



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0146101
(43) 공개일자 2023년10월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2023.05)
A61K 35/17 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7033327(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2015년12월30일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2017-7021038
원출원일자(국제) 2015년12월30일
심사청구일자 2020년12월28일
- (85) 번역문제출일자 2023년09월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/068055
- (87) 국제공개번호 WO 2016/109661
국제공개일자 2016년07월07일
- (30) 우선권주장
62/098,560 2014년12월31일 미국(US)
- (71) 출원인
안트로제네시스 코퍼레이션
미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
- (72) 발명자
머피, 브라이언
미국 뉴저지주 07302 저지 시티 그린 에스티 99
1/2 에이피티 1
보스키나리안-버즈, 바네사
미국 뉴저지주 07946 밀링톤 밸리 로드 1670
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 광장리앤코

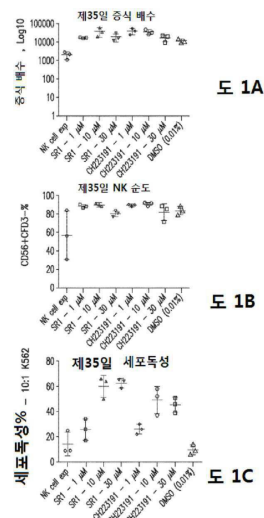
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 천연 킬러 세포 및 그의 용도

(57) 요약

본원은, 줄기 세포 동원 인자(stem cell mobilizing factor)를 포함하는 배지와 함께 3-단계 증식 및 분화 방법을 사용하여 천연 킬러(NK) 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 본원은 또한 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 및 NK 세포 집단을 사용하여 종양 세포 증식을 저해하는 방법뿐 아니라, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 및 NK 세포 집단을 암 또는 바이러스성 감염을 갖는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 바이러스성 감염을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 2501/125 (2013.01)

C12N 2501/145 (2013.01)

C12N 2501/22 (2013.01)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/2306 (2013.01)

C12N 2501/2307 (2013.01)

C12N 2501/26 (2013.01)

(72) 발명자

노드버그, 안드레아

미국 뉴저지주 07302 저지 시티 스투벤 스트리트
162 에이피티. 3

월슨, 키이스

미국 뉴저지주 07092 마운틴사이드 올드 토트 로드
224

장, 린

미국 뉴저지주 08820 에디슨 팀버 오크스 로드
1106

명세서

청구범위

청구항 1

발명의 설명에 기재된 발명.

발명의 설명

기술 분야

1. 분야

본 출원은 2014년 12월 31일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/098,560호의 이점을 청구하며, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

본원은 줄기 세포 동원 인자(stem cell mobilizing factor)를 포함하는 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단으로부터 천연 킬러(natural killer, NK) 세포의 집단을 생성하는 방법, 예를 들어, 줄기 세포 동원 인자를 포함하는 배지에서 태반의 세포, 예를 들어 태반 관류액 (예를 들어, 인간 태반 관류액) 또는 다른 조직, 예를 들어 제대혈 또는 말초혈로부터 조혈 줄기 또는 전구 세포로 시작하여 NK 세포를 생성하는 3-단계 방법을 제공한다. 또한, 본원은 예를 들어 종양 세포의 증식을 저해하거나, 병원체 감염, 예를 들어 바이러스성 감염을 저해하기 위해 본원에 개시된 태반 관류액, NK 세포 및/또는 NK 전구 세포를 사용하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 및/또는 NK 전구 세포는 하나 이상의 면역조절 화합물과 조합되어 사용되고/사용되거나 이로 처치된다.

배경 기술

2. 배경

천연 킬러 (NK) 세포는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구이다.

NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 시토카인에 대한 반응으로 활성화된다. NK 세포의 세포독성 활성화는 "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"로 간주될 수 있는, 2가지 유형의 표면 수용체에 의해 크게 제어되지만, 몇몇 수용체, 예를 들어 CD94 및 2B4 (CD244)는 리간드 상호작용에 따라 어떤 식으로든 작용할 수 있다.

여러 활성화 중에서, NK 세포는 종양의 숙주 거부에 있어서 소정의 역할을 수행하고 바이러스-감염된 세포를 죽일 수 있는 것으로 나타났다. 천연 킬러 세포는 주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC) 단백질이 결핍되거나, 또는 그의 감소된 수준을 나타내는 세포에 의해 활성화될 수 있다. 변경되거나 감소된 수준의 셀프-클래스 I MHC 발현을 갖는 암 세포는 NK 세포 민감성을 유도한다. 말초혈로부터 활성화되고 증식된 NK 세포, 및 몇몇 경우 LAK 세포는 진행성 암을 갖는 환자의 생체외 요법 및 생체내 치료법 둘다에 사용되어 왔고, 골수 관련 질환, 예컨대 백혈병; 유방암; 및 특정 유형의 림프종에 대해 일부 성공적이었다.

NK 세포가 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포의 사멸에 유리한 특성을 가짐에도 불구하고, NK 세포는 1차적으로는 배양 및 증식 동안 이것의 종양-표적화 및 종양치사 능력 유지가 어렵기 때문에 면역요법에 적용하는 것이 여전히 어렵다. 따라서, 당업계에는 종양을 사멸하는 기능을 유지하는 천연 킬러 세포를 생성 및 증식시키는 효율적인 방법을 개발할 필요성이 있다.

발명의 내용

3. 요약

본원은 천연 킬러(NK) 세포를 생성하기 위해, 세포, 예를 들어 조혈 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포, 예를 들어 CD34⁺ 조혈 줄기 세포를 증식 및 분화시키는 방법을 제공한다.

한 측면에서, 본원은 본원에 개시된 바와 같은 3단계를 포함하는 NK 세포 집단을 생성하는 방법 (이후 "3-단계 방법"으로 칭함)을 제공한다. 본원에 제공된 3-단계 방법에 의해 생성된 천연 킬러 세포는 본원에서 "3-단계 방

법에 의해 생성된 NK 세포"로 칭한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 세포가 접촉되는 (또는 배양되는) 어떠한 제4 또는 중간 단계도 포함하지 않는다.

[0012] 한 측면에서, 본원은 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함하는 제1 배지에서 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어 $CD34^{+}$ 줄기 세포 또는 전구 세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계, 후속적으로 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo는 결핍된 제2 배지에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생성하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기 세포 동원제 및 저-분자량 헤파린(LMWH)은 결핍된 제3 배지에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하되, 상기 제3 세포 집단은 $CD56^{+}$, $CD3^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함하고, 상기 천연 킬러 세포의 70% 이상, 예를 들어 80% 이상이 생존가능한 NK 세포의 생성 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 또는 $CD16^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 또는 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 및 $CD16^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 및 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지, 제2 배지, 및 제3 배지 중 하나 이상, 둘 이상 또는 셋 모두는 배지 GBGM®이 아니다. 특정 실시양태에서, 제3 배지에는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 특정 실시양태에서, 제3 배지에는 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다.

[0013] 특정 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 포유류 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 인간 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 영장류 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 개 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 설치류 세포이다.

[0014] 특정 측면에서, 제1 배지에서 배양된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 $CD34^{+}$ 줄기 세포 또는 전구 세포이다. 특정 측면에서, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포이다. 특정 측면에서, 태반 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액으로부터 획득되거나 또는 획득가능하다 (예를 들어, 태반 관류액으로부터 분리된 유핵 세포로부터 획득되거나 획득가능하다). 특정 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 제대혈로부터 획득되거나 획득가능하다. 특정 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 태아간 세포이다. 특정 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 동원화된 말초혈 세포이다. 특정 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 골수 세포이다.

[0015] 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, 하나 이상의 저분자량 헤파린(LMWH), Flt-3 리간드 (Flt-3L), 줄기 세포 인자 (SCF), IL-6, IL-7, 과립구 세포군-자극 인자 (G-CSF), 또는 과립구/대식세포 자극 인자 (GM-CSF)를 포함한다. 특정 측면에서, 상기 제1 배지는 부가된 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 상기 제1 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 상기 제1 배지는 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 상기 제1 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제1 배지는, 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여 Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 Tpo는 제1 배지에서 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 측면에서, 제1 배지에서, LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, LMWH는 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30

ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, LMWH는 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 GBGM®이 아니다.

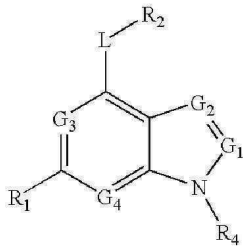
[0016]

특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함하고, Tpo는 결핍된다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는, 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 측면에서, 제2 배지는 부가된 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 제2 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 제2 배지는 LMWH를 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 제2 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸을 포함하지 않는다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는, 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는, 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 10 ng/mL 내지 30 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제2 배지에서, LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, LMWH는 제2 배지에 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, LMWH는 제2 배지에 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, LMWH는 제2 배지에서 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 배지는 GBGM®이 아니다.

[0017]

특정 양태에서, 상기 제1 배지, 상기 제2 배지, 또는 상기 제1 및 제2 배지 중에 존재하는 상기 줄기 세포 동원 인자는, 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 예를 들어 아릴 탄화수소 수용체 길항제이다. 특정 양태에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 레스베라트롤이다. 특정 양태에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 하기 화학식 I의 화합물 또는 그의 염이다:

[0018] 화학식 I



(I)

[0019]

[0020]

상기 식에서,

[0021]

G₁ 은 N 및 CR₃ 에서 선택되고;

[0022]

G₂, G₃ 및 G₄ 는 CH 및 N 에서 독립적으로 선택되고; 단 G₃ 및 G₄ 중 적어도 1개는 N이고; 단 G₁ 및 G₂ 가 둘다 N 은 아니며;

[0023]

L 은 --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--에서 선택되고; 여기서 R_{5a} 및 R_{5b} 는 수소 및 C₁₋₄ 알킬에서 독립적으로 선택되며;

[0024]

R₁ 은 수소, 페닐, 티오펜, 푸라닐, 1H-벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 1H-이미다조피리디닐, 벤조티오펜, 피리미디닐, 1H-피라졸릴, 피리디닐, 1H-이미다졸릴, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 1H-피롤릴 및 티아졸릴에서 선택되고; 여기서, R₁ 의 상기 페닐, 티오펜, 푸라닐, 1H-벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 1H-이미다조피리디닐, 벤조티오펜, 피리미디닐, 1H-피라졸릴, 피리디닐, 1H-이미다졸릴, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 1H-피롤릴 또는 티아졸릴은 시아노, 히드록시, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로, 할로-치환된-C₁₋₄ 알킬, 할로-치환된-C₁₋₄ 알콕시, 히드록시, 아미노, --C(O)R_{8a}, --S(O)₀₋₂R_{8a}, --C(O)OR_{8a} 및 --C(O)NR_{8a}R_{8b}에서 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 선택적으로 치환될 수 있고; 여기서 R_{8a} 및 R_{8b} 는 수소 및 C₁₋₄ 알킬에서 독립적으로 선택되고; 단 R₁ 및 R₃ 가 둘다 수소는 아니며;

[0025]

R₂ 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-디히드로-1H-벤조이미다졸릴 및 1H-인다졸릴에서 선택되고; R_{6a}, R_{6b} 및 R_{6c} 는 수소 및 C₁₋₄ 알킬에서 독립적으로 선택되고; R₂ 의 상기 페닐, 1H-피롤로피리딘-3-일, 1H-인돌릴, 티오펜, 피리디닐, 1H-1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 1H-피라졸릴, 2-옥소-2,3-디히드로-1H-벤조이미다졸릴 또는 1H-인다졸릴은 히드록시, 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}에서 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 선택적으로 치환되고; R_{7a} 및 R_{7b} 는 수소 및 C₁₋₄ 알킬에서 독립적으로 선택되며;

[0026]

R₃ 은 수소, C₁₋₄ 알킬 및 비페닐에서 선택되고;

[0027]

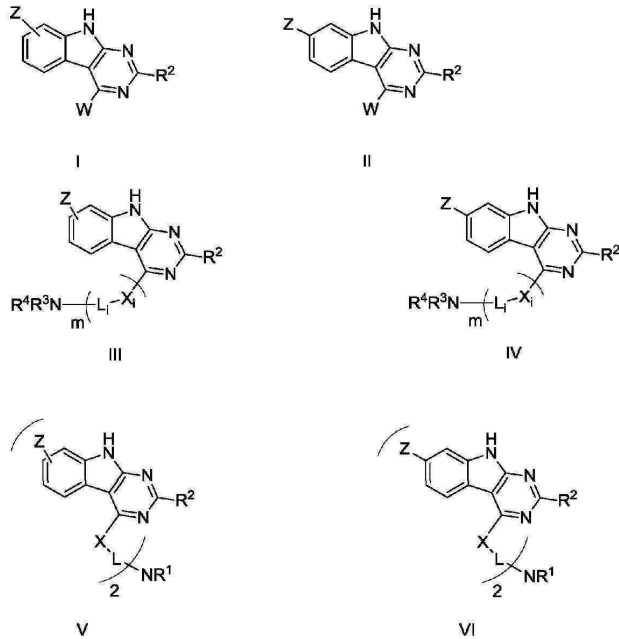
R₄ 는 C₁₋₁₀ 알킬, 프로프-1-엔-2-일, 시클로헥실, 시클로프로필, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 벤즈히드릴, 테트라히드로-2H-피란-3-일, 테트라히드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라히드로푸란-3-일, 벤질, (4-펜틸페닐)(페닐)메틸 및 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸에서 선택되고; 여기서, 상기 알킬, 시클로프로필, 시클로헥실, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 옥세탄-2-일, 벤즈히드릴, 테트라히드로-2H-피란-2-일, 테트라히드로-2H-피란-3-일, 테트라히드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라히드로푸란-3-일, 테트라히드로푸란-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 히드록시, C₁₋₄ 알킬 및 할로-치환된-C₁₋₄ 알킬에서 독립적으로 선택된 1 내지 3개의 라디칼로 선택적으로 치환될 수 있다.

[0028]

특정 양태에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제제는 스템레게닌-1 (StemRegenin-1, SR-1)(4-(2-(2-(벤조[b]티오펜-3-일)-9-이소프로필-9H-푸린-6-일아미노)에틸)페놀)이다. 특정 양태에서, 상기 아릴 탄화수소 수용체 억제

제는 화합물 CH223191 (1-메틸-N-[2-메틸-4-[2-(2-메틸페닐)디아제닐]페닐-1H-피라졸-5-카르복사미드]이다.

특정 양태에서, 상기 제1 배지, 상기 제2 배지, 또는 상기 제1 및 제2 배지 중에 존재하는 상기 줄기 세포 동원 인자는 피리미도(4,5-b)인돌 유도체이다. 특정 양태에서, 상기 피리미도(4,5-b)인돌 유도체는 하기 화학식의 화합물 중 하나 이상 또는 그의 염 또는 전구약물이다 :



상기 식에서,

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 선택적으로 치환된 -벤질,

15) L 및 헤테로아릴기 중 어느 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -L-헤테로아릴,

16) L 및 헤테로시클릴기 중 어느 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -L-헤테로시클릴,

- [0049] 17) L 및 헤테로아릴기 중 어느 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -L-아릴,
- [0050] 18) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -헤테로아릴, 또는
- [0051] 19) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -아릴이고,
- [0052] 여기서, 각 치환체는 L기에, 그것이 이미 존재하지 않는 경우에 선택적으로 부착되고, (R<1>) 및 R<1>이 질소 원자에 부착된 경우, 이들은 선택적으로 질소 원자와 함께 결합하여 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 다른 헤테로 원자를 선택적으로 포함하는 3 내지 7원 고리를 형성하고, 이 고리는 하나 이상의 R<1> 또는 R<A>로 선택적으로 치환되며;
- [0053] W는
- [0054] 1) -H,
- [0055] 2) -할로젠,
- [0056] 3) -OR<1>,
- [0057] 4) -L-OH,
- [0058] 5) -L-OR<1>,
- [0059] 6) -SR<1>,
- [0060] 7) -CN,
- [0061] 8) -P(O)(OR<1>)(OR<1>),
- [0062] 9) -NHR<1>,
- [0063] 10) -N(R<1>)R<1>,
- [0064] 11) -L-NH₂,
- [0065] 12) -L-NHR<1>,
- [0066] 13) -L-N(R<1>)R<1>,
- [0067] 14) -L-SR<1>,
- [0068] 15) -L-S(O)R<1>,
- [0069] 16) -L-S(O)₂R<1>,
- [0070] 17) -L-P(O)(OR<1>)(OR<1>)
- [0071] 18) -C(O)OR<1>,
- [0072] 19) -C(O)NH₂,
- [0073] 20) -C(O)NHR<1>,
- [0074] 21) -C(O)N(R<1>)R<1>,
- [0075] 22) -NHC(O)R<1>,
- [0076] 23) -NR₁C(O)R<1>, -NHC(O)OR<1>,
- [0077] -NR₁C(O)OR<1>,
- [0078] -OC(O)NH₂,
- [0079] -OC(O)NHR<1>,
- [0080] -OC(O)N(R)R<1>,
- [0081] -OC(O)R<1>,

- [0082] $-C(O)R_{<1>}$,
- [0083] $-NHC(O)NH_2$,
- [0084] $-NHC(O)NHR_{<1>}$,
- [0085] $-NHC(O)N(R)R_{<1>}$,
- [0086] $-NRC(O)NH_2$,
- [0087] $-NRC(O)NHR_{<1>}$,
- [0088] $-NRC(O)N(R)R_{<1>}$,
- [0089] $-NHS(O)_2R_{<1>}$,
- [0090] $-NRS(O)_2R_{<1>}$,
- [0091] $-S(O)_2NH_2$,
- [0092] $-S(O)_2NHR_{<1>}$,
- [0093] $-S(O)_2N(R)R_{<1>}$,
- [0094] $-S(O)R_{<1>}$,
- [0095] $-S(O)_2R_{<1>}$,
- [0096] $-OS(O)_2R_1$,
- [0097] $-S(O)_2OR_{<1>}$,
- [0098] 1, 2 또는 3개의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 -벤질,
- [0099] L 및 헤테로아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 -L-헤테로아릴,
- [0100] L 및 헤테로시클릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 -L-헤테로시클릴,
- [0101] L 및 아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 -L-아릴,
- [0102] $-L-NR_{<1>}(R_{<1>})$,
- [0103] $-L)_2NR_{<1>}$,
- [0104] $-L-(N(R_1)-L)_n-N(R_1)R_1$, L 및 헤테로아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 $-L-(N(R_{<1>})-L)_n$ -헤테로아릴,
- [0105] L 및 헤테로시클릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 $-L-(N(R_{<1>})-L)_n$ -헤테로시클릴,
- [0106] L 및 아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 $-L-(N(R_{<1>})-L)_n$ -아릴,
- [0107] $-O-L-N(R)R_{<1>}$,
- [0108] L 및 헤테로아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 $-O-L$ -헤테로아릴,
- [0109] L 및 헤테로시클릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 $-O-L$ -헤테로시클릴,
- [0110] L 및 아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 $R_{<A>}$ 또는 $R_{<1>}$ 치환체로 선택적으로 치환된 $-O-L$ -아릴,
- [0111] $-O-L)_2NR_{<1>}$,
- [0112] $-O-L-(N(R)-L)_n-N(R)R_{<1>}$,

- [0113] L 및 헤테로아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,
- [0114] L 및 헤테로시클릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로시클릴,
- [0115] 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -O-L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0116] 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -S-L-헤테로아릴,
- [0117] 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -S-L-헤테로시클릴,
- [0118] L 및 아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -S-L-아릴,
- [0119] -S-L)₂NR₁,
- [0120] -S-L-(N(R₁)-L)"-N(R₁)R₁,
- [0121] 하나 이상의 R<A> 치환체로 선택적으로 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴, 하나 이상의 R<A> 치환체로 선택적으로 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-헤테로시클릴, 하나 이상의 R<A> 치환체로 선택적으로 치환된 -S-L-(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0122] -NR<1>(R<1>),
- [0123] -(N(R₁)-L)_n-N(R₁)R₁,
- [0124] -N(R₁)L)₂-NR₁,
- [0125] 76) -(N(R₁)-L)"-N(R₁)RA,
- [0126] 77) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-헤테로아릴,
- [0127] 78) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-헤테로시클릴,
- [0128] 79) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -(N(R<1>)-L)_n-아릴,
- [0130] 80) 하나 이상의 R<A> 치환체로 선택적으로 치환된 -헤테로아릴, 또는
- [0131] 81) 하나 이상의 R<A> 치환체로 선택적으로 치환된 -아릴이고,
- [0132] 여기서, 각 치환체는 L기에, 그것이 이미 존재하지 않는 경우에 선택적으로 부착되고, 2개의 R<1> 치환체가 동일 질소 원자 상에 존재하는 경우, 각 R<1> 치환체는 이하에 기재된 R<1> 값 리스트에서 독립적으로 선택되며,
- [0133] n은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5 중 하나의 정수이고,
- [0134] (R<1>) 및 R<1>이 질소 원자에 부착된 경우, 이들은 선택적으로 질소 원자와 함께 결합하여 N, 0 및 S로부터 선택된 하나 이상의 다른 헤테로 원자를 선택적으로 포함하는 3 내지 7원 고리를 형성하고, 이 고리는 하나 이상의 R<1> 또는 R<A>로 선택적으로 치환되며;
- [0135] L은
- [0136] 1) -C1-6 알킬,
- [0137] 2) -C2-6 알케닐,
- [0138] 3) -C2-6 알키닐,
- [0139] 4) -C3-7 시클로알킬,
- [0140] 5) -C3-7 시클로알케닐,
- [0141] 6) 헤테로시클릴,
- [0142] 7) -C1-6 알킬-C3-7 시클로알킬,
- [0143] 8) -C1-6 알킬-헤테로시클릴,

- [0144] 9) 아릴, 또는
- [0145] 10) 헤테로아릴이고,
- [0146] 여기서, 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 아릴 및 헤테로아릴 기는 각각 독립적으로 1 또는 2개의 R<A> 치환체로 선택적으로 치환되며;
- [0147] R1은
- [0148] 1) -H,
- [0149] 2) -C1-6 알킬,
- [0150] 3) -C2-6 알케닐,
- [0151] 4) -C2-6 알키닐,
- [0152] 5) -C3-7 시클로알킬,
- [0153] 6) -C3-7 시클로알케닐,
- [0154] 7) -C1-5 퍼플루오르화 기,
- [0155] 8) -헤테로시클릴,
- [0156] 9) -아릴,
- [0157] 10) -헤테로아릴,
- [0158] 11) -벤질, 또는
- [0159] 12) 5-[(3aS,4S,6aR)-2-옥소헥사하이드로-1H-티에노[3,4-d]이미다졸-4-일]펜타노일이고,
- [0160] 여기서, 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알케닐, 퍼플루오르화 알킬, 헤테로시클릴, 아릴, 헤테로아릴 및 벤질 기는 각각 독립적으로 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환되며;
- [0161] R2는
- [0162] 1) -H,
- [0163] 2) -C1-6 알킬,
- [0164] 3) -SR,
- [0165] 4) -C(0)R1,
- [0166] 5) -S(0)R1,
- [0167] 6) -S(0)2R<1>,
- [0168] 7) 1, 2 또는 3개의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -벤질,
- [0169] 8) L 및 헤테로아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -L-헤테로아릴,
- [0170] 9) L 및 헤테로시클릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -L-헤테로시클릴,
- [0171] 10) L 및 아릴기 중 하나 또는 둘다에 부착된 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -L-아릴,
- [0172] 11) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -헤테로아릴, 또는
- [0173] 12) 하나 이상의 R<A> 또는 R<1> 치환체로 선택적으로 치환된 -아릴이고,
- [0174] 여기서, 각 치환체는 L기에, 그것이 이미 존재하지 않는 경우에 선택적으로 부착되며;
- [0175] R<A>는

- [0176] 1) -할로젠,
- [0177] 2) -CFs,
- [0178] 3) -OH,
- [0179] 4) -OR<1>,
- [0180] 5) -L-OH,
- [0181] 6) -L-OR<1>,
- [0182] 7) -OCFs,
- [0183] 8) -SH,
- [0184] 9) -SR1,
- [0185] 10) -CN,
- [0186] 11) -NO2,
- [0187] 12) -NH2,
- [0188] 13) -NHR<1>,
- [0189] 14) -NR<1>R<1>,
- [0190] 15) -L-NH2,
- [0191] 16) -L-NHR<1>,
- [0192] 17) -L-NR<4>R<1>,
- [0193] 18) -L-SR<1>,
- [0194] 19) -L-S(O)R<1>,
- [0195] 20) -L-S(O)2R<1>,
- [0196] 21) -C(O)OH,
- [0197] 22) -C(O)OR<1>,
- [0198] 23) -C(O)NH2,
- [0199] 24) -C(O)NHR<1>,
- [0200] 25) -C(O)N(R<1>)R<1>,
- [0201] 26) -NHC(O)R<1>,
- [0202] 27) -NR1C(O)R<1>,
- [0203] 28) -NHC(O)OR<1>,
- [0204] 29) -NR1C(O)OR<1>,
- [0205] 30) -OC(O)NH2,
- [0206] 31) -OC(O)NHR<1>,
- [0207] 32) -OC(O)N(R)R<1>,
- [0208] 33) -OC(O)R<1>,
- [0209] 34) -C(O)R1,
- [0210] 35) -NHC(O)NH2,
- [0211] 36) -NHC(O)NHR1,

[0212] 37) $-\text{NHC}(\text{O})\text{N}(\text{R})\text{R}<1>$,

[0213] 38) $-\text{NRC}(\text{O})\text{NH}_2$,

[0214] 39) $-\text{NRC}(\text{O})\text{NHR}<1>$,

[0215] 40) $-\text{NR}_1\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}_1)\text{R}_1$,

[0216] 41) $-\text{NHS}(\text{O})_2\text{R}<1>$,

[0217] 42) $-\text{NRS}(\text{O})_2\text{R}<1>$,

[0218] 43) $-\text{S}(\text{O})_2\text{NH}_2$,

[0219] 44) $-\text{S}(\text{O})_2\text{NHR}<1>$,

[0220] 45) $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R})\text{R}<1>$,

[0221] 46) $-\text{S}(\text{O})\text{R}<1>$,

[0222] 47) $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}<1>$,

[0223] 48) $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}<1>$,

[0224] 49) $-\text{S}(\text{O})_2\text{OR}<1>$,

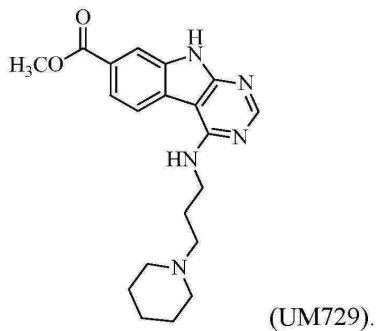
[0225] 50) -벤질,

[0226] 51) $-\text{N}_3$, 또는

[0227] 52) $-\text{C}(-\text{N}=\text{N}-)(\text{CF}_3)$ 이고,

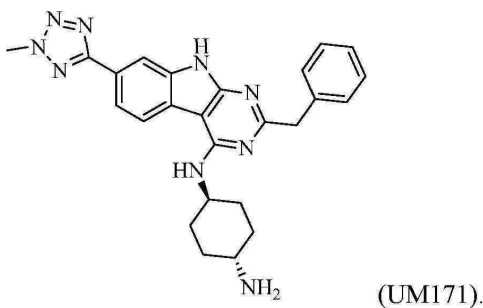
[0228] 여기서, 벤질기는 1, 2 또는 3개의 $\text{R}<\text{A}>$ 또는 $\text{R}<1>$ 치환체로 선택적으로 치환된다.

[0229] 특정 양태에서, 상기 피리미도(4,5-b)인돌 유도체는 하기 화학 구조를 갖는다:



[0230]

[0231] 특정 양태에서, 상기 피리미도(4,5-b)인돌 유도체는 하기 화학 구조를 갖는다:



[0232]

[0233] 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 상기 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원제 및 LMWH가 결핍된다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는, IL-2 및 IL-15에 덧붙여, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는, IL-2 및 IL-15에 덧붙여, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에 10 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고, 상기 IL-15는 상기 제3 배지에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의

농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에 100 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에 300 U/mL 내지 3,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에 10 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에 약 1,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제3 배지에서, SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제3 배지에서, SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제3 배지에서, SCF는 약 22 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 20 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 제3 배지는 GBGM®이 아니다.

- [0234] 일반적으로, 상기 특별히 인용된 배지 성분은 상기 배지의 불특정 성분 (예를 들어, 혈청)에서 가능한 구성요소를 말하는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 불특정 성분 안에 포함되지 않으며, 예를 들어 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 혈청 안에 포함되지 않는다. 또한, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 불특정 성분 안에 포함되지 않고, 예를 들어 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 혈청 안에 포함되지 않는다.
- [0235] 특정 측면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 인간 혈청-AB를 포함한다. 특정 측면에서, 임의의 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 1% 내지 20% 인간 혈청-AB, 5% 내지 15% 인간 혈청-AB, 또는 약 2, 5, 또는 10% 인간 혈청-AB를 포함한다.
- [0236] 특정 측면에서, 임의의 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 2-머캅토에탄올을 포함한다. 특정 측면에서, 임의의 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 겐타마이신을 포함한다.
- [0237] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제2 배지에서 상기 배양 전에, 상기 제1 배지에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 실시양태에서, 세포는 상기 제3 배지에서 상기 배양 전에, 상기 제2 배지에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 실시양태에서, 세포는 상기 제3 배지에서 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 초과 동안 배양된다.
- [0238] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제1 배지에서 7 내지 13일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생성하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지에 2 내지 6일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생성하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지에서 10 내지 30일 동안 배양되는데, 즉 상기 세포는 총 19 내지 49일 동안 배양된다.
- [0239] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제1 배지에서 8 내지 12일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생성하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지에서 3 내지 5일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생성하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지에서 15 내지 25일 동안 배양되는데, 즉 상기 세포는 총 26 내지 42일 동안 배양된다.
- [0240] 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제1 배지에서 약 10일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생성하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제2 배지에서 약 4일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생성하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지에서 약 21일 동안 배양되는데, 즉 상기 세포는 총 약 35일 동안 배양된다.
- [0241] 특정 측면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 및 제3 배지에서 상기 배양은 모두 정적 배양 조건 하에, 예를 들어 배양 디쉬 또는 배양 플라스크에서 수행된다. 특정 측면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지 중 하나 이상에서 상기 배양은 스피너 플라스크(spinner flask)에서 수행된다. 특정 측면에서, 상기 제1 배지 및 상기 제2 배지에서 상기 배양은 정적 배양 조건 하에 수행되고, 상기 제3 배지에서 상기 배양은 스피너 플라스크에서 수행된다.

- [0242] 특정 측면에서, 상기 배양은 스피너 플라스크에서 수행된다. 다른 측면에서, 상기 배양은 G-Rex 장치에서 수행된다. 또 다른 측면에서, 상기 배양은 WAVE 바이오리액터(bioreactor)에서 수행된다.
- [0243] 특정 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 처음에 상기 제1 배지에 1×10^4 내지 1×10^5 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 처음에 상기 제1 배지에 약 3×10^4 세포/mL로 접종된다.
- [0244] 특정 측면에서, 상기 제1 세포 집단은 처음에 상기 제2 배지에 5×10^4 내지 5×10^5 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 제1 세포 집단은 처음에 상기 제2 배지에 약 1×10^5 세포/mL로 접종된다.
- [0245] 특정 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 1×10^5 내지 5×10^6 세포/mL로 접종된다. 특정 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 1×10^5 내지 1×10^6 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 약 5×10^5 세포/mL로 접종된다. 더욱 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 스피너 플라스크에서 상기 제3 배지에 약 5×10^5 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 약 3×10^5 세포/mL로 접종된다. 더욱 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 정적 배양으로 상기 제3 배지에 약 3×10^5 세포/mL로 접종된다.
- [0246] 특정 측면에서, 본원에 개시된 3-단계 방법은 상기 제1 배지 안에 처음 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교하여 적어도 5000-배 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 안에 처음 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교하여 적어도 10,000-배 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 안에 처음 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교하여 적어도 50,000-배 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지 안에 처음 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교하여 적어도 75,000-배 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 7-아미노악티노마이신 D (7AAD) 염색에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 아넥신-V 염색에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 7-AAD 염색 및 아넥신-V 염색 모두에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 트리판 블루 염색(trypan blue staining)에 의해 결정된다.
- [0247] 특정 측면에서, 본원에 개시된 3-단계 방법은 20% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 40% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 60% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 70% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 75% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 80% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다.
- [0248] 특정 측면에서, 본원에 개시된 3-단계 방법은, 천연 킬러 세포 및 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때 상기 K562 세포에 대해 20% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 천연 킬러 세포와 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때 상기 K562 세포에 대해 35% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 천연 킬러 세포와 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때 상기 K562 세포에 대해 45% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 천연 킬러 세포와 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때 상기 K562 세포에 대해 60% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 천연 킬러 세포와 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때 상기 K562 세포에 대해 75% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다.
- [0249] 특정 측면에서, 상기 제3 배양 단계 후, 상기 제3 세포 집단, 예를 들어, 상기 천연 킬러 세포 집단은, 동결보존된다.
- [0250] 특정 측면에서, 본원은 천연 킬러 세포, 즉 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단을 제공한다. 따라서, 본원은 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 천연 킬러 세포 집단을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 20% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를

포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 40% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 60% 이상 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 80% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다.

[0251] 한 실시양태에서, 본원은 단리된 NK 전구 세포 집단을 제공하되, 여기서 상기 NK 전구 세포는 본원에 개시된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0252] 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 성숙 NK 세포 집단을 제공하되, 여기서 상기 성숙 NK 세포는 본원에 개시된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0253] 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 NK 세포 집단을 제공하되, 여기서 상기 NK 세포는 활성화되고, 상기 활성화된 NK 세포는 본원에 개시된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0254] 따라서, 또 다른 측면에서, 본원은 암 세포 증식을 저해하고 바이러스성 감염을 치료하거나 암, 예를 들어 혈액 암 및 고형 종양을 치료하기 위한, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단의 용도를 제공한다. 특정 실시양태에서, NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예를 들어 본원에 개시된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드와 접촉하거나, 이와 조합하여 사용된다. 특정 실시양태에서, NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예를 들어, 본원에 개시된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드로 처리되거나 이와 조합하여 사용된다.

[0255] 구체적인 실시양태에서, 상기 암은 고형 종양이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 암은 혈액암이다. 구체적인 실시양태에서, 암은 교모세포종, 원발성 소엽 암종, 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, 다발성 골수종 또는 망막모세포종이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 암은 AML이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 암은 다발성 골수종이다.

[0256] 또 다른 구체적인 실시양태에서, NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 수득된다. 한 실시양태에서, NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반, 예를 들어, 태반 관류액으로부터 수득된다. 한 실시양태에서, NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 제대혈로부터 수득되지 않는다. 한 실시양태에서, NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 말초혈로부터 수득되지 않는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액과 제대혈, 예를 들어, 관류액과 동일한 태반으로부터의 제대혈의 조합된 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 수득되는 태반 이외의 태반으로부터 단리된다. 특정 실시양태에서, 상기 조합된 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 풀링(pooling) 또는 조합하여 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은, 조합된 세포를 수득하기 위해 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 부피 비율로 조합된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5 (85%:15%)의 비율로 조합된다.

[0257] 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은, 조합된 세포를 수득하기 위해, 총 유핵 세포 (TNC) 함량으로 결정했을 때, 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 비율로 조합된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다.

[0258] 따라서, 본원은 한 실시양태에서, 암 또는 바이러스성 감염이 있는 개체에게 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 단리된 NK 세포 집단으로부터 유효량의 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 바이러스성 감염

이 있는 개체의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양이다. 특정 실시양태에서, 암은 혈액 암이다. 구체적인 실시양태에서, 혈액 암은 백혈병이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 혈액 암은 림프종이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 혈액 암은 급성 골수성 백혈병이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 혈액 암은 만성 림프구성 백혈병이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 혈액 암은 만성 골수형성 백혈병이다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 동결보존되었다. 다른 측면에서, 상기 천연 킬러 세포는 상기 접촉 또는 상기 투여 전에 동결보존되지 않았다.

[0259] 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 면역조절 화합물, 예를 들어 본원에 개시된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드로 처리되었다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 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 처리되었다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 개체에게 (1) 유효량의, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 단리된 NK 세포 집단; 및 (2) 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 투여하는 단계를 포함한다. 문맥상 "유효량"이란, NK 세포 집단 및, 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 투여되지 않은 상기 암 또는 상기 감염을 갖는 개체와 비교했을 때, 상기 암 또는 상기 감염 중 하나 이상의 증상에서 검출가능한 향상을 만들어 내는, NK 세포 집단의 세포, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 레날리도미드 또는 포말리도미드이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 개체에게 항암 화합물을, 예를 들어 이하에 개시된 하나 이상의 항암 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0260] 또 다른 실시양태에서, 본원은, 치료 효과량의 NK 세포 집단을 종양 세포에 근접시키는, 예를 들어, 종양 세포를 NK 세포 집단에서의 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 종양 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 이후, 달리 지시되지 않으면, 용어 "근접"이란 원하는 결과를 끌어내기에 충분한 근접을 말한다; 예를 들어, 특정 실시양태에서, 용어 근접은 접촉을 말한다. 특정 실시양태에서, 상기 접촉은 생체외에서 발생한다. 다른 실시양태에서, 상기 접촉은 생체내에서 발생한다. 특정 실시양태에서, 상기 종양 세포는 유방 암 세포, 두경부암 세포, 또는 육종 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 종양 세포는 원발성 유관 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 망막모세포종 세포이다.

[0261] 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물의 투여는 전신성 또는 국소성일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 투여는 비경구이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 주사, 주입, 정맥내(IV) 투여, 대퇴부 내 투여, 또는 종양 내 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 대상체에게 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드(scaffold)를 사용하여 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 대상체에게 주사에 의해 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 대상체에게 카테터를 통해 투여된다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포의 주사는 국소 주사이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 국소 주사는 고형 종양 (예를 들어, 육종)에 직접 놓는다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 대상체에게 주사에 의해 주사된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단은 그의 약제학적 조성물은 대상체에게 유도 전달(guided delivery)에 의해 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 주사에 의해 투여하는 것은 복강경검사, 내시경검사, 초음파, 컴퓨터 단층촬영술, 자기 공명, 또는 영상의학의 도움을 받는다.

[0262] 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 단리된 NK 세포 집단을 면역조절 화합물, 예를 들어 본원에 아래에 개시된 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, 상기 접촉 또는 근접 전에 처리하였다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역조절 화합물, 예를 들어 본원에 아래에 개시된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드의 유효량을 상기 종양 세포에 추가로 근접시키고, 예를 들어, 상기 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉시킨다. 문맥상 "유효량"은, NK 세포 집단의 세포, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉하거나 근접하지 않은 동일한 개수의 종양 세포와 비교할 때, 상기 종양 세포의 검출가능한 저해를 만들어 내는, NK 세포 집단의 세포, 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 유효량의 항암 화합물, 예를 들어 이하 개시되는 항암 화합물을 종양 세포에 근접시키는 것, 예를 들어 종양 세포를 항암 화합물과 접촉시키는 것을 추가로 포함한다.

- [0263] 본 발명의 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 혈액 암 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 종양 세포는 원발성 유관 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종 (CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 아교모세포종 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구 림프종 세포, 다발성 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 결장직장 암종 세포, 전립선암 세포, 또는 결장직장 선암종 세포이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 AML 세포이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 다발성 골수종 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 접촉 또는 근접은 생체외에서 발생한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 접촉 또는 근접은 생체내에서 발생한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 생체내 접촉 또는 근접은 인간에게서 발생한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 간 종양 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 폐 종양 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 췌장 종양 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 신장 종양 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 종양 세포는 다형성 아교모세포종 (GBM) 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포는 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포는 안티-CD33 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포는 안티-CD20 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포는 안티-CD138 항체와 함께 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포는 안티-CD32 항체와 함께 투여된다.
- [0264] 또 다른 측면에서, 본원은 (1) 레날리도미드; (2) 멜팔란; 및 (3) NK 세포를 개체에게 투여하는 단계를 포함하되, 상기 NK 세포는 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하기에 효과적인, 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들어, 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한, 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 생성되었다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 증식되었다. 또 다른 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란, 및/또는 NK 세포는 서로 개별적으로 투여된다. 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법의 특정 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 개시된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다.
- [0265] 또 다른 측면에서, 본원은 개체에 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 IL18로 전처리에 의해 선택적으로 활성화된)를 투여하는 단계를 포함하되, 상기 NK 세포는 상기 개체에서 AML을 치료하기에 효과적인, 급성 골수성 백혈병 (AML)을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들어 본원에 설명된 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한, 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 생성되었다. AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 특정 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 개시된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다. 특별한 실시양태에서, 상기 방법에 의해 치료되어야 할 AML은 불응성(refractory) AML, 예후가 안 좋은 AML, 또는 소아 AML을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 개체는 AML을 갖되, AML에 대해 적어도 하나의 비-천연 킬러 세포 치료가 실패했다. 구체적인 실시양태에서, 상기 개체는 65세 또는 그 이상이며, 처음으로 관해된(remission) 상태이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 개체는 상기 천연 킬러 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 시타라빈, 또는 둘 모두로 컨디셔닝되었다.
- [0266] 또 다른 측면에서, 본원은 (1) 레날리도미드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) NK 세포, 예를 들어, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단의 치료적 유효량을 만성 림프구 백혈병 (CLL)을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함하되, 상기 NK 세포가 상기 개체에서 상기 CLL을 치료하기에 효과적인, 만성 림프구 백혈병 (CLL)을 갖는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들어, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한, 본원에 개시된 임의의 방법에 의해 생성되었다. 임의의 상기 방법의 구체적인 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란, 플루다라빈, 및 증식된 NK 세포는 상기 개체에 별도로 투여된다. CLL을 갖는 개체를 치료하는 방법의 특정 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 개시된 바와 같이, 3-단계 방법에 의해 생성된다.
- [0267] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단은 동결보존되고, 예를 들어, 본원에 개시된 방법을 사용하여 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생

성된 NK 세포 집단은 동결보존 배지에서, 예를 들어 본원에 개시된 동결보존 배지에서 동결보존된다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단의 동결보존은 (1) 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단을 포함하는 세포 현탁액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 단계 (1)로부터의 세포 현탁액에 첨가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 상기 단계(2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 동결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 아래에서 보관하는 단계를 포함한다.

[0268] 상기 치료 또는 종양 저해 방법의 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 다른 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 관류액, 체대혈 또는 말초혈로부터 단리된, 또는 상이한 방법에 의해 조혈 세포로부터 생성된 천연 킬러 세포와 조합된다. 구체적인 실시양태에서, 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 비율로 조합된다.

[0269] 또 다른 측면에서, 본원은 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 태반 관류액, 체대혈, 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 조성물에서 세포의 70% 이상을 차지한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 조성물에서 세포의 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상을 차지한다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포의 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상은 CD3^{-} 및 CD56^{+} 이다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상은 CD16^{-} 이다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60% 이상은 CD94^{+} 이다.

[0270] 특정 측면에서, 상기 조성물에서 다수의 NK 세포는 microRNAs 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 말초혈 천연 킬러 세포만큼 더 높은 검출 수준으로 발현한다. 특정 측면에서, 상기 조성물에서 다수의 NK 세포는 microRNAs 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 miR342-3p 중 하나 이상을 말초혈 천연 킬러 세포보다 더 낮은 검출 수준으로 발현한다. 특정 측면에서, 상기 조성물에서 다수의 NK 세포는 microRNAs miR-181a, miR-30b, 및 miR30c 중 하나 이상을 말초혈 천연 킬러 세포와 동일한 수준으로 발현한다.

[0271] 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 2개 이상의 상이한 개체로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 그 NK 세포로 치료하고자 하는 개체와는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드에, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드에 접촉 또는 근접하지 않은 동일한 개수의 천연 킬러 세포, 즉 NK 세포보다 더 많은 검출가능한 그랜자임 B 또는 퍼포린을 상기 NK 세포가 발현시키기에 충분한 양으로 충분한 시간 동안, 접촉하거나 근접하였다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역조절 화합물은 아래 기술된 화합물, 예를 들어, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다. 특정 실시양태에서, 면역조절 화합물은 레날리도미드이다. 특정 실시양태에서, 면역조절 화합물은 포말리도미드이다.

[0272] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어, 아래 개시된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0273] 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 및 다른 공급원으로부터 또는 또 다른 방법에 의해 제조된 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공

급원은 태반혈 및/또는 제대혈이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, NK 세포는 다른 공급원으로부터의 또는 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 비율로 조합된다.

[0274] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 단리된 태반 관류액이나 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포와는 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액에서 세포의 모두, 또는 실질적으로 모두 (예를 들어, 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과)는 태아 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모계 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액에서 태아 세포는 상기 관류액에서 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 태반 혈관계에 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 적혈구 제거 처리된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 면역조절 화합물, 예를 들어 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0275] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포와는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하되, 여기서 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 2개 이상의 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 2개 이상의 개체로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0276] 또 다른 측면에서, 본원은, 단리된 NK 세포 집단 (예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된)을 포함하는 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들어, 태반으로부터, 예를 들어, 태반 관류액, 제대혈, 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물에서 세포의 70% 이상을 차지한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물에서 세포의 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상을 차지한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 조성물에서 세포의 70% 이상을 차지한다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포의 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상은 $CD3^+$ 및 $CD56^+$ 이다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상이 $CD16^+$ 이다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60% 이상은 $CD94^+$ 이다.

[0277] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물에서 상기 단리된 NK 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포는 2개 이상의 상이한 개체로부터의 NK 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물에서 상기 단리된 NK 세포는 그 NK 세포로 치료하고자 하는 개체와는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는, 면역조절 화합물 또는 탈리도미드에, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드에 접촉 또는 근접하지 않은 동일한 개수의 천연 킬러 세포, 즉 NK 세포보다 더 많은 검출가능한 그랜자임 B 또는 퍼포린을 상기 NK 세포가 발현시키기에 충분한 양으로 충분한 시간 동안, 접촉하거나 근접하였다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 이하에 개시된 화합물이다.

- [0278] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어, 이하에 개시된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.
- [0279] 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 또 다른 공급원으로부터 수득된 또는 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 태반혈 및/또는 체대혈이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포 집단은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 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 비율로 조합된다.
- [0280] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 NK 세포 집단 및 분리된 태반 관류액이나 분리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과는 상이한 개체로부터 수득한 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액에서 세포의 모두, 또는 실질적으로 모두 (예를 들어, 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과)는 태아 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는, 태아 및 모체 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태아 세포는 상기 태반 관류액에서 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 태반 혈관계에 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 적혈구 제거 처리된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 면역조절 화합물, 예를 들어 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.
- [0281] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 NK 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 분리된 태반 관류액 및 분리된 태반 관류액 세포를 포함하되, 여기서 상기 분리된 관류액 및 상기 분리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된다. 태반 관류액을 포함하는 상기 임의의 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 2개 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 임의의 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 분리된 태반 관류액 세포는 2개 이상의 개체로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.
- [0282] **3.1. 용어**
- [0283] 본원에서 사용될 때, 용어 "면역조절 화합물" 및 "IMiD™"은 탈리도미드를 포함하지 않는다.
- [0284] 본원에서 사용될 때, "레날리도미드"는 3-(4'-아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-디온 (케미칼 앵스트랙츠 서비스(Cheical Abstracts Service) 명칭) 또는 2,6-피페리딘디온,3-(4-아미노-1,3-디히드로-1-옥소-2H-이소인돌-2-일)- (국제 순수 응용 화학 연합 (IUPAC) 명칭))을 의미한다. 본원에서 사용될 때, "포말리도미드"는 4-아미노-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)이소인돌-1,3-디온을 의미한다.
- [0285] 본원에서 사용될 때, "다분화능"이 세포를 지칭하는 경우에, 그 세포가 또 다른 세포 유형의 세포로 분화하는 능력을 갖는다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, "다분화능 세포"는 포유동물 신체의 대략 260종 세포 유형 중 임의의 서브세트에 성장하는 능력을 갖는 세포이다. 분화다능성(pluripotent) 세포와는 달리, 다분화능 세포는 모든 세포 유형을 형성하는 능력은 갖지 못한다.
- [0286] 본원에서 사용될 때, "영양 세포"는 제2 유형의 세포와 공동배양되어 상기 제2 유형의 세포가 유지될 수 있고 가능하다면 증식될 수도 있는 환경을 제공하는 한 유형의 세포를 지칭한다. 임의의 이론에 얽매이지 않고, 영양 세포는 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드, 전기 신호, 유기 분자 (예를 들어, 스테로이드), 핵산 분자, 성장 인자 (예를 들어, bFGF), 다른 인자 (예를 들어, 시토카인) 및 대사 영양분을 표적 세포에 제공할 수 있다. 특정 실시양태에서, 영양 세포는 단층으로 성장한다.

- [0287] 본원에서 사용될 때, 추가의 수식 없이 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 "천연 킬러 세포" 또는 "NK 세포"는 임의의 조직 공급원으로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다.
- [0288] 본원에서 사용될 때, "태반 관류액"은 태반, 예를 들어 인간 태반의 적어도 일부를 통과한, 예를 들어 태반 혈 관계를 통해 통과한 관류 용액을 의미하며, 태반을 통과하는 동안 관류 용액에 의해 수집된 복수개의 세포를 포함한다.
- [0289] 본원에서 사용될 때, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 단리되거나 단리가능한 유핵 세포, 예를 들어 전체 유핵 세포를 의미한다.
- [0290] 본원에서 사용될 때, "종양 세포 저해", "종양 세포 증식의 저해" 등은 종양 세포 집단의 성장을, 예를 들어 상기 종양 세포 집단의 종양 세포 중 하나 이상을, 예컨대 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 또는 NK 세포 집단을 종양 세포 집단과 접촉시키거나 근접시켜, 예를 들어 종양 세포 집단을 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 또는 NK 세포 집단과 접촉시켜서 사멸함으로써, 저속화하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 접촉은 생체외에서 발생한다. 다른 실시양태에서, 상기 접촉은 생체내에서 발생한다.
- [0291] 본원에서 사용될 때, 용어 "조혈 세포"는 조혈 줄기 세포 및 조혈 전구 세포를 포함한다.
- [0292] 본원에서 사용될 때, "불특정 성분"은 구성성분이 일반적으로 제공되거나 정량화되지 않은 성분을 지칭하는 배양 배지 분야에서의 당업계 용어이다. "불특정 성분"의 예는 혈청, 예를 들어 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB) 및 태아 혈청 (예를 들어, 태아 소 혈청 또는 태아 송아지 혈청)을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.
- [0293] 본원에서 사용될 때, "+"가 특정 세포 마커의 존재를 가리키는데 사용되는 경우에, 이것은 그 세포 마커가 형광 활성화 세포 분류에서 동형 대조군에 비해 검출가능하게 존재하거나; 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 백그라운드 위로 검출가능함을 의미한다.
- [0294] 본원에서 사용될 때, "-"가 특정 세포 마커의 존재를 가리키는데 사용되는 경우에, 이것은 그 세포 마커가 형광 활성화 세포 분류에서 동형 대조군에 비해 검출가능하게 존재하지 않거나; 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 백그라운드 위로 검출가능하지 않음을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0295] 4. 도면의 간단한 설명

도 1: 선행 NK 세포 증식 배지 ("NK cell exp") 또는 DMSO와 비교했을 때, 스템레게닌-1 (SR-1) 또는 CH223191을 1 μ M, 10 μ M, 및 30 μ M로 사용하는 3-단계 방법에 대해, 10:1(E:T)에서 K562 세포의 (A) 증식 배수, (B) 세포 순도 (CD56+CD3-), 및 (C) 세포독성에 미치는 영향.

도 2: 3-단계 방법에 생성된 CD3-CD56+ 게이트 세포(gated cell)의 멀티컬러 유세포 측정기(multi-color flow cytometry)로서, CD11a와 천연 세포독성 수용체 NKp30, c-렉틴 수용체 NKG2D, DNAM-1, 2B4, 세포용해 매개체 퍼포린 및 그랜자임 B, 및 EOMES, 즉 NK 세포 성숙 및 세포용해 작용의 조절제의 발현을 나타낸다.

도 3: 종양 세포주 K562 (CML), HL-60 (AML), 및 RPMI8226 (다발성 골수종)에 대한 제35일 3-단계 NK 세포 (n=10)의 세포독성. 10:1 작동 세포(effector) 대 표적 세포(target) 비율로 용해를 측정하였다.

도 4: 퍼포린 (상부), 세포용해 매개체, 및 CD107 (하부), 즉 탈과립 마커의 발현에 있어서 FITC 동형 대조군 세포와 3-단계 NK 세포를 비교하는 멀티컬러 유세포 측정기. 화살표는 퍼포린(상부)과 CD107(하부)을 발현하는 3-단계 NK 세포를 나타낸다.

도 5: K562 (CML) 세포와 함께 1:1 비율로 24시간 동안 공동-배양될 때 3-단계 NK 세포 (n=11)에 의한 시토카인의 생성.

도 6a 및 도 6b: 작동 세포 대 표적 세포 1:1로, 배양 후 15분에 63배 확대한, 3-단계 NK 세포 및 K562 (CML) (A) 및 RPMI8226 (다발성 골수종) (B) 세포의 공초점 영상에 의해 캡처된 퍼포린의 분극을 사용한 F-액틴 면역학적 시냅스의 형성. 세포를 포름알데히드로 고정시키고 F-액틴을 알렉사-488(Alexa-488) 콘쥬게이트된 팔로이딘으로 염색하고, 퍼포린 항체에 이어 알렉사 플루오르 555 염료 콘쥬게이트된 고트 안티-래빗(Alexa Fluor 555 dye conjugated goat anti-rabbit) 2차 항체로 공-염색을 수행하였다. 종양 표적 세포는 또한 셀트랙커 바이올렛(CellTracker Violet) 염료로 염색하였다. 화살표는 NK 세포, 퍼포린, 및 표적 세포를 지시한다.

도 7: 종양 세포주 K562(CML), HL-60 (AML), 및 RPMI8226 (다발성 골수종)에 대한 3-단계 NK 세포 (n=3)의 세포독성. 용해는 다양한 작동 세포 대 표적 세포의 비율로 측정되었다.

도 8: 종양 세포 (K562 또는 HL-60) 또는 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA)로 자극할 때 3-단계 NK 세포 (n=4)에서 CD107a 발현. CD107a 발현은 탈과립에 대한 마커이다. 4개의 공여자로부터의 결과를 나타낸다.

도 9: 종양 세포 (K562, HL-60, 또는 RPMI8226) 또는 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트 (PMA)로 자극할 때 3-단계 NK 세포 (n=3)에서의 IFN γ 분비. 3개의 공여자로부터의 결과를 나타낸다.

도 10: 3:1의 작동 세포-대-표적 세포로, 기본적 AML 표적 세포 (A1, A2, 및 KG1a)에 대한 3-단계 NK 세포 (n = 2)의 세포용해 활성. 24시간 항온처리에 대한 결과를 나타낸다. 2개의 공여자로부터 결과를 나타낸다.

도 11: HL-60 (AML) 종양 세포주로 자극했을 때와 비교한, 기본적 AML 표적 세포 (AML 1-4, 및 KG1a)로 자극했을 때의 3-단계 NK 세포 (n=5)에서의 IFN γ 분비.

도 12: 3-단계 NK 세포의 접종 후 1일, 7일, 14일, 21일, 28일, 및 45일에 NOD/SCID 감마 Null (NSG) 마우스에서 인간 키메라증 (CD45+).

도 13: 3-단계 NK 세포의 접종 후 1일, 7일, 14일, 21일, 28일, 및 45일에 인간 NK 세포 상에 CD16 발현 빈도.

도 14: 3-단계 NK 세포의 접종 후 1일, 7일, 14일, 21일, 28일, 및 45일에 인간 NK 세포 상에 KIR의 발현. 막대의 하부는 KIR2DL2/DL3의 발현을 나타내고, 막대의 중간 부분은 KIR2DL2/DL3 및 KIR3DL1 모두의 발현을, 막대의 상부는 KIR3DL1의 발현을 나타낸다.

도 15: 다양한 E:T 비율에서 K562 세포에 대한 항-종양 활성을, 3-단계 NK 세포를 투여받은 마우스로부터 풀링된 14일 말초혈 또는 간으로부터 단리된 인간 세포로부터 세포군형성억제 평가를 사용하여 시험하였다. 형성된 세포군의 상당한 감소가, K562 대조군 종양 세포 단독과 비교했을 때 인간 세포와 함께 배양된 K562에서 관찰되었다.

도 16: 다양한 E:T 비율에서 MA9.3Ras 세포에 대한 항-종양 활성을, 3-단계 NK 세포를 투여받은 마우스로부터 풀링된 제14일 말초혈 또는 간으로부터 단리된 인간 세포로부터 세포군형성억제 평가를 사용하여 시험하였다. 형성된 세포군의 상당한 감소가, MA9.3Ras 대조군 종양 세포 단독과 비교했을 때 인간 세포와 함께 배양된 MA9.3Ras에서 관찰되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

5. 상세한 설명

본원은 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 NK 세포를 생성 및 증식시키는 신규한 방법을 제공한다. 또한 본원은 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 NK 세포 집단을 생성하는 방법, 예를 들어, 3-단계 방법을 제공한다. NK 세포, 및 NK 세포 집단 생성에 사용되는 조혈 세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 비장 또는 간 (이에 제한되지 않음)으로부터 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, NK 세포 또는 NK 세포 집단은 증식된 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 및/또는 조혈 전구 세포로부터 생성된다. 한 실시양태에서, 조혈 세포는 이러한 세포의 공급원, 예컨대 태반, 예를 들어 태반 관류액, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 비장, 간 및/또는 골수로부터 수집된다.

NK 세포 및 NK 세포 집단을 생성하는 데 사용되는 조혈 세포는 임의의 동물 종으로부터 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조혈 줄기 또는 전구 세포는 포유류 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 및 전구 세포는 인간 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 영장류 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 개의 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 설치류의 세포이다.

5.1 조혈 세포

본원에 개시한 방법에 유용한 조혈 세포는 NK 세포로 분화할 수 있는 임의의 조혈 세포, 예를 들어 전구 세포, 조혈 전구 세포, 조혈 줄기 세포 등일 수 있다. 조혈 세포는 예를 들어 골수, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 간 등, 또는 그의 조합과 같은 조직 공급원으로부터 수득될 수 있다. 조혈 세포는 태반으로부터 수득될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 태반 관류액으로부터 수득된다. 한 실시양태에서, 조혈 세포는 제대혈로부터 수득되지 않는다. 한 실시양태에서, 조혈 세포는 말초혈로부터 수득되지 않는다. 태반 관류액으로부터의 조혈

세포는 태아 및 모계 조혈 세포의 혼합물, 예를 들어 모계 세포가 조혈 세포 총 개수의 5% 초과로 포함된 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 태아 세포를 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상 포함한다.

[0301] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 생성하는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액, 제대혈, 태아 간, 동원 말초혈 또는 골수로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 생성하는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액 및 제대혈, 예를 들어 상기 관류액과 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 조합된 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제대혈은 상기 태반 관류액을 수득한 태반과는 다른 태반으로부터 분리된다. 특정 실시양태에서, 상기 조합된 세포는 제대혈과 태반 관류액을 풀링 또는 조합하여 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 조합된 세포를 수득하기 위해, 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 부피 비율로 조합된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5 (85%:15%)의 비율로 조합된다.

[0302] 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 조합된 세포를 수득하기 위해, 전체 유핵 세포 (TNC) 함유량 기준으로 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 비율로 조합된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다.

[0303] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 생성하는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 제대혈 및 태반 관류액 둘다로부터 수득하지만, 여기서 상기 제대혈은 상기 태반 관류액을 수득한 태반과는 다른 태반으로부터 분리된다.

[0304] 특정 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}$ 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시한 방법에 유용한 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{+}$ 또는 $CD34^{+}CD38^{-}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}Lin^{-}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD2^{-}$, $CD3^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$, $CD19^{-}$, $CD24^{-}$, $CD56^{-}$, $CD66b^{-}$ 및/또는 글리코포린 A⁻ 중 하나 이상이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD2^{-}$, $CD3^{-}$, $CD11b^{-}$, $CD11c^{-}$, $CD14^{-}$, $CD16^{-}$, $CD19^{-}$, $CD24^{-}$, $CD56^{-}$, $CD66b^{-}$ 및 글리코포린 A⁻이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}CD33^{-}CD117^{-}$ 이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD38^{-}CD33^{-}CD117^{-}CD235^{-}CD36^{-}$ 이다.

[0305] 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD45^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD45^{+}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $Thy-1^{+}$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}Thy-1^{+}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD133^{+}$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}CD133^{+}$ 또는 $CD133^{+}Thy-1^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, $CD34^{+}$ 조혈 세포는 $CXCR4^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, $CD34^{+}$ 조혈 세포는 $CXCR4^{-}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 KDR (혈관 성장 인자 수용체 2)에 대해 양성이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^{+}KDR^{+}$, $CD133^{+}KDR^{+}$ 또는 $Thy-1^{+}KDR^{+}$ 이다. 특정 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 알데히드 탈하이드로게나제에 대해 양성 (ALDH⁺)이고, 예를 들어 상기 세포는 $CD34^{+}ALDH^{+}$ 이다.

- [0306] 특정 다른 실시양태에서, $CD34^+$ 세포는 $CD45^-$ 이다. 구체적인 실시양태에서, $CD34^+$ 세포, 예를 들어 $CD34^+$, $CD45^-$ 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.
- [0307] 특정 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^-$ 이다.
- [0308] 조혈 세포는 또한 계통 위탁(lineage commitment)을 나타내는 특정 마커가 없을 수도 있고, 발생적 특징이 없을 수도 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $HLA-DR^-$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+HLA-DR^-$, $CD133^+HLA-DR^-$, $Thy-1^+HLA-DR^-$ 또는 $ALDH^+HLA-DR^-$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 계통 마커 CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A 중 하나 이상, 또는 모두에 대해 음성이다.
- [0309] 이렇게, 조혈 세포는 본원에 개시된 방법에 사용하기 위해 미분화 상태를 나타내는 마커의 존재를 기초로 하거나, 또는 적어도 일부 계통 분화가 일어났음을 나타내는 계통 마커의 부재를 기초로 하여 선택될 수 있다. 특이적 마커의 존재 또는 부재를 기초로 하여, 조혈 세포를 포함하는 세포를 분리하는 방법은 이하에 상세하게 논의된다.
- [0310] 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포는 실질적으로 동종인 집단, 예를 들어 단일 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 약 95% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상 포함하는 집단, 또는 동일한 조혈 세포-관련 세포 마커를 나타내는 조혈 세포를 포함하는 집단일 수 있다. 예를 들어, 다양한 실시양태에서, 조혈 세포는 골수, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 또는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 약 95%, 98% 또는 99% 이상 포함할 수 있다.
- [0311] 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포는 단일 개체로부터, 예를 들어 단일 태반으로부터 취득될 수도 있고, 또는 복수개의 개체로부터 취득될 수도 있으며, 예를 들어 풀링될 수 있다. 조혈 세포가 복수개의 개체로부터 취득되고 풀링되는 경우, 상기 조혈 세포는 동일 조직 공급원으로부터 취득될 수 있다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 풀링된 조혈 세포는 모두 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터 취득되거나, 모두 태반혈로부터 취득되거나, 모두 제대혈로부터, 모두 말초혈 등으로부터 취득된다.
- [0312] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 조혈 세포는 2종 이상의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 2종 이상의 공급원으로부터의 조혈 세포가 조합되어 본원에서 사용되는 방법에 사용되는 경우, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 천연 킬러 세포를 생성하기 위해 사용되는 복수개의 조혈 세포는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용되는 조혈 세포는 태반 및 태반혈로부터의 조혈 세포; 태반 및 말초혈로부터의 조혈 세포; 태반 및 태반혈로부터의 조혈 세포, 또는 태반 및 골수로부터의 조혈 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 조혈 세포는 제대혈로부터의 조혈 세포와 조합된 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함하고, 여기서 상기 제대혈 및 태반은 동일 개체로부터 유래된 것이고, 즉, 관류액 및 제대혈이 매치된다. 조혈 세포가 2종의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함하는 실시양태에서, 상기 공급원들로부터의 조혈 세포는 예를 들어 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 비율로 조합될 수 있다.
- [0313] 5.1.1. 태반 조혈 줄기 세포
- [0314] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포는 태반 조혈 세포이다. 한 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^+$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 대부분 (예를 들어, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상) $CD34^+CD38^-$ 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 대부분 (예를 들어, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상) $CD34^+CD38^+$ 세포이다. 태반 조혈 세포는 분만 후 포유동물 (예를 들어, 인간) 태반으로부터 당업자에게 공지된 임의의 수단, 예를 들어 관류를 통해 취득될 수 있다.
- [0315] 또 다른 실시양태에서, 태반 조혈 세포 $CD45^-$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD45^-$ 이다. 또 다

른 구체적인 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^{+}CD45^{+}$ 이다.

[0316] **5.2. 천연 킬러 세포 및 천연 킬러 세포 집단의 생성**

[0317] 본 발명의 방법에 의한 NK 세포의 생성은 조혈 세포의 집단을 증식시키는 것을 포함한다. 세포 증식 동안, 상기 조혈 세포 집단 내 복수개의 조혈 세포는 NK 세포로 분화한다. 한 실시양태에서, 본원은 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함하는 제1 배지에서 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어, $CD34^{+}$ 줄기 세포 또는 전구 세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계, 후속적으로 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함하고, Tpo는 결핍된 제2 배지에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생성하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기 세포 동원제 및 저-분자량 헤파린(LMWH)은 결핍된 제3 배지에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하되, 상기 제3 세포 집단은 $CD56^{+}$, $CD3^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함하고, 특정 실시양태에서 상기 천연 킬러 세포의 70% 이상, 예를 들어 80% 이상이 생존가능하고, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함하는, NK 세포의 생성 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 또는 $CD16^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 또는 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{+}$ 및 $CD16^{+}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 천연 킬러 세포는 $CD94^{-}$ 및 $CD16^{-}$ 인 천연 킬러 세포를 포함한다.

[0318] **5.2.1. 3-단계 방법을 사용하는 NK 세포 집단의 생성방법**

[0319] 한 실시양태에서, 본원은 NK 세포 집단을 생성하는 3-단계 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 따라 NK 세포 집단을 생성하기 위한, 본원에 개시된 바와 같은 조혈 세포의 증식 및 분화의 방법은, 상기 조혈 세포를 밀리리터 당 약 2×10^4 내지 약 6×10^6 세포로 포함하는 세포 집단을 유지하는 단계를 포함한다. 특정 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 처음에 상기 제1 배지에 1×10^4 내지 1×10^5 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 처음에 상기 제1 배지에 약 3×10^4 세포/mL로 접종된다.

[0320] 특정 측면에서, 상기 제1 세포 집단은 처음에 상기 제2 배지에 5×10^4 내지 5×10^5 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 제1 세포 집단은 처음에 상기 제2 배지에 약 1×10^5 세포/mL로 접종된다.

[0321] 특정 측면에서 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 1×10^5 내지 5×10^6 세포/mL로 접종된다. 특정 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 1×10^5 내지 1×10^6 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 약 5×10^5 세포/mL로 접종된다. 더욱 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 스피너 플라스크 안에서 상기 제3 배지에 약 5×10^5 세포/mL로 접종된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 상기 제3 배지에 약 3×10^5 세포/mL로 접종된다. 더욱 구체적인 측면에서, 상기 제2 세포 집단은 처음에 정적 배양으로 상기 제3 배지에 약 3×10^5 세포/mL로 접종된다.

[0322] 특정 실시양태에서, 상기 3-단계 방법은 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어, $CD34^{+}$ 줄기 세포 또는 전구 세포를, 예를 들어 본원에 개시된 소정의 기간 동안 제1 배지에서 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는 제1 단계 ("단계 1")를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 제1 배지는 부가된 LMWH이 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 배지는 LMWH가 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다.

[0323] 특정 실시양태에서, 후속적으로 "단계 2"에서 상기 세포는 예를 들어 본원에 개시된 소정의 기간 동안 제2 배지

에서 배양되어 제2 세포 집단을 생성한다. 특정 실시양태에서, 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo가 결핍된다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 제2 배지는 부가된 LMWH가 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제2 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제2 배지는 LMWH가 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제2 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 특정 실시양태에서, 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다.

[0324] 특정 실시양태에서, 후속적으로 "단계 3"에서 상기 세포는 예를 들어 본원에 개시된 소정의 기간 동안 제3 배지에서 배양되어 제3 세포 집단, 예를 들어, 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 실시양태에서, 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원제 및 LMWH가 결핍된다. 특정 실시양태에서, 제3 배지는 IL-2 및 IL-15에 덧붙여, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제3 배지는 IL-2 및 IL-15에 덧붙여, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 제3 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 구체적인 실시양태에서, 제3 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다.

[0325] 구체적인 실시양태에서, 상기 3-단계 방법을 사용하여 NK 세포 집단을 생성한다. 특정 실시양태에서, 상기 3-단계 방법은 간질 영양 세포(stromal feeder cell) 지지체의 부재하에 수행된다. 특정 실시양태에서, 상기 3-단계 방법은 외인성으로 부가된 스테로이드 (예를 들어, 코티손, 히드로코티손, 또는 그의 유도체)의 부재하에 수행된다.

[0326] 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법에 사용되는 상기 제1 배지는 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법에 사용된 제1 배지는, 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, 저분자량 헤파린 (LMWH), Flt-3 리간드 (Flt-3L), 줄기 세포 인자 (SCF), IL-6, IL-7, 과립구 세포군-자극 인자 (G-CSF), 또는 과립구/대식세포 자극 인자 (GM-CSF) 중 하나 이상을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법에 사용된 제1 배지는, 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법에 사용된 제1 배지는, 줄기 세포 동원제 및 Tpo에 덧붙여, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 제1 배지는 부가된 LMWH가 결핍된다. 특정 측면에서, 제1 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 구체적인 측면에서, 제1 배지는 LMWH가 결핍된다. 구체적인 측면에서, 제1 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 특정 측면에서, 상기 Tpo는 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 제1 배지에 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, LMWH는 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제1 배지에서, LMWH는 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 다음 중 하나 이상을 부가적으로 포함한다: 항생제, 예컨대 겐타마이신; 산화방지제, 예컨대

대 트랜스퍼린, 인슐린, 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 실시양태에서, 제1 배지의 기본이 되는 배지는 당업자에게 잘 공지된 세포/조직 배양 배지로서, 예를 들어, 시판되는 세포/조직 배양 배지, 예컨대 SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: 햄즈(Ham's) F12 ("F12") (예를 들어, 2:1 비율, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 어드밴스드(Advanced) DMEM (집코(Gibco)), EL08-1D2, 미엘로컬트(Myelocult)™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640; 또는 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분을 포함하는 배지, 예컨대 GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: 햄즈 F12 ("F12") (예를 들어, 2:1 비율, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 (DMEM), 어드밴스드 DMEM (집코), EL08-1D2, 미엘로컬트™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 GBGM®이 아니다.

[0327]

특정 측면에서, 상기 3-단계 방법에 사용된 상기 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함하고, Tpo가 결핍된다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는, 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제2 배지는 줄기 세포 동원제 및 IL-15에 덧붙여, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 구체적인 측면에서, 제2 배지는 부가된 LMWH가 결핍된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 배지는 부가된 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 배지는 LMWH가 결핍된다. 구체적인 측면에서, 상기 제2 배지는 탈황산화 글리코사미노글리칸이 결핍된다. 특정 측면에서, 상기 IL-15는 상기 제2 배지에 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로, 10 ng/mL 내지 30 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제2 배지에서, LMWH는 1U/mL 내지 10U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제2 배지에서, Flt-3L은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, LMWH는 제2 배지에서 4U/mL 내지 5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, Flt-3L은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, LMWH는 제2 배지에서 약 4.5U/mL의 농도로 존재하고; Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 제2 배지에서, Flt-3L은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; SCF는 약 27 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 25 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 항생제, 예컨대 겐타마이신; 산화방지제, 예컨대 트랜스퍼린, 인슐린, 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 실시양태에서, 제2 배지의 기본이 되는 배지는 당업자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, 시판되는 세포/조직 배양

배지, 예컨대 SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: 햅즈 F12 ("F12") (예를 들어, 2:1 비율, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 DMEM), 어드밴스드 DMEM (집코), EL08-1D2, 미엘로컬트™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640; 또는 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분을 포함하는 배지, 예컨대 GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: 햅즈 F12 ("F12") (예를 들어, 2:1 비율, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 (DMEM), 어드밴스드 DMEM (집코), EL08-1D2, 미엘로컬트™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 배지는 GBGM®이 아니다.

[0328] 특정 실시양태에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는 IL-2 및 IL-15를 포함하고, 줄기 세포 동원제 및 LMWH는 결핍된다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는 IL-2 및 IL-15에 덧붙여, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 또는 GM-CSF 중 하나 이상을 포함한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법에 사용된 제3 배지는, IL-2 및 IL-15에 덧붙여, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및 GM-CSF의 각각을 포함한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에서 10 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에서 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에서 100 U/mL 내지 10,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에서 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에서 300 U/mL 내지 3,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에서 10 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 IL-2는 상기 제3 배지에서 약 1,000 U/mL의 농도로 존재하고 상기 IL-15는 상기 제3 배지에서 약 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제3 배지에서, SCF는 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.01 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 1 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.01 ng/mL 내지 0.50 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.1 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제3 배지에서, SCF는 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 0.04 ng/mL 내지 0.06 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 20 ng/mL 내지 30 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 0.20 ng/mL 내지 0.30 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 0.005 ng/mL 내지 0.5 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 측면에서, 상기 제3 배지에서, SCF는 약 22 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-6은 약 0.05 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 약 20 ng/mL의 농도로 존재하고; G-CSF는 약 0.25 ng/mL의 농도로 존재하고; GM-CSF는 약 0.01 ng/mL의 농도로 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 제3 배지는 다음 중 하나 이상을 추가로 포함한다: 항생제, 예컨대 겐타마이신; 산화방지제, 예컨대 트랜스퍼린, 인슐린, 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스코르브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 실시양태에서, 제3 배지의 기본을 이루는 배지는 당업자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, 시판되는 세포/조직 배양 배지, 예컨대 SCGM™, STEMMACS™, GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: 햅즈 F12 ("F12") (예를 들어, 2:1 비율, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 (DMEM), 어드밴스드 DMEM (집코), EL08-1D2, 미엘로컬트™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640; 또는 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함된 성분을 포함하는 배지, 예컨대 GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: 햅즈 F12 ("F12") (예를 들어, 2:1 비율, 또는 고 글루코즈 또는 저 글루코즈 (DMEM), 어드밴스드 DMEM (집코), EL08-1D2, 미엘로컬트™ H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640에 포함된 성분을 포함하는 배지이다. 특정 실시양태에서, 상기 제3 배지는 GBGM®이 아니다.

[0329] 일반적으로, 특별히 인용된 배지 성분은 상기 배지의 불특정 성분에서 가능한 구성요소를 말하는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 불특정 성분 안에 포함되지 않고, 예를 들어, 상기 Tpo, IL-2, 및 IL-15는 혈청 안에 포함되지 않는다. 또한, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지의 불특정 성분 안에 포함되지 않고, 예를 들어, 상기 LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF, 및/또는 GM-CSF는 혈청 안에 포함되지 않는다.

[0330] 특정 측면에서, 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 인간 혈청-AB를 포함한다. 특정 측면에서, 임의의 상기 제1 배지, 제2 배지 또는 제3 배지는 1% 내지 20% 인간 혈청-AB, 5% 내지 15% 인간 혈청-AB, 또는 약 2, 5, 또는 10% 인간 혈청-AB를 포함한다.

[0331] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제1 배지 안에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 세포는 상기 제2 배지에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 동안 배양된다. 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 세포는 상기 제3 배지에서 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 초과 동안 배양된다.

- [0332] 구체적 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제2 배지에서 상기 배양 전에 상기 제1 배지에서 7 내지 13일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생성하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제3 배지에서 상기 배양 전에 상기 제2 배지에서 2 내지 6일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생성하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지에서 10 내지 30일 동안 배양되는데, 즉 세포는 총 19 내지 49일 동안 배양된다.
- [0333] 구체적 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제2 배지에서 상기 배양 전에 상기 제1 배지에서 8 내지 12일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생성하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제3 배지에서 상기 배양 전에 상기 제2 배지에서 3 내지 5일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생성하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지에서 15 내지 25일 동안 배양되는데, 즉 세포는 총 26 내지 42일 동안 배양된다.
- [0334] 구체적 실시양태에서, 본원에 개시된 상기 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제2 배지에서 상기 배양 전에 상기 제1 배지에서 약 10일 동안 배양되어 제1 세포 집단을 생성하고; 상기 제1 세포 집단은 상기 제3 배지에서 상기 배양 전에 상기 제2 배지에서 약 4일 동안 배양되어 제2 세포 집단을 생성하고; 상기 제2 세포 집단은 상기 제3 배지에서 약 21일 동안 배양되는데, 즉 세포는 총 약 35일 동안 배양된다.
- [0335] 특정 측면에서, 본원에 개시된 3-단계 방법은 상기 제1 배지에 처음에 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교했을 때, 5000-배수 이상 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지에 처음에 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교했을 때 10,000-배수 이상 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지에 처음에 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교했을 때 50,000-배수 이상 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 제1 배지에 처음에 접종된 조혈 줄기 세포의 개수와 비교했을 때 75,000-배수 이상 더 많은 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 7-아미노약티노마이신 D (7AAD) 염색에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 아넥신-V 염색에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 7-AAD 염색 및 아넥신-V 염색 모두에 의해 결정된다. 특정 측면에서, 상기 천연 킬러 세포의 생존도는 트리판 블루 염색에 의해 결정된다.
- [0336] 특정 측면에서, 3-단계 방법은 20% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 40% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 60% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 70% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 80% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포를 생성한다.
- [0337] 특정 측면에서, 상기 3-단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때, K562 세포에 대해 20% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때, K562 세포에 대해 35% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때, K562 세포에 대해 45% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때, K562 세포에 대해 60% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다. 특정 측면에서, 3-단계 방법은 상기 천연 킬러 세포 및 상기 K562 세포가 10:1의 비율로 생체외에서 공동-배양될 때 K562 세포에 대해 75% 이상의 세포독성을 나타내는 천연 킬러 세포를 생성한다.
- [0338] 특정 측면에서, 상기 제3 배양 단계 후, 상기 제3 세포 집단, 예를 들어, 상기 천연 킬러 세포 집단은 동결보존된다.
- [0339] 특정 측면에서, 본원은 천연 킬러 세포, 즉 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 천연 킬러 세포를 포함하는 세포 집단을 제공한다. 따라서, 본원은 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된, 단리된 천연 킬러 세포 집단을 제공한다. 구체적 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 20% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 40% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 60% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 80% 이상의 CD56+CD3- 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 60% 이상의 CD16- 세포를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 상기

천연 킬러 세포 집단은 80% 이상의 CD16⁺ 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 20% 이상의 CD94⁺ 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 천연 킬러 세포 집단은 40% 이상의 CD94⁺ 세포를 포함한다.

[0340] **5.3. 줄기 세포 동원 인자**

[0341] 5.3.1. 화학 정의

[0342] 본원에 설명된 줄기 세포 동원 인자의 내용의 이해를 돕기 위해, 다수의 용어가 아래와 같이 정의된다.

[0343] 일반적으로, 본원에서 사용된 명명법 및 본원에 개시된 생물학, 세포 생물학, 생화학, 유기 화학, 의화학, 및 약리학에서의 실험 절차는 당업계에 잘 공지되어 있고 통상 사용되는 것이다. 달리 정의되지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 일반적으로 그 내용이 속하는 기술분야의 숙련인이 통상 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0344] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자가 결정한 특별한 값에 대한 허용가능한 오차를 의미하며, 부분적으로는 그 값이 측정되거나 결정되는 방법에 의존한다. 특정 실시양태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 1, 2, 3, 또는 4 표준편차 이내를 의미한다. 특정 실시양태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 50%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.05% 이내를 의미한다.

[0345] 용어 "아릴 탄화수소 수용체" 또는 "AHR"은 인간에 있어서 AHR 유전자에 의해 코딩된 단백질, 또는 그의 변형을 말한다 (예를 들어, GenBank Accession Nos. P35869.2 및 AAH70080.1을 참조한다) .

[0346] 용어 "아릴 탄화수소 수용체 길항제," "AHR 길항제," "아릴 탄화수소 수용체 억제제," 또는 "AHR 억제제"는 아릴 탄화수소 수용체의 활성을 하향조절하거나 감소시키는 화합물을 말한다.

[0347] 용어 "알킬"은 선형 또는 분지형 포화된 일가 탄화수소 라디칼을 칭하며, 여기서 상기 알킬은 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다. 용어 "알킬"은 또한 달리 특정되지 않으면, 선형 및 분지형 알킬 모두를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 알킬은 탄소 원자수 1 내지 20개 (C₁₋₂₀), 1 내지 15개 (C₁₋₁₅), 1 내지 10개 (C₁₋₁₀), 또는 1 내지 6개 (C₁₋₆)를 갖는 선형 포화된 일가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소 원자수 3 내지 20개 (C₃₋₂₀), 3 내지 15개 (C₃₋₁₅), 3 내지 10개 (C₃₋₁₀), 또는 3 내지 6개 (C₃₋₆)를 갖는 분지형 포화된 일가 탄화수소 라디칼이다. 본원에 사용된 바와 같은, 선형 C₁₋₆ 및 분지형 C₃₋₆ 알킬 기는 또한 "저급 알킬"로 칭한다. 알킬 기의 예는 메틸, 에틸, 프로필 (모든 이성질체 형태 포함), n-프로필, iso-프로필, 부틸 (모든 이성질체 형태 포함), n-부틸, iso-부틸, sec-부틸, t-부틸, 펜틸 (모든 이성질체 형태 포함), 및 헥실 (모든 이성질체 형태 포함)을 포함하되, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, C₁₋₆ 알킬은 탄소 원자수 1 내지 6개의 선형 포화된 일가 탄화수소 라디칼 또는 탄소 원자수 3 내지 6개의 분지형 포화 일가 탄화수소 라디칼을 말한다.

[0348] 용어 "알킬렌"이란 선형 또는 분지형 포화된 이가 탄화수소 라디칼을 말하고, 여기서 알킬렌은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다. 예를 들어, C₁₋₆ 알킬렌은 탄소 원자수 1 내지 6개의 선형 포화된 이가 탄화수소 라디칼 또는 탄소 원자수 3 내지 6개의 분지형 포화된 이가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 실시양태에서, 알킬렌은 탄소 원자수 1 내지 20개 (C₁₋₂₀), 1 내지 15개 (C₁₋₁₅), 1 내지 10개 (C₁₋₁₀), 또는 1 내지 6개 (C₁₋₆)를 갖는 선형 포화된 이가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소 원자수 3 내지 20개 (C₃₋₂₀), 3 내지 15개 (C₃₋₁₅), 3 내지 10개 (C₃₋₁₀), 또는 3 내지 6개 (C₃₋₆)를 갖는 분지형 포화된 일가 탄화수소 라디칼이다. 본원에서 사용된 바와 같은, 선형 C₁₋₆ 및 분지형 C₃₋₆ 알킬렌 기는 또한 "저급 알킬렌"으로 칭한다. 알킬렌 기의 예는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌 (모든 이성질체 형태 포함), n-프로필렌, iso-프로필렌, 부틸렌 (모든 이성질체 형태 포함), n-부틸렌, iso-부틸렌, t-부틸렌, 펜틸렌 (모든 이성질체 형태 포함), 및 헥실렌 (모든 이성질체 형태 포함)을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.

[0349] 용어 "알케닐"은 하나 이상의, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의, 또 다른 실시양태에서, 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는 선형 또는 분지형 일가 탄화수소 라디칼을 칭한다. 알케닐은 선택적으로 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다. 용어 "알케닐"은 또한 당업자에 의해 인식될 때 "시스" 및 "트랜스" 배열, 또는 대안적으로 "Z" 및 "E" 배열을 갖는 라디칼을 포함한다. 본원에 사용될 때, 용어 "알케닐"은 달리 구체화되지 않으면, 선형 및 분지형 알케닐 모두를 포함한다. 예를 들어, C₂₋₆ 알케닐은 탄소 원자

수 2 내지 6개의 선형 불포화된 일가 탄화수소 라디칼 또는 탄소 원자수 3 내지 6개의 분지형 불포화된 일가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 실시양태에서, 알케닐은 탄소 원자수 2 내지 20개 (C_{2-20}), 2 내지 15개 (C_{2-15}), 2 내지 10개 (C_{2-10}), 또는 2 내지 6개 (C_{2-6})의 선형 일가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소 원자수 3 내지 20개 (C_{3-20}), 3 내지 15개 (C_{3-15}), 3 내지 10개 (C_{3-10}), 또는 3 내지 6개 (C_{3-6})의 분지형 일가 탄화수소 라디칼이다. 알킬닐 기의 예는 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 알릴, 부테닐, 및 4-메틸부테닐을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.

[0350] 용어 "알케닐렌"은 하나 이상, 한 실시양태에서, 1 내지 5개, 또 다른 실시양태에서, 하나의 탄소-탄소 이중 결합(들)을 함유하는 선형 또는 분지형 이가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알케닐렌은 선택적으로 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다. 용어 "알케닐렌"은 또한 당업자에 의해 인식될 때 "시스" 및 "트랜스" 배열 또는 그의 혼합, 또는 대안적으로 "Z" 및 "E" 배열 또는 그의 혼합을 갖는 라디칼을 포함한다. 예를 들어, C_{2-6} 알케닐렌은 탄소 원자수 2 내지 6개의 선형 불포화된 이가 탄화수소 라디칼 또는 탄소 원자수 3 내지 6개의 분지형 불포화된 이가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 실시양태에서, 상기 알케닐렌은 탄소 원자수 2 내지 20개(C_{2-20}), 2 내지 15개 (C_{2-15}), 2 내지 10개 (C_{2-10}), 또는 2 내지 6개 (C_{2-6})의 선형 이가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소 원자수 3 내지 20개 (C_{3-20}), 3 내지 15개 (C_{3-15}), 3 내지 10개 (C_{3-10}), 또는 3 내지 6개 (C_{3-6})의 분지형 이가 탄화수소 라디칼이다. 알케닐렌 기의 예는 에테닐렌, 알릴렌, 프로페닐렌, 부테닐렌, 및 4-메틸부테닐렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.

[0351] 용어 "알킬닐"은 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 또는 5개, 또 다른 실시양태에서, 하나의 탄소-탄소 삼중 결합(들)을 함유하는 선형 또는 분지형 일가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알킬닐은 선택적으로 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다. 용어 "알킬닐"은 또한 달리 구체화되지 않는다면, 선형 및 분지형 알킬닐 모두를 포함한다. 특정 실시양태에서, 알킬닐은 탄소 원자수 2 내지 20개 (C_{2-20}), 2 내지 15개 (C_{2-15}), 2 내지 10개 (C_{2-10}), 또는 2 내지 6개 (C_{2-6})의 선형 일가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소 원자수 3 내지 20개 (C_{3-20}), 3 내지 15개 (C_{3-15}), 3 내지 10개 (C_{3-10}), 또는 3 내지 6개 (C_{3-6})의 분지형 일가 탄화수소 라디칼이다. 알킬닐 기의 예는 에티닐 ($-C\equiv CH$) 및 프로파길 ($-CH_2C\equiv CH$)을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, C_{2-6} 알킬닐은 탄소 원자수 2 내지 6개의 선형 불포화된 일가 탄화수소 라디칼 또는 탄소 원자수 3 내지 6개의 분지형 불포화된 일가 탄화수소 라디칼을 말한다.

[0352] 용어 "알킬닐렌"은 하나 이상의, 한 실시양태에서, 1 내지 5개의, 또 다른 실시양태에서, 하나의 탄소-탄소 삼중 결합(들)을 함유하는 선형 또는 분지형 이가 탄화수소 라디칼을 말한다. 알킬닐렌은 선택적으로 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다. 예를 들어, C_{2-6} 알킬닐렌은 탄소 원자수 2 내지 6개의 선형 불포화된 이가 탄화수소 라디칼 또는 탄소 원자수 3 내지 6개의 분지형 불포화된 이가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 실시양태에서, 알킬닐렌은 탄소 원자수 2 내지 20개 (C_{2-20}), 2 내지 15개 (C_{2-15}), 2 내지 10개 (C_{2-10}), 또는 2 내지 6개 (C_{2-6})의 선형 이가 탄화수소 라디칼, 또는 탄소 원자수 3 내지 20개 (C_{3-20}), 3 내지 15개 (C_{3-15}), 3 내지 10개 (C_{3-10}), 또는 3 내지 6개 (C_{3-6})의 분지형 이가 탄화수소 라디칼이다. 알킬닐렌 기의 예는 에티닐렌, 프로피닐렌 (모든 이성질체 형태, 예를 들어, 1-프로피닐렌 및 프로파길렌을 포함함), 부티닐렌 (모든 이성질체 형태, 예를 들어, 1-부틴-1-일렌 및 2-부틴-1-일렌을 포함함), 펜티닐렌 (모든 이성질체 형태, 예를 들어, 1-펜틴-1-일렌 및 1-메틸-2-부틴-1-일렌을 포함함), 및 헥시닐렌 (모든 이성질체 형태, 예를 들어, 1-헥신-1-일렌을 포함함)을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.

[0353] 용어 "시클로알킬"은 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된, 시클릭 포화된 또는 비-방향족 불포화된, 가교 또는 비-가교의 일가 탄화수소 라디칼을 말한다. 특정 실시양태에서, 시클로알킬은 시클릭 포화된 가교 또는 비-가교의 일가 탄화수소 라디칼이다. 특정 실시양태에서, 시클로알킬은 탄소 원자수 3 내지 20개 (C_{3-20}), 3 내지 15개 (C_{3-15}), 3 내지 10개 (C_{3-10}), 또는 3 내지 7개 (C_{3-7})를 갖는다. 시클로알킬 기의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 비시클로[2.1.1]헥실, 비시클로[2.2.1]헵틸, 데칼리닐, 및 아다만틸을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.

[0354] 용어 "시클로알킬렌"은 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 시클릭 이가 탄화수소 라디칼을 말한다. 한 실시양태에서, 시클로알킬 기는 포화된 또는 불포화된 비-방향족, 및/또는 가교 및/또는 비가교

의, 및/또는 접합된 비시클릭 기이다. 특정 실시양태에서, 시클로알킬렌은 탄소 원자수 3 내지 20개 (C_{3-20}), 3 내지 15개 (C_{3-15}), 3 내지 10개 (C_{3-10}), 또는 3 내지 7개 (C_{3-7})를 갖는다. 시클로알킬렌 기의 예는 시클로프로필렌 (예를 들어, 1,1-시클로프로필렌 및 1,2-시클로프로필렌), 시클로부틸렌 (예를 들어, 1,1-시클로부틸렌, 1,2-시클로부틸렌, 또는 1,3-시클로부틸렌), 시클로펜틸렌 (예를 들어, 1,1-시클로펜틸렌, 1,2-시클로펜틸렌, 또는 1,3-시클로펜틸렌), 시클로헥실렌 (예를 들어, 1,1-시클로헥실렌, 1,2-시클로헥실렌, 1,3-시클로헥실렌, 또는 1,4-시클로헥실렌), 시클로헵틸렌 (예를 들어, 1,1-시클로헵틸렌, 1,2-시클로헵틸렌, 1,3-시클로헵틸렌, 또는 1,4-시클로헵틸렌), 테칼리닐렌, 및 아다만틸렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다.

[0355] 용어 "아릴"은 모노시클릭 방향족 카르보시클릭 기 및/또는 하나 이상의 방향족 탄화수소 고리를 함유하는 멀티시클릭 일가 방향족 카르보시클릭 기를 말한다. 특정 실시양태에서, 아릴은 6 내지 20개 (C_{6-20}), 6 내지 15개 (C_{6-15}), 또는 6 내지 10개 (C_{6-10})의 고리 원자를 갖는다. 아릴 기의 예는 페닐, 나프틸, 플루오레닐, 아줄레닐, 안트릴, 페난트릴, 피레닐, 비페닐, 및 터페닐을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 용어 "아릴"은 비시클릭 또는 트리시클릭 탄소 고리를 말하는 것으로, 상기 고리 중 하나는 방향족이고 나머지는 포화된, 부분적으로 불포화된, 또는 방향족, 예를 들어, 디히드로나프틸, 인데닐, 인다닐 또는 테트라히드로나프틸 (테트라리닐)일 수 있다. 아릴은 선택적으로 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0356] 용어 "아릴렌"은 이가 모노시클릭 방향족 기, 및/또는 하나 이상의 방향족 탄소 고리를 함유하는 이가 폴리시클릭 방향족 기를 말한다. 특정 실시양태에서, 아릴렌은 6 내지 20개 (C_{6-20}), 6 내지 15개 (C_{6-15}), 또는 6 내지 10개 (C_{6-10})의 고리 원자를 갖는다. 아릴렌 기의 예는 페닐렌, 나프틸렌, 플루오레닐렌, 아줄레닐렌, 안트릴렌, 페난트릴렌, 피레닐렌, 비페닐렌, 및 터페닐렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 아릴렌은 또한 비시클릭 또는 트리시클릭 탄소 고리를 말하는데, 상기 고리 중 하나는 방향족이고 나머지는 포화된, 부분적으로 불포화된, 또는 방향족, 예를 들어, 디히드로나프틸렌, 인데닐렌, 인다닐렌 또는 테트라히드로나프틸렌 (테트라리닐렌)일 수 있다. 아릴렌은 선택적으로 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0357] 용어 "아르알킬" 또는 "아릴알킬"은 하나 이상의 아릴 기로 치환된 일가 알킬 기를 말한다. 특정 실시양태에서, 아르알킬은 탄소 원자수 7 내지 30개 (C_{7-30}), 7 내지 20개 (C_{7-20}), 또는 7 내지 16개 (C_{7-16})를 갖는다. 아르알킬 기의 예는 벤질, 1-페닐에틸, 2-페닐에틸, 및 3-페닐프로필을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 아르알킬은 선택적으로 본원에 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0358] 용어 "헤테로아릴"은 일가 모노시클릭 방향족 기, 또는 하나 이상의 방향족 고리를 함유하는 일가 폴리시클릭 방향족 기를 말하고, 여기서 하나 이상의 방향족 고리는 그 각각 O, S, N, 및 P로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 고리에 함유한다. 분명히 하기 위해, 본원에 사용될 때, 용어 "아릴" 및 "헤테로아릴"은 상호배타적이며, 즉, "아릴" 기는 "헤테로아릴" 기를 포함하지 않고, 그 반대로 마찬가지이다. 헤테로아릴 기는 그 방향족 고리를 통해 분자의 나머지에 결합된다. 헤테로아릴 기의 각각의 고리는 1 또는 2개의 O 원자, 1 또는 2개의 S 원자, 1 내지 4개의 N 원자, 및/또는 1 또는 2개의 P 원자를 함유할 수 있고, 단 각각의 고리의 헤테로원자의 총 개수는 4개 이하이고 각각의 고리는 하나 이상의 탄소 원자를 함유한다. 특정 실시양태에서, 헤테로아릴은 5 내지 20개, 5 내지 15개, 또는 5 내지 10개의 고리 원자를 갖는다. 모노시클릭 헤테로아릴 기의 예는 푸라닐, 이미다졸릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴, 옥사디아졸릴, 옥사졸릴, 피라지닐, 피라졸릴, 피라다지닐, 피리딜, 피리미디닐, 피롤릴, 티아디아졸릴, 티아졸릴, 티에닐, 테트라졸릴, 트리아지닐, 및 트리아졸릴을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 비시클릭 헤테로아릴 기의 예는 벤조푸라닐, 벤즈이미다졸릴, 벤조이속사졸릴, 벤조피라닐, 벤조티아디아졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조티에닐, 벤조트리아졸릴, 벤족사졸릴, 푸로피리딜, 이미다조피리디닐, 이미다조티아졸릴, 인돌리지닐, 인돌릴, 인다졸릴, 이소벤조푸라닐, 이소벤조티에닐, 이소인돌릴, 이소퀴놀리닐, 이소티아졸릴, 나프티리디닐, 옥사졸로피리디닐, 프탈라지닐, 프테리디닐, 프리닐, 피리도피리딜, 피롤로피리딜, 퀴놀리닐, 퀴녹살리닐, 퀴나졸리닐, 티아디아졸로피리미딜, 및 티에노피리딜을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 트리시클릭 헤테로아릴 기의 예는 아크리디닐, 벤즈인돌릴, 카르바졸릴, 디벤조푸라닐, 페리미디닐, 페난트롤리닐, 페난트리디닐, 페나르사지닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 및 크산테닐을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 헤테로아릴은 선택적으로 본원에서 개시된 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0359] 용어 "헤테로아릴렌"은 이가 모노시클릭 방향족 기, 또는 하나 이상의 방향족 고리를 함유하는 이가 폴리시클릭 방향족 기를 말하고, 여기서 하나 이상의 방향족 고리는 O, S, 및 N으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 고리에 함유한다. 분명히 하기 위해, 본원에서 사용된 용어 "아릴렌" 및 "헤테로아릴렌"은 상호배타

적이고, 즉, "아릴렌" 기는 "헤테로아릴렌" 기를 포함하지 않고, 그 반대도 마찬가지이다. 헤테로아릴렌 기는 그 방향족 고리를 통해 분자의 나머지에 결합된다. 헤테로아릴렌 기의 각각의 고리는 1 또는 2개의 O 원자, 1 또는 2개의 S 원자 및/또는 1 내지 4개의 N 원자를 함유할 수 있고, 단 각각의 고리의 헤테로원자의 총 개수는 4개 이하이고 각각의 고리는 하나 이상의 탄소 원자를 함유한다. 특정 실시양태에서, 헤테로아릴렌은 5 내지 20개, 5 내지 15개, 또는 5 내지 10개의 고리 원자를 갖는다. 모노시클릭 헤테로아릴렌 기의 예는 푸라닐렌, 이미다졸릴렌, 이소티아졸릴렌, 이속사졸릴렌, 옥사디아졸릴렌, 옥사디아졸릴렌, 옥사졸릴렌, 피라지닐렌, 피라졸릴렌, 피리다지닐렌, 피리딜렌, 피리미디닐렌, 피롤릴렌, 티아디아졸릴렌, 티아졸릴렌, 티에닐렌, 테트라졸릴렌, 트리아지닐렌, 및 트리아졸릴렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 비시클릭 헤테로아릴렌 기의 예는 벤조푸라닐렌, 벤즈이미다졸릴렌, 벤조이속사졸릴렌, 벤조피라닐렌, 벤조티아디아졸릴렌, 벤조티아졸릴렌, 벤조티에닐렌, 벤조트리아졸릴렌, 벤조사졸릴렌, 푸로피리딜렌, 이미다조피리디닐렌, 이미다조티아졸릴렌, 인돌리지닐렌, 인돌릴렌, 인다졸릴렌, 이소벤조푸라닐렌, 이소벤조티에닐렌, 이소인돌릴렌, 이소퀴놀리닐렌, 이소티아졸릴렌, 나프티리디닐렌, 옥사졸로피리디닐렌, 프탈라지닐렌, 프테리디닐렌, 프리닐렌, 피리도피리딜렌, 피롤로피리딜렌, 퀴놀리닐렌, 퀴놀살리닐렌, 퀴나졸리닐렌, 티아디아졸로피리미딜렌, 및 티에노피리디닐렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 트리시클릭 헤테로아릴렌 기의 예는 아크리디닐렌, 벤즈인돌릴렌, 카바졸릴렌, 디벤조푸라닐렌, 페리미디닐렌, 페난트롤리닐렌, 페난트리디닐렌, 페나르사지닐렌, 페나지닐렌, 페노티아지닐렌, 페녹사지닐렌, 및 크산테닐렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 헤테로아릴렌은 선택적으로 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0360] 용어 "헤테로시클릭" 또는 "헤테로시클릭"은 일가 모노시클릭 비-방향족 고리계, 또는 하나 이상의 비-방향족 고리를 함유하는 일가 폴리시클릭 고리계를 말하고, 여기서 비-방향족 고리 원자 중 하나 이상은 헤테로원자이고, 그 각각은 O, S, N, 및 P로부터 독립적으로 선택되고; 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 특정 실시양태에서, 헤테로시클릭 또는 헤테로시클릭 기는 3 내지 20개, 3 내지 15개, 3 내지 10개, 3 내지 8개, 4 내지 7개, 또는 5 내지 6개의 고리 원자를 갖는다. 헤테로시클릭 기는 그의 비-방향족 고리를 통해 분자의 나머지에 결합된다. 특정 실시양태에서, 헤테로시클릭은 모노시클릭, 비시클릭, 트리시클릭, 또는 테트라시클릭 고리계로서, 이는 스피로, 접합, 또는 가교된 상태일 수 있으며, 여기서 질소 또는 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고, 질소 원자는 선택적으로 사차화되고, 일부 고리는 부분적으로 또는 완전히 포화되거나 또는 방향족일 수 있다. 헤테로시클릭은 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 주요 구조에 부착되어 안정한 화합물을 생성할 수 있다. 헤테로시클릭 기의 예는 아제피닐, 벤조디옥사닐, 벤조디옥솔릴, 벤조푸라노닐, 벤조피라노닐, 벤조피라닐, 벤조테트라히드로푸라닐, 벤조테트라히드로티에닐, 벤조티오피라닐, 벤조사지닐, β -카볼리닐, 크로마닐, 크로모닐, 시놀리닐, 쿠마리닐, 데카히드로이소퀴놀리닐, 디히드로벤즈이소티아지닐, 디히드로벤즈이속사지닐, 디히드로푸릴, 디히드로이소인돌릴, 디히드로피라닐, 디히드로피라졸릴, 디히드로피라지닐, 디히드로피리디닐, 디히드로피리미디닐, 디히드로피롤릴, 디옥솔라닐, 1,4-디티아닐, 푸라노닐, 이미다졸리디닐, 이미다졸리닐, 인돌리닐, 이소벤조테트라히드로푸라닐, 이소벤조테트라히드로티에닐, 이소크로마닐, 이소쿠마리닐, 이소인돌리닐, 이소티아졸리디닐, 이속사졸리디닐, 모폴리닐, 옥타히드로인돌릴, 옥타히드로이소인돌릴, 옥사졸리디노닐, 옥사졸리디닐, 옥시라닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 4-피페리도닐, 피라졸리디닐, 피라졸리닐, 피롤리디닐, 피롤리닐, 퀴누클리디닐, 테트라히드로푸릴, 테트라히드로이소퀴놀리닐, 테트라히드로피라닐, 테트라히드로티에닐, 티아모르폴리닐, 티아졸리디닐, 테트라히드로퀴놀리닐, 및 1,3,5-트리티아닐을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 헤테로시클릭은 선택적으로 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0361] 용어 "헤테로시클릭렌"은 이가 모노시클릭 비-방향족 고리계, 또는 하나 이상의 비-방향족 고리를 함유하는 이가 폴리시클릭 고리계를 말하고, 여기서 하나 이상의 비-방향족 고리 원자는 O, S, 및 N으로부터 독립적으로 선택된 헤테로원자이고; 나머지 고리 원자는 탄소 원자이다. 특정 실시양태에서, 헤테로시클릭렌 기는 3 내지 20개, 3 내지 15개, 3 내지 10개, 3 내지 8개, 4 내지 7개, 또는 5 내지 6개의 고리 원자를 갖는다. 특정 실시양태에서, 헤테로시클릭렌은 모노시클릭, 비시클릭, 트리시클릭, 또는 테트라시클릭 고리계이고, 이들은 접합되거나 가교될 수 있으며, 여기서 질소 또는 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고, 질소 원자는 선택적으로 사차화될 수 있고, 몇몇 고리는 부분적으로 또는 완전히 포화되거나 방향족일 수 있다. 헤테로시클릭렌은 임의의 헤테로원자 또는 탄소 원자에서 주요 구조에 부착되어 안정한 화합물을 생성할 수 있다. 이러한 헤테로시클릭렌 기의 예는 아제피닐렌, 벤조디옥사닐렌, 벤조디옥솔릴렌, 벤조푸라노닐렌, 벤조피라노닐렌, 벤조피라닐렌, 벤조테트라히드로푸라닐렌, 벤조테트라히드로티에닐렌, 벤조티오피라닐렌, 벤조사지닐렌, β -카볼리닐렌, 크로마닐렌, 크로모닐렌, 시놀리닐렌, 쿠마리닐렌, 데카히드로이소퀴놀리닐렌, 디히드로벤즈이소티아지닐렌, 디히드로벤즈이속사지닐렌, 디히드로푸릴렌, 디히드로이소인돌릴렌, 디히드로피라닐렌, 디히드로피라졸릴렌, 디히드로피라지닐렌, 디히드로피리디닐렌, 디히드로피리미디닐렌, 디히드로피롤릴렌, 디옥솔라닐렌, 1,4-디티아닐렌,

푸라노닐렌, 이미다졸리디닐렌, 이미다졸리닐렌, 인돌리닐렌, 이소벤조테트라히드로푸라닐렌, 이소벤조테트라히드로티에닐렌, 이소크로마닐렌, 이소쿠마리닐렌, 이소인돌리닐렌, 이소티아졸리디닐렌, 이속사졸리디닐렌, 모폴리닐렌, 옥타히드로인돌릴렌, 옥타히드로이소인돌릴렌, 옥사졸리디노닐렌, 옥사졸리디닐렌, 옥시라닐렌, 피페라지닐렌, 피페리디닐렌, 4-피페리도닐렌, 피라졸리디닐렌, 피라졸리닐렌, 피롤리디닐렌, 피롤리닐렌, 퀴누클리디닐렌, 테트라히드로푸릴렌, 테트라히드로이소퀴놀리닐렌, 테트라히드로피라닐렌, 테트라히드로티에닐렌, 티아모르폴리닐렌, 티아졸리디닐렌, 테트라히드로퀴놀리닐렌, 및 1,3,5-트리티아닐렌을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 헤테로시클릴렌은 선택적으로 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0362]

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

[0363]

용어 "할로알킬"은 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 또는 3개의 할로 기로 치환된 알킬 기를 말하고, 여기서 알킬은 본원에서 정의된 바와 같다. 할로 알킬은 선택적으로 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 치환된다.

[0364]

용어 "알콕시"는 -O-알킬을 말하고, 여기서 알킬은 본원에서 정의된 바와 같다.

[0365]

용어 "할로알콕시"는 -O-할로알킬을 말하고, 여기서 할로알킬은 본원에서 정의된 바와 같다.

[0366]

용어 "선택적으로 치환된"은 알킬, 알킬렌, 알케닐, 알케닐렌, 알키닐, 알키닐렌, 시클로알킬, 시클로알킬렌, 아릴, 아릴렌, 아르알킬 (예를 들어, 벤질), 헤테로아릴, 헤테로아릴렌, 헤테로시클릴, 및 헤테로시클릴렌 기와 같은 기 또는 치환체가 하나 이상의 치환체 Q로 치환될 수 있음을 의미하고자 하는 것으로, 치환체 Q의 각각은 예를 들어, (a) 옥소 (=O), 시아노 (-CN), 할로, 및 니트로 (-NO₂); (b) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릴[그 각각은 또한 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 치환체 Q^a로 선택적으로 치환됨]; 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, -NR^aS(O)NR^bR^c, -NR^aS(O)₂NR^bR^c, -P(O)R^aR^d, -P(O)(OR^a)R^d, -P(O)(OR^a)(OR^d), -SR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)NR^bR^c, 및 -S(O)₂NR^bR^c[여기서, 각각의 R^a, R^b, R^c, 및 R^d는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로시클릴(그 각각은 또한 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 또는 4개의 치환체 Q^a로 선택적으로 치환됨); 또는 (iii) 그들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로아릴 또는 헤테로시클릴을 형성하는 R^b 및 R^c(그 각각은 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 또는 4개의 치환체 Q^a로 선택적으로 치환됨)이다]로부터 독립적으로 선택된다. 본원에서 사용될 때, 치환될 수 있는 본원에 개시된 모든 기는 달리 구체화되지 않으면, "선택적으로 치환된다".

[0367]

한 실시양태에서, 각각의 치환체 Q^a는 독립적으로 (a) 옥소, 시아노, 할로, 및 니트로; 및 (b) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릴; 및 (c) -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)NR^fR^g, -C(NR^e)NR^fR^g, -OR^e, -OC(O)R^e, -OC(O)OR^e, -OC(O)NR^fR^g, -OC(=NR^e)NR^fR^g, -OS(O)R^e, -OS(O)₂R^e, -OS(O)NR^fR^g, -OS(O)₂NR^fR^g, -NR^fR^g, -NR^eC(O)R^h, -NR^eC(O)OR^h, -NR^eC(O)NR^fR^g, -NR^eC(=NR^h)NR^fR^g, -NR^eS(O)R^h, -NR^eS(O)₂R^h, -NR^eS(O)NR^fR^g, -NR^eS(O)₂NR^fR^g, -P(O)R^eR^h, -P(O)(OR^e)R^h, -P(O)(OR^e)(OR^h), -SR^e, -S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)NR^fR^g, 및 -S(O)₂NR^fR^g로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 각각의 R^e, R^f, R^g, 및 R^h는 독립적으로 (i) 수소, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로시클릴; 또는 (ii) 그들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로아릴 또는 헤테로시클릴을 형성하는 R^f 및 R^g이다.

[0368]

특정 실시양태에서, "광학 활성" 및 "거울상 이성질체 활성"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 이성질체 과량을 갖는, 분자의 집합을 말한다. 특정 실시양태에서, 상기 화합물은, 문제의 2개의 거울상 이성질체의 총 중량을 기준으로, 약 95% 이상의 의도하는 거울상 이성질체 및 약 5% 이하의 덜 바람직한 거울상 이성질체를 포함한다.

[0369] 광학적으로 활성인 화합물을 설명할 때, 접두사 R 및 S가 사용되어 그의 카이랄 중심(들) 주변으로 광학적 활성 화합물의 절대 배열을 표시한다. (+) 및 (-)이 사용되어 광학적 활성 화합물의 광학 회전을, 즉 편광면이 광학적 활성 화합물에 의해 회전되는 방향을 표시한다. (-) 접두사는 광학적으로 활성인 화합물이 좌회전성인 것을 나타내고, 즉 상기 화합물은 편광면을 왼쪽으로 또는 시계반대방향으로 회전시킨다. 상기 (+) 접두사는 상기 광학적으로 활성인 화합물이 우회전성인 것을 나타내고, 즉 상기 화합물은 편광면을 오른쪽 또는 시계방향으로 회전시킨다. 그러나, 광학 회전의 표시, (+) 및 (-)는 화합물의 절대 배열, R 및 S와 관계가 없다.

[0370] 용어 "동위원소 변형"은 이러한 화합물을 구성하는 하나 이상의 원자에서 비정상적인 비율의 동위원소를 함유하는 화합물을 말한다. 특정 실시양태에서, 화합물의 "동위원소 변형"은 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 포함하는 (그러나, 여기에 제한되지 않음) 하나 이상의 동위원소를 비정상적인 비율로 함유한다. 특정 실시양태에서, 화합물의 "동위원소 변형"은 안정한 형태이고, 즉 비-방사성이다. 특정 실시양태에서, 화합물의 "동위원소 변형"은 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 포함하는 (그러나, 여기에 제한되지 않음) 하나 이상의 동위원소의 비정상적인 비율을 함유한다. 특정 실시양태에서, 화합물의 "동위원소 변형"은 불안정한 형태이고, 즉 방사성이다. 특정 실시양태에서, 화합물의 "동위원소 변형"은 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)을 포함하는 (그러나, 여기에 제한되지 않음) 하나 이상의 동위원소의 비정상적인 비율을 함유한다. 본원에 제공된 화합물에서, 당업자의 판단에 따라 실현가능하면, 임의의 수소는 예를 들어, ^2H 일 수 있거나, 또는 임의의 탄소는 예를 들어, ^{13}C 일 수 있거나, 또는 임의의 질소는, 예를 들어 ^{15}N 일 수 있거나, 또는 임의의 산소는, 예를 들어, ^{18}O 일 수 있는 것으로 이해된다. 특정 실시양태에서, 화합물의 "동위원소 변형"은 중수소 (D)의 비정상적인 비율을 함유한다.

[0371] 용어 "용매화물"은 화학량론적 또는 비-화학량론적 양으로 존재하는, 용질, 예를 들어 본원에 제공된 화합물의 하나 이상의 분자와 하나 이상의 용매 분자에 의해 형성된 복합체 또는 집합체를 말한다. 적당한 용매는 물, 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 이소프로판올, 및 아세트산을 포함하되, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 용매는 약제학적으로 허용가능하다. 한 실시양태에서, 복합체 또는 집합체는 결정성 형태로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 복합체 또는 집합체는 비결정성 형태로 존재한다. 용매가 물일 때, 용매화물은 수화물이다. 수화물의 예는 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 사수화물 및 오수화물을 포함하되, 여기에 제한되지 않는다.

[0372] "그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물 또는 전구약물"이라는 문구는 "(i) 본원에 언급된 화합물의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; (ii) 본원에 언급된 화합물의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물; 또는 (iii) 본원에 언급된 화합물의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물"이라는 문구와 동일한 의미를 갖는다.

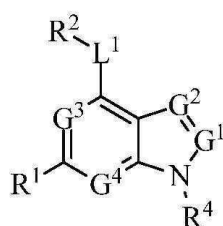
[0373] 5.3.2. 줄기 세포 동원 화합물

[0374] 한 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 아릴 탄화수소 수용체 억제제, 예를 들어, 아릴 탄화수소 수용체 길항제이다.

[0375] 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 그 전문이 본원에서 참고로서 포함된 미국 특허 출원 공개 제 2010/0183564호, 제2014/0023626호, 및 제2014/0114070호에 개시된 것을 포함하는(단, 이에 제한되지 않는다), 5,6-접합된 헤테로아릴 화합물이다.

[0376] 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0377] 화학식 I



(I)

[0378]

[0379] 상기 식에서,

[0380] G^1 은 N 및 CR^3 이고;

[0381] G^2 , G^3 , 및 G^4 는 각각 독립적으로 CH 및 N이고; 단, G^3 및 G^4 중 하나 이상은 N이고, G^1 및 G^2 중 하나 이상은 N이 아니고;

[0382] L^1 은 $-NR^{1a}-$, $-NR^{1a}(CH_2)_{1-3}-$, $-NR^{1a}CH(C(O)OCH_3)CH_2-$, $-NR^{1a}(CH_2)_2NR^{1c}-$, $-NR^{1a}(CH_2)_2S-$, $-NR^{1a}CH_2CH(CH_3)CH_2-$, $-NR^{1a}CH_2CH(OH)-$, 또는 $-NR^{1a}CH(CH_3)CH_2-$ 이고;

[0383] R^1 은 (i) 수소; 또는 (ii) 페닐, 푸라닐, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티에닐, 티아졸릴, 피리디닐, 피리미디닐, 피롤리디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 벤조이미다졸릴, 이소퀴놀리닐, 이미다조피리디닐, 또는 벤조티에닐이고, 그 각각은 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환되고, 여기서 각각의 치환체는 독립적으로 시아노, 할로, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, C_{1-4} 할로알킬, C_{1-4} 할로알콕시, 히드록실, 아미노, $-C(O)R^{1a}$, $-C(O)OR^{1a}$, $-C(O)NR^{1a}R^{1b}$, $-SR^{1a}$, $-S(O)R^{1a}$, 또는 $-S(O)_2R^{1a}$ 이고;

[0384] R^2 는 (i) $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$, $-NR^{1c}C(O)NR^{1a}R^{1b}$, 또는 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$; 또는 (ii) 페닐, 피롤로피리딘-3-일, 인돌릴, 티에닐, 피리디닐, 1,2,4-트리아졸릴, 2-옥소이미다졸리디닐, 피라졸릴, 2-옥소-2,3-디히드로-1H-벤조이미다졸릴, 또는 인다졸릴이고, 그 각각은 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환되고, 여기서 각각의 치환체는 독립적으로 히드록실, 할로, 메틸, 메톡시, 아미노, $-O(CH_2)_{1-3}NR^{1a}R^{1b}$, $-OS(O)_2NR^{1a}R^{1b}$, $-NR^{1a}S(O)_2R^{1b}$, 또는 $-S(O)_2NR^{1a}R^{1b}$ 이고;

[0385] R^3 은 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 비페닐이고; 단 R^1 및 R^3 중 하나 이상은 수소가 아니고;

[0386] R^4 는 C_{1-10} 알킬, 프로프-1-엔-2일, 시클로헥실, 시클로프로필, 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸, 옥세탄-3-일, 벤즈히드릴, 테트라히드로-2H-피란-3-일, 테트라히드로-2H-피란-4-일, 페닐, 테트라히드로푸란-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)에틸이

고, 그 각각은 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환되고, 여기서 각각의 치환체는 독립적으로 히드록실, C₁₋₄ 알킬, 또는 C₁₋₄ 할로알킬이고;

[0387] 각각의 R^{1a}, R^{1b}, 및 R^{1c}는 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬기거나; 또는 R^{1a} 및 R^{1b}는 그들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로시크릴릴을 형성한다.

[0388] 한 실시양태에서, 화학식 I에서, G¹은 CR³이고, 한 실시양태에서, CH이며; G², G³, 및 G⁴는 각각 N이고; R¹, R², R³, R⁴, 및 L¹은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0389] 또 다른 실시양태에서, 화학식 I에서, G¹, G³, 및 G⁴는 각각 N이고; G²는 CH이고;

[0390] R¹, R², R⁴, 및 L¹은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0391] 또한 또 다른 실시양태에서, 화학식 I에서, G¹은 CR³이고, 한 실시양태에서, CH이고; G² 및 G³는 각각 N이고; G⁴는 CH이고; R¹, R², R³, R⁴, 및 L¹은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0392] 또한 또 다른 실시양태에서, 화학식 I에서, G¹은 CR³이고, 한 실시양태에서, CH이고; G² 및 G⁴는 각각 N이고; G³은 CH이고; R¹, R², R³, R⁴, 및 L¹은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0393] 또한 또 다른 실시양태에서, 화학식 I에서, G¹은 CR³이고, 한 실시양태에서, CH이고; G²는 CH이고; G³ 및 G⁴는 각각 N이고; R¹, R², R³, R⁴, 및 L¹은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0394] 여전히 한 실시양태에서, 화학식 I에서, G¹은 CH이고; G², G³ 및 G⁴는 각각 N이고; R¹은 1, 2, 또는 3개의 치환체에 의해 선택적으로 치환된 벤조티에닐이고, 그 치환체 각각은 독립적으로 시아노, 할로, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, C₁₋₄ 할로알킬, C₁₋₄ 할로알콕시, 히드록실, 아미노, -C(O)R^{1a}, -C(O)OR^{1a}, -C(O)NR^{1a}R^{1b}, -SR^{1a}, -S(O)R^{1a}, 또는 -S(O)₂R^{1a}이고;

[0395] R²는 1, 2, 또는 3개의 치환체에 의해 선택적으로 치환된 페닐이고, 그 치환체 각각은 독립적으로 히드록실, 할로, 메틸, 메톡시, 아미노, -O(CH₂)₁₋₃NR^{1a}R^{1b}, -OS(O)₂NR^{1a}R^{1b}, -NR^{1a}S(O)₂R^{1b}, 또는 -S(O)₂NR^{1a}R^{1b}이고;

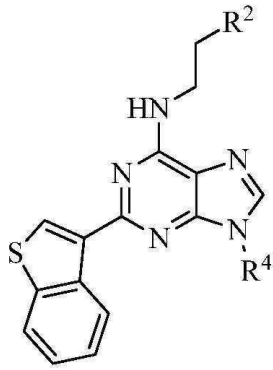
[0396] R⁴는 1, 2, 또는 3개의 치환체로 선택적으로 치환된 C₁₋₁₀ 알킬이고, 그 치환체 각각은 독립적으로 히드록실, C₁₋₄ 알킬, 또는 C₁₋₄ 할로알킬이고;

[0397] L¹은 -NR^{1a}(CH₂)₂-이고;

[0398] R^{1a} 및 R^{1b}는 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0399] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 II의 화합물 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0400] 화학식 II



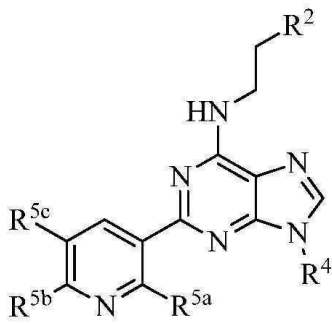
(II)

[0401]

[0402] 상기 식에서, R^2 및 R^4 는 각각 본원에 정의된 바와 같다.

[0403] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 III의 화합물 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0404] 화학식 III

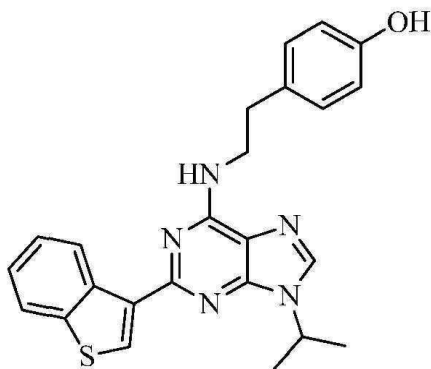


(III)

[0405]

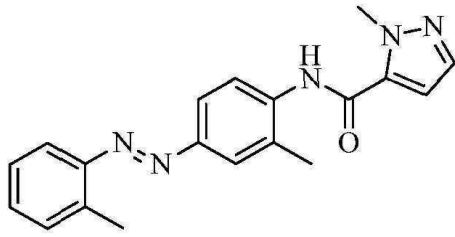
[0406] 상기 식에서, R^2 및 R^4 는 각각 본원에 정의된 바와 같고; R^{5a} , R^{5b} , 및 R^{5c} 는 각각 독립적으로 수소, 시아노, 메틸, 할로, 트리플루오로메틸, 또는 $-SO_2CH_3$ 이다.

[0407] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 4-(2-(2-(벤조[b]티엔-3-일)-9-이소프로필-9H-푸린-6-일아미노)에틸)페닐이다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은



의 구조를 갖는 스템레게닌-1 (SR-1)이다.

[0408] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 1-메틸-N-(2-메틸-4-(2-(2-메틸페닐)디아제닐)페닐)-1H-피라졸-5-카르복사미드이다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 CH223191이고, 그의 구조는

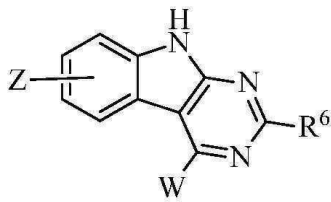


이다.

[0409] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 피리미도(4,5-*b*)인돌이다.

[0410] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 IV의 화합물 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0411] 화학식 IV



(IV)

[0412]

[0413] 상기 식에서, Z는 시아노, C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 벤질, 헤테로아릴, 헤테로시클릴, -L-C₆₋₁₄ 아릴, -L-헤테로아릴, -L-헤테로시클릴, -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;

[0414]

W는 수소, 할로, 시아노, C₆₋₁₄ 아릴, 벤질, 헤테로아릴, 헤테로시클릴, -L-C₆₋₁₄ 아릴, -L-헤테로아릴, -L-헤테로시클릴, -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-헤테로시클릴, -O-L-N(R^{1a})R^{1b}, -O-L-C₆₋₁₄ 아릴, -O-L-헤테로아릴, -O-L-헤테로시클릴, -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-헤테로시클릴, -S-L-N(R^{1a})R^{1b}, -S-L-C₆₋₁₄ 아릴, -S-L-헤테로아릴, -S-L-헤테로시클릴, -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-헤테로시클릴, -(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-헤테로시클릴, -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}, -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NHR^{1a}, -NHC(O)N(R^{1a})R^{1b}, -NR^{1a}C(O)NH₂, -NR^{1c}C(O)NHR^{1a}, -NR^{1c}C(O)N(R^{1a})R^{1b}, -NHS(O)₂R^{1a}, -NR^{1c}S(O)₂R^{1a}, -OR^{1a}, -OC(O)R^{1a}, -OC(O)OR^{1a}, -OC(O)NH₂, -OC(O)NHR^{1a}, -OC(O)N(R^{1a})R^{1b}, -OS(O)₂R^{1a}, -P(O)(OR^{1a})(OR^{1c}), -SR^{1a}, -S(O)R^{1a}, -S(O)₂R^{1a}, -S(O)₂NH₂, -S(O)₂NHR^{1a}, -S(O)₂N(R^{1a})R^{1b}, 또는 -S(O)₂OR^{1a}이고;

[0415] 각각의 L은 독립적으로 C₁₋₆ 알킬렌, C₂₋₆ 알케닐렌, C₂₋₆ 알키닐렌, C₃₋₇ 시클로알킬렌, C₆₋₁₄ 아릴렌, 헤테로아

릴렌, 헤테로시클릴렌, C₁₋₆알킬렌-C₃₋₇ 시클로알킬렌, 또는 C₁₋₆ 알킬렌-헤테로시클릴렌이고;

[0416] R⁶은 수소, C₁₋₆ 알킬, C₆₋₁₄ 아릴, 벤질, 헤테로아릴, -C(O)R^{1a}, -SR^{1a}, -S(O)R^{1a}, -S(O)₂R^{1a}, -L-C₆₋₁₄ 아릴, -L-헤테로아릴, 또는 -L-헤테로시클릴이고;

[0417] 각각의 n은 독립적으로 1, 2, 3, 4, 또는 5의 정수이고;

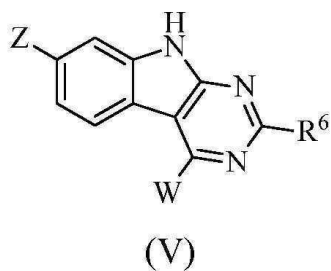
[0418] 각각의 R^{1a}, R^{1b}, 및 R^{1c}는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로시클릴; 또는 (iii) 그들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로시클릴을 형성하는 R^{1a} 및 R^{1b}이고;

[0419] 여기서, 각각의 알킬, 알킬렌, 알케닐, 알케닐렌, 알키닐, 알키닐렌, 시클로알킬, 시클로알킬렌, 아릴, 벤질, 아릴렌, 헤테로아릴, 헤테로아릴렌, 헤테로시클릴, 및 헤테로시클릴렌은 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 또는 4개의 치환체 Q로 선택적으로 치환되고, 여기서 각각의 치환체 Q는 독립적으로 (a) 옥소, 시아노, 할로, 및 니트로; (b) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릴 (그 각각은 하나 이상, 1, 2, 3 또는 4개의 치환체 Q^a로 추가로 선택적으로 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, -NR^aS(O)NR^bR^c, -NR^aS(O)₂NR^bR^c, -SR^a, -S(O)R^a, -S(O)₂R^a, -S(O)NR^bR^c, 및 -S(O)₂NR^bR^c로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 각각의 R^a, R^b, R^c, 및 R^d는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로시클릴(그 각각은 또한 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 또는 4개의 치환체 Q^a로 선택적으로 치환된다); 또는 (iii) 그들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로시클릴을 형성하는 R^b 및 R^c (이는 또한 하나 이상, 한 실시양태에서, 1, 2, 3, 또는 4개의 치환체 Q^a로 선택적으로 치환된다)이고;

[0420] 여기서 각각의 Q^a는 (a) 옥소, 시아노, 할로, 및 니트로; (b) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릴; 및 (c) -C(O)R^e, -C(O)OR^e, -C(O)NR^fR^g, -C(NR^e)NR^fR^g, -OR^e, -OC(O)R^e, -OC(O)OR^e, -OC(O)NR^fR^g, -OC(=NR^e)NR^fR^g, -OS(O)R^e, -OS(O)₂R^e, -OS(O)NR^fR^g, -OS(O)₂NR^fR^g, -NR^fR^g, -NR^eC(O)R^h, -NR^eC(O)OR^h, -NR^eC(O)NR^fR^g, -NR^eC(=NR^h)NR^fR^g, -NR^eS(O)R^h, -NR^eS(O)₂R^h, -NR^eS(O)NR^fR^g, -NR^eS(O)₂NR^fR^g, -SR^e, -S(O)R^e, -S(O)₂R^e, -S(O)NR^fR^g, 및 -S(O)₂NR^fR^g로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 각각의 R^e, R^f, R^g, 및 R^h는 독립적으로 (i) 수소; (ii) C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐, C₃₋₁₀ 시클로알킬, C₆₋₁₄ 아릴, C₇₋₁₅ 아르알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로시클릴; 또는 (iii) 그들이 부착된 N 원자와 함께 헤테로시클릴을 형성하는 R^f 및 R^g이다.

[0421] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 V의 화합물 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0422] 화학식 V



[0423]

[0424] 상기 식에서, R^6 , W, 및 Z는 각각 본원에 정의된 바와 같다.

[0425] 한 실시양태에서, 화학식 IV 또는 V에서, Z는 시아노, 헤테로아릴, 또는 $-C(O)OR^{1a}$ 이고;

[0426] W는 헤테로시클릴, -L-헤테로시클릴, -O-L-헤테로시클릴, $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, $-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로시클릴, $-NHR^{1a}$, 또는 $-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고;

[0427] 각각의 L은 독립적으로 C_{1-6} 알킬렌 또는 C_{3-7} 시클로알킬렌이고;

[0428] R^6 은 수소, C_{1-6} 알킬, 벤질, $-C(O)R^{1a}$, -L- C_{6-14} 아릴, 또는 -L-헤테로아릴이고;

[0429] 각각의 n은 독립적으로 정수 1이고;

[0430] R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같고;

[0431] 여기서 각각의 알킬, 알킬렌, 시클로알킬렌, 아릴, 벤질, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릴은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다.

[0432] 또 다른 실시양태에서, 화학식 IV 또는 V에서,

[0433] Z는 시아노, 5-원 헤테로아릴, 또는 $-C(O)O-C_{1-6}$ 알킬이고;

[0434] W는 헤테로시클릴, -L-헤테로시클릴, -O-L-헤테로시클릴, $-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}$, $-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로시클릴, $-NHR^{1a}$, 또는 $-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고;

[0435] 각각의 L은 독립적으로 C_{1-6} 알킬렌 또는 C_{3-7} 시클로알킬렌이고;

[0436] R^6 은 수소, 메틸, 벤질, -L- C_{6-14} 아릴, 또는 -L-헤테로아릴이고;

[0437] 각각의 n은 독립적으로 정수 1이고;

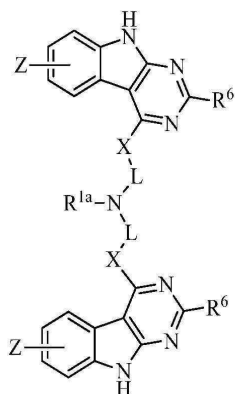
[0438] R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같고;

[0439] 여기서 각각의 알킬렌, 시클로알킬렌, 아릴, 벤질, 헤테로아릴, 및 헤테로시클릴은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다.

[0440] 한 실시양태에서, 화학식 IV 또는 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 Z는 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0441] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 VI의 화합물 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0442] 화학식 VI



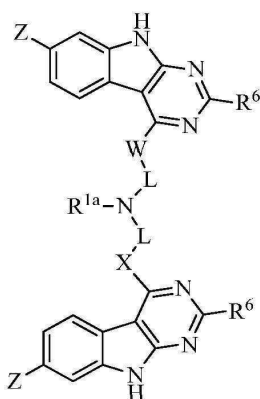
(VI)

[0443]

[0444] 상기 식에서, X는 결합, O, S, 또는 NR^{1c} 이고; R^{1a} , R^{1c} , R^6 , L, 및 Z는 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0445] 여전히 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 하기 화학식 VII의 화합물 또는 그의 거울상 이성질체, 거울상 이성질체의 혼합물, 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물, 또는 동위원소 변형; 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 또는 전구약물이다:

[0446] 화학식 VII

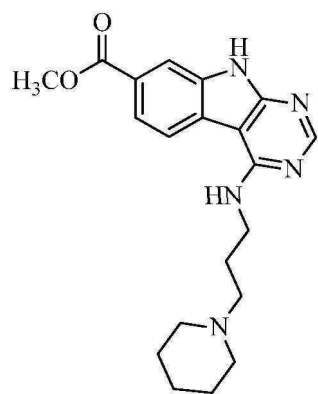


(VII)

[0447]

[0448] 상기 식에서, R^{1a} , R^6 , L, X, 및 Z는 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0449] 또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은



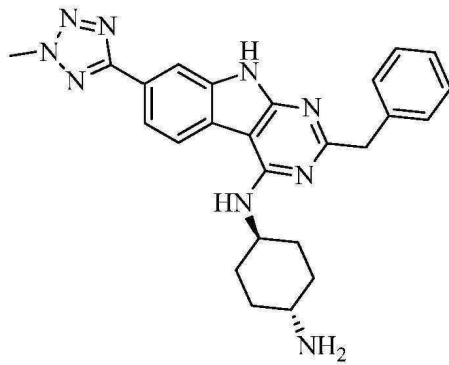
(UM729).

[0450]

의 구조를 갖는 화합물이다.

[0451]

또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은



(UM171).

의 구조를 갖는 화합물이다.

[0452]

[0453]

또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 레스베라트롤, 테트라에틸렌헥사민 (TEPA), 알파 나프토플라본, 3'-메톡시-4'-니트로플라본, 3,4-디메톡시플라본, 4',5,7-트리히드록시플라본 (아피게닌), 6-메틸-1,3,8-트리클로로디벤조푸란, 에피갈로카테킨, 또는 에피갈로카테킨갈레이트이다.

[0454]

또한 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 레스베라트롤이다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 (Z)-레스베라트롤이다. 특정 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 (E)-레스베라트롤이다.

[0455]

여전히 또 다른 실시양태에서, 줄기 세포 동원 화합물은 테트라에틸렌헥사민 (TEPA)이다.

[0456]

본원에 개시된 모든 화합물은 시판되거나 또는 본원에 개시된 특허 또는 특허 공보에 개시된 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 광학적으로 순수한 화합물은 공지된 분해제 또는 카이랄 칼럼뿐 아니라 다른 표준 합성 유기 화학 기술을 사용하여 비대칭적으로 합성되거나 분해될 수 있다. 줄기 세포 동원 화합물, 그 제조방법 및 용도에 대한 부가적인 정보는 예를 들어, 미국 특허 출원 공보 제2010/0183564호, 제2014/0023626호, 및 제2014/0114070호; 및 문헌[Kim *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, **2006**, 69, 1871-1878](각각 그 전문이 본원에서 참고로서 포함됨)에서 확인할 수 있다.

[0457]

본원에서 제공된 화학식, 예를 들어, 화학식 I 내지 VII에서 기 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 또한 본원에 개시된 실시양태에서 정의된다. 이러한 기 및/또는 변수에 대해 본원에 제공된 모든 실시양태의 조합은 이러한 내용의 범주 안에 있다.

[0458]

특정 실시양태에서, G^1 은 N이다. 특정 실시양태에서, G^1 은 CR^3 이고, 여기서 R^3 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, G^1 은 CH이다.

[0459]

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

[0460]

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

[0461]

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

[0462]

특정 실시양태에서, R^1 은 수소이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 페닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 푸라닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피롤릴이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 이미다졸릴이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피라졸릴이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 티에닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 티아졸릴이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피리디닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피리미디닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피롤리디닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피라지닐이다. 특정 실시양태에서, R^1

은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 피리다지닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 벤조이미다졸릴이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 이소퀴놀리닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 이미다조피리디닐이다. 특정 실시양태에서, R^1 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 벤조티에닐이다.

[0463]

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

[0464]

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

[0465]

특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 C_{1-10} 알킬이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 프로프-1-엔-2-일이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 시클로헥실이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 시클로프로필이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 2-(2-옥소피롤리딘-1-일)에틸이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 옥세탄-3-일이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 벤즈히드릴이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 테트라히드로-2H-피란-3-일이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 테트라히드로-2H-피란-4-일이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 페닐이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 테트라히드로푸란-3-일이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 벤질이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 (4-펜틸페닐)(페닐)메틸이다. 특정 실시양태에서, R^4 은 본원에 개시된 바와 같이 선택적으로 치환된 1-(1-(2-옥소-6,9,12-트리옥사-3-아자테트라데칸-14-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸이다.

[0466]

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

같다. 특정 실시양태에서, L^1 은 $-NR^{1a}CH_2CH(CH_3)CH_2-$ 이되, 여기서 R^{1a} 은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, L^1 은 $-NR^{1a}CH_2CH(OH)-$ 이되, 여기서 R^{1a} 은 본원에 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서 L^1 은 $-NR^{1a}CH(CH_3)CH_2-$ 이되, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다.

[0467] 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 수소이다. 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 시아노이다. 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 메틸이다. 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 할로이다. 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 플루오로, 클로로, 또는 브로모이다. 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 트리플루오로메틸이다. 특정 실시양태에서, R^{5a} 는 $-SO_2CH_3$ 이다.

[0468] 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 수소이다. 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 시아노이다. 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 메틸이다. 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 할로이다. 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 플루오로, 클로로, 또는 브로모이다. 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 트리플루오로메틸이다. 특정 실시양태에서, R^{5b} 는 $-SO_2CH_3$ 이다.

[0469] 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 수소이다. 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 시아노이다. 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 메틸이다. 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 할로이다. 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 플루오로, 클로로, 또는 브로모이다. 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 트리플루오로메틸이다. 특정 실시양태에서, R^{5c} 는 $-SO_2CH_3$ 이다.

[0470] 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬렌이다. 특정 실시양태에서, L은 각각 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 에틸렌, 프로필렌, 또는 부틸렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{2-6} 알케닐렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{2-6} 알키닐렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{3-7} 시클로알킬렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 시클로헥실렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{6-14} 아릴렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로시클릴렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬렌- C_{3-7} 시클로알킬렌이다. 특정 실시양태에서, L은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬렌-헤테로시클릴렌이다.

[0471] 특정 실시양태에서, R^6 은 수소이다. 특정 실시양태에서, R^6 은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 특정 실시양태에서, R^6 은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 메틸이다. 특정 실시양태에서, R^6 은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{6-14} 아릴이다. 특정 실시양태에서, R^6 은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 벤질이다. 특정 실시양태에서, R^6 은 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로아릴이다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-C(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-SR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-S(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-L-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-L$ -헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, R^6 은 $-L$ -헤테로시클릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다.

- [0472] 특정 실시양태에, W는 수소이다. 특정 실시양태에서, W는 할로이다. 특정 실시양태에서, W는 시아노이다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C₆₋₁₄ 아틸이다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 벤질이다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로아틸이다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로시클릴이다.
- [0473] 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -L-C₆₋₁₄ 아틸이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -L-헤테로아틸이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -L-헤테로시클릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-OH이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-OR^{1a}이고, 여기서 R^{1a} 및 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-NH₂이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-NHR^{1a}이고, 여기서 R^{1a} 및 L 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-N(R^{1a})(R^{1b})이고, 여기서, R^{1a}, R^{1b}, 및 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-SR^{1a}이고, 여기서 R^{1a} 및 L 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-S(O)R^{1a}이고, 여기서 R^{1a} 및 L 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-S(O)₂R^{1a}이고, 여기서 R^{1a} 및 L 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 -L-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})이고, 여기서 R^{1a}, R^{1c}, 및 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.
- [0474] 특정 실시양태에서, W는 -L-(N(R^{1c})-L)_n-N(R^{1a})R^{1b}이고, 여기서 R^{1a}, R^{1b}, R^{1c}, L 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄ 아틸이고, 여기서 R^{1c}, L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로아틸이고, 여기서 R^{1c}, L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로시클릴이고, 여기서 R^{1c}, L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.
- [0475] 특정 실시양태에서, W는 -O-L-N(R^{1a})R^{1b}이고, 여기서 R^{1a}, R^{1b}, 및 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -O-L-C₆₋₁₄ 아틸이고, 여기서 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -O-L-헤테로아틸이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -O-L-헤테로시클릴이고, 여기서 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.
- [0476] 특정 실시양태에서, 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 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-C₆₋₁₄ 아틸이고, 여기서 R^{1c}, L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로아틸이고, 여기서 R^{1c}, L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 -O-L-(N(R^{1c})-L)_n-헤테로시클릴이고, 여기서 R^{1c}, L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.
- [0477] 특정 실시양태에서, W는 -S-L-N(R^{1a})R^{1b}이고, 여기서 R^{1a}, R^{1b}, 및 L은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실

시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-S-L-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-S-L$ -헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-S-L$ -헤테로시클릴, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다.

[0478]

특정 실시양태에서, 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 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로아릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-S-L-(N(R^{1c})-L)_n$ -헤테로시클릴이고, 여기서 R^{1c} , L, 및 n은 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0479]

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

[0480]

특정 실시양태에서, W는 $-C(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-C(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-C(O)NH_2$ 이다. 특정 실시양태에서, W는 $-C(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHC(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NR^{1a}C(O)R^{1c}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHC(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NR^{1a}C(O)OR^{1c}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHC(O)NH_2$ 이다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHC(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHC(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NR^{1a}C(O)NH_2$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NR^{1c}C(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NR^{1c}C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} , R^{1b} , 및 R^{1c} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NHS(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-NR^{1c}S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-OC(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, W는 $-OC(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실

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

[0481]

특정 실시양태에서, Z는 시아노이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{1-6} 알킬이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{2-6} 알케닐이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{2-6} 알킬닐이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{3-10} 시클로알킬이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{6-14} 아릴이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 C_{7-15} 아르알킬이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 벤질이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로아릴이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 5-원 헤테로아릴이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 테트라졸릴이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 1,2,4-옥사디아졸릴이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 헤테로시클릴이다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-L-C_{6-14}$ 아릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-L$ -헤테로아릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된 $-L$ -헤테로시클릴이고, 여기서 L은 본원에서 정의된 바와 같다.

[0482]

특정 실시양태에서, Z는 $-C(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-C(O)OR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-C(O)OC_{1-6}$ 알킬이고, 여기서 알킬은 본원에 정의된 바와 같은 하나 이상의 치환체 Q로 선택적으로 치환된다. 특정 실시양태에서, Z는 $-C(O)OCH_3$ 이다. 특정 실시양태에서, Z는 $-C(O)NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-C(O)N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 은 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-P(O)(OR^{1a})(OR^{1c})$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1c} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-SR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-S(O)R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-S(O)_2R^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-S(O)_2NH_2$ 이다. 특정 실시양태에서, Z는 $-S(O)_2NHR^{1a}$ 이고, 여기서 R^{1a} 은 본원에서 정의된 바와 같다. 특정 실시양태에서, Z는 $-S(O)_2N(R^{1a})R^{1b}$ 이고, 여기서 R^{1a} 및 R^{1b} 는 각각 본원에서 정의된 바와 같다.

[0483]

특정 실시양태에서, X는 결합이다. 특정 실시양태에서, X는 O이다. 특정 실시양태에서, X는 S이다. 특정 실시양

태에서, X는 NR^{1c} 이고, 여기서 R^{1c} 는 본원에서 정의된 바와 같다.

[0484] 특정 실시양태에서, n은 1이다. 특정 실시양태에서, n은 2이다. 특정 실시양태에서, n은 3이다. 특정 실시양태에서, n은 4이다. 특정 실시양태에서, n은 5이다.

[0485] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 화합물은 AHR의 길항제로서 활성을 나타낸다.

[0486] 본원에 제공된 화합물은 거울상 이성질체 차원에서 순수하고, 예컨대 단일 거울상 이성질체 또는 단일 부분입체 이성질체이거나, 또는 화학량론적 혼합물, 예컨대 거울상 이성질체의 혼합물, 예를 들어, 2개의 거울상 이성질체의 라세믹 혼합물; 또는 2개 이상의 부분입체 이성질체의 혼합물일 수 있다. 이와 같이, 당업자라면, 생체내 에피머화를 겪는 화합물의 경우 (R) 형태의 화합물의 투여가 그의 (S) 형태의 화합물의 투여와 동일하다는 것을 인식할 것이다. 개별적인 거울상 이성질체의 제조/단리를 위한 종래의 기술은 적당한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 합성, 비카이랄 출발 물질로부터 비대칭 합성, 또는 거울상 이성질체 혼합물의 분해, 예를 들어, 카이랄 크로마토그래피, 재결정화, 분해, 부분입체 이성질체 염 형성, 또는 부분입체 이성질체 부가물로의 유도화에 이어 분리를 포함한다.

[0487] 5.4. NK 세포의 단리

[0488] 천연 킬러 세포의 단리 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 천연 킬러 세포, 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 단리하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, NK 세포는, 한 실시양태에서, 세포를 $CD56^+$ 및 $CD3^-$ 에 대한 항체로 염색하고 $CD56^+CD3^-$ 세포를 선택함으로써 단리되거나 농축(enrich)될 수 있다. NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 세포는 시판되는 키트, 예를 들어 NK 세포 단리 키트(NK Cell Isolation Kit) (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec))를 사용하여 단리될 수 있다. NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 세포는 또한 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 세포를 포함하는 세포의 집단에서 NK 세포 이외의 세포의 제거에 의해 단리되거나 농축될 수 있다. 예를 들어, NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 세포는 예를 들어 $CD3$, $CD4$, $CD14$, $CD19$, $CD20$, $CD36$, $CD66b$, $CD123$, HLA DR 및/또는 $CD235a$ (글리코포린 A) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하면서 비-NK 세포 마커를 표시하는 세포의 고갈에 의해 단리되거나 농축될 수 있다. 시판되는 키트, 예를 들어 NK 세포 네가티브 단리 키트 (NK Cell Negative Isolation Kit, 다이날 바이오테크(Dynal Biotech))를 사용하여 네가티브 단리(negative isolation)를 수행할 수 있다. 이들 방법에 의해 단리된 세포는, 예를 들어 별도의 $CD16^+$ 및 $CD16^-$ 세포, 및/또는 $CD94^+$ 및 $CD94^-$ 로 추가로 분류될 수 있다.

[0489] 세포 분리는 예를 들어, 유세포 측정기, 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS)에 의해, 또는 한 실시양태에서, 특정 항체와 콘주게이트된 마이크로비드를 사용하는 자기 세포 분류(magnetic cell sorting)에 의해 할 수 있다. 세포는 예를 들어, 자기 활성화 세포 분류(magnetic activated cell sorting, MACS) 기술, 하나 이상의 특정 항체, 예를 들어, 안티- $CD56$ 항체를 포함하는 자석 비드 (예를 들어, 약 0.5 내지 100 μm 직경)에 결합하는 능력을 기준으로 입자를 분리하기 위한 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 자기 세포 분류는 예를 들어, AUTOMACS™ 분리기 (밀테니)를 사용하여 수행되고 자동화될 수 있다. 특정 세포 표면 분자 또는 불완전 항원을 특별하게 인식하는 항체의 공유부가를 포함한 다양한 유용한 변형이 자석 미소구체 상에서 수행될 수 있다. 이어서 비드를 세포와 함께 혼합하여 결합할 수 있게 한다. 이어서 세포는 자기장을 통과하여 특정 세포 표면 마커를 갖는 세포는 분리되어 나간다. 한 실시양태에서, 이러한 세포들은 이제 단리되고 추가의 세포 표면 마커에 맞서는 항체와 쌍을 이룬 자석 비드와 재혼합된다. 세포들은 다시 자기장을 통과하고 항체 모두를 결합한 세포를 단리한다. 이러한 세포를 이어서 별개의 디쉬들로, 예컨대 클론 단리를 위한 마이크로티터 디쉬 안으로 희석할 수 있다.

[0490] 5.5. 태반 관류액

[0491] NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단은 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반혈, 말초혈, 비장, 간 등으로부터의 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구체로부터 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조혈 줄기 세포는 태반 관류액 및 상기 태반 관류액 생성에 사용된 것과 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터의 조합된 조혈 줄기 세포이다. 태반 관류액 세포를 포함하는 태반 관류액은 예를 들어 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,468,276호 및 미국 특허 출원 공개 제2009/0104164호(상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 포함됨)에 개시된 방법으로 수득될 수 있다.

[0492] 5.5.1. 세포 수집 조성물

- [0493] 조혈 줄기 또는 전구 세포가 그로부터 단리될 수 있거나, 또는 예를 들어 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단과 조합되어 종양 세포, 암 또는 바이러스성 감염이 있는 개체의 종양 제거 또는 치료에 유용한, 태반 관류액 및 관류액 세포는, 포유동물, 예를 들어 인간의 분만 후 태반을 태반 세포 수집 조성물을 사용하여 관류시켜서 수집될 수 있다. 관류액은 태반을 임의의 생리적으로 허용되는 용액, 예를 들어 염수 용액, 배양 배지, 또는 보다 복잡한 세포 수집 조성물로 관류시켜서 태반으로부터 수집될 수 있다. 태반의 관류 및 관류액 세포의 수집 및 보존에 적합한 세포 수집 조성물은 관련 미국 출원 공개 제 2007/0190042호에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.
- [0494] 세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 임의의 생리적으로 허용되는 용액, 예를 들어 염수 용액 (예를 들어, 인산염 완충 염수, 크렙(Kreb's) 용액, 변형된 크렙 용액, 이글(Eagle's) 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.
- [0495] 세포 수집 조성물은 수집 시점부터 배양 시점까지 태반 세포를 보존하는 경향, 즉, 태반 세포의 사멸을 방지하거나 태반 세포의 사멸을 지연시키거나, 세포 집단 중에서 사멸하는 태반 세포의 수를 감소시키는 등의 경향을 갖는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 예를 들어 세포사멸 억제제 (예를 들어, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제 (예를 들어, 마그네슘 설페이트, 항고혈압 약물, 심방 나트륨이노 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 나트륨 니트로프루시드, 히드랄라진, 아데노신 트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 마그네슘 설페이트, 포스포디에스테라제 억제제 등); 괴사 억제제 (예를 들어, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카르바메이트 또는 클로나제팜); TNF- α 억제제; 및 /또는 산소-수송 퍼플루오로카본 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.
- [0496] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 히알루로니다제, RNase 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 이러한 효소는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스토리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 썬몰리신, 엘라스타제, 트립신, 리버라제(LIBERASE), 히알루로니다제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0497] 세포 수집 조성물은 살균 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 특정 비-제한적인 실시양태에서, 상기 항생제는 마크롤리드 (예를 들어, 토브라마이신), 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 V) 또는 퀴놀론 (예를 들어, 오픈록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라시클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시양태에서, 항생제는 그람(Gram)(+) 및/또는 그람(-) 박테리아, 예를 들어 슈도모나스 애틀기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.
- [0498] 세포 수집 조성물은 또한 하기 화합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아데노신 (약 1 mM 내지 약 50 mM); D-글루코스 (약 20 mM 내지 약 100 mM); 마그네슘 이온 (약 1 mM 내지 약 50 mM); 한 실시양태에서는 내피 통합성 및 세포 생존도 유지에 충분한 양으로 존재하는 분자량 20,000 달톤 초과와 거대분자 (예를 들어, 합성 또는 천연 발생 콜로이드, 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜 (약 25 g/L 내지 약 100 g/L 또는 약 40 g/L 내지 약 60 g/L로 존재함)); 항산화제 (예를 들어, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E (약 25 μ M 내지 약 100 μ M로 존재함)); 환원제 (예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재하는 N-아세틸시스테인); 세포로의 칼슘 유입을 방지하는 작용제 (예를 들어, 약 2 μ M 내지 약 25 μ M로 존재하는 베라파밀); 니트로글리세린 (예를 들어, 약 0.05 g/L 내지 약 0.2 g/L); 한 실시양태에서는 잔류 혈액의 응고 방지를 돕는데 충분한 양으로 존재하는 항응고제 (예를 들어, 헤파린 또는 히루딘 (약 1000 유닛/L 내지 약 100,000 유닛/L의 농도로 존재함)); 또는 아밀로리드 함유 화합물 (예를 들어, 아밀로리드, 에틸 이소프로필 아밀로리드, 헥사메틸렌 아밀로리드, 디메틸 아밀로리드 또는 이소부틸 아밀로리드 (약 1.0 μ M 내지 약 5 μ M로 존재함)).
- [0499] 5.5.2. 태반의 수집 및 취급
- [0500] 일반적으로, 인간 태반은 출산 후 추출된 후에 바로 회수된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 환자로부터 사전 동의 후에 회수되고, 환자의 완전한 의학적 병력을 수집하여 상기 태반 수집물에 기재한다. 한 실시양태에서, 의학적 병력 기재는 분만 후에도 계속된다.
- [0501] 제대혈 및 태반혈은 관류액의 회수 이전에 제거된다. 특정 실시양태에서, 분만 후에 태반의 제대혈을 회수한다.

태반은 통상적인 제대혈 회수 과정을 거칠 수 있다. 전형적으로, 바늘 또는 캐놀라가 사용되며, 태반의 방혈(exsanguination)을 위해 중력의 도움을 받는다(예를 들어, 앤더슨(Anderson)의 미국 특허 제5,372,581호; 헤셀(Hessel) 등의 미국 특허 제5,415,665호 참조). 바늘 또는 캐놀라는 통상적으로 제대 정맥에 배치하고, 태반을 부드럽게 마사지하여 태반으로부터 제대혈을 빼내는데 도움을 줄 수 있다. 이러한 제대혈 회수는 예를 들어 라이프뱅크 인크.(LifeBank Inc.) (미국 뉴저지주 세다 크놀즈 소재), 비아코드(ViaCord), 코드 블러드 레지스트리(Cord Blood Registry) 및 크리오셀(CryoCell)을 통해 상업적으로 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 태반에서 추가의 조작 없이 액체를 중력으로 빼내어 제대혈 회수 동안의 조직 파괴를 최소화한다.

[0502] 전형적으로, 태반을 분만실에서 또 다른 위치, 예를 들어 실험실로 수송하여 제대혈을 회수하고 관류액을 수집한다. 태반을 멸균 단열 수송 장치(태반의 온도를 20℃ 내지 28℃로 유지함)에서 수송하고, 예를 들어 태반을 근위 제대를 클램핑한 상태로 멸균 집-락(zip-lock) 플라스틱 백에 넣은 후에 단열 용기에 넣는다. 또 다른 실시양태에서, 태반을 실질적으로 미국 특허 제7,147,626호에 기재된 바와 같은 제대혈 수집 키트에서 수송한다. 한 실시양태에서, 태반은 분만 후 4시간 내지 24시간 이내에 실험실로 전달된다. 특정 실시양태에서, 근위 제대를 제대혈 회수 전에 태반 디스크로의 삽입부로부터 4 cm 내지 5 cm (센티미터) 이내에서 클램핑한다. 다른 실시양태에서, 근위 제대를 제대혈 회수 이후 및 태반의 추가 처리 이전에 클램핑한다.

[0503] 관류액 수집 전에, 태반을 멸균 조건 하에 실온 또는 5℃ 내지 25℃의 온도(섭씨온도)에 저장할 수 있다. 태반은 태반 관류 전에 48시간 초과와 기간, 또는 4시간 내지 24시간의 기간 동안 저장하여 임의의 잔류 제대혈을 제거할 수 있다. 태반은 항응고제 용액 중에 5℃ 내지 25℃의 온도(섭씨온도)에 저장될 수 있다. 적합한 항응고제 용액은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와르파린 나트륨 용액을 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액(예를 들어, 1:1000 용액 중 1% w/w)을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 방혈된 태반은 태반 관류액 수집 전에 36시간 이하 동안 저장한다.

[0504] 5.5.3. 태반 관류액

[0505] 포유동물 태반을 관류하고 태반 관류액을 수득하는 방법은 예를 들어 하리리(Hariri)의 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,255,879호, 및 미국 출원 공개 제2009/0104164호, 제2007/0190042호 및 제20070275362호(미국 특허 제8,057,788호로서 허여됨)에 개시되어 있고, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0506] 관류액은 관류 용액, 예를 들어 상기 기재된 염수 용액, 배양 배지 또는 세포 수집 조성물을 태반 혈관계에 통과시켜 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 포유동물 태반은 관류 용액을 제대 동맥 및 제대 정맥 중 어느 하나 또는 둘다에 통과시켜 관류된다. 관류 용액을 태반을 통해 흘려주는 것은 예를 들어 태반으로의 중력식 유동을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 관류 용액은 펌프, 예를 들어 연동 펌프를 이용하여 태반을 통해 가압된다. 제대 정맥은 예를 들어 멸균 연결 장치, 예컨대 멸균 튜빙에 연결된 캐놀라, 예를 들어 테플론(TEFLON)® 또는 플라스틱 캐놀라로 캐놀라삽입될 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 매니폴드에 연결된다.

[0507] 관류 준비시에, 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥이 태반의 가장 높은 지점에 위치되도록 하는 방식으로 배향될 수 있다. 태반은 관류 용액을 태반 혈관계에 통과시키거나 태반 혈관계 및 주변 조직에 통과시켜 관류될 수 있다. 한 실시양태에서, 제대 동맥 및 제대 정맥은 가요성 커넥터를 통해 관류 용액의 저장고에 연결된 피켓에 동시에 연결된다. 관류 용액을 제대 정맥 및 동맥에 통과시킨다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 및/또는 이것을 통해 태반의 주변 조직으로 들어가고, 임신 동안에 모체의 자궁에 부착되었던 태반의 표면으로부터 적합한 개방형 용기에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구부를 통해 도입될 수도 있고 모체의 자궁 벽과 경계를 형성했던 태반 벽 내의 개구부 밖으로 흘러나오거나 스며들게 될 수도 있다. 또 다른 실시양태에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통해 통과하여 동맥으로부터 수집하거나, 또는 관류 용액은 제대 동맥을 통과하여 제대 정맥으로부터 수집하며, 즉, 오직 태반 혈관계(태아 조직)만을 통과시킨다.

[0508] 한 실시양태에서, 예를 들어 제대 동맥 및 제대 정맥은 예를 들어 가요성 커넥터를 통해 관류 용액의 저장고에 연결된 피켓에 동시에 연결된다. 관류 용액을 제대 정맥 및 동맥에 통과시킨다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 및/또는 이것을 통해 태반의 주변 조직으로 들어가고, 임신 동안에 모체의 자궁에 부착되었던 태반의 표면으로부터 적합한 개방형 용기에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구부를 통해 도입될 수도 있고 모체의 자궁 벽과 경계를 형성했던 태반 벽 내의 개구부 밖으로 흘러나오거나 스며들게 될 수도 있다. "팬(pan)" 방법이라고 지칭될 수 있는 이러한 방법으로 수집되는 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

[0509] 또 다른 실시양태에서, 관류 용액을 제대 정맥에 통과시켜 제대 동맥으로부터 수집하거나, 또는 관류 용액을 제대 동맥에 통과시켜서 제대 정맥으로부터 수집한다. "폐쇄형 회로" 방법이라고 지칭될 수 있는 이러한 방법으로

수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 전적으로 태아의 것이다.

- [0510] 한 실시양태에서, 폐쇄형 회로 관류 방법은 다음과 같이 수행될 수 있다. 분만 후 태반은 출산 후 약 48시간 이내에 수득한다. 제대를 클램핑하고, 클램프 윗부분을 절단한다. 제대는 폐기될 수도 있고, 또는 예를 들어 제대 줄기 세포 회수를 위한 처리를 하고/하거나 생체물질 생성을 위해 제대 막을 처리하는 과정을 거칠 수도 있다. 양막은 관류 동안에 유지될 수도 있고, 또는 예를 들어 손가락으로 평활 절개하여 용모막으로부터 분리할 수도 있다. 관류 전에 양막을 용모막으로부터 분리하는 경우, 이것은 예를 들어 폐기될 수도 있고, 또는 예를 들어 효소 소화를 통해 줄기 세포를 수득하는 처리를 하거나 예를 들어 양막 생체물질, 예를 들어 미국 출원 공개 제 2004/0048796호에 기재된 생체물질 생성을 위해 처리하는 과정을 거칠 수도 있다. 태반에서 모든 가시적 혈병 및 잔류 혈액을 예를 들어 멸균 거즈를 사용하여 세정한 후에 제대 혈관을 노출시키고, 예를 들어 제대 막을 부분 절단하여 제대의 단면을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들어 각 혈관의 절단된 끝부분을 통해 폐쇄형 엘리게이터 클램프를 밀어넣어서 혈관을 개방한다. 이후, 예를 들어 관류 장치 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 튜빙과 같은 장치를 태반 동맥 각각에 삽입한다. 펌프는 이러한 목적에 적합한 임의의 펌프, 예를 들어 연동 펌프일 수 있다. 이후, 멸균 수집 저장고, 예를 들어 250 mL 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 태반 정맥에 삽입한다. 대안적으로, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥에 삽입하고, 수집 저장고(들)에 연결된 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 둘다에 삽입한다. 이후, 태반을 소정 부피의 관류 용액, 예를 들어 약 750 mL의 관류 용액으로 관류한다. 이후, 관류액 중의 세포를 예를 들어 원심분리를 통해 수집한다.
- [0511] 한 실시양태에서, 근위 제대를 관류 동안 클램핑하고, 더욱 구체적으로 근위 제대를 태반 디스크로의 제대 삽입 부로부터 4 cm 내지 5 cm (센티미터) 이내에서 클램핑한다.
- [0512] 방혈 과정 동안 포유동물 태반으로부터의 첫번째 관류액 수집물은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반혈의 잔류 적혈구 색을 나타낸다. 상기 관류액은 관류가 진행되고 잔류 제대혈 세포가 태반으로부터 세척됨에 따라 점점 무색이 된다. 일반적으로 30 mL 내지 100 mL의 관류액이 태반으로부터의 초기 혈액 플러싱(flush)에 적합하지만, 관찰되는 결과에 따라 더 많거나 더 적은 관류 유체가 사용될 수 있다.
- [0513] 특정 실시양태에서, 제대혈은 관류 전에 태반으로부터 제거되지만(예를 들어 중력 배수에 의해), 태반은 잔류 혈액을 제거하기 위해 용액으로 플러싱되지(예를 들어, 관류되지) 않는다. 특정 실시양태에서, 제대혈은 관류 전에 태반으로부터 제거되고(예를 들어 중력 배수에 의해), 태반은 잔류 혈액을 제거하기 위해 용액으로 플러싱된다(예를 들어 관류된다).
- [0514] 태반 관류에 사용되는 관류 액체의 부피는 수집할 태반 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반으로부터 수행될 수집 회수 등에 따라 달라질 수 있다. 다양한 실시양태에서, 관류 액체의 부피는 50 mL 내지 5000 mL, 50 mL 내지 4000mL, 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 mL 내지 800 mL의 관류 액체로 관류된다.
- [0515] 태반은 수시간 또는 수일의 기간에 걸쳐 여러 회 관류될 수 있다. 태반을 여러 회 관류하는 경우, 이것은 무균 조건 하에 용기 또는 다른 적합한 용기 내에서 유지되거나 배양되고 세포 수집 조성물 또는 표준 관류 용액 [예를 들어, 통상적인 염수 용액, 예컨대 인산염 완충 염수 ("PBS") - 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와르파린 나트륨, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)를 함유하거나 함유하지 않고/거나 항미생물 작용제 (예를 들어, β -머캅토에탄올 (0.1 mM)); 항생제, 예컨대 스트렙토마이신 (예를 들어, 40 내지 100 $\mu\text{g/mL}$), 페니실린 (예를 들어, 40U/mL), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 $\mu\text{g/mL}$)를 함유하거나 함유하지 않는 것]으로 관류될 수 있다. 한 실시양태에서, 단리된 태반은 소정의 기간 동안 관류액 수집 없이 유지되거나 배양되어 관류 및 관류액 수집 이전에 태반이 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 또는 24시간 동안 또는 2일 또는 3일 이상 동안 유지되거나 배양된다. 관류된 태반은 1 이상의 추가적인 회수로, 예를 들어 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간 이상 동안 유지될 수 있고, 예를 들어 700 내지 800 mL 관류 유체로 2회째 관류될 수 있다. 태반은 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 이상 관류될 수 있고, 예를 들어 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 또는 6시간마다 1회씩 관류될 수 있다. 한 실시양태에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어 태반 세포 수집 조성물의 수집은 회수되는 유핵 세포의 수가 1 mL 당 세포 100개 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 여러 시점에서 관류액을 추가로 따로 처리하여 세포, 예를 들어 전체 유핵 세포의 시간-의존적 집단을 회수할 수 있다. 여러 시점에서의 관류액은 또한 풀링될 수도 있다.
- [0516] 5.5.4. 태반 관류액 및 태반 관류액 세포

[0517] 전형적으로, 단일 태반 관류로부터의 태반 관류액은 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 본원에 개시된 방법으로 생성할 수 있는 조혈 세포를 포함하여 약 1억개 내지 약 5억개의 유핵 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 이러한 세포는 $CD34^+CD45^-$ 줄기 또는 전구 세포, $CD34^+CD45^+$ 줄기 또는 전구 세포 등을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 관류액 또는 관류액 세포는 그로부터의 조혈 세포 단리 이전에 동결보존된다. 특정 다른 실시양태에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 오직 태아 세포만을 포함하거나 태아 세포 및 모계 세포의 조합물을 포함한다.

[0518] 5.6. NK 세포

[0519] 5.6.1. 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포

[0520] 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 NK 세포 집단을 제공하고, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개시된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0521] 한 실시양태에서, 본원은 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 세포 집단을 제공하고, 여기서 상기 NK 세포 집단은 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들어 NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하는데 사용된 제3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는다는 것을 제외하고는 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 큰 백분율의 $CD3-CD56^+$ 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단은 약 70% 이상, 몇몇 실시양태에서, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% $CD3-CD56^+$ 의 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단은 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 이상의 $CD3-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단은 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99% $CD3-CD56^+$ 세포를 포함한다.

[0522] 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 부가적으로 $NKp46^+$ 인 $CD3^-D56^+$ 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 부가적으로 $CD16^-$ 인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 부가적으로 $CD16^+$ 인 $CD3-CD56^+$ 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 부가적으로 $CD94^-$ 인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 부가적으로 $CD94^+$ 인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다.

[0523] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 $CD117^+$ 인 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 $NKG2D^+$ 인 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 $NKp44^+$ 인 세포를 포함한다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 $CD244^+$ 인 세포를 포함한다.

[0524] 5.7. 태반 관류액과 조합된 NK 세포

[0525] 본원은 또한 본원에 개시된 3-단계 방법에 따른 NK 세포와 예를 들어, 하나의 종양 세포 또는 다수의 종양 세포의 증식을 저해하는데 사용하기 위한 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 유착성 태반 세포가 조합된 조성물을 제공한다.

[0526] 5.7.1. NK 세포 및 관류액 또는 관류액 세포의 조합

[0527] 본원은 또한 본원에 개시된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단, 및 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합을 포함한 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 예를 들면, 본원은 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포로 보충된 소정 부피의 태반 관류액을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 예를 들어 태반 관류액의 각각의 밀리리터가 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 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포로 보충된다. 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액 세포는 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포로 보충된다. 특정 다른 실시양태에서, 태반 관류액 세포가 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합할 때, 태반 관류액 세포는 일반적으로 총 세포 개수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 대략 그 이상 또는 이하를 차지한다. 특정 다른

실시양태에서, 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포가 다수의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포와 조합될 때, NK 세포 또는 NK 세포 집단은 일반적으로 세포의 총 개수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 또는 대략 그 이상 또는 이하를 차지한다. 특정 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포가 태반 관류액을 보충하기 위해 사용될 때, 세포가 현탁된 용액 (예를 들어, 염수 용액, 배양 배지 등)의 부피는 관류액과 세포의 총 부피의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 그 이상 또는 이하를 차지하고, 여기서 NK 세포는 보충 전에 밀리리터 당 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.

[0528] 다른 실시양태에서, 세포의 상기 임의의 조합이 결국 체대혈 또는 체대혈로부터의 유핵 세포와 조합된다.

[0529] 또한 본원은 2개 이상의 공급원, 예를 들어 2개 이상의 태반으로부터 수득되어 조합된, 예를 들어 풀링된, 풀링된 태반 관류액을 제공한다. 이러한 풀링된 관류액은 각 공급원으로부터 대략 동일한 부피의 관류액을 포함하거나, 또는 각각의 공급원으로부터 상이한 부피를 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터의 상대적 부피는 무작위로 선택될 수 있거나, 또는 하나 이상의 세포 인자, 예를 들어 시토카인, 성장 인자, 호르몬 등의 농도 또는 양; 각각의 공급원으로부터 관류액에서 관류액 세포의 개수; 또는 각각의 공급원으로부터 관류액의 다른 특징을 기준으로 할 수 있다. 동일한 태반의 다수의 관류로부터 관류액은 마찬가지로 풀링될 수 있다.

[0530] 마찬가지로, 본원은, 2개 이상의 공급원, 예를 들면, 2개 이상의 태반으로부터 수득되고 풀링된 태반 관류액 세포, 및 태반-유도된 중간 천연 킬러 세포를 제공한다. 이러한 풀링된 세포는 2개 이상의 공급원으로부터 대략 동일한 수의 세포를 포함하거나 풀링된 공급원 중 하나 이상으로부터 상이한 개수의 세포를 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터 세포의 상대적 개수는 풀링된 세포에서 하나 이상의 특정 세포 유형의 개수, 예를 들어 CD34+ 세포, 등의 개수를 기준으로 선택될 수 있다.

[0531] 또한 본원은, 예를 들어 소정 개수의 NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 소정 부피의 관류액으로부터 예상되는 종양 저해의 정도와 양(즉, 효능)을 결정하기 위해 평가된, 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 및 그러한 세포와 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합을 제공한다. 예를 들어, 일부 또는 샘플 개수의 세포를, 종양 세포가 그렇지 않으면 증식할 조건 하에, 알고 있는 개수의 종양 세포와 접촉시키거나 근접하게 하고, 태반 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 그의 조합의 존재하에 종양 세포의 시간(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10주 또는 그 이상)에 따른 증식률을, 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 그의 조합의 부재하에 동일한 개수의 종양 세포 증식과 비교한다. 세포의 효능은 예를 들어 종양 세포 성장을 저해하기 위해 요구되는 세포의 개수로서 또는 용액의 부피로서, 예를 들어 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 등으로 나타낼 수 있다.

[0532] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포가 약제학적 등급의 투여가능한 단위로서 제공된다. 이러한 단위는 별개의 부피들, 예를 들어 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 특정 개수의 세포, 예를 들어 다른 NK 세포 또는 관류액 세포와 조합된 NK 세포 또는 NK 세포 집단을, 예를 들어 밀리리터 당 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 단위 당 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 실시양태에서, 이러한 단위는 밀리리터 당 약 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 이상의 NK 세포, 또는 단위 당 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 세포, 대략 그 이상의 또는 최대 대략 그 값을 포함할 수 있다. 이러한 단위는 NK 세포 또는 NK 세포 집단 및/또는 임의의 다른 세포의 특정 개수를 함유하도록 제공될 수 있다.

[0533] 상기 실시양태에서, NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 세포 또는 NK 세포 집단과 다른 NK 세포, 관류액 세포 또는 관류액의 조합은 수용체의 자기 조직일 수 있거나 (즉, 수용체로부터 수득된다), 또는 수용체에 동종이게 될 수 있다 (즉, 마지막으로 상기 수용체와 상이한 하나의 다른 개체로부터 수득됨).

[0534] 특정 실시양태에서, 각각의 세포 단위는, 세포의 부피, 개수, 세포의 유형, 상기 단위가 세포의 특정 유형에 대해 농축되었는지, 및/또는 상기 단위에서 세포의 주어진 개수, 또는 상기 단위의 소정의 밀리리터 수치의 효능,

즉 상기 단위에서 세포가 특정 유형 또는 유형들의 종양 세포의 측정가능한 증식 저해를 유발하는지 여부 중 하나 이상을 구체화하도록 라벨링된다.

[0535] 5.7.2. NK 세포와 유착성 태반 줄기 세포의 조합

[0536] 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단은 단독으로 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와의 조합으로, 단리된 유착성 태반 세포, 예를 들어, 본원에서 그 전문이 참고로서 포함된 문헌[Hariri, 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,255,879호, 및 미국 특허 출원 제2007/0275362호]에 개시된 바와 같은 태반 줄기 세포 및 태반 다분화능 세포로 보충된다. "유착성 태반 세포"란 세포가 조직 배양 표면, 예를 들어 조직 배양 플라스틱에 유착성인 세포를 의미한다. 본원에 개시된 조성물 및 방법에 유용한 유착성 태반 세포는 영양막, 배아 배세포 또는 배아 줄기 세포가 아니다.

[0537] 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어, NK 세포 집단은, 단독으로 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 조합하여 예를 들어, 밀리리터 당 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 유착성 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} 이상의 유착성 태반 세포로 보충된다. 상기 조합에서 유착성 태반 세포는 예를 들어 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 40 이상의 집단 배가(doubling) 동안 배양된 유착성 태반 세포일 수 있다.

[0538] 단리된 유착성 태반 세포는, 일차 배양에서 배양되거나 세포 배양에서 증식될 때 조직 배양 기질, 예를 들어 조직 배양 컨테이너 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱)에 유착된다. 배양에서 유착성 태반 세포는 일반적으로 섬유아세포로서, 중심 세포체로부터 연장되는 다수의 세포질 돌기를 갖는 별모양 형상을 갖는다. 그러나, 유착성 태반 세포는 유착성 태반 세포가 섬유아세포가 하는 것보다 더 많은 수의 이러한 돌기를 나타내기 때문에, 동일한 조건 하에 배양된 섬유아세포와 형태학적으로 구분될 수 있다. 형태학적으로, 유착성 태반 세포는, 또한 배양시 더욱 둥글거나, 또는 자갈형상의 형태인 조혈 줄기 세포와 구분될 수 있다.

[0539] 본원에 제공된 조성물 및 방법에 유용한, 단리된 유착성 태반 세포, 및 유착성 태반 세포의 집단은, 유착성 태반 세포를 포함하는 상기 세포 또는 세포 집단을 확인하고/하거나 단리하기 위해 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현한다. 본원에 제공된 조성물 및 방법에서 유용한 유착성 태반 세포, 및 유착성 태반 세포 집단은 유착성 태반 세포 및 태반으로부터 직접 수득한 유착성 태반 세포-함유 세포 집단, 또는 임의의 그의 일부를 포함한다 (예를 들어, 양막, 융모막, 양막-융모막 판, 태반엽, 제대혈 등). 한 실시양태에서, 유착성 태반 줄기 세포 집단은 배양시 유착성 태반 줄기 세포의 집단 (즉 2개 이상), 예를 들어 컨테이너, 예를 들어 백에 있는 집단이다.

[0540] 유착성 태반 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, 및 CD200, 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38, 또는 CD45를 발현하지 않는다. 유착성 태반 줄기 세포는 또한 HLA-ABC (MHC-1) 및 HLA-DR를 발현한다. 이들 마커를 사용하여 유착성 태반 세포를 확인하고, 유착성 태반 세포를 다른 세포 유형과 구별한다. 유착성 태반 세포가 CD73 및 CD105를 발현할 수 있기 때문에, 이들은 중간엽 줄기 세포와 같은 특징을 가질 수 있다. CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현이 없으면 유착성 태반 줄기 세포를 비-조혈 줄기 세포로 확인한다.

[0541] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 단리된 유착성 태반 세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 저해한다.

[0542] 특정 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 특정 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 단리된 태반 다분화능 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 유세포 측정기로 검출했을 때 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 유착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 다분화능 유착성 태반 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골형성 표현형의 세포, 또는 연골발생 표현형의 세포로 분화시키는 포텐셜을 갖는다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 유착성 태반 세포는 부가적으로 $CD200^{+}$ 이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 유착성 태반 세포는 유세포 측

정기에 의해 검출할 때 부가적으로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$ 유착성 태반 세포는 유세포 측정기에 의해 검출할 때 부가적으로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 유착성 태반 세포는 유세포 측정기에 의해 검출할 때 부가적으로 $CD90^{+}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 유착성 태반 세포는 유세포 측정기에 의해 검출할 때 부가적으로 $CD90^{+}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^{-}$, $CD10^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$, $CD90^{+}$, $CD45^{-}$ 유착성 태반 세포는 유세포 측정기에 의해 검출할 때 부가적으로 $CD80^{-}$ 및 $CD86^{-}$ 이다.

[0543] 한 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 $CD200^{+}$, $HLA-G^{+}$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아모양 몸체를 생성한다.

[0544] 또 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 이다. 상기 집단의 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $HLA-G^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아모양 몸체를 생성한다.

[0545] 또 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 $CD200^{+}$, $OCT-4^{+}$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD73^{+}$ 및 $CD105^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $HLA-G^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 또한 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아모양 몸체를 생성한다.

[0546] 또 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 및 $HLA-G^{+}$ 이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 유착성 줄기 세포는 또한 $OCT-4^{+}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 유착성 줄기 세포는 또한 $CD200^{+}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 유착성 줄기 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$, $CD45^{-}$, $OCT-4^{+}$ 및 $CD200^{+}$ 이다.

[0547] 또 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 $CD73^{+}$, $CD105^{+}$ 줄기 세포로서, 여기서 상기 세포는 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 하나 이상의 배아모양 몸체를 생성한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 또는 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $OCT-4^{+}$ 이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 $OCT-4^{+}$, $CD34^{-}$, $CD38^{-}$ 및 $CD45^{-}$ 이다.

[0548] 또 다른 실시양태에서, 유착성 태반 줄기 세포는 $OCT-4^{+}$ 줄기 세포로서, 여기서 상기 유착성 태반 줄기 세포는 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아모양 몸체를 생성하고, 여기서 상기 줄

기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 저해하는 것으로 확인되었다.

[0549] 다양한 실시양태에서, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 상기 단리된 유착성 태반 세포가 OCT-4⁺이다. 상기 집단의 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 CD73⁺ 및 CD105⁺이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 CD34⁻, CD38⁻, 또는 CD45⁻이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 CD200⁺이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 또한 CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻, CD38⁻, 및 CD45⁻이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 유착성 태반 세포는 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상 또는 20회 이상 증식되었고, 예를 들어 계대배양되었다.

[0550] 상기 임의의 실시양태의 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 ABC-p를 발현한다 [태반-특이적 ABC 운반 단백질; 예를 들어 문헌(Allikmets *et al*, *Cancer Res.* 58(23):5337-9 (1998))참조].

[0551] 또 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁻ 및 CD133⁻이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 본질적으로 IL-6, IL-8 및 단백질 화학유인물질 단백질 (MCP-1)을 분비한다.

[0552] 상기 언급된 단리된 유착성 태반 세포의 각각은 포유류의 태반으로부터 수득되고 직접 단리된 세포, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30회 또는 그 이상 배양되고 계대배양된 세포 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 상기 개시된 종양 세포 저해성의 복수개의 단리된 유착성 태반 세포는 약 1x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶, 5x10⁶, 1x10⁷, 5x10⁷, 1x10⁸, 5x10⁸, 1x10⁹, 5x10⁹, 1x10¹⁰, 5x10¹⁰, 1x10¹¹ 또는 그 이상, 또는 그 이상 또는 이하의 단리된 유착성 태반 세포를 포함할 수 있다.

[0553] 5.7.3. 유착성 태반 세포 컨디셔닝된 배지를 포함하는 조성물

[0554] 본원은 또한 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단, 및 부가적으로 컨디셔닝된 배지를 포함하는 조성물의 용도를 제공하고, 여기서 상기 조성물은 종양 저해성이거나, 또는 암 또는 바이러스성 감염의 치료에 효과적이다. 본원에 개시된 바와 같은 유착성 태반 세포를 사용하여 종양 세포 저해성, 항-암 또는 항-바이러스성인 컨디셔닝된 배지, 즉 검출가능한 종양 세포 저해 효과, 항-암 효과 또는 항바이러스 효과를 갖는 세포에 의해 분비되거나 배출된 하나 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생성할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 컨디셔닝된 배지는 세포가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 또는 그 이상 동안 증식된 (즉 배양된) 배지를 포함한다. 다른 실시양태에서, 컨디셔닝된 배지는 그러한 세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 융합, 또는 최대 100% 융합까지 성장한 배지를 포함한다. 이러한 컨디셔닝된 배지를 사용하여 세포, 예를 들어 태반 세포 또는 또 다른 종류의 세포의 별도의 집단의 배양을 지지할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 컨디셔닝된 배지는 단리된 유착성 태반 세포, 예를 들어, 단리된 유착성 태반 줄기 세포 또는 단리된 유착성 태반 다분화능 세포, 및 단리된 유착성 태반 세포 이외의 세포, 예를 들어, 비-태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포가 배양된 배지를 포함한다.

[0555] 이러한 컨디셔닝된 배지는 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 임의의 NK 세포와, 또는 태반 관류액, 또는 태반 관류액 세포와의 임의의 조합과 조합되어 종양 세포 저해성, 항암 또는 항바이러스성인 조성물을 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 부피기준으로 절반 미만으로 컨디셔닝된 배지, 예를 들어 부피기준으로 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 또는 그 미만으로 컨디셔닝된 배지를 포함한다.

[0556] 따라서, 한 실시양태에서, 본원은 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 단리된 유착성 태반 세포의 배양으로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 상기 단리된 유착성 태반 세포는 (a) 기질에 유착되고; (b) CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺이고; 여기서, 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 저해하거나, 또는 항-암 또는 항바이러스성이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 유착성 태반 세포는 유세포 측정기에 의해 검출할 때, CD34⁻, CD10⁺ 및 CD105⁺이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 유착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺,

CD105⁺ 태반 세포는 다분화능 유착성 태반 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골형성 표현형의 세포, 또는 연골발생 표현형의 세포로 분화시키는 포텐셜을 갖는다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 유착성 태반 세포는 부가적으로 CD200⁺이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 유착성 태반 세포는, 유세포 측정기에 의해 검출할 때, 부가적으로 CD90⁺ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ 유착성 태반 세포는, 유세포 측정기에 의해 검출할 때, 부가적으로 CD90⁺ 또는 CD45⁻이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 유착성 태반 세포는, 유세포 측정기에 의해 검출할 때, 부가적으로 CD90⁺ 또는 CD45⁻이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ 유착성 태반 세포는, 유세포 측정기에 의해 검출할 때, 부가적으로 CD90⁺ 및 CD45⁻이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁻ 유착성 태반 세포는, 유세포 측정기에 의해 검출할 때, 부가적으로 CD80⁻ 및 CD86⁻이다.

[0557] 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 단리된 유착성 태반 세포의 배양으로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 상기 단리된 유착성 태반 세포는 (a) 기질에 유착되고; (b) CD200 및 HLA-G를 발현하거나, 또는 CD73, CD105, 및 CD200를 발현하거나, 또는 CD200 및 OCT-4를 발현하거나, 또는 CD73, CD105, 및 HLA-G를 발현하거나, 또는 CD73 및 CD105를 발현하고, 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 상기 집단이 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때, 하나 이상의 배아모양 몸체의 형성을 촉진시키거나, OCT-4를 발현하고, 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단에서 상기 집단이 배아모양 몸체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아모양 몸체의 형성을 촉진시키고; 여기서 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 저해하거나, 또는 항-암 또는 항 바이러스성이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 다수의 상기 단리된 태반 유착성 세포를 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 다수의 비-태반 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 비-태반 세포는 CD34⁺ 세포, 예를 들어, 조혈 전구 세포, 예컨대 말초혈 조혈 전구 세포, 제대혈 조혈 전구 세포, 또는 태반혈 조혈 전구 세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 줄기 세포, 예컨대 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래된 중간엽 줄기 세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 하나 이상의 유형의 성인 세포 또는 세포주일 수 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 항-증식제, 예를 들어 항-MIP-1a 또는 항-MIP-1 β 항체를 포함한다.

[0558] 구체적인 실시양태에서, 상기 개시된 세포 또는 세포 조합 중 하나에 의해 컨디셔닝된 배양 배지는 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 또는 약 5:1의 단리된 유착성 태반 세포 대 종양 세포의 비율로 다수의 종양 세포와 공동 배양된 다수의 단리된 유착성 태반 세포로부터 수득된다. 예를 들어, 컨디셔닝된 배양 배지 또는 상청액은 약 1×10^5 단리된 유착성 태반 세포, 약 1×10^6 단리된 유착성 태반 세포, 약 1×10^7 단리된 유착성 태반 세포, 또는 약 1×10^8 단리된 유착성 태반 세포, 또는 그 이상을 포함하는 배양액으로부터 수득될 수 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 컨디셔닝된 배양 배지 또는 상청액은 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 단리된 유착성 태반 세포 및 약 1×10^5 종양 세포; 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 단리된 유착성 태반 세포 및 약 1×10^6 종양 세포; 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 단리된 유착성 태반 세포 및 약 1×10^7 종양 세포; 또는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 단리된 유착성 태반 세포 및 약 1×10^8 종양 세포를 포함하는 공동-배양액으로부터 수득된다.

[0559] 5.8. 세포의 보존

[0560] 세포, 예를 들어 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단, 또는 조혈 줄기 세포나 전구 세포를 포함하는 태반 관류액 세포는 보존될 수 있으며, 즉, 장기 저장을 가능케 하는 조건 하에 또는 예를 들어 세포자멸 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 보관될 수 있다.

[0561] 태반 관류액은 태반의 적어도 일부, 예를 들어 태반 혈관계에 세포 수집 조성물을 통과시켜 생성될 수 있다. 세포 수집 조성물은 관류액 내 함유된 세포를 보존하는 작용을 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 이러한 태반

세포 수집 조성물은, 관련된 미국 특허 출원 공개 제20070190042호에 기재된 바와 같이 세포자멸 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-수송 퍼플루오로카본을 포함할 수 있으며, 상기 문헌의 지시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0562] 한 실시양태에서, 관류액 또는 태반 세포 집단은 포유동물, 예를 들어 인간의 분만 후 태반으로부터, 상기 관류액 또는 세포 집단을 세포자멸 억제제 및 산소-수송 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물과 근접시켜 수집하며, 여기서 상기 세포자멸 억제제는 태반 세포, 예를 들어 유착성 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다분화능 세포의 집단에서의 세포자멸을 상기 세포자멸 억제제와 접촉 또는 근접하지 않은 세포 집단에 비해 감소시키거나 방지하기에 충분한 양으로 충분한 시간 동안 존재한다. 예를 들어, 태반은 세포 수집 조성물로 관류될 수 있고, 태반 세포, 예를 들어 총 유핵 태반 세포는 이로부터 단리된다. 구체적인 실시양태에서, 세포자멸 억제제는 카스파제 억제제이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 세포자멸 억제제는 JNK 억제제이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 JNK 억제제는 유착성 태반 세포, 예를 들어 유착성 태반 줄기 세포 또는 유착성 태반 다분화능 세포의 분화 또는 증식을 조정하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸 억제제 및 상기 산소-수송 퍼플루오로카본을 별개의 상에서 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸 억제제 및 상기 산소-수송 퍼플루오로카본을 에멀전으로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 유화제, 예를 들어 레시틴을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포자멸 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 태반 세포를 세포 수집 조성물과 근접시킬 때 약 0℃ 내지 약 25℃이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 세포자멸 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 태반 세포를 세포 수집 조성물과 근접시킬 때 약 2℃ 내지 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 근접은 상기 세포 집단의 수송 동안 수행된다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 근접은 상기 세포 집단의 냉동 및 해동 동안 수행된다.

[0563] 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 상기 관류액 및/또는 세포를 세포자멸 억제제 및 장기-보존(organ-preserving) 화합물과 근접시켜 수집 및 보존될 수 있고, 여기서 상기 세포자멸 억제제는 세포의 세포자멸을, 상기 세포자멸 억제제와 접촉 또는 근접하지 않은 관류액 또는 태반 세포에 비해, 감소시키거나 방지하기에 충분한 양으로 충분한 시간 동안 존재한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 장기-보존 화합물은 UW 용액 [미국 특허 제4,798,824호에 기재되고, 또한 비아스판(VIASPAN)TM로서 공지됨; 또한, 문헌 (Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)) 참조] 또는 스테른(Stern) 등의 미국 특허 제5,552,267호에 기재된 용액이다 (상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함됨). 또 다른 실시양태에서, 상기 장기-보존 조성물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, 또는 그의 조합이다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포 수집 조성물은 산소-수송 퍼플루오로카본을 2개의 상으로 또는 에멀전으로서 추가로 포함한다.

[0564] 상기 방법의 또 다른 실시양태에서, 태반 세포를 관류 동안에, 세포자멸 억제제 및 산소-수송 퍼플루오로카본, 장기-보존 화합물, 또는 그의 조합을 포함하는 세포 수집 조성물과 근접시킨다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포를 관류에 의해 수집한 후 상기 세포 수집 화합물과 근접시킨다.

[0565] 전형적으로, 태반 세포 수집, 농축 및 단리 중에 저산소증 및 기계적 응력으로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 방법의 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액 또는 태반 세포 집단을 상기 보존 동안에 수집, 농축 또는 단리 중에 6시간 미만 동안 저산소 조건에 노출시키며, 여기서 저산소 조건은 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소 농도이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액 또는 태반 세포 집단을 상기 보존 동안에 2시간 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출시킨다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 세포 집단을 수집, 농축 또는 단리 중에 1시간 미만 또는 30분 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출시키거나, 또는 저산소 조건에 노출시키지 않는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 세포 집단은 수집, 농축 또는 단리 중에 전단 응력에 노출되지 않는다.

[0566] 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포, 조혈 세포, 예를 들어 CD34⁺ 조혈 줄기 세포; 본원에 개시된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포; 본원에 제공된 단리된 유착성 태반 세포는 예를 들어 소형 용기, 예를 들어 앰플 또는 격막 바이알 내에 동결보존 배지 중에 동결보존될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 세포는 1 mL 당 약 1x10⁴개 내지 5x10⁸개 세포의 농도로 동결보존된다. 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공되는 세포는 1 mL 당 약 1x10⁶개 내지 1.5x10⁷개 세포의 농도로 동결보존된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공되는 세포는 1 mL 당 약 1x10⁴개, 5x10⁴개, 1x10⁵개, 5x10⁵개, 1x10⁶개, 5x10⁶개, 1x10⁷개, 1.5x10⁷개 세포의 농도로 동결보존된다.

[0567] 적합한 동결보존 배지는 통상적인 염수, 예를 들어 성장 배지를 비롯한 배양 배지, 또는 세포 냉동 배지, 예를 들어 시판되는 세포 냉동 배지, 예를 들어 C2695, C2639 또는 C6039 (시그마(Sigma)); 크리오스토르(CryoStor)®CS2, 크리오스토르®CS5 또는 크리오스토르®CS10 (바이오라이프 솔루션즈(BioLife Solutions))를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 실시양태에서, 동결보존 배지는 바람직하게는 DMSO (디메틸설폭시드)를 예를 들어 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 동결보존 배지는 추가의 작용제, 예를 들어 메틸셀룰로오스, 텍스트란, 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민), 트레할로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10% DMSO, 약 25% 내지 75% 텍스트란 및/또는 약 20% 내지 60% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10% DMSO, 약 25% 내지 75% 트레할로스 및/또는 약 20% 내지 60% 인간 HSA를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 텍스트란 및 40% HSA를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 텍스트란 (통상적인 염수 중 10% w/v) 및 40% HSA를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 트레할로스 및 40% HSA를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 트레할로스 (통상적인 염수 중 10% w/v) 및 40% HSA를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 크리오스토르®CS5를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 크리오스토르®CS10을 포함한다.

[0568] 본원에서 제공되는 세포는 임의의 다양한 방법으로 임의의 세포 배양, 증식 또는 분화 단계에서 동결보존될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 세포는 원래의 조직 또는 장기, 예를 들어 태반 관류액 또는 체대혈로부터의 단리 직후에, 또는 상기 요약된 방법의 제1 단계, 제2 단계 또는 제3 단계 동안에 또는 그 이후에 동결보존될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포는 원래의 조직 또는 장기로부터의 단리 후 약 1분, 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 45분 이내에, 또는 약 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 10시간, 12시간, 18시간, 20시간 또는 24시간 이내에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 원래의 조직 또는 장기로부터의 단리 후 1일, 2일 또는 3일 이내에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 상기 기재된 제1 배지에서 배양된 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 동결보존된다. 일부 실시양태에서, 상기 세포는 상기 기재된 바와 같은 제1 배지에서 배양된 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 동결보존되고, 상기 기재된 바와 같이 제2 배지에서 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 동결보존된다. 일부 실시양태에서, NK 세포가 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 제조될 때, 상기 세포는 제1 배지에서 배양된 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 또는 25일 동안; 및/또는 제2 배지에서 배양된 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 또는 25일 동안; 및/또는 제3 배지에서 배양된 후 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 또는 25일 동안 동결보존된다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포는 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 만들어지고, 상기 세포는 제1 배지에서 배양된 후 10일 동안 동결보존되고; 제2 배지에서 배양된 후 4일 동안 동결보존되고; 제3 배지에서 배양된 후 21일 동안 동결보존된다.

[0569] 한 측면에서, 본원은 NK 세포, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단을 동결보존하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은: 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함하는 제1 배지에서 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어 CD34⁺ 줄기 세포 또는 전구 세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계, 후속적으로 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15(IL-15)를 포함하고, Tpo는 결핍된 제2 배지에서 상기 제1 세포 집단을 배양하여 제2 세포 집단을 생성하는 단계, 및 후속적으로 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기 세포 동원제 및 LMWH는 결핍된 제3 배지에서 상기 제2 세포 집단을 배양하여 제3 세포 집단을 생성하는 단계, 및 이어서 NK 세포를 동결보존 배지에서 동결보존하는 단계를 포함하되, 상기 제3 세포 집단은 CD56⁺, CD3⁻, CD16⁻ 또는 CD16⁺, 및 CD94⁺ 또는 CD94⁻인 천연 킬러 세포를 포함하고, 상기 천연 킬러 세포의 70% 이상, 80% 이상이 생존가능한 NK 세포의 생성 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 동결보존 단계는 (1) 세포 현탁 용액을 제조하는 단계; (2) 동결보존 배지를 상기 단계 (1)로부터의 세포 현탁 용액에 첨가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계; (3) 상기 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜서 동

결보존된 샘플을 수득하는 단계; 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80°C 미만에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0570] 본원에서 제공되는 세포는 동결보존 동안에 속도 제어 동결기에서, 예를 들어 1분 당 약 0.1°C , 0.3°C , 0.5°C , 1°C 또는 2°C 로 냉각될 수 있다. 한 실시양태에서, 동결보존 온도는 약 -80°C 내지 약 -180°C , 약 -125°C 내지 약 -140°C 이다. 동결보존된 세포는 사용을 위해 해동시키기 전에 액화 질소로 옮길 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 앰플이 일단 약 -90°C 에 이르게 되면, 이것들을 액체 질소 저장소로 옮긴다. 동결보존된 세포는 약 25°C 내지 약 40°C 의 온도에서, 바람직하게는 약 37°C 의 온도로 해동될 수 있다. 특정 실시양태에서, 동결보존된 세포는 약 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 10시간, 12시간, 18시간, 20시간 또는 24시간 동안, 또는 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 동결보존된 후에 해동된다. 특정 실시양태에서, 동결보존된 세포는 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 24개월, 25개월, 26개월, 27개월 또는 28개월 동안 동결보존된 후에 해동된다. 특정 실시양태에서, 동결보존된 세포는 약 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년 또는 10년 동안 동결보존된 후에 해동된다.

[0571] 적합한 해동 배지는 통상적인 염수, 예를 들어 성장 배지를 비롯한 플라스말라이트 배양 배지, 예를 들어 RPMI 배지를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 해동 배지는 하나 이상의 배지 보충물 (예를 들어, 영양분, 시토카인 및/또는 인자)을 포함한다. 본원에서 제공되는 세포를 해동시키기에 적합한 배지 보충물은 예를 들어 혈청, 예컨대 인간 혈청 AB, 태아 소 혈청 (FBS) 또는 태아 송아지 혈청 (FCS), 비타민, 인간 혈청 알부민 (HSA), 소 혈청 알부민 (BSA), 아미노산 (예를 들어, L-글루타민), 지방산 (예를 들어, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린 (예를 들어, 재조합 인간 인슐린), 트랜스페린 (철 포화 인간 트랜스페린), β -머캅토에탄올, 줄기 세포 인자 (SCF), Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드 (Flt3-L), 시토카인, 예컨대 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15), 트롬보포이에틴 (Tpo) 또는 헤파린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에서 유용한 해동 배지는 RPMI를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20% FBS를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 1%, 2%, 5%, 10%, 15% 또는 20% FBS를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20% HSA를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15% 또는 20% HSA를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 RPMI 및 약 10% FBS를 포함한다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트 및 약 5% HSA를 포함한다.

[0572] 본원에서 제공되는 동결보존 방법은 장기 저장을 허용하도록 또는 예를 들어 세포자멸 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에서 최적화될 수 있다. 한 실시양태에서, 해동후 세포는 예를 들어 자동 세포 계수기 또는 트리판 블루 방법으로 측정할 때 살아있는 세포를 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 초과로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 해동후 세포는 사멸된 세포를 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 해동후 세포는 조기 세포자멸 세포를 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 해동후 세포의 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15% 또는 20%에서는 예를 들어 세포자멸 검정 (예를 들어, TO-PRO3 또는 AnnV/PI 세포자멸 검정 키트)으로 측정할 때 해동된 지 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 후에 세포자멸이 일어난다. 특정 실시양태에서, 해동후 세포는 본원에서 제공되는 방법을 이용하여 배양, 증식 또는 분화된 후 재동결보존된다.

[0573] 5.9. NK 세포를 포함하는 조성물

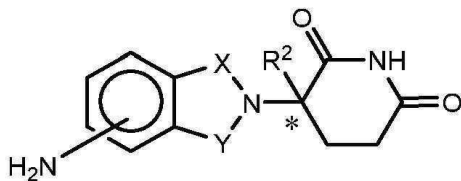
[0574] 5.9.1. 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포

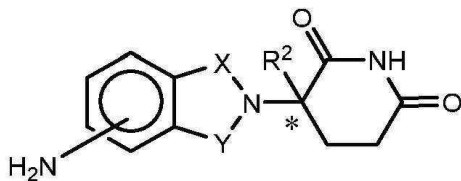
[0575] 몇몇 실시양태에서, 본원은, 예를 들어 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 단리된 NK 세포 집단을 포함하는 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들어, 태반 관류액, 제대혈, 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물에서 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단, 예를 들어 $\text{CD}3^{-}\text{CD}56^{+}$ 세포는 조성물에서 세포의 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상을 차지한다. 특정 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포 집단에서 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 또는 40% 이하가 $\text{CD}3^{-}\text{CD}56^{+}$ 세포이다. 특정 실시양태에서, 상기 $\text{CD}3^{-}\text{CD}56^{+}$ 세포

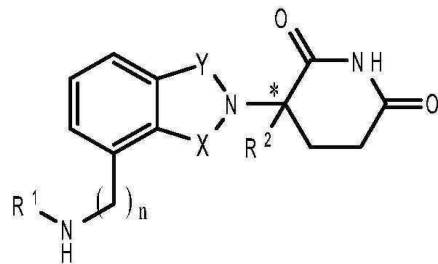
는 CD16⁻이다.

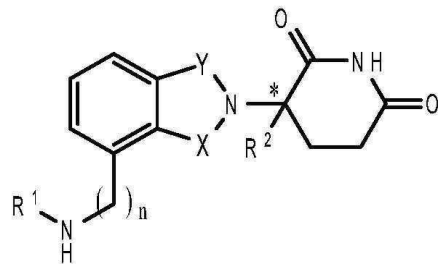
[0576]

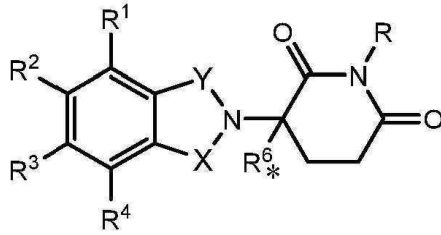
또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물에서 상기 단리된 NK 세포는 단일 개체로부터 획득된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 NK 세포는 2개 이상의 상이한 개체로부터 획득된 NK 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물에서 상기 단리된 NK 세포는 그 NK 세포로 치료하고자 하는 개체와는 상이한 개체로부터 획득된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉하거나 근접하지 않은 동일 개수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 NK 세포보다 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 검출가능하게 발현시키기에 충분한 양으로 충분한 시간 동안, 접촉하거나 근접하였다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 이하에 개시된 화합물이다. 그 전문이 본원에서 참고로서 포함된 미국 특허 제7,498,171호를 참조한다. 특정 실시양태에서, 면역조절 화합물은 아미노-치환된 이소인돌린이다. 한 실시양태에서, 면역조절 화합물은 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로이소인돌-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. 또 다른 실시양태에서, 면역조절 화합물은 포말리도미드, 또는 레날리도미드이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은

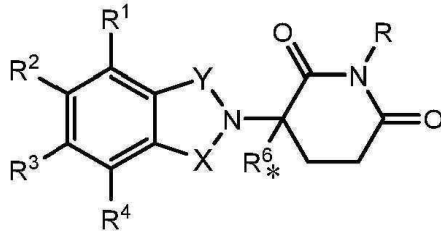


구조식 를 갖는 화합물 (여기서, X 및 Y 중 □ 하나는 C=O이고, X 및 Y 중 다른 하나는 C=O 또는 CH₂이고, R²는 수소 또는 저급 알킬이다), 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 포접체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체의 혼합물이



다. 또 다른 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 구조식 를 갖는 화합물(여기서, X 및 Y 중 하나는 C=O이고 다른 하나는 CH₂ 또는 C=O이고; R¹은 H, (C₁-C₈)알킬, (C₃-C₇)시클로알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, 벤질, 아릴, (C₀-C₄)알킬-(C₁-C₆)헤테로시클로알킬, (C₀-C₄)알킬-(C₂-C₅)헤테로아릴, C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)알킬-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)알킬-OR⁵, (C₁-C₈)알킬-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} 또는 (C₁-C₈)알킬-O(CO)R⁵이고; R²는 H, F, 벤질, (C₁-C₈)알킬, (C₂-C₈)알케닐, 또는 (C₂-C₈)알키닐이고; R³ 및 R^{3'}은 독립적으로 (C₁-C₈)알킬, (C₃-C₇)시클로알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, 벤질, 아릴, (C₀-C₄)알킬-(C₁-C₆)헤테로시클로알킬, (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)헤테로시클로알킬, 또는 (C₀-C₄)알킬-(C₂-C₅)헤테로아릴이고; R⁵는 (C₁-C₈)알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, 벤질, 아릴, 또는 (C₂-C₅)헤테로아릴이고; R⁶는 각각 독립적으로 H, (C₁-C₈)알킬, (C₂-C₈)알케닐, (C₂-C₈)알키닐, 벤질, 아릴, (C₂-C₅)헤테로아릴, 또는 (C₀-C₈)알킬-C(O)OR⁵이거나 또는 R⁶기들은 함께 결합하여 헤테로시클로알킬 기를 형성할 수 있고; n은 0 또는 1이고; *는 카이랄-탄소 중심이다), 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 포접체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체의 혼합물이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은



은 구조식  를 갖는 화합물(여기서, X 및 Y 중 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH₂ 또는 C=O이고; R는 H 또는 CH₂OCOR'이고; (i) R¹, R², R³, 또는 R⁴의 각각은 다른 것과 독립적으로 할로, 탄소 원자수 1 내지 4개의 알킬, 또는 탄소 원자수 1 내지 4개의 알콕시이거나 또는 (ii) R¹, R², R³, 또는 R⁴ 중 하나는 니트로 또는 -NHR⁵이고 R¹, R², R³, 또는 R⁴의 나머지는 수소이고; R⁵는 수소 또는 탄소 원자수 1 내지 8개의 알킬이고; R⁶은 수소, 탄소 원자수 1 내지 8개의 알킬, 벤조, 클로로 또는 플루오로이고; R'는 R⁷-CHR¹⁰-N(R⁸, R⁹)이고; R⁷은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 -(C_nH_{2n})-이고, 여기서 n은 0 내지 4의 값이고; R⁸ 및 R⁹의 각각은 서로 독립적으로 취해져서 수소 또는 탄소 원자수 1 내지 8개의 알킬이거나 또는 R⁸ 및 R⁹는 함께 취해져서 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 또는 -CH₂CH₂X₁CH₂CH₂-이고, 여기서 X₁은 -O-, -S-, 또는 -NH-이고; R¹⁰은 수소, 탄소 원자수 1 내지 8개의 알킬, 또는 페닐이고; *는 카이랄-탄소 중심이다), 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 포접체, 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체의 혼합물이다.

[0577] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 이하 개시되는 항암 화합물 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0578] 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 또 다른 공급원으로부터 또는 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 태반혈 및/또는 제대혈이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물에서 NK 세포 집단은 또 다른 공급원으로부터, 또는 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 비율로 조합된다.

[0579] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 본원에 개시된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단 및 분리된 태반 관류액 또는 분리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 획득된다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 상이한 개체로부터 획득된 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액의 모든 또는 실질적으로 모든 (예를 들어, 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과) 세포는 태아 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모계 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액에서 태아 세포는 상기 관류액에서 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만으로 포함된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 태반 혈관계에 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 획득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 적혈구 제거 처리된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들어 아래에 개시된 면역조절 화합물, 예를 들어 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 아래에 기재된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0580] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 NK 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 획득된다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 상이한 개체로부터 획득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 분리된 태반 관류액 및 분리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 분리된 관류액 및 상기 분리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 획득된다. 태반 관류액을 포함하는 상기

임의의 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 2개 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 상기 임의의 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 2개 이상의 개체로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들어 아래 개시된 하나 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0581] **5.10. 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포의 용도**

[0582] 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포는 암이 있는 개체, 예를 들어 고형 종양 세포 및/또는 혈액암 세포를 갖는 개체, 또는 바이러스성 감염을 갖는 사람들을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있다. 이러한 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 제조된 NK 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 세포/킬로그램 체중 또는 그 이상의 범위이다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 또한 종양 세포의 증식을 저해하는 방법에도 사용될 수 있다.

[0583] **5.10.1. 암이 있는 개체의 치료**

[0584] 한 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 치료 유효량의 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 암, 예를 들어 혈액암 또는 고형 종양이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 개체에서는 천연 킬러 세포가 결핍, 예를 들어 개체의 암에 대해 활성인 NK 세포가 결핍되어 있다. 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포, 예를 들어 치료 유효량의 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 유효량의 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 기재된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "유효량"은, 예를 들어 개체가 앓고 있는 암의 하나 이상의 증상의 감축 가능한 개선, 그의 진행 완화 또는 그의 제거를 일으키는 양이다.

[0585] 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물의 투여는 국소성일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 투여는 비경구적이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 주사, 주입, 정맥(IV) 투여, 대퇴부 내 투여, 또는 종양 내 투여에 의해 대상체에게 투여한다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드를 사용하여 대상체에게 투여한다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 주사에 의해 대상체에게 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 카테터를 통해 대상체에게 투여된다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포의 주사는 국소 주사이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 국소 주사는 고형 종양 (예를 들어, 육종)에 직접 놓는다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 주사기에 의해 대상체에게 주사된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 유도 전달에 의해 대상체에게 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 주사에 의해 대상체에게 투여하는 것은 복강경검사, 내시경검사, 초음파, 컴퓨터 단층촬영술, 자기 공명, 또는 영상의학의 도움을 받는다.

[0586] 구체적인 실시양태에서, 암은 혈액암, 예를 들어 백혈병 또는 림프종이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 암은 급성 백혈병, 예를 들어 급성 T 세포 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수모세포 백혈병, 급성 거핵아구성 백혈병, 전구체 B 급성 림프모구성 백혈병, 전구체 T 급성 림프모구성 백혈병, 버키트 백혈병 (버키트 림프종), 또는 급성 이중표현형 백혈병; 만성 백혈병, 예를 들어 만성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 단핵구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소형 림프구성 림프종, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병; 유모 세포(hairy cell) 림프종; T-세포 전림프구성 백혈병; 또는 림프종, 예를 들어 조직구성 림프종, 림프형질세포성 림프종 (예를 들어, 발렌스트롬 마크로글로불린혈증), 비장 변연대 림프종, 혈장 세포 신생물(예를 들어, 혈장 세포 골수종, 형질세포종, 모노클로날 이뮤노글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 림프절의 변연대 B 세포 림프종 (MALT 림프종), 결절 변연대 B 세포 림프종 (NMZL), 소포 림프종, 맨틀 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma), 중격 (흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, T 세포 대과립 림프구성 백혈병, 공격적(aggressive) NK 세포 백혈병, 성인 T 세포 백혈병/림프종, 림프절외 NK/T 세포 림프종 - 비측 유형, 장질환-유형 T 세포 림프종, 간 비장 T 세포 림프종, 모구성 NK 세포 림프종, 균상식육종 (세자리(Sezary) 증후군), 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프구성증 장애 (예를 들어, 원발성 피부 미분화 대세포 림프종 또는 림프종양 구진증), 혈관면역모구성

T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종 - 상세포형, 미분화 대세포 림프종, 호지킨 림프종 또는 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 암은 다발성 골수종 또는 골수이형성 증후군이다.

[0587] 다른 구체적인 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양, 예를 들어 암종, 예컨대 선암종, 부신피질 암종, 결장 선암종, 결장직장 선암종, 결장직장 암종, 도관 세포 암종, 폐 암종, 갑상선 암종, 비인두 암종, 흑색종 (예를 들어, 악성 흑색종), 비-흑색종 피부 암종, 또는 상세포형의 암종, 인대양 종양, 유조직형성 소원형 세포 종양; 내분비 종양; 유잉(Ewing) 육종; 생식 세포 종양 (예를 들어, 고환암, 난소암, 융모막암종, 내배엽종 종양, 배세포종양(germinoma) 등); 간세포종; 간세포암; 신경모세포종; 비-횡문근육종 연조직 육종; 골육종; 망막모세포종; 횡문근육종; 또는 윌름스 종양이다. 또 다른 실시양태에서, 고형 종양은 췌장암 또는 유방암이다. 다른 실시양태에서, 고형 종양은 청신경초종(acoustic neuroma); 성상세포종 (예를 들어, 등급 I 킬모양세포(pilocytic) 성상세포종, 등급 II 저악성도(low grade) 성상세포종, 등급 III 미분화 성상세포종, 또는 등급 IV 다형성 교모세포종); 척삭종; 두개인두종; 신경교종(예를 들어, 뇌 줄기 신경교종, 뇌실막세포종, 혼합형 신경교종, 시신경교종, 또는 뇌실막하세포종); 교모세포종; 수모세포종; 수막종; 전이성 뇌 종양; 회소돌기신경교종; 과체모세포종; 뇌하수체 종양; 원시신경 외배엽 종양; 또는 슈반세포종이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 전립선암이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 간암이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 폐암이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 신장암이다.

[0588] 특정 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액암 또는 고형 종양이 있는 개체, 예를 들어 천연 킬러 세포가 결핍된 개체는 상기 투여 이전에 골수 이식을 받은 적이 있는 개체이다. 특정 실시양태에서, 골수 이식은 상기 암의 치료법이다. 다른 특정 실시양태에서, 골수 이식은 상기 암 이외의 상태의 치료법이다. 특정 실시양태에서, 상기 개체는 상기 골수 이식에 추가하여 면역억제제를 투여받는다. 특정 실시양태에서, 골수 이식을 받았던 적이 있는 개체는 상기 투여시 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 다른 특정 실시양태에서, 골수 이식을 받았던 적이 있는 개체에게 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 증상이 나타나기 전에 상기 세포를 투여한다.

[0589] 구체적인 특정 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액암이 있는 개체에게 상기 투여 이전에 적어도 1회 용량의 TNF α 억제제, 예를 들어 에타네르셉트(ETANERCEPT)®(엔브렐(Enbrel))를 투여한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 개체에게 상기 암을 진단받은 지 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월 이내에 상기 용량의 TNF α 억제제를 투여한다. 구체적인 실시양태에서, 1회 용량의 TNF α 억제제를 투여받은 개체는 급성 골수성 백혈병을 나타낸다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 1회 용량의 TNF α 억제제를 투여받고 급성 골수성 백혈병을 나타내는 개체는 혈액 세포의 염색체 5 장완(long arm)의 결실을 추가로 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액암이 있는 개체는 필라델피아(Philadelphia) 염색체를 나타낸다.

[0590] 다른 특정 실시양태에서, 상기 개체에서의 암, 예를 들어 혈액암 또는 고형 종양은 하나 이상의 항암 약물에 불응성이다. 구체적인 실시양태에서, 암은 글리벡(GLEEVEC)®(이마티닙 메실레이트)에 불응성이다.

[0591] 특정 실시양태에서, 상기 개체에서의 암, 예를 들어 혈액암은 하나 이상의 항암 약물에 반응하고, 이러한 실시양태에서는 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반-유래 중간 천연 킬러 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 또는 본원에 기재된 NK 세포 및/또는 이것들의 조합물, 및 선택적으로 면역조절 화합물이 보조 치료제로서, 또는 상기 항암 약물과의 조합 요법으로서 부가된다. 다른 특정 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액암이 있는 개체는 하나 이상의 항암 약물로 치료되었고, 상기 투여 이전에 재발되었다. 특정 실시양태에서, 치료된 개체는 불응성 암을 갖는다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 세포를 사용한 암 치료법은 암의 재발로부터 보호한다(예를 들어 방지 또는 지연한다). 한 실시양태에서, 본원에 기재된 암 치료법은 1개월 이상, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개월 이상 동안, 1년 이상 동안, 2년 이상 동안, 3년 이상 동안, 또는 4년 이상 동안 암의 관해를 만들어 낸다.

[0592] 한 실시양태에서, 본원은 (1) 레날리도미드, (2) 멜팔란 및 (3) NK 세포를 다발성 골수종이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서의 다발성 골수종 치료에 효과적인, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 체대혈 NK 세포이거나, 또는 체대혈 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 NK 세포의 3-단계 생성 방법에 의해 생성된 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란 및/또는 NK 세포는 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종이 있는 개체를 치료하는 방법의 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포는, 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 세포 또는 전

구 세포, 예를 들어 CD34⁺ 줄기 세포 또는 전구 세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계에 이어, 상기 제1 세포 집단을 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함하고 Tpo는 결핍된 제2 배지에서 배양하여 제2 세포 집단을 생성하는 단계, 이어서 상기 제2 세포 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기 세포 동원제 및 LMWH는 결핍된 제3 배지에서 배양하여 제3 세포 집단을 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 또한 상기 천연 킬러 세포의 70% 이상 또는 80% 이상이 생존가능한 것인 방법에 의해 생성된다.

[0593] 또 다른 실시양태에서, 본원은 (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 전처리에 의해 임의로 활성화된) 개별 NK 세포를 급성 골수성 백혈병 (AML)이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 NK 세포는 상기 개체에서 AML을 치료하는데 효과적인, 상기 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위하여 본원에 기재된 3-단계 방법에 의해 생성되었다. AML이 있는 개체를 치료하는 방법의 특징의 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다. 특별한 실시양태에서, 상술한 방법에 의해 처리될 AML은 불응성 AML, 진단이 어려운 AML, 또는 아동기 AML을 포함한다. 불응성 AML, 진단이 어려운 AML, 또는 아동기 AML을 치료하기 위하여 NK 세포를 투여하는 당해 분야에 공지된 방법은 상기 목적을 위해 개변될 수 있다; 예를 들어 그 전체가 참조에 의해 본원에 각각 포함되는 문헌(Miller et al., 2005, Blood 105: 3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28: 955-959) 참조. 특정 실시양태에서, 상기 개체는 AML에 대하여 적어도 비-천연 킬러 세포 치료에 실패한 적이 있는 AML을 갖는다. 구체적인 실시양태에서, 상기 개체는 65세 이상이며, 처음으로 관해 상태이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 개체는 상기 천연 킬러 세포를 투여하기 전에 플루다라빈, 시타라빈, 또는 이들 양쪽으로 처리된 적이 있다.

[0594] AML이 있는 개체를 치료하는 방법의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어 CD34⁺ 줄기 세포 또는 전구 세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계, 상기 제1 세포 집단을 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함하고 Tpo는 결핍된 제2 배지에서 배양하여 제2 세포 집단을 생성하는 단계, 이어서 상기 제2 세포 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기 세포 동원제 및 LMWH는 결핍된 제3 배지에서 배양하여 제3 세포 집단을 생성하며, 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 또한 상기 천연 킬러 세포의 70% 이상 또는 80% 이상이 생존가능한 것인 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다.

[0595] 또 다른 실시양태에서, 본원은 치료 유효량의 (1) 레날리도미드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포를 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서의 CLL 치료에 효과적인 것인, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포이거나, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 NK 세포를 생성하기 위한 3-단계 방법에 의해 생성된 것이다. 상기 방법 중의 구체적인 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란, 플루다라빈 및 증식된 NK 세포는 상기 개체에 서로 별도로 투여된다. CLL이 있는 개체를 치료하는 방법의 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포는 줄기 세포 동원제 및 트롬보포이에틴 (Tpo)을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어 CD34⁺ 줄기 세포 또는 전구 세포를 배양하여 제1 세포 집단을 생성하는 단계, 이어서 상기 제1 세포 집단을 줄기 세포 동원제 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함하고 Tpo는 결핍된 제2 배지에서 배양하여 제2 세포 집단을 생성하는 단계, 이어서 상기 제2 세포 집단을 IL-2 및 IL-15를 포함하고 줄기 세포 동원제 및 LMWH는 결핍된 제3 배지에서 배양하여 제3 세포 집단을 생성하며, 여기서 상기 제3 세포 집단은 CD56+, CD3-, CD16- 또는 CD16+, 및 CD94+ 또는 CD94-인 천연 킬러 세포를 포함하고, 또한 상기 천연 킬러 세포의 70% 이상 또는 80% 이상이 생존가능한 것인 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다.

[0596] 5.10.2. 종양 세포의 증식 저해

[0597] 추가로, 본원은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 종양 세포와 접촉시키는, 예를 들어 상기 종양 세포를 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 임의로, 단리된 대만 관류액 또는 단리된 대만 관류액 세포를 종양 세포 및/또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉시킨다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 기재된 면역조절 화

합물, 또는 탈리도미드가 추가로 종양 세포 및/또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉되어, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉되지 않은 동일 유형의 종양 세포에 비해 종양 세포의 증식이 검출 가능하게 감소된다. 임의로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를, 면역조절 화합물과 접촉된 종양 세포 및/또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉시킨다.

[0598]

본원에서 사용된 바와 같이, 특정 실시양태에서, 세포와 관련하여 "접촉시키는"은, 한 실시양태에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 천연 킬러 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단, 및/또는 단리된 조합된 천연 킬러 세포 및 종양 세포 간의 직접적인 물리적, 예를 들어 세포-세포 접촉을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, "접촉시키는"은 동일한 물리적 공간에서의 존재를 포함하며, 예를 들어 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 중간 천연 킬러 세포, 본원에 기재된 천연 킬러 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단, 및/또는 단리된 조합된 천연 킬러 세포는 종양 세포와 동일한 용기 (예를 들어, 배양 디쉬, 멀티웰 플레이트)에 배치된다. 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 태반 중간 천연 킬러 세포, 및 본원에 기재된 천연 킬러 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단, 및 종양 세포를 "접촉시키는"것은, 예를 들어 태반 관류액 또는 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 중간 천연 킬러 세포를 개체, 예를 들어 종양 세포를 포함하는 인간, 예를 들어 암 환자에게 주사 또는 주입함으로써 달성된다. 면역조절 화합물 및/또는 탈리도미드의 맥락에서, "접촉시키는"은 예를 들어 세포 및 면역조절 화합물 및/또는 탈리도미드가 서로 직접적으로 물리적으로 접촉되거나, 또는 동일한 물리적 부피 (예를 들어, 세포 배양 용기 또는 개체) 안에 배치되는 것을 의미한다.

[0599]

구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 혈액암 세포, 예를 들어 백혈병 세포 또는 림프종 세포이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 암은 급성 백혈병, 예를 들어 급성 T 세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포, 급성 전골수세포성 백혈병 세포, 급성 골수모구성 백혈병 세포, 급성 거핵아구성 백혈병 세포, 전구체 B 급성 림프모구성 백혈병 세포, 전구체 T 급성 림프모구성 백혈병 세포, 버키트 백혈병 (버키트 림프종) 세포, 또는 급성 이중표현형 백혈병 세포; 만성 백혈병 세포, 예를 들어 만성 골수성 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 만성 단핵구성 백혈병 세포, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소형 림프구성 림프종 세포, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병 세포; 유모 세포 림프종 세포; T-세포 전림프구성 백혈병 세포; 또는 림프종 세포, 예를 들어 조직구성 림프종 세포, 림프형질세포성 림프종 세포 (예를 들어, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증 세포), 비장 변연대 림프종 세포, 혈장 세포 신생물 세포 (예를 들어, 혈장 세포 골수종 세포, 형질세포종 세포, 모노클로날 이뮤노글로블린 침착 질환 세포 또는 중쇄 질환 세포), 림프절의 변연대 B 세포 림프종 (MALT 림프종) 세포, 결절 변연대 B 세포 림프종 (NMZL) 세포, 소포 림프종 세포, 맨틀 세포 림프종 세포, 미만성 거대 B 세포 림프종 세포, 종격 (흉선) 거대 B 세포 림프종 세포, 혈관내 거대 B 세포 림프종 세포, 원발성 삼출 림프종 세포, T 세포 대과립 림프구성 백혈병 세포, 공격적 NK 세포 백혈병 세포, 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포, 림프절외 NK/T 세포 림프종 - 비측 유형 세포, 장질환-유형 T 세포 림프종 세포, 간비장 T 세포 림프종 세포, 모구성 NK 세포 림프종 세포, 균상식육종 (세자리 증후군), 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프구증식 장애 (예를 들어, 원발성 피부 미분화 대세포 림프종 또는 림프종양 구진증) 세포, 혈관면역모구성 T 세포 림프종 세포, 말초 T 세포 림프종 - 상세포명의 세포, 미분화 대세포 림프종 세포, 호지킨 림프종 세포 또는 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 다발성 골수종 세포 또는 골수이형성 증후군 세포이다.

[0600]

구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 고형 종양 세포, 예를 들어 암종 세포, 예를 들어 선암종 세포, 부신피질암종 세포, 결장 선암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 결장직장 암종 세포, 도관 세포 암종 세포, 폐 암종세포, 갑상선 암종 세포, 비인두 암종 세포, 흑색종 세포 (예를 들어, 악성 흑색종 세포), 비-흑색종 피부 암종세포, 또는 상세포명의 암종 세포; 인대양 종양 세포; 섬유조직형성 소원형 세포 종양 세포; 내분비 종양 세포; 유잉 육종 세포; 생식 세포 종양 세포 (예를 들어, 고환암 세포, 난소암 세포, 용모막암종 세포, 내배엽종 종양세포, 종자세포종 세포 등); 간모세포종 세포; 간세포암 세포; 경모세포종 세포; 비-황문근육종 연조직 육종세포; 골육종 세포; 망막모세포종 세포; 횡문근육종 세포; 또는 윌름스 종양 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 종양 세포는 췌장암 세포 또는 유방암 세포이다. 다른 실시양태에서, 고형 종양 세포는 청신경초종 세포, 성상세포종 세포 (예를 들어, 등급 I 털모양세포 성상세포종 세포, 등급 II 저악성도 성상세포종 세포, 등급 III 미분화 성상세포종 세포, 또는 등급 IV 다형성 교모세포종 세포); 척삭종 세포; 두개인두종 세포; 신경교종 세포 (예를 들어, 뇌 줄기 신경교종 세포, 뇌실막세포종 세포, 혼합형 신경교종 세포, 시신경교종 세포, 또는 뇌실막하세포종 세포); 교모세포종 세포; 수모세포종 세포; 수막종 세포; 전이성 뇌 종양 세포; 희소돌기신경교종 세포; 송과체모세포종 세포; 뇌하수체 종양 세포; 원시신경 외배엽 종양 세포; 또는 슈반세포종 세포이다. 또 다른 실시

양태에서, 종양 세포는 전립선암 세포이다.

[0601] 본원에서 사용된 바와 같은 "치료학적으로 유의한" 및 "치료학적 이점"은 예를 들어 종양 크기의 감소, 종양의 증식 완화 또는 중지, 전이성 질환의 감소 또는 예방; 단위 부피 당 조직 샘플, 예를 들어 혈액 샘플에서의 암 세포 수의 감소, 상기 개체가 가지고 있는 특정 암 또는 종양의 임의의 증상의 임상적 개선, 개체가 가지고 있는 특정 암의 임의의 증상의 완화 또는 상기 증상의 악화 중지 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0602] 5.10.3. NK 세포 및 다른 항암제를 사용한 암의 치료

[0603] 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 사용한 암이 있는 개체의 치료는 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 요법 계획의 부분일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 사용한 암이 있는 개체의 치료는 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 요법을 보충하기 위하여 이용될 수 있다. 이러한 항암제는 당업계에 널리 공지되어 있고 또한 항염증제, 면역조절제, 세포독성제, 암 백신, 화학요법제, HDAC 억제제, 및 siRNA를 포함한다. 암이 있는 개체, 예를 들어 종양 세포가 있는 개체에 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 선택적으로 관류액, 관류액 세포, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 이외의 천연 킬러 세포에 추가하여 투여될 수 있는 구체적인 항암제는 아시비신, 아클라루비신, 아코다졸 히드로클로라이드, 아크로닌, 아도젤레신, 아드리아마이신, 아드루실, 알테스류킨, 알트레타민, 암보마이신, 아메탄트론 아세테이트, 암사크린, 아나스트로졸, 안트라마이신, 아스파라지나제(예를 들어, 에르위니아 크리산(Erwinia chrysan), 에르위나제(Erwinaze)), 아스페를린, 아바스틴 (베바시주맵), 아자시티딘, 아제테파, 아조토마이신, 바티마스타트, 벤조테파, 비칼루타미드, 비산트렌 히드로클로라이드, 비스나파이드 디메실레이트, 비젤레신, 블레오마이신 술페이트, 브레퀴나르 나트륨, 브로피리민, 부술판, 캅티노마이신, 칼루스테론, 카라세마이드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 카루비신 히드로클로라이드, 카르젤레신, 세테핀골, 셀레룩십 (COX-2 억제제), 세루비딘, 클로람부실, 시롤레마이신, 시스플라틴, 클라드리빈, 크리스나톨 메실레이트, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신 히드로클로라이드, 데시타빈, 텍소르마플라틴, 데자구아닌, 데자구아닌 메실레이트, 디아지쿠온, 도세탁셀, 독소루비신, 독소루비신 히드로클로라이드, 드롤록시펜, 드롤록시펜 시트레이트, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 두아조마이신, 에다트렉세이트, 에플로미딘 히드로클로라이드, 엘사미트루신, 엘스파르, 엔로플라틴, 엔프로메이트, 에피프로피딘, 에피루비신 히드로클로라이드, 에르볼로졸, 에소루비신 히드로클로라이드, 에스트라무스틴, 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨, 에타니다졸, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 에토포포스, 에토프린, 파드로졸 히드로클로라이드, 파자라빈, 펜레티나이드, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 플루오로우라실, 플루로시타빈, 포스퀴돈, 포스트리에신 나트륨, 겐시타빈, 겐시타빈 히드로클로라이드, 히드록시우레아, 이다마이신, 이다루비신 히드로클로라이드, 이포스파미드, 일모포신, 이프로플라틴, 이리노테칸, 이리노테칸 히드로클로라이드, 란레오티드 아세테이트, 레트조졸, 류프롤리드 아세테이트, 리아로졸 히드로클로라이드, 로메트렉솔 나트륨, 로무스틴, 로속산트론 히드로클로라이드, 마소프로콜, 메이탄신, 메클로레타민 히드로클로라이드, 메게스트롤 아세테이트, 멜렌게스트롤 아세테이트, 멜팔란, 메노가릴, 머캅토프린, 메토티렉세이트, 메토티렉세이트 나트륨, 메토프린, 메트우레테파, 미딘도미드, 미토카르신, 미토크로민, 미토길린, 미토말신, 미토마이신, 미토스페르, 미토탄, 미톡산트론 히드로클로라이드, 미코페놀산, 노코다졸, 노갈라마이신, 오르마플라틴, 옥시수란, 파클리탁셀, 페가스파르가제, 펠리오마이신, 펜타무스틴, 페플로마이신 술페이트, 퍼포스파미드, 피포브로만, 피포술판, 피록산트론 히드로클로라이드, 플리카마이신, 플로메스탄, 포르피머나트륨, 포르피로마이신, 프레드니무스틴, 프로카르바진 히드로클로라이드, 프롤레우킨, 푸린에톨, 퓨로마이신, 퓨로마이신 히드로클로라이드, 피라조푸린, 로이마트렉스, 리보프린, 사핀골, 사핀골 히드로클로라이드, 세무스틴, 심트라젠, 스파르포세이트 나트륨, 스파르소마이신, 스피로게르마늄 히드로클로라이드, 스피로무스틴, 스피로플라틴, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 솔로페누르, 탈블로이드, 탈리소마이신, 테코갈란 나트륨, 탁소테레, 테가푸르, 텔록산트론 히드로클로라이드, 테모포르핀, 테니포시드, 테록시론, 테스톨락톤, 티아미프린, 티오구아닌, 티오테파, 티아조푸린, 티라파자민, 토포사르, 토레미펜 시트레이트, 트레스톨론 아세테이트, 트렉살, 트리시리빈 포스페이트, 트리메트렉세이트, 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트, 트립토렐린, 튜블로졸 히드로클로라이드, 우라실 머스타드, 우레테파, 바프레오티드, 베르테포르핀, 빈블라스틴 술페이트, 빈크리스틴 술페이트, 빈데신, 빈데신 술페이트, 비네피딘 술페이트, 빈글리시네이트 술페이트, 빈류로신 술페이트, 비노렐빈 타르트레이트, 빈로시딘 술페이트, 빈줄리딘 술페이트, 보로졸, 제니플라틴, 지노스타틴, 및 조루비신 히드로클로라이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0604] 다른 항암 약물은 20-epi-1,25 디히드록시비타민 D3, 5-아자시티딘, 5-에티닐우라실, 아비라테론, 아클라루비신, 아실폴벤, 아테시페놀, 아도젤레신, 알테스류킨, ALL-TK 길항제, 알트레타민, 암바무스틴, 아미

독스, 아미포스틴, 아미노레블린산, 암루비신, 암사크린, 아나그렐리드, 아나스트로졸, 안드로그라폴리드, 혈관 신생 억제제, 길항제 D, 길항제 G, 안타렐릭스, 항-배방화(anti-dorsalizing) 형태형성 단백질-1, 항안드로겐, 전립선 암종, 항에스트로겐, 항네오플라스톤, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 아피디콜린 글리시네이트, 세포자멸 유전자 조절제, 세포자멸 조절인자, 퓨린결여산(apurinic acid), ara-CDP-DL-PTBA, 아르기닌 데아미나제, 아술라크린, 아타메스탄, 아트리무스틴, 악시나스타틴 1, 악시나스타틴 2, 악시나스타틴 3, 아자세트론, 아자톡신, 아자티로신, 바카틴 III 유도제, 발라놀, 바티마스타트, BCR/ABL 길항제, 벤조클로린스, 벤조일스타우로스포르린, 베타 락탐 유도제, 베타-알레틴, 베타클라마이신 B, 베틀린산, bFGF 억제제, 비칼루타미드, 비산트렌, 비스아지리디닐스페르민, 비스나파이드, 비스트라텐 A, 비젤레신, 브레플레이트, 브로피리민, 부도티탄, 부티오닌 술폭시민, 칼시포트리올, 칼포스틴 C, 캄프토사르 (캄프토(Campto)라고도 지칭됨, 이리노테칸) 캄프토테신 유도제, 카페시타빈, 카르복시아미드-아미노-트리아졸, 카르복시아미도트리아졸, CaRest M3, CARN 700, 연골 유래 억제제, 카르젤레신, 카세인 키나제 억제제(ICOS), 카스타노스페르민, CC-122, CC-486, 세크로핀 B, 세트로렐릭스, 클로린스, 클로로퀴녹살린 술폰아미드, 시카프로스트, 시스-포피린, 클라드리빈, 클로미펜 유사체, 클로트리마졸, 콜리스마이신 A, 콜리스마이신 B, 콤브레타스타틴 A4, 콤브레타스타틴 유사체, 코나게닌, 크람베시딘 816, 크리나톨, 크립토파이신 8, 크립토파이신 A 유도제, 쿠라신 A, 시클로펜트안트라퀴논, 시클로플라탐, 시페마이신, 시타라빈 옥포스페이트, 세포용해 인자, 사이토스타틴, 다클릭시맙, 데시타빈, 데히드로디텐민 B, 데슬로렐린, 텍사메타손, 텍시포스파미드, 텍스라죽산, 텍스베라파밀, 디아지쿠온, 디텐민 B, 디독스, 디에틸노르스페르민, 디히드로-5-아자시티딘, 디히드로탁솔, 9-, 디옥사마이신, 디페닐 스피로무스틴, 도세탁셀, 도코사놀, 둘라세트론, 독시플루리딘, 독소루비신, 드롤록시펜, 드로나비놀, 듀오카르마이신 SA, 엡셀렌, 에코무스틴, 에델포신, 에드레콜로맙, 에플로르니틴, 엘레멘, 에미테푸르, 에피루비신, 에프리스테리드, 에스트라무스틴 유사체, 에스트로겐 효능제, 에스트로겐 길항제, 에타니다졸, 에토포시드 포스페이트, 엑세메스탄, 파드로졸, 파자라빈, 펜레티나이드, 필그라스티م, 피나스테라이드, 플라보피리돌, 플레젤라스틴, 플루아스테론, 플루다라빈(예를 들어, 플루다라), 플루오로다우노루니신 히드로클로라이드, 포르페니맥스, 포르메스탄, 포스트리에신, 포테무스틴, 가돌리늄 텍사피린, 질산갈륨, 갈로시타빈, 가니렐릭스, 젤라티나제 억제제, 겐시타빈, 글루타티온 억제제, 헵술팜, 헤레굴린, 핵사메틸렌 비스아세트아미드, 하이페리신, 이반드론산, 이다루비신, 이독시펜, 이드라만톤, 일모포신, 일로마스타트, 이마티닙 (예를 들어, 글리백®), 이미퀴모드, 면역자극제 펩티드, 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제, 인터페론 효능제, 인터페론, 인터류킨, 이오벤구안, 아이오도독소루비신, 이포메아놀, 4-, 이르포락트, 이르소글라딘, 이소벤가졸, 이소호모할리콘드린 B, 이타세트론, 자스플라키놀리드, 카하랄리드 F, 라멜라린-N 트리아세테이트, 란레오티드, 레이나마이신, 레노그라스티م, 렌티난 술페이트, 렘플스타틴, 레트로졸, 백혈병 억제 인자, 백혈구 알파 인터페론, 류프롤리드 + 에스트로겐 +프로게스테론, 류프로렐린, 레바미졸, 리아로졸, 선형 폴리아민 유사체, 친유성 디사카라이드 펩티드, 친유성 백금 화합물, 리소클린아미드 7, 로바플라틴, 롬브리신, 로메트렉솔, 로니다민, 로속산트론, 록소리빈, 루르토테칸, 루테튬 텍사피린, 리소필린, 용균성 펩티드, 마이탄신, 만노스타틴 A, 마리마스타트, 마소프로콜, 마스핀, 매트리리신 억제제, 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제, 메노가릴, 메르바론, 메테렐린, 메티오니나제, 메토클로프라미드, MIF 억제제, 미페프리스톤, 밀테포신, 미리모스틴, 미토구아존, 미톨락톨, 미토마이신 유사체, 미토나파이드, 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린, 미톡산트론, 모파로텐, 몰그라모스틴, 항-EGFR 항체 (예를 들어, 에르비투스(Erbix) (세특시맙)), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체 (예를 들어, 리툭시맙(rituximab)), 항-디시알로강글리오시드(GD2) 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체 3F8 또는 ch14>18), 항-ErbB2 항체 (예를 들어, 헤르셉틴(herceptin)), 인간 옴모생식선자극호르몬, 모노포스포릴 지질 A+마이오박테리움 세포 벽 sk, 모피다몰, 머스타드 항암제, 마이카파옥시드 B, 마이코박테리아 세포 벽 추출물, 마이리아포론, N-아세틸디날린, N-치환된 벤즈아미드, 나파렐린, 나그레스티프, 날록손+펜타조신, 나파빈, 나프테르핀, 나르토그라스티프, 네다플라틴, 네모루비신, 네리드론산, 닐루타미드, 니사마이신, 산화질소 조절제, 니트록시드 항산화제, 니트룰린, 오블리메트센 (게나센스(GENASENSE)®), O⁶-벤질구아닌, 옥트레오티드, 오키세논, 올리고뉴클레오타이드, 오나프리스톤, 온단세트론, 온단세트론, 오라신, 경구 시토키인 유도제, 오르마플라틴, 오사테론, 옥살리플라틴 (예를 들어, 플록사틴(Floxatin)), 옥사우노마이신, 파클리탁셀, 파클리탁셀 유사체, 파클리탁셀 유도제, 팔라우아민, 팔미토일리주신, 파미드론산, 파낙시트리올, 파노미펜, 파라박틴, 파젤립틴, 페가스파르가제, 펠데신, 펜토산 폴리술페이트 나트륨, 펜토스타틴, 펜트로졸, 퍼플루브론, 퍼포스파미드, 페릴릴 알콜, 페나지노마이신, 페닐아세테이트, 포스파타제 억제제, 피시바닐, 필로카르핀 히드로클로라이드, 피라루비신, 피리트렉심, 플라세틴 A, 플라세틴 B, 플라스미노겐 활성화제 억제제, 백금 착체, 백금 화합물, 백금-트리아민 착체, 포르피머 나트륨, 포르피로마이신, 프레드니손, 프로필 비스-아크리돈, 프로스타글란딘 J2, 프로테아솜 억제제, 단백질 A-기계의 면역 조정자, 단백질 키나제 C 억제제, 단백질 키나제 C 억제제, 미세조류, 단백질 티로신 포스파타제 억제제, 퓨린 뉴클레오시

드 포스포릴라제 억제제, 푸르푸린, 피라졸로아크리딘, 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체, raf 길항제, 랄티트렉세드, 라모세트론, ras 파르네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제, ras 억제제, ras-GAP 억제제, 탈메틸화 레텔립틴, 레늄 Re 186 에티드로네이트, 리족신, 리보자임, RII 레틴아미드, 로히투킨, 로무르티드, 로퀴니맥스, 루비기논 B1, 루복실, 사핀글, 사인토펜, SarCNU, 사르코피톨 A, 사르그라모스틴, Sdi 1 모방체, 세무스틴, 세네신스 유래 억제제 1, 센스 올리고뉴클레오타이드, 신호 도입 억제제, 시조피란, 소부족산, 나트륨 보로캡테이트, 나트륨 페닐아세테이트, 솔베롤, 소마토메딘 결합 단백질, 소네르민, 스파르포스산, 스피카마이신 D, 스피로무스틴, 스플레노펜틴, 스폰지스타틴 1, 스쿠알라민, 스티피아미드, 스트로멜리신 억제제, 술피노신, 과활성 혈관작용성 장 펩티드 길항제, 수라디스타, 수라민, 스와인소닌, 탈리무스틴, 타목시펜 메티오다이드, 타우로무스틴, 타자로텐, 테코갈란 나트륨, 테가푸르, 텔루라피릴륨, 텔로머라제 억제제, 테모포르핀, 테니포시드, 테트라클로로테카옥시드, 테트라조민, 탈리블라스틴, 티오코랄린, 트롬보포이에틴, 트롬보포이에틴 모방체, 티말파신, 티모포이에틴 수용체 효능제, 티모트리난, 갑상선 자극 호르몬, 주석 에틸 에티오프루핀, 티라파자민, 티타노센 바이클로라이드, 톱센틴, 토레미펜, 번역 억제제, 트레티노인, 트리아세틸유리딘, 트리시리빈, 트리메트렉세이트, 트림토텔린, 트로피세트론, 투로스테리드, 티로신 키나제 억제제, 티르포스틴, UBC 억제제, 우베니맥스, 비노생식동-유래 성장 억제 인자, 유로키나제 수용체 길항제, 바프레오티드, 바리올린 B, 벡티빅스 (Vectibix) (파니투무맙) 벨라레솔, 베라민, 베르딘스, 베르테포르핀, 비노렐빈, 빈크살틴, 비탁신, 보로졸, 웰코보린(Welcovorin) (류코보린), 크셀로다(Xeloda) (카페시타빈), 자노테론, 제니플라틴, 질라스코르브, 및 지노스타틴 스티말라머를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0605] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 사용한 암이 있는 개체의 치료는 항원-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)에 대한 항암 요법 계획의 부분이다. 한 실시양태에서, ADCC 계획은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합하여 하나 이상의 항체(예를 들어 상기 단락에 기재된 항체)를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 ADCC 방법을 사용하여 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 또는 다른 B-세포 악성종양(림프종 및 백혈병), 신경아종, 흑색종, 유방암, 및 두경부암을 비롯한 일부 유형의 암이 치료될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 구체적인 실시양태에서, ADCC 요법은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합하여 하기 항체 항-EGFR 항체(예를 들어, Erbitux (세록시맙)), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체(예를 들어, 리툭시맙), 항-디시알로강글리오시드(GD2) 항체(예를 들어, 모노클로날 항체 3F8 또는 ch14>18), 또는 항-ErbB2 항체(예를 들어, 헤르셉틴) 중의 하나 이상을 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, ADCC 계획은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합하여 항-CD33 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, ADCC 계획은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합하여 항-CD20 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, ADCC 계획은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합하여 항-CD138 항체를 투여하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, ADCC 계획은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합하여 항-CD32 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0606] 5.10.4. 바이러스성 감염의 치료

[0607] 또 다른 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 치료 유효량의 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 바이러스성 감염이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 개체에서는 천연 킬러 세포, 예를 들어 개체의 바이러스성 감염에 대해 활성인 NK 세포가 결핍되어 있다. 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 투여는 단리된 대만 관류액, 단리된 대만 관류액 세포, 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 대만 천연 킬러 세포, 예를 들어 대만-유래 중간 천연 킬러 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 이들의 조합물 중 하나 이상을 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 구체적인 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 상기 투여 이전에 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된다. 다른 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 투여는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 상기 NK 세포에 추가하여 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 양은 예를 들어 상기 바이러스성 감염의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 그의 진행 완화 또는 그의 제거를 일으키는 양이다. 구체적인 실시양태에서, 바이러스성 감염은 아데노비리대(Adenoviridae), 피코르나비리대(Picornaviridae), 헤르페스비리대(Herpesviridae), 헤파드나비리대(Hepadnaviridae), 플라비비리대(Flaviviridae), 레트로비리대(Retroviridae), 오르토믹소비리대(Orthomyxoviridae), 파라믹소비리대(Paramyxoviridae), 파필로마비리대(Papillomaviridae), 람도비리대(Rhabdoviridae) 또는 토가비리대(Togaviridae) 패밀리의 바이러스에 의한 감염이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 바이러스는 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 콕사키바이러스, A형 간염 바이러스(HAV), 폴리오바이러스, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 단순 포진 유형 1(HSV1), 단순 포진 유형 2(HSV2), 인간 사이토메갈로바이

러스 (CMV), 인간 헤르페스바이러스 유형 8 (HHV8), 대상포진 바이러스 (바리셀라 조스터 바이러스 (VZV) 또는 싱글레스 바이러스), B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV), D형 간염 바이러스 (HDV), E형 간염 바이러스 (HEV), 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스 또는 토고토바이러스), 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 유두종 바이러스, 광견병 바이러스 또는 풍진 바이러스이다.

[0608] 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 바이러스는 아데노바이러스 중 A, 혈청형 12, 18 또는 31; 아데노바이러스 중 B, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35 또는 50; 아데노바이러스 중 C, 혈청형 1, 2, 5 또는 6; 중 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.

[0609] 다른 더욱 구체적인 특정 실시양태에서, 바이러스는 아포이(Apoi) 바이러스 (APOIV), 아로아(Aroa) 바이러스 (AROAV), 배가자(bagaza) 바이러스 (BAGV), 반지(Banzi) 바이러스 (BANV), 부부이(Bouboui) 바이러스 (BOUV), 카시파코어(Cacipacore) 바이러스 (CPCV), 캐리 아일랜드(Carey Island) 바이러스 (CIV), 카우본 릿지(Cowbone Ridge) 바이러스 (CRV), 탕기(Dengue) 바이러스 (DENV), 엣지 힐(Edge Hill) 바이러스 (EHV), 개지트 걸리(Gadgets Gully) 바이러스 (GGYV), 일레우스(Ilheus) 바이러스 (ILHV), 이스라엘 터키 수막뇌척수염 바이러스 (ITV), 일본 뇌염 바이러스 (JEV), 유그라(Jugra) 바이러스 (JUGV), 유티아파(Jutiapa) 바이러스 (JUTV), 카담(kadam) 바이러스 (KADV), 케두구(Kedougou) 바이러스 (KEDV), 코코베라(Kokobera) 바이러스 (KOKV), 쿠탄고(Koutango) 바이러스 (KOUV), 키야사나 삼림병(Kyasanur Forest disease) 바이러스 (KFDV), 랭갓(Langat) 바이러스 (LGTV), 메아반(Meaban) 바이러스 (MEAV), 모독(Modoc) 바이러스 (MODV), 몬타나 마이오티스(Montanamyotitis) 백색질뇌염 바이러스 (MMLV), 머레이 밸리(Murray Valley) 뇌염 바이러스 (MVEV), 엔타야(Ntaya) 바이러스 (NTAV), 옴스크(Omsk) 출혈성 열병 바이러스 (OHFV), 포와산(Powassan) 바이러스 (POWV), 리오 브라보(Rio Bravo) 바이러스 (RBV), 로얄 팜(Royal Farm) 바이러스 (RFV), 사보야(Saboya) 바이러스 (SABV), 세인트 루이스(St. Louis) 뇌염 바이러스 (SLEV), 샬 비야(Sal Vieja) 바이러스 (SVV), 산 페를리타(San Perlita) 바이러스 (SPV), 사우마레즈 리프(Saumarez Reef) 바이러스 (SREV), 세픽(Sepik) 바이러스 (SEPV), 템부수(Tembusu) 바이러스 (TMUV), 진드기-매개 뇌염 바이러스 (TBEV), 틀레니이(Tyuleniy) 바이러스 (TYUV), 우간다 S 바이러스 (UGSV), 우수투(Usutu) 바이러스 (USUV), 베셀스브론(Wesselsbron) 바이러스 (WESSV), 웨스트 나일열(West Nile) 바이러스 (WNV), 야운데(Yaounde) 바이러스 (YAOV), 황열 바이러스 (YFV), 요코스(Yokose) 바이러스 (YOKV) 또는 지카(Zika) 바이러스 (ZIKV)이다.

[0610] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 선택적으로 태반 관류액 및/또는 관류액 세포는 하나 이상의 다른 항바이러스제를 포함하는 항바이러스 요법 계획의 일부로서 바이러스성 감염이 있는 개체에게 투여된다. 바이러스성 감염이 있는 개체에게 투여될 수 있는 구체적인 항바이러스제는 이미퀴모드, 포도필록스, 포도필린, 인터페론 알파 (IFN α), 레티콜로스, 논옥시놀-9, 아시클로비르, 팜시클로비르, 발라시클로비르, 간시클로비르, 시도포비르, 아만타딘, 리만타딘, 리바비린, 자나마비르 및 오셀타우마비르, 프로테아제 억제제, 예컨대 인디나비르, 넬피나비르, 리토나비르 또는 사퀴나비르; 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예컨대 디다노신, 라미부딘, 스타부딘, 잘시타빈 또는 지도부딘; 및 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예컨대 네비라핀 또는 에파비렌즈를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0611] 5.10.5. 투여

[0612] 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단의 수의 결정, 및 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양의 결정은 서로 독립적으로 수행될 수 있다.

[0613] 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물의 투여는 전신성 또는 국소성일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 투여는 비경구적이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것은 주사, 주입, 정맥내 (IV) 투여, 대퇴부 내 투여, 또는 종양 내 투여에 의한다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것은 장치, 매트릭스 또는 스캐폴드를 이용하여 실시한다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것은 주사에 의한다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것은 카테터를 통하여 행한다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포의 주사는 국소 주사이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 국소 주사는 고형 종양 (예를 들어, 육종)에 직접 놓는다. 구체적인 실시양

태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 것은 주사기에 의한 주사이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물은 유도 전달에 의해 대상체에게 투여된다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 NK 세포 집단 또는 그의 약제학적 조성물을 대상체에게 주사에 의해 투여하는 것은 복강경검사, 내시경검사, 초음파, 컴퓨터 단층촬영술, 자기 공명, 또는 영상의학의 도움을 받는다.

[0614] 5.10.5.1. 세포의 투여

[0615] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단은 개체에서 검출가능한 치료학적 이점을 야기하는 임의의 양 또는 수로, 예를 들어 유효량으로 개체에게 사용, 예를 들어 투여되며, 여기서 개체는 바이러스성 감염, 암 또는 종양 세포를 가지며, 예를 들어 종양 세포, 고형 종양 또는 혈액암이 있는 개체, 예를 들어 암 환자이다. 이러한 세포는 상기 개체에게 절대적인 수의 세포로 투여될 수 있으며, 예를 들어 상기 개체에게 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 대략적으로, 최소 또는 최대 약 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개 또는 1×10^{11} 개를 투여할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 상기 개체에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있으며, 예를 들어 상기 개체에게 개체 1 킬로그램 당 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포를 대략적으로, 최소 또는 최대 약 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개 또는 1×10^{11} 개 투여할 수 있다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 선택적으로 태반 관류액 세포 및/또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 이외의 천연 킬러 세포의 수와 상기 개체에서의 종양 세포의 수 (예를 들어, 추정치) 사이의 대략적인 비율에 따라 상기 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 상기 개체에서의 종양 세포의 수에 대해 대략적으로, 최소 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 비율로 상기 개체에게 투여될 수 있다. 이러한 개체에서의 종양 세포의 수는, 예를 들어 개체로부터의 조직 샘플, 예를 들어 혈액 샘플, 생검 등에서 종양 세포의 수를 계수함으로써 추정될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 예를 들어 고형 종양의 경우, 상기 계수는 종양(들)의 영상화와 조합하여 수행되어 대략적인 종양 부피를 획득할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 선택적으로 태반 관류액 세포 및/또는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 이외의 천연 킬러 세포에 추가하여 면역조절 화합물 또는 탈리도미드, 예를 들어 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 개체에게 투여된다.

[0616] 특정 실시양태에서, 예를 들어 개체에서의 종양 세포의 증식 저해 방법, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료 방법, 또는 바이러스성 감염이 있는 개체의 치료 방법, 또는 암이 있는 개체, 예를 들어 종양 세포, 혈액암 또는 고형 종양이 있는 개체의 치료 방법은 종양 세포를 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 하나 이상의 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합물과 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0617] 구체적인 실시양태에서, 예를 들어 천연 킬러 세포가 결핍된 (예를 들어, NK 세포의 수가 결핍되거나, 또는 암, 종양 또는 바이러스성 감염된 세포에 대한 NK 세포의 반응성이 결핍된) 개체의 치료, 또는 암 또는 바이러스성 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해는 상기 종양 세포를 단리된 태반 관류액 세포 또는 태반 관류액으로 보충된, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 1 밀리리터 당 약 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 이상의 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 또는 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 이상의 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 1 밀리리터 당 대략적으로 또는 최소 약 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개 이상의 단리된 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 이상의 단리된 태반 관류액 세포로 보충된다.

다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 1 밀리리터 당 약 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개 이상의 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 또는 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 이상의 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 대략적으로 또는 최소 약 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 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, 550 mL, 600 mL, 650 mL, 700 mL, 750 mL, 800 mL, 850 mL, 900 mL, 950 mL 또는 1000 mL의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

[0618] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료, 암이 있는 개체의 치료, 바이러스성 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해는 종양 세포를 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포는 접착성 태반 세포, 예를 들어 접착성 태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포, 예를 들어 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 세포로 보충된다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 1 밀리리터 당 약 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개 이상의 접착성 태반 줄기 세포, 또는 1×10^4 개, 5×10^4 개, 1×10^5 개, 5×10^5 개, 1×10^6 개, 5×10^6 개, 1×10^7 개, 5×10^7 개, 1×10^8 개, 5×10^8 개, 1×10^9 개, 5×10^9 개, 1×10^{10} 개, 5×10^{10} 개, 1×10^{11} 개 이상의 접착성 태반 세포, 예를 들어 접착성 태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포로 보충된다.

[0619] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료, 암이 있는 개체의 치료, 바이러스성 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포와 조합 사용하여 수행하며, 여기서 상기 세포는 컨디셔닝된 배지, 예를 들어 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 세포로 컨디셔닝된 배지, 예를 들어 관류액 단위 당 또는 10^4 개, 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 개, 10^9 개, 10^{10} 개 또는 10^{11} 개의 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 당 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL, 0.7 mL, 0.8 mL, 0.9 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL의 줄기 세포-컨디셔닝된 배양 배지로 보충된다. 특정 실시양태에서, 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 세포는 미국 특허 제7,468,276호 및 미국 특허출원 공개 제2007/0275362호에 기재된 다분화능 접착성 태반 세포이며, 상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0620] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료, 암이 있는 개체의 치료, 바이러스성 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해에서, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포는 태반 관류액 세포로 보충되고 상기 관류액 세포는 접촉 전에 일정 기간의 시간 동안 인터류킨-2 (IL-2)와 접촉시킨다. 특정 실시양태에서, 상기 접촉 전의 상기 기간의 시간은 대략적으로, 최소 또는 최대 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간, 28시간, 30시간, 32시간, 34시간, 36시간, 38시간, 40시간, 42시간, 44시간, 46시간 또는 48시간이다.

[0621] 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 및 선택적으로 관류액 또는 관류액 세포는 항암 요법의 과정 동안 바이러스성 감염이 있는 개체, 암이 있는 개체 또는 종양 세포가 있는 개체에게 1회 투여될 수도 있고, 또는 상기 요법 동안 여러 회, 예를 들어 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간 또는 23시간마다 1회씩 또는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일마다 1회씩 또는 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 24주, 36주 이상의 주마다 1회씩 다수 회 투여될 수도 있다. 세포 및 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 사용되는 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드, 및 세포 또는 관류액은 개체에게 함께 (예를 들어, 동일 제제로) 또는 대략 동시에 별도로 (예를 들어, 별개의 제제로) 투여될 수도 있고, 또는 별도로, 예를 들어 상이한 투여 스케줄로 또는 하루 중 상이한 시간에 투여될 수도 있다. 유사하게, 세포 및 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물이 사용되는 실시양태에서, 상기 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물,

및 세포 또는 관류액은 개체에게 함께 (예를 들어, 동일 제제로) 또는 대략 동시에 별도로 (예를 들어, 별개의 제제로) 투여될 수도 있고, 또는 별도로, 예를 들어 상이한 투여 스케줄로 또는 하루 중 상이한 시간에 투여될 수도 있다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 및 관류액 또는 관류액 세포는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 관류액 또는 관류액 세포가 과거에 개체에게 투여되었던 적이 있는지의 여부와 상관없이 투여될 수 있다.

6. 키트

본원은 본원에 기재된 하나 이상의 조성물, 예를 들어, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어, 본원에 기재된 상기 3-단계 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 집단을 포함하는 조성물에 의해 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트를 제공한다. 선택적으로 이러한 용기에는 약제 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부에 의해 규정된 형태의 주의사항이 들어 있고, 이러한 주의사항은 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 정부의 승인을 반영한다.

본원에 포함된 키트는 본원에 기재된 방법, 예를 들어 종양 세포의 성장을 저해하는 방법 및/또는 암, 예를 들어 혈액암을 치료하는 방법에 따라 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 NK 세포 또는 그의 조성물을 하나 이상의 용기에 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 본원은 본원에 기재된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단, 또는 그의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

7. 실시예

7.1. 실시예 1: 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 천연 킬러 세포를 생성하는 3-단계 방법

CD34⁺ 세포를 하기 배지 제제 중에서 지시된 일수 동안 배양하고, 세포 분취액을 취하여 세포 수, 세포 생존율, 천연 킬러 세포 분화의 특징규명 및 기능적 평가를 수행하였다.

1 단계 배지: 4.5 U/mL 저분자량 헤파린 (LMWH), 25 ng/mL 재조합 인간 트롬보포이에틴 (TPO), 25 ng/mL 재조합 인간 Flt3L, 27 ng/mL 재조합 인간 줄기 세포 인자 (SCF), 25 ng/mL 재조합 인간 IL-7, 0.05 ng/mL 재조합 인간 IL-6 (500배), 0.25 ng/mL 재조합 인간 과립구 세포군-자극 인자 (G-CSF) (50배), 0.01 ng/mL 재조합 인간 과립구-대식세포 세포군-자극 인자 (GM-CSF) (500배), 0.10% 젠타마이신, 및 1 내지 10 μ m StemRegenin-1 (SR-1)으로 보충된, 90% 줄기 세포 성장 배지 (SCGM) (CellGro®), 10% 인간 혈청-AB.

2 단계 배지: 4.5 U/mL 저분자량 헤파린 (LMWH), 25 ng/mL 재조합 인간 Flt3L, 27 ng/mL 재조합 인간 SCF, 25 ng/mL 재조합 인간 IL-7, 20 ng/mL 재조합 인간 IL-15, 0.05 ng/mL 재조합 인간 IL-6 (500배), 0.25 ng/mL 재조합 인간 G-CSF (50배), 0.01 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF (500배), 0.10% 젠타마이신, 및 1 내지 10 μ m SR1으로 보충된, 90% SCGM, 10% 인간 혈청-AB.

3 단계 배지: 22 ng/mL 재조합 인간 SCF, 1000 U/mL 재조합 인간 IL-2, 20 ng/mL 재조합 인간 IL-7, 20 ng/mL 재조합 인간 IL-15, 0.05 ng/mL 재조합 인간 IL-6 (500배), 0.25 ng/mL 재조합 인간 G-CSF (50배), 0.01 ng/mL 재조합 인간 GM-CSF (500배), 및 0.10% 젠타마이신으로 보충된, 90% STEMMACS™, 10% 인간 혈청-AB, 0.025 mM 2-머캅토에탄올 (55 mM).

세포를 제0일에 1 단계 배지에서 3x10⁴ 세포/mL로 파종하고, CD34⁺ 및 CD45⁺ 계수에 의해 순도 및 7AAD 염색에 의해 생존율에 대해 세포를 시험하였다. 제5일에 세포를 계수하고 1x10⁵ 세포/mL 농도로 1 단계 배지에 파종하였다. 제7일에 세포를 계수하고 1x10⁵ 세포/mL 농도로 1 단계 배지에 파종하였다.

제10일에, 세포를 계수하고 1x10⁵ 세포/mL 농도로 2 단계 배지에 파종하였다. 제12일에, 세포를 계수하고 3x10⁵ 세포/mL 농도로 2 단계 배지에 파종하였다.

다르게는, 14일간에 걸쳐 다음 과정을 이용하였다: 세포를 제0일에 7.5x10³ 세포/mL로 1 단계 배지에 파종하고, CD34⁺ 및 CD45⁺ 계수에 의해 순도 및 7AAD 염색에 의해 생존율에 대해 세포를 시험하였다. 제7일에 세포를 계수하고 3x10⁵ 세포/mL 농도로 1 단계 배지에 파종하였다. 제9일에 세포를 계수하고 3 x 10⁵ 세포/mL 농도로 2 단계 배지에 파종하였다. 제12일에, 세포를 계수하고 3x10⁵ 세포/mL 농도로 2 단계 배지에 파종

하였다.

[0635] 동적 분화를 위해, 제14일에 스피너 플라스크 내에서, 세포를 원심분리시켜 농축물을 얻고, 계수한 다음 5×10^5 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제17일에, 세포를 원심분리시키고, 계수하며 7.5×10^5 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제21일에, 세포를 원심분리시키고, 계수하며, CD56, CD3, CD16, 및 CD94인지 표현형결정(phenotyped)하고, 7AAD 염색에 의해 생존율을 검정하며, 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제24일에, 세포를 계수하고, 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제25일부터 제27일까지, 하루에 5 mL 부피로 3 단계 배지를 첨가하였다. 제28일에, 세포를 계수하고, 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제31일에, 세포를 계수하고 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제32일부터 제34일까지, 하루에 5 mL 부피로 3 단계 배지를 첨가하였다. 제35일에, 세포를 수집하고, 계수하며, 표현형결정하고, 세포독성을 검정하였다.

[0636] 정적 분화를 위해, 제14일에, 세포를 원심분리시켜 농축물을 얻고, 계수하며, 3×10^5 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제17일에, 세포를 계수하고, 3×10^5 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제19일에, 세포를 계수하고, 3×10^5 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제21일에, 세포를 원심분리시키고, 계수하며, CD56, CD3, CD 16, 및 CD94인지 표현형결정하고, 7AAD 염색에 의해 생존율을 검정하며, 5×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제24일에, 세포를 원심분리시키고, 계수하며, 7.5×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제26일에, 세포를 계수하고, 7.5×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제28일에, 세포를 계수하고, 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제31일에, 세포를 원심분리시키고, 계수하며, 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제33일에, 세포를 원심분리시키고, 계수하며, 1×10^6 세포/mL 농도로 3 단계 배지에 파종하였다. 제35일에, 세포를 수집하고, 계수하며, 표현형결정하고, 세포독성을 검정하였다.

[0637] 수집을 위해, 세포를 400xg으로 7분간 휘젓고, 이어서 동일 부피의 플라스말라이트(Plasmalyte) A에서 펠릿을 현탁시켰다. 그 현탁액을 400xg으로 7분간 휘젓고, 생성한 펠릿을 10% HSA (w/v), 60% 플라스말라이트 A (v/v)에 표적 세포 농도로 현탁시켰다. 70 μ m 메쉬를 통하여 세포를 거르고, 최종 용기에 채우고, 세포의 분취물을 생존율, 세포독성, 순도, 및 세포 계수에 대해 시험하고, 나머지 세포는 팩케이징하였다.

[0638] 7.2. 실시예 2: 3-단계 방법으로 SR-1 및 CH223191의 농도의 평가

[0639] 상기 실시예 1에 개략적으로 나타낸 3-단계 방법을 사용하여 1 μ M, 10 μ M, 및 30 μ M 농도에서 스템레게닌-1 (SR-1)을 1 단계 및 2 단계 배지의 성분으로 평가하였다. 상기 3-단계 방법에서 동일 농도의 CH223191도 또한 평가받았다. 10 μ M의 SR-1은 시험된 다른 2개 농도에 비하여 더 높은 세포독성을 야기하였다. SR-1 및 CH223191은 10 μ M 및 1 μ M 농도 모두에서 10:1 (E:T) 비율에서의 K562 세포의 증식 배수, 세포 순도 (CD56+CD3-), 및 세포독성에 대하여 필적하는 효과가 관찰되었다(도 1A-C). SR-1 및 CH223191 모두 CD34의 제7일 및 제14일 발현에 대하여 유사한 효과 및 경향을 나타내었다.

[0640] 7.3. 실시예 3: 3-단계 NK 세포의 특징규명

[0641] 방법

[0642] UCB CD34+ 세포를 실시예 1에 기재한 바와 같이 트롬보포이에틴, SCF, Flt3 리간드, IL-7, IL-15 및 IL-2를 비롯한 시토카인의 존재하에서 35일간 배양하여 3-단계 NK 세포를 생성하였다. 멀티컬러 유세포 측정기를 이용하여 상기 3-단계 NK 세포의 표현형 특징을 결정하였다. 35 NK 서브타입을 이용하는 11개의 6-마커 패널 및 다른 표면마커 (표 1 참조)를 평가하였다.

[0643] 표 1. 3-단계 NK 세포의 표현형 특징을 평가하기 위하여 사용된 35 NK 서브타입 표면 마커를 비롯한 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		

[0644]

[0645]

3-단계 NK 세포를 종양 세포주와 4시간 동안 공동배양함으로써 세포독성 시험을 실시하였다. 또한, 상청액을 수집하고, 분리된 퍼포린, 그랜자임 및 시토카인을 분석하였다.

[0646]

세포용해 활성을 더 조사하기 위하여, 면역 시냅스 형성을 모니터링하였다. NK-민감성 표적 세포 (K562, 만성 골수성 백혈병 세포)를 셀트랙커 바이올렛 (라이프 테크놀로지 제조)으로 라벨링하였다. 동일 부피 및 세포 수의 NK 작동 세포 (1×10^6 /ml) 및 표적 세포를 커버슬립(cover slip) 상의 배양 배지에서 37°C에서 15분간 현탁시킴으로써 NK 세포/표적 세포 콘주게이트를 형성하였다. 이어서 세포를 3% 무-메탄올 포르말데히드를 사용하여 고정화시키고, 투과처리시켰다. F-액틴은 알렉사-488 콘주게이트된 팔로이딘(라이프 테크놀로지 제조)을 사용하여 염색시켰다. F-액틴과 공동염색된 퍼포린, CD2, 또는 LFA-1 항체의 경우, 슬라이드를 일차 항체와 1시간 동안 항온처리한 다음, 알렉사 플루오르 555 염료-콘주게이트된 고트 안티-래빗 2차 항체 (라이프 테크놀로지 제조)를 첨가하였다. 2 HyD 검출기를 구비하는 도립(inverted) DMI 6000 현미경을 갖는 레이카 SP8 리아크로익스 컴팩트 유닛(Leica SP8 LIAchroics Compact Unit)을 이용하여 공초점 현미경관찰을 실시하였다.

[0647]

결과

[0648]

실시에 1에 기재된 배양 방법을 사용하여, 고도로 순수한 CD3-CD56+ NK 세포 집단(88.3% $\pm$ 6.3%)을 통상적으로 달성하였다. 3-단계 NK 세포는 발달상 중간의 면역표현형을 나타내었고, 이는 CD 16 및 KIR의 낮은/부정적 발현으로부터 입증되었다. 3-단계 NK 세포는 천연 세포독성 수용체 (NKp30, NKp46 및 NKp44), c-렉틴 수용체 (CD94, NKG2D 및 CD 161), DNAM-1, 2B4, CD117, 및 CD11a를 발현하였다(도 2). NK 세포 성숙과 세포용해 작용의 조절제인 세포용해 매개체 (퍼포린 및 그랜자임) 및 EOMES가 또한 3-단계 NK 세포에서 검출되었다 (도 2).

[0649]

3-단계 NK 세포는 생체외에서 혈액학적 종양 세포주에 대하여 세포독성을 나타내었다. 10:1의 작동 세포-대-표적 세포 비율에서, 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 비롯한 세포주에 대하여 용해성을 나타내었다(도 3). 3-단계 NK 세포는 또한 높은 퍼포린 생산 및 고도의 과립화를 나타내었다 (도 4). 1:1 비율로 K562 세포와 24시간 동안 공동배양되면, 3-단계 NK 세포는 IFN γ , TNF α 및 GM-CSF를 비롯한 기능적 시토카인을 생산하였다(도 5 및 표 2).

표 2. 3-단계 NK 세포는 K562와 1:1로 24시간 공동배양되면 기능적 시토카인을 생성한다.

	평균 (pg/mL) @ K562 에 대한 E:T 비율 1:1 (n=11)	범위 (Min, Max) (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 작동 세포-대-표적 세포 (E:T) 비율에서, 공초점 현미경관찰에 의하면 종양세포와 접촉할 때 3-단계 NK 세포는 퍼포린의 분비에 의해 F-액틴 면역학적 시냅스를 형성함이 밝혀졌고(도 6a 및 도 6b), 이는 높은 세포용해 활성을 나타낸다.

또한, 항-CD20 (리툰시맙, 10 μ g/mL)의 존재하에서, Daudi 세포 (버키트 림프종, NK 치사에 대해 내성이 있는 림프아구성 세포주)에 대한 3-단계 NK 세포의 세포독성은 7.3% $\pm$ 8.0%에서부터 35.1% $\pm$ 5.7%로 증가하였고, 이는 강력한 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC)을 나타낸다.

7.4. 실시예 4: 3-단계 NK 세포의 추가의 특징규명

도 7에 도시된 바와 같이, 다양한 작동 세포 대 표적 세포 비율에서 CML, AML, 및 다발성 골수종 세포 (K562, HL-60, 및 RPMI8226, 각각)에 대한 3-단계 NK 세포의 세포독성을 검사하였다. K562, HL60, 또는 PMA (포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트) 존재하에서, 탈과립화의 표시인 상이한 수준의 CD107a 발현이 관찰되었다(도 8). 마찬가지로, K562 및 HL60 세포주와 공동배양시, 또는 PMA 자극시 3-단계 NK 세포에 의한 IFN γ 생산에서의 증가가 관찰되었다 (도 9). 40%까지, 24시간 배양한 후 3:1의 작동 세포-대-표적 세포 비율에서 기본적인 AML 표적 존재하에서 특성의 용해가 관찰되었고, NK 치사에 대한 AML 표적의 차등적 감수성이 관찰되었다(도 10). 종양 세포주 및 기본적인 표적에 대하여 뿐만 아니라 3-단계 NK 세포와 기본적인 AML 표적에 대한 공여자 변이에 대하여 다양한 범위의 IFN γ 생산 수준이 관찰되었다(도 11).

3-단계 NK 세포는, 표 3에 나타난 바와 같이, 다양한 종양 세포주 또는 기본적인 AML 표적(AML 1-4) 존재하에서 다양한 세포용해 효소 및 시토카인을 생성하는 것으로 밝혀져 있다.

표 3. 다양한 기본 세포 및 종양 세포에 대하여 1:1의 작동 세포-대-표적 세포 비율에서 평균 시토카인 분비 (pg/1x10⁶ 세포)를 나타낸다.

pg/1E6	NK+ K562	NK+ HL-60	NK+ KGLa	NK+ RPMI	NK+ AML1	NK+ AML2	NK+ AML3	NK+ AML4	NK+ PMA
N=	5	5	2	3	2	2	3	3	5
퍼포린	4292	3430	2787	30	419	596	1462	1662	8466
IFN γ	750	71	6	2	5	148	4	70	26601
그랜자임-A	49192	36560	23867	274	10241	12003	51316	71886	147792
그랜자임-B	8858	6638	1276	2	1015	1699	1071	2123	22606
GMCSF	1920	434	46	4	16	646	50	1311	70340
TNF-A	5272	2110	30	17	46	306	138	554	7564
MCP-1	1739	37004	146	153	131	1173	173	466	3811

요컨대, 3-단계 NK 세포는 다양한 종양 세포주에 대하여 세포용해 활성을 나타내었고, 종양 세포와 접촉할 경우 및 PMA에 의해 활성화될 경우 탈과립화 성능을 나타내었으며, 종양 세포와 공동배양될 경우 또는 PMA에 의해 활성화될 경우 IFN γ , 퍼포린, 그랜자임 A, 및 그랜자임 B를 분비하였다. 또한, 3-단계 NK 세포는 3:1의 작동 세포 대 표적 세포 비율에서 기본적인 AML 표적에 대하여 24시간 세포용해 활성을 나타내었고 또 기본적인 AML 세포에 대하여 IFN γ 를 분비하는 능력을 나타내었다.

[0660] **7.5. 실시예 5: NOD/SCID 감마 뉴 마우스에서 3-단계 NK 세포의 생체내 특징규명**

[0661] 이하의 실험은 NOD/SCID 감마 뉴 (NSG) 마우스가 부술판으로 미리 컨디셔닝되고 재조합 인간 (h) IL-15 단백질을 보충되어 있는 생체내 모델을 이용하여 3-단계 NK 세포를 특징규명하였다. 3-단계 NK 세포는 45일간에 걸쳐 생체내에서의 3-단계 NK 세포의 영속성, 성숙 및 생체분포에 대해 분석되며 또한 3-단계 NK 세포를 수용한 마우스로부터 얻은 말초혈 또는 간조직으로부터 분리된 인간 세포의 생체외 항-종양 활성(종양 세포에 대한)에 대해 분석되었다.

[0662] **실험 디자인.** 16-31 그램 범위의 6 내지 12주령의 웅성 및 자성 NOD/SCID 감마 뉴 (NSG) 마우스를 이들 실험에 사용하였다. NSG 마우스는 30 mg/kg의 부술판으로 미리 컨디셔닝된 지 24시간 후 마우스당 10×10^6 3-단계 NK 세포를 IV 주입으로 투여받았다. 말초혈, 비장, 간, 및 골수를 수집하고, 세포 투여한 지 제1일, 제7일, 제14일, 제21일, 제28일, 및 제45일에 인간 NK 세포 마커의 존재를 분석하였다. 이들 조직에서의 인간 NK 세포는 인간 (CD45⁺) NK 세포 (CD56⁺ CD3⁻)에 대한 NK 성숙 마커(CD16 또는 KIR)의 표면 발현 분석을 포함하는 유세포 측정기에 의해 정량하였다. NK 세포 절대 수는 전혈 세포 계수로부터의 림프구 수로 곱해진 말초혈 중에서의 NK 세포의 빈도로부터 추정하였다. 3-단계 NK 세포를 투여받은 풀링된 동물 조직으로부터 분리된 인간 세포의 항-종양 활성은 K562 및 MA9.3Ras 종양 세포에 대한 세포군 억제 분석을 이용하여 검사하였다.

[0663] **결과.** 전반적으로, 데이터는 3-단계 NK 세포의 생존율과 순도가 높음을 나타내었다. 도 12에 도시된 바와 같이, 3-단계 NK 세포는 말초혈, 골수, 비장 및 간에서 검출되었고, 생체내 영속성은 NSG 마우스 모델에서 양자 면역 전달(adoptive transfer) 이후 2주에 최고를 나타내었다. 말초혈, 비장, 간, 및 골수에서 검출된 3-단계 NK 세포는 인간 IL-15의 존재하에서 NK 성숙 마커 CD 16 (도 13) 및 KIR (도 14)의 발현을 나타내었다. 마우스의 풀링된 말초혈로부터 분리된 인간 세포는, 3-단계 NK 세포가 제14일에 (생체내 키메라형성에서의 피크 동안) K562 (도 15) 및 MA9.3 Ras (도 16)에 대하여 강한 항-종양 활성을 나타냄을 증명하였다. 풀링된 마우스 간으로부터 분리된 인간 세포는 또한 MA9.3Ras 종양 세포에 대한 항-종양 활성을 나타내었지만, 그러한 활성은 풀링된 말초혈로부터 분리된 NK 세포로부터 관찰된 것보다는 낮았다. 전반적으로, 투여받은 마우스로부터 분리된 인간 세포의 생체외 기능성이 밝혀졌다.

[0664] **7.6. 실시예 6: AML에 대한 치료로서 3-단계 NK 세포의 투여**

[0665] AML이 있는 개체. 3-단계 NK 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 투여에 적합한 수로 생성하였다. 본원에 기재된 투여 방식에 의해 3-단계 NK 세포를 개체에 투여하였다. 투여 후 AML에 대해 개체를 다시 평가하였다.

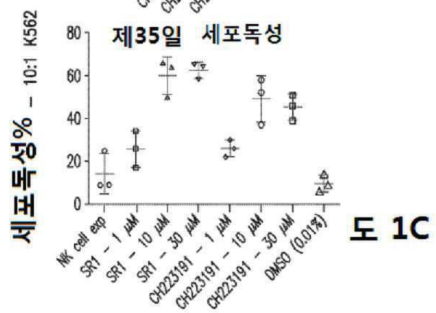
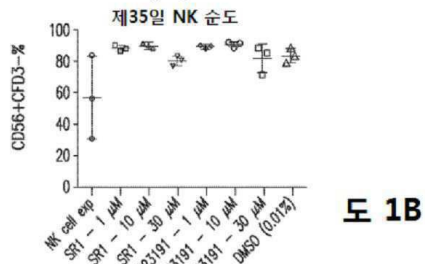
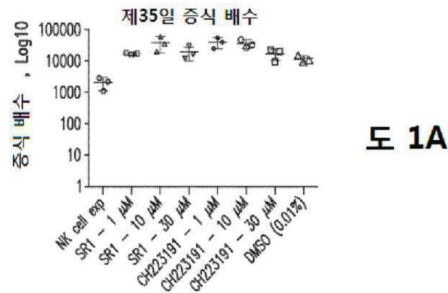
[0666] **등가물:**

[0667] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 실시양태로 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 당업자에게는 본원에 기재된 것 이외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재 및 첨부된 도면으로부터 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

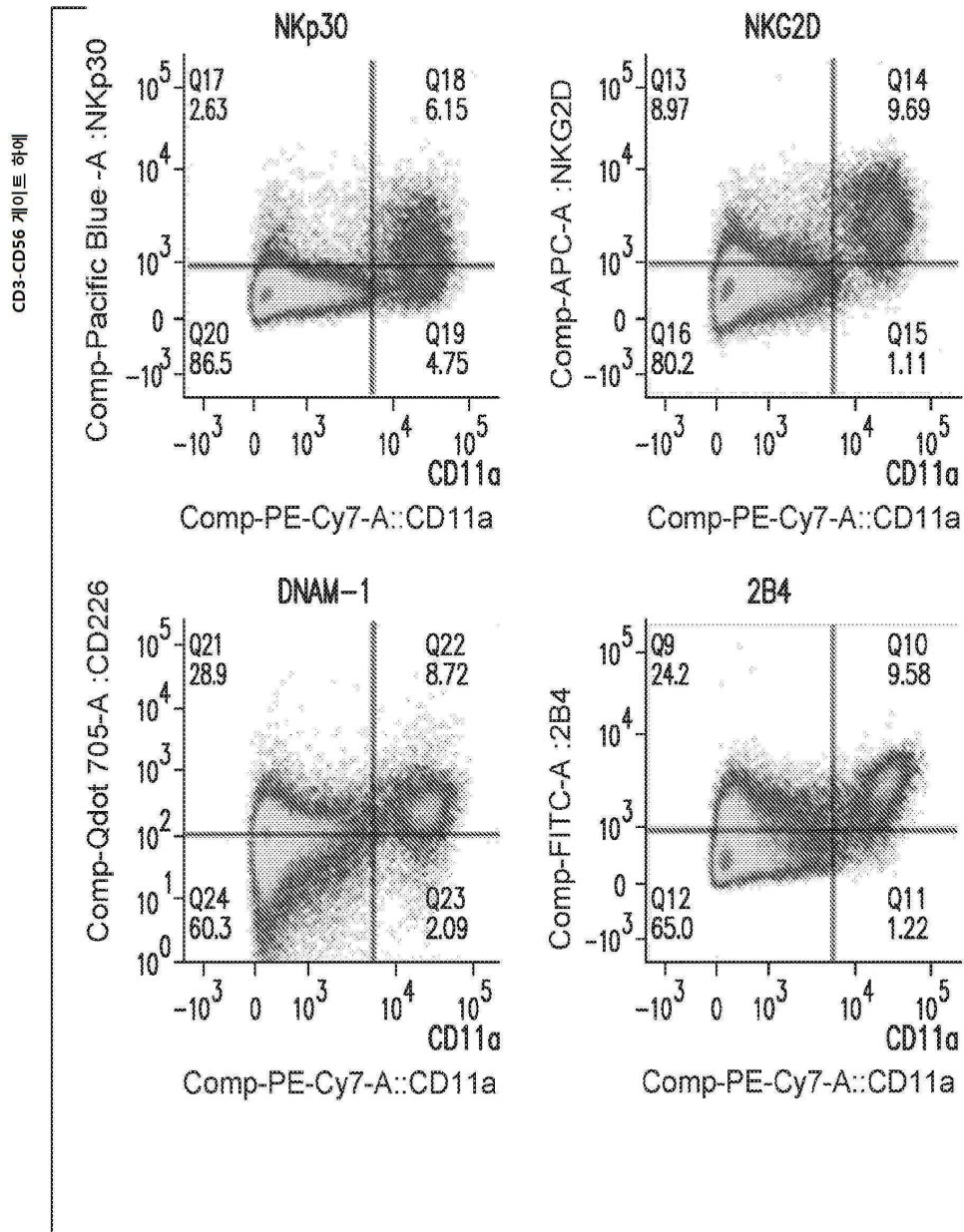
[0668] 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참고로 본원에 포함되며 어떠한 목적을 위해서든지 개개의 간행물, 특허 또는 특허 출원 각각이 어떠한 목적을 위해서든지 그 전문이 참고로 포함된다고 구체적이고 개별적으로 언급되는 것과 동일한 정도로 본원에 포함된다. 임의의 간행물의 인용은 출원일 전의 그의 개시내용에 대한 것이고, 이는 본 발명이 선행 발명이라는 이유로 이러한 간행물을 선행하는 것이 아님을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

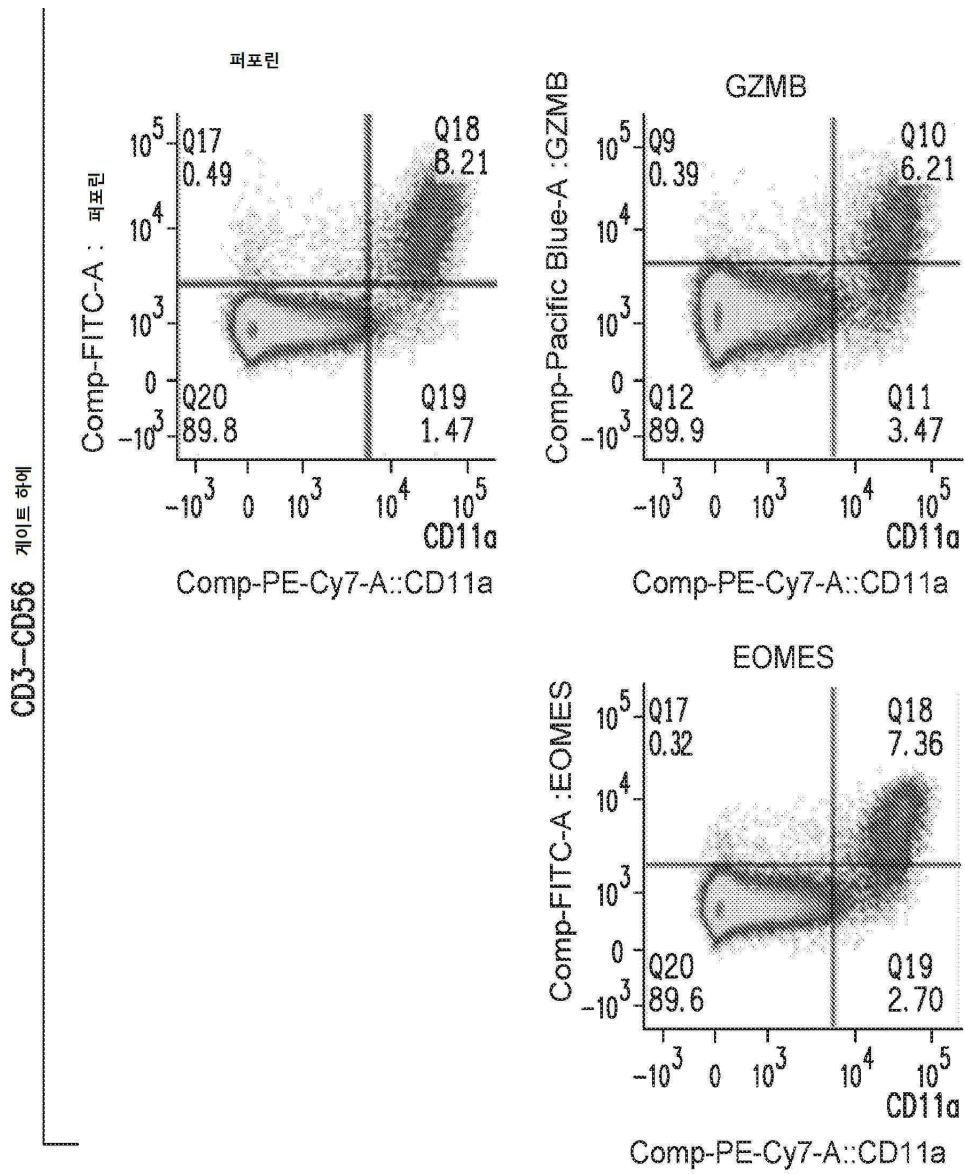
도면1



도면2

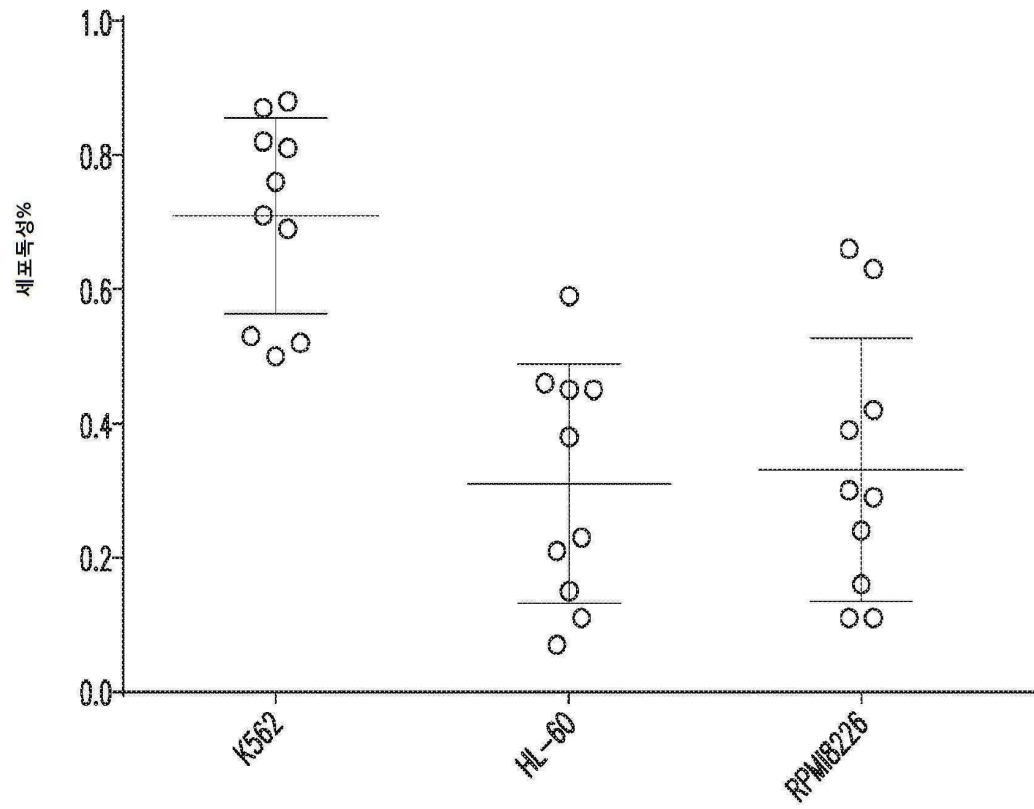


도면2a



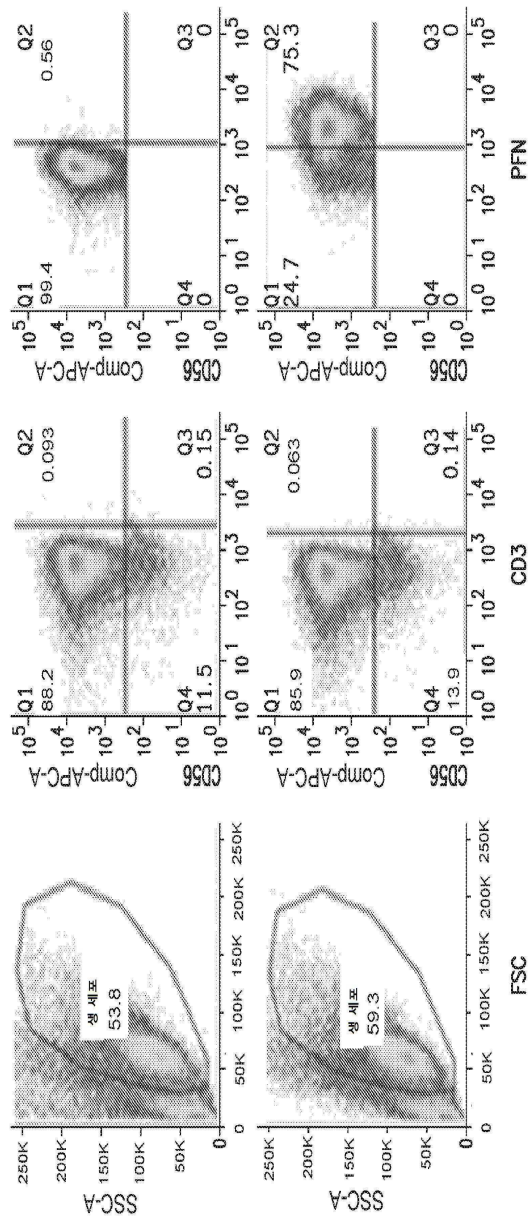
도면3

10:1 (n=10)에서 종양 세포주에 대한 D35 세포독성

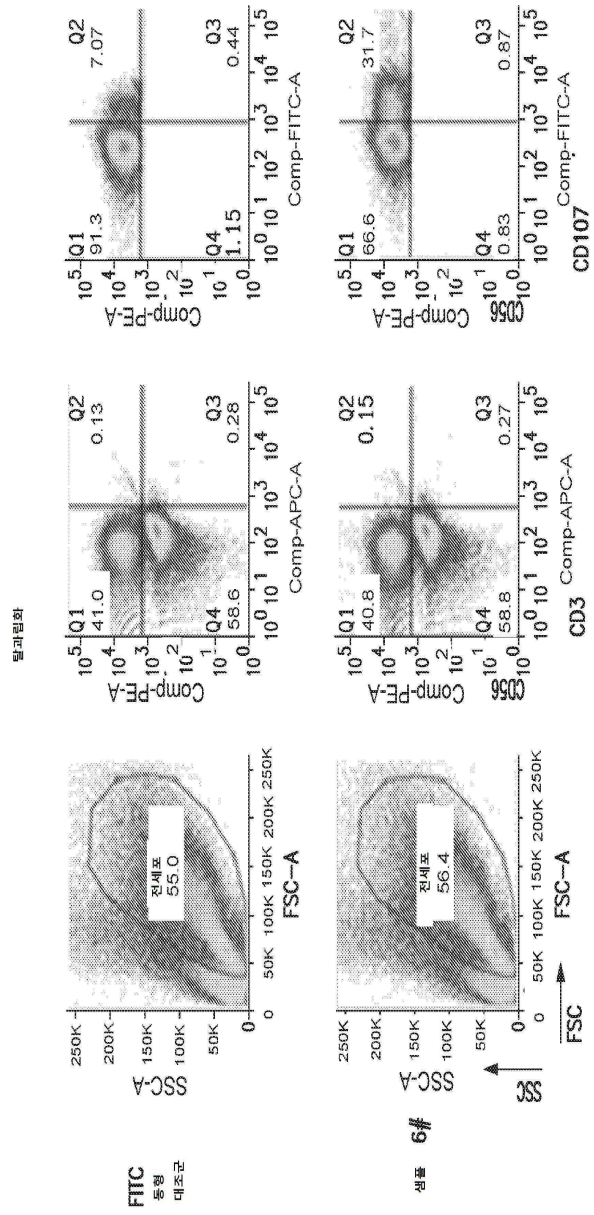


도면4

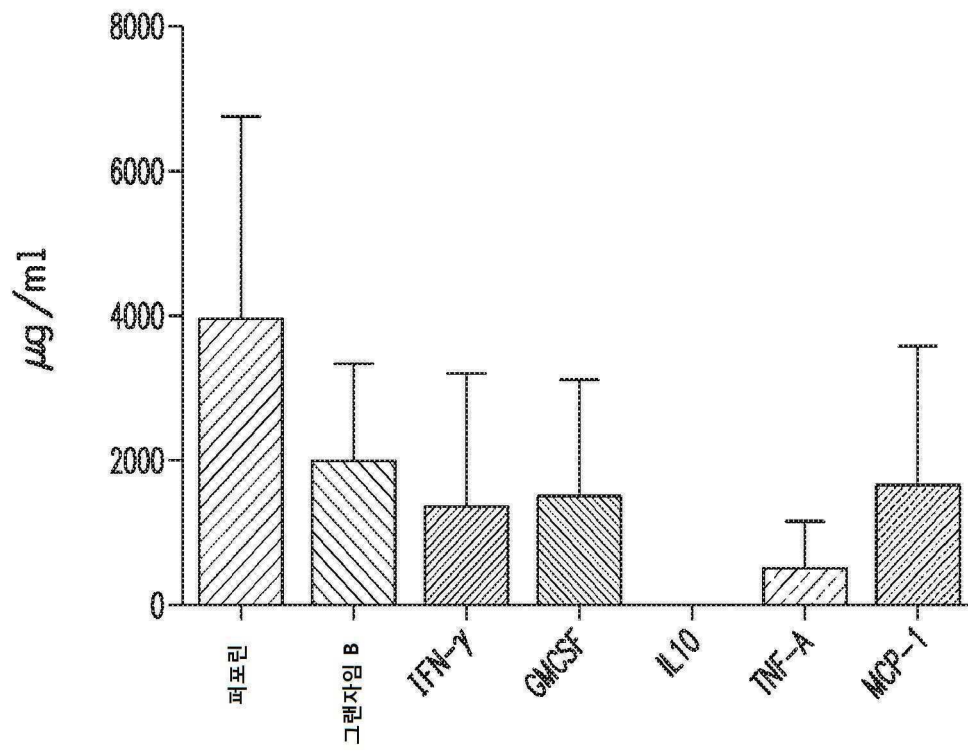
세포간 퍼포린 생성



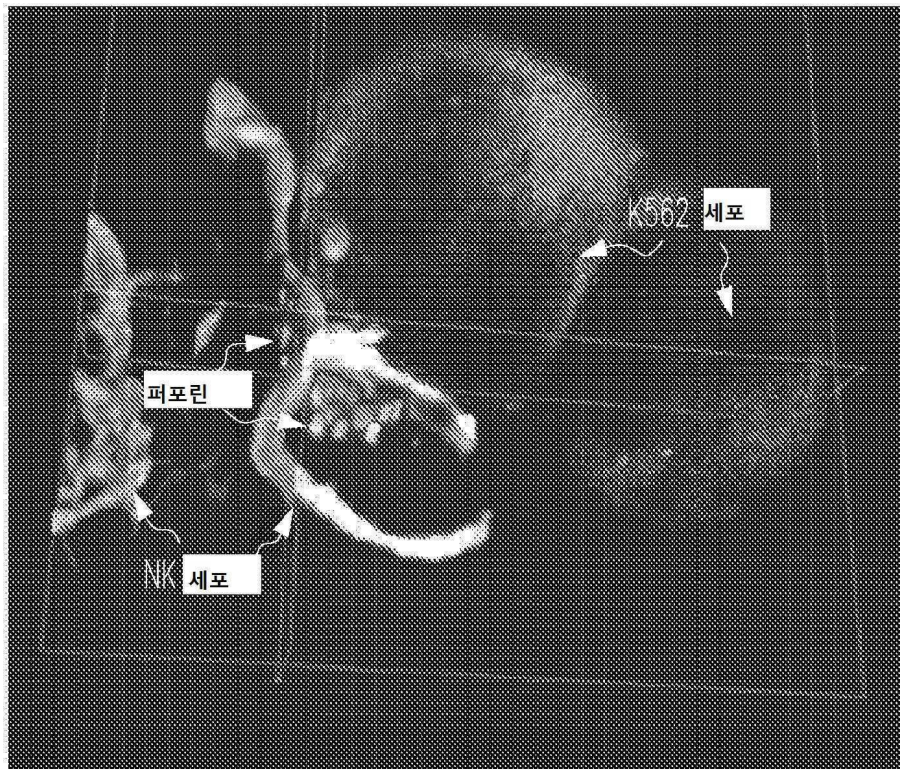
도면4a



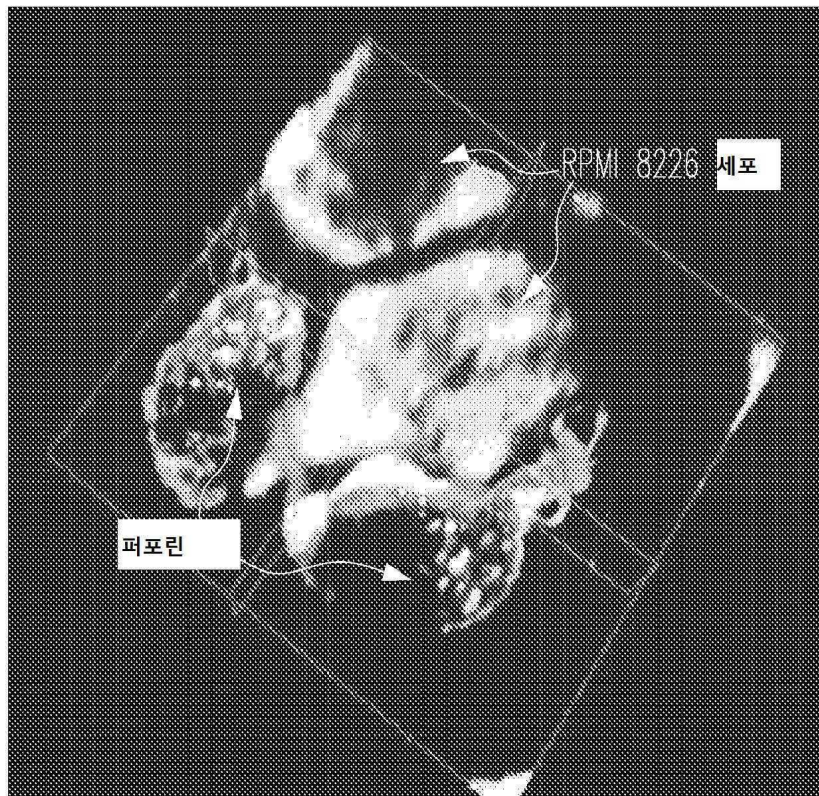
도면5



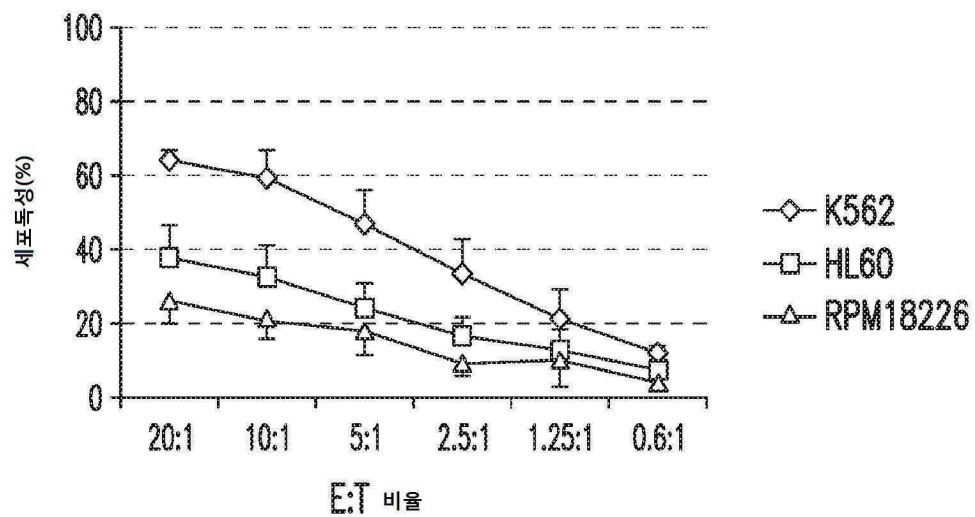
도면6a



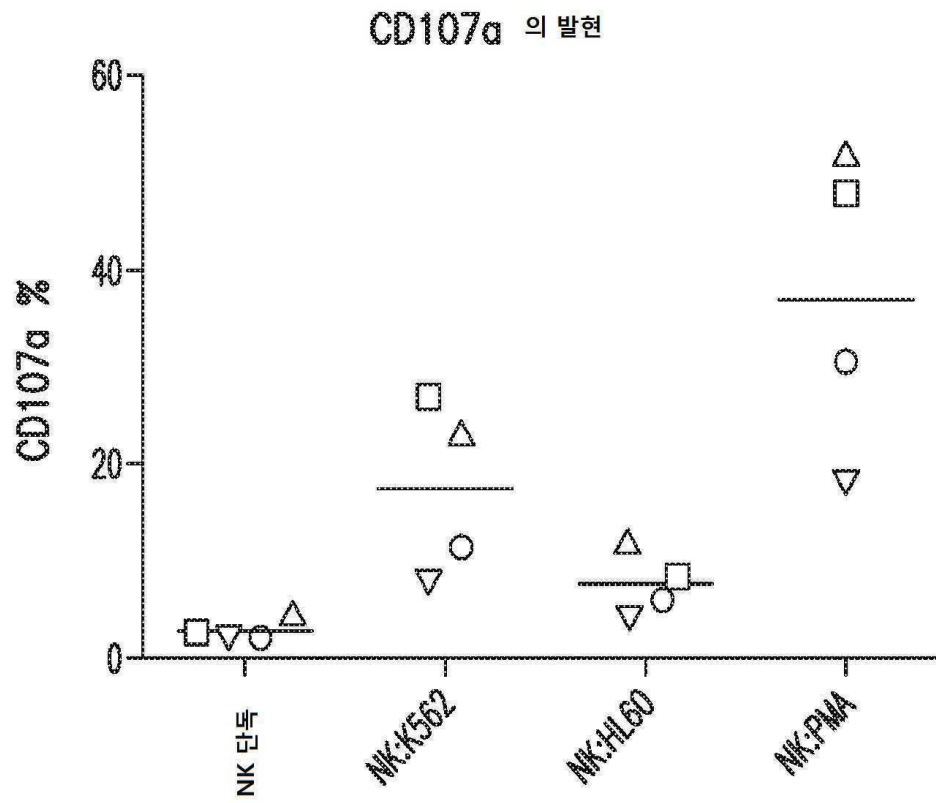
도면6b



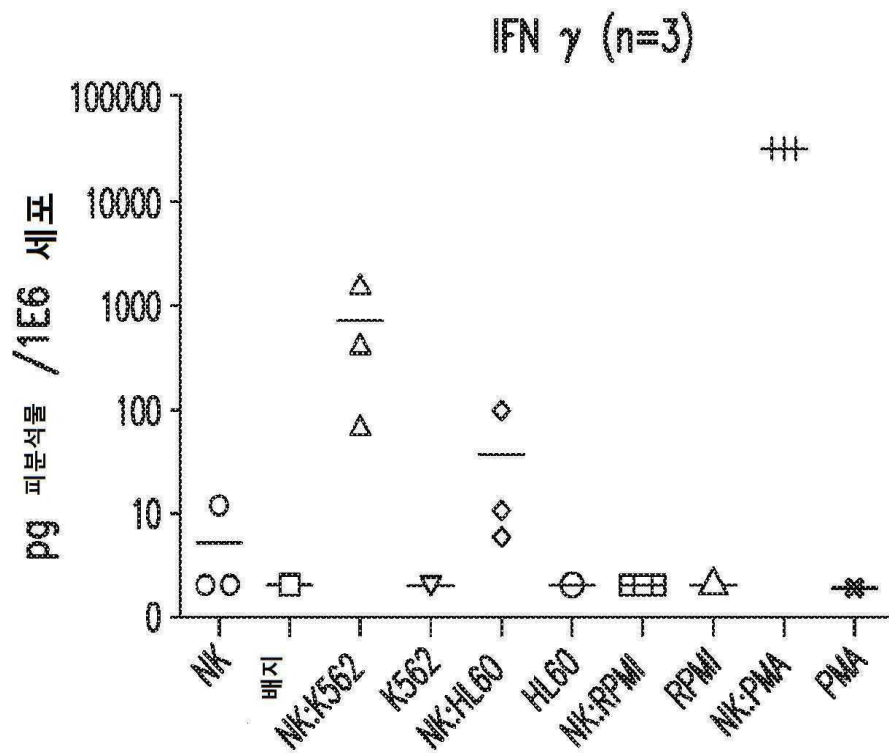
도면7



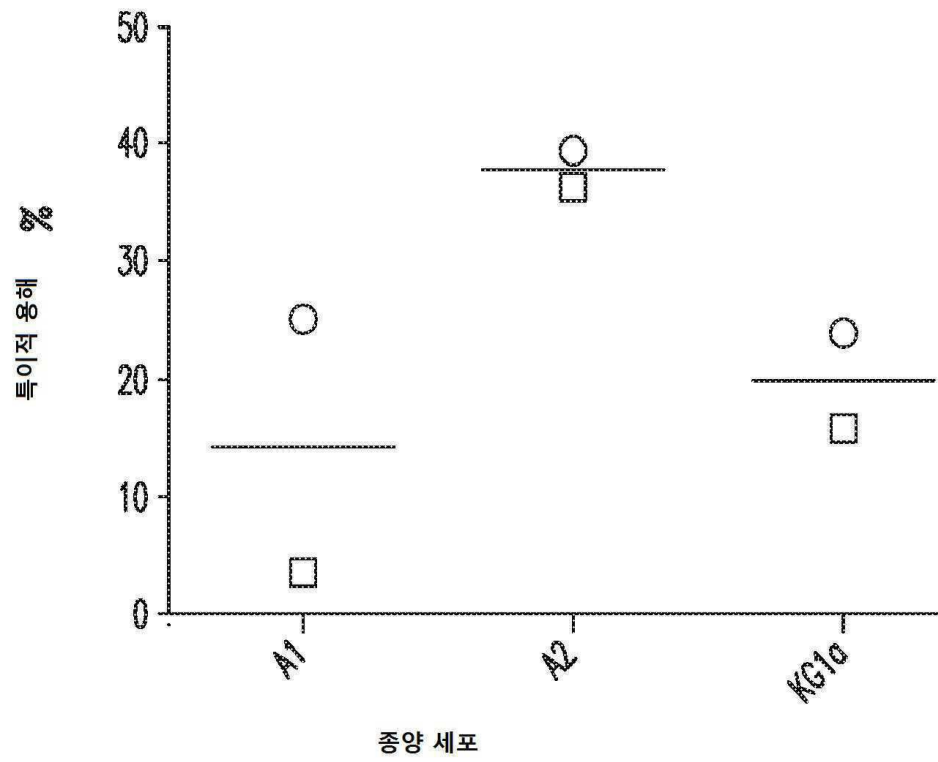
도면8



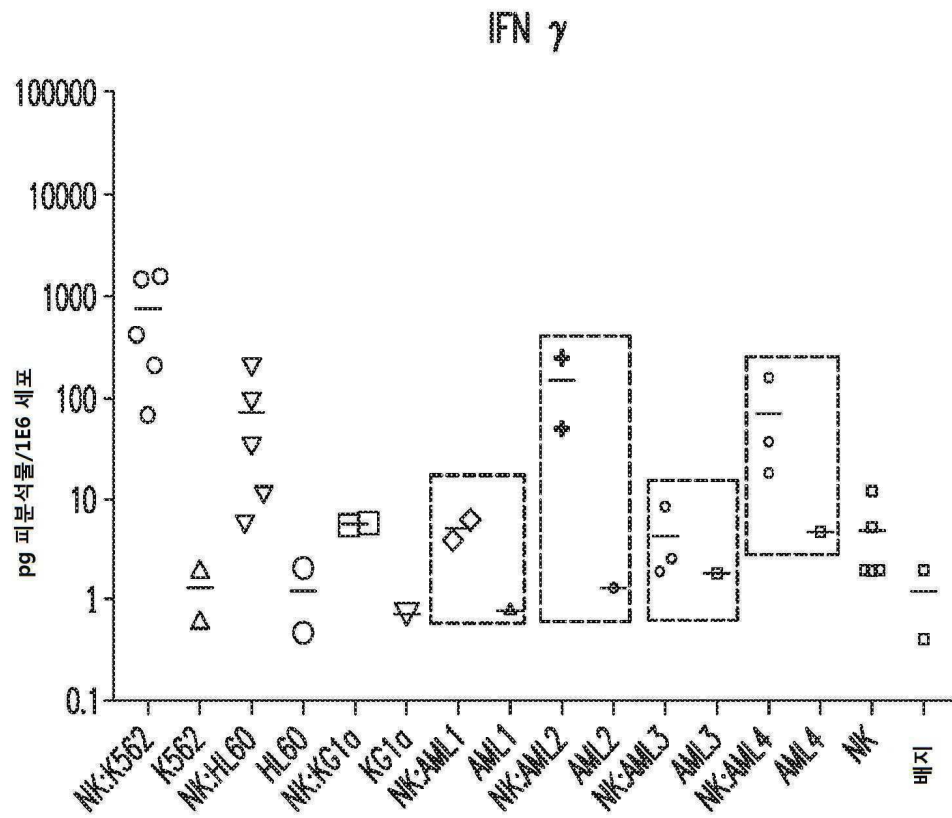
도면9



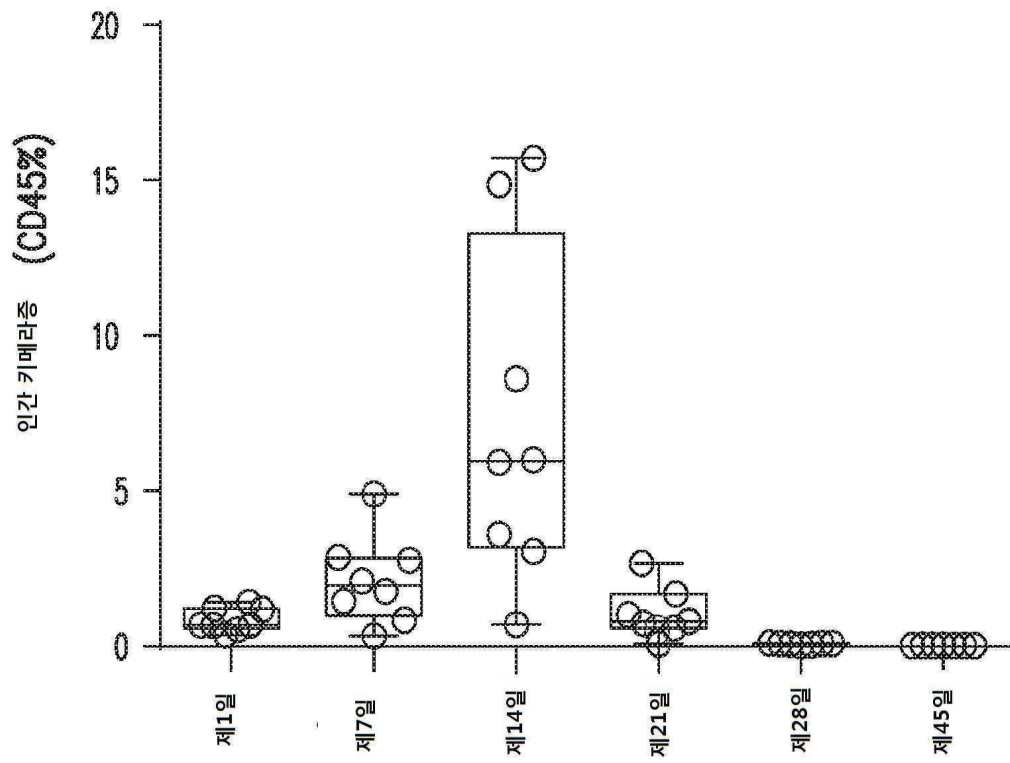
도면10



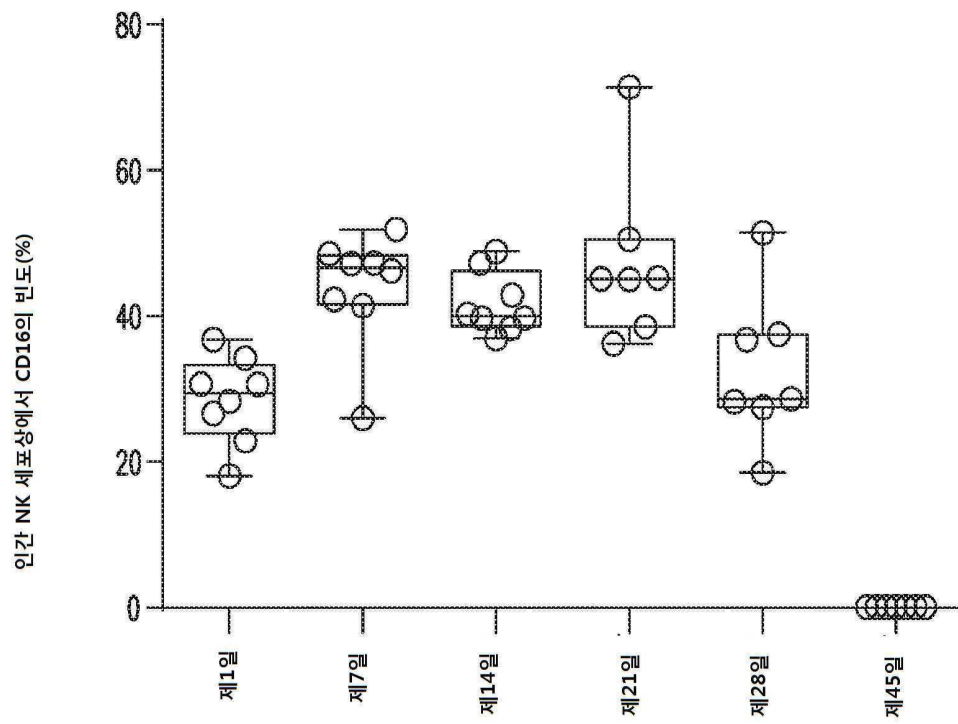
도면11



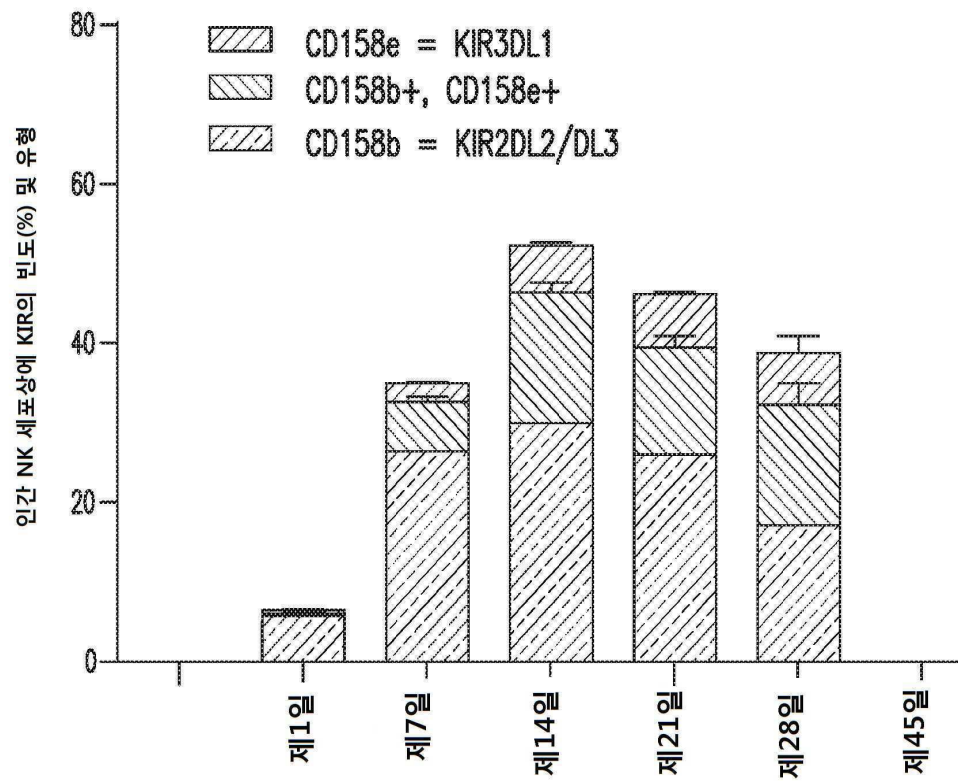
도면12



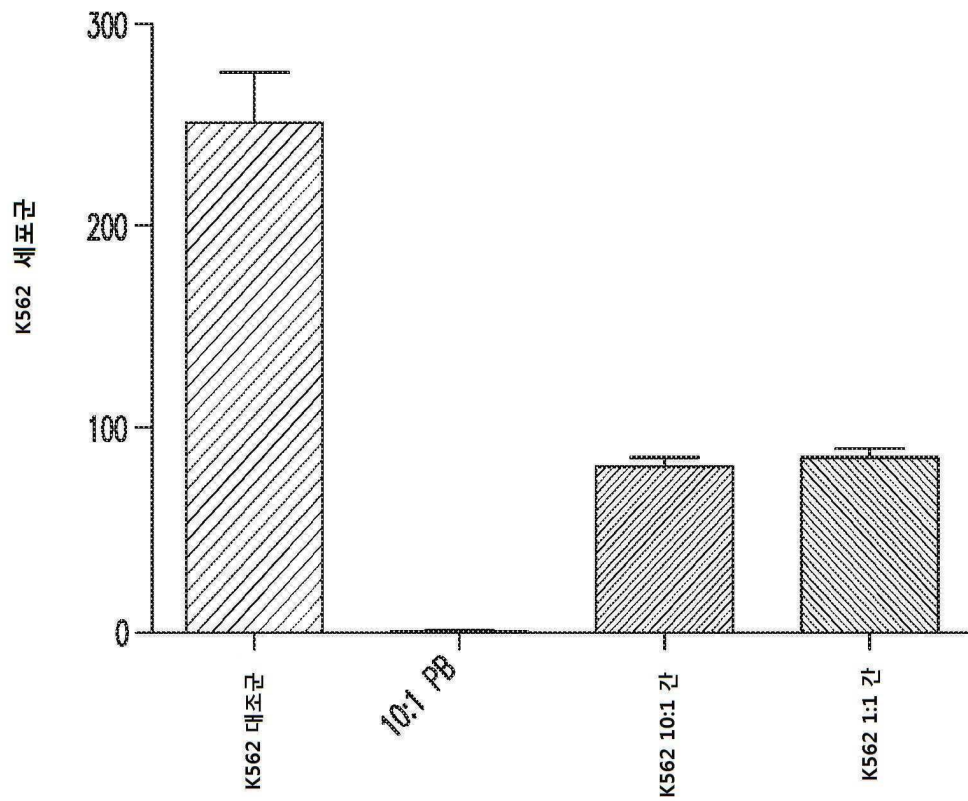
도면13



도면14



도면15



도면16

