(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0166873
(43) 공개일자 2022년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61P 35/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7042037(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년08월13일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2021-7017107
원출원일자(국제) 2013년08월13일
심사청구일자 2021년07월02일
(85) 번역문제출일자 2022년11월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/054677
(87) 국제공개번호 WO 2014/028453
국제공개일자 2014년02월20일
(30) 우선권주장
61/682,706 2012년08월13일 미국(US)
61/799,211 2013년03월15일 미국(US)

(71) 출원인
셀룰래리티 인코포레이티드
미국 뉴저지주 07932 플로햄 파크 파크 애비뉴 170
(72) 발명자
로 에릭
미국 뉴저지주 08816 이스트 브룬스윅 저니 드라이브 45
캉 린
미국 뉴저지주 08820 에디슨 팀버 오크스 로드 1106
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

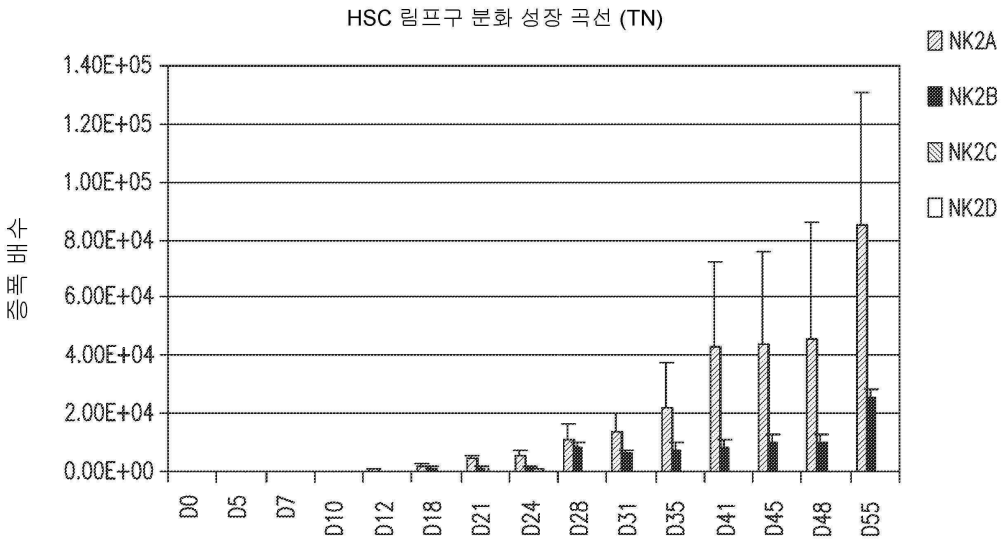
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **자연 살해 세포 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 2-단계 증폭 및 분화 방법을 이용하여 자연 살해(NK) 세포 및 NK 전구 세포 집단을 생성하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 3-단계 증폭 및 분화 방법을 이용하여 NK 세포의 집단 및 NK 전구 세포 집단을 생성하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 NK 세포, NK 세포 집단 및 NK 전구 세포 집단을 이용하여 종양 세포 증식을 억제하는 방법, 및 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 NK 세포, NK 세포 집단 및 NK 전구 세포 집단을 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/02 (2018.01)
C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/145 (2013.01)
C12N 2501/22 (2013.01)
C12N 2501/2306 (2013.01)
C12N 2501/2307 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/26 (2013.01)
C12N 2506/11 (2013.01)

(72) 발명자
얀코빅 블라디미르
미국 뉴욕주 10044 뉴욕 리버 로드 30 아파트먼트 4디
장 시아오쿠이
미국 뉴저지주 07039 리빙스톤 마운트하벤 드라이브 10
애봇 스튜어트
미국 뉴저지주 07059 워렌 카세일 드라이브 15
하리리 로버트 제이
미국 뉴저지주 07924 버나즈빌 멘담 로드 341

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 Flt3L, TPO, SCF, IL-7, G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함하는 제 1 배지에서 배양하고, (ii) 이어서, 상기 세포를 Flt3L, SCF, IL-15, IL-7, IL-17, IL-15, G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함하는 제 2 배지에서 배양하고, (iii) 이어서, 상기 세포를 SCF, IL-15, IL-7, IL-2, G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함하는 제 3 배지에서 배양하는 방법에 따라 생성된 자연 살해(NK) 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

배양 단계 (i)의 기간이 7 내지 9 일이고, 배양 단계 (ii)의 기간이 5 내지 7 일이고, 배양 단계 (iii)의 기간이 5 내지 9 일인, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

배양 단계 (i)의 기간이 7 내지 9 일이고, 배양 단계 (ii)의 기간이 5 내지 7 일이고, 배양 단계 (iii)의 기간이 21 내지 35 일인, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

방법에 사용된 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포가 $CD34^{+}$인, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 5

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

조혈 줄기 세포 또는 전구 세포가 인간 태반 관류액으로부터의 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 및 제대혈로부터의 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 포함하고, 상기 태반 관류액 및 상기 제대혈이 동일한 태반으로부터 수득되는, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

$CD34^{-}$ 세포가 배양 단계 (i)의 종료시 전체 집단의 80% 초과를 차지하는, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

집단이 40% 이하의 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포를 포함하는, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서,

집단이 $CD52^{+}CD117^{+}$인 세포를 포함하는, NK 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 9

40% 이하의 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포를 포함하는, 자연 살해(NK) 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 10

$CD52^{+}CD117^{+}$인 세포를 포함하는, 자연 살해(NK) 전구 세포의 단리된 집단.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 NK 전구 세포의 단리된 집단을 포함하는 약학 조성물.

청구항 12

종양 세포를 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 NK 전구 세포의 단리된 집단 또는 제 11 항에 따른 약학 조성물과 근접하게 함을 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

종양 세포가 원발성 관상 암종 세포, 교모세포종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 폐암 세포, 결장 선암 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발성 골수종 세포, 대장암 세포, 대장 선암 세포, 전립선암 세포 또는 망막모세포종 세포인 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 NK 전구 세포의 단리된 집단 또는 제 11 항에 따른 약학 조성물을 치료를 필요로 하는 대상에게 투여함을 포함하는, 상기 대상에서 혈액암을 치료하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

혈액암이 급성 골수성 백혈병인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조혈 전구 세포 집단으로부터 자연 살해(natural killer, NK) 세포 집단 및 NK 전구 세포 집단을 생산하는 방법, 예를 들면, 태반, 예를 들어, 태반 관류액(예, 인간 태반 관류액)으로부터의 세포, 예를 들면, 태반-유래 중간 NK 세포로부터, 또는 다른 조직, 예를 들면, 제대혈 또는 말초혈로부터 NK 세포 및 NK 전구 세포를 생성하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 증폭된 NK 세포 집단뿐 아니라, 본원에 제공된 방법에 의해 생성된 NK 세포 및 NK 전구 세포의 단리된 집단에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 본원에 기술된 태반 관류액, NK 세포 및/또는 NK 전구 세포를 사용하여 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 관한 것이다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 NK 세포 및/또는 NK 전구 세포는 하나 이상의 면역조절 화합물, 예를 들면, 본원에서 IMiD(등록상표)로 지칭되는 면역조절 화합물과 함께 사용되고/되거나, 상기 화합물로 처리된다.

배 경 기 술

[0003] 자연 살해(NK) 세포는 선천적 면역계의 주성분을 구성하는 세포독성 림프구이다. NK 세포는 T-세포 항원 수용체(TCR), CD3 또는 표면 면역글로불린(Ig) B 세포 수용체를 발현하지 않는다. NK 세포는 일반적으로 인간에서 표면 마커 CD16(FcγRIII) 및 CD56을 발현하지만, 인간 NK 세포의 서브클래스는 $CD16^{-}$이다. NK 세포는 세포독성이며; 그의 세포질중의 소과립은 퍼포린과 같은 특수 단백질 및 그랜자임으로 알려진 프로테아제를 함유한다. 사멸시키기 위해 표적화된 세포에 매우 근접하여 방출시, 퍼포린은 표적 세포의 세포막에 구멍을 형성하고, 이를 통해 그랜자임 및 관련 분자들이 진입하여, 세포자살(apoptosis)을 유도할 수 있다. 하나의 그랜자임인 그

랜자임 B(그랜자임 2 및 세포독성 T-림프구-관련 세린 에스터라제 1로도 알려짐)는 세포-매개 면역 반응에서 표적 세포 자살의 신속한 유도에 중요한 세린 프로테아제이다.

[0004] NK 세포는 인터페론 또는 대식세포-유래 사이토카인에 반응하여 활성화된다. 활성화된 NK 세포는 때때로 림포카인 활성화 살해(LAK) 세포로 지칭되지만, LAK 세포는 전형적으로 NK 세포, CD56+CD3+ NK-유사 T 세포, 및 아마도 다른 세포독성 세포의 이종 집단이다. NK 세포의 세포독성 활성은 주로 "활성화 수용체" 또는 "억제 수용체"로 간주될 수 있는 두가지 유형의 표면 수용체에 의해 조절되지만, 일부 수용체들, 예를 들면, CD94 및 2B4는 리간드 상호작용에 의존하는 방식으로 작용할 수 있다.

[0005] 다른 활성들중에서, NK 세포는 종양의 숙주 거부에서 한 역할을 하며, 바이러스-감염 세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 변화되거나 감소된 수준의 자가-클래스 I MHC 발현을 갖는 암세포는 NK 세포 민감성의 유도를 야기한다. 쌓여가는 임상 데이터는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 또는 골수로부터 단리된 인간 NK 세포의 일배수동종(haploidentical) 이식이 검출가능한 이식편 대 숙주 질환(GVDH)을 야기하지 않으면서 강력한 항-백혈병 효과를 매개함을 시사한다(문헌 [Ruggeri *et al.*, *Science* 295:2097-2100 (2002)] 참조). 자연 살해 세포는 세포 결손에 의해, 또는 감소된 수준의 주조직적합성 복합체(MHC) 단백질을 디스플레이함으로써 활성화될 수 있다. 또한, NK 세포상에서 발현된 활성화 수용체는 활성화 수용체에 대한 리간드를 발현하는 "스트레스유도" 되거나 형질전환된 세포의 검출을 매개하며 따라서 NK 세포 활성화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, NCR1(NKp46)은 바이러스 헤마글루티닌에 결합한다. NKG2D 리간드로는 CMV UL16-결합 단백질 1(ULB1), ULB2, ULB3 및 MHC-클래스-I-폴리펩티드-관련 서열 A(MICA) 및 MICB 단백질이 포함된다. NK 단백질 2B4는 CD48에 결합하고, DNAM-1은, 둘 다 급성 골수성 백혈병(AML)에서 일관되게 검출되는 폴리오바이러스(Poliovirus) 수용체(PVR) 및 넥틴(Nectin)-2에 결합한다(문헌 [Penda *et al.*, *Blood* 105: 2066-2073 (2004)] 참조). 또한, AML의 용해는 주로 천연 세포독성 수용체(NCR) 의존성인 것으로 기술되었다(문헌 [Fauriat *et al.*, *Blood* 109: 323-330 (2007)] 참조). 말초혈로부터 수득된, 활성화 및 증폭된 NK 세포, 및 일부 경우에서 LAK 세포는, 백혈병; 유방암; 및 특정 유형의 림프종과 같은 골수 관련 질환에 대한 일부 성공하에, 진행성 암을 갖는 환자의 생체외 요법 및 생체내 치료 둘 다에 사용되어 왔다. NK 세포 치료, 또는 일부 경우에서, LAK 세포 치료는, 환자가 먼저 IL-2를 투여받은 후, 백혈구성분채집(leukopheresis) 및 입양 전달(adoptive transfer)을 필요로 한다. 일부 경우에서, 입양 전달은, 수일 동안 IL-2의 존재하에서, 수집된 자가유래 혈액 세포의 생체외 배양이 선행된다. NK 세포, 또는 일부 경우에서 LAK 세포는 치료를 완료하기 위해 비교적 고용량의 IL-2와 함께 재주입되어야 한다. 상기 퍼징(purging) 치료는 고가이며 심각한 부작용을 야기할 수 있다. 상기 부작용으로는 체액 잔류, 폐부종, 혈압 강하 및 고열이 포함된다.

[0006] 종양 세포 및 바이러스-감염 세포를 사멸시키는데 있어 NK 세포의 유리한 특성들에도 불구하고, 이들은, 주로 배양 및 증폭시 그 종양-표적화 및 종양세포치사 능력을 유지하는데 있어서의 어려움으로 인해, 면역치료와 함께 작업하고 면역치료에 적용하기에 어려움이 있다. 따라서, 당해 분야에서는 종양세포치사 기능을 유지하는 자연 살해 세포를 생성하고 증폭시키는 효과적인 방법을 개발하는 것이 요구된다.

발명의 내용

[0008] 본원에는 세포, 예를 들면, 조혈 세포, 예를 들어, $CD34^+$ 조혈 줄기 세포와 같은 조혈 줄기 세포를 증폭 및 분화시켜 자연 살해(NK) 세포 및 NK 전구 세포를 생성하는 방법이 제공된다.

[0009] 한 양태에서, 본원에는 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들면, $CD34^+$ 줄기 세포 또는 전구 세포를 제 1 배지에서 배양하여 증폭되고 분화된 세포를 생성하고(예를 들면, 세포의 전구 상태의 소실 및/또는 CD34 발현의 소실로 나타나는 바와 같은 분화), 이어서 상기 증폭된 세포를, 상기 세포가 더 증폭되고 자연 살해 세포로 분화되는 제 2 배지에서 배양하는 것을 포함하는, NK 세포의 제조 방법이 제공된다. 제 1 및 제 2 단계는 세포를 세포 인자들의 독특한 조합을 갖는 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 일반적으로, 제 1 단계에서 사용되는 배지는 제 2 단계에서 사용되는 배지와 상이하다. 특정 태양에서, 상기 세포 인자(예를 들면, 사이토카인)는 배지의 규정되지 않은 성분(예를 들면, 혈청) 내에 포함되지 않는다. 예를 들면, 세포 인자들(예, 사이토카인, 예를 들어, 특정 농도의 사이토카인)은 배지의 규정되지 않은 성분(예, 혈청)에 대해 외인성이다. 특정 태양에서, 상기 방법은 2-단계 방법이다. 특정 태양에서, 제 2 단계의 배지는 제 1 단계로부터의 배지를 교환하지 않고 제 1 단계로부터의 세포 배양물에 첨가된다. 특정 태양에서, 상기 방법은 세포가 접촉되는(또는 배양되는) 임의의 제 3 또는 중간 단계를 포함하지 않는다. 상기 2 단계를 이용하는 본원에 제공된 방법(예를 들면, 2-단

계 방법)에 의해 생성된 자연 살해 세포는 본원에서 TSNK 세포로 지칭된다.

[0010] 특정 태양에서, 본원에는 다음을 포함하는, 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 방법이 제공된다: (a) 외인성 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 외인성 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은, 존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 IL-15, SCF 또는 IL-7의 모든 양에 추가적이다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 제 1 단계로부터 수득된 세포를 외인성 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지(여기서, 상기 외인성 IL-2는, 존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 IL-2의 모든 양에 추가적이다)에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0011] 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 인터루킨-15(IL-15), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL, 및 하나 이상의 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS), 예를 들면, 1% 내지 20% v/v, 예를 들면, 5% 내지 20% v/v, 줄기 세포 인자(SCF), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL, FMS-유사 티로신 키나제-3 리간드(Flt-3 리간드), 예를 들면, 1 내지 20 ng/mL; 인터루킨-7(IL-7), 예를 들면 1 내지 50 ng/mL; 트롬보포이에틴(TPO), 예를 들면, 1 내지 100 ng/mL, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL; 인터루킨-2(IL-2), 예를 들면, 2000 IU/mL 이하, 예를 들면, 50 내지 500 IU/mL; 및/또는 헤파린, 예를 들면, 0.1 내지 10 IU/mL를 포함하는 배지를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 IL-15 및 줄기 세포 인자(SCF) 또는 인터루킨-7(IL-7)을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 IL-15, SCF 및 IL-7을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 성장 배지, 혈청(예를 들면, 인간 혈청(예, 인간 혈청 AB), FBS 또는 FCS), SCF, IL-7 및 IL-15를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 Flt-3 리간드(Flt3-L), TPO, IL-2 및/또는 헤파린을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 성장 배지, 10% 인간 혈청 또는 소 태아 혈청, 20 ng/mL SCF, 10 ng/ml Flt3-L, 20 ng/mL IL-7, 20 ng/mL TPO, 200 IU/mL IL-2, 10 ng/mL IL-15, 및 1.5 IU/mL 헤파린을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 IL-2를 포함하지 않는다.

[0012] 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저(OPTMIZER), 스템스팬(Stemspan, 등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(CELLGRO COMPLETE, 등록상표), DMEM:함(Ham) F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(Advanced DMEM)(깁코(Gibco)), EL08-1D2, 마이엘로컬트(Myelocult, 등록상표) H5100, IMDM, 및/또는 RPMI-1640을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 O-아세틸-카르니틴(아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴, OAC 또는 ALCAR로도 지칭됨), 예를 들면, 약 0.5 내지 10 mM을 포함한다. 한 태양에서, 상기 배지는 스템스팬 H3000 및/또는 DMEM:F12를 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 배지는 OAC, 예를 들면, 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM, 및 스템스팬 H3000, 및/또는 DMEM:F12를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 GBGM(등록상표)을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 DMEM:F12 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 스템스팬 H3000 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다.

[0013] 특정 태양에서, 상기 제 1 배지에서의 상기 배양은 배양보조 세포(feeder cell), 예를 들면, K562 세포, 예를 들면, 미토마이신 C-처리된 K562 세포, 말초혈 단핵 세포(PBMC), 예를 들면, 미토마이신 C-처리된 PBMC 또는 조직 배양물-부착성 줄기 세포, 예를 들면, 미토마이신 C-처리된 배양물-부착성 줄기 세포를 사용하여 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 제 1 배지에서의 상기 배양은 배양보조 세포를 사용한 배양을 포함하지 않는다.

[0014] 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 IL-2, 예를 들면, 10 내지 1000 IU/mL, 및 다음중 하나 이상을 포함한다: 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS), 예를 들면, 5% 내지 15% FCS v/v; 트랜스페린, 예를 들면, 10 내지 50 ㎍/mL; 인슐린, 예를 들면, 5 내지 20 ㎍/mL; 에탄올아민, 예를 들면, 5×10^{-4} 내지 5×10^{-5} M; 올레산, 예를 들면, 0.1 내지 5 ㎍/mL; 리놀레산, 예를 들면, 0.1 내지 5 ㎍/mL; 팔미트산, 예를 들면, 0.05 내지 2 ㎍/mL; 소 혈청 알부민(BSA), 예를 들면, 1 내지 5 ㎍/mL; 및/또는 피토헤마글루티닌, 예를 들면, 0.01 내지 1 ㎍/mL. 보다 특정한 태양에서, 상기 제 2 배지는 인간 혈청, FBS 또는 FCS, 예를 들면, 10% v/v, IL-2, 트랜스페린, 인슐린, 에탄올아민, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 소 혈청 알부민(BSA) 및/또는 피토헤마글루티닌을 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 제 2 배지는 이스코브 변형 둘베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM), 10% 인간 혈청, FBS 또는 FCS, 400 IU/ml IL-2, 35 ㎍/mL 트랜스페린, 5 ㎍/mL 인슐린, 2×10^{-5} M 에탄올아민, 1 ㎍/mL 올레산, 1 ㎍/mL 리놀레산, 0.2 ㎍/mL 팔미트산, 2.5 ㎍/mL BSA 및 0.1 ㎍/mL 피토헤마글루티닌을 포함한다.

[0015] 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), EL08-1D2, 어드밴스드 DMEM(깁코), 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 O-아세틸-카르니틴, 또는 미토콘드리아에서 아세틸-CoA 순환에 영향을 미치는 화합물, 티아조비빈, Y-27632, 파이인테그린, Rho 키나제(ROCK) 억제제, 카스파제 억제제 또는 다른 항-세포자살 화합물/펩티드, NOVA-RS(셰필드 바이오-사이언스(Sheffield Bio-Science)) 또는 다른 소분자 성장 증진제 중 하나 이상을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-) 리포산, 니코틴아미드 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 약 0.5 내지 10 mM OAC를 포함한다. 한 태양에서, 상기 배지는 스템스팬(등록상표) H3000 및/또는 DMEM:F12를 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 배지는 OAC, 예를 들면, 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM, 및 스템스팬(등록상표) H3000 및/또는 DMEM:F12를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 GBGM(등록상표)을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 DMEM:F12 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 스템스팬(등록상표) H3000 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다.

[0016] 특정 태양에서, 상기 제 2 배지에서의 상기 배양은, 예를 들면, 세포가 상기 제 2 배지에서 배양되기 시작할 때에, 또는 그 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 후에, 배양보조 세포, 예를 들면, K562 세포(예를 들면, 미토마이신 C-처리된 K562 세포) 또는 PBMC(예를 들면, 미토마이신 C-처리된 PBMC)를 사용하여 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 제 2 배지에서의 상기 배양은 배양보조 세포를 사용한 배양을 포함하지 않는다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 제 1 배양 배지를 제거하지 않고 제 1 배양 단계로부터 수득된 세포에 첨가된다.

[0017] 특정 태양에서, 본원에는 다음을 포함하는, 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 방법이 제공된다: (a) 본원에 기술된 바와 같은 제 1 배지, 예를 들면, 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은, 존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 IL-15, SCF 또는 IL-7의 모든 양에 추가적이다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고 상기 증폭시에 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지(여기서, 상기 IL-2는, 존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 IL-2의 모든 양에 추가적이다)에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0018] 또 다른 특정 태양에서, 본원에는 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법이 제공되며, 이때 상기 방법의 제 1 단계는 SCF, IL-7 및 IL-15 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키는 것을 포함하고(여기서, 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는, 존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분(예를 들면, 혈청)에 존재하는 IL-15, SCF 또는 IL-7의 모든 양에 추가적이고, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 상기 방법의 제 2 단계는 IL-2를 포함하는 제 2 배지(여기서, 상기 IL-2는, 존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 IL-2의 모든 양에 추가적이다)에서 제 1 단계로부터 수득된 세포를 증폭시켜 활성화 NK 세포를 생성하는 것을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드(Flt3-L), 트롬보포이에틴(Tpo), 인터루킨-2(IL-2) 및/또는 헤파린 중 하나 이상(존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 모든 양에 추가적임)을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 약 5% 내지 20% 소 태아 혈청 또는 인간 혈청을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, SCF는 제 1 배지중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, Flt3-L은 제 1 배지중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, IL-2는 제 1 배지중에 약 50 내지 약 1500 IU/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, IL-7은 제 1 배지중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, IL-15는 제 1 배지중에 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, Tpo는 제 1 배지 중에 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, 헤파린은 제 1 배지중에 약 0.1 내지 약 30 U/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, 제 2 단계에서의 IL-2는 제 2 배지중에 50 내지 약 1500 IU/mL의 농도로 존재한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 추가로 송아지 태아 혈청(FCS), 트랜스페린, 인슐린, 에탄올아민, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 소 혈청 알부민(BSA) 및 피토헤마글루티닌 중 하나 이상(존재하는 경우, 상기 배지의 규정되지 않은 성분에 존재하는 모든 양에 추가적이

다)을 포함한다.

[0019] 어떤 특정 태양에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는, 상기 제 2 배지에서의 상기 배양전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양된다. 어떤 다른 특정 태양에서, 상기 세포는 상기 제 2 배지에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 동안 배양된다. 보다 특정한 태양에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 1 배지에서 21 일 동안 배양된 후, 상기 제 2 배지에서 21 일 동안 배양된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 1 배지에서 21 일 동안 배양된 후, 상기 제 2 배지에서 14 일 동안 배양된다.

[0020] 또한 본원에는, TSNK 세포로 지칭되는, 전술한 방법에 의해 생성된 자연 살해 세포의 집단이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 $CD3^-56^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 $CD3^-D56^+CD16^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 또한 $CD94^+CD117^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 또한 $CD161^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 또한 $NKG2D^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 또한 $NKp46^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 또한 $CD226^+$이다.

[0021] 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포의 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 이상은 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 일부 태양에서, 상기 TSNK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%는 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 이상은 $CD56^+$, $CD16^-$ 및 $CD3^-$이다. 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 적어도 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60%는 $NKG2D^+$이다. 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만은 $NKB1^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만은 $NKAT2^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만은 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%는 $NKp46^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%는 $CD117^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45%는 $CD94^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%는 $CD161^-$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20%는 $CD226^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%는 $CD7^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%는 $CD5^+$이다.

[0022] 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD117^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 NKG2D+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKG2D^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 NKp44+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKp44^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD52+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD52^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD52+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD244^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD244+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양

에서, TSNK 세포 집단은 LFA-1+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 LFA-1+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD94+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본원에는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 생성하는, 본원에 기술된(및 본원에서 "3-단계 방법"으로 지칭되는) 3 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 상기 3 단계를 이용하는, 본원에 제공된 방법(예를 들면, 3-단계 방법)에 의해 생성된 자연 살해 세포는 본원에서 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 또는 NK 세포로 지칭된다. 특정 태양에서, 상기 방법은 세포가 접촉되는(또는 배양되는) 임의의 제 4 또는 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0024] 특정 양태에서, 3-단계 방법은 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들면, $CD34^+$ 줄기 세포 또는 전구 세포를, 제 1 배지에서, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 특정한 시간 동안 배양하는 것을 포함하는 제 1 단계("단계 1")를 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 조혈 전구 세포의 증폭을 촉진하는 하나 이상의 인자, 증폭되는 조혈 전구세포 집단 내에서 림프구 분화의 개시를 위한 하나 이상의 인자, 및/또는 기질 배양보조 세포 지지를 모방하는 하나 이상의 인자를 함유한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, Flt3L, TPO, SCF)을 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 IL-7을 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및/또는 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 사이토카인 Flt3L, TPO 및 SCF, IL-7, 및 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지중에서, CD34+ 세포는 계통 특이적 전구세포로 증폭되고, 상기 전구세포는 이어서 CD34-가 된다. 특정 태양에서, 제 1 배지중에서, CD34+ 세포의 증폭은 세포의 분화(예를 들면, 다분화능의 소실, 전구 세포 상태의 소실, CD34 발현의 소실 및/또는 CD34- 계통 특이적 전구세포의 증가에 의해 나타나는 바와 같은 분화)와 결부된다. 특정 태양에서, 제 1 배지중에서, CD34- 계통 특이적 전구세포가 우세하게 된다. 특정 태양에서, CD34- 세포는 단계 1의 종료시 전체 집단의 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 또는 그 이상을 차지한다. 보다 특정한 태양에서, CD34- 세포는 단계 1의 종료시 전체 집단의 80% 초과를 차지한다.

[0025] 이어서, "단계 2"에서, 상기 세포는, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 특정 시간 동안 제 2 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 림프성 전구세포의 증폭을 더 촉진할 수 있는 인자, NK 계통에 따른 발달에 기여할 수 있는 인자, 및/또는 기질 배양보조 세포 지지를 모방하는 인자를 함유한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, Flt3L, SCF, IL-15 및/또는 IL-7)을 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 IL-17 및/또는 IL-15를 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및/또는 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 사이토카인 Flt3L, SCF, IL-15, 및 IL-7, IL-17 및 IL-15, 및 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함한다.

[0026] 이어서, "단계 3"에서, 상기 세포는, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같은 특정 시간 동안 제 3 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 CD56+CD3-CD16- 세포의 분화 및 기능적 활성화를 촉진하는 인자를 포함한다. 한 태양에서, 상기 인자는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18을 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 기질 배양보조 세포 지지를 모방하는 인자를 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, SCF, IL-15, IL-7, IL-2)을 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및/또는 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 사이토카인 SCF, IL-15, IL-7, IL-2 및 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함한다.

[0027] 특정 태양에서, 3-단계 방법은 NK 전구 세포를 생성하기 위해 사용된다. 또 다른 특정 태양에서, 3-단계 방법은 NK 세포를 생성하기 위해 사용된다. 특정 태양에서, 3-단계 방법은 활성화된 NK 세포를 생성하기 위해 사용된다. 특정 태양에서, 3-단계 방법은 기질 배양보조 세포 지지의 부재하에 수행된다.

[0028] 특정 태양에서, 단계 2 배지 및/또는 단계 3 배지는 하나 이상의 이전 단계들로부터의 배지를 제거하지 않고 배양물에 첨가된다. 특정 태양에서, 단계 2 배지는 단계 1 배양물로부터의 배지를 제거하지 않고 단계 1 배양물에 첨가된 후, 단계 2 배양물로부터 배지를 첨가하지 않고 단계 3 배지를 단계 2 배양물에 첨가한다.

[0029] 특정 양태에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 사용되는 제 1 배지는 3-단계 방법과 관련하여 전술한 제 1 배지 및 제 2 배지의 임의의 성분들을 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 3-단계 방법에 사용되는 상기 제 1 배지는 다음 중 하나 이상을 포함하는 배지를 포함한다: 동물 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB),

소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS), 예를 들면, 1% 내지 20 % v/v 혈청, 예를 들면, 5% 내지 20% v/v 혈청; 줄기 세포 인자(SCF), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL SCF; FMS-유사 티로신 키나제-3 리간드(Flt-3 리간드), 예를 들면, 1 내지 30 ng/mL Flt-3 리간드; 인터루킨-7(IL-7), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-7; 트롬보포이에틴(TPO), 예를 들면, 1 내지 100 ng/mL, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL TPO; 인터루킨-2(IL-2), 예를 들면, 2000 IU/mL 이하, 예를 들면, 50 내지 500 IU/mL; 및/또는 헤파린, 예를 들면, 저-분자량 헤파린(LWH), 예를 들면, 0.1 내지 10 IU/mL 헤파린. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 항생물질, 예를 들면, 젠타마이신; 산화방지제, 예를 들면, 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스콜브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 OAC를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 인터루킨-6(IL-6), 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF 및/또는 MIP-1α를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원된 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-) 리포산, 니코틴아미드, 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지용 베이스를 제공하는 배지는 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640이거나; 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분들, 예를 들면, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함되는 성분들을 포함하는 배지이다.

[0030] 본원에 기술된 3-단계 방법에 사용되는 제 2 배지는 2-단계 방법과 관련하여 전술한 제 1 배지 및 제 2 배지의 임의의 성분들을 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 3-단계 방법에 사용되는 상기 제 2 배지는 다음 중 하나 이상을 포함하는 배지를 포함한다: 동물 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), FBS 또는 FCS, 예를 들면, 5% 내지 20 % v/v 혈청; SCF, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL SCF; Flt-3 리간드, 예를 들면, 1 내지 30 ng/mL Flt-3 리간드; IL-7, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-7; 인터루킨-15(IL-15), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-15; 및/또는 헤파린, 예를 들면, LWH, 예를 들면, 0.1 내지 10 IU/mL 헤파린. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 항생물질, 예를 들면, 젠타마이신; 산화방지제, 예를 들면, 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스콜브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한 OAC를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한 인터루킨-6(IL-6), 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF 및/또는 MIP-1α를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원된 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-)리포산, 니코틴아미드, 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지용 베이스를 제공하는 배지는 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640이거나; 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분들, 예를 들면, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함되는 성분들을 포함하는 배지이다.

[0031] 본원에 기술된 3-단계 방법에 사용되는 제 3 배지는 2-단계 방법과 관련하여 전술한 제 1 배지 및 제 2 배지의 임의의 성분들을 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 3-단계 방법에 사용되는 상기 제 3 배지는 다음 중 하나 이상을 포함하는 배지를 포함한다: 동물 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), FBS 또는 FCS, 예를 들면, 5% 내지 20 % v/v 혈청; SCF, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL SCF; Flt-3 리간드, 예를 들면, 1 내지 30 ng/mL Flt-3 리간드; IL-7, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-7; IL-15, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-15; 및, 예를 들면, 0 내지 2000 IU/mL 범위의 인터루킨-2(IL-2), 예를 들면, 50 내지 1000 UL/mL IL-2. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 항생물질, 예를 들면, 젠타마이신; 산화방지제, 예를 들면, 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스콜브산; 에탄

올아민; 및 글루타티온. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한 OAC를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한 인터루킨-6(IL-6), 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF 및/또는 MIP-1α를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원된 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-)리포산, 니코틴아미드, 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지용 베이스를 제공하는 배지는 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), EL08-1D2, 어드밴스드 DMEM(깁코), 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640이거나; 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분들, 예를 들면, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함되는 성분들을 포함하는 배지이다.

[0032] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지에서 배양된 세포는 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또 는 20 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 일 동안, 또는 30 일 이상 동안 상기 제 3 배지에서 배양된다.

[0033] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에, 2 내지 12 일, 3 내지 11 일, 예를 들면, 3 내지 5, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 7 내지 9, 8 내지 10, 또는 9 내지 11 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양된다. 특정한 태양에서, 상기 제 1 배지에서 배양된 세포는 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에, 1 내지 10 일, 예를 들면, 1 내지 3, 2 내지 4, 3 내지 5, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양된다. 특정한 태양에서, 상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포는 2 내지 27 일, 예를 들면, 3 내지 25 일 동안, 예를 들면, 3 내지 5, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 7 내지 9, 8 내지 10, 9 내지 11, 10 내지 12, 11 내지 13, 12 내지 14, 13 내지 15, 14 내지 16, 15 내지 17, 16 내지 18, 17 내지 19, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 21 내지 23, 22 내지 24, 또는 23 내지 25 일 동안 상기 제 3 배지에서 배양된다.

[0034] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 7 내지 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 내지 7 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 5 내지 9 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 17 내지 25 일 동안 배양된다.

[0035] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 7 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 21 일 동안 배양된다.

[0036] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 7 내지 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 내지 7 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 21 내지 31 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 33 내지 47 일 동안 배양된다.

[0037] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 21 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 35 일 동안 배양된다.

[0038] 한 태양에서, 본원에는 단리된 NK 전구 세포 집단이 제공되며, 이때 상기 NK 전구 세포는 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0039] 또 다른 태양에서, 본원에는 단리된 NK 세포 집단이 제공되며, 이때 상기 NK 세포는 본원에 기술된 3-단계 방법

에 따라 생성된다.

[0040] 또 다른 태양에서, 본원에는 단리된 NK 세포 집단이 제공되며, 이때 상기 NK 세포는 활성화되고, 상기 활성화된 NK 세포는 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0041] 어떤 특정한 작업 이론에 결부시키고자 하는 것이 아니라, 본 발명자들에 의해, 3-단계 방법의 특정 시점에서, 3-단계 방법의 다른 시점에서 단리된 세포 집단의 특징과 다른 특징, 예를 들면, 구조적 및 기능적 특징을 갖는 세포 집단이 단리될 수 있음이 밝혀졌다. 예를 들면, 더 짧은 제 3 배양 단계를 갖는, 본원에 기술된 바와 같은 3-단계 방법을 사용하여 생성된 세포 집단은, 더 긴 3단계를 갖는 본원에 기술된 바와 같은 3-단계 방법을 이용하여 생성된 세포 집단과 다른 특징을 갖는다. 예를 들면, 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 갖는 3-단계 방법으로부터 단리된, 그 밖에 모든 것이 동일한 세포 집단은, 긴 제 3 배양 단계, 예를 들면, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22 또는 21 내지 23 일의 제 3 배양 단계를 갖는 3-단계 방법으로부터 단리된 세포 집단과 다르다. 짧은 제 3 배양 단계를 갖는 3-단계 방법으로부터 단리된 상기 다른 세포 집단은 NK 전구 세포 집단을 구성(즉, NK 세포보다 더 높은 비율의 NK 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 구성)하는 반면, 긴 제 3 배양 단계를 갖는 3-단계 배양 방법으로부터 단리된 세포 집단은 NK 세포 집단을 구성(즉, NK 전구 세포보다 더 높은 비율의 NK 세포를 포함하는 세포 집단을 구성)한다.

[0042] 따라서, 본원에는 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은, NK 세포 집단, 예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단과 관련된 $CD3^-CD56^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 세포 집단과 관련된 $CD3^-CD56^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하는 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD56+ 세포보다 큰 비율의 CD56- 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 생체내 또는 생체외에서 증가된 비율의 CD56+ 세포를 갖는 집단으로 분화된다.

[0043] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한$CD117^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 $CD117^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이 $CD117^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%가 $CD117^+$이다.

[0044] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD161^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%는 $CD161^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상이 $CD161^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 또는 70% 내지 75%가 $CD161^+$이다.

[0045] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $NKp46^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상은 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55%는 $NKp46^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55% 이하가 $NKp46^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 또는 85% 내지 90%가 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 또는 50% 내지 55%가 $NKp46^+$이다.

[0046] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 $CD56^+CD16^-$인 세포를 함유한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^-$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD16^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 또는 20% 내지 25%의 $CD16^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD16^+$ 세포를 포함한다.

[0047] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD16^-$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD117^+$ 및 $CD161^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD16^-$, $CD117^+$ 및 $CD161^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD16^-$, $CD117^+$, $CD161^+$, 및 $NKp46^+$이다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 약 40% 이하의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다.

[0048] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD117^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 NKG2D+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKG2D^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NKp44+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKp44^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD52+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD52^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 CD52+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD244^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 CD244+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 LFA-1+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 LFA-1+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD94+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90%

이하의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0049] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD34^-CD117^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포는, 더 긴 제 3 배양 단계, 예를 들면, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 또는 21 내지 23 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포보다 높은 효율로 골수를 이식(engraft)시킨다(예를 들면, 생체내에서).

[0050] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD161^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0051] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $NKp46^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0052] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD56^+CD16-$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는

45% 내지 50%의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0053] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD52+CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 조혈 전구 세포 집단과 관련된 $CD52^+CD117+$ 세포의 비율에 비해 높은 비율의 $CD52^+CD117+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD52^+CD117+$ 세포의 비율에 비해 높은 비율의 $CD52^+CD117+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 그 이상의 $CD52^+CD117+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이상의 $CD52^+CD117+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 이상의 $CD52^+CD117+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 $CD52^+CD117+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, $CD52^+CD117+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 총 12 일 이상, 13 일 이상, 14 일 이상, 15 일 이상, 16 일 이상, 17 일 이상, 18 일 이상, 19 일 이상, 20 일 이상, 또는 21 일 이상의 배양을 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, $CD52^+CD117+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 총 12 일, 13 일, 14 일 이상이지만, 21 내지 25 일, 25 내지 30 일, 또는 30 내지 35일 이하의 배양을 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, $CD52^+CD117+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 총 21 일의 배양을 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0054] 또한, 본원에는 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 세포 집단이 제공되며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 큰 비율의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%의 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 세포 집단은 긴 제 3 배양 단계, 예를 들면, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 또는 21 내지 23 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0055] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD117^+$인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 낮은 비율의 $CD3^-CD56^+CD117^+$ 세포를 포함한다.

[0056] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD161^+$인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은

기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 낮은 비율의 $CD3^-CD56^+CD161^+$ 세포를 포함한다.

[0057] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $NKp46^+$인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 큰 비율의 $CD3^-CD56^+NKp46^+$ 세포를 포함한다.

[0058] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD117^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 NKG2D+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKG2D^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 NKp44+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKp44^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD52+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD52^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 세포 집단은 CD52+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD244^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 세포 집단은 CD244+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 LFA-1+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 LFA-1+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD94+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0059] 특정 태양에서, 본원에 기술된 NK 전구 세포 집단은, NK 세포 집단, 예를 들면, 본원에 기술된 NK 세포 집단, 예를 들어, NK 전구 세포 집단보다 높은 비율의 CD56+ 세포를 갖는 NK 세포 집단보다 골수를 이식시키는(예를 들면, 생체내에서) 더 큰 능력을 갖는다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 NK 전구 세포 집단은, NK 세포 집단, 예를 들면, 본원에 기술된 NK 세포 집단, 예를 들어, 높은 비율의 CD16+ 세포를 갖는 NK 세포 집단보다 골수를 이식시키는(예를 들면, 생체내에서) 더 큰 능력을 갖는다. 특정 태양에서, 더 짧은 시간 동안 배양된 NK 전구 세포 및/또는 NK 세포는 더 긴 시간 동안 배양된 NK 전구 세포 및/또는 NK 세포보다 더 높은 효율로 골수를 이식시킨다. 예를 들면, 특정 태양에서, 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단은, 긴 제 3 배양 단계, 예를 들면, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 또는 21 내지 23 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단보다 높은 효율로 골수를 이식시킨다(예를 들면, 생체내에서). 본원에 기술된 NK 전구 세포 집단의 이식 세포는 또한 생체내에서, 예를 들면, 골수에서 존속되고 복제될 수 있다. 어떤 특정한 작업 이론에 결부시키고자 하는 것이 아니라, NK 세포 집단의 세포보다 더 높은 정도로 생체내에서 골수를 이식시키고 생체내에서 영속/복제되는, 본원에 기술된 NK 전구 세포 집단의 이식 세포의 능력은 상기 세포가 NK 세포 활성이 유리한 생체내 방법에 사용하기에 이상적임을 시사하는 것으로 생각된다. 예를 들면, 특정 태양에서, 본원에 기술된 NK 전구 세포 집단은 치료, 예를 들면, 혈액암의 치료 방법에 사용될 수 있으며, 이때 상기 방법은 상기 치료를 필요로 하는 환자에게 상기 NK 전구 세포 집단의 투여를 포함한다. 상기 태양에 따라서, 상기 NK 전구 세포 집단으로부터의 상기 세포는 생체내에서 많은 수로 존속될 수 있어서, 결국 목적하는 치료 효과를 제공하는 NK 세포로 성숙된다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 NK 전구 세포 집단의 세포들의 NK 세포로의 분화/성숙을 촉진하는 제 2의 약제와 공-투여될 수 있다. 예를 들면, NK 세포 성숙/분화

를 유도할 수 있는 제 2의 약제가 환자에게 NK 전구 세포 집단의 투여 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여될 수 있다.

[0060] 따라서, 또 다른 양태에서, 본원에는 종양 세포 증식을 억제하거나, 바이러스 감염을 치료하거나, 암, 예를 들면, 혈액암 및 고형 종양을 치료하기 위한, TSNK 세포; 및/또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 단리된 본원에 기술된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단의 용도가 제공된다. 특정 태양에서, TSNK 세포, NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예를 들면, 본원에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드와 접촉하거나, 이들과 함께 사용된다. 특정 태양에서, TSNK 세포, NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단은 면역조절 화합물, 예를 들면, 본원에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드로 처리되거나, 이와 함께 사용된다.

[0061] 특정 태양에서, 상기 암은 고형 종양이다. 또 다른 태양에서, 상기 암은 혈액암이다. 특정 태양에서, 암은 교모세포종, 원발성 관상 암종, 백혈병, 급성 T 세포 백혈병, 만성 골수성 림프종(CML), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 폐암, 결장 선암, 조직구성 림프종, 대장암, 대장 선암, 전립선암, 다발성 골수종 또는 망막모세포종이다.

[0062] 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되고/되거나 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 수득된다. 한 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되고/되거나 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반, 예를 들면, 태반 관류액으로부터 수득된다. 한 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되고/되거나 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 제대혈로부터 수득되지 않는다. 한 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되고/되거나 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 말초혈로부터 수득되지 않는다. 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되고/되거나 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액 및 제대혈, 예를 들면, 관류액과 동일한 태반으로부터 수득된 제대혈로부터의 혼합 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제대혈은 그로부터 상기 제대혈이 수득되는 태반이 아닌 다른 태반으로부터 단리된다. 특정 태양에서, 혼합 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 취합하거나 혼합함으로써 수득될 수 있다. 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은, 혼합 세포를 수득하기 위한 부피 기준으로 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다. 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 혼합된다. 또 다른 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 혼합된다. 보다 특정한 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5(85%:15%)의 비로 혼합된다.

[0063] 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은, 혼합 세포를 수득하기 위한 전체 유핵 세포(TNC) 함량을 기준으로 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다. 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 혼합된다. 또 다른 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 혼합된다.

[0064] 그러므로, 한 태양에서, 본원에는, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체에게 효과량의 단리된 TSNK 세포를 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 또 다른 태양에서, 본원에는 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체에게 본원에 기술된 단리된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단 효과량을 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 상기 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 또 다른 태양에서, 본원에는 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체에게 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단 효과량을 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 상기 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 암은 고형 종양이다. 특정 태양에서, 암은 혈액암이다. 특정 태양에서, 상기 혈액암은 백혈병이다. 또 다른 특정 태양에서, 혈액암은 림프종이

다. 또 다른 특정 태양에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병이다. 또 다른 특정 태양에서, 혈액암은 만성 림프구성 백혈병이다. 또 다른 특정 태양에서, 혈액암은 만성 골수성 백혈병이다.

[0065] 특정 태양에서, 단리된 TSNK 세포, 및/또는 본원에 기술된 단리된 NK 전구 세포 집단, 및/또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 단리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 면역조절 화합물, 예를 들면, 본원에 기술된 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드로 처리되었다. 특정 태양에서, 단리된 TSNK 세포, 및/또는 본원에 기술된 단리된 NK 전구 세포 집단, 및/또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 단리된 NK 세포 집단은 상기 투여 전에 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 방법은 개체에게 (1) 효과량의 단리된 TSNK 세포, 효과량의 단리된 NK 전구 세포 집단, 또는 효과량의, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 세포 집단; 및 (2) 효과량의 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 투여하는 것을 포함한다. 이와 관련하여, "효과량"은, 상기 TSNK 세포, 상기 NK 전구 세포 집단, 또는 상기 NK 세포 집단, 및 선택적으로, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 투여받지 않은, 상기 암 또는 상기 감염을 갖는 개체에 비해, 상기 암 또는 상기 감염의 하나 이상의 증상에 검출가능한 개선을 야기하는 TSNK 세포의 양, 또는 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단의 세포 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드의 양을 의미한다. 특정 태양에서, 상기 면역조절 화합물은 레날리도마이드 또는 포말리도마이드이다. 또 다른 태양에서, 상기 방법은 또한, 개체에게 항암 화합물, 예를 들면, 하기에 기술되는 항암 화합물 중 하나 이상을 투여하는 것을 포함한다.

[0066] 또 다른 태양에서, 본원에는 치료 효과량의 TSNK 세포를 종양 세포와 근접하게 하는 것, 예를 들면, 종양 세포를 TSNK 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 이하에서, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "근접"은 목적하는 결과를 유도하기에 충분한 근접을 말한다; 예를 들면, 특정 태양에서, 용어 근접은 접촉을 말한다. 또 다른 태양에서, 본원에는, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단의 치료 효과량을 종양 세포와 근접하게 하는 것, 예를 들면, 종양 세포를 NK 전구 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다.

[0067] 특정 태양에서, 단리된 TSNK 세포, 및/또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단은, 상기 접촉 또는 근접시키기 전에, 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기에서 본원에 기술된 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드, 및/또는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18로 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 효과량의 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기에서 본원에 기술된 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드는 또한 종양 세포와 근접된다. 예를 들면, 종양 세포는 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉된다. 이와 관련하여, "효과량"은 상기 TSNK 세포, NK 전구 세포 집단의 세포, 또는 NK 세포 집단의 세포, 및 선택적으로, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 종양 세포에 비해, 상기 종양 세포의 검출가능한 억제를 야기하는 TSNK 세포, NK 전구 세포 집단의 세포 또는 NK 세포 집단의 세포 및 선택적으로 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드의 양을 의미한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 방법은 또한, 효과량의 항암 화합물, 예를 들면, 하기에 기술된 항암 화합물을 종양 세포와 근접하게 하는 것, 예를 들면, 종양 세포를 항암 화합물과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0068] 상기 방법의 특정 태양에서, 종양 세포는 혈액암 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 종양 세포는 고형 종양 세포이다. 또 다른 태양에서, 종양 세포는 원발성 관상 암종 세포, 백혈병 세포, 급성 T 세포 백혈병 세포, 만성 골수성 림프종(CML) 세포, 급성 골수성 백혈병 세포(AML), 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 교모세포종 세포, 폐암 세포, 결장 선암 세포, 조직구성 림프종 세포, 다발성 골수종 세포, 망막모세포종 세포, 대장암 세포, 전립선암 세포 또는 대장 선암 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 접촉 또는 근접하게 하는 것은 시험관내에서 일어난다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 접촉 또는 근접하게 하는 것은 생체내에서 일어난다. 보다 특정한 태양에서, 상기 생체내 접촉 또는 근접하게 하는 것은 인간에서 일어난다.

[0069] 또 다른 양태에서, 본원에는, 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하기에 효과적인, 증폭된 NK 세포를 투여하는 것을 포함하는, 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기 위한, 또는 3-단계 방법을 이용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 생성된 것이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 증폭되었다. 또 다른 태양에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란 및/또는 NK 세포는 서로 별도로 투여된다. 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는, 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계

방법에 의해 생성되며, 이때 상기 방법의 제 1 단계는 줄기 세포 인자(SCF), 인터루킨-7(IL-7) 및 인터루킨-15(IL-15) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키는 것을 포함하고(여기서, 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 상기 방법의 제 2 단계는 제 1 단계로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포를 생성하는 것을 포함한다. 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다.

[0070] 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법의 다른 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 상기 증폭시에 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0071] 또 다른 양태에서, 본원에는, 개체에게, 상기 개체에서 AML을 치료하기에 효과적인 증폭된 NK 세포(선택적으로, IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18을 사용한 예비처리에 의해 활성화된)를 투여하는 것을 포함하는, 급성 골수성 백혈병(AML)을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기 위한, 또는 본원에 나타낸 바와 같은 3-단계 방법을 이용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 생성된 것이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 증폭되었다. AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는, 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법에 의해 생성되며, 이때 상기 방법의 제 1 단계는 줄기 세포 인자(SCF), 인터루킨-7(IL-7) 및 인터루킨-15(IL-15) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키는 것을 포함하고(여기서, 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 상기 방법의 제 2 단계는 제 1 단계로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포를 생성하는 것을 포함한다. AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다. 특정 태양에서, 상기 방법들에 의해 치료될 AML은 난치성 AML, 불량-예후 AML 또는 소아 AML을 포함한다.

[0072] AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 다른 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포가 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0073] 또 다른 양태에서, 본원에는, 개체에게 치료 효과적 용량의 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) 상기 개체에서 CLL을 치료하기에 효과적인, 증폭된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단을 투여하는 것을 포함하는, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기 위한, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한 본원에 기술된 임의의 방법에 의해 생성된 것이다. 임의의 상기 방법들의 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 적어도 10 일 동안 증폭되었다. 임의의 상기 방법들의 특정 태양에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 플루다라빈, 및 증폭된 NK 세포는 상기 개체에게 별도로 투여된다. CLL을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는, 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법에 의해 생성되며, 이때 상기 방법의 제 1 단계는 줄기 세포 인자(SCF), 인터루킨-7(IL-7) 및 인터루킨-15(IL-15) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키는 것을 포함하고(여기서,

상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 상기 방법의 제 2 단계는 제 1 단계로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포를 생성하는 것을 포함한다. CLL을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다.

[0074] CLL을 갖는 개체를 치료하는 방법의 다른 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0075] 한 양태에서, 본원에는 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포의 집단을 냉동보존하는 방법이 제공된다. 한 태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성하고; (c) 단계 (b)로부터 수득된 NK 세포를 냉동보존 배지에서 냉동보존시킨다. 특정 태양에서, 상기 단계 (c)는 또한, (1) 세포 현탁 용액을 제조하고; (2) 단계 (1)에서 수득된 세포 현탁 용액에 냉동보존 배지를 첨가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하고; (3) 단계 (3)에서 수득된 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하고; (4) 냉동보존된 샘플을 -80 ℃ 이하에서 저장하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이에, 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0076] 또 다른 태양에서, NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포의 집단을 냉동보존하는 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 줄기 세포 인자(SCF), IL-2, 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-15(IL-15) 및 헤파린 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키고(여기서, 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성하고; (c) 단계 (b)로부터 수득된 NK 세포를 냉동보존 배지에서 냉동보존시킨다. 특정 태양에서, 상기 단계 (c)는 또한, (1) 세포 현탁 용액을 제조하고; (2) 단계 (1)에서 수득된 세포 현탁 용액에 냉동보존 배지를 첨가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하고; (3) 단계 (3)에서 수득된 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하고; (4) 냉동보존된 샘플을 -80 ℃ 이하에서 저장하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이에, 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계, 및/또는 단계 (a) 전에 추가의 배양 단계를 포함하지 않는다.

[0077] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단은 냉동보존된다. 예를 들면, 본원에 기술된 방법을 이용하여 냉동보존된다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단은 냉동보존 배지, 예를 들면, 본원에 기술된 냉동보존 배지에서 냉동보존된다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단의 냉동보존은 (1) 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단을 포함하는 세포 현탁 용액을 제조하고; (2) 단계 (1)에서 수득된 세포 현탁 용액에 냉동보존 배지를 첨가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하고; (3) 단계 (3)에서 수득된 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하고; (4) 냉동보존된 샘플을 -80 ℃ 이하에서 저장하는 것을 포함한다.

[0078] 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 또는 전구 세포는 마이크로RNA hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, hsa-miR-520a, hsa-miR-337, hsa-miR-422a, hsa-miR-549, 및 hsa-miR-618 중 하나 이상을, 예를 들면, 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)로 측정할 때, 말초혈 자연 살해 세포보다 검출가능하게 높은 수준으로 발현한다. 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 또는 전구 세포는 마이크로RNA hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, hsa-miR-520a, hsa-miR-337, hsa-miR-422a, hsa-miR-549, 및 hsa-miR-618 중 하나 이상을, 예를 들면, 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)로 측정할 때, 말초혈 자연 살해 세포보다 검출가능하게 높은 수준

으로 발현한다.

[0079] 또 다른 특정 태양에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드는, 상기 자연 살해 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 TSNK 세포와 근접된다. 또 다른 특정 태양에서, 면역조절 화합물, 예를 들면, 레날리도마이드 또는 포말리도마이드, 또는 탈리도마이드는, 상기 세포가 상기 면역조절 화합물, 예를 들면, 레날리도마이드 또는 포말리도마이드와, 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포보다 상기 종양 세포에 대해 검출가능하게 더 많은 세포독성을 나타내기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 TSNK 세포와 근접된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, 또는 TNFRSF18 중 하나 이상을 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포보다 높은 수준으로 발현시킨다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, 및/또는 TBX21 중 하나 이상을, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포보다 높은 수준으로 발현시킨다.

[0080] 또 다른 특정 태양에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드는, 상기 자연 살해 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, NK 전구 세포 또는 NK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 또는 NK 세포와 근접된다. 또 다른 특정 태양에서, 면역조절 화합물, 예를 들면, 레날리도마이드 또는 포말리도마이드, 또는 탈리도마이드는, 상기 세포가 상기 면역조절 화합물, 예를 들면, 레날리도마이드 또는 포말리도마이드와, 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, NK 전구 세포 또는 NK 세포보다 상기 종양 세포에 대해 검출가능하게 더 많은 세포독성을 나타내기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포와 근접된다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는 BAX, CCL5, CCR5, CSF2, FAS, GUSB, IL2RA, 또는 TNFRSF18 중 하나 이상을, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, NK 전구 세포 또는 NK 세포보다 높은 수준으로 발현시킨다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는 ACTB, BAX, CCL2, CCL3, CCL5, CCR5, CSF1, CSF2, ECE1, FAS, GNLY, GUSB, GZMB, IL1A, IL2RA, IL8, IL10, LTA, PRF1, PTGS2, SKI, 및/또는 TBX21 중 하나 이상을, 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, NK 전구 세포 또는 NK 세포보다 높은 수준으로 발현시킨다.

[0081] 상기 치료 또는 종양 억제 방법의 특정 태양에서, TSNK 세포는 다른 자연 살해 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 단리되거나 다른 방법에 의해 조혈 세포로부터 생성된 자연 살해 세포와 혼합된다. 특정 태양에서, TSNK 세포는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단과 혼합된다. 또 다른 특정 태양에서, TSNK 세포는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단과 혼합된다. 특정 태양에서, TSNK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포(예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 및/또는 NK 세포 집단)와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0082] 상기 치료 또는 종양 억제 방법의 다른 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단은 다른 자연 살해 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 단리되거나 다른 방법에 의해 조혈 세포로부터 생성된 자연 살해 세포와 혼합된다. 특정 태양에서, NK 전구 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비료 혼합된다.

[0083] 상기 치료 또는 종양 억제 방법의 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단은 다른 자연 살해 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 단리되거나 다른 방법에 의해 조

혈 세포로부터 생성된 자연 살해 세포와 혼합된다. 특정 태양에서, NK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0084] 또 다른 양태에서, 본원에는 단리된 TSNK 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 조성물중 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 조성물중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%. 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 태양에서, 상기 조성물중 TSNK 세포의 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 이상이 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 다른 태양에서, 상기 조성물중 TSNK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%가 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 적어도 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60%가 $NKG2D^+$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%가 $NKp46^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%가 $CD117^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45%가 $CD94^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20%가 $CD226^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%가 $CD7^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%가 $CD5^+$이다.

[0085] 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ TSNK 세포는 단일 개체로부터 수득된다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 자연 살해 세포(TSNK 세포)는 둘 이상의 상이한 개체로부터 수득된 자연 살해 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 TSNK 세포를 사용하여 치료하고자 하는 개체와 다른 개체로부터 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는, 상기 TSNK 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 하기에 기술된 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0086] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0087] 보다 특정한 태양에서, 조성물은 TSNK 세포, 및 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 태양에서, TSNK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0088] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 TSNK 세포, 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 TSNK 세포와 동일한 개체로부터 수득된다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 TSNK 세포와 다른 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한

다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 태반 관류액 중의 세포의 전부 또는 실질적으로 전부(예를 들면, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정 태양에서, 상기 태반 관류액중의 태아 세포는 상기 관류액중의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하도록 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기 단락 2.1.1에 기술된 면역조절 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0089] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 TSNK 세포 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 TSNK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 TSNK 세포와 다른 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 이때 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 둘 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 둘 이상의 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0090] 또 다른 양태에서, 본원에는, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 전구 세포 또는 NK 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는 조성물중 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는 조성물중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%. 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 태양에서, 상기 조성물중 NK 전구 세포 또는 NK 세포의 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 이상이 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 다른 태양에서, 상기 조성물중 NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%가 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 적어도 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60%가 $NKG2D^+$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%가 $NKp46^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%가 $CD117^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45%가 $CD94^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20%가 $CD226^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%가 $CD7^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ NK 전구 세포 또는 NK 세포의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%가 $CD5^+$이다.

[0091] 특정 태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ NK 전구 세포 또는 NK 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 자연 살해 세포(NK 전구 세포 또는 NK 세포)는 둘 이상의 상이한 개체로부터 수득된 자연 살해 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는 NK 전구 세포 또는 NK 세포를 사용하여 치료하고자 하는 개체와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포는, 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 즉, NK 전구 세포 또는 NK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 면역조절

화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 하기에 기술된 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0092] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0093] 보다 특정한 태양에서, 조성물은 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 또는 NK 세포, 및 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 태양에서, NK 전구 세포 또는 NK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0094] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 또는 NK 세포, 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포와 상이한 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 태반 관류액 중의 세포의 전부 또는 실질적으로 전부(예를 들면, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액중의 태아 세포는 상기 관류액중의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하도록 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기 단락 2.1.1에 기술된 면역조절 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0095] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 또는 NK 세포, 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 전구 세포 또는 NK 세포와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 이때 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 둘 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 둘 이상의 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0096] 또 다른 양태에서, 본원에는, 예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단을 포함하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 조성물중 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 조성물중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%. 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단중 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하가 $CD3^-CD56^+$ 세포이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이 $CD117^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상이 $CD161^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하가 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의

25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55% 이하가 $NKp46^{+}$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포는 $CD16^{-}$이다.

[0097] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 전구 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포는 둘 이상의 상이한 개체로부터 수득된 NK 전구 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 전구 세포는 NK 전구 세포를 사용하여 치료하고자 하는 개체와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포는, 상기 NK 전구 세포가 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 즉, NK 전구 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 하기에 기술된 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0098] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0099] 보다 특정한 태양에서, 조성물은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 전구 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 조성물 중 NK 전구 세포 집단은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 전구 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0100] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 NK 전구 세포 집단 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 전구 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 전구 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 태반 관류액 중의 세포의 전부 또는 실질적으로 전부(예를 들면, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액중의 태아 세포는 상기 관류액중의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하도록 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기에 기술된 면역조절 화합물, 예를 들어, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0101] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 NK 전구 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 전구 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 전구 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 이때 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 둘 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 둘 이상의 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0103] <u>정의</u>

[0104] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "면역조절 화합물" 및 "IMiD(등록상표)"는 탈리도마이드를 포함하지 않는다.

[0105] 본원에서 사용된 바와 같이, "레날리도마이드"는 3-(4'-아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-다이온(화학 초록 서비스(Chemical Abstracts Service) 명칭) 또는 2,6-피페리딘다이온-3-(4-아미노-1,3-다이하이드로-1-옥소-2H-이소인돌-2-일)(국제 순수 응용 화학 연합(International Union of Pure and Applied Chemistry(IUPAC) 명칭)을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "포말리도마이드"는 4-아미노-2-(2,6-다이옥소피페리딘-3-일) 이소인돌-1,3-다이온을 의미한다.

[0106] 본원에서 사용된 바와 같이, "다분화능"은, 세포를 언급할 때, 세포가 또 다른 세포 유형의 세포로 분화되는 능력을 갖는 것을 의미한다. 특정 태양에서, "다분화능 세포"는 포유동물 몸체의 약 260개 세포 유형의 임의의 아집합으로 성장하는 능력을 갖는 세포이다. 만능 세포와 달리, 다분화능 세포는 모든 세포 유형들을 생성하는 능력을 갖지 않는다.

[0107] 본원에서 사용된 바와 같이, "배양보조 세포(feeder cell)"는 제 2 유형의 세포가 유지되고 아마도 증식될 수 있는 환경을 제공하기 위해 제 2 유형의 세포와 공-배양되는 한 유형의 세포를 말한다. 어떤 이론에 결부되지 않고, 배양보조 세포는, 예를 들면, 펩티드, 폴리펩티드, 전기 신호, 유기 분자(예를 들면, 스테로이드), 핵산 분자, 성장 인자(예를 들면, bFGF), 다른 인자(예를 들면, 사이토카인) 및 대사 영양소를 표적 세포에 제공할 수 있다. 특정 태양에서, 배양보조 세포는 단일-층으로 성장한다.

[0108] 본원에서 사용된 바와 같이, 추가의 변형을 갖지 않는 "자연 살해 세포" 또는 "NK 세포"는 임의의 조직 공급원으로부터의 자연 살해 세포를 포함한다. 한 태양에서, NK 세포는 성숙 NK 세포 마커 CD16, 낮은 발현율의 CD56("CD56dim") 및 KIR을 갖는 세포를 포함하는 NK 세포 집단으로 규정된다.

[0109] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "NK 전구 세포 집단"은, 예를 들면, 하나 이상의 표현형 마커, 예를 들어, CD56, CD16 및 KIR을 발현하는 수준(들)에 의해 나타나는 바와 같이, 성숙 NK 세포로 발달해야 하는 자연 살해 세포 계통의 세포를 포함하는 세포들의 집단을 말한다. 한 태양에서, NK 전구 세포 집단은 저비율 CD16 및 고비율 CD56을 갖는 세포를 포함한다.

[0110] 본원에서 사용된 바와 같이, "태반 관류액"은 태반을 통과하는 동안 관류 용액에 의해 수집된 다수의 세포를 포함하는, 태반, 예를 들면, 인간 태반의 적어도 일부를 통과, 예를 들면, 태반 혈관계를 통과한 관류 용액을 의미한다.

[0111] 본원에서 사용된 바와 같이, "태반 관류액 세포"는 태반 관류액으로부터 단리되거나 단리될 수 있는 유핵 세포, 예를 들면, 전체 유핵 세포를 의미한다.

[0112] 본원에서 사용된 바와 같이, "종양 세포 억제", "종양 세포 증식의 억제" 등은, 예를 들면, TSNK 세포 또는 TSNK 세포를 포함하는 세포들의 집단, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단을 종양 세포의 집단과 접촉시키거나 근접하게 함으로써, 예를 들면, 종양 세포들의 집단을 TSNK 세포 또는 TSNK 세포를 포함하는 세포들의 집단, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단과 접촉시킴으로써 상기 종양 세포의 집단 중 하나 이상의 종양 세포를 사멸시켜, 종양 세포 집단의 성장을 지연시키는 것을 포함한다.

[0113] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조혈 세포"는 조혈 줄기 세포 및 조혈 전구 세포를 포함한다.

[0114] 본원에서 사용된 바와 같이, "규정되지 않은 성분"은 그 구성성분들이 일반적으로 제공되거나 정량화되지 않는 성분들을 말하는 배양 배지 분야의 용어이다. "규정되지 않은 성분"의 예로는, 제한하지 않고, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB) 및 태아 혈청(예를 들면, 태아 소 혈청 또는 태아 송아지 혈청)을 포함한다.

[0115] 본원에서 사용된 바와 같이, "+"는 특정 세포 마커의 존재를 나타내기 위해 사용될 때, 그 세포 마커가 이소타입 대조군에 비해 형광 활성화 세포 분류에서 검출가능하게 존재하거나; 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경 이상에서 검출가능한 것을 의미한다.

[0116] 본원에서 사용된 바와 같이, "-"는 특정 세포 마커의 존재를 나타내기 위해 사용될 때, 그 세포 마커가 이소타입 대조군에 비해 형광 활성화 세포 분류에서 검출가능하게 존재하지 않거나; 정량적 또는 반정량적 RT-PCR에서 배경 이상에서 검출가능하지 않은 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0118] 도 1은 다양한 배지 배합물을 사용하여 조혈 줄기 세포(HSC)로부터 분화된 NK 세포의 증폭 배수를 나타낸 것이다. 에러 바는 세 공여체로부터의 표준 편차를 나타낸다. X축: 배양 일수(D). Y축: 제 0 일(배양 시작)과 비교한 증폭-배수.

도 2는 NK2A 배지를 사용하여 배양된 NK 세포의 표현형 특성화를 나타낸 것이다. 세포는 PE-항CD56, FITC-항CD3, PerCP-항CD16으로 3중-표지화하였다. 수평, 수직선: 배경보다 상당히 높은 형광 표지 수준.

도 3은 NK2A(FF), NK2A(배양보조 세포로서 태반 줄기 세포), NK2A(배양보조 세포로서 MSC) 또는 2-단계 NK 배지를 사용하여 배양된 NK 세포의 증폭 배수를 나타낸 것이다. X축: 배양 일수(D). Y축: 제 0 일(배양 시작)과 비교한 증폭-배수.

도 4는 배양 개시후 제 45 일에, NK2A(배양보조 세포 비함유), 2-단계 NK 배지; 배양보조 세포로서 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 줄기 세포(PSC)를 갖는 NK2A, 배양보조 세포로서 골수-유래 중간엽 줄기 세포(MSC)를 갖는 NK2A를 사용하여 배양된 NK 세포의 세포독성을 나타낸 것이다. 세 공여체로부터의 대표적인 데이터를 도 4에 나타내었다.

도 5는 배양 제 41 일(D41)에 NK 세포의 표현형 특성화를 나타낸 것이다. 3명의 개개 공여체로부터의 대표적인 데이터를 나타내었다. X축: $CD3^-CD56^+$, $CD16^-CD56^+$, 또는 $CD16^+CD56^+$이거나; NKB1, NKG2D, NKp46, CD94, CD117, CD226, CD7 또는 CD5를 발현하는, 2-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포의 비율. 세포는 배양 개시후 제 41 일에, NK2A(배양보조 세포 비함유), 2-단계 NK 배지; 배양보조 세포로서 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 줄기 세포(PSC)를 갖는 NK2A, 배양보조 세포로서 골수-유래 중간엽 줄기 세포(MSC)를 갖는 NK2A에서 배양하였다.

도 6은 NK2A 배지에서 NK 배양시 $CD56^+CD3^-$ NK 세포 집단에서 CD94 및 CD117의 발현을 나타낸 것이다. 배아 줄기 세포(ESC)-유래 NK 세포($CD56^+CD94^+CD117^{low/-}$)와 구별가능한, NK2A 배지에서 배양된 NK 세포로부터 $CD56^+CD94^+CD117^+$ 세포의 우세한 집단을 확인하였다. 세 공여체로부터 대표적인 데이터를 도 6에 나타내었다. X축: 피코에리트린(PE)-표지된 항-CD94로부터의 형광. Y축: APC-표지된 항CD117로부터의 형광. 수평, 수직선: 배경보다 상당히 높은 형광 표지의 수준. D13, D20, D28, D35: $CD34^+$ 세포 배양 개시후 제 13, 20, 28 및 35 일.

도 7은 MSC 및 NK2A 배지 단독과 비교하여 배양된 NK 세포에 대한 태반 줄기 세포의 효과를 나타낸 것이다. X축: 배양보조 세포 층(FF)을 갖지 않는 NK2A 배지에서 배양된 NK 세포; 배양보조 세포 층으로서 골수-유래 중간엽 줄기 세포(MCS)를 갖는 NK2A 배지에서 배양된 NK 세포; 또는 배양보조 세포 층으로서 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 줄기 세포(PDAC)를 갖는 NK2A 배지에서 배양된 NK 세포. Y축(왼쪽): 잔류하는 종양 세포의 비율로서 나타낸 세포독성(1.0 = 100%); 흰색 사각형으로 나타낸 세포독성. Y축(오른쪽): 2-단계 방법을 이용한 NK 세포의 증폭 배수; 별표로 나타낸 증폭 배수.

도 8a 및 8b는 해동 후 $CD34^+$ 세포의 순도에 대한 제대혈(UCB) 및 인간 태반 관류액(HPP)의 상대비의 효과를 나타낸 것이다. 도 8a: $CD34^+Lin^-$ 순도에 대한 HPP 부피 함량(부피%)의 효과. X축: 취합된 UCB 및 HPP(콤보(Combo))에서 HPP의 부피 분획. Y축: $CD34^+Lin^-$ 세포의 비율. 도 8b: $CD34^+Lin^-$ 순도에 대한 HPP TNC 함량(TNC%)의 효과. Y축: $CD34^+Lin^-$ 세포의 비율.

도 9는 PKH26-TOPRO3으로 표지된 다양한 종양 세포주에 대한 35일 배양된(D35) NK 세포의 FACS-기반 세포독성 분석을 나타낸 것이다. 에러 바는 3중으로 수행된 실험들중에서의 표준 편차를 나타낸 것이다.

도 10은 HCT-116 세포에 대한 D35 NK 세포 세포독성을 평가하기 위한 LDH 방출 분석을 나타낸 것이다. 작동인자(NK 세포) 대 종양(HCT-116 세포) 세포비를 X축에 나타내었다.

도 11은 K562 종양 이종이식 모델에서 D35 NK 세포 생체내 세포독성을 나타낸 것이다.

도 12는 HCT-116 종양 이종이식 모델에서 D35 NK 세포 생체내 세포독성을 나타낸 것이다.

도 13은 U-87MG 종양 이종이식 모델에서 D35 NK 세포 생체내 세포독성을 나타낸 것이다.

도 14a 및 14b는 IL-2(a) 또는 IL-15의 존재하에 또는 사이토카인의 부재하에(b) BT474 종양 이종이식 모델에서 D35 NK 세포 생체내 세포독성을 나타낸 것이다.

도 15a 내지 15c는 도 14b에 나타낸 생체내 연구의 종료점에서 회수된 BT474 종양 이종이식편의 연속 절편들의 헤마톡실린 및 에오신(H&E; a; 왼쪽 패널) 및 면역조직화학(b, c) 염색을 나타낸 것이다. b 및 c에는 인간 핵을 나타내었고, 화살표는 CD56 항체(b, 중간 패널) 및 NKp46 항체(c, 오른쪽 패널)로 염색된 세포를 나타낸다.

도 16a 및 16b는 K562 세포(a, 위 패널) 및 D35 NK 세포(b, 아래 패널)의 면역형광 분석을 나타낸 것이다. 핵은 모든 영상에서 염색된다; 왼쪽 영상 = 항-CD56; 중간 영상 = 항-NKG2D; 오른쪽 영상 = 항-NKp46. 바 = 50 ㎛.

도 17a 내지 17f는 마우스로부터 수득한 인간 종양 이종이식편의 면역형광 분석을 나타낸 것이다. a 내지 d: 비히클(a); 정맥내(I.V.) 투여된 D35 NK 세포(b); 비히클 + IL-2 I.V.(c); 및 D35 NK 세포 + IL-2 I.V.(d)의 투여후 영상화된 K562 이종이식편. e 및 f: 비히클 + IL-2 I.V.(e); 및 D35 NK 세포 + IL-2 I.V(f)의 투여후 영상화된 BT474 이종이식편. 핵은 모든 영상에서 염색된다; 왼쪽 영상 = 항-CD56; 중간 영상 = 항-NKG2D; 오른쪽 영상 = 항-NKp46. 바 = 50 ㎛.

도 18a 내지 18d: 인간 조혈 사이토카인(IL-2 및 IL-15)-발현 NSGS 마우스에서 생체내 2-단계 D35 NK 세포의 생체분포 및 지속성을 나타낸 것이다. 전달후 상이한 시점(d = 일수)에서 IL-2(a, c) 및 IL-15(b, d) 처리된 마우스에서 마우스 CD45에 비해 인간 CD45(2-단계 D35 NK 세포에 대한 마커로서)의 비율을 나타내었다. a, bS = 혈액 분석; c, d = 간 분석.

도 19는 형광-보조 세포 분류(FACS)에 의한, 표시된 마커에 대해 시험관내 분석된, 배양된 2-단계 D35 NK 세포를 나타낸 것이다: 위 = CD56+ 대 CD16+; 아래 왼쪽 = CD56+ 대 KIR2DL2/DL3/DS2+; 아래 오른쪽 = CD56+ 대 KIR3DL1/DS1+.

도 20은 생체내 입양 전달후 제 28 일에 검출된 인간 조혈 사이토카인(IL-15)-발현 마우스에서 2-단계 D35 NK 세포의 생체내 성숙을 나타낸 것이다. 위 왼쪽 = 마우스 CD45 대 인간 CD45. 오른쪽 패널은 인간 CD45 세포 집단에 대한 추가 분석을 나타낸 것이다: 위 = CD56+ 대 CD16+; 아래 = KIR2DL2/DL3/DS2+ 대 KIR3DL1/DS1+.

도 21은 유전적으로 유도된 1차 백혈병 줄기 세포에 대한 D35 NK 세포 집단의 시험관내 살해 활성을 나타낸 것이다. D35 NK 세포 집단 세포독성의 액체 공-배양 분석의 결과. MLL = MLL-AF9를 발현하는 조작된 CD34+ 세포; THP1 = 인간 급성 단핵구성 백혈병 세포주; K562 = K562 종양 세포주. y-축 상의 값은 $x10^6$ 값이다.

도 22는 D35 NK 세포 집단의 세포독성에 대한 메틸셀룰로스 분석을 나타낸 것이다. 도 18에 나타낸 생체분포 연구로부터 D35 NK 세포 집단의 생체외 단리된 세포를 이용한 AML 콜로니 생성 세포의 사멸을 나타내었다. MLL = MLL-AF9를 발현하는 조작된 CD34+ 세포; K562 = K562 종양 세포주.

도 23a 내지 23f는 MLL 이식후 8 주동안 백혈병 세포 검출 빈도를 나타낸 것이다. a. MLL 세포 이식후 처리에 대한 도식. DA = 독소루비신 및 도세탁셀; D = 일수로 나타낸 실험의 시점(제 58 일 = b 및 c에 대한 그래프상에서 나타나듯이, 마우스가 더 빨리 사망하지 않는 한, 종료점); NK = D35 NK 세포 집단. b. 그래프는 대조군 - PBS(b) 또는 IL-15(c)가 투여된 마우스 - 및 IL-15 및 화학치료제 단독(d) 또는 D35 NK 세포 집단 NK 세포 플러스 IL-15 및 화학치료제의 조합(e)이 투여된 군에서 형광성 세포의 수를 나타낸다. (f)는 파트 c, d 및 e에 나타낸 결과의 요약을 제공한 것이다. 잔류하는 AML 세포의 양은 Y축에 나타나 있다; 값들은 말초혈중 AML 세포의 비율을 나타낸다.

도 24는 생체내 입양 전달 4주후 제 21 일(D21) NK 전구 세포 집단으로부터 생성된 골수 이식 인간 세포 집단을 나타낸 것이다.

도 25는 생체내 입양 전달 4주후 골수 이식 D21 NK 전구 세포 집단의 생체내 세포 주기 분석을 나타낸 것이다.

도 26은 D21 NK 전구 세포 집단 유래 골수 이식 CD56-CD16- 전구세포의 생체외 분화를 나타낸 것이다.

도 27은 성숙 NK 세포로 생체외 분화된 D21 NK 전구 세포 집단의 세포독성 활성을 나타낸 것이다.

도 28은 HL60 세포와 비교할때, D21 NK 전구 세포(NK-D21) 및 D35 NK 세포(NK-D35), 및 말초혈(PB) NK 세포를 포함하는 다른 세포의 상대적 텔로미어(telomere) 길이를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0119] 본원에는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 NK 세포를 생성하고 증폭시키는 새로운 방법이 제공된다. 또한, 본원에는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포로부터 NK 전구 세포 집단 및 NK 세포 집단을 생성하는 방법, 예를 들면, 3-단계 방법이 제공된다. NK 세포, 및 NK 세포 집단뿐 아니라, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 조혈 세포는 임의의 공급원, 예를 들면, 제한하지 않고, 태반, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 비장 또는 간으로부터 단리될 수 있다. 특정 태양에서, NK 세포, NK 세포 집단, 또는 NK 전구 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 및/또는 조혈 전구 세포로부터 생성된다. 한 태양에서, 조혈 세포는 상기 세포들의 공급원, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 비장, 간 및/또는 골수로부터 수집된다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 배양보조 세포를 사용하지 않고 제 1 배지에서 연속적으로 증폭되고 분화된다. 세포는 이어서 배양보조 세포의 존재하에 제 2 배지에서 배양된다. 대안적 태양에서, 배양은 배양보조 세포의 부재하에 제 2 배지에서 이루어진다. 상기 단리, 증폭 및 분화는, 사용 장소, 예를 들면, 병원, 군기지, 군 최전방 등에서의 분산된 증폭 및 분화로 수송을 위해 증폭된 조혈 세포를 제공하는 중심 기관에서 수행될 수 있다.

[0120] 1. <u>조혈 세포</u>

[0121] 본원에 개시된 방법에 유용한 조혈 세포는 NK 세포 및/또는 NK 전구 세포로 분화될 수 있는 임의의 조혈 세포, 예를 들면, 전구체 세포, 조혈 전구 세포, 조혈 줄기 세포 등일 수 있다. 조혈 세포는, 예를 들면, 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 간 등, 또는 그의 조합과 같은 조직 공급원으로부터 수득될 수 있다. 조혈 세포는 태반으로부터 수득될 수 있다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 태반 관류액으로부터 수득된다. 한 태양에서, 조혈 세포는 제대혈로부터 수득되지 않는다. 한 태양에서, 조혈 세포는 말초혈로부터 수득되지 않는다. 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 태아 및 모체 조혈 세포의 혼합물, 예를 들면, 모체 세포가 조혈 세포의 총수의 5% 이상을 차지하는 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포는 약 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상의 태아 세포를 포함한다.

[0122] 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되거나, 그로부터 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액, 제대혈 또는 말초혈로부터 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되거나, 그로부터 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 태반 관류액 및 제대혈, 예를 들면, 관류액과 동일 태반으로부터의 제대혈로부터 수득된 세포와 혼합된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 수득되는 태반이 아닌 다른 태반으로부터 단리된다. 특정 태양에서, 혼합 세포는 제대혈 및 태반 관류액을 취합하거나 혼합함으로써 수득될 수 있다. 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 혼합 세포를 수득하기 위한 부피 기준으로 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다. 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 혼합된다. 또 다른 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 혼합된다. 보다 특정한 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 8.5:1.5(85%:15%)의 비로 혼합된다.

[0123] 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 혼합 세포를 수득하기 위한 전체 유핵 세포(TNC) 함량을 기준으로 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다. 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1 내지 1:10, 5:1 내지 1:5, 또는 3:1 내지 1:3의 비로 혼합된다. 또 다른 특정 태양에서, 제대혈 및 태반 관류액은 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 또는 1:10의 비로 혼합된다.

[0124] 또 다른 특정 태양에서, 그로부터 TSNK 세포가 생성되거나, 그로부터 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단이 생성되는 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 제대혈 및 태반 관류액 둘 다로부터 수득되지만, 이때 상기 제대혈은 상기 태반 관류액이 수득되는 태반이

아닌 다른 태반으로부터 단리된다.

[0125] 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+$ 세포이다. 특정 태양에서, 본원에 개시된 방법에서 유용한 조혈 세포는 $CD34^+CD38^+$ 또는 $CD34^+CD38^-$이다. 보다 특정한 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD38^-Lin^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD2^-$, $CD3^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD14^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD24^-$, $CD56^-$, $CD66b^-$ 및/또는 글리코포린 A^- 중 하나 이상이다. 또 다른 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD2^-$, $CD3^-$, $CD11b^-$, $CD11c^-$, $CD14^-$, $CD16^-$, $CD19^-$, $CD24^-$, $CD56^-$, $CD66b^-$ 및 글리코포린 A^-이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD38^-CD33^-CD117^-$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD38^-CD33^-CD117^-CD235^-CD36^-$이다.

[0126] 또 다른 태양에서, 조혈 세포는 $CD45^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD45^+$이다. 또 다른 태양에서, 조혈 세포는 $Thy\text{-}1^+$이다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+Thy\text{-}1^+$이다. 또 다른 태양에서, 조혈 세포는 $CD133^+$이다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD133^+$ 또는 $CD133^+Thy\text{-}1^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, $CD34^+$ 조혈 세포는 $CXCR4^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, $CD34^+$ 조혈 세포는 $CXCR4^-$이다. 또 다른 태양에서, 조혈 세포는 KDR(혈관 성장 인자 수용체 2)에 대해 양성이다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+KDR^+$, $CD133^+KDR^+$ 또는 $Thy\text{-}1^+KDR^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 조혈 세포는 알데하이드 데하이드로게나제($ALDH^+$)에 대해 양성이다. 예를 들면, 상기 세포는 $CD34^+ALDH^+$이다.

[0127] 특정한 다른 태양에서, $CD34^+$ 세포는 $CD45^-$이다. 특정 태양에서, $CD34^+$ 세포, 예를 들어, $CD34^+$, $CD45^-$ 세포는 miRNAs hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, hsa-miR-520a, hsa-miR-337, hsa-miR-422a, hsa-miR-549, 및/또는 hsa-miR-618 중 하나 이상, 또는 전부를 발현한다.

[0128] 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^-$이다.

[0129] 조혈 세포는 또한 계통 결정, 또는 발달상의 단순함의 결여를 나타내는 특정 마커가 결여될 수 있다. 예를 들면, 또 다른 태양에서, 조혈 세포는 $HLA\text{-}DR^-$이다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+HLA\text{-}DR^-$, $CD133^+HLA\text{-}DR^-$, $Thy\text{-}1^+HLA\text{-}DR^-$ 또는 $ALDH^+HLA\text{-}DR^-$이다. 또 다른 태양에서, 조혈 세포는 계통 마커 CD2, CD3, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A 중 하나 이상, 바람직하게는 전부에 대해 음성이다.

[0130] 따라서, 조혈 세포는 미분화 상태를 나타내는 마커의 존재를 기준으로, 또는 적어도 일부의 계통 분화가 일어난 것을 나타내는 계통 마커의 부재를 기준으로, 본원에 개시된 방법에 사용하기 위해 선택될 수 있다. 특정 마커의 존재 또는 부재를 기준으로, 조혈 세포를 포함하여 세포를 단리하는 방법은 하기에서 상세히 논의된다.

[0131] 본원에 제공된 방법에서 사용되는 조혈 세포는 실질적으로 동종 집단, 예를 들면, 단일 조직 공급원으로부터 약 95% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상을 포함하는 집단, 또는 동일한 조혈 세포-관련 세포 마커를 나타내는 조혈 세포를 포함하는 집단일 수 있다. 예를 들면, 다양한 태양에서, 조혈 세포는 골수, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈 또는 태반, 예를 들면, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 약 95%, 98% 또는 99% 이상 포함할 수 있다.

[0132] 본원에 제공된 방법에 사용되는 조혈 세포는 단일 개체로부터, 예를 들면, 단일 태반으로부터 수득될 수 있거나, 다수의 개체로부터 수득될 수 있다. 예를 들면, 취합될 수 있다. 조혈 세포가 다수의 개체로부터 수득되고 취합되는 경우, 조혈 세포는 동일한 조직 공급원으로부터 수득될 수 있다. 따라서, 다양한 태양에서, 취합된 조혈 세포는 모두 태반, 예를 들면, 태반 관류액으로부터, 모두 태반 혈액으로부터, 모두 제대혈로부터, 모두 말초혈 등으로부터 수득된 것이다.

[0133] 특정 태양에서, 본원에 개시된 방법에 사용되는 조혈 세포는 2개 이상의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함한다. 예를 들면, 특정 태양에서, 2개 이상의 공급원으로부터의 조혈 세포를 본원의 방법에 사용하기 위해 혼합할 때, TSNK 세포를 생성하기 위해 사용되는 다수의 조혈 세포는 태반, 예를 들면, 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함한다. 다양한 태양에서, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용되는 조혈 세포는 태반 및 제대혈로부터; 태반 및 말초혈로부터; 태반 및 태반 혈액으로부터, 또는 태반 및 골수로부터의 조혈 세포를 포함한다. 바람직한 태양에서, 조혈 세포는 제대혈로부터의 조혈 세포와 함께 태반 관류액으로부터의 조혈 세포를 포함하며, 이때 상기 제대혈

및 태반은 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 즉, 이때 관류액 및 제대혈은 일치된다. 조혈 세포가 2개의 조직 공급원으로부터의 조혈 세포를 포함하는 태양에서, 공급원으로부터의 조혈 세포는, 예를 들면, 1:10, 2:9, 3:8, 4:7:, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 9:1 의 비로 혼합될 수 있다.

[0134] 1.1. 태반 조혈 줄기 세포

[0135] 특정 태양에서, 본원에 제공된 방법에 사용되는 조혈 세포는 태반 조혈 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "태반 조혈 세포"는 태반 자체로부터 수득되고 태반 혈액 또는 제대혈로부터 수득되지 않은 조혈 세포를 의미한다. 한 태양에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^+$이다. 특정 태양에서, 태반 조혈 세포는 주로(예를 들면, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상) $CD34^+CD38^-$ 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 조혈 세포는 주로(예를 들면, 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상) $CD34^+CD38^+$ 세포이다. 태반 조혈 세포는 산후 포유동물(예를 들면, 인간) 태반으로부터 당해 분야에 기술을 가진 자에게 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들면, 관류에 의해 수득될 수 있다.

[0136] 또 다른 태양에서, 태반 조혈 세포는 $CD45^-$이다. 특정 태양에서, 조혈 세포는 $CD34^+CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 조혈 세포는 $CD34^+CD45^+$이다.

[0137] **2. 자연 살해 세포, 자연 살해 세포 집단 및 자연 살해 전구 세포 집단의 생성**

[0138] 본 발명의 방법에 의한 NK 세포, NK 세포 집단 및 NK 전구 세포 집단의 생성은 조혈 세포의 집단을 증폭시키는 것을 포함한다. 세포 증폭시, 조혈 세포 집단내의 다수의 조혈 세포가 NK 세포로 분화된다.

[0139] 2.1. TSNK 세포의 생성

[0140] 한 태양에서, 본원에는 다음을 포함하는, 활성화 자연 살해(NK) 세포 집단을 생성하는 방법이 제공된다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분 내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0141] 또 다른 태양에서, 본원에 제공된 NK 세포는 NK 세포의 증폭/분화 및 성숙의 2-단계 방법에 의해 생성된다. 제 1 및 제 2 단계는 세포 인자들의 독특한 조합을 갖는 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 (a) 제 1 배지에서 조혈 세포의 집단을 배양하고 증폭시키고(이때 조혈 세포 집단내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 NK 세포로 분화된다); (b) 단계 (a)로부터 수득된 NK 세포를 제 2 배지에서 증폭시키는 것을(이때, NK 세포가 더 증폭 및 분화되고, 성숙된다(예를 들면, 활성화되거나 아니면 세포독성 활성을 소유)) 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이에 중간 단계, 단계 (a) 전에 추가의 배양 단계, 및/또는 단계 (b) 다음에 추가의 단계(예를 들면, 성숙 단계)를 포함하지 않는다.

[0142] 2.1.1. 제 1 배양 단계

[0143] 특정 태양에서, 본원에 제공된 방법은 제 1 배지에서 조혈 세포의 집단을 배양하고 증폭시키는 제 1 단계를 포함하며, 이때 조혈 세포 집단내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 NK 세포로 분화된다.

[0144] 어떤 파라미터, 메카니즘 또는 이론에 결부시키고자 하는 것이 아니지만, 본원에 제공된 바와 같은 조혈 세포의 배양은 조혈 세포의 연속적 증폭 및 상기 세포로부터 NK 세포 및/또는 NK 전구 세포 집단의 분화를 야기한다. 특정 태양에서, 본원에 제공된 방법에 사용되는 조혈 세포, 예를 들면, 줄기 세포 또는 전구 세포는 배양보조 세포 층을 사용하여 제 1 단계에서 증폭되고 분화된다. 다른 태양에서, 조혈 세포, 예를 들면, 줄기 세포 또는 전구 세포는 배양보조 세포 층을 사용하지 않고 제 1 단계에서 증폭되고 분화된다.

[0145] 조혈 세포의 배양보조 세포-독립적 증폭 및 분화는 세포 배양 및 증폭과 상용가능한 임의의 용기, 예를 들면, 플라스크, 튜브, 비이커, 접시, 다중웰 플레이트, 봉지 등에서 일어날 수 있다. 특정 태양에서, 조혈 세포의 배양보조 세포-독립적 증폭은 백, 예를 들면, 유연하고 가스-투과성인 플루오로카본 배양 봉지(예를 들면, 아메리칸 플루오로실(American Fluoroseal)로부터)에서 일어난다. 특정 태양에서, 조혈 세포가 증폭되는 용기는 증폭된 NK 세포가 더 증폭되고 분화되는 장소, 예를 들면, 병원 또는 군사 지역으로 수송하기에 적합하다.

[0146] 특정 태양에서, 조혈 세포는 제 1 배양 배지에서, 예를 들면, 연속 방식으로 증폭되고 분화된다. 한 태양에서, 제 1 배양 배지는 동물-성분 비함유 배지이다. 본원에 제공된 방법에서 유용한 대표적인 동물 성분-비함유 배지로는 다음이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다: 이글 기본 배지(Basal Medium Eagle, BME), 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM), 글래스고 최소 필수 배지(Glasgow Minimum Essential Medium, GMEM), 둘베코 변형 이글 배지/영양소 혼합물 F-12 함(DMEM/F-12), 최소 필수 배지(Minimum Essential Medium, MEM), 이소코브 변형 둘베코 배지(Isocove's Modified Dulbecco's Medium, IMDM), 영양소 혼합물 F-10 함(Nutrient Mixture F-10 Ham, Ham's F-10), 영양소 혼합물 F-12 함(Ham's F-12), RPMI-1640 배지, 윌리엄스 배지 E(Williams' Medium E), 스템스팬(등록상표)(Cat. No. 스템 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies), 캐나다 밴쿠버), 글리코스템 기본 성장 배지(Glycostem Basal Growth Medium, GBGM(등록상표)), AIM-V(등록상표) 배지(인비트로겐(Invitrogen)), X-VIVO(상표) 10(론자(Lonza), X-VIVO(상표) 15(론자), 옵티마이저(인비트로겐), 스템스팬(등록상표) H3000(스템셀 테크놀로지스), 셀그로 컴플리트(상표)(메디아테크(Mediatech)), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, 또는 그의 임의의 변형된 변형물 또는 조합.

[0147] 바람직한 태양에서, 제 1 배양 배지는 인터루킨-15(IL-15), 및 하나 이상의 다른 배지 보충제(예를 들면, 영양소, 사이토카인 및/또는 인자)를 포함한다. 본원에 제공된 방법에 사용하기에 적합한 배지 보충제로는, 예를 들면, 제한하지 않고 다음이 포함된다: 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB, 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS)), 비타민, 소 혈청 알부민(BSA), 아미노산(예를 들면, L-글루타민), 지방산(예를 들면, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린(예를 들면, 재조합 인간 인슐린), 트랜스페린(철 포화 인간 트랜스페린), β-머캅토에탄올, 줄기 세포 인자(SCF), Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드(Flt3-L), 사이토카인, 예를 들면, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-7(IL-7), 트롬보포이에틴(Tpo), 헤파린 또는 O-아세틸-카르니틴(아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴 또는 OAC로도 지칭됨). 특정 태양에서, 본원에서 사용된 배지는 인간 혈청 AB를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에서 사용된 배지는 FBS를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에서 사용된 배지는 OAC를 포함한다.

[0148] 특정 태양에서, 제 1 배지는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 염증 단백질 1α(MIP1α) 또는 백혈병 억제 인자(LIF) 중 하나 이상을 포함하지 않는다.

[0149] 따라서, 한 양태에서, 본원에는 NK 세포를 생성하는 2-단계 방법이 제공되며, 이때 상기 방법의 제 1 단계는 배양보조 세포의 부재하에 제 1 배양 배지에서 조혈 세포의 집단을 증폭 및 분화시키는 것을 포함하고, 여기서 상기 조혈 세포 집단내의 다수의 조혈 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되고, 배지는 IL-15를 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, SCF를 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, IL-2를 약 50 내지 약 1500 IU/mL의 농도로, IL-7을 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, 및 헤파린을 약 0.1 내지 약 30 IU/mL의 농도로 포함하며, 상기 SCF, IL-2, IL-7, IL-15 및 헤파린은 상기 배지의 규정되지 않은 성분(예를 들면, 혈청) 내에 포함되지 않는다. 특정 태양에서, 상기 배지는 O-아세틸-카르니틴(아세틸카르니틴, O-아세틸-L-카르니틴 또는 OAC로도 지칭됨), 또는 미토콘드리아에서 아세틸-CoA 순환에 영향을 미치는 화합물, 티아조비빈, Y-27632, 파이인테그린, Rho 키나제(ROCK) 억제제, 카스파제 억제제 또는 다른 항-세포자살 화합물/펩티드, NOVA-RS(셰필드 바이오-사이언스) 또는 다른 소분자 성장 증진제 중 하나 이상을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-) 리포산, 니코틴아미드 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 배지는 약 0.5 내지 10 mM OAC를 포함한다. 한 태양에서, 상기 배지는 스템스팬(등록상표) H3000 및/또는 DMEM:F12 및 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 mM OAC를 포함한다. 상기 방법의 특정 태양에서, 상기 배지는 GBGM(등록상표)이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 스템스팬(등록상표) H3000 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 DMEM:F12 및 약 5 mM의 OAC를 포함한다. OAC는 본원에 제공된 배양 방법중 언제든 첨가될 수 있다. 특정 태양에서, 상기 OAC는 제 1 배지에 및/또는 제 1 배양 단계 중에 첨가된다. 일부 태양에서, 상기 OAC는 제 1 배지에 배양의 제 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 , 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 일에 첨가된다. 특정 태양에서, 상기 OAC는 제 1 배지에 제 1 배양 단계의 제 7 일에 첨가된다. 보다 특정한 태양에서, 상기 OAC는 제 1 배지에 배양의 제 7 일에 첨가되고, 제 1 및 제 2 배양 단계 전체에 걸쳐 존재한다. 특정 태양에서, 상기 OAC는 제 2 배지에 및/또는 제 2 배양 단계 중에 첨가된다. 일부 태양에서, 상기 OAC는 제 2 배지에 배양의 제 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 일에 첨가된다.

[0150] 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 약 5 내지 20% BSA, 약 1 내지 10 ㎍/mL 재조합 인간 인슐린, 약 10 내지

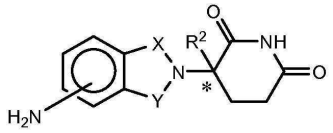
50 ㎍/mL 철 포화 인간 트랜스페린 및 약 10 내지 50 μM β-머캅토에탄올로 보충된 IMDM이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 IL-11, IL-3, 호메오박스-B4(HoxB4) 및/또는 메틸셀룰로스 중 하나 이상, 또는 이들 중 어느 하나를 포함하지 않는다.

[0151] 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 SCF를 약 0.1 내지 약 500 ng/mL; 약 5 내지 약 100 ng/mL; 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 IL-2를 약 10 내지 약 2000 IU/mL; 또는 약 100 내지 약 500 IU/mL; 또는 약 200 IU/mL의 농도로 포함한다. 다른 특정한 태양에서, 상기 배지는 IL-7을 약 0.1 내지 약 500 ng/mL; 약 5 내지 약 100 ng/mL; 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 IL-15를 약 0.1 내지 약 500 ng/mL; 약 5 내지 약 100 ng/mL; 또는 약 10 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 헤파린을 약 0.05 내지 약 100 U/mL; 또는 약 0.5 내지 약 20 U/mL; 또는 약 1.5 U/mL의 농도로 포함한다.

[0152] 상기 방법의 또 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 또한, Fms-유사-키나제 3 리간드(Flt-3L)를 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, 트롬보포이에틴(Tpo)을 약 1 내지 약 150 ng/mL의 농도로, 또는 둘 다의 조합을 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 Flt-3L을 약 0.1 내지 약 500 ng/mL; 약 5 내지 약 100 ng/mL; 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다. 다른 특정 태양에서, 상기 배지는 Tpo를 약 0.1 내지 약 500 ng/mL; 약 5 내지 약 100 ng/mL; 또는 약 20 ng/mL의 농도로 포함한다.

[0153] 상기 방법의 보다 특정한 태양에서, 제 1 배양 배지는 약 20 ng/mL SCF, 약 20 ng/mL IL-7, 약 10 ng/mL IL-15를 포함하는 GBGM(등록상표)이다. 상기 방법의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 제 1 배양 배지는 약 20 ng/mL SCF, 약 20 ng/mL Flt3-L, 약 200 IU/mL IL-2, 약 20 ng/mL IL-7, 약 10 ng/mL IL-15, 약 20 ng/mL Tpo, 및 약 1.5 U/mL 헤파린을 포함하는 GBGM(등록상표)이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 제 1 배양 배지는 또한 10% 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB) 또는 태아 혈청(예를 들면, FBS)을 포함한다.

[0154] 또 다른 태양에서, 조혈 세포는, 면역조절 화합물과 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 조혈 세포에 비해, 주어진 시간 동안 조혈 세포의 증식에 검출가능한 증가를 야기하기에 충분한 시간 동안 및 충분한 양으로 면역조절 화합물, 예를 들면, TNF-α 억제 화합물과 접촉하거나 근접하게 상기 세포를, 예를 들면, 상기 제 1 배지에서 배양함으로써 증폭된다(예를 들면, 본원에 전체로 참고로 인용된, 미국 특허 제 7,498,171 호로 허여된 미국 특허출원공개 제 2003/0235909 호 참조). 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 아미노-치환된 이소인돌린이다. 바람직한 태양에서, 면역조절 화합물은 3-(4-아미노-1-옥소-1,3-다이하이드로이소인돌-2-일)-피페리딘-2,6-다이온: 3-(4'-아미노이소인돌린-1'-온)-1-피페리딘-2,6-다이온; 4-(아미노)-2-(2,6-다이옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-다이온; 또는 4-아미노-2-(2,6-다이옥소피페리딘-3-일)이소인돌-1,3-다이온이다. 또 다른 바람직한 태양에서, 면역조절 화합물은 포말리도마이드 또는 레날리도마이드이다. 또 다른 태양에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라스레이트(clathrate), 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체 혼합물이다:

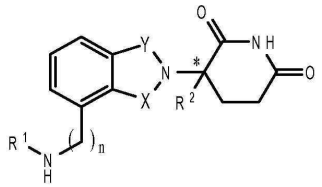
[0155] 

[0156] 상기 식에서,

[0157] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, X 및 Y 중 다른 하나는 C=O 또는 CH_2이고;

[0158] R^2는 수소 또는 저급 알킬이다.

[0159] 또 다른 태양에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라스레이트, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체 혼합물이다:

[0160] 

[0161] 상기 식에서,

[0162] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH_2 또는 C=O이고;

[0163] R^1은 H, (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)사이클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로사이클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, $C(O)R^3$, $C(S)R^3$, $C(O)OR^4$, (C_1-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, $C(O)NHR^3$, $C(S)NHR^3$, $C(O)NR^3R^{3'}$, $C(S)NR^3R^{3'}$ 또는 (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$이고;

[0164] R^2는 H, F, 벤질, (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, 또는 (C_2-C_8)알키닐이고;

[0165] R^3 및 $R^{3'}$는 독립적으로 (C_1-C_8)알킬, (C_3-C_7)사이클로알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로사이클로알킬, (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴, (C_0-C_8)알킬-$N(R^6)_2$, (C_1-C_8)알킬-OR^5, (C_1-C_8)알킬-$C(O)OR^5$, (C_1-C_8)알킬-$O(CO)R^5$, 또는 $C(O)OR^5$이고;

[0166] R^4는 (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, (C_1-C_4)알킬-OR^5, 벤질, 아릴, (C_0-C_4)알킬-(C_1-C_6)헤테로사이클로알킬 또는 (C_0-C_4)알킬-(C_2-C_5)헤테로아릴이고;

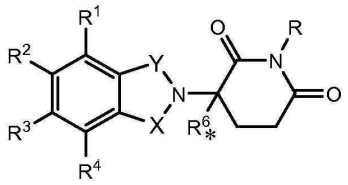
[0167] R^5는 (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴 또는 (C_2-C_5)헤테로아릴이고;

[0168] R^6은 각 경우에 독립적으로 H, (C_1-C_8)알킬, (C_2-C_8)알케닐, (C_2-C_8)알키닐, 벤질, 아릴, (C_2-C_5)헤테로아릴 또는 (C_0-C_8)알킬-$C(O)O-R^5$이거나, R^6 기는 결합하여 헤테로사이클로알킬기를 형성할 수 있고;

[0169] n은 0 또는 1이고;

[0170] *은 키랄-탄소 중심을 나타낸다.

[0171] 또 다른 태양에서, 상기 면역조절 화합물은 하기 구조를 갖는 화합물, 또는 그의 약학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 클라스레이트, 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체, 또는 입체이성질체 혼합물이다:

[0172] 

[0173] 상기 식에서,

[0174] X 및 Y 중 하나는 C=O이고, 다른 하나는 CH_2 또는 C=O이고;

[0175] R은 H 또는 CH_2OCOR'이고;

[0176] (i) R^1, R^2, R^3 또는 R^4는 각각, 서로 독립적으로, 할로, 1 내지 4개 탄소원자의 알킬, 또는 1 내지 4개 탄소원자의 알콕시이거나, (ii) R^1, R^2, R^3 또는 R^4 중 하나는 $-NHR^5$이고, R^1, R^2, R^3 또는 R^4 중 나머지는 수소이고;

[0177] R^5는 수소 또는 1 내지 8개 탄소의 알킬이고;

[0178] R^6은 수소, 1 내지 8개 탄소원자의 알킬, 벤조, 클로로 또는 플루오로이고;

[0179] R'는 $R^7-CHR^{10}-N(R^8R^9)$이고;

[0180] R^7은 m-페닐렌 또는 p-페닐렌 또는 $-(C_nH_{2n})-$이고, 여기서 n은 0 내지 4의 값을 가지고;

[0181] R^8 및 R^9는 각각 서로 독립적으로 수소 또는 1 내지 8개 탄소의 알킬이거나, R^8 및 R^9는 함께 테트라메틸렌, 펜타메틸렌, 헥사메틸렌 또는 $-CH_2CH_2X_1CH_2CH_2-$이고, X_1은 -O-, -S- 또는 -NH-이고;

[0182] R^{10}은 수소, 8개 탄소원자의 알킬 또는 페닐이고;

[0183] *은 키랄-탄소 중심을 나타낸다.

[0184] 특정 태양에서, 조혈 세포의 증폭은 20% BITS(소 혈청 알부민, 재조합 인간 인슐린 및 트랜스페린), SCF, Flt-3 리간드, IL-3 및 4-(아미노)-2-(2,6-다이옥소(3-피페리딜))-이소인돌린-1,3-다이온(0.05% DMSO중 10 μM)으로 보충된 IMDM에서 수행한다. 보다 특정한 태양에서, 약 5 x 10^7 조혈 세포, 예를 들면, $CD34^+$ 세포를 배지에서 약 5 x 10^{10} 세포 내지 약 5 x 10^{12} 세포로 증폭시키고, 이것을 100 mL의 IMDM에 재현탁시켜 증폭된 조혈 세포의 집단을 생성한다. 증폭된 조혈 세포의 집단은 바람직하게는 수송을 용이하게 하기 위해 냉동보존한다.

[0185] 다양한 특정 태양에서, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%. 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99%의 조혈 세포가 NK 세포로 분화된다.

[0186] 특정 태양에서, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포의 증폭 및 분화 방법은 증폭 및 분화동안 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 약 2 x 10^4 내지 약 6 x 10^6 세포/mL, 예를 들면, 약 2 x 10^4 내지 약 2 x 10^5 세포/mL로 유지시키는 것을 포함한다. 특정한 다른 태양에서, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포의 증폭 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 mL 당 약 1 x 10^5 세포, 1 x 10^4 세포, 또는 1 x 10^3 세포 이하로 유지하는 것을 포함한다. 특정한 다른 태양에서, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포의 증폭 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 약 1 x 10^5 세포/mL, 2 x 10^5 세포/mL, 3 x 10^5 세포/mL, 4 x 10^5 세포/mL, 5 x 10^5 세포/mL, 6 x 10^5 세포/mL, 7 x 10^5 세포/mL, 8 x 10^5 세포/mL, 9 x 10^5 세포/mL, 1 x 10^6 세포/mL, 2 x 10^6 세포/mL, 3 x 10^6 세포/mL, 4 x 10^6 세포/mL, 5 x 10^6 세포/mL, 6 x 10^6 세포/mL, 7 x 10^6 세포/mL, 8 x 10^6 세포/mL, 또는 9 x 10^6 세포/mL 이하로 유지시키는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 본원에는 본원에 기술된 세포를 배양하는 방법이 제공되며, 여기서는 약 1 x 10^3 내지 5 x 10^3, 5 x 10^3 내지 1 x 10^4, 1 x 10^4 내지 5 x 10^4, 5 x 10^4 내지 1 x 10^5, 1 x 10^5 내지 5 x 10^5, 5 x 10^5 내지 1 x 10^6, 1 x 10^6 내지 5 x 10^6, 5 x 10^6 내지 1 x 10^7, 1 x 10^7 내지 5 x 10^7 이상 세포/cm^2의 밀도가 달성된다.

[0187] 조혈 세포의 NK 세포로의 증폭 및 분화를 위한 시간은, 예를 들면, 약 3 일 내지 약 120 일일 수 있다. 한 태양에서, 분화 시간은 약 7 일 내지 약 75 일이다. 또 다른 태양에서, 분화 시간은 약 14 일 내지 약 50 일이다. 특정 태양에서, 분화 시간은 약 21 일 내지 약 28 일이다.

[0188] 2.1.2. <u>제 2 단계</u>

[0189] 본원에 제공된 방법에서, 조혈 세포, 예를 들면, 줄기 세포 또는 전구 세포, 및 제 1 단계로부터 생성된 자연살해 세포는 제 2 단계에서, 예를 들면, 배양보조 세포 층을 사용하지 않거나 배양보조 세포의 존재하에서 더 증폭 및 분화된다. 본원에 제공된 바와 같은 세포의 배양은 제 1 단계로부터 NK 세포의 연속적인 증폭, 분화뿐 아니라, 성숙을 야기한다. 제 2 단계에서, NK 세포는, 예를 들면, 상기 제 1 배지와 상이한 사이토카인 및/또는 생체활성 분자를 포함하는 제 2 배양 배지에서, 연속 방식으로 증폭되고 분화되고 성숙된다. 특정 태양에서, 제 2 배양 배지는 동물 성분-비함유 배지이다. 대표적인 동물 성분-비함유 세포 배양 배지는 상기에 기술되어 있다.

[0190] 따라서, 한 양태에서, 본원에는 전술한 제 1 단계로부터 수득된 NK 세포를 제 2 배지에서 배양보조 세포의 존재하에 및 인터루킨-2(IL-2)와 접촉 또는 근접시켜 증폭시키는 것을 포함하는, NK 세포의 제조 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 IL-2, 예를 들면, 10 내지 1000 IU/mL, 및 다음 중 하나 이상을 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다: 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS), 예를 들면, 5% 내지 15% FCS v/v; 트랜스페린, 예를 들면, 10 내지 50 μg/mL; 인슐린, 예를 들면, 5 내

지 20 μg/mL; 에탄올아민, 예를 들면, 5 x 10^{-4} 내지 5 x 10^{-5} M; 올레산, 예를 들면, 0.1 내지 5 μg/mL; 리놀레산, 예를 들면, 0.1 내지 5 μg/mL; 팔미트산, 예를 들면, 0.05 내지 2 μg/mL; 소 혈청 알부민(BSA), 예를 들면, 1 내지 5 μg/mL; 및/또는 피토헤마글루티닌, 예를 들면, 0.01 내지 1 μg/mL. 보다 특정한 태양에서, 상기 제 2 배지는 FBS 또는 FCS, 예를 들면, 10% FCS v/v, IL-2, 트랜스페린, 인슐린, 에탄올아민, 올레산, 리놀레산, 팔미트산, 소 혈청 알부민(BSA) 및 피토헤마글루티닌을 포함하는 세포 성장 배지를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 제 2 배지는 이스코브 변형 둘베코 배지(IMDM), 10% FBS 또는 FCS, 400 IU IL-2, 35 μg/mL 트랜스페린, 5 μg/mL 인슐린 2 x 10^{-5} M 에탄올아민, 1 μg/mL 올레산, 1 μg/mL 리놀레산(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)), 0.2 μg/mL 팔미트산(시그마-알드리치), 2.5 μg/mL BSA(시그마-알드리치) 및 0.1 μg/mL 피토헤마글루티닌을 포함한다.

[0191] 특정 태양에서, 제 2 배지는 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구/대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-6(IL-6), 대식세포 염증 단백질 1α(MIP1α) 또는 백혈병 억제 인자(LIF) 중 하나 이상을 포함하지 않는다.

[0192] 상기 방법 이외에, 본원에는 조성물로서 전술한 임의의 배지들이 제공된다.

[0193] 배양보조 세포는, 사용되는 경우, 다양한 세포 유형들로부터 설정될 수 있다. 이들 세포 유형의 예로는, 제한하지 않고, 섬유모세포, 줄기 세포(예를 들면, 조직 배양물-부착성 태반 줄기 세포), 혈액 세포(예를 들면, 말초혈 단핵 세포(PBMC)) 및 암성 세포(예를 들면, K562와 같은 만성 골수성 백혈병(CML) 세포)가 포함된다. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지에서의 상기 배양은 배양보조 세포, 예를 들면, K562 세포 및/또는 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 사용하여, 예를 들면, 세포가 상기 제 2 배지에서 배양시작될 때, 그 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 일에 배양하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 배양보조 세포는 선택적으로 이들이 지지하고 있는 세포와 상이한 종으로부터 유래된 것이다. 예를 들면, 인간 NK 세포는 마우스 배아 섬유모세포(1차 배양물 또는 텔로머화 세포주로부터)에 의해 지지될 수 있다.

[0194] 특정 태양에서, 배양보조 세포는, 이들이 지지하고 있는 세포보다 더 커지는 것은 방지하고 NK 세포를 지지하는 중요한 인자의 합성은 허용하도록, 선택적으로 방사선조사(예를 들면, γ-방사선조사) 또는 미토마이신 C와 같은 항-유사분열제 처리에 의해 불활성화된다. 예를 들면, 세포는 증식은 억제하지만 인간 배아 줄기(hES) 세포를 지지하는 중요한 인자의 합성은 허용하는 용량(약 4000 rad 감마 방사선조사)으로 방사선조사될 수 있다.

[0195] 제 2 단계를 위한 NK 세포의 배양은 세포 배양 및 증폭과 상용가능한 임의의 용기, 예를 들면, 플라스크, 튜브, 비이커, 접시, 다중웰 플레이트, 봉지 등에서 일어날 수 있다. 특정 태양에서, NK 세포의 배양보조 세포-의존적 배양은 봉지, 예를 들면, 유연하고 가스-투과성인 플루오로카본 배양 봉지(예를 들면, 아메리칸 플루오로실로부터)에서 일어난다. 특정 태양에서, NK 세포가 배양되는 용기는 증폭된 NK 세포가 더 증폭되고 분화되고 성숙되는 장소, 예를 들면, 병원 또는 군사 지역으로의 수송에 적합하다.

[0196] 제 1 단계에서 수득된 세포의 TSNK 세포로의 분화는, 예를 들면, 유세포분석에 의해 NK 세포-특이적 마커를 검출함으로써 평가될 수 있다. NK 세포-특이적 마커로는 CD56, CD94, CD117 및 NKp46이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 분화는 또한 NK 세포의 형태학적 특징, 예를 들면, 거대한 크기, 풍부한 소포체(ER)에서의 높은 단백질 합성 활성 및/또는 미리형성된 과립들에 의해 평가될 수 있다.

[0197] 제 1 단계에서 수득된 세포의 TSNK 세포로의 증폭 및 분화에 걸리는 시간은, 예를 들면, 약 3일 내지 약 120일일 수 있다. 한 태양에서, 분화 시간은 약 7일 내지 약 75일이다. 또 다른 태양에서, 분화 시간은 약 14일 내지 약 50일이다. 특정 태양에서, 분화 시간은 약 10일 내지 약 21일이다.

[0198] 조혈 세포의 NK 세포로의 분화는, 예를 들면, 유세포분석에 의해 마커, 예를 들면, CD56, CD94, CD117, NKG2D, DNAM-1 및 NKp46을 검출함으로써 평가될 수 있다. 분화는 또한 NK 세포의 형태학적 특징, 예를 들면, 거대한 크기, 풍부한 소포체(ER)에서의 높은 단백질 합성 활성 및/또는 미리형성된 과립들에 의해 평가될 수 있다. NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 성숙은 하나 이상의 기능적으로 적절한 마커, 예를 들면, CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR, 및 활성화 수용체의 NKG2 부류(예를 들면, NKG2D)를 검출함으로써 평가할 수 있다. NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 성숙은 또한 상이한 발달 단계 동안 특정 마커를 검출함으로써 평가할 수 있다. 예를 들면, 한 태양에서, NK 전구 세포는 $CD34^{+}$, $CD45RA^{+}$, $CD10^{+}$, $CD117^{-}$ 및/또는 $CD161^{-}$이다. 또 다른 태양에서, NK 전구 세포는 $CD34^{+}$, $CD45RA^{+}$, $CD10^{-}$, $CD117^{+}$, 및/또는 $CD161^{-}$이다. 또 다른 태양에서, 미성숙 NK 세포는 $CD34^{-}$, $CD117^{+}$, $CD161^{+}$, $NKp46^{-}$ 및/또는 $CD94/NKG2A^{-}$이다. 또 다른 태양에서, $CD56^{bright}$ NK 세포는

$CD117^+$, $NKp46^+$, $CD94/NKG2A^+$, $CD16^-$ 및/또는 $KIR^{+/-}$이다. 또 다른 태양에서, $CD56^{dim}$ NK 세포는 $CD117^-$, $NKp46^+$, $CD94/NKG2A^{+/-}$, $CD16^+$, 및/또는 KIR^+이다. 특정 태양에서, NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 성숙은 $CD161^-$, $CD94^+$ 및/또는 $NKp46^+$인 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 비율에 의해 측정된다. 보다 특정한 태양에서, 성숙한 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%가 $NKp46^+$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 성숙한 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%가 $CD94^+$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 성숙한 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%가 $CD161^-$이다.

[0199] 특정 태양에서, 조혈 세포의 NK 세포로의 분화는, 예를 들면, CD3, CD7 또는 CD127, CD10, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD56, CD94, CD117, CD161, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4 또는 TO-PRO-3의 발현 수준을, 예를 들면, 하나 이상의 이들 세포 마커에 대한 항체를 이용하여 검출함으로써 평가된다. 상기 항체는, 예를 들면, 형광 표지로서, 검출가능한 표지, 예를 들면, FITC, R-PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7 또는 APC-H7에 접합될 수 있다.

[0200] 2.2. <u>3-단계 방법을 이용한 NK 전구 세포 집단 및 NK 세포 집단의 생성</u>

[0201] 한 태양에서, 본원에는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 생성하는 3-단계 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포를 증폭 및 분화시켜 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 NK 전구 세포 집단 또는 NK 세포 집단을 생성하는 방법은, 증폭 및 분화동안 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 약 2×10^4 내지 약 6×10^6 세포/mL, 예를 들면, 약 2×10^4 내지 약 2×10^5 세포/mL로 유지시키는 것을 포함한다. 특정한 다른 태양에서, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포의 증폭 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 약 1×10^5 세포/mL 이하로 유지시키는 것을 포함한다. 특정한 다른 태양에서, 본원에 기술된 바와 같은 조혈 세포의 증폭 및 분화 방법은 상기 조혈 세포를 포함하는 세포 집단을 약 1×10^5 세포/mL, 2×10^5 세포/mL, 3×10^5 세포/mL, 4×10^5 세포/mL, 5×10^5 세포/mL, 6×10^5 세포/mL, 7×10^5 세포/mL, 8×10^5 세포/mL, 9×10^5 세포/mL, 1×10^6 세포/mL, 2×10^6 세포/mL, 3×10^6 세포/mL, 4×10^6 세포/mL, 5×10^6 세포/mL, 6×10^6 세포/mL, 7×10^6 세포/mL, 8×10^6 세포/mL, 또는 9×10^6 세포/mL 이하로 유지시키는 것을 포함한다.

[0202] 특정 태양에서, 3-단계 방법은 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포, 예를 들면, $CD34^+$ 줄기 세포 또는 전구 세포를, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같이 특정한 시간 동안 제 1 배지에서 배양하는 것을 포함하는 제 1 단계("단계 1")를 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 조혈 전구 세포의 증폭을 촉진하는 하나 이상의 인자, 증폭되는 조혈 전구세포 집단 내에서 림프구 분화의 개시를 위한 하나 이상의 인자, 및/또는 기질 배양보조 세포 지지를 모방하는 하나 이상의 인자를 함유한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, Flt3L, TPO, SCF)을 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 IL-7을 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및/또는 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지는 사이토카인 Flt3L, TPO 및 SCF, IL-7, 및 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지중에서, CD34+ 세포는 계통 특이적 전구세포로 증폭되고, 상기 전구세포는 이어서 CD34-가 된다. 특정 태양에서, 상기 증폭은 신속하게 일어난다. 특정 태양에서, CD34- 세포는 단계 1의 종료시 전체 집단의 50% 초과, 55% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 또는 그 이상을 차지한다. 보다 특정한 태양에서, CD34- 세포는 단계 1의 종료시 전체 집단의 80% 초과를 차지한다.

[0203] 특정 태양에서, 이어서, "단계 2"에서, 상기 세포는, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같이, 특정 시간 동안 제 2 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 림프성 전구세포의 추가의 증폭을 촉진할 수 있는 인자, NK 계통에 따른 발달에 기여할 수 있는 인자, 및/또는 기질 배양보조 세포 지지를 모방하는 인자를 함유한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, Flt3L, SCF, IL-15 및/또는 IL-7)을 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 IL-17 및/또는 IL-15를 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및/또는 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지는 사이토카인 Flt3L, SCF, IL-15 및 IL-7, IL-17 및 IL-15, 및 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함한다.

[0204] 특정 태양에서, 이어서, "단계 3"에서, 상기 세포는, 예를 들면, 본원에 기술된 바와 같이, 특정 시간 동안 제

3 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 NK 전구 세포일 수 있는 CD56+CD3-CD16- 세포의 분화 및 기능적 활성화를 촉진하는 인자를 포함한다. 한 태양에서, 상기 인자로는 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18이 포함된다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 기질 배양보조 세포 지지를 모방하는 인자를 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 하나 이상의 사이토카인(예를 들면, SCF, IL-15, IL-7, IL-2)을 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및/또는 GM-CSF를 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지는 사이토카인 SCF, IL-15, IL-7, IL-2 및 ng/mL-이하 농도의 G-CSF, IL-6 및 GM-CSF를 포함한다.

[0205] 특정 태양에서, 3-단계 방법은 NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된다. 또 다른 특정 태양에서, 3-단계 방법은 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된다. 특정 태양에서, 3-단계 방법은 기질 배양보조 세포 지지의 부재하에 수행된다. 특정 태양에서, 3-단계 방법은 외인적으로 첨가된 스테로이드(예를 들면, 코르티손, 하이드로코르티손 또는 그의 유도체)의 부재하에 수행된다.

[0206] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 사용되는 제 1 배지는 2-단계 방법에 관해 전술한 제 1 또는 제 2 배지의 임의의 성분들을 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 3-단계 방법에 사용되는 상기 제 1 배지는 다음 중 하나 이상을 포함하는 배지를 포함한다: 동물 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS), 예를 들면, 1% 내지 20 % v/v 혈청, 예를 들면, 5% 내지 20% v/v 혈청; 줄기 세포 인자(SCF), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL SCF; FMS-유사 티로신 키나제-3 리간드(Flt-3 리간드), 예를 들면, 1 내지 30 ng/mL Flt-3 리간드; 인터루킨-7(IL-7), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-7; 트롬보포이에틴(TPO), 예를 들면, 1 내지 100 ng/mL, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL TPO; 인터루킨-2(IL-2), 예를 들면, 2000 IU/mL 이하, 예를 들면, 50 내지 500 IU/mL; 및/또는 헤파린, 예를 들면, 저분자량 헤파린(LWH), 예를 들면, 0.1 내지 10 IU/mL 헤파린. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 항생물질, 예를 들면, 젠타마이신; 산화방지제, 예를 들면, 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스콜브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 OAC를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 인터루킨-6(IL-6), 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF 및/또는 MIP-1α를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원된 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-) 리포산, 니코틴아미드, 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 제 1 배지용 베이스를 제공하는 배지는 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640이거나; 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분들, 예를 들면, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함되는 성분들을 포함하는 배지이다.

[0207] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 사용되는 제 2 배지는 2-단계 방법과 관련하여 전술한 제 1 또는 제 2 배지의 임의의 성분들을 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 3-단계 방법에 사용되는 상기 제 2 배지는 다음 중 하나 이상을 포함하는 배지를 포함한다: 동물 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), FBS 또는 FCS, 예를 들면, 5% 내지 20 % v/v 혈청; SCF, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL SCF; Flt-3 리간드, 예를 들면, 1 내지 30 ng/mL Flt-3 리간드; IL-7, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-7; 인터루킨-15(IL-15), 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-15; 및/또는 헤파린, 예를 들면, LWH, 예를 들면, 0.1 내지 10 IU/mL 헤파린. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 항생물질, 예를 들면, 젠타마이신; 산화방지제, 예를 들면, 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스콜브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한 OAC를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한 인터루킨-6(IL-6), 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF 및/또는 MIP-1α를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 2 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원된 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-)리포산, 니코틴아미드, 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 제 2 배지용 베이스를 제공하는 배지는 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스

팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640이거나; 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분들, 예를 들면, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함되는 성분들을 포함하는 배지이다.

[0208] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 사용되는 제 3 배지는 2-단계 방법과 관련하여 전술한 제 1 또는 제 2 배지의 임의의 성분들을 함유할 수 있다. 특정 태양에서, 3-단계 방법에 사용되는 상기 제 3 배지는 다음 중 하나 이상을 포함하는 배지를 포함한다: 동물 혈청, 예를 들면, 인간 혈청(예를 들면, 인간 혈청 AB), FBS 또는 FCS, 예를 들면, 5% 내지 20 % v/v 혈청; SCF, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL SCF; Flt-3 리간드, 예를 들면, 1 내지 30 ng/mL Flt-3 리간드; IL-7, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-7; IL-15, 예를 들면, 1 내지 50 ng/mL IL-15; 및, 예를 들면, 0 내지 2000 IU/mL 범위의 인터루킨-2(IL-2), 예를 들면, 50 내지 1000 UL/mL IL-2. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한, 다음 중 하나 이상을 포함한다: 항생물질, 예를 들면, 젠타마이신; 산화방지제, 예를 들면, 트랜스페린, 인슐린 및/또는 베타-머캅토에탄올; 나트륨 셀레나이트; 아스콜브산; 에탄올아민; 및 글루타티온. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한 OAC를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한 인터루킨-6(IL-6), 백혈병 억제 인자(LIF), G-CSF, GM-CSF 및/또는 MIP-1α를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 제 3 배지는 또한 하나 이상의 산화방지제, 예를 들면, 홀로-트랜스페린, 인슐린 용액, 환원된 글루타티온, 나트륨 셀레나이트, 에탄올아민, 아스콜브산, b-머캅토에탄올, O-아세틸-L-카르니틴, N-아세틸시스테인, (+/-)리포산, 니코틴아미드, 또는 레스베라트롤을 포함한다. 특정 태양에서, 제 3 배지용 베이스를 제공하는 배지는 당해 분야의 기술을 가진 자에게 공지된 세포/조직 배양 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포/조직 배양 배지, 예를 들어, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640이거나; 공지된 세포/조직 배양 배지에 일반적으로 포함되는 성분들, 예를 들면, GBGM(등록상표), AIM-V(등록상표), X-VIVO(상표) 10, X-VIVO(상표) 15, 옵티마이저, 스템스팬(등록상표) H3000, 셀그로 컴플리트(상표), DMEM:함 F12("F12")(예를 들면, 2:1 비, 또는 글루코스 고함량 또는 글루코스 저함량 DMEM), 어드밴스드 DMEM(깁코), EL08-1D2, 마이엘로컬트(상표) H5100, IMDM 및/또는 RPMI-1640에 포함되는 성분들을 포함하는 배지이다.

[0209] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지에서 배양된 세포는 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또 는 20 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 일 동안, 또는 30 일 이상 동안 상기 제 3 배지에서 배양된다.

[0210] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 2 내지 12 일, 3 내지 11 일, 예를 들면, 3 내지 5, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 7 내지 9, 8 내지 10, 또는 9 내지 11 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양된다. 특정한 태양에서, 상기 제 1 배지에서 배양된 세포는 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 1 내지 10 일, 예를 들면, 1 내지 3, 2 내지 4, 3 내지 5, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양된다. 특정 태양에서, 상기 제 1 배지 및 상기 제 2 배지에서 배양된 세포는 2 내지 27 일, 예를 들면, 3 내지 25 일 동안, 예를 들면, 3 내지 5, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 7 내지 9, 8 내지 10, 9 내지 11, 10 내지 12, 11 내지 13, 12 내지 14, 13 내지 15, 14 내지 16, 15 내지 17, 16 내지 18, 17 내지 19, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 21 내지 23, 22 내지 24, 또는 23 내지 25 일 동안 상기 제 3 배지에서 배양된다.

[0211] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 7 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 21 일 동안 배양된다.

[0212] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기

배양 전에 7 내지 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 내지 7 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 21 내지 35 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 35 일 동안 배양된다. 보다 특정한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에서, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 제 2 배지에서의 상기 배양 전에 9 일 동안 상기 제 1 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서의 상기 배양 전에 5 일 동안 상기 제 2 배지에서 배양되고; 상기 제 3 배지에서 21 일 동안 배양된다. 즉, 상기 세포는 총 35 일 동안 배양된다.

[0213] 3. NK 세포의 단리

[0214] 자연 살해 세포를 단리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 본원에 기술된, 3-단계 방법을 이용하여 생성된 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 전구 세포 또는 NK 세포를 단리하기 위해 사용될 수 있다. NK 세포는 조직 공급원, 예를 들면, 말초혈로부터의 세포를 CD56 및 CD3에 대한 항체로 염색시키고, $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포에 대해 선택함으로써 단리되거나 농축될 수 있다. NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포는 상업적으로 시판하는 키트, 예를 들면, NK 세포 단리 키트(NK Cell Isolation Kit, 밀테나이 바이오텍(Miltenyi Biotec))를 사용하여 단리할 수 있다. NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포는 또한 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포를 포함하는 세포 집단에서 NK 세포가 아닌 다른 세포를 제거함으로써 단리 또는 농축될 수 있다. 예를 들면, NK 세포, 예를 들어, TSNK 세포는, 예를 들면, CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR 및/또는 CD235a(글리코포린 A) 중 하나 이상에 대한 항체를 사용하여 비-NK 세포 마커를 나타내는 세포의 결손에 의해 단리 또는 농축될 수 있다. 음성적 단리는 상업적으로 시판하는 키트, 예를 들면, NK 세포 음성 단리 키트(NK Cell Negative Isolation Kit, 디날 바이오텍(Dynal Biotech))를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 방법들에 의해 단리된 세포는, 예를 들면, $CD16^{+}$ 및 $CD16^{-}$ 세포를 분리하기 위해 추가로 분류될 수 있다.

[0215] 세포 단리는, 예를 들면, 유세포분석, 형광-활성화 세포 분류(FACS), 또는 바람직하게는, 특정 항체와 접합된 미세비드를 이용한 자기 세포 분류에 의해 달성될 수 있다. 세포는, 예를 들면, 하나 이상의 특이적 항체, 예를 들면, 항-CD56 항체를 포함하는 자기 비드(예를 들면, 약 0.5 내지 100 ㎛ 직경)에 결합하는 그의 능력에 근거하여 입자를 단리하는 방법인 자기 활성화 세포 분류(MACS) 기술을 이용하여 단리할 수 있다. 자기 세포 단리는, 예를 들면, 오토맥스(AUTOMACS, 등록상표) 단리장치(밀테나이)를 사용하여 수행되고 자동화될 수 있다. 특정한 세포 표면 분자 또는 합텐을 특이적으로 인식하는 항체의 공유적 부가를 포함하여, 자기 미세구에 다양한 유용한 변형이 수행될 수 있다. 이어서, 비드를 세포와 혼합하여 결합시킨다. 이어서 세포를 자기장에 통과시켜 특정 세포 표면 마커를 갖는 세포를 분리한다. 한 태양에서, 상기 세포들은 이어서 단리되고 또 다른 세포 표면 마커에 대한 항체와 커플링된 자기 비드와 재-혼합된다. 세포는 다시 자기장에 통과시켜 두 항체 모두에 결합된 세포를 단리한다. 상기 세포는 이어서 개별 접시, 예를 들면, 클론 단리를 위한 미세적정 접시내에 희석될 수 있다.

[0216] 4. 태반 관류액

[0217] 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 및 NK 전구 세포 및 NK 세포 집단은 임의의 공급원, 예를 들면, 태반 조직, 태반 관류액, 제대혈, 태반 혈액, 말초혈, 비장, 간 등으로부터 수득된 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 또는 전구세포로부터 생성될 수 있다. 특정 태양에서, 조혈 줄기 세포는 태반 관류액으로부터 및 태반 관류액을 생성하기 위해 사용된 동일한 태반으로부터의 제대혈로부터 수득된 혼합 조혈 줄기 세포이다. 태반 관류액 세포를 포함하는 태반 관류액은, 예를 들면, 본원에 전체로 인용된 미국 특허 제 7,045,148 호 및 제 7,468,276 호에 개시된 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0218] 4.1. 세포 수집 조성물

[0219] 그로부터 조혈 줄기 또는 전구세포가 단리될 수 있거나, 예를 들면, 본원에 제공된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포, 예를 들어, TSNK 세포, 또는 NK 전구 세포 또는 NK 세포 집단과 함께, 종양 억제 또는 종양 세포, 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체의 치료에 유용한 태반 관류액 및 관류액 세포는 태반 세포 수집 조성물을 사용하여 포유동물, 예를 들면, 인간 산후 태반의 관류에 의해 수집될 수 있다. 관류액은 임의의 생리학적으로 허용되는 용액, 예를 들면, 식염수 용액, 배양 배지 또는 보다 복잡한 세포 수집 조성물로 태반을 관류시켜 태반으로부터 수집될 수 있다. 태반의 관류, 및 관류액 세포의 수집 및 보존에 적합한 세포 수집 조성물은 본원에 전체로 인용된, 관련된 미국 특허출원공개 제 2007/0190042 호에 상세히 기술되어 있다.

[0220] 세포 수집 조성물은 줄기 세포의 수집 및/또는 배양에 적합한 임의의 생리학적으로 허용되는 용액, 예를 들면, 식염수 용액(예, 포스페이트-완충 식염수, 크렙(Kerb) 용액, 변형된 크렙 용액, 이글(Eagle) 용액, 0.9% NaCl

등), 배양 배지(예, DMEM, H.DMEM 등) 등을 포함할 수 있다.

[0221] 세포 수집 조성물은 태반 세포를 보존하는, 즉, 수집 시기부터 배양 시기까지, 태반 세포가 사멸되는 것을 방지하거나 태반 세포의 사멸을 지연시키거나, 사멸하는 세포 집단중 태반 세포의 수를 감소시키는 등의 경향이 있는 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다. 상기 성분은, 예를 들면, 세포자살 억제제(예, 카스파제 억제제 또는 JNK 억제제); 혈관확장제(예, 마그네슘 설페이트, 항고혈압 약물, 심방성 나트륨이뇨 펩티드(ANP), 아드레노코르티코트로핀, 코르티코트로핀-방출 호르몬, 나트륨 니트로프루시드, 하이드랄라진, 아데노신 트라이포스페이트, 아데노신, 인도메타신 또는 마그네슘 설페이트, 포스포다이에스터라제 억제제 등); 괴사 억제제(예, 2-(1H-인돌-3-일)-3-펜틸아미노-말레이미드, 피롤리딘 다이티오카바메이트 또는 클로나제팜); TNF-α 억제제; 및/또는 산소-함유 퍼플루오로카본(예, 퍼플루오로옥틸 브로마이드, 퍼플루오로데실 브로마이드 등)일 수 있다.

[0222] 세포 수집 조성물은 하나 이상의 조직-분해 효소, 예를 들면, 메탈로프로테아제, 세린 프로테아제, 중성 프로테아제, 히알루로니다제, RNase 또는 DNase 등을 포함할 수 있다. 상기 효소로는 콜라게나제(예를 들면, 콜라게나제 I, II, III 또는 IV, 클로스트리듐 히스토라이티쿰(*Clostridium histolyticum*)으로부터의 콜라게나제 등); 디스파제, 터모라이신, 엘라스타제, 트립신, 리베라제(LIBERASE), 히알루로니다제 등이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다.

[0223] 세포 수집 조성물은 살세균 또는 세균발육억제 효과량의 항생물질을 포함할 수 있다. 특정한 비-제한적 태양에서, 항생물질은 매크롤라이드(예, 토브라마이신), 세팔로스포린(예, 세팔렉신, 세프라딘, 세푸록심, 세프프로질, 세파클로르, 세픽심 또는 세파드록실), 클라리트로마이신, 에리트로마이신, 페니실린(예, 페니실린 V) 또는 퀴놀론(예, 오플록사신, 시프로플록사신 또는 노르플록사신), 테트라사이클린, 스트렙토마이신 등이다. 특정 태양에서, 항생물질은 그람(Gram)(+) 및/또는 그람(-) 세균, 예를 들면, 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 스태필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*) 등에 대해 활성이다.

[0224] 세포 수집 조성물은 또한 하기 화합물 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 아데노신(약 1 내지 약 50 mM); D-글루코스(약 20 내지 약 100 mM); 마그네슘 이온(약 1 내지 약 50 mM); 한 태양에서, 내피 보전성 및 세포 생존력을 유지시키기에 충분한 양으로 존재하는, 20,000 달톤보다 큰 분자량을 갖는 거대분자(예를 들면, 약 25 내지 약 100 g/l, 또는 약 40 내지 약 60 g/l로 존재하는 합성 또는 천연 콜로이드, 폴리사카라이드, 예를 들어, 덱스트란, 또는 폴리에틸렌 글리콜); 산화방지제(예를 들면, 약 25 내지 약 100 μM로 존재하는 부틸화 하이드록시아니솔, 부닐화 하이드록시톨루엔, 글루타티온, 비타민 C 또는 비타민 E); 환원제(예를 들면, 약 0.1 내지 약 5 mM로 존재하는 N-아세틸시스테인); 세포내 칼슘 유입을 방지하는 약제(예를 들면, 약 2 내지 약 25 μM로 존재하는 베라파밀); 니트로글리세린(예를 들면, 약 0.05 내지 약 0.2 g/L); 한 태양에서, 잔류 혈액의 응고를 방지하는 것을 돕기에 충분한 양으로 존재하는 항응고제(예를 들면, 약 1000 내지 약 100,000 단위/l의 농도로 존재하는 헤파린 또는 히루딘); 또는 아밀로라이드 함유 화합물(예를 들면, 약 1.0 내지 약 5 μM로 존재하는 아밀로라이드, 에틸 이소프로필 아밀로라이드, 헥사메틸렌 아밀로라이드, 다이메틸 아밀로라이드 또는 이소부틸 아밀로라이드).

[0225] 4.2. <u>태반의 수집 및 처리</u>

[0226] 일반적으로, 인간 태반은 출산후 그 축출 직후에 회수된다. 바람직한 태양에서, 태반은 사전 동의 후 및 환자의 완전한 병력을 취하여 태반과 연관시킨 후에 환자로부터 회수된다. 바람직하게, 병력은 분만후에 이어진다.

[0227] 관류액의 회수에 앞서, 제대혈 및 태반 혈액을 제거한다. 특정 태양에서, 분만후, 태반내 제대혈을 회수한다. 태반은 통상적인 제대혈 회수 공정에 적용될 수 있다. 전형적으로, 중력을 이용하여 바늘 또는 캐뉼라를 사용하여 태반을 방혈시킨다(예를 들면, 앤더슨(Anderson)의 미국 특허 제 5,372,581 호; 헤셀(Hessel) 등의 미국 특허 제 5,415,665 호 참조). 바늘 또는 캐뉼라는 통상적으로 제정맥 내에 위치시키고 태반을 부드럽게 마사지하여 태반으로부터 제대혈을 배수시키는 것을 용이하게 할 수 있다. 상기 제대혈 회수는 상업적으로, 예를 들면, 라이프뱅크 인코포레이티드, 세다르 크놀스, 엔.제이., 비아코드, 코드 블러드 레지스트리 앤드 크리오셀(LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and CryoCell)에서 수행될 수 있다. 바람직하게, 태반은 제대혈 회수시 조직 파괴를 최소화하기 위해 추가의 조작없이 중력 배수된다.

[0228] 전형적으로, 태반은 제대혈의 회수 및 관류액 수집을 위해, 분만실로부터 또 다른 장소, 예를 들면, 실험실로 운반된다. 태반은 바람직하게는, 예를 들면, 태반을, 탯줄에 가장 가까운 쪽을 클램프고정한 채, 멸균 지퍼락 비닐 봉지에 넣고, 이어서 이것을 단열 용기에 넣음으로써, 멸균된 단열 운반 장치(20 내지 28 ℃에서 태반 온

도를 유지)에서 운반된다. 또 다른 태양에서, 태반은 미국 특허 제 7,147,626 호에 기술된 바와 같이 실질적으로 제대혈 수집 키트에서 운반된다. 바람직하게, 태반은 분만 4 내지 24 시간 후에 실험실로 전달된다. 특정 태양에서, 근위 탯줄을, 바람직하게는 제대혈 회수 전에 태반 디스크내 삽입부의 4 내지 5 cm(센티미터) 내에서 클램프고정한다. 다른 태양에서, 근위 탯줄은 제대혈 회수 후 태반의 추가 처리 전에 클램프고정된다.

[0229] 태반은 관류액 수집 전에 멸균 조건하에 및 실온 또는 5 내지 25 ℃(섭씨)의 온도에서 저장될 수 있다. 태반은 48 시간보다 더 긴 기간동안, 바람직하게는 태반을 관류시켜 임의의 잔류 제대혈을 제거하기 전 4 내지 24 시간 동안 저장될 수 있다. 태반은 바람직하게는 5 내지 25 ℃(섭씨)의 온도에서 항응고 용액 중에 저장된다. 적합한 항응고 용액은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 헤파린 또는 와파린 나트륨 용액을 사용할 수 있다. 바람직한 태양에서, 항응고 용액은 헤파린 용액을 포함한다(예를 들면, 1:1000 용액중 1% w/w). 방혈시킨 태반은 바람직하게는 태반 관류액을 수집하기 전 36 시간 이하 동안 저장된다.

[0230] 4.3. <u>태반 관류</u>

[0231] 포유동물 태반을 관류시키고 태반 관류액을 수득하는 방법은, 예를 들면, 하리리(Hariri)의 미국 특허 제 7,045,148 호 및 제 7,255,879 호, 및 미국 특허출원공개 제 2007/0190042 호, 및 미국 특허 제 8,057,788 호로 허여된 2007/0275362 호에 개시되어 있으며, 이들은 본원에 전체로 참고로 인용된다.

[0232] 관류액은 관류 용액, 예를 들면, 식염수 용액, 배양 배지 또는 전술한 세포 수집 조성물을 태반 혈관계에 통과시킴으로써 수득할 수 있다. 한 태양에서, 포유동물 태반은 관류 용액을 제동맥 및 제정맥 중 어느 하나 또는 둘 다에 통과시킴으로써 관류시킨다. 태반을 통한 관류 용액의 유동은, 예를 들면, 태반내로의 중력 유동을 이용하여 달성될 수 있다. 바람직하게, 관류 용액은 펌프, 예를 들면, 연동 펌프를 사용하여 강제로 태반을 통과시킨다. 제정맥은, 예를 들면, 멸균 배관과 같은 멸균 연결 장치에 연결된 캐뉼라, 예를 들면, 테플론(TEFLON, 등록상표) 또는 플라스틱 캐뉼라를 사용하여 캐뉼라가 삽입될 수 있다. 멸균 연결 장치는 관류 매니폴드에 연결된다.

[0233] 관류를 위한 준비에 있어, 태반은 바람직하게는 제동맥 및 제정맥이 태반의 최고 지점에 위치하는 방식으로 배향된다. 태반은 태반 혈관계를 통해, 또는 태반 혈관계 및 주위 조직을 통해 관류 용액을 통과시킴으로써 관류될 수 있다. 한 태양에서, 제동맥 및 제정맥은 유연성 연결장치를 통해 관류 용액의 저장기에 연결되는 피펫에 동시에 연결된다. 관류 용액은 제정맥 및 동맥 내로 이동된다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 태반의 주위 조직내로 압출되고/되거나 혈관 벽을 통해 태반의 주위 조직 내로 이동되고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착되었던 태반 표면으로부터 적절한 개방 용기에 수집된다. 관류 용액은 또한 탯줄 개방을 통해 도입되고, 모체 자궁벽과 접하고 있는 태반 벽의 개구부로부터 유출되거나 삼출될 수 있다. 또 다른 태양에서, 관류 용액은 제정맥을 통과하고 제동맥으로부터 수집되거나, 제동맥을 통과하고 제정맥으로부터 수집된다. 즉, 태반 혈관계(태아 조직) 만을 통과한다.

[0234] 한 태양에서, 예를 들어, 제동맥 및 제정맥은, 예를 들면, 유연성 연결장치를 통해 관류 용액의 저장기에 연결된 피펫에 동시에 연결된다. 관류 용액은 제정맥 및 동맥 내로 이동된다. 관류 용액은 혈관 벽으로부터 태반의 주위 조직내로 압출되고/되거나 혈관 벽을 통해 태반의 주위 조직 내로 이동되고, 임신 동안 모체의 자궁에 부착되었던 태반 표면으로부터 적절한 개방 용기에 수집된다. 관류 용액은 또한 제대혈 개방을 통해 도입되고, 모체 자궁벽과 접하고 있는 태반 벽의 개구부로부터 유출되거나 삼출될 수 있다. "팬(pan)" 방법으로도 지칭될 수 있는 상기 방법에 의해 수집되는 태반 세포는 전형적으로 태아 및 모체 세포의 혼합물이다.

[0235] 또 다른 태양에서, 관류 용액은 제정맥을 통과하고 제동맥으로부터 수집되거나, 제동맥을 통과하고 제정맥으로부터 수집된다. "폐쇄 회로" 방법으로 지칭될 수 있는 상기 방법에 의해 수집되는 태반 세포는 전형적으로 거의 전적으로 태아 세포이다.

[0236] 폐쇄 회로 관류 방법은, 한 태양에서, 다음과 같이 수행될 수 있다. 산후 태반은 출산후 약 48 시간 이내에 수득된다. 탯줄은 클램프고정되고 클램프 위로 절단된다. 탯줄은 폐기할 수 있거나, 예를 들면, 제대 줄기 세포를 회수하고/하거나 바이오물질의 생산을 위해 제대막을 가공하기 위해 처리될 수 있다. 양막은 관류시 유지될 수 있거나, 예를 들면, 손가락으로 둔적 박리에 의해 장막으로부터 분리될 수 있다. 약막이 관류 전에 장막으로부터 분리되는 경우, 양막은, 예를 들면, 폐기될 수 있거나, 예를 들면, 효소 절단에 의해 줄기 세포를 수득하기 위해, 또는 예를 들면, 양막 바이오물질, 예를 들어, 미국 특허출원공개 제 2004/0048796 호에 기술된 바이오물질을 생산하기 위해 가공될 수 있다. 예를 들면, 멸균 거즈를 사용하여, 태반에서 모든 가시적인 혈병 및 잔류 혈액을 닦은 후, 예를 들면, 제대막을 부분적으로 절단하여 탯줄의 횡단면을 노출시킴으로써 제대 혈관

을 노출시킨다. 혈관을 확인하고, 예를 들면, 각 혈관의 절단된 말단을 통해 닫힌 악어입 클램프를 전진시킴으로써 개방한다. 이어서, 상기 장치, 예를 들면, 관류 장치 또는 연동 펌프에 연결된 플라스틱 배관을 각각의 태반 동맥 내에 삽입한다. 펌프는 목적에 적합한 임의의 펌프, 예를 들면, 연동 펌프일 수 있다. 멸균 수집 저장기, 예를 들면, 250 mL 수집 주머니와 같은 혈액 주머니에 연결된 플라스틱 배관을 이어서 태반 정맥 내에 삽입한다. 또는, 펌프에 연결된 배관을 태반 정맥 내에 삽입하고, 연결 저장기(들)에 연결된 튜브를 태반 동맥 중 하나 또는 둘 다에 삽입한다. 이어서, 태반을 일정 부피의 관류 용액, 예를 들면, 약 750 ml의 관류 용액으로 관류시킨다. 이어서, 관류액 중의 세포를, 예를 들면, 원심분리에 의해 수집한다.

[0237] 한 태양에서, 근위 탯줄을 관류시 클램프고정하고, 보다 바람직하게는 태반 디스크내 탯줄 삽입부의 4 내지 5 cm(센티미터) 이내에서 클램프고정한다.

[0238] 방혈 과정 동안 포유동물 태반으로부터의 관류 유체의 첫번째 수집물은 일반적으로 제대혈 및/또는 태반 혈액의 잔류 적혈구 세포로 착색된다. 관류 유체는 관류가 진행될 때 더 무색이 되고, 잔류 적혈구 세포는 태반에서 씻어낸다. 일반적으로, 30 내지 100 mL의 관류 유체가 초기에 태반으로부터 혈액을 플러싱하기에 충분하지만, 관찰된 결과에 따라 더 많거나 더 적은 관류 유체를 사용할 수 있다.

[0239] 태반을 관류시키기 위해 사용되는 관류 액체의 부피는 수집될 태반 세포의 수, 태반 크기, 단일 태반으로부터 제조될 수집물의 수 등에 따라 달라질 수 있다. 다양한 태양에서, 관류 액체의 부피는 50 내지 5000 mL, 50 내지 4000 mL, 50 내지 3000 mL, 100 내지 2000 mL, 250 내지 2000 mL, 500 내지 2000 mL, 또는 750 내지 2000 mL일 수 있다. 전형적으로, 태반은 방혈 후에 700 내지 800 mL의 관류 액체를 사용하여 관류된다.

[0240] 태반은 수시간 또는 수일의 과정 동안 여러번 관류될 수 있다. 태반이 여러번 관류될 것인 경우, 태반은 용기 또는 다른 적합한 그릇에서 무균 조건하에서 유지되거나 배양되고, 세포 수집 조성물로, 또는 항응고제(예, 헤파린, 와파린, 나트륨, 쿠마린, 비스하이드록시쿠마린)의 존재 또는 부재하에 및/또는 항미생물제(예를 들면, β-머캅토에탄올(0.1 mM)); 항생물질, 예를 들어, 스트렙토마이신(예를 들면, 40 내지 100 ㎍/ml), 페니실린(예를 들면, 40 U/ml), 암포테리신 B(예를 들면, 0.5 ㎍/ml)의 존재 또는 부재하에 표준 관류 용액(예를 들면, 포스페이트 완충 식염수("PBS")와 같은 표준 식염수 용액)으로 관류시킨다. 한 태양에서, 단리된 태반은 관류액을 수집하지 않고 일정 시간 동안 유지되거나 배양되어, 태반은 관류 및 관류액의 수집 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 시간, 또는 2 또는 3 일 이상 동안 유지되거나 배양된다. 관류된 태반은 1회 이상의 추가 시간(들)동안, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 시간 이상 동안 유지될 수 있으며, 두번째로, 예를 들면, 700 내지 800 mL 관류 유체로 관류된다. 태반은 1, 2, 3, 4, 5회 이상, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6 시간마다 한번씩 관류될 수 있다. 바람직한 태양에서, 태반의 관류, 및 관류 용액, 예를 들어, 태반 세포 수집 조성물의 수집은 회수된 유핵 세포의 수가 100 세포/ml 미만으로 떨어질 때까지 반복된다. 상이한 시점들에서 수득된 관류액들은 세포, 예를 들면, 전체 유핵 세포의 시간-의존성 집단을 회수하기 위해 개별적으로 더 처리될 수 있다. 상이한 시점들로부터 수득된 관류액들은 또한 취합될 수 있다.

[0241] 4.4. 태반 관류액 및 태반 관류액 세포

[0242] 전형적으로, 단일 태반 관류로부터 수득된 태반 관류액은, 그로부터 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 전구 세포 또는 NK 세포가 본원에 개시된 방법에 의해 생성될 수 있는 조혈 세포를 포함하여, 약 100만 내지 약 500만개의 유핵 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 세포는 $CD34^+CD45^-$ 줄기 또는 전구 세포, $CD34^+CD45^+$ 줄기 또는 전구 세포 등을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 관류액 또는 관류액 세포는 그로부터 조혈 세포의 단리 전에 냉동보존된다. 특정한 다른 태양에서, 태반 관류액 또는 관류액 세포는 태아 세포만을 포함하거나 태아 세포와 모체 세포의 혼합물을 포함한다.

[0243] **5. NK 및 NK 전구 세포**

[0244] 5.1. TSNK 세포

[0245] 한 양태에서, 본원에는 본원에 기술된(예를 들면, 단락 2.1 참조) 2-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포인 TSNK 세포가 제공된다. 또한, 본원에는 본원에 기술된 방법(예를 들면, 2-단계 방법)에 의해 생성된 TSNK 세포를 포함하는 세포들의 집단이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 $CD3^-CD56^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 $CD3^-CD56^+CD16^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세

포(예를 들면, TSNK 세포)는 또한 $CD94^{+}CD117^{+}$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 또한 $CD161^{-}$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포(예를 들면, TSNK 세포)는 또한 $NKG2D^{+}$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 또한 $NKp46^{+}$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 또한 $CD226^{+}$이다.

[0246] 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포의 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98% 이상이 $CD56^{+}$ 및 $CD16^{-}$이다. 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%가 $CD3^{-}$ 및 $CD56^{+}$이다. 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 적어도 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60%가 $NKG2D^{+}$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^{+}$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^{+}$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 30%, 20%, 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^{+}$ 및 $CD16^{+}$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%가 $NKp46^{+}$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%가 $CD117^{+}$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%가 $CD94^{+}$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%가 $CD161^{-}$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20%가 $CD226^{+}$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%가 $CD7^{+}$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^{-}$, 56^{+} TSNK 세포의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%가 $CD5^{+}$이다.

[0247] 특정 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD56+ 세포보다 큰 비율의 CD56- 세포를 포함한다. 특정 태양에서, TSNK 세포 집단은 생체내 또는 생체외에서 증가된 비율의 CD56+ 세포를 갖는 집단으로 분화된다.

[0248] 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD117^{+}$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 NKG2D+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKG2D^{+}$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 NKp44+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKp44^{+}$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD52+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD52^{+}$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD52+ CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD244^{+}$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD244+ CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 LFA-1+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 LFA-1+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, TSNK 세포 집단은 CD94+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0249] 다양한 다른 태양에서, TSNK 세포는, 예를 들면, 조직 공급원으로부터 단리되고 증폭되지 않은 NK 세포; 조직 공급원으로부터 단리되고 증폭된 NK 세포, 또는 다른 방법에 의해 생성된 NK 세포, 예를 들면, $CD56^{+}CD16^{+}$ 자연살해 세포와, 예를 들면, 약 1:10, 2:9, 3:8, 4:7:, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 또는 약 9:1의 비로 혼합될 수 있다. 상기 문

맥에서 사용된 바와 같이, "단리된"은 세포가 그의 정상적인 조직 환경으로부터 제거된 것을 의미한다.

[0250] TSNK 세포는 태아 표현형 또는 모체 표현형을 가질 수 있다. 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기에 적합한 조혈 세포의 공급원으로서 산후 태반은 태아로부터 및 모체로부터의 조직 및 세포를 포함하기 때문에, 태반 관류액은 태아 세포만, 또는 실질적인 대부분의 태아 세포(예를 들면, 약 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)를 포함할 수 있거나, 태아 및 모체 세포의 혼합물을 포함할 수 있다(예를 들면, 태아 세포는 관류액의 전체 유핵 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다). 한 태양에서, TSNK 세포는 태아 태반 조혈 세포, 예를 들면, 관류가 실질적인 대부분의, 또는 태아 태반 조혈 세포만을 포함하는 관류액을 생성하는 태반의 폐쇄-회로 관류로부터 수득된 세포 만으로부터 유래된다. 또 다른 태양에서, TSNK 세포는 태아 및 모체 세포, 예를 들면, 관류가 태아 및 모체 태반 세포의 혼합물을 포함하는 관류액을 생성하는 팬 방법(상기 참조)에 의한 관류에 의해 수득된 세포로부터 유래된다. 따라서, 한 태양에서, 본원에는 그의 실질적인 대부분이 태아 표현형을 갖는 태반-유래 중간 자연 살해 세포의 집단이 제공된다. 또 다른 태양에서, 본원에는 태아 표현형을 갖는 자연 살해 세포 및 모체 표현형을 갖는 자연 살해 세포를 포함하는 태반-유래 중간 자연 살해 세포의 집단이 제공된다.

[0251] 또한, 본원에는 본원에 기술된 방법에 의해 생성되지 않은 자연 살해 세포를 포함하는 TSNK 세포의 집단이 제공된다. 예를 들면, 한 태양에서, 본원에는, 예를 들면, 제대혈, 말초혈, 골수 또는 이들중 2개 이상의 조합으로부터 단리된 자연 살해 세포, 또는 본원에 기술된 방법이 아닌 다른 방법에 의해 증폭된 NK 세포를 또한 포함하는 TSNK 세포의 집단이 제공된다. 상기 TSNK 세포의 집단은 TNSK 세포 및 다른 NK 세포를, 예를 들면, 약 1:10, 2:9, 3:8, 4:7:, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 10:1, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 또는 약 1:100 등의 비로 포함할 수 있다.

[0252] 특정 태양에서, 단리된 자연 살해 세포(예를 들면, TSNK 세포), 또는 자연 살해 세포(예를 들면, TSNK 세포)가 농축된 집단은 하나 이상의 기능적으로 적절한 마커, 예를 들면, CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR, 및 활성 수용체의 NKG2 부류(예를 들면, NKG2D)를 검출함으로써 평가할 수 있다. 일부 태양에서, 단리되거나 농축된 자연 살해 세포의 순도는 CD56, CD3 및 CD16 중 하나 이상을 검출함으로써 확인할 수 있다.

[0253] 선택적으로, 단리되거나 농축된 자연 살해 세포의 세포독성 활성은, 예를 들면, 표적 세포로서 종양 세포, 예를 들어, 배양된 K562, LN-18, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1 또는 U266 종양 세포 등을 사용하는 세포독성 분석에서 평가할 수 있다.

[0254] 5.2. <u>NK 전구 세포</u>

[0255] 한 태양에서, 본원에는 단리된 NK 전구 세포 집단이 제공되며, 여기서 상기 NK 전구 세포는 상기 단락 2.2에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된다.

[0256] 한 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단, 예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단과 관련된 CD3-CD56+ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 세포 집단과 관련된 CD3-CD56+ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 CD3-CD56+ 세포를 포함하는 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0257] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포는 또한$CD117^{+}$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^{-}CD56^{+}$ 세포의 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%는

$CD117^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상은 $CD117^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%가 $CD117^+$이다.

[0258] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 또한 CD161+이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75%는 CD161+이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상은 CD161+이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 또는 70% 내지 75%가 CD161+이다.

[0259] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 또한 NKp46+이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상은 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 약 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55%는 $NKp46^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55% 이하가 $NKp46^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90% 이상이 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포의 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 45% 내지 50%, 또는 50% 내지 55%가 $NKp46^+$이다.

[0260] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 $CD56^+CD16^-$인 세포를 함유한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^-$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^+$이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD16^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 또는 20% 내지 25%의 $CD16^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD16^+$ 세포를 포함한다.

[0261] 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 또한 CD16-이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 또한 CD117+ 및 CD161+이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 또한 CD16-, CD117+ 및 CD161+이다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단에서 상기 CD3-CD56+ 세포는 또한 CD16-, CD117+, CD161+, 및 NKp46+이다.

[0262] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 약 40% 이하의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD117+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 CD52+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD52+ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 CD52+ CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD244+ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 CD244+ CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 LFA-1+인 세포를 포함한

다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 LFA-1+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD94+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0263] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD56+ 세포보다 더 큰 비율의 CD56- 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 생체 내 또는 생체외에서 증가된 비율의 CD56+ 세포를 갖는 집단으로 분화한다.

[0264] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD34^-CD117^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD34^-D117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD34^-CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0265] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD161^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD161^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0266] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $NKp46^+$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $NKp46^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0267] 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD56^+CD16-$ 세포의 비율에 비해 낮은 비율의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%의 $CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태

양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50% 이하의 $CD56^+CD16^-$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 0% 내지 5%, 5% 내지 10%, 10% 내지 15%, 15% 내지 20%, 20% 내지 25%, 25% 내지 30%, 30% 내지 35%, 35% 내지 40%, 40% 내지 45%, 또는 45% 내지 50%의 $CD56^+CD16^-$ 세포를 포함한다. 일부 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 1% 이하, 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 10% 이하, 또는 15% 이하의 $CD56^+CD16^-$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0268] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 CD52+CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 조혈 전구 세포 집단과 관련된 $CD52^+CD117^+$ 세포의 비율에 비해 높은 비율의 $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단은 NK 세포 집단과 관련된 $CD52^+CD117^+$ 세포의 비율에 비해 높은 비율의 $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함한다. 예를 들면, NK 전구 세포 집단은 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상의 $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이상의 $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포 집단은 50% 내지 55%, 55% 내지 60%, 60% 내지 65%, 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95% 이상의 $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 총 12일 이상, 13일 이상, 14일 이상, 15일 이상, 16일 이상, 17일 이상, 18일 이상, 19일 이상, 20일 이상, 또는 21일 이상의 배양을 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 총 12일, 13일 또는 14일 이상이지만, 21 내지 25일, 25 내지 30일, 또는 30 내지 35일 이하의 배양을 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다. 특정 태양에서, $CD52^+CD117^+$ 세포를 포함하는 상기 NK 전구 세포 집단은 총 21일의 배양을 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0269] 특정 태양에서, 본원에 기술된 NK 전구 세포는, NK 세포, 예를 들면, 필적하는 방법에 의해 생성된 NK 세포보다 골수를 이식시키는(예를 들면, 생체내에서) 더 큰 능력을 갖는다. 예를 들면, 특정 태양에서, 짧은 제 3 배양 단계, 예를 들면, 4 내지 6, 5 내지 7, 6 내지 8, 또는 7 내지 9 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포는, 더 긴 제 3 배양 단계, 예를 들면, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 또는 21 내지 23 일의 제 3 배양 단계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포보다 높은 효율로 골수를 이식시킨다(예를 들면, 생체내에서). 또 다른 태양에서, 본원에 기술된 NK 전구 세포는 말초혈(PB) 유래 NK 세포보다 긴 텔로미어를 갖는다.

[0270] 5.3. <u>3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포</u>

[0271] 또 다른 태양에서, 본원에는 단리된 NK 세포 집단이 제공되며, 이때 상기 NK 세포는 상기 단락 2.2에 기술된 방법에 따라 생성된다.

[0272] 한 태양에서, 본원에는 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 단리된 NK 세포 집단이 제공되며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 큰 비율의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 65% 내지 70%, 70% 내지 75%, 75% 내지 80%, 80% 내지 85%, 85% 내지 90%, 90% 내지 95%, 또는 95% 내지 99%의 CD3-CD56+ 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 세포 집단은 긴 제 3 배양 단계, 예를 들면, 18 내지 20, 19 내지 21, 20 내지 22, 또는 21 내지 23 일의 제 3 배양 단

계를 포함하는 3-단계 방법을 이용하여 생성된다.

[0273] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD117^+$인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 낮은 비율의 $CD3^-CD56^+CD117^+$ 세포를 포함한다.

[0274] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $CD161^+$인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 낮은 비율의 $CD3^-CD56^+CD161^+$ 세포를 포함한다.

[0275] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 $NKp46^+$인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 큰 비율의 $CD3^-CD56^+NKp46^+$ 세포를 포함한다.

[0276] 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단에서 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 또한 CD16-인 $CD3^-CD56^+$ 세포를 포함하며, 이때 상기 NK 세포 집단은, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, NK 전구 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계가 NK 세포 집단을 생성하기 위해 사용된 제 3 배양 단계보다 짧은 기간을 갖는 것을 제외하고 동일한 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 전구 세포 집단보다 큰 비율의 $CD3^-CD56^+CD16-$ 세포를 포함한다. 또 다른 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포는 말초혈(PB) 유래 NK 세포보다 긴 텔로미어를 갖는다.

[0277] 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD117+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD117^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 NKG2D+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKG2D^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 NKp44+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $NKp44^+$ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD52+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD52^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 세포 집단은 CD52+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD244+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 $CD244^+$ 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 상기 NK 세포 집단은 CD244+CD117+인 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 LFA-1+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 LFA-1+ 세포를 포함한다. 한 태양에서, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포 집단은 CD94+인 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하의 CD94+ 세포를 포함한다.

[0278] 6. 태반 관류액과 함께 NK 및 NK 전구 세포

[0279] 또한 본원에는, 예를 들면, 종양 세포 또는 다수의 종양 세포들의 증식을 억제하는데 사용하기 위한, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 및/또는 부착성 태반 세포와 함께, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 TSNK 세포, NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공된다.

[0280] 6.1. NK 세포와 관류액 또는 관류액 세포의 혼합물

[0281] 또한 본원에는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 혼합물을 포함하는 조성물이 제공된다. 한 태양에서, 예를 들면, 본원에는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단으로 보충된 다량의 태반 관류액이 제공된다. 특정 태양에서, 예를 들면, 태반 관류액의 각각의 밀리리터는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상으로 보충된다. 또 다른 태양에서, 태반 관류액 세포는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단으로 보충된다. 특정한 다른 태양에서, 태반 관류액 세포가 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 혼합될 때, 태반 관류액 세포는 일반적으로 세포 총 수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%를 차지하거나, 대략 그 이상을 차지하거나, 대략 그 미만을 차지한다. 특정한 다른 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이 다수의 태반 관류액 세포 및/또는 혼합된 자연 살해 세포와 혼합되는 경우, NK 세포 또는 NK 세포 집단, 또는 NK 전구 세포 집단은 일반적으로 세포 총 수의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%를 차지하거나, 대략 그 이상을 차지하거나, 대략 그 미만을 차지한다. 특정한 다른 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이 태반 관류액을 보충하기 위해 사용되는 경우, 세포가 현탁되는 용액(예를 들면, 식염수 용액, 배양 배지 등)의 부피는 관류액과 세포를 합한 총 부피의 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% 또는 1%를 차지하거나, 대략 그 이상을 차지하거나, 대략 그 미만을 차지하며, 이때 NK 세포 또는 NK 전구 세포는 보충 전에 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의 세포/mL로 현탁된다.

[0282] 다른 태양에서, 임의의 상기 세포 혼합물은 이어서 제대혈 또는 제대혈로부터 수득된 유핵 세포와 혼합된다.

[0283] 또한 본원에는 2개 이상의 공급원, 예를 들면, 2개 이상의 태반으로부터 수득되고 혼합, 예를 들면, 취합된 취합 태반 관류액이 제공된다. 상기 취합된 관류액은 각 공급원으로부터 대략 동일 부피의 관류액을 포함할 수 있거나, 각 공급원으로부터 상이한 부피를 포함할 수 있다. 각 공급원으로부터의 상대적 부피는 무작위로 선택될 수 있거나, 예를 들면, 하나 이상의 세포 인자, 예를 들어, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬 등의 농도 또는 양; 각 공급원으로부터의 관류액 중 태반 세포의 수; 또는 각 공급원으로부터의 관류액의 다른 특성들을 기준으로 할 수 있다. 동일한 태반의 다중 관류로부터 수득된 관류액도 유사하게 취합할 수 있다.

[0284] 유사하게, 본원에는 2개 이상의 공급원, 예를 들면, 2개 이상의 태반으로부터 수득되고 취합된, 태반 관류액 세포 및 태반-유래 중간 자연 살해 세포가 제공된다. 상기 취합된 세포들은 2개 이상의 공급원으로부터 대략 동일한 수의 세포, 또는 하나 이상의 취합된 공급원으로부터 상이한 수의 세포를 포함할 수 있다. 각 공급원으로부터의 세포들의 상대적 수는, 예를 들면, 취합될 세포중 하나 이상의 특정 세포 유형의 수, 예를 들면, $CD34^=$ 세포의 수 등을 기준으로 선택할 수 있다.

[0285] 또한 본원에는, 예를 들면, 주어진 수의 NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 또는 주어진 부피의 관류액으로부터 예상될 종양 억제 정도 또는 양(즉, 효능)을 측정하기 위해 분석된, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 상기 세포와 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 혼합물이 제공된다. 예를 들면, 세포의 분취량 또는 샘플 수를, 종양 세포가 달리 증식되는 조건하에서 알고 있는 수의 종양 세포와 접촉시키거나 근접시키고, 태반 관류액, 관류액 세포, 태반 자연 살해 세포 또는 그의 혼합물의 존재하에 시간경과 동안(예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

또는 10 주, 또는 그 이상) 종양 세포의 증식 속도를 관류액, 관류액 세포, 태반 자연 살해 세포 또는 그의 혼합물의 부재하에서의 동등한 수의 종양 세포의 증식과 비교한다. 세포의 효능은, 예를 들면, 종양 세포 성장을, 예를 들면, 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 등만큼 억제하는데 필요한 세포의 수 또는 용액의 부피로서 나타낼 수 있다.

[0286] 특정 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 약품 등급의 투여가능한 단위로서 제공된다. 상기 단위는 별개의 부피로, 예를 들면, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 30 nL. 35 mL, 40 mL, 45 mL, 50 mL, 55 mL, 60 mL, 65 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 85 mL, 90 mL, 95 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 250 mL, 300 mL, 350 mL, 400 mL, 450 mL, 500 mL 등으로 제공될 수 있다. 상기 단위는, 다른 NK 세포 또는 관류액 세포와 함께 특정 수의 세포, 예를 들어, NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 예를 들면, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의 세포/mL, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의 세포/단위를 함유하도록 제공될 수 있다. 특정 태양에서, 상기 단위는 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6 이상, 또는 대략 그 이상, 또는 대략 그 이하의 NK 세포 또는 NK 전구 세포/mL, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의 세포/단위를 포함할 수 있다. 상기 단위는 특정 수의 NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단 및/또는 임의의 다른 세포를 함유하도록 제공될 수 있다.

[0287] 상기 태양에서, NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 또는 NK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 다른 NK 세포, 관류액 세포 또는 관류액의 혼합물은 수용체에 대해 자가유래성(즉, 수용체로부터 수득)이거나, 수용체에 대해 동종이계(즉, 상기 수용체와 다른 하나 이상의 개체로부터 수득)일 수 있다.

[0288] 특정 태양에서, 세포의 각각의 단위는, 부피, 세포수, 세포 유형, 단위가 특정 유형의 세포로 농축되었는지 여부, 및/또는 단위내 주어진 수의 세포 또는 단위의 주어진 수의 밀리리터의 효능, 즉, 단위내 세포들이 특정 유형 또는 유형들의 종양 세포의 증식의 측정가능한 억제를 야기하는지 여부 중 하나 이상을 명시하기 위해 표지된다.

[0289] 6.2. <u>NK 세포 또는 NK 전구 세포와 부착성 태반 줄기 세포의 혼합물</u>

[0290] 다른 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은, 단독으로 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 함께, 단리된 부착성 태반 세포, 예를 들면, 본원에 전체로 참고로 인용된 하리리의 미국 특허 제 7,045,148 호 및 제 7,255,879 호 및 미국 특허출원공개 제 2007/027362 호에 기술된 바와 같은 태반 줄기 세포 및 태반 다분화능 세포로 보충된다. "부착성 태반 세포"는 세포가 조직 배양물 표면, 예를 들면, 조직 배양 플라스틱에 부착되는 것을 의미한다. 본원에 개시된 조성물 및 방법에 유용한 부착성 태반 세포는 영양모세포, 배아 생식 세포 또는 배아 줄기 세포가 아니다. 특정 태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 전술한 바와 같은 공정(예를 들면, 2-단계 방법) 동안 배양보조 세포로서 사용된다.

[0291] 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은, 단독으로 또는 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포와 함께, 예를 들면, 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의 부착성 태반 세포/mL, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의 부착성 태반 세포로 보충될 수 있다. 혼합물 중 부착성 태반 세포는, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 또는 40배 집단 배가 또는 그 이상 동안 배양된 부착성 태반 세포일 수 있다.

[0292] 단리된 부착성 태반 세포는, 1차 배양물 중에서 배양되거나 세포 배양물에서 증폭될 때, 조직 배양 기판, 예를 들면, 조직 배양 용기 표면(예를 들면, 조직 배양 플라스틱)에 부착된다. 배양물중 부착성 태반 세포는 일반적으로 중심 세포체로부터 연장되는 많은 세포질 돌기를 갖는 섬유모세포타입의 별모양 외관을 나타낸다. 그러나, 부착성 태반 세포는 섬유모세포보다 더 많은 수의 상기 돌기를 나타내기 때문에, 부착성 태반 세포는

동일한 조건하에서 배양된 섬유모세포와 형태학적으로 구별가능하다. 형태학적으로, 부착성 태반 세포는 또한, 일반적으로 배양물중에서 더 둥글거나 조약돌 형태를 나타내는 조혈 줄기 세포와도 구별가능하다.

[0293] 본원에 기술된 조성물 및 방법에 유용한 단리된 부착성 태반 세포, 및 부착성 태반 세포들의 집단은 세포, 또는 부착성 태반 세포를 포함하는 세포들의 집단을 확인하고/하거나 단리하기 위해 사용될 수 있는 다수의 마커를 발현한다. 본원에 기술된 조성물 및 방법에 유용한 단리된 부착성 태반 세포, 및 부착성 태반 세포 집단은 태반 또는 그의 임의의 부분(예를 들면, 양막, 장막, 양막-장막 판, 태반엽, 탯줄 등)으로부터 직접 수득된 부착성 태반 세포 및 부착성 태반 세포-함유 세포 집단을 포함한다. 한 태양에서, 부착성 태반 줄기 세포 집단은 배양물중 부착성 태반 줄기 세포들의 집단(즉, 2개 이상의), 예를 들면, 용기, 예를 들어, 봉지내의 집단이다.

[0294] 부착성 태반 세포는 일반적으로 마커 CD73, CD105 및 CD200, 및/또는 OCT-4를 발현하고, CD34, CD38 또는 CD45는 발현하지 않는다. 부착성 태반 줄기 세포는 또한 HLA-ABC(MHC-1) 및 HLA-DR을 발현한다. 상기 마커들은 부착성 태반 세포를 확인하고, 다른 세포 유형과 부착성 태반 세포를 구별하기 위해 사용될 수 있다. 부착성 태반 세포는 CD73 및 CD105를 발현할 수 있으므로, 이들은 중간엽 줄기 세포-유사 특징을 가질 수 있다. CD34, CD38 및/또는 CD45의 발현의 결여는 부착성 태반 줄기 세포를 비-조혈 줄기 세포로서 확인시킨다.

[0295] 특정 태양에서, 본원에 기술된 단리된 부착성 태반 세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제한다.

[0296] 특정 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 단리된 태반 줄기 세포이다. 특정한 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 단리된 태반 다분화능 세포이다. 특정 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 유세포분석에 의해 검출할 때 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다분화능 부착성 태반 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형을 갖는 세포, 골형성 표현형을 갖는 세포 또는 연골원 표현형을 갖는 세포로 분화되는 잠재력을 갖는다. 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 또한 $CD200^+$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 보다 특정한 태양에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ $CD90^+$, $CD45^-$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD80^-$ 및 $CD86^-$이다.

[0297] 한 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD200^+$, $HLA\text{-}G^+$이다. 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 배상체(embryoid-like body)의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때 하나 이상의 배상체를 생성한다.

[0298] 또 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$이다. 상기 집단의 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 배상체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때 하나 이상의 배상체를 생성한다.

[0299] 또 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD200^+$, $OCT\text{-}4^+$이다. 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 보다 특정한 태양에

서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 또한 배상체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때 하나 이상의 배상체를 생성한다.

[0300] 또 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 및 $HLA\text{-}G^+$이다. 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 CD34-, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 부착성 줄기 세포는 또한 $CD200^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$, $CD45^-$, $OCT\text{-}4^+$ 및 $CD200^+$이다.

[0301] 또 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD73^+$, $CD105^+$ 줄기 세포이며, 이때 상기 세포는 배상체의 형성을 허용하는 조건하에서 하나 이상의 배상체를 생성한다. 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $OCT\text{-}4^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다.

[0302] 또 다른 태양에서, 부착성 태반 줄기 세포는 $OCT\text{-}4^+$ 줄기 세포이며, 이때 상기 부착성 태반 줄기 세포는 배상체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때 하나 이상의 배상체를 생성하고, 상기 줄기 세포는 암세포 증식 또는 종양 성장을 검출가능하게 억제하는 것으로 확인되었다.

[0303] 다양한 태양에서, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 상기 단리된 부착성 태반 세포는 $OCT\text{-}4^+$이다. 상기 집단의 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$ 및 $CD105^+$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD34^-$, $CD38^-$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 줄기 세포는 $CD200^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 또한 $CD73^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$, $CD38^-$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 부착성 태반 세포는 증폭되었다. 예를 들면, 1회 이상, 3회 이상, 5회 이상, 10회 이상, 15회 이상 또는 20회 이상 계대배양되었다.

[0304] 임의의 상기 태양들의 보다 특정한 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 ABC-p(태반-특이적 ABC 운반체 단백질; 예를 들면, 문헌 [Allikmets *et al.*, *Cancer Res.* 58(23):5337-9 (1998)] 참조)를 발현한다.

[0305] 또 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 $CD29^+$, $CD44^+$, $CD73^+$, $CD90^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD34^-$ 및 $CD133^-$이다. 또 다른 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 구성적으로 IL-6, IL-8 및 단핵구 화학주성 단백질(MCP-1)을 분비한다.

[0306] 상기-언급된 단리된 부착성 태반 세포들 각각은 포유동물 태반으로부터 직접 수득되고 단리된 세포, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30회 이상 배양 및 계대배양된 세포, 또는 그의 혼합물을 포함할 수 있다. 전술한 단리된 부착성 태반 세포의 종양 세포 억제성 다수는 대략, 적어도, 또는 많아야 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의 단리된 부착성 태반 세포를 포함할 수 있다.

[0307] 6.3. <u>부착성 태반 세포 조정 배지를 포함하는 조성물</u>

[0308] 본원에는 또한, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 추가로 조정 배지를 포함하는, 종양 억제성이거나 암 또는 바이러스 감염 치료에 효과적인 조성물의 용도가 제공된다. 본원에 기술된 바와 같은 부착성 태반 세포는, 종양 세포 억제성, 항암 또는 항바이러스성인 조정 배지, 즉, 검출가능한 종양 세포 억제 효과, 항암 효과 또는 항바이러스 효과를 갖는 세포에 의해 분비되거나 배출된 하나 이상의 생체분자를 포함하는 배지를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 다양한 태양에서, 조정 배지는 세포가 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상 동안 증식(즉, 배양)되었던 배지를 포함한다. 다른 태양에서, 조정 배지는 상기 세포가 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%의 컨플루언스(confluence), 또는 100% 이하의 컨플루언스까지 성장되었던 배지를 포함한다. 상기 조정 배지는, 세포, 예를 들면, 태반 세포, 또는 또 다른 종류의 세포의 별개 집단의 배양을 지지하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 태양에서, 본원에 제공된 조정 배지는, 단리된 부착성 태반 세포, 예를 들면, 단리된 부착성 태반 줄기 세포 또는 단리된 부착성 태반 다분화능 세포, 및 단리된 부착성 태반 세포 이외의 다른 세포, 예를 들어, 비-태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포가 배양되었던 배지를 포함한다.

[0309] 상기 조정 배지는, 종양 세포 억제성, 항암성 또는 항바이러스성인 조성물을 제조하기 위해 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 태반 관류액, 태반 관류액 세포 중 어느 하나, 또는 이들의 임의의 혼합물과 혼합될 수 있다. 특정 태양에서, 상기 조성물은 부피 기준으로 절반 미만의 조정 배지, 예를 들면, 부피 기준으로 약 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%, 또는 그 미만의 조정 배지를 포함한다.

[0310] 따라서, 한 태양에서, 본원에는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 단리된 부착성 태반 세포의 배양물로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 상기 단리된 부착성 태반 세포는 (a) 기판에 부착되고; (b) $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$이며; 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 억제하거나, 항암 또는 항바이러스성이다. 특정 태양에서, 단리된 부착성 태반 세포는 유세포분석에 의해 검출할 때 $CD34^-$, $CD10^+$ 및 $CD105^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 태반 줄기 세포이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 다분화능 부착성 태반 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 태반 세포는 신경 표현형을 갖는 세포, 골형성 표현형을 갖는 세포, 또는 연골원 표현형을 갖는 세포로 분화되는 잠재력을 갖는다. 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 또한 $CD200^+$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 단리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 보다 특정한 태양에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 또는 $CD45^-$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD90^+$ 및 $CD45^-$이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ $CD90^+$, $CD45^-$ 부착성 태반 세포는 또한, 유세포분석에 의해 검출할 때, $CD80^-$ 및 $CD86^-$이다.

[0311] 또 다른 태양에서, 본원에는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 단리된 부착성 태반 세포의 배양물로부터의 배양 배지를 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 상기 단리된 부착성 태반 세포는 (a) 기판에 부착되고; (b) CD200 및 HLA-G를 발현하거나, CD73, CD105 및 CD200을 발현하거나, CD200 및 OCT-4를 발현하거나, CD73, CD105 및 HLA-G를 발현하거나, CD73 및 CD105를 발현하고 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배상체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때 상기 집단중에서 하나 이상의 배상체의 형성을 촉진하거나, OCT-4를 발현하고 태반 줄기 세포를 포함하는 태반 세포의 집단이 배상체의 형성을 허용하는 조건하에서 배양될 때 상기 집단중에서 하나 이상의 배상체의 형성을 촉진하며; 상기 조성물은 종양 세포의 성장 또는 증식을 검출가능하게 억제하거나, 항암 또는 항바이러스성이다. 특정 태양에서, 조성물은 또한 다수의 상기 단리된 부착성 태반 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 다수의 비-태반 세포를 포함한다. 보다 특정 태양에서, 상기 비-태반 세포는 $CD34^+$ 세포, 예를 들면, 조혈 전구 세포, 예를 들어, 말초혈 조혈 전구 세포, 제대혈 조혈 전구 세포 또는 태반혈액 조혈 전구 세포를 포함한다. 비-태반 세포는 또한 줄기 세포, 예를 들면, 중간엽 줄기 세포, 예를 들어, 골수-유래 중간엽 줄기 세포를 포함할 수 있다. 비-태반 세포는 또한 성인 세포 또는 세포주의 하나 이상의 유형일 수 있다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 항-증식제, 예를 들면, 항-MIP-1α 또는 항-MIP-1β 항체를 포함한다.

[0312] 특정 태양에서, 전술한 세포 또는 세포 혼합물 중 하나에 의해 조정된 배양 배지는 약 1:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1 또는 약 5:1의 단리된 부착성 태반 세포 대 종양 세포의 비로 다수의 종양 세포와 함께 공-배양된 다수의

단리된 부착성 태반 세포로부터 수득된다. 예를 들면, 조정된 배양 배지 또는 상등액은 약 1 x 10^5의 단리된 부착성 태반 세포, 약 1 x 10^6의 단리된 부착성 태반 세포, 약 1 x 10^7의 단리된 부착성 태반 세포, 또는 약 1 x 10^8 또는 그 이상의 단리된 부착성 태반 세포를 포함하는 배양물로부터 수득될 수 있다. 또 다른 특정 태양에서, 조정된 배양 배지 또는 상등액은 약 1 x 10^5 내지 약 5 x 10^5의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1 x 10^5의 종양 세포; 약 1 x 10^6 내지 약 5 x 10^6의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1 x 10^6의 종양 세포; 약 1 x 10^7 내지 약 5 x 10^7의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1 x 10^7의 종양 세포; 또는 약 1 x 10^8 내지 약 5 x 10^8의 단리된 부착성 태반 세포 및 약 1 x 10^8의 종양 세포를 포함하는 공-배양물로부터 수득된다.

[0313] 7. <u>세포의 보존</u>

[0314] 세포, 예를 들면, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 또는 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포를 포함하는 태반 관류액 세포는 보존될 수 있다. 즉, 장기간 저장을 가능하게 하는 조건하에, 또는 예를 들면, 세포자살 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건하에 놓일 수 있다.

[0315] 태반 관류액은 세포 수집 조성물을 태반의 적어도 일부를 통해, 예를 들면, 태반 혈관계를 통해 통과시킴으로써 생성될 수 있다. 세포 수집 조성물은 관류액내에 함유된 세포를 보존하는 작용을 하는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 상기 태반 세포 수집 조성물은, 본원에 전체로 참고로 인용된 관련된 미국 특허출원공개 제 20070190042 호에 기술된 바와 같이, 세포자살 억제제, 괴사 억제제 및/또는 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함할 수 있다.

[0316] 한 태양에서, 관류액 또는 관류 세포의 집단은, 관류액 또는 세포 집단을 세포자살 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본을 포함하는 세포 수집 조성물과 근접시킴으로써 포유동물, 예를 들면, 인간의 산후 태반으로부터 수집되며, 이때 상기 세포자살 억제제는, 세포자살 억제제와 접촉되거나 근접되지 않은 세포 집단에 비해, 태반 세포, 예를 들면, 부착성 태반 세포, 예를 들어, 태반 줄기 세포 또는 태반 다분화능 세포의 집단에서 세포자살을 감소시키거나 방지하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 존재한다. 예를 들면, 태반은 세포 수집 조성물로 관류될 수 있으며, 그로부터 태반 세포, 예를 들면, 전체 유핵 태반 세포가 단리된다. 특정 태양에서, 세포자살 억제제는 카스파제 억제제이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 세포자살 억제제는 JNK 억제제이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 JNK 억제제는 부착성 태반 세포, 예를 들면, 부착성 태반 줄기 세포 또는 부착성 태반 다분화능 세포의 분화 또는 증식을 조절하지 않는다. 또 다른 태양에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자살 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 별개의 상으로 포함한다. 또 다른 태양에서, 세포 수집 조성물은 상기 세포자살 억제제 및 상기 산소-운반 퍼플루오로카본을 유화액으로 포함한다. 또 다른 태양에서, 세포 수집 조성물은 또한 유화제, 예를 들면, 레시틴을 포함한다. 또 다른 태양에서, 상기 세포자살 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 태반 세포를 세포 수집 조성물과 근접시킬 때 약 0 내지 약 25 ℃이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 세포자살 억제제 및 상기 퍼플루오로카본은 태반 세포를 세포 수집 조성물과 근접시킬 때 약 2 내지 약 10 ℃, 또는 약 2 내지 약 5 ℃이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 근접하게 하는 것은 상기 세포 집단의 수송시에 수행된다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 근접하게 하는 것은 상기 세포 집단의 냉동 및 해동시에 수행된다.

[0317] 또 다른 태양에서, 태반 관류액 및/또는 태반 세포는 수집되고, 관류액 및/또는 세포를 세포자살 억제제 및 장기(organ)-보존 화합물과 근접시킴으로써 보존될 수 있으며, 이때 상기 세포자살 억제제는 세포자살 억제제와 접촉되거나 근접되지 않은 관류액 또는 태반 세포에 비해 세포의 자살을 감소시키거나 방지하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 존재한다. 특정 태양에서, 장기-보존 화합물은 UW 용액(미국 특허 제 4,798,824 호에 기술됨; 비아스판(VIASPAN, 상표)으로도 알려짐; 또한 문헌 [Southard *et al.*, *Transplantation* 49(2):251-257 (1990)] 참조), 또는 스턴(Stern) 등의 미국 특허 제 5,552,267 호에 기술된 용액이며, 이들 문헌은 본원에 전체로 참고로 인용된다. 또 다른 태양에서, 상기 장기-보존 조성물은 하이드록시에틸 전분, 락토비온산, 라피노스 또는 그의 혼합물이다. 또 다른 태양에서, 태반 세포 수집 조성물은 또한 산소-운반 퍼플루오로카본을 2개의 상으로 또는 유화액으로 포함한다.

[0318] 상기 방법의 또 다른 태양에서, 태반 세포는 관류시, 세포자살 억제제 및 산소-운반 퍼플루오로카본, 장기-보존 화합물 또는 그의 혼합물을 포함하는 세포 수집 조성물과 근접된다. 또 다른 태양에서, 태반 세포는 관류에 의

해 수집된 후 상기 세포 수집 화합물과 근접된다.

[0319] 전형적으로, 태반 세포 수집, 농축 및 단리 시에, 저산소증 및 기계적 응력으로 인한 세포 스트레스를 최소화하거나 제거하는 것이 바람직하다. 그러므로, 상기 방법의 또 다른 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 세포 집단은 수집, 농축 또는 단리시 상기 보존중에 6 시간 미만 동안 저산소증 조건에 노출되며, 이때 저산소증 조건은 정상적인 혈중 산소 농도 미만인 산소 농도이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 관류액 또는 태반 세포 집단은 상기 보존중 2 시간 미만 동안 상기 저산소증 조건에 노출된다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 세포 집단은 수집, 농축 또는 단리 시, 1 시간 미만 또는 30분 미만 동안 상기 저산소증 조건에 노출되거나, 저산소증 조건에 노출되지 않는다. 또 다른 특정한 태양에서, 상기 태반 세포 집단은 수집, 농축 또는 단리시 전단 응력에 노출되지 않는다.

[0320] 세포, 예를 들면, 태반 관류액 세포, 조혈 세포, 예를 들어, $CD34^+$ 조혈 줄기 세포; 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단; 본원에 제공된 단리된 부착성 태반 세포는 소형 용기, 예를 들면, 앰플 또는 격막 바이알에, 예를 들면, 냉동보존 배지 중에서 냉동보존될 수 있다. 특정 태양에서, 본원에 제공된 세포는 약 1×10^4 내지 5×10^8 세포/mL의 농도로 냉동보존된다. 특정 태양에서, 본원에 제공된 세포는 약 1×10^6 내지 1.5×10^7 세포/mL의 농도로 냉동보존된다. 보다 특정한 태양에서, 본원에 제공된 세포는 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 1.5×10^7 세포/mL의 농도로 냉동보존된다.

[0321] 적합한 냉동보존 배지로는 표준 식염수, 예를 들면, 성장 배지를 포함하는 배양 배지, 또는 세포 냉동 배지, 예를 들면, 상업적으로 시판하는 세포 냉동 배지, 예를 들어, C2695, C2639 또는 C6039(시그마); 크리오스토르(CryoStor, 등록상표) CS2, 크리오스토르(등록상표) CS5 또는 크리오스토르(등록상표) CS10(바이오라이프 솔루션즈(BioLife Solutions))가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 한 태양에서, 냉동보존 배지는 DMSO(다이메틸설폭사이드)를, 예를 들면, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10%(v/v)의 농도로 포함한다. 냉동보존 배지는 추가의 약제, 예를 들면, 메틸셀룰로스, 덱스트란, 알부민(예, 인간 혈청 알부민), 트레할로스 및/또는 글리세롤을 포함할 수 있다. 특정 태양에서, 냉동보존 배지는 약 1% 내지 10% DMSO, 약 25% 내지 75% 덱스트란 및/또는 약 20 내지 60% 인간 혈청 알부민(HSA)을 포함한다. 특정 태양에서, 냉동보존 배지는 약 1% 내지 10% DMSO, 약 25% 내지 75% 트레할로스 및/또는 약 20 내지 60% 인간 HSA를 포함한다. 특정 태양에서, 냉동보존 배지는 5% DMSO, 55% 덱스트란 및 40% HSA를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 냉동보존 배지는 5% DMSO, 55% 덱스트란(표준 식염수중 10% w/v) 및 40% HSA를 포함한다. 또 다른 특정한 태양에서, 냉동보존 배지는 5% DMSO, 55% 트레할로스 및 40% HSA를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 냉동보존 배지는 5% DMSO, 55% 트레할로스(표준 식염수중 10% w/v) 및 40% HSA를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 냉동보존 배지는 크리오스토르(등록상표) CS5를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 냉동보존 배지는 크리오스토르(등록상표) S10을 포함한다.

[0322] 본원에 제공된 세포는 임의의 다양한 방법에 의해서, 및 세포 배양, 증폭 또는 분화의 임의의 단계에서 냉동보존될 수 있다. 예를 들면, 본원에 제공된 세포는 원래의 조직 또는 장기, 예를 들면, 태반 관류액 또는 제대혈로부터의 단리 직후에, 또는 상기에 개략된 방법들의 제 1 또는 제 2 단계 중에, 또는 그 후에 냉동보존될 수 있다. 특정 태양에서, 조혈 세포, 예를 들면, 조혈 줄기 또는 전구 세포는 원래 조직 또는 장기로부터의 단리 후 약 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 분 이내에 또는 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 또는 24 시간 이내에 냉동보존된다. 특정 태양에서, 상기 세포는 원래 조직 또는 장기로부터 단리 후 1, 2 또는 3 일 이내에 냉동보존된다. 특정 태양에서, 상기 세포는 전술한 바와 같은 제 1 배지에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 동안 배양된 후에 냉동보존된다. 일부 태양에서, 상기 세포는 전술한 바와 같은 제 1 배지에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 동안, 및 전술한 바와 같이 제 2 배지에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 동안 배양된 후에 냉동보존된다. 일부 태양에서, NK 세포 또는 NK 전구 세포가 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 제조되는 경우, 상기 세포는 제 1 배지에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 일 동안 배양되고/되거나; 제 2 배지에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 일 동안 배양되고/되거나; 제 3 배지에서 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 일 동안 배양된 후에 냉동보존된다. 특정 태양에서, NK 전구 세포는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 제조되고, 상기 세포는 제 1 배지에서 9 일 동안 배양된 후; 제 2 배지에서 5 일 동안 배양된

후; 및 제 3 배지에서 7 일 동안 배양된 후에 냉동보존된다.

[0323] 한 양태에서, 본원에는 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포의 집단을 냉동보존하는 방법이 제공된다. 한 태양에서, 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포가 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성하고; (c) 단계 (b)로부터 수득된 NK 세포를 냉동보존 배지에서 냉동보존시킨다. 특정 태양에서, 상기 단계 (c)는 또한, (1) 세포 현탁 용액을 제조하고; (2) 단계 (1)에서 수득된 세포 현탁 용액에 냉동보존 배지를 첨가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하고; (3) 단계 (3)에서 수득된 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하고; (4) 냉동보존된 샘플을 -80 ℃ 이하에서 저장하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이에 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계, 및/또는 단계 (a) 전에 추가의 배양 단계를 포함하지 않는다.

[0324] 또 다른 태양에서, NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포의 집단을 냉동보존하는 상기 방법은 다음을 포함한다: (a) 줄기 세포 인자(SCF), IL-2, 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-15(IL-15) 및 헤파린 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키고(여기서, 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성하고; (c) 단계 (b)로부터 수득된 NK 세포를 냉동보존 배지에서 냉동보존시킨다. 특정 태양에서, 상기 단계 (c)는 또한, (1) 세포 현탁 용액을 제조하고; (2) 단계 (1)에서 수득된 세포 현탁 용액에 냉동보존 배지를 첨가하여 냉동보존된 세포 현탁액을 수득하고; (3) 단계 (3)에서 수득된 냉동보존된 세포 현탁액을 냉각시켜 냉동보존된 샘플을 수득하고; (4) 냉동보존된 샘플을 -80 ℃ 이하에서 저장하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 단계 (a)와 (b) 사이에 및 단계 (b)와 (c) 사이에 중간 단계를 포함하지 않는다.

[0325] 본원에 제공된 세포는 바람직하게는 냉동보존시 자동온도조절 냉동기(controlled-rate freezer)에서, 예를 들면, 약 0.1, 0.3, 0.5, 1 또는 2 ℃/분으로 냉각된다. 바람직한 냉동보존 온도는 약 -80 내지 약 -180 ℃, 바람직하게는 약 -125 내지 약 -140 ℃이다. 냉동보존된 세포는 사용을 위해 해동되기 전에 액체 질소로 옮겨질 수 있다. 일부 태양에서, 예를 들면, 일단 앰플이 약 -90 ℃에 도달하면, 이들은 액체 질소 저장 영역으로 옮겨진다. 냉동보존된 세포는 바람직하게는 약 25 내지 약 40 ℃의 온도, 바람직하게는 약 37 ℃의 온도에서 해동된다. 특정 태양에서, 냉동보존된 세포는 약 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 또는 24 시간 동안, 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 동안 냉동보존된 후에 해동된다. 특정 태양에서, 냉동보존된 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 개월 동안 냉동보존된 후 해동된다. 특정 태양에서, 냉동보존된 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 년 동안 냉동보존된 후에 해동된다.

[0326] 적절한 해동 배지로는 표준 식염수, 예를 들면, 성장 배지를 포함하는 플라스마라이트(plasmalyte) 배양 배지, 예를 들면, RPMI 배지가 포함되나, 이로 한정되지는 않는다. 바람직한 태양에서, 해동 배지는 하나 이상의 배지 보충제(예를 들면, 영양소, 사이토카인 및/또는 인자)를 포함한다. 본원에 제공된 세포를 해동하기에 적합한 배지 보충제로는, 예를 들면, 제한하지 않고, 다음이 포함된다: 혈청, 예를 들어, 인간 혈청 AB, 소 태아 혈청(FBS) 또는 송아지 태아 혈청(FCS), 비타민, 인간 혈청 알부민(HSA), 소 혈청 알부민(BSA), 아미노산(예를 들면, L-글루타민), 지방산(예를 들면, 올레산, 리놀레산 또는 팔미트산), 인슐린(예를 들면, 재조합 인간 인슐린), 트랜스페린(철 포화된 인간 트랜스페린), β-머캅토에탄올, 줄기 세포 인자(SCF), Fms-유사-티로신 키나제 3 리간드(Flt3-L), 사이토카인, 예를 들면, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-15(IL-15), 트롬보포이에틴(Tpo) 또는 헤파린. 특정 태양에서, 본원에 제공된 방법에 유용한 해동 배지는 RPMI를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 해동 배지는 플라스마라이트를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 해동 배지는 약 0.5 내지 20% FBS를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 해동 배지는 약 1, 2, 5, 10, 15 또는 20% FBS를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 해동 배지는 약 0.5% 내지 20% HSA를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 해동 배지는 약 1, 2.5, 5, 10, 15 또는 20% HSA를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 해동 배지는 RPMI 및 약 10% FBS를 포함한다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 해동 배지는 플

라스마라이트 및 약 5% HSA를 포함한다.

[0327] 본원에 제공된 냉동보존 방법은 장기간 저장을 가능하게 하기 위해, 또는 예를 들면, 세포자살 또는 괴사에 의한 세포 사멸을 억제하는 조건하에서 최적화될 수 있다. 한 태양에서, 해동 후 세포는, 예를 들면, 자동 세포 계수기 또는 트리판 블루 방법으로 측정할 때, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%보다 많은 생존 세포를 포함한다. 또 다른 태양에서, 해동 후 세포는 약 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 또는 25%의 사멸 세포를 포함한다. 또 다른 태양에서, 해동 후 세포는 약 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 또는 25%의 조기 자살 세포를 포함한다. 또 다른 태양에서, 해동 후 세포의 약 0.5, 1, 5, 10, 15 또는 20%가, 예를 들면, 세포자살 분석(예를 들면, TO-PRO3 또는 AnnV/PI 아포토시스 분석 키트)에 의해 측정할 때, 해동된 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 또는 28 일 후에 세포자살이 일어난다. 특정 태양에서, 해동 후 세포는 본원에 제공된 방법을 이용하여 배양, 증폭 또는 분화된 후 재-냉동보존된다.

[0328] 8. <u>NK 세포를 포함하는 조성물</u>

[0329] 8.1. <u>TSNK 세포</u>

[0330] 일부 태양에서, 본원에는 단리된 TSNK 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 조성물중 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는 조성물중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%. 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 태양에서, 상기 조성물중 TSNK 세포의 90%, 92%, 94%, 96% 또는 98% 이상이 $CD56^+$ 및 $CD16^-$이다. 다른 태양에서, 상기 조성물중 TSNK 세포의 적어도 80%, 82%, 84%, 86%, 88% 또는 90%가 $CD3^-$ 및 $CD56^+$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 적어도 50%, 52%, 54%, 56%, 58% 또는 60%가 $NKG2D^+$이다. 다른 태양에서, 상기 세포의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 또는 3% 미만이 $NKB1^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $NKAT2^+$이다. 특정한 다른 태양에서, 상기 TSNK 세포의 10%, 8%, 6%, 4% 또는 2% 미만이 $CD56^+$ 및 $CD16^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65% 또는 70%가 $NKp46^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 85%가 $CD117^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 또는 45%가 $CD94^+$이다. 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 10%, 12%, 14%, 16%, 18% 또는 20%가 $CD226^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40%가 $CD7^+$이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 $CD3^-$, $CD56^+$ TSNK 세포의 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60%가 $CD5^+$이다.

[0331] 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ TSNK 세포는 단일 개체로부터 수득된다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 $CD56^+$, $CD16^-$ 자연 살해 세포(TSNK 세포)는 둘 이상의 상이한 개체로부터 수득된 자연 살해 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 TSNK 세포는, 상기 TSNK 세포가 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 즉, TSNK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 하기에 기술된 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0332] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0333] 보다 특정한 태양에서, 조성물은 TSNK 세포, 및 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 태양에서, TSNK 세포는 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 자연 살해 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95,

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

[0334] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 TSNK 세포, 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 TSNK 세포와 동일한 개체로부터 수득된다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 TSNK 세포와 상이한 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 태반 관류액 중의 세포의 전부 또는 실질적으로 전부(예를 들면, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정 태양에서, 상기 태반 관류액중의 태아 세포는 상기 관류액중의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하도록 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기 단락 2.1.1에 기술된 면역조절 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0335] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 TSNK 세포 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 TSNK 세포와 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 TSNK 세포와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 이때 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 둘 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 둘 이상의 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0336] 8.2. <u>3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포</u>

[0337] 일부 태양에서, 본원에는, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 전구 세포 집단을 포함하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 조성물중 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단은 조성물중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%. 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포 집단중 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하가 $CD3^-CD56^+$ 세포이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이 $CD117^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상이 $CD161^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하가 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, $CD3^-CD56^+$ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55% 이하가 $NKp46^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^-$이다.

[0338] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 전구 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 NK 전구 세포는 둘 이상의 상이한 개체로부터 수득된 NK 전구 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 전구 세포는 NK 전구 세포를 사용하여 치료하고자 하는 개체와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 전구 세포는, 상기 NK 전구 세포가 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 즉, NK 전구 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 하기에 기술된 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0339] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0340] 보다 특정한 태양에서, 조성물은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 전구 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 조성물 중 NK 전구 세포 집단은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 전구 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0341] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 전구 세포 집단, 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 전구 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 전구 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 태반 관류액 중의 세포의 전부 또는 실질적으로 전부(예를 들면, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액중의 태아 세포는 상기 관류액중의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하도록 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기에 기술된 면역조절 화합물, 예를 들어, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0342] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 NK 전구 세포 집단 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 전구 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 전구 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 이때 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 둘 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 둘 이상의 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0343] 8.3. <u>3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포</u>

[0344] 일부 태양에서, 본원에는, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 단리된 NK 세포 집단을 포함하는 조성물, 예를 들면, 약학 조성물이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조혈 세포, 예를 들면, 태반 관류액, 제대혈 및/또는 말초혈로부터 단리된 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 생성된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물중 세포의 50% 이상을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 세포 집단은 조성물중 세포의 적어도 80%, 85%, 90%. 95%, 98% 또는 99%를 차지한다. 특정 태양에서, 상기 단리된 NK 세포 집단중 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% 또는 40% 이하가 $CD3^-CD56^+$ 세포이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상이 $CD117^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상이 $CD161^+$이다. 특정 태양에서, $CD3^-CD56^+$ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% 또는 90% 이하가 $NKp46^+$이다. 보다 특정한 태양에서, $CD3^-CD56^+$ 세포의 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% 또는 55% 이하가 $NKp46^+$이다. 특정 태양에서, 상기 $CD3^-CD56^+$ 세포는 $CD16^-$이다.

[0345] 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 세포는 단일 개체로부터 수득된 것이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 NK 세포는 둘 이상의 상이한 개체로부터 수득된 NK 세포를 포함한다. 또 다른 특정 태

양에서, 상기 조성물 중 상기 단리된 NK 세포는 NK 세포를 사용하여 치료하고자 하는 개체와 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 NK 세포는, 상기 NK 세포가 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되지 않은 동등한 수의 자연 살해 세포, 즉, NK 세포보다 검출가능하게 더 많은 그랜자임 B 또는 퍼포린을 발현하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 상기 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 또한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 포함한다. 특정 태양에서, 면역조절 화합물은 하기에 기술된 화합물, 예를 들면, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물이다.

[0346] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0347] 보다 특정한 태양에서, 조성물은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포를 포함한다. 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 태반 혈액 및/또는 제대혈이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 다른 공급원은 말초혈이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 조성물중 NK 세포 집단은 또 다른 공급원으로부터 수득되거나 또 다른 방법에 의해 제조된 NK 세포와, 약 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45: 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 등의 비로 혼합된다.

[0348] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단, 및 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 상기 NK 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 태반 관류액 중의 세포의 전부 또는 실질적으로 전부(예를 들면, 90%, 95%, 98% 또는 99% 이상)는 태아 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 태반 관류액 또는 태반 관류액 세포는 태아 및 모체 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액중의 태아 세포는 상기 관류액중의 세포의 약 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만을 차지한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 태반 혈관계를 통해 0.9% NaCl 용액을 통과시켜 수득된다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 배양 배지를 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 관류액은 적혈구를 제거하도록 처리되었다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물, 예를 들면, 하기에 기술된 면역조절 화합물, 예를 들어, 아미노-치환된 이소인돌린 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0349] 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 NK 세포 집단, 및 태반 관류액 세포를 포함한다. 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 동일한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액 세포는 상기 NK 세포 집단과 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 단리된 태반 관류액 및 단리된 태반 관류액 세포를 포함하며, 이때 상기 단리된 관류액 및 상기 단리된 태반 관류액 세포는 상이한 개체로부터 수득된 것이다. 태반 관류액을 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 태반 관류액은 둘 이상의 개체로부터 수득된 태반 관류액을 포함한다. 태반 관류액 세포를 포함하는 임의의 상기 태양들의 또 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 단리된 태반 관류액 세포는 둘 이상의 개체로부터 수득된 것이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 조성물은 면역조절 화합물을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 조성물은 또한 하나 이상의 항암 화합물, 예를 들면, 하나 이상의 하기에 기술된 항암 화합물을 포함한다.

[0350] 9. <u>TSNK 세포 및 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 및 NK 전구 세포의 용도</u>

[0351] 본원에 제공된, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 암을 갖는 개체, 예를 들면, 고형 종양 세포 및/또는 혈액암 세포를 갖는 개체, 또는 바이러스 감염을 갖는 개인을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 상기 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포의 효과적인 투여량은 1×10^4 내지 5×10^4, 5×10^4 내지 1×10^5, 1×10^5 내지 5×10^5, 5×10^5 내지 1×10^6, 1×10^6 내지 5×10^6, 5×10^6 내지 1×10^7 이상 세포/체중 kg의 범위이다. 본원에 제공된, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 또한 종양 세포의 증식을 억제하는 방법에 사용될 수

있다.

[0352] 9.1. 암을 갖는 개체의 치료

[0353] 한 태양에서, 본원에는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단의 치료 효과량을 암을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 암, 예를 들면, 혈액암 또는 고형 종양을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 개체는 자연 살해 세포 결핍, 예를 들면, 개체의 암에 대해 활성인 NK 세포의 결핍을 갖는다. 특정 태양에서, 상기 방법은 또한, 상기 개체에게 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포, 예를 들면, 치료 효과량의 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 방법은 또한, 상기 개체에게 효과량의 면역조절 화합물, 예를 들면, 전술한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 투여하는 것을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "효과량"은, 예를 들면, 상기 개체가 앓고 있는 암의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 그의 진행의 감소, 또는 그의 제거를 야기하는 양이다.

[0354] 특정 태양에서, 암은 혈액암, 예를 들면, 백혈병 또는 림프종이다. 보다 특정한 태양에서, 암은 급성 백혈병, 예를 들면, 급성 T 세포 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수모구성 백혈병, 급성 거핵모구성 백혈병, 전구체 B 급성 림프모구성 백혈병, 전구체 T 급성 림프모구성 백혈병, 버킷(Burkitt) 백혈병(버킷 림프종) 또는 급성 혼합형 백혈병; 만성 백혈병, 예를 들면, 만성 골수성 림프종, 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 단핵구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소림프구성 림프종 또는 B-세포 전림프구성 백혈병; 모발성 세포 림프종; T-세포 전림프구성 백혈병; 또는 림프종, 예를 들면, 조직구성 림프종, 림프형질세포성 림프종(예를 들면, 발덴스트롬(Waldenstrom) 거대글로불린혈증), 비장 변연부 림프종, 형질세포 신생물(예를 들면, 형질 세포 골수종, 형질세포종, 단클론성 면역글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 결절외 변연부 B 세포 림프종(MALT 림프종), 결절 변연부 B 세포 림프종(NMZL), 소포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 종격(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 원발성 삼출성 림프종, T 세포 거대 과립성 림프구성 백혈병, 침습성 NK 세포 백혈병, 성인 T 세포 백혈병/림프종, 비강형 결절외 NK/T 세포 림프종, 장병증-유형 T 세포 림프종, 간비장 T 세포 림프종, 모세포성 NK 세포 림프종, 균상 식육종(시자리(Sezary) 증후군), 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프증식성 질환(예를 들면, 원발성 피부 역형성 거대 세포 림프종 또는 림프종모양 구진증), 혈관면역모세포성 T 세포 림프종, 상세불명의 주변 T 세포 림프종, 역형성 거대 세포 림프종, 호지킨(Hodgkin) 림프종 또는 결절성 림프구-우세형 호지킨 림프종이다. 또 다른 특정 태양에서, 암은 다발성 골수종 또는 골수이형성 증후군이다.

[0355] 어떤 다른 특정 태양에서, 암은 고형 종양, 예를 들면, 암종, 예를 들어, 선암, 부신피질암, 결장 선암, 대장 선암, 대장암, 관상세포암, 폐암, 갑상선암, 비인두암, 흑색종(예를 들면, 악성 흑색종), 비-흑색종 피부암, 또는 상세불명 암; 유건종; 결합조직형 소원형 세포 종양; 내분비 종양; 유잉(Ewing) 육종; 생식세포 종양(예를 들면, 고환암, 난소암, 융모암, 내배엽동 종양, 배아세포종 등); 간모세포종; 간세포암; 신경모세포종; 비-횡문근육종 연조직 육종; 골육종; 망막모세포종; 횡문근육종; 또는 빌름스(Wilms) 종양이다. 또 다른 태양에서, 고형 종양은 췌장암 또는 유방암이다. 다른 태양에서, 고형 종양은 청신경초종; 성상세포종(예를 들면, 등급 I 모양세포성 성상세포종, 등급 II 저등급 성상세포종; 등급 III 역형성 성상세포종; 또는 등급 IV 다형성 교모세포종); 척색종; 두개인두종; 신경교종(예를 들면, 뇌간 신경교종: 상의세포종; 혼합형 신경교종: 시신경교종; 또는 상의하세포종); 교모세포종; 수모세포종; 뇌수막종; 전이성 뇌종양; 핍지교종; 송과체모세포종; 뇌하수체 종양; 원시 신경외배엽성 종양; 또는 슈반종(schwannoma)이다. 또 다른 태양에서, 암은 전립선암이다.

[0356] 특정 태양에서, 암, 예를 들면, 혈액암 또는 고형 종양을 갖는 개체, 예를 들면, 자연 살해 세포의 결핍을 갖는 개체는 상기 투여 전에 골수 이식을 받은 개체이다. 특정 태양에서, 골수 이식은 상기 암의 치료에서의 이식이었다. 특정한 다른 태양에서, 골수 이식은 상기 암이 아닌 다른 질병의 치료에서의 이식이었다. 특정 태양에서, 개체는 상기 골수 이식 이외에 면역억제제를 투여받았다. 특정 태양에서, 골수 이식을 받은 개체는 상기 투여시에 이식편-대-숙주 질환(GVHD)의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 특정한 다른 태양에서, 골수 이식을 받은 개체는 이식편-대-숙주 질환(GVHD)의 증상이 나타나기 전에 상기 세포를 투여받는다.

[0357] 어떤 특정한 태양에서, 암, 예를 들어, 혈액암을 갖는 개체는 상기 투여 전에 하나 이상의 용량의 TNFα 억제제, 예를 들면, 에타너셉트(ETANERCEPT, 등록상표)(엔브렐(Enbrel))를 투여받았다. 특정 태양에서, 상기 개체는 상기 암 진단후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 개월 이내에 상기 용량의 TNFα 억제제를 투여받았다. 특정 태양에서, 한 용량의 TNFα 억제제를 투여받았던 개체는 급성 골수성 백혈병을 나타낸다.

보다 특정한 태양에서, 한 용량의 TNFα 억제제를 투여받았었고 급성 골수성 백혈병을 나타내는 개체는 또한 혈액 세포에서 5번 염색체 장완(long arm)의 결실을 나타낸다. 또 다른 태양에서, 암, 예를 들어, 혈액암을 갖는 개체는 필라델피아(Philadelphia) 염색체를 나타낸다.

[0358] 특정한 다른 태양에서, 상기 개체에서, 암, 예를 들면, 혈액암 또는 고형 종양은 하나 이상의 항암 약물에 저항적이다. 특정 태양에서, 암은 글리벡(GLEEVEC, 등록상표)(이마티닙 메실레이트)에 저항적이다.

[0359] 특정 태양에서, 상기 개체에서, 암, 예를 들면, 혈액암은 하나 이상의 항암 약물에 반응하며; 상기 태양에서, 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 자연 살해 세포, 예를 들면, 태반 자연 살해 세포, 예를 들어, 태반-유래 중간 자연 살해 세포, 단리된 혼합 자연 살해 세포, 또는 본원에 기술된 TSNK, NK 전구 세포 또는 NK 세포, 및/또는 그의 혼합물, 및 선택적으로 면역조절 화합물이 보조 치료제로서 또는 상기 항암 약물과의 병용 치료로서 첨가된다. 특정한 다른 태양에서, 암, 예를 들어, 혈액암을 갖는 개체는 하나 이상의 항암 약물로 치료받았었으며, 상기 투여 전에 재발되었다. 특정 태양에서, 치료될 개체는 난치성 암을 갖는다. 한 태양에서, 본원에 기술된 세포를 사용한 암 치료 방법은 암의 재발을 방지한다(예를 들면, 예방 또는 지연). 한 태양에서, 본원에 기술된 암 치료 방법은 1 개월 이상, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 개월 이상, 1년 이상, 2년 이상, 3년 이상 또는 4년 이상 동안 암의 관해를 야기한다.

[0360] 한 태양에서, 본원에는, 개체에게 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; 및 (3) 상기 개체에서 다발성 골수종을 치료하기에 효과적인, 증폭된 NK 세포를 투여하는 것을 포함하는, 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기 위한, 본원에 기술된 방법들 중 임의의 방법에 의해 생성된 것이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 증폭되었던 것이다. 또 다른 태양에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란 및/또는 NK 세포는 서로와 별도로 투여된다. 다발성 골수종을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된다: 줄기 세포 인자(SCF), IL-2, 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-15(IL-15) 및 헤파린 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키고(여기서, 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 단계 (a)에서 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시킨다.

[0361] 또 다른 태양에서, 본원에는, 개체에서 AML을 치료하기에 효과적인, 증폭된 NK 세포(선택적으로 IL2 및 IL12 및 IL18, IL12 및 IL15, IL12 및 IL18, IL2 및 IL12 및 IL15 및 IL18, 또는 IL2 및 IL15 및 IL18을 사용한 전처리에 의해 활성화된)를 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 급성 골수성 백혈병(AML)을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기 위한, 또는 3-단계 방법을 이용하여 NK 세포 집단을 생성하기 위한, 본원에 기술된 방법들 중 임의의 방법에 의해 생성된 것이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 증폭되었던 것이다. AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 활성화 자연 살해(NK) 세포의 집단을 생성하는 2-단계 방법에 의해 생성되며, 이때 상기 방법의 제 1 단계는 줄기 세포 인자(SCF), 인터루킨-7(IL-7) 및 인터루킨-15(IL-15) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키는 것을 포함하고(여기서, 상기 SCF, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 상기 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포의 집단 내의 다수의 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 상기 방법의 제 2 단계는 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 제 1 단계로부터 수득된 세포를 증폭시켜 활성화 NK 세포를 생성하는 것을 포함한다. AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정 태양에서, 상기 NK 세포 집단은 본원에 기술된 바와 같은 3-단계 방법에 의해 생성된다. 특정한 태양에서, 상기 방법들에 의해 치료될 AML은 난치성 AML, 불량-예후 AML 또는 소아 AML을 포함한다. 난치성 AML, 불량-예후 AML 또는 소아 AML의 치료를 위해 NK 세포를 투여하기 위한 당해 분야에 공지된 방법은 상기 목적을 위해 변형될 수 있다(예를 들면, 각각 본원에 전체로 참고로 인용된 문헌 [Miller et al., 2005, Blood 105:3051-3057; Rubnitz et al., 2010, J Clin Oncol. 28:955-959] 참조).

[0362] AML을 갖는 개체를 치료하는 방법의 다른 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된다: (a) 인터루킨-15(IL-15), 및 선택적으로, 줄기 세포 인자(SCF) 및 인터루킨-7(IL-7) 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지(여기서, 상기 IL-15 및 선택적 SCF 및 IL-7은 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않는다)에 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 접종하여, 상기 집단이 증폭되고, 상기 조혈 줄기 또는 전구 세포

의 집단 내의 다수의 조혈 줄기 세포 또는 전구 세포가 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화되게 하고; (b) 단계 (a)로부터 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포의 집단을 생성한다.

[0363] 또 다른 태양에서, 본원에는, 개체에게 치료 효과적 용량의 (1) 레날리도마이드; (2) 멜팔란; (3) 플루다라빈; 및 (4) 상기 개체에서 CLL을 치료하기에 효과적인, 증폭된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포를 투여하는 것을 포함하는, 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 제대혈 NK 세포, 또는 제대혈 조혈 줄기 세포로부터 생성된 NK 세포이다. 또 다른 태양에서, 상기 NK 세포는 NK 세포를 생성하기 위한, 예를 들면, TSNK 세포를 생성하기 위한, 본원에 기술된 방법들 중 임의의 방법에 의해 생성된 것이다. 임의의 상기 방법들의 특정 태양에서, 상기 NK 세포는 상기 투여 전에 10일 이상 동안 증폭되었던 것이다. 임의의 상기 방법의 특정 태양에서, 상기 레날리도마이드, 멜팔란, 플루다라빈 및/또는 증폭된 NK 세포는 별도로 상기 개체에게 투여된다. CLL을 갖는 개체를 치료하는 방법의 어떤 특정한 태양에서, 상기 NK 세포는 다음을 포함하는 방법에 의해 생성된다: 줄기 세포 인자(SCF), IL-2, 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-15(IL-15) 및 헤파린 중 하나 이상을 포함하는 제 1 배지에서 조혈 줄기 또는 전구 세포의 집단을 증폭시키고 (여기서, 상기 SCF, IL-2, IL-7 및 IL-15는 상기 배지의 규정되지 않은 성분내에 포함되지 않고, 조혈 줄기 또는 전구 세포의 상기 집단 내의 다수의 조혈 줄기 또는 전구 세포는 상기 증폭 동안 NK 세포로 분화된다); 단계 (a)에서 수득된 세포를 인터루킨-2(IL-2)를 포함하는 제 2 배지에서 증폭시켜 활성화 NK 세포를 생성한다.

[0364] 9.2. <u>종양 세포 증식의 억제</u>

[0365] 본원에는 또한, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구세포 집단을 종양 세포와 근접시키는, 예를 들면, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들어, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 세포의 증식을 억제하는 방법이 제공된다. 선택적으로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포는 종양 세포 및/또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 근접된다. 또 다른 특정 태양에서, 면역조절 화합물, 예를 들면, 전술한 면역조절 화합물, 또는 탈리도마이드가 또한 종양 세포 및/또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 근접되어, 종양 세포의 증식이 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 근접되지 않은 동일 유형의 종양 세포에 비해 검출가능하게 감소된다. 선택적으로, 단리된 태반 관류액 또는 단리된 태반 관류액 세포는, 면역조절 화합물과 접촉되거나 근접된, 종양 세포 및/또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 근접된다.

[0366] 본원에서 사용된 바와 같이, 특정 태양에서, 세포와 관련하여 "접촉시키는"은, 한 태양에서, 직접적인 물리적 접촉, 예를 들면, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 자연 살해 세포, 예를 들어, TSNK 세포, 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및/또는 단리된 혼합 자연 살해 세포와 종양 세포 사이의 세포-세포 접촉을 포함한다. 또 다른 태양에서, "접촉시키는"은 동일한 물리적 공간에서의 존재를 포함한다. 예를 들면, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 자연 살해 세포, 예를 들어, 태반 중간 자연 살해 세포, 본원에 기술된 자연 살해 세포, 예를 들어, TSNK 세포, 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및/또는 단리된 혼합 자연 살해 세포가 종양 세포와 동일한 용기(예를 들면, 배양 접시, 다중웰 플레이트)에 위치한다. 또 다른 태양에서, 태반 관류액, 태반 관류액 세포, 혼합된 자연 살해 세포, 태반 중간 자연 살해 세포, 또는 본원에 기술된 자연 살해 세포, 예를 들어, TSNK 세포, 본원에 기술된 3-단계 방법에 따라 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과, 종양 세포를 "접촉시키는" 것은, 예를 들면, 태반 관류액 또는 세포, 예를 들면, 태반 관류액 세포, 혼합 자연 살해 세포 또는 자연 살해 세포, 예를 들어, 태반 중간 자연 살해 세포를, 개체, 예를 들면, 종양 세포를 함유하는 인간, 예를 들면, 암 환자에게 주사 또는 주입함으로써 달성된다. 면역조절 화합물 및/또는 탈리도마이드의 맥락에서, "접촉시키는"은, 예를 들면, 세포와 면역조절 화합물 및/또는 탈리도마이드가 서로와 직접 물리적으로 접촉하거나, 동일한 물리적 부피(예를 들면, 세포 배양 용기 또는 개체) 내에 위치하는 것을 의미한다.

[0367] 특정 태양에서, 종양 세포는 혈액암 세포, 예를 들면, 백혈병 세포 또는 림프종 세포이다. 보다 특정한 태양에서, 암은 급성 백혈병, 예를 들면, 급성 T 세포 백혈병 세포, 급성 골수성 백혈병(AML) 세포, 급성 전골수성 백혈병 세포, 급성 골수모구성 백혈병 세포, 급성 거핵모구성 백혈병 세포, 전구체 B 급성 림프모구성 백혈병 세포, 전구체 T 급성 림프모구성 백혈병 세포, 버킷 백혈병(버킷 림프종) 세포 또는 급성 혼합형 백혈병 세포; 만

성 백혈병 세포, 예를 들면, 만성 골수성 림프종 세포, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포, 만성 단핵구성 백혈병 세포, 만성 림프구성 백혈병(CLL)/소림프구성 림프종 세포 또는 B-세포 전림프구성 백혈병 세포; 모발성 세포 림프종 세포; T-세포 전림프구성 백혈병 세포; 또는 림프종 세포, 예를 들면, 조직구성 림프종 세포, 림프형질세포성 림프종 세포(예를 들면, 발덴스트롬 거대글로불린혈증 세포), 비장 변연부 림프종 세포, 형질세포 신생물 세포(예를 들면, 형질 세포 골수종 세포, 형질세포종 세포, 단클론성 면역글로불린 침착 질환, 또는 중쇄 질환), 결절외 변연부 B 세포 림프종(MALT 림프종) 세포, 결절 변연부 B 세포 림프종(NMZL) 세포, 소포성 림프종 세포, 외투 세포 림프종 세포, 미만성 거대 B 세포 림프종 세포, 종격(흉선) 거대 B 세포 림프종 세포, 혈관내 거대 B 세포 림프종 세포, 원발성 삼출성 림프종 세포, T 세포 거대 과립성 림프구성 백혈병 세포, 침습성 NK 세포 백혈병 세포, 성인 T 세포 백혈병/림프종 세포, 비강형 결절외 NK/T 세포 림프종 세포, 장병증-유형 T 세포 림프종 세포, 간비장 T 세포 림프종 세포, 모세포성 NK 세포 림프종 세포, 균상 식육종(시자리 증후군), 원발성 피부 CD30-양성 T 세포 림프증식성 질환(예를 들면, 원발성 피부 역형성 거대 세포 림프종 또는 림프종모양 구진증) 세포, 혈관면역모세포성 T 세포 림프종 세포, 상세불명의 주변 T 세포 림프종 세포, 역형성 거대 세포 림프종 세포, 호지킨 림프종 세포 또는 결절성 림프구-우세형 호지킨 림프종 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 종양 세포는 다발성 골수종 세포 또는 골수이형성 증후군 세포이다.

[0368] 특정 태양에서, 종양 세포는 고형 종양 세포, 예를 들면, 암종 세포, 예를 들어, 선암 세포, 부신피질암 세포, 결장 선암 세포, 대장 선암 세포, 대장암 세포, 관상세포암 세포, 폐암 세포, 갑상선암 세포, 비인두암 세포, 흑색종 세포(예를 들면, 악성 흑색종 세포), 비-흑색종 피부암 세포, 또는 상세불명 암 세포; 유건종 세포; 결합조직형 소원형 세포 종양 세포; 내분비 종양 세포; 유잉 육종 세포; 생식세포 종양 세포(예를 들면, 고환암 세포, 난소암 세포, 융모암 세포, 내배엽동 종양 세포, 배아세포종 세포 등); 간모세포종 세포; 간세포암 세포; 신경모세포종 세포; 비-횡문근육종 연조직 육종 세포; 골육종 세포; 망막모세포종 세포; 횡문근육종 세포; 또는 빌름스 종양 세포이다. 또 다른 태양에서, 종양 세포는 췌장암 세포 또는 유방암 세포이다. 다른 태양에서, 고형 종양 세포는 청신경초종 세포; 성상세포종 세포(예를 들면, 등급 I 모양세포성 성상세포종 세포, 등급 II 저등급 성상세포종 세포; 등급 III 역형성 성상세포종 세포; 또는 등급 IV 다형성 교모세포종 세포); 척색종 세포; 두개인두종 세포; 신경교종 세포(예를 들면, 뇌간 신경교종 세포: 상의세포종 세포; 혼합형 신경교종 세포: 시신경교종 세포; 또는 상의하세포종 세포); 교모세포종 세포; 수모세포종 세포; 뇌수막종 세포; 전이성 뇌종양 세포; 핍지교종 세포; 송과체모세포종 세포; 뇌하수체 종양 세포; 원시 신경외배엽성 종양 세포; 또는 슈반종 세포이다. 또 다른 태양에서, 종양 세포는 전립선암 세포이다.

[0369] 본원에서 사용된 바와 같이, "치료적으로 유리한" 및 "치료적 이점"으로는, 예를 들면, 종양 크기의 감소; 종양 확장의 감소 또는 정지; 전이성 질환의 감소 또는 예방; 단위 부피당, 조직 샘플, 예를 들면, 혈액 샘플중 암세포 수의 감소; 상기 개체가 갖는 특정 암 또는 종양의 임의의 증상에서의 임상적 개선; 개체가 갖는 특정 암의 임의의 증상의 악화의 감소 또는 정지 등이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다.

[0370] 9.3. <u>NK 세포, NK 세포 집단 및 NK 전구 세포 집단, 및 다른 항암제를 사용한 암 치료</u>

[0371] 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 사용하여 암을 갖는 개체를 치료하는 것은 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 치료 요법의 일부일 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 사용하여 암을 갖는 개체를 치료하는 것은 하나 이상의 다른 항암제를 포함하는 항암 치료를 보조하기 위해 이용될 수 있다. 상기 항암제는 당해 분야에 공지되어 있다. 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 선택적으로 관류액, 관류액 세포, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단 이외의 다른 자연 살해 세포 이외에, 암을 갖는 개체, 예를 들면, 종양 세포를 갖는 개체에게 투여될 수 있는 특정 항암제로는 다음이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다: 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 아드리아마이신; 아드루실; 알데스류킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제(예를 들면, 에르위니아 크리산(Erwinia chrysan); 에르위나제(Erwinaze)로부터의); 아스페를린; 아바스틴(베바시주맙); 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타미드; 비산트렌 하이드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 나트륨; 브로피리민; 부설판; 칵티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀골; 셀레콕시브(COX-2 억제제); 세루비딘(Cerubidine); 클로람부실; 시롤레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나

톨 메실레이트; 사이클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 덱소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지퀸; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미틴 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엘스파르(Elspar); 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르불로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 나트륨; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토포포스(Etopophos); 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티나이드; 플록스우리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 나트륨; 겜시타빈; 겜시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다마이신(Idamycin); 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 이프로플라틴; 이리노테칸; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오티드 아세테이트; 레트로졸; 류프롤라이드 아세테이트; 리아로졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 나트륨; 로무스틴; 로소잔트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로레타민 하이드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가릴; 머캅토푸린; 메토트렉세이트; 메토트렉세이트 나트륨; 메토프린; 메투레데파; 미틴도마이드; 미토카르신; 미토크로민; 미토질린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토테인; 미토잔트론 하이드로클로라이드; 미코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가세; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 설페이트; 퍼포스파미드; 피포브로만; 피포설판; 피로잔트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카바진 하이드로클로라이드; 프로류킨(Proleukin); 푸리네톨(Purinethol); 푸로마이신; 푸로마이신 하이드로클로라이드; 피라조푸린; 류마트렉스(Rheumatrex); 리보프린; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 나트륨; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 술로페누르; 타블로이드(Tabloid); 탈리소마이신; 테코갈란 나트륨; 탁소테어; 테가푸르; 텔로잔트론 하이드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토포사르(Toposar); 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트렉살(Trexall); 트리시리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토렐린; 튜불로졸 하이드로클로라이드; 우라실 머스터드; 우레데파; 바프레오타이드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 설페이트; 빈크리스틴 설페이트; 빈데신; 빈데신 설페이트; 비네피딘 설페이트; 빈글리시네이트 설페이트; 빈레우로신 설페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 설페이트; 빈졸리딘 설페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 및 조루비신 하이드로클로라이드.

[0372] 다른 항암 약물로는 다음이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다: 20-에피-1,25-다이하이드록시비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라테론; 아클라루비신; 아실풀벤; 아데실페놀; 아도젤레신; 알데스류킨; ALL-TK 길항물질; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레불린산; 암루비신; 암사크린; 아나그렐리드; 아나스트로졸; 안드로그래폴리드; 혈관신생 억제제; 길항물질 D; 길항물질 G; 안타렐릭스; 항-배화(anti-dorsalizing) 형태형성 단백질-1; 항안드로겐, 전립선암; 항에스트로겐; 안티네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 아피디콜린 글리시네이트; 세포자살 유전자 조절인자; 세포자살 조절유전자; 아푸린산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 디아미나제; 아술라크린; 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 바카틴 III 유도체; 발라놀; 바티마스타트; BCR/ABL 길항물질; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도체; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베툴린산; bFGF 억제제, 비칼루타미드; 비산트렌; 비스아지리디닐스페르민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레플레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 설폭스이민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캄토사르(캄토(Campto)로도 불림; 이리노테칸) 캄토테신 유도체; 카페시타빈; 카복스아미드-아미노-트리아졸; 카복시아미도트리아졸; 카레스트(CaRest) M3; CARN 700; 연골 유래 억제제; 카르젤레신; 카세인 키나제 억제제(ICOS); 카스타노스페르민; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로린; 클로로퀴녹살린 설폰아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나게닌; 크람베시딘 816; 크리스나톨; 크립토피신 8; 크립토피신 A 유도체; 쿠라신 A; 사이클로펜트안트라퀴논; 사이클로플라탐; 시페마이신; 시타라빈 옥포스페이트; 세포용해 인자; 시토스타틴; 다클릭시맙; 데시타빈; 디하이드로디덴민 B; 데슬로렐린; 덱사메타손; 덱시포스파미드; 덱스라족산; 덱스베라파밀; 디아지퀸; 디뎀닌 B; 디독스; 다이에틸노르스페르민; 다이하이드로-5-아자시티딘; 9-다이하이드로탁솔; 다이옥사마이신; 다이페닐 스피로무스틴; 도세탁셀; 도코사놀; 돌라세트론; 독시플루리딘; 독소루비신; 드롤록시펜; 드로나비놀; 듀오카마이신 SA; 엡셀렌; 에코무스틴; 에델포신; 에드레콜로맙; 에플로르니틴; 엘레멘; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테라이드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로겐 작용물질; 에스트로겐 길항물질;

에타니다졸; 에토포시드 포스페이트; 엑스메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티나이드; 필그라스팀; 피나스테라이드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈(예를 들면, 플루다라(Fludara)); 플루오로다우노루니신 하이드로클로라이드; 포르페니멕스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 젤라티나제 억제제; 겜시타빈; 글루타티온 억제제; 헵설팜; 헤레귤린; 헥사메틸렌 비스아세타미드; 하이페리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라만톤; 일모포신; 일로마스타트; 이마티닙(예를 들면, 글리벡(등록상표)), 이미퀴모드; 면역자극 펩티드; 인슐린-유사 성장 인자-1 수용체 억제제; 인터페론 작용물질; 인터페론; 인터루킨; 이오벤구안; 요오도독소루비신; 4-이포메아놀; 이로플락트; 이르소글라딘; 이소벤가졸; 이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀라이드; 카할랄라이드 F; 라멜라린-N 트라이아세테이트; 란레오티드; 레이나마이신; 레노그라스팀; 렌티난 설페이트; 렙톨스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제 인자; 백혈구 알파 인터페론; 류프롤라이드 + 에스트로겐 + 프로게스테론; 류프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친유성 다이사카라이드 펩티드; 친유성 백금 화합물; 리소클리나미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로소잔트론; 록소리빈; 루토테칸; 루테튬 텍사피린; 리소필린; 용균성 펩티드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스타트; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴리신 억제제; 기질 메탈로프로테이나제 억제제; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메티오니나제; 메토클로프라미드; MIF 억제제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스팀; 미토구아존; 미토락톨; 미토마이신 유사체; 미토나피드; 미토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린; 미토잔트론; 모파로텐; 몰그라모스팀; 항-EGFR 항체(예를 들면, 에르비툭스(Erbitux)(세툭시맙)); 항-CD19 항체; 항-CD20 항체(예를 들면, 리툭시맙); 항-디시알로강글리오시드(GD2) 항체(예를 들면, 단클론성 항체 3F8 또는 ch14>18); 항-ErbB 항체(예를 들면, 헤르셉틴); 인간 융모성 고나도트로핀; 모노포스포릴 지질 A + 미오박테리움 세포벽 sk: 모피다몰; 머스터드 항암제; 미카퍼옥사이드 B; 미코박테리움 세포벽 추출물; 미리아포론; N-아세틸디날린; N-치환된 벤즈아미드; 나파렐린; 나그레스팁; 날록손 + 펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라스팀; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조절인자; 니트록사이드 산화방지제; 니트룰린; 오블리메르센(게나센스(GENASENSE, 등록상표)); O^6-벤질구아민; 옥트레오티드; 오키세논; 올리고뉴클레오티드; 오나프리스톤; 온단세트론; 오라신; 경구 사이토카인 유도인자; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴(예를 들면, 플록사틴(Floxatin)); 옥사우노마이신; 파클리탁셀; 파클리탁셀 유사체; 파클리탁셀 유도체; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤립틴; 페가스파르가세; 펠데신; 펜토산 폴리설페이트 나트륨; 펜토스타틴; 펜트로졸; 퍼플루브론; 퍼포스파미드; 페릴릴 알콜; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타제 억제제; 피시바닐; 필로카르핀 하이드로클로라이드; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노겐 활성화제 억제제; 백금 복합체; 백금 화합물; 백금-트라이아민 복합체; 포르피머 나트륨; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아솜 억제제; 단백질 A-계 면역 조절인자; 단백질 키나제 C 억제제; 미세조류 단백질 키나제 C 억제제; 단백질 티로신 포스파타제 억제제; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 억제제; 푸르푸린; 피라졸로아크리딘; 피리독실화 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체; raf 길항물질; 랄티트렉세드; 라모세트론; ras 파네실 단백질 트랜스퍼라제 억제제; ras 억제제; ras-GAP 억제제; 데메틸화 레텔립틴; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레티나미드; 로히투킨; 로무르티드; 로퀴니멕스; 루비기논 B1; 루복실; 사핀골; 사인토핀; SarCNU; 사르코피톨 A; 사르그라모스팀; Sdi 1 모방물질; 세무스틴; 노화 유도 억제제 1; 센스 올리고뉴클레오티드; 신호전달 억제제; 시조피란; 소부족산; 나트륨 보로캅테이트; 나트륨 페닐아세테이트; 솔베롤; 소마토메딘 결합 단백질; 소네르민; 스프라포스산; 스피카마이신 D; 스피로무스틴; 스플레노펜틴; 스폰지스타틴 1; 스쿠알라민; 스티피아미드; 스트로멜리신 억제제; 설피노신; 초활성 혈관활성 장 펩티드 길항물질; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 탈리무스틴; 타목시펜 메트요오다이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 나트륨; 테가푸르; 텔루라피릴륨; 텔로머라제 억제제; 테모포르핀; 테니포시드; 테트라클로로데카옥사이드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이에틴; 트롬보포이에틴 모방물질; 티말파신; 티모포이에틴; 수용체 작용물질; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 주석 에틸 에티오푸르푸린; 티라파자민; 티타노센 바이클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 번역 억제제; 트레티노인; 트라이아세틸우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토렐린; 트로피세트론; 투로스테라이드; 티로신 키나제 억제제; 티르포스틴; UBC 억제제; 우베니멕스; 비뇨생식동-유래 성장 억제 인자; 우로키나제 수용체 길항물질; 바프레오티드; 바리올린 B; 벡티빅스(Vectibix)(파니투무맙) 벨라레졸; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈잘틴; 비탁신; 보로졸; 웰코보린(Welcovorin)(류코보린); 젤로다(Xeloda)(카페시타빈); 자노테론; 제니플라틴; 질라스콜브; 및 지노스타틴 스티말라머.

[0373] 일부 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, 본원에 기술된 TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 사용하여 암을 갖는 개체를 치료하는 것은 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC)에 대한 항암 치료 요법의 일부이다. 한 태양에서, ADCC 요법은 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성

된 NK 세포, 예를 들면, 본원에 기술된 TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 함께 하나 이상의 항체(예를 들면, 앞 단락에서 기술된 항체)의 투여를 포함한다. 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 또는 다른 B-세포 악성종양(림프종 및 백혈병), 신경모세포종, 흑색종, 유방암 및 두경부암을 포함하나 이로 한정되지는 않는 여러 유형의 암이 상기 ADCC 방법을 이용하여 치료될 수 있다. 특정 태양에서, ADCC 치료는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, 본원에 기술된 TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 함께, 하기 항체들 중 하나 이상의 투여를 포함한다: 항-EGFR 항체(예를 들면, 에르비툭스(Erbitux)(세툭시맙)), 항-CD19 항체, 항-CD20 항체(예를 들면, 리툭시맙), 항-디시알로강글리오시드(GD2) 항체(예를 들면, 단클론성 항체 3F8 또는 ch14>18), 또는 항-ErbB2 항체(예를 들면, 헤르셉틴).

[0374] 9.4. 바이러스 감염의 치료

[0375] 또 다른 태양에서, 본원에는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단의 치료 효과량을 바이러스 감염을 갖는 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 바이러스 감염을 갖는 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 태양에서, 상기 개체는 자연 살해 세포의 결핍, 예를 들면, 개체의 바이러스 감염에 대해 활성인 자연 살해 세포의 결핍을 갖는다. 어떤 특정한 태양에서, 상기 투여는 또한, 개체에게 단리된 태반 관류액, 단리된 태반 관류액 세포, 단리된 자연 살해 세포, 예를 들면, 태반 자연 살해 세포, 예를 들어, 태반-유래 중간 자연 살해 세포, 단리된 혼합 자연 살해 세포 및/또는 그의 혼합물 중 하나 이상을 투여하는 것을 포함한다. 어떤 특정한 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 상기 투여 전에, 면역조절 화합물, 예를 들면, 상기의 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 접촉되거나 근접된다. 어떤 다른 특정한 태양에서, 상기 투여는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 상기 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단 이외에 면역조절 화합물, 예를 들면, 전술한 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 이때 상기 양은, 예를 들면, 상기 바이러스 감염의 하나 이상의 증상의 검출가능한 개선, 증상의 진행의 감소, 또는 증상의 제거를 야기하는 양이다. 특정 태양에서, 바이러스 감염은 아데노바이러스과(*Adenoviridae*), 피코르나바이러스과(*Picornaviridae*), 헤르페스바이러스과(*Herpesviridae*), 헤파드나바이러스과(*Hepadnaviridae*), 플라비바이러스과(*Flaviviridae*), 레트로바이러스과(*Retroviridae*), 오르토믹소바이러스과(*Orthomyxoviridae*), 파라믹소바이러스과(*Paramyxoviridae*), 파필로마바이러스과(*Papilommaviridae*), 랍도바이러스과(*Rhabdoviridae*) 또는 토가바이러스과(*Togaviridae*)의 바이러스에 의한 감염이다. 보다 특정한 태양에서, 상기 바이러스는 인간 면역결핍 바이러스(HIV). 콕사키 바이러스, A 형 간염 바이러스(HAV), 폴리오바이러스, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스(EBV), 제 1 형 단순 헤르페스(HSV1), 제 2 형 단순 헤르페스(HSV2), 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 제 8 형 인간 헤르페스 바이러스(HHV8), 대상 포진 바이러스(수두 대상포진 바이러스(VZV) 또는 대상포진(shingles) 바이러스), B 형 간염 바이러스(HBV), C 형 간염 바이러스(HCV), D 형 간염 바이러스(HDV), E 형 간염 바이러스(HEV), 인플루엔자 바이러스(예를 들면, 인플루엔자 A 바이러스, 인플루엔자 B 바이러스, 인플루엔자 C 바이러스 또는 토고토바이러스), 홍역 바이러스, 유행성 이하선염 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스, 파필로마바이러스, 광견병 바이러스 또는 풍진 바이러스이다.

[0376] 다른 보다 특정한 태양에서, 상기 바이러스는 아데노스바이러스 A 형, 혈청형 12, 18, 또는 31; 아데노바이러스 B 형, 혈청형 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35, 또는 50; 아데노바이러스 C 형, 혈청형 1, 2, 5, 또는 6; D 형, 혈청형 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 51; E 형, 혈청형 4; 또는 F 형, 혈청형 40 또는 41이다.

[0377] 어떤 다른 보다 특정한 태양에서, 바이러스는 아포이(Apoi) 바이러스(APOIV), 아로아(Aroa) 바이러스(AROAV), 바가자(bagaza) 바이러스(BAGV), 반지(Banzi) 바이러스(BANV), 보우보우이(Bouboui) 바이러스(BOUV), 카시파코어(Cacipacore) 바이러스(CPCV), 카레이 아일랜드(Carey Island) 바이러스(CIV), 카우본 릿지(Cowbone Ridge) 바이러스(CRV), 뎅기열(Dengue) 바이러스(DENV), 엣지 힐(Edge Hill) 바이러스(EHV), 가드겟츠 굴리(Gadgets Gully) 바이러스(GGYV),일헤우스(Ilheus) 바이러스(ILHV), 이스라엘 칠면조 수막뇌염(Israel turkey meningoencephalomyelitis) 바이러스(ITV), 일본 뇌염(Japanese encephalitis) 바이러스(JEV), 저그라(Jugra) 바이러스(JUGV), 주티아파(Jutiapa) 바이러스(JUTV), 카담 바이러스(KADV), 케도우고우(Kedougou) 바이러스(KEDV), 코코베라(Kokobera) 바이러스(KOKV), 코우탄고(Koutango) 바이러스(KOUV), 키아사누르 포레스트병(Kyasanur Forest disease) 바이러스(KFDV), 랑갓(Langat) 바이러스(LGTV), 메아반(Meaban) 바이러스(MEAV), 모독(Modoc) 바이러스(MODV), 몬타나 미오티스 백질뇌염(Montana myotis leukoencephalitis) 바이러스(MMLV), 머레이 계곡 뇌염(Murray Valley encephalitis) 바이러스(MVEV), 엔타야(Ntaya) 바이러스(NTAV), 옴스크 출혈

열(Omsk hemorrhagic fever) 바이러스(OHFV), 포와산(Powassan) 바이러스(POWV), 리오 브라보(Rio Bravo) 바이러스(RBV), 로얄 팜(Royal Farm) 바이러스(RFV), 사보야(Saboya) 바이러스(SABV), 세인트 루이스 뇌염(St. Louis encephalitis) 바이러스(SLEV), 살 비자(Sal Vieja) 바이러스(SVV), 산 페를리타(San Perlita) 바이러스(SPV), 소마레즈 리프(Saumarez Reef) 바이러스(SREV), 세픽(Sepik) 바이러스(SEPV), 템부수(Tembusu) 바이러스(TMUV), 진드기-매개 뇌염 바이러스(TBEV), 티울레니(Tyuleniy) 바이러스(TYUV), 우간다 S(Uganda S) 바이러스(UGSV), 우수투(Usutu)(USUV), 웨셀스브론(Wesselsbron) 바이러스(WESSV), 웨스트 나일(West Nile) 바이러스(WNV), 야운데(Yaounde) 바이러스(YAOV), 황열(Yellow fever) 바이러스(YFV), 요코세(Yokose) 바이러스(YOKV), 또는 지카(Zika) 바이러스(ZIKV)이다.

[0378] 다른 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 선택적으로 태반 관류액 및/또는 관류액 세포는 하나 이상의 항바이러스제를 포함하는 항바이러스 치료 요법의 일부로서 바이러스 감염을 갖는 개체에게 투여된다. 바이러스 감염을 갖는 개체에게 투여될 수 있는 특정 항바이러스제로는 다음이 포함되나, 이로 한정되지는 않는다: 이미퀴모드, 포도필록스, 포도필린, 인터페론 알파(IFNα), 레티콜로스, 논옥시놀-9, 아시클로비르, 팜시클로비르, 발라시클로비르, 간시클로비르, 시도포비르; 아만타딘, 리만타딘; 리바비린; 자나마비르 및 오셀타우마비르; 프로테아제 억제제, 예를 들면, 인디나비르, 넬피나비르, 리토나비르 또는 사퀴나비르; 뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예를 들면, 디다노신, 라미부딘, 스타부딘, 잘시타빈 또는 지도부딘; 및 비-뉴클레오시드 역전사효소 억제제, 예를 들면, 네비라핀 또는 에파비렌즈.

[0379] 9.5. <u>투여</u>

[0380] 세포, 예를 들면, 태반 관류액 세포, 예를 들어, 태반 관류액으로부터의 유핵 세포, 혼합 자연 살해 세포, 및/또는 단리된 자연 살해 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단의 세포 수의 측정, 및 면역조절 화합물, 예를 들면, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드의 양의 측정은 서로 독립적으로 수행될 수 있다.

[0381] 9.5.1. <u>세포의 투여</u>

[0382] 특정 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은, 개체에게 검출가능한 치료 이점을 야기하는 임의의 양 또는 수, 예를 들면, 효과량으로 사용된다. 예를 들면, 바이러스 감염, 암 또는 종양 세포를 갖는 개체, 예를 들면, 종양 세포, 고형 종양 또는 혈액암을 갖는 개체, 예를 들어, 암 환자에게 투여된다. 상기 세포는 상기 개체에게 무명수의 세포만큼 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 개체는, 약 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 또는 1×10^{11}, 또는 대략 그 이상, 또는 대략 그 이하의 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 투여받을 수 있다. 다른 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 상기 개체에게 무명수의 세포만큼 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 개체는, 개체 kg 당, 약 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 또는 1×10^{11}, 또는 대략 그 이상, 또는 대략 그 이하의 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 투여받을 수 있다. 다른 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 상기 개체에게 무명수의 세포만큼 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 개체는, 개체 kg 당, 약 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 또는 5×10^8, 또는 대략 그 이상, 또는 대략 그 이하의 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 투여받을 수 있다. 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 선택적으로 태반 관류액 세포 및/또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이 아닌 다른 자연 살해 세포의 수와, 상기 개체내 종양 세포의 수(예를 들면, 추정수) 사이의 근사한 비에 따라 상기 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은 개체내 종양 세포의 수에 대해, 약 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1,

35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 또는 100:1, 또는 대략 그 이상, 또는 대략 그 이하의 비로 상기 개체에게 투여될 수 있다. 상기 개체내 종양 세포의 수는, 예를 들면, 개체로부터의 조직 샘플, 예를 들면, 혈액 샘플, 생검물 등 내의 종양 세포의 수를 계수함으로써 추정될 수 있다. 특정 태양에서, 예를 들어, 고형 종양의 경우, 상기 계수는 근사한 종양 부피를 수득하기 위해 종양 또는 종양들의 영상화와 함께 수행된다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 선택적으로 태반 관류액 세포, 및/또는 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이 아닌 다른 자연 살해 세포 이외에, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드, 예를 들면, 효과량의 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드가 개체에게 투여된다.

[0383] 특정 태양에서, 예를 들면, 개체에서 종양 세포의 증식의 억제; 개체의 자연 살해 세포에 결핍을 갖는 개체의 치료; 또는 바이러스 감염을 갖는 개체의 치료; 또는 암을 갖는 개체, 예를 들면, 종양 세포, 혈액암 또는 고형 종양을 갖는 개체의 치료의 방법은, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 하나 이상의 태반 관류액 및/또는 태반 관류액 세포의 혼합물과 근접시키거나, 상기 개체에게 상기 혼합물을 투여하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, 상기 방법은 또한, 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 근접시키거나, 이를 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0384] 특정 태양에서, 예를 들면, 개체의 자연 살해 세포에 결핍(예를 들면, NK 세포 수의 결핍, 또는 암, 종양 또는 바이러스-감염된 세포에 대한 NK 세포의 반응성의 결핍)을 갖는 개체의 치료; 또는 암 또는 바이러스 감염을 갖는 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제는, 상기 종양 세포를, 단리된 태반 관류액 세포 또는 태반 관류액으로 보충된, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 근접시키거나, 이들을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 태양에서, mL 당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이, mL 당 약, 또는 적어도 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의 단리된 태반 관류액 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의 단리된 태반 관류액 세포로 보충된다. 다른 보다 특정한 태양에서, mL 당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8, 1×10^9, 5×10^9, 1×10^{10}, 5×10^{10}, 1×10^{11} 이상의, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이 약, 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 또는 1000 mL의 관류액, 또는 약 1 단위의 관류액으로 보충된다.

[0385] 또 다른 특정 태양에서, 개체의 자연 살해 세포에 결핍을 갖는 개체의 치료; 암을 갖는 개체의 치료; 바이러스 감염을 갖는 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제는, 종양 세포를 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 근접시키거나, 이들을 상기 개체에게 투여하는 것을 포함하며, 이때 상기 세포는 부착성 태반 세포, 예를 들면, 부착성 태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포, 예를 들어, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포로 보충된다. 특정 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단은, mL 당 약 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8, 5×10^8 이상의 부착성 태반 줄기 세포, 또는 1×10^4, 5×10^4, 1×10^5, 5×10^5, 1×10^6, 5×10^6, 1 x

10^7, 5 x 10^7, 1 x 10^8, 5 x 10^8, 1 x 10^9, 5 x 10^9, 1 x 10^{10}, 5 x 10^{10}, 1 x 10^{11} 이상의 부착성 태반 세포, 예를 들면, 부착성 태반 줄기 세포 또는 다분화능 세포로 보충된다.

[0386] 또 다른 특정 태양에서, 개체의 자연 살해 세포에 결핍을 갖는 개체의 치료; 암을 갖는 개체의 치료; 바이러스 감염을 갖는 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단과 함께 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드를 사용하여 수행되며, 이때 상기 세포는 조정 배지, 예를 들면, $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포에 의해 조정된 배지, 예를 들면, 관류액 단위 당 또는 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 또는 10^{11}의 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단 당, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.1, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mL의 줄기 세포-조정된 배양 배지로 보충된다. 특정 태양에서, 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 세포는, 본원에 전체로 참고로 인용된 미국 특허 제 7,468,276 호 및 미국 특허출원공개 제 2007/0275362 호에 기술된 다분화능 부착성 태반 세포이다. 또 다른 특정 태양에서, 상기 방법은 또한, 종양 세포를 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드와 근접시키거나, 이들을 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0387] 또 다른 특정 태양에서, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단이 태반 관류액 세포로 보충되는, 개체의 자연 살해 세포에 결핍을 갖는 개체의 치료; 암을 갖는 개체의 치료; 바이러스 감염을 갖는 개체의 치료; 또는 종양 세포 증식의 억제에서, 관류액 세포는 상기 근접되기 전에 일정 시간 동안 인터루킨-2(IL-2)와 근접된다. 특정 태양에서, 상기 기간은 상기 근접시키기 전에 약, 적어도 또는 많아야 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 또는 48 시간이다.

[0388] 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 선택적으로 관류액 또는 관류액 세포는 바이러스 감염을 갖는 개체, 암을 갖는 개체, 또는 종양 세포를 갖는 개체에게 항임 치료 과정 동안 1 회 투여될 수 있거나; 치료 동안 여러번, 예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23 시간마다 1 회씩, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7 일마다 1 회씩, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 36 주 이상마다 1 회씩 투여될 수 있다. 세포 및 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드가 사용되는 태양에서, 면역조절 화합물 또는 탈리도마이드 및 세포 또는 관류액은 개체에게 함께, 예를 들면, 동일 제형으로; 별도로, 예를 들면, 별도의 제형으로, 대략 동일한 시간에 투여될 수 있거나; 예를 들면, 상이한 투약 스케줄하에 또는 그 날의 상이한 시간에 별도로 투여될 수 있다. 유사하게, 세포 및 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물이 사용되는 태양에서, 항바이러스 화합물 또는 항암 화합물, 및 세포 또는 관류액은 개체에게 함께, 예를 들면, 동일 제형으로; 별도로, 예를 들면, 별도의 제형으로, 대략 동일한 시간에 투여될 수 있거나; 예를 들면, 상이한 투약 스케줄하에 또는 그 날의 상이한 시간에 별도로 투여될 수 있다. 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 및 관류액 또는 관류액 세포는, 본원에 기술된 방법을 이용하여 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단, 관류액 또는 관류액 세포가 과거에 개체에게 투여되었었는지 여부에 관계없이 투여될 수 있다.

[0390] **키트**

[0391] 본원에는, 하나 이상의 본원에 기술된 조성물, 예를 들면, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포, 또는 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단을 포함하는 조성물로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 약학 팩 또는 키트가 제공된다. 선택적으로, 의약품 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 고지가 상기 용기(들)에 첨부될 수 있으며, 상기 고지는 인간 투여를 위한 제조, 사용 또는 판매에 대한 상기 기관에 의한 승인을 나타낸다.

[0392] 본원에 포함된 키트는 본원에 기술된 방법, 예를 들면, 종양 세포의 성장을 억제하는 방법 및/또는 암, 예를 들면, 혈액암을 치료하는 방법, 및/또는 바이러스 감염을 치료하는 방법에 따라 사용될 수 있다. 한 태양에서, 키트는 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 NK 세포, 예를 들면, TSNK 세포 또는 NK 세포 집단 또는 NK 전구 세포 집단 또는 그의 조성물을 하나 이상의 용기에 포함한다. 특정 태양에서, 본원에는 TSNK 세포 또는 그의 조

성물을 포함하는 키트가 제공된다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에는, 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 생성된 NK 세포 집단 또는 그의 조성물을 포함하는 키트가 제공된다. 또 다른 특정 태양에서, 본원에는 NK 전구 세포 집단 또는 그의 조성물을 포함하는 키트가 제공된다. 특정 태양에서, 상기 키트중의 상기 NK 전구 세포 집단은, 본원에 기술된 방법, 예를 들면, 본원에 기술된 3-단계 방법에 의해 생성된다.

[0394] 실시예

[0395] 실시예 1: 인간 태반 관류액 및 제대혈로부터 조혈 줄기 세포의 회수

[0396] 인간 태반 관류액(HPP) 및 제대혈(UCB) 세포를 피콜(Ficoll) 또는 염화암모늄을 사용하여 일반적으로 정제하여 전체 유핵 세포(TNC)를 수득하였다. 이어서, TNC를 양성 선별 절차에 이용하여 항-CD34 비드 및 로보셉(RoboSep)을 제조사의 프로토콜(스템셀 테크놀로지스, 인코포레이티드(StemCell Technologies, Inc.))에 따라 사용하여 $CD34^+$ 세포를 단리하였다. 이 실험에서, $CD34^+$ 세포는 90%보다 높은 순도하에 단리되었다. 또는, 이지셉(등록상표) 인간 전구 세포 농축 키트(EasySep Human Progenitor Cell Enrichment Kit, 스템셀 테크놀로지스 인코포레이티드)를 음성 선별 절차에 이용하여, 하기의 인간 세포 표면 항원에 대한 단클론성 항체를 갖는 인간 전구 세포 농축 칵테일을 사용하여 계통 결정 세포를 고갈시켰다: CD2, CD3, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b 및 글리코포린 A. 음성 선별을 이용하여 90% $CD34^+$ 세포를 원재료로부터 회수하였다. 회수된 HSC의 세포 조성은 표 1에 요약하였다.

[0398] [표 1] 농축 조혈 줄기 세포(HSC)의 세포 조성(표준 편차는 3 공여체에 대한 모집단 평균에 대해 산출하였다)

[0399]

	평균%	STDEV
Lin^-CD34^+	75.1	6.2
$Lin^-CD34^-CD38^-$	9.8	2.4
$Lin^-CD34^-CD133^+$	0.9	0.2
$Lin^-CD34^-CD117^+$	7.2	0.5

[0401] 실시예 2: 조혈 줄기 세포의 무배양보조 세포 증폭 및 자연 살해 세포로의 분화

[0402] $CD34^+$ 세포를 하기의 배지 배합물에서 48 일 이하 동안 배양하고, 세포수, 세포 생존율, 자연 살해 세포 분화의 특성화 및 기능 측정의 평가를 위해 세포 분취량들을 취하였다.

[0403] NK1 배지: 펜/스트렙(Cat# 15140, 깁코), 20 ng/mL SCF(Cat# 255-SC, 알앤디 시스템즈), 10 ng/mL Flt-3 리간드(Cat# 308-FK, 알앤디 시스템), 20 ng/mL TPO(Cat# 288-TP, 알앤디 시스템즈), 20 ng/mL IL-7(Cat# 207-IL, 알앤디 시스템즈), 200 IU/mL IL-2(Cat# 202-IL, 알앤디 시스템즈) 및 10 ng/mL IL-15(Cat# 247-IL, R&D 시스템즈)로 보충된 GBGM(글리코스템 기본 성장 배지, 글리코스템 Cat# CCT-SCB500, 클리어 셀 테크놀로지(Clear cell technology)).

[0404] NK2 배지: 2 mM L-글루타민(Cat# 25030, 인비트로겐), 1% 펜/스트렙, 20% 인간 혈청 AB(Cat# 100-512, 겜셀(Gemcell)), 5 ng/mL 나트륨 셀레나이트(Cat# S9133, 시그마), 50 μM 에탄올아민(Cat# E0135, 시그마), 25 μM β-머캅토에탄올(Cat# 21985, 인비트로겐), 20 mg/mL 아스콜브산(Cat# 47863, 시그마), 5 ng/mL IL-3(Cat# 203-IL, 알앤디 시스템즈), 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL IL-7 및 10 ng/mL IL-15로 보충된 1:2 DMEM(Cat# MT-10-013-CV, 피셔(Fisher)):함 F12(Cat# BW12-615F, 피셔).

[0405] NK3 배지: 펜/스트렙, 10% 인간 혈청 AB(Cat# 100-512, 겜셀) 및 500 IU/mL IL-2로 보충된 X-비보 20(Cat# BW04-448Q, 피셔).

[0406] NK2A 배지: 10% 인간 혈청 AB, 1% 펜/스트렙, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL TPO, 20 ng/mL IL-7, 200 IU/mL IL-2, 10 ng/mL IL-15 및 1.5 IU/mL 헤파린(Cat# H3149, 시그마)으로 보충된 GBGM.

[0407] NK2B1 배지: 2 mM L-글루타민, 1% 펜/스트렙, 20% 인간 혈청 AB, 5 ng/mL 나트륨 셀레나이트, 50 μM 에탄올아민, 25 μM β-머캅토에탄올, 20 ㎍/mL 아스콜브산, 5 ng/mL IL-3, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20

ng/mL IL-7 및 10 ng/mL IL-15로 보충된 1:2 DMEM:함 F12.

[0408] NK2B2 배지: 2 mM L-글루타민, 1% 펜/스트렙, 20% 인간 혈청 AB, 5 ng/mL 나트륨 셀레나이트, 50 μM 에탄올아민, 25 μM β-머캅토에탄올, 20 ㎍/mL 아스콜브산, 200 IU/mL IL-2, 20 ng/mL SCF, 10 ng/mL Flt-3 리간드, 20 ng/mL IL-7 및 10 ng/mL IL-15로 보충된 1:2 DMEM:함 F12.

[0409] NK2C 배지: 10% FBS(Cat# SH30070.03, 하이클론(Hyclone)), 2 mM L-글루타민, 1% 펜/스트렙, 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL Flt-3 리간드, 100 IU/mL IL-2, 20 ng/mL IL-7 및 20 ng/mL IL-15로 보충된 RPMI 1640(Cat# 22400105, 인비트로겐).

[0410] NK2D 배지: 1 μM 합성 글루코코르티코이드 덱사메타손(Dex, Cat# D4902, 시그마, 미국 미주리주 세인트루이스), 40 ng/mL 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF-1, Cat# 291-G1-250, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 미네아폴리스), 100 ng/mL SCF, 40 mg/mL 지질(콜레스테롤-풍부 지질 혼합물; Cat# C7305-1G, 시그마, 미국 미주리주 세인트루이스), 5 ng/mL IL-3, 200 IU/mL IL-2, 20 ng/mL IL-7 및 20 ng/mL IL-15로 보충된 무혈청 배지(스템스팬, Cat# 09650, 스템 셀 테크놀로지스, 캐나다 밴쿠버).

[0411] 상이한 시점들에서 수집된 세포들을 RPMI1640(페놀 비함유) 및 5% FBS로 세척하고, 4 ℃에서 형광-접합 항체(표 2 및 3)로 15분 동안 표지화하고, 유세포분석(FACSCanto, BD) 및 FlowJo 세포분석 소프트웨어(트리 스타(Tree Star))에 의해 분석하였다.

[0413] [표 2] 세포 표지화에 사용된 항체

HSC-NK FACS 항체		
종목	판매회사	Cat No.
FITC 항-hu CD3	BD	555332
APC-Cy7 항-hu CD3	BD	557832
APC 항-hu CD5	BD	555355
PE 항-hu CD7	BD	555361
FITC 항-hu CD16	BD	555406
PE-Cy5 항-hu CD16	BD	555408
PE 항-hu CD56	BD	555516
PE-CY5 CD56 (N-CAM)	BD	555517
PE CD94	R&D	FAB-1058P
APC 항-hu CD117	BD	550412
PE 항-hu CD226	BD	559789
이소타입 FITC 마우스 IgG1	BD	340755
이소타입 PE 마우스 IgG1	BD	340761
이소타입 PerCP 마우스 IgG1	BD	340762
이소타입 PE-CY7 마우스 IgG1	BD	348798
이소타입 APC 마우스 IgG1	BD	340754
이소타입 APC-CY7 마우스 IgG1	BD	348802
이소타입 APC 마우스 IgG2a	BD	555576
PE 항-hu KIR-NKAT2 (2DL3)	BD	556071
PE NKB1(3DL1)	BD	555967
APC NKG2D	BD	558071
APC NKp46	BD	558051
단순 세포 보상 비드	뱅스 랩(Bangs Labs)	550

[0414]

[0416] [표 3] NK 표면 수용체의 유세포분석 특성화 패널

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

[0417]

[0419] *PKH26/TO-PRO-3 표지화를 이용한 세포독성 분석.* 표적 종양 세포를, 그의 친유성 지방족 잔기를 통해 세포질막 내에 삽입되는 염료인 PKH26(Cat#PKH26GL, 시그마-알드리치)로 표지화한 다음, 96-웰 U자 바닥 조직 배양 플레이트에 놓고, 10% FBS로 보충된 200 ㎕ RPMI 1640 중에서 다양한 작동인자-표적(E:T) 비로 증폭된 NK 세포와 함께 배양하였다. 배양물을 37 ℃에서 5% CO_2 하에 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 세포를 수거하고, TO-PRO-3(인비트로겐 Cat# T3605), 막-불투과성 DNA 착색제를 배양물에 첨가한(1 mM 최종 농도) 후, FACS 분석을 행하였다. 세포독성은 전체 PHK26+ 표적 종양 세포내 사멸 세포((PKH26+TO-PRO-3+)의 비율로 나타내었다.

[0420] *$CD34^+$ 세포 증폭 및 NK 세포로의 분화의 최적화.* 시험한 배지 배합물, NK1, NK2 및 NK3 중에서, NK1 배지는 제 21 일(D21)에 500 배 증폭을 나타내었다. NK2도 NK3 배지도 세포 증식 또는 분화를 유지하지 않았다. NK1 배지에 대해 추가의 배지 최적화를 수행하였으며, 후속 배지들은 NK2A, NK2B, NK2C 및 NK2D로 명명되었다. NK2A 배지를 사용하여 배양된 $CD34^+$ 세포는 제 55 일(D55)에 10^5-배 증폭을 나타내었다. NK1, 2 및 3 배지로부터의 증폭 배수, 분화 및 세포독성으로부터 얻은 결과를 기준으로, NK2A, NK2B, NK2C 및 NK2D 배지 배합물의 2 차 배치를 수행하였으며, D55에 10^5-배 증폭이 달성되었다(도 1에 나타낸 바와 같음). NK2B 배지는 약 3 x 10^4 배 증폭을 나타내었다. NK2C 배지에서의 배양은 제 21 일에 3 x 10^2 배 증폭을 야기하였다. NK2D 배지는 실험 기간 내내 세포를 유지하지 못했다.

[0421] 제 48 일(D48)에, NK2A 배지 중 NK 세포의 약 90%가 $CD56^+CD3^-$이었다. $CD56^+CD3^-$ 집단 내에서, 세포의 98% 이상이 $CD56^+CD16^-$인 반면(도 2에 나타낸 바와 같음), 58%는 활성화 수용체 NKG2D를 발현하였고, 68%는 $NKp46^+$이었고, 17%는 $CD226^+$이었다(표 4A 및 4B에 나타낸 바와 같음).

[0423] [표 4A] D48에 증폭된 NK의 표현형 특성화

[0424]

D48 표현형							
NK2A		CD56+CD3-	CD56+CD16-	CD56+CD16+	NKB1	NKG2D	NKAT2
	평균	86.84%	98.44%	1.56%	3.38%	58.41%	1.69%
	표준편차	4.50%	0.30%	0.30%	1.42%	5.88%	0.22%

[0426] [표 4B] D48에 증폭된 NK의 표현형 특성화

[0427]

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

[0429] 또한, NK2A 배지에서 배양된 세포의 97.8% 및 NK2B 배지에서 배양된 세포의 93.1%가 배양 제 21 일에 $CD56^+CD16^-$이었다.

[0430] **실시예 3: CNK 배지에서 NK 세포의 배양은 NK 세포의 증폭 및 세포독성을 증대시킨다**

[0431] 제 27일(D27)에, NK2A 배지에서 배양된 $CD34^+$ 세포를 하기 배지들 중 하나에서 더 배양하였다:

[0432] - CNK 배지 및 유지 배지를 포함하는 2-단계 배지. CNK 배지는 10% FCS(하이클론), 200 IU/mL IL-2(알앤디 시스템즈), 35 ㎍/mL 트랜스페린(시그마-알드리치), 5 ㎍/mL 인슐린(시그마-알드리치), 2 x 10^{-5} M 에탄올아민(시그마-알드리치), 1 ㎍/mL 올레산(시그마-알드리치), 1 ㎍/mL 리놀레산(시그마-알드리치), 0.2 ㎍/mL 팔미트산(시그마-알드리치), 2.5 ㎍/mL BSA(시그마-알드리치) 및 0.1 ㎍/mL 피토헤마글루티닌(PHA-P, 시그마-알드리치)으로 보충된 IMDM(인비트로겐)이다. NK2A 배지에서 배양된 $CD56^+CD3^-$ NK 세포를 세포 배양물 처리된 24-웰 플레이트 또는 T 플라스크에서 CNK 배지 중에 2.5x10^5 생세포/mL로 재현탁하였다. 미토마이신 C-처리된 동종이계 PBMC 및 K562 세포(만성 골수성 백혈병 세포주)를 둘 다 배양보조 세포로서 CNK 배지에 mL 당 1 x 10^6의 최종

농도로 첨가하였다. NK 세포는 37 ℃에서 5% CO_2 하에서 5 내지 6 일 동안 배양하였다. 5 내지 6 일 후에 및 이어서 3 내지 4 일마다 동일 부피의 유지 배지(mL 당 10% FCS, 2% 인간 AB 혈청, 항생물질, L-글루타민 및 400 단위의 IL-2를 함유하는 IMDM)를 배양물에 첨가하였다.

[0433] - 미토마이신 C 처리된 $CD34^-$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 줄기 세포를 배양보조 세포로 함유하는 NK2A(PDAC) 배지;

[0434] - 미토마이신 C 처리된 중간엽 줄기 세포(MSC)를 배양보조 세포로 함유하는 NK2A(MSC) 배지; 또는

[0435] - 대조군으로서 배양보조 세포 비함유 NK2A(FF) 배지.

[0436] 2-단계 배지는 NK2A(FF), NK2A(PDAC) 및 NK2A(MSC)에 비해 $CD34^+$ 세포의 증폭 배수를, 특히 제 27 일(D27)과 제 48 일(D48) 사이에 증대시켰다. 도 3 참조.

[0437] 제 35 일까지, $CD34^+$ 세포의 비율은 이미 약 4%로 감소된 반면, $CD56^+CD3^-$의 비율은 2-단계 배지에서 약 80%로 증가되었다. 제 45 일(D45)에 2-단계 배지에서 배양된 세포는 NK2A(FF), NK2A(PDAC) 및 NK2A(MSC)에서 배양된 NK 세포에 비해 최고 세포독성을 나타내었다(도 3에 나타낸 바와 같음). 제 41 일에 표현형 특성화(도 5에 나타낸 바와 같음)는 세포중 NKp46 및 CD226의 증가된 발현을 나타내어, 세포독성 증대에 대해 가능한 설명을 시사하였다. D41에 $CD226^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서의 0.9% ± 0.8%로부터 2-단계 배지에서의 13% ± 4%로 증가되었고; $NKp46^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서의 55.4% ± 8.7%에서 2-단계 배지에서의 80% ± 7.85%로 증가되었다. D48에 CD226+ 세포의 비율은 NK2A 배지에서의 17.3% ± 14.3%에서 2-단계 배지에서의 52.3% ± 11.64%로 증가되었고; $NKp46^+$ 세포의 비율은 NK2A 배지에서의 67.9% ± 5.4%에서 2-단계 배지에서의 86% ± 4%로 증가되었다. 시험된 조건들중에서 NKG2D 발현의 유의적 차이는 없었다. CD226 및 NKp46의 발현에서의 차이는 하기 표5에 나타내었다.

[0439] [표 5] 제 41 일(D41) 및 제 48 일(D48)에 NK2A(FF) 및 2-단계 배지에서 배양된 NK2 세포상에서 CD226 및 NKp46의 발현(표준 편차는 3 공여체에 대해 산출되었다)

[0440]

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

[0442] <u>실시예 4: 2-단계 배지-배양된 자연 살해 세포와 배아 줄기 세포(ESC)로부터 유래된 자연 살해 세포의 비교</u>

[0443] 2-단계 배지에서 배양된 NK 세포를, 문헌 [Woll *et al.*, Blood 113(4):6094-6101 (2009)]의 방법에 의해 생성된, 배아 줄기 세포(ESC)로부터 유래된 NK 세포와 비교하였다. 특히, CD94와 CD117의 발현 수준의 차이를 두 세포 유형 모두의 배양 과정 동안 관찰하였다. 도 6은 CD117의 발현이 제 7 일(D7)부터 제 35 일(D35)까지에 2-단계 NK 세포에서 더 높거나 "+"였던 반면, CD94의 발현은 서서히 증가되었다. 제 35 일(D35)에, $CD56^+CD3^-$ (2-단계) 세포의 약 44%가 $CD94^+CD117^+$ 세포였고, $CD56^+CD3^-$ 세포의 37.6%가 $CD94^-D117^+$였으며, $CD56^+CD3^-$ 세포의 14.7%가 $CD94^+CD117^-$이었다. 따라서, 2-단계 방법에 의해 생성된 NK 세포는, 배양의 제 14 일부터 제 35 일까지 그 78%가 $CD117^{low/-}$를 유지한, ESC로부터 유래된 NK 세포와 구별가능하다. $CD117^+$ NK 세포는 하기 실시예 6에 기술된 바와 같이, 다양한 조직으로부터의 종양 세포주에 대해 세포독성이기 때문에 CD117 발현에서의 상기 차이는 유용하다.

[0444] 상기 결과는 TSNK 세포의 분화 진행이 ESC-유래 NK 세포와 상이하며, TSNK 세포는 ESC 유래 NK 세포와 구별가능

함을 시사한다.

[0445] <u>실시예 5: PDAC는 NK2A 배지에서 배양된 자연 살해 세포의 증폭 배수를 증대시킨다</u>

[0446] 자연 살해 세포로의 조혈 줄기 세포(HSC) 분화에 대한 $CD10^+$, $CD34^-$, $CD105^+$, $CD200^+$ 조직 배양 플라스틱-부착성 태반 줄기 세포(본 실시예에서 PDAC로 지칭)의 효과를 평가하기 위해, HSC를 제 0 일 및 제 21 일에 미토마이신 C-처리된 PDAC 또는 골수-유래 중간엽 줄기 세포(MSC)로 10:1 PDACs/MSC:HSC의 비로 자극하는 한편, 배양보조 세포-비함유 배양물을 대조군으로 사용하였다. NK2A 배지를 배양 배지로 사용하였다. PDAC는 배지 단독에 비해 배양된 NK 세포의 증폭 배수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 배양보조 세포 층의 존재 또는 부재하에서 성장된 세포들 사이에 세포독성의 유의적 차이는 나타나지 않았다. MSC로 처리된 세포는 도 7에 나타낸 바와 같이, 최고 증폭 배수를 나타내었지만 최저 세포독성을 나타내었다.

[0447] <u>실시예 6: 2-단계 배지를 사용하여 증폭된 NK 세포의 세포독성 활성</u>

[0448] 본 실시예는 전술한 2-단계 방법을 이용하여 증폭되고 분화된 $CD34^+$ 세포로부터 생성된 NK 세포가 종양 세포주에 대해 세포독성임을 입증한다.

[0449] *락테이트 디하이드로게나제(LDH) 방출 분석.* LDH 방출 분석은 사이토톡스 96(CYTOTOX 96, 등록상표) 비-방사능 세포독성 분석 키트(프로메가(Promega), Cat# G1780)를 사용하여 수행하였다. 상기 분석에서는, 공여체-일치 인간 태반 관류액(HPP) 및 제대혈 유니트(콤보스(Combos) 유니트)로부터 유도된 배양된 NK 세포를 작동인자 세포로 사용한 한편, 특정 종양 세포주를 표적 세포로 사용하였다. 상기 연구에 사용된 3개의 유니트로부터, HPP 세포의 비율은 56.6% ± 28.3%이었다. 작동인자 세포 및 표적 세포를 96-웰 U자 바닥 조직 배양 플레이트에 놓고, 2% 인간 AB 혈청(제미니(Gemini), Cat# 100-512)으로 보충된, 페놀 레드(인비트로겐, Cat# 11835-030) 비함유 100 ㎕ RPMI 1640 중에서 다양한 작동인자-표적(E:T) 비로 배양하였다. 배양물은 37 ℃에서 5% CO_2 하에 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 50 ㎕의 상등액을 효소 분석 플레이트로 옮기고, LDH 활성을 제조사에 의해 제공된 바와 같이 검출하고, ELISA 판독기(시너지(Synergy) HT, 바이오테크(Biotek))에서 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 하기 식에 따라 산출하였다: % 세포독성 = (샘플 - 자발적 작동인자 - 자발적 표적)/(최대 표적 - 자발적 표적) x 100(여기서, "자발적 작동인자"는 작동인자 세포로부터 LDH의 자발적 방출에 대한 규준이고; "자발적 표적"은 표적 세포로부터의 LDH의 자발적 방출에 대한 규준이고; "최대 표적"은 필수적으로 100%의 세포가 용해될 때 최대 LDH 방출에 대한 규준이다.

[0450] *인간 태반 관류액(HPP) CD34+ 세포 및 제대혈(UCB) CD34+ 세포의 단리.* HPP 및 UCB 세포를 피콜 또는 염화암모늄을 사용하여 정제하여 전체 유핵 세포(TNC)를 수득하였다. 이어서, 항-CD34 비드 및 로보셉을 제조사(스템셀 테크놀로지스 인코포레이티드)에 의해 제공된 프로토콜에 따라 사용하여 $CD34^+$ 세포를 단리하기 위해 TNC를 양성 선별 절차에 사용하였다. 본 실험에서, $CD34^+$ 세포는 90%보다 큰 순도하에 단리되었다.

[0451] *배양된 2-단계 NK 세포에 대한 종양 세포 민감성에 대한 연구.* 인간 유방암(HCC2218), 인간 대장 선암(HT-29), 인간 만성 골수성 백혈병(CML), 인간 급성 골수성 백혈병(AML), 인간 교모세포종(LN-18 및 U-118MG), 인간 다발성 골수종(U266), 인간 조직구성 림프종(U937), 및 인간 망막모세포종(WERI-RB-1)을 포함한 종양 세포주들(표 6)을 2-단계 NK 세포와 공-배양하였다. 2-단계 배양된 NK 세포는 NK2A 배지에서 21 일 동안 배양한 후 CNK 배지에서 21 일 동안 배양된 것들, 및 NK2A 배지에서 28 일 동안 배양한 후 CNK 배지에서 14 일 동안 배양된 것들을 포함한다. NK 세포 세포독성은 4-시간 공-배양 후에 락테이트 디하이드로게나제(LDH) 방출 분석에 의해 측정하였다. 10:1의 작동인자 대 표적(E:T) 비에서, 표적은 일반적으로 작동인자보다 높은 세포독성을 나타내었다(표 6). 종양 세포주들 중에서, LN-18이 NK-매개 사멸에 가장 민감하였으며, 이어서 K562, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1 및 U266이 뒤를 따랐다.

[0452] 그러므로, TSNK 세포는 다양한 암 세포주에 대해 상당한 세포독성을 나타내었다. 또한, NK 세포독성은 NK2A 배지에서의 배양 기간을 21 일로부터 28 일로 연장시킴으로써 개선될 수 있는 것으로 보인다.

[0454] [표 6] 종양 세포주를 표적화하는 배양된 TSNK의 세포독성

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

[0455]

[0456] *n: 공여체 수.

[0458] *인간 태반 관류액(HPP) CD34+ 세포 및 제대혈(UCB) CD34+ 세포의 마이크로RNA 프로파일링.* 정제된 공여체-일치 HPP 및 UCB CD34+ 세포를 미르바나(MIRVANA, 상표) miRNA 단리 키트(암비온(Ambion), Cat# 1560)를 사용하여 마이크로RNA(miRNA) 제조에 적용하였다. $CD34^+$ 세포(0.5 내지 1.5 x 10^6 세포)를 변성 용해 완충액에서 파괴시켰다. 이어서, 샘플을 산-페놀+클로로포름 추출에 적용시켜 소형 RNA 종에 대해 고도로 농축된 RNA를 단리하였다. 100% 에탄올을 첨가하여 샘플을 25% 에탄올 용액이 되게 하였다. 상기 용해액/에탄올 혼합물을 유리 섬유 필터에 통과시키고, 대형 RNA 종을 고정화시키고, 소형 RNA 종을 여액중에 수거하였다. 이어서, 여액의 에탄올 농도가 55%까지 증가되었으며, 혼합물을 제 2의 유리 섬유 필터에 통과시켰으며, 이때 소형 RNA는 고정화되었다. 상기 RNA를 수회 세척하고, 낮은 이온 강도 용액중에서 용출시켰다. 회수된 소형 RNA의 농도 및 순도는 260 및 280 nm에서 그의 흡광도를 측정함으로써 결정하였다. 시험된 모든 공여체(n = 3)에서 HPP CD34+ 세포에 대해 유일한 것으로 밝혀진 miRNA는 hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b, 및 hsa-miR-520a를 포함하였다.

[0459] <u>실시예 7: 취합된 UCB 및 HPP로부터 $CD34^+$ 세포의 단리</u>

[0460] 본 실시예는 취합된 제대혈(UCB) 및 인간 태반 관류액(HPP)(콤보)으로부터 $CD34^+$ 세포의 단리를 나타낸다. UCB:HPP 취합 비를 평가하기 위해, 3 개의 상이한 취합비의 병렬(side-by-side) 비교를 다음과 같이 수행하였다: (1) 전체 취합: 1x UCB (전체 부피) + 1x HPP (전체 부피); (2) HPP의 부분 취합(33%): 1x UCB (전체 부피) + 0.33x HPP (HPP 부피의 1/3); 및 (3) HPP의 부분 취합(10%): 1x UCB (전체 부피) + 0.10x HPP (HPP 부피의 1/10). 총 N=3의 실험 복제를 수행하였다. 초기 TNC 및 부피를 기록하였다. 이어서, 취합 샘플들을 $CD34^+$ 세포에 대해 정제하고, $CD34^+$ 순도를 해동 후에 측정하였다. 이어서, 해동 후 $CD34^+$ 순도 대 부피 또는 세포수(TNC) 비(콤보의 %로서) 플롯으로부터 그래프적으로 최적 취합 비를 결정하였다. 도 8에서 보이듯이, 종말점 $CD34^+$ 순도는 HPP 부피 함량과 적절히 상관관계를 이루나, HPP TNC 함량과는 그만큼 상관관계를 이루지 않는다. 전체적으로, UCB 85%(v/v), HPP 15%(v/v)가 80% 이상의 순도를 갖는 $CD34^+$ 세포를 수득하기에 최적의 취합비인 것으로 밝혀졌다.

[0461] <u>실시예 8: GBGM(등록상표)-기본 배지를 이용한 NK 세포 배양의 비교</u>

[0462] 본 실시예는 2개의 GBGM-기본 배지를 이용한 NK 세포 배양 공정(3-단계 공정 및 2-단계 공정)의 비교를 보여준다. 두 공정은 표 7에 요약되어 있다. 두 공정 모두 태반 유래의 NK 세포 및 $CD34^+$ 세포의 분화를 위한 기본 배지로서 GBGM을 사용하였다.

[0464] [표 7] 3-단계 및 2-단계 공정의 요약

	3-단계 공정	2-단계 공정
배양 공정	3-단계, GBGM 기반, 무배양보조 세포, 35 일 - 단계 1(9 일): 10% 인간 혈청 AB (HS), LWH 헤파린, TPO, SCF, IL-7, F1t3L(25 내지 27 ng/mL) 함유 GBGM - 단계 2(5 일): 10% HS, LWH 헤파린, SCF, IL-7, F1t3L, IL-15(20 내지 27 ng/mL) 함유 GBGM - 단계 3(21 일): 10% HS, SCF, IL-7, F1t3L, IL-15(20 내지 27 ng/mL), IL-2(1000 U/mL) 함유 GBGM 공정 전체에 걸쳐 50 내지 250 pg/mL 에서 저용량 사이토카인(IL-6, LIF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1a)의 사용	2-단계, 1 단계에서 GBGM, K562/PBMC 배양보조 세포 존재하에, 35 일 - 단계 1(21 일): 10% 인간 혈청, 헤파린, TPO, SCF, IL-7, F1t3L, IL-15 (10 내지 20 ng/mL), IL-2(200 U/mL) 함유 GBGM - 단계 2(14 일): TSNK 배지, 즉, 10% FBS, K562 + PBMC 배양보조 세포, IL-2(200 U/mL) 함유 IMDM에서 TSNK 증폭 과정 단계-2에서 TSNK 유지 배지, 즉, 10% FBS, 2% HS, IL-2(200 U/mL) 함유 IMDM으로 배지 보충

[0465]

[0467] 실험 파라미터는 다음과 같이 개략된다:

[0468] 공여체:

[0469] (1) 새로운 UCB로부터의 $CD34^+$ 세포: N = 6

[0470] (2) 새로운 "콤보"로부터의 $CD34^+$ 세포: N = 2

[0471] (3) 냉동보존된 "콤보"로부터의 $CD34^+$ 세포: N = 8

[0472] 규모: T-25까지 다중웰 접시, 다중 T-75 플라스크까지, 배양 부피 1 내지 80 mL

[0473] 공정 방법:

[0474] (1) 2-단계 공정

[0475] (2) 3-단계 공정

[0476] 배양보조 세포의 사용

[0477] (1) 배양보조 세포 부재

[0478] (2) 불활성화 K562 및 PBMC 배양보조 세포 존재하에, 제 21 일에 배양물에 첨가

[0479] 접종 밀도: 20000 내지 50000 세포/mL

[0480] 실시예 7, 10 및 11에 기술된 방법으로 새로운 UCB 또는 새로운 콤보로부터 $CD34^+$ 세포를 생성하고 냉동보존하였다. 배양물은 37 ℃, >90% 습도 및 5% CO_2 배양기에서 유지시켰다. 세포 성장을 공정전체에 걸쳐 모니터링하고(세포수), 1 주일에 2 회 배지 교체를 수행하여 세포 농도를 $5x10^4$ 내지 $1x10^6$ /mL의 범위 내에서 유지시켰다. 분화는 제 21 일 및 제 35 일에 표현형 분석에 의해 모니터링하였다. 배양보조 세포를 사용한 경우, NK 배양의 제 21 일에, 새로운 3-일 배양된 K562 및 해동 후 알로-PBMC를 미토마이신-C(16 ㎍/mL, 2 시간, 37 ℃)로 불활성화시키고, $1x10^6$ /mL에서 2-단계 공정 조건에 첨가하였다. NK를 분화시키는 것은 $0.5x10^6$ /mL로 표준화시켰다. 제 35 일에, 최종 세포 계수를 수행한 후, 새로 배양되고 PKH 표지된 K562 세포(10:1 E:T 비, 4 시간, 37 ℃)를 사용하는 유세포분석-기반 세포독성 분석을 수행하여 NK 기능을 평가하였다.

[0481] *결과*

[0482] 두 공정을 이용하여 새로운 UCB로부터 유도된 $CD34^+$ 세포에 대한 TNC 증폭 배수의 중앙값은 제 35 일에 필적하

였다. 2-단계 공정은 새로운 콤보-유래 $CD34^+$ 세포에 대해 3-단계 공정보다 높은 TNC 증폭 배수를 제공하는 것으로 나타났다. 전체 TNC 증폭 배수는 두 공정 모두를 사용한 해동 후 콤보로부터 유도된 $CD34^+$ 세포에 대해 필적하였지만, 새로운 UCB 또는 새로운 콤보로부터 유도된 것들보다는 훨씬 더 낮았다. 전체적으로, 3-단계 및 2-단계 공정 모두 배양 종료시 유사한 세포 수율을 제공하였다.

[0483] 제 21 일에, UBC 또는 콤보로부터 유도된 세포에 대한 표현형의 뚜렷한 차이는 없었다. 2-단계 공정은 3-단계 공정(평균 6.1%)보다 높은 비율의 $CD56^+CD3^-$ NK 세포(평균 14.7%)를 제공하였다. 분화 정도(예를 들면, $CD56^+CD3^-$ 수준)는 공여체-의존성인 것으로 나타났다. 두 $CD56^+CD3^-$ (T-세포) 및 $CD56^+CD3^+$ (NKT-유사 세포) 집단 모두의 비율은 모든 경우에서 최소였다.

[0484] 제 35 일에, 높은 종료점 $CD56^+CD3^-$ 순도 수준(2-단계 및 3-단계 공정 각각에 대해 87.2% 및 90.1%)으로 입증되듯이, 두 공정 모두 NK 세포를 분화시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌다. 2-단계 공정에서 배양보조 세포의 첨가는 NK 표현형 순도를 증대시키는 것으로 나타난 반면(배양보조 세포 부재하에 75.3%; 배양보조 세포 존재하에 87.2%), 3-단계 공정을 사용하여 NK 순도에 대한 배양보조 세포의 주목할만한 이점은 나타나지 않았다(배양보조 세포 부재하에 90.1%; 배양보조 세포 존재하에 84.7%).

[0485] 배양된 NK 세포는 전체에 걸쳐 그의 $CD16^-$ 표현형을 유지하였다. 2-단계 공정은 다른 조건(<2%)보다 배양보조 세포의 부재하에서 약간 더 많은 $CD56^+CD3^+$ 세포(평균 11.2%)를 생성하는 것으로 나타났다. 두 공정 모두에서 PBMC 및 K562 배양보조 세포의 존재는 NK 세포 집단에 대한 특정 NK 기능성 마커(NKp46, DNAM-1, CD94)를 상당히 상향조절/활성화시켰다. 전체적으로, NK 순도 및 기능성 마커 발현 프로필은 배양보조 세포 조건이 동일할 때 두 공정 사이에서 필적하는 것으로 밝혀졌다.

[0486] 배양된 NK 세포의 기능성은, 4 시간 시험관내 K562 세포독성 분석에 의해 측정할 때, 배양보조 세포 조건이 동일한 경우 두 공정 사이에서 필적하는 것으로 나타났다. 배양보조 세포-활성화된 NK 세포는, 2-단계 및 3-단계 공정 각각에 대해 93.2% 및 93.6%의 평균 특이적 용해율하에, 시험관내에서 K562 세포를 사멸하는데 매우 효과적이었다.

[0487] 요약하면, 2-단계 및 3-단계 공정은 동일한 배양보조 세포 조건을 사용한 경우 NK 세포에 대해 필적하는 성장, 표현형(순도 및 활성화 마커), 및 시험관내 기능성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 2-단계 공정은 3-단계 공정에 비해 NK 세포를 배양하는 용이함과 편리함을 제공한다.

[0488] <u>실시예 9: 다양한 기본 배지를 이용한 NK 세포 배양의 비교</u>

[0489] 본 연구는 상이한 기본 배지들을 사용하여 $CD34^+$-유래 NK 세포의 분화 및 증폭을 평가하는 것을 목표로 한다.

[0490] 실험 조건은 표 8에 요약되어 있다. 세포는 실시예 11에 기술된 바와 같이 배양되었다. 모든 실험은 다중웰 접시/T-플라스크의 규모로 구성되었고, 37 ℃, >90% 습도 및 5% CO_2 배양기에서 유지되었다. 세포 성장을 계속 모니터링하고(세포수), 1 주일에 2 회 배지 교체를 수행하여 세포 농도를 $5x10^4$ 내지 $1x10^6$ /mL의 범위 내에서 유지시켰다. 분화는 제 21 일 및 제 35 일에 표현형 분석에 의해 모니터링하였다. 제 21 일에, 새로운 3-일 배양된 K562 및 해동 후 알로-PBMC를 불활성화시키고 첨가하여 $1x10^6$ /mL에서 NK 세포 배양을 전개시켰다. NK 세포는 $0.5x10^6$ /mL로 표준화시켰다. 제 35 일에, 최종 세포 계수를 수행한 후, 새로 배양되고 PKH 표지된 K562 세포(10:1 E:T 비, 4 시간, 37 ℃)를 사용하는 유세포분석-기반 세포독성 분석을 수행하여 NK 기능성을 평가하였다.

[0492] [표 8] 다양한 기본 배지의 평가를 위한 실험 조건 요약

CD34+ 공여체	1 UCB 공여체
배양 공정 방법	3-단계 공정
K562 및 PBMC 배양보조 세포	제 21 일에 배양보조 세포 사용
선별된 기본 배지	- GBGM (대조군) - AIM-V - X-VIVO 10 - X-VIVO 15 - 옵티마이저 - 스템스팬 H3000 - 셀그로 - DMEM:F12 - DMEM:F12 w/5 mM OAC(제 7 일부터 제 35 일까지 배양물에 첨가)
접종 밀도 (제 0 일)	50000 /mL

[0493]

[0495] 성장 수율

[0496] 스템스팬 H3000 및 옵티마이저는 제 35 일에 GBGM에 필적하는 성장 수율(TNC 증폭 배수)을 나타내었다. 셀그로, X-VIVO 15, AIM-V, X-VIVO 10, DMEM:F12, DMEM:F12 w/5 mM OAC는 GBGM보다 낮은 성장 수율을 나타내었다.

[0497] 표현형 분석

[0498] 제 35 일(종료점)에, GBGM은 약 80% 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 생성하였다. 옵티마이저 및 스템스팬 H3000은 약 50% 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 생성하였다. DMEM:F12는 약 35% 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 생성하였다. AIM-V, X-VIVO 10, X-VIVO 15 및 셀그로 배지는 약 <30% 순도의 $CD56^{+}CD3^{-}$ 세포를 생성하였다. 배양중 DMEM:F12 기본 배지에 OAC의 첨가는 종료점 NK 순도를 크게 증대시키는 것으로 밝혀졌다; 배양 제 35 일에 $CD56^{+}CD3^{-}$의 비율은 35%에서 72%로 증가되었다.

[0499] 세포독성/기능성

[0500] 배양중 DMEM:F12 기본 배지에 5 mM OAC의 첨가는 NK 세포의 활성화 상태 및 시험관내 기능성을 크게 증대시키는 것으로 밝혀졌다. OAC의 첨가는 또한 NK 활성화 마커 NKp46, NKG2D, DNAM-1, 및 CD94의 수준을 상당히 증가시켰다. 제 35 일 NK 세포의 시험관내 기능성(K562 세포독성)도 또한 21.4%에서 97.1%로 상당히 증가되었다.

[0501] 전체적으로, NK 세포 성질은 5 mM OAC의 첨가로부터 상당히 증대되었다.

[0502] **실시예 10: NK 세포의 저장 및 냉동보존**

[0503] 본 실시예는 NK 세포를 저장하고 냉동보존하는 방법을 나타낸다. 인간 태반 관류액(HPP) 및 제대혈 세포로부터 단리된 $CD34^{+}$ 조혈 줄기 세포를 이전 실시예에서 기술된 프로토콜을 이용하여 증폭시키고 NK 세포로 분화시켰다. 세포는 HPP 및 제대혈로부터 단리된 직후(제 0 일)에 또는 NK 세포의 1차 성장기 동안(단리 후 제 9 일, 제 14 일, 제 21 일 또는 제 35 일에) 냉동보존되었다.

[0504] 세포는 하기의 냉동보존 배합물 중에서 냉동보존되었다: 배합물 1 - 덱스트란 냉동 배지: 5% DMSO(시그마 알드리치, D2650), 55% 덱스트란(표준 식염수중 10% w/v)(0.9% 염화나트륨 주사액중 10% LMD, 호스피라(Hospira)), 40% HAS(옥타파르마(Octapharma); 배합물 2 - 트레할로스 냉동 배지: 5% DMSO, 55% 트레할로스(표준 식염수중 10% w/v), 40% HAS; 배합물 3 - 크리오스토르(등록상표) CS2(바이오라이프 솔루션즈); 배합물 4 - 크리오스토르(등록상표) CS5(바이오라이프 솔루션즈); 배합물 5 - 크리오스토르(등록상표) S10(바이오라이프 솔루션즈); 배합물 6 - 무혈청 냉동 배지(시그마-알드리치, Cat# 6295); 배합물 7 - 글리세롤 냉동 배지(시그마-알드리치, CAT# C6039); 또는 배합물 8 - DMSO 및 혈청-비함유 냉동 배지(시그마-알드리치, CAT# 2639).

[0505] 상이한 시점에 수집된 세포들을 배양 배지 또는 식염수 용액으로 수회 세척하였다. 이어서, 세포를 원심분리하

여 세포 펠릿을 수득하였다. 상등액을 제거하고, 세포 펠릿을 냉동보존 배지로 약 1 x 10^6 내지 1.5 x 10^7 이상 세포/mL로 현탁시켰다. 세포 현탁액을 1 mL 또는 2 mL 격막 바이알에 분취하고 2 내지 8 ℃에서 약 10 분 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 자동온도조절 냉동기(터모)에서 0.5 ℃/분으로 냉동시켰다. 냉동된 바이알을 액체 질소 증기하에 저장하기 위해 극저온 냉동기로 옮겼다. 냉동보존된 NK 세포는 모든 눈에 보이는 얼음이 녹을 때까지 샘플을 약하게 휘저으면서 37 ℃ 수조에서 신속하게 해동할 수 있다. 세포 샘플은 예열된 배양 배지로 희석될 수 있다.

[0506] <u>실시예 11: NK 세포의 저장 및 냉동보존</u>

[0507] 본 실험은 NK 세포를 저장하고 냉동보존하는 또 다른 방법을 나타낸다. 인간 태반 관류액(HPP) 및 제대혈 세포로부터 단리된 $CD34^+$ 조혈 줄기 세포를 전술한 프로토콜을 이용하여 증폭시키고 NK 세포로 분화시켰다. 세포는 HPP 및 제대혈로부터 단리된 직후(제 0 일)에 또는 NK 세포의 1 차 성장기 동안(단리 후 제 9 일, 제 14 일, 제 21 일 또는 제 35 일에) 냉동보존되었다.

[0508] 세포 현탁 용액은 덱스트란-40 및 HSA를 60% 덱스트란-40 v/v, 40% HSA(25% 용액으로부터) v/v의 비로 혼합하여 제조하였다.

[0509] 50% 덱스트란-40 v/v, 40% HSA(25% 용액) v/v, 10% DMSO v/v를 사용하여 2x 냉동 용액을 제조하였다. DMSO를 먼저 덱스트란-40에 서서히 첨가하고 잘 혼합하였다. 이어서, HSA의 25% 용액을 혼합하면서 상기 용액에 서서히 첨가하였다. 생성된 용액을 잘 혼합하고 사용 전에 실온으로 가온시켰다.

[0510] *냉동보존 절차*

[0511] 세포 수를 평가하고 세포 현탁액으로서 세포 현탁 용액중 15x10^6으로 표준화시켰다. 세포 현탁액의 부피를 측정하고, 동 부피의 새로 제조한 2x 냉동 용액을 서서히 첨가하고 혼합하였다. 냉동 용액중 최종 세포 현탁액 부피를 기록하고 다수의 바이알에 분배시켰다. 저장된 배양 현탁액에 미코알러트(MycoAlert) 검사를 수행하여 마이코플라스마 오염을 검출하였다. 1개의 보존 바이알에 해동 후 검사를 수행하여 해동 후 생존율, 세포 회수율 및 세포 특정화를 측정하였다.

[0512] <u>실시예 12: 냉동보존/해동 NK 세포의 분석</u>

[0513] *생존율 분석.* 실시예 10 또는 11에서와 같은 다양한 배합물에 냉동보존된 NK 세포를 해동시켰다. 세포는 2 x 10^6 내지 3 x 10^7 세포/mL의 밀도에서 냉동시켰다. 해동된 NK 세포는 새로운 세포 또는 미리냉동된 세포와 비교하여 해동 후 제 0 일, 제 3 일 및 제 18 일에 카운테스(Countess, 등록상표) 자동 세포 계수기(인비트로겐)를 사용하여 세포 생존율에 대해 평가하였다. 간략하게, 10 ㎕의 세포 샘플을 10 ㎕의 트리판 블루와 혼합하였다. 세포 혼합물을 카운테스(등록상표) 챔버 슬라이드내에 피펫팅하였다. 슬라이드를 기구에 삽입하고 세포를 계수하였다. 냉동-해동 후 세포는 상이한 냉동보존 배합물에 따라서, 생존율의 약 80% 내지 >90%의 세포 생존율을 나타내었다.

[0514] *세포자살 분석.* 해동된 NK 세포는 또한 해동 후 제 0 일, 제 3 일 및 제 18 일에 BD AnnV/PI 세포자살 분석 키트를 사용하여 세포자살에 대해 평가하였다. 간략하게, 세포를 1x 냉 PBS로 2회 세척하고 1x 결합 완충액(BD 아넥신(Annexin) V/PI 세포자살 키트 제품 번호 556547, 결합 완충액 제품 번호 51-66121E 0.1 M Hepes/NaOH(pH 7.4), 1.4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$의 조성물, 1x 희석의 경우 9부의 증류수에 대해 1부의 10x 완충액)에 재현탁시켰다. 약 100,000개 세포를 함유하는 세포 현탁액 100 ㎕를 FACS 튜브로 옮겼다. 100 ㎕의 1x 결합 완충액, 5 ㎕의 AnnV-FITC, 및 5 ㎕의 PI-PE를 튜브에 첨가하였다. 이어서, 튜브를 약하게 볼텍싱하고 암실에서 15 분간 배양하였다. 이어서, 400 ㎕의 1x 결합 완충액을 첨가하였다. 샘플을 1 시간 이내에 분석하였다. 쿼드란트(quadrant) 및 게이트(gate)를 구성하기 위해 사용된 대조군은 비염색 세포, AnnV-FITC 만으로 염색되고 PI로는 염색되지 않은 세포, PI만으로 염색되고 AnnV로는 염색되지 않은 세포였다. 자살 세포는 크기 산란(FSC 대 SSC) 플롯 상에 "세포"로 게이팅된 결과들의 집단의 %로서 정량화되었다. 냉동-해동 후 세포는 상이한 냉동보존 배합물에 따라서 약 5 내지 25%의 사멸/말기 세포자살 세포 및 10 내지 25%의 초기 세포자살 세포를 나타내었다. 전체적으로, 배합물 1(5% DMSO, 55% 덱스트란(표준 식염수중 10% w/v), 40% HAS), 배합물 2(5% DMSO, 55% 트레할로스(표준 식염수중 10% w/v), 40% HSA), 배합물 4(크리오스토르(등록상표) CS5(바이오라이프 솔루션즈)), 및 배합물 5(크리오스토르(등록상표) CS10(바이오라이프 솔루션즈))는 다른 배합물들에 비해 더 높은 세포 생존율 및 더 낮은 자살 세포를 나타내었다.

[0515] <u>실시예 13: 인-프로세스 냉동보존 세포 뱅킹의 평가</u>

[0516] 본 실시예는 인-프로세스 냉동보존 세포 뱅킹(In-Process Cryopreserved Cell Banking)의 평가를 보여준다. 세포 배양은 혈청 공급원으로 HS-AB 또는 FBS를 사용하여 문헌 [Spanholtz *et al*, PLoS One. 5(2):e9221 (2010)]에 기술된 바와 같은 방법을 이용하여 UCB $CD34^+$ 세포를 사용하여 개시하였다. 세포 농도를 측정하고 조정하였으며, 배지를 필요에 따라 보충하였다. 제 7 일, 제 9 일, 제 10 일 또는 제 14 일에, 약 10^6 내지 3 x 10^6 세포를 세포 배양물로부터 제거하고, 원심분리하고, 냉동보존 배지(5.5% v/v 덱스트란-40, 10% v/v HSA, 5% v/v DMSO)에 재현탁하였다. 세포를 자동온도조절 냉동기에서 냉동시키고 냉동보존을 위해 액체상 질소 저장고로 옮겼다. 각 바이알에 약 1 mL 세포를 10^6 내지 10^7 /mL 범위의 농도에서 냉동보존하였다. 남은 배양을 종료점(제 35 일)까지 진행하여 "프레시(비 인-프로세스 냉동보존)"로 지칭하였다. 표현형 분석은 세포 배양의 제 21 일, 제 28 일 및 제 35 일에 수행하였다. 시험관내 기능성(K562 세포독성, 10:1 E:T)은 배양의 제 35 일(종료점)에 평가하였다.

[0517] 인-프로세스 냉동보존 배양 샘플의 해동 후 성능(제 9 일 및 제 14 일)은 다음과 같이 평가하였다. 세포 뱅크 바이알을 37 ℃ 수조에서 신속하게 해동하였다. 이어서, 세포를 RPMI-FBS 배지로 희석하고, 원심분리하고, 재현탁하고, 배양 배지에 접종하였다. 이어서, 배양 조건 각각을 배양 공정 개시로부터 누적하여 제 35 일까지 진행하였다. 분석(세포수, 생존율, 표현형 분석, 기능성 평가)은 그의 "프레시" 상대와 동일한 방식으로 수행하였다.

[0518] *결과*

[0519] 제 9 일, 제 10 일 및 제 14 일 인-프로세스 냉동보존 샘플 모두, 인-프로세스 시점 또는 세포 농도(96.2% 내지 97.3% 트리판 블루 음성, 86.1% 내지 93.2% 아넥신-V 음성/TO-PRO-3 음성)와 무관하게 탁월한 해동 후 생존율을 제공하였다. 인-프로세스 뱅킹은 배양 종료시(제 35 일) 수율 손실에 불리한 영향을 미치지 않았다. 해동 후 제 9 일과 제 14 일 사이의 최종 세포 수율 및 "프레시" 조건은 HS-AB 또는 혈청 공급원으로서 HS-AB를 사용하여 필적한다.

[0520] 제 21 일/제 28 일/제 35 일 시점에서 성숙 NK 세포의 표현형 프로필은 "프레시" 및 "해동 후" 배양 각각 사이에서 매우 필적하는 것으로 밝혀졌다. 표현형 순도(($CD56^+CD3^-$)도 또한 필적하는 것으로 나타났다. 특정 NK 기능성 마커(CD94, NKG2D)의 발현은 실행간(run-to-run) 가변성으로 인해 약간 달랐다.

[0521] K562 세포독성 분석에서, 해동 후 제 9 일/제 14 일 배양된 NK 세포는 비 인-프로세스 냉동보존 배양 NK 세포에 비해 약 0 내지 20% 더 낮은 특이적 K562 용해 판독물을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, NK 세포독성 기능과 관련된 표면 마커(DNAM1, NKp46, NKG2D 등)의 발현 수준이 동시에 감소되지 않은 것을 고려할 때, 상기 경향은 추가의 공여체 및 반복 분석을 사용하여 확인되어야 한다. 전체적으로, 제 9 일/제 14 일 배양에서의 인-프로세스 냉동보존은 공정 결과에 최소의 영향을 미쳤다.

[0522] <u>실시예 14: NK 세포 투여를 위한 해동 후 배지의 개발</u>

[0523] 본 실험은 동물에서 NK 세포 투여를 위한 해동 후 배지의 개발을 보여준다. NK 세포의 생존율, 세포독성, 세포 회수율 및 응집괴(clump) 형성에 대한 주입 배지 및 세포 밀도의 효과를 검사하였다. 생존율은 트리판 블루 염색에 의해 평가하였고; 세포독성은 FACS(10:1 비의 NK:K562)로 평가하였으며, 응집괴 형성은 현미경 분석으로 평가하였다. 결과는 다양한 유형의 주입 배지 및 세포 밀도에 대해 표 9 내지 12에 나타내었다.

[0525] [표 9] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: RPMI + 10% FBS; 주입 배지: PBS + 1% FBS; 세포 밀도: 10x10^6 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	98.8%				
생존율	74.3%	69.0%	66.1%	63.3%	62.4%
세포독성		60.3%		44.3%	
응집괴 형성	없음				

[0526]

[0528] [표 10] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: RPMI + 10% FBS; 주입 배지: PBS + 1% FBS; 세포 밀도: $30x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	98.8%				
생존율(%)	74.3%	69.8%	66.5%	64.0%	63.6%
세포독성(%)		51.8%		37.9%	
응집괴 형성	없음				

[0529]

[0531] [표 11] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: RPMI + 10% FBS; 주입 배지: 플라스마라이트 + 1% HSA; 세포 밀도: $10x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	98.8%				
생존율	74.9%	76.3%	72.0%	70.5%	69.4%
세포독성		59.4%		51.3%	
응집괴 형성	없음				

[0532]

[0534] [표 12] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: RPMI + 10% FBS; 주입 배지: 플라스마라이트 + 1% HSA; 세포 밀도: $30x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	98.8%				
생존율	74.9%	74.7%	71.2%	70.3%	69.9%
세포독성		61.2%		53.9%	
응집괴 형성	없음				

[0535]

[0537] 결과는 플라스마라이트 + 1% HSA 주입 배지가 PBS + 1% FBS 주입 배지보다 더 우수한 생존율 및 세포독성하에 NK 세포를 유지시켰음을 나타내었다. 세포독성은 또한 세포를 주입 배지에 현탁한 후에 시간 경과에 따라 감소되었다. 세포를 플라스마라이트 + 1% HSA에 현탁시켰을 때 생존율 및 세포독성에 대한 세포 밀도의 효과는 관찰되지 않았다. NK 세포는 또한 PBS + 1% FBS 또는 플라스마라이트 + 1% HSA 배지에서 1 시간후에 침강되었지만, 세포는 응집되는 것으로 보이지 않았다. 최종적으로, 냉동-해동 공정으로부터 세포 회수율 및 생존율의 분명한 손실은 없었다.

[0538] <u>실시예 15: NK 세포 투여를 위한 해동 후 배지의 개발</u>

[0539] NK 세포의 생존율, 세포독성, 세포 회수율 및 응집괴 형성에 대한 다양한 HSA 농도의 효과도 또한 검사하였다. 실시예 14와 동일한 방법을 사용하였다. 결과는 다양한 유형의 주입 배지 및 세포 밀도에 대해 표 13 내지 16에 나타내었다.

[0541] [표 13] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: RPMI + 10% FBS; 주입 배지: 플라스마라이트 + 1% HSA; 세포 밀도: $10x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	82.0%				
생존율	75.6%	75.3%	74.5%	71.8%	71.5%
세포독성		64.4%		35.5%	
응집괴 형성	없음				

[0542]

[0544] [표 14] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: 플라스마라이트 + 1% HSA; 주입 배지: 플라스마라이트 + 1% HSA; 세포 밀도: $10x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	102.4%				
생존율(%)	77.1%	77.5%	71.2%	72.4%	75.1%
세포독성(%)		61.48%		31.7%	
응집괴 형성	없음				

[0545]

[0547] [표 15] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: 플라스마라이트 + 2.5% HSA; 주입 배지: 플라스마라이트 + 2.5% HSA; 세포 밀도: $10x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	91.6%				
생존율	83.9%	82.6%	78.9%	79.0%	79.3%
세포독성		71.7%		46.8%	
응집괴 형성	없음				

[0548]

[0550] [표 16] 시험된 특정 조건의 세포 회수율, 생존율, 세포독성 및 응집괴 형성

해동 배지: 플라스마라이트 + 5% HSA; 주입 배지: 플라스마라이트 + 5% HSA; 세포 밀도: $10x10^6$ 세포/ml					
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
세포 회수율	81.2%				
생존율	81.8%	80.7%	78.2%	78.3%	78.6%
세포독성		64.8%		55.1%	
응집괴 형성	없음				

[0551]

[0553] 결과들은 시험한 3개 주입 배지 모두에서 해동 후 4 시간 동안 생존율이 잘 유지되었음을 보여준다. 또한, 세포독성은 3개 주입 배지 모두에서 시간 경과에 따라 감소되었다. 그러나, 감소 수준은 HSA의 보다 높은 농도에서 더 작았던 반면 플라스마라이트 + 5% HSA는 최고 세포독성을 유지하였다. 또한 NK 세포는 3개 주입 배지 모두에서 응집되지 않은 것으로 관찰되었다. 전체적으로, 플라스마라이트는 PBS보다 우수한 주입 배지 후보인 것으로 보인다.

[0554] <u>실시예 16: IL-2의 부재하에서 NK 세포의 배양</u>

[0555] 본 실시예는 IL-2의 부재하에서 NK 세포의 배양을 나타낸다. 세포 배양은 실시예 11에 기술된 2-단계 방법에 의해 수행하였다. 제 1 배지에서 5가지 상이한 농도의 IL-2를 시험하였다: 0, 200, 500, 1000, 2000 U/mL.

[0556] 결과는 배양중 NK 세포를 발달시키는 것이 성장시 IL-2에 반응하는 것으로 나타나지 않았음을 시사한다. NK 세포의 순도는 IL-2에 의존하는 것으로 보이지 않았다: NK 세포는 IL-2의 부재하에서 $CD56^+CD3^-$ 표현형으로 분화한다. IL-7, IL-15 및 SCF의 혼합물은 시험관내 NK 세포 발달에 충분한 것으로 나타났다.

[0557] <u>실시예 17: 자연 살해(NK) 세포로의 CD34+ 태반 조혈 세포의 배양 및 특성화</u>

[0558] 본 실시예는 자연 살해(NK) 세포 집단으로의 CD34+ 태반 조혈 세포의 증폭 및 분화를 위한 3-단계 배양 공정을 기술한다. 본 배양 공정의 35 일의 3-단계 배양 공정 후에 수득된 세포 집단("D35 NK 세포"로 지칭)도 또한 본 실시예에서 기술되고 특성화된다.

[0559] <u>재료 및 방법</u>

[0560] **NK 세포로의 조혈 줄기 세포(HSC)의 증폭 및 분화를 위한 배양 공정**. CD34+ 세포를 GBGM 배지(글리코스템 테라퓨틱스; 문헌 [Spanholtz, et al., PLoS One (2010) 5(2):9221] 참조)에서 배양하고, 세포수, 세포 생존율, 림프구 분화의 특성화 및 기능 측정의 평가를 위해 세포 분취량을 취하였다. 시험관내 증폭 및 NK 계통 결정을

개시하기 위해, CD34+ 세포를 GBGM 배지에 접종하였다. 세포를 다음과 같은 3 단계로 무배양보조 세포 배양으로 배양하였다:

[0561] 단계 1(9 일): 10% 인간 혈청 AB(HS), LWH 헤파린, TPO, SCF, IL-7, Flt3L(25 내지 27 ng/mL) 함유 GBGM;

[0562] 단계 2(5 일): 10% HS, LWH 헤파린, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15 (20 내지 27 ng/mL) 함유 GBGM; 및

[0563] 단계 3(21 일): 10% HS, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15(20 내지 27 ng/mL), IL-2 (1000 U/mL) 함유 GBGM.

[0564] **락테이트 디하이드로게나제(LDH) 방출 분석**. LDH는 세포 용해시 방출되는 안정한 시토졸 효소이다. LDH 방출에 대한 분석은 사이토톡스 96(등록상표) 비색 세포독성 분석 키트(프로메가, Cat# G1780)를 사용하여 수행하였으며, 배양된 D35 NK 세포를 작동인자 세포로 사용하고 종양 세포를 표적 세포로 사용하였다. 작동인자 세포 및 표적 세포를 96-웰 U자 바닥 조직 배양 플레이트에 놓고, 페놀 레드(인비트로겐, Cat# 11835-030)를 함유하지 않고 2% 인간 AB 혈청으로 보충된 100 ㎕ RPMI 1640(인비트로겐, Cat# 11835-030) 중에서 다양한 작동인자-표적(E:T) 비로 배양하였다. 배양물은 37 ℃에서 5% CO_2 하에 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 50 ㎕의 상등액을 효소 분석 플레이트로 옮겼다. LDH 활성을 제조사에 의해 제공된 바와 같이 검출하고, ELISA 판독기(시너지 HT, 바이오테크)에서 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 하기 식에 따라 산출하였다: % 세포독성 = (샘플 - 자발적 작동인자 - 자발적 표적)/(최대 표적 - 자발적 표적) x 100

[0565] **시험관내 세포독성 분석**. 작동인자 세포로서 배양된 D35 NK 세포 및 표적 세포로서 종양 세포를 사용하여 직접적 세포독성 분석을 수행하였다. 그의 친유성 지방족 잔기로 인해 세포질막 내에 삽입되는 PKH26(시그마-알드리치 카탈로그# PKH26-GL)(문헌 [Ferlazzo G, et al, 2004, PNAS USA 101(47):16606-11; Lee-MacAry AE, et al, 2001, J Immunol Methods 252(1-2):83-92] 참조)으로 종양 세포를 표지화한 다음, 96-웰 U자 바닥 조직 배양 플레이트에 놓고, 10% FBS로 보충된 200 ㎕ RPMI 1640 중에서 다양한 작동인자-대-표적(E:T) 비에서 배양된 D35 NK 세포와 함께 배양하였다. 배양물을 37 ℃에서 5% CO_2 하에 4 시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 세포를 수거하고, TO-PRO-3(인비트로겐 Cat# T3605), 막-불투과성 DNA 착색제를 배양물에 1 mM 최종 농도로 첨가한 후, BD FACSCanto I을 사용하여 분석을 행하였다. 세포독성은 전체 PHK26+ 표적 종양 세포내 사멸 세포($PKH26^{+}TO\text{-}PRO\text{-}3^{+}$)의 비율로 나타내었다.

[0566] **생체분포 및 효능 연구를 위한 생체내 마우스 모델**. 6 내지 8 주령의 암컷 NSG(NOD-CgPrkdc-scid-Il2rg-tm1Wjl-Sz) 마우스(더 잭슨 래버러토리(The Jackson Laboratory); 미국 메인주 바하버)를 연구에 사용하였다. 생체내 효능 연구는 표 17에 나타낸 바와 같이 구성되었다.

[0568] [표 17] 생체내 D35 NK 세포 효능을 평가하기 위한 연구 군

	군	종양 모델	마우스#	처리	용량 및 투여경로	투여 부피
단계 1	1	K562	8	대조군	비히클 (i.v.)`	0.4 mL
	2	K562	8	새로운 NK*	6.0E6 (i.v.)	0.4 mL
	3	K562	8	대조군	비히클 (IT)	0.03 mL
	4	K562	8	새로운 NK	2.0E6 (IT)	0.03 mL
	5	U-87MG	8	대조군	비히클 (i.v.)	0.4 mL
	6	U-87MG	8	새로운 NK	6.0E6 (i.v.)	0.4 mL
	7	U-87MG	8	대조군	비히클 (IT)	0.03 mL
	8	U-87MG	8	새로운 NK	2.0E6 (IT)	0.03 mL
	9	HCT-116	8	대조군	비히클 (i.v.)	0.4 mL
	10	HCT-116	8	새로운 NK	6.0E6 (i.v.)	0.4 mL
	11	HCT-116	8	대조군	비히클 (IT)	0.03 mL
	12	HCT-116	8	새로운 NK	2.0E6 (IT)	0.03 mL

[0569] *NK = D35 NK 세포

[0571] 마우스를 미세단리장치 우리에 수용시키고, 연구 개시 전에 수일 동안 격리하였다. 마트리겔로 재현탁시킨, 지수 성장기의 총 5 x 10^6 K562 세포, 또는 6 x 10^6 HCT-116 세포, 또는 2 x 10^6 U087MG 세포를 마우스의 우측 옆구리 부위에 피하 이식하였다. 마우스를 세포 이식 후 매일 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 이르면, 평균값에 가장 가까운 종양 부피를 갖는 마우스를 사용하여 마우스를 군으로 무작위배정하

였다. D35 NK 세포에 의한 처리는 무작위배정 그 다음날 개시하였으며, 오직 하나의 단일 용량의 D35 NK 세포를 마우스에 투여하였다. 투여 경로는 표 17에 기술된 바와 같이 i.v.(마우스당 6 x 10^6 NK 세포) 또는 I.T.(마우스당 6 x 10^6 NK 세포) 주사였다. 종양 부피는 식 V = L x W x H x π/6을 이용하여 측정하였으며, 여기서, L 및 W는 종양의 더 길고 더 짧은 직경을 나타내고, H는 종양의 높이를 나타낸다. 전체 연구 동안 계속, 종양 부피 및 체중을 1 주일에 2 회씩 측정하였다. 동물들은 D35 NK 세포의 처리로부터의 가능한 독성 효과에 대해 관찰하였다. 종양 부피가 > 1,500 mm^3에 이르거나 원래 체중의 손실이 20%를 초과하거나 종양 궤양이 생기거나 마우스가 빈사상태가 되면, 계획되지 않은 희생을 행하였다. 실험 종료시, 대조군 및 각 처리군의 종양 성장 속도에 대한 통계학적 분석을 수행하였다.

[0572] **통계학적 분석**. 상이한 실험들로부터의 결과는 평균 ± 평균의 표준 편차(STDEV)로 기술한다. 결과는 0.05 이하의 *P* 값에서 유의적인 것으로 간주하였다.

[0573] <u>결과</u>

[0574] **시험관내에서 종양 세포에 대한 D35 NK 세포의 세포독성**. 종양 세포주에 대한 35 일 배양된(D35) NK 세포 집단의 세포독성 활성을 평가하였다. 도 9에서 보이듯이, 10:1의 작동인자-대-표적(E:T) 비에서, 배양된 D35 NK 세포는, 종양 세포를 PKH26-TOPRO로 표지화한 FACS-기반 시험관내 세포독성 분석에 의해 검출할 때, NTERA-2cl.D1(NT2/D1, 고환암), PC-3(전립선 선암), U-87MG(교모세포종), K562(만성 골수성 백혈병(CML)), KG-1a(급성 골수성 백혈병(AML)), 및 BT474(유방암)를 포함하여, 다양한 종양 세포주에 대한 세포용해 활성을 나타내었다. D35 NK 세포 집단 세포독성은 효과적이었지만, 시험한 다른 세포주에 비해 라지(Raji) 세포(림프종)에 대해 최저였다. LDH 방출 분석을 이용하여, 도 10에 나타낸 바와 같이, HCT-116 세포(대장암)에 대한 D35 NK 세포의 세포독성을 또한 측정하였다.

[0575] **마우스 이종이식된 종양에 대한 D35 NK 세포의 세포독성**. 면역결핍 마우스에서 이종이식 종양에 대한 D35 NK 세포 집단의 생체내 효능 연구를 수행하였다. 도 11 내지 14b에서 보이듯이, D35 NK 세포 집단의 단일 용량 투여는 다양한 종양의 이종이식 NSG 마우스 모델에서 종양 성장 억제를 나타내었다. 도 11은 제 13 일에 CML(K562 세포)의 성장 억제를 보여준다. 도 12는 제 28 일에 대장암(HCT-116 세포)의 성장 억제를 보여준다. 도 13은 제 24 일에 교모세포종(U-87MG 세포)의 성장 억제를 보여준다. 유방암(BT474 세포)의 이종이식 모델에서, D35 NK 세포 집단은 사이토카인 IL-2 또는 IL-15의 존재 및 부재하에서 투여되었다. 도 14a 및 14b에 나타낸 바와 같이, D35 NK 세포 집단의 성장 억제 효과는 IL-2 또는 IL-15의 존재 및 부재하 둘 다에서 관찰되었다.

[0576] **D35 NK 세포 집단은 BT474 이종이식된 NSG 모델에서 종양 침윤 능력을 나타낸다**. 전술한 D35 NK 세포 집단-처리된 BT474 이종이식 실험의 종료점으로부터 BT474 이종이식의 생체외 면역조직화학(IHC) 분석(도 14b)은 D35 NK 세포 집단이 NSG 마우스에서 확립된 BT474 종양 이종이식편으로 향하고 그 속으로 침윤됨을 보여준다. 특히, 종양 이종이식 절편의 영상화는, 형광 표지된 항-CD56(도 15b) 및 항-NKp46(도 15c)에 의해 검출할 때, 괴사성 종양 세포(헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색에 의해 가시화됨; 도 15a)가 종양-침윤된 D35 NK 세포 집단과 공-편재화됨을 나타내었다. 상기 결과들은 D35 NK 세포 집단이 생체내에서 종양에 대해 세포용해 활성을 가짐을 시사한다.

[0577] <u>실시예 18: 이종이식 종양에 대한 D35 NK 세포 활성의 특성화</u>

[0578] 본 실시예에서는, 마우스 이종이식 모델에서 K562 및 RPMI8226에 대한 D35 NK 세포 집단 단독 및 IL-2와 병용될 때의 치료 효능을 평가하였다.

[0579] <u>재료 및 방법</u>

[0580] **마우스**. 잭슨 래버러토리즈로부터 입수한 NSG (NOD-CgPrkdc-scid-Il2rg-tm1Wjl-Sz) 암컷.

[0581] **세포**. CML 세포주 K562로부터의 세포를 500만개 세포/옆구리로 마트리겔과 함께 피하 주사하였다. 3개의 다발성 골수종(MM) 세포주, RPMI8226, BT474, HL-60을 사용하였다. 배양된 D35 NK 세포 집단을 즉시 주입을 위해 새로운 세포 현탁액으로서 공급하였다.

[0582] **처리 방법**. 3-단계 방법에 의해 제조된 D35 NK 세포 집단에 의한 처리는 종양 확정(종양 크기 = 100 mm^3) 후 개시되었다. 실험군은 종양 존재량 분포를 기준으로 무작위배정하였다. 처리군은 표 18에 나타내었다.

[0584] [표 18] (군 1 내지 4, 9 내지 10 = 분석된 샘플; 군 5 내지 8, 11 내지 12 = 예상 샘플)

군	종양 모델	마우스#	처리	용량 및 투여 경로	투여 부피
1	K562	8	대조군	비히클 (i.v.)	0.4 mL
2	K562	8	NKs*	6.0E6 (i.v.)	0.4 mL
3	K562	8	대조군	비히클 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
4	K562	8	NKs	6.0E6 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
5	RPMI822	8	대조군	비히클 (i.v.)	0.4 mL
6	RPMI822	8	NKs	6.0E6 (i.v.)	0.4 mL
7	RPMI822	8	대조군	비히클 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
8	RPMI822	8	NKs	6.0E6 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
9	BT474	8	대조군	비히클 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
10	BT474	8	NKs	6.0E6 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
11	HL-60	8	대조군	비히클 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL
12	HL-60	8	NKs	6.0E6 + IL-2 (i.v.)	0.4 mL

[0585] * NKs = D35 NK 세포

[0587] **면역조직화학**. 면역조직화학에 하기 항체들을 사용하였다: CD56의 검출을 위해, 아브캄(Abcam) ab9272로부터의 항-NCAM 클론 123C3 마우스 단클론성 IgG1, 인비트로겐으로부터의 2차 항체 AF594 접합된 염소 항-마우스 IgG_1; NKG2D의 검출을 위해, 아브캄 ab35033으로부터의 클론 ID11 마우스 단클론성 IgG, 인비트로겐으로부터의 2차 항체 AF488 접합된 염소 항-마우스 IgG_1; 및 NKp46의 검출을 위해, 알앤디 시스템즈 AF1850으로부터 염소 다클론성 IgG, 인비트로겐으로부터의 2차 항체 AF488 접합된 당나귀 항-염소 IgG. 이종이식편 절제시, 각 종양의 절반을 액체 질소에서 냉동시키고 -80 ℃에서 저장하였다. 다른 절반은 즉시 최적 절삭 온도(Optimum Cutting Temperature, OCT) 배지에 포매시키고 액체 질소에서 냉동시켰다. 5 ㎛ 절편을 크리오스타트(cryostat)(레이카(Leica), 미국 일리노이주 디어필드)를 사용하여 절삭하였다. 상기 절편들을 PBS에서 희석하고, 실온(RT)에서 PBS 중에 2% 카세인 용액, 5% 말 혈청 및 0.3% 트리톤(Triton)-X100을 함유하는 단백질 차단 용액에 60 분 동안 노출시켰다. 이어서, 차단 용액에 희석된(1:50) 1 차 항체를 세포에 적용하고 4 ℃에서 밤새 배양하였다. 다음날 아침, 샘플을 PBS에서 세척하고, 차단 용액에 희석된(1:500) 2 차 항체를 RT에서 30 분 동안 세포에 적용하였다. 이어서, 슬라이드를 PBS에서 세척하고, 600 nM DAPI 용액을 RT에서 10 분 동안 적용하여 핵을 가시화시켰다. 모든 슬라이드는 형광을 위한 수성 배지(벡타쉴드(VECTASHIELD), 벡터 래버러토리즈(Vector Laboratories))를 사용하여 탑재시켰다. 면역조직화학 영상은, 영상 포착 및 기록저장을 위한 NIS 엘러먼츠(NIS Elements) 소프트웨어가 장착된 PC에 연결된 고해상도 디지털 카메라(니콘(Nikon) DXM1200F)가 장착된 니콘 에클립스(NIKON Eclipse) 현미경 모델 E800을 사용하여 포착하였다. 상기 실험을 위한 대조군은 새로 제조된 D35 NK 세포 및 사이토스핀(cytospin) 슬라이드 상에서 제조된 K562 세포였다.

[0588] <u>결과</u>

[0589] D35 NK 세포 집단 처리 스케줄의 종료 후에, 이종이식편을 마우스로부터 절제하였다. 각 종양의 절반을 액체 질소에서 냉동시키고 -80 ℃에서 저장하였다. 다른 절반은 즉시 최적 절삭 온도(OCT) 배지에 포매시키고 액체 질소에서 냉동시켰다. 5 ㎛ 절편을 크리오스타트(레이카, 미국 일리노이주 디어필드)를 사용하여 절삭하였다. 상기 절편들을 통상적인 조직학 및 면역형광 연구를 위해 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색에 사용하였다.

[0590] 항체가 특이적인 것을 확인하기 위해 면역형광 실험을 수행하였다. 도 16a에서 보이듯이, K562 세포는 CD56, NKG2D, 또는 Nkp46 마커를 발현하지 않는다. 도 16b에서 보이듯이, 새로 제조된 D35 NK 세포 집단은 상기 3개 마커에 대해 양성으로 염색되었다. 항체 각각에 대한 이소타입 대조군에서 항체의 비특이적 결합으로부터의 배경은 관찰되지 않았다.

[0591] 도 17b에서 나타나듯이, 10^6 세포의 D35 NK 세포 집단의 주입 후에, 세포는 높은 효율하에 K562 종양으로 편재화되고 실질적인 생체내 생존을 나타내었다. 이것은 NKG2D(중앙)를 갖는 CD56 항원(왼쪽)에 대한 양성 신호의 공-편재화에 의해 입증되었다. D35 NK 세포 집단의 세포의 존재하에서 및 IL-2의 존재 및 부재하에서 K562 종양 세포 사멸은, 도 17b(IL-2 부재) 및 도 17d(IL-2 존재)에서 보이는 바와 같이, 종양 세포 집단에 증가된 수의 과립(세포자살 핵)에 의해 입증되었다. 반대로, 성장하는 종양의 형태를 나타낸 도 17a에서 보이듯이, 비히클 대조군(D35 NK 세포 집단 또는 IL-2 부재하의 K562 세포)에서는 입상이 관찰되지 않았다. 어떤 이론 또는

메카니즘에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 조직병리학적 관찰은 D35 NK 세포 집단의 투여후 종양 부피의 감소가 세포자살에 기인할 가능성이 있음을 시사한다.

[0592] D35 NK 집단-처리된 BT474 마우스 이종이식 종양 모델의 면역조직화학은 종양 세포독성을 개시하는 IL-2 단독의 능력(도 17E)이 D35 NK 세포 집단의 투여에 의해 증가되었음(도 17f)을 입증한다.

[0593] 그러므로, 상기 결과들은 D35NK 세포가 다양한 인간 종양 유형에 대해 세포용해 활성을 나타냄을 입증한다.

[0594] <u>실시예 19: 마우스에서 3-단계 공정을 사용하여 배양된 D35 세포의 특성화</u>

[0595] 본 실시예는 D35 NK 세포 집단의 생체분포 및 표현형 특성화 연구를 기술한다.

[0596] <u>재료 및 방법</u>

[0597] **NK 세포로의 조혈 줄기 세포(HSC)의 증폭 및 분화**. 시험관내 증폭 및 NK 계통 결정을 개시하기 위해, CD34+ 세포를 GBGM 배지에 접종하였다. 세포를 저용량(50 내지 250 pg/mL)의 사이토카인(IL-6, LIF, G-CSF, GM-CSF, MIP-1a)의 존재하에 무배양보조 세포 배지에서 전술한 바와 같은 3단계로 배양하였다.

[0598] **생체분포 및 효능 연구를 위한 생체내 마우스 모델**. 6 내지 8 주령의 암컷 NSG(NOD-CgPrkdc-scid-Il2rg-tm1Wjl-Sz) 마우스(더 잭슨 래버러토리; 미국 메인주 바하버)를 연구에 사용하였다. 마우스를 미세단리장치 우리에 수용시키고, 연구 개시 전에 수일 동안 격리하였다. 마트리겔로 재현탁시킨, 지수 성장기의 총 5 x 10^6 K562 세포를 마우스의 우측 옆구리 부위에 피하 이식하였다. 마우스를 세포 이식후 매일 종양 성장에 대해 모니터링하였다. 종양 부피가 약 100 mm^3에 이르면, 평균값에 가장 가까운 종양 부피를 갖는 마우스를 사용하여 마우스를 군으로 무작위배정하였다. D35 NK 세포 집단에 의한 처리는 무작위배정 그 다음날 개시하였으며, 오직 하나의 단일 용량의 D35 NK 세포 집단을 마우스에 투여하였다. 투여 경로는 표 17에 기술된 바와 같이 i.v.(마우스당 6 x 10^6 NK 세포) 또는 종양내(I.T.)(마우스당 6 x 10^6 NK 세포) 주사였다. 종양 부피는 식 V = L x W x H x π/6을 이용하여 측정하였으며, 여기서, L 및 W는 종양의 더 길고 더 짧은 직경을 나타내고, H는 종양의 높이를 나타낸다. 전체 연구 동안 계속, 종양 부피 및 체중을 1 주일에 2 회씩 측정하였다. 동물들은 D35 NK 세포 집단의 처리로부터의 가능한 독성 효과에 대해 관찰하였다. 종양 부피가 > 1,500 mm^3에 이르거나 원래 체중의 손실이 20%를 초과하거나 종양 궤양이 생기거나 마우스가 빈사상태가 되면, 계획되지 않은 희생을 행하였다. 실험 종료시, 대조군 및 각 처리군의 종양 성장 속도에 대한 통계학적 분석을 수행하였다.

[0599] **메틸셀룰로스 콜로니 형성 분석**. 콜로니 형성 세포(CFC) 분석으로도 지칭되는 메틸셀룰로스 콜로니 형성 분석을 제조사의 프로토콜(스템셀 테크놀로지스 인코포레이티드)에 따라 수행하였다. 간략하게, CD34+ 세포 현탁액 또는 시험 세포를, 플레이트당 상이한 세포 밀도에서, 지시된 바와 같은 사이토카인으로 보충된 메틸셀룰로스 배지에 넣었다. 각 세포 밀도에 대해, 3중 분석을 수행한 후 2 내지 3 주 배양하였다. 콜로니 평가 및 계수는 광 현미경을 사용하여 수행하였다.

[0600] **통계학적 분석**. 상이한 실험들로부터의 결과는 평균 ± 평균의 표준 편차(STDEV)로 기술한다. 결과는 0.05 이하의 *P* 값에서 유의적인 것으로 간주하였다.

[0601] <u>결과</u>

[0602] **마우스에서의 생체분포 및 지속성**. 인간 IL-3, SCF 및 GM-CSF의 전이유전자 발현하에 NSG 면역결핍 마우스에서 인간 조혈 미세환경 모델로 입양 전달 후에 D35 NK 세포 집단의 세포들의 생체내 생체분포 및 지속성을 분석하였다. 동물들을 치사량에 가까운 방사선조사(260 Rad)에 의해 전처리하고, D35 NK 세포 집단을 꼬리 i.v. 주입(6x10^6 세포/동물)에 의해 투여하였다. 전이된 인간 세포의 지속성, 조직 분포 및 세포 표면 표현형을 4 주 동안 유세포분석에 의해 분석하였다. 동물들을 연구 과정 동안 인간 재조합 IL-2 또는 IL-15 사이토카인의 매일 주사로 처리하여 임상적으로 적절한 보조 사이토카인 치료에 대한 D35 NK 세포 집단의 생체내 반응을 측정하였다.

[0603] 전이된 인간 세포는 말초혈, 비장, 간 및 골수에서 입양 전달 후 4 번의 주간 시점들(제 7 일, 제 14 일, 제 21 일 및 제 28 일)에서 분석하였다. D35 NK 세포 집단의 세포는 말초혈 및 골수에서 및 간 및 비장 세포 현탁액에서 세포 표면 인간 CD45 발현의 유세포분석에 의해 검출하였다. 도 18b 및 도 18d에서 보이듯이, IL-15 보조 치료를 받은 동물에서, D35 NK 세포 집단의 세포는 전체 4-주 시간 과정 내내 수용체 마우스 CD45+ 세포의 1 내지 5%의 상대 빈도로 말초혈에서 존속되었다. 인간 CD45+ 세포는, IL-15 처리된 동물에서 전이 후 제 21 일에

간에서 수용체 마우스 CD45+ 세포 집단에 비해 20% 이하의 빈도에 도달하여(도 18d), D35 NK 세포의 간-특이적 귀소성을 시사하였다. 동일한 동물에서, D35 NK 세포 집단의 세포는 또한 전체 4 주 과정 내내 비장 및 골수에서 용이하게 검출가능하였다. IL-2 보조 치료를 받은 동물에서(도 18a 및 도 18c), 인간 세포는 IL-15가 공투여된 마우스에 비해 훨씬 더 낮은 수준으로 검출되어(도 18b 및 도 18d), IL-15가 D35 NK 세포 집단 세포의 생체내 생존 및/또는 지속성을 증대시킴을 시사하였다.

[0604] 상기 결과들은 D35 NK 세포 집단의 세포가 마우스에서 4 주 이상 존속됨을 입증한다.

[0605] **마우스에서 3-단계 D35 NK 세포의 표현형 및 기능적 성숙.** 전술한 생체분포 연구로부터 D35 NK 세포 집단의 생체외에서 검출된 세포를 NK 세포 성숙의 기능적으로 관련된 마커인 CD16의 발현에 대해 분석하였다. 도 19에서 보이듯이, 시험관내에서 D35 NK 세포 집단의 세포는, 증폭된 태반 CD34+ 줄기 세포로부터 생성된 미성숙 NK 표현형과 일치하게, 낮은 수준(5% 미만)의 CD56+CD16+, CD56+KIR2DL2/DL3/DS2+, 및 CD56+KIR3DL1/DS1 세포를 갖는다. 도 20에서 보이듯이, IL-15 처리된 NSGS 마우스에서, D35 NK 세포 집단의 세포는, 50%까지의 CD56+CD16+, 및 90% 이상의 CD56+KIR+에 이르는, 생체내 CD16 발현의 점진적 증가를 나타낸다. 또한, 상기 연구에서 보이듯이, D35 NK 세포 집단의 세포는 입양 전달 4 주 후에 말초혈에서 검출되었다. 상기 결과들은 모두 생체내에서 D35 NK 세포 집단 세포의 기능적 성숙에 대한 증거를 제공한다.

[0606] 상기 결과들은 D35 NK 세포 집단의 미성숙(CD16-) 세포들의 상당한 부분이 생체내에서 CD16+로 되었음을 입증하여, 표현형 및 기능적 성숙을 시사한다.

[0607] **D35 NK 세포 집단의 항종양 활성.** 본 실험에서, 유전적으로 유도된 백혈병 모델(문헌 [Mulloy et al., *Cell Cycle*. 2008 Nov 1;7(21):3314-9]에 개관되어 있음)을 이용하여 동종이계 백혈병-개시 세포에 대한 D35 NK 세포 집단 및 정상적인 비-형질전환된 제대혈("UCB") CD34+ 세포 대조군의 특이적 세포독성 활성을 검사하였다. 세포독성 활성은 2 개의 상이한 방법을 이용하여 측정하였다.

[0608] 간략하게, 첫번째 방법으로, 정상 및 백혈병 전구 세포를 액체 분석법에서 공-배양하고, 4-시간 배양 후 공배양물중 잔류하는 표적 세포의 수를 계수함으로써 D35 NK 세포-유도된 세포독성을 측정하였다. 두번째 방법으로, 정상 CD34+ 및 백혈병 전구 세포를 D35 NK 세포 집단과 함께 4 시간 동안 공-배양한 다음, 메틸셀룰로스 배지에서의 2 차 콜로니 형성 세포 분석에 플레이팅하였다. 메틸셀룰로스 콜로니 형성 분석은 정상 및 백혈병 줄기/전구 세포에 대한 D35 NK 세포 집단의 특이적 세포독성 활성의 판독정보로 사용되었다. 도 21 및 22에 나타낸 결과는 D35 NK 세포 집단과의 공-배양에 의한 백혈병 전구세포 활성의 완벽한 억제 및 정상적인 동종이계 CD34+ 전구세포에 대한 무영향을 입증한다.

[0609] 상기 결과들은, D35 NK 세포 집단이 MLL-AF9 융합 단백질을 발현하는 조작된 UCB CD34+ 세포(상기 조작된 CD34+ 세포는 면역결핍 마우스에 이식된 후 백혈병으로 발전될 수 있다)에 대해 세포독성을 나타내지만, 백혈병 전구 세포의 클론형성성(clonogenicity)의 제거에 의해 명백한 정상 UCB CD34+ 세포에 대해서는 세포독성을 나타내지 않음을 입증한다.

[0610] **D35 NK 세포 집단은 이종이식체 질환을 억제한다.** 유전적으로 유도된 백혈병 모델을 D35 NK 세포 집단의 생체내 세포독성을 평가하기 위한 실험에 사용하였다. 도 23a에 도식화된 바와 같이, MLL-AF9 융합 유전자에 의해 형질도입된 UCB CD34+ 세포의 이식 후에, 마우스를 제 8 일, 제 9 일 및 제 10 일에 화학치료제(DA: 시타라빈(50 mg/kg)/독소루비신(1.5 mg/kg))로 처리하였다. D35 NK 세포 집단의 세포(6×10^6 세포/마우스) 및 IL-15를 제 11 일에 투여하였다. GFP-발현 MLL 세포의 FACS 분석을 수행하여, 마우스가 더 빨리 죽지않는 한, 이식 후 제 58 일로 규정된 실험 종료점에서 잔류하는 백혈병 세포의 빈도를 측정하였다. 대조군, 즉, PBS(도 23b) 또는 IL-15를 투여한 마우스(도 23c), 또는 IL-15 및 화학치료제 단독을 투여한 군(도 23d) 또는 D35 NK 세포 집단과 IL-15 및 화학치료제의 조합을 투여한 군(도 23e)에 대해 각각의 그래프를 나타내었다. 도 23f에서 보이듯이, 제 58 일에, 대조군 마우스의 65%가 AML 세포에 대해 양성이었고; 화학치료제로 처리된 군에서는, 마우스의 40%가 AML 세포에 대해 양성이었으며; 화학치료제와 D35 NK 세포 집단 둘 다로 처리된 군에서는, AML 세포에 대해 양성인 마우스가 없었다.

[0611] 상기 결과들은 D35 NK 세포 집단이 인간 이종이식체 백혈병 모델에서 화학치료 후에 백혈병 질환의 생체내 재발을 억제함을 입증한다.

[0612] <u>실시예 20: 자연 살해 전구 세포 집단의 생성 및 특성화</u>

[0613] 본 실시예는 CD34+ 태반 조혈 세포의 자연 살해(NK) 전구 세포 집단으로의 증폭 및 분화를 위한 3-단계 배양 공

정을 기술한다. 상기 배양 공정의 21 일 후에 수득된 NK 전구 세포 집단도 또한 본 실시예에서 기술되고 특성화된다.

[0614] <u>재료 및 방법</u>

[0615] **조혈 줄기 세포(HSC)의 NK 전구 세포 집단으로의 증폭 및 분화를 위한 배양 공정**. CD34+ 세포를 GBGM 배지(글리코스템 테라퓨틱스; 문헌 [Spanholtz, et al., PLoS One (2010) 5(2):9221] 참조; GBGM은 IMDM을 기반으로 하는 동물-유래 성분 비함유 배지이며 인간-유래 또는 인간 재조합 단백질을 함유한다)에서 배양하고, 세포수, 세포 생존율, 림프구 분화의 특성화 및 기능 측정의 평가를 위해 세포 분취량을 취하였다. 시험관내 증폭 및 NK 계통 결정을 개시하기 위해, CD34+ 세포를 GBGM 배지에 접종하였다. 세포를 다음과 같은 3 단계로 저용량(50 내지 250 pg/mL)의 사이토카인(IL-6, LIF, G-CSF, GM-CSF, MIP1a)의 존재하에서 무배양보조 세포 배지에서 배양하였다:

[0616] 단계 1(9 일): 10% 인간 혈청 AB(HS), LWH 헤파린, TPO, SCF, IL-7, Flt3L(25 내지 27 ng/mL) 함유 GBGM;

[0617] 단계 2(5 일): 10% HS, LWH 헤파린, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15(20 내지 27 ng/mL) 함유 GBGM; 및

[0618] 단계 3(7 일): 10% HS, SCF, IL-7, Flt3L, IL-15(20 내지 27 ng/mL), IL-2 (1000 U/mL) 함유 GBGM.

[0619] **이식 연구를 위한 생체내 마우스 모델**. 6 내지 8 주령의 암컷 NSG(NOD-CgPrkdc-scid-Il2rg-tm1Wjl-Sz) 마우스(더 잭슨 래버러토리; 미국 메인주 바하버)를 연구에 사용하였다. 마우스를 미세단리장치 우리에 수용시키고, 연구 개시 전에 수일 동안 격리하였다. D21 NK 전구 세포 집단의 세포에 의한 처리는 무작위배정 그 다음날 개시하였으며, 오직 하나의 단일 용량의 D21 NK 전구 세포 집단을 마우스에 투여하였다. 투여 경로는 표 17에 기술된 바와 같이 i.v.(마우스당 6 x 10^6 D21 NK 전구 세포 집단의 세포) 또는 I.T.(마우스당 6 x 10^6 D21 NK 전구 세포) 주사였다. 종양 부피는 식 V = L x W x H x π/6을 이용하여 측정하였으며, 여기서, L 및 W는 종양의 더 길고 더 짧은 직경을 나타내고, H는 종양의 높이를 나타낸다. 전체 연구 동안 계속, 종양 부피 및 체중을 1 주일에 2 회씩 측정하였다. 동물들은 D21 NK 전구 세포 집단의 처리로부터의 가능한 독성 효과에 대해 관찰하였다. 종양 부피가 > 1,500 mm^3에 이르거나 원래 체중의 손실이 20%를 초과하거나 종양 궤양이 생기거나 마우스가 빈사상태가 되면, 계획되지 않은 희생을 행하였다. 실험 종료시, 대조군 및 각 처리군의 종양 성장 속도에 대한 통계학적 분석을 수행하였다.

[0620] **크롬(^{51}Cr) 방출 세포독성**. 작동인자 세포(D21 NK 전구 세포 집단의 세포)를 적절한 농도에서 100 ㎕ 분취량/웰의 분석 배지(RPMI1640+10% FBS+P/S)중에서 환저 96-웰 플레이트상에 접종하였다. 표적 종양 세포를 37 ℃에서 10 μCi 나트륨 크로메이트와 함께 60 분 동안 배양한 후, 분석 배지로 3 회 세척하였다. 이어서, ^{51}Cr 표지된 종양 세포를 나타낸 작동인자-대-표적(E:T) 비에서 작동인자 세포에 첨가하였다. 배양은 37 ℃에서 5% CO_2 배양기에서 4 시간 동안 수행하였다. 모든 배양은 3중으로 수행하였으며, % 세포독성은 다음 식에 따라 산출하였다: 100 x (시험 ^{51}Cr 방출 - 자발적 ^{51}Cr 방출)/(최대 ^{51}Cr 방출 - 자발적 ^{51}Cr 방출)(여기서, 최대 및 자발적 수는 2% 트리톤 X와 함께 배양된 3중의 표적 세포들로부터 및 분석 배지중에서 각각 산출하였다.

[0621] **통계학적 분석**. 상이한 실험들로부터의 결과는 평균 ± 평균의 표준 편차(STDEV)로 기술한다. 결과는 0.05 이하의 *P* 값에서 유의적인 것으로 간주하였다.

[0622] <u>결과</u>

[0623] D21 NK 전구 세포 집단의 생체내 생체분포 분석은, 도 24a에서 보이듯이, 입양 전달 4 주 후에 수용체 마우스 CD45+ 세포에 비해 >10%의 빈도에 달하는, 골수에서 높은 수준의 인간 세포 존속을 입증하였다. 골수 이식 세포는 CD56-CD16-(도 24b)이었고, 낮은 CD117을 발현하였으며, 마커 2B4(CD244)에 대해 >50%여서(도 24c) NK 전구 세포 표현형을 시사하였다. 상기 표현형 집단은 또한 D35 NK 세포의 입양 전달 후에도 검출되었으나, 약 10 배 더 낮은 빈도하에 검출되었다. BrdU를 밤새 혼입시켜 신생 DNA 합성에 의한 세포의 생체내 S기 세포 주기 진입을 표지화함으로써 골수 이식 D21 NK 전구 세포 집단을 생체내 세포 주기 진입에 대해 검사하였다. 도 25에서 보이듯이, 골수로부터 유래된 D21 NK 전구 세포 집단의 세포는 높은 비율(>35% BrdU+ 세포)의 생체내 순환에 적용되어, 그의 관찰된 생체내 증폭과 일치하는 상기 집단의 활성 전환을 시사하였다.

[0624] 투여 28 일 후 골수 샘플로부터 회수된 골수 이식 CD56-CD16- D21 NK 전구 세포 집단 세포를 FACS 분류에 의해 정제하고, 그의 NK 분화 잠재력을 측정하기 위해 NK 세포 배양 배지(10% FBS, 2% HS, IL-2(200 U/mL) 함유

IMDM)에서 생체외 배양하였다. 도 26에서 보이듯이, NK 배양 배지에서 성장한 D21 NK 전구 세포 집단의 세포는 CD56+CD16+ 표현형으로 성숙한 NK 세포로 분화될 수 있다. D21 NK 전구 세포 집단의 골수 이식 세포로부터 유도된 상기 생체외 분화된 CD56+ NK 세포를 또한 K562 표적 세포에 대한 크롬(^{51}Cr) 방출 세포독성 분석에서 시험하였다. D21 NK 전구 세포 집단의 세포로부터 유도된 분화된 CD56+ NK 세포의 세포독성 활성을 NK-92 세포주뿐 아니라, 시험관내 기질 공-배양에 의해 생성된 인간 CD34+ 세포 유래 NK 세포와도 비교하였다. 도 27에서 보이듯이, D21 NK 전구 세포 집단의 세포로부터 유도된 분화된 CD56+ NK 세포는 등가의 작동인자-대-표적 세포 비에서 양성 대조군 NK 세포 유형 둘 다에 비해 유사하거나 더 큰 세포독성 활성을 나타내었다.

[0625] 포괄하여, D21 NK 전구 세포 집단의 골수 이식 집단의 상기 생체외 분석은 그의 NK-세포 기능적 분화 잠재력과 일치하여, 전이시 생체내 자가-재생을 지속시키는 상기 세포의 능력을 시사하였다.

[0626] 결론적으로, 본 실시예는 NK 전구 세포 집단이 골수에서 이동하여 이식되는 능력을 나타냄을 입증한다. 상기 골수-이식 세포는 2B4(CD244)에 대해 양성으로, 이들이 NK 전구 세포임을 시사한다.

[0627] <u>실시예 21: NK 전구 세포 집단과 NK 세포 집단의 비교</u>

[0628] 본 실시예는 D21 NK 전구 세포 집단의 세포 및 전술한 3-단계 공정을 이용하여 배양된 D35 NK 세포 집단의 세포의 표현형을 비교한다. FACS를 이용한 시험관내 프로파일링 실험에서, 5 개 복제물을 기준으로, D35 NK 세포 집단 세포의 88.5% +/- 11.2%에 비해 D21 NK 전구 세포 집단의 세포의 29.9% +/- 13.4%가 CD56+CD3-이었다. 또한, D35 NK 세포 집단 세포의 49.0% +/- 20.4%에 비해 D21 NK 전구 세포 집단 세포의 12.3% +/- 5.6%가 NKp46+이었다.

[0629] <u>실시예 22: D21 NK 전구 세포 집단과 D35 NK 세포 집단의 비교</u>

[0630] 본 실시예에서는, 실시예 17 내지 21에 기술된 실험들로부터의 결과 및 결론을 요약한다. 상기 결과들은, 만삭 인간 태반으로부터 수득된 공여체-일치 제대혈 및 인간 태반 유래 줄기 세포로부터 단리된 CD34+ 세포로부터 인간 NK 세포 집단을 생성하기 위한 배양 방법이 성공적으로 확립되었음을 입증한다. 상기 배양 방법은 무배양 보조세포 배양이며, 전구 세포 증폭에 이은, 트롬보포이에틴, 줄기 세포 인자, Flt3 리간드, IL-7, IL-15 및 IL-2를 포함한 사이토카인에 의해 지지된 NK 세포 집단으로의 분화를 기반으로 한다. CD34+ 조혈 전구 세포(또는 조혈 줄기 세포, HSC)를 포함하는 집단으로부터 NK 세포를 포함하는 집단으로의 단계적 진행은 궁극적으로 약 90% CD3-CD56+ 표현형을 갖는 NK 세포 집단을 제공하며, 35 일 동안 달성된 평균 10,000 배 증폭과 결부된다. 생성된 세포 집단은 CD16-이며, 낮은 수준의 KIR을 발현하여, 상기 집단이 주로 미성숙 NK 세포 표현형을 포함하는 것을 시사한다. 그러나, 특히, 상기 세포 집단은 또한 광범위한 종양 세포주 표적에 대해 활성인 시험관내 세포독성을 나타낸다.

[0631] HSC-유래 NK 세포 집단의 생체내 지속성, 성숙 및 기능적 활성을, 인간 사이토카인 SCF, GM-CSF 및 IL-3을 발현하도록 조작된 면역결핍(NSG) 마우스에서 평가하였다. 인간 IL-2 또는 IL-15를 1 주일에 3 회 복강내 주사하여 생체내 전이된 NK 세포 집단에 대한 사이토카인 보충의 효과를 검사하였다. NK 세포 집단의 존재 및 상세한 면역표현형을 말초혈(PB), 골수(BM), 비장 및 간 샘플에서 7-일 간격으로 전이후 28 일까지 평가하였다. 사이토카인 보충없이, 상기 NK 세포 집단으로부터 매우 적은 세포가 임의 시점에서 검출가능하였다. IL-2의 투여는 상기 인간 NK 세포 집단으로부터 세포의 지속성의 검출가능하지만 중간정도의 증대를 야기하였다. IL-15 보충의 효과는 훨씬 더 커서, 순환시 전이된 NK 집단 세포의 강한 지속성, 및 수용체 마우스의 간에서 적당한 특이적 귀소성 및 증폭을 유도하였다.

[0632] 생체내 전이 후에, 인간 CD56+ 세포의 상당한 비율이 CD16 및 KIR을 발현하여, 완전한 생리적 NK 분화를 시시하였다. 생체외 단리된 인간 CD56+ 세포는 시험관내 세포독성 분석에서 K562 표적을 효과적으로 사멸하였다. 말초혈, 비장 및 간과 대조적으로, BM은 CD56/CD16 이중 음성(DN)이지만 CD244 및 CD117에 대해서는 양성인 인간 세포를 상당 부분 함유하여, CD34+ 유래 세포 생성물의 CD56- 비율중 잔류하는 전구세포 기능을 시시하였다. BM 이식 집단은 증폭 초기 단계에서는 NK 세포 집단 배양물에서 더 높았지만, 35 일 배양된 생성물에서는 보존되었다. BM중 상기 세포의 빈도는 시간 경과에 따라 증가되었으며, 전이 28 일 후 생체내 BrdU 표지화를 기준으로 지속적인 순환을 나타내어, 생체내 상당한 전구세포 잠재력을 시사하였다. 흥미롭게도, BM으로부터 단리된 DN 세포는 생체외에서 K562에 대한 시험관내 세포독성 활성을 갖는 성숙 CD56+CD16+ NK 세포로 효과적으로 분화될 수 있었다. 생체내에서, 상기 BM 이식 세포는 인간에서 성숙 NK 세포 풀을 제공하는 전구세포 집단을 제공할 수 있다.

[0633] HSC-유래 NK 세포 집단의 생체내 활성을, 최소 잔존 질환(MRD)의 유전자 조작된 인간 AML 이종이식 모델을 이용

하여 더 조사하였다. 상기 실험들로부터의 데이터는 화학치료 후 NK 세포 집단을 투여받은 동물에서 AML 재발의 상당한 억제를 시사한다.

[0634] <u>실시예 23: D21 및 D35 NK 세포의 텔로미어 길이</u>

[0635] 본 실시예에서는, 전술한 3-단계 공정을 이용하여 배양된 D21 및 D35 세포를 DNA 텔로미어 길이에 대해 평가하였다.

[0636] 유사 분열에 앞서, 세포성 DNA를 DNA 폴리머라제에 의해 중복시켰다. 상기 효소는 염색체의 제일 말단 - 텔로미어 영역을 복제하지 않는다. 이때문에, 텔로미어는 각각의 세포 분열 후에 단축되므로, 텔로미어는 "유사분열 시계"로서 작용한다. 텔로미어는 염색체 말단이 손상되지 않게 유지시키는 기능을 한다. 정상 세포에서, 텔로미어 단축은 세포 노화를 야기한다. 척추동물 텔로미어는 수백 내지 수천의 반복서열에 6 개 뉴클레오티드(TTAGGG)로 이루어진다. 텔로미어 길이는 인간에서의 5 내지 20 킬로베이스(kb)로부터 마우스에서의 20 내지 150 kb까지의 범위로 종 특이적이다.

[0637] <u>재료 및 방법</u>

[0638] ***텔로미어 PNA-FITC 방법***. 세포들의 텔로미어 서열의 검출을 텔로미어 PNA 키트/유세포분석용 FITC(Cat# K5327, 다코(DAKO), 에이질런트 테크놀로지스 캄파니(Agilent Technologies Co.))를 사용하여 평가하였다. 상기 키트의 프로브는 서브텔로미어 서열을 인식하지 않으며, 전통적인 텔로미어 제한효소 단편(TRF) 측정과 대조적으로, 상기 방법은 서브텔로미어를 포함시키지 않고 텔로미어 길이를 평가한다.

[0639] ***대조군 세포***. 다음의 대조군 세포를 사용하였다: HL60 세포주, NK92 세포주, PBMC 유래 NK 세포, CCRF-CEM, NTERA2 및 NHDF-성인 섬유모세포주.

[0640] ***분석 방법***. 프로브 형광염색을 위한 로그 눈금 FL1-H 및 DNA 염색을 위한 선형 눈금 FL3-H를 사용하여 유세포분석에 의해 샘플을 분석하였다. 전방 산란 측방 산란, FL1-H 및 FL3-H 값을 저장하였다(변형방법으로, FL3-A 및 FL#W 값도 또한 저장할 수 있다).

[0641] ***계산***. RTL = (프로브 존재하에서의 평균 FL1 샘플 세포 - 프로브 부재하에서의 평균 FL1 샘플 세포) x 대조군 세포의 DNA 지수 x 100/(프로브 존재하에서의 평균 FL1 대조군 세포 - 프로브 부재하에서의 평균 FL1 대조군 세포) x 샘플 세포의 DNA 지수.

[0642] <u>결과 및 고찰</u>

[0643] 텔로미어 PNA-FITC 방법을 이용하여 CCRF-CEM(T 림프모구성 세포주), HL60(전골수구성 세포주), NTERA2(고환 태생암 세포주), NHDF(정상 인간 피부 섬유모세포), NK92 세포주, 및 말초혈(PB) NK 세포와 비교한 본원에 기술된 3-단계 방법을 이용하여 배양된 21 일 및 35 일 NK 세포의 텔로미어 길이를 측정하였다. CCRF-CEM에 대한 예상 텔로미어 길이는 약 15 내지 20 kb이고, HL60에 대해서는 약 15 kb이다. 분석간 가변성으로 인해, 시험 결과들은 HL60에 대한 상대적 텔로미어 길이(RTL)로 나타내었다(%RTL = 텔로미어 길이$_{TEST}$ /텔로미어 길이$_{HL60}$ x 100).

도 28에서 보이듯이, NK92 세포는 21 일 NK 세포(NK-D21) 및 35 일 NK 세포(NK-D35)보다 더 긴 텔로미어 길이를 갖는다. 두 공여체로부터 유도된 상업적으로 시판하는 PB NK 세포는 상이한 두 공여체로부터의 NK-D21 및 NK-D35에 비해 더 짧은 텔로미어 길이를 갖는 것으로 밝혀졌다. 상기 결과들은 NK-D21 및 NK-D35 세포가 PB NK 세포보다 더 미성숙하고 덜 분화되며, 따라서 PB NK 세포보다 추가 증폭 및 분화에 대한 더 큰 가능성을 가질 수 있음을 시사한다.

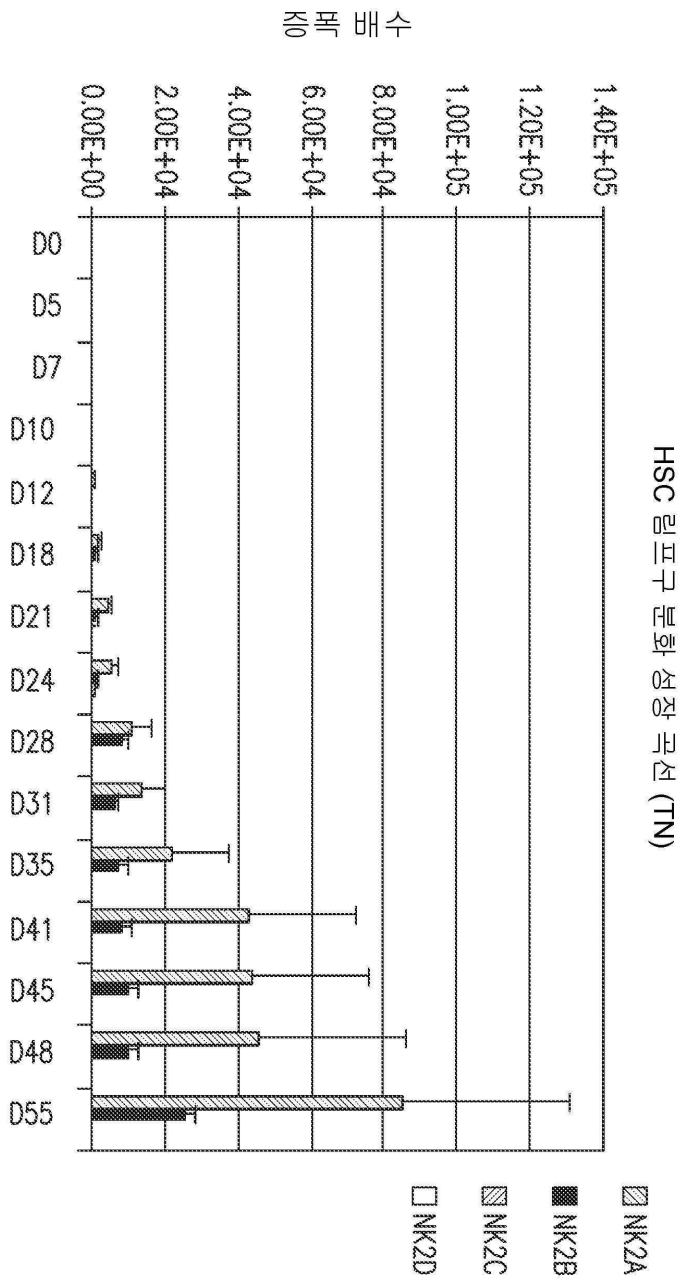
[0645] 균등론:

[0646] 본 발명은 본원에 기술된 특정 태양에 의해 범위에 제한받지 않는다. 사실상, 기술된 것들 이외에 본 발명의 다양한 수정이 상기 설명 및 첨부한 도면으로부터 당해 분야에 숙련된 자들에게 명백해질 것이다. 상기 수정은 첨부된 청구항들의 범위내에 속하는 것이다.

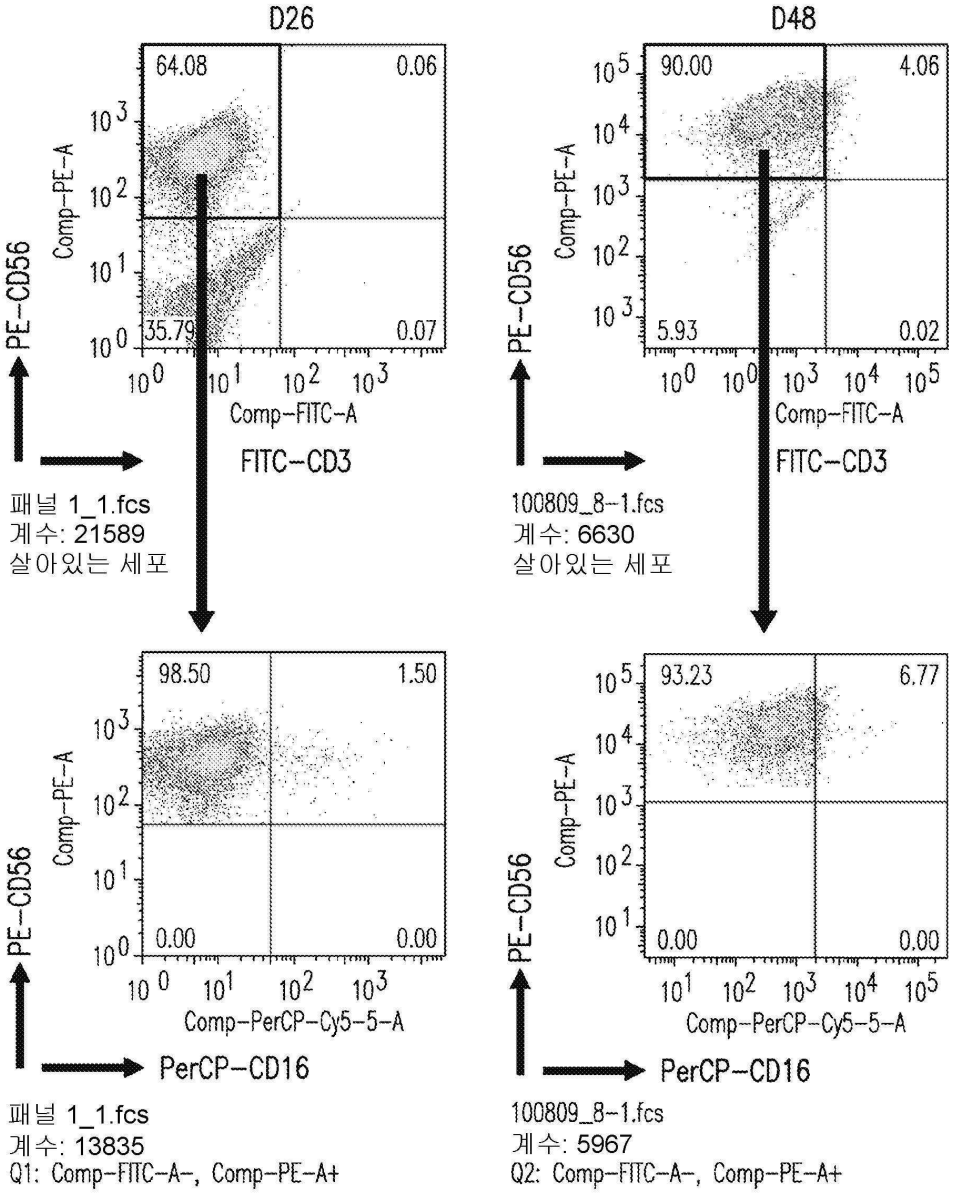
[0647] 본원에 인용된 모든 참조문헌들은 그 전체로 및 모든 경우에 각각의 개개 공개공보, 특허 또는 특허출원이 그 전체로 모든 경우에 참고로 인용되는 것으로 특별히 개별적으로 지적된 바와 동일한 정도로 본원에 참고로 인용된다. 임의의 공개공보의 인용은 출원일 이전의 그의 개시내용에 대한 것이며, 본 발명이 이전 발명때문에 상기 공개공보보다 선행하는 자격이 주어지지 않음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도면

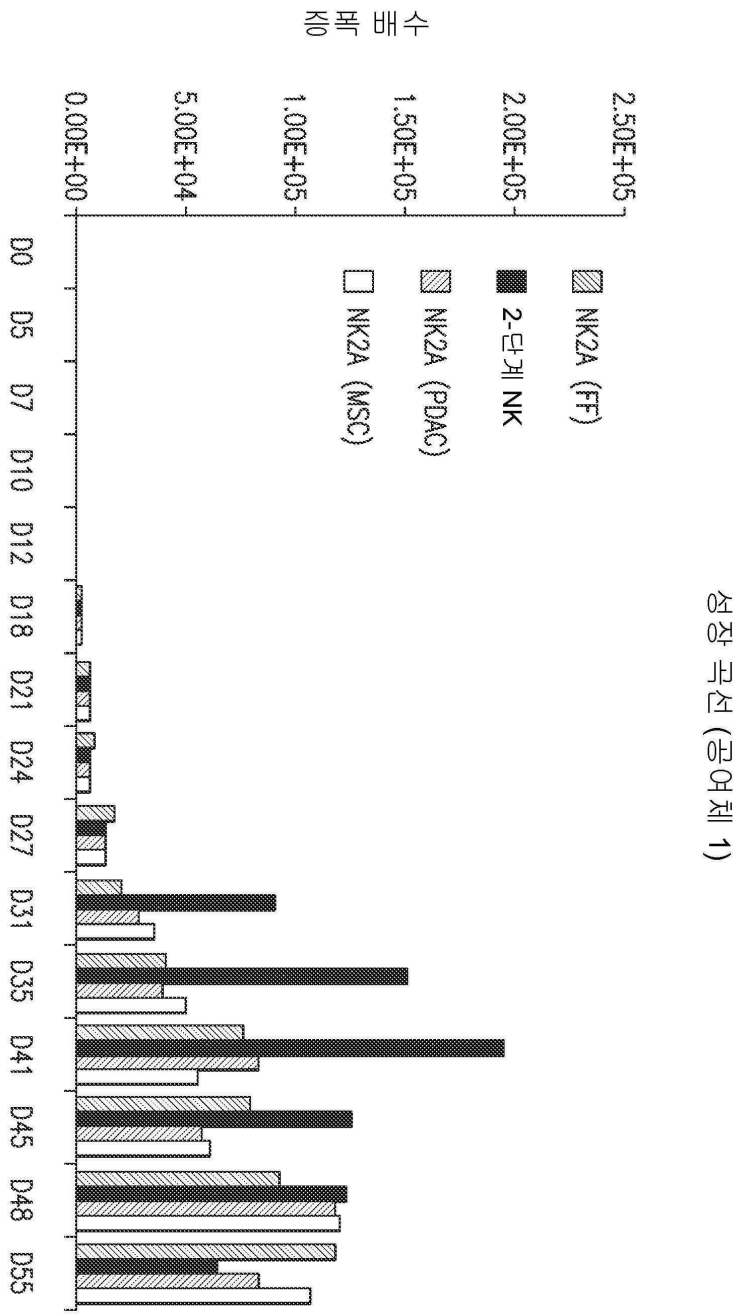
도면1


HSC 림프구 분화 성장 곡선 (TN)
증폭 배수
1.40E+05
1.20E+05
1.00E+05
8.00E+04
6.00E+04
4.00E+04
2.00E+04
0.00E+00
D0
D5
D7
D10
D12
D18
D21
D24
D28
D31
D35
D41
D45
D48
D55
NK2A
NK2B
NK2C
NK2D

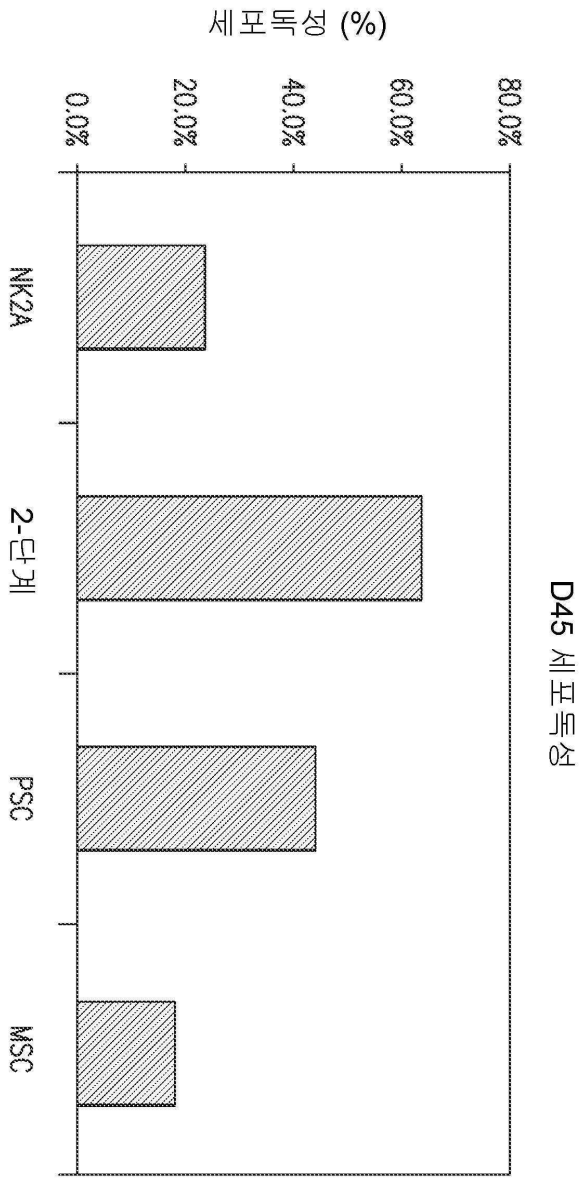
도면2


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

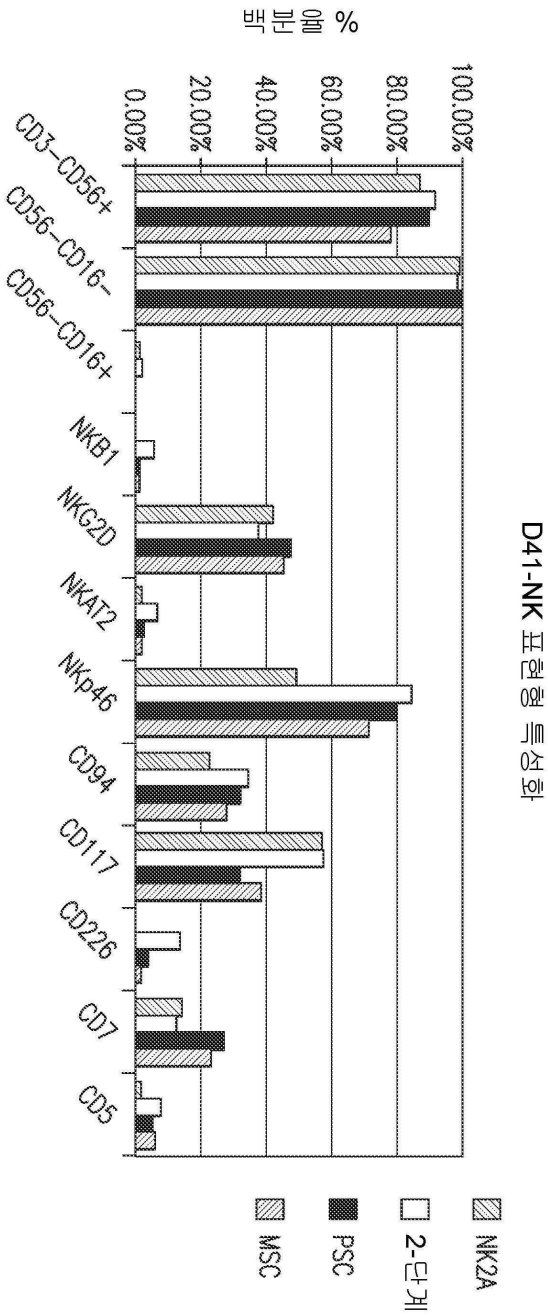
도면3


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

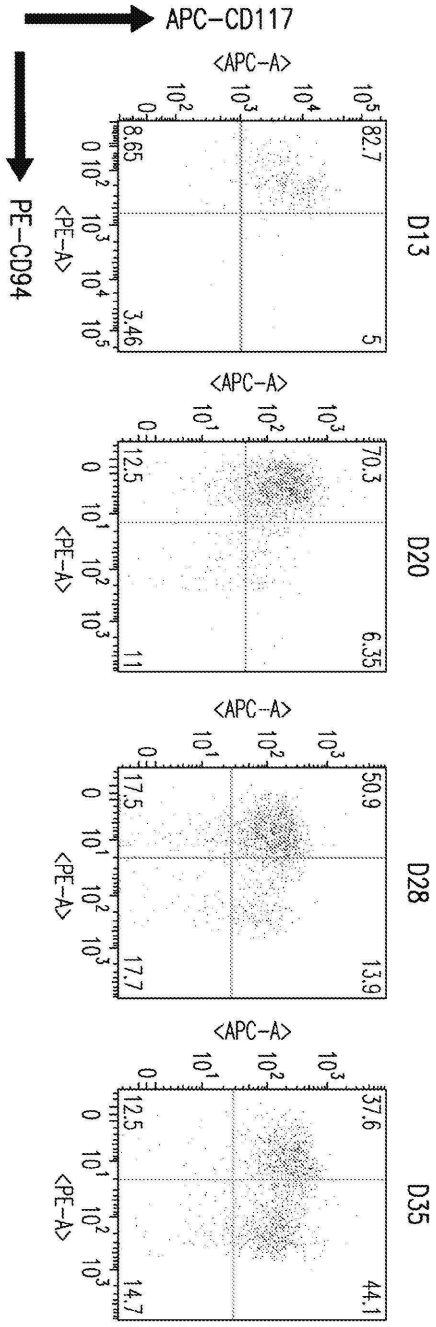
도면4



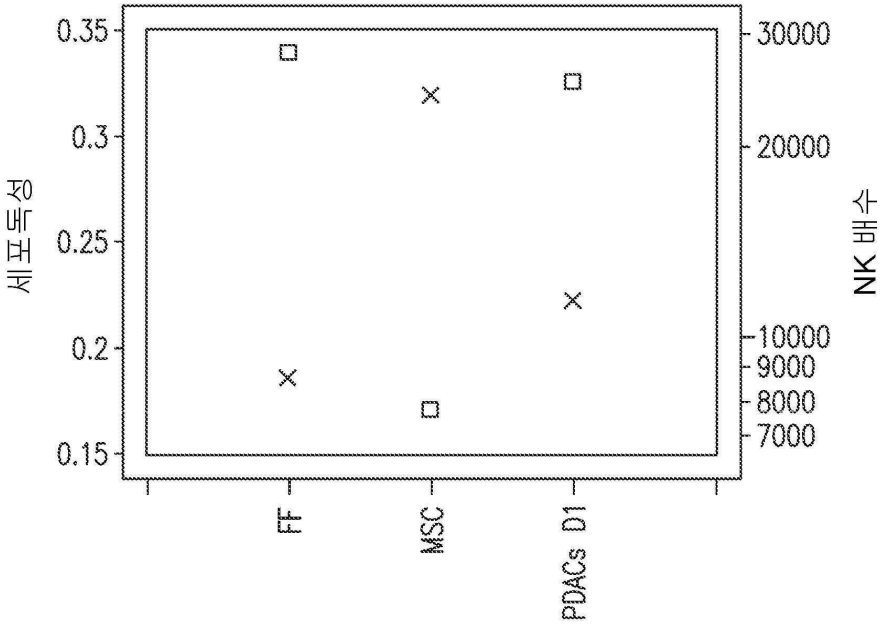
도면5


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

도면6


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

도면7

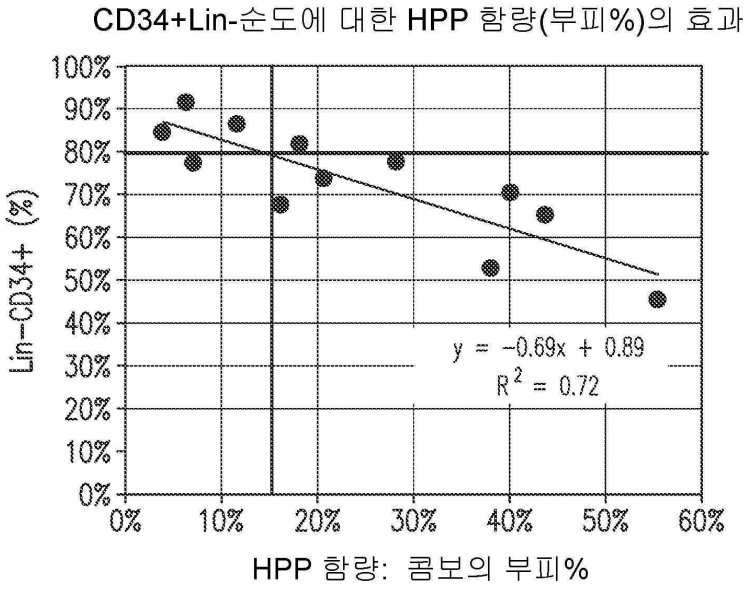


컬럼 1

좌측 눈금: □ 세포독성

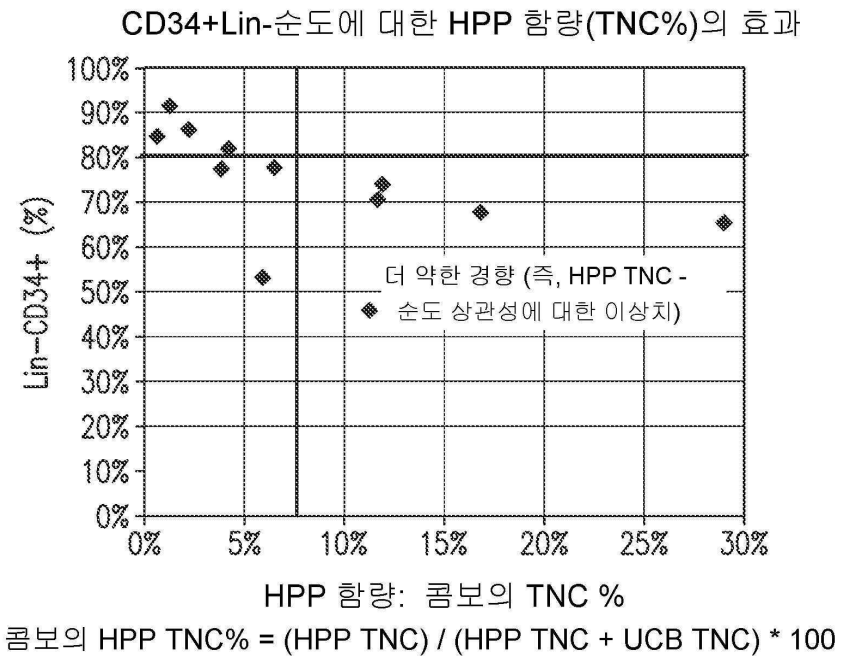
우측 눈금: × NK 배수

도면8a



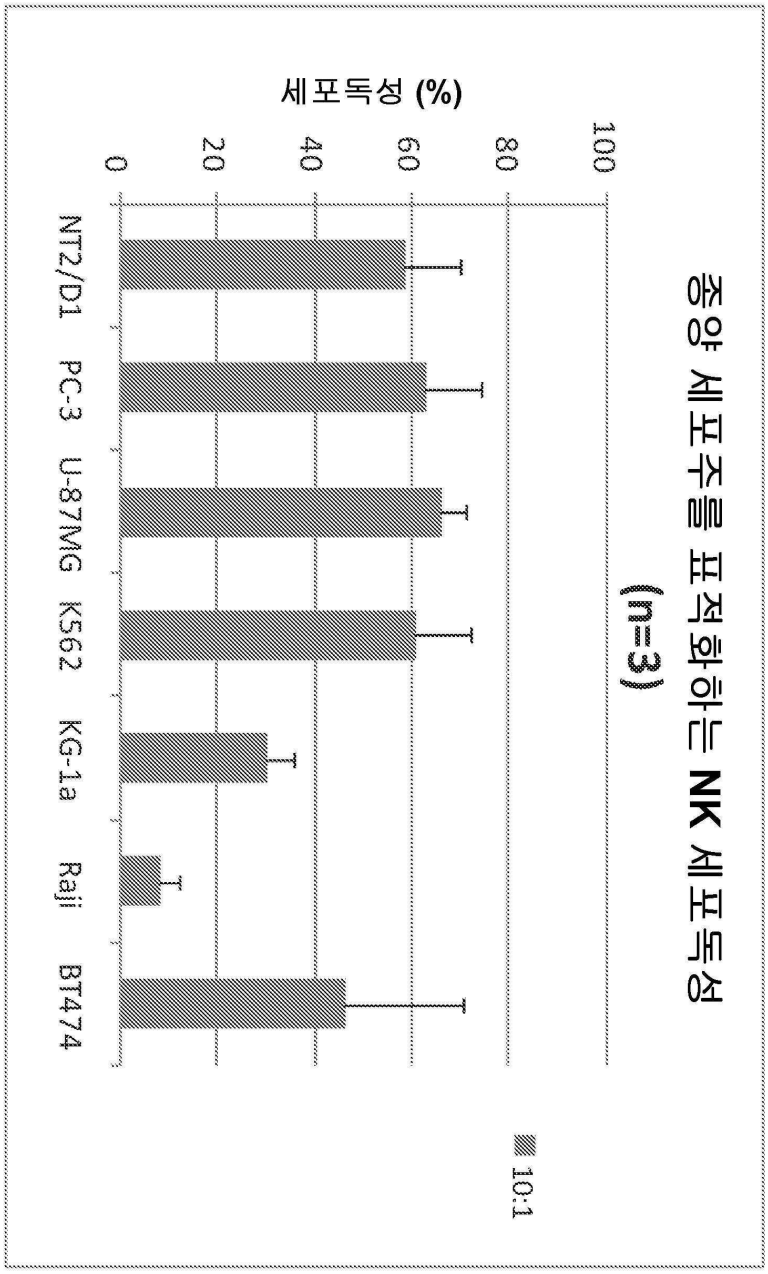
콤보의 HPP 부피% = (HPP 부피) / (HPP 부피 + UCB 부피) * 100

도면8b

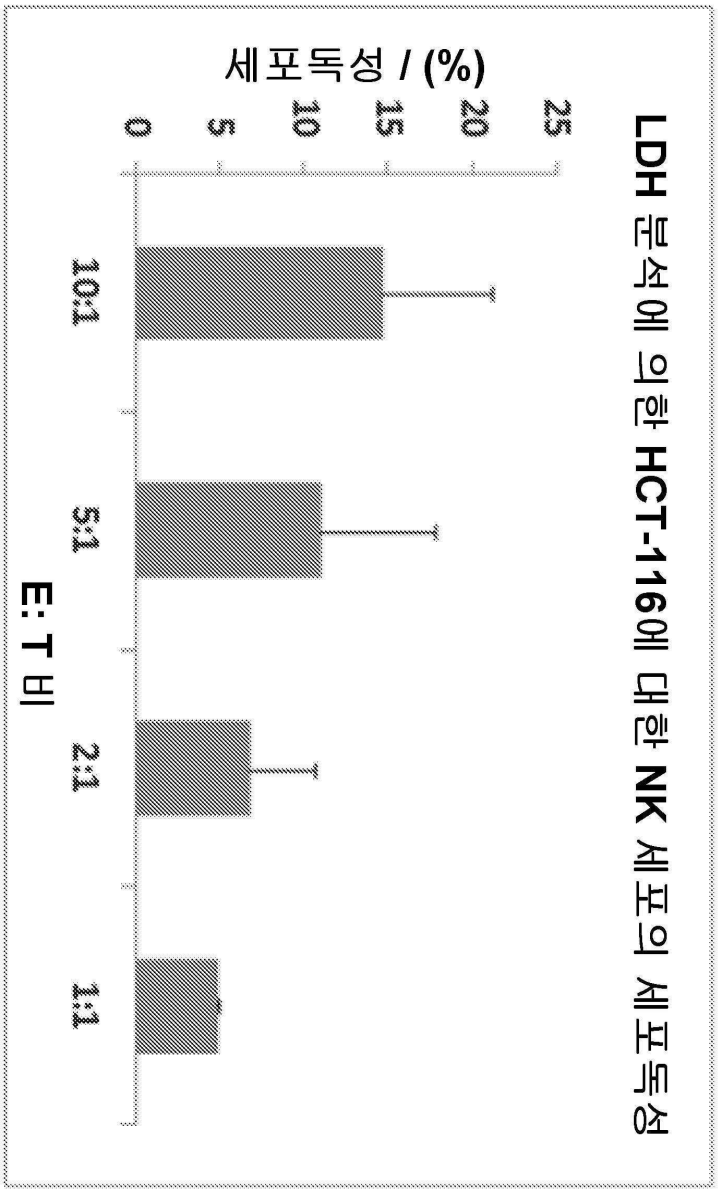


콤보의 HPP TNC% = (HPP TNC) / (HPP TNC + UCB TNC) * 100

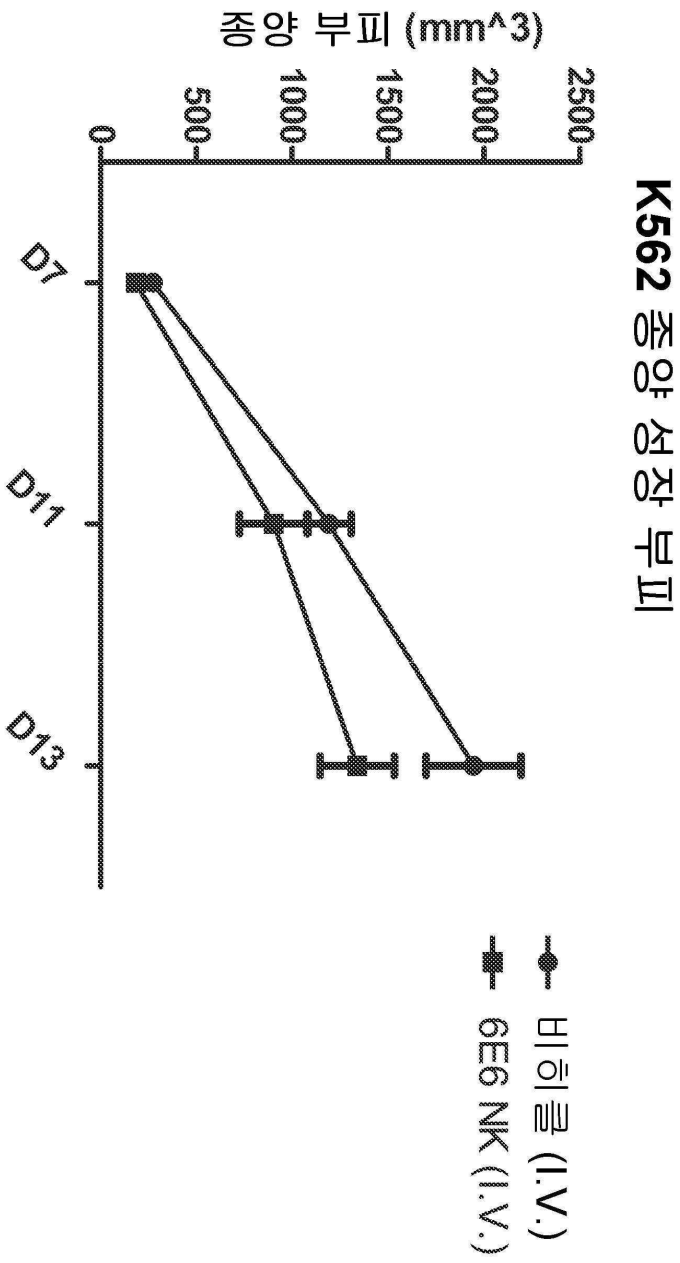
도면9


종양 세포주를 표적화하는 NK 세포독성
(n=3)
세포독성 (%)
100
80
60
40
20
0
10:1
NT2/D1
PC-3
U-87MG
K562
KG-1a
Raji
BT474

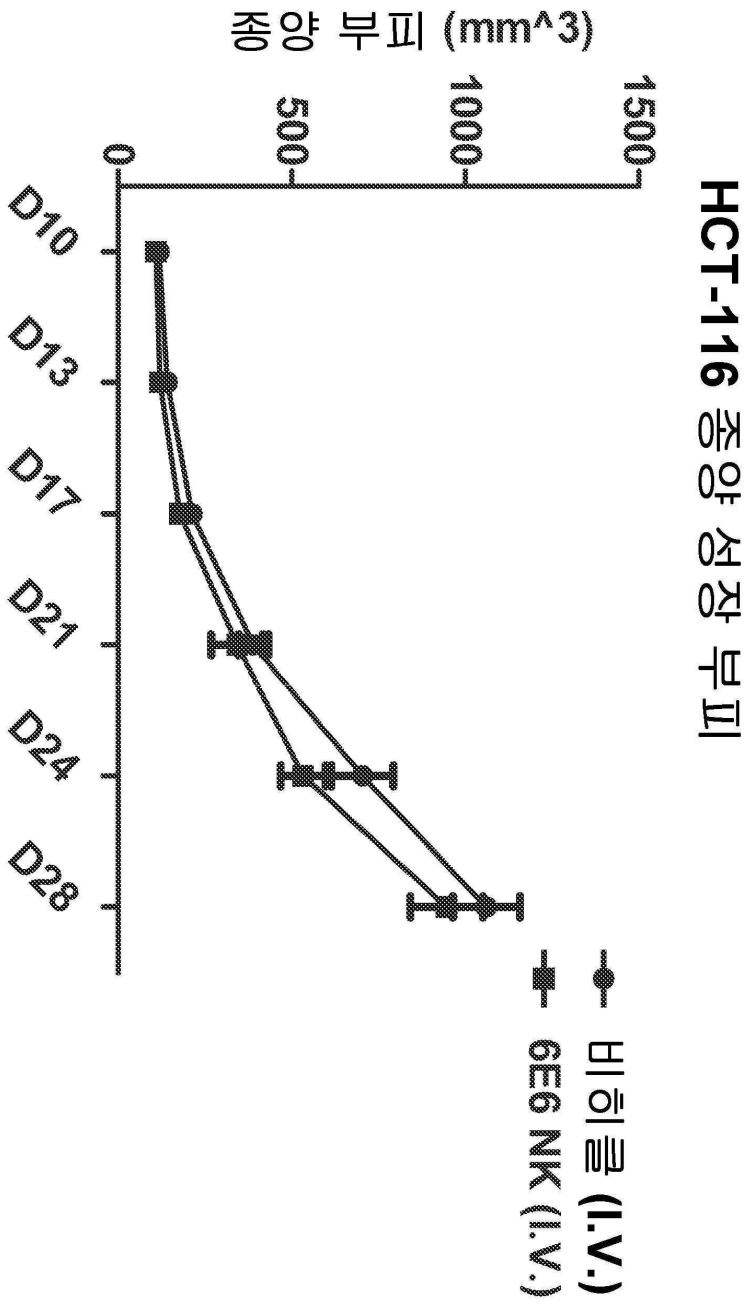
도면10


LDH 분석에 의한 HCT-116에 대한 NK 세포의 세포독성
세포독성 / (%)
25
20
15
10
5
0
10:1
5:1
2:1
1:1
E: T 비

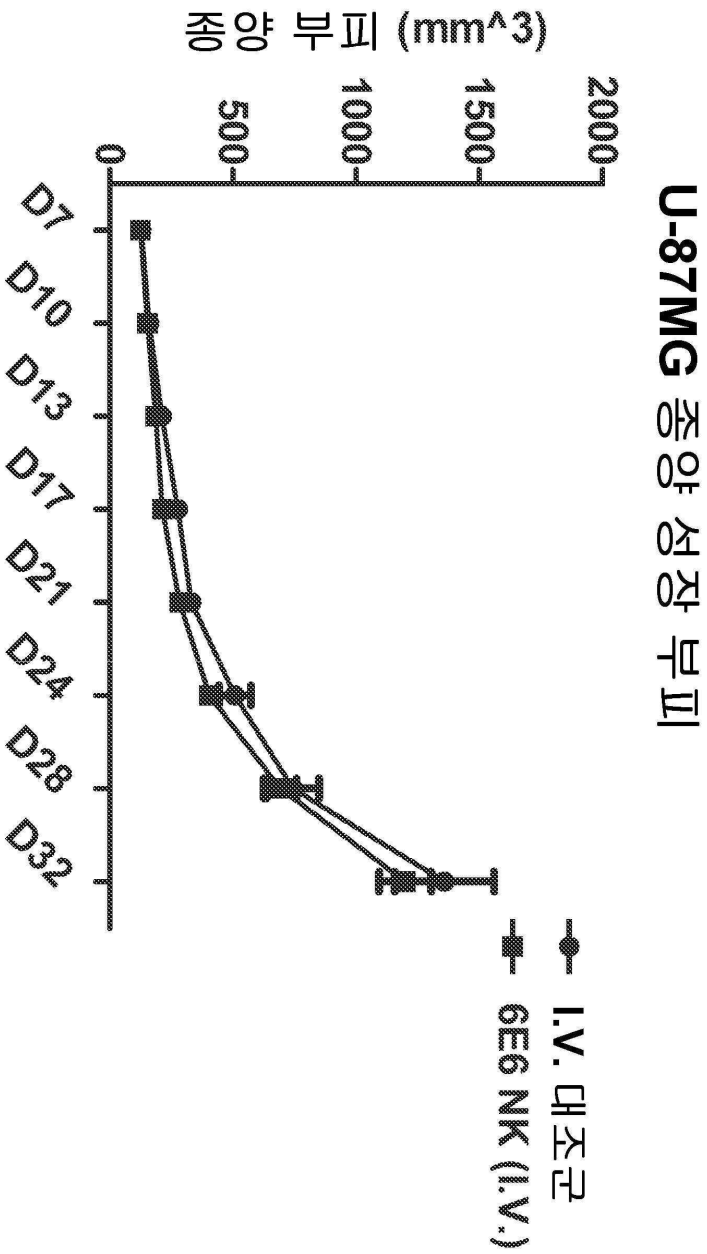
도면11


K562 종양 성장 부피
종양 부피 (mm^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
D7
D11
D13
비히클 (I.V.)
6E6 NK (I.V.)

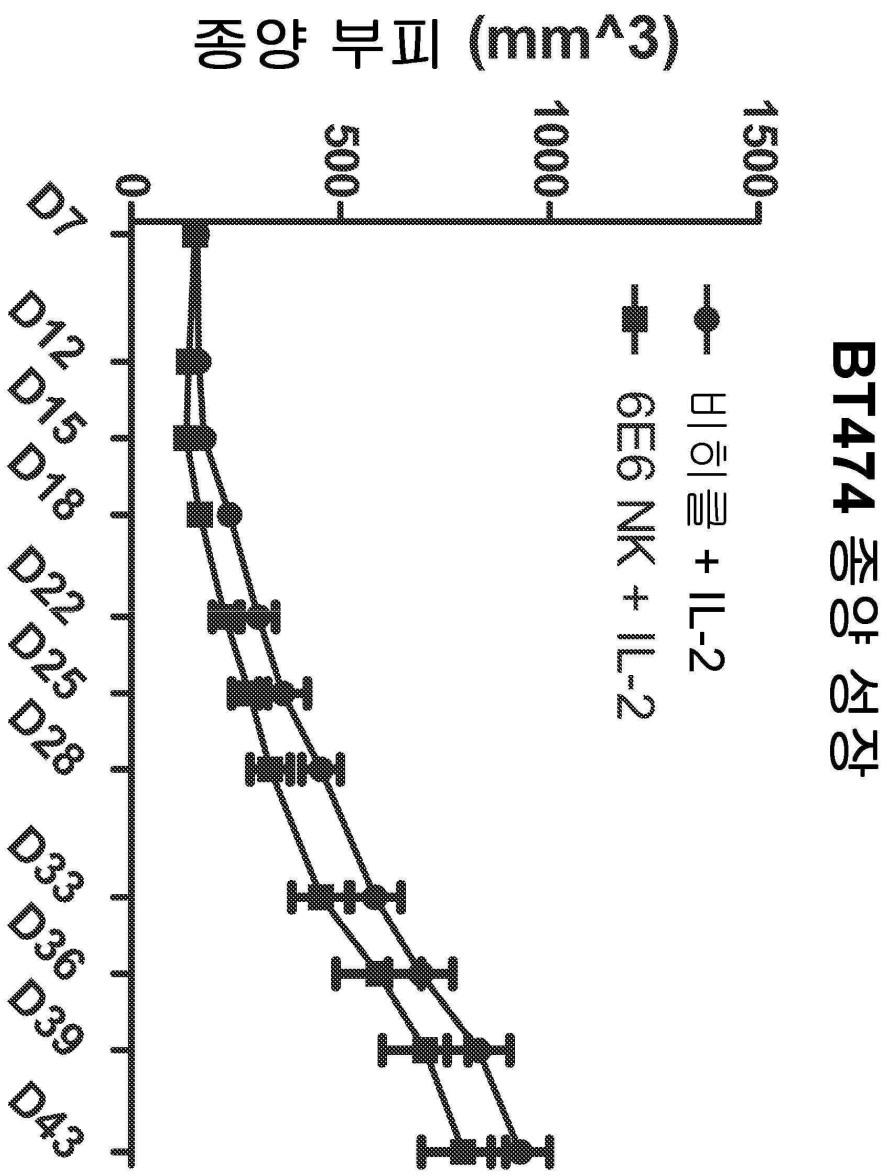
도면12


HCT-116 종양 성장 부피
종양 부피 (mm^3)
1500
1000
500
0
D10
D13
D17
D21
D24
D28
비히클 (I.V.)
6E6 NK (I.V.)

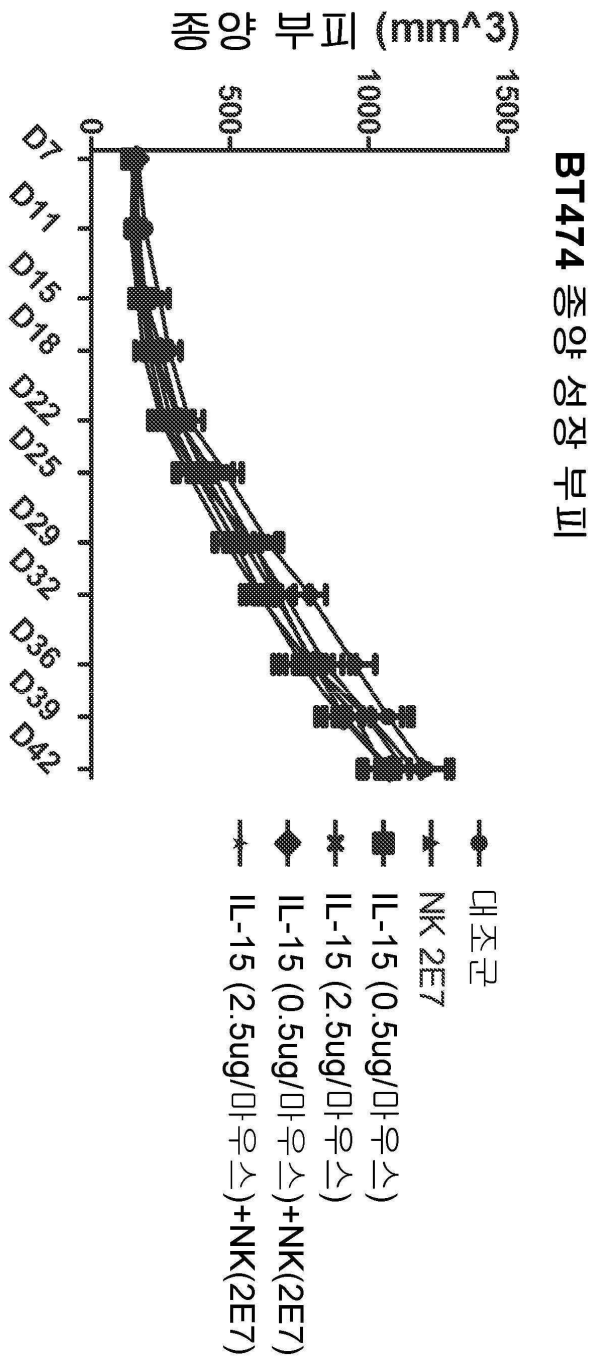
도면13


U-87MG 종양 성장 부피
종양 부피 (mm^3)
2000
1500
1000
500
0
D7
D10
D13
D17
D21
D24
D28
D32
I.V. 대조군
6E6 NK (I.V.)

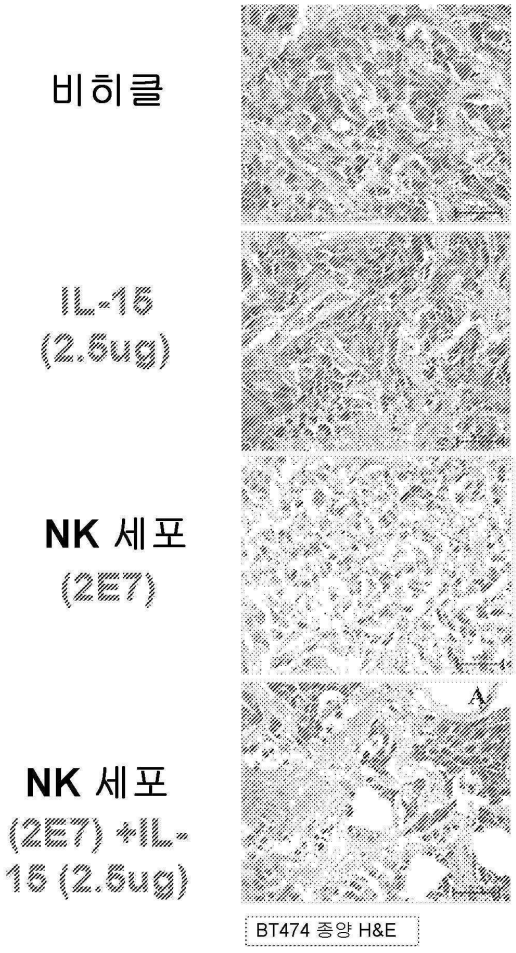
도면14a


BT474 종양 성장
비히클 + IL-2
6E6 NK + IL-2
종양 부피 (mm^3)
1500
1000
500
0
D7
D12
D15
D18
D22
D25
D28
D33
D36
D39
D43

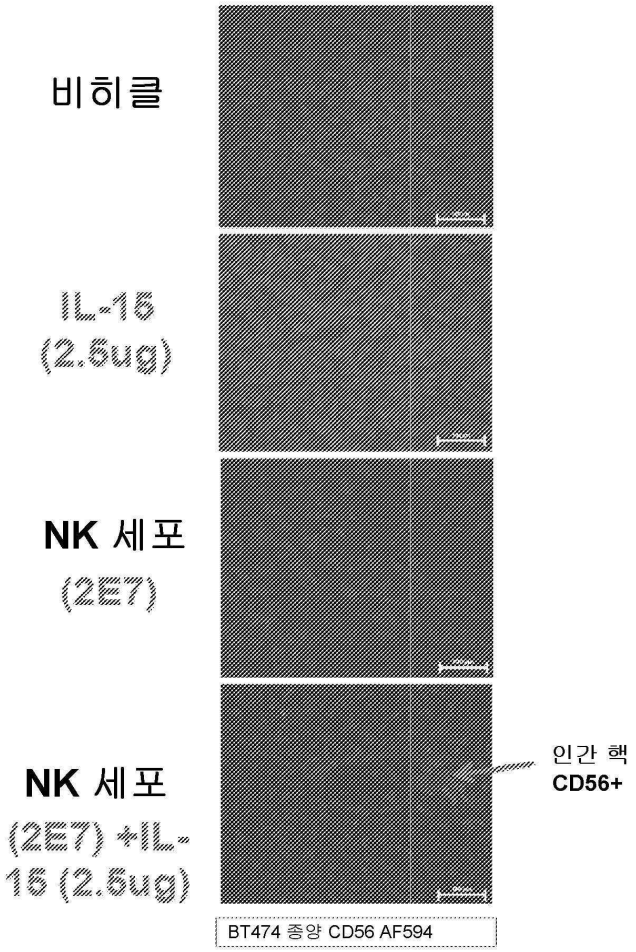
도면14b


BT474 종양 성장 부피
종양 부피 (mm^3)
1500
1000
500
0
D7
D11
D15
D18
D22
D25
D29
D32
D36
D39
D42
대조군
NK 2E7
IL-15 (0.5ug/마우스)
IL-15 (2.5ug/마우스)
IL-15 (0.5ug/마우스)+NK(2E7)
IL-15 (2.5ug/마우스)+NK(2E7)

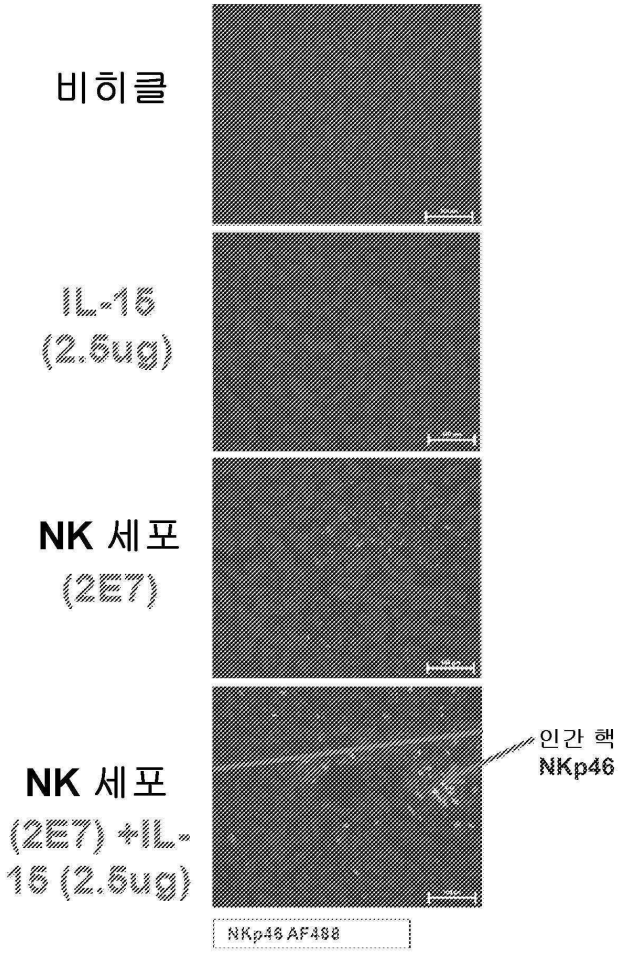
도면15a



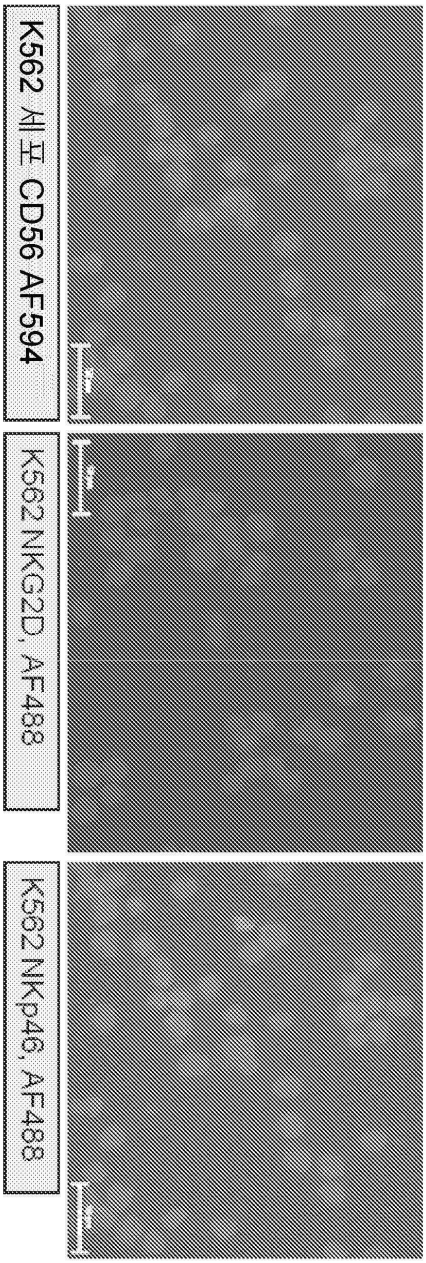
도면15b


비히클
IL-16
(2.5ug)
NK 세포
(2E7)
NK 세포
(2E7) +IL-
16 (2.5ug)
인간 핵
CD56+
BT474 종양 CD56 AF594

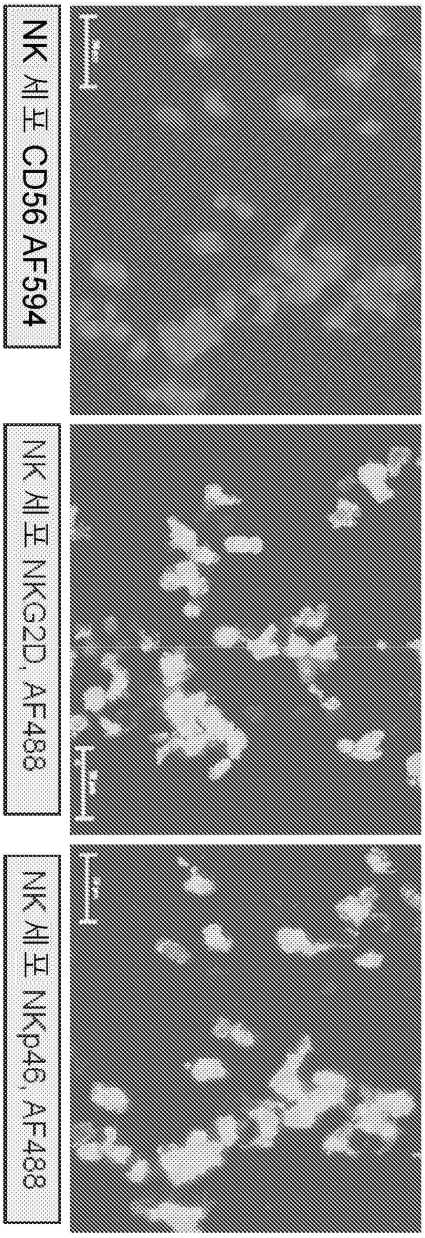
도면15c


비히클
IL-15
(2.5ug)
NK 세포
(2E7)
NK 세포
(2E7) +IL-
15 (2.5ug)
인간 핵
NKp46
NKp46 AF488

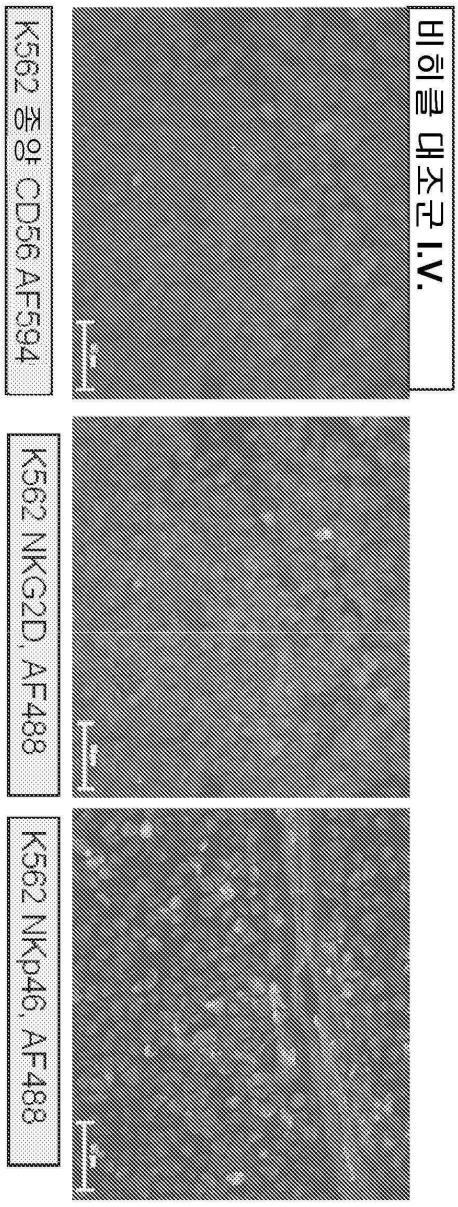
도면16a



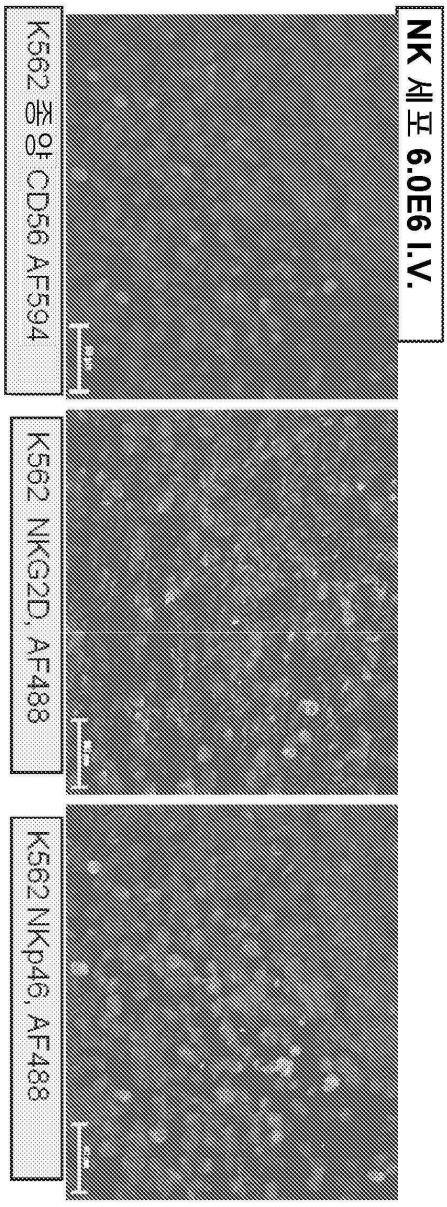
도면16b



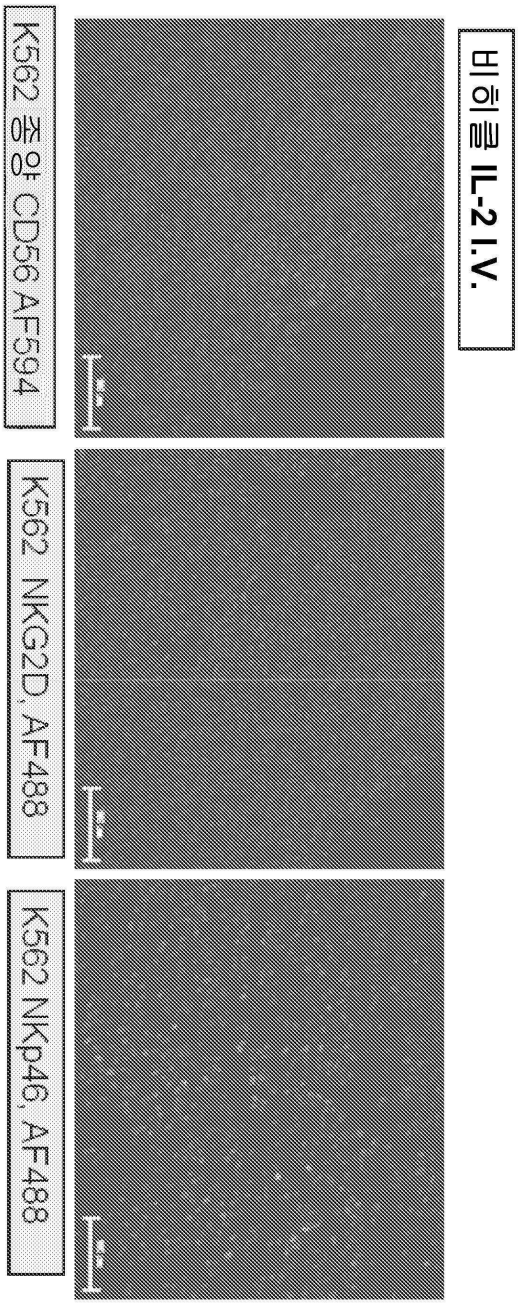
도면17a


비히클 대조군 I.V.
K562 종양 CD56 AF594
K562 NKG2D, AF488
K562 NKp46, AF488

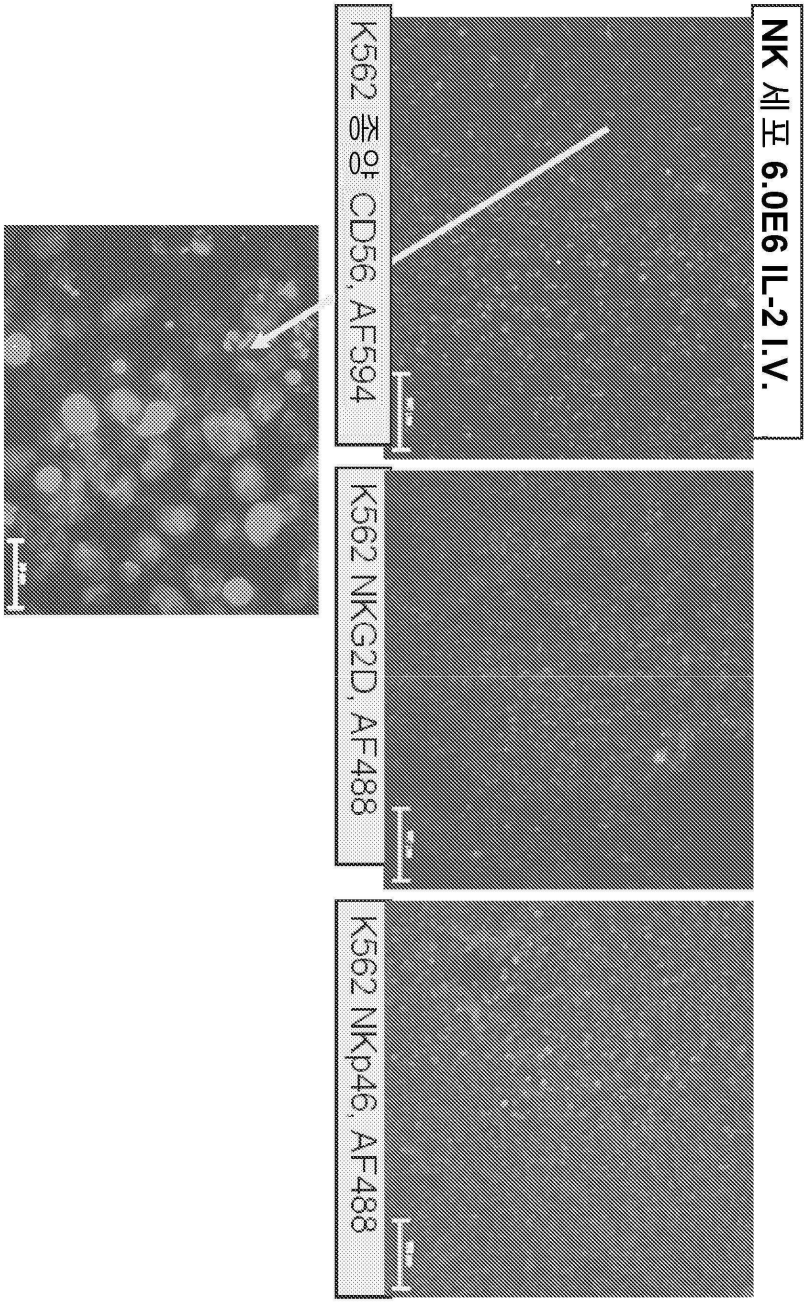
도면17b


NK 세포 6.0E6 I.V.
K562 혼합 CD56 AF594
K562 NKG2D, AF488
K562 NKp46, AF488

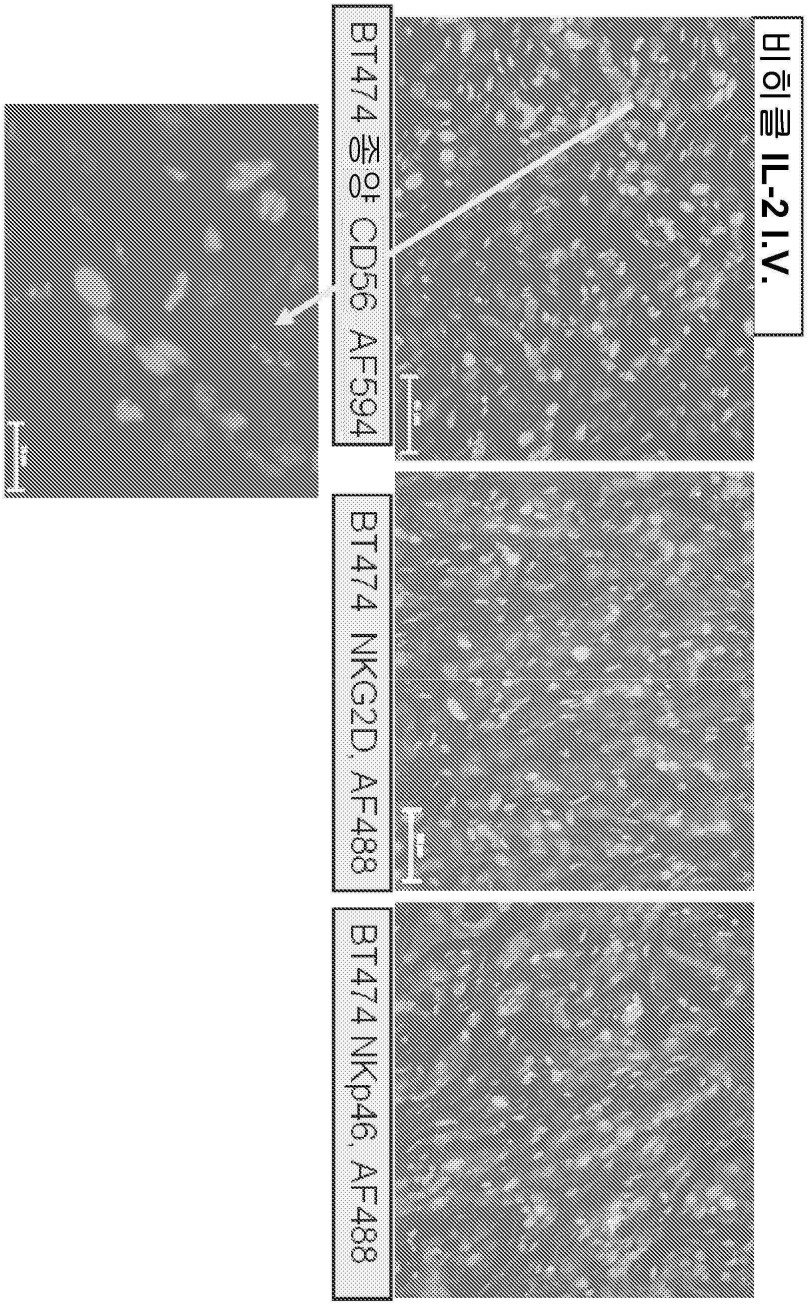
도면17c


비히클 IL-2 I.V.
K562 종양 CD56 AF594
K562 NKG2D, AF488
K562 NKp46, AF488

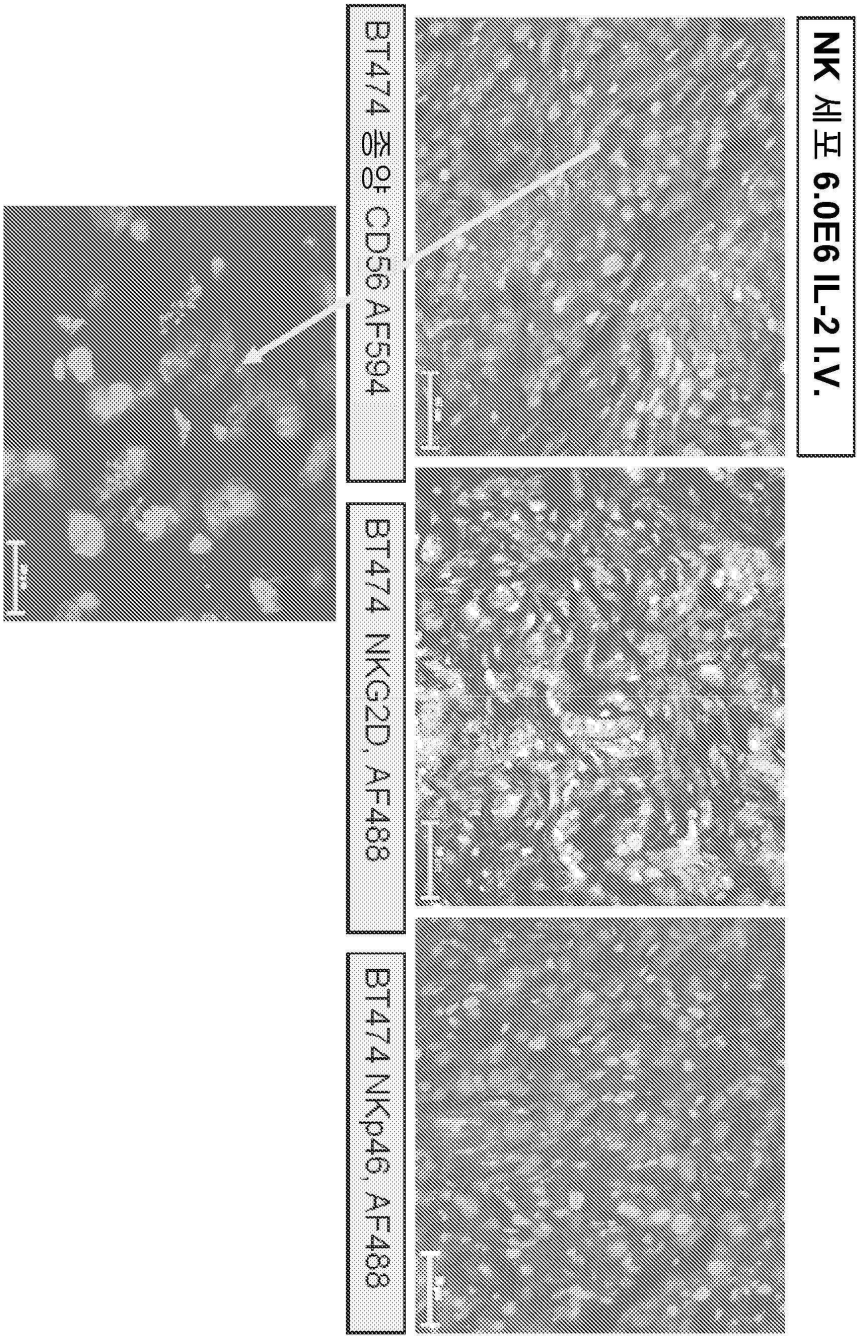
도면17d


NK 세포 6.0E6 IL-2 I.V.
K562 NKp46, AF488
K562 NKG2D, AF488
K562 공동 CD56, AF594

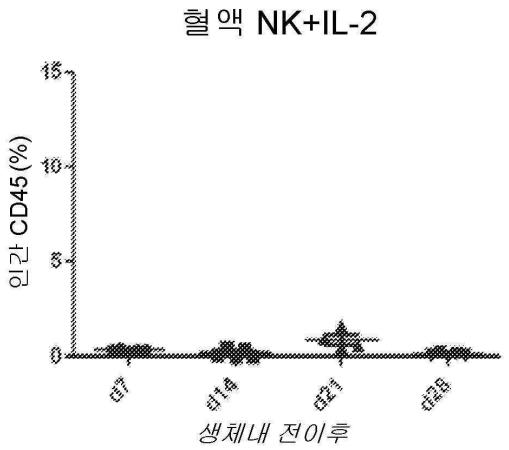
도면17e


비히클 IL-2 I.V.
BT474 종양 CD56 AF594
BT474 NKG2D, AF488
BT474 NKp46, AF488

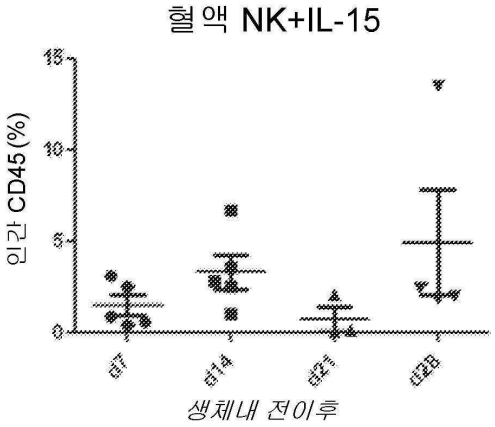
도면17f


NK 세포 6.0E6 IL-2 I.V.
BT474 NKp46, AF488
BT474 NKG2D, AF488
BT474 종양 CD56 AF594

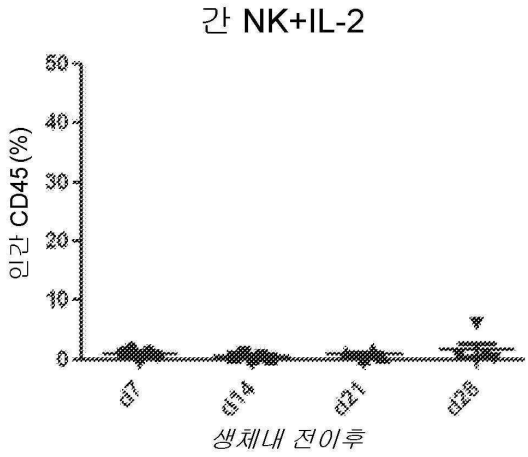
도면18a



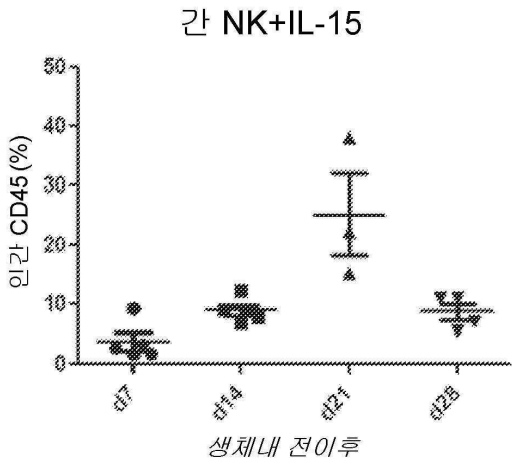
도면18b



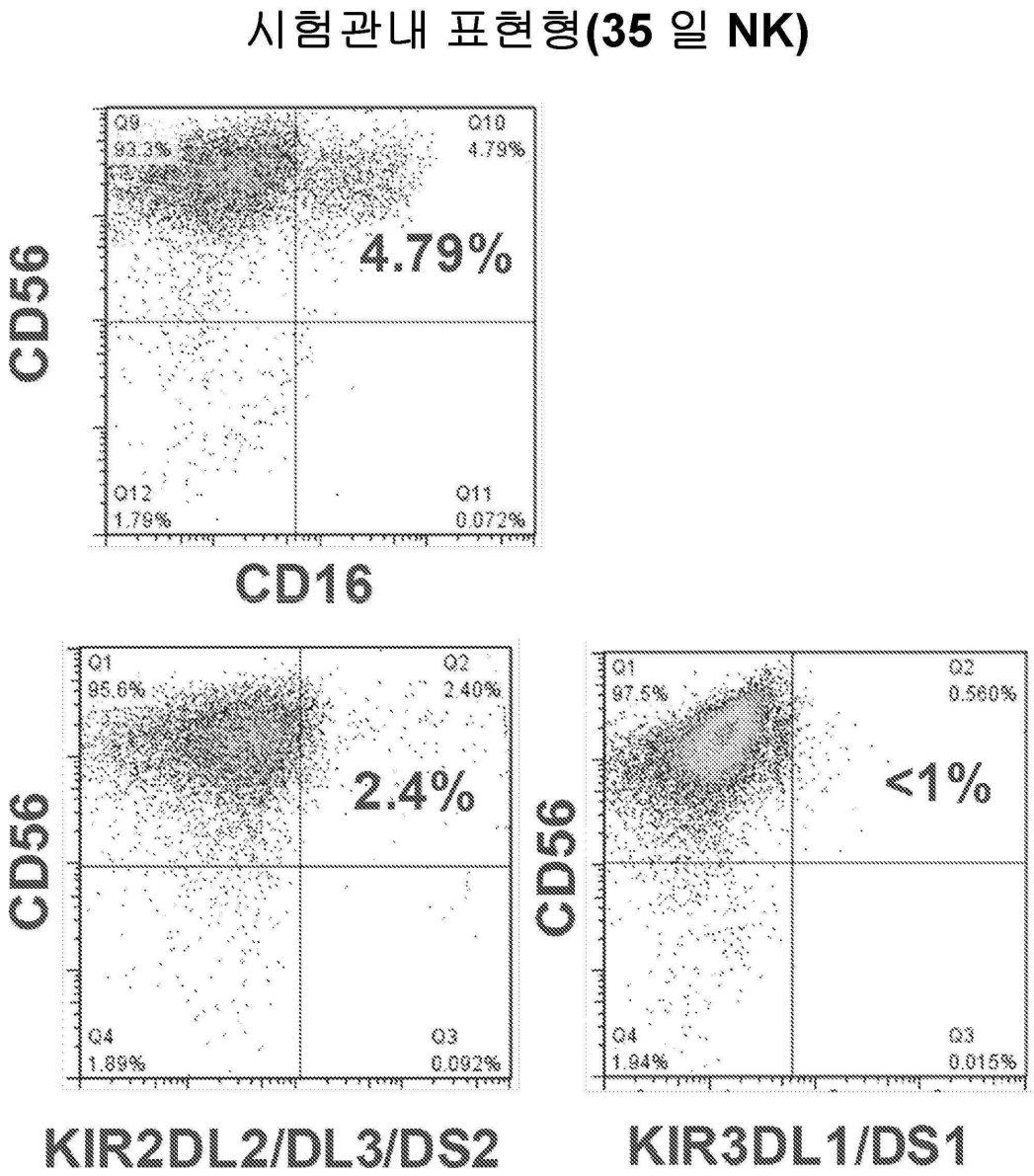
도면18c



도면18d

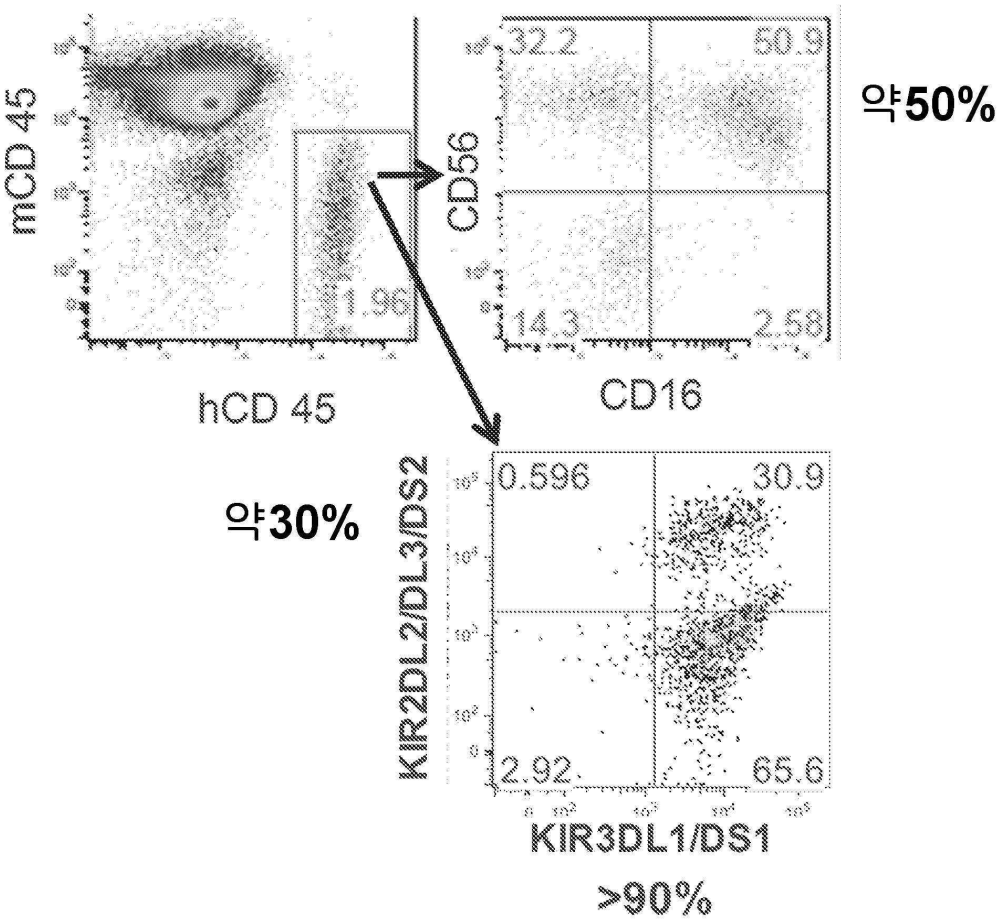

간 NK+IL-15
인간 CD45 (%)
50
40
30
20
10
0
d7
d14
d21
d28
생체내 전이후

도면19

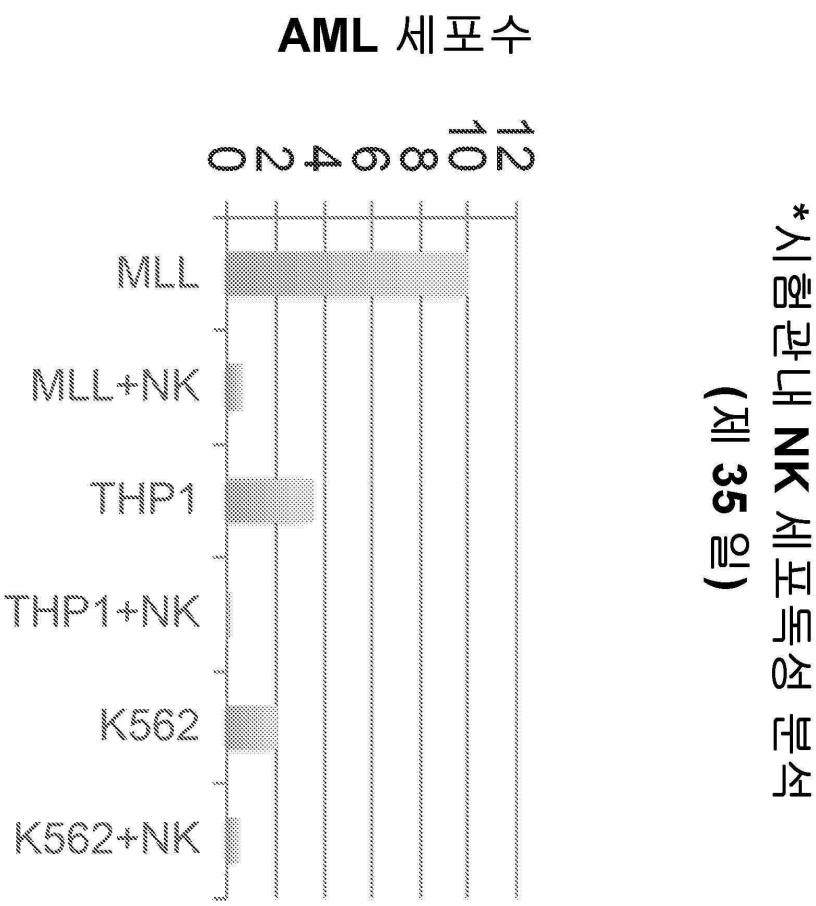

시험관내 표현형(35 일 NK)
CD56
CD16
Q9
93.3%
Q10
4.79%
4.79%
Q12
1.79%
Q11
0.072%
CD56
KIR2DL2/DL3/DS2
Q1
95.6%
Q2
2.40%
2.4%
Q4
1.89%
Q3
0.092%
CD56
KIR3DL1/DS1
Q1
97.5%
Q2
0.560%
<1%
Q4
1.94%
Q3
0.015%

도면20

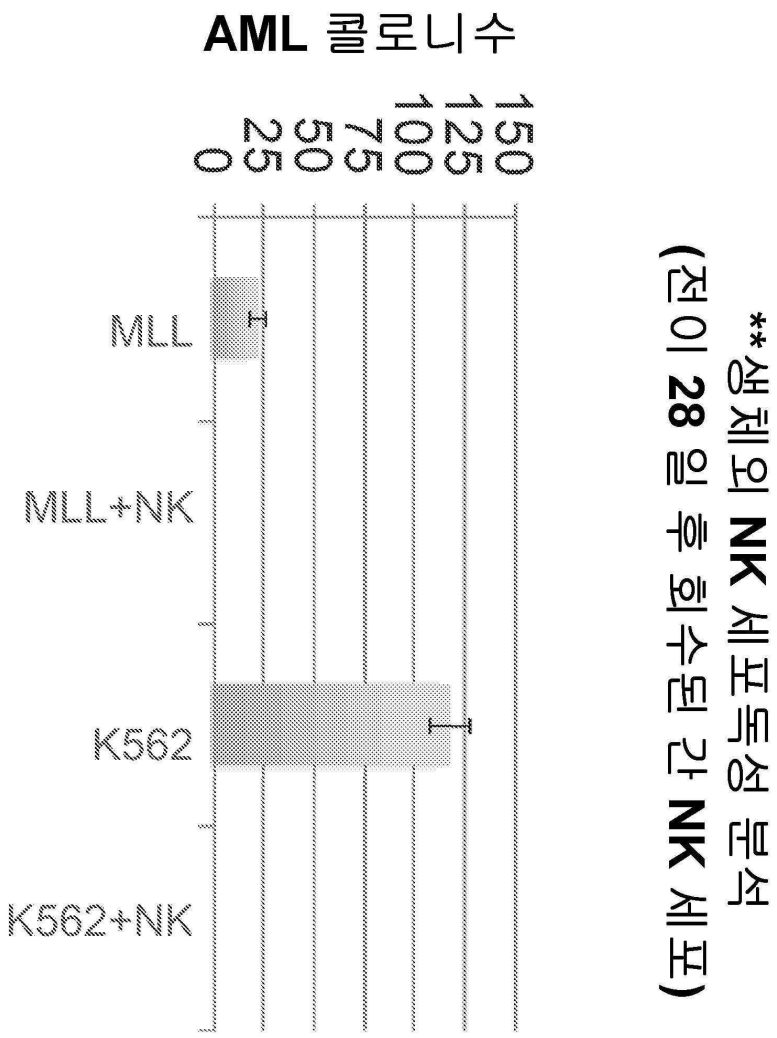
생체내 표현형(35 일 NK의 전이 28 일 후)



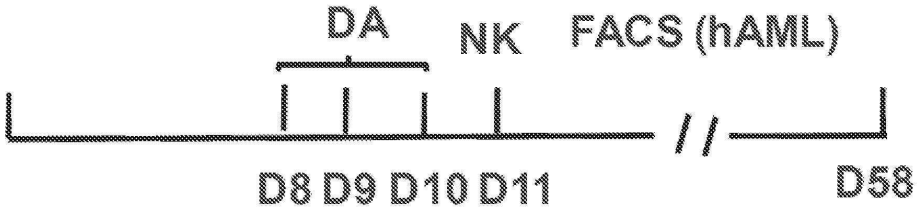
도면21


*시험관내 NK 세포독성 분석
(제 35 일)
AML 세포수
12
10
8
6
4
2
0
MLL
MLL+NK
THP1
THP1+NK
K562
K562+NK

도면22

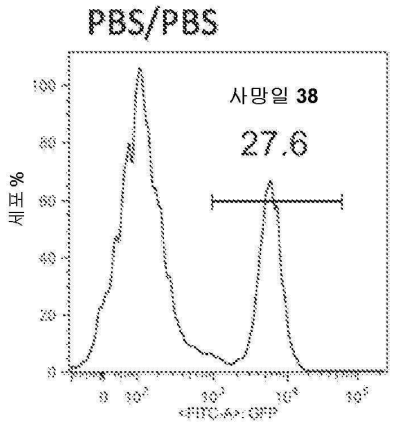


도면23a

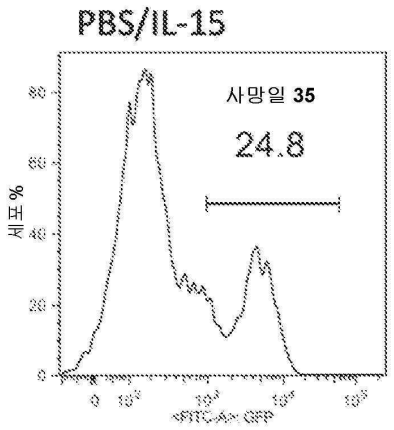


MLL/AF9-Ras BM 이식편

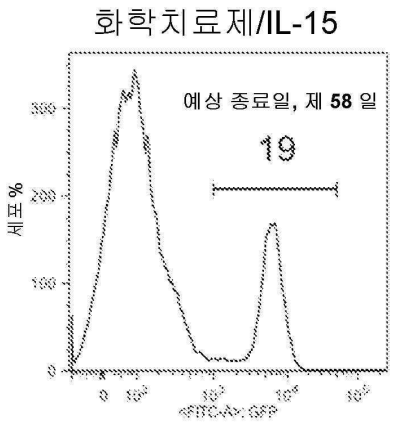
도면23b



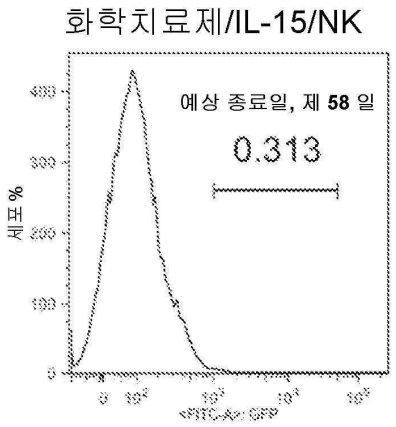
도면23c



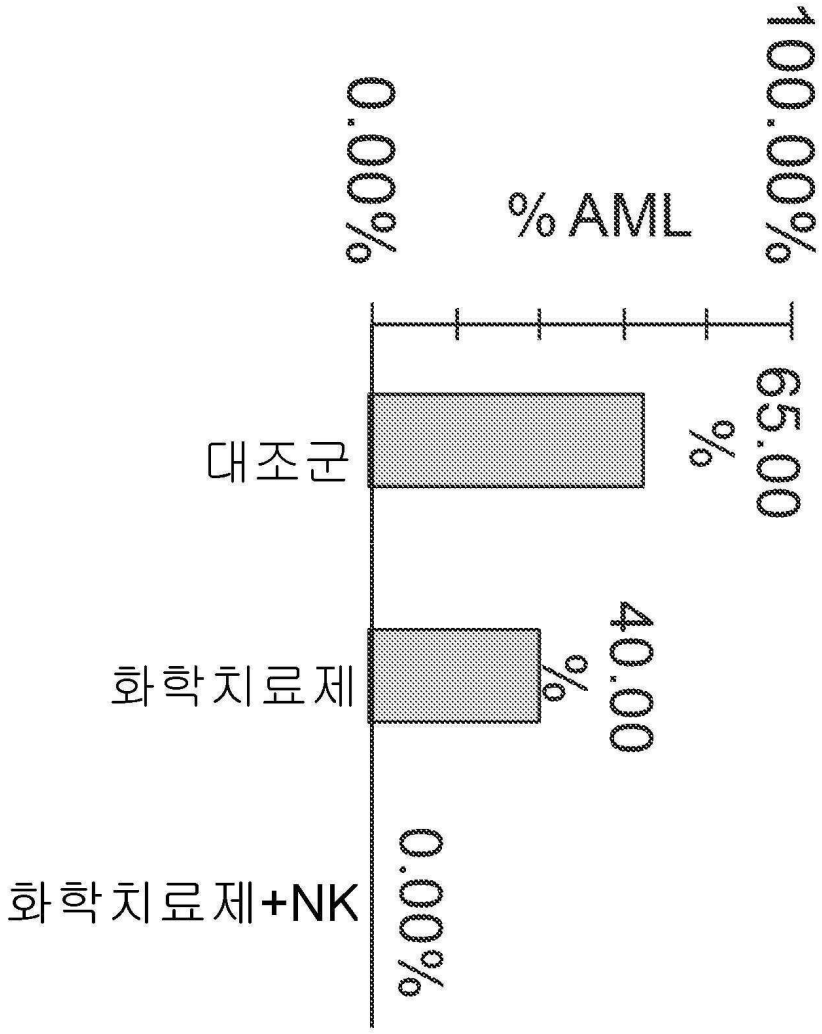
도면23d



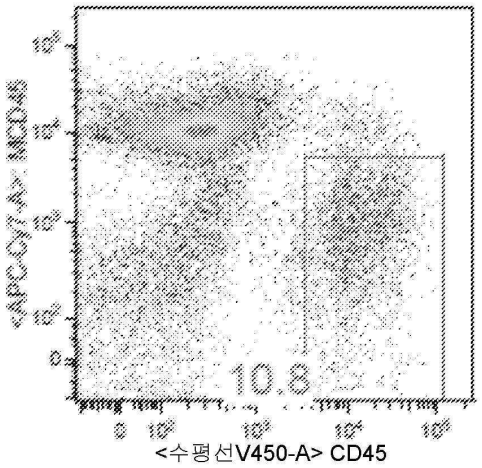
도면23e


화학치료제/IL-15/NK
예상 종료일, 제 58 일
0.313
세포 %

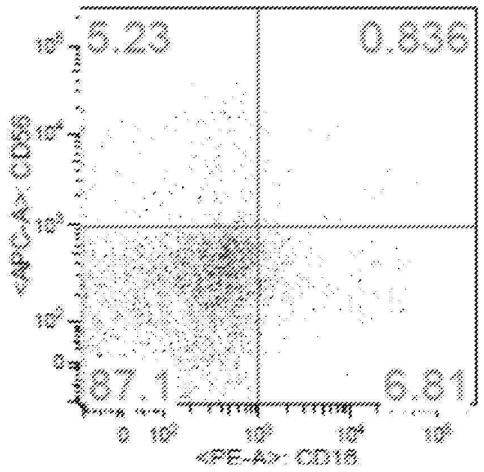
도면23f


화학치료제+NK
화학치료제
대조군
0.00%
40.00%
65.00%
% AML
0.00%
100.00%

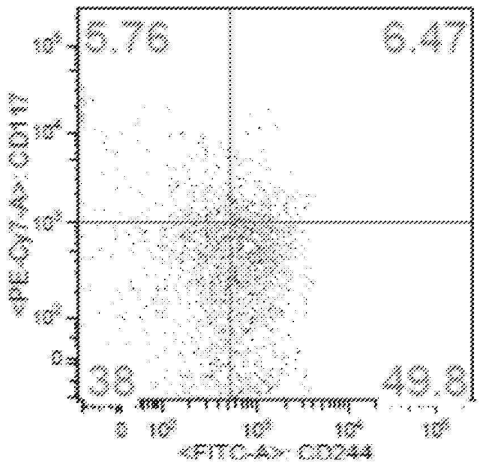
도면24a



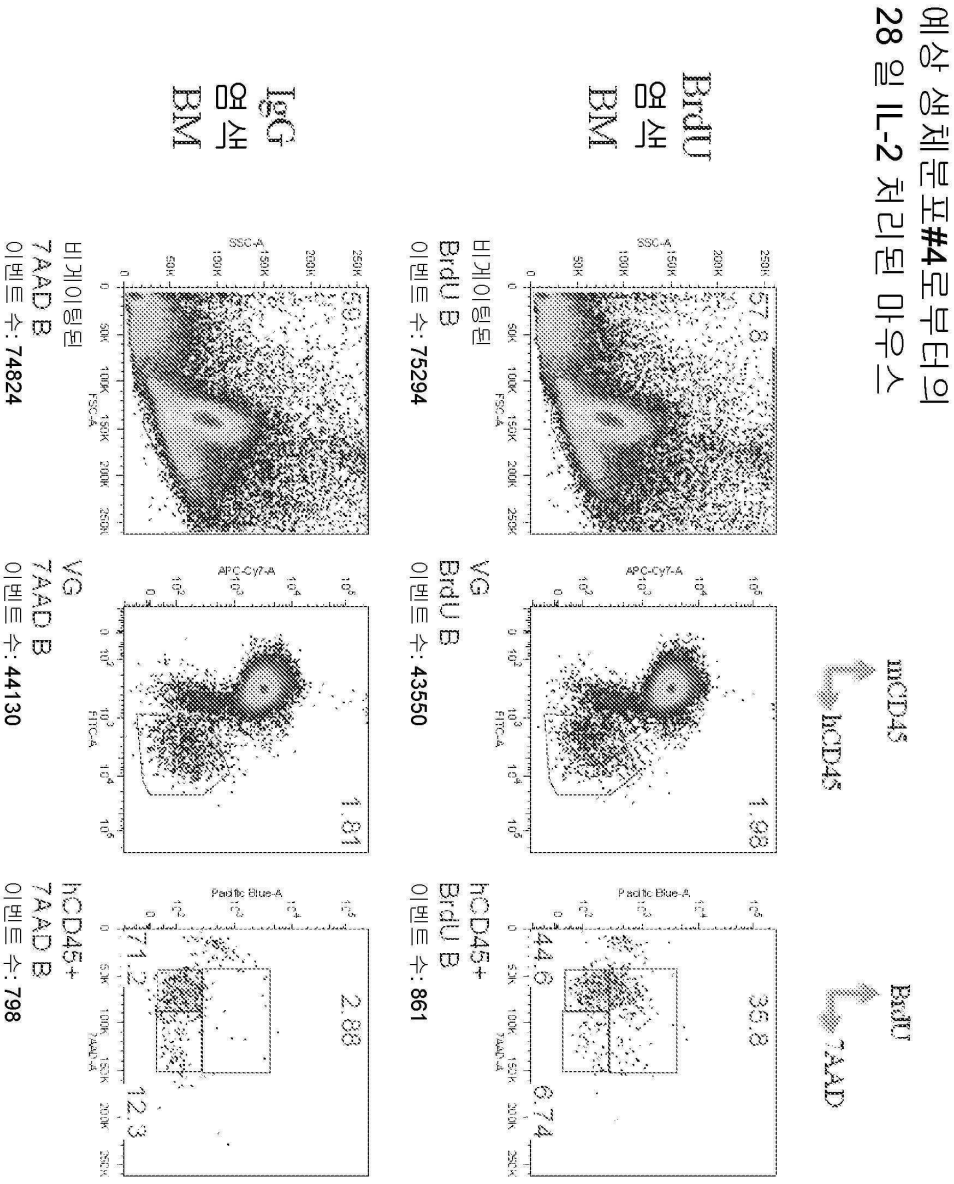
도면24b



도면24c



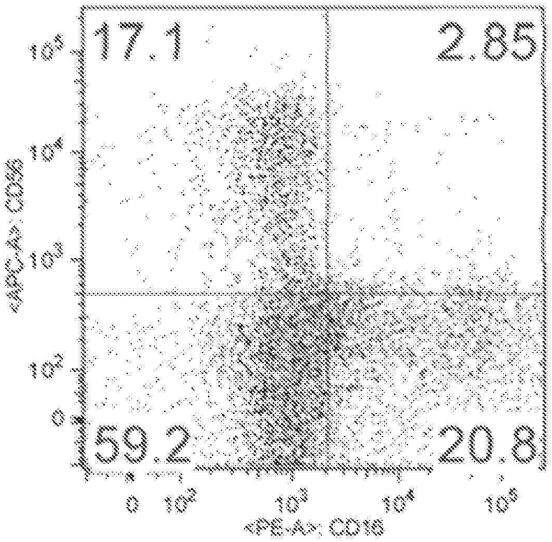
도면25


예상 생체분포#4로부터의
28 일 IL-2 처리된 마우스
BrdU
염색
BM
IgG
염색
BM
mCD45
hCD45
BrdU
7AAD
비게이팅된
BrdU B
이벤트 수: 75294
비게이팅된
7AAD B
이벤트 수: 74824
VG
BrdU B
이벤트 수: 43550
VG
7AAD B
이벤트 수: 44130
hCD45+
BrdU B
이벤트 수: 861
hCD45+
7AAD B
이벤트 수: 798
57.8
1.98
35.8
44.6
6.74
2.88
71.2
12.3
1.81

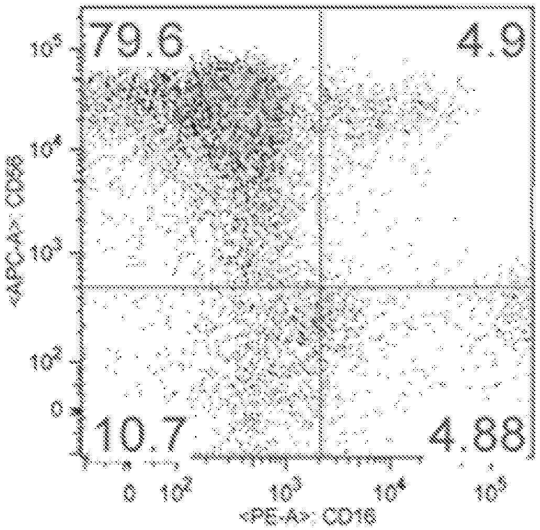
도면26

시험관내 분화:

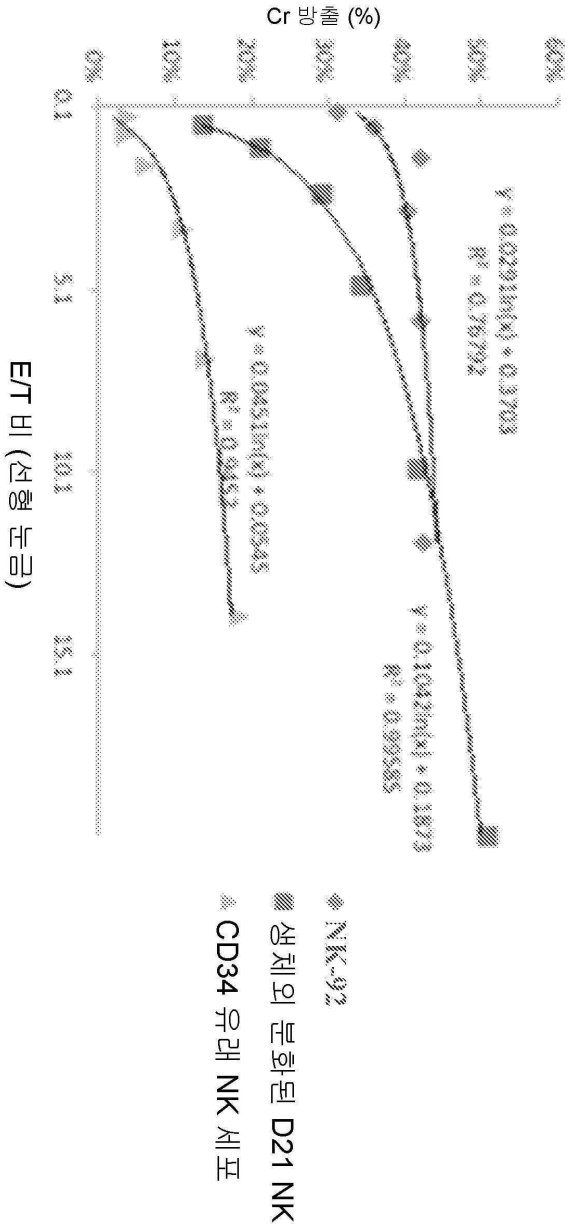
제 **5** 일



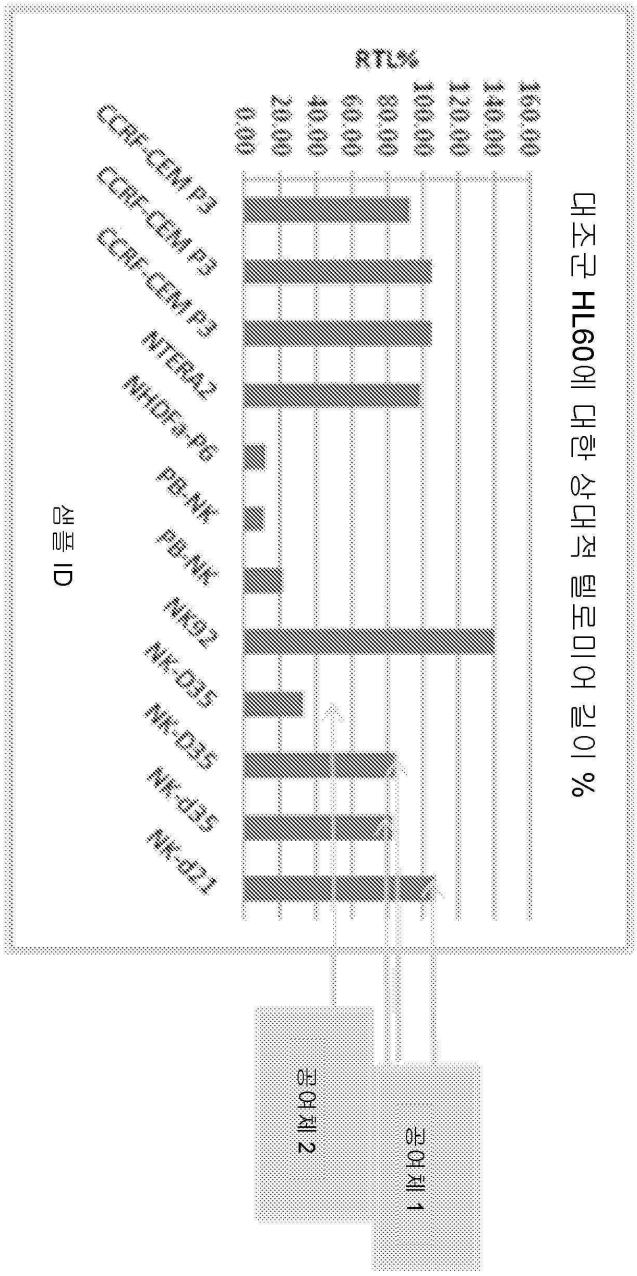
제 **11** 일



도면27


Cr 방출 (%)
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
0.1
1:1
10:1
15:1
E/T 비 (섬유 형성 수준)
y = 0.02916ln(x) + 0.3703
R² = 0.7962
y = 0.10428ln(x) + 0.1873
R² = 0.9555
y = 0.0451ln(x) + 0.0543
R² = 0.9552
NK-92
생체외 분화된 D21 NK
CD34 유래 NK 세포

도면28


대조군 HL60에 대한 상대적 텔로미어 길이 %
RTL%
160.00
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
CCRF-CEM P3
CCRF-CEM P3
CCRF-CEM P3
NTERA2
NHDF9-P6
PB-NK
PB-NK
NK92
NK-D35
NK-D35
NK-d35
NK-d21
샘플 ID
운여제 1
운여제 2