(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0053695
(43) 공개일자 2022년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 31/12 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7012904(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년07월13일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2021-7015540
원출원일자(국제) 2011년07월13일
심사청구일자 2021년06월23일
(85) 번역문제출일자 2022년04월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/043831
(87) 국제공개번호 WO 2012/009422
국제공개일자 2012년01월19일
(30) 우선권주장
61/363,981 2010년07월13일 미국(US)
61/497,897 2011년06월16일 미국(US)

(71) 출원인
셀룰래리티 인코포레이티드
미국 뉴저지주 07932 플로햄 파크 파크 애비뉴 170
(72) 발명자
하리리, 로버트, 제이.
미국 07924 뉴저지주 버나즈빌 멘드햄 로드 341
헤이다란, 모하마드, 에이.
미국 07928 뉴저지주 채텀 오르몬트 로드 88
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

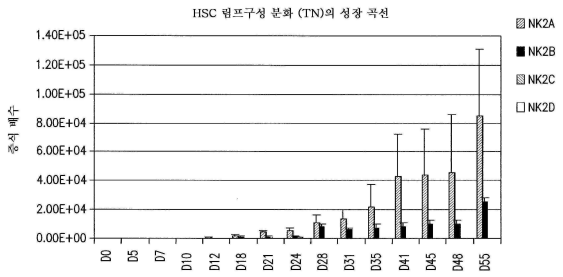
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 **천연 킬러 세포의 생성 방법**

(57) 요 약

본원은 2-단계 증식 및 분화 방법을 이용하여 천연 킬러 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 또한, 본원은 상기 방법으로 생성되는 NK 세포를 암 또는 바이러스 감염이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 바이러스 감염이 있는 개체의 종양 세포 증식을 저해하고 상기 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 31/12 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
자스코, 스티븐
미국 07070 뉴저지주 러더포드 카르미타 애비뉴 248
캉, 린
미국 08820 뉴저지주 에디슨 팀버 오크스 로드 1106
로우, 에릭
미국 08816 뉴저지주 이스트 브런즈윅 저니 드라이브 45
팔, 아자이
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 레반 코트 1
스토우트, 바바니
미국 08833 뉴저지주 레바논 헌터즈 써클 37
보스키나리안-버르세, 바네싸
미국 07946 뉴저지주 밀링톤 발리 로드 1670
제이틀린, 앤드류
미국 07920 뉴저지주 바스킹 릿지 리버사이드 드라이브 29
장, 크시아오쿠이
미국 07039 뉴저지주 리빙스톤 마운트헤이븐 드라이브 10

명 세 서

청구범위

청구항 1

종양 세포 증식의 저해, 바이러스 감염의 치료 또는 암을 치료하기 위한, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **1. 관련 출원**

[0002] 본 출원은 2010년 7월 13일자로 출원된 미국 특허 가출원 제61/363,981호 및 2011년 6월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제61/497,897호의 이점을 청구하며, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0003] **2. 기술분야**

[0004] 본원은 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반, 예를 들어 태반 관류액 (예를 들어, 인간 태반 관류액)으로부터 유래된 천연 킬러 세포, 예컨대 태반-유래 중간 천연 킬러 세포의 집단, 또는 다른 조직, 예컨대 제대혈 또는 말초혈로부터 유래된 천연 킬러 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 또한, 본원은 본원에서 제공되는 방법으로 생성되는 증식된 천연 킬러 세포 집단을 제공한다. 추가로, 본원은 태반 관류액, 및 그로부터의 천연 킬러 세포를 사용하여 종양 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 천연 킬러 세포는 1종 이상의 면역조절 화합물, 예를 들어 IMiD™라고 지칭되는 면역조절 화합물과 조합되어 사용되거나 이와 함께 처치된다.

배 경 기 술

[0005] **3. 배경기술**

[0006] 천연 킬러 (NK) 세포는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 세포독성 림프구이다. NK 세포는 T-세포 항원 수용체 (TCR), CD3 또는 표면 이뮤노글로불린 (Ig) B 세포 수용체를 발현하지 않는다. NK 세포는 일반적으로 인간에서 표면 마커 CD16 (FcγRIII) 및 CD56을 발현하지만, 인간 NK 세포의 하위부류는 $CD16^{-}$이다. NK 세포는 세포독성이고, 세포질 내의 작은 과립은 특별한 단백질, 예컨대 퍼포린 및 그란자임이라 공지된 프로테아제를 함유한다. 퍼포린이 사멸 표적화된 세포에 밀접하게 방출되면, 퍼포린은 표적 세포의 세포 막에 공극을 형성하고 이것을 통해 그란자임 및 관련 분자가 유입되어 세포자멸을 유도할 수 있다. 그란자임 중 하나인 그란자임 B (또한, 그란자임 2 및 세포독성 T-림프구-관련 세린 에스테라제 1이라고도 공지됨)는 세포-매개 면역 반응에서 표적 세포 세포자멸의 신속한 유도에 중대한 세린 프로테아제이다.

[0007] NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 시토카인에 대한 반응으로 활성화된다. 활성화된 NK 세포는 림포카인 활성화된 킬러 (LAK) 세포라 지칭된다. NK 세포는 "활성화 수용체" 및 "억제성 수용체"로 불리는, 세포의 세포독성 활성을 제어하는 2가지 유형의 표면 수용체를 보유한다.

[0008] NK 세포는 여러 활성 중에서도 특히 종양의 숙주 거부에서 소정의 역할을 수행한다. 암 세포에서는 클래스 I MHC 발현이 감소되거나 없기 때문에, 암 세포는 NK 세포의 표적이 될 수 있다. 축적된 임상적 데이터는, 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 또는 골수로부터 단리된 인간 NK 세포의 일배체동종(haploidentical) 이식이 검출가능한 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)의 유발 없이 강력한 항-백혈병 효과를 매개함을 시사한다. 문헌 [Ruggeri et al., Science 295:2097-2100 (2002)]을 참조한다. 천연 킬러 세포는 주조직적합성 복합체 (MHC) 단백질이 없거나 이것을 감소된 수준으로 나타내는 세포에 의해 활성화될 수 있다. 추가로, NK 세포에서 발현된 활성화 수용체는 활성화 수용체에 대한 리간드를 발현하여 NK 세포 활성화를 촉발하는 "스트레스받은" 또는 형질전환된 세포의 검출을 매개한다고 공지되어 있다. 예를 들어, NCR1 (NKp46)은 바이러스 적혈구응집소와 결합한다. NKG2D 리간드는 CMV UL16-결합 단백질 1 (ULB1), ULB2, ULB3 및 MHC-클래스-I-폴리펩티드-관련 서열 A (MICA) 및 MICB 단백질을 포함한다. NK 단백질 2B4는 CD48과 결합하고, DNAM-1은 폴리오바이러스 수용체 (PVR) 및 넥틴-

2(Nectin-2) (둘다 일관되게 급성 골수성 백혈병 (AML)에서 검출됨)와 결합한다. 문헌 [Penda et al., Blood 105:2066-2073 (2004)]을 참조한다. 추가로, AML의 용해는 주로 천연 세포독성 수용체 (NCR) 의존적이라 기재된 바 있다. 문헌 [Fauriat et al., Blood 109:323-330 (2007)]을 참조한다. 말초혈로부터의 활성화되고 증식된 NK 세포 및 LAK 세포는 진행성 암을 갖는 환자의 생체외 요법 및 생체내 치료법 둘다에 사용되어 왔고, 골수 관련 질환, 예컨대 백혈병, 유방암, 및 특정 유형의 림프종에서 일부 성공적이었다. LAK 세포 처치에는, 환자에게 우선 IL-2를 주입한 후에 백혈구성분채집(leukopheresis)을 수행하고 이후 수확된 자가 혈액 세포를 IL-2의 존재하에 수일 동안 생체외 인큐베이션 및 배양할 것이 요구된다. 요법을 완료하기 위해서는 LAK 세포가 비교적 고용량의 IL-2와 함께 재주입되어야 한다. 이러한 하제사용(purging) 처치는 고가이고, 심각한 부작용을 초래할 수 있다. 이는, 유체 정체, 폐 부종, 혈압 강하 및 고열을 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] NK 세포가 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포의 사멸에 유리한 특성을 가짐에도 불구하고, NK 세포는 1차적으로는 배양 및 증식 동안 이것의 종양-표적화 및 종양치사 능력 유지가 어렵기 때문에 면역요법에 사용하고 적용하는것이 여전히 어렵다. 따라서, 당업계에는 종양치사 기능을 유지하는 천연 킬러 세포를 생성 및 증식시키는 효율적인 방법을 개발할 것이 요구된다.

과제의 해결 수단

[0010] **4. 요약**

[0011] 본원은 세포, 예를 들어 조혈 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포, 예를 들어 $CD34^+$ 조혈 줄기 세포를 천연 킬러 세포로 증식 및 분화시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 본원은 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들어 $CD34^+$ 줄기 세포 또는 전구 세포를 제1 배지 중에서 배양하여 증식 및 분화된 세포를 생성하는 단계, 및 이후 상기 증식된 세포를 제2 배지 중에서 배양하여 상기 세포를 추가로 증식시키고 천연 킬러 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 천연 킬러 (NK) 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 상기 제1 및 제2 단계는 세포를 세포 인자의 독특한 조합을 갖는 배지 중에 배양하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 세포 인자 (예를 들어, 시토카인)는 배지의 불특정 성분(undefined component) (예를 들어, 혈청)에는 포함되지 않으며, 예를 들어 세포 인자 (예를 들어, 시토카인)는 배지의 불특정 성분 (예를 들어, 혈청)에 외인성이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 2-단계 방법이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 세포를 접촉시키는 임의의 제3 또는 중간 단계를 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본원은 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 제1 단계로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 본원에서 제공되는 방법 (예를 들어, 2-단계 방법)으로 생성되는 천연 킬러 세포는 본원에서 TSNK 세포라 지칭된다.

[0012] 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB), 태아 소 혈청 (FBS) 또는 태아 송아지 혈청 (FCS), 예를 들어 5% 내지 20% v/v, 줄기 세포 인자 (SCF), 예를 들어 1 ng/mL 내지 50 ng/mL, FMS-유사 티로신 키나제-3 리간드 (Flt-3 리간드), 예를 들어 1 ng/mL 내지 20 ng/mL; 인터류킨-7 (IL-7), 예를 들어 1 ng/mL 내지 50 ng/mL; 트롬보포이에틴 (TPO), 예를 들어 1 ng/mL 내지 50 ng/mL; 인터류킨-2 (IL-2), 예를 들어 50 IU/mL 내지 500 IU/mL; 인터류킨-15 (IL-15), 예를 들어 1 ng/mL 내지 50 ng/mL; 및/또는 헤파린, 예를 들어 0.1 IU/mL 내지 10 IU/mL 중 1종 이상을 포함하는 배지를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 줄기 세포 인자 (SCF), 인터류킨-7 (IL-7) 및 인터류킨-15 (IL-15)를 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 성장 배지, 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB), FBS, FCS, SCF, IL-7 및 IL-15를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배지는 Flt-3 리간드 (Flt3-L), TPO, IL-2 및/또는 헤파린을 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배지는 성장 배지, 10% 인간 혈청 또는 태아 소 혈청, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt3-L, 20 ng/mL IL-7, 20 ng/mL TPO, 200 IU/mL IL-2, 10 ng/mL IL-15, 및 1.5 IU/mL 헤파린을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배지는 IL-2는 포함하지 않는

다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배지 중에서의 상기 배양 단계는 영양 세포(feeder cell), 예를 들어 K562 세포, 예를 들어 미토마이신 C-처리된 K562 세포, 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 예를 들어 미토마이신 C-처리된 PBMC 또는 조직 배양-접착성 줄기 세포, 예를 들어 미토마이신 C-처리된 조직 배양-접착성 줄기 세포를 사용하여 배양하는 것을 포함한다.

[0013] 특정 실시양태에서, 상기 제1 배지는 GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, 옵트마이저(OPTMIZER), 스템스판(STEMSPAN)® H3000, 셀그로 컴플리트(CELLGRO COMPLETE)™ 및/또는 DMEM:F12이거나 이것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 O-아세틸-카르니틴 (또한, 아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴 또는 OAC라고 지칭되기도 함), 예를 들어 약 0.5 mM 내지 10 mM을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 배지는 스템스판® H3000 및/또는 DMEM:F12 및 예를 들어 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM의 OAC을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 GBGM®을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 DMEM:F12 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 스템스판® H3000 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 상기 제2 배지는 다음 중 1종 이상을 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다: 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB), 태아 소 혈청 (FBS) 또는 태아 송아지 혈청 (FCS), 예를 들어 5% 내지 15% FCS v/v; IL-2, 예를 들어 10 IU/mL 내지 1000 IU/mL; 트랜스페린, 예를 들어 10 μg/mL 내지 50 μg/mL; 인슐린, 예를 들어 5 μg/mL 내지 20 μg/mL; 에탄올아민, 예를 들어 5×10^{-4} 내지 5×10^{-5} M; 올레산, 예를 들어 0.1 μg/mL 내지 5 μg/mL; 리놀레산, 예를 들어 0.1 μg/mL 내지 5 μg/mL; 팔미트산, 예를 들어 0.05 μg/mL 내지 2 μg/mL; 소 혈청 알부민 (BSA), 예를 들어 1 μg/mL 내지 5 μg/mL; 및/또는 식물성적혈구응집소, 예를 들어 0.01 μg/mL 내지 1 μg/mL. 특정 실시양태에서, 상기 제2 배지는 IL-2를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지는 인간 혈청, FBS 또는 FCS, 예를 들어 10% v/v, IL-2, 트랜스페린, 인슐린, 에탄올아민, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 소 혈청 알부민 (BSA) 및/또는 식물성적혈구응집소를 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지는 이스코브 변형 둘베코 배지 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM), 10% 인간 혈청, FBS 또는 FCS, 400 IU IL-2, 35 μg/mL 트랜스페린, 5 μg/mL 인슐린, 2×10^{-5} M 에탄올아민, 1 μg/mL 올레산, 1 μg/mL 리놀레산, 0.2 μg/mL 팔미트산, 2.5 μg/mL BSA 및 0.1 μg/mL 식물성적혈구응집소를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양은 예를 들어 상기 제2 배지 중에서 세포 배양을 시작하는 시점 또는 이로부터 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 10일 후에 영양 세포, 예를 들어 K562 세포 (예를 들어, 미토마이신 C-처리된 K562 세포) 또는 PBMC (예를 들어, 미토마이신 C-처리된 PBMC)를 사용하여 배양하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, 옵트마이저, 스템스판® H3000, 셀그로 컴플리트™ 및/또는 DMEM:F12를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 O-아세틸-카르니틴 (또한, 아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴 또는 OAC라고 지칭되기도 함), 또는 미토콘드리아에서의 아세틸-CoA 순환에 영향을 미치는 화합물, 티아조비빈, Y-27632, 피와이인테그린(pyintegrin), Rho 키나제 (ROCK) 억제제, 카스파제 억제제 또는 다른 항-세포자멸 화합물/펩티드, NOVA-RS (쉐필드 바이오-사이언스(Sheffield Bio-Science)) 또는 다른 소분자 성장 증진제 중 1종 이상을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 니코틴아미드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 약 0.5 mM 내지 10 mM의 OAC를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 배지는 스템스판® H3000, 및/또는 DMEM:F12 및 예를 들어 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM의 OAC을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 GBGM®을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 DMEM:F12 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 스템스판® H3000 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다.

[0015] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원은 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 집단을 생성하는 방

법을 제공한다.

[0016] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원은 SCF, IL-7 및 IL-15 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정 성분 (예를 들어, 혈청)에는 포함되지 않는 것인 제1 단계, 및 상기 제1 단계로부터의 세포를 IL-2를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포를 생성하는 것을 포함하는 제2 단계의, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법을 제공한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배지는 Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드 (Flt3-L), 트롬보포이에틴 (Tpo), 인터류킨-2 (IL-2) 및/또는 헤파린 중 1종 이상을 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배지는 약 5% 내지 20% 태아 소 혈청 또는 인간 혈청을 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, SCF는 제1 배지 중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, Flt3-L은 제1 배지 중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, IL-2는 제1 배지 중에 약 50 내지 약 1500 IU/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, IL-7은 제1 배지 중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, IL-15는 제1 배지 중에 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, Tpo는 제1 배지 중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 헤파린은 제1 배지 중에 약 0.1 내지 약 30 U/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제2 단계에서의 IL-2는 제2 배지 중에 50 내지 약 1500 IU/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지는 태아 송아지 혈청 (FCS), 트랜스페린, 인슐린, 에탄올아민, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 소 혈청 알부민 (BSA) 및 식물성적혈구응집소 중 1종 이상을 추가로 포함한다.

[0017] 특정 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양 이전에 상기 제1 배지 중에서 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 배양된다. 특정 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 세포는 상기 제2 배지 중에서 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 배양된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제1 배지 중에서 21일 동안 배양된 후에 상기 제2 배지 중에서 21일 동안 배양된다.

[0018] 추가로, 본원은 본원에서 TSNK 세포라 지칭되는, 상기 기재된 2-단계 방법으로 생성되는 천연 킬러 세포의 집단을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 $CD3^-CD56^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 $CD3^-CD56^+CD16^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 추가로 $CD94^+CD117^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 추가로 $CD161^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 추가로 $NKG2D^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 추가로 $NKp46^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 추가로 $CD226^+$이다.

[0019] 특정 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 초과가 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 일부 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상이 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 초과가 $CD56^+$, $CD16^-$ 및 $CD3^-$이다. 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60% 이상이 $NKG2D^+$이다. 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% 이상이 $NKp46^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85% 이상이 $CD117^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45

% 이상이 $CD94^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상이 $CD161^-$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20% 이상이 $CD226^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이상이 $CD7^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60% 이상이 $CD5^+$이다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본원은 종양 세포 증식의 저해, 바이러스 감염의 치료 또는 암, 예를 들어 혈액 암 및 충실성 종양의 치료에 있어서 TSNK 세포의 용도를 제공한다. 특정 실시양태에서, TSNK 세포를 면역조절 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉시키거나 이것과 조합하여 사용한다.

[0021] 특정 실시양태에서, 상기 암은 충실성 종양이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 암은 혈액 암이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 암은 교모세포종, 원발성 소엽 암종, 백혈병, 급성 T 세포 백혈병, 만성 골수성 림프종(CML), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 폐 암종, 결장 선암종, 조직구성 림프종, 결장직장 암종, 결장직장 선암종, 전립선암, 다발성 골수종 또는 망막모세포종이다.

[0022] 또 다른 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포가 생성되는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포가 생성되는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액 및 제대혈, 예를 들어 상기 관류액과 동일한 태반의 제대혈로부터의 조합된 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 수득된 태반과는 다른 태반으로부터 단리된다. 특정 실시양태에서, 조합된 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 풀링(pooling) 또는 조합하여 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 부피비로 조합되어 조합된 세포가 수득된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5 (85%:15%)의 비율로 조합된다.

[0023] 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 전체 유핵 세포 (TNC) 함유율로 조합되어 조합된 세포가 수득된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다.

[0024] 따라서, 본원은 한 실시양태에서 암 또는 바이러스 감염이 있는 개체에게 유효량의 단리된 TSNK 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 바이러스 감염이 있는 개체의 치료 방법을 제공한다.

[0025] 구체적인 실시양태에서, 단리된 TSNK 세포는 상기 투여 전에 면역조절 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드로 처리된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 개체에게 (1) 유효량의 단리된 TSNK 세포 및 (2) 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 투여하는 것을 포함한다. 이러한 문맥에서의 "유효량"은, TSNK 세포 및 임의로는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 투여되지 않은 상기 암 또는 상기 감염이 있는 개체와 비교할 때 상기 암 또는 상기 감염의 하나 이상의 증상에서 검출가능한 개선을 일으키는, TSNK 세포 및 임의로는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 레날리도미드 또는 포말리도미드이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 개체에게 항암 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.8.3에 기재된 1종 이상의 항암 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0026] 또 다른 실시양태에서, 본원은 종양 세포를 치료 유효량의 TSNK 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다.

[0027] 구체적인 실시양태에서, 단리된 TSNK 세포는 상기 접촉 이전에 면역조절 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드로 처리된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 유효량의 면역조절 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 추가로 접촉된다. 이러한 문맥에서의 "유효량"은, TSNK 세포 및 임의로는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되지 않은 동등한 수의 종양 세포와 비교할 때 상기 종양 세포의 검출가능한 저해를 일으키는, TSNK 세포 및 임의로는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드의 양을 의미한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 종양 세포를 유효량의 항암 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.8.3에 기재된 항암 화합물과 접촉시키는 것을 추가로 포함한다.

[0028] 이러한 방법의 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 혈액 암 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 충실성 종양 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 종양 세포는 원발성 소엽 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종 (CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 교모세포종 세포, 폐 암종 세포, 결장 선암종 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발성 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 결장직장 암종 세포, 전립선암 세포 또는 결장직장 선암종 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 접촉은 시험관내 수행된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 접촉은 생체내 수행된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 생체내 접촉은 인간에서 수행된다.

[0029] 또 다른 측면에서, 본원은 다발성 골수종이 있는 개체에게 (1) 레날리도미드, (2) 멜팔란, 및 (3) 증식된 NK 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서의 다발성 골수종 치료에 효과적인 것인, 다발성 골수종이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포이거나, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 NK 세포의 생성 방법, 예를 들어 TSNK 세포의 생성 방법 중 임의의 방법으로 생성된 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 이전에 증식된 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란 및/또는 NK 세포는 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종이 있는 개체를 치료하는 방법의 특정 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 줄기 세포 인자 (SCF), 인터류킨-7 (IL-7) 및 인터류킨-15 (IL-15) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 제1 단계, 및 상기 제1 단계로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포를 생성하는 것을 포함하는 제2 단계의, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법으로 생성된다.

[0030] 다발성 골수종이 있는 개체를 치료하는 방법의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법으로 생성된다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본원은 만성 림프구성 백혈병 (CLL)이 있는 개체에게 치료 유효 용량의 (1) 레날리도미드, (2) 멜팔란, (3) 플루다라빈 및 (4) 증식된 NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서의 상기 CLL 치료에 효과적인 것인, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)이 있는 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포이거나, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 NK 세포의 생성 방법, 예를 들어 TSNK 세포의 생성 방법 중 임의의 방법으로 생성된 것이다. 임의의 상기 방법의 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 이전에 10일 이상 증식된 것이다. 임의의 상기 방법의 구체적인 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란, 플루다라빈 및 증식된 NK 세포는 상기 개체에게 별도로 투여된다. CLL이 있는 개체를 치료하는 방법의 특정 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 줄기 세포 인자 (SCF), 인터류킨-7 (IL-7) 및 인터류킨-15 (IL-15) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정

성분에는 포함되지 않는 것인 제1 단계, 및 상기 제1 단계로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포를 생성하는 것을 포함하는 제2 단계의, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법으로 생성된다.

[0032] CLL이 있는 개체를 치료하는 방법의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법으로 생성된다.

[0033] 한 측면에서, 본원은 NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포의 집단을 동결보존하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계, 및 (c) 상기 단계 (b)로부터의 NK 세포를 동결보존 배지 중에 동결보존하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단계 (c)는 (1) 세포 현탁 용액을 제조하는 단계, (2) 동결보존 배지를 상기 단계 (1)로부터의 세포 현탁 용액에 첨가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계, (3) 상기 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜서 동결보존된 샘플을 수득하는 단계, 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 미만에 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0034] 또 다른 실시양태에서, NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포의 집단을 동결보존하는 상기 방법은 (a) 줄기 세포 인자 (SCF), IL-2, 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15) 및 헤파린 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포를 생성하는 단계, 및 (c) 상기 단계 (b)로부터의 NK 세포를 동결보존 배지 중에 동결보존하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단계 (c)는 (1) 세포 현탁 용액을 제조하는 단계, (2) 동결보존 배지를 상기 단계 (1)로부터의 세포 현탁 용액에 첨가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계, (3) 상기 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜서 동결보존된 샘플을 수득하는 단계, 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 미만에 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계를 포함하지 않고/거나 단계 (a) 이전에 추가의 배양 단계를 포함하지 않는다.

[0035] 또 다른 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포가 생성되는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포는 예를 들어 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)로 측정할 때 마이크로RNA hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b 및 hsa-miR-520a 중 1종 이상을 말초혈 천연 킬러 세포보다 검출가능하게 더 높은 수준으로 발현한다.

[0036] 상기 방법의 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 이러한 천연 킬러 세포가 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그란자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양 및 시간으로 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 이러한 세포가 면역조절 화합물, 예를 들어 레날리도미드 또는 포말리도미드, 또는 탈리도미드와 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포보다 상기 종양 세포에 대하여 검출가능하게 더 많은 세포독성을 나타내기에 충분한 양 및 시간으로 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포보다 BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA 또는 TNFRSF18 중 1종 이상을 더 높은 수준으로 발현한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포보다 ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB,

GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI 및/또는 TBX21 중 1종 이상을 더 높은 수준으로 발현한다.

[0037] 상기 치료 또는 종양 저해 방법의 특정 실시양태에서, TSNK 세포는 다른 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 단리되거나 상이한 방법에 의해 조혈 세포로부터 생성된 천연 킬러 세포와 조합된다. 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법으로 제조된 천연 킬러 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비율로 조합된다.

[0038] 또 다른 측면에서, 본원은 단리된 TSNK 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 상기 조성물 중 세포의 50% 이상으로 포함된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 상기 조성물 중 세포의 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상으로 포함된다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물 중 TSNK 세포의 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 초과가 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 다른 실시양태에서, 상기 조성물 중 TSNK 세포의 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상이 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 실시양태에서, 상기 세포 중 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60% 이상이 $NKG2D^+$이다. 다른 실시양태에서, 상기 세포 중 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% 이상이 $NKp46^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85% 이상이 $CD117^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45% 이상이 $CD94^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20% 이상이 $CD226^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이상이 $CD7^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60% 이상이 $CD5^+$이다.

[0039] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ TSNK 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 천연 킬러 세포는 2종 이상의 상이한 개체로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포는 이러한 TSNK 세포가 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉되지 않은 동등한 수의 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그란자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양 및 시간으로 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 면역조절 화합물은 하기 섹션 6.2.1에 기재된 화합물, 예를 들어 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0040] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 1종 이상의 항암 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.8.2에 기재된 1종 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0041] 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 TSNK 세포 및 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법으로 제조된 천연 킬러 세포를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법으로 제조된 천연 킬러 세포와 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80,

15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비율로 조합된다.

[0042] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 TSNK 세포 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 TSNK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 상기 TSNK 세포와 상이한 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 중 세포의 모든 또는 실질적으로 모든 (예를 들어, 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과) 세포는 태아 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모계 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 중의 태아 세포는 상기 관류액 중 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만으로 포함된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 태반 혈관계에 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액은 적혈구 제거 처리된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들어 하기 섹션 5.2.1.1에 기재된 면역조절 화합물, 예를 들어 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 1종 이상의 항암 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.8.2에 기재된 1종 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0043] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 TSNK 세포 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 TSNK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 TSNK 세포와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하고, 여기서 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 관류액은 2개 이상의 개체로부터의 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 실시양태의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 2개 이상의 개체로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 1종 이상의 항암 화합물, 예를 들어 하기 섹션 6.8.2에 기재된 1종 이상의 항암 화합물을 추가로 포함한다.

[0044] 4.1. 정의

[0045] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역조절 화합물" 및 "IMiD™"는 탈리도미드를 포함하지 않는다.

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, "레날리도미드"는 3-(4'-아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-디온 (케미칼 앱스트랙츠 서비스(Chemical Abstracts Service) 명칭) 또는 2,6-피페리딘디온,3-(4-아미노-1,3-디히드로-1-옥소-2H-이소인돌-2-일)- (국제 순수 응용 화학 연합 (IUPAC) 명칭)을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "포말리도미드"는 4-아미노-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)이소인돌-1,3-디온을 의미한다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "다분화능(multipotent)"이 세포를 지칭하는 경우에 이것은 그 세포가 또 다른 세포 유형의 세포로 분화하는 능력을 갖는다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, "다분화능 세포"는 포유동물 신체의 대략 260종 세포 유형 중 임의의 하위세트로 성장하는 능력을 갖는 세포이다. 전분화능(pluripotent) 세포와는 달리, 다분화능 세포는 모든 세포 유형을 형성하는 능력은 갖지 못한다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, "영양 세포"는 제2 유형의 세포와 공동배양되어 상기 제2 유형의 세포가 유지될 수 있고 가능하다면 증식될 수도 있는 환경을 제공하는 한 유형의 세포를 지칭한다. 임의의 이론에 얽매이지 않고, 영양 세포는 예를 들어 펩티드, 폴리펩티드, 전기 신호, 유기 분자 (예를 들어, 스테로이드), 핵산 분자, 성장 인자 (예를 들어, bFGF), 다른 인자 (예를 들어, 시토카인) 및 대사 영양분을 표적 세포에 제공할 수 있다. 특정 실시양태에서, 영양 세포는 단층으로 성장한다.

[0049] 본원에서 사용된 바와 같이, "천연 킬러 세포" 또는 추가의 수식 없는 "NK 세포"는 임의의 조직 공급원으로부터의 천연 킬러 세포를 포함한다.

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, "TSNK" 및 "TSNK 세포"는 본원에 개시된 배양/증식 방법 (예를 들어, 2-단계 방법)으로 생성되는 천연 킬러 세포를 지칭한다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, "태반 관류액"은 태반, 예를 들어 인간 태반의 적어도 일부에 예를 들어 태반 혈관계에 통과시킨 관류 용액을 의미하며, 태반을 통과하는 동안 관류 용액에 의해 수집된 복수개의 세포를 포함한

다.

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 단리되거나 단리가능한 유핵 세포, 예를 들어 전체 유핵 세포를 의미한다.

[0053] 본원에서 사용된 바와 같이, "종양 세포 저해", "종양 세포 증식의 저해" 등은 예를 들어 종양 세포의 집단을 예를 들어 TSNK 세포 또는 TSNK 세포를 포함하는 세포 집단과 접촉시켜서 예를 들어 상기 종양 세포 집단 내 1개 이상의 종양 세포를 사멸시킴으로써 종양 세포 집단의 성장을 저속화하는 것을 포함한다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조혈 세포"는 조혈 줄기 세포 및 조혈 전구 세포를 포함한다.

[0055] 본원에서 사용된 바와 같이, "불특정 성분"은 구성성분이 일반적으로 제공되거나 정량화되지 않은 성분을 지칭하는 배양 배지 분야에서의 당업계 용어이다. "불특정 성분"의 예는 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB) 및 태아 혈청 (예를 들어, 태아 소 혈청 또는 태아 송아지 혈청)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0056] 본원에서 사용된 바와 같이, "+"가 특정 세포 마커의 존재를 가리키는데 사용되는 경우에 이것은 그 세포 마커가 형광 활성화 세포 분류에서 이소형 대조군에 비해 검출가능하게 존재하거나 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 백그라운드보다 더 검출가능함을 의미한다.

[0057] 본원에서 사용된 바와 같이, "-"가 특정 세포 마커의 존재를 가리키는데 사용되는 경우에 이것은 그 세포 마커가 형광 활성화 세포 분류에서 이소형 대조군에 비해 검출가능하게 존재하지 않거나 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 백그라운드보다 더 검출가능하지는 않음을 의미한다.

발명의 효과

[0058] 본원은 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반, 예를 들어 태반 관류액 (예를 들어, 인간 태반 관류액)으로부터 유래된 천연 킬러 세포, 예컨대 태반-유래 중간 천연 킬러 세포의 집단, 또는 다른 조직, 예컨대 제대혈 또는 말초혈로부터 유래된 천연 킬러 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다. 또한, 본원은 본원에서 제공되는 방법으로 생성되는 증식된 천연 킬러 세포 집단을 제공한다. 추가로, 본원은 태반 관류액, 및 그로부터의 천연 킬러 세포를 사용하여 종양 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0059] **5. 도면의 간단한 설명**

도 1: 다양한 배지 제제 사용시 조혈 줄기 세포 (HSC)로부터 분화된 NK 세포의 증식 배수. 오차 막대는 3개 공여자로부터의 표준 편차를 나타낸다. X축: 배양 일수 (D). Y축: 제0일 (배양 시작일)과 비교한 증식 배수.

도 2: NK2A 배지를 사용하여 배양된 NK 세포의 표현형 특징규명. 세포를 PE-항CD56, FITC-항CD3, PerCP-항CD16으로 삼중-표지하였다. 가로선, 세로선: 백그라운드보다 유의하게 더 높은 수준의 형광 표지.

도 3: NK2A (FF), NK2A (영양 세포로서 태반 줄기 세포 사용), NK2A (영양 세포로서 MSC 사용) 또는 2-단계 NK 배지를 사용하여 배양된 NK 세포의 증식 배수. X축: 배양 일수 (D). Y축: 제0일 (배양 시작일)과 비교한 증식 배수.

도 4: NK2A (영양 세포 없음), 2-단계 NK 배지, 영양 세포로서 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 줄기 세포 (PSC)를 함유하는 NK2A, 영양 세포로서 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 함유하는 NK2A를 사용하여 배양된 NK 세포의 세포독성 (배양 개시 후 제45일). 3개 공여자로부터의 대표적인 데이터를 도 4에 나타냈다.

도 5: 배양 제41일 (D41)에 NK 세포의 표현형 특징규명. 3개 개체의 공여자로부터의 대표적인 데이터를 나타냈다. X축: 2-단계 방법으로 생성된, $CD3^-CD56^+$, $CD16^-CD56^+$ 또는 $CD16^+CD56^+$ 또는 NKB1, NKG2D, NKp46, CD94, CD117, CD226, CD7 또는 CD5를 발현하는 NK 세포의 백분율(%). 세포를 NK2A (영양 세포 없음), 2-단계 NK 배지, 영양 세포로서 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 줄기 세포 (PSC)를 함유하는 NK2A, 영양 세포로서 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 함유하는 NK2A 중에서 배양하였다 (배양 개시 후 제41일).

도 6: NK2A 배지 중 NK 배양 동안 $CD56^+CD3^-$ NK 세포 집단의 CD94 및 CD117의 발현. NK2A 배지 중에서 배양된

NK 세포로부터 $CD56^{+}CD94^{+}CD117^{+}$ 세포 우세 집단을 확인하였고, 이것은 배아 줄기 세포 (ESC)-유래 NK 세포($CD56^{+}CD94^{+}CD117^{낮음/-}$)와 구별된다. 3개 공여자로부터의 대표적인 데이터를 도 6에 나타냈다. X축: 피코에리트린 (PE)-표지된 항-CD94로부터의 형광. Y축: APC-표지된 항CD117로부터의 형광. 가로선, 세로선: 백그라운드보다 유의하게 더 높은 수준의 형광 표지. D13, D20, D28, D35: $CD34^{+}$ 세포 배양 개시 후 제13일, 제20일, 제28일 및 제35일.

도 7: MSC 및 NK2A 배지 단독의 경우와 비교한, 배양된 NK 세포에 태반 줄기 세포가 미치는 효과. X축: 영양층(feeder layer) 없는 NK2A 배지 (FF) 중에서 배양된 NK 세포, 영양 층으로서 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (MCS)를 함유하는 NK2A 배지 또는 영양 층으로서 $CD10^{+}$, $CD34^{-}$, $CD105^{+}$, $CD200^{+}$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 줄기 세포 (PDAC)를 함유하는 NK2A 배지 중에서 배양된 NK 세포. Y축 (좌측): 남아있는 종양 세포의 백분율(%)로 표현한 세포독성 (1.0 = 100%) - 세포독성을 백색 사각형으로 표시함). Y축 (우측): 2-단계 방법을 이용한 NK 세포의 증식 배수 - 증식 배수를 별표로 표시함.

도 8A 및 도 8B: 해동후 $CD34^{+}$ 세포의 순도에 제대혈 (UCB) 및 인간 태반 관류액 (HPP)의 상대적 비율이 미치는 효과. 도 8A: $CD34^{+}Lin^{-}$ 순도에 HPP 부피비 함유율 (부피%)이 미치는 효과. X축: 풀링된 UCB 및 HPP (콤보) 중 HPP의 부피비. Y축: $CD34^{+}Lin^{-}$ 세포의 백분율(%). 도 8B: $CD34^{+}Lin^{-}$ 순도에 HPP TNC 함유율 (TNC%)이 미치는 효과. Y축: $CD34^{+}Lin^{-}$ 세포의 백분율(%).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] **6. 상세한 설명**

[0061] 본원은 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 NK 세포를 생성 및 증식시키는 신규 방법을 제공한다. NK 세포 생성에 사용되는 조혈 세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 비장 또는 간 (이에 제한되지 않음)으로부터 단리될 수 있다. 특정 실시양태에서, NK 세포는 증식된 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 및/또는 조혈 전구 세포로부터 생성된다. 한 실시양태에서, 조혈 세포는 이러한 세포의 공급원, 예를 들어 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 비장, 간 및/또는 골수로부터 수집된다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 제1 배지 중에서 영양 세포의 사용 없이 연속적으로 증식 및 분화된다. 이후, 세포는 제2 배지 중에서 영양 세포의 존재하에 배양된다. 이러한 단리, 증식 및 분화는 중앙 설비에서 수행될 수 있고, 여기서 증식된 조혈 세포를 사용 지점, 예를 들어 병원, 군사 기지, 군사 전선 등에서 추가로 증식 및 분화를 수행하도록 수송한다.

[0062] 6.1. 조혈 세포

[0063] 본원에 개시한 방법에 유용한 조혈 세포는 NK 세포로 분화할 수 있는 임의의 조혈 세포, 예를 들어 전구체 세포, 조혈 전구 세포, 조혈 줄기 세포 등일 수 있다. 조혈 세포는 예를 들어 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 간 등, 또는 이것들의 조합과 같은 조직 공급원으로부터 수득될 수 있다. 조혈 세포는 태반으로부터 수득될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 태반 관류액으로부터 수득된다. 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 태아 및 모계 조혈 세포의 혼합물, 예를 들어 모계 세포가 조혈 세포 총 개수의 5% 초과로 포함된 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 태아 세포를 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상 포함한다.

[0064] 또 다른 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포가 생성되는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 수득된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포가 생성되는 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액 및 제대혈, 예를 들어 상기 관류액과 동일한 태반의 제대혈로부터의 조합된 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 수득된 태반과는 다른 태반으로부터 단리된다. 특정 실시양태에서, 조합된 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 풀링 또는 조합하여 수득될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 부피비로 조합되어 조합된 세포가 수득된

다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5 (85%:15%)의 비율로 조합된다.

[0065] 특정 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 전체 유핵 세포 (TNC) 함유율로 조합되어 조합된 세포가 수득된다. 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 10:1, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비율로 조합된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비율로 조합된다.

[0066] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 TSNK 세포가 생성된 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 제대혈 및 태반 관류액 둘다로부터 생성되지만, 여기서 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 수득된 태반과는 다른 태반으로부터 단리된 것이다.

[0067] 특정 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+$ 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 개시한 방법에 유용한 조혈 세포는 $CD34^+CD38^+$ 또는 $CD34^+CD38^-$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD38^-Lin^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD2^-$, $CD3^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD14^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD24^-$, $CD56^-$, $CD66b^-$ 및/또는 글리코포린 A^- 중 1종 이상이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD2^-$, $CD3^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD14^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD24^-$, $CD56^-$, $CD66b^-$ 및 글리코포린 A^-이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD38^-CD33^-CD117^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD38^-CD33^-CD117^-CD235^-CD36^-$이다.

[0068] 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD45^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD45^+$이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $Thy\text{-}1^+$이다. 특정 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+Thy\text{-}1^+$이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD133^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD133^+$ 또는 $CD133^+Thy\text{-}1^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, $CD34^+$ 조혈 세포는 $CXCR4^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, $CD34^+$ 조혈 세포는 $CXCR4^-$이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 KDR (혈관 성장 인자 수용체 2)에 대해 양성이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+KDR^+$, $CD133^+KDR^+$ 또는 $Thy\text{-}1^+KDR^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 알데히드 데히드로게나제에 대해 양성 ($ALDH^+$)이고, 예를 들어 상기 세포는 $CD34^+ALDH^+$이다.

[0069] 특정 다른 실시양태에서, $CD34^+$ 세포는 $CD45^-$이다. 구체적인 실시양태에서, $CD34^+$ 세포, 예를 들어 $CD34^+$, $CD45^-$ 세포는 miRNA hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b 및/또는 hsa-miR-520a 중 1종 이상 또는 모두를 발현한다.

[0070] 특정 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^-$이다.

[0071] 조혈 세포는 또한 계통 위탁(lineage commitment)을 나타내는 특정 마커가 없을 수도 있고, 발생적 특징이 없을 수도 있다. 예를 들어, 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 $HLA\text{-}DR^-$이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+HLA\text{-}DR^-$, $CD133^+HLA\text{-}DR^-$, $Thy\text{-}1^+HLA\text{-}DR^-$ 또는 $ALDH^+HLA\text{-}DR^-$이다. 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 계통 마커 CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A 중 1종 이상, 바람직하게는 모두에 대해 음성이다.

[0072] 따라서, 본원에 개시된 방법에 사용하기 위한 조혈 세포는 미분화 상태를 나타내는 마커의 존재를 기초로 하거

나, 또는 적어도 일부 계통 분화가 일어났음을 나타내는 계통 마커의 부재를 기초로 하여 선택될 수 있다. 특이적 마커의 존재 또는 부재를 기초로 하여 조혈 세포를 포함하는 세포를 단리하는 방법은 예를 들어 하기 섹션 6.1.2에서 상세하게 논의된다.

[0073] 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포는 실질적으로 동종인 집단, 예를 들어 단일 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 약 95% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상 포함하는 집단, 또는 동일한 조혈 세포-관련 세포 마커를 나타내는 조혈 세포를 포함하는 집단일 수 있다. 예를 들어, 다양한 실시양태에서, 조혈 세포는 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 또는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 약 95%, 98% 또는 99% 이상 포함할 수 있다.

[0074] 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포는 단일 개체로부터, 예를 들어 단일 태반으로부터 수득될 수도 있고, 또는 복수개의 개체로부터 수득될 수도 있으며, 예를 들어 풀링될 수 있다. 조혈 세포가 복수개의 개체로부터 수득되고 풀링되는 경우, 상기 조혈 세포는 동일 조직 공급원으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 다양한 실시양태에서, 풀링된 조혈 세포는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 모든 세포, 태반 혈액으로부터의 모든 세포, 제대혈로부터의 모든 세포, 말초혈로부터의 모든 세포 등이다.

[0075] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 조혈 세포는 2종 이상의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 2종 이상의 공급원으로부터의 조혈 세포가 조합되어 본원에서의 방법에 사용되는 경우, TSNK 세포 생성을 위해 사용되는 복수개의 조혈 세포는 태반, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함한다. 다양한 실시양태에서, TSNK 세포 생성을 위해 사용되는 조혈 세포는 태반 및 제대혈로부터의 조혈 세포, 태반 및 말초혈로부터의 조혈 세포, 태반 및 태반 혈액으로부터의 조혈 세포, 또는 태반 및 골수로부터의 조혈 세포를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 조혈 세포는 제대혈로부터의 조혈 세포와 조합된 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함하고, 여기서 상기 제대혈 및 태반은 동일 개체로부터 유래된 것이고, 즉, 관류액 및 제대혈이 매치된다. 조혈 세포가 2종의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함하는 실시양태에서, 상기 공급원들로부터의 조혈 세포는 예를 들어 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1의 비율로 조합될 수 있다.

[0076] 6.1.1. 태반 조혈 줄기 세포

[0077] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포는 태반 조혈 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "태반 조혈 세포"는 태반 자체로부터 수득된 조혈 세포를 의미하며, 태반 혈액 또는 제대혈로부터 수득된 것은 의미하지 않는다. 한 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 우세하게 (예를 들어, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상) $CD34^+CD38^-$ 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 우세하게 (예를 들어, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상) $CD34^+CD38^+$ 세포이다. 태반 조혈 세포는 분만 후 포유동물 (예를 들어, 인간) 태반으로부터 당업자에게 공지된 임의의 수단, 예를 들어 관류를 통해 수득될 수 있다.

[0078] 또 다른 실시양태에서, 태반 조혈 세포 $CD45^-$이다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^+CD45^+$이다.

[0079] 6.2. 천연 킬러 세포의 생성

[0080] 본 발명의 방법에 의한 NK 세포의 생성은 조혈 세포의 집단을 증식시키는 것을 포함한다. 세포 증식 동안, 상기 조혈 세포 집단 내 복수개의 조혈 세포는 NK 세포로 분화하다.

[0081] 한 실시양태에서, 본원은 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 활성화된 천연 킬러 (NK) 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공한다.

[0082] 또 다른 실시양태에서, 본원에서 제공되는 NK 세포는 NK 세포의 증식/분화 및 성숙의 2-단계 방법으로

생성된다. 제1 단계 및 제2 단계는 상기 세포를 세포 인자의 독특한 조합을 함유하는 배지 중에 배양하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 조혈 세포를 제1 배지 중에 배양 및 증식시켜서 조혈 세포 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 NK 세포로 분화시키는 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 NK 세포를 제2 배지 중에서 증식시켜서 NK 세포를 추가로 증식 및 분화시키고 NK 세포를 성숙시키는 (예를 들어, 활성화시키거나 또는 달리 세포독성 활성을 보유하게 하는) 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이에 중간 단계를 포함하지 않고/거나 단계 (a) 이전에 추가의 배양 단계를 포함하지 않고/거나 단계 (b) 이후에 추가의 단계 (예를 들어, 성숙 단계)를 포함하지 않는다.

[0083] 6.2.1. 제1 배양 단계

[0084] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법은 조혈 세포의 집단을 제1 배지 중에서 배양 및 증식시켜서 상기 조혈 세포 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 NK 세포로 분화시키는 제1 단계를 포함한다.

[0085] 임의의 파라미터, 메카니즘 또는 이론에 얽매이지 않고, 본원에서 제공되는 바와 같은 조혈 세포의 배양에 의해 조혈 세포가 연속 증식되고 상기 세포로부터 NK 세포가 분화된다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에 사용되는 조혈 세포, 예를 들어 줄기 세포 또는 전구 세포는 제1 단계에서 영양 층을 사용하여 증식 및 분화된다. 다른 실시양태에서, 조혈 세포, 예를 들어 줄기 세포 또는 전구 세포는 제1 단계에서 영양 층의 사용 없이 증식 및 분화된다.

[0086] 조혈 세포의 영양 세포-독립적 증식 및 분화는 세포 배양 및 증식에 상용가능한 임의의 용기, 예를 들어 플라스크, 튜브, 비커, 디쉬, 멀티웰 플레이트, 백 등에서 수행될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포의 영양 세포-독립적 증식은 백, 예를 들어 가요성의 기체-투과가능한 플루오로카본 배양 백 (예를 들어, 아메리칸 플루오로실(American Fluoroseal) 제품)에서 수행된다. 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포가 증식되는 용기는 예를 들어 병원 또는 군사 지역과 같은 곳으로 운반하기에 적합하고, 여기서 상기 증식된 NK 세포가 추가로 증식 및 분화된다.

[0087] 특정 실시양태에서, 조혈 세포는 제1 배양 배지 중에서 예를 들어 연속 방식으로 증식 및 분화된다. 한 실시양태에서, 제1 배양 배지는 동물 성분-무함유 배지이다. 본원에서 제공되는 방법에 유용한 예시적인 동물 성분-무함유 배지는 기본 배지 이글 (Basal Medium Eagle, BME), 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), 글래스고 최소 필수 배지 (Glasgow Minimum Essential Medium, GMEM), 둘베코 변형 이글 배지/영양분 혼합물 F-12 햄 (Nutrient Mixture F-12 Ham) (DMEM/F-12), 최소 필수 배지 (Minimum Essential Medium, MEM), 이스코브 변형 둘베코 배지 (IMDM), 영양분 혼합물 F-10 햄 (햄 F-10(Ham's F-10)), 영양분 혼합물 F-12 햄 (햄 F-12(Ham's F-12)), RPMI-1640 배지, 윌리암스 배지 E (Williams' Medium E), 스템스판® (카탈로그 번호, 캐나다 밴쿠버 소재의 스템셀 테크놀로지즈(StemCell Technologies)), 글리코스템 기본 성장 배지 (Glycostem Basal Growth Medium, GBGM®), AIM-V® 배지 (인비트로젠(Invitrogen)), X-VIVO™ 10 (론자(Lonza)), X-VIVO™ 15 (론자), 옵트마이저 (인비트로젠), 스템스판® H3000 (스템셀 테크놀로지즈), 셀그로 컴플리트™ (메디아테크(Mediatech)), 또는 이것들의 임의의 변형된 변이물 또는 조합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0088] 바람직한 실시양태에서, 제1 배양 배지는 1종 이상의 배지 보충물 (예를 들어, 영양분, 시토카인 및/또는 인자)을 포함한다. 본원에서 제공되는 방법에 사용하기에 적합한 배지 보충물은 예를 들어 혈청, 예컨대 인간 혈청 AB, 태아 소 혈청 (FBS) 또는 태아 송아지 혈청 (FCS), 비타민, 소 혈청 알부민 (BSA), 아미노산 (예를 들어, L-글루타민), 지방산 (예를 들어, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린 (예를 들어, 재조합 인간 인슐린), 트랜스페린 (철 포화 인간 트랜스페린), β-메르캅토에탄올, 줄기 세포 인자 (SCF), Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드 (Flt3-L), 시토카인 예컨대 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15), 트롬보포이에틴 (Tpo), 헤파린 또는 O-아세틸-카르니틴 (또한, 아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴 또는 OAC라고 지칭되기도 함)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 본원에서 사용되는 배지는 인간 혈청 AB를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에서 사용되는 배지는 FBS를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 본원에서 사용되는 배지는 OAC를 포함한다.

[0089] 특정 실시양태에서, 제1 배지는 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터류킨-6 (IL-6), 대식세포 염증성 단백질 1α (MIP1α) 또는 백혈병 억제 인자 (LIF) 중 1종 이상을 포함하지 않는다.

[0090] 따라서, 한 측면에서, 본원은 NK 세포를 생성하는 2-단계 방법을 제공하고, 여기서 상기 제1 단계는 제1 배양 배지 중에서 영양 세포의 부재하에 조혈 세포의 집단을 증식 및 분화시키는 것을 포함하고, 이때 조혈 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 세포는 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화하고 상기 배지는 SCF를 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 포함하고, IL-2를 약 50 내지 약 1500 IU/mL의 농도로 포함하고, IL-7을 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 포함하고, IL-15를 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 포함하고, 헤파린을 약 0.1 내지 약 30 IU/mL의 농도로 포함하고, 여기서 상기 SCF, IL-2, IL-7, IL-15 및 헤파린은 상기 배지의 불특정 성분 (예를 들어, 혈청)에는 포함되지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 O-아세틸-카르니틴 (또한, 아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴 또는 OAC라고 지칭되기도 함), 또는 미토콘드리아에서의 아세틸-CoA 순환에 영향을 미치는 화합물, 티아조비빈, Y-27632, 피와이인테그린, Rho 키나제 (ROCK) 억제제, 카스파제 억제제 또는 다른 항-세포자멸 화합물/펩티드, NOVA-RS (쉐필드 바이오-사이언스) 또는 다른 소분자 성장 증진제 중 1종 이상을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 니코틴아미드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 배지는 약 0.5 mM 내지 10 mM의 OAC를 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 배지는 스템스판® H3000, 및/또는 DMEM:F12 및 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM의 OAC를 포함한다. 상기 방법의 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 GBGM®이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 스템스판® H3000 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 DMEM:F12 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. OAC는 본원에서 제공되는 배양 방법 동안 임의의 시점에 첨가될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 OAC는 제1 배지에 첨가되고/거나 제1 배양 단계 동안에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 상기 OAC는 제1 배지에 배양 제0일, 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일, 제8일, 제9일, 제10일, 제11일, 제12일, 제13일, 제14일, 제15일, 제16일, 제17일, 제18일, 제19일, 제20일, 제21일에 첨가된다. 구체적인 실시양태에서, 상기 OAC는 제1 배지에 제1 배양 단계의 제7일에 첨가된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 OAC는 제1 배지에 배양 제7일에 첨가되고, 제1 배양 단계 및 제2 배양 단계 전체 동안 존재한다. 특정 실시양태에서, 상기 OAC는 제2 배지에 및/또는 제2 배양 단계 동안에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 상기 OAC는 제2 배지에 배양 제22일, 제23일, 제24일, 제25일, 제26일, 제27일, 제28일, 제29일, 제30일, 제31일, 제32일, 제33일, 제34일, 제35일에 첨가된다.

[0091] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 약 5% 내지 20% BSA, 약 1 내지 10 ㎍/mL 재조합 인간 인슐린, 약 10 내지 50 ㎍/mL 철 포화 인간 트랜스페린 및 약 10 내지 50 μM β-메르캅토에탄올이 보충된 IMDM이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 IL-11, IL-3, 호메오박스(homeobox)-B4 (HoxB4) 및/또는 메틸셀룰로스 중 1종 이상을 포함하지 않거나 어느 것도 포함하지 않는다.

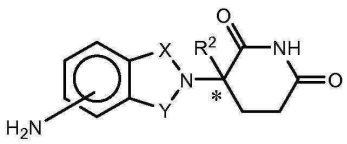
[0092] 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 SCF를 약 0.1 내지 약 500 ng/mL, 약 5 내지 약 100 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 IL-2를 약 10 내지 약 2000 IU/mL 또는 약 100 내지 약 500 IU/mL, 또는 약 200 IU/mL의 농도로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 IL-7을 약 0.1 내지 약 500 ng/mL, 약 5 내지 약 100 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 IL-15를 약 0.1 내지 약 500 ng/mL, 약 5 내지 약 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 헤파린을 약 0.05 내지 약 100 U/mL 또는 약 0.5 내지 약 20 U/mL, 또는 약 1.5 U/mL의 농도로 포함한다.

[0093] 상기 방법의 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드 (Flt-3L)를 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, 트롬보포이에틴 (Tpo)을 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, 또는 이것들 둘다의 조합물을 추가로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 Flt-3L을 약 0.1 내지 약 500 ng/mL, 약 5 내지 약 100 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 배지는 Tpo를 약 0.1 내지 약 500 ng/mL, 약 5 내지 약 100 ng/mL, 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다.

[0094] 상기 방법의 더욱 구체적인 실시양태에서, 제1 배양 배지는 GBGM®이고, 이것은 약 20 ng/mL SCF, 약 20 ng/mL IL-7, 약 10 ng/mL IL-15를 포함한다. 상기 방법의 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 제1 배양 배지는 GBGM®이고, 이것은 약 20 ng/mL SCF, 약 20 ng/mL Flt3-L, 약 200 IU/mL IL-2, 약 20 ng/mL IL-7, 약 10 ng/mL IL-15, 약 20 ng/mL Tpo, 및 약 1.5 U/mL 헤파린을 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 제1 배양 배지는 10% 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB) 또는 태아 혈청 (예를 들어, FBS)을 추가로 포함한다.

[0095] 또 다른 실시양태에서, 조혈 세포는 상기 세포를 예를 들어 상기 제1 배지 중에서 면역조절 화합물과 접촉하지 않은 동등한 수의 조혈 세포에 비해 주어진 시간에 걸쳐서 상기 조혈 세포의 증식에 검출가능한 증가를 야기하

기에 충분한 시간 및 양으로 면역조절 화합물, 예를 들어 TNF-α 억제성 화합물과 접촉시켜 배양하여 증식된다. 예를 들어 미국 특허 출원 공개 제2003/0235909호를 참조하며, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다. 특정 실시양태에서, 면역조절 화합물은 아미노-치환된 이소인돌린이다. 바람직한 실시양태에서, 면역조절 화합물은 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-디히드로이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-디온, 3-(4'-아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-디온, 4-(아미노)-2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-디온 또는 4-아미노-2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)이소인돌-1,3-디온이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 면역조절 화합물은 포말리도미드 또는 레날리도미드이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 포접화합물, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체 또는 입체이성질체 혼합물이다:

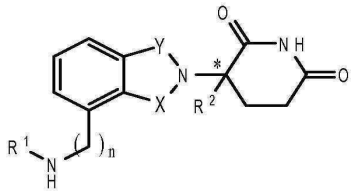
[0096] 

[0097] 상기 식에서,

[0098] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, X 및 Y 중 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고,

[0099] R^2는 수소 또는 저급 알킬이다,

[0100] 또 다른 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 포접화합물, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체 또는 입체이성질체 혼합물이다:

[0101] 

[0102] 상기 식에서,

[0103] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH_2 또는 C=O이고,

[0104] R^1은 H, (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)시클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, $C(O)R^3$, $C(S)R^3$, $C(O)OR^4$, (C_1-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, $C(O)NHR^3$, $C(S)NHR^3$, $C(O)NR^3R^{3'}$, $C(S)NR^3R^{3'}$ 또는 (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$이고,

[0105] R^2는 H, F, 벤질, (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐 또는 (C_2-C_8)알키닐이고,

[0106] R^3 및 $R^{3'}$는 독립적으로 (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)시클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, (C_0-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$ 또는 $C(O)OR^5$이고,

[0107] R^4는 (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, (C_1-C_4)알킬-OR^5, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로시클로알킬 또는 (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴이고,

[0108] R^5는 (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴 또는 (C_2-C_5)헤테로아릴이고,

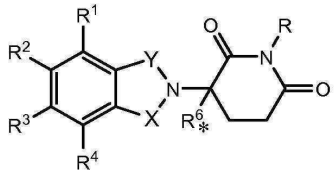
[0109] 각 경우의 R^6은 독립적으로 H, (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_2-C_5)헤테로아릴 또는

(C_0-C_8)알킬-C(O)O-R^5이거나, 또는 R^6 기가 연결되어 헤테로시클로알킬 기를 형성할 수 있고,

[0110] n은 0 또는 1이며,

[0111] *는 키랄-탄소 중심을 나타낸다.

[0112] 또 다른 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 포접화합물, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체 또는 입체이성질체 혼합물이다:

[0113] 

[0114] 상기 식에서,

[0115] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH_2 또는 C=O이고,

[0116] R은 H 또는 CH_2OCOR'이고,

[0117] (i) 각각의 R^1, R^2, R^3 또는 R^4는 서로 독립적으로 할로, 1개 내지 4개 탄소 원자의 알킬 또는 1개 내지 4개 탄소 원자의 알콕시이거나, 또는 (ii) R^1, R^2, R^3 또는 R^4 중 하나는 니트로 또는 -NHR^5이고, R^1, R^2, R^3 또는 R^4 중 나머지는 수소이고,

[0118] R^5는 수소 또는 1개 내지 8개 탄소의 알킬이고,

[0119] R^6은 수소, 1개 내지 8개 탄소 원자의 알킬, 벤조, 클로로 또는 플루오로이고,

[0120] R'는 R^7-CHR^{10}-$N(R^8R^9)$이고,

[0121] R^7은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 -(C_nH_{2n})- (여기서, n은 0 내지 4의 값을 가짐)이고,

[0122] 각각의 R^8 및 R^9는 서로 독립적으로 수소 또는 1개 내지 8개 탄소 원자의 알킬이거나, 또는 R^8 및 R^9가 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌 또는 -$CH_2CH_2X_1CH_2CH_2$- (여기서, X_1은 -O-, -S- 또는 -NH-임)이고,

[0123] R^{10}은 수소, 1개 내지 8개 탄소 원자의 알킬 또는 페닐이며,

[0124] *는 키랄-탄소 중심을 나타낸다.

[0125] 구체적인 실시양태에서, 조혈 세포의 증식은 20% BITS (소 혈청 알부민, 재조합 인간 인슐린 및 트랜스페린), SCF, Flt-3 리간드, IL-3 및 4-(아미노)-2-(2,6-디옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-디온 (0.05% DMSO 중 10 μM)이 보충된 IMDM 중에서 수행된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 약 5×10^7개의 조혈 세포, 예를 들어 $CD34^+$ 세포가 상기 배지 중에서 약 5×10^{10}개의 세포 내지 약 5×10^{12}개의 세포로 증식되고, 이것을 IMDM 100 mL 중에 재현탁하여 증식된 조혈 세포의 집단을 생성한다. 증식된 조혈 세포의 집단은 운반을 용이하게 하기 위해서 동결보존시키는 것이 바람직하다.

[0126] 다양한 구체적인 실시양태에서, 상기 조혈 세포 중 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 이상이 NK 세포로 분화된다.

[0127] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 조혈 세포의 증식 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 증식 및 분화 동안에 1 밀리리터 당 약 2×10^4개 내지 약 2×10^5개 세포로 유지하는 것을 포함한다. 특정 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 조혈 세포의 증식 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 1 밀리리터 당 약 1×10^5개 이하의 세포로 유지하는 것을 포함한다.

[0128] 조혈 세포를 NK 세포로 증식 및 분화시키는 시간은 예를 들어 약 3일 내지 약 120일일 수 있다. 한 실시양태에서, 분화 시간은 약 7일 내지 약 75일이다. 또 다른 실시양태에서, 분화 시간은 약 14일 내지 약 50일이다. 구체적인 실시양태에서, 분화 시간은 약 21일 내지 약 28일이다.

[0129] 6.2.2. 제2 단계

[0130] 본원에서 제공되는 방법에서, 제1 단계로부터 수득된 조혈 세포, 예를 들어 줄기 세포 또는 전구 세포, 및 천연 킬러 세포는 제2 단계에서 예를 들어 영양 층의 사용 없이 또는 영양 세포의 존재하에 추가로 증식 및 분화된다. 본원은 제공되는 바와 같은 세포 배양으로 제1 단계로부터의 NK 세포가 연속 증식, 분화 및 또한 성숙된다. 제2 단계에서, NK 세포는 예를 들어 상기 제1 배지와는 상이한 시토카인 및/또는 생물활성 분자를 포함하는 제2 배양 배지 중에서 연속 방식으로 증식, 분화 및 성숙된다. 특정 실시양태에서, 제2 배양 배지는 동물 성분-무함유 배지이다. 예시적인 동물 성분-무함유 세포 배양 배지는 상기 섹션 6.2.1에 기재되어 있다.

[0131] 따라서, 한 측면에서, 본원은 상기 기재된 제1 단계로부터의 NK 세포를 제2 배지 중에서 영양 세포의 존재하에 인터류킨-2 (IL-2)와의 접촉하에 증식시키는 것을 포함하는, NK 세포의 생성 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지는 IL-2, 예를 들어 10 IU/mL 내지 1000 IU/mL, 및 다음 중 1종 이상을 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다: 인간 혈청 (예를 들어, 인간 혈청 AB), 태아 소 혈청 (FBS) 또는 태아 송아지 혈청 (FCS), 예를 들어 5% 내지 15% FCS v/v; 트랜스페린, 예를 들어 10 μg/mL 내지 50 μg/mL; 인슐린, 예를 들어 5 μg/mL 내지 20 μg/mL; 에탄올아민, 예를 들어 5×10^{-4} 내지 5×10^{-5} M; 올레산, 예를 들어 0.1 μg/mL 내지 5 μg/mL; 리놀레산, 예를 들어 0.1 μg/mL 내지 5 μg/mL; 팔미트산, 예를 들어 0.05 μg/mL 내지 2 μg/mL,; 소 혈청 알부민 (BSA), 예를 들어 1 μg/mL 내지 5 μg/mL; 및/또는 식물성적혈구응집소, 예를 들어 0.01 μg/mL 내지 1 μg/mL. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지는 FBS 또는 FCS, 예를 들어 10% FCS v/v, IL-2, 트랜스페린, 인슐린, 에탄올아민, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 소 혈청 알부민 (BSA) 및 식물성적혈구응집소를 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지는 이스코브 변형 둘베코 배지 (IMDM), 10% FBS 또는 FCS, 400 IU IL-2, 35 μg/mL 트랜스페린, 5 μg/mL 인슐린, 2×10^{-5} M 에탄올아민, 1 μg/mL 올레산, 1 μg/mL 리놀레산 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 0.2 μg/mL 팔미트산 (시그마-알드리치), 2.5 μg/mL BSA (시그마-알드리치) 및 0.1 μg/mL 식물성적혈구응집소를 포함한다.

[0132] 특정 실시양태에서, 제2 배지는 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF), 인터류킨-6 (IL-6), 대식세포 염증성 단백질 1α (MIP1α) 또는 백혈병 억제 인자 (LIF) 중 1종 이상을 포함하지 않는다.

[0133] 상기 방법에 추가하여, 본원은 임의의 상기 배지를 조성물로서 제공한다.

[0134] 영양 세포가 사용되는 경우, 이것은 다양한 세포 유형으로부터 수립될 수 있다. 이들 세포 유형의 예는 섬유모세포, 줄기 세포 (예를 들어, 조직 배양-접착성 태반 줄기 세포), 혈액 세포 (예를 들어, 말초혈 단핵 세포 (PBMC)) 및 암성 세포 (예를 들어, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 예컨대 K562)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 상기 제2 배지 중에서의 상기 배양은 예를 들어 세포를 상기 제2 배지 중에서 배양하기 시작한지 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 10일 후의 시점에 영양 세포, 예를 들어 K562 세포 및/또는 말초혈 단핵 세포 (PBMC)를 사용하여 배양하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 영양 세포는 임의로 이것들이 부양하고 있는 세포와는 상이한 종으로부터 수득된다. 예를 들어, 인간 NK 세포는 마우스 배아 섬유모세포 (초대 배양물 또는 텔로머화된 세포주(telomerized line)로부터의 것)에 의해 부양될 수 있다.

[0135] 특정 실시양태에서, 영양 세포를 조사 (예를 들어, γ-조사) 또는 항-유사분열 작용제, 예컨대 미토마이신 C 처리에 의해 임의로 불활성화시켜서 이것들이 부양하고 있는 세포보다 과성장하는 것을 방지하면서도 NK 세포를 부양하는 중요 인자의 합성은 허용한다. 예를 들어, 세포를, 증식은 억제하지만 인간 배아 줄기 (hES) 세포를 부양하는 중요 인자의 합성은 허용하는 용량으로 조사한다 (약 4000 rad의 감마 조사).

[0136] 제2 단계를 위한 NK 세포의 배양은 세포 배양 및 증식에 상용가능한 임의의 용기, 예를 들어 플라스크, 튜브, 비커, 디쉬, 멀티웰 플레이트, 백 등에서 수행될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포의 영양 세포-의존적 배양은 백, 예를 들어 가요성의 기체-투과가능한 플루오로카본 배양 백 (예를 들어, 아메리칸 플루오로실 제품)에서 수행된다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포가 배양되는 용기는 예를 들어 병원 또는 군사 지역과 같은 곳으로 운반하기에 적합하고, 여기서 상기 증식된 NK 세포가 추가로 증식, 분화 및 성숙된다.

[0137] 단계 1로부터의 세포가 TSNK 세포로 분화하는 것은, 예를 들어 유동 세포계측을 통해 NK 세포-특이적 마커를 검출하여 평가할 수 있다. NK 세포-특이적 마커는 CD56, CD94, CD117 및 NKp46을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 분화는 또한 NK 세포의 형태상의 특징, 예를 들어 커다란 크기, 풍부한 소포체 (ER) 중 높은 단백질 합성 활성 및/또는 사전형성된 과립으로 평가할 수도 있다.

[0138] 단계 1로부터의 세포가 TSNK 세포로 증식 및 분화하는 시간은 예를 들어 약 3일 내지 약 120일일 수 있다. 한 실시양태에서, 분화 시간은 약 7일 내지 약 75일이다. 또 다른 실시양태에서, 분화 시간은 약 14일 내지 약 50일이다. 구체적인 실시양태에서, 분화 시간은 약 10일 내지 약 21일이다.

[0139] 조혈 세포가 NK 세포로 분화하는 것은 예를 들어 유동 세포계측을 통해 마커, 예를 들어 CD56, CD94, CD117, NKG2D, DNAM-1 및 NKp46을 검출하여 평가할 수 있다. 분화는 또한 NK 세포의 형태상의 특징, 예를 들어 커다란 크기, 풍부한 소포체 (ER) 중 높은 단백질 합성 활성 및/또는 사전형성된 과립으로 평가할 수도 있다. NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)의 성숙은 1종 이상의 기능적 관련 마커, 예를 들어 CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR, 및 NKG2 부류의 활성화 수용체 (예를 들어, NKG2D)를 검출하여 평가할 수 있다. NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)의 성숙은 또한 여러 발생 단계 동안 특이적 마커를 검출하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 프로-NK 세포는 $CD34^{+}$, $CD45RA^{+}$, $CD10^{+}$, $CD117^{-}$ 및/또는 $CD161^{-}$이다. 또 다른 실시양태에서, 프리-NK 세포는 $CD34^{+}$, $CD45RA^{+}$, $CD10^{-}$, $CD117^{+}$ 및/또는 $CD161^{-}$이다. 또 다른 실시양태에서, 미성숙 NK 세포는 $CD34^{-}$, $CD117^{+}$, $CD161^{+}$, $NKp46^{-}$ 및/또는 $CD94/NKG2A^{-}$이다. 또 다른 실시양태에서, $CD56^{\text{브라이트(bright)}}$ NK 세포는 $CD117^{+}$, $NKp46^{+}$, $CD94/NKG2A^{+}$, $CD16^{-}$ 및/또는 $KIR^{+/-}$이다. 또 다른 실시양태에서, $CD56^{\text{딤(dim)}}$ NK 세포는 $CD117^{-}$, $NKp46^{+}$, $CD94/NKG2A^{+/-}$, $CD16^{+}$ 및/또는 KIR^{+}이다. 구체적인 실시양태에서, NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)의 성숙은 $CD161^{-}$, $CD94^{+}$ 및/또는 $NKp46^{+}$인 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)의 백분율(%)로 결정된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 성숙 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포) 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% 이상이 $NKp46^{+}$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 성숙 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포) 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상이 $CD94^{+}$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 성숙 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포) 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상이 $CD161^{-}$이다.

[0140] 특정 실시양태에서, 조혈 세포가 NK 세포로 분화하는 것은 예를 들어 CD3, CD7 또는 CD127, CD10, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD56, CD94, CD117, CD161, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4 또는 TO-PRO-3의 발현 수준을 예를 들어 1종 이상의 이들 세포 마커에 대한 항체로 검출하여 평가한다. 이러한 항체는 검출가능한 표지, 예를 들어 형광 표지로서는 예를 들어 FITC, R-PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7 또는 APC-H7에 접합될 수 있다.

[0141] 6.3. TSNK 세포의 단리

[0142] 천연 킬러 세포를 단리하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 이것을 이용하여 TSNK 세포를 단리할 수 있다. 천연 킬러 세포는 조직 공급원, 예를 들어 말초혈로부터의 세포를 CD56 및 CD3에 대한 항체로 염색하고 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 선별하여 단리되거나 풍부해질 수 있다. TSNK 세포는 시판 키트, 예를 들어 NK 세포 단리 키트(NK Cell Isolation Kit) (밀테니이 바이오테크(Miltenyi Biotec))를 사용하여 단리할 수 있다. TSNK 세포는 또한 TSNK 세포를 포함하는 세포 집단에서 NK 세포 이외의 세포를 제거함으로써 단리되거나 풍부해질 수 있다. 예를 들어, TSNK 세포는 예를 들어 CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR 및/또는 CD235a (글리코포린 A) 중 1종 이상에 대한 항체를 사용하여 비-NK 세포 마커를 디스플레이하는 세포를 고갈시킴으로써 단리되거나 풍부해질 수 있다. 음성 단리는 시판 키트, 예를 들어 NK 세포 음성 단리 키트(NK Cell Negative Isolation Kit) (다이날 바이오테크(Dynal Biotech))를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 방법으로 단리된 세포는 추가로 분류될 수 있고, 예를 들어 $CD16^{+}$ 및 $CD16^{-}$ 세포를 분리할 수 있다.

[0143] 세포 분리는 예를 들어 유동 세포계측, 형광-활성화 세포 분류 (FACS) 또는 바람직하게는 특이적 항체와 접합된 마이크로비드를 사용한 자성 세포 분류로 수행될 수 있다. 세포는 예를 들어 자성 활성화된 세포 분류 (MACS) 기술로 단리될 수 있고, 이것은 1종 이상의 특이적 항체, 예를 들어 항-CD56 항체를 포함하는 자성 비드 (예를 들어, 약 0.5 내지 100 ㎛ 직경)에 결합하는 능력을 기초로 입자를 분리하는 방법이다. 자성 세포 분리는 예를

들어 오토맥스(AUTOMACS)™ 분리기 (밀테니이)를 사용하여 수행되고 자동화될 수 있다. 특정 세포 표면 분자 또는 합텐을 특이적으로 인식하는 항체의 공유 첨가를 포함하여 자성 미소구에 대한 다양한 유용한 변형이 수행될 수 있다. 이후, 비드를 세포와 혼합하여 결합이 허용될 수 있다. 이후, 세포가 자성 영역을 지나면서 특이적 세포 표면 마커를 갖는 세포가 분리된다. 한 실시양태에서, 이후에 이들 세포를 단리하고, 추가의 세포 표면 마커에 대한 항체와 커플링된 자성 비드와 다시 혼합할 수 있다. 상기 세포는 다시 자성 영역을 지나면서 상기 항체 둘다에 결합하는 세포가 단리된다. 이후, 이러한 세포는 별도의 디쉬, 예컨대 클론 단리용 마이크로역가 디쉬로 희석될 수 있다.

[0144] 6.4. 태반 관류액

[0145] TSNK 세포는 임의의 공급원, 예를 들어 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 비장, 간 등의 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조혈 줄기 세포는 태반 관류액 및 상기 태반 관류액 생성에 사용된 것과 동일한 태반의 제대혈로부터 조합된 조혈 줄기 세포이다. 태반 관류액 세포를 포함하는 태반 관류액은 예를 들어 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,468,276호 (상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 포함됨)에 개시된 방법으로 수득될 수 있다.

[0146] 6.4.1. 세포 수집 조성물

[0147] 조혈 줄기 또는 전구 세포가 단리될 수 있거나 예를 들어 본원에서 제공되는 바와 같은 TSNK 세포와 조합되어 종양 세포, 암 또는 바이러스 감염이 있는 개체의 종양 저해 또는 치료에 유용한 태반 관류액 및 관류액 세포는 포유동물, 예를 들어 인간의 분만 후 태반을 태반 세포 수집 조성물로 관류시켜서 수집될 수 있다. 관류액은 태반을 임의의 생리적으로 허용되는 용액, 예를 들어 염수 용액, 배양 배지, 또는 보다 복합적인 세포 수집 조성물로 관류시켜서 태반으로부터 수집될 수 있다. 태반의 관류 및 관류액 세포의 수집 및 보존에 적합한 세포 수집 조성물은 관련 미국 출원 공개 제2007/0190042호에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0148] 세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 임의의 생리적으로 허용되는 용액, 예를 들어 염수 용액 (예를 들어, 인산염 완충 염수, 크렙(Kreb's) 용액, 변형된 크렙 용액, 이글 용액, 0.9% NaCl 등), 배양 배지 (예를 들어, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0149] 세포 수집 조성물은 수집 시점부터 배양 시점까지 태반 세포를 보존하는 경향, 즉, 태반 세포의 건조를 방지하거나 태반 세포의 사멸을 지연시키거나, 세포 집단 중에서 사멸하는 태반 세포의 수를 감소시키는 등의 경향을 갖는 1종 이상의 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 예를 들어 세포자멸 억제제 (예를 들어, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제), 혈관확장제 (예를 들어, 황산마그네슘, 항고혈압 약물, 심방 나트륨이뇨 펩티드 (ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 나트륨 니트로프루시드, 히드랄라진, 아데노신 트리포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 황산마그네슘, 포스포디에스테라제 억제제 등), 괴사 억제제 (예를 들어, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노-말레이미드, 피롤리딘 디티오카르바메이트 또는 클로나제팜), TNF-α 억제제 및/또는 산소-수송 퍼플루오로카본 (예를 들어, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0150] 세포 수집 조성물은 1종 이상의 조직-분해 효소, 예를 들어 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 히알루로니다제, RNase 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 이러한 효소는 콜라게나제 (예를 들어, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스톨리티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등), 디스파제, 써몰리신, 엘라스타제, 트립신, 리버라제(LIBERASE), 히알루로니다제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0151] 세포 수집 조성물은 살균 또는 정균 유효량의 항생제를 포함할 수 있다. 특정 비-제한적인 실시양태에서, 상기 항생제는 마크롤리드 (예를 들어, 토브라마이신), 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 V) 또는 퀴놀론 (예를 들어, 오플록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라시클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 실시양태에서, 상기 항생제는 그람(Gram)(+) 및/또는 그람(-) 박테리아, 예를 들어 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스타필로콕쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.

[0152] 세포 수집 조성물은 또한 하기 화합물 중 1종 이상을 포함할 수 있다: 아데노신 (약 1 mM 내지 약 50 mM), D-글루코스 (약 20 mM 내지 약 100 mM), 마그네슘 이온 (약 1 mM 내지 약 50 mM), 한 실시양태에서는 내피 통합성

및 세포 생존율 유지에 충분한 양으로 존재하는 분자량 20,000 달톤 초과의 거대분자 (예를 들어, 합성 또는 천연 발생 콜로이드, 폴리사카라이드, 예컨대 덱스트란 또는 폴리에틸렌 글리콜 (약 25 g/L 내지 약 100 g/L 또는 약 40 g/L 내지 약 60 g/L로 존재함)), 항산화제 (예를 들어, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E (약 25 μM 내지 약 100 μM로 존재함)), 환원제 (예를 들어, 약 0.1 mM 내지 약 5 mM로 존재하는 N-아세틸시스테인), 세포로의 칼슘 유입을 방지하는 작용제 (예를 들어, 약 2 μM 내지 약 25 μM로 존재하는 베라파밀), 니트로글리세린 (예를 들어, 약 0.05 g/L 내지 약 0.2 g/L), 한 실시양태에서는 잔류 혈액의 응고 방지를 돕는데 충분한 양으로 존재하는 항응고제 (예를 들어, 헤파린 또는 히루딘 (약 1000 유닛/L 내지 약 100,000 유닛/L의 농도로 존재함)), 또는 아밀로리드 함유 화합물 (예를 들어, 아밀로리드, 에틸 이소프로필 아밀로리드, 헥사메틸렌 아밀로리드, 디메틸 아밀로리드 또는 이소부틸 아밀로리드 (약 1.0 μM 내지 약 5 μM로 존재함)).

[0153] 6.4.2. 태반의 수집 및 취급

[0154] 일반적으로, 인간 태반은 출생 후 축출된 후에 바로 회수된다. 바람직한 실시양태에서, 태반은 환자로부터 사전 동의 후에 회수되고, 환자의 완전한 의학적 병력을 수집하여 상기 태반 수집물에 기재한다. 바람직하게는, 의학적 병력 기재는 분만 후에도 지속된다.

[0155] 제대혈 및 태반 혈액은 관류액의 회수 이전에 제거된다. 특정 실시양태에서, 분만 후에 태반의 제대혈을 회수한다. 태반은 통상적인 제대혈 회수 과정을 거칠 수 있다. 전형적으로, 바늘 또는 캐뉼라가 사용되며, 태반의 방혈(exsanguination)을 위해 중력의 도움을 받는다 (예를 들어, 앤더슨(Anderson)의 미국 특허 제5,372,581호, 헤셀(Hessel) 등의 미국 특허 제5,415,665호 참조). 바늘 또는 캐뉼라는 통상적으로 제대 정맥에 배치하고, 태반을 부드럽게 마사지하여 태반으로부터 제대혈을 빼내는데 도움을 줄 수 있다. 이러한 제대혈 회수는 예를 들어 라이프뱅크 인크.(LifeBank Inc.) (미국 뉴저지주 세다 크놀즈 소재), 비아코드(ViaCord), 코드 블러드 레지스트리(Cord Blood Registry) 및 크리오셀(CryoCell)을 통해 상업적으로 수행될 수 있다. 바람직하게는, 태반을 추가의 조작 없이 중력으로 빼내어 제대혈 회수 동안의 조직 파괴를 최소화한다.

[0156] 전형적으로, 태반을 분만실에서 또 다른 위치, 예를 들어 실험실로 수송하여 제대혈을 회수하고 관류액을 수집한다. 바람직하게는, 태반을 멸균 단열 수송 장치 (태반의 온도를 20℃ 내지 28℃로 유지함)에서 수송하고, 예를 들어 태반을 근위 제대를 클램핑한 상태로 멸균 집-락(zip-lock) 플라스틱 백에 넣은 후에 단열 용기에 넣는다. 또 다른 실시양태에서, 태반을 실질적으로 미국 특허 제7,147,626호에 기재된 바와 같은 제대혈 수집 키트에서 수송한다. 바람직하게는, 태반은 분만 후 4시간 내지 24시간 이내에 실험실로 전달된다. 특정 실시양태에서, 근위 제대를 제대혈 회수 전에 태반 디스크로의 삽입부로부터 바람직하게는 4 cm 내지 5 cm (센티미터) 이내에서 클램핑한다. 다른 실시양태에서, 근위 제대를 제대혈 회수 이후 및 태반의 추가 처리 이전에 클램핑한다.

[0157] 관류액 수집 전에 태반을 멸균 조건하에 실온 또는 5℃ 내지 25℃의 온도 (섭씨온도)에 저장할 수 있다. 태반은 태반 관류 전에 48시간 초과의 기간, 바람직하게는 4시간 내지 24시간의 기간 동안 저장하여 임의의 잔류 제대혈을 제거할 수 있다. 태반은 바람직하게는 항응고제 용액 중에 5℃ 내지 25℃의 온도 (섭씨온도)에 저장된다. 적합한 항응고제 용액은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 헤파린 또는 와파린 나트륨 용액을 사용할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항응고제 용액은 헤파린 용액 (예를 들어, 1:1000 용액 중 1% w/w)을 포함한다. 방혈된 태반은 바람직하게는 태반 관류액 수집 전에 36시간 이하 동안 저장한다.

[0158] 6.4.3. 태반 관류액

[0159] 포유동물 태반을 관류하고 태반 관류액을 수득하는 방법은 예를 들어 하리리(Hariri)의 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,255,879호, 및 미국 출원 공개 제2007/0190042호 및 제20070275362호에 개시되어 있고, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0160] 관류액은 관류 용액, 예를 들어 상기 기재된 염수 용액, 배양 배지 또는 세포 수집 조성물을 태반 혈관계에 통과시켜 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 포유동물 태반은 관류 용액을 제대 동맥 및 제대 정맥 중 어느 하나 또는 둘다에 통과시켜 관류된다. 관류 용액을 태반을 통해 흘려주는 것은 예를 들어 태반으로의 중력식 유동을 이용하여 수행될 수 있다. 바람직하게는, 관류 용액은 펌프, 예를 들어 연동 펌프를 이용하여 태반을 통해 가압된다. 제대 정맥은 예를 들어 멸균 연결 장치, 예컨대 멸균 튜빙에 연결된 캐뉼라, 예를 들어 테플론(TEFLON)® 또는 플라스틱 캐뉼라로 캐뉼라삽입될 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 매니폴드에 연결된다.

[0161] 관류 준비시에, 태반은 제대 동맥 및 제대 정맥이 태반의 가장 높은 지점에 위치되도록 하는 방식으로 배향되는

것이 바람직하다. 태반은 관류 용액을 태반 혈관계에 통과시키거나 태반 혈관계 및 주변 조직에 통과시켜 관류될 수 있다. 한 실시양태에서, 제대 동맥 및 제대 정맥은 가요성 커넥터를 통해 관류 용액의 저장고에 연결된 피펫에 동시에 연결된다. 관류 용액을 제대 정맥 및 동맥에 통과시킨다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 및/또는 이것을 통해 태반의 주변 조직으로 들어가고, 임신 동안에 모체의 자궁에 부착되었던 태반의 표면으로부터 적합한 개방형 용기에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구부를 통해 도입될 수도 있고 모체의 자궁 벽과 경계를 형성했던 태반 벽 내의 개구부 밖으로 흘러나오거나 스며들게 될 수도 있다. 또 다른 실시양태에서, 관류 용액을 제대 정맥에 통과시켜 제대 동맥으로부터 수집하거나, 또는 관류 용액을 제대 동맥에 통과시켜서 제대 정맥으로부터 수집하며, 즉, 오직 태반 혈관계 (태아 조직)만을 통과시킨다.

[0162] 한 실시양태에서, 예를 들어 제대 동맥 및 제대 정맥은 예를 들어 가요성 커넥터를 통해 관류 용액의 저장고에 연결된 피펫에 동시에 연결된다. 관류 용액을 제대 정맥 및 동맥에 통과시킨다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 및/또는 이것을 통해 태반의 주변 조직으로 들어가고, 임신 동안에 모체의 자궁에 부착되었던 태반의 표면으로부터 적합한 개방형 용기에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대 개구부를 통해 도입될 수도 있고 모체의 자궁 벽과 경계를 형성했던 태반 벽 내의 개구부 밖으로 흘러나오거나 스며들게 될 수도 있다. "팬(pan)" 방법이라고 지칭될 수 있는 이러한 방법으로 수집되는 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모계 세포의 혼합물이다.

[0163] 또 다른 실시양태에서, 관류 용액을 제대 정맥에 통과시켜 제대 동맥으로부터 수집하거나, 또는 관류 용액을 제대 동맥에 통과시켜서 제대 정맥으로부터 수집한다. "폐쇄형 회로" 방법이라고 지칭될 수 있는 이러한 방법으로 수집된 태반 세포는 전형적으로 거의 전적으로 태아의 것이다.

[0164] 한 실시양태에서, 폐쇄형 회로 관류 방법은 다음과 같이 수행될 수 있다. 분만 후 태반을 분만 약 48시간 이내에 수득한다. 제대를 클램핑하고, 클램프 윗부분을 절단한다. 제대는 폐기될 수도 있고, 또는 예를 들어 제대 줄기 세포 회수를 위한 처리를 하고/하거나 생체물질 생성을 위해 제대 막을 처리하는 과정을 거칠 수도 있다. 양막은 관류 동안에 유지될 수도 있고, 또는 예를 들어 손가락으로 평활 절개하여 융모막으로부터 분리할 수도 있다. 관류 전에 양막을 융모막으로부터 분리하는 경우, 이것은 예를 들어 폐기될 수도 있고, 또는 예를 들어 효소 소화를 통해 줄기 세포를 수득하는 처리를 하거나 예를 들어 양막 생체물질, 예를 들어 미국 출원 공개 제2004/0048796호에 기재된 생체물질 생성을 위해 처리하는 과정을 거칠 수도 있다. 태반에서 모든 가시적 혈병 및 잔류 혈액을 예를 들어 멸균 거즈를 사용하여 세정한 후에 제대 혈관을 노출시키고, 예를 들어 제대 막을 부분 절단하여 제대의 단면을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들어 각 혈관의 절단된 끝부분을 통해 폐쇄형 엘리게이터 클램프를 밀어넣어서 혈관을 개방한다. 이후, 예를 들어 관류 장치 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 튜빙과 같은 장치를 태반 동맥 각각에 삽입한다. 펌프는 이러한 목적에 적합한 임의의 펌프, 예를 들어 연동 펌프일 수 있다. 이후, 멸균 수집 저장고, 예를 들어 250 mL 수집 백과 같은 혈액 백에 연결된 플라스틱 튜빙을 태반 정맥에 삽입한다. 대안적으로, 펌프에 연결된 튜빙을 태반 정맥에 삽입하고, 수집 저장고(들)에 연결된 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 둘다에 삽입한다. 이후, 태반을 소정 부피의 관류 용액, 예를 들어 약 750 mL의 관류 용액으로 관류한다. 이후, 관류액 중의 세포를 예를 들어 원심분리를 통해 수집한다.

[0165] 한 실시양태에서, 근위 제대를 관류 동안 클램핑하고, 더욱 바람직하게는 근위 제대를 태반 디스크로의 제대 삽입부로부터 4 cm 내지 5 cm (센티미터) 이내에서 클램핑한다.

[0166] 방혈 과정 동안 포유동물 태반으로부터의 첫번째 관류액 수집물은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구를 함유하는 색상이다. 상기 관류액은 관류가 진행되고 잔류 제대혈 세포가 태반으로부터 세척됨에 따라 점점 무색이 된다. 일반적으로 30 mL 내지 100 mL의 관류액이 태반으로부터의 초기 혈액 세정에 적합하지만, 관찰되는 결과에 따라 더 많거나 더 적은 관류액이 사용될 수 있다.

[0167] 태반 관류에 사용되는 관류액의 부피는 수집할 태반 세포의 수, 태반의 크기, 단일 태반으로부터 수행될 수집 회수 등에 따라 달라질 수 있다. 다양한 실시양태에서, 관류액의 부피는 50 mL 내지 5000 mL, 50 mL 내지 4000 mL, 50 mL 내지 3000 mL, 100 mL 내지 2000 mL, 250 mL 내지 2000 mL, 500 mL 내지 2000 mL, 또는 750 mL 내지 2000 mL일 수 있다. 전형적으로, 태반은 방혈 후 700 mL 내지 800 mL의 관류액으로 관류된다.

[0168] 태반은 수시간 또는 수일의 기간에 걸쳐 여러 회 관류될 수 있다. 태반을 여러 회 관류하는 경우, 이것은 무균 조건하에 용기 또는 다른 적합한 용기 내에서 유지되거나 배양되고 세포 수집 조성물 또는 표준 관류 용액 (예를 들어, 통상적인 염수 용액, 예컨대 인산염 완충 염수 ("PBS") - 항응고제 (예를 들어, 헤파린, 와파린 나트륨, 쿠마린, 비스히드록시쿠마린)를 함유하거나 함유하지 않고/거나 항미생물 작용제 (예를 들어, β-메르캅토에탄올 (0.1 mM)), 항생제, 예컨대 스트렙토마이신 (예를 들어, 40 내지 100 ㎍/mL), 페니실린 (예를 들어, 40 U/mL), 암포테리신 B (예를 들어, 0.5 ㎍/mL)를 함유하거나 함유하지 않는 것)으로 관류될 수 있다. 한 실시양

태에서, 단리된 태반은 소정 기간의 시간 동안 관류액 수집 없이 유지되거나 배양되어 관류 및 관류액 수집 이전에 태반이 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간 또는 24시간 동안 또는 2일 또는 3일 이상 동안 유지되거나 배양된다. 관류된 태반은 하나 이상의 추가의 시간(들) 동안, 예를 들어 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간 이상 동안 유지될 수 있고, 예를 들어 700 내지 800 mL 관류액으로 2회차 관류될 수 있다. 태반은 1회, 2회, 3회, 4회, 5회 이상 관류될 수 있고, 예를 들어 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 또는 6시간마다 1회씩 관류될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 태반의 관류 및 관류 용액, 예를 들어 태반 세포 수집 조성물의 수집은 회수되는 유핵 세포의 수가 1 mL 당 세포 100개 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 여러 시점에서 관류액을 추가로 따로 처리하여 세포, 예를 들어 전체 유핵 세포의 시간-의존적 집단을 회수할 수 있다. 여러 시점에서의 관류액은 또한 풀링될 수도 있다.

[0169] 6.4.4. 태반 관류액 및 태반 관류액 세포

[0170] 전형적으로, 단일 태반 관류로부터의 태반 관류액은 본원에 개시된 방법으로 TSNK 세포가 생성될 수 있는 조혈 세포를 포함하여 약 1억개 내지 약 5억개의 유핵 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 이러한 세포는 $CD34^+CD45^-$ 줄기 또는 전구 세포, $CD34^+CD45^+$ 줄기 또는 전구 세포 등을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 관류액 또는 관류액 세포는 그로부터의 조혈 세포 단리 이전에 동결보존된다. 특정 다른 실시양태에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 오직 태아 세포만을 포함하거나 태아 세포 및 모계 세포의 조합물을 포함한다.

[0171] 6.5. TSNK 세포

[0172] 한 측면에서, 본원은 본원에 기재된 방법 (예를 들어, 2-단계 방법)으로 생성되는 NK 세포인 TSNK 세포를 제공한다. 추가로, 본원은 본원에 기재된 방법 (예를 들어, 2-단계 방법)으로 생성되는 TSNK 세포를 포함하는 세포의 집단을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 $CD3^-CD56^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 $CD3^-CD56^+CD16^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 추가로 $CD94^+CD117^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 추가로 $CD161^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포 (예를 들어, TSNK 세포)는 추가로 $NKG2D^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 추가로 $NKp46^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 추가로 $CD226^+$이다.

[0173] 특정 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98% 초과가 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 50%, 60%, 70%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90% 이상이 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60% 이상이 $NKG2D^+$이다. 다른 실시양태에서, 상기 세포 중 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^+$이다. 특정 다른 실시양태에서, 상기 TSNK 세포 중 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70% 이상이 $NKp46^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85% 이상이 $CD117^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상이 $CD94^+$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이상이 $CD161^-$이다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20% 이상이

$CD226^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이상이 $CD7^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포 중 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60% 이상이 $CD5^+$이다.

[0174] 다양한 다른 실시양태에서, TSNK 세포는 예를 들어 약 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 약 9:1과 같은 비율로 예를 들어 NK 세포와 조합될 수 있고, 여기서 상기 NK 세포는 조직 공급원으로부터 단리되어 증식되지는 않은 것이거나, 조직 공급원으로부터 단리되어 증식된 NK 세포 또는 상이한 방법으로 생성된 NK 세포, 예를 들어 $CD56^+CD16^+$ 천연 킬러 세포이다. 이러한 문맥에서 사용되는 바와 같이, "단리된"은 그 세포가 통상적인 조직 환경으로부터 제거되었음을 의미한다.

[0175] TSNK 세포는 태아 유전자형 또는 모계 유전자형을 가질 수 있다. 예를 들어, TSNK 세포 생성에 적합한 조혈 세포의 공급원으로서의 분만 후 태반은 태아 및 모체로부터의 조직 및 세포를 포함하기 때문에, 태반 관류액은 태아 세포만을 포함할 수도 있고 실질적으로 다수의 태아 세포 (예를 들어, 약 90%, 95%, 98% 또는 99% 초과)를 포함할 수도 있고, 또는 태아 및 모계 세포의 혼합물 (예를 들어, 태아 세포는 상기 관류액의 전체 유핵 세포 중 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만으로 포함됨)을 포함할 수도 있다. 한 실시양태에서, TSNK 세포는 태아 태반 조혈 세포, 예를 들어 실질적 다수의 태아 태반 조혈 세포를 포함하거나 오직 태아 태반 조혈 세포만을 포함하는 관류액을 생성하는 태반의 폐쇄형 회로 관류로부터 수득된 세포로부터만 유래된다. 또 다른 실시양태에서, TSNK 세포는 태아 및 모계 세포, 예를 들어 태아 및 모계 태반 세포의 혼합물을 포함하는 관류액을 생성하는 꽨 방법 (상기 참조)에 의한 관류로 수득된 세포로부터 유래된다. 따라서, 한 실시양태에서, 본원은 실질적 다수가 태아 유전자형을 갖는 태반-유래 중간 천연 킬러 세포의 집단을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본원은 태아 유전자형을 갖는 천연 킬러 세포 및 모계 표현형을 갖는 천연 킬러 세포를 포함하는 태반-유래 중간 천연 킬러 세포의 집단을 제공한다.

[0176] 또한, 본원은 본원에 기재된 방법으로 생성되지 않은 천연 킬러 세포를 포함하는 TSNK 세포의 집단을 제공한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본원은 예를 들어 제대혈, 말초혈, 골수, 또는 이것들 중 2종 이상의 조합물로부터 단리된 천연 킬러 세포 또는 본원에 기재된 방법 이외의 방법으로 증식된 NK 세포를 또한 포함하는 TSNK 세포의 집단을 제공한다. 이러한 TSNK 세포 집단은 TSNK 세포 및 다른 NK 세포를 예를 들어 약 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 10:1, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95 또는 약 1:100 등의 비율로 포함할 수 있다.

[0177] 특정 실시양태에서, 단리된 천연 킬러 세포 (예를 들어, TSNK 세포), 또는 천연 킬러 세포 (예를 들어, TSNK 세포)가 풍부한 집단은 1종 이상의 기능적 관련 마커, 예를 들어 CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR, 및 NKG2 부류의 활성화 수용체 (예를 들어, NKG2D)를 검출하여 평가할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리되거나 풍부해진 천연 킬러 세포의 순도는 CD56, CD3 및 CD16 중 1종 이상을 검출하여 확인할 수 있다.

[0178] 임의로, 단리되거나 풍부해진 천연 킬러 세포의 세포독성 활성은 예를 들어 종양 세포, 예컨대 배양된 K562, LN-18, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1 또는 U266 종양 세포 등을 표적 세포로서 사용하는 세포독성 검정에서 평가될 수 있다.

[0179] 6.6. 태반 관류액과 조합된 TSNK 세포

[0180] 추가로, 본원은 예를 들어 종양 세포 또는 복수개의 종양 세포의 증식을 저해하는데 사용하기 위한, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 접착성 태반 세포와 조합된 TSNK 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0181] 6.6.1. TSNK 세포 및 관류액 또는 관류액 세포의 조합물

[0182] 추가로, 본원은 TSNK 세포 및 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합물을 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 예를 들어 본원은 TSNK 세포가 보충된 소정 부피의 태반 관류액을 제공한다. 구체적인 실시

양태에서, 예를 들어 태반 관류액에는 1 밀리리터 당 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 TSNK 세포가 보충된다. 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액 세포에는 TSNK 세포가 보충된다. 특정 다른 실시양태에서, 태반 관류액 세포가 TSNK 세포와 조합되는 경우에 상기 태반 관류액 세포는 일반적으로 세포 총 개수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 초과 또는 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 미만으로 포함된다. 특정 다른 실시양태에서, TSNK 세포가 복수개의 태반 관류액 세포 및/또는 조합된 천연 킬러 세포와 조합되는 경우에 상기 NK 세포는 일반적으로 세포 총 개수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 초과 또는 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 미만으로 포함된다. 특정 다른 실시양태에서, TSNK 세포가 태반 관류액을 보충하는데 사용되는 경우에 세포가 현탁된 용액 (예를 들어, 염수 용액, 배양 배지 등)의 부피는 관류액과 세포의 총 부피의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 초과 또는 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1% 미만으로 포함되고, 여기서 TSNK 세포는 상기 보충 전에 1 밀리리터 당 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 세포로 현탁된다.

[0183] 다른 실시양태에서, 세포의 임의의 상기 조합은 다시 제대혈 또는 제대혈로부터의 유핵 세포와 조합된다.

[0184] 추가로, 본원은 2종 이상의 공급원, 예를 들어 2종 이상의 태반으로부터 수득되고 조합된, 예를 들어 풀링된, 풀링된 태반 관류액을 제공한다. 이러한 풀링된 관류액은 각 공급원으로부터의 관류액을 대략 동일 부피로 포함할 수도 있고, 또는 각 공급원으로부터 상이한 부피로 포함할 수도 있다. 각 공급원으로부터의 상대적 부피는 무작위로 선택될 수도 있고, 또는 예를 들어 1종 이상의 세포 인자, 예컨대 시토카인, 성장 인자, 호르몬 등의 농도 또는 양, 각 공급원으로부터의 관류액 중 태반 세포의 수, 또는 각 공급원으로부터의 관류액의 다른 특징을 기초로 할 수도 있다. 동일 태반의 여러 회 관류로부터의 관류액이 유사하게 풀링될 수 있다.

[0185] 유사하게, 본원은 2종 이상의 공급원, 예를 들어 2종 이상의 태반으로부터 수득되고 풀링된 태반 관류액 세포 및 태반-유래 중간 천연 킬러 세포를 제공한다. 이러한 풀링된 세포는 2종 이상의 공급원으로부터의 세포를 대략 동일 수로 포함할 수도 있고, 또는 1종 이상의 풀링된 공급원으로부터의 세포를 상이한 수로 포함할 수도 있다. 각 공급원으로부터의 세포의 상대적 수는 예를 들어 풀링된 세포 중 1종 이상의 특정 세포 유형의 수, 예컨대 $CD34^+$ 세포의 수 등을 기초로 선택될 수 있다.

[0186] 추가로, 본원은 예를 들어 주어진 수의 TSNK 세포 또는 주어진 부피의 관류액으로부터 기대되는 종양 저해의 정도 또는 양 (즉, 효력)이 검정을 통해 결정된 TSNK 세포, 및 TSNK 세포와 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합물을 제공한다. 예를 들어, 소정 개수의 세포 분취액 또는 샘플을 종양 세포가 달리 증식하는 조건하에 공지된 수의 종양 세포와 접촉시키고, 태반 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 이것들의 조합물의 존재하에 시간 경과 (예를 들어, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주 또는 10주 이상)에 따른 종양 세포의 증식 속도를 관류액, 관류액 세포, 태반 천연 킬러 세포, 또는 이것들의 조합물 부재하의 동등한 수의 종양 세포의 증식과 비교한다. 상기 세포의 효력은 예를 들어 종양 세포 성장을 예를 들어 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 등으로 저해하는데 필요한 세포 수 또는 용액의 부피로 표현될 수 있다.

[0187] 특정 실시양태에서, TSNK 세포는 제약 등급의 투여가능한 단위로서 제공된다. 이러한 단위는 분리된 부피, 예를 들어 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL. 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL 등으로 제공될 수 있다. 이러한 단위는 명시된 수의 세포, 예를 들어 TSNK 세포 단독 또는 다른 NK 세포 또는 관류액 세포와 조합된 TSNK 세포를 예를 들어 1 밀리리터 당 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 세포, 또는 1개 단위 당 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 세포로 함유하도록 하여 제공될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단위는 1 밀리리터 당 대략적으로 최소 또는 최대 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개 이상의 TSNK 세포

또는 1개 단위 당 대략적으로 최소 또는 최대 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 이러한 단위는 명시된 수의 TSNK 세포, 및/또는 임의의 다른 세포를 함유하도록 하여 제공될 수 있다.

[0188] 상기 실시양태에서, TSNK 세포 또는 TSNK 세포와 다른 NK 세포, 관류액 세포 또는 관류액의 조합물은 수용자에게 자가 (즉, 해당 수용자로부터 수득된 것)일 수도 있고, 또는 수용자에게 동종이계 (즉, 해당 수용자와는 하나 이상의 다른 개체로부터 수득된 것)일 수도 있다.

[0189] 특정 실시양태에서, 세포의 각 단위에는 부피, 세포 수, 세포 유형, 해당 단위에 특정 유형의 세포가 풍부한지의 여부 및/또는 해당 단위 중 주어진 수의 세포의 효력, 또는 해당 단위의 주어진 밀리리터 양, 즉, 단위 중의 세포가 특정 유형(들)의 종양 세포 증식에 대해 측정가능한 저해를 야기하는지의 여부 중 1종 이상을 명시하여 표지된다.

[0190] 6.6.2. TSNK 세포 및 접착성 태반 줄기 세포의 조합물

[0191] 다른 실시양태에서, TSNK 세포 단독 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 조합된 TSNK 세포에는 예를 들어 하리리의 미국 특허 제7,045,148호 및 제7,255,879호 및 미국 특허 출원 공개 제2007/0275362호 (상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같은 단리된 접착성 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 및 태반 다분화능 세포가 보충된다. "접착성 태반 세포"는 그 세포가 조직 배양 표면, 예를 들어 조직 배양 플라스틱에 접착성인 것을 의미한다. 본원에 개시된 조성물 및 방법에 유용한 접착성 태반 세포는 영양막, 배아 생식 세포 또는 배아 줄기 세포가 아니다. 특정 실시양태에서, 접착성 태반 줄기 세포는 상기 기재된 바와 같은 방법 (예를 들어, 2-단계 방법) 동안에 영양 세포로서 사용된다.

[0192] TSNK 세포 단독 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 조합된 TSNK 세포에는 예를 들어 1 밀리리터 당 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 접착성 태반 세포 또는 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 접착성 태반 세포가 보충될 수 있다. 예를 들어, 조합물 중의 접착성 태반 세포는 예를 들어 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 20회, 22회, 24회, 26회, 28회, 30회, 32회, 34회, 36회, 38회 또는 40회 이상의 집단 배가 동안 배양되었던 접착성 태반 세포일 수 있다.

[0193] 초대 배양으로 배양되거나 세포 배양으로 증식된 경우의 단리된 접착성 태반 세포는 조직 배양 기판, 예를 들어 조직 배양 용기 표면 (예를 들어, 조직 배양 플라스틱)에 접착된다. 배양물 중의 접착성 태반 세포는 일반적으로 섬유모세포형의 성상 외관을 가지며 중심 세포체로부터 연장되는 수많은 세포질 과정을 거친 것으로 추정된다. 그러나, 접착성 태반 세포는 동일 조건하에 배양된 섬유모세포와는 형태상으로 구별가능한데, 이는 접착성 태반 세포가 섬유모세포보다 이러한 과정을 더 많이 겪기 때문이다. 형태상으로, 접착성 태반 세포는 또한 배양시에 일반적으로 더 둥글거나 자갈돌 형태로 추정되는 조혈 줄기 세포와도 구별가능하다.

[0194] 본원에서 제공되는 조성물 및 방법에 유용한 단리된 접착성 태반 세포, 및 접착성 태반 세포의 집단은 상기 세포, 또는 접착성 태반 세포를 포함하는 세포 집단을 확인 및/또는 단리하는데 이용될 수 있는 복수개의 마커를 발현한다. 본원에서 제공되는 조성물 및 방법에 유용한 접착성 태반 세포, 및 접착성 태반 세포 집단은 태반 또는 이것의 임의의 일부 (예를 들어, 양막, 융모막, 양막-융모막 판, 태반엽, 제대 등)로부터 직접 수득된 접착성 태반 세포 및 접착성 태반 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 한 실시양태에서, 접착성 태반 줄기 세포 집단은 배양된 접착성 태반 줄기 세포의 집단 (즉, 2종 이상), 예를 들어 용기, 예컨대 백 중의 집단이다.

[0195] 접착성 태반 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105 및 CD200 및/또는 OCT-4를 발현하고 CD34, CD38 또는 CD45는 발현하지 않는다. 접착성 태반 줄기 세포는 또한 HLA-ABC (MHC-1) 및 HLA-DR도 발현할 수 있다. 이들 마커는 접착성 태반 세포를 확인하고 접착성 태반 세포를 다른 세포 유형과 구별하는데 이용될 수 있다. 접착성 태반 세포가 CD73 및 CD105를 발현할 수 있기 때문에, 접착성 태반 세포는 중간엽 줄기 세포-유사 특징을 가질 수 있다. CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현 부재는 접착성 태반 줄기 세포가 비-조혈 줄기 세포임을 확인시켜 준다.

[0196] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 단리된 접착성 태반 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 저해한다.

[0197] 특정 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 특정 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 단리된 태반 다분화능 세포이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다분화능 접착성 태반 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골형성 표현형의 세포 또는 연골발생 표현형의 세포로 분화하는 잠재력을 갖는다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 추가로 $CD200^+$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD80^-$ 및 $CD86^-$이다.

[0198] 한 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 배아-유사 세포체의 형성을 허용하는 조건하에 배양된 경우에 1개 이상의 배아-유사 세포체를 생성한다.

[0199] 또 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$이다. 상기 집단의 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 배아-유사 세포체의 형성을 허용하는 조건하에 배양된 경우에 1개 이상의 배아-유사 세포체를 생성한다.

[0200] 또 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 또한 배아-유사 세포체의 형성을 허용하는 조건하에 배양된 경우에 1개 이상의 배아-유사 세포체를 생성한다.

[0201] 또 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 접착성 줄기 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 접착성 줄기 세포는 또한 $CD200^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 접착성 줄기 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ 및 $CD200^+$이다.

[0202] 또 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 줄기 세포이고, 여기서 상기 세포는 배아-유사

세포체의 형성을 허용하는 조건하에 1개 이상의 배아-유사 세포체를 생성한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다.

[0203] 또 다른 실시양태에서, 접착성 태반 줄기 세포는 $OCT\text{-}4^+$ 줄기 세포이고, 여기서 상기 접착성 태반 줄기 세포는 배아-유사 세포체의 형성을 허용하는 조건하에 배양된 경우에 1개 이상의 배아-유사 세포체를 생성하고, 상기 줄기 세포는 암 세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 저해하는 것으로 확인된 것이다.

[0204] 다양한 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포 중 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상이 $OCT\text{-}4^+$이다. 상기 집단의 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 단리된 접착성 태반 세포는 증식된 것, 예를 들어 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상 또는 20회 이상 계대배양된 것이다.

[0205] 임의의 상기 실시양태의 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 ABC-p (태반-특이적 ABC 수송자 단백질. 예를 들어, 문헌 [Allikmets et al., Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)] 참조)를 발현한다.

[0206] 또 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 및 $CD133^-$이다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 IL-6, IL-8 및 단핵구 화학유인물질 단백질 (MCP-1)을 구성적으로 분비한다.

[0207] 상기 언급된 단리된 접착성 태반 세포 각각은 포유동물 태반으로부터 직접 수득 및 단리된 세포 또는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 12회, 14회, 16회, 18회, 20회, 25회, 30회 이상 배양 및 계대배양된 세포, 또는 이것들의 조합물을 포함할 수 있다. 상기한 종양 세포 저해성의 복수개의 단리된 접착성 태반 세포는 대략적으로 최소 또는 최대 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 단리된 접착성 태반 세포를 포함할 수 있다.

[0208] 6.6.3. 접착성 태반 세포 조건화 배지를 포함하는 조성물

[0209] 또한, 본원은 TSNK 세포 및 추가로 조건화 배지를 포함하는 조성물의 용도를 제공하고, 여기서 상기 조성물은 종양 저해성이거나 암 또는 바이러스 감염의 치료에 효과적이다. 상기 섹션 6.6.2에 기재된 바와 같은 접착성 태반 세포는 종양 세포 저해성이거나 항암이거나 또는 항바이러스인 조건화 배지, 즉, 검출가능한 종양 세포 저해성 효과, 항암 효과 또는 항바이러스 효과를 갖는 세포에 의해 분비되거나 배출된 1종 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생성하는데 사용될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 조건화 배지는 상기 세포가 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일 이상 동안 증식되었던 (즉, 배양되었던) 배지를 포함한다. 다른 실시양태에서, 조건화 배지는 이러한 세포가 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 전면성장될 때까지 또는 최대 100% 전면성장될 때까지 성장했던 배지를 포함한다. 이러한 조건화 배지는 세포, 예를 들어 태반 세포, 또는 또 다른 종류의 세포의 별개 집단의 배양을 부양하는데 사용될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에서 제공되는 조건화 배지는 단리된 접착성 태반 세포, 예를 들어 단리된 접착성 태반 줄기 세포 또는 단리된 접착성 태반 다분화능 세포, 및 단리된 접착성 태반 세포 이외의 세포, 예를 들어 비-태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포가 배양되었던 배지를 포함한다.

[0210] 이러한 조건화 배지는 임의의 TSNK 세포, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 또는 이것들의 임의의 조합물과 조합하여 종양 세포 저해성이거나, 항암이거나 또는 항바이러스인 조성물을 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 조건화 배지를 부피 기준으로 절반 미만, 예를 들어 약 50 부피%, 45 부피%, 40 부피%, 35 부

피%, 30 부피%, 25 부피%, 20 부피%, 15 부피%, 10 부피%, 5 부피%, 4 부피%, 3 부피%, 2 부피% 또는 1 부피% 이하로 포함한다.

[0211] 따라서, 한 실시양태에서, 본원은 단리된 접착성 태반 세포의 배양물로부터의 TSNK 세포 및 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 상기 단리된 접착성 태반 세포는 (a) 기판에 접착되고 (b) $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$이고, 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 저해하거나, 또는 항암 또는 항바이러스이다. 구체적인 실시양태에서, 단리된 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다분화능 접착성 태반 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형의 세포, 골형성 표현형의 세포 또는 연골발생 표현형의 세포로 분화하는 잠재력을 갖는다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 추가로 $CD200^+$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD90^+$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ 접착성 태반 세포는 유동 세포계측으로 검출할 때 추가로 $CD80^-$ 및 $CD86^-$이다.

[0212] 또 다른 실시양태에서, 본원은 단리된 접착성 태반 세포의 배양물로부터의 TSNK 세포 및 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 상기 단리된 접착성 태반 세포는 (a) 기판에 접착되고 (b) CD200 및 HLA-G를 발현하거나, CD73, CD105 및 CD200을 발현하거나, CD200 및 OCT-4를 발현하거나, CD73, CD105 및 HLA-G를 발현하거나 또는 CD73 및 CD105를 발현하고 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사 세포체의 형성을 허용하는 조건하에 배양되는 경우 상기 집단에서의 1종 이상의 배아-유사 세포체의 형성을 용이하게 하거나, 또는 OCT-4를 발현하고 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배아-유사 세포체의 형성을 허용하는 조건하에 배양되는 경우 상기 집단에서의 1종 이상의 배아-유사 세포체의 형성을 용이하게 하고, 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 저해하거나, 또는 항암 또는 항바이러스이다. 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 복수개의 상기 단리된 태반 접착성 세포를 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 복수개의 비-태반 세포를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 비-태반 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들어, 조혈 전구 세포, 예컨대 말초혈 조혈 전구 세포, 제대혈 조혈 전구 세포 또는 태반 혈액 조혈 전구 세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 줄기 세포, 예컨대 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포를 포함할 수 있다. 비-태반 세포는 또한 성체 세포 또는 세포주 중 1종 이상의 유형일 수 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 조성물은 항증식제, 예를 들어, 항-MIP-1α 또는 항-MIP-1β 항체를 포함한다.

[0213] 구체적인 실시양태에서, 상기 기재된 세포 또는 세포 조합물 중 하나에 의해 조건화된 배양 배지는 단리된 접착성 태반 세포:종양 세포를 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1 또는 약 5:1의 비율로 하여 복수개의 종양 세포와 공동배양된 복수개의 단리된 접착성 태반 세포로부터 수득된다. 예를 들어, 조건화 배양 배지 또는 상등액은 약 1×10^5개 이상의 단리된 접착성 태반 세포, 약 1×10^6개 이상의 단리된 접착성 태반 세포, 약 1×10^7개 이상의 단리된 접착성 태반 세포 또는 약 1×10^8개 이상의 단리된 접착성 태반 세포를 포함하는 배양물로부터 수득될 수 있다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 조건화 배양 배지 또는 상등액은 약 1×10^5개 내지 약 5×10^5개의 단리된 접착성 태반 세포 및 약 1×10^5개의 종양 세포, 약 1×10^6개 내지 약 5×10^6개의 단리된 접착성 태반 세포 및 약 1×10^6개의 종양 세포, 약 1×10^7개 내지 약 5×10^7개의 단리된 접착성 태반 세포 및 약 1×10^7개의 종양 세포, 또는 약 1×10^8개 내지 약 5×10^8개의 단리된 접착성 태반 세포 및 약 1×10^8개의 종양 세포를 포함하는

공동배양물로부터 수득된다.

[0214] 6.7. 세포의 보존

[0215] 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 포함하는 세포, 예를 들어 TSNK 세포 또는 태반 관류액 세포는 보존될 수 있으며, 즉, 장기 저장을 가능케 하는 조건하에 또는 예를 들어 세포자멸 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건하에 배치된다.

[0216] 태반 관류액은 태반의 적어도 일부, 예를 들어 태반 혈관계에 세포 수집 조성물을 통과시켜 생성될 수 있다. 세포 수집 조성물은 관류액 내 함유된 세포를 보존하는 작용을 하는 1종 이상의 화합물을 포함한다. 이러한 태반 세포 수집 조성물은, 관련된 미국 출원 공개 제20070190042호에 기재된 바와 같이 세포자멸 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-수송 퍼플루오로카본을 포함할 수 있으며, 상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0217] 한 실시양태에서, 상기 관류액 또는 태반 세포 집단은 포유동물, 예를 들어 인간의 분만 후 태반으로부터, 상기 관류액 또는 세포 집단을 세포자멸 억제제 및 산소-수송 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉시켜 수집하며, 여기서 상기 세포자멸 억제제는 태반 세포, 예를 들어 접착성 태반 세포, 예를 들어 태반 줄기 세포 또는 태반 다분화능 세포의 집단에서의 세포자멸을 상기 세포자멸 억제제와 접촉되지 않은 세포 집단에 비해 감소시키거나 방지하기에 충분한 시간 및 양으로 존재한다. 예를 들어, 태반은 세포 수집 조성물로 관류될 수 있고, 태반 세포, 예를 들어 전체 유핵 태반 세포는 이로부터 단리된다. 구체적인 실시양태에서, 세포자멸 억제제는 카스파제 억제제이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 세포자멸 억제제는 JNK 억제제이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 JNK 억제제는 접착성 태반 세포, 예를 들어 접착성 태반 줄기 세포 또는 접착성 태반 다분화능 세포의 분화 또는 증식을 조정하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸 억제제 및 상기 산소-수송 퍼플루오로카본을 별개의 상으로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자멸 억제제 및 상기 산소-수송 퍼플루오로카본을 에멀젼으로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 수집 조성물은 에멀젼화제, 예를 들어 레시틴을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 세포자멸 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 태반 세포와의 접촉시 약 0℃ 내지 약 25℃이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 세포자멸 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 태반 세포와의 접촉시 약 2℃ 내지 10℃, 또는 약 2℃ 내지 약 5℃이다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 세포 집단의 수송 동안 수행된다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 접촉은 상기 세포 집단의 냉동 및 해동 동안 수행된다.

[0218] 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 상기 관류액 및/또는 세포를 세포자멸 억제제 및 장기-보존 화합물과 접촉시켜 수집 및 보존될 수 있고, 여기서 상기 세포자멸 억제제는 세포의 세포자멸을 상기 세포자멸 억제제와 접촉되지 않은 관류액 또는 태반 세포에 비해 감소시키거나 방지하기에 충분한 시간 및 양으로 존재한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 장기-보존 화합물은 UW 용액 (미국 특허 제4,798,824호에 기재되고, 또한 비아스판(VIASPAN)™로서 공지됨. 또한, 문헌 [Southard et al., Transplantation 49(2):251-257 (1990)] 참조) 또는 스테른(Stern) 등의 미국 특허 제5,552,267호에 기재된 용액이다 (상기 문헌의 개시내용은 본원에 그 전문이 참고로 포함됨). 또 다른 실시양태에서, 상기 장기-보존 조성물은 히드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스, 또는 이것들의 조합물이다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포 수집 조성물은 산소-수송 퍼플루오로카본을 2개의 상으로 또는 에멀젼으로서 추가로 포함한다.

[0219] 상기 방법의 또 다른 실시양태에서, 태반 세포를 관류 동안에 세포자멸 억제제 및 산소-수송 퍼플루오로카본, 장기-보존 화합물, 또는 이것들의 조합물을 포함하는 세포 수집 조성물과 접촉시킨다. 또 다른 실시양태에서, 태반 세포를 관류에 의해 수집한 후 상기 세포 수집 화합물과 접촉시킨다.

[0220] 전형적으로, 태반 세포 수집, 풍부화 및 단리 중에 저산소증 및 기계적 응력으로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 방법의 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액 또는 태반 세포 집단을 상기 보존 동안에 수집, 풍부화 또는 단리 중에 6시간 미만 동안 저산소 조건에 노출시키며, 여기서 저산소 조건은 정상적인 혈액 산소 농도보다 낮은 산소 농도이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 관류액 또는 태반 세포 집단을 상기 보존 동안에 2시간 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출시킨다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 세포 집단을 수집, 풍부화 또는 단리 중에 1시간 미만 또는 30분 미만 동안 상기 저산소 조건에 노출시키거나, 또는 저산소 조건에 노출시키지 않는다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 태반 세포 집단은 수집, 풍부화 또는 단리 중에 전단 응력에 노출되지 않는다.

[0221] 본원에서 제공되는 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포, 조혈 세포, 예를 들어 $CD34^+$ 조혈 줄기 세포, NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포, 단리된 접착성 태반 세포는 예를 들어 소형 용기, 예를 들어 앰플 또는 격막 바이알 내 동결보존 배지 중에 동결보존될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 세포는 1 mL 당 약 1×10^4개 내지 5×10^8개 세포의 밀도로 동결보존된다. 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공되는 세포는 1 mL 당 약 1×10^6개 내지 1.5×10^7개 세포의 밀도로 동결보존된다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공되는 세포는 1 mL 당 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 1.5×10^7개 세포의 밀도로 동결보존된다.

[0222] 적합한 동결보존 배지는 통상적인 염수, 및 예를 들어 성장 배지를 비롯한 배양 배지, 또는 세포 냉동 배지, 예를 들어 시판되는 세포 냉동 배지, 예를 들어 C2695, C2639 또는 C6039 (시그마), 크라이오스토르(CryoStor)® CS2, 크라이오스토르® CS5 또는 크라이오스토르® CS10 (바이오라이프 솔루션즈(BioLife Solutions))를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 동결보존 배지는 바람직하게는 DMSO (디메틸술폭시드)를 예를 들어 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10% (v/v)의 농도로 포함한다. 동결보존 배지는 추가의 작용제, 예를 들어 메틸셀룰로스, 덱스트란, 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민), 트레할로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10% DMSO, 약 25% 내지 75% 덱스트란 및/또는 약 20% 내지 60% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 동결보존 배지는 약 1% 내지 10% DMSO, 약 25% 내지 75% 트레할로스 및/또는 약 20% 내지 60% 인간 HSA를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 덱스트란 및 40% HSA를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 덱스트란 (통상적인 염수 중 10% (w/v)) 및 40% HSA를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 트레할로스 및 40% HSA를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 5% DMSO, 55% 트레할로스 (통상적인 염수 중 10% (w/v)) 및 40% HSA를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 크라이오스토르® CS5를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 동결보존 배지는 크라이오스토르® CS10을 포함한다.

[0223] 본원에서 제공되는 세포는 임의의 다양한 방법으로 임의의 세포 배양, 증식 또는 분화 단계에서 동결보존될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 세포는 원래의 조직 또는 장기, 예를 들어 태반 관류액 또는 제대혈로부터의 단리 직후에, 또는 상기 요약된 방법의 제1 단계 또는 제2 단계 동안에 또는 그 이후에 동결보존될 수 있다. 특정 실시양태에서, 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 또는 전구 세포는 원래의 조직 또는 장기로부터의 단리 후 약 1분, 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 45분 이내에, 또는 약 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 10시간, 12시간, 18시간, 20시간 또는 24시간 이내에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 원래의 조직 또는 장기로부터의 단리 후 1일, 2일 또는 3일 이내에 동결보존된다. 특정 실시양태에서, 상기 세포는 상기 섹션 6.2.1에 기재된 바와 같이 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 제1 배지 중에서 배양된 후 동결보존된다. 일부 실시양태에서, 상기 세포는 상기 섹션 6.2.1에 기재된 바와 같이 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 제1 배지 중에서 배양되고, 상기 섹션 6.2.1에 기재된 바와 같이 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 제2 배지 중에서 배양된 후에 동결보존된다.

[0224] 한 측면에서, 본원은 NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포 집단을 동결보존하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 인터류킨-15 (IL-15) 및 임의로는 줄기 세포 인자 (SCF) 및 인터류킨-7 (IL-7) 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여 상기 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 IL-15 및 임의의 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계, 및 (c) 상기 단계 (b)로부터의 NK 세포를 동결보존 배지 중에 동결보존하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단계 (c)는 (1) 세포 현탁 용액을 제조하는 단계, (2) 동결보존 배지를 상기 단계 (1)로부터의 세포 현탁 용액에 첨가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계, (3) 상기 단계 (2)로부터의

동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜서 동결보존된 샘플을 수득하는 단계, 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 미만에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계를 포함하지 않고/거나 단계 (a) 이전에 추가의 배양 단계를 포함하지 않는다.

[0225] 또 다른 실시양태에서, NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포 집단을 동결보존하는 상기 방법은 (a) 줄기 세포 인자 (SCF), IL-2, 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15) 및 헤파린 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포를 생성하는 단계, 및 (c) 상기 단계 (b)로부터의 NK 세포를 동결보존 배지 중에 동결보존하는 단계를 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 단계 (c)는 (1) 세포 현탁 용액을 제조하는 단계, (2) 동결보존 배지를 상기 단계 (1)로부터의 세포 현탁 용액에 첨가하여 동결보존된 세포 현탁액을 수득하는 단계, (3) 상기 단계 (2)로부터의 동결보존된 세포 현탁액을 냉각시켜서 동결보존된 샘플을 수득하는 단계, 및 (4) 동결보존된 샘플을 -80℃ 미만에서 저장하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0226] 본원에서 제공되는 세포는 바람직하게는 동결보존 동안에 속도 제어 동결기에서, 예를 들어 1분 당 약 0.1℃, 0.3℃, 0.5℃ 또는 1℃로 냉각된다. 바람직한 동결보존 온도는 약 -80℃ 내지 약 -180℃, 바람직하게는 약 -125℃ 내지 약 -140℃이다. 동결보존된 세포는 사용을 위해 해동시키기 전에 액체 질소로 옮길 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 앰플이 일단 약 -90℃에 이르게 되면, 이것들을 액체 질소 저장소로 옮긴다. 동결보존된 세포는 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도에서, 바람직하게는 약 37℃의 온도로 해동된다. 특정 실시양태에서, 동결보존된 세포는 약 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 10시간, 12시간, 18시간, 20시간 또는 24시간 동안, 또는 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 동안 동결보존된 후에 해동된다. 특정 실시양태에서, 동결보존된 세포는 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 24개월, 25개월, 26개월, 27개월 또는 28개월 동안 동결보존된 후에 해동된다. 특정 실시양태에서, 동결보존된 세포는 약 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년 또는 10년 동안 동결보존된 후에 해동된다.

[0227] 적합한 해동 배지는 통상적인 염수, 및 예를 들어 성장 배지를 비롯한 플라스말라이트 배양 배지, 예를 들어 RPMI 배지를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 해동 배지는 1종 이상의 배지 보충물 (예를 들어, 영양분, 시토카인 및/또는 인자)을 포함한다. 본원에서 제공되는 세포를 해동시키기에 적합한 배지 보충물은 예를 들어 혈청, 예컨대 인간 혈청 AB, 태아 소 혈청 (FBS) 또는 태아 송아지 혈청 (FCS), 비타민, 인간 혈청 알부민 (HSA), 소 혈청 알부민 (BSA), 아미노산 (예를 들어, L-글루타민), 지방산 (예를 들어, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린 (예를 들어, 재조합 인간 인슐린), 트랜스페린 (철 포화 인간 트랜스페린), β-메르캅토에탄올, 줄기 세포 인자 (SCF), Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드 (Flt3-L), 시토카인, 예컨대 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15), 트롬보포이에틴 (Tpo) 또는 헤파린을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 구체적인 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에서 유용한 해동 배지는 RPMI를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20% FBS를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 1%, 2%, 5%, 10%, 15% 또는 20% FBS를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20% HSA를 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 약 1%, 2.5%, 5%, 10%, 15% 또는 20% HSA를 포함한다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 RPMI 및 약 10% FBS를 포함한다. 또 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 해동 배지는 플라스말라이트 및 약 5% HSA를 포함한다.

[0228] 본원에서 제공되는 동결보존 방법은 장기 저장을 허용하는 조건 또는 예를 들어 세포자멸 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건하에서 최적화될 수 있다. 한 실시양태에서, 해동후 세포는 예를 들어 자동 세포 계수기 또는 트립판 블루 방법으로 측정할 때 살아있는 세포를 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 초과로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 해동후 세포는 사멸된 세포를 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 해동후 세포는 조기 세포자멸 세포를 약 0.5%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 해동후 세포의 약 0.5%, 1%, 5%, 10%,

15% 또는 20%에서는 예를 들어 세포자멸 검정 (예를 들어, TO-PRO3 또는 AnnV/PI 세포자멸 검정 키트)으로 측정할 때 해동된지 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일 또는 28일 후에 세포자멸이 일어난다. 특정 실시양태에서, 해동후 세포는 본원에서 제공되는 방법을 이용하여 배양, 증식 또는 분화된 후 재동결보존된다.

[0229] 6.8. TSNK 세포의 용도

[0230] 본원에서 제공되는 TSNK 세포는 암이 있는 개체, 예를 들어 충실성 종양 세포 및/또는 혈액 암 세포가 있는 개체, 또는 바이러스 감염이 있는 인간의 치료 방법에서 사용될 수 있다. 본원에서 제공되는 TSNK 세포는 또한 종양 세포의 증식 저해 방법에서 사용될 수도 있다.

[0231] 6.8.1. 암이 있는 개체의 치료

[0232] 한 실시양태에서, 본원은 치료 유효량의 TSNK 세포를 암, 예를 들어 혈액 암 또는 충실성 종양이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 개체에서는 천연 킬러 세포, 예를 들어 개체의 암에 대해 활성인 NK 세포가 결핍되어 있다. 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포, 예를 들어 치료 유효량의 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 유효량의 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 섹션 6.2.1에 기재되어 있는 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "유효량"은, 예를 들어 개체가 앓고 있는 암의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 그의 진행 완화 또는 그의 제거를 일으키는 양이다.

[0233] 구체적인 실시양태에서, 암은 혈액 암, 예를 들어 백혈병 또는 림프종이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 암은 급성 백혈병, 예를 들어 급성 T 세포 백혈병, 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 전골수구성 백혈병, 급성 골수모세포 백혈병, 급성 거핵아구성 백혈병, 전구체 B 급성 림프모구성 백혈병, 전구체 T 급성 림프모구성 백혈병, 버키트 백혈병 (버키트 림프종), 또는 급성 이중표현형 백혈병, 만성 백혈병, 예를 들어 만성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병 (CML), 만성 단핵 백혈병, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소형 림프구성 림프종, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병, 모발 세포 림프종, T-세포 전림프구성 백혈병, 또는 림프종, 예를 들어 조직구성 림프종, 림프형질세포성 림프종 (예를 들어, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증), 비장 변연대 림프종, 혈장 세포 신생물 (예를 들어, 혈장 세포 골수종, 형질세포종, 모노클로날 이뮤노글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 림프절외 변연대 B 세포 림프종 (MALT 림프종), 결절 변연대 B 세포 림프종 (NMZL), 소포 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 종격 (흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, T 세포 대과립 림프구성 백혈병, 활동성(aggressive) NK 세포 백혈병, 성인 T 세포 백혈병/림프종, 림프절외 NK/T 세포 림프종 - 비측 유형, 장질환-유형 T 세포 림프종, 간비장 T 세포 림프종, 모구성 NK 세포 림프종, 균상식육종 (세자리 증후군), 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프구증식 장애 (예를 들어, 원발성 피부 미분화 대세포 림프종 또는 림프종양 구진증), 혈관면역모구성 T 세포 림프종, 말초 T 세포 림프종 - 상세불명, 미분화 대세포 림프종, 호지킨 림프종 또는 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 암은 다발성 골수종 또는 골수이형성 증후군이다.

[0234] 다른 구체적인 특정 실시양태에서, 암은 충실성 종양, 예를 들어 암종, 예컨대 선암종, 부신피질 암종, 결장 선암종, 결장직장 선암종, 결장직장 암종, 도관 세포 암종, 폐 암종, 갑상선 암종, 비인두 암종, 흑색종 (예를 들어, 악성 흑색종), 비-흑색종 피부 암종, 또는 상세불명의 암종, 인대양 종양, 섬유조직형성 소원형 세포 종양, 내분비 종양, 유잉 육종, 생식 세포 종양 (예를 들어, 고환암, 난소암, 융모막암종, 내배엽동 종양, 종자세포종 등), 간모세포종, 간세포암, 신경모세포종, 비-횡문근육종 연조직 육종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 또는 윌름스 종양이다. 또 다른 실시양태에서, 충실성 종양은 췌장암 또는 유방암이다. 다른 실시양태에서, 충실성 종양은 청신경초종, 성상세포종 (예를 들어, 등급 I 털모양세포 성상세포종, 등급 II 저악성도 성상세포종, 등급 III 미분화 성상세포종, 또는 등급 IV 다형성 교모세포종), 척삭종, 두개인두종, 신경교종 (예를 들어, 뇌 줄기 신경교종, 뇌실막세포종, 혼합형 신경교종, 시신경교종, 또는 뇌실막하세포종), 교모세포종, 수모세포종, 수막종, 전이성 뇌 종양, 희소돌기신경교종, 송과체모세포종, 뇌하수체 종양, 원시신경 외배엽 종양, 또는 슈반세포종이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 전립선암이다.

[0235] 특정 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액 암 또는 충실성 종양이 있는 개체, 예를 들어 천연 킬러 세포가 결핍된 개체는 상기 투여 이전에 골수 이식을 받은 적이 있는 개체이다. 특정 실시양태에서, 골수 이식은 상기 암의 치료법이다. 다른 특정 실시양태에서, 골수 이식은 상기 암 이외의 상태의 치료법이다. 특정 실시양태에서,

개체에게 상기 골수 이식에 추가하여 면역억제제를 투여한다. 특정 실시양태에서, 골수 이식을 받았던 적이 있는 개체는 상기 투여시 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 다른 특정 실시양태에서, 골수 이식을 받았던 적이 있는 개체에게 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 증상이 나타나기 전에 상기 세포를 투여한다.

[0236] 구체적인 특정 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액 암이 있는 개체에게 상기 투여 이전에 적어도 1회 용량의 TNFα 억제제, 예를 들어 에타네르셉트(ETANERCEPT)® (엔브렐(Enbrel))를 투여한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 개체에게 상기 암을 진단받은지 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 12개월 이내에 상기 용량의 TNFα 억제제를 투여한다. 구체적인 실시양태에서, 1회 용량의 TNFα 억제제를 투여받은 개체는 급성 골수성 백혈병을 나타낸다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 1회 용량의 TNFα 억제제를 투여받고 급성 골수성 백혈병을 나타내는 개체는 혈액 세포의 염색체 5 장완(long arm)의 결실을 추가로 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액 암이 있는 개체는 필라델피아(Philadelphia) 염색체를 나타낸다.

[0237] 다른 특정 실시양태에서, 상기 개체에서의 암, 예를 들어 혈액 암 또는 충실성 종양은 1종 이상의 항암 약물에 불응성이다. 구체적인 실시양태에서, 암은 글리벡(GLEEVEC)® (이마티닙 메실레이트)에 불응성이다.

[0238] 특정 실시양태에서, 상기 개체에서의 암, 예를 들어 혈액 암은 1종 이상의 항암 약물에 반응하고, 이러한 실시양태에서는 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반-유래 중간 천연 킬러 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 이것들의 조합물, 및 임의로는 면역조절 화합물이 보조 치료제로서, 또는 상기 항암 약물과의 조합 요법으로서 부가된다. 다른 특정 실시양태에서, 암, 예를 들어 혈액 암이 있고 암이 재발된 개체는 상기 투여 이전에 1종 이상의 항암 약물로 처치된다.

[0239] 한 측면에서, 본원은 (1) 레날리도미드, (2) 멜팔란 및 (3) 증식된 NK 세포를 다발성 골수종이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서의 다발성 골수종 치료에 효과적인 것인, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포이거나, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 NK 세포의 생성 방법, 예를 들어 TSNK 세포의 생성 방법 중 임의의 방법으로 생성된 것이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 이전에 증식된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란 및/또는 NK 세포는 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종이 있는 개체를 치료하는 방법의 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포는, (a) 줄기 세포 인자 (SCF), IL-2, 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15) 및 헤파린 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다.

[0240] 또 다른 측면에서, 본원은 치료 유효 용량의 (1) 레날리도미드, (2) 멜팔란, (3) 플루다라빈 및 (4) 증식된 NK 세포, 예를 들어 TSNK 세포를 만성 림프구성 백혈병 (CLL)이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 NK 세포는 상기 개체에서의 상기 CLL 치료에 효과적인 것인, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포이거나, 또는 NK 세포는 제대혈 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 NK 세포는 본원에 기재된 NK 세포의 생성 방법, 예를 들어 TSNK 세포의 생성 방법 중 임의의 방법으로 생성된 것이다. 상기 방법의 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 이전에 10일 이상 증식된 것이다. 상기 방법의 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 레날리도미드, 멜팔란, 플루다라빈 및 증식된 NK 세포는 상기 개체에게 별도로 투여된다. CLL이 있는 개체를 치료하는 방법의 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 NK 세포는, (a) 줄기 세포 인자 (SCF), IL-2, 인터류킨-7 (IL-7), 인터류킨-15 (IL-15) 및 헤파린 중 1종 이상을 포함하는 제1 배지 중에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증식시키고 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내 복수개의 조혈 줄기 또는 전구 세포를 상기 증식 동안에 NK 세포로 분화시키고, 여기서 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 불특정 성분에는 포함되지 않는 것인 단계, 및 (b) 상기 단계 (a)로부터의 세포를 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 제2 배지 중에서 증식시켜서 활성화된 NK 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다.

[0241] 6.8.2. 종양 세포의 증식 저해

[0242] 추가로, 본원은 종양 세포를 TSNK 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포의 증식을 저해하는 방법을 제공한다. 임의로, 종양 세포 및/또는 TSNK 세포를 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포와 접촉시킨다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 종양 세포 및/또는 TSNK 세포는 추가로 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물, 또는 탈리도미드와 접촉되어, 종양 세포의 증식이 TSNK 세포와 접촉되지 않은 동일 유형의 종양 세포에 비해 검출가능하게 감소된다. 임의로, 면역조절 화합물과 접촉된 종양 세포 및/또는 TSNK 세포를 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포와 접촉시킨다.

[0243] 세포와 관련하여 본원에서 사용된 바와 같은 "접촉시키는"은, 한 실시양태에서 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포, 및/또는 단리된 조합된 천연 킬러 세포 및 종양 세포 간의 직접적인 물리적, 예를 들어 세포-세포 접촉을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, "접촉시키는"은 동일한 물리적 공간에서의 존재를 포함하며, 예를 들어 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 중간 천연 킬러 세포, 및/또는 단리된 조합된 천연 킬러 세포는 종양 세포와 동일한 용기 (예를 들어, 배양 디쉬, 멀티웰 플레이트)에 배치된다. 또 다른 실시양태에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 태반 중간 천연 킬러 세포, 및 종양 세포를 "접촉시키는" 것은, 예를 들어 태반 관류액 또는 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포, 조합된 천연 킬러 세포 또는 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 중간 천연 킬러 세포를 종양 세포를 포함하는 개체, 예를 들어 인간, 예를 들어 암 환자로 주사 또는 주입함으로써 달성된다. 면역조절 화합물 및/또는 탈리도미드의 맥락에서, "접촉시키는"은 예를 들어 세포 및 면역조절 화합물 및/또는 탈리도미드가 서로 직접적으로 물리적으로 접촉되거나, 또는 동일한 물리적 부피 (예를 들어, 세포 배양 용기 또는 개체) 안에 배치되는 것을 의미한다.

[0244] 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 혈액 암 세포, 예를 들어 백혈병 세포 또는 림프종 세포이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 암은 급성 백혈병, 예를 들어 급성 T 세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포, 급성 전골수세포성 백혈병 세포, 급성 골수모구성 백혈병 세포, 급성 거핵아구성 백혈병 세포, 전구체 B 급성 림프모구성 백혈병 세포, 전구체 T 급성 림프모구성 백혈병 세포, 버키트 백혈병 (버키트 림프종) 세포, 또는 급성 이중표현형 백혈병 세포, 만성 백혈병 세포, 예를 들어 만성 골수성 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병 (CML) 세포, 만성 단핵 백혈병 세포, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)/소형 림프구성 림프종 세포, 또는 B-세포 전림프구성 백혈병 세포, 모발 세포 림프종 세포, T-세포 전림프구성 백혈병 세포, 또는 림프종 세포, 예를 들어 조직구성 림프종 세포, 림프형질세포성 림프종 세포 (예를 들어, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 세포), 비장 변연대 림프종 세포, 혈장 세포 신생물 세포 (예를 들어, 혈장 세포 골수종 세포, 형질세포종 세포, 모노클로날 이뮤노글로불린 침착 질환 세포 또는 중쇄 질환 세포), 림프절외 변연대 B 세포 림프종 (MALT 림프종) 세포, 결절 변연대 B 세포 림프종 (NMZL) 세포, 소포 림프종 세포, 외투 세포 림프종 세포, 미만성 거대 B 세포 림프종 세포, 종격 (흉선) 거대 B 세포 림프종 세포, 혈관내 거대 B 세포 림프종 세포, 원발성 삼출 림프종 세포, T 세포 대과립 림프구성 백혈병 세포, 활동성 NK 세포 백혈병 세포, 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포, 림프절외 NK/T 세포 림프종 - 비측 유형 세포, 장질환-유형 T 세포 림프종 세포, 간비장 T 세포 림프종 세포, 모구성 NK 세포 림프종 세포, 균상식육종 (세자리 증후군), 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프구증식 장애 (예를 들어, 원발성 피부 미분화 대세포 림프종 또는 림프종양 구진증) 세포, 혈관면역모구성 T 세포 림프종 세포, 말초 T 세포 림프종 - 상세불명의 세포, 미분화 대세포 림프종 세포, 호지킨 림프종 세포 또는 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종 세포이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 다발성 골수종 세포 또는 골수이형성 증후군 세포이다.

[0245] 구체적인 실시양태에서, 종양 세포는 충실성 종양 세포, 예를 들어 암종 세포, 예를 들어 선암종 세포, 부신피질 암종 세포, 결장 선암종 세포, 결장직장 선암종 세포, 결장직장 암종 세포, 도관 세포 암종 세포, 폐 암종 세포, 갑상선 암종 세포, 비인두 암종 세포, 흑색종 세포 (예를 들어, 악성 흑색종 세포), 비-흑색종 피부 암종 세포, 또는 상세불명의 암종 세포, 인대양 종양 세포, 섬유조직형성 소원형 세포 종양 세포, 내분비 종양 세포, 유잉 육종 세포, 생식 세포 종양 세포 (예를 들어, 고환암 세포, 난소암 세포, 융모막암종 세포, 내배엽동 종양 세포, 종자세포종 세포 등), 간모세포종 세포, 간세포암 세포, 신경모세포종 세포, 비-횡문근육종 연조직 육종 세포, 골육종 세포, 망막모세포종 세포, 횡문근육종 세포, 또는 윌름스 종양 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 종양 세포는 췌장암 세포 또는 유방암 세포이다. 다른 실시양태에서, 충실성 종양 세포는 청신경초종 세포, 성상세포종 세포 (예를 들어, 등급 I 털모양세포 성상세포종 세포, 등급 II 저악성도 성상세포종 세포, 등급 III 미분화 성상세포종 세포, 또는 등급 IV 다형성 교모세포종 세포), 척삭종 세포, 두개인두종 세포, 신경교종 세포 (예를 들어, 뇌 줄기 신경교종 세포, 뇌실막세포종 세포, 혼합형 신경교종 세포, 시신경교종 세포, 또는 뇌

실막하세포종 세포), 교모세포종 세포, 수모세포종 세포, 수막종 세포, 전이성 뇌 종양 세포, 희소돌기신경교종 세포, 송과체모세포종 세포, 뇌하수체 종양 세포, 원시신경 외배엽 종양 세포, 또는 슈반세포종 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 종양 세포는 전립선암 세포이다.

[0246] 본원에서 사용된 바와 같은 "치료학적으로 유익한" 및 "치료학적 이점"은 예를 들어 종양 크기의 감소, 종양의 증식 완화 또는 중지, 단위 부피 당 조직 샘플, 예를 들어 혈액 샘플에서의 암 세포 수의 감소, 상기 개체가 가지고 있는 특정 암 또는 종양의 임의의 증상의 임상적 개선, 개체가 가지고 있는 특정 암의 임의의 증상의 완화 또는 상기 증상의 악화 중지 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0247] 6.8.3. TSNK 세포 및 다른 항암제를 사용한 암의 치료

[0248] 본원에 기재된 TSNK 세포를 사용한 암이 있는 개체의 치료는 1종 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 요법 계획의 부분일 수 있다. 이러한 항암제는 당업계에 널리 공지되어 있다. 암이 있는 개체, 예를 들어 종양 세포가 있는 개체에게 TSNK 세포, 및 임의로는 관류액, 관류액 세포, TSNK 세포 이외의 천연 킬러 세포에 추가하여 투여될 수 있는 구체적인 항암제는 아시비신, 아클라루비신, 아코다졸 히드로클로라이드, 아크로닌, 아도젤레신, 아드루실, 알데스류킨, 알트레타민, 암보마이신, 아메탄트론 아세테이트, 암사크린, 아나스트로졸, 안트라마이신, 아스파라지나제, 아스페를린, 아바스틴 (베바시주맙), 아자시티딘, 아제테파, 아조토마이신, 바티마스타트, 벤조데파, 비칼루타미드, 비산트렌 히드로클로라이드, 비스나파이드 디메실레이트, 비젤레신, 블레오마이신 술페이트, 브레퀴나르 나트륨, 브로피리민, 부술판, 칵티노마이신, 칼루스테론, 카라세마이드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 카루비신 히드로클로라이드, 카르젤레신, 세데핀골, 셀레콕십 (COX-2 억제제), 클로람부실, 시롤레마이신, 시스플라틴, 클라드리빈, 크리스나톨 메실레이트, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신 히드로클로라이드, 데시타빈, 덱소르마플라틴, 데자구아닌, 데자구아닌 메실레이트, 디아지쿠온, 도세탁셀, 독소루비신, 독소루비신 히드로클로라이드, 드롤록시펜, 드롤록시펜 시트레이트, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 두아조마이신, 에다트렉세이트, 에플로미틴 히드로클로라이드, 엘사미트루신, 엔로플라틴, 엔프로메이트, 에피프로피딘, 에피루비신 히드로클로라이드, 에르불로졸, 에소루비신 히드로클로라이드, 에스트라무스틴, 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨, 에타니다졸, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 에토프린, 파드로졸 히드로클로라이드, 파자라빈, 펜레티나이드, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 플루오로우라실, 플루로시타빈, 포스퀴돈, 포스트리에신 나트륨, 겜시타빈, 겜시타빈 히드로클로라이드, 히드록시우레아, 이다루비신 히드로클로라이드, 이포스파미드, 일모포신, 이프로플라틴, 이리노테칸, 이리노테칸 히드로클로라이드, 란레오티드 아세테이트, 레트로졸, 류프롤리드 아세테이트, 리아로졸 히드로클로라이드, 로메트렉솔 나트륨, 로무스틴, 로속산트론 히드로클로라이드, 마소프로콜, 메이탄신, 메클로레타민 히드로클로라이드, 메게스트롤 아세테이트, 멜렌게스트롤 아세테이트, 멜팔란, 메노가릴, 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 메토트렉세이트 나트륨, 메토프린, 메트우레데파, 미틴도미드, 미토카르신, 미토크로민, 미토길린, 미토말신, 미토마이신, 미토스페르, 미토탄, 미톡산트론 히드로클로라이드, 미코페놀산, 노코다졸, 노갈라마이신, 오르마플라틴, 옥시수란, 파클리탁셀, 페가스파르가제, 펠리오마이신, 펜타무스틴, 페플로마이신 술페이트, 퍼포스파미드, 피포브로만, 피포술판, 피록산트론 히드로클로라이드, 플리카마이신, 플로메스탄, 포르피머 나트륨, 포르피로마이신, 프레드니무스틴, 프로카르바진 히드로클로라이드, 퓨로마이신, 퓨로마이신 히드로클로라이드, 피라조푸린, 리보프린, 사핀골, 사핀골 히드로클로라이드, 세무스틴, 심트라젠, 스파르포세이트 나트륨, 스파르소마이신, 스피로게르마늄 히드로클로라이드, 스피로무스틴, 스피로플라틴, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 술로페누르, 탈리소마이신, 테코갈란 나트륨, 탁소테레, 테가푸르, 텔록산트론 히드로클로라이드, 테모포르핀, 테니포시드, 테록시론, 테스톨락톤, 티아미프린, 티오구아닌, 티오테파, 티아조푸린, 티라파자민, 토레미펜 시트레이트, 트레스톨론 아세테이트, 트리시리빈 포스페이트, 트리메트렉세이트, 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트, 트립토렐린, 튜블로졸 히드로클로라이드, 우라실 머스타드, 우레데파, 바프레오티드, 베르테포르핀, 빈블라스틴 술페이트, 빈크리스틴 술페이트, 빈데신, 빈데신 술페이트, 비네피딘 술페이트, 빈글리시네이트 술페이트, 빈류로신 술페이트, 비노렐빈 타르트레이트, 빈로시딘 술페이트, 빈졸리딘 술페이트, 보로졸, 제니플라틴, 지노스타틴, 및 조루비신 히드로클로라이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0249] 다른 항암 약물은 20-epi-1,25 디히드록시비타민 D3, 5-에티닐우라실, 아비라테론, 아클라루비신, 아실풀벤, 아데시페놀, 아도젤레신, 알데스류킨, ALL-TK 길항제, 알트레타민, 암바무스틴, 아미독스, 아미포스틴, 아미노레불린산, 암루비신, 암사크린, 아나그렐리드, 아나스트로졸, 안드로그라폴리드, 혈관신생 억제제, 길항제 D, 길항제 G, 안타렐릭스, 항-배방화 형태형성 단백질-1, 항안드로겐, 전립선 암종, 항에스트로겐, 항네오플라스톤, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 아피디콜린 글리시네이트, 세포자멸 유전자 조절제, 세포자멸 조절인자, 퓨린결여산(apurinic acid), ara-CDP-DL-PTBA, 아르기닌 데아미나제, 아술라크린, 아타메스탄, 아트리무스틴, 악시나

스타틴 1, 악시나스타틴 2, 악시나스타틴 3, 아자세트론, 아자톡신, 아자티로신, 바카틴 III 유도체, 발라놀, 바티마스타트, BCR/ABL 길항제, 벤조클로린스, 벤조일스타우로스포린, 베타 락탐 유도체, 베타-알레틴, 베타클라마이신 B, 베툴린산, bFGF 억제제, 비칼루타미드, 비산트렌, 비스아지리디닐스페르민, 비스나파이드, 비스트라텐 A, 비젤레신, 브레플레이트, 브로피리민, 부도티탄, 부티오닌 술폭시민, 칼시포트리올, 칼포스틴 C, 캄프토사르 (캄프토(Campto)라고도 지칭됨, 이리노테칸) 캄프토테신 유도체, 카페시타빈, 카르복스아미드-아미노-트리아졸, 카르복시아미도트리아졸, CaRest M3, CARN 700, 연골 유래 억제제, 카르젤레신, 카세인 키나제 억제제 (ICOS), 카스타노스페르민, 세크로핀 B, 세트로렐릭스, 클로린스, 클로로퀴녹살린 술폰아미드, 시카프로스트, 시스-포피린, 클라드리빈, 클로미펜 유사체, 클로트리마졸, 콜리스마이신 A, 콜리스마이신 B, 콤브레타스타틴 A4, 콤브레타스타틴 유사체, 코나게닌, 크람베시딘 816, 크리스나톨, 크립토파이신 8, 크립토파이신 A 유도체, 쿠라신 A, 시클로펜트안트라퀴논, 시클로플라탐, 시페마이신, 시타라빈 옥포스페이트, 세포용해 인자, 사이토스타틴, 다클릭시맙, 데시타빈, 데히드로디덴민 B, 데슬로렐린, 덱사메타손, 덱시포스파미드, 덱스라족산, 덱스베라파밀, 디아지쿠온, 디뎀닌 B, 디독스, 디에틸노르스페르민, 디히드로-5-아자시티딘, 디히드로탁솔, 9-, 디옥사마이신, 디페닐 스피로무스틴, 도세탁셀, 도코사놀, 돌라세트론, 독시플루리딘, 독소루비신, 드롤록시펜, 드로나비놀, 듀오카르마이신 SA, 엡셀렌, 에코무스틴, 에텔포신, 에드레콜로맙, 에플로르니틴, 엘레멘, 에미테푸르, 에피루비신, 에프리스테리드, 에스트라무스틴 유사체, 에스트로겐 효능제, 에스트로겐 길항제, 에타니다졸, 에토포시드 포스페이트, 엑세메스탄, 파드로졸, 파자라빈, 펜레티나이드, 필그라스팀, 피나스테라이드, 플라보피리돌, 플레젤라스틴, 플루아스테론, 플루다라빈, 플루오로다우노루니신 히드로클로라이드, 포르페니멕스, 포르메스탄, 포스트리에신, 포테무스틴, 가돌리늄 텍사피린, 질산갈륨, 갈로시타빈, 가니렐릭스, 젤라티나제 억제제, 겜시타빈, 글루타티온 억제제, 헵술팜, 헤레굴린, 헥사메틸렌 비스아세트아미드, 하이페리신, 이반드론산, 이다루비신, 이독시펜, 이드라만톤, 일모포신, 일로마스타트, 이마티닙 (예를 들어, 글리벡®), 이미퀴모드, 면역자극제 펩티드, 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제, 인터페론 효능제, 인터페론, 인터류킨, 이오벤구안, 아이오도독소루비신, 이포메아놀, 4-, 이로플락트, 이르소글라딘, 이소벤가졸, 이소호모할리콘드린 B, 이타세트론, 자스플라키놀리드, 카하랄리드 F, 라멜라린-N 트리아세테이트, 란레오티드, 레이나마이신, 레노그라스팀, 렌티난 술페이트, 렙톨스타틴, 레트로졸, 백혈병 억제 인자, 백혈구 알파 인터페론, 류프롤리드 + 에스트로겐 + 프로게스테론, 류프로렐린, 레바미졸, 리아로졸, 선형 폴리아민 유사체, 친유성 디사카라이드 펩티드, 친유성 백금 화합물, 리소클린아미드 7, 로바플라틴, 롬브리신, 로메트렉솔, 로니다민, 로속산트론, 록소리빈, 루르토테칸, 루테튬 텍사피린, 리소필린, 용균성 펩티드, 마이탄신, 만노스타틴 A, 마리마스타트, 마소프로콜, 마스핀, 마트리리신 억제제, 매트릭스 메탈로프로테이나제 억제제, 메노가릴, 메르바론, 메테렐린, 메티오니나제, 메토클로프라미드, MIF 억제제, 미페프리스톤, 밀테포신, 미리모스팀, 미토구아존, 미톨락톨, 미토마이신 유사체, 미토나파이드, 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린, 미톡산트론, 모파로텐, 몰그라모스팀, 에르비툭스(Erbitux) (세툭시맙), 인간 융모생식선자극호르몬, 모노포스포릴 지질 A+마이오박테리움 세포 벽 sk, 모피다몰, 머스타드 항암제, 마이카퍼옥시드 B, 마이코박테리아 세포 벽 추출물, 마이리아포론, N-아세틸디날린, N-치환된 벤즈아미드, 나파렐린, 나그레스팁, 날록손+펜타조신, 나파빈, 나프테르핀, 나르토그라스팀, 네다플라틴, 네모루비신, 네리드론산, 닐루타미드, 니사마이신, 산화질소 조절제, 니트록시드 항산화제, 니트룰린, 오블리메르센 (게나센스(GENASENSE)®), O^6-벤질구아닌, 옥트레오티드, 오키세논, 올리고뉴클레오티드, 오나프리스톤, 온단세트론, 온단세트론, 오라신, 경구 시토카인 유도자, 오르마플라틴, 오사테론, 옥살리플라틴 (예를 들어, 플록사틴(Floxatin)), 옥사우노마이신, 파클리탁셀, 파클리탁셀 유사체, 파클리탁셀 유도체, 팔라우아민, 팔미토일리족신, 파미드론산, 파낙시트리올, 파노미펜, 파라박틴, 파젤립틴, 페가스파르가제, 펠데신, 펜토산 폴리술페이트 나트륨, 펜토스타틴, 펜트로졸, 퍼플루브론, 퍼포스파미드, 페릴릴 알콜, 페나지노마이신, 페닐아세테이트, 포스파타제 억제제, 피시바닐, 필로카르핀 히드로클로라이드, 피라루비신, 피리트렉심, 플라세틴 A, 플라세틴 B, 플라스미노겐 활성자 억제제, 백금 착체, 백금 화합물, 백금-트리아민 착체, 포르피머 나트륨, 포르피로마이신, 프레드니손, 프로필 비스-아크리돈, 프로스타글란딘 J2, 프로테아솜 억제제, 단백질 A-기재의 면역 조정자, 단백질 키나제 C 억제제, 단백질 키나제 C 억제제, 미세조류, 단백질 티로신 포스파타제 억제제, 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제, 푸르퓨린, 피라졸로아크리딘, 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체, raf 길항제, 랄티트렉세드, 라모세트론, ras 파르네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제, ras 억제제, ras-GAP 억제제, 탈메틸화 레텔립틴, 레늄 Re 186 에티드로네이트, 리족신, 리보자임, RII 레틴아미드, 로히투킨, 로무르티드, 로퀴니멕스, 루비기논 B1, 루복실, 사핀골, 사인토핀, SarCNU, 사르코피톨 A, 사르그라모스팀, Sdi 1 모방체, 세무스틴, 세네신스 유래 억제제 1, 센스 올리고뉴클레오티드, 신호 도입 억제제, 시조피란, 소부족산, 나트륨 보로캅테이트, 나트륨 페닐아세테이트, 솔베롤, 소마토메딘 결합 단백질, 소네르민, 스파르포스산, 스피카마이신 D, 스피로무스틴, 스플레노펜틴, 스폰지스타틴 1, 스쿠알라민, 스티피아미드, 스트로멜리신 억제제, 술

피노신, 과활성 혈관작용성 장 펩티드 길항제, 수라디스타, 수라민, 스와인소닌, 탈리무스틴, 타목시펜 메티오다이드, 타우로무스틴, 타자로텐, 테코갈란 나트륨, 테가푸르, 텔루라피릴륨, 텔로머라제 억제제, 테모포르핀, 테니포시드, 테트라클로로데카옥시드, 테트라조민, 탈리블라스틴, 티오코랄린, 트롬보포이에틴, 트롬보포이에틴 모방체, 티말파신, 티모포이에틴 수용체 효능제, 티모트리난, 갑상선 자극 호르몬, 주석 에틸 에티오푸르퓨린, 티라파자민, 티타노센 바이클로라이드, 톱센틴, 토레미펜, 번역 억제제, 트레티노인, 트리아세틸유리딘, 트리시리빈, 트리메트렉세이트, 트립토렐린, 트로피세트론, 투로스테리드, 티로신 키나제 억제제, 티르포스틴, UBC 억제제, 우베니멕스, 비뇨생식동-유래 성장 억제 인자, 유로키나제 수용체 길항제, 바프레오티드, 바리올린 B, 벡티빅스(Vectibix) (파니투무맙), 벨라레솔, 베라민, 베르딘스, 베르테포르핀, 비노렐빈, 빈크살틴, 비탁신, 보로졸, 웰코보린(Welcovorin) (류코보린), 크셀로다(Xeloda) (카페시타빈), 자노테론, 제니플라틴, 질라스코르브, 및 지노스타틴 스티말라머를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0250] 6.8.4. 바이러스 감염의 치료

[0251] 또 다른 실시양태에서, 본원은 치료 유효량의 TSNK 세포를 바이러스 감염이 있는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체의 치료 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 개체에서는 천연 킬러 세포, 예를 들어 개체의 바이러스 감염에 대해 활성인 NK 세포가 결핍되어 있다. 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 투여는 단리된 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반 천연 킬러 세포, 예를 들어 태반-유래 중간 천연 킬러 세포, 단리된 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 이것들의 조합물 중 1종 이상을 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다. 구체적인 특정 실시양태에서, TSNK 세포는 상기 투여 이전에 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉된다. 다른 구체적인 특정 실시양태에서, 상기 투여는 상기 TSNK 세포에 추가하여 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 섹션 6.2.1에 기재된 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 양은 예를 들어 상기 바이러스 감염의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 그의 진행 완화 또는 그의 제거를 일으키는 양이다. 구체적인 실시양태에서, 바이러스 감염은 아데노비리대(*Adenoviridae*), 피코르나비리대(*Picornaviridae*), 헤르페스비리대(*Herpesviridae*), 헤파드나비리대(*Hepadnaviridae*), 플라비비리대(*Flaviviridae*), 레트로비리대(*Retroviridae*), 오르토믹소비리대(*Orthomyxoviridae*), 파라믹소비리대(*Paramyxoviridae*), 파필로마비리대(*Papilommaviridae*), 랍도비리대(*Rhabdoviridae*) 또는 토가비리대(*Togaviridae*) 부류의 바이러스에 의한 감염이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 바이러스는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 콕사키바이러스, A형 간염 바이러스 (HAV), 폴리오바이러스, 엡스타인-바 바이러스 (EBV), 단순 포진 유형 1 (HSV1), 단순 포진 유형 2 (HSV2), 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV), 인간 헤르페스바이러스 유형 8 (HHV8), 대상포진 바이러스 (바리셀라 조스터 바이러스 (VZV) 또는 싱글레스 바이러스), B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV), D형 간염 바이러스 (HDV), E형 간염 바이러스 (HEV), 인플루엔자 바이러스 (예를 들어, A형 인플루엔자 바이러스, B형 인플루엔자 바이러스, C형 인플루엔자 바이러스 또는 토고토바이러스), 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 유두종바이러스, 광견병 바이러스 또는 풍진 바이러스이다.

[0252] 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 상기 바이러스는 아데노바이러스 종 A, 혈청형 12, 18 또는 31, 아데노바이러스 종 B, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35 또는 50, 아데노바이러스 종 C, 혈청형 1, 2, 5 또는 6, 종 D, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 51, 종 E, 혈청형 4, 또는 종 F, 혈청형 40 또는 41이다.

[0253] 다른 더욱 구체적인 특정 실시양태에서, 바이러스는 아포이(Apoi) 바이러스 (APOIV), 아로아(Aroa) 바이러스 (AROAV), 배가자(bagaza) 바이러스 (BAGV), 반지(Banzi) 바이러스 (BANV), 부부이(Bouboui) 바이러스 (BOUV), 카시파코어(Cacipacore) 바이러스 (CPCV), 캐리 아일랜드(Carey Island) 바이러스 (CIV), 카우본 릿지(Cowbone Ridge) 바이러스 (CRV), 뎅기(Dengue) 바이러스 (DENV), 엣지 힐(Edge Hill) 바이러스 (EHV), 개지트 걸리(Gadgets Gully) 바이러스 (GGYV), 일레우스(Ilheus) 바이러스 (ILHV), 이스라엘 터키 수막뇌척수염 바이러스 (ITV), 일본 뇌염 바이러스 (JEV), 유그라(Jugra) 바이러스 (JUGV), 유티아파(Jutiapa) 바이러스 (JUTV), 카담(kadam) 바이러스 (KADV), 케두구(Kedougou) 바이러스 (KEDV), 코코베라(Kokobera) 바이러스 (KOKV), 쿠탄고(Koutango) 바이러스 (KOUV), 키야사나 삼림병(Kyasanur Forest disease) 바이러스 (KFDV), 랭깃(Langat) 바이러스 (LGTV), 메아반(Meaban) 바이러스 (MEAV), 모독(Modoc) 바이러스 (MODV), 몬타나 마이오티스(Montana myotis) 백색질뇌염 바이러스 (MMLV), 머레이 밸리(Murray Valley) 뇌염 바이러스 (MVEV), 엔타야(Ntaya) 바이러스 (NTAV), 옴스크(Omsk) 출혈성 열병 바이러스 (OHFV), 포와산(Powassan) 바이러스 (POWV), 리오 브라보(Rio Bravo) 바이러스 (RBV), 로얄 팜(Royal Farm) 바이러스 (RFV), 사보야(Saboya) 바이러스 (SABV), 세인트

루이스(St. Louis) 뇌염 바이러스 (SLEV), 샐 비야(Sal Vieja) 바이러스 (SVV), 산 페를리타(San Perlita) 바이러스 (SPV), 사우마레즈 리프(Saumarez Reef) 바이러스 (SREV), 세픽(Sepik) 바이러스 (SEPV), 템부수(Tembusu) 바이러스 (TMUV), 진드기-매개 뇌염 바이러스 (TBEV), 튤레니이(Tyuleniy) 바이러스 (TYUV), 우간다 S 바이러스 (UGSV), 우수투(Usutu) 바이러스 (USUV), 베셀스브론(Wesselsbron) 바이러스 (WESSV), 웨스트 나일열(West Nile) 바이러스 (WNV), 야운데(Yaounde) 바이러스 (YAOV), 황열 바이러스 (YFV), 요코스(Yokose) 바이러스 (YOKV) 또는 지카(Zika) 바이러스 (ZIKV)이다.

[0254] 다른 실시양태에서, TSNK 세포 및 임의로는 태반 관류액 및/또는 관류액 세포는 1종 이상의 다른 항바이러스제를 포함하는 항바이러스 요법 계획의 일부로서 바이러스 감염이 있는 개체에게 투여된다. 바이러스 감염이 있는 개체에게 투여될 수 있는 구체적인 항바이러스제는 이미퀴모드, 포도필록스, 포도필린, 인터페론 알파 (IFN α), 레티콜로스, 논옥시놀-9, 아시클로비르, 팜시클로비르, 발라시클로비르, 간시클로비르, 시도포비르, 아만타딘, 리만타딘, 리바비린, 자나마비르 및 오셀타우마비르, 프로테아제 억제제, 예컨대 인디나비르, 넬피나비르, 리토나비르 또는 사퀴나비르, 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예컨대 디다노신, 라미부딘, 스타부딘, 잘시타빈 또는 지도부딘, 및 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예컨대 네비라핀 또는 에파비렌즈를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0255] 6.8.5. 투여

[0256] 세포, 예를 들어 태반 관류액 세포, 예를 들어 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 조합된 천연 킬러 세포, 및/또는 단리된 천연 킬러 세포, 예를 들어 TSNK 세포 수의 결정, 및 면역조절 화합물, 예를 들어 상기 섹션 6.2.1에서의 면역조절 화합물 또는 탈리도미드 양의 결정은 서로 독립적으로 수행될 수 있다.

[0257] 6.8.5.1. 세포의 투여

[0258] 특정 실시양태에서, TSNK 세포는 개체에서 검출가능한 치료학적 이점을 야기하는 임의의 양 또는 수로, 예를 들어 유효량으로 개체에게 사용, 예를 들어 투여되며, 여기서 개체는 바이러스 감염, 암 또는 종양 세포를 가지며, 예를 들어 종양 세포, 충실성 종양 또는 혈액 암이 있는 개체, 예를 들어 암 환자이다. 이러한 세포는 상기 개체에게 절대적인 수의 세포로 투여될 수 있으며, 예를 들어 상기 개체에게 대략적으로 최소 또는 최대 약 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개 또는 1×10^{11}개의 TSNK 세포를 투여할 수 있다. 다른 실시양태에서, TSNK 세포는 상기 개체에게 상대적인 수의 세포로 투여될 수 있으며, 예를 들어 상기 개체에게 개체 1 킬로그램 당 대략적으로 최소 또는 최대 약 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개 또는 1×10^{11}개의 TSNK 세포를 투여할 수 있다. TSNK 세포는 TSNK 세포 및 임의로는 태반 관류액 세포 및/또는 TSNK 세포 이외의 천연 킬러 세포의 수와 상기 개체에서의 종양 세포의 수 (예를 들어, 추정치) 사이의 대략적인 비율에 따라 상기 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, TSNK 세포는 상기 개체에서의 종양 세포의 수에 대해 대략적으로 최소 또는 최대 약 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1의 비율로 상기 개체에게 투여될 수 있다. 이러한 개체에서의 종양 세포의 수는, 예를 들어 개체로부터의 조직 샘플, 예를 들어 혈액 샘플, 생검 등에서 종양 세포의 수를 계수함으로써 추정될 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 예를 들어 충실성 종양의 경우, 상기 계수는 종양(들)의 영상화와 조합하여 수행되어 대략적인 종양 부피를 획득할 수 있다. 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포 및 임의로는 태반 관류액 세포 및/또는 TSNK 세포 이외의 천연 킬러 세포에 추가하여 면역조절 화합물 또는 탈리도미드, 예를 들어 유효량의 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 개체에게 투여된다.

[0259] 특정 실시양태에서, 예를 들어 개체에서의 종양 세포의 증식 저해 방법, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료 방법, 또는 바이러스 감염이 있는 개체의 치료 방법, 또는 암이 있는 개체, 예를 들어 종양 세포, 혈액 암 또는 충실성 종양이 있는 개체의 치료 방법은 종양 세포를 TSNK 세포 및 1종 이상의 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 조합물과 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0260] 구체적인 실시양태에서, 예를 들어 천연 킬러 세포가 결핍된 (예를 들어, NK 세포의 수가 결핍되거나, 또는 암, 종양 또는 바이러스 감염된 세포에 대한 NK 세포의 반응성이 결핍된) 개체의 치료, 또는 암 또는 바이러스 감염

이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해는 상기 종양 세포를 단리된 태반 관류액 세포 또는 태반 관류액으로 보충된 TSNK 세포와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 1 밀리리터 당 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 TSNK 세포, 또는 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 TSNK 세포는 1 밀리리터 당 대략적으로 또는 최소 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 단리된 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 단리된 태반 관류액 세포로 보충된다. 다른 더욱 구체적인 실시양태에서, 1 밀리리터 당 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 TSNK 세포, 또는 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 TSNK 세포는 대략적으로 또는 최소 약 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL, 550 mL, 600 mL, 650 mL, 700 mL, 750 mL, 800 mL, 850 mL, 900 mL, 950 mL 또는 1000 mL의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

[0261] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료, 암이 있는 개체의 치료, 바이러스 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해는 종양 세포를 TSNK 세포와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 TSNK 세포는 접착성 태반 세포, 예를 들어 접착성 태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포, 예를 들어 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 세포로 보충된다. 구체적인 실시양태에서, TSNK 세포는 1 밀리리터 당 약 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개 이상의 접착성 태반 줄기 세포, 또는 1×10^4개, 5×10^4개, 1×10^5개, 5×10^5개, 1×10^6개, 5×10^6개, 1×10^7개, 5×10^7개, 1×10^8개, 5×10^8개, 1×10^9개, 5×10^9개, 1×10^{10}개, 5×10^{10}개, 1×10^{11}개 이상의 접착성 태반 세포, 예를 들어 접착성 태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포로 보충된다.

[0262] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료, 암이 있는 개체의 치료, 바이러스 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해는 면역조절 화합물 또는 탈리도미드를 TSNK 세포와 조합 사용하여 수행하며, 여기서 상기 세포는 조건화 배지, 예를 들어 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 세포로 조건화된 배지, 예를 들어 관류액 단위 당 또는 10^4개, 10^5개, 10^6개, 10^7개, 10^8개, 10^9개, 10^{10}개 또는 10^{11}개 TSNK 세포 당 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL, 0.5 mL, 0.6 mL, 0.7 mL, 0.8 mL, 0.9 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL, 7 mL, 8 mL, 9 mL, 10 mL의 줄기 세포-조건화 배양 배지로 보충된다. 특정 실시양태에서, 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 세포는 미국 특허 제7,468,276호 및 미국 특허 출원 공개 제2007/0275362호에 기재된 다분화능 접착성 태반 세포이며, 상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 상기 방법은 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도미드와 접촉시키거나 또는 이를 상기 개체에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0263] 또 다른 구체적인 실시양태에서, 천연 킬러 세포가 결핍된 개체의 치료, 암이 있는 개체의 치료, 바이러스 감염이 있는 개체의 치료, 또는 종양 세포의 증식 저해에서, TSNK 세포는 태반 관류액 세포로 보충되고 상기 관류액 세포는 접촉 전에 일정 기간의 시간 동안 인터류킨-2 (IL-2)와 접촉시킨다. 특정 실시양태에서, 상기 접촉 전의 상기 기간의 시간은 대략적으로 최소 또는 최대 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간, 26시간, 28시간, 30시간, 32시간, 34시간, 36시간, 38시간, 40시간, 42시간, 44시간, 46시간 또는 48시간이다.

[0264] TSNK 세포 및 임의로는 관류액 또는 관류액 세포는 항암 요법의 과정 동안 바이러스 감염이 있는 개체, 암이 있는 개체 또는 종양 세포가 있는 개체에게 1회 투여될 수도 있고, 또는 상기 요법 동안 여러회, 예를 들어

1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간 또는 23시간마다 1회씩 또는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일마다 1회씩 또는 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 24주, 36주 이상의 주마다 1회씩 투여될 수도 있다. 세포 및 면역조절 화합물 또는 탈리도미드가 사용되는 실시양태에서, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도미드, 및 세포 또는 관류액은 개체에게 함께 (예를 들어, 동일 제제로) 또는 대략 동시에 별도로 (예를 들어, 별개의 제제로) 투여될 수도 있고, 또는 별도로, 예를 들어 상이한 투여 스케줄로 또는 하루 중 상이한 시간에 투여될 수도 있다. 유사하게, 세포 및 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물이 사용되는 실시양태에서, 상기 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물, 및 세포 또는 관류액은 개체에게 함께 (예를 들어, 동일 제제로) 또는 대략 동시에 별도로 (예를 들어, 별개의 제제로) 투여될 수도 있고, 또는 별도로, 예를 들어 상이한 투여 스케줄로 또는 하루 중 상이한 시간에 투여될 수도 있다. TSNK 세포, 및 관류액 또는 관류액 세포는 TSNK 세포, 관류액 또는 관류액 세포가 과거에 개체에게 투여되었던 적이 있는지의 여부와 상관없이 투여될 수 있다.

[0265] **7. 실시예**

[0266] 7.1. 실시예 1: 인간 태반 관류액 및 제대혈로부터 조혈 줄기 세포의 회수

[0267] 인간 태반 관류액 (HPP) 및 제대혈 (UCB) 세포는 일반적으로 피콜(Ficoll) 또는 염화암모늄을 사용하여 정제하여 전체 유핵 세포 (TNC)를 수득하였다. 이어서, TNC를 양성 선별 절차에 사용하여, 제조업체 (스템셀 테크놀로지즈, 인크.)의 프로토콜에 따라 항-CD34 비드 및 로보셉(RoboSep)을 사용하여 $CD34^+$ 세포를 단리하였다. 본 실험에서, $CD34^+$ 세포를 90% 초과의 순도로 단리하였다. 대안적으로, 이지셉(EasySep)® 인간 전구 세포 풍부화 키트 (스템셀 테크놀로지즈, 인크.)를 음성 선별 절차에 사용하여, 인간 전구 세포 풍부화 칵테일 및 하기 인간 세포 표면 항원에 대한 모노클로날 항체를 사용하여 계통 수임 세포를 고갈시켰다: CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A. 음성 선별을 이용하여, 90% $CD34^+$ 세포를 원재료로부터 회수하였다. 회수된 HSC의 세포 조성을 표 1에 요약하였다.

표 1

풍부한 조혈 줄기 세포 (HSC)의 세포 조성.
표준 편차는 3개 공여자에 대한 집단 평균에 대해 계산되었음.

[0268]

	평균%	표준 편차
$Lin\text{-}CD34^+$	75.1	6.2
$Lin\text{-}CD34^+CD38^-$	9.8	2.4
$Lin\text{-}CD34^+CD133^+$	0.9	0.2
$Lin\text{-}CD34^+CD117^+$	7.2	0.5

[0269] 7.2. 실시예 2: 조혈 줄기 세포의 영양 세포-무함유 증식 및 천연 킬러 세포로의 분화

[0270] $CD34^+$ 세포를 하기 배지 제제 중에서 최대 48일 동안 배양하였고, 세포 분취액을 취하여 세포 수, 세포 생존율, 천연 킬러 세포 분화의 특징규명 및 기능적 평가를 수행하였다.

[0271] NK1 배지: 페니실린/스트렙토마이신(pen/strep) (카탈로그 번호 15140, 깁코(Gibco)), 20 ng/mL SCF (카탈로그 번호 255-SC, 알앤디 시스템즈(R&D Systems)), 10 ng/mL Flt-3 리간드 (카탈로그 번호 308-FK, 알앤디 시스템즈), 20 ng/mL TPO (카탈로그 번호 288-TP, 알앤디 시스템즈), 20 ng/mL IL-7 (카탈로그 번호 207-IL, 알앤디 시스템즈), 200 IU/mL IL-2 (카탈로그 번호 202-IL, 알앤디 시스템즈) 및 10 ng/mL IL-15 (카탈로그 번호 247-IL, 알앤디 시스템즈)로 보충된 GBGM (글리코스템 기본 성장 배지, 글리코스템 카탈로그 번호 CCT-SCB500, 클리어 셀 테크놀로지(Clear cell technology)).

[0272] NK2 배지: 2 mM L-글루타민 (카탈로그 번호 25030, 인비트로젠), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 20% 인간 혈청 AB (카탈로그 번호 100-512, 젬셀(Gemcell)), 5 ng/mL 나트륨 셀레나이트 (카탈로그 번호 S9133, 시그마), 50 μM 에탄올아민 (카탈로그 번호 E0135, 시그마), 25 μM β-메르캅토에탄올 (카탈로그 번호 21985, 인비트로

젠), 20 mg/mL 아스코르브산 (카탈로그 번호 47863, 시그마), 5 ng/mL IL-3 (카탈로그 번호 203-IL, 알앤디 시스템즈), 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL IL-7 및 10 ng/mL IL-15로 보충된 1:2의 DMEM (카탈로그 번호 MT-10-013-CV, 피셔(Fisher)):햄 F12 (카탈로그 번호 BW12-615F, 피셔).

[0273] NK3 배지: 페니실린/스트렙토마이신, 10% 인간 혈청 AB (카탈로그 번호 100-512, 젬셀) 및 500 IU/mL IL-2로 보충된 X-vivo 20 (카탈로그 번호 BW04-448Q, 피셔).

[0274] NK2A 배지: 10% 인간 혈청 AB, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL TPO, 20 ng/mL IL-7, 200 IU/mL IL-2, 10 ng/mL IL-15 및 1.5 IU/mL 헤파린 (카탈로그 번호 H3149, 시그마)으로 보충된 GBGM.

[0275] NK2B1 배지: 2 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 20% 인간 혈청 AB, 5 ng/mL 나트륨 셀레나이트, 50 μM 에탄올아민, 25 μM β-메르캅토에탄올, 20 μg/mL 아스코르브산, 5 ng/mL IL-3, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL IL-7 및 10 ng/mL IL-15로 보충된 1:2의 DMEM:햄 F12.

[0276] NK2B2 배지: 2 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 20% 인간 혈청 AB, 5 ng/mL 나트륨 셀레나이트, 50 μM 에탄올아민, 25 μM β-메르캅토에탄올, 20 μg/mL 아스코르브산, 200 IU/mL IL-2, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL IL-7 및 10 ng/mL IL-15로 보충된 1:2의 DMEM:햄 F12.

[0277] NK2C 배지: 10% FBS (카탈로그 번호 SH30070.03, 하이클론(Hyclone)), 2 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL Flt-3 리간드, 100 IU/mL IL-2, 20 ng/mL IL-7 및 20 ng/mL IL-15로 보충된 RPMI 1640 (카탈로그 번호 22400105, 인비트로젠).

[0278] NK2D 배지: 1 μM 합성 글루코코르티코이드 덱사메토손 (덱스(Dex), 카탈로그 번호 D4902, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마), 40 ng/mL 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1, 카탈로그 번호 291-G1-250, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈), 100 ng/mL SCF, 40 μg/mL 지질 (콜레스테롤-풍부 지질 혼합물, 카탈로그 번호 C7305-1G, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마), 5 ng/mL IL-3, 200 IU/mL IL-2, 20 ng/mL IL-7 및 20 ng/mL IL-15로 보충된 혈청 무함유 배지 (스템스판, 카탈로그 번호 09650, 캐나다 밴쿠버 소재의 스템셀 테크놀로지즈).

[0279] 상이한 시점에서 수집된 세포를 RPMI1640 (페놀 무함유) 및 5% FBS로 2회 세척하고, 형광-접합된 항체 (표 2 및 3)를 사용하여 4℃에서 15분 동안 표지하고, 유동 세포계측 (FACSCanto, 비디(BD)) 및 플로우조(FlowJo) 세포계측 소프트웨어 (트리 스타(Tree Star))로 분석하였다.

표 2

세포 표지에 사용된 항체

HSC-NK FACS 항체		
품목	공급업체	카탈로그 번호
FITC 항-hu CD3	비디	555332
APC-Cy7 항-hu CD3	비디	557832
APC 항-hu CD5	비디	555355
PE 항-hu CD7	비디	555361
FITC 항-hu CD16	비디	555406
PE-Cy5 항-hu CD16	비디	555408
PE 항-hu CD56	비디	555516
PE-CY5 CD56 (N-CAM)	비디	555517
PE CD94	알앤디	FAB-1058P
APC 항-hu CD117	비디	550412
PE 항-hu CD226	비디	559789
이소형 FITC 마우스 IgG1	비디	340755
이소형 PE 마우스 IgG1	비디	340761
이소형 PerCP 마우스 IgG1	비디	340762
이소형 PE-CY7 마우스 IgG1	비디	348798
이소형 APC 마우스 IgG1	비디	340754
이소형 APC-CY7 마우스 IgG1	비디	348802
이소형 APC 마우스 IgG2a	비디	555576
PE 항-hu KIR-NKAT2 (2DL3)	비디	556071
PE NKB1(3DL1)	비디	555967
APC NKG2D	비디	558071
APC NKp46	비디	558051
단순 세포 보상 비드	뱅스 랩스(Bangs Labs)	550

[0280]

표 3

NK 표면 수용체의 유동 세포계측 특징규명 패널

	FITC	PE	PerCP	APC	APC-Cy7
대조군					
이소형					
패널 1	CD3	CD56	CD16		
패널 2	CD16	NKB1	CD56	NKG2D	CD3
패널 3	CD16	NKAT2	CD56	NKp46	CD3
패널 4	CD16	CD94	CD56	CD117	CD3
패널 5	CD16	CD226	CD56		CD3
패널 6	CD16	CD7	CD56	CD5	CD3

[0281]

[0282] *PKH26/TO-PRO-3 표지를 사용한 세포독성 검정.* 표적 종양 세포를 친유성 지방족 잔기를 통해 세포 원형질막에 삽입되는 염료인 PKH26 (카탈로그 번호 PKH26GL, 시그마-알드리치)으로 표지한 후에 96웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트에 두고, 10% FBS로 보충된 RPMI 1640 200 ㎕에서 다양한 이펙터-표적 (E:T) 비율로 증식된 NK 세포와 함께 인큐베이션하였다. 배양물을 37℃, 5% CO_2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 수확하고, 막-불투과성 DNA 염료인 TO-PRO-3 (인비트로젠 카탈로그 번호 T3605)을 상기 배양물에 첨가 (1 μM의 최종 농도)한 후에 FACS 분석하였다. 세포독성을 전체 PKH26+ 표적 종양 세포 내 사멸된 세포 (PKH26+TO-PRO-3+)의 백분율(%)로서 표시하였다.

[0283] *$CD34^+$ 세포 증식의 최적화 및 NK 세포로의 분화.* 시험된 배지 제제 NK1, NK2 및 NK3 중에서, NK1 배지는 제21일 (D21)에 500배 증식을 나타냈다. NK2 배지 및 NK3 배지는 어떤것도 세포 증식 또는 분화를 유지하지 않았다. 추가의 배지 최적화를 NK1 배지에 대해 수행하고, 후속적 배지를 NK2A, NK2B, NK2C 및 NK2D로 명명하였다. NK2A 배지로 배양된 $CD34^+$ 세포는 제55일 (D55)에 10^5배 증식을 나타냈다. NK1, NK2 및 NK3 배지로부터의 증식 배수, 분화 및 세포독성 결과를 기준으로, NK2A, NK2B, NK2C 및 NK2D 배지 제제의 제2 배치를 수행하였

고, D55에 10^5배 증식이 달성되었다 (도 1에 나타낸 바와 같음). NK2B 배지는 대략 3×10^4배 증식을 나타냈다. NK2C 배지에서의 배양은 제21일에 3×10^2배 증식되었고 이후에는 세포 생존율이 감소되었다. NK2D 배지는 실험 기간 전체에 걸쳐서 세포를 유지하지 못하였다.

[0284] 제48일 (D48)에는, NK2A 배지 중 NK 세포의 약 90%가 $CD56^+CD3^-$였다. $CD56^+CD3^-$ 집단 내에서, 세포의 98% 초과가 $CD56^+CD16^-$인 반면 (도 2에 나타낸 바와 같음), 58%가 활성화 수용체 NKG2D를 발현하였고, 68%가 $NKp46^+$였고 17%가 $CD226^+$였다 (표 4A 및 표 4B에 나타낸 바와 같음).

표 4

D48에 증식된 NK 세포의 표현형 특징

4A: D48 표현형							
NK2A		CD56+CD3-	CD56+ CD16–	CD56+ CD16+	NKB1	NKG2D	NKAT2
	평균	86.84%	98.44%	1.56%	3.38%	58.41%	1.69%
	표준 편차	4.50%	0.30%	0.30%	1.42%	5.88%	0.22%

4B: D48 표현형: CD56+CD3-					
NKp46	CD94	CD117	CD226	CD7	CD5
67.92%	38.08%	80.53%	17.32%	34.43%	53.53%
5.43%	21.14%	14.27%	14.26%	8.48%	3.00%

[0285]

[0286] 추가로, NK2A 배지 중에서 배양된 세포의 97.8% 및 NK2B 배지 중에서 배양된 세포의 93.1%는 배양 제21일에 $CD56^+CD16^-$였다.

[0287] 7.3. 실시예 3: CNK 배지 중에서의 NK 세포의 배양은 NK 세포의 증식 및 세포독성을 증진시킴

[0288] 제27일 (D27)에, NK2A 배지 중에서 배양된 $CD34^+$ 세포를 하기 배지 중 하나에서 추가로 배양하였다:

[0289] ● CNK 배지 및 유지 배지를 포함하는 2-단계 배지.

[0290] CNK 배지는 10% FCS (하이클론), 200 IU/mL IL-2 (알앤디 시스템즈), 35 μg/mL 트랜스페린 (시그마-알드리치), 5 μg/mL 인슐린 (시그마-알드리치), 2×10^{-5} M 에탄올아민 (시그마-알드리치), 1 μg/mL 올레산 (시그마-알드리치), 1 μg/mL 리놀레산 (시그마-알드리치), 0.2 μg/mL 팔미트산 (시그마-알드리치), 2.5 μg/mL BSA (시그마-알드리치) 및 0.1 μg/mL 식물성적혈구응집소 (PHA-P, 시그마-알드리치)로 보충된 IMDM (인비트로젠)이다. NK2A 배지 중에서 배양된 $CD56^+CD3^-$ NK 세포를 세포 배양물 처리된 24웰 플레이트 또는 T 플라스크의 CNK 배지 중에 1 mL 당 살아있는 세포 2.5×10^5개로 하여 재현탁시켰다. 미토마이신 C-처리된 동종이계의 PBMC 및 K562 세포 (만성 골수성 백혈병 세포주) 둘다를 1×10^6개/mL의 최종 농도가 되도록 하여 CNK 배지에 영양 세포로서 첨가하였다. NK 세포를 37℃, 5% CO_2에서 5일 내지 6일 동안 배양하였다. 5일 내지 6일 후에 3일 내지 4일마다 동일 부피의 유지 배지 (10% FCS, 2% 인간 AB 혈청, 항생제, L-글루타민 및 1 mL 당 IL-2 400 유닛을 함유하는 IMDM)를 상기 배양물에 첨가하였다.

[0291] ● 미토마이신 C-처리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 줄기 세포를 영양 세포로서 함유하는 NK2A (PDAC) 배지,

[0292] ● 미토마이신 C-처리된 중간엽 줄기 세포 (MSC)를 영양 세포로서 함유하는 NK2A (MSC) 배지, 또는

[0293] ● 대조군으로서의 영양 세포-무함유 NK2A (FF) 배지.

[0294] 2-단계 배지는 NK2A (FF), NK2A (PDAC) 및 NK2A (MSC)에 비해, 특히 제27일 (D27)과 제48일 (D48) 사이에서 $CD34^+$ 세포의 증식 배수를 증진시켰다. 도 3을 참조한다.

[0295] 제35일까지 $CD34^+$ 세포의 비율은 이미 대략 4%로 감소하였으나, $CD56^+CD3^-$의 비율은 2-단계 배지에서 대략 80%

로 증가하였다. 제45일 (D45)에, 2-단계 배지 중에서 배양된 세포는 NK2A (FF), NK2A (PDAC) 및 NK2A (MSC) 중에서 배양된 NK 세포에 비해 최대 세포독성을 나타냈다 (도 3에 나타낸 바와 같음). 제41일의 표현형 특징규명 (도 5에 나타낸 바와 같음)은 세포 내 NKp46 및 CD226의 발현이 증가되었음을 보여주었고, 이는 세포독성의 증진과 관련하여 가능한 설명을 나타낸다. D41에 $CD226^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서는 0.9%±0.8%에서 2-단계 배지에서는 13%±4%로 증가하였고, $NKp46^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서는 55.4%±8.7%에서 2-단계 배지에서는 80%±7.85%로 증가하였다. D48에 $CD226^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서는 17.3%±14.3%에서 2-단계 배지에서는 52.3%±11.64%로 증가하였고, $NKp46^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서는 67.9%±5.4%에서 2-단계 배지에서는 86%±4%로 증가하였다. 시험된 조건 중에서는 NKG2D 발현에 유의한 차이는 없었다. CD226 및 NKp46의 발현 변화는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

제41일 (D41) 및 제48일 (D48)에 NK2A (FF) 및 2-단계 배지 중에서 배양된 NK 세포에서의 CD226 및 NKp46 발현. 표준 편차는 3개 공여자에 대해 계산되었음.

D41		NK2A (FF)	2-단계
CD226%	평균	0.9%	13%
	표준 편차	0.8%	4%
NKp46%	평균	55.4%	80%
	표준 편차	8.7%	7.85%
D48		NK2A (FF)	2-단계
CD226%	평균	17.3%	52.3%
	표준 편차	14.3%	11.6%
NKp46%	평균	67.9%	86%
	표준 편차	5.4%	4%

[0296]

[0297] 7.4. 실시예 4: 2-단계 배지-배양된 천연 킬러 세포와 배아 줄기 세포 (ESC)로부터 유래된 천연 킬러 세포의 비교

[0298] 2-단계 배지 중에서 배양된 NK 세포를 문헌 [Woll et al., Blood 113(4):6094-6101 (2009)]의 방법으로 생성된 배아 줄기 세포 (ESC) 유래의 NK 세포와 비교하였다. 구체적으로, 상기 2가지 세포 유형의 배양 공정 동안에 CD94 및 CD117의 발현 수준 차이를 관찰하였다. 도 6은 CD117의 발현이 2-단계 NK 세포에서 높거나 또는 제7일 (D7)부터 제35일 (D35)까지 "+"인 반면, CD94의 발현은 서서히 증가함을 보여준다. 제35일 (D35)에 $CD56^+CD3^-$ (2-단계) 세포의 약 44%는 $CD94^+CD117^+$ 세포였고, $CD56^+CD3^-$ 세포의 37.6%는 $CD94^-CD117^+$였고 $CD56^+CD3^-$ 세포의 14.7%는 $CD94^+CD117^-$였다. 따라서, 2-단계 방법으로 생성된 NK 세포는, 배양 제14일 내지 제35일에 78%가 여전히 $CD117^{낮음/-}$인 ESC 유래의 NK 세포와 구별가능하다. CD117 발현에서의 이러한 차이는, $CD117^+$ NK 세포가 하기 실시예 6에 기재된 바와 같은 다양한 조직으로부터의 종양 세포주에 대해 세포독성이기 때문에 유용하다.

[0299] 이러한 결과는 TSNK 세포의 분화 진행이 ESC-유래 NK 세포와 상이하고 TSNK 세포를 ESC-유래 NK 세포와 구별할 수 있음을 시시한다.

[0300] 7.5. 실시예 5: PDAC는 NK2A 배지에서 배양된 천연 킬러 세포의 증식 배수를 증진시킴

[0301] 천연 킬러 세포로의 조혈 줄기 세포 (HSC) 분화에 대한 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-접착성 태반 줄기 세포 (본 실시예에서 PDAC라고 지칭됨)의 영향을 평가하기 위해, HSC를 미토마이신 C-처리된 PDAC 또는 골수-유래 중간엽 줄기 세포 (MSC)로 제0일 및 제21일에 10:1의 PDAC/MSC:HSC 비율로 자극하였고, 영양 세포-무함유 배양물을 대조군으로 사용하였다. NK2A 배지를 배양 배지로 사용하였다. PDAC는 배지 단독의 경우에 비해 배양된 NK 세포의 증식 배수를 증진시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 영양 층과 함께 또는 영양 층 없이 성장된 세포들 사이의 세포독성에서는 유의한 차이가 발견되지 않았다. 도 7에 나타낸 바와 같이, MSC로 처

리된 세포가 가장 높은 증식 배수를 나타냈으나 세포독성은 가장 낮았다.

[0302] 7.6. 실시예 6: 2-단계 배지를 사용하여 증식시킨 NK 세포의 세포독성 활성

[0303] 본 실시예는 상기 기재된 2-단계 방법을 이용하여 증식 및 분화된 $CD34^+$ 세포로부터 생성된 NK 세포가 종양 세포주에 세포독성임을 입증한다.

[0304] *락테이트 데히드로게나제 (LDH) 분비 검정.* LDH 분비 검정은 사이토톡스(CYTOTOX) 96® 비-방사성 세포독성 검정 키트 (프로메가(Promega), 카탈로그 번호 G1780)를 사용하여 수행하였다. 본 검정에서, 공여자-매칭된 인간 태반 관류액 (HPP) 및 제대혈 유닛 (콤보스(Combos) 유닛)으로부터 유래된 배양된 NK 세포를 이펙터 세포로 사용하였고, 특정 종양 세포주 세포를 표적 세포로서 사용하였다. 본 연구에 사용된 3개 유닛으로부터의 HPP 세포의 백분율(%)은 56.6%±28.3%였다. 이펙터 세포 및 표적 세포를 96웰 U자형 바닥 조직 배양 플레이트에 넣고 2% 인간 AB 혈청 (제미니(Gemini), 카탈로그 번호 100-512)으로 보충된, 페놀 레드 무함유 RPMI 1640 (인비트로젠, 카탈로그 번호 11835-030) 100 ㎕에서 다양한 이펙터-표적 (E:T) 비율로 인큐베이션하였다. 배양물을 37℃, 5% CO_2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상등액 50 ㎕를 효소 검정 플레이트로 옮기고, LDH 활성을 제조업체가 제공한 바와 같이 하여 검출하고, 흡광도를 490 nm에서 ELISA 판독기 (시너지(Synergy) HT, 바이오텍(Biotek))로 측정하였다. 세포독성을 하기 식에 따라 계산하였다: 세포독성(%) = (샘플-자발적 이펙터-자발적 표적)/(최대 표적-자발적 표적)*100 (식 중, "자발적 이펙터"는 이펙터 세포로부터의 자발적 LDH 분비에 대한 대조군이고, "자발적 표적"은 표적 세포로부터의 자발적 LDH 분비에 대한 대조군이고, "최대 표적"은 본질적으로 세포의 100%가 용해될 때의 최대 LDH 분비에 대한 대조군임).

[0305] *인간 태반 관류액 (HPP) $CD34^+$ 세포 및 제대혈 (UCB) $CD34^+$ 세포의 단리.* HPP 및 UCB 세포를 피콜 또는 염화암모늄을 사용하여 정제하여 전체 유핵 세포 (TNC)를 수득하였다. 이어서, TNC를 양성 선별 절차에 사용하여, 제조업체 (스템셀 테크놀로지즈, 인크.)가 제공한 프로토콜에 따라 항-CD34 비드 및 로보셉을 사용하여 $CD34^+$ 세포를 단리하였다. 본 실험에서, $CD34^+$ 세포는 90% 초과의 순도로 단리되었다.

[0306] *배양된 2-단계 NK 세포에 대한 종양 세포 감수성의 연구.* 인간 유방암 (HCC2218), 인간 결장직장 선암종 (HT-29), 인간 만성 골수성 백혈병 (CML), 인간 급성 골수성 백혈병 (AML), 인간 교모세포종 (LN-18 및 U-118MG), 인간 다발성 골수종 (U266), 인간 조직구성 림프종 (U937) 및 인간 망막모세포종 (WERI-RB-1)을 비롯한 종양 세포주 (표 1)를 2-단계 NK 세포와 함께 공동배양하였다. 2-단계 배양된 NK 세포에는, 21일 동안 NK2A 배지에서 배양한 후에 21일 동안 CNK 배지에서 배양한 것, 및 28일 동안 NK2A 배지에서 배양한 후에 14일 동안 CNK 배지에서 배양한 것이 포함되었다. 4시간의 공동배양 후, NK 세포 세포독성을 락테이트 데히드로게나제 (LDH) 분비 검정에 의해 측정하였다. 10:1의 이펙터:표적 (E:T) 비율에서, 후자는 일반적으로 전자보다 높은 세포독성을 나타냈다 (표 6). 종양 세포주 중 LN-18이 NK-매개 사멸에 가장 높은 감수성을 나타냈고, 그 다음은 K562, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1 및 U266이었다.

[0307] 따라서, TSNK 세포는 다양한 암 세포주에 대해 유의한 세포독성을 나타냈다. 추가로, NK2A 배지에서의 배양 기간을 21일에서 28일로 연장시킴으로써 NK 세포독성이 개선될 수 있다고 여겨진다.

표 6

종양 세포주를 표적으로 하는, 배양된 TSNK 세포의 세포독성

	21-일 NK2A 배지 + 21-일 CCT NK 배지		28-일 NK2A 배지 + 14-일 CCT NK 배지	
종양 세포주	평균 세포독성(%)	표준편차	평균 세포독성(%)	표준편차
HCC2218	15.65 (n=1)		11.89 (n=3)	10.2
HT-29	20.52 (n=3)	9.3	33.42 (n=3)	20.2
K562	69.63(n=3)	27.6	80.04 (n=3)	25.4
KG-1	5.67 (n=3)	3.4	15.41 (n=3)	9.2
LN-18	99.00 (n=3)	0.0	99.00 (n=3)	0.0
U-118MG	23.12 (n=3)	6.9	49.16 (n=2)	15.8
U266	2.21 (n=1)		5.07 (n=2)	3.3
U937	46.44 (n=2)	19.3	51.58 (n=2)	23.2
WERI-RB-1	25.30 (n=2)	4.7	36.79 (n=2)	11.3

*n: 공여자의 수

[0308]

[0309] *인간 태반 관류액 (HPP) CD34$^+$ 세포 및 제대혈 (UCB) CD34$^+$ 세포의 마이크로RNA 프로파일링.* 정제된 공여자-매칭된 HPP 및 UCB CD34$^+$ 세포에 미르바나(MIRVANA)™ miRNA 단리 키트 (암비온(Ambion), 카탈로그 번호 1560)를 사용하여 마이크로RNA (miRNA) 제제를 적용하였다. CD34$^+$ 세포 (0.5×10^6개 내지 1.5×10^6개 세포)를 변성 용해 완충제에서 파괴하였다. 이어서, 샘플을 산-페놀 + 클로로포름 추출하여 작은 RNA 종이 고도로 풍부한 RNA를 단리하였다. 100% 에탄올을 첨가하여 샘플이 25% 에탄올이 되도록 하였다. 상기 용해물/에탄올 혼합물을 유리 섬유 필터에 통과시켰을 때 커다란 RNA 종은 고정되었고 작은 RNA 종은 여액 중에 수집되었다. 이어서, 여액의 에탄올 농도를 55%로 증가시키고, 상기 혼합물을 제2 유리 섬유 필터에 통과시켜 여기에 작은 RNA를 고정시켰다. 상기 RNA를 수회 세척하고 낮은 이온 강도의 용액으로 용출시켰다. 회수된 작은 RNA의 농도 및 순도는 260 nm 및 280 nm에서 그의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 시험된 모든 공여자 (n=3)에서 HPP CD34$^+$ 세포에서만 유일하게 발견된 miRNA에는 hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b 및 hsa-miR-520a가 포함되었다.

[0310] 7.7. 실시예 7: 풀링된 UCB 및 HPP로부터 CD34$^+$ 세포의 단리

[0311] 본 실시예는 풀링된 제대혈 (UCB) 및 인간 태반 관류액 (HPP) (콤보)으로부터의 CD34$^+$ 세포의 단리를 입증한다. UCB:HPP 풀링 비를 평가하기 위해, 다음과 같이 3가지 상이한 풀링 비율을 나란히 놓고 비교하였다: (1) 완전 풀링: 1× UCB (전체 부피) + 1× HPP (전체 부피), (2) HPP의 부분적 풀링 (33%): 1× UCB (전체 부피) + 0.33× HPP (HPP 부피의 1/3), 및 (3) HPP의 부분적 풀링 (10%): 1× UCB (전체 부피) + 0.10× HPP (HPP 부피의 1/10). 실험을 총 3회 반복하였다. 초기 TNC 및 부피를 기록하였다. 이어서, 풀링된 샘플에서 CD34$^+$ 세포를 정제하고, CD34$^+$ 순도를 해동후에 측정하였다. 이어서, 최적의 풀링 비율을 해동후 CD34$^+$ 순도 vs. 부피계측 또는 세포 계수 (TNC) 분획 (콤보에 대한 백분율(%)로서)에 대한 플롯으로부터 그래프에 의해 결정하였다. 도 8에 나타낸 바와 같이, 종점 CD34$^+$ 순도는 HPP 부피 함유율과 상관관계가 높았으나 HPP TNC 함유율과는 상관관계가 그만큼 높지 않았다. 종합적으로, UCB 85% v/v, HPP 15% v/v가 80% 이상의 순도를 갖는 CD34$^+$ 세포를 수득하는데 있어 최적의 풀링 비율인 것으로 밝혀졌다.

[0312] 7.8. 실시예 8: GBGM® -기재의 배지를 사용한 NK 세포 배양의 비교

[0313] 본 실시예는 2종의 GBGM-기재의 배지를 사용한 NK 세포 배양 방법 (3-단계 방법 및 2-단계 방법)의 비교를 나타낸다. 이러한 2가지 방법을 표 10에 요약하였다. 상기 2가지 방법 모두 태반 기원의 NK 세포 및 CD34$^+$ 세포의 분화를 위한 기본 배지로서 GBGM을 사용하였다.

표 7

3-단계 방법 및 2-단계 방법의 요약

	3-단계 방법	2-단계 방법
배양 방법	3-단계, GBGM 기재, 영양자-무함유, 35일 • 단계 1 (9일): 10% 인간 혈청 AB (HS), LWH 헤파린, TPO, SCF, IL-7, Flt3L (25 - 27 ng/mL) 함유 GBGM • 단계 2 (5일): 10% HS, LWH 헤파린, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15 (20 - 27 ng/mL) 함유 GBGM • 단계 3 (21일): 10% HS, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15 (20 - 27 ng/mL), IL-2 (1000 U/mL) 함유 GBGM 전반적으로 저용량 시토카인 (IL-6, LIF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1a) 사용, 50 - 250 pg/mL	2-단계, 제1 단계에서 GBGM, K562/PBMC 영양자 함유, 35일 • 단계 1 (21일): 10% 인간 혈청, 헤파린, TPO, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15, (10 - 20 ng/mL), IL-2 (200 U/mL) 함유 GBGM. • 단계 2 (14일): 10% FBS, K562 + PBMC 영양자, IL-2 (200 U/mL) 함유 IMDM인 CCT NK 배지 중 CCT NK 증식 방법. 단계-2에서, 10% FBS, 2% HS, IL-2 (200 U/mL) 함유 IMDM인 CCT NK 유지 배지를 사용하여 배지를 보충함

[0314]

[0315] 실험 파라미터를 하기에 요약하였다:

[0316] 공여자 항목:

[0317] (1) 신선한 UCB로부터의 $CD34^+$ 세포: N = 6

[0318] (2) 신선한 "콤보"로부터의 $CD34^+$ 세포: N = 2

[0319] (3) 동결보존된 "콤보"로부터의 $CD34^+$ 세포: N = 8

[0320] 규모: 멀티웰 디쉬 내지 T-25, 최대 여러개의 T-75 플라스크, 배양물 부피 1 mL 내지 80 mL

[0321] 처리 방법:

[0322] (1) 2-단계 방법

[0323] (2) 3-단계 방법

[0324] 영양자의 사용:

[0325] (1) 영양자 없음

[0326] (2) 불활성화된 K562 및 PBMC 영양자를 제21일에 배양물에 첨가함

[0327] 접종 밀도: 20000개 내지 50000개 세포/mL

[0328] 신선한 UCB 또는 신선한 콤보로부터의 $CD34^+$ 세포를 실시예 7, 10 및 11에 기재된 방법을 이용하여 생성하고 동결보존하였다. 배양물을 37℃, >90% 습도 및 5% CO_2 인큐베이터에서 유지하였다. 세포 성장을 전반에 걸쳐 모니터링하고 (세포 계수) 배지를 1주 당 2회씩 교환하여 세포 농도를 5×10^4 내지 1×10^6개/mL 범위 내로 유지하였다. 제21일 및 제35일에 분화를 표현형 분석으로 모니터링하였다. 영양자를 사용하는 경우, NK 배양 제21일에 신선한 3-일 배양된 K562 및 해동후 알로-PBMC를 미토마이신-C (16 μg/mL, 2시간, 37℃)로 불활성화시키고, 2-단계 방법 조건에 1×10^6개/mL로 첨가하였다. 분화하는 NK를 0.5×10^6개/mL로 표준화하였다. 제35일에 최종 세포 계수를 수행한 후, 신선하게 배양되고 PKH 표지된 K562 세포 (10:1의 E:T 비율, 4시간, 37℃)를 사용하여 유동 세포계측-기재의 세포독성 검정을 수행하여 NK 기능성을 평가하였다.

[0329] *결과*

[0330] 상기 2가지 방법을 이용한 경우에, 신선한 UCB 유래의 $CD34^+$ 세포에 대한 TNC 증식 배수의 중앙값은 제35일에 유사하였다. 2-단계 방법은 신선한 콤보-유래 $CD34^+$ 세포에 대해 3-단계 방법보다 높은 TNC 증식 배수를 산출하는 것으로 나타났다. 총 TNC 증식 배수는 상기 2가지 방법을 이용한 경우 둘다 해동후 콤보 유래의 $CD34^+$ 세포에 있어서는 유사하였으나, 신선한 UCB 또는 신선한 콤보로부터 유래된 것보다는 유의하게 낮았다. 모든 경우에서, 상기 3-단계 및 2-단계 방법은 배양 종료시에 유사한 세포 수득율을 산출하였다.

[0331] 제21일에 UCB 또는 콤보 기원 세포의 표현형에서는 주목할 만한 차이가 없었다. $CD56^+CD3^-$ NK 세포의 백분율(%)은 상기 2-단계 방법 (평균 14.7%)이 상기 3-단계 방법 (평균 6.1%)보다 높았다. 분화 정도 (예를 들어, $CD56^+CD3^-$ 수준)는 공여자-의존적인 것으로 여겨졌다. $CD3^+CD56^-$ (T-세포) 및 $CD3^+CD56^+$ (NKT-유사 세포) 집단의 백분율(%)은 모든 경우에서 최소였다.

[0332] 제35일에는, 높은 종점 $CD56^+CD3^-$ 순도 수준 (2-단계 방법 및 3-단계 방법에서 각각 87.2% 및 90.1%)으로 증명된 바와 같이 상기 2가지 방법 모두가 NK 세포를 분화시키는데 효과적이었다. 2-단계 방법에서 영양자의 첨가는 NK 표현형 순도를 증진시키는 것으로 나타난 반면 (영양자가 없는 경우에는 75.3%, 영양자가 존재하는 경우에는 87.2%), 3-단계 방법에서는 NK 순도에 대한 영양자의 관찰가능한 이점이 발견되지 않았다 (영양자가 없는 경우에는 90.1%, 영양자가 존재하는 경우에는 84.7%).

[0333] 배양된 NK 세포는 전반에 걸쳐 그의 $CD16^-$ 표현형을 유지하였다. 2-단계 방법은 $CD56^+CD3^+$ 세포의 산출률이 영

양자의 부재하 (평균 11.2%)에서가 다른 조건 (< 2%)보다 약간 더 높은 것으로 여겨졌다. 상기 2가지 방법 모두에서 PBMC 및 K562 영양자의 존재는 NK 세포 집단에서의 특정 NK 기능적 마커 (NKp46, DNAM-1, CD94)를 유의하게 상향조절/활성화시켰다. 종합적으로, NK 순도 및 기능적 마커 발현 프로파일은 영양자 조건이 동일한 경우에는 상기 2가지 방법 사이에서 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0334] 4시간의 시험관내 K562 세포독성 검정으로 결정된 바와 같이, 배양된 NK 세포의 기능성은 영양자 조건이 동일한 경우에는 상기 2가지 방법 사이에서 유사한 것으로 밝혀졌다. 영양자-활성화된 NK 세포는 2-단계 방법 및 3-단계 방법에서의 평균 특이적 용해율이 각각 93.2% 및 93.6%로, 시험관내에서 K562 세포를 사멸시키는데 매우 효과적이었다.

[0335] 요약하면, 상기 2-단계 및 3-단계 방법은 동일한 영양자 조건이 사용된 경우에는 NK 세포의 성장, 표현형 (순도 및 활성화 마커) 및 시험관내 기능성이 유사한 것으로 밝혀졌다. 2-단계 방법은 3-단계 방법에 비해 NK 세포 배양의 용이성 및 편리성을 제공한다.

[0336] 7.9. 실시예 9: 다양한 기본 배지를 사용한 NK 세포 배양의 비교

[0337] 본 연구는 여러 기본 배지를 사용한 $CD34^+$-유래 NK 세포의 분화 및 증식을 평가하는 것이 목적이다.

[0338] 실험 조건은 표 11에 요약하였다. 세포를 실시예 11에 기재된 바와 같이 배양하였다. 모든 실험은 멀티웰 디쉬/T-플라스크의 규모로 설정하였고, 37℃, >90% 습도 및 5% CO_2 인큐베이터에서 유지하였다. 세포 성장을 전반에 걸쳐 모니터링하고 (세포 계수) 배지를 1주 당 2회씩 교환하여 세포 농도를 5×10^4 내지 1×10^6/mL 범위 내로 유지하였다. 제21일 및 제35일에 분화를 표현형 분석으로 모니터링하였다. 제21일에 신선한 3-일 배양된 K562 및 해동후 알로-PBMC를 불활성화시키고, 발생 중인 NK 세포 배양물에 1×10^6개/mL로 첨가하였다. NK 세포를 0.5×10^6개/mL로 표준화하였다. 제35일에 최종 세포 계수를 수행한 후, 신선하게 배양되고 PKH 표지된 K562 세포 (10:1의 E:T 비율, 4시간, 37℃)를 사용하여 유동 세포계측-기재의 세포독성 검정을 수행하여 NK 기능성을 평가하였다.

표 8

다양한 기본 배지 평가를 위한 실험 조건의 요약

[0339]

CD34+ 공여자	1 UCB 공여자
배양 과정의 방법	3-단계 방법
K562 및 **PBMC** 영양자	• 제21일에 영양자 사용
스크리닝한 기본 배지	• GBGM (대조군) • AIM-V • X-VIVO 10 • X-VIVO 15 • 옵트마이저 • 스템스판 H3000 • 셀그로 • DMEM:F12 • DMEM:F12 및 5 mM OAC(제7일부터 제35일까지 배양액에 첨가)
접종 밀도 (제0일)	50000 / mL

[0340] 성장률

[0341] 스템스판 H3000 및 옵트마이저는 제35일에 GBGM과 유사한 성장률 (TNC 증식 배수)을 나타냈다. 셀그로, X-VIVO 15, AIM-V, X-VIVO 10, DMEM:F12, 5 mM OAC 함유 DMEM:F12는 GBGM보다 낮은 성장률을 나타냈다.

[0342] 표현형 분석

[0343] 제35일 (종점)에 GBGM은 약 80% 순도의 $CD56^+CD3^-$ 세포를 산출하였다. 옵트마이저 및 스템스판 H3000은 약 50

% 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 산출하였다. DMEM:F12는 약 35% 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 생성하였다. AIM-V, X-VIVO 10, X-VIVO 15 및 셀그로 배지는 약 30% 미만 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 생성하였다. 배양 동안 DMEM:F12 기본 배지에 OAC를 첨가하면 종점 NK 순도가 크게 증진되는 것으로 밝혀졌고, 배양 제35일의 $CD56^{+}CD3^{-}$의 백분율(%)은 35%에서 72%로 증가하였다.

[0344] 세포독성/기능성

[0345] 배양 동안 DMEM:F12 기본 배지에 5 mM OAC를 첨가하면 NK 세포의 활성화 상태 및 시험관내 기능성이 크게 증진되는 것으로 밝혀졌다. OAC의 첨가는 또한 NK 활성화 마커 NKp46, NKG2D, DNAM-1 및 CD94의 수준을 유의하게 증가시켰다. 제35일 NK 세포의 시험관내 기능성 (K562 세포독성) 역시 21.4%에서 97.1%로 현저히 증가하였다.

[0346] 종합적으로, NK 세포 특성은 5 mM OAC의 첨가로 인해 유의하게 증진되었다.

[0347] 7.10. 실시예 10: NK 세포의 저장 및 동결보존

[0348] 본 실시예는 NK 세포의 저장 및 동결보존 방법을 입증한다. 인간 태반 관류액 (HPP) 및 제대혈 세포로부터 단리된 $CD34^{+}$ 조혈 줄기 세포를 상기 실시예에 기재된 프로토콜을 사용하여 증식시키고 NK 세포로 분화시켰다. 세포를 HPP 및 제대혈로부터 단리한 직후 (제0일) 또는 NK 세포의 제1 성장기 동안에 (단리후 제9일, 제14일, 제21일 또는 제35일) 동결보존하였다.

[0349] 세포를 하기 동결보존 제제 중에 동결보존하였다: 제제 1 - 덱스트란 동결 배지: 5% DMSO (시그마 알드리치, D2650), 55% 덱스트란 (통상적인 염수 중 10% w/v) (0.9% 염화나트륨 주입액 중 10% LMD, 호스피라(Hospira)), 40% HAS (옥타파마(Octapharma)), 제제 2 - 트레할로스 동결 배지: 5% DMSO, 55% 트레할로스 (통상적인 염수 중 10% w/v), 40% HSA, 제제 3 - 크라이오스토르® CS2 (바이오라이프 솔루션즈), 제제 4 - 크라이오스토르® CS5 (바이오라이프 솔루션즈), 제제 5 - 크라이오스토르® CS10 (바이오라이프 솔루션즈), 제제 6 - 혈청-무함유 냉동 배지 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 6295), 제제 7 - 글리세롤 냉동 배지 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 C6039), 또는 제제 8 - DMSO 및 혈청-무함유 냉동 배지 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 2639).

[0350] 상이한 시점에서 수집된 세포를 배양 배지 또는 염수 용액으로 수회 세척하였다. 이어서, 세포를 원심분리하여 세포 펠렛을 수득하였다. 상등액을 제거하고, 세포 펠렛을 1 밀리리터 당 약 1×10^{6}개 내지 1.5×10^{7}개 이상의 세포로 하여 동결보존 배지에 현탁시켰다. 상기 세포 현탁액을 1 mL 또는 2 mL의 격막 바이알로 분취하고, 2℃ 내지 8℃에서 대략 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 세포를 속도 제어 동결기 (테르모(Thermo))에서 1분 당 0.5℃로 냉동시켰다. 냉동된 바이알을 액체 질소 증기에서의 저장을 위해 극저온 동결기로 옮겼다. 동결보존된 NK 세포는 모든 가시적인 얼음이 용융될 때까지 37℃ 수조에서 샘플을 온화하게 흔들면서 신속하게 해동시킬 수 있었다. 세포 샘플을 사전 가온시킨 배양 배지로 희석할 수 있었다.

[0351] 7.11. 실시예 11: NK 세포의 저장 및 동결보존

[0352] 본 실시예는 NK 세포의 또 다른 저장 및 동결보존 방법을 입증한다. 인간 태반 관류액 (HPP) 및 제대혈 세포로부터 단리된 $CD34^{+}$ 조혈 줄기 세포를 상기 기재된 프로토콜을 사용하여 증식시키고 NK 세포로 분화시켰다. 세포를 HPP 및 제대혈로부터 단리한 직후 (제0일) 또는 NK 세포의 제1 성장기 동안에 (단리후 제9일, 제14일, 제21일 또는 제35일) 동결보존하였다.

[0353] 덱스트란-40과 HSA를 60% (v/v) 덱스트란-40 및 40% (v/v) HSA (25% 용액으로부터 제조함)의 비율로 배합하여 세포 현탁 용액을 제조하였다.

[0354] 50% (v/v) 덱스트란-40, 40% (v/v) HSA (25% 용액), 10% (v/v) DMSO를 사용하여 2× 냉동 용액을 제조하였다. DMSO를 먼저 덱스트란-40에 서서히 첨가한 후 충분히 혼합하였다. 이어서, 25% HSA 용액을 상기 용액에 혼합하면서 서서히 첨가하였다. 생성된 용액을 충분히 혼합하고, 사용 전에 실온이 되도록 하였다.

[0355] *동결보존 절차*

[0356] 세포 수를 추정하고, 세포 현탁 용액 중 15×10^{6}개의 세포 현탁액으로서 표준화하였다. 세포 현탁액의 부피를

측정하고, 동일 부피의 신선하게 제조된 2× 냉동 용액을 서서히 첨가하고 혼합하였다. 냉동 용액 중의 최종 세포 현탁액 부피를 기록하고 여러개의 바이알에 분배하였다. 저장된 배양 상등액에 대해 미코알러트(MycoAlert) 시험을 수행하여 미코플라스마 오염을 검출하였다. 1개의 보유 바이알에 대해 해동후 시험을 수행하여 해동후 생존율, 세포 회수율 및 세포 특징을 결정하였다.

[0357] 7.12. 실시예 12: 동결보존/해동된 NK 세포의 분석

[0358] *생존율 검정*. 실시예 10 또는 11에서와 같은 다양한 제제 중에 동결보존된 NK 세포를 해동하였다. 세포를 2×10^6개 내지 3×10^7개 세포/mL의 밀도로 냉동시켰다. 카운티스(Countess)® 자동화 세포 계수기 (인비트로젠)를 사용하여, 해동된 NK 세포를 신선한 세포 또는 냉동전 세포와 비교하여 해동후 제0일, 제3일 및 제18일의 세포 생존율에 대해 평가하였다. 간략하게 설명하면, 세포 샘플 10 ㎕를 트립판 블루 10 ㎕와 혼합하였다. 세포 혼합물을 카운티스® 챔버 슬라이드에 피펫팅하였다. 상기 슬라이드를 기기 내에 삽입하고, 세포를 계수하였다. 동결-해동후 세포는 상이한 동결보존 제제에 따라 약 80%의 세포 생존율 내지 90% 초과의 생존율을 나타냈다.

[0359] *세포자멸 검정*. 비디 AnnV/PI 세포자멸 검정 키트를 사용하여, 해동된 NK 세포를 또한 해동후 제0일, 제3일 및 제18일에 세포자멸에 대해 평가하였다. 간략하게 설명하면, 세포를 1× 빙냉 PBS로 2회 세척하고, 1× 결합 완충제 (비디 안넥신(BD Annexin) V/PI 세포자멸 키트 부품 번호 556547. 결합 완충제 부품 번호 51-66121E의 조성: 0.1 M Hepes/NaOH (pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$. 1× 희석을 위해, 1부의 10× 완충제를 9부의 증류수와 혼합함) 중에 재현탁시켰다. 대략 100,000개 세포를 함유하는 세포 현탁액 100 ㎕를 FACS 튜브로 옮겼다. 1× 결합 완충제 100 ㎕, AnnV-FITC 5 ㎕ 및 PI-PE 5 ㎕를 상기 튜브에 첨가하였다. 이어서, 상기 튜브를 온화하게 볼텍싱하고 15분 동안 광차단하여 인큐베이션하였다. 이어서, 1× 결합 완충제 400 ㎕를 첨가하였다. 샘플을 1시간 이내에 분석하였다. 사분면 및 게이트를 설정하기 위해 사용된 대조군은 염색되지 않은 세포, AnnV-FITC로만 염색되고 PI로는 염색되지 않은 세포, PI로만 염색되고 AnnV로는 염색되지 않은 세포였다. 세포자멸 세포를 크기 산란 (FSC vs. SSC) 플롯에서 "세포"로서 게이팅된 사건 집단의 백분율(%)로서 정량화하였다. 동결-해동후 세포에서는 상이한 동결보존 제제에 따라 사멸/후기 세포자멸 세포가 약 5% 내지 25%로, 조기 세포자멸 세포가 10% 내지 25%로 나타났다. 종합적으로, 제제 1 (5% DMSO, 55% 덱스트란 (통상적인 염수 중 10% w/v), 40% HAS), 제제 2 (5% DMSO, 55% 트레할로스 (통상적인 염수 중 10% w/v), 40% HSA), 제제 4 (크라이오스토르® CS5 (바이오라이프 솔루션즈)) 및 제제 5 (크라이오스토르® CS10 (바이오라이프 솔루션즈))는 다른 제제에 비해 더 높은 세포 생존율 및 더 낮은 세포자멸 세포를 나타냈다.

[0360] 7.13. 실시예 13: 공정중(In-Process) 동결보존된 세포 저장물의 평가

[0361] 본 실시예는 공정중 동결보존된 세포 저장물의 평가를 입증한다. 세포 배양은, 혈청 공급원으로서 HS-AB 또는 FBS를 사용하여 문헌 [Spanholtz et al., PLoS One. 5(2):e9221 (2010)]에 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 UCB $CD34^+$ 세포로 개시하였다. 세포 농도를 측정 및 조정하고 필요에 따라서는 배지를 보충하였다. 제7일, 제9일, 제10일 또는 제14일에 대략 10^6개 내지 3×10^6개 세포를 세포 배양물로부터 꺼내어 원심분리하고 동결보존 배지 (5.5% v/v 덱스트란-40, 10% v/v HSA, 5% v/v DMSO) 중에 재현탁시켰다. 세포를 속도 제어 동결기에서 냉동시키고 동결보존을 위해 액상 질소 저장소로 옮겼다. 대략 1 mL의 각각의 세포 바이알을 10^6개 내지 10^7개/mL 범위의 농도로 하여 동결보존하였다. 나머지 배양은 종점 (제35일)까지 수행하고 이를 "신선한 (공정중 동결보존되지 않음)"이라고 지칭하였다. 세포 배양 제21일, 제28일 및 제35일에 표현형 분석을 수행하였다. 배양 제35일 (종점)에 시험관내 기능성 (K562 세포독성, 10:1의 E:T)을 평가하였다.

[0362] 공정중 동결보존된 배양 샘플 (제9일 및 제14일)의 해동후 성능을 다음과 같이 평가하였다. 세포 저장 바이알을 37℃ 수조에서 신속하게 해동시켰다. 이어서, 세포를 RPMI-FBS 배지로 희석하고 원심분리하여 재현탁시키고 배양 배지에 접종하였다. 이어서, 배양 공정의 시작부터 지속시킨 배양 조건 각각을 제35일까지 수행하였다. 분석 (세포 계수, 생존율, 표현형 분석, 기능성 평가)을 이것들의 "신선한" 대응물과 동일한 방식으로 행하였다.

[0363] *결과*

[0364] 제9일, 제10일 및 제14일의 공정중 동결보존된 샘플은 모두 공정중 시점 또는 세포 농도에 상관없이 탁월한 해동후 생존율을 제공하였다 (96.2% 내지 97.3% 트립판 블루 음성, 86.1% 내지 93.2% 안넥신-V 음성/TO-PRO-3 음성). 공정중 저장물은 배양 종료 (제35일)시의 수득률 손실과 관련하여 부정적인 영향을 갖지 않았다. 제9

일 또는 제14일의 해동후 조건과 "신선한" 조건 사이의 최종 세포 수득율은 혈청 공급원으로서의 HS-AB 또는 FBS에서 유사하였다.

[0365] 제21일/제28일/제35일 시점에서 성숙 NK 세포의 표현형 프로파일은 "신선한" 배양과 "해동후" 배양 사이에서 각각 상당히 유사한 것으로 밝혀졌다. 표현형 순도 ($CD56^{+}CD3^{-}$) 역시 유사한 것으로 밝혀졌다. 특정 NK 기능적 마커 (CD94, NKG2D)의 발현은 실행간(run-to-run) 가변성으로 인해 약간 상이하였다.

[0366] K562 세포독성 검정에서, 제9일/제14일 해동후 배양된 NK 세포는 공정중 동결보존되지 않은 배양된 NK 세포에 비해 약 0% 내지 20% 더 낮은 특이적 K562 용해 판독값을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, NK 세포독성 기능과 관련된 표면 마커 (DNAM1, NKp46, NKG2D 등)의 발현 수준이 동시에 감소되지 않은 것으로 볼 때, 이러한 경향은 추가의 공여자 및 검정 반복을 통해 확인할 필요가 있다. 종합적으로, 배양 제9일/제14일의 공정중 동결보존은 공정 결과에 최소한의 영향을 미쳤다.

[0367] 7.14. 실시예 14: NK 세포 투여를 위한 해동후 배지의 개발

[0368] 본 실시예는 동물로의 NK 세포 투여를 위한 해동후 배지의 개발을 입증한다. NK 세포의 생존율, 세포독성, 세포 회수율 및 클럼프(clump) 형성에 대한 주입 배지 및 세포 밀도의 영향을 시험하였다. 생존율은 트립판 블루 염색으로 평가하였고, 세포독성은 FACS (10:1 비율의 NK:K562)로 평가하였고, 클럼프 형성은 현미경 검정으로 평가하였다. 다양한 유형의 주입 배지 및 세포 밀도에 대한 결과를 표 9 내지 표 12에 나타냈다.

표 9

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

[0369]

해동 배지 : RPMI + 10%FBS; 주입 배지 : PBS + 1%FBS; 세포 밀도: 10×10^{6}개 세포/mL					
	0시간	1시간	2시간	3시간	4시간
세포 회수율	98.8%				
생존율	74.3%	69.0%	66.1%	63.3%	62.4%
세포독성		60.3%		44.3%	
클럼프 형성	없음				

표 10

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

[0370]

해동 배지 : RPMI + 10%FBS; 주입 배지: PBS + 1%FBS; 세포 밀도: 30×10^{6}개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	98.8%				
생존율 (%)	74.3%	69.8%	66.5%	64.0%	63.6%
세포독성 (%)		51.8%		37.9%	
클럼프 형성	없음				

표 11

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

해동 배지: RPMI + 10%FBS; 주입 배지: 플라스말라이트 + 1%HSA; 세포 밀도: 10×10^6개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	98.8%				
생존율	74.9%	76.3%	72.0%	70.5%	69.4%
세포독성		59.4%		51.3%	
클럼프 형성	없음				

[0371]

표 12

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

해동 배지: RPMI + 10%FBS; 주입 배지: 플라스말라이트 + 1%HSA; 세포 밀도: 30×10^6 개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	98.8%				
생존율	74.9%	74.7%	71.2%	70.3%	69.9%
세포독성		61.2%		53.9%	
클럼프 형성	없음				

[0372]

[0373] 상기 결과는 플라스말라이트(Plasmalyte) + 1% HSA 주입 배지가 PBS + 1% FBS 주입 배지보다 더 우수한 생존율 및 세포독성으로 NK 세포를 유지하였음을 보여준다. 세포독성은 또한 세포를 주입 배지 중에 현탁시킨 후에 시간 경과에 따라 감소되었다. 세포를 플라스말라이트 + 1% HSA 중에 현탁시킨 경우에는 생존율 및 세포독성과 관련하여 관찰된 세포 밀도의 영향은 없었다. NK 세포는 또한 1시간 후 PBS + 1% FBS 또는 플라스말라이트 + 1% HSA 배지 중에 가라앉았으나, 세포가 응집된 것으로 여겨지지는 않았다. 마지막으로, 냉동-해동 공정으로부터 관찰된 세포 회수율 및 생존율에서는 명백한 손실이 없었다.

[0374] 7.15. 실시예 15: NK 세포 투여를 위한 해동후 배지의 개발

[0375] NK 세포의 생존율, 세포독성, 세포 회수율 및 클럼프 형성에 대한 다양한 HSA 농도의 영향을 또한 시험하였다. 실시예 14와 동일한 방법을 이용하였다. 다양한 유형의 주입 배지 및 세포 밀도에 대한 결과를 표 14 내지 표 16에 나타냈다.

표 13

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

해동 배지: RPMI + 10%FBS; 주입 배지: 플라스말라이트 + 1%HSA; 세포 밀도: 10×10^6 개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	82.0%				
생존율	75.6%	75.3%	74.5%	71.8%	71.5%
세포독성		64.4%		35.5%	
클럼프 형성	없음				

[0376]

표 14

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

해동 배지: 플라스말라이트 + 1%HSA; 주입 배지: 플라스말라이트 + 1%HSA; 세포 밀도: 10×10^6 개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	102.4%				
생존율 (%)	77.1%	77.5%	71.2%	72.4%	75.1%
세포독성 (%)		61.48%		31.7%	
클럼프 형성	없음				

[0377]

표 15

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

해동 배지: 플라스말라이트 + 2.5%HSA; 주입 배지: 플라스말라이트 + 2.5%HSA; 세포 밀도: 10×10^6 개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	91.6%				
생존율	83.9%	82.6%	78.9.0%	79.0%	79.3%
세포독성		71.7%		46.8%	
클럼프 형성	없음				

[0378]

표 16

시험한 특정 조건에서의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 클럼프 형성

해동 배지: 플라스말라이트 + 5%HSA; 주입 배지: 플라스말라이트 + 5%HSA; 세포 밀도: 10×10^6 개 세포/mL					
	0 시간	1 시간	2 시간	3 시간	4 시간
세포 회수율	81.2%				
생존율	81.8%	80.7%	78.2%	78.3%	78.6%
세포독성		64.8%		55.1%	
클럼프 형성	없음				

[0379]

[0380] 상기 결과는 시험된 3종의 모든 주입 배지에서 해동후 4시간에 걸쳐 생존율이 충분히 유지됨을 보여준다. 또한, 세포독성은 3종의 모든 주입 배지에서 시간 경과에 따라 감소되었다. 그러나, 플라스말라이트 + 5% HSA는 최대 세포독성을 유지한 반면, 더 높은 농도의 HSA에서는 감소 수준이 더 적었다. 또한, NK 세포는 3개의 모든 주입 배지에서 응집되지 않은 것으로 관찰되었다. 종합적으로, 플라스말라이트는 PBS보다 우수한 주입 배지 후보인 것으로 여겨졌다.

[0381] 7.16. 실시예 16: IL-2 부재하의 NK 세포의 배양

[0382] 본 실시예는 IL-2 부재하의 NK 세포의 배양을 입증한다. 세포 배양을 실시예 11에 기재된 2-단계 방법으로 수행하였다. 제1 배지 중 0 U/mL, 200 U/mL, 500 U/mL, 1000 U/mL, 2000 U/mL의 5가지 상이한 농도의 IL-2를 시험하였다.

[0383] 이 결과로부터, 배양되는 NK 세포의 발생이 성장에 대해 IL-2에 반응한다고 여겨지지 않았다. NK 세포의 순도는 IL-2에 의존적인 것으로 여겨지지 않았고, NK 세포는 IL-2의 부재하에 $CD56^{+}CD3^{-}$ 표현형으로 분화하였다.

IL-7, IL-15 및 SCF의 조합이 시험관내 NK 세포 발생에 충분한 것으로 여겨졌다.

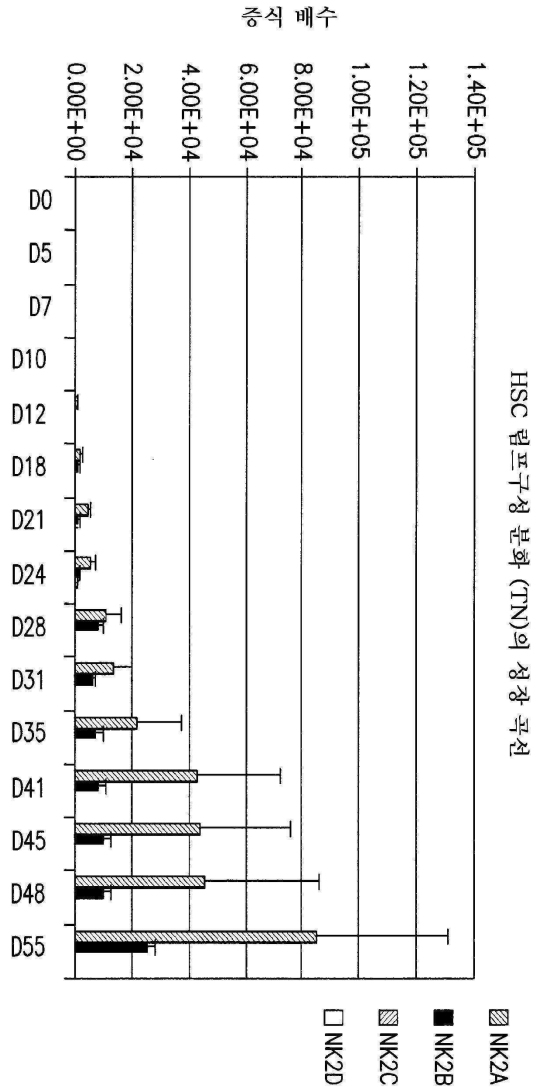
[0384] *등가물*:

[0385] 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 실시양태로 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 당업자에게는 본원에 기재된 것 이외에도 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재 및 첨부된 도면으로부터 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

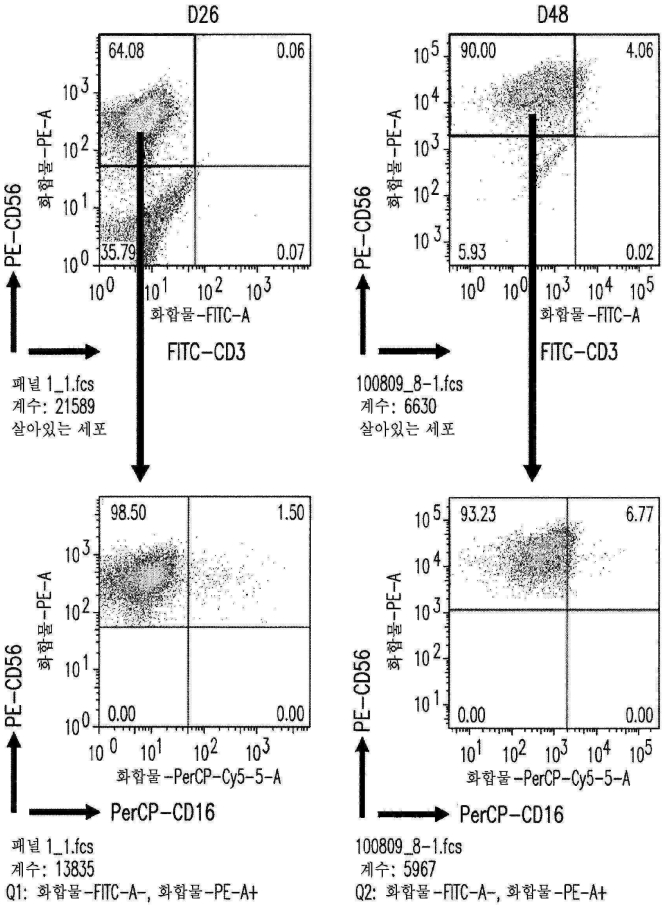
[0386] 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참고로 본원에 포함되며 어떠한 목적을 위해서든지 개개의 간행물, 특허 또는 특허 출원 각각이 어떠한 목적을 위해서든지 그 전문이 참고로 포함된다고 구체적이고 개별적으로 언급되는 것과 동일한 정도로 본원에 포함된다. 임의의 간행물의 인용은 출원일 전의 그의 개시내용에 대한 것이고, 이는 본 발명이 선행 발명이라는 이유로 이러한 간행물을 선행하는 것이 아님을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

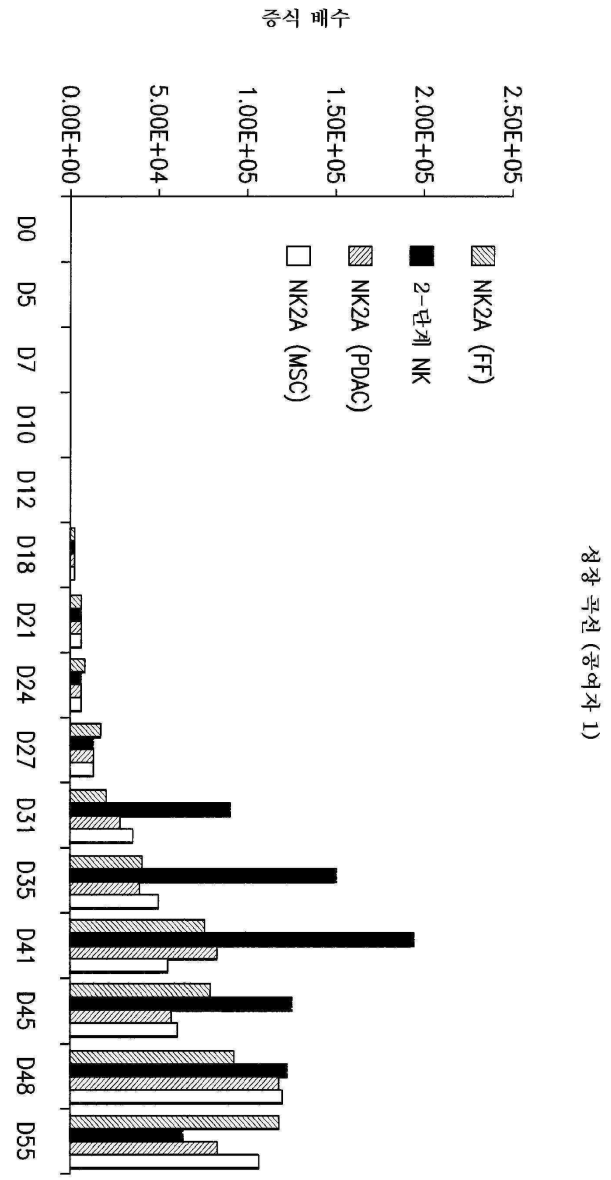
도면1



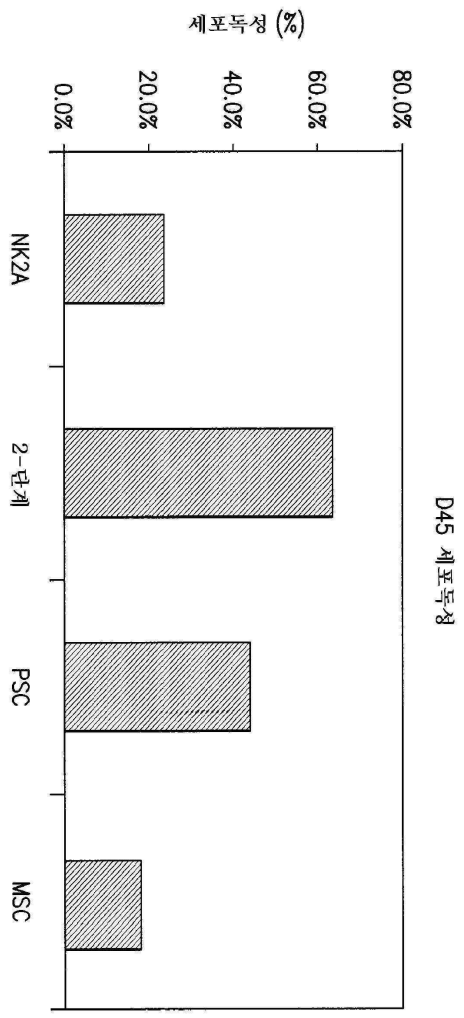
도면2


D26
D48
64.08
0.06
35.79
0.07
90.00
4.06
5.93
0.02
98.50
1.50
0.00
0.00
93.23
6.77
0.00
0.00
PE-CD56
화합물-PE-A
FITC-CD3
화합물-FITC-A
PerCP-CD16
화합물-PerCP-Cy5-5-A
패널 1_1.fcs
계수: 21589
살아있는 세포
100809_8-1.fcs
계수: 6630
살아있는 세포
패널 1_1.fcs
계수: 13835
Q1: 화합물-FITC-A-, 화합물-PE-A+
100809_8-1.fcs
계수: 5967
Q2: 화합물-FITC-A-, 화합물-PE-A+

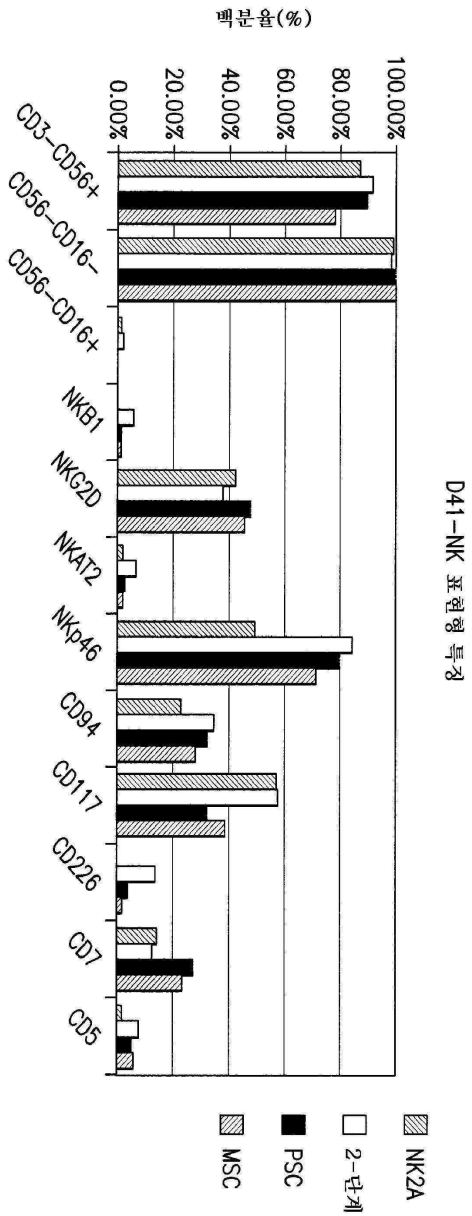
도면3


증식 배수
2.50E+05
2.00E+05
1.50E+05
1.00E+05
5.00E+04
0.00E+00
NK2A (FF)
2-단계 NK
NK2A (PDAC)
NK2A (MSC)
D0
D5
D7
D10
D12
D18
D21
D24
D27
D31
D35
D41
D45
D48
D55
성장 곡선 (공여자 1)

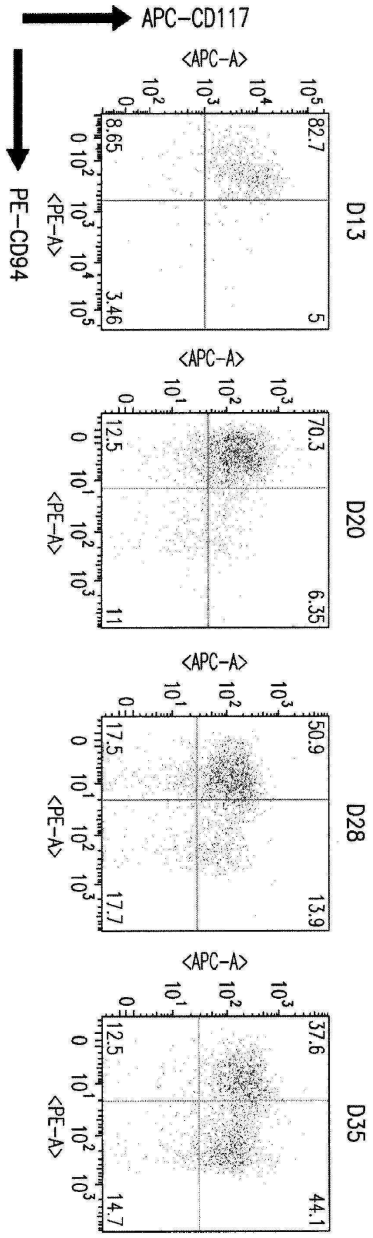
도면4



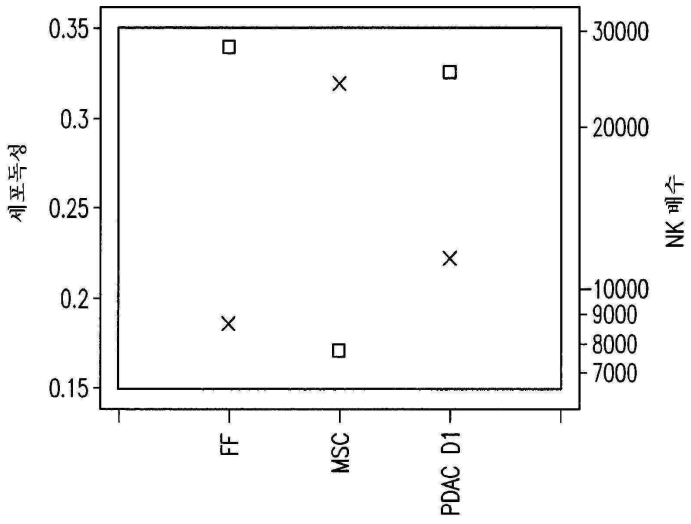
도면5


백분율(%)
0.00%
20.00%
40.00%
60.00%
80.00%
100.00%
CD3-CD56+
CD56-CD16-
CD56-CD16+
NKB1
NKG2D
NKAT2
NKp46
CD94
CD117
CD226
CD7
CD5
D41-NK 표현형 특징
NK2A
2-단계
PSC
MSC

도면6


APC-CD117
PE-CD94
<APC-A>
<PE-A>
D13
D20
D28
D35
8.65
82.7
3.46
5
12.5
70.3
11
6.35
17.5
50.9
17.7
13.9
12.5
37.6
14.7
44.1

도면7

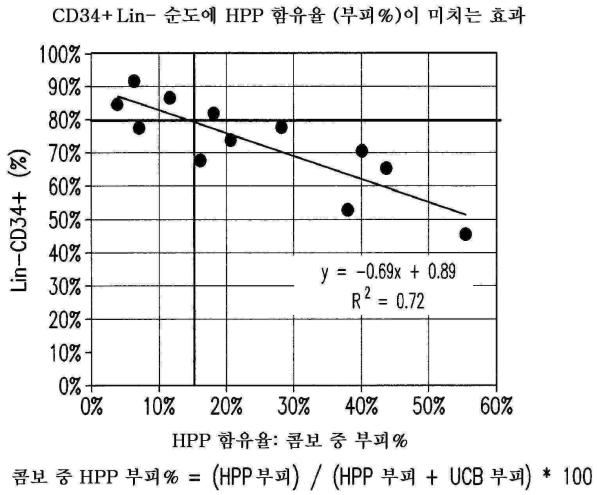


컬럼 1

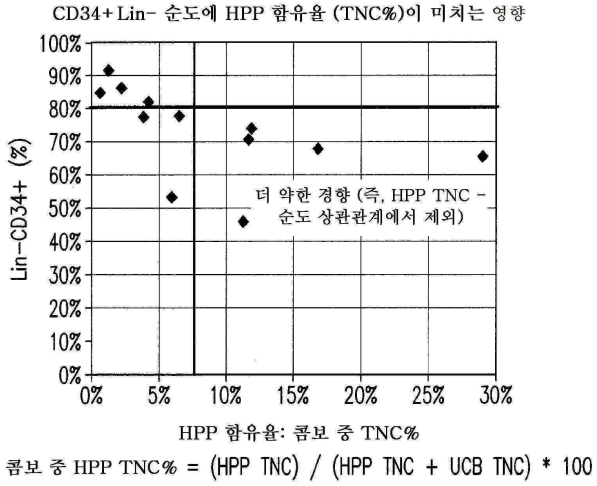
좌측 스케일: □ 세포독성

우측 스케일: × NK 배수

도면8


CD34+Lin- 순도에 HPP 함유율 (부피%)이 미치는 효과
Lin-CD34+ (%)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
y = -0.69x + 0.89
R2 = 0.72
HPP 함유율: 콤보 중 부피%
콤보 중 HPP 부피% = (HPP부피) / (HPP 부피 + UCB 부피) * 100

8A


CD34+Lin- 순도에 HPP 함유율 (TNC%)이 미치는 영향
Lin-CD34+ (%)
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0%
5%
10%
15%
20%
25%
30%
더 약한 경향 (즉, HPP TNC - 순도 상관관계에서 제외)
HPP 함유율: 콤보 중 TNC%
콤보 중 HPP TNC% = (HPP TNC) / (HPP TNC + UCB TNC) * 100

8B