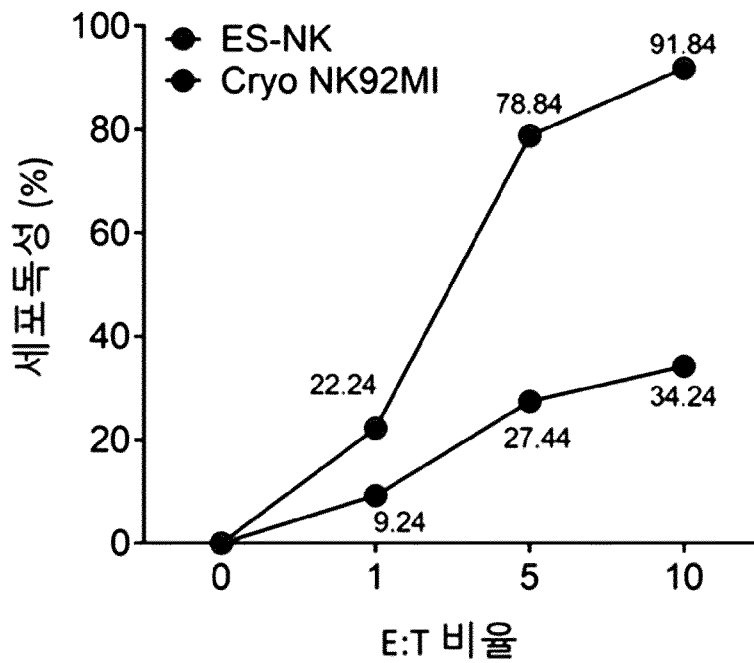
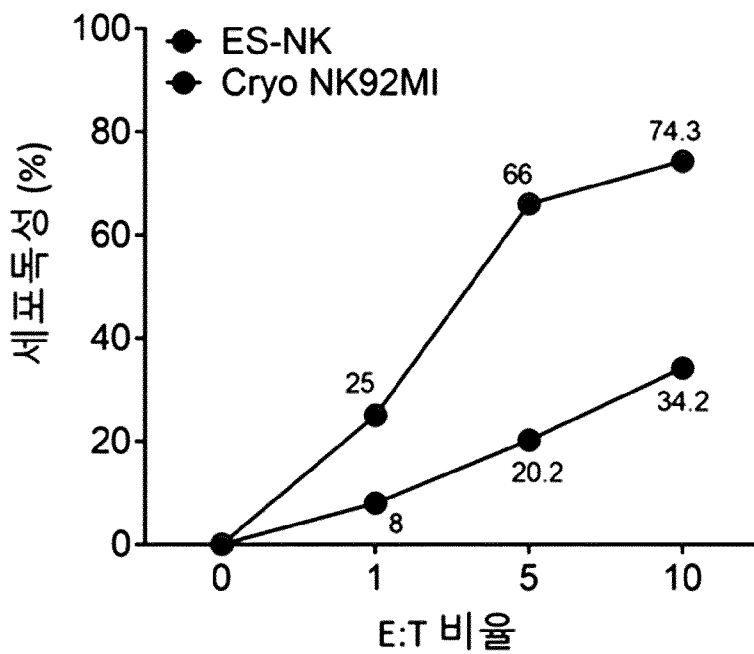
[도 3a]



[도3b]

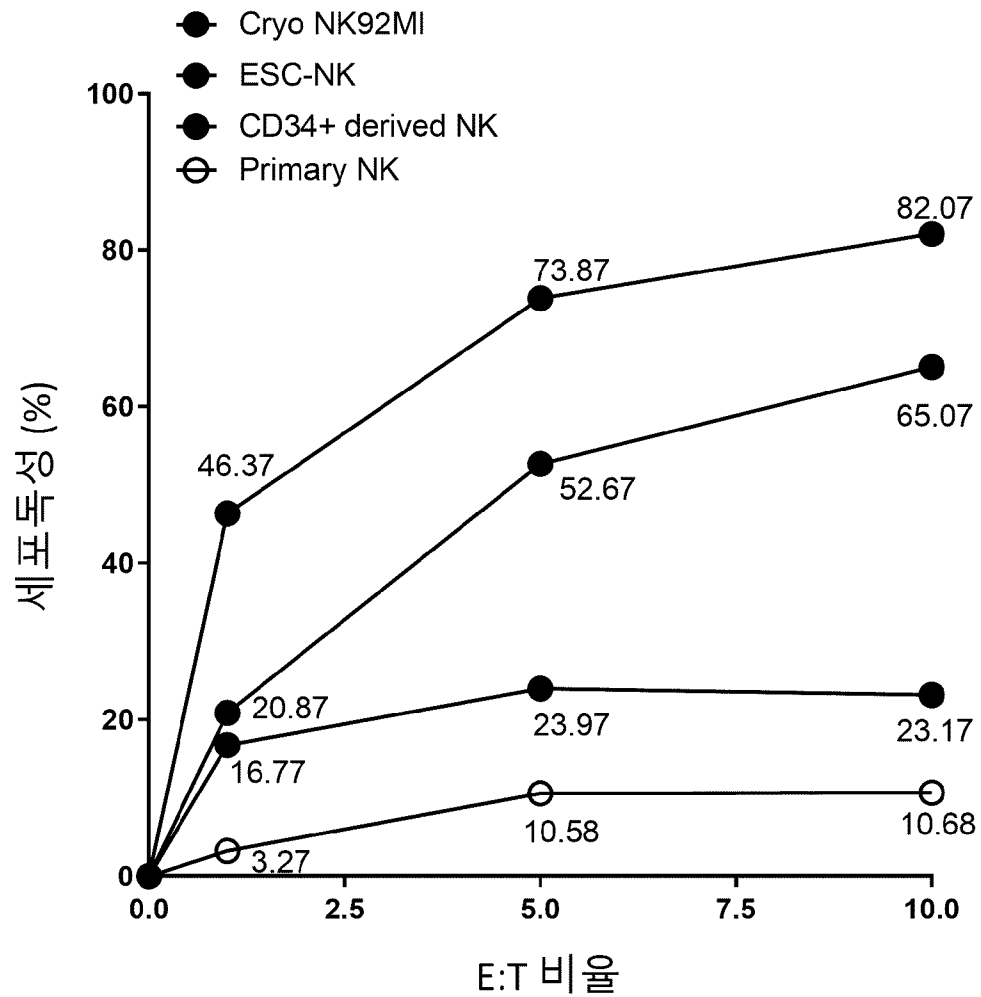
PSC-NK 세포**Primary NK 세포 (JECRC, 2021 참고)**

[도4]

K562: 백혈병 세포주**A2780cis: 난소암 세포주**

[도5]

SKOV3 난소암 세포주



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/017981

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 5/0783(2010.01); A61K 38/17(2006.01); C07K 14/725(2006.01); G01N 33/569(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell, PSC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC), 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC), 자연살해세포(natural killer cell, NK cell), 분화(differentiation), GSK 억제제(GSK inhibitor), ROCK 억제제(ROCK inhibitor)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2018-0066263 A (FATE THERAPEUTICS, INC.) 18 June 2018 (2018-06-18) See abstract; claims 1, 11-17, 131, 133 and 135-140; and paragraphs [0197], [0199] and [0258].	1-18
A	EP 4083063 A2 (FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC.) 02 November 2022 (2022-11-02) See entire document.	1-18
A	WO 2022-187682 A2 (THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 09 September 2022 (2022-09-09) See entire document.	1-18
A	KR 10-2019-0057387 A (FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC.) 28 May 2019 (2019-05-28) See entire document.	1-18
A	KR 10-2018-0063333 A (FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC.) 11 June 2018 (2018-06-11) See entire document.	1-18
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 February 2024		Date of mailing of the international search report 08 February 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/017981

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2018-0066263	A	18 June 2018	CN	108473961	A	31 August 2018
				CN	108473961	B	29 November 2022
				CN	115927199	A	07 April 2023
				EP	3371301	A1	12 September 2018
				EP	3371301	A4	26 June 2019
				JP	2018-533363	A	15 November 2018
				JP	2022-058480	A	12 April 2022
				US	10858628	B2	08 December 2020
				US	10947505	B2	16 March 2021
				US	11162075	B2	02 November 2021
				US	11162076	B2	02 November 2021
				US	2018-0320137	A1	08 November 2018
				US	2021-0024891	A1	28 January 2021
				US	2021-0062151	A1	04 March 2021
				US	2021-0222126	A1	22 July 2021
				US	2021-0230549	A1	29 July 2021
				WO	2017-078807	A1	11 May 2017
EP	4083063	A2	02 November 2022	CN	110891967	A	17 March 2020
				EP	3612557	A1	26 February 2020
				EP	3612557	B1	19 January 2022
				EP	4083063	A3	04 January 2023
				JP	2020-517237	A	18 June 2020
				JP	7181219	B2	30 November 2022
				KR	10-2019-0141190	A	23 December 2019
				US	2020-0123501	A1	23 April 2020
				WO	2018-195175	A1	25 October 2018
WO	2022-187682	A2	09 September 2022	EP	4301847	A2	10 January 2024
				WO	2022-187682	A3	13 October 2022
KR	10-2019-0057387	A	28 May 2019	CN	110023491	A	16 July 2019
				EP	3523423	A1	14 August 2019
				JP	2019-528771	A	17 October 2019
				JP	2022-078215	A	24 May 2022
				JP	7212615	B2	25 January 2023
				KR	10-2598351	B1	08 November 2023
				US	2020-0263139	A1	20 August 2020
				WO	2018-067836	A1	12 April 2018
KR	10-2018-0063333	A	11 June 2018	CN	108350429	A	31 July 2018
				CN	108350429	B	25 February 2022
				CN	108431211	A	21 August 2018
				EP	3365433	A1	29 August 2018
				EP	3365435	A1	29 August 2018
				EP	3365435	B1	13 January 2021
				JP	2018-531020	A	25 October 2018
				JP	2018-531025	A	25 October 2018
				JP	2021-151254	A	30 September 2021
				JP	6976939	B2	08 December 2021
				JP	7061961	B2	02 May 2022
				JP	7212722	B2	25 January 2023
				KR	10-2018-0063332	A	11 June 2018
				US	10865381	B2	15 December 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/017981

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		US 10947502 B2	16 March 2021
		US 2017-0107492 A1	20 April 2017
		US 2018-0305664 A1	25 October 2018
		US 2021-0017494 A1	21 January 2021
		WO 2017-070333 A1	27 April 2017
		WO 2017-070337 A1	27 April 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/0783(2010.01)i; C12N 5/0789(2010.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0783(2010.01); A61K 38/17(2006.01); C07K 14/725(2006.01); G01N 33/569(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell, PSC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC), 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC), 자연살해세포(natural killer cell, NK cell), 분화(differentiation), GSK 억제제(GSK inhibitor), ROCK 억제제(ROCK inhibitor)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2018-0066263 A (페이트 세리퓨틱스, 인코포레이티드) 2018.06.18 요약; 청구항 1, 11-17, 131, 133, 135-140; 단락 [0197], [0199], [0258]	1-18
A	EP 4083063 A2 (FUJIFILM CELLULAR DYNAMICS, INC.) 2022.11.02 전체 문헌	1-18
A	WO 2022-187682 A2 (THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2022.09.09 전체 문헌	1-18
A	KR 10-2019-0057387 A (후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드) 2019.05.28 전체 문헌	1-18
A	KR 10-2018-0063333 A (후지필름 셀룰러 다이내믹스, 인코포레이티드) 2018.06.11 전체 문헌	1-18
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년02월08일(08.02.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년02월08일(08.02.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2018-0066263 A	2018/06/18	CN 108473961 A	2018/08/31
		CN 108473961 B	2022/11/29
		CN 115927199 A	2023/04/07
		EP 3371301 A1	2018/09/12
		EP 3371301 A4	2019/06/26
		JP 2018-533363 A	2018/11/15
		JP 2022-058480 A	2022/04/12
		US 10858628 B2	2020/12/08
		US 10947505 B2	2021/03/16
		US 11162075 B2	2021/11/02
		US 11162076 B2	2021/11/02
		US 2018-0320137 A1	2018/11/08
		US 2021-0024891 A1	2021/01/28
		US 2021-0062151 A1	2021/03/04
		US 2021-0222126 A1	2021/07/22
		US 2021-0230549 A1	2021/07/29
		WO 2017-078807 A1	2017/05/11
EP 4083063 A2	2022/11/02	CN 110891967 A	2020/03/17
		EP 3612557 A1	2020/02/26
		EP 3612557 B1	2022/01/19
		EP 4083063 A3	2023/01/04
		JP 2020-517237 A	2020/06/18
		JP 7181219 B2	2022/11/30
		KR 10-2019-0141190 A	2019/12/23
		US 2020-0123501 A1	2020/04/23
		WO 2018-195175 A1	2018/10/25
WO 2022-187682 A2	2022/09/09	EP 4301847 A2	2024/01/10
		WO 2022-187682 A3	2022/10/13
KR 10-2019-0057387 A	2019/05/28	CN 110023491 A	2019/07/16
		EP 3523423 A1	2019/08/14
		JP 2019-528771 A	2019/10/17
		JP 2022-078215 A	2022/05/24
		JP 7212615 B2	2023/01/25
		KR 10-2598351 B1	2023/11/08
		US 2020-0263139 A1	2020/08/20
		WO 2018-067836 A1	2018/04/12
KR 10-2018-0063333 A	2018/06/11	CN 108350429 A	2018/07/31
		CN 108350429 B	2022/02/25
		CN 108431211 A	2018/08/21
		EP 3365433 A1	2018/08/29
		EP 3365435 A1	2018/08/29
		EP 3365435 B1	2021/01/13
		JP 2018-531020 A	2018/10/25
		JP 2018-531025 A	2018/10/25
		JP 2021-151254 A	2021/09/30
		JP 6976939 B2	2021/12/08
		JP 7061961 B2	2022/05/02
		JP 7212722 B2	2023/01/25
		KR 10-2018-0063332 A	2018/06/11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 10865381 B2	2020/12/15
		US 10947502 B2	2021/03/16
		US 2017-0107492 A1	2017/04/20
		US 2018-0305664 A1	2018/10/25
		US 2021-0017494 A1	2021/01/21
		WO 2017-070333 A1	2017/04/27
		WO 2017-070337 A1	2017/04/27
