(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0107147
(43) 공개일자 2024년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2015.01) *A61K 31/675* (2006.01)
A61K 31/7076 (2006.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 47/26* (2017.01)
A61K 47/36 (2017.01) *A61K 47/42* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2023.05)
A61K 31/675 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7018559
(22) 출원일자(국제) 2022년11월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/048887
(87) 국제공개번호 WO 2023/081317
국제공개일자 2023년05월11일
(30) 우선권주장
63/275,890 2021년11월04일 미국(US)

(71) 출원인
아티바 바이오테라퓨틱스, 인크.
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 스위트 200 모어하우스 드라이브 5505
주식회사 지씨셀
경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107(보정동)
아피메트 게엠베하
독일, 68165 만하임, 고틀립-다임러-슈트라쎄 2, 코로스 빌딩
(72) 발명자
플린, 피터
미국 92007 캘리포니아, 카디프 바이 더 시 옥스포드 애비뉴 2335
리튼, 제이슨 비.
미국 92014 캘리포니아, 델 말 13 스트리트 121
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사

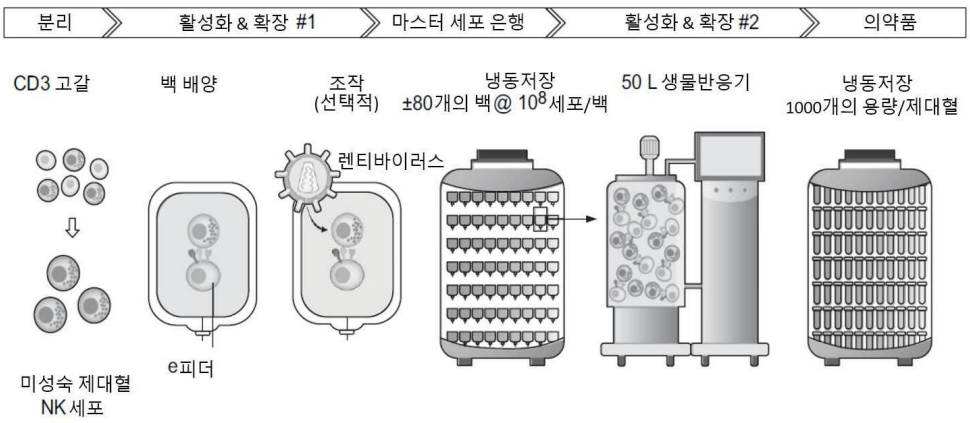
전체 청구항 수 : 총 136 항

(54) 발명의 명칭 **NK 세포 및 다중특이적 인게이저를 이용한 암의 치료**

(57) 요 약

본 발명은, 무엇보다도, 자연 살해(NK) 세포 및 다중특이적 인게이저를 사용하여 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/7076 (2013.01)
A61K 38/2013 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 47/36 (2013.01)
A61K 47/42 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/283 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C12N 5/0646 (2023.05)

(72) 발명자
파렐, 토마스 제임스
미국 92037 캘리포니아, 라 졸라 시타델 서클 5931
래이몬, 헤더 카렌
미국 92037 캘리포니아, 라 졸라 아베니다 드 라 플라야 2325
소만치, 스리니바스 사이
인도 92130 샌디에고 유닛 10, 시 펄 코브 10525
구레타즈, 리사
미국 92007 캘리포니아, 2 카디프, 캠브릿지 애이 브이이., 2008
그래프, 톨스텐
미국 94022 캘리포니아, 로스 아틀로스 힐스 도리 래인 26209
코흐, 요아힘
독일 하이델베르크 69120 임 노이엔하이머 펠트 582 아피메트 게엠베하 씨오
팔, 엔스
독일 하이델베르크 69120 임 노이엔하이머 펠트 582 아피메트 게엠베하 씨오
민보경
경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107(보정동) 주식회사 지씨셀
김효진
경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107(보정동) 주식회사 지씨셀
이상현
경기도 용인시 기흥구 이현로30번길 107(보정동) 주식회사 지씨셀

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법:

KIR-B 일배체형(haplotype) 및 CD16 분자의 발현을 포함하는 자연 살해 세포(NK 세포)를 포함하는 제1 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계; 및

CD16(FcγRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계,

상기 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은

서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및

서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함하고; 및

상기 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은

서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및

서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 NK 세포가 제대혈(cord blood) 유래 NK 세포인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제대혈 유래 NK 세포는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성되는 것인, 방법:

(a) 자연 살해 세포를 포함하는 제대혈 세포의 샘플을 제공하는 단계;

(b) 세포에서 CD3(+) 세포를 고갈시키거나 양성 선별에 의해 NK 세포에 대하여 시드 세포(seed cell)를 농축시키는 단계;

(c) 시드 세포를 IL-2를 포함하는 배지에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주로부터의 제1의 다수의 세포와 함께 배양하여 자연 살해 세포를 확장(expand)하여,

제대혈 유래 자연 살해 세포를 생성하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 불활성화된 CD4(+) T 세포주가 4-1BBL 유전자, 막 결합형(membrane-bound) IL-21(mbIL-21) 유전자, OX40L 유전자, 및 돌연변이된 TNF-α 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현하는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 불활성화된 CD4(+) T 세포주가 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자, 및 돌연변이된 TNF-α 유전자를 발현하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2를 포함하는 배지가 OKT3, UCHT1, HTa, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포 자극 항체를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16 분자가 CD16A 분자인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16 분자가 F158에서 V/V 다형성(polymorphism)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인이 CD16A에 특이적으로 결합하는 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포가 자연 살해 세포의 집단인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% CD16+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제10항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKG2D+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp46+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp30+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% DNAM-1+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 16

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp44+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 20% 미만, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD3+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 18

제10항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD14+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 19

제10항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD19+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 20

제10항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD38+ 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 21

제10항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포 집단이 적어도 1억 개의 확장된 자연 살해 세포, 예를 들어 2억, 2억 5천만, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 7억 5천만, 8억, 9억, 10억, 20억, 30억, 40억, 50억, 60억, 70억, 80억, 90억, 100억, 150억, 200억, 250억, 500억, 750억, 800억, 900억, 1000억, 2000억, 2500억, 3000억, 4000억, 5000억, 6000억, 7000억, 8000억, 9000억, 1조, 2조, 3조, 4조, 5조, 6조, 7조, 8조, 9조 또는 10조 개의 확장된 자연 살해 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 22

제10항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포 집단이 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성되는 것인, 방법:

(a) 제대혈(umbilical cord blood)로부터 자연 살해 세포를 포함하는 시드 세포를 수득하는 단계;

(b) 시드 세포에서 CD3+ 세포를 고갈시키는 단계;

(c) 고갈된 시드 세포를 막 결합형 IL-21, 돌연변이된 TNFα 및 4-1BBL 유전자를 발현하도록 조작된 제1의 다수의 Hut78 세포와 함께 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 확장된 자연 살해 세포를 생성함으로써,

자연 살해 세포의 집단을 생성하는 단계.

청구항 23

제10항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포 집단이 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성되는 것인, 방법:

(a) 제대혈로부터 자연 살해 세포를 포함하는 시드 세포를 수득하는 단계;

(b) 시드 세포에서 CD3+ 세포를 고갈시키는 단계;

(c) 고갈된 시드 세포를 막 결합형 IL-21, 돌연변이된 TNFα 및 4-1BBL 유전자를 발현하도록 조작된 제1의 다수의 Hut78 세포와 함께 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 생성하는 단계; 및

(d) 막 결합형 IL-21, 돌연변이된 TNFα 및 4-1BBL 유전자를 발현하도록 조작된 제2의 다수의 Hut78 세포와 함께 배양함으로써 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 확장시켜 확장된 자연 살해 세포를 생성하고;

이로써 자연 살해 세포의 집단을 생성하는 단계.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 NK 세포 집단이, 상기 단계 (c) 이후에,

(i) 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 다수의 용기에서 동결시키는 단계; 및

(ii) 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단의 분취량을 포함하는 용기를 해동하는 단계를 추가로 포

함하는 방법에 의해 생성되며,

상기 단계 (d)에서 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 확장시키는 것은 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단의 분취량을 확장시키는 것을 포함하는 것인, 방법.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제대혈이 KIR-B 일배체형 및 CD16 158V 다형성에 대한 동형접합성(homozygous)을 갖는 기증자로부터의 것인, 방법.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포 집단이 제대혈로부터의 자연 살해 세포를 적어도 10,000배, 예를 들어 15,000배, 20,000배, 25,000배, 30,000배, 35,000배, 40,000배, 45,000배, 50,000배, 55,000배, 60,000배, 65,000배, 또는 70,000배 확장시키는 것을 포함하는 방법에 의해 생산되는 것인, 방법.

청구항 27

제22항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단이 확장 후에 농축되거나 분류되지 않는 것인, 방법.

청구항 28

제22항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단에서 CD16을 발현하는 NK 세포의 비율이 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높은 것인, 방법.

청구항 29

제22항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단에서 NKG2D를 발현하는 NK 세포의 비율이 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높은 것인, 방법.

청구항 30

제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단에서 NKp30을 발현하는 NK 세포의 비율이 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높은 것인, 방법.

청구항 31

제22항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단에서 NKp44를 발현하는 NK 세포의 비율이 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높은 것인, 방법.

청구항 32

제22항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단에서 NKp46을 발현하는 NK 세포의 비율이 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높은 것인, 방법.

청구항 33

제22항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포의 집단에서 DNAM-1을 발현하는 NK 세포의 비율이 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높은 것인, 방법.

청구항 34

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포가 CD16 전이유전자(transgene)를 포함하지 않는 것인, 방법.

청구항 35

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포가 외인성 CD16 단백질을 발현하지 않는 것인, 방법.

청구항 36

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포가 유전자 조작되지 않는 것인, 방법.

청구항 37

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 자연 살해 세포가 동일한 제대혈 기증자로부터 유래된 것인, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 하기를 추가로 포함하는 것인, 방법:

(a) 인간 알부민;

(b) 덱스트란;

(c) 글루코스;

(d) DMSO; 및

(e) 버퍼.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 30 내지 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함하는 것인, 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함하는 것인, 방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 20 내지 30 mg/mL의 덱스트란을 포함하는 것인, 방법.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 25 mg/mL의 덱스트란을 포함하는 것인, 방법.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 덱스트란이 덱스트란 40인, 방법.

청구항 44

제38항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 12 내지 15 mg/mL의 글루코스를 포함하는 것인, 방법.

청구항 45

제38항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 12.5 mg/mL의 글루코스를 포함하는 것인, 방법.

청구항 46

제38항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함하는 것인, 방법.

청구항 47

제38항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 50 내지 60 ml/mL의 DMSO를 포함하는

것인, 방법.

청구항 48

제38항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 55 mg/mL의 DMSO를 포함하는 것인, 방법.

청구항 49

제38항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 40 내지 60% v/v의 버퍼를 포함하는 것인, 방법.

청구항 50

제38항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 버퍼가 인산염 완충 식염수인 방법.

청구항 51

제1항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 하기를 추가로 포함하는 것인, 방법:

(a) 약 40 mg/mL 인간 알부민;

(b) 약 25 mg/mL 덱스트란 40;

(c) 약 12.5 mg/mL 글루코스;

(d) 약 55 mg/mL DMSO; 및

(e) 약 0.5 mL/mL 인산염 완충 식염수.

청구항 52

제38항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 0.5 mL/mL의 물을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 약제학적 조성물이 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인이 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함하는 것인, 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인이 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 것인, 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인이 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함하는 것인, 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인이 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 것인, 방법.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 이중특이적 항원 결합 단편이고;

상기 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD30 - L1 - VL_CD16A - L2 - VH_CD16A - L3 - VL_CD30의 순서로 연결되는 것인, 방법.

청구항 59

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 이중특이적 항원 결합 단편이고;

상기 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD16A - L1 - VL_CD30 - L2 - VH_CD30 - L3 - VL_CD16A의 순서로 연결되는 것인, 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3이 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성되는 것인, 방법.

청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 구축물(construct)의 링커 L2가 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성되는 것인, 방법.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 서열번호 18과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 방법.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원 결합 단편인, 방법.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용량(dose)이 0.01, 0.04, 0.15, 0.5, 1.5, 3.0, 4.5 또는 7.0 mg/kg으로 환자에게 투여되는 것인, 방법.

청구항 65

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용량이 200 mg의 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 것인, 방법.

청구항 66

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 말초 T 세포 림프종,

피부 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종(anaplastic large-cell lymphoma), $CD30^+$ B 세포 림프종, 다발성 골수종, 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 상기 암이 호지킨 림프종인, 방법.

청구항 68

제66항에 있어서, 상기 암이 말초 T 세포 림프종인, 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 항-CD30 항체로 치료한 후에 재발했거나 항-CD30 항체에 불응성인, 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 항-CD30 항체가 브렌툭시맙 베도틴(brentuximab vedotin)인, 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 자가 줄기세포 이식 또는 키메라 항원 수용체 T 세포 요법(CAR-T)으로 치료한 후 질병 진행을 경험한 적이 있인, 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자에게 NK 세포 용량당 1×10^8 내지 1×10^{10}개의 NK 세포가 투여되는 것인, 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 환자에게 NK 세포 용량당 1×10^9 내지 8×10^9개의 NK 세포가 투여되는 것인, 방법.

청구항 74

제72항에 있어서, 상기 환자에게 NK 세포 용량당 4×10^8, 1×10^9, 4×10^9, 8×10^9, 또는 1.6×10^{10}개의 NK 세포가 투여되는 것인, 방법.

청구항 75

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 치료 전에 림프구고갈(lymphodepleting) 화학요법을 받게 되는 것인, 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 림프구고갈 화학요법이 비-골수파괴 화학요법인, 방법.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 상기 림프구고갈 화학요법이 사이클로포스파미드 및 플루다라빈 중 적어도 하나를 사용한 치료를 포함하는 것인, 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 림프구고갈 화학요법은 사이클로포스파미드 및 플루다라빈을 사용한 치료를 포함하는 것인, 방법.

청구항 79

제77항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드가 100 내지 500 mg/m^2/일로 투여되는 것인, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드가 250 mg/m^2/일로 투여되는 것인, 방법.

청구항 81

제79항에 있어서, 상기 사이클로포스파미드가 500 mg/m^2/일로 투여되는 것인, 방법.

청구항 82

제77항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 플루다라빈이 10 내지 50 mg/m^2/일로 투여되는 것인, 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 상기 플루다라빈이 30 mg/m^2/일로 투여되는 것인, 방법.

청구항 84

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자에게 IL-2를 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 환자에게 용량당 1 x 10^6 IU/m^2의 IL-2가 투여되는 것인, 방법.

청구항 86

제84항에 있어서, 상기 환자에게 용량당 100만 IU 또는 600만 IU의 IL-2가 투여되는 것인, 방법.

청구항 87

제84항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2의 투여가 NK 세포 투여 후 1-4시간 이내에 발생하는 것인, 방법.

청구항 88

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물의 용량 및 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물의 용량의 투여가 매주 발생하는 것인, 방법.

청구항 89

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포 및 NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물 및 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물이 4 내지 8주 동안 매주 투여되는 것인, 방법.

청구항 90

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물의 투여는 3주 동안 매주 발생하고, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물의 투여는 6주 동안 매주 발생하는 것인, 방법.

청구항 91

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물의 투여는 6주 동안 격주로 발생하고, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물의 투여는 6주 동안 매주 발생하는 것인, 방법.

청구항 92

하기 단계를 포함하는, $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법:

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법을 포함하는 제1 치료 주기를 환자에게 투여하는 단계; 및

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법을 포함하는 제2 치료 주기를 환자에게 투여하는 단계,

여기서 제1 치료 주기와 제2 치료 주기는 동일하거나 상이하다.

청구항 93

제92항에 있어서, 제1항 내지 제91항 중 어느 한 항의 방법을 포함하는 제3 치료 주기를 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 방법이 주기 사이에 적어도 2주의 치료 중단(break)을 포함하는 것인, 방법.

청구항 95

제92항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료가, $CD30^+$ 암이 진전될 때까지, 또는 NK 세포, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 둘 다에 대한 환자의 불내성(intolerance)으로 인해 투여가 중단될 때까지, 또는 환자가 NK 세포, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 둘 다에 독성을 경험할 때까지 계속되는 것인, 방법.

청구항 96

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포가 유전자 변형되지 않는 것인, 방법.

청구항 97

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포의 적어도 70%가 CD56+ 및 CD16+인, 방법.

청구항 98

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포의 적어도 85%가 CD56+ 및 CD3-인, 방법.

청구항 99

선행하는 청구항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포의 1% 이하는 CD3+이고, NK 세포의 1% 이하는 CD19+이고, NK 세포의 1% 이하는 CD14+인, 방법.

청구항 100

다음을 포함하는 약제학적 조성물:

(a) KIR-B 일배체형 및 CD16 분자의 발현을 포함하는 자연 살해 세포(NK 세포); 및

(b) CD16(FcγRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편,

상기 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은

서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및

서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함하고; 및

상기 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은

서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및

서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 CD16 분자가 CD16A 분자인, 약제학적 조성물.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 상기 CD16 분자가 F158에서 V/V 다형성을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체가 CD16A에 특이적으로 결합하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 104

제100항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인이 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 105

제100항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인이 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 106

제100항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인이 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 107

제100항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인이 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 108

제100항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 이중특이적 항원 결합 단편이고;

상기 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD30 - L1 - VL_CD16A - L2 - VH_CD16A - L3 - VL_CD30의 순서로 연결되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 109

제100항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 이중특이적 항원 결합 단편이고;

상기 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD16A - L1 - VL_CD30 - L2 - VH_CD30 - L3 - VL_CD16A의 순서로 연결되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3이 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 111

제108항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 구축물의 링커 L2가 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 112

제100항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 서열번호 18과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 113

제100항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원 결합 단편인, 약제학적 조성물.

청구항 114

제100항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포는 제대혈 유래 NK 세포인, 약제학적 조성물.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 제대혈 유래 NK 세포는 다음의 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 것인, 약제학적 조성물:

(a) 자연 살해 세포를 포함하는 제대혈 세포의 샘플을 제공하는 단계;

(b) 세포에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 단계;

(b) 하기를 포함하는 배지에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주로부터의 제1 다수의 세포와 함께 시드 세포를 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜,

OKT3, UCHT1, HTa, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포 자극 항체; 및

IL-2,

제대혈 유래 자연 살해 세포를 생성하는 단계.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 불활성화된 CD4(+) T 세포주가 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자, OX40L 유전자, 및 마우스 TNF-α 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 불활성화된 CD4(+) T 세포주가 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자 및 마우스 TNF-α 유전자를 발현하는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 118

제100항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 NK 세포의 CD16 분자에 결합되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 119

제100항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 다음을 추가로 포함하는, 약제학적 조성물:

(a) 인간 알부민;

(b) 덱스트란;

(c) 글루코스;

(d) DMSO; 및

(e) 버퍼.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 조성물은 30 내지 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 121

제120항에 있어서, 상기 조성물은 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 122

제119항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 20 내지 30 mg/mL의 덱스트란을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 123

제119항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 25 mg/mL의 덱스트란을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 124

제119항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 덱스트란은 덱스트란 40인, 약제학적 조성물.

청구항 125

제119항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 12 내지 15 mg/mL의 글루코스를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 126

제119항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 12.5 mg/mL의 글루코스를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 127

제119항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 128

제119항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 50 내지 60 ml/mL의 DMSO를 포함하는, 약제학적

조성물.

청구항 129

제119항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 55 mg/mL의 DMSO를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 130

제119항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 40 내지 60% v/v의 버퍼를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 131

제119항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 버퍼가 인산염 완충 식염수인, 약제학적 조성물.

청구항 132

제119항에 있어서, 상기 조성물은 하기를 포함하는, 약제학적 조성물:

(a) 약 40 mg/mL 인간 알부민;

(b) 약 25 mg/mL 덱스트란 40;

(c) 약 12.5 mg/mL 글루코스;

(d) 약 55 mg/mL DMSO; 및

(e) 약 0.5 mL/mL 인산염 완충 식염수.

청구항 133

제119항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 0.5 mL/mL의 물을 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 134

제100항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 135

제100항 내지 제134항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 포함하는 냉동 바이알.

청구항 136

제100항 내지 제134항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **우선권 주장**

[0002] 본 출원은 2021년 11월 4일에 출원된 미국 가출원 일련번호 63/275,890의 우선권을 주장한다. 전술한 내용의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 항체 요법을 포함한 표적 요법은 암 치료에 혁명을 일으켰다. 항체 요법이 세포독성을 유도하는 한 가지 작용 기전은 항체 의존성 세포 매개 세포독성(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)을 통한 것이다. 많은 암 환자들은 강력한 ADCC 반응을 보일 수 없다. ADCC 반응이 감소하면 지시된(indicated) 단일클론 항체 치료제가 이러한 환자들에게 훨씬 덜 효과적이게 되어 이러한 환자들이 반응하는 것을 방해하거나 재발을 초

래할 수 있다. 따라서 감소된 ADCC 반응은 임상 결과에 부정적인 영향을 미칠 수 있다.

[0004] 최근 몇 가지 항암제의 발견 및 개발에도 불구하고, 많은 유형의 암에 대한 예후가 좋지 않기 때문에 개선된 방법 및 치료제에 대한 요구가 여전히 존재한다.

[0005] 본 발명은 당해 분야의 이러한 결함 및 기타 결함을 해결한다.

발명의 내용

[0006] **요약**

[0007] NK 세포는 이들 세포 표면에 있는 수용체의 복잡한 배열을 통해서 뿐만 아니라 항체 의존성 세포 세포독성(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)을 통해 종양 세포와 결합할 수 있는 면역 세포이다. ADCC를 개시하기 위해 NK 세포는 표면의 CD16 수용체를 통해 항체와 결합한다. NK 세포는 CAR-T 세포 치료 및 기타 세포 치료에 사용되는 T 세포와 같은 다른 면역 세포에 비해 이점을 가질 수 있다. 예시적인 이점으로 NK 세포는 동종이계(allogeneic) 치료법으로 사용될 수 있으며, 이는 한 기증자로부터의 NK 세포가 HLA 일치, 유전자 편집 또는 기타 유전자 조작에 대한 요구 사항 없이 한 명 이상의 환자에게 안전하게 사용될 수 있음을 의미한다. 항종양 활성을 갖는 동종이계 NK 세포는 중증 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome, CRS), 및 신경학적 독성 또는 이식편대숙주병(graft versus host disease, GvHD)과 같은 T 세포 치료와 관련된 많은 위험 없이 환자에게 안전하게 투여될 수 있다.

[0008] 동종이계 NK 세포는 암 환자에게 중요한 치료 옵션을 제공할 수 있다. 한 가지 예시적인 이점으로, NK 세포는 다른 세포 기반 치료법과 관련된 이식편-대-숙주병, 신경독성 또는 사이토카인 방출 증후군의 증거 없이 잘 용인되어 왔다. 또 다른 예시적인 이점으로, NK 세포는 종양 세포를 식별하고 용해하기 위해 사전 항원 노출 또는 특정 항원의 발현을 필요로 하지 않는다. 또 다른 예시적인 이점으로, NK 세포는 선천성 면역 사이를 연결하고 다중클론 적응성 면역 반응을 발생시켜 장기 항암 면역 기억을 일으키는 고유한 능력을 가지고 있다.

[0009] 예를 들어, NK 세포는 면역체계의 다른 구성요소를 동원하고 활성화할 수 있다. 활성화된 NK 세포는 인터페론 감마(IFNγ)와 같은 사이토카인 및 케모카인; 종양 괴사 인자 알파(TNFα); 및 신호를 전달하여 T 세포를 종양에 동원하는 대식세포 염증성 단백질 1(MIP1)을 분비한다. NK 세포는 또한 종양 세포를 직접 죽이는 방식으로 적응성 면역 체계가 인식할 수 있도록 종양 항원을 노출시킨다.

[0010] 추가적으로, 향상된 임상 활성을 위해 선호되는 특성(예를 들어, 고친화도 CD16 및 살해 세포 면역글로불린 유사 수용체(Killer cell Immunoglobulin-like Receptor, KIR) B-일배체형(haplotype))을 가진 제대(cord)를, NK 세포의 공급원으로 다양한 제대혈(umbilical cord blood) 은행을 활용하여 선택할 수 있다.

[0011] 본원에 기재된 바와 같은 동종이계 NK 세포의 투여는 예를 들어 다중특이적 인게이저(multispecific engager), 예를 들어 본원에 기재된 다중특이적 인게이저와 조합하여 환자의 ADCC 반응을 향상시킬 수 있다.

[0012] CD30은 전형적(classical) 호지킨 림프종(HL)에서 뿐만 아니라 역형성 대세포 림프종(anaplastic large-cell lymphoma, ALCL), 말초 T 세포 림프종(PTCL)-달리 명시되지 않은 것(PTCL-NOS), 및 혈관면역모세포성(angioimmunoblastic) T 세포 림프종(AITL)을 포함하여 다양한 정도의 말초 T 세포 림프종의 여러 하위 유형에서 보편적으로 발현되는 종양 괴사 인자 수용체 계열의 세포막 단백질이다.

[0013] 가장 일반적인 CD30 양성 림프종인 전형적 HL(cHL)에서 방사선 요법을 포함하거나 포함하지 않는 제1선(frontline) 화학요법(ABVD 또는 BEACOPP)이 상당한 효과를 입증하였다. 진행성 cHL 환자의 경우, 제1선 요법은 화학요법(AVD)과 함께 CD30 표적화 항체 약물 접합체인 브렌툭시맙 베도틴(brentuximab vedotin)을 포함할 수도 있다. 그러나, 최대 30%의 환자는 제1선 치료에 불응하거나 재발한다. 재발성 또는 불응성 cHL 환자의 경우, 고용량 화학요법과 자가 줄기세포 이식(ASCT)으로 50% 이하가 치료될 수 있다(Majhail NS, Weisdorf DJ, Defor TE, et al. Long-term results of autologous stem cell transplantation for primary refractory or relapsed Hodgkin's lymphoma. Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12(10):1065-1072. doi:10.1016/j.bbmt.2006.06.006; Josting A, Mueller H, Borchmann P, et al. Dose intensity of chemotherapy in patients with relapsed Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2010;28(34):5074-5080. doi:10.1200/JCO.2010.30.5771; Bartlett NL, Herrera AF, Domingo-Domenech E, et al. A phase 1b study of AFM13 in combination with pembrolizumab in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. Blood. 2020;136(21):2401-2409. doi:10.1182/blood.2019004701). ASCT 후 재발은 중앙값(median) 생존기간이 26개월로 좋지 않은 예후와 관련이 있다(Voorhees TJ, Beaven AW. Therapeutic Updates for Relapsed and

Refractory Classical Hodgkin Lymphoma. Cancers (Basel). 2020;12(10):2887. Published 2020 Oct 8. doi:10.3390/cancers12102887). 난치성 및 재발 환자를 위한 전신 치료 옵션에는 브렌툭시맙 베도틴과 같은 약물을 단독 요법으로 사용하거나 다른 약물 및/또는 PD-(L)1 억제제와 병용하는 것도 포함될 수 있다. 유망한 표적화 및 면역학적 제제를 포함하는 최근의 발전에도 불구하고, 재발성/불응성 환경에서 임상적으로 허용되는 안전성 프로파일과 함께 높은 반응 수준, 더 긴 반응 기간 및 치료 가능성을 제공하는 치료에 대한 의학적 요구가 여전히 충족되지 않고 있다.

[0014] 말초 T 세포 림프종과 관련하여, CHOP 또는 CHOP 유사 요법을 사용한 1차(first-line) 치료는 *ALK*+ ALCL의 경우를 제외하고는 좋지 않은 결과를 초래하였다. ASCT와의 통합과 같은 제1선 치료의 강화된 접근법에도 불구하고, 이들 환자는 여전히 재발 또는 조기 진행의 상당한 위험에 처해 있다. 일반적으로 PTCL 치료를 받는 모든 환자는 아니더라도 대부분의 환자는 완화에 도달하지 못하거나 매우 열악한 장기 생존으로 재발하며, 특히 조혈세포 이식(hematopoietic cell transplantation, HCT)이 없는 경우 중앙값 PFS 및 OS 추정치는 각각 3개월 및 6개월로 낮다(Mak V, Hamm J, Chhanabhai, et al. Survival of patients with peripheral T-cell lymphoma after first relapse or progression: spectrum of disease and rare long-term survivors. J. Clin. Oncol. 2013;31(16):1970-1976; Biasoli I, Cesaretti M, Bellei M, et al. Dismal outcome of T-cell lymphoma patients failing first-line treatment: results of a population-based study from the Modena Cancer Registry. Hematol. Oncol. 2015;33(3):147-151; Bellei M, Foss F, Shustov A, et al. The outcome of peripheral T-cell lymphoma patients failing first-line therapy: a report from the prospective, International T-Cell Project. Hematologica. 2018;103(7):1191-1197). 따라서, PTCL 환자에게 존재하는 충족되지 않은 의학적 요구를 해결하기 위해서는 새로운 치료법과 치료 전략이 필요한다.

[0015] AFM13은 HL 그리고 PTCL을 비롯한 기타 CD30 양성 악성종양의 치료를 위해 연구되고 있는 4가 이중특이적(항-인간 CD30 × 항-인간 CD16A) 재조합 항체 구축물(construct)이다. AFM13은 악성 림프종 세포에서 발현되는 CD30 항원을 표적으로 삼는다. 동시에, 항-CD16A 도메인은 NK 세포 및 대식세포 상의 CD16A(FcλRIIIA)에 결합한다. AFM13은 종양 표적 세포와 선천성 이펙터(effector) 세포 사이에 다리를 형성하여 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)을 통해 NK 세포에 의한 CD30 항원 양성 세포의 용해를 촉발한다.

[0016] HL의 면역억제성 종양 미세환경에는 NK 세포 집단이 존재하지 않는 것으로 나타났다. 더욱이, HL 환자로부터의 NK 세포는 부분적으로 활성화 수용체와 억제 수용체의 불균형으로 인해 기능 장애가 있다(Reiners KS, Kessler J, Sauer M, et al. Rescue of impaired NK cell activity in Hodgkin lymphoma with bispecific antibodies in vitro and in patients. Mol Ther 2013;21:895-903). 자가(autologous) NK 세포 기능의 이러한 제한으로 인해 HL에 대한 최적의 NK 면역요법은 동종이계 공급원을 필요로 할 가능성이 높다.

[0017] 따라서, 본 발명은, 무엇보다도, $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이는 KIR-B 일배체형 및 CD16 분자의 발현을 포함하는 자연 살해 세포(NK 세포)를 포함하는 제1 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계; 및 CD16(FcɣRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및 서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함하고; 여기서 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, NK 세포는 제대혈(cord blood) 유래 NK 세포이다.

[0019] 일부 구현예에서, 제대혈 유래 NK 세포는 (a) 자연 살해 세포를 포함하는 제대혈 세포의 샘플을 제공하는 단계; (b) 세포에서 CD3(+) 세포를 고갈시키거나 양성 선별에 의해 NK 세포에 대하여 시드 세포(seed cell)를 농축시키는 단계; (c) 시드 세포를 IL-2를 포함하는 배지에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주로부터의 제1의 다수의 세포와 함께 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장(expand)하여 제대혈 유래 자연 살해 세포를 생성하는 단계를 포함

하는 방법에 의해 생성된 것이다.

[0020] 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형(membrane-bound) IL-21(mbIL-21) 유전자, OX40L 유전자, 및 돌연변이된 TNF-α 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현한다. 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자, 및 돌연변이된 TNF-α 유전자를 발현한다.

[0021] 일부 구현예에서, IL-2를 포함하는 배지는 OKT3, UCHT1, HTa, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포 자극 항체를 추가로 포함한다.

[0022] 일부 구현예에서, CD16 분자는 CD16A 분자이다. 일부 구현예에서, CD16 분자는 F158에서 V/V 다형성(polymorphism)을 포함한다. 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 CD16A에 특이적으로 결합한다.

[0023] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는 자연 살해 세포의 집단이다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% CD16+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKG2D+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp46+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp30+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% DNAM-1+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp44+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 20% 미만, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD3+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD14+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD19+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하, 0.5% 이하, 또는 0% CD38+ 세포를 포함한다.

[0024] 일부 구현예에서, NK 세포 집단은 적어도 1억 개의 확장된 자연 살해 세포, 예를 들어 2억, 2억 5천만, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 7억 5천만, 8억, 9억, 10억, 20억, 30억, 40억, 50억, 60억, 70억, 80억, 90억, 100억, 150억, 200억, 250억, 500억, 750억, 800억, 900억, 1000억, 2000억, 2500억, 3000억, 4000억, 5000억, 6000억, 7000억, 8000억, 9000억, 1조, 2조, 3조, 4조, 5조, 6조, 7조, 8조, 9조 또는 10조 개의 확장된 자연 살해 세포를 포함한다.

[0025] 일부 구현예에서, NK 세포 집단은 (a) 제대혈로부터 자연 살해 세포를 포함하는 시드 세포를 수득하는 단계; (b) 시드 세포에서 CD3+ 세포를 고갈시키는 단계; (c) 고갈된 시드 세포를 막 결합형 IL-21, 돌연변이된 TNFα 및 4-1BBL 유전자를 발현하도록 조작된 제1의 다수의 Hut78 세포와 함께 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 확장된 자연 살해 세포를 생성함으로써 자연 살해 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, NK 세포 집단은 (a) 제대혈로부터 자연 살해 세포를 포함하는 시드 세포를 수득하는 단계; (b) 시드 세포에서 CD3+ 세포를 고갈시키는 단계; (c) 고갈된 시드 세포를 막 결합형 IL-21, 돌연변이된 TNFα 및 4-1BBL 유전자를 발현하도록 조작된 제1의 다수의 Hut78 세포와 함께 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 생성하는 단계; 및 (d) 막 결합형 IL-21, 돌연변이된 TNFα 및 4-1BBL 유전자를 발현하도록 조작된 제2의 다수의 Hut78 세포와 함께 배양함으로써 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 확장시켜 확장된 자연 살해 세포를 생성하고; 이로써 자연 살해 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된다.

[0026] 일부 구현예에서, NK 세포 집단은, 단계 (c) 이후에, (i) 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 다수의 용기에서 동결시키는 단계; 및 (ii) 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단의 분취량을 포함하는 용기를 해동하는 단계를 추가로 포함하는 방법에 의해 생성되며, 여기서 단계 (d)에서 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단을 확장시키는 것은 확장된 자연 살해 세포의 마스터 세포 은행 집단의 분취량을 확장시키는 것을 포함한다.

[0027] 일부 구현예에서, 제대혈은 KIR-B 일배체형 및 CD16 158V 다형성에 대한 동형접합성(homozygous)을 갖는 기증자

로부터의 것이다.

[0028] 일부 구현예에서, NK 세포 집단은 제대혈로부터의 자연 살해 세포를 적어도 10,000배, 예를 들어 15,000배, 20,000배, 25,000배, 30,000배, 35,000배, 40,000배, 45,000배, 50,000배, 55,000배, 60,000배, 65,000배, 또는 70,000배 확장시키는 것을 포함하는 방법에 의해 생산된다.

[0029] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단은 확장 후에 농축되거나 분류되지 않는다.

[0030] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단에서 CD16을 발현하는 NK 세포의 비율은 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단에서 NKG2D를 발현하는 NK 세포의 비율은 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단에서 NKp30을 발현하는 NK 세포의 비율은 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단에서 NKp44를 발현하는 NK 세포의 비율은 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단에서 NKp46을 발현하는 NK 세포의 비율은 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 집단에서 DNAM-1을 발현하는 NK 세포의 비율은 제대혈로부터의 시드 세포에서 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0031] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는 CD16 전이유전자(transgene)를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는 외인성 CD16 단백질을 발현하지 않는다.

[0032] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는 유전자 조작되지 않는다.

[0033] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는 동일한 제대혈 기증자로부터 유래된 것이다.

[0034] 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 (a) 인간 알부민; (b) 덱스트란; (c) 글루코스; (d) DMSO; 및 (e) 버퍼를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 30 내지 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 20 내지 30 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 25 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란은 덱스트란 40이다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 12 내지 15 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 12.5 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 50 내지 60 ml/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 55 mg/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 40 내지 60% v/v의 버퍼를 포함한다. 일부 구현예에서, 버퍼는 인산염 완충 식염수이다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 (a) 약 40 mg/mL 인간 알부민; (b) 약 25 mg/mL 덱스트란 40; (c) 약 12.5 mg/mL 글루코스; (d) 약 55 mg/mL DMSO; 및 (e) 약 0.5 mL/mL 인산염 완충 식염수를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 0.5 mL/mL의 물을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.

[0035] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다.

[0036] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD30 - L1 - VL_CD16A - L2 - VH_CD16A - L3 - VL_CD30의 순서로 연결된다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD16A - L1 - VL_CD30 - L2 - VH_CD30 - L3 - VL_CD16A의 순서로 연결된다.

[0037] 일부 구현예에서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3은 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성된다. 일부 구현예에서, 항체 구축물의 링커 L2는 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성된다.

[0038] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원 결합 단편이다.

[0039] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용량(dose)은 0.01, 0.04, 0.15, 0.5, 1.5, 3.0, 4.5 또는 7.0 mg/kg으로 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 용량은 200 mg의 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0040] 일부 구현예에서, 암은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종, $CD30^+$ B 세포 림프종, 다발성 골수종, 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 호지킨 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 말초 T 세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 환자는 항-CD30 항체로 치료한 후에 재발했거나 항-CD30 항체에 불응성이다. 일부 구현예에서, 항-CD30 항체는 브렌툭시맙 베도틴이다. 일부 구현예에서, 환자는 자가 줄기세포 이식 또는 키메라 항원 수용체 T 세포 요법(CAR-T)으로 치료한 후에 질병 진행을 경험한 적이 있다.

[0041] 일부 구현예에서, 환자에게는 NK 세포 용량당 1×10^8 내지 1×10^{10}개의 NK 세포가 투여된다. 일부 구현예에서, 환자에게는 NK 세포 용량당 1×10^9 내지 8×10^9개의 NK 세포가 투여된다. 일부 구현예에서, 환자에게는 NK 세포 용량당 4×10^8, 1×10^9, 4×10^9, 8×10^9, 또는 1.6×10^{10}개의 NK 세포가 투여된다.

[0042] 일부 구현예에서, 환자는 치료 전에 림프구고갈(lymphodepleting) 화학요법을 받게 된다. 일부 구현예에서, 림프구고갈 화학요법은 비-골수파괴 화학요법이다. 일부 구현예에서, 림프구고갈 화학요법은 사이클로포스파미드 및 플루다라빈 중 적어도 하나를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 림프구고갈 화학요법은 사이클로포스파미드 및 플루다라빈을 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 100 내지 500 mg/m^2/일로 투여된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 250 mg/m^2/일로 투여된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드는 500 mg/m^2/일로 투여된다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 10 내지 50 mg/m^2/일로 투여된다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 30 mg/m^2/일로 투여된다.

[0043] 일부 구현예에서, 방법은 환자에게 IL-2를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 환자에게는 용량당 1×10^6 IU/m^2의 IL-2가 투여된다. 일부 구현예에서, 환자에게는 용량당 100만 IU 또는 600만 IU의 IL-2가 투여된다. 일부 구현예에서, IL-2의 투여는 NK 세포 투여 후 1-4시간 이내에 발생한다.

[0044] 일부 구현예에서, NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물의 용량 및 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물의 용량의 투여는 매주 발생한다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물 및 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물은 4 내지 8주 동안 매주 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물의 투여는 3주 동안 매주 발생하고, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물의 투여는 6주 동안 매주 발생한다. 일부 구현예에서, NK 세포를 포함하는 제1 약제학적 조성물의 투여는 6주 동안 격주로 발생하고, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물의 투여는 6주 동안 매주 발생한다.

[0045] 또한, 본 발명은 $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 본원에 기재된 치료 방법

중 어느 하나를 포함하는 제1 치료 주기를 환자에게 투여하는 단계; 및 본원에 기재된 치료 방법 중 어느 하나의 방법을 포함하는 제2 치료 주기를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 치료 주기와 제2 치료 주기는 동일하거나 상이하다.

[0046] 일부 구현예에서, 방법은 본원에 기재된 방법 중 어느 하나의 방법을 포함하는 제3 치료 주기를 환자에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0047] 일부 구현예에서, 방법은 주기 사이에 적어도 2주의 치료 중단(break)을 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, 치료는, $CD30^{+}$ 암이 진전될 때까지, 또는 NK 세포, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 둘 다에 대한 환자의 불내성(intolerance)으로 인해 투여가 중단될 때까지, 또는 환자가 NK 세포, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 둘 다에 독성을 경험할 때까지 계속된다.

[0049] 일부 구현예에서, NK 세포는 유전자 변형되지 않는다.

[0050] 일부 구현예에서, NK 세포의 적어도 70%는 CD56+ 및 CD16+이다. 일부 구현예에서, NK 세포의 적어도 85%는 CD56+ 및 CD3-이다. 일부 구현예에서, NK 세포의 1% 이하는 CD3+이고, NK 세포의 1% 이하는 CD19+이고, NK 세포의 1% 이하는 CD14+이다.

[0051] 또한, 본 발명은 (a) KIR-B 일배체형 및 CD16 분자의 발현을 포함하는 자연 살해 세포(NK 세포); 및 (b) CD16(FcγRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및 서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함하고; 여기서 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

[0052] 일부 구현예에서, CD16 분자는 CD16A 분자이다. 일부 구현예에서, CD16 분자는 F158에서 V/V 다형성을 포함한다. 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체는 CD16A에 특이적으로 결합한다.

[0053] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역, 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다.

[0054] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD30 - L1 - VL_CD16A - L2 - VH_CD16A - L3 - VL_CD30의 순서로 연결된다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의

항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD16A - L1 - VL_CD30 - L2 - VH_CD30 - L3 - VL_CD16A의 순서로 연결된다.

[0055] 일부 구현예에서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3은 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성된다. 일부 구현예에서, 항체 구축물의 링커 L2는 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성된다.

[0056] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원 결합 단편이다.

[0057] 일부 구현예에서, NK 세포는 제대혈 유래 NK 세포이다.

[0058] 일부 구현예에서, 제대혈 유래 NK 세포는 (a) 자연 살해 세포를 포함하는 제대혈 세포의 샘플을 제공하는 단계; (b) 세포에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 단계; (b) OKT3, UCHT1, HTa, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포 자극 항체; 및 IL-2를 포함하는 배지에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주로부터의 제1 다수의 세포와 함께 시드 세포를 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 제대혈 유래 자연 살해 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 것이다.

[0059] 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자, OX40L 유전자, 및 마우스 TNF-α 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현한다. 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자 및 마우스 TNF-α 유전자를 발현한다.

[0060] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 NK 세포의 CD16 분자에 결합된다.

[0061] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 (a) 인간 알부민; (b) 덱스트란; (c) 글루코스; (d) DMSO; 및 (e) 버퍼를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 30 내지 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 20 내지 30 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 25 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란은 덱스트란 40이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 12 내지 15 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 12.5 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 내지 60 ml/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 55 mg/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 40 내지 60% v/v의 버퍼를 포함한다. 일부 구현예에서, 버퍼는 인산염 완충 식염수이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 (a) 약 40 mg/mL 인간 알부민; (b) 약 25 mg/mL 덱스트란 40; (c) 약 12.5 mg/mL 글루코스; (d) 약 55 mg/mL DMSO; 및 (e) 약 0.5 mL/mL 인산염 완충 식염수를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 0.5 mL/mL의 물을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.

[0062] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 약제학적 조성물을 포함하는 냉동 바이알(들)을 제공한다.

[0063] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0064] 또한, 본 발명은 (a) KIR-B 일배체형 및 CD16 분자의 발현을 포함하는 자연 살해 세포(NK 세포); 및 (b) CD16(FcγRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및 서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함하고; 여기서 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호

15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

[0065] 일부 구현예에서, CD16 분자는 CD16A 분자이다.

[0066] 일부 구현예에서, CD16 분자는 F158에서 V/V 다형성을 포함한다.

[0067] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체는 CD16A에 특이적으로 결합한다.

[0068] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다.

[0071] 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다.

[0072] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD30 - L1 - VL_CD16A - L2 - VH_CD16A - L3 - VL_CD30의 순서로 연결된다. 일부 구현예에서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3은 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성된다. 일부 구현예에서, 항체 구축물의 링커 L2는 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성된다.

[0073] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD16A - L1 - VL_CD30 - L2 - VH_CD30 - L3 - VL_CD16A의 순서로 연결된다. 일부 구현예에서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3은 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성된다. 일부 구현예에서, 항체 구축물의 링커 L2는 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성된다.

[0074] 일부 구현예에서 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0075] 일부 구현예에서 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원 결합 단편이다.

[0076] 일부 구현예에서 NK 세포는 제대혈 유래 NK 세포이다.

[0077] 일부 구현예에서 제대혈 유래 NK 세포는 (a) 자연 살해 세포를 포함하는 제대혈 세포의 샘플을 제공하는 단계; (b) 세포에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 단계; (b) OKT3, UCHT1, HTa, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포 자극 항체; 및 IL-2를 포함하는 배지에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주로부터의 제1 다수의 세포와 함께 시드 세포를 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 제대혈 유래 자연 살해 세포를 생성하는 단

계를 포함하는 방법에 의해 생성된 것이다.

[0078] 일부 구현예에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자, OX40L 유전자, 및 마우스 TNF-α 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현한다.

[0079] 일부 구현예에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자 및 마우스 TNF-α 유전자를 발현한다.

[0080] 일부 구현예에서 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편의 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 NK 세포의 CD16 분자에 결합된다.

[0081] 일부 구현예에서 약제학적 조성물은 (a) 인간 알부민; (b) 덱스트란; (c) 글루코스; (d) DMSO; 및 (e) 버퍼를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 30 내지 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 20 내지 30 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 25 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란은 덱스트란 40이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 12 내지 15 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 12.5 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 50 내지 60 ml/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 55 mg/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 40 내지 60% v/v의 버퍼를 포함한다. 일부 구현예에서, 버퍼는 인산염 완충 식염수이다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 (a) 약 40 mg/mL 인간 알부민; (b) 약 25 mg/mL 덱스트란 40; (c) 약 12.5 mg/mL 글루코스; (d) 약 55 mg/mL DMSO; 및 (e) 약 0.5 mL/mL 인산염 완충 식염수를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 0.5 mL/mL의 물을 추가로 포함한다.

[0082] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.

[0083] 또한, 본원에 기재된 임의의 약제학적 조성물을 포함하는 냉동 바이알이 본원에 기술되어 있다.

[0084] 또한, 본원에 기재된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는 $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 본원에 기술되어 있다.

[0085] 또한, KIR-B 일배체형 및 CD16 분자의 발현을 포함하는 자연 살해 세포(NK 세포)를 포함하는 제1 약제학적 조성물을 투여하는 단계; 및 CD16(FcγRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, $CD30^+$ 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법이 본원에 기술되어 있으며, 여기서 CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및 서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함하고; 여기서 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

[0086] 일부 구현예에서, NK 세포는 제대혈 유래 NK 세포이다.

[0087] 일부 구현예에서, 제대혈 유래 NK 세포는 (a) 자연 살해 세포를 포함하는 제대혈 세포의 샘플을 제공하는 단계; (b) 세포에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 단계; (b) OKT3, UCHT1, HTa, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포 자극 항체; 및 IL-2를 포함하는 배지에서 불활성화된 CD4(+) T 세포주로부터의 제1 다수의 세포와 함께 시드 세포를 배양함으로써 자연 살해 세포를 확장시켜 제대혈 유래 자연 살해 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생성된 것이다.

[0088] 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자, OX40L 유전자, 및 마우스 TNF-α 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현한다.

[0089] 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포주는 4-1BBL 유전자, 막 결합형 IL-21(mbIL-21) 유전자 및 마우스 TNF-α 유전자를 발현한다.

[0090] 일부 구현예에서, CD16 분자는 CD16A 분자이다.

[0091] 일부 구현예에서, CD16 분자는 F158에서 V/V 다형성을 포함한다.

[0092] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 CD16A에 특이적으로 결합한다.

[0093] 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 (a) 인간 알부민; (b) 덱스트란; (c) 글루코스; (d) DMSO; 및 (e) 버퍼를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 30 내지 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 50 mg/mL의 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 20 내지 30 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 25 mg/mL의 덱스트란을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란은 덱스트란 40이다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 12 내지 15 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 12.5 mg/mL의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 50 내지 60 ml/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 55 mg/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 40 내지 60% v/v의 버퍼를 포함한다. 일부 구현예에서, 버퍼는 인산염 완충 식염수이다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 (a) 약 40 mg/mL 인간 알부민; (b) 약 25 mg/mL 덱스트란 40; (c) 약 12.5 mg/mL 글루코스; (d) 약 55 mg/mL DMSO; 및 (e) 약 0.5 mL/mL 인산염 완충 식염수를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 0.5 mL/mL의 물을 추가로 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 제1 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20을 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다.

[0096] 일부 구현예에서, CD16에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인은 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(V_L) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(V_H) 영역을 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인은 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역을 포함한다.

[0099] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD30 - L1 - VL_CD16A - L2 - VH_CD16A - L3 - VL_CD30의 순서로 연결된다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 이중특이적 항원 결합 단편이고; 이중특이적 항원 결합 단편의 가변 도메인은 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3에 의해 N-말단에서 C-말단까지 VH_CD16A - L1 - VL_CD30 - L2 - VH_CD30 - L3 - VL_CD16A의 순서로 연결된다. 일부 구현예에서, 각각의 펩타이드 링커 L1, L2 및 L3은 12개 이하의 아미노산 잔기로 구성된다. 일부 구현예에서, 항체 구축물의 링커 L2는 3 내지 9개의 아미노산 잔기로 구성된다.

[0100] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0101] 일부 구현예에서, 이중특이적 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 이중특이적 항원 결합 단편이다.

[0102] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에 사용하기 위한 방법 및 재료가 본 명세서에 기술되어 있다; 당업계에 공지된 다른 적합한 방법 및 재료도 사용될 수 있다. 재료, 방법 및 실시예는 예시일 뿐이며 제한하려는 의도는 없다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 서열, 데이터베이스 항목 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참고로 포함된다. 상충되는 경우 정의를 포함한 본 명세서가 적용된다.

[0103] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 도면, 그리고 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[0104] **참고로의 포함**

[0105] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0106] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에서 구체적으로 설명된다. 본 발명의 특징과 이점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 활용되는 예시적인 구현예를 설명하는 하기 상세한 설명과 첨부 도면을 참조하여 얻어질 것이다:

도 1은 NK 세포 확장 및 자극 방법의 예시적인 구현예를 나타낸 것이다.

도 2는 전임상 연구에서 제대혈 유래 NK 세포(CB-NK)가 말초 혈액 유래 NK 세포(PB-NK)에 비해 배양액에서 약 10배 더 큰 확장 능력을 가짐을 보여준다.

도 3은 말초 혈액에서 생성된 것과 비교하여 제대혈 유래 의약품(drug product)에서 종양 관련 NK 활성화 면역 수용체의 발현이 더 높고 더 일관적임을 보여준다.

도 4는 확장되고 자극된 NK 세포 집단의 표현형을 나타낸 것이다.

도 5는 제대혈로부터 유래되고 확장된 NK 세포 집단의 일 예인 AB-101 의약품 제조의 주요 단계를 나타낸 것이다.

도 6은 AB-101의 순도를 나타낸 것이다(n=9).

도 7은 GMP 조건에서 제조된 CD3 고갈된 세포, MCB 및 DP의 순도를 나타낸 것이다.

도 8은 GMP 조건에서 제조된 CD3 고갈된 세포, MCB 및 DP에서 NK 세포 수용체의 발현을 나타낸 것이다.

도 9는 유세포 분석에 의한 NK 순도(CD56+/CD3-)를 나타낸 것이다.

도 10은 3명의 서로 다른 제대혈 기증자로부터의 확장된 NK 세포의 CD38+ 발현을 나타낸 것이다.

도 11은 3명의 서로 다른 제대혈 기증자로부터 얻은 CD38+ NK 세포의 CD38+ 평균 형광 강도를 나타낸 것이다.

도 12는 AB-101 세포와 비교하여 출발 NK 세포 공급원의 차등적인 표면 단백질 발현을 나타낸 것이다.

도 13은 이펙터 대 표적 (E:T) 비율을 10:1에서 시작하여 2배 연속 희석에 의해 감소하는 비율에서 KARPAS-299 표적 세포에 대한 4시간 칼세인 방출 분석에서 AFM13 및 MCB2로부터의 AB-101 NK 세포의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 14는 이펙터 대 표적 (E:T) 비율을 10:1에서 시작하여 2배 연속 희석에 의해 감소하는 비율에서 KARPAS-299 표적 세포에 대한 4시간 칼세인 방출 분석에서 AFM13 및 MCB1로부터의 AB-101 NK 세포의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 15는 5:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 비율에서 KARPAS-299 표적 세포에 대한 4시간 칼세인 방출 분석에서 AFM13 및 MCB1(오른쪽, AB-101 MCB1) 및 MCB2(왼쪽, AB-101 MCB2)로부터의 AB-101 NK 세포의 세포독성 활성에 대한 막대 그래프를 나타낸 것이다.

도 16은 해동 후 MCB2로부터의 사전 로딩된 냉동보존된 AB-101 세포에서의 결합된 AFM13의 보유를 나타낸 것이

며, 여기서 채워진 히스토그램은 항-AFM13(래트 항-AFM13 항체) + 2차 항체(염소 항-래트 FITC 항체)를 나타내고, 오픈된 히스토그램은 2차 항체만을 나타낸다. 위에서부터 아래로: 사전 로딩되지 않음; 사전 로딩되지 않음 + 신선한 과잉 AFM; AFM 사전 로딩됨; AFM 사전 로딩됨 + 신선한 과잉 AFM.

도 17은 해동 후 MCB1로부터의 사전 로딩된 냉동보존된 AB-101 세포에서의 결합된 AFM13의 보유를 나타낸 것이며, 여기서 채워진 히스토그램은 항-AFM13(래트 항-AFM13 항체) + 2차 항체(염소 항-래트 FITC 항체)를 나타내고, 오픈된 히스토그램은 2차 항체만을 나타낸다. 위에서부터 아래로: 사전 로딩되지 않음; 사전 로딩되지 않음 + 신선한 과잉 AFM; AFM 사전 로딩됨; AFM 사전 로딩됨 + 신선한 과잉 AFM.

도 18은 사전 로딩된 AB-101 세포(왼쪽: MCB2, 오른쪽: MCB1)에서의 CD16 발현에 대한 형광 강도를 나타낸 것이다. 다양한 조건은 AB-101 세포에서 CD16의 균일한 발현을 보여준다. 위에서부터 아래로: 사전 로딩되지 않음; 사전 로딩되지 않음 + 신선한 과잉 AFM; AFM 사전 로딩됨; AFM 사전 로딩됨 + 신선한 과잉 AFM.

도 19는 1:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 비율에서 4시간 칼세인 방출 분석에서 MCB2로부터의 AB-101 NK 세포에 대한 AFM13에 의한 NK 동족살해(fratricide)(NK-NK 세포 용해)를 나타낸 것이다.

도 20은 1:1의 이펙터 대 표적 (E:T) 비율에서 4시간 칼세인 방출 분석에서 MCB1로부터의 AB-101 NK 세포에 대한 AFM13에 의한 NK 동족살해(NK-NK 세포 용해)를 나타낸 것이다.

도 21은 Karpas-299 표적 세포 및 AFM13에 반응하여 CD107a의 상향 조절을 나타낸 것이며, 여기서 MCB2로부터의 AB-101 NK 세포는 표적 세포와 함께 및 표적 세포 없이 1:1 세포 비율로 공동 배양하였으며, 여기서 %CD107a+ NK 세포는 유세포 분석법으로 결정하였다.

도 22는 Karpas-299 표적 세포 및 AFM13에 반응하여 CD107a의 상향 조절을 나타낸 것이며, 여기서 MCB1로부터의 AB-101 NK 세포는 표적 세포와 함께 및 표적 세포 없이 1:1 세포 비율로 공동 배양하였으며, 여기서 %CD107a+ NK 세포는 유세포 분석법으로 결정하였다.

도 23은 Karpas-299 표적 세포 및 AFM13에 반응하여 세포내 IFNγ의 생산 증가를 나타낸 것이며, 여기서 MCB2로부터의 AB-101 NK 세포는 표적 세포와 함께 및 표적 세포 없이 1:1 세포 비율로 공동 배양하였으며, 여기서 %IFNγ + NK 세포는 유세포 분석법으로 결정하였다.

도 24는 Karpas-299 표적 세포 및 AFM13에 반응하여 세포내 IFNγ의 생산 증가를 나타낸 것이며, 여기서 MCB1로부터의 AB-101 NK 세포는 표적 세포와 함께 및 표적 세포 없이 1:1 세포 비율로 공동 배양하였으며, 여기서 %IFNγ + NK 세포는 유세포 분석법으로 결정하였다.

도 25는 냉동보존된 AFM13-사전 로딩된 AB-101 NK 세포의 생존력(viability) 분석을 나타낸 것이며, 여기서 AFM13-사전 로딩된 또는 비어 있는 AB-101 NK 세포의 효능을 암컷 hIL15-NOG 마우스의 복강내 이종이식 종양 모델에서 MDA-MB-231-Luc 세포에 대해 평가하였다.

도 26은 Karpas-299/Luc 인간 종양 이종이식 모델에서 AFM13과 AB-101을 조합한 생체 내 효능 연구를 위한 실험 설계를 나타낸 것이다.

도 27은 Karpas-299/Luc 인간 종양 이종이식 모델에서 AFM13과 AB-101을 조합한 생체 내 효능 연구의 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0107] 본 발명은, 무엇보다도, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 NK 세포(들) 및 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 다중특이적 인게이저(multispecific engager)(들)을 포함하는 약제학적 조성물, 뿐만 아니라 약제학적 조성물(들)을 포함하는 냉동 바이알(들), 및 약제학적 조성물(들)로 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0108] **I. 자연 살해 세포의 확장(EXPANSION) 및 자극**

[0109] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는, 예를 들어 피더 세포(feeder cell)와 함께 배양 및 자극에 의해, 확장되고 자극된다.

[0110] NK 세포는 예를 들어 US 2020/0108096 또는 WO 2020/101361에 기재된 바와 같이 확장되고 자극될 수 있으며, 두 문헌 모두 전문이 본원에 참고로 포함된다. 간략하게, 공급원 세포는 US 2020/0108096에 기재된 바와 같이 4-1BBL, 막 결합형 IL-21 및 돌연변이 TNFα를 발현하도록 조작된 변형된 HuT-78(ATCC® TIB-161™) 세포에서

배양될 수 있다.

[0111] 적합한 NK 세포는 또한 본원에 기술된 바와 같이 확장되고 자극될 수 있다.

[0112] 일부 구현예에서, NK 세포는 (a) NK 세포, 예를 들어 NK 세포, 예를 들어 CD3(+) 고갈된 NK 세포를 포함하는 조성물을 제공하는 단계; 및 (b) 피더 세포 및/또는 자극 인자를 포함하는 배지에서 배양하여 확장되고 자극된 NK 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 확장되고 자극된다.

[0113] **A. 자연 살해 세포 공급원**

[0114] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원은 말초 혈액, 말초 혈액 림프구(PBL), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수, 제대혈(umbilical cord blood)(제대혈(cord blood)), 단리된 NK 세포, 유도 만능 줄기세포로부터 유래된 NK 세포, 배아 줄기세포로부터 유래된 NK 세포, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0115] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원은 단일 유닛(single unit)의 제대혈이다.

[0116] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 1 x 10^7 또는 약 1 x 10^7개 내지 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개의 총 유핵(nucleated) 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 1 x 10^8 또는 약 1 x 10^8개 내지 1.5 x 10^8 또는 약 1.5 x 10^8개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 1 x 10^8개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 약 1 x 10^8개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 1 x 10^9개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 약 1 x 10^9개의 총 유핵 세포를 포함한다.

[0117] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 약 20% 내지 약 80%의 CD16+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 20% 또는 약 20% 내지 80% 또는 약 80%, 약 20% 내지 70% 또는 약 70%, 약 20% 내지 60% 또는 약 60%, 약 20% 내지 50% 또는 약 50%, 약 20% 내지 40% 또는 약 40%, 약 20% 내지 30% 또는 약 30%, 약 30% 내지 80% 또는 약 80%, 약 30% 내지 70% 또는 약 70%, 약 30% 내지 60% 또는 약 60%, 약 30% 내지 50% 또는 약 50%, 약 30% 내지 40% 또는 약 40%, 약 40% 내지 80% 또는 약 80%, 약 40% 내지 70% 또는 약 70%, 약 40% 내지 60% 또는 약 60%, 약 40% 내지 50% 또는 약 50%, 약 50% 내지 80% 또는 약 80%, 약 50% 내지 70% 또는 약 70%, 약 50% 내지 60% 또는 약 60%, 약 60% 내지 80% 또는 약 80%, 약 60% 내지 70% 또는 약 70%, 또는 약 70% 내지 80% 또는 약 80%의 CD16+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 80% 이하의 CD16+ 세포를 포함한다. 대안적으로, 일부 NK 세포 공급원은 80% 초과의 농도로 CD16+ 세포를 포함할 수 있다.

[0118] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 MLG2A+ 세포를 포함한다.

[0119] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 NKG2C+ 세포를 포함한다.

[0120] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 NKG2D+ 세포를 포함한다.

[0121] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 NKp46+ 세포를 포함한다.

[0122] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 NKp30+ 세포를 포함한다.

[0123] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 DNAM-1+ 세포를 포함한다.

[0124] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 NKp44+ 세포를 포함한다.

[0125] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 CD25+ 세포를 포함한다.

[0126] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 CD62L+ 세포를 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 CD69+ 세포를 포함한다.

[0128] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 CXCR3+ 세포를 포함한다.

[0129] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원, 예를 들어 제대혈 유닛은 40% 이하, 예를 들어 30% 이하, 예를 들어 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 예를 들어 5% 이하의 CD57+ 세포를 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원 내의 NK 세포는 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자(allele)를 포함한다. *예를 들어,* Hsu et al., "The Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genomic Region: Gene-Order, Haplotypes and Allelic Polymorphism," *Immunological Review* 190:40-52 (2002); 및 Pyo et al., "Different Patterns of Evolution in the Centromeric and Telomeric Regions of Group A and B Haplotypes of the Human Killer Cell Ig-like Receptor Locus," *PLoS One* 5:e15115 (2010) *참조하라*.

[0131] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원 내의 NK 세포는 CD16의 158 V/V 변이체(즉, 동형접합성 CD16 158V 다형성)를 포함한다. *예를 들어,* Koene et al., "FcγRIIIa-158V/F Polymorphism Influences the Binding of IgG by Natural Killer Cell FcgammaRIIIa, Independently of the FcgammaRIIIa-48L/R/H Phenotype," *Blood* 90:1109-14 (1997) *참조하라*.

[0132] 일부 구현예에서, 세포 공급원 내의 NK 세포는 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체 둘 다를 포함한다.

[0133] 일부 구현예에서, 세포 공급원 내의 NK 세포는 유전자 조작되지 않는다.

[0134] 일부 구현예에서, 세포 공급원 내의 NK 세포는 CD16 전이유전자를 포함하지 않는다.

[0135] 일부 구현예에서, 세포 공급원 내의 NK 세포는 외인성 CD16 단백질을 발현하지 않는다.

[0136] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원은 CD3(+)가 고갈되어 있다. 일부 구현예에서, 본 방법은 NK 세포 공급원에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포 공급원에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 것은 NK 세포 공급원을 CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 OKT3, UCHT1 및 HIT3a, 및 그의 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 OKT3 또는 그의 항원 결합 단편이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 비드(bead), 예를 들어 자기 비드에 부착된다. 일부 구현예에서, 조성물에서 CD3(+) 세포를 고갈시키는 것은 조성물을 비드에 부착된 CD3 표적화 항체 또는 그의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계 및 조성물로부터 비드-결합된 CD3(+) 세포를 제거하는 단계를 포함한다. 조성물은 예를 들어 CliniMACS T 세포 고갈 세트((LS Depletion set (162-01) Miltenyi Biotec)를 사용하여 면역자기 선별(immunomagnetic selection)에 의해 CD3 세포를 고갈시킬 수 있다.

[0137] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원은 예를 들어 CD56 발현에 대한 게이팅(gating)에 의해 CD56+가 농축(enriched)된다.

[0138] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원은 예를 들어 CD56+CD3- 발현을 갖는 세포를 선별함으로써 CD56+가 농축되고 CD3(+)가 고갈된다.

[0139] 일부 구현예에서, NK 세포 공급원은 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체 둘 다를 포함하고, 예를 들어 CD56+CD3- 발현을 갖는 세포를 선별함으로써 + 농축되고 CD3(+)가 고갈된다.

[0140] **B. 피더 세포**

[0141] NK 세포의 확장을 위한 피더 세포가 본원에 개시된다. 이러한 피더 세포는 유리하게는 NK 세포가 본원에 논의된 바와 같은 약제학적 조성물의 제조에 적합한 수로 확장되도록 허용한다. 일부 경우에는, 피더 세포가 CD16 발현의 손실 없이 NK 세포의 확장을 허용하며, 이는 종종 다른 유형의 피더 세포 상에서 또는 다른 방법을 사용하는

세포 확장을 수반한다. 일부 경우에는, 피더 세포가 확장된 NK 세포를 동결에 더 허용적으로 만들어서 동결/해동 주기 후에 더 많은 비율의 NK 세포가 생존 가능한 상태로 유지되도록 하거나 동결 중에 세포가 더 오랜 기간 동안 생존 가능한 상태로 유지되도록 한다. 일부 경우에는, 피더 세포는 NK 세포가 ADCC를 포함하여 높은 수준의 세포독성을 유지하고, 생존 기간을 연장하고, 지속성을 증가시키며, 높은 수준의 CD16을 강화하거나 유지하도록 허용한다. 일부 경우에는, 피더 세포가 상당한 수준의 고갈이나 노화(senescence)를 유발하지 않고 NK 세포가 확장되도록 허용한다.

[0142] 피더 세포는 NK 세포를 자극하고, 예를 들어 기질, 성장 인자 및/또는 사이토카인을 제공함으로써 세포가 보다 빠르게 확장되도록 돕는데 사용될 수 있다.

[0143] NK 세포는, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스에 의해 형질전환된 B-림프모구 세포(예를 들어, EBV-LCL), 골수성 백혈병 세포(예를 들어, K562), 및 CD4(+) T 세포(예를 들어, HuT), 및 이들의 유도체를 포함하지만 이에 국한되지 않는 다양한 유형의 피더 세포를 사용하여 자극될 수 있다.

[0144] 일부 구현예에서, 피더 세포는 예를 들어 γ-조사 또는 미토마이신-c 처리에 의해 불활성화된다.

[0145] 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합한 피더 세포는 예를 들어 US 2020/0108096에 기술되어 있으며, 이는 전체 내용이 본원에 참고로 포함된다.

[0146] 일부 구현예에서, 피더 세포(들)는 불활성화된 CD4(+) T 세포(들)이다. 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포(들)는 HuT-78 세포(ATCC® TIB-161TM) 또는 이의 변이체 또는 유도체이다. 일부 구현예에서, HuT-78 유도체는 H9(ATCC® HTB-176™)이다.

[0147] 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포(들)는 OX40L을 발현한다. 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포(들)는 OX40L(서열번호 4) 또는 이의 변이체를 발현하는 HuT-78 세포 또는 이의 변이체 또는 유도체이다.

[0148] 일부 구현예에서, 피더 세포는 4-1BBL(UniProtKB P41273, 서열번호 1), 막 결합형 IL-21(서열번호 2), 및 돌연변이 TNF알파(서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현하도록 조작된 HuT-78 세포("eHut-78 세포"), 또는 이의 변이체이다.

[0149] 일부 구현예에서, 불활성화된 CD4(+) T 세포(들)는 OX40L의 동원체(ortholog) 또는 이의 변이체를 발현하는 HuT-78(ATCC® TIB-161™) 세포 또는 이의 변이체 또는 유도체이다. 일부 구현예에서, 피더 세포는 4-1BBL 동원체 또는 이의 변이체, 막 결합형 IL-21 동원체 또는 이의 변이체, 및 돌연변이 TNF알파 동원체 또는 이의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현하도록 조작된 HuT-78 세포이다.

[0150] 일부 구현예에서, 피더 세포는 OX40L(서열번호 4)을 발현하고, 4-1BBL(서열번호 1), 막 결합형 IL-21(서열번호 2), 및 돌연변이 TNF알파(서열번호 3)를 발현하도록 조작된 HuT-78 세포(들)("eHut-78 세포") 또는 이의 변이체 또는 유도체이다.

[0151] 일부 구현예에서, 피더 세포는 예를 들어 실시예 2에 기재된 바와 같이 NK 세포와 함께 배양하기 전에 예를 들어 냉동 스톡으로부터 확장된다.

[0152] **C. 자극 인자**

[0153] NK 세포는 또한 피더 세포에 더하여 또는 피더 세포를 대신하여 피더 세포 이외의 하나 이상의 자극 인자, 예를 들어 신호 인자를 사용하여 자극될 수 있다.

[0154] 일부 구현예에서, 자극 인자, 예를 들어 신호 인자는 본원에 기재된 바와 같은 배양 배지의 성분이다. 일부 구현예에서, 자극 인자, 예를 들어 신호 인자는 본원에 기재된 바와 같은 배양 배지에 대한 보충물이다.

[0155] 일부 구현예에서, 자극 인자(들)는 사이토카인(들)이다. 일부 구현예에서, 사이토카인(들)은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, IFN-α, IFNβ, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0156] 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-2이다.

[0157] 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-2 및 IL-15의 조합이다.

[0158] 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-2, IL-15 및 IL-18의 조합이다.

[0159] 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-2, IL-18 및 IL-21의 조합이다.

[0160] **D. 배양**

[0161] NK 세포는 NK 세포 공급원과 피더 세포 및/또는 기타 자극 인자를 공동 배양(co-culture)함으로써 확장되고 자극될 수 있다. 적합한 NK 세포 공급원, 피더 세포 및 자극 인자가 본원에 기재되어 있다.

[0162] 일부 경우에, 생성된 확장된 자연 살해 세포의 집단은 확장 후 농축 및/또는 분류된다. 일부 경우에는, 생성된 확장된 자연 살해 세포의 집단은 확장 후 농축 및/또는 분류되지 않는다.

[0163] 또한, 본원에 기재된 다양한 배양 조성물을 포함하는, 예를 들어 NK 세포를 포함하는 조성물이 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, KIR-B 일배체형 및 CD16 158V 다형성에 대한 동형접합성을 포함하는 확장된 제대혈 유래 자연 살해 세포 집단 및 다수의 조작된 HuT78 세포를 포함하는 조성물.

[0164] 또한, 생성된 확장된 자연 살해 세포의 집단을 포함하는 용기, 예를 들어 바이알, 냉동백(cryobag) 등이 본원에 기술되어 있다. 일부 경우에, 생성된 확장된 자연 살해 세포의 집단의 일부를 포함하는 복수의 용기, 예를 들어 적어도 10개, 예를 들어 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 또는 1200개의 용기.

[0165] 또한, 본원에 기재된 다양한 배양 조성물을 포함하는, 예를 들어 NK 세포를 포함하는 생물반응기(bioreactor)가 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 자연 살해 세포 공급원으로부터의 자연 살해 세포 및 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 피더 세포를 포함하는 배양물. 또한, 생성된 확장된 자연 살해 세포 집단을 포함하는 생물반응기가 본원에 기재되어 있다.

[0166] *1. 배양 배지*

[0167] NK 세포의 증식을 위한 배양 배지가 본원에 개시된다. 이들 배양 배지는 유리하게는 NK 세포가 본원에 논의된 바와 같은 약제학적 조성물의 제조에 적합한 수로 확장되도록 허용한다. 일부 경우에, 배양 배지는 종종 다른 헬퍼 세포 상에서 또는 다른 배지에서 세포 확장을 수반하며 CD16 발현의 손실 없이 NK 세포가 확장되도록 허용한다.

[0168] 일부 구현예에서, 배양 배지는 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 추가 성분이 임의로 보충된 기본 배양 배지이다.

[0169] 일부 구현예에서, 배양 배지, 예를 들어 기본 배양 배지는 무혈청 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 배양 배지, 예를 들어 기본 배양 배지는 인간 혈장 및/또는 혈청이 보충된 무혈청 배양 배지이다.

[0170] 적합한 기본 배양 배지는 DMEM, RPMI 1640, MEM, DMEM/F12, SCGM(CellGenix® 20802-0500 또는 20806-0500), LGM-3™(Lonza, CC-3211), TexMACS™(Miltenyi Biotec, 130-097-196), ALyS™ 505NK-AC(Cell Science and Technology Institute, Inc., 01600P02), ALyS™ 505NK-EX(Cell Science and Technology Institute, Inc., 01400P10), CTS™ AIM-V™ SFM(ThermoFisher Scientific, A3830801), CTS™ OpTmizer™(ThermoFisher Scientific, A1048501, ABS-001, StemXxVivo 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0171] 배양 배지는 성장 인자, 신호 전달 인자, 영양분, 항원 결합제 등과 같은 추가 성분을 포함할 수 있거나, 추가 성분으로 보충될 수 있다. 배양 배지의 보충은 배지가 배양 용기에 첨가되기 전, 동시에 또는 후에 각각의 추가 성분 또는 성분들을 배양 용기에 첨가함으로써 발생할 수 있다. 추가 성분 또는 성분들은 함께 또는 별도로 추가될 수 있다. 별도로 추가할 경우 추가 성분들을 동시에 추가할 필요는 없다.

[0172] 일부 구현예에서, 배양 배지는 혈장, 예를 들어 인간 혈장을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 혈장, 예를 들어 인간 혈장으로 보충된다. 일부 구현예에서, 혈장, 예를 들어 인간 혈장은 항응고제, 예를 들어 시트르산삼나트륨(trisodium citrate)을 포함한다.

[0173] 일부 구현예에서, 배지는 0.5% 또는 약 0.5% 내지 10% 또는 약 10% v/v 혈장, 예를 들어 인간 혈장을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배지는 0.5% 또는 약 0.5% 내지 9% 또는 약 9%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 8% 또는 약 8%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 7% 또는 약 7%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 6% 또는 약 6%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 5% 또는 약 5%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 4% 또는 약 4%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 3% 또는 약 3%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 2% 또는 약 2%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 1% 또는 약 1%, 1% 또는 약 1% 내지 10% 또는 약 10%, 1% 또는 약 1% 내지 9% 또는 약 9%, 1% 또는 약 1% 내지 8% 또는 약 8%, 1% 또는 약 1% 내지 7% 또는 약 7%, 1% 또는 약 1% 내지 6% 또는 약 6%, 1% 또는 약 1% 내지 5% 또는 약 5%, 1% 또는 약 1% 내지 4% 또는 약 4%, 1% 또는 약 1% 내지 3% 또는 약 3%, 1% 또는 약 1% 내지 2% 또는 약 2%, 2% 또는 약 2% 내지 10% 또는 약 10%, 2% 또는 약 2% 내지 9% 또는 약 9%, 2% 또는 약 2% 내지 8% 또는 약 8%, 2% 또는 약 2% 내지 7% 또는 약 7%, 2% 또는 약 2% 내지 6% 또는 약 6%, 2% 또는 약 2% 내지 5% 또는 약 5%, 2% 또는 약 2% 내지 4% 또는

약 4%, 2% 또는 약 2% 내지 3% 또는 약 3%, 3% 또는 약 3% 내지 10% 또는 약 10%, 3% 또는 약 3% 내지 9% 또는 약 9%, 3% 또는 약 3% 내지 8% 또는 약 8%, 3% 또는 약 3% 내지 7% 또는 약 7%, 3% 또는 약 3% 내지 6% 또는 약 6%, 3% 또는 약 3% 내지 5% 또는 약 5%, 3% 또는 약 3% 내지 4% 또는 약 4%, 4% 또는 약 4% 내지 10% 또는 약 10%, 4% 또는 약 4% 내지 9% 또는 약 9%, 4% 또는 약 4% 내지 8% 또는 약 8%, 4% 또는 약 4% 내지 7% 또는 약 7%, 4% 또는 약 4% 내지 6% 또는 약 6%, 4% 또는 약 4% 내지 5% 또는 약 5%, 5% 또는 약 5% 내지 10% 또는 약 10%, 5% 또는 약 5% 내지 9% 또는 약 9%, 4% 또는 약 4% 내지 8% 또는 약 8%, 5% 또는 약 5% 내지 7% 또는 약 7%, 5% 또는 약 5% 내지 6% 또는 약 6%, 6% 또는 약 6% 내지 10% 또는 약 10%, 6% 또는 약 6% 내지 9% 또는 약 9%, 6% 또는 약 6% 내지 8% 또는 약 8%, 6% 또는 약 6% 내지 7% 또는 약 7%, 7% 또는 약 7% 내지 10% 또는 약 10%, 7% 또는 약 7% 내지 9% 또는 약 9%, 7% 또는 약 7% 내지 8% 또는 약 8%, 8% 또는 약 8% 내지 10% 또는 약 10%, 8% 또는 약 8% 내지 9% 또는 약 9%, 또는 9% 또는 약 9% 내지 10% 또는 약 10% v/v 혈장, 예를 들어 인간 혈장으로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.8% 내지 1.2% v/v 인간 혈장을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1.0% v/v 인간 혈장을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 1.0% v/v 인간 혈장을 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0174] 일부 구현예에서, 배양 배지는 혈청, 예를 들어 인간 혈청을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지에는 혈청, 예를 들어 인간 혈청으로 보충된다. 일부 구현예에서, 혈청은 불활성화, 예를 들어 열 불활성화된다. 일부 구현예에서, 혈청은 여과, 예를 들어 멸균 여과된다.

[0175] 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루타민으로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 2.0 또는 약 2.0 내지 6.0 또는 약 6.0 mM 글루타민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 2.0 또는 약 2.0 내지 5.5 또는 약 5.5, 2.0 또는 약 2.0 내지 5.0 또는 약 5.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 4.5 또는 약 4.5, 2.0 또는 약 2.0 내지 4.0 또는 약 4.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 3.5 또는 약 3.5, 2.0 또는 약 2.0 내지 3.0 또는 약 3.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 2.5 또는 약 2.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 6.0 또는 약 6.0, 2.5 또는 약 2.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 5.0 또는 약 5.0, 2.5 또는 약 2.5 내지 4.5 또는 약 4.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 4.0 또는 약 4.0, 2.5 또는 약 2.5 내지 3.5 또는 약 3.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 3.0 또는 약 3.0, 3.0 또는 약 3.0 내지 6.0 또는 약 6.0, 3.0 또는 약 3.0 내지 5.5 또는 약 5.5, 3.0 또는 약 3.0 내지 5.0 또는 약 5.0, 3.0 또는 약 3.0 내지 4.5 또는 약 4.5, 3.0 또는 약 3.0 내지 4.0 또는 약 4.0, 3.0 또는 약 3.0 내지 3.5 또는 약 3.5, 3.5 또는 약 3.5 내지 6.0 또는 약 6.0, 3.5 또는 약 3.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 3.5 또는 약 3.5 내지 5.0 또는 약 5.0, 3.5 또는 약 3.5 내지 4.5 또는 약 4.5, 3.5 또는 약 3.5 내지 4.0 또는 약 4.0, 4.0 또는 약 4.0 내지 6.0 또는 약 6.0, 4.0 또는 약 4.0 내지 5.5 또는 약 5.5, 4.0 또는 약 4.0 내지 5.0 또는 약 5.0, 4.0 또는 약 4.0 내지 4.5 또는 약 4.5, 4.5 또는 약 4.5 내지 6.0 또는 약 6.0, 4.5 또는 약 4.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 4.5 또는 약 4.5 내지 5.0 또는 약 5.0, 5.0 또는 약 5.0 내지 6.0 또는 약 6.0, 5.0 또는 약 5.0 내지 5.5 또는 약 5.5, 또는 5.5 또는 약 5.5 내지 6.0 또는 약 6.0 mM 글루타민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 3.2 mM 글루타민 내지 4.8 mM 글루타민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 4.0 mM 글루타민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 4.0 mM의 글루타민을 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0176] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 사이토카인으로 보충된다.

[0177] 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0178] 일부 구현예에서, 배양 배지는 IL-2를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 150 또는 약 150 내지 2,500 또는 약 2,500 IU/mL IL-2를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 200 또는 약 200 내지 2,250 또는 약 2,250, 200 또는 약 200 내지 2,000 또는 약 2,000, 200 또는 약 200 내지 1,750 또는 약 1,750, 200 또는 약 200 내지 1,500 또는 약 1,500, 200 또는 약 200 내지 1,250 또는 약 1,250, 200 또는 약 200 내지 1,000 또는 약 1,000, 200 또는 약 200 내지 750 또는 약 750, 200 또는 약 200 내지 500 또는 약 500, 200 또는 약 200 내지 250 또는 약 250, 250 또는 약 250 내지 2,500 또는 약 2,500, 250 또는 약 250 내지 2,250 또는 약 2,250, 250 또는 약 250 내지 2,000 또는 약 2,000, 250 또는 약 250 내지 1,750 또는 약 1,750, 250 또는 약 250 내지 1,500 또는 약 1,500, 250 또는 약 250 내지 1,250 또는 약 1,250, 250 또는 약 250 내지 1,000 또는 약 1,000, 250 또는 약 250 내지 750 또는 약 750, 250 또는 약 250 내지 500 또는 약 500, 500 또는 약 500 내지 2,500 또는 약 2,500, 500 또는 약 500 내지 2,250 또는 약 2,250, 500 또는 약 500 내지 2,000 또는 약 2,000, 500 또는 약 500 내지 1,750 또는 약 1,750, 500 또는 약

500 내지 1,500 또는 약 1,500, 500 또는 약 500 내지 1,250 또는 약 1,250, 500 또는 약 500 내지 1,000 또는 약 1,000, 500 또는 약 500 내지 750 또는 약 750, 750 또는 약 750 내지 2,250 또는 약 2,250, 750 또는 약 750 내지 2,000 또는 약 2,000, 750 또는 약 750 내지 1,750 또는 약 1,750, 750 또는 약 750 내지 1,500 또는 약 1,500, 750 또는 약 750 내지 1,250 또는 약 1,250, 750 또는 약 750 내지 1,000 또는 약 1,000, 1,000 또는 약 1,000 내지 2,500 또는 약 2,500, 1,000 또는 약 1,000 내지 2,250 또는 약 2,250, 1,000 또는 약 1,000 내지 2,000 또는 약 2,000, 1,000 또는 약 1,000 내지 1,750 또는 약 1,750, 1,000 또는 약 1,000 내지 1,500 또는 약 1,500, 1,000 또는 약 1,000 내지 1,250 또는 약 1,250, 1,250 또는 약 1,250 내지 2,500 또는 약 2,500, 1,250 또는 약 1,250 내지 2,250 또는 약 2,250, 1,250 또는 약 1,250 내지 2,000 또는 약 2,000, 1,250 또는 약 1,250 내지 1,750 또는 약 1,750, 1,250 또는 약 1,250 내지 1,500 또는 약 1,500, 1,500 또는 약 1,500 내지 2,500 또는 약 2,500, 1,500 또는 약 1,500 내지 2,250 또는 약 2,250, 1,500 또는 약 1,500 내지 2,000 또는 약 2,000, 1,500 또는 약 1,500 내지 1,750 또는 약 1,750, 1,750 또는 약 1,750 내지 2,500 또는 약 2,500, 1,750 또는 약 1,750 내지 2,250 또는 약 2,250, 1,750 또는 약 1,750 내지 2,000 또는 약 2,000, 2,000 또는 약 2,000 내지 2,500 또는 약 2,500, 2,000 또는 약 2,000 내지 2,250 또는 약 2,250, 또는 2,250 또는 약 2,250 내지 2,500 또는 약 2,500 IU/mL IL-2를 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0179] 일부 구현예에서, 배양 배지는 64 μg/L 내지 96 μg/L IL-2를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 80 μg/L IL-2(대략 1,333 IU/mL)를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 80 μg/L를 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0180] 일부 구현예에서, 배양 배지는 IL-2 및 IL-15의 조합을 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0181] 일부 구현예에서, 배양 배지는 IL-2, IL-15 및 IL-18의 조합을 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0182] 일부 구현예에서, 배양 배지는 IL-2, IL-18 및 IL-21의 조합을 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0183] 일부 구현예에서, 배양 배지는 글루코스를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.5 또는 약 0.5 내지 3.5 또는 약 3.5 g/L의 글루코스를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.5 또는 약 0.5 내지 3.0 또는 약 3.0, 0.5 또는 약 0.5 내지 2.5 또는 약 2.5, 0.5 또는 약 0.5 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.5 또는 약 0.5 내지 1.5 또는 약 1.5, 0.5 또는 약 0.5 내지 1.0 또는 약 1.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 3.0 또는 약 3.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 2.5 또는 약 2.5, 1.0 또는 약 1.0 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.5 또는 약 1.5, 1.5 또는 약 1.5 내지 3.0 또는 약 3.0, 1.5 또는 약 1.5 내지 2.5 또는 약 2.5, 1.5 또는 약 1.5 내지 2.0 또는 약 2.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 3.0 또는 약 3.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 2.5 또는 약 2.5, 또는 2.5 또는 약 2.5 내지 3.0 또는 약 3.0 g/L 글루코스를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1.6 내지 2.4 g/L 글루코스를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 2.0 g/L 글루코스를 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 2.0 g/L의 글루코스를 포함한다.

[0184] 일부 구현예에서, 배양 배지는 피루브산나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.1 또는 약 0.1 내지 2.0 또는 약 2.0 mM 피루브산나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.1 또는 약 0.1 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.6 또는 약 0.6, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.4 또는 약 0.4, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.2 또는 약 0.2, 0.2 또는 약 0.2 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.2 또는 약 0.2 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.2 또는 약 0.2 내지 0.6 또는 약 0.6, 0.2 또는 약 0.2 내지 0.4 또는 약 0.4, 0.4 또는 약 0.4 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.4 또는 약 0.4 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.4 또는 약 0.4 내지 0.6 또는 약 0.6, 0.6 또는 약 0.6 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.6 또는 약 0.6 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.8 또는 약 0.8 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.0 또는 약

1.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.8 또는 약 1.8, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.6 또는 약 1.6, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.4 또는 약 1.4, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.2 또는 약 1.2, 1.2 또는 약 1.2 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.2 또는 약 1.2 내지 1.8 또는 약 1.8, 1.2 또는 약 1.2 내지 1.6 또는 약 1.6, 1.2 또는 약 1.2 내지 1.4 또는 약 1.4, 1.4 또는 약 1.4 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.4 또는 약 1.4 내지 1.8 또는 약 1.8, 1.4 또는 약 1.4 내지 1.6 또는 약 1.6, 1.6 또는 약 1.6 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.6 또는 약 1.6 내지 1.8 또는 약 1.8, 또는 1.8 또는 약 1.8 내지 2.0 또는 약 2.0 mM 피루브산나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.8 내지 1.2 mM 피루브산나트륨을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1.0 mM 피루브산나트륨을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 1.0 mM 피루루브산나트륨을 포함한다.

[0185] 일부 구현예에서, 배양 배지는 탄산수소나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.5 또는 약 0.5 내지 3.5 또는 약 3.5 g/L의 탄산수소나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.5 또는 약 0.5 내지 3.0 또는 약 3.0, 0.5 또는 약 0.5 내지 2.5 또는 약 2.5, 0.5 또는 약 0.5 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.5 또는 약 0.5 내지 1.5 또는 약 1.5, 0.5 또는 약 0.5 내지 1.0 또는 약 1.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 3.0 또는 약 3.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 2.5 또는 약 2.5, 1.0 또는 약 1.0 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.5 또는 약 1.5, 1.5 또는 약 1.5 내지 3.0 또는 약 3.0, 1.5 또는 약 1.5 내지 2.5 또는 약 2.5, 1.5 또는 약 1.5 내지 2.0 또는 약 2.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 3.0 또는 약 3.0, 2.0 또는 약 2.0 내지 2.5 또는 약 2.5, 또는 2.5 또는 약 2.5 내지 3.0 또는 약 3.0 g/L 탄산수소나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1.6 내지 2.4 g/L의 탄산수소나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 2.0 g/L 탄산수소나트륨을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 2.0 g/L의 탄산수소나트륨을 포함한다.

[0186] 일부 구현예에서, 배양 배지는 알부민, 예를 들어 인간 알부민, 예를 들어 본원에 기재된 인간 알부민 용액을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.5% 또는 약 0.5% 내지 3.5 또는 약 3.5% v/v의 20% 알부민 용액, 예를 들어 20% 인간 알부민 용액을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.5% 또는 약 0.5% 내지 3.0 또는 약 3.0%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 2.5 또는 약 2.5%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 2.0 또는 약 2.0%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 1.5 또는 약 1.5%, 0.5% 또는 약 0.5% 내지 1.0 또는 약 1.0%, 1.0% 또는 약 1.0% 내지 3.0 또는 약 3.0%, 1.0% 또는 약 1.0% 내지 2.5 또는 약 2.5%, 1.0% 또는 약 1.0% 내지 2.0 또는 약 2.0%, 1.0% 또는 약 1.0% 내지 1.5 또는 약 1.5%, 1.5% 또는 약 1.5% 내지 3.0 또는 약 3.0%, 1.5% 또는 약 1.5% 내지 2.5 또는 약 2.5%, 1.5% 또는 약 1.5% 내지 2.0 또는 약 2.0%, 2.0% 또는 약 2.0% 내지 3.0 또는 약 3.0%, 2.0% 또는 약 2.0% 내지 2.5 또는 약 2.5%, 또는 2.5 또는 약 2.5% 내지 3.0 또는 약 3.0% v/v의 20% 알부민 용액, 예를 들어 20% 인간 알부민 용액을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1.6% 내지 2.4% v/v의 20% 알부민 용액, 예를 들어 20% 인간 알부민 용액을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 2.0% v/v의 20% 알부민 용액, 예를 들어 20% 인간 알부민 용액을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 2.0% v/v의 20% 알부민 용액, 예를 들어 20% 인간 알부민 용액을 포함한다.

[0187] 일부 구현예에서, 배양 배지는 2 또는 약 2 내지 6 또는 약 6 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 2 또는 약 2 내지 5.5 또는 약 5.5, 2 또는 약 2 내지 5.0 또는 약 5.0, 2 또는 약 2 내지 4.5 또는 약 4.5, 2 또는 약 2 내지 4 또는 약 4, 2 또는 약 2 내지 3.5 또는 약 3.5, 2 또는 약 2 내지 3 또는 약 3, 2 또는 약 2 내지 2.5 또는 약 2.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 6 또는 약 6, 2.5 또는 약 2.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 5.0 또는 약 5.0, 2.5 또는 약 2.5 내지 4.5 또는 약 4.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 4.0 또는 약 4.0, 2.5 또는 약 2.5 내지 3.5 또는 약 3.5, 2.5 또는 약 2.5 내지 3.0 또는 약 3.0, 3 또는 약 3 내지 6 또는 약 6, 3 또는 약 3 내지 5.5 또는 약 5.5, 3 또는 약 3 내지 5 또는 약 5, 3 또는 약 3 내지 4.5 또는 약 4.5, 3 또는 약 3 내지 4 또는 약 4, 3 또는 약 3 내지 3.5 또는 약 3.5, 3.5 또는 약 3.5 내지 6 또는 약 6, 3.5 또는 약 3.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 3.5 또는 약 3.5 내지 5 또는 약 5, 3.5 또는 약 3.5 내지 4.5 또는 약 4.5, 3.5 또는 약 3.5 내지 4 또는 약 4, 4 또는 약 4 내지 6 또는 약 6, 4 또는 약 4 내지 5.5 또는 약 5.5, 4 또는 약 4 내지 5 또는 약 5, 4 또는 약 4 내지 4.5 또는 약 4.5, 4.5 또는 약 4.5 내지 6 또는 약 6, 4.5 또는 약 4.5 내지 5.5 또는 약 5.5, 4.5 또는 약 4.5 내지 5 또는 약 5, 5 또는 약 5 내지 6 또는 약 6, 5 또는 약 5 내지 5.5 또는 약 5.5, 또는 5.5 또는 약 5.5 내지 6 또는 약 6 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 3.2 내지 4.8 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 4 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부

구현예에서, 배양 배지는 약 4 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다.

[0188] 일부 구현예에서, 배양 배지는 폴록사머 188로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.1 또는 약 0.1 내지 2.0 또는 약 2.0 g/L 폴록사머 188을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.1 또는 약 0.1 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.1 또는 약 0.1 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.6 또는 약 0.6, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.4 또는 약 0.4, 0.1 또는 약 0.1 내지 0.2 또는 약 0.2, 0.2 또는 약 0.2 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.2 또는 약 0.2 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.2 또는 약 0.2 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.2 또는 약 0.2 내지 0.6 또는 약 0.6, 0.2 또는 약 0.2 내지 0.4 또는 약 0.4, 0.4 또는 약 0.4 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.4 또는 약 0.4 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.4 또는 약 0.4 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.4 또는 약 0.4 내지 0.6 또는 약 0.6, 0.6 또는 약 0.6 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.6 또는 약 0.6 내지 1.0 또는 약 1.0, 0.6 또는 약 0.6 내지 0.8 또는 약 0.8, 0.8 또는 약 0.8 내지 2.0 또는 약 2.0, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.8 또는 약 1.8, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.6 또는 약 1.6, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.4 또는 약 1.4, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.2 또는 약 1.2, 0.8 또는 약 0.8 내지 1.0 또는 약 1.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.8 또는 약 1.8, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.6 또는 약 1.6, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.4 또는 약 1.4, 1.0 또는 약 1.0 내지 1.2 또는 약 1.2, 1.2 또는 약 1.2 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.2 또는 약 1.2 내지 1.8 또는 약 1.8, 1.2 또는 약 1.2 내지 1.6 또는 약 1.6, 1.2 또는 약 1.2 내지 1.4 또는 약 1.4, 1.4 또는 약 1.4 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.4 또는 약 1.4 내지 1.8 또는 약 1.8, 1.4 또는 약 1.4 내지 1.6 또는 약 1.6, 1.6 또는 약 1.6 내지 2.0 또는 약 2.0, 1.6 또는 약 1.6 내지 1.8 또는 약 1.8, 또는 1.8 또는 약 1.8 내지 2.0 또는 약 2.0 g/L 폴록사머 188을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 0.8 내지 1.2 g/L 폴록사머 188을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1.0 g/L 폴록사머 188을 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 1.0 g/L 폴록사머 188을 포함한다.

[0189] 일부 구현예에서, 배양 배지는 하나 이상의 항생제를 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0190] 첫 번째 예시적인 배양 배지는 표 1에 제시되어 있다.

[0191] **표 1. 예시적인 배양 배지 #1**

성분	예시적인 농도 범위	예시적인 농도
CellgroSCGM 액체 배지	희석되지 않음	희석되지 않음
인간 혈장	0.8 – 1.2 % (v/v)	1.0 % v/v
글루타민	3.2 – 4.8 mM	4.0 mM
IL-2	64 - 96 μg/L	80 μg/L

[0192]

[0193] 두 번째 예시적인 배양 배지는 표 2에 제시되어 있다.

[0194] **표 2. 예시적인 배양 배지 #2**

성분	예시적인 농도 범위	예시적인 농도
RPMI1640	7.6 – 13.2 g/L	10.4 g/L
인간 혈장	0.8 – 1.2 % (v/v)	1.0 % v/v
글루코스	1.6 – 2.4 g/L	2.0 g/L
글루타민	3.2 – 4.8 mM	4.0 mM
피루브산나트륨	0.8 – 1.2 mM	1.0 mM
탄산수소나트륨	1.6 – 2.4 g/L	2.0 g/L
IL-2	64 - 96 μg/L	80 μg/L
알부민 20% 용액	1.6 – 2.5 % v/v (3.2 내지 4.8 g/L)	2.0 % v/v (4.0 g/L)
폴록사머 188	0.8 – 1.2 g/L	1.0 g/L

[0195]

[0196] *2. CD3 결합 항체*

[0197] 일부 구현예에서, 배양 배지는 CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 OKT3, UCHT1 및 HIT3a 또는 그의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편은 OKT3 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0198] 일부 구현예에서, CD3 결합 항체 또는 그의 항원 결합 단편 및 피더 세포는 NK 세포 및/또는 배양 배지를 첨가하기 전에 배양 용기에 첨가된다.

[0199] 일부 구현예에서, 배양 배지는 5 또는 약 5 ng/mL 내지 15 또는 약 15 ng/mL OKT3을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 5 또는 약 5 내지 12.5 또는 약 12.5, 5 또는 약 5 내지 10 또는 약 10, 5 또는 약 5 내지 7.5 또는 약 7.5, 7.5 또는 약 7.5 내지 15 또는 약 15, 7.5 또는 약 7.5 내지 12.5 또는 약 12.5, 7.5 또는 약 7.5 내지 10 또는 약 10, 10 또는 약 10 내지 15 또는 약 15, 10 또는 약 10 내지 12.5 또는 약 12.5, 또는 12.5 또는 약 12.5 내지 15 또는 약 15 ng/mL OKT3을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 10 ng/mL OKT3을 포함하고/하거나 이로 보충된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 약 10 ng/mL OKT3을 포함하고/하거나 이로 보충된다.

[0200] *3. 배양 용기*

[0201] 다수의 용기가 본 명세서의 개시내용과 일관성을 유지한다. 일부 구현예에서, 배양 용기는 플라스크, 병, 접시, 다중벽 플레이트, 롤러 병, 백 및 생물반응기로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0202] 일부 구현예에서, 배양 용기는 친수성이 되도록 처리된다. 일부 구현예에서, 배양 용기는 부착 및/또는 증식을 촉진하도록 처리된다. 일부 구현예에서, 배양 용기 표면은 혈청, 콜라겐, 라미닌, 젤라틴, 폴리-L-리신, 피브로넥틴, 세포외 기질 단백질 및 이들의 조합으로 코팅된다.

[0203] 일부 구현예에서, 다양한 배양 단계를 위해 다양한 유형의 배양 용기가 사용된다.

[0204] 일부 구현예에서, 배양 용기는 100 mL 또는 약 100 mL 내지 1,000 L 또는 약 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 배양 용기는 125 mL 또는 약 125 mL, 250 mL 또는 약 250 mL, 500 mL 또는 약 500 mL, 1 L 또는 약 1 L, 5 L 또는 약 5 L, 10 L 또는 약 10 L, 또는 20 L 또는 약 20 L의 부피를 갖는다.

[0205] 일부 구현예에서, 배양 용기는 생물반응기이다.

[0206] 일부 구현예에서, 생물반응기는 록킹 베드(rocking bed)(웨이브 모션) 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 교반형 탱크 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 회전하는 벽 용기이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 관류 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 단리/팽창 자동화 시스템이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 자동화 또는 반자동 생물반응기이다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 일회용 백 생물반응기이다.

[0207] 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 100 mL 내지 약 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 10 L 내지 약 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 100 L 내지 약 900 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 10 L 내지 약 800 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기

는 약 10 L 내지 약 700 L, 약 10 L 내지 약 600 L, 약 10 L 내지 약 500 L, 약 10 L 내지 약 400 L, 약 10 L 내지 약 300 L, 약 10 L 내지 약 200 L, 약 10 L 내지 약 100 L, 약 10 L 내지 약 90 L, 약 10 L 내지 약 80 L, 약 10 L 내지 약 70 L, 약 10 L 내지 약 60 L, 약 10 L 내지 약 50 L, 약 10 L 내지 약 40 L, 약 10 L 내지 약 30 L, 약 10 L 내지 약 20 L, 약 20 L 내지 약 1,000 L, 약 20 L 내지 약 900 L, 약 20 L 내지 약 800 L, 약 20 L 내지 약 700 L, 약 20 L 내지 약 600 L, 약 20 L 내지 약 500 L, 약 20 L 내지 약 400 L, 약 20 L 내지 약 300 L, 약 20 L 내지 약 200 L, 약 20 L 내지 약 100 L, 약 20 L 내지 약 90 L, 약 20 L 내지 약 80 L, 약 20 L 내지 약 70 L, 약 20 L 내지 약 60 L, 약 20 L 내지 약 50 L, 약 20 L 내지 약 40 L, 약 20 L 내지 약 30 L, 약 30 L 내지 약 1,000 L, 약 30 L 내지 약 900 L, 약 30 L 내지 약 800 L, 약 30 L 내지 약 700 L, 약 30 L 내지 약 600 L, 약 30 L 내지 약 500 L, 약 30 L 내지 약 400 L, 약 30 L 내지 약 300 L, 약 30 L 내지 약 200 L, 약 30 L 내지 약 100 L, 약 30 L 내지 약 90 L, 약 30 L 내지 약 80 L, 약 30 L 내지 약 70 L, 약 30 L 내지 약 60 L, 약 30 L 내지 약 50 L, 약 30 L 내지 약 40 L, 약 40 L 내지 약 1,000 L, 약 40 L 내지 약 900 L, 약 40 L 내지 약 800 L, 약 40 L 내지 약 700 L, 약 40 L 내지 약 600 L, 약 40 L 내지 약 500 L, 약 40 L 내지 약 400 L, 약 40 L 내지 약 300 L, 약 40 L 내지 약 200 L, 약 40 L 내지 약 100 L, 약 40 L 내지 약 90 L, 약 40 L 내지 약 80 L, 약 40 L 내지 약 70 L, 약 40 L 내지 약 60 L, 약 40 L 내지 약 50 L, 약 50 L 내지 약 1,000 L, 약 50 L 내지 약 900 L, 약 50 L 내지 약 800 L, 약 50 L 내지 약 700 L, 약 50 L 내지 약 600 L, 약 50 L 내지 약 500 L, 약 50 L 내지 약 400 L, 약 50 L 내지 약 300 L, 약 50 L 내지 약 200 L, 약 50 L 내지 약 100 L, 약 50 L 내지 약 90 L, 약 50 L 내지 약 80 L, 약 50 L 내지 약 70 L, 약 50 L 내지 약 60 L, 약 60 L 내지 약 1,000 L, 약 60 L 내지 약 900 L, 약 60 L 내지 약 800 L, 약 60 L 내지 약 700 L, 약 60 L 내지 약 600 L, 약 60 L 내지 약 500 L, 약 60 L 내지 약 400 L, 약 60 L 내지 약 300 L, 약 60 L 내지 약 200 L, 약 60 L 내지 약 100L, 약 60 L 내지 약 90 L, 약 60 L 내지 약 80 L, 약 60 L 내지 약 70 L, 약 70 L 내지 약 1,000 L, 약 70 L 내지 약 900 L, 약 70 L 내지 약 800 L, 약 70 L 내지 약 700 L, 약 70 L 내지 약 600 L, 약 70 L 내지 약 500 L, 약 70 L 내지 약 400 L, 약 70 L 내지 약 300 L, 약 70 L 내지 약 200 L, 약 70 L 내지 약 100 L, 약 70 L 내지 약 90 L, 약 70 L 내지 약 80 L, 약 80 L 내지 약 1,000 L, 약 80 L 내지 약 900 L, 약 80 L 내지 약 800 L, 약 80 L 내지 약 700 L, 약 80 L 내지 약 600 L, 약 80 L 내지 약 500 L, 약 80 L 내지 약 400 L, 약 80 L 내지 약 300 L, 약 80 L 내지 약 200 L, 약 80 L 내지 약 100 L, 약 80 L 내지 약 90 L, 약 90 L 내지 약 1,000 L, 약 90 L 내지 약 900 L, 약 90 L 내지 약 800 L, 약 90 L 내지 약 700 L, 약 90 L 내지 약 600 L, 약 90 L 내지 약 500 L, 약 90 L 내지 약 400 L, 약 90 L 내지 약 300 L, 약 90 L 내지 약 200 L, 약 90 L 내지 약 100 L, 약 100 L 내지 약 1,000 L, 약 100 L 내지 약 900 L, 약 100 L 내지 약 800 L, 약 100 L 내지 약 700 L, 약 100 L 내지 약 600 L, 약 100 L 내지 약 500 L, 약 100 L 내지 약 400 L, 약 100 L 내지 약 300 L, 약 100 L 내지 약 200 L, 약 200 L 내지 약 1,000 L, 약 200 L 내지 약 900 L, 약 200 L 내지 약 800 L, 약 200 L 내지 약 700 L, 약 200 L 내지 약 600 L, 약 200 L 내지 약 500 L, 약 200 L 내지 약 400 L, 약 200 L 내지 약 300 L, 약 300 L 내지 약 1,000 L, 약 300 L 내지 약 900 L, 약 300 L 내지 약 800 L, 약 300 L 내지 약 700 L, 약 300 L 내지 약 600 L, 약 300 L 내지 약 500 L, 약 300 L 내지 약 400 L, 약 400 L 내지 약 1,000 L, 약 400 L 내지 약 900 L, 약 400 L 내지 약 800 L, 약 400 L 내지 약 700 L, 약 400 L 내지 약 600 L, 약 400 L 내지 약 500 L, 약 500 L 내지 약 1,000 L, 약 500 L 내지 약 900 L, 약 500 L 내지 약 800 L, 약 500 L 내지 약 700 L, 약 500 L 내지 약 600 L, 약 600 L 내지 약 1,000 L, 약 600 L 내지 약 900 L, 약 600 L 내지 약 800 L, 약 600 L 내지 약 700 L, 약 700 L 내지 약 1,000 L, 약 700 L 내지 약 900 L, 약 700 L 내지 약 800 L, 약 800 L 내지 약 1,000 L, 약 800 L 내지 약 900 L, 또는 약 900 L 내지 약 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 약 50 L의 부피를 갖는다.

[0208] 일부 구현예에서, 생물반응기는 100 mL 내지 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 10 L 내지 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 100 L 내지 900 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 10 L 내지 800 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 10 L 내지 700 L, 10 L 내지 600 L, 10 L 내지 500 L, 10 L 내지 400 L, 10 L 내지 300 L, 10 L 내지 200 L, 10 L 내지 100 L, 10 L 내지 90 L, 10 L 내지 80 L, 10 L 내지 70 L, 10 L 내지 60 L, 10 L 내지 50 L, 10 L 내지 40 L, 10 L 내지 30 L, 10 L 내지 20 L, 20 L 내지 1,000 L, 20 L 내지 900 L, 20 L 내지 800 L, 20 L 내지 700 L, 20 L 내지 600 L, 20 L 내지 500 L, 20 L 내지 400 L, 20 L 내지 300 L, 20 L 내지 200 L, 20 L 내지 100 L, 20 L 내지 90 L, 20 L 내지 80 L, 20 L 내지 70 L, 20 L 내지 60 L, 20 L 내지 50 L, 20 L 내지 40 L, 20 L 내지 30 L, 30 L 내지 1,000 L, 30 L 내지 900 L, 30 L 내지 800 L, 30 L 내지 700 L, 30 L 내지 600 L, 30 L 내지 500 L, 30 L 내지 400 L, 30 L 내지 300 L, 30 L 내지 200 L, 30 L 내지 100 L, 30 L 내지 90 L, 30 L 내지 80 L, 30 L 내지 70 L, 30 L 내지 60 L, 30 L 내지 50 L, 30 L 내지 40 L, 40 L 내지 1,000 L, 40 L 내지 900 L, 40 L 내지

800 L, 40 L 내지 700 L, 40 L 내지 600 L, 40 L 내지 500 L, 40 L 내지 400 L, 40 L 내지 300 L, 40 L 내지 200 L, 40 L 내지 100 L, 40 L 내지 90 L, 40 L 내지 80 L, 40 L 내지 70 L, 40 L 내지 60 L, 40 L 내지 50 L, 50 L 내지 1,000 L, 50 L 내지 900 L, 50 L 내지 800 L, 50 L 내지 700 L, 50 L 내지 600 L, 50 L 내지 500 L, 50 L 내지 400 L, 50 L 내지 300 L, 50 L 내지 200 L, 50 L 내지 100 L, 50 L 내지 90 L, 50 L 내지 80 L, 50 L 내지 70 L, 50 L 내지 60 L, 60 L 내지 1,000 L, 60 L 내지 900 L, 60 L 내지 800 L, 60 L 내지 700 L, 60 L 내지 600 L, 60 L 내지 500 L, 60 L 내지 400 L, 60 L 내지 300 L, 60 L 내지 200 L, 60 L 내지 100L, 60 L 내지 90 L, 60 L 내지 80 L, 60 L 내지 70 L, 70 L 내지 1,000 L, 70 L 내지 900 L, 70 L 내지 800 L, 70 L 내지 700 L, 70 L 내지 600 L, 70 L 내지 500 L, 70 L 내지 400 L, 70 L 내지 300 L, 70 L 내지 200 L, 70 L 내지 100 L, 70 L 내지 90 L, 70 L 내지 80 L, 80 L 내지 1,000 L, 80 L 내지 900 L, 80 L 내지 800 L, 80 L 내지 700 L, 80 L 내지 600 L, 80 L 내지 500 L, 80 L 내지 400 L, 80 L 내지 300 L, 80 L 내지 200 L, 80 L 내지 100 L, 80 L 내지 90 L, 90 L 내지 1,000 L, 90 L 내지 900 L, 90 L 내지 800 L, 90 L 내지 700 L, 90 L 내지 600 L, 90 L 내지 500 L, 90 L 내지 400 L, 90 L 내지 300 L, 90 L 내지 200 L, 90 L 내지 100 L, 100 L 내지 1,000 L, 100 L 내지 900 L, 100 L 내지 800 L, 100 L 내지 700 L, 100 L 내지 600 L, 100 L 내지 500 L, 100 L 내지 400 L, 100 L 내지 300 L, 100 L 내지 200 L, 200 L 내지 1,000 L, 200 L 내지 900 L, 200 L 내지 800 L, 200 L 내지 700 L, 200 L 내지 600 L, 200 L 내지 500 L, 200 L 내지 400 L, 200 L 내지 300 L, 300 L 내지 1,000 L, 300 L 내지 900 L, 300 L 내지 800 L, 300 L 내지 700 L, 300 L 내지 600 L, 300 L 내지 500 L, 300 L 내지 400 L, 400 L 내지 1,000 L, 400 L 내지 900 L, 400 L 내지 800 L, 400 L 내지 700 L, 400 L 내지 600 L, 400 L 내지 500 L, 500 L 내지 1,000 L, 500 L 내지 900 L, 500 L 내지 800 L, 500 L 내지 700 L, 500 L 내지 600 L, 600 L 내지 1,000 L, 600 L 내지 900 L, 600 L 내지 800 L, 600 L 내지 700 L, 700 L 내지 1,000 L, 700 L 내지 900 L, 700 L 내지 800 L, 800 L 내지 1,000 L, 800 L 내지 900 L, 또는 900 L 내지 1,000 L의 부피를 갖는다. 일부 구현예에서, 생물반응기는 50 L의 부피를 갖는다.

[0209] ***4. 세포 확장 및 자극***

[0210] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 피더 세포와 공동 배양되어 확장되고 자극된 NK 세포를 생산한다.

[0211] 일부 구현예에서, 공동 배양은 본원에 기술된 배양 배지, 예를 들어 예시적인 배양 배지 #1(표 1) 또는 예시적인 배양 배지 #2(표 2)에서 수행된다.

[0212] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 확장 전 1 x 10^7 또는 약 1 x 10^7 내지 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 확장 전 1 x 10^8 또는 약 1 x 10^8 내지 1.5 x 10^8 또는 약 1.5 x 10^8개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 확장 전 1 x 10^8개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 확장 전 약 1 x 10^8개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 확장 전 1 x 10^9개의 총 유핵 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈은 확장 전 약 1 x 10^9개의 총 유핵 세포를 포함한다.

[0213] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈 및 피더 세포의 공동 배양으로부터의 세포는 예를 들어 본원에 기술된 냉동보존(cryopreservation) 조성물 중에 수확되고 냉동된다. 일부 구현예에서, 공동 배양으로부터 동결된 세포는 인퓨젼-레디(infusion-ready) 의약품(drug product)이다. 일부 구현예에서, 공동 배양으로부터 동결된 세포는 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 하나 이상의 추가적인 공동 배양 단계를 통해 인퓨젼-레디 의약품을 생산하기 위한 마스터 세포 은행(MCB)으로 사용된다. 따라서, 예를 들어, 자연 살해 세포 공급원은 본원에 기술된 바와 같이 확장 및 자극되어 어떠한 중간 생성물도 생성하지 않고 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 확장 및 자극된 NK 세포를 생성할 수 있다. 자연 살해 세포 공급원은 또한 본 명세서에 기술된 바와 같이 확장 및 자극되어 중간 생성물, 예를 들어 제1 마스터 세포 은행(MCB)을 생성할 수 있다. 제1 MCB는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 확장 및 자극된 NK 세포를 생성하는 데 사용될 수 있거나, 대안적으로 또 다른 중간 생성물, 예를 들어 제2 MCB를 생성하는 데 사용될 수 있다. 제2 MCB는 인퓨젼-레디 의약품에 적합한 확장 및 자극된 NK 세포를 생성하는 데 사용될 수 있거나, 대안적으로 또 다른 중간 생성물, 예를 들어 제3 MCB를 생성하는 데 사용될 수 있으며, 이하 같다.

[0214] 일부 구현예에서, 공동 배양에 접종되는 피더 세포 대 자연 살해 세포 공급원의 세포 또는 MCB 세포의 비율은 1:1 또는 약 1:1 내지 4:1 또는 약 4:1이다. 일부 구현예에서, 피더 세포 대 자연 살해 세포 공급원의 세포 또는 MCB 세포의 비율은 1:1 또는 약 1:1 내지 3.5:1 또는 약 3.5:1, 1:1 또는 약 1:1 내지 3:1 또는 약 3:1, 1:1 또는 약 1:1 내지 2.5:1 또는 약 2.5:1, 1:1 또는 약 1:1 내지 2:1 또는 약 2:1, 1:1 또는 약 1:1 내지 1.5:1 또는 약 1.5:1, 1.5:1 또는 약 1.5:1 내지 4:1 또는 약 4:1, 1.5:1 또는 약 1.5:1 내지 3.5:1 또는 약 3.5:1, 1.5:1 또는 약 1.5:1 내지 3:1 또는 약 3:1, 1.5:1 또는 약 1.5:1 내지 2.5:1 또는 약 2.5:1, 1.5:1 또는 약 1.5:1 내지 2:1 또는 약 2:1, 2:1 또는 약 2:1 내지 4:1 또는 약 4:1, 2:1 또는 약 2:1 내지 3.5:1 또는 약 3.5:1, 2:1 또는 약 2:1 내지 3:1 또는 약 3:1, 2:1 또는 약 2:1 내지 2.5:1 또는 약 2.5:1, 2.5:1 또는 약 2.5:1 내지 4:1 또는 약 4:1, 2.5:1 또는 약 2.5:1 내지 3.5:1 또는 약 3.5:1, 2.5:1 또는 약 2.5:1 내지 3:1 또는 약 3:1, 3:1 또는 약 3:1 내지 4:1 또는 약 4:1이다. 일부 구현예에서, 공동 배양에 접종되는 피더 세포 대 자연 살해 세포 공급원 또는 MCB의 세포의 비율은 2.5:1이다. 일부 구현예에서, 공동 배양에 접종되는 피더 세포 대 자연 살해 세포 공급원 또는 MCB의 세포의 비율은 약 2.5:1이다.

[0215] 일부 구현예에서, 공동 배양은 일회용 배양 백, 예를 들어 1 L 일회용 배양 백에서 수행된다. 일부 구현예에서, 공동 배양은 생물반응기, 예를 들어 50 L 생물반응기에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 초기 접종 후 공동 배양에 첨가된다.

[0216] 일부 구현예에서, 공동 배양은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24일 또는 그 이상 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 공동 배양은 최대 16일 동안 수행된다.

[0217] 일부 구현예에서, 공동 배양은 37℃ 또는 약 37℃에서 수행된다.

[0218] 일부 구현예에서, 공동 배양은 pH 7.9 또는 약 pH 7.9에서 수행된다.

[0219] 일부 구현예에서, 공동 배양은 50% 이상의 용존 산소(DO) 수준에서 수행된다.

[0220] 일부 구현예에서, 예시적인 배양 배지 #1(표 1)은 MCB를 생산하는 데 사용되고 예시적인 배양 배지 #2(표 2)는 인퓨젼-레디 의약품에 적합한 세포를 생산하는 데 사용된다.

[0221] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 예를 들어 단일 유닛의 제대혈과 피더 세포의 공동 배양은 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 50 x 10^{12} 또는 약 50 x 10^{12}개의 세포, 예를 들어 MCB 세포 또는 인퓨젼-레디 의약품 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 확장은 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 10 x 10^8 또는 약 10 x 10^8개 내지 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개, 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개, 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개, 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개, 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개, 50 x 10^8 또는 약 50 x 10^8개 내지 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개, 75 x 10^8 또는 약 75 x 10^8개 내지 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개, 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개, 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개 내지 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개, 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개 내지 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개, 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개 내지 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개, 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개 내지 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개, 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개, 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개 내지 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개, 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개 내지 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개, 25 x 10^9 또는 약 25 x 10^9개 내지 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개, 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개, 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 50 x 10^9 또는 약 50 x 10^9개 내지 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개, 50 x 10^9 또는 약

50 x 10^9개 내지 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개, 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개, 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 75 x 10^9 또는 약 75 x 10^9개 내지 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개, 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개, 1 x 10^{10} 또는 약 1 x 10^{10}개 내지 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개, 또는 25 x 10^{10} 또는 약 25 x 10^{10}개 내지 50 x 10^{10} 또는 약 50 x 10^{10}개의 세포, 예를 들어, 예를 들어 MCB 세포 또는 인퓨젼-레디 의약품 세포를 생성한다.

[0222] 일부 구현예에서, 확장은 각각 6억 또는 약 6억 내지 10억 또는 약 10억 개의 세포, 예를 들어 MCB 세포 또는 인퓨젼-레디 의약품 세포를 포함하는 60 또는 약 60개 내지 100 또는 약 100개의 바이알을 생성한다. 일부 구현예에서, 확장은 각각 8억 또는 약 8억 개의 세포, 예를 들어 MCB 세포 또는 인퓨젼-레디 의약품 세포를 포함하거나 이로 구성되는 80개 또는 약 80개의 바이알을 생성한다.

[0223] 일부 구현예에서, 확장은 자연 살해 세포 공급원 내의 세포, 예를 들어 NK 세포의 세포 수에 비해 세포 수, 예를 들어 MCB 세포의 세포 수를 100배 또는 약 100배 내지 500배 또는 약 500배 증가시킨다. 일부 구현예에서, 확장은 자연 살해 세포 공급원 내의 세포, 예를 들어 NK 세포의 세포 수에 비해 세포 수, 예를 들어 MCB 세포의 세포 수를 100배 또는 약 100배 내지 500배 또는 약 500배, 100배 또는 약 100배 내지 400배 또는 약 400배, 100배 또는 약 100배 내지 300배 또는 약 300배, 100배 또는 약 100배 내지 200배 또는 약 200배, 200배 또는 약 200배 내지 450배 또는 약 450배, 200배 또는 약 200배 내지 400배 또는 약 400배, 100배 또는 약 100배 내지 350배 또는 약 350배, 200배 또는 약 200배 내지 300배 또는 약 300배, 200배 또는 약 200배 내지 250배 또는 약 250배, 250배 또는 약 250배 내지 500배 또는 약 500배, 250배 또는 약 250배 내지 450배 또는 약 450배, 200배 또는 약 200배 내지 400배 또는 약 400배, 250배 또는 약 250배 내지 350배 또는 약 350배, 250배 또는 약 250배 내지 300배 또는 약 300배, 300배 또는 약 300배 내지 500배 또는 약 500배, 300배 또는 약 300배 내지 450배 또는 약 450배, 300배 또는 약 300배 내지 400배 또는 약 400배, 300배 또는 약 300배 내지 350배 또는 약 350배, 350배 또는 약 350배 내지 500배 또는 약 500배, 350배 또는 약 350배 내지 450배 또는 약 450배, 또는 350배 또는 약 350배 내지 400배 또는 약 400배 증가시킨다.

[0224] 일부 구현예에서, 확장은 자연 살해 세포 공급원 내의 세포, 예를 들어 NK 세포의 세포 수에 비해 세포 수, 예를 들어 MCB 세포의 세포 수를 100배 또는 약 100배 내지 70,000배 또는 약 70,000배 증가시킨다. 일부 구현예에서, 확장은 자연 살해 세포 공급원 내의 세포, 예를 들어 NK 세포의 세포 수에 비해 세포 수, 예를 들어 MCB 세포의 세포 수를 적어도 10,000배, 예를 들어, 15,000배, 20,000배, 25,000배, 30,000배, 35,000배, 40,000배, 45,000배, 50,000배, 55,000배, 60,000배, 65,000배 또는 70,000배 증가시킨다.

[0225] 일부 구현예에서, MCB 세포와 피더 세포의 공동 배양은 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포, 예를 들어 NK 세포를 5억 또는 약 5억 내지 15억 또는 약 15억 개 생성한다. 일부 구현예에서, MCB 세포와 피더 세포의 공동 배양은 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포, 예를 들어 NK 세포를 5억 또는 약 5억 내지 15억 또는 약 15억, 5억 또는 약 5억 내지 12억5천 또는 약 12억5천, 5억 또는 약 5억 내지 10억 또는 약 10억, 5억 또는 약 5억 내지 7억5천 또는 약 7억5천, 7억5천 또는 약 7억5천 내지 15억 또는 약 15억, 5억 또는 약 5억 내지 12억5천 또는 약 12억5천, 7억5천 또는 약 7억5천 내지 10억 또는 약 10억, 10억 또는 약 10억 내지 15억 또는 약 15억, 10억 또는 약 10억 내지 12억5천 또는 약 12억5천, 또는 12억5천 또는 약 12억5천 내지 15억 또는 약 15억 개 생성한다.

[0226] 일부 구현예에서, MCB 세포와 피더 세포의 공동 배양은 세포, 예를 들어 인퓨젼-레디 의약품 세포의 바이알을 50 또는 약 50 내지 150 또는 약 150개 생산하며, 각각은 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포, 예를 들어, NK 세포를 7억5천 또는 약 7억5천 내지 12억5천 또는 약 12억5천 개씩 포함한다. 일부 구현예에서, MCB 세포와 피더 세포의 공동 배양은 100개 또는 약 100개의 바이알을 생산하며, 각각은 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포, 예를 들어 NK 세포를 10억 또는 약 10억 개씩 포함하거나 또는 이로 구성된다.

[0227] 일부 구현예에서, 확장은 출발 MCB 세포 수에 비해 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포 수, 예를 들어 NK 세포 수를 100배 또는 약 100배 내지 500배 또는 약 500배 증가시킨다. 일부 구현예에서, 확장은 출발 MCB 세포 수에 비해 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포 수, 예를 들어 NK 세포 수를 100배 또는 약 100배 내지 500배 또는 약 500배, 100배 또는 약 100배 내지 400배 또는 약 400배, 100배 또는 약 100배 내지 300배 또는 약 300배, 100배 또는 약 100배 내지 200배 또는 약 200배, 200배 또는 약

200배 내지 450배 또는 약 450배, 200배 또는 약 200배 내지 400배 또는 약 400배, 100배 또는 약 100배 내지 350배 또는 약 350배, 200배 또는 약 200배 내지 300배 또는 약 300배, 200배 또는 약 200배 내지 250배 또는 약 250배, 250배 또는 약 250배 내지 500배 또는 약 500배, 250배 또는 약 250배 내지 450배 또는 약 450배, 200배 또는 약 200배 내지 400배 또는 약 400배, 250배 또는 약 250배 내지 350배 또는 약 350배, 250배 또는 약 250배 내지 300배 또는 약 300배, 300배 또는 약 300배 내지 500배 또는 약 500배, 300배 또는 약 300배 내지 450배 또는 약 450배, 300배 또는 약 300배 내지 400배 또는 약 400배, 300배 또는 약 300배 내지 350배 또는 약 350배, 350배 또는 약 350배 내지 500배 또는 약 500배, 350배 또는 약 350배 내지 450배 또는 약 450배, 350배 또는 약 350배 내지 400배 또는 약 400배 증가시킨다.

[0228] 일부 구현예에서, 확장은 출발 MCB 세포 수에 비해 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포 수, 예를 들어 NK 세포 수를 100배 또는 약 100배 내지 70,000배 또는 약 70,000배 증가시킨다. 일부 구현예에서, 확장은 출발 MCB 세포 수에 비해 MCB 및/또는 인퓨젼-레디 의약품에 사용하기에 적합한 세포 수, 예를 들어 NK 세포 수를 적어도 10,000배, 예를 들어, 15,000배, 20,000배, 25,000배, 30,000배, 35,000배, 40,000배, 45,000배, 50,000배, 55,000배, 60,000배, 65,000배 또는 70,000배 증가시킨다.

[0229] 본원에 기술된 바와 같이 세포가 확장 및 자극 동안 조작되는 구현예에서, 확장 및 자극된 세포 모두가 반드시 성공적으로 조작되는 것은 아니며, 예를 들어 성공적으로 형질도입되는 것은 아니며, 예를 들어 이종 단백질, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR 및/또는 IL-15를 포함하는 이종 단백질을 포함하는 벡터로 성공적으로 형질도입되는 것은 아니다. 따라서, 본원에 기술된 방법은 조작된 세포, 예를 들어 본원에 기술된 조작된 세포를 조작되지 않은 세포로부터 분류하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0230] 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 형질도입된 세포는 조작된 세포의 항원에 특이적인 시약, 예를 들어, 조작된 세포의 항원은 표적으로 하지만 조작되지 않은 세포는 표적으로 삼지 않는 항체를 사용하여, 조작되지 않은 세포, 예를 들어 비-형질도입된 세포로부터 분류된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 항원은 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 CAR의 성분이다.

[0231] 세포의 항원-기반 세포 분리를 위한 시스템은 상업적으로 이용 가능하며, 예를 들어, CliniMACS® 분류 시스템(Miltenyi Biotec)이 있다.

[0232] 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어, 형질도입된 세포는 유세포 분석법(flow cytometry)을 사용하여 조작되지 않은 세포, 예를 들어, 비-형질도입된 세포로부터 분류된다.

[0233] 일부 구현예에서, 분류된 조작된 세포는 MCB로서 사용된다. 일부 구현예에서, 분류된 조작된 세포는 인퓨젼-레디 의약품의 성분으로 사용된다.

[0234] 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 형질도입된 세포는 미세유체 세포 분류 방법을 사용하여, 조작되지 않은 세포, 예를 들어 비-형질도입된 세포로부터 분류된다. 미세유체 세포 분류 방법은 예를 들어 Dalili et al., "A Review of Sorting, Separation and Isolation of Cells and Microbeads for Biomedical Application: Microfluidic Approaches," Analyst 144:87 (2019)에 기재되어 있다.

[0235] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 세포의 1% 또는 약 1% 내지 99% 또는 약 99%가 성공적으로 조작되고, 예를 들어 성공적으로 형질도입되고, 예를 들어 이종 단백질, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR 및/또는 IL-15를 포함하는 이종 단백질을 포함하는 벡터로 성공적으로 형질도입된다. 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 세포의 1% 또는 약 1% 내지 90% 또는 약 90%, 1% 또는 약 1% 내지 80% 또는 약 80%, 1% 또는 약 1% 내지 70% 또는 약 70%, 1% 또는 약 1% 내지 60% 또는 약 60%, 1% 또는 약 1% 내지 50% 또는 약 50%, 1% 또는 약 1% 내지 40% 또는 약 40%, 1% 또는 약 1% 내지 30% 또는 약 30%, 1% 또는 약 1% 내지 20% 또는 약 20%, 1% 또는 약 1% 내지 10% 또는 약 10%, 1% 또는 약 1% 내지 5% 또는 약 5%, 5% 또는 약 5% 내지 99% 또는 약 99%, 5% 또는 약 5% 내지 90% 또는 약 90%, 5% 또는 약 5% 내지 80% 또는 약 80%, 5% 또는 약 5% 내지 70% 또는 약 70%, 5% 또는 약 5% 내지 60% 또는 약 60%, 5% 또는 약 5% 내지 50% 또는 약 50%, 5% 또는 약 5% 내지 40% 또는 약 40%, 5% 또는 약 5% 내지 30% 또는 약 30%, 5% 또는 약 5% 내지 20% 또는 약 20%, 5% 또는 약 5% 내지 10% 또는 약 10%, 10% 또는 약 10% 내지 99% 또는 약 99%, 10% 또는 약 10% 내지 90% 또는 약 90%, 10% 또는 약 10% 내지 80% 또는 약 80%, 10% 또는 약 10% 내지 70% 또는 약 70%, 10% 또는 약 10% 내지 60% 또는 약 60%, 10% 또는 약 10% 내지 50% 또는 약 50%, 10% 또는 약 10% 내지 40% 또는 약 40%, 10% 또는 약 10% 내지 30% 또는 약 30%, 10% 또는 약 10% 내지 20% 또는 약 20%, 20% 또는 약 20% 내지 99% 또는 약 99%, 20% 또는 약 20% 내지 90% 또는 약 90%, 20% 또는 약 20% 내지 80% 또는 약 80%, 20% 또는 약 20% 내지 70% 또는 약 70%, 20% 또는 약 20% 내

지 60% 또는 약 60%, 20% 또는 약 20% 내지 50% 또는 약 50%, 20% 또는 약 20% 내지 40% 또는 약 40%, 20% 또는 약 20% 내지 30% 또는 약 30%, 30% 또는 약 30% 내지 99% 또는 약 99%, 30% 또는 약 30% 내지 90% 또는 약 90%, 30% 또는 약 30% 내지 80% 또는 약 80%, 30% 또는 약 30% 내지 70% 또는 약 70%, 30% 또는 약 30% 내지 60% 또는 약 60%, 30% 또는 약 30% 내지 50% 또는 약 50%, 30% 또는 약 30% 내지 40% 또는 약 40%, 40% 또는 약 40% 내지 99% 또는 약 99%, 40% 또는 약 40% 내지 90% 또는 약 90%, 40% 또는 약 40% 내지 80% 또는 약 80%, 40% 또는 약 40% 내지 70% 또는 약 70%, 40% 또는 약 40% 내지 70% 또는 약 70%, 40% 또는 약 40% 내지 60% 또는 약 60%, 40% 또는 약 40% 내지 50% 또는 약 50%, 50% 또는 약 50% 내지 99% 또는 약 99%, 50% 또는 약 50% 내지 90% 또는 약 90%, 50% 또는 약 50% 내지 80% 또는 약 80%, 50% 또는 약 50% 내지 70% 또는 약 70%, 50% 또는 약 50% 내지 60% 또는 약 60%, 60% 또는 약 60% 내지 99% 또는 약 99%, 60% 또는 약 60% 내지 90% 또는 약 90%, 60% 또는 약 60% 내지 80% 또는 약 80%, 60% 또는 약 60% 내지 70% 또는 약 70%, 70% 또는 약 70% 내지 99% 또는 약 99%, 70% 또는 약 70% 내지 90% 또는 약 90%, 70% 또는 약 70% 내지 80% 또는 약 80%, 80% 또는 약 80% 내지 99% 또는 약 99%, 80% 또는 약 80% 내지 90% 또는 약 90% 또는 90% 또는 약 90% 내지 99% 또는 약 99%가 성공적으로 조작되고, 예를 들어 성공적으로 형질도입되고, 예를 들어 이종 단백질, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 CAR 및/또는 IL-15를 포함하는 이종 단백질을 포함하는 벡터로 성공적으로 형질도입된다.

[0236] 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 MCB의 동결된 세포를 해동하고 배양한다. 일부 구현예에서, 제1 또는 제2 MCB의 동결된 세포의 단일 바이알, 예를 들어 8억 또는 약 8억 개의 세포, 예를 들어 제1 또는 제2 MCB 세포를 포함하는 단일 바이알을 해동하고 배양한다. 일부 구현예에서, 동결된 제1 MCB 세포 또는 제2 MCB 세포는 추가 피더 세포와 함께 배양되어 제2 또는 제3 MCB로서 또는 인퓨젼-레디 의약품으로 사용하기에 적합한 세포를 생산한다. 일부 구현예에서, 제1 MCB 또는 제2 MCB의 공동 배양으로부터의 세포를 수확하고 냉동시킨다.

[0237] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포 공급원, 제1 MCB 또는 제2 MCB의 공동 배양으로부터의 세포를 수확하고, 냉동보존 조성물, 예를 들어 본원에 기술된 냉동보존 조성물 중에 동결시킨다. 일부 구현예에서, 세포는 수확 후 세척된다. 따라서, 본 발명은 활성화되고 자극된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 활성화되고 자극된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 방법에 의해 생산된 수확 및 세척된 활성화되고 자극된 NK 세포, 및 냉동보존 조성물, 예를 들어, 본원에 기술된 냉동보존 조성물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0238] 일부 구현예에서, 세포는 동결 전에 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 냉동보존 조성물과 혼합된다. 일부 구현예에서, 세포는 냉동백에서 동결된다. 일부 구현예에서, 세포는 냉동 바이알에서 동결된다.

[0239] 일부 구현예에서, 방법은 확장되고 자극된 NK 세포 집단으로부터 NK 세포를 분리하는 것을 추가로 포함한다.

[0240] NK 세포를 확장하고 자극하는 예시적인 과정이 도 1에 도시되어 있다.

[0241] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포는 유전자 조작되지 않는다.

[0242] **E. 확장 및 자극된 NK 세포의 특성**

[0243] 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 생체 외에서 확장 및 자극된 후, 확장 및 자극된 NK 세포 집단은 인체에서 자연적으로 발생할 수 없는 수/밀도(예를 들어, 상기 기술된 바와 같음)를 가질 뿐만 아니라, 이들의 표현형 특성(예를 들어, 유전자 발현 및/또는 표면 단백질 발현)도 출발 공급원 물질 또는 기타 자연적으로 발생하는 NK 세포 집단과는 다르다.

[0244] 일부 경우에, 출발 NK 세포 공급원은 단일 개체, 예를 들어 생체 외에서 확장되지 않은 단일 제대혈 유닛으로부터 유래된 샘플이다. 따라서, 일부 경우에, 확장되고 자극된 NK 세포는 공통 계통을 공유하며, 즉, 이들은 모두 출발 NK 세포 공급원의 확장으로 인해 발생하므로 그 자체가 단일 유기체로부터 유래한 세포 집단의 클론 확장을 통해 유전자형을 공유한다. 그러나 이들은 생체 외 확장을 통해 달성된 밀도에서는 자연적으로 발생할 수 없으며 출발 NK 세포 공급원과 표현형 특성도 다르다.

[0245] 일부 경우에, 확장되고 자극된 NK 세포 집단은 적어도 1억 개의 확장된 자연 살해 세포를 포함하며, 예를 들어, 2억, 2억5천만, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 7억5천만, 8억, 9억, 10억, 20억, 30억, 40억, 50억, 60억, 70억, 80억, 90억, 100억, 150억, 200억, 250억, 500억, 750억, 800억, 900억, 1000억, 2000억, 2500억, 3000억, 4000억, 5000억, 6000억, 7000억, 8000억, 9000억, 1조, 2조, 3조, 4조, 5조, 6조, 7조, 8조, 9조 또는 10조 개의 확장된 자연 살해 세포를 포함한다.

[0246] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 80%, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또

는 100% CD56+CD3- 세포를 포함한다.

[0247] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는 유전자 조작되지 않는다.

[0248] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는 CD16 전이유전자를 포함하지 않는다.

[0249] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는 외인성 CD16 단백질을 발현하지 않는다.

[0250] 확장되고 자극된 NK 세포는 예를 들어 표면 발현에 의해, 예를 들어, CD16, CD56, CD3, CD38, CD14, CD19, NKG2D, NKp46, NKp30, DNAM-1 및 NKp44 중 하나 이상의 표면 발현에 의해 특성화될 수 있다.

[0251] 본원에 언급된 표면 단백질 발현 수준은 일부 경우에 참조된 특정 표면 단백질에 대한 양성 선별 없이 달성된다. 예를 들어, 일부 경우에, NK 세포 공급원, 예를 들어 단일 제대혈 유닛은 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체를 둘 다 포함하고, 예를 들어, CD56+CD3-발현에 대해 게이팅함으로써 또는 면역친화성 자기 비드(예를 들어, CliniMACS Prodigy® 시스템)를 포함한 자기 비드를 사용함으로써 +가 농축되고 CD3(+)는 고갈되지만, 확장 및 자극 중에 다른 표면 단백질 발현 선별은 수행되지 않는다.

[0252] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKG2D+ 세포를 포함한다.

[0253] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp46+ 세포를 포함한다.

[0254] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp30+ 세포를 포함한다.

[0255] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% DNAM-1+ 세포를 포함한다.

[0256] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp44+ 세포를 포함한다.

[0257] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 적어도 60%, 예를 들어 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% CD94+ (KLRD1) 세포를 포함한다.

[0258] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD3+ 세포를 포함한다.

[0259] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD14+ 세포를 포함한다.

[0260] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD19+ 세포를 포함한다.

[0261] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CXCR+ 세포를 포함한다.

[0262] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 20% 이하, 예를 들어 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD122+ (IL2RB) 세포를 포함한다.

[0263] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 놀랍게도 본원에 기술된 방법에 의해 확장되고 자극된 NK 세포가 확장 및 자극 과정 전반에 걸쳐 높은 수준으로 CD16을 발현하여 높은 CD16 발현을 갖는 세포 집단을 생성한다는 것을 입증하였다. CD16의 높은 발현은 확장된 세포가 ADCC를 개시하는 데 중요한 CD16을 발현하도록 조작하는 필요성을 제거하며, 따라서 이는 본원에 기술된 확장 및 자극 방법의 놀랍고 예상치 못한 이점이다. 따라서, 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 50% 이상, 예를 들어 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% CD16+ NK 세포를 포함한다.

[0264] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체를 둘 다 포함하고, 50% 이상, 예를 들어 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% CD16+ NK 세포를 포함한다.

[0265] 일부 구현예에서, CD16을 발현하는 확장되고 자극된 NK 세포의 비율, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포의 비율은 제대혈로부터 유래한 시드 세포 내 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0266] 일부 구현예에서, NKG2D를 발현하는 확장되고 자극된 NK 세포의 비율, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포의 비율은 제대혈로부터 유래한 시드 세포 내 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0267] 일부 구현예에서, NKp30을 발현하는 확장되고 자극된 NK 세포의 비율, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포의 비율은 제대혈로부터 유래한 시드 세포 내 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0268] 일부 구현예에서, DNAM-1을 발현하는 확장되고 자극된 NK 세포의 비율, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포의 비율은 제대혈로부터 유래한 시드 세포 내 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0269] 일부 구현예에서, NKp44를 발현하는 확장되고 자극된 NK 세포의 비율, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포의 비율은 제대혈로부터 유래한 시드 세포 내 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0270] 일부 구현예에서, NKp46을 발현하는 확장되고 자극된 NK 세포의 비율, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포의 비율은 제대혈로부터 유래한 시드 세포 내 자연 살해 세포의 비율과 동일하거나 더 높다.

[0271] 본원에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 또한 놀랍게도 본원에 기술된 방법에 의해 확장되고 자극된 NK 세포가 CD38을 낮은 수준으로 발현한다는 것을 입증하였다. CD38은 특정 암 치료법(예를 들어, 다발성 골수종 및 급성 골수성 백혈병)에 효과적인 표적이다. *예를 들어,* Jiao et al., "CD38: Targeted Therapy in Multiple Myeloma and Therapeutic Potential for Solid Cancerrs," *Expert Opinion on Investigational Drugs* 29(11):1295-1308 (2020) *참조하라*. 그러나, 항-CD38 항체를 NK 세포와 함께 투여할 경우, NK 세포가 천연적으로 CD38을 발현하기 때문에 동족살해(fratricide)가 증가할 위험이 있다. 그러나 본원에 기술된 방법에 의해 확장되고 자극된 NK 세포는 낮은 수준의 CD38을 발현하므로 예상되는 동족살해를 극복한다. 다른 그룹에서는 CD38 발현을 감소시키기 위해 게놈 편집과 같은 조작 방법에 의존하였지만(*예를 들어,* Gurney et al., "CD38 Knockout Natural Killer Cells Expressing an Affinity Optimized CD38 Chimeric Antigen Receptor Successfully Target Acute Myeloid Leukemia with Reduced Effector Cell Fratricide," *Haematologica* doi:10.3324/haematol.2020.271908 (2020) *참조하라*), 본원에 기술된 방법에 의해 확장되고 자극된 NK 세포는 유전자 조작의 필요 없이 낮은 수준의 CD38을 발현하며, 이는 예를 들어 CD38 항체와 조합하여 본원에 기술된 바와 같이 확장되고 자극된 NK 세포를 사용하여 예를 들어 CD38+ 암을 치료하는 데 놀랍고 예상치 못한 이점을 제공한다.

[0272] 따라서, 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 80% 이하의 CD38+ 세포, 예를 들어 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% 또는 20% 이하의 CD38+ 세포를 포함한다.

[0273] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체를 둘 다 포함하고, 80% 이하의 CD38+ 세포, 예를 들어 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% 또는 20% 이하의 CD38+ 세포를 포함한다.

[0274] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체를 둘 다 포함하고, 80% 이하의 CD38+ 세포, 예를 들어 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% 또는 20% 이하의 CD38+ 세포를 포함하고, 50% 이상, 예를 들어, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% CD16+ NK 세포를 포함한다.

[0275] 일부 구현예에서, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 단일 제대혈 유닛의 확장 및 자극으로부터 확장되고 자극된 NK 세포는 KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자 및 CD16의 158 V/V 변이체를 둘 다 포함하고, 다음을 포함한다: i) 50% 이상, 예를 들어, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% CD16+ NK 세포; 및/또는 ii) 80% 이하의 CD38+ 세포, 예를 들어, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 또는 20% 이하의 CD38+ 세포; 및/또는 iii) 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKG2D+ 세포; 및/또는 iv) 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp46+ 세포; 및/또는 v) 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp30+ 세포; 및/또는 vi) 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% DNAM-1+ 세포; 및/또는 vii) 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% NKp44+ 세포; 및/또는 viii) 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% CD94+ (KLRD1) 세포; 및/또는 ix) 20% 이하, 예를 들어, 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD3+ 세포; 및/또는 x) 20% 이하, 예를 들어, 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD14+ 세포; 및/또는 xi) 20% 이하, 예를 들어, 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD19+ 세포; 및/또는 xii) 20% 이하, 예를 들어, 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CXCR+ 세포; 및/또는 xiii) 20% 이하, 예를 들어, 10% 이하, 5% 이하, 1% 이하 또는 0% CD122+ (IL2RB) 세포.

[0276] 일부 구현예에서, 피더 세포는 확장되고 자극된 NK 세포에서 지속되지 않지만, 피더 세포의 잔류 시그니처(signature)는 예를 들어 잔류 세포의 존재에 의해(예를 들어, 특정 표면 단백질을 발현하는 세포를 검출함으로써) 또는 피더 세포에 의해 발현되는 잔류 핵산 및/또는 단백질에 의해 검출될 수 있다.

[0277] 예를 들어, 일부 경우에, 본 명세서에 기술된 방법은 조작된 피더 세포, 예를 들어, 자연 살해 세포를 포함한 자연 살해 세포 공급원 내의 세포에 의해 발현되지 않는 서열을 발현하도록 조작된 위에서 기술한 eHuT-78 피더 세포를 사용하여 자연 살해 세포를 확장하고 자극하는 것을 포함한다. 예를 들어, 조작된 피더 세포는 4-1BBL(UniProtKB P41273, 서열번호 1), 막 결합형 IL-21(서열번호 2), 및 돌연변이 TNF알파(서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현하도록 조작될 수 있거나("eHut-78 세포"), 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0278] 이러한 피더 세포는 확장되고 자극된 NK 세포에서 지속되지 않을 수 있지만, 확장되고 자극된 NK 세포는 피더 세포로부터의 검출 가능한 잔류량의 세포, 단백질 및/또는 핵산을 보유할 수 있다. 따라서, 확장되고 자극된 NK 세포에서 이들의 잔류 존재는 예를 들어 세포 자체(예를 들어, 유세포 분석법을 통해), 이들이 발현하는 단백질 및/또는 이들이 발현하는 핵산을 검출함으로써 검출될 수 있다.

[0279] 따라서, 잔류 피더 세포(살아 있는 세포 또는 죽은 세포) 또는 잔류 피더 세포 세포 불순물(예를 들어, 잔류 피더 세포 단백질 또는 그의 일부, 및/또는 유전 물질 예컨대 핵산 또는 그의 일부)을 포함하는 확장되고 자극된 NK 세포 집단이 또한 본원에 기술되어 있다. 일부 경우에, 확장되고 자극된 NK 세포는 0% 초과 및 0.3% 이하의 잔류 피더 세포, 예를 들어 eHuT-78 피더 세포를 포함한다.

[0280] 일부 경우에, 확장되고 자극된 NK 세포는 예를 들어, 잔류 4-1BBL (UniProtKB P41273, 서열번호 1), 막-결합형 IL-21 (서열번호 2), 및/또는 돌연변이 TNF알파(서열번호 3) 또는 이들의 일부(들)를 암호화하는 잔류 피더 세포 핵산을 포함한다. 일부 경우에, 막-결합형 IL-21은 CD8 막관통 도메인을 포함한다.

[0281] 일부 경우에, 확장되고 자극된 NK 세포는, 예를 들어, 샘플에서 피더 세포 특이적인 단백질 또는 핵산 서열(즉, 자연 살해 세포에 의해 발현되지 않는 단백질 또는 핵산 서열)의 상대적인 비율로 측정했을 때, 0% 초과 및

0.2% 이하의 잔류 피더 세포 %를 포함한다. 예를 들어, qPCR에 의해, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이.

[0282] 일부 구현예에서, 잔류 피더 세포는 CD4(+) T 세포이다. 일부 구현예에서, 잔류 피더 세포는 조작된 CD4(+) T 세포이다. 일부 구현예에서, 잔류 피더 세포는 4-1BBL(UniProtKB P41273, 서열번호 1), 막-결합형 IL-21(서열번호 2) 및 돌연변이 TNF알파(서열번호 3)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 유전자를 발현하도록 조작된 것("eHut-78 세포"), 또는 이의 변이체이다. 따라서, 일부 경우에, 피더 세포 특이적인 단백질은 4-1BBL(UniProtKB P41273, 서열번호 1), 막-결합형 IL-21(서열번호 2) 및/또는 돌연변이 TNFα(서열번호 3)이다. 따라서, 피더 세포 특이적인 핵산은 4-1BBL(UniProtKB P41273, 서열번호 1), 막-결합형 IL-21(서열번호 2) 및/또는 돌연변이 TNF알파(서열번호 3), 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산이다. 일부 경우에, 막-결합형 IL-21은 CD8 막관통 도메인을 포함한다.

[0283] 생물학적 샘플에서 핵산 또는 단백질 유전자 산물의 존재를 분석하고 검출하기 위해 매우 다양한 여러 가지 방법을 사용할 수 있다. 본원에서 사용된 "검출"은 화합물 및/또는 물질(예를 들어, 세포, 단백질 및/또는 핵산)의 실존 또는 존재를 발견, 결정 또는 확인하는 데 사용되는 방법을 지칭할 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 방법은 단백질을 검출하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 검출은 화학발광 또는 형광 기술을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 검출은 항체가 전체 단백질 또는 단백질의 특정 에피토프와 특이적으로 반응하는 데 사용되는 면역학적 기반 방법(예를 들어, 정량적 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA), 웨스턴 블롯팅 또는 도트 블롯팅)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 검출은 단백질의 면역침강을 포함할 수 있다(Jungblut et al., *J Biotechnol*.31;41(2-3):111-20 (1995); Franco et al., *Eur J Morphol*. 39(1):3-25 (2001)). 일부 구현예에서, 검출 방법은 핵산(예를 들어, DNA 및/또는 RNA)을 검출하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 검출은 노던 블롯 분석, 뉴클레아제 보호 분석(NPA), 인 시추(in situ) 혼성화 또는 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)을 포함할 수 있다(Raj et al., *Nat. Methods* 5, 877-879 (2008); Jin et al., *J Clin Lab Anal*. 11(1):2-9 (1997); Ahmed, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 20(2):77-116 (2002)).

[0284] 따라서, 본원에서는 또한 조작된 피더 세포, 예를 들어 본원에 기술된 eHuT-78 피더 세포와 공동 배양된, 확장되고 자극된 NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 방법을 사용하여 확장되고 자극된 NK 세포의 집단을 검출하는 방법을 기술한다.

[0285] **II. 냉동보존**

[0286] **A. 냉동보존 조성물**

[0287] 본 발명은 냉동보존 조성물, 예를 들어 정맥내 투여, 예를 들어 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포의 정맥내 투여에 적합한 냉동보존 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 냉동보존 조성물 및 세포, 예를 들어 본원에 기재된 NK 세포를 포함한다.

[0288] ***1. 알부민***

[0289] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 알부민 단백질, 예를 들어, 인간 알부민 단백질(UniProtKB Accession P0278, 서열번호 5) 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 알부민 단백질, 예를 들어, 인간 알부민 단백질의 동원체, 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 알부민 단백질, 예를 들어, 인간 알부민의 생물학적 활성 부분, 또는 이의 변이체를 포함한다.

[0290] 일부 구현예에서, 알부민, 예를 들어, 인간 알부민은 용액으로서 제공되며, 이는 또한 본원에서 알부민 용액 또는 인간 알부민 용액으로 지칭된다. 따라서, 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 알부민 용액, 예를 들어 인간 알부민 용액이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 무혈청 알부민 용액이다.

[0291] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 정맥내 사용에 적합하다.

[0292] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 40 또는 약 40 내지 200 또는 약 200 g/L의 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 40 또는 약 40 내지 50 또는 약 50 g/L의 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 약 200 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 200 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다.

[0293] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 95% 이상이 알부민 단백질, 예를 들어, 인간 알부민 단백질인 단백질 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질의 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 이상이 알부민, 예를 들어, 인간 알부민

이다.

[0294] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 나트륨을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 100 또는 약 100 내지 200 또는 약 200 mmol 나트륨을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 130 또는 약 130 내지 160 또는 약 160 mmol 나트륨을 포함한다.

[0295] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 칼륨을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 3 mmol 이하의 칼륨을 포함한다. 일부 구현예에서, 알부민 용액은 2 mmol 이하의 칼륨을 추가로 포함한다.

[0296] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 하나 이상의 안정화제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 안정화제(들)는 카프릴산나트륨, 카프릴산, (2*S*)-2-아세트아미도-3-(1*H*-인돌-3-일)프로판산(또한 다음과 같이 지칭됨: 아세틸 트립토판, N-아세틸-L-트립토판 및 아세틸-L-트립토판), 2-아세트아미도-3-(1*H*-인돌-3-일)프로판산(또한 다음과 같이 지칭됨: N-아세틸트립토판, DL-아세틸트립토판 및 N-아세틸-DL-트립토판)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 용액은 용액 내 단백질 g 당 하나 이상의 안정화제를 각각 0.1 mmol 미만으로 포함한다. 일부 구현예에서, 용액은 용액 내 단백질 g 당 안정화제를 각각 0.05 또는 약 0.05 내지 0.1 또는 약 0.1, 예를 들어 0.064 또는 약 0.064 내지 0.096 또는 약 0.096 mmol로 포함한다. 일부 구현예에서, 용액은 용액 내 단백질 g 당 0.1 mmol 미만의 총 안정화제를 포함한다. 일부 구현예에서, 용액은 용액 내 단백질 g 당 0.05 또는 약 0.05 내지 0.1 또는 약 0.1, 예를 들어 0.064 또는 약 0.064 내지 0.096 또는 약 0.096 mmol의 총 안정화제를 포함한다.

[0297] 일부 구현예에서, 알부민 용액은 물 중의, 95% 이상이 알부민 단백질인 단백질 조성물, 나트륨, 칼륨, 및 카프릴산나트륨, 카프릴산, (2*S*)-2-아세트아미도-3-(1*H*-인돌-3-일)프로판산(또한 다음과 같이 지칭됨: 아세틸 트립토판, N-아세틸-L-트립토판 및 아세틸-L-트립토판), 2-아세트아미도-3-(1*H*-인돌-3-일)프로판산(또한 다음과 같이 지칭됨: N-아세틸트립토판, DL-아세틸트립토판 및 N-아세틸-DL-트립토판)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 안정화제로 구성된다.

[0298] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10% 또는 약 10% v/v 내지 50% 또는 약 50% v/v의 알부민 용액, 예를 들어 본원에 기술된 알부민 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10% 또는 약 10% 내지 50% 또는 약 50%, 10% 또는 약 10% 내지 45% 또는 약 45%, 10% 또는 약 10% 내지 40% 또는 약 40%, 10% 또는 약 10% 내지 35% 또는 약 35%, 10% 또는 약 10% 내지 30% 또는 약 30%, 10% 또는 약 10% 내지 25% 또는 약 25%, 10% 또는 약 10% 내지 20% 또는 약 20%, 10% 또는 약 10% 내지 15 또는 약 15%, 15% 또는 약 15% 내지 50% 또는 약 50%, 15% 또는 약 15% 내지 45% 또는 약 45%, 15% 또는 약 15% 내지 40% 또는 약 40%, 15% 또는 약 15% 내지 35% 또는 약 35%, 15% 또는 약 15% 내지 30% 또는 약 30%, 15% 또는 약 15% 내지 25% 또는 약 25%, 15% 또는 약 15% 내지 20% 또는 약 20%, 20% 또는 약 20% 내지 50% 또는 약 50%, 20% 또는 약 20% 내지 45% 또는 약 45%, 20% 또는 약 20% 내지 40% 또는 약 40%, 20% 또는 약 20% 내지 35% 또는 약 35%, 20% 또는 약 20% 내지 30% 또는 약 30%, 20% 또는 약 20% 내지 25% 또는 약 25%, 25% 또는 약 25% 내지 50% 또는 약 50%, 25% 또는 약 25% 내지 45% 또는 약 45%, 25% 또는 약 25% 내지 40% 또는 약 40%, 25% 또는 약 25% 내지 35% 또는 약 35%, 25% 또는 약 25% 내지 30% 또는 약 30%, 30% 또는 약 30% 내지 50% 또는 약 50%, 30% 또는 약 30% 내지 45% 또는 약 45%, 30% 또는 약 30% 내지 40% 또는 약 40%, 30% 또는 약 30% 내지 35% 또는 약 35%, 35% 또는 약 35% 내지 50% 또는 약 50%, 35% 또는 약 35% 내지 45% 또는 약 45%, 35% 또는 약 35% 내지 40% 또는 약 40%, 40% 또는 약 40% 내지 50% 또는 약 50%, 40% 또는 약 40% 내지 45% 또는 약 45%, 또는 45% 또는 약 45% 내지 50% 또는 약 50% v/v의 본원에 기술된 알부민 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45% 또는 약 50% v/v의 본원에 기술된 알부민 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% v/v의 본원에 기술된 알부민 용액을 포함한다.

[0299] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 20 또는 약 20 내지 100 또는 약 100 g/L의 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 20 또는 약 20 내지 100 또는 약 100, 20 또는 약 20 내지 90 또는 약 90, 20 또는 약 20 내지 80 또는 약 80, 20 또는 약 20 내지 70 또는 약 70, 20 또는 약 20 내지 60 또는 약 60, 20 또는 약 20 내지 50 또는 약 50, 20 또는 약 20 내지 40 또는 약 40, 20 또는 약 20 내지 30 또는 약 30, 30 또는 약 30 내지 100 또는 약 100, 30 또는 약 30 내지 90 또는 약 90, 30 또는 약 30 내지 80 또는 약 80, 30 또는 약 30 내지 70 또는 약 70, 30 또는 약 30 내지 60 또는 약 60, 30 또는 약 30 내지 50 또는 약 50, 30 또는 약 30 내지 40 또는 약 40, 40 또는 약 40 내지 100 또는 약 100, 40 또는 약 40 내지 90 또는 약 90, 40 또는 약 40 내지 80 또는 약 80, 40 또는 약 40 내지 70 또는 약 70, 40 또는 약 40 내지

60 또는 약 60, 40 또는 약 40 내지 50 또는 약 50, 50 또는 약 50 내지 100 또는 약 100, 50 또는 약 50 내지 90 또는 약 90, 50 또는 약 50 내지 80 또는 약 80, 50 또는 약 50 내지 70 또는 약 70, 50 또는 약 50 내지 60 또는 약 60, 60 또는 약 60 내지 100 또는 약 100, 60 또는 약 60 내지 90 또는 약 90, 60 또는 약 60 내지 80 또는 약 80, 60 또는 약 60 내지 70 또는 약 70, 70 또는 약 70 내지 100 또는 약 100, 70 또는 약 70 내지 90 또는 약 90, 70 또는 약 70 내지 80 또는 약 80, 80 또는 약 80 내지 100 또는 약 100, 80 또는 약 80 내지 90 또는 약 90, 또는 90 또는 약 90 내지 100 또는 약 100 g/L의 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다.

[0300] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 20 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 40 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 70 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 100 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다.

[0301] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 20 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 40 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 70 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 100 g/L 알부민, 예를 들어 인간 알부민을 포함한다.

[0302] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 안정화제, 예를 들어 알부민 안정화제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 안정화제(들)는 카프릴산나트륨, 카프릴산, (2*S*)-2-아세트아미도-3-(1*H*-인돌-3-일)프로판산(또한 다음과 같이 지칭됨: 아세틸 트립토판, N-아세틸-L-트립토판 및 아세틸-L-트립토판), 2-아세트아미도-3-(1*H*-인돌-3-일)프로판산(또한 다음과 같이 지칭됨: N-아세틸트립토판, DL-아세틸트립토판 및 N-아세틸-DL-트립토판으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 조성물 내 단백질 g 당, 예를 들어 알부민 단백질 g 당 하나 이상의 안정화제를 각각 0.1 mmol 미만으로 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 조성물 내 단백질 g 당, 예를 들어 알부민 단백질 g 당 안정화제를 각각 0.05 또는 약 0.05 내지 0.1 또는 약 0.1, 예를 들어 0.064 또는 약 0.064 내지 0.096 또는 약 0.096 mmol로 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 냉동보존 조성물 내 단백질 g 당, 예를 들어 알부민 단백질 g 당 0.1 mmol 미만의 총 안정화제를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 냉동보존 조성물 내 단백질 g 당, 예를 들어 알부민 단백질 g 당 0.05 또는 약 0.05 내지 0.1 또는 약 0.1, 예를 들어 0.064 또는 약 0.064 내지 0.096 또는 약 0.096 mmol의 총 안정화제를 포함한다.

[0303] ***2. 덱스트란***

[0304] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 덱스트란 또는 이의 유도체를 포함한다.

[0305] 덱스트란은 대략 95%의 α-D-(1-6) 연결로 구성된 무수글루코스(anhydroglucose) 중합체($(C_6H_{10}O_5)_n$으로 명명됨)이다. 덱스트란 분획은 약 1,000 달톤 내지 약 2,000,000 달톤의 분자량으로 공급된다. 이들은 번호(덱스트란 X)로 명명되며, 예를 들어, 덱스트란 1, 덱스트란 10, 덱스트란 40, 덱스트란 70 등이고, 여기서 X는 평균 분자량을 1,000 달톤으로 나눈 값에 해당한다. 따라서, 예를 들어, 덱스트란 40은 평균 분자량이 40,000 달톤 또는 약 40,000 달톤이다.

[0306] 일부 구현예에서, 덱스트란의 평균 분자량은 1,000 달톤 또는 약 1,000 달톤 내지 2,000,000 달톤 또는 약 2,000,000 달톤이다. 일부 구현예에서, 덱스트란의 평균 분자량은 40,000 달톤 또는 약 40,000 달톤이다. 일부 구현예에서, 덱스트란의 평균 분자량은 70,000 달톤 또는 약 70,000 달톤이다.

[0307] 일부 구현예에서, 덱스트란은 덱스트란 40, 덱스트란 70, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 덱스트란은 덱스트란 40이다.

[0308] 일부 구현예에서, 덱스트란, 예를 들어, 덱스트란 40은 용액으로 제공되며, 이는 본원에서 덱스트란 용액 또는 덱스트란 40 용액으로도 지칭된다. 따라서, 일부 구현예에서, 조성물은 덱스트란 용액, 예를 들어 덱스트란 40 용액을 포함한다.

[0309] 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 정맥내 사용에 적합하다.

[0310] 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 약 5% 내지 약 50% w/w의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 5% 또는 약 5% 내지 50% 또는 약 50%, 5% 또는 약 5% 내지 45% 또는 약 45%, 5% 또는 약 5% 내지 40% 또는 약 40%, 5% 또는 약 5% 내지 35% 또는 약 35%, 5% 또는 약 5% 내지 30% 또는 약 30%, 5% 또는 약 5% 내지 25% 또는 약 25%, 5% 또는 약 5% 내지 20% 또는 약 20%, 5% 또는 약 5% 내지 15 또는

약 15%, 5% 또는 약 5% 내지 10% 또는 약 10%, 10% 또는 약 10% 내지 50% 또는 약 50%, 10% 또는 약 10% 내지 45% 또는 약 45%, 10% 또는 약 10% 내지 40% 또는 약 40%, 10% 또는 약 10% 내지 35% 또는 약 35%, 10% 또는 약 10% 내지 30% 또는 약 30%, 10% 또는 약 10% 내지 25% 또는 약 25%, 10% 또는 약 10% 내지 20% 또는 약 20%, 10% 또는 약 10% 내지 15 또는 약 15%, 15% 또는 약 15% 내지 50% 또는 약 50%, 15% 또는 약 15% 내지 45% 또는 약 45%, 15% 또는 약 15% 내지 40% 또는 약 40%, 15% 또는 약 15% 내지 35% 또는 약 35%, 15% 또는 약 15% 내지 30% 또는 약 30%, 15% 또는 약 15% 내지 25% 또는 약 25%, 15% 또는 약 15% 내지 20% 또는 약 20%, 20% 또는 약 20% 내지 50% 또는 약 50%, 20% 또는 약 20% 내지 45% 또는 약 45%, 20% 또는 약 20% 내지 40% 또는 약 40%, 20% 또는 약 20% 내지 35% 또는 약 35%, 20% 또는 약 20% 내지 30% 또는 약 30%, 20% 또는 약 20% 내지 25% 또는 약 25%, 25% 또는 약 25% 내지 50% 또는 약 50%, 25% 또는 약 25% 내지 45% 또는 약 45%, 25% 또는 약 25% 내지 40% 또는 약 40%, 25% 또는 약 25% 내지 35% 또는 약 35%, 25% 또는 약 25% 내지 30% 또는 약 30%, 30% 또는 약 30% 내지 50% 또는 약 50%, 30% 또는 약 30% 내지 45% 또는 약 45%, 30% 또는 약 30% 내지 40% 또는 약 40%, 30% 또는 약 30% 내지 35% 또는 약 35%, 35% 또는 약 35% 내지 50% 또는 약 50%, 35% 또는 약 35% 내지 45% 또는 약 45%, 35% 또는 약 35% 내지 40% 또는 약 40%, 40% 또는 약 40% 내지 50% 또는 약 50%, 40% 또는 약 40% 내지 45% 또는 약 45%, 또는 45% 또는 약 45% 내지 50% 또는 약 50% w/w의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% w/w의 덱스트란, 예를 들어, 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 또는 약 50% w/w의 덱스트란, 예를 들어, 덱스트란 40을 포함한다.

[0311] 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 25 또는 약 25 g/L 내지 200 또는 약 200 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 35 또는 약 35 내지 200 또는 약 200, 25 또는 약 25 내지 175 또는 약 175, 25 또는 약 25 내지 150 또는 약 150, 25 또는 약 25 내지 125 또는 약 125, 25 또는 약 25 내지 100 또는 약 100, 25 또는 약 25 내지 75 또는 약 75, 25 또는 약 25 내지 50 또는 약 50, 50 또는 약 50 내지 200 또는 약 200, 50 또는 약 50 내지 175 또는 약 175, 50 또는 약 50 내지 150 또는 약 150, 50 또는 약 50 내지 125 또는 약 125, 50 또는 약 50 내지 100 또는 약 100, 50 또는 약 50 내지 75 또는 약 75, 75 또는 약 75 내지 200 또는 약 200, 75 또는 약 75 내지 175 또는 약 175, 75 또는 약 75 내지 150 또는 약 150, 75 또는 약 75 내지 125 또는 약 125, 75 또는 약 75 내지 100 또는 약 100, 100 또는 약 100 내지 200 또는 약 200, 100 또는 약 100 내지 175 또는 약 175, 100 또는 약 100 내지 150 또는 약 150, 100 또는 약 100 내지 125 또는 약 125, 125 또는 약 125 내지 200 또는 약 200, 125 또는 약 125 내지 175 또는 약 175, 125 또는 약 125 내지 150 또는 약 150, 150 또는 약 150 내지 200 또는 약 200, 150 또는 약 150 내지 175 또는 약 175, 또는 175 또는 약 175 내지 200 또는 약 200 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 또는 200 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 100 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 또는 약 200 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 약 100 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다.

[0312] 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 글루코스(덱스트로스로도 지칭됨)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 10 또는 약 10 g/L 내지 100 또는 약 100 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 10 또는 약 10 내지 100 또는 약 100, 10 또는 약 10 내지 90 또는 약 90, 10 또는 약 10 내지 80 또는 약 80, 10 또는 약 10 내지 70 또는 약 70, 10 또는 약 10 내지 60 또는 약 60, 10 또는 약 10 내지 50 또는 약 50, 10 또는 약 10 내지 40 또는 약 40, 10 또는 약 10 내지 30 또는 약 30, 10 또는 약 10 내지 20 또는 약 20, 20 또는 약 20 내지 100 또는 약 100, 20 또는 약 20 내지 90 또는 약 90, 20 또는 약 20 내지 80 또는 약 80, 20 또는 약 20 내지 70 또는 약 70, 20 또는 약 20 내지 60 또는 약 60, 20 또는 약 20 내지 50 또는 약 50, 20 또는 약 20 내지 40 또는 약 40, 20 또는 약 20 내지 30 또는 약 30, 30 또는 약 30 내지 100 또는 약 100, 30 또는 약 30 내지 90 또는 약 90, 30 또는 약 30 내지 80 또는 약 80, 30 또는 약 30 내지 70 또는 약 70, 30 또는 약 30 내지 60 또는 약 60, 30 또는 약 30 내지 50 또는 약 50, 30 또는 약 30 내지 40 또는 약 40, 40 또는 약 40 내지 100 또는 약 100, 40 또는 약 40 내지 90 또는 약 90, 40 또는 약 40 내지 80 또는 약 80, 40 또는 약 40 내지 70 또는 약 70, 40 또는 약 40 내지 60 또는 약 60, 40 또는 약 40 내지 50 또는 약 50, 50 또는 약 50 내지 100 또는 약 100, 50 또는 약 50 내지 90 또는 약 90, 50 또는 약 50 내지 80 또는 약 80, 50 또는 약 50 내지 70 또는 약 70, 50 또는 약 50 내지 60 또는 약 60, 60 또는 약 60 내지 100 또는 약 100, 60 또는 약 60 내지 90 또는 약 90, 60 또는 약 60 내지 80 또는 약 80, 60 또는 약 60 내지 70

또는 약 70, 70 또는 약 70 내지 100 또는 약 100, 70 또는 약 70 내지 90 또는 약 90, 70 또는 약 70 내지 80 또는 약 80, 80 또는 약 80 내지 90 또는 약 90, 80 또는 약 80 내지 100 또는 약 100, 80 또는 약 80 내지 90 또는 약 90, 또는 90 또는 약 90 내지 100 또는 약 100 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 g/L 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 50 g/L 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90, 또는 약 100 g/L 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 50 g/L 글루코스를 포함한다.

[0313] 일부 구현예에서, 덱스트란 용액은 물 중의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40, 및 글루코스로 구성된다.

[0314] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10% 또는 약 10% v/v 내지 50% 또는 약 50% v/v의 본원에 기술된 덱스트란 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10% 또는 약 10% 내지 50%, 10% 또는 약 10% 내지 45% 또는 약 45%, 10% 또는 약 10% 내지 40% 또는 약 40%, 10% 또는 약 10% 내지 35% 또는 약 35%, 10% 또는 약 10% 내지 30% 또는 약 30%, 10% 또는 약 10% 내지 25% 또는 약 25%, 10% 또는 약 10% 내지 20% 또는 약 20%, 10% 또는 약 10% 내지 15 또는 약 15%, 15% 또는 약 15% 내지 50% 또는 약 50%, 15% 또는 약 15% 내지 45% 또는 약 45%, 15% 또는 약 15% 내지 40% 또는 약 40%, 15% 또는 약 15% 내지 35% 또는 약 35%, 15% 또는 약 15% 내지 30% 또는 약 30%, 15% 또는 약 15% 내지 25% 또는 약 25%, 15% 또는 약 15% 내지 20% 또는 약 20%, 20% 또는 약 20% 내지 50% 또는 약 50%, 20% 또는 약 20% 내지 45% 또는 약 45%, 20% 또는 약 20% 내지 40% 또는 약 40%, 20% 또는 약 20% 내지 35% 또는 약 35%, 20% 또는 약 20% 내지 30% 또는 약 30%, 20% 또는 약 20% 내지 25% 또는 약 25%, 25% 또는 약 25% 내지 50% 또는 약 50%, 25% 또는 약 25% 내지 45% 또는 약 45%, 25% 또는 약 25% 내지 40% 또는 약 40%, 25% 또는 약 25% 내지 35% 또는 약 35%, 25% 또는 약 25% 내지 30% 또는 약 30%, 30% 또는 약 30% 내지 50% 또는 약 50%, 30% 또는 약 30% 내지 45% 또는 약 45%, 30% 또는 약 30% 내지 40% 또는 약 40%, 30% 또는 약 30% 내지 35% 또는 약 35%, 35% 또는 약 35% 내지 50% 또는 약 50%, 35% 또는 약 35% 내지 45% 또는 약 45%, 35% 또는 약 35% 내지 40% 또는 약 40%, 40% 또는 약 40% 내지 50% 또는 약 50%, 40% 또는 약 40% 내지 45% 또는 45% 또는 약 45% 내지 50% 또는 약 50% v/v의 덱스트란 용액, 예를 들어 본원에 기술된 덱스트란 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% v/v의 덱스트란 용액, 예를 들어, 본원에 기술된 덱스트란 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 또는 약 50% v/v의 덱스트란 용액, 예를 들어 본원에 기술된 덱스트란 용액을 포함한다.

[0315] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10 또는 약 10 내지 50 또는 약 50 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10 또는 약 10 내지 50 또는 약 50, 10 또는 약 10 내지 45 또는 약 45, 10 또는 약 10 내지 40 또는 약 40, 10 또는 약 10 내지 35 또는 약 35, 10 또는 약 10 내지 30 또는 약 30, 10 또는 약 10 내지 25 또는 약 25, 10 또는 약 10 내지 20 또는 약 20, 10 또는 약 10 내지 15 또는 약 15, 15 또는 약 15 내지 50 또는 약 50, 15 또는 약 15 내지 45 또는 약 45, 15 또는 약 15 내지 40 또는 약 40, 15 또는 약 15 내지 35 또는 약 35, 15 또는 약 15 내지 30 또는 약 30, 15 또는 약 15 내지 25 또는 약 25, 15 또는 약 15 내지 20 또는 약 20, 20 또는 약 20 내지 50 또는 약 50, 20 또는 약 20 내지 45 또는 약 45, 20 또는 약 20 내지 40 또는 약 40, 20 또는 약 20 내지 30 또는 약 30, 20 또는 약 20 내지 25 또는 약 25, 25 또는 약 25 내지 50 또는 약 50, 25 또는 약 25 내지 45 또는 약 45, 25 또는 약 25 내지 40 또는 약 40, 25 또는 약 25 내지 35 또는 약 35, 25 또는 약 25 내지 30 또는 약 30, 30 또는 약 30 내지 50 또는 약 50, 30 또는 약 30 내지 45 또는 약 45, 30 또는 약 30 내지 40 또는 약 40, 30 또는 약 30 내지 35 또는 약 35, 35 또는 약 35 내지 50 또는 약 50, 35 또는 약 35 내지 45 또는 약 45, 35 또는 약 35 내지 40 또는 약 40, 40 또는 약 40 내지 50 또는 약 50, 40 또는 약 40 내지 45 또는 약 45, 또는 45 또는 약 45 내지 50 또는 약 50 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 10, 15, 20, 25, 30, 30, 35, 40, 45 또는 50 g/L의 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 또는 약 50 g/L 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40을 포함한다.

[0316] ***3. 글루코스***

[0317] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 글루코스를 포함한다.

[0318] 일부 구현예에서, 상기 기술된 바와 같이, 냉동보존 조성물은 글루코스를 포함하는 덱스트란 용액을 포함한다.

[0319] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 글루코스를 포함하지 않는 덱스트란 용액을 포함한다. 일부 구현예에서,

예를 들어, 덱스트란 용액이 글루코스를 포함하지 않을 경우, 글루코스는 냉동보존 조성물에 별도로 첨가된다.

[0320] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 5 또는 약 5 내지 25 또는 약 25 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 5 또는 약 5 내지 25 또는 약 25, 5 또는 약 5 내지 20 또는 약 20, 5 또는 약 5 내지 15 또는 약 15, 5 또는 약 5 내지 10 또는 약 10, 10 또는 약 10 내지 25 또는 약 25, 10 또는 약 10 내지 20 또는 약 20, 10 또는 약 10 내지 15 또는 약 15, 15 또는 약 15 내지 25 또는 약 25, 15 또는 약 15 내지 20 또는 약 20, 또는 20 또는 약 20 내지 25 또는 약 25 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 또는 25 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 12.5 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 5, 약 7.5, 약 10, 약 12.5, 약 15, 약 17.5, 약 20, 약 22.5, 또는 약 25 g/L의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 12.5 g/L의 글루코스를 포함한다.

[0321] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 2.75% w/v 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 27.5 g/L 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 2% w/v 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1.5% w/v 미만의 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 1.25% w/v 이하의 글루코스를 포함한다.

[0322] ***4. 디메틸 설폭사이드***

[0323] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 디메틸 설폭사이드(DMSO, 메틸 설폭사이드 및 메틸설피닐메탄으로도 지칭됨)를 포함한다.

[0324] 일부 구현예에서, DMSO는 용액으로 제공되며, 이는 본원에서 DMSO 용액으로도 지칭된다. 따라서, 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 DMSO 용액을 포함한다.

[0325] 일부 구현예에서, DMSO 용액은 정맥내 사용에 적합하다.

[0326] 일부 구현예에서, DMSO 용액은 1.1 g/mL의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, DMSO 용액은 약 1.1g/mL의 DMSO를 포함한다.

[0327] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1% 또는 약 1% 내지 10% 또는 약 10% v/v의 DMSO 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1% 또는 약 1% 내지 10% 또는 약 10%, 1% 또는 약 1% 내지 9% 또는 약 9%, 1% 또는 약 1% 내지 8% 또는 약 8%, 1% 또는 약 1% 내지 7% 또는 약 7%, 1% 또는 약 1% 내지 6% 또는 약 6%, 1% 또는 약 1% 내지 5% 또는 약 5%, 1% 또는 약 1% 내지 4% 또는 약 4%, 1% 또는 약 1% 내지 3% 또는 약 3%, 1% 또는 약 1% 내지 2% 또는 약 2%, 2% 또는 약 2% 내지 10% 또는 약 10%, 2% 또는 약 2% 내지 9% 또는 약 9%, 8% 또는 약 8%, 2% 또는 약 2% 내지 7% 또는 약 7%, 2% 또는 약 2% 내지 6% 또는 약 6%, 2% 또는 약 2% 내지 5% 또는 약 5%, 2% 또는 약 2% 내지 4% 또는 약 4%, 2% 또는 약 2% 내지 3% 또는 약 3%, 3% 또는 약 3% 내지 10% 또는 약 10%, 3% 또는 약 3% 내지 9% 또는 약 9%, 3% 또는 약 3% 내지 8% 또는 약 8%, 3% 또는 약 3% 내지 7% 또는 약 7%, 3% 또는 약 3% 내지 6% 또는 약 6%, 3% 또는 약 3% 내지 5% 또는 약 5%, 3% 또는 약 3% 내지 4% 또는 약 4%, 4% 또는 약 4% 내지 10% 또는 약 10%, 4% 또는 약 4% 내지 9% 또는 약 9%, 4% 또는 약 4% 내지 8% 또는 약 8%, 4% 또는 약 4% 내지 7% 또는 약 7%, 4% 또는 약 4% 내지 6% 또는 약 6%, 4% 또는 약 4% 내지 5% 또는 약 5%, 5% 또는 약 5% 내지 10% 또는 약 10%, 5% 또는 약 5% 내지 9% 또는 약 9%, 5% 또는 약 5% 내지 8% 또는 약 8%, 5% 또는 약 5% 내지 7% 또는 약 7%, 5% 또는 약 5% 내지 6% 또는 약 6%, 6% 또는 약 6% 내지 10% 또는 약 10%, 6% 또는 약 6% 내지 9% 또는 약 9%, 6% 또는 약 6% 내지 8% 또는 약 8%, 6% 또는 약 6% 내지 7% 또는 약 7%, 7% 또는 약 7% 내지 10% 또는 약 10%, 7% 또는 약 7% 내지 9% 또는 약 9%, 7% 또는 약 7% 내지 8% 또는 약 8%, 8% 또는 약 8% 내지 10% 또는 약 10%, 8% 또는 약 8% 내지 9% 또는 약 9% 또는 9% 또는 약 9% 내지 10% 또는 약 10% v/v의 DMSO 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 또는 10% v/v의 DMSO 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 5%의 DMSO 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 또는 약 10% v/v의 DMSO 용액을 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 5%의 DMSO 용액을 포함한다.

[0328] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 11 또는 약 11 내지 110 또는 약 110 g/L의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 11 또는 약 11 내지 110 또는 약 110, 11 또는 약 11 내지 99 또는 약 99, 11 또는 약 11 내지 88 또는 약 88, 11 또는 약 11 내지 77 또는 약 77, 11 또는 약 11 내지 66 또는 약 66, 11 또는 약 11 내지 55 또는 약 55, 11 또는 약 11 내지 44 또는 약 44, 11 또는 약 11 내지 33 또는 약 33, 11 또는

약 11 내지 22 또는 약 22, 22 또는 약 22 내지 110 또는 약 110, 22 또는 약 22 내지 99 또는 약 99, 22 또는 약 22 내지 88 또는 약 88, 22 또는 약 22 내지 77 또는 약 77, 22 또는 약 22 내지 77 또는 약 77, 22 또는 약 22 내지 66 또는 약 66, 22 또는 약 22 내지 55 또는 약 55, 22 또는 약 22 내지 44 또는 약 44, 22 또는 약 22 내지 33 또는 약 33, 33 또는 약 33 내지 110 또는 약 110, 33 또는 약 33 내지 99 또는 약 99, 33 또는 약 33 내지 88 또는 약 88, 33 또는 약 33 내지 77 또는 약 77, 33 또는 약 33 내지 66 또는 약 66, 33 또는 약 33 내지 55 또는 약 55, 33 또는 약 33 내지 44 또는 약 44, 44 또는 약 44 내지 110 또는 약 110, 44 또는 약 44 내지 99 또는 약 99, 44 또는 약 44 내지 88 또는 약 88, 44 또는 약 44 내지 77 또는 약 77, 44 또는 약 44 내지 66 또는 약 66, 44 또는 약 44 내지 55 또는 약 55, 55 또는 약 55 내지 110 또는 약 110, 55 또는 약 55 내지 99 또는 약 99, 55 또는 약 55 내지 88 또는 약 88, 55 또는 약 55 내지 77 또는 약 77, 55 또는 약 55 내지 66 또는 약 66, 66 또는 약 66 내지 110 또는 약 110, 66 또는 약 66 내지 99 또는 약 99, 66 또는 약 66 내지 88 또는 약 88, 66 또는 약 66 내지 77 또는 약 77, 77 또는 약 77 내지 119 또는 약 119, 77 또는 약 77 내지 88 또는 약 88, 88 또는 약 88 내지 110 또는 약 110, 88 또는 약 88 내지 99 또는 약 99, 또는 99 또는 약 99 내지 110 또는 약 110 g/L의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 11, 22, 33, 44, 55, 66, 77, 88, 99, 또는 110 g/L의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 55 g/L의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 11, 약 22, 약 33, 약 44, 약 55, 약 66, 약 77, 약 88, 약 99, 또는 약 110 g/L의 DMSO를 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 약 55 g/L의 DMSO를 포함한다.

[0329] ***5. 버퍼***

[0330] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 버퍼 용액, 예를 들어 정맥내 투여에 적합한 버퍼 용액을 포함한다.

[0331] 버퍼 용액은 인산염 완충 식염수(PBS), 링거 용액, Tyrode 버퍼, 행크 균형된 염 용액(Hank's balanced salt solution), 얼(Earle) 균형된 염 용액, 식염수 및 트리스를 포함하지만 이에 국한되지는 않는다.

[0332] 일부 구현예에서, 버퍼 용액은 인산염 완충 식염수(PBS)이다.

[0333] ***6. 예시적인 냉동보존 조성물***

[0334] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1) 알부민, 예를 들어 인간 알부민, 2) 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40, 3) DMSO, 및 4) 버퍼 용액을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 글루코스를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1) 알부민, 예를 들어 인간 알부민, 2) 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40, 3) 글루코스, 4) DMSO 및 5) 버퍼 용액으로 구성된다.

[0335] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1) 본원에 기술된 알부민 용액, 2) 본원에 기술된 덱스트란 용액, 3) 본원에 기술된 DMSO 용액, 및 4) 버퍼 용액을 포함한다.

[0336] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 1) 본원에 기술된 알부민 용액, 2) 본원에 기술된 덱스트란 용액, 3) 본원에 기술된 DMSO 용액, 및 4) 버퍼 용액으로 구성된다.

[0337] 일부 구현예에서, 냉동보존 조성물은 세포 배양 배지를 포함하지 않는다.

[0338] 일 구현예에서, 냉동보존 조성물은 40 mg/mL 인간 알부민, 25 mg/mL 덱스트란 40, 12.5 mg/mL 글루코스 및 55 mg/mL DMSO를 포함하거나 또는 약 40 mg/mL 인간 알부민, 약 25 mg/mL 덱스트란 40, 약 12.5 mg/mL 글루코스 및 약 55 mg/mL DMSO를 포함한다.

[0339] 일 구현예에서, 냉동보존 조성물은 물 중의 40 mg/mL 인간 알부민, 25 mg/mL 덱스트란 40, 12.5 mg/mL 글루코스, 55 mg/mL DMSO 및 0.5 mL/mL 100% 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 물 중의 약 40 mg/mL 인간 알부민, 약 25 mg/mL 덱스트란 40, 약 12.5 mg/mL 글루코스, 약 55 mg/mL DMSO 및 약 0.5 mL/mL 100% 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함하거나 이로 구성된다.

[0340] 일 구현예에서, 냉동보존 조성물은 32 mg/mL 인간 알부민, 25 mg/mL 덱스트란 40, 12.5 mg/mL 글루코스 및 55 mg/mL DMSO를 포함하거나 또는 약 32 mg/mL 인간 알부민, 약 25 mg/mL 덱스트란 40, 약 12.5 mg/mL 글루코스 및 약 55 mg/mL DMSO를 포함한다.

[0341] 일 구현예에서, 냉동보존 조성물은 물 중의 32 mg/mL 인간 알부민, 25 mg/mL 덱스트란 40, 12.5 mg/mL 글루코스, 55 mg/mL DMSO 및 0.54 mL/mL 100% 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함하거나 이로 구성되거나, 또는 물 중의 약 32 mg/mL 인간 알부민, 약 25 mg/mL 덱스트란 40, 약 12.5 mg/mL 글루코스, 약 55 mg/mL DMSO 및

약 0.54 mL/mL 100% 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함하거나 이로 구성된다.

[0342] 예시적인 냉동보존 조성물을 **표 3**에 나타내었다.

[0343] **표 3. 예시적인 냉동보존 조성물**

부형제 용액	용액의 농도 범위	예시적인 용액 농도	냉동보존 조성물에서의 예시적인 범위 v/v%
알부민 용액	물 중 40–200 g/L 알부민	200 g/L 알부민	10%–50%
덱스트란 40 용액	물 중 25–200 g/L 덱스트란 40; 및 0-100 g/L 글루코스	100 g/L 덱스트란 40; 50 g/L 글루코스	10%–50%
DMSO	물 중 11–110 g/L DMSO	1,100 g/L DMSO	1%–10%
버퍼	부피까지	부피까지	부피까지

[0344]

[0345] **표 4. 예시적인 냉동보존 조성물 #1**

부형제 용액	용액 조성	냉동보존 조성물 #1 에서의 예시적인 v/v%	냉동보존 조성물 #1 에서의 최종 농도
알부민 용액	물 중 200 g/L 알부민	20%	40 mg/mL 알부민
덱스트란 40 용액	물 중 100 g/L 덱스트란 40; 및 50 g/L 글루코스	25%	25 mg/mL 덱스트란 40; 12.5 mg/mL 글루코스
DMSO	100% DMSO (1,100 g/L)	5%	55 mg/mL
버퍼	100% 인산염 완충 식염수(PBS)	50%	0.5 mL/mL

[0346]

[0347] **표 5. 예시적인 냉동보존 조성물 #2**

부형제 용액	용액 조성	냉동보존 조성물 #2 에서의 예시적인 v/v%	냉동보존 조성물 #2 에서의 최종 농도
알부민 용액	물 중 200 g/L 알부민	16%	32 mg/mL 알부민
덱스트란 40 용액	물 중 100 g/L 덱스트란 40; 및 50 g/L 글루코스	25%	25 mg/mL 덱스트란 40; 12.5 mg/mL 글루코스
DMSO	100% DMSO (1,100 g/L)	5%	55 mg/mL
버퍼	100% 인산염 완충 식염수(PBS)	54%	0.54 mL/mL

[0348]

[0349] **B. 냉동보존 방법**

[0350] 본원에 기술된 냉동보존 조성물은 세포(들), 예를 들어 치료 세포, 예를 들어 자연 살해(NK) 세포(들), 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포(들)를 냉동보존하는 데 사용될 수 있다.

[0351] 일부 구현예에서, 세포(들)는 동물 세포(들)이다. 일부 구현예에서, 세포(들)는 인간 세포(들)이다.

[0352] 일부 구현예에서, 세포(들)는 면역 세포(들)이다. 일부 구현예에서, 면역 세포(들)는 호염구, 호산구, 호중구, 비만 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 자연 살해 세포, B 세포, T 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0353] 일부 구현예에서, 면역 세포(들)는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포(들)는 본원에 기술된 방법에 의해 확장 및 자극된다.

[0354] 일부 구현예에서, 세포(들)를 냉동보존하는 것은 세포(들)를 본원에 기재된 냉동보존 조성물 또는 그의 성분과 혼합하여 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물을 생성하는 단계; 및 혼합물을 냉동하는 단계를 포함한다.

[0355] 일부 구현예에서, 세포(들)를 냉동보존하는 것은 세포(들)를 포함하는 조성물을 본원에 기재된 냉동보존 조성물 또는 그의 성분과 혼합하여 조성물, 예를 들어 약제학적 조성물을 생성하는 단계; 및 혼합물을 냉동하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포(들)를 포함하는 조성물은 세포(들) 및 버퍼를 포함한다. 적합한 버퍼는 본원에 기재되어 있다.

[0356] 일부 구현예에서, 세포(들)를 냉동보존하는 것은 세포(들) 및 버퍼, 예를 들어 PBS를 포함하는 조성물을, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은, 알부민, 덱스트란 및 DMSO를 포함하는 조성물과 혼합하는 단계; 및 혼합물을 냉동하는 단계를 포함한다.

[0357] 일부 구현예에서, 세포(들)를 냉동보존하는 것은 세포(들) 및 버퍼, 예를 들어 PBS를 1:1로 포함하는 조성물을, 40 mg/mL 알부민, 예를 들어 인간 알부민, 25 mg/mL 덱스트란, 예를 들어 덱스트란 40, 12.5 mg/mL 글루코스 및 55 mg/mL DMSO를 포함하는 조성물과 혼합하는 단계를 포함한다.

[0358] 일부 구현예에서, 세포(들) 및 버퍼, 예를 들어 PBS를 포함하는 조성물은 $2x10^7$ 또는 약 $2x10^7$ 내지 $2x10^9$ 또는 약 $2x10^9$개 세포/mL를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포(들) 및 버퍼, 예를 들어 PBS를 포함하는 조성물은 $2x10^8$개 세포/mL를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포(들) 및 버퍼, 예를 들어 PBS를 포함하는 조성물은 약 $2x10^8$개 세포/mL를 포함한다.

[0359] 일부 구현예에서, 세포(들)를 냉동보존하는 것은 세포(들), 버퍼, 예를 들어, PBS, 알부민, 예를 들어, 인간 알부민, 덱스트란, 예를 들어, 덱스트란 40 및 DMSO를 혼합하는 단계; 및 혼합물을 냉동하는 단계를 포함한다.

[0360] 일부 구현예에서, 혼합물은 $1x10^7$ 또는 약 $1x10^7$ 내지 $1x10^9$ 또는 약 $1x10^9$개 세포/mL를 포함한다. 일부 구현예에서, 혼합물은 $1x10^8$개 세포/mL를 포함한다. 일부 구현예에서, 혼합물은 약 $1x10^8$개 세포/mL를 포함한다.

[0361] 알부민, 덱스트란 및 DMSO의 적합한 범위는 상기에 제시되어 있다.

[0362] 일부 구현예에서, 조성물은 -135℃ 이하에서 냉동된다.

[0363] 일부 구현예에서, 조성물은 제어된 속도로 동결된다.

[0364] 일부 구현예에서, 조성물은 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기재된 다중특이적 인게이저를 추가로 포함한다.

[0365] **III. 다중특이적 인게이저(multispecific engager)**

[0366] 본원에서 사용되는 용어 "다중특이적 인게이저"는 "적어도 이중특이적"인 항체 구축물을 지칭하며, 즉 이는 적어도 제1 결합 도메인 및 제2 결합 도메인을 포함하며, 여기서 제1 결합 도메인은 하나의 항원 또는 표적(여기서: NK 세포 수용체, 예를 들어 CD16a)에 결합하고, 제2 결합 도메인은 또 다른 항원 또는 표적(여기서: 표적 세포 표면 항원 CD30)에 결합한다. 따라서, 본 개시내용의 맥락에서 정의된 바와 같은 항체 구축물은 적어도 2개의 상이한 항원 또는 표적에 대한 특이성을 포함한다. 예를 들어, 제1 도메인은 바람직하게는 인간, 마카카(Macaca) 종 및 설치류 종으로부터 선택되는 종 중 하나 이상의 NK 세포 수용체의 세포외 에피토프에 결합한다.

[0367] 다중특이적 항체 구축물에는 예를 들어 이중특이적 및 삼중특이적 항체 구축물, 또는 3개 초과(예를 들어 4, 5...) 특이성을 갖는 구축물이 포함된다. 다중특이적 항체 구축물의 예는 예를 들어 WO 2006/125668, WO 2015/158636, WO 2017/064221, WO 2019/175368, WO 2019/198051, WO 2020/043670, WO 2021/130383, 및 Ellwanger et al. (MAbs. 2019 Jul;11(5):899-918)에 제공되어 있다.

[0368] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 CD16(FcγRIII)에 특이적으로 결합하는 제1 결합 도메인 및 CD30에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0369] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 이중특이적 인게이저이다. 일부 구현예에서, 이중특이적 인게이저는 CD16 결합 도메인 및 CD30 결합 도메인을 포함한다.

[0370] 일부 구현예에서, CD16 결합 도메인은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A); 및 서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A)을 포함한다.

[0371] 일부 구현예에서, CD16 결합 도메인은 서열번호 20과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변(VL) 영역, 및 서열번호 19와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다.

[0372] 일부 구현예에서, CD16 결합 도메인은 서열번호 20을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변(VL) 영역 및 서열번호 19를 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다.

[0373] 일부 구현예에서, CD30 결합 도메인은 서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함하는 경쇄 가변 도메인(VL_CD30); 및 서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함하는 중쇄 가변 도메인(VH_CD30)을 포함한다.

[0374] 일부 구현예에서, CD30 결합 도메인은 서열번호 22와 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 경쇄 가변(VL) 영역, 및 서열번호 21과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖거나 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다.

[0375] 일부 구현예에서, CD30 결합 도메인은 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변(VL) 영역 및 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변(VH) 영역을 포함한다.

[0376] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 4가 동종이량체(homodimer)이다. 일부 구현예에서, 4가 동종이량체는 각각 N-말단에서 C-말단까지 다음을 포함하거나 이로 이루어진 제1 및 제2 폴리펩타이드 단량체를 포함한다: CD16A 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A) - 제1 링커(L1) - CD30 경쇄 가변 도메인(VL_CD30) - 제2 링커(L2) - CD30 중쇄 가변 도메인(VH_CD30) - 제3 링커(L3) - 및 CD16 경쇄 가변 도메인(VL_CD16). 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드는 Ig 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 사슬 내 도메인의 비공유 상호작용을 통해 머리에서 꼬리로 이량체화된다.

[0377] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 4가 동종이량체이다. 일부 구현예에서, 4가 동종이량체는 각각 N-말단에서 C-말단까지 다음을 포함하거나 이로 이루어진 제1 및 제2 폴리펩타이드 단량체를 포함한다: CD30 중쇄 가변 도메인(VH_CD30) - 제1 링커(L1) - CD16A 경쇄 가변 도메인(VL_CD16A) - 제2 링커(L2) - CD16A 중쇄 가변 도메인(VH_CD16A) - 제3 링커(L3) - 및 CD30 경쇄 가변 도메인(VL_CD30). 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩타이드는 Ig 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 사슬 내 도메인의 비공유 상호작용을 통해 머리에서 꼬리로 이량체화된다.

[0378] 일부 구현예에서, VH_CD16은 서열번호 6을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 7을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2)); 및 서열번호 8을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함한다. 일부 구현예에서, VH_CD16은 서열번호 19를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0379] 일부 구현예에서, VL_CD16은 서열번호 9를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 10을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 11을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함한다. 일부 구현예에서, VL_CD16A는 서열번호 20을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0380] 일부 구현예에서, VH_CD30은 서열번호 12를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(CDRH1); 서열번호 13을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 2(CDRH2); 및 서열번호 14를 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 3(CDRH3)을 포함한다. 일

부 구현예에서, VH_CD30은 서열번호 21을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0381] 일부 구현예에서, VL_CD30은 서열번호 15를 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(CDRL1); 서열번호 16을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 2(CDRL2); 및 서열번호 17을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 3(CDRL3)을 포함한다. 일부 구현예에서, VL_CD16A는 서열번호 22를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0382] 일부 구현예에서, L1은 서열번호 26을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0383] 일부 구현예에서, L2는 서열번호 27을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0384] 일부 구현예에서, L3은 서열번호 28을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0385] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리머릭 단량체는 각각 서열번호 18을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0386] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 태그, 예를 들어 히스티딘 태그, 예를 들어 헥사-히스티딘 태그(서열번호 25)를 포함한다.

[0387] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 AFM13이다. *예를 들어,* Wu et al., "AFF13: a first-in-class tetravalent bispecific anti-CD30/CD16A antibody for NK cell-mediated immunotherapy," *J. Hemat & Oncol* 8, 96 (2015) *참조하라*, 이는 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨; *또한 하기 문헌을 참조하라,* Reusch et al., "A Novel Tetravalent Bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells," *mAbs* 6(3):727-38 (2014), 이는 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨, Rothe et al., "A Phase 1 Study for the Bispecific Anti-CD30/CD16A Antibody Construct AFM13 in Patients with Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma," *Blood* 125(26):4024-31 (2015), 이는 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨.

[0388] 본원에서 사용되는 용어 "NK 세포 수용체"는 NK 세포 표면의 단백질 및 단백질 복합체를 정의한다. 따라서 이 용어는 NK 세포의 특징이지만, 반드시 NK 세포의 표면에서만 발현되는 것은 아니며 대식세포나 T 세포와 같은 다른 세포에서도 발현되는 세포 표면 분자를 정의한다. NK 세포 수용체의 예는 FcɣRIII(CD16a, CD16b), NKp46 및 NKG2D를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0389] 본원에서 사용되는 "CD16a"는 NK 세포의 세포 표면에서 발현되는 FcɣRIIIA로도 알려진 활성화 수용체 CD16a를 지칭한다. CD16a는 NK 세포의 세포독성 활성을 유발하는 활성화 수용체이다. CD16a에 대한 항체의 친화력은 NK 세포 활성화를 유발하는 능력과 직접적으로 연관되어 있으므로 CD16a에 대한 친화력이 높을수록 활성화에 필요한 항체 용량이 감소한다. 항원 결합 단백질의 항원 결합 부위는 CD16a에 결합하지만 CD16b에는 결합하지 않는다. 예를 들어, CD16a에는 결합하지만 CD16B에는 결합하지 않는 중쇄(VH) 및 경쇄(VL) 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 부위는, CD16b에는 존재하지 않는 C-말단 서열 SFFPPGYQ(서열번호 23)의 아미노산 잔기 및/또는 CD16a(서열번호 24)의 잔기 G130 및/또는 Y141을 포함하는 CD16a의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부위에 의해 제공될 수 있다.

[0390] 본원에서 사용되는 "CD16b"는 호중구 및 호산구에서 발현되는 FcɣRIIIB로도 알려진 수용체 CD16b를 지칭한다. 수용체는 글리코실포스파티딜 이노시톨(GPI)에 고정되어 있으며 CD16b 양성 면역 세포의 어떤 종류의 세포독성 활성도 유발하지 않는 것으로 이해된다.

[0391] 본원에서 사용되는 용어 "표적 세포 표면 항원"은 세포에 의해 발현되고 본원에 기술된 바와 같은 항체 구축물에 접근 가능하도록 세포 표면에 존재하는 항원 구조를 지칭한다. 일부 경우에, 본원에 기술된 다중특이적 항체 구축물이 결합하는 "표적 세포 표면 항원"은 CD30이다. TNFRSF8로도 알려진 CD30은 종양 괴사 인자 수용체 계열의 세포막 단백질이자 종양 마커이다.

[0392] 본 발명의 맥락에서 정의된 바와 같은 항체 구축물이 (적어도) 이중특이적이라는 점을 고려하면, 이는 자연적으로 발생하지 않으며 자연적으로 발생하는 생성물과 현저하게 다르다. 따라서 "다중특이적" 항체 구축물 또는 면역글로불린은 서로 다른 특이성을 갖는 적어도 2개의 별개의 결합 부위를 갖는 인공 하이브리드 항체 또는 면역글로불린이다. 다중특이적 항체 구축물은 하이브리도마의 융합이나 Fab' 단편의 연결을 포함한 다양한 방법으로 생산될 수 있다. *예를 들어*, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol*. 79:315- 321 (1990) *참조하라*.

[0393] 본 개시내용의 항체 구축물의 적어도 2개의 결합 도메인 및 가변 도메인(VH / VL)은 펩타이드 링커(스페이서 또는 커넥터 펩타이드)를 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 일부 구현예에서, 용어 "펩타이드 링커"는 본원에 정의된 항체 구축물의 하나의 (가변 및/또는 결합) 도메인과 또 다른 (가변 및/또는 결합) 도메인의 아미노산 서열을 서로 연결시키는 아미노산 서열을 포함한다. 펩타이드 링커는 또한 제3 도메인을 본원에 정의된

항체 구축물의 다른 도메인 또는 Fc 부분에 융합시키는 데 사용될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 펩타이드 링커는 어떠한 중합 활성도 포함하지 않는다.

[0394] 본원에서 사용되는 용어 "결합 도메인"은 표적 분자(항원) 상의 주어진 표적 에피토프 또는 주어진 표적 사이드, 예를 들어 NK 세포 수용체 항원, 예를 들어 CD16, 및 표적 세포 표면 항원 CD30에 각각 (특이적으로) 결합하고/상호작용하고/인식하는 도메인을 특징으로 한다. 제1 결합 도메인(예를 들어 CD16을 인식함)의 구조 및 기능, 그리고 바람직하게는 또한 제2 결합 도메인(표적 세포 표면 항원을 인식함)의 구조 및/또는 기능은 항체, 예를 들어 전장 또는 전체 면역글로불린 분자의 구조 및/또는 기능에 기초하거나, 및/또는 항체 또는 이의 단편의 가변 중쇄(VH) 및/또는 가변 경쇄(VL) 도메인으로부터 유래된다. 바람직하게는, 제1 결합 도메인은 3개의 경쇄 CDR(즉, VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3) 및/또는 3개의 중쇄 CDR(즉, VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3)의 존재를 특징으로 한다. 제2 결합 도메인은 바람직하게는 또한 표적 결합을 허용하는 항체의 최소 구조적 요건을 포함한다. 더욱 바람직하게는, 제2 결합 도메인은 적어도 3개의 경쇄 CDR(즉, VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3) 및/또는 3개의 중쇄 CDR(즉, VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3)을 포함한다. 일부 경우에, 제1 및/또는 제2 결합 도메인은 기존 (단클론) 항체로부터의 CDR 서열을 스캐폴드에 이식하는 것보다 파지 디스플레이 또는 라이브러리 스크리닝 방법에 의해 생산되거나 획득 가능한다.

[0395] 일부 구현예에서, 결합 도메인은 하나 이상의 폴리펩타이드 형태이다. 이러한 폴리펩타이드는 단백질성 부분과 비단백질성 부분(예를 들어, 화학적 링커 또는 화학적 가교제 예컨대 글루타르알데히드)을 포함할 수 있다. 단백질(일반적으로 30개 미만의 아미노산을 갖는 이의 단편, 바람직하게는 생물학적 활성 단편, 및 펩타이드를 포함함)은 공유 펩타이드 결합을 통해 서로 결합된 2개 이상의 아미노산을 포함한다(아미노산 사슬이 생성됨).

[0396] 본원에서 사용되는 용어 "폴리펩타이드"는 일반적으로 30개 이상의 아미노산으로 구성된 분자 그룹을 설명한다. 폴리펩타이드는 또한 이량체, 삼량체 및 더 높은 올리고머와 같은 다량체, 즉 하나 이상의 폴리펩타이드 분자로 구성된 다량체를 형성할 수 있다. 이러한 이량체, 삼량체 등을 형성하는 폴리펩타이드 분자는 동일하거나 동일하지 않을 수 있다. 이러한 다량체의 상응하는 고차 구조는 결과적으로 동종- 또는 이종이량체, 동종- 또는 이종삼량체 등으로 불린다. 이종다량체의 예는 자연 발생 형태에서 2개의 동일한 경쇄 폴리펩타이드와 2개의 동일한 중쇄 폴리펩타이드로 구성된 항체 분자이다. 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 또한 자연적으로 변형된 펩타이드 / 폴리펩타이드 / 단백질을 지칭하며, 여기서 변형은 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등과 같은 번역 후 변형에 의해 영향을 받는다. "펩타이드", "폴리펩타이드" 또는 "단백질"은 본원에서 언급될 때 페길화와 같이 화학적으로 변형될 수도 있다. 이러한 변형은 당업계에 잘 알려져 있으며 본원에 아래에 설명되어 있다.

[0397] 바람직하게는 NK 세포 수용체 항원, 예를 들어 CD16에 결합하는 결합 도메인 및/또는 표적 세포 표면 항원 CD30에 결합하는 결합 도메인은 인간, 인간화 또는 뮤린 유래 키메라 결합 도메인이다. 적어도 하나의 인간 결합 도메인을 포함하는 항체 및 항체 구축물은 비인간 예컨대 설치류(예를 들어, 뮤린, 래트, 햄스터 또는 토끼) 가변 및/또는 불변 영역을 보유하는 항체 또는 항체 구축물과 관련된 문제 중 일부를 방지한다. 그러한 설치류 유래 단백질의 존재는 항체 또는 항체 구축물의 신속한 제거로 이어질 수 있거나 환자에 의한 항체 또는 항체 구축물에 대한 면역 반응의 발생을 초래할 수 있다. 설치류 유래 항체 또는 항체 구축물의 사용을 피하기 위해, 설치류가 완전 인간 항체를 생산하도록 인간 항체 기능을 설치류에 도입함으로써 인간 또는 완전 인간 항체/항체 구축물을 생성할 수 있다.

[0398] 일부 구현예에서, CD16A에 대한 이러한 항원 결합 부위는 CD16B에 결합하지 않고 유사한 친화도로 공지된 CD16A 동종이형(allotype) F158 및 V158에 결합한다. IgG의 힌지 영역과의 상호작용에 중요한 위치 158의 아미노산을 변경하는 두 개의 대립형질 단일 뉴클레오티드 다형성이 인간 CD16A에서 확인되었다. 동형접합성 158 F/F 및 이형접합성 158 V/F 대립유전자의 대립유전자 빈도는 백인 인구 내에서 각각 35 내지 52% 또는 38 내지 50% 범위로 유사한 반면, 동형접합성 158 V/V 대립유전자는 단지 10-15%에서만 발견된다(Lopez-Escamez JA et al.; BMC Med Genet 2011; 12: 2). 따라서 유사한 친화도로 인해 모든 환자에서 이 항-CD16A 도메인에 의한 NK 세포의 활성화가 유리하다. CD16A에는 결합하지만 CD16B에는 결합하지 않는 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 포함하는 추가의 CD16A 항원 결합 부위는 WO 2006/125668에 기재되어 있다.

[0399] 일부 구현예에서, 중쇄 및 경쇄 도메인은 본원에 기재된 CDR 또는 프레임워크 서열의 면역학적 활성 상동체 또는 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, CDR 변이체 서열은 중요하지 않은 잔기 또는 중요하지 않은 영역의 잔기를 변경하도록 변형된다. 중요하지 않은 아미노산은 친화도 성숙, CDR 워킹 돌연변이 유발(CDR walking mutagenesis), 부위 지정 돌연변이 유발, 결정화, 핵 자기 공명, 광친화성 표지 또는 알라닌 스캐닝 돌연변이

유발과 같은 공지된 방법으로 식별할 수 있다.

[0400] **IV. 약제학적 조성물**

[0401] 본 발명은 본원에 기술된 자연 살해 세포를 포함하는 약제학적 조성물 및 본원에 기술된 약제학적 조성물의 투여 단위(dosage unit)를 제공한다.

[0402] 일부 경우에, 투여 단위는 1억 내지 15억 개의 세포, 예를 들어, 1억, 2억, 3억, 4억, 5억, 6억, 7억, 8억, 9억, 10억, 11억, 12억, 13억, 14억 또는 15억 개를 포함한다.

[0403] 약제학적 조성물은 전형적으로 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 약제학적 투여에 적합한 식염수, 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균제, 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.

[0404] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 a) 본원에 기술된 자연 살해 세포(들); 및 b) 냉동보존 조성물을 포함한다.

[0405] 적합한 냉동보존 조성물이 본원에 기술되어 있다.

[0406] 일부 구현예에서, 조성물은 동결된다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 3개월 동안, 예를 들어 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 12개월, 적어도 15개월, 적어도 18개월, 적어도 24개월 또는 적어도 36개월 동안 동결된다.

[0407] 일부 구현예에서, 자연 살해 세포의 적어도 60%, 예를 들어, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%는 해동 후 생존 가능하다.

[0408] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 a) 본원에 기재된 냉동보존 조성물; 및 b) 치료 세포(들)를 포함한다.

[0409] 일부 구현예에서, 치료 세포(들)는 동물 세포(들)이다. 일부 구현예에서, 치료 세포(들)는 인간 세포(들)이다.

[0410] 일부 구현예에서, 치료 세포(들)는 면역 세포(들)이다. 일부 구현예에서, 면역 세포(들)는 호염구, 호산구, 호중구, 비만 세포, 단핵구, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 자연 살해 세포, B 세포, T 세포, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0411] 일부 구현예에서, 면역 세포(들)는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 자연 살해 세포(들)는 본원에 기술된 방법에 의해 확장되고 자극된다.

[0412] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 c) 버퍼 용액을 추가로 포함한다. 적절한 버퍼 용액은 예를 들어 냉동보존 조성물에 대해서와 같이 본원에 기술되어 있다.

[0413] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 $1x10^7$ 또는 약 $1x10^7$ 내지 $1x10^9$ 또는 약 $1x10^9$개 세포/mL를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 $1x10^8$개 세포/mL를 포함한다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 약 $1x10^8$개 세포/mL를 포함한다.

[0414] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기재된 다중특이적 인게이저를 추가로 포함한다.

[0415] 약제학적 조성물은 전형적으로 의도된 투여 경로에 적합하도록 제제화된다. 투여 경로의 예로는 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 경구(예를 들어 흡입), 경피(국소), 경점막 및 직장 투여를 포함한다.

[0416] 적합한 약제학적 조성물을 제형화하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed., 2005; and the books in the series Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY)를 참조하라. 예를 들어, 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음과 같은 성분을 함유할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항균제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨(sodium bisulfite); 킬레이트제, 예컨대 에틸렌다이아민테트라아세트산; 버퍼, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 장성 조절제, 예컨대 염화나트륨 또는 덱스트로스. pH는 염산이나 수산화나트륨과 같은 산이나 염기로 조정할 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리나 플라스틱으로 만들어진 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다.

[0417] 주사용으로 적합한 약제학적 조성물은 멸균 수용액(수용성인 경우) 또는 분산액, 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체로는 생리 식염수, 정균수, Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산염 완충 식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균되어야 하며 쉽게 주사할 수 있을 정도로 유동성이어야 한다. 이는 제조 및 보관 조건 하에서 안정적이어야 하며 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅제의 사용에 의해, 분산제의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당류, 폴리알코올 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0418] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 위에 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매 중에 필요한 양의 활성 화합물을 혼합한 후, 여과 멸균함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질과 위에 열거된 것들 중에서 필수 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사용 용액 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조이며, 이는 이전에 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 생성한다.

[0419] **V. 치료 방법**

[0420] 본원에 기술된 NK 세포는 암 또는 기타 증식성 장애를 치료하기 위한 용도를 가진다.

[0421] 따라서, 본 발명은 또한 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포, 및 CD30 표적화 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저를 투여하는 것을 포함하는, 장애, 예를 들어 암, 예를 들어 CD30+ 암과 관련된 장애를 앓고 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

[0422] 또한, 본 발명은 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포, 및 CD30 표적화 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저를 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암 세포 또는 암 세포 집단의 재발, 성장, 증식, 이동 및/또는 전이를 예방, 감소 및/또는 억제하는 방법을 제공한다.

[0423] 또한, 본 발명은 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포, 및 CD30 표적화 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저를 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 항암 요법에 대한 반응을 강화, 개선 및/또는 증가시키는 방법을 제공한다.

[0424] 또한, 본 발명은 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포, 및 CD30 표적화 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저를 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 면역 체계를 유도하는 방법을 제공한다.

[0425] 본원에 기술된 방법은 비정상적인 세포사멸 또는 분화 과정과 관련된 장애, 예를 들어 세포 증식성 장애 또는 세포 분화 장애, 예를 들어 고형 종양 및 조혈 암을 모두 포함하는 암의 치료 방법을 포함한다. 일반적으로, 방법은 그러한 치료가 필요하거나 그러한 치료가 필요한 것으로 결정된 대상체에게 본원에 기술된 바와 같은 치료의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포, 및 CD30 표적화 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저를 포함하는 치료의 치료학적 유효량을 투여하는 것을 포함한다.

[0426] 본원에서 사용되는 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 비정상적인 세포사멸 또는 분화 과정과 관련된 장애를 역전시키거나, 완화시키거나, 발병을 지연시키거나, 진행을 억제하는 것을 의미한다. 예를 들어, 치료가 종양 크기나 성장 속도의 감소를 가져올 수 있다. 비정상적인 세포사멸 또는 분화 과정과 관련된 상태의 치료를 위해 본원에 기술된 화합물의 치료학적 유효량을 투여하면 무엇보다도 종양 크기 감소 또는 성장 속도 감소, 재발 위험 또는 빈도 감소, 재발 지연, 전이 감소, 생존율 증가, 및/또는 이환률 및 사망률 감소를 가져올 것이다. 일부 구현예에서, 치료는 하나 이상의 증상이 발생한 후에 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 치료는 증상이 없는 상태에서 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는 증상의 발병 전에 감수성 개인에게 투여될 수 있다(예를 들어, 증상의 병력 및/또는 유전적 또는 기타 감수성 요인에 비추어). 치료는 증상이 해결된 후에도 예를 들어 재발을 예방하거나 지연시키기 위해 계속할 수도 있다.

[0427] 본원에서 사용되는 용어 "억제"는 암 및/또는 암 세포 증식과 관련하여, 세포독성, 영양분 고갈 또는 세포사멸 유도에 의해, 개별적으로 또는 다른 암 세포와 집합적으로, 암 세포의 성장, 분열, 성숙 또는 생존 가능성의 억제, 및/또는 암 세포의 사멸을 유발하는 것을 지칭한다.

[0428] 본원에서 사용되는 질병 또는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상의 발달을 "지연"한다는 것은 질병, 장애 또는 이의 증상의 발달을 지연시키거나, 방해하거나, 느리게 하거나, 지체시키거나, 안정화하거나 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질병의 병력 및/또는 치료받는 대상체에 따라 다양한 시간 길이일 수 있다. 당업자에게 자명한 바와 같이, 충분하거나 상당한 지연은 대상체가 질병, 장애 또는 이의 증상을 발생시키지 않는다는 점에서 사실상 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 암 발생을 "지연"시키는 방법은 해당 방법을 사용하지 않는 것과 비교하여 주어진 기간에 질병이 발생할 확률을 낮추고/낮추거나 주어진 기간에 질병의 정도를 줄이는 방법이다. 이러한 비교는 통계적으로 유의미한 수의 대상체를 사용한 임상 연구를 기반으로 할 수 있다.

[0429] 본원에서 사용되는 "예방" 또는 "예방하는"은 질병의 임상 증상이 발생하지 않도록 질병 또는 장애의 발병으로부터 보호하는 요법을 지칭한다. 따라서, "예방"은 대상체에서 질병의 징후가 감지되기 이전에 및/또는 질병의 특정 단계 이전에(예를 들어, 아직 전이되지 않은 암이 있는 대상체에게 치료 물질의 투여) 대상체에게 치료법을 투여(예를 들어, 치료 물질의 투여)하는 것과 관련이 있다. 대상체는 질병 또는 장애가 발생할 위험이 있거나 질병 진행, 예를 들어 암 전이의 위험이 있는 개인일 수 있다. 예를 들어, 질병이나 장애의 발생 또는 발병과 관련이 있는 것으로 알려진 하나 이상의 위험 인자를 가진 개체일 수 있다. 예를 들어, 개체는 암의 발생 또는 진행과 관련된 돌연변이를 가질 수 있다. 또한, 예방을 통해 질병이나 장애의 발병을 완전히 예방할 수는 없는 것으로 이해된다. 일부 경우에는, 예방에는 질병이나 장애가 발생할 위험을 줄이는 것이 포함된다. 위험을 감소시킨다고 해서 질병이나 장애가 발생할 위험이 완전히 제거되는 것은 아니다.

[0430] "증가된" 또는 "향상된" 양(예를 들어 항종양 반응, 암세포 전이와 관련하여)은 본원에 언급된 양 또는 수준에 대해 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 또는 50배 또는 그 이상의 배수(예를 들어, 100배, 500배, 1000배)(이들 사이에 있고 1보다 큰 모든 정수 및 소수점 포함, 예를 들어, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 등)의 증가를 지칭한다. 이는 또한 본원에 언급된 양 또는 수준에 대한 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 150%, 적어도 200%, 적어도 500% 또는 적어도 1000% 증가를 포함할 수 있다.

[0431] "감소된" 또는 "저하된" 또는 "더 적은" 양(예를 들어, 종양 크기, 암세포 증식 또는 성장과 관련하여)은 본원에 언급된 양 또는 수준에 대해 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 또는 50배 또는 그 이상의 배수(예를 들어, 100배, 500배, 1000배)(이들 사이에 있고 1보다 큰 모든 정수 및 소수점 포함, 예를 들어, 1.5, 1.6, 1.7. 1.8 등)의 감소를 지칭한다. 이는 또한 본원에 언급된 양 또는 수준에 대한 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 150%, 적어도 200%, 적어도 500% 또는 적어도 1000% 감소를 포함할 수 있다.

[0432] **A. 장애**

[0433] 본원에 개시된 방법 및 제조된 조성물은 세포 증식성 장애와 같은 다수의 장애를 표적화하는 용도를 가진다. 본 발명의 접근법의 이점은 외인성 항체에 의해 표적화되는 특정한 증식성 세포를 표적화하기 위해 외인성 항체 투여와 조합하여 동종이계 세포가 사용된다는 점이다. 화학요법 또는 방사선요법과 같은 이전 치료법과 달리, 본 발명의 접근법 및 약제학적 조성물을 사용하면, 잠재적으로, 증식하는 세포에 무차별적으로 영향을 미치는 전신 약물 또는 독소를 투여하지 않고도 유해한 증식 활성을 나타내는 세포를 특이적으로 표적화할 수 있다.

[0434] 세포 증식성 및/또는 분화성 장애의 예로는 암, 예를 들어 암종, 육종, 전이성 장애 또는 조혈 신생물성(neoplastic) 장애, 예를 들어 백혈병을 포함한다. 전이성 종양은 전립선, 결장, 폐, 유방 및 간 기원을 포함하되 이에 국한되지 않는 다양한 원발성 종양 유형에서 발생할 수 있다.

[0435] 본원에서 사용되는 용어 "암", "과증식성(hyperproliferative)" 및 "신생물성(neoplastic)"은 자율 성장 능력을 갖는 세포, 즉 급속하게 증식하는 세포 성장을 특징으로 하는 비정상 상태 또는 병태를 지칭한다. 과증식성 및 신생물성 질환 상태는 병리적으로, 즉, 질병 상태를 특징짓거나 구성하는 것으로 분류될 수 있거나, 또는 비병리적으로, 즉, 정상에서 벗어났지만 질병 상태와 연관되지 않는 것으로 분류될 수 있다. 이 용어는 조직병리학적 유형이나 침습 단계에 관계없이 모든 유형의 암성 성장 또는 발암 과정, 전이성 조직 또는 악성 변형

세포, 조직 또는 장기를 포함하는 것을 의미한다. "병리학적 과증식성" 세포는 악성 종양 성장을 특징으로 하는 질병 상태에서 발생한다. 비병리학적 과증식성 세포의 예로는 상처 복구와 관련된 세포의 증식을 포함한다.

[0436] 용어 "암" 또는 "신생물"은 폐, 유방, 갑상선, 림프계, 위장관 및 생식기-요로에 영향을 미치는 등의 다양한 기관계의 악성 종양뿐만 아니라 대부분의 결장암, 신장 세포 암종, 전립선암 및/또는 고환 종양, 폐의 비소세포 암종, 소장암 및 식도암과 같은 악성 종양을 포함하는 선암종을 포함한다.

[0437] 용어 "암종"은 당업계에서 인식되고 있으며 호흡기계 암종, 위장계 암종, 비뇨생식기계 암종, 고환 암종, 유방 암종, 전립선 암종, 내분비계 암종 및 흑색종을 포함하는 상피 또는 내분비 조직의 악성 종양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 질환은 신장 암종 또는 흑색종이다. 예시적인 암종에는 자궁경부, 폐, 전립선, 유방, 두경부, 결장 및 난소의 조직으로부터 형성되는 암종이 포함된다. 이 용어는 또한 예를 들어 암종성 조직과 육종성 조직으로 구성된 악성 종양을 포함하는 암육종(carcinosarcoma)을 포함한다. "선암종"은 선(glandular) 조직으로부터 유래되거나 종양 세포가 인식가능한 선 구조를 형성하는 암종을 지칭한다.

[0438] 용어 "육종"은 당업계에서 인식되고 있으며 중간엽 유래의 악성 종양을 지칭한다.

[0439] 증식성 장애의 추가의 예로는 조혈 신생물성 장애를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "조혈 신생물성 장애"는 예를 들어 골수성, 림프성 또는 적혈구 계통 또는 이의 전구 세포로부터 발생하는 조혈 기원의 과형성/신생물 세포와 관련된 질병을 포함한다. 바람직하게는, 질병은 거의 미분화된 급성 백혈병, 예를 들어 적혈구모구 백혈병 및 급성 거핵모구(megakaryoblastic) 백혈병에서 발생한다. 추가의 예시적인 골수성 장애로는 급성 전골수성 백혈병(APML), 급성 골수성 백혈병(AML) 및 만성 골수성 백혈병(CML)을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니며(Vaickus, L. (1991) Crit Rev. in Oncol./Hemotol. 11:267-97에서 검토됨); 림프성 악성종양은 B 계통 급성 림프모구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL) 및 T 계통 ALL을 포함하는 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 전림프구성 백혈병(PLL), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia, HLL) 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(WM)을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다. 악성 림프종의 추가적인 형태로는 비호지킨 림프종 및 이의 변종, 말초 T 세포 림프종, 성인 T 세포 백혈병/림프종(ATL), 피부 T 세포 림프종(CTCL), 거대 과립 림프구성 백혈병(LGF), 호지킨병 및 리드-스턴버그병(Reed-Sternberg disease)을 포함하지만 이에 국한되는 것은 아니다.

[0440] 일부 구현예에서, 암은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 부신피질 암종, 카포시 육종, AIDS-관련 림프종, 원발성 CNS 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 전형적인 기형종/횡문근 종양(teratoid/rhabdoid tumor), 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌암, 유방암, 기관지 종양, 버킷(Burkitt) 림프종, 카르시노이드(carcinoid), 심장 종양, 수모세포종(medulloblastoma), 생식 세포 종양, 원발성 CNS 림프종, 자궁경부암, 담관암종, 척색종(chordoma), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수증식성 신생물, 결장직장암, 두개인두종(craniopharyngioma), 피부 T 세포 림프종, 유관 제자리 암종(ductal carcinoma in situ), 배아성 종양, 자궁내막암, 상의세포종(ependymoma), 식도암, 감각신경모세포종(esthesioneuroblastoma), 유잉육종, 두개외 생식 세포 종양, 고환외 생식 세포 종양, 안구암(예를 들어, 안내 흑색종 또는 망막모세포종), 자궁관 암(fallopian tube cancer), 뼈의 섬유성 조직구종, 골육종, 담낭암, 위암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질 종양(GIST), 생식 세포 종양, 임신성 융모성 질환, 털세포 백혈병, 두경부암, 심장 종양, 간세포성 암, 조직구증, 호지킨 림프종, 하인두암, 안내 흑색종, 섬세포 종양, 췌장 신경내분비 종양, 신장 (신세포) 암종, 랑게르한스 세포 조직구증, 후두암, 백혈병, 입술 및 구강의 암, 간암, 폐암 (예를 들어, 비-소 세포성 폐암, 소 세포성 폐암, 흉막폐 모세포종 및 기관 기관지 종양(tracheobronchial tumor)), 림프종, 남성 유방암, 뼈의 악성 섬유성 조직구종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, 전이성 암, 전이성 편평 목 암, 중심관 암종 (midline tract carcinoma), 구강암, 다발성 내분비 종양증 증후군, 다발성 골수종/형질 세포 신생물, 균상 식육종(mycosis fungoides), 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 골수증식성 신생물, 비강 및 부비동 암(paranasal sinus cancer), 비인두암, 신경모세포종, 비-호지킨 림프종, 구강암, 입술 및 구강 암, 구강인두암, 골육종, 악성 섬유성 조직구종, 난소암, 췌장암, 췌장 신경내분비 종양, 유두종증, 부신경절종(paraganglioma), 부비동 및 비강 암, 부갑상선 암, 음경암, 인두암, 갈색세포종(pheochromocytomas), 뇌하수체 종양, 형질세포 신생물, 다발성 골수종, 흉막폐 모세포종, 임신성 유방암(pregnancy and breast cancer), 원발성 중추 신경계 림프종, 원발성 복막암, 전립선암, 직장암, 재발암, 신장 세포 암, 망막모세포종, 횡문근육종, 침샘암, 육종(예를 들어, 소아 횡문근육종, 소아 혈관 종양, 유잉육종, 카포시 육종, 골육종, 연조직 육종, 자궁 육종), 세자리 증후군(Sezary syndrome), 피부암, 소장암, 연조직 육종, 편평세포 암종, 편평 목 암, 위암, T-세포 림프종, 고환암, 인후암, 비인두암, 구강인두암, 하인두암, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 기관기관지 종양, 신우 및 요

관의 이행 세포 암(transitional cell cancer), 요도암, 자궁암, 자궁 육종, 질암, 혈관 종양, 외음부암 및 윌름스 종양.

[0441] 일부 구현예에서, 암은 고형 종양이다.

[0442] 일부 구현예에서, 암은 전이성이다.

[0443] 일부 구현예에서, 암은 CD38+ 암이다.

[0444] 일부 구현예에서, CD30+ 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 림프종은 전형적 호지킨 림프종(CHL), 역형성 대세포 림프종(ALCL), 회색지대 림프종(grey zone lymphoma, GZL), 엡스타인-바 바이러스 양성 미만성 거대 B 세포 림프종(EBV+ DLBCL) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0445] 일부 구현예에서, 암은 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B 세포 비호지킨 림프종, 말초 T 세포 림프종, 달리 명시되지 않은 말초 T 세포 림프종, 피부 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종, $CD30^+$ B 세포 림프종, 다발성 골수종, 균상 식육종 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 환자는 재발된 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 환자는 이전의 치료 개입에 불응성이다.

[0446] 일부 구현예에서, 장애는 재발성 또는 불응성 전형적 호지킨 림프종(cHL)이다.

[0447] 일부 구현예에서, 장애는 재발성 또는 불응성 말초 T 세포 림프종(PTCL)이다. 일부 구현예에서, PTCL은 달리 명시되지 않은 말초 T 세포 림프종, 혈관면역모구 T 세포 림프종, 역형성 대세포 림프종 역형성 림프종 키나제(ALK) 양성, 및 역형성 대세포 림프종 ALK 음성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 PTCL 하위유형이다.

[0448] **B. 환자**

[0449] 본 발명의 조성물 및 방법에 적합한 환자로는 세포 증식성 및/또는 분화성 장애, 예를 들어 암을 앓고 있거나, 진단을 받았거나, 갖는 것으로 의심되는 환자를 포함한다. 본 개시내용의 기술을 받은 환자는 일반적으로 본 발명의 방법 및 조성물에 더 잘 반응하는데, 이는 부분적으로 약제학적 조성물이 동종이계이고 일반적으로 증식하는 세포를 표적화 하기보다는 항체에 의해 표적 세포를 식별하기 때문이다. 결과적으로, 오프-표적(off-target) 영향이 덜하고, 환자는 실질적으로 해로운 오프-표적 효과 없이 치료 요법을 완료할 가능성이 더 높다.

[0450] 일부 구현예에서, 본 발명이 제공하는 치료 방법은 세포 증식성 및/또는 분화성 장애, 예를 들어 암으로 진단되었거나 앓고 있는 것으로 의심되는 대상체(예를 들어, 인간, 원숭이, 개, 고양이, 마우스)를 치료하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물이다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0451] 본원에서 사용되는 대상체는 예를 들어 인간을 포함하는 포유동물을 지칭한다.

[0452] 일부 구현예에서, 포유동물은 아르마딜로, 당나귀, 박쥐, 곰, 비버, 고양이, 침팬지, 소, 코요테, 사슴, 개, 돌고래, 코끼리, 여우, 팬더, 긴팔원숭이, 기린, 염소, 땅다람쥐, 고슴도치, 하마, 말, 혹등고래, 재규어, 캥거루, 코알라, 표범, 사자, 라마, 스라소니, 두더지, 원숭이, 마우스, 일각고래, 오랑우탄, 범고래, 수달, 황소, 돼지, 북극곰, 호저(porcupine), 퓨마, 토끼, 너구리, 래트, 코뿔소, 양, 다람쥐, 호랑이, 바다코끼리, 족제비, 늑대, 얼룩말, 염소, 말 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0453] 일부 구현예에서, 포유동물은 인간이다.

[0454] 대상체, 예를 들어, 인간 대상체는 어린이, 예를 들어 0세 또는 약 0세 내지 14세 또는 약 14세일 수 있다. 대상체는 청년, 예를 들어 15세 또는 약 15세 내지 24세 또는 약 24세일 수 있다. 대상체는 성인, 예를 들어 25세 또는 약 25세 내지 64세 또는 약 64세일 수 있다. 대상체는 노인, 예를 들어 65세 이상일 수 있다.

[0455] 일부 구현예에서, 대상체는 세포 증식성 및/또는 분화성 장애, 예를 들어 암, 예를 들어 종양과 관련된 하나 이상의 증상을 나타내는 인간일 수 있다. 본원에 제공된 임의의 치료 방법은 다양한 단계의 암을 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 암 단계는 초기, 진행성, 국소 진행성, 완화, 불응성, 완화 후 재발 및 진행성을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 암의 초기 단계에 있다. 다른 구현예에서, 대상체는 암이 진행된 단계에 있다. 다양한 구현예에서, 대상체는 I기, II기, III기 또는 IV기 암을 앓고 있다. 본원에 기술된 치료 방법은 종양의 감소 또는 수축을 촉진하고, 종양 성장 또는 암 세포 증식을 감소 또는 억제하고, 및/또는 종양 세포 사멸을 유도, 증가 또는 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 암 완화 상태에 있다. 본원에 기술된 치료 방법은 암의 전이 또는 재발을 예방하거나 지연시킬 수 있다.

[0456] 일부 구현예에서, 대상체는 진단되었거나 진단되지 않은 세포 증식성 및/또는 분화성 장애, 예를 들어 암이 발

생할 위험이 있거나 유전적으로 또는 달리 소인(예를 들어, 위험 인자)을 갖고 있다.

[0457] 본원에서 사용되는 "위험이 있는" 개체는 치료할 상태, 예를 들어 세포 증식성 및/또는 분화성 장애, 예를 들어 암이 발생할 위험이 있는 개체이다. 일반적으로, "위험이 있는" 대상체는 검출 가능한 질병을 갖거나 갖지 않을 수도 있고, 본원에 기술된 치료 방법 이전에 검출 가능한 질병을 나타내거나 나타내지 않을 수도 있다. "위험이 있는"이라는 것은 개체가 하나 이상의 소위 위험 인자를 갖고 있음을 의미하며, 이는 질병 또는 상태의 발달과 연관되고 당업계에 공지된 측정 가능한 파라미터이다. 예를 들어, 위험이 있는 대상체는 암의 발병과 관련이 있는 측정 가능한 파라미터인 하나 이상의 위험 인자를 가질 수 있다. 이러한 위험 인자 중 하나 이상을 갖고 있는 대상체는 이러한 위험 인자(들)이 없는 개체보다 암이 발생할 가능성이 더 높다. 일반적으로, 위험 인자는 예를 들어 연령, 성별, 인종, 식이요법, 이전 질병 병력, 전구 질환의 존재, 유전적(예를 들어, 유전성) 고려사항 및 환경 노출을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 암에 걸릴 위험이 있는 대상체는, 예를 들어 질병을 경험한 친척이 있는 대상체, 및 유전적 또는 생화학적 마커의 분석에 의해 결정된 위험을 가진 대상체를 포함한다.

[0458] 또한, 대상체는 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 수술 또는 이들의 조합과 같은 하나 이상의 표준 요법을 받고 있을 수 있다. 따라서, 하나 이상의 키나제 억제제는 화학요법, 방사선요법, 면역요법, 수술 또는 이들의 조합의 투여 전, 도중 또는 후에 투여될 수 있다.

[0459] 특정 구현예에서, 대상체는 (i) 적어도 하나의 화학요법 치료에 실질적으로 불응성이거나, (ii) 화학요법으로의 치료 후 재발하거나, 또는 (i) 및 (ii) 둘 다인 인간일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 화학요법 치료(표준 또는 실험적 화학요법 포함)에 불응성이다.

[0460] 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD30 항체로 치료한 후 재발했거나 항-CD30 항체에 불응성이다. 일부 구현예에서, 항-CD30 항체는 브렌툭시맙 베도틴이다.

[0461] 일부 구현예에서, 대상체는 자가 줄기세포 이식 또는 키메라 항원 수용체 T 세포 요법(CAR-T)으로 치료한 후 질병 진행을 경험하였다.

[0462] 일부 구현예에서, 환자는 CD30+ 암으로 진단되었거나 진단된 적이 있다.

[0463] 일부 구현예에서, 환자는 암의 생검 또는 수술 샘플의 면역조직화학적 염색에 의해 CD30+ 암으로 진단되었거나 진단된 적이 있다. 일부 구현예에서, 환자는 발색성 제자리 혼성화에 의해 CD30+ 암으로 진단되었거나 진단된 적이 있다. 일부 구현예에서, 환자는 암의 생검 또는 수술 샘플의 형광 제자리 혼성화에 의해 CD30+ 암으로 진단되었거나 진단된 적이 있다. 일부 구현예에서, 환자는 유전자 분석에 의해 CD30+ 암으로 진단되었거나 진단된 적이 있다.

[0464] 일부 구현예에서, 환자는 CD30 억제제를 사용한 치료에 불응성이거나 치료 후에 재발을 가진다.

[0465] 일부 구현예에서, 환자는 화학요법 약물로의 치료에 불응성이거나 치료 후에 재발을 가진다.

[0466] 일부 구현예에서, 화학요법 약물은 시스플라틴, 도세탁셀, 카르보플라틴, 젬시타빈, 시스플라틴, 페메트렉시드 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0467] 일부 구현예에서, 환자는 티로신 키나제 억제제를 사용한 치료에 불응성이거나 치료 후에 재발을 가진다. 일부 구현예에서, 티로신 키나제 억제제는 게피티닙, 에를론티닙, 아파티닙, 오시머티닙 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0468] 일부 구현예에서, 환자는 재발성 또는 불응성 전형적 호지킨 림프종을 갖고 있으며 한 개의 이전 라인(prior line)의 병용 화학요법을 포함하는 적어도 두 개 라인의 치료법을 받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 이전 요법은 브렌툭시맙 베도틴 및 체크 포인트 억제제를 포함한다.

[0469] 일부 구현예에서, 환자는 재발성 또는 불응성 말초 T 세포 림프종을 갖고 있으며 적어도 한 개의 이전 라인의 병용 요법을 받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 이전 요법은 브렌툭시맙 베도틴을 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 재발성 또는 불응성 말초 T 세포 림프종을 갖고 있으며 브렌툭시맙 베도틴에 불내성(intolerant)이 있거나 그러한 적이 있었다.

[0470] **C. 림프구고갈(Lymphodepletion)**

[0471] 일부 구현예에서, 환자는 치료 전에 림프구고갈된다.

[0472] 예시적인 림프구고갈 화학요법 요법은 상관적이고 유익한 바이오마커와 함께 WO 2016/191756 및 WO 2019/079564에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 특정 구현예에서, 림프구고갈 화학요법 요법은 환자에게 사이클로포스파미드 용량(200 mg/m^2/일 내지 2000 mg/m^2/일) 및 플루다라빈 용량(20 mg/m^2/일 내지 900 mg/m^2/일)을 투여하는 것을 포함한다.

[0473] 일부 구현예에서, 림프구고갈은 250 또는 약 250 내지 500 또는 약 500 mg/m^2의 사이클로포스파미드, 예를 들어 250 또는 약 250 내지 500 또는 약 500, 250, 400, 500, 약 250, 약 400 또는 약 500 mg/m^2의 사이클로포스파미드의 투여를 포함한다

[0474] 일부 구현예에서, 림프구고갈은 20 또는 약 20 mg/m^2/일 내지 40 또는 약 40 mg/m^2/일 플루다라빈, 예를 들어 30 또는 약 30 mg/m^2/일의 투여를 포함한다.

[0475] 일부 구현예에서, 림프구고갈은 사이클로포스마이드 및 플루다라빈 둘 다의 투여를 포함한다.

[0476] 일부 구현예에서, 환자는 사이클로포스파미드(250 mg/m^2/일) 및 플루다라빈(30 mg/m^2/일)의 정맥내 투여에 의해 림프구고갈된다.

[0477] 일부 구현예에서, 환자는 사이클로포스파미드(500 mg/m^2/일) 및 플루다라빈(30 mg/m^2/일)의 정맥내 투여에 의해 림프구고갈된다.

[0478] 일부 구현예에서, 림프구고갈은 NK 세포의 첫 번째 투여 전 5일 이내에 발생한다. 일부 구현예에서, 림프구고갈은 NK 세포의 첫 번째 투여 전 7일 이내에 발생한다.

[0479] 일부 구현예에서, 림프구고갈은 NK 세포의 첫 번째 투여 5일 전부터 시작하여 연속 3일 동안 매일 발생한다(즉, -5일부터 -3일까지).

[0480] 일부 구현예에서, 림프구 고갈은 -5일, -4일 및 -3일에 발생한다.

[0481] **D. 투여**

[0482] ***1. NK세포***

[0483] 일부 구현예에서, NK 세포는 약제학적 조성물, 예를 들어 본원에 기재된 약제학적 조성물의 일부로서 환자에게 투여된다. 세포는 해동 후 투여되며, 일부 경우에는 냉동보호제(cryoprotectant)가 즉시 투여에 적합한 경우 추가 조작 없이 투여된다. 소정의 개체에 대해, 치료 요법은 종종 공통의 배치 또는 기증자로부터 채취한 NK 세포의 여러 분취량 또는 용량을 시간에 걸쳐 투여하는 것을 포함한다.

[0484] 일부 구현예에서, 치료는 공통의 배치, 마스터 세포 은행 또는 기증자로부터 채취한 NK 세포(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같음)의 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료는 서로 다른 배치, 마스터 세포 은행 또는 기증자로부터 채취한 NK 세포(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같음)의 용량의 투여를 포함한다. 예를 들어, 첫 번째 기증자로부터 생산된 NK 세포를 처음 투여받은 환자는 첫 번째 기증자로부터 생산된 NK 세포에 대해 면역원성이 발생한 경우 두 번째 기증자로부터 생산된 NK 세포를 투여받을 수 있다.

[0485] NK 세포는 임의의 적합한 수단에 의해, 예를 들어 볼루스 주입에 의해, 주사에 의해, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내 주사, 안구주위 주사, 망막하 주사, 유리체강내 주사, 트랜스-중격(trans-septal) 주사, 공막하(subscleral) 주사, 맥락막내(intrachoroidal) 주사, 전안방내(intracameral) 주사, 결막하(subconjectval) 주사, 결막하(subconjuntival) 주사, 테논하 주사(sub-Tenon's injection), 안구후(retrobulbar) 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후방공막옆 전달(posterior juxtascleral delivery)에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비강내로 투여되고, 국소 치료를 위해 원하는 경우 병변내 투여로 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 일부 구현예에서, 주어진 용량은 세포의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 주어진 용량은 예를 들어 3일 이하의 기간에 걸쳐 세포의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 세포 용량 또는 임의의 추가 요법, 예를 들어 다중특이적 인게이저 요법, 림프구고갈 요법, 개입 요법 및/또는 병용 요법의 투여는 외래환자 전달을 통해 수행된다.

[0486] 입양 세포 요법의 맥락에서, 주어진 "용량(dose)"의 투여는 주어진 양 또는 개수의 세포를 단일 조성물 및/또는

단일의 중단 없는(uninterrupted) 투여, 예를 들어 단일 주사 또는 연속 주입으로서 투여하는 것을 포함할 수 있다. 주어진 "용량"은 또한 주어진 양 또는 개수의 세포를 특정의 기간에 걸쳐, 예컨대 3일 이하에 걸쳐, 다중 개별 조성물 또는 주입으로 제공되는 분할 투여량으로 또는 다수의 조성물로서 투여하는 것을 포함할 수 있다. 따라서 일부 상황에서 용량은 단일 시점에 제공되거나 시작되는, 지정된 개수의 세포를 단일 또는 연속 투여하는 것이다. 그러나 일부 상황에서는 용량이 3일 이하의 기간에 걸쳐 다중 주사 또는 주입으로 투여되며, 예컨대 3일 동안 또는 2일 동안 1일 1회 또는 하루에 걸쳐 여러 번 주입하는 등이다.

[0487] 일부 구현예에서, NK 세포는 100만 또는 약 100만 개 내지 1000억 또는 약 1000억 개 세포의 범위로 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포, 예를 들어 본원에 기재된 NK 세포는 용량당 5 x 10^6 또는 약 5 x 10^6개 내지 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개의 NK 세포로 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 용량당 5 x 10^6 또는 약 5 x 10^6, 1 x 10^7 또는 약 1 x 10^7, 3 x 10^7 또는 약 3 x 10^7, 1 x 10^8 또는 약 1 x 10^8, 3 x 10^8 또는 약 3 x 10^8, 또는 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개의 세포로 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 용량당 100만 또는 약 100만 개 내지 200억 또는 약 200억 개 세포(예를 들어, 5백만 또는 약 5백만 개 세포, 2천5백만 또는 약 2천5백만 개 세포, 5천만 또는 약 5천만 개 세포, 7천5백만 또는 약 7천5백만 개 세포, 1억 또는 약 1억 개 세포, 2억 또는 약 2억 개 세포, 3억 또는 약 3억 개 세포, 4억 또는 약 4억 개 세포, 5억 또는 약 5억 개 세포, 10억 또는 약 10억 개 세포, 20억 또는 약 20억 개 세포, 30억 또는 약 30억 개 세포, 40억 또는 약 40억 개 세포, 50억 또는 약 50억 개 세포, 60억 또는 약 60억 개 세포, 70억 또는 약 70억 개 세포, 80억 또는 약 80억 개 세포, 90억 또는 약 90억 개 세포, 100억 또는 약 100억 개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개로 정의되는 범위), 1,000만 또는 약 1,000만 개 내지 200억 또는 약 200억 개 세포(예를 들어, 2,500만 또는 약 2,500만 개, 5,000만 또는 약 5,000만 개 세포, 7,500만 또는 약 7,500만 개, 1억 또는 약 1억 개 세포, 2억 또는 약 2억 개 세포, 3억 또는 약 3억 개 세포, 4억 또는 약 4억 개 세포, 5억 또는 약 5억 개 세포, 10억 또는 약 10억 개 세포, 20억 또는 약 20억 개 세포, 30억 또는 약 30억 개 세포, 40억 또는 약 40억 개 세포, 50억 또는 약 50억 개 세포, 60억 또는 약 60억 개 세포, 70억 또는 약 70억 개 세포, 80억 또는 약 80억 개 세포, 90억 또는 약 90억 개 세포, 100억 또는 약 100억 개 세포, 200억 또는 약 200억 개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개로 정의되는 범위), 그리고 일부 경우에 1억 또는 약 1억 개 세포 내지 500억 또는 약 500억 개 세포(예를 들어, 1억 5천만 또는 약 1억 5천만 개 세포, 2억 또는 약 2억 개 세포, 3억 또는 약 3억 개 세포, 4억 또는 약 4억 개 세포, 5억 또는 약 5억 개 세포, 10억 또는 약 10억 개 세포, 20억 또는 약 20억 개 세포, 30억 또는 약 30억 개 세포, 40억 또는 약 40억 개 세포, 50억 또는 약 50억 개 세포, 60억 또는 약 60억 개 세포, 70억 또는 약 70억 개 세포, 80억 또는 약 80억 개 세포, 90억 또는 약 90억 개 세포, 100억 또는 약 100억 개 세포, 200억 또는 약 200억 개 세포, 300억 또는 약 300억 개 세포, 400억 또는 약 400억 개 세포), 또는 이들 범위 사이의 모든 값으로 투여된다.

[0488] 따라서, 일부 구현예에서, NK 세포는 용량당 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6 또는 9 x 10^6개, 또는 약 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6 또는 9 x 10^6개의 세포, 용량당 1 x 10^7, 2 x 10^7, 3 x 10^7, 4 x 10^7, 5 x 10^7, 6 x 10^7, 7 x 10^7, 8 x 10^7 또는 9 x 10^7개, 또는 약 1 x 10^7, 2 x 10^7, 3 x 10^7, 4 x 10^7, 5 x 10^7, 6 x 10^7, 7 x 10^7, 8 x 10^7 또는 9 x 10^7개의 세포, 용량당 1 x 10^8, 2 x 10^8, 3 x 10^8, 4 x 10^8, 5 x 10^8, 6 x 10^8, 7 x 10^8, 8 x 10^8 또는 9 x 10^8개, 또는 약 1 x 10^8, 2 x 10^8, 3 x 10^8, 4 x 10^8, 5 x 10^8, 6 x 10^8, 7 x 10^8, 8 x 10^8 또는 9 x 10^8개의 세포, 용량당 1 x 10^9, 2 x 10^9, 3 x 10^9, 4 x 10^9, 5 x 10^9, 6 x 10^9, 7 x 10^9, 8 x 10^9 또는 9 x 10^9개, 또는 약 1 x 10^9, 2 x 10^9, 3 x 10^9, 4 x 10^9, 5 x 10^9, 6 x 10^9, 7 x 10^9, 8 x 10^9 또는 9 x 10^9개의 세포, 용량당 1 x 10^{10} 또는 2 x 10^{10}개, 또는 약 1 x 10^{10} 또는 약 2 x 10^{10}개의 세포를 포함하는 용량으로 투여된다.

[0489] 따라서, 일부 구현예에서, NK 세포는 용량당 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^6, 2 x 10^6, 3 x 10^6, 4 x 10^6, 5 x 10^6, 6 x 10^6, 7 x 10^6, 8 x 10^6 또는 9 x 10^6개의 세포, 용량당 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^7, 2 x 10^7, 3 x 10^7, 4 x 10^7, 5 x 10^7, 6 x 10^7, 7 x 10^7, 8 x 10^7 또는 9 x 10^7개의 세포, 용량당 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^8, 2 x 10^8, 3 x 10^8, 4 x 10^8, 5 x 10^8, 6 x 10^8, 7 x 10^8, 8 x 10^8 또는 9 x 10^8개의 세포, 용량당 적어도 또

는 적어도 약 1 x 10^9, 2 x 10^9, 3 x 10^9, 4 x 10^9, 5 x 10^9, 6 x 10^9, 7 x 10^9, 8 x 10^9 또는 9 x 10^9개의 세포, 또는 용량당 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^{10}, 또는 2 x 10^{10}개의 세포를 포함하는 용량으로 투여된다.

[0490] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 세포의 용량이 환자의 체표면적 또는 체중에 묶여 있거나 이를 기초로 하지 않도록 하는 세포의 균일 용량(flat dose) 또는 세포의 고정 용량(fixed dose)이다.

[0491] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 환자의 체중에 기초하여 투여된다. 예를 들어, 용량은 환자의 체중 1kg당 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 용량은 1 x 10^5 또는 약 1 x 10^5개 세포/kg 내지 1 x 10^8 또는 약 1 x 10^8개 세포/kg, 예컨대 1.5 x 10^5 또는 약 1.5 x 10^5개 세포/kg 내지 1.5 x 10^7 또는 약 1.5 x 10^7개 세포/kg, 또는 4 x 10^5 또는 약 4 x 10^5개 세포/kg 내지 4 x 10^6 또는 약 4 x 10^6개 세포/kg을 포함한다.

[0492] 따라서, 일부 구현예에서, NK 세포는 다음을 포함하는 용량으로 투여된다: 약 1 x 10^5, 1.5 x 10^5, 2 x 10^5, 2.5 x 10^5, 3 x 10^5, 3.5 x 10^5, 4 x 10^5, 4.5 x 10^5, 5 x 10^5, 5.5 x 10^5, 6 x 10^5, 6.5 x 10^5, 7 x 10^5, 7.5 x 10^5, 8 x 10^5, 8.5 x 10^5, 9 x 10^5, 또는 9.5 x 10^5개 세포/kg, 1 x 10^6, 1.5 x 10^6, 2 x 10^6, 2.5 x 10^6, 3 x 10^6, 3.5 x 10^6, 4 x 10^6, 4.5 x 10^6, 5 x 10^6, 5.5 x 10^6, 6 x 10^6, 6.5 x 10^6, 7 x 10^6, 7.5 x 10^6, 8 x 10^6, 8.5 x 10^6, 9 x 10^6, 또는 9.5 x 10^6개 세포/kg, 약 1 x 10^7, 1.5 x 10^7, 2 x 10^7, 2.5 x 10^7, 3 x 10^7, 3.5 x 10^7, 4 x 10^7, 4.5 x 10^7, 5 x 10^7, 5.5 x 10^7, 6 x 10^7, 6.5 x 10^7, 7 x 10^7, 7.5 x 10^7, 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7개 세포/kg, 또는 9.5 x 10^7, 또는 약 1 x 10^8, 1.5 x 10^8, 또는 2 x 10^8개 세포/kg.

[0493] 일부 구현예에서, NK 세포는 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^5, 1.5 x 10^5, 2 x 10^5, 2.5 x 10^5, 3 x 10^5, 3.5 x 10^5, 4 x 10^5, 4.5 x 10^5, 5 x 10^5, 5.5 x 10^5, 6 x 10^5, 6.5 x 10^5, 7 x 10^5, 7.5 x 10^5, 8 x 10^5, 8.5 x 10^5, 9 x 10^5, 또는 9.5 x 10^5개 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^6, 1.5 x 10^6, 2 x 10^6, 2.5 x 10^6, 3 x 10^6, 3.5 x 10^6, 4 x 10^6, 4.5 x 10^6, 5 x 10^6, 5.5 x 10^6, 6 x 10^6, 6.5 x 10^6, 7 x 10^6, 7.5 x 10^6, 8 x 10^6, 8.5 x 10^6, 9 x 10^6, 또는 9.5 x 10^6개 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^7, 1.5 x 10^7, 2 x 10^7, 2.5 x 10^7, 3 x 10^7, 3.5 x 10^7, 4 x 10^7, 4.5 x 10^7, 5 x 10^7, 5.5 x 10^7, 6 x 10^7, 6.5 x 10^7, 7 x 10^7, 7.5 x 10^7, 8 x 10^7, 8.5 x 10^7, 9 x 10^7개 세포/kg, 또는 9.5 x 10^7, 또는 적어도 또는 적어도 약 1 x 10^8 또는 1.5 x 10^8개 세포/kg을 포함하는 용량으로 투여된다.

[0494] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 NK 세포의 용량은 대상체에게 단일 용량으로 투여되거나 또는 2주, 1개월, 3개월, 6개월, 1년 또는 그 이상의 기간 내에 단 한 번만 투여된다.

[0495] 반복 투여를 제공하는 능력은 환자가 요법으로부터 더 깊거나 장기간의 반응을 경험하거나 유지하도록 허용할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 환자는 NK 세포의 다중 용량, 예를 들어 2회 이상의 용량 또는 적어도 1회 후속 용량을 투여받는다. 일부 구현예에서, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 용량이 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차 용량 및 3차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차, 3차 및 4차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차, 3차, 4차 및 5차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차, 3차, 4차, 5차 및 6차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차, 3차, 4차, 5차, 6차 및 7차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 1회 후속 용량은 2차, 3차, 4차, 5차, 6차, 7차 및 8차 용량을 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 반응에 기반한 투여를 받을 수 있으며, 그 동안 환자는 이익을 얻는 한 계속해서 NK 세포 요법의 투여량을 받는다. 투여 횟수 및 각 투여량에 투여되는 세포의 수는 또한 개별 환자에 맞춤화될 수 있다. 일부 구현예에서, 추가적 또는 후속 용량 또는 용량들로 대상체에게 투여되는 세포의 수는 1차 용량과 동일하거나 유사하다. 따라서, 본원에 기술된 NK 세포 치료법은 환자 자신의 반응에 기초하여 각 환자에게 맞춤화될 수 있다. 일부 경우에는 환자가 더 이상 NK 세포 치료법의 효과를 얻지 못하는 경우 치료가 종료될 수 있다. 일부 경우에는 환자가 재발하면 치료를 다시 시작할 수도 있다.

[0496] 다중 투여 또는 반복 투여를 포함하는 일부 구현예에서, NK 세포는 매주, 격주, 3주마다 1회, 4주마다 1회, 5주마다 1회, 6주마다 1회, 7주마다 1회, 8주마다 1회, 9주마다 1회, 10주마다 1회, 11주마다 1회, 12주마다 1회,

13주마다 1회, 14주마다 1회, 15주마다 1회, 또는 16주마다 1회 투여된다. 예를 들어, 환자는 1차 용량, 2차 용량, 3차 용량을 받을 수 있으며, 여기서 각 용량은 1주 간격으로 분리된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 매월 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 격월로 또는 3개월마다 1회 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 3주 또는 약 3주 동안 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 4주 또는 약 4주 동안 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 8주 또는 약 8주 동안 투여된다.

[0497] 일부 구현예에서, 투여 일정은 치료 과정에 걸쳐 달라질 수 있다. 따라서, 예를 들어 환자는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16주마다 첫 번째 일련(또는 주기)의 투여량을 받고, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16주마다 두 번째 일련의 투여량을 받을 수 있으며, 여기서 첫 번째 일련의 투여량과 두 번째 일련의 투여량 사이의 시간은 상이하다. 일부 구현예에서, 환자는 첫 번째 일련의 투여량에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 투여량을 받고, 두 번째 일련의 투여량에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 투여량을 받으며, 여기서 첫 번째 일련의 투여량과 두 번째 일련의 투여량의 투여량 수는 동일하거나 다를 수 있다. 따라서, 예를 들어, 환자는 첫 번째 일련의 투여량에서 격주로 투여되는 4회 투여량과 두 번째 일련의 투여량에서 12주마다 투여되는 4회 투여량을 투여받을 수 있다.

[0498] 일부 구현예에서, NK 세포는 9개월의 과정에 걸쳐 1회 내지 4회 투여된다.

[0499] 일부 구현예에서, NK 세포는 인퓨전-레디 배지, 예를 들어 정맥내 투여에 적합한 냉동보존 조성물에, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, 냉동보존된다.

[0500] 일부 구현예에서, NK 세포는 바이알당 1 x 10^7 또는 약 1 x 10^7개 내지 1 x 10^9 또는 약 1 x 10^9개의 세포를 함유하는 바이알에 냉동보존된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 단일 용량을 함유하는 바이알에 냉동보존된다.

[0501] 일부 구현예에서, 세포는 투여 전에 예를 들어 37℃ 수조에서 해동된다.

[0502] 일부 구현예에서, NK 세포의 해동된 바이알(들)은 예를 들어 바이알 어댑터 및 멸균 주사기를 사용하여 단일 투여 용기, 예를 들어 투여 백으로 무균적으로 전달된다. NK 세포는 중력에 의해 IV 주입으로 Y형 혈액/용액 세트 필터를 통해 용기로부터 환자에게 투여될 수 있다.

[0503] 일부 구현예에서, NK 세포는 가능한 한 빨리, 바람직하게는 해동 후 90분 미만, 예를 들어 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10분 미만에 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 해동 후 30분 이내에 투여된다.

[0504] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 주사기를 통해 정맥내로 투여된다.

[0505] 일부 구현예에서, 1 mL, 4 mL, 또는 10 mL의 의약품이 주사기를 통해 정맥내로 환자에게 투여된다.

[0506] 일부 구현예에서, 환자에게는 NK 세포 주입이 투여되기 전에 아세트아미노펜이 투여된다. 일부 구현예에서, 환자에게는 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1250, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1750, 1800, 1900, 또는 2000 mg의 아세트아미노펜이 투여된다. 일부 구현예에서, 아세트아미노펜은 NK 세포 직전에 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 아세트아미노펜은 NK 세포 투여 전 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 또는 180분 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 아세트아미노펜은 경구로 투여된다.

[0507] 일부 구현예에서, 환자에게는 NK 세포 주입이 투여되기 전에 디펜히드라민이 투여된다. 일부 구현예에서, 환자에게는 5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 또는 100 mg의 디펜히드라민이 투여된다. 일부 구현예에서, 디펜히드라민은 NK 세포 직전에 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 디펜히드라민은 NK 세포 투여 전 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 또는 180분 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 아세트아미노펜은 경구로 투여된다.

[0508] 일부 구현예에서, NK 세포 투여 전 및 투여 후 일정 기간 동안 환자를 모니터링한다. 예를 들어, 환자의 바이탈 사인(vital sign)을 모니터링할 수 있다. 여기에는 체온, 호흡수, 심박수, 혈압, 및 맥박 산소 측정에 의한 산소 포화도(SaO_2)가 포함될 수 있다. 일부 경우에는, 적어도 하나의 바이탈 사인을 NK 세포 투여 전 5분, 10분, 15분, 20분, 25분 또는 30분 전에 시작하여 측정한다. NK 세포 투여 후, 적어도 하나의 바이탈 사인을 1, 2, 3, 4 또는 5시간 동안 지속적으로 또는 대략 5분, 10분, 15분, 20분, 25분 또는 30분 마다를 포함하여 규칙적 또는 불규칙한 간격으로 모니터링할 수 있다. 일부 경우에는, NK 세포 투여 후 환자가 안정될 때까지 바이탈 사인을 모니터링할 수 있다.

[0509] *2. 다중특이적 인게이저*

[0510] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 NK 세포(들), 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포(들)를 포함하는 약제학적 조성물은 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저, 예를 들어, CD30 표적화 다중특이적 인게이저와 조합하여 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 약제학적 조성물의 일부로서 NK 세포와 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 NK 세포와 별도로, 예를 들어 별도의 약제학적 조성물의 일부로 투여된다.

[0511] 다중특이적 인게이저는 NK 세포 투여 전, 투여 후 또는 투여와 동시에 투여될 수 있다.

[0512] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 NK 세포 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 NK 세포 후에 투여된다.

[0513] 일부 구현예에서, NK 세포는 다중특이적 인게이저가 투여된 다음날 투여된다.

[0514] 일부 구현예에서, NK 세포는 각각의 투여에 투여되는 반면, 다중특이적 인게이저는 투여의 하위세트에 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, NK 세포는 주 1회 투여되고, 다중특이적 인게이저는 월 1회 투여된다.

[0515] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저의 용량은 세포의 첫 번째 용량 이전에 제공된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저의 용적축소(debulking) 용량은 세포의 첫 번째 용량 이전에 제공된다.

[0516] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 0.01 내지 10 또는 약 0.01 내지 10 mg/kg, 예를 들어 약 0.1 내지 9, 0.01 내지 8, 0.01 내지 7, 0.01 내지 6, 0.01 내지 5, 0.01 내지 4, 0.01 내지 3, 0.01 내지 2, 0.01 내지 1.5, 0.01 내지 1, 0.01 내지 0.5, 0.01 내지 0.15, 0.01 내지 0.04, 0.04 내지 10, 0.04 내지 9, 0.04 내지 8, 0.04 내지 7, 0.04 내지 6, 0.04 내지 5, 0.04 내지 4, 0.04 내지 3, 0.04 내지 2, 0.04 내지 1.5, 0.04 내지 1, 0.04 내지 0.5, 0.04 내지 0.15, 0.15 내지 10, 0.15 내지 9, 0.15 내지 8, 0.15 내지 7, 0.15 내지 6, 0.15 내지 5, 0.15 내지 4, 0.15 내지 3, 0.15 내지 2, 0.15 내지 1.5, 0.15 내지 1, 0.15 내지 0.5, 0.5 내지 10, 0.5 내지 9, 0.5 내지 8, 0.5 내지 7, 0.5 내지 6, 0.5 내지 5, 0.5 내지 4, 0.5 내지 3, 0.5 내지 2, 0.5 내지 1.5, 0.5 내지 1, 1 내지 10, 1 내지 9, 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 1 내지 1.5, 1.5 내지 10, 1.5 내지 9, 1.5 내지 8, 1.5 내지 7, 1.5 내지 6 1.5 내지 5, 1.5 내지 4, 1.5 내지 3, 1.5 내지 2, 2 내지 10, 2 내지 9, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 10, 3 내지 9, 3 내지 8, 3 내지 7, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 10, 4 내지 9, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 10, 5 내지 9, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 10, 6 내지 9, 6 내지 8, 6 내지 7, 7 내지 10, 7 내지 9, 7 내지 8, 8 내지 10, 8 내지 9, 또는 9 내지 10 mg/kg으로 환자에게 투여된다.

[0517] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 0.01 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.015 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 4.5 mg/kg, 또는 7.0 mg/kg, 또는 약 0.01 mg/kg, 0.04 mg/kg, 0.015 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 4.5 mg/kg, 또는 7.0 mg/kg으로 환자에게 투여된다.

[0518] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저의 용량은 100 또는 약 100 내지 300 또는 약 300 mg, 예를 들어 약 100 내지 275, 100 내지 250, 100 내지 225, 100 내지 200, 100 내지 175, 100 내지 150, 100 내지 125, 125 내지 300, 125 내지 275, 125 내지 250, 125 내지 225, 125 내지 200, 125 내지 175, 125 내지 150, 150 내지 300, 150 내지 275, 150 내지 250, 150 내지 225, 150 내지 200, 150 내지 175, 175 내지 300, 175 내지 275, 175 내지 250, 175 내지 225, 175 내지 200, 200 내지 300, 200 내지 275, 200 내지 250, 200 내지 225, 225 내지 300, 225 내지 275, 225 내지 250, 250 내지 275, 또는 275 내지 300 mg을 포함한다.

[0519] 다중특이적 인게이저는 임의의 적합한 수단에 의해, 예를 들어 볼루스 주입에 의해, 주사에 의해, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내 주사, 안구주위 주사, 망막하 주사, 유리체강내 주사, 트랜스-중격(trans-septal) 주사, 공막하(subscleral) 주사, 맥락막내(intrachoroidal) 주사, 전안방내(intracameral) 주사, 결막하(subconjectval) 주사, 결막하(subconjuntival) 주사, 테논하 주사(sub-Tenon's injection), 안구후(retrobulbar) 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후방공막옆 전달(posterior juxtascleral delivery)에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 비경구, 폐내 및 비강내로 투여되고, 국소 치료를 위해 원하는 경우 병변내 투여로 투여된다. 비경구 주입에는 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여가 포함된다. 일부 구현예에서, 주어진 용량은 다중특이적 인게이저의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 주어진 용량은 예를 들어 3일 이하의 기간에 걸쳐 다중특이적 인게이저의 다중 볼루스 투여에

의해, 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 투여된다.

[0520] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 NK 세포의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저의 투여는 NK 세포의 투여 개시 전 적어도 15, 30, 45, 60, 90 또는 120분 전에 완료된다. 일부 구현예에서, NK 세포는 다중특이적 인게이저의 투여 전에 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포의 투여는 다중특이적 인게이저의 투여 개시 전 적어도 15, 30, 45, 60, 90 또는 120분 전에 완료된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 용량이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8시간에 걸쳐 투여되도록 하는 속도로 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 용량이 4시간에 걸쳐 투여되도록 하는 속도로 투여된다.

[0521] 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 6주 동안 매주 투여되고, NK 세포는 4주 동안 매주 투여된다. 일부 구현예에서, 다중특이적 인게이저는 4시간에 걸쳐 각 주기의 1일, 8일, 15일, 22일, 29일 및 36일에 200 mg IV QW의 고정 용량으로 투여될 것이다. 일부 구현예에서, NK 세포는 각 주기의 1일, 8일 및 15일에 10억 또는 40억 개 세포의 용량으로 투여될 것이다. 일부 구현예에서, 환자에게는 1회, 2회, 3회, 4회 또는 5회의 치료 주기가 투여될 것이다. 일부 구현예에서, 치료 주기 사이에 1주, 2주, 3주, 4주 또는 5주 중단(break)이 있을 것이다.

[0522] *3. 사이토카인*

[0523] 일부 구현예에서, 사이토카인이 환자에게 투여된다.

[0524] 일부 구현예에서, 사이토카인은 약제학적 조성물의 일부로서 NK 세포와 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 NK 세포와 별도로, 예를 들어 별도의 약제학적 조성물의 일부로 투여된다.

[0525] 일부 구현예에서, 사이토카인은 IL-2이다.

[0526] 일부 구현예에서, IL-2는 피하로 투여된다.

[0527] 일부 구현예에서, IL-2는 NK 세포 투여 종료 후 1 내지 4시간 또는 약 1 내지 약 4시간에 투여된다. 일부 구현예에서, IL-2는 NK 세포 투여 종료 후 적어도 1시간에 투여된다. 일부 구현예에서, IL-2는 NK 세포 투여 종료 후 4시간 이내에 투여된다. 일부 구현예에서, IL-2는 NK 세포 투여 종료 후 적어도 1시간 및 종료 후 4시간 이내에 투여된다.

[0528] 일부 구현예에서, IL-2는 최대 10,000,000 IU/M^2, 예를 들어 최대 1,000,000, 2,000,000, 3,000,000, 4,000,000, 5,000,000, 6,000,000, 7,000,000, 8,000,000, 9,000,000 또는 10,000,000 IU/m^2로 투여된다.

[0529] 일부 구현예에서, IL-2는 1,000,000 또는 약 1,000,000, 2,000,000 또는 약 2,000,000, 또는 3,000,000 또는 약 3,000,000, 또는 4,000,000 또는 약 4,000,000, 또는 5,000,000 또는 약 5,000,000, 또는 6,000,000 또는 약 6,000,000, 또는 7,000,000 또는 약 7,000,000, 또는 8,000,000 또는 약 8,000,000, 또는 9,000,000 또는 약 9,000,000, 또는 10,000,000 또는 약 10,000,000 IU/M^2로 투여된다.

[0530] 일부 구현예에서, IL-2는 1×10^6 또는 약 1×10^6 IU/M^2로 투여된다. 일부 구현예에서, IL-2는 2×10^6 또는 약 2×10^6 IU/M^2로 투여된다.

[0531] 일부 구현예에서, 1×10^6 IU/M^2 미만의 IL-2가 환자에게 투여된다.

[0532] 일부 구현예에서, IL-2의 균일 용량이 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, 6,000,000 IU 또는 약 6,000,000 IU의 균일 용량이 환자에게 투여된다.

[0533] 일부 구현예에서, IL-2는 환자에게 투여되지 않는다.

[0534] *4. 사전-치료(Pre-Treatment)*

[0535] 일부 구현예에서, 환자는 약물로 사전 치료된다. 일부 구현예에서, 약물은 H1 길항제, H2 길항제, 아세트아미노펜, 예방적 항구토제, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, H1 길항제는 디펜히드라민이다. 일부 구현예에서, H2 길항제는 파모티딘이다.

[0536] **E. 치료 주기 및 요법**

[0537] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 NK 세포 및 다중특이적 인게이저는 여러 날에 걸친 치료 주기의 일부로서 환자에게 투여된다. 일부 구현예에서, NK 세포 및 다중특이적 인게이저는 하나 이상의 치료 주기를 포함하는 치료

요법의 일부로서 환자에게 투여된다.

[0538] 일부 구현예에서, 치료 요법은, 환자의 장애(예를 들어, $CD30^+$ 암)가 진전될 때까지, 또는 환자의 NK 세포, 다중특이적 인게이저, 또는 둘 다에 대한 불내성으로 인해 투여량이 중단될 때까지, 또는 환자가 NK 세포, 다중특이적 인게이저 또는 둘 다에 독성을 경험할 때까지 계속된다.

[0539] 일부 구현예에서, 치료 요법은 치료 주기 사이에 치료 중단(예를 들어, NK 세포 또는 다중특이적 인게이저의 투여가 없는 기간)을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 중단은 1 내지 8주, 예를 들어 1 내지 8, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 8, 3 내지 7, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 8, 6 내지 7, 또는 7 내지 8주이다. 일부 구현예에서, 치료 중단은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주이다. 일부 구현예에서, 치료 중단은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주이다.

[0540] 일부 구현예에서, 치료 주기는 2 내지 60일, 예를 들어 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 10, 2 내지 5, 5 내지 60, 5 내지 50, 5 내지 40, 5 내지 30, 5 내지 20, 5 내지 10, 10 내지 60, 10 내지 50, 10 내지 40, 10 내지 30, 10 내지 20, 20 내지 60, 20 내지 50, 20 내지 40, 20 내지 30, 30 내지 60, 30 내지 50, 30 내지 40, 40 내지 60, 40 내지 50, 또는 50 내지 60일이다. 일부 구현예에서, 치료 주기는 1 내지 8주(예를 들어, 1 내지 7, 1 내지 6, 1 내지 5, 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 8, 2 내지 7, 2 내지 6, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 8, 3 내지 7, 3 내지 6, 3 내지 5, 3 내지 4, 4 내지 8, 4 내지 7, 4 내지 6, 4 내지 5, 5 내지 8, 5 내지 7, 5 내지 6, 6 내지 8, 6 내지 7, 또는 7 내지 8주)이다. 일부 구현예에서, 치료 주기는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주이다.

[0541] 일부 구현예에서, 치료 요법은 1 내지 5회 치료 주기, 예를 들어 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 5, 3 내지 4, 또는 4 내지 5회 치료 주기를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 요법은 1, 2, 3, 4, 또는 5회 치료 주기를 포함한다.

[0542] 일부 구현예에서, 치료 요법의 치료 주기는 동일하다(예를 들어, 동일한 투약 및 시기 일정을 따른다). 일부 구현예에서, 치료 요법의 치료 주기는 상이하다(예를 들어, 상이한 투약 및 시기 일정을 따른다).

[0543] 일부 구현예에서, 치료 주기는 다중특이적 인게이저, 예를 들어 본원에 기술된 다중특이적 인게이저 및/또는 1회 이상의 용량의 NK 세포, 예를 들어 본원에 기술된 NK 세포의 다중 투여를 포함한다.

[0544] 치료 주기의 일부로서, NK 세포의 용량 및 다중특이적 인게이저의 용량은 일부 경우에 함께 투여된다(예를 들어, 동시에 또는 단일 치료 일 동안 연속적으로). 다른 경우에는 NK 세포와 다중특이적 인게이저가 별도로 투여된다(예를 들어, 다른 치료 일에).

[0545] 일부 구현예에서, 치료 주기는 치료 주기에 걸쳐 고르게 분산된 치료 일을 포함한다. 예를 들어, 치료 주기가 6주(또는 그 정도)인 경우, 일부 경우에는 치료 일은 1주(또는 그 정도)마다 발생한다.

[0546] 일부 구현예에서, 치료 주기는 각 치료 일에 다중특이적 인게이저의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 주기는 치료 일의 하위세트에 다중특이적 인게이저의 투여를 포함한다.

[0547] 일부 구현예에서, 치료 주기는 각 치료 일에 NK 세포의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 주기는 치료 일의 하위세트에 NK 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, NK 세포는 치료 주기의 전반부 동안에만 투여된다.

[0548] 일부 구현예에서, 치료 주기는 사이토카인, 예를 들어 본원에 기재된 사이토카인, 예를 들어 IL-2의 투여를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 NK 세포 및/또는 다중특이적 인게이저와 함께(예를 들어, NK 세포 및/또는 다중특이적 인게이저와 동시에 또는 연속하여) 투여된다. 다른 경우에, 사이토카인은 NK 세포 및/또는 다중특이적 인게이저와 별도로(예를 들어, 다른 치료 일에) 투여된다. 일부 구현예에서, 사이토카인(예를 들어, IL-2)은 NK 세포가 투여되는 날에만 투여된다. 일부 구현예에서, 사이토카인(예를 들어, IL-2)은 NK 세포가 투여되는 날마다 투여된다. 일부 구현예에서, 사이토카인(예를 들어, IL-2)은 NK 세포가 투여되는 모든 날이 아닌 일부 날에 투여된다.

[0549] 일부 구현예에서, 치료 주기는 치료 주기에 걸쳐 균일한 (또는 그 정도로) 간격으로(예를 들어, 6주 치료 주기에 걸쳐 매주) 다중특이적 인게이저의 용량을 투여하고 주기의 전반부 동안(예를 들어, 치료 주기의 전반부 동

안 다중특이적 인게이저와 동일한 치료 일에) NK 세포를 투여하고, 선택적으로 IL-2 투여와 함께(예를 들어, 상기 기재된 바와 같이) 투여하는 것은 포함한다. 따라서, 일부 경우에, 치료 주기는 각각 NK 세포, 다중특이적 인게이저 및 IL-2의 투여를 포함하는 치료 일(예를 들어, 6주 치료 주기의 처음 3주 동안 균등하게 또는 그 정도로 간격을 둔 3개의 치료일, 예를 들어 1일, 8일 및 15일)을 포함하고, 이어서 각각 다중특이적 인게이저만을 투여하는 것을 포함하는 치료 일(예를 들어, 6주 치료 주기의 마지막 3주 동안 균등하게 또는 그 정도로 간격을 둔 3개의 치료일, 예를 들어 22일, 29일 및 36일)을 포함한다. 일부 구현예에서, 치료 요법은 이 치료 주기를 최대 3회(예를 들어, 1, 2, 또는 3회) 반복하는 것을 포함하고, 일부 구현예에서 치료 요법은 각 치료 주기 사이에 치료 중단(예를 들어, 2 내지 4주 또는 그 정도)을 포함한다. 일부 구현예에서, 이들 치료 주기 중 첫 번째는 첫 번째 치료 일 이전에(예를 들어, 첫 번째 치료 주기에 대해서만 -3일 및 -4일 또는 그 무렵) 림프구고갈을 포함한다. 일부 구현예에서, 이들 치료 주기 각각은 첫 번째 치료일 이전에(예를 들어, 각 치료 주기에 대해 -3일 및 -4일 또는 그 무렵) 림프구고갈을 포함한다.

[0550] 일부 구현예에서, 치료 주기는 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 림프구고갈을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 림프구고갈은 해당 주기 동안 임의의 용량의 NK 세포 또는 다중특이적 인게이저를 투여하기 전에 수행된다.

[0551] 일부 경우에, 치료 주기에 있어서 림프구고갈은 임의의 용량의 NK 세포 또는 다중특이적 인게이저를 투여하기 전 1 내지 5일 전, 예를 들어 1 내지 4, 1 내지 3, 1 내지 2, 2 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 3, 3 내지 5, 3 내지 4, 또는 4 내지 5일 전에 수행된다. 일부 경우에, 치료 주기에 있어서 림프구고갈은 치료 주기에 대한 임의의 용량의 NK 세포 또는 다중특이적 인게이저를 투여하기 전 1, 2, 3, 4 또는 5일 전에 수행된다.

[0552] 일부 경우에, 치료 요법은 각각 림프구고갈을 포함하는 치료 주기를 포함한다. 일부 경우에, 치료 요법은 림프구고갈을 포함하는 일부 치료 주기와 포함하지 않는 일부 치료 주기로 구성된다. 일부 경우에, 치료 요법의 첫 번째 치료 주기에는 림프구고갈이 포함되지만, 치료 요법의 후속 치료 주기에는 포함되지 않는다.

[0553] **F. 투여량(Dosing)**

[0554] "유효량"은 유익하거나 원하는 결과를 가져오기에 충분한 양이다. 예를 들어, 치료량은 원하는 치료 효과를 달성하는 양이다. 이 양은 질병 또는 질병 증상의 발병을 예방하는 데 필요한 양인 예방적 유효량과 동일하거나 다를 수 있다. 유효량은 1회 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 투여될 수 있다. 치료 화합물의 치료학적 유효량(즉, 유효 투여량)은 선택된 치료 화합물에 따라 달라진다. 조성물은 1일 1회 이상 내지 1주 1회 이상으로 투여될 수 있으며; 격일로 1회를 포함한다. 당업자는 질병 또는 장애의 중증도, 이전 치료, 대상체의 전반적인 건강 및/또는 연령, 및 기타 존재하는 질병을 포함하되 이에 국한되지 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하는 데 필요한 용량 및 시기에 영향을 미칠 수 있음을 이해할 것이다. 더욱이, 본원에 기술된 치료 화합물의 치료학적 유효량을 사용한 대상체의 치료는 단일 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0555] 치료 화합물의 투여량, 독성 및 치료 효능은, 예를 들어, LD50(집단의 50%에 치명적인 용량)과 ED50(집단의 50%에 치료학적으로 유효한 용량)을 결정하기 위한, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 약학 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수(therapeutic index)이며 이는 LD50/ED50 비율로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만, 감염되지 않은 세포에 대한 잠재적인 손상을 최소화하여 부작용을 줄이기 위해 이러한 화합물을 영향을 받은 조직 부위로 표적화하는 전달 시스템을 설계하는 데 주의를 기울여야 한다.

[0556] 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에게 사용할 투여량 범위를 공식화(formulate)하는 데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED50을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있을 수 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 임의의 화합물의 경우, 치료학적 유효 용량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 용량은 세포 배양에서 측정된 바와 같은 IC50(즉, 증상의 최대 억제율의 절반을 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 공식화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 유용한 복용량을 보다 정확하게 결정하는 데 사용될 수 있다. 혈장 내 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피로 측정할 수 있다.

[0557] **VI. 변이체**

[0558] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 분자(들) 또는 이의 성분, 본원에 기술된 융합 단백질(들) 또는 이의 성분, 또는 본원에 기술된 NK 세포 유전자형은 예시적인 서열(예를 들어, 본원에 제공된 바와 같음)의 아미노산 서열과

적어도 80%, 예를 들어 적어도 85%, 90%, 95%, 98% 또는 100% 동일하며, 예를 들어, 본원에 기술된 돌연변이를 포함하거나 이에 더하여, 예를 들어, 보존적(conservative) 돌연변이로 대체된 예시적인 서열의 잔기의 예를 들어 최대 1%, 2%, 5%, 10%, 15% 또는 20%의 차이를 가진다. 바람직한 구현예에서, 변이체는 모체의 원하는 활성을 유지한다.

[0559] 2개의 핵산 서열의 동일성 백분율(%)을 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬된다(예를 들어, 최적의 정렬을 위해 첫 번째 및 두 번째 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 모두에 갭이 도입될 수 있고 비-상동 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 비교 목적을 위해 정렬된 참조 서열의 길이는 참조 서열 길이의 적어도 80%이고, 일부 구현예에서는 적어도 90% 또는 100%이다. 이어서, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치의 뉴클레오티드를 비교한다. 첫 번째 서열의 한 위치에 두 번째 서열의 상응하는 위치와 동일한 뉴클레오티드가 존재한다면, 분자는 해당 위치에서 동일하다(본원에서 사용된 핵산 "동일성"은 핵산 "상동성"과 동일함). 두 서열 사이의 동일성 %는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입되어야 하는 갭의 개수와 각 갭의 길이를 고려한 서열이 공유하는 동일한 위치의 개수의 함수이다.

[0560] 대상 폴리펩타이드 또는 핵산 서열(즉, 쿼리(query))과 두 번째 폴리펩타이드 또는 핵산 서열(즉, 표적) 사이의 동일성 %는 당업계의 기술 범위 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 Smith Waterman 정렬(Smith, T. F. and M. S. Waterman (1981) J Mol Biol 147:195-7); GeneMatcher PlusTM, Schwarz and Dayhof (1979) Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhof, M.O., Ed, pp 353-358에 통합된 바와 같은 "BestFit" (Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489 (1981)); BLAST 프로그램 (Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-10), BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL, 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 결정된다. 또한, 당업자는 비교되는 서열의 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 일반적으로, 표적 단백질 또는 핵산의 경우, 비교 길이는 표적의 임의의 길이, 최대로 및 표적의 전장 길이일 수 있다(예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%). 본 개시내용의 목적을 위해, 동일성 %는 쿼리 서열의 전장 길이에 상대적이다.

[0561] 본 개시내용의 목적을 위해, 서열의 비교 및 두 서열 사이의 동일성 % 결정은 갭 패널티 12, 갭 연장 패널티 4, 및 프레임시프트 갭 패널티 5를 갖는 Blossum 62 스코어링 매트릭스를 사용하여 달성될 수 있다.

[0562] 보존적 치환은 전형적으로 다음 그룹 내의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루타민산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신.

[0563] **VII. 정의**

[0564] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 기술 분야의 모든 용어, 표기법 및 기타 기술 및 과학 용어 또는 용어법(terminology)은 청구 내용이 속하는 기술 분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖도록 의도된다. 일부 경우, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본 명세서에서 정의되며, 본 명세서에 이러한 정의가 포함된다고 해서 반드시 해당 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0565] 본 출원 전반에 걸쳐, 다양한 구현예가 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 기재는 단지 편의와 간결성을 위한 것이며 본 개시내용의 범위에 대한 변경할 수 없는 제한으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위에 대한 기재는 가능한 모든 하위 범위, 뿐만 아니라 그 범위 내의 개별 수치도 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위에 대한 기재는 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위 범위, 뿐만 아니라 해당 범위 내의 개별 숫자, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 및 6을 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0566] 명세서 및 청구범위에서 사용되는 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 예를 들어, "샘플"이라는 용어는 이들의 혼합물을 포함하여 복수의 샘플을 포함한다.

[0567] "결정하는(determining)", "측정하는(measuring)", "평가하는(evaluating)", "판정하는(assessing)", "검정하는(assaying)" 및 "분석하는(analyzing)"이라는 용어는 종종 측정의 형태를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 요소가 존재하는지 여부를 결정하는 것(예를 들어, 검출)을 포함한다. 이러한 용어에는 정량적, 정성적, 또는 정량적 및 정성적 결정이 포함될 수 있다. 평가는 상대적일 수도 있고 절대적일 수도 있다. "~의 존재를 검출하는 것"에는 문맥에 따라 존재 여부를 결정하는 것 외에도 존재하는 어떤 것의 양을 결

정하는 것도 포함될 수 있다.

[0568] "대상체", "개체" 또는 "환자"라는 용어는 종종 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0569] "생체 내"라는 용어는 대상체의 신체에서 일어나는 사건을 설명하는 데 사용된다.

[0570] "생체 외"라는 용어는 대상체의 신체 외부에서 발생하는 사건을 설명하는 데 사용된다. 생체 외 분석은 대상체에 대해 수행되지 않는다. 오히려, 이는 대상체로부터 분리된 샘플을 대상으로 수행된다. 샘플에 대해 수행되는 생체 외 분석의 예는 "시험관 내" 분석이다.

[0571] "시험관 내"라는 용어는 물질이 수득되는 생물학적 공급원으로부터 분리되도록 실험실 시약을 수용하기 위한 용기 안에서 일어나는 사건을 설명하는데 사용된다. 시험관 내 분석에는 살아 있는 세포나 죽은 세포를 사용하는 세포 기반 분석이 포함될 수 있다. 시험관 내 분석에는 손상되지 않은 세포가 사용되지 않는 무세포(cell-free) 분석도 포함될 수 있다.

[0572] 본원에서 사용되는 숫자에 대한 용어 "약"은 해당 숫자에 해당 숫자의 10%를 더하거나 뺀 값을 지칭한다. 범위에 대한 용어 "약"은 해당 범위에서 가장 낮은 값의 10%를 뺀 값에서 가장 큰 값의 10%를 더한 값까지를 지칭한다.

[0573] 본원에서 사용되는 용어 "버퍼 용액"은 약산과 그 짝염기의 혼합물로 구성된 수용액을 지칭하거나 그 반대의 경우도 마찬가지이다.

[0574] 본원에서 사용되는 용어 "세포 배양 배지"는 당, 아미노산, 각종 영양소, 무기물질 등 세포의 성장 및 증식에 필수적인 성분을 함유한 시험관 내 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 지칭한다.

[0575] 본원에서 사용되는 버퍼 용액은 세포 배양 배지가 아니다.

[0576] 본원에서 사용되는 용어 "생물반응기"는 세포 배양에 영향을 미치는 일련의 조건, 예컨대 용존 산소 농도, 용존 이산화탄소 농도, pH 및 온도를 지속적으로 제어할 수 있는 배양 장치를 지칭한다.

[0577] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 연결된 다른 핵산을 전파할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 이 용어는 자가복제 핵산 구조로서의 벡터뿐만 아니라 이것이 도입된 숙주 세포의 게놈에 통합된 벡터도 포함한다. 일부 벡터는 본 출원의 핵산 분자(들) 또는 폴리뉴클레오티드(들)을 전달하는 데 적합한다. 특정 벡터는 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 발현 벡터로 지칭된다.

[0578] "작동가능하게 연결된"이란 용어는 일반적으로 물리적으로 연결되어 있고 서로 기능적 관계에 있는 2개 이상의 핵산 서열 또는 폴리펩타이드 요소를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현을 개시하거나 조절할 수 있는 경우 프로모터는 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이며, 이 경우 코딩 서열은 프로모터의 "제어 하에" 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0579] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환적으로 사용되며 외인성 핵산이 도입된 세포와 이러한 세포의 자손을 지칭한다. 숙주 세포는 "조작된 세포", "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 1차 조작된(예를 들어, 형질전환된) 세포 및 계대 횟수에 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 모세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있으며, 돌연변이를 포함할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에서 선별되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 여기에 포함된다.

[0580] 적절한 경우, 숙주 세포는 본원에 기술된 바와 같은 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 안정적으로 또는 일시적으로 형질감염될 수 있다.

[0581] 본원에서 사용되는 섹션 제목은 구성 목적만을 위한 것이며 기재된 발명의 내용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0582] **VIII. 실시예**

[0583] 하기 실시예는 예시 목적으로만 포함되며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도는 아니다.

[0584] **실시예 1: 기성품(Off-the-Shelf) NK 세포 치료 플랫폼**

[0585] NK 세포를 확장하고 자극하는 방법의 일 예를 **도 1**에 나타내었다. 수용체 CD16의 고 친화성 변이체(158 V/V 변이체, *예를 들어* Koene et al., "Fcɣ IIIa-158V/F Polymorphism Influences the Binding of IgG by Natural

Killer Cell FcgammaRIIIa, Independently of the FcgammaRIIIa-48L/R/H Phenotype," Blood 90:1109-14 (1997) *참조하라*) 및 KIR-B 유전자형(KIR 수용체 계열의 KIR B 대립유전자, *예를 들어* Hsu et al., "The Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor (KIR) Genomic Region: Gene-Order, Haplotypes and Allelic Polymorphism," Immunological Review 190:40-52 (2002); 및 Pyo et al., "Different Patterns of Evolution in the Centromeric and Telomeric Regions of Group A and B Haplotypes of the Human Killer Cell Ig-like Receptor Locus," PLoS One 5:e15115 (2010) *참조하라*)을 갖는 단일 유닛의 FDA 허가된 냉동 제대혈을 NK 세포의 공급원으로 선택하였다.

[0586] 제대혈 유닛을 해동하고 원심분리를 통해 동결 배지를 제거하였다. 그런 다음 QuadroMACS 세포 선별 시스템(Miltenyi) 및 CD3(T 세포) MicroBeads를 사용하여 세포 제제(preparation)에서 T 세포를 고갈시켰다. 6 x 10^8개의 총 유핵 세포(total nucleated cell, TNC) 집단을 MicroBeads로 표지하고 QuadroMACS 장치 및 버퍼를 사용하여 분리하였다. T 세포의 고갈 후, 주로 단핵구와 NK 세포인 남아 있는 세포를 세척하고 항생제가 없는 배지(CellgroSCGM)에 수집하였다. 그런 다음 세포 제제를 총 유핵 세포 수, 생존력(viability) 및 % CD3+ 세포에 대해 평가하였다. **도 1**에 도시된 바와 같이, 제대혈 NK 세포는 CD3가 고갈되었다.

[0587] CD3- 세포 제제를 성장 배지를 함유하는 기체 투과성 세포 확장 백에 접종하였다. 마스터 세포 은행(MCB) 생산을 위한 확장을 향상시키기 위해 세포를 복제 불능 조작된 HuT-78(eHUT-78) 피더 세포와 공동 배양하였다. CellgroSCGM 성장 배지를 먼저 10 ng/mL의 항-CD3 항체(OKT3), 인간 혈장, 글루타민, 및 IL-2로 보충하였다.

[0588] **도 1**에 도시된 바와 같이, 공동 배양 단계 중 한 단계 중에 NK 세포를, 예를 들어 렌티바이러스 벡터를 사용하여, 예를 들어 CAR을 NK 세포에 도입하기 위해, 선택적으로 조작하였다.

[0589] 세포를 5% CO_2 밸런스된 공기 환경에서 37℃에서 12-16일 동안 정적 배양으로 인큐베이션하였고, 매 2 내지 4일마다 배지를 추가로 교환하였다. 배양액이 100배 이상 확장된 후, 배양된 세포를 수확한 다음 동결 배지에 현탁하여 냉동백에 충진하였다. 이 실시예에서는, 공동 배양 동안 백 또는 바이알 당 10^8개의 세포로 구성된 80개의 백 또는 바이알을 생산하였다. 냉동백을 속도 제어형 냉동고를 사용하여 냉동하였으며 -150℃ 미만의 증기상(vapor phase) 액체 질소(LN_2) 탱크에 보관하였다. FDA 허가된 제대혈 유닛으로부터 유래된 이러한 냉동보존된 NK 세포는 마스터 세포 은행(MCB) 역할을 하였다.

[0590] 의약품을 생산하기 위해, MCB으로부터의 냉동된 세포의 백을 해동하고 냉동 배지를 제거하였다. 해동된 세포를 일회용 배양 백에 접종하고 피더 세포, 예를 들어 eHUT78 피더 세포와 공동 배양하여 의약품을 생산하였다. 이 실시예에서는, 세포를 50 L 생물반응기에서 배양하여 제대혈 유닛당 수천 개의 의약품 로트(예를 들어, 4,000-8,000개의 냉동 바이알, 각 10^9개 세포/바이알)를 생산하고, 이를 냉동보존 조성물과 혼합한 다음 냉동 바이알과 같은 다수의 저장 용기에서 냉동하였다. 이 의약품은 직접 주입에 사용할 수 있는 기성품 인퓨젼 레디 제품이다. 의약품의 각 로트는 수백 내지 수천 명의 환자를 주입하는 데 사용할 수 있다(예를 들어, 100-1,000명의 환자, 예를 들어 4 x 10^9개 세포의 표적 용량을 사용).

[0591] **실시예 2: 피더 세포 확장**

[0592] 일 예로서, 적합한 피더 세포, 예를 들어 eHut-78 세포를 냉동 스톡으로부터 해동하고, 125 mL 플라스크에서 RPMI1640(Life Technologies) 89% v/v, 불활성화된 소 태아 혈청(FBS)(Life Technologies)(10% v/v), 및 글루타민(hyclone)(2 mM)을 포함하는 성장 배지에서 37℃ 또는 약 37℃에서 3-7% CO_2 또는 약 3-7% CO_2 하에 18-24일 또는 약 18-24일 동안 확장 및 배양하였다. 세포를 2-3일마다 125 mL - 2 L 플라스크에 분할하였다. 세포를 원심분리하여 수확하고 감마선을 조사하였다. 수확 및 조사된 세포를 2 mL 냉동 바이알에서 냉동보존 배지(Cryostor CS10)와 혼합하고 속도 제어형 냉동고에서 냉동시켰으며, 5분마다 약 15℃씩 온도를 감소시켜 최종 온도 -90℃ 또는 약 -90℃까지 냉동하였으며, 이후 액체 질소 탱크 또는 냉동고로 옮겨 최종 온도가 -150℃ 또는 약 -150℃가 되도록 하였다.

[0593] 동결 후, 세포 생존력은 원래 세포 수의 70% 이상이었고(여기서, 적어도 1.0 x 10^8개의 생존 세포/mL), 85% 이상의 세포가 mTNF-α를 발현하였고, 85% 이상의 세포가 mbIL-21+를 발현하였으며, 85% 이상의 세포가 4-1BBL을 발현하였다.

[0594] **실시예 3: NK 세포 확장 및 자극**

[0595] 일 예로서, 적합한 NK 세포는 4-1BBL, 막 결합형 IL-21 및 돌연변이 TNF알파를 발현하도록 형질도입된 HuT-78 세포("eHut-78P 세포")를 피더 세포로서 사용하여 다음과 같이 제조할 수 있다. 피더 세포를 1%(v/v) CellGro 배지에 현탁시키고 감마선 조사기에서 20,000 cGy로 조사하였다. 시드 세포(예를 들어, CD3이 고갈된 PBMC 또는 CD3이 고갈된 제대혈 세포)를 37℃의 정적 배양으로 인간 혈장, 글루타민, IL-2 및 OKT-3를 함유하는 CellGro 배지에서 피더 세포 상에서 성장시켰다. 세포를 2-4일마다 분할하였다. 총 배양 시간은 19일이었다. NK 세포를 원심분리에 의해 수확하고 냉동보존하였다. 해동된 NK를 다음으로 구성된 주입 배지 중에서 환자에게 투여한다: 인산염 완충 식염수(PBS 1x, FujiFilm Irvine)(50% v/v), 알부민(인간)(다음을 함유하는 20% v/v OctaPharma 알부민 용액: 200 g/L 단백질, 이 중 ≥ 96%이 인간 알부민임, 130-160 mmol 나트륨; ≤ 2 mmol 칼륨, 0.064 - 0.096 mmol/g 단백질 N-아세틸-DL-트립토판, 0.064 - 0.096 mmol/g 단백질, 카프릴산, 추가로 1000 ml 물), 덱스트로스 중의 덱스트란 40(덱스트로스 주사액 중의 25% v/v의 Hospira 덱스트란 40, 다음을 함유한 USP: 10 g/100 mL 덱스트란 40 및 5 g / 100 mL 물에 함수된(hydrous) 덱스트로스) 및 디메틸 설폭사이드(DMSO)(5% v/v의 Avantor DMSL 용액, 20℃에서 1.101 g/cm^3의 밀도를 가짐).

[0596] 일부 경우에, 시드 세포는 CD3이 고갈된 제대혈 세포이다. 예를 들어 CliniMACS T 세포 고갈 세트((LS Depletion set (162-01) Miltenyi Biotec)를 사용하여 면역자기 선별에 의해 세포 분획에서 CD3 세포를 고갈시킬 수 있다.

[0597] 바람직하게는, 제대혈 시드 세포는 F158에서 V/V 다형성을 가진 CD16(Fc 감마 RIIIa-158 V/V 유전자형)을 발현하도록 선별한다(Musolino et al. 2008 J Clin Oncol 26:1789). 바람직하게는, 제대혈 시드 세포는 KIR-B 일배체형이다.

[0598] **실시예 4: NK 세포 공급원으로서의 제대혈**

[0599] NK 세포는 말초 혈액 림프구의 5 내지 15%를 구성한다. 전통적으로, 말초 혈액은 치료적 사용을 위한 NK 세포의 공급원으로 사용되어 왔다. 그러나, 본 명세서에 나타난 바와 같이, 제대혈로부터 유래된 NK 세포는 세포의 조기 고갈 또는 노화 없이 말초 혈액으로부터 유래된 것보다 본 명세서에 기술된 배양 시스템에서 확장에 대해 거의 10배 더 큰 잠재력을 갖는다. 종양 세포 결합 시 NK 세포의 활성화에 관여하는 것과 같은 NK 세포 표면의 관심 수용체 발현은 말초 혈액 NK 세포보다 제대혈 NK에 대해 기증자 간 일관성이 더 높은 것으로 나타났다. 본 명세서에 기술된 제조 공정의 사용은 기증자와 독립적인 방식으로 제대혈 내 NK 세포를 일관되게 활성화시켜, 고도로 확장되고(scaled) 활성이며 일관된 NK 세포 제품을 생성하였다.

[0600] **도 2**에 도시된 바와 같이, 제대혈 유래 NK 세포(CB-NK)는 전임상 연구에서 말초 혈액 유래 NK 세포(PB-NK)에 비해 배양 시 약 10배 더 큰 확장 능력을 갖고 있다. **도 3**에 도시된 바와 같이, 말초 혈액으로부터 생성된 것과 비교하여 제대혈 유래 의약품에서 종양 관련 NK 활성화 면역 수용체의 발현이 더 높고 더 일관적이었다.

[0601] **실시예 5: 확장 및 자극된 NK 세포 표현형**

[0602] 일 예에서, 제대혈 유닛으로부터의 NK 세포를 **실시예 1**에 기재된 확장 및 자극 과정에 따라 eHut-78 세포를 사용하여 확장하고 자극하였다. **도 4**에 도시된 바와 같이, 생성된 확장되고 자극된 NK 세포 집단은 일관되게 높은 CD16(158V) 및 활성화된 NK 세포 수용체 발현을 나타낸다.

[0603] **실시예 6: AB-101**

[0604] AB-101은 환자, 예를 들어 단클론 항체 또는 NK 세포 인게이저로 치료를 받은 환자에서 ADCC 항-종양 반응을 향상시키도록 설계된 생체 외 확장되고 활성화된 이펙터 세포를 포함하는 보편적인 기성품의 냉동보존된 동종이계 제대혈 유래 NK 세포 치료제이다. AB-101은 T 림프구의 고갈에 의해 NK 세포에 대해 농축되고, IL-2 및 항-CD3 항체(OKT3)가 보충된 조작된 복제 불능 T 세포 피더 라인을 사용하여 공동 배양된, 제대혈 유래 단핵 세포(CBMC)로 구성된다.

[0605] AB-101은 FDA 허가된 제대혈로부터 유래한 동종이계 NK 세포 제품으로, 특히 치료용 단일클론 항체(mAb)와 조합하여 혈액 및 고형 종양을 치료하도록 설계되었다. AB-101 제조 공정을 통해 다음과 같은 특성을 지닌 NK 세포 제품을 생성한다:

[0606] · 일관된 NK 세포 프로파일. 항체가 결합하는 CD16 및 NKG2D, NKp46, Nkp30 및 NKp44와 같은 종양 항원-결합/활성화 수용체의 높은 표면 수용체 발현.

[0607] · KIR-B-일배체형. KIR-B 일배체형은 일배체동종 이식 환경(haploidentical transplant setting)에서 개선된

임상 결과 및 동종이계 환경에서 더 큰 치료학적 잠재력과 관련이 있다.

[0608] · CD16 F158V 다형성. mAb Fc-도메인에 결합하는 친화도가 더 높은 CD16 F158V 변이체는 향상된 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC)을 촉진하는 것으로 나타났다.

[0609] · 변형되지 않은 NK 세포. AB-101 의약품에는 유전자 강화나 유전자 편집이 필요하지 않거나, 또는 그 일부이다.

[0610] AB-101의 성분 및 조성을 **표 6**에 나열하였다. AB-101은 성숙한 NK 세포를 나타내는 천연 세포독성 수용체 NKp30 및 NKp46을 발현하는 NK 세포($CD16^+$, $CD56^+$)로 구성된다. AB-101은 무시할 수 있는 양의 T 세포, B 세포 및 대식세포(≤ 0.2% $CD3^+$, ≤ 1.0% $CD19^+$, ≤ 1.0% $CD14^+$)를 함유한다. AB-101 배양에 사용된 잔류 eHuT-78P 피더 세포는 의약품의 ≤ 0.2%이다.

[0611] **표 6. AB-101의 성분 및 조성**

성분 용액	용액 조성	농도	농도	유닛당 수량 (11 mL 충전)
AB-101 의약품 물질(생체 외 확장된 동종이계 자연 살해 세포)	대략 1.1×10^9개의 생존가능한 세포	50% v/v	0.5 mL/mL	5.5 mL (5.27 – 6.23 mL PBS 중의 바이알 당 0.9×10^9 – 1.3×10^9개의 생존가능한 세포)
PBS	100% 인산염 완충 식염수(PBS)			
알부민 용액	물 중 200 g/L 알부민	20% v/v	40 mg/mL 알부민	2.2 mL (1.98 – 2.42 mL)
덱스트란 40 용액	물 중 100 g/L 덱스트란 40; 및 50 g/L 글루코스	25% v/v	25 mg/mL 덱스트란 40; 12.5 mg/mL 글루코스	2.75 mL (2.475-3.025 mL)
DMSO	100% DMSO (1,100 g/L)	5% v/v	55 mg/mL	0.55 mL (0.495 – 0.605 mL)

[0612]

[0613] 초기 안정성 연구에 따르면 AB-101은 액체 질소의 증기상에서 최대 6개월 동안 안정한 것으로 나타났다. 6개월 이후의 제품 안정성을 평가하기 위한 장기 안정성 연구가 진행 중이며, 가장 최근의 안정성 정보는 분석 인증서에 수록될 것이다.

[0614] AB-101 의약품의 제조는 하기의 주요 단계로 구성된다(**도 5**):

[0615] · FDA 허가된 제대혈 유닛(Hemacord, BLA 125937)의 해동.

[0616] · 제대혈 유닛(CBU)으로부터 냉동보존 배지 제거

[0617] · FDA 승인된 Vario MACS 세포 선별 시스템(Miltenyi)을 사용한 CD3 고갈

[0618] · 조작된 피더 세포주(eHuT-78 세포)를 사용하여 백에서 확장 및 공동 배양

[0619] · AB-101 마스터 세포 은행(약 200개의 백)의 테스트 및 냉동보존

[0620] · 해동(단일 백), 조작된 HuT-78 세포를 사용한 확장 및 공동 배양

[0621] · 생물반응기에서 추가적인 확장

[0622] · 수확 및 충진(바이알당 $1x10^9$개의 NK 세포)

[0623] · AB-101 의약품의 냉동보존(약 150개의 바이알)

[0624] · 일관성, 순도, 효능 및 안전성을 결정하기 위한 광범위한 특성화.

[0625] **표 7**에 나타난 바와 같이, 이 제조 공정은 매우 많은 양의 고순도 및 활성의 AB-101 의약품 NK 세포를 재현 가능하게 생성한다. 데이터 포인트는 세 개의 독립적인 제대혈 유닛으로부터 생성된 제품을 나타낸다.

[0626] **표 7. AB-101 제품 특성**

테스트 속성		허용 기준	조작 배치			임상 배치			
			1	2	3	1	2	3	4
세포수(세포/바이알)		0.9–1.3 x 10^9	1.3 x 10^9	1.1 x 10^9	1.0 x 10^9	1.3 x 10^9	1.2 x 10^9	1.2 x 10^9	1.0 x 10^9
세포 생존력		≥ 70%	96%	95%	94%	93%	94%	94%	94%
내독소 (EU/mL)		≤ 5	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
동일성	CD3-, CD56+ %	≥ 85%	99.16%	99.79%	99.43%	99.53%	98.40%	97.87%	98.54%
	CD56+, CD16+ %	≥ 70%	94.42%	94.20%	99.04%	93.24%	91.72%	95.22%	90.21%
순도	CD3+ %	(CD3+) ≤ 0.20%	≤ 0.00%	0.00%	0.00%	0.06%	0.00%	0.00%	0.02%
	CD14+ %	(CD14+) ≤ 1.00%	≤ 0.02%	0.00%	0.00%	0.02%	0.03%	0.01%	0.10%
	CD19+ %	(CD19+) ≤ 1.00%	≤ 0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.05%	0.05%
효능(potency)		4 시간 만에 ≥ 50% 살해	69.00%	60.20%	64.10%	64.50%	67.10%	54.80%	67.40%

[0627]

[0628] *동일성(Identity)(CD3-, CD56+)*

[0629] CD3-, CD56+ 세포의 빈도를 사용하여 AB-101 의약품의 동일성을 평가한다. AB-101 의약품의 샘플을 해동하고 염색 버퍼에 재현탁시킨다. 재현탁된 샘플을 CD3+ 및 CD56+ 표면 항원에 결합하는 형광색소-표지된 항체에 첨가한다. 유세포 분석법을 사용하여 제품 동일성의 척도로서 CD3-, CD56+의 모집단 비율을 결정한다.

[0630] 동일성*(CD56+, CD16+)*

[0631] CD56+, CD16+ 세포의 빈도를 사용하여 AB-101 의약품의 동일성을 평가한다. AB-101 의약품의 샘플을 해동하고 염색 버퍼에 재현탁시킨다. 재현탁된 샘플을 CD56+ 및 CD16+ 표면 항원에 결합하는 형광색소-표지된 항체에 첨가한다. 유세포 분석법을 사용하여 제품 동일성의 척도로서 CD56+, CD16+의 모집단 비율을 결정한다.

[0632] *순도(CD3+)*

[0633] CD3+ 발현 세포의 측정을 사용하여 AB-101 의약품의 순도를 평가한다. 유세포 분석법을 사용하여 CD3+ 발현 세포에 대한 의약품의 순도를 결정한다. CD3+ 세포의 모집단 비율을 제품 순도의 척도로 사용한다.

[0634] *순도(CD14+)*

[0635] CD14+ 발현 세포의 측정을 사용하여 AB-101 의약품의 순도를 평가한다. 유세포 분석법을 사용하여 CD14+ 발현 세포에 대한 의약품의 순도를 결정한다. CD14+ 세포의 모집단 비율을 제품 순도의 척도로 사용한다.

[0636] *순도(CD19+)*

[0637] CD19+ 발현 세포의 측정을 사용하여 AB-101 의약품의 순도를 평가한다. 유세포 분석법을 사용하여 CD19+ 발현 세포에 대한 의약품의 순도를 결정한다. CD19+ 세포의 모집단 비율을 제품 순도의 척도로 사용한다.

[0638] *순도: 잔류 eHuT-78P(잔류 eHuT-78P 세포)*

[0639] AB-101 의약품 중 잔류 eHuT-78P 세포를 유세포 분석법(FACS)으로 측정한다. FACS를 사용하여 살아있는 CD3+4-1BBLhigh+ eHuT-78P를 정량화함으로써 AB-101 DP 중의 잔류 eHuT-78을 검출한다. eHuT-78이 피부 T 림프구로서 CD3을 발현하는 HuT-78 세포주로부터 유래한 것이기 때문에, 싱글렛(singlet), 7-AAD 및 CD3+4-1BBL+를 순차적으로 게이팅하는 FACS 게이팅 전략(도 1 참조)을 사용하였다. HuT-78 세포주에 4-1BB 리간드(4-1BBL), 막 종양 괴사 인자-α(mTNF-a) 및 막 결합형 IL-21(mbIL-21)을 형질도입하였다. 세 가지 유전자를 고도로 발현하는 eHuT-78 단일 세포를 선별하고 연구, 마스터 및 워킹 세포 은행을 순차적으로 확립하였다. 세 가지 유전자 중 4-1BBL이 AB-101 세포 은행 및 최종 의약품에서 가장 높은 발현을 보이므로 FACS 게이팅 전략에 활용하였다.

[0640] *효능(10:1의 AB-101 DP 세포 대 K562 세포에서의 세포독성)*

[0641] K562 종양 세포에 대한 세포 세포독성 능력을 평가함으로써 AB-101 의약품의 효능을 결정한다. 의약품의 세포독

성을 형광 분석법으로 평가한다. K562 종양 세포를 30 μM 칼세인-AM(Molecular probe)으로 37℃에서 1시간 동안 염색한다. 의약품 샘플과 표지된 종양 세포를 96웰 플레이트에서 삼중으로 37℃ 및 5% CO2에서 4시간 동안 빛을 차단하면서 공동 배양한다. 10% FBS 또는 2% triton-X100을 함유한 RPMI1640 배지를 표적에 첨가하여 자발적인 최대 방출을 제공하도록 하였다. 10% FBS 또는 2% triton-X100을 함유한 RPMI1640 배지를 각 웰에 첨가하여 배경 형광을 측정한다. 형광 측정은 형광 판독기를 사용하여 여기 485 nm 및 방출 535 nm에서 수행한다. 특이적(specific) 세포독성 백분율을 하기 공식으로 계산한다.

$$\%\ \text{특이적 세포독성} = 100 \times \frac{\%\ \text{특이적 사멸} - \%\ \text{자발적 사멸}}{100 - \%\ \text{자발적 사멸}}$$

[0642]

[0643] *효능(10:1의 AB-101 DP 세포 대 Ramos 세포에서의 세포독성)*

[0644] 위에서 설명한 것과 동일한 방법 및 계산을 사용하여 라모스 종양 세포에 대한 세포 세포독성 능력을 평가함으로써 AB-101 의약품의 효능을 또한 결정한다. 이 테스트의 사양은 결정 중에 있다.

[0645] **실시예 7: AB-101 표현형 특성화**

[0646] AB-101의 다중 배치의 순도 뿐만 아니라 항체-결합 CD16 및 활성화, 억제 및 케모카인 수용체의 발현을 유세포 분석을 통해 측정하였다.

[0647] AB-101 순도를 세포 표면 마커를 사용하여 측정하였다: AB-101 배치는 >99% CD3-CD56+ NK 세포 및 < 0.1% CD3+, CD14+ 및 CD19+ 세포를 포함하는 것으로 나타났다. AB-101의 CD16 발현을 측정하였다. AB-101 세포의 95.11±2.51%는 CD16+이었으며, CD16의 평균 및 중앙값 MFI는 각각 15311±6186 및 13097±5592이었다. NK 세포는 다양한 NK 특이적 활성화 및 억제 수용체를 발현하는 것으로 알려져 있다. 테스트된 다양한 AB-101 배치의 경우 >80%의 세포가 CD16, NKG2A, NKG2D, CD94, NKp30, 2B4, Tim-3, CD44를 발현하였고, 40~70%의 세포가 NKp44, NKp46, DNAM-1을 발현하였고, 약 30%의 세포가 CD161 및 CD96을 발현하였고, 15%의 세포가 CXCR3을 발현하였고, 5% 미만의 세포가 다른 활성화 억제 수용체를 발현하였다.

[0648] AB-101의 2개의 GMP 배치를 연구에 포함시켜 제조 과정의 세 가지 다른 단계에서 NK 세포의 표현형 특성을 평가하였다: CD3+ 세포 고갈 후 제대혈 세포; 중간체로서의 마스터 세포 은행(MCB) 및 AB-101 최종 의약품(DP). CD3 고갈된 세포, MCB 및 DP를 각각 순도와 NK 세포 수용체에 대해 측정하였다. 그 결과에 따르면, CB로부터 초기에 유래된 NK 세포는 미성숙 NK 표현형을 나타내는 것으로 나타났다. NK 표현형은 제조 과정에서 성숙되었다. MCB 단계에서는, 90% 이상의 세포가 성숙한 NK 세포에서 볼 수 있는 표현형 특성을 이미 발현하였으며, 다른 세포 유형의 마커는 <0.1%이었다. 대부분의 NK 세포 특이적 수용체의 발현 수준은 CD3 고갈된 세포에서부터 MCB까지, 그리고 최종적으로 DP까지 제조 과정 전반에 걸쳐 증가하였다.

[0649] AB-101의 순도는 NK 세포의 경우 CD3-CD56+ 세포, T 세포의 경우 CD3+ 세포, 단핵구의 경우 CD14+ 세포, 그리고 B 세포의 경우 CD19+ 세포로 표시된다. AB-101의 총 9개 배치의 순도를 측정하였다. 결과는 CD3-CD56+ 세포의 경우 99.27 ± 0.59%(평균 ± SD), CD3+ 세포의 경우 0.02 ± 0.03%, CD14+ 세포의 경우 0.10 ± 0.12%, 그리고 CD19+ 세포의 경우 0.02 ± 0.04%로 나타났다(**도 6**). 따라서, AB-101은 고순도의 NK 세포로 구성되어 있으며, 불순물인 다른 종류의 세포는 거의 존재하지 않음을 확인할 수 있었다.

[0650] *GMP 조건에서 제조된 CD3 고갈된 세포, MCB, 및 DP의 순도 비교.*

[0651] AB-101의 2개의 GMP 배치를 사용하여 AB-101 출발 물질(CD3 고갈된 세포), 중간체(마스터 세포 은행, MCB) 및 최종 의약품(DP)의 순도를 평가하였다. CD3 고갈된 세포 분획의 세포 중 50~60%는 NK 세포였으며, 이 비율은 MCB 및 DP에서 90% 이상으로 증가하였다. CD14+ 세포 및 CD19+ 세포는 CD3 고갈된 세포 분획의 20~30%를 나타내었으며, 이러한 세포 비율은 MCB 및 DP에서 0.1% 미만으로 감소하였고, 이는 AB-101 MCB 및 AB-101 최종 의약품의 순도를 나타낸다(**도 7, 표 8**).

[0652] **표 8. 세포 순도**

마커	GMP 배치 #1			GMP 배치 #2		
	CD3- 세포 (414855P)	MCB (20AB101MG001)	DP (20AB101PG001)	CD3- 세포 (608631P)	MCB (20AB101MG002)	DP (20AB101PG002)
CD3- CD56+ (%)	58.0	99.43	99.80	56.70	93.14	97.98
CD3+ (%)	0.79	0.05	0.01	0.21	0.03	0.02
CD14+ (%)	15.01	0.02	0.01	28.00	0.03	0.02
CD19+ (%)	9.83	0.01	0.00	9.17	0.00	0.00

[0653]

[0654] *GMP 조건에서 제조된 CD3 고갈된 세포, MCB, 및 DP의 NK 세포 수용체 비교*

[0655] AB-101의 2개 GMP 배치를 또한 사용하여 AB-101 출발 물질(CD3 고갈된 세포), 중간체(마스터 세포 은행, MCB) 및 최종 의약품(DP)에 대한 다양한 NK 세포 수용체의 발현을 평가하였다. CD16, NKG2D, NKG2C, NKp30, NKp44, NKp46 및 DNAM-1과 같은 여러 NK 세포 및 활성화 수용체가 AB-101 출발 물질(CD3 고갈된 세포)과 비교했을 때 MCB 및 최종 의약품에서 더 높은 수준으로 발현되는 것으로 관찰되었다. CD57 발현은 AB-101 출발 물질(CD3 고갈된 세포)과 비교했을 때 MCB 및 최종 의약품에서 더 낮았다(**도 8, 표 9**). 전반적으로, 데이터는 MCB 및 DP에서 NK 세포 활성화 수용체의 발현 증가를 보여주며 이는 AB-101이 종양에 대해 효과적임을 나타낸다.

[0656] **표 9. 세포 수용체 발현**

마커	GMP 배치 #1			GMP 배치 #2		
	CD3- 세포 (414855P)	MCB (20AB101MG001)	DP (20AB101PG001)	CD3- 세포 (608631P)	MCB (20AB101MG002)	DP (20AB101PG002)
Cd16	90.27	96.45	98.50	89.27	97.70	98.30
NKG2A	69.99	87.05	93.70	72.94	81.92	88.43
NKG2C	0.26	23.87	1.11	6.32	22.91	25.04
NKG2D	85.52	91.13	95.17	20.70	83.16	98.77
NKp30	76.29	91.55	94.64	12.61	85.19	85.22
NKp44	1.29	58.27	51.14	2.48	19.15	72.03
NKp46	35.12	71.83	67.77	7.64	70.54	54.46
CXCR3	9.10	28.39	14.40	1.79	33.13	7.01
2B4	93.66	99.75	99.20	82.63	98.29	99.46
DNAM-1	13.94	55.64	73.07	5.12	36.24	61.13
CD57	12.24	1.92	0.65	2.63	1.63	0.74

[0657]

[0658] *결론*

[0659] 표면 마커 분석의 사용은 AB-101 제품의 동일성 및 순도 그리고 배치 간 일관성을 뒷받침하였다. 또한, NK 특이적 활성화 및 억제 세포 표면 마커에 대한 광범위한 평가를 통해 제조 확장 과정 후 AB-101 제품의 일관된 프로파일이 확립되었다. CB 유래 NK 세포는 말초 혈액(PB) 유래 NK 세포에 비해 NKG2A의 고 발현 및 NKG2C, CD62L, CD57, IL-2R, CD16, DNAM-1의 저 발현과 같은 미성숙 표현형을 갖는 것으로 알려져 있으며, 또한 미성숙 표현형을 갖는 CB 유래 NK 세포는 종양 세포에 대해 낮은 세포독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 보고서의 데이터는 동종이계 제대혈(CB) 유래 NK 세포 제품인 AB-101이 종양 세포에 대한 잠재적으로 더 높은 세포독성을 나타내는 주요 활성화 수용체를 높은 수준으로 발현한다는 것을 보여준다.

[0660] **실시예 8: AB-101 약동학 및 생체분포(Biodistribution)**

[0661] NOD scid 감마(NSG) 마우스 모델을 사용하여 AB-101의 생체분포 및 약동학(PK)을 결정하였다. 비히클(PBS, 덱스트란, 알부민(인간) DMSO) 및 AB-101 세포($0.5x10^7$개 세포/마우스, $2x10^7$개 세포/마우스)를 총 8회 용량으로 정맥내(0.25 mL/마우스) 투여하였다. 비히클 및 AB-101 그룹의 동물을 마지막 용량 주입 후 4시간, 1, 3, 7, 14 및 78일 시점(시점당 n=3마리의 수컷 마우스, n=3마리의 암컷 마우스)에 희생하였다.

[0662] AB-101은 주로 고도로 관류된 조직(폐, 비장, 심장 및 간)과 주사 부위에서 투여 후 4시간부터 시작하여 AB-101의 최종 용량 투여 후 3일(53일째)까지 검출되었다. 최종 용량 투여 후 7일(57일째)에 폐(6개의 샘플 중 3개), 비장(6개의 샘플 중 5개) 및 주사 부위(6개의 샘플 중 5개)에서 AB-101이 검출되었다. 최종 용량 투여 후 14일 및 28일(각각 64일째 및 78일째)에 AB-101은 각각 2개 및 1개의 주사 부위 샘플에서 검출되었다. 64일째 및 78

일째에 주사 부위 샘플에서 관찰된 산발적인 발생률과 낮은 농도는 AB-101 테스트 물품의 전신적인 지속성을 나타내지 않는다.

[0663] 생체분포 연구 결과에 따르면 생체 내 AB-101의 분포는 정맥내 투여 경로와 일치하며 세포는 투여 후 7일 후에 조직 제거(clearance)를 나타내고 영구적인 생착의 증거가 없어 장기 지속 가능성이 결여되어 있음을 나타낸다.

[0664] **실시예 9: AB-101 독성학**

[0665] AB-101의 비임상 독성을 NSG 마우스의 GLP 연구에서 평가하였다. 이 연구는 AB-101의 급성 및 지연 독성 프로필을 평가하기 위해 설계하였다. AB-101의 두 가지 용량 수준인 $0.5x10^7$ 및 $2x10^7$개 세포/동물을 연구에서 테스트하였다. 제안된 시험 용량 범위는 최초의 인간 대상 연구에서 제공하기로 계획한 최고 등가 인간 용량(용량당 $4x10^9$개의 세포)보다 더 큰 노출 수준으로 제품을 제공하도록 설계하였다. 상대성 스케일링(allometric scaling)(Nair 2016)에 기초하여, 환자 체중이 70kg이라고 가정할 때 $0.5x10^7$개 세포/마우스는 $14x10^9$개 세포/사람에 해당하고 $2x10^7$개 세포/마우스는 $56x10^9$개 세포/사람에 해당한다. AB-101을 꼬리 정맥을 통해 8주 동안 매주 1회 정맥 내 투여하였다. AB-101의 급성 독성을 8차 투여(즉, 마지막 투여) 후 3일 후에 평가하였다. 지연 독성은 8차 투여 후 28일의 회복 기간이 끝날 때 평가하였다. 생존력, 체중, 임상 관찰 및 촉진(palpation)을 연구의 생애 부분 동안 각 동물에 대해 기록하였다. 모든 동물에 대해 안락사 시점에 육안 부검 및 혈액학, 임상 화학 및 조직병리학 분석을 위한 샘플 수집을 수행하였다.

[0666] 각 그룹은 양쪽 성별에 따른 결과를 평가하고 강화된 통계 분석을 위해 성별별로 총 20마리의 동물을 포함하였다. AB-101 치료 그룹과의 비교를 위해 비히클 치료 대조군을 포함하였다. 치료 편향을 최소화하기 위해 동물을 컴퓨터에서 생성된(체중순) 무작위 절차를 기반으로 용량 그룹에 배정하였으며, 수컷과 암컷은 별도로 무작위로 배정하였다. 이 연구는 데이터 보고를 포함하여 GLP 지침을 준수하였다.

[0667] 평가한 용량 수준들 중 어떤 용량에서도 AB-101의 투여와 관련하여 사망률 및 유해한 임상 관찰은 기록되지 않았다. 언급된 모든 사소한 임상 관찰은 마우스에서 흔히 발견되는 것이며 AB-101 투여와 관련된 것으로 간주되지 않는다. 체중과 장기의 무게 변화는 용량 그룹과 치료 후 평가의 다른 날짜(급성 독성 그룹의 경우 53일째, 지연 독성 그룹의 경우 78일째) 간에 유사하였다. 급성 또는 지연 독성 그룹 모두 안락사 시 동물에서 나타난 혈액학 및 임상 화학 파라미터나 육안 부검 소견에서 AB-101과 관련된 변화는 없었다. 통계적 유의성과 관계없이 개인 및 평균 임상 화학 값 사이의 모든 변동은 산발적이고, 생물학적 및 절차 관련 변동과 일치하며 및/또는 크기가 무시할 수 있는 것으로 간주되었고, 따라서 AB-101 투여와 관련이 없는 것으로 간주되었다. AB-101과 관련된 현미경 소견은 없었다. 결론적으로, GLP 독성 연구 결과는 AB-101이 최대 2×10^7개 세포/용량/동물의 반복 투여한 NSG 마우스에서 충분히 내약성임을 나타낸다.

[0668] **실시예 10: NK 세포의 냉동보존**

[0669] AB-101 세포를 **도 5**에 도시된 공정에 의해 제조하였다. 배양 기간 종료 시점에 Sartorius kSep® 400 일회용 자동 원심분리 시스템을 사용하여 상대 원심력장(Relative Centrifugal Field, RCF): 800 - 1200 g, 유속 60 내지 120 mL/분으로 세포를 수확하고, 인산염 완충 용액(PBS)으로 2회 세척하였다. 세척 후, AB-101 세포를 (1) 알부민(인간); (2) 덱스트란 40; (3) DMSO 및 (4) PBS를 사용하여 목표 농도 1×10^8개 세포/mL로 제형화하였다(예시적인 냉동보존 조성물 #1, **표 4**). 이어서, 제제화된 현탁액을 10 mL AT-Closed vial®에 11 mL의 목표 부피로 충진하였다. 충진된 바이알을 검사하고 라벨을 붙인 다음 ≤-135℃의 속도 제어형 냉동고에서 냉동보존하였다.

[0670] 안정성 연구는 초기 방출 테스트 데이터로서 시간 = 0으로 수행하였다. 안정성 저장 냉동고는 ≤-135℃의 온도를 유지하도록 설정된 검증된 증기상 LN_2 저장 냉동고이다. 무균성 시점의 경우, 배치 크기의 10% 또는 4개 바이알 중 더 큰 값을 테스트하였다. 임상 해동 조건을 모방하기 위해 테스트 물품을 37℃에서 해동하였다.

[0671] **표 10**에 나타난 바와 같이, 냉동보존된 AB-101의 생존력 및 활성은 적어도 9개월 동안 보존되는 것으로 나타났다.

[0672] **표 10. 냉동보존된 AB-101의 장기 생존력 및 활성**

테스트 속성		허용 기준	냉동보존 (≤ 135°C), 샘플 시간(개월)					
			0 개월	3 개월	6 개월	9 개월	12 개월	18 개월
세포수 (세포/바이알)		0.9–1.3 x 10^9	1.3x10^9	1.3 x 10^9	1.4 x 10^9	1.4 x 10^9	1.3 × 10^9 세포/바이알	1.4 × 10^9 세포/바이알
세포 생존력		≥ 70%	96%	93%	94%	93%	90%	87%
내독소 (EU/kg/hr)		≤ 5	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	< 1.0	< 1.0
동일성	CD3-, CD56+ %	≥85%	99.16%	99.39%	99.49%	99.41%	99.54%	99.36%
	CD56+, CD16+ %	≥ 70%	94.42%	94.60%	94.44%	93.71%	94.85%	90.27%
순도	CD3+ %	≤ 0.20%	0.00%	0.00%	0.00%	0.04%	0.06%	0.00%
	CD14+ %	≤ 1.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.02%	0.01%	0.00%
	CD19+ %	≤ 1.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.02%	0.00%	0.00%
효능(4 시간만에 살해)		≥ 50%	69.00%	66.90%	67.40%	61.80%	67.1	68.3

[0673]

[0674] 투여 직전에 취급하는 동안의 AB-101의 안정성 특성을 파악하기 위해, "병상(bedside)" 단기 안정성 연구를 수행하였다. 샘플을 해동하고 10 mL 주사기로 옮기고 여과한 후 내용물을 Falcon 튜브에 보관하고 표시된 대로 정의된 기간 동안 해당 온도에 두었다. 그런 다음 수집된 제품을 테스트하였다. 두 개의 AB-101 로트에 대한 단기 안정성 데이터를 **표 11**에 나타내었다.

[0675] **표 11. AB-101에 대한 단기 안정성 데이터**

4 개 바이알의 평균 데이터		로트 방출	0 분	5 분	15 분	30 분	60 분	90 분	120 분	플러시
PG001	세포수 (0.8 – 1.2 x 10^8 세포/mL)	1.18	1.10	1.11	1.11	1.10	1.12	1.07	1.03	0.07
	생존력(%)	93	94	94	94.75	94	93.5	93.5	93.5	93.25
	CD3-56+ (%)	99.53	99.53	NT	NT	NT	99.53	NT	97.58	NT
	CD16+CD56 (%)	93.24	97.74	NT	NT	NT	97.74	NT	97.43	NT
PG002	세포수 (0.8 – 1.2 x 10^8 세포/mL)	1.09	1.13	1.08	1.14	1.14	1.08	1.11	1.05	0.08
	생존력(%)	94	93.75	94.25	94.75	95.25	94.25	94.5	94	92.75
	CD3-56+ (%)	98.40	99.30	NT	NT	NT	99.27	NT	99.53	NT
	CD16+CD56 (%)	91.72	98.88	NT	NT	NT	99.55	NT	98.40	NT

[0676]

[0677] **실시예 11: KIR-B 및 CD16 158 v/v에 대해 선별한 제대혈 NK 세포는 확장 후 낮은 CD38 발현을 나타냄**

[0678] KIR-B 및 CD16 158v/v에 대해 선별한 2개의 서로 다른 제대혈 기증자를 사용하여 NK 세포를 **실시예 6**에 기술된 바와 같이 확장시켜 AB-101 세포를 생성하였고, 하나의 비-선별된 기증자(대조군)로부터도 생성하였다. 유세포 분석법으로 측정한 생성된 세포의 순도(% CD56+CD3-)를 **도 9**에 나타내었다. **도 10** 및 **도 11**에 도시된 바와 같이, CD38 발현은 비-선별된 NK 세포와 비교하여 모집단으로(양성 백분율, **도 10**) 및 개별적으로(양성 세포의 평균 형광 강도, **도 11**) KIR-B/158 v/v NK 세포에서 더 낮았다.

[0679] **실시예 12: AB-101의 표면 단백질 발현**

[0680] NK 세포를 **실시예 6**에 기술된 바와 같이 확장시켰다. 출발 NK 세포 공급원(CD56+/CD3- 발현에 대해 게이팅된 제대혈, n=3)의 표면 단백질 발현을 생성된 확장된 NK 세포(n=16)와 비교하였다. **도 12**에 도시된 바와 같이, CD16 발현은 생성된 세포에서 높았으며, 출발 세포에 비해 증가하였다. NKG2D, CD94, NKp30, NKp44 및 NKp46의 발현도 증가한 반면, CXCR4 및 CD122의 발현은 감소하였다.

[0681] **실시예 13: AB-101 NK 세포에 AFM13을 사전 로딩(preloading)**

[0682] 일 예로서, 176억 개의 AB-101 NK 세포(V/V 및 KIR-B에 대해 선별된 제대혈 유래 및 확장된 NK 세포)(원심분리

및 제형화 중 세포 손실을 고려한 10% 추가량 포함)를 수확 시 채취하여 실험실로 옮겼다.

[0683] AB-101 세포에 AFM13을 사전 로딩하기 위해, 40억 개의 세포를 100 μg/mL의 AFM13 존재 하에 40 mL 배양 배지에서 주위 온도에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 각 복제물을 10 mL 배양 배지에서 2회 세척하고, 40 mL 동결 배지에 재현탁하고 1 mL 분취량으로 냉동보존하였다. 이러한 사전 로딩 과정으로 인해 AFM13이 세포의 CD16A 분자에 결합된(사전 복합체를 형성한) AB-101 NK 세포가 생성된다.

[0684] 대조군 AB-101 세포의 경우, 80억 개의 세포를 80 mL 동결 배지에 재현탁시켰고, 여기서 세포는 1 mL 분취량으로 동결시켰다. 필요한 총 세포 수는 176억개 세포였다.

[0685] **실시예 14: AFM13 및 AB-101 NK 세포의 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC)**

[0686] 일 예로서, 시험관 내에서 AB-101 NK 세포에 의한 항체 매개 표적 세포 용해를 4시간 후 칼세인 표지된 Karpas-299 표적 세포로부터 세포 배양 상층액으로의 칼세인의 방출을 정량화함으로써 평가하였다. 분석은 다음을 사용하여 수행하였다: 1) 이전에 세척되고 단독으로 냉동보존된 사전 복합체화되지 않은(비어 있는(empty)) AB-101 세포("사전 로딩되지 않은" 조건); 2) 조건 1에서와 같이 "사전 로딩되지 않은" AB-101 세포, 그러나 신선한(동결된 적이 없는) AFM13과 조합됨("사전 로딩되지 않은 + 신선한 과잉 AFM13" 조건); 및 3) AFM13이 사전 로딩된 AB-101 세포(**실시예 1**에 기재된 바와 같이), 이어서 결합되지 않은 AFM13 제거(즉, 세척) 및 후속 냉동보존. 분석 전에, 냉동보존된 AB-101 세포를 37℃에서 신속하게 해동하고 2% FCS 및 0.6% 시트레이트-덱스트로스 용액이 보충된 PBS 버퍼로 세척하였다. 분석은 두 개의 서로 다른 제대혈 단위(MCB1 및 MCB2), 각각 n=3 및 n=4에서 유래된 AB-101 세포를 사용하여 수행하였다.

[0687] 표적 세포를 37℃에서 FCS가 없는 RPMI 1640 배지에서 30분 동안 10 μM 칼세인 AM으로 표지하였다. 부드럽게 세척한 후, 칼세인 표지된 세포를 완전 RPMI 배지(즉, 10% h.i. FCS, 2 mM L 글루타민, 100 U/mL 페니실린 G 나트륨, 100 μg/mL 스트렙토마이신 황산염이 보충된 RPMI 1640 배지)에 $1x10^5$/mL의 밀도로 재현탁시켰다. 그런 다음 $1x10^4$개의 표적 세포를 둥근 바닥 96웰 마이크로타이터 플레이트의 개별 웰에 시딩하고, 달리 언급되지 않는 한, 해동된 비어 있는(empty) 또는 사전 로딩된 AB-101 NK 세포와, 이펙터 대 표적 세포(E:T) 비율을 10:1에서 시작하여 2배 연속 희석에 의해 감소하는 비율로 혼합하였다. 표시된 경우, 10 μg/mL의 AFM13을 비어 있는 또는 사전 로딩된 AB-101 NK 세포의 개별 웰에 추가하여 총 부피가 200 μL/웰이 되도록 이중으로 추가하였다.

[0688] 자발적인 칼세인 방출 및 최대 방출을 각 플레이트에서 4회 측정하였다. 자발적인 방출은 이펙터 NK 세포가 없고 AFM13이 없는 상태에서 표적 세포의 인큐베이션에 의해 결정하였다. 이펙터 세포가 없고 항체가 없는 상태에서 Triton X 100을 최종 농도 1%로 첨가하여 최대 방출을 달성하였다. 200xg에서 2분 동안 원심분리한 후, 마이크로타이터 플레이트를 5% CO_2가 포함된 습한 대기에서 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션에 이어서, 500xg에서 5분간 원심분리한 후 각 웰에서 100 μL의 무세포 세포 배양 상층액을 수집하고 검은색 평면 바닥 96웰 마이크로타이터 플레이트로 옮겼다. 방출된 칼세인의 형광 계수는 다중 모드 플레이트 판독기를 사용하여 520 nm에서 측정하였다. 특이적 세포 용해는 다음 공식에 따라 계산하였다: [형광(샘플) - 형광(자발적)] / [형광(최대) - 형광(자발적)] x 100% 여기서 "형광(자발적)" 및 "형광(최대)" "는 각각 이펙터 세포 및 항체가 없을 때의 형광과 Triton X 100을 첨가하여 유도된 형광으로 정의된다.

[0689] **도 13**, **도 14** 및 **도 15**에 도시된 바와 같이, AFM13과 조합된 AB-101 세포의 ADCC 활성은 AFM13이 신선하게 첨가되었을 때와 냉동보존 전에 사전 로딩되었을 때 모두 AB-101 단독만큼 강력하거나 그 보다 더 강한 ADCC 반응을 나타내었다.

[0690] **실시예 15: AFM13-사전 로딩된 냉동보존된 AB-101 NK 세포에 의한 냉동보존 후 결합된 AFM13의 보유**

[0691] AFM13-사전 로딩된 냉동보존된 AB-101 NK 세포에 의한 냉동보존 후 결합된 AFM13의 보유(여기서는 점유라고 함)를 유세포 분석법으로 평가하였다. 사전 로딩 절차 및 냉동보존 후 해동은 **실시예 14**에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0692] 해동된 비어 있는 또는 AFM13-사전 로딩된 AB-101 NK 세포를 세척하고 FACS 버퍼(즉, 2% FCS 및 0.1% 아지드화 나트륨이 보충된 PBS)에 재현탁하고 둥근 바닥 96웰 마이크로타이터 플레이트의 개별 웰에 $2-4x10^5$개 세포로 시딩하였다. 세포를 FACS 버퍼 또는 FACS 단독으로 희석한 래트 항-AFM13 클론 7 항체(5 μg/mL, Affimed GmbH)와 함께 4℃의 암실에서 30분 동안 인큐베이션한 후 세척하고 이어서 염소 항-래트 FITC(1/100, Dianova)와 함께 4℃의 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 두 번 최종 세척한 후 CytoFlex S 유세포 분석기(Beckman

Coulter)에서 세포를 측정한 후 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. AFM13-사전 로딩된 AB-101 세포에 대한 AFM13의 양성 검출은 염소 항-래트 FITC만을 사용한 염색과 비교하여 그리고 비어 있는 AB-101 세포에 대한 염색과 비교하여 결정하였다(**도 16** 및 **도 17**). 채워진 히스토그램은 항-AFM13 + 2차 항체를 나타내고; 오픈된 히스토그램은 2차 항체만을 나타낸다. 사전 복합체화된 AB-101 세포에 결합된 AFM13의 형광 강도는 AFM13과 함께 신선하게 인큐베이션된 비어 있는 AB-101 세포의 형광 강도만큼 높았으며, 이는 최대 로딩/포화도를 나타낸다.

[0693] 최대 로딩/포화도를 평가하기 위해, 비어 있는 대조군 및 사전 로딩된 대조군 AB-101을 위에서 설명한 염색 절차에 앞서 먼저 AFM13(10 μg/mL)과 함께 신선하게 인큐베이션하였다.

[0694] 추가적으로, 비어 있는 AB-101 NK 세포, AFM13-사전 로딩된 AB-101 NK 세포를 마우스 항-인간 CD16 BV421(클론 3G8, 1/100, Biolegend), 마우스 항-인간 CD56 BV785(클론 5.1H11, 1/100, Biolegend)와 함께 인큐베이션하고 상응하는 농도 일치 마우스 이소형 대조군(모두 Biolegend 제품)과 비교하여 분석하였다. **도 18**(왼쪽: MCB2; 오른쪽: MCB1)에 도시된 바와 같이, CD16 발현이 사전 로딩된 냉동보존된 AB-101 세포에서 해동 후 검출되었다. 채워진 히스토그램은 CD16 염색을 나타내고; 오픈된 히스토그램은 이소형 대조군 항체 염색만을 나타낸다. 균일하고 높은 CD16 발현에 대비한 균일하고 높은 AFM13 결합이 검출된 것은 AFM13에 의한 CD16의 포화된 결합을 시사한다.

[0695] **실시예 16: AFM13 매개 NK 동족살해(fratricide) 검출**

[0696] 두 개의 인접한 NK 세포 상에서 두 개의 CD16 분자 또는 CD30과 CD16(AFM13에 의해)의 교차 결합에 의해 잠재적으로 매개되는 NK-NK 세포 용해(즉, NK 동족살해)를, 자가(autologous) 표지되지 않은 NK 세포와 함께 4시간 공동 배양 후 칼세인 표지된 NK 세포로부터 세포 배양 상층액으로의 칼세인 방출을 정량화함으로써 시험관 내에서 평가하였다. 사전 로딩 절차 및 냉동보존 후 해동은 **실시예 14**에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0697] 표적인 비어 있는 또는 사전 로딩된 AB-101 NK 세포를 **실시예 14**에 기술된 바와 같이 칼세인으로 표지하였다. 그런 다음 $5x10^4$개의 표적 NK 세포를 둥근 바닥 96-웰 마이크로타이터 플레이트의 개별 웰에 시딩하고, 달리 언급되지 않는 한 이펙터 비어 있는 또는 사전 로딩된 AB-101 NK 세포와 1:1 E:T 비율로 혼합하였다. 표시된 경우, AFM13 10 μg/mL를 개별 웰에 첨가하여 총 부피 200 μL/웰이 되도록 이중으로 수행하였다.

[0698] 다음 조건을 테스트하였다: a) 이펙터 AFM13-사전 로딩된 AB-101 세포와 함께 표적 칼세인-표지된 AFM13-사전 로딩된 AB-101 세포, b) 이펙터 비어 있는 AB-101 세포와 함께 표적 칼세인-표지된 비어 있는 AB-101 세포, 및 c) 과잉의(세척 없음) AFM13의 존재 하에 이펙터 비어 있는 AB-101 세포와 함께 표적 칼세인 표지된 비어 있는 AB-101 세포. **도 19**(MCB2) 및 **도 20**(MCB1)에 도시된 바와 같이, AFM13과 조합하여 사용된 AB-101 세포는 AB-101 세포 상의 CD30 (및 CD16)의 상당한 발현에도 불구하고 사전 로딩된 경우와 신선하게 과량으로 추가된 경우('공동 투여') 모두 낮은 수준의 NK 동족살해를 나타내었다. 대조적으로, 일차 버피 코트(buffy coat)-유래 NK 세포에서 AFM13은 용량 의존적 NK 동족살해를 초래할 수 있다.

[0699] **실시예 17: AFM13-사전 로딩된 냉동보존된 AB-101 NK 세포에 의한 표적 세포에 대한 반응으로 인한 NK 세포 활성화**

[0700] NK 세포 활성화를 모니터링하기 위해, Karpas-299 표적 세포주 및 AFM13에 반응하여 CD107a(NK 세포 탈과립에 대한 마커)의 상향 조절 및 세포내 IFN-γ 발현을 평가하였다. 사전 로딩 절차 및 냉동보존 후 해동은 **실시예 14**에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0701] 비어 있는(음성 대조군) 및 사전 로딩된 AB-101 NK 세포, 그리고 (신선한) AFM13이 0.5 μg/mL 첨가된 AB-101 NK 세포를 종양 표적 세포와 함께 및 표적 세포 없이 1:1 세포 비율(각각 5×10^4개 세포)로 둥근 바닥 96웰 플레이트에서 완전한 RPMI 1640 배지에서 항-CD107a-FITC(1/100 v/v, 클론 H4A3, Biolegend) 및 GolgiPlug(1/1000 v/v, BD Bioscience)의 존재 하에서 4시간 동안 공동 배양하였다. 세포외 CD107a+(**도 21**(MCB2) 및 **도 22**(MCB1)) 또는 세포내 IFN γ+ NK 세포(**도 23**(MCB2) 및 **도 24**(MCB1))에 대해 양성인 NK 세포의 백분율을 유세포 분석에 의해 결정하였다. 유세포 분석 염색을 **실시예 14**에 기술된 바와 같이 수행하였다. **도 21**, **도 22**, **도 23** 및 **도 24**에 도시된 바와 같이, AFM13이 사전 로딩된 세포 및 AFM13이 보충된 비어 있는 AB-101 세포는 특히 Karpas-299 표적 세포에 반응하여 탈과립화 및 IFN-γ 생산 증가를 나타낸 반면, AFM13이 사전 로딩된 AB-101 세포 및 AFM13이 보충된 비어 있는 AB-101 세포는 표적 세포가 없는 경우에는 유의미한 탈과립화 또는 IFN-γ 발현을 나타내지 않았다.

[0702] **실시예 18: 냉동보존된 AFM13 사전 로딩된 AB-101의 생존력**

[0703] 냉동보존된 AFM-사전 로딩된 AB-101(vs 냉동보존된 비-로딩된)의 생존력 분석을 해동 후 및 추가 24시간 배양 후에 수행하였다. **도 25**에 도시된 바와 같이, 2명의 별도 기증자로부터 유래된 AB-101 세포의 생존력은 해동 후 80% 이상이었고, 해동 후 24시간 후 60% 이상이었다.

[0704] **실시예 19: 생체 내에서 AB-101과 조합된 AFM13의 평가: Karpas-299/Luc 세포 i.v. hIL-15 NOG 마우스에서**

[0705] 인간 비호지킨 CD30 양성 대세포 림프종 세포주 Karpas-299를 CD30 양성(ALCL)으로 분류되는 T 세포 비호지킨 림프종 환자의 말초 혈액으로부터 NPM-ALK융합 유전자와 함께 확립하였다. 생물발광 영상화를 위해 세포주를 루시퍼라제 전사체로 형질감염시켰다. 림프종 세포주 Karpas-299/Luc 모델을 사용하여 AFM13과 조합된 AB-101의 효능을 평가하였다. 간단히 말하면, 연구 0일차에 hIL-15 NOG 마우스에 1.2 Gy를 조사한 후 복강내(i.p.) 프로류킨(IL-2) 10,000 IU를 투여하였다. 조사 후 4시간 후, 동물에 0.5 x 10^5 또는 1 x 10^5개 Karpas-299/Luc 세포를 접종하였다. 종양 접종 직후, 동물에게 AB-101 단독(1 x 10^7개 세포) 또는 AB-101에 이어 AFM13(10 mg/kg)을 각각의 투여에 대해 꼬리 정맥을 교대로 정맥내(i.v) 투여하였다. IL-2 i.p.으로의 보충은 2일마다 지속하였고, AB-101 및 AFM13을 사용한 치료는 3일마다 총 6회 용량으로 지속하였으며 같은 날에 예정된 경우 IL-2 보충 후에 투여하였다(**도 26**, **표 12**). 마우스는 1일차부터 생물발광(BLI)에 대해 매주 영상을 촬영하였다. 전체 연구 기간 동안 체중과 일반적인 건강 상태를 기록하였다.

[0706] **표 12: 실험 설계**

그룹	마우스 수	처리	적용 경로	시퀀스 일	용량	이펙터:표적 비율
A	6	Karpas-299/Luc 세포	i.v.	d0	1x10^5	
		비히클(동결 배지)	i.v.	d0 부터: Q3D x6	0.1 ml	N/A
B	6	Karpas-299/Luc 세포	i.v.	d0	1x10^5	
		비히클(동결 배지)	i.v.	d0 부터: Q3D x6	0.1 ml	N/A
		프로류킨(IL-2)	i.p.	Q2D Mo-Fr	10,000 IU	
C	6	Karpas-299/Luc 세포	i.v.	d0	1x10^5	
		AB-101	i.v.	d0 부터: Q3D x6	1x10^7	100:1
D	6	Karpas-299/Luc 세포	i.v.	d0	1x10^5	
		AB-101	i.v.	d0 부터: Q3D x6	1x10^7	100:1
		프로류킨(IL-2)	i.p.	Q2D Mo-Fr	10,000 IU	
E	6	Karpas-299/Luc 세포	i.v.	d0	1x10^5	
		AB-101	i.v. 좌측	d0 부터: Q3D x6	1x10^7	100:1
		AFM13	i.v. 우측	d0 부터: Q3D x6	10 mg/kg	
F	6	Karpas-299/Luc 세포	i.v.	d0	1x10^5	
		AB-101	i.v. 좌측	d0 부터: Q3D x6	1x10^7	100:1
		AFM13	i.v. 우측	d0 부터: Q3D x6	10 mg/kg	
		프로류킨(IL-2)	i.p.	Q2D Mo-Fr	10,000 IU	

[0707] * 그룹 G 내지 I는 D 내지 F와 동일하였고 E:T 비율이 200:1, 0.5x10^5개 Karpas-299/Luc 및 1x10^7개 AB-101 이었다.

[0708] 0.5 x 10^5 또는 1 x 10^5개 Karpas-299/Luc 세포의 정맥내 주사는 마우스에서 파종성 림프종 생착을 초래하였다. 세포의 i.v. 접종 후 1일째에 BLI에 의해 생착이 검출되었다. 27일째에 일부 마우스는 진행성 림프종 성장을 나타내었으며 희생되어야 했다. 더 높은 용량의 Karpas-299/Luc를 투여받은 그룹(그룹 A-D)에서 27일부터 29일까지 추가 진행성 림프종 성장이 관찰되었다. 나머지 그룹은 31일까지 추가로 추적 관찰하였다. 연구 전반에 걸쳐 여러 시점에서 대조군과 비교하여 AB-101/AFM13 치료 그룹에서 향상된 항종양 효능이 관찰되었다(**도 27**). 저용량 Karpas-299/Luc 그룹(그룹 G-I)에서는 그룹별 비교에서 특정 날짜에 유의미한 수준에 도달하지 못한 BLI의

변동이 있었다.

[0709] 부검을 통해 비히클 대조군 그룹(A 및 B)의 모든 마우스와 AB-101 단독을 투여받은 마우스(C 및 D)에서 복막은 물론 표면 겨드랑이 및 서혜부 림프절 주변에 파종과 함께 진행성 림프종 성장이 확인되었다. AB-101+AFM13 그룹(E, H 및 I)의 개별 동물에는 육안으로 볼 수 있는 종양 병변이 없었다.

[0710] AB-101을 투여받은 그룹(그룹 C-I)에서, Q3D 일정(d0, d3, d6 및 d9)으로 4회 투여 후 동물은 10일차에 ~10-13%의 평균 체중 감소를 나타내었다. 투여 일정을 Q4D(d13 및 d17)로 변경한 후, 그룹 C 내지 F의 마우스는 다음 날에 걸쳐 회복되었다. 그룹 G 내지 I의 마우스는 13일에 NK 세포 접종 후 15일에 ~6-12% 체중 변화를 나타내었다. 따라서, d17에 마지막 예정된 투여는 이들 그룹에서 수행하지 않았다.

[0711] AFM13과 AB-101의 조합물을 투여받은 그룹에서 항종양 효능이 관찰되었으며, 이는 대조군과 비교하여 통계학적 유의성을 갖는다. 종양 성장의 차이는 AB-101 및 AFM13을 투여받은 동물의 서혜부 및 겨드랑이 림프절과 복강에서 감소된 종양 덩어리의 육안 발견에 의해 확인되었다. 결론적으로, AFM13과 AB-101의 조합은 Karpas-299/Luc 이종이식 종양 모델에서 상당한 항종양 효능을 입증하였다.

[0712] **서열**

서열번호 및 설명	서열
서열번호 1 피더 세포에 의해 발현될 수 있는 4-1BBL 의 서열	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLA CPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE
서열번호 2 피더 세포에 의해 발현될 수 있는 막 결합형 IL-21(mbIL-21)의 서열	MALPVTALLLPLALLLHAARPQDRHMIRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEF LPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPST NAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSE DSAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
서열번호 3 피더 세포에 의해 발현될 수 있는 돌연변이된 TNF 알파(mTNF-a)의 서열	MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCL LHFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQPVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEG QLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPSTHV LLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVF QLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL
서열번호 4 피더 세포에 의해 발현될 수 있는 OX40L 의 서열	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSAL QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDGF YLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVY LNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
서열번호 5 인간 알부민	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIA FAQYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCT VATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA FHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAA CLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKA EFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE FKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKC CTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLV AASQAALGL
서열번호 6 CD16 CDR H1	SYYMH
서열번호 7 CD16 CDR H2	IINPSGGSTSYAQKFQG
서열번호 8 CD16 CDR H3	GSAYYYDFADY
서열번호 9 CD16 CDR L1	GGHNIGSKNVH

[0713]

서열번호 10 CD16 CDR L2	QDNKRPS
서열번호 11 CD16 CDR L3	QVWDNYSVL
서열번호 12 CD30 CDR H1	TYTIH
서열번호 13 CD30 CDR H2	YINPSSGYSDYNQNFKG
서열번호 14 CD30 CDR H3	RADYGNYEYTWFAY
서열번호 15 CD30 CDR L1	KASQNVGTNVA
서열번호 16 CD30 CDR L2	SASYRYS
서열번호 17 CD30 CDR L3	QQYHTYPLT
서열번호 18 CD16x CD30 이중특이적 Ab 구축물	QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGS AYYYDFADYWGQGTLVTVSSGGSGGSGGSDIVMTQSPKFMSTSVGDRVTV TCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKVLIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDF TLTISNVQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGTKLEINGGSGGSGGSQVQLQ QSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWVRQRPGHDLEWIGYINPSS GYSDYNQNFKGKTTLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNY EYTWFAYWGQGTTVTVSSGGSGGSGGSSYVLTQPSSVSVAPGQTATISCG GHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLT ISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGGTKLTVL
서열번호 19 VH CD16	QVQLVQSGAEVKKPGESLKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMGI INPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGS AYYYDFADYWGQGTLVTVSS
서열번호 20 VL CD16	SYVLTQPSSVSVAPGQTATISCGGHNIGSKNVHWYQQRPGQSPVLVIYQD NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQVWDNYSVLFGGG TKLTVL
서열번호 21 VH CD30	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTIHWVRQRPGHDLEWIGY INPSSGYSDYNQNFKGKTTLTADKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRA DYGNYEYTWFAYWGQGTTVTVSS
서열번호 22 VL CD30	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVTCKASQNVGTNVAWFQQKPGQSPKVLIYS ASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGG GTKLEIN
서열번호 23 C-말단 CD16a	SFFPPGYQ
서열번호 24 인간 CD16A	GMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLEKDSVTLKCQGAYSPEDNSTQWFHNESL ISSQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLLQAPRW VFKEEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKD SGSYFCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFPPGYQ
서열번호 25 헥사-히스티딘 태그	HHHHHH

[0714]

서열번호 26 L1	GGSGGSGGS
서열번호 27 L2	GGSGGSGGS
서열번호 28 L3	GGSGGSGGS

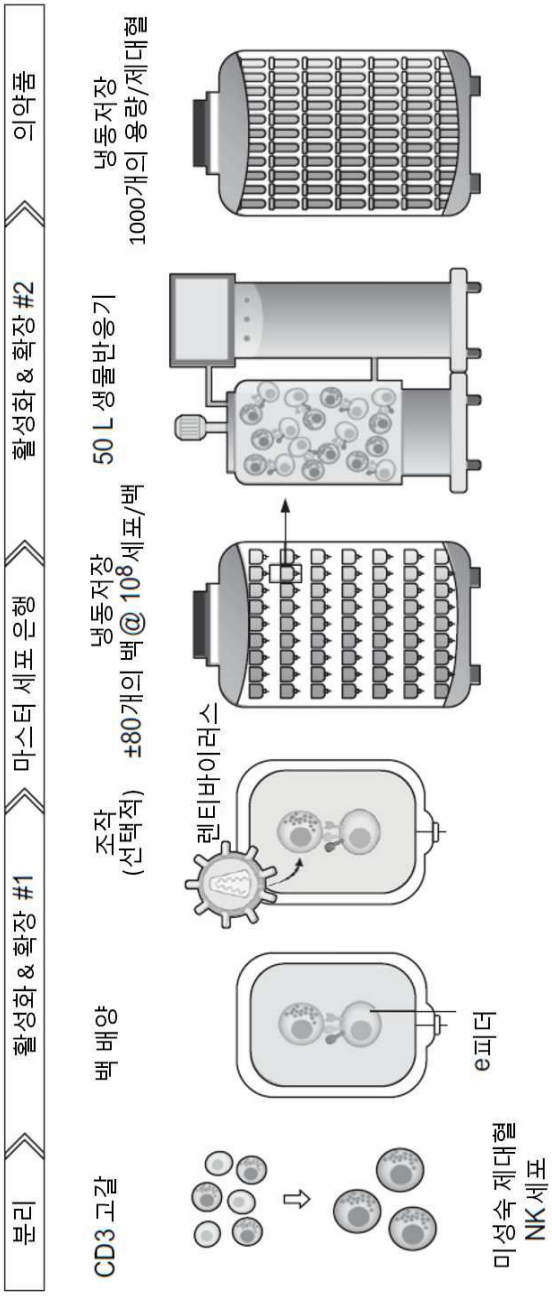
[0715]

[0716] **기타 구현예**

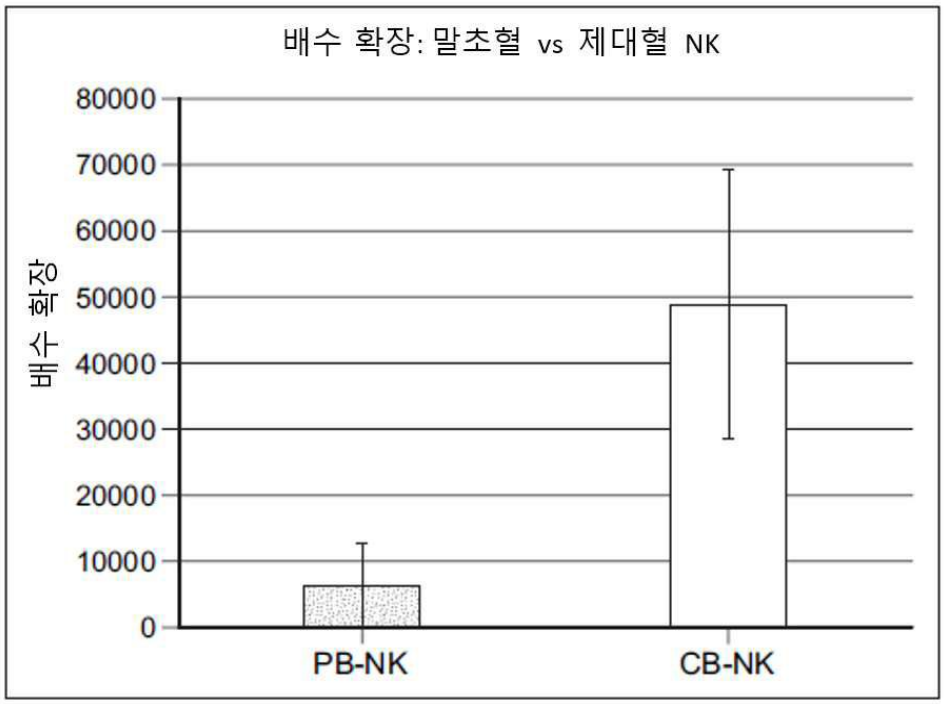
[0717] 본 발명은 그의 상세한 설명과 함께 기술되었지만, 전술한 설명은 첨부된 청구범위의 범위에 의해 정의되는 본 발명의 범위를 설명하기 위한 것이지 제한하려는 것이 아니라는 것이 이해되어야 한다. 다른 측면, 이점 및 수정은 다음 청구범위의 범위 내에 있다.

도면

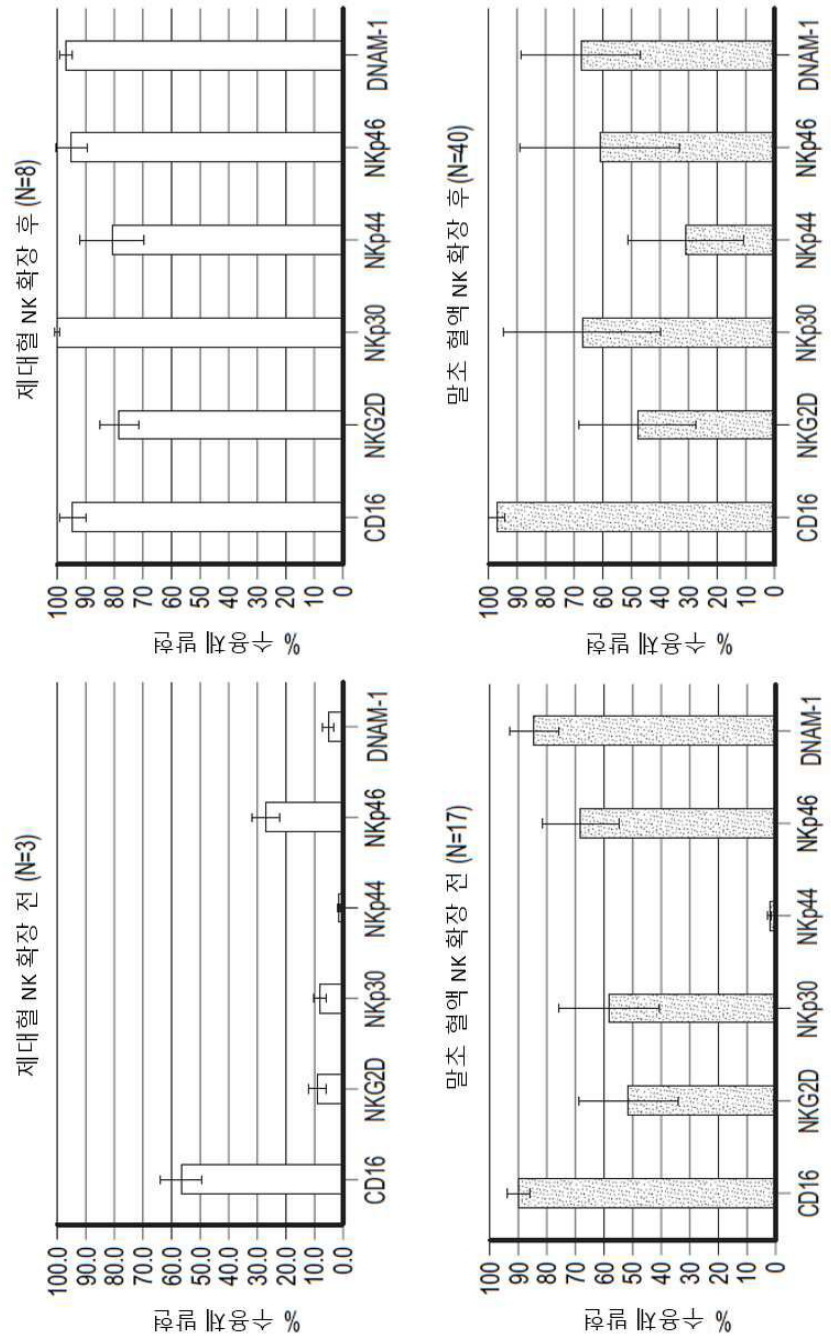
도면1


분리
활성화 & 확장 #1
마스터 세포 은행
활성화 & 확장 #2
의약품
CD3 고갈
백 배양
조작
(선택적)
±80개의 백@ 10^8세포/백
냉동저장
50 L 생물반응기
냉동저장
1000개의 용량/제대혈
렌티바이러스
e피더
미성숙 제대혈
NK세포

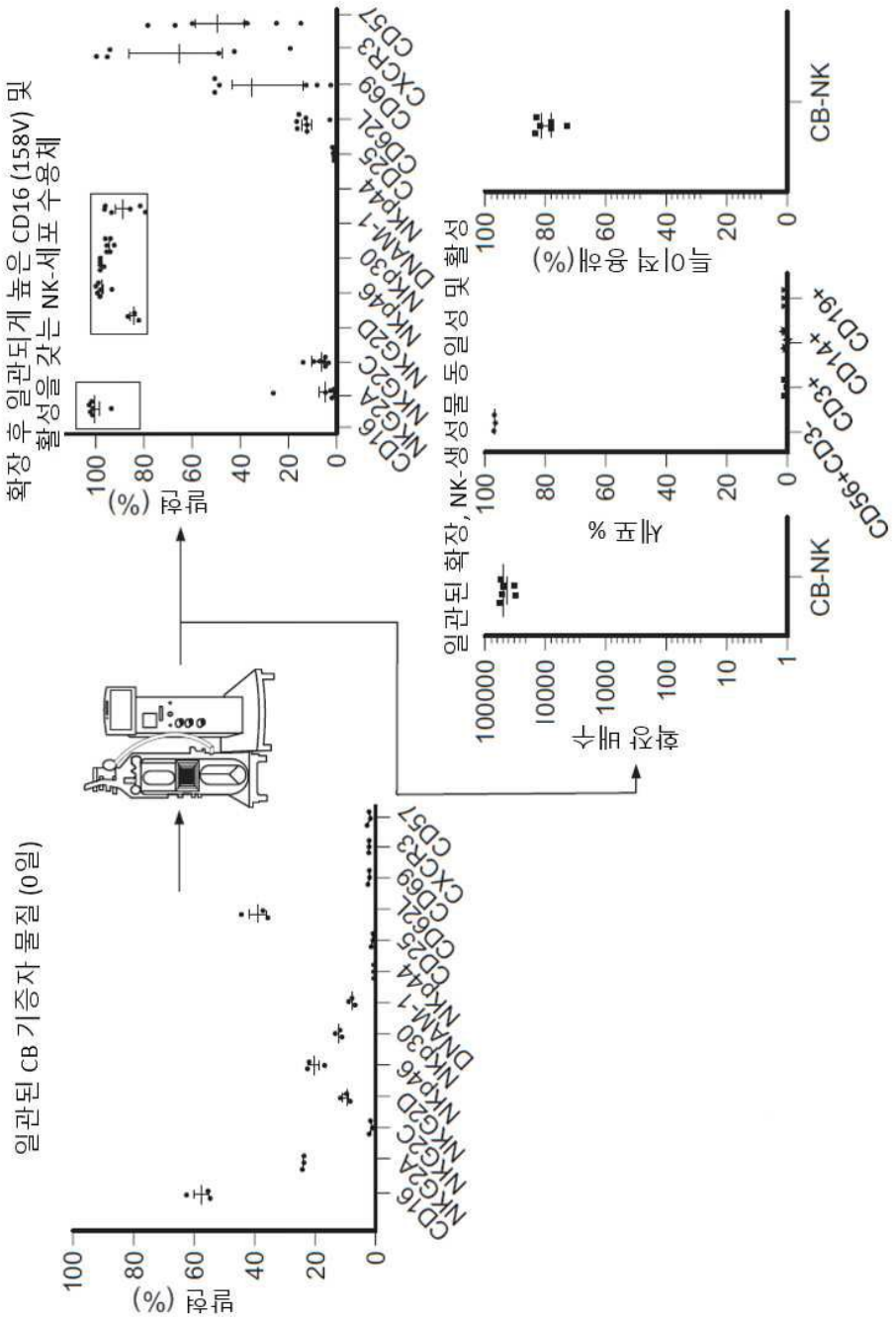
도면2


배수 확장: 말초혈 vs 제대혈 NK
배수 확장
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
PB-NK
CB-NK

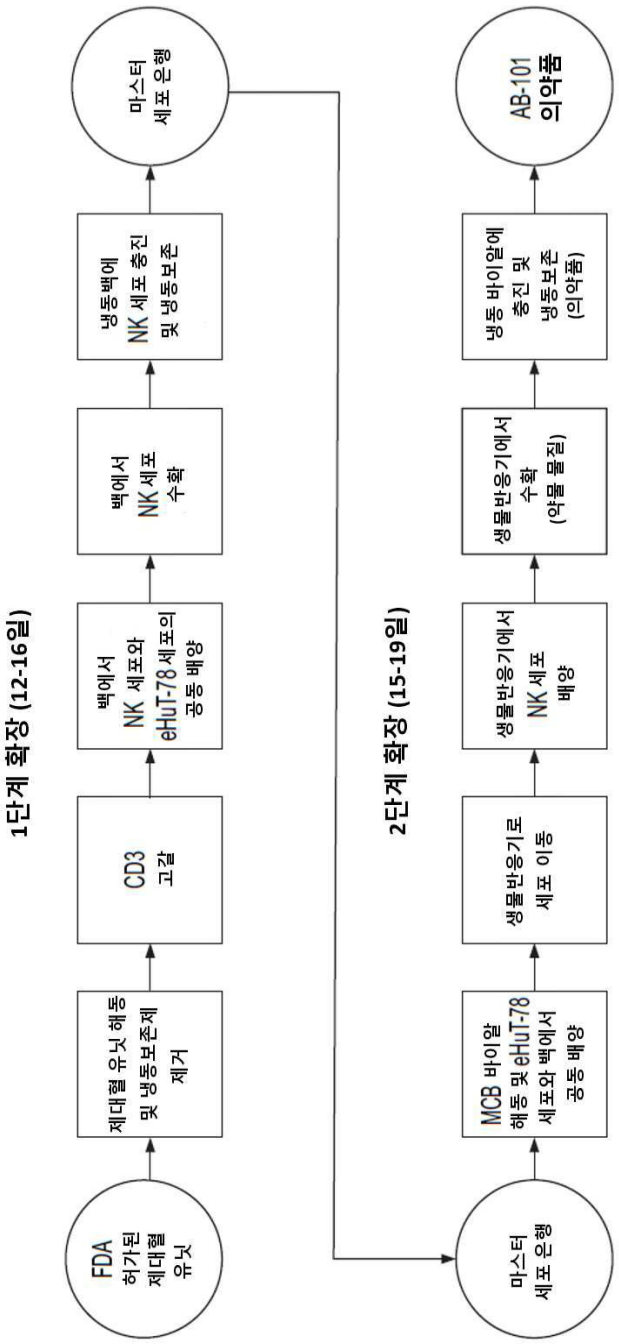
도면3


제대혈 NK 확장 후 (N=8)
말초 혈액 NK 확장 후 (N=40)
제대혈 NK 확장 전 (N=3)
말초 혈액 NK 확장 전 (N=17)
% 수용체 발현
CD16
NKG2D
NKp30
NKp44
NKp46
DNAM-1

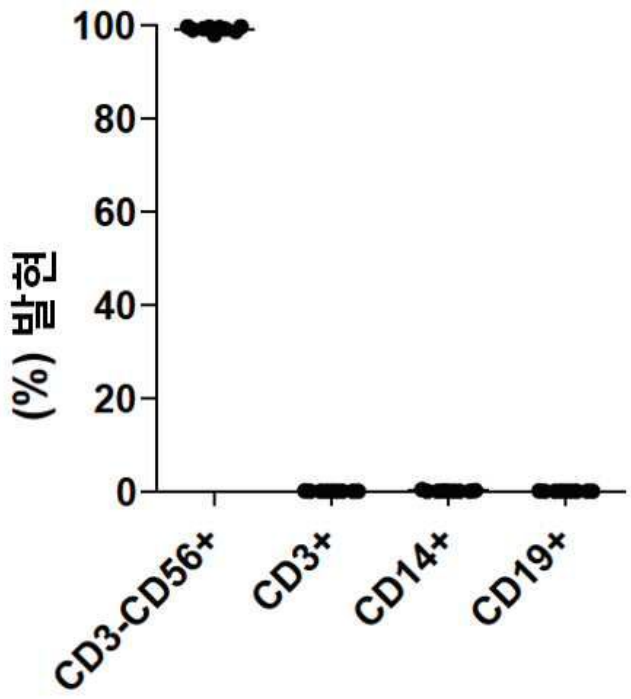
도면4


일관된 CB 기증자 물질 (0일)
발현 (%)
CD16
NKG2A
NKG2C
NKG2D
NKp46
NKp30
DNAM-1
NKp44
CD25
CD62L
CD69
CXCR3
CD57
확장 후 일관되게 높은 CD16 (158V) 및 활성을 갖는 NK-세포 수용체
일관된 확장, NK-생성물 동일성 및 활성
확장 배수
CB-NK
세포 %
CD56+CD3-
CD3+
CD14+
CD19+
특이적 용해 (%)

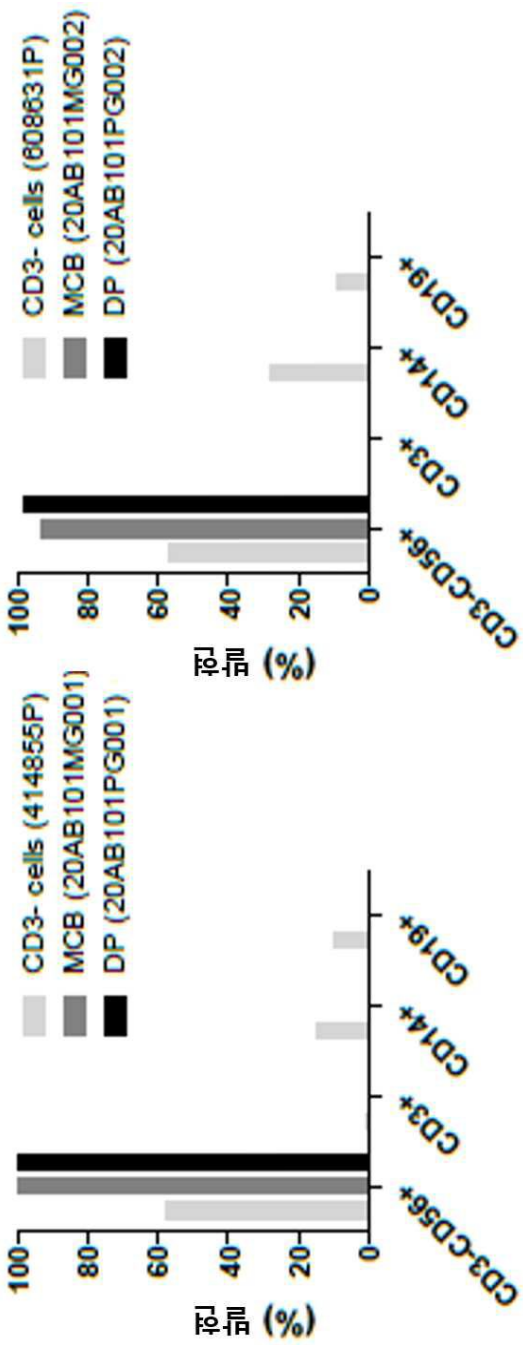
도면5


1단계 확장 (12-16일)
FDA 허가된 제대혈 유닛
제대혈 유닛 해동 및 냉동보존제 제거
CD3 고갈
백에서 NK 세포와 eHuT-78 세포의 공동 배양
백에서 NK 세포 수확
냉동백에 NK 세포 충진 및 냉동보존
마스터 세포 은행
2단계 확장 (15-19일)
마스터 세포 은행
MCB 바이알 해동 및 eHuT-78 세포와 백에서 공동 배양
생물반응기로 세포 이동
생물반응기에서 NK 세포 배양
생물반응기에서 수확 (약물 물질)
냉동 바이알에 충진 및 냉동보존 (의약품)
AB-101 의약품

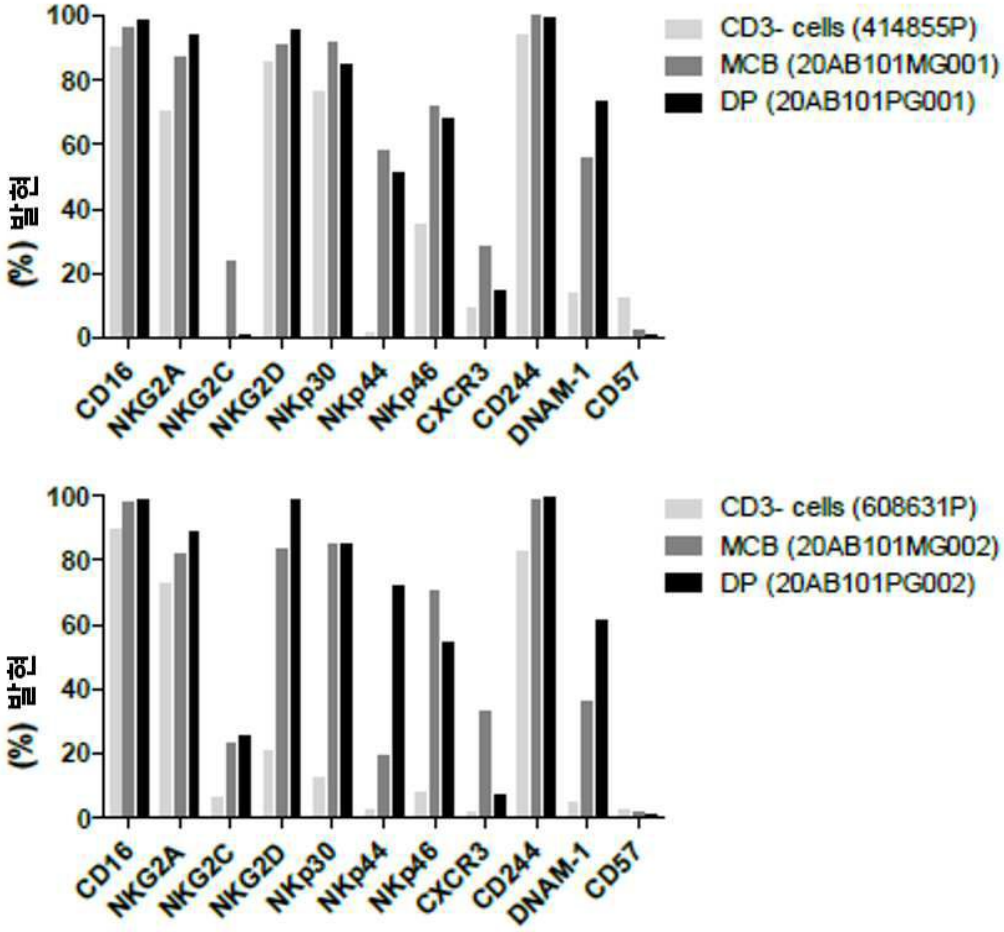
도면6



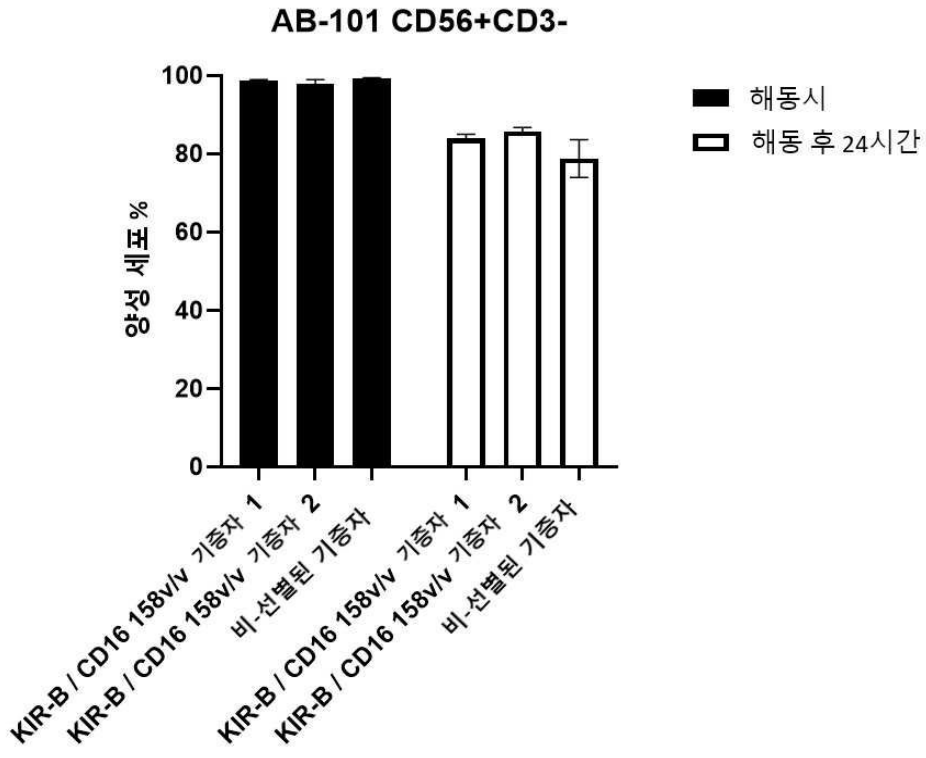
도면7


CD3- cells (808631P)
MCB (20AB101MG002)
DP (20AB101PG002)
CD19+
CD14+
CD3+
CD3-CD56+
100
80
60
40
20
0
발현 (%)
CD3- cells (414855P)
MCB (20AB101MG001)
DP (20AB101PG001)
CD19+
CD14+
CD3+
CD3-CD56+
100
80
60
40
20
0
발현 (%)

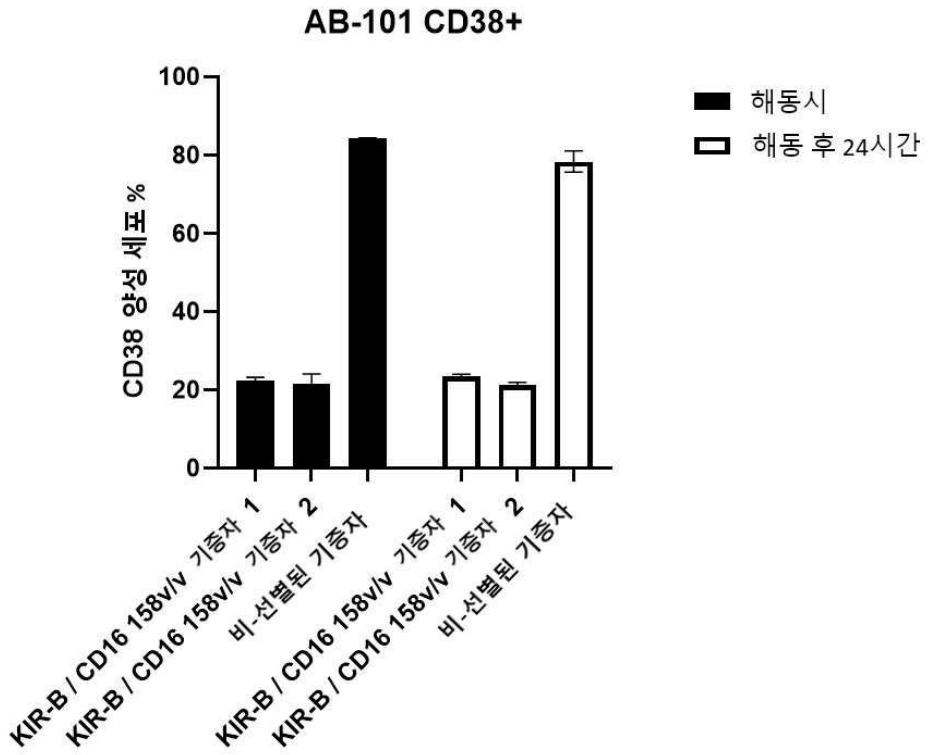
도면8


CD3- cells (414855P)
MCB (20AB101MG001)
DP (20AB101PG001)
(%) 발현
100
80
60
40
20
0
CD16
NKG2A
NKG2C
NKG2D
NKp30
NKp44
NKp46
CXCR3
CD244
DNAM-1
CD57
CD3- cells (608631P)
MCB (20AB101MG002)
DP (20AB101PG002)
(%) 발현
100
80
60
40
20
0
CD16
NKG2A
NKG2C
NKG2D
NKp30
NKp44
NKp46
CXCR3
CD244
DNAM-1
CD57

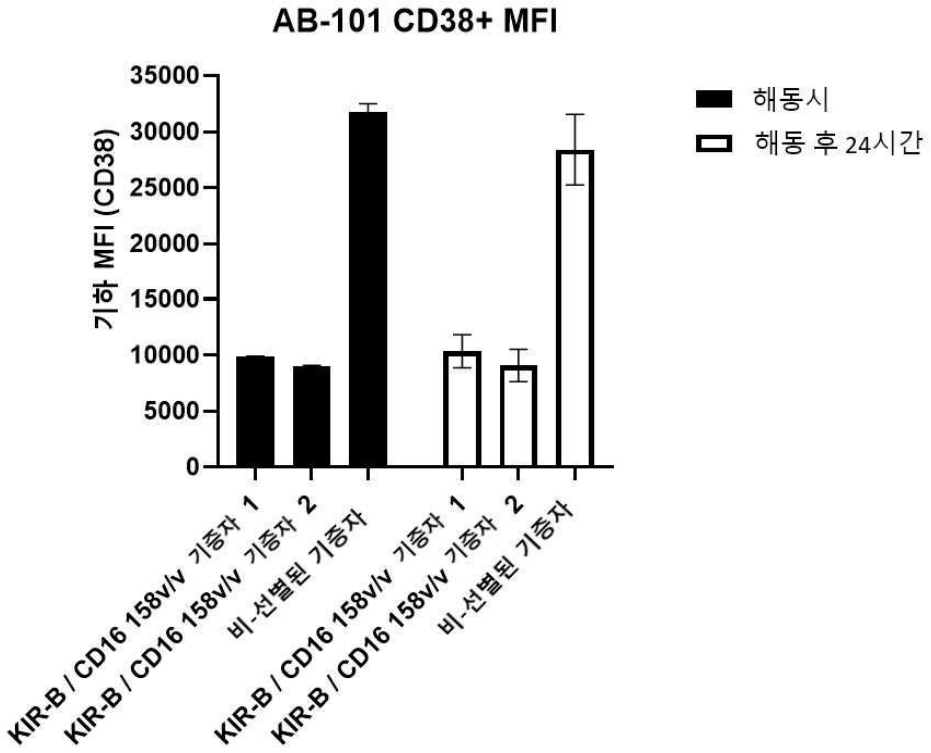
도면9


AB-101 CD56+CD3-
해동시
해동 후 24시간
양성 세포 %
100
80
60
40
20
0
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 1
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 2
비-선별된 기증자
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 1
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 2
비-선별된 기증자

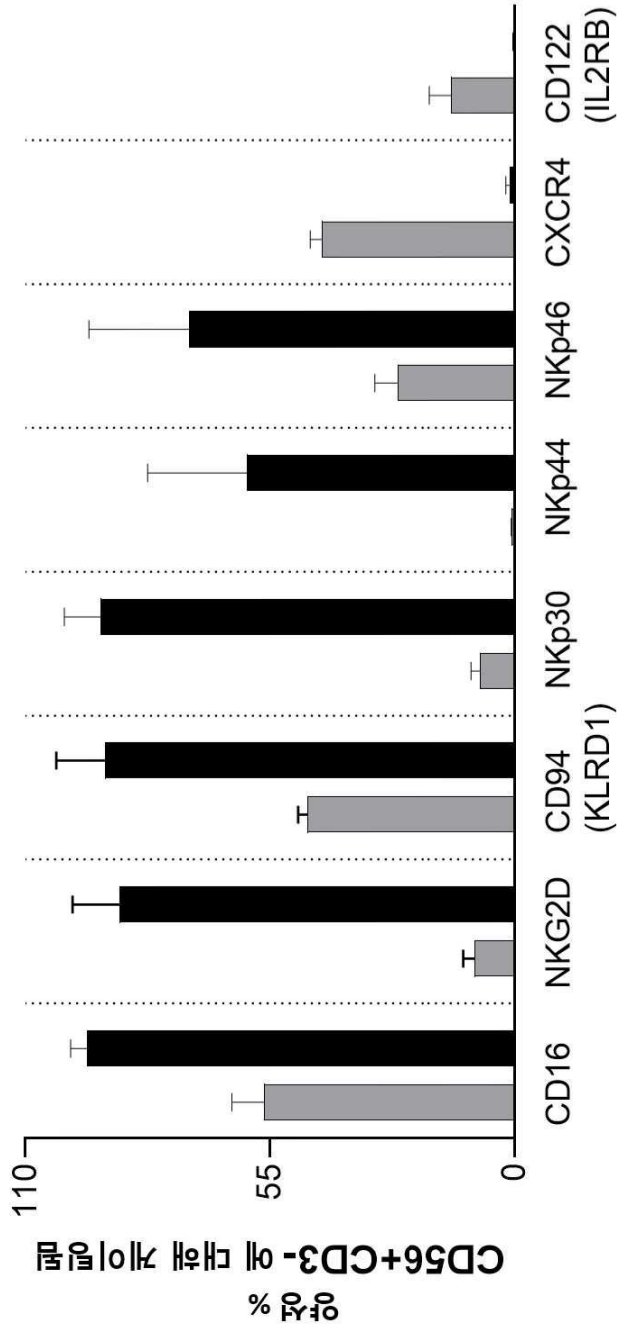
도면10


AB-101 CD38+
CD38 양성 세포 %
100
80
60
40
20
0
해동시
해동 후 24시간
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 1
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 2
비-선별된 기증자
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 1
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 2
비-선별된 기증자

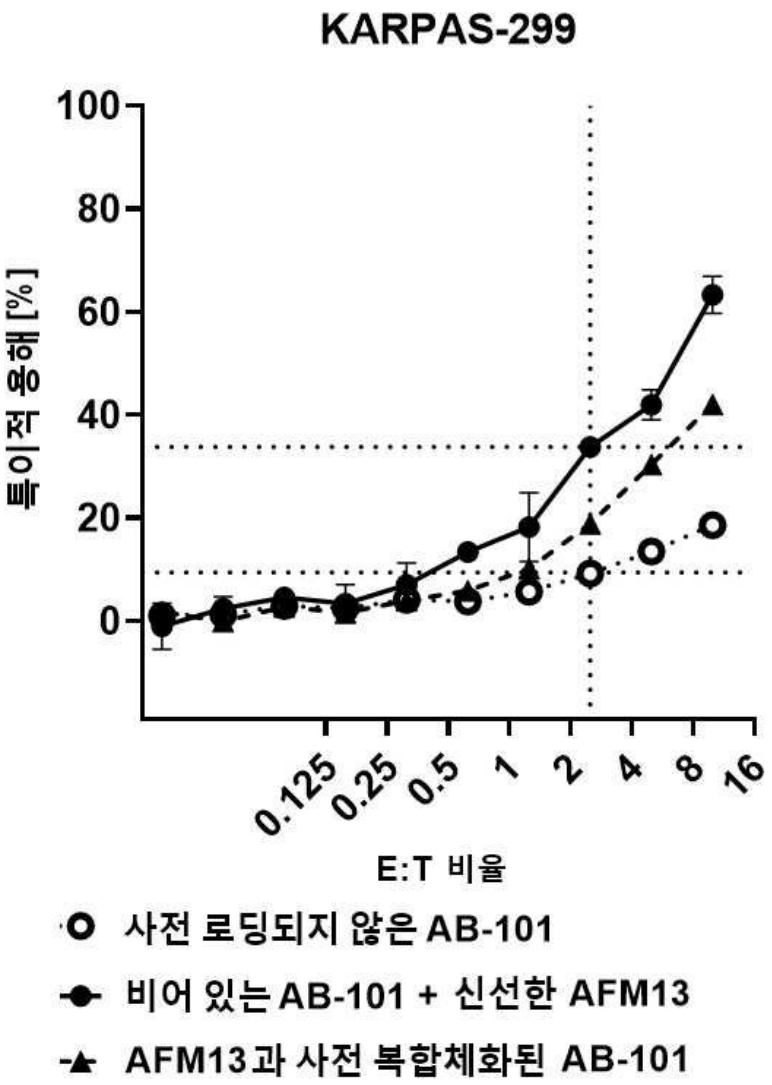
도면11


AB-101 CD38+ MFI
기하 MFI (CD38)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
해동시
해동 후 24시간
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 1
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 2
비-선별된 기증자
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 1
KIR-B / CD16 158v/v 기증자 2
비-선별된 기증자

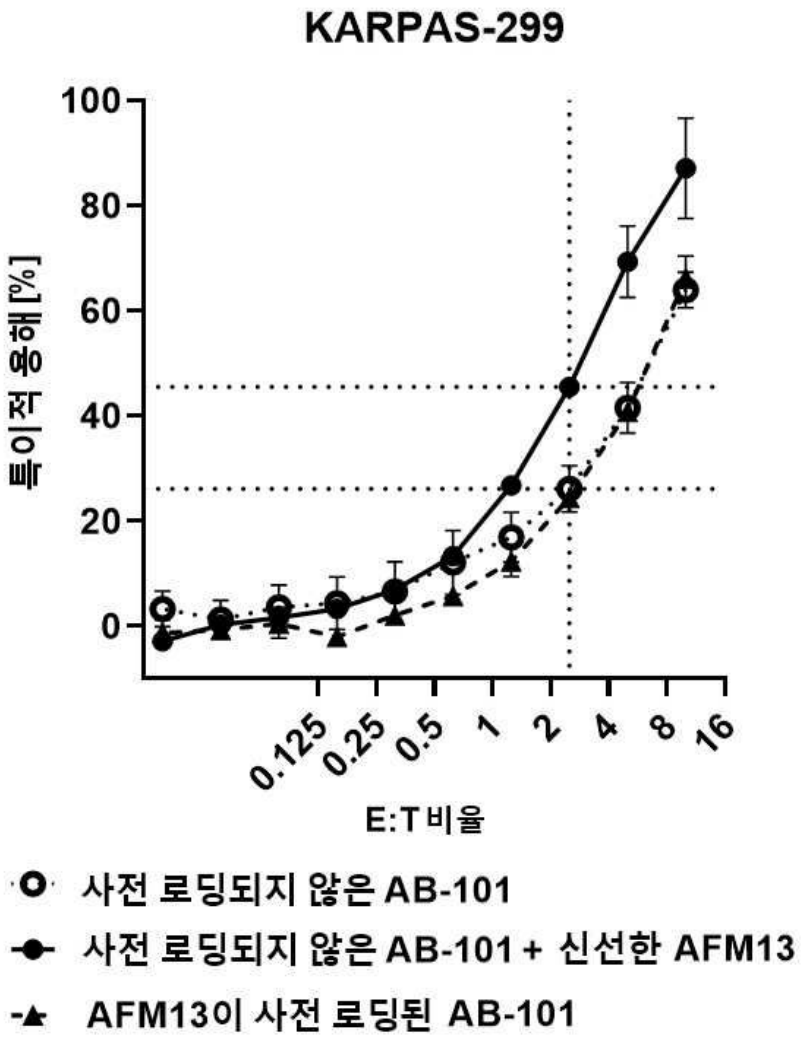
도면12


CD16
NKG2D
CD94 (KLRD1)
NKp30
NKp44
NKp46
CXCR4
CD122 (IL2RB)
0
55
110
양성 %
CD56+CD3- 에 대해 게이팅됨

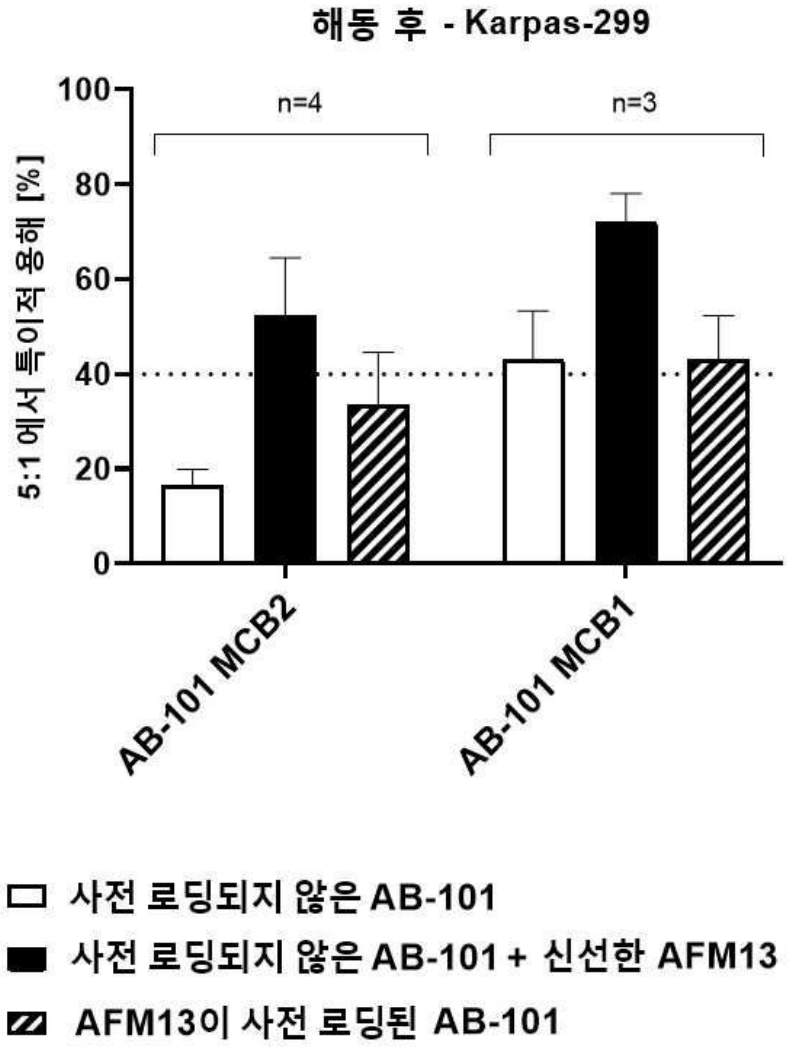
도면13


KARPAS-299
100
80
60
40
20
0
특이적 용해 [%]
0.125
0.25
0.5
1
2
4
8
16
E:T 비율
사전 로딩되지 않은 AB-101
비어 있는 AB-101 + 신선한 AFM13
AFM13과 사전 복합체화된 AB-101

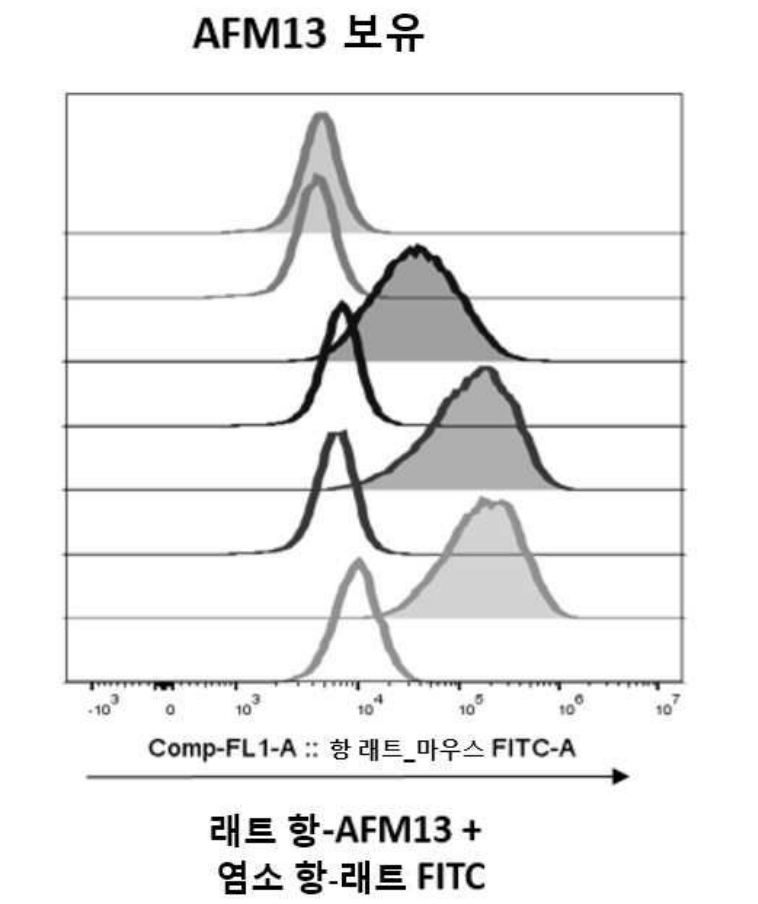
도면14


KARPAS-299
특이적 용해 [%]
100
80
60
40
20
0
0.125
0.25
0.5
1
2
4
8
16
E:T 비율
사전 로딩되지 않은 AB-101
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13
AFM13이 사전 로딩된 AB-101

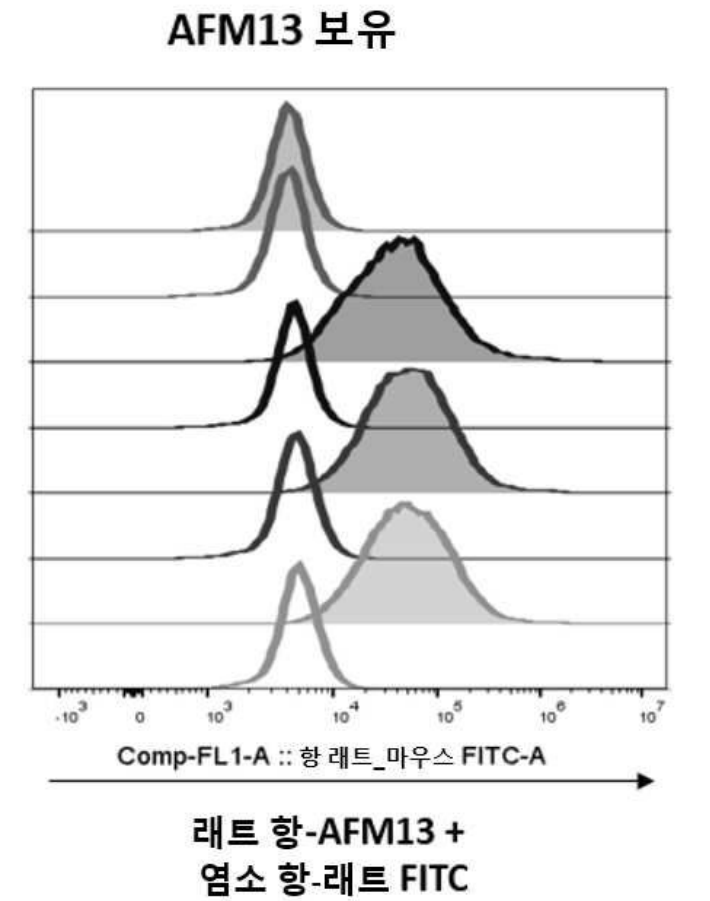
도면15


해동 후 - Karpas-299
n=4
n=3
5:1 에서 특이적 용해 [%]
100
80
60
40
20
0
AB-101 MCB2
AB-101 MCB1
사전 로딩되지 않은 AB-101
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13
AFM13이 사전 로딩된 AB-101

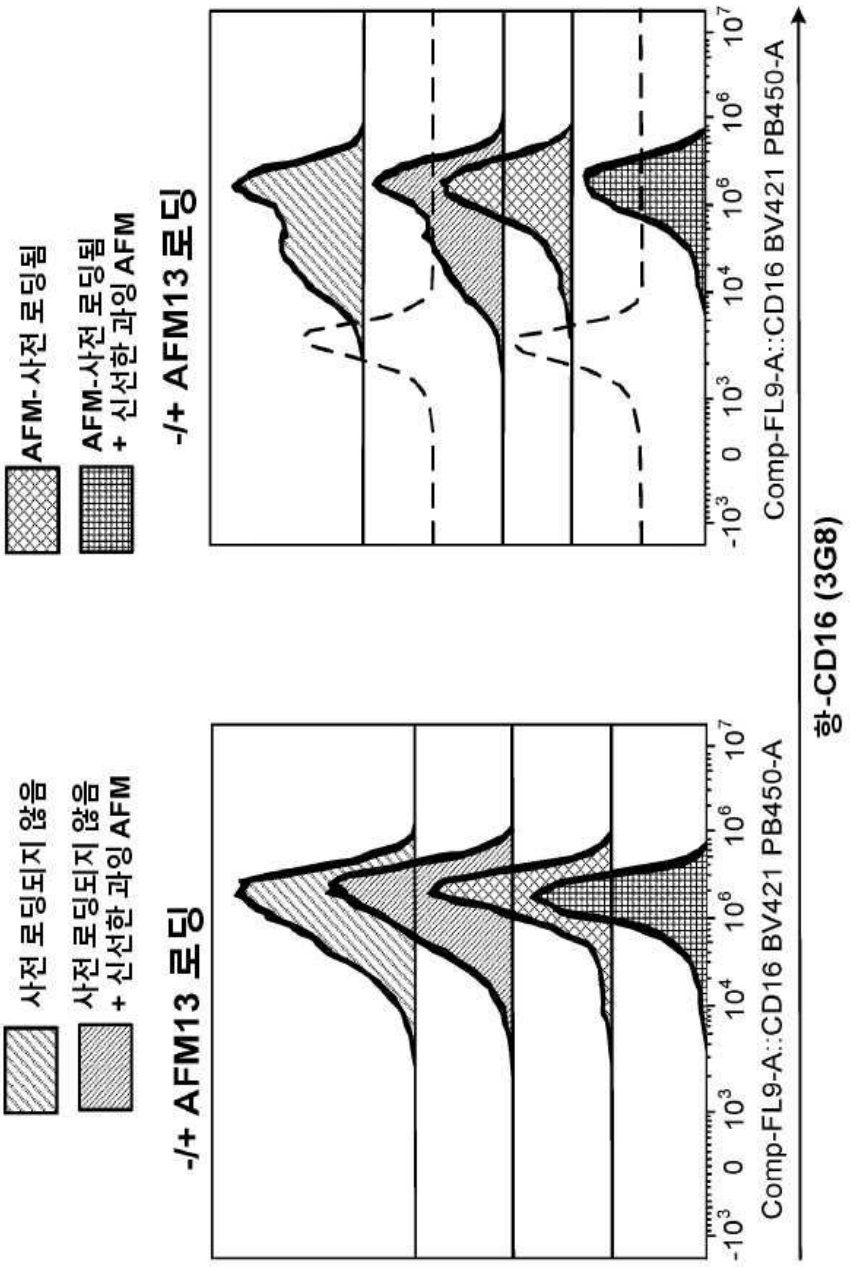
도면16


AFM13 보유
Comp-FL1-A :: 항 래트_마우스 FITC-A
래트 항-AFM13 +
염소 항-래트 FITC
사전 로딩되지 않음
사전 로딩되지 않음
+ 신선한 과잉 AFM
AFM-사전 로딩됨
AFM-사전 로딩됨
+ 신선한 과잉 AFM

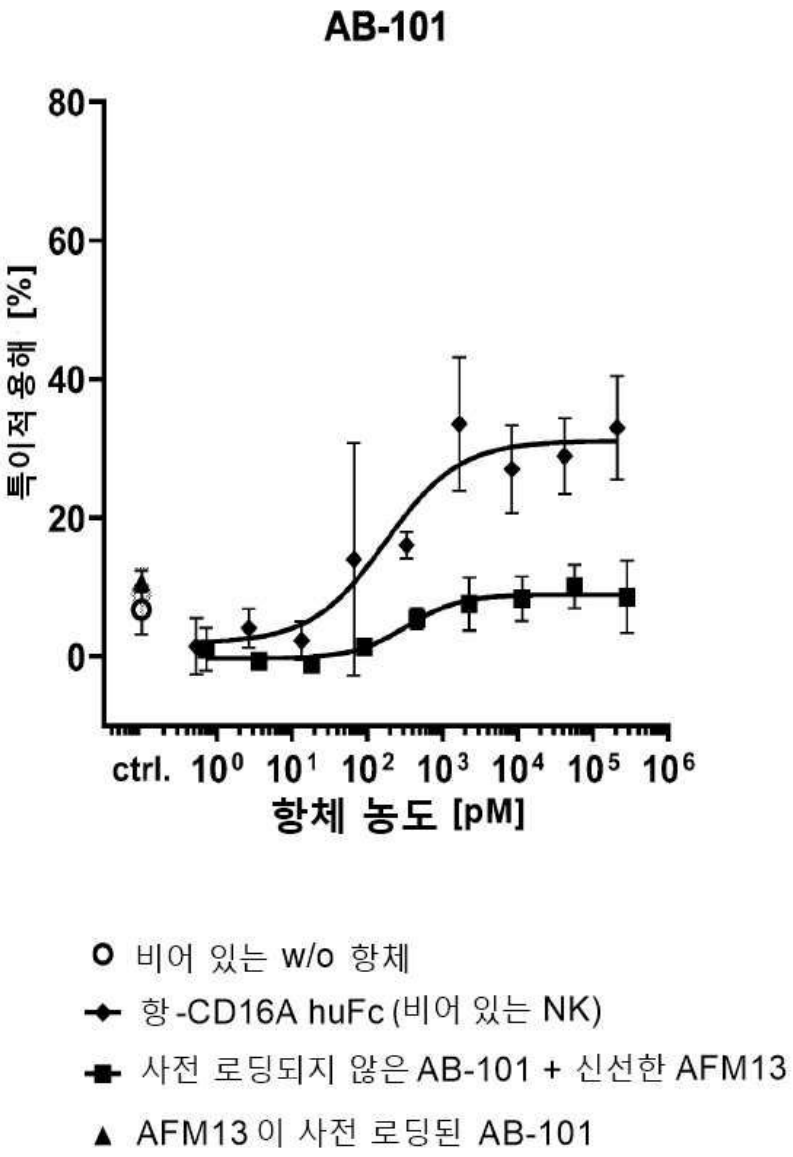
도면17


AFM13 보유
Comp-FL1-A :: 항 래트_마우스 FITC-A
래트 항-AFM13 +
염소 항-래트 FITC
사전 로딩되지 않음
사전 로딩되지 않음
+ 신선한 과잉 AFM
AFM-사전 로딩됨
AFM-사전 로딩됨
+ 신선한 과잉 AFM

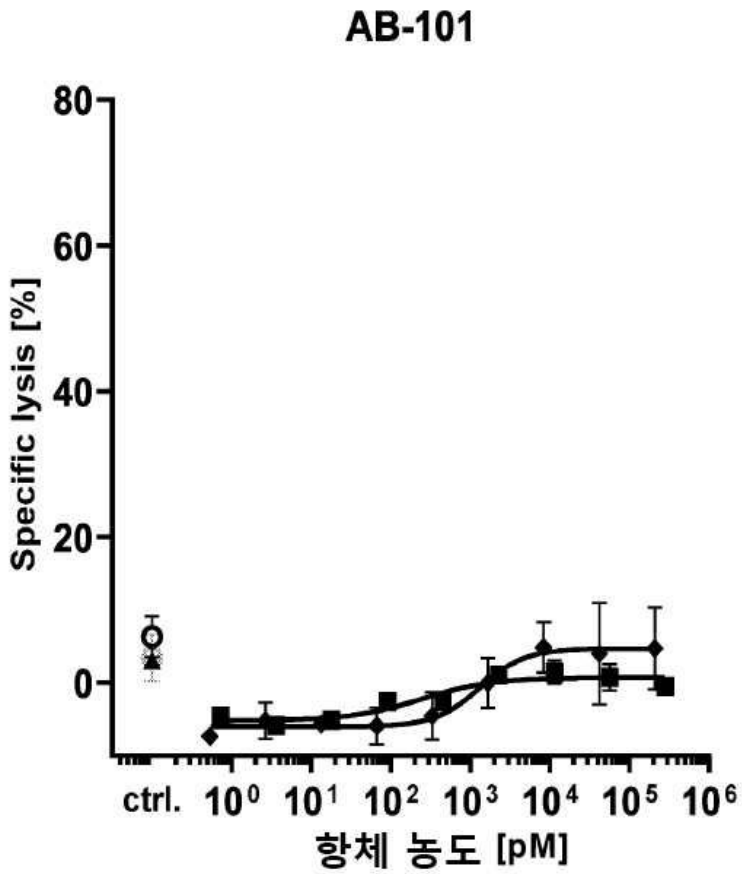
도면18


사전 로딩되지 않음
사전 로딩되지 않음
+ 신선한 과잉 AFM
-/+ AFM13 로딩
AFM-사전 로딩됨
AFM-사전 로딩됨
+ 신선한 과잉 AFM
-/+ AFM13 로딩
Comp-FL9-A::CD16 BV421 PB450-A
Comp-FL9-A::CD16 BV421 PB450-A
항-CD16 (3G8)

도면19


AB-101
80
60
40
20
0
특이적 용해 [%]
ctrl.
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶
항체 농도 [pM]
비어 있는 w/o 항체
항-CD16A huFc (비어 있는 NK)
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13
AFM13이 사전 로딩된 AB-101

도면20



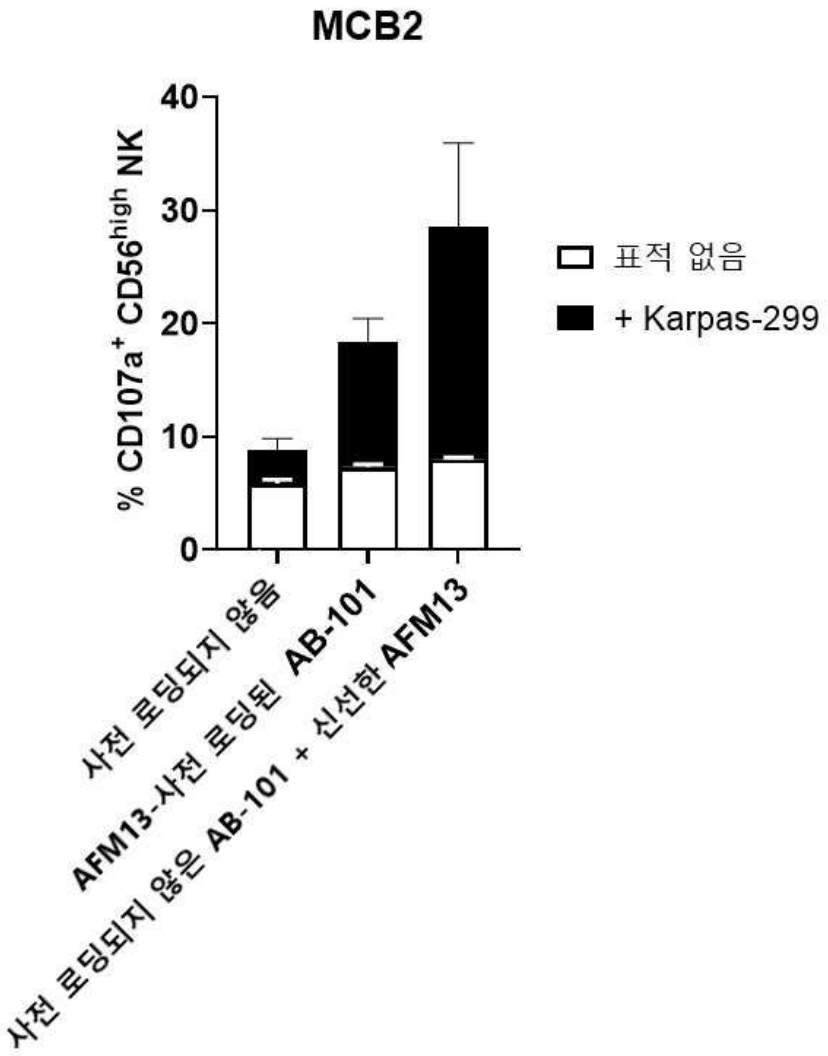
○ 사전 로딩되지 않은 w/o 항체

◆ 항-CD16A huFc (사전 로딩되지 않은)

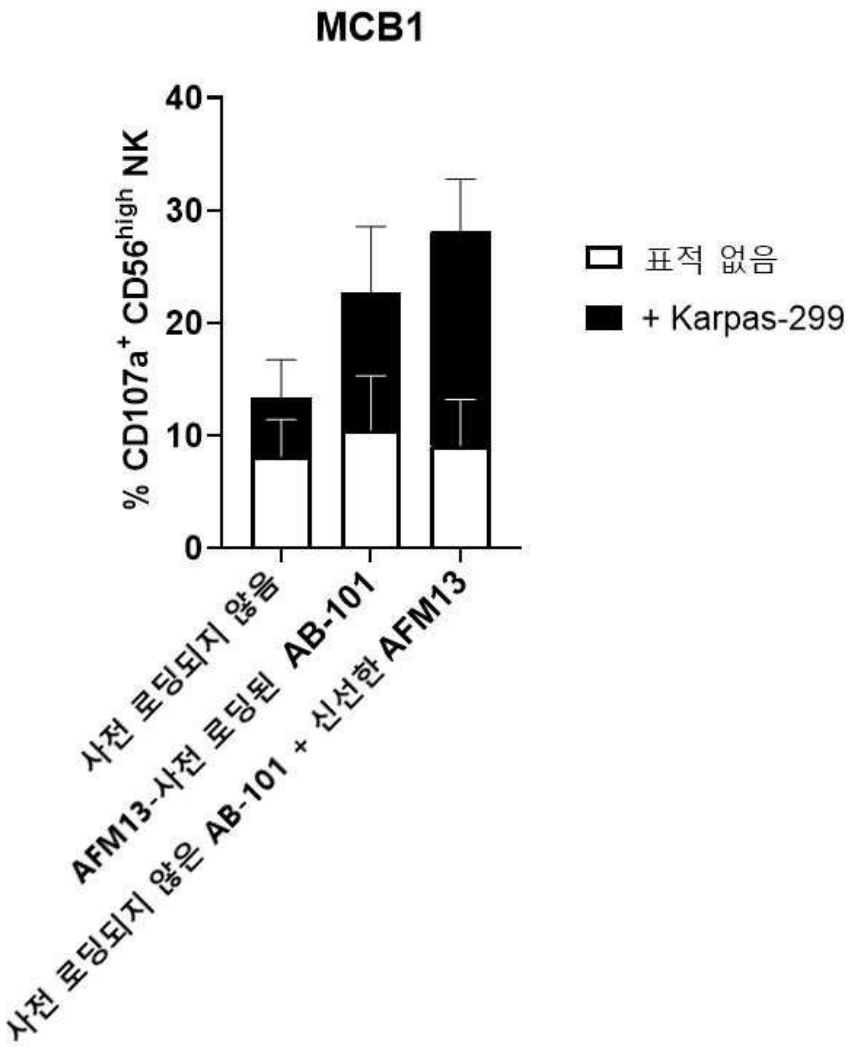
■ 사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13

▲ AFM13이 사전 로딩된 AB-101

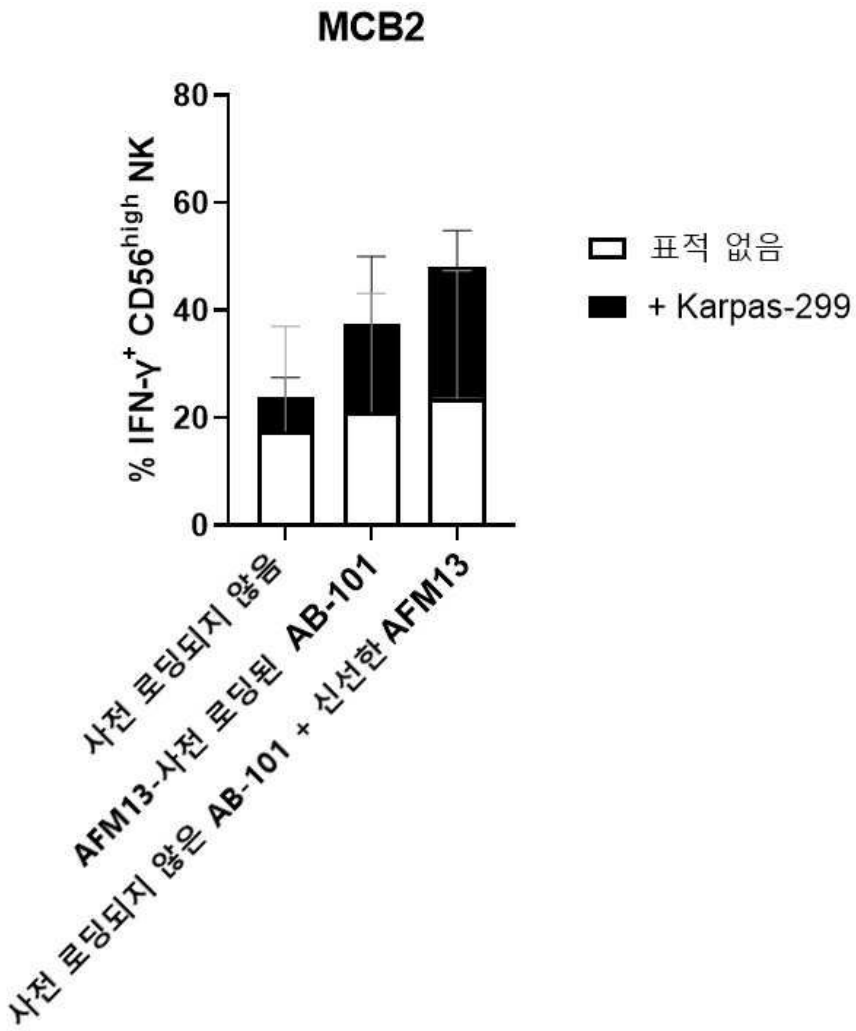
도면21


MCB2
% CD107a+ CD56high NK
40
30
20
10
0
표적 없음
+ Karpas-299
사전 로딩되지 않음
AFM13-사전 로딩된 AB-101
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13

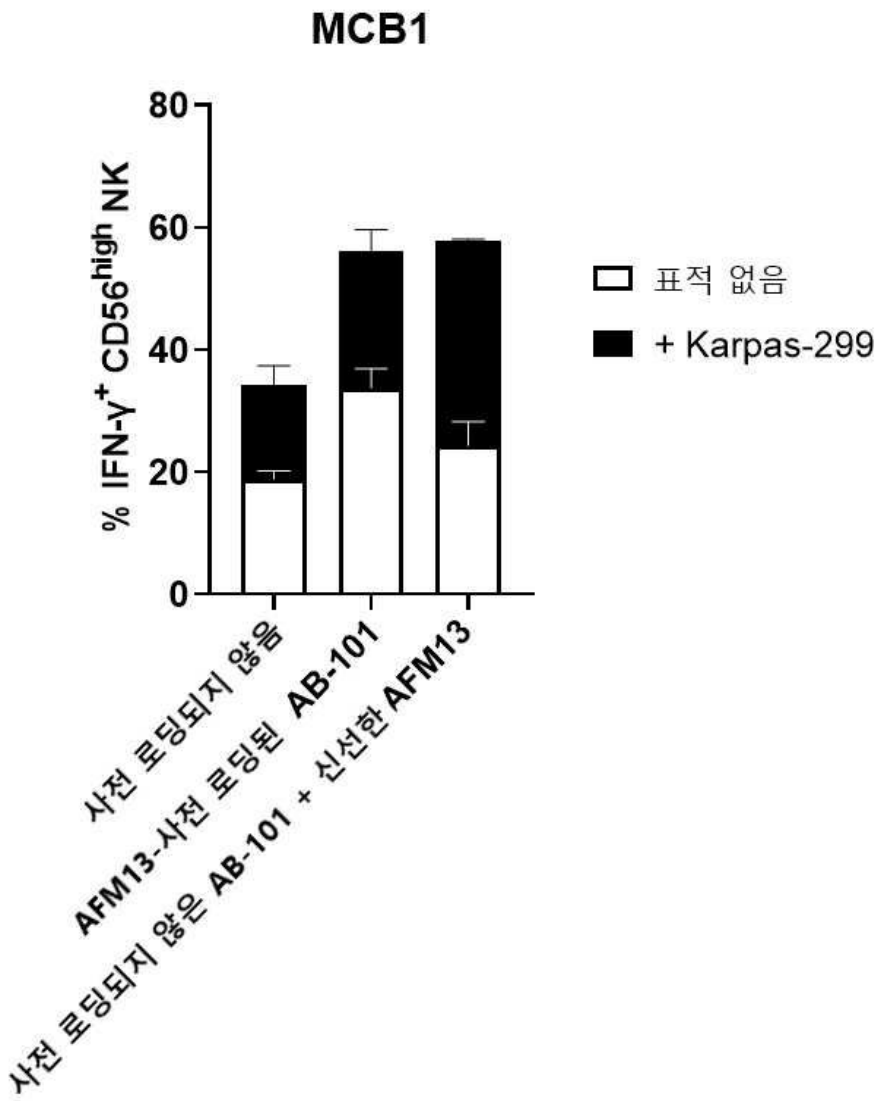
도면22


MCB1
% CD107a+ CD56high NK
40
30
20
10
0
표적 없음
+ Karpas-299
사전 로딩되지 않음
AFM13-사전 로딩된 AB-101
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13

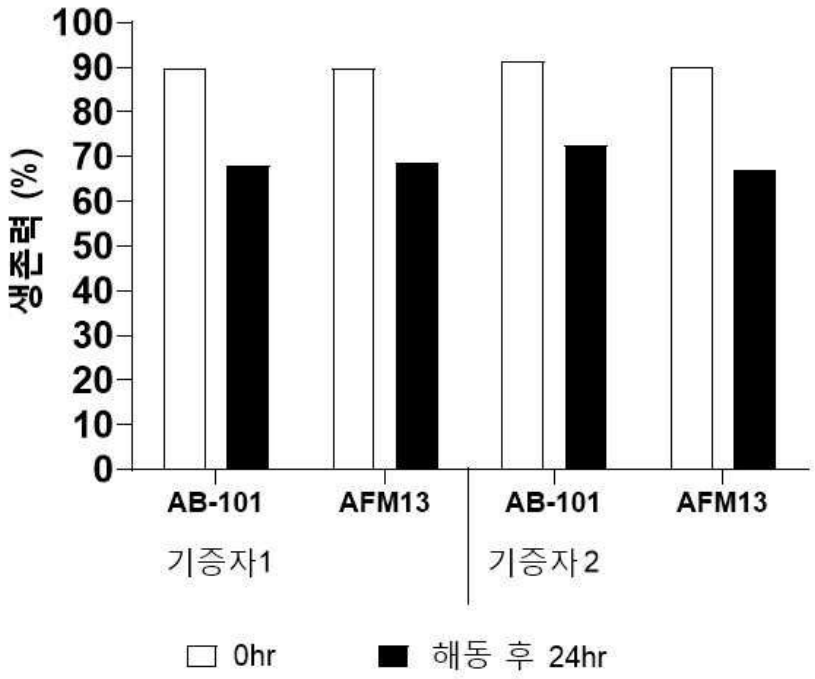
도면23


MCB2
% IFN-γ+ CD56high NK
80
60
40
20
0
표적 없음
+ Karpas-299
사전 로딩되지 않음
AFM13-사전 로딩된 AB-101
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13

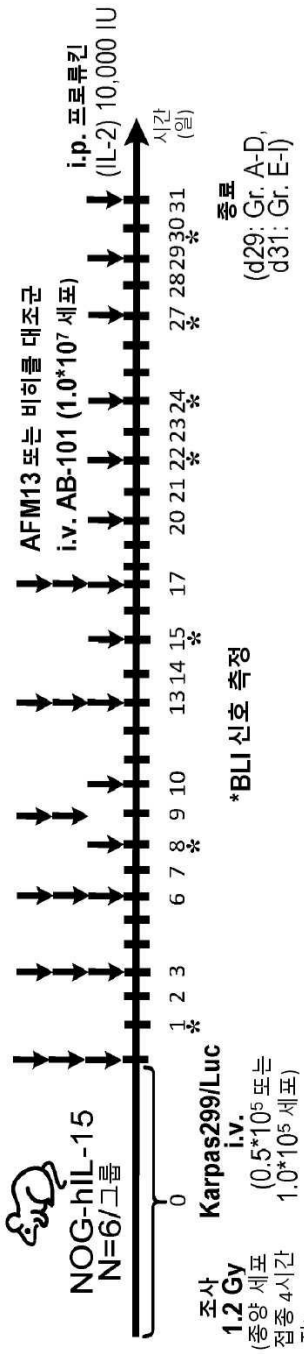
도면24


MCB1
% IFN-γ+ CD56high NK
80
60
40
20
0
표적 없음
+ Karpas-299
사전 로딩되지 않음
AFM13-사전 로딩된 AB-101
사전 로딩되지 않은 AB-101 + 신선한 AFM13

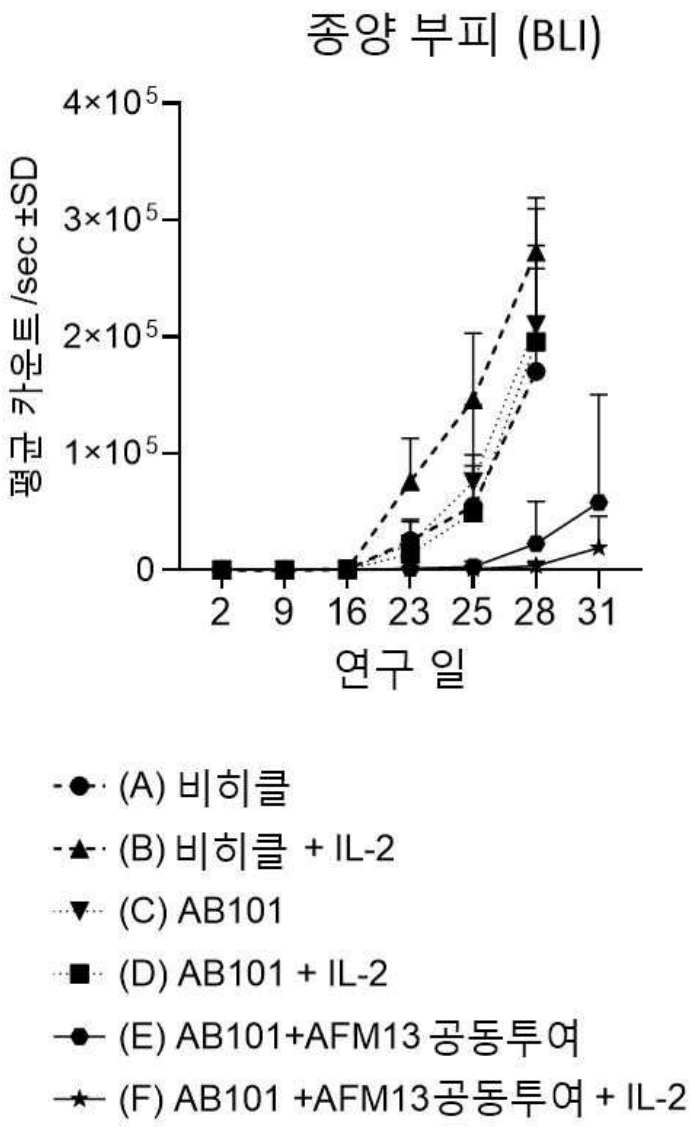
도면25


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
생존률 (%)
AB-101
AFM13
AB-101
AFM13
기증자1
기증자2
0hr
해동 후 24hr

도면26


NOG-hIL-15
N=6/그룹
조사
1.2 Gy
(종양 세포
접종 4시간
전)
0
Karpas299/Luc
i.v.
(0.5*10^5 또는
1.0*10^5 세포)
1
2
3
6
7
8
9
10
13
14
15
17
20
21
22
23
24
27
28
29
30
31
시간
(일)
*BLI 신호 측정
AFM13 또는 비히클 대조군
i.v. AB-101 (1.0*10^7 세포)
i.p. 프로류킨
(IL-2) 10,000 IU
종료
(d29: Gr. A-D,
d31: Gr. E-I)

도면27


종양 부피 (BLI)
평균 카운트 /sec ±SD
4×10^5
3×10^5
2×10^5
1×10^5
0
2
9
16
23
25
28
31
연구 일
(A) 비히클
(B) 비히클 + IL-2
(C) AB101
(D) AB101 + IL-2
(E) AB101+AFM13 공동투여
(F) AB101 +AFM13공동투여 + IL-2

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.