

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 8월 4일 (04.08.2016)



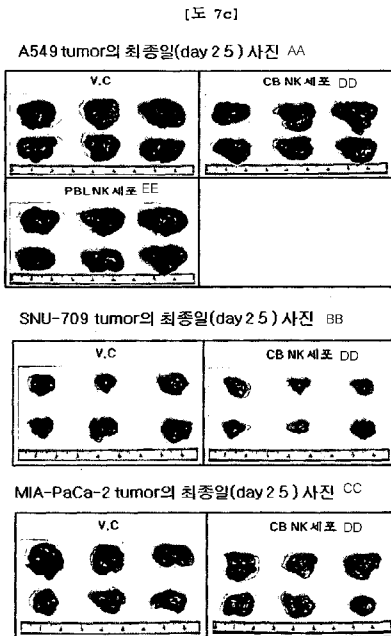
(10) 국제공개번호
WO 2016/122014 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 5/0783 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/14 (2015.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/000854
- (22) 국제출원일: 2015년 1월 27일 (27.01.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 최인표 (CHOI, In Pyo); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 윤석란 (YOON, Suk Ran); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이수연 (LEE, Sooyun); 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR MASS-PRODUCING NATURAL KILLER CELLS AND USE OF NATURAL KILLER CELLS OBTAINED BY THE METHOD AS ANTICANCER AGENT

(54) 발명의 명칭 : 자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 수득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도



AA ... Photos of A549 tumor on final day (day 25)
 BB ... Photos of SNU-709 tumor on final day (day 25)
 CC ... Photos of MIA-PaCa-2 tumor on final day (day 25)
 DD ... CB NK cells
 EE ... PBL NK cells

(57) Abstract: The present invention relates to a method for mass-producing natural killer cells and a use of the natural killer cells obtained by the method as an anticancer agent. NK cells produced according to the mass-production method of the present invention has been confirmed to be useful in a pharmaceutical composition for preventing and treating cancer by confirming that, when CD3-negative cells are obtained by removing CD3-positive T-cells from monocytes and the CD3-negative cells are treated by mixing with cytokines such as IL-15 and IL-21 and then cultivated, highly-pure NK cells could be mass-produced within a shorter amount of time, compared to existing methods for producing natural killer cells, the NK cells produced by the method inhibited growth of cancer cells and reduced the weight of cancer cells and had a therapeutic effect even in blood cancer such as leukemia in a mouse model in which cell strains of colon cancer, lung cancer, liver cancer, and pancreatic cancer have been xenotransplanted. Also, therapeutic methods including dose, administration method, and administration schedule of the NK cells to treat actual cancer patients using the NK cells produced by the method have been established.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2016/122014 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, **공개:**
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

본 발명은 자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 수득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도에 관한 것으로, 단핵구로부터 CD3 양성인 T 세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득한 후, 상기 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21 등의 사이토카인을 혼합처리한 후 배양하였을 때, 종래의 자연살해세포 제조방법보다 빠른시간 내에 순도 높은 NK 세포를 대량생산할 수 있고, 상기 방법으로 제조된 NK 세포가 대장암, 폐암, 간암 및 췌장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에서 암 세포의 성장을 억제하고, 암 세포 무게를 감소시키며, 백혈병과 같은 혈액암 내에서도 이의 치료효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명의 대량생산 방법으로 생산된 NK 세포가 암 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 방법으로 생산된 NK 세포를 이용하여 실제 암환자를 치료하기 위한 NK 세포의 투여량, 투여방법, 투여 스케줄 등의 치료방법을 확립하였다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 취득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도

5

【기술분야】

본 발명은 자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 취득된 자연살해세포의 항암제로서의 용도에 관한 것이다.

10 **【배경기술】**

종양 치료를 위해 수술, 방사선 치료, 화학요법 등의 다양한 치료법이 발전해 왔으나, 종양에 따라서는 빈번한 재발이 심각한 문제가 되고 있다. 이에 따라 환자의 면역기능을 이용한 세포치료의 가능성이 제기되었다.

15 종양을 제거하는 면역반응은 다양한 기능을 가진 면역세포들의 복잡한 상호작용을 통해 일어난다. 종양세포를 직접 제거하는 면역세포로는 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)와 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte, CTL)가 있으며, 이들 효력세포(effector cell)에게 항원을 제시해 주는 항원제시세포로는 수지상세포(dendritic cell, DC)나 B 세포가 있고, 이 외에 다양한 사이토카인(cytokine)을 분비하는 보조 T 세포(helper T cell), 조절 T 세포(regulatory T cell) 등이 함께 작용하게 된다.

상기 면역체계를 구성하는 세포들 중 자연살해세포는 림프구의 일종으로 인체 내 골수, 비장, 말초 림프절 및 말초 혈액에 분포하며, 말초 혈액의 경우 림프구
25 구의 약 10%가 NK 세포인 것으로 알려져 있다(Ann Rev Immunol., 24: 257-286,

2006). NK 세포는 CD56 및 CD16이 양성이나, CD3에는 음성을 나타낸다. T 세포와는 달리 NK 세포는 이전에 노출되었던 자극이나 MHC에 제한 없이 종양세포 또는 바이러스에 감염된 세포를 살해하며 세포 클론에 따른 수용체 재배열도 나타나지 않는다(Trends Immunol., 22: 633-640, 2001). NK 세포가 세포를 살해하는 과정은

5 퍼포린(perforin) 및 그랜자임(granzyme)을 포함하는 세포질 과립의 배출과 FasL 및 TRAIL을 포함하는 과정과 관련되어 있다. NK 세포는 다양한 사이토카인, 특히 IFN- γ , INF- α , GM-CSF 및 IL-10을 분비하고, 세포 표면에 여러 수용체를 발현하는데 이들 수용체는 세포 흡착, 세포 살해능력의 활성화, 또는 세포 살해능력의 억제에 관여한다. 또한, NK 세포는 MHC class I 분자를 KIR(killer immunoglobulin-

10 like receptor)를 통하여 인지하는데, 대다수의 KIR은 세포 살해억제 수용체이고, 이러한 억제 수용체가 MHC 분자로 인지되지 않으면 세포의 살해가 일어나게 된다.

이러한 NK 세포의 살해능은 림포카인 활성화세포(lymphokine activated killer cell, LAK) 및 종양침윤림프구(tumor infiltration lymphocytes, TIL)를 이

15 용하여 고형암 치료에 이용하거나, 공여자 임파구 주입(donor lymphocyte infusion)을 통한 면역치료법(Tilden. A.B. et al, *J. Immunol.*, 136: 3910-3915, 1986; Bordignon C. et al., *Hematologia*, 84: 1110-1149, 1999)을 수행함으로써, 골수이식이나 장기 이식시 발생하는 거부반응을 방지하기 위한 새로운 세포치료 요법으로 응용이 시도되고 있다. 또한, NK 세포의 분화와 활성의 결함이 유방암

20 (Konjevic G. et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 66: 255-263, 2001), 흑색종암 (Ryuke Y. et al., *Melanoma Res.*, 13: 349-356, 2003), 폐암(Villegas FR., et al., *Lung Cancer*, 35: 23-28, 2002) 등 다양한 암 질환과 관련되어 있음이 보고되어 이러한 질환들을 치료하기 위해 NK 세포 치료법이 대두되고 있다.

25 그러나, 정상 상태에서 체내에 존재하는 대부분의 NK 세포는 비활성화 상태

(inactivated state)로 존재하지만, 실제로 NK 세포를 치료용으로 이용하기 위해서는 활성화된 NK 세포가 필요하기 때문에 정상혈액으로부터 또는 비활성화된 환자 혈액으로부터 NK 세포를 활성화 시키는 연구가 활발히 진행되고 있다.

체외에서 NK 세포를 활성화시킴으로써 달성된 NK 세포의 높은 세포독성 (cytotoxicity)은 NK 세포의 면역세포 치료 가능성을 확인시켜 주었다. 체외에서 활성화된 NK 세포는 다양한 암 종류, 특히 백혈병과 같은 혈액암을 대상으로 동종 골수이식 후에 투여함으로써 그 치료효과를 확인한 보고(*Blood Cells Molecules & Disease*, 33: 261-266, 2004)가 있다. 그러나, 혈액암이 아닌 고형암에 대해서는 NK 세포에 대하여 아직 임상적으로 뚜렷한 치료 효과가 입증되지 않고 있다. 구체적으로 NK 세포를 종양이 생기기 전부터 투여하여 종양의 성장을 방해할 수 있다는 보고가 있으나(*Cancer Immunol. Immunother.*, 56(11): 1733-1742, 2007), 적합한 치료모델이라고 보기 어렵고, 복강으로 NK 세포를 투여하여 유방암 세포의 성장을 저해한 동물 실험결과도 있으나, NK 세포에 의한 효과인지 불분명하다(*Breast Cancer Res. Treat.*, 104(3): 267-275, 2007).

또한, NK 세포를 항암 면역 세포치료로 효과적으로 이용하기 위해서는 많은 수의 NK 세포 확보가 필요하다. 그러나 NK 세포는 혈액 내 림프구의 10 ~ 15%를 차지하고 있고 암 환자에서는 종종 NK 세포의 수, 분화 및 기능이 저하되어 있어 사실상 충분한 세포수의 확보가 어려운 실정이다. 그러므로 NK 세포의 증식 또는 분화를 통한 NK 세포의 다량 확보가 절실히 요구되고 있다.

NK 세포는 골수의 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell, HSC)로부터 유래된다고 알려져 있다. 시험관내(*in vitro*)에서는 제대혈로부터 조혈줄기세포를 분리하여 적당한 사이토카인들을 처리하여 배양함으로써 NK 세포로 분화시키는 방법들이 보고되었다(Galy et al., *Immunity* 3: 459-473, 1995; Mrozek E, et al., *Blood* 87:2632-2640, 1996; Sivori, S. et al., *Eur J Immunol.* 33:3439-3447,

2003; B. Grzywacz, et al., *Blood* 108: 3824-3833, 2006). 즉, CD34⁺ HSC에 Flt-3L, IL-7, SCF 및 IL-15을 첨가하여 5주 배양 후 CD3⁻CD56⁺의 NK 세포로 분화시킬 수 있다. 그러나 이런 분화 방법은 치료에 충분한 양의 세포를 얻기 힘들고 분화하는데 시간과 비용이 많이 요구되는 등의 실제 임상 적용에 대한 어려움이 있다.

5

사이토카인(Cytokine) 수용체의 γ_c 의 발현이 결핍된 쥐에서 B세포와 T세포는 발견이 되지만 NK 세포는 발견되지 않는 점에서 γ_c 를 지닌 수용체들이 NK 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Singer, B et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 377-381, 1995). 수용체의 γ_c 형태는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21의 수용체이며, 이 중 IL-2는 성숙된 NK 세포의 증식과 활성화를 증진시키는 기능을 지니고 있음이 보고되고 있다(Shibuya, A. et al., *Blood* 85, 3538-3546, 1995). IL-2가 결핍된 인간과 마우스에서는 NK 세포의 수가 현저히 감소한다는 보고가 전해지고 있으나(DiSanto, J. P. et al., *J. Exp. Med.* 171, 1697-1704, 1990), 한편으로는 IL-2 및 IL-2Ra 결핍은 간접적으로 NK 세포의 수와 활성화에 영향을 미친다는 연구 결과도 있다. 게다가, IL-2R(IL-2 receptor) 사슬은 IL-15의 수용체를 형성하는데 관여한다고 알려져 있다.

15

IL-15는 NK 세포 분화에 관여하고, 이것은 IL-15 생성에 요구되는 전사인자인 인터페론-조절 인자 1(interferon-regulating factor-1, IRF-1)이 결핍된 쥐에서는 NK 세포가 결핍되며(Kouetsu et al., *Nature* 391, 700-703, 1998), IL-15 또는 IL-15Ra가 결핍된 쥐에서 NK 세포가 발견되지 않는다는 것에 의해 알게 되었다. 이로써 IL-15는 NK 세포에서 발현되는 IL-15 수용체를 통해서 NK 세포의 성장과 분화를 직접적으로 증진시킨다는 것이 보고되었다(MrozekE et al., *Blood* 87, 2632-2640, 1996).

20

IL-21은 활성화된 CD4⁺T 세포에 의해 분비되는 사이토카인이며(Nature,

25

5:688-697, 2005), IL-21의 수용체(IL-21R)는 수지상세포, NK 세포, T 세포 및 B 세포와 같은 림프구에서 발현되어 있다(Rayna Takaki, et al., *J. Immunol* 175: 2167- 2173, 2005). IL-21은 구조적으로 IL-2 및 IL-15과 매우 유사하며, IL-21R 는 IL-2R, IL-15, IL-7R 및 IL-4R 등과 사슬을 공유하고 있다(Asao et al., *J. Immunol*, 167: 1-5, 2001). IL-21은 골수로부터의 NK 세포 전구체의 성숙을 유도 하는 것으로 보고되었고(Parrish-Novak, et al., *Nature*, 408: 57-63, 2000), 특히 NK 세포의 사이토카인 생성능 및 세포사멸능과 같은 효과기 기능(effector functions)을 증가시키는 것으로 보고되었으며(M. Strengell, et al., *J Immunol*, 170: 5464-5469, 2003; J. Brady, et al., *J Immunol*, 172: 2048-2058, 2004), CD8⁺T 세포의 효과기 기능도 증가시킴으로써 내재, 적응면역계의 항암반응을 촉진 시키는 것으로 보고되었다(Rayna Takaki, et al., *J Immunol* 175: 2167-2173, 2005; A. Moroz, et al., *J Immunol*, 173: 900-909, 2004). 또한, 인간의 말초혈 액에서 분리한 NK 세포를 활성화 시키며(Parrish-Novak, et al., *Nature*, 408: 57, 2000), 제대혈에서 분리한 조혈줄기세포로부터 성숙한 NK 세포를 유도하는데 중요 한 역할을 하는 것이 보고되었다(J. Brady, et al., *J Immunol*, 172: 2048, 2004).

한편, 상기와 같은 NK 세포의 암 치료제로서의 가능성에도 불구하고, 체내 에 존재하는 NK 세포의 수가 많지 않아 이를 암 치료제로 사용하기 위해서는 체내 에서 충분한 효능을 유지할 수 있을 정도의 대량으로 이를 생산하는 기술이 필수적 이다. 그러나, NK 세포는 시험관 내에서 대량 증식 및 배양이 제대로 이루어지지 않는다는 문제점이 있으며, 따라서 실제 유용한 수준으로 NK 세포를 증폭 및 배양 하는 기술의 개발이 요구되어 왔으며 이를 위한 많은 연구가 진행되고 있으나, 아 직 임상에 적용가능한 수준에는 미치지 못하고 있다.

이에, 본 발명자들은 보다 효율적이고 경제적으로 NK 세포를 대량생산하는

방법을 개발하던 중, 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를
 수득한 후, 상기 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21 등의 사이토카인을 혼합처리한 후
 배양하였을 때, 종래의 자연살해세포 제조방법보다 빠른시간 내에 순도 높은 NK 세
 포를 대량생산할 수 있고, 상기 방법으로 제조된 NK 세포가 대장암, 폐암, 간암 및
 5 췌장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에서 암 세포의 성장을 억제하고, 암 세포
 무게를 감소시키며, 백혈병과 같은 혈액암 내에서도 이의 치료효과를 나타내는 것
 을 확인함으로써, 본 발명의 대량생산 방법으로 생산된 NK 세포가 암 예방 및 치료
 용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 방법으로 생산된
 NK 세포를 이용하여 실제 암환자를 치료하기 위한 NK 세포의 투여량, 투여방법, 투
 10 여 스케줄 등의 치료방법을 확립하여 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 자연살해세포의 대량생산 방법 및 상기 방법으로 수득된
 15 자연살해세포를 이용한 암 환자의 치료방법을 제공하는 것이다.

【기술적 해결방법】

상기 목적을 해결하기 위하여 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 자연살해
 세포(natural killer cell; NK cell)의 대량생산 방법을 제공한다:

- 20 1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단
 계; 및
- 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 사이토카인을 처리한 후 배양하는 단계.

또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포(natural killer
 cell; NK cell)를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공
 25 한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 주사제를 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포의 약학적으로 유효한 양을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 및 치료 방법을 제공한다.

아울러, 본 발명은 암의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 하기의 단계를 포함하는 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)의 대량생산 방법을 제공한다:

1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계; 및

2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 사이토카인을 처리한 후 배양하는 단계.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 단핵구는 체대혈, 골수 또는 말초혈액으로부터 유래한 것이 바람직하나, CD3 음성세포라면 어떤 종류의 세포라도 전구체로 사용할 수 있다.

상기 방법에 있어서, 단계 1)의 CD3 음성세포의 제조는 CD3 마이크로비드로 CD3 양성 세포에 자성을 띄게 한 후 MACS 컬럼에 통과시켜 CD3 음성세포를 분리하는 방법, 또는 CD3 음성 T 세포를 형광 표지시킨 후 세포분별장치(Cell sorter) 등의 세포분리기를 이용하여 CD3 음성세포를 분리하는 방법을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 2)의 사이토카인은 IL-2, IL-15 및 IL-21로 구성된 군으로부터 선택된 둘 이상을 혼합처리하는 것이 바람직하고, IL-15 및 IL-21를

함께 혼합처리하거나 IL-2, IL-15 및 IL-21를 함께 혼합 처리하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 단계 2)의 사이토카인은 인터루킨(interleukin) 류에서 선택된 하나 이상인 것이 바람직하고, 상기 인터루킨은 림프구, 단핵구 및 대식세포 등 면역담당 세포가 생산하는 단백질성 생물활성물질의 총칭으로 본 발명에서 사용가능한 인터루킨으로는 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 더욱 바람직하며, 본 발명의 실시예에 의하면 IL-15 및 IL-21을 함께 혼합처리하는 것이 가장 바람직하나, NK 세포로의 분화를 촉진한다고 알려진 모든 공지된 물질을 사용할 수 있다.

상기 방법에 있어서, 단계 2)의 배양은 정지배양(stationary culture) 또는 부유배양(suspension culture) 방법을 사용할 수 있고, 정지배양은 배양기에 교반(agitating) 또는 진탕(shaking)없이 방치한 상태에서 배양하는 것을 의미하며, 부유배양은 통기(aeration)나 교반 등을 통해 세포들이 반응기의 하부 또는 측면부에 부착되지 않고 현탁된 상태에서 배양하는 것을 의미한다. 또한, 정지배양을 위한 반응기와 부유배양을 위한 반응기는 동일한 것일 수도 있고, 상이한 것일 수도 있다. 예를 들어, 정지배양을 위한 반응기와 부유배양을 위한 반응기가 동일한 것인 경우에는 동일한 반응기에서 정지배양이 완료된 후, 사이토카인 등의 필요한 영양 성분을 포함하는 배지를 추가적으로 공급하여 부유배양 방식으로 배양하는 것이 가능하며, 상이한 종류의 배양기를 사용하는 경우에는 정지배양이 완료된 후에 배양물을 부유배양을 위한 반응기로 옮겨 부유배양 할 수 있다.

배양시 세포의 수는 1×10^6 cell/ml의 농도로 유지하여 배양하는 것이 바람직하나, 세포의 모양 및 활성에 이상을 나타내지 않는 한 통상의 당업자가 임의로 조절할 수 있으며, 배양기간은 10 내지 24일 동안 배양하는 것을 특징으로 하나 배양된 세포가 CD3⁻CD56⁺의 특징을 나타내는 것을 확인함으로써 배양기간을 결정할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

5 상기 자연살해세포는 제대혈, 골수 또는 말초혈액 단핵구로부터 유래한 것이 바람직하나, CD3 음성세포라면 어떤 종류의 세포라도 전구체로 사용할 수 있다.

 상기 자연살해세포는 프레쉬, 4°C 보관, 또는 냉동된 것을 모두 사용할 수 있으며, 프레쉬는 제조한 뒤 바로 사용하는 것을 특징으로 하고, 4°C 보관은 프레쉬한 자연살해세포를 4°C에서 12시간 보관한 것을 특징으로 하며, 냉동된 것은 프
10 레쉬한 자연살해세포를 냉동시켜 보관한 뒤 사용하는 것을 나타낸다.

 상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암, 림프종으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된
15 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 더욱 바람직하다.

 또한, 상기 조성물은 생 세포(live cell), 냉동된 세포, 또는 생 세포 및 냉동된 세포를 혼합하여 사용할 수 있다.

 상기 조성물은 1×10^4 내지 5×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 바람직하나, 5×10^5 내지 3×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 더욱 바람직하고, 6×10^6 내지
20 1×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 1×10^4 개 미만의 NK 세포를 투여할 경우 약리학적 효과가 나타나지 않을 수 있고, 5×10^8 개 초과인 NK 세포를 투여할 경우 과다하게 처리되어 이식 후 부작용이 심하게 나타나거나 활성을 나타내지 못한 채 버려지는 NK 세포가 증가함에 따라 비용이 상승하는 문제가 발생할 수 있다. 상기 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여
25 경로 및 기간에 따라 달라질 수 있고 이는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

상기 조성물은 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안 투여되는 것을 특징으로 하고, 생 세포 및 냉동된 세포를 혼합하여 사용하는 경우 생 세포를 1회 투여한 뒤, 냉동된 세포를 3회 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있는데, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 5 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular)로 주사 또는 카테터를 이용하여 투여될 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 NK 세포와 공지되어 있는 항암물질을 병용처리할 수 있으며, 이때 함께 처리되는 항암물질은 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

10

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 제대혈로부터 NK 세포의 효율적 생산방법을 결정하고자 제대혈 유래의 자연살해세포를 제조하였고(도 1 참조), 상기 제조된 자연살해세포의 체내 분포도를 확인 한 결과, 측정 시작부터 복부를 중심으로 자연살해세포가 분포되어 있고, 주요 장기들인 간, 비장, 신장, 심장 및 15 폐를 적출하여 자연살해세포의 분포도를 확인한 결과, 간, 비장 및 폐에 자연살해세포가 높게 분포되어 있음을 확인하였다(도 2 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 자연살해세포가 효능을 나타내는 최적의 세포 투여량 및 부작용을 최소화하는 투여량을 결정, 및 이로 인한 항암활성을 확인하기 위하여 대장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에 자연살해세포를 미정맥 투 20 여한 결과, 농도의존적으로 종양 성장 억제 및 종양 무게 감소 효과가 있음을 확인하였고, 본 발명의 NK 세포를 사이토카인과 병행하였을 시 추가적 효능을 확인하기 위하여 이를 확인한 결과, IL-2를 병용처리하였을 때도 농도의존적으로 대장암에 대한 항암활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 3 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 자연살해세포의 독성을 확인하기 위해 마우 25 스의 체중변화 및 일반 증상을 관찰한 결과, 자연살해세포 단독 또는 IL-2와 병용

투여시 일반 증상 및 체중 감소와 같은 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 NK 세포의 최적 투여 수 및 투여 간격을 결정하기 위해, 본 발명의 자연살해세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암활성을 확인하기 위해 대장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에 자연살해세포를 투여한 결과, 프레쉬(fresh) 자연살해세포의 경우 주 1회씩 4주 또는 주 2회씩 2주 동안 투여하였을 때 유의적인 항암활성을 나타내었고, 4°C 보관한 자연살해세포의 경우 주 2회씩 2주 동안 투여하였을 때 유의적인 항암활성을 나타냄을 확인하였다(도 4 참조).

또한, 본 발명자들은 NK 세포의 보관방법 및 냉장 보관 후 환자 상태에 다른 반복 투여 가능성, 및 이로 인한 항암활성을 확인하기 위하여 대장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에 자연살해세포를 투여한 결과, 생 세포(live cell)의 경우 주 1회씩 4회, 냉동된 세포(frozen cell)의 경우 주 2회씩 4회, 또는 생 세포를 주 1회씩 1회 및 냉동된 세포를 주 1회씩 3회 혼합하여 투여하였을 경우 유의적인 항암 활성을 나타냄을 확인하였다(도 5 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 자연살해세포의 폐암에 대한 항암 활성을 확인하기 위해 폐암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에 자연살해세포를 투여한 결과, 1×10^7 세포수로 투여하였을 경우 유의적인 항암 활성을 나타내고, 투여한 자연살해세포가 종양 부위로 침윤하는 것을 확인하였다(도 6 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 자연살해세포의 폐암, 간암 및 췌장암에 대한 항암 활성을 확인하기 위해, 폐암, 간암 및 췌장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에 자연살해세포를 투여한 결과, 6×10^6 세포수로 투여하였을 경우 유의적인 항암 활성을 나타냄을 확인하였다(도 7 참조).

또한, 본 발명자들은 본 발명의 자연살해세포를 조혈모세포이식(hematopoietic cell transplantation, HCT) 후의 백혈병 환자에게 중심정맥 카테터(central venous catheter)를 이용하여 투여한 결과, 심각한 부작용 없이 환자의

생존율이 증가함을 확인하였다.

따라서, 본 발명의 자연살해세포는 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병에 대해 유의적인 항암 활성을 나타냄으로써 암 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

5

본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 운활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술 분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

20 또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 주사제를 제공한다.

상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암, 림프종으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된

25

군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 더욱 바람직하다.

상기 조성물은 1×10^4 내지 5×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 바람직하나, 5×10^5 내지 3×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 더욱 바람직하고, 6×10^6 내지 1×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 1×10^4 개 미만의 NK 세포를 투여할 경우 약리학적 효과가 나타나지 않을 수 있고, 5×10^8 개 초과인 NK 세포를 투여할 경우 과다하게 처리되어 이식 후 부작용이 심하게 나타나거나 활성을 나타내지 못한 채 버려지는 NK 세포가 증가함에 따라 비용이 상승하는 문제가 발생할 수 있다. 상기 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 달라질 수 있고 이는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

상기 조성물은 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안 투여되는 것을 특징으로 하고, 생 세포 및 냉동된 세포를 혼합하여 사용하는 경우 생 세포를 1회 투여한 뒤, 냉동된 세포를 3회 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있는데, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular)로 주사를 이용하여 투여될 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 NK 세포와 공지되어 있는 항암물질을 병용처리할 수 있으며, 이때 함께 처리되는 항암물질은 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 단핵구로부터 자연살해세포를 제조하였고, 상기 제조된 자연살해세포가 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병에 대해 유의적인 항암 활성을 나타냄으로써 암 예방 및 치료용 주사제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

본 발명의 주사제는 적절한 처방으로 제조될 수 있으며, 주사제 처방의 유통에 따른 제품 안정성을 확보하기 위하여 주사제로 사용가능한 산수용액 또는 인산염 등의 완충용액을 사용하여 pH를 조절함으로써 물리적으로나 화학적으로 매우

안정한 주사제로 제조될 수 있다.

보다 구체적으로, 상기 주사제는 안정화제 또는 용해 보조제와 함께 주사용수에 용해시킨 후, 멸균처리, 특히 고온감압멸균법 또는 무균여과법에 의해 멸균처리하여 제조될 수 있다. 상기 주사용수로는 주사용 증류수 또는 주사용 완충용액, 예를 들어 pH3.5 내지 7.5 범위의 인산염 완충용액 또는 인산이수소나트륨(NaH_2PO_4)-구연산 완충용액을 사용할 수 있다. 사용되는 인산염은 나트륨염 또는 칼륨염 형태이거나 무수물 또는 수화물 형태이어도 무방하고, 구연산 또는 무수물 또는 수화물 형태이어도 무방하다.

또한, 본 발명에서 사용되는 안정화제는 나트륨 피로설파이트(sodium pyrosulfite), 중아황산나트륨(NaHSO_3), 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid)을 포함하고, 용해 보조제는 수산화나트륨(NaOH), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산나트륨(NaCO_3) 또는 수산화칼륨(KOH)과 같은 염기, 또는 염산(HCl) 또는 아세트산(CH_3COOH)과 같은 산을 포함한다.

본 발명에 따른 주사제는 생체흡수성, 생체 분해성, 생체적합성으로 제형화될 수 있다. 생체흡수성이라 함은 주사제가 체내에서, 분산된 주사제의 분해 또는 분해 없이, 초기 적용에서 사라질 수 있음을 의미하는 것이다. 생체 분해성은 가수분해 또는 효소 분해에 의해 주사제가 체내에서 파쇄 또는 분해될 수 있음을 의미한다. 생체적합성은 성분 모두가 체내에서 무독성임을 의미한다.

본 발명에 따른 주사제는 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 계면활성제 등의 희석제, 또는 부형제 등을 사용하여 제조할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포의 약학적으로 유효한 양을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 및 치료 방법을 제공한다.

상기 자연살해세포의 약학적으로 유효한 양은 1×10^4 내지 5×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 바람직하나, 5×10^5 내지 3×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 더욱 바람직하고, 6×10^6 내지 1×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 가장 바람직하다. 1×10^4 개 미만의 NK 세포를 투여할 경우 약리학적 효과가 나타나지 않을 수 있고, 5×10^8 개 초과인 NK 세포를 투여할 경우 과다하게 처리되어 이식 후 부작용이 심하게 나타나거나 활성을 나타내지 못한 채 버려지는 NK 세포가 증가함에 따라 비용이 상승하는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 상기 투여는 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안, 정맥주사 또는 중심정맥 카테터로 투여될 수 있으나, 상기 투여량 및 투여방법은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 달라질 수 있고 이는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암, 림프종으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 더욱 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 단핵구로부터 자연살해세포를 제조하였고, 상기 제조된 자연살해세포가 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병에 대해 유의적인 항암 활성을 나타냄으로써 암 예방 및 치료방법으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

아울러, 본 발명은 암의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 본 발명의 방법으로 제조된 자연살해세포를 제공한다.

상기 자연살해세포의 약학적으로 유효한 양은 1×10^4 내지 5×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 바람직하나, 5×10^5 내지 3×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 더욱 바람직하고, 6×10^6 내지 1×10^8 개의 NK 세포를 포함하는 것이 가장 바람

적하다. 1×10^4 개 미만의 NK 세포를 투여할 경우 약리학적 효과가 나타나지 않을 수 있고, 5×10^8 개 초과인 NK 세포를 투여할 경우 과다하게 처리되어 이식 후 부작용이 심하게 나타나거나 활성을 나타내지 못한 채 버려지는 NK 세포가 증가함에 따라 비용이 상승하는 문제가 발생할 수 있다. 또한, 상기 투여는 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안, 정맥주사 또는 중심정맥 카테터로 투여될 수 있으나, 상기 투여량 및 투여방법은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 달라질 수 있고 이는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

상기 암은 위암, 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 자궁경부암, 갑상선암, 후두암, 백혈병, 뇌종양, 신경모세포종, 망막모세포종, 두경부암, 침샘암, 림프종으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 본 발명의 실시예에 의하면 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 더욱 바람직하다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 단핵구로부터 자연살해세포를 제조하였고, 상기 제조된 자연살해세포가 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병에 대해 유의적인 항암 활성을 나타냄으로써 암 예방 및 치료방법으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

【유리한 효과】

본 발명의 방법인 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득한 후, 상기 CD3 음성세포에 IL-15 및 IL-21 등의 사이토카인을 혼합처리한 후 배양하였을 때, 종래의 자연살해세포 제조방법보다 빠른시간 내에 순도 높은 NK 세포를 대량생산할 수 있고, 상기 방법으로 제조된 NK 세포가 대장암, 폐암, 간암 및 췌장암 세포주를 이종이식한 마우스 모델에서 암 세포의 성장을 억제하고, 암 세포 무게를 감소시키며, 백혈병과 같은 혈액암 내에서도 이의 치료효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명의 대량생산 방법으로 생산된 NK 세포가 암 예방 및

치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 방법으로 생산된 NK 세포를 이용하여 실제 암환자를 치료하기 위한 NK 세포의 투여량, 투여방법, 투여 스케줄 등의 치료방법을 확립하였다.

5 【도면의 간단한 설명】

도 1은 배양 후 11일 내지 21일 사이에 제대혈에서 분리된 CD3 음성세포로부터 NK 세포로 분화가 유도된 것을 FACS로 확인한 도이다.

도 2a는 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)에 대한 농도별 검출한계 측정을 위해 마우스 체내에서 자연살해세포의 검출을 확인한 도이다:

10 V.C(5% HAS): 용매대조군.

도 2b는 자연살해세포에 대한 농도별 검출한계 측정을 위해 마우스의 복부 내 주요 장기들을 적출하여 자연살해세포의 검출을 확인한 도이다:

V.C(5% HAS): 용매대조군.

15 도 2c는 자연살해세포의 조직 내 분포를 확인하기 위하여 마우스의 복부 내 주요 장기들을 적출하여 자연살해세포의 분포를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군.

도 2d는 시간에 따른 자연살해세포의 마우스 체내 분포를 확인한 도이다.

20 도 3a는 자연살해세포 투여에 따른 대장암에 대한 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 3b는 자연살해세포 단독 또는 IL-2와 병용처리시, 자연살해세포 수에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군, 및

ADR: 아드리아마이신(adriamycin) 처리군.

25 도 3c는 자연살해세포 단독 또는 IL-2와 병용처리시, 자연살해세포 수에 따

른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군, 및

ADR: 아드리아마이신 처리군.

5 도 4a는 자연살해세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 4b는 자연살해세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

10 NK-F: 프레쉬(fresh) NK 세포 처리군,

NK-W/oR-F: 프레쉬 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군,

NK-4°C: 4°C 보관된 NK 세포 처리군,

NK-W/oR-4°C: 4°C 보관된 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군, 및

ADR: 아드리아마이신 처리군.

15 도 4c는 자연살해세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

NK-F: 프레쉬(fresh) NK 세포 처리군,

NK-W/oR,F: 프레쉬 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군,

20 NK-4°C-보관: 4°C 보관된 NK 세포 처리군,

NK-W/oR,4°C보관: 4°C 보관된 NK 세포(Rosettesep 없음) 처리군, 및

ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 5a는 자연살해세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위한 투여
25 스케줄을 나타내는 도이다.

도 5b는 자연살해세포의 냉동 여부에 따른 대장암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

NK cells-Live(4): 생 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,

5 NK cells-Live(1)+(3)Frozen: 생 NK 세포주를 1회 및 냉동된 세포주를 3회 혼합 투여한 투여군,

V.O(Serum free media): 무혈청 배지 대조군,

NK cells-Frozen(4): 냉동된 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,

NK cells-Frozen(8): 냉동된 NK 세포주를 8회 투여한 투여군, 및

10 ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 5c는 자연살해세포의 냉동 여부에 따른 대장암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

NK cells-Live(4): 생 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,

15 NK cells-Live(1)+(3)Frozen: 생 NK 세포주를 1회 및 냉동된 세포주를 3회 혼합 투여한 투여군,

V.O(Serum free media): 무혈청 배지 대조군,

NK cells-Frozen(4): 냉동된 NK 세포주를 4회 투여한 투여군,

NK cells-Frozen(8): 냉동된 NK 세포주를 8회 투여한 투여군, 및

20 ADR: 아드리아마이신 처리군.

도 6a는 자연살해세포의 세포 수에 따른 폐암에 대한 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다.

도 6b는 자연살해세포의 세포 수에 따른 폐암에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

25

V.C: 용매대조군, 및

Dox.hcl: 독소루비신.HCl.

도 6c는 자연살해세포의 세포 수에 따른 폐암에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

5 V.C: 용매대조군, 및

Dox.hcl: 독소루비신.HCl.

도 6d는 자연살해세포가 종양 부위로 침윤하는 것을 확인하기 위해 H-E 염색을 수행한 도이다:

V.O: 무혈청 배지 대조군,

10 화살표: 죽은 암세포, 및

CA: 암 세포.

도 6e는 자연살해세포가 종양 부위로 침윤하는 것을 확인하기 위해 CD56을 확인한 도이다:

V.O: 무혈청 배지 대조군,

15 화살표: CD56 양성세포, 및

CA: 암 세포.

도 7a는 자연살해세포의 폐암, 간암 및 췌장암에 대한 항암 효과를 확인하기 위한 투여 스케줄을 나타내는 도이다:

-20- ~~CB-NK 세포: 제대혈 유래 NK 세포, 및~~

PBL NK 세포: 말초혈액 유래 NK 세포.

도 7b는 자연살해세포의 폐암(A549), 간암(SNU-709) 및 췌장암(MIA-PaCa-2)에 대한 종양 크기 억제 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

25 CB NK 세포: 제대혈 유래 NK 세포, 및

PBL NK 세포: 말초혈액 유래 NK 세포.

도 7c는 자연살해세포의 폐암(A549), 간암(SNU-709) 및 췌장암(MIA-PaCa-2)에 대한 종양 무게 감소 효과를 확인한 도이다:

V.C: 용매대조군,

5 CB NK 세포: 제대혈 유래 NK 세포, 및

PBL NK 세포: 말초혈액 유래 NK 세포.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

10 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> NK 세포의 제조

병원으로부터 연구용으로 제공받은 제대혈(건양대학병원 산부인과 및 충남
15 대학병원 산부인과로부터 제공받음, 각 병원 및 한국생명공학연구원 IRB 심사통과)을 RPMI 1640을 이용하여 2:1로 희석하여 준비한 다음, Ficoll-Paque 상층부에서 상기 준비된 제대혈을 조심스레 놓은 후, 20,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 단핵구 세포층(mononuclear cell layer, MNC layer)을 얻었다. 상기 단핵구 세포층으로부터 조심스럽게 취한 세포에서 적혈구를 제거하여 단핵구를 수득하였다. 상기
20 수득한 단핵구에 CD3 마이크로비드(microbeads)(Miltenyi Biotech)를 첨가하여 표지한 후, 이를 CS 컬럼(column) 및 Vario MACS를 이용하여 CD3 양성세포를 제거하고 CD3 음성세포를 수득하였다. 이는 구체적으로 CD3 마이크로비드(Miltenyi Biotech)가 CD3 ϵ 사슬(chain)을 인식하여 단핵구로부터 CD3 양성인 세포를 포착하여 자성을 가지게 한 후, 단핵구 중 상기 마이크로비드가 부착된 CD3 양성세포를
25 자석과 반응하는 MACS 컬럼을 통과시킴으로써 CD3 양성세포는 컬럼에 남아있고 CD3

음성세포만 컬럼을 빠져나와 분리하였다. 상기 분리된 CD3 음성세포를 12-웰 플레이트(12-well plate, Falcon, 미국)에 1×10^6 cells/ml의 농도로 접종하여 Myelocult(Stem cell Technology) 완전 배지에 IL-15 및 IL-21을 함께 처리하여 37°C, 5% CO₂의 조건에서 21일 동안 배양하였다. 배양하는 동안 세포의 농도가 1×10^6 cells/ml을 넘게되면 초기 사용한 조건의 배지를 사용하여 세포를 나누어 주었다. 4, 8, 14, 18 및 21일에 각각 세포 수를 확인하였고, 4, 8, 14 및 21일 순으로 CD3 및 CD56 항체로 염색하여 CD3⁻CD56⁺인 NK 세포군의 비율을 공지된 방법으로 FACS 분석하였다.

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 배양 후 11일 내지 21일 사이에 체대혈에서 분리된 CD3 음성세포로부터 NK 세포로 분화가 유도되었음을 확인하였다.

<실시에 2> NK 세포의 마우스에서 체내 분포도 확인

상기 <실시에 1>에서 제조된 NK 세포의 조직 내 분포도를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

우선, NK 세포의 분포도 확인을 위해 NK 세포에 DiR을 표지하였는데, 이는 $3.5 \mu\text{g/ml}$ 의 DiR(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine, Sigma, 미국) 염료와 0.5% 에탄올이 포함된 1×PBS(phosphate buffered saline) 10 ml에 세포 1×10^7 개를 부유하고, 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, 반응이 끝난 세포는 1×PBS로 2번 세척하고, 트립판 블루(trypan blue)로 세포를 염색하여 NK 세포의 체내 분포도를 확인하였다.

상기 DiR로 표지된 NK 세포의 시간별, 날짜별 조직 내 분포도 확인을 위하여 BALB/C 암컷 누드 마우스의 정맥에 5% HSA 또는 DiR이 표지된 NK 세포를 각각 1×10^3 , 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 및 5×10^6 cells의 농도가 되도록 주사하고 일정 시간 후 제조사의 프로토콜에 따라 라이브 애니멀 이미징 시스템 (live animal imaging system, PHOTONE IMAGER, Biospace)을 이용하여 마우스 전체

또는 부검을 통해 적출한 주요 장기들(간, 비장, 폐, 심장, 신장)에서 NK 세포의 분포도를 확인하였다.

DiR 표지된 NK 세포에 대한 농도별 검출 한계 측정을 위해 DiR 표지된 NK 세포 주입 24시간 후 마우스 체내에서의 분포도를 확인한 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이 5×10^4 cells 이하의 농도군에서는 DiR 표지된 NK 세포의 분포 형태가 뚜렷하게 나타나지 않았으며, 1×10^5 cells 이상의 농도군에서는 마우스 복부를 중심으로 영상신호 정도가 농도 의존적으로 강하게 검출되었다(도 2A). 또한, 복부 내 주요 장기들(간, 비장, 신장, 심장, 폐)을 적출하여 영상을 측정한 결과 5×10^4 cells 이하의 농도 군에서는 폐에서만 DiR 표지된 NK 세포의 약한 분포가 확인되었으나, 1×10^5 cells 이상의 농도 군에서는 간, 비장, 폐에서 영상신호 정도가 농도 의존적으로 강하게 검출되었다(도 2B).

다음으로, DiR 표지된 NK 세포의 조직 내 분포도를 확인하기 위하여 1×10^7 cells을 정맥으로 투여한 뒤 30분 및 2시간 후에 이를 측정한 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, 측정 시작부터 복부를 중심으로 DiR 표지된 NK 세포의 분포가 강하게 검출되었으며, 30분 및 2시간 후에는 용매 대조군과 비교하여 각각 4 배 및 3.8 배 높은 영상신호가 측정되었다. 또한, 복부를 중심으로 하는 주요 장기들인 간, 비장, 신장, 심장 및 폐를 적출하여 영상을 측정한 결과 간, 비장 및 폐에서 DiR 표지된 NK 세포의 분포가 강하게 검출되었다(도 2C). 특히 간에서는 30분 및 2시간째에 용매 대조군과 비교하여 각각 9.5배 및 5.1배 정도 높게 영상신호가 측정되었다.

이후, DiR 표지된 NK 세포의 정맥투여 1일 후부터 DiR 표지된 NK 세포가 검출되지 않을 때까지 1주에 3회 측정한 결과, 도 2D에 나타난 바와 같이 투여 후 14일까지는 DiR 표지된 NK 세포가 강하게 검출되었고, 그 이후부터는 영상 신호 정도가 약해지기 시작해서 42일째 측정한 영상에서는 DiR 표지된 NK 세포가 검출되지 않았다(도 2D). 상기 결과는 본 발명의 체내로 투여된 NK 세포가 생체 내에서 적

어도 30일까지 생존하며, 폐, 간, 비장 등에 많이 분포하는 것을 나타낸다.

<실험예 1> NK 세포의 투여에 따른 대장암에 대한 항암효과 확인

<1-1> NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 종양 크기 억제 확인

5 상기 <실시에 1>의 방법으로 제조된 NK 세포의 항암 효과를 확인하기 위하여 인간 유래 대장암 세포주인 SW620(한국생명공학연구원, 대한민국)을 이종이식한 마우스 모델을 이용하였다.

 구체적으로, SW620 세포주를 PBS에 2×10^7 cells/ml의 농도로 현탁한 후 마우스당 0.3 ml씩 우측 견갑부와 흉벽 사이의 액와부위 피하에 주입하였다. 암 세포주를 이식하고 2시간 뒤 NK 세포주를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주사를 개시하였고, 이때 IL-2는 PBS에 희석하여 10,000 u/mouse의 농도로 처리하였다. 시험기간 동안 주 1회의 투여 스케줄로 총 4회(0일, 7일, 14일 및 21일)에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사한 뒤, 약물투여 개시일부터 부검일까지 총 7회 종양의 크기변화를 배리어 캘리퍼(verier caliper)를 이용하여 3 방향을 측정한 뒤 하기의 <수학식 1>의 계산식으로 계산하여 확인하였다.

【수학식 1】

$$\text{암세포 부피} = \frac{(\text{길이} + \text{넓이} + \text{높이})}{2}$$

 그 결과, 도 3B에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주사한 군에서 각각 23.8%, 53.4%($p < 0.001$), 59.4%($p < 0.001$) 및 76.8%($p < 0.001$)의 종양 성장 억제 효과가 확인 되었으며, 양성대조군인 아드리아마이신(adriamycin)을 투여한 투여군에서는 58.3%($p < 0.001$)의 종양 성장 억제 효과가 확인되었다. 또한, IL-2를 병용처리하였을 때는 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주사한

군에서 각각 17.0%, 33.8%($p<0.01$), 49.8%($p<0.01$) 및 73.5%($p<0.001$)의 종양 성장 억제 효과가 확인되었다(도 3B).

<1-2> NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 종양 무게 감소 확인

5 NK 세포의 투여 수, IL-2 병용에 따른 항암효과를 확인하기 위하여 약물을 처리한 마우스에서 종양의 무게를 측정하였다.

상기 실험에 <1-1>과 동일한 방법으로 NK 세포 단독, 또는 NK 세포 및 IL-2 병용처리한 뒤, 23일째 마우스를 CO₂ 가스를 이용하여 희생시켜 종양을 분리하여 그 무게를 화학저울(chemical balance)를 이용하여 측정하였고, 사진 촬영 후 액체 10 질소에 고정하였다. 모든 측정 항목들의 값은 t-TEST 통계법을 사용하여 용매 대조군과 투여군을 비교하여 통계학적인 유의성을 검사하였다.

그 결과, 도 3C에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주사한 군에서 각각 23.4%, 54.0%, 59.1%($p<0.05$) 및 78.8%($p<0.01$)의 종양무게 감소 효과를 확인하였다(도 15 3C). 또한, IL-2를 병용처리하였을 때는 NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주사한 군에서 각각 17.0%, 34.3%, 47.0% 및 75.6%($p<0.01$)의 종양 무게 감소를 확인하였으며, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 58.2%($p<0.05$)의 종양무게가 감소함을 확인하였다(도 3C).

20 <실험예 2> NK 세포에 의한 독성 확인

상기 <실시에 1>의 마우스에서 NK 세포 단독 또는 IL-2와의 병용 투여에 따른 독성을 확인하기 위하여 마우스의 체중변화 및 일반 증상을 관찰하였다.

그 결과, 용매 대조군과 비교하여 NK 세포 단독 또는 IL-2와의 병용 투여군에서 시험기간 동안 일반 증상 없이 정상적인 체중증가가 관찰되었으나, 양성 대조 25 군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 21.8%($p<0.01$)의 통계적으로 유의한

체중 감소가 나타났다.

결론적으로, 본 발명의 NK 세포는 단독 또는 IL-2와 병용 투여시 일반증상 및 체중감소와 같은 독성을 나타내지 않았으며, 항암 효과와 관련하여 NK 세포 단독 투여군에서 최고 70% 이상의 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타냈고, IL-2와 병용 투여한 군에서는 NK 세포 단독 투여군과 비교하여 첨가 또는 상승의 효과를 나타내지는 않는 것으로 확인되었다.

<실험예 3> NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암 효과 확인

<3-1> NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 종양 크기 억제 확인

본 발명의 NK 세포의 배양방법, 보관 조건 및 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 크기의 감소를 확인하였다.

구체적으로, NK 세포를 배양조건에 따라 프레쉬(fresh) NK, 프레쉬 NK(w/o Rosettesep), 4℃ 보관한 NK 및 4℃ 보관한 NK(w/o Rosettesep)로 나누었고, 프레쉬 NK 세포는 상기 <실시에 1>과 동일한 방법으로 제조되었으며, 프레쉬 NK(w/o Rosettesep) 세포는 <실시에 1>과 동일한 방법으로 제조되었으나, CD3 양성 세포를 제거하는 단계를 생략하였고, 4℃ 보관한 NK 세포는 프레쉬 NK 세포를 4℃에서 12시간 보관 후 사용한 것이며, 4℃ 보관한 NK(w/o Rosettesep) 세포는 CD3 양성 세포를 제거하는 단계를 생략하고 NK 세포를 제조한 뒤, 4℃에서 12시간 보관 후 사용한 것이다. 상기 제조된 NK 세포를 마우스 모델에 투여하기 위해, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 3×10⁶ cells/mouse의 농도로 투여하였으며, 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였고, 이때 투여 스케줄은 주 1회×4주, 주 2회×2주로 투여를 수행하였다(도 4A).

시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 NK 세포를 주 1회×4주[프레쉬 NK, 프레쉬

NK(w/o Rosettesep)] 및 주 2회×2주[프레쉬 NK, 프레쉬 NK(w/o Rosettesep), 4°C 보관한 NK, 4°C 보관한 NK(w/o Rosettesep)] 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였으나, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 2수의 사망동물 및 31.5%($p<0.001$)의 통계적으로 유의한 체중감소가 나타났다.

또한, NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위하여 종양의 크기변화를 확인한 결과, 도 4B에 나타난 바와 같이 주 1회×4주 스케줄로 프레쉬 NK 및 프레쉬 NK(w/o Rosettesep)를 3×10^6 cells/mouse의 농도로 투여하였을 때 용매 대조군과 비교하여 각각 50.8%($p<0.001$) 및 32.7%($p<0.05$)의 종양성장 억제 효과가 나타났고, 주 2회×2주 스케줄로 프레쉬 NK, 프레쉬 NK(w/o Rosettesep) 및 4°C 보관한 NK 세포를 투여하였을 때 각각 35.4%, 10.8% 및 33.0%의 종양 성장 억제 효과가 나타났으나, 4°C 보관한 NK(w/o Rosettesep) 세포를 투여한 투여군에서는 종양 성장 억제 효과가 나타나지 않았으며, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 71.7%($p<0.01$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 4B).

<3-2> NK 세포의 배양, 보관조건, 투여 스케줄에 따른 종양 무게 감소 확인

본 발명의 NK 세포의 배양방법, 보관 조건 및 투여 스케줄에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 무게의 감소를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 상기 실험예 <3-1>과 동일한 조건으로 NK 세포를 투여한 뒤, 약물 투여 후 27일째 종양을 절제하여 무게를 측정하였다.

그 결과, 도 4C에 나타난 바와 같이 주 1회×4주 스케줄로 프레쉬 NK 및 프레쉬 NK(w/o Rosettesep)를 3×10^6 cells/mouse의 농도로 투여하였을 때 용매 대조군과 비교하여 각각 49.0%($p<0.001$) 및 33.1%($p<0.05$)의 종양무게 감소 효과가 나

타났고, 주 2회×2주 스케줄로 프레쉬 NK, 프레쉬 NK(w/o Rosettesep) 및 4°C 보관한 NK 세포를 투여하였을 때 각각 30.3%, 7.2% 및 29.0%의 종양무게 감소 효과가 나타났으며, 양성 대조군인 아드리아마이신을 투여한 투여군에서는 70.2%($p<0.05$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 4C).

5 결론적으로, 상기 결과로부터 주 1회×4주 스케줄로 투여하였을 때 프레쉬 NK 배양조건에서 배양한 NK 세포를 3×10^6 cells/mouse의 농도로 투여하였을 때 우수한 항암 효과를 나타내었고, 주 2회×2주 스케줄로 투여한 경우에는 프레쉬 NK(w/o Rosettesep) 및 4°C 보관한 NK(w/o Rosettesep) 세포주보다 프레쉬 NK 및 4°C 보관한 NK 세포주에서 높은 항암 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

10

<실험예 4> NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암효과 확인

<4-1> NK 세포의 냉동 여부에 따른 종양 크기 억제 확인

본 발명의 NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 크기의 감소를 확인하였다.

15 구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 3×10^6 cells/mouse의 농도로 투여하였으며, 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였고, 이때 생 세포(주 1회×4주, 총 4회), 냉동된 세포(주 1회×4주, 총 4회), 냉동된 세포(주 2회×4주, 총 8회), 및 생 세포(주 1회×1주)+냉동된 세포(주 1회×3주, 총 3회)의 조건으로 투여
20 하였다. 용매 대조군으로는 5% HSA와 무혈청 배지(serum free media)를 투여하였고, 양성 대조군으로는 아드리아나마이신을 2 mg/kg의 용량으로 격일 복강 투여하였다(도 5A).

시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 모든 NK 세포 투여군에서 시험기간 동안 일반
25 증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였으나, 양성 대조군인 아드리아마이신을

투여한 투여군에서는 2수의 사망동물 및 32.1%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 체중 감소가 나타났다.

또한, NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위하여 27일째의 종양의 크기변화를 확인한 결과, 도 5B에 나타난 바와 같이 생 세포(총 4회), 냉동된 세포(총 8회), 및 생 세포(총 1회)+냉동된 세포(총 3회)을 투여한 투여군에서 각각 58.8%($p < 0.001$), 45.2%($p < 0.001$) 및 19.2%의 종양 성장 억제 효과를 확인하였고, 양성대조군에서는 60.1%($p < 0.01$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 5B).

<4-2> NK 세포의 냉동 여부에 따른 종양 무게 감소 확인

본 발명의 NK 세포의 냉동 여부에 따른 항암 효과를 확인하기 위해 종양 무게의 감소를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 상기 실험예 <4-1>과 동일한 조건으로 NK 세포를 투여한 뒤, 약물 투여 후 27일째 종양을 절제하여 무게를 측정하였다.

그 결과 도 5C에 나타난 바와 같이, 생 세포(총 4회), 냉동된 세포(총 8회), 및 생 세포(총 1회)+냉동된 세포(총 3회)을 투여한 투여군에서 각각 58.5%($p < 0.001$), 46.2%($p < 0.01$) 및 19.5%의 종양 무게 감소 효과를 확인하였고, 양성대조군에서는 60.5%($p < 0.05$)의 종양 무게 감소 효과를 나타내었다(도 5B).

결론적으로, 상기 결과로부터 생 세포(주 1회×4주, 총 4회), 냉동된 세포(주 2회×4주, 총 8회)를 3×10^6 cells/mouse의 농도로 투여 시 일반증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 현저한 항암 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

<실험예 5> NK 세포 수에 따른 폐암에 대한 항암효과 확인

<5-1> NK 세포 수에 따른 종양 성장 억제 및 종양 무게 감소 효과 확인

본 발명의 NK 세포 수에 따라 인체 유래 폐암 세포주인 NCI-H460(한국생명

공학연구원, 대한민국)을 이종이식한 마우스 모델을 이용하여 NK 세포주의 용량별 반복 정맥주사를 통한 항암효과를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실험예 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 및 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주사를 개시하였고, 시험기간 동안 주 1회의 투여 스케줄로 총 4회(주 1회)에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였다. 용매 대조군으로는 5% HSA를 투여하였고, 양성 대조군으로는 독소루비신.HCL(doxorubicin.HCL)을 2 mg/kg의 용량으로 격일 복강 투여하였다(도 6A).

시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 모든 용량의 NK 세포 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였으나, 양성 대조군인 독소루비신.HCL을 투여한 투여군에서는 43.3%($p < 0.001$)의 통계적으로 유의한 체중감소가 나타났다.

항암 효과 확인을 위해, 상기 <실험예 1>의 방법으로 개시일부터 부검일까지 총 11회에 걸쳐 종양 크기를 확인하였고, 최종일(26일)에 마우스를 희생시켜 종양을 분리한 후 이를 측정하여 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과, 도 6B에 나타난 바와 같이 NK 세포를 1×10^7 cells/mouse의 농도로 투여한 투여군에서 용매 대조군과 비교하여 47.9%($p < 0.001$)의 유의한 종양 성장 억제 효과를 확인하였고, 3×10^5 , 1×10^6 및 3×10^6 cells/mouse의 농도로 투여한 투여군에서는 투여 후 10일까지 종양의 성장을 억제하는 것이 확인되었으나, 그 이후에는 억제율이 감소함에 따라 종양의 성장이 증가하는 경향을 나타내었으며, 양성 대조군에서는 53.8%($p < 0.001$)의 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 6B).

또한, 종양 무게 감소 효과를 확인한 결과, 도 6C에 나타난 바와 같이 NK 세포를 1×10^7 cells/mouse의 농도로 투여한 투여군에서 용매 대조군과 비교하여 46.5%($p < 0.001$)의 유의한 종양 무게 감소 효과를 확인하였고, 양성 대조군에서는

52.4%($p < 0.001$)의 종양 무게 감소 효과를 나타내었다(도 6C).

<5-2> 종양 부위로의 NK 세포 침윤 효과 확인

상기 실험에 <5-1>의 조건으로 NK 세포를 투여하였을 때, 얼마나 많은 NK
5 세포가 침윤하는지 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

구체적으로, 마우스의 암 조직을 10% 포르말린 용액에 넣고 4°C에서 12시간
동안 고정을 하였다. 상기 고정된 조직을 얇게 절편을 만들어 PBS 용액에 담근 뒤,
NK 세포의 면역조직화학 염색을 위해 상기 조직 절편을 30분 동안 3% 과산화수소
용액에 담근 후, 상기 절편을 다시 0.1 M PBS(pH 7.4), 0.1% 트라이톤 X-
10 100(triton X-100), 소혈청알부민(serum bovine albumin) 및 CD56 항체(1:500,
PharMigen, 미국)가 포함된 용액에 넣고 4°C에서 12시간 동안 배양하였다. 그리고
나서 상기 절편을 상온에서 1시간 동안 형광표지 항 마우스 IgG(1:200, PharMigen,
미국)가 포함된 용액에 넣고 배양한 뒤 현미경으로 관찰하였다. 또는, 상기 고정
된 조직을 바로 H-E(Hematoxylin and Eosin) 염색을 수행하여 이를 현미경으로 관
15 찰하였다.

그 결과, 도 6D 및 5E에 나타난 바와 같이 NK 세포주를 3×10^5 , 1×10^6 및 3
 $\times 10^6$ cells/mouse의 농도로 1차 투여하였을 때 죽은 암세포의 수(화살표)가 NK 세
포를 주입한 개수에 의존적으로 증가하였고(도 6D), NK 세포 마커인 CD56 양성세포
수(화살표)는 정상 대조군으로 용매를 1차 투여한 대조군과 비교하여 현저하게 증
20 가하였으며, CD56 양성 세포들이 주로 암조직 주변에 침윤함을 확인하였다(도 6E).

결론적으로, NK 세포를 1×10^7 cells/mouse의 농도로 주 1회씩 4주간 마우
스의 미정맥 주사시, 일반증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 인체 유래 폐
암에 대해 현저한 종양 억제 효과가 있음을 확인하였다.

25 <실험예 6> 폐암, 간암 및 췌장암에 대한 NK 세포의 항암 효과 확인

다양한 암종에 대한 본 발명의 NK 세포의 항암 효과를 확인하기 위하여, 인간 유래 폐암 세포인 A549(한국생명공학연구원, 대한민국), 간암 세포인 SNU-709(한국생명공학연구원, 대한민국) 및 췌장암 세포인 MIA-Paca-2(한국생명공학연구원, 대한민국) 세포주를 이종이식한 마우스 모델을 이용하여 NK 세포주의 반복 정맥주사를 통한 항암효과를 확인하였다.

구체적으로, 상기 실험에 <1-1>과 동일한 방법으로 암세포를 이식한 후, 평균 종양 크기가 약 50.0 mm³에 도달하였을 때, NK 세포를 6×10^6 cells/mouse의 농도로 주사를 개시하였고, 시험기간 동안 주 1회의 투여 스케줄로 총 4회(주 1회)에 걸쳐 마우스당 0.2 ml씩 미정맥 주사하였으며, 용매 대조군으로는 5% HSA를 투여하였다(도 7A).

시험기간 동안 독성을 확인하기 위해 마우스의 체중변화 및 일반증상을 관찰한 결과, 용매 대조군과 비교하여 모든 용량의 NK 세포 투여군에서 시험기간 동안 일반증상 없이 정상적인 체중의 증가를 관찰하였다.

항암 효과 확인을 위해, 상기 <실험에 1>의 방법으로 개시일부터 부검일까지 총 11회에 걸쳐 종양 크기를 확인하였고, 최종일(25일)에 마우스를 희생시켜 종양을 분리한 후 이를 측정하여 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 폐암 마우스 모델에서 제대혈 유래 NK 세포주 및 말초혈액 유래 NK 세포주를 투여한 경우 각각 24.7%($p < 0.05$) 및 9.0%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었고, 간암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 37.7%($p < 0.01$), 및 췌장암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 28.2%($p < 0.01$)의 유의한 종양 성장 억제 효과를 나타내었다(도 7B).

또한, NK 세포 투여 후 25일째 종양 무게 감소 효과를 확인한 결과, 도 7C에 나타난 바와 같이 용매 대조군과 비교하여 폐암 마우스 모델에서 제대혈 유래 NK 세포주 및 말초혈액 유래 NK 세포주를 투여한 경우 각각 20.4%($p < 0.01$) 및 10.8%의 종양 성장 억제 효과를 나타내었고, 간암 마우스 모델에서는 제대혈 유래

NK 세포주를 투여한 경우 37.6%($p < 0.01$), 및 체장암 마우스 모델에서는 제대혈 유래 NK 세포주를 투여한 경우 23.9%($p < 0.01$)의 종양 무게 감소 효과를 나타내었다 (도 7C).

결론적으로, 본 발명의 NK 세포는 6×10^6 cells/mouse의 농도로 주 1회씩 4주간 마우스의 미정맥 주사시, 일반증상 및 체중 감소와 같은 독성 증상 없이 인체 유래 폐암, 간암 및 체장암에 대해 현저한 종양 억제 효과가 있음을 확인하였다.

<실험예 7> 백혈병(leukemia) 환자에서 NK 세포의 치료 효과 확인

<7-1> 환자 및 공여자(donor)의 통계

실험을 위한 전체 환자의 평균 나이는 47 세이고, 32명의 급성 골수성 백혈병 환자, 7명의 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia) 환자, 1명의 골수이형성증후군(MyeloDysplastic Syndrome) 환자 및 1명의 미만성 큰 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma) 환자가 참여하였다. 조혈모세포이식(hematopoietic cell transplantation, HCT) 시, 활성화된 혈액 종양(hematologic malignancy)을 갖는 40명의 환자 중 37명은 난치성이었다; 골수에 35명, 연막(leptomeninges) 및 폐(lung)에 각각 1명.

NK 세포를 위한 공여자의 평균 나이는 32세(7 내지 62세의 범위)였고, 이식편 숙주반응(graft-versus-host) 방향에서 8 HLA-A, -B, -C 및 -DRB1 대립유전자(allele)의 공여자와 환자 불일치의 평균은 3.38이고, 거부방향(rejection direction)에서 8 대립유전자의 불일치 평균은 3.68이었다. 평가된 기증자-공여자(donor-recipient) 쌍 40명 중 7명(18%)은 KIR 리간드 부적합성(ligand incompatibility)에 따른 분류 시 NK 세포 알로반응성(alloreactivity)이 나타났다.

<7-2> 조혈모세포의 이식 및 NK 세포의 투여 및 이의 효과 확인

상기 실시예 <7-1>의 공여자로부터 수득한 조혈모세포를 환자에게 이식한

뒤, 일부 조혈모세포로부터 상기 <실시에 1>의 NK 세포 제조방법으로 활성이 증가된 NK 세포를 제조하여 이를 환자에게 투여하였다.

구체적으로, 투여는 도 8a에 나타난 투여 스케줄대로 수행하였고, HLA-동일 단배체의 HCT 후, NK 세포를 투여하였다. 투여 프로토콜은 아산병원 윤리심의위원회 및 식품의약품 안전관리본부의 승인을 받아 수행하였다. 조건요법 (conditioning regime)을 위해 환자들에게 HCT 7일과 6일 전에 부설판(busulfan)을 3.2 mg/kg/day, 7일과 2일 전에 플루다라빈(fludarabine)을 30 mg/m²/day, 및 4일과 1일 전 또는 3일과 1일 전에 티모글로불린(thymoglobulin) 3 mg/kg/day을 정맥 주사하였다. G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor) 450 µg를 5일 후부터 절대적인 호중구(neutrophil) 개수가 3000/µL로 회복될 때까지 매일 정맥 주사하였다. 3명의 불치의 급성 백혈병 환자는 백혈구 수치가 빠르게 증가하여 조건치료(conditioning therapy) 전 2주 내에 2 내지 5일 동안 아라-C(ara-C) 200 내지 500 mg/m²/day로 정맥 투여하였다. 이식편 숙주반응 질환(graft-versus-host disease, GVHD)를 예방하기 위하여 모든 환자들은 사이클로스포린(cyclosporine)을 투여받았다. 추가적으로, 28명의 환자는 메토트렉사트(methotrexate)를 마지막 공여세포 투입 후 첫날에 15 mg/m²로, 3일, 6일 및 11일째에는 10 mg/m²로 투여받았으며, 13명의 환자는 간 기능의 이상, 폐혈증, 또는 의사의 판단에 의해 메토트렉사트를 투여받지 않았다.

NK 세포 투여 3일 전에 각각의 조혈모세포 공여자에게 G-CSF 10 µg/kg를 5 내지 6일 동안 매일 피하주사하였고, G-CSF 투여 4일 후부터 3 내지 4일 동안 백혈구분리반출법(leukapheresis)을 사용하여 공여자로부터 조혈구세포를 수득하였다. 2 내지 3일에 수득된 조혈모세포는 같은 날 중심정맥 카테터(central venous catheter)를 이용하여 환자에게 이식되었고, 마지막날 수득된 조혈모세포는 NK 세포의 제조를 위하여 식품의약품 안전관리본부의 점검을 받는 실험실로 운반되었다.

이렇게 수득된 단핵구로부터 본 발명의 NK 세포 제조방법으로 제조된 NK

세포를 환자에게 투여하였으며, 최소 3명의 환자 집단을 한 군으로 각각 0.2×10^8 , 0.5×10^8 , 1.0×10^8 및 1.0×10^8 개 이상의 NK 세포주/kg로 HCT 후 2주 및 3주째에 한 번씩 총 두 번 투여하였다. NK 세포의 투여는 중심정맥 카테터로 한 시간 이상 투여되었으며, 투여 30분 전에 페니라민(pheniramine) 45.5 mg을 정맥으로 주사하였다.

0.2×10^8 , 0.5×10^8 cell/kg로 NK 세포주를 투여받은 6명의 환자들은 모두 어떠한 급성 독성 또는 3급 급성 GVHD를 경험하지 않았으나, 1.0×10^8 cell/kg로 NK 세포주를 투여받은 8명의 환자 중 2명은 3급 이상의 급성 GVHD를 경험하였다. 이후 등록된 환자를 위해서, 제조된 세포의 양에 따라서 NK 세포의 투여량이 결정되었다: 예를 들어, 2주째에 투여하는 경우, 1 내지 2×10^8 cell/kg 또는 세포배양 산물의 절반을 투여하고, 3주째에 투여하는 경우, 남은 세포 배양 산물을 투여하였다.

그 결과, HCT 이식 후 8 내지 43일 동안에 NK 세포를 투여받은 35명의 환자의 호중구 개수가 $500/\mu\text{L}$ 이상을 달성하였고, 이의 중간값은 13일이다(누적 발생율: 85%; 95% 신뢰구간, 75~97%). 한 명의 환자(UPN 1093)는 1차 이식에 실패하였고, 남은 5명의 환자는 초기 백혈병 진행 또는 이식관련 사망율(transplantation-related mortality)을 경험하였다. HCT 이식 후 8 내지 77일 동안에 NK 세포를 투여받은 31명의 환자의 혈소판 개수는 $20,000/\mu\text{L}$ 이상을 달성하였고, 이의 중간값은 16일이다(누적 발생율: 78%). 백혈병 진행, 이식관련 사망율 또는 이식 실패가 나타나지 않은 33명의 환자는 모두 HCT 30일 후까지 90%를 넘는 공여자 말초 혈액 단핵구 키메라 현상(chimerism)을 달성하였다. 한명의 환자(UPN 1093)는 HCT 2달 후 2차 이식에도 실패하였다.

또한, 9명의 환자가 HCT 후 0.5 내지 1.7개월 동안 급성 GVHD를 경험하였고, 이의 중간값은 0.8개월이다(누적 발생율: 22%; 95% 신뢰구간, 12~39%). 이들 중 7명의 환자는 2 내지 4급의 급성 GVHD였고(누적 발생율: 17%), 5명의 환자는 3 또는

4급의 급성 GVHD였다(누적 발생율: 17%). HCT 후 2.6 내지 4.6개월 동안 10명의 환자에서 만성 GVHD가 발생하였고, 이의 중간값은 3.3개월이었으며(누적 발생율: 24%; 95% 신뢰구간, 14~42%), 이들 중 6명의 환자는 심각한 만성 GVHD를 경험하였다(누적 발생율: 15%). 전체적으로, 11명의 환자가 악성화 또는 골수이형성증후군의 진행이 없이 27%의 누적 이식관련 사망을 발생에 의해 사망하였다(95% 신뢰구간, 16~45%).

또한, 이들 31명의 환자 집단의 호중구 투여의 누적 발생율, 혈소판 투여, 2 내지 4급 급성 GVHD, 중간부터 심각한 만성 GVHD 및 이식관련 사망율은 각각 87%, 77%, 16%, 10% 및 19%로 HCT에 의한 결과와 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

또한, HCT를 이식할 때, 난치의 급성 백혈병 또는 림프종(lymphoma)이었던 37명의 환자는 HCT 및 NK 세포의 투여 후에 68%인 25명이 완전 완화(complete remission)을 달성하였다; 완전완화율은 급성 골수성 백혈병 환자에서 72% 및 모든/림프종 환자에서 50%로 나타났다. 전체적으로, 17명의 환자가 질병의 진행을 경험하였고(누적 발생율: 46%), 급성 골수성 백혈병 환자에서 38% 및 모든/림프종 환자에서 75%로 나타났다.

아울러, 치의 급성 골수성 백혈병 환자에서 누적된 악화되지 않은 생존율(event-free survival rate) 및 전체 생존율(overall survival rate)은 각각 31% 및 35%로 나타났고, 모든/림프종 환자에서 누적된 악화되지 않은 생존율 및 전체 생존율은 모두 0%로 나타났다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

1) 단핵구로부터 CD3 양성인 T세포를 제거하여 CD3 음성세포를 수득하는 단계; 및

5 2) 단계 1)의 CD3 음성세포에 사이토카인을 처리한 후 배양하는 단계를 포함하는 NK 세포의 대량생산 방법.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 단핵구는 제대혈, 골수 또는
10 말초혈액으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 단계 1)의 제조는 CD3 마이크로비드로 CD3 양성 세포에
자성을 띄게 한 후 MACS 컬럼에 통과시켜 CD3 음성세포를 분리하는 방법, 또는 CD3
15 음성 T 세포를 형광 표지시킨 후 세포분별장치를 이용하여 CD3 음성세포를
분리하는 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 단계 2)의 사이토카인은 IL-15 및 IL-21를 혼합처리하는
20 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 배양은 세포 수를 1×10^6 cell/ml의 농도로
유지하여 배양하는 것을 특징으로 하는 방법.

25

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 배양은 10 내지 24일간 배양하는 것을 특징으로
하는 방법.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 NK 세포는 CD3⁻CD56⁺인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

5 제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

【청구항 9】

10 제 8항에 있어서, 상기 자연살해세포는 제대혈, 골수 또는 말초혈액 단핵구로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

15 제 8항에 있어서, 상기 자연살해세포는 프레쉬, 4°C 보관, 또는 냉동된 것임을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 상기 프레쉬는 제조한 뒤 바로 사용하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 12】

20 제 10항에 있어서, 상기 4°C 보관은 프레쉬한 자연살해세포를 4°C에서 12시간 보관한 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 13】

25 제 8항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 14】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 6×10^6 내지 1×10^8 개의

자연살해세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 15】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안 투여되는
5 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 16】

제 8항에 있어서, 상기 조성물은 정맥주사 또는 중심정맥 카테터를
이용하여 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

10

【청구항 17】

제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포(natural killer cell; NK cell)를
유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료용 주사제.

15 【청구항 18】

제 17항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로
구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 주사제.

【청구항 19】

20 제 17항에 있어서, 상기 주사제는 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안 투여되는
것을 특징으로 하는 주사제.

【청구항 20】

25 제 17항에 있어서, 상기 주사제는 정맥으로 투여되는 것을 특징으로 하는
주사제.

【청구항 21】

제 17항에 있어서, 상기 주사제는 6×10^6 내지 1×10^8 개의
자연살해세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 주사제.

【청구항 22】

제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포의 약학적으로 유효한 양을 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 및 치료 방법.

5

【청구항 23】

제 22항에 있어서, 상기 자연살해세포의 약학적으로 유효한 양은 6×10^6 내지 1×10^8 개인 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료 방법.

10 **【청구항 24】**

제 22항에 있어서, 상기 투여는 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안 투여되는 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료방법.

【청구항 25】

15 제 22항에 있어서, 상기 투여는 정맥주사 또는 중심정맥 카테터로 투여되는 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료방법.

【청구항 26】

20 제 22항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 특징으로 하는 암 예방 및 치료방법.

【청구항 27】

암의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용하기 위한 제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포.

25

【청구항 28】

제 27항에 있어서, 상기 자연살해세포는 6×10^6 내지 1×10^8 개인 것을 특징으로 하는 제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포.

【청구항 29】

5 제 27항에 있어서, 상기 조성물은 주 1회 또는 주 2회로 4주 동안 투여되는 것을 특징으로 하는 제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포.

【청구항 30】

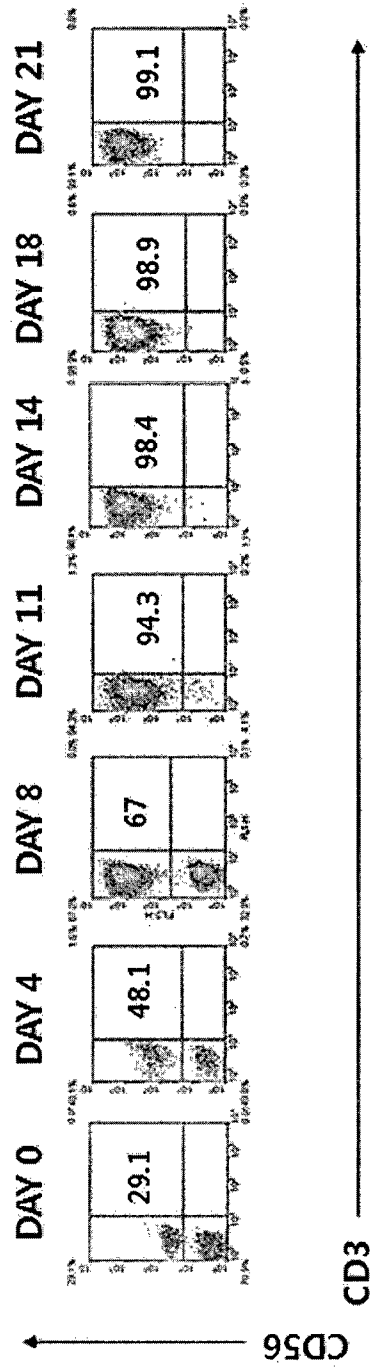
10 제 27항에 있어서, 상기 조성물은 정맥주사 또는 중심정맥 카테터로 투여되는 것을 특징으로 하는 제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포.

【청구항 31】

15 제 27항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 췌장암 및 백혈병으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나를 특징으로 하는 제 1항의 방법으로 제조된 자연살해세포.

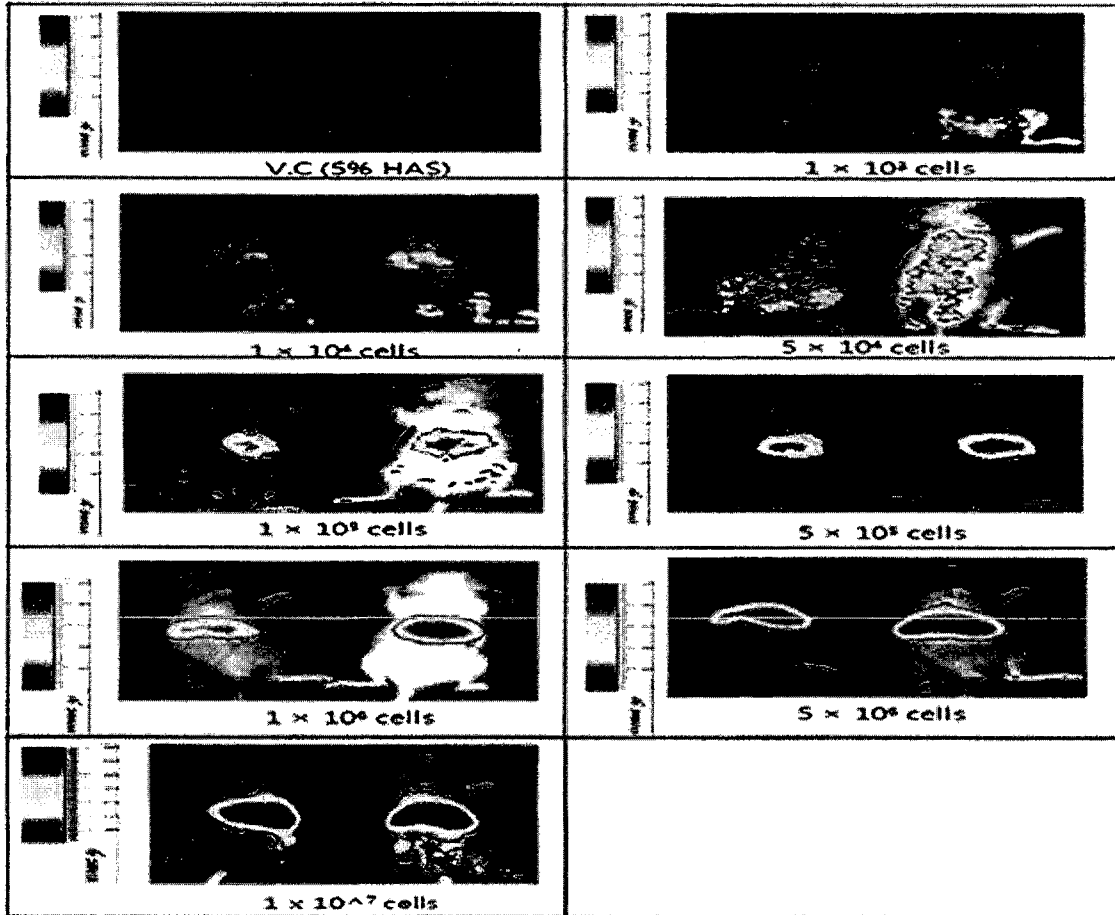
1/22

[5 1]



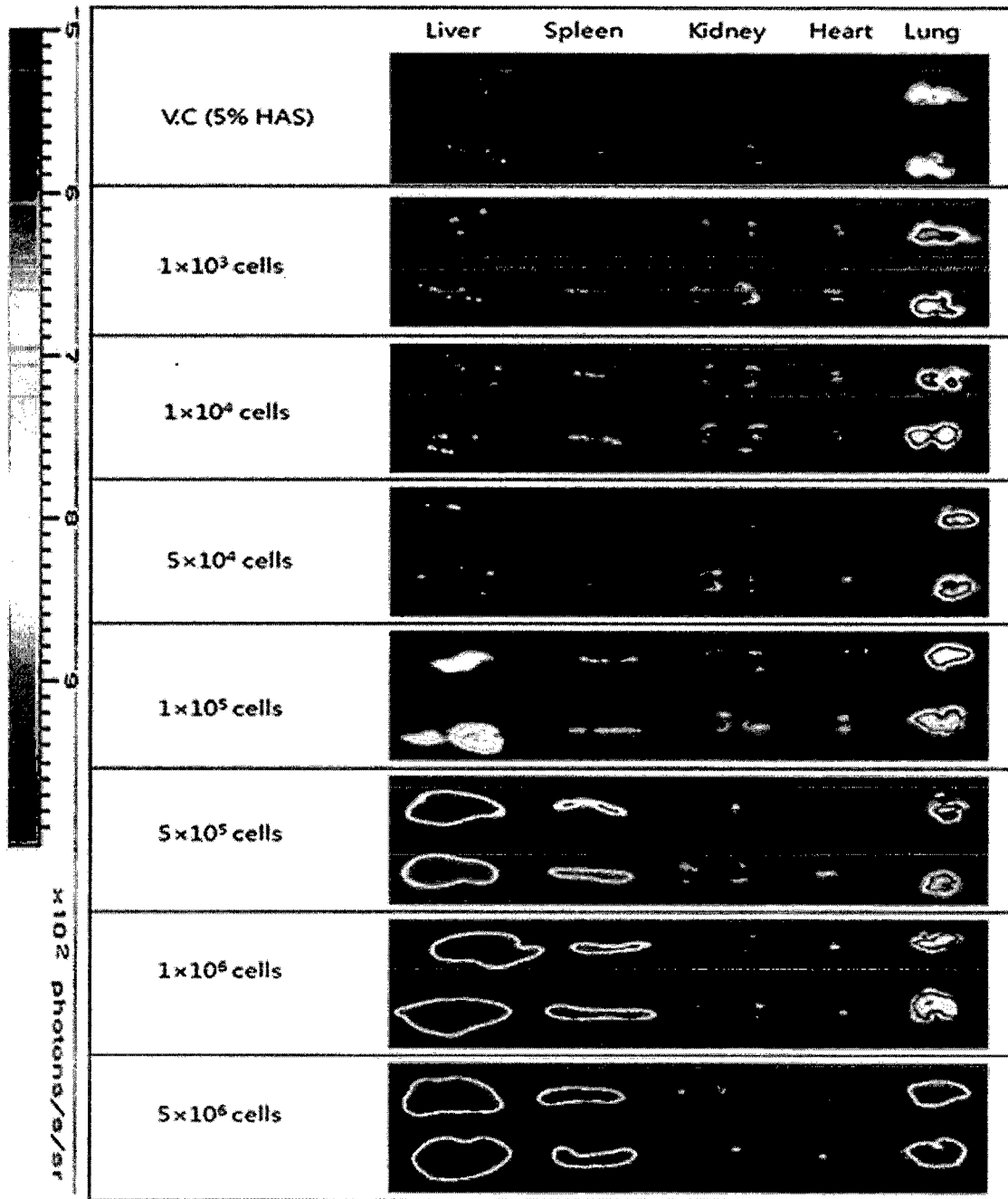
2/22

[도 2a]



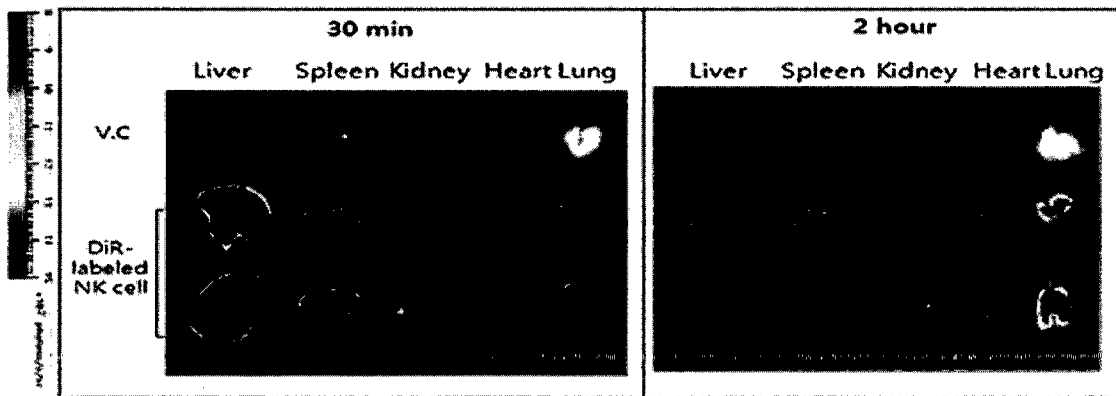
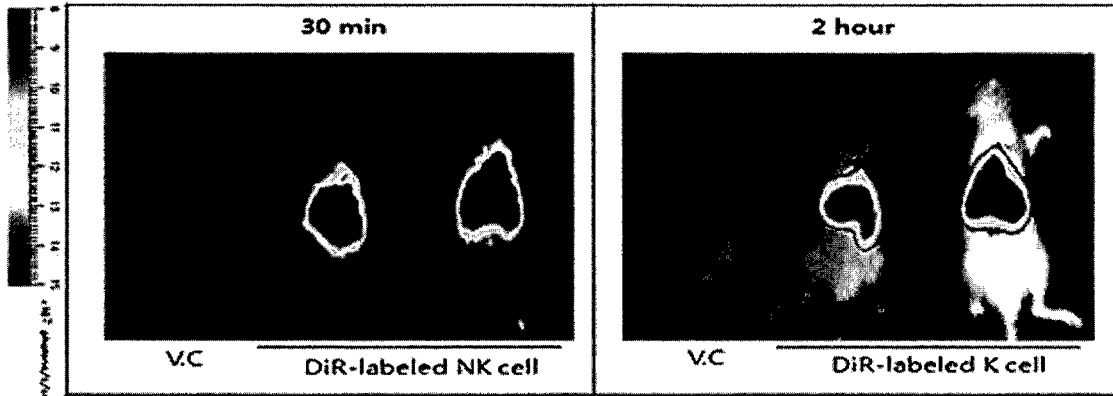
3/22

[도 2b]



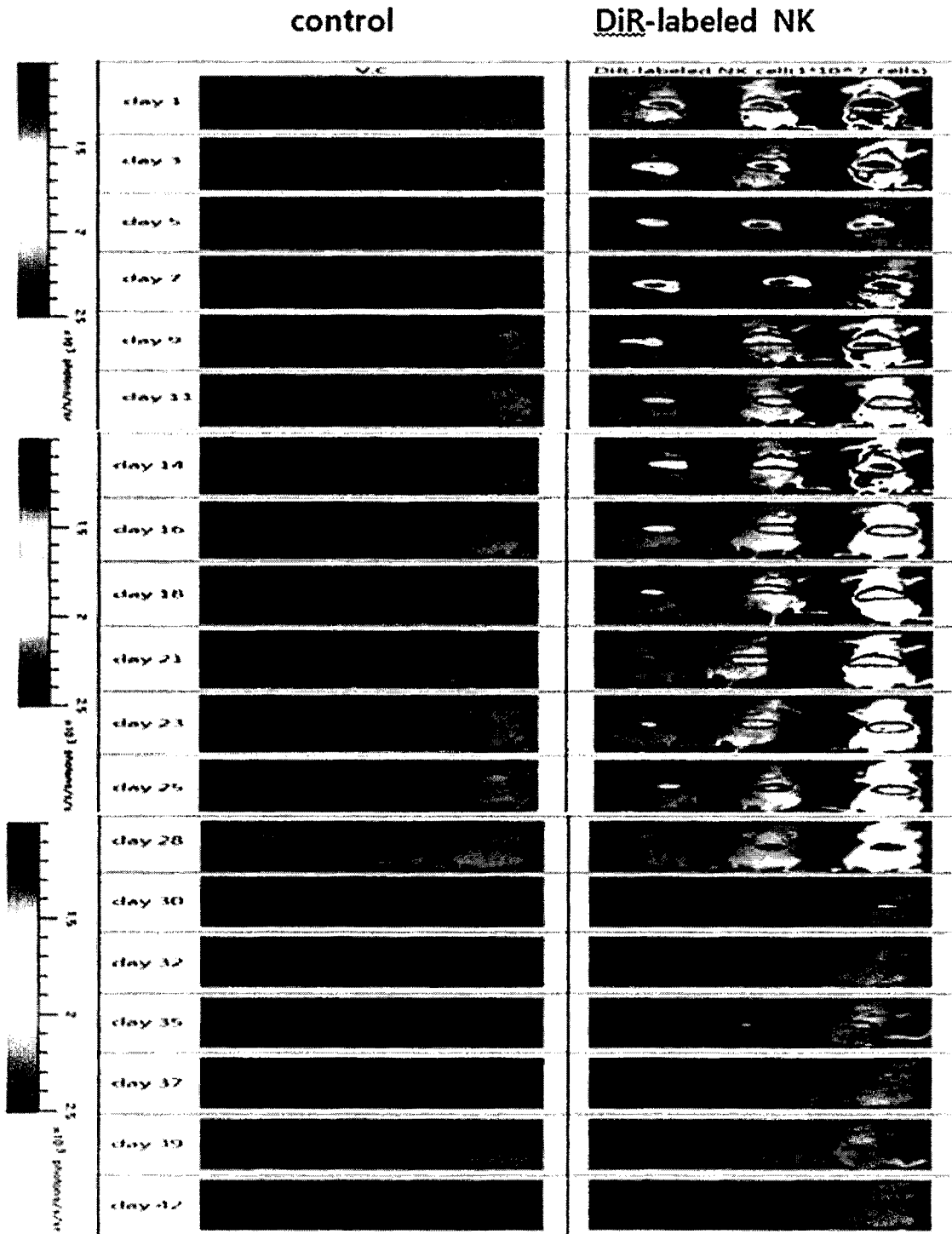
4/22

[도 2c]



5/22

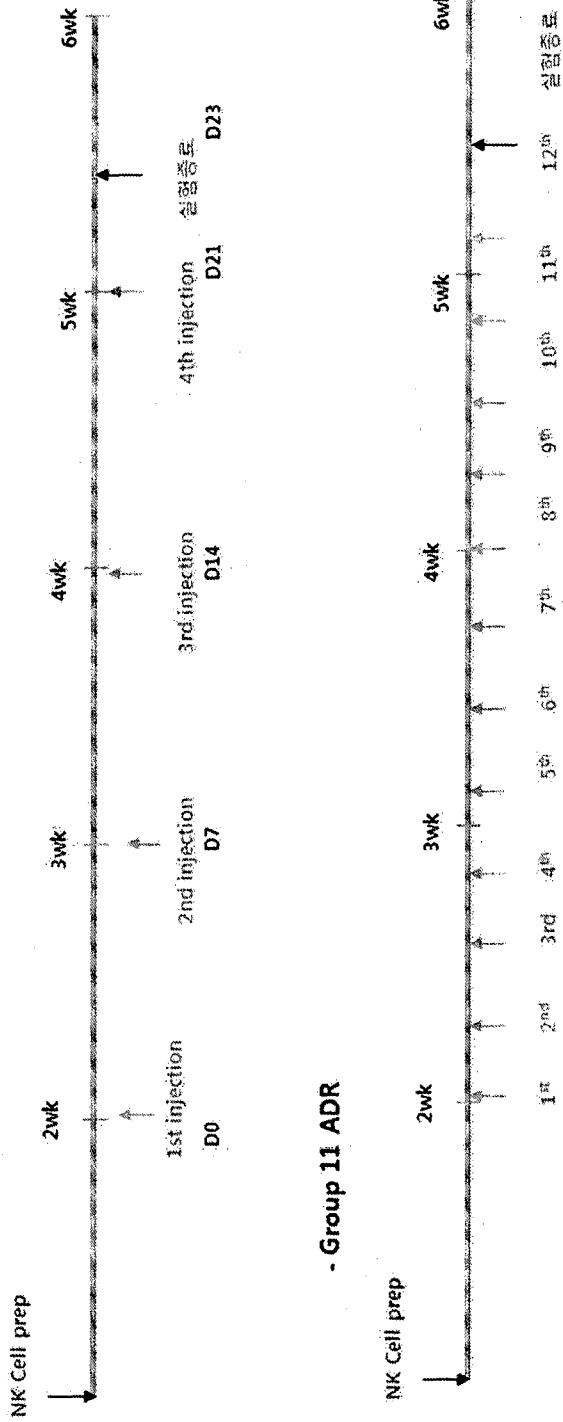
[도 2d]



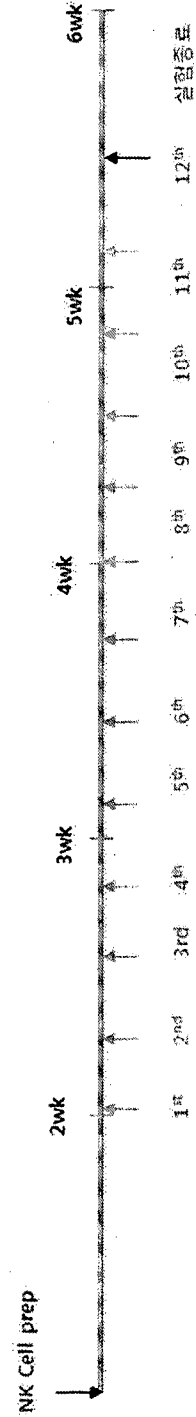
6/22

[표 3a]

- Group 1,6: 용매 대조군(+ IL-2)
- Group 2,7 : NK 3X 10⁵ (+ IL-2)
- Group 3,8 : NK 1X 10⁶(+ IL-2)
- Group 4,9 : NK 3X 10⁶(+ IL-2)
- Group 5,10 : NK 1X 10⁷(+ IL-2)

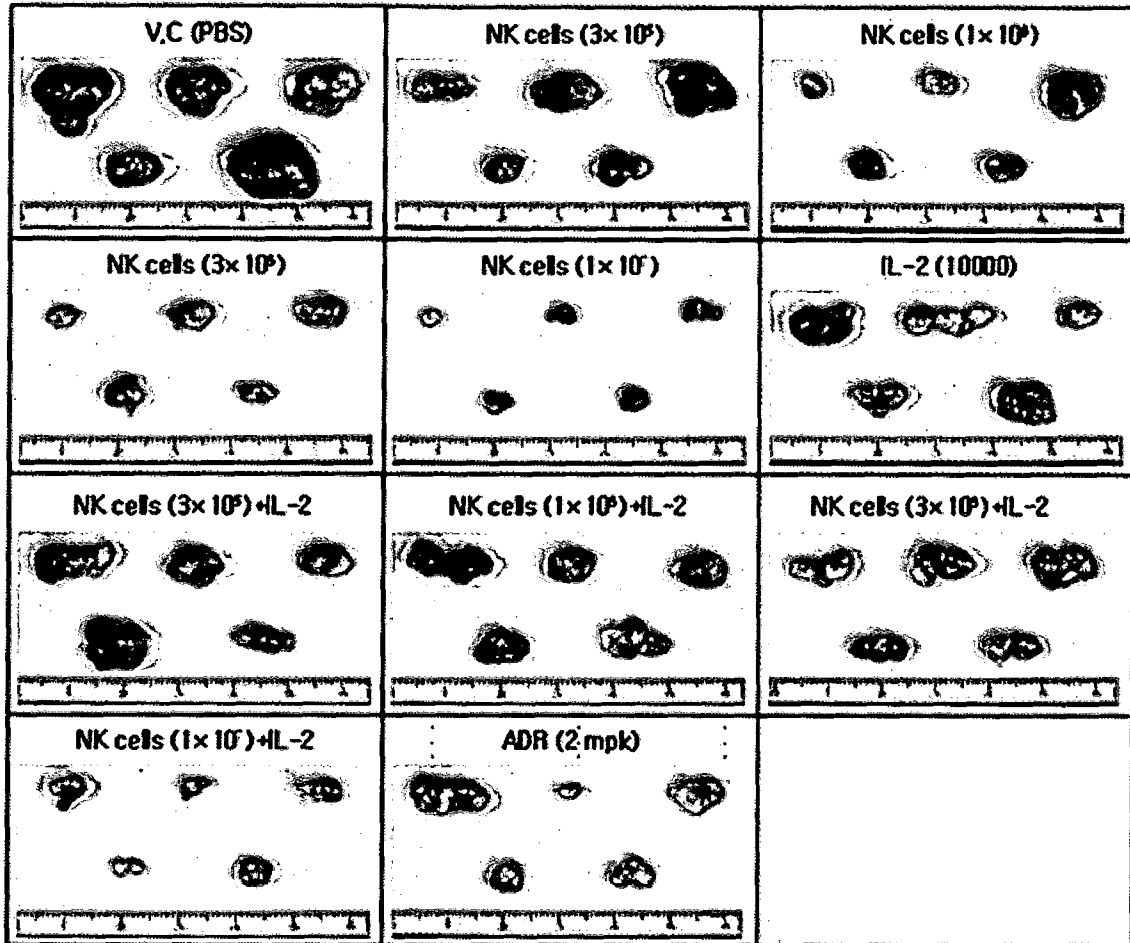


- Group 11 ADR



8/22

[도 3c]



9/22

[4a]

Group 1, Group 3 & Group 4



Group 2, Group 5, Group 6, Group 7 & Group 8



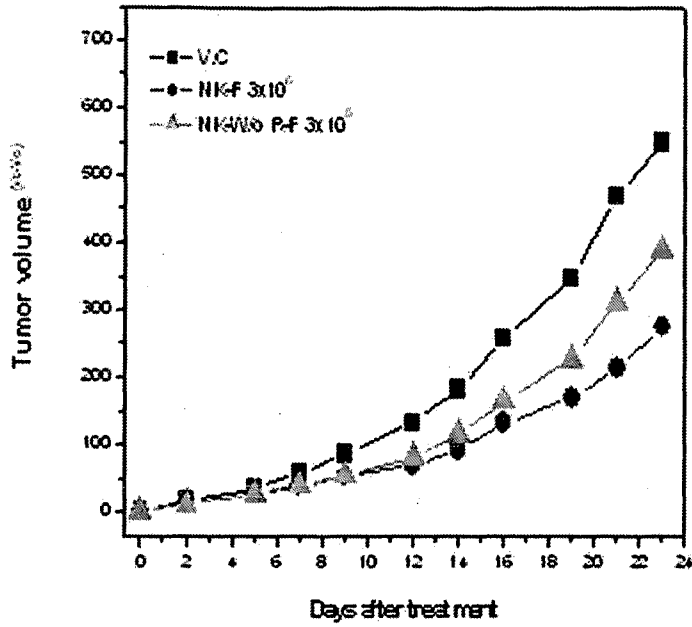
Group 9



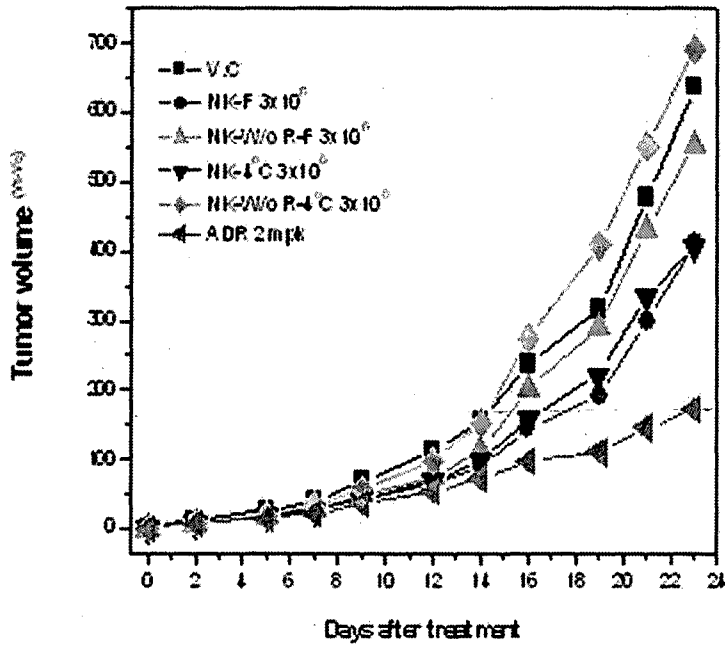
10/22

[도 4b]

주 1회 X 4주



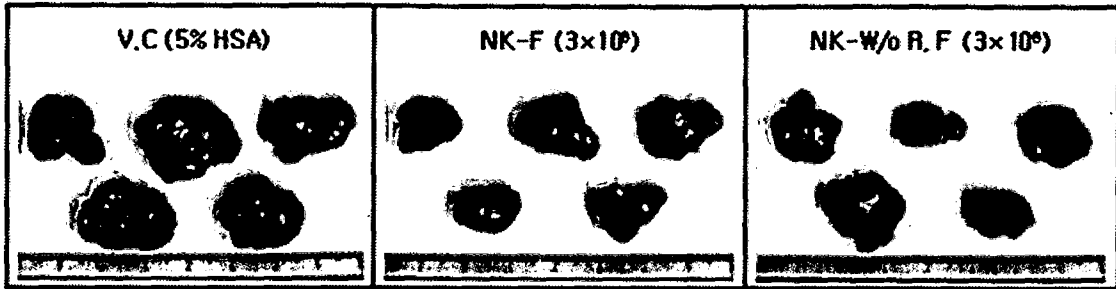
주 2회 X 2주



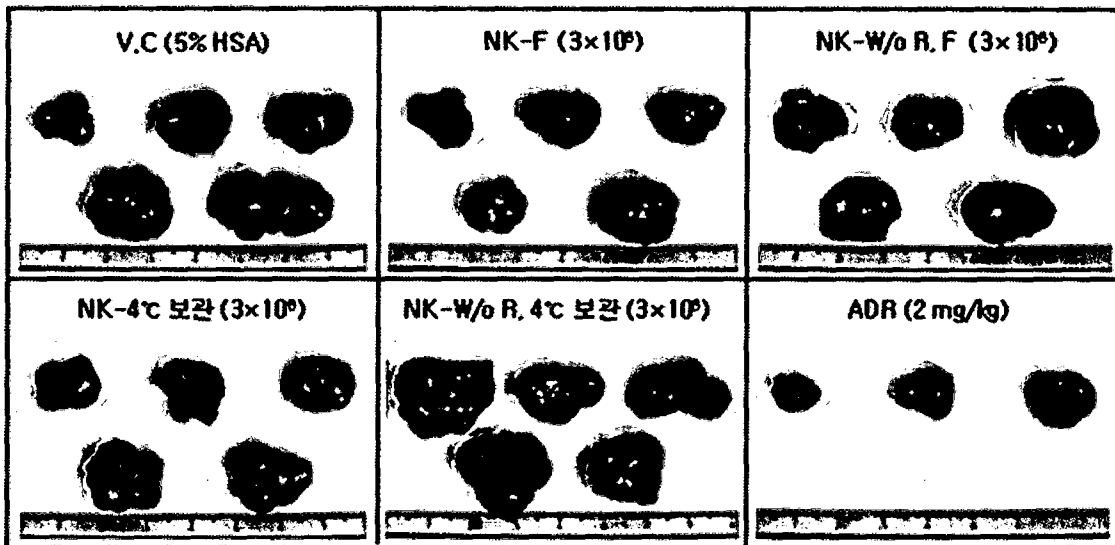
11/22

[도 4c]

주 1회 × 4주

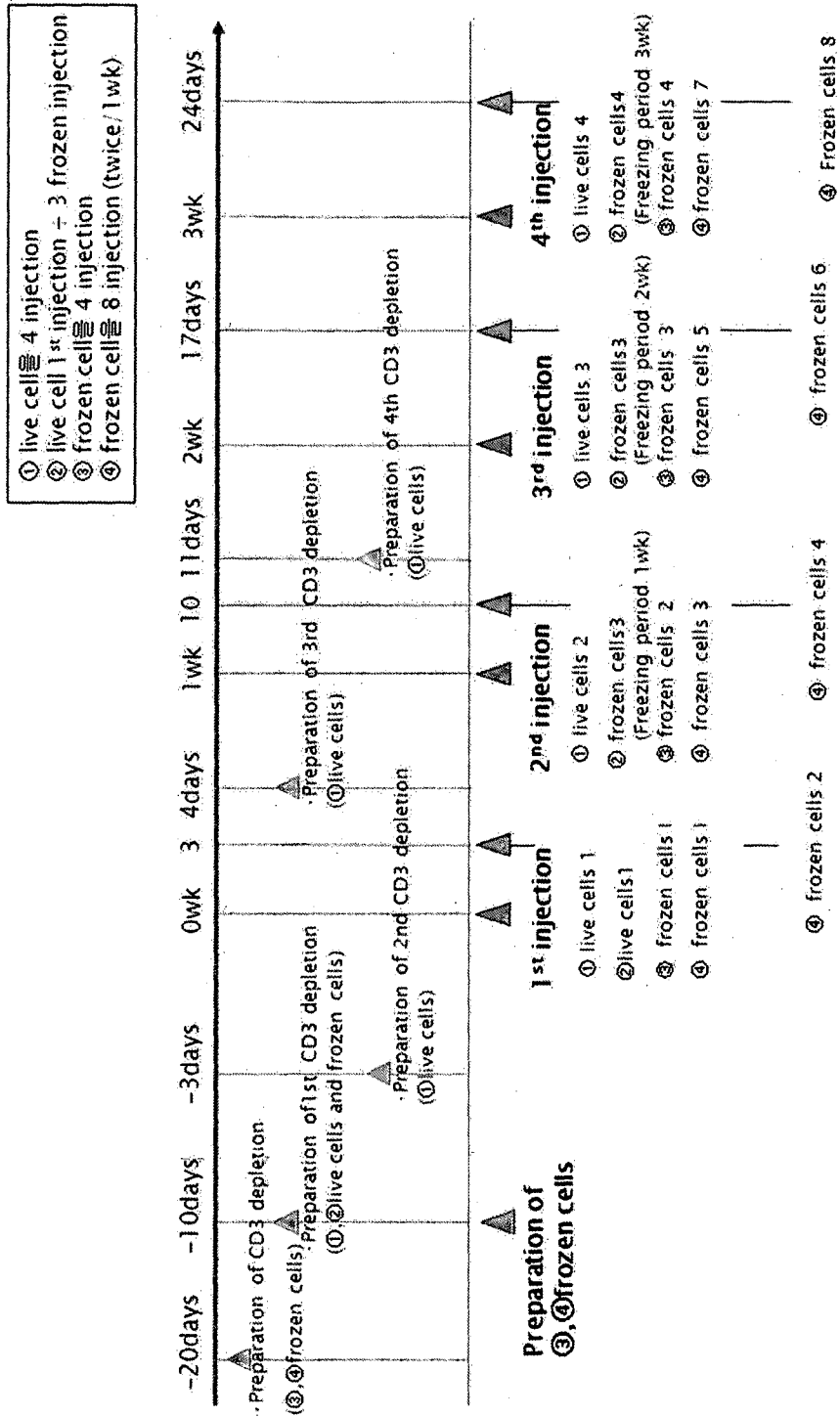


주 2회 × 2주



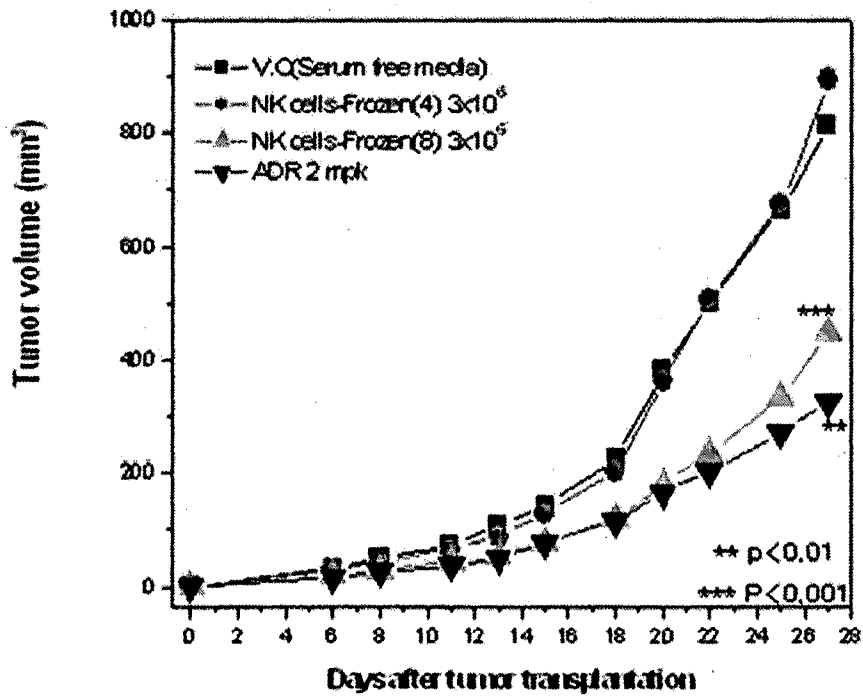
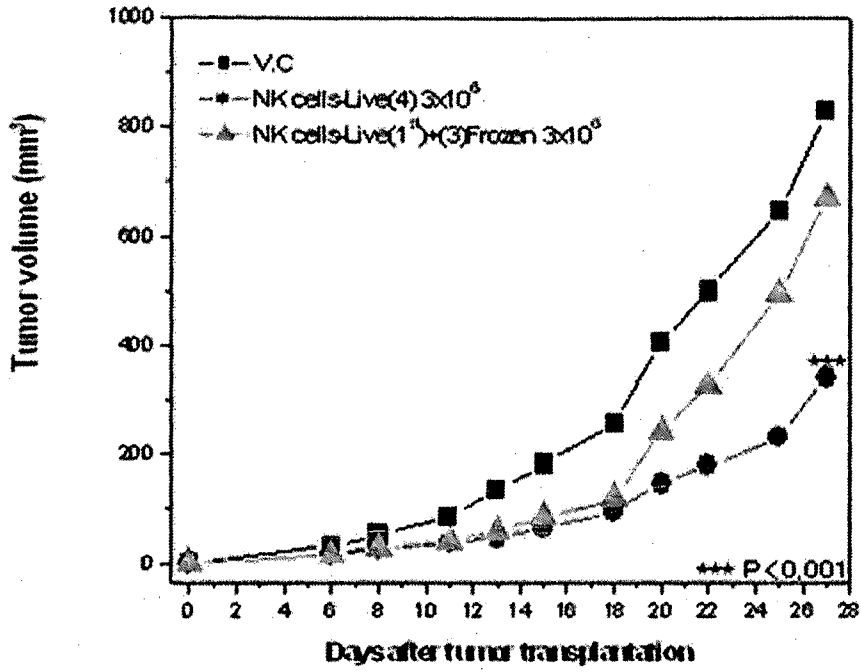
12/22

[5a]



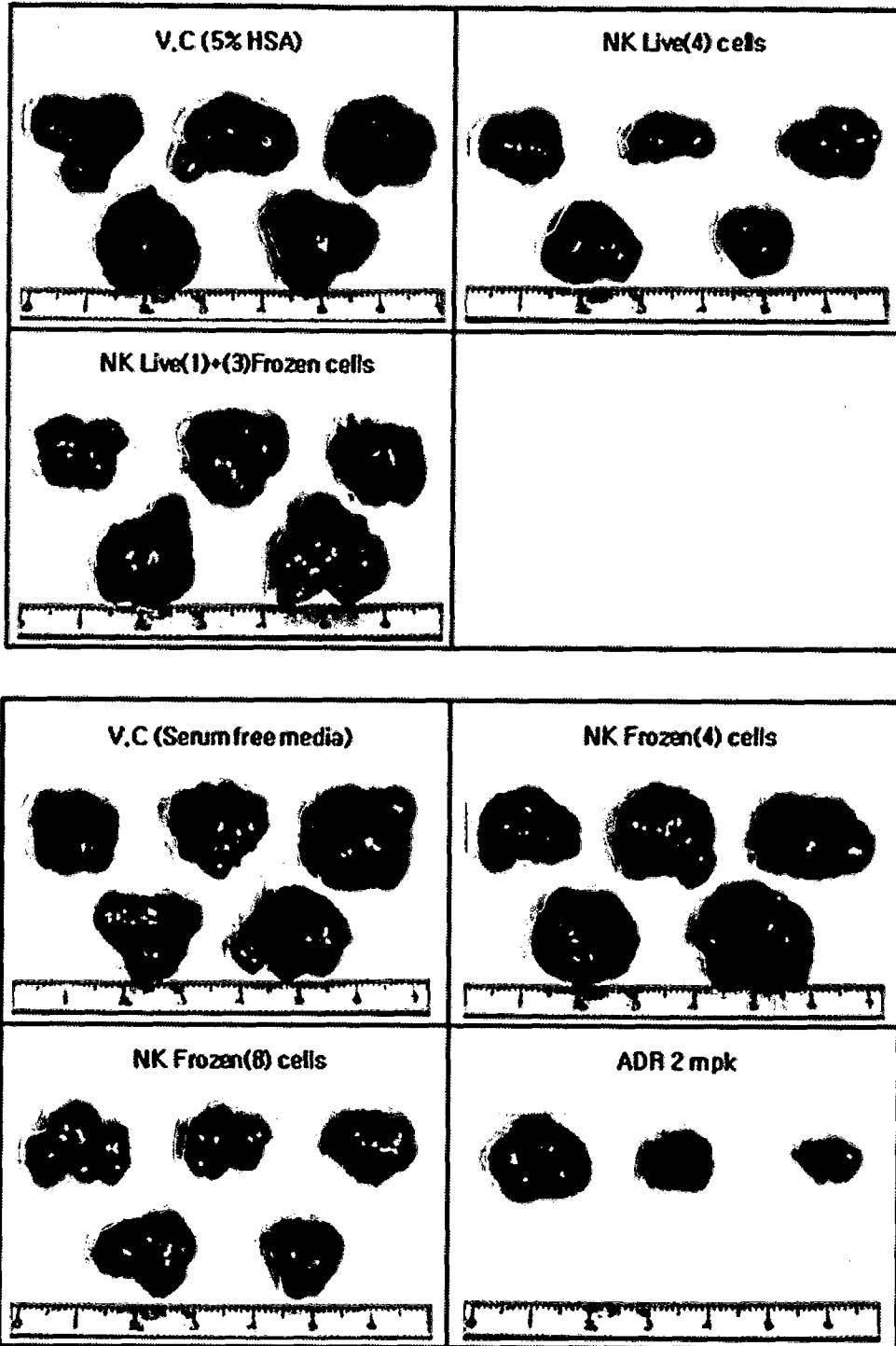
13/22

[도 5b]



14/22

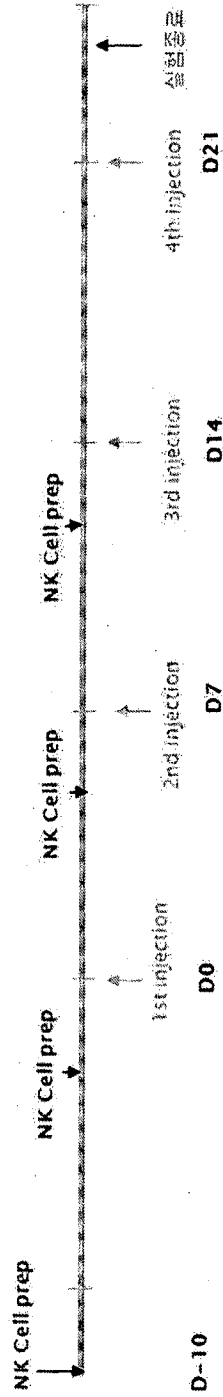
[도 5c]



15/22

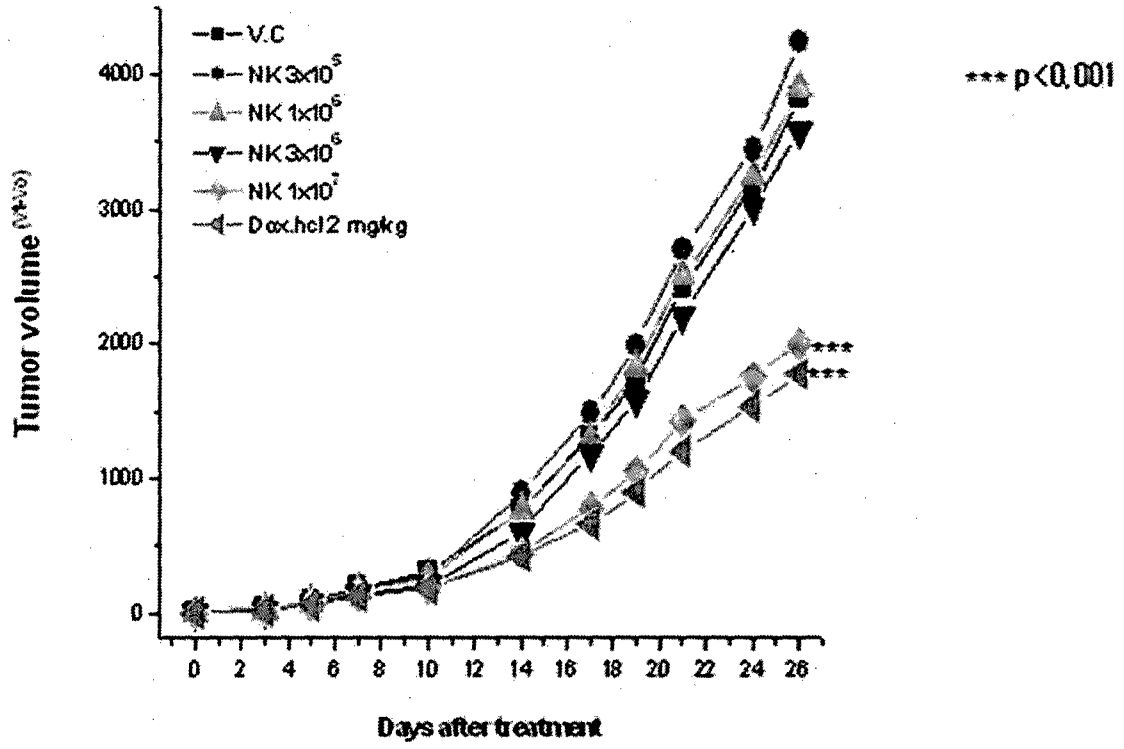
[도 6a]

- G1. 용매대조군 (5% HAS)
- G2. NK cells (live, 3×10^5 cells/mouse)
- G3. NK cells (live, 1×10^6 cells/mouse)
- G4. NK cells (live, 3×10^6 cells/mouse)
- G5. NK cells (live, 1×10^7 cells/mouse)
- G6. doxorubicin.HCl (in saline)(2mg/kg)



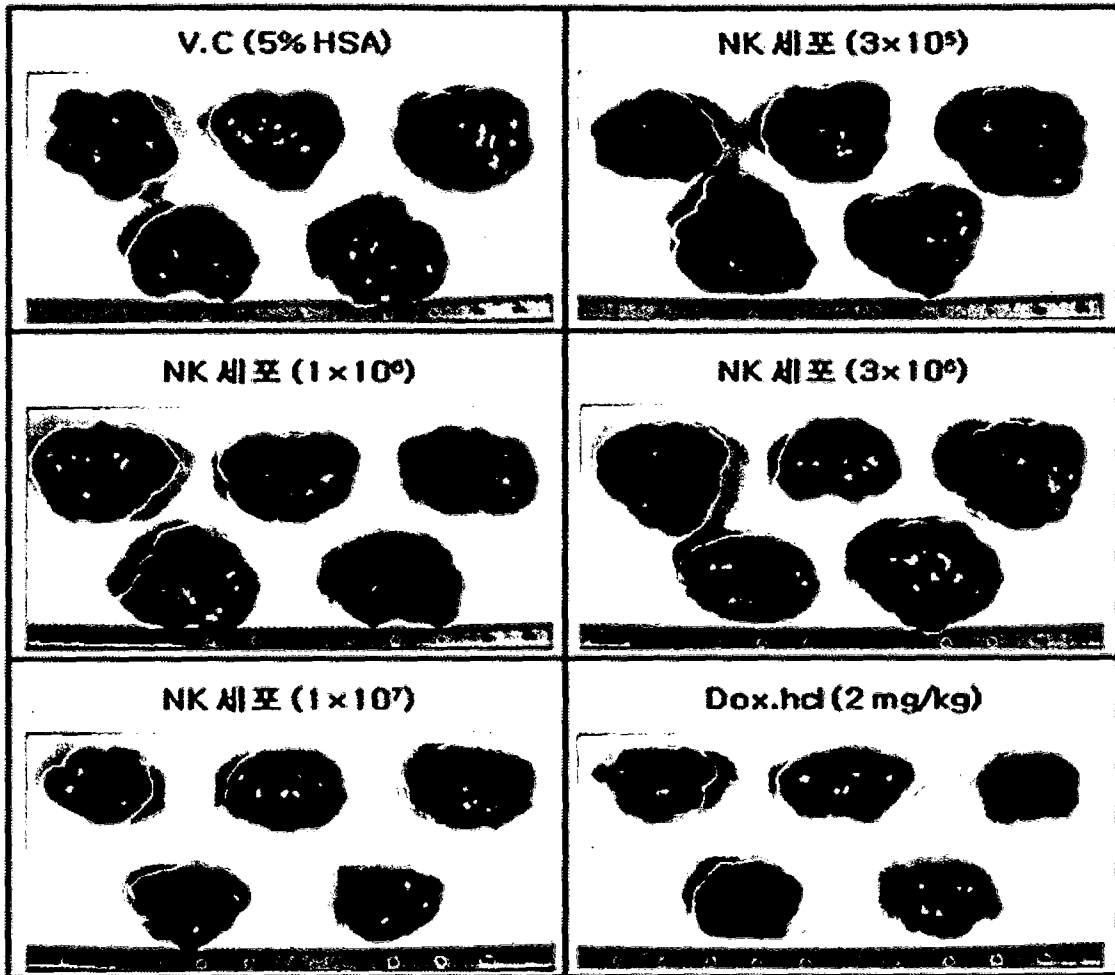
16/22

[도 6b]



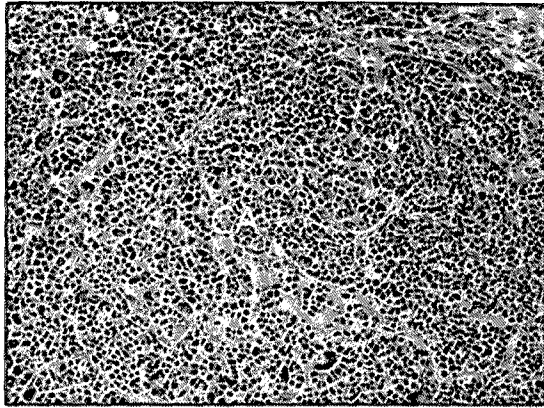
17/22

[도 6c]

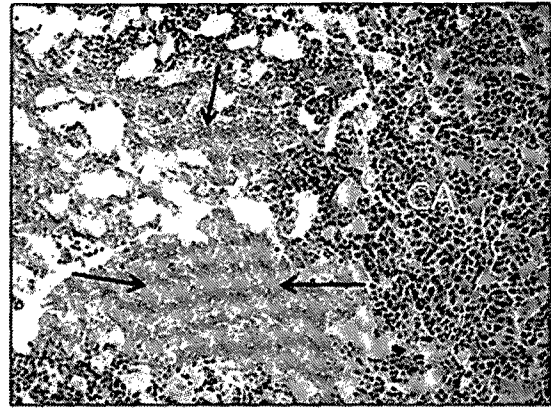


18/22

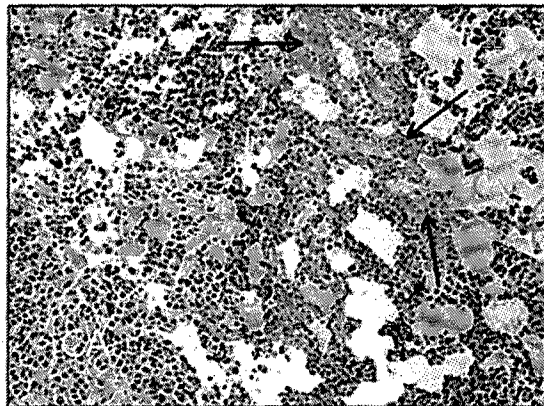
[도 6d]



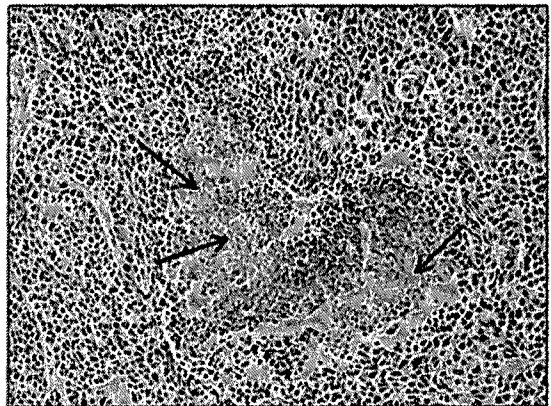
1차 V.O



1차 3×10^5



1차 1×10^6

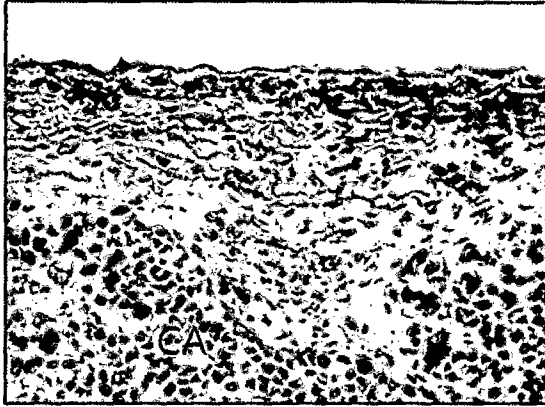


1차 3×10^6

H-E 염색, x200

19/22

[도 6e]



1차 1×10^5

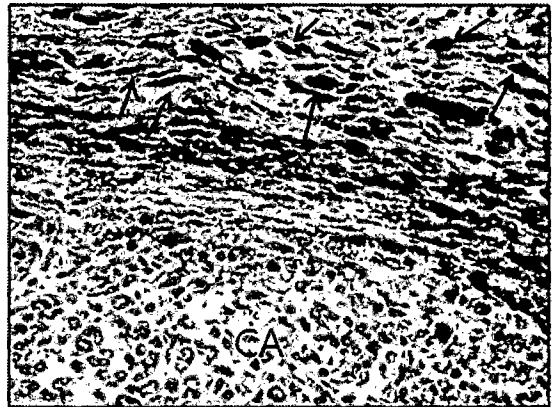


1차 3×10^5



1차 1×10^6

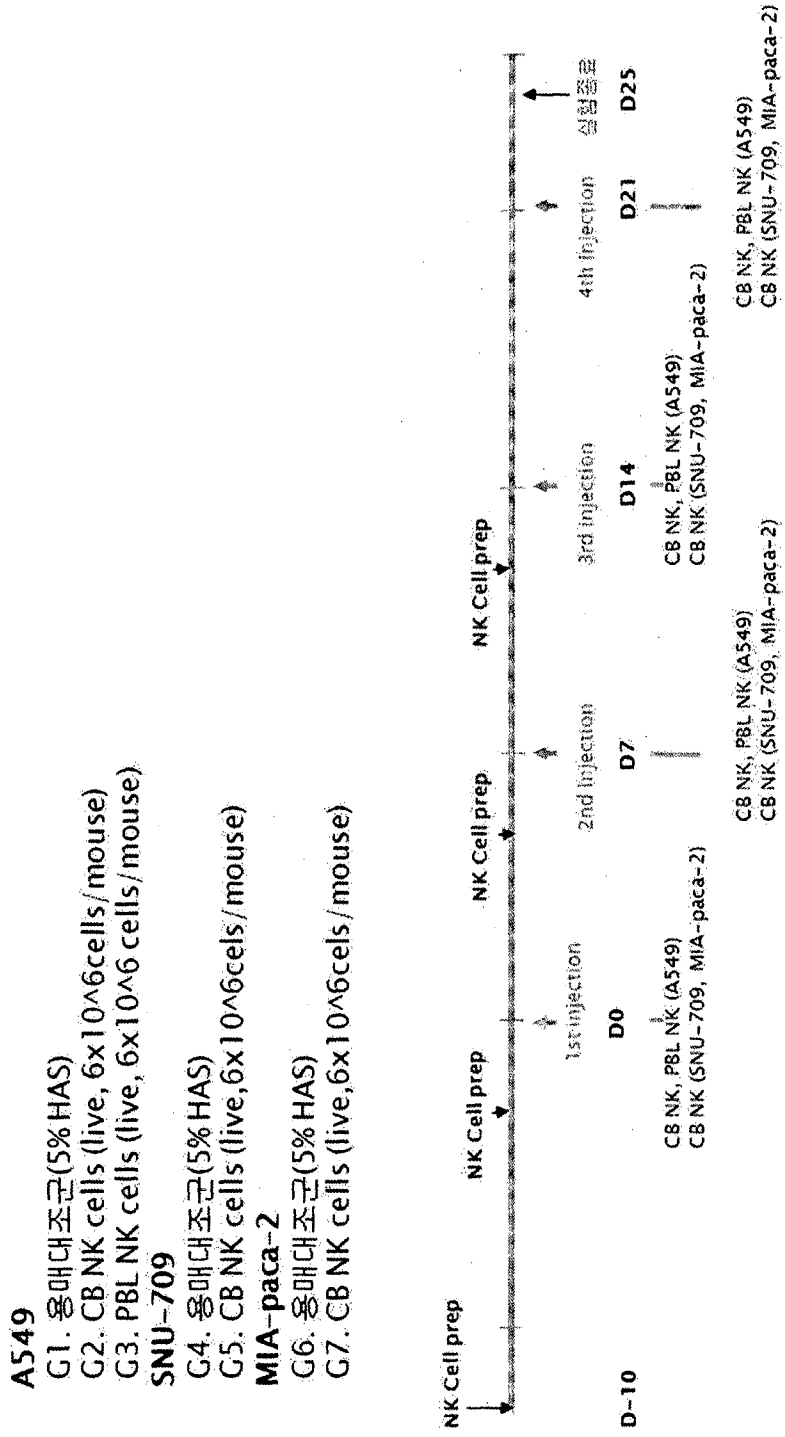
CD56, x400



1차 3×10^6

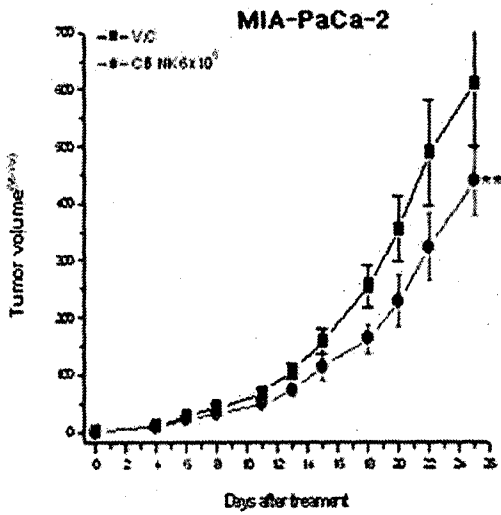
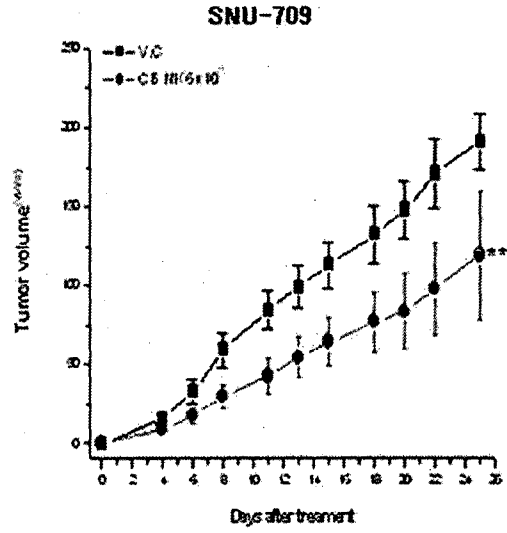
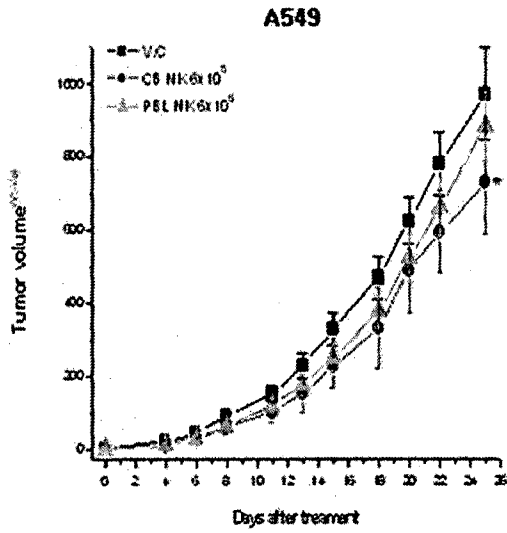
20/22

[도 7a]



21/22

[도 7b]

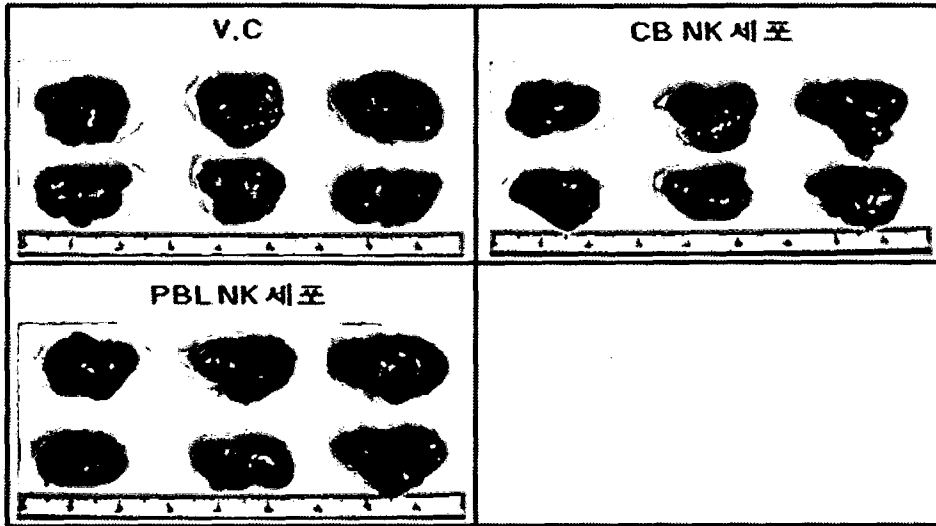


* p < 0.05
** p < 0.01

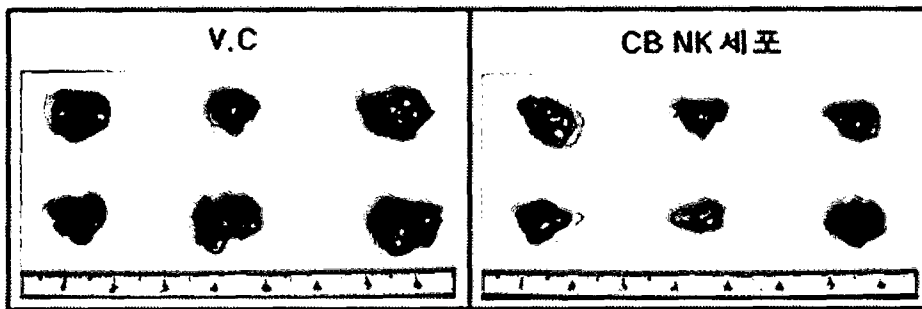
22/22

[도 7c]

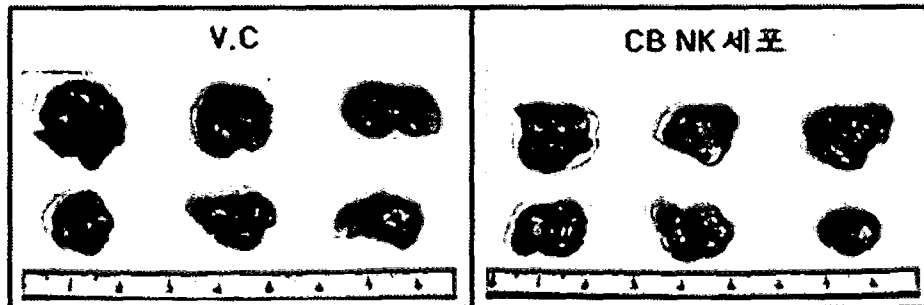
A549 tumor의 최종일(day 25) 사진



SNU-709 tumor의 최종일(day 25) 사진



MIA-PaCa-2 tumor의 최종일(day 25) 사진



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000854

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0783(2010.01)i, A61K 35/14(2006.01)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; C12N 5/071; C12N 13/00; A61K 35/12; A61K 35/26; A61K 35/14; A61P 35/00

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: CD3, monocyte, cytokine, NK cell, anti-cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1077912 B1 (MEDICELL CORPORATION) 31 October 2011 See abstract; claims 1-2, 5-6; paragraphs [0006]-[0009], [0011]-[0035], [0045]-[0055], [0063]-[0094]; figures 1-7; and tables 1-6.	1-21,27-31
X	CHOI, Inpyo et al., "Donor-derived Natural Killer Cells infused after Human Leukocyte Antigen-Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation: A Dose-Escalation Study", <i>Biology of Blood and Marrow Transplantation</i> , 2014, vol. 20, no. 5, pages 696-704 See abstract; pages 696-697, 699, 701-703; figures 1-2; and tables 1-3.	1-7
A	CN 103923879 A (HUBEI HUASAI BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 16 July 2014 See abstract and claims 1-5.	1-21,27-31
A	WO 2013-168978 A1 (UNIV. KOREA RES. & BUS. FOUND.) 14 November 2013 See abstract and claims 1-11.	1-21,27-31
A	DE MARIA, Andrea et al., "Revisiting Human Natural Killer Cell Subset Function revealed Cytolytic CD56dimCD16+ NK Cells as Rapid Producers of Abundant IFN- γ on Activation", <i>PNAS</i> , 2011, vol. 108, no. 2, pages 728-732 See the entire document.	1-21,27-31

 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

"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

"I" 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

26 OCTOBER 2015 (26.10.2015)

Date of mailing of the international search report

26 OCTOBER 2015 (26.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
 Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000854

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 22-26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 22-26 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000854

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1077912 B1	31/10/2011	CN 102356154 A US 2012-0121544 A1 WO 2010-047475 A2 WO 2010-047475 A3	15/02/2012 17/05/2012 29/04/2010 15/07/2010
CN 103923879 A	16/07/2014	NONE	
WO 2013-168978 A1	14/11/2013	CN 104321425 A KR 10-1520534 B1 KR 10-2015-0039592 A US 2015-0152387 A1	28/01/2015 21/05/2015 10/04/2015 04/06/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/0783(2010.01)i, A61K 35/14(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)j		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/0783; C12N 5/071; C12N 13/00; A61K 35/12; A61K 35/26; A61K 35/14; A61P 35/00 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: CD3, 단핵구, 사이토카인, NK 세포, 항암		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-1077912 B1 (주식회사 메디셀) 2011.10.31. 요약; 청구항 1-2, 5-6; 문단 [0006]-[0009], [0011]-[0035], [0045]-[0055], [0063]-[0094]; 도면 1-7; 및 표 1-6 참조.	1-21,27-31
X	CHOI, INPYO 등, `Donor-derived natural killer cells infused after human leukocyte antigen-haploidentical hematopoietic cell transplantation: A dose-escalation study`, Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2014, 20권, 5호, 페이지 696-704 요약; 페이지 696-697, 699, 701-703; 도면 1-2; 및 표 1-3 참조.	1-7
A	CN 103923879 A (HUBEI HUASAI BIO-PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 2014.07.16. 요약 및 청구항 1-5 참조.	1-21,27-31
A	WO 2013-168978 A1 (고려대학교 산학협력단) 2013.11.14. 요약 및 청구항 1-11 참조.	1-21,27-31
A	DE MARIA, ANDREA 등, `Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-γ on activation`, PNAS, 2011, 108권, 2호, 페이지 728-732 전체 문헌 참조.	1-21,27-31
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 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 2015년 10월 26일 (26.10.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 10월 26일 (26.10.2015)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150	

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: 22-26
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제22항 내지 제26항은 사람의 치료방법에 해당하므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1077912 B1	2011/10/31	CN 102356154 A US 2012-0121544 A1 WO 2010-047475 A2 WO 2010-047475 A3	2012/02/15 2012/05/17 2010/04/29 2010/07/15
CN 103923879 A	2014/07/16	없음	
WO 2013-168978 A1	2013/11/14	CN 104321425 A KR 10-1520534 B1 KR 10-2015-0039592 A US 2015-0152387 A1	2015/01/28 2015/05/21 2015/04/10 2015/06/04