

명세서

발명의 명칭: 유사 기억 자연 살해 세포 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 유사 기억 자연 살해 세포의 항암 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 유사 기억 자연 살해 세포의 항암 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인체의 면역 시스템 중에서 림프구에 속하는 자연 살해 세포(natural killer cell, 이하 NK 세포)는 선천 면역을 담당하며 외부의 병원균 혹은 내부의 암세포 등 비정상적인 세포를 빠른 시간에 인식하여 제거하는 역할을 한다. 특히 획득 면역을 담당하는 T 세포가 활성화되기 위해서는 먼저 항원 제시 세포가 타겟 세포를 분해하여 MHC에 항원을 제시해야 하는 복잡한 과정이 필수적인 것에 비하여, NK 세포는 항원의 제시를 필요로 하지 않는 부분에서 면역 세포 치료제로서 각광을 받고 있다. 한편 NK 세포는 골수, 림프절, 말초혈액에 존재하는 림프구의 한 아형으로, 전체 림프구의 약 10~15%를 차지하며, T 세포와 B 세포에 이어 세 번째로 흔한 아형이다. 암세포 또는 바이러스에 감염된 세포를 살상할 수 있는 능력을 갖춘 면역세포로써 선천성 면역반응에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. NK 세포는 특정한 항원의 자극 없이 세포 표면의 수용체와 그에 대응하는 표적 세포 리간드의 상호작용에 의해 기능이 조절되고, 이들 수용체는 크게 활성화 수용체와 억제 수용체로 구분된다. NK 세포에 활성화 신호를 전달하여 자연 살해 세포의 기능을 조절하는 활성화 수용체에는 대표적으로 natural cytotoxicity receptors(NCRs; NKp30, NKp44, NKp46), NKG2D 등이 잘 알려져 있다. NK 세포는 이러한 리간드 특이성이 다른 다양한 활성화 수용체를 통해 표적세포를 감지하며 이들 수용체는 주로 인산화(phosphorylation)를 통해 활성화를 유도하는데 각각의 신호전달 특성이 매우 다르다. NCRs(NKp30, NKp44, NKp46)과 CD16의 경우 ITAM motif를 가진 FcR γ , CD3 γ , DAP12와 복합체를 형성하여 T 세포, B 세포의 TCR, BCR과 유사하게 활성화 신호를 전달하는 것으로 알려지고 있다. NKG2D는 YINM motif를 가진 DAP10 adaptor와 결합하며 PI3K 또는 Grb2-Vav1 복합체를 통해 신호를 전달한다. 특히, NCRs의 발현이 높은 자연 살해 세포의 경우 발현이 적은 세포에 비해 세포 독성 능력이 더 높다는 사실이 밝혀져 있어 NCRs의 발현 정도에 따라 자연 살해 세포의 활성화 정도를 확인할 수 있다. 활성화된 자연 살해 세포는 다양한 과립(granule)들을 합성하고 세포 밖으로 분비하여 표적 세포를 파괴할 수 있다. 과립에 포함되어 있는 대표적인 단백질 중 퍼포린(Perforin)과 그랜자임(Granzyme)은 표적 세포를 파괴하는데 주요한 역할을 한다. 퍼포린은 표적 세포의 세포막에 모여 복합체를 형성하여 세포막에 구멍을 뚫어 세포의 용해를 일으키며, 그랜자임은 세포에 생성된 구멍을 통해 세포 내로 들어

가서 caspase를 활성화시킬 뿐만 아니라 다양한 기전을 통해 세포사멸을 유도한다.

- [3] 한편, T 세포는 MHC에 제시된 항원들을 인지하며 자기 세포와 비자기 세포를 구분하기도 한다. 비자기 세포를 인지하면 비정상 세포로 인지하여 즉각 살해하게 되므로 암세포는 면역 시스템을 회피하기 위하여 표면에 MHC의 발현이 현저히 저하되어 있다. 그러나 NK 세포는 다른 세포의 MHC를 인지하면 억제 신호가 발동되며, 타겟 세포의 MHC가 없을 경우 오히려 활성 신호가 발동되어 타겟 세포를 제거할 수 있게 된다. 따라서, 암세포 살상 능력에 있어서는 NK 세포가 T 세포에 비하여 조금 더 유리하다. 또한 NK 세포는 FasL, TRAIL과 같은 death ligand를 이용하여 암 세포의 death receptor와 결합함으로써 암 세포의 세포 자살을 유도한다. 이 수용체들의 결합은 암 세포내의 caspase-8, -10을 활성화시키고 이로 인해 caspase-3, -7이 활성화되어 결과적으로 세포 자살을 일으키게 되는 것이다. 또한, 자연 살해 세포는 다양한 사이토카인(cytokine)과 케모카인(chemokine)을 분비하고 항원제시 세포와 직접적인 상호 작용을 통해 후천면역반응을 활성화시키는데 교두보적인 역할을 한다. 활성화된 NK 세포에서 분비되는 IFN- α 는 단핵 세포와 수지상 세포를 활성화 시키고 성숙시켜 병원균에 대한 선천면역 반응을 증가시키는데 중요한 역할을 하며, Th1 면역 반응 초기에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [4] NK 세포가 이러한 능력을 갖추기 위해서는 표적 세포를 만나기 전 분화 자극(priming)이 필요하다. 그렇기 때문에, 쥐와 사람에게서 분리해 낸 전구체 자연 살해 세포는 암세포 살상 능력과 IFN- γ 생성능력이 현저히 감소되어 있다. 이러한 NK 세포의 능력을 극대화시켜줄 수 있는 분화 자극 사이토카인으로 IL-2, IL-15 등이 일부 보고된 바가 있다. 예컨대, IL-2는 성숙된 NK 세포의 증식과 활성화를 증진시키는 기능을 지니고 있음이 보고되고 있다. 또한, IL-15는 NK 세포 분화에 관여하는 것이 알려져 있다. 또한, IL-21은 활성화된 CD4⁺T 세포에 의해 분비되는 사이토카인이며, IL-21의 수용체(IL-21R)는 수지상세포, NK 세포, T 세포 및 B 세포와 같은 림프구에서 발현된다고 알려져 있다.
- [5] 암환자의 경우 전체적인 면역 시스템이 제기능을 발휘하지 못하는 상태이기 때문에 체내에 가지고 있는 면역 세포들을 그대로 이용해서는 암세포 살상 능력이 충분하지 못한 상태이다. 최근 환자의 말초 혈액으로부터 NK 세포를 분리 및 배양하여 암세포 살상 능력을 활성화시킨 후 다시 환자에게 주입하는 면역 세포 치료제가 활발히 개발되고 있다. 그러나 일반적인 NK 세포는 체내 주입 1~2주 후 골수로 들어가 사라지게 되므로 지금까지 개발되고 있는 NK 세포 치료제들은 1~2주에 한 번씩 환자에게 NK 세포를 주입하여야 하기 때문에 환자에게 부담이 되고 있다. 이에, 최근 초기에 자극 이후 휴식기 배양을 한 후 재자극을 주게 되면, T 세포처럼 유사 기억(Memory-like) 세포 기능을 지니면서, 암세포 사멸 능력이 좋고, 체내 장기 생존 가능한 NK 세포가 제조된다는 것이 확인되어, 이에 따라 관련 연구가 활발히 진행되고 있으나, 생산 과정에서 증식이 잘 되지 않고, 충

분한 수의 NK 세포를 확보하기 위하여 다량의 혈액이 필요하기 때문에 환자나 공여자에게 부담이 되는 단점으로 인해 치료제/치료법의 개발에 어려움이 있다 (Matteo Tanzi, et al., Cancers, 13;1577, 2021).

- [6] 따라서, 체내에 존재하는 활성이 낮은 자연 살해 세포를 대신하여 더욱 활성이 높은 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 제조하고, 이를 항암 용도 등에 이용할 필요성이 존재한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 다른 목적은 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 제공하는 것이다.
- [9] 또한, 본 발명의 다른 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 암 치료용 면역 세포 치료제를 제공하는 것이다.
- [11] 또한, 본 발명의 다른 목적은 항암제 활성 증진을 위한 항암 보조제를 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 다른 목적은 암 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [13]

과제 해결 수단

- [14] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 제조방법을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 면역 세포 치료제를 제공한다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 보조제를 제공한다.
- [19] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물 또는 상기 세포 치료제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [20] 본 발명의 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 제조방법은 세포 증식이 유지되면서 암세포 살상 능력도 증가한 유사 기억 자연 살해 세포를 제조하는 최적의 자가 면역 세포 배양방법이며, 이를 통해 제조한 유사 기억 자연 살해 세포는 자연 살해 세포(natural killer cell, NK 세포)에 비하여 암세포 살상 능력

이 뛰어나고, 유사 기억 능력을 가지고 있어 2번째 자극이 주어질 경우 다시 활성화되고 다시 증식하는 기능이 있으며, 체내에서 2개월 이상 생존할 수 있는 장점이 있어, 면역 세포 치료제 또는 암의 예방 또는 치료 용도로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, NK 세포의 순도(분포)를 측정한 도이다:
- [22] 대조군: 말초 혈액 단핵구를 2~10%의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 음성 대조군 세포; 및
- [23] 유사 기억 자연 살해 세포: 본 발명의 방법으로 생산한 유사 기억 자연 살해 세포.
- [24] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 유사 기억 자연 살해 세포의 활성화(암세포 살상 능력)을 확인한 도이다:
- [25] 대조군: 말초 혈액 단핵구를 2~10%의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 음성 대조군 세포; 및
- [26] 유사 기억 자연 살해 세포: 본 발명의 방법으로 생산한 유사 기억 자연 살해 세포.
- [27] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 유사 기억 자연 살해 세포 특이적 표지의 세포 표면 발현을 분석한 도이다:
- [28] 대조군: 말초 혈액 단핵구를 2~10%의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 음성 대조군 세포; 및
- [29] 유사 기억 자연 살해 세포: 본 발명의 방법으로 생산한 유사 기억 자연 살해 세포.
- [30] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 처음 배양을 시작한 전체 세포 대비 최종 수확한 전체 세포 수를 비교하여 누적 증식률을 확인한 도이다.
- [31] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 음성 대조군(control) 대비 실험군(유사 기억 자연 살해 세포, Memory-like NK cell)의 전체 세포 증식률을 비교한 도이다:
- [32] 대조군: 말초 혈액 단핵구를 2~10%의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 음성 대조군 세포; 및
- [33] 유사 기억 자연 살해 세포: 본 발명의 방법으로 생산한 유사 기억 자연 살해 세포.
- [34] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 처음 배양 시작할 때의 NK 세포수 대비 최종 생산한 NK 세포의 수를 확인하여 세포증식률을 비교한 도이다.
- [35] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 음성 대조군(control)과 실험군(유사 기억 자연 살해 세포, Memory-like NK cell)에서 초대배양 NK 세포 대비 최종 NK 세포 증식률을 비교한 도이다:
- [36] 대조군: 말초 혈액 단핵구를 2~10%의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 음성 대조군 세포; 및

- [37] 유사 기억 자연 살해 세포: 본 발명의 방법으로 생산한 유사 기억 자연 살해 세포.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [38] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [39] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [40] 일 측면에서, 본 발명은 1) 말초혈액으로부터 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 분리하는 단계; 2) 혈장, 항-NKp46 항체, IL-2 및 IL-18를 처리하여 배양하는 단계; 3) 세포를 새로운 배양 용기로 옮겨 혈장 및 IL-2를 처리하여 배양하는 단계; 4) 세포를 새로운 배양 용기로 옮겨 혈장, IL-12, IL-15 및 IL-18을 처리하여 배양하는 단계; 및 5) 세포를 새로운 배양 용기로 옮겨 혈장, IL-2 및 IL-15을 처리하여 배양하는 단계를 포함하는, 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 제조 방법에 관한 것이다.
- [41] 일 구현예에서, 단계 2)에서 세포는 피브로넥틴(Fibronectin), γ -글로불린(γ -globulin) 및 항-CD56 항체가 코팅된 배양 용기에서 배양될 수 있다.
- [42] 일 구현예에서, 단계 2)의 혈장은 1 내지 20%(w/w), 항-NKp46 항체는 0.01 내지 10 μ g/ml, IL-2는 10~5000 IU/ml 및 IL-18은 2~500 ng/ml 처리할 수 있다.
- [43] 일 구현예에서, 단계 2)를 2회 이상 수행할 수 있으며, 혈장, 항-NKp46 항체, IL-2 및 IL-18를 1차 처리하여 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양한 뒤, 혈장, 항-NKp46 항체, IL-2 및 IL-18를 2차 처리하여 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양할 수 있다.
- [44] 일 구현예에서, 단계 3)의 혈장은 1 내지 20%(w/w) 및 IL-2는 10~5000 IU/ml 처리할 수 있다.
- [45] 일 구현예에서, 단계 3)을 2회 이상 수행할 수 있으며, 혈장 및 IL-2를 1차 처리하여 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양한 뒤, 혈장 및 IL-2를 2차 처리하여 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양할 수 있다.

- [46] 일 구현예에서, 단계 4)의 혈장은 1 내지 20%(w/w), IL-12는 0.5 내지 200 ng/ml, IL-15는 0.1 내지 100 ng/ml 및 IL-18는 2~500 ng/ml 처리할 수 있다.
- [47] 일 구현예에서, 단계 4)의 배양은 10 내지 20시간 동안 수행될 수 있으며, 12 내지 16시간 동안 수행되는 것이 더욱 바람직하다.
- [48] 일 구현예에서, 단계 5)의 혈장은 1 내지 20%(w/w), IL-2는 10~5000 IU/ml 및 IL-15는 0.1 내지 100 ng/ml 처리할 수 있다.
- [49] 일 구현예에서, 단계 5) 이후에 IL-2가 포함된 새로운 배지를 처리하여 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, IL-2는 10~5000 IU/ml 처리될 수 있다.
- [50] 일 구현예에서, 상기 혈장은 상기 말초혈액으로부터 분리한 혈장일 수 있으며, 상기 말초혈액 단핵세포(PBMC) 및 혈장은 대상체에 대해 자가일 수 있다.
- [51] 본 발명의 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법은 세포 증식이 잘 되지 않는 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 단점을 극복하기 위하여, 말초 혈액 단핵구를 분리한 후 세포 전체를 이용하여 NK 세포 증식을 위한 배양을 시작하고, 활발한 증식이 진행되는 과정 중에 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)로 자극을 주어 세포 증식이 유지되면서 암세포 살상 능력도 증가한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 제조/생산하는 최적의 자가 면역 세포 배양방법이며, CD3 양성 T 세포를 제거하는 과정 및 먹이 세포 없이 고순도의 NK 세포를 배양하여 환자 투여에 적합한 충분한 수의 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 증식시킬 수 있는 효과가 있다.
- [52] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제조방법으로 제조된 유사 기억 자연 살해 세포에 관한 것이다.
- [53] 일 구현예에서, 본 발명의 제조방법으로 제조된 유사 기억 자연 살해 세포는 NK 세포에 비해 CD94 또는 CD25의 발현이 증가되고, NK 세포에 비해 NKp80의 발현이 감소될 수 있다.
- [54] 일 구현예에서, 본 발명의 제조방법으로 제조된 유사 기억 자연 살해 세포는 NK 세포에 비해 세포증식률이 증가될 수 있다.
- [55] 본 발명의 제조방법으로 제조된 유사 기억 자연 살해 세포는 NK 세포에 비하여 암세포 살상 능력이 뛰어나 면역 세포 치료제로 이용될 수 있으며, 유사 기억 능력을 가지고 있어 2번째 자극이 주어질 경우 다시 활성화되고 다시 증식하는 기능이 있고, 체내에서 2개월 이상 생존할 수 있는 장점이 있다.
- [56] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 유사 기억 자연 살해 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [57] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 유사 기억 자연 살해 세포를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 면역 세포 치료제에 관한 것이다.
- [58] 일 구현예에서, 암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비

선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [59] 본 발명에서 사용되는 용어, "암" 및 "종양"은 서로 혼용될 수 있다.
- [60] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 발달 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [61] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 암 및 이로 인한 합병증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.
- [62] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 개체의 상태 등에 따라 달라질 수 있다.
- [63] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [64] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.
- [65] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack

- Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [66] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 단백질을 0.0001 내지 10 중량 %로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량 %를 포함한다.
- [67] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정 셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 경구 투여 하는 것이 가장 바람직하다. 투여량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [69] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다.
- [70] 일 측면에서, 본 발명은 유사 기억 자연 살해 세포를 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 보조제에 관한 것이다.
- [71] 일 구현예에서, 항암제는 에리블린(eribulin), 카보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 할라벤(Halaven), 5-플루오로우라실(5-FU), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(Vincristine), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 도세탁셀(Docetaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide), 켄시타빈(gemcitabine), 미토마이신(Mitomycin) 또는 블레오마이신(Bleomycin)일 수 있다.
- [72] 일 측면에서, 본 발명은 상기 약학적 조성물 또는 상기 세포 치료제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 간암을 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [73] 본 발명에서 "개체"는 암을 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 인간을 포함하는 동물, 예를 들어 비-영장류 (예를 들면, 소, 돼지,

말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류 (예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노물구스 (cynomolgous) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나타낸다.

[74] 본 발명의 약학적 조성물 또는 세포 치료제는 치료학적으로 유효한 양 또는 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[75] 본 발명에서, 용어 "치료학적으로 유효한 양"은 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 조성물의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정된 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed. (2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (1990), Mack Publishing Co.에 기술되어 있다.

[76] 본 발명에서, 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[77] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[78] 실시예 1. 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell) 생산

[79] 1-1. 플라스크 코팅

[80] 채혈 하루 전에 미리 사용할 플라스크에 5~10 $\mu\text{g/ml}$ 의 피브로넥틴(Fibronectin) (FC010, Sigma), 1~2 mg/ml의 γ -글로불린(γ -globulin)(녹십자), 5~10 $\mu\text{g/ml}$ 의 항-CD56 항체(559043, BD Biosciences)를 DPBS에 희석한 용액을 넣고 골고루 퍼뜨려 2~8°C에서 16시간 이상 코팅하였다. 이 때, 플라스크의 크기가 25 cm²일 경우에는 총 3~5 ml, 75 cm²일 경우에는 5~10 ml의 용액으로 코팅하였다. 코팅이 완료된 플라스크는 잔여 코팅 용액을 제거하고 DPBS 10 ml로 세척한 뒤 DPBS를 제거하였다.

[81] 1-2. 말초혈액 단핵세포(PBMC) 분리

[82] 총 5명의 건강한 공여자의 정맥으로부터 헤파린이 코팅된 진공 채혈관(367874, BD)에 각각 채혈하고, 15 ml의 Histopaque 1077(10771, Sigma-Aldrich)이 담긴 50 ml 튜브에 혈액을 조심스럽게 옮겼다. 혈액이 담긴 튜브를 1000 xg에서 실온에 10분간 브레이크 오프 상태에서 원심분리한 뒤, 튜브를 조심스럽게 꺼내어 상층액을 새로운 50 ml 튜브에 옮겨 담고 56°C로 설정한 수조에 넣어 30분간 불활성화시키고 1400 xg에서 10분간 원심분리하였다. 튜브를 꺼내어 상층액만 새로운 50 ml 튜브에 넣어 자가 혈장 분리를 완료하였다. 자가 혈장은 냉장(2~8°C) 보관하여 사용하였다. 혈장을 분리하고 남은 튜브에서 미황색 층(mononuclear cell layer)을 조심스럽게 분리하여 새로운 50 ml 튜브에 옮기고 DPBS(17-512F, Lonza)를 가득 채워 910 xg에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 버리고 침전 세포를 30 ml의 DPBS로 재현탁한 뒤 910 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버린 뒤 침전 세포를 5 ml의 적혈구 용해 버퍼(Red blood cell lysis buffer)(00-4333-57, Thermo Fisher Scientific)로 재현탁한 후 실온에서 5분간 정치하였다. 이 후 세포 현탁액에 30 ml의 DPBS를 넣어 반응을 종료시킨 후, 910 xg에서 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 침전 세포에 10 ml의 DPBS를 넣어 재현탁 후 910 xg에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 남은 침전 세포를 10 ml의 배양 배지(NK MACS medium, 130-114-429, Miltenyi biotec)로 재현탁한 후 소량의 세포를 취하고 10배 희석하여 계수하였다.

[83] 1-3. NK 세포의 1차 배양

[84] 상기 실시예 1-2에서 준비한 세포 현탁액을 취하여 상기 실시예 1-1에서 준비한 25 cm² 코팅 플라스크에 넣고, 2~10%(v/v)의 자가 혈장과 0.1~1 µg/ml의 항-NKp46 항체(130-094-271, Miltenyi Biotec), 100~1000 IU/ml의 IL-2(146545, Boehringer Ingelheim) 및 5~100 ng/ml의 IL-18(9124IL-500-CF, R&D Systems)를 넣어 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양하였다. 세포 배양 중인 상기 플라스크에 10%의 자가 혈장, 100~1000 IU/ml의 IL-2, 5~100 ng/ml의 IL-18 및 0.1~1 µg/ml의 항-NKp46 항체가 포함된 새로운 배지를 2.5 ml 첨가한 후 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 계속 배양하였다. 세포 배양이 완료된 25 cm² 플라스크의 바닥에 붙은 세포까지 세포 스크래퍼(cell scraper)를 이용하여 떼어낸 후 세포 현탁액 7.5 ml을 75 cm² 플라스크에 옮겨주었다. 여기에 2~10%의 자가 혈장 및 100~1000 IU/ml의 IL-2이 포함된 새로운 배지를 8 ml 첨가한 후 추가로 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 계속 배양하였다. 세포 배양 중인 상기 플라스크에 2~10%의 자가 혈장 및 100~1000 IU/ml의 IL-2이 포함된 새로운 배지 15 ml을 첨가한 후 추가로 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양하였다. 세포 스크래퍼를 이용하여 세포 배양이 완료된 플라스크의 바닥에 붙은 세포까지 떼어낸 후 세포 현탁액 30 ml을 튜브에 옮겨 담아 910 xg에서 10분간 원심분리하였다.

- [85] 1-4. 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)로 자극
- [86] 상기 실시예 1-3에서 원심분리한 세포의 상층액을 제거하고 DPBS 10 ml로 재현탁한 뒤 다시 910 xg에서 10분간 원심분리하여 세포를 세척하였다. 세척은 2회 반복하였다. 세척을 완료한 세포를 2~10%(v/v)의 자가 혈장, 2~50 ng/ml의 IL-12, 1~10 ng/ml의 IL-15 및 10~100 ng/ml의 IL-18이 포함된 새로운 배지 30 ml로 재현탁한 뒤 새로운 75 cm² 플라스크에 넣어 12 내지 16시간 동안 배양하여 자극하였다. 12 내지 16시간 동안 자극한 세포를 수거하여 50 ml 튜브에 옮겨 담고 910 xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 10 ml의 DPBS로 재현탁한 뒤 다시 910 xg에서 10분 동안 원심분리하여 세척하였다. 세척은 2회 반복하였다.
- [87] 1-5. NK 세포의 2차 배양
- [88] 상기 실시예 1-4에서 세척을 완료한 세포를 2~10%(v/v)의 자가 혈장과 100~1000 IU/ml의 IL-2 및 1~10 ng/ml의 IL-15가 포함된 새로운 배지 30 ml로 재현탁한 뒤 새로운 75 cm² 플라스크에서 세포의 밀도가 80% 이상이 될 때까지 배양하였다. 플라스크에 세포의 밀도가 80% 이상이 되면 175 cm² 플라스크로 옮겨주어 100~1000 IU/ml의 IL-2가 포함된 새로운 배지를 첨가하고 계속해서 배양을 진행하여 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 생산하였다.
- [89] 실시예 2. NK 세포 순도 분석
- [90] 상기 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 순도를 측정하기 위해, 샘플 당 1~5 x 10⁵ 개의 세포를 취하여 1.5 ml 튜브에 세포 현탁액을 담고 DPBS 1 ml을 넣어 잘 섞어준 뒤 910 xg에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 500 μ l의 DPBS를 사용하여 2회 반복 세척하였다. 세척이 완료된 세포 침전물을 98 μ l의 FACS 염색 버퍼(554657, BD Biosciences)로 재현탁한 후 2 μ l의 인간 FcR 블로킹 시약(130-059-901, Miltenyi Biotec)을 넣고 잘 섞은 뒤 0~4°C의 암소에서 20분간 반응시켰다. 이 후 500 μ l의 DPBS를 사용하여 3회 반복 세척하고, 세척이 완료된 세포 침전물을 94 μ l의 FACS 염색 버퍼로 재현탁한 후 여기에 각각 2 μ l의 항-CD3 항체(48-0038-82, eBioscience), 항-CD56 항체(318303, BioLegend) 및 항-CD19 항체(555415, BD Biosciences)를 넣고 잘 섞은 뒤 0~4°C의 암소에서 30분간 반응시켰다. 500 μ l의 DPBS를 사용하여 3회 반복 세척한 뒤 세척이 끝난 세포 침전물을 200 μ l의 FACS 염색 버퍼로 재현탁한 후 유세포분석기를 이용하여 CD3 음성이면서 CD56 양성인 NK 세포의 순도 분석을 수행하였다. 또한, 5명의 공여자로부터 채혈하여 말초 혈액 단핵구를 얻은 직후 NK 세포의 분포를 분석한 결과로부터 0일(day 0)의 분포도를 획득하고, 상기 실시예 1의 과정을 거쳐 최종으로 얻은 유사 기억 자연 살해 세포(12~15일)의 분포를 분석하였다. 대조군은 말초 혈액 단핵구를 2~10%(v/v)의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 세포를 이용하였다.
- [91] [표 1]

[92]

NK 세포 분포(%)

	0일	12~15일	
		대조군	유사 기억 자연 살해 세포
공여자 1	30.0	20.3	71.6
공여자 2	18.4	53.65	94.3
공여자 3	21.6	32.7	92.2
공여자 4	19.7	32.7	86.9
공여자 5	41.57	44.0	92.38

[93] 상기 표 1은 총 5명의 건강한 공여자로부터 얻은 NK 세포의 분포를 나타낸다. 채혈하여 말초 혈액 단핵구를 얻은 직후 NK 세포의 분포를 분석한 결과로부터 0일(day 0)의 분포도를 획득하였다. 12~15일(day 12~15)간의 배양을 완료한 후 NK 세포의 분포를 분석하여 최종으로 얻은 NK 세포의 분포를 나타내었다. CD3 음성이면서 CD56 양성인 세포를 NK 세포로 간주한다. Control은 음성 대조군으로 말초 혈액 단핵구를 2~10%의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배양 배지에서 배양한 세포에 해당한다. 그 결과, 본 발명의 방법을 통해 유사 기억 자연 살해 세포가 현저히 증가한 것으로 나타났다(표 1 및 도 1).

[94] 실시예 3. NK 세포의 항암 활성 분석

[95] 상기 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 활성을 측정하였다. 구체적으로, 타겟 인간 암세포주인 K562를 이의 배양 배지인 complete IMDM(10%의 FBS 포함된 IMDM)를 이용하여 2회 반복 세척한 뒤, 세척이 완료된 세포 침전물을 1 ml의 complete IMDM으로 재현탁한 뒤 여기에 0.01 μ M의 농도로 Calcein-AM(C1430, Invitrogen)을 추가하여 잘 섞은 뒤 37°C의 암소에서 10분간 염색하였다. 염색이 완료된 K562 세포가 담긴 튜브를 910 xg에서 5분간 원심분리한 뒤 상층액을 제거하고 NK 세포의 배양 배지로 3회 세척하였다. NK 세포를 NK 세포의 배양 배지로 2회 세척한 뒤 Calcein-AM이 염색된 K562와 함께 12 well 플레이트에 5:1의 비율(샘플 당 5×10^5 개의 NK 세포 및 1×10^5 개의 K562 세포)로 넣어 5%의 CO₂ 농도, 37°C의 배양기에서 4시간 동안 동시 배양하였다. 이때 2~10%(v/v)의 자가 혈장 및 100~1000 IU/ml의 IL-2를 포함하는 배양 배지를 한 웰 당 1 ml씩 넣어주었다. 플레이트로부터 세포를 회수하여 1.5 ml 튜브에 옮겨 담고 910 xg에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 500 μ l의 DPBS로 2번 세척한 뒤 99 μ l의 FACS 염색 버퍼로 재현탁 후 1 μ l의 7-AAD 생존율 염색 용액(Viability staining solution)(420403, BioLegend)을 추가하고 잘 섞어 실온의 암소에서 5~10분간 염색하였다. 염색이 완료된 세포를 유세포분석기를 통하여 분석하였으며, Calcein-AM 양성인 세포들 중에서 7-AAD 양성인 세포를 NK 세포에 의하여 사멸한 세포로 간주하였다. 또한, 음성 대조군(control)으로는 배양 배지에 2~10%(v/v)의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배지에서 배양한 세포를 사용하였다.

[96] [표 2]

[97]

세포 독성(%)

	대조군	유사 기억 자연 살해 세포
공여자 1	3.8	65.8
공여자 2	41.3	69.7
공여자 3	37.5	67.7
공여자 4	50.0	70.2
공여자 5	30.5	63.0

[98] 상기 표 2는 총 5명의 건강한 공여자로부터 배양하여 최종적으로 얻은 Memory-like NK cell의 암세포 살상 능력(이하 ‘세포 독성’)을 나타낸다. 음성 대조군(control)으로는 배양 배지에 2~10%(v/v)의 자가 혈장과 1 ng/ml의 IL-15이 포함된 배지에서 배양한 세포가 사용되었다. 그 결과, 모든 공여자의 세포에서 음성 대조군 대비 실험군(유사 기억 자연 살해 세포, Memory-like NK cell)의 세포 독성이 현저히 증가한 것으로 나타났다(표 2 및 도 2).

[99] 실시예 4. 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 식별 표지의 발현 분석

[100] 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)는 일반적인 NK 세포에 비해 CD94, CD25의 발현이 증가하고, NKp80의 발현은 감소하므로(Margery Gang, et al., Semin Hematol. 57(4):185-193, 2020), 상기 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)에서 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell) 특이적 식별 표지 발현을 분석하였다. 구체적으로, 배양 배지에 2~10%(v/v)의 자가 혈장 및 1 ng/ml의 IL-15를 첨가하여 12 내지 15일 동안 배양한 음성 대조군(control) 세포, 및 12 내지 15일 동안 상기 실시예 1의 방법으로 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)를 수확하여 샘플 당 5×10^5 의 세포를 취하여 DPBS로 3회 세척하고, 98 μ l의 FACS 염색 버퍼 및 2 μ l의 인간 FcR 블로킹 시약을 넣고 잘 섞은 뒤 0~4°C에서 20분 간 반응시켰다. 반응 후 500 μ l의 DPBS를 사용하여 3회 반복 세척한 뒤, 세척이 완료된 세포 침전물을 90 μ l의 FACS 염색 버퍼로 재현탁한 뒤, 각각 2 μ l의 항-CD3 항체(48-0038-82, eBioscience), 항-CD56 항체(47-0567-42, eBioscience), 항-CD94 항체(305508, BioLegend), 항-CD25 항체(562661, BD Biosciences) 및 항-NKp80 항체(130-125-238, Miltenyi Biotec)를 넣고 잘 섞은 후 0~4°C에서 30분 간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 500 μ l의 DPBS를 사용하여 3회 반복 세척하고 세척이 완료된 세포 침전물을 200 μ l의 FACS 염색 버퍼로 재현탁한 후 유세포 분석기를 이용하여 CD3 음성이면서 CD56 양성인 NK 세포를 선택한 후 각각의 식별 표지의 발현 정도를 분석하였다.

[101] 도 3은 음성 대조군 대비 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)에서의 수용체 발현을 비교한 결과를 나타낸 것이며, 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-

like NK cell)에서 CD94, CD25는 증가하고, NKp80은 감소하는 것으로 나타났다(도 3).

[102] 실시예 5. NK 세포의 증식능 분석

[103] 5-1. 전체 세포 대비 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)수 비교

[104] 상기 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 증식능을 확인하기 위해, 처음 배양을 시작한 전체 세포수 대비 최종 수확한 전체 세포수를 비교하고자, 배양을 시작한 날을 0일(day 0)로 하여 기준으로 설정한 후 배양을 진행하면서 날짜별로 전체 세포수를 계수한 뒤 0일(day 0) 대비 몇 배의 세포가 증식되었는지 누적 증식률을 계산하였다. 또한, 배양 배지에 2~10%(v/v)의 자가 혈장 및 1 ng/ml의 IL-15를 첨가하여 12 내지 15일 동안 배양한 음성 대조군(control) 대비 본 발명의 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 전체 세포 증식 정도를 확인하였다.

[105] [표 3]

[106] 전체 세포 증식 정도(n)

	0일	6일	9일	12일
공여자 1	1.0	2.6	10.4	65.9
공여자 2	1.0	5.9	23.2	189.4
공여자 3	1.0	3.0	10.9	35.6
공여자 4	1.0	3.3	14.0	45.9
공여자 5	1.0	3.2	N/A	48.6

[107] [표 4]

[108] 음성 대조군 대비 실험군의 전체 세포 증식 정도(0일/12일)

	대조군	유사 기억 자연 살해 세포
공여자 1	2.4	65.9
공여자 2	1.2	189.4
공여자 3	18.0	35.6
공여자 4	11.5	45.9
공여자 5	0.1	48.6

[109] 그 결과, 공여자에 따라 편차가 일부 있지만, 배양 시작일 대비 최소 35배 이상, 평균 77배로 세포가 증식되는 것으로 나타났다(표 3 및 도 4). 또한, 모든 공여자에서 음성 대조군 대비 평균 12배 높은 세포증식률을 나타냈다(표 4 및 도 5).

[110] 5-1. 배양 시작시 NK 세포수 대비 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)수 비교

[111] 상기 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 증식능을 확인하기 위해, 처음 배양을 시작한 NK 세포수 대비 최종 수확한 전체 세

포 수를 비교하고자, 배양을 시작한 날(0일, day 0)을 기준으로 한 뒤 배양을 진행하면서 증식한 NK 세포를 계산하여 몇 배의 세포가 증식하였는지 분석하였다. 또한, 배양 배지에 2~10%(v/v)의 자가 혈장 및 1 ng/ml의 IL-15를 첨가하여 12 내지 15일 동안 배양한 음성 대조군(control) 대비 본 발명의 실시예 1에서 생산한 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)(실험군)의 NK 세포 증식 정도를 확인하였다.

[112] [표 5]

[113]

초대배양 NK 세포 대비 NK 세포의 증식률

	0일	6일	9일
공여자 1	1.0	3.7	153.1
공여자 2	1.0	20.3	956.0
공여자 3	1.0	7.3	143.2
공여자 4	1.0	8.4	193.7
공여자 5	1.0	5.6	98.0

[114] [표 6]

[115]

초대배양 NK 세포 대비 최종 NK 세포 증식률(0일/12일)

	대조군	유사 기억 자연 살해 세포
공여자 1	1.6	153.1
공여자 2	3.4	956.0
공여자 3	25.2	143.2
공여자 4	17.4	193.7
공여자 5	0.1	98.0

[116] 그 결과, 공여자에 따라 편차가 있지만, NK 세포가 최소 98배, 평균 309배 증식된 것으로 나타났다(표 5 및 도 6). 또한, 모든 공여자에서 음성대조군은 평균 9.5배의 NK 세포 증식률을 보이는 반면, 실험군은 평균 308.8배의 NK 세포 증식률을 나타내(약 32배), 음성 대조군에 비해 실험군에서 현저하게 NK 세포가 증식된 것으로 나타났다(표 6 및 도 7).

청구범위

- [청구항 1] 1) 말초혈액으로부터 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 분리하는 단계;
2) 혈장, 항-NKp46 항체, IL-2 및 IL-18를 처리하여 배양하는 단계;
3) 세포를 새로운 배양 용기로 옮겨 혈장 및 IL-2를 처리하여 배양하는 단계;
4) 세포를 새로운 배양 용기로 옮겨 혈장, IL-12, IL-15 및 IL-18을 처리하여 배양하는 단계; 및
5) 세포를 새로운 배양 용기로 옮겨 혈장, IL-2 및 IL-15을 처리하여 배양하는 단계를 포함하는, 유사 기억 자연 살해 세포(Memory-like NK cell)의 제조방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
단계 2)에서 세포는 피브로넥틴(Fibronectin), γ -글로불린(γ -globulin) 및 항-CD56 항체가 코팅된 배양 용기에서 배양되는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
단계 2)의 혈장은 1 내지 20%(w/w), 항-NKp46 항체는 0.01 내지 10 μ g/ml, IL-2는 10~5000 IU/ml 및 IL-18은 2~500 ng/ml 처리하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
단계 2)를 2회 이상 수행하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
단계 3)의 혈장은 1 내지 20%(w/w) 및 IL-2는 10~5000 IU/ml 처리하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
단계 3)을 2회 이상 수행하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
단계 4)의 혈장은 1 내지 20%(w/w), IL-12는 0.5 내지 200 ng/ml, IL-15는 0.1 내지 100 ng/ml 및 IL-18는 2~500 ng/ml 처리하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
단계 4)는 10 내지 20시간 동안 배양하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
단계 5)의 혈장은 1 내지 20%(w/w), IL-2는 10~5000 IU/ml 및 IL-15는 0.1 내지 100 ng/ml 처리하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,

- 단계 5) 이후에 IL-2가 포함된 새로운 배지를 처리하여 배양하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
IL-2는 10~5000 IU/ml 처리하는 것인, 유사 기억 자연 살해 세포의 제조방법.
- [청구항 12] 제1항의 방법으로 제조된 유사 기억 자연 살해 세포.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
NK 세포에 비해 CD94 또는 CD25의 발현이 증가된 것인, 유사 기억 자연 살해 세포.
- [청구항 14] 제12항에 있어서,
NK 세포에 비해 NKp80의 발현이 감소된 것인, 유사 기억 자연 살해 세포.
- [청구항 15] 제12항에 있어서,
NK 세포에 비해 세포증식률이 증가된 것인, 유사 기억 자연 살해 세포.
- [청구항 16] 제12항의 유사 기억 자연 살해 세포를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 18] 제12항의 유사 기억 자연 살해 세포를 유효성분으로 포함하는 암 치료용 면역 세포 치료제.
- [청구항 19] 제18항에 있어서,
암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 면역 세포 치료제.
- [청구항 20] 제12항의 유사 기억 자연 살해 세포를 유효성분으로 포함하는 항암제 활성 증진을 위한 항암 보조제.

- [청구항 21] 제20항에 있어서,
항암제는 에리불린(eribulin), 카보플라틴(carboplatin), 시스플라틴(cisplatin), 할라벤(Halaven), 5-플루오로우라실(5-FU), 글리벡(gleevec), 빈크리스틴(Vincristine), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 도세탁셀(Docetaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide), 젬시타빈(gemcitabine), 미토마이신(Mitomycin) 또는 블레오마이신(Bleomycin)인, 항암 보조제.
- [청구항 22] 제16항의 약학적 조성물 또는 제18항의 세포 치료제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 예방 또는 치료 방법.
- [청구항 23] 제22항에 있어서,
암은 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 방법.