



등록특허 10-2476640



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년12월09일

(11) 등록번호 10-2476640

(24) 등록일자 2022년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 35/17* (2015.01) *A61K 38/20* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01) *A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 9/50* (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
*A61K 35/17* (2013.01)  
*A61K 38/2013* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-7037585(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2014년10월28일  
심사청구일자 2021년12월17일  
(85) 번역문제출일자 2021년11월17일  
(65) 공개번호 10-2021-0144920  
(43) 공개일자 2021년11월30일  
(62) 원출원 특허 10-2016-7014198  
원출원일자(국제) 2014년10월28일  
심사청구일자 2019년10월18일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/062695  
(87) 국제공개번호 WO 2015/066054  
국제공개일자 2015년05월07일  
(30) 우선권주장  
61/899,066 2013년11월01일 미국(US)

(73) 특허권자  
이뮤너티바이오, 인크.  
미국 90232 캘리포니아주 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920  
(72) 발명자  
클링거만, 한스 쥐.  
미국 90232 캘리포니아주 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920 난트케이웨스트, 인크. 내  
시몬, 배리 제이.  
미국 90232 캘리포니아주 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920 난트케이웨스트, 인크. 내  
(74) 대리인  
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 17 항

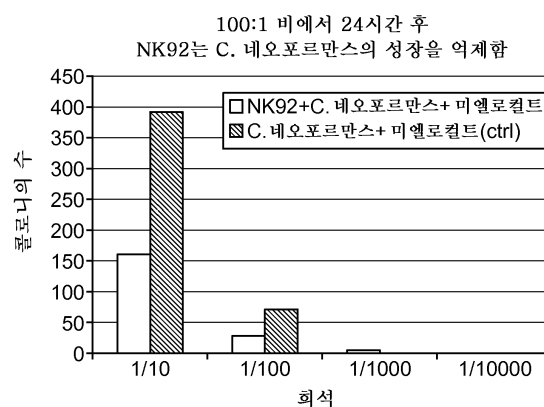
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 **종양세포 치사활성 및 항균성 조성물 및 방법**

### (57) 요약

본원은 NK-92 세포 배지의 상청액으로부터 분리된 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분을 포함하는 제약학적 조성물 및 암 세포를 사멸시키기 위한 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 9/0019** (2013.01)

**A61K 9/08** (2013.01)

**A61K 9/5068** (2013.01)

**C12N 5/0646** (2013.01)

**A61K 2300/00** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제약학적으로 허용가능한 담체, 및 NK-92 세포로부터의 분리된 엑소좀 또는 미세소포체 중 적어도 하나를 포함하고, NK-92 세포는 CD-16을 발현하지 않는 것인, 환자에서 진균성 감염을 치료하기 위한 제약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 멸균 수용액을 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 주사용 제제인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 진피하 또는 피하 주사를 위해 제제화된, 제약학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 연장 방출 제제인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 국소 제제인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 국소 제제가 실온에서 액체이고, 신체에 적용될 때 겔이 되는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 국소 제제가 폴록사머를 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, NK-92 세포가 야생형 NK-92 세포를 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, NK-92 세포가 변형 NK-92 세포를 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 제약학적으로 허용가능한 담체가 증점제를 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 하나 이상의 시토카인을 추가로 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 하나 이상의 시토카인이 적어도 IL-2를 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 하나 이상의 NK-92 세포가 하나 이상의 성분의 분리 전에 적어도 하나의 자극 작용제로 처리되는 것인, 제약학적 조성물.

## 청구항 15

제14항에 있어서, 적어도 하나의 자극 작용제가 IL-15 또는 인터페론 감마인, 제약학적 조성물.

## 청구항 16

제1항에 있어서, 하나 이상의 추가의 항균제를 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

## 청구항 17

제1항에 있어서, 계면활성제, 유화제, 보존제, 안정제, 또는 그의 임의의 조합을 포함하는 것인, 제약학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 특성을 갖는 제약학적 조성물, 및 암 및/또는 미생물을 사멸시키기 위해 이들 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 피부암은 사람 뿐만 아니라 많은 가축에서의 주된 종류의 암이다. 피부암 및 흑색종의 발생은 햇빛 또는 태닝 베드에서 발견되는 것과 같은 UV 선에 대한 무방비의 피부 노출을 포함하는 다양한 요인으로 인해 상당히 증가한다. 초기 단계에서 진단될 때, 이러한 암은 암 및 주변 조직의 절제에 의해 손쉽게 치료 가능하다. 그러나, 어떤 수술 절차에서든지, 변종 암 세포가 절개 위치에 남아 암의 재발을 일으킬 가능성이 남아있다. 이는 특히 흑색종의 경우에 그러하고, 모든 종양 제거의 실패는 높은 수준의 이병율을 수반하는 전이를 초래할 수 있다.

[0003] 종래 치료학적 프로토콜 뿐만 아니라 임상 의(attending clinician)의 수많은 검진을 포함한 재발의 위험을 최소화하는데 사용될 수 있는 수많은 공격적인 프로토콜이 있다. 이러한 프로토콜에도 불구하고, 흑색종은 매우 공격적인 경향이 있으며, 흑색종은 치료시 암의 단계에 따라 5 년 내에 2 % 내지 65 %의 재발 가능성을 갖는다고 보고되고 있다. 예컨대, [www.aimatmelanoma.org/en/aim-for-answers/moving-on-after-treatment/follow-up-by-stage.html](http://www.aimatmelanoma.org/en/aim-for-answers/moving-on-after-treatment/follow-up-by-stage.html) 참조.

[0004] 또한 동물은 피부암, 특히 흑색종, 편평 세포 암종 및 비만 세포 종양에 취약하다. 피부암은 특히 오랜 시간 햇빛을 쬔 동물에서 흔하다.

[0005] 감염은 전세계적으로 흔한 문제이다. 많은 감염은 박테리아, 진균 및 다른 미생물이 원인이 된다. 비록 이러한 감염에 대한 현행 치료가 항생제 및 항균 약물에 크게 의존하고 있지만, 증가하는 수의 박테리아성 감염이 적어도 일부 항생제에 내성을 보이는 것으로 밝혀졌다. CDC는 매년 2백만명이 넘는 미국인들이 항생제-내성 미생물에 감염되어, 그 결과 23,000이 넘는 사망자를 초래하였다고 보고하였다. 예컨대, [www.medicalnewstoday.com/articles/266182.php](http://www.medicalnewstoday.com/articles/266182.php) 참조. 피부 및 연조직 감염은 응급 치료 세팅에서 세 번째로 가장 흔한 진단을 나타내고, 모든 입원 환자 중 7 % 내지 10 %로 추산되는 환자는 피부 또는 연조직 감염을 앓고 있다. 문헌[Ki and Rotstein, Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2008 March; 19(2): 173-184]. 다른 흔한 감염은 전신 감염, 호흡기 감염, 이염, 소화기 감염 및 요로 감염을 포함한다. 감염은 가축에서 유사하게 흔하고 치료가 어려울 수 있다. 바이러스성 감염 또한 흔하고, 이러한 감염을 치료하는데 가능한 치료법이 별로 없다.

[0006] 따라서, 암 세포, 특히 진피 및 진피하(subdermal) 암에 관련된 것들을 용해하는데 유용한 종양세포 치사활성 조성물에 대한 요구가 남아 있다. 또한 감염을 치료하는데 유용한 새로운 항균성 조성물에 대한 요구가 남아 있다.

### 발명의 내용

[0007] 면역계의 특정 세포는 특정 표적 세포에 대한 세포독성 활성을 갖는다. 일반적으로 약 10-15 %의 순환 림프구를 나타내는 자연 살해(NK) 세포는 항원에 관해서 비특이적으로 사전 면역 민감화 없이 바이러스-감염된 세포 및 많은 악성 세포를 포함한 표적 세포에 결합하고 이를 사멸시킨다. 문헌[Herberman et al., Science 214:24 (1981)]. 표적 세포의 사멸은 세포 용해를 유도함으로써 발생한다. NK 세포는 진행암을 앓는 환자에 대한 생

체의 치료법 및 생체내 치료 모두에 효과적인 것으로 나타났다. 그러나, 내인성 NK 세포(즉, 공여자로부터 또는 환자로부터 수확된 것들)는 면역요법과 함께 작용하고 이에 적용되기에 여전히 어렵다. NK 세포들을 생체외에서 늘려 생체내 그들의 종양-표적화, 종양세포 치사활성 및 살바이러스 능력을 유지하는 것이 어렵고, 이는 입양 세포 면역요법에서 이들의 임상적 사용에 주요 장애물이다. 문헌[Melder, et al., Cancer Research 48:3461-3469 (1988)], 문헌[Stephen, et al., Leuk. 림프종 377-399 (1992)], 문헌[Rosenberg, et al., New Engl. J. Med. 316:889-897 (1987)]. 추가로, 내인성 NK 세포의 제제는 NK 세포가 공여자와 관계 없는 환자를 치료하는데 사용된다면 반드시 제거되어야 할 T 세포 및/또는 다른 면역 작동자 세포를 포함한다.

[0008] NK-92 세포주는 인터류킨 2(IL-2)의 존재 하에 급증하는 것으로 밝혀진 독특한 세포주이다. 문헌[Gong et al., Leukemia 8:652-658 (1994)]. NK 세포와 다르게, NK-92는 비-호지킨 림프종을 앓고 있는 대상체의 혈액 내에서 발견되고 이어서 생체외에서 무한증식하는 세포용해 암 세포주이다. 이 세포주는 다양한 암에 대해 높은 세포용해 활성을 갖는다. NK-92 세포주는 그것의 용해 활성과 관련되는 동종 NK 세포 군이다. I 상 임상 시험에서 그것의 안전성 프로파일이 확인되었고, 진행암을 앓는 특정 환자에서 항-종양 반응이 관찰되었다.

[0009] 내인성 NK 세포는 그들의 구별되는 기원으로 인해 많은 부분에서 NK-92 세포와 상당히 다르다: NK-92는 암-유래 세포주인 반면, 내인성 NK 세포는 공여자(또는 환자)로부터 수확되고 환자에서의 주입을 위해 가공된다. 내인성 NK 세포 제제는 이종 세포 군인 반면, NK-92 세포는 그들이 모두 용해 활성을 나타낸다는 점에서 동종인 클론 세포주이다. NK-92 세포는 세포독성을 유지하면서 배양 중 빠르게 급증하는 반면, 내인성 NK 세포는 그러하지 않다.

[0010] NK 세포를 포함하는 세포는 그들의 배양 배지 내로 다양한 성분을 방출한다. 이러한 성분의 예는 단백질, 엑소좀 및 미세소포체이다. 엑소좀은 다양한 정상 및 종양 세포에 의해 방출된 나노소포체(nanovesicle)(최대 100 nm)이다. 미세소포체는 엑소좀과 비슷하지만 크기는 더 크다(100 nm 초과). 엑소좀 및 미세소포체는 세포 배양 상청액 및 체액(예컨대, 혈액)으로부터 발견되거나 분리될 수 있다.

[0011] 내인성 NK 세포의 세포 배양 상청액으로부터 분리된 엑소좀은 CD56, 퍼포린, FasL 및 Rab5B를 포함하는 단백질을 함유한다. 문헌[Lugini, et al. J Immunol. (2012) 189, 2833-2842]. 그러나, 엑소좀과 내인성 NK 세포로부터 유래된 다른 인자는 매우 가변적이고, 모두 회수된 엑소좀 및 그 안에 함유된 단백질의 양과 관련이 있다. 위 문헌 2839 참조. 이론에 얽매이지 않고, 내인성 NK 세포가 개별 공여자로부터 수확되기 때문에, 또한 내인성 NK 세포가 세포의 이종 군을 포함하기 때문에, 이런 가변성이 발생하는 것으로 여겨진다. 예컨대 세포 배양 조건, 정제 방법, 초기 세포수(initial cell population) 및 배양 중 세포 종류의 비와 같은 조건들에서의 차이는 모두 내인성 NK 세포로부터 정제될 수 있는 엑소좀의 조성 및 양의 가변성으로 이어질 수 있다. 예를 들어, NK 세포 제제 내 특정 세포군은 사용된 정제 방법 및/또는 배양 조건을 위해 선택되거나 이에 대하여 선택될 수 있다.

[0012] 내인성 NK 세포와 관련된 가변성의 문제점은 NK-92 세포주에 적용되지 않는다. 이것은 세포주이기 때문에, 다수의 세포가 장기간 동안 배양 및 증식될 수 있다. 이들 배양물은 일정하고 재현가능한 엑소좀 및/또는 미세소포체 제제를 제공하는 동종 세포군이다. NK-92 세포에서 분비된 엑소좀 및/또는 미세소포체는 세포독성 및/또는 세포용해와 같은 종양세포 치사활성 특성을 갖도록 의도된 단백질을 함유한다. 다른 성분은 항균 특성, 면역조절 특성 등을 갖는 성분을 포함하는 NK-92 세포를 함유하는 배지로부터 분리될 수 있다.

[0013] 한편, NK-92 세포는 암세포주이다. 일부 암세포는, 어떤 상황에서 종양 성장에 기여하는 인자를 함유하는 엑소좀, 예컨대 마이크로 RNA를 방출하는 것으로 나타났다. 많은 암세포는 엑소좀 및, 그들의 비-악성 대응부에 의해 방출된 것들과는 구별되는 다른 인자를 방출한다. 예를 들어, NK-92 세포는 항균 특성이 있는 인자를 방출하고, 이는 내인성 NK 세포에서 발견되지 않는 특질이다. 한 실시양태에서, NK-92 세포로부터 수득된 엑소좀 및/또는 미세소포체는 적절한 용액, 예컨대 PBS 또는 등장액에서 인큐베이션되어, 이들을 사용하기 전에 이러한 인자를 추출할 수 있도록 한다. 이런 인큐베이션 기간은 종양 성장에 기여하는 이들 인자를 실질적으로 감소시키거나 제거하는 것으로 생각된다.

[0014] 본 발명의 한 측면은 NK-92 세포 배지의 상청액으로부터 수득된 하나 이상의 성분을 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 성분은 종양세포 치사활성 및/또는 항균성일 수 있다. 또한 성분은 면역조절 특성을 가질 수 있다. 이들 성분은 바람직하게 상청액으로부터 분리된 엑소좀 및/또는 미세소포체이다. 한 실시양태에서, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 세포독성이다. 한 실시양태에서, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 암세포를 용해시키는 능력을 갖는다. 한 실시양태에서, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 항균성이다. 한 실시양태에서, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 항바이러스성이다. 한 실시양태에서, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 항박테리아성이다. 한 실

시양태에서, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 면역조절성이다.

- [0015] 바람직한 실시양태에서, 제약학적 조성물은 생세포를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 주사용 조성물이다. 일부 실시양태에서, 주사는 전신 면역조절 활성을 제공할 것으로 생각된다.
- [0016] NK-92 세포의 아형(subpopulation)이 배양에서 관찰되어 왔고 분리될 수 있다. 아형은 세포 표면 마커의 발현, 단백질 발현 등의 면에서 다를 수 있다. 본 발명의 한 측면에서, NK-92 세포 배지의 상청액으로부터 하나 이상의 성분을 수득하기 전에 NK-92 세포의 하나 이상의 아형이 분리된다. 정해진 아형 또는 아형들의 분리는, 일관되게 정해진 엑소좀 및/또는 미세소포체, 및 구체적으로 종양세포 치사활성 특성을 거의 보이지 않거나 전혀 보이지 않는 엑소좀 및/또는 미세소포체를 가능하게 한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약학적 조성물은 남아있는 암세포를 사멸시키고/거나 암의 재발의 가능성을 줄이기 위해 수술 후 몸의 일부에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 국소용으로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 진피하층에 적용되도록 제제화된다. 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 상전이 폴록사머를 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 조성물이 액체로 주사되고 체내에서(예컨대, 체온에서) 겔로 상전이됨으로써 약물 저장부(drug depot)를 제공하도록 상전이 고분자를 포함하는 주사용 형태이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 측면은 NK-92 세포 배지의 상청액으로부터 수득된 항균성(항박테리아성, 항진균성 및/또는 항바이러스성) 성분을 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 항균성 성분은 종양세포 치사활성 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항균성 성분은 상청액으로부터 분리된 엑소좀 및/또는 미세소포체이다. 바람직한 실시양태에서, 항균성 성분은 상청액으로부터 분리된 미세소포체를 포함한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 측면은 NK-92 세포의 성장 배지의 상청액으로부터 분리된 항종양 또는 세포독성 성분을 이를 필요로 하는 인간 또는 동물 환자에 투여하는 것을 포함하는 암세포를 용해하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 성분은 종양(예컨대, 고형 종양)에 주사된다. 한 실시양태에서, 성분은 종양 주위 또는 주변 영역에 주사된다. 한 실시양태에서, 성분은 종양에 국소적으로 적용된다(예컨대, 피부암). 한 실시양태에서, 성분은 전신 투여된다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 암은 암종, 림프종, 육종, 흑색종, 성상세포종, 중피종 세포, 난소 암종, 결장 암종, 췌장 암종, 식도 암종, 위 암종, 폐 암종, 비뇨기 암종, 방광 암종, 유방암, 위암, 백혈병, 폐암, 결장암, 중추신경계 암, 난소암, 자궁경부암, 신장암 또는 전립선암이다. 바람직한 실시양태에서, 암은 피부암이다.
- [0022] 본 발명의 이들 및 다른 측면은 하기에서 상세하게 설명될 것이다.

## 도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 *크립토크쿠스 네오포르만스*(*Cryptococcus neoformans*) 성장에 대한 NK-92 세포의 효과를 나타낸다.
- 도 2는 *C. 네오포르만스* 성장의 백분율로 표현된, 도 1에서와 동일한 데이터를 나타낸다.
- 도 3a는 다양한 배양 조건(레인 4-7) 하의 NK-92 세포로부터 분리된 엑소좀/미세소포체(EV/MV)의 단백질 함량을 분석하는 웨스턴 블롯(Western blot)의 도면이다. NK-92 세포(레인 3)는 양성 대조군으로써 사용되었다. MCF-7 세포(레인 1) 및 엑소좀(EV, 레인 2)은 튜블린 및/또는 Rab5B에 대한 양성 대조군이고, 세포용해 단백질에 대한 음성 대조군이다.
- 도 3b는 NK-92 세포 및 엑소좀/미세소포체 제제에서 핵막(뉴클레오포린), 미토콘드리아(프로히비틴) 및 엑소좀(Rab5B)에 대한 마커의 존재를 분석하는 웨스턴 블롯의 도면이다.
- 도 4는 프로피디움 요오드화물 분석법에서 Jurkat 세포에 대한 NK-92 엑소좀/미세소포체 제제의 세포용해 활성을 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 정의
- [0025] 본 발명 및 방법이 개시되고 기재되기 전, 하기 기재된 측면은 특정 조성물에 한정되지 않고, 제조 방법 또는 그러한 용도는 물론 다양할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한 본원에 사용된 용어는 오직 특정 측면을 기재하려는 목적을 위한 것이고 이로 한정하려는 의도가 아닌 것으로 이해되어야 한다.



- [0026] 하기 본 명세서 및 청구항에서, 하기 의미를 갖는 것으로 정의될 다수의 용어가 언급될 것이다:
- [0027] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 단수형 "한", "하나" 및 "그"는 문맥에서 명확히 다르게 기술하지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다는 점에 주의하여야 한다. 따라서, 예를 들어, "시토키인"에 대한 언급은 2 이상의 시토키인의 혼합물 등을 포함한다.
- [0028] "임의의" 또는 "임의로"는 그 뒤에 기재된 사건 또는 상황이 발생할 수 있거나 발생할 수 없음을 의미하고, 상기 기재는 사건 또는 상황이 발생하는 경우 및 그러지 아니하는 경우를 포함한다.
- [0029] 용어 "포함"은 조성물 및 방법이 인용된 요소를 포함하는 것을 의미하도록 의도되지만, 다른 것을 배제하는 것은 아니다. 조성물 및 방법을 정의하는데 사용될 때 "본질적으로 구성되는"은 조합에 임의의 필수적이고 중요한 다른 요소는 배제하는 것을 의미한다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같이 요소로써 본질적으로 구성되는 조성물은 청구된 발명의 기본 및 새로운 특질에 실질적으로 영향을 미치지 않는 다른 요소는 배제하지 않을 것이다. "구성되는"은 인용된 것과 다른 극소량보다 많은 성분들 및 실질적인 방법 단계들을 배제하는 것을 의미한다. 이들 과도기 용어 각각에 의해 정의되는 실시양태는 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0030] 본원에 사용되는 용어 "환자"는 인간, 가축, 집에서 기르는 애완동물 등과 같은 포유류 환자를 포함하지만 이로 한정되지 않는 임의의 척추동물 유기체이다. 바람직한 실시양태에서, 환자는 인간이다.
- [0031] 수치 앞에 사용될 때 용어 "약"은 합리적인 범위, 예컨대  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ , 및  $\pm 0.2\%$  내에서 변할 수 있다.
- [0032] 사용된 용어 "내인성 NK 세포"는 NK-92 세포주와 구별되어, 공여자(또는 환자)로부터 유래된 NK 세포를 지칭하는 것이다. NK 세포는 특이 항원 자극의 부재 하에 표적 세포를 사멸시키는 면역계의 세포이고, MHC 클래스에 따른 제한이 없다. 내인성 NK 세포는 일반적으로 NK 세포가 풍부한 세포의 이종군이다. 내인성 NK 세포는 환자의 자가 또는 동종이계 치료를 위한 것일 수 있다.
- [0033] 용어 "NK-92 세포"는 야생형 NK-92 세포 및 변형 NK-92 세포 모두를 포함한다. NK-92 세포는 NK 세포보다 종양 및 감염된 세포 종류에 더 세포독성인 것으로 밝혀졌다.
- [0034] 용어 "야생형 NK-92 세포"는, 본래 비-호지킨 림프종을 앓는 환자로부터 수득되고 *생체외*에서 무한증식하는, NK 세포주, NK-92를 지칭한다. NK-92 세포는 수탁 번호 CRL-2407로 미국 군주 은행(American Type Culture Collection)으로부터 입수가능하고, 예컨대 그 전문이 참조문헌으로서 포함되는 U.S. 특허 7,618,817에 기재된다.
- [0035] 용어 "변형 NK-92 세포"는 그것이 유래된 야생형 NK-92 세포에서 볼 수 없는 특성을 부여하도록 추가로 처리된 NK-92 세포를 지칭한다. 이러한 처리는, 예를 들어, 물리적 처리, 화학적 및/또는 생물학적 처리 등을 포함한다. 처리는 변형 NK-92 세포에 그들을 바람직한 목적을 위해 더 유리하게 만드는 특성을 부여한다. 변형 NK-92 세포의 예는, 예컨대 그 모두의 전문이 참조문헌으로서 본원에 포함되는 U.S. 특허 7,618,817; 8,034,332; 및 8,313,943에 기재된다.
- [0036] 용어 "세포의 소포체"는 엑소솜 및 미세소포체 모두 뿐만 아니라 세포(예컨대, NK-92 세포)에 의해 배지로 분비되는 임의의 다른 소포체를 포함한다. 일반적으로, 엑소솜은 약 100 나노미터(nm) 직경 미만인 나노솜(nanosome)이다. 미세소포체는 약 100 nm 이상의 직경을 갖는다.
- [0037] 본 발명을 기재하는데 사용된 바와 같이, "암", "종양" 및 "악성종양" 모두 조직 또는 기관의 과형성(hyperplasia)에 동일하게 관련된다. 만약 조직이 림프계 또는 면역계의 일부라면, 악성 세포는 순환 세포의 비-고형 종양을 포함할 수 있다. 다른 조직 또는 기관의 악성종양은 고형 종양을 생성할 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 방법은 림프 세포, 순환 면역 세포 및 고형 종양의 치료에 사용될 수 있다.
- [0038] 용어 "종양세포 치사활성 성분"은 암성 종양 및/또는 암세포를 치료하는 성분을 지칭한다. 종양의 치료는 종양을 감소시키거나 제거하고, 암세포를 사멸시키고/거나 암세포의 성장, 증식 및/또는 전이를 억제하는 것을 포함한다. 바람직하게, 종양 세포는, 예컨대 세포용해에 의해 사멸된다.
- [0039] 용어 "항균성 성분"은 미생물에 의한 감염을 치료하거나 예방하는 성분을 지칭한다. 미생물은 박테리아, 진균, 곰팡이, 바이러스 등을 포함한다. 따라서, 항균성은 또한 항바이러스성 성분, 항박테리아성 성분, 항진균성 성분 등을 지칭한다.
- [0040] 본 발명을 기재하는데 사용된 바와 같이, NK 세포와 같은 효과기 세포의 활성을 기재하는데 사용될 때, 용어 "세포독성" 및 "세포용해"는 동의어로 의도된다. 일반적으로, 세포상해 활성은 임의의 다양한 생물학적, 생화학

적 또는 생물리학적 메커니즘에 의한 표적 세포의 사멸과 관련된다. 세포용해는 더 구체적으로 효과기가 표적 세포의 원형질 막을 용해함으로써, 그것의 물리적 일체성을 파괴하는 활성을 지칭한다. 이는 그 결과 표적 세포의 사멸이 된다. 이론에 얽매이지 않고, NK 세포의 세포독성 효과는 세포용해에 의한 것으로 알려져 있다.

[0041] 본원에 사용된 용어 "성장 배지" 또는 "배지"는 동의어로 의도된다. 일반적으로, 상기 용어는 NK-92 세포가 성장되거나 놓일 수 있고, NK-92 세포가 엑소솜, 미세소포체 및/또는 다른 활성 성분을 방출할 수 있는, 임의의 배지 또는 수용액을 지칭한다. 배지는 성장 배지(예컨대, 상용으로 입수가 가능한 배지), 예컨대 X-VIVO 10 또는 RPMI를 포함할 수 있다. 다르게는, 배지는 PBS 또는 다른 수용액을 포함할 수 있다.

[0042] 본원에 사용된 바와 같이, "치료", "치료하는" 및 "치료하다"는 질병, 장애 또는 병태 및/또는 그것의 증상의 해로운 또는 임의의 다른 바람직하지 않은 효과를 줄이거나 완화시키는 작용제를 사용하여 질병, 장애 또는 병태에 조치를 취하는 것으로 정의된다. 본원에 사용된 "치료"는 환자의 치료를 포함하고, (a) 병태에 취약하지만 아직 병태를 갖는 것으로 진단되지 않은 것으로 밝혀진 환자의 병태의 발생의 위험을 감소시키고, (b) 병태의 진전을 지연시키고/거나, (c) 병태를 완화, 즉, 병태의 회귀를 일으키고/거나 병태의 하나 이상의 증상을 완화시키는 것을 포함한다. 병태 또는 환자를 "치료하는" 또는 그의 "치료"는 증상의 감소와 같은 임상적 결과를 포함하는 유리한 또는 바람직한 결과를 얻는 단계를 밝는 것을 지칭한다. 본 발명의 목적을 위하여, 유리한 또는 바람직한 임상적 결과는: 종양의 크기 또는 전이 가능성을 감소시키고; 종양 세포를 사멸시키거나; 또는 예컨대 하나 이상의 증상을 감소시키고, 감염의 기간을 감소시키는 등을 통해, 감염원(미생물)에 의한 감염의 심각성을 감소시키는 것을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.

[0043] **NK-92 세포의 배지의 상청액으로부터 분리된 성분**

[0044] NK-92 세포는 배양 배지에서 팽창, 변형 및/또는 유지될 수 있다. 임의의 허용가능한 배양 조건이 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, NK-92 세포는 우태아혈청(fetal calf serum)(예컨대, 12.5 %; 미주리주 세인트 루이스 소재 시그마 케미칼 코.(Sigma Chemical Co.)) 및/또는 말 혈청(예컨대, 12.5 %; 미주리주 세인트 루이스 소재 시그마 케미칼 코.)로 보충된 풍부한 알파 MEM(alpha minimum essential medium)(MEM; 미주리주 세인트 루이스 소재 시그마 케미칼 코.)에서 배양된다. 또 다른 실시양태에서, NK-92 세포는 인간 혈청, 인간 혈장 또는 인간 혈청 알부민(예컨대, 5 %)로 보충된 XVivo 10 배지에서 배양된다. 바람직한 실시양태에서, 혈청, 혈장 또는 혈청 알부민은 NK-92 세포의 배양 전에 엑소솜-제거된 것이다.

[0045] 배지는 임의로 다른 영양소, 시토카인 및/또는 성장 인자, 예컨대 인터류킨 2(IL-2), L-아스파라긴, L-글루타민 및/또는 L-세린으로 보충된다. 배지에 있을 때, NK-92 세포는 단백질(예컨대, 시토카인), 미세소포체 및/또는 엑소솜과 같은 성분을 배지에 방출할 수 있다. 세포가 예를 들어 원심분리에 의해 배지로부터 분리된 후, 세포로부터 방출된 성분은 상청액에 남아 있다.

[0046] 사용된 또 다른 적합한 배지는 X-VIVO 10 배지, 5 % 인간 혈청 AB, 36  $\mu$ M L-아스파라긴, 450  $\mu$ M L-글루타민, 324  $\mu$ M L-세린 및 500 IU의 IL-2를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 배지는 무혈청 배지, PBS 또는 다른 수용액, 예컨대 링거액, 텍스트로스 용액, 행크스 용액(Hank's solution) 및 다른 수성 생리적 평형 염류 용액(aqueous physiologically balanced salt solution)이다. 이론에 얽매이지 않고, 성장 배지의 일부 성분(예컨대, 혈청)은 엑소솜, 미세소포체 및/또는 NK-92 세포에 무관한 다른 성분을 함유할 수 있다. 따라서, 배지로부터 엑소솜, 미세소포체 또는 다른 성분을 분리하기 전 NK-92 세포를 장기간 동안 무혈청 배지 또는 다른 수용액에 유지하는 것이 유리할 수 있다. 다르게는, NK-92 세포는 엑소솜-제거된 또는 엑소솜-없는(exosome-free) 혈청 또는 혈청 대체제에서 배양될 수 있다.

[0048] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 자극 작용제(stimulatory agent)가 배지에 첨가된다. 이론에 얽매이지 않고, 이러한 작용제로의 NK-92 세포의 자극은 엑소솜 및/또는 미세소포체를 포함하는 성분의 더 일정한, 강력한 및/또는 재현가능한 방출을 유발할 수 있다고 여겨진다. 자극 작용제는, 예를 들어, 시토카인 또는 제약학적 자극제(stimulator)를 포함한다. 한 실시양태에서, 자극 작용제는 IL-15이다. 한 실시양태에서, 자극 작용제는 인터페론 감마(interferon gamma)이다.

[0049] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분은 상청액으로부터 분리된 엑소솜을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분은 상청액으로부터 분리된 미세소포체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분은 상청액으로부터 분리된 엑소솜 및 미세소포체를 포함한다.

[0050] 엑소솜은 최대 약 100 nm 직경을 갖는 세포로부터 분비된 나노소포체이다. 일부 실시양태에서, 이들은 약 30



내지 약 100 nm의 직경을 갖는다. 미세소포체는 비-세포이고, 약 100 nm 초과인 바람직하게 약 1.5 미크론 미만인 직경을 갖는다.

[0051] 엑소좀 및/또는 미세소포체는 여러 방법에 의해 배지로부터 분리될 수 있다. 한 방법은 초원심분리에 의한 것이다. 다른 방법은, 상용으로 입수가 가능한 엑소좀 분리 키트(예컨대, 총 엑소좀 분리 키트(Total Exosomes Isolation kit)[라이프 테크놀로지스(Life Technologies)], 엑소-스핀™ 엑소좀 정제 키트(Exo-spin™ Exosome Purification Kit)[셀 가이드 시스템(Cell Guidance Systems)] 또는 퓨어엑소(PureExo)® 엑소좀 분리 키트(Exosome Isolation Kit)[101 바이오(Bio)]; 상용으로 입수가 가능한 기기, 예컨대 다이나비즈(Dynabeads)® 인간 CD63-특이적 정제 시스템 또는 다이나비즈® 스트렙타비딘(Streptavidin) 정제 시스템(라이프 테크놀로지스 코 포레이션으로부터 입수가 가능함); 여과; 또는 분별 원심분리법(예컨대, 문헌[S. Rani et al., *Methods Mol Biol.*, 784:181-95 (2011)]에 기재된 것)을 포함한다. 엑소좀 및/또는 미세소포체의 존재, 크기 및 순도 등은 웨스턴 블로팅, 투과형 전자 현미경 관찰법, 유동세포 계수법(flow cytometry), 원자력 현미경 관찰법, 나노입자 추적 분석, 라만 미세분광학, 저항 펄스 센싱(resistive pulse sensing) 및 투과형 전자 현미경 관찰법과 같은 방법을 특징으로 할 수 있다.

[0052] 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 야생형 NK-92 세포를 포함한다.

[0053] 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 변형 NK-92 세포를 포함한다. NK-92 세포는, 그 전문이 본원에 참조문헌으로서 포함되는 U.S. 특허 7,618,817에 기재된 것과 같이 기술분야에 공지된 방법에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, NK-92 세포는 세포의 표면 상에 Fc 수용체를 발현하도록 변형될 수 있다. Fc 수용체는 활성화 Fc $\gamma$  수용체, CD16(Fc $\gamma$ RIII-A), Fc $\gamma$ RI(CD64), Fc $\gamma$ RII(CD32), Fc $\gamma$ RIII, FcRn, Fc $\alpha$  및 Fc $\epsilon$  등일 수 있다. Fc 수용체는 저- 및 고-결합 친화성 형태를 포함하는, 그들의 리간드 또는 그들의 리간드의 단편에 대한 임의의 결합 친화성을 가질 수 있다. NK-92 세포는 하나 이상의 관련 액세서리 신호전달 폴리펩티드(associated accessory signaling polypeptide), 예컨대 Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  또는 TCR- $\zeta$ , 시토카인 또는 그의 단편을 발현하도록 추가로 변형될 수 있다.

[0054] 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 Fc 수용체를 발현하도록 변형되는 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 Fc $\gamma$ RIII-A, Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, FcRn, Fc $\alpha$  또는 Fc $\epsilon$ , 또는 그의 조합을 발현하도록 변형되는 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 수탁 번호 PTA-8836, PTA-6967, PTA-8837 또는 PTA-6672, 또는 그의 조합으로 미국 군주 은행으로부터 입수가 가능한 변형 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 NK-92-CD16, NK-92-CD16- $\gamma$  또는 NK-92-CD16- $\zeta$ , 또는 그의 조합을 포함한다.

[0055] 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 시토카인을 발현하도록 변형된 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 세포 및/또는 시토카인 수용체의 성장을 촉진하는 시토카인을 발현하도록 변형된 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 IL-2 및/또는 IL-2 수용체를 발현하도록 변형된 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 IL-15, IL-18 또는 IL-21, 또는 그의 수용체를 발현하도록 변형된 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 수탁 번호 CRL-2408 또는 CRL-2409, 또는 그의 조합으로 미국 군주 은행으로부터 입수가 가능한 변형 NK-92 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, NK-92 세포는 NK-92MI, NK-92CI 또는 그의 조합을 포함한다.

[0056] 이론에 얽매이지 않고, 변형 NK-92 세포로부터의 엑소좀 및/또는 미세소포체는 야생형 NK-92 세포로부터의 것들과 구분될 것으로 여겨진다. 예를 들어, 변형 NK-92 세포로부터의 엑소좀 및/또는 미세소포체는 세포의 변형(들)을 기준으로, 상이한 수용체 및/또는 다른 단백질(예컨대, 세포용해 효소)을 함유할 수 있다. 변형 NK-92 세포로부터의 엑소좀 및/또는 미세소포체는 또한 일부 수용체 및/또는 다른 단백질의 상이한 양 또는 상대적인 양을 함유할 수 있다.

#### [0057] 제약학적 조성물

[0058] 한 측면에 있어서, 조성물이 제약학적으로 허용가능한 담체 및 NK-92 세포의 성장 배지의 상청액으로부터 분리된 하나 이상의 성분을 포함하는 것인, 온혈동물 내 암세포를 사멸시키는데 유용한 제약학적 조성물이 제공된다.

[0059] 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 실온에서 액체이고 환자에게 적용될 때 겔이다. 일부 실시양태에서, 제

약학적으로 허용가능한 담체는 폴록사머를 포함한다.

- [0060] 또 다른 측면에 있어서, NK-92 세포의 성장 배지의 상청액으로부터 분리된 엑소좀 및/또는 미세소포체 및 멸균 수성 담체를 포함하는 제약학적 조성물이 제공된다.
- [0061] 또 다른 측면에 있어서, 제약학적으로 허용가능한 담체 및, NK-92 세포의 성장 배지의 상청액으로부터 분리된 엑소좀 및/또는 미세소포체를 포함하는 제1 제약학적 조성물, 및 겔을 포함하는 제2 제약학적 조성물을 포함하는 키트를 제공하고, 여기서 제1 제약학적 조성물 및 제2 제약학적 조성물은 국소 제제이다. 일부 실시양태에서, 제2 제약학적 조성물은 폴록사머이다. 일부 실시양태에서, 제2 제약학적 조성물은 NK-92 세포의 성장 배지의 상청액으로부터 분리된 엑소좀 및/또는 미세소포체를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 제약학적 성분은 미세소포체를 포함한다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 제1 제약학적 조성물은 액체를 포함하고 제2 제약학적 조성물은 겔, 폴록사머, 또는 실온에서 액체이고 체온에서 겔인 조성물을 포함한다. 액체는 먼저 치료 영역에 적용되고, 겔이 액체로 적용된다. 이론에 얽매이지 않고, 액체 제제는 영역의 빠른 치료를 제공하는 반면, 겔은 적용 부위에 액체를 유지한다. 일부 실시양태에서, 겔은 NK-92 세포의 성장 배지의 상청액으로부터 분리된 엑소좀 및/또는 미세소포체 및 멸균 수성 담체를 포함한다. 이론에 얽매이지 않고, 겔은 치료 영역에 엑소좀 및/또는 미세소포체의 더 느린 방출을 제공할 것이고, 따라서 서방성 및 발병 영역의 치료를 제공한다고 여겨진다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 하나 이상의 시토카인을 추가로 포함한다.
- [0064] 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분(들)은 시토카인, 예컨대 IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 등과 함께 투여되어, 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분(들)을 포함하는 조성물의 기능적 유효성을 유지할 수 있다. 용어 "~와 함께"는 시토카인이 성분을 포함하는 조성물의 투여 직전에 투여될 수 있거나, 그것이 성분을 포함하는 조성물과 함께 동시에 주어질 수 있거나, 또는 종양세포 치사활성 성분을 포함하는 조성물이 투여된 직후일 수 있음을 나타낸다. 시토카인은 또한 종양세포 치사활성 성분을 포함하는 조성물을 투여하는 횟수에 대하여 이러한 2 회, 또는 모든 3 회에 주어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 시토카인은 및 성분은 단일 조성물로 투여된다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 시토카인은 적어도 IL-2를 포함한다.
- [0066] 제약학적 조성물은 경구, 국소, 경피, 직장, 흡입 또는 비경구(정맥내, 근육내 또는 복강내) 투여 등에 적합한 다양한 제제일 수 있다. 제약학적 조성물은 종양에 또는 종양 부위에 또는 그 주변에 주사하기 적합한 제제로 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 제약학적 조성물은 종양의 전부 또는 대부분을 제거하는 수술 후 종양 부위에 주사되거나 적용된다.
- [0067] 본원에 사용된 "제약학적으로 허용가능한 담체" 또는 "제약학적으로 허용가능한 부형제"는 제약학적 용도에 적합하고 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분과 혼화성인 임의의 모든 용매, 분산제 또는 매질, 코팅(들), 항균제, 등장제/저장제/고장제, 흡수-변형제(absorption-modifying agent) 등을 포함한다. 더욱이, 다른 또는 보충적 유효성분 또한 최종 조성물에 혼입될 수 있다.
- [0068] 본원에 기재된 제약학적 조성물은, 국부 치료가 바람직할지 전신 치료가 바람직할지에 따라, 그리고 치료될 영역에 따라 여러 방식으로 투여될 수 있다. 한 측면에 있어서, 조성물이 액체 또는 겔로 제제화되는 경우, 투여는 주사에 의할 수 있다. 다른 측면에 있어서, 조성물은 환자에게 내복용으로 적용되도록 제제화될 수 있다. 다른 측면에 있어서, 조성물은 국소적으로(눈으로, 질내로, 직장으로, 비강내로, 경구로 또는 직접 피부로 포함) 적용될 수 있다. 예를 들어, 엑소좀 및/또는 미세소포체를 포함하는 국소 조성물은 임의의 접근가능한 종양 또는 감염, 예컨대 피부 종양 또는 다른 종양(예컨대, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma)); 바이러스성 감염(예컨대, 사마귀, 성기 사마귀, 헤르페스); 또는 박테리아성 감염에 적용될 수 있다.
- [0069] 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 주사용 제제이다.
- [0070] 제약학적 조성물은 비경구적으로, 예컨대, 정맥내로, 근육내로, 정맥내로, 피하로 또는 복막내로(interperitonically) 투여될 수 있다. 조성물은 전신으로 또는 암의 부위에 또는 주위에 국부적으로 주사될 수 있다. 1회 정맥내 또는 복강내 용량이 투여될 수 있다. 다르게는, 느린 장기 주입물 또는 다중 단기 일일 주입물이 이용될 수 있고, 전형적으로 1 내지 8 일 지속된다. 격일 또는 며칠에 한 번 투여 또한 이용될 수 있다.
- [0071] 멸균, 주사용 조성물은 적절한 담체에 적합한 양으로 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분을 혼입함으로써

제조된다. 적합한 담체는 수성 담체, 예컨대 물 및 수성 완충액(예컨대, 인산 완충 식염수(PBS), 시트르산 완충액 등), 수용성 유기 용매(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 300, 폴리에틸렌 글리콜 400, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 글리세린, N-메틸-2-피롤리돈, 디메틸아세트아미드 및 디메틸술폰), 유기 액체/반(semi)-고체(밀랍, d-토코페롤, 올레산, 중쇄 모노- 및 디글리세리드), 비이온성 계면활성제(폴리에톡시화 피마자유(예컨대, 크레모포(Cremophor) EL, 크레모포 RH 40, 크레모포 RH 60), 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴록사머 188, 폴록사머 407, d-토코페롤 폴리에틸렌 글리콜 1000 숙시네이트, 폴리에틸렌 글리콜 (15)-히드록시스테아레이트, 소르비탄 모노올레이트, 올레오일 폴리옥실-6 글리세리드, 리놀레오일(linoleoyl) 폴리옥실-6 글리세리드, 카프틸로카프로일 폴리옥실-8 글리세리드, 겔루시어(Gellucire)® 44/14, 소프트젠(Softigen)® 767, 및 PEG 300, 400 또는 1750의 모노- 및 디-지방산 에스테르 등), 지질(예컨대, 피마자유, 옥수수유, 면실유, 올리브유, 낙화생유, 박하유, 홍화유, 참기름, 콩기름, 수소화 식물유, 수소화 콩기름, 및 야자유 및 팜 씨유의 중쇄 트리글리세리드), 시클로텍스트린 (예컨대, α-시클로텍스트린, β-시클로텍스트린 및 γ-시클로텍스트린, 히드록시프로필-β-시클로텍스트린, 및 술포부틸에테르-β-시클로텍스트린), 및 인지질(예컨대, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 디스테아로일포스파티딜글리세롤, 1-디미리스토일포스파티딜콜린, 1-디미리스토일포스파티딜글리세롤 등), 또는 그의 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수성 담체는 히알루론산, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액, 행크스 용액 및 다른 수성 생리적 평형 염류 용액을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비수성 담체는 불휘발유(fixed oil), 식물성유 예컨대 올리브유 및 참기름, 트리글리세리드, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 또는 올레산 에틸과 같은 주사용 유기 에스테르를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약학적으로 허용가능한 담체는 점성 증강제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로오스 또는 그의 염, 소르비톨 또는 텍스트란; 등장성 및 화학적 안정성을 증강시키는 물질, 예컨대 인산 완충액, 중탄산염 완충액 및 트리스 완충액(Tris buffer); 보존제, 예컨대 티메로살(thimerosal), 크레솔, 포르말린 및 벤질 알콜을 추가로 포함한다.

[0072] 주사용 조성물은 용액 또는 현탁액에 있을 수 있지만, 증공 바늘과 같은 주사 기기를 통해 쉽게 통과할 수 있어야 한다. 적합한 점성은 용매 또는 부형제의 적합한 선택으로 달성되고 유지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약학적으로 허용가능한 담체는 점성 증강제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 25 °C에서 약 5 센티포아즈(cP) 내지 약  $1 \times 10^6$  cP, 또는 약 5 cP 내지 약  $1 \times 10^5$  cP, 또는 약 5 cP 내지 약  $1 \times 10^4$  cP, 또는 약 5 cP 내지 약  $1 \times 10^3$  cP, 또는 약 6 cP 내지 약 100 cP의 점성을 갖는다.

[0073] 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 주사용 연장 방출 제제(extended release formulation)이다. 연장 방출 제제 내 중앙세포 치사활성 및/또는 항균성 성분은, 조성물로부터 장기간, 예컨대 적어도 몇 분, 적어도 한 시간, 적어도 몇 시간, 적어도 1 일, 적어도 몇 일 또는 몇 주 등에 걸쳐 몸으로 방출되어 장기 및/또는 지속적 치료 효과를 제공할 수 있다.

[0074] 일부 실시양태에서, 조성물은, 임의로 조성물 내 중앙세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 연장 및/또는 지속 방출 동안, 중앙 부위 또는 가까운 곳에 전달될 때 조성물의 국부화 정체를 가능하게 하는 국부화제를 포함한다. 이러한 작용제는 요변제(thixotropic agent), 상변화제, 예컨대 히드로겔, 생침식성(bioerodible), 생체적합성 고분자 및 콜라겐 겔 등을 포함한다. 이들 조성물은 주변 조건에서 주사용 또는 액체 형태로 있고, 적용 후 점성의 또는 겔-유사 생침식성 또는 생분해성 매스를 형성하는데, 이는 전달의 부위를 떠나는 수송을 제한하고 조성물로부터의 중앙세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 확산을 가능하게 한다.

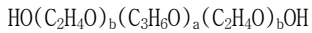
[0075] 조성물 내 유용한 히드로겔은 화학적 및/또는 물리적으로 가교된 히드로겔일 수 있다. 현장에서 화학적 가교가, 예컨대, 바람직하게 공유 결합 형성을 수반하는 광-개시성, 산화환원-개시성 또는 마이클형 첨가 중합 반응을 통해 수득된다. 물리적으로 가교된 히드로겔은 외부 자극 하에 자기-조립하고 공유 결합 형성에 의존하지 않는다. 온도, pH, 이온 농도 및 소수성 상호작용은 이러한 자기-조립 및 히드로겔의 고정화에 유용한 특정한 외부 자극이다.

[0076] 조성물에 사용하기 적합한 예시적인 중합체는 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 폴리(카프로락톤), 폴리무수물, 폴리아민, 폴리에스테르아미드, 폴리오르토에스테르, 폴리디옥사논, 폴리아세탈, 폴리케탈, 폴리카르보네이트, 폴리포스포에스테르, 폴리오르토카르보네이트, 폴리포스파젠, 숙시네이트, 폴리(말레산), 폴리(아미노산), 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리히드록시셀룰로오스, 폴리포스포에스테르, 다당류, 키틴, 키토산, 히알루론산 및 공중합체, 예컨대 폴록사머, 삼원중합체 및 그의 혼합물을 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 국소화제는 폴록사머이다. 폴록사머는 폴리옥시프로필렌(예컨대, 측면에 두 친수성 사슬의 폴리옥시에틸렌(예컨대, 폴리(에틸렌 옥시드)이 있는 (폴리(프로필렌 옥시드)))의 중심 소수성 사슬로 구성된

비이온성 트리블록 공중합체이다. 한 측면에 있어서, 폴록사머는 하기 화학식을 가지고

[0078]



[0079]

여기서 a는 10 내지 100, 20 내지 80, 25 내지 70 또는 25 내지 70, 또는 50 내지 70이고; b는 5 내지 250, 10 내지 225, 20 내지 200, 50 내지 200, 100 내지 200 또는 150 내지 200이다. 또 다른 측면에 있어서, 폴록사머는 2,000 내지 15,000, 3,000 내지 14,000, 또는 4,000 내지 12,000의 분자량을 갖는다. 본원에 유용한 폴록사머는 바스프(BASF)에 의해 제조된 상표명 플루로닉(Pluronic)<sup>®</sup> 하에 시판된다. 본원에 유용한 폴록사머의 비-한정적인 예는, 플루로닉<sup>®</sup> F68, P103, P105, P123, F127 및 L121을 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 적합한 농도, 예컨대 10 % - 30 % w/w의 폴록사머에서, 폴록사머 용액은 실온에서 액체이고 체내에서 연질 겔을 형성한다.

[0080]

적합한 콜라겐은, 예를 들어, 다양한 동물로부터 추출된 불용성 콜라겐의 알칼리 처리, 또는 펩신, 트립신, 키모트립신, 파핀(papin) 또는 프로나아제와 같은 효소로의 처리에 의한 것을 포함한다. 콜라겐은 새 또는 포유류의 피부, 뼈, 연골, 힘줄 또는 장기 등으로부터 수득될 수 있다. 콜라겐은 경화 후에 가요성일 수 있고 가교를 위해 오직 짧은 시간만을 필요로 하는데, 다시 말해서, 겔화를 위해 오직 짧은 시간만을 필요로 한다. 콜라겐 용액은 또한 예컨대 물, 생리 식염수, 붕산염 완충액과 같은 완충액, 또는 염화 나트륨, 브로민화 나트륨 및 브로민화 칼륨과 같은 염을 함유하는 수용액, 또는 단백질, 당 또는 지질 등을 포함하는 비독성 용매 중에 콜라겐을 용해시키는 것으로 만들어질 수 있다.

[0081]

콜라겐은 또한 혈액 또는 종양 내와 같은 수분의 존재 하에서도 겔을 형성할 수 있고, 살아있는 신체 조직에 대한 고도의 점착력을 보일 수 있다. 본 발명에 사용된 콜라겐 용액은 다양한 농도에서 만들어지고, 주사를 위해 중화되고 제조될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 조성물 내 콜라겐의 농도는 0.2 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL, 40 mg/mL 및 50 mg/mL, 또는 이들 두 숫자 사이의 임의의 범위에 있을 수 있다. 장기에 주사 시, 냉각된(chilled) 콜라겐 겔은 그들이 체온 또는 약 37 °C에 도달할 때 써모겔(thermogel)일 수 있다.

[0082]

일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 조성물의 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분(들)의 연장, 지속 및/또는 연속 방출을 제공한다.

[0083]

조성물의 멸균화는 공지된 절차, 예컨대 여과에 의해 수행될 수 있다.

[0084]

최종 형태는 제조 및 저장의 상태 하에서 안정하여야 한다. 더욱이, 최종 제약학적 형태는 오염으로부터 보호되어야 하고, 그러므로 박테리아 또는 진균과 같은 미생물의 성장을 억제할 수 있어야 한다.

[0085]

미생물의 성장의 방해 또는 억제는 하나 이상의 항균제, 예컨대 클로로부탄올, 아스코르브산, 파라벤, 티메로살 등의 첨가를 통해 달성될 수 있다. 또한 당 또는 염과 같은 장성(tonicity)을 바꾸는 작용제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다.

[0086]

제약학적 조성물은 또한 멸균 분말로서 제조될 수 있다. 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분을 포함하는 멸균 분말은, 액체 조성물, 예컨대 수성 담체를 포함하는 조성물의 진공 건조 또는 동결 건조를 포함하는 방법을 통해 제조될 수 있다. 멸균 분말은 PBS와 같은 수성 담체의 적합한 양으로 재구성되어, 환자에게 투여를 위한 주사용 조성물을 제공할 수 있다.

[0087]

일부 실시양태에서, 조성물은 피부암을 치료하기 위해 피부에 직접 적용되는 국소 조성물로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 다른 접근가능한 암, 예를 들어, 자궁경부암 또는 구강암에 직접 적용되는 국소 조성물로서 제제화된다. 일부 실시양태에서, 국소 조성물은 바이러스-감염 세포, 예컨대 사마귀에 적용된다. 일부 실시양태에서, 사마귀는 성기(성병) 사마귀이다. 일부 실시양태에서, 사마귀는 심상성 사마귀, 편평 사마귀, 사상/지상 사마귀, 모자이크 사마귀, 조갑주위(peringual) 사마귀 또는 족저(plantar) 사마귀이다.

[0088]

국소 투여를 위한 제제는 에멀전, 크림, 수용액, 오일, 연고, 페이스트, 겔, 로션, 밀크, 폼(foam), 현탁액 및 분말을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약학적 조성물은 크림 또는 로션이다. 한 측면에 있어서, 국소 조성물은 하나 이상의 계면활성제 및/또는 유화제를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 유화제는 엑소솜 및/또는 미세소포체의 구조를 바꾸지 않는다. 한 실시양태에서, 유화제는 엑소솜 및/또는 미세소포체의 구조를 바꾼다. 예를 들어, 유화제는 엑소솜 및/또는 미세소포체 구조를 파괴함으로써, 엑소솜 및/또는 미세소포체 내 활성 인자를 방출할 수 있다.



- [0089] 존재할 수 있는 계면활성제(또는 표면-활성 물질)는 음이온성, 비이온성, 양이온성 및/또는 양쪽성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 전형적인 예는 비누, 알킬벤젠설포네이트, 알칸설포네이트, 올레핀 설포네이트, 알킬 에테르 설포네이트, 글리세롤 에테르 설포네이트,  $\alpha$ -메틸 에스테르 설포네이트, 설포 지방산, 알킬 술페이트, 지방 알콜 에테르 술페이트, 글리세롤 에테르 술페이트, 지방산 에테르 술페이트, 히드록시 혼성 에테르 술페이트, 모노글리세리드(에테르) 술페이트, 지방산 아마이드(에테르) 술페이트, 모노- 및 디알킬 설포숙시네이트, 모노- 및 디알킬 설포숙신아마이트(sulfosuccinamate), 설포트리글리세리드, 아마이드 비누, 에테르 카르복시산 및 그의 염, 지방산 이세티오네이트, 지방산 사르코시네이트, 지방산 타우라이드, N-아실아미노산, 예컨대, 아실 락티레이트, 아실 타르테이트(tartrate), 아실 글루타메이트 및 아실 아스파르테이트, 알킬 올리고글루코시드 술페이트, 단백질 지방산 응축물(특히, 밀(wheat)-기반 식물성 생성물) 및 알킬(에테르) 포스페이트를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 비이온성 계면활성제의 예는, 지방 알콜 폴리글리콜 에테르, 알킬 페놀 폴리글리콜 에테르, 지방산 폴리글리콜 에스테르, 지방산 아마이드 폴리글리콜 에테르, 지방 아민 폴리글리콜 에테르, 알콕실화 트리글리세리드, 혼성 에테르 또는 혼성 포르말, 임의로 부분적으로 산화된 알킬(알케닐) 올리고글리코시드 또는 글루코론산(glucuronic acid) 유도체, 지방산 N-알킬글루카미드(alkylglucamide), 단백질 가수분해물(특히, 밀-기반 식물성 생성물), 폴리올 지방산 에스테르, 당 에스테르, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트 및 아민 옥시드를 포함하지만, 이로 한정되지 않는다. 양쪽성(amphoteric) 또는 쯔비터이온성(zwitterionic) 계면활성제의 예는 알킬베타인, 알킬아미도베타인, 아미노프로피오네이트, 아미노글리시네이트, 이미다졸리늄-베타인 및 술포베타인을 포함하지만, 이로 한정되지 않는다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 계면활성제는 지방 알콜 폴리글리콜 에테르 술페이트, 모노글리세리드 술페이트, 모노- 및/또는 디알킬 설포숙시네이트, 지방산 이세티오네이트, 지방산 사르코시네이트, 지방산 타우라이드, 지방산 글루타메이트, 알파-올레핀설포네이트, 에테르 카르복시산, 알킬 올리고글루코시드, 지방산 글루카미드, 알킬아미도베타인, 양쪽성아세탈 및/또는 단백질 지방산 응축물일 수 있다.
- [0091] 쯔비터이온성 계면활성제의 예는, 베타인, 예컨대, N-알킬-N,N-디메틸암모늄 글리시네이트, 예를 들어 코코알킬 디메틸암모늄 글리시네이트, N-아실아미노프로필-N,N-디메틸암모늄 글리시네이트, 예를 들어, 코코아실아미노프로필디메틸암모늄 글리시네이트, 및 각 경우에 알킬 또는 아실 기에 8 개 내지 18 개 탄소 원자를 갖는 2-알킬-3-카르복시메틸-3-히드록시에틸이미다졸린, 및 코코아실아미노에틸히드록시에틸-카르복시메틸 글리시네이트를 포함한다.
- [0092] 일부 실시양태에서, 유화제는 하기로부터 선택된 비이온발생성(nonionogenic) 계면활성제일 수 있다: 8 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 선형 지방 알콜로의, 12 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 지방산으로의, 알킬 기 내 8 개 내지 15 개의 탄소 원자를 갖는 알킬페놀로의, 또는 알킬 라디칼 내 8 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 알킬아민으로의, 2 내지 30 몰의 에틸렌 옥시드 및/또는 0 내지 5 몰의 프로필렌 옥시드 첨가물; 알킬(알케닐) 라디칼 및 그의 에톡실화 유사체 내 8 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 알킬 및/또는 알케닐 올리고글리코시드; 피마자유 및/또는 수소화 피마자유로의 1 내지 15 몰의 에틸렌 옥시드 첨가물; 피마자유 및/또는 수소화 피마자유로의 15 내지 60 몰의 에틸렌 옥시드 첨가물; 12 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 불포화, 선형 또는 포화, 분지형 지방산 및/또는 3 개 내지 18 개의 탄소 원자를 갖는 히드록시카르복시산이 있는 글리세롤 및/또는 소르비탄의 부분 에스테르, 및 1 내지 30 몰의 에틸렌 옥시드가 있는 그의 부가물; 폴리글리세롤의 부분 에스테르(평균 자기-축합도(degree of self-condensation) 2 내지 8), 트리메틸올프로판, 펜타에리트리톨, 당 알콜(예컨대, 소르비톨), 알킬 글루코시드(예컨대, 메틸 글루코시드, 부틸 글루코시드, 라우릴 글루코시드), 및 12 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 포화 및/또는 불포화, 선형 또는 분지형 지방산 및/또는 3 개 내지 18 개의 탄소 원자를 갖는 히드록시카르복시산, 및 1 내지 30 몰의 에틸렌 옥시드가 있는 그의 부가물; 펜타에리트리톨, 지방산, 시트르산 및 지방 알콜의 혼성 에스테르 및/또는 6 개 내지 22 개의 탄소 원자를 갖는 지방산의 혼성 에스테르, 메틸글루코스 및 폴리올, 바람직하게 글리세롤 또는 폴리글리세롤, 모노-, 디- 및 트리알킬 포스페이트, 및 모노-, 디- 및/또는 트리-PEG 알킬 포스페이트 및 그의 염; 울 왁스(wool wax) 알콜; 폴리실옥산-폴리알킬-폴리에테르 공중합체 및 해당 유도체; 및 블록 공중합체, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜-30 디폴리히드록시스테아레이트.
- [0093] 일부 실시양태에서, 유화제는, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리프로필렌 글리콜과 같은 폴리알킬렌 글리콜이다. 일부 실시양태에서, 유화제는 100 Da 내지 5,000 Da, 200 Da 내지 2,500 Da, 300 Da 내지 1,000 Da, 400 Da 내지 750 Da, 550 Da 내지 650 Da, 또는 약 600 Da 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜이다.
- [0094] 일부 실시양태에서, 유화제는 본원에 기재된 폴록사머이다.

- [0095] 일부 실시양태에서, 유화제는 하나 이상의 지방 알콜로 구성된다. 일부 실시양태에서, 지방 알콜은 선형 또는 분지형  $C_6$  내지  $C_{35}$  지방 알콜이다. 지방 알콜의 예는 카프릴 알콜(1-옥탄올), 2-에틸 헥산올, 펠라르곤산 알콜(1-노난올), 카프릭 알콜(1-데칸올, 데실 알콜), 운데실 알콜(1-운데칸올, 운데칸올, 헨데칸올), 라우릴 알콜(도데칸올, 1-도데칸올), 트리데실 알콜(1-트리데칸올, 트리데칸올, 이소트리데칸올), 미리스틸 알콜(1-테트라데칸올), 펜타데실 알콜(1-펜타데칸올, 펜타데칸올), 세틸 알콜(1-헥사데칸올), 팔미톨레일 알콜(cis-9-헥사데센-1-올), 헵타데실 알콜(1-n-헵타데칸올, 헵타데칸올), 스테아릴 알콜(1-옥타데칸올), 이소스테아릴 알콜(16-메틸헵타데칸-1-올), 엘라이딜 알콜(elaidyl alcohol)(9E-옥타데센-1-올), 올레일 알콜(cis-9-옥타데센-1-올), 리놀레일 알콜(9Z,12Z-옥타데카디엔-1-올), 엘라이돌리놀레일 알콜(elaidolinoleyl alcohol)(9E,12E-옥타데카디엔-1-올), 리놀레닐 알콜(9Z,12Z,15Z-옥타데카트리엔-1-올) 엘라이돌리놀레닐 알콜(elaidolinolenyl alcohol)(9E,12E,15-E-옥타데카트리엔-1-올), 리시놀레일 알콜(12-히드록시-9-옥타데센-1-올), 노나데실 알콜(1-노나데칸올), 아라키딜 알콜(1-에이코산올), 헨에이코실 알콜(1-헨에이코산올), 베헤닐 알콜(1-도코산올), 에루실 알콜(cis-13-도데센-1-올), 리그노세틸(lignoceryl) 알콜(1-테트라코산올), 세틸 알콜(1-헥사코산올), 몬타닐 알콜, 클루티틸(cluetyl) 알콜(1-옥타코산올), 미리실 알콜, 멜리실 알콜(1-트리아콘탄올), 게딜(geddy) 알콜(1-테트라triacon탄올), 또는 세테아릴 알콜을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다.
- [0096] 일부 실시양태에서, 국소 조성물을 생성하기 위해 사용된 담체는 폴리에틸렌 및 하나 이상의 지방 알콜의 혼합물이다. 예를 들어, 담체는 약 50 중량% 내지 약 99 중량%, 약 75 중량% 내지 약 99 중량%, 약 90 중량% 내지 약 99 중량%, 또는 약 95 중량%의 폴리에틸렌 글리콜 및 약 1 중량% 내지 약 50 중량%, 약 1 중량% 내지 약 25 중량%, 약 1 중량% 내지 약 10 중량%, 또는 약 5 중량%의 지방 알콜을 포함한다. 일부 실시양태에서, 담체는 폴리에틸렌 글리콜 및 세틸 알콜의 혼합물을 포함한다.
- [0097] 국소 조성물은 또한 이러한 조성물에 적합한 추가의 성분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 국소 조성물은 하나 이상의 하기 성분을 포함할 수 있다: 지방, 왁스, 진주빛(pearlescent) 왁스, 보형제(bodying agent), 증점제, 과지제(superfating agent), 안정제, 중합체, 실리콘 화합물, 레시틴, 인지질, 바이오제닉 활성 성분, 데오드란트, 향균제, 발한억제제(antiperspirant), 팽윤제, 방충제, 하이드로트로프(hydrotrope), 가용화제, 방부제, 향미유(perfume oil) 및 염료. 이들 성분 각각의 예시는, 이들 성분에 대한 참조문헌으로서 포함되는 US 특허 제8,067,044호에 개시된다.
- [0098] 본원에 기재된 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분(들)을 포함하는 국소 조성물은 충분한 시간 동안 성분(들)을 담체와 혼합함으로써 제조되어 입자들이 담체를 통해 고르게 분산되도록 할 수 있다. 담체가 2 이상의 성분을 포함하는 경우, 성분은 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 첨가 전 서로 혼합될 수 있다. 국소 조성물 내 존재하는 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 양은 적용에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분은 국소 조성물의 0.5 중량% 내지 20 중량%, 1 중량% 내지 10 중량%, 2 중량% 내지 5 중량%, 또는 약 3 중량%이다.
- [0099] 특정 경우에 조성물 내 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 양은 사용된 특정 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분, 제제화된 특정 조성물, 적용의 방식 및 특정 위치 및 치료받는 환자에 따라 다를 것임이 이해될 것이다. 정해진 수용자에 대한 용량은 통상적인 고려사항, 예컨대 적절한 통상적인 약리학적 프로토콜로, 예컨대 조성물 및 공지된 치료법의 차등 활성도의 관습적인 비교를 사용하여 정해질 수 있다. 제약 작용제의 용량을 결정하는 통상의 기술자인 의사 및 조제사(formulator)는 표준 권고에 따라 용량을 결정하는데 어려움이 없을 것이다(문헌[Physician's Desk Reference, Barnhart Publishing (1999)]).
- [0100] 특정 임상적 세팅에서 각각 이점을 제공하는 단위 용량 또는 다중 용량 제형이 고려된다. 단위 용량은 암을 치료하는 세팅에서 바람직한 효과(들)를 제공하도록 계산된 일정량의 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분을 함유할 것이다. 다중 용량 제형은 다수의 1회 용량, 또는 분할 용량이 바람직한 결과를 달성하도록 요구될 때 특히 유용할 수 있다. 이들 용량 제형 중 어느 한 쪽은, 특정 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 독특한 특성, 달성되어야 할 특정 치료적 효과, 치료되어야 할 질병 및 환자의 병태 등에 의해 판단되거나 이에 직접적으로 의존한다.
- [0101] 단위 용량은 환자가 앓는 질병을 치료하기에 충분한 치료학적 유효량을 함유할 것이고, 약 0.001 mg 내지 100 mg의 종양세포 치사활성, 세포독성 및/또는 항균성 성분을 함유할 수 있다. 종양세포 치사활성, 세포독성 및/또는 항균성 성분의 양은 0.001 % 내지 90 % w/w의 조성물, 예컨대 0.001 %, 0.01 %, 0.1 %, 1 %, 10 %, 50 % 또는 90 %, 또는 임의의 두 숫자 사이의 범위 내로 달라질 수 있다. 치료되는 질병은 본 발명의 엑소솜에 의해 치료될 수 있는 임의의 질병, 예컨대 암, 박테리아성 감염, 바이러스성 감염 또는 진균성 감염일 수 있다.



- [0102] 또한, 제약학적 조성물은 추가로 경구 제제, 예컨대 섭취용 정제, 구강용 정제, 캡슐, 캐플릿, 엘릭서(elixir), 현탁액, 시럽, 트로키(trouche), 웨이퍼(wafer), 로젠지(lozenge) 등일 수 있다.
- [0103] 조성물은 서방형 제제일 수 있다. 조성물은 경질 또는 연질 캡슐 내에 넣을 수 있고, 정제로 압축될 수 있고, 또는 음료, 음식 또는 다르게는 식사에 혼입될 수 있다. 최종 조성물 및 제제의 백분율은 물론 다를 수 있고, 편의상 1 내지 90 중량% 범위의 최종 제형, 예컨대 정제일 수 있다. 이러한 치료학적으로 유용한 조성물의 양으로 적합한 용량이 얻어질 것이다.
- [0104] 또한 경구 조성물의 적합한 제형은 바인더, 예컨대 검 트라가칸스(gum tragacanth), 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴; 감미제, 예컨대 락토스 또는 수크로스; 봉해제, 예컨대 옥수수 전분, 알긴산 등; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트; 또는 향미료(flavoring), 예컨대 페퍼민트, 노루발풀의 향유(oil of wintergreen) 등을 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질은 코팅으로 존재할 수 있거나 다르게는 경구 투여 단위의 물리적 형태를 변형시킬 수 있다. 경구 투여 단위는 셀락(shellac), 당 또는 돌 다로 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭서는 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분, 감미제로서 수크로스, 방부제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 향미료를 함유할 수 있다. 이용되는 임의의 물질은 제약학적으로 허용가능하고 실질적으로 비독성이어야 한다.
- [0105] 제약학적 조성물을 제조하는 추가의 설명은 문헌[19<sup>th</sup> Edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, Published by the Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18040]에서 찾을 수 있다. 관련된 부분은 참조문헌으로서 본원에 포함된다.
- [0106] **본 발명의 치료 방법**
- [0107] 본원에 기재된 조성물은 암과 같은 다양한 질병을 치료하는데 유용하다. 조성물에 의해 치료될 수 있는 질병의 예는 면역계, 림프계 및 조혈계의 악성 종양과, 형성된 종양(formed tumor) 및 고형 종양을 포함한다. 조성물로 치료될 수 있는 암의 비-한정적인 예로는 비만 세포성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 적백혈병, 골수성장장애(예컨대, 골수성 백혈병, 다발성 골수종 및 적백혈병), 생식 세포 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 위장관 기질 종양, 신경모세포종, 자궁 경부암종, 난소 암종, 뇌 암종, 유방 암종, 난소 암종, 자궁내막 암종, 신장 암종, 갑상선 암종, 방광 암종, 결장 암종, 췌장 암종 및 전립선 암종, 피부 암종, 예컨대 흑색종, 선종(예컨대, 결장 용모 선종), 및 육종(예컨대, 골육종) 등이 있다.
- [0108] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 피부암, 예컨대 흑색종, 편평 세포 암, 기저 세포 암, 또는 비만 세포 종양을 치료하는데 사용된다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 다른 상피 세포 암, 예컨대 자궁 경부암 또는 구강암을 치료하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 바이러스-감염된 세포, 예컨대 사마귀를 치료하는데 사용된다.
- [0110] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 면역계를 조절하는데 사용된다. 예를 들어, 엑소좀 및/또는 미세소포체는 세포독성 T 세포 반응(예컨대, 종양에 대해)을 유도하고/거나, 세포예정사(예컨대, 활성화된 면역 세포의 세포예정사)를 유도할 수 있다. 엑소좀 및/또는 미세소포체는 또한 면역 감시(immune surveillance) 역할을 할 수 있다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 감염을 치료하는데 유용하다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 병원성 바이러스에 의한 감염을 치료하는데 유용하다. 병원성 바이러스는 인유두종 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 거대세포바이러스, 에볼라 바이러스, 마르부르그 바이러스(Marburg virus), 인플루엔자, 호흡기세포융합 바이러스, 폭스바이러스, 수두대상포진 바이러스 및 헤르페스를 제한없이 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 박테리아성 감염을 치료하는데 유용하다. 감염성 박테리아는 임의의 상기 항생제-내성 균주를 포함하는 연쇄상구균, 포도상구균, 크립토코쿠스, 클라미디아(Chlamydia), 에세리키아(Escherichia), 슈도모나스(Pseudomonas), 클로스트리듐(Clostridium) 및 칸디다(Candida)를 제한없이 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제약학적 조성물은 진균 및 효모균을 포함하는, 다른 미생물에 의해 야기된 감염을 치료하는데 유용하다.
- [0112] 인간 및 가축을 포함하는 포유류에서, 유효량이 커버되어야 할 체표면적(예컨대, 환부)을 기준으로, 예를 들어 국소 조성물로 투여될 수 있다. 적합한 용량 범위는 체표면적 1 m<sup>2</sup> 당 약 0.001 mg 내지 약 100 mg 당량의 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분, 예컨대 약 0.005 mg/m<sup>2</sup> 내지 약 50 mg/m<sup>2</sup>이다. 투여량은 매일, 예컨대

하루에 한번, 두번, 세번 또는 그 이상, 또는 이틀마다 또는 며칠마다, 또는 매주마다 등 투여될 수 있다. 연장 방출 제제가 투여된다면, 투여의 빈도는 줄어들 수 있다.

[0113] 한 실시양태에서, 유효량은 종양 부피를 기준으로 투여될 수 있다. 적합한 용량 범위는 약 1:100 내지 약 1:10,000의 엑소솜/미세소포체 제제 대 종양 부피 비이다. 한 실시양태에서, 적합한 용량 범위는 약 1:100 내지 약 1:1,000의 엑소솜/미세소포체 제제 대 종양 부피 비이다. 한 실시양태에서, 적합한 용량 범위는 약 1:1,000 내지 약 1:10,000의 엑소솜/미세소포체 제제 대 종양 부피 비이다.

[0114] 한 실시양태에서, 유효량은 환자 체중을 기준으로 투여될 수 있다. 적합한 용량 범위는 체중 1 kg 당 약 1  $\mu$ g 내지 약 100 mg 엑소솜/미세소포체 제제이다. 한 실시양태에서, 적합한 용량 범위는 체중 1 kg 당 약 1  $\mu$ g 내지 약 10 mg 엑소솜/미세소포체 제제이다. 한 실시양태에서, 적합한 용량 범위는 체중 1 kg 당 약 1  $\mu$ g 내지 약 100  $\mu$ g 엑소솜/미세소포체 제제이다. 한 실시양태에서, 적합한 용량 범위는 체중 1 kg 당 약 10  $\mu$ g 내지 약 10 mg 엑소솜/미세소포체 제제이다. 한 실시양태에서, 적합한 용량 범위는 체중 1 kg 당 약 100  $\mu$ g 내지 약 10 mg 엑소솜/미세소포체 제제이다. 용량 및 투여의 빈도는 제형의 종류, 치료될 질병, 종양세포 치사활성 및/또는 항균성 성분의 양, 환자의 나이, 성별, 중, 다른 조건 등에 의존할 수 있다.

#### [0115] 병용 치료법

[0116] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 조성물은 다른 암 치료법, 예컨대 수술, 방사선, 항암화학요법(예컨대, 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin), 옥살리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin) 및 피코플라틴(picoplatin), 특히 시스플라틴 및 카보플라틴; 타산(taxane), 예컨대 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel); 및 안트라사이클린(anthracycline), 예컨대 다우노루비신(daunorubicin), 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin) 또는 발루비신(valrubicin) 등), 세포 기반 치료법(예컨대, NK-92 세포 치료법), 항체 치료법 등과 함께 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 것과 같은 하나 이상의 시토키인과 함께 투여될 수 있다.

[0117] 하기 실시예는 발명을 설명하기 위한 것이고 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 본 명세서에 인용된 모든 공보 또는 참조문헌은 참조문헌으로서 본원에 포함된다.

#### [0118] 실시예

##### [0119] 실시예 1: NK-92 세포의 항균 효과

[0120] NK-92 세포를 24 시간 동안 미엘로컬트(Myelocult) 배지에서 둥근바닥 플레이트에 크립토콕쿠스 네오포르만스와 함께 인큐베이팅하였다. 100:1( $1 \times 10^6$ : $1 \times 10^4$  세포/웰)의 작동자:표적(NK-92: *C. 네오포르만스*) 비율을 사용하였다. *C. 네오포르만스*( $1 \times 10^4$  세포/웰)는, 대조군으로써 NK-92 세포 없이 미엘로컬트 배지에서 인큐베이팅하였다. 24 시간 인큐베이션 후, 배양액을 연속으로 희석시키고 사보라우드(Sabouraud) 한천 플레이트에 놓았다. 플레이트를 48 시간 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 각 희석액에서의 콜로니의 수를 측정하였다.

[0121] 각 희석액에서의 플레이트 당 콜로니의 수는 도 1에 나타낸다. 흰 막대: NK-92 세포 + *C. 네오포르만스*. 검은 막대: *C. 네오포르만스* 단독. 도 2는 NK-92 세포가 대략 60 %로 *C. 네오포르만스* 성장을 억제한 것을 나타낸다.

[0122] NK-92 세포를 또 다른 종의 진균(일종의 *아스페르길루스(Aspergillus)*)과 함께 인큐베이팅할 때 유사한 결과가 관찰되었다. NK-92 세포는 용량- 및 시간-의존적 방법으로 진균에 균사(hyphal) 손상을 일으킨다.

##### [0123] 실시예 2: NK-92 세포 상청액으로부터의 엑소솜 및/또는 미세소포체의 분리

[0124] 세포외 소포체(엑소솜 및/또는 미세소포체)를 초원심분리를 통해 분리하였다. 배양된 NK-92 세포를 10 분 동안 300xg에서 원심분리하였고, 세포 펠렛은 폐기하였다. 상청액은 20 분 동안 2000xg에서 원심분리하였고, 펠렛(세포 파편)은 폐기하였다. 그 결과의 상청액은 80 분 동안 100,000xg에서 초원심분리를 하였다. 그 결과의 펠렛은 인산 완충 식염수로 워싱하였고 80 분 동안 100,000xg에서 초원심분리를 하였다. 엑소솜 및 미세소포체를 함유하는 워싱된 펠렛(EV/MV 제제)은 추가의 연구를 위해 보관하였다.

##### [0125] 실시예 3: 세포의 소포체의 특성화

[0126] NK-92 세포를 다양한 조건 하에 배양하였고, 세포외 소포체는 실시예 2에 기재된 배지로부터 분리하였다. 배양 조건은 표 1에 제공된다. 세포는 엑소솜의 수확 전 적어도 24 내지 46 시간 동안 엑소프리(exofree) FBS에서

컨디션이 좋았다. 엑소프리(ExoFree) FBS는 NK-92 세포의 소포체 제제의 오염을 피하기 위해 엑소좀이 걸러진 것이다.

[0127] <표 1>

[0128] NK-92 배양 조건

라인	세포의 수	배지 백본	엑소프리 FBS (%)	IL-2 (IU/mL)
4	$4.0 \times 10^7$	$\alpha$ MEM(NK)	5	500
5	$4.8 \times 10^7$	RPMI	10	500
6	$4.0 \times 10^7$	X-Vivo10 <sup>1</sup>	5	500
7	$3.6 \times 10^7$	X-Vivo10 <sup>1</sup>	0	500

[0129]

[0130] <sup>1</sup> 론자 그룹 엘티디.(Lonza Group Ltd.)

[0131] 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이 표준 웨스턴 블로팅 기법을 사용하여 EV/MV 제제를 여러 단백질의 존재에 대해 분석하였다. MCF-7 세포주는 엑소좀 생성에 대한 양성 대조군 및 세포용해 단백질에 대한 음성 대조군으로서 사용하였다. NK-92 세포 펠렛(NK-92 세포)은 양성 대조군으로서 사용하였다. MCF-7 세포는 10 % 엑소프리 소 태아 혈청(FBS) 및 2 mM L-글루타민과 함께 DMEM에서 배양하였다.

[0132] NK-92 및 MCF-7 세포 둘다로부터의 세포의 소포체는 엑소좀 마커인 Rab5B에 대해 양성이었다. NK-92 EV/MV 제제(MCF-7 EV/MV 제제는 아님) 또한 퍼포린, Fas 리간드(FasL), 그랜자임(granzyme)B, 및 그라눌리신(granulysin)을 포함하는 NK 세포 활성화에 관여하는 것으로 알려진 여러 세포예정사-유도 및/또는 세포용해 단백질에 대해 양성이었다. 그러나, 이들 단백질의 각 양은, 배지 백본(media backbone)(예컨대,  $\alpha$  MEM(NK), RPMI, X-Vivo) 및 혈청 농도를 포함하는, NK-92 세포 성장 조건에 의존적인 것으로 나타난다.

[0133] NK-92 세포로부터의 EV/MV 제제를 다른 세포소기관에 의한 오염에 대해 분석하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, NK-92로부터 분리된 EV/MV는 핵 물질(작은 세포사멸체(small apoptotic body))로의 일부 오염을 보였지만, 다른 오염 세포소기관은 없었다.

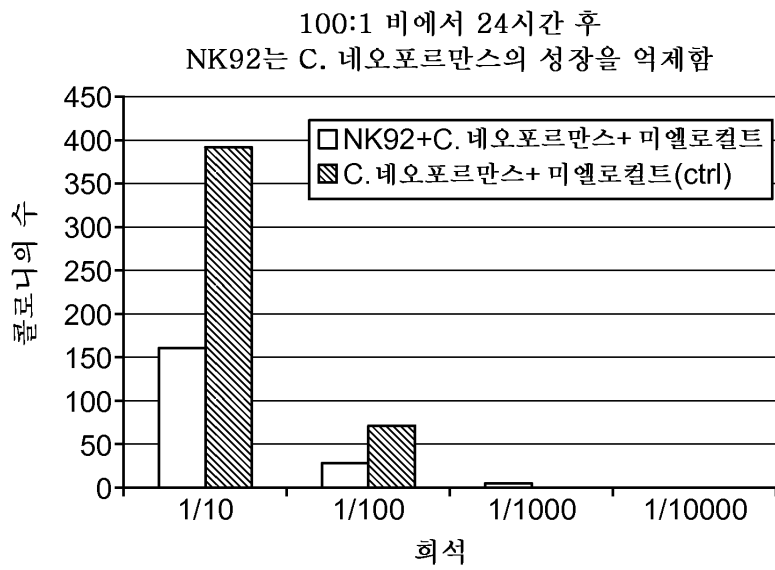
[0134] **실시예 4: EV/MV 제제의 세포독성**

[0135] Jurkat 세포에 대한 EV/MV 제제의 세포독성을 표 1에서 나타난 배양 조건을 사용하여 시험하였다. Jurkat 세포 ( $2 \times 10^4$ )를 2 시간 또는 20 시간 동안 170  $\mu$ L 배지(엑소프리 FBS로) 및, 5, 15, 또는 30  $\mu$ L의 EV/MV 제제 (PBS로 총 200  $\mu$ L의 인큐베이션 부피를 달성)에서 인큐베이팅하였다. 세포독성은 피로피디움 요오드화물(PI) 분석법으로 측정하였고, 데이터는 PI 양성(사멸 세포의 지표)인 세포의 백분율로 표현된다.

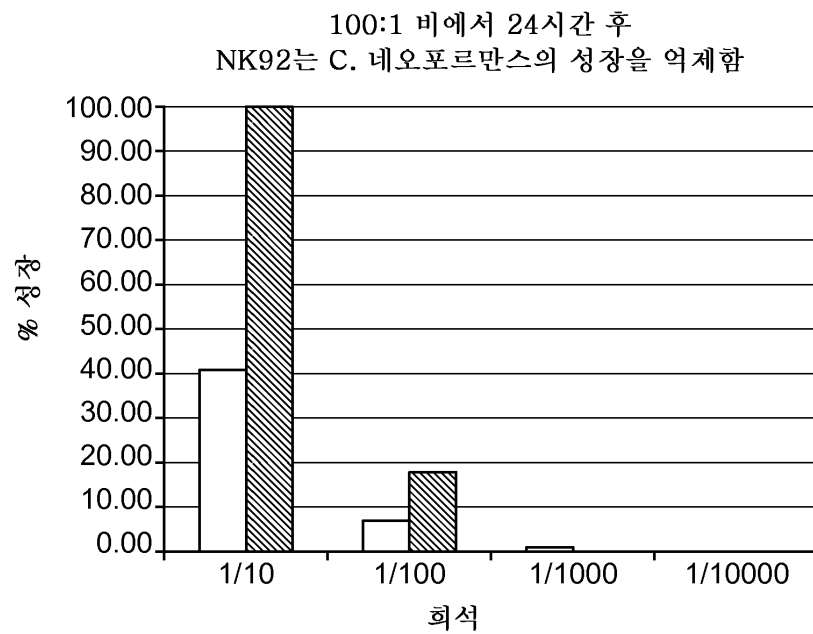
[0136] 도 4에 나타나는 바와 같이, MCF-7 세포가 아닌 NK-92 세포로부터의 EV/MV 제제는 *생체외* Jurkat 세포에 대한 세포상해 활성을 갖는다. 배지 조성물은 EV/MV의 용해능(lytic potential)을 변화시키고, 성장 배지 내 혈청의 존재는 NK-92 세포에 의한 용해성 EV/MV의 생성을 자극한다.

도면

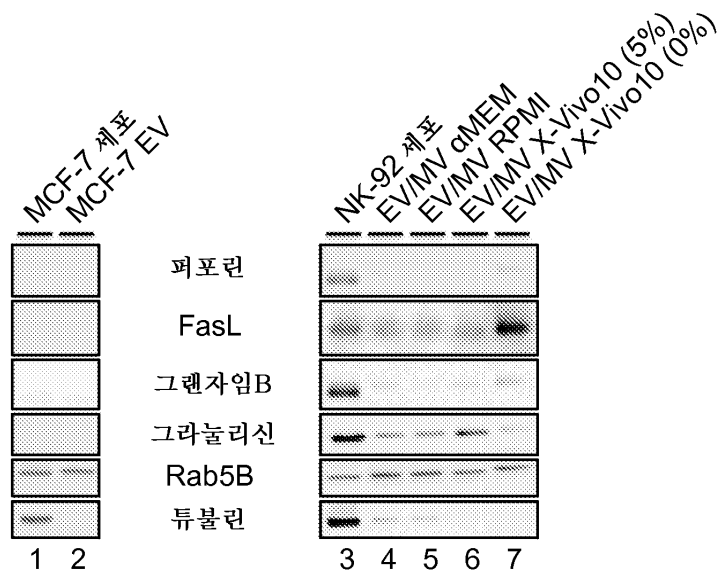
도면1



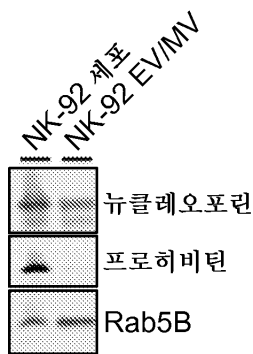
도면2



도면3a



도면3b



뉴클레오포린 = 핵막 마커  
프로히비틴 = 미토콘드리아 마커  
Rab5B = 엑소솜 마커

도면4

