



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148174
(43) 공개일자 2022년11월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) C12N 5/0789 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7028995
(22) 출원일자(국제) 2021년02월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/019917
(87) 국제공개번호 WO 2021/174004
국제공개일자 2021년09월02일
(30) 우선권주장
62/983,511 2020년02월28일 미국(US)
- (71) 출원인
다케다 야쿠힌 교교 가부시키키가이샤
일본 오사카시 주오구 도쇼마찌 4-1-1
- (72) 발명자
치안, 유
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40 밀레니엄 파마슈티컬즈 인코포레이티드(내)
창, 후이-신
미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40 밀레니엄 파마슈티컬즈 인코포레이티드(내)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

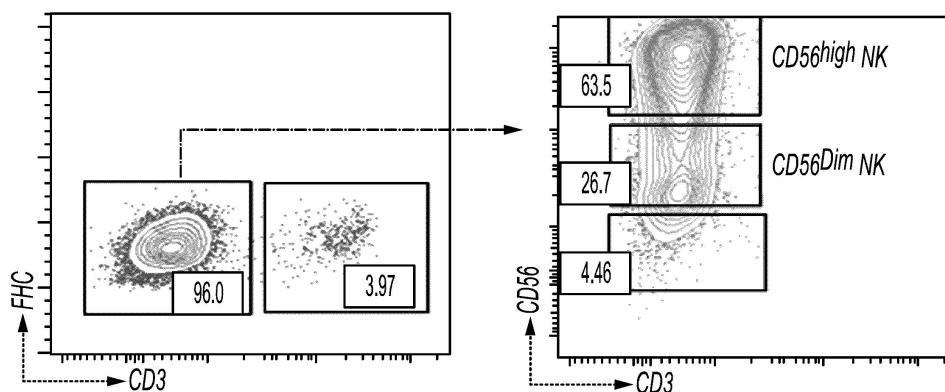
전체 청구항 수 : 총 73 항

(54) 발명의 명칭 다능성 줄기 세포로부터 자연 살해 세포를 생산하기 위한 방법

(57) 요약

본 개시는 특허, 유도된 다능성 세포로부터 자연 살해 세포를 효율적으로 생산하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 (I) 배양 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 단계를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2501/26 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)

(72) 발명자

시, 시

미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40 밀레니엄 파마슈티컬즈 인코포레이티드 (내)

후, 지안신

미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40 밀레니엄 파마슈티컬즈 인코포레이티드 (내)

카오, 란

미국 02139 매사추세츠 케임브리지 랜즈다운 스트리트 40 밀레니엄 파마슈티컬즈 인코포레이티드 (내)

명세서

청구범위

청구항 1

다능성 줄기 세포-유래된 NK 세포를 생산하는 방법으로서,

(A) 다능성 줄기 세포로부터 유래된 조혈 전구 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 포함하는 벌크 세포 집단을 제공하는 단계;

(B) 하나 이상의 배양 배지에서 상기 HP 세포 벌크를 배양하여 CD56+/CD3- 세포를 생산하는 단계를 포함하되, 상기 방법은 세포 단리 단계를 포함하지 않는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법은 단계 (A) 및 (B)에서 세포 단리 단계를 포함하지 않는 것인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 (A)에서의 HP 세포 벌크는 CD34+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 HP 세포 벌크 내 세포의 20% 이상은 CD34+ 세포인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 HP 세포 벌크의 20% 내지 90%는 CD34+ 세포인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (B)는

(i) CD4/CD8 유도 배지에서 HP 세포 벌크를 배양하여 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8-, 및 CD4+/CD8+ 세포를 포함하는 중간 이중 세포 집단을 생성하는 단계; 및

(ii) NK 유도 배지에서 중간 이중 세포 집단을 배양하여 CD56+/CD3- 세포를 생산하는 단계; 를 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 CD4+/CD8+ 세포를 단리하는 단계를 포함하지 않는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (A)는 HPC 유도 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 생산하는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다능성 줄기 세포는 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)인 것인, 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 HPC 유도 배지는 골 형성 단백질-4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기 성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 아스코르브산, Flt3 리간드(Flt3L), 트롬보포이에틴(TPO) 및 TGF β 억제제로부

터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 HPC 유도 배지는 5 ng/mL 내지 500 ng/ml의 농도로 BMP4를 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 BMP4는 50 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벌크 세포 배지는 VEGF를 5 ng/ml 내지 500 ng/ml의 농도로 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 VEGF는 약 50 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HPC 유도 배지는 5 ng/ml 내지 500 ng/ml의 농도로 bFGF를 포함하는 것인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 bFGF는 50 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벌크 세포 배지는 5 µg/ml 내지 500 µg/ml의 농도로 아스코르브산을 포함하는 것인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 아스코르브산은 50 µg/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 19

제10항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HPC 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 Flt3L을 포함하는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 Flt3L은 50 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 21

제10항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 HPC 유도 배지는 1 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 TPO를 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 TPO는 100 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 23

제6항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산, 줄기 세포 인자(SCF), IL-7, Flt3L, 트롬보포이에틴(TPO), p38 억제제 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 것인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 아스코르브산을 포함하는 것인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 아스코르브산은 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도인 것인, 방법.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 5 ng/ml 내지 100 ng/ml 의 농도로 SCF를 포함하는 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 SCF는 50 ng/ml 의 농도인 것인, 방법.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml 의 농도로 IL-7을 포함하는 것인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 IL-7은 50 ng/ml 의 농도인 것인, 방법.

청구항 30

제23항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml 의 농도로 Flt3L을 포함하는 것인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 Flt3L은 50 ng/ml Flt3L의 농도인 것인, 방법.

청구항 32

제23항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 1 ng/ml 내지 200 ng/ml 의 농도로 TPO를 포함하는 것인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 TPO는 100 ng/ml 의 농도인 것인, 방법.

청구항 34

제23항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 0.5 μM 내지 100 μM 의 농도로 p38 억제제를 포함하는 것인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 p38 억제제는 SB203580인 것인, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 SB203580은 15 μM 의 농도인 것인, 방법.

청구항 37

제23항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml 의 농도로 SDF-1 억제제를 포함하는 것인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 SDF-1 억제제는 30 nM의 농도인 것인, 방법.

청구항 39

제6항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 유도 배지는 CD3 활성화제, IL-2 및 IL7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 것인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 NK 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 IL-2를 포함하는 것인, 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 IL-2는 10 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 IL-7을 포함하는 것인, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 IL-7은 10 ng/ml의 농도인 것인, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 배양 단계는 약 5%의 산소로 수행되는 것인, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 배양 단계는 14% 초과 산소로 수행되는 것인, 방법.

청구항 46

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 배양 단계는 대기 중 산소로 수행되는 것인, 방법.

청구항 47

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 배양 단계는 5% 미만의 산소로 수행되는 것인, 방법.

청구항 48

제8항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벌크 세포 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 획득하는 단계는 10일 초과 동안 지속되는 것인, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 벌크 세포 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 획득하는 단계는 11일 내지 15일 동안 지속되는 것인, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 벌크 세포 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 획득하는 단계는 14일 동안 지속되는 것인, 방법.

청구항 51

제9항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 iPSC는 말초 혈액 단핵 세포로부터 획득되는 것인, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포인, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 생산된 세포의 약 25% 미만은 CD3+ 세포인, 방법.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 상기 생산된 세포의 백분율은 유세포 분석에 의해 결정되는 것인, 방법.

청구항 55

제52항 또는 제53항에 있어서, 상기 생산된 세포의 백분율은 단일-세포 RNA 시퀀싱(scRNAseq)에 의해 결정되는 것인, 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, CD56+/CD3- 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 CD56+/CD3- 세포는 형광-활성화 세포 분류(FACS) 또는 자기 분류에 의해 분리되는 것인, 방법.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD56+/CD3- 면역 세포는 NK 세포인, 방법.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD56+/CD3- 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된 것인, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 분리된 CD56+/CD3- 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된 것인, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 항원은 CD19인, 방법.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 IL-15R α /IL-15 복합체를 발현하도록 추가로 유전적으로 변형된 것인, 방법.

청구항 63

유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)-유래된 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 방법으로서,

(1) 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 및 아스코르브산으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 HPC 유도 배지에서 iPSC를 배양하여 조혈 전구 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 포함하는 세포의 이종 집단을 획득하는 단계;

(2) 아스코르브산, p38 억제제 및 SDF-1 중 하나 이상을 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 (1)에서 획득된 HP 세포 벌크를 배양하여 세포의 중간 이종 집단을 획득하는 단계; 및

(3) CD3 활성화제, IL-2 및 IL-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 NK 유도 배지에서 (2)로부터의 세포의 중간 이종 집단을 배양하는 단계;

를 포함하는 방법.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 생산된 NK 세포 집단.

청구항 65

전체 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+ 면역 세포의 적어도 60%의 비율로 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+/CD3- 세포를 포함하는, 미분류 세포 집단.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 세포의 25% 미만은 CD3+ 세포인, 미분류 세포 집단.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 세포의 5% 미만은 단핵구인, 미분류 세포 집단.

청구항 68

제65항 또는 제66항에 있어서, 상기 세포의 5% 미만은 B 세포인, 미분류 세포 집단.

청구항 69

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 백분율은 유세포 분석에 의해 결정되는 것인, 미분류 집단.

청구항 70

제65항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 백분율은 단일-세포 RNA 시퀀싱(scRNAseq)에 의해 결정되는 것인, 미분류 집단.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 세포 요법을 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 72

제68항에 있어서, 상기 대상체는 암을 가진 것인, 방법.

청구항 73

제69항에 있어서, 상기 암은 백혈병 또는 림프종인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2021년 2월 28일에 출원된, 미국 가출원 일련 번호 제62/983,511호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 개시는 여기에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 자연살해(NK) 세포는 면역계의 세포독성 림프구이다. NK 세포는 암성 세포, 병원체-감염된 세포 및 이외 손상된 세포에 대해 세포독성이다. NK 세포는 선천성 림프 세포(ILC), 구체적으로 선천성 및 적응성 면역 반응의 아암(arm)을 연결하는 대형 과립 세포독성 림프구이다. 이들은 말초 혈액에서 순환하는 림프구의 10-15%를 구성한다. NK 세포는 또한 면역계 내에서 가장 높은 수준의 세포독성 활성을 나타낸다. 따라서, 변경된 NK 세포 기능 또는 수는 감염 및 암에 대한 면역계의 기능에 영향을 미친다.

[0004] NK 세포에는 특정 세포 표면 항원 수용체가 없다. 이 때문에, NK 세포는 사전 감각 없이 암성 세포 및 병원체-감염된 세포를 사멸시킬 수 있으며, 이들은 선천성 면역 반응의 일부가 될 수 있다. 이들은 또한 적응성 면역

반응에 직접적으로 영향을 주어 종양 면역 감시에 있어서 역할을 한다. 이러한 특징 및 기타 요소는 NK 세포를 입양 세포 요법에 사용하기에 특히 매력적인 세포 유형으로 만든다.

[0005] 전구 세포로부터 NK 세포를 수득하기 위한 다양한 프로토콜이 기술되어 있다. 그러나, 이전에 기술된 프로토콜은 노동 집약적이며, 세포 단리 단계를 포함하는, 다수의 시간 소모적인 단계를 필요로 하며, 이는 결국 NK 세포를 생산하기 위한 제조/생산 시간 및 금전적 비용을 증가시킨다.

발명의 내용

[0006] 요약

[0007] 본 출원은 특히, CD56+/CD3- 면역 세포(즉, NK 또는 NK-유사 세포)를 생산하는 개선된 방법을 제공한다. 본 출원은, 적어도 부분적으로, 세포 단리 단계 필요 없이, 다능성 줄기 세포(예를 들어, 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC))로부터 유래된 벌크 세포 집단으로부터의 CD56+/CD3- 면역 세포의 효율적이고 강력한 생산의 놀라운 발견을 기반으로 한다. 본 출원 이전에, NK 세포를 유도하기 위한 방법은 종종 NK 세포에 대해 공지된 세포 계통을 기반으로 한 특정 세포 유형의 단리를 필요로 한다. 본원에 기술된 바와 같이, 본 출원은 NK 세포가 계통을 기반으로 한 임의의 세포 유형의 단리를 필요로 하지 않고 벌크 세포 집단으로부터 성공적으로 유래될 수 있음을 예기치 않게 보여준다. 이 방법은 따라서 예를 들어, 비용 및 시간 효율적인 방식으로 대량의 NK 세포를 스케일 업하고 생산할 수 있는 능력을 포함한, NK 세포를 생산하는 기존 방법에 비해 많은 이점을 갖는다. 따라서 본 발명은 세포 치료 분야에서 중요한 돌파구를 나타낸다.

[0008] 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 iPSC-유래된 CD56+/CD3- 세포(본원에서 "iNK 세포"로도 지칭됨)는 기능적이며, 예컨대 특정 세포 집단을 표적화하기 위한 CAR의 도입을 통해, 추가로 유전적으로 변형될 수 있다.

[0009] 일부 측면에서, (A) 다능성 줄기 세포로부터 유래된 조혈 전구 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 포함하는 벌크 세포 집단을 제공하는 단계; (B) 하나 이상의 배양 배지에서 상기 HP 세포 벌크를 배양하여 CD56+/CD3- 세포를 생산하는 단계;를 포함하되, 상기 방법은 세포 단리 단계를 포함하지 않는, 다능성 줄기 세포-유래된 NK 세포를 생산하는 방법이 제공된다.

[0010] 일부 구현예에서, 상기 방법은 단계 (A) 및 (B)에서 세포 단리 단계를 포함하지 않는다.

[0011] 일부 구현예에서, 상기 (A)에서의 HP 세포 벌크는 CD34+ 세포를 포함한다.

[0012] 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크 내 세포의 20% 이상은 CD34+ 세포이다.

[0013] 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 20% 내지 90%는 CD34+ 세포이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 30%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 40%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 50%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 60%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 70%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 80%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 약 90%는 CD34+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크의 70% 초과는 CD34+ 세포이다.

[0014] 일부 구현예에서, 단계 (B)는 (i) CD4/CD8 유도 배지에서 HP 세포 벌크를 배양하여 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8-, 및 CD4+/CD8+ 세포를 포함하는 중간 이종 세포 집단을 생성하는 단계; 및 (ii) NK 유도 배지에서 중간 이종 세포 집단을 배양하여 CD56+/CD3- 세포를 생산하는 단계;를 포함한다.

[0015] 일부 구현예에서, 단계 (A)는 HPC 유도 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 생산하는 것을 포함한다.

[0016] 일부 구현예에서, 상기 다능성 줄기 세포는 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)이다.

[0017] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 골 형성 단백질-4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 아스코르브산, Flt3 리간드(Flt3L), 트롬보포이에틴(TPO) 및 TGFβ 억제제로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물, 또는 화합물의 임의의 조합을 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 5 ng/mL 내지 500 ng/ml의 농도로 BMP4를 포함한다.

[0019] 일부 구현예에서, 상기 BMP4는 50 ng/ml의 농도이다.

[0020] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 5 ng/ml 내지 500 ng/ml의 농도로 VEGF를 포함한다.

- [0021] 일부 구현예에서, 상기 VEGF는 약 50 ng/ml의 농도이다.
- [0022] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 5 ng/ml 내지 500 ng/ml의 농도로 bFGF를 포함한다.
- [0023] 일부 구현예에서, 상기 bFGF는 50 ng/ml의 농도이다.
- [0024] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 5 μ g/ml 내지 500 μ g/ml의 농도로 아스코르브산을 포함한다.
- [0025] 일부 구현예에서, 상기 아스코르브산은 50 μ g/ml의 농도이다.
- [0026] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 Flt3L을 포함한다.
- [0027] 일부 구현예에서, 상기 Flt3L은 50 ng/ml의 농도이다.
- [0028] 일부 구현예에서, 상기 HPC 유도 배지는 1 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 TPO를 포함한다.
- [0029] 일부 구현예에서, 상기 TPO는 100 ng/ml의 농도이다.
- [0030] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산, 줄기 세포 인자(SCF), IL-7, Flt3L, 트롬보포이에틴(TPO), p38 억제제 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물, 또는 화합물의 임의의 조합을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 SCF를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 IL-7을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 Flt3L을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 TPO를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 p38 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 SDF-1을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 p38 억제제 및 SDF-1을 포함한다.
- [0031] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 5 μ g/ml 내지 약 500 μ g/ml의 농도로 아스코르브산을 포함한다.
- [0032] 일부 구현예에서, 상기 아스코르브산은 50 μ g/ml의 농도이다.
- [0033] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 5 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 SCF를 포함한다.
- [0034] 일부 구현예에서, 상기 SCF는 50 ng/ml의 농도이다.
- [0035] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 IL-7을 포함한다.
- [0036] 일부 구현예에서, 상기 IL-7은 50 ng/ml의 농도이다.
- [0037] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 Flt3L을 포함한다.
- [0038] 일부 구현예에서, 상기 Flt3L은 50 ng/ml Flt3L의 농도이다.
- [0039] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 1 ng/ml 내지 200 ng/ml의 농도로 TPO를 포함한다.
- [0040] 일부 구현예에서, 상기 TPO는 100 ng/ml의 농도이다.
- [0041] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 0.5 μ M 내지 100 μ M의 농도로 p38 억제제를 포함한다.
- [0042] 일부 구현예에서, 상기 p38 억제제는 SB203580이다. 일부 구현예에서, 상기 p38 억제제는 BIRB 796이다. 일부 구현예에서, 상기 p38 억제제는 VX-702이다. 일부 구현예에서, 상기 p38 억제제는 SB239063이다. 일부 구현예에서, 상기 p38 억제제는 SB202190이다. 일부 구현예에서, 상기 p38 억제제는 BMS 582949이다.
- [0043] 일부 구현예에서, 상기 SB203580은 15 μ M의 농도이다.
- [0044] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 농도로 SDF-1 억제제를 포함한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 상기 SDF-1 억제제는 30 nM의 농도이다.
- [0046] 일부 구현예에서, 상기 SDF-1 억제제는 30 nM의 농도이고, p38 억제제, 예를 들어, SB203580은 15 μ M의 농도이다.
- [0047] 일부 구현예에서, 상기 NK 유도 배지는 CD3 활성화제, IL-2 및 IL7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 NK 유도 배지는 CD3 활성화제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 NK 유도 배지는 IL-2를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 NK 유도 배지는 IL-7을 포함한다.

- [0048] 일부 구현예에서, 상기 NK 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 IL-2를 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 상기 IL-2는 10 ng/ml의 농도이다.
- [0050] 일부 구현예에서, 상기 NK 유도 배지는 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 농도로 IL-7을 포함한다.
- [0051] 일부 구현예에서, 상기 IL-7은 10 ng/ml의 농도이다.
- [0052] 일부 구현예에서, 상기 각각의 배양 단계는 약 5%의 산소로 수행된다.
- [0053] 일부 구현예에서, 상기 각각의 배양 단계는 14% 초과와 산소로 수행된다.
- [0054] 일부 구현예에서, 상기 각각의 배양 단계는 대기 중 산소로 수행된다.
- [0055] 일부 구현예에서, 상기 각각의 배양 단계는 5% 미만의 산소로 수행된다.
- [0056] 일부 구현예에서, 상기 벌크 세포 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 수득하는 단계는 10일 초과 동안 지속된다.
- [0057] 일부 구현예에서, 상기 벌크 세포 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 수득하는 단계는 11일 내지 15일 동안 지속된다.
- [0058] 일부 구현예에서, 상기 벌크 세포 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 HP 세포 벌크를 수득하는 단계는 14일 동안 지속된다.
- [0059] 일부 구현예에서, 상기 iPSC는 말초 혈액 단핵 세포로부터 수득된다.
- [0060] 일부 구현예에서, 농축(enrichment) 단계 없이, 예를 들어, CD56+/CD3- 세포의 추가 분류/단리/정제 단계 없이, 생산된 세포의 적어도 약 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 따라서, 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 50% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 55% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 60% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 65% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 70% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 75% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 80% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 85% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 90% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 95% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다. 일부 구현예에서, 농축 단계 없이 생산된 세포의 적어도 약 97% 또는 그 이상은 CD56+/CD3- 세포이다.
- [0061] 일부 구현예에서, 생산된 세포의 약 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만은 CD3+ 세포이다.
- [0062] 일부 구현예에서, 생산된 세포의 표현형은 당업계의 다양한 수단에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 상기 생산된 세포의 표현형은 유세포 분석 또는 단일-세포 RNA 시퀀싱(scRNAseq)에 의해 확인될 수 있다.
- [0063] 일부 구현예에서, 생산된 세포의 백분율은 유세포 분석에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 생산된 세포의 백분율은 scRNAseq에 의해 결정된다.
- [0064] 일부 구현예에서, 상기 방법은 CD56+/CD3- 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, CD56+/CD3- 세포는 형광-활성화 세포 분류(FACS) 또는 자기 분류(magnetic sorting)에 의해 단리된다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 세포는 FACS에 의해 단리된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 자기 분류(MACS)에 의해 단리된다.
- [0066] 일부 구현예에서, 상기 CD56+/CD3- 면역 세포는 NK 세포이다.
- [0067] 일부 구현예에서, 상기 CD56+/CD3- 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된다.
- [0068] 일부 구현예에서, 상기 단리된 CD56+/CD3- 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된다.

- [0069] 일부 구현예에서, 상기 항원은 CD19이다.
- [0070] 일부 구현예에서, 상기 세포는 IL-15R α /IL-15 복합체를 발현하도록 추가로 유전적으로 변형된다.
- [0071] 일부 측면에서, (1) 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 및 아스코르브산으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 HPC 유도 배지에서 iPSC를 배양하여 조혈 전구 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 포함하는 세포의 이중 집단을 수득하는 단계; (2) 아스코르브산, p38 억제제 및 SDF-1 중 하나 이상을 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 (1)에서 수득된 HP 세포 벌크를 배양하여 세포의 중간 이중 집단을 수득하는 단계; 및 (3) CD3 활성화제, IL-2 및 IL-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함하는 NK 유도 배지에서 (2)로부터의 세포의 중간 이중 집단을 배양하는 단계;를 포함하는, 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)-유래된 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 방법이 제공된다.
- [0072] 일부 측면에서, NK 세포 집단이 제공되며, 상기 집단은 본원에 기술된 방법을 사용하여 생산된다.
- [0073] 일부 측면에서, 미분류 세포 집단이 제공되며, 상기 집단은 전체 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+ 면역 세포의 적어도 60%의 비율로 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+/CD3- 세포를 포함한다.
- [0074] 일부 구현예에서, 세포의 25% 미만은 CD3+ 세포이다.
- [0075] 일부 구현예에서, 세포의 5% 미만은 단핵구이다.
- [0076] 일부 구현예에서, 세포의 5% 미만은 B 세포이다.
- [0077] 일부 측면에서, 세포 요법을 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 본원에 기술된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0078] 일부 구현예에서, 상기 대상체는 암을 갖는다.
- [0079] 일부 구현예에서, 상기 암은 백혈병 또는 림프종이다.
- [0080] 일부 측면에서, 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (I) 하나 이상의 배양 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0081] 일부 구현예에서, 단계 (I)은 (A) 배양 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하여 조혈 전구 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 생산하는 단계; 및 (B) 배양 배지에서 단계 (A)에서 수득된 세포를 배양하여 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 단계;를 포함한다.
- [0082] 일부 구현예에서, 단계 (B)는 (a) 배양 배지에서 단계 (A)에서 수득된 세포를 배양하여 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 단계; 및 (b) 배양 배지에서 단계 (a)에서 수득된 세포를 배양하여 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 단계;를 포함한다.
- [0083] 일부 구현예에서, 이전 단계 중 임의의 것은 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 분리 단계를 수행하는 것을 포함하지 않는다.
- [0084] 일부 구현예에서, 상기 다능성 줄기 세포는 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)이다.
- [0085] 일부 측면에서, CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 (II) 배양 배지에서 조혈 전구 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 포함하는 세포를 배양하여 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 단계를 포함한다.
- [0086] 일부 구현예에서, 상기 단계 (II)는 (X) 배양 배지에서 조혈 전구 세포(HPC)를 포함하는 세포를 배양하여 CD4/CD8 이중-양성 세포를 생산하는 단계; 및 (Y) 배양 배지에서 단계 (X)에서 수득된 세포를 배양하여 CD56+/CD3- 면역 세포를 생산하는 단계;를 포함한다.
- [0087] 일부 구현예에서, 상기 단계 (II)는 CD4/CD8 이중 양성 세포의 분리 단계를 수행하는 것을 포함하지 않는다.
- [0088] 일부 구현예에서, 단계 (A)는 골 형성 단백질-4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 아스코르브산, Flt3 리간드(Flt3L), 트롬보포이에틴(TPO) 및 TGF β 억제제로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 갖는 배양 배지를 포함한다.
- [0089] 일부 구현예에서, 단계 (a) 또는 단계 (X)는 아스코르브산, 줄기 세포 인자(SCF), IL-7, Flt3L, 트롬보포이에틴(TPO), p38 억제제 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 갖는 배양 배지를 포함한다.

- [0090] 일부 구현예에서, 단계 (b) 또는 단계 (Y)는 CD3 활성화제, IL-2 및 IL7로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 갖는 배양 배지를 포함한다.
- [0091] 일부 구현예에서, 방법은 IL-7 및/또는 IL-15를 포함하는 배양 배지에서 단계 (b) 또는 단계 (Y) 후에 생산된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 배양은 약 5%의 산소로 수행된다.
- [0093] 일부 구현예에서, 단계 (A)는 약 10일 동안 지속된다. 다른 구현예에서, 단계 (A)는 약 10-18일 동안 지속된다.
- [0094] 일부 구현예에서, 상기 iPSC는 말초 혈액 단핵 세포로부터 생산된다.
- [0095] 일부 구현예에서, 생산된 세포의 적어도 약 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% 또는 90%는 CD56+/CD3- 세포이다.
- [0096] 일부 구현예에서, 생산된 세포의 약 25% 미만은 CD3+ 세포이다.
- [0097] 일부 구현예에서, 상기 방법은 CD56+/CD3- 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0098] 일부 구현예에서, CD56+/CD3- 세포는 형광-활성화 세포 분류(FACS)에 의해 분리된다.
- [0099] 일부 구현예에서, 상기 CD56+ 면역 세포는 CD56+/CD3-이다.
- [0100] 일부 구현예에서, 임의의 다능성, 다분화능, 또는 환자-유래된 HPC는 본원에 기술된 방법과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 성체 줄기 세포이다. 다양한 성체 줄기 세포는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 중간엽 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 제대-유래 세포, 골수 줄기 세포, 지방 줄기 세포 등이 포함된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유도된-다능성 줄기 세포(iPSC)이다. 따라서, 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 NK 세포는 임의의 다능성, 다분화능, 또는 환자-유래된 HPC, 예컨대 공여자로부터 직접적으로 유래된 일차 HPC로부터 제조될 수 있다.
- [0101] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 세포 분화의 임의의 단계에서 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 다능성, 다분화능, 또는 단분화능 단계에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 다능성 단계에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 세포는 배아 줄기 세포 단계 또는 iPSC 줄기 세포 단계에서 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 다분화능 단계에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 세포는 HSC 단계에서 유전적으로 변형될 수 있다.
- [0102] 일부 구현예에서, 상기 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된다.
- [0103] 일부 구현예에서, 상기 분리된 CD56+/CD3- 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형된다.
- [0104] 일부 구현예에서, 상기 항원은 CD19이다.
- [0105] 일부 구현예에서, 상기 세포는 IL-15R α /IL-15 복합체를 발현하도록 추가로 유전적으로 변형된다.
- [0106] 일부 측면에서, 미분류 세포 집단이 제공되며, 상기 세포 집단은 전체 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+ 면역 세포의 적어도 60%의 비율로 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+/CD3- 세포를 포함한다.
- [0107] 일부 구현예에서, 세포의 25% 미만은 CD3+ 세포이다.
- [0108] 일부 구현예에서, 세포의 5% 미만은 단핵구이다.
- [0109] 일부 구현예에서, 세포의 5% 미만은 B 세포이다.
- [0110] 일부 측면에서, 세포 요법을 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 선행하는 청구항 중 어느 한 항의 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+/CD3- 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 상기 대상체는 암을 갖는다.
- [0112] 일부 구현예에서, 상기 암은 백혈병 또는 림프종이다.
- [0113] 예를 들어 HPC 유도 배지, CD4/CD8 유도 배지 및 NK 유도 배지를 비롯한, 다양한 배양 배지가 본원에 기술된 방법에 사용된다.

[0114] 일부 측면에서, 유도된 다능성 세포(iPSC)는 조혈 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하기 위해 일정 기간 동안 HPC 유도 배지에서 배양되며, 이러한 세포 집단은 본원에서 HP 세포 벌크로 지칭된다. 일부 구현예에서, 상기 일정 기간은 약 10 내지 14일이다. 일부 구현예에서, 상기 일정 기간은 약 13일 동안이다. 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 BMP4, VEGF, bFGF, 아스코르브산, TGF β 억제제, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴 TPO, 및 Flt3L 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 iPSC는 VEGF, bFGF, 아스코르브산을 포함하는 HPC 유도 배지에서 1일 내지 약 10일 동안 배양된다. 일부 구현예에서, VEGF는 약 50 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 bFGF는 50 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 아스코르브산은 약 50 μ g/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 iPSC는 BMP4를 포함하는 HPC 유도 배지에서 1일 내지 약 3일 동안 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 BMP4는 약 50 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 iPSC는 약 6 μ M의 농도의 TGF β 억제제, 예컨대 SB431542와 약 2일 내지 약 3일 동안 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 7-13일 사이에 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴 TPO, 및 Flt3L 중 하나 이상이 배양에 첨가된다. 일부 구현예에서, SCF는 약 50 ng/mL의 농도로 첨가된다. 일부 구현예에서, TPO는 약 30 ng/mL의 농도로 첨가된다. 일부 구현예에서, Flt3L은 약 10 ng/mL의 농도로 첨가된다.

[0115] 일부 측면에서, HP 세포 벌크 집단은 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8-, 및 CD4+/CD8+ 세포를 포함하는 이중 세포 집단을 포함하는 세포 집단을 생성하기 위해 일정 기간 동안 CD4/CD8 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, HP 세포 벌크 집단은 19-22일 동안 CD4/CD8 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, HP 세포 벌크 집단은 약 21일 동안 CD4/CD8 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산, SCF, TPO, Flt3L, IL7, p38MAPKi 억제제, 예컨대 SB203580, SDF1a 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 아스코르브산은 약 50 μ g의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 SCF는 50 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 TPO는 약 100 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 Flt3L은 약 50 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 IL7은 약 50 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 SB203580은 약 15 μ M의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 SDF1a는 약 30 nM의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 HP 세포 벌크는 hDLL4/RetroNectin으로 코팅된 배양 디쉬 상에서 배양된다.

[0116] 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산, 줄기 세포 인자(SCF), IL-7, Flt3L, 트롬보포이에틴(TPO), p38 억제제 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 p38 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 SDF-1을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD4/CD8 유도 배지는 p38 억제제 및 SDF-1을 포함한다.

[0117] 일부 측면에서, 상기 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8-, 및 CD4+/CD8+ 세포를 포함하는 이중 세포 집단은 CD56+/CD3-NK 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하기 위해 일정 기간 동안 NK 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 이중 세포 집단은 약 5-9일 간의 기간 동안 NK 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 집단은 약 7일 동안 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 NK 세포 유도 배지는 IL-7, IL-2 및 항-CD3 항체 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 이중 세포 집단은 약 7일 동안 IL-7 및 IL-2를 포함하는 NK 세포 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 IL-7은 약 10 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2는 약 10 ng/mL의 농도이다. 일부 구현예에서, 상기 이중 집단은 약 3일의 기간 동안 항-CD3를 포함하는 NK 세포 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 이 방법은 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다. 따라서, 일부 구현예에서, 이 방법은 50% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 60% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 70% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 80% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 90% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 95% 초과 CD56+/CD3- 세포를 생성한다.

도면의 간단한 설명

[0118] 도 1은 본원에 기술된 방법을 사용하여 수득된 NK 세포 벌크 집단의 유세포 분석기 분석 결과를 나타낸 일련의 유세포 분석 플롯이다. 간략하게, iPS 세포는 중간 단리 단계 없이 본원에 기술된 바와 같이 배양되었다. 유세포 분석 그래프는 CD56^{high}인 CD3 음성 세포의 집단(NK 세포 벌크 집단의 대략 63.5%) 및 CD56^{dim}인 CD3 음성 세포의 집단(NK 세포 벌크 집단의 대략 26.7%)의 존재를 나타낸다. 이들 두 집단은 모두 NK 세포이다. 따라서, 수득된 전체 CD56 양성, CD3 음성 NK 세포 집단은 전체 세포 집단의 90% 초과이다.

도 2는 본원에 기술된 방법을 사용하여 수득된 NK 세포 벌크 집단의 scRNA 분석 결과를 나타낸다. 간략하게,

iPS 세포는 중간 단계 없이 본원에 기술된 바와 같이 배양되었다. 세포는 4가지 세포 집단 - 단핵구, B 세포, NK 세포 및 T 세포로 분류되었다. NK 세포 벌크 집단 내 세포의 대략 75%는 NK 세포(CD56+/CD3- 세포)로 확인된 반면, 벌크 세포 집단 내 세포의 대략 25%는 T 세포로 확인되었다. 본원에 기술된 T 세포는 NKT 세포(CD56+/CD3+ 세포)를 포함할 수 있다.

도 3은 루시페라제를 발현하는 Nalm6 세포의 투여에 이어, iNK-CAR19 세포를 투여한 NSG(NOD/Shi-scid, IL-2R 감마 널) 마우스에서 항-종양 활성 검정의 결과를 나타낸 일련의 사진을 도시한다. Nalm6 세포-이식된 NSG 마우스는 (a) PBS 완충액 (b) iNK-CAR 세포로 처리되었고, 이러한 처리의 항-종양 효능이 관찰되었다. 데이터는 iNK-CAR 세포가 Nalm6 세포의 증식을 감소시켰음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0119] 정의

투여: 본원에 사용된 바와 같은 용어, "투여하다", "투여하는", "투여", "도입하는" 또는 "도입"은 해당 세포의 전달을 초래하는 방법 또는 경로에 의해, 치료적 세포, 예를 들어, iPSC 또는 HPC 유래된 CD56+/CD3- 면역 세포를 대상체 내로 전달하는 맥락에서 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, 정맥내, 국소, 경구, 근육내, 복강내, 척수강내, 피하 또는 경피를 포함하는, 세포를 투여하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 세포는 담체의 유무에 관계없이 투여될 수 있다.

입양 세포 요법: 본원에 상호교환적으로 사용된 바와 같은 용어, "입양 세포 요법" 또는 "입양 세포 전달" 또는 "세포 요법" 또는 "ACT"는 세포, 예를 들어, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생성된 CD56+/CD3- 세포 집단의 전달을 지칭하고, 이를 필요로 하는 대상체 또는 환자 내로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 방법을 사용하여 제조되고 추가적으로 CAR를 발현하는 CD56+/CD3- 면역 세포이다.

동물: 본원에 사용된 바와 같은 용어, "동물"은 동물계의 임의의 구성원을 지칭한다. 일부 구현예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에서, 인간을 지칭한다. 일부 구현예에서, "동물"은 임의의 발달 단계에서, 비-인간 동물을 지칭한다. 특정 구현예에서, 상기 비-인간 동물은 포유동물(예를 들어, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 양, 소, 영장류 및/또는 돼지)이다. 일부 구현예에서, 동물은 이에 제한되지는 않으나, 포유류, 조류, 파충류, 양서류, 어류, 곤충류 및/또는 벌레류를 포함한다. 일부 구현예에서, 동물은 형질전환 동물, 유전적으로-조작된 동물, 및/또는 클론일 수 있다.

항원-특이적 표적화 도메인: "항원-특이적 표적화 도메인"은 관심 표적 항원에 결합하는 능력을 갖는 CAR를 제공한다. 일부 구현예에서, 항원-특이적 표적화 도메인은 종양 사멸을 초래하는 이펙터 면역 반응을 유발하는 것이 바람직한 임상적 관심 항원을 표적화한다. 항원-특이적 표적화 도메인은 생물학적 분자(예를 들어, 세포 표면 수용체 또는 종양 단백질, 또는 이들의 구성요소)를 특이적으로 인식하고, 이에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 상기 항원-특이적 표적화 도메인은 관심 있는 생물학적 분자에 대해 임의의 자연 발생, 합성, 반-합성, 또는 재조합적으로 생산된 결합 파트너를 포함한다.

예시적인 항원-특이적 표적화 도메인은 예를 들어 항체 또는 항체 단편 또는 유도체, 수용체의 세포외 도메인, 세포 표면 분자/수용체에 대한 리간드, 또는 이의 수용체 결합 도메인, 및 종양 결합 단백질을 포함한다.

일부 구현예에서, 항원-특이적 표적화 도메인은 항체이거나 이로부터 유래된다. 항체-유래 표적화 도메인은 항체의 단편 또는 항체의 하나 이상의 단편의 유전적으로 조작된 생성물일 수 있으며, 이 단편은 항원과의 결합에 관여한다. 예에는 가변 영역(Fv), 상보성 결정 영역(CDR), Fab, 단일 사슬 항체(scFv), 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL) 및 낙타과 항체(VHH)가 포함된다.

일부 구현예에서, 결합 도메인은 단일 사슬 항체(scFv)이다. scFv는 무인, 인간 또는 인간화된 scFv일 수 있다.

동종이계: 본원에 사용된 바와 같이, "동종이계"는 물질이 도입된 개체와 동일한 종의 다른 동물로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 둘 이상의 개체는 하나 이상의 유전자좌에서 유전자가 동일하지 않은 경우 서로 동종이계라고 한다. 일부 측면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종이계 물질은 항원적으로 상호작용하기 위해 유전적으로 충분히 상이할 수 있다.

대략 또는 약: 본원에 사용된 바와 같은 용어, 하나 이상의 관심 값에 적용되는 "대략" 또는 "약"은 명시된 기준 값과 유사한 값을 지칭한다. 특정 구현예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되거나 문맥에서 명백하지 않는 한 명시된 기준 값(해당 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우 제외)의 어느 한 방향(초과 또는 미만)으

로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만에 속하는 값의 범위를 지칭한다. 용어 "약" 또는 "대략"은 명시된 기준 값을 변형하는 데 사용되는 경우, 명시된 기준 값 자체는 명시된 기준 값의 양쪽에 명시된 기준 값에 가까운 값과 함께 포함되는 것으로 이해된다.

[0129] *아스코르브산 또는 비타민 C*: 본원에 사용된 바와 같이, "아스코르브산" 또는 "비타민 C"는 L-아스코르빈산 및 이의 유도체를 의미하고, "L-아스코르빈산 유도체"는 생체 내에서 효소 반응에 의해 비타민 C가 되는 유도체를 의미한다. L-아스코르빈산의 유도체의 예는 비타민 C 포스페이트, 아스코르브산 글루코시드, 아스코르빌 에틸, 비타민 C 에스테르, 아스코르빌 테트라헥실테카노에이트, 아스코르빌 스테아레이트 및 아스코르빌 2-포스페이트 6-팔미테이트를 포함한다. 비타민 C 포스페이트의 예는 L-아스코르빈산 포스페이트의 염, 예컨대 L-아스코르빈산 포스페이트 Na 및 L-아스코르브산 포스페이트 Mg를 포함한다. 일 구현예에서, 비타민 C는 아스코르브산 2-포스페이트일 수 있다.

[0130] *벌크 세포 집단*: 용어 "벌크 세포 집단", "벌크 세포" 등은 세포의 이종 집단을 지칭한다. 일부 구현예에서, 벌크 세포 집단은 조혈 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 벌크 세포 집단은 다능성 세포, 예를 들어, 유도된 다능성 줄기 세포로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 벌크 세포 집단은 예를 들어, 혈액을 포함하는 공여자 조직으로부터 수득된다.

[0131] *CD4/CD8 유도 배지*: 본원에 사용된 바와 같은 용어, CD4/CD8 유도 배지는 CD4-/CD8- 세포, CD4+/CD8+ 세포, CD4+/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하기 위해 사용되는 세포 배양 배지를 지칭한다. 일부 구현예에서, CD4/CD8 유도 배지는 HP 세포 벌크를 CD4-/CD8- 세포, CD4+/CD8+ 세포, CD4+/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포를 포함하는 세포 집단으로 분화시키는데 사용된다. 일부 구현예에서, CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산, SCF, TPO, Flt3L, IL7, p38MAPKi 억제제, 예컨대 SB203580, 및 SDF1a 중 하나 이상 또는 모두를 포함한다.

[0132] *키메라 항원 수용체(CAR)*: 본원에 사용된 바와 같은 용어, "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"는 조작된 수용체로, 이는 세포(예를 들어, NK 세포, T 세포, 예컨대 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포 또는 이의 조합)에 항원 특이성을 부여할 수 있다. CAR는 인공 T-세포 수용체, 키메라 T-세포 수용체 또는 키메라 면역 수용체로도 알려져 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 CAR는 항원-특이적 표적화 도메인, 세포외 도메인, 막횡단 도메인, 임의로 하나 이상의 공동-자극 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 본원에 기술된 일부 구현예에서, CAR는 원하는 세포-표면 항원 또는 MHC-펩티드 복합체에 대한 특이성을 재유도하도록 본원에 기술된 방법을 사용하여 제조된 CD56+/CD3-면역 세포(예를 들어, NK 또는 NK-유사 세포) 내로 도입된다. 이러한 합성 수용체는 전형적으로 단일 융합 분자에서 가요성 링커를 통해 하나 이상의 신호전달 도메인과 연관된 표적 결합 도메인을 함유한다. 표적 결합 도메인은 병리학적 세포(예를 들어, 암 세포) 표면 상의 특정 표적으로 면역 세포(예를 들어, CD56+/CD3+ 면역 세포)를 유도하는 데 사용되며, 신호전달 도메인은 면역 세포(예를 들어, CD56+/CD3- 면역 세포) 활성화 및 증식을 위한 분자 매커니즘을 함유한다. 일반적으로 면역 세포(예를 들어, CD56+/CD3-세포) 막을 통과하는 가요성 링커(즉, 막횡단 도메인 형성)는 CAR의 표적 결합 도메인의 세포막 디스플레이를 허용한다. CAR는 면역 세포가 림프종 및 고형 종양을 포함한 다양한 악성 종양의 종양 세포 표면에서 발현된 항원에 대해 재유도되도록 성공적으로 허용하였다(Gross 등, (1989) Transplant Proc., 21(1 Pt 1): 127-30; Jena 등, (2010) Blood, 116(7):1035-44). CAR의 세포외 결합 도메인은 무인 또는 인간화 단클론성 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 융합으로부터 유래된 단일 사슬 가변 단편(scFv)으로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 단일 도메인 항체를 포함한다. 대안적으로, (예를 들어, Fab 라이브리리로부터 수득된 항체 대신에) Fab로부터 유래된 scFv가 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 상기 scFv는 막횡단 도메인에 융합된 다음 세포내 신호전달 도메인에 융합된다. 최소 3세대의 CAR가 개발되었다. 제1 세대 CAR는 CD3제타 또는 Fc 수용체 감마 사슬의 세포질 영역으로부터 유래된 신호전달 도메인에 부착된 표적 결합 도메인을 포함하였다. 제1 세대 CAR는 면역 세포를 선택된 표적으로 성공적으로 재유도하는 것으로 나타났지만, 생체 내에서 연장된 확장 및 항종양 활성을 제공하지 못하였다. 제2 세대 및 제3 세대 CAR는 공동-자극 분자, 예컨대 CD28, OX-40(CD134) 및 4-1BB(CD137)를 포함하여 변형된 세포 생존을 강화하고 증식을 증가시키는 데 중점을 두었다.

[0133] *배양*: 용어 "배양" 또는 "세포 배양" 또는 "배양하는"은 시험관내 환경에서 세포의 유지, 성장 및/또는 분화를 지칭한다. 본원에 기술된 다양한 방법에서, 세포는 하나의 유형의 세포에서 다른 하나의 유형의 세포로의 성장 또는 분화를 용이하게 하거나 촉진하는 특정 세포 배양 배지(또는 복수의 경우 "배지")에서 배양된다. 예를 들어, 본원에 기술된 특정 구현예에서, 세포 배양 배지에서 iPSC를 배양하면 전체 세포 집단에서 세포의 적어도

20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80%가 되는 CD34+ 세포(즉, HPCs)가 생성된다. 본원에 기술된 일부 구현예에서, 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80% 30% HPCs를 함유하는 세포 집단을 배양하면 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8-, 및 CD4+/CD8+ 세포를 포함하는 세포 집단이 생성된다. 또 다른 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8-, 및 CD4+/CD8+ 세포를 함유하는 세포의 세포 집단을 배양하면 농축된 CD56+/CD3- 세포 집단(즉, 전체 세포 집단에서 세포의 적어도 50%가 CD56+/CD3-임)이 생성된다. 세포 배양 배지는 세포의 증식 및/또는 유지에 도움이 되는 영양소, 호르몬 및/또는 기타 인자의 공급원으로 작용한다.

[0134] **분화:** 용어 "분화하는", "유도하는", "전환하는", "유래하는" 등은 하나의 표현형의 세포가 다른 하나의 표현형의 세포로 변화하는 과정을 지칭한다.

[0135] **조작된(Engineered):** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "조작된"은 디자인되거나 변형된 폴리뉴클레오타이드, 폴리펩티드 또는 세포 및/또는 존재 및 생산에 중재 및/또는 활성이 필요한 세포를 설명한다. 예를 들어, 의도적으로 특정 효과를 유도하도록 디자인된 조작된 세포는 동일한 유형의 자연 발생 세포의 효과와 상이하다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 본원에 기술된 방법을 사용하여 iPSC 또는 HPC로부터 유래된 CD56+/CD3- 세포이고, 키메라 항원 수용체를 추가로 발현한다.

[0136] **농축된(enriched):** 특정 세포 유형과 관련하여 본원에 사용된 "농축된"은 유세포 분석 또는 다른 분석 방법에 의해 결정된 바와 같이 세포 집단 내에서 특정 세포 유형의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 또는 90%를 갖는 세포 집단을 의미한다.

[0137] **생체외:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "생체외"는 세포가 살아있는 유기체로부터 제거되고, 유기체 외부(예를 들어, 시험관에서, 배양 백에서, 생물반응기에서)에서 증식되는 과정을 의미한다.

[0138] **기능적 등가물 또는 유도체:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "기능적 등가물" 또는 "기능적 유도체"는 아미노산 서열의 기능적 유도체의 맥락에서 원래 서열과 실질적으로 유사한 생물학적 활성(기능 또는 구조적)을 유지하는 분자를 의미한다. 기능적 유도체 또는 등가물은 천연 유도체일 수 있거나 합성적으로 제조된다. 예시적인 기능적 유도체는 단백질의 생물학적 활성이 보존된다면, 하나 이상의 아미노산의 치환, 결실 또는 부가를 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 치환 아미노산은 바람직하게는 치환된 아미노산과 유사한 물리화학적 특성을 갖는다. 바람직한 유사한 물리화학적 특성은 전하의 유사성, 벌키성, 소수성, 친수성 등을 포함한다.

[0139] **조혈 전구 세포:** 용어 "조혈 전구 세포" 또는 "조혈 전구 세포들" 또는 "HPC" 또는 "HPCs"는 조혈 계통에 전념하지만 추가로 조혈 분화가 가능한 CD34+ 세포를 지칭하며, 조혈 줄기 세포, 다분화능 조혈 줄기 세포, 공통 골수성 전구 세포, 거핵구 전구 세포, 적혈구 전구 세포 및 림프구성 전구 세포를 포함한다.

[0140] **HPC 벌크:** 용어 "HPC 벌크", "조혈 전구 세포 벌크" 또는 "HP 세포 벌크"는 조혈 전구 세포를 포함하는 세포의 이종 집단을 의미한다. 일부 구현예에서, HPC 벌크는 iPSC로부터 유래된다. 일부 구현예에서, HPC 벌크는 혈액으로부터 유래된다.

[0141] **HPC 유래된 NK 세포:** 용어 "HPC 유래된 NK 세포"는 세포 배양 배지에서 배양한 후 HPC 벌크 집단으로부터 수득된 CD56+/CD3- 면역 세포(예를 들어, NK 또는 NK-유사 세포)를 의미한다.

[0142] **HPC 유도 배지:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, HPC 유도 배지는 출발 세포 집단으로부터 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하는 데 사용되는 배양 배지를 지칭한다. 일부 구현예에서, 출발 세포 집단은 iPSC이다. 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 BMP4, VEGF, bFGF, 아스코르브산, TGFβ 억제제, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴 TPO, 및 Flt3L 중 하나 이상을 포함한다.

[0143] **면역 세포:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "면역 세포" 또는 "면역 세포들"은 이에 제한되지는 않으나, T 세포, NK 세포, T/NK 세포, 수지상 세포, 대식세포, B 세포, 호중구, 적혈구, 단핵구, 호염기구, 호중구, 비만 세포, 호산구, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 면역계의 세포를 지칭한다. 다양한 구현예에서, 본원에 기술된 방법을 사용하여 생성된 면역 세포는 CD56+/CD3- 세포를 특징으로 하는 NK 세포이다.

[0144] **유도된 다능성 줄기 세포(iPSC):** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "유도된 다능성 줄기 세포" 또는 "iPSC"는 예를 들어, (이에 제한되지는 않으나, SOX2(유전자 ID: 6657), KLF4(유전자 ID: 9314), cMYC(유전자 ID: 4609), NANOG(유전자 ID: 79923), LIN28/LIN28A(유전자 ID: 79727)와 조합된 POU4F1/OCT4(유전자 ID: 5460)를 포함하는) 하나 이상의 유전자의 발현을 유도함으로써 비-다능성 세포, 전형적으로 성체 체세포로부터 인공적으로 유래된(예를 들어, 유도된) 다능성 줄기 세포를 지칭한다. 줄기 세포는 마커 또는 유전자로 임의의 단계에서 유전적으로 변형되어 상기 마커 또는 유전자가 임의의 배양 단계에 걸쳐 전달될 수 있다. 상기 마커는 임의의 배양

단계에서 분화되거나 미분화된 줄기 세포 집단을 정제하거나 풍부하게 하는 데 사용될 수 있다.

- [0145] **유도 배지:** 용어 "유도 배지"는 일반적으로 제1 세포 표현형에서 제2 세포 표현형으로 세포 집단을 분화시키는 데 사용되는 세포 배양 배지를 지칭한다. 일부 구현예에서, 제1 세포 표현형 및 제2 세포 표현형은 세포의 이중 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 세포 표현형은 세포의 이중 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 세포 표현형은 세포의 이중 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 유도 배지는 이중 세포 집단을 실질적으로 균질한 세포 집단으로 분화시키는 데 사용된다.
- [0146] **시험관내:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "시험관내"는 다세포 유기체 내가 아니라 인공 환경, 예를 들어, 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양 등에서 발생하는 이벤트를 지칭한다.
- [0147] **생체내:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "생체내"는 다세포성 유기체, 예컨대, 인간 및 비-인간 동물 내에서 발생하는 이벤트를 지칭한다. 세포-기반 시스템의 맥락에서, 상기 용어는 살아있는 세포 내(예를 들어, 시험관내 시스템과는 대조적임)에서 발생하는 이벤트를 지칭하는 데 사용될 수 있다.
- [0148] **단리 단계:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "단리 단계" 또는 "세포 단리 단계"는 세포 혼합물로부터 특정 세포 유형을 분리하는 단계를 의미한다. 세포 혼합물로부터 특정 세포 유형을 분리하는 다양한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 형광-활성화 세포 분류(FACS) 및 자기-활성화 세포 분류(MACS)와 같은 자기-비드 기반 분류 전략이 포함된다.
- [0149] **자연 살해(NK) 세포:** 본원에 사용된 바와 같이, "자연 살해 세포" 또는 NK 세포는 이의 마커 발현 및 기능/활성에 의해 정의되는 림프구성 세포이다. 예를 들어, 인간에서 NK 세포는 CD56을 발현한다. 추가 구현예에서, 이러한 NK 세포는 CD56 및 CD16을 발현할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 이러한 NK 세포는 CD56+/CD3- 세포일 수 있다. NK 세포는 다양한 수준의 CD56을 발현할 수 있다. 예를 들어, NK 세포는 "CD56^{high}"일 수 있으며, 이는 NK 세포가 당업계의 방법, 예를 들어 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같이 높은 수준의 CD56을 발현함을 의미한다. 또 다른 실시예로서, NK 세포는 "CD56^{dim}"일 수 있으며, 이는 NK 세포가 예를 들어, 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같이 당업계의 방법에 의해 평가되는 바와 같이 낮지만 검출가능한 수준의 CD56을 발현함을 의미한다.
- [0150] **NK 유도 배지:** 일부 구현예에서, 용어 "NK 유도 배지"는 CD56+/CD3- 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하는 데 사용되는 세포 배양 배지를 지칭한다. 일부 구현예에서, NK 세포 유도 배지는 IL-7, IL-2 및 항-CD3 항체 중 하나 이상을 포함한다.
- [0151] **iPS NK 세포:** 본원에 사용된 바와 같이, "iPS NK 세포"는 iPSC 유래된 NK 세포, 예를 들어 출발 물질로서 iPSC로부터 유래된 NK 세포이다. 이러한 iPS NK 세포는 CD56을 발현한다. 추가 구현예에서, 이러한 iPS NK 세포는 CD56 및 CD16을 발현할 수 있다. 또 다른 실시예에서, 이러한 iPS NK 세포는 CD56을 발현할 수 있고, CD3-(CD56+/CD3-)일 수 있다. iPS NK 세포는 또한 본원에서 "iNK 세포"로도 지칭된다.
- [0152] **T 세포:** 본원에 사용된 바와 같이 "T 세포"는 이의 마커 발현 및 기능/활성에 의해 정의되는 림프구성 세포이다. 예를 들어, 인간에서 T 세포는 CD3를 발현한다. CD56+/CD3+ 세포는 NKT 세포로도 알려져 있다.
- [0153] **단일-사슬 Fv 항체** 또는 "scFv"는 직접적으로 또는 펩티드 링커 서열을 통해 서로 연결된 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 조각된 항체를 지칭한다.
- [0154] **대상체:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, "대상체"는 인간 또는 임의의 비-인간 동물(예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말 또는 영장류)을 지칭한다. 인간은 출산 전 및 출산 후 형태를 포함한다. 다수의 구현예에서, 대상체는 인간이다. 대상체는 질병의 진단 또는 치료를 위해 의료 제공자에게 제시되는 인간을 지칭하는 환자일 수 있다. 용어 "대상체"는 본원에서 "개체" 또는 "환자"와 상호교환적으로 사용된다. 대상체는 질병 또는 장애로 고통받거나 이에 민감할 수 있지만, 질병 또는 장애의 증상을 나타내거나 나타내지 않을 수 있다.
- [0155] **앓고 있는(Suffering from):** 질병, 장애 및/또는 병태를 "앓고 있는" 개체는 질병, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상으로 진단되거나 이를 나타낸다. 질병은 암, 예를 들어 림프종 및 백혈병을 포함할 수 있다.
- [0156] **치료적 유효량:** 본원에 사용된 바와 같은 용어, 치료제(예를 들어, 세포 요법)의 "치료적 유효량"은 질병, 장애 및/또는 병태를 앓고 있거나 이에 민감한 대상체에게 투여될 때, 질병, 장애 및/또는 병태의 증상(들)을 치료, 진단, 예방, 및/또는 발병을 지연시키기에 충분한 양(예를 들어, 특정 유형 또는 유형의 세포 또는 세포가 특정

비율로 농축된 특정 수의 세포 또는 세포 집단)을 의미한다. 치료적 유효량은 적어도 하나의 단위 용량을 포함하는 투여 요법을 통해 전형적으로 투여된다는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD56+/CD3- 세포는 하나 이상의 전이유전자를 발현하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD56+/CD3- 세포는 예를 들어, CD19와 같은 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약 1억 내지 9억개의 CD56+/CD3- 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약 1억 내지 7억개의 CD56+/CD3- 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약 1억 내지 5억개의 CD56+/CD3- 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약 2억 내지 9억개의 CD56+/CD3- 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약 2억 내지 7억개의 CD56+/CD3- 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 약 2억 내지 5억개의 CD56+/CD3- 세포가 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다.

[0157] 치료: 본원에 사용된 바와 같은 용어, "치료하다", "치료" 또는 "치료하는"은 특정 질병, 장애 및/또는 병태의 하나 이상의 증상 또는 특징을 부분적으로 또는 완전히 경감, 개선, 완화, 억제, 예방, 발병 지연, 중증도 감소 및/또는 발병률 감소에 사용되는 임의의 방법을 지칭한다. 치료는 질병과 관련된 병리 현상이 발생할 위험을 감소시킬 목적으로 질병의 징후를 나타내지 않고/하거나 질병의 초기 징후만 나타내는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0158] 본원에서 종점에 의한 수치 범위의 언급은 그 범위 내에 포함된 모든 수 및 분수를 포함한다(예를 들어, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.9, 4 및 5를 포함한다). 또한, 이의 모든 수 및 분수는 용어 "약"에 의해 변형된 것으로 추정됨을 이해해야 한다.

[0159] 본 발명의 다양한 측면은 하기 섹션에서 상세하게 기술된다. 섹션의 사용은 본 발명을 제한하려는 것을 의미하지 않는다. 각 섹션은 본 발명의 모든 측면에 적용될 수 있다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "하나(a)", "한(an)" 및 "그(the)"는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 단수 및 복수 지시 대상을 모두 포함한다.

[0160] 본 발명의 다양한 측면은 하기 섹션에서 상세히 기술된다. 섹션의 사용은 본 발명을 제한하려는 것이 아니다. 각 섹션은 본 발명의 임의의 측면에 적용될 수 있다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다.

[0161] 상세한 설명

[0162] 본 개시는 다능성 세포, 예컨대 iPS 세포 또는 조혈 전구 세포(HPC)로부터 NK 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 상기 iPSC로부터 생산된 NK 세포는 본원에서 iPS 유래된 NK 세포, iPS NK 세포 또는 iNK 세포로 지칭된다. 본 개시는 전구 세포, 예컨대 iPSC 또는 HPC가 단리 단계 필요 없이 NK 세포 또는 iPS NK 세포에 대해 고효율로 분화될 수 있는 세포 배양 방법을 제공한다. 본 개시는 또한 획득된 iPS NK 세포가 기능적이며, 예를 들어, 암과 같은 다양한 질병 또는 장애의 치료에 유용한 키메라 항원 수용체(CAR)의 도입을 통해 유전적으로 추가로 변형될 수 있음을 보여준다.

[0163] CD56+/CD3- 세포(NK 세포)를 생산하는 다양한 방법이 하기에 보다 상세하게 기술된다.

[0164] 단리 단계 없이 다능성 세포로부터 NK 또는 iPS 유래된 NK 세포를 생산하는 방법

[0165] 일부 구현예에서, 단리 단계를 필요로 하지 않는 방법인, NK 세포 또는 iPS 유래된 NK 세포를 생산하는 방법이 제공된다.

[0166] 배양 방법의 개요

[0167] 본원에 제공된 방법은 임의의 중간 단리 단계 없이 CD56+/CD3- 세포의 생산을 허용한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 HPC 유도 배지에서 다능성 줄기 세포, iPSC를 배양하여 조혈 세포(HPC)(HP 세포 벌크)를 포함하는 세포 집단을 획득하는 단계를 포함한다. 상기 HP 세포 벌크 집단을 단리 단계 수행 없이 CD4/CD8 유도 배지에서 후속적으로 배양하여 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단을 획득한다. 일부 구현예에서, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단은 또한 CD4+/CD8- 세포, CD4-/CD8- 세포, 및 CD4-/CD8+ 세포를 포함한다. 이는 CD56+/CD3- 면역 세포가 농축된 집단을 획득하기 위해 NK 유도 배지에서 배양되는 세포의 단리 단계 수행 없이 후속 배양 기간이 이어진다. 따라서, 일부 구현예에서, CD56+/CD3- 세포를 생산하는 방법은 하기를 포함한다: 1) HPC 유도 배지에서 다능성 세포를 배양하여 조혈 세포(HP 세포 벌크)를 포함하는 집단을 획득하는 단계; 2) CD4/CD8 유도 배지에서 HP 세포 벌크를 배양하여 CD4+/CD8- 세포, CD4-/CD8- 세포, 및 CD4-/CD8+ 세포를 포함

하는 세포 집단을 수득하는 단계; 및 3) CD56+/CD3- 세포를 수득하기 위해 일정 기간 동안 NK 유도에서 CD4+/CD8- 세포, CD4-/CD8- 세포, 및 CD4-/CD8+ 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계.

[0168] 일부 구현예에서, NK 세포 또는 iPS NK 세포를 생산하는 방법은 조혈 전구 세포(예를 들어, HP 세포 벌크)를 포함하는 세포를 배양하여 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하는 것을 포함하고, CD56+/CD3-면역 세포가 농축된 집단을 수득하기 위해 배지에서 배양되는 세포 집단의 단리 단계 수행 없이 후속 배양 기간이 이어진다. 일부 구현예에서, 다능성 줄기 세포-유래된 CD56+/CD3-면역 세포를 생산하는 방법은 하나 이상의 배지에서 다능성 줄기 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CD56+/CD3-면역 세포를 생산하는 방법은 하나 이상의 배양 배지에서 조혈 전구 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CD56+/CD3-면역 세포를 생산하는 방법은 하나 이상의 배양 배지에서 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포의 혼합물 또는 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CD56+/CD3-면역 세포가 농축된 집단은 후속적으로 예를 들어, FACS 분류 또는 자기 비드-기반 단리 기술과 같은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 분리될 수 있다. 일 구현예에서, iPS 세포는 약 4-8주, 5-7주, 또는 약 6주 내에 iPS NK 세포로 분화될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, iPS 세포는 약 4-8주 내에 NK 세포로 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 약 5-7주 내에 NK 세포로 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, IPS 세포는 약 6주 내에 NK 세포로 분화될 수 있다.

[0169] 세포 분화 과정은 당업계에 공지된 다양한 수단에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양된 세포의 세포 분화는 배양된 세포의 샘플을 수득하고 배양된 세포의 샘플을 하나 이상의 분석 방법에 적용하여 세포의 세포 표현형을 확인함으로써 평가될 수 있다. 세포 표현형을 확인하는 알려진 방법은 예를 들어, 유세포 분석 및 면역형광 이미징을 포함한다. 임의의 적합한 샘플링 및 표현형 검정은 세포 분화 과정의 진행을 확인하기 위해 본원에 기술된 세포 배양 방법과 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법은 주어진 시간에 세포 표현형을 결정하기 위한 하나 이상의 샘플링 단계를 포함한다.

[0170] *iPSC에서 HP 세포 벌크로의 개요*

[0171] 일부 구현예에서, 다능성 세포, 예컨대 iPSC는 HPC 유도 배지에서 배양되어 HP 세포 벌크를 포함하는 집단을 생산한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크를 수득하기 위해 HPC 유도 배지에서 iPSC를 배양하는 것은 HPC 유도 배지에서 iPSC를 배양하는 것을 포함한다. HPC 유도 배지는 HP 세포 벌크의 생산을 허용하는 다양한 구성요소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 골 형성 단백질-4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 아스코르브산, ROCK 억제제, GSK3 억제제, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO), Flt3L, 및 TGFβ 억제제로부터 선택되는 적어도 하나 이상의 화합물을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, iPSC로부터 HPC를 유도하기 위한 HPC 유도 배지는 BMP4를 포함한다. 일부 구현예에서, iPSC로부터 HPC를 유도하기 위한 배양 배지는 VEGF를 포함한다. 일부 구현예에서, iPSC로부터 HPC를 유도하기 위한 배양 배지는 bFGF를 포함한다. 일부 구현예에서, iPSC로부터 HPC를 유도하기 위한 배양 배지는 TGFβ를 포함한다.

[0172] iPSC는 HP 세포 벌크를 생산하기에 충분한 기간 동안 HPC 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, iPSC는 약 7 내지 21일, 또는 10 내지 18일, 또는 약 14일의 기간 동안 HPC 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, iPSC는 약 13일의 기간 동안 HPC 유도 배지에서 배양된다.

[0173] 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 약 3%, 4%, 5%, 또는 6%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포는 약 3%의 O₂에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 4%의 O₂에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 5%의 O₂에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 6%의 O₂에서 배양된다.

[0174] *HP 세포 벌크에서 CD4/CD8로의 개요*

[0175] 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크, 또는 달리 수득된 HPC, 예를 들어, 인간 공여자로부터 단리된 일차 HPC 또는 다른 줄기 세포 공급원/유형, 예컨대 배아 줄기 세포 유래로부터 분화된 HPC는 임의의 중간 단리 단계 없이 배지에서 추가로 배양되어 CD4/CD8 이중-양성 (DP) 세포를 포함하는 세포 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크, 또는 달리 수득된 HPC, 예를 들어, 인간 공여자로부터 단리된 일차 HPC 또는 다른 줄기 세포 공급원/유형, 예컨대 배아 줄기 세포 유래로부터 분화된 HPC는 임의의 중간 단리 단계 없이 배지에서 추가로 배양되어 CD4+/CD8 세포를 포함하는 세포 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크, 또는 달리 수득된 HPC, 예를 들어, 인간 공여자로부터 단리된 일차 HPC 또는 다른 줄기 세포 공급원/유형, 예컨대 배아 줄기 세포 유래로부터 분화된 HPC는 임의의 중간 단리 단계 없이 배지에서 추가로 배양되어 CD4-/CD8- 세포를 포함하는 세포 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크, 또는 달리 수득된 HPC, 예를 들어, 인간 공여자로부터 단리된 일차 HPC 또는 다른 줄기 세포 공급원/유형, 예컨대 배아 줄기 세포 유래로부터 분화된 HPC는 임의의 중간 단리

단계 없이 배지에서 추가로 배양되어 CD4-/CD8+ 세포를 포함하는 세포 집단을 수득한다. 상기 방법에 의해 수득된 세포 집단은 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 세포 집단은 예를 들어, 림프구를 포함한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 아스코르브산, 줄기 세포 인자(SCF), IL-7, Flt3L, TPO, 피브로넥틴 또는 이의 변이체, Notch 리간드(예를 들어, Jag-1, Jag-2, DLL-1, DLL-3, DLL-4), p38 억제제 및 SDF-1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 화합물을 갖는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다. 따라서, 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 아스코르브산을 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 SCF를 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 IL-7을 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 Flt3L을 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 p38 억제제를 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다. 일부 구현예에서, HPC 세포 벌크는 SDF-1을 포함하는 CD4/CD8 유도 배지에서 배양되어 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단을 수득한다.

[0176] 배양 기간은 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하기에 적합한 시간 동안이다. 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하기 위한 HP 세포 벌크 배양은 약 2-6주; 3-5주 또는 약 3주이다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포 배양 기간은 약 2-6주 동안이다. 일부 구현예에서, 세포 배양 기간은 약 3-5주 동안이다. 일부 구현예에서, 세포 배양 기간은 약 3주 동안이다.

[0177] 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 약 3%, 4%, 5%, 또는 6%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 약 3%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 약 4%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 약 5%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 약 6%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다.

[0178] CD4/CD8 세포에서 CD56+/CD3- 세포로의 개요

[0179] 상기 기술된 바와 같은 CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8-을 포함하는 세포 집단은 세포 배양 배지에서 추가로 배양하여 CD56+/CD3- 세포 집단을 수득할 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 NK 유도 배지이다. 일부 구현예에서, NK 유도 배지는 IL-7, IL-2 및 항-CD3 항체 중 하나 이상을 포함한다.

[0180] 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8-을 포함하는 세포 집단은, 중간 단리 단계 없이, 배양 배지에서 추가로 배양하여 CD56+/CD3- 세포가 농축된 세포 집단을 수득한다. 이러한 CD56+ 세포에는 예를 들어, 자연 살해(NK) 세포가 포함된다. 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8-세포를 포함하는 집단은 CD3 활성화제, IL-2 및/또는 IL-7을 포함하는 배지에서 배양된다. 따라서, 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8-세포를 포함하는 집단은 CD3 활성화제를 포함하는 배지에서 배양된다. CD3 활성화제는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, CD3 및/또는 CD28 표면 리간드에 결합하는 항체 복합체를 포함한다. 예를 들어, 항-CD3 항체를 포함하는, CD3 활성화제 또는 이에 결합된 단편이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD3 항체가 사용되는 경우, 항-CD3 항체는 다클론성 항체 또는 단클론성 항체일 수 있다. 일부 구현예에서, 항-CD3 항체는 다클론성 항체이다. 일부 구현예에서, 항-CD3 항체는 단클론성 항체이다. 항체는 IgG, IgA, IgM, IgD, IgE 또는 IgG의 면역글로불린 부류에 속할 수 있다. 하기를 포함하는 다양한 종류의 항-CD3 항체가 사용될 수 있으며, 예를 들어, 이는 OKT3 클론 또는 UCHT1 클론으로부터 생산된 항체가 사용될 수 있다. 배지에서 항-CD3 항체의 농도는 예를 들어, 10 ng/ml 내지 1000 ng/ml이다.

[0181] 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8-세포를 포함하는 집단은 IL-2를 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8-세포를 포함하는 집단은 IL-7을 포함하는 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어 약

3%, 4%, 5%, 또는 6%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포는 약 3%의 O₂에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 4%의 O₂에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 5%의 O₂에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 약 6%의 O₂에서 배양된다.

[0182] CD56+ 세포를 포함하는 세포 집단은 NK 유도 배지에서 추가로 배양되어 CD56+/CD3- 세포 집단을 풍부하게 할 수 있다. 일부 구현예에서, CD56+ 세포를 포함하는 세포 집단은 IL-7 및/또는 IL-15를 포함하는 NK 유도 배지에서 배양되어 CD56+ 세포를 더 풍부하게 한다. 따라서, 일부 구현예에서, CD56+ 세포를 포함하는 세포 집단은 IL-7을 포함하는 NK 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, CD56+ 세포를 포함하는 세포 집단은 IL-15를 포함하는 NK 유도 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어 약 3%, 4%, 5%, 또는 6%의 O₂와 같은 저산소 조건에서 배양된다. 일부 구현예에서, 생산된 CD56+/CD3- 세포는 NK 세포이다. 생산된 CD56+/CD3- NK 세포의 백분율은 적어도 약 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 95% 이상이다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 50%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 55%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 60%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 65%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 70%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 75%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 80%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 85%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 90%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 95%의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 약 95% 이상의 CD56+/CD3- NK 세포를 생성한다.

[0183] 일부 구현예에서, 상기 배양 방법에 의해 생산된 세포의 약 5%, 10, 15%, 20%, 25%, 또는 약 30%는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 5% 미만은 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 약 5%는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 약 10%는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 약 15%는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 약 20%는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 약 25%는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 생산된 세포의 약 30%는 CD3+ T 세포이다.

[0184] 일부 구현예에서, CD56+/CD3- 세포가 농축된 집단은 당업계에 공지된 방법에 의해 분리된다. 이러한 방법에는 예를 들어, 유세포 분석(FACS)-기반 분류 방법 및 자기-기반 분류 방법(MACS)이 포함된다.

[0185] 일부 구현예에서, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, CD4+/CD8+ 세포 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 집단으로부터 CD56+/CD3- NK 세포를 수득하기 위한 배양 기간은 약 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일 또는 18일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 약 7일이다.

[0186] 일부 구현예에서, 농축된 CD56+ 세포 집단은 NK 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 농축된 CD56+ 세포는 CD3- 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 농축된 CD56+ 세포는 CD3+ 세포를 포함한다.

[0187] **CD56 +/CD3- 세포로의 분화에 적합한 다능성 세포**

[0188] 일부 구현예에서, 임의의 다능성, 다분화능 또는 환자-유래된 HPC는 본원에 기술된 방법과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 성체 줄기 세포이다. 다양한 성체 줄기 세포는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 중간엽 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 제대-유래 세포, 골수 줄기 세포, 지방 줄기 세포 등이 포함된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유도된-다능성 줄기 세포(iPSC)이다. 따라서, 본원에 기술된 방법에 따라 생산된 NK 세포는 임의의 다능성, 다분화능, 또는 환자-유래된 HPC, 예컨대 공여자로부터 직접적으로 유래된 일차 HPC로부터 제조될 수 있다.

[0189] 일부 구현예에서, 다능성 세포는 예를 들어, 배아 줄기(ES) 세포, 핵 이식에 의해 수득된 클로닝된 배아로부터 유래된 배아 줄기 세포(ntES 세포), 생식선 줄기 세포("GS 세포"), 배아 생식 세포("EG 세포"), iPS 세포, 및 배양된 섬유아세포 또는 골수 줄기 세포로부터 유래된 다능성 세포(Muse 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, iPS 세포는 건강한 개체의 말초 혈액 단핵 세포로부터 유래될 수 있다. iPS 세포를 생산하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 이들 세포는 재프로그래밍 인자를 임의의 체세포에 도입함으로써 생산될 수 있다. 본원에서 재프로그래밍 인자의 예는 유전자, 예컨대 Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tel1, 베타-카테닌, Lin28b, Sal11, Sal14, Esrrb,

Nr5a2, Tbx3, 및 Glis1와 이의 유전자 산물을 포함한다. 이들 재프로그래밍 인자는 개별적으로 사용될 수 있거나, 이들 중 둘 이상이 조합되어 사용될 수 있다. 재프로그래밍 인자의 조합의 예는 WO2007/069666, WO2008/118820, WO2009/007852, WO2009/032194, WO2009/058413, WO2009/057831, WO2009/075119, WO2009/079007, WO2009/091659, WO2009/101084, WO2009/101407, WO2009/102983, WO2009/114949, WO2009/117439, WO2009/126250, WO2009/126251, WO2009/126655, WO2009/157593, WO2010/009015, WO2010/033906, WO2010/033920, WO2010/042800, WO2010/050626, WO2010/056831, WO2010/068955, WO2010/098419, WO2010/102267, WO2010/111409, WO2010/111422, WO2010/115050, WO2010/124290, WO2010/147395, WO2010/147612, Huangfu D. 등 (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797, Shi Y. 등 (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528, Eminli S. 등 (2008), Stem Cells, 26: 2467-2474, Eluangfu D. 등 (2008), Nat. Biotechnol. 26: 1269-1275, Shi Y. 등 (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574, Zhao Y. 등 (2008), Cell Stem Cell, 3: 475-479, Marson A. (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135, Feng B. 등 (2009), Nat. Cell Biol. 11: 197-203, R. L. Judson 등 (2009), Nat. Biotechnol., 27: 459-461, Lyssiotis CA. 등 (2009), Proc Natl Acad Sci US A. 106: 8912-8917, Kim J. 등 (2009), Nature. 461: 649-643, Ichida J K. 등 (2009), Cell Stem Cell. 5: 491-503, Heng JC. 등 (2010), Cell Stem Cell. 6: 167-74, Han J. 등 (2010), Nature. 463: 1096-100, Mali P. 등 (2010), Stem Cells. 28: 713-720, 및 Maekawa M. 등 (2011), Nature. 474: 225-9에 기술된 것들을 포함한다.

- [0190] iPSC는 임의의 적합한 조직으로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, iPSC는 말초 혈액 단핵 세포로부터 수득된다.
- [0191] 조혈 전구 세포(HPC)는 혈액 세포, 예컨대 림프구, 호산구, 호중구, 호염기구, 적혈구 및 거핵구로 분화할 수 있는 세포이다. 조혈 전구 세포 또는 조혈 줄기 세포는 예를 들어, CD34 및/또는 CD43 표면 항원의 존재를 기반으로 하여 확인될 수 있다.
- [0192] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD56+/CD3- NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 세포 분화의 임의의 단계에서 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, CD56+/CD3- NK 세포는 원하는 키메라 항원 수용체(CAR), T-세포 수용체(TCR) 또는 다른 조작된 단백질을 포함하도록 유전적으로 변형된다.
- [0193] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD56+/CD3- NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 다능성, 다분화능 또는 단분화능 단계에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD56+/CD3- NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 다능성 단계에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 세포는 배아 줄기 세포 단계 또는 iPSC 줄기 세포 단계에서 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 CD56+/CD3- NK 세포를 생산하는 데 사용되는 세포는 다분화능 단계에서 유전적으로 변형된다. 예를 들어, 세포는 조혈 줄기 세포(HSC) 단계에서 유전적으로 변형될 수 있다.
- [0194] **배양 조건 - iPSC에서 HPC 세포 발크로**
- [0195] 일부 구현예에서, iPSC로부터 조혈 전구 세포의 생산을 위한 배지(즉, HPC 유도 배지)는 동물 세포의 배양에 사용되는 기본 배지에 비타민 C를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 기본 배지의 예로는 이스코브 변형 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM), 배지 199, 이글 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM), αMEM 배지, 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM), 햄스 F12(Ham's F12) 배지, RPMI 1640 배지, 피셔 배지(Fischer's medium), 및 뉴로베이셜 배지(Neurobasal Medium)(Life Technologies), 및 이들 배지 중 둘 이상의 혼합물이 포함된다. 일부 구현예에서, 배지는 혈청을 함유한다. 일부 구현예에서, 배지는 무-혈청이다.
- [0196] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 StemPro™-34를 포함할 수 있다. StemPro™-34는 배양에서 인간 조혈 세포의 발달을 지원하도록 제형화된 무-혈청 배지이다.
- [0197] 필요한 경우, 일부 구현예에서, HPC 유도 배지에는 하나 이상의 물질, 예컨대 알부민, 인간 인슐린, 인간 트랜스페린, 셀레늄 또는 아셀렌산나트륨, 지방산, 미량 원소, 2-메르캅토에탄올, 티올 글리세롤, α-모노티오글리세롤, 지질, 아미노산, L-글루타민, 비-필수 아미노산, 비타민, 성장 인자, 저분자량 화합물, 항생제, 항산화제, 피루브산, 완충제, 무기염 및 사이토카인이 함유될 수도 있다.
- [0198] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 혈청, 인슐린, 트랜스페린, 셀레늄, 티올 글리세롤 또는 α-모노티오글리세롤, L-글루타민 및 아스코르브산을 함유하는 IMDM 배지를 포함한다.

- [0199] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 골 형성 단백질 4(BMP4) 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 BMP4가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0200] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 VEGF가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0201] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 섬유아세포 성장 인자(FGF) 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 bFGF 및 FGF2가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0202] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 줄기 세포 인자/kit 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 SCF가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0203] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 Flt3 리간드 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 Flt3 리간드(Flt3L)가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0204] 일부 구현예에서, HPC 유도 배지는 트롬보포이에틴 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 TPO가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0205] TGFβ 억제제는 TGFβ 패밀리의 신호 전달을 방해하는 소분자 억제제이며, 예를 들어, SB431542, SB202190(both R.K. Lindemann 등, Mol. Cancer 2:20 (2003)), SB505124(GlaxoSmithKline), NPC30345, SD093, SD908, SD208(Scios), LY2109761, LY364947, LY580276(Lilly Research Laboratories) 등을 포함한다.
- [0206] SB431542는 전환 성장 인자-베타(TGFβ) 슈퍼패밀리 유형 I 액티빈 수용체-유사 키나제(ALK) 수용체 ALK4, ALK5 및 ALK7의 강력하고 특이적인 억제제이다.
- [0207] 예를 들어, TGFβ 억제제가 SB431542인 경우, 배지 내 이의 농도는 바람직하게는 0.5 μM - 100 μM이다.
- [0208] HP 세포 벌크 집단의 생산을 위한 HPC 유도 배지는 BMP4(골 형성 단백질 4), VEGF(혈관 내피 성장 인자), bFGF(염기성 섬유아세포 성장 인자), SCF(줄기 세포 인자), TPO(트롬보포이에틴), 및 Flt3L(Flt3 리간드)로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인(들)이 추가로 보충될 수 있다.
- [0209] 일 구현예에서, HPC 유도 배지는 인간 인슐린(약 10 μg/ml), 인간 트랜스페린(약 5.5 μg/ml), 아셀렌산나트륨(약 6.7 ng/ml), L-글루타민(약 2 mM), α-모노티오글리세롤(약 0.4 mM), 및 SB431542(약 6 μM)가 보충된 StemPro34를 포함할 수 있다.
- [0210] 일부 구현예에서, 비타민 C는 배양 기간 동안 4일마다, 3일마다, 2일마다, 또는 매일 첨가될 수 있다. 배지에 비타민 C의 첨가는 약 5 μg/ml 내지 약 500 μg/ml에 상응하는 양으로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 비타민 C는 배지에 약 5 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 300 μg/ml, 400 μg/ml, 또는 500 μg/ml로 존재한다.
- [0211] 본 명세서에서 "비타민 C"는 L-아스코르빈산 및 이의 유도체를 의미하고, "L-아스코르빈산 유도체"는 생체의 효소적 반응에 의해 비타민 C가 되는 유도체를 의미한다. L-아스코르빈산 유도체의 예는 비타민 C 포스페이트(예를 들어, 아스코르브산 2-포스페이트), 아스코르브산 글루코사이드, 아스코르빌 에틸, 비타민 C 에스테르, 아스코르빌 테트라헥실테카노에이트, 아스코르빌 스테아레이트 및 아스코르빌 2-포스페이트 6-팔미테이트를 포함한다. 비타민 C 포스페이트가 바람직하다. 비타민 C 포스페이트(예를 들어, 아스코르브산 2-포스페이트)의 예는 L-아스코르브산 포스페이트의 염, 예컨대 L-아스코르브산 포스페이트 Na 및 L-아스코르브산 포스페이트 Mg를 포함한다.
- [0212] 일부 구현예에서, 골 형성 단백질 4(BMP4) 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 BMP4인 경우, 조혈 전구 세포의 생산을 위한 HPC 유도 배지 중 BMP4의 농도는 약 5 ng/ml 내지 500 ng/ml, 예를 들어, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml 또는 500 ng/ml이다.
- [0213] 일부 구현예에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 VEGF인 경우, 조혈 전구 세포의 생산을 위한 HPC 유도 배지 중 VEGF의 농도는 약 5 ng/ml 내지 500 ng/ml, 예를 들어, 약 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml 또는 500 ng/ml이다.
- [0214] 일부 구현예에서, 섬유아세포 성장 인자(FGF) 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 bFGF인 경우, 조혈 전구 세

포의 생산을 위한 HPC 유도 배지 중 bFGF의 농도는 약 5 ng/ml 내지 500 ng/ml, 예를 들어, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml 또는 500 ng/ml이다.

[0215] 일부 구현예에서, 줄기 세포 인자/kit 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 SCR인 경우, 조혈 전구 세포의 생산을 위한 HPC 유도 배지 중 SCF의 농도는 약 5 ng/ml 내지 100 ng/ml, 예를 들어, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 또는 100 ng/ml이다.

[0216] 일부 구현예에서, Flt3 리간드 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 Flt3L인 경우, 조혈 전구 세포의 생산을 위한 HPC 유도 배지 중 Flt3L의 농도는 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 예를 들어, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 또는 100 ng/ml이다.

[0217] 일부 구현예에서, 트롬보포이에틴 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 TPO인 경우, 조혈 전구 세포의 생산을 위한 HPC 유도 배지 중 TPO의 농도는 약 1 ng/ml 내지 200 ng/ml, 예를 들어, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100, 125 ng/ml, 150 ng/ml, 175 ng/ml, 또는 200 ng/ml이다.

[0218] 일부 구현예에서, 다능성 줄기 세포는 부착성 배양 또는 현탁 배양에 의해 배양될 수 있다. 부착성 배양의 경우, 배양은 코팅제가 코팅된 배양 용기에서 수행될 수 있고/있거나 다른 세포와 공동-배양될 수 있다. 공동-배양을 위한 다른 세포의 예는 C3H10T1/2 (Takayama N. 등, J Exp Med. 2817-2830, 2010) 및 상이한 종으로부터 유래된 기질 세포(Niwa A 등, J Cell Physiol. 2009 Nov; 221(2): 367-77)를 포함한다. 코팅제의 예는 매트릭셀(Nivea A 등, PLoS One. 6(7): e22261, 2011), iMatrix 511(Miyazaki T 등, Nature Communication 2012; 3: 1236), 젤라틴, 콜라겐, 엘라스틴 등, 글루코사미노글리칸 및 프로테오글리칸, 예컨대 히알루론산, 콘드로이틴 설페이트 등, 세포 접착 단백질, 예컨대 피브로넥틴 또는 이의 변이체, 비트로넥틴, 라미닌 등등을 포함한다. 현탁 배양 방법의 예는 Chadwick 등, Blood 2003, 102: 906-15, Vijayaragavan 등, Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62, 및 Saeki 등, Stem Cells 2009, 27: 59-67에 기술된 방법을 포함한다.

[0219] 일부 구현예에서, HP 세포 벌크는 또한 다능성 줄기 세포의 배양에 의해 수득된 그물-유사 구조(ES-sac 또는 iPS-sac로도 지칭됨)로부터 제조될 수 있다. 본원에서 "그물-유사 구조"는 다능성 줄기 세포로부터 유래된 3-차원 주머니형(sac-shaped) 구조(내부에 공간을 가짐)이다. 구조는 내피 세포 집단 등으로 형성되고, 내부에 조혈 전구 세포를 함유한다.

[0220] 일부 구현예에서, HP 세포 벌크의 생산을 위한 배양 온도 조건은 약 37℃ 내지 약 42℃이다. 일부 구현예에서, 온도는 예를 들어, 약 37℃ 내지 약 42℃, 바람직하게는 약 37 내지 약 39℃이다. 배양 기간은 표현형 분석을 위한 세포 배양물로부터 샘플을 수득하여 조혈 전구 세포의 수 등을 모니터링함으로써 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있다. 세포 샘플의 표현형 분석과 관련된 다양한 종류의 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 유세포 분석법 및 면역형광법을 포함한다.

[0221] HP 세포 벌크를 수득하기 위한 배양 기간은 다양할 수 있으며, 예를 들어, 6 내지 14일을 포함할 수 있다. 배양 기간의 예는 적어도 6일, 7일 이상, 8일 이상, 9일 이상, 10일 이상, 11일 이상, 12일 이상, 13일 이상, 14일 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 6일 동안이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 7일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 8일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 9일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 10일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 10일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 11일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 12일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 13일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 14일이다. 일부 구현예에서, 배양 기간은 14일 초과 동안이다. 배양은 저산소 조건 하에서 수행될 수 있다. 저산소 조건의 예는 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% 또는 그 이하를 포함한다. 배지 교체의 빈도는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 배지는 2일마다 교체될 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 배지는 3일마다 교체될 수 있다. 일부 구현예에서, 배지는 매일 교체된다.

[0222] 일부 구현예에서, HP 세포 벌크의 생산을 위한 배양은 상기 조건 중 하나 이상을 조합함으로써 수행된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, iPSC로부터 HP 세포 벌크를 수득하는 방법은 하기를 포함한다: (i) 저산소 조건 하에서 비타민 C가 보충된 기본 배지에서 C3H10T1/2 상의 다능성 줄기 세포를 배양하는 단계; 및 (ii) (1)의 배양액에 VEGF, SCF 및 Flt3L을 추가로 첨가하고, 정상 산소 조건 하에서 세포를 배양하는 단계. 단계 (i)가 수행되는 기

간은 적어도 6일 이상, 바람직하게는 7일 이상, 보다 바람직하게는 7일 이상이다. 단계 (ii)가 수행되는 기간은 적어도 6일 이상, 7일 이상 및 7일 동안이다.

- [0223] 일부 구현예에서, HP 세포 벌크에서 수득된 조혈 전구 세포는 추가 사용 전에 단리될 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 수득된 조혈 전구 세포는 또한 다른 세포 중(HP 세포 벌크)을 함유하는 세포 집단으로서 사용될 수 있다. HP 세포 벌크 집단은 비분리된 세포 제제이다. 일부 구현예에서, 방법은 단리 단계를 포함하지 않는다.
- [0224] **배양 조건 - HP 세포 벌크에서 CD4/CD8 세포로**
- [0225] 일부 구현예에서, CD4/CD8 유도 배지는 CD4+/CD8+, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 세포 집단을 생성한다. "CD4/CD8 이중-양성 세포"(DP 세포)는 CD4 및 CD8을 모두 발현하는 세포를 의미한다. CD4/CD8 이중-양성 세포는 CD4, CD8, CD3 및 CD45 양성인 세포로 식별될 수 있다. "CD4/CD8 이중-음성 세포"(DN 세포)는 CD4- 및 CD8-을 모두 발현하지 않는 세포를 의미한다. "CD4-/CD8+ 세포"는 CD4-를 발현하지 않지만 CD8+를 발현하는 세포를 의미한다. "CD4+/CD8- 세포"는 CD4를 발현하지만 CD8을 발현하지 않는 세포를 의미한다.
- [0226] 일부 구현예에서, CD4+/CD8+, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 세포 집단은 CD56+/CD3- 세포로 분화되도록 유도될 수 있다.
- [0227] 일부 구현예에서, 다른 세포 중에서 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단은 비타민 C가 보충된 배지에서 조혈 전구 세포 또는 HP 세포 벌크를 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다. 기본 배지에 첨가되는 비타민 C는 전술한 HP 세포 벌크의 유도에서의 것과 동일하다.
- [0228] 일부 구현예에서, HP 세포 벌크로부터 CD4+/CD8+, CD4-/CD8- 세포, CD4-/CD8+ 세포, 및 CD4+/CD8- 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하기 위해 사용되는 배지는 CD4/CD8 유도 배지이다. 일부 구현예에서, CD4/CD8 유도 배지는 동물 세포의 배양에 사용되는 기본 배지에 비타민 C를 첨가하여 제조될 수 있다. 기본 배지의 예로는 이스코브 변형 둘베코 배지(IMDM), 배지 99, 이글 최소 필수 배지(EMEM), αMEM 배지(Thermo Fisher Scientific (Gibco)), 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 햄스 F12(Ham's F12) 배지, RPMI 1640 배지, 피셔 배지(Fischer's medium), 및 뉴로베이셜 배지(Life Technologies), 및 이들 배지 중 둘 이상의 혼합물이 포함된다. 배지는 혈청을 함유하거나, 무-혈청일 수 있다.
- [0229] 필요한 경우, 기본 배지에는 하나 이상의 물질, 예컨대 알부민, 인간 인슐린, 인간 트랜스페린, 셀레늄, 아셀렌 산나트륨, 지방산, 미량 원소, 2-메르캅토에탄올, 티올 글리세롤, 지질, 아미노산, L-글루타민, 비-필수 아미노산, 비타민, 성장 인자, 저분자량 화합물, 항생제, 항산화제, 피루브산, 완충제, 무기염 및 사이토카인이 함유될 수도 있다.
- [0230] 다른 세포 중에서, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산을 위한 CD4/CD8 유도 배지는 아스코르브산, SCF, IL-7, Flt3L, TPO, 피브로넥틴 또는 이의 변이체, Notch 리간드, p38 억제제 및 SDF-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인(들)이 추가로 보충될 수 있다.
- [0231] 일부 구현예에서, 비타민 C는 배양 기간 동안 4일마다, 3일마다, 2일마다, 또는 매일 첨가될 수 있다. 배지에 비타민 C의 첨가는 약 5 μg/ml 내지 약 500 μg/ml에 상응하는 양으로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 비타민 C는 배지에 약 5 μg/ml, 10 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 300 μg/ml, 400 μg/ml, 또는 500 μg/ml로 존재한다.
- [0232] 일부 구현예에서, 기본 배지는 줄기 세포 인자/kit 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 SCF가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0233] 일부 구현예에서, 기본 배지는 Flt3 리간드 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 Flt3 리간드(Flt3L)가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0234] 일부 구현예에서, 기본 배지는 트롬보포이에틴 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 하나 이상의 물질을 함유한다. 이러한 물질에는 TPO가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0235] 일부 구현예에서, 기본 배지는 p38 α 및 p38 β의 억제제인 하나 이상의 p38 억제제를 함유하며, 이는 결국 MAPKAP 키나제-2 및 열 충격 단백질 27의 다운스트림 활성화를 억제한다. 본 발명에서 사용되는 p38의 화학적 억제제의 예로는 SB203580 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸설포닐페닐)-5-(4-피리딜)-1H-이미다졸), 및 이의 유도체, SB202190 (4-(4-플루오로페닐)-2-(4-하이드록시페닐)-5-(4-피리딜)-1H-이미다졸) 및 이의 유도체,

SB239063 (트랜스-4-[4-(4-플루오로페닐)-5-(2-메톡시-4-피리미디닐)-1H-이미다졸-1-일]시클로헥산올) 및 이의 유도체, SB220025 및 이의 유도체, PD169316, RPR200765A, AMG-548, BIRB-796, SC10-469, SC10-323, VX-702 및 FR167653이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 화합물은 상업적으로 구입가능하며, 예를 들어, SB203580, SB202190, SC239063, SB220025 및 PD169316은 Calbiochem로부터 구입가능하고, SC10-469 및 SC10-323은 Scios 등으로부터 구입가능하다. p38 억제제의 다른 예는 p38의 DNA 결합 영역에 위치한 180-위치의 트레오닌을 알라닌으로 점 돌연변이에 의해 수득된 p38T180A, 인간 및 마우스에서 p38의 182-위치의 티로신을 페닐알라닌 등으로 점 돌연변이에 의해 수득된 p38Y182F를 포함하는 p38의 우성-음성 돌연변이체(dominant-negative mutant)를 포함한다. p38 억제제는 예를 들어, 약 0.5 μ M - 약 50 μ M로 배지에 함유된다.

[0236]

일부 구현예에서, 기본 배지는 SDF-1을 함유한다.

[0237]

일부 구현예에서, SDF-1은 SDF-1 α 또는 이의 성숙한 형태일 수 있을 뿐만 아니라, SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , SDF-1 ϕ 등과 같은 동종형 또는 이의 성숙한 형태, 또는 이들의 임의의 비율의 혼합물 등일 수 있다. 바람직하게는 SDF-1 α 가 사용된다. SDF-1은 때때로 CXCL-12 또는 PBSF로 지칭된다.

[0238]

일부 구현예에서, SDF-1의 아미노산 서열에서 하나 또는 여러 개의 아미노산은 케모카인으로서의 활성을 갖는 한 치환, 결실 및/또는 부가될 수 있고, 유사하게, 당쇄는 치환, 결실 및/또는 부가될 수 있다. 아미노산 돌연변이는 적어도 4개의 시스테인 잔기(인간 SDF-1 α 에서 Cys30, Cys32, Cys55 및 Cys71)가 유지되고 천연 물질의 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 나타내는 한 허용가능하다. SDF-1은 포유동물, 예를 들어, 인간 또는 비-인간 포유류, 예컨대, 원숭이, 양, 소, 말, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 랫트, 마우스 등으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, GenBank 등록번호: NP_954637로 등록된 단백질은 인간 SDF-1 α 로 사용될 수 있으며, GenBank 등록번호: NP_000600으로 등록된 단백질은 SDF-1 β 로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, Flt3 리간드 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 Flt3L인 경우, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산을 위한 배지 중 Flt3L의 농도는 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 예를 들어, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 또는 100 ng/ml이다.

[0239]

일부 구현예에서, 줄기 세포 인자/kit 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 SCF인 경우, SCF는 전술된 바와 같은 동일한 조건 하에서 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산에 사용된다.

[0240]

일부 구현예에서, 트롬보포이에틴 신호전달 경로의 신호 전달을 유발하는 물질이 TPO인 경우, TPO는 전술된 바와 같은 동일한 조건 하에서 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산에 사용된다.

[0241]

본 발명에서 사용되는 피브로넥틴 또는 이의 변이체는 CD3 양성 세포에 결합할 수 있는 분자라면, 특별히 제한되지는 않는다. 피브로넥틴의 변이체는 CD3 양성 세포 표면 상의 VLA-5 및 VLA-4에 결합할 수 있는 분자라면 특별히 제한되지 않으며, 이의 예는 RetroNectin을 포함한다. 피브로넥틴 및 이의 변이체는 배지에 임의의 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 이들은 배양 중에 배지에 함유될 수 있거나, 배양 용기에 고정화될 수 있으며, 이는 바람직하게는 배양 용기에 고정화된다.

[0242]

피브로넥틴 또는 이의 변이체가 배지에 함유되는 경우, 피브로넥틴 또는 이의 변이체 농도의 하한은 10 ng/ml 이상이고, 바람직하게는 100 ng/ml 이상이고, 상한은 10000 μ g/ml 이하이고, 바람직하게는 1000 μ g/ml 이하일 수 있다.

[0243]

일부 구현예에서, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산에 사용되는 배지 중 IL-7의 농도는 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 예를 들어, 1 ng/ml, 2 ng/ml, 3 ng/ml, 4 ng/ml, 5 ng/ml, 6 ng/ml, 7 ng/ml, 8 ng/ml, 9 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 또는 100 ng/ml이다.

[0244]

SDF-1은 상업적으로 구입가능하거나, 자연에서 정제되거나, 펩티드 합성 또는 유전적 공학 기술에 의해 생산될 수 있다. SDF-1은 예를 들어 약 10 ng/ml 내지 약 100 ng/ml의 범위 내에서 배지에 함유된다. 또한, SDF-1 대신 SDF-1-유사 활성을 갖는 SDF-1 대안을 사용할 수도 있다. 이러한 SDF-1 대안의 예는 CXCR4 아고니스트를 포함하고, SDF-1 대신에 CXCR4 아고니스트 활성을 갖는 저분자량 화합물 등을 배지에 첨가할 수 있다.

[0245]

일부 구현예에서, SDF-1이 SDF1 α 인 경우, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산을 위한 배지 중 SDF-1 α 의 농도는 약 1 nM 내지 100 nM, 예를 들어, 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 7 nM, 8 nM, 9 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 또는 100 nM이다.

- [0246] 일부 구현예에서, p38 억제제가 SB203580인 경우, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산을 위한 배지 중 SB203580의 농도는 약 0.5 μ M 내지 100 μ M, 예를 들어, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 9 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, or 50 μ M, 60 μ M, 70 μ M, 80 μ M, 90 μ M, 또는 100 μ M이다.
- [0247] 일부 구현예에서, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산을 위한 기본 배지는 약 15% FBS, 약 4 mM의 L-글루타민, 약 100 U/ml의 페니실린, 약 100 μ g/ml의 스트렙토마이신, 약 55 μ M의 2-메르캅토에탄올, 약 50 μ g/ml의 아스코르브산 2-포스페이트, 약 10 μ g/ml의 인간 인슐린, 약 5.5 μ g/ml의 인간 트랜스페린, 약 6.7 ng/ml의 아셀렌산나트륨, 약 50 ng/ml의 SCF, 약 50 ng/ml의 IL-7, 약 50 ng/ml의 Flt3L, 약 100 ng/ml의 TPO, 약 15 μ M의 SB203580, 약 30 nM의 SDF-1 α 가 보충된 α MED 배지를 포함한다.
- [0248] CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산에서, 조혈 전구 세포는 부착성 배양 또는 현탁 배양에 의해 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 용기/디쉬는 DLL1 또는 DLL4, 또는 DLL4 또는 DLL1의 융합 단백질, 및 Fc 등으로 코팅된다. DLL1 또는 DLL4는 재조합 인간 (rh)-DLL1 또는 rh-DLL4일 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 용기/디쉬는 rh-DLL4/Fc 키메라(Sino Biological) 및 RetroNectin (Takara Bio Inc)으로 코팅된다. 부착성 배양의 경우에, 코팅된 배양 용기가 사용될 수 있고/있거나, 조혈 전구 세포는 피더 세포 등과 공동-배양될 수 있다. 공동-배양을 위한 피더 세포의 예는 골수 기질 세포주, OP9 세포(Riken BioResource Center로부터 입수가 가능함)를 포함한다. OP9 세포는 바람직하게는 DIII를 지속적으로 발현하는 OP-DL1 세포일 수 있다(Holmes R I 및 Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2)). 일부 구현예에서, OP9 세포가 피더 세포로 사용되는 경우, DIII, 또는 DIII 및 Fc의 융합 단백질 등은 개별적으로 제조된 배지에 첨가하여 공동-배양을 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, DIII는 인간의 경우 NCBI 등록번호 NM#005618, 또는 마우스의 경우 NCBI 등록번호 NM#007865의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 유전자에 의해 암호화되는 단백질; 및 이들 단백질에 대해 높은 서열 동일성(예를 들어, 90% 이상의 서열 동일성을 가짐)을 갖고 동등한 기능을 갖는 자연 발생 돌연변이체를 포함할 수 있다. 피더 세포가 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생산하기 위해 사용되는 경우, 피더 세포는 배양 동안 적절하게 교체될 수 있다. 피더 세포의 교체는 배양 중인 대상체 세포를 사전에 플레이팅된 피더 세포 상에 이동시킴에 의해 수행될 수 있다. 교체는 5일마다, 4일마다, 3일마다 또는 2일마다 수행될 수 있다.
- [0249] 일부 구현예에서, CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단의 생산을 위한 HP 세포 벌크의 배양을 위한 배양 온도 조건은 약 37°C 내지 약 42°C, 및 약 37°C 내지 약 39°C이다. 일부 구현예에서, 배양은 저산소 조건 하에서 수행될 수 있다. 저산소 조건의 예는 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5% 및 이들보다 낮은 산소 농도를 포함한다. 배양 기간은 CD4/CD8 이중-양성 세포 등을 포함하는 상이한 유형의 세포 수를 모니터링함으로써 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있다. 배양 기간의 예는 10일 이상, 12일 이상, 14일 이상, 16일 이상, 18일 이상, 20일 이상, 21일 이상, 23일 이상, 25일 이상, 28일 이상, 30일 이상, 35일 이상 또는 42일 이상을 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 배양으로부터 수득된 CD4/CD8 이중-양성 세포는 다른 세포 중(DP 세포 벌크)을 또한 함유하는 세포 집단이다.
- [0250] CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단으로부터 특정 세포 유형(예를 들어, CD4⁻/CD8⁺ 세포)의 집단을 분리하는 경우, 분리는 분리되는 세포 유형에 따라 CD4, CD8, CD3 및 CD45를 포함하나, 이에 제한되지 않는 임의의 하나의 지표(index)를 사용하여 수행될 수 있다. 분리 방법은 당업자에게 잘 알려진 방법, 예를 들어, 세포를 특정 항체(예를 들어, CD4, CD8, CD3, 또는 CD45 항체)로 표지한 후, 유세포 분석기를 사용하여 분리하는 방법, 또는 원하는 항원이 고정화된 친화성 컬럼 등을 사용하여 세포를 정제하는 방법일 수 있다.
- [0251] **CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 세포 집단으로부터 CD56⁺/CD3⁻ 세포를 유도하는 단계**
- [0252] 일부 구현예에서, NK 세포는 CD56⁺/CD3⁻ 면역 세포이다.
- [0253] 일부 구현예에서, NK 세포는 비타민 C가 보충된 배지에서 CD4/CD8 이중-양성 세포 또는 DP 세포 벌크를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, NK 유도 배지는 CD56⁺/CD3⁻ 세포를 생산하는 데 사용된다.
- [0254] 일부 구현예에서, 배지는 동물 세포의 배양에 사용되는 기본 배지에 비타민 C를 첨가하여 제조된다. 기본 배지의 예로는 이스코브 변형 돌베코 배지(IMDM), 배지 99, 이글 최소 필수 배지(EMEM), α MED 배지, 돌베코 변형 이글 배지(DMEM), 햄스 F12(Ham's F12) 배지, RPMI 1640 배지, 피셔 배지(Fischer's medium), 및 뉴로베이셀 배지(Life Technologies), 및 이들 배지 중 둘 이상의 혼합물이 포함된다. 일부 구현예에서, 배지는 혈청을 함

유한다. 일부 구현예에서, 배지는 무-혈청이다. 필요한 경우, 기본 배지에는 하나 이상의 물질, 예컨대 알부민, 인간 인슐린, 인간 트랜스페린, 셀레늄 또는 아셀렌산나트륨, 지방산, 미량 원소, 2-메르캅토에탄올, 티올 글리 세롤, 지질, 아미노산, 글루타민, 비-필수 아미노산, 비타민, 성장 인자, 저분자량 화합물, 항생제, 항산화제, 피루브산, 완충제, 무기염 및 사이토카인이 포함될 수도 있다.

- [0255] 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포의 생산에 사용되는 배지는 항-CD3 항체(UCHT1) 및 사이토카인을 추가로 함 유한다. 적합한 사이토카인의 예는 IL-2 및 IL-7을 포함한다.
- [0256] CD3 항체는 CD3를 특이적으로 인식하는 항체라면 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, NK 유도 배지 중 CD3 항체 의 농도는 약 10 ng/ml 내지 1000 ng/ml, 예를 들어, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 700 ng/ml, 800 ng/ml, 900 ng/ml, 또는 1000 ng/ml이다.
- [0257] 일부 구현예에서, 비타민 C는 전술된 바와 같은 동일한 조건 하에서 CD56 양성 K 세포의 생산을 위해 사용된다.
- [0258] 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포의 생산을 위한 NK 유도 배지 중 IL-2의 농도는 약 1 U/ml 내지 1000 U/ml, 예를 들어, 약 1 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 20 U/ml, 30 U/ml, 40 U/ml, 50 U/ml, 60 U/ml, 70 U/ml, 80 U/ml, 90 U/ml, 100 U/ml, 500 U/ml, 또는 1000 U/ml이다. 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포의 생산을 위한 NK 유도 배지 중 IL-2의 농도는 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 예를 들어, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 또는 100 ng/ml이다.
- [0259] 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포의 생산을 위한 NK 유도 배지 중 IL-7의 농도는 약 1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 예를 들어, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 또는 100 ng/ml이다.
- [0260] 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포의 생산을 위한 CD4/CD8 이중-양성 세포를 포함하는 집단의 배양을 위한 배 양 온도 조건은 약 37°C 내지 약 42°C, 또는 약 37°C 내지 약 39°C이다. 배양 기간은 CD56 양성 NK 세포 수 등 을 모니터링함으로써 당업자에 의해 적절하게 결정될 수 있다. 배양 일수는 CD56 양성 NK 세포가 수득될 수 있 는 한 제한되지 않는다. 배양 기간의 예는 적어도 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이 상 또는 7일 이상을 포함한다.
- [0261] 일부 구현예에서, 수득된 CD56+ NK 세포는 추가로 사용 전에 분리될 수 있다. 일부 다른 구현예에서, 수득된 CD56 양성 NK 세포는 T 세포(NK 세포 벌크)를 포함하는 다른 세포 종을 또한 함유하는 세포 집단으로서 사용될 수 있다.
- [0262] 일부 구현예에서, NK 세포 벌크는 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 90% 이상의 NK 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, NK 세포 벌크는 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50%의 T 세포를 포 함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 벌크는 약 75%의 CD56+/CD3-NK 세포 및 약 25%의 CD56+/CD3+ T 세포를 포함 한다. 일부 구현예에서, NK 세포 벌크는 또한 B 세포 및 단핵구를 포함할 수 있다.
- [0263] CD56+ NK 세포를 분리하는 경우, 분리 방법은 당업자에게 잘 알려진 방법, 예를 들어, 세포를 항-CD56 항체 및 항-CD3 항체로 표지한 후, 유세포 분석기(형광-활성화 세포 분류)를 사용하여 분리하는 방법, 또는 원하는 항원 이 고정화된 친화성 컬럼 등을 사용하여 세포를 정제하는 방법일 수 있다.
- [0264] 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포는 CD56+/CD3+이다. 일부 구현예에서, CD56 양성 NK 세포는 CD56+/CD3-이 다.
- [0265] **CAR-NK 세포 제조**
- [0266] 일부 구현예에서, NK 세포는 하나 이상의 전이유전자(transgene)를 포함하도록 조작된다. 예를 들어, NK 세포는 종양-유도성 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있으며, 이에 따라 항종양 이펙터 세 포를 생산할 수 있다. 일 실시예에서, NK 세포 또는 iPS NK 세포는 CAR를 발현하도록 조작될 수 있다. 일부 구 현예에서, NK 세포에 대한 세포 전구체는 CAR를 발현하도록 조작된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, iPS 세포는 CAR를 발현하도록 조작된다. 일부 구현예에서, HP 세포 벌크 내 세포는 CAR를 발현하도록 조작된다. 일부 구현 예에서, NK 세포는 CAR를 발현하도록 조작된다. 더욱이, 일부 구현예에서, 이들 형질전환 수용체는 단백질-유래 가 아닌 종양-관련 항원으로 유도될 수 있다. 특정 구현예에서, NK 세포 또는 iPS NK 세포는 적어도 하나의 CAR 를 포함하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 단일 CAR는 2개 이상의 항원을 표적화한다.
- [0267] 일부 구현예에서, iNK 세포는 키메라, 비-천연 및 조작된 수용체를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 키메라

항원 수용체(CAR)는 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 구성요소를 갖고, 일부 구현예에서 하나 이상의 구성요소는 하나 이상의 종양 항원을 포함하는 암 세포에 대한 림프구의 표적화 또는 결합을 용이하게 한다.

- [0268] 일부 구현예에서, CAR는 일반적으로 적어도 하나의 세포의 리간드-결합 도메인을 포함하는 적어도 하나의 막횡단 폴리펩티드 및; 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 하나의 막횡단 폴리펩티드를 포함하고; 폴리펩티드가 함께 조립되어 키메라 항원 수용체를 형성하도록 한다.
- [0269] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포의 리간드-결합 도메인"은 리간드에 결합할 수 있는 올리고- 또는 폴리펩티드로 정의된다. 바람직하게는, 도메인은 세포 표면 분자와 상호작용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포의 리간드-결합 도메인은 특정 질병 상태와 관련된 표적 세포에서 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다.
- [0270] 특히, 세포의 리간드-결합 도메인은 표적의 항원에 대한 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.
- [0271] 일부 구현예에서, NK 세포 또는 iPS NK 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, CAR는 하기 중 하나 이상으로부터 선택된 종양 항원을 표적화하는 세포의 리간드-결합 도메인을 포함한다: CD44, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD89, CD123, CS-1, ROR1, 메소텔린, c-Met, PSMA, Her2, GD-2, CEA, MAGE A3 TCR, EGFR, HER2/ERBB2/neu, EPCAM, EphA2, CEA, BCMA. 일부 구현예에서, 종양 항원은 CD19이다.
- [0272] 일부 구현예에서, 세포의 리간드-결합 도메인은 가요성 링커에 의해 연결된 표적 항원 특이적 단클론성 항체의 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 가변 단편을 포함하는 단일 사슬 항체 단편(scFv)이다.
- [0273] 일부 구현예에서, CAR는 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 막횡단 도메인은 세포의 리간드-결합 도메인 및 막횡단 도메인 사이에 줄기 영역(stalk region)을 추가로 포함한다. 본원에 사용된 용어 "줄기 영역"은 일반적으로 막횡단 도메인을 세포의 리간드-결합 도메인에 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 특히, 줄기 영역은 세포의 리간드-결합 도메인에 대한 더 많은 가요성 및 접근성을 제공하는 데 사용된다. 줄기 영역은 최대 300개의 아미노산, 10 내지 100개의 아미노산, 및/또는 25 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다. 줄기 영역은 자연 발생 분자의 전부 또는 일부로부터, 예컨대 CD8, CD4 또는 CD28의 세포 외 영역의 전부 또는 일부로부터, 또는 항체 불변 영역의 전부 또는 일부로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 줄기 영역은 자연 발생 줄기 서열에 상응하는 합성 서열일 수 있거나, 완전히 합성 줄기 서열일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 상기 줄기 영역은 인간 CD8 알파 사슬의 일부이다.
- [0274] 일부 구현예에서, CAR는 iPS NK 세포 및 면역 반응의 활성화를 초래하는 표적에 대한 세포의 리간드 결합 도메인의 결합 후 세포내 신호전달에 기여하는 신호 전달 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 용어 "신호 전달 도메인"은 이펙터 신호 기능 신호를 전달하고, 세포가 특수 기능을 수행하도록 유도하는 단백질의 부분을 지칭한다. 일부 구현예에서, iPS NK 세포는 신호 전달 도메인을 포함하는 CAR를 갖는다.
- [0275] 일부 구현예에서, iPS NK 세포는 IL-15R α /IL-15 복합체를 발현하도록 유전적으로 변형된다.
- [0276] 일부 구현예에서, 막횡단 폴리펩티드는 면역 세포의 표면, 예를 들어 iPS NK 세포에서 발현되고, 미리 정의된 표적 세포에 대한 면역 세포의 세포 반응을 유도하기 위해 함께 상호작용하는 능력을 포함한다. 세포의 리간드-결합 도메인 및/또는 신호 전달 도메인을 포함하는 CAR의 상이한 막횡단 폴리펩티드는 표적 리간드와의 결합 후 신호 전달에 참여하고 면역 반응을 유도하기 위해 함께 상호작용한다. 막횡단 도메인은 천연으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 막횡단 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다.
- [0277] 일부 구현예에서, CAR를 발현하기 위한 NK 세포의 유전적 변형은 하기 단계를 포함할 수 있다: (1) 특정 CAR에 상응하는 유전자를 합성하는 단계; (2) CAR에 상응하는 유전자를 함유하는 벡터를 준비하는 단계; 및 (3) CAR 유전자를 함유하는 벡터로 CD56+ NK 세포를 형질도입하는 단계.
- [0278] CAR를 암호화하는 발현 벡터는 하나 이상의 DNA 분자 또는 작제물로 도입될 수 있으며, 상기 작제물(들)을 함유하는 숙주 세포의 선택을 허용할 적어도 하나의 마커가 있을 수 있다.
- [0279] 작제물은 통상적인 방법으로 제조될 수 있으며, 이때 유전자 및 조절 영역은 적절하게 단리되고, 결찰되고, 적절한 클로닝 숙주에서 클로닝되고, 제한 또는 시퀀싱 또는 기타 편리한 수단에 의해 분석될 수 있다. 특히, PCR을 사용하여, 기능적 단위의 전부 또는 일부를 포함하는 개별 단편이 단리될 수 있으며, 이때 하나 이상의 돌연변이는 "프라이머 복구", 결찰, 시험관내 돌연변이유발 등을 적절하게 사용하여 도입될 수 있다. 일단 완료되고

적절한 서열을 갖는 것으로 입증된 작제물(들)은 이후 임의의 편리한 수단에 의해 CTL에 도입될 수 있다. 작제물은 세포로의 감염 또는 형질도입을 위해, 아데노바이러스, 아데노-관련된 바이러스(AAV), 또는 단순포진 바이러스(HSV) 또는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터를 포함한, 다른 것들과 같은 비-복제, 결합성 바이러스 게놈에 통합되고 패키징될 수 있다. 작제물은 원하는 경우, 형질감염을 위한 바이러스 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 작제물은 융합, 전기천공, 유전자충격(biolistics), 형질감염, 리포펙션 등에 의해 도입될 수 있다. 숙주 세포는 작제물(들)의 도입 전에 배양물에서 성장시키고 확장시킬 수 있으며, 뒤이어 작제물(들)의 도입 및 작제물(들)의 통합을 위해 적절하게 처리될 수 있다. 이후, 세포를 확장시키고 작제물에 존재하는 마커를 통해 스크리닝한다. 성공적으로 사용될 수 있는 다양한 마커에는 hprt, 네오마이신 내성, 티미딘 키나제, 히그로마이신 내성 등이 포함된다.

[0280] 일부 경우에, 작제물은 상동 재조합을 위한 표적 부위를 가질 수 있으며, 이때 작제물은 특정 유전자좌에 통합되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 내인성 유전자를 녹아웃시키고, 이를 (동일한 유전자좌 또는 다른 곳에서) 상동 재조합을 위해 당업계에 공지된 바와 같은 재료 및 방법을 사용하여 작제물에 의해 암호화되는 유전자로 대체시킬 수 있다. 상동 재조합을 위해, OMEGA. 또는 O-벡터를 사용할 수 있다.

[0281] 작제물은 적어도 CAR 및 선택적으로 또 다른 유전자를 암호화하는 단일 DNA 분자, 또는 하나 이상의 유전자를 갖는 상이한 DNA 분자로서 도입될 수 있다. 다른 유전자에는 예를 들어, 치료적 분자 또는 자살 유전자를 암호화하는 유전자가 포함된다. 작제물은 각각 동일하거나 상이한 마커를 가지며, 동시에 또는 연속적으로 도입될 수 있다.

[0282] 작제물 DNA의 스톡(stock)을 제조하고 형질감염을 수행하는 데 사용될 수 있는, 유용한 요소, 예컨대 박테리아 또는 효모의 복제 기점, 선택가능하고/하거나 증폭가능한 마커, 원핵생물 또는 진핵생물에서의 발현을 위한 프로모터/인핸서 요소 등을 함유하는 벡터는 당업계에 잘 알려져 있으며 다수가 상업적으로 이용가능하다.

[0283] 사용 방법

[0284] 본 발명에 따른 세포는 이를 필요로 하는 환자에서 암, 바이러스 감염 또는 자가면역 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 상기 단리된 세포는 이를 필요로 하는 환자에서 암, 자가면역 장애의 바이러스 감염의 치료를 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다.

[0285] 본 발명은 이를 필요로 하는 환자를 치료하기 위한 방법에 의존하며, 상기 방법은 하기 단계 중 적어도 하나를 포함한다: (a) 본 발명에 따른 키메라 항원 수용체 세포를 제공하는 단계 및 (b) 상기 환자에게 세포를 투여하는 단계.

[0286] 상기 치료는 개선, 치유 또는 예방적일 수 있다. 이는 자가 면역요법의 일부 또는 동종 면역요법 치료의 일부일 수 있다. 자가 조직이란, 환자를 치료하기 위해 사용되는 세포, 세포주 또는 세포 집단이 상기 환자 또는 인간 백혈구 항원(HLA) 적합성 공여자로부터 유래된 것임을 의미한다. 동종이계란 환자를 치료하기 위해 사용되는 세포 또는 세포 집단이 상기 환자로부터 유래하는 것이 아니라 기증자로부터 유래된 것임을 의미한다.

[0287] 일부 구현예에서, 상기 기술된 세포는 동종이계이다. 일부 구현예에서, 상기 기술된 세포는 자가 조직이다.

[0288] 치료는 암, 바이러스 감염, 자가면역 장애 또는 이식편대숙주병(GvHD)으로 진단된 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 암은 혈관이 형성되지 않았거나, 아직 실질적으로 혈관이 형성되지 않은 종양 뿐만 아니라 혈관이 형성된 종양을 포함한다. 암은 비고형 종양(예컨대 혈액 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함하거나 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR로 치료되는 암의 유형은 이에 제한되지는 않으나, 암종, 모세포종 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프구성 악성종양, 양성 및 악성 종양(malignant tumor), 및 악성종양(malignancies), 예를 들어, 육종, 암종 및 흑색종을 포함한다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암도 포함된다.

[0289] 일부 구현예에서, 치료는 항체 요법, 화학요법, 사이토카인 요법, 수지상 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 레이저 광 요법 및 방사선 요법의 군으로부터 선택된 암에 대한 하나 이상의 요법과 조합된다.

[0290] 일부 구현예에서, 상기 치료는 면역억제 치료를 받는 환자에게 투여될 수 있다.

[0291] 추가 구현예에서, 세포 조성물은 하나 이상의 추가 요법과 조합하여 환자에게 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 조성물은 골수 이식, 플루다라빈과 같은 화학요법제, 외부-빔 방사선 요법(XRT), 시클로포스파미드, 또는 항체, 예컨대 OKT3 또는 CAM PATH를 사용하는 T 세포 절제 요법과 함께 (예를 들어, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에게 투여된다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20, 예를 들어 리툭산과 반응하는 제제와 같은 B-세포 절제 요법 이후에 투여된다. 예를 들어, 일 구현예에서, 대상체는 고용량 화학요법

에 이어 말초 혈액 줄기 세포 이식으로 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 구현예에서, 이식 후에, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가 구현예에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다. 본원에 기술된 방법 중 임의의 하나에 의해 수득된 상기 변형된 세포는 숙주대이식편(HvG) 거부 및 이식편대숙주질환(GvHD)에 대해 이를 필요로 하는 환자를 치료하기 위해 본 발명의 특정 측면에서 사용될 수 있다; 따라서 본 발명의 범위는 불활성화된 TCR 알파 및/또는 TCR 베타 유전자를 포함하는 변형된 세포의 유효량을 상기 환자에게 투여함으로써 상기 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 숙주대이식편(HvG) 거부 및 이식편대숙주질환(GvHD)에 대해 이를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법이다.

[0292] **세포의 투여**

[0293] 일부 구현예에서, 세포는 매우 다양한 방법으로 숙주 유기체, 예를 들어, 포유동물 내로 도입될 수 있다. 세포는 특정 구현예에서 종양 부위에 도입될 수 있지만, 대안적인 구현예에서 세포는 암에 대해 개량되거나 암에 대해 개량되도록 변형된다. 적용되는 세포의 수는 여러 상황, 도입 목적, 세포의 수명, 사용되는 프로토콜, 예를 들어, 투여 횟수, 증식하는 세포의 능력, 재조합 작제물의 안정성 등에 따라 달라질 것이다. 세포는 일반적으로 관심 부위 또는 그 근처에 주입되는 분산물로 적용될 수 있다. 세포는 생리학적으로-허용가능한 배지에 있을 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명의 NK 세포 또는 iPS NK 세포는 하나 이상의 CAR, TCR, 또는 고친화성 CD16과 같은 임의의 다른 조작된 단백질 또는 폴리펩티드 도메인을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 면역 인식을 억제하기 위해 캡슐화되고 종양 부위에 배치된다.

[0294] 세포는 원하는 대로 투여될 수 있다. 원하는 반응에 따라, 투여 방식, 세포의 수명, 존재하는 세포의 수, 다양한 프로토콜이 적용될 수 있다. 투여 횟수는 적어도 부분적으로 전술한 인자에 따라 달라질 것이다.

[0295] 본 발명에 따른 세포 또는 세포 집단의 투여는 에어로졸 흡입, 주입, 섭취, 수혈, 착상 또는 이식을 포함하는, 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 환자에게 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 척수내로, 근육내로, 정맥내 또는 림프관내 주사에 의해, 또는 복강내로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 세포 조성물은 바람직하게는 정맥내 주사에 의해 투여된다.

[0296] **핵산-기반 발현 시스템**

[0297] 일부 구현예에서, 본 발명의 NK 세포 또는 iPS NK 세포는 하나 이상의 CAR, TCR, 또는 고친화성 CD16 또는 CD19와 같은 임의의 다른 조작된 단백질 또는 폴리펩티드 도메인을 발현하도록 조작된다. 이들 폴리펩티드를 포함하는 발현 벡터를 생성하기 위한 재조합 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 일반적으로 하기에 기술된다.

[0298] **벡터**

[0299] 용어 "벡터"는 핵산 서열이 복제될 수 있는 세포 내로의 도입을 위해 삽입될 수 있는 운반체 핵산 분자를 지칭하기 위해 사용된다. 핵산 서열은 "외인성"일 수 있으며, 이는 벡터가 도입되는 세포에 대해 이질적이거나, 서열이 일반적으로 발견되지 않는 숙주 세포 핵산 내의 위치에 있지만 서열이 세포 내의 서열과 상동임을 의미한다. 벡터에는 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스) 및 인공 염색체(예를 들어, YAC)가 포함된다. 당업자는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 구축하는 데 능숙할 것이다(예를 들어, Maniatis 등, 1988 및 Ausubel 등, 1994 참조, 둘 다 본원에 참조로 포함됨).

[0300] 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 RNA를 암호화하는 핵산을 포함하는 임의의 유형의 유전적 작제물을 지칭한다. 일부 경우에, RNA 분자는 이후 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드로 번역된다. 다른 경우에, 이들 서열은 예를 들어, 안티센스 분자 또는 리보자임의 생산에서 번역되지 않는다. 발현 벡터는 다양한 "제어 서열"을 함유할 수 있으며, 이는 특정 숙주 세포에서 작동가능하게 연결된 암호화 서열의 전사 및 가능하게는 번역에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 전사 및 번역을 통제하는 제어 서열 뿐만 아니라, 벡터 및 발현 벡터는 또한 다른 기능을 제공하는 핵산 서열을 함유할 수 있고 이하에서 기술된다.

[0301] **프로모터 및 인핸서**

[0302] "프로모터"는 전사의 개시 및 속도가 제어되는 핵산 서열의 영역인 제어 서열이다. 이는 RNA 중합효소 및 기타 전사 인자와 같이 조절 단백질 및 분자가 결합하여, 핵산 서열의 특정 전사를 개시할 수 있는 유전학적 요소를 함유할 수 있다. 문구 "작동가능하게 위치된", "작동가능하게 연결된", "제어 하에", 및 "전사 제어 하에"는 프로모터가 핵산 서열과 관련하여 정확한 기능적 위치 및/또는 방향(orientation)에 있어서 해당 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 제어한다는 것을 의미한다.

[0303] 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 시작 부위를 위치시키는 기능을 하는 서열을 포함한다. 이것의 가장 잘

알려진 예는 TATA 박스이지만, 예를 들어 포유류 말단 테옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터 및 SV40 후기 유전자에 대한 프로모터와 같은 TATA 박스가 없는 일부 프로모터에서는 시작 부위 자체를 오버레이하는 개별 요소가 개시 위치를 고정시키는 데 도움이 된다. 부가적인 프로모터 요소는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 시작 부위의 30 110 bp 업스트림 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터가 시작 부위의 다운스트림에도 기능적 요소를 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터의 "제어 하에" 암호화하는 서열을 가져오기 위해, 선택된 프로모터의 "다운스트림" (즉, 3')에 전사 관독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 말단을 위치시킨다. "업스트림" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진한다.

[0304] 프로모터 요소 사이의 공간은 주로 유연해서, 요소가 서로에 대해 반전되거나 이동할 때 프로모터 기능이 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 공간은 활성도가 감소하기 시작하기 전에 50 bp까지 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별 요소는 전사를 활성화하기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 나타난다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작용 조절 서열을 지칭하는 "인핸서"와 함께 사용되거나 사용되지 않을 수 있다.

[0305] 프로모터는 암호화 세그먼트 및/또는 엑손의 업스트림에 위치한 5' 비-암호화 서열을 단리함으로써 수득될 수 있는 바와 같이, 핵산 서열과 자연적으로 연관된 것일 수 있다. 이러한 프로모터는 "내인성"으로 지칭될 수 있다. 유사하게, 인핸서는 그 서열의 다운스트림 또는 업스트림에 위치한 핵산 서열과 자연적으로 연관된 것일 수 있다. 대안적으로, 재조합 또는 이중 프로모터의 제어 하에 암호화 핵산 세그먼트를 위치시킴으로써 특정 이점을 얻을 수 있으며, 이는 자연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 연관되지 않는 프로모터를 지칭한다. 재조합 또는 이중 인핸서는 또한 이의 자연 환경에서 핵산 서열과 정상적으로 연관되지 않는 인핸서를 지칭한다. 이러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 바이러스, 또는 원핵 세포 또는 진핵 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인핸서, 및 "자연적으로 발생하는"이 아닌, 즉, 상이한 전사 조절 영역의 상이한 요소를 함유하는 프로모터 또는 인핸서, 및/또는 발현을 변경하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 작제물에 가장 일반적으로 사용되는 프로모터는 락타마제(페니실리나제), 락토스 및 트립토판(trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성적으로 생성하는 것 이외에도, 서열은 본원에 개시된 조성물과 관련하여, PCR.TM.을 비롯한 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생성될 수 있다(미국특허번호 제4,683,202호 및 제5,928,906호 참조, 각각 참조로서 본원에 포함됨). 또한, 미토콘드리아, 엽록체 등과 같은 비핵 소기관 내 서열의 전사 및/또는 발현을 유도하는 제어 서열이 또한 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0306] 자연적으로, 발현을 위해 선택된 소기관, 세포 유형, 조직, 기관 또는 유기체에서 DNA 세그먼트의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요할 것이다. 분자 생물학 분야의 숙련가는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형 조합의 사용을 알고 있다(예를 들어, 본원에 참조로 포함된 Sambrook 등 1989 참조). 사용된 프로모터는 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 대규모 생산에 유리한 것과 같은, 도입된 DNA 세그먼트의 고수준의 발현을 유도하는 적절한 조건 하에서 구성적이고, 조직-특이적이며, 유도할 수 있고/있거나 유용할 수 있다. 프로모터는 이중 또는 내인성일 수 있다.

[0307] 추가적으로, 임의의 프로모터/인핸서 조합이 또한 발현을 유도하는데 사용될 수 있다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 또 다른 가능한 구현예이다. 진핵 세포는 적절한 박테리아 중합효소가 전달 복합체의 일부로서 또는 추가 유전적 발현 작제물로서 제공되는 경우 특정 박테리아 프로모터로부터 세포질 전사를 지원할 수 있다.

[0308] 조직-특이적 프로모터 또는 요소의 정체(identity), 뿐만 아니라 이들의 활성을 특성화하는 검정은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0309] 특정 개시 신호는 또한 암호화 서열의 효율적인 번역을 위해 필요할 수 있다. 이러한 신호에는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열이 포함된다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 제어 신호가 제공될 필요가 있다. 당업자는 이를 쉽게 결정하고, 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다.

[0310] 본 발명의 특정 구현예에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 요소의 용도는 다중 유전자 또는 폴리시트로닉(polycistronic) 메시지를 생성하는 데 사용되며, 이들은 본 발명에서 사용될 수 있다.

[0311] 벡터는 다중 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역인, 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함할 수 있으며, 이들 중 임의의 부위는 벡터를 소화하기 위해 표준 재조합 기술과 함께 사용될 수 있다. "제한 효소 소화"는 핵산 분자의 특정 위치에서만 작용하는 효소를 갖는 핵산 분자의 촉매적 절단을 지칭한다. 이러한 제한 효소의 대부분은 상

업적으로 이용 가능하다. 이러한 효소의 사용은 당업자에 의해 널리 이해된다. 흔히, 벡터는 외인성 서열이 벡터에 결합될 수 있도록 MCS 내에서 절단하는 제한 효소를 사용하여 선형화되거나 단편화된다. "결합"은 서로 인접하거나 인접하지 않을 수 있는, 2개의 핵산 단편 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성하는 과정을 지칭한다. 제한 효소 및 결합 반응을 수반하는 기술은 재조합 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.

[0312] 스플라이싱 부위, 종결 신호, 복제 기점 및 선택 가능한 마커가 또한 사용될 수 있다.

[0313] 플라스미드 벡터

[0314] 특정 구현예에서, 플라스미드 벡터는 숙주 세포를 형질전환시키는 데 사용하기 위해 고려된다. 일반적으로, 숙주 세포와 호환가능한 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 이들 숙주와 관련하여 사용된다. 벡터는 일반적으로 복제 부위, 뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 운반한다. 비제한적 예에서, E. coli는 종종 E. coli 종에서 유래된 플라스미드인 pBR322의 유도체를 사용하여 형질전환된다. pBR322는 암피실린 및 테트라사이클린 내성 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 식별하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR 플라스미드, 또는 기타 미생물 플라스미드 또는 파지는 또한 예를 들어, 그 자체 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 함유하도록 변형되어야 한다.

[0315] 또한, 숙주 미생물과 호환가능한 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터는 이러한 숙주와 관련하여 형질전환 벡터로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 파지 람다 GEM.TM. 11은 예를 들어, E. coli LE392와 같은 숙주 세포를 형질전환하는데 사용될 수 있는 재조합 파지 벡터를 제조하는데 활용될 수 있다.

[0316] 추가로 유용한 플라스미드 벡터에는 추후 정제 및 분리 또는 절단을 위해 글루타티온 S 트랜스퍼라제 (GST) 가 용성 융합 단백질을 생성하는 데 사용하기 위한, pIN 벡터 (Inouye 등, 1985); 및 pGEX 벡터가 포함된다. 다른 적합한 융합 단백질은 갈락토시다제, 유비퀴틴 등을 갖는 것들이다.

[0317] 발현 벡터를 포함하는 박테리아 숙주 세포, 예를 들어 E. coli는 다수의 적합한 배지 중 임의의 것, 예를 들어 LB에서 성장된다. 특정 벡터에서 재조합 단백질의 발현은 당업자에 의해 이해될 수 있는 바와 같이, 숙주 세포를 특정 프로모터에 특이적인 제제와 접촉시킴으로써, 예를 들어, 배지에 IPTG를 첨가함으로써 또는 배양을 더 높은 온도로 전환함으로써 유도될 수 있다. 일반적으로 2 내지 24시간 사이의 추가 기간 동안 박테리아를 배양한 후, 세포를 원심단리로 수집하고 세척하여 잔류 배지를 제거한다.

[0318] 바이러스 벡터

[0319] 수용체 매개된 엔도시토시스(endocytosis)를 통해 세포를 감염시키거나 세포에 진입하고, 숙주 세포 게놈에 통합되어 바이러스 유전자를 안정적이고 효율적으로 발현시키는 특정 바이러스의 능력은 외래 핵산을 세포(예를 들어, 포유류 세포)로 전달하기 위한 매력적인 후보로 만들었다. 본 발명의 구성요소는 하나 이상의 CAR, TCR, 또는 본 발명의 고친화성 CD16과 같은 임의의 다른 조작된 단백질 또는 폴리펩티드 도메인을 암호화하는 바이러스 벡터일 수 있다. 본 발명의 핵산을 전달하는 데 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비제한적인 예는 하기에 기술된다.

[0320] 아데노바이러스 벡터

[0321] 핵산의 전달을 위한 특정 방법은 아데노바이러스 발현 벡터의 사용을 수반한다. 아데노바이러스 벡터는 게놈 DNA 내에 통합하기 위한 낮은 능력을 갖는 것으로 알려져 있지만, 이 특징은 이러한 벡터에 의해 제공되는 유전자 전달의 높은 효율로 균형을 이룬다. "아데노바이러스 발현 벡터"는 (a) 작제물의 패키징을 지원하고 (b) 궁극적으로 그 안에 클로닝된 조직 또는 세포 특이적 작제물을 발현하기에 충분한 아데노바이러스 서열을 함유하는 작제물을 포함하는 것을 의미한다. 36 kb, 선형, 이중 가닥 DNA 바이러스인, 아데노바이러스 또는 유전학적 구조에 대한 지식은 아데노바이러스 DNA의 큰 부분을 외래 서열로의 대체를 최대 7 kb까지 허용한다(Grunhaus 및 Horwitz, 1992).

[0322] AAV 벡터

[0323] 핵산은 아데노바이러스 관련된 형질감염을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 아데노바이러스 결합 시스템을 사용한 세포 시스템에서 증가된 형질감염 효율이 보고되었다(Kelleher 및 Vos, 1994; Cotten 등, 1992; Curiel, 1994). 아데노 관련된 바이러스(AAV)는 높은 통합 빈도를 가지며 비분열 세포를 감염시킬 수 있기 때문에 본 발명의 세포에 사용하기에 매력적인 벡터 시스템이며, 따라서 예를 들어, 조직 배양(Muzyczka, 1992)에서 또는 생체내에서 유전자를 포유류 세포로 전달하는 데 유용하게 만든다. AAV는 감염에 대한 광범위한 숙주 범위

를 가지고 있다(Tratschin 등, 1984; Laughlin 등, 1986; Lebkowski 등, 1988; McLaughlin 등, 1988). rAAV 벡터의 생성 및 사용에 관한 세부사항은 미국특허번호 제5,139,941호 및 제4,797,368호에 기재되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0324] 레트로바이러스 벡터

[0325] 레트로바이러스는 그들의 유전자를 숙주 게놈에 통합시키고, 다량의 외래 유전 물질을 전달하고, 광범위한 종 및 세포 유형을 감염시키고, 특수 세포주에 패키징되는 그들의 능력 때문에 전달 벡터로서 유용하다(Miller, 1992).

[0326] 레트로바이러스 벡터를 구축하기 위해, 핵산(예를 들어, 원하는 서열을 암호화하는 것)을 특정 바이러스 서열 대신에 바이러스 게놈에 삽입하여 복제 결합이 있는 바이러스를 생성한다. 비리온을 생산하기 위해, gag, pol 및 env 유전자를 함유하지만 LTR 및 패키징 구성요소가 없는 패키징 세포주가 구축된다(Mann 등, 1983). 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열과 함께, cDNA를 함유하는 재조합 플라스미드가 특수 세포주에 (예를 들어, 인산칼슘 침전에 의해) 도입될 때, 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자로 패키징될 수 있도록 하고, 이는 이후 배양 배지로 분비된다(Nicolas 및 Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann 등, 1983). 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지는 수집된 다음, 선택적으로 농축되고, 유전자 전달에 사용된다. 레트로바이러스 벡터는 다양한 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 그러나, 통합 및 안정적인 발현은 숙주 세포의 분열을 필요로 한다(Paskind 등, 1975).

[0327] 렌티바이러스는 복합 레트로바이러스이며, 이는 일반적인 레트로바이러스 유전자 gag, pol 및 env 이외에 조절 또는 구조적 기능을 갖는 다른 유전자를 함유한다. 렌티바이러스 벡터는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, aldini 등, 1996; Zufferey 등, 1997; Blomer 등, 1997; 미국특허번호 제6,013,516호 및 제5,994,136호 참조). 렌티바이러스의 일부 예는 인간 면역결핍 바이러스: HIV-1, HIV-2 및 원숭이 면역결핍 바이러스(Simian Immunodeficiency Virus): SIV를 포함한다. 렌티바이러스 벡터는 HIV 독성 유전자, 예를 들어, 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef가 삭제되어 벡터를 생물학적으로 안전하게 만드는 다중 약독화에 의해 생성되었다.

[0328] 재조합 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있고, 생체내 및 생체의 유전자 전달 및 핵산 서열의 발현 모두에 사용될 수 있다. 예를 들어, 적합한 숙주 세포가 패키징 기능, 즉 gag, pol 및 env, 뿐만 아니라 rev 및 tat를 운반하는 2개 이상의 벡터로 형질감염된 비-분열 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스는 본원에 참조로 포함된 미국특허번호 제5,994,136호에 기술되어 있다. 특정 세포-유형의 수용체에 표적화하기 위한 항체 또는 특정 리간드와 외피 단백질의 연결에 의해 재조합 바이러스를 표적화할 수 있다. 예를 들어, 특정 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드를 암호화하는 다른 유전자와 함께 (조절 영역을 포함하는) 관심 서열을 바이러스 벡터에 삽입함으로써, 벡터는 이제 표적-특이적이 된다.

[0329] **조합 요법**

[0330] 본 발명의 특정 구현예에서, 임상적 측면을 위한 본 발명의 방법은 과증식성 질환의 치료에 효과적인 다른 제제, 예컨대 항암제와 조합된다. "항암" 제제는 예를 들어, 암 세포를 사멸시키고, 암 세포에서 아포토시스를 유도하고, 암 세포의 성장 속도를 감소시키고, 전이의 발생 또는 수를 감소시키고, 종양 크기를 감소시키고, 종양 성장을 억제시키고, 종양 또는 암 세포로의 혈액 공급을 감소시키고, 암 세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진시키고, 암의 진행을 예방하거나 억제하고, 또는 암에 걸린 대상체의 수명을 연장시킴으로써 대상체의 암에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 보다 일반적으로, 이들 다른 조성물은 세포를 사멸시키거나 증식을 억제하는데 효과적인 조합량으로 제공될 것이다. 이 과정은 암 세포를 발현 작제물 및 작용제(들) 또는 다중 인자(들)와 동시에 접촉시키는 것을 수반할 수 있다. 이는 두 제제를 모두 포함하는 단일 조성물 또는 약리학적 제제와 세포를 접촉시키거나, 세포를 동시에 2개의 별개의 조성물 또는 제제와 접촉시킴으로써 달성될 수 있으며, 이때 하나의 조성물은 발현 작제물을 포함하고 다른 조성물은 제2 제제(들)를 포함한다.

[0331] 화학요법 및 방사선요법 제제에 대한 종양 세포 내성은 임상 종양학에서 주요 문제를 나타낸다. 현재 암 연구의 한 가지 목표는 다른 치료법과 결합하여 화학요법 및 방사선요법의 효능을 향상시키는 방법을 찾는 것이다. 본 발명의 맥락에서, 세포 요법은 화학요법제, 방사선요법제 또는 면역요법제 중재 뿐만 아니라 프로-아포토틱(pro-apoptotic) 또는 세포 주기 조절제와 함께 유사하게 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0332] 대안적으로, 상기 요법은 수분 내지 수주 범위의 간격으로 다른 제제 치료를 선행하거나 후속할 수 있다. 다른 제제 및 본 발명이 개별적으로 개체에게 적용되는 구현예에서, 상기 제제와 본 발명의 요법이 여전히 세포에 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있도록, 일반적으로 각 전달 시간 사이에 상당한 기간이 만료되지 않았음을 보

장할 것이다. 이러한 경우에, 이는 서로 약 12-24시간 이내, 보다 바람직하게는 서로 약 6-12시간 이내에 두 가지 양식 모두로 세포와 접촉할 수 있는 것으로 고려된다. 그러나, 일부 상황에서, 각 투여 사이에 수일 (2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일) 내지 수주 (1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주 또는 8주)가 경과되는 경우, 이는 치료 기간을 상당히 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0333] 일부 구현예에서, 치료 주기는 필요에 따라 반복된다. 외과적 중재 뿐만 아니라 다양한 표준 요법이 본 발명의 세포 요법과 조합하여 적용될 수 있음이 또한 고려된다.

[0334] 화학요법

[0335] 암 치료법은 또한 화학 및 방사선 기반 치료법을 모두 갖는 다양한 조합 치료법을 포함한다. 조합 화학요법에는 예를 들어, 아브라칸, 알트레타민, 도세탁셀, 허셉틴, 메토트렉세이트, 노반트론, 졸라텍스, 시스플라틴(CDDP), 카보플라틴, 프로카바진, 메클로레타민, 시클로포스파미드, 캄토테신, 이포스파미드, 멜팔란, 클로람부실, 부숄판, 니트로우레아, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 블레오마이신, 플리코마이신, 미토마이신, 에토포사이드(VP16), 타목시펜, 탈록시펜, 에스트로겐 수용체 결합제, 탁솔, 젬시타비엔, 나벨빈, 파르네실-단백질 탄수화물 분해 억제제, 트랜스플라티늄, 5-플루오로우라실, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 메토트렉세이트, 또는 전술한 것 중 임의의 유사체 또는 유도체 변이체 및 또한 이들의 조합이 포함된다.

[0336] 특정 구현예에서, 개체에 대한 화학요법은 예를 들어 본 발명의 투여 전, 투여 중 및/또는 투여 후에 본 발명과 함께 적용된다.

[0337] 방사선요법

[0338] DNA 손상을 유발하고 광범위하게 사용되어 온 다른 인자에는 감마선, X-선으로 통상적으로 공지된 것들, 및/또는 종양 세포에 대한 방사성 동위원소의 직접 전달이 포함된다. 다른 형태의 DNA 손상 인자들, 예컨대, 마이크로파 및 UV-조사 또한 고려된다. 이러한 인자들을 모두 DNA에, DNA의 전구물질에, DNA의 복제 및 복원에, 그리고 염색체의 어셈블리 및 유지에 광범위한 손상을 줄 가능성이 크다. X-선의 선량 범위는 장기간의 시기 (3 내지 4 주) 동안 일일 50 내지 200 렌트겐 선량 내지 1회 2000 내지 6000 렌트겐 선량 범위이다. 방사성 동위원소의 선량 범위는 광범위하게 달라질 수 있으며, 동위원소의 반감기, 방출되는 방사선의 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 따라 달라진다.

[0339] 세포에 적용될 때 용어 "접촉된" 및 "노출된"은 치료적 작제물 및 화학요법제 또는 방사선요법제를 표적 세포로 전달하거나 표적 세포와의 근접위치에 직접 넣는 과정을 기술하기 위하여 본원에서 사용된다. 세포 사멸 또는 정체를 달성하기 위하여, 제제 둘 다는 세포를 사멸시키거나 세포 분열을 방지하는 데 효과적인 조합량으로 세포에 전달된다.

[0340] 면역요법

[0341] 면역치료제는 일반적으로 면역 이펙터 세포 및 분자의 사용에 의존하여 암 세포를 표적화하고 파괴한다. 면역 이펙터는, 예를 들어, 종양 세포의 표면 상의 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 항체 단독은 요법의 이펙터로서 작용할 수 있거나, 이는 다른 세포를 모집하여 세포 사멸에 실제로 영향을 미칠 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소(화학요법제, 방사성핵종, 리신 A 사슬, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합될 수 있고 단지 표적화제로 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 표적과 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 표면 분자를 운반하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

[0342] 따라서, 본원에 기재된 본 발명의 요법 이외의 면역요법은 본 세포 요법과 함께 조합 요법의 일부로서 사용될 수 있다. 복합 요법에 대한 일반적인 접근법은 하기에 논의된다. 일반적으로, 종양 세포는 표적화할 수 있는, 즉, 대부분의 다른 세포에는 존재하지 않는 일부 마커를 보유해야 한다. 많은 종양 마커가 존재하고 이들 중 임의의 것이 본 발명의 맥락에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커는 PD-1, PD-L1, CTLA4, 암태아성 항원, 전립선 특이적 항원, 비뇨기 종양 관련 항원, 태아 항원, 티로시나제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 에스트로겐 수용체, 라미닌 수용체, erb B 및 p155를 포함한다.

[0343] 유전자

[0344] 또 다른 구현예에서, 2차 치료는 치료적 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 임상 구현예 이전, 이후 또는 동시에 투여되는 유전자 요법이다. 세포성 증식의 유도제, 세포성 증식의 억제제, 또는 프로그래밍된 세포 사멸의 조절제를 포함하는 다양한 발현 생성물이 본 발명 내에 포함된다.

- [0345] 수술
- [0346] 암에 걸린 사람의 대략 60%는 예방, 진단 또는 병기결정, 치유 및 완화 수술을 포함하는 일부 유형의 수술을 받게 될 것이다. 완치 수술(curative surgery)은 다른 요법, 예컨대, 본 발명의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬 요법, 유전자 요법, 면역요법 및/또는 대체 요법과 함께 사용될 수 있는 암 치료이다.
- [0347] 완치 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부를 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴하는 절제술을 포함한다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 지칭한다. 종양 절제술 외에도, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 동결 수술, 전기 수술, 및 현미경적으로 제어된 수술(모스 수술)을 포함한다. 본 발명은 표재성 암, 전암 또는 부수적인 양의 정상 조직의 제거와 함께 사용될 수 있음이 추가로 고려된다.
- [0348] 암성 세포, 조직 또는 종양 전체의 일부를 절제하는 경우, 체내에 공동(cavity)이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접 주사 또는 추가 항암 요법과 함께 해당 부위의 국소 적용에 의해 달성될 수 있다. 해당 치료는, 예를 들어, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일마다, 또는 1주, 2주, 3주, 4주 및 5주마다 또는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료는 투여량 또한 다양할 수 있다.
- [0349] 실시예
- [0350] 본 발명의 다른 특징, 목적 및 이점은 하기 실시예에서 명백하다. 그러나, 실시예는 본 발명의 구현예를 나타내지만, 제한이 아니라 단지 예시로서 제공된다는 것을 이해해야 한다. 본 발명의 범위 내에서 다양한 변경 및 변형은 실시예로부터 당업자에게 명백해질 것이다.
- [0351] **실시예 1. iPS 세포의 HP 세포 벌크로의 분화**
- [0352] iPS 세포주인 FfI-01s04 세포주는 건강한 개체의 말초 혈액 단핵 세포로부터 유래하였다. StemFit 완전 배지에 분산된 FfI-01s04 세포를 저산소(5% O₂) 조건("0일") 하에서 초저(ultra-low) 접착-처리된 6웰 플레이트에 6 x 10⁵ 개 세포/웰로 시딩하였다. StemFit 완전 배지에는 10 μM의 CHIR99021 및 50 μM의 Y-27632가 포함되었다. 다음 날(즉, 1일), FfI-01s04 세포를 BMP4(50 ng/ml), VEGF(50 ng/ml), bFGF(50 ng/ml), 및 아스코르브산 2-포스페이트(50 μg/ml)를 함유하는 조혈 전구 세포(HPC) 분화 배지에 분산시켰다. HPC 유도 배지 배지에는 인간 인슐린(10 μg/ml), 인간 트랜스페린(5.5 μg/ml), 아셀렌산나트륨(6.7 ng/ml), L-글루타민(2 mM) 및 α-모노티오글리세롤(0.4 mM)이 보충된 StemPro34가 포함되었다. 2일째, SB431542(배지 중 6 μM)를 배양 배지(즉, 세포를 함유하는 HPC 분화 배지)에 첨가하고, 세포를 2일 동안 배양하였다. 4일째, 세포를 VEGF(50 ng/ml), bFGF(50 ng/ml), SCF(50 ng/ml), 및 아스코르브산 2-포스페이트(50 μg/ml)를 함유하는 다른 배지에 재분산시키고, 추가로 3일 동안 배양하였다. 7일째, 세포를 VEGF(50 ng/ml), bFGF(50 ng/ml), SCF(50 ng/ml), 아스코르브산 2-포스페이트(50 μg/ml), TPO(30 ng/ml) 및 Flt3L(10 ng/ml)을 함유하는 다른 배지에 노출시키고, 상기 배지를 사용하여 추가로 7일 동안 배양하였다. 상기 7일의 배양 기간 동안 매 2-3일마다 배지를 변경하였다.
- [0353] **실시예 2. HP 세포 벌크의 CD4/CD8 세포를 포함하는 집단으로의 분화**
- [0354] 14일째에, 임의의 세포 단리도 거치지 않고 실시예 1로부터 수득된 세포 집단("HP 세포 벌크")을 15 cm 디쉬에 3.12 x 10⁶ 개 세포/디쉬로 시딩하고, 5% O₂ 하에 37°C에서 배양하였다. 다양한 시딩 밀도가 사용될 수 있으며, 전술한 시딩 밀도는 일 구현예임에 주목한다. 각 15 cm 디쉬를 rh-DLL4/Fc 키메라(Sino Biological) 및 RetroNectin(Takara Bio Inc)으로 코팅하였다. 상기 배양 기간 동안 매 2-3일마다 배지를 변경하였다. 15% FBS, 4 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μg/ml 스트렙토마이신, 55 μM 2-메르캅토에탄올, 50 μg/ml 아스코르브산 2-포스페이트, 10 μg/ml 인간 인슐린, 5.5 μg/ml 인간 트랜스페린, 6.7 ng/ml 아셀렌산나트륨, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-7, 50 ng/ml Flt3L, 100 ng/ml TPO, 15 μM SB203580, 30 nM SDF-1α가 보충된 MEMα(Thermo Fisher Scientific (Gibco))를 배지로 사용하여 상기 세포를 배양하였다. 21일째, 세포를 hDLL4/RetroNectin으로 새로 코팅된 새로운 15 cm 디쉬에 계대배양하였다. 28일째, 세포를 hDLL4/RetroNectin으로 새로 코팅된 새로운 15 cm 디쉬에 추가로 계대배양하였다. 35일째, 특히, CD4/CD8 세포를 포함하는 모든 세포("DP 세포 벌크")를 수확하였다.
- [0355] **실시예 3. DP 세포 벌크의 NK 세포 벌크로의 분화**
- [0356] 35일째, DP 세포 벌크, 즉 임의의 세포 단리도 거치지 않고 실시예 2로부터 수득된 세포를 48-웰 플레이트에 1

$\times 10^6$ 개 세포/웰로 시딩하고, 37°C에서 5% CO₂ 하에 3일 동안 배양하였다. 15% FBS, 4 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 ng/ml 스트렙토마이신, 50 µg/ml 아스코르브산 2-포스페이트, 10 µg/ml 인간 인슐린, 5.5 µg/ml 인간 트랜스페린, 6.7 ng/ml 아셀렌산나트륨, 500 ng/ml 항-CD3 항체(UCHT1), 10 ng/ml IL-2, 및 10 ng/ml IL-7이 보충된 MEM α 배지를 배양 배지로 사용하였다. 38일째, 세포를 15% FBS, 4 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 ng/ml 스트렙토마이신, 50 µg/ml 아스코르브산 2-포스페이트, 10 µg/ml 인간 인슐린, 5.5 µg/ml 인간 트랜스페린, 6.7 ng/ml 아셀렌산나트륨, 10 ng/ml IL-2, 및 10 ng/ml IL-7이 보충된 다른 MEM α 배지에 분산시키고, 이를 배양 배지로 사용하였다. 42일째, NK 세포("NK 세포 벌크")를 포함하는 모든 세포를 수확하였다.

[0357] 실시예 4. 유세포 분석기 분석

[0358] 이후, NK 세포 벌크를 표 1에 나열된 항체 세트에 염색하고, 유세포 분석기로 분석하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, CD3 음성 NK 세포 벌크의 일부는 CD56("CD56 양성 면역 세포")을 발현하였다. 도 1. CD56 양성 및 CD3 음성 면역 세포는 자연 살해 세포(NK 세포)이다. 따라서, CD56 양성 및 CD3 음성 면역 세포는 iPS 세포(FfI-01s04 세포주)로부터 유래된 HP 세포 벌크로부터 제조되었다. 상기 과정에서 수득된 CD56을 발현하는 세포는 때때로 iPS NK 세포로도 지칭된다. 유세포 분석에 사용된 항체는 표 1에 제시된다.

[0359] 표 1:

항-CD3 항체	CD3 BioLegend APC/Cy7
항-CD56 항체	CD56 Biolegend PE

[0361] 실시예 5. 단일 세포 RNA 서열(scRNAseq) 분석

[0362] NK 세포 벌크 집단(즉, 실시예 3에서 수득된 세포)에서 상이한 세포 유형을 확인하기 위해, 비-선형 차원-축소 기법(단일 세포 RNA-seq(scRNAseq)을 기반으로 하는 균일 매니폴드 근사 및 투영법(uniform manifold approximation 및 projection, UMAP)을 적용하였다.

[0363] NK 세포 벌크로부터의 수만 개의 세포는 제네위즈(Genewiz)의 Illumina NextSeq 500으로 단일 세포 RNA-시퀀싱이 수행되었다. SingleR 알고리즘 및 수동 클러스터 라벨링을 사용하여, 이벤트를 PBMC 샘플에서 4가지 광범위한 세포 집단 - 단핵구, B 세포, NK 세포 및 T 세포로 분류하였다. 10X Genomics로부터 자유롭게 이용가능한, PBMC의 데이터 세트를 데이터 분석을 위한 대조군으로 사용하였다.

[0364] 도 2에 나타난 바와 같이, NK 세포 벌크 내 세포의 약 75%는 NK 세포로 확인된 반면, NK 세포 벌크 내 세포의 약 25%는 T 세포로 확인되었다. 따라서, NK 세포 벌크는 단일 세포 RNA-시퀀싱에 의한 mRNA 프로파일링을 기반으로 NK 세포 및 T 세포 둘 다를 포함하였다.

[0365] 실시예 6. CAR-NK 세포 제조

[0366] NK 세포는 하나 이상의 CAR를 발현하도록 추가로 변형되었다. NK 세포의 변형은 하기 단계를 포함한다: (1) 항-CD19 CAR 유전자 및 IL-15R α/IL-15 유전자를 합성하는 단계; (2) 항-CD19 CAR 유전자 및 IL-15R α/IL-15 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터를 제조하는 단계; 및 (3) 항-CD19 CAR 유전자 및 IL-15R α/IL-15 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터로 NK 세포를 형질도입하는 단계.

[0367] CAR/IL15-NK 세포 제조

[0368] 항-CD19 CAR 유전자는 표 2에 나타난 바와 같이 N-말단부터 배열되도록 디자인된 올리고핵티드를 합성하여 제조하였다.

표 2:

N-말단으로부터의 서열	유전자	아미노산 수
1	면역글로불린 중쇄의 리드 서열	22
2	항-CD19 항체(FMC60) 경쇄의 가변 도메인	104
3	GGGGS 링커	15
4	항-CD19 항체(FMC60) 중쇄의 가변 도메인	120
5	CD8 유래된 서열(막횡단 도메인 함유)	83
6	4-1BB의 세포내 도메인	47
7	CD3 제타의 세포내 도메인	112

항-CD19 CAR는 W02014/153270호에 따라 구축되었으며, 이의 전문은 본원에 참조로 포함된다.

IL-15R α /IL-15 유전자의 제조

IL-15R α /IL-15 유전자는 N-말단부터 배열되도록 디자인된 올리고핵티드를 합성하여 제조하였다. IL-15R α /IL-15는 Mortier 등, 2006, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, No. 3, 페이지 1612-1619, 2006년 1월 20일; Chertova 등, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 288, No. 25, 페이지 18093-18103, 2013년 6월 21일; 및 Rowley 등, *Eur J Immunol*, 2009년 2월; 39(2):491-506에 따라 구축되었으며, 이들 각각은 이의 전문이 참조로 포함된다.

표 4:

N-말단으로부터의 서열	유전자	아미노산 수
1	인간 IL-2의 리드 서열	23
2	인간 IL-15의 C-말단 서열	114
3	GGGGS 링커	24
4	인간 IL-15RA의 C-말단 서열	239

항-CD19 CAR 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제조

항-CD19 CAR 유전자는 pMY 레트로바이러스 벡터의 다중-클로닝 부위에 통합시켰다. 레트로바이러스 벡터 생산을 위해, FRY-RD18 세포를 사용하여 레트로바이러스 벡터를 생성하였다.

IL-15R α /IL-15 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터의 제조

IL-15R α /IL-15 유전자는 다른 pMY 레트로바이러스 벡터의 다중-클로닝 부위에 통합시켰다. 레트로바이러스 벡터 생산을 위해, FRY-RD18 세포를 사용하여 레트로바이러스 벡터를 생성하였다.

항-CD19 CAR 유전자 및 IL-15R α /IL-15 유전자의 iPS NK 세포로의 형질도입

iPS NK 세포는 항-CD19 CAR 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터 및 IL-15R α /IL-15 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입되어 항-CD19 CAR를 발현하는 iPS NK 세포("iNK-CAR19")를 생성하였다.

실시예 7. iNK-CAR19의 생체내 항-종양 활성

루시페라제를 발현하는 Nalm6 세포(ATCC; 암세포)(5×10^5 세포)를 꼬리 정맥을 통해 NOD/Shi-scid, IL-2R 감마넢 마우스("NSG 마우스")에 이식하였다. 4-5주령의 수컷 NSG 마우스는 잭슨 연구소로부터 공급되었다. Nalm6 세포의 이식 4일 후, 0.2 ml PBS에 분산된 iNK-CAR19(1×10^7 세포) 또는 세포 없이 단지 0.2 ml의 PBS를 꼬리 정맥을 통해 Nalm6-이식된 NSG 마우스에 투여하였다. iNK-CAR19 세포 또는 PBS의 투여 후, 꼬리 정맥을 통해 마우스에 루시페린을 투여하였다. 루시페라제 활성은 IVIS 이미징 시스템(PerkinElmer)을 사용하여 70일 이상 동안 측정되었다.

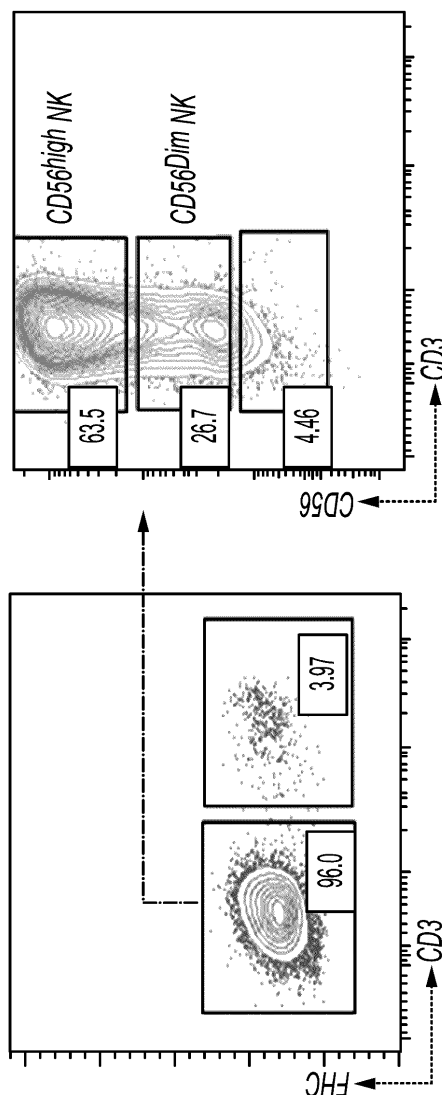
[0384] 도 3은 미처리(완충액만으로 처리됨) 및 iNK-CAR19 세포 처리된 Nalm6-이식 NSG 마우스의 항-종양 효능을 나타낸다. 3일 직후에, D-PBS 완충액으로 처리된 모든 마우스에서 발광(luminescence)이 검출되었다. 대조적으로, 다른 마우스(일차 CAR T 세포 또는 iNK-CAR 세포로 처리됨)에서는 투여 후 28일까지 발광이 검출되지 않았고, iNK-CAR19 세포로 처리된 마우스에서는 처리 후 70일에도 발광이 검출되지 않았다. 따라서, iNK-CAR19 세포는 Nalm6 암세포에 대한 향상된 독성을 명확히 입증하였다.

[0385] **등가물 및 범위**

[0386] 당업자는 단지 정례적인 실험을 사용하여 본원에 기술된 본 발명의 특정 구현예에 대한 많은 등가물을 인식하거나, 확인할 수 있을 것이다. 본 발명의 범위는 상기 설명으로 제한하도록 의도되지는 않지만, 하기 청구범위에 제시된 바와 같다:

도면

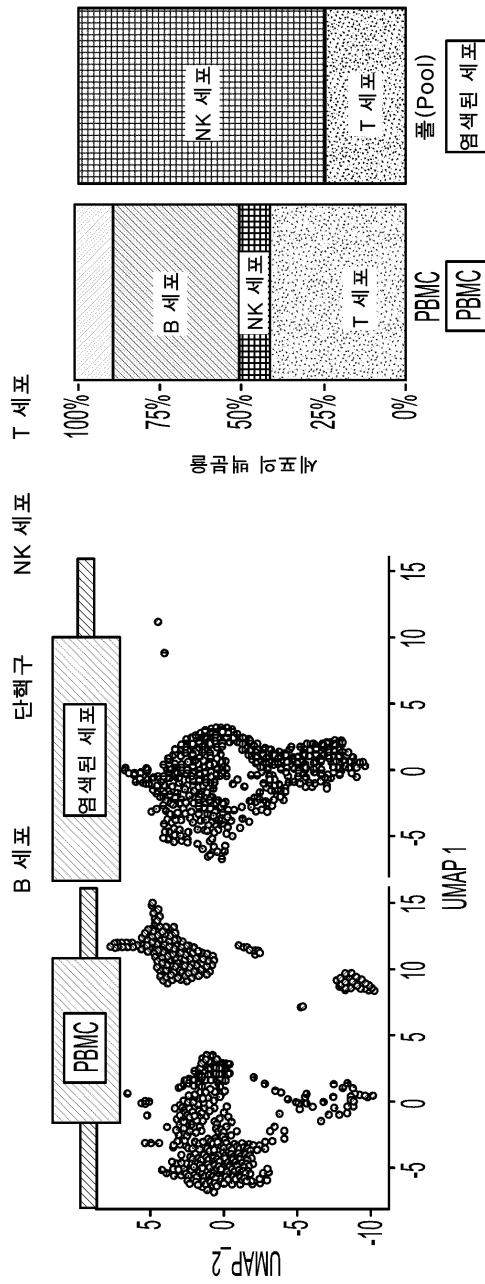
도면1



도면2

ScRNA 데이터:
~75%의 세포는 SingleR 알고리즘에
의해 NK 세포로 확인됨

알고리즘적으로-배정된 세포 유형



도면3

