(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0088336
(43) 공개일자 2015년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/50 (2015.01) *A61K 35/12* (2015.01)
A61K 38/03 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/50 (2013.01)
A61K 35/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7019757(분할)
(22) 출원일자(국제) 2008년09월29일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2010-7009228
원출원일자(국제) 2008년09월29일
심사청구일자 2013년09월27일
(85) 번역문제출일자 2015년07월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/011251
(87) 국제공개번호 WO 2009/045360
국제공개일자 2009년04월09일
(30) 우선권주장
60/995,763 2007년09월28일 미국(US)
61/090,555 2008년08월20일 미국(US)

(71) 출원인
안트로제네시스 코포레이션
미국 07059 뉴저지주 워렌 파우더 혼 드라이브 7
(72) 발명자
창, 샤오쿠이
미국 07039 뉴저지주 리빙스톤 마운트헤븐 드라이브 10
보스키나리안-버스, 바네사 에이.
미국 07940 뉴저지주 메디슨 넘버1 그린우드 에비뉴 57
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 양영환

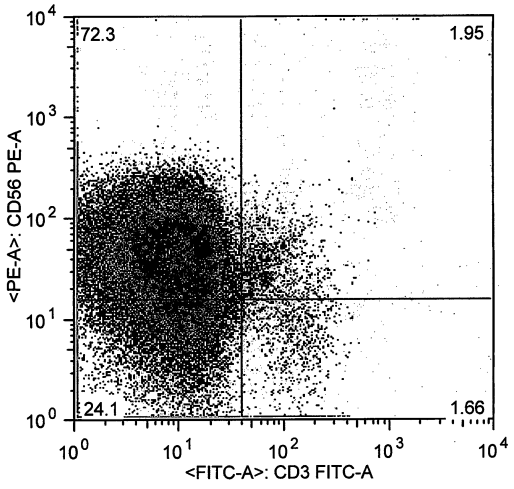
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **인간 태반 관류액 및 인간 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포를 사용한 종양 억제 방법**

(57) 요 약

태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및 태반-유래 중간체 천연 킬러 (PINK) 세포, 및 그의 조합물을 본원에서 제공한다. 또한, 상기 물질을 포함하는 조성물, 및 종양 세포, 암 세포 등의 성장 또는 증식을 억제하고 종양 세포를 가진 개체를 치료하기 위해 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포, 및 그의 조합물을 사용하는 방법을 본원에서 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 조성물은 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 38/03 (2013.01)
(72) 발명자
캉, 린
미국 08820 뉴저지주 에디슨 팀버 오크스 로드 1106
패들리야, 니라브 딜립
미국 07076 뉴저지주 스카치 플레인스 컨트리 클럽 레인 212
헤이다란, 모하매드 에이.
미국 07928 뉴저지주 차탐 오르몬트 로드 88
팔, 아자이
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 레반 코트 1
제이틀린, 앤드류
미국 07920 뉴저지주 소머셋 바스킹 릿지 리버사이드 드라이브 29

명 세 서

청구범위

청구항 1

종양 세포의 증식 억제하기 위한, 인간 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포(total nucleated cell)인 인간 태반 관류액 세포의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 그 개시 내용 전부가 본원에 참고로 포함되는, 2008년 9월 28일에 출원된 미국 가출원 60/995,763 및 2008년 8월 21일에 출원된 미국 가출원 61/090,555를 기초로 한 우선권을 주장한다.

[0002] 종양 세포를 태반 관류액 (perfusate), 태반 관류액-유래 세포, 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 천연 킬러 (natural killer) 세포, 및/또는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 천연 킬러 세포와 제대혈로부터의 천연 킬러 세포를 포함하는 조합된 천연 킬러 세포와 접촉시킴으로써, 종양 세포의 성장 또는 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다. 또한, 태반, 예를 들어 태반 관류액, 예를 들어 인간 태반 관류액으로부터 천연 킬러 세포의 특유한 집단을 생산하는 방법을 본원에서 제공한다. 종양 세포의 증식을 억제하기 위해 태반 관류액 및 그로부터의 천연 킬러 세포를 사용하는 방법을 또한 본원에서 제공한다.

배 경 기 술

[0003] 태반 관류액은 태반 혈관계를 통한 관류 용액의 통과에 의해 얻어진 태반 세포들의 수집물, 혈관계로부터, 태반의 모체 표면으로부터 또는 둘 모두로부터 관류 유체의 수집물을 포함한다. 포유동물 태반을 관류시키는 방법은 예를 들어 미국 특허 7,045,146 및 미국 특허 7,255,879에 기재되어 있다. 관류에 의해 얻어진 태반 세포의 집단은 불균질하여, 조혈 ($CD34^{+}$) 세포, 유핵 세포, 예를 들어 과립구, 단핵구 및 대식세포, 적은 비율 (1% 미만)의 조직 배양 기질-부착 태반 줄기 세포, 및 천연 킬러 세포를 포함한다. 지금까지 아무도 종양 세포 증식의 억제에서 태반 관류액, 또는 관류액으로부터의 태반 세포 집단의 사용을 설명하지 않았다.

[0004] 천연 킬러 (NK) 세포는 선천 면역계의 주성분을 구성하는 세포독성 림프구이다. NK 세포는 T-세포 항원 수용체 (TCR), CD3 또는 표면 면역글로불린 (Ig) B 세포 수용체를 발현하지 않지만, 인간에서 대체로 표면 마커 CD16 ($Fc\gamma RIII$) 및 CD56을 발현한다. NK 세포는 세포독성이고; 그들의 세포질 내의 작은 과립은 특수한 단백질, 예를 들어 퍼포린 (perforin), 및 그랜자임 (granzyme)으로 알려진 프로테아제를 함유한다. 사멸이 예정된 세포에 근접하게 방출되면, 퍼포린은 표적 세포의 세포막에 공극을 형성하고, 그를 통해 그랜자임 및 연관 분자가 들어갈 수 있어서 세포자멸 (apoptosis)을 유도한다. 그랜자임의 일종인 그랜자임 B (그랜자임 2 및 세포독성 T-림프구-연관 세린 에스테라제 1로도 공지됨)는 세포-매개 면역 반응에서 표적 세포 세포자멸의 신속한 유도를 위해 중요한 세린 프로테아제이다.

[0005] NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 시토킨에 반응하여 활성화된다. 활성화된 NK 세포는 림포킨 활성화된 킬러 (LAK) 세포로 칭해진다. NK 세포는 세포의 세포독성 활성을 제어하는 2가지 종류의 표면 수용체, 즉, "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"를 갖는다.

[0006] 다른 활성 중에서, NK 세포는 종양의 숙주 거부에서 일정 역할을 한다. 암 세포는 클래스 I MHC 발현이 감소되거나 없으므로, NK 세포의 표적이 될 수 있다. 축적된 임상 데이타는 PBMC 또는 골수로부터 단리된 인간 NK 세포의 일배수체 일치성 (haploidentical) 이식이 검출가능한 이식편 대 숙주병 (GVHD)을 갖지 않으면서 강력한 항-백혈병 효과를 매개함을 제안한다 ([Ruggeri et al., Science 295: 2097-2100 (2002)] 참조). 천연 킬러 세포는 주조직적합성 복합체 (MHC) 단백질이 결여되거나 감소된 수준을 나타내는 세포에 의해 활성화될 수 있다. 활성화된 및 팽창된 NK 세포 및 LAK 세포는 진행암을 가진 환자의 생체외 요법 및 생체내 치료 모두에서 사용되어 왔고, 골수 관련 질병, 예를 들어 백혈병; 유방암; 및 특정 종류의 림프종에 대해 일부 성공하였다. LAK 세포 치료에서는 환자에게 먼저 IL-2를 투여한 후 백혈구 분리 반출술 (leukopheresis)을 시행한 다음, IL-2의 존재 하에 수일 동안 수거된 자가 혈액 세포의 생체외 인큐베이션 및 배양을 요구한다. 요법을 완료하기

위해 LAK 세포는 비교적 고용량의 IL-2와 함께 재주입되어야 한다. 상기 청정 (purging) 치료는 고가이고, 심각한 부작용을 일으킬 수 있다. 이들은 체액 저류, 폐 부종, 혈압 강하 및 고열을 포함한다.

[0007] 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포의 치사에 있어서 NK 세포의 유리한 특성에도 불구하고, 주로 배양 및 팽창 동안 그들의 종양-표적화 및 종양치사 능력의 유지가 어렵기 때문에 이들은 작업과 면역요법에 대한 적용이 어려운 상태이다. 따라서, 당업계에서는 즉시 공급하기 위한 천연 킬러 세포가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 종양 세포 증식을 억제하기 위한 태반 관류액; 태반 관류액으로부터의 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포; 태반 관류액 세포와 제대혈 세포의 조합물; 및/또는 태반으로부터의 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 천연 킬러 세포 또는 태반 조직의 소화에 의해 얻어진 천연 킬러 세포의 용도를 본원에서 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 한 측면에서, 종양 세포 또는 종양 세포들의 집단을 인간 태반 관류액과 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 종양 세포들의 집단의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다. 상기 방법의 특정 실시태양에서, 종양 세포는 혈액 암 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 종양 세포는 혈액 암 세포들이다. 다른 특정 실시태양에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 종양 세포는 고형 종양 세포들이다. 다른 실시태양에서, 종양 세포는 원발성 관상 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종 (CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 폐암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 결직장 암종 세포, 또는 결직장 선암종 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 시험관 내에서 일어난다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 생체 내에서 일어난다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 생체 내 접촉은 인체 내에서 일어난다.

[0010] 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 태반 혈관계를 통해, 예를 들어 오직 태반 혈관계만을 통해 통과된 관류액이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 태반 혈관계를 통해 통과되고 태반의 모체면 (maternal face)으로부터 수집되었다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 내의 모든 또는 실질적으로 모든 (예를 들어 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과의) 세포가 태아 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 태반 관류액은 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 내의 태아 세포는 상기 관류액 내의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통한 0.9% NaCl 용액의 통과에 의해 얻어진다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 관류액은 다수의 적혈구를 제거하기 위해 처리되었다.

[0011] 다른 측면에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 다수의 태반 관류액 세포들과 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 태반 관류액 세포는 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포이거나 그를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포는 적어도 한 종류의 세포를 제거하기 위해 처리되었다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 시험관 내에서 일어난다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 생체 내에서 일어난다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 생체 내 접촉은 포유동물, 예를 들어 인체 내에서 일어난다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 적어도 한 종류의 세포, 예를 들어 $CD56^+$ 세포를 농축시키도록 처리되었다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 $CD56^+$ 태반 세포이다. 보다 특정한 실시태양에서, $CD56^+$ 세포는 $CD56^+CD16^-$ 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포 또는 태반 조직의 기계적인 또는 효소적 파괴에 의해 얻은 태반 세포로부터 얻어진 태반 중간체 천연 킬러 (PINK) 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 $CD56^+$ 세포는 CD56-컨쥬게이팅된 마이크로비드에 의해 선택된다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 $CD56^+$ 세포는 동등한 수의 $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포보다 NKG2D, NKp46 또는 CD94의 검출가능하게 더 낮은 발현을 보이는 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, PINK 세포는 $CD3^-$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포 내의 적어도 50%의 세포는 상기 $CD56^+$ 세포이다. 보다 특정한 실시태양에서, $CD56^+$ 세포는 상기 태반 관류액 세포의 적어도 50%이고, 종양 세포

는 원발성 관상 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종 (CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 폐암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 결직장 암종 세포 또는 결직장 선암종 세포이다. 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 시험관 내의 접촉이다. 다른 실시태양에서, 상기 접촉은 생체 내, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 인체 내의 접촉이다.

[0012] 다른 측면에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 태반으로부터의 다수의 천연 킬러 세포들, 예를 들어 PINK 세포들과 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 태반으로부터의 천연 킬러 세포는 태반 관류액으로부터 얻어진 천연 킬러 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 천연 킬러 세포는 태반 조직의 물리적 파괴 및/또는 효소에 의한 소화에 의해 얻어진 천연 킬러 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 천연 킬러 세포는 $CD56^{+}CD16^{-}$ 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 천연 킬러 세포는 CD56-컨쥬게이팅된 마이크로비드에 의해, 예를 들어 태반 관류액 세포 또는 태반 조직의 물리적 파괴 및/또는 효소에 의한 소화에 의해 얻어지는 세포로부터 선택된다. 다른 특정 실시태양에서, 천연 킬러 세포는 $CD3^{-}$이다. 특정 실시태양에서, 다수의 천연 킬러 세포는 천연 킬러 세포를 포함하는 세포들의 집단 내의 세포의 적어도 80%이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 시험관 내에서 일어난다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 접촉은 생체 내에서 일어난다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 생체 내 접촉은 포유동물, 예를 들어 인체 내에서 일어난다.

[0013] 방법의 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 천연 킬러 세포는 동등한 수의 $CD56^{+}CD16^{+}$ 천연 킬러 세포보다 NKG2D, NKp46 또는 CD94의 검출가능하게 더 낮은 발현을 보이는 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포는 hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 및/또는 hsa-miR-99a 중 하나 이상의 microRNA를 말초혈 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다.

[0014] 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포는 상기 다수의 천연 킬러 세포가 면역조절성 화합물과 접촉하지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B를 발현하기에 충분한 양의 면역조절성 화합물과 충분한 시간 동안 접촉된다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 면역조절성 화합물은 레날리도마이드 (lenalidomide) 또는 포말리도마이드 (pomalidomide)이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포는 상기 천연 킬러 세포가 면역조절성 화합물, 예를 들어 레날리도마이드 또는 포말리도마이드와 접촉하지 않은 동등한 수의 상기 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 세포독성을 상기 종양 세포에 대해 보이기에 충분한 양의 면역조절성 화합물과 충분한 시간 동안 접촉된다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포는 BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA 또는 TNFRSF18 중 하나 이상을 상기 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 상기 천연 킬러 세포보다 더 높은 수준으로 발현한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포는 ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI 및 TBX21 중 하나 이상을 상기 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 상기 천연 킬러 세포보다 더 높은 수준으로 발현한다.

[0015] 다른 실시태양에서, 태반으로부터의 천연 킬러 세포는 다른 공급원, 예를 들어 태반 혈액 및/또는 제대혈로부터의 천연 킬러 세포와 조합되어, 예를 들어 조합된 천연 킬러 세포를 형성한다. 본원에서 사용될 때, 어구 "태반으로부터의 천연 킬러 세포(들)"은 제대혈 또는 태반 혈액로부터의 천연 킬러 세포를 포함하지 않는다. 보다 특정한 실시태양에서, 태반으로부터의 천연 킬러 세포는 다른 공급원으로부터의 천연 킬러 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0016] 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 배양되지 않고, 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검

출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+NKp46^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+NKp30^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+2B4^+$ 천연 킬러 세포; 또는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+CD94^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 배양되고, 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+NKp46^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+NKp44^+$ 천연 킬러 세포; 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+NKp30^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다.

[0017] 임의의 상기 방법의 특정 실시태양에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 종양 세포는 액체 종양 세포, 예를 들어 혈액 종양 세포이다. 보다 특정한 실시태양에서, 종양 세포는 원발성 관상 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종 (CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 폐암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 결직장 암종 세포 또는 결직장 선암종 세포이다.

[0018] 다른 측면에서, 단리된 태반 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포를 포함하는 조성물을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 상기 태반 천연 킬러 세포는 태반 관류액으로부터 단리된다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 천연 킬러 세포는 태반 조직의 물리적 파괴 및/또는 효소에 의한 소화에 의해 태반으로부터 단리된다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 천연 킬러 세포는 조성물 내의 세포의 적어도 50%를 구성한다. 특정 실시태양에서, 상기 천연 킬러 세포는 조성물 내의 세포의 적어도 80%를 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 조성물은 단리된 $CD56^+$, $CD16^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 $CD56^+$, $CD16^+$ 천연 킬러 세포는 상기 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포와 상이한 개체로부터의 것이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포는 단일 개체로부터의 것이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포는 적어도 2개의 상이한 개체로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어 상기 PINK 세포는 팽창된다.

[0019] 보다 특정한 실시태양에서, 조성물은 태반 천연 킬러 세포 및 다른 공급원으로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 상기 다른 공급원은 탯줄 혈액 및/또는 제대혈이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 실시태양에서, 태반으로부터의 천연 킬러 세포는 다른 공급원으로부터의 천연 킬러 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 조합된다.

[0020] 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액을 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 천연 킬러 세포와 동일한 개체로부터의 것이다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 천연 킬러 세포와 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 내의 모든 또는 실질적으로 모든 (예를 들어 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과의) 세포가 태아 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 태반 관류액은 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 내의 태아 세포는 상기 관류액 내의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통한 0.9% NaCl 용액의 통과에 의해 얻어진다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 관류액은 다수의 적혈구를 제거하기 위해 처리되었다.

[0021] 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 천연 킬러 세포와 동일한 개체로부터의 것이다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 천연 킬러 세포와 상이한 개체로부터의 것이다. 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터의 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 실시태양의 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2개의 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 실시태양의 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 적어도 2개의 개체로부터의 것이다. 조성물은 단리된 PINK 세포를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 PINK 세포는 상기 태반 관류액 또는 상기 관류액 세포와 상이한 개체로부터의 것이다.

[0022] 다른 측면에서, 다수의 태반 세포를 수득하고, 상기 다수의 태반 세포로부터 천연 킬러 세포를 단리하는 것을 포함하는, 태반 천연 킬러 세포를 단리하는 방법을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 태반 세포는 태반 관류액 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포이거나 그를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 태반 세포는 태반 조직의 기계적인 및/또는 효소에 의한 소화에 의해 얻어지는 태반 세포이거나 그를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 단리는 하나 이상의 항체를 사용하여 수행한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 하나 이상의 항체는 CD3, CD16 또는 CD56에 대한 하나 이상의 항체를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리는 상기 다수의 태반 세포에서 $CD56^-$ 세포로부터 $CD56^+$ 세포를 단리하는 것을 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리는 $CD56^-$ 또는 $CD16^+$인 태반 세포로부터 $CD56^+$, $CD16^-$ 태반 세포를 단리하는 것을 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리는 $CD56^-$, $CD16^+$, 또는 $CD3^+$인 태반 세포로부터 $CD56^+$, $CD16^-$, $CD3^-$ 태반 세포를 단리하는 것을 포함한다. 다른 실시태양에서, 태반 천연 킬러 세포를 단리하는 상기 방법은 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 적어도 99%의 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포인 태반 세포들의 집단을 생성시킨다.

[0023] 상기 방법의 특정 실시태양에서, 태반 관류액 세포는 배양액 내에서 팽창되었다. 다양한 실시태양에서, 세포는 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30일 동안 또는 그 이하의 기간 동안 팽창되었다. 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 영양세포층 (feeder layer)의 존재 하에 및/또는 적어도 하나의 시토킨의 존재 하에 팽창되었다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 영양세포층은 K562 세포 또는 말초혈 단핵 세포를 포함한다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 적어도 하나의 시토킨은 인터류킨-2이다.

[0024] 3.1. 정의

[0025] 본원에서 사용될 때, "조합된 천연 킬러 세포"는 예를 들어 매칭된 (matched) 제대 및 인간 태반 관류액으로부터의 천연 킬러 세포이고, 여기서 태반 관류액은 제대혈과 동일한 태반으로부터 얻어진다. 둘로부터의 천연 킬러 세포는 별도로 또는 동시에 단리되고 조합된다.

[0026] 본원에서 사용될 때, "PINK" 및 "PINK 세포"는 인간 태반, 예를 들어 인간 태반 관류액 또는 기계적으로 및/또는 효소에 의해 파괴된 태반 조직으로부터 얻어지는 태반 중간체 천연 킬러 세포를 나타낸다. 세포는 예를 들어 유동 세포측정, 예를 들어 CD56 및 CD16에 대한 항체를 사용하는 형광-활성화 세포 분류에 의해 측정할 때 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. PINK 세포는 제대혈 또는 말초혈로부터 얻어지지 않는다.

[0027] 본원에서 사용될 때, "태반 관류액"은 태반을 통한 통과 동안 관류 용액에 의해 수집되는 다수의 세포를 포함하는, 태반, 예를 들어 인간 태반의 적어도 일부를 통해, 예를 들어 태반 혈관계를 통해 통과된 관류 용액을 의미한다.

[0028] 본원에서 사용될 때, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 단리되거나 단리가능한 유핵 세포, 예를 들어 총 유핵 세포를 의미한다.

[0029] 본원에서 사용될 때, "종양 세포 억제", "종양 세포 증식의 억제" 등은 예를 들어 종양 세포의 집단을 PINK 세포, PINK 세포를 포함하는 세포의 집단, 조합된 천연 킬러 세포, 조합된 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단, 인간 태반 관류액 등과 접촉시킴으로써, 예를 들어 종양 세포의 집단에서 하나 이상의 종양 세포를 죽여서

종양 세포의 집단의 성장을 느리게 하는 것을 포함한다.

발명의 효과

[0030] 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 성장 또는 증식을 억제하기 위한, 태반으로부터 얻어진 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및/또는 태반 관류액-유래 천연 킬러 ("PINK") 세포의 용도를 본원에서 제공한다. 특히, 태반 관류액, 예를 들어 인간 태반 관류액으로부터 단리되거나 기계적으로 및/또는 효소에 의해 파괴된 태반 조직으로부터 단리된 천연 킬러 (NK) 세포 및 NK 세포의 집단, NK 세포를 수득하는 방법, 및 세포를 사용하는 방법을 본원에서 제공한다. 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단, 예를 들어, 태반 세포의 집단을 또한 본원에서 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 인간 태반 관류액 (HPP)으로부터 CD56 마이크로비드에 의해 선택된 세포에 대해 항-CD3 항체 및 항-CD56 항체를 사용한 유동 세포측정 결과를 보여준다. 단리된 세포의 대부분은 $CD56^{+}CD3^{-}$이다.

도 2는 24시간 배양 동안 PINK 세포 및/또는 종양 세포에 의한 시토킨의 생산을 도시한 것이다. 도 2a는 태반 관류액-유래 중간체 천연 킬러 세포 (PINK) 단독에 의해 또는 KG-1a 종양 세포의 존재 하에 인터페론 감마 (IFNγ)의 분비를 도시한 것이다. PINK 세포 및 KG-1a 세포는 단독으로 또는 1:1의 비로 조합하여 배양된다. Y축: 배양에 의해 생산된 IFNγ의 피코그램. 도 2b는 PINK 세포 단독에 의해 또는 KG-1a 종양 세포의 존재 하에 과립구-대식세포 집락 자극 인자 (GM-CSF)의 분비를 도시한 것이다. PINK 세포 및 KG-1a 세포는 단독으로 또는 1:1의 비로 조합하여 배양된다. Y축: 배양에 의해 생산된 GM-CSF의 피코그램.

도 3은 1:1, 5:1, 10:1 또는 20:1의 PINK 세포 대 종양 세포의 비에서 24시간 동시-배양에서 KG-1a 종양 세포에 대한 PINK 세포의 세포독성을 도시한 것이다. X축: PINK 세포 대 종양 세포의 비. Y축: PINK 세포의 부재 하의 종양 세포에 비해 죽은 종양 세포의 백분율.

도 4는 21일 동안 배양된 태반 NK 세포 및 말초혈 (PB) NK 세포의 K562 세포에 대한 세포독성을 도시한 것이다. 오차 막대는 4 단위의 배양된 태반 NK 세포 또는 3 단위의 배양된 말초혈 NK 세포의 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 1:1, 5:1, 10:1 또는 20:1 또는 100:1의 HPP 세포 대 종양 세포의 비에서 24시간 동시-배양에서 KG-1a 종양 세포에 대한 태반으로부터 얻어진 전체 인간 태반 관류액의 세포독성을 도시한 것이다. X축: HPP 세포 대 종양 세포의 비. Y축: HPP 세포의 부재 하의 종양 세포에 비해 죽은 종양 세포의 백분율.

도 6은 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.25:1, 3.12:1, 1.56:1 또는 0.78:1의 HPP 세포 또는 UCB 세포 대 종양 세포의 연속 희석에서 48시간 동시-배양에서 KG-1a 종양 세포에 대한 태반 및 제대혈로부터 얻어진 전체 인간 태반 관류액의 세포독성을 도시한 것이다. X축: HPP 세포 또는 제대 세포 대 종양 세포의 비. Y축: HPP 세포 또는 제대 세포의 부재 하의 종양 세포에 비해 48시간 배양 시간 후에 죽은 종양 세포의 백분율.

도 7은 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1, 6.25:1, 3.12:1, 1.56:1 또는 0.78:1의 HPP 세포 대 종양 세포의 연속 희석에서 48시간 동시-배양에서 KG-1a 종양 세포에 대한 태반으로부터 얻어진 전체 인간 태반 관류액의 세포독성을 도시한 것이다. 관류액은 수집된 그대로 사용되거나, 24시간 동안 100 U/mL 또는 1000 U/mL 인터류킨-2 (IL-2)로 자극되었다. X축: HPP 세포 대 종양 세포의 비. Y축: HPP 세포의 부재 하의 종양 세포에 비해 48시간 배양 시간 후에 죽은 종양 세포의 백분율.

도 8은 종양 세포에 대해 50:1 비로 HPP 또는 UCB 세포와 함께 배양한 후, 종양 세포주 패널에 대한 인간 태반 관류액의 세포독성 효과를 도시한 것이다. 도 8A: 24시간 동안 동시-배양. 도 8B: 48시간 동안 동시-배양. X축: 시험된 종양 세포주. Y축: 종양 세포의 부재 하의 종양 세포의 수에 비해, 동시-배양 후의 죽은 종양 세포의 백분율.

도 9는 HPP 세포 대 종양 세포의 상이한 비에서 KG-1a 종양 세포와 동시-배양된 HPP 세포에 의한 IFNγ 생산을 도시한 것이다. X축: HPP 세포 대 종양 세포의 비를 포함한 실험 조건. Y축: 24시간 동시-배양 후의 IFNγ 수준/밀리리터.

도 10은 종양 세포의 패널과 함께 동시-배양에서 HPP 또는 UCB 세포에 의한 IFNγ의 생산을 도시한 것이다. HPP 또는 UCB 세포는 종양 세포주와 50:1의 비에서 24시간 (도 10A) 또는 48시간 (도 10B) 동안 동시-배양하였다. IFNγ 수준은 Luminex 분석 (HCYTO-60K-03, 밀리포어 (Millipore))에 의해 결정하였다. X축: 시험된 종

양 세포주. Y축: 종양 세포의 부재 하에 생산된 IFNγ의 피코그램에 비교한, HPP 또는 UCB 세포에 의해 생산된 IFNγ의 피코그램.

도 11은 부피 약 332 mm^3의 KG-1 세포 종양을 가진 마우스에 대해 2 x 10^7 인간 태반 관류액 (HPP) 세포를 투여할 때 종양 크기의 감소를 도시한 것이다. 종양내 - HPP 세포를 피하 종양 부위 내로 직접 주사하였다. IV - HPP 세포를 정맥내 투여하였다. 대조군 - 비히클만 투여. 종양 부피 (mm^3 단위).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 성장 또는 증식을 억제하기 위한, 태반으로부터 얻어진 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및/또는 태반 관류액-유래 천연 킬러 ("PINK") 세포의 용도를 본원에서 제공한다. 특히, 태반 관류액, 예를 들어 인간 태반 관류액으로부터 단리되거나 기계적으로 및/또는 효소에 의해 파괴된 태반 조직으로부터 단리된 천연 킬러 (NK) 세포 및 NK 세포의 집단, NK 세포를 수득하는 방법, 및 세포를 사용하는 방법을 본원에서 제공한다. 천연 킬러 세포를 포함하는 세포의 집단, 예를 들어, 태반 세포의 집단을 또한 본원에서 제공한다. 태반 관류액을 수득하고 태반 관류액으로부터의 세포를 수득하는 방법을 아래 섹션 5.1에서 설명한다. 태반 관류액-유래 천연 킬러 세포 및 세포를 수득하는 방법을 아래 섹션 5.2에서 설명한다. 종양 세포의 증식을 억제하기 위해 태반 관류액, 태반 관류액-유래 세포 또는 태반 관류액-유래 천연 킬러 세포, 예를 들어, 중간체 천연 킬러 세포를 사용하는 방법을 하기 섹션 5.3에서 설명한다.

[0033] 5.1. 태반 관류액

[0034] 5.1.1. 세포 수집 조성물

[0035] 본원에서 제공되는 태반 관류액, 관류액 세포 및 태반 관류액-유래 천연 킬러 세포는 태반 세포 수집 조성물을 사용하여 포유동물, 예를 들어, 인간 산후 태반의 관류에 의해 수집할 수 있다. 관류액은 임의의 생리학상 허용되는 용액, 예를 들어, 염수 용액, 배양 배지, 또는 보다 복잡한 세포 수집 조성물을 사용한 태반의 관류에 의해 태반으로부터 수집할 수 있다. 태반을 관류시키기 위해, 및 관류액 세포, 예를 들어, 총 유핵 태반 관류액 세포 또는 PINK 세포의 수집 및 보존을 위해 적합한 세포 수집 조성물은 그 전부가 본원에 참고로 포함되는 관련 미국 특허 출원 공개 2007/0190042에 상세히 기재되어 있다.

[0036] 세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양을 위해 적합한 임의의 생리학상 허용되는 용액, 예를 들어, 염수 용액 (예를 들어, 포스페이트-완충 염수, 크렙 (Kreb's) 용액, 변형 크렙 용액, 이글 (Eagle's) 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0037] 세포 수집 조성물은 수집 시간부터 배양 시간까지 태반 세포를 보존하는, 즉, 태반 세포가 죽는 것을 방지하거나, 태반 세포의 사멸을 지연시키거나, 세포의 집단 내의 죽는 태반 세포의 수를 감소시키는 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 그러한 성분들은 예를 들어, 세포자멸 억제제 (예를 들어, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제 (예를 들어, 황산마그네슘, 항고혈압약, 심방 나트륨이뇨 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀 방출 호르몬, 나트륨 니트로프루시드, 히드랄라진, 아데노신 트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 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-보유 퍼플루오로탄소 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0038] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 히알루로니다제, RNase, 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 그러한 효소는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스톨리티쿰 (*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 써몰리신, 엘라스타제, 트립신, LIBERASE, 히알루로니다제 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0039] 세포 수집 조성물은 살균 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 특정 비-제한적인 실시태양에서, 항생제는 마크롤리드 (예를 들어, 토브라마이신), 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클래리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 V) 또는 퀴놀론 (예를 들어, 오플록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시태양에서, 항생제는 그람(+) 및/또는 그람(-) 세균, 예를 들어, 슈도모나스 애루기노사

(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성을 보인다.

[0040] 세포 수집 조성물은 또한 다음 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 실시태양에서 내피 통합성 및 세포 생존력을 유지하기 위해 충분한 양으로 존재하는, 분자량이 20,000 달톤을 초과하는 거대분자 (예를 들어, 약 25 g/l 내지 약 100 g/l, 또는 약 40 g/l 내지 약 60 g/l로 존재하는 합성 또는 천연 발생 콜로이드, 다당류, 예를 들어 덱스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜); 항산화제 (예를 들어, 약 25 μM 내지 약 100 μM로 존재하는 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E); 환원제 (예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재하는 N-아세틸시스테인); 세포 내로 칼슘 유입을 방지하는 물질 (예를 들어, 약 2 μM 내지 약 25 μM로 존재하는 베라파밀); 니트로글리세린 (예를 들어, 약 0.05 g/L 내지 약 0.2 g/L); 한 실시태양에서 잔류 혈액의 응고 방지를 돕기에 충분한 양으로 존재하는 항응고제 (예를 들어, 약 1000 단위/l 내지 약 100,000 단위/l의 농도로 존재하는 헤파린 또는 히루딘); 또는 아밀로라이드 함유 화합물 (예를 들어, 약 1.0 μM 내지 약 5 μM로 존재하는 아밀로라이드, 에틸 이소프로필 아밀로라이드, 헥사메틸렌 아밀로라이드, 디메틸 아밀로라이드 또는 이소부틸 아밀로라이드).

[0041] 5.1.2. 태반의 수집 및 취급

[0042] 일반적으로, 인간 태반은 출산 후 그의 방출 직후에 회수한다. 바람직한 실시태양에서, 태반은 공지에 의한 동의 후에 및 환자의 완전한 병력이 확인되고 태반과 연관된 후에 환자로부터 회수된다. 바람직하게는, 병력은 분만 후에 계속 확인된다. 그러한 병력은 태반 또는 그로부터 수거된 세포의 후속적인 사용을 조율하기 위해 이용할 수 있다. 예를 들어, 인간 태반 세포는 병력의 면에서, 태반과 연관된 유아를 위한, 또는 유아의 부모, 형제자매 또는 다른 친척을 위한 개인맞춤형 의약에 사용할 수 있다.

[0043] 관류액의 회수 전에, 제대혈 및 태반 혈액을 제거한다. 특정 실시태양에서, 분만 후에, 태반 내의 제대혈이 회수된다. 태반은 통상적인 제대혈 회수 과정으로 처리할 수 있다. 일반적으로, 태반을 방혈시키기 위해 주사바늘 (needle) 또는 삽입관 (cannula)을 중력의 도움 하에 사용한다 (예를 들어, 미국 특허 5,372,581 (Anderson); 미국 특허 5,415,665 (Hessel et al.) 참조). 주사바늘 또는 삽입관은 대체로 제대 정맥 내에 놓이고, 태반은 태반으로부터 제대혈을 배수시키는 것을 돕도록 부드럽게 문지를 수 있다. 그러한 제대혈 회수는 상업적으로, 예를 들어 라이프뱅크 인크. (LifeBank Inc., 미국 뉴저지주 시더 놀즈), 바이아코드 (ViaCord), 코드 블러드 레지스트리 (Cord Blood Registry) 및 크리요셀 (CryoCell)에 의해 수행할 수 있다. 바람직하게는, 태반은 제대혈 회수 동안 조직 파괴를 최소화하기 위해 추가로 조작하지 않으면서 중력 배수된다.

[0044] 일반적으로, 태반은 제대혈의 회수 및 관류액의 수집을 위해 분만 또는 출산실로부터 다른 장소, 예를 들어 실험실로 수송된다. 태반은 바람직하게는 예를 들어, 근위 제대를 플램핑한 태반을 멸균 지퍼락 (zip-lock) 플라스틱 백 (bag) 내에 넣은 후, 이를 절연 용기에 넣음으로써 멸균 열 절연 수송 장치 (태반의 온도를 20-28℃로 유지하는) 내에서 수송된다. 다른 실시태양에서, 태반은 실질적으로 미국 특허 7,147,626에 기재된 바와 같은 제대혈 수집 키트 내에서 수송된다. 바람직하게는, 태반은 분만 4 내지 24시간 후에 실험실에 전달된다. 특정 실시태양에서, 제대혈 회수 전에 근위 제대를, 바람직하게는 태반 원반 내로의 삽입부의 4-5 cm (센티미터) 내에서 클램핑한다. 다른 실시태양에서, 근위 제대를 제대혈 회수 후에 그러나 태반의 추가 처리 전에 클램핑한다.

[0045] 관류액의 수집 전에 태반을 멸균 조건 하에 실온 또는 5 내지 25℃의 온도 (섭씨)에서 보관할 수 있다. 잔류 제대혈을 제거하기 위해 태반을 관류시키기 전에 태반은 48시간 이상의 기간 동안, 바람직하게는 4 내지 24시간 동안 보관할 수 있다. 태반은 바람직하게는 5℃ 내지 25℃의 온도 (섭씨)에서 항응고제 용액 내에 보관된다. 적합한 항응고제 용액은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와파린 나트륨 용액을 사용할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액 (예를 들어, 1:1000 용액으로 1% w/w)을 포함한다. 방혈시킨 태반은 바람직하게는 태반 관류액을 수집하기 전에 36시간 이내로 보관한다.

[0046] 5.1.3. 태반 관류

[0047] 포유동물 태반을 관류시키는 방법은 예를 들어, 그 개시 내용 전부가 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 7,045,148 및 7,255,879 (Hariri), 및 미국 특허 출원 공개 2007/0190042 (발명의 명칭 "Improved Composition for Collecting and Preserving Organs")에 개시되어 있다.

[0048] 관류액은 관류 용액, 예를 들어, 염수 용액, 배양 배지 또는 상기 설명되는 세포 수집 조성물을 태반 혈관계를

통해 통과시켜 얻을 수 있다. 한 실시태양에서, 포유동물 태반은 관류 용액을 제대 동맥 및 제대 정맥 중 하나 또는 둘 모두를 통해 통과시킴으로써 관류시킨다. 태반을 통한 관류 용액의 유동은 예를 들어, 태반 내로 중력 유동을 이용하여 달성할 수 있다. 바람직하게는, 관류 용액은 펌프, 예를 들어, 연동식 펌프를 사용하여 태반을 통해 가압된다. 제대 정맥은 예를 들어, 멸균 연결 장치, 예를 들어 멸균 튜브에 연결되는 삽입관, 예를 들어, TEFLON® 또는 플라스틱 삽입관으로 삽관될 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 다기관 (manifold)에 연결된다.

[0049] 관류를 위한 준비에서, 태반은 바람직하게는 제대 동맥 및 제대 정맥이 태반의 최고점에 위치하는 방식으로 배향된다. 태반은 관류 용액을 태반 혈관계를 통해, 또는 태반 혈관계 및 주위 조직을 통해 통과시킴으로써 관류시킬 수 있다. 한 실시태양에서, 제대 동맥 및 제대 정맥은 가요성 연결기 (connector)를 통해 관류 용액의 저장기 (reservoir)에 연결되는 피펫에 동시에 연결된다. 관류 용액은 제대 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액은 태반의 주위 조직 내로 혈관벽으로부터 삼출하고/하거나 그를 통해 통과되고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적합한 개방 혈관에서 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 구멍을 통해 도입되고, 모체 자궁벽과 접촉되는 태반 벽 내의 구멍에서 유동하거나 스며나올 수 있다. 다른 실시태양에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통해 통과되고 제대 동맥으로부터 수집되거나, 제대 동맥을 통해 통과되고 제대 정맥으로부터 수집되고, 즉, 태반 혈관계 (태아 조직)만을 통해 통과된다.

[0050] 한 실시태양에서, 예를 들어, 제대 동맥 및 제대 정맥은 예를 들어 가요성 연결기를 통해 관류 용액의 저장기에 연결되는 피펫에 동시에 연결된다. 관류 용액은 제대 정맥 및 동맥 내로 통과된다. 관류 용액은 태반의 주위 조직 내로 혈관벽으로부터 삼출하고/하거나 그를 통해 통과되고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착된 태반의 표면으로부터 적합한 개방 혈관에서 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 구멍을 통해 도입되고, 모체 자궁벽과 접촉되는 태반 벽 내의 구멍에서 유동하거나 스며나올 수 있다. "팬 (pan)" 방법으로 칭할 수 있는 상기 방법에 의해 수집되는 태반 세포는 대개 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

[0051] 다른 실시태양에서, 관류 용액은 제대 정맥을 통해 통과되고 제대 동맥으로부터 수집되거나, 제대 동맥을 통해 통과되고 제대 정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로 (closed circuit)" 방법으로 칭할 수 있는 상기 방법에 의해 수집되는 태반 세포는 대개 거의 전적으로 태아 세포이다.

[0052] 폐쇄 회로 관류 방법은 한 실시태양에서 다음과 같이 수행할 수 있다. 산후 태반을 출산 후 약 48시간 내에 수득한다. 제대를 클램핑하고 클램프 위를 절단한다. 제대는 폐기할 수 있거나, 예를 들어, 제대 줄기 세포를 회수하고/하거나 생체재료 (biomaterial)의 생산을 위해 제대 막을 가공하기 위해 처리할 수 있다. 양막은 관류 동안 보유될 수 있거나, 예를 들어, 손가락을 사용한 둔박리 (blunt dissection)를 이용하여 융모막으로부터 분리될 수 있다. 양막이 관류 전에 융모막으로부터 분리되는 경우에, 이를 예를 들어 폐기하거나, 또는 예를 들어 효소에 의한 소화에 의해 줄기 세포를 얻기 위해, 또는 예를 들어 양막 생체재료, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 2004/0048796에 기재된 생체재료를 생산하기 위해 처리할 수 있다. 태반을 예를 들어 멸균 거즈를 사용하여 모든 보이는 혈병 및 잔류 혈액을 세정한 후, 예를 들어, 탯줄의 단면을 노출시키도록 제대 막을 부분 절단함으로써 제대 혈관을 노출시켰다. 혈관을 확인하고 예를 들어, 닫힌 앨리게이터 (alligator) 클램프를 각각의 혈관의 절단면을 통해 진행시킴으로써 개방시킨다. 이어서, 관류 장치 또는 연동식 펌프에 연결되는 장치, 예를 들어, 플라스틱 튜브를 각각의 태반 동맥 내로 삽입한다. 펌프는 목적에 적합한 임의의 펌프, 예를 들어 연동식 펌프일 수 있다. 이어서, 멸균 수집 저장기, 예를 들어, 250 mL 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜브를 태반 정맥 내로 삽입한다. 별법으로, 펌프에 연결된 튜브를 태반 정맥 내로 삽입하고, 수집 저장기(들)에 연결된 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 둘에 삽입한다. 이어서, 태반을 일정 부피의 관류 용액, 예를 들어, 약 750 ml의 관류 용액으로 관류시킨다. 이어서, 관류액 내의 세포를 예를 들어 원심분리에 의해 수집한다.

[0053] 한 실시태양에서, 관류 동안 근위 제대를 클램핑하고, 보다 바람직하게는 태반 원반 내로의 탯줄 삽입부의 4-5 cm (센티미터) 내에서 클램핑한다.

[0054] 방혈 과정 동안 포유동물 태반으로부터의 관류 유체의 제1 수집물은 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구를 가져서 일반적으로 유색이다. 관류 유체는 관류가 진행되고 잔류 제대혈 세포가 태반에서 세척 제거됨에 따라 보다 무색으로 된다. 태반으로부터 혈액을 초기에 세정하기 위해 일반적으로 30 내지 100 mL의 관류 유체가 적당하지만, 관찰된 결과에 따라 보다 많거나 보다 적은 관류 유체를 사용할 수 있다.

[0055] 태반을 관류시키기 위해 사용되는 관류 액체의 부피는 수집할 태반 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반으로부터 제조할 수집물의 수 등에 따라 변할 수 있다. 다양한 실시태양에서, 관류 액체의 부피는 50 mL 내지 5000 mL,

50 mL 내지 4000 mL, 50 mL 내지 3000 mL, 100 mL 내지 2000 mL, 250 mL 내지 2000 mL, 500 mL 내지 2000 mL, 또는 750 mL 내지 2000 mL일 수 있다. 일반적으로, 태반은 방혈 후에 700-800 mL의 관류 액체로 관류된다.

[0056] 태반은 수시간 또는 수일에 걸쳐 복수회로 관류될 수 있다. 태반은 복수회로 관류시켜야 하는 경우에, 무균 조건 하에 용기 또는 다른 적합한 그릇 (vessel) 내에 유지하거나 배양하고, 세포 수집 조성물, 또는 표준 관류 용액 (예를 들어, 정상 염수 용액, 예를 들어 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와파린 나트륨, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)를 함유하거나 함유하지 않고/않거나 항미생물제 (예를 들어, β-머캅토에탄올 (0.1 mM); 항생제, 예를 들어 스트렙토마이신 (예를 들어, 40-100 ㎍/ml), 페니실린 (예를 들어, 40 U/ml), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 ㎍/ml)를 함유하거나 함유하지 않는 포스페이트 완충 염수 ("PBS"))로 관류시킬 수 있다. 한 실시태양에서, 단리된 태반은 관류액을 수집하지 않는 기간 동안 유지되거나 배양되어, 태반이 관류 및 관류액의 수집 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간, 또는 2 또는 3일 이상 동안 유지되거나 배양되도록 한다. 관류된 태반은 추가로 1회 이상의 시간(들), 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24시간 이상 동안 유지되고, 예를 들어, 700-800 mL 관류 유체로 두 번째로 관류될 수 있다. 태반은 1, 2, 3, 4, 5회 이상, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6시간마다 1회 관류될 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어, 태반 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 유핵 세포의 수가 100 세포/ml 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 상이한 시점의 관류액은 세포, 예를 들어, 총 유핵 세포의 시간-의존적 집단을 회수하기 위해 개별적으로 더욱 처리될 수 있다. 상이한 시점으로부터의 관류액을 모을 수 있다.

[0057] 5.1.4. 태반 관류액 및 태반 관류액 세포

[0058] 태반 관류액은 세포들의 불균질한 수집물을 포함한다. 일반적으로, 태반 관류액은 사용 전에 적혈구가 고갈된다. 그러한 고갈은 유핵 혈액 세포로부터 적혈구를 분리시키는 공지의 방법에 의해 수행할 수 있다. 특정 실시태양에서, 관류액 또는 관류액 세포는 냉동보존된다. 특정한 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 또는 관류액 세포는 태아 세포만을 또는 태아 세포와 모체 세포의 조합물을 포함한다.

[0059] 일반적으로, 단일 태반 관류로부터의 태반 관류액은 약 1억 개 내지 약 5억 개의 유핵 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함한다. 그러한 세포는 보다 특정한 실시태양에서, $CD34^+CD45^-$ 줄기 또는 전구 세포, $CD34^+CD45^+$ 줄기 또는 전구 세포, 골수성 전구체, 림프양 전구체, 및/또는 적혈구양 전구체를 포함할 수 있다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액 및 태반 관류액 세포는 부착성 태반 줄기 세포, 예를 들어, $CD34^-$ 줄기 세포를 포함한다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액 및 태반 관류액 세포는 예를 들어, 내피 전구 세포, 골전구 세포, 및 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 태반으로부터 수집되고 적혈구가 고갈된 그대로의 태반 관류액, 또는 상기 관류액으로부터 단리된 관류액 세포는 예를 들어 유동 세포측정에 의해, 예를 들어 FACS 분석에 의해 측정할 때 약 6-7% 천연 킬러 세포 ($CD3^-$, $CD56^+$); 약 21-22% T 세포 ($CD3^+$); 약 6-7% B 세포 ($CD19^+$); 약 1-2% 내피 전구 세포 ($CD34^+$, $CD31^+$); 약 2-3% 신경 전구 세포 (네스틴$^+$); 약 2-5% 조혈 전구 세포 ($CD34^+$); 및 약 0.5-1.5% 부착성 태반 줄기 세포 (예를 들어, $CD34^-$, $CD117^-$, $CD105^+$ 및 $CD44^+$)를 포함한다.

[0060] 5.2. PINK 세포를 얻기 위한 태반 조직의 파괴 및 소화

[0061] 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포는 기계적으로 및/또는 효소에 의해 파괴된 태반 조직으로부터 얻을 수 있다.

[0062] 태반 조직은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, RNase, 또는 DNase 등을 이용하여 파괴할 수 있다. 그러한 효소는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스톨리티쿰으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 써몰리신, 엘라스타제, 트립신, LIBERASE, 히알루로니다제 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일반적으로, 소화 후에, 소화된 조직은 부분적으로-소화된 세포 덩어리를 제거하여, 실질적으로 단일-세포의 현탁액을 남기도록 여과망 (strainer) 또는 필터를 통해 통과된다.

[0063] 태반 세포의 현탁액이 얻어진 후, 천연 킬러 세포는 예를 들어 CD3 및 CD56에 대한 항체를 사용하여 단리할 수 있다. 특정 실시태양에서, 태반 천연 킬러 세포는 $CD56^+$인 세포를 선택하여 제1 세포 집단을 생산하고; 상기 제1 세포 집단을 CD3 및/또는 CD16에 특이적인 항체와 접촉시키고; 상기 제1 세포 집단으로부터 $CD3^+$ 또는 $CD56^+$

인 세포를 제거하여, 실질적으로 $CD56^+$ 및 $CD3^-$, $CD56^+$ 및 $CD16^-$, 또는 $CD56^+$, $CD3^-$ 및 $CD16^-$인 세포의 제2 집단을 생산함으로써 단리한다.

[0064] 한 실시태양에서, 태반 세포의 현탁액으로부터 태반 천연 킬러 세포를 단리하기 위해 자성 비드를 사용한다. 세포는 예를 들어 자성 활성화 세포 분류 (MACS) 기술 (하나 이상의 특이적 항체, 예를 들어 항-CD56 항체를 포함하는 자성 비드 (예를 들어, 약 0.5-100 ㎛ 직경)에 결합하는 그들의 능력에 기초하여 입자를 분리하는 방법)을 이용하여 단리할 수 있다. 다양한 유용한 변형을 특정 세포 표면 분자 또는 합텐을 특이적으로 인식하는 항체의 공유 첨가를 포함하는 자성 미세구에 대해 수행할 수 있다. 이어서, 비드를 세포와 혼합하여 결합시킨다. 이어서, 세포를 자기장을 통해 통과시켜 특이적 세포 표면 마커를 갖는 세포를 분리시킨다. 한 실시태양에서, 이어서, 이들 세포를 단리하고 추가의 세포 표면 마커에 대한 항체에 커플링된 자성 비드와 재혼합할 수 있다. 세포를 다시 자기장을 통해 통과시켜, 두 항체 모두에 결합된 세포를 단리시킨다. 이어서, 그러한 세포를 클론 단리를 위해 별개의 접시, 예를 들어 미량역가 접시 내로 희석시킬 수 있다.

[0065] 5.3. 태반 천연 킬러 세포

[0066] 한 측면에서, 태반으로부터, 예를 들어, 태반 관류액으로부터 및/또는 기계적으로 및/또는 효소에 의해-파괴된 태반 조직으로부터 수득가능한 천연 킬러 세포, 및 상기 천연 킬러 세포를 포함하는 조성물의 단리, 특성 결정, 및 용도를 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 태반 천연 킬러 세포는 "태반 중간체 천연 킬러 세포" 또는 "PINK" 세포이고, 예를 들어, 상기 설명한 바와 같이 CD16 및 CD56에 대한 항체를 사용하여 유동 세포측정, 예를 들어, 형광-활성화 세포 분류에 의해 결정할 때 $CD56^+CD16^-$인 것으로서, 즉, CD56 세포 마커를 표시하고 CD16 세포 마커가 결여되는 것으로서 특성 결정된다. 따라서, 단리된 PINK 세포 및 단리된 다수의 PINK 세포들을 본원에서 제공한다. 또한, $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포와 조합된, $CD56^+CD16^-$ PINK 세포를 포함하는 단리된 다수의 세포를 본원에서 제공한다. 보다 특정한 실시태양에서, $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포는 태반, 또는 다른 공급원, 예를 들어, 말초혈, 제대혈, 골수 등으로부터 단리할 수 있다. 따라서, 다양한 다른 실시태양에서, PINK 세포는 $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포와, 예를 들어 약 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 약 9:1의 비로 조합될 수 있다. 본 문맥에서 사용될 때, "단리된"은 세포가 그들의 정상 환경, 예를 들어, 태반으로부터 제거된 것을 의미한다.

[0067] 특정 실시태양에서, PINK 세포는 $CD3^-$이다.

[0068] 다른 실시태양에서, PINK 세포는 완전 성숙 천연 킬러 세포 (예를 들어, CD16)에 의해 보여지는 하나 이상의 세포 마커를 보여주지 않거나, 그러한 하나 이상의 마커를 완전 성숙 천연 킬러 세포에 비해 검출가능하게 감소된 수준으로 보여주거나, 천연 킬러 세포 전구체와 연관되지만 완전 성숙 천연 킬러 세포와 연관되지 않은 하나 이상의 세포 마커를 보여준다. 특정 실시태양에서, 본원에서 제공되는 PINK 세포는 NKG2D, CD94 및/또는 NKp46을, 완전 성숙 NK 세포보다 검출가능하게 더 낮은 수준으로 발현한다. 다른 특정 실시태양에서, 본원에서 제공되는 다수의 PINK 세포는 총합하여 NKG2D, CD94 및/또는 NKp46을, 동등한 수의 완전 성숙 NK 세포보다 검출가능하게 더 낮은 수준으로 발현한다.

[0069] 특정 실시태양에서, PINK 세포는 hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, 및/또는 hsa-miR-99a 중 하나 이상의 microRNA를 말초혈 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다.

[0070] 특정 실시태양에서, 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, PINK 세포는 배양액 내에서 팽창되었다. 다른 특정 실시태양에서, 태반 관류액 세포는 배양액 내에서 팽창되었다. 특정 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 영양세포층의 존재 하에 및/또는 적어도 하나의 시토킨의 존재 하에 팽창되었다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 영양세포층은 K562 세포 또는 말초혈 단핵 세포를 포함한다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 적어도 하나의 시토킨은 인터류킨-2이다.

[0071] 다른 실시태양에서, 단리된 다수 (예를 들어, 집단)의 PINK 세포를 본원에서 제공한다. 다른 특정 실시태양에서, 세포들의 단리된 집단은 태반 관류액으로부터 세포의 CD56-마이크로비드 단리에 의해 생산된다. 다양한 특정 실시태양에서, 집단은 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 적어도 약

99%의 PINK 세포를 포함한다. 다른 실시태양에서, 다수의 PINK 세포는 팽창되지 않은; 예를 들어 태반 관류액으로부터 수집된 그대로의 PINK 세포를 포함하거나 그로 이루어진다. 다른 실시태양에서, 다수의 PINK 세포는 팽창된 PINK 세포를 포함하거나 그로 이루어진다. 천연 킬러 세포를 팽창시키는 방법은 예를 들어 미국 특허 출원 공개 2003/0157713 (Ohno et al.)에 기재되어 있고; 또한 문헌 [Yssel et al., J. Immunol. Methods 72(1):219-227 (1984)] 및 [Litwin et al., J. Exp. Med. 178(4):1321-1326 (1993)] 및 하기 실시예 1의 천연 킬러 세포 팽창에 대한 설명을 참조한다.

[0072] 다른 실시태양에서, 단리된 다수의 PINK 세포는 완전 성숙 천연 킬러 세포 (예를 들어, CD16)에 의해 보여지는 하나 이상의 세포 마커를 보이지 않거나, 그러한 하나 이상의 마커를 완전 성숙 천연 킬러 세포에 비해 검출가능하게 감소된 수준으로 보이거나, 천연 킬러 세포 전구체와 연관되지만 완전 성숙 천연 킬러 세포와 연관되지 않은 하나 이상의 세포 마커를 보인다. 특정 실시태양에서, 본원에서 제공되는 PINK 세포는 NKG2D, CD94 및/또는 NKp46을, 완전 성숙 NK 세포보다 검출가능하게 더 낮은 수준으로 발현한다. 다른 특정 실시태양에서, 본원에서 제공되는 다수의 PINK 세포는 총합하여 NKG2D, CD94 및/또는 NKp46을, 동등한 수의 완전 성숙 NK 세포보다 검출가능하게 더 낮은 수준으로 발현한다.

[0073] 특정 실시태양에서, PINK 세포의 집단은 hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618, 및/또는 hsa-miR-99a 중 하나 이상의 microRNA를 말초혈 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다. 다른 특정 실시태양에서, PINK 세포의 집단은 동등한 수의 말초혈 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 양의 그랜자임 B를 발현한다.

[0074] 다른 실시태양에서, 본원에서 제공되는 PINK 세포는 배양액 내에서 팽창되었다. 특정 실시태양에서, PINK 세포는 적어도, 약 또는 최대로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28일 동안 배양, 예를 들어, 배양액 내에서 팽창되었다. 특정 실시태양에서, PINK 세포는 약 21일 동안 배양된다.

[0075] 다른 실시태양에서, PINK 세포를 포함하는 세포들, 예를 들어, 태반 세포들의 단리된 집단을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 세포들의 단리된 집단은 자가성의 단리된 PINK 세포를 포함하는 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포, 예를 들어, 태반 관류액 세포이다. 다른 특정 실시태양에서, 세포들의 집단은 태반 관류액으로부터 세포의 CD56-마이크로비드 단리에 의해 생산되는 세포들의 단리된 집단이다. 다양한 특정 실시태양에서, 집단은 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 적어도 약 99%의 PINK 세포를 포함한다.

[0076] 산후 태반은 태아로부터 및 모체 태반 관류액으로부터의 조직 및 세포를 포함하기 때문에, 수집 방법에 따라 태아 세포만을 포함하거나 실질적으로 대다수의 태아 세포 (예를 들어, 약 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과)를 포함할 수 있거나, 태아와 모체 세포의 혼합물을 포함할 수 있다 (예를 들어, 태아 세포는 관류액의 총 유핵 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60%, 또는 50% 미만을 차지한다). 한 실시태양에서, PINK 세포는 태아 태반 세포로부터만, 예를 들어, 태반의 폐쇄 회로 관류 (상기 참조)로부터 얻어진 세포로부터만 유래하고, 여기서 관류는 실질적으로 대다수의 또는 단지 태아 태반 세포만을 포함하는 관류액을 생산한다. 다른 실시태양에서, PINK 세포는 태아 및 모체 세포로부터, 예를 들어 팬 방법에 의한 관류 (상기 참조)에 의해 얻어진 세포로부터 유래하고, 여기서 관류는 태아 및 모체 태반 세포의 혼합물을 포함하는 관류액을 생산한다. 따라서, 한 실시태양에서, 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포들의 집단을 본원에서 제공하고, 그의 실질적으로 대다수는 태아 유전자형을 갖는다. 다른 실시태양에서, 태아 유전자형을 갖는 천연 킬러 세포 및 모체 표현형을 갖는 천연 킬러 세포를 포함하는 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포들의 집단을 본원에서 제공한다.

[0077] 또한, 비-태반 공급원으로부터의 천연 킬러 세포를 포함하는 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포들의 집단을 본원에서 제공한다. 예를 들어, 한 실시태양에서, 제대혈, 말초혈, 골수로부터의 천연 킬러 세포, 또는 상기한 것 중 2 이상의 조합물을 또한 포함하는 PINK 세포들의 집단을 본원에서 제공한다. PINK 세포 및 비-태반 공급원으로부터의 천연 킬러 세포를 포함하는 천연 킬러 세포들의 집단은 세포들을, 예를 들어 약 1:10, 2:9, 3:8, 4:7:, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 10:1, 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, 9:1, 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 또는 약 1:100 등의 비로 포함할 수 있다.

[0078] 또한, 제대혈 및 단리된 PINK 세포의 조합물을 본원에서 제공한다. 다양한 실시태양에서, 제대혈은 제대혈의 밀리리터당 약 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 또는 5 x 10^8개 이상의 PINK 세포로 PINK 세포와 조합된다.

[0079] PINK 세포를 단리하는 방법을 또한 본원에서 제공한다. 한 실시태양에서, PINK 세포는 태반 관류액을 수득한 후, 태반 관류액을 $CD56^+$ 세포에 특이적으로 결합하는 조성물, 예를 들어 CD56에 대한 항체와 접촉시킨 후, 상기 결합에 기초하여 $CD56^+$ 세포를 단리하여 $CD56^+$ 세포들의 집단을 형성함으로써 수집된다. $CD56^+$ 세포들의 집단은 천연 킬러 세포들의 단리된 집단을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, $CD56^+$ 세포는 $CD16^+$ 세포에 특이적으로 결합하는 조성물, 예를 들어, CD16에 대한 항체, 및 $CD56^+$ 세포들의 집단으로부터의 $CD16^+$ 세포와 접촉된다. 다른 특정 실시태양에서, $CD3^+$ 세포가 또한 $CD56^+$ 세포들의 집단으로부터 배제된다.

[0080] 한 실시태양에서, PINK 세포는 다음과 같이 태반 관류액으로부터 수득된다. 산후 인간 태반을 방혈시키고, 태반 혈관계만을 통해, 예를 들어 약 200-800 mL의 관류 용액을 사용하여 관류시킨다. 특정 실시태양에서, 태반은 제대혈을 배수시키고 태반 혈관계를 통해, 예를 들어 관류 용액을 사용하여 세정하여, 상기 관류 전에 잔류 혈액을 제거한다. 관류액은 수집되고 임의의 잔류 적혈구를 제거하기 위해 처리된다. 관류액 내의 총 유핵 세포 내의 천연 킬러 세포는 CD56 및 CD16의 발현에 기초하여 단리될 수 있다. 특정 실시태양에서, PINK 세포의 단리는 CD56에 대한 항체를 사용하는 단리를 포함하고, 여기서 단리된 세포는 $CD56^+$이다. 다른 실시태양에서, PINK 세포의 단리는 CD16에 대한 항체를 사용하는 단리를 포함하고, 여기서 단리된 세포는 $CD16^-$이다. 다른 실시태양에서, PINK 세포의 단리는 CD56에 대한 항체를 사용하는 단리, 및 CD16에 대한 항체를 사용하는 다수의 비-PINK 세포의 배제를 포함하고, 여기서 단리된 세포는 $CD56^+$, $CD16^-$ 세포를 포함한다.

[0081] 세포 분리는 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 형광-활성화 세포 분류 (FACS), 또는 바람직하게는, 특이적 항체와 컨쥬게이팅된 마이크로비드를 사용하는 자성 세포 분류에 의해 달성할 수 있다. 자성 세포 분리는 예를 들어 AUTOMACS™ 분리기 (밀테니이 (Miltenyi))를 사용하여 수행되고 자동화될 수 있다.

[0082] 다른 측면에서, 다수의 태반 세포를 수득하고 상기 다수의 태반 세포로부터 천연 킬러 세포를 단리하는 것을 포함하는, 태반 천연 킬러 세포를 단리시키는 방법을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 태반 세포는 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포이거나 그를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 다수의 태반 세포는 태반 조직의 기계적인 및/또는 효소에 의한 소화에 의해 얻어지는 태반 세포이거나 그를 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 단리는 하나 이상의 항체를 사용하여 수행한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 하나 이상의 항체는 CD3, CD16 또는 CD56에 대한 하나 이상의 항체를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리는 상기 다수의 태반 세포 내에서 $CD56^-$ 세포로부터 $CD56^+$ 세포를 단리하는 것을 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리는 $CD56^-$ 또는 $CD16^+$인 태반 세포로부터 $CD56^+$, $CD16^-$ 태반 세포, 예를 들어, 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, PINK 세포를 단리하는 것을 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리는 $CD56^-$, $CD16^+$, 또는 $CD3^+$인 태반 세포로부터 $CD56^+$, $CD16^-$, $CD3^-$ 태반 세포를 단리하는 것을 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 태반 천연 킬러 세포를 단리하는 방법은 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 적어도 99%의 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포인 태반 세포들의 집단을 생성시킨다.

[0083] 5.4. 매칭된 관류액 및 제대혈로부터의 태반 천연 킬러 세포

[0084] 매칭된 단위의 태반 관류액 및 제대혈의 조합으로부터 수득되고 수득가능한 천연 킬러 세포 (본원에서 조합된 천연 킬러 세포로 칭함)를 또한 본원에서 제공한다. "매칭된 단위"는 본원에서 사용될 때 NK 세포가 태반 관류액 세포, 및 제대혈 세포 (여기서, 제대혈 세포는 태반 관류액이 얻어지는 태반으로부터의 제대혈로부터 수득된다)로부터 수득되는, 즉, 태반 관류액 세포 및 제대혈 세포인 것을 나타내고, 따라서 각각으로부터의 천연 킬러

세포는 동일한 개체로부터의 것이다.

[0085] 특정 실시태양에서, 조합된 태반 킬러 세포는 $CD56^+$ 및 $CD16^-$인 천연 킬러 세포만을 또는 실질적으로 그 세포만을 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 태반 킬러 세포는 $CD56^+$ 및 $CD16^-$인 NK 세포, 및 $CD56^+$ 및 $CD16^+$인 NK 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 조합된 태반 킬러 세포는 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5%의 $CD56^+CD16^-$ 천연 킬러 세포 (PINK 세포)를 포함한다.

[0086] 한 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 배양되지 않았다. 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+CD16^-$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+CD16^-$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+NKp46^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+NKp30^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+2B4^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+CD94^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다.

[0087] 다른 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 예를 들어 21일 동안 배양되었다. 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 적은 수의 $CD3^-CD56^+KIR2DL2/L3^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 배양되지 않았다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+NKp44^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 말초혈로부터의 동등한 수의 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 수의 $CD3^-CD56^+NKp30^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다.

[0088] 다른 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포는 동등한 수의 말초혈 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 많은 양의 그랜자임 B를 발현한다.

[0089] 제대혈 및 조합된 천연 킬러 세포의 조합물을 또한 본원에서 제공한다. 다양한 실시태양에서, 제대혈은 조합된 천연 킬러 세포와, 제대혈의 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개의 조합되는 천연 킬러 세포로 조합된다.

[0090] 5.5. 관류액/세포 조합물

[0091] 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 중간체 천연 킬러 세포에 추가로, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는데 사용하기 위한, 관류액 또는 세포를 포함하는 조성물을 본원에서 제공한다.

[0092] 5.5.1. 태반 관류액, 관류액 세포 및 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포의 조합물

[0093] 또한, 상기 섹션 5.1, 5.3, 또는 5.4에 설명된 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및/또는 조합된 천연 킬러 세포의 조합물을 포함하는 조성물을 본원에서 제공한다. 한 실시태양에서, 예를 들어, 다수의 태반 관류액 세포 및/또는 다수의 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포 또는 기계적으로 또는 효소에 의해 파괴된 태반 조직으로부터 얻은 태반 중간체 천연 킬러 세포로 보충된 일정 부피의 태반 관류액을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 예를 들어, 1 밀리리터의 태반 관류액은 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 태반 관류액 세포, 태

반 중간체 천연 킬러 세포, 및/또는 조합된 천연 킬러 세포로 보충된다. 다른 실시태양에서, 다수의 태반 관류액 세포는 태반 관류액, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및/또는 조합된 천연 킬러 세포로 보충된다. 다른 실시태양에서, 다수의 태반 중간체 천연 킬러 세포는 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및/또는 조합된 천연 킬러 세포로 보충된다. 특정 실시태양에서, 관류액이 보충을 위해 사용될 때, 관류액의 부피는 세포 (용액 내) + 관류액의 총 부피의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 상기 값 초과, 또는 상기 값 미만이다. 다른 특정 실시태양에서, 태반 관류액 세포가 다수의 PINK 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포와 조합될 때, 태반 관류액 세포는 일반적으로 세포 총수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 상기 값 초과, 또는 상기 값 미만을 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, PINK 세포가 다수의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포와 조합될 때, PINK 세포는 일반적으로 세포 총수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 상기 값 초과, 또는 상기 값 미만을 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, 조합된 천연 킬러 세포가 PINK 세포 및/또는 태반 관류액 세포와 조합될 때, 조합된 천연 킬러 세포는 일반적으로 세포 총수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 상기 값 초과, 또는 상기 값 미만을 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 태반 관류액 세포가 태반 관류액을 보충하기 위해 사용될 때, 세포들이 현탁되는 용액 (예를 들어, 염수 용액, 배양 배지 등)의 부피는 관류액 + 세포의 총 부피의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%, 또는 상기 값 초과, 또는 상기 값 미만을 구성하고, 여기서 PINK 세포는 보충 전에 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 세포로 현탁된다.

[0094] 다른 실시태양에서, 임의의 상기 조합물은 다시 제대혈 또는 제대혈로부터의 유핵 세포와 조합된다.

[0095] 2개 이상의 공급원, 예를 들어 2개 이상의 태반으로부터 수득하고 조합된, 예를 들어 모아진 (pooled) 태반 관류액을 또한 본원에서 제공한다. 그러한 모아진 관류액은 각각의 공급원으로부터의 관류액을 대략 동일 부피로 포함할 수 있거나, 각각의 공급원으로부터의 관류액을 상이한 부피로 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터의 상대적인 부피는 무작위로 선택될 수 있거나, 예를 들어 하나 이상의 세포성 인자, 예를 들어 시토킨, 성장 인자, 호르몬 등의 농도 또는 양; 각각의 공급원으로부터의 관류액 내의 태반 세포의 수; 또는 각각의 공급원으로부터의 관류액의 다른 특성에 기초할 수 있다. 동일한 태반의 다발 관류로부터의 관류액이 유사하게 모아질 수 있다.

[0096] 유사하게, 2개 이상의 공급원, 예를 들어 2개 이상의 태반으로부터 얻어지고 모아진 태반 관류액 세포 및 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포를 본원에서 제공한다. 그러한 모아진 세포는 2개 이상의 공급원으로부터의 세포를 대략 동일한 수로, 또는 하나 이상의 모아진 공급원으로부터 세포를 상이한 수로 포함할 수 있다. 각각의 공급원으로부터 세포의 상대적인 수는 예를 들어, 모을 세포 내의 하나 이상의 특이적 세포 종류의 수, 예를 들어, $CD34^+$ 세포의 수, $CD56^+$ 세포의 수 등에 기초하여 선택될 수 있다.

[0097] 풀 (pool)은 예를 들어 태반 관류액 세포로 보충한 태반 관류액; 태반-유래 중간체 천연 킬러 (PINK) 세포로 보충한 태반 관류액; 태반 관류액 세포 및 PINK 세포 모두로 보충한 태반 관류액; 태반 관류액으로 보충한 태반 관류액 세포; PINK 세포로 보충한 태반 관류액 세포; 태반 관류액 및 PINK 세포 모두로 보충한 태반 관류액 세포; 태반 관류액으로 보충한 PINK 세포; 태반 관류액 세포로 보충한 PINK 세포; 또는 태반 관류액 세포 및 태반 관류액 모두로 보충한 PINK 세포를 포함할 수 있다.

[0098] 예를 들어, 제시된 수의 태반 관류액 또는 PINK 세포, 또는 제시된 부피의 관류액으로부터 예상될 종양 억제의 정도 또는 양 (즉, 효력)을 결정하도록 분석되는, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및 이들의 풀 또는 이들의 조합물을 또한 본원에서 제공한다. 예를 들어, 세포의 분취액 또는 샘플 수를 공지의 수의 종양 세포와, 종양 세포가 달리 증식할 조건 하에 접촉시키고, 시간 경관에 따라 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10주 이상) 태반 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 그의 조합물의 존재 하에 종양 세포의 증식 속도를 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 그의 조합물의 부재 하에 동등한 수의 종양 세포의 증식에 대해 비교한다. 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 PINK 세포, 또는 그의 조합물 또는 풀의 효력은 예를 들어, 종양 세포 성장을 예를 들어 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 등으로 억제하기 위해 요구되는 세포의 수 또는 용액의 부피로서 표현할 수 있다.

[0099] 특정 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및 PINK 세포는 제약 등급의 투여가능 단위로서 제공된다. 그러한 단위는 구분되는 부피, 예를 들어 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL,

500 mL 등으로 제공될 수 있다. 그러한 단위는 예를 들어 특정 수의 태반 관류액 세포, 태반 중간체 천연 킬러 세포 또는 둘 모두, 예를 들어 밀리리터당 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8개 이상의 세포, 또는 단위당 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 1 x 10^{11}개 이상의 세포를 함유하도록 제공될 수 있다. 그러한 단위는 특정 수의 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 및/또는 PINK 세포 중 임의의 2개, 또는 3개 모두를 함유하도록 제공될 수 있다.

[0100] 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 PINK 세포의 상기 조합물에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 PINK 세포 중 임의의 하나, 임의의 2개, 또는 3개 모두는 수여자에게 자가성 (즉, 수여자로부터 얻는)이거나, 수여자에게 상동성 (즉, 상기 수여자와 다른 적어도 하나의 개체로부터 얻는)일 수 있다.

[0101] PINK 세포, 태반 관류액 세포 및/또는 태반 관류액의 임의의 상기 조합물 또는 풀은 예를 들어, 태반 관류액, 말초혈, 제대혈, 골수 등으로부터의 $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 조합물은 밀리리터당 약, 적어도 약, 또는 최대로 약 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6개 이상의 상기 천연 킬러 세포, 또는 단위당 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 1 x 10^{11}개 이상의 세포를 포함한다. $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포는 천연 공급원으로부터 단리된 상태로 사용될 수 있거나, 상기 조합물 또는 풀 중 하나에 포함시키기 전에 팽창될 수 있다. $CD56^+CD16^+$ NK 세포는 자가성 (즉, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 PINK 세포와 동일한 개체로부터 얻거나; 수여자로부터 얻은) 또는 상동성 (즉, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 PINK 세포와 상이한 개체로부터 유래하거나; 수여자가 아닌 개체로부터 유래하는)일 수 있다.

[0102] 바람직하게는, 각각의 단위는 부피, 세포의 수, 세포의 종류, 단위가 특정 세포의 종류를 위해 농축되었는지 여부, 및/또는 단위 내의 제시된 수의 세포의 효력, 또는 특정 종류(들)의 종양 세포 증식의 측정가능한 억제를 일으키는 단위의 제시된 수의 밀리리터를 명시하기 위해 표지된다.

[0103] 태반 중간체 천연 킬러 세포를 단독으로 또는 태반 관류액 세포 및/또는 태반 관류액과 조합으로 포함하는 조성물을 또한 본원에서 제공한다. 따라서, 다른 측면에서, 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포를 포함하는 조성물을 본원에서 제공하고, 여기서 상기 천연 킬러 세포는 태반 관류액으로부터 단리되고, 상기 천연 킬러 세포는 조성물 내의 세포의 적어도 50%를 구성한다. 특정 실시태양에서, 상기 천연 킬러 세포는 조성물 내의 세포의 적어도 80%를 구성한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 조성물은 단리된 $CD56^+$, $CD16^+$ 천연 킬러 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 $CD56^+$, $CD16^+$ 천연 킬러 세포는 상기 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포와 상이한 개체로부터의 것이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 천연 킬러 세포는 단일 개체로부터의 것이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리된 천연 킬러 세포는 적어도 2개의 상이한 개체로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액을 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 천연 킬러 세포와 동일한 개체로부터의 것이다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 천연 킬러 세포와 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 천연 킬러 세포와 동일한 개체로부터의 것이다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 천연 킬러 세포와 상이한 개체로부터의 것이다. 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 추가로 포함하고, 여기서 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터의 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 실시태양의 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 관류액은 적어도 2개의 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 실시태양의 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 적어도 2개의 개체로부터의 것이다.

[0104] 5.5.2. 부착성 태반 줄기 세포를 포함하는 조성물

[0105] 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 다수의 태반 관류액 세포, 및/또는 다수의 PINK 세포, 또는 임의의 상기한 것의 조합물 또는 풀은 부착성 태반 줄기 세포로 보충된다. 그러한 줄기 세포는 예를 들어, 미국 특허 7,045,148 및 7,255,879 (Hariri)에 기재되어 있다. 부착성 태반 줄기 세포는 영양모세포가 아니다.

[0106] 태반 관류액, 다수의 태반 관류액 세포, 및/또는 다수의 PINK 세포, 또는 임의의 상기한 것의 조합물 또는 풀은 예를 들어 밀리리터당 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8개 이상의 세포, 또는 1 x 10^4, 5 x 10^4, 1 x 10^5, 5 x 10^5, 1 x 10^6, 5 x 10^6, 1 x 10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 1 x 10^{11}개 이상의 부착성 태반 세포로 보충될 수 있다. 예를 들어, 조합물 내의 부착성 태반 줄기 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 40회 이상의 집단 배가 (doubling) 동안 배양된 부착성 태반 줄기 세포일 수 있다.

[0107] 부착성 태반 줄기 세포는 1차 배양액 내에서 또는 세포 배양액 내에서 배양될 때 조직 배양 기질, 예를 들어, 조직 배양 용기 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱)에 부착한다. 배양액 내의 부착성 태반 줄기 세포는 중심 세포체로부터 뻗어나오는 많은 세포질성 돌기를 갖는, 전체적으로 섬유아세포양 별모양 외형을 취한다. 그러나, 태반 줄기 세포는 섬유아세포보다 매우 많은 그러한 돌기를 보이므로, 부착성 태반 줄기 세포는 동일한 조건 하에 배양된 섬유아세포로부터 형태학상 구분가능하다. 형태학상으로, 태반 줄기 세포는 또한 일반적으로 배양액 내에서 보다 둥글거나 자갈돌 형태를 취하는 조혈 줄기 세포로부터 구분가능하다.

[0108] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법에서 유용한 부착성 태반 줄기 세포, 및 태반 줄기 세포들의 집단은 줄기 세포, 또는 줄기 세포를 포함하는 세포의 집단을 확인 및/또는 단리하기 위해 사용될 수 있는 많은 마커를 발현한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법에서 유용한 부착성 태반 줄기 세포, 및 부착성 줄기 세포 집단은 태반 또는 그의 임의의 일부 (예를 들어, 양막, 융모막, 양막-융모막판, 태반 엽 (cotyledons), 탯줄 등)로부터 직접 수득한 줄기 세포 및 줄기 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 한 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포 집단은 배양액 내의 부착성 태반 줄기 세포의 집단 (즉, 2 이상), 예를 들어 용기, 예를 들어, 백 내의 집단이다.

[0109] 부착성 태반 줄기 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105, CD200, HLA-G 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38 또는 CD45를 발현하지 않는다. 부착성 태반 줄기 세포는 또한 HLA-ABC (MHC-1) 및 HLA-DR을 발현할 수 있다. 이들 마커는 부착성 태반 줄기 세포를 확인하고, 태반 줄기 세포를 다른 줄기 세포 종류로부터 구분하기 위해 사용될 수 있다. 태반 줄기 세포는 CD73 및 CD105를 발현할 수 있기 때문에 중간엽 줄기 세포-유사 특징을 가질 수다. 그러나, 부착성 태반 줄기 세포는 CD200 및 HLA-G (태아-특이적 마커)를 발현할 수 있기 때문에, 이들은 CD200이나 HLA-G를 발현하지 않는 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포로부터 구분될 수 있다. 동일한 방식으로, CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현 결핍으로 부착성 태반 줄기 세포는 비-조혈 줄기 세포로서 확인된다.

[0110] 한 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$이고, 여기서 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다. 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 다른 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

[0111] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$이고,여기서 상기 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다. 상기 집단의 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $HLA\text{-}G^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 태반 줄기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

[0112] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$이고, 여기서 상기 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다. 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $HLA\text{-}G^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$,

$CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체를 생산한다.

[0113] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이고, 여기서 상기 부착성 줄기 세포 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다. 상기 집단의 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD200^+$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ 및 $CD200^+$이다.

[0114] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 줄기 세포이고, 여기서 상기 줄기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체를 생산하고, 상기 부착성 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다. 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다.

[0115] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $OCT\text{-}4^+$ 줄기 세포이고, 여기서 상기 부착성 태반 줄기 세포는 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 하나 이상의 배아-유사체를 생산하고, 상기 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제하는 것으로 확인되었다.

[0116] 다양한 실시태양에서, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 상기 단리된 태반 세포가 $OCT4^+$ 줄기 세포이다. 상기 집단의 특정 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD34^-$, $CD38^-$, 또는 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 집단은 팽창, 예를 들어, 적어도 1회, 적어도 3회, 적어도 5회, 적어도 10회, 적어도 15회, 또는 적어도 20회 계대배양되었다.

[0117] 임의의 상기 실시태양의 보다 특정한 실시태양에서, 부착성 태반 세포는 ABC-p (태반-특이적 ABC 트랜스포터 단백질; 예를 들어, [Allikmets et al., Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)] 참조)를 발현한다.

[0118] 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 및 $CD133^-$이다. 다른 실시태양에서, 부착성 태반 줄기 세포, 태반 줄기 세포는 IL-6, IL-8 및 단핵구 화학주성 단백질 (MCP-1)을 구성적으로 분비한다.

[0119] 각각의 상기 언급된 태반 줄기 세포는 포유동물 태반로부터 직접 얻어지거나 단리된 태반 줄기 세포, 또는 배양되고 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30회 이상 계대배양된 태반 줄기 세포, 또는 그의 조합물을 포함할 수 있다. 상기 설명된 종양 세포 억제성의 다수의 부착성 태반 줄기 세포는 약 또는 적어도 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상 또는 그 이하의 부착성 태반 줄기 세포를 포함할 수 있다.

[0120] 5.5.3. 태반 줄기 세포 조건화 배지를 포함하는 조성물

[0121] PINK 세포, 태반 관류액 및/또는 태반 관류액, 및 추가로 조건화된 배지를 포함하는 종양-억제 조성물의 용도를 또한 본원에서 제공한다. 부착성 태반 줄기 세포, 태반 관류액 세포 및/또는 태반 중간체 천연 킬러 세포는 종양 세포 억제성인 조건화 배지, 즉, 다수의 하나 이상의 종류의 면역 세포에 대해 검출가능한 종양 세포 억제 효과를 갖는 줄기 세포에 의해 분비되거나 배출되는 하나 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 실시태양에서, 조건화 배지는 태반 세포 (예를 들어, 줄기 세포, 태반 관류액 세포,

PINK 세포)가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 동안 성장된 배지를 포함한다. 다른 실시태양에서, 조건화 배지는 태반 세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 융합, 또는 100% 융합까지 성장되는 배지를 포함한다. 그러한 조건화 배지는 태반 세포 또는 다른 종류의 세포의 별개의 집단의 배양을 지지하기 위해 사용될 수 있다. 다른 실시태양에서, 본원에서 제공되는 조건화 배지는 부착성 태반 줄기 세포 및 비-태반 줄기 세포가 배양된 배지를 포함한다.

[0122] 그러한 조건화 배지는 임의의 태반 관류액 태반 관류액 세포, 및/또는 태반 중간체 천연 킬러 세포, 또는 이들의 임의의 조합물과 조합되어 종양 세포 억제 조성물을 형성할 수 있다. 특정 실시태양에서, 조성물은 부피 기준으로 절반 미만의 조건화 배지, 예를 들어, 부피 기준으로 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 또는 상기 값 미만의 조건화 배지를 포함한다.

[0123] 따라서, 한 실시태양에서, 태반 줄기 세포의 배양액으로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물을 본원에서 제공하고, 여기서 상기 태반 줄기 세포는 (a) 기질에 부착하고; (b) CD200 및 HLA-G를 발현하거나, CD73, CD105 및 CD200을 발현하거나, CD200 및 OCT-4를 발현하거나, CD73, CD105 및 HLA-G를 발현하거나, CD73 및 CD105를 발현하고, 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포들의 집단 내에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하거나, 또는 OCT-4를 발현하고, 상기 집단이 배아-유사체의 형성을 허용하는 조건 하에 배양될 때 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포들의 집단 내에서 하나 이상의 배아-유사체의 형성을 용이하게 하고; (c) 종양 세포 또는 종양 세포들의 집단의 성장 또는 증식을 검출가능하게 억제한다. 특정 실시태양에서, 조성물은 다수의 상기 태반 줄기 세포를 추가로 포함한다. 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 다수의 비-태반 세포를 포함한다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 비-태반 세포는 CD34+ 세포, 예를 들어, 조혈 전구 세포, 예를 들어 말초혈 조혈 전구 세포, 제대혈 조혈 전구 세포, 또는 태반 혈액 조혈 전구 세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 다른 줄기 세포, 예를 들어 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포를 포함할 수 있다. 비-태반 세포는 또한 하나 이상의 종류의 성체 세포 또는 세포주일 수 있다. 다른 특정 실시태양에서, 조성물은 항증식제, 예를 들어, 항-MIP-1α 또는 항-MIP-1β 항체를 포함한다.

[0124] 특정 실시태양에서, 태반 세포-조건화 배양 배지 또는 상등액은 다수의 종양 세포들과, 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 또는 약 5:1의 태반 줄기 세포 대 종양 세포의 비로 동시-배양된 다수의 태반 줄기 세포로부터 수득한다. 예를 들어, 조건화 배양 배지 또는 상등액은 약 1×10^5, 약 1×10^6, 약 1×10^7, 또는 약 1×10^8개 이상의 태반 줄기 세포를 포함하는 배양액으로부터 수득할 수 있다. 다른 특정 실시태양에서, 조건화 배양 배지 또는 상등액은 약 1×10^5 내지 약 5×10^5 태반 줄기 세포 및 약 1×10^5 종양 세포; 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 태반 줄기 세포 및 약 1×10^6 종양 세포; 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 태반 줄기 세포 및 약 1×10^7 종양 세포; 또는 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 태반 줄기 세포 및 약 1×10^8 종양 세포를 포함하는 동시-배양액으로부터 수득한다.

[0125] 특정 실시태양에서, 70 kg 개체에 투여에 적합한 조건화 배지는 약 200 mL 배양 배지 내의 약 7천만 개의 태반 줄기 세포에 의해 조건화된 상등액을 포함한다.

[0126] 조건화 배지는 투여가능한 제약 등급 제품을 제조하기 위해 농축될 수 있다. 예를 들어, 조건화 배지는 물의 제거에 의해, 예를 들어, 증발, 동결건조 등에 의해 약 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% 이상 농축될 수 있다. 특정 실시태양에서, 예를 들어, 약 7천만 개의 태반 줄기 세포로부터 200 mL 조건화 배지는 약 180 mL, 160 mL, 140 mL, 120 mL, 100 mL, 80 mL, 60 mL, 40 mL, 20 mL 이하의 부피로 농축될 수 있다. 조건화 배지는 또한 예를 들어, 증발, 동결건조 등에 의해, 예를 들어 분말로 실질적으로 건조될 수 있다.

[0127] 5.6. 관류액 및 태반 세포의 보존

[0128] 태반 관류액 또는 태반 세포, 예를 들어, 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및 PINK 세포는 보존, 즉, 장기 보관을 허용하는 조건 하에, 또는 예를 들어, 세포자멸 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건 하에 놓일 수 있다.

[0129] 태반 관류액은 태반 세포 조성물을 적어도 태반의 일부를 통해, 예를 들어, 태반 혈관계를 통해 통과시켜 생산할 수 있다. 태반 세포 수집 조성물은 관류액 내에 함유된 세포를 보존하는 역할을 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 그러한 태반 세포 수집 조성물은 상기 섹션 5.1에 기재되어 있고, 예를 들어, 관련 미국 특허 출원

11/648,812 (발명의 명칭: "Improved Composition for Collecting and Preserving Placental Stem Cells and Methods of Using the Composition"; 2006년 12월 28일자 출원)에 기재된 바와 같은 세포자멸 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-보유 퍼플루오로탄소를 포함하는 조성물이다. 한 실시태양에서, 태반 또는 태반 조직을 통해 통과된 태반 세포 수집 조성물은 아래 섹션 5.4에 설명되는 방법에서 유용한 태반 관류액이다.

[0130] 한 실시태양에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 세포를 세포자멸의 억제제 및 산소-보유 퍼플루오로탄소를 포함하는 태반 세포 수집 조성물과 접촉시킴으로써 포유동물, 예를 들어, 인간, 산후 태반으로부터 수집되고, 여기서 상기 세포자멸의 억제제는 세포자멸의 억제제와 접촉되지 않은 줄기 세포들의 집단에 비해 줄기 세포들의 집단에서 세포자멸을 감소 또는 예방하기 위해 충분한 시간 동안 충분한 양으로 존재한다. 예를 들어, 태반은 태반 세포 수집 조성물로 관류시킬 수 있고, 태반 세포, 예를 들어, 총 유핵 태반 세포가 그로부터 단리된다. 특정 실시태양에서, 세포자멸의 억제제는 카스파제 억제제이다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 세포자멸의 억제제는 JNK 억제제이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 JNK 억제제는 상기 줄기 세포의 분화 또는 증식을 조정하지 않는다. 다른 실시태양에서, 태반 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸의 억제제 및 상기 산소-보유 퍼플루오로탄소를 별개의 상으로 포함한다. 다른 실시태양에서, 태반 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸의 억제제 및 상기 산소-보유 퍼플루오로탄소를 에멀젼으로 포함한다. 다른 실시태양에서, 태반 세포 수집 조성물은 유화제, 예를 들어, 레시틴을 추가로 포함한다. 다른 실시태양에서, 상기 세포자멸 억제제 및 상기 퍼플루오로탄소는 태반 세포와 접촉 시점에 약 0℃ 내지 약 25℃이다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 세포자멸 억제제 및 상기 퍼플루오로탄소는 태반 세포와 접촉 시점에 약 2℃ 내지 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃이다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 접촉은 상기 줄기 세포들의 집단의 수송 동안 수행된다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 접촉은 상기 줄기 세포들의 집단의 동결 및 해동 동안 수행된다.

[0131] 다른 실시태양에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 관류액 및/또는 세포를 세포자멸의 억제제 및 장기-보존 화합물과 접촉시킴으로써 수집되고 보존될 수 있고, 여기서 상기 세포자멸의 억제제는 세포자멸의 억제제와 접촉되지 않은 관류액 또는 태반 세포에 비해 세포의 세포자멸을 감소 또는 방지하기 위해 충분한 시간 동안 충분한 양으로 존재한다.

[0132] 특정 실시태양에서, 장기-보존 화합물은 UW 용액 (미국 특허 4,798,824에 기재되고; 또한 VIASPAN™으로서 공지됨; 또한 [Southard et al., Transplantation 49(2):251-257 (1990)] 참조) 또는 미국 특허 5,552,267 (Stern et al.)에 기재되어 있는 용액이다. 다른 실시태양에서, 상기 장기-보존 조성물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, 또는 그의 조합물이다. 다른 실시태양에서, 태반 세포 수집 조성물은 산소-보유 퍼플루오로탄소를 2개의 상 내에 또는 에멀젼으로서 추가로 포함한다.

[0133] 방법의 다른 실시태양에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 관류 동안 세포자멸 억제제 및 산소-보유 퍼플루오로탄소, 장기-보존 화합물, 또는 그의 조합물을 포함하는 태반 세포 수집 조성물과 접촉된다. 다른 실시태양에서, 태반 세포는 관류에 의한 수집 후에 상기 줄기 세포 수집 화합물과 접촉된다.

[0134] 일반적으로, 태반 세포 수집, 농축 및 단리 동안, 저산소증 및 기계적인 스트레스로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 방법의 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 세포, 또는 태반 세포들의 집단은 수집, 농축 또는 단리 동안 상기 보존 동안 6시간 미만 동안 저산소 조건에 노출되고, 여기서 저산소 조건은 정상 혈액 산소 농도 미만인 산소의 농도이다. 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 세포들의 집단은 상기 보존 동안 2시간 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출된다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 상기 태반 세포들의 집단은 1시간 미만, 또는 30분 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출되거나, 수집, 농축 또는 단리 동안 저산소 조건에 노출되지 않는다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 태반 세포들의 집단은 수집, 농축 또는 단리 동안 전단 스트레스에 노출되지 않는다.

[0135] 본원에서 제공되는 태반 세포는 작은 용기, 예를 들어 앰플 내에서 예를 들어, 냉동보존 배지 내에서 냉동보존될 수 있다. 적합한 냉동보존 배지는 예를 들어, 성장 배지를 포함하는 배양 배지, 또는 세포 동결 배지, 예를 들어 상업적으로 이용가능한 세포 동결 배지, 예를 들어, C2695, C2639 또는 C6039 (시그마 (Sigma))를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 냉동보존 배지는 바람직하게는 DMSO (디메틸술폭시드)를 예를 들어 약 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 냉동보존 배지는 추가의 물질, 예를 들어, 메틸셀룰로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 태반 세포는 바람직하게는 냉동보존 동안 약 1℃/min으로 냉각된다. 바람직한 냉동보존 온도는 약 -80℃ 내지 약 -180℃, 바람직하게는 약 -125℃ 내지 약 -140℃이다. 냉동보존된 태반 세포는 사용하기 위해 해동 전에 액체 질소에 이송될 수 있다. 일부 실시태양에서, 예를 들어, 일단 앰플이 약 -90℃에 도달하면, 액체 질소 저장 영역으로 이송한다. 냉동보존된 세포는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도, 바람직하게는 약

37℃의 온도에서 해동된다.

[0136] 5.7. 종양 세포 성장을 억제하기 위한 태반 관류액, PINK 세포, 및 조합된 태반 천연 킬러 세포의 용도

[0137] 태반 관류액, 태반 관류액으로부터 단리된 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 또는 단리된 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포를 사용하여 종양 세포의 성장, 예를 들어, 증식을 억제하는 방법을 또한 본원에서 제공한다.

[0138] 한 실시태양에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을, 태반 관류액, 관류액 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 PINK 세포와 접촉되지 않은 동일한 종류의 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들에 비해 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식이 검출가능하게 감소되도록 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 PINK 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다.

[0139] 본원에서 사용될 때, "접촉하는"은 한 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및/또는 단리된 조합된 천연 킬러 세포; 및 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들 사이의 직접적인 물리적, 예를 들어, 세포-세포, 접촉을 포함한다. 다른 실시태양에서, "접촉하는"은 동일한 물리적 공간 내의 존재를 포함하고, 예를 들어, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및/또는 단리된 조합된 천연 킬러 세포는 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들과 동일한 용기, 예를 들어, 배양 접시, 다수 웰 내에 놓인다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 "접촉시키는" 것은 예를 들어, 태반 관류액 또는 세포, 예를 들어, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 태반 중간체 천연 킬러 세포를 개체, 예를 들어, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 갖는 인간, 예를 들어, 암 환자 내로 주사 또는 주입함으로써 달성한다.

[0140] 특정 실시태양에서, 태반 관류액은 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 갖는 개체, 예를 들어, 암 환자에 검출가능한 치료 이익을 생성시키는 임의의 양으로 사용된다. 다른 특정 실시태양에서, 태반 관류액 세포, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및/또는 조합된 천연 킬러 세포는 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 갖는 개체에 검출가능한 치료 이익을 생성시키는 임의의 양으로 사용된다. 따라서, 다른 실시태양에서, 접촉이 개체에게 검출가능하게 또는 입증가능하게 치료상 유익하도록, 개체 내에서 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포, 또는 다수의 PINK 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포, 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다.

[0141] 본원에서 사용될 때, "치료 이익"은 예를 들어, 종양 크기의 감소; 종양의 팽창의 감소 또는 중단; 단위 부피당 조직 샘플, 예를 들어, 혈액 샘플 내의 암 세포의 수의 감소; 개체가 갖는 특정 암의 임의의 증상의 임상적 개선; 개체가 갖는 특정 암의 임의의 증상의 악화의 감소 또는 중단 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 임의의 하나 이상의 그러한 치료 이익을 달성하는 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 PINK 세포의 접촉이 치료상 유익한 것으로 말해진다.

[0142] 특정 실시태양에서, 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 태반 중간체 천연 킬러 세포는 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들을 갖는 개체, 예를 들어, 암 환자에 검출가능한 치료 이익을 생성시키는 임의의 양 또는 수로 사용된다. 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 및/또는 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 중간체 천연 킬러 세포는 그러한 개체에게 수많은 세포로 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체에게 약, 적어도 약 또는 최대 약 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 또는 5×10^{10}개의 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 및/또는 천연 킬러 세포가 투여될 수 있다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포는 그러한 개체에게 수많은 세포로 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체에게 개체의 kg당 약, 적어도 약 또는 최대 약 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 또는 5×10^{10}개의 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 천연 킬러 세포가 투여될 수 있다. 태반 관류액 세포 및/또는 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포는 그러한 개체에게, 태반 관류액 세포 및/또는 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 중간체 천연 킬러 세포, 및 상기 개체 내의 종양 세포 사이의 대략적인 비에 따라 투여될 수 있다. 예를 들어, 태반 관류액 세포 및/또는 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, 태반 중간체 천연 킬러 세포는 개체 내의 종양 세포의 수에 대해 약, 적어

도 약 또는 최대 약 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1의 비로 상기 개체에게 투여될 수 있다. 그러한 개체 내의 종양 세포의 수는 예를 들어 개체로부터의 조직의 샘플, 예를 들어, 혈액 샘플, 생검 등의 내의 종양 세포의 수를 계수함으로써 추정할 수 있다. 특정 실시태양에서, 예를 들어, 고형 종양에 대해, 상기 계수는 대략의 종양 부피를 얻기 위해 종양 또는 종양들의 영상화와 조합하여 수행한다.

[0143] 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포의 조합물을 사용하는 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식 억제 방법을 또한 본원에서 제공한다. 다양한 실시태양에서, 종양 세포 또는 종양 세포들을 다수의 태반 관류액 세포 또는 PINK 세포로 보충한 태반 관류액; 태반 관류액 또는 다수의 PINK 세포로 보충한 태반 관류액 세포; 태반 관류액 및 태반 관류액 세포로 보충한 PINK 세포; 다수의 PINK 세포 및 다수의 조합된 천연 킬러 세포; 다수의 조합된 천연 킬러 세포 및 다수의 태반 관류액 세포; 조합된 천연 킬러 세포로 보충한 태반 관류액; 또는 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및 PINK 세포 모두의 조합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공한다.

[0144] 하나의 특정 실시태양에서, 예를 들어, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식은 다수의 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 및/또는 다수의 태반 중간체 천연 킬러 세포로 보충한 태반 관류액에 의해 억제된다. 특정 실시태양에서, 예를 들어, 태반 관류액 1 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6개 이상의 태반 관류액 세포 또는 태반 중간체 천연 킬러 세포로 보충된다. 다른 특정 실시태양에서, 태반 관류액, 예를 들어, 1 단위 (즉, 단일 태반으로부터의 수집물), 또는 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000 mL의 관류액은 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 태반 관류액 세포로 보충된다.

[0145] 다른 특정 실시태양에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식은 태반 관류액, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 태반 중간체 천연 킬러 세포로 보충된 다수의 태반 관류액 세포에 의해 억제된다. 보다 특정한 실시태양에서, 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 태반 관류액 세포가 밀리리터당 약 또는 적어도 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 PINK 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 PINK 세포로 보충된다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 태반 관류액 세포, PINK 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 태반 관류액 세포는 약 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000 mL의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

[0146] 다른 특정 실시태양에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식은 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포로 보충된 다수의 태반 중간체 천연 킬러 세포에 의해 억제된다. 보다 특정한 실시태양에서, 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, 5×10^8개 이상의 태반 중간체 천연 킬러 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 PINK 세포는 밀리리터당 약 1×10^4,

5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포로 보충된다. 다른 보다 특정한 실시태양에서, 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 태반 중간체 천연 킬러 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포는 약 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000 mL의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

[0147] 다른 실시태양에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식은 종양 세포 또는 종양 세포들을 부착성 태반 줄기 세포로 보충한 태반 관류액, 관류액 세포, PINK 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포와 접촉시킴으로써 억제된다. 특정 실시태양에서, 태반 관류액, 관류액 세포 또는 PINK 세포는 밀리리터당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8개 이상의 부착성 태반 줄기 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11}개 이상의 부착성 태반 줄기 세포로 보충된다.

[0148] 다른 실시태양에서, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식은 종양 세포 또는 종양 세포들을 부착성 태반 줄기 세포-조건화 배지, 예를 들어, 관류액, 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 PINK 세포의 1 단위당, 또는 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 또는 10^{10}개의 세포당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.1, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL의 줄기 세포-조건화 배양 배지로 보충한 태반 관류액, 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 및/또는 PINK 세포와 접촉시킴으로써 억제된다.

[0149] 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어, PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및 그의 조합물 및 풀은 초기에 수득한 그대로 사용되고, 즉, 관류 동안 수득한 관류액, 그러한 관류액으로부터 단리된 태반 관류액 세포, 그러한 관류액과 매칭된 제대혈로부터의 조합된 천연 킬러 세포, 또는 그러한 관류액 또는 그러한 태반 관류액 세포로부터 단리된 PINK 세포가 사용된다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, PINK 세포, 및 그의 조합물 및 풀은 사용 전에 가공된다. 예를 들어, 태반 관류액은 태반으로부터 수집된 그대로, 그의 원래대로의 미가공 형태로 사용될 수 있다. 태반 관류액은 또한 예를 들어, 하나 이상의 종류의 세포의 음성 선택, 탈수, 동결건조 및 재수화 등에 의한 부피의 감소에 의해 사용 전에 가공될 수 있다. 유사하게, 관류액 세포의 집단은 태반 관류액으로부터 초기에 단리된 그대로, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포로서 사용될 수 있거나, 예를 들어, 하나 이상의 세포 종류 (예를 들어, 적혈구)를 제거하기 위해 가공될 수 있다. PINK 세포는 예를 들어, CD56 마이크로비드를 사용하여 태반 관류액으로부터 초기에 단리된 그대로 사용될 수 있거나, 예를 들어, 하나 이상의 비-킬러 세포 종류를 제거하기 위해 가공될 수 있다.

[0150] 다른 실시태양에서, 종양 세포 또는 종양 세포들을 태반 관류액, 태반 관류액 세포, PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 또는 그를 포함하는 풀 또는 조합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포 또는 종양 세포들의 증식을 억제하는 방법을 본원에서 제공하고, 여기서 상기 태반 관류액, 태반 관류액 세포, PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 또는 그를 포함하는 풀 또는 조합물은 상기 접촉에 앞서 일정 기간 동안 인터류킨-2 (IL-2)와 접촉되었다. 특정 실시태양에서, 상기 일정 기간은 상기 접촉에 앞서 약, 적어도 또는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48시간이다.

[0151] 관류액, 관류액 세포, PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 또는 그를 포함하는 풀 및/또는 조합물은 항암 요법의 과정 동안 암을 가진 개체 또는 종양 세포를 가진 개체에게 1회 투여될 수 있거나, 요법 동안 다수회, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23시간마다 1회, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다 1회, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10주 이상마다 1회 투여될 수 있다. 관류액, 관류액 세포, PINK 세포, 그를 포함하는 풀 및/또는 조합물은, 관류액, 관류액 세포,

PINK 세포, 그를 포함하는 풀 및/또는 조합물이 과거에 암이 있는 또는 종양 세포를 가진 개인에게 투여되었는지에 무관하게 투여될 수 있다. 따라서, 본원에서 제공되는 방법은 암을 가진 또는 종양 세포를 가진 개인에게 태반 관류액, 관류액 세포, PINK 세포, 그를 포함하는 풀 및/또는 조합물의 임의의 조합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0152] 특정 실시태양에서, 종양 세포는 혈액 암 세포이다. 다양한 특정 실시태양에서, 종양 세포는 원발성 관상 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종 (CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 폐암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 결직장 암종 세포 또는 결직장 선암종 세포이다.

[0153] 태반 관류액, 관류액 세포, PINK 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 그를 포함하는 풀 및/또는 조합물은 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 요법 계획의 일부일 수 있다. 그러한 항암제는 당업계에 잘 공지되어 있다. 관류액, 관류액 세포, PINK 세포, 그를 포함하는 풀 및/또는 조합물에 추가로 암을 가진 개체에게 투여될 수 있는 특정 항암제는 다음을 포함하고 이로 제한되지 않는다: 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 염산염; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페를린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타미드; 비스안트렌 염산염; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 황산염; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부술판; 칵티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 염산염; 카르젤레신; 세데핑골; 셀레콕시브 (COX-2 억제제); 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파미드; 사이타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 염산염; 데시타빈; 덱소마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 염산염; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 듀아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미틴 염산염; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 염산염; 에르불로졸; 에소루비신 염산염; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 염산염; 파자라빈; 펜레티니드; 플록스유리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 겜시타빈; 겜시타빈 염산염; 하이드록시우레아; 이다루비신 염산염; 이포스파미드; 일모포신; 이프로플라틴; 이리노테칸 염산염; 란레오티드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤리드 아세테이트; 리아로졸 염산염; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로소잔트론 염산염; 마소프로콜; 매이탄신; 메클로레타민 염산염; 메제스트롤 아세테이트; 멜렌제스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가릴; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 메토트렉세이트 나트륨; 메토프린; 메투레데파; 미틴도미드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스퍼; 미토탄; 미톡산트론 염산염; 마이코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가세; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트; 퍼포스파미드; 피포브로만; 피포설판; 피록산트론 염산염; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 염산염; 퓨로마이신; 퓨로마이신 염산염; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핑골; 사핑골 염산염; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로제르마늄 염산염; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 설포페누르; 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 탁소테레; 테가푸르; 텔록산트론 염산염; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토렐린; 투불로졸 염산염; 우라실 머스타드; 우레데파; 바프레오티드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈류로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈졸리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴, 지노스타틴; 조루비신 염산염.

[0154] 다른 항암 약물은 다음을 포함하고, 이로 제한되지 않는다: 20-에피-1,25 디히드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실풀벤; 아데시페놀; 아도젤레신; 알데스류킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레불린산; 암루비신; 암사크린; 아나그렐리드; 아나스트로졸; 안드로그라폴리드; 혈관형성 억제제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-척추 발생 단백질-1; 항안드로겐, 전립선 암종; 항에스트로겐; 항네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 아피디콜린 글리시네이트; 세포자멸 유전자 조절제; 세포자멸 조절제; 퓨린 결여산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 데아미나제; 아술라크린; 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 바카틴 III 유도체; 발라놀; 바티마스타트; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도체; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베툴린산; bFGF 억제제; 비칼루트아미드; 비산트렌; 비사지리디닐스페르민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 술폭스이민; 칼시

포트리올; 칼포스틴 C; 캄토테신 유도체; 카페시타빈; 카복스아미드-아미노-트리아졸; 카복시아미도트리아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골조직 유도된 억제제; 카르젤레신; 카제인 키나제 억제제 (ICOS); 카스타노스페르민; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로를른스; 클로로퀴녹살린 설폰아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나제닌; 크람베시딘 816; 크리스나톨; 크립토피신 8; 크립토피신 A 유도체; 큐라신 A; 시클로펜탄트라퀴논; 시클로플라탐; 시페마이신; 시타라빈 옥포스페이트; 세포용해 인자; 시토스타틴; 다클릭시맵; 데시타빈; 데히드로디뎀닌 B; 데슬로렐린; 덱사메타손; 덱시포스파미드; 덱스라족산; 덱스베라파밀; 디아지쿠온; 디뎀닌 B; 디독스; 디에틸노르스페르민; 디히이드로-5-아자시티딘; 디히드로탁솔, 9-; 디옥사마이신; 디페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 돌라세트론; 독시플루리딘; 독소루비신; 드롤록시펜; 드로나비놀; 듀오카마이신 SA; 엡셀렌; 에코무스틴; 에델포신; 에드레콜로맵; 에플로르니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테리드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로겐 효능제; 에스트로겐 길항제; 에타니다졸; 에토포시드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티니드; 필그라스팀; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈; 플루오로다우노루니신 염산염; 포르페니멕스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 젤라티나제 억제제; 젬시타빈; 글루타티온 억제제; 헵술팜; 헤레굴린; 헥사메틸렌 비스아세트아미드; 하이페리신; 이반드론산; 이다루비신; 요오독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이마티닙 (예를 들어, GLEEVEC®); 이미퀴모드; 면역자극 펩티드; 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제; 인터페론 작용제; 인터페론; 인터류킨; 요오벤구안; 요오도독소루비신; 이포메아놀, 4-; 이로플락트; 이르소글라딘; 이소벤가졸; 이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키노리드; 카할랄리드 F; 라멜라린-N 트리아세테이트; 란레오티드; 레이나마이신; 레노그라스팀; 렌티난 설페이트; 렙톨스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤리드 + 에스트로겐 + 프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친지성 이당류 펩티드; 친지성 백금 화합물; 리소클린아미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로속산트론; 록소리빈; 루르토테칸; 루테튬 텍사피린; 리소필린; 용해성 펩티드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴리신 억제제; 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메티오니나제; 메토클로프라미드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스팀; 미토구아존; 미토락톨; 미토마이신 유사체; 미토나피드; 미토톡신 섬유아세포 성장 인자-사포린; 미톡산트론; 모파로텐; 몰그라모스팀; 에르비툭스, 인간 융모막 고나도트로핀; 모노포스포릴 지질 A + 미오박테리움 세포벽 sk; 모피다몰; 머스타드 항암제; 미카퍼옥시드 B; 마이코박테리움 세포벽 추출물; 미리아포론; N-아세틸디날린; N-치환된 벤즈아미드; 나파렐린; 나그레스팁; 날록손 + 펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라시팀; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 닐루타미드; 니사마이신; 일산화질소 조절제; 니트록시드 항산화제; 니트룰린; 오블리머센 (GENASENSE®); O^6-벤질구아닌; 옥트레티드; 오키세논; 올리고뉴클레오티드; 오나프리스톤; 온단세트론; 온단세트론; 오라신; 경구 시토킨 유도인자; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴; 옥사유노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도체; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 페가스파르가제; 펠데신; 펜토산 폴리설페이트 나트륨; 펜토스타틴; 펜트로졸; 페르플루브론; 페르포스파미드; 페릴릴 알콜; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제; 피시바닐; 필로카르핀 염산염; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노겐 활성인자 억제제; 백금 착체; 백금 화합물; 백금-트리아민 복합체; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아좀 억제제; 단백질 A-기재 면역 조절제; 단백질 키나제 C 억제제; 단백질 키나제 C 억제제, 미크로알갈; 단백질 티로신 포스파타제 억제제; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제; 푸르푸린; 피라졸로아크리딘; 피리독실화된 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 컨쥬게이트; raf 길항제; 랄티트렉세드; 라모세트론; ras 파르네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제; ras 억제제; ras-GAP 억제제; 탈메틸화된 레텔립틴; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레티나미드; 로히투킨; 로무르티드; 로퀴니멕스; 루비기논 B1; 루복실; 사핑골; 사인토핀; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스팀; Sdi 1 모방체; 세무스틴; 노화 유도 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오티드; 신호 전달 억제제; 시조피란; 소부족산; 나트륨 보로캅테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베롤; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스플레노펜틴; 스폰지스타틴 1; 스쿠알라민; 스티피아미드; 스트로멜리신 억제제; 설피노신; 과활성 혈관작용 장 펩티드 길항제; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 탈리무스틴; 타목시펜 메티오다이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로메라제 억제제; 테모포르핀; 테니포시드; 테트라클로로데카옥시드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모방체; 티말파신; 티모포이에틴 수용체 효능제; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 주석 에틸 에티오푸르푸린; 티라파자민; 티타노센 비클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 번역 억제제; 트레티노인; 트리아세틸유리딘; 트리시리

빈; 트리메트렉세이트; 트립토렐린; 트로피세트론; 투로스테라이드; 티로신 키나제 억제제; 트리포스틴; UBC 억제제; 유베니멕스; 비뇨생식기 강-유래된 성장 억제 인자; 유로키나제 수용체 길항제; 바프레오티드; 바리올린 B; 벨라레졸; 베라민; 베르딘스; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈크살틴; 비탁신; 보로졸; 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브; 및 지노스타틴 스티말라머.

[0155] 5.8. 면역조절성 화합물을 사용한 천연 킬러 세포의 처리

[0156] 본원의 다른 부분에서 설명되는 바와 같은 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포 또는 조합된 천연 킬러 세포는 세포의 항종양 활성을 향상시키기 위해 면역조절성 화합물로 처리, 예를 들어 면역조절성 화합물과 접촉될 수 있다. 따라서, 천연 킬러 세포를, 천연 킬러 세포가 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 천연 킬러 세포에 비해 증가된 세포독성을 종양 세포에 대해 나타내기에 충분한 시간 동안 충분한 농도로 면역조절성 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 천연 킬러 세포의 종양 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법을 본원에서 제공한다. 다른 실시태양에서, 천연 킬러 세포를, 천연 킬러 세포가 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 천연 킬러 세포에 비해 그랜자임 B의 증가된 발현을 나타내기에 충분한 시간 동안 충분한 농도로 면역조절성 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 천연 킬러 세포에서 그랜자임 B의 발현을 증가시키는 방법을 본원에서 제공한다. 면역조절성 화합물은 아래에 설명되는 임의의 화합물, 예를 들어 레날리도마이드 또는 포말리도마이드일 수 있다.

[0157] 또한, 천연 킬러 세포의 집단을, 천연 킬러 세포의 집단이 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포에 비해 검출가능하게 증가된 세포독성을 다수의 종양 세포에 대해 나타내기에 충분한 시간 동안 충분한 농도로 면역조절성 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 천연 킬러 세포, 예를 들어, PINK 세포 또는 조합된 천연 킬러 세포의 집단의 다수의 종양 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법을 본원에서 제공한다. 다른 실시태양에서, 천연 킬러 세포의 집단을, 천연 킬러 세포의 집단이 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포에 비해 검출가능하게 증가된 양의 그랜자임 B를 발현하기에 충분한 시간 동안 충분한 농도로 면역조절성 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 천연 킬러 세포의 집단에서 그랜자임 B의 발현을 증가시키는 방법을 본원에서 제공한다. 특정 실시태양에서, 상기 천연 킬러 세포의 집단은 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포 내에 함유된다.

[0158] 상기 실시태양의 특정 실시태양에서, 천연 킬러 세포는 $CD56^+$, $CD16^-$ 태반 중간체 천연 킬러 세포 (PINK 세포)이다. 상기 실시태양의 다른 특정 실시태양에서, 천연 킬러 세포는 조합된 천연 킬러 세포, 즉, 매칭된 태반 관류액 및 제대혈로부터의 천연 킬러 세포이다.

[0159] 다른 특정 실시태양에서, 상기 면역조절성 화합물과 접촉된 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 PINK 세포 또는 조합된 천연 킬러 세포는 상기 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 상기 천연 킬러 세포보다 더 높은 수준으로 하나 이상의 BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, 또는 TNFRSF18을 발현한다. 다른 특정 실시태양에서, 상기 면역조절성 화합물과 접촉된 상기 다수의 천연 킬러 세포, 예를 들어, PINK 세포는 상기 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 상기 천연 킬러 세포보다 더 높은 수준으로 하나 이상의 ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, 및 TBX21을 발현한다.

[0160] 또한, 태반 관류액 세포를, 태반 관류액 세포가 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 태반 관류액 세포에 비해 검출가능하게 증가된 세포독성을 다수의 종양 세포에 대해 나타내기에 충분한 시간 동안 충분한 농도로 면역조절성 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 인간 태반 관류액 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 총 유핵 세포의 집단의 다수의 종양 세포에 대한 세포독성을 증가시키는 방법을 본원에서 제공한다. 다른 실시태양에서, 태반 관류액 세포의 집단을, 태반 관류액 세포의 집단이 면역조절성 화합물과 접촉되지 않은 동등한 수의 태반 관류액 세포에 비해 검출가능하게 증가된 양의 그랜자임 B를 발현하기에 충분한 시간 동안 충분한 농도로 면역조절성 화합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 태반 관류액 세포의 집단에서 그랜자임 B의 발현을 증가시키는 방법을 본원에서 제공한다.

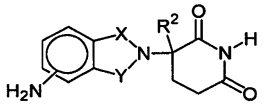
[0161] 면역조절성 화합물은 상업적으로 구입하거나, 그 전부가 본원에 참고로 포함되는 특허 또는 특허 공고에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다. 또한, 광학상 순수한 조성물은 비대칭적으로 합성되거나, 공지의 분할제 또는 키랄 컬럼 및 다른 표준 합성 유기 화학 기술을 사용하여 분할될 수 있다. 면역조절성 화합물은 라세미체, 입체이성질체 풍부 또는 입체이성질체상 순수할 수 있고, 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물, 및 전구약물을 포함할 수 있다.

[0162] 달리 나타내지 않으면, 본원에서 사용되는 용어 "면역조절성 화합물"은 TNF-α, LPS 유도 단핵구 IL-1β 및 IL-

12를 현저하게 억제하고 IL-6 생산을 부분적으로 억제하는 작은 유기 분자를 포함한다. 특정 예에서, 면역조절성 화합물은 레날리도마이드, 포말리도마이드 또는 탈리도마이드이다.

[0163] 면역조절성 화합물의 구체적인 예는 치환된 스티렌의 시아노 및 카르복시 유도체, 예를 들어 미국 특허 5,929,117에 개시된 것; 1-옥소-2-(2,6-디옥소-3-플루오로피페리딘-3-일) 이소인돌린 및 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소-3-플루오로피페리딘-3-일) 이소인돌린, 예를 들어 미국 특허 5,874,448 및 5,955,476에 기재된 것; 미국 특허 5,798,368에 기재된 4 치환된 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소이소인돌린; 미국 특허 5,635,517, 6,476,052, 6,555,554, 및 6,403,613에 기재된 것을 포함하고 이로 제한되지 않는 1-옥소 및 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일) 이소인돌린 (예를 들어, 탈리도마이드의 4-메틸 유도체); 미국 특허 6,380,239에 기재된 인돌린 고리의 4- 또는 5-위치에서 치환된 1-옥소 및 1,3-디옥소이소인돌린 (예를 들어, 4-(4-아미노-1,3-디옥소이소인돌린-2-일)-4-카르바모일부탄산); 미국 특허 6,458,810에 기재된, 2-위치에서 2,6-디옥소-3-히드록시피페리딘-5-일로 치환된 이소인돌린-1-온 및 이소인돌린-1,3-디온 (예를 들어, 2-(2,6-디옥소-3-히드록시-5-플루오로피페리딘-5-일)-4-아미노이소인돌린-1-온); 미국 특허 5,698,579 및 5,877,200에 개시된 비-폴리펩티드 시클릭 아미드의 클래스; 아미노탈리도마이드, 및 아미노탈리도마이드의 유사체, 가수분해 생성물, 대사산물, 유도체 및 전구체, 및 치환된 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일) 프탈이미드 및 치환된 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소이소인돌, 예를 들어 미국 특허 6,281,230 및 6,316,471에 기재된 것; 및 이소인돌-이미드 화합물, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 2003/0045552 A1, 미국 특허 7,091,353, 및 WO 02/059106에 기재된 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 본원에서 언급되는 각각의 특허 및 특허 출원의 전부는 본원에 참고로 포함된다. 면역조절성 화합물은 탈리도마이드를 포함하지 않는다.

[0164] 특정 실시태양에서, 면역조절성 화합물은 그 전부가 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 5,635,517에 기재된 바와 같이 벤조 고리에 아미노로 치환된 1-옥소- 및 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일) 이소인돌린이다. 상기 화합물은 하기 구조 I을 갖는다:

[0165] 

[0166] 상기 식에서, X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, X 및 Y 중의 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고, R^2는 수소 또는 저급 알킬, 특히 메틸이다. 특정 면역조절성 화합물은 다음을 포함하고, 이로 제한되지 않는다:

[0167] 1-옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-4-아미노이소인돌린;

[0168] 1-옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-5-아미노이소인돌린;

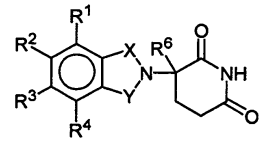
[0169] 1-옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-6-아미노이소인돌린;

[0170] 1-옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-7-아미노이소인돌린;

[0171] 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-4-아미노이소인돌린; 및

[0172] 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-5-아미노이소인돌린.

[0173] 다른 특정 면역조절성 화합물은 치환된 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일) 프탈이미드 및 치환된 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소이소인돌의 클래스, 예를 들어 각각 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 6,281,230; 6,316,471; 6,335,349; 및 6,476,052, 및 WO 98/03502에 기재된 것에 속한다. 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0174] 

[0175] 상기 식에서,

[0176] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, X 및 Y 중의 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고;

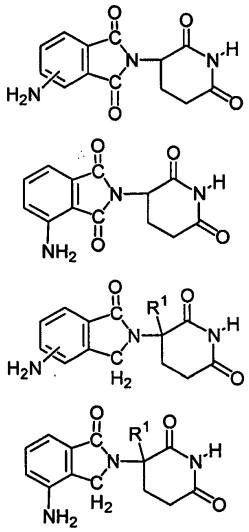
[0177] (i) 각각의 R^1, R^2, R^3, 및 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시이거나 또는 (ii) R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 하나는 $-NHR^5$이고, R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 나머지는 수소이고;

[0178] R^5는 수소 또는 1 내지 8 탄소 원자의 알킬이고;

[0179] R^6은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 벤질, 또는 할로이되;

[0180] X 및 Y가 C=O이고, (i) 각각의 R^1, R^2, R^3, 및 R^4가 플루오로이거나 또는 (ii) R^1, R^2, R^3, 또는 R^4 중의 하나가 아미노일 경우, R^6은 수소가 아니다.

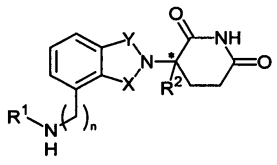
[0181] 상기 클래스의 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0182] 

[0183] 상기 식에서, R^1은 수소 또는 메틸이다. 별개의 실시태양에서, 상기 화합물의 에난티오머상 순수한 형태 (예를 들어 광학상 순수한 (R) 또는 (S) 에난티오머)의 사용이 포함된다.

[0184] 또다른 특정 면역조절성 화합물은 각각 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 공개 US 2003/0096841 및 US 2003/0045552, 및 WO 02/059106에 개시된 이소인돌-이미드의 클래스에 속한다. 대표적인 화합물은 하기 화학식 II의 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 포접화합물 (clathrate), 에난티오머, 부분입체이성질체, 라세미체, 및 입체이성질체의 혼합물이다:

[0185] <화학식 II>

[0186] 

[0187] 상기 식에서,

[0188] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH_2 또는 C=O이고;

[0189] R^1은 H, (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)시클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, $C(O)R^3$, $C(S)R^3$, $C(O)OR^4$, (C_1-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, $C(O)NHR^3$, $C(S)NHR^3$, $C(O)NR^3R^{3'}$, $C(S)NR^3R^{3'}$ 또는 (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$이고;

[0190] R^2는 H, F, 벤질, (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, 또는 (C_2-C_8)알키닐이고;

[0191] R^3 및 $R^{3'}$는 독립적으로 (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)시클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, (C_0-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$, 또는 $C(O)OR^5$이고;

[0192] R^4는 (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, (C_1-C_4)알킬-OR^5, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, 또는 (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴이고;

[0193] R^5는 (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, 또는 (C_2-C_5)헤테로아릴이고;

[0194] 존재하는 각각의 R^6은 독립적으로 H, (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_2-C_5)헤테로아릴, 또는 (C_0-C_8)알킬-$C(O)O-R^5$이거나 또는 R^6 기는 함께 헤테로시클로알킬기를 형성할 수 있고;

[0195] n은 0 또는 1이고;

[0196] *는 키랄-탄소 중심이다.

[0197] 화학식 II의 특정 화합물에서, n이 0이면, R^1은 (C_3-C_7)시클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, $C(O)R^3$, $C(O)OR^4$, (C_1-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, $C(S)NHR^3$, 또는 (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$이고;

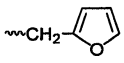
[0198] R^2는 H 또는 (C_1-C_8)알킬이고;

[0199] R^3은 (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)시클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, (C_5-C_8)알킬-$N(R^6)_2$; (C_0-C_8)알킬-$NH-C(O)O-R^5$; (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$, 또는 $C(O)OR^5$이고; 다른 기는 동일한 정의를 갖는다.

[0200] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, R^2는 H 또는 (C_1-C_4)알킬이다.

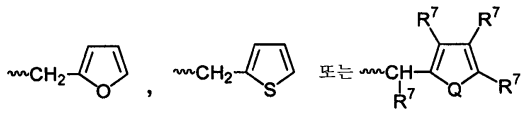
[0201] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, R^1은 (C_1-C_8)알킬 또는 벤질이다.

[0202] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, R^1은 H, (C_1-C_8)알킬, 벤질, CH_2OCH_3, $CH_2CH_2OCH_3$, 또는

[0203] 

[0204] 이다.

[0205] 화학식 II의 화합물의 다른 실시태양에서, R^1은

[0206] 

이고,

[0207] 여기서, Q는 O 또는 S이고, 존재하는 각각의 R^7은 독립적으로 H, (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)시클로알킬,

(C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, 할로겐, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, (C_0-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$, 또는 $C(O)OR^5$이거나, 또는 인접하여 존재하는 R^7은 함께 비시클릭 알킬 또는 아릴 고리를 형성할 수 있다.

[0208] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, R^1은 $C(O)R^3$이다.

[0209] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, R^3은 (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, (C_1-C_8)알킬, 아릴, 또는 (C_0-C_4)알킬-OR^5이다.

[0210] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, 헤테로아릴은 피리딜, 푸릴, 또는 티에닐이다.

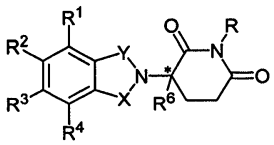
[0211] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, R^1은 $C(O)OR^4$이다.

[0212] 화학식 II의 다른 특정 화합물에서, C(O)NHC(O)의 H는 (C_1-C_4)알킬, 아릴, 또는 벤질로 교체될 수 있다.

[0213] 상기 클래스 내의 화합물의 추가의 예는 [2-(2,6-디옥소-피페리딘-3-일)-1,3-디옥소-2,3-디히드로-1H-이소인돌-4-일메틸]-아미드; (2-(2,6-디옥소-피페리딘-3-일)-1,3-디옥소-2,3-디히드로-1H-이소인돌-4-일메틸)-카르밤산 tert-부틸 에스테르; 4-(아미노메틸)-2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-디온; N-(2-(2,6-디옥소-피페리딘-3-일)-1,3-디옥소-2,3-디히드로-1H-이소인돌-4-일메틸)-아세트아미드; N-{(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜)-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)메틸}시클로프로필-카르복사미드; 2-클로로-N-{(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)메틸}아세트아미드; N-(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)-3-피리딜 카르복사미드; 3-{1-옥소-4-(벤질아미노)이소인돌린-2-일}피페리딘-2,6-디온; 2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-4-(벤질아미노)이소인돌린-1,3-디온; N-{(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)메틸}프로판아미드; N-{(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)메틸}-3-피리딜카르복사미드; N-{(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)메틸}헵탄아미드; N-{(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)메틸}-2-푸릴카르복사미드; {N-(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)카르바모일}메틸 아세테이트; N-(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)펜탄아미드; N-(2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일)-2-티에닐카르복사미드; N-{[2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일]메틸}(부틸아미노)카르복사미드; N-{[2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일]메틸}(옥틸아미노)카르복사미드; 및 N-{[2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-1,3-디옥소이소인돌린-4-일]메틸}(벤질아미노)카르복사미드를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0214] 또다른 특정 면역조절성 화합물은 각각 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 공개 2002/0045643, 국제 특허 출원 공개 WO 98/54170, 및 미국 특허 6,395,754에 개시된 이소인돌-이미드의 클래스에 속한다. 대표적인 화합물은 하기 화학식 III의 화합물 및 그의 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 포접화합물, 에난티오머, 부분입체이성질체, 라세미체, 및 입체이성질체의 혼합물이다:

[0215] <화학식 III>

[0216] 

[0217] 상기 식에서,

[0218] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH_2 또는 C=O이고;

[0219] R은 H 또는 CH_2OCOR'이고;

[0220] (i) 각각의 R^1, R^2, R^3, 또는 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시이거나, 또는 (ii) R^1, R^2, R^3, 또는 R^4 중의 하나는 니트로 또는 $-NHR^5$이고, R^1, R^2, R^3, 또는 R^4 중의 나머지는 수소이고;

[0221] R^5는 수소 또는 1 내지 8 탄소 원자의 알킬이고,

[0222] R^6은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 벤조, 클로로, 또는 플루오로이고;

[0223] R'는 R^7-CHR^{10}-$N(R^8R^9)$이고;

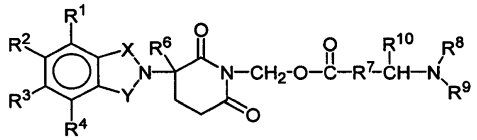
[0224] R^7은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 $-(C_nH_{2n})-$이고, 여기서 n은 0 내지 4이고;

[0225] 각각의 R^8 및 R^9는 서로 독립적으로 수소 또는 1 내지 8 탄소 원자의 알킬이거나, 또는 R^8 및 R^9는 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 또는 $-CH_2CH_2X_1CH_2CH_2-$를 형성하고, 여기서 X_1은 -O-, -S-, 또는 -NH-이고;

[0226] R^{10}은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 또는 페닐이고;

[0227] *는 키랄-탄소 중심을 나타낸다.

[0228] 다른 대표적인 화합물은 하기 화학식으로 표시된다:

[0229] 

[0230] 상기 식에서,

[0231] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, X 및 Y 중의 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고;

[0232] (i) 각각의 R^1, R^2, R^3, 또는 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시이거나, 또는 (ii) R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 하나는 $-NHR^5$이고, R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 나머지는 수소이고;

[0233] R^5는 수소 또는 1 내지 8 탄소 원자의 알킬이고;

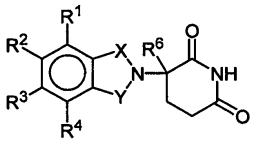
[0234] R^6은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 벤조, 클로로, 또는 플루오로이고;

[0235] R^7은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 $-(C_nH_{2n})-$이고, 여기서 n은 0 내지 4이고;

[0236] 각각의 R^8 및 R^9는 서로 독립적으로 수소 또는 1 내지 8 탄소 원자의 알킬이거나, 또는 R^8 및 R^9는 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 또는 $-CH_2CH_2X^1CH_2CH_2-$를 형성하고, 여기서 X^1은 -O-, -S-, 또는 -NH-이고;

[0237] R^{10}은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 또는 페닐이다.

[0238] 다른 대표적인 화합물은 하기 화학식으로 표시된다:

[0239] 

[0240] 상기 식에서,

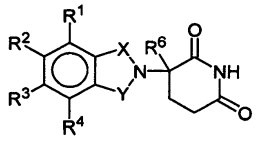
[0241] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, X 및 Y 중의 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고;

[0242] (i) 각각의 R^1, R^2, R^3, 또는 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시이거나, 또는 (ii) R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 하나는 니트로 또는 보호된 아미노이고, R^1, R^2, R^3, 및 R^4

중의 나머지는 수소이고;

[0243] R^6은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 벤조, 클로로, 또는 플루오로이다.

[0244] 다른 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0245] 

[0246] 상기 식에서,

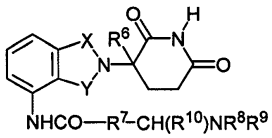
[0247] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, X 및 Y 중의 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고;

[0248] (i) 각각의 R^1, R^2, R^3, 및 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시이거나, 또는 (ii) R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 하나는 $-NHR^5$이고, R^1, R^2, R^3, 및 R^4 중의 나머지는 수소이고;

[0249] R^5는 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 또는 $CO-R^7-CH(R^{10})NR^8R^9$이고, 여기서 각각의 R^7, R^8, R^9, 및 R^{10}은 본원에서 정의된 바와 같고;

[0250] R^6은 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 벤조, 클로로, 또는 플루오로이다.

[0251] 화합물의 구체적인 예는 하기 화학식으로 표시된다:

[0252] 

[0253] 상기 식에서,

[0254] X 및 Y 중의 하나는 C=O이고, X 및 Y 중의 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고;

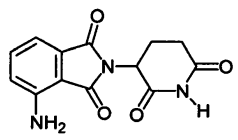
[0255] R^6은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 벤질, 클로로, 또는 플루오로이고;

[0256] R^7은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 $-(C_nH_{2n})-$이고, 여기서 n은 0 내지 4이고;

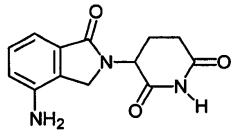
[0257] 각각의 R^8 및 R^9는 서로 독립적으로 수소 또는 1 내지 8 탄소 원자의 알킬이거나, 또는 R^8 및 R^9는 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌, 또는 $-CH_2CH_2X^1CH_2CH_2-$를 형성하고, 여기서 X^1은 -O-, -S-, 또는 -NH-이고;

[0258] R^{10}은 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 또는 페닐이다.

[0259] 가장 바람직한 면역조절성 화합물은 4-(아미노)-2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-디온 및 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-디온이다. 화합물은 표준 합성 방법에 의해 얻을 수 있다 (예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 5,635,517 참조). 화합물은 셀젠 코퍼레이션 (Celgene Corporation, 미국 뉴저지주 워렌))으로부터 입수가능하다. 4-(아미노)-2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-디온은 다음 화학 구조를 갖는다:

[0260] 

[0261] 화합물 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-디온은 다음 화학 구조를 갖는다:

[0262] 

[0263] 다른 실시태양에서, 특정 면역조절성 화합물은 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 다형체 형태, 예를 들어 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 공개 US 2005/0096351 A1에 개시된 형태 A, B, C, D, E, F, G 및 H를 포함한다. 예를 들어, 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 A는 비-수성 용매계로부터 얻을 수 있는 비용매화된 결정질 물질이다. 형태 A는 약 8, 14.5, 16, 17.5, 20.5, 24 및 26도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 270℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다. 형태 A는 흡수성이 약하거나 또는 비흡수성이고, 지금까지 발견된 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-디온의 열역학적으로 가장 안정한 무수 다형체로 보인다.

[0264] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 B는 헥산, 톨루엔, 및 물을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 용매계로부터 얻을 수 있는 반수화된 결정질 물질이다. 형태 B는 약 16, 18, 22 및 27도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 146 및 268℃의 흡열 DSC 곡선을 갖고, 이는 고온 (hot stage) 현미경 실험에 의해 탈수 및 용융으로 확인된다. 상호전환 연구를 통해, 형태 B는 수성 용매계 내에서 형태 E로 전환되고, 아세톤 및 다른 무수계 내에서 다른 형태로 전환됨이 밝혀졌다.

[0265] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 C는 예를 들어 아세톤을 포함하고 이로 제한되지 않는 용매로부터 얻을 수 있는 반용매화된 결정질 물질이다. 형태 C는 약 15.5 및 25도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 269℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다. 형태 C는 약 85% RH 미만에서 비흡수성이지만, 더 높은 상대 습도에서 형태 B로 전환될 수 있다.

[0266] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 D는 아세토니트릴과 물의 혼합물로부터 제조된 결정질의 용매화된 다형체이다. 형태 D는 약 27 및 28도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 270℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다. 형태 D는 흡수성이 약하거나 비흡수성이지만, 일반적으로 더 높은 상대 습도에서 스트레스에 노출될 때 형태 B로 전환될 것이다.

[0267] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 E는 물 내에서 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 슬러리화 및 아세톤:물의 비율이 약 9:1인 용매계 내에서 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 느린 증발에 의해 얻을 수 있는 이수화된 결정질 물질이다. 형태 E는 약 20, 24.5 및 29도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 269℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다. 형태 E는 아세톤 용매계 내에서 형태 C로 전환되고 THF 용매계 내에서 형태 G로 전환될 수 있다. 수성 용매계 내에서, 형태 E는 가장 안정한 형태인 것으로 보인다. 형태 E에 대해 수행된 탈용매화 (desolvation) 실험에 의해, 약 125℃에서 약 5분 동안 가열시에 형태 E가 형태 B로 전환될 수 있음이 밝혀졌다. 175℃에서 약 5분 동안 가열시에, 형태 B는 형태 F로 전환될 수 있다.

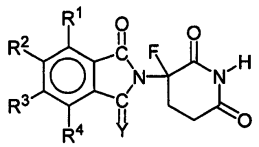
[0268] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 F는 형태 E의 탈수로부터 얻을 수 있는 비용매화된 결정질 물질이다. 형태 F는 약 19, 19.5 및 25도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 269℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다.

[0269] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 G는 용매, 예를 들어 테트라히드로푸란 (THF) (이로 제한되지 않음) 내에서 형태 B 및 E를 슬러리화함으로써 얻을 수 있는 비용매화된 결정질 물질이다. 형태 G는 약 21, 23 및 24.5도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 267℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다.

[0270] 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-피페리덴-2,6-디온의 형태 H는 형태 E를 0% 상대 습도에 노출시킴으로써 얻을 수 있는 부분적으로 수화된 (약 0.25 몰) 결정질 물질이다. 형태 H는 약 15, 26 및 31도 2Θ에서 유의한 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖고, 약 269℃의 시차 주사 열량분석 최대 융점을 갖는다.

[0271] 본원에서 제공되는 방법에 사용될 수 있는 다른 특정 면역조절성 화합물은 1-옥소-2-(2,6-디옥소-3-플루오로피

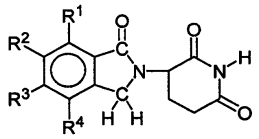
페리딘-3-일) 이소인돌린 및 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소-3-플루오로피페리딘-3-일) 이소인돌린, 예를 들어 각각 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 5,874,448 및 5,955,476에 기재된 것을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 대표적인 화합물은 하기 화학식으로 표시된다:

[0272] 

[0273] 상기 식에서, Y는 산소 또는 H_2이고,

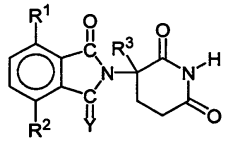
[0274] 각각의 R^1, R^2, R^3, 및 R^4는 서로 독립적으로 수소, 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시, 또는 아미노이다.

[0275] 본원에서 제공되는 방법에 사용될 수 있는 다른 특정 면역조절성 화합물은 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 5,798,368에 기재된 4 치환된 2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1-옥소이소인돌린을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0276] 

[0277] 상기 식에서, 각각의 R^1, R^2, R^3, 및 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시이다.

[0278] 본원에서 제공되는 방법에 사용될 수 있는 다른 특정 면역조절성 화합물은 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 6,403,613에 개시된 1-옥소 및 1,3-디옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일) 이소인돌린을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0279] 

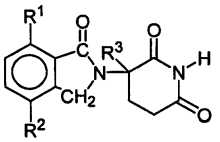
[0280] 상기 식에서,

[0281] Y는 산소 또는 H_2이고,

[0282] R^1 및 R^2 중의 하나는 할로, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 디알킬아미노, 시아노, 또는 카르바모일이고, R^1 및 R^2 중의 다른 하나는 독립적으로 수소, 할로, 알킬, 알콕시, 알킬아미노, 디알킬아미노, 시아노, 또는 카르바모일이고,

[0283] R^3은 수소, 알킬, 또는 벤질이다.

[0284] 화합물의 구체적인 예는 하기 식으로 표시된다:

[0285] 

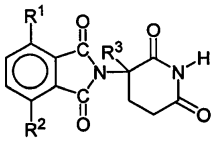
[0286] 상기 식에서,

[0287] R^1 및 R^2 중의 하나는 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시, 디알킬아미노 (각각의 알킬은 1 내지 4 탄소 원자의 알킬임), 시아노, 또는 카르바모일이고,

[0288] R^1 및 R^2 중의 다른 하나는 독립적으로 수소, 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시, 알킬아미노 (알킬은 1 내지 4 탄소 원자의 알킬임), 디알킬아미노 (각각의 알킬은 1 내지 4 탄소 원자의 알킬임), 시아노, 또는 카르바모일이고,

[0289] R^3은 수소, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 벤질이다. 구체적인 예는 1-옥소-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-4-메틸이소인돌린을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0290] 본원에서 제공되는 방법에 사용할 수 있는 다른 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0291] 

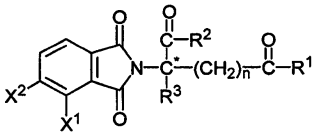
[0292] 상기 식에서,

[0293] R^1 및 R^2 중의 하나는 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시, 디알킬아미노 (각각의 알킬은 1 내지 4 탄소 원자의 알킬임), 시아노, 또는 카르바모일이고,

[0294] R^1 및 R^2 중의 다른 하나는 독립적으로 수소, 할로, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 1 내지 4 탄소 원자의 알콕시, 알킬아미노 (알킬은 1 내지 4 탄소 원자의 알킬임), 디알킬아미노 (각각의 알킬은 1 내지 4 탄소 원자의 알킬임), 시아노, 또는 카르바모일이고,

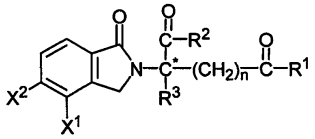
[0295] R^3은 수소, 1 내지 4 탄소 원자의 알킬, 또는 벤질이다.

[0296] 본원에서 제공되는 방법에 사용될 수 있는 다른 특정 면역조절성 화합물은 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 6,380,239 및 미국 특허 출원 공개 2006/0084815에 기재된 인돌린 고리의 4- 또는 5-위치에서 치환된 1-옥소 및 1,3-디옥소이소인돌린을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 대표적인 화합물은 하기 화학식의 화합물 및 그의 염이다:

[0297] 

[0298] 상기 식에서, C^*로 표시된 탄소 원자는 키랄 중심을 구성하고 (n이 0이 아니고 R^1이 R^2와 동일하지 않을 때); X^1 및 X^2 중의 하나는 아미노, 니트로, 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 또는 NH-Z이고, X^1 및 X^2 중의 다른 하나는 수소이고; 각각의 R^1 및 R^2는 서로 독립적으로 히드록시 또는 NH-Z이고; R^3은 수소, 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 할로, 또는 할로알킬이고; Z는 수소, 아릴, 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 포르밀, 또는 1 내지 6개의 탄소의 아실이고; n은 0, 1, 또는 2이되; X^1이 아미노이고, n이 1 또는 2일 경우, R^1 및 R^2 모두가 히드록시인 것은 아니다.

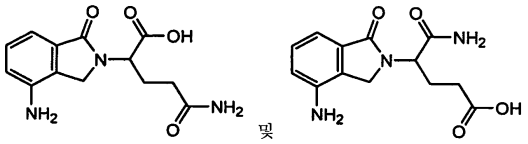
[0299] 본원에서 제공되는 방법에 사용될 수 있는 추가의 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0300] 

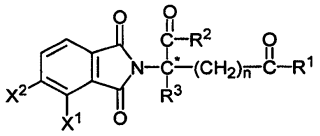
[0301] 상기 식에서, C^*로 표시된 탄소 원자는 n이 0이 아니고 R^1이 R^2와 동일하지 않을 때 키랄 중심을 구성하고; X^1 및 X^2 중의 하나는 아미노, 니트로, 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 또는 NH-Z이고, X^1 및 X^2 중의 다른 하나는 수소

이고; 각각의 R^1 및 R^2는 서로 독립적으로 히드록시 또는 NH-Z이고; R^3은 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 할로, 또는 수소이고; Z는 수소, 1 내지 6개의 탄소의 아릴 또는 알킬 또는 아실이고; n은 0, 1, 또는 2이다.

[0302] 본원에서 제공되는 방법에 사용될 수 있는 화합물의 구체적인 예는 각각 다음 화학 구조를 갖는 2-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-4-카르바모일-부티르산 및 4-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일)-4-카르바모일-부티르산, 및 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물, 전구약물, 및 입체이성질체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다:

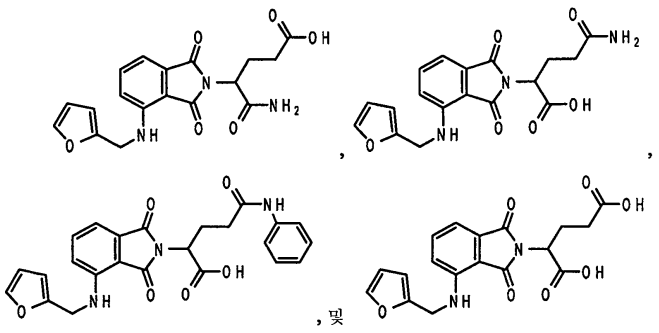
[0303]  및

[0304] 다른 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시되는 화합물 및 그의 염이다:

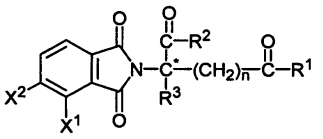
[0305] 

[0306] 상기 식에서, C^*로 표시된 탄소 원자는 n이 0이 아니고 R^1이 R^2와 동일하지 않을 때 키랄 중심을 구성하고; X^1 및 X^2 중의 하나는 아미노, 니트로, 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 또는 NH-Z이고, X^1 및 X^2 중의 다른 하나는 수소이고; 각각의 R^1 및 R^2는 서로 독립적으로 히드록시 또는 NH-Z이고; R^3은 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 할로, 또는 수소이고; Z는 수소, 1 내지 6개의 탄소의 아릴 또는 알킬 또는 아실이고; n은 0, 1, 또는 2이다.

[0307] 구체적인 예는 각각 다음 화학 구조를 갖는 4-카르바모일-4-{4-[(푸란-2-일-메틸)-아미노]-1,3-디옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일}-부티르산, 4-카르바모일-2-{4-[(푸란-2-일-메틸)-아미노]-1,3-디옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일}-부티르산, 2-{4-[(푸란-2-일-메틸)-아미노]-1,3-디옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일}-4-페닐카르바모일-부티르산, 및 2-{4-[(푸란-2-일-메틸)-아미노]-1,3-디옥소-1,3-디히드로-이소인돌-2-일}-펜탄디온산 및 그의 제약상 허용되는 염, 용매화물, 전구약물, 및 입체이성질체를 포함하고, 이로 제한되지 않는다:

[0308]  ,

[0309] 다른 화합물의 구체적인 예는 하기 식으로 표시된다:

[0310] 

[0311] 상기 식에서,

[0312] X^1 및 X^2 중의 하나는 니트로, 또는 NH-Z이고, X^1 또는 X^2 중의 다른 하나는 수소이고;

[0313] 각각의 R^1 및 R^2는 서로 독립적으로 히드록시 또는 NH-Z이고;

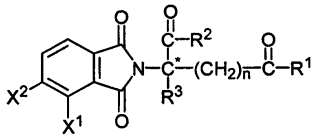
[0314] R^3은 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 할로, 또는 수소이고;

[0315] Z는 수소, 페닐, 1 내지 6개의 탄소의 아실, 또는 1 내지 6개의 탄소의 알킬이고;

[0316] n은 0, 1, 또는 2이되;

[0317] X^1 및 X^2 중의 하나가 니트로이고, n이 1 또는 2이면, R^1 및 R^2는 히드록시가 아니고;

[0318] $-COR^2$ 및 $-(CH_2)_nCOR^1$이 상이하면, C^*로 표시된 탄소 원자는 키랄 중심을 구성한다. 다른 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0319] 

[0320] 상기 식에서,

[0321] X^1 및 X^2 중의 하나는 1 내지 6개의 탄소의 알킬이고;

[0322] 각각의 R^1 및 R^2는 서로 독립적으로 히드록시 또는 NH-Z이고;

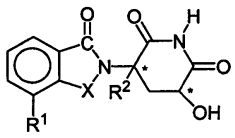
[0323] R^3은 1 내지 6개의 탄소의 알킬, 할로, 또는 수소이고;

[0324] Z는 수소, 페닐, 1 내지 6개의 탄소의 아실, 또는 1 내지 6개의 탄소의 알킬이고;

[0325] n은 0, 1, 또는 2이고;

[0326] $-COR^2$ 및 $-(CH_2)_nCOR^1$이 상이하면, C^*로 표시된 탄소 원자는 키랄 중심을 구성한다.

[0327] 또다른 특정 면역조절성 화합물은 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 6,458,810에 기재된 2,6-디옥소-3-히드록시피페리딘-5-일로 2-위치에서 치환된 이소인돌린-1-온 및 이소인돌린-1,3-디온을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 대표적인 화합물은 하기 식으로 표시된다:

[0328] 

[0329] 상기 식에서,

[0330] *로 표시된 탄소 원자는 키랄 중심을 구성하고;

[0331] X는 -C(O)- 또는 $-CH_2$-이고;

[0332] R^1은 1 내지 8 탄소 원자의 알킬 또는 $-NHR^3$이고;

[0333] R^2는 수소, 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 또는 할로겐이고;

[0334] R^3은 수소,

[0335] 1 내지 8 탄소 원자의 알콕시, 할로, 아미노, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알킬아미노로 치환되거나 비치환된 1 내지 8 탄소 원자의 알킬,

[0336] 3 내지 18 탄소 원자의 시클로알킬,

[0337] 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 1 내지 8 탄소 원자의 알콕시, 할로, 아미노, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알킬아미노로 치환되거나 비치환된 페닐,

[0338] 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 1 내지 8 탄소 원자의 알콕시, 할로, 아미노, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알킬아미노로 치환되거나 비치환된 벤질, 또는

[0339] $-COR^4$이고;

[0340] 여기서 R^4는 수소,

[0341] 1 내지 8 탄소 원자의 알콕시, 할로, 아미노, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알킬아미노로 치환되거나 비치환된 1 내지 8 탄소 원자의 알킬,

[0342] 3 내지 18 탄소 원자의 시클로알킬,

[0343] 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 1 내지 8 탄소 원자의 알콕시, 할로, 아미노, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알킬아미노로 치환되거나 비치환된 페닐, 또는

[0344] 1 내지 8 탄소 원자의 알킬, 1 내지 8 탄소 원자의 알콕시, 할로, 아미노, 또는 1 내지 4 탄소 원자의 알킬아미노로 치환되거나 비치환된 벤질이다.

[0345] 본원에서 제공되는 화합물은 상업적으로 구입하거나 또는 본원에 개시된 특허 또는 특허 공고에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다. 또한, 광학상 순수한 화합물은 비대칭적으로 합성되거나 또는 공지의 분할제 또는 키랄 컬럼 및 다른 표준 합성 유기 화학 기술을 사용하여 분할될 수 있다.

[0346] 다양한 면역조절성 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 갖고, 에난티오머의 라세미 혼합물 또는 부분입체이성질체의 혼합물로서 존재할 수 있다. 상기 화합물의 입체이성질체상 순수한 형태 및 상기 형태의 혼합물의 사용이 포함된다. 예를 들어, 특정 면역조절성 화합물의 에난티오머의 동일한 양 또는 상이한 양을 포함하는 혼합물이 본원에서 제시되는 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 이들 이성질체는 비대칭적으로 합성되거나 또는 표준 기술, 예를 들어 키랄 컬럼 또는 키랄 분할제를 사용하여 분할될 수 있다. 예를 들어, 문헌 ([Jacques, J., et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley-Interscience, New York, 1981)]; [Wilen, S.H., et al., Tetrahedron 33:2725 (1977)]; [Eliel, E.L., Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962)]; 및 [Wilen, S. H., Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN, 1972)])을 참조한다.

[0347] 설명된 구조와 그 구조에 부여된 명칭 사이에 차이가 존재할 경우, 설명된 구조에 더 큰 비중이 부여됨을 유의하여야 한다. 추가로, 구조 또는 구조의 일부의 입체화학이 예를 들어 굵은 선 또는 파선으로 표시되지 않으면, 구조 또는 구조의 일부는 그의 모든 입체이성질체를 포함하는 것으로서 해석되어야 한다.

[0348] 5.9. PINK 세포, 인간 태반 관류액, 또는 조합된 천연 킬러 세포의 투여

[0349] PINK 세포, 인간 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 그러한 세포를 포함하는 집단들의 집단, 또는 그의 조합물은 개체, 예를 들어, 종양 세포를 갖는 개체, 예를 들어, 암 환자에게 생세포의 투여에 적합한 당업계에 공지된 임의의 의학상 허용되는 경로로 투여될 수 있다. 다양한 실시태양에서, 본원에서 제공되는 세포는 예를 들어, 카테터 또는 시린지에 의해 외과적으로 이식, 주사 또는 주입되거나, 복구 또는 증대를 필요로 하는 부위에 직접 또는 간접적으로 달리 투여될 수 있다. 한 실시태양에서, 세포는 개체에게 정맥내 투여된다. 다른 실시태양에서, 세포는 개체에게 종양, 예를 들어, 고형 종양의 부위에 투여된다. 개체가 하나 초과의 부위에서 종양을 갖는 특정 실시태양에서, 세포는 적어도 2개 또는 모든 종양 부위에 투여된다. 다른 특정 실시태양에서, 본원에서 제공되는 세포, 또는 세포를 포함하는 조성물은 경구, 코로, 동맥내, 비경구, 안과적으로, 근육내, 피하, 복강내, 뇌내, 심실내, 뇌실내, 경막내, 수조내, 척수내 및/또는 척수주위로 투여된다. 특정 실시태양에서, 세포는 펌프 장치를 사용하거나 사용하지 않으면서 두개내 또는 척추내 주사바늘 및/또는 카테터를 통해 전달된다.

[0350] PINK 세포, 인간 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 또는 그의 조합물, 또는 그러한 세포를 포함하는 세포 집단은 세포를 포함하는 조성물, 예를 들어, 매트릭스, 히드로겔, 스캐폴드 (scaffold) 등으로 개체에게 투여될 수 있다.

[0351] 한 실시태양에서, 본원에서 제공되는 세포는 천연 매트릭스, 예를 들어, 태반 생체재료, 예를 들어 양막 재료 상에 접종된다. 그러한 양막 재료는 예를 들어, 포유동물 태반으로부터 직접 절개된 양막; 고정 또는 열-처리된 양막, 실질적으로 건조한 (즉, <20% H_2O) 양막, 융모막, 실질적으로 건조한 융모막, 실질적으로 건조한 양막 및 융모막 등일 수 있다. 태반 줄기 세포가 접종될 수 있는 바람직한 태반 생체재료는 그 개시 내용 전부가 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 공개 2004/0048796 (Hariri)에 기재되어 있다.

[0352] 다른 실시태양에서, PINK 세포, 인간 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 또는 그의 조합물, 또는 그러한 세포를 포함하는 세포 집단은 예를 들어 주사를 위해 적합한 히드로겔 용액 내에 현탁된다. 상기 조성물에 적합한 히드로겔은 자가조립형 펩티드, 예를 들어 RAD16을 포함한다. 한 실시태양에서, 세포를 포함하는 히드로겔 용액은 예를 들어 몰드 (mold) 내에서 경화되어, 이식을 위해 세포가 그 내부에 분산된 매트릭스를 형성할 수 있다. 세포가 이식에 앞서 유사분열방식으로 팽창되도록, 그러한 매트릭스 내의 세포는 또한 배양될 수 있다. 히드로겔은 예를 들어 공유, 이온, 또는 수소 결합을 통해 가교결합되어, 물 분자를 포획하여 겔을 형성하는 3차원 개방-격자 구조를 생성하는 유기 중합체 (천연 또는 합성)일 수 있다. 히드로겔-형성 물질은 다당류, 예를 들어 알기네이트 및 그의 염, 펩티드, 폴리포스파진, 및 폴리아크릴레이트 (이온적으로 가교결합하는), 또는 블록 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 옥시드-폴리프로필렌 글리콜 블록 공중합체 (각각 온도 또는 pH에 의해 가교결합되는)를 포함한다. 일부 실시태양에서, 본 발명의 히드로겔 또는 매트릭스는 생분해성이다.

[0353] 본 발명의 일부 실시태양에서, 제형은 계내 (in situ) 중합가능 겔을 포함한다 (예를 들어 미국 특허 출원 공개 2002/0022676; 문헌 [Anseth et al., J. Control Release, 78(1-3):199-209 (2002)]; [Wang et al., Biomaterials, 24(22):3969-80 (2003)] 참조).

[0354] 일부 실시태양에서, 중합체는 전하를 띈 측쇄기, 또는 1가 이온 염을 갖는 수용액, 예를 들어 물, 완충 염 용액, 또는 수성 알콜 용액 내에 적어도 부분적으로 가용성이다. 양이온과 반응할 수 있는 산성 측쇄기를 갖는 중합체의 예는 폴리(포스파젠), 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 아크릴산 및 메타크릴산의 공중합체, 폴리(비닐 아세테이트), 및 술폰화 중합체, 예를 들어 술폰화 폴리스티렌이다. 아크릴산 또는 메타크릴산 및 비닐 에테르 단량체 또는 중합체의 반응에 의해 형성된 산성 측쇄기를 갖는 공중합체를 또한 사용할 수 있다. 산성기의 예는 카르복실산기, 술폰산기, 할로겐화 (바람직하게는 플루오르화) 알콜기, 페놀성 OH기, 및 산성 OH기이다.

[0355] 본 발명의 태반 줄기 세포 또는 그의 동시-배양액은 3차원 프레임워크 또는 스캐폴드 상에 접종되고, 생체 내 이식될 수 있다. 그러한 프레임워크는 조직 형성을 자극하거나 본 발명의 실시를 향상 또는 개선하는 임의의 하나 이상의 성장 인자, 세포, 약물 또는 다른 성분과 조합되어 이식될 수 있다.

[0356] 본 발명에서 사용될 수 있는 스캐폴드의 예는 부직 매트 (nonwoven mat), 다공성 포움 (foam), 또는 자가조립형 펩티드를 포함한다. 부직 매트는 글리콜산 및 락트산의 합성 흡수성 공중합체로 이루어진 섬유 (예를 들어, PGA/PLA) (VICRYL, 에티콘, 인크. (Ethicon, Inc., 미국 뉴저지주 소머빌))를 사용하여 형성될 수 있다. 동결-건조 또는 동결건조 (예를 들어, 미국 특허 6,355,699 참조)와 같은 과정에 의해 형성된, 예를 들어, 폴리(ε-카프로락톤)/폴리(글리콜산) (PCL/PGA) 공중합체로 이루어진 포움이 또한 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

[0357] 본 발명의 태반 줄기 세포는 또한 모노-, 디-, 트리-, 알파-트리-, 베타-트리-, 및 테트라-칼슘 인삼염, 히드록시아파타이트, 플루오로아파타이트, 황산칼슘, 불화칼슘, 산화칼슘, 탄산칼슘, 인산마그네슘칼슘, 생물 활성 유리, 예를 들어 BIOGLASS®, 및 그의 혼합물을 포함하고 이로 제한되지 않는 생리학상 허용되는 세라믹 물질 상에 접종되거나 접촉될 수 있다. 현재 상업적으로 이용가능한 다공성 생체적합성 세라믹 물질은 SURGIBONE® (캔메디카 코퍼레이션 (CanMedica Corp., 캐나다)), ENDOBON® (머크 바이오머티리얼 프랑스 (Merck Biomaterial France, 프랑스)), CEROS® (매티스, 아게 (Mathys, AG, 스위스 베트라흐)), 및 무기질화된 콜라겐 뼈 이식 제품, 예를 들어 HEALOS™ (데푸이, 인크. (DePuy, Inc., 미국 매사추세츠주 레인햄)) 및 VITOSS®, RHAKOSS™ 및 CORTOSS® (오르쏘비타 (Orthovita, 미국 펜실베니아주 맬버른))을 포함한다. 프레임워크는 천연 및/또는 합성 물질의 혼합물, 배합물 (blend) 또는 복합재일 수 있다.

[0358] 다른 실시태양에서, 태반 줄기 세포는 생흡수성 물질, 예를 들어 PGA, PLA, PCL 공중합체 또는 배합물, 또는 히알루론산으로 만들어진 멀티필라멘트사 (multifilament yarn)인, 예를 들어 그로 구성될 수 있는 펠트 상에 접종되거나 접촉될 수 있다.

[0359] 다른 실시태양에서, 본 발명의 태반 줄기 세포는 복합재 구조일 수 있는 포움 스캐폴드 상에 접종될 수 있다.

그러한 포움 스캐폴드는 유용한 형태, 예를 들어 복구, 교체 또는 증대시킬 체내의 특수한 구조의 일부의 형태로 성형될 수 있다. 일부 실시태양에서, 프레임워크는 세포 부착을 향상시키기 위해 본 발명의 세포의 접종 전에, 예를 들어 0.1M 아세트산으로 처리한 후 폴리라이신, PBS 및/또는 콜라겐 내에서 인큐베이팅한다. 매트릭스의 외부 표면은 세포의 부착 또는 성장 및 조직의 분화를 개선하기 위해, 예를 들어 매트릭스의 혈장-코팅, 또는 하나 이상의 단백질 (예를 들어, 콜라겐, 탄성 섬유, 망상 섬유), 당단백질, 글리코스아미노글리칸 (예를 들어, 헤파린 술페이트, 콘드로이틴-4-술페이트, 콘드로이틴-6-술페이트, 데르마탄 술페이트, 케라틴 술페이트 등), 세포 매트릭스, 및/또는 비제한적으로 젤라틴, 알기네이트, 아가, 아가로스 및 식물 검 등과 같은 다른 물질의 첨가에 의해 변형시킬 수 있다.

[0360] 일부 실시태양에서, 스캐폴드는 그를 비-혈전생성성으로 만드는 물질을 포함하거나 그러한 물질로 처리된다. 이들 처리 및 물질은 또한 내피 성장, 이동, 및 세포외 매트릭스 침착을 촉진하거나 지지할 수 있다. 이들 물질 및 처리의 예는 천연 물질, 예를 들어 기저막 단백질, 예를 들어 라미닌 및 타입 IV 콜라겐, 합성 물질, 예를 들어 EPTFE, 및 분절화 (segmented) 폴리우레탄우레아 실리콘, 예를 들어 PURSPAN™ (더 폴리머 테크놀로지 그룹, 인크. (The Polymer Technology Group, Inc., 미국 캘리포니아주 버클리))을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 스캐폴드는 또한 항혈전제, 예를 들어 헤파린을 포함할 수 있고; 스캐폴드는 또한 태반 줄기 세포를 접종하기 전에 표면 전하를 변경하도록 처리될 수 있다 (예를 들어, 혈장으로 코팅).

[0361] **6. 실시예**

[0362] 6.1. 실시예 1: 태반 관류액 및 제대혈로부터의 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포의 특성 결정

[0363] 본 실시예는 인간 태반 관류액으로부터의 천연 킬러 세포의 단리 및 배양을 입증한다.

[0364] 태반 천연 킬러 세포의 단리. 천연 킬러 세포는 8 단위의 인간 태반 관류액 (HPP) 및 4 단위의 제대혈 (UCB)로부터 CD56-컨쥬게이팅된 마이크로비드를 사용하여 단리하였다. PINK 세포의 단리는 자성 비드 선택 (밀테니이 바이오텍 (Miltenyi Biotec))에 의해 수행하였다. 산후 태반을 방혈시키고 약 200 내지 약 750 mL의 관류 용액 (0.9% NaCl 주사 용액 USP 등급 (Cat No. 68200-804, VWR))을 사용하여 관류시켰다. 비처리 관류액을 수집하고, 적혈구를 제거하도록 처리하였다. HPP 또는 UCB로부터의 단핵 세포를 형광-활성화 세포 분류 (FACS) 버퍼 (RPMI 1640, 페놀 레드 비함유, + 5% FBS)로 1회 세척한 후, 1500 rpm에서 6분 동안 원심분리하였다. 세포 수를 계수하고, 세포 펠렛을 20 ㎕의 CD3 마이크로비드 (카탈로그 No. 130-050-101, 밀테니이)와 함께 10^7개의 총 세포당 80 ㎕의 버퍼 내에 재현탁하였다. 시스템을 잘 혼합하고, 15분 동안 4-8℃에서 인큐베이팅하였다. 10^7개의 총 세포당 1-2 mL의 버퍼를 첨가한 후, 혼합물을 300 g에서 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 완전히 피펫으로 제거하였다. 세포 펠렛을 10^8 세포까지 500 ㎕의 버퍼 내에 재현탁하고, 자성 분리를 위해 준비하였다. LS 컬럼 (밀테니이 바이오텍)을 MIDIMACS™ 세포 분리기 (밀테니이 바이오텍)의 자기장 내에 놓고, 3 mL 버퍼를 적용하여 컬럼을 세정하고, 세포/마이크로비드 현탁액을 컬럼에 적용하였다. 컬럼을 통해 통과하고 천연 킬러 세포를 포함할 비표지된 $CD3^-$ 세포를 2 x 3 mL 세척 버퍼와 함께 수집하였다. $CD3^-$ 세포를 계수하고, 1회 세척한 후, CD56 마이크로비드 (Cat#: 130-050-401, 밀테니이)로 염색하고, 상기 설명되는 CD3 마이크로비드 분리에서와 동일한 프로토콜을 사용하여 분리/단리하였다. 이에 의해, $CD56^+CD3^-$ 집단이 수집되고, 추가 분석을 위해 준비되었다. 천연 킬러 세포의 백분율 범위는 HPP에서 3.52 내지 11.6 (중앙값 6.04, 평균 5.22), 및 UCB에서 1.06 내지 8.44 (중앙값: 3.42, 평균: 4.2)이었다. HPP로부터의 천연 킬러 세포의 CD56 마이크로비드 선택으로 약 80% 순수한 집단을 생산하였다 (도 1 참조). 전체 $CD56^+$, $CD3^-$ 천연 킬러 세포 집단 중에서, $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포 (즉, PINK 세포)의 백분율 범위는 HPP로부터 56.6 내지 87.2 (중앙값 74.2, 평균 65.5), 및 UCB로부터 53.7 내지 96.6 (중앙값 72.8)이었다. $CD56^+$, $CD16^+$ 천연 킬러 세포의 백분율 범위는 HPP로부터 12.8 내지 43.3 (중앙값 25.8, 평균 34.5), 및 UCB에 대해 3.4 내지 46.3 (중앙값 27.3, 평균 33.4)이었다.

[0365] 다른 실험에서, 인간 혈액 세포 상의 세포 표면 항원 (CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA-DR, 글리코포린 A)을 표적으로 하는 자성 음성 선택 키트를 사용하여 천연 킬러 세포를 단리하였다. HPP 및 UCB 냉동보존된 단위를 해동하고, 1:1로 해동 배지 (RPMI Media 1640 (카탈로그 #22400, 깁코 (Gibco)) + 20% 우태 혈청 (열 불활성화) (카탈로그 #SH30070.03, 하이클론 (Hyclone)))로 희석하고, 1500 rpm에서 8분 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 적혈구를 추가로 고갈시키기 위해 염화암모늄 처리를 적용하고; 각각의 단위를 약 30 mL의 빙냉 FACS 버퍼 (RPMI 1640, 페놀 레드 비함유, + 5% FBS) 내에 재현탁한 후, 60 mL 빙냉

염화암모늄 (카탈로그 #07850, 스템 셀 (Stem Cell))을 첨가하고, 용액을 볼텍싱한 후, 얼음 상에서 5분 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 단핵 세포를 FACS 버퍼로 3회 세척한 후, 1500 rpm에서 8분 동안 원심분리하였다. 세포 수를 계수하고, 세포 펠렛을 5 x 10^7 생세포/ml로 RoboSep 버퍼 (카탈로그 #20104, 스템 셀) 내에 재현탁하고, 0.1 mg/mL DNAase I 용액 (카탈로그 #07900, 스템 셀)을 세포 현탁액에 첨가하고, 피펫으로 부드럽게 혼합하고, 단리에 앞서 15분 동안 실온에서 인큐베이팅하였다. 덩어리는 세포 현탁액으로부터 40 ㎛ 메시 나일론 여과망 (카탈로그 #352340, 비디 팔콘 (BD Falcon))으로 여과한 후 단리를 진행함으로써 제거하였다. 단리는 EasySep 음성 선택 인간 NK 세포 농축 칵테일 및 EasySep 자성 마이크로입자를 포함하는 인간 NK 세포 농축 키트 (카탈로그 #19055, 스템 셀)을 사용하여 장치 RoboSep (카탈로그 #20000, 스템 셀) 및 프로그램 "Human NK Negative Selection 19055 and high recovery" (50 ㎕/mL 칵테일 첨가, 100 ㎕/mL 마이크로입자 첨가, 10 및 5분 인큐베이션, 1x 2.5분 분리)에 의해 자동화하였다. 따라서, $CD56^+CD3^-$ 집단이 수집되고 추가의 분석을 위해 준비된다.

[0366] 천연 킬러 세포의 팽창. 일반적으로 천연 킬러 세포를 다음과 같이 팽창시켰다. 천연 킬러 세포 배양액을 위한 출발 배지는 문헌 ([Yssel et al., J. Immunol. Methods 72(1):219-227 (1984)] 및 [Litwin et al., J. Exp. Med. 178(4):1321-1326 (1993)]에 기재된 프로토콜의 변형에 기초하여 제조하였다. 간단히 설명하면, 출발 배지는 35 ㎍/mL 트랜스페린 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)), 5 ㎍/mL 인슐린 (시그마-알드리치), 2 x 10^{-5}M 에탄올아민 (시그마-알드리치), 1 ㎍/mL 올레산 (시그마-알드리치), 1 ㎍/mL 리놀레산 (시그마-알드리치), 0.2 ㎍/mL 팔미트산 (시그마-알드리치), 2.5 ㎍/mL BSA (시그마-알드리치) 및 0.1 ㎍/mL 식물성 혈구응집소 (PHA-P, 시그마-알드리치)의 최종 농도의 시약을 함유하는, 10% FCS (하이클론)가 존재하는 IMDM (인비트로겐 (Invitrogen))을 포함한다. $CD56^+CD3^-$ NK 세포를 2.5 x 10^5 생세포/mL의 출발 배지 + 200 iu/mL IL-2 (R&D 시스템즈 (R&D Systems))로 세포 배양액 처리된 24-웰 플레이트 또는 T 플라스크 내에서 재현탁하였다. 미토마이신 C-처리된 동종 PBMC 및 K562 세포 (만성 골수성 백혈병 세포주)를 모두 영양 세포로서 출발 배지에 1 x 10^6/mL의 최종 농도로 첨가하였다. NK 세포를 5-6일 동안 37℃에서 5% CO_2 내에서 배양하였다. 5-6일 후에 이어서 3-4일마다, 동일 부피의 유지 배지 (10% FCS, 2% 인간 AB 혈청, 항생제, L-글루타민 및 400 단위의 IL-2/mL을 함유하는 IMDM)를 배양액에 첨가하였다. NK 세포를 제21일에 수거하였다.

[0367] 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포의 특성 결정. 기증자 매칭된 HPP 및 CB를 해동하고, 세포를 FACS 버퍼 (5% FBS를 함유하는 RPMI-1640)로 세척하였다. 이어서, 천연 킬러 세포를 제조자가 지시한 바와 같이 ROBOSEP® 자성 분리 시스템 (스템셀 테크놀로지스 (StemCell Technologies))를 이용하여 CD56 마이크로비드를 사용하여 농축시켰다. CD56 농축된 천연 킬러 세포 집단을 면역표현형 특성 결정을 위해 다음 항체 (달리 지시하지 않으면 비디 바이오사이언스)로 염색하였다: PE-Cy-7에 컨쥬게이팅된 항-CD56, 항-CD3 APC Cy7, 항-CD16 FITC, 항-NKG2D APC, 항-NKp46 APC, 항-CD94 PE (R&D), 항-NKB1 PE, 및 항-KIR-NKAT2 PE. CD94, NKG2D 및 NKp46은 NK 세포 전구체 내에 부재하거나 감소된 발현을 보여주지만 완전-분화된 NK 세포 상에 존재하는 마커이다 ([Freud et al., "Evidence for Discrete States of Human Natural Killer Cell Differentiation In Vivo," J. Exp. Med. 203(4):1033-1043 (2006)]; [Eagle & Trowsdale, "Promiscuity and the Single Receptor: NKG2D," Nature Reviews Immunology Published online August 3, 2007]; [Walzer et al., "Natural Killer Cells: From $CD3^-NKp46^+$ to Post-Genomics Meta-Analyses," Curr. Opinion Immunol. 19:365-372 (2007)] 참조). 표 1에 나타난 바와 같이, KIR3DL1, KIR2DL2/L3, NKG2D, NKp46 및 CD94의 발현은 HPP로부터의 농축된 $CD56^+$ 세포 집단 및 제대혈 (CB)로부터의 HLA-매칭된 $CD56^+$ 세포 집단 사이에서 유의하게 상이하지 않았다.

[0368] <표 1>

특정 마커 조합을 보유하는 NK 세포의 백분율. 3개 샘플의 평균.

	평균(%)		
	CB	HPP	p값
CD3-CD56+	0.6	0.7	0.799
CD3-CD56+CD16-	53.9	58.7	0.544
CD3-CD56+CD16+	46.1	41.3	0.544
CD3-CD56+KIR3DL1+	5.8	7.3	0.762
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	10.7	9.9	0.89
CD3-CD56+NKG2D+	60.3	58.5	0.865
CD3-CD56+CD94+	74.6	76.8	0.839

[0369]

[0370] 6.2. 실시예 2: 조합된 태반 관류액 및 제대혈로부터의 태반-유래 중간체 천연 킬러 세포의 특성 결정

[0371] 제대혈 및 태반 관류액의 기증자 매칭된 단핵 세포 (combo)를 혼합하고, FACS 버퍼 (5% FBS를 함유하는 RPMI-1640)로 1회 세척하고, BD FACSCanto (비디 바이오사이언시즈) 상에서 표 2에 나열된 항체를 사용하여 면역표현형 특성 결정하였다. 데이타를 FlowJo 소프트웨어 (트리 스타 (Tree Star))에 의해 분석하였다.

[0372] <표 2>

면역표현형 특성 결정에 사용된 항체 목록.

항목	공급처	Cat No.
FITC 항-hu CD3	비디 바이오사이언스	555332
FITC 항-hu CD3	밀테니이	130-080-401
APC-Cy7 항-hu CD3	비디 바이오사이언스	557832
FITC 항-hu CD16	비디 바이오사이언스	555406
PE-Cy5 항-hu CD16	비디 바이오사이언스	555408
PE 항-hu CD56	비디 바이오사이언스	555516
PE 항-hu CD56	밀테니이	130-090-755
PE-CY5 항-hu CD56	비디 바이오사이언스	555517
PE-Cy7 항-hu CD56	비디 바이오사이언스	557747
PE 항-hu CD94	R&D	FAB-1058P
PE 항-hu KIR-NKAT2 (2DL2/L3)	비디 바이오사이언스	556071
PE 항-hu NKB1(3DL1)	비디 바이오사이언스	555967
APC 항-hu NKG2D	비디 바이오사이언스	558071
APC 항-hu NKp46	비디 바이오사이언스	558051
PE 항-hu CD226	비디 바이오사이언스	559789
PE 항-hu NKp44	비디 바이오사이언스	558563
PE 항-hu NKp30	비디 바이오사이언스	558407
PE 항-hu 2B4	비디 바이오사이언스	550816
이소형 FITC 마우스 IgG1	비디 바이오사이언스	340755
이소형FITC 마우스 IgG2b	비디 바이오사이언스	556577
이소형 PE 마우스 IgG1	비디 바이오사이언스	340761
이소형 PE 마우스 IgG2b	비디 바이오사이언스	555743
이소형 PerCP 마우스 IgG1	비디 바이오사이언스	340762
이소형 PE-Cy5 마우스 IgG2b	비디 바이오사이언스	555744
이소형 APC 마우스 IgG1	비디 바이오사이언스	340754
이소형 APC 마우스 IgG2a	비디 바이오사이언스	555576
이소형 APC-Cy7 마우스 IgG1	비디 바이오사이언스	348802
이소형 PE-Cy7 마우스 IgG1	비디 바이오사이언스	348798

[0373]

[0374] 태반 NK 세포 및 말초혈 (PB) NK 세포의 면역표현형 특성 결정. NK 세포는 다음 2개의 주요 군으로 분류될 수 있다: $CD56^{+}CD16^{+}$ NK 세포 및 $CD56^{+}CD16^{-}$ 세포. $CD56^{+}CD16^{+}$ NK 세포는 풍부한 세포용해성 과립을 갖고 CD16을 많이 발현하고, 따라서 항체-의존 세포-매개 세포독성 (ADCC)을 나타낼 수 있다. 이와 반대로 $CD56^{+}CD16^{-}$ NK 세포는 세포용해성 과립이 매우 적고, CD16을 적게 발현하거나 발현하지 않지만, 활성화 시에 시토킨 및 케모킨을 생산할 수 있다. 개별 NK 세포는 다양한 레파토리의 활성화 및 억제성 수용체, 예를 들어 킬러 면역글로불린-유사 수용체 (KIR, 예를 들어, KIR3DL1 및 KIR2DL2/3), 천연 세포독성 수용체 NCR (예를 들어, NKp30, NKp44 및 NKp46), 킬러 세포 렉틴-유사 수용체 (KLR; 예를 들어, CD94, NKG2D), 2B4 및 CD226을 디스플레이한다.

[0375] 특이적 NK 수용체에 대한 형광-컨쥬게이팅된 mAb를 사용하여 FACS 분석을 태반 NK 및 말초혈 NK 세포에 대해 수행하였다. 특성 결정된 11개의 NK 하위세트 중에서, 11개의 NK 하위세트 중 7개 ($CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$, $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$, $CD3^{-}CD56^{+}KIR2DL2/3^{+}$, $CD3^{-}CD56^{+}NKp46^{+}$, $CD3^{-}CD56^{+}NKp30^{+}$, $CD3^{-}CD56^{+}2B4^{+}$ 및 $CD3^{-}CD56^{+}CD94^{+}$)에서 세포의 수는 태반 NK 세포와 말초혈 NK 세포 사이에서 유의한 차이 ($p<0.05$)를 보였다 (64% 차이를 차지함) (표 3A; 또한 표 3B 및 3C 참조).

[0376] <표 3A>

16 단위의 조합된 기증자-매칭된 제대혈 및 인간 태반 관류액 (combo) 및 13 단위의 말초혈 (PB)에서 $CD3^{-}CD56^{+}$ NK 세포의 표현형 특성 결정. 2-샘플 t-검정을 이용하여, 집단 평균이 태반 및 말초혈 단위에서 동일한지 결정한다.

	Combo (16 단위)	PB (13 단위)	
표면 마커	평균 %	평균 %	P 값
CD3-CD56+	2.2	2.4	0.728
CD3-CD56+CD16-	60.9	21.4	0.000
CD3-CD56+CD16+	39.1	78.6	0.000
CD3-CD56+KIR3DL1	12.3	7.1	0.099
CD3-CD56+KIR2DL2/L3	21.9	9.5	0.004
CD3-CD56+NKG2D	42.1	29.9	0.126
CD3-CD56+NKp46	7.0	18.9	0.011
CD3-CD56+CD226	16.0	26.7	0.135
CD3-CD56+NKp44	9.5	4.9	0.073
CD3-CD56+NKp30	39.1	19.0	0.006
CD3-CD56+2B4	11.1	4.5	0.019
CD3-CD56+CD94	71.3	26.2	0.000

[0377]

[0378] 표 3B 및 3C는 별개의 실험에서 16 단위의 조합된 기증자-매칭된 제대혈 및 인간 태반 관류액 (combo) 및 13 단위의 말초혈 (PB)에서 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{-}$ 및 $CD3^{-}CD56^{+}CD16^{+}$ NK 세포의 표현형 특성 결정을 보여준다.

[0379] <표 3B>

	Combo	PB	
표면 마커	평균 %	평균 %	P 값
CD3-CD56+CD16-	62.3	14.1	0.000
CD3-CD56+CD16-KIR3DL1	7.8	1.5	0.004
CD3-CD56+CD16-NKG2D	43.5	42.7	0.941
CD3-CD56+CD16-KIR2DL2/L3	13.6	2.4	0.000
CD3-CD56+CD16-NKp46	6.7	43.6	0.001
CD3-CD56+CD16-CD94	69.8	48.5	0.057
CD3-CD56+CD16-CD226	7.6	4.9	0.068
CD3-CD56+CD16-NKp44	3.4	0.6	0.076
CD3-CD56+CD16-NKp30	46.7	22.0	0.000
CD3-CD56+CD16-2B4	3.7	0.5	0.078

[0380]

[0381] <표 3C>

	Combo	PB	
표면 마커	평균%	평균%	P 값
CD3-CD56+CD16+	37.7	85.9	0.000
CD3-CD56+CD16+KIR3DL1	21.5	8.9	0.014
CD3-CD56+CD16+NKG2D	42.1	28.5	0.066
CD3-CD56+CD16+KIR2DL2/L3	34.5	12.1	0.000
CD3-CD56+CD16+NKp46	10.4	14.5	0.242
CD3-CD56+CD16+CD94	72.9	23.8	0.000
CD3-CD56+CD16+CD226	35.5	32.6	0.347
CD3-CD56+CD16+NKp44	22.6	6.4	0.016
CD3-CD56+CD16+NKp30	45.7	19.7	0.000
CD3-CD56+CD16+2B4	31.2	6.1	0.008

[0382]

[0383] 60.9%의 태반 NK 세포가 $CD56^{+}CD16^{-}$ (태반-유래 중간체 천연 킬러 (PINK) 세포)인 반면, 단지 21.4%의 말초혈 NK 세포가 $CD56^{+}CD16^{-}$이다. 21일 동안 배양 후에, 11개의 NK 하위세트 중 4개 ($CD3^{-}CD56^{+}KIR2DL2/3^{+}$, $CD3^{-}CD56^{+}NKp46^{+}$, $CD3^{-}CD56^{+}NKp44^{+}$ 및 $CD3^{-}CD56^{+}NKp30^{+}$)의 백분율은 태반 NK 세포와 말초혈 NK 세포 사이에 유의한 차이 ($p<0.05$)를 보였다 (표 4).

[0384] <표 4>

12 단위의 조합된 기증자-매칭된 제대혈 및 인간 태반 관류액 (Combo), 및 9 단위의 말초혈 (PB)로부터 유래된 21일-배양된 NK 세포의 표현형 특성 결정. 2-샘플 t-검정을 이용하여, 집단 평균이 combo 및 말초혈 단위에서 동일한지 결정한다.

	Combo (n6 단위)	PB (n3 단위))	
표면 마커	평균%	평균%	P 값
CD3-CD56+	2.2	2.4	0.728
CD3-CD56+CD16-	60.9	21.4	0.000
CD3-CD56+CD16+	39.1	78.6	0.000
CD3-CD56+KIR3DL1	12.3	7.1	0.099
CD3-CD56+KIR2DL2/L3	21.9	9.5	0.004
CD3-CD56+NKG2D	42.1	29.9	0.126
CD3-CD56+NKp46	7.0	18.9	0.011
CD3-CD56+CD226	16.0	26.7	0.135
CD3-CD56+NKp44	9.5	4.9	0.073
CD3-CD56+NKp30	39.1	19.0	0.006
CD3-CD56+2B4	11.1	4.5	0.019
CD3-CD56+CD94	71.3	26.2	0.000

[0385]

[0386] 추가로, 별개의 실험에서, Luminex 분석에 의해 결정할 때, 21일 동안 배양 후에, 태반 및 말초혈 NK 세포는 특히 IL-8에 대해 특유한 시토킨 프로필을 나타낸 것으로 결정되었다 (표 5).

[0387] <표 5>

시토킨	PB (pg/mL)	Combo (pg/mL)
IL-13	1.26	1.89
IL-8	6.61	15.77
IL-10	1.26	2.23
TNFa	0.28	0.34
MCP-1	10.49	11.32

[0388]

[0389] 태반 NK 세포 및 말초혈 NK 세포의 microRNA 프로파일링. 단리된 또는 팽창된 NK 세포를 MIRVANA™ miRNA 단리 키트 (앰비온 (Ambion), Cat# 1560)를 사용하여 microRNA (miRNA) 제제로 처리하였다. NK 세포 (0.5 내지 1.5 x 10^6 세포)를 변성 용해 버퍼 내에서 파괴시켰다. 이어서, 샘플을 산-페놀+클로로포름 추출로 처리하여, 작은 RNA 종에 대해 고도로 농축된 RNA를 단리하였다. 샘플을 25% 에탄올에 도입하기 위해 100% 에탄올을 첨가하였다. 상기 용해물/에탄올 혼합물을 유리 섬유 필터를 통해 통과시킬 때, 큰 RNA는 고정되고, 작은 RNA 종은 여액 내에 수집되었다. 이어서, 여액의 에탄올 농도를 55%로 증가시키고, 혼합물을 제2 유리 섬유 필터를 통해 통과시켰고, 여기서 작은 RNA가 고정되었다. 상기 RNA를 수회 세척하고, 낮은 이온 강도 용액으로 용출하였다. 회수된 작은 RNA의 농도 및 순도는 260 및 280 nm에서 그의 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

[0390] PINK 세포에 특유한 것으로 발견된 miRNA를 표 6에 제시한다. hsa-miR-199b로 명명된 하나의 miRNA가 말초혈 NK 세포에 특유한 것으로 밝혀졌다.

[0391] <표 6>

qRT-PCR을 통한 piNK 세포 및 PB NK 세포의 miRNA 프로파일링.

miRNA ID	Sanger 기탁 번호	서열
hsa-miR-100	MIMAT0000098	aacccguagauccgaacuugug
hsa-miR-127	MIMAT0000446	ucggauccgucugagcuuggcu
hsa-miR-211	MIMAT0000268	uucccuuugucauccuucgccu
hsa-miR-302c	MIMAT0000717	uaagugcuuccauguuucagugg
hsa-miR-326	MIMAT0000756	ccucugggcccuuccuccag
hsa-miR-337	MIMAT0000754	uccagcuccuauaugaugccuuu
hsa-miR-497	MIMAT0002820	cagcagcacacugugguuugu
hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	aagugcugucauagcugagguc
hsa-miR-515-5p	MIMAT0002826	uucuccaaaagaaagcacuuucug
hsa-miR-517b	MIMAT0002857	ucgugcaucccuuuagaguguu
hsa-miR-517c	MIMAT0002866	aucgugcaucccuuuuagagugu
hsa-miR-518a	MIMAT0002863	aaagcgcuucccuuugcugga
hsa-miR-518e	MIMAT0002861	aaagcgcuucccuucagagug
hsa-miR-519d	MIMAT0002853	caaagugccucccuuuagagug
hsa-miR-520g	MIMAT0002858	acaaagugcuucccuuuagagugu
hsa-miR-520h	MIMAT0002867	acaaagugcuucccuuuagagu
hsa-miR-564	MIMAT0003228	aggcacggugucagcaggc
hsa-miR-566	MIMAT0003230	gggcgccugugaucccaac
hsa-miR-618	MIMAT0003287	aaacucuacuuguccuucugagu
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	aacccguagauccgaucuugug

[0392]

[0393] 배양된 태반 NK 세포 및 비배양된 NK 세포의 면역표현형 특성 결정. 배양된 PINK 세포의 전체 특성을 광범위 면역표현형 연구 및 세포독성 분석에 의해 평가하였다. 팽창된 NK 세포의 표현형을 결정하기 위해서, NK 수용체 (NKR), 예를 들어 KIR, NKG2D, NKp46, NKp44 및 2B4의 발현을 분석하였다. 세포독성 분석은 종양 세포 (K562 세포)를 PKH26으로 표지한 후, PINK 세포와 4시간 동안 동시-배양함으로써 수행하였다. 제0일부터 제21일까지, NKG2D의 발현은 60.9%±4.8%로부터 86%±17.4%로 증가하고 (0.024의 p 값); NKp46은 10.5%±5.4%로부터 82.8%±9.0%로 증가하고 (0.00002의 p 값); NKp44는 9.6%±6.5%로부터 51.6%±27.5%로 증가하고 (0.022의 p 값); 2B4는 13.0%±7.1%로부터 0.65%±0.5%로 감소하였다 (0.009%의 p 값) (표 7). 이들 배양 조건 하에서, KIR3DL1 (킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체, 3개의 도메인, 긴 세포질 테일 1, 억제성 수용체) 및 KIR2DL2/L3 (킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체, 2개의 도메인, 긴 세포질 테일 2 및 긴 세포질 테일 3; 억제성 수용체)을 포함한 억제성 KIR은 21일의 팽창 동안 영향받지 않은 상태로 유지되었다. NKR 발현의 변화는 또한 K562 세포에 대해 제14일에 비해 제21일에 세포용해 활성의 현저한 증가 (63%±15% 대 45%±4%, 0.0004의 p 값)와 상호관련되었다. 이들 발견을 통해 NK 세포의 세포독성 활성과 밀접하게 상호관련되는 NK 세포의 추정 마커를 확인하였다.

[0394] <표 7>

21일 배양의 전후에 piNK 세포의 표현형 특성 결정. 표준 편차 (Stdev)는 5명의 기증자의 집단 평균에 대해 계산되었다.

	제0일		제21일	
	평균%	Stdev	평균%	Stdev
CD3-CD56+	2.9	1.1	85.5	8.6
CD3-CD56+CD16-	62.6	20.2	27.8	8.3
CD3-CD56+CD16+	37.4	20.2	72.2	8.3
CD3-CD56+KIR3DL1+	22.7	4.2	20.0	16.7
CD3-CD56+KIR2DL2/L3+	28.4	4.2	29.6	6.4
CD3-CD56+NKG2D+	60.9	4.8	86.0	17.4
CD3-CD56+NKp46+	10.5	5.4	82.8	8.9
CD3-CD56+CD226+	19.5	7.4	14.1	13.3
CD3-CD56+NKp44+	9.6	6.5	51.6	27.5
CD3-CD56+NKp30+	58.9	7.0	76.5	19.4
CD3-CD56+2B4+	13.0	7.1	0.6	0.5
CD3-CD56+CD94+	79.7	4.9	63.9	19.4

[0395]

[0396] *지질-기반 단백질 고정 기술 및 선형 이온 트랩 (Linear Ion Trap) LC/MS*를 통한 배양된 태반 NK 세포 및 배양된 말초혈 NK 세포의 막 단백질체 (Proteomic) 프로파일링. 막 단백질 정제: 21일 동안 배양된 조합된 태반 관류액 및 제대혈 세포로부터의 태반 천연 킬러 세포, 및 PB NK 세포를 세포 용해 전에 15 min 동안 프로테아제 억제제 칵테일 용액 (P8340, 시그마 알드리치 (미국 미주리주 세인트루이스 소재); 4-(2-아미노에틸)벤젠술포닐 플루오라이드 (AEBSF), 펩스타틴 A, E-64, 베스타틴, 류펩틴 및 아프로티닌 함유, 금속 킬레이터 미함유)과 함께 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 10 mM HCl 용액 (세제 미함유)의 첨가에 의해 용해시키고, 10 min 동안 400 g에서 원심분리하여 핵을 펠렛화하고 제거하였다. 핵후 상등액을 초원심분리관에 옮기고, T-1270 회전자

(rotor)가 있는 WX80 초원심분리기 (써모 피셔 사이언티픽 (Thermo Fisher Scientific, 미국 노스캐롤라이나주 애슈빌)) 상에서 100,000g에서 150분 동안 원심분리하여 막 단백질 펠렛을 생성하였다.

[0397] 단백질 함유 리포좀 (proteoliposome)의 생성, 고정 및 소화: 막 단백질 펠렛을 NANOXIS® 버퍼 (10 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8)를 사용하여 수회 세척하였다. 막 단백질 펠렛을 1.5 mL의 NANOXIS® 버퍼 내에 현탁시킨 후, VIBRA-CELL™ VC505 초음파 분산기 (소닉스 앤 머티리얼스, 인크. (Sonics & Materials, Inc., 미국 커넥티컷주 뉴타운))를 사용하여 20분 동안 얼음 상에서 팁 (tip)-초음파분리하였다. 단백질 함유 리포좀의 크기는 FM1-43 염료 (인비트로겐, 미국 캘리포니아주 칼스바드)로 염색하고, 형광 현미경으로 가시화하여 결정하였다. 단백질 함유 리포좀 현탁액의 단백질 농도는 BCA 분석 (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific))에 의해 결정하였다. 이어서, 단백질 함유 리포좀을 표준 피펫 팁을 사용하여 LPI™ Flow Cell (나녹시스 에이비 (Nanoxis AB, 스웨덴 고텐부르크)) 상으로 주입하고, 1시간 동안 고정시켰다. 고정시킨 후, 일련의 세척 단계를 수행하고, 트립신 5 ㎍/mL (프린스턴 세퍼레이션 (Princeton Separations, 미국 뉴저지주 아델피))을 LPI™ Flow Cell 상으로 직접 주입하였다. 칩을 37℃에서 밤새 인큐베이팅하였다. 이어서, 트립신분해 펩티드를 칩으로부터 용출시킨 후, Sep-Pak 카트리지 (워터스 코퍼레이션 (Waters Corporation, 미국 매사추세츠주 밀포드))를 사용하여 탈염시켰다.

[0398] 강한 양이온 교환 (SCX) 분획법: 트립신분해 펩티드를 0.1% 포름산/수용액 내에 재구성하고, 강한 양이온 교환 (SCX) TOP-TIP™ 컬럼 (폴리엘씨 (PolyLC, 미국 매릴랜드주 콜럼비아)) 상에 로딩하고, 피펫 팁을 30 ㎛ 폴리술포에틸 아스파르타미드 SCX 충전 물질로 채웠다. 단계-구배의 포름산암모늄 버퍼 (pH 2.8) (10 mM-500 mM)를 사용하여 펩티드를 SCX TOP-TIP™으로부터 용출하였다. 각각의 SCX 분획을 급속 진공 농축기 (speed-vac system)를 사용하여 건조시키고, 하류 LC/MS 분석을 위한 준비에서 5% 아세토니트릴, 0.1% 포름산으로 재구성하였다.

[0399] LTQ 선형 이온 트랩 LC/MS/MS 분석: 각각의 SCX 분획을 180 min 구배 (버퍼 A: 물, 0.1% 포름산; 버퍼 B: 아세토니트릴, 0.1% 포름산)를 사용하여 축방향 탈용매화 진공-보조 나노모세관 전기분무 이온화 (ADVANCE) 원 (source) (미크롬 바이오리소시스, 인크. (Michrom Bioresources, Inc., 미국 캘리포니아주 오번))에 직접 접속된 0.2 mm x 150 mm 3 ㎛ 200 Å MAGIC C18 컬럼 (미크롬 바이오리소시스 인크.) 상에서 분리하였다. ADVANCE 원은 3 ㎕/min의 상당히 더 빠른 유속에서 작동시키면서 전통적인 nanoESI와 동등한 수준의 감도를 달성한다. 용출된 펩티드를 각각의 완전 스캔 질량 스펙트럼에 이어 10 데이타-의존 MS/MS 스캔을 사용한 LTQ 선형 이온 트랩 질량 분광계 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였다.

[0400] 생체정보학: 각각의 종양 세포주 (AML, CML)에 대해 수집되는 6개의 염 분획에 대응하는 6개의 RAW 파일을 SORCERER™ SOLO™ 워크스테이션 (세이지-엔 리서치 (Sage-N Research, 미국 캘리포니아주 산 호세)) 상에서 SEQUEST 알고리즘의 실행을 이용하여 IPI 인간 데이타베이스에 대한 단일 검색으로서 검색하였다. 1.2 amu의 펩티드 질량 허용도 (mass tolerance)를 지정하고, 메티오닌의 산화는 차별적 변형으로서 지정하고, 카르브아미도메틸화는 정적 변형으로서 지정하였다. Trans-Proteomic Pipeline (TPP)의 스캐폴드 소프트웨어 실행을 이용하여 막 단백질체 데이타를 분류하고 분석하였다. 단백질은 분석을 위해 95%의 펩티드 확률, 95%의 단백질 확률 및 1의 특유한 펩티드로 확인되는 것처럼 간주하였다. 막 단백질체 데이타세트 사이의 비교는 사내에서 개발한 맞춤 Perl 스크립트를 이용하여 수행하였다.

[0401] 분석에 의해 말초혈 NK 세포로부터 확인된 막 단백질에 특유한, 배양된 태반 NK 세포로부터 8개의 막 단백질이 확인되었다. 표 8을 참조한다. 또한, 배양된 태반 NK 세포에 특유한, 말초혈 NK 세포로부터 8개의 막 단백질을 확인하였다. 표 8을 참조한다. 확인된 10개의 막 단백질만이 배양된 태반 NK 세포 및 말초혈 NK 세포 둘 모두에서 공유되는 것으로 밝혀졌다.

[0402] <표 8>

태반 NK 세포에 특이적인 단백질	PB NK 세포에 특이적인 단백질
아미노펩티다제 N	섬유모세포 성장 인자 수용체 4 전구체
아포리포단백질 E	면역성-연관 뉴클레오티드 4-유사 1 단백질
아트로핀-1 상호작용 단백질 1	인테그린 알파-L 전구체
이넥신 inx-3	인테그린 베타-2 전구체
인테그린 알파-2 전구체	인테그린 베타-4 전구체
인테그린 베타-5 전구체	막-결합 용해성 뮤레인 트랜스글리코실라제 D 전구체
비만세포 표면 당단백질 GP49B 전구체	옥시스테롤 결합 단백질-관련 단백질 8
라이아노다인 수용체 1	퍼포린 1 전구체

[0403]

[0404] 6.3. 실시예 3: 종양 세포에 대한 천연 킬러 세포의 세포독성

[0405] 본 실시예는 태반 중간체 천연 킬러 세포가 종양 세포에 대한 세포독성을 보임을 입증한다. HPP로부터의 PINK 세포는 세포독성 분석에서 및 NK 세포 시토킨 분비의 Luminex 분석에 의해 입증된 바와 같이 급성 골수성 백혈병 세포에 대해 세포독성이다.

[0406] 시토킨 분비 분석에서, HPP로부터 CD56 마이크로비드-농축된 NK 세포를 KG-1a 급성 골수성 백혈병 세포와 1:1 비로 혼합하였다. 24시간 동안 인큐베이션 후에, 상등액을 수집하고 IFN-γ 및 GM-CSF 분비의 Luminex 분석으로 처리하였다. 증가된 수준의 IFN-γ 및 GM-CSF를, 도 2에 제시된 바와 같이 CD56-농축된 HPP 세포를 KG-1a 세포와 함께 24h 인큐베이팅한 후에 관찰하였다.

[0407] *PINK 세포의 세포독성*

[0408] PINK 세포를 사용하는 세포독성 분석에서, 표적 종양 세포를 카르복시플루오로세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 표지하였다. CFSE는 세포에 비-독성인 생체 염색제이고, 세포 분할 동안 딸 세포들 사이에 나누어진다. 이어서, 세포를 96-웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트에 넣고, 10% FBS를 보충한 RPMI 1640 내에서 새로 단리된 $CD56^{+}CD16^{-}$ PINK 세포와 함께 20:1, 10:1, 5:1 및 1:1의 효과기-표적 (E:T) 비에서 인큐베이팅하였다. 4시간 인큐베이션 시간 후에, 세포를 수거하고 유동 세포측정에 의해 CFSE의 존재에 대해 검사하였다. NK 세포 없이 배양액으로부터 회수된 표적 세포의 수를 참조로 사용하였다. 세포독성은 다음과 같이 정의한다: $(1-CFSE_{샘플}/CFSE_{대조군})*100\%$. 유의한 종양 세포 세포독성이 20:1 비에서 관찰되었다. 도 3 참조.

[0409] *배양된 PINK 세포에 대한 종양 세포 감수성*

[0410] *락테이트 데히드로게나제 (LDH)-방출 분석.* LDH-방출 분석은 CYTOTOX 96® 색도계 세포독성 분석 키트 (프로메가, Cat# G1780)를 사용하여 수행하였다. 상기 분석에서, 매칭된 HPP/UCB로부터 유래된 $CD56^{+}CD16^{-}$ 세포 및 $CD56^{+}CD16^{+}$ 세포의 조합물을 포함하는 배양된 NK 세포가 효과기 세포이고, 종양 세포가 표적 세포이었다. 효과기 세포 및 표적 세포를 96-웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트에 넣고, 2% 인간 AB 혈청 (제미니 (Gemini), Cat# 100-512)을 보충한 페놀 레드 비함유 100 ㎕ RPMI 1640 (인비트로겐, Cat# 11835-030) 내에서 다양한 효과기-표적 (E:T) 비에서 인큐베이팅하였다. 배양액을 4h 동안 37℃에서 5% CO_2 내에서 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 후에, 50 ㎕ 상등액을 효소에 의한 분석 플레이트에 옮기고, 제조자가 제공한 바와 같이 LDH 활성을 검출하고, ELISA 판독기 (Synergy HT, 바이오텍 (Biotek))에서 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 정도는 다음 식에 따라 계산하였다: %세포독성 = (샘플 - 효과기 자발 - 표적 자발)/(표적 최대 - 표적 자발)*100.

[0411] 특정 종양 종류가 다른 것보다 NK 세포에 대해 더 반응성일 수 있다. 배양된 PINK 세포에 대한 종양 세포의 감수성을 분석하기 위해, PINK 세포와 함께 동시배양된 12개의 상이한 종양 세포주를 LDH 방출 분석으로 분석하였다. 12개의 종양 세포주는 인간 만성 골수성 백혈병 (CML), 림프종, 망막모세포종 (RB) 및 다발 골수종 (MM)을 포함하였다 (표 9). NK 세포의 세포독성은 4-시간 동시-배양 후에 LDH 방출 분석에 의해 측정하였다.

[0412] <표 9>

ATCC 종양 세포주

명칭	설명
CCRF-CEM	인간 백혈병
KG-1	인간 급성 골수성 백혈병
KG-1A	인간 급성 골수성 백혈병
K562	인간 만성 골수성 백혈병
KU812	인간 만성 골수성 백혈병
U-937	인간 조직구성 림프종
WERI-RB-1	인간 망막모세포종
HCC2218	인간 유방암
RPMI 8226	인간 다발 골수종
HCT116	인간 결직장 암종
HT29	인간 결직장 선암종
U266	인간 다발 골수종

[0413]

[0414] 10:1의 효과기 대 표적 (E:T) 비에서, 배양된 PINK 세포의 유의한 세포독성이 K562 세포 (CML)에 대해 88.6%±5.6%, U937 세포 (림프종)에 대해 89.2%±9.8%, WERI-RB-1 세포 (RB)에 대해 73.3%±11.8%, RPMI8226 세포 (MM)에 대해 61.3%±1.3%, U266 세포 (MM)에 대해 57.4%±4.7%로 관찰되었다 (표 10).

[0415] <표 10>

배양된 piNK 세포에 대한 종양 세포의 차별적 감수성. 평균의 표준 오차 (S.E.M.)를 3 기증자로부터의 평균 세포독성에 대해 계산하였다.

세포주	% 세포독성	S.E.M
CCRF-CEM	7.6	1.2
KG-1	20.5	1.5
KG-1a	6.0	3.2
K562	88.6	5.6
KU812	40.3	8.2
U937	89.2	9.8
WERI-RB-1	73.3	11.8
RPMI8226	61.3	1.3
U266	57.4	4.7
HCT-116	61.0	5.1
HCC2218	14.8	3.7
HT-29	45.6	6.0

[0416]

[0417] *레날리도마이드 및 포말리도마이드 처리에 의한 PINK 세포의 세포독성의 향상*

[0418] *RNA 단리 및 정제.* 단리된 또는 팽창된 NK 세포를 RNAQUEOUS®-4PCR 키트 (앰비온, Cat #AM1914)를 사용하여 RNA 제제로 처리하였다. 간단히 설명하면, NK 세포 (0.5 내지 1.5 x 10^6 세포)를 구아니디늄 용해 용액에서 용해시켰다. 이어서, 샘플 용해물을 에탄올 용액과 혼합하고, mRNA 및 보다 큰 리보좀 RNA에 선택적으로 및 정량적으로 결합하는 실리카-기재 필터에 적용하였고; 매우 작은 RNA, 예를 들어 tRNA 및 5S 리보좀 RNA는 정량적으로 결합되지 않았다. 이어서, 필터를 세척하여 잔류 DNA, 단백질 및 다른 오염물질을 제거하고, RNA를 중금속을 킬레이팅하도록 미량의 EDTA를 함유하는 뉴클레아제 미함유 물 내에 용해시켰다. 실리카 필터를 키트 내에 제공되는 RNase 미함유 미세원심분리관 내에 맞는 작은 카트리지 내에 수용하였다. 샘플 용해물, 세척 용액 및 용출 용액은 원심분리 또는 진공 압력에 의해 필터를 통해 제거하였다. 필터로부터 용출 후에, RNA를 키트 내에 제공되는 초순수 DNase 1로 처리하여 미량의 DNA를 제거하였다. 마지막으로, DNase 및 2가 양이온은 또한 키트 내에 제공되는 시약에 의해 제거하였다. 회수된 RNA의 농도 및 순도는 260 및 280 nm에서 그의 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

[0419] *정량적 실시간 (qRT-PCR) 분석.* 이어서, 단리된 RNA를 TAQMAN® 역전사 시약 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems), Cat #N8080234)을 사용한 cDNA 합성, 이어서 Human Immune Array (어플라이드 바이오시스템즈, Cat# 4370573) 및 Human MicroRNA Array (어플라이드 바이오시스템즈, Cat# 4384792)를 사용하는 7900HT 신속 실시간 PCR 시스템에 의한 실시간 PCR 분석을 위해 사용할 수 있다.

[0420] 레날리도마이드 및 포말리도마이드는 항암 및 소염 활성이 향상된 탈리도마이드의 화학적 유사체이다. 레날리도마이드 및 포말리도마이드가 PINK 세포의 세포독성을 향상시킬 수 있는지 연구하기 위해서, 생체 외 배양된 (19일) PINK 세포를 레날리도마이드 또는 포말리도마이드로 24시간 동안 예비-처리한 후, 표적 결직장 암종 세포주 HCT-116과 동시-배양하였다. 레날리도마이드-처리된 NK 세포는 42.1% 세포독성을 나타내고, 포말리도마이드-처리된 NK 세포는 47.4% 세포독성을 보인 반면, 비처리된 대조군 PINK 세포는 단지 24.3% 세포독성을 보였다.

[0421] 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR) 및 유동 세포측정 분석에서는 NK 세포의 세포독성의 포말리도마이드-유도된 향상이 증가된 그랜자임 B (GZMB) 유전자 발현 (60%±1.7% 증가) (표 11) 및 GZMB-양성 NK 세포의 증가된 백분율 (25% 증가)와 상호관련됨을 보여주었다. 추가로, GM-CSF의 발현이 레날리도마이드 (232%±1.6% 증가) 및 포말리도마이드 (396%±0.3% 증가)-처리된 PINK 세포에서 증가하였다 (표 11A, 표 11B).

[0422] 표 11A, 표 11B. 비처리된 세포에 비교한 레날리도마이드- 및 포말리도마이드-처리된 배양된 PINK 세포의 qRT-PCT 분석. 표 11A: 나열된 유전자에 대한 레날리도마이드-처리된 샘플과 레날리도마이드-비처리된 샘플 사이의 유전자 발현의 변화 배수. 페어드 (paired) t-검정을 이용하여 변화 배수가 레날리도마이드-처리된 샘플 및 -비처리된 샘플에서 동일한지 결정한다. 표 11B: 나열된 25개 유전자에 대한 포말리도마이드-처리된 샘플 및 포말리도마이드-비처리된 샘플 사이의 유전자 발현의 변화 배수. 페어드 t-검정을 이용하여 변화 배수가 처리된 샘플 및 비처리된 샘플에서 동일한지 결정한다.

[0423] <표 11A>

	Veh	Len	Veh.stdev	Len.stdev	P 값
BAX	1	1.39	0.06	0.02	0.05
CCL5	1	1.24	0.11	0.07	0.04
CCR5	1	0.9	0.07	0.08	0.02
CD68	1	4.04	0.05	0.13	0.01
CD8A	1	1.3	0.01	0.02	0.02
CSF2	1	2.32	0.14	0.02	0.02
FAS	1	1.11	0.02	0.04	0.04
GUSB	1	1.13	0.04	0.07	0.05
IL2RA	1	1.26	0.03	0.01	0.03
TNFRSF18	1	0.7	0.1	0.16	0.04

[0424]

[0425] BAX - BCL2-연관 X 단백질

[0426] CCL5 - 케모킨 (C-C 모티프) 리간드 5

[0427] CCR5 - 케모킨 (C-C 모티프) 수용체 5

[0428] CSF2 - 집락 자극 인자 2 (과립구-대식세포)

[0429] FAS - TNF 수용체 수퍼패밀리, 멤버 6

[0430] GUSB - β 글루쿠로니다제β

[0431] IL2RA - α 인터류킨 2 수용체

[0432] TNFRSF18 - 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리, 멤버 18

[0433] <표 11B>

	Veh	Pom.	Veh.stdev	Pom.stdev	P 값
ACTB	1	0.77	0.01	0	0.01
BAX	1	2.23	0.06	0	0.01
CCL2	1	5.46	0.01	0.37	0.02
CCL3	1	2.2	0.04	0.16	0.02
CCL5	1	1.78	0.11	0.04	0.02
CCR5	1	0.68	0.07	0	0.05
CD68	1	8.74	0.05	0.19	0
CD80	1	1.59	0.13	0.19	0.02
CD8A	1	2.39	0.01	0.08	0.01
CSF1	1	1.41	0.07	0.05	0.01
CSF2	1	3.96	0.14	0	0.01
ECE1	1	1.56	0.06	0.12	0.02
FAS	1	1.34	0.02	0.03	0.01
GNLY	1.01	1.96	0.18	0.02	0.05
GUSB	1	1.76	0.04	0.01	0.01
GZMB	1	1.59	0.06	0.02	0.03
IL10	1.02	1.52	0.31	0.22	0.04
IL1A	1.01	2.61	0.19	0.12	0.01
IL2RA	1	1.58	0.03	0.06	0.01
IL8	1	1.62	0.04	0.06	0.04
LTA	1	2.88	0.02	0.21	0.02
PRF1	1	1.17	0.07	0.1	0.05
PTGS2	1	1.68	0.01	0.05	0.02
SKI	1	1.96	0.04	0.02	0.01
TBX21	1.01	2.05	0.14	0.2	0.01

[0434]

[0435] ACTB - β-액틴

[0436] BAX - BCL2-연관 X 단백질

[0437] CCL2 - 케모킨 (C-C 모티프) 리간드 2

[0438] CCL3 - 케모킨 (C-C 모티프) 리간드 3

[0439] CCL5 - 케모킨 (C-C 모티프) 리간드 5

[0440] CCR5 - 케모킨 (C-C 모티프) 수용체 5

[0441] CSF1 - 집락 자극 인자 1 (대식세포)

[0442] CSF2 - 집락 자극 인자 2 (과립구-대식세포)

[0443] ECE1 - 엔도텔린 전환 효소 1

[0444] FAS - TNF 수용체 수퍼패밀리, 멤버 6

[0445] GNLY - 그래눌라이신

[0446] GUSB - 글루쿠로니다제-β

[0447] GZMB - 그랜자임 B (그랜자임 2, 세포독성 T-림프구-연관 세린 에스테라제 1)

[0448] IL1A - α 인터류킨 1

[0449] IL2RA - 인터류킨 2 수용체-α

[0450] IL8 - 인터류킨 8

[0451] IL10 - 인터류킨 10

[0452] LTA - 림프독소 α (TNF 수퍼패밀리, 멤버 1)

[0453] PRF1 - 퍼포린 1 (공극 형성 단백질)

[0454] PTGS2 - 프로스타글란딘-엔도퍼옥시드 합성효소 2 (프로스타글란딘 G/H 합성효소 및 시클로옥시게나제)

[0455] SKI - v-ski 육종 바이러스 발암유전자 상동체 (조류)

[0456] TBX21- T-box 21

[0457] *조합된 천연 킬러 세포의 세포독성*

[0458] 별개의 세포독성 분석에서, 기증자 매칭된 제대혈 및 태반 관류액으로부터 유래된 배양된 NK 세포가 효과기 세포인 한편, 종양 세포가 표적 세포였다. 종양 세포를 그의 친지성 지방족 잔기로 인해 세포 형질막 내로 삽입하는 PKH26 (시그마-알드리치 카탈로그 # PKH26-GL) (예를 들어, [Lee-MacAry et al., J. Immunol. Meth. 252(1-2):83-92 (2001)] 참조)로 표지한 후, 96-웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트에 넣고, 10% FBS를 보충한 200 ㎕ RPMI 1640 내에서 배양된 NK 세포와 함께 다양한 효과기-표적 (E:T) 비에서 인큐베이팅하였다. 배양액을 4h 동안 37℃에서 5% CO_2 내에서 인큐베이팅하였다. 인큐베이션 후에, 세포를 수거하고, TO-PRO-3 (인비트로겐 카탈로그 # T3605) (막-불투과성 DNA 염색)을 배양액에 1 μM 최종 농도로 첨가한 후, BD FACSCanto를 사용하여 FACS 분석하였다. 세포독성은 총 $PKH26^+$ 표적 종양 세포 내의 죽은 세포 ($PKH26^+TO\text{-}PRO\text{-}3^+$)의 백분율로서 표현하였다.

[0459] 상기 세포독성 분석에서, 인간 만성 골수성 림프종 (CML) K562 세포를 세포 형질막으로 삽입하는 PKH26으로 표지하고, 96-웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트에 넣었다. 21일 동안 배양된 태반 (combo) 또는 말초혈 NK 세포를 10% v/v FBS를 보충한 RPMI 1640 내에서 K562 세포와 10:1, 5:1, 2.5:1 및 1.25:1의 효과기 대 표적 (E:T) 비로 혼합하였다. 4시간 인큐베이션 시간 후에, 세포를 수거하고, TO-PRO-3을 세포 배양액에 첨가한 후, PKH26 및 TO-PRO-3의 존재에 대해 유동 세포측정을 수행하였다. 세포독성은 총 $PKH26^+$ 표적 종양 세포 내의 $PKH26^+TO\text{-}PRO\text{-}3^+$ 죽은 세포의 백분율로서 표현하였다. 태반 NK 세포 및 말초혈 NK 세포는 모두 시험된 모든 E:T 비에서 K562 세포에 대해 실질적인 독성을 보였다 (도 4). K562 세포에 대한 말초혈 NK 세포보다 태반 NK 세포의 유의하게 더 높은 독성이 2가지 E:T 비, 즉, 10:1 및 5:1에서 관찰되었다 (도 4).

[0460] 6.4. 실시예 4: 종양 세포에 대한 인간 태반 관류액의 세포독성

[0461] 본 실시예는 인간 태반 관류액 세포가 종양 세포에 대해 세포독성이고, KG-1a에 대한 HPP로부터의 총 유핵 세포 (TNC-HPP)의 세포독성이 매칭된 UCB로부터의 TNC보다 더 높음을 입증한다. HPP 또는 제대혈 (UCB)로부터의 총 유핵 세포를 KG-1a 세포와 1:1, 5:1, 10:1, 20:1 또는 100:1의 비로 혼합하였다. 24h 또는 48h 인큐베이션 후에, 세포를 수거하고, CFSE의 존재에 대해 FACS 분석 (BD FACSCanto, 비디 바이오사이언시즈)에 의해 검사하였다. 단독 배양된 종양 세포를 대조군으로서 사용하였다. 세포독성은 다음과 같이 정의하였다: $(1\text{-}CFSE_{샘플}/CFSE_{대조군})*100\%$. 100:1 비에서 유의한 세포독성이 보였다. 도 5 참조.

[0462] 별개의 실험에서, HPP로부터의 총 유핵 세포의 세포독성을 제대혈로부터의 총 유핵 세포에 비교하였다. 매칭된 TNC-HPP 또는 UCB를 KG-1a 세포와 0.78:1, 1.56:1, 3.12:1, 6.25:1, 12.5:1, 25:1, 50:1 또는 100:1의 비로 혼

합하였다. TNC-HPP는 UCB에 비해 모든 비에서 일관된 더 높은 세포독성을 보였다. 도 6 참조.

[0463] 다른 실험에서, KG-1a 세포와 함께 인큐베이팅하기 24시간 전에, TNC-HPP를 100 U/mL, 또는 1000 U/mL의 IL-2로 자극한 한편, RPMI 배지와 함께 배양된 HPP를 대조군으로서 사용하였다. KG-1a 세포당 6.25 이상의 NK 세포의 비에서, IL-2는 TNC-HPP의 세포독성을 증가시키는 것으로 보인다. 도 7 참조.

[0464] 5×10^5 HPP 세포 및 1×10^4 종양 세포를 사용하여, 표 12에 제시된 바와 같이 보다 넓은 어레이의 종양 세포 종류를 사용하여 실험을 반복하였다.

[0465] <표 12>

태반 관류액의 세포독성 효과에 대해 시험된 종양 세포 종류

[0466]

HCC2218	인간 원발성 관상 암종
CCRF-CEM	인간 백혈병
J.RT3-T3.5	인간 급성 T 세포 백혈병
K562	인간 만성 골수성 림프종 (CML)
KG-1	인간 급성 골수성 백혈병
KG-1a	인간 급성 골수성 백혈병 (AML)
KU812	인간 백혈병 (CML)
NCI-H1417	인간 폐 암종
SNU-CI	인간 결장 선암종
U-937	인간 조직구성 림프종
WERI-RB-1	인간 망막모세포종
HCT-116	인간 결직장 암종
HT-29	인간 결직장 선암종
U266	인간 골수종

[0467] HPP 세포 및 종양 세포를 24시간 또는 48시간 동안 50:1 비에서 동시-배양할 때, HPP 세포는 종양 세포에 대한 실질적인 독성을 보였다. 2가지 시간 모두에 대해, 동시-배양은 50% 초과의 종양 세포의 사멸을 일으켰다. 도 8A 및 8B 참조.

[0468] 6.5. 실시예 5: 종양 세포에 대한 노출 동안 인간 태반 관류액 세포에 의한 시토킨 생산

[0469] HPP 세포의 강력한 항-백혈병 효과를 매개하는 것을 담당하는 일차 작용 메카니즘을 결정하기 위해, 종양 세포주와 동시-배양한 HPP 세포의 시토킨 방출 프로필을 분석하고, 다중화 Luminex 분석에 의해 상이한 시점에 UCB 세포의 프로필에 비교하였다.

[0470] 인큐베이션 후 수집된 상등액을 Luminex 분석으로 처리하여 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF의 농도를 결정하였다 (Cat# HCYTO-60K-03, 밀리포어). 이들 3가지 시토킨은 NK 세포독성과 관련된다 (예를 들어, [Imai et al., Blood 2005. 106(1):376-83] 참조). 어플라이드 바이오시스템즈 FAST 7900HT 기기 및 프라이머를 사용하는 정량적 RT-PCR을 또한 수행하여 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF의 발현을 검사하였다. 배양 조건은 상기 설명한 동시-배양 세포독성 분석과 동일하였다. 시토킨의 농도는 Luminex 분석을 이용하여 결정하였다.

[0471] 종양 세포와 동시배양된 HPP 세포로부터의 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF의 분비는 UCB 세포의 분비보다 유의하게 더 높은 것으로 결정되었다. 한 실험에서, HPP 세포를 100 U IL-2의 존재 또는 부재 하에 KG-1a 세포와 0.78:1, 1.56:1, 3.12:1, 6.25:1, 12.5:1, 25:1, 50:1 또는 100:1의 비로 혼합하였다. TNC-HPP는 IL-2의 부재 하에 비해 IL-2의 존재 하에 IFN-γ의 일정한 증가된 생산을 보였다. IFN-γ 수준은 24h에서 약 5-26배 (중앙값: 16배) 증가하고; 48h에서 약 3-65배 (중앙값: 27배) 증가하는 것으로 결정되었고, 이는 세포독성 연구 결과와 일치한다. 도 9 참조.

[0472] 다른 실험에서, KG-1a 세포와 인큐베이팅하기 24시간 전에, TNC-HPP를 100 U/mL 또는 1000 U/mL의 IL-2로 자극한 한편, RPMI 배지와 함께 배양된 HPP를 대조군으로서 사용하였다. HPP 또는 매칭된 UCB 세포를 IL-2의 존재 또는 부재 하에 24h 동안 인큐베이팅한 후, KG-1a 세포와 동시배양하였다. IFN-γ의 분비는 K562 및 KG-1a와 동시배양된 HPP 세포에서 48h에서 가장 증가되었다. HPP 세포를 100 U/mL IL-2로 처리할 때, 24h 및 48h에서 KG-1a에 대한 HPP 세포의 세포독성은 증가하였다. HPP 세포에서 IFN-γ의 분비 수준은 IL-2 처리시에 매칭된 UCB 세포의 수준보다 더 높았다. IFN-γ의 보다 높은 발현은 매칭된 HPP 및 UCB로부터의 세포의 RT-PCR 분석에 의해 확인하였다. 이들 결과는 HPP 세포가 UCB 세포에 비해 더 높은 항-백혈병 활성을 보임을 보여주고, 상기 보다 높은 활성은 IFN-γ 생산의 유의한 증가와 연관된다.

[0473] 종양 세포주의 패널과 동시-배양하는 동안, HPP 세포 및 제대혈 세포에서 IFN-γ 생산을 상기 표 1에 나열된 종

양 세포주를 사용하여 분석하였다. HPP 세포 및 종양 세포를 10^4 종양 세포 및 5 x 10^5 HPP 세포를 사용하여 24시간 또는 48시간 동안 50:1의 비에서 동시-배양하였다. CCRF-CEM, J.RT3-T3.5, K562, KG1, KG-1a, KU812, NC1-H1417, U-937 및 WER1-RB-1 세포주에 대해, 24시간 동시-배양에서 HPP 세포에서 IFN-γ 생산의 증가는 동일한 시간 동안 상기 세포주와 동시-배양된 제대혈 세포를 초과하였다 (도 10A 참조). 48시간 동시-배양시에, HPP 세포에서 IFN-γ 생산의 증가는 모든 종양 세포주에 대해 제대혈을 초과하였다 (도 10B 참조). 종양 세포주 중에서, K562 세포는 24시간 및 48시간 모두에서 HPP 세포에서 IFN-γ 생산의 최대 증가를 유도하였다. 유사한 결과가 TNF-α 및 GM-CSF에 대해 관찰되었다.

[0474] 세포 주기 분석으로 단독으로 배양된 KG-1a 세포에 비해 HPP와 동시배양할 때 S기의 KG-1a의 백분율이 30% 감소하였음이 입증되었다. HPP의 상이한 농축된 분획을 사용하여 수행한 추가의 동시배양 실험을 통해, HPP의 항-백혈병 활성이 $CD56^+$의 높은 발현, CD16의 발현의 결여를 특징으로 하는 고농도의 특유한 미성숙 천연 킬러 세포에 크게 기인되었음이 입증되었다.

[0475] 6.6. 실시예 6: 인간 태반 관류액 세포에 의한 생체 내에서 종양 세포 증식의 억제

[0476] 6.6.1. 물질 및 방법

[0477] 본 실시예는 NOD/SCID 마우스 이종이식편 종양 모델을 사용하여 종양 세포에 대한 인간 태반 관류액의 생체내 효과를 입증한다.

[0478] *KG-1 세포의 배양*. KG-1 세포를 20%의 우태 혈청을 보충한 이스코브 (Iscove)의 변형 둘베코 (Dulbecco) 배지 (성장 배지) 내에서 37℃에서 95% 공기/5% CO_2 및 100% 습도에서 유지하였다. 배양액 내의 배지는 격일로 교환하고, 세포는 매주 통과시켰다. KG-1 세포는 현탁액으로서 성장한다. 따라서, 배지를 교환하고 세포를 통과시키기 위해, 세포 현탁액을 원심분리관 내에 수집하고 2,000 rpm에서 10 min 동안 SORVALL® HERAEUS® 회전자 (part no. 75006434) 내에서 원심분리하였다. 상등액을 폐기하고, 배양을 계속하기 위해 적절한 양의 세포 펠렛을 성장 배지 내에 재현탁하였다.

[0479] *이식을 위한 KG-1 세포 준비*. 마우스에 세포 이식을 위해, 세포를 상기 설명한 바와 같이 원심분리에 의해 수거하였다. 세포 펠렛을 수집하고, 포스페이트 완충 염수 내에 재현탁하였다. 마우스에 이식시킬 세포의 수를 결정하기 위해, 세포 현탁액의 분취액을 헤마사이토미터 (hemacytometer)를 사용하여 계수하였다. 트리판 블루 (Trypan Blue) 염료를 사용하여 현탁액 내의 비-생존가능 세포를 배제하였다.

[0480] *이식을 위한 HPP 세포 준비*. HPP 보관 및 해동을 위해, 샘플을 동결된 상태로 건조한 수송 (shipper) 용기 내에서 우수한 상태로 수용하였다. 단위를 2007년 2월 7일에 해동할 때까지 건조한 수송 용기 내에 보관하였다. 해동 일에, HPP 단위를 극저온냉동기 (cryofreezer)로부터 꺼내어 (하나씩) 집탑 (ziptop) 플라스틱 백에 넣었다. 이어서, 백을 대부분이 해동할 때까지 (작은 동결된 조각이 백 내에 남아있는) 부드럽게 교반하면서 37℃ 수조에 넣었다. 이어서, 백을 수조로부터 꺼내고, 단위를 집탑 백으로부터 꺼내고, 단위를 완전히 해동될 때까지 부드럽게 뒤집었다. 이어서, 단위를 층류 (laminar flow) 후드 내에 넣고, 혈액 백의 외부 표면을 70% 에탄올을 분무하여 멸균하였다. 혈액 백을 멸균 가위를 사용하여 절개 개방하고, 세포를 멸균 피펫에 의해 멸균 50 ml 원뿔형 튜브 (각각의 HPP 단위에 대해 1개의 튜브; 각각의 UCB 단위에 대해 2개의 튜브)로 옮겼다. 이어서, 10 mL 해동 버퍼 (2.5% 인간 알부민, 5% 덱스트란 40)을 부드럽게 혼합하면서 (2.2 - 2.9분에 걸쳐) 각각의 튜브에 서서히 첨가하였다. 이어서, 각각의 혈액 백을 10 mL 해동 버퍼로 세정한 후, 50 ml 원뿔형 튜브에 서서히 첨가하였다 (0.7 - 1.3분에 걸쳐).

[0481] 해동 후에, 원심분리 전에 각각의 단위를 젖은 얼음 상에 보관하였다. 모든 튜브를 10 min 동안 원심분리하고 (440xg, 10℃에서), 상등액을 멸균 피펫을 이용하여 흡인하고, 튜브를 진탕시켜 펠렛을 부드럽게 파괴하였다. 비히클 (PBS + 1% 우태 혈청)의 1-ml 분취액을 튜브 중 하나에 첨가하고, 튜브를 부드럽게 휘저어 혼합하였다. 2-ml 피펫을 사용하여, 내용물을 제2 튜브에, 이어서 제3 튜브에, 이어서 제4 튜브에 옮겼다. 비워진 튜브는 0.2 ml 희석 버퍼로 세척하였다.

[0482] 세포 계수를 위해, 25 ㎕ 분취액을 얼음 상에서 975 ㎕ 비히클을 함유하는 15 ml 원뿔형 튜브에 옮겼다. 이어서, 4 ml 냉 염화암모늄 용해 시약을 첨가하고 얼음 상에서 10 min 동안 인큐베이팅함으로써 적혈구를 용해시켰다. 인큐베이션 후에, 5 ml 냉 PBS를 각각의 튜브에 첨가하고, 튜브를 원심분리하였다 (10 min, 400xg, 10℃). RBC 용해 후에, 세포를 생존력을 평가하기 위해 트리판 블루를 사용하여 헤마사이토미터에 의해 계수하였다.

계수 결과는 희석에 대해 교정한 후, 용해 인수 (0.46)으로 나누어 RBC 용해 전에 존재하는 세포의 수를 추정하였다.

[0483] HPP 투여량 제조를 위해, 계수 후에, 비히클을 첨가하여 HPP 세포를 1 x 10^8 세포/ml로 희석하였다. 이어서, 시린지를 로딩할 때까지 HPP 세포를 얼음 상에서 보관하였다. 제1 단위의 해동과 투여량 제조의 완료 사이의 경과 시간은 3시간 이내였다.

[0484] 시린지를 채우기 전에, 투약 물질의 50 ㎕ 분취액을 상기 설명한 바와 같이 계수에 의한 후-투여량 검증을 위해 따로 두었다. 투약 후에, 남아있는 투여량 물질을 투여량 검증을 위해 평가하였다.

[0485] *연구 설계*. 제1일에, 24마리의 NOD/SCID 수컷 마우스 (잭슨 래보래토리스 (Jackson Laboratories))에 5백만개의 생존가능한 KG-1 세포를 S/C로 옆구리 구역에 이식하였다. 4 내지 5마리의 마우스가 나무조각을 깐 마이크로-격리 케이지 시스템 내에 수용되도록, 마우스를 분리하였다. 멸균 설치류 사료와 물을 자유롭게 접근하도록 제공하였다. 마우스를 종양 성장에 대해 매주 2회 주의깊게 모니터링하였다. 제1 측정가능한 종양은 제25일에 관찰되었다. 이어서, 체중을 매주 1회 기록하고, 종양 측정치를 캘리퍼스 (caliper)로 매주 2회 기록하였다. 이식 후 제52일에, 동물을 3개의 별개의 군으로 무작위로 나누고, 종양 부피는 평균 약 300-350 mm^3이었다 (하기 표 13 참조). 제1 군은 평균 종양 부피가 312 mm^3인 4마리의 대조 마우스로 이루어졌다. 이들 마우스 중 2마리에 각각 200 ㎕ 및 50 ㎕의 비히클 용액을 정맥내 (IV) 이식하고, 2마리에 종양내 (IT) 이식하였다. 4마리의 마우스로 이루어진 평균 종양 부피가 345 mm^3인 제2 군에는 마우스당 200 ㎕의 HPP 세포 (2 x 10^7 세포)를 정맥내 이식하였다. 마우스당 50 ㎕의 HPP 세포를 IT로 이식한 마지막 군은 또한 4마리의 마우스로 이루어지고, 평균 종양 부피가 332 mm^3이었다.

[0486] <표 13>

생체 내 종양 억제 실험을 위한 실험군.

동물 #	HPP 처리군	HPP 이식일에 종양 부피
제1군 (대조군)		
1	IV 1	457
2	IT 2	429
3	IT 3	214
4	IV 4	147
	평균:	**312**
제2군 (IV 세포 이식)		
5	1	466
6	2	209
7	3	217
8	4	487
	평균:	**345**
제3군 (IT 세포 이식)		
9	1	491
10	2	256
11	3	296
12	4	285
	평균:	**332**
IV - 200 ㎕ 이식; IT - 50 ㎕ 이식		

[0487]

[0488] 제66일 (HPP 세포의 이식 14일 후)에, 큰 종양 부피 때문에 연구를 종결하였다.

[0489] 6.6.2. 결과

[0490] 종양 부피 (TV)는 제66일 (HPP-세포 이식 14일후)까지 측정하였고, 이때 대조군의 TV는 평균 2921 mm^3에 도달하였다. 연구의 끝에 IV 처리군은 평균 TV가 2076 mm^3이고, IT 군은 TV가 2705 mm^3이었다. 처리 후 TV의 % 증가에 관하여, IT 군은 적당한 20% 억제를 보인 한편, IV 군은 대조군에 비해 종양 성장의 35% 초과의 억제를 보였다. IT 군에서 억제는 명백하였다 (도 11 참조).

[0491] 균등물:

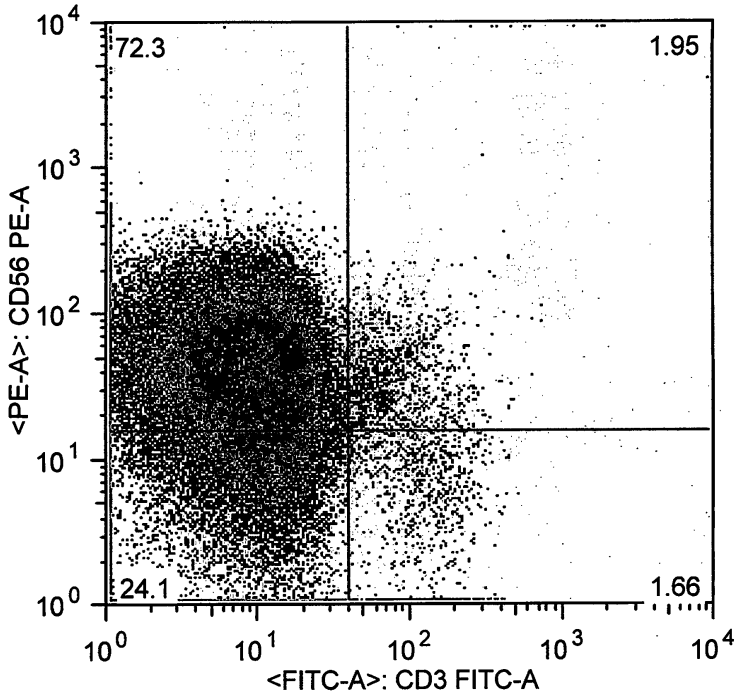
[0492] 본 발명은 본원에 기재되는 특정 실시태양에 의해 그 범위가 제한되지 않아야 한다. 실제로, 설명된 것에 추가로 본 발명의 다양한 변형은 상기한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 상기 변형은 첨

부된 청구의 범위 내에 있는 것으로 의도된다.

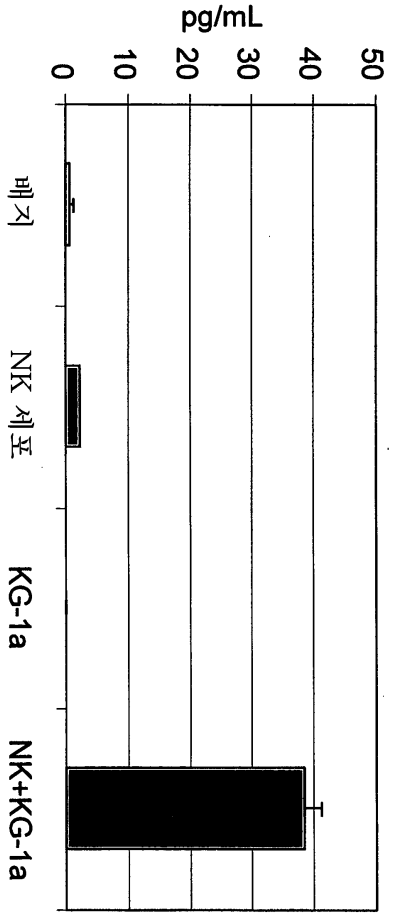
[0493] 본원에 인용된 모든 참조문헌은 각각의 개별 공개문, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 모든 목적으로 그 전문이 참고로 포함되는 것으로 나타내어지는 것처럼 동일한 정도로 모든 목적으로 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 임의의 공개문헌의 인용은 출원일에 앞선 그의 개시에 대한 것이고, 본 발명이 선행 발명으로서 상기 공개문헌에 선행하는 것으로 인정될 수 있는 자격이 없다고 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

도면

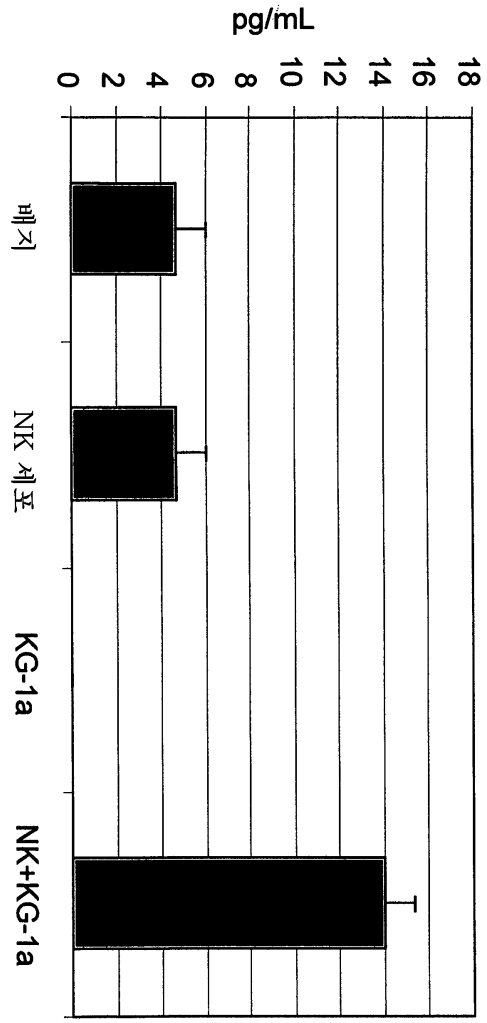
도면1



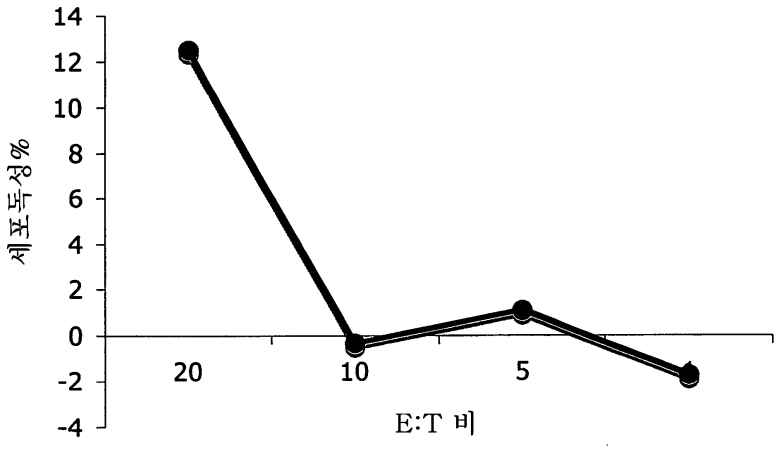
도면2a



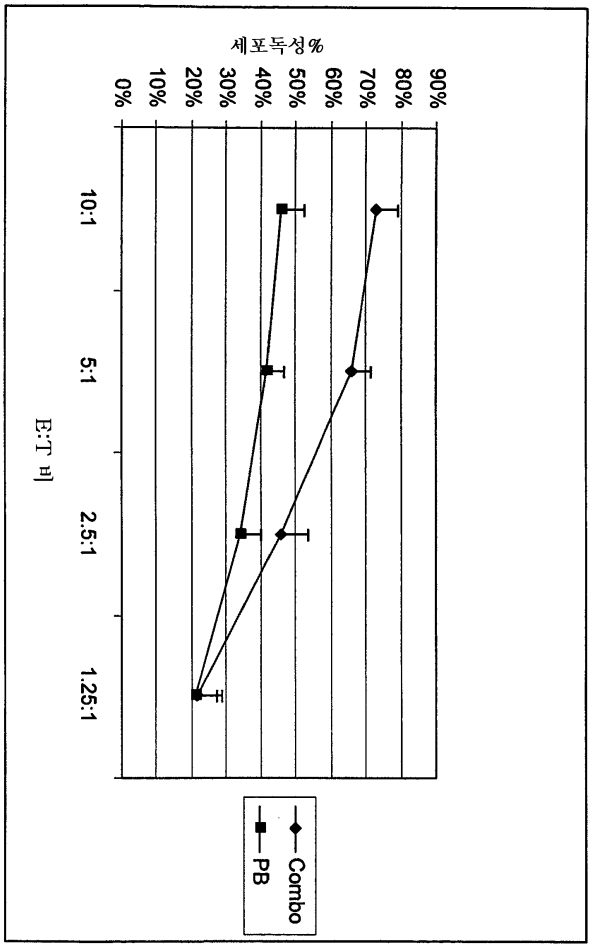
도면2b


pg/mL
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
배지
NK 세포
KG-1a
NK+KG-1a

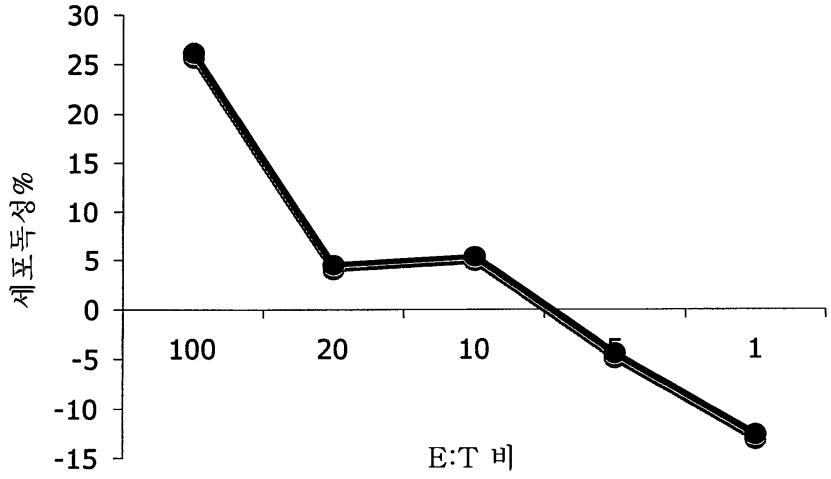
도면3


14
12
10
8
6
4
2
0
-2
-4
세포독성%
20
10
5
E:T 비

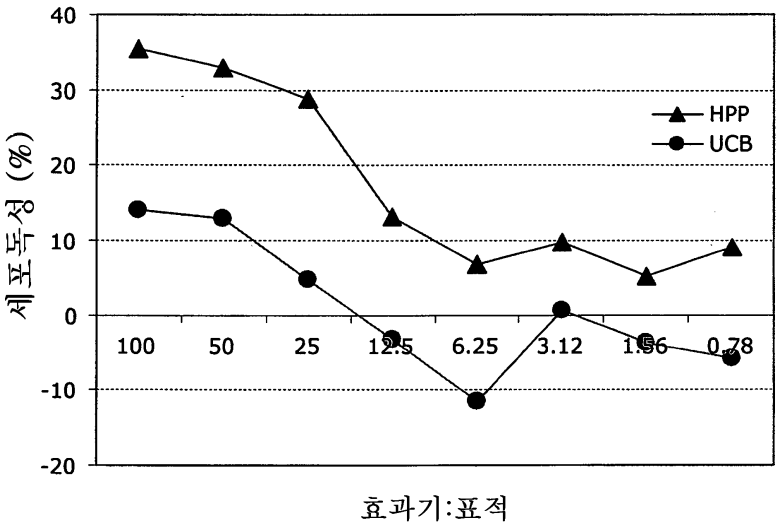
도면4


세포독성%
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
E:T 비
10:1
5:1
2.5:1
1.25:1
PB
Combo

도면5

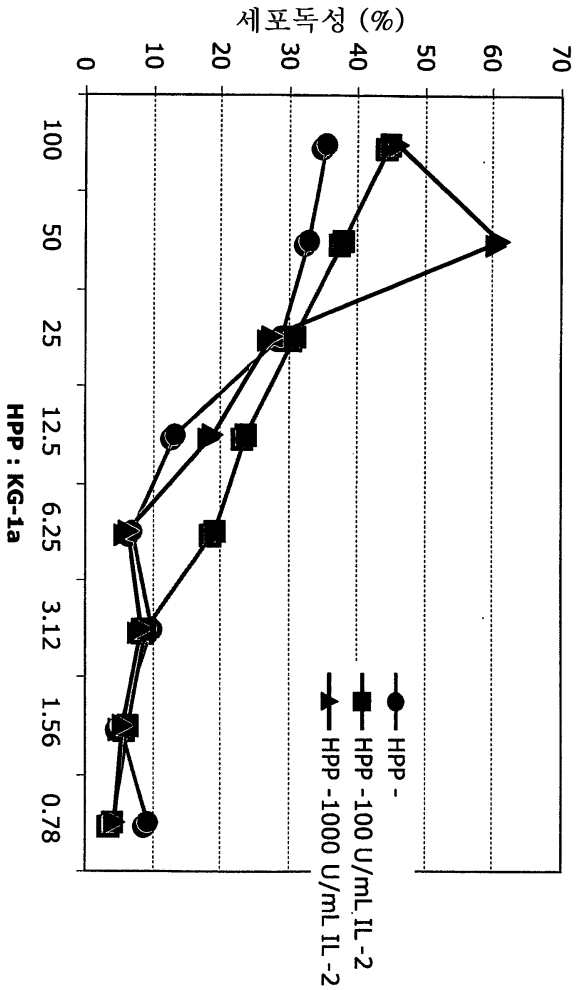

30
25
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
세포독성%
100
20
10
5
1
E:T 비

도면6



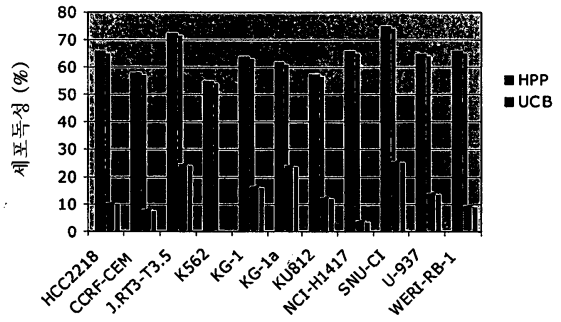
효과기:표적

도면7

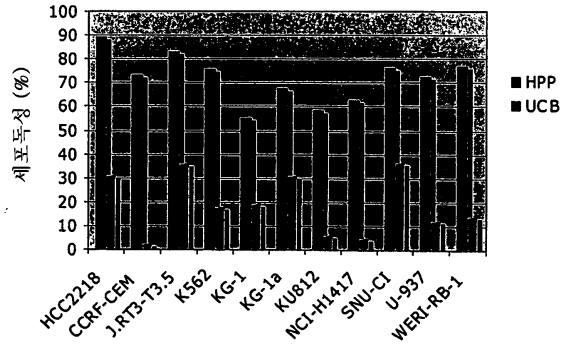


도면8

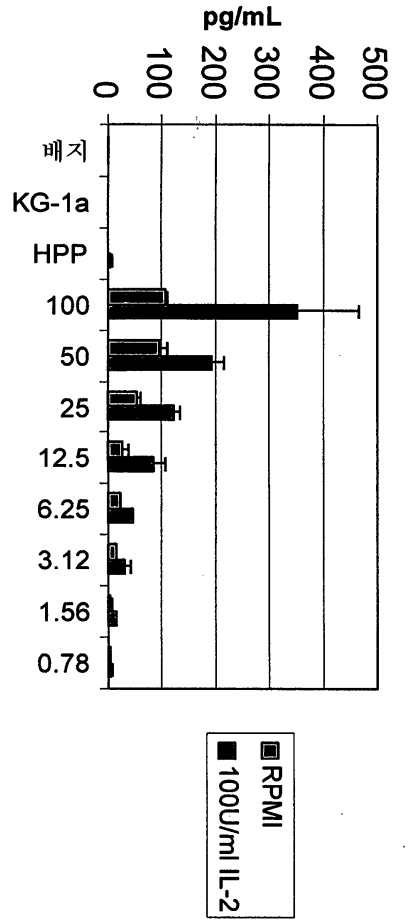
A


세포독성 (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
HCC2218
CCRF-CEM
J.RT3-T3.5
K562
KG-1
KG-1a
KU812
NCI-H1417
SNU-CI
U-937
WERI-RB-1
HPP
UCB

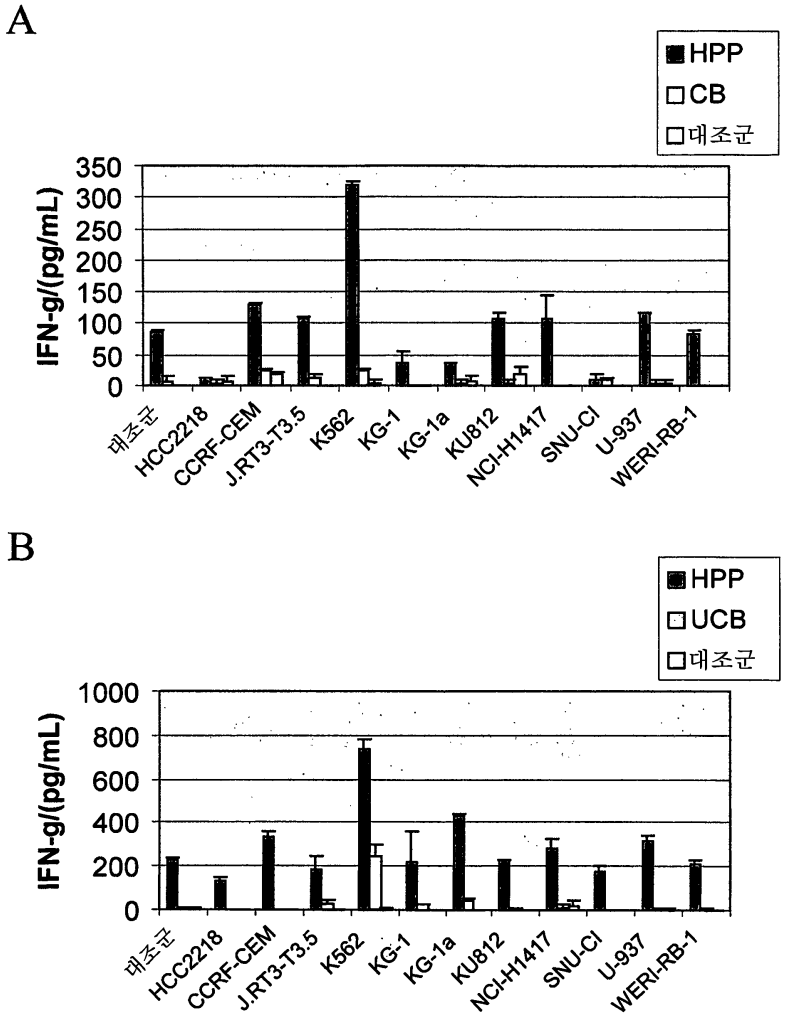
B


세포독성 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
HCC2218
CCRF-CEM
J.RT3-T3.5
K562
KG-1
KG-1a
KU812
NCI-H1417
SNU-CI
U-937
WERI-RB-1
HPP
UCB

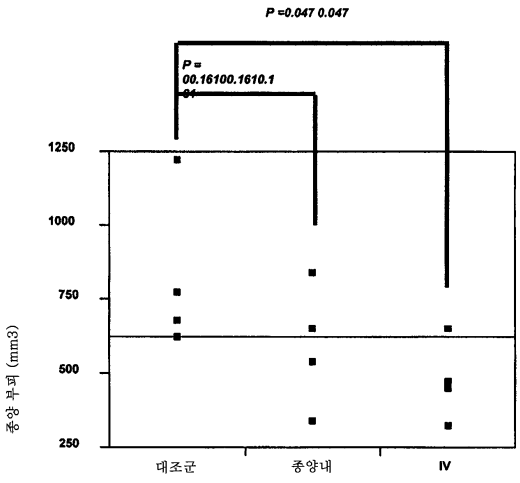
도면9


pg/mL
0
100
200
300
400
500
배지
KG-1a
HPP
100
50
25
12.5
6.25
3.12
1.56
0.78
RPMI
100U/ml IL-2

도면10



도면11



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Celgene Cellular Therapeutics
Zhang, Xiaokui
Voskinarian-Berse, Vanessa A.
Kang, Lin
Padliya, Neerav Dilip
<120> TUMOR SUPPRESSION USING HUMAN PLACENTAL PERFUSATE AND HUMAN PLACENTA-DERIVED INTERMEDIATE NATURAL KILLER CELLS
<130> 9516-776-228
<140> PCT/US2008/011251
<141> 2008-09-29
<150> US 61/090,555
<151> 2008-08-20
<150> US 60/995,763
<151> 2007-09-28
<160> 20
<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 1
aacccguaga uccgaacuug ug 22
<210> 2
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
ucggauccgu cugagcuugg cu 22
<210> 3
<211> 22
<212> RNA
<213> Homo sapiens
<400> 3
uucccuuugu cauccuucgc cu 22
<210> 4

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

uaagugcuuc cauguuucag ugg 23

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ccucugggcc cuuccuccag 20

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

uccagcuccu auaugaugcc uuu 23

<210> 7

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cagcagcaca cugugguuug u 21

<210> 8

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

aagugcuguc auagcugagg uc 22

<210> 9

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

uucuccaaaa gaaagcacuu ucug 24

<210> 10

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ucgugcaucc cuuuagagug uu 22

<210> 11

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aucgugcauc cuuuuagagu gu 22

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

aaagcgcuuc ccuuugcugg a 21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

aaagcgcuuc ccuucagagu g 21

<210> 14

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

caaagugccu cccuuuagag ug 22

<210> 15

<211> 24

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

acaaagugcu ucccuuuaga gugu 24

<210> 16

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

acaaagugcu ucccuuuaga gu 22

<210> 17

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

aggcacggug ucagcaggc 19

<210> 18

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

gggcgccugu gaucccaac 19

<210> 19

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

aaacucuacu uguccuucug agu 23

<210> 20

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

aacccguaga uccgaucuug ug 22