



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0059555
(43) 공개일자 2018년06월04일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7013666</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년10월14일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년05월14일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/056988</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/066530
국제공개일자 2017년04월20일</p> <p>(30) 우선권주장
62/242,246 2015년10월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)</p> | <p>(71) 출원인
셀룰라리티, 인코포레이티드
미국 뉴저지 07059 워런 33 테크놀로지 드라이브</p> <p>(72) 발명자
장, 샤오쿠이
미국 뉴저지 07039 리빙스톤 10 마운트헤븐 드라이브
주레틱, 이바나
미국 뉴저지 07030 호보컨 아파트 2 224 블룸필드 스트리트
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
특허법인필엔은지</p> |
|--|--|

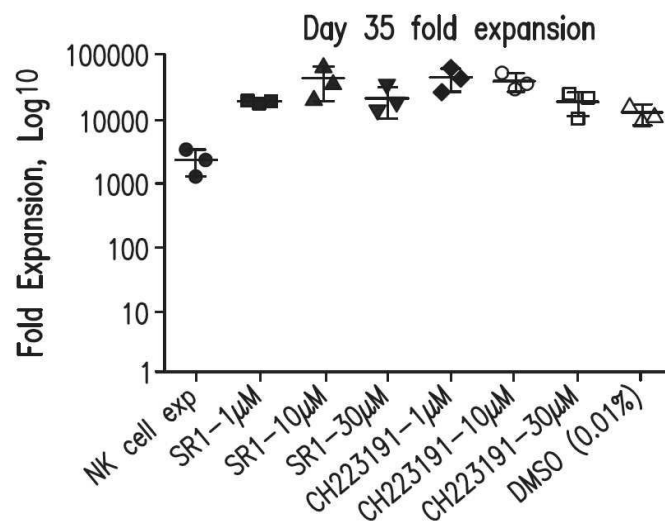
전체 청구항 수 : 총 243 항

(54) 발명의 명칭 천연 킬러 세포 및 ILC3 세포 및 이의 용도

(57) 요약

줄기 세포 동원 인자를 포함하는 배지로 3 단계 확장 및 분화 방법을 사용하여 천연 킬러(NK) 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 사용하여 종양 세포 증식을 억제하는 방법, 및 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개인에게 투여함을 포함하여, 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07D 487/04 (2013.01)
C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/145 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2506/11 (2013.01)

(72) 발명자

강, 린

미국 뉴저지 08820 에디슨 1106 팀버 옥스 로드

보스키나리안-베르세, 바네사

미국 뉴저지 07946 밀링턴 1670 벨리 로드

스타우트, 바바니

미국 뉴저지 08833 레바논 37 헌터스 서클

하리리, 로버트 제이.

미국 뉴저지 07924 버나즈빌 341 멘드햄 로드

호프가르트너, 울프강

미국 뉴저지 07718 플로햄 파크 샵에이 89 브룩데일 로드

에딘저, 제임스

미국 뉴저지 07718 벨포드 273 레오나르드빌레 로드

로우, 에릭

미국 뉴저지 08816 이스트 브런즈윅 45 저니 드라이브

얀코비치, 블라디미르

미국 뉴욕 10044 뉴욕 아파트 1012 531 메인 스트리트

(30) 우선권주장

62/272,984 2015년12월30일 미국(US)

62/403,571 2016년10월03일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 줄기 세포 동원 작용제(stem cell mobilizing agent) 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기(hematopoietic stem) 또는 선조(progenitor) 세포를 배양하여 세포의 제1 집단(population)을 생산하는 단계;

(b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 저 분자량 헤파린(LMWH)을 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하고,

상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-인 천연 킬러 세포를 포함하며, 상기 천연 킬러 세포의 적어도 80%가 살아 있는, 천연 킬러 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포의 제3 집단이 CD94+ 또는 CD16+인 천연 킬러 세포를 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포의 제3 집단이 CD94- 또는 CD16-인 천연 킬러 세포를 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포의 제3 집단이 CD94+ 또는 CD16+인 천연 킬러 세포를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포의 제3 집단이 CD94- 또는 CD16-인 천연 킬러 세포를 포함하는 방법.

청구항 6

(a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계;

(b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하고,

상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함하는, 천연 킬러 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제3 배지가 줄기 세포 인자(SCF)를 결여하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 제3 배지가 LMWH를 결여하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, (d) 상기 세포의 제3 집단으로부터 CD11a+ 세포를 분리하여 세포의 제4 집단을 생산하는 추가

의 단계를 포함하고;

상기 세포의 제4 집단이 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함하는 방법.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 퍼포린(perforin) 및 EOMES를 발현하는 방법.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 ROR γ t 또는 IL1R1을 발현하지 않는 방법.

청구항 12

(a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여, 세포의 제1 집단을 생산하는 단계;

(b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하고;

상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 ILC3 세포를 포함하는, ILC3 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제3 배지가 줄기 세포 동원 작용제를 포함하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 제3 배지가 SCF를 포함하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 제3 배지가 줄기 세포 동원 작용제 및 SCF를 포함하는 방법.

청구항 16

(a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계;

(b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계;

(c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH 각각을 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및

(d) 상기 세포의 제3 집단으로부터 CD11a- 세포를 분리하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하고;

상기 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 ILC3 세포를 포함하는, ILC3 세포를 포함하는 세포 집단의 생산 방법.

청구항 17

제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 ROR γ t 및 IL1R1을 발현하는 방법.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 퍼포린 또는 EOMES를 발현하지 않는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 데설페이트화된(desulphated) 글리코사미노글리칸을 결여하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 사람 세포인 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 영장류 세포인 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 개과(canine) 세포인 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 설치류 세포인 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 사람, 영장류, 개과 또는 설치류 이외의 포유동물로부터의 세포인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 $CD34^{+}$ 조혈 줄기 세포인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 태반 세포인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 태반 세포가 사람 태반 관류액(perfusate)으로부터 수득되거나, 수득가능한 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 태반 세포가 사람 태반 관류액으로부터 분리된 핵화된(nucleated) 세포로부터 수득되거나 수득가능한 방법.

청구항 30

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 제대혈(umbilical cord blood)로부터 수득되거나, 수득가능한 방법.

청구항 31

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 태아 간 세포인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 동원된(mobilized) 말초 혈액 세포인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포가 골수 세포인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Tpo가 상기 제1 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 Tpo가 상기 제1 배지 속에 약 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 Tpo가 상기 제1 배지 속에, 약 25 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-15가 상기 제2 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 IL-15가 상기 제2 배지 속에 10 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 상기 IL-15가 상기 제2 배지 속에 약 20 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2가 상기 제3 배지 속에 10 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-15가 상기 제3 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 41

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2가 상기 제3 배지 속에 300 U/mL 내지 3,000 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-15가 상기 제3 배지 속에 10 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 42

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2가 상기 제3 배지 속에 약 1,000 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-15가 상기 제3 배지 속에 약 20 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15가 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 규정되지 않은 성분 속에 포함되지 않는 방법.

청구항 44

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15가 혈청 속에 포함되지 않는 방법.

청구항 45

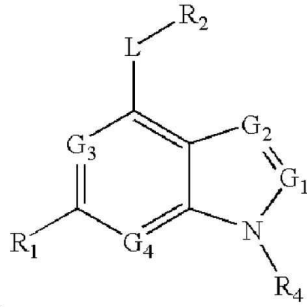
제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포 동원 작용제가 아릴 탄화수소 수용체 억제제인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제가 레스베라트롤(resveratrol)인 방법.

청구항 47

제45항에 있어서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제가 하기 화학식의 화합물; 또는 이의 염인 방법:



상기 화학식에서:

G₁은 N 및 CR₃으로부터 선택되고;

G₂, G₃ 및 G₄는 CH 및 N으로부터 독립적으로 선택되며; 단 G₃ 및 G₄ 중 적어도 하나는 N이고; 단 G₁ 및 G₂는 둘 다 N은 아니며;

L은 --NR_{5a}(CH₂)₀₋₃--, --NR_{5a}CH(C(O)OCH₃)CH₂--, --NR_{5a}(CH₂)₂NR_{5b}--, --NR_{5a}(CH₂)₂S--, --NR_{5a}CH₂CH(CH₃)CH₂--, --NR_{5a}CH₂CH(OH)-- 및 --NR_{5a}CH(CH₃)CH₂--로부터 선택되고; 여기서 R_{5a} 및 R_{5b}는 수소 및 C₁₋₄알킬로부터 독립적으로 선택되며;

R₁은 수소, 페닐, 티오펜, 푸라닐, 1H-벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 1H-이미다조피리디닐, 벤조티오펜, 피리미디닐, 1H-피라졸릴, 피리디닐, 1H-이미다졸릴, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 1H-피롤릴 및 티아졸릴로부터 선택되고; 여기서 R₁ 중 상기 페닐, 티오펜, 푸라닐, 1H-벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 1H-이미다조피리디닐, 벤조티오펜, 피리미디닐, 1H-피라졸릴, 피리디닐, 1H-이미다졸릴, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 1H-피롤릴 또는 티아졸릴은 시아노, 하이드록시, C₁₋₄알킬, C₁₋₄알콕시, 할로, 할로-치환된-C₁₋₄알킬, 할로-치환된-C₁₋₄알콕시, 하이드록시, 아미노, --C(O)R_{8a}, --S(O)₀₋₂R_{8a}, --C(O)OR_{8a} 및 --C(O)NR_{8a}R_{8b}로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 임의 치환될 수 있으며, 여기서 R_{8a} 및 R_{8b}는 수소 및 C₁₋₄알킬로부터 독립적으로 선택되고; 단 R₁ 및 R₃는 둘 다 수소가 아니고;

R₂는 --S(O)₂NR_{6a}R_{6b}, --NR_{9a}C(O)R_{9b}, --NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}, 페닐, 1H-피롤로피리딘-3-일, 1H-인돌릴, 티오펜, 피리디닐, 1H-1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 1H-피라졸릴, 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조이미다졸릴 및 1H-인다졸릴로부터 선택되고; 여기서 R_{6a}, R_{6b} 및 R_{6c}는 수소 및 C₁₋₄알킬로부터 독립적으로 선택되며; 여기서 R₂ 중 상기 페닐, 1H-피롤로피리딘-3-일, 1H-인돌릴, 티오펜, 피리디닐, 1H-1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 1H-피라졸릴, 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조이미다졸릴 또는 1H-인다졸릴은 하이드록시, 할로, 메틸, 메톡시, 아미노, --O(CH₂)_nNR_{7a}R_{7b}, --S(O)₂NR_{7a}R_{7b}, --OS(O)₂NR_{7a}R_{7b} 및 --NR_{7a}S(O)₂R_{7b}로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 임의 치환되고, 여기서 R_{7a} 및 R_{7b}는 수소 및 C₁₋₄알킬로부터 독립적으로 선택되며;

R₃은 수소, C₁₋₄알킬 및 바이페닐(biphenyl)로부터 선택되고;

R₄는 C₁₋₁₀알킬, 프로프-1-엔-2-일, 사이클로헥실, 사이클로프로필, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 벤즈하이드릴, 테트라하이드로-2H-피란-3-일, 테트라하이드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라하이드로푸란-3-일, 벤질, (4-펜틸페닐)(페닐)메틸 및 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸로부터 선택되고; 여기서 상기 알킬, 사이클로프로필, 사이클로헥실, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 옥세탄-2-일, 벤즈하이드릴, 테트라하이드로-2H-피란-2-일, 테트라하이드로-2H-피란-3-일, 테트라하이드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라하이드로푸란-3-일, 테트라하이드로푸란-2-일, 벤질, (4-펜틸페닐)(페닐)메틸 또는 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸은 하이드록시, C₁₋₄알킬 및 할로-치환된-C₁₋₄알킬로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 임의 치환될 수 있음.

청구항 48

제45항에 있어서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제가 스템레게닌(StemRegenin)-1(SR-1)(4-(2-(2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-이소프로필-9H-푸린-6-일아미노)에틸)페놀)인 방법.

청구항 49

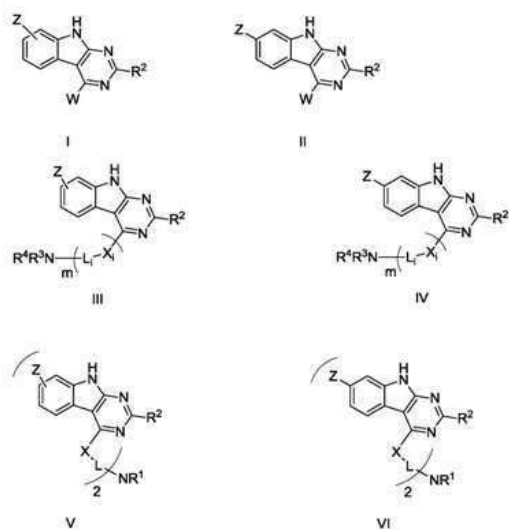
제45항에 있어서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제가 화합물 CH223191 (1-메틸-N-[2-메틸-4-[2-(2-메틸페닐)디아제닐]페닐-1H-피라졸-5-카복사미드]인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 줄기 세포 동원 작용제가 피리미도(4,5-b)인돌 유도체인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 피리미도(4,5-b)인돌 유도체가 다음 화학식의 화합물, 또는 이의 염 또는 전구약물 중 하나 이상인 방법:



여기서:

Z는

- 1) -P(O)(OR<1>)(OR<1>),
- 2) -C(O)OR<1>,
- 3) -C(O)NHR<1>,
- 4) -C(O)N(R)R<1>,
- 5) -C(O)R<1>,
- 6) -CN,
- 7) -SR,
- 8) -S(O)₂NH₂,
- 9) -S(O)₂NHR<1>,
- 10) -S(O)₂N(R)R<1>,
- 11) -S(O)R<1>,
- 12) -S(O)₂R<1>,

- 13) -L,
- 14) 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -벤질,
- 15) L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로아릴,
- 16) L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴,
- 17) L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-아릴,
- 18) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -헤테로아릴, 또는
- 19) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -아릴이고,

여기서 각각의 치환체는 이미 존재하지 않는 경우 L 그룹에 임의 부착되고, 여기서 (R<1>) 및 R<1>이 질소 원자에 부착된 경우, 임의로 이들은 질소 원자와 함께 결합하여 3-원 내지 7-원 환을 형성하며, 이들은 임의로 N, O 및 S로부터 선택되고, 하나 이상의 R<1> 또는 R<A>로 임의 치환된 하나 이상의 다른 헤테로원자를 임의로 포함하며;

W는

- 1) -H,
- 2) -할로젠,
- 3) -OR<1>,
- 4) -L-OH,
- 5) -L-OR<1>,
- 6) -SR<1>,
- 7) -CN,
- 8) -P(0)(OR<1>)(OR<1>),
- 9) -NHR<1>,
- 10) -N(R<1>)R<1>,
- 11) -L-NH₂,
- 12) -L-NHR<1>,
- 13) -L-N(R<1>)R<1>,
- 14) -L-SR<1>,
- 15) -L-S(0)R<1>,
- 16) -L-S(0)2R<1>,
- 17) -L-P(0)(OR<1>)(OR<1>)
- 18) -C(0)OR<1>,
- 19) -C(0)NH₂,
- 20) -C(0)NHR<1>,
- 21) -C(0)N(R<1>)R<1>,
- 22) -NHC(0)R<1>,

23) $-NR1C(0)R<1>$, $-NHC(0)OR<1>$,

$-NR1C(0)OR<1>$,

$-OC(0)NH_2$,

$-OC(0)NHR<1>$,

$-OC(0)N(R)R<1>$,

$-OC(0)R<1>$,

$-C(0)R<1>$,

$-NHC(0)NH_2$,

$-NHC(0)NHR<1>$,

$-NHC(0)N(R)R<1>$,

$-NRC(0)NH_2$,

$-NR C(0)NHR<1>$,

$-NRC(0)N(R)R<1>$,

$-NHS(0)2R<1>$,

$-NRS(0)2R<1>$,

$-S(0)2NH_2$,

$-S(0)2NHR<1>$,

$-S(0)2N(R)R<1>$,

$-S(0)R<1>$,

$-S(0)2R<1>$,

$-OS(0)2R1$,

$-S(0)2OR<1>$,

1, 2 또는 3개의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -벤질,

L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로아릴,

L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴,

L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -L-아릴,

$-L-NR<1>(R<1>)$,

$-L-)2 NR<1>$,

L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -L-($N(R1)-L$) $_n$ - $N(R1)R1$, $-L-(N(R<1>))-L$) $_n$ -헤테로아릴,

L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -L-($N(R<1>))-L$) $_n$ -헤테로사이클릴,

L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R<A>$ 또는 $R<1>$ 치환체로 임의 치환된 -L-($N(R<1>))-L$) $_n$ -아릴,

$-O-L-N(R)R<1>$,

L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-헤테로아릴,

L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-헤테로사이클릴,

L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-아릴,
-O-L)₂-NR<1>,

-O-L-(N(R)-L)_n-N(R)R<1>,

L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,

L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴,

하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,

하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -S-L-헤테로아릴,

하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -S-L-헤테로사이클릴,

L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -S-L-아릴,
-S-L)₂ NR₁,

-S-L-(N(R₁)-L)"-N(R₁)R₁,

하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴, 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴, 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,

-NR<1>(R<1>),

-(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁,

-N(R₁)L)₂-NR₁, 76)-(N(R₁)-L)"-N(R₁)RA,

77) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,

78) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴,

79) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-아릴,

80) 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -헤테로아릴, 또는

81) 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -아릴이고,

여기서 각각의 치환체는 이미 존재하지 않는 경우 L 그룹에 임의 부착되고, 여기서 2개의 R<1> 치환체가 동일한 질소 원자에 존재하는 경우, 각각의 R<1> 치환체는 이후 기술된 R<1> 값의 목록으로부터 독립적으로 선택되고,

여기서 n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5와 같은 정수이며,

여기서, (R<1>) 및 R<1>가 질소 원자에 부착된 경우, 임의로 이들은 질소 원자와 함께 결합하여 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 다른 헤테로원자를 임의로 포함하는 3 내지 7-원 환을 형성하고, 임의로 당해 환은 하나 이상의 R<1> 또는 R<A>로 치환되며;

L은

1) -C1-6 알킬,

2) -C2-6 알케닐,

3) -C2-6 알키닐,

4) -C3-7 사이클로알킬,

- 5) -C3-7 사이클로알케닐,
- 6) 헤테로사이클릴,
- 7) -C1-6 알킬-C3-7 사이클로알킬,
- 8) -C1-6 알킬-헤테로사이클릴,
- 9) 아릴, 또는
- 10) 헤테로아릴이고,

여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 각각 독립적으로 1개 또는 2개의 R<A> 치환체로 임의 치환되며;

R1는

- 1) -H,
- 2) -C1-6 알킬,
- 3) -C2-6 알케닐,
- 4) -C2-6 알키닐,
- 5) -C3-7 사이클로알킬,
- 6) -C3-7 사이클로알케닐,
- 7) 퍼플루오르화된-C1-5,
- 8) -헤테로사이클릴,
- 9) -아릴,
- 10) -헤테로아릴,
- 11) -벤질, 또는
- 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일]펜타노일이고,

여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알케닐, 퍼플루오르화된 알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴 및 벤질 그룹은 각각 독립적으로 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환되며;

R2는

- 1) -H,
- 2) -C1-6 알킬,
- 3) -SR,
- 4) -C(0)R1,
- 5) -S(0)R1,
- 6) -S(0)2R<1>,
- 7) 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -벤질,
- 8) L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로아릴,
- 9) L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴,
- 10) L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-아릴,
- 11) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -헤테로아릴, 또는

12) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -아릴이고,
여기서 각각의 치환체는 이미 존재하지 않는 경우 L 그룹에 임의 부착되고;

R<A>는

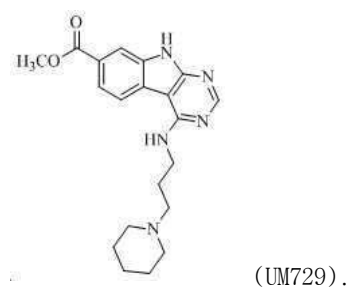
- 1) -할로젠,
- 2) -CF,
- 3) -OH,
- 4) -OR<1>,
- 5) -L-OH,
- 6) -L-OR<1>,
- 7) -OCF,
- 8) -SH,
- 9) -SR1,
- 10) -CN,
- 11) -NO2,
- 12) -NH2,
- 13) -NHR<1>,
- 14) -NR<1>R<1>,
- 15) -L-NH2,
- 16) -L-NHR<1>,
- 17) -L-NR<4>R<1>,
- 18) -L-SR<1>,
- 19) -L-S(O)R<1>,
- 20) -L-S(O)2R<1>,
- 21) -C(O)OH,
- 22) -C(O)OR<1>,
- 23) -C(O)NH2,
- 24) -C(O)NHR<1>,
- 25) -C(O)N(R<1>)R<1>,
- 26) -NHC(O)R<1>,
- 27) -NR1C(O)R<1>,
- 28) -NHC(O)OR<1>,
- 29) -NR1C(O)OR<1>,
- 30) -OC(O)NH2,
- 31) -OC(O)NHR<1>,
- 32) -OC(O)N(R)R<1>,
- 33) -OC(O)R<1>,

- 34) $-C(O)R_1$,
- 35) $-NHC(O)NH_2$,
- 36) $-NHC(O)NHR_1$,
- 37) $-NHC(O)N(R)R_{<1>}$,
- 38) $-NR C(O)NH_2$,
- 39) $-NR C(O)NHR_{<1>}$,
- 40) $-NR_1C(O)N(R_1)R_1$,
- 41) $-NHS(O)_2R_{<1>}$,
- 42) $-NR S(O)_2R_{<1>}$,
- 43) $-S(O)_2NH_2$,
- 44) $-S(O)_2NHR_{<1>}$,
- 45) $-S(O)_2N(R)R_{<1>}$,
- 46) $-S(O)R_{<1>}$,
- 47) $-S(O)_2R_{<1>}$,
- 48) $-OS(O)_2R_{<1>}$,
- 49) $-S(O)_2OR_{<1>}$,
- 50) -벤질,
- 51) $-N_3$, 또는
- 52) $-C(-N=N-)(CF_3)_2$ 이고,

상기 벤질 그룹은 1, 2 또는 3개의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된다.

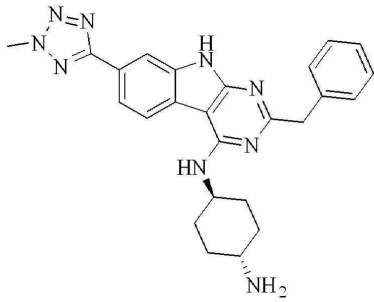
청구항 52

제50항에 있어서, 상기 피리미도(4,5-b)인돌 유도체가 다음 화학식을 갖는 방법:



청구항 53

제50항에 있어서, 상기 피리미도(4,5-b)인돌 유도체가 다음 화학식을 갖는 방법:



(UM171).

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지가 LMWH, Flt-3 리간드(Flt-3L), 줄기 세포 인자(SCF), IL-6, IL-7, 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 또는 과립구-대식세포-자극 인자(GM-CSF) 중 하나 이상을 추가로 포함하는 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지가 LMWH를 포함하지 않는 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 제1 배지가 테설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 상기 제1 배지가 각각의 LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함하는 방법.

청구항 58

제55항 또는 제56항에 있어서, 상기 제1 배지가 각각의 Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함하는 방법.

청구항 59

제54항 또는 제57항에 있어서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 LMWH가 1 U/mL 내지 10 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L가 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6는 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 60

제54항 또는 제57항에 있어서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 LMWH가 4 U/mL 내지 5 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L이 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 61

제54항 또는 제57항에 있어서, 상기 제1 배지 속에서, LMWH가 약 4.5 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L이 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 62

제55항 또는 제58항에 있어서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L이 1 ng/mL 내지 약 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF가 1 ng/mL 내지 50ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6이 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7이 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF가 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하는 배지.

청구항 63

제55항 또는 제58항에 있어서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L이 20ng/mL 내지 약 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF가 20 ng/mL 내지 30ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6이 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7이 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF가 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재하는 배지.

청구항 64

제55항 또는 제58항에 있어서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L이 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF가 약 27ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6이 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7이 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF가 약 .25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF가 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재하는 배지.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 배지가 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 추가로 포함하는 배지.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 배지가 LMWH를 포함하지 않는 배지.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 제2 배지가 테셀레이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는 방법.

청구항 68

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 배지가 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 각각을 추가로 포함하는 방법.

청구항 69

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 배지가 Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 각각을 추가로 포함하는 방법.

청구항 70

제65항 또는 제68항에 있어서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 LMWH가 1 U/mL 내지 10 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L이 1ng/mL 내지 약 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 1 ng/mL 내지 50ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 1 ng/mL 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 71

제65항 또는 제68항에 있어서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 LMWH가 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L이 20ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 20 ng/mL 내지 30ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 72

제65항 또는 제68항에 있어서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 LMWH가 약 4.5 U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L이 약 251ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 73

제66항 또는 제69항에 있어서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 Flt-3L이 1ng/mL 내지 약 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 1 ng/mL 내지 50ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 1 ng/mL 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 74

제66항 또는 제69항에 있어서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 Flt-3L이 약 20ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF가 20 ng/mL 내지 30ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6이 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 75

제66항 또는 제69항에 있어서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 Flt-3L이 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 IL-6, IL-7, G-CSF, 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 제3 배지가 각각의 IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함하는 방법.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 IL-6이 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 79

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 IL-6이 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 80

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 IL-6이 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7이 약 20 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF가 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF가 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재하는 방법.

청구항 81

제6항 내지 제11항 및 제19항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 100 ng/mL의 IL-7, 1000 ng/mL의 IL-2, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여하는 방법.

청구항 82

제6항 내지 제11항 및 제19항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 20 ng/mL의 IL-7, 1000 ng/mL의 IL-2, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여하는 방법.

청구항 83

제6항 내지 제11항 및 제19항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 20 ng/mL의 IL-7, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여하는 방법.

청구항 84

제12항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 100 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한 방법.

청구항 85

제12항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한 방법.

청구항 86

제12항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 20 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한 방법.

청구항 87

제12항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 20 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 및 1000 ng/mL의 IL-2를 포함하고 SR1을 결여하는 방법.

청구항 88

제54항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF가 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 규정되지 않은 성분 내에 포함되지 않는 방법.

청구항 89

제54항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF가 상기 혈청 내에 포함되지 않는 방법.

청구항 90

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지가 사람 혈청-AB를 포함하는 방법.

청구항 91

제90항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것이 1% 내지 20%의 사람 혈청-AB를 포함하는 방법.

청구항 92

제90항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것이 5% 내지 15%의 사람 혈청-AB를 포함하는 방법.

청구항 93

제90항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것이 약 10%의 사람 혈청-AB를 포함하는 방법.

청구항 94

제1항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것이 2-머캅토에

탄올을 포함하는 방법.

청구항 95

제1항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것이 겐타마이신을 포함하는 방법.

청구항 96

제1항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포를 상기 제1 배지 속에서 7 내지 13일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포를 상기 제1 배지 속에서 8 내지 12일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 98

제96항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포를 상기 제1 배지 속에서 약 10일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 99

제1항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제1 집단을 상기 제2 배지 속에서 2 내지 6일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 100

제1항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제1 집단을 상기 제2 배지 속에서 3 내지 5일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 101

제1항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제1 집단을 상기 제2 배지 속에서 약 4일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단을 상기 제3 배지 속에서 10 내지 30일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 103

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단을 상기 제3 배지 속에서 15 내지 25일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 104

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단을 상기 제3 배지 속에서 약 21일 동안 배양함을 포함하는 방법.

청구항 105

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 및 제3 배지 속에서의 상기 배양이 정적 배양 조건 하에서 모두 수행되는 방법.

청구항 106

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 속에서의 상기 배양이 스핀너 플라스크(spinner flask) 속에서 수행되는 방법.

청구항 107

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지 속에서의 상기 배양이 정적 배양 (static culture) 조건 하에서 수행되고, 상기 제3 배지 속에서의 상기 배양이 스피너 플라스크 속에서 수행되는 방법.

청구항 108

제1항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 세포가 초기에 상기 제1 배지 내에 1×10^4 내지 1×10^5 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 상기 조혈 세포가 초기에 상기 제1 배지 내에 약 3×10^4 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 110

제1항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제1 집단이 초기에 상기 제2 배지 내에 5×10^4 내지 5×10^5 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 상기 세포의 제1 집단이 초기에 상기 제2 배지 내에 약 1×10^5 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 112

제1항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단이 초기에 상기 제3 배지 내에 1×10^5 내지 5×10^6 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단이 초기에 상기 제3 배지 내로 1×10^5 내지 1×10^6 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 114

제112항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단이 초기에 상기 제3 배지 내로 약 5×10^5 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 115

제112항에 있어서, 상기 세포의 제2 집단이 초기에 상기 제3 배지 내로 약 3×10^5 개의 세포/mL로 접종되는 방법.

청구항 116

제1항 내지 제11항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 방법이 적어도 10,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 118

제116항에 있어서, 상기 방법이 적어도 50,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 119

제116항에 있어서, 상기 방법이 적어도 75,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 120

제12항 내지 제80항 및 제84항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 상기 제1 배지 내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 121

제120항에 있어서, 상기 방법이 적어도 10,000배 이상의 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 122

제120항에 있어서, 상기 방법이 적어도 50,000배 이상의 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 123

제120항에 있어서, 상기 방법이 적어도 75,000배 이상의 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 124

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 20%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 125

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 40%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 126

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 60%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 127

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 80%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 128

제1항 내지 제11항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 20%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 129

제1항 내지 제11항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 40%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 130

제1항 내지 제11항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 60%의 CD56+CD3- CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 131

제1항 내지 제11항, 제19항 내지 제83항, 및 제88항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 80%의 CD56+CD3- CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산하는 방법.

청구항 132

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 및 제120항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 20%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 133

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 및 제120항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 40%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 134

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 및 제120항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 60%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 135

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 및 제120항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 적어도 80%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산하는 방법.

청구항 136

제1항 내지 제11항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 및 제124항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 천연 킬러 세포가 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 137

제136항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 138

제136항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 139

제136항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 140

제136항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 141

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 및 제132항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 ILC3 세포가 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 142

제141항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 143

제141항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 144

제141항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 145

제141항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 방법.

청구항 146

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 및 제136항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능이 7-아미노악티노마이신 D (7AAD) 염색으로 측정되는 방법.

청구항 147

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 및 제136항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능이 안넥신-V 염색으로 측정되는 방법.

청구항 148

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 및 제136항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능이 7-AAD 염색 및 안넥신-V 염색 둘 다로 측정되는 방법.

청구항 149

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 및 제136항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능이 트립판 블루 염색으로 측정되는 방법.

청구항 150

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 또는 단계 (d) 후 상기 세포의 집단을 동결보존함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 151

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 후 상기 세포의 집단을 동결보존함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 152

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지가 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여하고 있는 방법.

청구항 153

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 배지가 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여하고 있는 방법.

청구항 154

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지가 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 있고, 상기 제3 배지가 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여하고 있는 방법.

청구항 155

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 테셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는 방법.

청구항 156

제1항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지가 헤파린을 포함하는 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, 상기 헤파린이 저 분자량 헤파린(LMWH)인 방법.

청구항 158

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 제136항 내지 제140항, 및 제146항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 또는 단계 (d) 후 상기 천연 킬러 세포를 동결보존함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 159

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 제136항 내지 제140항, 및 제146항 내지 제149항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 천연 킬러 세포의 집단.

청구항 160

제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 제136항 내지 제140항, 및 제146항 내지 제149항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된, 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단.

청구항 161

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 제132항 내지 제135항, 제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된, ILC3 세포의 집단.

청구항 162

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 제132항 내지 제135항, 제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된, ILC3 세포를 포함하는 세포의 집단.

청구항 163

제1항 내지 제8항 및 제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 세포의 제3 집단을 포함하는, 세포의 집단.

청구항 164

제9항 또는 제16항에 따른 세포의 제4 집단을 포함하는, 세포의 집단.

청구항 165

종양 세포를 제1항 내지 제5항, 제19항 내지 제83항, 제88항 내지 제119항, 제124항 내지 제131항, 제136항 내지 제140항, 및 제146항 내지 제149항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 다수의 천연 킬러 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 166

제165항에 있어서, 상기 접촉이 시험관내(*in vitro*)에서 일어나는 방법.

청구항 167

제165항에 있어서, 상기 접촉이 생체내(*in vivo*)에서 일어나는 방법.

청구항 168

제167항에 있어서, 상기 접촉이 사람 개인에서 일어나는 방법.

청구항 169

제167항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포를 상기 개인에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 170

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 다발 골수종 세포인 방법.

청구항 171

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 급성 골수성 백혈병(AML) 세포인 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 상기 개인이 재발된/난치성 AML을 갖는 방법.

청구항 173

제171항에 있어서, 상기 개인이 AML에 대해 적어도 하나의 비-선천성 림프 세포(ILC) 치료제로 실패한 AML을 갖는 방법.

청구항 174

제165항에 있어서, 상기 개인이 65세 이상이고, 첫번째 차도(first remission) 중에 있는 방법.

청구항 175

제165항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개인이 상기 천연 킬러 세포의 투여 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화된 방법.

청구항 176

제159항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 유방암 세포, 두경부암 세포, 또는 육종 세포인 방법.

청구항 177

제159항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포인 방법.

청구항 178

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 고형 종양 세포인 방법.

청구항 179

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 간 종양 세포인 방법.

청구항 180

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 폐 종양 세포인 방법.

청구항 181

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 췌장 종양 세포인 방법.

청구항 182

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 신장 종양 세포인 방법.

청구항 183

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 교모세포종 다형성 (GBM) 세포인 방법.

청구항 184

제165항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD33 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 185

제165항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD33 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 186

제165항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD20 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 187

제165항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD138 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 188

제165항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되는 방법.

청구항 189

제165항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되지 않은 방법.

청구항 190

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 제132항 내지 제135항, 및 제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 다수의 ILC3 세포와 종양 세포를 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 191

제190항에 있어서, 상기 접촉이 시험관내에서 일어나는 방법.

청구항 192

제190항에 있어서, 상기 접촉이 생체내에서 일어나는 방법.

청구항 193

제192항에 있어서, 상기 접촉이 사람 개인에서 일어나는 방법.

청구항 194

제192항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포를 상기 개인에게 투여함을 포함하는 방법.

청구항 195

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 다발 골수종 세포인 방법.

청구항 196

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 급성 골수성 백혈병(AML) 세포인 방법.

청구항 197

제196항에 있어서, 상기 개인이 재발된/난치성 AML을 갖는 방법.

청구항 198

제196항에 있어서, 상기 개인이 AML에 대해 적어도 하나의 비-선천성 림프 세포(ILC) 치료제로 실패한 AML을 갖는 방법.

청구항 199

제196항에 있어서, 상기 개인이 65세 이상이고, 첫번째 차도 중에 있는 방법.

청구항 200

제196항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개인이 상기 ILC3 세포의 투여 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화된 방법.

청구항 201

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 유방암 세포, 두경부암 세포, 또는 육종 세포인 방법.

청구항 202

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포인 방법.

청구항 203

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 고형 종양 세포인 방법.

청구항 204

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 간 종양 세포인 방법.

청구항 205

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 폐 종양 세포인 방법.

청구항 206

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 췌장 종양 세포인 방법.

청구항 207

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 신장 종양 세포인 방법.

청구항 208

제190항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양 세포가 교모세포종 다형성(GBM) 세포인 방법.

청구항 209

제190 내지 제208 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD33 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 210

제190항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD20 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 211

제190항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD138 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 212

제190항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 항-CD32 항체와 함께 투여되는 방법.

청구항 213

제190항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되는 방법.

청구항 214

제190항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되지 않는 방법, 제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 제132항 내지 제135항, 및 제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 다수의 ILC3 세포를 개인에게 투여함을 포함하는, 화학치료요법 후 위장관을 보수하는 방법.

청구항 215

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 제132항 내지 제135항, 및 제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 다수의 ILC3 세포를 개인에게 투여함을 포함하여, 방사선에 대해 개인을 보호하는 방법.

청구항 216

제210항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 골수 이식에 대한 보조제로서 사용되는 방법.

청구항 217

제12항 내지 제80항, 제84항 내지 제115항, 제120항 내지 제123항, 제132항 내지 제135항, 및 제141항 내지 제145항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 다수의 ILC3 세포를 개인에게 투여함을 포함하여, 개인의 가슴샘(thymus)을 재구성하는 방법.

청구항 218

퍼포린 및/또는 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하지 않는, CD56+CD3- CD117+CD11a+인 천연 킬러 세포의 집단.

청구항 219

제219항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 퍼포린 및 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 또는 IL1R1 중 어느 것도 발현하지 않는 집단.

청구항 220

제219항 또는 제220항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 T-bet, GZMB, Nkp46, Nkp30, 및 NKG2D를 추가로 발현하는 집단.

청구항 221

제219항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 CD94를 발현하는 집단.

청구항 222

제219항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 천연 킬러 세포가 CD94를 발현하지 않는 집단.

청구항 223

CD56+CD3- CD117+CD11a-인 ILC3 세포의 집단으로서, 상기 ILC3 세포가 ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하고, CD94, 퍼포린, 및 EOMES 중 하나 이상을 발현하지 않는, 세포의 집단.

청구항 224

제224항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 및 IL1R1을 발현하고, CD94, 퍼포린, 또는 EOMES 중 어느 것도 발현하지 않는 집단.

청구항 225

제224항 또는 제225항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 CD226 및/또는 2B4를 추가로 발현하는 집단.

청구항 226

제224항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 IL-22, TNF α , 및 DNAM-1 중 하나 이상을 추

가로 발현하는 집단.

청구항 227

제224항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ILC3 세포가 CD226, 2B4, IL-22, TNF α , 및 DNAM-1을 발현하는 집단.

청구항 228

- (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계;
- (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계;
- (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계;
- (d) CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 상기 세포의 제3 집단으로부터 분리하는 단계; 및
- (e) 상기 CD11a⁺ 세포를 상기 CD11a⁻ 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 혼합하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하여, 천연 킬러 세포 및 ILC3 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 방법.

청구항 229

제229항에 있어서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지가 LIF 및/또는 MIP-1 α 를 결여한 방법.

청구항 230

제229항에 있어서, 상기 제3 배지가 LIF, MIP-1 α , 및 Flt-3L을 결여한 방법.

청구항 231

제229항에 있어서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지가 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지가 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여하는 방법.

청구항 232

제229항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하는 방법.

청구항 233

제229항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지가 헤파린을 포함하는 방법.

청구항 234

제234항에 있어서, 상기 헤파린이 저 분자량 헤파린(LMWH)인 방법.

청구항 235

제229항에 있어서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포가 50:1의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 236

제229항에 있어서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포가 20:1의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 237

제229항에 있어서, 상기 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포가 10:1의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 238

제229항에 있어서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포가 5:1의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 239

제229항에 있어서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포가 1:1의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 240

제229항에 있어서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포가 1:5의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 241

제229항에 있어서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포가 1:10의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 242

제229항에 있어서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포가 1:20의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

청구항 243

제229항에 있어서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포가 1:50의 비로 조합되는 세포의 제4 집단.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2015년 10월 15일자로 출원된, 미국 가특허원 제62/242,246호, 2015년 12월 30일자로 출원된 미국 가특허원 제62/272,984호, 및 2016년 10월 3일자로 출원된 미국 가특허원 제62/403,571호의 이익을 청구하며, 이들 각각의 개시내용은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0002] 1. 분야

[0003] 줄기 세포 동원 인자(stem cell mobilizing factor)를 포함하는 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포의 집단으로부터 천연 킬러(NK) 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단을 생산하는 방법, 예컨대, 태반, 예를 들면, 태반 관류액(예컨대, 사람 태반 관류액) 또는 다른 조직, 예를 들면, 제대혈 또는 말초 혈액의 세포로부터의 조혈 줄기 또는 선조 세포로 출발하여 줄기 세포 동원 인자를 포함하는 배지 속에서 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하는 3 단계 방법이 본원에 제공된다. 예컨대, 종양 세포의 증식을 억제하거나, 병원체 감염, 예컨대 바이러스 감염을 억제하기 위해, 태반 관류액, 본원에 기술된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및/또는 NK 선조 세포를 사용하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및/또는 NK 선조 세포는 하나 이상의 면역조절 화합물과 함께 사용되고/되거나 치료된다.

배경 기술

[0004] 2. 배경

[0005] 천연 킬러(NK) 세포는 선천적인 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구(lymphocyte)이다.

[0006] NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유도된 사이토킨에 대한 반응시 활성화된다. NK 세포의 세포독성 활성화는 2가지 유형의 표면 수용체에 의해 주로 조절되며, 일부 수용체, 예컨대, CD94 및 2B4(CD244)가 리간드 상호작용에 의존하는 방식으로 작용할 수 있지만, 상기 표면 수용체는 "활성화 수용체" 또는 "억제성 수용체"로 고려될 수 있다.

[0007] 다른 활성화 중에서, NK 세포는 종양의 숙주 거부에 역할을 담당하며 바이러스-감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 천연 킬러 세포는 주요 조직접합성 복합체(MHC) 단백질을 결여하거나, 감소된 수준을 나타내는 세포에 의해 활성화될 수 있다. 변경된 또는 감소된 수준의 자가-제I 부류 MHC 발현되는 암 세포는 NK 세포 민감성의 유도를 초래한다. 활성화되고 확장된 NK 세포, 및 일부 경우에, 말초 혈액으로부터의 LAK 세포는 진전된 암을 지닌 환자의 생체외(ex vivo) 치료요법 및 생체내(In vivo) 치료 둘 다에서 사용되어 왔으며, 백혈병; 유방암; 및 특정 유형의 림프종과 같은 골수 관련 질환에 대해 일부 성공하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포를 사멸시키는데 있어서 NK 세포의 유리한 특성에도 불구하고, 살종양 기능을 보유한 천연 킬러 세포를 생산하여 확장시키는 효율적인 방법을 개발하는 것이 당해 분야에서 요구되고 있다.

[0009] NK 세포는 선천성 림프계 세포(ILC)이다. 선천성 림프계 세포는 발달을 위해 전사 인자 ID2에 있어 이들의 의존성을 통해 관련되어 있다. ILC3 세포로 공지된, ILC의 하나의 유형은 문헌에 ROR γ t를 발현하고 IL-22를 생산하는 것으로, 및 퍼포린, 그란자임, 및 사멸 수용체와 같은 명백한 세포독성 효과 없이, 성체의 면역 반응에 있어 역할을 담당하는 것으로 기술되어 있다(Montaldo *et al.*, 2014, *Immunity* 41:988-1000; Killig *et al.*, 2014, *Front. Immunol.* 5:142; Withers *et al.*, 2012, *J. Immunol.* 189 (5):2094-2098).

과제의 해결 수단

[0010] 3. 요약

[0011] 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포와 같은 조혈 세포, 예컨대, CD34⁺ 조혈 줄기 세포를 확장하고 분화시켜, 천연 킬러(NK) 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공된다.

[0012] 일 국면에서, 본원에 기술된 3개의 단계(및 본원에서 "3 단계 방법"으로 언급됨)를 포함하는 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 본원에 제공된 3 단계 방법에 의해 생산된 천연 킬러 세포 및/또는 ILC3 세포가 본원에 제공되며 본원에서 "3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포", "3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포", 또는 "3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포"로 언급된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 추가의 또는 중간 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 세포가 접촉(또는 배양)되는 어떠한 제4 또는 중간 단계도 포함하지 않는다.

[0013] 일 국면에서, 줄기 세포 동원 작용제(stem cell mobilizing agent) 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서, 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 저 분자량 헤파린(LMWH)을 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 NK 세포의 생산 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56⁺, CD3-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 여기서 당해 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 예를 들면 80%는 살아있다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여하고 있다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여하고 있다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 있고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여하고 있다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 CD16-인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 CD94+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 CD94- 또는 CD16-인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 CD94+ 및 CD16+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 CD94- 및 CD16-인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지, 및 제3 배지 중 적어도 1개, 2개, 또는 3개 모두는 배지 GBGM®가 아니다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 첨가된 데설페이트화된(desulphated) 글리코사미노글리칸을 결여하고 있다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여하고 있다.

[0014] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH는 결여하는 제3 배지 속에서 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 NK 세포의 생산 방법이 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56⁺,

CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0015] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 인자(SCF) 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 NK 세포의 생산 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0016] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 SCF, 줄기 세포 동원 작용제, 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 NK 세포의 생산 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0017] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) 상기 세포의 제3 집단으로부터 CD11a+ 세포를 분리하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하는 NK 세포의 생산 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0018] 특정 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 퍼포린 및 에오메소터민(Eomes)을 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 RAR-관련된 오르판 수용체 감마(ROR γ t) 또는 인터루킨-1 수용체 1(IL1R1)을 발현하지 않는다.

[0019] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 ILC3 세포의 생산 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제

2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0020] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기 세포 동원 작용제, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 ILC3 세포를 생산하는 방법이 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0021] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고 Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 ILC3 세포의 생산 방법이 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0022] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 줄기 세포 동원 작용제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는 ILC3 세포의 생산 방법이 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0023] 일 국면에서, (a) 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 조혈 줄기 또는 선조 세포를 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 상기 세포의 제1 집단을 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 상기 세포의 제2 집단을 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) 상기 세포의 제3 집단으로부터 CD11a-세포를 분리하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하는 ILC3 세포의 생산 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도

해파린, 예컨대, 저 분자량 해파린을 포함하지 않는다.

[0024] 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t 및 IL1R1을 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 퍼포린 또는 EOMES를 발현하지 않는다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 첨가된 테셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 테셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다.

[0025] 특정 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 포유동물 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 사람 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 영장류 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 개과 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 설치류 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 사람, 영장류, 개과 또는 설치류 이외의 포유동물로부터의 세포이다.

[0026] 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서 배양된 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포이다. 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 태반 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포이다. 특정 국면에서, 상기 태반 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 태반 관류액으로부터 획득되거나, 획득가능하다(예컨대, 태반 관류액으로부터 분리되어 핵화된 세포로부터 획득되거나, 획득가능하다). 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포로부터 획득되거나, 획득가능하다. 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 태아 간 세포이다. 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 동원된 말초 혈액 세포이다. 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 골수 세포이다.

[0027] 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제3 단계에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 이외에, 저 분자량 해파린(LMWH), Flt-3 리간드(Flt-3L), 줄기 세포 인자(SCF), IL-6, IL-7, 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 또는 과립구-대식세포-자극 인자(GM-CSF) 중 하나 이상을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지는 첨가된 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지는 첨가된 테셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지는 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지는 테셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제3 단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 각각의 LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제3 단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 각각의 Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 Tpo는 상기 제1 배지 속에 1 ng/mL 내지 100 ng/mL, 1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 20 ng/mL 내지 30 ng/mL, 또는 약 25 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에, 상기 LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6는 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6는 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, LMWH는 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6는 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6는 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 LMWH는 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L는 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6는 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 .25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L는 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6는 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 약 .25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농

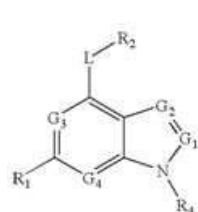
도로 존재한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지는 GBGM®가 아니다.

[0028]

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)을 포함하고, Tpo를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는, 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지는 첨가된 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지는 첨가된 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지는 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에서 사용된 제2 배지는, 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, 각각의 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에서 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, 각각의 Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 10 ng/mL 내지 30 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 LMWH는 상기 제2 배지 속에 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 Flt-3는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 LMWH는 상기 제2 배지 속에서 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3는 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 Flt-3는 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지는 GBGM®이 아니다.

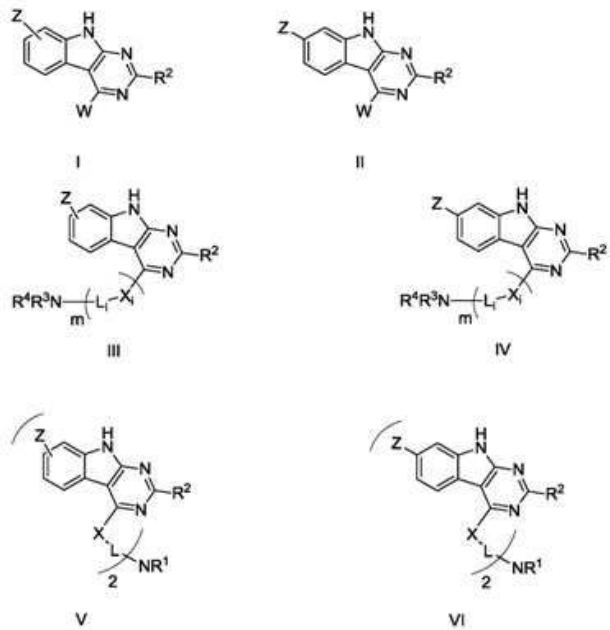
[0029]

특정 국면에서, 상기 제1 배지, 상기 제2 배지, 또는 상기 제1 및 제2 배지 속에 존재하는 상기 줄기 세포 동원 인자는 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 예컨대, 아릴 탄화수소 수용체 길항제이다. 특정 국면에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 레스베라트롤이다. 특정 구현예에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 하기 화학식의 화합물 또는 이의 염이다:



[0030]

- [0031] 상기 화학식에서:
- [0032] G_1 은 N 및 CR_3 로부터 선택되고;
- [0033] G_2 , G_3 및 G_4 는 CH 및 N으로부터 독립적으로 선택되며; 단 G_3 및 G_4 중 적어도 하나는 N이고; 단, G_1 및 G_2 는 둘 다 N이 아니며;
- [0034] L은 $--NR_{5a}(CH_2)_{0-3}--$, $--NR_{5a}CH(C(O)OCH_3)CH_2--$, $--NR_{5a}(CH_2)_2NR_{5b}--$, $--NR_{5a}(CH_2)_2S--$, $--NR_{5a}CH_2CH(CH_3)CH_2--$, $--NR_{5a}CH_2CH(OH)--$ 및 $--NR_{5a}CH(CH_3)CH_2--$ 로부터 선택되고; 여기서 R_{5a} 및 R_{5b} 는 수소 및 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되며;
- [0035] R_1 은 수소, 페닐, 티오펜, 푸라닐, 1H-벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 1H-이미다조피리디닐, 벤조티오펜, 피리미디닐, 1H-피라졸릴, 피리디닐, 1H-이미다졸릴, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 1H-피롤릴 및 티아졸릴로부터 선택되고; 여기서 R_1 중 상기 페닐, 티오펜, 푸라닐, 1H-벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 1H-이미다조피리디닐, 벤조티오펜, 피리미디닐, 1H-피라졸릴, 피리디닐, 1H-이미다졸릴, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 1H-피롤릴 또는 티아졸릴은 시아노, 하이드록시, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 할로-치환된- C_{1-4} 알킬, 할로-치환된- C_{1-4} 알콕시, 하이드록시, 아미노, $--C(O)R_{8a}$, $--S(O)_{0-2}R_{8a}$, $--C(O)OR_{8a}$ 및 $--C(O)NR_{8a}R_{8b}$ 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 임의 치환될 수 있으며, 여기서 R_{8a} 및 R_{8b} 는 수소 및 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되고; 단, R_1 및 R_3 는 둘 다 수소가 아니고;
- [0036] R_2 는 $--S(O)_2NR_{6a}R_{6b}$, $--NR_{9a}C(O)R_{9b}$, $--NR_{6a}C(O)NR_{6b}R_{6c}$, 페닐, 1H-피롤로피리딘-3-일, 1H-인돌릴, 티오펜, 피리디닐, 1H-1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 1H-피라졸릴, 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조이미다졸릴 및 1H-인다졸릴로부터 선택되고; 여기서 R_{6a} , R_{6b} 및 R_{6c} 는 수소 및 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되며; 여기서 R_2 중 상기 페닐, 1H-피롤로피리딘-3-일, 1H-인돌릴, 티오펜, 피리디닐, 1H-1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 1H-피라졸릴, 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조이미다졸릴 또는 1H-인다졸릴은 하이드록시, 할로, 메틸, 메톡시, 아미노, $--O(CH_2)_nNR_{7a}R_{7b}$, $--S(O)_2NR_{7a}R_{7b}$, $--OS(O)_2NR_{7a}R_{7b}$ 및 $--NR_{7a}S(O)_2R_{7b}$ 로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 임의 치환되고; 여기서 R_{7a} 및 R_{7b} 는 수소 및 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되며;
- [0037] R_3 은 수소, C_{1-4} 알킬 및 비페닐로부터 선택되고;
- [0038] R_4 는 C_{1-10} 알킬, 프로프-1-엔-2-일, 사이클로헥실, 사이클로프로필, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 벤즈하이드릴, 테트라하이드로-2H-피란-3-일, 테트라하이드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라하이드로푸란-3-일, 벤질, (4-펜틸페닐)(페닐)메틸 및 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸로부터 선택되고; 여기서 상기 알킬, 사이클로프로필, 사이클로헥실, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 옥세탄-2-일, 벤즈하이드릴, 테트라하이드로-2H-피란-2-일, 테트라하이드로-2H-피란-3-일, 테트라하이드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라하이드로푸란-3-일, 테트라하이드로푸란-2-일, 벤질, (4-펜틸페닐)(페닐)메틸 또는 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸은 하이드록시, C_{1-4} 알킬 및 할로-치환된- C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 임의 치환된다.
- [0039] 특정 국면에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 스템레게닌(StemRegenin)-1(SR-1)(4-(2-(2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-이소프로필-9H-푸린-6-일아미노)에틸)페놀)이다. 특정 국면에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 화합물 CH223191(1-메틸-N-[2-메틸-4-[2-(2-메틸페닐)디아제닐]페닐-1H-피라졸-5-카복사미드]이다.
- [0040] 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 상기 제2 배지, 또는 상기 제1 및 제2 배지 속에 존재하는 줄기 세포 동원 인자는 피리도(4,5-b)인돌 유도체이다. 특정 국면에서, 상기 피리도(4,5-b)인돌 유도체는 다음 중 하나 이상 또는 이의 염 또는 프로드럭(prodrug)이다:



[0041]

[0042] 여기서:

[0043] Z는

[0044] 1) $-P(O)(OR_{<1>})(OR_{<1>})$,

[0045] 2) $-C(O)OR_{<1>}$,

[0046] 3) $-C(O)NHR_{<1>}$,

[0047] 4) $-C(O)N(R)R_{<1>}$,

[0048] 5) $-C(O)R_{<1>}$,

[0049] 6) $-CN$,

[0050] 7) $-SR$,

[0051] 8) $-S(O)_2NH_2$,

[0052] 9) $-S(O)_2NHR_{<1>}$,

[0053] 10) $-S(O)_2N(R)R_{<1>}$,

[0054] 11) $-S(O)R_{<1>}$,

[0055] 12) $-S(O)_2R_{<1>}$,

[0056] 13) $-L$,

[0057] 14) 1, 2 또는 3개의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된 -벤질,

[0058] 15) L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로아릴,

[0059] 16) L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴,

[0060] 17) L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된 -L-아릴,

[0061] 18) 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된 -헤테로아릴, 또는

[0062] 19) 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 임의 치환된 -아릴이고,

- [0063] 여기서 각각의 치환체는 이미 존재하지 않는 경우 L 그룹에 임의 부착되고, 여기서 ($R<1>$) 및 $R<1>$ 이 질소 원자에 부착된 경우, 임의로 이들은 질소 원자와 함께 결합하여 N, O 및 S로부터 선택되고, 하나 이상의 $R<1>$ 또는 $R<A>$ 로 임의 치환된 하나 이상의 다른 헤테로원자를 임의로 포함하는 3-원 내지 7-원 환을 형성하며;
- [0064] W는
- [0065] 1) -H,
- [0066] 2) -할로젠,
- [0067] 3) -OR<1>,
- [0068] 4) -L-OH,
- [0069] 5) -L-OR<1>,
- [0070] 6) -SR<1>,
- [0071] 7) -CN,
- [0072] 8) -P(O)(OR<1>)(OR<1>),
- [0073] 9) -NHR<1>,
- [0074] 10) -N(R<1>)R<1>,
- [0075] 11) -L-NH₂,
- [0076] 12) -L-NHR<1>,
- [0077] 13) -L-N(R<1>)R<1>,
- [0078] 14) -L-SR<1>,
- [0079] 15) -L-S(O)R<1>,
- [0080] 16) -L-S(O)₂R<1>,
- [0081] 17) -L-P(O)(OR<1>)(OR<1>)
- [0082] 18) -C(O)OR<1>,
- [0083] 19) -C(O)NH₂,
- [0084] 20) -C(O)NHR<1>,
- [0085] 21) -C(O)N(R<1>)R<1>,
- [0086] 22) -NHC(O)R<1>,
- [0087] 23) -NR₁C(O)R<1>, -NHC(O)OR<1>,
- [0088] -NR₁C(O)OR<1>,
- [0089] -OC(O)NH₂,
- [0090] -OC(O)NHR<1>,
- [0091] -OC(O)N(R)R<1>,
- [0092] -OC(O)R<1>,
- [0093] -C(O)R<1>,
- [0094] -NHC(O)NH₂,
- [0095] -NHC(O)NHR<1>,
- [0096] -NHC(O)N(R)R<1>,

- [0097] $-NRC(0)NH_2$,
- [0098] $-NRC(0)NHR<1>$,
- [0099] $-NRC(0)N(R)R<1>$,
- [0100] $-NHS(0)2R<1>$,
- [0101] $-NRS(0)2R<1>$,
- [0102] $-S(0)2NH_2$,
- [0103] $-S(0)2NHR<1>$,
- [0104] $-S(0)2N(R)R<1>$,
- [0105] $-S(0)R<1>$,
- [0106] $-S(0)2R<1>$,
- [0107] $-OS(0)2R_1$,
- [0108] $-S(0)2OR<1>$,
- [0109] 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -벤질,
- [0110] L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로아릴,
- [0111] L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴,
- [0112] L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-아릴,
- [0113] $-L-NR<1>(R<1>)$,
- [0114] $-L-)2 NR<1>$,
- [0115] L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁, -L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,
- [0116] L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴,
- [0117] L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0118] $-O-L-N(R)R<1>$,
- [0119] L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-헤테로아릴,
- [0120] L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-헤테로사이클릴,
- [0121] L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-아릴,
- [0122] $-O-L)2-NR<1>$,
- [0123] $-O-L-(N(R)-L)_n-N(R)R<1>$,
- [0124] L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,
- [0125] L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴,

- [0126] 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0127] 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -S-L-헤테로아릴,
- [0128] 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -S-L-헤테로사이클릴,
- [0129] L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -S-L-아릴,
- [0130] -S-L)₂NR₁,
- [0131] -S-L-(N(R₁)-L)"-N(R₁)R₁,
- [0132] 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴, 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴, 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0133] -NR<1>(R<1>),
- [0134] -(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁,
- [0135] -N(R₁)L)₂-NR₁,
- [0136] 76) -(N(R₁)-L)"-N(R₁)RA,
- [0137] 77) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,
- [0138] 78) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-헤테로사이클릴,
- [0139] 79) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0140] 80) 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -헤테로아릴, 또는
- [0141] 81) 하나 이상의 R<A> 치환체로 임의 치환된 -아릴이고,
- [0142] 여기서 각각의 치환체는 이미 존재하지 않는 경우 L 그룹에 임의 부착되고, 여기서 2개의 R<1> 치환체가 동일한 질소 원자에 존재하는 경우, 각각의 R<1> 치환체는 이후 기술된 R<1> 값의 목록으로부터 독립적으로 선택되고,
- [0143] 여기서 n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5와 같은 정수이며,
- [0144] 여기서, (R<1>) 및 R<1>가 질소 원자에 부착된 경우, 임의로 이들은 질소 원자와 함께 결합하여 N, 0 및 S로부터 선택된 하나 이상의 다른 헤테로원자를 임의로 포함하는 3 내지 7-원 환을 형성하고, 임의로 당해 환은 하나 이상의 R<1> 또는 R<A>로 치환되며;
- [0145] L은
- [0146] 1) -C1-6 알킬,
- [0147] 2) -C2-6 알케닐,
- [0148] 3) -C2-6 알키닐,
- [0149] 4) -C3-7 사이클로알킬,
- [0150] 5) -C3-7 사이클로알케닐,
- [0151] 6) 헤테로사이클릴,
- [0152] 7) -C1-6 알킬-C3-7 사이클로알킬,
- [0153] 8) -C1-6 알킬-헤테로사이클릴,
- [0154] 9) 아릴, 또는
- [0155] 10) 헤테로아릴이고,
- [0156] 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 헤테로사이클릴, 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 각각 독립적으로 1개 또는 2개의 R<A> 치환체로 임의 치환되며;
- [0157] R₁은

- [0158] 1) -H,
- [0159] 2) -C1-6 알킬,
- [0160] 3) -C2-6 알케닐,
- [0161] 4) -C2-6 알키닐,
- [0162] 5) -C3-7 사이클로알킬,
- [0163] 6) -C3-7 사이클로알케닐,
- [0164] 7) 퍼플루오르화된 -C1-5,
- [0165] 8) -헤테로사이클릴,
- [0166] 9) -아릴,
- [0167] 10) -헤테로아릴,
- [0168] 11) -벤질, 또는
- [0169] 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일]펜타노일이고,
- [0170] 여기서 상기 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알케닐, 퍼플루오르화된 알킬, 헤테로사이클릴, 아릴, 헤테로아릴 및 벤질 그룹은 각각 독립적으로 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환되며;
- [0171] R2는
- [0172] 1) -H,
- [0173] 2) -C1-6 알킬,
- [0174] 3) -SR,
- [0175] 4) -C(0)R1,
- [0176] 5) -S(0)R1,
- [0177] 6) -S(0)2R<1>,
- [0178] 7) 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -벤질,
- [0179] 8) L 및 헤테로아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로아릴,
- [0180] 9) L 및 헤테로사이클릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴,
- [0181] 10) L 및 아릴 그룹 중 하나 또는 둘 다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -L-아릴,
- [0182] 11) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -헤테로아릴, 또는
- [0183] 12) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된 -아릴이고,
- [0184] 여기서 각각의 치환체는 이미 존재하지 않는 경우 L 그룹에 임의 부착되고;
- [0185] R<A>는
- [0186] 1) -할로젠,
- [0187] 2) -CF,
- [0188] 3) -OH,
- [0189] 4) -OR<1>,
- [0190] 5) -L-OH,

- [0191] 6) -L-OR<1> ,
- [0192] 7) -OCF ,
- [0193] 8) -SH ,
- [0194] 9) -SR1 ,
- [0195] 10) -CN ,
- [0196] 11) -NO2 ,
- [0197] 12) -NH2 ,
- [0198] 13) -NHR<1> ,
- [0199] 14) -NR<1>R<1> ,
- [0200] 15) -L-NH2 ,
- [0201] 16) -L-NHR<1> ,
- [0202] 17) -L-NR<4>R<1> ,
- [0203] 18) -L-SR<1> ,
- [0204] 19) -L-S(0)R<1> ,
- [0205] 20) -L-S(0)2R<1> ,
- [0206] 21) -C(0)OH ,
- [0207] 22) -C(0)OR<1> ,
- [0208] 23) -C(0)NH2 ,
- [0209] 24) -C(0)NHR<1> ,
- [0210] 25) -C(0)N(R<1>)R<1> ,
- [0211] 26) -NHC(0)R<1> ,
- [0212] 27) -NR1C(0)R<1> ,
- [0213] 28) -NHC(0)OR<1> ,
- [0214] 29) -NR1C(0)OR<1> ,
- [0215] 30) -OC(0)NH2 ,
- [0216] 31) -OC(0)NHR<1> ,
- [0217] 32) -OC(0)N(R)R<1> ,
- [0218] 33) -OC(0)R<1> ,
- [0219] 34) -C(0)R1 ,
- [0220] 35) -NHC(0)NH2 ,
- [0221] 36) -NHC(0)NHR1 ,
- [0222] 37) -NHC(0)N(R)R<1> ,
- [0223] 38) -NRC(0)NH2 ,
- [0224] 39) -NRC(0)NHR<1> ,
- [0225] 40) -NR1C(0)N(R1)R1 ,
- [0226] 41) -NHS(0)2R<1> ,

[0227] 42) -NRS(0)2R<1>,

[0228] 43) -S(0)2NH₂,

[0229] 44) -S(0)2NHR<1>,

[0230] 45) -S(0)2N(R)R<1>,

[0231] 46) -S(0)R<1>,

[0232] 47) -S(0)2R<1>,

[0233] 48) -OS(0)2R<1>,

[0234] 49) -S(0)2OR<1>,

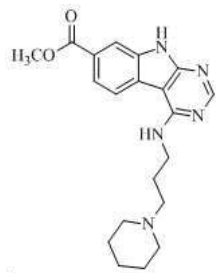
[0235] 50) -벤질,

[0236] 51) -N₃, 또는

[0237] 52) -C(-N=N-)(CF₃)이고,

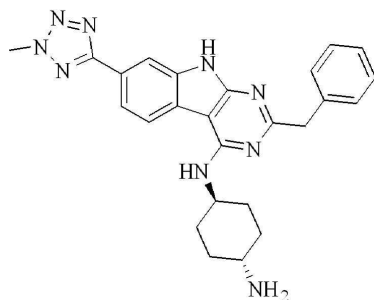
[0238] 여기서 상기 벤질 그룹은 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 임의 치환된다.

[0239] 특정 국면에서, 상기 피리미도 (4,5-b)인돌 유도체는 다음의 화학식을 갖는다:



[0240] (UM729).

[0241] 특정의 국면에서, 상기 피리미도 (4,5-b)인돌 유도체는 다음 화학 구조를 갖는다:



[0242] (UM171).

[0243] 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 이외에, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 이외에, 각각의 SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 10 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 100 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 300 U/mL 내지 3,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 10 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 약 1,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-

6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 SCF는 약 22 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 20 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 GBGM®이 아니다.

[0244] 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 100 ng/mL의 IL-7, 1000 ng/mL의 IL-2, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 1000 ng/mL의 IL-2, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 100 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 및 1000 ng/mL의 IL-2를 포함하고 SR1을 결여한다.

[0245] 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

[0246] 일반적으로, 특별하게 인용된 배지 성분은 상기 배지의 정의되지 않은 성분 속에 가능한 성분들을, 예컨대, 혈청을 언급하지 않는다. 예를 들면, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 정의되지 않은 성분 내에 포함되지 않는데, 예컨대, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 혈청 속에 포함되지 않는다. 또한, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 정의되지 않은 성분 속에 포함되지 않는데, 예컨대, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 혈청 속에 포함되지 않는다.

[0247] 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 사람 혈청-AB를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 1% 내지 20%의 사람 혈청-AB, 5% 내지 15%의 사람 혈청-AB, 또는 약 2, 5, 또는 10%의 사람 혈청-AB를 포함한다.

[0248] 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 2-머캅토에탄올을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 겐타마이신을 포함한다.

[0249] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제2 배지 속에서 상기 배양되기 전에 상기 제1 배지 속에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 구현예에서, 세포는 상기 제3 배지 속에서 상기 배양되기 전에 상기 제2 배지 속에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 구현예에서, 세포는 상기 제3 배지 속에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일 동안, 또는 30일 이상 동안 배양된다.

[0250] 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에서 7 내지 13일 동안 배양되어 세포의 제1 집단을 생산하고; 상기 세포의 제1 집단은 상기 제2 배지 속에서 2 내지 6일 동안 배양되어 세포의 제2 집단을 생산하며; 및 상기 세포의 제2 집단은 상기 제3 배지 속에서 10 내지 30일 동안 배양되는데, 즉 상기 세포는 총 19 내지 49일 동안 배양된다.

[0251] 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에서 8 내지 12일 동안 배양되어 세포의 제1 집단을 생산하고; 상기 세포의 제1 집단은 상기 제2 배지 속에서 3 내지 5일 동안 배양되어 세포의 제2 집단을 생산하고; 상기 세포의 제2 집단은 상기 제3 배지 속에서 15 내지 25일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 26 내지 42일 동안 배양된다.

[0252] 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에서 약 10일 동안 배양되어 세포의 제1 집단을 생산하고; 상기 세포의 제1 집단은 상기 제2 배지 속에서 약 4일 동

안 배양되어 세포의 제2 집단을 생산하고; 상기 세포의 제2 집단은 상기 제3 배지 속에서 약 21일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 약 35일 동안 배양된다.

- [0253] 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 및 제3 배지 속에서 상기 배양은 모두 정적 배양 조건, 예컨대, 배양 디쉬 또는 배양 플라스크 속에서 수행된다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 적어도 하나에서의 상기 배양은 스피너 플라스크(Spinner flask) 속에서 수행된다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지 속에서의 상기 배양은 정적 배양 조건 하에서 수행되고, 상기 제3 배지 속에서의 상기 배양은 스피너 플라스크 속에서 수행된다.
- [0254] 특정 국면에서, 상기 배양은 스피너 플라스크 속에서 수행된다. 다른 국면에서, 상기 배양은 G-Rex 장치 속에서 수행된다. 여전히 다른 국면에서, 상기 배양은 WAVE 생물반응기 속에서 수행된다.
- [0255] 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 초기에 상기 제1 배지 내에 1×10^4 내지 1×10^5 개의 세포/mL로 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 초기에 상기 제1 배지내에 약 3×10^4 개의 세포/mL로 접종된다.
- [0256] 특정 국면에서, 상기 세포의 제1 집단은 초기에 상기 제2 배지내에 5×10^4 내지 5×10^5 개의 세포/mL로 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제1 집단은 초기에 상기 제2 배지내에 약 1×10^5 개의 세포/mL로 접종된다.
- [0257] 특정 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지내에 1×10^5 내지 5×10^6 개의 세포/mL로 접종된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지내로 1×10^5 내지 1×10^6 개의 세포/mL로 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지내로 약 5×10^5 개의 세포/mL로 접종된다. 보다 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 스피너 플라스크 속에서 상기 제3 배지내로 약 5×10^5 개의 세포/mL로 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지내에 약 3×10^5 개의 세포/mL로 접종된다. 보다 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 정적 배양으로 상기 제3 배지내에 약 3×10^5 개의 세포/mL로 접종된다.
- [0258] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 7-아미노악티노마이신 D (7AAD) 염색(staining)으로 측정한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 안벡신-V 염색으로 측정한다. 구체적인 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 7-AAD 염색 및 안벡신-V 염색 둘 다로 측정한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 트립신 블루 염색으로 측정한다.
- [0259] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 5,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내에 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다.
- [0260] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 70%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 75%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- 천연

킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다.

- [0261] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다.
- [0262] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다.
- [0263] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내(In vitro)에서 10:1의 비로 공배양(co-culturing)하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다.
- [0264] 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 10:1의 비로 공배양하는 경우, 상기 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내에서 10:1의 비로 공배양하는 경우 상기 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다.
- [0265] 특정 국면에서, 상기 제3 배양 단계 후, 상기 세포의 제3 집단, 예컨대, 천연 킬러 세포의 상기 집단은 냉동보존된다. 특정 국면에서, 상기 제4 배양 단계 후, 상기 세포의 제4 집단, 예컨대, 천연 킬러 세포의 상기 집단은 동결건조된다.
- [0266] 특정 국면에서, 천연 킬러 세포를 포함하는 세포, 즉, 본원에 기술된 3 단계 방법으로 생산된 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단이 본원에 제공된다. 따라서, 본원에 기술된 3 단계 방법으로 생산된 분리된 천연 킬러 세포 집단이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 20%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 40%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 60%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 80%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 사람용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.
- [0267] 특정 국면에서, ILC3 세포, 즉 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, ILC3 세포를 포함하는 세포의 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 사람용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.
- [0268] 일 구현예에서, 분리된 NK 선조 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 선조 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 선조 세포 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 사람용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.

- [0269] 다른 구현예에서, 분리된 성숙한 NK 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 성숙한 NK 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 구현예에서, 상기 성숙한 NK 세포 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 사람용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.
- [0270] 다른 구현예에서, 분리된 ILC3 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 ILC3 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 사람용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.
- [0271] 다른 구현예에서, 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포 집단은 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 세포의 제3 집단이다. 다른 구현예에서, 세포 집단이 본원에 제공되고, 여기서 상기 세포 집단은 본원에 기술된 방법으로 생산된 세포의 제4 집단이다.
- [0272] 다른 구현예에서, 분리된 NK 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 활성화되고, 여기서 상기 활성화된 NK 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 집단은 생체 내에서 사용하기 적합한, 예를 들면, 생체내에서 사람 용으로 적합한 약제학적 조성물로 제형화된다.
- [0273] 따라서, 다른 국면에서, 종양 세포 증식을 억제하거나, 바이러스 감염을 치료하거나, 암, 예컨대, 혈액암 및 고형 종양을 치료하기 위한 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단의 용도가 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예컨대, 본원에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드와 접촉되거나, 이와 함께 사용된다. 특정 구현예에서, NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예컨대, 본원에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드로 치료되거나 이와 함께 사용된다.
- [0274] 구체적인 구현예에서, 상기 암은 고형 종양이다. 다른 구현예에서, 상기 암은 혈액암이다. 구체적인 구현예에서, 암은 고모세포종, 주요 도관 암종 (primary ductal carcinoma), 백혈병, 급성 T 세포 백혈병, 만성 골수성 림프종(CML), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 폐 암종, 결장 선암종, 조직구성 림프종, 결장직장 암종, 결장직장 선암종, 전립선암, 다발골수종, 또는 망막아세포종이다. 보다 구체적인 구현예에서, 암은 AML이다. 보다 구체적인 구현예에서, 암은 다발경화증이다.
- [0275] 다른 구체적인 구현예에서, 이로부터 NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 수득된다. 일 구현예에서, 이로부터 NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터 수득된다. 일 구현예에서, 이로부터 NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 제대혈로부터 수득된다. 일 구현예에서, 이로부터 NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 말초 혈액으로부터 수득된다. 다른 구체적인 구현예에서, 이로부터 NK 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는, 태반 관류액 및 제대혈, 예컨대, 관류액과 동일한 태반으로부터의 제대혈과 혼합된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 제대혈은 이로부터 상기 태반 관류액이 수득되는 태반 이외의 태반으로부터 분리된다. 특정 구현예에서, 조합된 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 혼주(pooling)시키거나 조합하여 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 조합된 세포를 수득하기 위해 용적당 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다. 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 조합된다. 다른 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다. 보다 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5 (85%:15%)의 비로 조합된다.
- [0276] 특정 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 조합된 세포를 수득하기 위해 전체 핵화된 세포(total nucleated cell: TNC) 함량에 의해 측정된 것으로서 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다. 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3로 조합된다. 다른 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1,

3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다.

[0277] 따라서, 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 분리된 NK 세포 집단으로부터의 세포 유효량을 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개인에게 투여함을 포함하여, 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 암은 고형 종양이다. 특정 구현예에서, 암은 혈액암이다. 구체적인 구현예에서, 혈액암은 백혈병이다. 다른 구체적인 구현예에서, 혈액암은 림프종이다. 다른 구체적인 구현예에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병이다. 다른 구체적인 구현예에서, 혈액암은 만성 림프구성 백혈병이다. 다른 구체적인 구현예에서, 혈액암은 만성 골수성 백혈병이다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되었다. 다른 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 동결보존되지 않았다.

[0278] 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 면역조절 화합물, 예컨대, 본원에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드로 치료되어 왔다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 치료되어 왔다. 다른 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 예비치료되어 왔다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 개인에게 (1) 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 분리된 NK 세포 집단의 유효량; 및 (2) 면역조절 화합물 또는 탈리도미드 유효량을 투여함을 포함한다. 이와 관련하여 "유효량"은 NK 세포 집단 및 임의로, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 투여되지 않은 암 또는 감염을 지닌 개인과 비교하여 상기 암 또는 상기 감염의 하나 이상의 증상에 있어서 검출가능한 개선을 야기하는, NK 세포 집단 중 세포, 및 임의로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 구체적인 구현예에서, 상기 면역조절 화합물은 레날리도미드 또는 포말리도미드이다. 다른 구현예에서, 상기 방법은 개인에게 항암제, 예컨대, 하기 기술된 항암제 중 하나 이상을 투여함을 추가로 포함한다.

[0279] 다른 구현예에서, NK 세포 집단의 치료학적 유효량을 종양 세포에 근접하도록 하는, 예컨대, 종양 세포를 NK 세포 집단 속의 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 본원에 제공된다. 이후에, 달리 나타내지 않는 한, 용어 "근접성"은 바람직한 결과를 유발하기에 충분한 근접성을 말하는데; 예컨대, 특정 구현예에서, 용어 근접성은 접촉을 말한다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 시험관내에서 일어난다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 생체외에서 일어난다. 다른 구현예에서, 상기 접촉은 생체내에서 일어난다. 다수의 NK 세포는 NK 세포 집단의 치료학적 유효량이 종양 세포와 근접하도록 함, 예컨대, 종양 세포를 NK 세포 집단 속의 세포와 접촉시킴을 포함하는 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부암, 또는 육종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포이다.

[0280] 일 구현예에서, 종양 세포를 다수의 천연 킬러 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용하기 위한 다수의 천연 킬러 세포가 본원에 제공되며, 여기서 상기 천연 킬러 세포는 본원에 기술된 방법에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 사람 개인에서 일어난다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 상기 천연 킬러 세포를 상기 개인에게 투여함을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 다발골수종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 재발된/난치성 AML을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 AML에 대해 적어도 하나의 비-선천성 림프 세포(ILC) 치료제로 실패한 AML을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 65세 이상이고 첫번째 차도 중에 있다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 상기 NK 세포의 투여 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부암 세포, 또는 육종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포, 간 종양 세포, 폐 종양 세포, 췌장 종양 세포, 신장 종양 세포 또는 교모세포종 다형성(GBM) 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 항-CD33 항체, 항-CD20 항체, 항-CD138 항체 또는 항-CD32 항체와 함께 투여된다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되지 않았다.

[0281] NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신계 또는 국소일 수 있다. 구체적인

구현예에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스, 또는 스캐폴드(Scaffold)를 사용하여 수행된다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한 투여이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터(catheter)를 통한 투여이다. 구체적인 구현예에서, NK 세포의 주사는 국소 주사이다. 보다 구체적인 구현예에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종)내로 직접 투여된다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 투여이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통해서이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 주사에 의한 투여는 복강경검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명, 또는 영상의학에 의해 보조된다.

[0282] 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 면역조절 화합물, 예컨대 본원의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드, 및/또는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 치료된다. 다른 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 치료된다. 다른 구체적인 구현예에서, 유효량의 면역조절 화합물, 예컨대, 본원의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드는 또한 종양 세포와 근접하게 되는데, 예컨대, 종양 세포는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된다. 이와 관련하여, "유효량"은 NK 세포 집단, 및 임의로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되거나 근접하게 되지 않은 종양 세포의 동일한 수와 비교하여 상기 종양 세포의 검출가능한 억제를 야기하는, NK 세포 집단 중 세포의 양, 및 임의로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 유효량의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물을 종양 세포의 근접하게, 예컨대, 상기 종양 세포를 항암 화합물과 접촉시킴을 추가로 포함한다.

[0283] 당해 방법의 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 혈액암 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 다른 구현예에서, 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포 (AML), 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 교모세포종 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막아세포종 세포, 결장직장 암종 세포, 전립샘 암 세포, 또는 결장직장 선암종 세포이다. 보다 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 AML 세포이다. 보다 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 다발 골수종 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 접촉 또는 근접하게 되는 것은 시험관내에서 일어난다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 접촉 또는 근접하게 되는 것은 생체외에서 일어난다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 접촉 또는 근접하게 되는 것은 생체내에서 일어난다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 생체내 접촉 또는 근접하게 되는 것은 사람에서 일어난다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포 간 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 폐 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 췌장 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 신장 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 교모세포종 다형성(GBM) 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 항-CD33 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 항-CD20 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 항-CD138 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 항-CD32 항체와 함께 투여된다.

[0284] 다른 국면에서, 개인에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) NK 세포를 투여함을 포함하여, 다발성 골수종을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개인에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 체대혈 NK 세포, 또는 체대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위해, 예컨대, 3 단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생산하기 위해 본원에 기술된 방법들 중 어느 것에 의해 생산되었다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 확장되었다. 다른 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 NK 세포는 서로 독립적으로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3 단계 방법으로 생산된다.

[0285] 다른 국면에서, 개인에게 NK 세포(IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18를 사용한 예비치료에 의해 임의로 활성화된)를 투여함을 포함하여, 급성 골수

성 백혈병 (AML)을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개인에서 AML을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 예비치료된다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 제대혈 NK 세포, 또는 NK 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본원에 설정된 바와 같은 3 단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생산하기 위한, 본원에 기술된 방법 중 어느 것에 의해서 생산되었다. AML을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3 단계 방법으로 생산된다. 특수한 구현예에서, 앞서의 방법으로 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아기 AML을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 AML에 대한 적어도 하나의 비-천연 킬러 또는 비-선천성 림프 세포 치료제에 실패한 AML을 갖는다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 65세 이상이고 첫번째 차도 상태에 있다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 상기 천연 킬러 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화된다. 다른 국면에서, 개인에게 치료학적 유효 투여량의 (1) 레날리도마이드; (2) 펠팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법으로 생산된 NK 세포 집단을 투여함을 포함하여, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개인에서 상기 CLL을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생산하기 위한 본원에 기술된 방법들 중 어느 것에 의해서도 생산되었다. 상기 방법들 중 어느 것의 구체적인 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 펠팔란, 플루다라빈, 및 확장된 NK 세포는 상기 개인에게 별도로 투여된다. CLL을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은, 3 단계 방법에 의해 생산된다.

[0286] 다른 구현예에서, 치료학적 유효량의 ILC3 세포 집단을 종양 세포에 근접시킴, 예컨대, 종양 세포를 ILC3 세포 집단 속의 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 본원에 제공된다. 이후에, 달리 나타내지 않는 한, 용어 "근접성"은 바람직한 결과를 유발하기에 충분한 근접성을 말하며, 예컨대, 특정 구현예에서, 용어 근접성은 접촉을 말한다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 시험관내에서 일어난다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 생체외에서 일어난다. 다른 구현예에서, 상기 접촉은 생체내에서 일어난다. 다수의 ILC 세포는 치료학적 유효량의 ILC3 세포집단이 종양 세포와 근접하도록 함, 예컨대, 종양 세포를 ILC3 세포 집단 속의 세포와 접촉시킴을 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부 암 세포, 또는 육종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막 아세포종 세포이다.

[0287] 일 구현예에서, 종양 세포를 다수의 ILC3 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 사용하기 위한 다수의 ILC3 세포가 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 방법에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 사람 개인에서 일어난다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 상기 ILC3 세포를 상기 개인에게 투여함을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 다발성 골수종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 재발된/난치성 AML을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 AML에 대해 적어도 하나의 비-선천성 림프 세포(ILC) 치료제로 실패한 AML을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 65세 이상이고 첫번째 차도 중에 있다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 상기 ILC 세포의 투여 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 유방암 세포, 두경부 암 세포, 또는 육종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 결장직장 암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 또는 망막아세포종 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포, 간 종양 세포, 폐 종양 세포, 췌장 종양 세포, 신장 종양 세포 또는 교모세포종 다형성 (GBM) 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD33 항체, 항-CD20 항체, 항-CD138 항체 또는 항-CD32 항체와 함께 투여된다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 냉동보존되지 않았다.

[0288] ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신계 또는 국소일 수 있다. 구체적인 구현예에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여이다. 구체적인 구현예에서, 대

상체에 대한 ICL3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스, 또는 스캐폴드를 사용하여 수행된다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 ICL3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한 것이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 ICL3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터를 통한 것이다. 구체적인 구현예에서, ICL3 세포의 주사는 국소 주사이다. 보다 구체적인 구현예에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종)내로 직접 투여된다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 ICL3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 투여이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 ICL3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통해서이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 ICL3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 주사에 의한 투여는 복강경 검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명, 또는 영상의학에 의해 보조된다.

[0289] 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 ILC3 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 면역조절 화합물, 예컨대 본원의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드, 및/또는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 치료된다. 다른 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 접촉 또는 근접하기 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 치료된다. 다른 구체적인 구현예에서, 유효량의 면역조절 화합물, 예컨대, 본원의 하기에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드는 또한 종양 세포와 근접하게 되는데, 예컨대, 종양 세포는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된다. 이와 관련하여, "유효량"은 ILC3 세포 집단, 및 임의로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되거나 근접하게 되지 않은 종양 세포의 동일한 수와 비교하여 상기 종양 세포의 검출가능한 억제를 야기하는, ILC3 세포 집단 중 세포의 양, 및 임의로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물을 종양 세포와 근접하게, 예컨대, 상기 종양 세포를 항암 화합물과 접촉시킴을 추가로 포함한다.

[0290] 당해 방법의 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 혈액암 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 다른 구현예에서, 종양 세포는 주요 도관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포 (AML), 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 교모세포종 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막아세포종 세포, 결장직장 암종 세포, 전립샘 암 세포, 또는 결장직장 선암종 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 접촉 또는 근접하게 되는 것은 시험관내에서 일어난다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 접촉 또는 근접하게 되는 것은 생체외에서 일어난다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 접촉 또는 근접하게 되는 것은 생체내에서 일어난다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 생체내 접촉 또는 근접하게 되는 것은 사람에게서 일어난다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 간 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 폐 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 췌장 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 신장 종양 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 종양 세포는 교모세포종 다형성 (GBM) 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD33 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD138 항체와 함께 투여된다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 항-CD32 항체와 함께 투여된다.

[0291] 개인에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 다발성 골수종을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개인에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위해, 예컨대, 3 단계 방법을 사용하여 ILC3 세포 집단을 생산하기 위해 본원에 기술된 방법들 중 어느 것에 의해 생산되었다. 다른 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 상기 투여 전에 확장되었다. 다른 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 ILC3 세포는 서로 독립적으로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3 단계 방법으로 생산된다.

[0292] 다른 국면에서, 개인에게 ILC3 세포(IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18를 사용한 예비치료에 의해 임의로 활성화된)를 투여함을 포함하여, 급성 골수성 백혈병 (AML)을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개인에서 AML을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 예비치료된다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된

ILC3 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본원에 설정된 바와 같은 3 단계 방법을 사용하여 ILC3 세포 집단을 생산하기 위한, 본원에 기술된 방법 중 어느 것에 의해서 생산되었다. AML을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3 단계 방법으로 생산된다. 특수한 구현예에서, 앞서의 방법으로 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아기 AML을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 AML에 대한 적어도 하나의 비-천연 킬러 또는 비-선천성 림프 세포 치료제에 실패한 AML을 갖는다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 65세 이상이고 첫번째 차도 상태에 있다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 상기 ILC3 세포를 투여받기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화된다. 다른 국면에서, 개인에게 치료학적 유효 투여량의 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법으로 생산된 ILC3 세포 집단을 투여함을 포함하여, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 지닌 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개인에서 상기 CLL을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 ILC3 세포 집단을 생산하기 위한 본원에 기술된 방법들 중 어느 것에 의해서도 생산되었다. 상기 방법들 중 어느 것의 구체적인 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 플루다라빈, 및 확장된 ILC3 세포는 상기 개인에게 별도로 투여된다. CLL을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은, 3 단계 방법에 의해 생산된다.

[0293] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 냉동보존되는데, 예컨대, 본원에 기술된 방법을 사용하여 냉동보존한다. 특징의 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단은 냉동보존 배지, 예컨대, 본원에 기술된 냉동보존 배지 속에서 냉동보존된다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 선조 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단을 포함하는 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 냉동보존 배지를 가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 냉동보존된 샘플을 -80°C 이하로 저장하는 단계를 포함한다.

[0294] 상기 치료 또는 종양 억제제의 방법의 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 다른 천연 킬러 세포, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 분리되거나, 상이한 방법에 의해 조혈 세포로부터 생산된 천연 킬러 세포와 조합된다. 구체적인 구현예에서, 천연 킬러 세포 집단은 다른 공급원으로부터, 또는 상이한 방법에 의해 제조된 천연 킬러 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0295] 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단은 냉동보존, 예컨대, 본원에 기술된 방법을 사용하여 냉동보존한다. 특징의 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단은 냉동보존 배지, 예컨대 본원에 기술된 냉동보존 배지 속에서 냉동보존된다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 선조 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단의 냉동보존은 (1) 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 선조 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 포함하는 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 단계 (1)로부터 세포 현탁액 용액에 냉동보존 배지를 가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 냉동보존된 샘플을 -80°C 이하로 저장하는 단계를 포함한다.

[0296] 상기 치료 또는 종양 억제제의 방법의 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 다른 ILC3 세포, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 분리되거나, 상이한 방법에 의해 조혈 세포로부터 생산된 ILC3 세포와 조합된다. 구체적인 구현예에서, ILC3 세포 집단은 다른 공급원으로부터, 또는 상이한 방법에 의해 제조된 ILC3 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

- [0297] 다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 화학치료요법 후 위장관을 보수하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 다수의 ILC3 세포는 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 화학치료요법 후 위장관을 보수하는 방법에서 사용될 수 있으며, 여기서 the ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.
- [0298] 다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 방사선에 대해 개인을 보호하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 다수의 ILC3 세포는 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 방사선에 대해 개인을 보호하는 방법에서 사용될 수 있고, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 상기 방법의 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 골수 이식에 대한 보조제(adjuvant)로서 사용될 수 있다.
- [0299] 다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 개인의 가슴샘을 재구성하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 다수의 ILC3 세포는 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 개인의 가슴샘을 재구성하는 방법에서 사용될 수 있으며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.
- [0300] 다른 국면에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 분리된 NK 세포를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 조혈 세포, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈, 및/또는 말초 혈액으로부터 분리된 조혈 줄기 또는 선조 세포로부터 생산된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 조성물 속의 세포의 적어도 70%를 구성한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 조성물 속의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 구성한다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD3⁻ 및 CD56⁺이다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포의 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD16⁺이다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%는 CD94⁺이다.
- [0301] 특정 국면에서, CD56+CD3⁻ CD117+CD11a⁺인 천연 킬러 세포의 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 천연 킬러 세포는 퍼포린 및/또는 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체, 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 퍼포린 및 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체, 또는 IL1R1 중 어느 것도 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 또한 T-bet, GZMB, NKp46, NKp30, 및 NKG2D를 발현한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 CD94를 발현한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 CD94를 발현하지 않는다.
- [0302] 특정 국면에서, CD56+CD3⁻ CD117+CD11a⁻인 ILC3 세포의 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체, 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하고, CD94, 퍼포린, 및 EOMES 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체, 및 IL1R1을 발현하고, CD94, 퍼포린, 또는 EOMES 중 어느 것도 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 또한 CD226 및/또는 2B4를 발현한다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 또한 IL-22, TNF α , 및 DNAM-1 중 하나 이상을 발현한다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 CD226, 2B4, IL-22, TNF α , 및 DNAM-1을 발현한다.
- [0303] 특정 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제 1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 상기 세포의 제3 집단으로부터 분리하는 단계; 및 (e) 상기 CD11a⁺ 세포를 상기 CD11a⁻ 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비에서 혼합하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하여, 천연 킬러 세포 및 ILC3 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 및 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 50:1의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 20:1의 비로 조합된다. 특정 국면에서,

상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 10:1의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 5:1의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:1의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:5의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:10의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:20의 비로 조합된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포는 1:50의 비로 조합된다.

[0304] 특정 국면에서, 상기 집단 중 다수의 NK 세포는 마이크로RNAs dme-miR-7, hsa-let-7a, hsa-let-7c, hsa-let-7e, hsa-let-7g, hsa-miR-103, hsa-miR-106a, hsa-miR-10b, hsa-miR-1183, hsa-miR-124, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1255A, hsa-miR-126, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-144, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-155, hsa-miR-15a, hsa-miR-16, hsa-miR-17, hsa-miR-181a, hsa-miR-182, hsa-miR-192, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-200a, hsa-miR-20a, hsa-miR-214, hsa-miR-221, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-30b, hsa-miR-30c, hsa-miR-31, hsa-miR-335, hsa-miR-374b, hsa-miR-454, hsa-miR-484, hsa-miR-513C, hsa-miR-516-3p, hsa-miR-520h, hsa-miR-548K, hsa-miR-548P, hsa-miR-600, hsa-miR-641, hsa-miR-643, hsa-miR-874, hsa-miR-875-5p, 및 hsa-miR-92a-2 중 하나 이상을 말초 혈액 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다. 특정 국면에서, 상기 집단 중 다수의 NK 세포는 마이크로RNAs miR188-5p, miR-339-5p, miR-19a, miR-34c, miR-18a, miR-500, miR-22, miR-222, miR-7a, miR-532-3p, miR-223, miR-26b, miR-26a, miR-191, miR-181d, miR-322, 및 miR342-3p를 말초 혈액 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 낮은 수준으로 발현한다. 특정 국면에서, 상기 집단 중 다수의 NK 세포는 마이크로RNAs miR-181a, miR-30b, 및 miR30c를 말초 혈액 천연 킬러 세포와 동일한 수준으로 발현한다.

[0305] 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 단일 개인으로부터 기원하는데, 즉, 조혈 줄기 및 선조 세포는 단일 개인으로부터 기원한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 적어도 2명의 상이한 개인으로부터의 천연 킬러 세포를 포함하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 선조 세포는 적어도 2명의 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 이들에 대한 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개인 이외의 상이한 개인으로부터 기원하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 선조 세포는 이들에 대한 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개인 이외의 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 당해 NK 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉하지 않거나 근접하게 되지 않은 동일한 수의 천연 킬러 세포, 즉, NK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그란자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양 및 시간으로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되거나 근접하게 된다. 다른 구체적인 구현예에서, NK 세포를 포함하는 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 포함한다. 특정 구현예에서, 면역조절 화합물은 하기 기술된 화합물, 예컨대 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다. 특정 구현예에서, 면역조절 화합물은 레날리도마이드이다. 특정 구현예에서, 면역조절 화합물은 포말리도미드이다.

[0306] 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포를 포함하는 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하나 이상의 하기 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0307] 보다 구체적인 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및 다른 공급원으로부터 기원하거나 다른 방법에 의해 제조된 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 다른 공급원은 말초 혈액이다. 보다 구체적인 구현예에서, NK 세포는 다른 공급원으로부터 기원하거나, 다른 방법에 의해 제조된 천연 킬러 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0308] 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포와 동일한 개인으로부터 기원한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 이외의 상이한 개인으로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 속의 세포 모두, 또는 실질적으로 모두(예컨대, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모계 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 중 태아 세포는 상기 관류액 속에 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만의 세포를 포함한다. 다른 구체적인

구현예에서, 상기 관류액은 태반 혈관화를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하기 위해 처리된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예컨대, 하기 기술된 면역조절 화합물, 예컨대, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0309] 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포와 동일한 개인으로부터 기원한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포와는 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 분리된 태반 관류액 및 분리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 분리된 관류액 및 상기 분리된 태반 관류액 세포는 상이한 개인으로부터 기원한다. 태반 관류액을 포함하는 상기 구현예 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2명의 개인으로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 구현예들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 태반 관류액 세포는 적어도 2명의 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물들 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0310] 다른 국면에서, 분리된 NK 세포 집단, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법 중 어느 구현예에 의해 생산된, 분리된 NK 세포 집단을 포함하는 조성물, 예컨대, 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 집단은 조혈 세포, 예컨대, 태반으로부터, 예컨대, 태반 관류액, 제대혈, 및/또는 말초 혈액으로부터 분리된 조혈 줄기 또는 선조 세포로부터 생산된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 집단은 조성물 속의 세포의 적어도 70%를 차지한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 집단은 조성물 속에 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 조성물 속에 세포의 적어도 70%를 차지한다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD3⁻ 및 CD56⁺이다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포의 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 CD16⁻이다. 특정 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포의 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%는 CD94⁺이다.

[0311] 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 속의 상기 분리된 NK 세포는 단일 개인으로부터 기원하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 선조 세포는 단일 개인으로부터 기원한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포는 적어도 2명의 상이한 개인으로부터의 NK 세포를 포함하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 선조 세포는 적어도 2명의 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 속의 상기 분리된 NK 세포는 이에 대해 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개인 이외의 상이한 개인으로부터 기원하는데, 즉, 상기 조혈 줄기 및 선조 세포는 이에 대해 NK 세포를 사용한 치료가 의도되는 개인 이외의 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 상기 NK 세포가 동일한 수의 천연 킬러 세포, 즉, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉하지 않거나 근접하지 않은 NK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 검출가능하게 발현하기에 충분한 양으로 및 시간 동안 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉하거나 근접한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 면역조절 화합물은 하기 기술된 화합물이다.

[0312] 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0313] 보다 구체적인 구현예에서, 조성물은 다른 공급원으로부터, 또는 다른 방법으로 제조된 NK 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 다른 공급원은 말초 혈액이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포 집단은 다른 공급원으로부터 기원하거나, 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0314] 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 NK 세포 집단 및 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 동일한 개인으로부터 기원한다.

다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과는 상이한 개인으로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 속의 세포의 모든, 또는 실질적으로 모든(예컨대, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)은 태아 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 태아 세포는 상기 태반 관류액 속의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 태반 혈관화를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하기 위해 처리된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예컨대, 하기 기술된 면역조절 화합물, 예컨대, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0315] 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 NK 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 동일한 개인으로부터 기원한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과는 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 분리된 태반 관류액 및 분리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 여기서 상기 분리된 관류액 및 상기 분리된 태반 관류액 세포는 상이한 개인으로부터 기원한다. 태반 관류액을 포함하는 상기 구현예들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2명의 개인으로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 구현예들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 태반 관류액 세포는 적어도 2명의 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물들 중 하나 이상을 포함한다.

[0316] 1.1. 전문 용어

[0317] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "면역조절 화합물" 및 "IMiDTM"은 탈리도미드를 포함하지 않는다.

[0318] 본원에 사용된 것으로서, "레날리도마이드"는 3-(4'아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-디온(화학 초록 서비스 명칭: Chemical Abstracts Service name) 또는 2,6-피페리딘디온, 3-(4-아미노-1,3-디하이드로-1-옥소-2H-이소인돌-2-일)-(순수 및 응용 화학의 국제 연합(IUPAC) 명칭)을 의미한다. 본원에 사용된 것으로서, "포말리도마이드"는 4-아미노-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)이소인돌-1,3-디온을 의미한다.

[0319] 본원에 사용된 것으로서, 세포를 언급하는 경우 "다능성(multipotent)"은 세포가 다른 세포형의 세포로 분화하는 능력을 가짐을 의미한다. 특정 구현예에서, "다능성 세포"는 포유동물 신체의 대략 260개 세포형의 서브세트(subset)로 성장하는 능력을 지닌 세포이다. 만능 세포(pluripotent cell)와는 달리, 다능성 세포는 세포형 모두를 형성하는 능력을 지니지 않는다.

[0320] 본원에 사용된 것으로서, "공급자 세포"는 제2 유형의 세포와 함께 공배양되어 제2 유형의 세포가 유지되고, 아마도 증식될 수 있는 환경을 제공하는 하나의 유형의 세포를 말한다. 특정 이론에 얽매지 않고, 공급자 세포는 예를 들면, 펩타이드, 폴리펩타이드, 전기 시그널, 유기 분자(예컨대, 스테로이드), 핵산 분자, 성장 인자(예컨대, bFGF), 다른 인자(예컨대, 사이토킨), 및 대사 영양인자를 표적 세포에게 제공할 수 있다. 특정 구현예에서, 공급자 세포는 단층으로 성장한다.

[0321] 본원에 사용된 것으로서, 추가의 변형없이, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 "천연 킬러 세포" 또는 "NK 세포"는 어떠한 조직 공급원으로부터의 천연 킬러 세포도 포함한다.

[0322] 본원에 사용된 것으로서, 추가의 변형없이, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 "ILC3 세포"는 어떠한 조직 공급원으로부터의 ILC3 세포도 포함한다.

[0323] 본원에 사용된 것으로서, "태반 관류액"은 태반, 예컨대, 사람 태반의 적어도 일부분을 통해, 예컨대, 태반 혈관화를 통해 통과한 관류 용액을 의미하며, 태반을 통과하는 동안 관류 용액에 의해 수집된 다수의 세포를 포함한다.

[0324] 본원에 사용된 것으로서, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 분리되거나, 분리가 가능한, 핵화된 세포, 예컨대, 총 핵화된 세포를 의미한다.

[0325] 본원에 사용된 것으로서, "종양 세포 억제", "종양 세포 증식의 억제" 등은 예컨대, 종양 세포의 상기 집단 속의 종양 세포 중 하나 이상을 사멸시킴, 예를 들면, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 또

는 NK 세포 집단을 종양 세포의 집단과 근접하게 함으로써, 예컨대, 종양 세포의 집단을 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 또는 NK 세포 집단과 접촉시킴으로써, 종양 세포의 집단의 성장을 지연시킴을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 접촉은 시험관내 또는 생체외에서 일어난다. 다른 구현예에서, 상기 접촉은 생체내에서 일어난다.

[0326] 본원에 사용된 것으로서, 용어 "조혈 세포"는 조혈 줄기 세포 및 조혈 선조 세포를 포함한다.

[0327] 본원에 사용된 것으로서, "정의되지 않은 성분"은 이의 구성성분이 일반적으로 제공되거나 정량화되지 않는 성분을 언급하는 배양 배지 분야에서의 기술 용어이다. "정의되지 않은 성분"의 예는 혈청, 예를 들면, 사람 혈청(예컨대, 사람 혈청 AB) 및 태아 혈청(예컨대, 태아 소 혈청 또는 태아 송아지 혈청)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0328] 본원에 사용된 것으로서, "+"는, 특수한 세포 마커의 존재를 나타내는데 사용된 경우, 세포 마커가 동형 대조군보다 형광성 활성화된 세포 분류에 검출가능하게 존재하거나 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경 이상으로 검출가능함을 의미한다.

[0329] 본원에 사용된 것으로서, "-"는, 특수한 세포 마커의 존재를 나타내는데 사용된 경우, 세포 마커가 동형 대조군보다 형광성 활성화된 세포 분류에 검출가능하게 존재하지 않거나 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경 이상으로 검출가능하지 않음을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0330] 4. 도면의 간단한 설명

도 1a 내지 도 1c: 앞서의 NK 세포 확장 배지 ("NK 세포 exp") 또는 디메틸 설펙사이드 (DMSO)에 대해 비교한 것으로서, 1 μ M, 10 μ M, 및 30 μ M에서 스탬레게닌-1(SR-1) 또는 CH223191을 사용하는 3-단계 방법에 대해 10:1 (E:T)에서 K562 세포에 대한 NK 세포의 (A) 배 확장, (B) 세포 순도(CD56+CD3-), 및 (C) 세포독성에 대한 효과.

도 2: CD11a 및 천연 세포독성 수용체 NKp30, c-렉틴 수용체 NKG2D, DNAM-1, 2B4, 세포분해성 매개인자 퍼포린 및 그랜자임 B, 및 EOMES, NK 세포 성숙 및 세포분해 기능의 조절인자의 발현을 나타내는, 3-단계 방법에 의해 생산된 CD3-CD56+ 게이트된 세포(gated cell)의 다중-색상 유동 세포분석.

도 3: 종양 세포 세포주 K562(CML), HL-60(AML), 및 RPMI8226(다발성 골수종)에 대해 35일된 3-단계 NK 세포(n=10)의 세포독성. 분해는 10:1의 효과기 대 표적 비에서 측정하였다.

도 4: 퍼포린(상단), 세포독성 매개인자, 및 탈과립화의 마커인, CD107(하단)의 발현에 있어서, 3-단계 NK 세포에 대한 FITC 동형 대조군 세포를 비교하는 다중-색상 유동 세포분석.

도 5: K562(CML) 세포와 함께 1:1의 비에서 24시간 동안 공배양하는 경우 3-단계 NK 세포(n=11)에 의한 사이토 킨의 생산.

도 6a 및 도 6b: 1:1의 효과기 대 표적에서 항온처리 후 15분째에 3-단계 NK 세포 및 K562(CML)(A) 및 RPMI8226(다발성 골수종)(B) 세포의 공초점 영상화(confocal imaging)에 의해 포획된 퍼포린의 편광화를 사용한 F-액틴 면역학적 시냅스의 형성. 세포를 포르말데하이드로 고정시키고 F-액틴을 알렉사(Alexa)-488 공액된 팔로 이딘으로 염색하고, 동시-염색을 퍼포린 항체에 이어서 염소 항-토끼 제2 항체에 접합된 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 555 염료로 수행하였다. 종양 표적 세포를 또한 세포 트래커 바이올렛 염료(Cell tracker violet dye)로 염색하였다. 화살표는 NK 세포, 퍼포린, 및 표적 세포를 나타낸다.

도 7: 종양 세포주 K562(CML), HL-60(AML), 및 RPMI8226(다발성 골수종)에 대한 3 단계 NK 세포(n=3)의 세포독성. 분해는 다양한 효과기 대 표적 비에서 측정하였다.

도 8: 종양 세포(K562 또는 HL-60) 또는 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 및 이오노마이신(PMA)을 사용한 자극시 3 단계 NK 세포 (n=4)에서 CD107a 발현. 4명의 공여체로부터의 결과를 나타낸다.

도 9: 종양 세포(K562, HL-60, 또는 RPMI8226) 또는 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 및 이오노마이신(PMA)으로 자극시 3 단계 NK 세포 (n=3)에서 IFN γ 분비. 3명의 공여체로부터의 결과를 나타낸다.

도 10: 3:1의 효과기 대 표적 비에서 주요 AML 표적 세포(A1, A2, 및 KG1a)에 대한 3 단계 NK 세포(n = 2)의

세포분해 활성. 결과는 24시간의 항온처리에 대해 나타낸다. 2명의 공여자로부터의 결과를 나타낸다.

도 11: HL-60(AML) 종양 세포주를 사용한 자극과 비교하여, 주요 AML 표적 세포(AML1-4, 및 KG1a)를 사용한 자극시 3 단계 NK 세포(n=5)에 있어서 IFN γ 분비. 5명의 공여자로부터의 결과를 나타낸다. 박스를 비교의 용이성을 위해 가한다.

도 12: CD11a 및 CD117의 발현을 나타내는, 3 단계 방법에 의해 생산된 CD3-CD56+ 게이트된 세포의 다중-색상 유동 세포분석법. 세포의 2개의 서브세트, CD11a+ 및 CD11a-를 박스 안에 나타낸다.

도 13: CD56 및 CD94의 발현을 나타내는, 도 12로부터의 CD11a+(우측) 및 CD11a-(좌측) 세포의 다중 색상 유동 세포분석법.

도 14: 각각의 서브세트에 대해 퍼포린, EOMES, ROR γ t, 및 IL1R1의 발현 수준을 나타내는, CD11a+(상단) 및 CD11a-(하단) 세포의 다중-색상 유동 세포분석법.

도 15: 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서, 퍼포린, 그랜자임 B, EOMES, T-bet, IL1R1, ROR γ t, 및 AHR을 발현하는 CD11a+ 및 CD11a- 3 단계 세포 발현 퍼센트의 정량화. 결과는 4명의 공여자에 걸쳐 나타낸다.

도 16: 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서, 사이토킨을 사용한 자극시, IFN γ , GM-CSF, IL-22, IL-8, 및 TNF α 를 발현하는 CD11a+ 및 CD11a- 3 단계 세포 퍼센트의 정량화. 결과는 4명의 공여자에 걸쳐 나타낸다. 그래프에서 바아(bar)는 좌측에서 우측으로, 다음과 같은 발현을 나타낸다: (i) 자극 없음, (ii) PMA 및 이오노마이신(PMAi)을 사용한 자극, (iii) PMAi 및 IL23을 사용한 자극, (iv) IL12 및 IL18을 사용한 자극, 및 (v) IL1b 및 IL23을 사용한 자극.

도 17: Nkp46, Nkp30, 및 NKG2D와 비교하여 CD11a의 발현을 나타내는, 3 단계 방법에 의해 생산된 CD3-CD56+ 게이트된 세포의 다중 색상 유동 세포분석법.

도 18: CD226(DNAM-1) 및 CD244 (2B4)와 비교하여 CD11a의 발현을 나타내는, 3 단계 방법에 의해 생산된 CD3-CD56+ 게이트된 세포의 다중 색상 유동 세포분석법.

도 19: CD16, NKG2A, 및 KIR와 비교하여 CD11a의 발현을 나타내는, 3 단계 방법에 의해 생산된 CD3-CD56+ 게이트된 세포의 다중 색상 유동 세포분석법.

도 20a 내지 도 20d: 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서, 표 6으로부터의 나타낸 제3 배지 조건을 사용한, (A) CD56 및 (B) CD14/15를 발현하는 3 단계 세포의 퍼센트, 및 (C) ROR γ t 및 (D) 퍼포린을 발현하는 CD56+3 단계 세포의 퍼센트. 2명의 공여자로부터의 결과를 각각의 조건에 대한 인접한 바아로 나타낸다.

도 21a 내지 도 21c: K562 세포의 존재하에서 (A) CD11a+ 및 (B) CD11a- 세포 소집단에서 FACS를 사용한 CD107a 발현. (C)에서의 그래프는 CD56+CD3- 3 단계 NK 세포의 4개 집단에 대한 결과를 나타낸다.

도 22: K562 세포에 대한 3 단계 NK 세포의 CD56+CD3- 집단의 CD11a+ (양성) 및 CD11a- (음성) 소집단의 세포독성. 표적 세포비에 대한 효과기는 x-축에 나타낸다.

도 23: K562 표적 세포 및 CD11a 양성 및 음성 효과기 세포 (1:1 비의 효과기:표적)의 공배양물의 존재 및 부재하에서 수행된 사이토킨 분비 분석. 양성 및 음성 세포 소집단에 대해 좌측 바아는 K562 세포의 부재하에서의 분비를 나타내는 반면, 양성 및 음성 세포 소집단에 대한 우측 바아는 K562 세포의 존재하에서의 분비를 나타낸다.

5. 상세한 설명

조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 생산하고 확장시키는 신규 방법이 본원에 제공된다. 또한 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포로부터 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는 방법, 예컨대, 3 단계 방법이 본원에 또한 제공된다. NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 조혈 세포(예컨대, CD34+ 조혈 줄기 세포)는 어떠한 공급원, 예를 들면, 태반, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장 또는 간으로부터 수득될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단은 확장된 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 및/또는 조혈 선조 세포로부터 생산된다. 일 구현예에서, 조혈 세포는 이러한 세포의 공급원은 이러한 세포, 예컨대, 태반, 예를 들면 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장, 간(예컨대, 태아 간) 및/또는 골수의 공급원으로부터 수집된다.

NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 조혈 세포는 어떠한 동물 종으로부터도 획득될 수 있다. 특정 구현예에서, 조혈 줄기 또는 선조 세포는 포유동물 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 사람 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 영장류 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 개 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 설치류 세포이다.

5.1. 조혈 세포

본원에 개시된 방법에서 유용한 조혈 세포는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포내로 분화할 수 있는 어떠한 조혈 세포, 예컨대, 전구체 세포, 조혈 선조 세포, 조혈 줄기 세포 등일 수 있다. 조혈 세포는 예컨대, 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 간 등 또는 이의 조합 등과 같은 조직 공급원으로부터 획득될 수 있다. 조혈 세포는 태반으로부터 획득될 수 있다. 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 태반 관류액으로부터 획득된다. 일 구현예에서, 조혈 세포는 제대혈로부터 획득되지 않는다. 일 구현예에서, 조혈 세포는 말초 혈액으로부터 획득되지 않는다. 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 태아 및 모체 조혈 세포의 혼합물, 예컨대, 모체 세포가 조혈 세포의 총 수의 5% 이상으로 포함되는 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 적어도 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5%의 태아 세포를 포함한다.

다른 구체적인 구현예에서, 이로부터 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단이 생산되는, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 태반 관류액, 제대혈, 태아 간, 동원된 말초 혈액, 또는 골수로부터 획득된다. 다른 구체적인 구현예에서, 이로부터 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단이 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산되는 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 태반 관류액 및 제대혈, 예컨대, 관류액으로서 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 조합된 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 제대혈은 이로부터 상기 태반 관류액이 획득되는 태반 이외의 다른 태반으로부터 분리된다. 특정 구현예에서, 조합된 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 혼주시키거나 조합함으로써 획득될 수 있다. 특정 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 용적당 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합되어 조합된 세포를 획득한다. 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 조합된다. 다른 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다. 보다 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5(85%:15%)의 비로 조합된다.

특정 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 총 핵화된 세포(TNC) 함량당 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합되어 조합된 세포를 획득한다. 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 조합된다. 다른 구체적인 구현예에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 조합된다.

다른 구체적인 구현예에서, 이로부터 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단이 생산되는 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포는 제대혈 및 태반 관류액 둘 다로부터 기원하지만, 여기서 상기 제대혈은 이로부터 상기 태반 관류액이 획득되는 태반 이외의 태반으로부터 분리된다.

특정 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}$ 세포이다. 구체적인 구현예에서, 본원에 개시된 방법에서 유용한 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{+}$ 또는 $CD34^{+}CD38^{-}$ 이다. 보다 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}Lin^{-}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD2^{-}$, $CD3^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$, $CD19^{-}$, $CD24^{-}$, $CD56^{-}$, $CD66b^{-}$ 및/또는 글리코포린 A⁻ 중 하나 이상이다. 다른 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD2^{-}$, $CD3^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$, $CD19^{-}$, $CD24^{-}$, $CD56^{-}$, $CD66b^{-}$ 및 글리코포린 A⁻이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}CD33^{-}CD117^{-}CD235^{-}CD36^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}CD33^{-}CD117^{-}CD235^{-}CD36^{-}$ 이다.

다른 구현예에서, 조혈 세포는 $CD45^{+}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD45^{+}$ 이다. 다른 구현예에서, 조혈 세포는 $Thy-1^{+}$ 이다. 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}Thy-1^{+}$ 이다. 다른 구현예에서, 조혈 세포는 $CD133^{+}$ 이다. 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD133^{+}$ 또는 $CD133^{+}Thy-1^{+}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, $CD34^{+}$ 조혈 세포는 $CXCR4^{+}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, $CD34^{+}$ 조혈 세포는 $CXCR4^{-}$ 이다. 다른 구현예에서, 조혈 세포는 KDR(혈관 성장 인자 수용체 2)에 대해 양성이다. 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}KDR^{+}$, $CD133^{+}KDR^{+}$ 또는 $Thy-1^{+}KDR^{+}$ 이다. 특정의 다른 구현예에서, 조혈 세포는 알데하이드 데하이드로게나제 (ALDH⁺)에 대해 양성이고, 예컨대, 세포는 $CD34^{+}ALDH^{+}$ 이다.

특정의 다른 구현예에서, $CD34^{+}$ 세포는 $CD45^{-}$ 이다. 구체적인 구현예에서, $CD34^{+}$ 세포, 예컨대, $CD34^{+}$, $CD45^{-}$ 세포는 miRNAs hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, hsa-miR-520a, hsa-miR-337, hsa-miR-422a, hsa-miR-549, 및/또는 hsa-miR-618 중 하나 이상 또는 모두를 발현한다.

특정 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{-}$ 이다.

조혈 세포는 또한 계통 구속(Lineage commitment)을 나타내는 특정의 마커를 결여하거나, 발달 행위를 결여할 수 있다. 예를 들면, 다른 구현예에서, 조혈 세포는 $HLA-DR^{-}$ 이다. 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}HLA-DR^{-}$, $CD133^{+}HLA-DR^{-}$, $Thy-1^{+}HLA-DR^{-}$ 또는 $ALDH^{+}HLA-DR^{-}$ 이다. 다른 구현예에서, 조혈 세포는 계통 마커 CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A 중 하나 이상, 또는 모두에 대해 음성이다.

따라서, 조혈 세포는 비분화된 상태를 나타내는 마커의 존재, 또는 적어도 일부 계통 분화가 일어남을 나타내는 계통 마커의 부재를 기준으로 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위해 선택될 수 있다. 특이적인 마커의 존재 또는 부재를 기준으로 하여, 조혈 세포를 포함하는 세포의 분리 방법은 하기에 상세히 논의한다.

본원에 제공된 방법에서 사용된 조혈 세포는 실질적으로 균질한 집단, 예컨대, 단일 조직 공급원으로부터 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 조혈 세포를 포함하는 집단, 또는 동일한 조혈 세포-관련 세포 마커를 나타내는 조혈 세포를 포함하는 집단일 수 있다. 예를 들면, 다양한 구현예에서, 조혈 세포는 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 또는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터 적어도 약 95%, 98% 또는 99% 조혈 세포를 포함할 수 있다.

본원에 제공된 방법에서 사용된 조혈 세포는 1명의 개인, 예컨대, 하나의 태반으로부터 또는 다수의 개인으로부터 수득될 수 있거나, 예컨대, 혼주될 수 있다. 조혈 세포가 다수의 개인으로부터 수득되어 혼주되는 경우, 조혈 세포는 동일한 조직 공급원으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 다양한 구현예에서, 혼주된 조혈 세포는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터 모든 것, 태반 혈액으로부터 모든 것, 제대혈로부터 모든 것, 말초 혈액으로부터 모든 것 등이다.

본원에 개시된 방법에서 사용된 조혈 세포는 특정 구현예에서, 2개 이상의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함할 수 있다. 예를 들면, 특정 구현예에서, 2개 이상의 공급원으로부터의 조혈 세포를 본원의 방법에서 사용하기 위해 합하는 경우, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 천연 킬러 세포를 생산하는데 사용된 다수의 조혈 세포는 태반, 예컨대, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함한다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 조혈 세포는 태반으로부터 및 제대혈로부터; 태반 및 말초 혈액으로부터; 태반 및 태반 혈액, 또는 태반 및 골수로부터의 조혈 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 조혈 세포는 제대혈로부터의 조혈 세포와 함께 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함하며, 여기서 상기 제대혈 및 태반은 동일한 개인으로부터 기원하는데, 즉, 여기서 관류액 및 제대혈은 일치(Match)된다. 조혈 세포가 2개의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함하는 구현예에서, 공급원으로부터의 조혈 세포는 예를 들면, 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1의 비로 조합될 수 있다.

5.1.1. 태반 조혈 줄기 세포

특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에서 사용된 조혈 세포는 태반 조혈 세포이다. 일 구현예에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^{+}$ 이다. 구체적인 구현예에서, 태반 조혈 세포는 주로(예컨대, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%,

75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) $CD34^{+}CD38^{-}$ 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 태반 조혈 세포는 주로 (예컨대, 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) $CD34^{+}CD38^{+}$ 세포이다. 태반 조혈 세포는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 어떠한 수단에 의해, 예컨대, 관류에 의해 출산 후 포유류(예컨대, 사람) 태반으로부터 취득될 수 있다.

다른 구현예에서, 태반 조혈 세포는 $CD45^{-}$ 이다. 구체적인 구현예에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD45^{-}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^{+}CD45^{+}$ 이다.

5.2. 천연 킬러 및/또는 ILC3 세포 및 천연 킬러 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 생산

본 방법에 의한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 생산은 조혈 세포의 집단을 확장시킴을 포함한다. 세포 확장 동안에 조혈 세포 집단내의 다수의 조혈 세포는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 분화한다. 일 국면에서, 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, $CD34^{+}$ 줄기 세포 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 이어서 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하는, NK 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 세포의 제3 집단은 $CD56^{+}$, $CD3^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함하며, 여기서 상기 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 예를 들면 적어도 80%는 살아있다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 또는 $CD16^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 또는 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 및 $CD16^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 및 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여, NK 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 $CD56^{+}$, $CD3^{-}$, 및 $CD11a^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 인자(SCF) 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여, NK 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 $CD56^{+}$, $CD3^{-}$, 및 $CD11a^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 및 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는

제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 SCF, 줄기 세포 동원 작용제, 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여, NK 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포를 상기 세포의 제3 집단으로부터 분리하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하여, NK 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

특정 구현예에서, 상기 구현예의 어느 것 중에서, 상기 천연 킬러 세포는 퍼포린 및 EOMES를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포는 ROR γ t 또는 IL1R1을 발현하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여 ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 줄기 세포 동원 작용제, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 줄기 세포 동원 작용제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하여 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계를 포함하여, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

일 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) 상기 세포의 제3 집단으로부터 CD11a- 세포를 분리하거나, CD11a+ 세포를 제거하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하여, ILC3 세포를 생산하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 상기 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t 및 IL1R1을 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 퍼포린 또는 EOMES를 발현하지 않는다.

5.2.1. 3 단계 방법을 사용한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 생산

일 구현예에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는 3 단계 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하기 위한, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포의 확장 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 밀리리터당 약 2×10^4 내지 약 6×10^6 개의 세포로 유지시킴을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지내로 1×10^4 내지 1×10^5 개의 세포/mL로 초기에 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 내로 약 3×10^4 개의 세포/mL에서 초기에 접종된다.

특정 국면에서, 상기 세포의 제1 집단은 초기에 상기 제2 배지 내로 5×10^4 내지 5×10^5 개의 세포/mL에서 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제1 집단은 초기에 상기 제2 배지 내에 약 1×10^5 개의 세포/mL에서 접종된다.

특정 국면에서 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 1×10^5 내지 5×10^6 개의 세포/mL에서 접종된다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 1×10^5 내지 1×10^6 개의 세포/mL에서 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 5×10^5 개의 세포/mL에서 접종된다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지내로 약 5×10^5 개의 세포/mL에서 회전 플라스크 속에 접종된다. 구체적인 국면에서, 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 3×10^5 개의 세포/mL에서 접종된다. 보다 구체적인 국면에서 상기 세포의 제2 집단은 초기에 상기 제3 배지 내로 약 3×10^5 개의 세포/mL에서 정적 배양물 속에 접종된다.

특정의 구현예에서, 상기 3 단계 방법은 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, $CD34^+$ 줄기 세포 또는 선조 세포를 제1 배지 속에서 규정된 시간 동안, 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이 배양하여 세포의 제1 집단을 수득함을 포함하는 제1 단계 ("단계 1")를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 각각의 LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함하는 제1 배지 각각을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 첨가된 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 LMWH를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 각각의 Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함하는 제1 배지 각각을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 백혈병 억제 인자(LIF), 대식세포 억제 단백질-1알파(MIP-1 α) 또는 둘 다를 결여한다.

특정 구현예에서, 후속적으로, "단계 2"에서 상기 세포는 제2 배지 속에서 규정된 기간 동안, 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이 배양되어, 세포의 제2 집단을 생산한다. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지는, 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지는, 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, 각각의 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제2 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제2 배지는 헤파린, 예컨대, LMWH를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지는, 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, 각각의 Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF), 대식세포 억제 단백질-1알파(MIP-1 α) 또는 이들 둘 다를 결여한다.

특정 구현예에서, 후속적으로, "단계 3"에서 상기 세포는 제3 배지 속에서 규정된 기간 동안, 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이 배양되어 세포의 제3 집단, 예컨대, 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 외에, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는, IL-2 및 IL-15 외에, 각각의 SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L 중 하나, 둘 또는 3개 모두를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제3 배지는 첨가된 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제3 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제3 배지는 헤파린, 예컨대, LMWH를 결여한다.

구체적인 구현예에서, 상기 3 단계 방법은 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 3 단계 방법은 기질 공급인자 세포 지지체의 부재하에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 3 단계 방법은 외인성으로 첨가된 스테로이드(예컨대, 코르티손, 하이드로코르티손, 또는 이의 유도체)의 부재하에서 수행된다.

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제3 단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 저 분자량 헤파린(LMWH), Flt-3 리간드(Flt-3L), 줄기 세포 인자(SCF), IL-6, IL-7, 과립구 콜로니-자극

인자 (G-CSF), 또는 과립구-대식세포-자극 인자 (GM-CSF) 중 하나 이상을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제3 단계 방법에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 각각의 LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제3 단계에서 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 Tpo 외에, 각각의 Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 국면에서, 상기 제1 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 국면에서, 상기 제1 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 국면에서, 상기 제1 배지는 LMWH를 결여한다. 구체적인 국면에서, 상기 제1 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 Tpo는 상기 제1 배지 속에 1 ng/mL 내지 100 ng/mL, 1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 20 ng/mL 내지 30 ng/mL, 또는 약 25 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 LMWH는 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 LMWH는 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 .25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지 속에서, 상기 Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 약 .25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 젠타마이신과 같은 항생제; 트랜스페린, 인슐린, 및/또는 베타-머캅토에탄올과 같은 항산화제; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지용 기재를 제공하는 배지는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예컨대, SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OpTmizer, Stemspan® H3000, Cellgro complete™, DMEM:Ham's F12 ("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 진전된 DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640와 같은 상업적으로 이용가능한 세포/조직 배양 배지이거나; GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OpTmizer, Stemspan® H3000, Cellgro complete™, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 진전된 DMEM(Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분과 같이, 공지된 세포/조직 배양 배지 속에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지는 GBGM®가 아니다. 상기 구현예들 중 어느 것의 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 LIF, MIP-1α, 또는 이들 둘 다를 결여한다.

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에서 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에서 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, 각각의 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에서 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원 작용제 및 IL-15 외에, 각각의 Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 구체적인 국면에서, 상기 제2 배지는 첨가된 LMWH를 결여한다. 구체적인 국면에서, 상기 제2 배지는 데설페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 구체적인 국면에서, 상기 제2 배지는 LMWH를 결여한다. 구체적인 국

면에서, 상기 제2 배지는 데셀페이트화된 글리코사미노글리칸을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 10 ng/mL 내지 30 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지에서, 상기 Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, LMWH는 상기 제2 배지 속에 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지에서, 상기 Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, LMWH는 상기 제2 배지 속에 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, LMWH는 상기 제2 배지 속에 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; 상기 Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제2 배지 속에서, 상기 Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 젠타마이신과 같은 항생제; 트랜스페린, 인슐린, 및/또는 베타-머캅토에탄올과 같은 항산화제; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 구현예에서, 상기 제2 배지용 기재를 제공하는 배지는 당해 분야의 숙련가에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예컨대, SCGMTM, STEMMACSTM, GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OpTmizer, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETETM, DMEM:Ham's F12 ("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 진전된 DMEM (Gibco), EL08-1D2, MyelocultTM H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640와 같은 상업적으로 이용가능한 세포/조직 배양 배지이거나; GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETETM, DMEM:Ham's F12 ("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 진전된 DMEM(Gibco), EL08-1D2, MyelocultTM H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분과 같이, 공지된 세포/조직 배양 배지 속에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지는 GBGM®가 아니다. 상기 구현예들 중 어느 것의 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 LIF, MIP-1α, 또는 이들 둘 다를 결여한다.

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, SCF 및 LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고,

SCF, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 줄기 세포 동원 작용제, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15 외에, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15 외에, 각각의 SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 10 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 100 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 300 U/mL 내지 3,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 10 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지 속에 약 1,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지 속에 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지 속에서, 상기 SCF는 약 22 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 IL-7은 약 20 ng/mL의 농도로 존재하고; 상기 G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하며; 상기 GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 100 ng/mL의 IL-7, 1000 ng/mL의 IL-2, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 1000 ng/mL의 IL-2, 20 ng/mL의 IL-15, 및 10 μ M의 SR1을 포함하고 SCF를 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 100 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 1000 ng/mL의 IL-2, 및 20 ng/mL의 IL-15를 포함하고 SR1을 결여한다. 특정 국면에서, 상기 제3 배지는 20 ng/mL의 IL-7, 22 ng/mL의 SCF, 및 1000 ng/mL의 IL-2를 포함하고 SR1을 결여한다. 상기 구현예 중 어느 것의 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지는 LIF, MIP-1 α , Flt-3L 중 하나, 둘 또는 3개 모두를 결여한다.

특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 젠타마이신과 같은 항생제; 트랜스페린, 인슐린, 및/또는 베타-머캅토에탄올과 같은 항산화제; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지용 기재를 제공하는 배지는 당해 분야의 숙련자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예컨대, SCGMTM, STEMMACSTM, GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETETM, DMEM:Ham's F12 ("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 진전된 DMEM (Gibco), EL08-1D2, MyelocultTM H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640와 같은 상업적으로 이용 가능한 세포/조직 배양 배지이거나; GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETETM, DMEM:Ham's F12("F12")(예컨대, 2:1의 비, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 진전된 DMEM(Gibco), EL08-1D2, MyelocultTM H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분과 같이, 공지된 세포/조직 배양 배지 속에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 GBGM®가 아니다.

일반적으로, 특별히 인용된 배지 성분은 상기 배지의 정의되지 않은 성분 속에 가능한 구성성분을 언급하지 않는다. 예를 들면, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 정의되지 않은 성분 내에 포함되지 않는데, 예컨대, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 혈청 내에 포함되지 않는다. 또한, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 규정되지 않은

성분 내에 포함되지 않는데, 예컨대, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 혈청 내에 포함되지 않는다.

특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 사람 혈청-AB를 포함한다. 특정 국면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 1% 내지 20%의 사람 혈청-AB, 5% 내지 15%의 사람 혈청-AB, 또는 약 2, 5, 또는 10%의 사람 혈청-AB를 포함한다.

특정 구현예에서, 본원에 기술된 상기 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 상기 3 단계 방법에서, 세포는 상기 제2 배지 속에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 상기 3 단계 방법에서, 세포는 상기 제3 배지 속에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30일, 또는 30일 이상 동안 배양된다.

구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 상기 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에서 7 내지 13일 동안 배양되어 상기 제2 배지 속에서 상기 배양 전에, 세포의 제1 집단을 생산하고; 상기 세포의 제1 집단은 상기 제2 배지 속에서 2 내지 6일 동안 배양되어 상기 제3 배지 속에서 배양 전에 세포의 제2 집단을 생산하며; 상기 세포의 제2 집단은 상기 제3 배지 속에서 10 내지 30일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 19 내지 49일 동안 배양된다.

구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 상기 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에서 8 내지 12일 동안 배양되어 상기 제2 배지 속에서 상기 배양 전에, 세포의 제1 집단을 생산하고; 상기 세포의 제1 집단은 상기 제2 배지 속에서 3 내지 5일 동안 배양되어 상기 제3 배지 속에서 상기 배양 전에, 세포의 제2 집단을 생산하며; 상기 세포의 제2 집단은 상기 제3 배지 속에서 15 내지 25일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 26 내지 42일 동안 배양된다.

구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 선조 세포는 상기 제1 배지 속에서 약 10일 동안 배양되어 상기 제2 배지 속에서 상기 배양 전에, 세포의 제1 집단을 생산하고; 상기 세포의 제1 집단은 상기 제2 배지 속에서 약 4일 동안 배양되어 상기 제3 배지 속에서 상기 배양 전에, 세포의 제2 집단을 생산하며; 상기 세포의 제2 집단은 상기 제3 배지 속에서 약 21일 동안 배양되는데, 즉, 상기 세포는 총 약 35일 동안 배양된다.

특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 7-아미노악티노마이신 D (7AAD) 염색으로 측정한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 안넥신-V 염색으로 측정한다. 구체적인 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 7-AAD 염색 및 안넥신-V 염색 둘 다로 측정한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존능은 트립신 블루 염색으로 측정한다.

특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 5000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 10,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 50,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 제1 배지내로 초기 접종된 조혈 줄기 세포의 수와 비교하여 적어도 75,000배 이상의 ILC3 세포를 생산한다.

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 70%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포

함하는 천연 킬러 세포를 생산한다.

특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3-CD11a+ 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생산한다.

특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 20%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 40%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 60%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 본원에 개시된 3 단계 방법은 적어도 80%의 CD56+CD3- CD11a- ILC3 세포를 포함하는 ILC3 세포를 생산한다.

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생산한다.

특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 20%의 세포독성을 나타내는 ILC 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 35%의 세포독성을 나타내는 ILC 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 45%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 60%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다. 특정 국면에서, 상기 3 단계 방법은 상기 ILC3 세포 및 상기 K562 세포를 시험관내 또는 생체외에서 10:1의 비에서 공-배양하는 경우 K562 세포에 대해 적어도 75%의 세포독성을 나타내는 ILC3 세포를 생산한다.

특정 국면에서, 상기 제3 배양 단계 후, 상기 세포의 제3 집단, 예컨대, 천연 킬러 세포 및/또는 ILC3 세포의 상기 집단은 동결보존된다. 특정 국면에서, 상기 제4 단계 후, 상기 세포의 제4 집단, 예컨대, 천연 킬러 세포 및/또는 ILC3 세포의 상기 집단은 동결보존된다.

특정 국면에서, 천연 킬러 세포, 즉 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단이 본원에 제공된다. 따라서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 분리된 천연 킬러 세포 집단이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 20%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 40%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 60%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 80%의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 60%의 CD16- 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 80%의 CD16- 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 20%의 CD94+ 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 적어도 40%의 CD94+ 세포를 포함한다.

특정 국면에서, CD56+CD3- CD117+CD11a+인 천연 킬러 세포의 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 천연 킬러 세포는 퍼포린 및/또는 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체(AHR), 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 퍼포린 및 EOMES를 발현하고, ROR γ t, 아틸 탄화수소 수용체, 또는 IL1R1 중 어느 것도 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 또한 T-bet, GZMB,

NKp46, NKp30, 및 NKG2D를 발현한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 CD94를 발현한다. 특정 국면에서, 상기 천연 킬러 세포는 CD94를 발현하지 않는다.

특정 국면에서, CD56+CD3- CD117+CD11a-인 ILC3 세포의 집단이 본원에 제공되고, 여기서 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 및 IL1R1 중 하나 이상을 발현하고, CD94, 퍼포린, 및 EOMES 중 하나 이상을 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 ROR γ t, 아릴 탄화수소 수용체, 및 IL1R1을 발현하고, CD94, 퍼포린, 또는 EOMES 중 어느 것도 발현하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 CD226 및/또는 2B4를 추가로 발현한다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 IL-22, TNF α , 및 DNAM-1 중 하나 이상을 추가로 발현한다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 CD226, 2B4, IL-22, TNF α , 및 DNAM-1을 발현한다.

특정 국면에서, (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)을 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)을 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포를 상기 세포의 제3 집단으로부터 분리하는 단계; 및 (e) 상기 CD11a+ 세포를 CD11a- 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 합하여 세포의 제4 집단을 생산하는 단계를 포함하여, 천연 킬러 세포 및 ILC3 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 50:1의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 20:1의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 10:1의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 5:1의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 1:1의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 1:5의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 1:10의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 1:20의 비로 합해진다. 특정 국면에서, 상기 세포의 제4 집단에서, 상기 CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 1:50의 비로 합해진다.

5.3. 줄기 세포 동원(mobilizing) 인자(factor)

3.3.1. 화학 정의

본원에 기술된 줄기 세포 동원 인자의 개시내용의 이해를 촉진하기 위하여, 다수의 용어가 하기 정의되어 있다.

일반적으로, 본원 및 본원에 기술된 생물학, 세포 생물학, 생화학, 유기 화학, 의학 화학, 및 약리학에서 실험실 과정에 사용된 명명법은 당해 분야에 잘 알려지고 일반적으로 사용된 것들이다. 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 개시내용이 속한 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

용어 "약" 또는 "대략"은 당해 값이 판단되거나 측정되는 방법에 일부 의존하는, 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 측정된 특수 값에 대해 허용되는 오차를 의미한다. 특정 구현예에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 1, 2, 3, 또는 4의 표준 편차를 의미한다. 특정 구현예에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 제공된 값 또는 범위의 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.05% 이내를 의미한다.

용어 "아릴 탄화수소 수용체" 또는 "AHR"은 사람에서 AHR 유전자에 의해 암호화된 단백질, 또는 이의 변이체(예를 들면, GenBank 수탁 번호 제P35869.2호 및 제AAH70080.1호)를 말한다.

용어 "아릴 탄화수소 수용체 길항제", "AHR 길항제", "아릴 탄화수소 수용체 억제제", 또는 "AHR 억제제"는 아릴 탄화수소 수용체의 활성을 하향조절하거나 감소시키는 화합물을 말한다.

용어 "알킬"은 직쇄 또는 측쇄의 포화된 1가 탄화수소 라디칼을 말하며, 여기서 상기 알킬은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 용어 "알킬"은 또한 달리 규정하지 않는 한, 직쇄 및 측쇄 알

킬 둘 다를 포함한다. 특정 구현예에서, 알킬은 탄소수가 1 내지 20(C_{1-20}), 1 내지 15(C_{1-15}), 1 내지 10(C_{1-10}), 또는 1 내지 6(C_{1-6})인 직쇄의 포화된 1가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 6(C_{3-6})인 측쇄되고 포화된 1가 탄화수소 라디칼이다. 본원에 사용된 것으로서, 직쇄 C_{1-6} 및 측쇄 C_{3-6} 알킬 그룹은 또한 "저급 알킬"로 언급된다. 알킬 그룹의 예는 메틸, 에틸, 프로필 (모든 이성체 형태 포함), *n*-프로필, 이소프로필, 부틸 (모든 이성체 형태 포함), *n*-부틸, 이소부틸, 2-부틸, *t*-부틸, 펜틸 (모든 이성체 형태 포함), 및 헥실 (모든 이성체 형태 포함)을 포함한다. 예를 들면, C_{1-6} 알킬은 탄소수 1 내지 6의 직쇄의 포화된 1가 탄화수소 라디칼 또는 탄소수 3 내지 6의 측쇄되고 포화된 1가 탄화수소 라디칼을 말한다.

용어 "알킬렌"은 직쇄 또는 측쇄의 포화된 2가 탄화수소 라디칼을 말하며, 여기서 알킬렌은 본원에 기술된 바와 같이 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 예를 들면, C_{1-6} 알킬렌은 탄소수가 1 내지 6인 직쇄의 포화된 2가 탄화수소 라디칼 또는 탄소수 3 내지 6의 측쇄되고 포화된 탄화수소 라디칼을 포함한다. 특정 구현예에서, 알킬렌은 탄소수가 1 내지 20(C_{1-20}), 1 내지 15(C_{1-15}), 1 내지 10(C_{1-10}), 또는 1 내지 6(C_{1-6})인 직쇄의 포화된 2가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 6(C_{3-6})인 측쇄의 포화된 2가 탄화수소 라디칼이다. 본원에 사용된 것으로서, 직쇄의 C_{1-6} 및 측쇄의 C_{3-6} 알킬렌 그룹은 또한 "저급 알킬렌"을 언급한다. 알킬렌 그룹의 예는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌 (모든 이성체 형태 포함), *n*-프로필렌, 이소프로필렌, 부틸렌 (모든 이성체 형태 포함), *n*-부틸렌, 이소부틸렌, *t*-부틸렌, 펜틸렌 (모든 이성체 형태 포함), 및 헥실렌 (모든 이성체 형태 포함)을 포함한다.

용어 "알케닐"은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개, 다른 구현예에서, 1개의 탄소-탄소 이중 결합 (들)을 함유하는 직쇄 또는 측쇄의 1가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알케닐은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 용어 "알케닐"은 당해 분야의 통상의 기술자에게 인식되는 것으로서, 또한 "시스" 및 "트랜스" 구조를 갖거나, 달리는 "Z" 및 "E" 구조를 갖는 라디칼을 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, 용어 "알케닐"은 달리 규정하지 않는 한, 직쇄 또는 측쇄 알케닐 둘 다를 포함한다. 예를 들면, C_{2-6} 알케닐은 탄소수 2 내지 6의 직쇄의 불포화된 1가 탄화수소 라디칼 또는 탄소수 3 내지 6의 측쇄되고 불포화된 1가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 구현예에서, 알케닐은 탄소수가 2 내지 20(C_{2-20}), 2 내지 15(C_{2-15}), 2 내지 10(C_{2-10}), 또는 2 내지 6(C_{2-6})인 직쇄의 1가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 6(C_{3-6})인 측쇄의 1가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알케닐 그룹의 예는 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 알릴, 부테닐, 및 4-메틸부테닐을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

용어 "알케닐렌"은 하나 이상, 일 구현예에서, 1 내지 5개, 다른 구현예에서, 1개의 탄소-탄소 이중 결합 (들)을 함유하는 직쇄 또는 측쇄의 2가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알케닐렌은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 용어 "알케닐렌"은 당해 분야의 통상의 기술자에게 인식되는 것으로서, "시스" 또는 "트랜스" 구조 또는 이의 혼합물을 갖거나, 달리는 "Z" 또는 "E" 구조또는 이의 혼합물을 갖는 라디칼을 포함한다. 예를 들면, C_{2-6} 알케닐렌은 탄소수가 2 내지 6인 직쇄의 불포화된 2가 탄화수소 라디칼 또는 탄소수가 3 내지 6인 측쇄의 불포화된 2가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 구현예에서, 알케닐렌은 탄소수가 2 내지 20(C_{2-20}), 2 내지 15(C_{2-15}), 2 내지 10(C_{2-10}), 또는 2 내지 6(C_{2-6})인, 직쇄의 2가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 6(C_{3-6})인 측쇄의 2가 탄화수소 라디칼이다. 알케닐렌 그룹의 예는 에테닐렌, 알릴렌, 프로페닐렌, 부테닐렌, 및 4-메틸부테닐렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

용어 "알키닐"은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개, 다른 구현예에서, 1개의 탄소-탄소 삼중 결합 (들)을 함유하는, 직쇄 또는 측쇄의 1가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알키닐은 본원에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 용어 "알키닐"은 달리 규정하지 않는 한, 직쇄 및 측쇄 알키닐 둘 다를 또한 포함한다. 특정 구현예에서, 알키닐은 탄소수가 2 내지 20(C_{2-20}), 2 내지 15(C_{2-15}), 2 내지 10(C_{2-10}), 또는 2 내지 6(C_{2-6})인 직쇄의 1가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 6(C_{3-6})인 측쇄의 1가 탄화수소 라디칼이다. 알키닐 그룹의 예는 에티닐 ($-C\equiv CH$) 및 프로파르길($-CH_2C\equiv CH$)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, C_{2-6} 알키닐은 탄소수 2 내지 6의 직쇄의 불

포화된 1가 탄화수소 라디칼 또는 탄소수 3 내지 6의 측쇄의 불포화된 1가 탄화수소 라디칼을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

용어 "알킬닐렌"은 하나 이상, 일 구현예에서, 1 내지 5개, 다른 구현예에서, 1개의 탄소-탄소 삼중 결합 (들)을 함유하는 직쇄 또는 측쇄의 2가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알킬닐렌은 본원에 기술된 것으로서 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 예를 들면, C_{2-6} 알킬닐렌은 탄소수 2 내지 6의 직쇄의 불포화된 2가 탄화수소 라디칼 또는 탄소수 3 내지 6의 측쇄되고 불포화된 2가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 구현예에서, 알킬닐렌은 탄소수 2 내지 20(C_{2-20}), 2 내지 15(C_{2-15}), 2 내지 10(C_{2-10}), 또는 2 내지 6(C_{2-6})의 직쇄의 2가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소수 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 6(C_{3-6})의 측쇄의 2가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알킬닐렌 그룹의 예는 에틸닐렌, 프로피닐렌 (모든 이성체 형태 포함, 예컨대, 1-프로피닐렌 및 프로파르길렌), 부틸닐렌 (모든 이성체 형태 포함, 예컨대, 1-부틴-1-일렌 및 2-부틴-1-일렌), 펜틸닐렌 (모든 이성체 형태 포함, 예컨대, 1-펜틴-1-일렌 및 1-메틸-2-부틴-1-일렌), 및 헥실닐렌 (모든 이성체 형태 포함, 예컨대, 1-헥신-1-일렌)을 포함한다.

용어 "사이클로알킬"은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된, 사이클릭의 포화되거나 비-방향족의 불포화되거나, 브릿지되거나 비-브릿지된 1가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 구현예에서, 사이클로알킬은 사이클릭의 포화되고 브릿지되거나 비-브릿지된 1가 탄화수소 라디칼이다. 특정 구현예에서, 사이클로알킬은 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 7(C_{3-7})이다. 사이클로알킬 그룹의 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 비사이클로[2.1.1]헥실, 비사이클로[2.2.1]헵틸, 데칼리닐, 및 아다만틸을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

용어 "사이클로알킬렌"은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 사이클릭의 2가 탄화수소 라디칼을 말한다. 일 구현예에서, 사이클로알킬렌 그룹은 포화되거나 불포화되지만 비-방향족, 및/또는 브릿지되고/되거나 비-브릿지되고/되거나 융합된 비사이클릭 그룹이다. 특정 구현예에서, 사이클로알킬렌은 탄소수가 3 내지 20(C_{3-20}), 3 내지 15(C_{3-15}), 3 내지 10(C_{3-10}), 또는 3 내지 7(C_{3-7})이다. 사이클로알킬렌 그룹의 예는 사이클로프로펜(예컨대, 1,1-사이클로프로필렌 및 1,2-사이클로프로필렌), 사이클로부틸렌(예컨대, 1,1-사이클로부틸렌, 1,2-사이클로부틸렌, 또는 1,3-사이클로부틸렌), 사이클로펜틸렌(예컨대, 1,1-사이클로펜틸렌, 1,2-사이클로펜틸렌, 또는 1,3-사이클로펜틸렌), 사이클로헥실렌(예컨대, 1,1-사이클로헥실렌, 1,2-사이클로헥실렌, 1,3-사이클로헥실렌, 또는 1,4-사이클로헥실렌), 사이클로헵틸렌(예컨대, 1,1-사이클로헵틸렌, 1,2-사이클로헵틸렌, 1,3-사이클로헵틸렌, 또는 1,4-사이클로헵틸렌), 데칼리닐렌, 및 아다만틸렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

용어 "아릴"은 적어도 하나의 방향족 탄화수소 환을 함유하는 모노사이클릭 방향족 카보사이클릭 그룹 및/또는 멀티사이클릭 1가 방향족 카보사이클릭 그룹을 말한다. 특정 구현예에서, 아릴은 6 내지 20(C_{6-20}), 6 내지 15(C_{6-15}), 또는 6 내지 10(C_{6-10})개의 환 원자를 갖는다. 아릴 그룹의 예는 페닐, 나프틸, 플루오레닐, 아줄레닐, 안트릴, 페난트릴, 피레닐, 비페닐, 및 테르페닐을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 용어 "아릴"은 비사이클릭 또는 트리사이클릭 탄소 환을 말하며, 여기서 당해 환중 하나는 방향족이고 다른 것은 포화되거나, 부분 불포화되거나, 방향족, 예를 들면, 디하이드로나프틸, 인데닐, 인다닐, 또는 테트라하이드로나프틸(테트라리닐)일 수 있다. 아릴은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "아릴렌"은 적어도 하나의 방향족 탄소 환을 함유하는 2가 모노사이클릭 방향족 그룹 및/또는 2가 폴리사이클릭 방향족 그룹을 말한다. 특정 구현예에서, 아릴렌은 6 내지 20(C_{6-20}), 6 내지 15(C_{6-15}), 또는 6 내지 10(C_{6-10})개의 환 원자를 갖는다. 아릴렌 그룹의 예는 페닐렌, 나프틸렌, 플루로레닐렌, 아줄레닐렌, 안트릴렌, 페난트릴렌, 피레닐렌, 비페닐렌, 및 테르페닐렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 아릴렌은 또한 비사이클릭 또는 트리사이클릭 탄소 환을 말하며, 여기서 환들 중 하나는 방향족이고 다른 것은 포화되거나, 부분 포화되거나, 방향족, 예를 들면, 디하이드로나프틸렌, 인데닐렌, 인다닐렌 또는 테트라하이드로나프틸렌 (테트라리닐렌)일 수 있다. 아릴렌은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 하나 이상 아릴 그룹으로 치환된 1가 알킬 그룹을 말한다. 특정 구현예에서, 아르알킬은 탄소수가 7 내지 30(C_{7-30}), 7 내지 20(C_{7-20}), 또는 7 내지 16(C_{7-16})이다. 아르알킬 그룹의 예는 벤질, 1-페닐에틸, 2-페닐에틸, 및 3-페닐프로필을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 아르알킬은 본원

에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "헤테로아릴"은 적어도 하나의 방향족 환을 함유하는 1가의 모노사이클릭 방향족 그룹 또는 1가의 폴리사이클릭 방향족 그룹을 말하며, 여기서 적어도 하나의 방향족 환은 하나 이상의 헤테로원자를 함유하고, 이들 각각은 환 내에서 O, S, N, 및 P로부터 독립적으로 선택된다. 명확성을 위해, 본원에 사용된 것으로서 용어 "아릴" 및 "헤테로아릴"은 상호 배타적인데, 즉, "아릴" 그룹은 "헤테로아릴" 그룹을 포함하지 않으며, 이의 역도 성립된다. 헤테로아릴 그룹은 이의 방향족 환을 통해 분자의 나머지에 결합된다. 헤테로아릴 그룹의 각각의 환은 1개 또는 2개의 O 원자, 1개 또는 2개의 S 원자, 1개 내지 4개의 N 원자, 및/또는 1개 또는 2개의 P 원자를 포함하고, 단, 각각의 환 내에서 헤테로원자의 총 수는 4 이하이고 각각의 환은 적어도 하나의 탄소 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 헤테로아릴은 5 내지 20, 5 내지 15, 또는 5 내지 10개의 환 원자를 갖는다. 모노사이클릭 헤테로아릴 그룹의 예는 푸라닐, 이미다졸릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 피라지닐, 피라졸릴, 피리다지닐, 피리딜, 피리미디닐, 피롤릴, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 테트라졸릴, 트리아지닐, 및 트리아졸릴을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 비사이클릭 헤테로아릴 그룹의 예는 벤조푸라닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조이속사졸릴, 벤조피라닐, 벤조티아디아졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티에닐, 벤조트리아졸릴, 벤족사졸릴, 푸로피리딜, 이미다조피리디닐, 이미다조티아졸릴, 인다졸리닐, 인돌릴, 인다졸릴, 이소벤조푸라닐, 이소벤조티에닐, 이소인돌릴, 이소퀴놀리닐, 이소티아졸릴, 나프티리디닐, 옥사졸로피리디닐, 프탈라지닐, 프테리디닐, 푸리닐, 피리도피리딜, 피롤로피리딜, 퀴놀리닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 티아디아졸로피리미딜, 및 티에노피리딜을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 트리사이클릭 헤테로아릴 그룹의 예는 아크리디닐, 벤즈인돌릴, 카바졸릴, 디벤조푸라닐, 페리미디닐, 페난트롤리닐, 페난트리디닐, 페나르사지닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 및 크산테닐을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 헤테로아릴은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "헤테로아릴렌"은 적어도 하나의 방향족 환을 함유하는 2가의 모노사이클릭 방향족 그룹 또는 2가의 폴리사이클릭 방향족 그룹을 말하며, 여기서 적어도 하나의 방향족 환은 환 내에 O, S, 및 N으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 함유한다. 명확성을 위해, 본원에 사용된 것으로서 용어 "아릴렌" 및 "헤테로아릴렌"은 상호 배타적인데, 즉, "아릴렌" 그룹은 "헤테로아릴렌" 그룹을 함유하지 않으며, 이의 역도 성립된다. 헤테로아릴렌 그룹은 이의 방향족 환을 통해 분자의 나머지에 결합된다. 헤테로아릴렌 그룹의 각각의 환은 1개 또는 2개의 O 원자, 1개 또는 2개의 S 원자, 및/또는 1 내지 4개의 N 원자를 함유할 수 있고, 단, 각각의 환 내의 헤테로원자의 총 수는 4개 이하이고 각각의 환은 적어도 1개의 탄소 원자를 함유한다. 특정 구현예에서, 헤테로아릴렌은 5 내지 20, 5 내지 15, 또는 5 내지 10개의 환 원자를 갖는다. 모노사이클릭 헤테로아릴렌 그룹의 예는 푸라닐렌, 이미다졸릴렌, 이소티아졸릴렌, 이속사졸릴렌, 옥사디아졸릴렌, 옥사디아졸릴렌, 옥사졸릴렌, 피라지닐렌, 피라졸릴렌, 피리다지닐렌, 피리딜렌, 피리미디닐렌, 피롤릴렌, 티아디아졸릴렌, 티아졸릴렌, 티에닐렌, 테트라졸릴렌, 트리아지닐렌, 및 트리아졸릴렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 비사이클릭 헤테로아릴렌 그룹의 예는 벤조푸라닐렌, 벤즈이미다졸릴렌, 벤조이속사졸릴렌, 벤조피라닐렌, 벤조티아디아졸릴렌, 벤조티아졸릴렌, 벤조티에닐렌, 벤조트리아졸릴렌, 벤족사졸릴렌, 푸로피리딜렌, 이미다조피리디닐렌, 이미다조티아졸릴렌, 인돌리지닐렌, 인돌릴렌, 인다졸릴렌, 이소벤조푸라닐렌, 이소벤조티에닐렌, 이소인돌릴렌, 이소퀴놀리닐렌, 이소티아졸릴렌, 나프티리디닐렌, 옥사졸로피리디닐렌, 프탈라지닐렌, 프테리디닐렌, 푸리닐렌, 피리도피리딜렌, 피롤로피리딜렌, 퀴놀리닐렌, 퀴놀리닐렌, 퀴녹살리닐렌, 퀴나졸리닐렌, 티아디아졸로피리미딜렌, 및 티에노피리딜렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 트리사이클릭 헤테로아릴렌 그룹의 예는 아크리디닐렌, 벤즈인돌릴렌, 카바졸릴렌, 디벤조푸라닐렌, 페리미디닐렌, 페난트롤리닐렌, 페난트리디닐렌, 페나르사지닐렌, 페나지닐렌, 페노티아지닐렌, 페녹사지닐렌, 및 크산테닐렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 헤테로아릴렌은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클릭"은 적어도 하나의 비-방향족 환을 함유하는 1가의 모노사이클릭 비-방향족 환 또는 1가의 폴리사이클릭 환 시스템을 말하며, 여기서 상기 비-방향족 환 원자 중 하나 이상은 헤테로원자이고, 이들 중 각각은 O, S, N, 및 P 중에서 독립적으로 선택되고; 환 원자의 나머지는 탄소 원자이다. 특정 구현예에서, 헤테로사이클릴 또는 헤테로사이클릭 그룹은 3 내지 20, 3 내지 15, 3 내지 10, 3 내지 8, 4 내지 7, 또는 5 내지 6개의 환 원자를 갖는다. 헤테로사이클릴 그룹은 이의 비-방향족 환을 통해 분자의 나머지에 결합된다. 특정 구현예에서, 헤테로사이클릴은 모노사이클릭, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 환 시스템이며, 이는 스피로일 수 있거나, 융합될 수 있거나, 브릿지될 수 있고, 여기서 질소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있으며, 일부 환은 부분적으로 또는 완전히 포화되거나, 방향족일 수 있다. 헤테로사이클릴은 안정한 화합물을 생성할 수 있는 어떠한 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 주요 구조에 부착될 수 있다. 헤테로사이클릭 그룹의 예는 아제피닐, 벤조디옥사닐, 벤조디옥솔릴, 벤조푸

라노닐, 벤조피라노닐, 벤조피라닐, 벤조테트라하이드로푸라닐, 벤조테트라하이드로티에닐, 벤조티오피라닐, 벤족사지닐, β -카르볼리닐, 크로마닐, 크로모닐, 신놀리닐, 코우마리닐, 데카하이드로이소퀴놀리닐, 디하이드로벤즈이소티아지닐, 디하이드로벤즈이속사지닐, 디하이드로푸릴, 디하이드로이소인돌릴, 디하이드로피라닐, 디하이드로피라졸릴, 디하이드로피라지닐, 디하이드로피리디닐, 디하이드로피리미디닐, 디하이드로피롤릴, 디옥솔라닐, 1,4-디티아닐, 푸라노닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 인돌리닐, 이소벤조테트라하이드로푸라닐, 이소벤조테트라하이드로티에닐, 이소크로마닐, 이소크로마닐, 이소코우마리닐, 이소인돌리닐, 이소티아졸리디닐, 이속사졸리디닐, 모르폴리닐, 옥타하이드로인돌릴, 옥타하이드로이소인돌릴, 옥사졸리디노닐, 옥사졸리디닐, 옥시라닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피롤리디닐, 피롤리닐, 퀴누클리디닐, 테트라하이드로푸릴, 테트라하이드로이소퀴놀리닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티에닐, 티아모르폴리닐, 티아졸리디닐, 테트라하이드로퀴놀리닐, 및 1,3,5-트리티아닐을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 헤테로사이클릴은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "헤테로사이클릴렌"은 적어도 하나의 비-방향족 환을 함유하는 2가의 모노사이클릭 비-방향족 환 시스템 또는 2가의 폴리사이클릭 환 시스템을 말하며, 여기서 상기 비-방향족 환 원자 중 하나 이상은 O, S, 및 N로부터 독립적으로 선택된 헤테로원자이고; 나머지 환 원자는 탄소 원자이다. 특정 구현예에서, 헤테로사이클릴렌 그룹은 3 내지 20, 3 내지 15, 3 내지 10, 3 내지 8, 4 내지 7, 또는 5 내지 6개의 환 원자를 갖는다. 특정 구현예에서, 헤테로사이클릴렌은 모노사이클릭, 비사이클릭, 트리사이클릭, 또는 테트라사이클릭 환 시스템이고, 이는 융합되거나 브릿지될 수 있으며, 여기서 질소 또는 황 원자는 임의로 산화될 수 있고, 질소 원자는 임의로 4급화될 수 있으며, 일부 환은 부분적으로 또는 완전히 포화될 수 있거나, 방향족일 수 있다. 헤테로사이클릴렌은 안정한 화합물을 생성하는 어떠한 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 주요 구조에 부착될 수 있다. 이러한 헤테로사이클릴렌 그룹의 예는 아제피리렌, 벤조디옥사닐렌, 벤조디옥솔릴렌, 벤조푸라노닐렌, 벤조피라노닐렌, 벤조피라닐렌, 벤조테트라하이드로푸라닐렌, 벤조테트라하이드로티에닐렌, 벤조티오피라닐렌, 벤족사지닐렌, β -카르볼리닐렌, 크로마닐렌, 크로모닐렌, 신놀리닐렌, 코우마리닐렌, 데카하이드로이소퀴놀리닐렌, 디하이드로벤즈이소티아지닐렌, 디하이드로벤즈이속사지닐렌, 디하이드로푸릴렌, 디하이드로이소인돌릴렌, 디하이드로피라닐렌, 디하이드로피라졸릴렌, 디하이드로피라지닐렌, 디하이드로피리디닐렌, 디하이드로피리미디닐렌, 디하이드로피롤릴렌, 디옥솔라닐렌, 1,4-디티아닐렌, 푸라노닐렌, 이미다졸리디닐렌, 이미다졸리닐렌, 인돌리닐렌, 이소벤조테트라하이드로푸라닐렌, 이소벤조테트라하이드로티에닐렌, 이소크로마닐렌, 이소코우마리닐렌, 이소인돌리닐렌, 이소티아졸리디닐렌, 이속사졸리디닐렌, 모르폴리닐렌, 옥타하이드로인돌릴렌, 옥타하이드로이소인돌릴렌, 옥사졸리디노닐렌, 옥사졸리디닐렌, 옥시라닐렌, 피페라지닐렌, 피페리디닐렌, 4-피페리도닐렌, 피라졸리디닐렌, 피라졸리닐렌, 피롤리디닐렌, 피롤리닐렌, 퀴누클리디닐렌, 테트라하이드로푸릴렌, 테트라하이드로이소퀴놀리닐렌, 테트라하이드로피라닐렌, 테트라하이드로티에닐렌, 티아모르폴리닐렌, 티아졸리디닐렌, 테트라하이드로퀴놀리닐렌, 및 1,3,5-트리티아닐렌을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 헤테로사이클릴렌은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "할로젠", "할라이드" 또는 "할로"는 불소, 염소, 브롬, 및/또는 요오드를 말한다.

용어 "할로알킬"은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 또는 3개의 할로 그룹으로 치환된 알킬 그룹을 말하며, 여기서 당해 알킬은 본원에 정의된 바와 같다. 할로알킬은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

용어 "알콕시"는 -O-알킬을 말하며, 여기서 알킬은 본원에 정의된 바와 같다.

용어 "할로알콕시"는 -O-할로알킬을 말하며, 여기서 할로알킬은 본원에 정의된 바와 같다.

용어 "임의 치환된"은 알킬, 알킬렌, 알케닐, 알케닐렌, 알키닐, 알키닐렌, 사이클로알킬, 사이클로알킬렌, 아릴, 아릴렌, 아르알킬(예컨대, 벤질), 헤테로아릴, 헤테로아릴렌, 헤테로사이클릴, 및 헤테로사이클릴렌 그룹과 같은 그룹 또는 치환체가 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있음을 의미하기 위한 의도이며, 이들 각각은 예컨대, (a) 옥소 (=O), 시아노 (-CN), 할로, 및 니트로 (-NO₂); (b) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 사이클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로사이클릴 (이들 각각은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 치환체 Q^a로 추가로 임의 치환된다) 및 (c) -C(O)R^a, -C(O)OR^a, -C(O)NR^bR^c, -C(NR^a)NR^bR^c, -OR^a, -OC(O)R^a, -OC(O)OR^a, -OC(O)NR^bR^c, -OC(=NR^a)NR^bR^c, -OS(O)R^a, -OS(O)₂R^a, -OS(O)NR^bR^c, -OS(O)₂NR^bR^c, -NR^bR^c, -NR^aC(O)R^d, -NR^aC(O)OR^d, -NR^aC(O)NR^bR^c, -NR^aC(=NR^d)NR^bR^c, -NR^aS(O)R^d, -NR^aS(O)₂R^d,

$-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{P}(\text{O})\text{R}^a\text{R}^d$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^a)\text{R}^d$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^a)(\text{OR}^d)$, $-\text{SR}^a$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^a$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^b\text{R}^c$, 및 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^b\text{R}^c$ (여기서, 각각의 R^a , R^b , R^c , 및 R^d 는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릴 (이들 각각은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 Q^a 로 임의 치환된다); 또는 (iii) 이들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴을 형성하는 R^b 및 R^c (이들 각각은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 Q^a 로 임의 치환된다)이다)로부터 독립적으로 선택된다. 본원에 사용된 것으로서, 치환될 수 있는 본원에 기술된 모든 그룹은 달리 규정하지 않는 한, "임의 치환된"다.

일 구현예에서, 각각의 치환체 Q^a 는 (a) 옥소, 시아노, 할로, 및 니트로; 및 (b) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로사이클릴; 및 (c) $-\text{C}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^e$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{C}(\text{NR}^e)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OR}^e$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^e$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OC}(=\text{NR}^e)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^e$, $-\text{OS}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{C}(\text{O})\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{C}(\text{O})\text{OR}^h$, $-\text{NR}^e\text{C}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{C}(=\text{NR}^h)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})_2\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{P}(\text{O})\text{R}^e\text{R}^h$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^e)\text{R}^h$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^e)(\text{OR}^h)$, $-\text{SR}^e$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}^e$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^e$, $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^f\text{R}^g$, 및 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^f\text{R}^g$ (여기서, 각각의 R^e , R^f , R^g , 및 R^h 는 독립적으로 (i) 수소, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릴; 또는 (ii) 이들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴을 형성하는 R^f 및 R^g 이다)로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

특정 구현예에서, "임의로 활성인" 및 "거울상 이성체적으로 활성인"은 약 50% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.5% 이상, 또는 약 99.8% 이상의 거울상 이성체성 과량을 갖는, 분자의 수집을 말한다. 특정 구현예에서, 화합물은 문제의 2개의 거울상 이성체의 총 중량을 기준으로 하여, 약 95% 이상의 바람직한 거울상 이성체 및 약 5% 이하의 거의 바람직하지 않은 거울상 이성체를 포함한다.

광학 활성 화합물을 기술하는데 있어서, 접두사 R 및 S는 이의 키랄 중심 (들)에 대하여 광학적으로 활성인 화합물의 절대 구조를 나타내는데 사용된다. (+) 및 (-)는 광학적으로 활성인 화합물의 광학 회전, 즉, 편광의 평면이 광학적으로 활성인 화합물에 의해 회전되는 방향을 나타내는데 사용된다. (-) 접두사는 광학적으로 활성인 화합물이 좌전성임을, 즉, 화합물이 편광의 편을 좌측으로 또는 반시계 방향으로 회전시킴을 나타낸다. (+) 접두사는 광학적으로 활성인 화합물이 우회전성임을, 즉, 화합물이 편광의 평면을 우측 또는 시계 방향으로 회전시킴을 나타낸다. 그러나, 광학 회전의 신호, (+) 및 (-)는 화합물의 절대적인 구조, R 및 S와 관련되지 않는다.

용어 "동위원소 변이체"는 이러한 화합물을 구성하는 원자 중 하나 이상에서 동위원소의 비천연 비율을 함유하는 화합물을 말한다. 특정 구현예에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 수소(^1H), 중수소(^2H), 삼중수소(^3H), 탄소-11(^{11}C), 탄소-12(^{12}C), 탄소-13(^{13}C), 탄소-14(^{14}C), 질소-13(^{13}N), 질소-14(^{14}N), 질소-15(^{15}N), 산소-14(^{14}O), 산소-15(^{15}O), 산소-16(^{16}O), 산소-17(^{17}O), 산소-18(^{18}O), 불소-17(^{17}F), 불소-18(^{18}F), 인-31(^{31}P), 인-32(^{32}P), 인-33(^{33}P), 황-32(^{32}S), 황-33(^{33}S), 황-34(^{34}S), 황-35(^{35}S), 황-36(^{36}S), 염소-35(^{35}Cl), 염소-36(^{36}Cl), 염소-37(^{37}Cl), 브롬-79(^{79}Br), 브롬-81(^{81}Br), 요오드-123(^{123}I), 요오드-125(^{125}I), 요오드-127(^{127}I), 요오드-129(^{129}I), 및 요오드-131(^{131}I)를 포함하나, 이에 한정되지 않는, 하나 이상 동위원소의 비천연 비율을 함유한다. 특정 구현예에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 안정한 형태, 즉, 비-방사활성이다. 특정 구현예에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 수소(^1H), 중수소(^2H), 탄소-12(^{12}C), 탄소-13(^{13}C), 질소-14(^{14}N), 질소-15(^{15}N), 산소-16(^{16}O), 산소-17(^{17}O), 산소-18(^{18}O), 불소-17(^{17}F), 인-31(^{31}P), 황-32(^{32}S), 황-33(^{33}S), 황-34(^{34}S), 황-36(^{36}S), 염소-35(^{35}Cl), 염소-37(^{37}Cl), 브롬-79(^{79}Br), 브롬-81(^{81}Br), 및 요오드-127(^{127}I)를 포함

하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 동위원소의 비천연 비율을 함유한다. 특정 구현예에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 불안정한 형태, 즉, 방사활성이다. 특정 구현예에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 삼중수소 (^3H), 탄소-11(^{11}C), 탄소-14(^{14}C), 질소-13(^{13}N), 산소-14(^{14}O), 산소-15(^{15}O), 불소-18(^{18}F), 인-32(^{32}P), 인-33(^{33}P), 황-35(^{35}S), 염소-36(^{36}Cl), 요오드-123(^{123}I), 요오드-125(^{125}I), 요오드-129(^{129}I), 및 요오드-131(^{131}I)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 동위원소의 비천연 비율을 함유한다. 본원에 제공된 화합물에서, 숙련가의 판단에 따라 실현가능한 경우, 어떠한 수소도 예를 들면, ^2H 일 수 있거나, 어떠한 탄소도 예를 들면, ^{13}C 일 수 있거나, 어떠한 질소도 예를 들면, ^{15}N 일 수 있거나, 어떠한 산소도 예를 들면, ^{18}O 일 수 있다. 특정 구현예에서, 화합물의 "동위원소 변이체"는 비천연 비율의 중수소 (D)를 함유한다.

용어 "용매화물"은 화학량론적 양 또는 비-화학량론적 양으로 존재하는, 용질, 예컨대, 본원에 제공된 화합물의 하나 이상의 분자, 및 용매의 하나 이상의 분자에 의해 형성된 복합체 또는 응집체를 말한다. 적합한 용매는 물, 메탄올, 에탄올, *n*-프로판올, 이소프로판올, 및 아세트산을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 용매는 약제학적으로 허용된다. 일 구현예에서, 복합체 또는 응집체는 결정성 형태로 존재한다. 다른 구현예에서, 복합체 또는 응집체는 비결정성 형태로 존재한다. 용매가 물인 경우, 용매화물은 수화물이다. 수화물의 예는 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 사수화물, 및 오수화물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

어구 "거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물(prodrug)은 어구 "(i) 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 본원에 언급된 화합물의 동위원소 변이체; (ii) 본원에 언급된 화합물의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물 또는 전구약물; 또는 (iii) 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 본원에 언급된 화합물의 동위원소 변이체의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물과 동일한 의미를 갖는다.

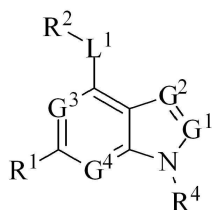
5.3.2. 줄기 세포 동원 화합물

일 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 예컨대, 아릴 탄화수소 수용체 길항제이다.

다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 이들 각각의 개시내용의 전문이 본원에 참고로 포함된, 미국 특허원 공보 제2010/0183564호, 제2014/0023626호, 및 제2014/0114070호에 기술된 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 5,6-융합된 헤테로아릴 화합물이다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 I의 화합물 또는 이의 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

G^1 은 N 및 CR^3 이고;

G^2 , G^3 , 및 G^4 는 서로 독립적으로 CH 및 N이며; 단 G^3 및 G^4 중 적어도 하나는 N이고, G^1 및 G^2 중 적어도 하나는 N이 아니며;

L^1 은 $-\text{NR}^{1a}-$, $-\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_{1-3}-$, $-\text{NR}^{1a}\text{CH}(\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_2\text{NR}^{1c}-$, $-\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_2\text{S}-$, $-\text{NR}^{1a}\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$, $-\text{NR}^{1a}\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-$, 또는 $-\text{NR}^{1a}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$ 이고;

R^1 은 (i) 수소; 또는 (ii) 페닐, 푸라닐, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티에닐, 티아졸릴, 피리디닐, 피리미디닐, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 이미다조피리디닐, 또는 벤조티에닐이고, 이들 각각은 1개, 2개, 또는 3개의 치환체로 임의 치환되고, 여기서 각각의 치환체는 독립적으로 시아노, 할로, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{1-4} 할로알킬, C_{1-4} 할로알콕시, 하이드록실, 아미노, $-C(O)R^{1a}$, $-C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1a,1b}$, $-SR^{1a}$, $-S(O)R^{1a}$, 또는 $-S(O)_2R^{1a}$ 이며;

R^2 는 (i) $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$, $-NR^{1c}C(O)NR^{1a,1b}$, 또는 $-S(O)_2NR^{1a,1b}$; 또는 (ii) 페닐, 피롤로피리딘-3-일, 인돌릴, 티에닐, 피리디닐, 1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 피라졸릴, 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조이미다졸릴, 또는 인다졸릴이고, 이들 각각은 1개, 2개, 또는 3개의 치환체로 임의 치환되며, 여기서 각각의 치환체는 독립적으로 하이드록실, 할로, 메틸, 메톡시, 아미노, $-O(CH_2)_{1-3}NR^{1a,1b}$, $-OS(O)_2NR^{1a,1b}$, $-NR^{1a}S(O)_2R^{1b}$, 또는 $-S(O)_2NR^{1a,1b}$ 이고;

R^3 은 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 비페닐이며; 단 R^1 및 R^3 중 적어도 하나는 수소가 아니고;

R^4 는 C_{1-10} 알킬, 프로프-1-엔-2-일, 사이클로헥실, 사이클로프로필, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 벤즈하이드릴, 테트라하이드로-2H-피란-3-일, 테트라하이드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라하이드로푸란-3-일, 벤질, (4-펜틸페닐)(페닐)메틸, 또는 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸이며, 이들 각각은 1개, 2개, 또는 3개의 치환체로 임의 치환되며, 여기서 각각의 치환체는 독립적으로 하이드록실, C_{1-4} 알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬이고;

각각의 R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬이거나; R^{1a} 및 R^{1b} 는 이들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로사이클릴을 형성한다.

일 구현예에서, 화학식 I에서, G^1 은 CR^3 이고, 일 구현예에서, CH이며; G^2 , G^3 , 및 G^4 는 각각 N이고; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , 및 L^1 은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

다른 구현예에서, 화학식 I에서, G^1 , G^3 , 및 G^4 는 각각 N이고; G^2 는 CH이며; R^1 , R^2 , R^4 , 및 L^1 은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 화학식 I에서, G^1 은 CR^3 이고, 일 구현예에서, CH이며; G^2 및 G^3 는 각각 N이고; G^4 는 CH이며; 및 R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , 및 L^1 은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 화학식 I에서, G^1 은 CR^3 이고, 일 구현예에서, CH이며; G^2 및 G^4 는 각각 N이고; G^3 는 CH이며; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , 및 L^1 은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 화학식 I에서, G^1 은 CR^3 이고, 일 구현예에서, CH이며; G^2 는 CH이고; G^3 및 G^4 는 각각 N이며; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , 및 L^1 은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 구현예에서, 화학식 I에서,

G^1 은 CH이고;

G^2 , G^3 , 및 G^4 는 각각 N이며;

R^1 은 1개, 2개, 또는 3개의 치환체로 임의 치환된 벤조티에닐이고, 치환체 각각은 독립적으로 시아노, 할로, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{1-4} 할로알킬, C_{1-4} 할로알콕시, 하이드록실, 아미노, $-C(O)R^{1a}$, $-C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1a,1b}$,

$-\text{SR}^{1a}$, $-\text{S(O)}\text{R}^{1a}$, 또는 $-\text{S(O)}_2\text{R}^{1a}$ 이며;

R^2 는 페닐, 1개, 2개, 또는 3개의 치환체로 임의 치환되며, 치환체 각각은 독립적으로 하이드록실, 할로, 메틸, 메톡시, 아미노, $-\text{O}(\text{CH}_2)_{1-3}\text{NR}^{1a}\text{R}^{1b}$, $-\text{OS(O)}_2\text{NR}^{1a}\text{R}^{1b}$, $-\text{NR}^{1a}\text{S(O)}_2\text{R}^{1b}$, 또는 $-\text{S(O)}_2\text{NR}^{1a}\text{R}^{1b}$ 이고;

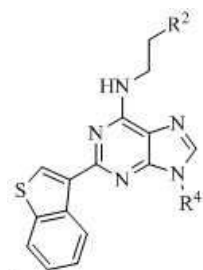
R^4 는 1개, 2개, 또는 3개의 치환체로 임의 치환된 C_{1-10} 알킬이며, 치환체 각각은 독립적으로 하이드록실, C_{1-4} 알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬이고;

L^1 은 $-\text{NR}^{1a}(\text{CH}_2)_2-$ 이며;

R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 II의 화합물 또는 이의 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[화학식 II]

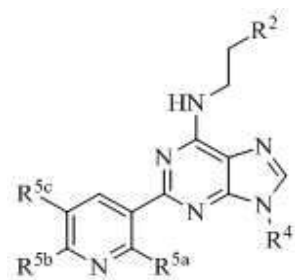


상기 화학식 II에서,

R^2 및 R^4 는 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 III의 화합물 또는 이의 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[화학식 III]

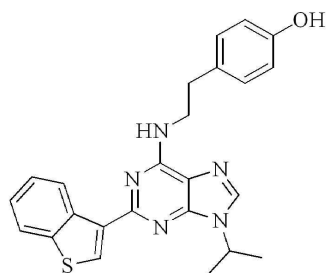


상기 화학식 III에서,

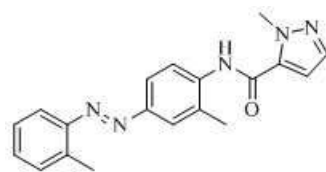
R^2 및 R^4 는 각각 본원에 정의된 바와 같고;

R^{5a} , R^{5b} , 및 R^{5c} 는 각각 독립적으로 수소, 시아노, 메틸, 할로, 트리플루오로메틸, 또는 $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ 이다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 4-(2-(2-(벤조[b]티엔-3-일)-9-이소프로필-9H-푸린-6-일아미노)에틸)페놀이다. 특정 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 다음 화학식의 스템레게닌-1(SR-1)이다:



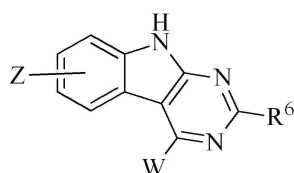
여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 1-메틸-*N*-(2-메틸-4-(2-(2-메틸페닐)디아제닐)페닐)-1*H*-피라졸-5-카복사미드이다. 특정 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 CH223191이고, 이는 다음 구조를 갖는다:



여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 피리도 (4,5-*b*)인돌이다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 IV의 화합물, 또는 이의 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[화학식 IV]



상기 화학식 IV에서,

Z는 시아노, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 사이클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 벤질, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, -L- C₆₋₁₄ 아릴, -L-헤테로아릴, -L-헤테로사이클릴, -C(O)R^{1a}, -C(O)OR^{1a}, -C(O)NHR^{1a}, -C(O)N(R^{1a})R^{1b}, -P(O)(OR^{1a})(OR^{1c}), -SR^{1a}, -S(O)R^{1a}, -S(O)₂R^{1a}, -S(O)₂NH₂, -S(O)₂NHR^{1a}, 또는 -S(O)₂N(R^{1a})R^{1b}이고;

W는 수소, 할로, 시아노, C₆₋₁₄ 아릴, 벤질, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, -L-C₆₋₁₄ 아릴, -L-헤테로아릴, -L-헤테로사이클릴, -L-OH, -L-OR^{1a}, -L-NH₂, -L-NHR^{1a}, -L-N(R^{1a})R^{1b}, -L-SR^{1a}, -L-S(O)R^{1a}, -L-S(O)₂R^{1a}, -L-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c}), -L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, -L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄ 아릴, -L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로아릴, -L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로사이클릴, -O-L-N(R^{1a})R^{1b}, -O-L-C₆₋₁₄ 아릴, -O-L-헤테로아릴, -O-L-헤테로사이클릴, -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄ 아릴, -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로아릴, -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로사이클릴, -S-L-N(R^{1a})R^{1b}, -S-L-C₆₋₁₄ 아릴, -S-L-헤테로아릴, -S-L-헤테로사이클릴, -S-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, -S-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄ 아릴, -S-L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로아릴, -S-L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로사이클릴, -(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}, -(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄ 아릴, -(N(R^{1c})-L)_n-헤테로아릴, -(N(R^{1c})-L)_n-헤테로사이클릴, -C(O)R^{1a}, -C(O)OR^{1a}, -C(O)NH₂, -C(O)NHR^{1a}, -C(O)N(R^{1a})R^{1b}, -NHR^{1a}, -N(R^{1a})R^{1b}, -NHC(O)R^{1a}, -NR^{1a}C(O)R^{1c}, -NHC(O)OR^{1a}, -NR^{1a}C(O)OR^{1c},

$-\text{NHC(O)NH}_2$, $-\text{NHC(O)NHR}^{1a}$, $-\text{NHC(O)N(R}^{1a})\text{R}^{1b}$, $-\text{NR}^{1a}\text{C(O)NH}_2$, $-\text{NR}^{1c}\text{C(O)NHR}^{1a}$, $-\text{NR}^{1c}\text{C(O)N(R}^{1a})\text{R}^{1b}$, $-\text{NHS(O)}_2\text{R}^{1a}$, $-\text{NR}^{1c}\text{S(O)}_2\text{R}^{1a}$, $-\text{OR}^{1a}$, $-\text{OC(O)R}^{1a}$, $-\text{OC(O)OR}^{1a}$, $-\text{OC(O)NH}_2$, $-\text{OC(O)NHR}^{1a}$, $-\text{OC(O)N(R}^{1a})\text{R}^{1b}$, $-\text{OS(O)}_2\text{R}^{1a}$, $-\text{P(O)(OR}^{1a})(\text{OR}^{1c})$, $-\text{SR}^{1a}$, $-\text{S(O)R}^{1a}$, $-\text{S(O)}_2\text{R}^{1a}$, $-\text{S(O)}_2\text{NH}_2$, $-\text{S(O)}_2\text{NHR}^{1a}$, $-\text{S(O)}_2\text{N(R}^{1a})\text{R}^{1b}$, 또는 $-\text{S(O)}_2\text{OR}^{1a}$ 이며;

각각의 L은 독립적으로 C_{1-6} 알킬렌, C_{2-6} 알케닐렌, C_{2-6} 알키닐렌, C_{3-7} 사이클로알킬렌, C_{6-14} 아릴렌, 헤테로아릴렌, 헤테로사이클릴렌, C_{1-6} 알킬렌- C_{3-7} 사이클로알킬렌, 또는 C_{1-6} 알킬렌-헤테로사이클릴렌이고;

R^6 은 수소, C_{1-6} 알킬, C_{6-14} 아릴, 벤질, 헤테로아릴, $-\text{C(O)R}^{1a}$, $-\text{SR}^{1a}$, $-\text{S(O)R}^{1a}$, $-\text{S(O)}_2\text{R}^{1a}$, $-\text{L-C}_{6-14}$ 아릴, $-\text{L-헤테로아릴}$, 또는 $-\text{L-헤테로사이클릴}$ 이며;

각각의 n은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 또는 5의 정수이고;

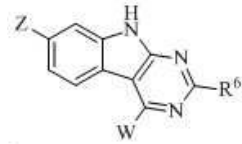
각각의 R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릴; 또는 (iii) 이들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로사이클릴을 형성하는 R^{1a} 및 R^{1b} 이고;

여기서 각각의 알킬, 알킬렌, 알케닐, 알케닐렌, 알키닐, 알키닐렌, 사이클로알킬, 사이클로알킬렌, 아릴, 벤질, 아릴렌, 헤테로아릴, 헤테로아릴렌, 헤테로사이클릴, 및 헤테로사이클릴렌은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 Q로 임의 치환되고, 여기서 각각의 치환체 Q는 (a) 옥소, 시아노, 할로, 및 니트로; (b) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로사이클릴(이들 각각은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 Q^a 로 추가로 임의 치환된다) 및 (c) $-\text{C(O)R}^a$, $-\text{C(O)OR}^a$, $-\text{C(O)NR}^b\text{R}^c$, $-\text{C(NR}^a)\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{OR}^a$, $-\text{OC(O)R}^a$, $-\text{OC(O)OR}^a$, $-\text{OC(O)NR}^b\text{R}^c$, $-\text{OC(=NR}^a)\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{OS(O)R}^a$, $-\text{OS(O)}_2\text{R}^a$, $-\text{OS(O)NR}^b\text{R}^c$, $-\text{OS(O)}_2\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{C(O)R}^d$, $-\text{NR}^a\text{C(O)OR}^d$, $-\text{NR}^a\text{C(O)NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{C(=NR}^d)\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{S(O)R}^d$, $-\text{NR}^a\text{S(O)}_2\text{R}^d$, $-\text{NR}^a\text{S(O)NR}^b\text{R}^c$, $-\text{NR}^a\text{S(O)}_2\text{NR}^b\text{R}^c$, $-\text{SR}^a$, $-\text{S(O)R}^a$, $-\text{S(O)}_2\text{R}^a$, $-\text{S(O)NR}^b\text{R}^c$, 및 $-\text{S(O)}_2\text{NR}^b\text{R}^c$ (여기서, 각각의 R^a , R^b , R^c , 및 R^d 는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릴(이들 각각은 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 Q^a 로 추가로 임의 치환된다) 또는 (iii) 이들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로사이클릴(이는 하나 이상, 일 구현예에서, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 치환체 Q^a 로 임의 치환된다)을 형성하는 R^b 및 R^c 이다)로부터 독립적으로 선택되고;

여기서 각각의 Q^a 는 (a) 옥소, 시아노, 할로, 및 니트로; (b) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로사이클릴; 및 (c) $-\text{C(O)R}^e$, $-\text{C(O)OR}^e$, $-\text{C(O)NR}^f\text{R}^g$, $-\text{C(NR}^e)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OR}^e$, $-\text{OC(O)R}^e$, $-\text{OC(O)OR}^e$, $-\text{OC(O)NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OC(=NR}^e)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OS(O)R}^e$, $-\text{OS(O)}_2\text{R}^e$, $-\text{OS(O)NR}^f\text{R}^g$, $-\text{OS(O)}_2\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{C(O)R}^h$, $-\text{NR}^e\text{C(O)OR}^h$, $-\text{NR}^e\text{C(O)NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{C(=NR}^h)\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{S(O)R}^h$, $-\text{NR}^e\text{S(O)}_2\text{R}^h$, $-\text{NR}^e\text{S(O)NR}^f\text{R}^g$, $-\text{NR}^e\text{S(O)}_2\text{NR}^f\text{R}^g$, $-\text{SR}^e$, $-\text{S(O)R}^e$, $-\text{S(O)}_2\text{R}^e$, $-\text{S(O)NR}^f\text{R}^g$, 및 $-\text{S(O)}_2\text{NR}^f\text{R}^g$ (여기서, 각각의 R^e , R^f , R^g , 및 R^h 는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-10} 사이클로알킬, C_{6-14} 아릴, C_{7-15} 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릴; 또는 (iii) 이들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로사이클릴을 형성하는 R^f 및 R^g 이다)로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 V의 화합물, 또는 이의 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[화학식 V]



상기 화학식 V에서,

R^6 , W, 및 Z 각각 본원에 정의된 바와 같다.

일 구현예에서, 화학식 IV 또는 화학식 V에서,

Z는 시아노, 헤테로아릴, 또는 $-C(O)OR^{1a}$ 이고;

W는 헤테로사이클릴, $-L$ -헤테로사이클릴, $-O-L$ -헤테로사이클릴, $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, $-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로사이클릴, $-NHR^{1a}$, 또는 $-N(R^{1a})R^{1b}$ 이며;

각각의 L은 독립적으로 C_{1-6} 알킬렌 또는 C_{3-7} 사이클로알킬렌이고;

R^6 은 수소, C_{1-6} 알킬, 벤질, $-C(O)R^{1a}$, $-L-C_{6-14}$ 아릴, 또는 $-L$ -헤테로아릴이며;

각각의 n은 독립적으로 1의 정수이고;

R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같으며;

여기서 각각의 알킬, 알킬렌, 사이클로알킬렌, 아릴, 벤질, 헤테로아릴, 및 헤테로사이클릴은 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다.

다른 구현예에서, 화학식 IV 또는 화학식 V에서,

Z는 시아노, 5-원 헤테로아릴, 또는 $-C(O)O-C_{1-6}$ 알킬이고;

W는 헤테로사이클릴, $-L$ -헤테로사이클릴, $-O-L$ -헤테로사이클릴, $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, $-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로사이클릴, $-NHR^{1a}$, 또는 $-N(R^{1a})R^{1b}$ 이며;

각각의 L은 독립적으로 C_{1-6} 알킬렌 또는 C_{3-7} 사이클로알킬렌이고;

R^6 은 수소, 메틸, 벤질, $-L-C_{6-14}$ 아릴, 또는 $-L$ -헤테로아릴이며;

각각의 n은 독립적으로 1의 정수이고;

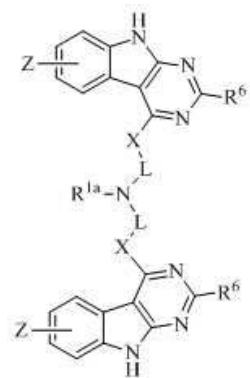
R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 각각 본원에 정의된 바와 같으며;

여기서 각각의 알킬렌, 사이클로알킬렌, 아릴, 벤질, 헤테로아릴, 및 헤테로사이클릴은 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 치환체로 임의 치환된다.

일 구현예에서, 화학식 IV 또는 화학식 V에서, W는 $-L-N(R^{1a})R^{1b}$, $-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, $-O-L-N(R^{1a})R^{1b}$, $-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, $-S-L-N(R^{1a})R^{1b}$, $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, 또는 $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고; R^6 , R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , L, 및 Z 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 VI의 화합물 또는 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다.

[화학식 VI]



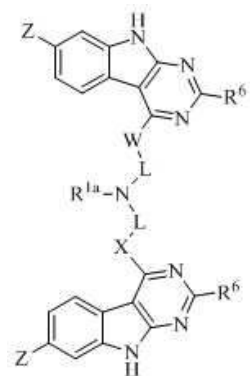
상기 화학식 VI에서,

X는 결합, O, S, 또는 NR^{1c} 이고;

R^{1a} , R^{1c} , R^6 , L, 및 Z 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 화학식 VII의 화합물 또는 이의 거울상 이성체, 거울상 이성체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체이성체의 혼합물, 또는 이의 동위원소 변이체; 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

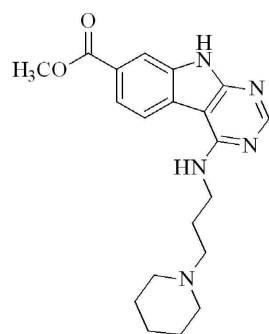
[화학식 VII]



상기 화학식 VII에서,

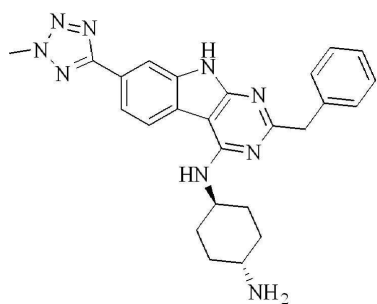
R^{1a} , R^6 , L, X, 및 Z 각각 본원에 정의된 바와 같다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 다음 구조를 갖는 화합물이다:



(UM729).

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 다음 구조를 갖는 화합물이다:



(UM171).

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 레스베라트롤, 테트라에틸렌펜타민(TEPA), 알파 나프토폴라본, 3'-메톡시-4'-니트로플라본, 3,4-디메톡시플라본, 4',5,7-트리하이드록시플라본 (아피게닌), 6-메틸-1,3,8-트리클로로디벤조푸란, 에피갈로카테킨, 또는 에피갈로카테킨갈레이트이다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 레스베라트롤이다. 특정 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 (Z)-레스베라트롤이다. 특정 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 (E)-레스베라트롤이다.

여전히 다른 구현예에서, 줄기 세포 동원 화합물은 테트라에틸렌펜타민(TEPA)이다.

본원에 기술된 화합물 모두는 상업적으로 이용가능하거나 본원에 개시된 특허 또는 특허 공보에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 광학적으로 순수한 화합물이 비대칭적으로 합성되거나 공지된 분할제 또는 키랄 컬럼 및 다른 표준 합성 유기 화학 기술을 사용하여 분할될 수 있다. 줄기 세포 동원 화합물, 이들의 제조, 및 용도에 대한 추가의 정보는 예를 들면, 미국 특허원 공보 제2010/0183564호, 제2014/0023626호, 및 제2014/0114070호; 및 Kim *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **2006**, 69, 1871-1878에서 찾을 수 있으며, 이들 각각의 개시내용은, 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

본원에 제공된 화학식, 예컨대, 화학식 I 내지 화학식 VII에서 그룹 또는 변수, G^1 , G^2 , G^3 , G^4 , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^{5a} , R^{5b} , R^{5c} , R^6 , X, L, L^1 , X, W, Z, 및 n은 본원에 기술된 구현예에 추가로 정의된다. 이러한 그룹 및/또는 변수에 대해 본원에 제공된 구현예의 모든 조합은 본 개시내용의 영역내에 있다.

특정 구현예에서, G^1 은 N이다. 특정 구현예에서, G^1 은 CR^3 이고, 여기서 R^3 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, G^1 은 CH이다.

특정 구현예에서, G^2 은 N이다. 특정 구현예에서, G^2 은 CH이다.

특정 구현예에서, G^3 은 N이다. 특정 구현예에서, G^3 은 CH이다.

특정 구현예에서, G^4 은 N이다. 특정 구현예에서, G^4 은 CH이다.

특정 구현예에서, R^1 은 수소이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 페닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 푸라닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피롤릴이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 이미다졸릴이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피라졸릴이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 티에닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 티아졸릴이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피리디닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피리미디닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피롤리디닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피라지닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 피리다지닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 벤조이미다졸릴이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 이소퀴놀리닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에 기술된 바와 같이 임의의 치환된 이미다조피리디닐이다. 특정 구현예에서, R^1 은 본원에

기술된 바와 같이 임의 치환된 벤조티에닐이다.

특정 구현예에서, R^2 는 $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^2 는 $-NR^{1c}C(O)NR^{1a}R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^2 는 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 페닐이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 피롤로피리딘-3-일이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 인돌릴이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 티에닐이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 피리디닐이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 1,2,4-트리아졸릴이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 2-옥소이미다졸리디닐이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 피라졸릴이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 2-옥소-2,3-디하이드로-1H-벤조이미다졸릴이다. 특정 구현예에서, R^2 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 인다졸릴이다.

특정 구현예에서, R^3 은 수소이다. 특정 구현예에서, R^3 은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{1-4} 알킬이다. 특정 구현예에서, R^3 은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 비페닐이다.

특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 C_{1-10} 알킬이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 프로프-1-엔-2-일이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 사이클로헥실이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 사이클로프로필이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 옥세탄-3-일이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 벤즈하이드릴이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 테트라하이드로-2H-피란-3-일이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 테트라하이드로-2H-피란-4-일이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 페닐이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 테트라하이드로푸란-3-일이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 벤질이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 (4-펜틸페닐)(페닐)메틸이다. 특정 구현예에서, R^4 는 본원에 기술된 바와 같이 임의 치환된 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸이다.

특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}(CH_2)_{1-3}-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}CH(C(O)OCH_3)CH_2-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}(CH_2)_2NR^{1c}-$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}(CH_2)_2S-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}CH_2CH(OH)-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, L^1 은 $-NR^{1a}CH(CH_3)CH_2-$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, R^{5a} 는 수소이다. 특정 구현예에서, R^{5a} 는 시아노이다. 특정 구현예에서, R^{5a} 는 메틸이다. 특정

구현예에서, R^{5a} 는 할로이다. 특정 구현예에서, R^{5a} 는 플루오로, 클로로, 또는 브로모이다. 특정 구현예에서, R^{5a} 는 트리플루오로메틸이다. 특정 구현예에서, R^{5a} 는 $-SO_2CH_3$ 이다.

특정 구현예에서, R^{5b} 는 수소이다. 특정 구현예에서, R^{5b} 는 시아노이다. 특정 구현예에서, R^{5b} 는 메틸이다. 특정 구현예에서, R^{5b} 는 할로이다. 특정 구현예에서, R^{5b} 는 플루오로, 클로로, 또는 브로모이다. 특정 구현예에서, R^{5b} 는 트리플루오로메틸이다. 특정 구현예에서, R^{5b} 는 $-SO_2CH_3$ 이다.

특정 구현예에서, R^{5c} 는 수소이다. 특정 구현예에서, R^{5c} 는 시아노이다. 특정 구현예에서, R^{5c} 는 메틸이다. 특정 구현예에서, R^{5c} 는 할로이다. 특정 구현예에서, R^{5c} 는 플루오로, 클로로, 또는 브로모이다. 특정 구현예에서, R^{5c} 는 트리플루오로메틸이다. 특정 구현예에서, R^{5c} 는 $-SO_2CH_3$ 이다.

특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{1-6} 알킬렌이다. 특정 구현예에서, L은 각각의 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 에틸렌, 프로필렌, 또는 부틸렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{2-6} 알케닐렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{2-6} 알킬닐렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{3-7} 사이클로알킬렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 사이클로헥실렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{6-14} 아릴렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로아릴렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로사이클릴렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{1-6} 알킬렌- C_{3-7} 사이클로알킬렌이다. 특정 구현예에서, L은 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{1-6} 알킬렌-헤테로사이클릴렌이다.

특정 구현예에서, R^6 는 수소이다. 특정 구현예에서, R^6 는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 특정 구현예에서, R^6 는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 메틸이다. 특정 구현예에서, R^6 는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{6-14} 아릴이다. 특정 구현예에서, R^6 는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 벤질이다. 특정 구현예에서, R^6 는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로아릴이다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-C(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-SR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-S(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-L-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-L$ -헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, R^6 는 $-L$ -헤테로사이클릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 수소이다. 특정 구현예에서, W는 할로이다. 특정 구현예에서, W는 시아노이다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{6-14} 아릴이다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 벤질이다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로아릴이다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로사이클릴이다.

특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-L-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-L$ -헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-L$ -헤테로사이클릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현

예에서, W는 -L-OH이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 -L-OR^{1a}이고, 여기서 R^{1a} 및 L는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 -L-NH₂이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-L-NH R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 L 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-L-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-L-SR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-L-S(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-L-S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-L-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1c} , 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , L 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-L-(N(R^{1c})-L)_n-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-L-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-L-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로사이클릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-O-L-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-O-L-C_{6-14}$ 아틸이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-O-L$ -헤테로아틸이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-O-L$ -헤테로사이클틸이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-C_6H_4$ 아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-$ 헤테로아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-O-L-(N(R^{1c})-L)_n-$ 헤테로사이클릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-S-L-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , 및 L은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-S-L-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-S-L-$ 헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-S-L-$ 헤테로사이클릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-C_6H_4$ 아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로사이클릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-(N(R^{1c})-L)_n-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 $-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로사이클릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, W는 $-C(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-C(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-C(O)NH_2$ 이다. 특정 구현예에서, W는 $-C(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NHR^{1a}$ 이고 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NHC(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NHC(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NR^{1a}C(O)OR^{1c}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NHC(O)NH_2$ 이다. 특정 구현예에서, W는 $-NHC(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NHC(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NR^{1a}C(O)NH_2$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NR^{1c}C(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NR^{1c}C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NHS(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-NR^{1c}S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-OC(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-OC(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-OC(O)NH_2$ 이다. 특정 구현예에서, W는 $-OC(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-OC(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-OS(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-SR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-S(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-S(O)_2NH_2$ 이다. 특정 구현예에서, W는 $-S(O)_2NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-S(O)_2N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, W는 $-S(O)_2OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 는 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, Z는 시아노이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{2-6} 알케닐이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C_{2-6} 알키

닐이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C₃₋₁₀ 사이클로알킬이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C₆₋₁₄ 아릴이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 C₇₋₁₅ 아르알킬이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 벤질이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로아릴이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 5-원 헤테로아릴이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 테트라졸릴이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 1,2,4-옥사디아졸릴이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 헤테로사이클릴이다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 -L- C₆₋₁₄ 아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 -L-헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된 -L-헤테로사이클릴이고, 여기서 L은 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, Z는 -C(O)R^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -C(O)OR^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -C(O)OC₁₋₆ 알킬이고, 여기서 당해 알킬은 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 임의 치환된다. 특정 구현예에서, Z는 -C(O)OCH₃이다. 특정 구현예에서, Z는 -C(O)NHR^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -C(O)N(R^{1a})R^{1b}이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c}는 각각 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -SR^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -S(O)R^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -S(O)₂R^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -S(O)₂NH₂이다. 특정 구현예에서, Z는 -S(O)₂NHR^{1a}이고, 여기서 R^{1a}는 본원에 정의된 바와 같다. 특정 구현예에서, Z는 -S(O)₂N(R^{1a})R^{1b}이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, X는 결합이다. 특정 구현예에서, X는 O이다. 특정 구현예에서, X는 S이다. 특정 구현예에서, X는 NR^{1c}이고, 여기서 R^{1c}는 본원에 정의된 바와 같다.

특정 구현예에서, n은 1이다. 특정 구현예에서, n은 2이다. 특정 구현예에서, n은 3이다. 특정 구현예에서, n은 4이다. 특정 구현예에서, n은 5이다.

특정 구현예에서, 본원에 제공된 화합물은 AHR의 길항제로서의 활성을 나타낸다.

본원에 제공된 화합물은 단일의 거울상 이성체 또는 단일의 부분입체이성체와 같은 거울상 이성체적으로 순수할 수 있거나, 거울상 이성체의 혼합물, 예컨대, 2개의 거울상 이성체의 라세미 혼합물; 또는 2개 이상의 부분입체 이성체의 혼합물일 수 있다. 이와 같이, 당해 분야의 통상의 기술자는 이의 (R) 형태의 화합물의 투여가 생체내 (In vivo)에서 에피머화를 겪는 화합물로 인하여, 이의 (S) 형태의 화합물의 투여와 동일함을 인식할 것이다. 개인 거울상 이성체의 제조/분리를 위한 통상의 기술은 적합한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 합성, 아키랄 (achiral) 출발 물질로부터의 비대칭 합성, 또는 거울상 이성체성 혼합물의 분해, 예를 들면, 키랄성 크로마토그래피, 재결정화, 분해, 부분입체이성체성 염 형성, 또는 부분입체이성체성 부가물로의 유도체화에 이은 분리를 포함한다.

5.4. NK 세포의 분리

천연 킬러 세포를 분리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 천연 킬러 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, NK 세포는 예를 들면, 일 구현예에서, CD56 및 CD3에 대한 항체를 사용하여, 세포를 염색하고, CD56⁺CD3⁻ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축될 수 있다. 특정 구현예에서, NK 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 총 세포와 비교하여

CD56⁺CD3⁻ 세포에 대해 농축된다. NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 시판되는 키트, 예를 들면, NK 세포 분리 키트(Miltenyi Biotec)를 사용하여 분리할 수 있다. NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포를 포함하는 세포의 집단 중 NK 세포 이외의 다른 세포를 제거함으로써 분리하거나 농축할 수 있다. 예를 들면, NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 예컨대, CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR 및/또는 CD235a (글리코포린 A) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하여, 비-NK 세포 마커를 나타내는 세포를 고갈시켜 분리하거나 농축시킬 수 있다. 음성 분리는 상업적으로 이용 가능한 키트, 예컨대, NK 세포 음성 분리 키트(Dynal Biotech)를 사용하여 수행할 수 있다. 이들 방법에 의해 분리된 세포를 추가로 분류하여, 예컨대, CD11a⁺ 및 CD11a⁻ 세포, 및/또는 CD117⁺ 및 CD117⁻ 세포, 및/또는 CD16⁺ 및 CD16⁻ 세포, 및/또는 CD94⁺ 및 CD94⁻를 분리할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법으로 생산된 세포를 분류하여 CD11a⁺ 및 CD11a⁻ 세포를 분리할 수 있다. 구체적인 구현예에서, CD11a⁺ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 전체 세포와 비교하여 CD11a⁻ 세포에 대해 농축된다. 특정 구현예에서, 세포를 분류하여 CD117⁺ 및 CD117⁻ 세포를 분리한다. 구체적인 구현예에서, CD117⁺ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD117⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 구현예에서, CD117⁻ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD117⁻ 세포에 대해 농축된다. 특정 구현예에서, 세포를 분류하여 CD16⁺ 및 CD16⁻ 세포를 분류한다. 구체적인 구현예에서, CD16⁺ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD16⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 구현예에서, CD16⁻ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD16⁻ 세포에 대해 농축된다. 특정 구현예에서, 세포를 분류하여 CD94⁺ 및 CD94⁻ 세포를 분류한다. 구체적인 구현예에서, CD94⁺ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD94⁺ 세포에 대해 농축된다. 구체적인 구현예에서, CD94⁻ 세포가 분리된다. 특정 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD94⁻ 세포에 대해 농축된다. 특정 구현예에서, 분리는 자기 분리를 사용하여 수행된다. 특정 구현예에서, 분리는 유동 세포분석법을 사용하여 수행된다.

ILC3 세포를 분리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, ILC3 세포는 세포, 일 구현예에서, CD56, CD3, 및 CD11a에 대한 항체를 사용하여 세포를 염색하고 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻ 세포에 대해 선택함으로써 분리하거나 농축시킬 수 있다. ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포를 포함하는 세포의 집단 중 ILC3 세포 이외의 세포를 제거함으로써 분리할 수 있거나 농축할 수 있다. 예를 들면, ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 예컨대, CD3, CD4, CD11a, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD94, CD123, HLA DR 및/또는 CD235a (글리코포린 A) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하여 비-ILC3 세포 마커를 나타내는 세포를 고갈시킴으로써 분리할 수 있거나 농축시킬 수 있다. 이들 방법에 의해 분리된 세포는 추가로 분류하여, 예컨대, CD117⁺ 및 CD117⁻ 세포를 분리할 수 있다. NK 세포는 일 구현예에서, CD56, CD3, CD94, 및 CD11a에 대한 항체를 사용하여 세포를 염색하고, CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺ 세포에 대해 선택함으로써 분리시키거나 농축시킬 수 있다. NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포는 또한, NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 세포를 포함하는 세포의 집단 중 NK 세포 이외의 세포를 제거함으로써 분리하거나 농축시킬 수 있다. 특정 구현예에서, NK 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD56⁺CD3⁻CD94⁺CD11a⁺ 세포에 대해 농축된다.

일 구현예에서, ILC3 세포는 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 특정 구현예에서, ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻에 대해 농축된다. 일 구현예에서, ILC3 세포는 CD56⁺CD3⁻CD11a⁻CD117⁺ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 특정 구현

예에서, ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117^{+}$ 세포에 대해 농축된다. 일 구현예에서, ILC3 세포는 $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117^{+}CD11R1^{+}$ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 특정 구현예에서, ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD11a^{-}CD117^{+}CD11R1^{+}$ 세포에 대해 농축된다.

일 구현예에서, NK 세포는 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 특정 구현예에서, NK 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}$ 에 대해 농축된다. 일 구현예에서, NK 세포는 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}CD117^{-}$ 세포에 대해 선택함으로써 분리되거나 농축된다. 특정 구현예에서, NK 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 전체 세포와 비교하여 $CD56^{+}CD3^{-}CD94^{+}CD11a^{+}CD117^{-}$ 세포에 대해 농축된다.

세포 분리는 예컨대, 유동 세포분석법, 형광성-활성화된 세포 분류(FACS), 또는, 일 구현예에서, 특이적인 항체와 집합된 마이크로비드를 사용하는 자기 세포 분류법에 의해 달성될 수 있다. 세포는 하나 이상의 특이적인 항체, 예컨대, 항-CD56 항체를 포함하는 자기 비드(예컨대, 약 0.5-100 μm 직경)에 결합하는 이들의 능력을 기준으로 입자를 분리하는 방법인, 자기 활성화된 세포 분류(MACS)를 사용하여 분리될 수 있다. 자기 세포 분류는 예컨대, AUTOMACS™ 분리기(Miltenyi)를 사용하여 수행하여 자동화할 수 있다. 특수한 세포 표면 분자 또는 항원을 특이적으로 인식하는 항체의 공유 결합 첨가를 포함하는, 다양한 유용한 변형을 자기 미세구에서 수행할 수 있다. 이후에, 비드를 세포와 혼합하여 세포가 결합하도록 한다. 세포는 이후에 자기장에 통과시켜 특이적인 세포 표면 마커를 가진 세포를 분리한다. 일 구현예에서, 이들 세포를 이후 분리하고 추가의 세포 표면 마커에 대해 항체에 커플링된 자기 비드와 재-혼합시킨다. 세포를 다시 자기장에 통과시키고 항체 둘 다에 결합된 세포를 분리한다. 이러한 세포를 이후에 클론 분석을 위한 미세역가 디쉬(microtiter dish)와 같은 별개의 디쉬내로 희석시킬 수 있다.

5.5. 태반 관류액

NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 조혈 세포, 예컨대, 어떠한 공급원, 예컨대, 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장, 간 등으로부터 조혈 줄기 또는 선조 세포로부터 생산될 수 있다. 특정 구현예에서, 조혈 줄기 세포는 태반 관류액 및 태반 관류액을 생성하는데 사용된 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 조합된 조혈 줄기 세포이다. 태반 관류액은 예를 들면, 이의 개시내용이 이의 전문으로 본원에 참고로 포함된, 미국 특허 제 7,045,148호 및 제 7,468,276호 및 미국 특허원 공보 제 2009/0104164호에 개시된 방법에 의해 수득될 수 있는 태반 관류액 세포를 포함한다.

5.5.1. 세포 수집 조성물

이로부터 조혈 줄기 또는 선조세포가 분리될 수 있거나, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 제공된 3 단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 함께, 종양 세포, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개인의 종양 억제 또는 치료에 유용한 태반 관류액 및 관류액 세포를 태반 세포 수집 조성물을 사용하여 포유동물, 예컨대, 사람 산후 태반의 관류에 의해 수집할 수 있다. 관류액은 어떠한 생리학적으로 허용되는 용액, 예컨대, 염수 용액, 배양 배지, 또는 보다 복잡한 세포 수집 조성물을 사용한 태반의 관류에 의해 태반으로부터 수집할 수 있다. 태반을 관류하고 관류 세포를 수집 및 보존하는데 적합한 세포 수집 조성물은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된 관련 미국 특허원 공보 제 2007/0190042호에 상세히 기술되어 있다.

세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 어떠한 생리학적으로 허용되는 용액, 예를 들면, 염수 용액(예컨대, 인산염 완충된 염수, 크렙스 용액(Kreb's solution), 개질된 크렙스 용액, 이글스 용액(Eagle's solution), 0.9% NaCl 등), 배양 배지(예컨대, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

세포 수집 조성물은 태반 세포를 보존하는, 즉, 태반 세포가 죽는 것을 방지하거나, 태반 세포의 사멸을 지연시키거나, 수집 시간으로부터 배양 시간까지 죽는 세포의 집단 속의 태반 세포의 수를 감소시키는 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 예컨대, 세포자멸사(apoptosis) 억제제(예컨대, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제(예컨대, 황산마그네슘, 항고혈압 약물, 심방 나트륨이뇨 펩타이드(ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코프로핀-방출 호르몬, 나트륨 니트로프루씨드, 하이드랄라진, 아데노신

트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포디에스테라제 억제제 등); 피사 억제제(예컨대, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카바메이트, 또는 클로나제팜); TNF- α 억제제; 및/또는 산소-수반 퍼플루오로탄소(예컨대, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-붕해 요소, 예컨대, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 하이알루로니다제, RNase, 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 이러한 효소는 콜라게나제(예컨대, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리디움 히스토리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 썬몰라이신, 엘라스타제, 트립신, LIBERASE, 하이알루로니다제 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

세포 수집 조성물은 살세균학적으로 또는 제균적으로 유효한 양의 항생제를 포함할 수 있다. 특정의 비-제한적 구현예에서, 항생제는 마크롤라이드(예컨대, 토브라마이신), 세팔로스포린(예컨대, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록신, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 페니실린(예컨대, 페니실린 V) 또는 퀴놀론(예컨대, 오픈록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특수한 구현예에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 세균, 예컨대, 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.

세포 수집 조성물은 또한 다음 화합물들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아데노신(약 1 mM 내지 약 50 mM); D-글루코즈(약 20 mM 내지 약 100 mM); 마그네슘 이온(약 1 mM 내지 약 50 mM); 일 구현예에서, 내피 통합성 및 세포 생존능을 유지하기에 충분한 양으로 존재하는, 분자량이 20,000 달톤 이상인 거대분자(예컨대, 약 25 g/l 내지 약 100 g/l, 또는 약 40 g/l 내지 약 60 g/l에서 존재하는 합성 또는 천연적으로 발생하는 콜로이드, 텍스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 다당류); 항산화제(예컨대, 약 25 μ M 내지 약 100 μ M에서 존재하는 부틸화된 하이드록시아니솔, 부틸화된 하이드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E); 환원제(예컨대, 약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재하는 N-아세틸시스테인); 세포내로 칼슘 도입을 방지하는 제제(예컨대, 약 2 μ M 내지 약 25 μ M로 존재하는 베라파밀); 니트로글리세린(예컨대, 약 0.05 g/L 내지 약 0.2 g/L); 일 구현예에서, 잔류 혈액의 응고를 방지하는데 도움이 되기에 충분한 양으로 존재하는 항응고제(예컨대, 약 1000 단위/l 내지 약 100,000 단위/l로 존재하는 헤파린 또는 히루딘); 또는 아밀로라이드 함유 화합물(예컨대, 약 1.0 μ M 내지 약 5 μ M로 존재하는 아밀로라이드, 에틸 이소프로필 아밀로라이드, 헥사메틸렌 아밀로라이드, 디메틸 아밀로라이드 또는 이소부틸 아밀로라이드).

5.5.2. 태반의 수집 및 취급

일반적으로, 사람 태반은 출생 후 이의 압박방출에 직후에 회수된다. 일 구현예에서, 태반은 사전 동의 후 및 환자의 완전한 의학적 병력이 취해진 후 환자로부터 회수되며 태반과 연관된다. 일 구현예에서, 의학적 병력은 분만 후 지속된다.

관류액의 회수 전에, 제대혈 및 태반 혈액을 제거한다. 특정 구현예에서, 회수 후, 태반 속의 제대혈을 회수한다. 태반을 통상의 제대혈 회수 공정에 적용시킬 수 있다. 전형적으로, 침 또는 캐놀라(cannula)를 중력의 도움으로 사용하여 태반을 방혈시킨다(참고: 예컨대, Anderson, 미국 특허 제5,372,581호; Hessel *et al.*, 미국 특허 제5,415,665호). 침 또는 캐놀라를 일반적으로 제대 정맥에 두고 태반을 온화하게 마사지하여 태반으로부터 제대혈이 빠져나오는 것을 돕는다. 이러한 제대혈 회수는 상업적으로 수행할 수 있다(예컨대, LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and CryoCell). 일 구현예에서, 태반은 추가의 조작없이 중력 배출시켜 제대혈 회수 동안 조직 파괴를 최소화한다.

전형적으로, 태반은 분만실 또는 출생실로부터 다른 위치, 예컨대, 제대혈의 회수 및 관류액의 수집을 위한 실험실로 수송된다. 태반은 예를 들면, 태반을 클램핑된 근접한 탯줄과 함께 멸균 zip-록 플라스틱 백(zip-lock plastic bag) 속에 둥으로써, 멸균되고, 열적으로 단열된 수송 장치(태반을 20 내지 28°C의 온도에서 유지시킴) 속에서 수송될 수 있다. 다른 구현예에서, 태반은 실질적으로 미국 특허 제7,147,626호에 기술된 바와 같이 제대혈 수집 키트 속에서 수송된다. 일 구현예에서, 태반은 분만 후 4 내지 24시간내에 실험실로 전달된다. 특정 구현예에서, 근접한 탯줄은 예를 들면, 제대혈 회수 전에 태반 원반내로 4 내지 5cm (센티미터) 내에서 클램핑된다. 다른 구현예에서, 근접한 탯줄은 제대혈 회수 후 그러나 태반의 추가의 가공 전에 클램핑된다.

관류액의 수집 전에, 태반은 멸균 조건 하에 및 실온 또는 5 내지 25°C (섭씨)의 온도에서 저장될 수 있다. 태반은 태반을 관류하기 전 48시간 이상, 또는 4 내지 24시간의 기간 동안 저장하여 어떠한 잔류 제대혈도 제거할 수 있다. 태반은 항응고제 용액 속에 5°C 내지 25°C (섭씨)의 온도에서 저장할 수 있다. 적합한 항응고제 용액

은 당해 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 헤파린 또는 와파린 나트륨의 용액을 사용할 수 있다. 일 구현예에서, 항응고제 용액은 헤파린의 용액(예컨대, 1:1000 용액 중 1% w/w)을 포함한다. 일부 구현예에서, 방혈된 태반은 태반 관류액이 수집된 후 36시간 이하 동안 저장된다.

5.5.3. 태반 관류(Placental Perfusion)

포유동물 태반을 관류하고 태반 관류액을 수집하는 방법은 예컨대, Hariri의, 미국 특허 제7,045,148호 및 제 7,255,879호, 및 미국 특허 제8,057,788호로 허여된 것으로서 미국 특허원 공보 제2009/0104164호, 제 2007/0190042호 및 제20070275362호에 개시되어 있으며, 이들의 개시내용은 이들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

관류액은 태반 혈관화를 통한, 관류 용액, 예컨대, 염수 용액, 배양 배지 또는 위에서 기술한 세포 수집 조성물의 제대배양에 의해 수득될 수 있다. 일 구현예에서, 포유동물 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥 중 하나 또는 둘 다를 통해 관류 용액을 통과시켜 관류시킨다. 태반을 통한 관류 용액의 유동은 예컨대, 태반으로의 중력 유동을 사용하여 달성할 수 있다. 예를 들면, 관류 용액을 펌프, 예컨대, 연동 펌프를 사용하여 태반을 통해 가압한다. 제대 정맥은 예컨대, 멸균 튜빙(tubing)과 같은 멸균 연결 장치에 연결된, 캐놀라(cannula), 예컨대, TEFLON® 또는 플라스틱 캐놀라를 사용하여 캐놀라화시킬 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 매니폴드(perfusion manifold)에 연결된다.

관류액의 제조시, 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥이 태반의 최고점에 위치하는 방식으로 배향시킬 수 있다. 태반은 태반 혈관화를 통해서, 또는 태반 혈관화 및 주변 조직을 통해서 관류 용액을 통과시켜 관류할 수 있다. 일 구현예에서, 제대 동맥 및 제대 정맥을 유연한 연결기를 통해 관류 용액의 저장기에 연결된 피펫에 동시 연결시킨다. 관류 용액은 제대 정맥 및 동맥내로 통과된다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 태반의 주변 조직으로부터 스며나오고/나오거나 태반의 주변 조직내로 통과하여, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적합한 개방 혈관 속에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구(opening)를 통해 도입되어 모체 자궁 벽과 마주하고 있는 태반의 벽 내 개구부로 유동하거나 이의 밖으로 스며들 수 있다. 다른 구현예에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하여 제대 동맥으로부터 수집되거나, 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집되는데, 즉, 태반 혈관화(태아 조직)만을 통해 통과된다.

일 구현예에서, 예를 들면, 제대 동맥 및 제대 정맥은 예컨대, 유연한 연결기를 통해 관류 용액의 저장기에 연결된 피펫에 동시 연결된다. 관류 용액은 제대 정맥 및 동맥내로 통과한다. 관류 용액은 혈관의 벽으로부터 주변 조직내로 스며나오고/나오거나 통과하여, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적합한 개방 혈관 속에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구부를 통해 도입되어 모체 자궁 벽과 마주하고 있는 태반의 벽 속의 개구부 밖으로 스며나오도록 한다. "팬(pan)" 방법으로 언급될 수 있는, 당해 방법에 의해 수집된 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

다른 구현예에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통과하여 제대 동맥으로부터 수집되거나, 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄된 회로(closed circuit)" 방법으로 언급될 수 있는, 당해 방법으로 수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 전적으로 태아의 것이다.

폐쇄된 회로 관류 방법은, 일 구현예에서, 다음과 같이 수행될 수 있다. 출산 후 태반을 출생 후 약 48시간 내에 수득한다. 제대를 클램핑하고 클램프 위에서 절단한다. 제대를 폐기하거나 가공하여 예컨대, 제대 줄기 세포를 회수하고/하거나 생체물질의 생산을 위해 제대 막을 가공할 수 있다. 양막을 관류 동안 보유하거나, 융모막으로부터, 예컨대 손가락으로 둔적 박리(blunt dissection)를 사용하여 분리할 수 있다. 양막이 관류 전 융모막으로부터 분리된 경우, 이는 예컨대 폐기하거나, 가공하여 예컨대 효소 분해에 의해 줄기 세포를 수득하거나, 예컨대 양막 생체물질, 예컨대, 미국 특허원 공보 제2004/0048796호에 기술된 생체물질을 생산할 수 있다. 모든 가시성 혈액 응괴 및 잔류 혈액을 예컨대, 멸균 거즈를 사용하여 세정한 후, 제대 혈관을 예컨대, 제대 막을 부분 절단하여 제대의 횡단면을 노출시킴으로써 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예컨대, 각각의 혈관의 절단 말단을 통해 폐쇄된 알리게이터 클램프(Closed alligator clamp)를 전진시켜 개방시킨다. 장치, 예컨대, 관류 장치 또는 연동 펌프(peristaltic pump)에 연결된 플라스틱 튜빙을 이후에 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적합한 어떠한 펌프, 예컨대, 연동 펌프일 수 있다. 멸균 수집 저장기, 예컨대, 250mL 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 이후에 태반 정맥내로 삽입한다. 달리, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥에 삽입하고, 수집 저장기(들)에 연결된 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 둘 다에 삽입한다. 이후에, 태반을 관류 용액의 용적, 예컨대, 약 750 ml의 관류 용액으로 관류한다. 이후에, 관류액 속의 세포를 예컨대, 원심분리에 의해 수집한다.

일 구현예에서, 근접한 제대는 관류 동안 클램핑되며, 보다 구체적으로, 태반 원반내로 4 내지 5cm(센티미터) 이내의 제대 삽입으로 클램핑될 수 있다.

방혈 공정 동안 포유동물 태반으로부터의 관류액의 제1 수집은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적색 혈액 세포로 착색된다. 관류액은 관류가 진행되면서 더 무색으로 되고 잔류 제대혈 세포가 태반에서 세척되어 나온다. 일반적으로 30 내지 100 mL의 관류액이 태반으로부터 혈액을 초기에 플러쉬(flush)하는데 적절하지만, 보다 더 적은 관류액을 관찰 결과에 따라 사용할 수 있다.

특정 구현예에서, 제대혈은 관류 전에 태반으로부터 제거(예컨대, 중력 배수에 의해)되지만, 태반은 잔류 혈액을 제거하기 위한 용액으로 플러쉬(예컨대, 관류)되지 않는다. 특정 구현예에서, 제대혈은 관류 전(예컨대, 중력 배수에 의해) 태반으로부터 제거되며, 태반은 잔류 혈액을 제거하기 위한 용액으로 플러쉬(예컨대, 관류)된다.

태반을 관류하는데 사용된 관류액의 용적은 수집될 태반 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반으로부터 제조될 수집 수 등에 따라 변할 수 있다. 다양한 구현예에서, 관류액의 용적은 50 mL 내지 5000 mL, 50 mL 내지 4000 mL, 50 mL 내지 3000 mL, 100 mL 내지 2000 mL, 250 mL 내지 2000 mL, 500 mL 내지 2000 mL, 또는 750 mL 내지 2000 mL일 수 있다. 전형적으로, 태반은 방혈 후 700 내지 800 mL의 관류액으로 관류된다.

태반을 수시간 또는 수일에 걸쳐 다수의 횟수로 관류시킬 수 있다. 태반이 다수의 횟수로 관류되는 경우, 이는 용기 또는 다른 적합한 베셀(vessel) 속에서 무균 조건 하에 유지되거나 배양되고, 세포 수집 조성물, 또는 표준 관류 용액(예컨대, 항응고제(예컨대, 헤파린, 와파린 나트륨, 코우마린, 비스하이드록시코우마린)의 존재 또는 부재하에, 및/또는 항미생물제(예컨대, β -머캅토에탄올(0.1mM); 스트렙토마이신(예컨대, 40-100 μ g/mL에서), 페니실린(예컨대, 40 U/mL에서), 암포테리신 B(예컨대, 0.5 μ g/mL에서)과 같은 항생제의 존재 또는 부재하에 인산염 완충된 염수("PBS")와 같은 정상의 염수 용액)로 관류된다. 일 구현예에서, 분리된 태반은 관류액의 부재하에서 일정 기간 동안 유지되거나 배양됨으로써, 태반은 관류 및 관류액의 수집 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간, 또는 2 또는 3일 이상 동안 유지되거나 배양된다. 관류된 태반은 예컨대, 700 내지 800 mL의 관류액과 함께 하나 이상의 추가의 시간(들), 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 시간 이상 동안 유지될 수 있고, 예컨대, 700 내지 800 mL의 관류액으로 두번째 관류될 수 있다. 태반은 1, 2, 3, 4, 5회 이상, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간 마다 1회씩 관류될 수 있다. 일 구현예에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예컨대, 태반 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 핵화된 세포의 수가 100개의 세포/mL 이하가 될 때까지 반복된다. 상이한 시점에서의 관류액은 개별로 추가로 가공하여 세포의 시간-의존성 집단, 예컨대, 총 핵화된 세포를 회수할 수 있다. 상이한 시점에서의 관류액은 또한 혼주(pooling)시킬 수 있다.

5.5.4. 태반 관류액 및 태반 관류액 세포

전형적으로, 1회 태반 관류로부터의 태반 관류액은 이로부터 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 본원에 개시된 방법에 의해 생산될 수 있는 조혈 세포를 포함하는, 약 1억 내지 약 5억개의 핵화된 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 $CD34^{+}$ 세포, 예컨대, 조혈 줄기 또는 선조 세포를 포함한다. 이러한 세포는, 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^{+}CD45^{-}$ 줄기 또는 선조 세포, $CD34^{+}CD45^{+}$ 줄기 또는 선조 세포 등을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 관류액 또는 관류액 세포는 이로부터 조혈 세포의 분리 전에 동결보존된다. 특정의 다른 구현예에서, 태반 관류액은 다음을 포함하거나 관류액 세포는 다음을 포함한다: 태아 세포만, 또는 태아 세포와 모체 세포의 조합.

5.6. NK 세포

5.6.1. 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포

다른 구현예에서, 분리된 NK 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된다.

일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 분리된 NK 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 선조 세포 집단, 예컨대, NK 선조 세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계보다 더 짧은 기간인 것을 제외하고는 동일한 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 선조 세포 집단보다 더 큰 퍼센트의 $CD3-CD56^{+}$ 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포 집단은 약 70% 이상, 구체적인 구현예에서, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

98%, 또는 99%의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포 집단은 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 이상의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포 집단은 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다.

특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 NKp46⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD16-인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD16+인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD94-인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD94+인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD11a⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 NKp30⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 CD161⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 DNAM-1⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 NK 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 추가로 T-bet⁺인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다.

일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 NKG2D+인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 NKp44+인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 퍼포린을 발현하는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 EOMES를 발현하는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 그랜자임 B를 발현하는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 집단은 IFN γ , GM-CSF 및/또는 TNF α 를 분비하는 세포를 포함한다.

5.7. ILC3 세포

5.7.1. 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포

다른 구현예에서, 분리된 ILC3 세포 집단이 본원에 제공되고, 여기서 상기 ILC3 세포는 상기 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된다.

일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 분리된 ILC3 세포 집단이 본원에 제공되며, 여기서 상기 ILC3 세포 집단은 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 선조 세포 집단, 예컨대, ILC 선조 세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계가 ILC3 세포 집단을 생산하는데 사용된 제3 배양 단계보다 더 짧은 기간이었음을 제외하고는 동일한 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 선조 세포 집단보다 더 높은 퍼센트의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단은 약 70% 이상, 일부 구현예에서, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단은 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 이상의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단은 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90%-내지 95%, 또는 95% 내지 99%의 CD3-CD56⁺ 세포를 포함한다.

특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 NKp46⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD16-인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 IL1R1+인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD94-인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 ROR γ t+인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 ILC3 세포 집단 중 상기 CD3⁻CD56⁺ 세포는 또한 CD11a⁻인 CD3⁻CD56⁺ 세포를 포함한다. 특정 구현예에서,

상기 ILC3 세포 집단 중 상기 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포는 또한 T-bet⁺인 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포를 포함한다.

일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 CD117⁺인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 NKG2D⁺인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 NKp30⁺인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 CD244⁺인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 DNAM-1⁺인 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 AHR를 발현하는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 퍼포린을 발현하지 않는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 EOMES를 발현하지 않는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 그랜자임 B를 발현하지 않는 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 ILC3 세포 집단은 IL-22 및/또는 IL-8을 분비하는 세포를 포함한다.

특정 국면에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 세포 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 50:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 20:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 10:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 5:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 1:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 1:5의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 1:10의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 1:20의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 1:50의 비로 포함한다.

특정 국면에서, 본원에 기술된 세포 집단은 CD11a⁺ 세포와 CD11a⁻ 세포를 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 조합하여 조합된 세포의 집단을 생산함으로써 생산된다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 50:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 20:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 10:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 5:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:1의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:5의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:10의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:20의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:50의 비로 조합된 CD11a⁺ 세포 및 CD11a⁻ 세포를 포함한다.

특정 국면에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 세포 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 50:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 20:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 10:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 5:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 1:1의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 1:5의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 1:10의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 1:20의 비로 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 세포의 집단은 NK 세포 및 ILC3 세포를 1:50의 비로 포함한다.

특정 국면에서, 본원에 기술된 세포 집단은 NK 세포를 ILC3 세포와 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 또는 1:50의 비로 조합하여 조합된 세포의 집단을 생산함으로써 생산된다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 50:1의 비로 조합된 NK 세포

및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 20:1의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 10:1의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 5:1의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:1의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:5의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:10의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:20의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다. 특정 국면에서, 본원에 기술된 조합된 세포의 집단은 1:50의 비로 조합된 NK 세포 및 ILC3 세포를 포함한다.

5.8. 태반 관류액과 조합된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포

예컨대, 종양 세포의 증식 또는 다수의 종양 세포를 억제하는데 사용하기 위한, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 부착성 태반 세포와 조합된, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따른 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함하는 조성물이 본원에 추가로 제공된다.

5.8.1. NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 관류액 또는 관류액 세포의 조합

본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된, 및 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합을 포함하는 조성물이 본원에 추가로 제공된다. 일 구현예에서, 예를 들면, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단으로 보충된 태반 관류액의 용적이 본원에 제공된다. NK 세포 및 ILC3 세포로 보충된 태반 관류액의 용적의 구체적인 구현예에서, NK 세포 및 ILC3 세포는 본원에 기술된 바와 같은 비로 존재한다. 구체적인 구현예에서, 예를 들면, 각각의 밀리리터의 태반 관류액은 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 보충된다. 다른 구현예에서, 태반 관류액 세포는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 보충된다. 특정의 다른 구현예에서, 태반 관류액 세포가 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 합해지는 경우, 태반 관류액 세포는 일반적으로 세포의 총 수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 이상, 또는 미만을 차지한다. 특정의 다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 다수의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포와 조합되는 경우, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 집단은 일반적으로 세포의 총 수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 이상 또는 미만을 차지한다. 특정의 다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 사용하여 태반 관류액을 보충하는 경우, 세포가 현탁되는 용액(예컨대, 염수 용액, 배양 배지 등)의 용적은 관류액 및 세포의 총 용적의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 이상 또는 미만을 차지하며, 여기서 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 보충 전 밀리리터당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 세포로 현탁된다.

다른 구현예에서, 세포의 상기 조합 중 어느 것도 궁극적으로 제대혈 또는 제대혈로부터의 핵화된 세포와 조합된다.

2개 이상의 공급원, 예컨대, 2개 이상의 태반, 및 조합된, 예컨대 혼주된 것으로부터 수득된 혼주된 태반 관류액이 추가로 본원에 제공된다. 이러한 혼주된 관류액은 각각의 공급원으로부터의 대략 동일한 용적의 관류액을 포함할 수 있거나, 각각의 공급원으로부터의 상이한 용적을 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터의 상대적인 용적은 무작위로 선택될 수 있거나, 예컨대, 하나 이상의 세포 인자, 예컨대, 사이토킨, 성장 인자, 호르몬 등의 농도 또는 양; 각각의 공급원으로부터의 관류액 속의 태반 세포의 수; 또는 각각의 공급원으로부터의 관류액의 다른 특징을 기본으로 할 수 있다. 동일한 태반의 다수의 관류로부터의 관류액은 유사하게 혼주될 수 있다.

유사하게, 2개 이상의 공급원, 예컨대, 2개 이상의 태반으로부터 수득되고 혼주된 태반 관류액 세포, 및 태반-기원한 중간체 천연 킬러 세포가 본원에 제공된다. 이러한 혼주된 세포는 2개 이상의 공급원으로부터의 대략적으로 동일한 수의 세포, 또는 혼주된 공급원 중 하나 이상으로부터의 상이한 수를 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터의 세포의 상대적인 수는 예컨대, 혼주될 세포 중 하나 이상의 특이적인 세포 유형의 수, 예컨대, CD34⁺ 세포의 수 등을 기준으로 선택될 수 있다.

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 이러한 세포와 태반 관류액 및/또는 태

반 관류액 세포의 조합이 추가로 본원에 제공되며, 이들은 예컨대, 제공된 수의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 또는 제공된 용적의 관류액으로부터 예측될 종양 억제 정도 또는 양 (즉, 잠재능)을 측정하기 위해 검정된다. 예를 들면, 세포의 분취량 또는 샘플 수를 공지된 수의 종양 세포와 당해 종양 세포가 달리 증식할 수 있는 조건 하에서 접촉시키거나 근접시키고, 태반 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 이의 조합물의 존재하에서 종양 세포의 증식률을 시간에 걸쳐(예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10주 이상) 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 이의 조합물의 부재하에서 동일한 수의 종양 세포의 증식과 비교한다. 세포의 잠재능은 예컨대, 종양 세포 성장을 예컨대, 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 등까지 억제하는데 요구되는 세포의 수 또는 용액의 용적으로서 표현할 수 있다.

특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 약제학적 등급의 투여가 가능한 단위로 제공된다. 이러한 단위는 별개의 용적, 예컨대, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL 등으로 제공될 수 있다. 이러한 단위는 다른 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 관류액 세포와 조합된 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단의 규정된 수, 예컨대, 밀리리터당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 이상의 세포를 함유하도록 제공될 수 있다. 구체적인 구현예에서, 상기 단위는 밀리리터당 약, 최소 약, 또는 최대 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 이상의 NK 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 이러한 단위는 규정된 수의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및/또는 다른 세포 중 어느 것을 함유하도록 제공될 수 있다.

다른 구현예에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 다른 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 관류액 세포 또는 관류액의 조합은 수용체에 대해 자가 조직이거나 (즉, 수용체로부터 수득됨), 수용체에 대해 동종이제 (즉, 적어도 하나의 다른 상기 수용체로부터 수득됨)이다.

특정 구현예에서, 각각의 세포 단위는, 당해 단위가 단위 내 세포의 특수한 유형, 및/또는 제공된 수의 세포의 잠재능, 또는 단위의 제공된 밀리리터의 수를 강화하는지, 즉, 단위의 세포가 특수한 유형 또는 유형들의 종양 세포의 증식을 측정가능하게 억제하는지에 상관없이, 용적, 세포의 수, 세포의 유형 중 하나 이상을 규정하기 위해 표지된다.

5.8.2. NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 부착성 태반 줄기 세포의 조합

다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된, NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 단독으로 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 함께, 분리된 부착성 태반 세포, 예컨대, 이들의 개시내용이 전문으로 본원에 참고로 포함된, Hariri의 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,255,879호, 및 미국 특허원 공보 제2007/0275362호에 기술된 바와 같은 태반 줄기 세포 및 태반 다능성 세포로 보충된다. 구체적인 구현예에서, NK 세포 및 ILC3 세포, 상기 NK 세포 및 ILC3 세포는 본원에 기술된 바와 같은 비로 존재한다. "부착성 태반 세포"는 조직 배양 표면, 예컨대, 조직 배양 플라스틱에 대해 부착성임을 의미한다. 본원에 개시된 조성물 및 방법에 유용한 부착성 태반 세포는 일반적으로 영양막, 배아 배 세포 또는 배아 줄기 세포가 아니다.

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 단독으로, 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 함께, 예컨대, 밀리리터당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 부착성 태반 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 부착성 태반 세포로 보충된다. 조합된 부착성 태반 세포는, 예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 또는 40개 집단 배가를 위해 배양

된 예컨대, 부착성 태반 세포일 수 있다.

분리된 부착성 태반 세포는, 1차 배양물속에서 배양되거나 세포 배양물 속에서 확장되는 경우, 조직 배양 기질, 예컨대, 조직 배양 용기 표면(예컨대, 조직 배양 플라스틱)에 부착한다. 배양물 속의 부착성 태반 세포는 중심 세포체로부터 확장하는 다수의 세포질 공정과 함께, 일반적으로 섬유아세포성, 방사상 외관으로 추정된다. 그러나, 부착성 태반 세포는, 부착성 태반 세포가 섬유아세포보다 보다 더 큰 수의 이러한 공정을 나타내므로, 동일한 조건 하에서 배양된 섬유아세포로부터 형태학적으로 구별가능하다. 형태학적으로, 부착성 태반 세포는 배양물 속에서 보다 둥글거나, 자갈형의 형태학으로 추정되는 조혈 줄기 세포와는 또한 구별가능하다.

본원에 제공된 조성물 및 방법에 유용한 상기 분리된 부착성 태반 세포, 및 부착성 태반 세포의 집단은 부착성 태반 세포를 포함하는 세포, 또는 세포의 집단을 확인하고/하거나 분리하는데 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법에 유용한 부착성 태반 세포, 및 부착성 태반 세포 집단은 태반, 또는 이의 어떠한 부위(예컨대, 양막, 융모막, 양막-융모막 원반, 태반 반엽, 제대 등)으로부터 직접 수득된 부착성 태반 세포 및 부착성 태반 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 부착성 태반 줄기 세포 집단은, 일 구현예에서, 배양물 속의 부착성 태반 줄기 세포의 집단 (즉, 2개 이상), 예컨대, 용기, 예컨대, 백 속의 집단이다.

부착성 태반 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, 및 CD200, 및/또는 OCT-4를 발현하며, CD34, CD38, 또는 CD45를 발현하지 않는다. 부착성 태반 줄기 세포는 또한 HLA-ABC(MHC-1) 및 HLA-DR을 발현할 수 있다. 이들 마커를 사용하여 부착성 태반 세포를 확인하고, 다른 세포 유형으로부터 부착성 태반 세포를 구별할 수 있다. 부착성 태반 세포는 CD73 및 CD105를 발현하므로, 이들은 간엽성 줄기 세포-유사 특징을 갖는다. CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현의 결여는 부착성 태반 줄기 세포를 비-조혈 줄기 세포로서 확인한다.

특정 구현예에서, 본원에 기술된 상기 분리된 부착성 태반 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다.

특정 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 분리된 태반 줄기 세포이다. 특정의 다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 분리된 태반 다능성 세포이다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 측정된 것으로서 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 다능성 부착성 태반 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 중성 표현형의 세포, 골원성 표현형의 세포, 또는 연골원성 표현형의 세포로 분화되는 잠재능을 갖는다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 추가로 $CD200^{+}$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^{+}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$, $CD90^{+}$, $CD45^{-}$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD80^{-}$ 및 $CD86^{-}$ 이다.

일 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 이다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하는 경우, 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 이다. 상기 집단의 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 $HLA-G^{+}$ 이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세

포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38-, CD45-, 및 HLA-G+이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우, 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 CD200+, OCT-4+이다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD73+ 및 CD105+이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 HLA-G+이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38-, CD45-, CD73+, CD105+ 및 HLA-G+이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양되는 경우 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 CD73+, CD105+ 및 HLA-G+이다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 OCT-4+이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 CD200+이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 CD34-, CD38-, CD45-, OCT-4+ 및 CD200+이다.

다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 CD73+, CD105+ 줄기 세포이고, 여기서 상기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38- 및 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 분리된 부착성 태반 세포는 또한 OCT-4+이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 OCT-4+, CD34-, CD38- 및 CD45-이다.

다른 구현예에서, 부착성 태반 줄기 세포는 OCT-4+ 줄기 세포이고, 여기서 상기 부착성 태반 줄기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에서 배양하는 경우 하나 이상의 배아-유사체를 생산하고, 여기서 상기 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제하는 것으로 확인되었다.

다양한 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 OCT-4⁺이다. 상기 집단의 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD73+ 및 CD105+이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, CD38-, 또는 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 줄기 세포는 CD200+이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 또한 CD73+, CD105+, CD200+, CD34-, CD38-, 및 CD45-이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 확장되며, 예를 들면, 적어도 1회, 적어도 3회, 적어도 5회, 적어도 10회, 적어도 15회, 또는 적어도 20회 계대배양된다.

상기 구현예들 중 어느 것의 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 ABC-p (태반-특이적인 ABC 수용인자 단백질; 참고: 예컨대, Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58 (23):5337-9 (1998))를 발현한다.

다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD200+, CD34- 및 CD133-이다. 다른 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 IL-6, IL-8 및 단백질 화합물(MCP-1)을 구성적으로 분비한다.

각각의 상기-참고된 분리된 부착성 태반 세포는 포유동물 태반으로부터 수득되거나 직접 분리된 세포, 또는 배양되고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30회 이상 계대배양된 세포, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 상기 기술된 상기 분리된 부착성 태반 세포의 종양 세포 억제성 다수는 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 분리된 부착성 태반 세포를 포함할 수 있다.

5.8.3. 부착성 태반 세포 조건화된 배지를 포함하는 조성물

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 및 추가로 조건화된 배지를 포함하는 조성물의 용도가 또한 본원에 제공되며, 여기서 상기 조성물은 암 또는 바이러스 감염의 치료시 억제성이거나, 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포 및 ILC3 세포는 본원에 기술된 바와 같은 비로 존재한다. 본원에 기술된 바와 같은 부착

성 태반 세포를 사용하여 종양 세포 억제성, 항암 또는 항바이러스인 조건화된 배지, 즉, 검출가능한 종양 세포 억제 효과, 항암 효과 또는 항바이러스 효과를 갖는 세포에 의해 분비되거나 배출된 하나 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생산할 수 있다. 다양한 구현예에서, 조건화된 배지는 세포가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 동안 증식 (즉, 배양)되는 배지를 포함한다. 다른 구현예에서, 조건화된 배지는 이러한 세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 합치성으로, 또는 100% 합치성까지 성장되는 배지를 포함한다. 이러한 조건화된 배지를 사용하여 세포의 별개의 집단, 예컨대, 태반 세포, 또는 다른 종류의 세포를 지지할 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 제공된 조건화된 배지는 분리된 부착성 태반 세포, 예컨대, 분리된 부착성 태반 줄기 세포 또는 분리된 부착성 태반 다능성 세포, 및 분리된 부착성 태반 세포 이외의 세포, 예컨대, 비-태반 줄기 세포 또는 다능성 세포가 배양된 배지를 포함한다.

이러한 조건화된 배지는 종양 세포 억제성, 항암 또는 항바이러스인 조성물을 형성하는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 태반 관류액, 또는 태반 관류액 세포 중 어느 것, 또는 이의 어느 조합과 조합될 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 용적당 1/2 미만의 조건화된 배지, 예컨대, 용적당 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 이하의 조건화된 배지를 포함한다.

따라서, 일 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 분리된 부착성 태반 세포의 배양물로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 상기 분리된 부착성 태반 세포는 (a) 기질에 부착하고; (b) $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$ 이며; 여기서 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 억제하거나, 항암 또는 항바이러스성이다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$ 이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다능성 부착성 태반 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골원성 표현형의 세포, 또는 연골원성 표현형의 세포로 분화할 잠재력을 갖는다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 추가로 $CD200^+$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$ 이다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ 부착성 태반 세포는 유동 세포분석법에 의해 검출된 것으로서, 추가로 $CD80^-$ 및 $CD86^-$ 이다.

다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 분리된 부착성 태반 세포의 배양물로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물이 본원에 제공되고, 여기서 상기 분리된 부착성 태반 세포는 (a) 기질에 부착하고; 및 (b) $CD200$ 및 HLA-G를 발현하거나, $CD73$, $CD105$, 및 $CD200$ 을 발현하거나, $CD200$ 및 OCT-4를 발현하거나, $CD73$, $CD105$, 및 HLA-G를 발현하거나, $CD73$ 및 $CD105$ 를 발현하고, 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단 내에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하거나, OCT-4를 발현하고 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양되는 경우 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단 속에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 촉진하며; 여기서 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 억제하거나, 항암 또는 항바이러스성이다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 다수의 상기 분리된 태반 부착성 세포를 추가로 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 다수의 비-태반 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 비-태반 세포는 $CD34^+$ 세포, 예컨대, 말초 혈액 조혈 선조 세포, 제대혈 조혈 선조 세포, 또는 태반 혈액 조혈 선조 세포와 같은 조혈 선조 세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 간엽성 줄기 세포, 예컨대, 골수-기원한 간엽성 줄기 세포와 같은 줄기 세포를 포함할 수 있다. 비-태반 세포는 또한 성체 세포 또는 세포주의 하나 이상의 유형일 수 있다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 항-증식제, 예컨대, 항-MIP-1 α 또는 항-MIP-1 β 항체를 포함한다.

구체적인 구현예에서, 위에서 기술된 세포 또는 세포 조합 중의 하나에 의해 조건화된 배양 배지는 분리된 부작성 태반 세포 대 종양 세포의 비가 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 또는 약 5:1인, 다수의 종양 세포와 함께 공-배양된 다수의 분리된 부작성 태반 세포로부터 수득된다. 예를 들면, 조건화된 배양 배지 또는 상층액은 약 1×10^5 개의 분리된 부작성 태반 세포, 약 1×10^6 개의 분리된 부작성 태반 세포, 약 1×10^7 개의 분리된 부작성 태반 세포, 또는 약 1×10^8 개 이상의 분리된 부작성 태반 세포를 포함하는 배양물로부터 수득될 수 있다. 다른 구체적인 구현예에서, 조건화된 배양 배지 또는 상층액은 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 개의 분리된 부작성 태반 세포 및 약 1×10^5 개의 종양 세포; 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 개의 분리된 부작성 태반 세포 및 약 1×10^6 개의 종양 세포; 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 개의 분리된 부작성 태반 세포 및 약 1×10^7 개의 종양 세포; 또는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 개의 분리된 부작성 태반 세포 및 약 1×10^8 개의 종양 세포를 포함하는 공-배양물로부터 수득된다.

5.9. 세포의 보존

세포, 예컨대, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 또는 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포를 포함하는 태반 관류액 세포는 보존될 수 있는데, 즉, 장기간 저장을 허용하는 조건 하에, 또는 예컨대, 세포자멸사 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 둘 수 있다.

태반 관류액은 태반의 적어도 일부분, 예컨대, 태반 혈관화를 통한 세포 수집 조성물의 계대배양에 의해 생산될 수 있다. 세포 수집 조성물은 관류액 속에 함유된 세포를 보존하는 작용을 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 이러한 태반 세포 수집 조성물은 이의 개시내용이 이의 전문으로 본원에 참고로 포함된, 관련 미국 특허원 공보 제20070190042호에 기술된 바와 같이, 세포자멸사 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-수반 퍼플루오로탄소를 포함할 수 있다.

일 구현예에서, 관류액 또는 태반 세포의 집단은 포유동물, 예컨대, 사람의 출산 후 태반으로부터 관류액 또는 세포의 집단을 세포자멸사 및 산소를 수반하는 퍼플루오로탄소의 억제제를 포함하는 세포 수집 조성물에 근접하도록 함으로써 수집되며, 여기서 상기 세포자멸사의 억제제는 세포자멸사의 억제제와 접촉하지 않거나 근접하지 않은 세포의 집단과 비교하여, 태반 세포, 예컨대, 부작성 태반 세포, 예를 들면, 태반 줄기 세포 또는 태반 다능성 세포의 집단 속에서 세포자멸사를 감소시키거나 방지하기에 충분한 양 및 시간으로 존재한다. 예를 들면, 태반은 세포 수집 조성물로 관류될 수 있으며, 태반 세포, 예컨대, 총 핵화된 태반 세포가 이로부터 분리된다. 구체적인 구현예에서, 세포자멸사의 억제제는 카스파제 억제제이다. 다른 구체적인 구현예에서, 세포자멸사의 상기 억제제는 JNK 억제제이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 JNK 억제제는 부작성 태반 세포, 예컨대, 부작성 태반 줄기 세포 또는 부작성 태반 다능성 세포의 분화 또는 증식을 조절하지 않는다. 다른 구현예에서, 세포 수집 조성물은 별도의 상 속에 상기 세포자멸사의 억제제 및 상기 산소를 수반하는 퍼플루오로탄소를 포함한다. 다른 구현예에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸사의 억제제 및 상기 산소를 수반하는 퍼플루오로탄소를 유액 속에 포함한다. 다른 구현예에서, 세포 수집 조성물은 유화제, 예컨대, 레시틴을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 상기 세포자멸사 억제제 및 상기 퍼플루오로탄소는 태반 세포를 세포 수집 조성물과 근접하도록 하는 시기에 약 0℃ 내지 약 25℃에 존재한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 세포자멸사 억제제 및 상기 퍼플루오로탄소는 태반 세포가 세포 수집 조성물과 근접하도록 하는 시기에 약 2℃ 내지 약 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃의 온도에서 존재한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 근접하도록 하는 것은 상기 세포의 집단의 수송 동안 수행된다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 근접하도록 하는 것은 상기 세포의 집단의 동결 및 해동 동안에 수행된다.

다른 구현예에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 수집하여 관류액 및/또는 세포를 세포자멸사의 억제제 및 산소-보존 화합물과 근접하도록 함으로써 보존시킬 수 있으며, 여기서 상기 세포자멸사의 억제제는 세포자멸사의 억제제와 접촉하지 않거나 근접하지 않은 관류액 또는 태반 세포와 비교하여, 세포의 세포자멸사를 감소시키거나 방지하기에 충분한 양 및 시간 동안 존재한다. 구체적인 구현예에서, 기관 보존 화합물은 UW 용액(미국 특허 제4,798,824호에 기술됨; VIASPANTM으로서 또한 공지됨; 참고: 또한 Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)) 또는 Stern *et al.*의 미국 특허 제5,552,267호에 기술된 용액이며, 상기 문헌의 개시내용은 이의 전문으로 본원에 참고로 포함된다. 다른 구현예에서, 상기 기관-보존 조성물은 하이드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노즈, 또는 이의 조합이다. 다른 구현예에서, 태반 세포 수집 조성물은 2개 상 또는 유액으로

서 산소를 수반하는 퍼플루오로탄소를 추가로 포함한다.

상기 방법의 다른 구현예에서, 태반 세포는 세포자멸사 억제제 및 산소를 수반하는 퍼플루오로탄소, 기관-보존 화합물, 또는 이의 조합을 포함하는 세포 수집 조성물과 관류 동안 근접된다. 다른 구현예에서, 태반 세포는 관류에 의한 수집 후 상기 세포 수집 화합물과 근접된다.

전형적으로, 태반 세포 수집, 농축 및 분리 동안, 저산소증 및 기계적 응력으로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 당해 방법의 다른 구현예에서, 태반 관류액 또는 태반 세포의 집단은 수집, 농축 또는 분리 동안 저산소증 조건에 상기 보존 동안 6시간 미만 동안 노출되며, 여기서 저산소증 조건은 정상의 혈액 산소 농도 미만인 산소의 농도이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 관류액 또는 태반 세포의 집단은 상기 저산소증 조건에 상기 보존 동안 2시간 미만 동안 노출된다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 세포의 집단은 상기 저산소증 조건에 수집, 농축 또는 분리 동안 1시간 미만, 또는 30분 미만 동안 노출되거나, 노출되지 않는다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 태반 세포의 집단은 수집, 농축 또는 분리 동안 전단 응력에 노출되지 않는다.

세포, 예컨대, 태반 관류액 세포, 조혈 세포, 예컨대, $CD34^+$ 조혈 줄기 세포; 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포; 본원에 제공된 분리된 부착성 태반 세포는 예컨대, 소 용기, 예컨대, 앰플 또는 격벽이 있는 바이알(septum vial) 속에서 동결보존 배지 속에 동결보존될 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 mL 당 약 1×10^4 내지 5×10^8 개의 세포의 농도에서 동결보존된다. 구체적인 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 mL당 약 1×10^6 내지 1.5×10^7 세포의 농도에서 동결보존된다. 보다 구체적인 구현예에서, 본원에 제공된 세포는 mL당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 1.5×10^7 개의 세포의 농도에서 동결보존된다.

적합한 동결보존 배지는 정상 염수, 예컨대, 성장 배지를 포함하는 배양 배지, 또는 세포 동결 배지, 예를 들면, 상업적으로 이용가능한 세포 동결 배지, 예컨대, C2695, C2639 또는 C6039(Sigma); CryoStor® CS2, CryoStor® CS5 또는 CryoStor®CS10 (BioLife Solutions)를 포함하는 배양 배지를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 동결보존 배지는 DMSO (디메틸설폭사이드)를, 예컨대, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10% (v/v)의 농도에서 포함한다. 동결보존 배지는 추가의 제제, 예를 들면, 메틸셀룰로즈, 텍스트란, 알부민(예컨대, 사람 혈청 알부민), 트레할로즈, 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10%의 DMSO, 약 25% 내지 75%의 텍스트란 및/또는 약 20 내지 60%의 사람 혈청 알부민(HSA)을 포함한다. 특정 구현예에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10%의 DMSO, 약 25% 내지 75%의 트레할로즈 및/또는 약 20 내지 60%의 사람 HSA를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 텍스트란 및 40%의 HSA를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 텍스트란(정상의 염수 중 10% w/v) 및 40%의 HSA를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 트레할로즈 및 40%의 HSA를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 동결보존 배지는 5%의 DMSO, 55%의 트레할로즈(정상 염수 중 10% w/v) 및 40%의 HSA를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 동결보존 배지는 CryoStor® CS5를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 동결보존 배지는 CryoStor®CS10를 포함한다.

본원에 제공된 세포는 어떠한 다양한 방법에 의해서, 및 세포 배양, 확장 또는 분화의 어느 단계에서도 동결보존될 수 있다. 예를 들면, 본원에 제공된 세포는 원래의 조직 또는 기관, 예컨대, 태반 관류액 또는 체대혈로부터 분리 후, 또는 동안, 또는 상기 요약된 방법들의 제1, 제2, 또는 제3 단계 후 바로 동결보존될 수 있다. 특정 구현예에서, 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 또는 선조 세포는 원래의 조직 또는 기관으로부터 분리 후 약 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45분내 또는 약 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 또는 24 시간 내에 동결보존된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 원래의 조직 또는 기관으로부터 분리 후 1, 2 또는 3일 내에 동결보존된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상술한 바와 같은 제1 배지 속에서 배양된 후, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 동결보존된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상술한 바와 같은 제1 배지 속에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 동결보존된다. 일부 구현예에서, NK 세포를 본원에 기술된 3 단계 방법으로 제조하는 경우, 상기 세포는 제1 배지 속에서 배양된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 동안; 및/또는 제2 배지 속에서 배양된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 동안; 및/또는 제3 배지 속에서 배양된 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25일 동안 동결보존된다. 구체적인 구현예에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 제조되며, 상기 세포는 제1 배지 속에서 배양된 후 10일 동안; 제2 배지 속에서 배양된 후 4일 동안; 및 제3 배지 속에서 배양된 후 21일 동안 배양된다.

일 국면에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 동결보존하는 방법이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 상기 방법은: 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 여기서 당해 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있다)을 생산하는 단계, 및 다음 상기 NK 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 이하에서 저장하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음에, NK 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 상기 세포 현탁액 용액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터 상기 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 이하에서 저장하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 인자(SCF) 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음에, NK 세포를 동결보존 배지 속에서 보존하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인

구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 단계 (1)로부터의 상기 세포 현탁액 용액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 SCF, 줄기 세포 동원 작용제, 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음에, NK 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 및 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a+ 세포를 상기 세포의 제3 집단으로부터 분리하여 세포의 제4 집단(여기서 당해 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 천연 킬러 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음, NK 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 및 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a+인 ILC3 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음, ILC3 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존된 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액 용액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 포함

한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여한 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 줄기 세포 동원 작용제, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 해파린, 예컨대, 저 분자량 해파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존된 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, 및 Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 해파린, 예컨대, 저 분자량 해파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존된 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집단을 생산하는 단계; 및 (c) 상기 세포의 제2 집단을 줄기 세포 동원 작용제, SCF, IL-2 및 IL-15를 포함하고, LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다)을 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 해파린, 예컨대, 저 분자량 해파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존된 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80°C 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

일 구현예에서, 상기 방법은: (a) 조혈 줄기 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계; (b) 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여, 세포의 제2 집

단을 생산하는 단계; (c) 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 각각의 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여하는 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단을 생산하는 단계; 및 (d) CD11a- 세포를 상기 세포의 제3 집단으로부터 분리하여 세포의 제4 집단(여기서 당해 세포의 제4 집단은 CD56+, CD3-, 및 CD11a-인 ILC3 세포를 포함한다)를 생산하는 단계 및 다음에, ILC3 세포를 동결보존 배지 속에서 동결보존시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다. 구체적인 구현예에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁액 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존된 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 단계 (3)으로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 상기 동결보존된 샘플을 -80℃ 이하의 온도에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

본원에 제공된 세포는 조절된 속도의 동결기 속에서, 동결보존 동안 예컨대, 약 0.1, 0.3, 0.5, 1, 또는 2℃/분에서 냉각시킬 수 있다. 일 구현예에서, 동결보존 온도는 -80℃ 내지 약 -180℃, 또는 약 -125℃ 내지 약 -140℃이다. 동결보존된 세포는 사용을 위한 해동 전에 액체 질소로 이전될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들면, 앰플이 약 -90℃에 이르면, 이들을 액체 질소 저장 구역에 이전시킨다. 동결보존된 세포는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도에서 해동될 수 있으며, 보다 구체적으로 약 37℃의 온도로 해동될 수 있다. 특정 구현예에서, 동결보존된 세포는 약 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 또는 24 시간 동안, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 동결보존된 후 해동된다. 특정 구현예에서, 동결보존된 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28개월 동안 동결보존된 후 해동된다. 특정 구현예에서, 동결보존된 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10년 동안 동결보존된 후 해동된다.

적합한 해동 배지는 정상 염수, 예를 들면, 성장 배지, 예컨대, RPMI 배지를 포함하는 플라스말라이트(plasmalyte) 배양 배지를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 해동 배지는 배지 보충물(예컨대, 영양물, 사이토킨 및/또는 인자들) 중 하나 이상을 포함한다. 본원에 제공된 세포를 해동시키는 데 적합한 배지 보충물은, 예를 들면, 사람 혈청 AB, 태아 소 혈청(FBS) 또는 태아 송아지 혈청(FCS)과 같은 혈청, 비타민, 사람 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 아미노산(예컨대, L-글루타민), 지방산(예컨대, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린(예컨대, 재조합체 사람 인슐린), 트랜스페린(철 포화된 사람 트랜스페린), β -머캅토에탄올, 줄기 세포 인자(SCF), Fms-유사-타이로신 키나제 3 리간드(Flt3-L), 사이토킨, 예컨대, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-15(IL-15), 트롬보포이에틴(Tpo) 또는 헤파린을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 구체적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법에서 유용한 해동 배지는 RPMI를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 약 0.5 내지 20%의 FBS를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 약 1, 2, 5, 10, 15 또는 20%의 FBS를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20%의 HSA를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 약 1, 2.5, 5, 10, 15, 또는 20%의 HSA를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 RPMI 및 약 10%의 FBS를 포함한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트 및 약 5%의 HSA를 포함한다.

본원에 제공된 동결보존 방법은 장기간 저장을 위해, 또는 예컨대, 세포자멸사 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에서 허용되도록 최적화될 수 있다. 일 구현예에서, 해동 후 세포는 예컨대, 자동 세포 계수기 또는 트립판 블루 방법에 의해 측정된 것으로서, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 살아있는 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 해동 후 세포는 약 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 또는 25%의 사멸 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 해동 후 세포는 약 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 또는 25%의 초기 세포자멸사 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 해동 후 세포의 약 0.5, 1, 5, 10, 15 또는 20%는 예컨대, 세포자멸사 검정(예컨대, TO-PRO3 또는 AnnV/PI 세포자멸사 검정 키트)에 의해 측정된 것으로서, 해동 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 후에 세포자멸사를 겪는다. 특정 구현예에서, 해동 후 세포는 본원에 제공된 방법을 사용하여 배양, 확장 또는 분화된 후 재-동결보존된다.

5.10.NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함하는 조성물

5.10.1. 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포

일부 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 포함하는 조성물, 예컨대, 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈, 및/또는 말초 혈액으로부터 분리된 예컨대, 조혈 줄기 또는 선조 세포를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 조성물 중 세포의 적어도 50%를 차지한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 예컨대, $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포는 조성물 중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 중 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 또는 40% 이하는 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포는 $CD16^{-}$ 이다.

본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 생체내에서 사용하기 위해 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 이러한 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체, 예컨대, 염수 용액 또는 생체내 투여용의 다른 허용된 생리학적으로 허용되는 용액 속에 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 집단을 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 본원의 어딘가에 기술된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 중 어느 것도 포함한다.

본 발명의 약제학적 조성물은 50% 이상의 생존 세포(즉, 집단 중 세포의 적어도 50%는 작용성이거나 살아있다)를 포함하는 세포의 집단을 포함한다. 바람직하게는, 집단 중 세포의 적어도 60%는 살아있다. 보다 바람직하게, 약제학적 조성물 속의 집단중 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%는 살아있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 예컨대, 이식을 촉진시키는 하나 이상의 화합물; 알부민, 텍스트란 40, 젤라틴, 하이드록시에틸 전분 등과 같은 안정화제를 포함할 수 있다.

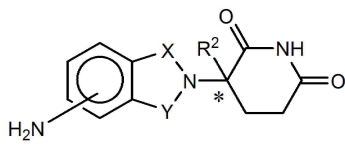
주사가능한 용액으로 제형화되는 경우, 일 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약 1.25%의 HSA 및 약 2.5%의 텍스트란을 포함한다. 세포 생성물의 투여에 적합한, 다른 주사가능한 제형을 사용할 수 있다.

일 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 전신계 또는 국소 투여에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 비경구 투여에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 중앙내 투여에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 장치, 매트릭스, 또는 스캐폴드(Scaffold)를 통해 투여하기에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 주사에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 카테터(catheter)를 통한 투여에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 국소 주사에 적합하다. 보다 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 고형 종양(예컨대, 육종)에 직접 국소 주사하기에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 주사기로 주사하기에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 안내된 전달을 통한 투여에 적합하다. 구체적인 구현예에서, 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 복강경 검사법, 내시경술, 초음파술, 컴퓨터 단층촬영술, 자기 공명술 또는 방사선학에 의해 보조된 주사에 적합하다.

특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함하는 조성물, 예컨대, 본원에 제공된 약제학적 조성물은 약제 등급의 투여가능한 단위로 제공된다. 이러한 단위는 별개의 용적, 예컨대, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL 등으로 제공된다. 이러한 단위는 규정된 수의 세포, 예컨대, NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 밀리리터당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 이상의 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 세포를 함유하도록 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 단위는 밀리리터당 약, 최소 약 또는 최대 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 개 이상의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 또는 단위당 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , $1 \times$

10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 이러한 단위는 규정된 수의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및/또는 다른 세포중 어느 것을 함유하도록 제공될 수 있다. 구체적인 구현예에서, NK 세포 및 ILC3 세포는 본원에 제공된 비로 존재한다.

다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 중 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 단일 개인으로부터 기원한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 상이한 개인으로부터의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 중 상기 분리된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 사용한 치료가 의도된 개인 이외의 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 상기 NK 세포가 동일한 수의 천연 킬러 세포, 즉 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉하지 않거나 근접하지 않는 NK 세포보다 검출가능하게 더 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양 및 시간 동안 면역조절 화합물과 접촉되거나 근접하게 된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 면역조절 화합물은 하기 기술된 화합물이다. 참고: 예컨대, 이의 개시내용이 이의 전문으로 본원에 참고로 포함된, 미국 특허 제7,498,171호. 특정 구현예에서, 면역조절 화합물은 아미노-치환된 이소인돌린이다. 일 구현예에서, 면역조절 화합물은 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디하이드로이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-디온; 3-(4'-아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-디온; 4-(아미노)-2-(2,6-디옥소 (3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-디온; 또는 4-아미노-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)이소인돌-1,3-디온이다. 다른 구현예에서, 면역조절 화합물은 포말리도마이드, 또는 레날리도마이드이다. 다른 구현예에서, 상기 면역조절 화합물은 다음 화학식을 갖는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라트레이트, 거울상 이성체, 부분입체이성체, 라세메이트, 또는 입체이성체의 혼합물이다:

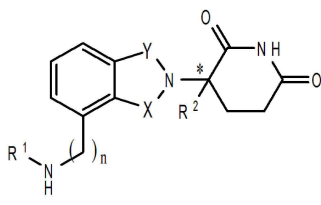


여기서,

X 및 Y 중 하나는 C=O이고, X 및 Y 중 다른 것은 C=O 또는 CH_2 이고,

R^2 은 수소 또는 저급 알킬이다.

다른 구현예에서, 상기 면역조절 화합물은 다음 화학식을 갖는 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라트레이트, 거울상 이성체, 부분입체이성체, 라세메이트, 또는 입체이성체의 혼합물이다:



여기서,

X 및 Y 중 하나는 C=O이고 다른 것은 CH_2 또는 C=O이며;

R^1 은 H, (C_1-C_8) 알킬, (C_3-C_7) 사이클로알킬, (C_2-C_8) 알케닐, (C_2-C_8) 알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4) 알킬- (C_1-C_6) 헤테로사이클로알킬, (C_0-C_4) 알킬- (C_2-C_5) 헤테로아릴, $\text{C}(\text{O})\text{R}^3$, $\text{C}(\text{S})\text{R}^3$, $\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$, (C_1-C_8) 알킬- $\text{N}(\text{R}^6)_2$, (C_1-C_8) 알킬- OR^5 , (C_1-C_8) 알킬- $\text{C}(\text{O})\text{OR}^5$, $\text{C}(\text{O})\text{NHR}^3$, $\text{C}(\text{S})\text{NHR}^3$, $\text{C}(\text{O})\text{NR}^3\text{R}^{3'}$, $\text{C}(\text{S})\text{NR}^3\text{R}^{3'}$ 또는 (C_1-C_8) 알킬- $\text{O}(\text{CO})\text{R}^5$ 이고;

R^2 은 H, F, 벤질, (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알케닐, 또는 (C_2-C_8) 알키닐이며;

R^3 및 $\text{R}^{3'}$ 는 독립적으로 (C_1-C_8) 알킬, (C_3-C_7) 사이클로알킬, (C_2-C_8) 알케닐, (C_2-C_8) 알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4) 알

킬-(C₁-C₆)헤테로사이클로알킬, (C₀-C₄)알킬-(C₂-C₅)헤테로아릴, (C₀-C₈)알킬-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)알킬-OR⁵, (C₁-C₈)알킬-C(O)OR⁵, (C₁-C₈)알킬-O(CO)R⁵, 또는 C(O)OR⁵이고;

R⁴는 (C₁-C₈)알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, (C₁-C₄)알킬-OR⁵, 벤질, 아릴, (C₀-C₄)알킬-(C₁-C₆)헤테로사이클로알킬, 또는 (C₀-C₄)알킬-(C₂-C₅)헤테로아릴이며;

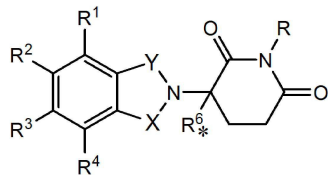
R⁵는 (C₁-C₈)알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, 벤질, 아릴, 또는 (C₂-C₅)헤테로아릴이고;

R⁶의 각각의 존재는 독립적으로 H, (C₁-C₈)알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, 벤질, 아릴, (C₂-C₅)헤테로아릴, 또는 (C₀-C₈)알킬-C(O)O-R⁵이거나 R⁶ 그룹은 결합하여 헤테로사이클로알킬 그룹을 형성하며;

n은 0 또는 1이고;

*은 키랄성-탄소 탄소 중심을 나타낸다.

다른 구현예에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 화학식을 갖는 화합물, 또는 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라트레이트, 거울상 이성체, 부분입체이성체, 라세메이트, 또는 입체이성체의 혼합물이다:



여기서:

X 및 Y 중 하나는 C=O이고 다른 것은 CH₂ 또는 C=O이며;

R은 H 또는 CH₂OCOR'이고;

(i) 각각의 R¹, R², R³, 또는 R⁴는 서로 독립적으로 할로, 탄소수 1 내지 4의 알킬, 또는 탄소수 1 내지 4의 알콕시이거나 (ii) R¹, R², R³, 또는 R⁴ 중 하나는 니트로 또는 -NHR⁵이고 R¹, R², R³, 또는 R⁴ 중 나머지는 수소이며;

R⁵는 수소 또는 탄소수 1 내지 8의 알킬이고;

R⁶은 수소, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 벤조, 클로로, 또는 플루오로이며;

R'는 R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸R⁹)이고;

R⁷은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 -(C_nH_{2n})-이며, 여기서 n은 0 내지 4의 값이고;

각각의 R⁸ 및 R⁹는 서로 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 8의 알킬이거나, R⁸ 및 R⁹은 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 또는 -CH₂CH₂X₁CH₂CH₂-이고, 여기서 X₁은 -O-, -S-, 또는 -NH-이며;

R¹⁰은 수소, 탄소수 1 내지 8의 알킬, 또는 페닐이고;

*는 키랄성-탄소 중심을 나타낸다.

다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하기 기술된 항암 화합물 중 하나 이상을 포함한다.

보다 구체적인 구현예에서, 조성물은 다른 공급원으로부터 또는 다른 방법에 의해 제조된, NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 다른 구체적

인 구현예에서, 상기 다른 공급원은 말초 혈액이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 조성물 속의 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 다른 공급원으로부터, 또는 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 동일한 개인으로부터 기원한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과는 상이한 개인으로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 속의 세포 모두, 또는 실질적으로 모두(예컨대, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 속의 태아 세포는 상기 관류액 속의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 태반 혈관화를 통해 0.9% NaCl 용액의 계대배양을 통해 수득된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하기 위해 처리된다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예컨대, 하기 기술된 면역조절 화합물, 예컨대, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하나 이상의 하기 기술된 항암 화합물을 포함한다.

다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과 동일한 개인으로부터 기원한다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단과는 상이한 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 조성물은 분리된 태반 관류액 및 분리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 분리된 관류액 및 상기 분리된 태반 관류액 세포는 상이한 개인으로부터 기원한다. 태반 관류액을 포함하는 상기 구현예들 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2명의 개인의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 구현예 중 어느 것의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 상기 분리된 태반 관류액 세포는 적어도 2명의 개인으로부터 기원한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예컨대, 하나 이상 하기 기술된 항암 화합물을 추가로 포함한다.

5.11.3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 용도

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 제공된, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 암을 지닌 개인, 예컨대, 고형 종양 세포 및/또는 혈액 암 세포를 지닌 개인, 또는 바이러스 감염된 개인을 치료하는 방법에서 사용될 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 유효 투여량은 1×10^4 내지 5×10^4 , 5×10^4 내지 1×10^5 , 1×10^5 내지 5×10^5 , 5×10^5 내지 1×10^6 , 1×10^6 내지 5×10^6 , 5×10^6 내지 1×10^7 개 이상 의 세포/kg의 체중의 범위이다. 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 또한 사용될 수 있다.

5.11.1. 암을 지닌 개인의 치료

일 구현예에서, 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개인에게 치료학적 유효량의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일 구현예에서, 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개인에게 치료학적 유효량의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 천연 킬러 세포 결핍성, 예컨대, 개인 암에 대해 활성인 NK 세포의 결핍성이다. 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 상기 개인에게 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포, 예컨대, 치료학적 유효량의 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포를 투여함을 추가로 포함한다. 다

른 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 상기 개인에게 유효량의 면역조절 화합물, 예컨대, 상기 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드를 투여함을 추가로 포함한다. 본원에 사용된 것으로서, "유효량"은 예컨대, 개인이 고생하는 암의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 이의 진행의 감소, 또는 이의 제거를 가져온다.

NK 세포의 분리된 집단 및/또는 ILC3 세포 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신계 또는 국소일 수 있다. 구체적인 구현예에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스, 또는 스캐폴드를 사용하여 수행된다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터를 통한 투여이다. 구체적인 구현예에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 투여는 국소 주사이다. 보다 구체적인 구현예에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종)내로 직접 이루어진다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 주사에 의한다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통한다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 복강경검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명, 또는 영상의학에 의한다.

구체적인 구현예에서, 암은 혈액 암, 예컨대, 백혈병 또는 림프종이다. 보다 구체적인 구현예에서, 암은 급성 백혈병, 예컨대, 급성 T 세포 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 전골수구 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 급성 거핵아구 백혈병, 전구체 B 급성 림프아구 백혈병, 전구체 T 급성 림프아구 백혈병, 버킷 백혈병(Burkitt's leukemia)(버킷 림프종), 또는 급성 이중표현형(biphenotypic) 백혈병; 만성 백혈병, 예컨대, 만성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 단핵구 백혈병, 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소 림프구성 림프종, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병; 모발 세포 림프종; T-세포 전림프구성 백혈병; 또는 림프종, 예컨대, 조직구 림프종, 림프구형질세포의 림프종(예컨대, 발덴스트롬(Waldenstrom 고분자글로불린혈증), 비장의 주변영역 림프종, 혈장 세포 신생물(예컨대, 혈장 세포 골수종, 형질세포종, 모노클로날 면역글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 외부결절성 가장자리 구역 B 세포 림프종(MALT 림프종), 결절성 가장자리 구역 B 세포 림프종(NMZL), 여포성 림프종, 외투 세포 림프종(mantle cell lymphoma), 확산성 거대 B 세포 림프종, 종격(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출액 림프종, T 세포 거대 과립구 림프구성 백혈병, 응집성 NK 세포 백혈병, 성인 T 세포 백혈병/림프종, 외부결절성 NK/T 세포 림프종, 비강 형, 장질환-형 T 세포 림프종, 간비장 T 세포 림프종, 유약화 (blastic) NK 세포 림프종, 군상 식육종(시자리 증후군(Sezary syndrome)), 1차 피부 CD30-양성 T 세포 림프구증식 질환(예컨대, 1차 피부 역성형 거대 세포 림프종 또는 림프종양구진), 혈관면역모구 T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종, 규정되지 않은, 역형성 거대 세포 림프종, 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma) 또는 결절성 림프구가 우세한 호지킨 림프종이다. 다른 구체적인 구현예에서, 암은 다발성 골수종 또는 골수이형성 증후군이다.

특정의 다른 구체적인 구현예에서, 암은 고형 종양, 예컨대, 선암종, 부신피질 암종, 결장 선암종, 결장직장 선암종, 결장직장 암종, 췌관 세포 암종, 폐 암종, 갑상샘 암종, 비인두 암종, 흑색종(예컨대, 악성 흑색종), 비-흑색종 피부 암종, 또는 상세불명 암종과 같은 암종; 데스모이드 종양(desmoid tumor); 결합조직성 소원형세포종양(desmoplastic small round cell tumor); 내분비 종양; 유잉 육종(Ewing sarcoma); 생식 세포종양(예컨대, 고환암, 난소암, 융모암, 내배엽동종양, 배아세포종 등); 간모세포종; 간세포 암종; 신경아세포종; 비-횡문근육종 연조직 육종(non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcoma); 골육종; 망막아세포종; 횡문근육종; 또는 윌름스 종양(Wilms tumor)이다. 다른 구현예에서, 고형 종양은 췌장암 또는 유방암이다. 다른 구현예에서, 고형 종양은 속귀신경집종(acoustic neuroma); 별아교세포종(예컨대, 등급 I 킬로양별아교세포종, 등급 II 저-등급 별아교세포종; 등급 III 역형성 별아교세포종(anaplastic astrocytoma); 또는 등급 IV 교모세포종 다형성); 척색종; 두개인두종; 신경교종(예컨대, 뇌 줄기 신경교종; 상의세포종; 복합 신경교종(Mixed glioma); 시신경 교종(optic nerve glioma); 또는 뇌실막밑세포종); 교모세포종; 수모세포종; 뇌수막종; 전이성 뇌 종양; 희소돌기아교세포종; 송과체모세포종; 뇌하수체 종양; 원시 신경외배엽 종양; 또는 신경초종이다. 다른 구현예에서, 암은 전립샘 암이다. 다른 구현예에서, 암은 간암이다. 다른 구현예에서, 암은 폐암이다. 다른 구현예에서, 암은 신장암이다.

특정 구현예에서, 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개인, 예컨대, 천연 킬러 세포가 결핍된 개인

은 상기 투여 전 골수 이식을 받은 개인이다. 특정 구현예에서, 상기 골수 이식은 상기 암의 치료시 시행되었다. 특정의 다른 구현예에서, 골수 이식은 상기 암 이외의 상태의 치료시 시행되었다. 특정 구현예에서, 개인은 상기 골수 이식 이외에 면역억제제를 제공받았다. 특정 구현예에서, 골수 이식을 받은 개인은 상기 투여 시기에 이식체 대 숙주 질환(GVHD)의 하나 이상의 증상을 나타내었다. 특정의 다른 구현예에서, 골수 이식을 받은 개인은 GVHD의 증상이 만연하기 전에 상기 세포를 투여받는다.

특정의 구체적인 구현예에서, 암, 예를 들면, 혈액 암을 지닌 개인은 상기 투여 전에 TNF α 억제제, 예컨대, ETANERCEPT®(Enbrel)의 적어도 1회 용량을 제공받는다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 상기 암의 진단 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 개월 내에 상기 용량의 TNF α 억제제를 제공받는다. 구체적인 구현예에서, TNF α 억제제의 용량을 제공받은 개인은 급성 골수성 백혈병을 나타낸다. 보다 구체적인 구현예에서, TNF α 억제제의 투여량을 제공받고 급성 골수성 백혈병을 나타내는 개인은 혈액 세포 속에서 5번 염색체의 롱 아암(long arm)의 결실을 추가로 나타낸다. 다른 구현예에서, 암, 예를 들면, 혈액 암을 지닌 개인은 필라델피아 염색체(Philadelphia chromosome)를 나타낸다.

특정의 다른 구현예에서, 상기 개인에서 암, 예를 들면, 혈액 암 또는 고형 종양은 하나 이상의 항암 약물에 대해 난치성이다. 구체적인 구현예에서, 암은 GLEEVEC® (이마티니브 메실레이트)에 대해 난치성이다.

특정 구현예에서, 상기 개인에서 암, 예를 들면, 혈액 암은 적어도 하나의 항암 약물에 대해 반응하며; 당해 구현예에서, 본원에 기술된 대반 관류액, 분리된 대반 관류액 세포, 분리된 천연 킬러 세포, 예컨대, 대반 천연 킬러 세포, 예컨대, 대반-기원한 중간체 천연 킬러 세포, 분리되고 조합된 천연 킬러 세포, 또는 NK 세포, 및/또는 이의 조합, 및 임의로 면역조절 화합물이 보조 치료로서 또는 조합 치료요법으로서 상기 항암 약물과 함께 가해진다. 특정의 다른 구현예에서, 암, 예를 들면, 혈액 암을 지닌 개인은 적어도 하나의 항암 약물로 치료되며, 상기 투여 전에 재발되었다. 특정 구현예에서, 치료될 개인은 난치성 암을 지닌다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 세포를 사용한 암 치료 방법은 암의 재발에 대해 보호(예컨대, 방지 또는 지연)한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 암 치료 방법은 1개월 이상, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 이상, 1년 이상, 2년 이상, 3년 이상, 또는 4년 이상 동안 암의 차도를 가져온다.

일 구현예에서, 다발성 골수종을 지닌 개인에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) NK 세포를 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개인에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 제대혈 조혈 세포로부터 생산된 제대혈 NK 세포, 또는 NK 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위해 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 다른 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 NK 세포는 각각 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특정의 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는: 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 당해 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 여기서 상기 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아 있다)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

다른 구현예에서, 급성 골수성 백혈병(AML)을 지닌 개인에게 NK 세포(IL2 단독, 또는 IL-15 단독, IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18을 사용한 예비치료에 의해 임의로 활성화됨)(여기서 상기 NK 세포는 상기 개인에서 AML를 치료하는데 효과적이다)를 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 상기 분리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 예비치료된다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한 본원에 기술된

3 단계 방법에 의해 생산된다. AML을 지닌 개인의 치료 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 본원에 기술된 바와 같은 3 단계 방법에 의해 생산된다. 특수한 구현예에서, 앞서의 방법에 의해 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML을 포함한다. 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML의 치료를 위해 NK 세포를 투여하기 위한 당해 분야에 공지된 방법은 당해 목적을 위해 채택될 수 있다: 참고: 예컨대, Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28:955-959(이들 각각은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다). 특정 구현예에서, 상기 개인은 AML에 대한 적어도 하나의 비-천연 킬러 세포 치료제에 실패하였다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 65세 이상이고 처음 차도가 있다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 상기 천연 킬러 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다.

일 구현예에서, 다발성 골수종을 지닌 개인에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) ILC3 세포(여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개인에서 다발성 골수종을 치료하는데 효과적이다)를 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 다른 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 및/또는 ILC3 세포는 각각 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는: 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 여기서 상기 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있다)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

다른 구현예에서, 급성 골수성 백혈병(AML)을 지닌 개인에게 ILC3 세포(IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 임의로 활성화됨)(여기서 상기 ILC3 세포는 상기 개인에서 AML을 치료하는데 효과적이다)를 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2, IL12, IL18, 또는 IL15 중 하나 이상으로 예비처리된다. 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 제대혈 ILC3 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 ILC3 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 ILC3 세포를 생산하기 위한 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. AML을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특징의 구체적인 구현예에서, 상기 ILC3 세포는 본원에 기술된 바와 같은 3 단계 방법에 의해 생산된다. 특수한 구현예에서, 앞서의 방법으로 치료될 AML은 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML을 포함한다. 난치성 AML, 불량한-예후의 AML, 또는 소아 AML의 치료를 위해 ILC3 세포를 투여하기 위한 당해 분야에 공지된 방법은 당해 목적을 위해 채택될 수 있다: 참고: 예컨대, Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28:955-959 (이들 각각은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다). 특정 구현예에서, 상기 개인은 AML에 대한 적어도 하나의 비-천연 킬러 세포 치료제에 실패한 AML을 갖는다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 65세 이상이고 처음 차도가 있다. 구체적인 구현예에서, 상기 개인은 상기 천연 킬러 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 사이타라빈, 또는 이들 둘 다로 조건화되었다.

AML을 지닌 개인을 치료하는 방법의 다른 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는: 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또

는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 여기서 상기 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있다)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

다른 구현예에서, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 지닌 개인에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) NK 세포, 예컨대, 상술한 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포(여기서 상기 NK 세포는 상기 개인에서 상기 CLL을 치료하는데 효과적이다)의 치료학적 유효량을 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예컨대, 조혈 줄기 세포로부터 생산된 NK 세포이다. 다른 구현예에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생산하기 위한 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 상기 방법 중 어느 것의 구체적인 구현예에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 플루다라빈, 및 확장된 NK 세포는 상기 개인에게 별도로 투여된다. CLL을 지닌 개인을 치료하는 방법의 특정의 구체적인 구현예에서, 상기 NK 세포는: 조혈 줄기 세포 또는 선조 세포, 예컨대, CD34⁺ 줄기 세포 또는 선조 세포를 줄기 세포 동원 작용제 및 트롬보포이에틴(Tpo)를 포함하는 제1 배지 속에서 배양하여 세포의 제1 집단을 생산하는 단계, 후속적으로 상기 세포의 제1 집단을 줄기 세포 동원 작용제 및 인터루킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo를 결여하는 제2 배지 속에서 배양하여 세포의 제2 집단을 생산하는 단계, 및 후속적으로 상기 세포의 제2 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원 작용제 및 LMWH를 결여한 제3 배지 속에서 배양하여, 세포의 제3 집단(여기서 상기 세포의 제3 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 여기서 상기 천연 킬러 세포의 적어도 70%, 또는 적어도 80%는 살아있다)을 생산하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지 및/또는 상기 제2 배지는 백혈병 억제 인자(LIF) 및/또는 대식세포 염증성 단백질-1 알파(MIP-1 α)를 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 FMS-유사 타이로신 키나제-3 리간드(Flt-3L)를 결여한다. 구체적인 구현예에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지는 LIF 및 MIP-1 α 를 결여하고, 상기 제3 배지는 LIF, MIP-1 α , 및 Flt3L을 결여한다. 특정 구현예에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 어느 것도 헤파린, 예컨대, 저 분자량 헤파린을 포함하지 않는다.

5.11.2. 종양 세포 증식의 억제

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을, 종양 세포와 근접시킴, 예컨대, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 따라서, 다수의 NK 세포가 치료학적 유효량의 NK 세포 집단을 종양 세포와 근접시킴, 예컨대, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 임의로, 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 NK 세포와 근접하게 된다. 다른 구체적인 구현예에서, 면역조절 화합물, 예컨대, 상술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 NK 세포와 근접시킴으로써, 종양 세포의 증식이 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포와 근접하지 않은 동일한 유형의 종양 세포와 비교하여 검출가능하게 감소되도록 한다. 임의로, 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포는 면역조절 화합물과 접촉시키거나 근접시킨 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 NK 세포와 근접시킨다.

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 종양 세포와 근접시킴, 예컨대, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 따라서, 다수의 ILC3 세포가 치료학적 유효량의 ILC3 세포 집단을 종양 세포와 근접시킴, 예컨대, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포와 접촉시킴을 포함하여, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에서 사용될 수 있다. 임의로, 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접하게 된다. 다른 구체적인 구현예에서, 면역조절 화합물, 예컨대, 상술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접시킴으로써, 종양 세포의 증식이 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포와 근접하지 않은 동일한 유형의 종양 세포와 비교하여 검출가능하게 감소되도록 한다. 임의로, 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포는 면역조

질 화합물과 접촉시키거나 근접시킨 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 종양 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접시킨다.

본원에 사용된 것으로서, 특정 구현예에서, 세포와 관련하여 "접촉시킴", 또는 "근접시킴"은, 일 구현예에서 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 천연 킬러 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 집단, ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 ILC3 세포 집단, 및/또는 분리되어 조합된 천연 킬러 세포 및 종양 세포 사이의 직접적인 물리적, 예컨대, 세포-세포 접촉을 포함한다. 다른 구현예에서, "접촉"은 동일한 물리적 공간 내에서의 존재를 포함하는데, 예컨대, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 천연 킬러 세포, 예컨대, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 본원에 기술된 천연 킬러 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 집단, 본원에 기술된 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 ILC3 세포 집단, 및/또는 분리되어 조합된 천연 킬러 세포가 종양 세포로서 동일한 용기(예컨대, 배양 디쉬, 다중웰 플레이트)에 속에 놓여짐을 포함한다. 다른 구현예에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 또는 본원에 기술된 천연 킬러 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 NK 세포 집단 또는 본원에 기술된 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법에 따라 생산된 ILC3 세포 집단, 및 종양 세포의 "접촉"은 예컨대, 태반 관류액 또는 세포, 예컨대, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 천연 킬러 세포, 예컨대, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 또는 ILC3 세포를 개인, 예컨대, 종양 세포를 포함하는 개인, 예컨대, 암 환자에게 주사하거나 주입시킴으로써 달성된다. 면역조절 화합물 및/또는 탈리도미드와 관련하여 "접촉"은, 예컨대, 세포 및 면역조절 화합물 및/또는 탈리도미드가 각각 서로 직접 물리적으로 접촉하거나 동일한 물리적 용적(예컨대, 세포 배양 용기 또는 개인) 내에 놓여짐을 의미한다.

구체적인 구현예에서, 종양 세포는 혈액 암 세포, 예컨대, 백혈병 세포 또는 림프종 세포이다. 보다 구체적인 구현예에서, 암은 급성 백혈병, 예컨대, 급성 T 세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병(AML) 세포, 급성 전골수구 백혈병 세포, 급성 골수아구성 백혈병 세포, 급성 거핵아구 백혈병 세포, 전구체 B 급성 림프아구 백혈병 세포, 전구체 T 급성 림프아구 백혈병 세포, 버킷 백혈병(버킷 림프종) 세포, 또는 급성 이중표현형 백혈병 세포; 만성 백혈병 세포, 예컨대, 만성 골수성 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 만성 단핵구 백혈병 세포, 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소 림프구성 림프종 세포, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병 세포; 모발 세포 림프종 세포; T-세포 전림프구성 백혈병 세포; 또는 림프종 세포, 예컨대, 조직구 림프종 세포, 림프구형질 세포의 림프종 세포(예컨대, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증 세포), 비장의 주변영역 림프종 세포, 혈장 세포 신생물 세포(예컨대, 혈장 세포 골수종 세포 세포, 형질세포종 세포, 모노클로날 면역글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 외부결절성 가장자리 구역 B 세포 림프종(MALT 림프종) 세포, 결절성 가장자리 구역 B 세포 림프종(NMZL) 세포, 여포성 림프종 세포, 외부 세포 림프종 세포, 확산성 거대 B 세포 림프종 세포, 종격(흉선) 거대 B 세포 림프종 세포, 혈관내 거대 B 세포 림프종 세포, 원발성 삼출액 림프종 세포, T 세포 거대 과립구 림프구성 백혈병 세포, 응집성 NK 세포 백혈병 세포, 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포, 외부결절성 NK/T 세포 림프종 세포-비강 형 세포, 장질환-형 T 세포 림프종 세포, 간비장 T 세포 림프종 세포, 유약화 NK 세포 림프종 세포, 균상 식육종(시자리 증후군), 1차 피부 CD30-양성 T 세포 림프구증식 질환(예컨대, 1차 피부 역성형 거대 세포 림프종 또는 림프종양구진) 세포, 혈관면역모구 T 세포 림프종 세포, 말초 T 세포 림프종-규정되지 않은 세포, 역형성 거대 세포 림프종 세포, 호지킨 림프종 세포 또는 결절성 림프구가 우세한 호지킨 림프종 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 종양 세포는 다발성 골수종 세포 또는 골수이형성 증후군 세포이다.

구체적인 구현예에서, 종양 세포는 고형 종양 세포, 예컨대, 암종 세포, 예를 들면, 선암종 세포, 부신피질 암종 세포, 결장 선암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 결장직장 암종 세포, 췌관 세포 암종 세포, 폐 암종 세포, 갑상샘 암종 세포, 비인두 암종 세포, 흑색종 세포(예컨대, 악성 흑색종 세포), 비-흑색종 피부 암종 세포, 또는 상세포암 암종 세포; 데스모이드 종양 세포; 결합조직성 소원형세포종양 세포; 내분비 종양 세포; 유잉 육종 세포; 생식 세포 종양 세포(예컨대, 고환암 세포, 난소암 세포, 음모암 세포, 내배엽종양 세포, 배아세포종 세포 등); 간세포종 세포; 간세포 암종 세포; 신경아세포종 세포; 비-황문근육종 연조직 육종 세포; 골육종 세포; 망막아세포종 세포; 황문근육종 세포; 또는 윌름스 종양 세포이다. 다른 구현예에서, 고형 종양은 체장암 세포 또는 유방암 세포이다. 다른 구현예에서, 고형 종양은 속귀신경집종 세포; 별아교세포종 세포(예컨대, 등급 I 털모양별아교세포종 세포, 등급 II 저-등급 별아교세포종 세포; 등급 III 역형성 별아교세포종 세포; 또는 등급 IV 교모세포종 다형성 세포); 척색종 세포; 두개인두종 세포; 신경교종 세포(예컨대, 뇌 줄기 신경교종 세포; 상의세포종 세포; 복합 신경교종 세포; 시신경 교종 세포; 또는 뇌실막밑세포종 세포); 교모세포종 세포; 수모세포종 세포; 뇌수막종 세포; 전이성 뇌 종양 세포; 희소돌기아교세포종 세포; 송과체세포종 세포; 뇌하수체 종양 세포; 원시 신경외배엽 종양 세포; 또는 신경초종 세포이다. 다른 구현예에서, 종양 세포는 전립샘

암 세포이다.

본원에 사용된 것으로서, "치료학적으로 유리한" 및 "치료학적 이점"은 예컨대, 종양 크기에 있어서의 감소; 종양의 확장의 축소 또는 중지; 전이성 질환의 감소 또는 예방; 조직 샘플, 예컨대, 혈액 샘플 중 암 세포의 수에 있어서 단위 용적당 감소; 상기 개인이 갖는 특수한 암 또는 종양의 어떠한 증상에 있어서의 임상적 개선, 개인이 갖는 특수한 암의 특정 증상 등의 악화의 축소 또는 중지를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

5.11.3. NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 다른 항암제를 사용한 암의 치료

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부일 수 있다. 유사하게, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부일 수 있다. 또한 또는 추가로, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 다른 항암제를 포함하는 항암 치료요법을 보충하는데 사용될 수 있다. 이러한 항암제는 당해 분야에 잘 공지되어 있으며 소염제, 면역조절제, 세포독성제, 암 백신, 화학치료제, HDAC 억제제(예컨대, HDAC6i (ACY-241)), 및 siRNA를 포함한다. 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및 임의로 관류액, 관류액 세포, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 이외의 천연 킬러 세포 이외에, 암을 지닌 개인, 예컨대, 종양 세포를 지닌 개인에게 투여될 수 있는 구체적인 항암제는 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 악시비신; 아클라루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 아드리아마이신; 아드루실; 알데슬레우킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제(예컨대, Erwinia chrysanthi로부터; 에르위나제); 아스페를린; 아바스틴 (베박시주마브); 아자시타딘; 아제테파; 아조도마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타미드; 비산트렌 하이드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부설판; 캅티노마이신; 칼루스테론; 카라세마이드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀골; 셀레코시브(COX-2 억제제); 세루비딘; 클로람부실; 시클레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파미드; 사이타라빈; 다카르바빈; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구라닌; 데자구아닌 메실레이트; 다이지쿰; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미틴 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엘스파르; 에놀로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르블로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토포포스; 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티닌; 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루오로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리엔 나트륨; 켄시타빈; 켄시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다마이신; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 이프로플라틴; 이리노테칸; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오타이드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤라이드 아세테이트; 리아로졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로속산트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 마이탄신; 메클로레타민 하이드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜레게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가틸; 머캅토프린; 메토트렉세이트; 메토트렉세이트 나트륨; 메토프린; 메투레데파; 미틴도마이드; 미토카르신; 미토그로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토탄; 미록산트론 하이드로클로라이드; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트; 피포스파미드; 피보브로만; 피포설판; 피록산트론 하이드로클로라이드; 폴리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 하이드로클로라이드; 프롤루킨; 푸리네톨; 푸로마이신; 푸로마이신 하이드로클로라이드; 피라조푸린; 류마트렉스; 리보프린; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 솔로페누르; 타블로이드; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 탁소트레; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 템포포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스톨락톤; 이아미프린; 티오구라닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토포사르; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트렉살; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텔린; 투블로졸 하이드로클로라이드; 우라실 무스타드; 우레데파; 바프레오타이드; 베르테포르핀; 빈블라틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈레우로신 설페이트; 비노렐빌 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈줄리딘 설페이트; 보

로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 및 조루비신 하이드로클로라이드.

다른 항암 약물은 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 20-에피-1,25 디하이드록시비타민 D3; 5-아자사이티딘; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실폴벤; 아테사이페놀; 아도젤레신; 알테류킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미놀레볼린산; 암루비신; 암사크린; 아날그렐라이드; 아나스트로졸; 안드로그라폴라이드; 혈관형성 억제제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-등쪽화결정 형태형성 단백질(anti-dorsalizing morphogenetic protein)-1; 안티안드로젠, 전립샘 암증; 안티안드로젠; 안티네오프라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오타이드; 아피디콜린 글리시네이트; 세포자멸사 유전자 조절인자; 세포자멸사 조절인자; 아푸린산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 데아미나제; 아술라크린; 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자타이로신; 박카틴 III 유도체; 발라놀; 바티마스타트; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도체; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베틀린산; bFGF 억제제; 비칼루타미드; 비산트렌; 비사지리디닐스페르민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 설포시민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캄프토사르(또한 캄프토로 불림; 이리노테칸) 캄프토테신 유도체; 카팩시타빈; 카복사미드-아미노-트리아졸; 카복시아미도트리아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유도된 억제제; 카르젤레신; 카제인 키나제 억제제(ICOS); 카스타노스페르민; CC-122; CC-220; CC-486; 셰크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로를렌스; 클로로퀴놀살린 설포아미드; 시카프로스트; 시스_포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나게닌; 크람베스시딘 816; 크리스나톨; 크립토파이신 8; 크립토파이신 A 유도체; 쿠라신 A; 사이클로펜탄트라퀴논; 사이클로플라탐; 사이페마이신; 사이타라빈 옥포스페이트; 세포상해인자(Cytolytic factor); 사이토스타틴; 다클릭시마브; 데시타빈; 데하이드로디텐민 B; 데슬로렐린; 엑사메타손; 텍시포스파미드; 엑스라족산; 텍스베라파밀; 이다지쿠온; 디렘닌 B; 디독스; 디에틸노르스페르민; 디하이드로-5-아자사이티딘; 디하이드로타솔, 9-; 디옥사마이신; 디페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 돌라세트론; 독시푸루리딘; 독소루비신; 드롤록시펜; 드로나비롤; 두오카르마이신 SA; 에브셀렌; 에코무스틴; 에텔포신; 에드레콜로마브; 에플로르니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테라이드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로겐 효능제; 에스트로겐 길항제; 에타나리제; 에토포시드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티나이드; 필그라스탐; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈(예컨대, 플루다라); 플루오다우노루니신 하이드로클로라이드; 로르페니맥스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 겔라티나제 억제제; 겐시타빈; 글루타타온 억제제; 헵술판; 헤레굴린; 헥사메틸렌 비사세타마이드; 호모헤링토닌(HHT, 오마세탁신 메페숙시네이트); 하이페리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이마티니브(예컨대, GLEEVEC®), 이미퀴모드; 면역자극성 펩타이드; 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제; 인터페론 효능제; 인터페론; 인터루킨; 이오겐쿠아닌; 요오도독소루비신; 이포메아놀, 4-; 이로플라트; 이르소글라딘; 이소벤가졸; 이소호모 할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀라이드; 카할랄리드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 란레오타이드; 레이나마이신; 레노그라스탐; 렌티남 설페이트; 램툴스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤라이드 + 에스트로겐 + 프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아미드 유사체; 친지성 이당류 펩타이드; 친지성 백금 화합물; 리쏘클리나미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로속산트론; 록소리빈; 루르토테칸; 루테튬 텍사피린; 라이소필린; 융해성 펩타이드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리아스타트; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴라이신 억제제; 맥크릭스 메탈로프로테이나제 억제제; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메티오나제; 메토클로프라미드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스탐; 미토구아존; 미톨락톨; 미토마이신 유사체; 미토나피드; 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린; 미톡산트론; 모파로텐; 몰그라모스탐; 항-EGFR 항체(예컨대, 에르비투스(세록시마브)); 항-CD19 항체; 항-CD20 항체(예컨대, 리툽시마브); 항-CS-1 항체(예컨대, 엘로투주마브 (BMS/AbbVie)); 항-CD38 항체(예컨대, 다라투마브(젠마브/Janssen Biotech); 항-CD138 항체(예컨대, 인다툽시마브(Biotest AG Dreieich)); 항-PD-1 항체; 항-PD-L1 항체(예컨대, 두르발루마브(AstraZeneca)); 항-NKG2A 항체(예컨대, 모날리주마브(IPH2201; Innate Pharma)); 항-DLL4 항체(예컨대, 뎀시주마브 (Oncomed/Celgene)); 항-DLL4 및 항-VEGF 이특이적인 항체; 항-RSP03 항체; 항-TIGIT 항체; ICOS 효능제 항체; 항-디시알로강글리오사이드(GD2) 항체(예컨대, 모노클로날 항체 3F8 또는 ch14.18); 항-ErbB2 항체(예컨대, 헤르셉틴); 사람 코리온 고나도트로핀; 모노포스포릴 지질 A+마이코박테리움 세포벽 sk; 모피다몰; 머스타드 항암제; 마이카페록사이드 B; 마이코박테리아 세포벽 추출물; 마이리아포론; N-아세틸디날린; N-치환된 벤자미드; 나파렐린; 나그레스탐; 할록손+펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라스탐; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조절제; 니트록사이드 항산화제; 니트룰린; 오블리머센(GENASENSE®); O⁶-벤질구아닌; 옥트레오타이드; 오키센논; 올리고뉴클레오타이드

드; 오나프리스톤; 온단세트론; 오라신; 경구 사이토킨 유도제; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴(예컨대, 플록사틴); 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도제; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 페가스파르가제; 펠테신; 펜토산 폴리설페이트 나트륨; 펜토스타틴; 펜트로졸; 퍼플루브론; 퍼포스파미드; 페틸릴 알코올; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제; 피시바닐; 필로카르핀 하이드로클로라이드; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노젠 활성화제 억제제; 백금 복합체; 백금 화합물; 백금-트리아민 복합체; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아좀 억제제; 단백질 A-계 면역 조절인자; 단백질 키나제 C 억제제; 단백질 키나제 C 억제제, 미세조류; 단백질 타이로신 포스파타제 억제제; 푸린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 억제제; 푸르푸린스; 피라졸로아크리딘; 피리독실화된 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체; raf 길항제; 랄리티트렉세드; 라모세트론; ras 파르네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제; ras 억제제; ras-GAP 억제제; 데메틸화된 레텔립틴; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레티나미드; 로히투킨; 로무르타이드; 로키니멕스; 루비기논 B1; 루복실; 사핀골; 사인토펜; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스탐; Sdi 1 모사체; 세무스틴; 노쇠 유도된 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오타이드; 신호 전달 억제제; 시조피란; 소부족산; 나트륨 보로캅테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베롤; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스플레노펜틴; 스폰기스타틴 1; 스쿠알라민; 스티피아미드; 스트로멜라이신 억제제; 신피노신; 초활성 혈관작용 장 펩타이드 길항제; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 탈리무스틴; 타목시펜 메티오다이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로머라제 억제제; 테모포르핀; 테니포시드; 테트라클로로데카옥사이드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모사체; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 효능제; 티모트리난; 갑상샘 자극 호르몬; 틴 에틸 에티오프루핀; 티라파자민; 티타노센 비클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 해독 억제제; 트레티노인; 트리아세틸 우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토텔린; 트로피세트론; 투로스테라이드; 타이로신 키나제 억제제; 티르포스틴; UBC 억제제; 우베니멕스; 비노생식동-유도된 성장 억제 인자; 우로키나제 수용체 길항제; 바프레오타이드; 바리올린 B; 벡티빅스(파니투무마브)벨라레솔; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈크살틴; 비탁신; 보로졸; 웰코보린(류코보린); 크셀로다(카팩시타빈); 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브; 및 지노스타틴 스티말라머.

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 하나 이상의 면역 체크포인트 조절인자(Immune checkpoint modulator)를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부일 수 있다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 CD28, OX40, 글루코코르티코이드-유도된 종양-괴사 인자 수용체-관련 단백질 (GITR), CD137(4-1BB), CD27, 헤르페스 바이러스 도입 매개인자(Herpes Virus Entry Mediator: HVEM), T 세포 면역글로불린 및 추천-도메인 함유-3(TIM-3), 림프구-활성화 유전자 3(LAG-3), 세포독성 T-림프구-관련 항원-4(CTLA-4), T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 억제제(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(Lymphocyte Attenuator: BTLA), PD-1, 및/또는 PD-L1과 같은 면역 체크포인트 분자를 조절한다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 분자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 면역 체크포인트 분자의 효능제이다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 CD28, OX40, 글루코코르티코이드-유도된 종양 괴사 인자 수용체-관련 단백질(GITR), CD137(4-1BB), CD27, ICOS(CD278); 유도성 T-세포 공자극인자) 및/또는 헤르페스 바이러스 도입 매개인자(HVEM)이다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 면역 체크포인트 분자의 길항제이다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 T 세포 면역글로불린 및 무친-도메인 함유-3(TIM-3), 림프구-활성화 유전자 3(LAG-3), 세포독성 T-림프구-관련 항원-4(CTLA-4), T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 억제제(VISTA), B 및 T 림프구 약화인자(BTLA), PD-1, 및/또는 PD-L1이다. 특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다.

특정 구현예에서, 면역 체크포인트 조절인자는 항체 또는 이의 항원-결합 단편이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항체-결합 단편은 PD-1에 결합한다. 특정 구현예에서, PD-1에 결합하는 항체 또는 이의 항체-결합 단편은 니볼루마브 (OPDIVO[®], BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538; Bristol-Myers Squibb, Ono Pharmaceuticals, Inc.), 펌브롤리주마브(KEYTRUDA[®], 람브롤리주마브, MK-3475; Merck), 피딜리주마브(CT-011; Curetech, Medivation); MEDI0680(AMP-514; MedImmune, AstraZeneca); PDR-001(Novartis), SHR1210, 또는 INC-SHR1210;

Incyte, Jiangsu Hengrui)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PD-L1에 결합한다. 특정 구현예에서, PD-L1에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 두르발루마브(MEDI4736; MedImmune, AstraZeneca), BMS-936559(MDX-1105; Bristol-Myers Squibb), 아벨루마브(MSB0010718C; Merck Serono, Pfizer), 또는 아테졸리주마브(MPDL-3280A; Genentech, Roche)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 LAG-3에 결합한다. 특정 구현예에서, LAG-3에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb), GSK2831781 (GlaxoSmithKline), 또는 LAG525(Novartis)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CTLA-4에 결합한다. 특정 구현예에서, CTLA-4에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 이필리무마브(YERVOYTM, BMS-734016, MDX010, MDX-101; Bristol-Myers Squibb), 또는 트레멜리무마브(CP-675,206; MedImmune, AstraZeneca)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 OX40에 결합한다. 특정 구현예에서, OX40에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 MEDI6469(MedImmune, AstraZeneca), MEDI0562(MedImmune, AstraZeneca), 또는 KHK4083(Kyowa Hakko Kirin)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 GITR에 결합한다. 특정 구현예에서, GITR에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 TRX518(Leap Therapeutics) 또는 MEDI1873(MedImmune, AstraZeneca)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD137 (4-1BB)에 결합한다. 특정 구현예에서, CD137 (4-1BB)에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 PF-2566(PF-05082566; Pfizer), 또는 우렐루마브(BMS-663513; Bristol-Myers Squibb)이다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 CD27에 결합한다. 특정 구현예에서, CD27에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 바릴루마브(CDX-1127; Celldex Therapies)이다.

특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 레날리도마이드 또는 포말리도마이드를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 HDAC 억제제를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-CS-1 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-CD38 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-CD138 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-PD-1 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-NKG2A 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-CD20 항체(예컨대, 리툽시마브; RITUXAN®)를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 CC-122를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 CC-220을 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-DLL4 항체(예컨대, 램시주마브)를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-DLL4 및 항-VEGF 이특이적인 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-RSP03 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항-TIGIT 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 ICOS 효능제 항체를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법

을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 호모헤링토닌(예컨대, 오마세탁신 메페식 시네이트)를 포함하는 항암 치료요법 섭생의 일부이다.

일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포를 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)에 대한 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포를 사용한 암을 지닌 개인의 치료는 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC)에 대한 항암 치료요법 섭생의 일부이다. 일 구현예에서, ADCC 섭생은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 하나 이상의 항체(예컨대, 앞서의 단락에서 기술된 항체)의 투여를 포함한다. 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 또는 다른 B-세포 악성종양(림프종 및 백혈병), 신경아세포종, 흑색종, 유방암, 및 두경부 암을 포함하나, 이에 한정되지 않는 수개 유형의 암이 이러한 ADCC 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 구체적인 구현예에서, ADCC 치료요법은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 다음의 항체, 항-EGFR 항체(예컨대, 에르비투스(세툽시마브)), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체(예컨대, 리툽시마브), 항-디시알로강글리오사이드(GD2) 항체(예컨대, 모노클로날 항체 3F8 또는 ch14.18), 또는 항-ErbB2 항체(예컨대, 헤르셉틴) 중 하나 이상의 투여를 포함한다. 일 구현예에서, ADCC 섭생은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD33 항체의 투여를 포함한다. 일 구현예에서, ADCC 섭생은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD20 항체의 투여를 포함한다. 일 구현예에서, ADCC 섭생은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD138 항체의 투여를 포함한다. 일 구현예에서, ADCC 섭생은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 항-CD32 항체의 투여를 포함한다.

5.11.4. 바이러스 감염의 치료

다른 구현예에서, 바이러스 감염을 지닌 개인에게 치료학적 유효량의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단을 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 다른 구현예에서, 바이러스 감염을 지닌 개인에게 치료학적 유효량의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 ILC3 세포 집단을 투여함을 포함하여, 상기 개인을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 개인은 천연 킬러 세포가 결핍되어 있는데, 예컨대, NK 세포 또는 개인의 바이러스 감염에 대해 다른 선천적인 림프 세포 결핍성이다. 특정의 구체적인 구현예에서, 상기 투여는 상기 개인에게 분리된 태반 관류액, 분리된 태반 관류액 세포, 분리된 천연 킬러 세포, 예컨대, 태반 천연 킬러 세포, 예컨대, 태반-기원한 중간체 천연 킬러 세포, 분리되고 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 이의 조합 중 하나 이상을 투여함을 포함한다. 특정의 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 상기 투여 전에 면역조절 화합물, 예컨대, 상기 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드와 접촉되거나 이와 근접하게 된다. 특정의 다른 구체적인 구현예에서, 상기 투여는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 외에, 면역조절 화합물, 예컨대, 상기 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드를 상기 개인에게 투여함을 포함하며, 여기서 상기 양은 예컨대, 상기 바이러스 감염의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 진행의 감소, 또는 이의 제거를 가져오는 양이다. 구체적인 구현예에서, 바이러스 감염은 아데노비리다에(Adenoviridae), 피코르나비리다에(Picornaviridae), 헤르페스비리다에(Herpesviridae), 헤파드나비리다에(Hepadnaviridae), 플라비비리다에(Flaviviridae), 레트로비리다에(Retroviridae), 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae), 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae), 파필로마비리다에(Papillomaviridae), 라브도비리다에(Rhabdoviridae), 또는 토가비리다에(Togaviridae) 계열의 바이러스에 의한 감염이다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 바이러스는 사람 면역결핍성 바이러스(HIV), 콕사키바이러스(Coxsackievirus), A형 간염 바이러스(HAV), 폴리오바이러스(poliovirus), 엡슈타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(EBV), 헤르페스 단순형 (herpes simplex type) 1 (HSV1), 헤르페스 단순형 2 (HSV2), 사람 사이토메갈로바이러스(Cytomegalovirus: CMV), 사람 헤르페스바이러스 8형 (HHV8), 헤르페스 조스터 바이러스(herpes zoster virus)(바리셀라 조스터 바이러스(varicella zoster virus: VZV) 또는 쉥글스 바이러스(Shingles virus)), B형 간염 바이러스(HBV), C형 간염 바이러스(HCV), D형 간염 바이러스(HDV), E형 간염 바이러스(HEV), 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)(예컨대, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 인플루엔자 C 바이러스, 또는 토고토바이러스(Thogotovirus)), 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 파필로마바이러스, 광견병 바이러스, 또는 풍진 바이러스의 바이러스에 의한 감염이다.

다른 보다 더 구체적인 구현예에서, 상기 바이러스는 아데노바이러스 A종 혈청형 12, 18, 또는 31; 아데노바이러스 B종, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35, 또는 50; 아데노바이러스 종 C, 혈청형 1, 2, 5, 또는 6; 종 D,

혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 51; 중 E, 혈청형 4; 또는 중 F, 혈청형 40 또는 41이다.

특정의 다른 보다 구체적인 구현예에서, 바이러스는 아포이 바이러스(Apoi virus: APOIV), 아로아 바이러스(Aroa virus: AROAV), 바가자 바이러스(bagaza virus: BAGV), 반지 바이러스(Banzi virus: BANV), 보우보우이 바이러스(Bouboui virus: BOUV), 카시파코레 바이러스(Cacipacore virus: CPCV), 카레이 아이슬랜드 바이러스(Carey Island virus: CIV), 카우본 릿지 바이러스(Cowbone Ridge virus: CRV), 뎅기열 바이러스(Dengue virus: DENV), 엣지 힐 바이러스(Edge Hill virus: EHV), 가드젯 굴리 바이러스(Gadgets Gully virus: GGYV), 일헤우스 바이러스(Ilheus virus: ILHV), 이스라엘 터키 뇌막뇌척수염 바이러스(Israel turkey meningoencephalomyelitis virus: ITV), 자패니즈 뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus: JEV), 주그라 바이러스(Jugra virus: JUGV), 주티아파 바이러스(Jutiapa virus: JUTV), 카담 바이러스(kadam virus: KADV), 케도우고우 바이러스(Kedougou virus: KEDV), 코코베라 바이러스(Kokobera virus: KOKV), 코우탄고 바이러스(Koutango virus: KOUV), 키아사누르 포레스트병 바이러스(Kyasanur Forest disease virus: KFDV), 란가트 바이러스(Langat virus: LGTV), 매반 바이러스(Meaban virus: MEAV), 모독 바이러스(Modoc virus: MODV), 몬타나 마이오티스 류코엔세팔리티스 바이러스(Montana myotis leukoencephalitis virus: MMLV), 무레이 밸리 엔세팔리티스 바이러스(Murray Valley encephalitis virus: MVEV), 느타야 바이러스(Ntaya virus: NTAV), 옴스크 출혈열 바이러스(Omsk hemorrhagic fever virus: OHFV), 포와싼 바이러스(Powassan virus: POWV), 리오 브라보 바이러스(Rio Bravo virus: RBV), 로얄 팜 바이러스(Royal Farm virus: RFV), 사보야 바이러스(Saboya virus: SABV), 세인트 루이스 뇌염 바이러스(St. Louis encephalitis virus: SLEV), 살 비에자 바이러스(Sal Vieja virus: SVV), 산 페를리타 바이러스(San Perlita virus: SPV), 사우마레즈 리프 바이러스(Saumarez Reef virus: SREV), 세픽 바이러스(Sepik virus: SEPV), 템부수 바이러스(Tembusu virus: TMUV), 진드기-매개 뇌염 바이러스(Tick-borne encephalitis virus: TBEV), 타울레니이 바이러스(Tyuleniy virus: TYUV), 우간다 S 바이러스(Uganda S virus: UGSV), 우수투 바이러스(Usutu virus: USUV), 웨셀스브론 바이러스(Wesselsbron virus: WESSV), 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus: WNV), 야오운데 바이러스(Yaounde virus: YAOV), 황색열 바이러스(Yellow fever virus: YFV), 요코세 바이러스(Yokose virus: YOKV), 또는 지카 바이러스(Zika virus: ZIKV)이다.

다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 및 임의로 태반 관류액 및/또는 관류액 세포는 바이러스 감염을 지닌 개인에게 하나 이상의 다른 항바이러스제를 포함하는 항바이러스 치료요법 섭생의 일부로서 투여된다. 바이러스 감염을 지닌 개인에게 투여될 수 있는 구체적인 항바이러스제는 다음을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 이미퀴모드, 포도필록스, 포도필린, 인터페론 알파(IFN α), 레티콜로스, 노독시놀-9, 아시클로비르, 팜시클로비르, 발라시클로비르, 간시클로비르, 시도포비르; 아만타딘, 리만타딘; 리바비린; 자나마비르 및 오셀타우마비르; 인디나비르, 넬피나비르, 또는 사퀴나비르와 같은 프로테아제 억제제; 디다노신, 라미부딘, 스타부딘, 잘시타빈, 또는 지도부딘과 같은 뉴클레오사이드 역 전사효소 억제제; 및 네비라핀, 또는 에파비렌즈와 같은 비-뉴클레오사이드 역 전사효소 억제제.

5.11.5. ILC3 세포에 대한 다른 치료 용도

프로비데드헤라인으로서 모든 방법에 사용될 수 있는 ILC3 세포가 본원에 제공된다. ILC3 세포가 사용될 수 있는 예시적인 방법은 다음의 국면에서 개시되어 있다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 화학치료요법 후 위장관을 회복시키는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 방사선에 대해 개인을 보호하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 특정 국면에서, 상기 ILC3 세포는 골수 이식에 대한 보조제로서 사용된다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 개인의 가슴샘을 재구축하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 개인에서 병원체에 대한 보호 면역성을 촉진시키는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다. 특정 국면에서, 병원체에 대한 보호 면역성을 촉진시키는 것은 장 감염을 치료하기 위해 수행된다. 특정 국면에서, 보호 면역성을 촉진시키는 것은 장 감염을 예방하기 위해 수행된다. 특정 국면에서, 장 감염은 시트로박터 로텐티움

(*Citrobacter rodentium*)에 의한다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하는 종양 거부방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하여, 기관형성 동안 조직 온전성을 유지하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하는 조직 회복 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.

다른 국면에서, 개인에게 다수의 ILC3 세포를 투여함을 포함하는, 염증의 조절 방법이 본원에 제공되며, 여기서 ILC3 세포는 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된다.

5.11.6. 투여

세포, 예컨대, 태반 관류액 세포, 예컨대, 태반 관류액으로부터 핵화된 세포, 조합된 천연 킬러 세포, ILC3 세포, 및/또는 분리된 천연 킬러 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단의 수의 측정, 및 면역조절 화합물, 예컨대, 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드의 양의 측정은 각각 서로 독립적으로 수행될 수 있다.

NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 전신계 또는 국소일 수 있다. 구체적인 구현예에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부내 투여, 또는 종양내 투여일 수 있다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포의 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 장치, 매트릭스, 또는 스캐폴드를 사용하여 수행된다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사에 의한다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 카테터를 통한다. 구체적인 구현예에서, NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 주사는 국소 주사이다. 보다 구체적인 구현예에서, 국소 주사는 고형 종양(예컨대, 육종)내 직접이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 주사기에 의한 주사이다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 안내된 전달을 통한다. 구체적인 구현예에서, 대상체에 대한 NK 세포 및/또는 ILC3 세포의 분리된 집단 또는 이의 약제학적 조성물의 투여는 복강경검사, 위내시경, 초음파, 컴퓨터 단층촬영, 자기 공명, 또는 영상의학에 의해 보조된다.

5.11.6.1. 세포의 투여

특정 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단은 개인에 대해 검출가능한 치료학적 이점을 가져 오는 양 또는 수, 예컨대 유효량으로 사용, 예컨대, 개인에게 투여되며, 여기서 당해 개인은 바이러스 감염, 암, 또는 종양 세포를 갖는데, 예를 들면, 종양 세포, 고형 종양 또는 혈액 암을 갖는 개인, 예컨대, 암 환자이다. 이러한 세포는 이러한 개인에게 절대 수의 세포로 투여될 수 있는데, 예컨대, 상기 개인에게 약, 최소 약, 또는 최대 약, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 또는 1×10^{11} 개의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 투여된다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이러한 개인에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있는데, 예컨대, 상기 개인에게 개인의 킬로그램당 약, 최소 약, 또는 최대 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 또는 1×10^{11} 개의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이러한 개인에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있는데, 예컨대, 상기 개인에게 개인의 킬로그램당 약, 최소 약, 또는 최대 약 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 또는 5×10^8 개의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포로 투여된다. 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 이러한 개인에게 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 및 임의로 태반 관

류액 세포 및/또는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 이외의 천연 킬러 세포와 상기 개인 내의 다수의 종양 세포(예컨대, 추정된 수) 사이의 적절한 비에 따라 투여될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 상기 개인에게 개인 속의 종양 세포의 수에 대해 약, 최소 약, 또는 최대 약 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1의 비로 투여될 수 있다. 이러한 개인에서 종양 세포의 수는 예컨대, 개인으로부터의 조직의 샘플, 예컨대, 혈액, 생검 등 속에서 종양 세포의 수를 계수함으로써 추정할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 예컨대, 고형 종양의 경우, 상기 계수는 종양 또는 종양들의 영상과 조합하여 수행하여 적절한 종양 용적을 수득한다. 구체적인 구현예에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드, 예컨대, 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도미드는 상기 개인에게 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 임의로 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 이외의 태반 관류액 세포 및/또는 천연 킬러 세포에 추가하여 투여된다.

특정 구현예에서, 예컨대, 개인에서 종양 세포의 증식을 억제하는 방법; 개인의 천연 킬러 세포가 결핍된 개인의 치료; 또는 바이러스 감염을 지닌 개인의 치료; 또는 암을 지닌 개인의 치료, 예컨대, 종양 세포, 혈액 암 또는 고형 종양을 지닌 개인의 치료는 종양 세포를 상기 개인, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포 중 하나 이상과 근접시키거나 투여함을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 종양 세포를 개인, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 근접시키거나 투여함을 추가로 포함한다.

구체적인 구현예에서, 예를 들면, 개인의 천연 킬러 세포가 결핍된 개인(예컨대, NK 세포의 수에 있어서의 결핍 또는 암, 종양 또는 바이러스-감염된 세포에 대한 NK 세포의 반응성)의 치료; 또는 암 또는 바이러스 감염을 지닌 개인의 치료, 또는 종양 세포 증식의 억제는 상기 종양 세포를 분리된 태반 관류액 세포 또는 태반 관류액이 보충된 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포를 상기 개인과 근접시키거나 투여함을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 밀리리터당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포가 밀리리터당 약, 또는 적어도 약, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 분리된 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 분리된 태반 관류액 세포로 보충된다. 다른 보다 구체적인 구현예에서, 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포가 약, 또는 적어도 약, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000 mL의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

다른 구체적인 구현예에서, 개인의 천연 킬러 세포가 결핍된 개인의 치료; 암을 지닌 개인의 치료; 바이러스 감염을 지닌 개인의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제는 상기 종양 세포를 상기 개인, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 근접시키거나 투여함을 포함하며, 여기서 상기 세포는 부작성 태반 세포, 예컨대, 부작성 태반 줄기 세포 또는 다능성 세포, 예컨대, $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부작성 태반 세포로 보충된다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포는 밀리리터당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 개 이상의 부작성 태반 줄기 세포, 또는 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} 개 이상의 부작성 태반 세

포, 예컨대, 부착성 태반 줄기 세포 또는 다능성 세포로 보충된다.

다른 구체적인 구현예에서, 개인의 천연 킬러 세포가 결핍된 개인의 치료; 암을 지닌 개인의 치료; 바이러스 감염을 지닌 개인의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포와 조합된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 사용하여 수행되며, 여기서 상기 세포는 관류액의 단위, 또는 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 또는 10^{11} 개의 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포당 조건화된 배지, 예컨대, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포, 예컨대, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.1, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL의 줄기 세포-조건화된 배양 배지로 보충된다. 특정 구현예에서, 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포는 이의 개시내용이 이의 전문으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제7,468,276호 및 제8,057,788호에 기술된 다능성 부착성 태반 세포이다. 다른 구체적인 구현예에서, 상기 방법은 종양 세포를 개인, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드과 접촉 시키거나 투여함을 추가로 포함한다.

다른 구체적인 구현예에서, 상기 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포가 태반 관류액 세포로 보충된, 개인의 천연 킬러 세포가 결핍된 개인의 치료; 암을 지닌 개인의 치료; 바이러스 감염을 지닌 개인의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제에서, 상기 관류액 세포는 상기 근접하기 전에 인터루킨-2(IL-2)과 일정 기간 근접한다. 특정 구현예에서, 상기 기간은 상기 근접 전 약, 최소 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48 시간이다.

본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 임의로 관류액 또는 관류액 세포는 바이러스 감염을 지닌 개인, 암을 지닌 개인, 또는 종양 세포를 지닌 개인에게 항암 치료요법 과정 동안 투여될 수 있거나; 치료요법 동안 수회, 예컨대, 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23시간 마다 1회, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일 마다 1회, 또는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 36주 이상 마다 1회 투여될 수 있다. 세포 및 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 사용되는 구현예에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드, 및 세포 또는 관류액은 예컨대, 동일한 제형 속에서 함께; 예컨대 별개의 제형 속에서 별도로, 적절하게는 동시에 투여될 수 있거나; 별도로, 예컨대, 상이한 투여 스케줄로 또는 상이한 날에 투여될 수 있다. 유사하게, 세포 및 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물이 사용되는 구현예에서, 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물, 및 세포 또는 관류액은 예컨대, 동일한 제형 속에서 함께; 예컨대 별개의 제형 속에서 별도로, 적절하게는 동시에 투여될 수 있거나; 별도로, 예컨대, 상이한 투여 스케줄로 또는 상이한 날에 투여될 수 있다. 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 및 관류액 또는 관류액 세포는, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 관류액, 또는 관류액 세포가 과거에 개인에게 투여되었는지의 여부와 상관없이 투여될 수 있다.

6. 키트(kit)

본원에 기술된 하나 이상의 조성물, 예컨대, 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포, 예컨대, 본원에 기술된 3 단계 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단을 포함하는 조성물로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩(pack) 또는 키트가 본원에 제공된다. 이러한 용기 (들)과 임의로 관련된 것은 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 처방된 형태의 지시사항일 수 있으며, 이러한 지시사항은 사람 투여용 제조, 사용 또는 판매의 상기 기관에 의한 승인을 반영한다.

본원에 포함된 키트는 본원에 기술된 방법, 예컨대, 종양 세포의 성장을 억제하는 방법 및/또는 암, 예컨대, 혈액 암을 치료하는 방법, 및/또는 바이러스 감염을 치료하는 방법에 따라 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 키트는 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 또는 이의 조성물은 하나 이상의 용기에 포함한다. 구체적인 구현예에서, 본원에 기술된 3 단계 방법에 의해 생산된 NK 세포 및/또는 ILC3 세포 집단, 또는 이의 조성물을 포함하는 키트가 본원에 제공된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

7. 실시예

7.1. 실시예 1: 조혈 줄기 또는 선조 세포의 천연 킬러 세포를 생산하는 3 단계 방법

[0331]

[0332]

- [0333] CD34⁺ 세포를 나타낸 일수 동안 다음의 배지 제형 속에서 배양하고, 세포의 분취량을 세포 수, 세포 생존능, 천연 킬러 세포 분화의 특성화 및 기능적 평가를 위해 취한다.
- [0334] 1 단계 배지: 90% 줄기 세포 성장 배지(SCGM)(CellGro®), 10% 사람 혈청-AB를 4.5 U/mL의 저 분자량 헤파린(LMWH), 25 ng/mL의 재조합체 사람 트롬보포이에틴(TPO), 25 ng/mL의 재조합체 사람 Flt3L, 27 ng/mL의 재조합체 사람 줄기 세포 인자(SCF), 25 ng/mL의 재조합체 사람 IL-7, 0.05 ng/mL의 재조합체 사람 IL-6 (500-배), 0.25 ng/mL의 재조합체 사람 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF)(50-배), 0.01 ng/mL의 재조합체 사람 과립구-대식 세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)(500-배), 0.10% 겐타마이신, 및 1 내지 10 μ m의 스템레게닌-1(SR-1)으로 보충하였다.
- [0335] 2 단계 배지: 90% SCGM, 10% 사람 혈청-AB를 4.5 U/mL의 저 분자량 헤파린(LMWH), 25 ng/mL의 재조합체 사람 Flt3L, 27 ng/mL의 재조합체 사람 SCF, 25 ng/mL의 재조합체 사람 IL-7, 20 ng/mL의 재조합체 사람 IL-15, 0.05 ng/mL의 재조합체 사람 IL-6(500-배), 0.25 ng/mL의 재조합체 사람 G-CSF(50-배), 0.01 ng/mL의 재조합체 사람 GM-CSF(500-배), 0.10%의 겐타마이신, 및 1 내지 10 μ m의 SR1으로 보충하였다.
- [0336] 3 단계 배지: 90% STEMMACTM, 10% 사람 혈청-AB, 0.025 mM 2-머캅토에탄올 (55 mM)을 22 ng/mL의 재조합체 사람 SCF, 1000 U/mL의 재조합체 사람 IL-2, 20 ng/mL의 재조합체 사람 IL-7, 20 ng/mL의 재조합체 사람 IL-15, 0.05 ng/mL의 재조합체 사람 IL-6(500-배), 0.25 ng/mL 재조합체 사람 G-CSF(50-배), 0.01 ng/mL 재조합체 사람 GM-CSF(500-배), 및 0.10% 겐타마이신으로 보충하였다.
- [0337] 세포를 0일 째에 3×10^4 개의 세포/mL로 1 단계 배지 속에 씨딩(seeding)하고, 세포를 CD34+ 및 CD45+ 수(count)로 순도에 대해 시험하고 7AAD 염색으로 생존능에 대해 시험한다. 5일 째에, 세포를 계수하고 1 단계 배지와 함께 1×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 7일째에 세포를 계수하고 1 단계 배지와 함께 1×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다.
- [0338] 10일 째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 속에 1×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 12일 째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 속에 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다.
- [0339] 또한, 다음의 프로토콜을 14일 전체에서 사용한다: 세포를 0일째에 7.5×10^3 개의 세포/mL에서 1 단계 배지에 씨딩하고, 세포를 CD34+ 및 CD45+ 수로 순도에 대해 시험하고 7AAD 염색으로 생존능에 대해 시험한다. 7일 째에, 세포 계수하고 1 단계 배지와 함께 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 9일 째에 세포를 계수하고 2 단계 배지와 함께 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 12일 째에, 세포를 계수하고 2 단계 배지 속에서 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다.
- [0340] 스피너 플라스크(spinner flask) 속에서 역동적 분화를 위해, 14일 째에, 세포를 원심분리하고, 계수하고 3 단계 배지 속에 5×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 17일 째에, 세포를 원심분리하고, 계수하고 3 단계 배지 속에서 7.5×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 21일 째에, 세포를 원심분리하고, 계수하며, CD56, CD3, CD16, 및 CD94에 대해 표현형 분석하고, 7AAD 염색으로 생존능에 대해 검정하고, 3 단계 배지 속에서 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 24일 째에, 세포를 계수하고, 3 단계 배지 속에 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 25 내지 27일 째에, 용적을 1일 당 3 단계 배지 5 mL에서 가한다. 28일 째에, 세포를 계수하고, 3 단계 배지 속에서 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 31일 째에, 세포를 계수하고, 3 단계 배지 속에서 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 32 내지 34일째에, 용적을 1일 당 3 단계 배지 5 mL에서 가한다. 35일 째에, 세포를 수거하고, 계수하며, 표현형분석하고, 세포독성에 대해 검정한다.
- [0341] 정적 분화를 위해, 14일 째에, 세포를 원심분리하여 농축시키고, 계수하며 3 단계 배지 속에서 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 17일 째에, 세포를 계수하고 3 단계 배지 속에서 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 19일 째에, 세포를 계수하고 3 단계 배지 속에서 3×10^5 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 21일 째에, 세포를 원심분리하고, 계수하며, CD56, CD3, CD16, 및 CD94에 대해 표현형분석하고, 7AAD 염색에 의해 생존능을 검

정하고, 3 단계 배지 속에서 5×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 24일 쯤에, 세포를 원심분리하고 계수하며 3 단계 배지 속에서 7.5×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 26일 쯤에, 세포 계수하고 3 단계 배지 속에서 7.5×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 28일 쯤에, 세포를 계수하고 3 단계 배지 속에서 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 31일 쯤에, 세포를 원심분리하고 계수하며 3 단계 배지 속에서 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 33일 쯤에, 세포를 원심분리하고 계수하며 3 단계 배지 속에서 1×10^6 개의 세포/mL의 농도로 씨딩한다. 35일 쯤에, 세포를 수거하고, 계수하며, 표현형분석하고, 세포독성에 대해 검증한다.

[0342] 수거를 위해, 세포를 400xg에서 7분 동안 회전시킨 후, 동일한 용적의 플라스말라이트 A 속에서 펠렛의 현탁액을 넣는다. 현탁액을 400xg에서 7분 동안 회전시키고, 수득되는 펠렛을 10% HSA(w/v), 60% 플라스말라이트 A(v/v) 속에 표적 세포 농도에서 현탁시킨다. 이후에, 세포를 70 μ m 메쉬(mesh)를 통해 여과하고, 최종 용기를 채우고, 세포의 분취량을 생존능, 세포독성, 순도, 및 세포 수에 대해 시험하고, 나머지를 포장한다.

[0343] 7.2. 실시예 2: 3 단계 방법에서 SR-1 및 CH223191의 농도의 평가

[0344] 스템레게닌-1(SR-1)을 1 μ M, 10 μ M, 및 30 μ M의 농도에서, 상기 실시예 1에 요약된 3 단계 방법을 사용하여 1 단계 및 2 단계 배지의 성분으로서 평가하였다. 3 단계 방법에서 동일한 농도의 CH223191을 또한 평가하였다. 10 μ M에서 SR-1은 시험한 다른 2개의 농도보다 더 높은 세포독성을 생성하였다. 10:1(E:T) 비에서 K562 세포의 배 확장(Fold expansion), 세포 순도(CD56+CD3-), 및 세포독성에 대한 비교가능한 효과는 SR-1 및 CH223191에 대해 10 μ M 및 1 μ M 농도 둘 다에서 관찰되었다 (도 1a 내지 도 1c). SR-1 및 CH223191은 둘 다 CD34의 7일 쯤 및 14일 쯤 발현과 관련하여 유사한 효과 및 경향성을 또한 나타내었다.

[0345] 7.3. 실시예 3: 3 단계 NK 세포의 특성화

[0346] 방법

[0347] UCB CD34+ 세포를 트롬보포이에틴, SCF, Flt3 리간드, IL-7, IL-15 및 IL-2를 포함하는 사이토킨의 존재하에서 35일 동안 배양하여 실시예 1에 기술된 바와 같이, 3 단계 NK 세포를 생산하였다. 다중 색상 유동 세포분석법을 사용하여 3 단계 NK 세포의 표현형 특성을 측정하였다. 35 NK 아형(Subtype)을 사용하는 7개의 6-마커 패널 및 다른 표면 마커 패널 (참고: 도 1)을 평가하였다.

표 1

3 단계 NK 세포의 표현형 특성을 평가하는데 사용된, 35NK 아형 표면 마커를 포함하는 표면 마커			
표면 마커			
CD16	NKB1 (KIR3DL1)	NKG2C	CD7
CD56	KIR2DL3	CCR5(CD195)	NKp80
7AAD	CD11a	CXCR3(CD183)	CD44
CD94	CD122(IL-2Rb)	NKp30	CD85j(LIR1, ILT2)
NKp46	CD62L	NKG2A	CRACC
CD3	CD117	CD2	CD14
KIR2DL4(CD158d)	CCL3(MIP1a)	CD27	CD45
CD25	CD226	CD57	HLA-ABC
NKG2D	CD161	CD96	CD19
CD69	CD11b	CXCR4(CD184)	
KIR2DL1	CD132	2B4(CD244)	
	NKp44		

[0349] 세포독성 검정은 3 단계 NK 세포와 종양 세포주를 4시간 동안 공-배양함으로써 수행하였다. 또한, 상층액을 수집하여 분비된 퍼로린, 그랜자임 및 사이토킨을 분석하였다.

[0350] 세포용해 활성을 추가로 시험하기 위하여, 면역 시냅스 정보를 모니터링하였다. NK-민감성 표적 세포 (K562, 만성 골수성 백혈병 세포)를 CellTracker Violet(Life Technology)로 표지하였다. NK 세포/표적 세포 접합체는 동일 용적 및 세포 수의 NK 효과기 세포 (1×10^6 /ml) 및 표적 세포를 커버 슬립(cover slip) 위의 배양 배지 속에 15분 동안 37°C에서 현탁시켜 형성하였다. 이후에, 세포를 3% 메탄올이 없는 포르말데하이드로 고정시키고 투과

시켰다. F-액틴을 Alexa-488 접합된 팔로이딘(Life Technology)으로 염색하였다. F-액틴으로 공-염색된 퍼포린, CD2, 또는 LFA-1 항체의 경우, 슬라이드를 1시간 동안 1차 항체와 함께 항온처리한 후 Alexa Fluor 555 염료-접합된 염소 항-토끼 제2 항체(Life Technology)를 첨가하였다. 공초점 영상을 2 HyD 검출기가 갖춰진 Inverted DMI 6000 현미경이 장착된 Leica SP8 LIAchroics Compact Unit을 사용하여 수행하였다.

결과

실시에 1에 기술된 배양 공정을 사용하여, CD3-CD56+ NK 세포의 고도로 순수한 집단 ($88.3\% \pm 6.3\%$)을 일상적으로 달성하였다. 3 단계 NK 세포는 CD16 및 KIR의 저/음성 발현에 의해 입증된, 발달적으로 중간체 면역표현형을 나타내었다. 3 단계 NK 세포는 천연 세포독성 수용체(NKp30, NKp46 및 NKp44), c-렉틴 수용체(CD94, NKG2D 및 CD161), DNAM-1, 2B4, CD117, 및 CD11a(도 2)를 발현하였다. NK 세포 성숙 및 세포용해 기능의 조절인자인, 세포독성 매개인자(퍼포린 및 그랜자임) 및 EOMES는 또한 3 단계 NK 세포에서 검출되었다(도 2).

3 단계 NK 세포는 시험관내에서 혈액학적 종양 세포주에 대해 세포독성을 나타내었다. 10:1의 효과기 대 표적 비에서, 3 단계 NK 세포는 CML(K562, $70.3\% \pm 14.8\%$), AML(HL-60, $31.0\% \pm 17.8\%$) 및 다발성 골수종(RPMI8266, $32.4\% \pm 19.5\%$)을 포함하는, 세포주에 대해 용해를 발휘하였다(도 3). 3 단계 NK 세포는 또한 고 퍼포린 생산 및 고도의 파립화를 입증하였다(도 4). K562 세포와 1:1 비에서 24시간 동안 공-배양하는 경우, 3 단계 NK 세포는 IFN γ , TNF α 및 GM-CSF를 포함하는 작용성 사이토킨을 생산하였다(도 5 및 표 2).

표 2

3 단계 NK 세포는 K562와 1:1의 비에서 24시간 동안 공-배양되는 경우 작용성 사이토킨을 생산한다

	K562에 대해 1:1(n=11)의 E:T에서의 평균(pg/mL)	범위(최소, 최대) (n=11)
퍼포린	3933.09	423, 11058
그랜자임 B	1976.35	46.80, 4281
IFN γ	1323.20	12.55, 4251.06
GMCSF	1471.64	116.00, 4362.00
IL10	3.95	2.6, 6.33
GRANZYME-A	32065.73	820, 74697
TNF-A	482.90	16.62, 1841.00
MCP-1	1671.63	2.96, 6042
세포독성 (10:1)	66.99%	52.79%, 79.76%
세포독성 (2.5:1)	43.63%	18.46%, 76.94%

1:1의 효과기 대 표적 (E:T)에서, 공초점 영상은 3 단계 NK 세포가 종양 세포와 접촉하는 경우 퍼포린 편광과 함께 F-액틴 면역학적 시냅스를 형성하였으며 (도 6a 내지 6b), 이는 고 세포용해 활성(cytolytic activity)을 입증한다.

또한, 항-CD20(리툰시마브, 10 μ g/mL)의 존재하에서, 다우디 세포 (Daudi cell)(버킷 림프종, NK 사멸에 대해 내성인 림프모구양 세포주)는 $7.3\% \pm 8.0\%$ 내지 $35.1\% \pm 5.7\%$ 로 증가하였으며, 잠재적인 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC)를 입증한다.

7.4. 실시에 4: 3 단계 NK 세포의 추가의 특성화

상이한 효과기 대 표적 비에서 CML, AML, 및 다발성 골수종 세포 (K562, HL-60, 및 RPMI8226 각각)에 대한 3 단계 NK 세포의 세포독성을 도 7에 나타난 바와 같이 시험하였다. K562, HL60, 또는 PMA(포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트)의 존재하에서, 하향 조절의 지시인자인, 상이한 수준의 CD107a 발현이 관찰되었다 (도 8). 유사하게, 3 단계 NK 세포에 의한 IFN γ 생성에 있어서의 증가가 K562 및 HL60 세포주와 공배양하는 경우, 또는 PMA 자극시 관찰되었다(도 9). 40% 이하의 특이적인 용해가 24시간의 항온처리 후 3:1의 효과기 대 표적 비에서 1차 AML 표적의 존재하에 관찰되었고 NK 사멸에 대한 AML 표적의 차등적인 민감성이 관찰되었다 (도 10). 광범위한 IFN γ 생산 수준이 3 단계 NK 세포 및 1차 AML 표적 둘 다에 대해 공여체 변화 뿐만 아니라 종양 세포주 및 1차 표적에 걸쳐서도 관찰되었다(도 11).

3 단계 NK 세포는 표 3에 나타난 바와 같이, 다양한 종양 세포주 또는 1차 AML 표적 (AML1-4)의 존재하에서 다

양한 세포용해 효소 및 사이토킨을 생산하는 것으로 밝혀졌다.

[0360] 평균 사이토킨 분비 (pg/1 x 10⁶ cells)가 다양한 1차 및 종양 세포에 대해 1:1의 효과기(effector)-대-표적(target) 비에서 나타난다.

표 3

pg/1E6	NK+ K562	NK+ HL-60	NK+ KG1a	NK+ RPMI	NK+ AML1	NK+ AML2	NK+ AML3	NK+ AML4	NK+ PMA
N=	5	5	2	3	2	2	3	3	5
PERFORIN	4292	3430	2787	30	419	596	1462	1662	8466
IFNG	750	71	6	2	5	148	4	70	26601
GRANZYME-A	49192	36560	23867	274	10241	12003	51316	71886	147792
GRANZYME-B	8858	6638	1276	2	1015	1699	1071	2123	22606
GM-CSF	1920	434	46	4	16	646	50	1311	70340
TNF-α	5272	2110	30	17	46	306	138	554	7564
MCP-1	1739	37004	146	153	131	1173	173	466	3811

[0361]

[0362] 요약하면, 3 단계 NK 세포는 다양한 종양 세포주에 걸쳐 세포용해 활성을 나타내었으며, 종양 세포와 접촉하는 경우 및 PMA에 의한 활성화시 탈과립화능을 나타내었으며, 종양 세포와 공 배양하거나 PMA에 의한 활성화시 IFN γ, 퍼포린, 그랜자임 A, 및 그랜자임 B를 분비하였다. 또한, 3 단계 NK 세포는 3:1의 효과기 대 표적 비에서 1차 AML 표적에 대해 24시간 세포용해 활성을 나타내었으며 1차 AML 세포에 대해 IFN γ를 분비하는 능력을 나타내었다.

[0363] 7.5. 실시예 5: 3 단계 NK 세포의 2개 집단

[0364] FACS를 사용하여, 3 단계 NK 세포의 CD56+CD3- 집단을 2개의 세포 집단을 나타내는, CD11a- 대 CD117 플롯에서 평가하였다(도 12). CD11a- 분획(ILC3)은 CD94-인 것으로 밝혀졌으며, CD11a+ 분획(NK)은 CD94+ 및 CD94+ 세포를 둘 다 함유하는 것으로 밝혀졌다(도 13). 또한, CD11a- 및 CD11a+ 세포는 퍼포린, 에오메소더민 (EOMES), RAR-관련 오르판 수용체 감마 t(ROR γ t) 및 인터루킨-1 수용체 1(IL1R1)의 이들 발현을 기준으로, 퍼포린 및 EOMES를 발현하는 CD11a+ 세포와 구별될 수 있지만, ROR γ t 및 IL1R1를 발현하지만, 퍼포린 및 EOMES는 발현하지 않는 ROR γ t 및 IL1R1, 및 CD11a- 세포와 구별될 수 없었다(도 14). 퍼포린, 그랜자임 B, EOMES, T-bet, IL1R1, ROR γ t 및 아릴 탄화수소 수용체(AHR)의 일관된 발현 양식은 공여자에 걸쳐, CD11a+ 세포에 의해 주로 발현된 퍼포린, 그랜자임 B, EOMES, 및 T-bet, 및 CD11a- 세포에 의한 IL1R1, ROR γ t 및 AHR과 함께 나타났다(도 15). CD11a+ 집단은 전통적인 NK 세포인 것으로 가설이 세워졌지만, CD11a- 집단은 ILC3 세포인 것으로 가설이 세워졌다.

[0365] 2개 집단의 작용 분석을 수행하기 위하여, ICCS(세포내 사이토킨 염색) 검정을 사용하여 3 단계 NK 세포 내에서 사이토킨 발현을 검출하였다. 자극은 1) IFN γ에 대한 트리거(Trigger)인, PMA + 이오노마이신, 2) PMA + 이오노마이신 및 IL-23(IL-22를 검출하기 위함), 및 3) CD11a+ 및 CD11a- 세포를 촉발시키기 위한 사이토킨 IL-12+IL-18 및 IL1b/IL-23 각각을 사용하여 6시간 동안 수행하였다. 이후에, 다음의 사이토킨을 CD56/CD3/CD117/CD11a/CD94 발현과 관련하여 분석하였다: NK-특이적인 IFN γ, GM-CSF, TNF α, 및 ILC3-특이적인 IL-22 및 IL-8. CD11a+ 세포는 IFN γ 및 GM-CSF를 발현하는 것으로 측정되었으며, 여기서 CD11a- 세포는 IL-22 및 IL-8을 발현하였다(도 16). CD11a+ 세포 및 CD11a- 세포는 둘 다 TNF α를 발현하였다(도 16). 또한, GM-CSF 및 IL-22/IL-8 발현은 상호 독점적이었으며, TNF α는 IL-22 및 IL-8을 동시 발현할 수 있음이 밝혀졌다(도 16).

[0366] 3 단계 NK 서브세트 집단에서 활성화 수용체의 발현을 또한 측정하였다. 주요 NK 활성화 수용체 Nkp46, Nkp30, 및 NKG2D는 CD11a+ 세포에서만 발현되는 것으로 발견되었다(도 17). CD226 (DNAM-1) 및 2B4(CD244)는 CD11a- 세포에서 발현될 수 있었다(도 18). CD16 및 KIR의 발현은 낮았고, CD94+ 세포(도 19)로 제한되었다. 3 단계 NK 세포 내에서 이들 활성화 수용체의 전체 발현은 수명의 공여자에 대해 표 4에 요약되어 있다.

표 4

[0367]

다양한 공여자로부터의 3 단계 NK 세포에 있어서 활성화 수용체의 총 발현							
총 세포의 %	Nkp30+	Nkp46+	NKG2D+	DNAM-1+	2B4+	NKG2A+	CD16+

공역자 1	12.5	7.5	8.8	14.1	33.8	6.9	2.6
공역자 2	24.2	19.2	23.2	36.2		12	2.2
공역자 3	13.8	10.6	12.2	30.3		9.6	2.3
공역자 4	23.6	19.0	24.0	29.2	25.5	12.0	3.4
공역자 5	35.5	27.6	33.9	47.5	33.2	16.3	8.8

[0368] 3 단계 NK 세포 속에 존재하는 CD11a⁻ 세포는 예를 들면, ROR γ t 및 AHR와 관련하여, ILC3 세포에 대해 앞서 기술된 발현 패턴 각각, 및 자극시 IL-22의 분비를 개괄한다. 그러나, 3 단계 세포 속에서 발견된 CD11a⁻("ILC3") 세포 집단은 ILC3 세포, 예를 들면, T-bet, TNF α , DNAM-1, 및 2B4의 발현에 대해 앞서 기술되지 않은 특성을 가진다.

[0369] 7.6. 실시예 6: 3 단계 NK 세포의 2개 집단의 기능적 평가

[0370] 방법

[0371] 3 단계 NK 세포(CD3-CD56⁺)를 FITC 선택 키트(줄기 세포, Cat#18552)에 이어서 제조업자가 제공한 프로토콜에 따라 CD11a⁺ 또는 CD94⁺ 세포의 농축에 적용시켰다. 농축 후, 선택된 집단의 순도를 CD56-PerCP (BD Pharmingen, 제품 번호 560842), CD3-APC-H7 (BD Pharmingen, 제품 번호 560176), CD11a-FITC (BD Pharmingen, 제품 번호 555383), 또는 CD94-FITC (BD Pharmingen, 제품 번호 555388)에 의해 평가하였다. 선택된 집단의 세포독성 활성은 나타낸 바와 같은 상이한 E (효과기):T (표적) 비에서 K562에 대한 4시간 세포독성 검정으로 시험하였다. 요약하면, K562 세포를 PKH26(Sigma-Aldrich, 제품 번호 PKH26-GL)로 표지하고, 96-웰 U-바닥 조직 배양 플레이트 속에 두고 NK 세포와 함께 나타낸 바와 같은 상이한 E:T 비에서 10% FBS가 보충된 200 μ L의 RPMI1640 속에서 항온처리하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 5%의 CO₂ 속에서 4시간 항온처리 후, 세포를 수거하고 TO-PRO-3(Invitrogen, 제품 번호 T3605)를 배양물에 1 μ M의 최종 농도에서 가하고 BD FACSCanto II를 사용하여 FACS 분석하였다. 세포독성을 총 PKH26⁺ 표적 종양 세포 내에서 죽은 세포(PKH26+TO-PRO-3⁺)의 퍼센트로 나타내었다.

[0372] 결과 및 논의

[0373] 표 5에 나타낸 바와 같이, CD11a⁺, 또는 91%의 CD94⁺ 세포의 98% 순도가 농축 과정을 사용하여 달성되었다. CD11a⁺ 집단은 2.5:1의 E:T의 비에서 K562에 대해 최고의 세포독성 (67.4%)을 나타낸 반면, 분획화되지 않은 3 단계 NK 세포는 61.3%의 세포독성을 나타내었고 CD11a⁻ 세포는 36.0%의 세포독성을 나타내었다.

표 5

농축 후 CD11a/CD94의 순도		
세포 분획화	CD94%	CD11a%
전체	13.1	19
CD94 ⁺ 분획	91.4	
CD11a ⁺ 분획		97.9
CD11a ⁻ 분획		7.48

[0375] 이들 결과는 NK-농축된 CD11a⁺CD3-CD56⁺ 세포가 K562 세포에 대해 고 세포독성을 나타내며, ILC3-농축된 CD11a⁻CD3-CD56⁺ 세포가 분획화되지 않은 세포 또는 NK-농축된 세포와 비교하는 경우 더 낮은 수준에서 세포용해 활성을 또한 나타냄을 나타낸다. CD11a⁻CD3-CD56⁺ 세포 집단에 의해 나타난 세포독성은 앞서 기술된 ILC 세포와 비교하여 3 단계 ILC3 세포의 다른 유일한 특성이다.

[0376] 7.7. 실시예 7: 3 단계 NK 세포의 순도 및 활성화에 대한 다양한 사이토킨 농도의 효과

[0377] 총 15개의 상이한 조건을 평가하여 3 단계 NK 세포에서 발견된 2개(CD11a⁺ 및 CD11a⁻)의 집단에 대한 실시예 1의 제3 배지의 다양한 성분의 효과를 측정하였다. 표 6은 시험한 상이한 조건을 요약한다.

표 6

다양한 제3 배지 성분을 사용한 15개의 조건						
	조건 번호	IL-7 (ng/ml)	SCF (ng/ml)	IL-2 (ng/ml)	SR1	IL-15 (ng/ml)

1	1a	100	22	1000	0uM	20
2	1b	100	22	1000	10uM	20
3	2a	100	0	1000	0uM	20
4	2b	100	0	1000	10uM	20
5	3a	20	22	1000	0uM	20
6	3b	20	22	1000	10uM	20
7	4a	20	0	1000	0uM	20
8	4b	20	0	1000	10uM	20
9	5a	0	22	1000	0uM	20
10	6a	0	0	1000	0uM	20
11	7a	20	22	0	0uM	20
12	7b	20	22	0	10uM	20
13	8a	20	0	0	0uM	20
14	8b	20	0	0	10uM	20
15	9a	20	22	1000	0uM	0

[0379] 세포 표면 마커 CD56, CD3, CD117, CD94, IL1R1, CD11a, CD34, 및 CD14/CD15 및 세포내 마커 ROR γ t, AHR, 및 퍼포린을 포함하는 유동 세포분석 패널(표 7)을 0, 7, 14, 21, 28, 및 35일 째에 평가를 위해 이용하였다.

표 7

[0380]

유동 세포분석법 평가에 사용된 항체의 패널	
형광단	항체
APCCy7	CD56
AmCyan	생존능/CD3
BV605	CD117
PerCPCy5.5	CD94
AF700	IL1R1
PECY7	CD11a
BV421	CD34
BV711	CD14+CD15
APC	ROR γ t
PE	AHR
FITC	퍼포린

[0381] 28일 째의 발현 데이터를 도 20a 내지 도 20d에 나타낸다. 15개 조건에 대한 결과들의 요약은 표 8에서 찾을 수 있다.

표 8

[0382]

3 단계 NK 세포에서 발견된 2개의(CD11a+ 및 CD11a-) 집단에 대한 제3 배지의 다양한 성분의 효과											
조건						공여자 1에 대한 28일째 결과			공여자 2에 대한 28일째 결과		
#	IL-7 (ng/ml)	SCF (ng/ml)	IL-2 (ng/ml)	IL-15 (ng/ml)	SR1	%CD56+	CD56+의 RORgt+ %	CD56+의 퍼포린+ %	CD56+ %	CD56+ 의 RORgt+ %	CD56+의 퍼포린+ %
1a	100	22	1000	20	0uM	67	77	4	55	75	14
1b	100	22	1000	20	10uM	27	53	26	19	21	71
2a	100	0	1000	20	0uM	37	42	27	14	19	66
2b	100	0	1000	20	10uM	22	7	79	16	4	88
3a	20	22	1000	20	0uM	54	70	8	53	65	15
3b	20	22	1000	20	10uM	27	54	31	24	38	52
4a	20	0	1000	20	0uM	40	41	37	11	17	68
4b	20	0	1000	20	10uM	27	10	77	20	3	93
5a	0	22	1000	20	0uM	50	66	10	32	63	27
6a	0	0	1000	20	0uM	22	37	41	11	14	74

7a	20	22	0	20	0uM	50	60	10	44	53	28
7b	20	22	0	20	10uM	27	53	31	18	41	49
8a	20	0	0	20	0uM	43	55	20	13	16	60
8b	20	0	0	20	10uM	26	7	75	14	3	86
9a	20	22	1000	0	0uM	67	64	3	57	78	10

[0383] 요약하면, 제3 배지 중 낮은 SCF 및 제3 배지 중 SR1의 존재는 NK(CD11a+) 세포 생산을 선호함이 발견된 반면, 제3 배지 속에서 SR1의 부재는 ILC3(CD11a-) 세포 생산을 선호함이 발견되었다.

[0384] **7.8. 실시예 8: 3 단계 NK 세포의 2개 집단의 추가의 특성화 및 작용적 평가**

[0385] FACS를 사용하여, 3 단계 NK 세포의 CD56+CD3 집단을 CD11a 대 CD117 플롯에 대해 평가하였으며, 세포의 2개의 집단인, CD11a- 분획 및 CD11a+ 분획은 K562 세포의 존재하에서 CD107a 발현에 의해 구별가능한 것으로 밝혀졌다(도 21a 및 21b). CD11a+ 분획은 K562 세포의 존재하에서 유의적으로 더 높은 CD107a+ 분획에 의해 측정된 것과 같이, 탈과립화될 수 있음이 밝혀졌다.

[0386] 3 단계 NK 세포의 CD56+CD3 집단의 81% 분획을 구성하는 CD11a+ 세포, 및 3 단계 NK 세포의 CD56+CD3- 집단의 5% 분획을 구성하는 CD11a- 세포를 K562 세포에 대한 세포독성에 대해 시험하였다(도 22). CD11a+가 농축된 집단은 특히 보다 높은 효과기:표적 세포 비에서, CD11a-가 농축된 집단과 비교하여 더 높은 K562 세포독성을 나타내었다(도 22).

[0387] 사이토킨 분비 분석을 이후에 K562 표적 세포 및 효과기 세포로서 CD11a 양성 및 음성 세포 각각을 효과기:표적의 1:1 비에서 밤새 공 배양에 의해 수행하였다. 이후에, 상층액을 수집하고 멀티플렉스(multiplex)로 분석하였다. K562 세포의 존재 및 부재하에서, CD11a- 및 CD11a+ 세포는 그랜자임 A, 그랜자임 B, IFN- γ , TNF α , 퍼포린, GM-CSF, 및 IL-2를 포함하는, 특정의 시험된 사이토킨의 발현에 있어서 구별될 수 있었다(표 9 및 도 23). 사이토킨 IL-17A, IL-22, TNF β , 및 IL-10은 낮은 수준 또는 검출 이하에서 발견되었다(표 9).

표 9

[0388]

K562 표적 세포의 존재 및 부재하에서 CD11a 양성 및 음성 세포의 사이토킨 분비 분석												
		GzA (pg/mL)	GzB (ng/mL)	IFN- γ (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF α (pg/mL)	Perf (pg/mL)	GM-CSF (ng/mL)	IL-17A (pg/mL)	IL-22 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	TNF β (pg/mL)
CD11a-	NK 독	32233	282.62	1.65	below	106.45	502.87	미만	미만	미만	141.87	24.64
CD11a+	NK 독	23322	3182	19.78	3	46.62	2021	0.21	미만	미만	681.98	below
CD11a-	NK+K562 1:1	16034	236.17	1.99	below	71.63	382.37	0.19	미만	미만	99.25	23.47
CD11a+	NK+K562 1:1	30648	6632	1169	2.43	711.62	2133	4.31	미만	미만	417.45	25.47

[0389] 표 10은 상기 특성화된, CD11a 양성 및 음성 세포의 특징의 요약을 제공한다.

표 10

[0390]

CD11a 양성 및 음성 세포의 특징의 요약		
	CD11a+	CD11a-
표현형		
표면 마커	CD56+CD3-CD94+	CD56+CD3-CD117+ILR1+
세포내	퍼포린+그랜자임+ IFN- γ +	
전사 마커	T-bet+EOMES+	RORgt+ AHR+
기능		
세포독성	고	저
탈과립화	있음	저

사이토킨 분비	그랜자임 A	그랜자임 A
	그랜자임 B	그랜자임 B
	IFN- γ	
	TNF α (저)	TNF α (저)
	퍼포린	퍼포린
	GM-CSF	
	IL-2	IL-2

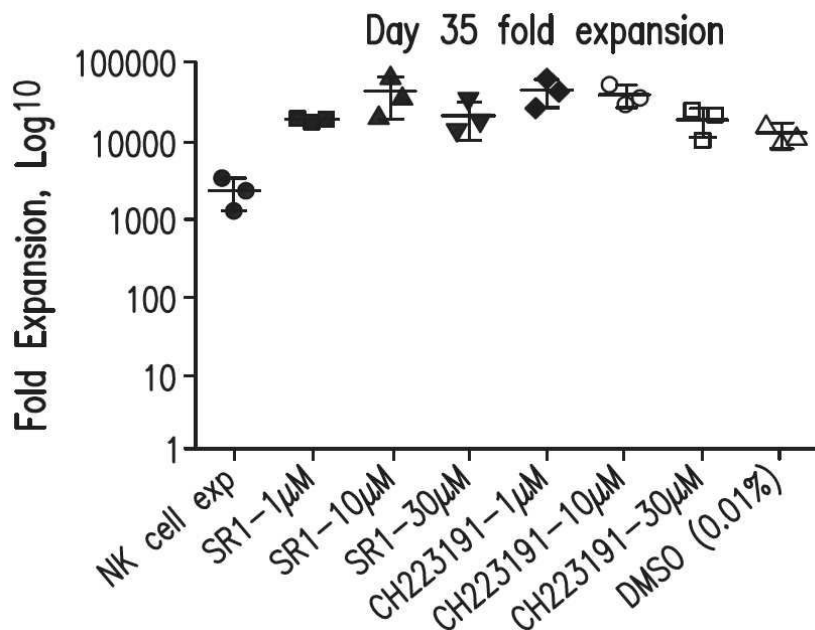
[0391] 평가:

[0392] 본 발명은 본원에 기술된 특정 구현예에 의한 영역에 한정되지 않아야 한다. 실제로, 기술된 것들 외에 본 발명의 다양한 변형이 앞서의 설명 및 첨부된 도면으로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 영역내에 있는 것으로 의도된다.

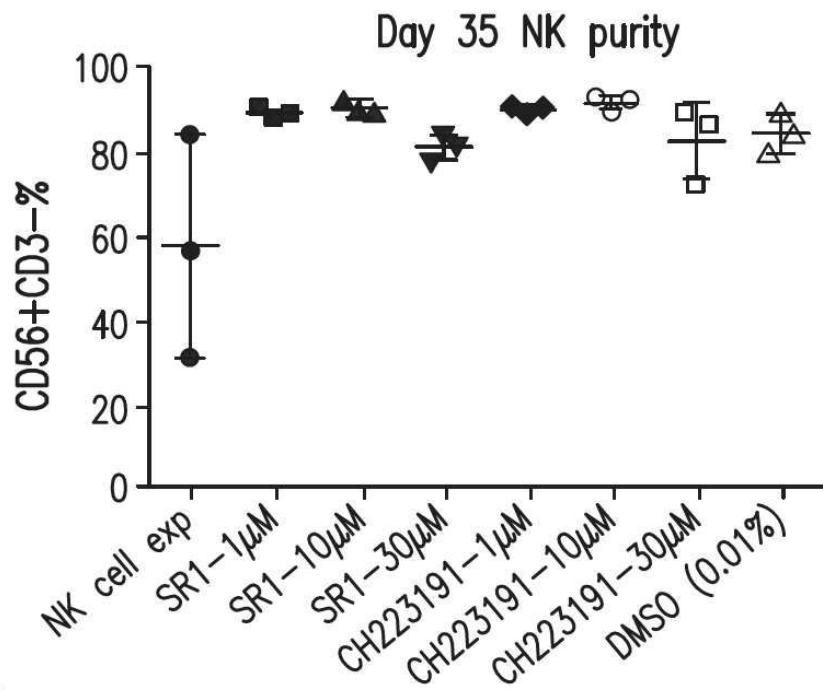
[0393] 본원에 인용된 모든 참고 문헌은, 각각의 개개 공보, 특허 또는 특허원이 모든 목적을 위해 이의 전문으로 참고로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 나타낸 바와 동일한 정도로 이들의 전문으로 및 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다. 어떠한 공보의 인용도 출원일 전의 이의 개시내용에 대한 것이며 본 발명이 이러한 공보를 선행 발명으로서 선행 자격이 주어지지 않음을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

도면

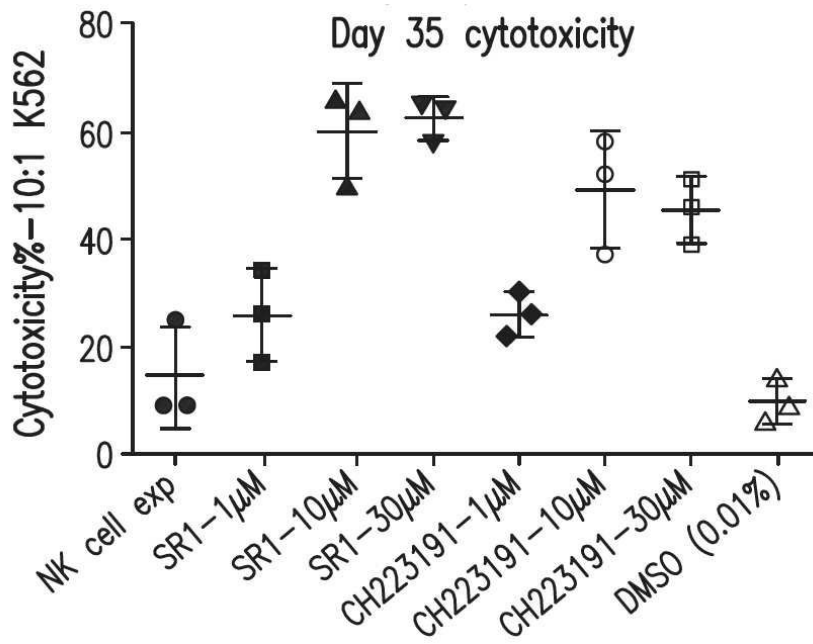
도면1a



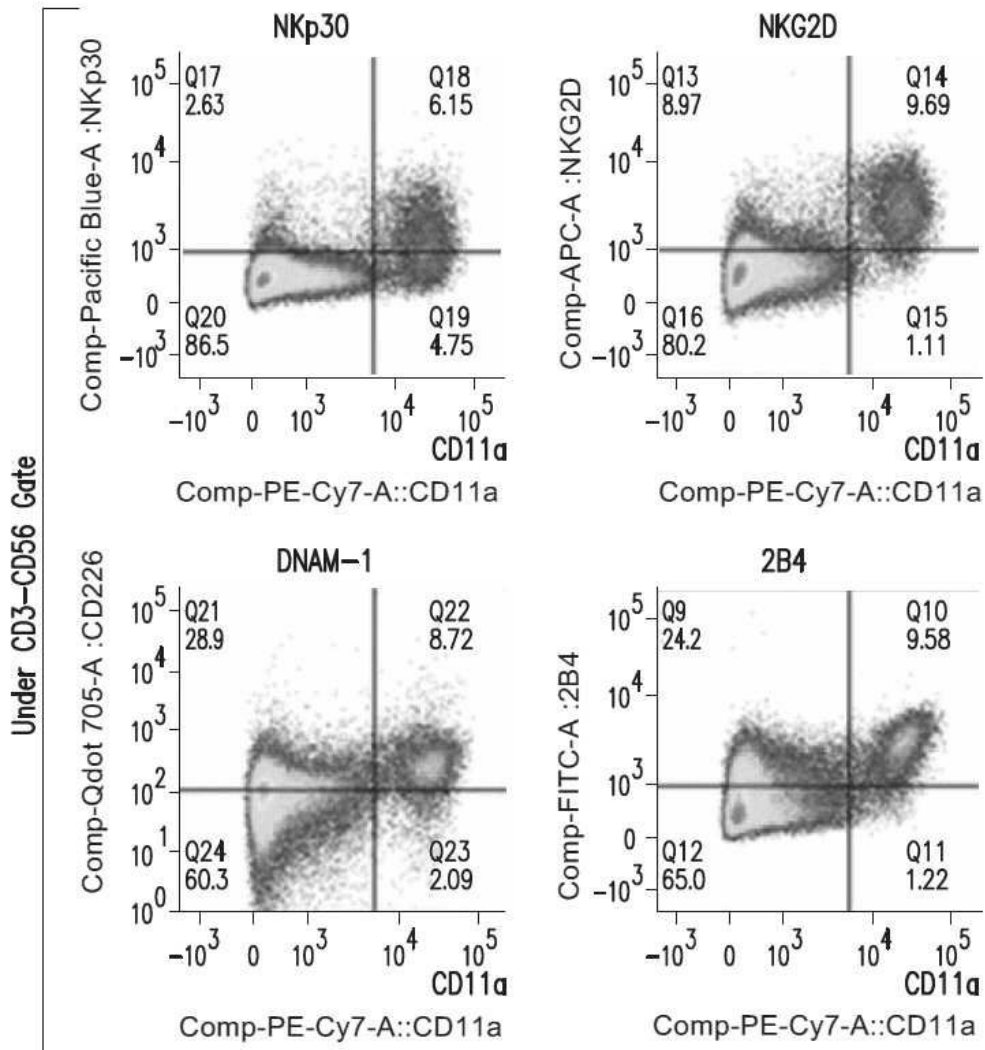
도면1b



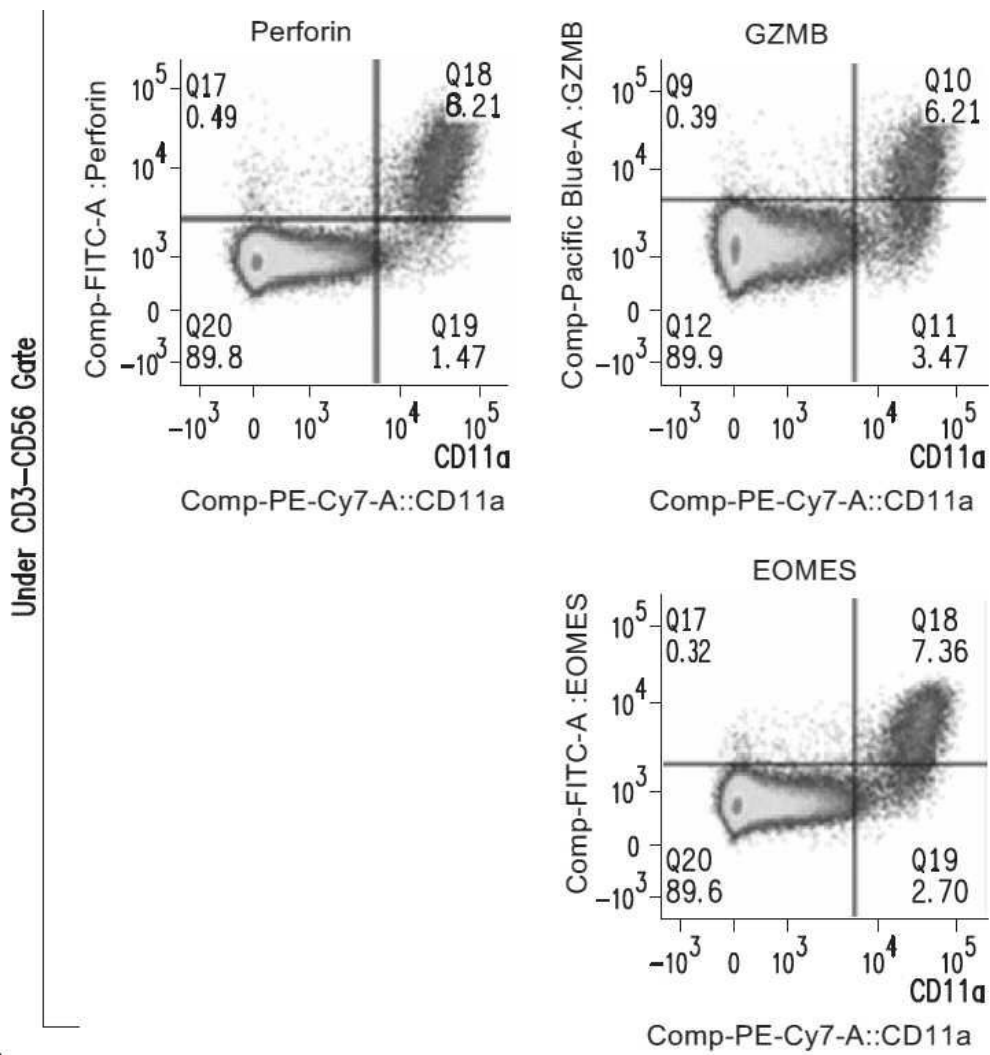
도면1c



도면2a

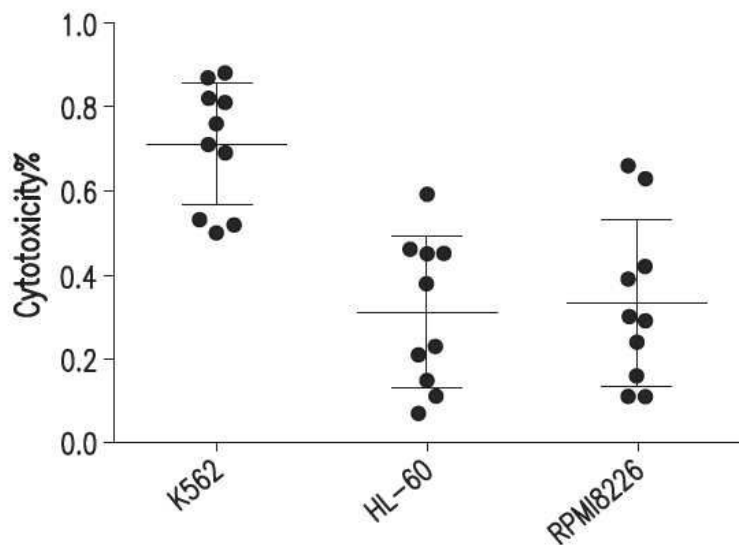


도면2b

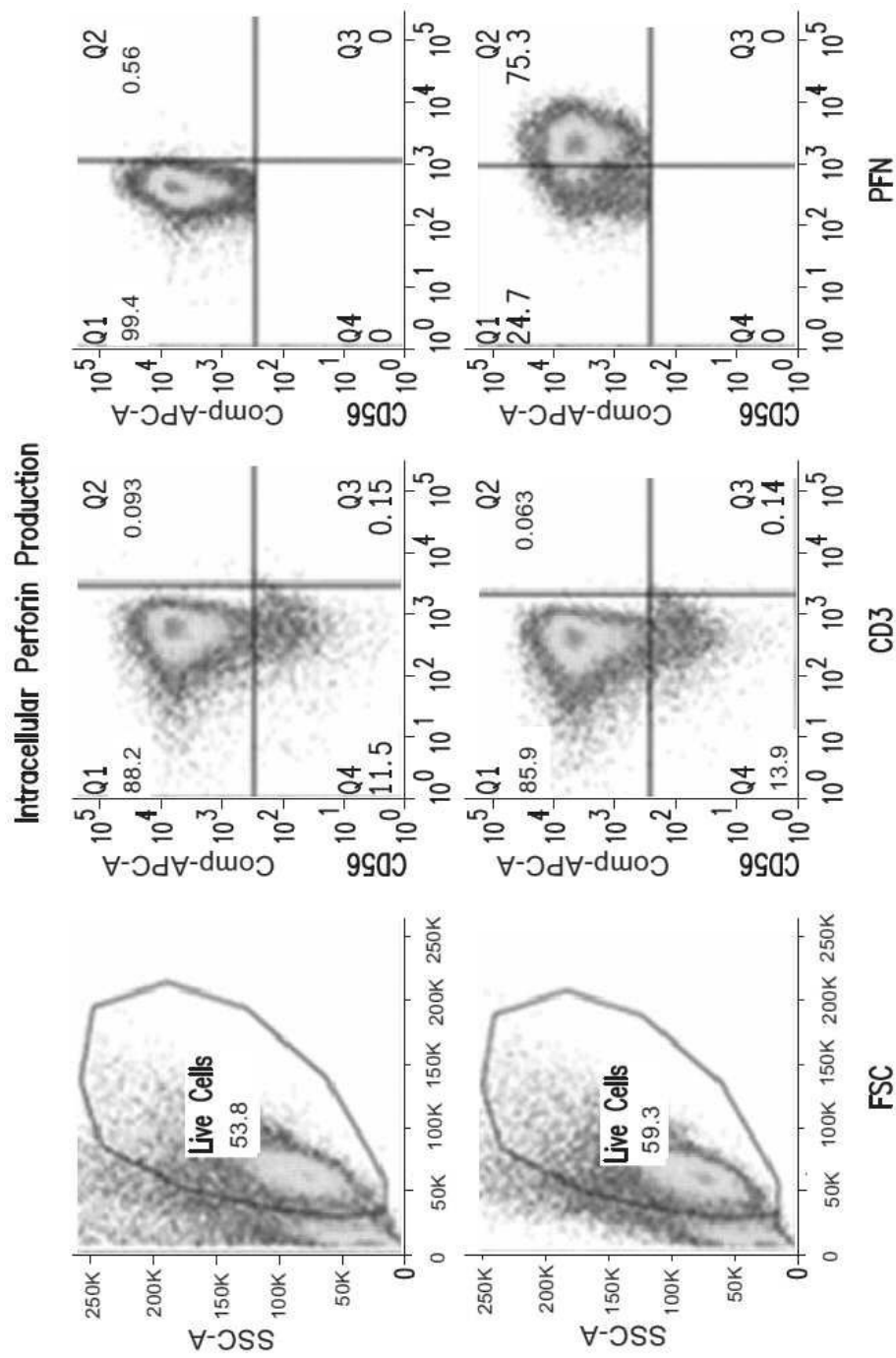


도면3

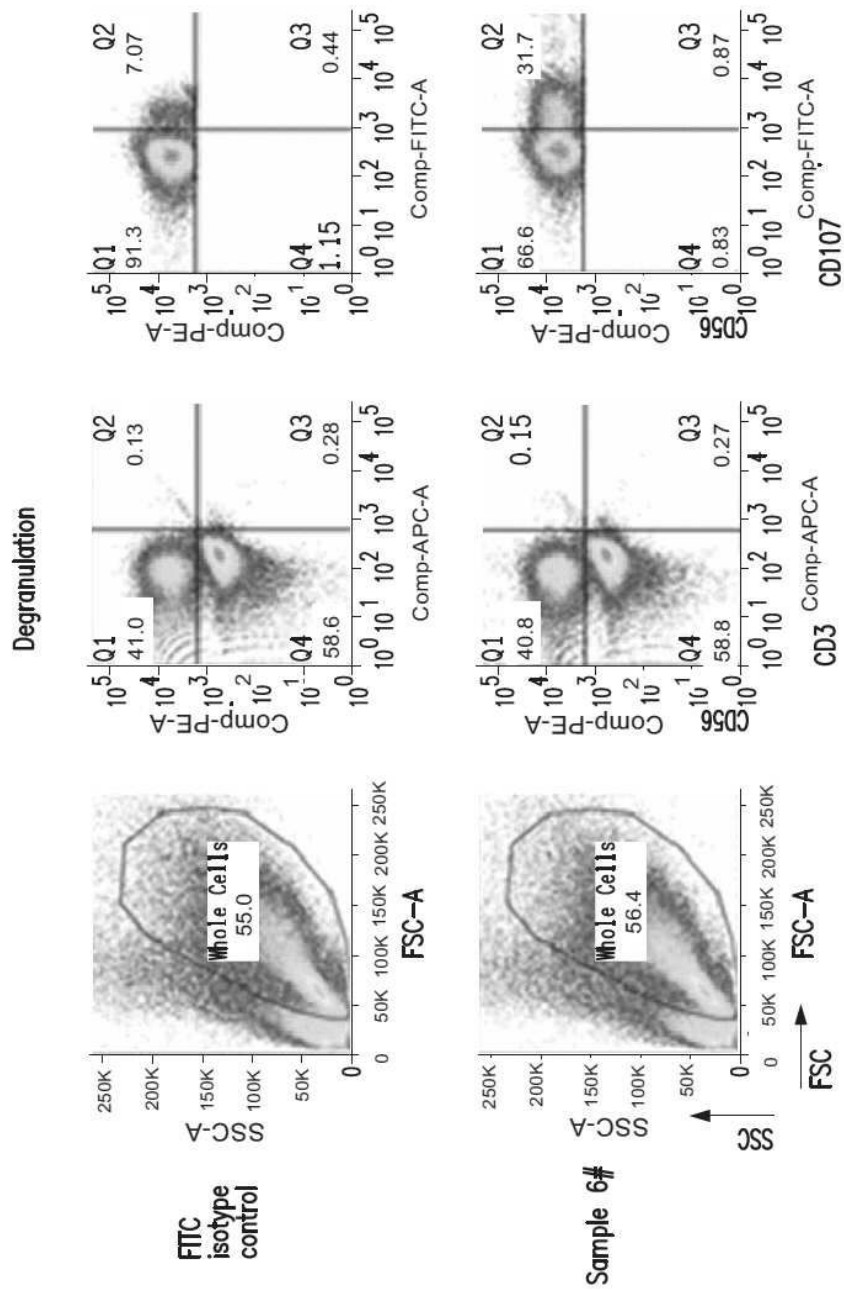
D35 Cytotoxicity against Tumor Cell Lines at 10:1 (n=10)



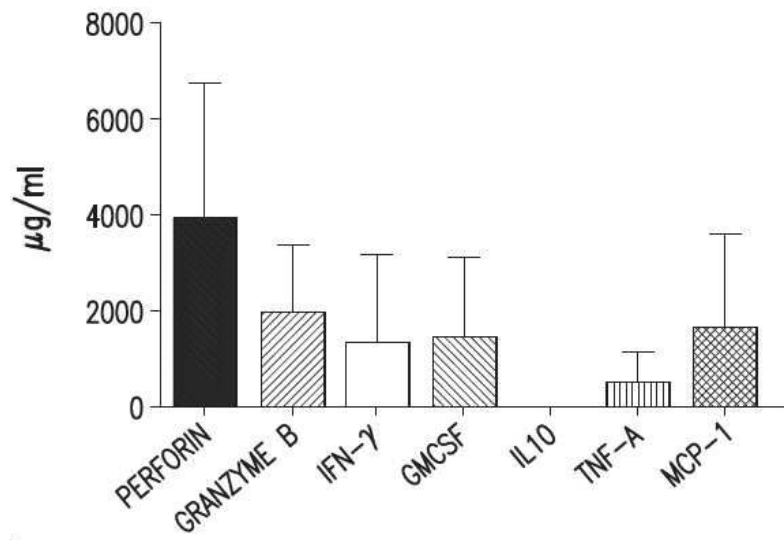
도면4a



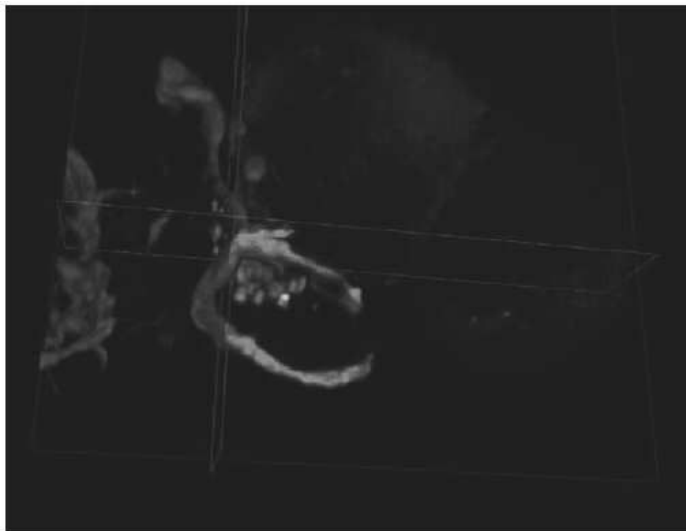
도면4b



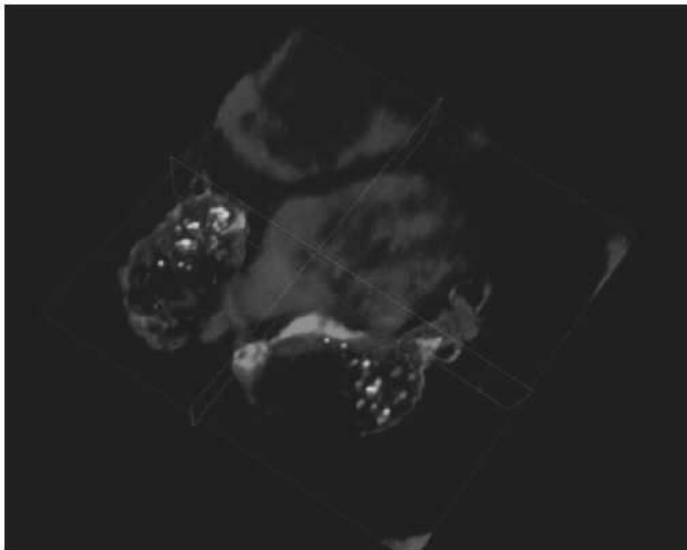
도면5



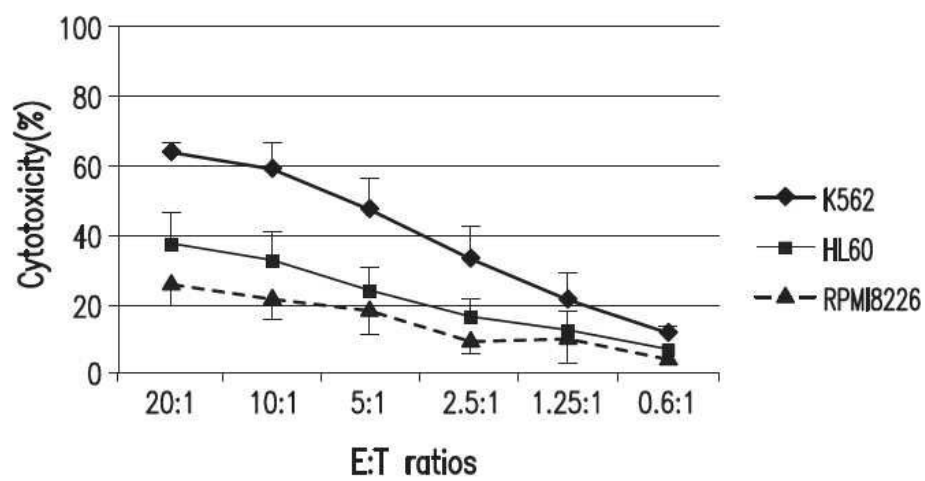
도면6a



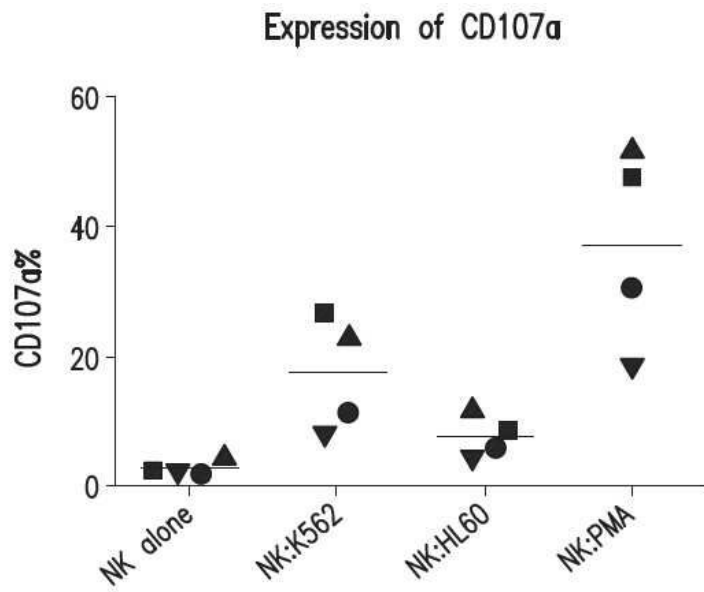
도면6b



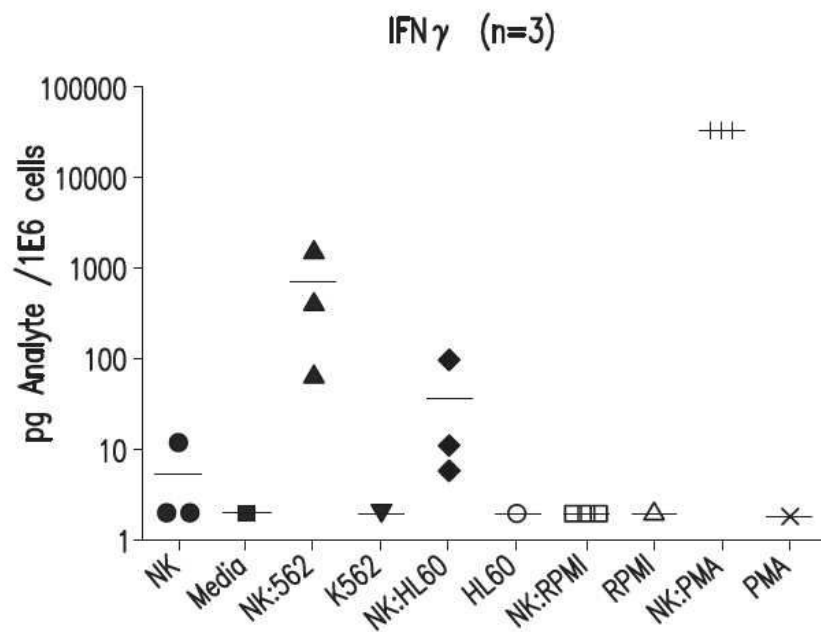
도면7



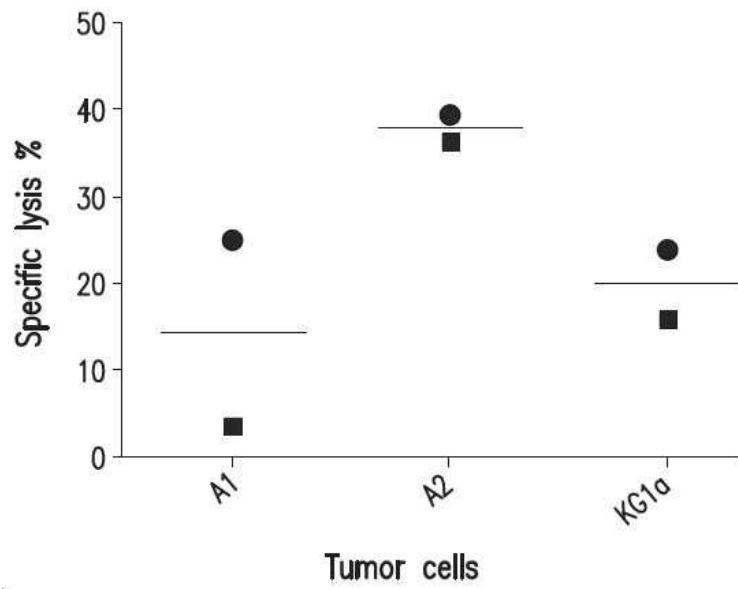
도면8



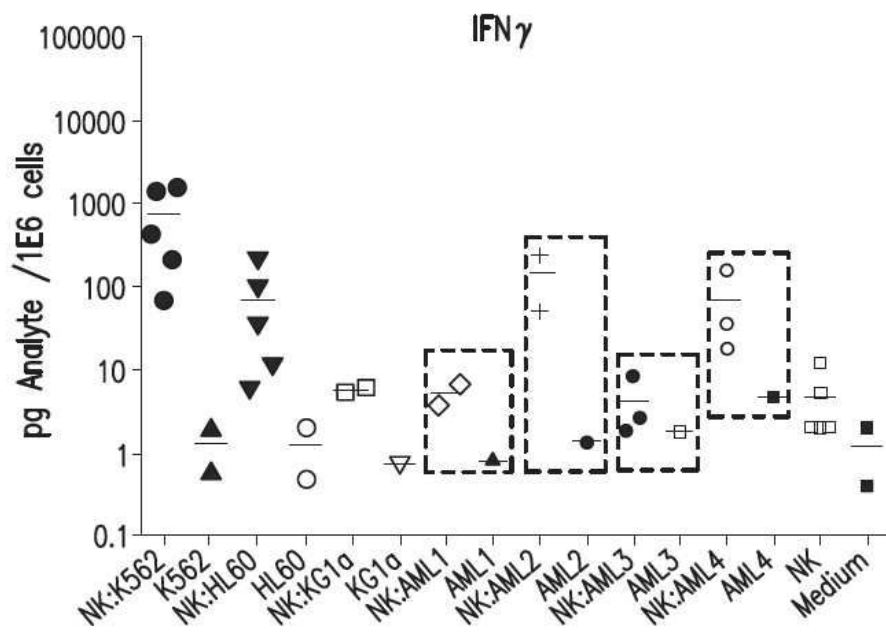
도면9



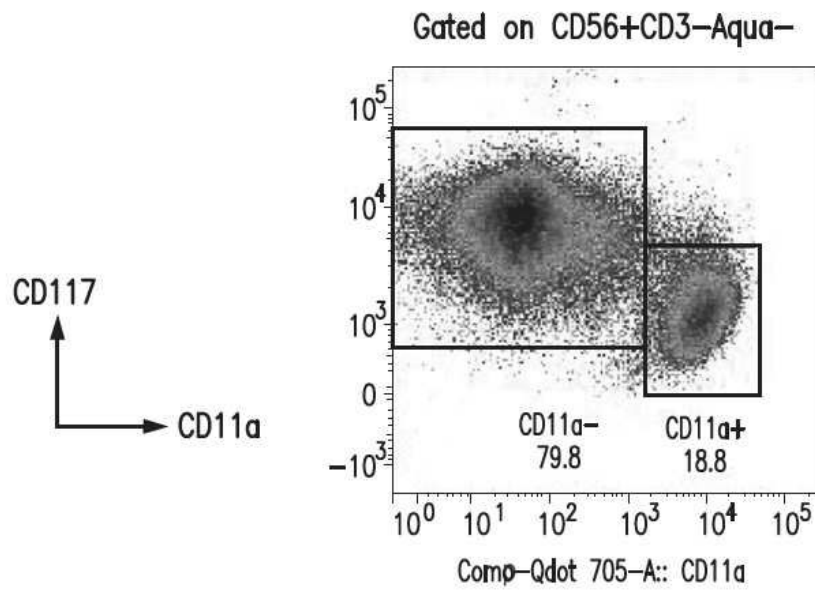
도면10



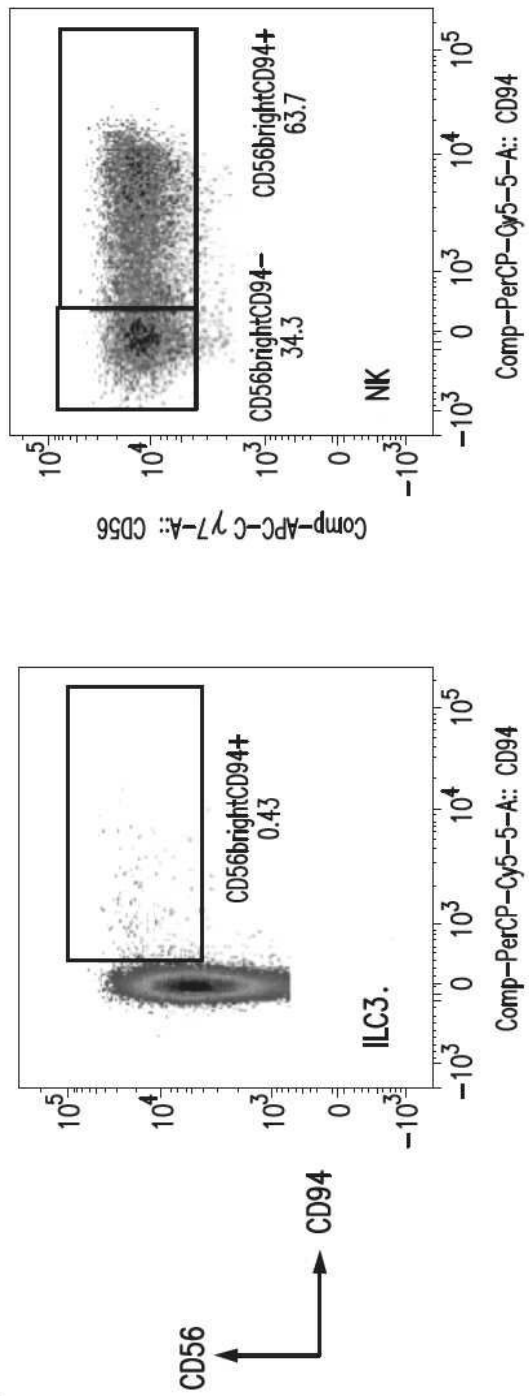
도면11



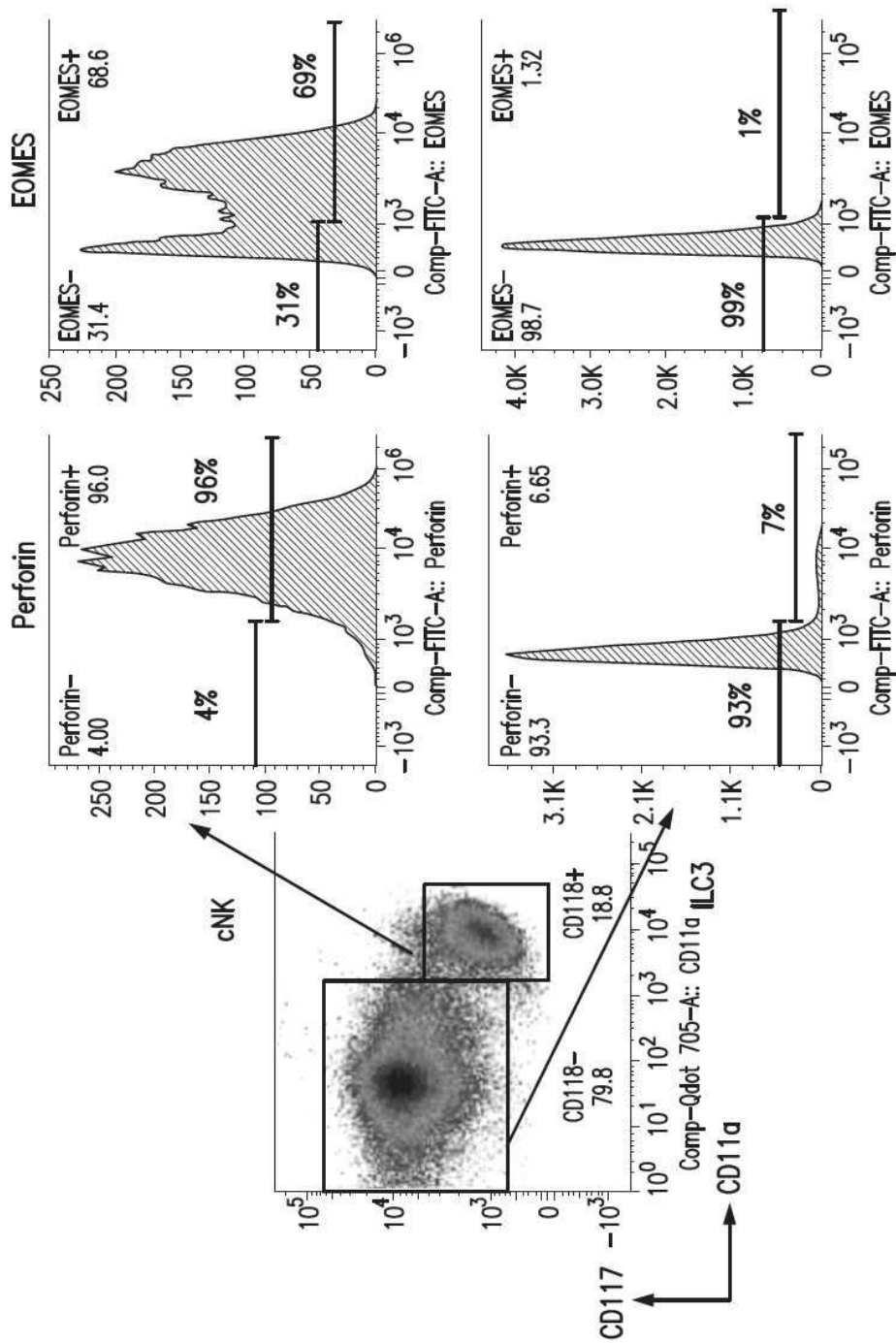
도면12



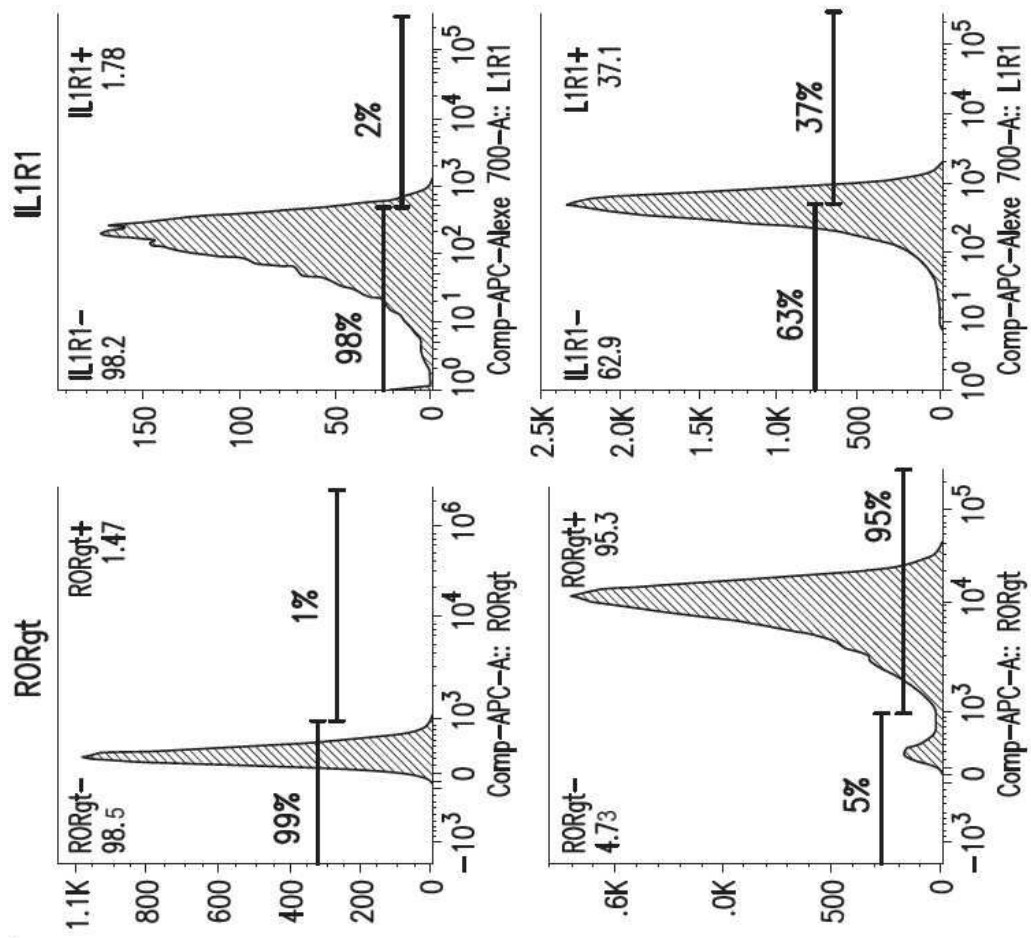
도면13



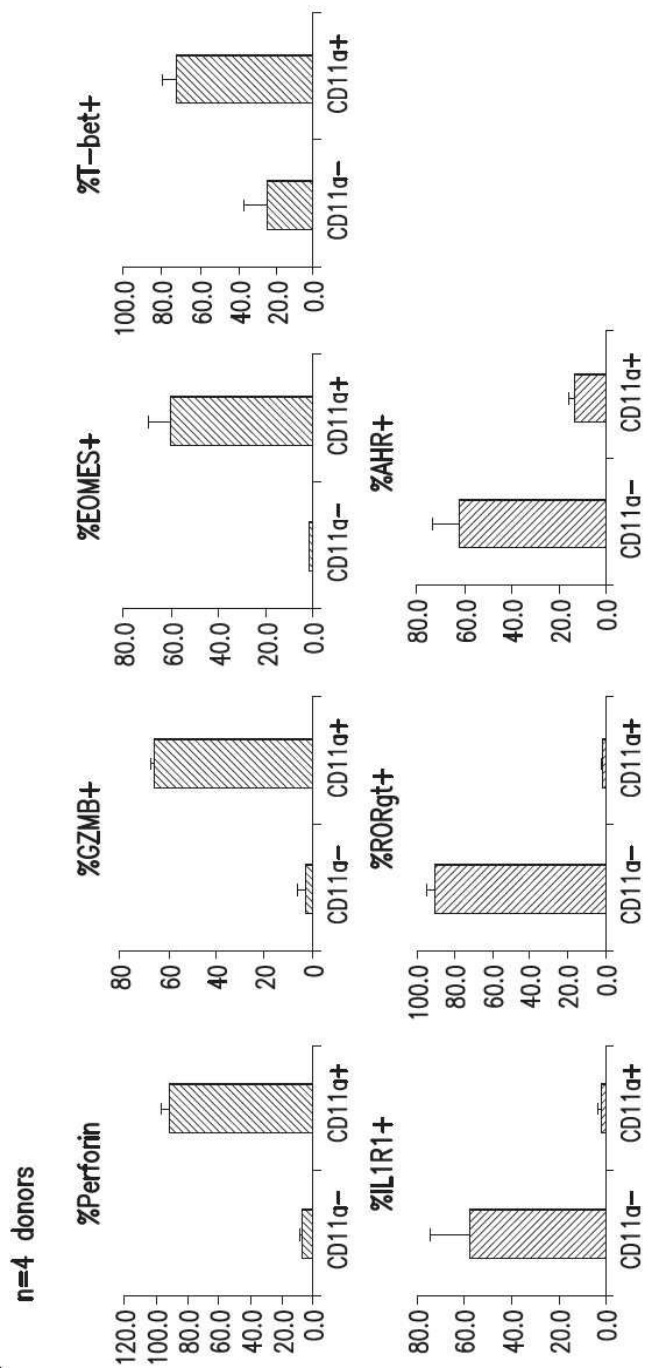
도면14a



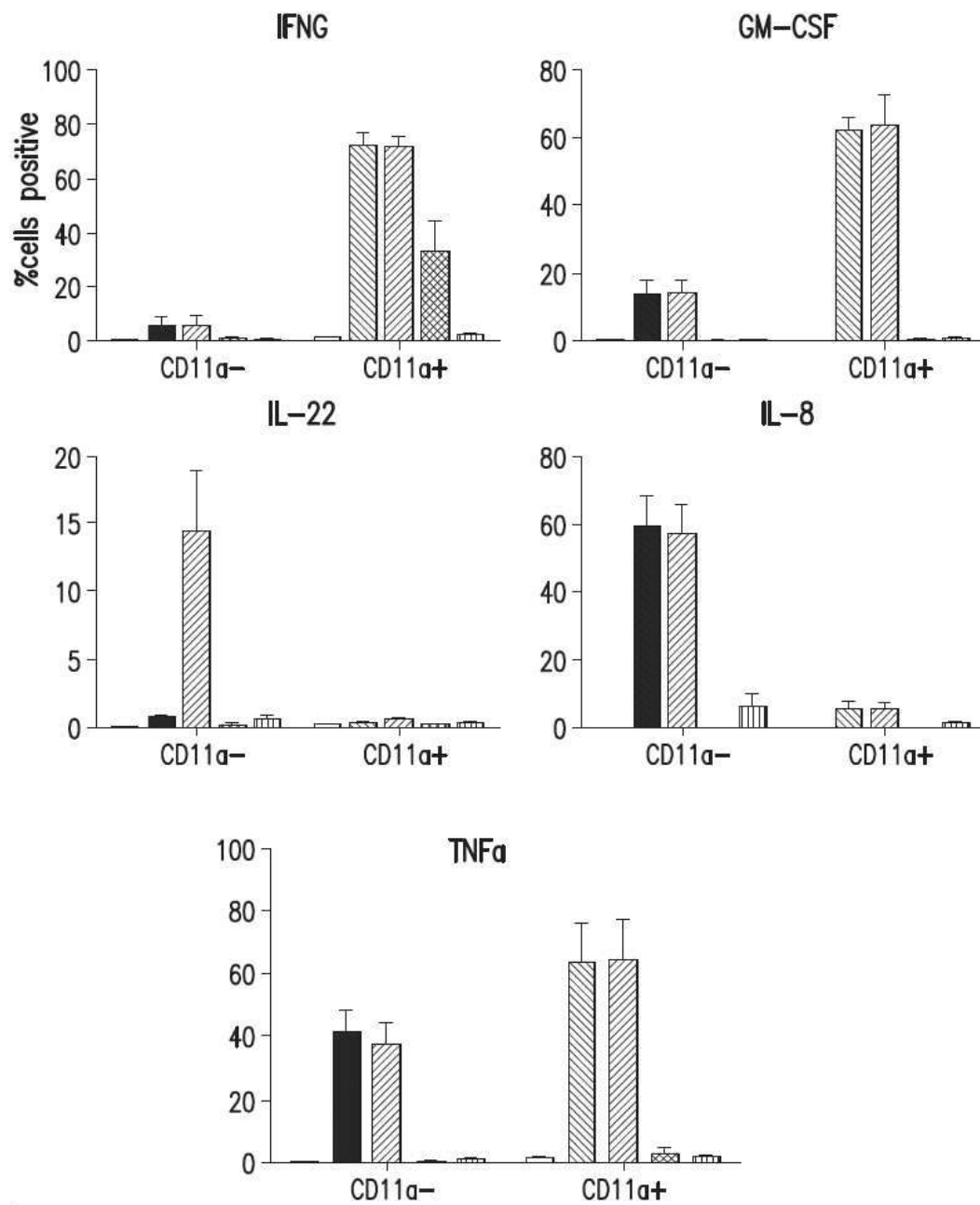
도면14b



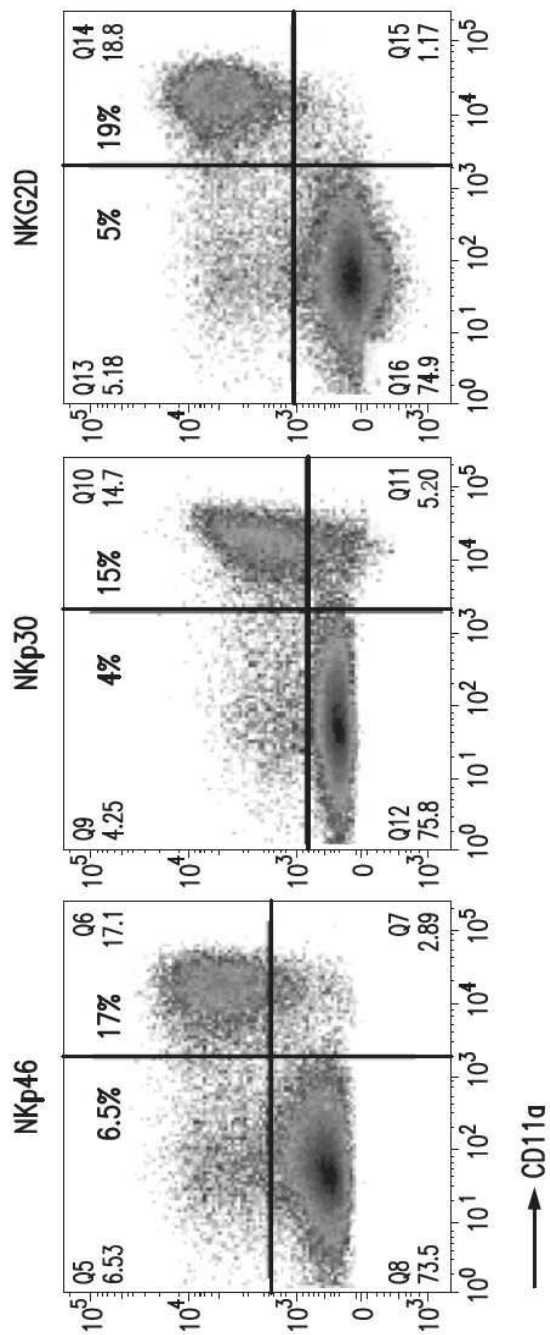
도면15



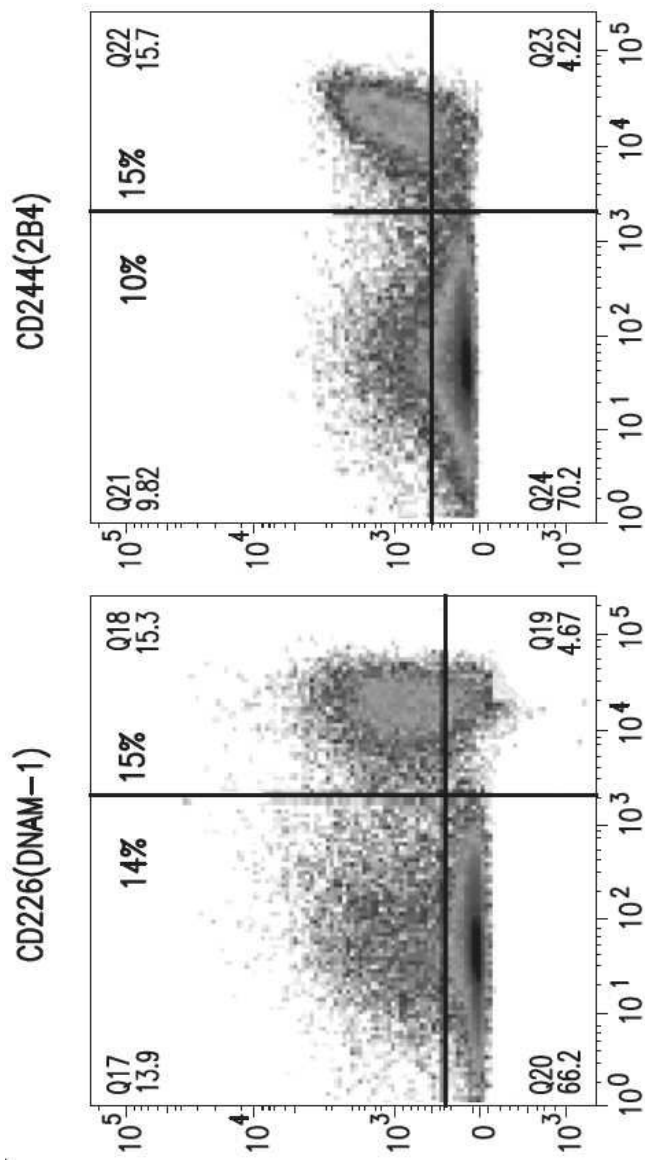
도면16



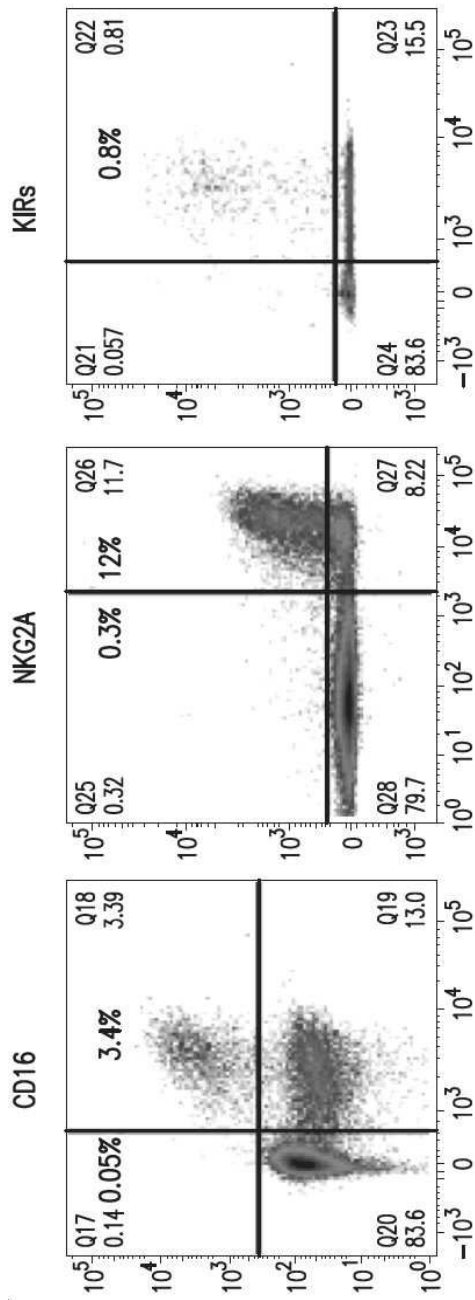
도면17



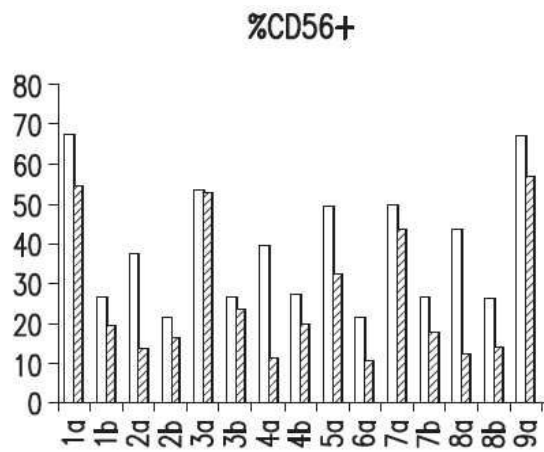
도면18



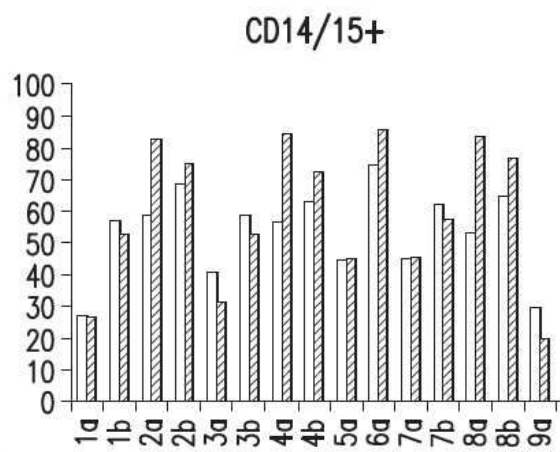
도면19



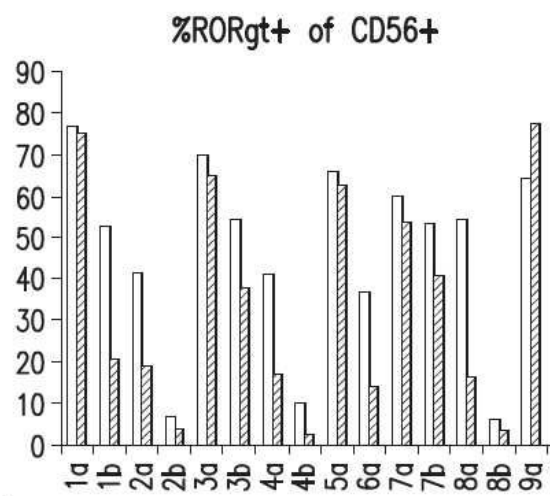
도면20a



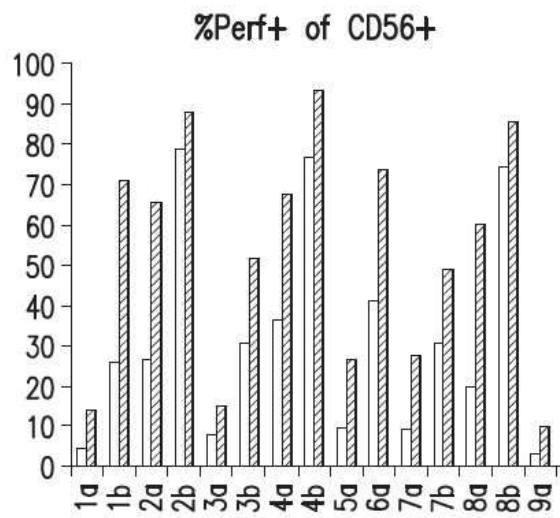
도면20b



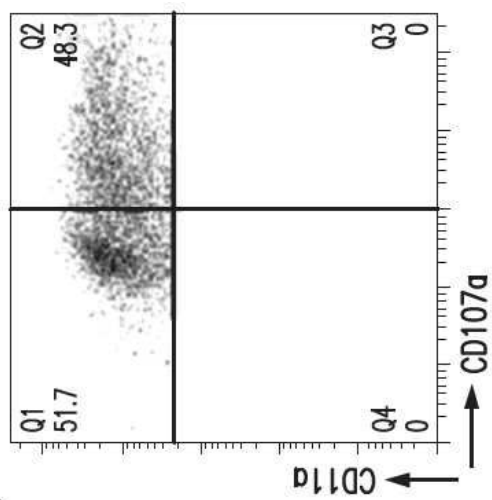
도면20c



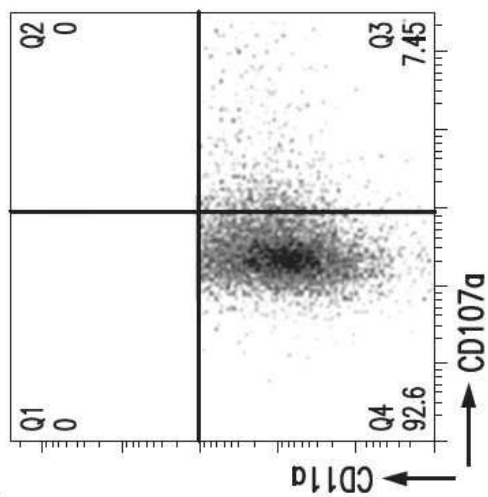
도면20d



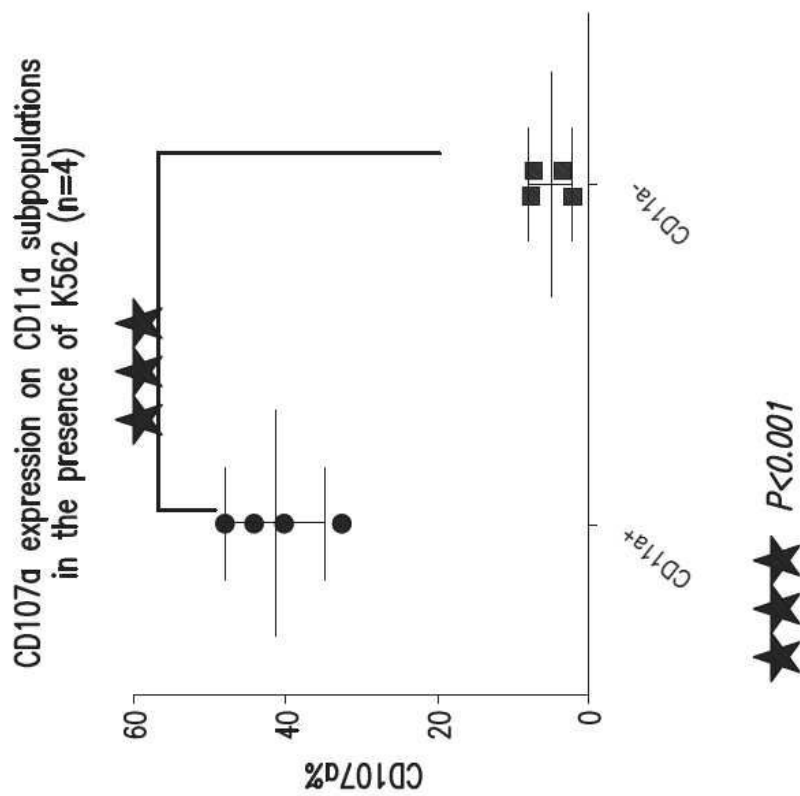
도면21a



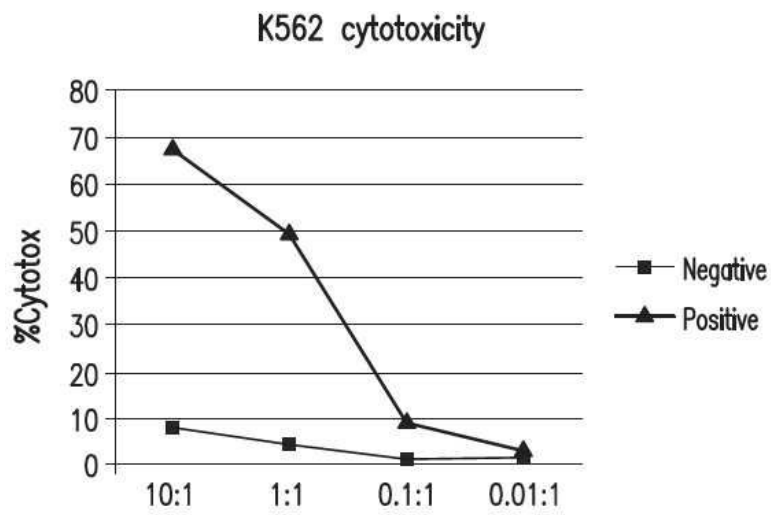
도면21b



도면21c



도면22



도면23

