

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 8월 24일 (24.08.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/142187 A1

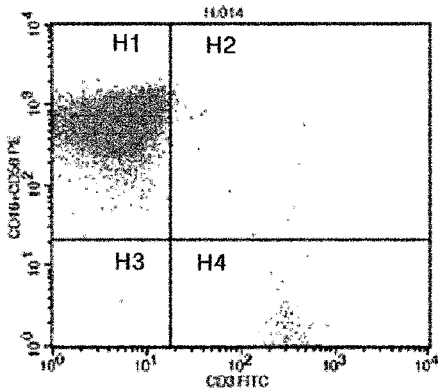
- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0783 (2010.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/015392
- (22) 국제출원일: 2016년 12월 28일 (28.12.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0017073 2016년 2월 15일 (15.02.2016) KR
- (72) 발명자: 겸
- (71) 출원인 : 신동혁 (SHIN, Dong Hyuk) [KR/KR]; 13527 경기도 성남시 분당구 동판교로 122, 205 동 1503 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 아이엠 (IAM PATENT & LAW FIRM); 06135 서울시 강남구 봉은사로 224, 402 호 (역삼동, 혜전빌딩), 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KW, 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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: MEDIUM ADDITION KIT FOR CULTURING NK CELLS AND NK CELL CULTURING METHOD USING KIT

(54) 발명의 명칭 : NK 세포배양용 배지첨가키트 및 상기 키트를 이용한 NK 세포배양방법



Quadrant Statistics

File: H.014
Sample ID:
Tube: Unlabeled
Acquisition Date: 11-Aug-15
Gated Events: 8463
X Parameter: CD3 FITC (Log)
Quad Location: 18, 21

Log Data Units: Linear V
Patient ID:
Panel: Unlabeled Acquisition
Gate: G1
Total Events: 10000
Y Parameter: CD16+CD25

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	8278	97.81	82.78
UR	31	0.37	0.31
LL	2	0.02	0.02
LR	152	1.80	1.52

(57) Abstract: The present invention relates to a method for culturing natural killer cells (NK cells) applied to immune therapy and, more particularly, to a medium addition kit for culturing NK cells with which lymphocytes derived from human peripheral blood can be cultured to effectively amplify and activate NK cells, which have an outstanding therapeutic effect on malignant tumors, while remarkably increasing the share of NK cells, and an NK cell culturing method using the kit.

(57) 요약서: 본 발명은 면역요법에 적용되는 자연살해세포(Natural Killer cell; NK 세포) 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 인간의 말초 혈액에서 유래된 림프구를 배양하여 악성종양 치료에 효과가 뛰어난 NK 세포를 효율적으로 증폭 및 활성화시키는 동시에 NK 세포가 차지하는 비율을 현저하게 증가시킬 수 있는 NK 세포배양용 배지첨가키트 및 상기 키트를 이용한 NK 세포배양방법에 대한 것이다.

WO 2017/142187 A1

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: NK세포배양용 배지첨가키트 및 상기 키트를 이용한 NK세포배양방법

기술분야

- [1] 본 발명은 면역요법에 적용되는 자연살해세포(Natural Killer cell; NK 세포) 배양방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 인간의 말초 혈액에서 유래된 림프구를 배양하여 악성종양 치료에 효과가 뛰어난 NK세포를 효율적으로 증폭 및 활성화시키는 동시에 NK세포가 차지하는 비율을 현저하게 증가시킬 수 있는 NK세포배양용 배지첨가키트 및 상기 키트를 이용한 NK세포배양방법에 대한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 면역요법은 자연살해세포(Natural Killer cell; NK 세포), 수지상세포(DC), B 세포, T 세포 등 암 치료에 가장 중요한 면역세포를 환자의 혈액에서 추출한 후 여러 종류의 자극제를 이용하여 암에 강하게 작용하는 면역세포로 키운 뒤 다시 환자에게 주입하는 방법으로서, 환자 자신의 혈액을 사용하기 때문에 종래의 화학요법 등에 비해 부작용도 적고 투여법도 간편하여 최근 들어 활발하게 연구되고 있다.
- [4] 면역요법에서 활성화시키는 면역세포 중에서 특히 NK 세포는 림프구의 일종인 특징적인 형태인 거대과립형 림프구(LGL, Large granular lymphocytes)로서, 감염된 바이러스, 종양세포를 죽이는 능력이 뛰어나고 대부분의 정상 세포는 죽이지 않는 특성을 가지고 있는데, 그 항종양 작용은 괴사(necrosis)나 세포예정사(apoptosis), 또는 이들 두 가지 작용기전이 동시에 발생하여 이루어진다. NK 세포는 IL-2, IL-12, 인터페론(Interferon) 등의 사이토카인(cytokine)에 반응하며 이에 의해 역가(cytotoxicity), 분비성(secretory), 증식성(proliferative) 기능이 상승한다. NK 세포의 표현형(phenotype)은 사람에게 있어서 CD16(Fc γ RIII), CD56이며, CD16과 CD56은 세포표면에 TRC(T-cell receptor complex)가 없어 NK세포에 대한 마커(marker)로 활용된다.
- [5] 이와 같은 NK 세포는 초기 생체방어 기구와 인체의 종양면역에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 즉, NK 세포는 주요조직적합유전자 복합체(Major Histocompatibility Complex : MHC)의 발현에 따른 면역 획득 과정 없이도 특정자기세포, 동종세포, 심지어 이종 암세포도 살상할 수 있으며, 특히 Class1 MHC를 적게 발현하거나 발현하지 않는 표적 세포들을 더 잘 죽일 수 있다. 따라서, NK 세포는 MHC가 발현되지 않는 대부분의 암세포를 효과적으로 죽일 수 있으며, 그 외에도 몇몇 바이러스에 감염된 세포와 장티프스균(salmonella typhi)과 같은 세균들을 죽일 수 있다.

- [6] 그러나, 이와 같이 암세포 살상에 탁월한 작용을 하는 NK 세포는 정상적인 사람인 경우에도 말초혈액 림프구의 5 ~ 15 % 만을 차지하고 있으며, 특히 암환자의 경우에는 그 비율이 1 % 미만으로 저하되기 때문에, 면역요법을 통한 별도의 증폭 과정 없이는 암세포를 효과적으로 공격하는 데에 한계가 있다.
- [7] 면역세포 특히 NK세포를 활성화하고 증식시키는데 있어서 IL-2 등의 Cytokine 과 CD3 등의 항체가 사용된다. 현행 기술은 면역세포의 증식에 있어서 매우 중요한 역할을 하는 것이 CD3 항체인데, 문제는 이 항체를 이용해서 면역세포를 활성화 시키는 것이 매우 까다롭다는 것이다. 즉, 면역세포 배양 시 현재의 일반적인 기술은 CD3항체를 플라스크에 고정화 시켜서 일정시간 자극하는 방법을 주로 사용한다. 그러나 면역세포의 경우 각 개인마다 감수성이 다르고 또한 세포배양 조건 또는 작업자의 숙련 정도에 따라서 매우 많은 차이가 난다. 예를 들면 CD3 항체의 자극이 적게 되거나 거의 안 되면 면역세포는 증식이 잘 안 된다. 또한 너무 많이 자극이 되면 NK세포는 거의 증식이 안 되고 NKT세포 또는 T세포가 많이 증식이 된다. 이 경우 특히 T세포가 많이 증식되기 때문에 NK세포를 많이 증식시켜 얻기란 쉽지 않다.
- [8] 특히, 처음부터 CD3 항체의 강한 자극이 가해지면 미성숙 전구세포들은 T세포로 성숙하게 되므로 일반적으로 행해지고 있는 현행 방법은 처음에 CD3 항체를 살짝 자극하는 방법을 사용하는데, 개인 차 등 주변 환경 요건에 의해 많이 좌우되어 활성화된 많은 양으로 증식된 NK세포를 얻는데 어려움이 있다.
- [9] 따라서, 현행 방법에서 반드시 플라스크에 CD3 항체를 고정한 후 일정시간 반응시켜야 하는 까다로움을 제거하면서도 NK 세포를 안정적으로 증폭시켜 대량으로 증식시킬 수 있는 새로운 배양배지 조성물 및 배양방법에 대한 개발 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

[10]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 본 발명자는 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 연구 노력한 결과, 항CD3 항체를 고정한 후 일정시간 반응시킨 후 제거하는 공정을 수행하지 않더라도 림프구배양액에서 NK세포를 안정적으로 증폭시킬 수 있는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [12] 따라서, 본 발명의 목적은 림프구를 자극하기 위해 항CD3 항체를 배양용기에 고정화시킨 상태로 림프구(면역세포)를 일정시간 배양하는 번거로운 과정을 제거하면서도 최종적으로 얻어지는 림프구배양액에서 NK 세포를 안정적으로 증폭시켜 대량으로 증식시킬 수 있는 조성을 갖는 NK세포배양용 배지첨가키트를 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 다른 목적은 배지첨가키트에 포함된 유닛을 구성하는 첨가제를 순차적으로 사용함으로써 즉 림프구에 자극을 주는 순서를 특정함으로써

최종적으로 얻어지는 림프구배양액에서 T세포의 비중은 낮고 NK세포의 비중이 현저하게 높은 안정적인 NK세포배양방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 림프구배양시 NK세포가 현저하게 높은 비율의 증식될 수 있도록 배양단계에서 첨가되어야 하는 배지첨가제를 규격화함으로써 극히 용이하게 NK세포를 배양할 수 있는 NK세포배양용 배지첨가키트 및 배양방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[16]

과제 해결 수단

[17] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 IL-2, L-글루타민 및 세포배양용 배지를 포함하는 기본용액으로 구성된 B유닛(IL-2가 약 3600 IU/mL이고 L-glutamine이 5uM/mL); IL-12가 0.5~5 ng/mL농도 및 IL-18가 2~50 ng/mL 농도로 포함되도록 상기 IL-12 및 IL-18을 상기 기본용액에 용해시켜 형성된 사이토카인1용액으로 구성된 C1유닛; IL-15가 10~35ng/mL 농도로 포함되도록 상기 IL-15를상기 기본용액에 용해시켜 형성된 사이토카인2용액으로 구성된 C2유닛; 항CD16 및 항CD56이 각각 0.1 ~ 15ug/mL농도로 포함되도록 상기 항CD16 및 항CD56을 상기 기본용액에 용해시켜 형성된 항체1용액으로 구성된 A1유닛; 상기 항체1용액: 상기 기본용액을 1:6~10의 부피비로 포함하는 항체2용액으로 구성된 A2유닛; 및 항CD3가 1~12 ug/mL농도로 포함되도록 상기 항CD3를 상기 사이토카인1용액에 용해시켜 형성된 항체-사이토카인혼합용액으로 구성된 D유닛;을 포함하는 NK세포배양용 배지첨가키트를 제공한다.

[18] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 A1유닛이 상기 D유닛보다 림프구배양배지에 먼저 첨가된다.

[19] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 A1유닛에 포함된 상기 항CD16, 항CD56 및 상기 기본용액이 분리 포장되고, 배지첨가단계에서 혼합되어 상기 항체1용액을 형성한다.

[20] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 A2유닛에 포함된 상기 항체1용액의 항CD16, 항CD56 및 상기 기본용액과 상기 기본용액은 각각 분리 포장되고, 배지첨가단계에서 혼합되어 상기 항체2용액을 형성한다.

[21] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 D유닛에 포함된 항CD3 및 상기 사이토카인1용액은 각각 분리 포장되고, 배지첨가단계에서 혼합되어 상기 항체-사이토카인혼합용액을 형성한다.

[22] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 유닛들은 A1유닛, D유닛, C1유닛, A2유닛, C2유닛, A2유닛 및 B유닛의 순서로 림프구배양배지에 첨가되도록 구성된다.

- [23] 또한, 본 발명은 분리된 림프구에 A1유닛의 항체1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제1단계; 상기 제1단계가 수행된 배지에 D유닛의 항체-사이토카인혼합용액을 첨가하는 제2단계; 상기 제2단계가 수행된 배지에 C1유닛의 사이토카인1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제3단계; 상기 제3단계가 수행된 배지에 A2유닛의 항체2용액을 첨가한 다음 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 제4단계; 상기 제4단계가 수행된 배지에 C2유닛의 사이토카인2용액을 첨가한 다음 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 제5단계; 상기 제5단계가 수행된 배지에 항체3용액 및 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 제6단계; 및 상기 제6단계가 수행된 배지에 B유닛의 기본용액 및 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 7단계;를 포함하는 NK세포배양방법을 제공한다.
- [24] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 항체3용액은 상기 A2유닛을 구성하는 항체2용액의 일부를 사용한다.
- [25] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 자가혈장은 혈장 1mL당 헤파린이 40 usp unit 이상 포함된다.
- [26] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 첨가되는 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것의 함량은 전체배지의 10부피% 미만이다.
- [27] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 제1단계 수행 후 상기 제2단계가 수행되기까지 24시간 이상의 간격을 갖는다.
- [28] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 제4단계 및 상기 제6단계는 각각 그 이전 단계보다 더 큰 부피를 갖는 배양용기에서 배양된다.
- [29] 또한, 본 발명은 상술된 어느 하나의 배지첨가키트로 배양된 NK세포배양액 또는 중 어느 하나의 배양방법으로 배양된 NK세포배양액을 제공한다.
- [30] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 NK세포배양액에 포함된 세포수는 3.1×10^9 이상이고, 이중 NK세포의 비율이 80% 이상이다.

[31]

발명의 효과

- [32] 본 발명은 다음과 같은 우수한 효과를 갖는다.
- [33] 먼저, 본 발명의 NK세포배양용 배지첨가키트는 림프구를 자극하기 위해 항CD3 항체를 배양용기에 고정화시킨 상태로 림프구(면역세포)를 일정시간 배양하는 번거로운 과정을 제거하면서도 최종적으로 얻어지는 림프구배양액에서 NK 세포를 안정적으로 증폭시켜 대량으로 증식시킬 수 있는 조성을 갖는다.
- [34] 또한, 본 발명의 NK세포배양방법은 배지첨가키트에 포함된 유닛을 구성하는 첨가제를 순차적으로 사용함으로써 즉 림프구에 자극을 주는 순서를 특정함으로써 최종적으로 얻어지는 림프구배양액에서 T세포의 비중은 낮고 NK세포의 비중이 현저하게 높은 안정적인 활성화 림프구를 제공할 수 있다.

[35] 또한, 본 발명에 의하면, 림프구배양시 NK세포가 현저하게 높은 비율의 증식될 수 있도록 배양단계에서 첨가되어야 하는 배지첨가제를 규격화함으로써 극히 용이하게 NK세포를 배양할 수 있다.

[36]

도면의 간단한 설명

[37] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 NK세포배양용 배지첨가키트를 이용한 NK세포 배양방법을 통해 얻어지는 활성화 림프구의 표현형 변화를 나타내는 그래프.

[38] 도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른 NK세포배양용 배지첨가키트를 이용한 NK세포 배양방법을 통해 얻어지는 활성화 림프구의 표현형 변화를 나타내는 그래프.

[39] 도 3은 본 발명의 또 다른 실시예에 따른 NK세포배양용 배지첨가키트를 이용한 NK세포 배양방법을 통해 얻어지는 활성화 림프구의 표현형 변화를 나타내는 그래프.

[40]

발명의 실시를 위한 형태

[41] 본 발명에서 사용하는 용어는 단지 특정한 실시예들을 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[42] 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성 요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성 요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안된다. 상기 용어들은 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다. 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제1 구성 요소는 제2 구성 요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제2 구성 요소도 제1 구성 요소로 명명될 수 있다.

[43] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 하며, 본 발명에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[44] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.

[45] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로

구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.

- [46] 본 발명의 기술적 특징은 림프구를 자극하기 위해 항CD3 항체를 배양용기에 고정화시킨 상태로 림프구(면역세포)를 일정시간 배양하는 번거로운 과정 없이도 최종적으로 얻어지는 림프구배양액에서 NK 세포를 안정적으로 증폭시켜 대량으로 증식시킬 수 있는 조성을 갖는 NK세포배양용 배지첨가키트 및 그 배지첨가키트를 이용한 배양방법에 있다.
- [47] 즉, 본 발명에서는 항CD16 및 항CD56 항체를 이용하여 먼저 자극을 주고 약 24 ~ 48시간 후 항CD3 항체를 그냥 단순히 배지 내에 추가 해 주는 것만으로도 NK세포를 최소 500배에서 최대 5000배 이상까지도 안정적으로 증식시킬 수 있기 때문이다.
- [48] 이와 같이 본 발명에서 개발한 원리에 따라 아직 성숙되지 않은 미성숙 전구세포를 항CD16 및 항CD56 항체로 자극하여 NK 세포로 분화를 유도하고 이미 성숙된 NK세포를 활성화 한 후 T세포에 항CD3 항체를 자극하여 활성화 된 T세포가 NK세포를 활성화 하게 하면 항CD3항체가 배양배지 내에서 분해되어 없어질 때까지 자극을 줘도 아무 문제없이 NK 세포가 많이 증식됨을 확인한 실험결과로부터, 본 발명의 배양방법에서는 림프구를 자극하기 위해 항CD3 항체를 배양용기에 고정화시킨 상태로 림프구(면역세포)를 일정시간 배양하는 번거로운 과정 없이도 NK세포의 비율이 매우 높게 림프구를 배양할 수 있는 것을 알 수 있다.
- [49] 따라서, 본 발명의 NK세포배양용 배지첨가키트는 림프구배양의 각 단계에서 배지에 첨가될 수 있도록 각각 개별적으로 포장되고 내용물 즉 구성성분이 다른 B유닛, C1유닛, C2유닛, A1유닛, A2유닛 및 D유닛을 포함한다. 여기서, 상기 유닛들은 림프구배양시 배양된 세포의 대부분이 NK세포일 수 있도록 림프구배양배지에 미치는 영향을 고려하여 포함될 구성성분이 결정되는데, A1유닛, D유닛, C1유닛, A2유닛, C2유닛, A2유닛 및 B유닛의 순서로 림프구배양배지에 첨가되면 기존배양방식과 비교하여 NK세포를 최소 500배 내지 5000배까지 안정적으로 증식시킬 수 있도록 구성된다.
- [50] 먼저, B유닛은 기본용액으로 구성되는데, 기본 용액은 IL-2, L-글루타민 및 세포배양용 배지를 포함한다. 이때 IL-2의 함량은 100ng/mL ~ 300ng/mL일 수 있는데, 바람직하게는 200 ~ 250 ng/mL(3240IU/mL ~ 4000IU/mL)의 농도로 포함될 수 있다.
- [51] 주지된 바와 같이 IL-2는 T 세포가 항원을 인식하여 활성화될 때 만들어지는 분자량 14 ~ 17 kDa의 당단백질(glycoprotein)로서, T 세포 밖으로 분비된 다음, IL-2를 생산한 T 세포 자신과 반응하여 해당 T 세포의 성장을 촉진하게 된다. IL-2는 또한 NK 세포에 작용하여 성장을 촉진하고 NK 세포의 살해능력을 강화하며, B 세포에 작용하여 그 성장을 촉진하기도 한다. L-글루타민은 면역세포 배양을 위한 영양분으로 작용하는 성분이고, 세포배양용배지는

부유세포배양용 기본배지로서 공지된 상태의 것을 사용할 수 있다.

- [52] B유닛의 구체적인 구현예로서 IL-2 2mg과 500mM L-glutamine 용액100mL를 부유세포 배양용 기본 배지(시중에서 판매되고 있는 세포 배양배지, 만약 기본 배지에 IL-2 또는 L-glutamine 이 이미 존재할 경우 최종농도를 맞추기 위해 첨가량을 조정한다)에 넣어 녹이고 최종 10L를 만들어 기본용액(B유닛)을 제조할 수 있다.
- [53] C1유닛은 사이토카인1용액으로 구성되는데, 사이토카인1용액은 IL-12, IL-18 및 기본용액을 포함한다. 여기서, 사이토카인1용액 중 IL-12는 0.5 ng/mL~ 5 ug/mL의 농도로 포함될 수 있는데, 바람직하게는 1-3 ng/mL의 농도, 보다 바람직하게는 1.5ug/mL ~ 2.5ug/mL의 농도일 수 있다. IL-18은 2ng/mL ~ 50ng/mL의 농도로 포함될 수 있는데, 바람직하게는 8ng/mL ~ 20ng/mL의 농도, 보다 바람직하게는 11ng/mL ~ 15ng/mL의 농도로 포함될 수 있다.
- [54] 주지된 바와 같이 IL-12는 수지상세포(DC)와 매크로파지, B세포에서 생산된다. IL-12는 NK세포와 T 림프구에서 IFN- γ 와 TNF- α 의 생산을 유도하며, IFN- γ 를 저해하는 IL-4의 생산을 감소시키는 역할을 한다. 또한 NK 세포와 CD8+ cytotoxic T림프구의 세포독성을 증가시킨다. IL-12는 NK세포 내에 IL-2 신호전달체계와 밀접한 관계를 갖고 있다. 또한, IL-2는 NK세포 내에 IL-12 수용체 β 1과 IL-12 수용체 β 2의 발현을 유도하여 IL-12 신호전달체계에 관련된 단백질들을 발현시키고 활성화시킨다. 이러한 기전은 NK세포의 IFN- γ 생산 능력과 타겟세포 살해능력에서 잘 증명되었다. IL-12 수용체 β 2는 IL-12 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 보이는데, 이것은 Th2의 발생을 저해하는 동시에 Th1의 발생을 진행시키는 것으로 보고되었다. T세포와 NK세포에서 IL-12의 신호전달은 JAK-STAT 신호전달체계에 포함되며 IL-12 수용체 β 2의 활성화는 전사인자인 STAT4의 인산화를 유도하여 활성화시키는데 중요한 역할을 한다.
- [55] 또한 IL-18은 매크로파지에서 생산되며 proinflammatory 사이토카인 유전자이다. IL-18은 IL-18 수용체에 결합하여 IL-12와 함께 박테리아나 바이러스에 감염된 세포에 면역반응을 일으키며 NK세포와 T세포에서 IFN- γ 의 생산을 증가시킨다.
- [56] C1유닛의 구체적인 구현예로서 IL-12 10ug 및 IL-18 50ug을 물에 녹여 10mL로 만들어 사이토카인용액 (IL-12 : 1ug/mL의 농도 IL-18 : 5ug/mL의 농도)을 제조한 다음, 사이토카인용액 1mL를 기본 용액 500mL에 녹여 IL-12가 2ng/mL의 농도로 포함되고, IL-18가 10ng/mL의 농도로 포함되도록 사이토카인1용액(C1유닛)을 제조할 수 있다.
- [57] C2유닛은 사이토카인2용액으로 구성되는데, 사이토카인2용액은 IL-15 및 기본용액을 포함하는 구성을 갖는다. 사이토카인2용액 중 IL-15의 함량은 10 ~ 50ng/mL의 농도일 수 있는데, 바람직하게는 15ng/mL ~ 25ng/mL일 수 있다.
- [58] 주지된 바와 같이, IL-15는 4개의 helix bundle cytokine family에 속하는 다면발현성 사이토카인으로 많은 종류의 세포에 작용하여 증식, 생존, 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 IL-15는 좀더 다양한 세포에서

발현되므로 IL-2와 비교하여 좀더 넓고 다양한 조절 작용을 할 수 있다. 특히, 면역반응의 각각의 phase에 영향을 주고 있으며, 또 각 단계의 면역반응에 관여하는 많은 종류의 세포에 작용하는데, 일련의 연구결과는 IL-15가 직접적으로 memory T cell의 형성에 관여한다고 논증하고 있다.

- [59] C2유닛의 구체적인 구현예로서 IL-15를 기본 용액에 녹여 농도 20ng/mL의 농도로 만들어 사이토카인2용액(C2유닛)을 제조할 수 있다.
- [60] A1유닛은 항체1용액으로 구성되는데, 항체1용액은 항CD16, 항CD56 및 기본용액을 포함한다. 이때 A1유닛을 구성하는 항체1용액 중 항CD16 및 항CD56의 함량은 각각 0.1 ~ 2.0 ug/mL일 수 있으며, 바람직하게는 각각 0.5 ~ 0.7ug/mL의 농도일 수 있다.
- [61] 주지된 바와 같이 CD16 및 CD56은 NK세포의 표면단백질로서, 항CD16 항체 또는 항원항체복합체의 존재하에 림프구를 배양하게 되면 NK 세포에 CD16 항원이 첨가되어 신호전달이 일어나는데, 이들의 자극에 의해서 NK 세포에 IL-2 수용체의 α 사슬 등 트랜스페린(transferrin) 수용체가 발현하거나, 또는 종양괴사인자(tumor necrosis factor; TNF)나 IFN- γ 가 생산될 수 있게 된다. 항CD56항체 또한 항 CD16항체와 비슷한 기능을 수행하게 된다.
- [62] A1유닛의 구체적인 구현예로서 항CD16 및 항CD56 용액(1mg/mL)을 각각 6uL씩을 기본용액 10mL에 녹여서 항체1용액(A1유닛)을 제조할 수 있다.
- [63] A2유닛은 항체2용액으로 구성되는데, 항체2용액은 항체1용액: 기본용액을 1:6~10의 부피비로 포함할 수 있으므로, A2유닛의 구체적인 구현예로는 항체1용액 6.5mL에 기본용액 30mL를 섞어서 항체2용액을 제조할 수 있다. 항체2용액 중 일부는 A2유닛을 구성하고, 일부는 A3유닛을 구성할 수 있다.
- [64] 이와 같이 항체가 이미 기본용액에 첨가된 상태로 제조된 A1유닛 내지 A3유닛은 냉장 보관시 1~2 개월 정도 사용가능하므로 사용기한을 연장시키기 위해 A1유닛 내지 A3 유닛을 구성하는 항CD16, 항CD56, 기본용액은 개별적으로 분리 포장되고 배지첨가단계에서 혼합되어 각각 항체1용액, 항체2용액, 항체3용액을 형성하도록 구현할 수도 있다.
- [65] D유닛은 항체-사이토카인혼합용액으로 구성되는데, 항체-사이토카인혼합용액은 항CD3 및 사이토카인1용액을 포함할 수 있다. 이때 항CD3의 함량은 1ug/mL ~ 12ug/mL일 수 있으며, 바람직하게는 3ug/mL ~ 8ug/mL일 수 있고, 보다 바람직하게는 4ug/ml ~ 5ug/mL일 수 있다.
- [66] 주지된 바와 같이, T cell은 TCR을 통해 신호를 받으면 activation 되지만, TCR 알파나 베타 체인은 그 스스로 activation signal을 전달하지 못하고 TCR 주변에 있는 CD3 chain을 통해 시그널을 전달하게 된다. 즉 CD3 항원은 TCR이 항원을 인식하면 그 신호를 세포내로 전달하는 역할 예를 들어 TRC가 MHC+항원과 결합할 때, 결합했다는 신호를 세포 내로 주는데, TCR은 CD3 항원 (γ , δ , ϵ , ζ , ζ 또는 η)과 복합체를 형성하고 있다.
- [67] D유닛의 구체적인 구현예로서 항CD3 용액(1mg/mL) 5uL를 사이토카인1용액

1mL에 녹여서 항체-사이토카인혼합용액(D유닛)을 제조할 수 있다.

[68] D유닛의 경우에도 항체가 이미 사이토카인1용액에 첨가된 상태로 제조되면 냉장 보관시 1~2개월 정도 사용가능하다. 따라서 사용기한을 연장시키기 위해 D유닛을 구성하는 항CD3 및 사이토카인1용액은 개별적으로 분리 포장되고 배지첨가단계에서 혼합되어 항체-사이토카인혼합용액을 형성하도록 구현할 수도 있다. 이 경우 사용기한을 6개월 이상 연장할 수 있다.

[69] 다음으로, 본 발명의 NK세포배양용 배지첨가키트를 이용한 NK세포배양방법은 분리된 림프구에 A1유닛의 항체1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제1단계; 상기 제1단계가 수행된 배지에 D유닛의 항체-사이토카인혼합용액을 첨가하는 제2단계; 상기 제2단계가 수행된 배지에 C1유닛의 사이토카인1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제3단계; 상기 제3단계가 수행된 배지에 A2유닛의 항체2용액을 첨가한 다음 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제4단계; 상기 제4단계가 수행된 배지에 C2유닛의 사이토카인2용액을 첨가한 다음 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제5단계; 상기 제5단계가 수행된 배지에 항체3용액 및 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제6단계; 및 상기 제6단계가 수행된 배지에 B유닛의 기본용액 및 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 7단계를 포함한다. 여기서, 항체3용액은 상기 A2유닛을 구성하는 항체2용액의 일부를 사용하고, 첨가되는 자가혈장 또는 FBS의 함량은 전체배지의 10부피%미만이다. 증식을 방해하지 않도록 제4단계 및 제6단계는 각각 그 이전 단계보다 더 큰 부피를 갖는 배양용기에서 배양될 수 있다.

[70] 한편, 본 발명의 배양단계에서 첨가되는 자가 혈장은 헤파린이 공지된 배양방법에서 사용되는 자가혈장에 포함된 헤파린의 양보다 최소 3배 이상이 더 많이 포함된 것이다. 즉, 통상 채혈시 헤파린을 혈액 10mL당 158 usp unit을 사용할 지라도 혈액은 응고되지 않으나, 혈장 약 5ml당 158 usp unit으로 세포배양액에 넣었을 때 묵처럼 응고되는 현상으로 세포 배양이 잘 되지 않기 때문이다. 하지만 본 발명에서는 최소한 통상사용량의 3배 이상의 헤파린을 사용하였을 경우 응고 현상 없이 세포가 잘 배양될 수 있음을 확인하였는데, 알려진 것보다 헤파린을 3~4배 이상 사용하여도 배양에 문제가 없음을 확인하였다. 또한 일반적으로 사용하는 혈장 불활성화 방법에서 섭씨 56도에서 30분간 가열하여 보체 등 단백질 등을 제거할 때 세포 배양에 필요한 유효성분들이 같이 제거 되지만, 본 발명과 같이 약 3배 이상의 헤파린을 사용하고 혈장불활성화 방법을 사용하지 않았을 때 배양에 필요한 유효성분들의 손실이 없기 때문에 소량의 혈장(plasma)를 사용할 수 있었다. 예를 들어 기존에는 배양액의 10부피%이상이 사용되지만, 본 발명에서 10부피%미만으로 3부피% 내지 7부피%만 사용하여도 배양이 잘 됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 배양방법에 사용되는 자가혈장은 혈장 1ml당 헤파린이 40 usp unit이상, 바람직하게는 50 ~ 60 usp unit이상 포함될 수 있다.

[71] 또한, 제1단계가 수행된 후 제2단계가 수행될 때까지는 24시간 이상의 간격을

두어 항체1용액으로 즉 IL-2 존재 하에 항CD16과 항CD56으로 충분히 림프구를 자극하도록 한 후 제2단계가 수행되어 D용액에 포함된 항CD3 항체가 고정화되지 않고 배지에 첨가되어 항CD3항체가 배양배지 내에서 분해되어 없어질 때까지 자극을 주더라도 특별한 문제가 전혀 발생하지 NK세포가 많이 증식됨을 본 발명을 통해 확인하였다.

- [72] 한편 통상 면역세포 배양은 14일에서 17일간 배양되며 이때 최대로 증식된 면역세포를 얻을 수 있음은 주지의 사실이다. 본 발명에서도 14일에서 17일 간 배양하였을 경우, 배양과정 중 세포가 자라는 특성을 살펴보았을 때 면역세포를 1 L bag에 옮긴 후에는 면역세포를 자극하기 위한 별다른 Cytokine이나 항체를 첨가하지 않는다. 즉, 면역세포가 이미 충분히 자극이 되었으므로 1 L bag에서 계속 증식이 되는 것이다. 면역세포가 충분히 증식된 후에는 증식 횟수의 제한이 있으므로 한계치에 다다른 후에는 사멸하게 된다. 따라서 약 14일에 걸쳐 면역세포 수를 최대로 증가시켜 환자에게 투여하여 항암효과를 기대할 수도 있지만 1L bag에 옮기기 전에 수확하여 환자에게 투여하는 방법도 고려해 볼 수 있다. 이 경우 환자에게 투여되는 면역세포 수($5 \times 10^7 \sim 25 \times 10^7$)는 14일 배양한 것 보다 적지만 아직 증식 한계치에 다다르지 않은 젊은 면역세포가 많아 인체에 투여되었을 때 우리 몸 안에서 더 오래 살며 또한 한계치에 다다른 때까지 계속 증식될 수 있어 종전 방법과는 색다른 효과를 기대할 수도 있다. 이는 항암효과 또는 암 예방 효과는 암의 종별, 시기별 또는 사람의 면역체계 특성별 효과가 다 다를 수 있어 어떤 사람에게는 14일 배양한 것이 더 좋을 수도 있고 또 어떤 경우에는 약 7일 내지 8일 동안 플라스크에서 배양 후 수확하여 투여한 것이 더 좋을 수도 있다.

[73]

[74] 실시예 1

[75] NK세포배양용 배지첨가키트를 다음과 같이 준비하였다.

[76] 1. B유닛 준비단계

[77] IL-2 2.2mg과 500mM L-glutamine 용액 100mL를 부유세포 배양용 기본 배지(기본 배지에 IL-2 또는 L-glutamine 이 이미 존재할 경우 최종농도를 맞추기 위해 첨가량을 조정한다)에 넣어 녹이고 최종 10L를 만들어 기본 용액(B용액)을 제조하였다. 이 용액 3.8L를 이용하여 각각 용기에 36mL씩을 담아 마개를 하고 미리 준비한 "B solution, day7" 라벨을 붙여서 B유닛을 준비하고 냉장 보관하였다. 나머지 6.2L는 다른 유닛을 만드는데 사용하였다.

[78] 2. C1유닛 준비단계

[79] IL-12 20ug과 IL-18 125ug을 증류수에 녹여 10mL로 만들어 사이토카인용액(C용액)을 제조하였다. C용액 1mL를 기본용액(B용액) 500mL에 녹여 사이토카인1용액(C1용액)을 제조하였다. 이 C1용액 중 490mL를 사용하여 용기에 각각 4.5mL씩 담아 마개를 하고 미리 준비한 "C1 solution, day3"라벨을 붙여서 C1유닛을 준비하고 냉장 보관하였다. 나머지 110mL는 D유닛 제조에

사용하였다.

[80] 3. C2유닛 준비단계

[81] IL-15 20ug을 B용액에 넣어 1000ml로 하여 사이토카인2용액(C2용액)을 제조하였다. C2용액을 용기에 9mL씩을 담아 마개를 하고 미리 준비한 "C2 solution, day5" 라벨을 붙여서 C2유닛을 제조하고 냉장보관하였다.

[82] 4. A1유닛 준비단계

[83] 항CD16 및 항CD56 항체 각각 0.5mg을 B용액 830mL에 녹여 항체1용액(A1용액)을 제조하였다. 용기에 항체1용액을 3.5mL씩을 담아 미리 준비한 "A1 solution, day0"이 라벨을 붙여서 A1유닛을 준비한 다음 냉장 보관하였다. 남은 용액들은 A2 및 A3유닛을 제조하는데 사용하였다.

[84] 5. A2유닛 및 A3유닛 준비단계

[85] A1용액 약 530mL와 B용액 3000mL를 섞어서 항체2용액(A2용액)을 제조하였다. 용기에 9mL씩을 담아 미리 준비한 "A2 solution, day4"이 라벨을 붙여서 A2유닛을 준비한 다음 냉장 보관하였다. A2용액을 또 다른 용기에 27mL씩을 담아 미리 준비한 "A3 solution, day6"의 라벨을 붙여서 A3유닛을 준비한 다음 냉장보관하였다. 이 때, A1용액 및 A2용액은 1개월 이내의 짧은 유효기간을 가지므로, 다음과 같이 만들어 사용할 수도 있다.

[86] 항CD16(1mg/mL) 및 항CD56(1mg/mL) 항체 용액을 각 6uL씩, B용액 10mL 및 30mL를 별도의 용기에 각각 포장하여 A1 내지 A3유닛을 준비한 다음, 사용시에 이들을 모두 섞어서 A1 내지 A3 용액을 제조할 수 있다. 즉, 먼저 B용액 10mL에 항CD16 및 항CD56 항체 각각 6uL를 용해시켜 만들어진 A1용액 중 3.5mL를 용기에 담아 미리 준비한 "A1 solution, day0"의 라벨을 붙여서 A1유닛을 제조한 후 냉장 보관한다. 남은 용액 약 6.5mL에 B용액 30mL를 섞은 후 만들어진 A2용액 중 9mL를 "A2 solution, day4"의 라벨을 붙여서 A2유닛으로 제조한 후 냉장보관하고, 나머지 약 37mL를 "A3 solution, day6"의 라벨을 붙여서 A3유닛으로 제조한 후 냉장보관하여 사용할 수 있다. 이 경우 이들의 유효기간은 6개월 이상으로 연장될 수 있다.

[87] 6. D유닛 준비단계

[88] 항CD3항체 500ug을 C1 용액에 넣어 105mL로 하여 항체-사이토카인혼합용액(D 용액)을 제조한 후, 용기에 1mL씩을 담아 미리 준비한 "D solution, day1"의 라벨을 붙여서 D유닛을 준비한 후 냉장 보관하였다. 이 때, D용액은 1개월 이내의 짧은 유효기간을 가지므로, 다음과 같이 만들어 사용할 수도 있다.

[89] 항CD3항체 용액(1mg/mL) 5uL를 및 C1용액 1mL를 별도 용기에 각각 포장하여 D유닛을 준비한 다음, 사용시에 이들을 섞어서 D용액을 제조할 수 있다. 즉, 사용 전에 항CD3항체 5uL를 C1 용액 1 mL에 넣어 녹이고 "D1 solution, day1"의 라벨을 붙여서 D유닛으로 제조한 후 냉장보관하여 사용할 수 있다. 이 경우 유효기간은 6개월 이상으로 연장될 수 있다.

- [90] 7. NK세포배양용 배지첨가키트 준비
- [91] 준비된 B유닛, C1유닛, C2유닛, A1유닛, A2유닛(필요한 경우 A2유닛과 A3유닛으로 분리가능) 및 D유닛을 배치하여 NK세포배양용 배지첨가키트를 제조할 수 있다. 필요한 경우 사용 순서에 따라 A1유닛, D유닛, C1유닛, A2유닛, C2유닛, A2유닛(A3유닛) 및 B유닛의 순서로 배치하여 준비될 수도 있다.
- [92]
- [93] 실시예 2
- [94] 환자로부터 혈액으로부터 림프구 및 자가혈장을 준비한 다음, 실시예1에서 얻어진 NK세포배양용 배지첨가키트를 이용하여 다음과 같이 NK세포를 배양하였다.
- [95] 1.림프구추출 및 자가혈장 준비단계
- [96]
- [97] 인간의 림프구 또는 단핵구 등의 단핵세포가 1.077보다 낮은 비중을 가지는 성질을 이용하여 치료 대상 환자의 혈액을 1.077 비중의 Ficoll-Paque Plus용액에 중첩시켜 일정한 원심력으로 원심 침전시킴으로써, 비중의 차이에 따라 비중이 1.077보다 큰 적혈구와 과립구층은 아래로, 1.077 이하인 단핵세포층과 혈소판 등은 위로 분리되게 하여 림프구가 포함된 단핵세포층을 얻고, 분리된 단핵세포층으로부터 림프구만을 추출하였다.
- [98] 보다 구체적으로 살펴보면 환자A의 말초혈액 30ml을 50ml conical tube에 넣은 후 원심분리한 후 상층의 자가혈장을 헤파린튜브에 넣어 처리한 다음 새로운 50ml conical tube에 넣고 다시 원심분리한 후 상층부의 혈장성분을 자가혈장으로 준비하였다.
- [99] 그 후 혈장이 제거된 혈액튜브에 PBS를 넣어 부피를 30ml로 맞춘 다음 잘 섞어서 준비해둔 Ficoll-Paque Plus가 들어있는 튜브에 옮기고, 800xg에서 15분간 원심분리한 후, 두 번째 층인 림프구가 들어 있는 연막층(buffy coat layer)을 분리하여 50ml conical tube에 모으고, PBS로 50ml까지 부피를 맞춘 다음 섞어주었다. 그 후 2 내지 3번의 원심분리를 통해 상층액을 버리고 림프구를 분리하였다. 이 때 얻어진 림프구세포수는 $1.0 \sim 2.0 \times 10^7$ 였다.
- [100] 2. 분리된 림프구에 A1유닛의 항체1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제1단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [101] A1 solution(day0) 1 바이알(3.5mL)을 이용하여 준비된 림프구를 풀어 T25 플라스에 넣은 다음 여기에 0.25mL ~ 0.5mL의 준비된 자가 혈장을 넣은 후 배양기에 넣어 배양을 시작하였다.
- [102] 3. 제1단계가 수행된 배지에 D유닛의 항체-사이토카인혼합용액을 첨가하는 제2단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [103] 현미경으로 세포를 관찰한 후, 배양 중인 T25 플라스크에 D solution(day1) 1 바이알(1mL)을 추가하고 가볍게 흔들어 준 후 배양기에 넣어 배양을 계속하였다.

- [104] 4. 제2단계가 수행된 배지에 C1유닛의 사이토카인1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제3단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [105] 세포 상태를 관찰한 후, C1 solution(day3) 1바이알(4.5mL)을 추가하고 0.25mL ~ 0.5mL의 자가 혈장을 넣고 배양기에 넣고 배양을 지속하였다.
- [106] 5. 제3단계가 수행된 배지에 A2유닛의 항체2용액을 첨가한 다음 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제4단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [107] 배양 중인 T25 플라스크의 바닥을 scraper로 잘 긁어 모아 모든 세포를 T75 플라스크로 옮긴다. 여기에 A2 solution(day4) 1바이알(9mL)과 자가혈장 또는 FBS(또는 이와 유사한 것) 0.5mL ~ 1mL를 추가하고 부드럽게 흔들어 준 후 배양기에 넣어 배양을 지속하였다.
- [108] 6. 제4단계가 수행된 배지에 C2유닛의 사이토카인2용액을 첨가한 다음 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제5단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [109] 배양 중인 T75 플라스크에 C2 solution(day5) 1 바이알(9mL)과 자가혈장 또는 FBS(또는 이와 유사한 것) 0.5mL ~ 1mL를 추가하고 부드럽게 흔들어 준 후 배양기에 넣어 배양을 지속하였다.
- [110] 7. 제5단계가 수행된 배지에 항체3용액 및 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제6단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [111]
- [112] 배양 중인 T75 플라스크의 바닥을 scraper로 잘 긁어 모아 모든 세포를 T150 플라스크에 옮긴다. 여기에 A3 solution(day4) 1 바이알(27mL)과 자가혈장 또는 FBS(또는 이와 유사한 것) 1.5mL ~ 3mL를 추가하고 부드럽게 흔들어 준 후 배양기에 넣어 배양을 지속하였다.
- [113] 8. 제6단계가 수행된 배지에 B유닛의 기본용액 및 자가혈장 또는 FBS를 첨가하는 제7단계를 다음과 같이 수행하였다.
- [114] 배양 중인 T150 플라스크에 B solution(day7) 1바이알(36mL)과 자가혈장 또는 FBS(또는 이와 유사한 것) 2mL ~ 4mL를 추가하고 부드럽게 흔들어 준 후 배양기에 넣어 배양을 지속하였다.
- [115] 9. 대량배양 후 세포수확 단계
- [116] 배양 중인 T150 플라스크의 바닥을 scraper로 긁어모아 세포 확인 후 바로 이 세포와 배양액에 남은 자가 혈장 모두 또는 FBS(또는 이와 유사한 것) 10ml를 추가하여 세포 현탁액을 만든 다음, 배양액이 들어있는 1L CO₂투과성 배양백에 세포현탁액을 첨가한 후 배양액과 잘 섞이도록 마사지 해준 후 37°C, 5% CO₂배양기에 고르게 퍼 넣어 4일 내지 5일 정도 더 배양함으로써 세포를 다량으로 증식시켰다. 배양이 끝난 최종배양액을 원심분리튜브에 담아 여러 번의 원심분리를 통해 세포를 수확한 후, 수확된 세포를 생리식염수 백에 포장하여 냉장보관하거나 동결하여 보관이 가능하다. 최종적으로 환자A 혈액 30mL로부터 분리된 림프구를 배양하여 얻어진 세포수는 3.14x10⁹개였다.
- [117] 경우에 따라서는 이 단계에서 대량배양하지 않고 바로 세포를 수확하여 사용할

수도 있는데, 8일 배양 후 얻어진 면역세포 수는 12.7×10^7 개였다.

[118]

[119] 실시예 3

[120] 사용된 혈액이 환자A가 아니라 환자B의 혈액인 것을 제외하면 실시예2와 동일한 방법을 수행하였는데, 8일 배양 후 얻어진 면역세포 수는 17.5×10^7 개 이었고 최종적으로 환자B 혈액 30mL로부터 분리된 림프구를 배양하여 얻어진 세포수는 4.33×10^9 개였다.

[121]

[122] 실시예 4

[123] 사용된 혈액이 환자A가 아니라 환자C의 혈액인 것을 제외하면 실시예2와 동일한 방법을 수행하였는데, 8일 배양 후 얻어진 면역세포 수는 8.5×10^7 개 이었고 최종적으로 환자C 혈액 30mL로부터 분리된 림프구를 배양하여 얻어진 세포수는 3.53×10^9 개였다.

[124]

[125] 실험예 1

[126] 실시예2 내지 실시예4와 같은 방법으로 배양된 림프구를 유세포 분석기(floweytometry)를 이용하여 표면 항원을 분석한 결과를 도 1 내지 도 3에 도시하였다. 도 1 내지 도 3은 실시예2 내지 4에서 얻어진 배양 전후 림프구의 표현형 변화를 나타내는 그래프로서, H1 영역은 NK 세포, H4 영역은 T 세포, H2 영역은 NKT 세포, H3 영역은 기타 면역 세포의 분포를 나타내고 있다.

[127] 도 1에 도시된 바와 같이, 환자A의 혈액을 사용하여 본 발명의 배양방법에 의해 증식된 세포수는 3.14×10^9 이고, 이 중 NK세포비율은 81.67%이며, NKT세포비율이 5.82%, gdT세포비율이 5.8%임을 알 수 있어, 거의 증식된 세포의 94%이상이 치료효과를 나타낼 수 있는 살해활성세포인 것을 알 수 있다.

[128] 도 2로부터, 환자B의 혈액을 사용하여 본 발명의 배양방법에 의해 증식된 세포수는 4.33×10^9 이고, 이 중 NK세포비율은 86.85%이며, NKT세포비율이 3.45%, gdT세포비율이 0.82%임을 알 수 있어, 거의 증식된 세포의 약 92%이상이 치료효과를 나타낼 수 있는 살해활성세포인 것을 알 수 있다.

[129] 도 3으로부터, 환자C의 혈액을 사용하여 본 발명의 배양방법에 의해 증식된 세포수는 3.53×10^9 이고, 이 중 NK세포비율은 97.81%이며, NKT세포비율이 0.37%, gdT세포비율이 0.06%임을 알 수 있어, 거의 증식된 세포의 98%이상이 치료효과를 나타낼 수 있는 살해활성세포인 것을 알 수 있다.

[130] 도 1 내지 도 3에 도시된 바와 같이, 본 발명의 배양방법으로 림프구 배양시 환자의 유전적 특성이 달라지더라도 거의 일정하게 증식된 세포의 80%이상이 NK세포로서, NKT세포, gdT세포까지 포함하면 92%이상의 살해활성세포를 균질하게 배양할 수 있음을 알 수 있다.

[131] 반면, 도 4에 도시된 바와 같이 종래기술(특허 제10-1039843호)에 의하면 배양 전에는 그래프 (a)에서와 같이 표면 항원 분포가 H4 영역에 가장 많이 분포되어

있는 반면, 배양 후에는 그래프 (b)에서와 같이 H1 영역에 가장 많이 분포되어 있음을 알 수 있지만, 증식된 세포수가 도1 내지 도3과 비교할 때 더 작은 것을 분명히 알 수 있기 때문이다.

[132]

[133] 실험예 2

[134] 실시예2 내지 실시예4와 같은 방법으로 배양된 림프구를 각각 효과기세포(effector cell)로, 혈액암 세포주(K562)를 표적세포(target cell)로 사용하고, 암세포 대비 활성화 림프구의 비율을 10:1로 설정하여 혈액암 세포주에 대한 활성화 림프구의 살해능력을 측정하는 역가 분석을 수행하였다.

[135] 통상, K562 cell line으로 역가를 시험하는 통상의 방법은 effector cell과 target cell의 비를 10:1에서 두 cell을 4시간 반응시켜 암세포를 살상하는 정도를 평가하나 이번 본 실험예에서는 본 발명에서 배양된 림프구의 역가가 너무 높아 거의 모든 암세포를 살상하므로 변별력을 높이고 분석의 시간을 단축하기 위해 2시간만 반응시켜 평가하고 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[136] [표1]

구분	실시예2	실시예3	실시예 4
역가(%)	68.2%	65.9%	71.4%

[137] 표 1에 나타나 바와 같이, 종래기술에 따라 배양된 림프구에 대한 역가분석결과치가 정상적으로 4시간 반응시켰을 때도 평균적으로 40~50%에 불과한 것과 대비하여, 본 발명의 배양방법으로 배양된 림프구는 통상의 반응시간보다 50% 단축하여 2시간밖에 반응시키지 않은 상태에서도 65% 이상이므로 암세포살해능력이 극히 우수함을 알 수 있다.

[138] 이와 같이 본 발명에 의해 배양된 림프구의 역가가 짧은 반응시간에도 높은 것은 림프구 중 NK세포가 차지하는 비율이 매우 높은데서 비롯된 것으로, 이러한 실험결과들은 본 발명의 배양방법으로 림프구가 배양되면, NK세포 비중이 아주 높은 림프구를 얻을 수 있고 암세포살해능력 또한 우수하여 치료 효과도 당연히 우수함을 확인할 수 있다.

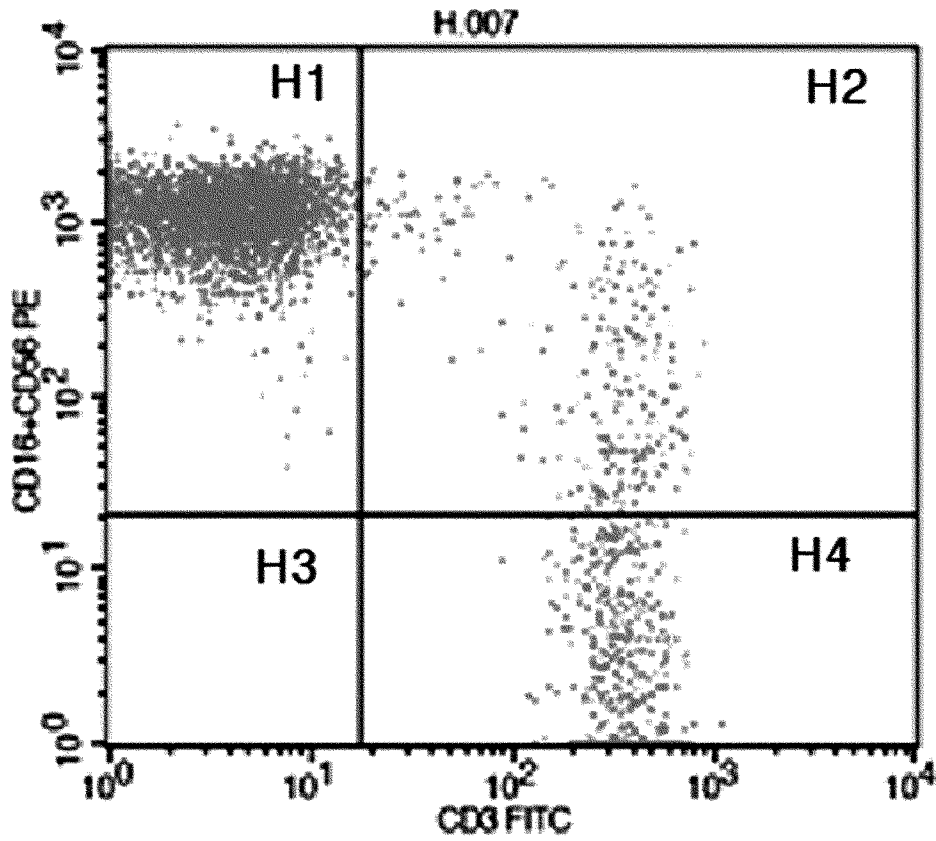
[139] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] IL-2, L-글루타민 및 세포배양용 배지를 포함하는 기본용액으로 구성된 B유닛;
 IL-12가 0.5~5 ng/mL농도 및 IL-18가 2~50 ng/mL 농도로 포함되도록 상기 IL-12 및 IL-18을 상기 기본용액에 용해시켜 형성된 사이토카인1용액으로 구성된 C1유닛;
 IL-15가 10~50ng/mL 농도로 포함되도록 상기 IL-15를상기 기본용액에 용해시켜 형성된 사이토카인2용액으로 구성된 C2유닛;
 항CD16 및 항CD56이 각각 0.1 ~ 15ug/mL농도로 포함되도록 상기 항CD16 및 항CD56을 상기 기본용액에 용해시켜 형성된 항체1용액으로 구성된 A1유닛;
 상기 항체1용액: 상기 기본용액을 1:6~10의 부피비로 포함하는 항체2용액으로 구성된 A2유닛; 및
 항CD3가 1~12 ug/mL농도로 포함되도록 상기 항CD3를 상기 사이토카인1용액에 용해시켜 형성된 항체-사이토카인혼합용액으로 구성된 D유닛;을 포함하는 NK세포배양용 배지첨가키트.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
 상기 A1유닛이 상기 D유닛보다 림프구배양배지에 먼저 첨가되는 것을 특징으로 하는 NK세포배양용 배지첨가키트.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
 상기 A1유닛에 포함된 상기 항CD16, 항CD56 및 상기 기본용액이 분리 포장되고, 배지첨가단계에서 혼합되어 상기 항체1용액을 형성하는 것을 특징으로 하는 NK세포 배양용 배지첨가키트.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
 상기 A2유닛에 포함된 상기 항체1용액의 항CD16, 항CD56 및 상기 기본용액과, 상기 기본용액은 각각 분리 포장되고, 배지첨가단계에서 혼합되어 상기 항체2용액을 형성하는 것을 특징으로 하는 NK세포배양용 배지첨가키트.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
 상기 D유닛에 포함된 항CD3 및 상기 사이토카인1용액은 각각 분리 포장되고, 배지첨가단계에서 혼합되어 상기 항체-사이토카인혼합용액을 형성하는 것을 특징으로 하는 NK세포배양용 배지첨가키트.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
 상기 유닛들은 A1유닛, D유닛, C1유닛, A2유닛, C2유닛, A2유닛 및 B유닛의 순서로 림프구배양배지에 첨가되도록 구성된 것을 특징으로 하는 NK세포배양용 배지첨가키트.
- [청구항 7] 분리된 림프구에 A1유닛의 항체1용액을 첨가한 다음 자가혈장을

- 첨가하는 제1단계;
 상기 제1단계가 수행된 배지에 D유닛의 항체-사이토카인혼합용액을 첨가하는 제2단계;
 상기 제2단계가 수행된 배지에 C1유닛의 사이토카인1용액을 첨가한 다음 자가혈장을 첨가하는 제3단계;
 상기 제3단계가 수행된 배지에 A2유닛의 항체2용액을 첨가한 다음 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 제4단계;
 상기 제4단계가 수행된 배지에 C2유닛의 사이토카인2용액을 첨가한 다음 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 제5단계;
 상기 제5단계가 수행된 배지에 항체3용액 및 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 제6단계; 및
 상기 제6단계가 수행된 배지에 B유닛의 기본용액 및 자가혈장, FBS 또는 이와 유사한 것을 첨가하는 7단계;를 포함하는 NK세포배양방법
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
 상기 항체3용액은 상기 A2유닛을 구성하는 항체2용액의 일부를 사용하는 것을 특징으로 하는 NK세포배양방법.
- [청구항 9] 제 7 항에 있어서,
 상기 자가혈장은 혈장 1ml당 헤파린이 40 usp unit 이상 포함된 것을 특징으로 하는 NK세포배양방법.
- [청구항 10] 제 7 항에 있어서,
 상기 첨가되는 자가혈장 또는 FBS의 함량은 전체배지의 10부피% 미만인 것을 특징으로 하는 NK세포배양방법.
- [청구항 11] 제 7 항에 있어서,
 상기 제1단계 수행 후 상기 제2단계가 수행되기까지 24시간 이상의 간격을 갖는 것을 특징으로 하는 NK세포배양방법.
- [청구항 12] 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 배지첨가키트로 배양된 NK세포배양액 또는 제 7 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항의 배양방법으로 배양된 NK세포배양액.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
 상기 NK세포배양액은 8일 이하로 배양하여 얻어진 것으로, 상기 NK세포배양액에 포함된 세포수는 5×10^7 이상인 것을 특징으로 하는 NK세포배양액.
- [청구항 14] 제 12 항에 있어서,
 상기 NK세포배양액에 포함된 세포수는 2×10^9 이상이고, 이 중 NK세포의 비율이 80% 이상인 것을 특징으로 하는 NK세포배양액.

[도 1]



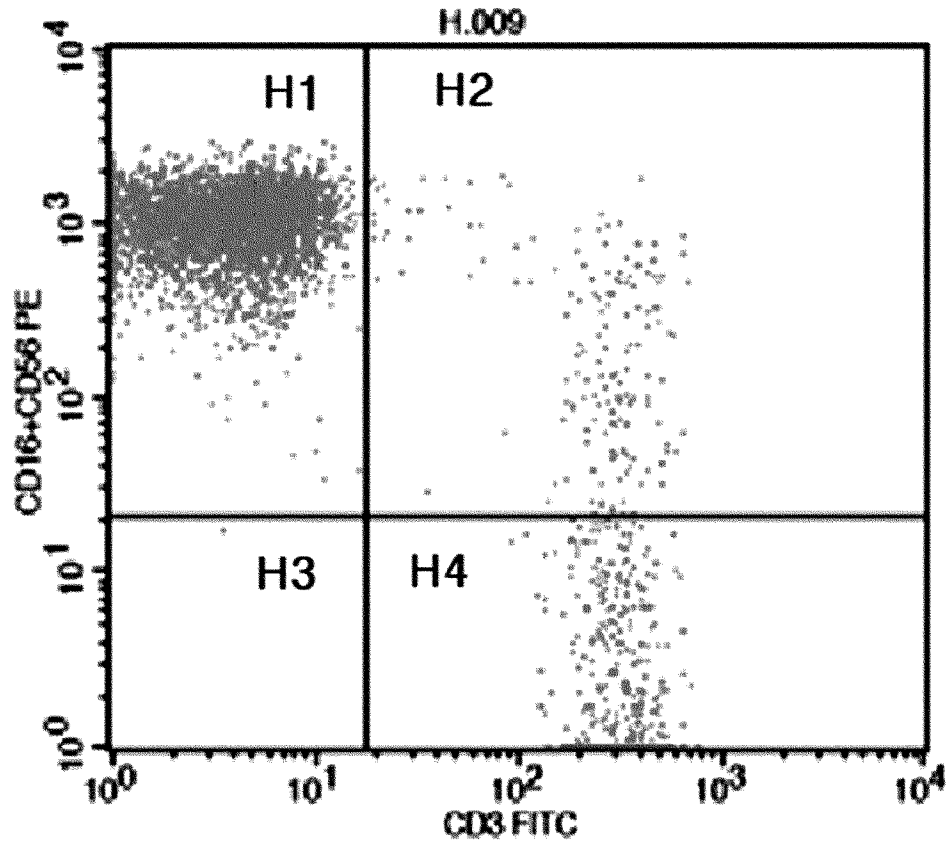
Quadrant Statistics

File: H.007
 Sample ID:
 Tube: Untitled
 Acquisition Date: 23-May-15
 Gated Events: 4692
 X Parameter: CD3 FITC (Log)
 Quad Location: 18, 21

Log Data Units: Linear Va
 Patient ID:
 Panel: Untitled Acquisitor
 Gate: G1
 Total Events: 10000
 Y Parameter: CD16+CD5

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	3832	81.67	38.32
UR	273	5.82	2.73
LL	0	0.00	0.00
LR	587	12.51	5.87

[도2]



Quadrant Statistics

File: H.009

Log Data Units: Linear V2

Sample ID:

Patient ID:

Tube: Untitled

Panel: Untitled Acquisition

Acquisition Date: 23-May-15

Gate: G1

Gated Events: 4783

Total Events: 10000

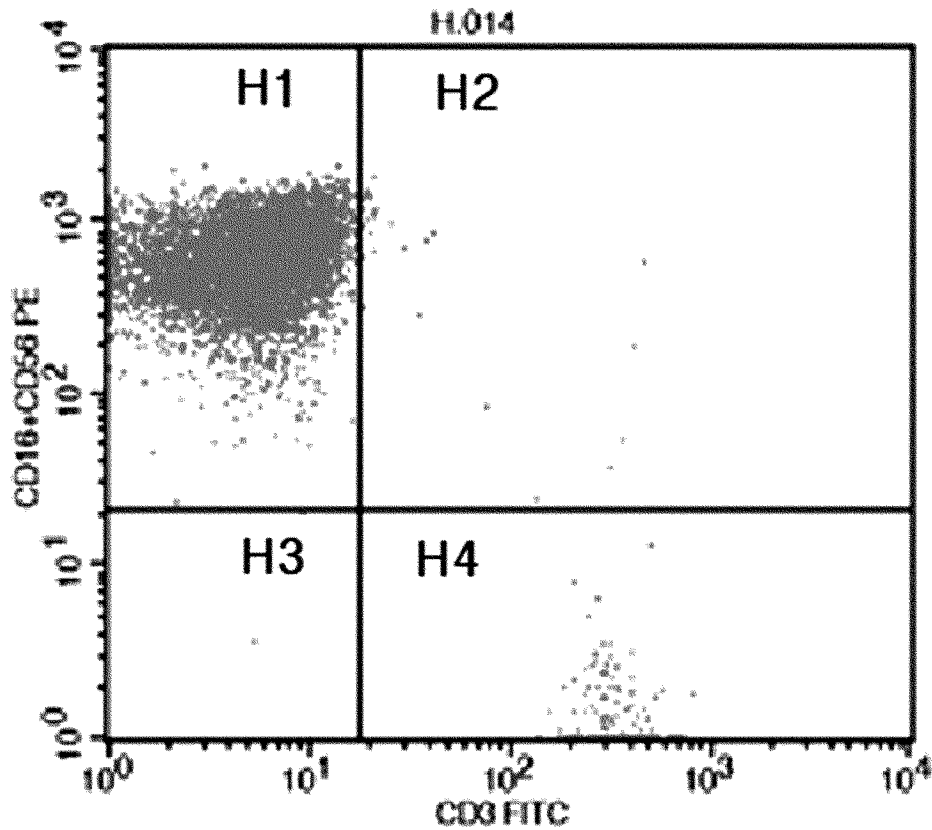
X Parameter: CD3 FITC (Log)

Y Parameter: CD16+CD5

Quad Location: 18, 21

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	4154	86.85	41.54
UR	165	3.45	1.65
LL	1	0.02	0.01
LR	463	9.68	4.63

[도3]



Quadrant Statistics

File: H.014

Sample ID:

Tube: Untitled

Acquisition Date: 11-Aug-15

Gated Events: 8463

X Parameter: CD3 FITC (Log)

Quad Location: 18, 21

Log Data Units: Linear V

Patient ID:

Panel: Untitled Acquisition

Gate: G1

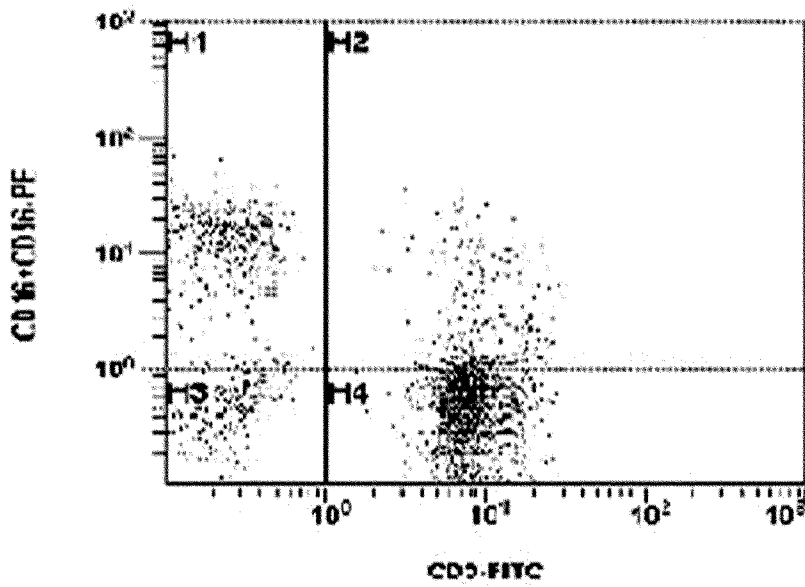
Total Events: 10000

Y Parameter: CD16+CD56

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	8278	97.81	82.78
UR	31	0.37	0.31
LL	2	0.02	0.02
LR	152	1.80	1.52

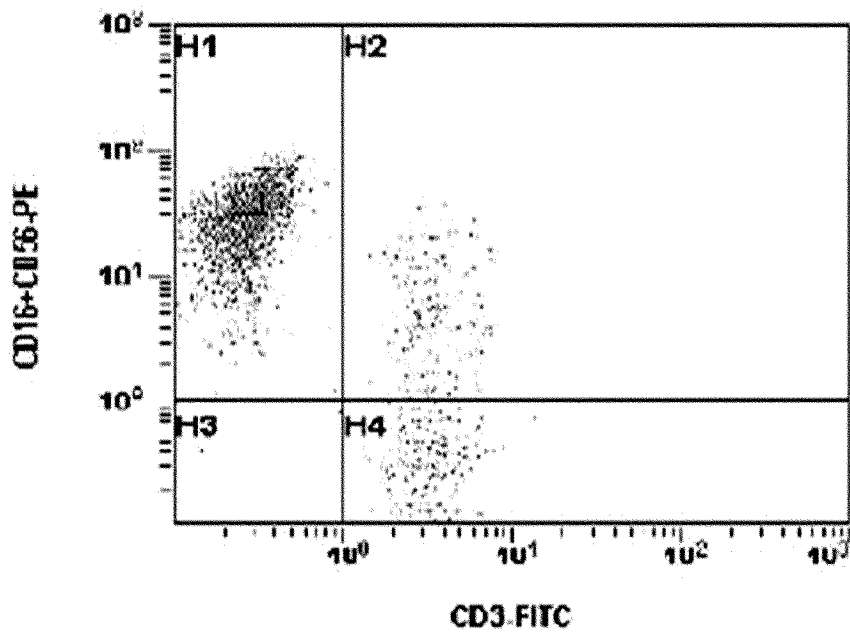
[도4]

(F3)AI 080103LHR(WB) 003.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



(a)

(F3)[A] 100224 SPL 003.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



(b)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/015392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/0783(2010.01)i, C07K 16/28(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 5/02; C12N 5/0784; C12N 5/08; C12N 5/078; C07K 16/28

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: IL-2, L-glutamine, IL-12, IL-18, IL-15, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD3, NK cell

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-1039843 B1 (NKBIO CO., LTD.) 09 June 2011 See claims 1-3; paragraph [0037].	1-14
Y	KR 10-2015-0029691 A (ABE, Hiroyuki et al.) 18 March 2015 See claims 1, 4 and 7.	1-14
Y	KR 10-1415039 B1 (GNSBIO CO., LTD.) 13 August 2014 See claim 4; paragraphs [0010]-[0030] and [0056]-[0060].	1-14
A	KR 10-2009-0127973 A (NKBIO CO., LTD.) 15 December 2009 See claim 1.	1-14
A	KR 10-2013-0033354 A (BIOTHERAPY INSTITUTE OF JAPAN) 03 April 2013 See claim 1.	1-14
PX	KR 10-1683614 B1 (SHIN, Dong Hyuk) 07 December 2016 See claims 1, 3-7 and 9-12.	1-14

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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

18 APRIL 2017 (18.04.2017)

Date of mailing of the international search report

19 APRIL 2017 (19.04.2017)

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. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/015392

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1039843 B1	09/06/2011	CN 103080302 A	01/05/2013
		US 2013-0157364 A1	20/06/2013
		WO 2012-030057 A2	08/03/2012
		WO 2012-030057 A3	26/04/2012
KR 10-2015-0029691 A	18/03/2015	CA 2876260 A1	06/02/2014
		CN 104395461 A	04/03/2015
		EP 2881462 A1	10/06/2015
		JP 2014-030375 A	20/02/2014
		JP 5856025 B2	09/02/2016
		US 2015-0197727 A1	16/07/2015
KR 10-1415039 B1	13/08/2014	NONE	
KR 10-2009-0127973 A	15/12/2009	CN 101603029 A	16/12/2009
		WO 2009-151182 A1	17/12/2009
KR 10-2013-0033354 A	03/04/2013	EP 2535052 A1	19/12/2012
		EP 2535052 A4	22/01/2014
		EP 2535052 B1	07/09/2016
		JP 5766619 B2	19/08/2015
		US 2012-0308986 A1	06/12/2012
		WO 2011-096504 A1	11/08/2011
KR 10-1683614 B1	07/12/2016	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C12N 5/0783(2010.01)i, C07K 16/28(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/0783; C12N 5/02; C12N 5/0784; C12N 5/08; C12N 5/078; C07K 16/28

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: IL-2, L-클루타민, IL-12, IL-18, IL-15, 항CD16, 항CD56, 항CD3, NK세포

C. 관련 문헌

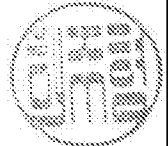
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-1039843 B1 (주식회사 엔케이바이오) 2011.06.09 청구항 1-3; 단락 [0037] 참조.	1-14
Y	KR 10-2015-0029691 A (아베, 히로유키 등) 2015.03.18 청구항 1, 4 및 7 참조.	1-14
Y	KR 10-1415039 B1 (지엔에스바이오(주)) 2014.08.13 청구항 4; 단락 [0010]-[0030] 및 [0056]-[0060] 참조.	1-14
A	KR 10-2009-0127973 A (주식회사 엔케이바이오) 2009.12.15 청구항 1 참조.	1-14
A	KR 10-2013-0033354 A (가부시키가이샤 니혼 바이오세라피 켄큐쇼) 2013.04.03 청구항 1 참조.	1-14
PX	KR 10-1683614 B1 (신동혁) 2016.12.07 청구항 1, 3-7 및 9-12 참조.	1-14

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
 “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 2017년 04월 18일 (18.04.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 04월 19일 (19.04.2017)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150
---	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1039843 B1	2011/06/09	CN 103080302 A US 2013-0157364 A1 WO 2012-030057 A2 WO 2012-030057 A3	2013/05/01 2013/06/20 2012/03/08 2012/04/26
KR 10-2015-0029691 A	2015/03/18	CA 2876260 A1 CN 104395461 A EP 2881462 A1 JP 2014-030375 A JP 5856025 B2 US 2015-0197727 A1 WO 2014-021070 A1	2014/02/06 2015/03/04 2015/06/10 2014/02/20 2016/02/09 2015/07/16 2014/02/06
KR 10-1415039 B1	2014/08/13	없음	
KR 10-2009-0127973 A	2009/12/15	CN 101603029 A WO 2009-151182 A1	2009/12/16 2009/12/17
KR 10-2013-0033354 A	2013/04/03	EP 2535052 A1 EP 2535052 A4 EP 2535052 B1 JP 5766619 B2 US 2012-0308986 A1 WO 2011-096504 A1	2012/12/19 2014/01/22 2016/09/07 2015/08/19 2012/12/06 2011/08/11
KR 10-1683614 B1	2016/12/07	없음	