(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0019599
(43) 공개일자 2021년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01) *C12N 11/16* (2020.01)
C12N 5/0789 (2010.01) *C12N 5/095* (2010.01)
G01N 33/569 (2017.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0607 (2013.01)
C12N 11/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7004280(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년06월11일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7028082
원출원일자(국제) 2010년06월11일
심사청구일자 2019년10월25일
(85) 번역문제출일자 2021년02월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/038438
(87) 국제공개번호 WO 2010/144887
국제공개일자 2010년12월16일
(30) 우선권주장
61/186,310 2009년06월11일 미국(US)
61/323,779 2010년04월13일 미국(US)

(71) 출원인
미네르바 바이오테크놀로지 코포레이션
미국 메사추세츠주 02451, 월섬, 40 베어 힐가
벰데드, 신티아
미합중국 엠에이 02115 보스톤 유니트 2번 356번지 말보로
(72) 발명자
벰데드, 신티아
미합중국 엠에이 02115 보스톤 유니트 2번 356번지 말보로
(74) 대리인
특허법인한얼

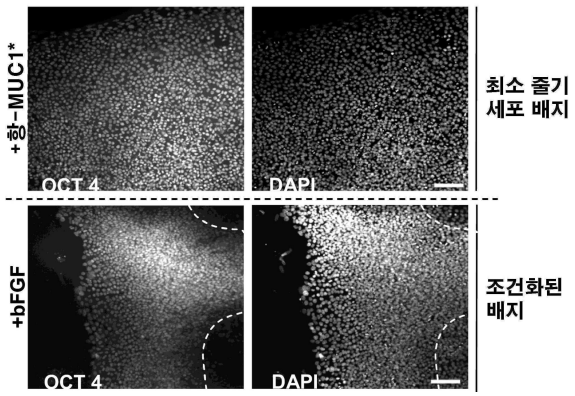
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **줄기세포 및 전구세포를 배양하는 방법**

(57) 요 약

본원은 표면 및 세포에 결합하는 리간드를 통해 세포를 표면에 부착시킴을 포함하여, 표면에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 배양하거나, 확장시키거나 성장시키는 방법을 기술한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 5/0695 (2013.01)
G01N 33/56966 (2013.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
C12N 2501/998 (2013.01)
C12N 2502/30 (2013.01)
C12N 2533/90 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 표면 및 세포에 결합하는 리간드를 통해 표면에 부착시킴을 포함하여, 표면에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 배양하거나, 확장시키거나 또는 성장시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 리간드가 중간기(intermediary)를 통해 직접 또는 간접적으로 표면에 결합하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 중간기가 화학적 링커 또는 다른 단백질 또는 이의 조합물인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단백질이 단백질 A 또는 단백질 G인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 링커가 광 또는 화학적으로 민감성인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 리간드 또는 중간기가 표면에 비-특이적으로 흡착되거나, 또는 친화성 태그-결합 파트너(affinity tag-binding partner) 상호작용을 통해 표면에 공유결합으로 커플링되거나 부착되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 리간드가 중합체에 연결되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 리간드가 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포 상에 발현된 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 리간드가 항체 또는 성장 인자인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 세포의 표면상의 폴리펩타이드가 MUC1 또는 MUC1*, SSEA3, SSEA4, Tra 1-81 또는 Tra 1-60인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포의 표면상의 폴리펩타이드가 MUC1*인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 항체가 PSMGFR 또는 C-10 PSMGFR에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 성장 인자가 야생형 NM23, 또는 NM23-S120G 돌연변이체, 또는 bFGF인 방법.

청구항 14

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 PSMGFR의 서열을갖는 펩타이드에 결합하는 제제를 함유하는 배지에 노출시킴을 포함하여, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 배양하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제제가 항체인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 제제가 야생형 NM23 또는 NM23-S120G 돌연변이체인 방법.

청구항 17

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 MUC1*-양성 암 세포로부터 분비된 제제를 함유하는 배지에 노출시킴을 포함하여, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 배양하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 MUC1*-양성 세포가 T47D, ZR-75-30, 또는 ZR-75-1로부터 선택되는 방법.

청구항 19

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 MUC1*-양성 암 세포로부터 조건화된 배지(conditioned media)에 노출시킴을 포함하여, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 배양하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, MUC1*-양성 세포가 T47D, ZR-75-30, 또는 ZR-75-1로부터 선택되는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 표면이 마트리겔이 아닌 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 상기 세포가 섬유모세포 공급자 세포(feeder cell)의 부재 하에서 배양되는 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 상기 세포가 수동적 절개없이 표면으로부터 제거되는 방법.

청구항 24

리간드에 결합하는 경쟁 분자를 첨가함으로써 세포가 리간드 또는 표면에 대한 결합으로부터 방출되도록 함을 포함하여, 제1항의 방법에 따라 성장된 세포로부터 세포를 수거하는 방법.

청구항 25

세포에 직접 또는 간접적으로 부착되는 표면에 결합된 링커를 분해함으로써 세포가 표면으로부터 방출되도록 함을 포함하여, 제1항의 방법에 따라 성장된 세포로부터 세포를 수거하는 방법.

청구항 26

항-MUC1* 항체를 사용하여 세포에 결합시킴을 포함하여 세포의 분화 상태를 확인하는 방법으로서, 여기서 항-MUC1* 항체에 대한 양성 시그날은 다능성 세포 상태를 나타내고, 비-클립된(clipped) MUC1에 대한 결합을 나타

내는 세포는 분화된 세포 상태를 나타내는 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 줄기 및 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포와 새로이 분화하는 세포의 혼합된 집단으로부터 세포를 분리함을 포함하고, 항-MUC1* 항체를 사용하여 세포에 결합시킴을 포함하며, 여기서, 항-MUC1* 항체에 대한 양성 시그날은 다능성 세포 상태를 나타내고, 비-클립된 MUC1에 대한 결합을 나타내는 세포는 분화된 세포 상태를 나타내는 것인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 세포를, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포 마커에 대한 항체와 접촉시킴을 추가로 포함하며, 여기서, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포 마커에 대한 양성 시그날은 다능성 줄기 세포 상태의 존재를 나타내는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 세포가 항-MUC1* 및 항-Tra 1-81, 항-Tra 1-60, SSEA3 또는 SSEA4 항체와 접촉되는 방법.

청구항 30

항-MUC1* 항체를 사용하여 세포에 결합시키는 암 줄기 세포의 검출 방법으로서, 여기서 항-MUC1* 항체에 대한 양성 시그날은 암 줄기 세포를 나타내는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 세포를 줄기 세포 마커에 대한 항체와 반응시킴을 포함하며, 여기서 줄기 세포 마커에 대한 양성 시그날은 암 줄기 세포의 존재를 나타내는 것인 방법.

청구항 32

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 세포에 결합하는 리간드를 통해 직접 또는 간접적으로 표면에 부착시키고, 세포를 PSMGFR의 서열을 갖는 펩타이드에 결합하는 제제를 함유하는 배지에 노출시킴을 포함하여, 표면에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포의 배양, 확장 또는 성장을 조절하고 이의 분화를 억제하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 제제가 MUC1*을 이량체화시켜 성장을 촉진하고 분화를 억제하는 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 제제가 MUC1*의 이량체화를 억제하여 분화를 촉진하는 방법.

청구항 35

상이한 세포 유형, 또는 세포 단계 또는 유형을 확인하는 특이적인 마커에 대해 친화성을 갖는 각종 리간드에 대한 표면 상에 공간적 어드레스(spatial address)를 생성시키고;

세포를 표면에 가함을 포함하며, 여기서 세포는, 세포가 결합하는 리간드에따라 공간적으로 분리되는, 세포 유형을 분리하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 표면이 입자인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 입자가 나노입자인 방법.

청구항 38

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포의 리간드인 부착된 리간드를 갖는 표면을 숙주 체(host body)내로 이식시키는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 숙주가 환자인 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 상기 리간드가 숙주의 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포에 대한 성장 인자인 방법.

청구항 41

표면 및 세포에 결합하는 리간드를 통해 부착된 세포를 갖는 표면을 숙주 체

내로 이식시키는 방법.

청구항 42

줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포의 리간드인 부착된

리간드를 갖는 표면을 숙주 체에 투여함을 포함하여, 생체내에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 증식시키는 방법.

청구항 43

친화성 상호작용을 통해 단백질 A 또는 단백질 G가 결합된 표면, 및 $MUC1^{*}$ 이량체화제를 포함하는 조성물로서, 여기서 단백질 A 또는 단백질 G는 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포 상에 특이적으로 발현된 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체에 결합하는 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 친화성 상호작용이 표면에 대한 NTA-Ni 상호작용을 통한 것인 방법.

청구항 45

제43항에 있어서, 폴리펩타이드가 MUC1 또는 $MUC1^{*}$, SSEA3, SSEA4, Tra 1-81 또는 Tra 1-60인 조성물.

청구항 46

제43항에 있어서, $MUC1^{*}$ 이량체화제가 야생형 NM23 또는 NM23-S120G 돌연변이체인 조성물.

청구항 47

단백질 A 또는 단백질 G 가 친화성 상호작용을 통해 결합된 표면을, 세포를함유하는 시료 및 $MUC1^{*}$ 이량체화제와 상호작용시킴을 포함하며, 여기서 단백질 A 또는 단백질 G는 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포 상에 특이적으로 발현된 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체에 결합되는, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포를 증식시키는 방법.

청구항 48

제14항에 있어서, 상기 배지가 최소 배지인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 본원은 2009년 6월 11일자로 출원된 미국 가특허원 제61/186,310호, 및 2010년 4월 13일자로 출원된 미국 가특허원 제61/323,779호에 대한 우선권의 이익을 청구하며, 이들의 내용은, 이의 전문이 여기에서 참고로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본원은 표면 및 세포에 결합하는 리간드를 통해 세포를 표면에 부착시킴을 포함하여, 표면에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 배양하거나, 확장시키거나 성장시키는 방법을 기술한다.

배 경 기 술

[0006] 줄기세포, 전구세포, 유도된 다능성 줄기세포 또는 다른 비-부착성 세포를 배양하거나 증식시키는 분야에 존재하는 문제점은, 이식 또는 하부(downstream) 분화를 포함하는, 이후 의도된 용도를 방해하지 않을 방법으로 세포를 배양하는 방법이다. 플라스틱 성장 플라스크에서 배양될 수 있는, 플라스틱에 부착하는 대부분의 세포와는 달리, 줄기세포는 비-부착성이므로, 전통적인 방법을 사용하여 성장시킬 수 없다. 그러나, 줄기세포는 섬유모세포의 층에서 성장할 것이다. 이러한 "공급자 세포(feeder cell)" 층은 부착을 위한 표면을 제공하고 줄기세포 성장 및 생존에 필요한 아직 특징화되지 않은 성장 인자의 혼합물을 사용하여 세포를 공급한다. 더욱 최근에, 연구자들은, 줄기세포를 마트리겔과 같은 세포외 매트릭스로부터 기원한 성분에 부착시킴으로써 줄기세포를 배양할 수 있었다. 줄기세포는 이러한 표면-유사 기체에 부착하지만 기본 섬유모세포 성장 인자(bFGF) 및 섬유모세포 공급자 세포로부터의 수집된 분비물 둘 다를 함유하는 성장 배지 속에서 배양시켜야 한다. 이들 방법 둘 다는 세포에 의해 분비된 특징화되지 않은 인자의 환경을 사용하므로, 이들 방법이 줄기세포 증식을 촉진하는 방법 또는 이유가 전적으로 명확하지 않다. 줄기세포는 마트리겔 표면 위에서 배양되는 경우 더 신속하게 분화하는 것으로 보고되어 왔다. 방법, 즉, 공급자 세포 또는 마트리겔과 공급자 세포로부터의 조건화된 배지에 따라 성장한 줄기세포는 자발적으로 분화한다. 분화하는 줄기세포는 이웃하는 세포가 또한 분화를 개시하도록 유도하는 인자들을 분비한다. 따라서, 대략 7일마다, 기술자들은 이들 줄기세포 콜로니 또는 분화하지 않은 것으로 보여지는 콜로니 일부 만을 수작업으로 절개(dissect)하여 수거하여야 한다. 이후에, 수거된 세포는 연속 성장을 위해 재-플레이팅(re-plating)된다. 당해 과정은, 분화되지 않은 세포가 의도된 목적을 위해 수거(harvesting)될 수 있기에 충분할 때까지 반복된다. 줄기세포를 배양하는 이러한 방법은 산업을 위한 당해 분야의 상태이다.

[0007] 줄기세포 또는 유도된 다능성 줄기세포의 성장의 사실상 어떠한 종류의 확장도 이들 세포의 수거를 통해 충분히 높일 수 있는 새로운 방법의 개발을 필요로 할 것이다.

[0008] 현재의 실시는 섬유모세포 공급자 세포 상에서 줄기세포를 성장시키는 것이며, 이로부터 유일한 수거 방법은 현미경하에서의 수작업 절개이고, "양호한" 세포의 분리에 이어 재-플레이팅하는 것이다. 당해 과정은 주관적이고 시간 소모적이므로 불리하다. 요구되는 것은, 세포가 기술자의 주관적인 기준보다는 분자적 인식을 기초로 선택되는 혼합된 혼주물(mixed pool)로부터 바람직한 세포를 수거하는 자동화가능한 방법 및 이를 정제하는 자동화가능한 방법이다.

[0009] 줄기세포를 배양하는 당해 분야의 방법들의 상태는, 이들이: 1) 노동-집약적이며; 2) 대규모 성장과 선천적으로 양립할 수 없고; 3) 조건화된 배지와 같은 특징화되지 않은 인자에 의존하며; 4) 줄기세포를 성장 플라스크에 부착시키기 위한 세포 또는 세포 생성물이 요구되며; 5) 사람 줄기세포를 비가역적으로 변화시킬 수 있는 비-사람 세포 및 세포 추출물을 흔히 사용하기 때문에 부적절하다. 줄기세포 성장이 가능하도록 하는 별개의 인자가 확인될 경우 유의적인 개선이 이루어질 수 있다. 만약 필수적이고 충분한 성장 인자만이 가해지는 경우, 자발적인 분화는 최소화될 수 있을 것으로 고려된다. 다른 유의적인 개선은, 세포가 현미경하에서 수동적인 절개의 현재 방법보다는 대규모 성장과 양립되는 방식으로 안전하게 수거될 수 있는 경우가 될 수 있다. 현재, 마트리겔 상에서 성장하는 줄기세포는 효소적 분해, 예를 들면, 트립신을 사용하여 수거할 수 있다. 전형적으로, 분화되지 않은 콜로니 또는 콜로니의 일부는 수동적으로 분해된 후 트립신 또는 콜라게나제와 같은 효소로 소화된다. 그러나, 트립신은 유의적인 세포 사멸을 유발하고 마트리겔 상에서 줄기세포의 일련의 계대배양은 비정상적인 핵형을 유발하는 것으로 보고되어 있다. 이는 트립신을 사용한 수거에 기인할 수 있거나 마트리겔이 세포

의 혼합물 및 마우스 육종 세포로부터의 분비물이라는 사실에 기인할 수 있다. 비-사람 공급자 세포는 수득되는 줄기세포를 변경시켜 이들이 전적으로 사람이 아니도록 하는 것으로 추측되어 왔다. 예를 들어, 글리코실화 패턴 및 다른 해독 후 변형은 공급자 세포 종의 특징을 취할 수 있는 것으로 예측된다.

[0010] 따라서, 줄기세포 성장을 뒷받침하는 세포-유리된 방법(cell-free method)이 개발된다면 당해 분야의 기술 상태를 극복하는 현저한 개선이 될 수 있다. 줄기세포가, 가능한 한 많이 합성 제제인, 완전히 특징화된, 별개의 제제를 사용하여 성장하고 수거될 수 있는 경우 훨씬 더 현저한 개선이 될 수 있다. 사람 치료요법에 적합한 세포를 생산하기 위해서는, 단독의 정의가능한 인자를 포함하는 세포를 배양하기 위한 방법이 개발되는 경우 당해 분야의 기술 상태를 극복하는 현저한 개선이 될 수 있다. 이상적으로, 상기 정의된 성분은 비-사람 성분을 함유하지 않아야 한다. 재조합체 단백질 또는 합성 성분이 바람직하다. 폴리클로날, 모노클로날, 사람화된, 키메라 또는 이의 유도체를 포함하는 항체는, 이들의 생산이 고도로 재생산가능하고, 이들이 견고하며 이들이 수거된 세포로부터, 예를 들면, 단백질 A 또는 단백질 G를 사용한 친화성 고갈(depletion)에 의해 용이하게 제거될 수 있으므로 특히 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 세포를 표면 및 세포에 결합하는 리간드(ligand)를 통해 표면에 부착시킴을 포함하여, 표면에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 배양하거나, 확장시키거나 또는 성장시키는 방법에 관한 것이다. 리간드는 중간기(intermediary)를 통해 직접 또는 간접적으로 표면에 결합할 수 있다. 중간기는 화학적 링커 또는 다른 단백질 또는 이의 조합물일 수 있다. 단백질은 단백질 A 또는 단백질 G일 수 있다. 특히, 링커는 광 또는 화학적으로 민감성일 수 있다. 그리고, 리간드 또는 중간기는 표면에 비-특이적으로 흡착되거나, 또는 친화성 태그-결합 파트너 상호작용을 통해 표면에 공유결합으로 커플링되거나 부착될 수 있다. 리간드는 또한 중합체에 연결될 수 있다. 특수 양태에서, 리간드는 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포 상에 발현되는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있다. 세포의 표면상의 폴리펩타이드는 MUC1 또는 MUC1*, SSEA3, SSEA4, Tra 1-81 또는 Tra 1-60일 수 있다. 리간드는 항체 또는 성장 인자일 수 있다. 바람직하게는, 항체는 PSMGFR 또는 C-10 PSMGFR에 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직하게는, 성장 인자는 야생형 NM23, 또는 NM23-S120G 돌연변이체, 또는 bFGF일 수 있다.

[0013] 다른 국면에서, 본 발명은 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 배양하는 방법에 관한 것이며, 여기서 상기 세포는 PSMGFR의 서열을 갖는 펩타이드에 결합하는 제제를 함유하는 배지에 노출된다. 이와 관련하여, 당해 제제는 항체일 수 있거나, 당해 제제는 야생형 NM23 또는 NM23-S120G 돌연변이체일 수 있다.

[0014] 또 다른 국면에서, 본 발명은 세포를 MUC1*-양성 암 세포로부터 분비된 제제를 함유하는 배지에 노출시킴을 포함하여, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. MUC1*-양성 세포는 T47D, ZR-75-30, 또는 ZR-75-1일 수 있다.

[0015] 또 다른 국면에서, 본 발명은 세포를 MUC1*-양성 암 세포로부터 조건화된 배지에 노출시킴을 포함하여, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. MUC1*-양성 세포는 특히 T47D, ZR-75-30, 또는 ZR-75-1일 수 있다.

[0016] 또 다른 국면에서, 사용될 표면은 바람직하게는 마트리겔이 아닐 수 있으며, 섬유모세포 공급자 세포의 존재하에서, 세포가 제거되는 경우 수동적 절개 공정이 아닐 수 있다.

[0017] 또 다른 국면에서, 본 발명은 리간드에 결합하는 경쟁하는 분자를 첨가함으로써 세포가 리간드 또는 표면에 대한 결합으로부터 방출되도록 함을 포함하여, 상기 방법에 따라 성장된 세포로부터 세포를 수거하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 또 다른 국면에서, 본 발명은 세포에 직접 또는 간접적으로 부착되는 표면에 결합된 링커를 분해함으로써 세포가 표면으로부터 방출되도록 함을 포함하여, 상기 나타낸 방법에 따라 성장된 세포로부터 세포를 수거하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 또 다른 국면에서, 본 발명은 항-MUC1* 항체를 사용하여 세포에 결합시킴을 포함하여, 세포의 분화 상태를 확인

하는 방법에 관한 것이며, 여기서, 항-MUC1* 항체에 대한 양성 시그날은 다능성 세포 상태를 나타내고, 비-클립된(clipped) MUC1에 대한 결합을 나타내는 세포는 분화된 세포 상태를 나타낸다. 당해 방법은 항-MUC1* 항체를 사용하여 세포에 결합시킴을 포함하여, 줄기 및 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포와 새로이 분화하는 세포의 혼합된 집단으로부터 세포를 분리함을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 항-MUC1* 항체에 대한 양성 시그날은 다능성 세포 상태를 나타내고, 비-클립된 MUC1에 대한 결합을 나타내는 세포는 분화된 세포 상태를 나타낸다. 특히, 당해 방법은 세포를 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포 마커와 접촉시킴을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포 마커에 대한 양성 시그날은 다능성 줄기세포 상태의 존재를 나타낸다. 특히, 세포는 항-MUC1* 및 항-Tra 1-81, 항-Tra 1-60, SSEA3 또는 SSEA4 항체와 접촉될 수 있다.

[0020] 또 다른 국면에서, 본 발명은 항-MUC1* 항체를 사용하여 세포에 결합시켜 암 줄기세포를 검출하는 방법에 관한 것이며, 여기서 항-MUC1* 항체에 대한 양성 시그날은 암 줄기세포를 나타낸다. 당해 방법은 세포를 줄기세포 마커에 대한 항체와 접촉시킴을 포함하며, 여기서 줄기세포 마커에 대한 양성 시그날은 암 줄기세포의 존재를 나타낸다.

[0021] 또 다른 국면에서, 본 발명은 세포를 세포에 결합하는 리간드를 통해 직접 또는 간접적으로 표면에 부착시키고, 세포를 PSMGFR의 서열을 갖는 펩타이드에 결합하는 제제를 함유하는 배지에 노출시킴을 포함하여, 표면에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포의 배양, 확장 또는 성장을 조절하고 이의 분화를 억제하는 방법에 관한 것이다. 당해 제제는 MUC1*을 이량체화시켜 성장을 촉진하고 분화를 억제할 수 있거나, 당해 제제는 MUC1*의 이량체화를 억제하여 분화를 촉진할 수 있다.

[0022] 또 다른 국면에서, 본 발명은 상이한 세포 유형 또는 세포 단계 또는 유형을 확인하는 특이적인 마커에 대해 친화성을 갖는 각종 리간드에 대한 표면에 공간적 어드레스(spatial address)를 생성시키고; 세포를 표면에 가함을 포함하여, 세포 유형을 분리하는 방법에 관한 것이며, 여기서, 세포는, 세포가 결합하는 리간드에 따라 공간적으로 분리된다. 표면은 입자 또는 나노입자일 수 있다.

[0023] 또 다른 국면에서, 본 발명은 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포의 리간드인 부착된 리간드를 갖는 표면을 숙주 체(host body)내로 이식시키는 방법에 관한 것이다. 숙주는 환자일 수 있다. 특히, 리간드는 숙주의 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포에 대한 성장 인자일 수 있다.

[0024] 또 다른 국면에서, 본 발명은 표면 및 세포에 결합하는 리간드를 통해 부착된 세포를 갖는 표면을 숙주 체내로 이식시키는 방법에 관한 것이다.

[0025] 또 다른 국면에서, 본 발명은 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포의 리간드인 부착된 리간드를 갖는 표면을 숙주 체에 투여함을 포함하여, 생체내에서 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 증식시키는 방법에 관한 것이다.

[0026] 또 다른 국면에서, 본 발명은 친화성 상호작용을 통해 단백질 A 또는 단백질 G가 결합된 표면, 및 MUC1* 이량체화제를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 여기서 단백질 A 또는 단백질 G는 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포 상에 특이적으로 발현된 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체에 결합된다. 친화성 상호작용은 표면에 대한 NTA-Ni 상호작용을 통할 수 있다. 폴리펩타이드는 MUC1 또는 MUC1*, SSEA3, SSEA4, Tra 1-81 또는 Tra 1-60일 수 있다. MUC1* 이량체화제는 야생형 NM23 또는 NM23-S120G 돌연변이체일 수 있다.

[0027] 또 다른 국면에서, 본 발명은 단백질 A 또는 단백질 G 가 친화성 상호작용을 통해 결합된 표면을, 세포를 함유하는 시료 및 MUC1* 이량체화제와 접촉시킴을 포함하여, 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포를 증식시키는 방법에 관한 것이며, 여기서, 단백질 A 또는 단백질 G는 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포 상에 특이적으로 발현된 폴리펩타이드에 대해 특이적인 항체에 결합된다.

과제의 해결 수단

[0029] **발명의 상세한 설명**

[0030] 본원에서, "하나"는 단수 및 다수의 대상을 모두 언급하기 위해 사용된다.

[0031] 본원에 사용된 바와 같은, "MUC1 성장 인자 수용체"(MGFR)는 성장 인자와 같은 활성화제 리간드 또는 분해 효소와 같은 변형시키는 효소와 상호작용하는 MUC1 수용체의 부위를 의미하는 기능적 정의이다. MUC1의 MGFR 영역은 세포 표면에 가장 근접한 세포외 부위이며 하기 정의된 바와 같이, PSMGFR 중 대부분 또는 모두에 의해 정의된다. MGFR은 예를 들면, 포스포릴화, 글리코실화 등과 같은 효소 변형을 행한 펩타이드 및 변형되지 않은 펩타이드 둘 다를 포함한다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같이, "MUC1 성장 인자 수용체의 주요 서열"(PSMGFR)은 일부 경우에 MGFR 중 대부분 또는 모두를 정의하는 펩타이드 서열, 및 당해 펩타이드 서열의 기능적 변이체 및 단편을 나타낸다. PSMGFR은 서열 번호 1, 및 20개 이하(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20)의 아미노산 치환의 임의의 정수 값 및/또는 이의 N-말단 및/또는 C-말단에서 20개 이하의 아미노산 첨가 또는 결실의 임의의 정수 값을 갖는 모든 기능적 변이체 및 이의 단편으로서 정의된다. 상기 내용에서 "기능적 변이체 또는 단편"은 서열번호 1의 펩타이드에 특이적으로 결합하거나, 기타의 경우 이와 특이적으로 상호작용하는 리간드에 특이적으로 결합하거나, 기타의 경우 이와 특이적으로 상호작용하는 능력을 가진 이러한 변이체 또는 단편을 나타내며, 상기 리간드는 자체와 동일한 다른 펩타이드 분자의 동일한 영역과 강하게 결합하지 않음으로써, 펩타이드 분자는 다른 동일한 펩타이드 분자와 응집(즉, 자가-응집)하는 능력을 가질 수 있다. 서열 번호 1의 PSMGFR 펩타이드의 기능성 변이체인 PSMGFR의 하나의 예는 서열 번호 2이며, 이는 -SRY-대신 -SPY-서열을 포함함으로써 서열 번호 1과는 상이하다.

[0033] 본원에 사용된 바와 같은, "MUC1*"은, N-말단이 트렁케이팅(truncating)됨으로써 세포외 도메인이 필수적으로 PSMGFR(서열 번호 1)으로 구성되는 MUC1 단백질을 나타낸다.

[0034] 본원에 사용된 바와 같은, 표면에 결합되어 있는 세포와 관련하여 사용된 "표면"은 고체 기체(substrate), 또는 다공성 기체 또는 다른 비-고체 기체일 수 있다.

[0035] 본원에 사용된 바와 같이, "최소 배지"는 세포로부터의 조건화된 배지, 또는 생 숙주(live host)로부터의 혈청과 같이, 일반적으로 정의되지 않은 제제의 혼합물의 존재없이, 세포 배양이 가능한 최소 영양물을 함유하는 특정 배지일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "최소 줄기세포 성장 배지"는 줄기세포 또는 줄기-유사 세포 배양이 가능한 최소 영양물을 함유하는 특정 배지일 수 있다. 이는 또한 최소 배지 또는 MM으로 언급된다. 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 사용된 최소 배지는 예시된 최소 배지에 한정되지 않으며 정의된 성분들을 포함하는 다수 유형의 용액을 포함할 수 있다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같은, "줄기-유사 (stem-like)" 세포는 줄기세포의 특성 중 일부를 갖는다. 예를 들어, 당해 세포는 자가-재생하는 일부 능력을 갖는다. 이 세포는 a) OCT4, SOX2, 및 NANOG, 또는 KLF4를 발현하거나, 발현하도록 유도되거나; b) 이 세포는 이의 표면에 높은 수준의 MUC1*을 발현한다. 줄기-유사 세포의 예는 전구세포, 다능성 줄기세포, 다능성을 유도하는 공정을 겪는 세포, 암 세포, 암 줄기세포, 조혈 줄기세포, iPS 및, 하이브리도마 세포를 생산하는 일부 항체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 본원에 사용된 바와 같이, "유도된 다능성 줄기세포" 또는 "iPS"는 특정 유전자의 "강제된" 발현을 유도함으로써 비-다능성 세포, 통상적으로 성체 체세포로부터 인공적으로 유도된 다능성 줄기세포의 유형을 나타낸다.

[0038] 본원에 사용된 바와 같이, "MUC1* 자극인자"는 MUC1*의 이량체화 또는 MUC1*을 형성하기 위한 MUC1의 분해와 같이, MUC1*의 활성을 활성화시킬 수 있는 특정 분자를 나타낸다.

[0040] **서열 목록 프리 텍스트**

[0041] a, g, c, t 외의 뉴클레오타이드 기호의 사용과 관련하여, 이들은 WIPO 표준 ST.25, 첨부 2, 표 1에 나타낸 조약을 따르며, 여기서, k는 t 또는 g를 나타내고; n은 a, c, t 또는 g를 나타내며; m은 a 또는 c를 나타내고; r은 a 또는 g를 나타내며; s는 c 또는 g를 나타내고; w는 a 또는 t를 나타내며; y는 c 또는 t를 나타낸다.

[0042] GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(서열 번호 1)는 아미노산 1110 내지 1155로부터의 MUC1의 막근접 세포외 영역(PSMGFR)을 기술한다. GTINVHDVETQFNQYKTEAASPYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(서열 번호 2)는 아미

노산 1110 내지 1155로부터 MUC1의 막 근접한 세포외 영역의 변이체(PSMGFR의 변이체)를 기술한다. QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA (서열 번호 3)는 N 말단에서 10개 아미노산(N-10 PSMGFR)이 결실된 PSMGFR 서열을 기술한다.

[0043] GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDV(서열 번호 4)는, C 말단에서 10개 아미노산(C-10 PSMGFR)이 결실된 PSMGFR 서열을 기술한다.

[0045] **표면 상의 줄기 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포**

[0046] 본 발명은 세포 표면 단백질에 대한 리간드를, 성장 배지를 유지할 수 있거나 성장 배지에 첨가될 수 있는 고체 지지체상에 부착시킴을 포함하는 줄기, 또는 줄기-유사 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포 및 전구세포를 배양하거나 확장시키는 방법을 기재한다.

[0047] 본 발명은 세포를 배양하기 위한 신규 방법 및 표면을 기재한다. 당해 방법은 부착하지 않는 세포를 성장시키고 유지하는데 특히 유용하다. 이들 방법은 줄기, 줄기-유사 및 전구세포를 배양하는데 특히 유용하다.

[0049] **표면**

[0050] 본 발명은 세포를 성장시키기 위한 신규 표면 및 방법을 기재한다. 이들 표면은 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포 및 일부 전구세포를 포함하는, 비 부착성 세포, 줄기세포 및 줄기-유사 세포를 배양하는데 특히 유용하다. 본원에 기재된 방법은 가치있는 세포를 유지하면서 세포 배양 배지를 교환하는 방법의 문제를 해결한다. 많은 기존의 세포 배양 방법은, 부착성 세포가 플라스크 표면에 부착하므로 부착성 세포에 대해 효과가 있다. 오래된 액체 배지는 제거하여 함유 용기의 표면에 부착된 세포를 파열시키지 않고 신규 배지로 교체할 수 있다. 본 발명의 일부 방법들은 또한, 이들이 가치있는 성장 인자의 보유를 허용하면서, 보다 빈번하게 교체될 필요가 있는 덜 비싼 인자들을 교체한다는 점에서 유용하다. 본 발명의 다른 방법은 세포 부착을 위한 더 큰 표면적을 제공함으로써 세포의 수율을 증가시키면서 비교적 작은 공간 및 작은 용적의 배양 배지를 사용한다. 당해 방법은 일반적으로 리간드를 표면에 직접 또는 간접적으로 부착시킴을 포함하며, 여기서, 리간드는 세포 표면의 분자에 결합할 수 있다.

[0051] 이들 방법에 사용하기에 적합한 표면은 막일 수 있거나 천연적으로 다공성일 수 있다. 본원에 기술된 표면은 중합체일 수 있거나 중합체, 사이클로덱스트린 또는 사이클로덱스트란으로 피복된 표면일 수 있다. 표면은 공간적으로 어드레스가능한(addressable) 표면일 수 있거나 비드, 입자 또는 나노입자의 표면일 수 있다. 비드, 입자 또는 나노입자는 용액 속에 유리되거나 중개 분자에 의해 연결될 수 있다. 예를 들어, 막은 중합체 물질을 포함할 수 있고 이에 세포와 표면 사이에 결합을 촉진하는 리간드를 함유하는 비드 또는 입자가 부착될 수 있다. 본 발명은 시험관내, 생체외 및 생체내 성장을 위한 이들 표면의 용도를 포함한다. 본 발명의 표면은 시험관내에서 세포를 배양하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 표면은 숙주 속에 이식될 수 있다. 표면은 치료요법으로 이식되는, 줄기세포와 같은 세포를 생성할 수 있다. 예를 들어, 부착된 성장하는 줄기세포가 있거나 없는 본 발명의 표면을 이식함으로써 표면이 접목(engraftment)의 효율을 증가시킬 수 있다. 다른 경우에, 이식된 표면은 숙주의 자체 세포 또는 줄기세포를 부위로 보충하거나 당해 위치에서 표적화된 세포의 성장을 촉진하기 위한 리간드를 함유한다. 예를 들어, 줄기세포를 부착시키고 이의 성장을 촉진하는 표면을 연골의 교체를 촉진하기 위해 관절내로 삽입시킬 수 있다. 본 발명의 표면은 성형되거나 스캐폴드(scaffold) 상에 피복됨으로써 세포가 궁극적으로 3차원 형태를 형성하도록 할 수 있다. 예를 들면, 물질은 궁극적으로 스캐폴드의 형태로 보다 성숙한 세포 또는 조직으로 발달하는 줄기 또는 줄기-유사 세포의 부착 및 성장을 가능하도록 하는 본원에 기술된 표면들 중의 하나로 나중에 피복된 귀의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 표면 및 조성물은 구조화되거나 구조화되지 않은 다공성 또는 고체 표면일 수 있는, 이식가능한 장치를 피복하는데 사용될 수 있는 것으로 또한 고려된다. 상기 장치는 조직 또는 세포의 보수 또는 재생을 목적으로하는 위치로 줄기 또는 전구세포를 전달하거나 보충할 수 있다. 예를 들어, 스텐트(stent)를 본 발명의 표면 또는 조성물 중 어느 것으로 피복하여 혈관을 보수하거나 재생할 수 있다. 본 발명의 표면으로 피복된 스텐트, 예를 들면, NM23-S120G 및 줄기 또는 전구세포가 부착된 스텐트를 숙주의 또는 사람 속에 이식하여 숙주의 자체 세포를 자극하는 성장 인자 또는 세포를 전달할 수 있었다. 당해 방법은 시험관내. 생체외 또는 생체내에서 수행할 수 있다.

[0053] **리간드**

[0054] 표면에 대한 세포의 결합을 촉진하거나 세포 증식을 자극하는 리간드를 표면에 직접 부착시키거나 예를 들면, 표면에 부착된 중합체에 간접적으로 부착시킬 수 있다. 예를 들면, 세포 표면 수용체를 인식하는 항체는 표면에 부착되거나 흡착된 사이클로덱스트린 또는 사이클로덱스트란과 같은 중합체에 공유결합으로 부착시킬 수 있다(참조: 실시예 6, 10 내지 12 및 도 7, 도 10). 세포 표면에서 분자에 대해 일부 친화성을 갖는 리간드를 이들 표면에 임의로 부착시켜 세포의 부착 및 성장을 촉진시킨다. 당해 리간드는 성장 인자 수용체와 같은 세포 표면에 특이적으로 결합할 수 있다. 리간드는 단백질, 펩타이드, 소 분자, 항체, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체, 이중특이적 항체, 일가 또는 이가 항체, Fab, 일본쇄 항체, 유전공학적으로 가공된 유도체 또는 항체의 가변 도메인이 다른 단백질내로 삽입됨으로써 이것이 이의 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 유도체와 같은 항체 유도체일 수 있다. 또한, 리간드는 세포 표면 분자에 대해 특이적인 친화성을 가질 필요가 없다. 예를 들어, 표면에 부착된 리간드는, 세포가 비-특이적인 상호작용을 통해 표면에 부착하도록 할 수 있다. 비-특이적인 상호작용은 천연적으로 화학적이거나 생물학적일 수 있다. 하이드록실과 같은 친수성 잔기 또는 메틸 그룹과 같은 소수성 헤드그룹(headgroup)으로 유도체화된 표면은 소수성 상호작용을 통해 비-특이적으로 세포를 보유할 수 있다. 하전된 화학적 또는 생물학적 실체를 지닌 표면은 이온성 상호작용을 통해 세포를 흡착할 수 있다. 세포는 또한 펩타이드, 폴리-라이신, 양성적으로 또는 음성적으로 하전된 표면, 콜라겐, 라미닌, 및 마트리겔 및 마트리겔-유사 물질을 포함하는 다른 세포외 매트릭스 성분을 포함하는 RGD 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 세포에 대해 일부 특이성을 갖는 실제를 지닌 표면에 의해 추가로 포획될 수 있다. 세포는 또한 화학적으로 변형된 표면의 다른 유형에 의해 포획될 수 있다. 예를 들면, NTA-Ni 및 다른 금속 킬레이트로 피복된 표면은 세포 및 줄기세포에 비-특이적으로 킬레이트화(chelating)한다(참조: 실시예 15 및 도 12).

[0055] 바람직한 양태에서, 세포 표면에서 분자에 대해 특이적인 친화성을 갖는 잔기를 표면에 부착시켜 줄기세포의 부착을 촉진시킨다. 예를 들면, SSEA3, SSEA4, 또는 Tra 1-81 또는 Tra 1-60과 같은 줄기세포의 특이적인 마커인 세포 표면 단백질에 결합하는 항체는 표면에 부착된다. 줄기세포들은 이러한 표면에 성장 플레이트 상의 이들의 세포 표면 단백질과 이들의 동족 항체 사이의 특이적인 상호작용을 통해 부착한다. 이후에, 세포는 표준 방법 또는 MUC1*을 자극하는 본 발명의 신규 방법에 의해 배양될 수 있다(참조: 실시예 1 내지 4, 8 내지 10, 12 및 도 1 내지 10). 다른 예에서, 표면에 부착되는 리간드는 성장 인자 또는 성장 인자의 일부이다. 다른 예에서, 표면에 부착된 리간드는 항체, 또는 성장 인자 수용체일 수 있는 세포 표면 분자를 인식하는 항체의 일부이다. 다른 예에서, 리간드 복합체는 표면에 부착되거나 고정화되며, 여기서, 복합체의 적어도 하나의 구성원은 세포 표면 분자에 대한 친화성을 가지거나 세포에 세포의 성장 또는 분화를 조절하는 제제를 제공한다. 예를 들어, 단백질 G는 히스티딘 태그 NTA-Ni 상호작용을 통해 표면상에 흡착되거나 이에 특이적으로 부착할 수 있고 줄기세포 표면 마커를 인식하는 항체는 단백질 G와의 이의 상호작용에 의해 표면에 부착된다(참조: 실시예 14, 도 11).

[0057] **혼합된 표면**

[0058] 일부 경우에, 리간드 및 성분들의 혼합물이 존재하는 표면을 갖는 것이 바람직하다. 이는 천연적으로 생물학적 또는 화학적이거나 생물학적 성분과 화학적 성분의 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 표면은 성장 인자의 혼합물, 또는 동등한 활성화 항체와 콜라겐 또는 라미닌과 같은 세포외 매트릭스의 성분의 혼합물로 피복될 수 있다. 라미닌 및 성장 인자 또는 항체의 혼합물로 피복된 표면은 또한 줄기세포 부착 및 성장을 촉진하였다. 예를 들어, 본 발명자들은, 콜라겐 또는 라미닌 및, 세포 표면 마커에 대해 특이적인 항체로 구성된 표면 피복물이 줄기 및 줄기-유사 세포의 성장에 유용함을 밝혀내었다.

[0059] 또 다른 예에서, 라미닌 또는 콜라겐은 세포 표면 마커의 리간드와 혼합된다. 실험들은, 라미닌과 항-MUC1*의 혼합이 줄기세포 부착 및 세포 성장 및 발달한 정상 줄기세포 콜로니에 필요한 항체의 양을 감소시켰음을 밝혀내었다. 본 발명의 다른 국면에서, 혼합된 종은 표면에 부착되며, 여기서, 하나 이상의 성분은 표면에 대한 세포의 부착을 촉진하는 리간드이며, 다른 것(들)은 세포의 기능에 영향을 미치는 제제를 세포에게 제공하는 성분이다. 표면에 부착될 수 있는 기능성 제제의 예는 성장, 분화를 촉진하거나 다능성을 유도하는 제제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0061] **리간드 부착 방법**

[0062] 세포 부착을 촉진하거나 성장 인자인 리간드는 예를 들면, EDC/NHS 또는 말레이미드 커플링 화학을 사용하는 공유결합 커플링을 포함하나, 이에 한정되지 않는 각종 방법으로 표면에 부착시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 리간드는 비-공유결합 상호작용 또는 친화성 상호작용을 통해 표면에 부착시킬 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 리간드는 히스티딘 태그된 후 니트릴로 트리-아세트산-니켈(NTA-Ni) 잔기를 통해 표면에 부착될 수 있다. 친화성 태그 상호작용을 사용하여 세포를 배양하기에 적합한 성장 표면을 생성시킬 수 있다. 예를 들면, NTA-Ni 잔기를 세포 배양 플라스크에 부착시키고 히스티딘 태그된 리간드를 NTA-Ni에 의해 포획시킨다. 리간드는 세포 표면 수용체에 직접 또는 간접적으로 결합하여 세포를 세포 표면에 정착시킨다. 리간드가 또한 성장 인자일 경우, 이는 세포 부착을 유발하고 증식을 촉진하도록 제공된다.(참조: 실시예 14, 도 11).

[0063] 하나의 양태에서, 리간드는 $MUC1^*$ 또는 FGFR(섬유모세포 성장 인자 수용체)와 같이 세포 표면 수용체를 인식하는 항체가 결합되는 단백질 G 또는 A이다. 단백질 G 또는 A는 표면에 비-특이적으로 흡착될 수 있거나, 친화성 태그-결합 파트너 상호작용을 통해 공유결합으로 커플링되거나 부착될 수 있다. 예를 들면, 세포 배양 플라스크를 NTA-Ni 잔기로 피복시킴으로써 히스티딘-태그된 단백질 G 또는 A는 표면에 의해 포획될 수 있다. 이후에, 세포 표면 수용체에 대한 항체를 가하며, 여기서, 이는 표면에 고정된 단백질 G 또는 A에 결합한다.

[0064] 다른 국면에서, 표면에 부착되는 리간드 및 제제는, 이들이 표면으로부터 방출되어 국소 환경을 변화시키는 방식으로 또는 세포가 제제를 소모할 수 있도록 표면에 부착될 수 있다. 제제는 표면에 부착됨으로써 이들은 분해되면서 표면으로부터 방출되거나 자극에 대한 반응시 방출될 수 있다. 예를 들어, 제제를 광-민감성 또는 화학적으로 민감성인 링커를 사용하여 표면에 부착시킴으로써 제제는 화학적 시그날을 통하거나 광에 대한 반응시 방출될 수 있다. 일부 링커는 pH에 있어서의 변화에 대한 반응시 분해된다. 다능성 또는 유전자를 유도하는 OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 또는 NM23과 같은 유전자 또는 유전자 생성물 또는, miR-145(마이크로 RNA)와 같이 분화를 유도하는 이들의 생성물을 배지에 가하거나 표지에 부착시킬 수 있다. 이들은 표면으로부터 시간에 걸쳐 분해에 의해 또는 광의 특이적인 파장과 같은 특이적인 시그날에 대한 반응시 방출되어 부착 결합을 분해할 수 있다.

[0065] 바람직한 양태에서, 표면에 부착되거나 이에 고정된 리간드는 세포 표면의 성장 인자 수용체를 인식하는 성장 인자이다. 세포 표면에서 성장 인자 수용체를 활성화시키는 항체는 앞서 기술된 방법들 중의 어느 것 또는 이의 조합을 사용하여 표면에 부착시킬 수 있다. 하나의 예에서, 성장 인자는 섬유모세포 성장 인자(FGF) 또는 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF)이고 리간드가 친화성을 갖는 세포 표면의 분자는 섬유모세포 성장 인자 수용체(FGFR)이다. 또한, 리간드는 FGFR을 인식하는 항체일 수 있다. 본 발명의 다른 국면에서, 성장 인자는 상피 성장 인자(EGF)이고 리간드가 친화성을 갖는 세포 표면의 분자는 상피 성장 인자 수용체(EGFR)이다. 다른 국면에서, 친화성 리간드는 줄기세포 인자(SCF) 또는 c-Kit/SCF-R을 활성화시키는 항체를 포함하는 다른 제제이다. 성장 표면에 부착된 리간드는 또한 Flt 3 리간드, 트롬보포에틴(TPO), IL-2, IL-3, IL-n 또는 이들의 동족 수용체상에 이들의 효과를 자극하는 항체일 수 있다.

[0067] **$MUC1^*$ 리간드**

[0068] 다른 바람직한 양태에서, 성장 표면에 부착된 리간드는 MUC1 세포 표면 단백질에 대한 친화성을 갖는다. 여전히 보다 바람직한 양태에서, 리간드는 단백질의 PSMGFR 부위($MUC1^*$)에 대해 친화성을 갖는다. 그리고, 여전히 보다 바람직한 양태에서, 리간드는 $MUC1^*$의 이량체화를 유도한다. 하나의 예에서, 리간드는 항-$MUC1^*$ 항체이다(실시예 1, 4, 7, 10, 및 도 1, 6A, B, D, 8). 다른 예에서, 리간드는 NM23또는 S120G와 같은 변이체, 또는 이량체 형성을 선호하거나 이량체로서 작용하는 특정의 다른 돌연변이체 또는 유도체이다(참조: 실시예 9, 12, 14, 15, 20 및 도 9, 10, 11, 12 및 19). 표면은, NM23이 이량체로서 세포에 대해 제공되도록 구성될 수 있다. 다른 예에서, 성장 표면에 부착된 리간드는 MUC1의 세포외 도메인에 결합하는 항체이다. 탄뎀(tandem) 반복 도메인이 분해되어 세포 표면으로부터 떨어진 후 세포 표면에 부착되어 남아있는 MUC1의 일부에 결합한 항체가 바람직하다. 예를 들어, MUC1의 PSMGFR 서열에 결합하는 이가 항체는 분해된 MUC1의 성장 인자 수용체 기능을 활성화시키고 세포 증식을 자극시킨다. PSMGFR 펩타이드의 적어도 일부를 사용한 면역화에 의해 생성된 폴리클로날 또는 모노크로날 항체는 표면에 부착하여 $MUC1^*$ 성장 인자 수용체의 활성화를 통해 표면에 대한 세포의 부착을 촉진하고 세포의 성장을 자극한다.

[0069] 폴리클로날 또는 모노클로날 항체 중의 하나 뿐만 아니라, 및 천연의 및 비-천연의 항체 유도체 둘다가 생성되거나 선택됨으로써 이들은 전체 PSMGFR 서열과 함께 생성되거나 이에 대한 친화성에 대해 선택된 항체보다 줄기세포 부착에 훨씬 더 적합할 수 있다. 폴리클로날 항체는 토끼를 MUC1* 세포외 도메인의 서열에 상응하지만 세포 표면에 근접한 10개 아미노산이 결실된 펩타이드로 면역화시켜 생성시켰고, "C-10 PSMGFR"는 완전한 PSMGFR 펩타이드 또는, 대부분의 먼(distal)쪽 10개 아미노산이 결실된 "N-10 PSMGFR"(QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA)(서열 번호 3)에 대해 생성된 항체보다 줄기세포 부착을 촉진하는데 있어 보다 효율적인 항체를 생성하였다(참조: 실시예 16 및 도 13, 14). 줄기세포에 결합하는 능력이 개선된 항체는 또한 C-10 PSMGFR 펩타이드 또는 다른 N-말단 단편이 존재하는 표면 위에서 이들을 친화성 정제함으로써 완전한 PSMGFR 펩타이드에 대해 상승된 폴리클로날로부터 분리할 수 있다.

[0070] C-10 PSMGFR 펩타이드에 결합하지만 N-10 PSMGFR 펩타이드에 결합하지 않는 모노클로날 항체를 분비한 하이브리도마 클론은 표면에 대한 줄기세포 부착을 촉진하는 것으로 밝혀졌다(참조: 도 13 A-C, 도 14). 대조적으로, N-10 PSMGFR 펩타이드에 결합하지만 C-10 PSMGFR 펩타이드에 결합하지 않는 모노클로날 항체는 줄기세포 부착이 거의 불가능하였다. 모노클로날 항체 유형 둘다는 배양 배지에 첨가되는 경우 세포 성장을 자극할 수 있었다.

[0071] 바람직한 양태에서, 줄기세포는 MUC1* 성장 인자 수용체의 리간드인 NM23을 제공하는 표면 위에서 배양된다. NM23은 표면에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 본 발명의 하나의 국면에서, 이량체화를 선호하는 NM23 또는 S120G 돌연변이체는 세포 성장을 위해 표면에 비-특이적으로 흡착된다(참조: 실시예 15, 도 12). 본 발명의 다른 국면에서, 표면은 우선 히스티딘-태그된 단백질 또는 펩타이드에 결합하는 NTA-Ni와 같은 친화성 태그 결합 파트너를 사용하여 유도체화시킨다. 이후에, 히스티딘-태그된 NM23을 NTA-Ni 표면에 비-공유결합으로 커플링시킨다. 줄기세포 및 일부 전구세포와 같은 MUC1*-양성 세포를 NM23 표면에 가하면, 세포는 표면에 부착하여 성장한다. 여전히 보다 바람직한 양태에서, NM23 S120G 돌연변이체는 사이클로덱스트란에 공유결합으로 커플링된다.

[0073] **수거 방법**

[0074] 본 발명의 다른 국면에서, 본 발명의 표면으로부터 세포를 수거하는 신규 방법이 기술되어 있다. 본 발명은 본 발명의 표면뿐만 아니라 많은 다른 세포 성장 시스템에서도 유용한 이들 수거 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 신규 표면을 사용하여 수동적 절개 및 효소적 분해와 같은 표준 수거 방법의 사용을 포함한다. 세포 수거 방법 중 일부는 표면 성분의 아이덴티티(identity)에 의존한다. 예를 들어, 항체 표면상의 흡착에 의해 성장하는 세포는 항체 에피토프와 동일한 서열을 갖는 과도한 펩타이드의 첨가에 의해 방출될 수 있다. 예를 들어, 항체가 MUC1*의 세포외 도메인을 인식하는 경우, 세포는 MUC1*의 세포외 도메인의 서열 중 일부 또는 모두를 갖는 펩타이드를 과량 첨가함으로써 방출시킬 수 있다. 유리된 펩타이드는 세포상에서 MUC1* 수용체와 표면 부착된 항체에 대한 결합에 대해 경쟁한다. 항체에 대한 펩타이드의 결합은 세포를 방출한다(참조: 실시예 4, 도 6D). 단백질 G 또는 A에 대한 결합에 의해 표면에 부착된 항체를 나타내는 표면상에서 배양된 세포는 과량의 Fc 부위 또는 과량의 비관련 항체를 첨가함에 의해 표면으로부터 방출된다. 단백질 G는 Fc 도메인에 결합하므로, 유리된 Fc는 동족 항체와 표면-부착된 단백질 G 또는 A에 대한 결합에 대해 경쟁하여 항체-복합체화된 세포를 방출한다. 친화성 태그-결합 파트너 상호작용에 의해 부착된 리간드와 함께 표면상에서 배양된 세포는 친화성 태그-결합 파트너 상호작용을 방해하는 제제를 첨가하거나 결합 파트너와 상호작용하는 친화성 태그의 일부 과량을 첨가함에 의해 방출된다. 예를 들어, NTA-Ni 표면에 결합한 히스티딘-태그된 리간드에서 성장하는 세포는 이미다졸, 관련되지 않은 히스티딘 펩타이드, 또는 표면 부착된 리간드의 결합 파트너의 적어로 일부의 과량을 첨가함에 의해 방출된다. NM23 표면의 경우에, 세포는 MUC1*의 세포외 도메인의 적어도 일부와 필수적으로 동일한 서열을 갖는 펩타이드 과량을 첨가하여 방출시킴으로써, 과량의 펩타이드의 첨가가 MUC1* 세포 표면 수용체와 표면 부착된 NM23에 결합함으로써 세포를 방출하는 것에 대해 경쟁할 수 있다. 또한, NM23을 표면에 대한 부착을 촉진하는 친화성 태그를 사용하여 제조한다. 친화성 태그와 표면 사이의 상호작용을 방해하는 방법은 표면으로부터 NM23 및 부착된 세포를 방출한다. 유사하게, His-태그된 단백질 G(및 항체) 또는 His-태그된 NM23은 표면으로부터 a) 이미다졸(0.5M에서) 또는 b) 과량의 $(His)_6$ 펩타이드를 첨가함으로써 방출시킬 수 있다.

[0075] 어떠한 친화성 태그, 결합 파트너 쌍도 리간드의 표면에 대한 부착을 위해 사용할 수 있으며 친화성 태그 결합 파트너 상호작용의 차단은 표면으로부터 줄기세포를 방출할 것이다. 적합한 친화성 태그, 결합 파트너 쌍의 예는 NTA-Ni/히스티딘 태그, 글루타티온/GST 융합체, 말토즈/말토즈 결합 단백질 및 바이오틴/스트렙타비딘을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0077] **성장 배지**

[0078] 본원에 기술된 표면 및 수거 방법은 표준 줄기세포 배양 방법뿐 아니라 신규 방법과도 양립성이다. 표준 줄기세포 배양 배지는, 줄기세포 성장이 지금까지 이들 세포에 의해 분비된 아직 확인되지 않은 성장 인자를 필요로 하고 있기 때문에 외인성 기본 섬유모세포 성장 인자(bFGF)의 첨가 및 섬유모세포 공급자 세포 위에서의 성장을 필요로 한다. 줄기세포는 또한 표준 프로토콜에 따라 마트리겔 위에서 성장할 수 있지만, 단, bFGF 외에, 섬유모세포 공급자 세포(CM)로부터의 조건화된 배지를 배지중 대략 30 내지 50%로 가하여야 한다. 불활성화된 사람 포피(HS27) 섬유모세포 공급자 세포가 배아 줄기세포의 성장을 위해 통상적으로 사용된다.

[0079] 본 발명자들은, 표준 성장 배지가 본 발명의 표면 위에서의 성장과 양립성임을 입증하였다(실시예 4, 도 6C 및 실시예 3, 도 4). 마트리겔 위에서의 성장과 유사하게, bFGF 매개된 성장은 섬유모세포 조건화된 배지를 또한 본원에 기술된 본 발명의 표면에서의 줄기세포 성장을 뒷받침하기 위해 요구한다. MUC1* 자극인자 또는 이량체화제를 함유하는 배양 배지가 바람직하다. PSMGFR 펩타이드; 또는 NM23, 야생형 또는 돌연변이체 S120G를 인식하는 항체들이 바람직한 성장 인자이며, bFGF 및 섬유모세포 조건화된 배지를 치환할 수 있다(참조: 도 6, 9, 10, 11 및 12). 마트리겔, 셀 스타트(Cell Start)(제조원: Invitrogen), 겔트렉스(Geltrex)(제조원: Invitrogen) 또는 본 발명의 표면 중 어느 것에 부착된 사람 배아 줄기세포의 성장은, 항-MUC1* 항체 또는 NM23-S120G가 bFGF 및 HS27 조건화된 배지 대신 최소 줄기세포 배지에 첨가되는 경우 일관되게 우수하며; 성장률, 콜로니 형태 및 분화의 억제는, MUC1* 자극인자가 bFGF와 조건화된 배지(CM)로 대체되는 경우 일관되게 우수하다.

[0080] 성장하는 MUC1*-양성 암 세포로부터 수집된 조건화된 배지는 줄기세포 성장 및 콜로니 형성을 증가시키는 한편 분화를 억제한다. 마트리겔에서 성장하는 사람 줄기세포, NTA-Ni, 항-MUC1* 항체 또는 NM23 표면은 최소 줄기세포 배지와, 성장하는 MUC1*-양성 암 세포로부터 수집된 조건화된 배지 속에서 배양하였다. MUC1*-양성 유방암 세포인 T47D 세포로부터의 조건화된 배지는, NM23-S120G, 또는 항-MUC1* 항체 또는 bFGF에 첨가되는 경우, HS27 섬유모세포 공급자 세포로부터의 조건화된 배지와 비교하여 줄기세포 성장, 콜로니 형성 및 분화의 억제를 현저히 개선시켰다(참조: 실시예 14, 15, 및 도 11, 12). 본원에 기술된 표면 및 수거 방법을 줄기세포 외의 세포에 사용할 수 있다.

[0082] **세포 분류를 위한 항-MUC1* 항체**

[0083] 정제: 다능성 줄기세포의 순수한 집단을 세포의 혼합된 집단으로부터 정제할 수 있다. 거대한 줄기세포 성장은 자발적으로 분화된 일부 줄기세포를 생성할 수 있다. 따라서, 바람직한 다능성 세포를 포획하고 분화된 것을 폐기하기 위한 고 처리량 방법이 필수적일 수 있다. MUC1*은, 세포가 분화를 개시하는 경우 OCT4전에 손실된 다능성에 대한 세포 표면 마커이다. 다능성((MUC1*-양성) 줄기세포의 순수한 집단은 이들을 항-MUC1* 항체로 유도체화시킨 컬럼상에 포획함으로써 혼합된 집단으로부터 분리할 수 있다. 역으로, MUC1* 친화성 컬럼을 사용하여 이식 전에 분화된 세포로부터 MUC1*-양성 세포를 제거함으로써 기형종 형성 위험을 감소시킬 것이다.

[0084] 많은 경우에, 이들의 분화 단계에 따라 줄기 및 전구세포를 분리하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명자들은, 다능성 줄기세포가 클립된 MUC1* 형태로 존재하며 완전한 길이의 MUC1 단백질이 아니며; 분화가 개시된 후, MUC1 분해가 중지되고 세포가 완전한 길이의 형태에 대해 주로 MUC1* 음성 및 양성임을 앞서 밝혔다. 완전한 길이의 MUC1의 탄뎀 반복 단위에 결합하는 많은 항체, 예를 들면, 시판되는 VU4H5 또는 HMPV 항체가 이용가능하

다. 성장 인자 수용체 형태, MUC1*에 대한 MUC1의 분해는 세포 표면으로부터 이들의 일부를 방출하므로, 탄뎀 반복물에 대한 항체는 MUC1*을 염색하지 않을 수 있다. 비록 PSMGFR 서열이 MUC1 및 이의 클립된 형태(MUC1*) 둘다에 존재한다고 해도, PSMGFR 서열에 대한 항체는, 에피토프가 차폐되므로 완전한 길이의 MUC1에 결합하지 않는다. 도 15A 내지 L은, 분화가 시작되기 전 및 후의 H9 사람 배아 줄기세포의 면역-세포화학(ICC) 염색의 사진을 나타낸다. 완전한 PSMGFR 펩타이드에 대해 상승된 토끼 폴리클로날 항체는 분화되지 않은 콜로니의 모든 세포를 실질적으로 염색하였다. 줄기세포에 대한 다능성의 금 표준 지시인자인 OCT4는 항-MUC1*(항-PSMGFR라고도 함) 항체 염색으로 정확히 공-국재화(co-localize)시켰다(도 15A, B). MUC1-완전한 길이의 먼 탄뎀 반복물에 결합하는 VU4H5 항체는 분화되지 않은 세포의 어느 것도 염색하지 않는다(도 15C). 그러나, 이들 동일한 세포를 14일 동안 bFGF를 제공하지 않음으로써 분화되도록 한 경우, 역 MUC1 패턴이 관측되었다. MUC1* 염색 또는 OCT4 염색은 관측되지 않았지만(도 15D, E), 모든 세포는 완전한 길이의 MUC1에 대해 양성으로 염색되었다(도 15F). 유사하게, 분화되지 않은 줄기세포는 NM23에 대해 양성으로 염색되었고, MUC1* 및 NM23에 대한 리간드는 MUC1*(도 15G 내지 I)와 및 OCT4(도 15J 내지 L)와 정확하게 공-국재화되었다. 분해 효소 MMP14, MMP16, 및 ADAM-17은 MUC1의 분해와 연관되어 있다. 이들은 또한 분화되지 않은 줄기세포상에서 MUC1*과 함께 공-국재화되었다(참조: Hikita et al, PLoS ONE, 2008).

[0085] 결과적으로, 항-MUC1* 항체를 임의로 NM23, MMP14, MMP16, ADAM-17 및 OCT4에 대한 항체를 포함하는 기타의 것들과 함께 사용하여 혼합된 혼주물로부터 다능성 줄기세포를 확인하고 분리할 수 있다. SSEA3/4 또는 Tra 1-81/1-60에 대한 항체를 또한 항-MUC1* 항체와 함께 사용하여 다능성 줄기세포를 확인할 수 있다. 분화되지 않은 줄기세포 및 분화된 줄기세포의 혼주물은 PSMGFR 펩타이드에 결합하는 항체 및, 클립되는 경우 방출되는 MUC1의 일부에 결합하는 항체로 염색시킬 수 있다. FACS(형광성 활성화된 세포 분류)와 같은 표준 세포 분리 방법을 이후에 사용하여 단백질의 완전한 길이의 형태를 제공하는 것들로부터 MUC1* 제공 세포를 분리할 수 있다. 일부 경우에, 다능성이 유지되는 것들로부터 분화된 줄기세포를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 경우에, 다능성이 유지된 줄기세포(MUC1*-양성)는 숙주 세포로 이식되는 경우 기형종 형성 위험이 증가할 수 있으므로, 당해 세포를 제거하는 것이 바람직할 수 있다. 항-MUC1* 항체, 즉, 항-PSMGFR 항체 및 NM23 항체의 조합물을 또한 사용하여 다능성 줄기세포를 확인하고 또한 MUC1* 자극에 의해 확장될 수 있는 전구세포를 확인할 수 있다.

[0087] **암 줄기세포 분류 고갈**

[0088] 암 세포는, 이들이 화학치료요법 약물에 대한 내성을 획득하는 경우, MUC1*의 발현을 증가시키지만, MUC1-완전한 길이를 증가시키지 않는다. 화학치료요법에 대해 내성인 이들 세포는 또한 암 줄기세포라고 부른다. 따라서, NM23, MMP14, MMP16, ADAM-17 및 OCT4에 대한 항체를 포함하는 다른 항체와 임의로 조합된 항-MUC1* 항체를 사용하여 암 줄기세포를 확인할 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항-MUC1* 항체 및 이들과 다른 항체의 조합물을 사용하여 환자, 예를 들면, 환자의 혈액으로부터 암 줄기세포를 고갈시킨다.

[0090] **FACS 및 사람 줄기세포의 성장**

[0091] 본 발명은 또한 항-MUC1* 항체; 또는 NM23 또는 NM23 S120G 또는, MUC1의 클립된 형태(MUC1*)을 발현하는 전구세포의 성장을 촉진하고 이의 분화를 억제하기 위해 이량체화를 선호하는 다른 돌연변이체의 사용을 기재한다. 비록 줄기세포가 분화를 개시하는 경우 MUC1 분해가 정지된다고 해도, 분해는 후기 단계에서 재개된다. 예를 들어, 조혈 줄기세포(HSC)는 클립된 형태, MUC1*을 발현하며 세포를 MUC1* 이량체화제에 노출시킴에 의해 증식하도록 할 수 있다. 조혈 줄기세포가 줄기세포로 고려되는 경우, 이들은 CD34-양성 및 CD38-음성이다. 이들이 분화의 다음 단계로 진행하는 경우, 이들은 CD34-양성 및 CD38-양성이 된다. 본 발명자들은 제대혈로부터 사람 HSC를 수득하여 이들은 최소 줄기세포 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 다양한 농도로 배양하였다. 세포를 11일

동안 5일-후-플레이트 상에 첨가된 신선한 항체와 함께 배양시켰다. 세포를 FACS로 분석하고 분류하였다. 도 16A 및 B, 실시예 18은, 조혈 줄기세포를 유지하는 세포, CD34+/CD38-,의 수가 증가하는 항-MUC1* 농도에 따라 증가하였음을 나타낸다. 역으로, 다음 전구 단계로 진행된 세포, CD34+/CD38+,의 수는 감소된 항-MUC1*의 농도에 따라 증가하였다. 이들 결과는, MUC1* 성장 인자 수용체의 자극이 HSC의 분화를 억제하였음을 나타낸다.

[0092] 조혈은 태아 및 신생아의 간에서 발생한다. 사람 태아 간 세포는 MUC1* 세포외 도메인의 PSMGFR 서열에 결합하는 항체 및 완전한 길이의 MUC1의 탄뎀 반복물 단위에 결합하는 시판되는 항체인 VU4H5를 사용하여 FACS 분류하였다. 도 17B의 FACS 스캔은, 태아 간 세포가 대부분 MUC1*-양성이고 완전한 길이-음성임을 나타낸다. MUC1*-양성 태아 간 세포를 분리하여 최소 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 이들을 성장시킴으로써 확장시켰다. 도 18의 그래프는, 태아 간 세포의 성장이 최적의 항-MUC1* 항체 농도에서 크게 증가됨을 나타낸다. 성장은, 항체가 과량으로 되고 2개의 수용체 각각에 결합하는 하나의 항체보다는 각각의 수용체에 부착된 하나의 항체가 존재하는 경우에 감소한다. 유사하게, 분화되지 않은 줄기세포는 FACS를 수행하거나 PSMGFR 영역 또는 완전한 길이의 MUC1 단백질의 먼 부위에 결합하는 항체와 같은 결합체를 사용하는 다른 분리 기술에 의해 분화된 것들로부터 분리시킬 수 있다.

[0093] 다른 유형의 세포는 MUC1의 클립된 형태로 존재할 수 있으며 MUC1 단백질의 PSMGFR 부위를 인식하는 항체가 세포에 결합하는지의 여부를 기초로 하여 세포 집단으로부터 분리하거나 고갈시킬 수 있다.

[0095] **포획, 성장, 방출, 조합된 분류**

[0096] 일부 경우에, 성장 기간 전, 동안 및 후에 다른 것들로부터 하나의 세포 유형을 분리하는 것이 바람직할 수 있다. 하나의 방법에서 표면의 각각의 공간 어드레스는 상이한 리간드로 존재하며, 이들 각각은 상이한 세포 유형 또는, 세포 단계 또는 유형을 확인하는 특이적인 마커에 대해 친화성을 갖는다. 세포를 표면에 가하고 친화성 상호작용에 의해 세포는 각각의 세포 유형의 표면에서 마커에 따라 공간적으로 분리되어진다. 분리된 세포는 별개의 위치에서 배양하기 위해 개별적으로 수거하거나 혼합물로서 배양한 후 위치에 의해 후에 수거할 수 있다. 하나의 방법에서, 부착의 상이한 양식을 사용하여 상이한 마커-특이적인 리간드를 부착시킨다. 예를 들면, 하나의 위치에서, 다능성 세포에 대한 마커인, MUC1*에 대한 리간드를 히스티딘-태그/NTA-Ni 상호작용에 의해 표면에 부착시키는 한편, 다른 위치에서, 외배엽 라인을 따라 분화하는 세포에 대한 마커에 대한 항체를 단백질 G에 의해 표면에 부착시킨다. 이러한 방법으로, 분화되지 않은 세포를 이미다졸의 첨가에 의해 방출시키며 외배엽 세포는 과량의 Fc의 첨가에 의해 방출시킨다. 다른 방법에서, 각각 상이한 친화성 리간드를 제공하는 2개 이상의 표면을 별개의 위치에 수용한다. 2개 이상의 표면을 유동 채널에 의해 연결시킬 수 있다. 하나의 양태에서, 세포들의 혼합물은 표면이 제공하는 리간드에 대한 동족 분자를 발현하는 세포를 포획하는 제1 표면에 도입시킨다. 상층액 또는 병류(flow through)를 이의 표면에 대한 결합을 촉진시키는 동족 세포 표면 분자를 제공하는 세포를 포획하는 제2 표면에 도입시킨다. 이후에, 상층액 또는 병류를 제3 표면에 도입시킴을 계속하여 바람직한 세포 유형을 공간적으로 어드레스 가능한 표면에 의해 포획시킨다. 당해 방법을 사용하여 유형에 의해 세포를 분리하거나 분리한 후 세포를 성장시킨다. 유동 채널 및 밸브를 사용함으로써 유동이 세포 분리 기간 동안 허용되지만 이후에 제한되도록 하여 특이적인 유형의 세포가 특수 세포 유형에 대해 최적인 상태하에 배양될 수 있도록 한다.

[0097] 본 발명의 방법은 성장 공정 동안 분화될 수 있는 세포의 분리에 적합하다. 특수 분화 상태 마커 또는 세포 유형에 대한 친화성 리간드를 각각 제시하는 혼합된 표면으로 이루어진 시스템을 역학적 시스템에 사용하여 분화 상태의 기능으로서 전구세포를 분류한다. 세포는 분화의 다른 상태에서 세포 또는 이의 전구세포에 의해 더이상 발현되지 않는, 초기 분화 상태의 마커인 이들의 세포 표면 단백질 중 하나의 상호작용에 의해 제1 표면에 초기에 부착한다. 따라서, 세포가 방출될 수 있으며, 여기서 이는 이의 새로운 분화 상태를 정의하는 세포 표면 마커에 대해 친화성을 갖는 리간드를 제공하는 새로운 위치로 이주할 수 있다. 이러한 분류는 지리학적으로, 예를 들면, 유동 채널내 위치, 상층액의 새로운 표면으로의 도입, 또는 세포가 하나의 위치(입자일 수 있다)로부터 방출되어 상이한 세포 마커에 대한 친화성 리간드가 고정되는 제2의 위치(이웃하는 입자일 수 있다)로의 이주로 발생할 수 있다. 하나의 양태에서, 상이한 친화성 리간드를 나타내는 비드 또는 입자는 함께 혼합되며, 세포는 이것이 이의 표면상에 동족 분자를 제공하는 비드/입자에 부착한다. 이 경우에, 비드

또는 입자는 또한 세포 부착 후 이들을 분류하도록 하는 특성을 소유한다. 예를 들면, CD34+/38- 조혈 줄기세포에 대해 친화성을 갖는 리간드(들)을 제공하는 자기 비드를 CD34+/CD38+ 전구세포에 대한 친화성을 지닌 리간드(들)을 제공하는 비-자기 비드와 혼합한다. 세포 배양 후, CD34+/38- 세포를 지닌 비드를 자기적으로 분리하여 수집하는 한편, 나머지 비드는 CD34+/38+ 세포의 집단을 포함한다. 이와는 달리, 공간 위치, 비드 또는 입자를 정제를 위해 다른 표면에 의해 포획될 수 있는 잔기들에 부착시킬 수 있다. 예로서, 친화성 리간드 및 정제 리간드를 제공하는 비드는 친화성 리간드와 동족 세포 표면 수용체 사이의 상호작용을 통해 바람직한 세포 유형 모두를 포획할 것이며; 정제 리간드는 정제 리간드와 제2 표면상의 잔기 사이의 결합을 통해 비드를 특이적인 공간 어드레스에 부착할 것이다. 본 발명은 이러한 방법을 사용하여 혼합된 혼주물로부터 세포를 분류함을 포함하며, 여기서, 세포는 다양한 분화 단계에 있다. 본 발명은 또한 세포 배양 상황에서 세포를 분류하기 위한 당해 방법의 사용을 포함하며, 여기서, 세포는 다능성이 되도록 유도되며 다능성을 유도하는 공정 동안 다양한 시점에서 특정의 줄기-유사 특성을 가진 세포를 선택하여 증폭시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0098] 대안적인 방법에서, 세포는 상이한 세포 유형에 특이적인 리간드를 제공하는 입자 상에 고정화시킴으로써 분리한다. 세포의 혼합물은 입자의 혼합물에 도입시킨다. 세포는 이의 세포 표면 분자에 대해 친화성을 갖는 리간드를 제공하는 입자위로 분리된다. 이후에, 입자-함유 세포를 배양 전에 분리하거나 모두 함께 배양한 후 성장 기간 후에 분리할 수 있다. 세포를 지닌 입자는 입자 자체의 특성 또는 입자에 부착된 리간드의 특성을 기초로 하는 각종 수단에 의해 분리한다. 예를 들어, 입자는 크기, 전하, 밀도, 광학 특성, 전자기 특성 등을 기초로 분리할 수 있다. 이들 특성은 입자 자체의 고유 특성일 수 있거나 부착된 리간드의 특성일 수 있다. 예를 들면, 입자 자체가 형광성이거나 입자에 부착된 리간드가 형광성일 수 있다. 입자는 자기, 하전된, 형광성 또는 전기적 특성을 포함하나, 이에 한정되지 않는 특성에 의해 용이하게 분리된다. 또한, 제2의 친화성 리간드를 지닌 리간드를 제공하는 입자를 사용할 수 있다. 이 경우에, 세포의 부착을 촉진하는 리간드를 지니는 것 외에, 입자는 또한 표면 또는 위치를 분리하기 위해 세포를 지닌 입자의 부착을 촉진시키는 잔기를 지닐 수 있다.

[0099] 본 발명의 다른 국면에서, 하나의 표면은 상이한 기능성을 갖는 2개 이상의 상이한 리간드를 제공한다. 일부 경우에, 2개 이상의 리간드는 특이적인 세포의 부착을 위한 단일의 리간드보다 더 선택적이다. 다른 경우에, 제1 리간드는 세포의 부착을 매개하는 한편, 제2 리간드는 다른 표면 또는 다른 위치일 수 있는 특이적인 위치에 대해 세포/표면 복합체를 표적화한다. 당해 방식으로, 특이적인 세포 유형을 포획하는 리간드를 지닌 입자 또는 물품인 표면은 제2 표면 또는 위치에 대한 부착을 통해 비-표적 세포로부터 정제제거할 수 있다. 다른 경우에, 성장 기간 전, 후 또는 동안에, 유형에 따라 세포를 분리하는 능력을 아직 가지고 있는 2개 이상의 상이한 세포 유형을 포획하는 것이 바람직할 수 있다. 이는 특이적인 세포 유형의 부착을 촉진하는 제1 리간드 및 표면을 특이적인 위치로 표적화하는 제2 리간드를 제공하는 입자 또는 표면을 사용하여 달성한다. 표적화 리간드는 상이한 위치에서 실체(entity)에 결합함으로써 입자를 표적화하는 화학적 또는 생물학적 잔기일 수 있다. 이와는 달리, 표적화 리간드는 다른 입자로부터 이를 분리할 수 있도록 하는 특정의 특성을 입자에 부여하는 실체일 수 있다. 예를 들어, 리간드는 형광성 잔기, 염료, 하전된 잔기, 또는 광학 특성 또는 전자기 특성을 지닌 잔기일 수 있다. 본 발명의 다른 국면에서, 표적화 리간드는 리간드 자체가 아니라 오히려 입자의 특이적인 특성이다.

[0100] 본 발명의 표면 및 신규한 성장 인자는 웨이브 백(wave bag), 롤러 병(roller bottle)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 각종의 양식 속에서 줄기세포, 전구세포 및 다른 $MUC1^{*}$-양성 세포의 성장, 현탁액 중 성장, 및 살아있는 숙주를 포함하는 특정 유형의 밀폐 용기(containment vessel)에서의 용도를 위해 사용하는 것으로 고려된다. 밀폐 용기는 용기에 대한 세포의 부착을 방지하기 위해 움직이며 유지될 수 있다. 표면-고정된 리간드와 세포 상의 이들의 동족 표적 사이의 상호작용은 세포의 손실없이 배지의 교환을 허용한다. 세포를 수거하거나 고갈시키는 것이 바람직한 경우, 입자일 수 있는 표면을 원심분리, 중력, 전자기장 또는 전기장에 의해 분리할 수 있다. 제제가 표면으로부터 세포를 방출시키기 위해 첨가될 수 있다. 과량의 친화성 리간드를 용액속에 자유롭게 첨가하여 이들이 세포 표면상에서 수용체에 대한 결합을 위해 경쟁함으로써 입자로부터 세포가 방출되도록 할 수 있다. 하나의 양태에서, 친화성 리간드가 항체인 경우, 입자로부터 항체를 방출하도록 제공되는 항체의 과량의 Fc 부위를 첨가하고 세포와 활성화 리간드를 용액 속에 유리시킨다. 다른 양태에서, 리간드는 NM23 또는 이의 돌연변이체이다.

[0101] 본 발명은 또한 핵산, siRNA, 마이크로 RNA 또는 단백질의 도입을 통해 줄기-유사물이 되도록 유도시킨 세포, 전구세포 또는 줄기세포의 분화를 유도하기 위해 사량체(tetramer) 및 육량체(hexamer)의 형성을 선호하는 돌연

변이체 또는 NM23 야생형을 사용함을 기재한다.

[0102] 본 발명은 또한 줄기세포 및 줄기-유사 세포의 분화를 유도하는 방법을 포함한다. MUC1*와 이의 이량체화 리간드의 상호작용을 차단하는 리간드는 분화를 유도한다. 예를 들면, NM23 및 MUC1* 세포외 도메인의 상호작용을 차단하기에 충분한 MUC1*의 세포외 도메인의 서열을 함유하는 펩타이드의 첨가는 분화를 유도한다. 유사하게, 항-MUC1* 항체의 저 농도의 Fab(일가)의 첨가는 수용체 이량체화를 방지하며, 이는 다능성을 촉진하고, 분화의 개시를 초래한다. MUC1* 세포외 도메인 펩타이드 또는, MUC1*에 결합하는 항체의 Fab를 배양 배지에 첨가하거나 표면에 부착시킬 수 있다. 줄기세포를 수거한 후 항-MUC1* Fab의 MUC1* 세포외 도메인 펩타이드와 같은 리간드를 제공하는 표면 위에 재플레이팅하여 분화를 유도할 수 있다. 마이크로 RNA 145(miR-145)는 MUC1을 억제하며 이렇게 함으로써 분화를 유도한다. miR-145를 배양물 중 줄기 및 전구세포에 첨가하여 분화를 촉진시킬 수 있다. 대조적으로, miR-145에 대해 특이적인 siRNA와 같은 miR-145의 억제제를 성장하는 줄기 및 줄기-유사 세포에 첨가하여 이들의 분화를 억제할 수 있다.

[0103] 리간드-중합체 성장 표면: 덱스트린 또는 사이클로덱스트란과 같은 중합체 또는 거대 분자에 대한 본 발명의 리간드의 부착은 표적화된 줄기 및 전구세포를 포획하여 성장시키는 이들의 능력을 크게 개선시킨다. 수득되는 표면은 용액 중 리간드를 자극한다. 단백질과 항체 둘다의 사이클로덱스트란에 대한 공유결합성 부착은, 리간드가 표면상에 직접 흡착된 경우와 비교하여, 세포의 부착력(adhesion)을 상당히 증가시키고, 요구된 리간드의 양을 크게 감소시켰다. 사이클로덱스트란에 커플링된 NM23 또는 항-MUC1*과 같은 리간드는 배지 속에서 추가의 성장 인자에 대한 요구없이 최소 배지 속에서 배아 줄기세포 성장을 지지하였다. 항체 및 항-MUC1* 및 NM23과 같은 동족 단백질을 또한 다른 중합체 및, 다공성 막 및 스캐폴드를 포함하는 다른 표면에 부착시킬 수 있다. 본 발명은 구조화된 표면 및 구조화되지 않은 표면 둘다를 포함한다. 예를 들어, 스텐트, 귀와 같은 인공 구조물을 줄기 및 전구세포의 부착을 촉진시키는 생물학적 및/또는 화학적 제제로 피복시킬 수 있다. 이들 리간드는 임의로 이들의 성장 및/또는 분화에 영향을 미치는 시그날 또는 영양물을 줄기 또는 전구세포에 제공할 수 있다.

[0104] 합성 항체 성장 표면: 본 발명은 또한 세포 성장 배지 및, 세포의 부착을 촉진하는 표면 피복물에 대한 성장 인자로서 합성 리간드의 사용을 고려한다. 예를 들어, 세포 표면 단백질에 결합하는 소 분자는 표준 스크리닝 방법을 사용하여 용이하게 확인한다. 본 발명자들은 MUC1* 세포외 도메인에 및 특히 PSMGFR 펩타이드에 결합하는 소 분자를 이미 기재하였다. 이후에, 이들 합성 분자는 MUC1*을 발현하는 줄기세포, iPS 세포 및 조혈 줄기세포와 같은 조기 전구세포와 같은, 비-부착성 세포의 흡착 및 성장을 위한 표면에 비-공유결합으로 또는 공유결합으로 부착시킬 수 있다. 합성 리간드가 이량체화를 통해 활성화된 성장 인자 수용체에 결합하는 경우, 소 분자의 활성화 이량체는 2개의 소 분자를 공유결합으로 연결함에 의해 제조하여 이량체를 제조할 수 있다. 바람직한 양태에서, 소 분자는 PSMGFR 펩타이드에 결합하고 소 분자들이 연결됨으로써 이들은 이량체가 되어 인공 성장 인자로서 기능한다. 본 발명의 다른 국면에서, 소 분자 단량체들은 표면에 부착함으로써 이들은 함께 이량체와 유사하게 거동(behave)하기에 충분하도록 근접해진다. 즉, 표면은 링커로서 작용함으로써, 소 분자는 수용체를 활성화시키는 정의된 기하학적 구조로 세포 표면 수용체에 대해 제공된다. 이들 소 분자 이량체는, 이들이 성장 배지에 첨가될 뿐만 아니라 표면에 흡착되거나 공유결합으로 부착될 수도 있는 것을 포함하는 천연 성장 인자와 동일한 방법으로 사용될 수 있다. 합성 표면은 a) 제조하기에 저렴하고; b) 장기간 저장에 대해 적합할 수 있며; c) 분해에 대해 면역성일 수 있다. 본 발명자들은 MUC1*의 세포외 도메인에 고 친화성으로 결합하는 소 분자를 이미 기술하였다. 항-MUC1* 항체를 모사하는 소 분자 이량체(이가)는 소 분자를 링커에 커플링시킴으로써 합성한다. 합성 항체는 플레이트 표면 상에 또는 중합체 피복을 통해 고정시킬 수 있다.

발명의 효과

도면의 간단한 설명

[0107] **도 1**은 표준 bFGF 및 섬유모세포 공급자 세포로부터의 조건화된 배지 속에서 배양하는 경우 더 적은 세포 수 및 더 많은 분화와 비교하여, 최소 배지에서 항-MUC1*속에서 배양하는 경우 마트리겔에 부착된 사람 배아 줄기세포(H9)가 필수적으로 100% 다능성(OCT4+)으로 성장함을 나타낸다. DAPI는 모든 세포의 핵을 염색한다. 점선은 콜로니의 분화되지 않은 부위의 경계를 표시한다. 항-MUC1*으로 처리된 웰(well)에서, 분화되지 않은 줄기세포는 웰의 한계까지 성장하였다.

도 2는, 항-MUC1* 및 최소 배지 단독 속에서 마트리겔 상에 사람 배아 줄기세포의 18회 계대배양 후, BG01v/hOG의 핵형이 변화하지 않았음을 나타낸다.

도 3A 내지 3D는, 항-MUC1* 및 최소 배지 단독 속에서 마트리겔 상에서 배양된 사람 배아 줄기세포가 3개의 생식 계열(germline)로 분화될 수 있었음을 나타낸다: A) OCT4-음성은, 세포가 분화됨을 나타내고; B) 알파-페토단백질에 대한 양성은 내배엽 생식 계열에 따른 분화를 나타내며; C) 네스틴(Nestin)에 대한 양성은, 외배엽 생식 계열 하부의 분화를 나타내고; D) 평활근 액틴에 대한 양성은 중배엽 생식 계열 하부의 분화를 나타낸다.

도 4는, 항-MUC1* 항체로 피복된 표면이 최소 줄기세포 배지 단독 또는 섬유모세포 공급자 세포로부터의 조건화된 배지와 bFGF 속에서 배양된 것에 상관없이 줄기세포 성장을 뒷받침함을 나타낸다. 상이한 표면에 피복된 비가역성 항체는 줄기세포 부착을 유발하지 않았으며 세포는 24시간내에 사멸하였다.

도 5A 및 5B는 항-MUC1* 및 최소 배지만을 함유하는 배양물 속에서 다수의 계대배양 후 마트리겔에 부착된 사람 줄기세포의 사진을 나타낸다. 좌측의 사진은 모든 세포의 핵을 염색한 DAPI를 나타내고 우측에 대한 패널은 OCT4 염색에 대한 1:1 연관성을 나타낸다. 이와 함께, 이들은, 세포 모두가 다능성을 나타내는 OCT4+를 유지함을 나타낸다.

도 6A1 내지 D2는 항-MUC1* 항체 표면에서 성장하는 hu ES H9 세포의 사진을 나타낸다: A) 3일째(A1) 및 7일째(A2)에 최소 배지 단독 속에서 배양됨; B) 3일째(B1) 및 7일째(B2)에 최소 배지와 80ng/ml 항-MUC1*; C) 3일째(C1) 및 7일째(C7)에 HS27 섬유모세포로부터 50% 조건화된 배지 및 4ng/ml bFGF에서; D1, D2) 웰(well) A 및 B로부터의 세포를 유리된 PSMGFR(MUC1* 세포외 도메인)을 첨가함으로써 수거하였으며, 이는 표면으로부터 세포를 방출하였고; 세포는 이들이 부착되어 증식하는 신선한 항-MUC1* 항체 표면에 재-플레이팅하였다.

도 7은, 항-MUC1*항체 또는, 베타-사이클로덱스트린에 커플링된 동일한 항체로 피복된 표면의 줄기세포 성장의 그래프이다. 이는, 항체가 덱스트린에 커플링된 경우 향상된 세포 부착 및 성장을 나타낸다.

도 8은, 최소 배지 및 80ng/ml의 항-MUC1* 항체 속에서 배양하는 경우 줄기세포 표면 마커 단백질 SSEA4 및 TrA 1-81에 결합하는 항체로 피복된 표면에 이들을 부착시킴으로써 hu ES 세포를 배양시킬 수 있음을 나타낸다.

도 9는, 마트리겔 상의 hu ES 세포가, 이것이 최소 배지 및 NM23 속에서 배양하는 경우 적어도 당해 분야의 기술 상태 정도로 잘 성장함을 나타낸다. 그래프는, 하기 세포가 표준 4ng/ml bFGF와 HS27 섬유모세포로부터의 조건화된 배지(대조군) 속에서 배양하는 경우 마트리겔 상에서 hu ES H9 세포의 성장 및, 나타낸 농도에서 줄기세포 배지와 NM23 속에서의 성장을 비교한다. 분화되지 않은 성장 퍼센트는 분화되지 않은 콜로니와 분화된 콜로니의 맹검 수로 계산한 후, 퍼센트로 계산하였다. 전체적으로 분화되지 않은 세포만이 분화되지 않은 것으로 기록되었다.

도 10은 사이클로덱스트란에 공유결합으로 커플링된 항-MUC1*로 피복되고 지시 농도에서 최소 배지와 NM23 속에서 분열될 준비가 될 때까지 배양시킨 항-MUC1*로 피복된 표면에서 성장하는 hu ES 세포를 나타낸다. 세포의 하나의 세트를 우선 4ng/ml bFGF 및 50% HS27 섬유모세포 조건화된 배지(CM) 속에서 처음 24시간 동안 배양하였다. 그래프는, bFGF 및 CM이, 적절한 양의 NM23를 가하는 경우 세포 성장 또는 분화 상태에 유리하지 않음을 나타낸다.

도 11A 내지 11G는, 줄기세포가, 첫번째로 히스티딘 태그된 리간드 NM23, RGD 펩타이드, 및 단백질 G에 이어서, 항-SSEA4 및 Tra 1-81가 결합된 NTA-Ni로 피복된 표면에 부착하여 배양됨을 나타낸다. Hu ES H9 세포 성장 및 콜로니 형성이 이어진다. 3일째에 계수된 분화되지 않은 콜로니 수 및 분화된 콜로니 수를 플롯팅(B-G)한다.

대표적인 줄기세포 콜로니의 사진은 도 11A에 플롯팅되어 있다.

도 12는, MUC1*-양성 암 세포(Ca CM)로부터의 조건화된 배지가 표준 섬유모세포 조건화된 배지(CM)보다 보다 훨씬 더 큰 정도까지 hu ES 세포의 성장을 촉진하고 이의 분화를 억제함을 나타낸다. 또한, NM23은 Ca CM에 첨가되는 경우 표준 bFGF보다 더 우수하게 작동한다.

도 13A 내지 13C는 상이한 모노클로날 항체를 각각 분비하는 하이브리도마 클론으로부터의 흡착된 상층액 상에서 성장하는 hu BG01v/hOG ES 세포의 사진을 나타낸다. 가장 우수하게 줄기세포 부착시키는 모노클로날 항체가 당해 방법으로 확인된다.

도 14는 ELISA 검정의 그래프를 나타내며, 여기서, 하이브리도마 상층액은 N- 또는 C-말단으로부터 10개의 아미노산이 손실된 PSMGFR 펩타이드의 결실 돌연변이에 결합하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 이들의 상층액으로 피복된 표면에 대한 줄기세포 부착을 가능하게 한 하이브리도마는 또한 C-10 PSMGFR 펩타이드(GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDV)에 대한 결합을 나타내었다. 본 발명자들은, MUC1* 세포외 도메인의 더 먼 부분에 결합한 항체가 표면에 대한 줄기세포 부착을 더 우수하게 가능하도록 할 수 있다고 결론지었다.

도 15A 내지 15L는 분화를 시작하기 전 및 후에 H9 사람 배아 줄기세포의 ICC 염색의 사진을 나타낸다. 항-MUC1*는 분화되지 않은 콜로니의 모든 세포를 염색하였으며 다능성의 금 표준 지시인자인 OCT4와 함께 공-국재화되었다(도 15A, 15B). MUC1-완전한 길이를 확인하는 VU4H5 항체는 분화되지 않은 세포들 중 어느 것도 염색하지 않았다(도 15C). 그러나, 세포가 분화되는 경우, 역 MUC1 패턴이 검출되었다. MUC1* 염색 또는 OCT4 염색은 관측되지 않았다(도 15D, 15E). 그러나, 모든 세포는 완전한 길이의 MUC1에 대해 양성으로 염색되었다(도 15F). 유사하게, 분화되지 않은 줄기세포는 NM23에 대해 양성으로 염색되었으며, MUC1* 및 NM23의 리간드는 MUC1* 및 OCT4와 함께 정확하게 공-국재화되었다(도 15G 내지 15L).

도 16A 및 16B는, 줄기세포 성장 배지에 첨가된 항-MUC1* 항체가 사람 조혈 줄기세포(HSC)의 성장을 증가시킴을 나타낸다(A). (B) FACS 분석은, 조혈 줄기세포로 잔류한 세포, CD34+/CD38-,의 수가 증가하는 항-MUC1* 농도에 따라 증가하였음을 나타낸다. 역으로, 다음 전구(progenitor) 단계로 진행된 세포, CD34+/CD38+,의 수는 감소된 항-MUC1*의 농도로서 증가하였다. 이들 결과는, MUC1* 성장 인자 수용체의 자극이 HSC의 분화를 억제하였음을 나타낸다.

도 17A 및 17B는 신경 줄기세포(A) 및 태아 간 세포(B)의 FACS 스캔을 나타낸다. 세포를 판매회사로부터 입수하여 형광성 표지된 항-MUC1* 항체 및 완전한 길이의 MUC1의 먼 부위를 인식하는 표지된 항체(HPMV) 둘다로 즉시 염색하였다. FACS 스캔은, MUC1가 조기 전구세포의 유형 둘다에서 MUC1*에 대부분 클립됨을 나타낸다. 후속적인 실험은, 항-MUC1*이 농도 의존적인 방식으로 세포의 유형 둘다의 성장을 자극하였음을 나타내었다.

도 18은, MUC1* 전구세포가 분리되어 MUC1* 수용체를 자극시킴에 의해 확장될 수 있음을 나타내는 항-MUC1* 농도의 함수로서 태아 간 세포의 성장의 플롯이다.

도 19는, hu ES H9 세포가 12-웰 플레이트 상에 피복된 항-MUC1* 또는 항-SSEA4 항체 상에 플레이팅된 후 8nM NM23 또는 4ng/ml bFGF와 50% HS27 섬유모세포 조건화된 배지 속에서 배양된 줄기세포 콜로니의 플롯이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 본 발명은 본원에 기술된 특정 양태에 의한 영역으로 한정되어서는 안된다. 실제로, 본원에 기술된 것들 외에 본 발명의 각종 변형이 앞서의 기술 및 첨부된 도면으로부터 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 특허청구범위의 영역내에 속하는 것으로 의도된다. 다음 실시예는 본 발명을 설명하기 위해서 제공되며 이로써 한정하지 않는다.

[0110] **실시예**

[0111] **실시예 1. 마트리겔에 부착되고 최소 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 배양된 다능성 줄기세포는 bFGF가 보충되고 섬유모세포 공급자 세포로부터의 조건화된 배지가 보충된 성장보다 더 신속하게 증식하며 덜 분화한다.**

[0112] H9 hESC(제조원: WiCell) 또는 BG01v/hOG(제조원: Invitrogen)을 6 웰 플레이트(제조원: BD Falcon) 속에서 37 ℃ 및 5% CO_2 에서 미토마이신-C 불활성화된 Hs27 사람 포피 섬유모세포(ATCC) 상에서 배양하였다. hESC 배양 배지는 DMEM/F12/GlutaMAX I과 20% 녹아웃(Knockout) 혈청 보충물, 1% 비-필수 아미노산 스톡, 0.1mM β-머캅토에탄올(제조원: 모두 Invitrogen) 및 4 ng/ml 사람 기본 섬유모세포 성장 인자(bFGF, 제조원: Peprotech)으로 이루어졌다. 세포는 수동적인 절개에 의해 매 5 내지 7일마다 1:3의 비율로 계대배양하였고 배지를 매 48시간마다 교환하였다. 일부 실험에서, hESC를 마트리겔(제조원: BD Biosciences) 상에서 30% Hs27-조건화된 배지와 4 ng/ml bFGF가 보충된 hESC 배양 배지를 사용하여 성장시켰다. 항-MUC1*가 첨가된 다른 실험에서는, 조건화된 배지와 bFGF를 제외시켰으며; 본 발명자들은 이를 "최소 배지"(MM으로 약칭함)라고 언급한다.

[0113] 도 1은 항-MUC1*으로 처리한 사람 줄기세포 콜로니의 OCT4 면역형광성을 나타낸다. H9 세포를 트립신-해리시키고 4 x 10^4 세포/웰에서 마트리겔로 예비-피복시킨 8-웰 챔버 슬라이드 속에 종균배양하였다. 배지를 교환하고 항체를 격일마다 5주 동안 2가 항-MUC1*에 대해 1㎍/ml의 최종 농도로 가하였다. 세포를 OCT4 특이적인 항체(제조원: Santa Cruz, 클론 H-134 및 C-10) 및 DAPI로 염색하였다.

[0114] 도 1은 5주 성장 후, 사람 배아 H9 줄기세포가 최소 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 배양되는 경우 100% 다능성으로 성장하였음을 나타낸다. 세포를 최소 배지와 bFGF 및, 거의 증식하지 않고 더욱 분화한, 공급자 세포로부터의 30% 조건화된 배지를 공급한 것을 제외하고는 동일하게 성장시켰다. 핵의 DAPI 염색과 다능성 세포를 확인하는 OCT4 염색을 비교한다. 점선은 분화되지 않은 부위의 경계부를 표시한다.

[0116] **실시예 2. 마트리겔 위에서 항-MUC1* 속에 배양된 다능성 줄기세포는 안정한 핵형을 유지하며 정상적으로 분화한다.**

[0117] BG01v/hOG hu ES 세포(제조원: Invitrogen)을 마트리겔 상에 플레이팅하고 최소 배지(참조: 실시예 1)와 토끼 폴리클로날 항-MUC1* 항체(SRY 2a)와, 80 ng/ml에서 18회 계대배양 동안 6개월의 과정에 걸쳐 배양하였다. 세포를 펠렛화(pelleting)하고, DNA를 추출하며 핵형에 대해 외부에 위탁하였다. 도 2는, 18회 계대배양의 말기에 핵형이 변화하지 않았음을 나타낸다. 당해 줄기세포주가 3염색체성 비정상성을 가짐에 주목하나; 핵형이 안정하였고 다른 성장 인자의 부재하에 항-MUC1* 중에서 배양함에 의해 변화하지 않았던 것은 적절하다.

[0118] 다수회 계대배양된 BG01v/hOG 세포의 당해 동일한 배치로부터, 분화되지 않은 줄기세포를 콜라게나제로 처리함으로써 수거한 후 최소 배지 속에 14일 동안 현탁시켰다. 당해 기간 동안에, 항-MUC1* 항체가 제거되어 분화를 촉진함에 주목한다. 이는, 세포가 엠브로이드체(embroid body)를 형성하도록 하며, 이는 7일 동안 젤라틴 상에 플레이팅한 후, 3개의 생식계열의 마커를 인식하는 항체로 염색한다: 도 3A) 세포는 OCT4-음성이며, 이는, 이것이 분화되었음을 나타내고; B) 내배엽에 대한 마커인 알파 페토단백질-양성이고; C) 외배엽에 대한 마커인 네스틴-양성이며; D) 중배엽 생식계열에 대한 마커인, 평활근 액틴에 대해 양성이다.

[0120] **실시예 3. 다능성 줄기세포 성장을 촉진하는 표면**

[0121] MUC1*의 세포외 도메인에 결합하여 이를 이량체화하는 리간드를 제공하는 표면은 다능성 줄기세포에, 플레이트 표면에 부착시키는 방법을 제공하며 또한 MUC1*의 성장 인자 수용체 기능을 활성화시킨다. 세포 배양 플라스크, 페트리 디쉬 또는 다중-웰 플레이트를 MUC1* 세포외 도메인: GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(서열 번호 1)의 서열을 갖는 펩타이드에 대해 상승된 토끼 폴리클로날 항체로 피복하였다. 상기 직접 제공된 서열에 결합하는 항체는 본원에서 항-MUC1* 항체 또는 항-PSMGFR 항체로 언급된다. 처리한 조직 배양물뿐만 아니라, 및 베어 플라스틱(bare plastic), 및 폴리스티렌 플레이트를 사용하였다.

[0122] 하나의 예에서, 항-MUC1* 항체(제조원: Zymed: 통상의 항체 공급업자)를 30, 100, 또는 300 ㎍/ml에서 96-웰 세포 배양물 처리된 플레이트(조직 배양 시험 플레이트 96F TPP #92096)에 가하고 밤새 4℃에서 흡착되도록 하였다. 분화되지 않은 BG01v/hOG(제조원: Invitrogen) 줄기세포를 최소 배지 속에 현탁시켰다. 최소 배지는 400 ml의 DME/F12/GlutaMAX I(제조원: Invitrogen # 10565-018); 100 ml의 녹아웃 혈청 보충물(KO-SR, 제조원: Invitrogen # 10828-028); 및 5 ml의 100x MEM 비-필수 아미노산 용액(제조원: Invitrogen # 11140-050); 및 0.9 ml(0.1mM)의 β-머캅토에탄올(55mM 스톡, 제조원: Invitrogen # 21985-023)이다. BG01v/hOG 줄기세포를 항-MUC1* 항체 피복된 표면 상에 10,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 24시간 동안 부착되도록 하였다. 이후에, 세포를 최소 배지 단독 속에서 5일 동안 매 48시간마다 배지를 교환하면서 배양하였다.

[0123] 비교를 위해, 대조군 웰 속의 세포를 4 ng/ml의 bFGF가 보충된 배지와 HS27 섬유모세포로부터의 30% 조건화된 배지 속에서 배양하였다. 도 4는, 칼세인-AM(제조원: Molecular Probes) 염색으로부터의 그래프를 나타내며, 여기서, 살아있는 세포로부터의 형광성은 세포가 성장한 표면상에서 항-MUC1* 항체 밀도의 함수로서 측정하였다. 표 4의 그래프는, 항-MUC1* 표면상에서 성장한 세포가 어떠한 다른 성장 인자의 부재하에서 증식함을 나타낸다. 성장은 공급자 세포로부터 분비된 특성화되지않은 인자 및 bFGF의 첨가에 의해 단지 적당히 향상된다. 음성 대조군으로서, 비관련성 항체를 표면상에 플레이팅하였다. 이들 표면상에 플레이팅된 줄기세포는 부착하지 않고 부유하거나 24-시간 부착 기간의 말기에 사멸하였다.

[0124] 평행하게, 수득되는 줄기세포를 DAPI(핵 염색) 및 항-OCT4로 이중 염색하였다. OCT4 양성 및 DAPI 염색의 1:1 상관성은, 수득되는 세포가 다능성이었음을 확인한다(참조: 도 5).

[0126] **실시예 4. 사람 다능성 줄기세포는 용액에 첨가된 MUC1* 자극인자의 존재 또는 부재하에 항-MUC1* 항체 표면에서 증식한다.**

[0127] 사람 배아 줄기세포주를 조직 배양 처리된 플레이트, 폴리스티렌 플레이트 또는 챔버 슬라이드 플레이트에 흡착된 항-MUC1* 항체상에서 성장하는 이의 능력에 대해 시험하였다. 항-MUC1*을 100 ㎍/ml에서 플레이트상에 흡착시키고 4℃에서 밤새 흡착되도록 하였다. 분화되지 않은 사람 H9 배아 줄기세포를 96-웰의 웰당 10,000개 세포 또는 40,000개 세포 또는 8-웰 플레이트의 웰당 25,000개 세포에서 플레이팅하였다. 모든 경우에, 분화되지 않은 줄기세포가 부착하여 항-MUC1* 표면에에 증식하였으며, 최소 배지만으로 또는 최소 줄기세포 성장 배지내로 첨가된 항-MUC1*과 함께 배양하였다. 이후에, 분화되지 않은 H9 줄기세포를 다음에서 배양하였다: A) 최소 배지; B) 최소 배지와 80 ng/ml에서의 항-MUC1* 항체; 또는 C) 최소 배지와 4 ng/ml에서의 bFGF 및 불활성화된 HS27 섬유모세포 공급자 세포로부터의 50% 조건화된 배지. 실험을 3회 수행하였다. 분화되지 않은 줄기세포는 항-MUC1* 표면에 부착하였다. 분화되지 않은 콜로니는, 항-MUC1* 항체를 또한 최소 배지에 첨가한 경우 더 빠르게 성장하였다. 그러나, 유사한 형태 및 품질의 분화되지 않은 줄기세포 콜로니는 최소 배지만으로 배양한 웰내에 1일 또는 2일 후에 발달하였다. 분화되지 않은 줄기세포 콜로니의 증식량 및 품질은, 세포가 최소 배지, 최소 배지와 항-MUC1* 또는 최소 배지와 bFGF 및 섬유모세포로부터의 조건화된 배지에서 배양되었는지를 비교할 수 있었다. 다능성 줄기세포가 생성되었고 5일 내지 7일 사이에 분열할 수 있었으며, 이는 표준 공급자 세포, bFGF 프로토콜에 따라 성장시킨 줄기세포의 경우 전형적이다. 도 6은 상이한 배지에서 배양한 경우 성장한 웰의 사진을 나타낸다. 6A) 최소 배지; 6B) 최소 배지와 80 ng/ml에서의 항-MUC1* 항체; 또는 6C) 최소 배지와 4 ng/ml에서의 bFGF 및 섬유모세포 공급자 세포로부터 50% 조건화된 배지. 1로 표시된 패널(예를 들면, A1, B1, C1)은 3일 성장 후 취한 사진이고; A2, B2, 및 B3은 7일째 취한 동일한 웰의 사진이다.

[0129] **실시예 5. 줄기세포를 수거하는 방법**

[0130] 상기 실시예 4에서 성장시킨 줄기세포를 7일째에 수거 및 분열을 위해 준비하였다. 세포는 항-MUC1* 표면에 고정되었으므로, 본 발명자들은, 이들이 플레이트 표면상에서 항-MUC1* 항체에 대한 결합에 대해 세포 표면 수용체와 경쟁할 수 있는 펩타이드를 첨가함에 의해 방출될 수 있다고 결론지었다. MUC1* 수용체의 세포외 도메인에

상응하고 또한 항-MUC1* 항체가 이에 대해 상승된 펩타이드인 서열 GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(서열 번호 1)을 갖는 펩타이드를 $MUC1^*_{ecd}$ 펩타이드 또는 PSMGFR 펩타이드로 언급한다. $MUC1*_{ecd}$ 펩타이드를 성장하는 줄기세포에 10μM의 농도로 첨가하고 30분 동안 항온처리하였다. 이때, 줄기세포가 표면으로부터 방출되었음이 관측되었다. 줄기세포를 상층액 속에서 수집하고, 세정하고 신선한 항-MUC1* 표면에 재-플레이팅하였으며, 여기서, 세포는 부착하여 증식을 지속하였다. 당해 과정을 또한 사람 배아 줄기(huES) 세포주 BG01v/hOG(제조원: Invitrogen)에 이어, huES H9를 사용하여 성공적으로 수행하였다. 도 6D는 항-MUC1* 항체 표면에서 성장하고, 단일 세포로부터 배양된 후 경쟁적 펩타이드 방출에 의해 수거되고, 새로운 항-MUC1* 표면에 재-플레이팅되어 여기서, 이들이 증식을 계속한 H9 줄기세포를 나타낸다.

[0132] **실시예 6. 베타-사이클로덱스트린에 커플링된 항-MUC1* 항체는 MUC1* 성장 인자와 세포 표면 수용체의 용액 상호작용을 자극한다.**

[0133] 항-MUC1* 항체를 카복시-β-사이클로덱스트린(Cβ-CD)에 표준 커플링 프로토콜[참조: Fraschini, C.; Vignon, M.R. Selective oxidation of primary alcohol groups of β-cyclodextrin mediated by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical(TEMPO). Carbohydrate Research 2000, 328(4):585-589]에 따라 공유결합으로 커플링시켰다. 96-웰 세포 배양물 처리된 플레이트(Tissue Culture Test Plate 96F TPP #92096)를 베타-사이클로덱스트린에 커플링된 항-MUC1*으로 0, 10, 30, 100, 300, 또는 1000μg/ml의 최종 항체 농도에서 피복하였으며; 각각의 웰에서 베타-사이클로덱스트린의 농도는 항체의 농도만을 변화시키면서 일정하게 유지시켰다. 대조군으로서, 항-MUC1* 항체를 플레이트상에 사이클로덱스트린의 부재하에 직접 흡착시켰다. BG01v/hOG 줄기세포의 단일 세포 현탁액을 제조하고, 세포를 최소 배지 중 10,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 줄기세포는 항체 표면 및 사이클로덱스트린 표면에 커플링된 항체 둘다에 부착하여 증식하였다. 다른 성장 인자를 첨가하지 않았다. 플레이팅 후 2일 째에, 생 세포를 칼세인-AM 시약으로 검정하였다. 도 7의 그래프는, 최소 배지에서 줄기세포 성장이 베타 사이클로덱스트린상에 제공된 항-MUC1* 항체에 의해 지지되며 요구되는 항체의 양은, 성장하는 세포에 대한 항체의 3-차원 제공의 이유로 인하여, 성장 플레이트 상에 흡착된 네이키드(naked) 항체의 양 미만임을 나타낸다.

[0135] **실시예 7. 특정 세포 표면 항원에 대한 항체는 항-MUC1* 항체를 최소 배지에 첨가하거나 통상의 수단으로 배양하는 경우 줄기세포가 표면에 부착하여 증식하도록 할 것이다.**

[0136] SSEA4, Tra 1-60, 및 Tra 1-81 항체는 최소 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 배양하는 경우 다능성 줄기세포 성장을 촉진한다. 96-웰 세포 배양물 처리된 플레이트(Tissue Culture Test Plate 96F TPP #92096)를 4℃에서 항-SSEA4(제조원: Santa Cruz), 항-Tra 1-60(제조원: Santa Cruz), 또는 항-Tra 1-81(제조원: Santa Cruz) 항체를 사용하여 멸균 PBS 중 0, 3, 10, 30, 및 100μg/ml의 최종 농도에서 3회 별도로 피복하였다. 다음 날, 세포를 PBS로 세정하였다. 마트리겔에서 성장시키고 최소 줄기세포 성장 배지와, 섬유모세포로부터의 30% 조건화된 배지와 4ng/ml bFGF 속에서 배양시킨 BG01v/hOG 사람 배아 줄기세포(제조원: Invitrogen)를 사용하여 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 세포를 각각의 웰에 최소 배지 속에서 10,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 다음 날, 배지를 웰로부터 제거하고, 최소 배지와 80ng/ml 항-MUC1* 항체로 교체하였다. 배지를 격일마다 교환하고 세포를 칼세인-AM 시약으로 검정하였다. 도 8은, 줄기세포가 세포 표면 단백질과 이의 동족 항체의 상호작용을 통해 표면에 부착한 후 최소 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 또는 어떠한 표준 줄기세포 성장 배지와 함께 배양할 수 있음을 나타낸다.

[0137] 유사하게, H9 분화되지 않은 줄기세포를 항-SSEA4 항체가 이미 흡착된(100 μg/ml) 96-웰 플레이트의 웰당 10,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 줄기세포를 최소 줄기세포 성장 배지와 80 ng/ml에서의 항-MUC1* 항체 속에서 8일 동안 배양하였다. 분화되지 않은 줄기세포 콜로니가 발달하여 증식하였다.

[0138] 동시 수행한 실험은, H9 사람 배아 줄기세포가 96-웰 및 12-웰 플레이트의 표면에 흡착된 항-SSEA4 및 항-Tra 1-81에 결합하였음을 나타내었다. 이후에, 세포를 4 ng/ml에서의 bFGF 및 HS27 섬유모세포 공급자 세포로부터의 50% 조건화된 배지, 또는 최소 배지와 80ng/ml에서의 항-MUC1* 항체, 또는 최소 배지와 8nM에서의 재조합체 NM23-S120G를 함유하는 표준 줄기세포 성장 배지속에서 배양하였다. 분화되지 않은 줄기세포 콜로니가 표준 방법에 의해 성장한 줄기세포 콜로니와 형태학적으로 동일한 모든 경우에 형성되었다. 비관련성 항체가 항-MUC1* 항체로 교체되거나, 세포가 최소 배지만으로 배양된 경우, 줄기세포는 약 1일 내에 사멸하였다.

[0140] **실시예 8. MUC1*$_{ecd}$ 펩타이드의 첨가는 분화를 유도한다.**

[0141] 공급자 세포, 마트리겔 또는 성장 표면에서 성장하는 분화되지 않은 사람 줄기세포를 MUC1*$_{ecd}$ 펩타이드의 첨가에 의해 신속하게 유도하여 분화시킬 수 있다. 펩타이드는 MUC1* 성장 인자 수용체에 대한 결합에 대해 천연의 리간드와 경쟁하며; 천연 리간드와 MUC1*의 상호작용은 다능성 세포 성장을 촉진한다. 이러한 상호작용의 차단은 다능성 줄기세포 성장을 억제하고 세포가 분화하도록 유도한다. 마트리겔에서 성장하는 H9 줄기세포는 MUC1*$_{ecd}$ 펩타이드로 처리한 후 약 3배 더 빠르게 분화하였다. MUC1* 세포외 도메인 펩타이드를 사용하여 MUC1*의 리간드로 피복시킨 표면으로부터 줄기세포를 수거할 수 있다. 증가된 분화율은 수거된 세포를 각각의 항-MUC1*와 함께 항온처리하여 펩타이드와 경쟁 분리시킨 후 세정하고 재-플레이팅함으로써 방지하였다.

[0143] **실시예 9. 최소 배지 중의 NM23은 사람 줄기세포의 배양을 위해 당해 분야의 bFGF와 HS27 섬유모세포 공급자 세포로부터의 조건화된 배지의 상태와 동등하다.**

[0144] 분화되지 않은 H9 사람 배아 줄기세포를 수동적 절개로 수거하였다. 가장자리가 대략 0.1cm인 콜로니 조각을 최소 배지와 혼합하고 제조업자의 지시에 따라서 줄기세포 품질 마트리겔로 피복시킨 24-웰 플레이트상에 균일하게 분포하였다. 6-웰 플레이트의 (3) 웰로부터의 분화되지 않은 콜로니 조각을 24-웰 플레이트로 이전시켰다. 최소 배지(MM) 속에서 4nM 또는 8nM 농도에서의 재조합체 NM23-S120G(이량체를 우선적으로 형성하는 돌연변이체)를, 현재 4 ng/ml bFGF(기본 섬유모세포 성장 인자)와 불활성화된 HS27 섬유모세포 공급자 세포로부터의 50% 조건화된 배지(CM)인 당해 분야의 상태와 비교하였다. 본 발명자들은 또한 처음 24시간 동안 새로이 플레이팅한 세포를 bFGF/CM으로 처리한 후 MM중 NM23에 대해 스위칭(switching)한 효과를 시험하였다. 배양 4일 후, 분화되지 않은 콜로니 대 분화된 콜로니의 수를 계수하였다. 결과는 도 9에 그래프화하였다. CONTROL로 표시한 막대는 4ng/ml bFGF 및 불활성화된 HS27 섬유모세포 공급자 세포로부터의 50% CM 속에서 마트리겔 위에서의 표준 배양 방법을 나타낸다. 그래프는, 1) NM23 + MM에서 성장하는 세포는 bFGF + CM보다 더 신속하게 성장하였으며; 2) NM23 + MM은 당해 분야의 기술 상태보다 덜 분화하였고; 3) 처음 24시간 동안 bFGF + CM의 첨가는 NM23 + MM에서 직접 배양하는 것보다 약간 악화되었으며; 4) 이러한 경향은, 최고 농도의 NM23(8nM)이 가장 우수하였음을 나타내는 것으로 여겨짐을 나타낸다.

[0145] 세포는 5일째에 분열하였으며 마트리겔 위에 재-플레이팅하였다. 다음 5일동안, 세포를 4, 8, 16, 32 또는 64nM에서 배양하였다. 결과는, 증가된 농도의 NM23-S120G가 보다 우수하게 작용하였음을 나타내었다. 16nM 및 32nM NM23-S120G는 bFGF + CM 대조군과 거의 동일한 수 및 품질의 분화되지 않은 콜로니를 생산하였다. 16nM에서, 각각의 웰은 4 내지 5개의 콜로니를 수득하였으며, 여기서, 단지 1개만이 분화하였고; 32nM 웰 각각은 총 3개의 콜로니를 수득하였으며 1개가 부분적으로 분화하였고; bFGF + CM 대조군은 1개의 웰 속에서 2개의 분화되지 않은 콜로니와 1개의 부분적으로 분화된 콜로니를 생산하였고, 다른 웰 속에서 1개의 분화되지 않은 콜로니, 2개의 완전히 분화된 콜로니를 생산하였다. NM23-S120G는 bFGF/CM보다 훨씬 더 많은 콜로니를 생산하였다.

[0147] **실시예 10. 사이클로덱스트란에 커플링된 항-MUC1*과 사이클로덱스트란에 커플링된 항-MUC1* 또는 bFGF - 항-MUC1* 항체는 전통적인 배지 또는 최소 배지와 MUC1* 자극인자에서 줄기세포 부착 및 성장을 촉진한다.**

[0148] 표준 방법에 의해 HS27 섬유모세포 상에 이어, 마트리겔 상에서 2회 계대배양 동안 성장시킨 사람 배아 H9 줄기

세포를 수동으로 절개하여 실시예 9에 기술된 바와 같이 수거하였다. 6-웰 플레이트의 2개 웰로부터의 분화되지 않은 콜로니 조각을 사이클로덱스트란에 공유결합으로 커플링된 항-MUC1* 항체로 피복시킨 24-웰 플레이트의 웰 상에 계대배양하였다. 이후에, 세포를 최소배지 중 최종농도 160 ng/ml인 항-MUC1* 항체 또는 4ng/ml bFGF와 50% HS27 조건화된 배지(CM) 속에서 배양하였다. 수 시간내에 부착된 세포는 가속된 성장 속도를 제외하고는, 공급자 세포 또는 마트리겔 위에서 성장에 대해 예측할 수 있는 바와 같이 성장하였다. 세포를 플레이팅 후 5과 6일 사이에 분열하도록 준비하였다. 분화되지 않은 콜로니 조각을 수동으로 수거하고 새로운 사이클로덱스트란-항-MUC1* 피복된 플레이트 상에 재-프레이팅하였으며, 여기서, 이들은 지속적으로 증식하여 분화되지 않은 콜로니를 형성하였다. 세포 수, 콜로니 형태 및 분화의 억제를 항-MUC1* 및 bFGF와 HS27 CM 속에서 배양한 웰들 사이에서 비교할 수 있었다.

[0150] **실시예 11. 사이클로덱스트란에 대해 리간드를 커플링하는 방법**

[0151] **덱스트란 카복실화:** 물질: 덱스트란 500(평균 중량은 500 kD이다, Aldrich 제품 번호 # 31392, 류코노스톡 아종(*Leuconostoc* spp.)으로부터 분리함, 제조원: Sigma-Aldrich, 미주리주 세인트 루이스 소재); 브로모아세트산 및 NaOH(제조원: Sigma-Aldrich); 제I형 H_2O(제조원: Ricca Chemical Company, 텍사스주 알링톤 소재); 20,000 MWCO 투석 튜브, 또는 슬라이드(제조원: Fisher Scientific, 메사츄세츠주 왈탐 소재).

[0152] 과정: NaOH의 2N 용액을 제I형 H_2O을 사용하여 제조하였다. 투명한, 건조된 20 mL 신틸레이션 바이알 내에 6 mL의 상기 용액을 가하였다. 여기에 834 mg의 브로모아세트산을 가하면, 용액은 용해 후 혼탁해졌다. 이후에, 1.00 g의 덱스트란 500을 바이알에 가하고 용액을 와동 및 광 초음파로 처리하여 5분내에 완전히 용해시켰다. 이후에, 용액을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 이후에, 용액을 흐르는 수돗물에 대해 8시간 동안 투석한 후 0.1N HCl에 대해 18시간 동안 투석한 다음, 증류수에 대해 12시간 동안 투석하였다. 이후에, 용액을 동결-건조시키고 -20℃에서 아르곤하에 저장하였다.

[0153] 덱스트란-단백질/항체 커플링: 물질: 내부 제조한, 카복실화된 덱스트란 500; 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)(제조원: Sigma-Aldrich); N-하이드록시석신이미드(NHS)(제조원: Sigma-Aldrich); 커플링될 단백질 또는 항체; 제I형 H_2O(제조원: Ricca Chemical Company); 에탄올아민(제조원: Sigma-Aldrich).

[0154] 과정: 제I형 H_2O 중 0.5 mg/mL 카복실화된 덱스트란 500의 용액을 제조하였다. 제I형 H_2O 중 100 mM EDC/100 mM NHS의 용액을 제조하였다 1.5 mL의 에펜도르프 튜브 속에, 1 mL 의 덱스트린 용액 분취량을 12 μL의 EDC/NHS 용액에 가하였다. 혼합물을 와동시키고, 실온에서 15분 동안 흔들어 카복실산 잔기를 활성화시켰다. 한편, 6.67 nmol의 단백질 또는 항체(적절한 완충액 속에 용해됨)를 별개의 튜브 내로 분취하였다. 15분 활성화한 후, 110 μL의 활성화된 덱스트란 용액을 커플링될 단백질 또는 항체를 함유하는 튜브내로 피펫팅하였다. 용액을 온화하게 와동시켜 혼합한 후, 실온에서 2시간 동안 튜브를 약하게 흔들었다. 5 μL의 에탄올아민을 튜브에 가하고 추가로 15분 동안 실온에서 흔들었다. 튜브의 내용물을 인산염 완충된 염수(pH 7.4)에 대해 4℃에서 적어도 18시간 동안 투석하였다. 용액은 새로이 사용할 수 있거나 동결건조시킬 수 있거나, -20℃에 저장시킨 후 사용 전에 재구성시킬 수 있다.

[0155] 본 발명자들이, 24개 표면에서 줄기세포의 성장을 시험함으로써 커플링될 단백질의 농도 및 카복실화의 최적량을 실험적으로 측정하였으며, 여기서 카복실화 및 단백질 농도는 전체적으로 변화하였음에 주목한다.

[0157] **실시예 12. 항-MUC1* 에 부착된 H9 줄기세포는 사이클로덱스트란에 커플링되었으며 최소 배지 중 NM23-S120G 또는 HS27 조건화된 배지 중 bFGF에서 배양하였다.**

[0158] 24 웰 플레이트를 실시에 11에 기술된 바와 같이 사이클로덱스트란에 커플링된 항-MUC1*로 피복하였다. H9 세포를 실시에 9에 기술된 바와 같이 이들 표면에 계대배양하고 1nM, 2nM, 4nM, 또는 8nM의 최종 농도에서 최소 배지 중 재조합체 NM23-S120G 속에서 배양하였다. 다른 조건에서, 세포를 4ng/ml bFGF 및 50% HS27 조건화된 배지(CM)로 24시간 처리한 후 최소 배지 속에서 Nm23-S120G로 변환시켰다. 실험을 2회 수행하였다. 4일 성장시킨 후, 분화되지 않은 콜로니의 수 대 분화된 콜로니의 수를 계수하고 콜로니의 총 수에 대해 분화되지 않은

콜로니의 퍼센트로 그래프화하였다. 100% 분화되지 않은 콜로니만을 분화되지 않은 것으로 계수하였다. 도 10은, bFGF와 CM가, NM23-S120G의 농도가 불충분한 경우에만 도움이 될 수 있음을 나타낸다. 또한, 결과들은, 최소 배지 중 NM23-S120G가 콜로니 형태, 수 및 분화의 억제 측면에서, bFGF와 섬유모세포 공급자 세포 조건화된 배지보다 그만큼 또는 우수하게 수행하였음을 나타내었다.

[0160] **실시예 13. NTA-Ni를 사용하여 배양 플라스크를 피복하는 과정**

[0161] 물질: 24-웰 카복실산-제공-표면 세포-배양 플레이트(제조원: BD Biosciences Purecoat: #356775); 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드(EDC); N-하이드록시석신이미드(NHS); N_{α},N_{α}-비스(카복시메틸)-L-라이신 수화물; 제I형 H_2O; 멸균 주사기(20 mL); 0.45 μm PVDF-막 주사기 여과기.

[0162] 과정: 유도체화될 플레이트 당 75 mL의 10 mM EDC/10 mM NHS 용액을 제조하였다. 멸균 주사기 및 주사기 여과기를 사용하여, EDC/NHS 용액을 각각의 웰내로 여과하고, 웰을 ~80% 충전하였다. 플레이트를 덮고 플레이트-진탕기 상에서 실온에서 15분 동안 온화하게 진탕시켰다. 플레이트를 진탕시키는 동안 플레이트당 ~40mL의 10 mM N_{α},N_{α}-비스(카복시메틸)-L-라이신 수화물을 제조하였다. 플레이트의 활성화 15분 후, 플레이트를 비우고 제I형 물로 3회 세정하였다. 새로운 멸균 주사기 및 주사기 여과기를 사용하여, N_{α},N_{α}-비스(카복시메틸)-L-라이신 수화물의 용액을 각각의 웰내로 여과하고, 웰을 약 1/2 충전시켰다. 플레이트를 덮고 실온에서 3시간 동안 온화하게 진탕시켰다. 3시간 후, 플레이트를 비우고 제I형 물로 5x 세정하였다. 나머지 활성화된 NHS-에스테르를 당해 시점에서 1% 에탄올아민의 멸균 용액을 첨가하고 실온에서 15분 동안 항온처리한 후, 10% 탄산나트륨의 멸균 용액을 가하고 실온에서 30분 동안 항온처리하여 퀀칭시켰다. 이는 또한 플레이트를 멸균된, 제I형 H_2O 속에서 적어도 48 내지 72시간 동안 4℃에서 저장함으로써 달성할 수 있다. 잔류하는 NHS 에스테르가 퀀칭되거나 카복실산으로 다시 가수분해되면, 웰은 멸균된, 제I형 H_2O로 충전시킨 후, 파라핀 속에 싸고(wrap), 덮고, 얇은 호일로 싸고, 4℃에서 저장하였다. 플레이트를 사용 직전에 멸균된 제I형 H_2O으로 다시 세정하여야 한다. 1% 황산니켈 용액을 플레이트에 가한 후 사용 전에 PBS로 세정하였다.

[0163] 에탄올아민 용액의 사용은 잔류하는 NHS 에스테르를 하이드록실 헤드 그룹을 제공하는 아미드로 전환시킬 것임에 주목한다. 이는 표면 화학을 변경시킬 것이다. 이것이 바람직하지 않은 경우, 카보네이트-용액 침지(soak) 또는 장기간 수성 침지의 사용은 모든 잔류하는 NHS 에스테르를 원래의 카복실산으로 다시 가수분해할 것이다.

[0165] **실시예 14. H9 줄기세포는 히스티딘 태그를 지닌 리간드로 피복된 NTA-Ni 플레이트에 부착하였다.**

[0166] 12-웰 플레이트를 실시예 13에 기술된 바와 같이 NTA-Ni로 유도체화하였다. 히스티딘 태그된 NM23-S120G, 서열 HHHHHHSSSSGSSSSGSSSSGGRGDSGRGDS(서열 번호 5)의 합성 펩타이드(제조원: RGD peptide), 및 재조합체, 히스티딘 태그된 단백질 G(제조원: Minerva)을 NTA-Ni 피복된 웰에 200nM의 최종 농도로 별도로 가하고 15분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 PBS 속에서 세정하였다. 단백질 G 웰에, 항-SSEA4 및 항-Tra 1-81을 200nM에서 가하고 15분 동안 항온처리한 후, PBS로 세척하였다. 2회 계대배양 동안 마트리겔 위에서 성장하는 H9 세포의 6-웰 플레이트의 3개 웰로부터 실시예 9에 기술된 바와 같이 수거한 콜로니 조각을 웰 상에 플레이팅하였다. 줄기세포를 최소 배지 중 8nM NM23-S120G, 4 ng/ml bFGF와 HS27 CM, 8nM NM23-S120G와 T47D MUC1*-양성 암 세포("Ca CM")로부터 수집한 50% 조건화된 배지, 또는 4ng/ml bFGF와 50% Ca CM 속에서 배양하였다. 24시간내에 플레이트에 부착한 세포 및 분화되지 않은 줄기세포 증식을 관찰하였다. 플레이팅한지 3일째에, 분화되지 않은 콜로니 및 분화된 콜로니를 계수하고 플롯팅하였다(참조: 도 11A). 대표적인 사진(40X)을 다음으로부터 취하였다: B) NM23-S120G 표면 및 8nM NM23-S120G와 50% Ca CM 속에서 배양됨; C) RGD 펩타이드 표면 및 8nM NM23-S120G와 50% Ca CM 속에서 배양됨; D) RGD 펩타이드 표면 및 4 ng/ml bFGF와 50% HS27 CM 속에서 배양됨; E) 단백질 G 표면, 항-SSEA4에 이어 8nM NM23-S120G와 50% Ca CM 속에서 배양됨; F) 단백질 G 표면, 항-Tra 1-81에 이어 8nM NM23-S120G와 50% Ca CM 속에서 배양됨; G) RGD 펩타이드 표면 및 4 ng/ml bFGF와 50% Ca CM 속에서 배양됨. 당해 실험의 가장 우수한 조건을 NTA-Ni 표면에 부착된 His-태그된 단백질 G으로부터 수득한데 이어, 항-SSEA4 또는 Tra 1-81에 친화성 부착된 후, MM 또는 CaCM 중 NM23-S120G 속에서 배양하였다.

[0167] 유사한 실험에서, 다른 MUC1*-양성 암 세포(ZR-75-1 및 ZR-75-30)로부터의 조건화된 배지를 사용하고 동일한 결

과를 생산하였다.

[0169] **실시예 15. MUC1*-양성 암 세포로부터 수집한 조건화된 배지는 줄기세포 성장을 촉진하며 섬유모세포로부터 조건화된 배지보다 분화를 더 우수하게 억제한다.**

[0170] 사람 배아 줄기세포(H9)를 6-웰 플레이트 속에서 마트리겔 상에 표준 방법에 따라 성장시킨 후 수동적 절개로 수거하였다. 6-웰 플레이트의 (3) 웰로부터의 콜로니 조각을 24-웰 NTA-Ni 피복된 플레이트의 웰 위에 분배시켰다. 본 발명자들은, 세포 표면상의 단백질 또는 배지내 단백질이 플레이트 표면에 부착된 금속 킬레이트에 부착할 수 있는지를 알고자 하였다. 플레이팅된 콜로니 조각에 첨가된 배지는 다음과 같았다: a) 4ng/ml bFGF와 HS27(섬유모세포) 조건화된 배지(CM); b) 4ng/ml bFGF와 T47D로부터의 조건화된 배지(MUC1* 양성 유방 암 세포주, 이들 세포로부터의 CM은 본원에서 "Ca CM"으로 언급되었다); c) 최소 배지("MM")중 4nM NM23; d) MM중 8nM NM23; e) Ca CM 중 4nM NM23; 또는 f) Ca CM 중 8nM NM23. 24시간 후, 심지어 bFGF/CM 또는 bFGF Ca CM 중 세포가 부착될 수 있는 명백한 이유가 없다고 하더라도, 최소 또는 CM 또는 Ca CM 속의 세포가 표면에 부착한 것이 관찰되었으며; 본 발명자들이 사용한 NM23이 NTA-Ni 플레이트에 의해 용이하게 포획될 수 있는 히스티딘-태그된 재조합체 단백질이었음을 상기시켰다. 암 세포 조건화된 배지, Ca CM에서 성장하는 세포는 다른 조건보다 더 잘 성장함을 관찰하였다. 매 48시간 마다 배지를 교환하면서, 배양물 속에서 6일 후, 플레이트를 줄기세포 콜로니 형태, 콜로니의 수 및 분화 정도에 대해 분석하였다. 4ng/ml bFGF와 암 세포 조건화된 배지 속에서 배양된 줄기세포는 보다 많은 콜로니를 형성하였으며 bFGF와 HS27의 대조군보다 훨씬 덜 분화(없음)하였다. NM23 만에서 배양시킨 세포는 성장하여 콜로니를 형성하였으나, NM23과 암 세포 조건화된 배지 속에서 배양시킨 세포는 다른 어떠한 조건보다 더 많은 콜로니를 형성하였고 콜로니는 약 80 내지 85%가 분화되지 않고 완전히 형성되었으며 분열될 준비를 하고 있었던 반면, 공급자 세포 또는 마트리겔 상에서 당해 방법의 상태는 동일한 단계에 도달하는데 9일이 소요되었음에도 불구하고, 평균 30 내지 40%가 분화되었다. 도 12는 9일째 NM23과 암세포 조건화된 배지(Ca CM)에서 콜로니 수의 그래프를 나타내고; 본 발명자들은 20개 콜로니를 그래프화하였으나 세포는 전체 웰을 완전히 덮어서 실제로 계수될 수 없었다. 9일 째에, 비록 NM23 자극된 웰 속에서, 세포가 보다 신속하게 증식하였지만, 대조군 bFGF와 HS27 섬유모세포 조건화된 배지(HS27CM)의 퍼센트와 거의 동일한 여전히 분화되지 않은 부위가 존재하였다.

[0172] **실시예 16. 세포 표면에 먼 펩타이드 영역에 결합하는 항체가 세포 부착에 바람직하다.**

[0173] 세포 표면과 먼 MUC1* 세포외 도메인의 부위에 결합하는 항체는 세포 표면에 근접한 영역에 결합하는 항체보다 줄기세포 부착을 촉진하는데 있어 보다 더 우수하다. MUC1*의 세포외 도메인은, 길이가 약 45개 아미노산이다. 45개 아미노산 펩타이드에 대해 상승되고 본원에서 및 앞서의 출원에서 서열 GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA (서열 번호 1)을 갖는 PSMGFR로서 언급된 폴리클로날 항체는 이들이 부착된 표면에 대한 줄기세포 부착을 촉진시켰다. 모노클로날 항체의 스크린은, 세포 표면에 근접한 MUC1* 세포외 도메인의 인식된 부위가 심지어 배지에 첨가된 경우 동일한 모노클로날이 줄기세포 성장을 자극하였다고 해도 표면에 대한 줄기세포 부착을 촉진하지 않았다. MUC1* 수용체의 먼 부위에 결합한 항체를 생산한 하이브리도마를 확인하기 위해, 본 발명자들은 하이브리도마 상층액을 96-웰 플레이트의 웰 상에 흡착시킨 후, 마트리겔 상에서 성장하는 BG01v/hOG 세포로부터 수거된 분화되지 않은 콜로니 조각을 플레이팅하였다. 3개의 클론으로부터의 상층액은 줄기세포 부착이 가능하도록 하였다. 최소 배지를 매 48시간마다 교환하였고 증식하는 분화되지 않은 줄기세포 콜로니는 플레이팅 후 9일째에 사진을 찍었다(참조: 도 13).

[0174] 실험에 이어서, ELISA 검정을 수행하여, 이들 하이브리도마에 의해 분비된 항체가 실제로 MUC1* 세포외 도메인의 먼 부위에 결합하는지를 측정하였다(참조: 도 14). 2개의 결실 펩타이드를 합성하였다: 1개는 10개의 N-말단 아미노산을 상실하였고, 서열 QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA (서열 번호 3)를 갖는 N-10 PSMGFR이며; 하나는 C-말단에 10개 아미노산을 상실한, 서열 GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDV (서열 번호 4)를 갖는 C-10 PSMGFR이다. 96-웰 플레이트의 웰에 대한 줄기세포 부착을 유발한 하이브리도마 상층액은, ELISA 검정에 의해 세포 표면에 근접한 10개 아미노산이 상실된 펩타이드에 결합하지만 먼 10개 아미노산을 상실한 펩타이드에 결합하지 않음을 나타내는 것들이다. 하이브리도마 상층액 상에 플레이팅한 줄기세포는 최소 배지만으로

수일 배양 후 분화되지 않는 완전히 형성된 콜로니로 성장하였다.

[0176] **실시예 17. MUC1* 항체를 사용하여 분화하는 것으로부터 다능성 줄기세포를 확인한다.**

[0177] MUC1* 리간드, NM23은 분화되지 않은 hESC 상에서 MUC1* 및 OCT4와 함께 공-국재화하지만 3개의 단백질 모두의 면역-반응성은 분화하기 시작한 콜로니 중 일부에서 상실된다. 분화되지 않은 H9 hESC 콜로니는 NM23, MUC1* 및 OCT4에 대해 양성으로 염색되었다. 새로이 분화하는 콜로니는 3개의 단백질 중 어느 것에 대한 항체와 반응하지 않았다. NM23과 OCT4 및 MUC1*의 공-발현이 분화하기 시작한 콜로니에서 가장 잘 관측된다. 점선은 콜로니의 분화하지 않은 부위와 분화한 부위 사이의 경계를 표시한다. 3중 염색 실험은 다음을 사용하여 수행하였다: 도 15 **G)** 항-NM23(녹색). **H)** 항-MUC1*(적색). **I). 항**-NM23(녹색), 항-MUC1*(적색) 및 DAPI(청색). 유사한 콜로니를 다음을 사용하여 염색하였다: **J)** 항-NM23(녹색). **K)** 항-OCT4(적색). **L).** 항-NM23(녹색), 항-OCT4(적색) 및 DAPI(청색). 스케일바 = 100㎛. 항-NM23은 업자(Santa Cruz), 클론 NM301 및 제조업자(BD Biosciences), Clone 56에서 구입하였다. 항-MUC1*은 제조업자(Zymed)에 의해 미네르바 PSMGFR 펩타이드로부터 통상적으로 생성하였다.

[0178] 다능성 줄기세포는 생 세포를 항-MUC1* 및 완전한 길이의 MUC1에 결합하는 VU4H5와 같은 항체로 표지한 후, FACS, 자기 세포 분리 또는 유사한 기술에 의해 분류함으로써 분화되지 않은 줄기세포 및 분화된 줄기세포의 혼합된 혼주물로부터 분리할 수 있다. MUC1*-양성은 다능성 줄기세포를 나타낸다. 생세포에 결합한 2가 항-MUC1*는 성장 인자로서 기능하기 때문에 후속적인 성장을 방해하지 않으므로, 세포 분리에 이상적이다.

[0180] **실시예 18. MUC1* 항체를 사용하여 이후 단계 전구세포-조혈 줄기세포로부터 MUC1* 조기 전구세포를 분리한다.**

[0181] 사람 제대혈(제조원: ALLCELLS)로부터 수득한 CD34-양성 조혈 줄기세포(HSC)를 수득하였다. 수득된 세포는 진정한 HSC로 보고된, CD34+/CD38-의 혼합물을 함유하였지만 CD34+/CD38+(다음 전구세포 단계)를 또한 함유하였다. 세포를 해동시키고, 펠렛화하며, StemSpan으로부터의 SFEM(혈청-유리된 확장 배지)(제조원: StemSpan) 속에서 세척하고 성장 인자가 첨가되지 않은 SFEM으로 재현탁시켰다. 대략 4000개 세포를 폴리-HEMA가 덮인 96-웰 플레이트의 웰에 플레이팅하여 부착을 방지하였다. PSMGFR 펩타이드로 면역화시켜 생성한, 토끼 폴리클로날 항-MUC1* 항체를 5개 웰 각각에 0, 80, 250, 및 2000ng/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 세포를 3일째에 사진을 찍었다(도 16A). 플레이팅 후 5일째에, 항체를 세포에 다시-첨가하였다.

[0182] 플레이팅 후 11일째에, 세포를 가시적으로 점검하며 대부분은, 이들이 플레이팅된 시기와 여전히 동일한 직경을 가졌으며, 이는, 이들이 여전히 다능성 줄기세포이며 다음 전구 단계로 진행되지 않았다는 것에 대한 지표이다. 동일한 웰로부터의 세포를 혼주하고, 항-CD34-FITC 및 항-CD38-PE-Cy5로 염색하였다. 세포를 분석하고 FACS(형광성 활성화된 세포 분류)로 분류하였다. 도 16b는, MUC1* 항체의 농도가 증가함에 따라, 실제 조혈 줄기세포(CD34+/CD38-)로 잔류하는 세포의 퍼센트도 증가하였다는 것을 나타낸다. 반대 상황도 또한 사실이었다. 다음 전구세포 단계(CD34+/CD38+)로 진행된 세포의 퍼센트는, MUC1* 항체의 농도가 최저일 때 가장 높았다. 대표적인 웰로부터의 통계는, MUC1* 항체를 사용한 자극이 자극되지 않은 세포보다 더 많은 CD34+/38- 세포(HSC) 및 더 적은 CD34+/38+(전구) 세포를 생성함을 나타낸다.

[0184] **실시예 19. 태아 간 세포의 FACS 분류 및 MUC1* 자극에 의한 후속적인 성장**

[0185] 완전한 길이의 MUC1(VU4H5, 제조원: Santa Cruz Biotechnology; 또는 HMPV, 제조원: BD Biosciences) 또는 항-MUC1*(PSMGFR 면역화로부터의 토끼 폴리클로날, 제조원: Minerva)을 인식한 항체를 사용한 FACS 분석을 다수의 상이한 전구세포 상에서 수행하여 어느 것이 MUC1*를 발현하였는지를 측정함으로써, 이들 세포를 분리하고 MUC1* 수용체를 자극시켜 확장시킬 수 있었다. 도 17A는, 신경 줄기세포(RenCell CX Millipore)가 MUC1*을 발현함을

나타낸다. 소수의 세포는 분해된 MUC1 및 분해되지 않은 MUC1 둘다를 발현한다. 이들의 성장은 항-MUC1* 또는, MUC1*을 이량체화시키는 NM23과 같은 다른 제제와 함께 배양시킴으로써 자극된다. 태아 간 세포(ALLCELLS)는 대부분 독점적으로 MUC1*을 발현하며, 이는 도 17B에 나타나 있다.

[0186] 태아 간 세포를 최소 배지와 항-MUC1* 항체 속에서 도 18에 나타낸 농도에서 배양하였다. 나타낸 성장 곡선은, 이들 MUC1* 전구세포의 성장이 MUC1* 성장 인자 수용체의 이량체화에 의해 자극됨을 나타낸다. 최적의 항체 농도에서, 하나의 항체는 2개의 MUC1* 수용체를 이량체화하며 항체가 과량으로 되면, 수용체당 1개의 항체가 존재하여 성장이 억제된다. 이들 결과는, 조혈 줄기세포뿐만 아니라 MUC1*을 발현하는 다른 전구세포도 MUC1* 수용체를 이량체화하는 제제를 첨가함에 의해 확장될 수 있음을 나타낸다.

[0188] **실시예 20. Hu ES 세포는 특정 세포 표면 마커 단백질에 대한 항체가 피복된 표면에 부착하며 표준 줄기세포 배지 또는 MUC1* 자극인자를 함유하는 배지 속에서 배양될 수 있다.**

[0189] 12-웰 플레이트를 0.5 ml의 항-MUC1* 또는 항-SSEA4 항체로 100 ㎍/ml의 농도에서 피복하였다. 플레이트를 밤새 4℃에서 배양한 후 멸균 PBS로 세정하였다. 마트리겔 상에서 성장하는 hu ES H9 세포로부터의 분화되지 않은 콜로니 조각을 수동으로 절개하고, 재현탁시킨 후, 표면위에 플레이팅하였다. 재조합체 NM23-S120G(제조원: Minerva)을 8nM의 최종 농도로 또는 4 ng/ml bFGF와 50% HS27 섬유모세포 조건화된 배지를 함유한 배지를 가하였다. 분화되지 않은 콜로니를 플레이팅한지 5일 후에 수동으로 수거하고, 분열시키고 동일하게 피복된 표면상에 재-플레이팅하였다. 도 19의 그래프는, 줄기세포가 최소 배지(MM) 중 NM23 또는 bFGF와 HS27 조건화된 배지 속에서 배양되는 경우 항체 표면상에서 성장함을 나타낸다. NM23 처리된 웰내 세포는 bFGF 처리된 웰에서보다 상당히 더 빠르게 성장하였음을 나타내었다.

[0191] **실시예 21. 줄기세포 성장을 촉진하고 분화를 억제하는 암 세포 조건화된 배지 속에서 제제의 확인**

[0192] *MUC1*-양성 암 세포로부터의 조건화된 배지는 사람 줄기세포의 성장을 촉진하는 한편 이들의 분화는 억제한다. 2가지 이유로 줄기세포의 성장에 영향을 미치는 암 조건화된 배지 속에서 별개의 제제를 확인하는 것이 바람직할 수 있다. 첫째로, 이들 제제는 합성적으로 또는 재조합적으로 제조하여 성장 배지 또는 표면 피복물에 대한 별개의 제제로서 가하여 줄기세포 및 특정의 조기 전구세포의 성장을 촉진한다. 둘째로, 이들 제제의 확인은 암을 치료하기 위해 이들을 억제하는 전략이 가능하도록 한다.

[0193] 암세포 조건화된 배지 Ca CM 속에서 단백질을 확인하기 위해, MUC1*-양성 암 세포로부터 Ca CM을 수집하고 이의 개별 성분을 예를 들면, 이온 교환, 크기 배제 등과 같은 컬럼 상에서 분리함으로써 분리하였다. 각종 분획을 별도로 또는 함께 분화하지 않은 줄기세포 성장을 자극하는 이들의 능력에 대해 시험할 수 있다. 이후에, 효과를 부여하는 분획(들)을 미세 서열 분석 또는 질량 분광분석법으로 분석하여 성분들의 아이덴티티를 측정할 수 있었다.

[0194] 보다 직접적인 시도는 처리되지 않은 MUC1*-양성 암 세포로부터의 Ca CM을 miR-145로 처리한 세포로부터 수집한 것과 비교하는 것이다. miR-145는, 줄기세포가 분화되지 않는 상태로부터 분화된 상태로 전환되는 경우 발현이 상향조절되는 조절 마이크로 RNA이다. 당해 전환 동안, MUC1 분해는 중지하며 MUC1 발현은 하향 조절됨을 상기한다. 최근에 miR-145는 MUC1을 사일런싱시킴이 밝혀졌다. 암세포를 miR-145로 처리하면 암 세포 성장 및 분화되지 않은 줄기세포의 성장 둘다의 줄기-유사 성장 특성보다도 분화의 조절된 성장 특성으로의 이동(shift)을 유발할 것이다. 나이브(naive) 암 세포에 의해 분비된 인자 및 miR-145로 처리한 암 세포에 의해 분비된 인자의 비교는 줄기세포 및 암 세포 성장을 촉진하는데 관여하는 제제를 확인할 수 있었다. 이들은 처리되지 않은 Ca CM 속에 존재할 수 있으며, 처리된 Ca CM에서 부재한다. 확인은 동일한 종류의 단백질 분리에 이어 서열 분석 또는 질량 분광분석법 분석에 의해 달성할 수 있다. 성분들을 겔 위에서 분리할 수 있으며, 처리되지 않은 Ca CM에 대해 유니크(unique)한 단백질 밴드를 겔로부터 절개한 후 미세 서열분석 또는 질량 분광분석법으로 분석할 수 있다.

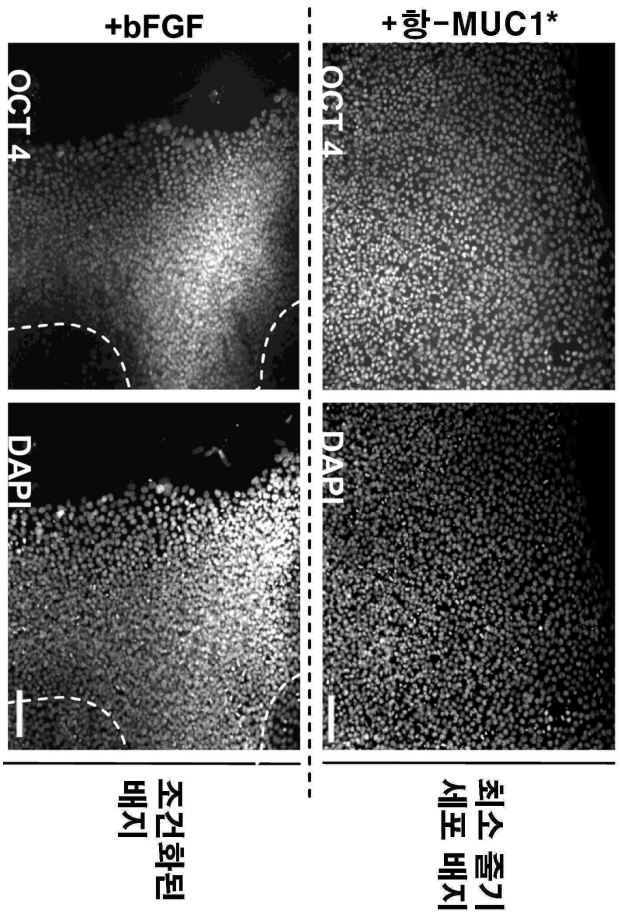
[0195] 동시에, 분화되지 않은 줄기세포로부터의 조건화된 배지를 MUC1* 세포외 도메인 펩타이드와 같은, 분화를 개시하는 제제로 처리한 줄기세포로부터 수집한 조건화된 배지와 비교할 수 있다. 이 경우에, 처리되지 않은 줄기세포에 의해 유니크하게 또는 우선적으로 분비된 성분들은 줄기세포 성장을 촉진하거나 다능성을 유도하기 위한 제제로서 바람직한 것들일 수 있다. 이들 제제를 억제하는 분자는 암 치료요법으로 사용될 수 있다. 대조적으로, 분화하는 줄기세포에 의해 유니크하게 또는 우선적으로 분비된 성분들은 암을 치료하기 위한 제제로서 바람직할 수 있다. 유사하게, 이들 제제를 억제하는 분자를 사용하여 줄기세포의 성장을 촉진하거나 다능성을 유도할 수 있다.

[0196] 줄기-유사 성장, 즉, 줄기 또는 암 세포 성장을 촉진하거나 억제하는 미세 RNA와 같은, 조절 핵산은 세포로부터의 분비를 분석하는 것 외에 상기 기술한 바와 같이 확인할 수 있으며, 핵산을 추출하여 분석할 수 있다. 예를 들면, 딥 서열분석(Deep Sequencing) 및 총 전사체 분석으로 공지된 기술을 수행하여 줄기-유사 성장이 억제된 경우 상향- 또는 하향-조절되는 조절 RNA를 확인할 수 있다. miR-145와 같이 줄기세포가 분화하는 경우 상향조절되는 조절 RNA를 항-암 치료로서 사용할 수 있었다. 유사하게, 이들 미세 RNA를 억제하는 siRNA를 포함하는 분자를 사용하여 다능성을 촉진하거나 유도할 수 있다. 분화되지 않은 줄기세포 성장 및 암 세포 성장에서 상향조절되는 조절 핵산은 암의 치료시에 또는 줄기세포의 분화의 동시 개시에 사일런싱 또는 억제를 위해 표적화될 수 있다.

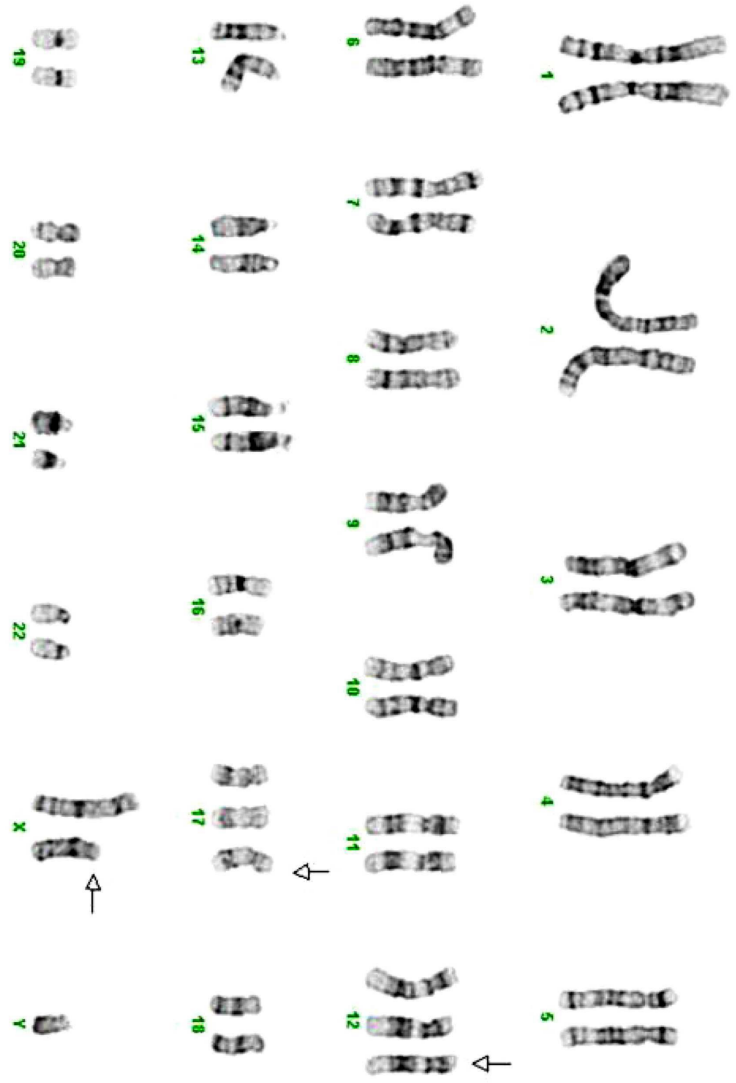
[0198] 당해 분야의 숙련가들은 단지 정규의 실험을 사용하여 본원에 상세히 기술된 본 발명의 구체적 양태들에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 본원의 특허청구범위의 영역내에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

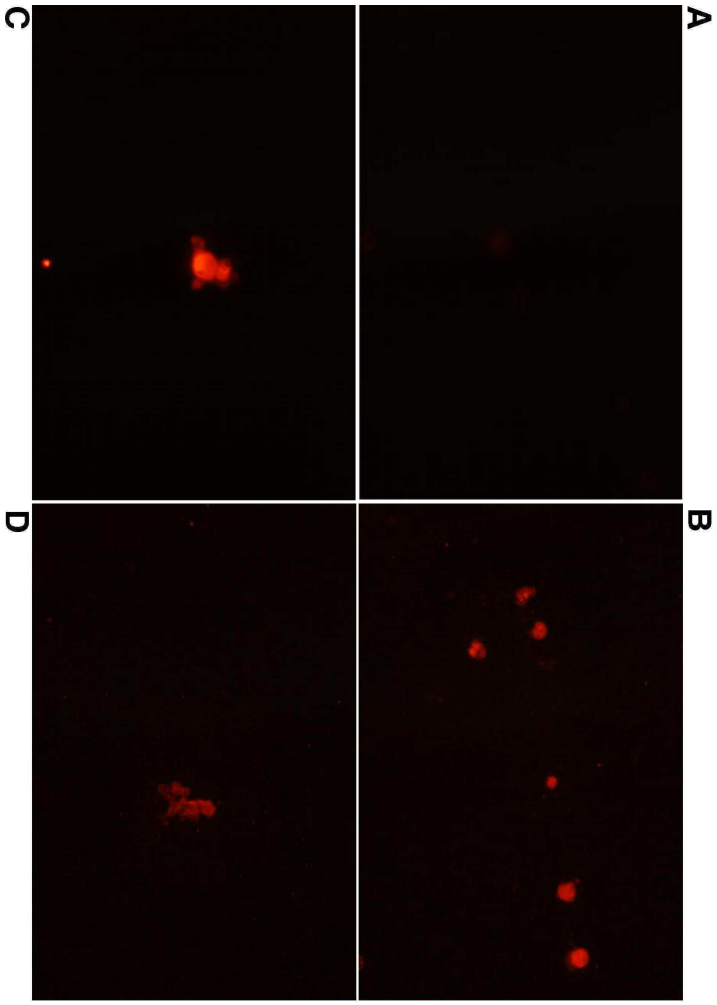
도면1



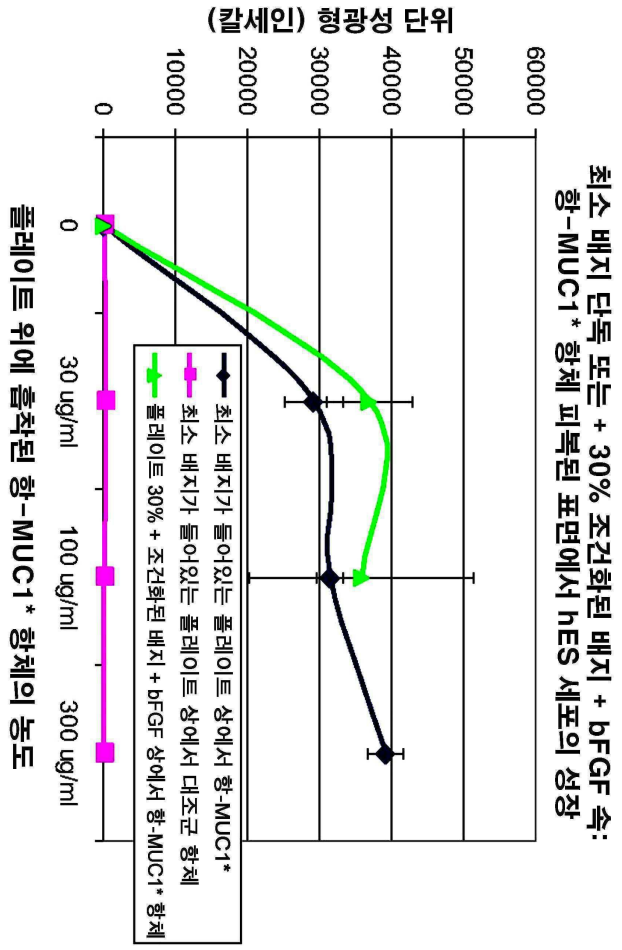
도면2



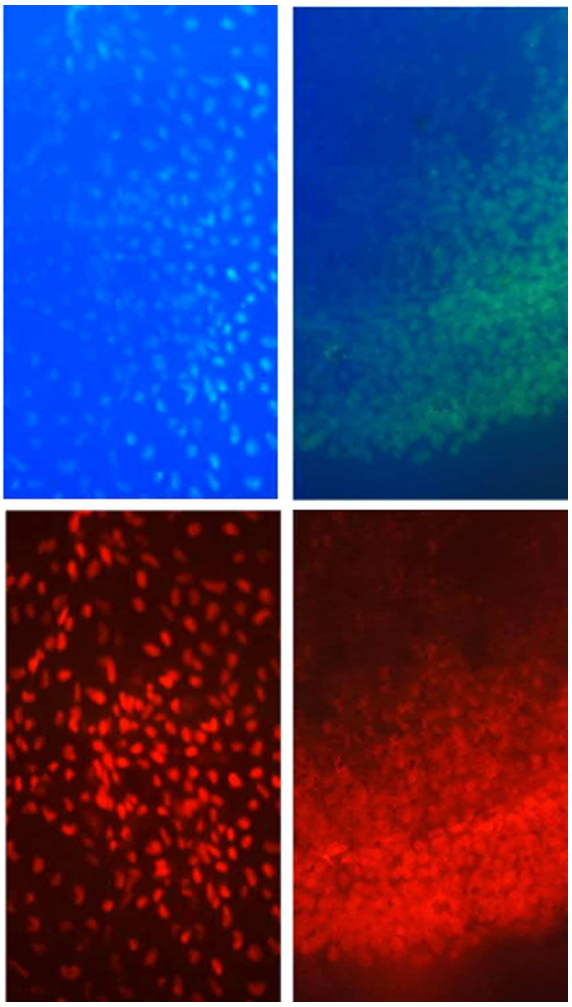
도면3



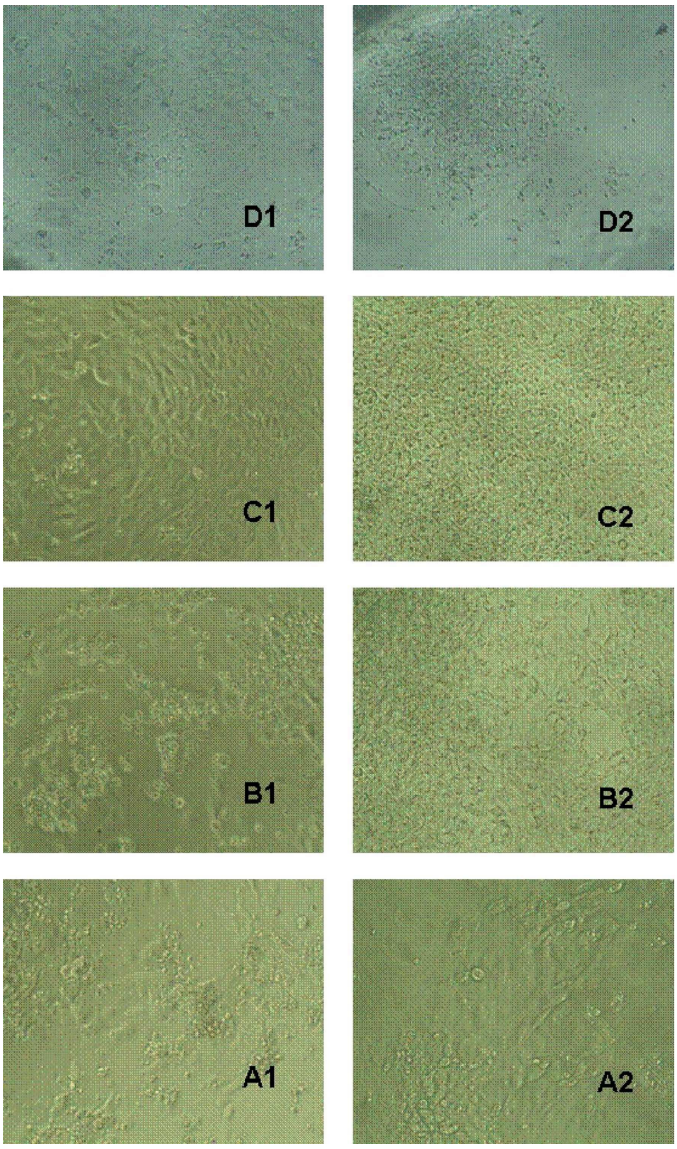
도면4


최소 배지 단독 또는 + 30% 조건화된 배지 + bFGF 속:
항-MUC1* 항체 피복된 표면에서 hES 세포의 성장
(칼세인) 형광성 단위
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
최소 배지가 들어있는 플레이트 상에서 항-MUC1*
최소 배지가 들어있는 플레이트 상에서 대조군 항체
플레이트 30% + 조건화된 배지 + bFGF 상에서 항-MUC1* 항체
0
30 ug/ml
100 ug/ml
300 ug/ml
플레이트 위에 흡착된 항-MUC1* 항체의 농도

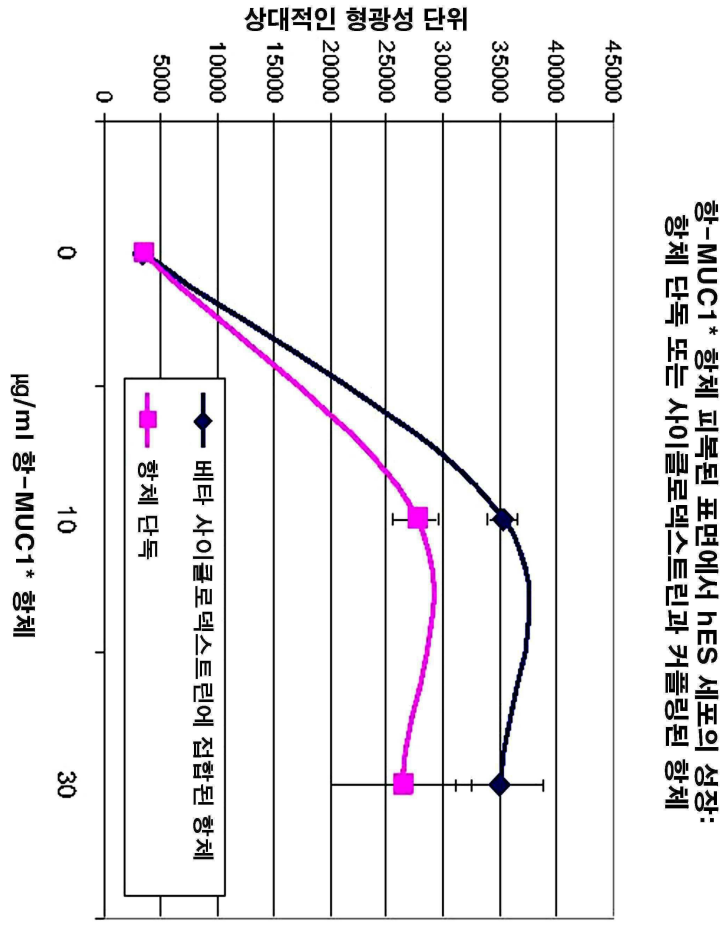
도면5



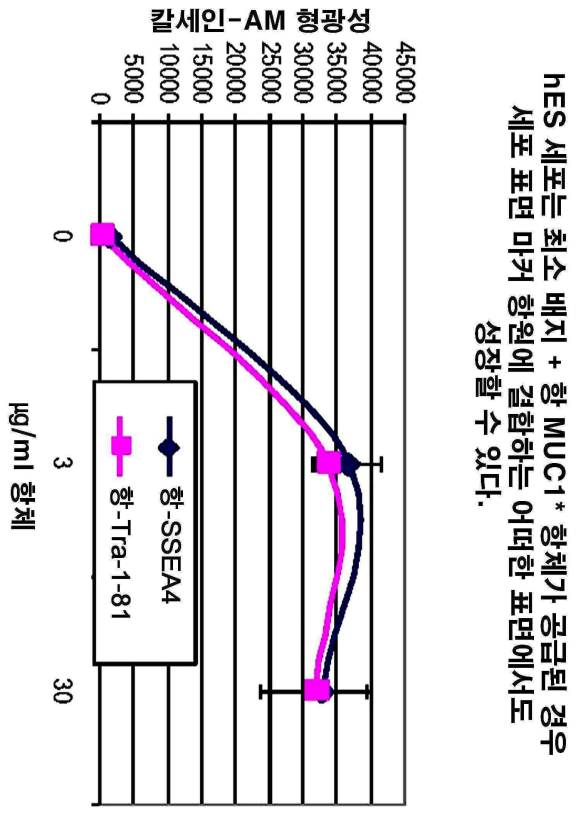
도면6



도면7

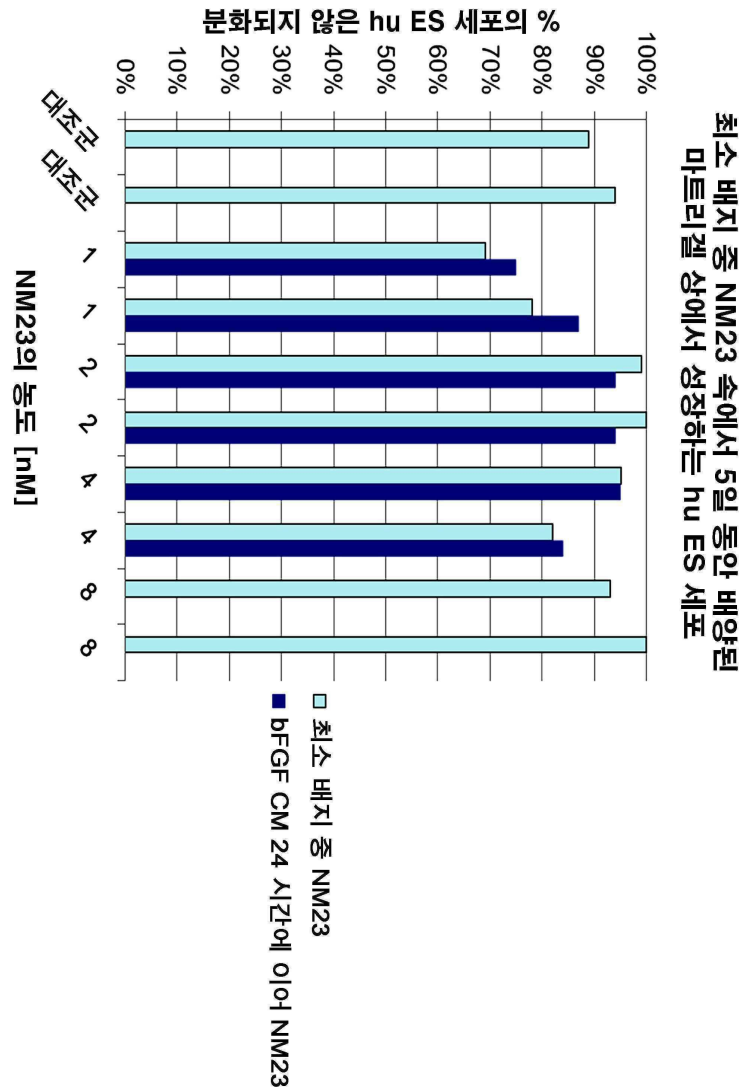

항-MUC1* 항체 피복된 표면에서 hES 세포의 성장:
항체 단독 또는 사이클로덱스트린과 커플링된 항체
상대적인 형광성 단위
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
10
30
μg/ml 항-MUC1* 항체
베타 사이클로덱스트린에 접합된 항체
항체 단독

도면8

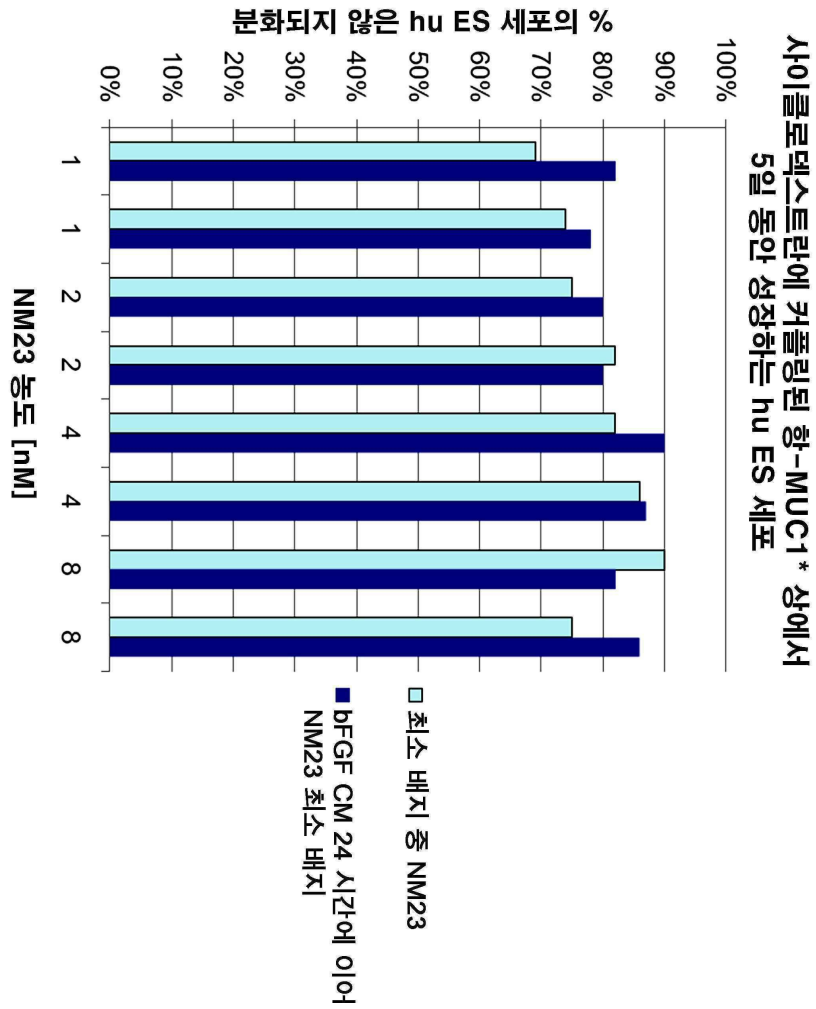


hES 세포는 최소 배지 + 항 MUC1* 항체가 공급된 경우 세포 표면 마커 항원에 결합하는 어떠한 표면에서도 성장할 수 있다.

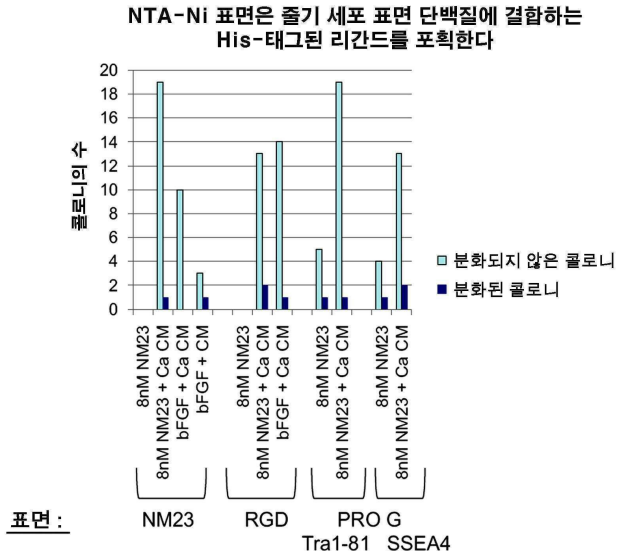
도면9


최소 배지 중 NM23 속에서 5일 동안 배양된
마트리겔 상에서 성장하는 hu ES 세포
분화되지 않은 hu ES 세포의 %
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
대조군
대조군
1
1
2
2
4
4
8
8
NM23의 농도 [nM]
최소 배지 중 NM23
bFGF CM 24 시간에 이어 NM23

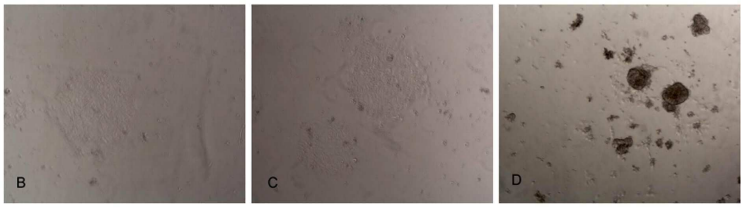
도면10


사이클로덱스트란에 커플링된 항-MUC1* 상에서
5일 동안 성장하는 hu ES 세포
분화되지 않은 hu ES 세포의 %
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
NM23 농도 [nM]
1
1
2
2
4
4
8
8
□ 최소 배지 중 NM23
■ bFGF CM 24 시간에 이어
NM23 최소 배지

도면11



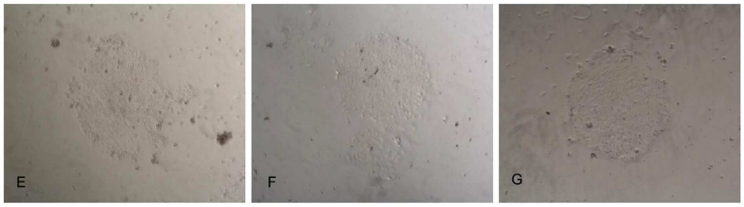
줄기 세포 표면 단백질에 결합하는 히스티딘-태그된 리간드에 부착된 hu ES H9 성장 - 플레이팅 후 3일째에 포획된 영상



표면상의 NM23
8nM NM23 + Ca CM
분화되지 않은 19개/분화된 1개

표면상의 RGD 펩타이드
8nM NM23 + Ca CM
분화되지 않은 13개/분화된 2개

표면상의 RGD 펩타이드
4ng/ml bFGF + HS27 CM
분화되지 않은 3개/분화된 1개

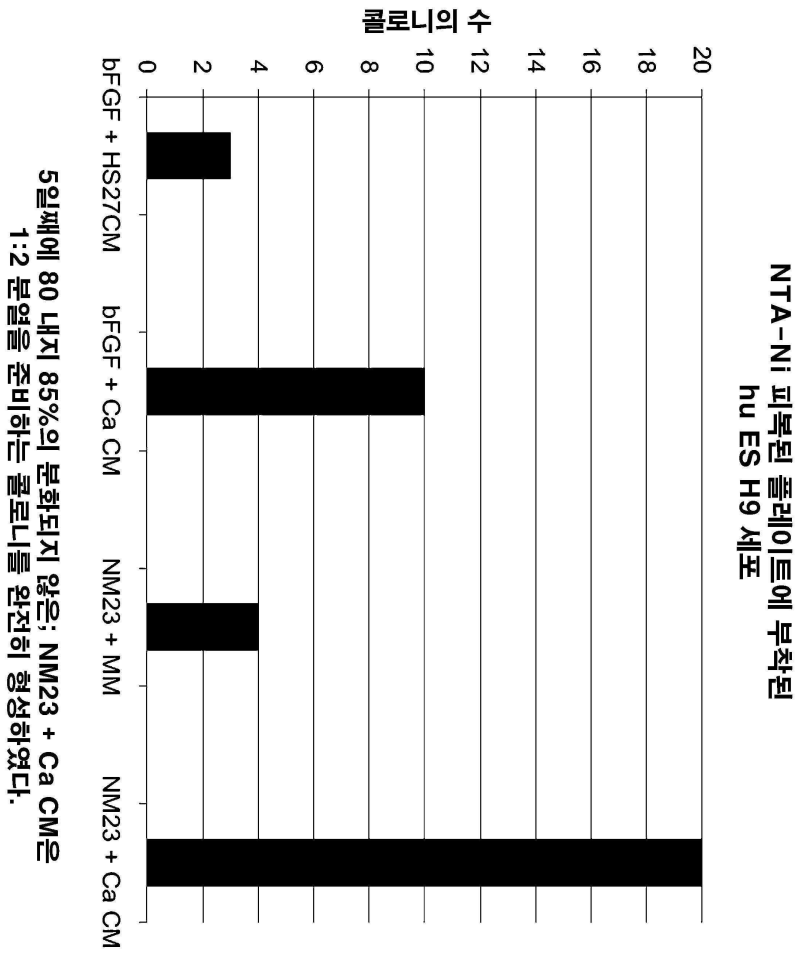


단백질 G,
표면상의 항-SSEA4
8nM NM23 + Ca CM
분화되지 않은 13개/분화된 2개

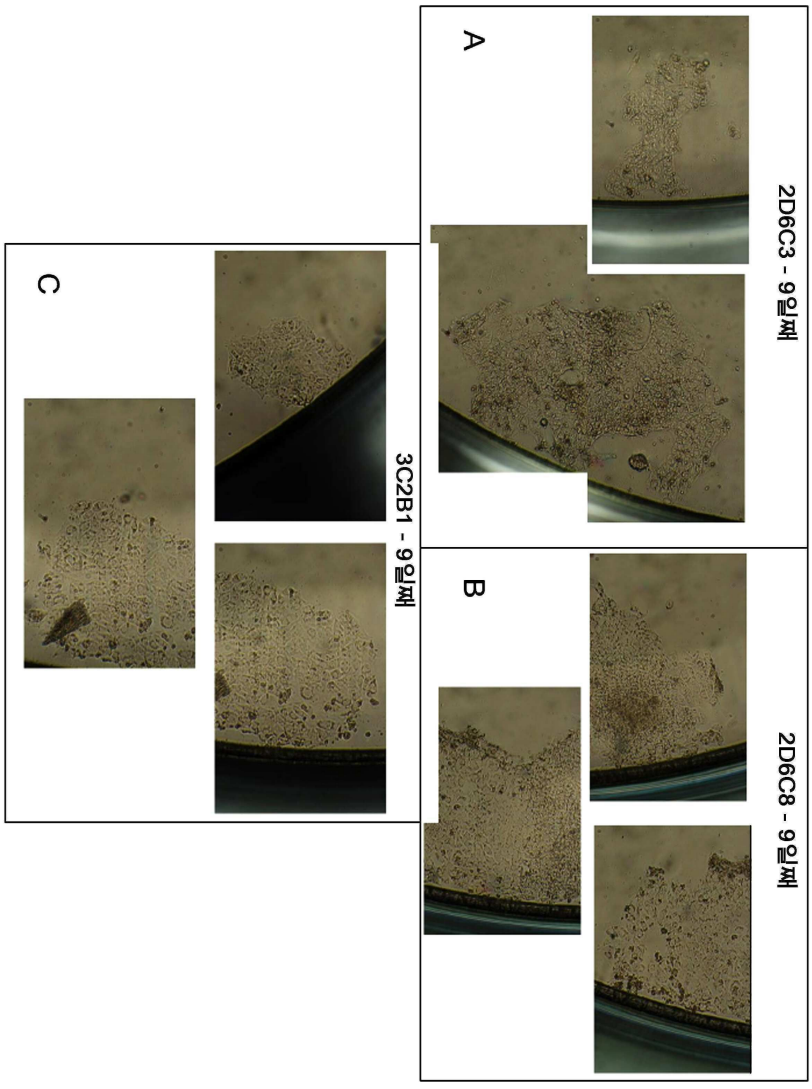
단백질 G,
표면상의 항-Tra 1-81
8nM NM23 + Ca CM
분화되지 않은 19개/분화된 1개

표면상의 RGD 펩타이드
4ng/ml bFGF + Ca CM
분화되지 않은 14개/분화된 1개

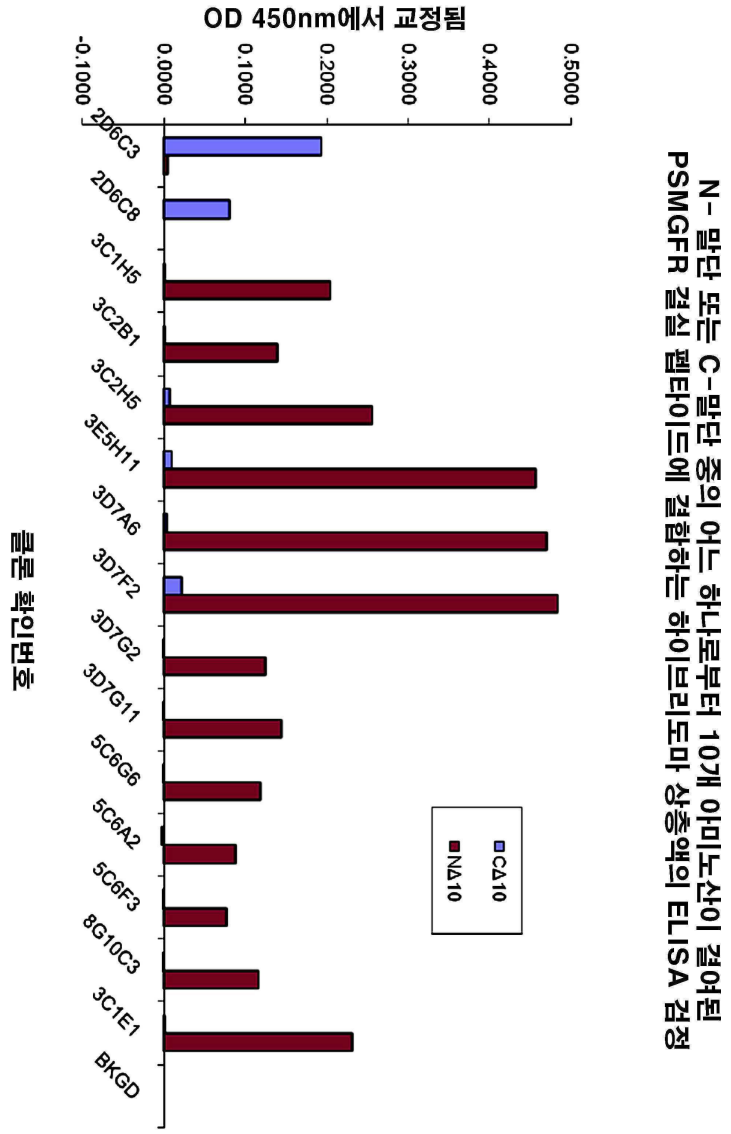
도면12


NTA-Ni 피복된 플레이트에 부착된
hu ES H9 세포
콜로니의 수
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
bFGF + HS27CM
bFGF + Ca CM
NM23 + MM
NM23 + Ca CM
5일째에 80 내지 85%의 분화되지 않은; NM23 + Ca CM은
1:2 분열을 준비하는 콜로니를 완전히 형성하였다.

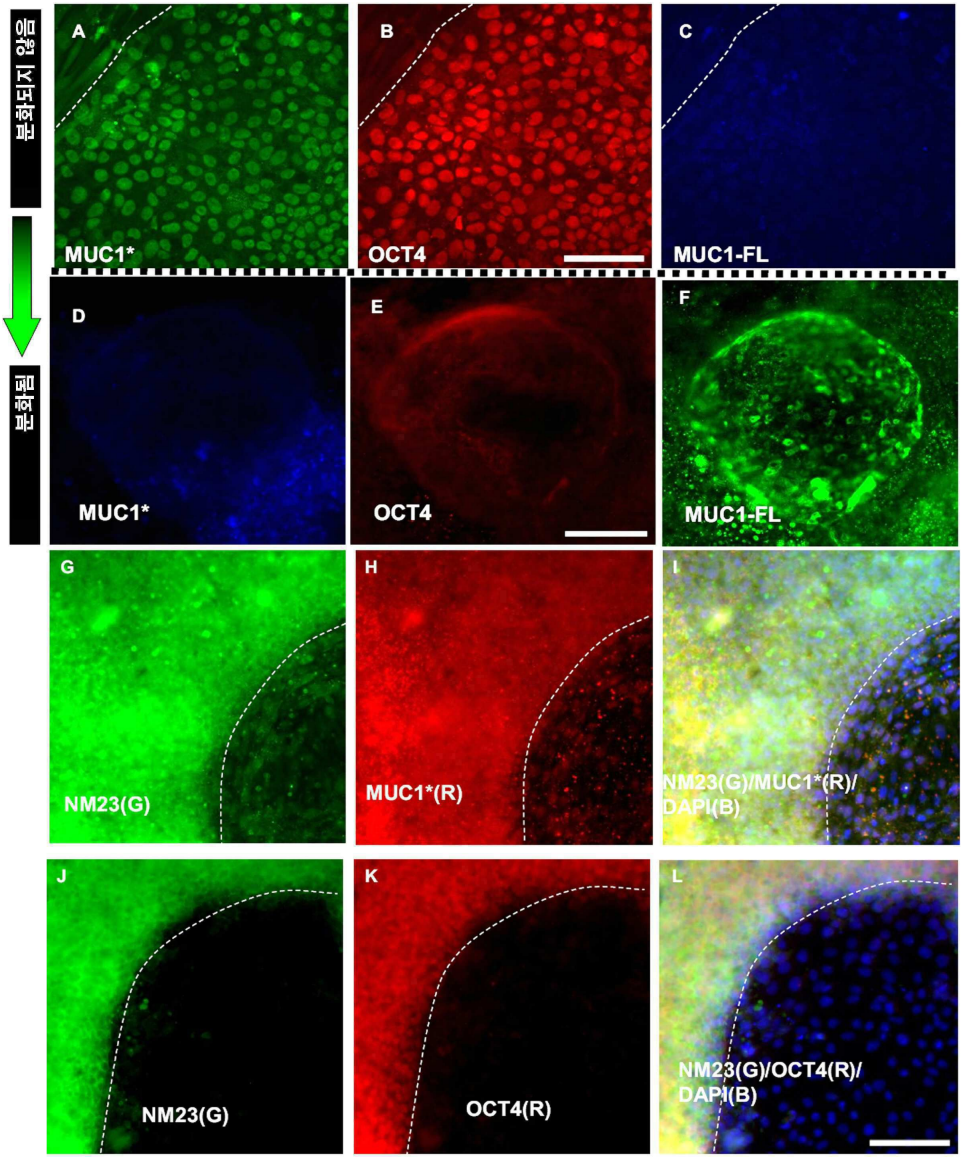
도면13



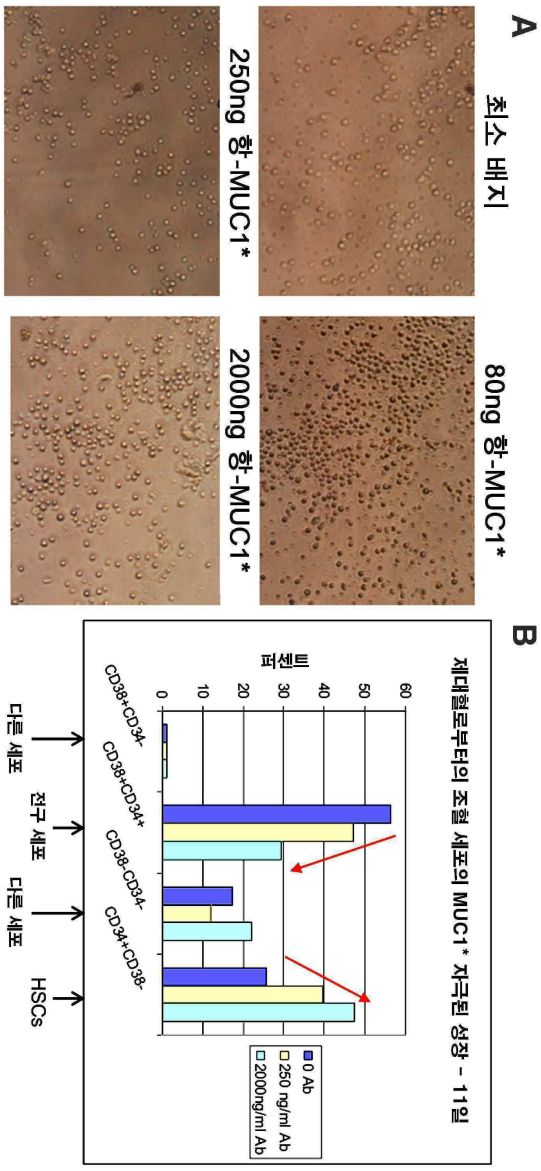
도면14


N- 말단 또는 C-말단 중의 어느 하나로부터 10개 아미노산이 결여된 PSMGFR 결실 펩타이드에 결합하는 하이브리도마 상층액의 ELISA 검정
OD 450nm에서 교정됨
-0.1000
0.0000
0.1000
0.2000
0.3000
0.4000
0.5000
2D6C3
2D6C8
3C1H5
3C2B1
3C2H5
3E5H11
3D7A6
3D7F2
3D7G2
3D7G11
5C6G6
5C6A2
5C6F3
8G10C3
3C1E1
BKGD
CΔ10
NΔ10
클론 확인번호

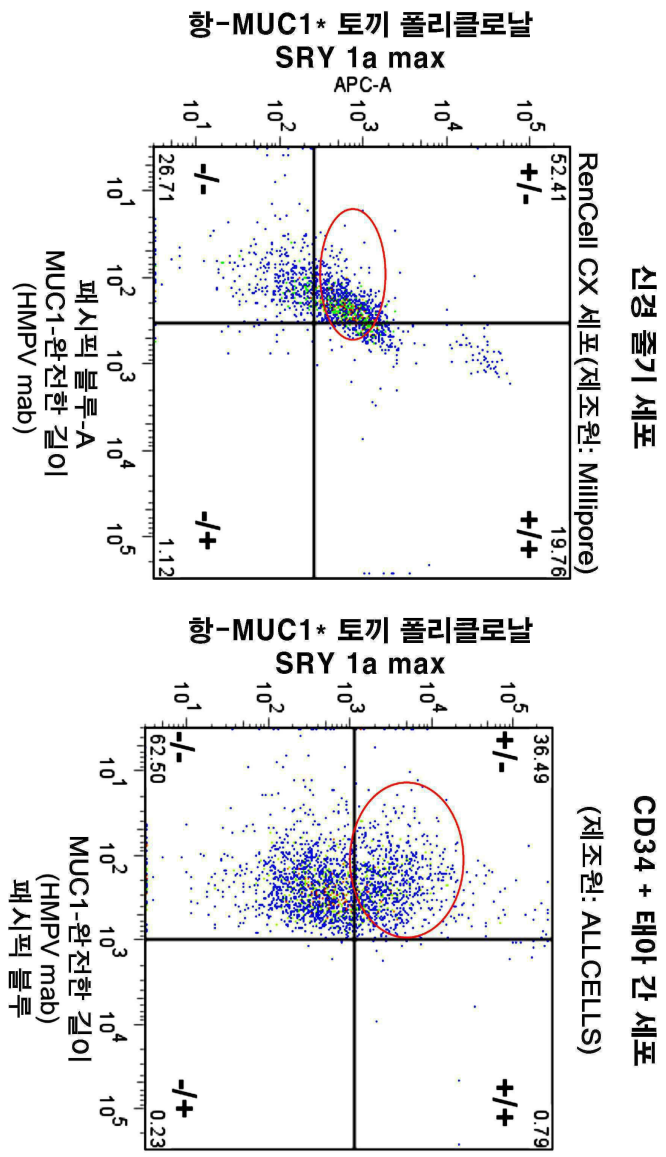
도면15


분화되지 않음
분화됨
A
MUC1*
B
OCT4
C
MUC1-FL
D
MUC1*
E
OCT4
F
MUC1-FL
G
NM23(G)
H
MUC1*(R)
I
NM23(G)/MUC1*(R)/
DAPI(B)
J
NM23(G)
K
OCT4(R)
L
NM23(G)/OCT4(R)/
DAPI(B)

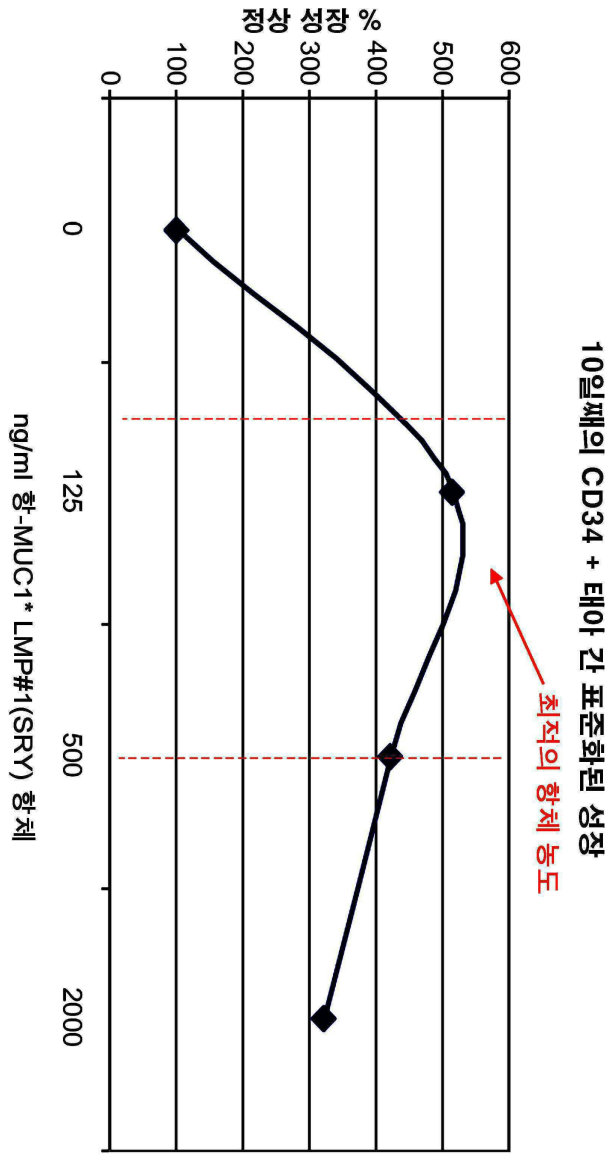
도면16


A
최소 배지
250ng 항-MUC1*
80ng 항-MUC1*
2000ng 항-MUC1*
B
제대혈로부터의 조혈 세포의 MUC1* 자극된 성장 - 11일
퍼센트
0
10
20
30
40
50
60
CD38+CD34-
CD38+CD34+
CD38-CD34-
CD34+CD38-
0 Ab
250 ng/ml Ab
2000ng/ml Ab
다른 세포
전구 세포
다른 세포
HSCs

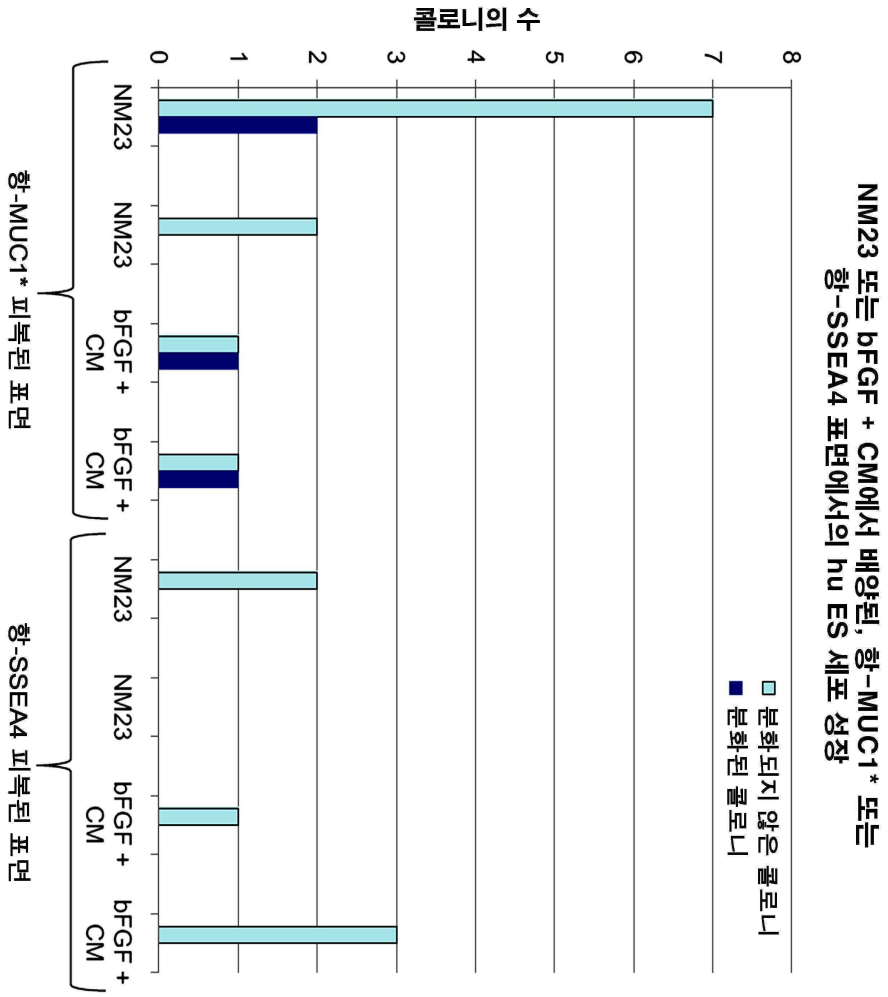
도면17


항-MUC1* 토끼 폴리클로날
SRY 1a max
APC-A
신경 줄기 세포
RenCell CX 세포(제조원: Millipore)
패시픽 블루-A
MUC1-완전한 길이
(HMPV mab)
-/-
+/-
-/+
+/+
26.71
52.41
1.12
19.76
항-MUC1* 토끼 폴리클로날
SRY 1a max
CD34 + 태아 간 세포
(제조원: ALLCELLS)
MUC1-완전한 길이
(HMPV mab)
패시픽 블루
-/-
+/-
-/+
+/+
62.50
36.49
0.23
0.79

도면18


정상 성장 %
0
100
200
300
400
500
600
0
125
500
2000
ng/ml 항-MUC1* LMP#1(SRY) 항체
10일째의 CD34 + 태아 간 표준화된 성장
최적의 항체 농도

도면19



서 열 목 록

<110> MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION

BAMDAD, Cynthia

<120> METHODS FOR CULTURING STEM AND PROGENITOR CELLS

<130> IPA120037-US-D1D1D1

<150> US 61/186,310

<151> 2009-06-11

<150> US 61/323,779

<151> 2010-04-13

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primary Sequence of the MUC1 Growth Factor Receptor

<400> 1

Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys

1 5 10 15

Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val

20 25 30

Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala

35 40 45

<210> 2

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> variant of the PSMGFR peptide

<400> 2

Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys

1 5 10 15

Thr Glu Ala Ala Ser Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val

20 25 30

Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala

35 40 45

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-10 PSMGFR

<400> 3

Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr

1 5 10 15

Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln

20 25 30

Ser Gly Ala

35

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> C-10 PSMGFR

<400> 4

Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
1 5 10 15

Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
20 25 30

Ser Asp Val
35

<210> 5

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RGD peptide

<400> 5

His His His His His His Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Gly Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser
20 25 30