(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0047375
(43) 공개일자 2022년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7009201
(22) 출원일자(국제) 2020년08월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/073407
(87) 국제공개번호 WO 2021/032855
국제공개일자 2021년02월25일
(30) 우선권주장
1911955.1 2019년08월20일 영국(GB)
2012306.3 2020년08월07일 영국(GB)

(71) 출원인
어댑티뮨 리미티드
영국, 애빙던 옥스퍼드셔 오엑스14 4알엑스, 밀튼 파크, 주빌리 애비뉴 60
(72) 발명자
양, 쳉 타오
영국, 오엑스14 4알엑스 옥스퍼드셔 애빙던, 밀튼 파크, 주빌리 애비뉴 60, 어댑티뮨 리미티드 내
카펜터, 리
영국, 오엑스14 4알엑스 옥스퍼드셔 애빙던, 밀튼 파크, 주빌리 애비뉴 60, 어댑티뮨 리미티드 내
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 **조혈 유도를 위한 배양 배지**

(57) 요 약

본 발명은 T 세포로 추가로 분화할 수 있는 조혈 전구 세포(HPC; haematopoietic progenitor cell)로의 혈액 생성 내피 세포(HEC; haemogenic endothelial cell)의 분화를 지지하는 화학적으로 정의된(chemically defined) 조혈 유도 배지(haematopoietic induction medium)에 관한 것이다. 배지는 (a) cKIT 수용체 또는 cKIT 수용체 매개 신호전달 경로를 자극시키고/거나 (b) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시킬 수 있다. 예를 들어, 배지는 SCF 및 VEGF를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 배지는 추가로 (c) MPL 또는 MPL 매개 신호전달 경로를 자극시키며; (d) *FLT3* 또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (e) *IGF1R* 또는 *IGF1R* 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (f) 인터루킨(IL) 활성을 표시할 수 있다. 예를 들어, 배지는 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, IL-6 및 선택적으로 IL-7을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 배지는 예를 들어 혈액 세포의 생성 또는 면역치료법에 사용하기에 유용할 수 있다.

(52) CPC특허분류
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/145 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2501/2303 (2013.01)
C12N 2501/2306 (2013.01)
C12N 2501/2307 (2013.01)
C12N 2506/28 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

조혈 전구 세포(HPC; haematopoietic progenitor cell)의 집단(population)을 생성하는 방법으로서,

(i) 조혈 유도 배지(haematopoietic induction medium)에서 혈액 생성 내피 세포(HEC; haemogenic endothelial cell)의 집단을 배양하여, 조혈 전구 세포(HPC)의 집단을 생성하는 단계

를 포함하고,

조혈 유도 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117) 또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키고/거나 (ii) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 조혈 유도 배지는 SCF 및 VEGF 중 하나 또는 둘 다를 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 조혈 유도 배지는 SCF 및 VEGF를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 유도 배지는 (iii) MPL(CD110) 또는 MPL(CD110) 매개 신호전달 경로를 자극시키며; (iv) *FLT3* 또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (v) *IGF1R* 또는 *IGF1R* 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (vi) 인터루킨(IL; interleukin) 활성을 표시하는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 조혈 유도 배지는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO; Thrombopoietin), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3 및 IL-6을 포함하는, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 조혈 유도 배지는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, IL-6, 및 IL-7을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 유도 배지는 BMP, FGF, SHH, EPO, 안지오텐신 II(angiotensin II) 및 로사르탄(losartan) 중 하나 이상이 없는 것(devoid of)인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된(chemically defined) 영양분 배지로 구성되고, 하나 이상의 분화 인자는 SCF 및/또는 VEGF로 구성되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성되고, (i) 하나 이상의 분화 인자는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3 및 IL-6으로 구성되거나; (ii) 하나 이상의 분화 인자는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, IL-6, 및 IL-7로 구성되는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 조혈 유도 배지 내의 분화 인자는 (i) VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L),

IGF-1, IL-3, IL-6, 및 IL-7; 또는 (ii) VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, 및 IL-6인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, HEC는 CD34+ CD73- CXCR4- 표현형(phenotype)을 표시하는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, HPC는 CD34+ 표현형을 표시하는, 방법.

청구항 13

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, HPC는 티모포이에틱 HPC(tHPC; thymopoietic HPC)를 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, tHPC는 CD34+ CD7+표현형을 표시하는, 방법.

청구항 15

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, HEC는 조혈 유도 배지에서 16일 내지 28일 동안 배양되어, HPC를 생성하는, 방법.

청구항 16

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, HEC의 집단은 시험관내에서(*in vitro*) 유도 만능 줄기세포(iPSC; induced pluripotent stem cell)로부터 생성되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 방법은

(i) 유도 만능 줄기세포(iPSC)의 집단을 중배엽 세포(mesoderm cells)로 분화시키는 단계; 및

(ii) 중배엽 세포를 분화시켜, 혈액 생성 내피 세포(HEC)의 집단을 생성하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, iPSC는 공여자 개체로부터 수득된 T 세포로부터 유래되는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 공여자 개체로부터 수득된 T 세포는 표적 항원에 특이적인 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 표적 항원은 종양 항원인, 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 공여자 개체로부터 수득된 T 세포는 종양-침윤성 림프구(TIL; tumour-infiltrating lymphocyte)인, 방법.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC는, 중배엽 분화를 촉진하기에 적합한 조건 하에 iPSC의 집단을 배양함으로써 중배엽 세포로 분화되는, 방법.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC는 제1, 제2 및 제3 중배엽 유도 배지에서 순차적으로 배양되

어, 중배엽 세포로의 분화를 유도하는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 제1 중배엽 유도 배지는 SMAD2 및 SMAD3 또는 SMAD2 및 SMAD3 매개 신호전달 경로를 자극시키는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 제1 중배엽 유도 배지는 액티빈(activin)을 포함하는, 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 제1 중배엽 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성되고, 하나 이상의 분화 인자는 액티빈으로 구성되는, 방법.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 중배엽 유도 배지는 (i) (a) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 또는 (b) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (ii) 섬유아세포 성장 인자(FGF; fibroblast growth factor) 활성을 갖는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 제2 중배엽 유도 배지는 액티빈, BMP, 및 FGF를 포함하는, 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 제2 중배엽 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성되고, 하나 이상의 분화 인자는 액티빈, BMP, 및 FGF로 구성되는, 방법.

청구항 30

제23항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 중배엽 유도 배지는 (i) (a) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 또는 (b) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (ii) 섬유아세포 성장 인자(FGF) 활성을 갖고, (iii) 글리코겐 생성효소(synthase) 키나제 3β를 저해하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 제3 중배엽 유도 배지는 액티빈, BMP, FGF, 및 GSK3 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 제3 중배엽 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성되고, 하나 이상의 분화 인자는 액티빈, BMP, FGF, 및 GSK3 저해제로 구성되는, 방법.

청구항 33

제23항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 중배엽 세포는 브라키어리(Brachyury), 구세코이드(Goosecoid), Mixl1, KDR, FoxA2, GATA6 및 PDGFαR 중 하나 이상을 표시하는, 방법.

청구항 34

제23항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 중배엽 세포는, 혈액 생성 내피(HE; haemogenic endothelial) 분화를 촉진하기에 적합한 조건 하에 중배엽 세포의 집단을 배양함으로써 HEC로 분화되는, 방법.

청구항 35

제23항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 중배엽 세포는 HE 유도 배지에서 배양되어, HEC로의 분화를 유도하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, HE 유도 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117) 또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (ii) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, HE 유도 배지는 SCF 및 VEGF를 포함하는, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, HE 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성되고, 하나 이상의 분화 인자는 SCF 및 VEGF로 구성되는, 방법.

청구항 39

선행하는 청구항 중 어느 한 항에 있어서, HPC의 집단을 전구 T 세포(progenitor T cells)로 분화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, HPC는 HPC의 집단을 림프 확장 배지(lymphoid expansion medium)에서 배양하여, 전구 T 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 분화되는, 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 전구 T 세포는 CD5+CD7+ 표현형을 갖는, 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 전구 T 세포를 성숙시켜, 이중 양성 CD8+ CD4+ T 세포의 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 전구 T 세포는, 전구 T 세포의 집단을 T 세포 성숙 배지에서 배양하여, 이중 양성 CD8+ CD4+ T 세포를 생성하는 단계를 포함하는 방법에 의해 성숙되는, 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 이중 양성 CD8+ CD4+ T 세포를 활성화시키고 확장(expand)시켜, CD8+ 단일 양성 표현형 또는 CD4+ 단일 양성 표현형을 갖는 T 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 45

제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포는 표적 항원을 발현하는 세포에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 표적 항원은 종양 항원인, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, T 세포는 종양 항원을 발현하는 암세포에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 48

제16항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, iPSC는, 표적 항원에 특이적인 공여자 개체로부터 수득된 T 세포로부터 유래되는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 공여자 개체로부터 수득된 T 세포는 종양-침윤성 림프구(TIL)인, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 항원 수용체를 인코딩하는 이종성 핵산(heterologous nucleic acid)을 iPSC, HEC, HPC, 또는 전구 T 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 항원 수용체를 인코딩하는 이종성 핵산은 발현 벡터에 포함되는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 발현 벡터는 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 또는 아데노-관련 바이러스(AAV; adeno-associated viral) 벡터인, 방법.

청구항 53

제50항 또는 제51항에 있어서, 이종성 핵산은 유전자 편집 시스템을 사용하여 iPSC, HEC, HPC, 또는 전구 T 세포의 게놈 내로 혼입되는, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 유전자 편집 시스템은 CRISPR/Cas9 또는 AAV인, 방법.

청구항 55

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 수용체는 TCR인, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, TCR은 친화도 증강된 TCR인, 방법.

청구항 57

제54항 또는 제55항에 있어서, TCR은, 세포에 의해 발현되는 표적 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 MHC에 특이적으로 결합하거나, MHC 제시(presentation)와 독립적으로 세포에 의해 발현되는 표적 항원 또는 이의 펩타이드에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, TCR은, 암세포에 의해 발현되는 종양 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 MHC에 특이적으로 결합하거나, MHC 제시와 독립적으로 암세포에 의해 발현되는 종양 항원 또는 이의 펩타이드 단편에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 59

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR; chimeric antigen receptor)인, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, CAR은 세포에 의해 발현되는 표적 항원에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, CAR은 암세포에 의해 발현되는 종양 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 MHC에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 62

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 수용체는 NK 세포 수용체(NKCR; NK cell receptor)인, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, NKCR은 세포에 의해 발현되는 표적 항원에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, NKCR은 암세포에 의해 발현되는 종양 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 MHC에 특이적으로 결합하는, 방법.

청구항 65

하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지를 포함하는 조혈 유도 배지로서, 하나 이상의 분화 인자는, cKit 수용체(CD117) 또는 cKit 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 및 VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자로 구성되는, 조혈 유도 배지.

청구항 66

하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지를 포함하는 조혈 유도 배지로서, 하나 이상의 분화 인자는 (a) cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, (b) VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, (c) MPL(CD110) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, (d) *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, (e) *IGF1R* 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 및 (f) 인터루킨(IL) 활성을 표시하는 하나 이상의 분화 인자로 구성되는, 조혈 유도 배지.

청구항 67

제66항에 있어서, MPL 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자는 TPO인, 조혈 유도 배지.

청구항 68

제66항 또는 제67항에 있어서, FLT3 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자는 FLT3L인, 조혈 유도 배지.

청구항 69

제66항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, IGF1R 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자는 IGF1인, 조혈 유도 배지.

청구항 70

제66항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 인터루킨 활성을 표시하는 하나 이상의 분화 인자는 IL-3, IL-6 및 선택적으로 IL-7인, 조혈 유도 배지.

청구항 71

제65항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, cKit 수용체(CD117) 또는 cKit 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자는 SCF인, 조혈 유도 배지.

청구항 72

제65항 내지 제710항 중 어느 한 항에 있어서, VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자는 VEGF인, 조혈 유도 배지.

청구항 73

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생성되는 HPC의 집단으로서, HPC는 표현형 CD34+ CD7+를 갖는 티모시스틱(thymocytic) HPC인, HPC의 집단.

청구항 74

제65항 내지 제7261항 중 어느 한 항에 따른 조혈 유도 배지의 용도로서, HPC로의 중배엽 세포 또는 HEC의 분화를 위한 것인, 용도.

청구항 75

제65항 내지 제72항 중 어느 한 항에 따른 조혈 유도 배지를 포함하는, HPC의 생성에 사용하기 위한 키트.

청구항 76

제75항에 있어서,

액티빈을 포함하는 제1 중배엽 유도 배지,

액티빈, BMP 및 FGF를 포함하는 제2 중배엽 유도 배지, 및/또는

액티빈, BMP, FGF, 및 GSK3 저해제를 포함하는 제3 중배엽 유도 배지

를 추가로 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조혈 전구 세포(HPC; Haematopoietic Progenitor Cell)로의 포유류 유도 만능 줄기세포(iPSC; induced pluripotent stem cell)의 분화를 지지하기 위한 배양 배지에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역치료제는 암 치료 전망을 장기간 생존율의 장래성으로 변환시키기 위한 태세를 갖추고 있다(문헌[McDermott 등, Cancer Treat Rev. 2014 Oct; 40(9): 1056-64]). 환자 집단 및 종양 유형의 범위를 확장시키기 위해 새로운 면역조절 약물에 대한 분명하고 충족되지 못한 의학적 필요성이 존재한다. 이에 더하여, 새로운 제제는 항종양 반응의 규모 및 지속기간을 증강시키는 데 필요하다. 이러한 제제의 개발은 지난 20년에 걸쳐 T-세포 면역력을 제어하는 기본적인 원리의 심도 깊은 이해 덕분에 가능하게 되었다(문헌[Sharma 및 Allison, Cell. 2015 Apr 9; 161(2): 205-14]). 이는 전형적으로, MHC 분자에 의해 제시되는 종양-관련 펩타이드 항원을 인식하는 종양 특이적 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 필요로 한다. 생체외에서 확장된 종양 침윤된 림프구의 상이한 백신화 전략 및 입양 전달(adoptive transfer)은 일부 경우, 말기 암을 치료하는 종양 특이적 T-세포의 능력을 실증하였다(문헌[Rosenberg 등, Nat Med. 2004 Sep; 10(9): 909-15]).

[0003] 그러나, 현재의 입양(adoptive) T 세포 치료법은 적합한 환자 및 종양-특이적 T 세포의 결여에 의해 제한되고, 면역치료법에서 효과적인 사용을 위해 치료적으로 충분하고 기능적인 항원-특이적 T 세포에 대한 필요성이 존재한다.

[0004] HPC 및 T 세포로의 유도 만능 줄기세포(iPSC)의 분화가 보고되었다(문헌[Kennedy 등 2012 Cell Reports 2 6 1722-1735]; 문헌[Sturgeon 등 2014 Nat Biotechnol 32(6) 554-561]; 문헌[Ditadi 등 (2015) Nat Cell Biol.;17(5):580-91]). 전형적으로 이는 배아체(embryoid body) 형성 및/또는 혈청의 사용, 그리고 더 후기에서는 T 세포 분화의 말기에 대해 OP9-DLL4 간질(stroma)의 사용을 수반한다(또한 문헌[Themeli 등 (2013) Nat Biotechnol. 31(10):928-33]; 문헌[Vizcardo 등 2013 Cell Stem Cell. 2013 Jan 3;12(1):31-6] 참조). 피더(feeder), 간질 세포, 혈청 또는 다른 불확정(undefined) 구성요소를 함유하는 배지를 사용하여 생성된 세포는 임상 적용에 적합하지 않다.

발명의 내용

[0005] 본 발명자들은, T 세포로 추가로 분화할 수 있는 HPC로의 혈액 생성 내피 세포(HEC; haemogenic endothelial cell)의 분화를 지지하는 화학적으로 정의된 조혈 유도 배지를 개발하였다. 이러한 배지(SV, HEM7.2 및 HEM7.3으로 지칭됨)는, 훨씬 더 이후의 시점(d16-18)에서, OP9-D14 간질의 사용 없이 T 세포 계통(lineage)을 향한 전진 배양(onward culture)을 허용하는 무혈청 및 안내(directed) GMP 순응(compliant) 방식에서, 기존의 조혈 유도 배지에 비해 감소된 비용으로 HPC의 단리를 가능하게 할 수 있다. 이는 면역치료법에 사용하기 위한, 예를

들어 임상 등급의 혈액 세포, 예컨대 T 세포의 생성에 유용할 수 있다.

[0006] 본 발명의 제1 양태는 HPC(haematopoietic progenitor cell)의 집단(population)을 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (i) 조혈 유도 배지에서 HEC의 집단을 배양하여, HPC의 집단을 생성하는 단계를 포함하고, 여기서 조혈 유도 배지는 (a) cKIT 수용체(CD117; KIT 수용체 티로신 키나제) 및/또는 cKIT 수용체(CD117; KIT 수용체 티로신 키나제) 매개 신호전달 경로를 자극시키고/거나 (b) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는 화학적으로 정의된 배지이다.

[0007] 바람직하게는, 조혈 유도 배지는 (a) cKIT 수용체(CD117; KIT 수용체 티로신 키나제) 및/또는 cKIT 수용체 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (b) VEGFR 및/또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시킨다.

[0008] 조혈 유도 배지는 c-KIT 수용체(CD117) 또는 c-KIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 SCF, 및/또는 VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로, 바람직하게는 VEGFR2 또는 VEGFR2 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 VEGF-A를 포함할 수 있다.

[0009] 바람직하게는, 이는 배지에서 유일한 분화 인자이다.

[0010] 제1 양태의 바람직한 조혈 유도 배지는 SCF 및/또는 VEGF를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있으며, 여기서 하나 이상의 분화 인자는 SCF 및/또는 VEGF로 구성된다.

[0011] 본 발명의 제2 양태는 HPC의 집단을 생성하는 방법을 제공하며, 이 방법은

[0012] (i) 조혈 유도 배지에서 HEC의 집단을 배양하여, HPC의 집단을 생성하는 단계

[0013] 를 포함하고,

[0014] 조혈 유도 배지는 (a) cKIT 수용체(CD117) 및/또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (b) VEGFR 및/또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (c) MPL(CD110) 및/또는 MPL(CD110) 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (d) *FLT3* 및/또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (e) *IGF1R 및/또는 IGF1R* 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (f) 인터루킨(IL; interleukin) 활성을 표시하는 화학적으로 정의된 배지이다.

[0015] 제2 양태의 바람직한 조혈 유도 배지는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO; Thrombopoietin), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 및 선택적으로 IL-7을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있고, 하나 이상의 분화 인자는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 및 선택적으로 IL-7로 구성된다.

[0016] 제1 양태 및 제2 양태의 방법에 의해 생성되는 HPC는 추가로 분화되어, T 세포를 생성할 수 있다. 예를 들어, 제1 양태의 방법은

[0017] (ii) HPC의 집단을 T 세포 전구 세포(T cell progenitor cell)로 분화시키는 단계; 및

[0018] (iii) 전구 T 세포를 성숙시켜, 이중 양성 CD4+CD8+T 세포의 집단을 생성하는 단계

[0019] 를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 제1 양태 또는 제2 양태의 방법은

[0021] (iv) 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포를 활성화시키고 확장(expand)시켜, 단일 양성 CD8+ T 세포의 집단 또는 단일 양성 CD4+ T 세포의 집단을 생성하는 단계

[0022] 를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 바람직한 구현예에서, 제1 양태의 방법에 사용하기 위한 HEC는 iPSC의 집단을 HEC로 분화시킴으로써 생성될 수 있다.

[0024] 본 발명의 제3 양태는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지를 포함하는 조혈 유도 배지를 제공하며, 여기서, 하나 이상의 분화 인자는, cKit 수용체(CD117) 또는 cKit 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 SCF, 및/또는 VEGFR(선택적으로 VEGFR2) 또는 VEGFR(선택적으로 VEGFR2) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 VEGF(선택적으로 VEGF-A)로 구성된다.

[0025] 본 발명의 제4 양태는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지를 포함하는 조혈 유도

배지를 제공하며, 여기서, 하나 이상의 분화 인자는, cKIT 수용체(CD117) 및/또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 SCF; VEGFR 및/또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 VEGF; MPL(CD110) 및/또는 MPL(CD110) 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 TPO; *FLT3* 및/또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 Flt3L; *IGF1R* 및/또는 *IGF1R* 매개 신호전달 경로를 자극시키는 분화 인자, 예컨대 IGF-1; 및 인터루킨(IL) 활성을 표시하는 하나 이상의 분화 인자, 예를 들어, 하나 이상의 인터루킨, 예컨대 IL-3, IL-6 및 선택적으로 IL-7로 구성된다.

[0026] 본 발명의 제5 양태는 HPC로의 HEC의 분화에 있어서 제3 양태 또는 제4 양태의 조혈 유도 배지의 용도를 제공한다.

[0027] 본 발명의 제6 양태는 제3 양태 또는 제4 양태의 조혈 유도 배지를 포함하는 HPC의 생성에 사용하기 위한 키트를 제공한다.

[0028] 키트는 HEC로의 iPSC의 분화를 지지하기 위해 적합한 배지를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는

[0029] 액티빈을 포함하는 제1 중배엽 유도 배지,

[0030] 액티빈, BMP 및 FGF를 포함하는 제2 중배엽 유도 배지, 및

[0031] 액티빈, BMP, FGF, 및 GSK3 저해제를 포함하는 제3 중배엽 유도 배지

[0032] 를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 이러한 양태와 다른 양태 및 구현예는 아래에서 더 상세히 기술된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 iPSC로부터 T 세포를 생산하기 위한 6-단계(stage) 방법의 일례의 개략도를 도시한다.

도 2는 분화중인 hiPSC로부터 CD34+ CD45+ CD7+ 세포 출현의 특징화를 도시한다: CD34+ CD45+ CD7+ 전구체(progenitor)의 출현은 3개의 별도의 주(line), ChiPSC31(2a), ADAP-J(2b) 및 NIH2(2c)에 걸쳐 나타나 있고, 둘 다 완전(HEM7) 및 최소(SV) 단계 3 조건이다. 전형적으로, 세포는 상이한 시점에서 단층으로부터 단리되며, 형광 항체로 염색되고, 유세포분석에 의해 평가된다. CD34+ CD45+ CD7+ 전구체는 완전(HEM7) 및 최소(SV) 단계 3 조건 하에 d16-d28로부터 출현하는 것으로 나타난다.

도 3은 본원에 기술된 조혈 유도 배지("최소 단계 3 배지")를 사용하여 ChiPSC31(n = 3; 3a) 및 NIH2(n = 2; 3b) 세포주로부터 생성된 CD34+ 또는 CD34+ CD7+ HPC로부터 생성되는 CD45+ CD7+ CD5+ T 세포 전구체의 수를 도시한다. 세포는 적절한 항체를 이용한 염색 및 유세포분석 후에 평가되었다. 세포 수는 24WP에서 웰당 생산된 proT 세포의 수를 나타내고, $5x10^3$개의 세포가 LP 배양 단계(단계 4)의 d0에 시딩되었다.

도 4는 본원에 기술된 조혈 유도 배지("최소 단계 3 배지")를 사용하여 ChiPSC31(n = 3; 3a) 및 NIH2(n = 2; 3b) 세포주로부터 생성된 CD34+ 또는 CD34+ CD7+ HPC로부터 생성되는 CD3+, CD4+ 및 CD8+ 이중 양성 T 세포의 수를 도시한다. 세포는 적절한 항체를 이용한 염색 및 유세포분석 후에 평가되었다. 세포 수는 24WP에서 웰당 생산된 단일 양성 T 세포의 수를 나타내고, $5x10^3$개의 세포가 LP 배양 단계의 d0에 시딩되었다.

도 5는 KILR™ 검정을 사용하여 측정된, 완전(HEM7) 및 최소(SV) 단계 3 조건을 사용하여 분화로부터 생산된 T 세포에 의한 항원-특이적 사멸화를 도시한다.

도 6은 표준(HEM7) 및 변형된(HEM7.2) 단계 3 조건 둘 다에서, hiPSC 주 NIH2로부터의 $CD34^+CD45^+CD7^+$ 전구체의 출현을 도시한다. 전형적으로, 세포는 제16일에 단층으로부터 단리되며, 형광 항체로 염색되고, 유세포분석에 의해 평가된다. $CD34^+CD45^+CD7^+$ 전구체는 HEM7(도 6a 및 도 6b 좌측 패널) 및 HEM7.2 단계 3 조건(도 6a 및 도 6b 우측 패널) 하에 출현하는 것으로 나타난다. NIH2 세포주(n3)로부터의 산출량(output)을 나타내었다.

도 7은 $CD34^+$ HPC의 단리 및 전진 배양이 proT 세포 잠재성을 실증함을 도시한다. $CD34^+$ HPC는 표준(HEM7; 도 7a 좌측 패널) 및 새로운(HEM7.2; 도 7a 우측 패널) 단계 3 배지를 이용하여 분화된 hiPSC로부터 단리되었고, 추가로 SCT의 림프 증식 배지(LP) 배지에서 배양되었으며, 따라서 이는 적절한 항체를 이용하여 염색 및 유세포분석 후 평가된 바와 같이 $CD7^+$ 및 $CD5^+$ proT 세포를 생산할 수 있다. NIH2 세포주(n2)로부터의 산출량을 나타

내었다.

도 8은 $CD34^+$ HPC의 단리 및 전진 배양이 완전 T 세포 잠재성을 실증함을 도시한다. $CD34^+$ HPC는 표준(HEM7) 및 새로운(HEM7.2) 단계 3 배지를 이용하여 분화된 hiPSC로부터 단리되었고, 추가로 SCT의 림프 증식 배지(LP) 배지 및 T 세포 성숙(TM) 배지에서 배양되었으며, 따라서 이는 적절한 항체를 이용하여 염색 및 유세포분석 후 평가된 바와 같이 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 이중 양성 T 세포를 생산할 수 있었고 CD3을 발현하였다. NIH2 세포주(n2)로부터의 산출량을 나타내었다.

도 9는 HEM7(도 9a) 또는 HEM7.2(도 9b)를 사용하여 분화로부터 생산된 T 세포에 의한 항원-특이적 사멸화를 도시한다. 표준(HEM7) 및 새로운(HEM7.2) 단계 3 조건 둘 다로부터의 단리된 $CD34^+$ HPC는 제16일에 수합되었다. 전형적으로, 세포는 T 세포 증식(LP) 배지를 위한 SCT 전매(proprietary) 배지에서 배양된 다음, MAGE-A4로 형질도입되거나(TD) 형질도입되지 않았다(NTD). 그 후에, 유래된 T 세포는 T 세포 성숙(TM) 배지 및 활성화제(S6)와 함께 추가 단계 6 배지에서 배양되었다. 성숙 T 세포는 KILR 검정에서 평가되었다. 결과는, 표준(HEM7) 및 새로운(HEM7.2) 단계 3 조건으로부터 생산된 T 세포에 의한 항원-특이적 사멸화를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명은 조혈 전구 세포(HPC)로의 혈액 생성 내피 세포(HEC)의 분화를 구동할 수 있는 분화 인자의 정의된 세트를 포함하는 정의된 배양 배지의 개발에 관한 것이다. 예를 들어, 본 발명의 배지(SV)는 단지 2개의 분화 인자(SCF 및 VEGF)를 함유할 수 있거나; 본 발명의 배지(HEM7.2)는 단지 7개의 분화 인자(VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6 및 IGF-1)를 함유할 수 있거나; 본 발명의 배지(HEM7.3)는 단지 8개의 분화 인자(VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 및 IL-7)를 함유할 수 있다. 기존의 조혈 유도 배지는 다수의 분화 인자를 함유하고 있어서, 이의 사용을 비경제적으로 만들고 규모 증가를 어렵게 한다. 더 적은 수의 분화 인자의 사용은 본원에 기술된 배지를 더 경제적으로 만들고 규모 증가를 더 용이하게 할 수 있다. 본 발명의 배지를 사용하여 생성된 HPC는 예를 들어, 면역치료법에 사용하기 위한 T 세포의 생성에 유용할 수 있다.

[0036] HEC는, 조혈 잠재성을 갖고 있고 적절한 조건 하에 조혈 계통으로 분화할 수 있는 부분적으로 분화된 내피 전구 세포이다. HEC는 CD34를 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, HEC는 CD73 또는 CXCR4(CD184)를 발현하지 않을 수 있다. 예를 들어, HEC는 표현형 CD34+ CD73- 또는 표현형 CD34+ CD73- CXCR4-를 가질 수 있다. 적합한 HEC는 CD34 선택에 의해 단리될 수 있다.

[0037] HEC는 HEC의 집단을 본 발명의 조혈 유도 배지에서 배양함으로써 HPC로 분화될 수 있다.

[0038] 적합한 조혈 유도 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117) 또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로 및/또는 (ii) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로, 바람직하게는 VEGFR2 또는 VEGFR2 매개 신호전달 경로를 자극시킬 수 있다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 분화 인자: VEGF-A 및/또는 SCF를 포함할 수 있다.

[0039] 바람직하게는 조혈 유도 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117) 또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로와 (ii) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로, 바람직하게는 VEGFR2 또는 VEGFR2 매개 신호전달 경로를 둘 다 자극시킨다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 분화 인자: VEGF-A 및 SCF를 포함할 수 있다.

[0040] 일부 구현예에서, 적합한 조혈 유도 배지는 (a) cKIT 수용체(CD117) 및/또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (b) VEGFR 및/또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (c) MPL(CD110) 및/또는 MPL(CD110) 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (d) *FLT3* 및/또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (e) *IGF1R 및/또는 IGF1R* 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (f) 인터루킨(IL) 활성을 표시할 수 있다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 분화 인자: VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, 및 IL-6을 포함할 수 있거나(표 3 참조); 조혈 유도 배지는 분화 인자: VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, IL-6, 및 IL-7을 포함할 수 있다(표 4 참조).

[0041] 적합한 조혈 유도 배지의 예는 표 3(HEM7.2) 및 표 4(HEM7.3)에 나타나 있다.

[0042] 혈관 내피 성장 인자(VEGF)는, VEGFR 티로신 키나제 수용체에 결합하고 혈관형성(vasculogenesis) 및 혈관신생(angiogenesis)을 자극시키는 PDGF 계열(family)의 단백질 인자이다. 적합한 VEGF는 VEGF 계열의 임의의 구성원, 예를 들어 VEGF-A 내지 VEGF-D 및 PGF 중 임의의 하나를 포함한다. 바람직하게는, VEGF는 VEGF-A(VEGF, NCBI 유전자 ID: 7422, 핵산 서열 NM_001025366.2, 아미노산 서열 NP_001020537.2로도 알려져 있음)이다. 바람

직하게는, VEGFR 매개 신호전달 경로는 VEGFR2(KDR/Flk-1) 매개 신호전달 경로이다. VEGF는 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 HE 유도 배지 내 VEGF의 농도는 1 내지 100 ng/ml, 예를 들어 약 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 15 ng/ml일 수 있다.

[0043] 조혈 유도 배지의 일부 예에서, VEGF는 VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시키는 VEGF 활성화제 또는 작용제에 의해 대체될 수 있다. 적합한 VEGF 활성화제는 당업계에 알려져 있고, 단백질, 예컨대 그렘린(gremlin)(문헌[Mitola 등 (2010) Blood 116(18) 3677-3680]) 핵산, 예컨대 shRNA(예를 들어 문헌[Turunen 등 Circ Res. 2009 Sep 11; 105(6):604-9]), CRISPR-기초 플라스미드(예를 들어 VEGF CRISPR 활성화 플라스미드; Santa Cruz Biotech, USA), 항체 및 저분자를 포함한다.

[0044] 줄기세포 인자(SCF)는 cKIT 수용체(KIT 수용체 티로신 키나제; CD117; SCFR)에 결합하는 사이토카인이고, 조혈 작용(haematopoiesi)에 관여한다. SCF(KITLG라고도 함, NCBI 유전자 ID: 4254)는 기준 핵산 서열 NM_000899.5 또는 NM_03994.5 및 기준 아미노산 서열 NP_000890.1 또는 NP_003985.5를 가질 수 있다. SCF는 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 HE 유도 배지 내 SCF의 농도는 1 내지 1000 ng/ml, 예를 들어 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 100 ng/ml일 수 있다.

[0045] 트롬보포이에틴(TPO)은 혈소판 생성을 조절하는 당단백질 호르몬이다. TPO(THPO라고도 함, NCBI 유전자 ID: 7066)는 기준 핵산 서열 NM_000460.4 및 기준 아미노산 서열 NP_000451.1을 가질 수 있다. TPO는 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 조혈 유도 배지 내 TPO의 농도는 3 내지 300 ng/ml, 예를 들어 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 27, 30, 32, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275 또는 300 ng/ml 임의의 것, 바람직하게는 약 30 ng/ml일 수 있다.

[0046] Flt3 리간드(Fms-관련 티로신 키나제 3 리간드 또는 FLT3L)는 FLT3 수용체에 결합하고 전구 세포의 증식 및 분화를 자극시키는 조혈 활성을 갖는 사이토카인이다. Flt3 리간드(FLT3LG라고도 함, NCBI 유전자 ID: 2323)는 기준 핵산 서열 NM_001204502.2 및 기준 아미노산 서열 NP_001191431.1을 가질 수 있다. Flt3은 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 조혈 유도 배지 내 Flt3 리간드의 농도는 0.25 내지 250 ng/ml, 예를 들어 약 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 또는 240 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 25 ng/ml일 수 있다.

[0047] 인터루킨(IL)은 면역 발달 및 기능에서 주요 역할을 하는 사이토카인이다. 조혈 유도 배지에서 IL은 IL-3, IL-6, 및 IL-7을 포함할 수 있다.

[0048] IL-3(IL3 또는 MCGF라고도 함, NCBI 유전자 ID: 3562)은 기준 핵산 서열 NM_000588.4 및 기준 아미노산 서열 NP_000579.2를 가질 수 있다. IL-3은 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 조혈 유도 배지 내 IL-3의 농도는 0.25 내지 250 ng/ml, 예를 들어 약 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 또는 240 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 25 ng/ml일 수 있다.

[0049] IL-6(IL6 또는 HGF라고도 함, NCBI 유전자 ID: 3569)는 기준 핵산 서열 NM_000600.5 및 기준 아미노산 서열 NP_000591.5를 가질 수 있다. IL-6은 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 조혈 유도 배지 내 IL-6의 농도는 0.1 내지 100 ng/ml, 예를 들어 약 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 10 ng/ml일 수 있다.

[0050] IL-7(IL7이라고도 함, NCBI 유전자 ID: 3574)은 기준 핵산 서열 NM_000880.4 및 기준 아미노산 서열 NP_000871.1을 가질 수 있다. IL-7은 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 조혈 유도 배지 내 IL-7의 농도는 0.1 내지 100 ng/ml, 예를 들어 약 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25,

30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 10 ng/ml일 수 있다.

[0051] 인슐린-유사 성장 인자 1(IGF-1)은 티로신 키나제 IGF-1 수용체(IGF1R) 및 인슐린 수용체에 결합하고 다수의 신호전달 경로를 활성화시키는 호르몬이다. IGF-1(IGF 또는 MGF라고도 함, NCBI 유전자 ID: 3479)은 기준 핵산 서열 NM_000618.5 및 기준 아미노산 서열 NP_000609.1을 가질 수 있다. IGF-1은 상업적인 공급원(예를 들어 R&D Systems, USA)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 조혈 유도 배지 내 IGF-1의 농도는 0.25 내지 250 ng/ml, 예를 들어 약 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230 또는 240 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 25 ng/ml일 수 있다.

[0052] 적합한 조혈 유도 배지는 (a) SMAD1, 5 및 9 매개 신호전달 경로, 예를 들어 골 형태형성 단백질(BMP; Bone Morphogenic Protein), 예컨대 BMP4; (b) 헤지호그(Hedgehog) 신호전달 경로, 예컨대 소닉 헤지호그(SHH; Sonic Hedgehog); (c) EpoR 매개 신호전달 경로, 예컨대 에리트로포이에틴(EPO); 및/또는 (d) AGTR2 매개 신호전달 경로, 예컨대 안지오텐신을 자극시키는 분화 인자가 결여될 수 있다. 적합한 조혈 유도 배지는 AGTR1(안지오텐신 II 유형 1 수용체(AT_1)) 매개 신호전달 경로를 저해하는 분화 인자, 예를 들어 안지오텐신 II 유형 1 수용체(AT_1) 길항제(ARB), 예컨대 로사르탄(2-부틸-4-클로로-1-{[2'-(1H-테트라졸-5-일)-4-비페닐일]메틸}-1H-이미다졸-5-일)메탄올); 및 섬유아세포 성장 인자(FGF) 활성을 갖는 분화 인자, 예를 들어 FGF, 예컨대 bFGF(FGF2)가 결여될 수 있다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 BMP, FGF. SHH, EPO; 안지오텐신 및 로사르탄이 없을 수 있다.

[0053] 바람직하게는, 조혈 유도 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 유효량의 VEGF, 예를 들어 15 ng/ml; 및 SCF, 예를 들어 100 ng/ml이 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있다. 조혈 유도 배지의 다른 예는 유효량의 VEGF, 예를 들어 15 ng/ml; SCF, 예를 들어 100 ng/ml; 트롬보포이에틴(TPO), 예를 들어 30 ng/ml; Flt3 리간드(Flt3L), 예를 들어 25 ng/ml; IL-3, 예를 들어 25 ng/ml; IL-6, 예를 들어 10 ng/ml; IGF-1, 예를 들어 25 ng/ml; 및 선택적으로 IL-7, 예를 들어 10 ng/ml로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있다. 적합한 조혈 유도 배지는 다른 분화 인자가 없을 수 있다. 예를 들어, 조혈 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있으며, 여기서, 하나 이상의 분화 인자는 SCF 및/또는 VEGF로 구성된다(즉, 배지는 SCF 및 VEGF 이외의 임의의 분화 인자를 함유하지 않음). 조혈 유도 배지의 다른 예는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있으며, 여기서, 하나 이상의 분화 인자는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 및 IL-7로 구성된다(즉, 배지는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6 및 IGF-1; 또는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 및 IL-7 이외의 임의의 분화 인자를 함유하지 않음).

[0054] 적합한 화학적으로 정의된 영양분 배지는 아래에 기술되고, StemPro™-34 PLUS(ThermoFisher Scientific) 또는 기본(basal) 배지, 예컨대 아래에 기술된 바와 같이 알부민, 인슐린, 셀레늄 트랜스페린 및 지질로 보충된 IMDM을 포함한다.

[0055] HEC는 조혈 유도 배지에서 8-35일, 바람직하게는 12-28일 또는 16-28일, 예를 들어 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 또는 27일 중 임의의 것, 예를 들어 약 16일 동안 배양되어, HPC의 집단을 생성할 수 있다.

[0056] HPC(조혈 줄기 및 전구 세포 또는 HSPC라고도 함)는, 조혈 계통으로 약속되고(committed) 단핵구, B 세포, NK 세포, NKT 세포 및 T 세포를 포함하여 골수(myeloid) 및 림프 계통을 포함한 모든 혈액 세포 유형으로의 추가 조혈 분화를 할 수 있는 다분화능(multipotent) 줄기세포이다. HPC는 CD34를 발현할 수 있으며, 즉, HPC는 CD34+ 표현형을 표시할 수 있다.

[0057] 일부 구현예에서, HPC는 티모시스틱 HPC(tHPC; thymocytic HPC)를 포함할 수 있다. 티모시스틱 HPC는 티모시스틱 계통으로 약속되고(즉, 초기 티모시스틱 세포) T 세포로의 추가 분화를 할 수 있는 전구 세포이다. tHPC는 CD34 및 CD7을 발현할 수 있으며, 즉, tHPC는 CD34+CD7+ 표현형을 표시할 수 있다.

[0058] HPC는 CD117, CD133, CD45 및 FLK1(KDR 또는 VEGFR2로도 알려져 있음)을 공동발현할 수 있고, CD38 및 다른 계통 특이적 마커의 발현에 대해 음성일 수 있다. 예를 들어, HPC는 하나 이상의, 바람직하게는 모든 CD34+ CD133+ CD45+ FLK1+ CD38-를 표시할 수 있다. 티모시스틱 HPC는 하나 이상의, 바람직하게는 모든 CD34+ CD7+

CD133+ CD45+ FLK1+ CD38-를 표시할 수 있다.

[0059] 본원에 기술된 방법은 본원에 기술된 바와 같은 HPC를 생성하는 방법에 사용하기 위한 HEC의 집단을 제공하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 HEC는 시험관내에서(*in vitro*) 유도 만능 줄기세포(iPSC)로부터 생성된다. 예를 들어, iPSC는 중배엽 단계를 포함한 2-단계 과정을 사용하여 HEC로 분화될 수 있다. 예를 들어, 방법은

[0060] (i) iPSC의 집단을 중배엽 세포로 분화시키는 단계, 및

[0061] (ii) 중배엽 세포를 HEC로 분화시키는 단계

[0062] 를 포함할 수 있다.

[0063] 방법은 추가로, (iii) 본원에 기술된 바와 같은 조혈 유도 배지를 사용하여 HEC를 HPC의 집단으로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0064] 유도 만능 줄기세포(iPSC)는 비-만능성(non-pluripotent), 완전히 분화된 공여자 또는 선조(antecedent) 세포로부터 유래되는 만능성 세포이다. iPSC는 시험관내에서(*in vitro*) 자가-재생하고 미분화된 표현형을 나타낼 수 있으며, 잠재적으로 임의의 3개의 배엽층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)의 임의의 태아 또는 성인 세포 유형으로 분화할 수 있다. iPSC의 집단은 클론적이며, 즉, 단일의 공통 조상(ancestor) 세포로부터 물려받은(descended) 유전적으로 동일한 세포일 수 있다.

[0065] iPSC는 하기 만능성 관련 마커 중 하나 이상을 발현할 수 있다: POU5f1(Oct4), Sox2, 알칼린 포스파타제, SSEA-3, Nanog, SSEA-4, Tra-1-60, KLF4 및 c-myc, 바람직하게는 POU5f1, NANOG 및 SOX2 중 하나 이상. iPSC는 특이적인 분화적 운명과 관련된 마커, 예컨대 브라커리(Brachury)(T), Sox17, FoxA2, αFP, Sox1, NCAM, GATA6, GATA4, Hand1 및 CDX2가 결여될 수 있다. 특히, iPSC는 내배엽 운명과 관련된 마커가 결여될 수 있다.

[0066] 바람직하게는, iPSC는 인간 IPSC(hiPSC)이다.

[0067] 일부 구현예에서, iPSC는 예를 들어, HLA 유전자 또는 면역원성 또는 GVHD와 관련된 다른 유전자를 비활성화시키거나 결실시키기 위해, 또는 선택적으로 외인성 항원 수용체, 예를 들어 외인성 TCR, CAR 또는 NKCR을 인코딩하는 핵산을 포함하기 위해 유전자 편집될 수 있다.

[0068] IPSC는 공여자 세포로부터 유래되거나 재프로그래밍될 수 있으며, 이러한 공여자 세포는 공급원, 예컨대 공여자 개체로부터 수득되는 체세포 또는 다른 선조 세포일 수 있다. 공여자 세포는 포유류, 바람직하게는 인간 세포일 수 있다. 적합한 공여자 세포는 성인 섬유아세포 및 혈액 세포, 예를 들어 말초 혈액 세포, 예컨대 HPC 또는 단핵 세포를 포함한다.

[0069] 본원에 기술된 바와 같이 iPSC로 재프로그래밍하기에 적합한 공여자 세포는 공여자 개체로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 공여자 개체는, T 세포가 본원에 기술된 바와 같이 생성 후 투여될 수혜자 개체와 동일한 사람일 수 있다(자가유래(autologous) 치료). 다른 구현예에서, 공여자 개체는, T 세포가 본원에 기술된 바와 같이 생성 후 투여될 수혜자 개체와 상이한 사람일 수 있다(동종이계(allogeneic) 치료). 예를 들어, 공여자 개체는 암을 앓고 있는 수혜자 개체와 인간 백혈구 항원(HLA) 매칭되는(기증 전에 또는 후에) 건강한 개체일 수 있다. 대안적으로, 공여자 개체는 수혜자 개체와 HLA 매칭되지 않을 수 있다. 바람직하게는, 공여자 개체는 신생아(갓 태어남)일 수 있으며, 예를 들어 공여자 세포는 제대혈의 시료로부터 수득될 수 있다.

[0070] 적합한 공여자 개체는 바람직하게는 전염성 바이러스(예를 들어 HIV, HPV, CMV) 및 외래성 오염인자(adventitious agent)(예를 들어 박테리아, 미코플라즈마)가 없고, 기지의 유전적 이상(genetic abnormality)이 없다.

[0071] 일부 구현예에서, 재프로그래밍하기 위한 말초 혈액 세포, 예컨대 HPC의 집단은 공여자 개체로부터 수득된 혈액 시료, 바람직하게는 탯줄 시료로부터 단리될 수 있다. HPC 및 다른 말초 혈액 세포의 단리에 적합한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어 자기 활성화된 세포 분류(예를 들어, 문헌[Gaudernack 등 1986 J Immunol Methods 90 179] 참조), 형광 활성화된 세포 분류(FACS: 예를 들어, 문헌[Rheinherz 등 (1979) PNAS 76 4061] 참조), 및 세포 패닝(cell panning)(예를 들어, 문헌[Lum 등 (1982) Cell Immunol 72 122] 참조)을 포함한다. HPC는 혈액 세포의 시료에서 CD34의 발현에 의해 식별될 수 있다. 다른 구현예에서, 재프로그래밍하기 위한 섬유아세포의 집단은 콜라게나제 또는 트립신을 사용한 분산 후 피부 생검으로부터 단리되고 적절한 세포 배양 조건에서 과성장할 수 있다.

[0072] 일부 구현예에서, iPSC는 항원-특이적 T 세포로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, T 세포는, 부류 1 MHC와의 복합체에서 표시되는 항원, 예컨대 종양 항원에 결합하는 TCR, 예컨대 αβ TCR을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. iPSC의 생산에 사용하기 위한 항원-특이적 T 세포는, 항원 제시 세포, 예컨대 수지상 세포의 표면 상의 부류 I 또는 II MHC 분자 상에서 표시되는 표적 항원으로부터의 펩타이드 에피토프를 이용하여 T 세포의 다양한 집단을 스크리닝함으로써 또는 암 환자로부터의 종양 시료로부터 단리함으로써 수득될 수 있다.

[0073] 공여자 세포는 전형적으로, 세포 내로의 재프로그래밍 인자, 예컨대 Oct4, Sox2 및 Klf4의 도입에 의해 iPSC로 재프로그래밍된다. 재프로그래밍 인자는 단백질 또는 인코딩 핵산일 수 있고, 플라스미드, 트랜스포존(transposon) 또는 더 바람직하게는 바이러스 형질주입 또는 직접 단백질 전달을 포함한 임의의 적합한 기법에 의해 분화된 세포 내로 도입될 수 있다. 다른 재프로그래밍 인자, 예를 들어 Klf 유전자, 예컨대 Klf-1, Klf-2, Klf-4 및 Klf-5; Myc 유전자, 예컨대 C-myc, L-myc 및 N-myc; Nanog; SV40 큰(Large) T 항원; Lin28; 및 짧은 헤어핀(shRNA) 표적화 유전자, 예컨대 p53이 또한 세포 내로 도입되어, 유도 효율을 증가시킬 수 있다. 재프로그래밍 인자의 도입 후, 공여자 세포는 배양될 수 있다. 만능성 마커를 발현하는 세포는 단리되고/거나 정제되어 iPSC의 집단을 생성할 수 있다. iPSC의 생성을 위한 기법은 당업계에 잘 알려져 있다(문헌[Yamanaka 등 Nature 2007; 448:313-7]; 문헌[Yamanaka 6 2007 Jun 7; 1(1):39-49]; 문헌[Kim 등 Nature. 2008 Jul 31; 454(7204):646-50]; 문헌[Takahashi Cell. 2007 Nov 30; 131(5):861-72]; 문헌[Park 등 Nature. 2008 Jan 10; 451(7175):141-6]; 문헌[Kimet 등 Cell Stem Cell. 2009 Jun 5; 4(6):472-6]; 문헌[Vallier, L., 등 Stem Cells, 2009. 9999(999A): p. N/A]; 문헌[Baghbaderani 등 2016; Stem Cell Rev. 2016 Aug; 12(4):394-420]; 문헌[Baghbaderani 등 (2015) Stem Cell Reports, 5(4), 647-659]).

[0074] 종래의 기법은 iPSC의 배양 및 유지에 이용될 수 있다(문헌[Vallier, L. 등 Dev. Biol. 275, 403-421 (2004)], 문헌[Cowan, C.A. 등 N. Engl. J. Med. 350, 1353-1356 (2004)], 문헌[Joannides, A. 등 Stem Cells 24, 230-235 (2006)], 문헌[Klimanskaya, I. 등 Lancet 365, 1636-1641 (2005)], 문헌[Ludwig, T.E. 등 Nat. Biotechnol. 24, 185-187 (2006)]). 본 방법에 사용하기 위한 iPSC는 정의된 조건에서 피더 세포 상에서 성장될 수 있다. 예를 들어, iPSC는 통상 배양 접시에서 피더 세포, 예컨대 방사선조사된 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 층 상에서 적절한 밀도(예를 들어 10^5 내지 10^6개 세포/60 mm 접시)에서, 또는 적절한 기재(substrate) 상에서, 피더 조건화된 또는 정의된 iPSC 유지 배지에서 배양될 수 있다. 본 방법에 사용하기 위한 iPSC는 효소적 또는 기계적 수단에 의해 계대배양될 수 있다. 일부 구현예에서, iPSC는 matrigel™ 또는 ECM 단백질, 예컨대 비트로넥틴 상에서, iPSC 유지 배지, 예컨대 mTeSR™1 또는 TeSR™2(StemCell Technologies) 또는 E8 flex(Life Thermo) 배양 배지에서 계대배양될 수 있다.

[0075] 본원에 기술된 방법의 단계에서 세포 집단의 분화 및 성숙은 분화 인자의 세트로 보충된 배양 배지에서 세포를 배양함으로써 유도된다. 각각의 배양 배지에 대해 나열된 분화 인자의 세트는 바람직하게는 완전(exhaustive)하고, 배지는 다른 분화 인자가 없을 수 있다. 바람직한 구현예에서, 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 예를 들어, 배양 배지는 아래 기술된 바와 같이 유효량의 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있다. 화학적으로 정의된 영양분 배지는 하나 이상의 무혈청 배양 배지 보충제로 보충된 기본 배지를 포함할 수 있다.

[0076] 분화 인자는, 포유류 세포에서 분화를 매개하는 신호전달 경로를 조절하는, 예를 들어 촉진하거나 저해하는 인자이다. 분화 인자는 액티빈/Nodal, FGF, Wnt 또는 BMP 또는 이의 신호전달 경로 중 하나 이상을 조절하는 성장 인자, 사이토카인 및 저분자를 포함할 수 있다. 분화 인자의 예는 액티빈/Nodal, FGF, BMP, 레티노산, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 줄기세포 인자(SCF), TGFβ 리간드, GDF, LIF, 인터루킨, GSK-3 저해제, 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 저해제, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, 및 인터루킨, 예컨대 IL-3, IL-6, 및 IL-7을 포함한다.

[0077] 본원에 기술된 배지 중 하나 이상에서 사용되는 분화 인자는 TGFβ 리간드, 예컨대 액티빈, 섬유아세포 성장 인자(FGF; fibroblast growth factor), 골 형태형성 단백질(BMP; bone morphogenetic protein), 줄기세포 인자(SCF; stem cell factor), 혈관 내피 성장 인자(VEGF; vascular endothelial growth factor), GSK-3 저해제(예컨대 CHIR-99021), 인터루킨, 및 호르몬, 예컨대 IGF-1, TPO 및 안지오텐신 II를 포함한다. 분화 인자는, 배지에서 배양되는 세포에서 신호전달 경로를 조절하기에 효과적인 양으로 본원에 기술된 배지에 존재할 수 있다.

[0078] 일부 구현예에서, 상기 또는 아래에 나열된 분화 인자는 동일한 신호전달 경로 상에서 동일한 효과(즉, 자극 또는 저해)를 갖는 인자에 의해 배양 배지에서 대체될 수 있다. 적합한 인자는 당업계에 알려져 있고, 단백질, 핵

산, 항체 및 저분자를 포함한다.

[0079] 각각의 단계 동안 세포 집단의 분화의 정도(extent)는 분화중인 세포의 집단에서 하나 이상의 세포 마커의 발현을 모니터링하고/거나 검출함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 더 분화된 세포 유형의 특징적인 마커의 발현 증가 또는 덜 분화된 세포 유형의 특징적인 마커의 발현 저하가 결정될 수 있다. 세포 마커의 발현은 면역세포화학, 면역형광, RT-PCR, 면역블로팅, 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 및 효소적 분석을 포함한 임의의 적합한 기법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 본원에서 마커를 발현하지 않는 것으로 언급된 세포는 마커 유전자의 활성 전사 및 세포내 발현을 표시할 수 있으나, 마커의 검출 가능한 수준은 세포의 표면 상에 존재하지 않을 수 있다.

[0080] 부분적으로 분화된 세포, 예를 들어 기능적인 T 세포가 아닌 세포, 예컨대 본원에 기술된 방법의 단계에 의해 생성되는 iPSC, 중배엽, HEC, HPC 전구 T 세포 또는 DP T 세포의 집단은 다음 분화 단계 전에 배양되거나, 유지되거나 확장될 수 있다. 부분적으로 분화된 세포는 임의의 편리한 기법에 의해 확장될 수 있다.

[0081] 각각의 단계 후, 부분적으로 분화된 세포의 집단은 배지에서 배양 후, 1% 이상, 5% 이상, 10% 이상 또는 15% 이상의 부분적으로 분화된 세포를 함유할 수 있다. 필요하다면, 부분적으로 분화된 세포의 집단은 임의의 편리한 기법, 예컨대 MACs 또는 FACS에 의해 정제될 수 있다.

[0082] 세포는 피더 세포의 부재 하에, 세포외 기질 단백질, 예컨대 피브로넥틴, 라미닌 또는 콜라겐으로 코팅된 표면 또는 기재 상에서 단층으로 배양될 수 있다. 세포 배양에 적합한 기법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Basic Cell Culture Protocols, C. Helgason, Humana Press Inc. U.S. (15 Oct 2004) ISBN: 1588295451]; 문헌[Human Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Medicine S.) Humana Press Inc., U.S. (9 Dec 2004) ISBN: 1588292223]; 문헌[Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, R. Freshney, John Wiley & Sons Inc (2 Aug 2005) ISBN: 0471453293], 문헌[Ho WY 등 J Immunol Methods. (2006) 310:40-52], 문헌[Handbook of Stem Cells (ed. R. Lanza) ISBN: 0124366430) Basic Cell Culture Protocols' by J. Pollard 및 J. M. Walker (1997), 'Mammalian Cell Culture: Essential Techniques' by A. Doyle 및 J. B. Griffiths (1997), 'Human Embryonic Stem Cells' by A. Chiu 및 M. Rao (2003), Stem Cells: From Bench to Bedside' by A. Bongso (2005), Peterson & Loring (2012) Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide Academic Press and 'Human Embryonic Stem Cell Protocols' by K. Turksen (2006)]). 배지 및 이의 성분은 상업적인 공급원(예를 들어 Gibco, Roche, Sigma, Europa bioproducts, R&D Systems)으로부터 입수될 수 있다. 표준 포유류 세포 배양 조건, 예를 들어 37℃, 5% 또는 21% 산소, 5% 이산화탄소가 상기 배양 단계에 대해 이용될 수 있다. 배지는 바람직하게는 2일마다 교환되고, 세포는 중력에 의해 침강되도록 놔두어진다.

[0083] 세포는 배양 용기에서 배양될 수 있다. 적합한 세포 배양 용기는 당업계에 잘 알려져 있고, 배양 플레이트, 접시, 플라스크, 생물반응기, 및 다중-웰 플레이트, 예를 들어 6-웰, 12-웰 또는 96-웰 플레이트를 포함한다.

[0084] 배양 용기는 바람직하게는 조직 배양을 위해 예를 들어 용기의 하나 이상의 표면을 세포외 기질 단백질, 예컨대 피브로넥틴, 라미닌 또는 콜라겐으로 코팅함으로써 처리된다. 배양 용기는 표준 기법을 사용하여, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같이 코팅 용액과 함께 인큐베이션함으로써 조직 배양용으로 처리될 수 있거나, 상업적인 공급업체로부터 전처리되어 입수될 수 있다.

[0085] 제1 단계에서, iPSC는 중배엽 분화를 촉진하기에 적합한 조건 하에 iPSC의 집단을 배양함으로써 중배엽 세포로 분화될 수 있다. 예를 들어, iPSC 세포는 제1, 제2 및 제3 중배엽 유도 배지에서 순차적으로 배양되어, 중배엽 세포로의 분화를 유도할 수 있다.

[0086] 적합한 제1 중배엽 유도 배지는 (i) SMAD2 및 SMAD3 또는 (ii) SMAD2 및 SMAD3 매개 신호전달 경로를 자극시킬 수 있다. 예를 들어, 제1 중배엽 유도 배지는 액티빈을 포함할 수 있다.

[0087] 적합한 제2 중배엽 유도 배지는 (i) (a) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 또는 (b) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (ii) 섬유아세포 성장 인자(FGF) 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 제2 중배엽 유도 배지는 액티빈, 바람직하게는 액티빈 A, BMP, 바람직하게는 BMP4 및 FGF, 바람직하게는 bFGF를 포함할 수 있다.

[0088] 적합한 제3 중배엽 유도 배지는 (i) (a) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 또는 (b) SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 및 SMAD9 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (ii) 섬유아세포 성장 인자(FGF) 활성을 갖고, (iii) 글리코겐 생성효소 키나제 3β를 저해할 수 있다. 예를 들어, 제3 중배엽 유도 배지는 액티빈, 바람직하게는 액티빈

A, BMP, 바람직하게는 BMP4, FGF, 바람직하게는 bFGF, 및 GSK3 저해제, 바람직하게는 CHIR99021을 포함할 수 있다.

[0089] 제1, 제2 및 제3 중배엽 유도 배지는 상기 제시된 분화 인자 이외의 분화 인자가 없을 수 있다.

[0090] SMAD2 및 SMAD3 매개 세포내 신호전달 경로는 제1 TGFβ 리간드의 배지에서의 존재를 통해 제1, 제2 및 제3 중배엽 유도 배지에 의해 자극될 수 있다. 제1 TGFβ 리간드는 액티빈일 수 있다. 액티빈(액티빈 A: NCBI 유전자 ID: 3624 핵산 기준 서열 NM_002192.2 GI: 62953137, 아미노산 기준 서열 NP_002183.1 GI: 4504699)은 액티빈/Nodal 경로의 자극을 통해 광범위한 세포성 효과를 발휘하는 다이머성 폴리펩타이드이다(문헌[Vallier 등, Cell Science 118:4495-4509 (2005)]). 액티빈은 상업적인 공급원(예를 들어 Stemgent Inc. MA USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)으로부터 쉽게 입수 가능하다. 편리하게는, 본원에 기술된 배지 내 액티빈의 농도는 1 내지 100 ng/ml, 예를 들어 약 3, 5, 7, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 5 내지 50 ng/ml일 수 있다.

[0091] 제2 및 제3 중배엽 유도 배지의 섬유아세포 성장 인자(FGF) 활성은 배지에서 섬유아세포 성장 인자(FGF)의 존재에 의해 제공될 수 있다. 섬유아세포 성장 인자(FGF)는 섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR)에 결합함으로써 세포성 성장, 증식 및 세포성 분화를 자극시키는 단백질 인자이다. 적합한 섬유아세포 성장 인자는 FGF 계열의 임의의 구성원, 예를 들어 FGF1 내지 FGF14 및 FGF15 내지 FGF23 중 임의의 하나를 포함한다. 바람직하게는, FGF는 FGF2(bFGF로도 알려져 있음, NCBI 유전자 ID: 2247, 핵산 서열 NM_002006.3 GI: 41352694, 아미노산 서열 NP_001997.4 GI: 41352695); FGF7(각질형성세포(keratinocyte) 성장 인자(또는 KGF)로도 알려져 있음, NCBI 유전자 ID: 2247, 핵산 서열 NM_002006.3 GI: 41352694, 아미노산 서열 NP_001997.4 GI: 41352695); 또는 FGF10(NCBI 유전자 ID: 2247, 핵산 서열 NM_002006.3 GI: 41352694, 아미노산 서열 NP_001997.4 GI: 413526955)이다. 가장 바람직하게는, 섬유아세포 성장 인자는 FGF2이다.

[0092] 편리하게는, 본원에 기술된 배지 내 FGF, 예컨대 FGF2의 농도는 0.5 내지 50 ng/ml, 예를 들어 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 5 ng/ml일 수 있다. 섬유아세포 성장 인자, 예컨대 FGF2, FGF7 및 FGF10은 일상적인 재조합 기법을 사용하여 생성되거나 상업적인 공급업체(예를 들어 R&D Systems, Minneapolis, MN; Stemgent Inc, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)로부터 수득될 수 있다.

[0093] SMAD1, SMAD5 및 SMAD9 매개 세포내 신호전달 경로는 제2 TGFβ 리간드의 배지에서의 존재를 통해 제2 및 제3 중배엽 유도 배지에 의해 자극될 수 있다.

[0094] 제2 TGFβ 리간드는 골 형태형성 단백질(BMP)일 수 있다. 골 형태형성 단백질(BMP)은 골 형태형성 단백질 수용체(BMPR)에 결합하고, SMAD1, SMAD5 및 SMAD9에 의해 매개되는 경로를 통해 세포내 신호전달을 자극시킨다. 적합한 골 형태형성 단백질은 BMP 계열의 임의의 구성원, 예를 들어 BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6 또는 BMP7을 포함한다. 바람직하게는 제2 TGFβ 리간드는 BMP2(NCBI 유전자 ID: 650, 핵산 서열 NM_001200.2 GI: 80861484; 아미노산 서열 NP_001191.1 GI: 4557369) 또는 BMP4(NCBI 유전자 ID: 652, 핵산 서열 NM_001202.3 GI: 157276592; 아미노산 서열 NP_001193.2 GI: 157276593)이다. 적합한 BMP는 BMP4를 포함한다. 편리하게는, 본원에 기술된 배지 내 골 형태형성 단백질, 예컨대 BMP2 또는 BMP4의 농도는 1 내지 500 ng/ml, 예를 들어 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 ng/ml 중 임의의 것, 바람직하게는 약 10 ng/ml일 수 있다. BMP는 일상적인 재조합 기법을 사용하여 생성되거나 상업적인 공급업체(예를 들어 R&D, Minneapolis, USA, Stemgent Inc, USA; Miltenyi Biotec Gmbh, DE)로부터 입수될 수 있다.

[0095] 제3 중배엽 유도 배지의 GSK3β 저해 활성은 배지에서 GSK3β 저해제의 존재에 의해 제공될 수 있다. GSK3β 저해제는 글리코겐 생성효소 키나제 3β(유전자 ID 2932: EC2.7.11.26)의 활성을 저해한다. 바람직한 저해제는 글리코겐 생성효소 키나제 3β의 활성을 특이적으로 저해한다. 적합한 저해제는 CHIR99021(*6-((2-((4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-메틸-1H-이미다졸-2-일)피리미딘-2-일)아미노)에틸)아미노)니코티노니트릴*; 문헌[Ring D. B. 등, Diabetes, 52:588-595 (2003)]) 알스테르파울론(alsterpaullone), 켄파울론(kenpaullone), BIO(6-브로모인디루빈-3'-옥심(문헌[Sato 등 Nat Med. 2004 Jan;10(1):55-63]), SB216763(*3-(2,4-디클로로페닐)-4-(1-메틸-1H-인돌-3-일)-1H-피롤-2,5-디온*), 리튬 및 SB415286(*3-[(3-클로로-4-하이드록시페닐)아미노]-4-(2-니트로페닐)-1H-피롤-2,5-디온;* 문헌[Coghlan 등 Chem Biol. 2000 Oct;7(10):793-803])을 포함한다. 일부 바람직한 구현예에서, GSK3β 저해제는 CHIR99021이다. 적합한 글리코겐 생성효소 키나제 3β 저해제는 상업적인 공급업체(예를 들어 Stemgent Inc. MA USA; Cayman Chemical Co. MI USA; Selleckchem, MA USA)로부터 입수될 수 있

다. 예를 들어, 제3 중배엽 유도 배지는 0.1 내지 100 μM, 예를 들어 약 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 95 μM 중 임의의 것, 바람직하게는 약 10 μM의 GSK3β 저해제, 예컨대 CHIR99021을 함유할 수 있다.

[0096] 바람직한 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 중배엽 유도 배지는 화학적으로 정의된 배지(CDM)이다. 예를 들어, 제1 중배엽 유도 배지는 유효량의 액티빈, 바람직하게는 액티빈 A, 예를 들어 50 ng/ml 액티빈 A로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있으며; 제2 중배엽 유도 배지는 유효량의 액티빈, 바람직하게는 액티빈 A, 예를 들어 5 ng/ml 액티빈 A, BMP, 바람직하게는 BMP4, 예를 들어 10 ng/ml BMP4; 및 FGF, 바람직하게는 bFGF(FGF2), 예를 들어 5 ng/ml bFGF로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있고; 제3 중배엽 유도 배지는 유효량의 액티빈, 바람직하게는 액티빈 A, 예를 들어 5 ng/ml 액티빈 A, BMP, 바람직하게는 BMP4, 예를 들어 10 ng/ml BMP4; FGF, 바람직하게는 bFGF(FGF2), 예를 들어 5 ng/ml bFGF; 및 GSK3 저해제, 바람직하게는 CHIR-99021, 예를 들어 10 μM CHIR-99021로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있다.

[0097] 화학적으로 정의된 배지(CDM)는 단지 명시된 구성요소, 바람직하게는 기지의 화학적 구조를 갖는 구성요소를 함유하는 세포 배양을 위한 영양 용액이다. CDM은 불확정된 구성요소, 예컨대 피더 세포, 간질 세포, 혈청, 및 복잡한 세포외 기질, 예컨대 matrigel™을 포함하는 불확정 구성요소 또는 구성분이 없다. 예를 들어, CDM은 Notch 리간드, 예컨대 DLL1 또는 DLL4를 발현하는 간질 세포, 예컨대 OP9 세포를 함유하지 않는다.

[0098] 화학적으로 정의된 영양분 배지는 화학적으로 정의된 기본 배지를 포함할 수 있다. 적합한 화학적으로 정의된 기본 배지는 Iscove's Modified Dulbecco's 배지(IMDM), Ham's F12, Advanced Dulbecco's 변형된 이글 배지(DMEM)(문헌[Price 등 Focus (2003), 25 3-6]), Williams E(문헌[Williams, G.M. 등 Exp. Cell Research, 89, 139-142 (1974)]), RPMI-1640(문헌[Moore, G.E. 및 Woods L.K., (1976) Tissue Culture Association Manual. 3, 503-508]) 및 StemPro™-34 PLUS(ThermoFisher Scientific)를 포함한다.

[0099] 기본 배지는 배지에서 무혈청 배양 배지 보충제 및/또는 추가 구성요소에 의해 보충될 수 있다. 적합한 보충제 및 추가 구성요소는 상기 기술되어 있고, L-글루타민 또는 치환물, 예컨대 GlutaMAX-1™, 아스코르브산, 모노티오글리세롤(MTG), 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신, 인간 혈청 알부민, 예를 들어 재조합 인간 혈청 알부민, 예컨대 Cellastim™(Merck/Sigma) 및 Recombumin™(albumedix.com), 인슐린, 트랜스페린, 셀레늄(ITS) 및 2-머캅토에탄올을 포함할 수 있다. 기본 배지는 혈청 치환물, 예컨대 넉아웃 혈청 대체물(KOSR; Invitrogen)로 보충될 수 있다.

[0100] iPSC는 제1 중배엽 유도 배지에서 1 내지 12시간, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12시간 중 임의의 시간, 바람직하게는 약 4시간 동안 배양된 다음; 제2 중배엽 유도 배지에서 30 내지 54시간, 예를 들어 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50시간 중 임의의 시간, 바람직하게는 약 44시간 동안 배양된 다음; 제3 중배엽 유도 배지에서 36 내지 60시간, 예를 들어 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 또는 53시간 중 임의의 시간, 바람직하게는 약 48시간 동안 배양되어, 중배엽 세포의 집단을 생성할 수 있다.

[0101] 중배엽 세포는, 중배엽 계통으로 약속되고 적절한 조건 하에 중간엽(mesenchyme)(섬유아세포), 근육, 골, 지방 조직, 혈관 및 조혈계의 모든 세포 유형으로 분화할 수 있는 부분적으로 분화된 전구 세포이다. 중배엽 세포는 하나 이상의 중배엽 마커를 발현할 수 있다. 예를 들어, 중배엽 세포는 브라키어리(Brachyury), 구세코이드, Mixl1, KDR, FoxA2, GATA6 및 PDGFαR 중 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 모든 7개를 발현할 수 있다.

[0102] 제2 단계에서, 중배엽 세포는 혈액 생성 내피(HE) 분화를 촉진하기에 적합한 조건 하에 중배엽 세포의 집단을 배양함으로써 혈액 생성 내피 세포(HEC)로 분화될 수 있다. 예를 들어, 중배엽 세포는 HE 유도 배지에서 배양될 수 있다.

[0103] 적합한 HE 유도 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117)를 자극시키거나 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (ii) VEGFR 또는 VEGFR 매개 신호전달 경로를 자극시킬 수 있다. 예를 들어, HE 유도 배지는 SCF 및 VEGF를 포함할 수 있다.

[0104] SCF 및 VEGF는 상기 기술되어 있다. 적합한 HE 유도 배지는 상기 기술된 조혈 유도 배지를 포함할 수 있다.

[0105] 바람직한 구현예에서, HE 유도 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 예를 들어, HE 유도 배지는 유효량의 VEGF, 예를 들어 15 ng/ml VEGF; 및 SCF, 예를 들어 100 ng/ml SCF로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될

수 있다. 적합한 HE 유도 배지는 하나 이상의 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있으며, 여기서, 하나 이상의 분화 인자는 SCF 및 VEGF로 구성된다(즉, 배지는 SCF 및 VEGF 이외의 임의의 분화 인자를 함유하지 않음)

[0106] 적합한 화학적으로 정의된 영양분 배지는 상기 기술되어 있으며, StemPro™-34 PLUS(ThermoFisher Scientific)를 포함한다.

[0107] 중배엽 세포는 HE 유도 배지에서 2 내지 6일, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 또는 6일 중 임의의 일수(day), 바람직하게는 약 4일 동안 배양되어, HEC의 집단을 생성할 수 있다.

[0108] HEC는 본원에 기술된 바와 같은 조혈 유도 배지에서 배양함으로써 HPC로 분화될 수 있다.

[0109] 일부 바람직한 구현예에서, 동일한 배양 배지는 HE 유도 배지 및 조혈 유도 배지로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이 생성된 중배엽 세포는 HE 유도와 조혈 유도 둘 다를 위해 동일한 배양 배지를 사용하여 HPC, 예컨대 HPC 및/또는 TPC로 분화될 수 있다.

[0110] 본원에 기술된 바와 같은 HEC로부터 HPC의 생산 후, 하나 이상의 세포 표면 마커, 예컨대 CD34, CD7 및/또는 CD45를 발현하는 HPC의 집단은 예를 들어 자기 활성화된 세포 분류(MACS)에 의해 정제된 다음, 추가 분화를 받을 수 있다. 예를 들어, CD34+ HPC, CD34+CD45+ HPC, CD34+CD7+ TPC 또는 CD34+CD45+CD7+ TPC의 집단이 정제될 수 있다.

[0111] HPC의 집단은 HPC, 티모시스틱 HPC 또는 HPC와 티모시스틱 HPC를 둘 다 포함할 수 있다.

[0112] 제4 단계에서, HPC는 림프 분화를 촉진하기에 적합한 조건 하에 HPC의 집단을 배양함으로써 전구 T 세포로 분화될 수 있다. 예를 들어, HPC는 림프 확장 배지(lymphoid expansion medium)에서 배양될 수 있다.

[0113] 림프 확장 배지는, 전구 T 세포로의 HPC의 림프 분화를 촉진하는 세포 배양 배지이다.

[0114] 적합한 림프 확장 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117) 또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (ii) MPL(CD110) 또는 MPL(CD110) 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (iii) *FLT3* 또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (iv) 인터루킨(IL) 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 림프 확장 배지는 분화 인자 SCF, FLT3L, TPO 및 IL7을 포함할 수 있다.

[0115] 바람직한 구현예에서, 림프 확장 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 예를 들어, 림프 확장 배지는 유효량의 상기 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있다. 적합한 림프 확장 배지는 당업계에 잘 알려져 있고, Stemspan™ 림프 확장 보충제(Cat # 9915; Stemcell Technologies Inc, CA)와 함께 Stemspan™ SFEM II(Cat # 9605; Stemcell Technologies Inc, CA)를 포함한다.

[0116] HPC는 전구 T 세포로의 분화 동안 표면 상에서 배양될 수 있다. 예를 들어, HPC는 배양 용기, 비드 또는 다른 생물물질 또는 중합체의 표면 상에서 배양될 수 있다.

[0117] 바람직하게는, 표면은 Notch 신호전달을 자극시키는 인자, 예를 들어 Notch 리간드, 예컨대 델타-유사 1(DLL1) 또는 델타-유사 4(DLL4)로 코팅될 수 있다. 적합한 Notch 리간드는 당업계에 잘 알려져 있고, 상업적인 공급업체로부터 입수 가능하다.

[0118] 표면은 또한, 세포외 기질 단백질, 예컨대 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌 또는 콜라겐 및/또는 하나 이상의 세포 표면 접착 단백질, 예컨대 VCAM1로 코팅될 수 있다.

[0119] 일부 구현예에서, HPC 배양을 위한 표면은, Notch 신호전달을 자극시키는 인자, 예를 들어 Notch 리간드, 예컨대 DLL4, 세포외 기질 단백질, 예컨대 비트로넥틴, 및 세포 표면 접착 단백질, 예컨대 VCAM1을 포함하는 코팅을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, HPC 배양을 위한 표면은, 세포외 기질 단백질 또는 세포 표면 접착 단백질 없이 Notch 신호전달을 자극시키는 인자, 예를 들어 Notch 리간드, 예컨대 DLL4를 포함하는 코팅을 가질 수 있다.

[0120] 표면은, 표면을 코팅 용액과 접촉시킴으로써 세포외 기질 단백질, Notch 신호전달을 자극시키는 인자, 및 세포 표면 접착 단백질로 코팅될 수 있다. 예를 들어, 코팅 용액은 표면을 코팅하기에 적합한 조건 하에 표면 상에서 인큐베이션될 수 있다. 조건은 예를 들어, 실온에서 약 2시간을 포함할 수 있다. 세포외 기질 단백질, 및 Notch 신호전달을 자극시키는 인자를 포함하는 코팅 용액은 상업적인 공급업체(StemSpan™ 림프 분화 코팅 물질; Cat # 9925; Stem Cell Technologies Inc, CA)로부터 입수 가능하다.

[0121] HPC는 HPC를 전구 T 세포로 분화시키기에 충분한 시간 동안 기재 상의 림프확장 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, HPC는 2-6주, 2-5주 또는 2-4주, 바람직하게는 3주 동안 배양될 수 있다.

[0122] 전구 T 세포는 αβ T 세포, γδ T 세포, 조직 체류 T 세포 및 NK T 세포를 발생시킬 수 있는 다분화능 림프구 형성(lymphopoietic) 전구 세포이다. 전구 T 세포는 흉선에서 pre-TCR 선택 후 αβ T 세포 계통으로 약속될 수 있다. 전구 T 세포는 생체내 흉선 콜로니화를 할 수 있고, 흉선에서 pre-TCR 선택 후 αβ T 세포 계통으로 약속될 수 있다. 전구 T 세포는 또한 사이토카인-생성 $CD3^+$ T-세포로 성숙될 수 있다.

[0123] 전구 T 세포는 CD5 및 CD7을 발현할 수 있으며, 즉, 전구 T 세포는 CD5+CD7+ 표현형을 가질 수 있다. 전구 T 세포는 또한 CD44, CD25 및 CD2를 또한 공동발현할 수 있다. 예를 들어, 전구 T 세포는 CD5+, CD7+ CD44+, CD25+ CD2+ 표현형을 가질 수 있다. 전구 T 세포는 CD45를 또한 공동발현할 수 있다. 전구 T 세포는 CD3, CD4 및 CD8의 발현, 예를 들어 세포 표면 발현이 결여될 수 있다.

[0124] 제5 단계에서, 전구 T 세포는, T 세포 성숙을 촉진하기에 적합한 조건 하에 전구 T 세포의 집단을 배양함으로써 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포로 성숙될 수 있다. 예를 들어, 전구 T 세포는 T 세포 성숙 배지에서 배양될 수 있다.

[0125] T 세포 성숙 배지는 성숙 T 세포로의 전구 T 세포의 성숙을 촉진하는 세포 배양 배지이다. 적합한 T 세포 성숙 배지는 (i) cKIT 수용체(CD117) 또는 cKIT 수용체(CD117) 매개 신호전달 경로를 자극시키며, (ii) *FLT3* 또는 *FLT3* 매개 신호전달 경로를 자극시키고, (iii) 인터루킨(IL) 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, T 세포 성숙 배지는 분화 인자 SCF, FLT3L, 및 IL7을 포함할 수 있다.

[0126] 바람직한 구현예에서, T 세포 성숙 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 예를 들어, T 세포 성숙 배지는 유효량의 상기 분화 인자로 보충된 화학적으로 정의된 영양분 배지로 구성될 수 있다. 적합한 T 세포 성숙 배지는 당업계에 잘 알려져 있고, Stemspan™ T 세포 성숙 보충제(Cat # 9930; Stemcell Technologies Inc, CA)와 함께 Stemspan™ SFEM II(Cat # 9605; Stemcell Technologies Inc, CA) 및 PBMC 및 CD3+ 세포의 확장에 적합한 다른 배지, 예컨대 Excellerate 인간 T 세포 확장 배지(R& D Systems, USA)를 포함한다. 다른 적합한 T 세포 성숙 배지는 본원 어디에서나 기술된 바와 같이 ITS, 알부민 및 지질이 보충되고 유효량의 상기 분화 인자로 추가로 보충된 기본 배지, 예컨대 IMDM을 포함할 수 있다.

[0127] 전구 T 세포는 표면 상에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 전구 T 세포는 배양 용기, 비드 또는 다른 생물물질 또는 중합체의 표면 상에서 배양될 수 있다.

[0128] 바람직하게는, 표면은 Notch 신호전달을 자극시키는 인자, 예를 들어 Notch 리간드, 예컨대 델타-유사 1(DLL1) 또는 델타-유사 4(DLL4)로 코팅될 수 있다. 적합한 Notch 리간드는 당업계에 잘 알려져 있고, 상업적인 공급업체로부터 입수 가능하다. 표면은 또한 세포외 기질 단백질, 예컨대 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌 또는 콜라겐 및/또는 하나 이상의 세포 표면 접착 단백질, 예컨대 VCAM1로 코팅될 수 있다. 적합한 코팅은 당업계에 잘 알려져 있고, 본원 어디에서나 기술된 바와 같다.

[0129] 전구 T 세포는, 전구 T 세포가 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포로 성숙하기에 충분한 시간 동안 기재 상에서 T 세포 성숙 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 전구 T 세포는 1-4주, 바람직하게는 2 또는 3주 동안 배양될 수 있다.

[0130] T 세포(T 림프구라고도 함)는 세포-매개 면역력에서 중심적인 역할을 하는 백혈구 세포이다. T 세포는 세포 표면 상에서 T 세포 수용체(TCR)의 존재에 의해 다른 림프구로부터 구별될 수 있다. T 세포는 T 세포 수용체(TCR)를 발현한다.

[0131] 각각의 유형이 별개의 기능을 갖는 몇몇 유형의 T 세포가 존재한다.

[0132] T 헬퍼 세포(T_H 세포)는 이것이 CD4 표면 당단백질을 발현하기 때문에 $CD4^+$ T 세포로서 알려져 있다. $CD4^+$ T 세포는 적응 면역계에서 중요한 역할을 하고, T 세포 사이토카인을 방출시키고 면역 반응을 억제시키거나 조절하는 것을 도움으로써 다른 면역 세포의 활성을 돕는다. 이는 세포독성 T 세포의 활성화 및 성장에 필수적이다. 세포독성 T 세포(T_C 세포, CTL, 살해 T 세포, 세포용해성 T 세포)는 이것이 CD8 표면 당단백질을 발현하기 때문에 $CD8^+$ T 세포로서 알려져 있다. $CD8^+$ T 세포는 바이러스-감염 세포 및 종양 세포를 파괴하는 작용을 한다. 대

부분의 $CD8^+$ T 세포는, 감염되거나 손상된 세포의 표면 상에 부류 I MHC 분자에 의해 표시된 특이적 항원을 인식하거나, MHC 제시와 독립적으로 표시된 특이적 항원을 인식할 수 있는 TCR을 발현하며, 이러한 T 세포는 본 발명의 방법에 따라 수득될 수 있다. 항원 및 MHC 분자에의 TCR 및 CD8 당단백질의 특이적 결합은 감염되거나 손상된 세포의 T 세포-매개 파괴를 유발한다.

[0133] 본원에 기술된 바와 같이 생성된 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포는 성숙 CD3+ T 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 또한 CD45 및 CD28을 발현할 수 있다.

[0134] 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포는 γδ T 세포, αβ T 세포 또는 NKT 세포일 수 있다.

[0135] 일부 바람직한 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포는 αβ T 세포이다.

[0136] 전구 T 세포의 성숙(단계 5) 후, T 세포의 집단은 주로 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포일 수 있다.

[0137] 제6 단계에서, 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포의 집단은 단일 양성 CD4+ T 세포, 또는 더 바람직하게는 단일 양성 CD8+ T 세포를 생성하거나 이의 비율을 증가시키기 위해 활성화되고/거나 확장될 수 있다.

[0138] T 세포를 활성화시키고 확장시키기에 적합한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, T 세포는 적절한 배양 조건 하에 T 세포 수용체(TCR) 작용제에 노출될 수 있다. 적합한 TCR 작용제는 비드 또는 항원 제시 세포, 예컨대 수지상 세포의 표면 상의 리간드, 예컨대 부류 I 또는 II MHC 분자 상에서 표시된 펩타이드(MHC-펩타이드 복합체), 및 가용성 인자, 예컨대 항-TCR 항체, 예를 들어 항-CD28 항체, 및 멀티머성 MHC-펩타이드 복합체, 예컨대 MHC-펩타이드 테트라머, 펜타머 또는 덱스트라머를 포함한다.

[0139] 활성화는, 검출 가능한 세포성 증식을 유도하기 위해 충분히 자극되었던 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한, 유도된 사이토카인 생성 및 검출 가능한 이펙터 기능과 관련이 있을 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는 다른 것들 중에서도, 세포 분열을 하고 있는 T 세포를 지칭한다.

[0140] 항-TCR 항체는 TCR의 구성요소, 예컨대 εCD3, αCD3 또는 αCD28에 특이적으로 결합할 수 있다. TCR 자극에 적합한 항-TCR 항체(예를 들어 OKT3)는 당업계에 잘 알려져 있고, 상업적인 공급업체(예를 들어 eBioscience CO USA)로부터 입수 가능하다. 일부 구현예에서, T 세포는 항-αCD3 항체 및 IL2, IL7 또는 IL15에 노출됨으로써 활성화될 수 있다. 더 바람직하게는, T 세포는 항-αCD3 항체 및 항-αCD28 항체에 노출됨으로써 활성화된다. 활성화는 $CD14^+$ 단핵구의 존재 또는 부재 하에 발생할 수 있다. T 세포는 항-CD3 및 항-CD28 항체 코팅된 비드로 활성화될 수 있다. 예를 들어, PBMC 또는 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포를 포함한 T 세포 하위세트는 피더 세포(항원 제시 세포) 또는 항원 없이, 항체 코팅된 비드, 예를 들어 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체로 코팅된 자기 비드, 예컨대 Dynabeads® 인간 T-활성화제 CD3/CD28(ThermoFisher Scientific)을 사용하여 활성화될 수 있다. 다른 구현예에서, CD3, CD28 및 CD2 세포 표면 리간드에 결합하는 가용성 테트라머성 항체 복합체, 예컨대 ImmunoCult™ 인간 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제 또는 인간 CD3/CD28 T 세포 활성화제는 T 세포를 활성화시키기 위해 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, T 세포는 선택적으로 항-CD28 항체와 조합된 MHC-펩타이드 복합체, 바람직하게는 멀티머성 MHC-펩타이드 복합체로 활성화될 수 있다.

[0141] 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포는 수용체에 대한 가용성 항원을 사용하여 활성화될 수 있다. 항원은 멀티머성 형태로 또는 비드의 표면 상에 존재할 수 있고, 선택적으로 항-TCR 항체, 예컨대 항-CD28 항체와 함께 사용될 수 있다.

[0142] 일부 구현예에서, 이중 양성 CD4+CD8+ T 세포는 IL-15로 보충된 본원에 기술된 바와 같은 T 세포 성숙 배지에서 배양될 수 있다. 배지는 추가로, 상기 기술된 바와 같이 T 세포 수용체(TCR) 작용제, 예를 들어 하나 이상의 항-TCR 항체, 예컨대 항-αCD3 항체, 및 항-αCD28 항체로 보충될 수 있다.

[0143] T 세포는 임의의 편리한 기법을 사용하여 배양되어, 확장된 집단을 생성할 수 있다. 적합한 배양 시스템은 교반된 탱크 발효기, 에어리프트 발효기, 롤러 병, 배양 백 또는 접시, 및 다른 생물반응기, 특히 중공 섬유 생물반응기를 포함한다. 이러한 시스템의 용도는 당업계에 잘 알려져 있다.

[0144] 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포는, 표적 항원에 결합하는 항원 수용체를 발현할 수 있다. 예를 들어, 항원 수용체는, 종양 항원을 발현하는 암세포에 특이적으로 결합할 수 있다. T 세포는 예를 들어 아래 기술된 바와 같이 면역치료법에 유용할 수 있다.

[0145] 항원 수용체는 T 세포 수용체(TCR)일 수 있다. TCR은, 불변(invariant) CD3 사슬 분자와 함께 복합체로서 발현

되는 고도로 가변적인 알파(α) 사슬 및 베타(β) 사슬을 포함하는 이황화-연결 막 고정된(anchored) 헤테로다이머성(heterodimeric) 단백질이다. 이러한 유형의 TCR(αβ TCR)을 발현하는 T 세포는 αβ(또는 α:β) T 세포로 지칭될 수 있다. 소수의 T 세포는 가변 감마(γ) 및 델타(δ) 사슬을 포함하는 대안적(alternative) TCR을 발현하고, γδ T 세포로 지칭된다.

[0146] TCR은 표적 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 세포의 표면 상의 주 조직적합성 복합체(MHC; major histocompatibility complex)에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, TCR은, 종양 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 암세포의 표면 상의 주 조직적합성 복합체(MHC)에 특이적으로 결합할 수 있다. MHC는, 적응 면역계가 '외래' 분자를 인식하는 것을 가능하게 하는 세포-표면 단백질의 세트이다. 단백질은 세포내에서 분해되고 MHC에 의해 세포의 표면 상에 제시된다. '외래' 펩타이드, 예컨대 바이러스 또는 암 관련 펩타이드를 표시하는 MHC는 적절한 TCR을 갖는 T 세포에 의해 인식되어, 세포 파괴 경로를 촉진한다. 암세포의 표면 상의 MHC는 종양 항원, 즉, 암세포 상에 존재하지만 상응하는 비(非)-암성 세포 상에는 존재하지 않는 항원의 펩타이드 단편을 표시할 수 있다. 이러한 펩타이드 단편을 인식하는 T 세포는 암세포 상에서 세포독성 효과를 발휘할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 MHC 제시와는 독립적으로 암세포 상의 표적 항원 또는 표적 항원의 펩타이드 단편을 인식할 수 있다.

[0147] 일부 구현예에서, T 세포에 의해 발현되는 TCR은 천연적으로 발현될 수 있다(즉, 내인성 TCR). 예를 들어, T 세포는 본원에 기술된 바와 같이 종양 침윤성 림프구(TIL)로부터 유래된 iPSC로부터 생성될 수 있다. TIL, 예를 들어 종양 체류 CD3+ CD8+ 세포는 암 병태를 갖는 개체로부터 표준 기법을 사용하여 수득될 수 있다. 대안적으로, T 세포는 본원에 기술된 바와 같이 항원 제시 세포, 예컨대 수지상 세포의 표면 상의 부류 I 또는 II MHC 분자 상에서 표시된 표적 항원의 펩타이드 단편에 결합하는 T 세포로부터 유래된 iPSC로부터 생성될 수 있거나; 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포의 집단은 부류 I 또는 II MHC 분자 상에서 표시된 표적 항원의 펩타이드 단편에의 결합, 및 식별되는 표시된 펩타이드 단편에 결합하는 T 세포에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0148] 다른 구현예에서, TCR은 세포에 의해 천연적으로 발현되지 않는다(즉, TCR은 외인성 또는 이종성임). 적합한 이종성 αβ TCR은 표적 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 부류 I 또는 II MHC 분자에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, T 세포는, 암 환자에서 암세포에 의해 발현되는 종양 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 부류 I 또는 II MHC 분자에 특이적으로 결합하는 이종성 αβ TCR을 발현하도록 변형될 수 있다. 암 환자에서 암세포에 의해 발현되는 종양 항원은 표준 기법을 사용하여 식별될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 MHC 제시와는 독립적으로 암세포 상의 표적 항원 또는 표적 항원의 펩타이드 단편을 인식할 수 있다. 바람직한 종양 항원은 NY-ESO1, PRAME, 알파-태아단백질(AFP), MAGE A4, MAGE A1, MAGE A10 및 MAGE B2, 가장 바람직하게는 NY-ESO-1, MAGE-A4 및 MAGE-A10을 포함할 수 있다.

[0149] 적합한 TCR은 전형적이지 않은 TCR, 예를 들어 단일형태성(monomorphic) 항원-제시 분자, 예컨대 CD1 및 MR1에 의해 표시된 비-펩타이드 항원을 인식하는 비-MHC 의존적 TCR; NKT 세포 TCR 및 상피내 림프구(IEL; intraepithelial lymphocyte) TCR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 MHC 제시와는 독립적으로 암세포 상의 표적 항원 또는 표적 항원의 펩타이드 단편를 인식할 수 있다.

[0150] 이종성 TCR은 합성 또는 인공 TCR, 즉, 자연에서 존재하지 않는 TCR일 수 있다. 예를 들어, 이종성 TCR은 종양 항원에 대한 이의 친화도 또는 결합력(avidity)을 증가시키도록 조작될 수 있다(즉, 친화도 증강된 TCR). 친화도 증강된 TCR은 천연 발생 TCR에 비해 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어, TCR α 및 β 사슬의 가변 영역의 초가변 상보성 결정 영역(CDR; complementarity determining region)에서 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는, 암세포에 의해 발현되는 종양 항원의 펩타이드 단편을 표시하는 MHC에 대한 TCR의 친화도를 증가시킨다. 친화도 증강된 TCR을 생산하기에 적합한 방법은 파지 또는 효모 디스플레이를 사용하여 TCR 돌연변이체의 스크리닝 라이브러리를 포함하고, 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어 문헌[Robbins 등 J Immunol (2008) 180(9):6116]; 문헌[San Miguel 등 (2015) Cancer Cell 28 (3) 281-283]; 문헌[Schmitt 등 (2013) Blood 122 348-256]; 문헌[Jiang 등 (2015) Cancer Discovery 5 901] 참조). 바람직한 친화도 증강된 TCR은 종양 항원 NY-ESO1, PRAME, 알파-태아단백질(AFP), MAGE A4, MAGE A1, MAGE A10 및 MAGE B2 중 하나 이상을 발현하는 암세포에 결합할 수 있다.

[0151] 대안적으로, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)일 수 있다. CAR은, 면역글로불린 항원 결합 도메인, 예컨대 단일-사슬 가변 단편(scFv)을 함유하도록 조작된 인공 수용체이다. CAR은 예를 들어, TCR CD3 막관통 영역 및 엔도도메인에 융합된 scFv를 포함한다. scFv는, 대략 10 내지 25개 아미노산의 짧은 링커 펩타이드를 이용하여 연결될 수 있는 면역글로불린의 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L)의 가변 영역의 융합 단백질이다(문헌[Huston J.S. 등

Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85(16):5879-5883]). 링커는 가요성을 위해 글리신-풍부이고 가용성을 위해 세린 또는 트레오닌 풍부일 수 있고, V_H의 N-말단을 V_L의 C-말단에 연결하거나 그 반대일 수 있다. scFv는 그 앞에 신호 펩타이드가 존재하여 단백질을 소포체로, 그리고 후속적으로 T 세포 표면으로 안내할 수 있다. CAR에서, scFv는 TCR 막관통 및 엔도도메인에 융합될 수 있다. 가요성 스페이서는 scFv와 TCR 막관통 도메인 사이에 포함되어, 가변 배향 및 항원 결합을 가능하게 할 수 있다. 엔도도메인은 수용체의 기능적 신호-전달 도메인이다. CAR의 엔도도메인은 예를 들어, CD3 ζ-사슬로부터 또는 수용체, 예컨대 CD28, 41BB, 또는 ICOS로부터 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. CAR은 CD3z-CD28-41BB 또는 CD3z-CD28-OX40과 같은 그러나 이로 제한되지 않는 다수의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0152] CAR은 암세포에 의해 발현되는 종양-특이적 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, T 세포는, 특정 암 환자에서 암세포에 의해 발현되는 종양 항원에 특이적으로 결합하는 CAR을 발현하도록 변형될 수 있다. 암 환자에서 암세포에 의해 발현되는 종양 항원은 표준 기법을 사용하여 식별될 수 있다.

[0153] 대안적으로, 항원 수용체는 NK 세포 수용체(NKCR)일 수 있다.

[0154] 이종성 항원 수용체, 예컨대 이종성 TCR, NKCR 또는 CAR의 발현은 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포의 면역원성 특이성을 변경시킬 수 있으며, 따라서 이는 하나 이상의 표적 항원, 예를 들어 암을 갖는 개체의 암세포의 표면 상에 존재하는 종양 항원에 대해 향상된 인식을 인식하거나 표시한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포는 이종성 항원 수용체의 부재 하에 암세포에 대해 감소된 결합을 표시하거나 결합을 표시하지 않을 수 있다. 예를 들어, 이종성 항원 수용체의 발현은, 항원 수용체를 발현하지 않는 T 세포에 비해 T 세포의 암세포 결합의 친화도 및/또는 특이성을 증가시킬 수 있다.

[0155] 용어 "이종성"은 특정 생물학적 시스템, 예컨대 숙주 세포에 대해 외래이고 해당 시스템에서 천연적으로 존재하지 않는 폴리펩타이드 또는 핵산을 지칭한다. 이종성 폴리펩타이드 또는 핵산은 인공 수단에 의해, 예를 들어 재조합 기법을 사용하여 생물학적 시스템에 도입될 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드를 인코딩하는 이종성 핵산은 적합한 발현 작제물 내로 삽입될 수 있으며, 이러한 작제물은 결국 숙주 세포를 변형시키는 데 사용되어 폴리펩타이드를 생성한다. 이종성 폴리펩타이드 또는 핵산은 합성 또는 인공일 수 있거나, 상이한 생물학적 시스템, 예컨대 상이한 종(species) 또는 세포 유형으로 존재할 수 있다. 내인성 폴리펩타이드 또는 핵산은 특정 생물학적 시스템, 예컨대 숙주 세포에 대해 네이티브(native)이고, 해당 시스템에서 천연적으로 존재한다. 재조합 폴리펩타이드는 인공 수단에 의해, 예를 들어 재조합 기법을 사용하여 세포 내로 도입되었던 이종성 핵산으로부터 발현된다. 재조합 폴리펩타이드는, 세포에 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드와 동일할 수 있거나, 해당 세포에 천연적으로 존재하는 폴리펩타이드와 상이할 수 있다.

[0156] T 세포는, 본원에 기술된 방법의 임의의 단계에서 이종성 인코딩 핵산을 세포 내로 도입함으로써 이종성 항원 수용체, 예컨대 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 이종성 인코딩 핵산은 iPSC, 중배엽 세포, HEC, HPC, TPCs, 또는 전구 T 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 바와 같이 림프 확장 배지에서 2주 배양(단계 4) 후, 항원 수용체를 인코딩하는 이종성 핵산으로 형질도입될 수 있다. 항원 수용체를 인코딩하는 이종성 핵산은 수용체의 모든 하위단위를 인코딩할 수 있다. 예를 들어, TCR을 인코딩하는 핵산은 TCR α 사슬을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 TCR β 사슬을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 또는 TCR δ 사슬을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 TCR γ 사슬을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0157] 핵산은 임의의 편리한 기법에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 이종성 핵산을 iPSC, 중배엽 세포, HEC, HPC, TPC 또는 전구 T 세포 내로 도입하거나 혼입할 때, 당업자에게 잘 알려진 소정의 고려사항이 고려되어야 한다. 삽입될 핵산은, T 세포에서 전사를 구동할 효과적인 조절 요소를 함유하는 작제물 또는 벡터 내에서 조립되어야 한다. 예를 들어, 핵산 작제물의 제조, 세포 내로의 DNA의 도입 및 유전자 발현에서 핵산의 조작 및 형질전환을 위한 많은 기지의 기법 및 프로토콜은 문헌[*Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel 등 eds. John Wiley & Sons, 1992]에 상세히 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 유전자 편집에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 표적 부위에서 DNA 이중 가닥 절단부(DSB; double strand break)는 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 유도될 수 있고, DSB의 수선은 표적 부위에서 이종성 핵산을 세포 게놈 내로 도입할 수 있거나, 핵산은 rAAV 벡터를 사용하여 도입될 수 있다(예를 들어 AAV 매개 유전자 편집; 문헌[Hirsch 등 2014 Methods Mol Biol 1114 291-307]).

[0158] 발현 벡터를 iPSC, HPC 또는 전구 T 세포 내로 도입하기에 적합한 기법은 당업계에 잘 알려져 있고, 칼슘 포스페이트 형질주입, DEAE-덱스트란, 전기천공, 리포솜-매개 형질주입, 유전자 편집 및 레트로바이러스 또는 다른

바이러스, 예를 들어 백시니아(vaccinia) 또는 렌티바이러스를 사용한 형질도입을 포함한다. 바람직하게는, 이종성 TCR을 인코딩하는 핵산은 바이러스 벡터, 가장 바람직하게는 감마 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터, 예컨대 VSVg-위형화된(pseudotyped) 렌티바이러스 벡터에 함유될 수 있다. 본원에 기술된 방법은 세포, 예를 들어 iPSC, HPC 또는 전구 T 세포의 집단을 바이러스 벡터로 형질도입하여, 유전적으로 변형된 세포의 형질도입된 집단을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 세포는 핵산을 포함하는 바이러스 입자와 접촉에 의해 형질도입될 수 있다. 형질도입을 위한 바이러스 입자는 기지의 방법에 따라 생성될 수 있다. 예를 들어, HEK293T 세포는 바이러스 패키징 및 외피 요소를 인코딩하는 플라스미드, 뿐만 아니라 코딩 핵산을 포함하는 렌티바이러스 벡터로 형질주입될 수 있다. VSVg-위형화된 바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스(Vesicular stomatitis virus)의 바이러스 외피 당단백질 G(VSVg)와 조합되어 생성되어, 위형화된 바이러스 입자를 생성할 수 있다. 예를 들어, 고체상(solid-phase) 형질도입은 레트로넥틴-코팅된, 레트로바이러스 벡터-예비로딩된(preloaded) 조직 배양 플레이트 상에서의 배양에 의한 선택 없이 수행될 수 있다.

[0159] 생성 후, T 세포, 예를 들어 이중 양성(DP) CD4+CD8+ 세포, 단일 양성(SP) CD4+ 세포 또는 단일 양성(SP) CD8+ 세포의 집단은 단리되고/거나 정제될 수 있다. 형광-활성화된 세포 분류(FACS) 또는 항체 코팅된 자기 입자(MACS)를 사용한 자기-활성화된 세포 분류를 포함하여 임의의 편리한 기법이 사용될 수 있다.

[0160] T 세포의 집단은 확장되고/거나 농축될 수 있다. 선택적으로, 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포의 집단은 사용 전에 저장되거나 예를 들어 동결보존될 수 있다.

[0161] T 세포의 집단은 다른 시약, 예컨대 완충액, 담체, 희석제, 보존제 및/또는 약학적으로 허용 가능한 부형제와 혼합될 수 있다. 적합한 시약은 아래에서 더 상세히 기술된다. 본원에 기술된 방법은 T 세포의 집단을 약학적으로 허용 가능한 부형제와 혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0162] 투여(예를 들어 주입에 의한)에 적합한 약학적 조성물은, 항산화제, 완충액, 보존제, 안정화제, 정균제(bacteriostat), 및 제형을 의도된 수혜자의 혈액과 등장성으로 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비-수성 등장성, 발열원-무함유, 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비-수성 멸균 현탁액을 포함한다. 이러한 제형에 사용하기에 적합한 등장성 비히클의 예는 소듐 클로라이드 주사액, 링거액, 또는 락테이트화된 링거 주사액을 포함한다. 적합한 비히클은 표준 약학적 교재, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990]에서 찾을 수 있다.

[0163] 일부 바람직한 구현예에서, DP CD4+CD8+ T 세포, SP CD4+ T 세포 또는 바람직하게는 SP CD8+ T 세포일 수 있는 T 세포는 개체에게 정맥내 주입하기에 적합한 약학적 조성물 내로 제형화될 수 있다.

[0164] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약학적으로 허용 가능한"은, 합리적인 의학적 판단의 범위 내에서 합리적인 이익/위험 비(benefit/risk ratio)를 준수하여, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제점 또는 합병증 없이 대상체(예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투약 형태에 관한 것이다. 각각의 담체, 부형제 등은 또한, 제형의 다른 성분과 양립성이라는 측면에서 "허용 가능"해야 한다.

[0165] 본 발명의 양태는 상기 기술된 방법에 의해 생성되는 예를 들어 DP CD4+CD8+ T 세포, SP CD4+ T 세포 또는 SP CD8+ T 세포일 수 있는 T 세포의 집단을 제공한다. T 세포의 집단은 약제로서 사용하기 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같이 성숙 T 세포의 집단은 암 면역치료 치료법, 예를 들어 입양 T 세포 치료법에 사용될 수 있다.

[0166] 적응 세포치료법 또는 적응 면역치료법은, 표적 세포에 특이적인 항원 수용체를 발현하는 인간 T 림프구의 입양 전달을 지칭한다. 예를 들어, 인간 T 림프구는, 표적 세포 상에서 발현되는 항원에 특이적이고/거나 표적 세포 상에서 발현되는 펩타이드 MHC 복합체에 특이적인 TCR 또는 표적 세포 상에서 발현되는 항원에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현할 수 있다.

[0167] 이는 선택된 표적, 예를 들어, 암을 치료하기 위해서는 종양 특이적 항원에 따라 광범위한 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 적응 세포치료법은 공여자의 또는 환자의 세포, 예를 들어, 백혈구 세포 중 일부를 제거하는 단계를 수반한다. 그 후에, 세포는 시험관내에서 iPSC를 생산하는 데 사용되며, 이러한 iPSC는 본원에 기술된 바와 같이 표적 세포 상에서 발현되는 항원에 특이적이고/거나 표적 세포 상의 펩타이드 MHC 복합체에 특이적인 T 세포를 효율적으로 생산하는 데 사용된다. T 세포는 확장되며, 세척되고, 농축되며, 및/또는 그 후에 환자가 세포의 주입을 받을 준비가 될 때까지 시험, 운송 및 저장을 위한 시간을 허용하기 위해 냉동될 수 있다.

[0168] 본 발명의 다른 양태는 암 치료용 약제의 제조를 위한 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포의 집단의 용도,

암 치료를 위한 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포의 집단, 및 본원에 기술된 바와 같이 생성된 T 세포의 집단을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.

[0169] T 세포의 집단은 자가유래일 수 있으며, 즉, T 세포는 원래 이것이 후속적으로 투여되는 동일한 개체로부터 수득되었다(즉, 공여자 및 수혜자 개체가 동일함).

[0170] T 세포의 집단은 동종이계일 수 있으며, 즉, T 세포는 원래 이것이 후속적으로 투여되는 개체에게 상이한 개체로부터 수득될 수 있다(즉, 공여자 및 수혜자 개체는 상이함). 동종이계는 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 이식물(graft)을 지칭한다.

[0171] 공여자 및 수혜자 개체는 GVHD 및 다른 바람직하지 못한 면역 효과, 예컨대 거부를 피하기 위해 HLA 매칭될 수 있다. 대안적으로, 공여자 및 수혜자 개체는 HLA 매칭되지 않을 수 있거나, 공여자 개체로부터의 세포에서 HLA 유전자는 예를 들어 유전자 편집에 의해 변형되어, 수혜자와의 임의의 HLA 미스매치를 제거할 수 있다.

[0172] 수혜자 개체에게 투여하기 위한 적합한 T 세포의 집단은, 공여자 개체로부터 수득된 세포의 초기 집단을 제공하는 단계, 세포를 iPSC로 재프로그래밍하는 단계, 및 iPSC를 수혜자 개체에서, 암세포 또는 선택적으로 MHC와의 복합체로 제시되는 암세포 상의 항원 또는 항원의 펩타이드에 특이적으로 결합하는 항원 수용체, 예컨대 αβ TCR을 발현하는 T 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제공될 수 있다.

[0173] T 세포의 투여 후, 수혜자 개체는 수혜자 개체에서 암세포에 대한 T 세포 매개 면역 반응을 나타낼 수 있다. 이는 개체에서 암 병태에 유익한 효과를 가질 수 있다.

[0174] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암," "신생물," 및 "종양"은 본원에서 상호 교환적으로 사용되고, 단수형 또는 복수형에서, 세포를 숙주 유기체에 대해 병리학적으로 만드는 악성 형질전환을 겪은 세포를 지칭한다.

[0175] 원발성 암세포는 잘-확립된 기법, 특히 조직학적 검사에 의해 비-암성 세포로부터 쉽게 구별될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 암세포의 정의는 원발성 암세포뿐만 아니라, 암세포 조상으로부터 유래되는 임의의 세포를 포함한다. 이는 전이된 암세포, 및 암세포로부터 유래된 시험관내 배양물 및 세포주를 포함한다. 통상 고형 종양으로서 나타나는 암 유형을 지칭할 때, "임상적으로 검출 가능한" 종양은 종양 덩어리를 기준으로; 예를 들어, 컴퓨터 단층촬영(CT) 스캔, 자기 공명 영상(MRI), X-선, 초음파 또는 신체 검사 시 촉진과 같은 절차에 의해 검출 가능하고/거나 환자로부터 수득 가능한 시료에서 하나 이상의 암-특이적 항원의 발현때문에 검출 가능한 것이다.

[0176] 암 병태는 악성 암세포의 비정상적인 증식을 특징으로 할 수 있고, 백혈병, 예컨대 AML, CML, ALL 및 CLL, 림프종, 예컨대 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 다발성 골수종, 및 고형암, 예컨대 육종, 피부암, 흑색종, 방광암, 뇌암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 폐암, 결장직장암, 자궁경부암, 간암, 두경부암, 식도암, 췌장암, 신장암, 부신암, 위암, 고환암, 담낭 및 담도의 암, 갑상선암, 흉선암, 골암, 및 대뇌암(cerebral cancer), 뿐만 아니라 원발부위 불명암(CUP; cancer of unknown primary)을 포함할 수 있다.

[0177] 개체 내의 암세포는 개체에서 정상적인 체세포와 면역학적으로 별도일 수 있다(즉, 암성 종양은 면역원성일 수 있음). 예를 들어, 암세포는 암세포에 의해 발현되는 하나 이상의 항원에 대해 개체에서 전신 면역 반응을 유도할 수 있다. 면역 반응을 유도하는 종양 항원은 암세포에 특이적일 수 있거나 개체에서 하나 이상의 정상 세포에 의해 공유될 수 있다.

[0178] 본원에 기술된 바와 같이 치료에 적합한 개체의 암세포는 항원을 발현할 수 있고/거나 TCR에 결합하도록 HLA 유형을 교정할 수 있다.

[0179] 상기 기술된 바와 같은 치료에 적합한 개체는 포유류일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 개체는 인간이다. 다른 바람직한 구현예에서, 인간에서 치료적 효능을 실증하기 위한 모델로서 통상적으로 사용되는 비-인간 포유류, 특히 포유류(예를 들어 뮤린, 영장류, 돼지, 개, 또는 토끼 동물)가 이용될 수 있다.

[0180] 일부 구현예에서, 개체는 초기 암 치료 후 미세 잔존 질환(MRD; minimal residual disease)을 가질 수 있다.

[0181] 암을 갖는 개체는, 당업계에 알려진 임상 표준에 따라 암 진단을 하기에 충분한 적어도 하나의 식별 가능한 징후, 증상, 또는 실험 결과를 표시할 수 있다. 이러한 임상 표준의 예는 의학 교재, 예컨대 문헌[Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Ed., Fauci AS 등, eds., McGraw-Hill, New York, 2001]에서 찾을 수 있다. 일부 경우, 개체에서 암의 진단은 개체로부터 수득된 체액 또는 조직의 시료에서 특정 세포 유형(예를 들어 암세포)의 식별을 포함할 수 있다.

[0182] 항종양 효과는, 종양 성장 속도의 감소, 종양 부피의 저하, 종양 세포 수의 저하, 전이 수의 저하, 예상 수명의 증가, 또는 암성 병태와 관련된 다양한 병리학적 증상의 개선에 의해 표현될 수 있는 생물학적 효과이다. "항종양 효과"는 또한, 본원에 기술된 바와 같이 제1 장소에서 종양의 발생의 방지에서 본 발명의 방법에 따라 수득될 수 있는 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 세포 및 항체, 또한 T 세포의 능력에 의해 표현될 수 있다.

[0183] 치료는, 인간 또는 동물(예를 들어 수의학 적용에서)이든지 간에, 일부 요망되는 치료적 효과, 예를 들어, 병태의 진전의 저해 또는 지연이 달성되고, 진전 속도의 감소, 진전 속도의 중단, 병태의 개선, 병태의 치유 또는 관해(부분 또는 완전이든지 간에), 병태의 하나 이상의 증상 및/또는 징후를 방지하거나, 지연시키거나, 약화시키거나 저지시키는 것, 또는 치료의 부재 시 예상되는 것을 능가하여 대상체 또는 환자의 생존율을 연장시키는 것을 포함하는 임의의 치료 및 치료법일 수 있다.

[0184] 치료는 또한 예방적(즉, 예방)일 수 있다. 예를 들어, 암에 감수성(susceptible)이거나 암의 발생 또는 재발의 위험에 있는 개체는 본원에 기술된 바와 같이 치료될 수 있다. 이러한 치료는 개체에서 암의 발생 또는 재발을 방지하거나 지연시킬 수 있다.

[0185] 특히, 치료는 완전 암 관해를 포함하여 암 성장을 저해하는 것, 및/또는 암 전이를 저해하는 것을 포함할 수 있다. 암 성장은 일반적으로, 더 발달된 형태로의 암 내에서의 변화를 나타내는 많은 지표(index) 중 임의의 하나를 지칭한다. 그러므로, 암 성장의 저해를 측정하기 위한 지표는 암세포 생존율의 저하, 종양 부피 또는 형태(예를 들어, 컴퓨터 단층촬영(CT), 초음파 검사, 또는 다른 이미지화 방법을 사용하여 결정된 바와 같음)에서의 저하, 지연된 종양 성장, 종양 혈관구조의 파괴, 지연형 과민성 피부 시험에서 향상된 성능, T 세포의 활성의 증가, 및 종양-특이적 항원의 수준의 저하를 포함한다. 본원에 기술된 바와 같이 변형된 T 세포의 투여는 암 성장, 특히 대상체에게 이미 존재하는 암의 성장을 저지하고/거나 개체에서 암 성장에 대한 경향을 저하시키는 개체의 역량을 향상시킬 수 있다.

[0186] T 세포 또는 T 세포를 포함하는 약학적 조성물은, 전신적으로/ 말초적으로 또는 요망되는 작용 부위에서든지 간에, 예를 들어, 주입에 의한 비경구를 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 편리한 투여 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 주입은 적합한 조성물에서 바늘 또는 카테터를 통한 T 세포의 투여를 수반한다. 전형적으로, T 세포는 정맥내로 또는 피하로 주입되지만, T 세포는 다른 비-경구 경로, 예컨대 근육내 주사 및 경막외 경로를 통해 주입될 수 있다. 적합한 주입 기법은 당업계에 알려져 있고, 치료법에서 보편적으로 사용된다(예를 들어, 문헌[Rosenberg 등, New Eng. J. of Med., 319:1676, 1988] 참조).

[0187] 전형적으로, 투여되는 세포의 수는 체중 Kg당 약 10^5 내지 약 10^{10}, 예를 들어 개체당 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9, x 10^5, x 10^6, x 10^7, x 10^8, x 10^9, 또는 x 10^{10}개 세포 중 임의의 것, 전형적으로 개체당 $2x10^8$ 내지 $2x10^{10}$개 세포로 전형적으로 30분의 기간에 걸쳐, 필요하다면 치료가 예를 들어 수일(day) 내지 수주(week)의 간격으로 반복되면서 투여된다. TCR αβ+ T 세포, 및 TCR αβ+ T 세포를 포함하는 조성물의 적절한 투약량은 환자마다 다양할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 최적 투약량을 결정하는 것은 일반적으로, 본 발명의 치료의 임의의 위험 또는 유해한 부작용에 대한 치료적 이익의 수준의 균형화를 수반할 것이다. 선택된 투약량 수준은 특정 세포의 활성, 사이토카인 방출 증후군(CRS), 투여 경로, 투여 시간, 세포의 소실 또는 비활성화의 속도, 치료의 지속기간, 조합에 사용되는 다른 약물, 화합물, 및/또는 물질, 및 환자의 연령, 성별, 체중, 조건, 일반적인 건강, 및 선행 의학적 이력을 포함하지만 이로 제한되지 않는 여러 가지 인자에 의존할 것이다. 세포의 양 및 투여 경로는 궁극적으로는 의사의 재량에 있을 것이지만, 일반적으로 투약량은 실질적인 해로운 또는 유해한 부작용을 야기하지 않으면서 요망되는 효과를 달성하는 작용 부위에서 국소(local) 농도를 달성할 것이다.

[0188] T 세포는 단독으로 투여될 수 있는 한편, 일부 경우, T 세포는 *생체내에서* T 세포의 집단의 확장을 촉진하기 위해 표적 항원, 표적 항원을 표시하는 APC, CD3/CD28 비드, IL-7, IL-2 및/또는 IL15와 조합되어 투여될 수 있다. 조합에서의 투여는 조합된 구성요소의 별도의, 동시의 또는 순차적인 투여에 의한 것일 수 있다.

[0189] T 세포의 집단은 하나 이상의 다른 치료법, 예컨대 사이토카인, 예를 들어 IL-2, 세포독성 화학치료법, 방사선 및 체크포인트 저해제, 예컨대 항-B7-H3, 항-B7-H4, 항-TIM3, 항-KIR, 항-LAG3, 항-PD-1, 항-PD-L1, 및 항-CTLA4 항체를 포함한 면역-종양학 제제와 조합되어 투여될 수 있다. 조합에서의 투여는 조합된 구성요소의 별도의, 동시의 또는 순차적인 투여에 의한 것일 수 있다.

[0190] 하나 이상의 다른 치료법은 임의의 편리한 수단에 의해, 바람직하게는 T 세포의 투여 부위로부터 별도인 부위에서 투여될 수 있다.

[0191] T 세포의 투여는 치료 과정 전반에 걸쳐 하나의 용량으로, 연속적으로 또는 간헐적으로(예를 들어, 적절한 간격으로 분할된 용량으로) 수행될 수 있다. 투여의 가장 효과적인 수단 및 투약량을 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고, 치료법에 사용되는 제형, 치료법의 목적, 치료될 표적 세포, 및 치료될 대상체에 따라 다양할 것이다. 단일 또는 다수의 투여는 치료 의사에 의해 선택되는 용량 수준 및 패턴으로 수행될 수 있다. 바람직하게는, T 세포는 임의의 500 x 100만, 1 x 10억, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 x 10억개의 T 세포, 예를 들어 적어도 1 x 10^9개의 T 세포의 단일 수혈로 투여된다.

[0192] 본 발명의 다른 양태는 상기 기술된 방법을 사용하여 HPC의 집단, 예컨대 HPC 및 TPC를 생산하는 데 사용하기 위한 키트 및 시약을 제공한다.

[0193] HPC, 예컨대 HPC 및 TPC의 생성을 위한 키트는,

[0194] 본원에 기술된 바와 같은 조혈 유도 배지, 예를 들어 VEGF 및 SCF를 포함하는 조혈 유도 배지; 또는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, IL-6, 및 선택적으로 IL-7을 포함하는 조혈 유도 배지

[0195] 를 포함할 수 있다.

[0196] 키트는,

[0197] 액티빈을 포함하는 제1 중배엽 유도 배지,

[0198] 액티빈, BMP 및 FGF를 포함하는 제2 중배엽 유도 배지, 및/또는

[0199] 액티빈, BMP, FGF, 및 GSK3 저해제를 포함하는 제3 중배엽 유도 배지

[0200] 를 추가로 포함할 수 있다.

[0201] 본 발명의 또 다른 양태는 또한, HPC의 생성을 위한 배양 배지의 세트의 용도를 제공하며, 여기서 배지의 세트는,

[0202] VEGF 및 SCF를 포함하는 조혈 유도 배지, 예를 들어 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IGF-1, IL-3, IL-6, 및 선택적으로 IL-7을 포함하는 조혈 유도 배지,

[0203] 및 선택적으로,

[0204] 액티빈을 포함하는 제1 중배엽 유도 배지,

[0205] 액티빈, BMP 및 FGF를 포함하는 제2 중배엽 유도 배지, 및

[0206] 액티빈, BMP, FGF, 및 GSK3 저해제를 포함하는 제3 중배엽 유도 배지

[0207] 를 포함한다.

[0208] 적합한 배지는 상기에서 더 상세히 기술되어 있다.

[0209] 배지는 본원 어디에서나 기술된 바와 같이, 유효량의 상기 제시된 분화 인자로 보충될 수 있다.

[0210] 하나 이상의 배양 배지는 탈이온화된 증류수에서 제형화될 수 있다. 하나 이상의 배지는 전형적으로, 오염을 방지하기 위해 사용 전에, 예를 들어 자외선, 가열, 방사선 조사 또는 여과에 의해 멸균될 것이다. 하나 이상의 배지는 저장 또는 수송을 위해 냉동(예를 들어 -20℃ 또는 -80℃에서)될 수 있다. 하나 이상의 배지는 오염을 방지하기 위해 하나 이상의 항생제를 함유할 수 있다.

[0211] 하나 이상의 배지는 1x 제형 또는 더 농축된 제형, *예를 들어* 2x 내지 250x 농축된 배지 제형일 수 있다. 1x 제형에서, 배지 내 각각의 성분은 세포 배양을 위해 의도된 농도, 예를 들어 상기 제시된 농도에 있다. 농축된 제형에서, 하나 이상의 성분은 세포 배양을 위해 의도된 것보다 더 높은 농도로 존재한다. 농축된 배양 배지는 당업계에 잘 알려져 있다. 배양 배지는 기지의 방법, *예를 들어* 염 침전 또는 선택적 여과를 사용하여 농축될 수 있다. 농축된 배지는 사용을 위해 물(바람직하게는 탈이온화되고 증류됨) 또는 임의의 적절한 용액, *예를 들어* 수성 식염수, 수성 완충액 또는 배양 배지로 희석될 수 있다.

[0212] 키트 내의 하나 이상의 배지는 기밀하게-밀봉된(hermetically-sealed) 용기에 함유될 수 있다. 기밀하게-밀봉된 용기는 오염을 방지하기 위해 배양 배지의 수송 또는 저장에 바람직할 수 있다. 용기는 임의의 적합한 용기, 예

를 들어 플라스크, 플레이트, 병, 단지(jar), 바이얼 또는 백일 수 있다.

[0213] 본 발명의 다른 양태 및 구현예는, 용어 "포함하는(comprising)"이 용어 "~로 구성되는(consisting of)"로 대체되는 상기 기술된 양태 및 구현예 및 용어 "포함하는"이 용어 "~로 본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"으로 대체되는 상기 기술된 양태 및 구현예를 제공한다.

[0214] 출원은 문맥상 다르게 요구하지 않는 한, 서로 상기에서 기술된 임의의 상기 양태 및 구현예의 모든 조합을 개시하는 것으로 이해되어야 한다. 유사하게는, 출원은 문맥상 다르게 요구하지 않는 한, 단독으로 또는 임의의 다른 양태와 함께 바람직한 그리고/또는 선택적인 특질의 임의의 조합을 개시한다.

[0215] 상기 구현예의 변형, 추가 구현예 및 이의 변형은 이 개시내용을 읽는 당업자에게 분명할 것이며, 이와 같이, 이는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0216] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 당업자에 의해 보편적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 조성물 및 방법이 개시내용의 방법의 실시 또는 시험에 사용될 수 있긴 하지만, 예시적인 조성물 및 방법은 본원에 기술된다. 본원에 기술된 개시내용의 임의의 양태 및 구현예가 또한 조합될 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 임의의 종속항 또는 독립항의 주제는 여러번 조합될 수 있다(*예를 들어*, 각각의 종속항으로부터의 하나 이상의 언급은 이것이 종속하는 독립항에 기초하여 단일항으로 조합될 수 있음).

[0217] 본원에 제공된 범위는 기술된 특정 범위 내의 모든 값 및 특정 범위에 대한 종점에 대한 값을 포함한다. 개시내용의 도면 및 표는 또한, 본원에 개시된 임의의 방법의 요소를 구성할 수 있는 범위, 및 별개의 값을 기술한다. 본원에 기술된 농도는 주위 온도 및 압력에서 결정된다. 이는 예를 들어, 실온에서 또는 과정 스트림의 특정 부분 내에서의 온도 및 압력일 수 있다. 바람직하게는, 농도는 21℃ 및 1 bar의 압력의 표준 상태에서 결정된다. 용어 "약"은 임의의 특정한 측정된 값에 대한 평균의 2개 표준 편차 내의 값을 의미한다.

[0218] 본원에서 그리고 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수형("a," "and," 및 "the")은 문맥상 분명하게 다르게 지시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 그러므로, 예를 들어, "펩타이드 사슬"에 대한 지칭은 하나 이상의 펩타이드 사슬에 대한 지칭이고, 당업자에게 알려진 이의 등가물을 포함한다.

[0219] 본 명세서에서 언급된 모든 문헌 및 서열 데이터베이스 엔트리는 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로서 포함된다.

[0220] 본원에 사용되는 경우 "및/또는"은 2개의 명시된 특질 또는 구성요소 각각의, 다른 것과 함께 또는 없이, 특정 개시내용으로서 간주되어야 한다. 예를 들어 "A 및/또는 B"는, 각각이 본원에서 개별적으로 제시되는 바와 같이, (i) A, (ii) B 및 (iii) A와 B 각각의 특정 개시내용으로서 간주되어야 한다.

[0221] 실험

[0222] *hiPSC 배양*

[0223] iPSC를 37℃에서 5% CO_2, 5% O_2에서 조직 배양 플라스틱웨어(plasticware)를 사용하여 마트리겔(BD Corning) 상에서 mTeSR1(SCT)에서 일상적으로 배양하였다. hiPSC를 EasyPassage 툴(Invitrogen)을 사용하여 수동적으로 수합하고, 세포를 10 uM에서 Y27632(R&D Systems)와 함께 배지에서 1:6 또는 1:12 비로 처음 48시간의 배양 동안 시딩하였다. 분화를 위해, hiPSC를 마트리겔 또는 비트로넥틴 상으로 저밀도 배양물에서 1:48 또는 1:98 분할비를 사용하여 계대배양하였다. 시딩 밀도는 시딩 후 24시간에서 현미경 상에서 x4 배율 하에 봤을 때 시야당 약 1개 콜로니였다. hiPSC를 사용된 세포 배양 매트릭스에 따라 mTeSR1 또는 E8 flex(SCT)에서 콜로니가 압착되고 별개의 세포가 더 이상 보이지 않을 때까지 대략 4-5일 동안 배양하였다.

[0224] *최소(SV) 단계 3 배지를 사용한, 만능성 줄기세포로부터의 T 세포 분화*

[0225] 3개의 hiPSC 세포주, ChiPSC31, ADAP-J 및 NIH2를 hiPSC 유지 배지(mTeSR1 또는 E8 flex)에서 유지시켰다. hiPSC 유지 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하였다. 2 mL의 StemPro34 PLUS(Invitrogen으로부터의 StemPro34; StemPro34 기본 배지, 보충제가 첨가되고 페니실린 스트렙토마이신(1% v/v: Invitrogen) 및 글루타민(2 mM: Invitrogen), 아스코르브산(50 μg/ml: Sigma Aldrich) 및 모노티오글리세롤(100 μM: Sigma Aldrich), 추가로 50 ng/ml의 액티빈으로 보충됨)를 첨가하고, 4시간 동안 인큐베이션하였다. 부피는 배양 플라스크 크기에 의존하고, 전형적으로 적어도 2 ml/9 cm^2, 및 20 ml/150 cm^2이다.

[0226] 4시간 후, 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하여, 잔여 고농도 액티빈 A를 제거하였다. 배지를, 5 ng/ml의 액티빈 A, 10 ng/ml의 BMP4 및 5 ng/ml의 bFGF로 보충된 2 mL의 StemPro34 PLUS로 대체하고, 44시간 동안 인큐베이션하였다(단계 1 배지). 그 후에, 배지를 신선한 단계 1 배지로 대체하고, 10 μM CHIR-99021로 보충하고, 48시간 동안 추가로 배양하였다.

[0227] 제4일에, 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하여, 잔여 단계 1 사이토카인을 제거하였다. 그 후에, 배지를, 100 ng/ml의 SCF 및 15 ng/ml의 VEGF로 보충된 StemPro34 PLUS로 대체하고, 48시간 동안 인큐베이션하였다(단계 2 배지). 그 후에, 배지를 신선한 단계 2 배지로 보충하고, 세포를 추가 48시간 동안 배양하였다.

[0228] 그 후에, 배지를, 표 1에 제시된 단계 3 배지(HEM7) 또는 SCF 및 VEGF 단독을 포함하는 최소 배지(SV)에 의해 대체하였다. 세포를 16-18일 동안 48시간마다 1:1 (v/v) 피딩(feeding)으로 배양하였다. 전형적으로 이는 배지의 수합 및 원심분리(300 g에서, 10분)에 의한 현탁액 중 세포의 수집, 및 현탁액 세포를 신선한 배지(즉, T150 플라스크에 대해 20 ml)와의 배양으로 되돌리는 것을 수반하였다.

[0229] 사용되는 hiPSC 주에 따라 대략 d16-18에서, (수합일 전에 유세포분석에 의해 별도로 확인됨) CD34+ 또는 CD34+CD7+ 세포를 전진 배양을 위해 생성된 단층으로부터 단리하였다. CD34+ 세포를 아큐타제(SCT: 37℃에서 30분 동안), 그 후에 37℃에서 30분 동안 콜라게나제 II(Invitrogen: 2 mg/ml)와 함께 순차적인 인큐베이션에 의해 수합하였다. 자기 활성화된 비드(MACS) 단리(Miltenyi: 제조업체의 설명에 따름)를 통한 CD34+ 세포 단리 전에, 세포 현탁액을 수집하고 세척하였다(DMEM/F12에서 300 g에서 12분 동안 x2 원심분리).

[0230] 정의된 시점 d12-d21에서, 또한 기술된 바와 같이 아큐타제 및 콜라게나제와 함께 단층으로부터 세포의 후속적인 단리 시, 세포를, 적절한 항체(CD34, CD45, 및 CD7)를 사용한 유세포분석을 위해 염색하였다. CD34+ CD45+ CD7+ 전구 세포의 출현을, 단계 3 배지에 대한 최소 선택사항으로서 표준 단계 3 배지(HEM7)와 SCF 및 VEGF 단독을 갖는 배지(SV) 사이에서 비교하였다(도 2).

[0231] $CD34^+$ $CD45^+$ $CD7^+$ 세포는 d16-d28로부터 완전(HEM7) 및 최소(SV) 단계 3 조건 하에 출현하는 것으로 밝혀졌고(도 2), 3개의 별도의 iPSC 주가 시험되었다(ChiPSC31, ADAP-J, NIH2).

[0232] d16-18에서 단층으로부터 세포의 후속적인 단리 시, ChiPSC31 및 NIH2 hiPSC주로부터의 CD34+ HPC 및 CD34+ CD7+ 세포를, SCT LP 배지(도 3)에서 14일 배양 후, 그리고 21일에서 proT 세포(CD7+ CD5+)에 기여하는 이의 능력에 대해 평가하였고, 여기서, CD4+ CD8+ CD3+ 발현을 적절한 염색 및 유세포분석 후 평가하였다(도 4).

[0233] 본원에 기술된 조혈 유도 배지("최소 단계 3 배지")를 사용하여 hiPSC로부터 생성된 CD34+ 또는 CD34+ CD7+ 세포는 림프 증식(LP) 배지(Stem Cell Technologies)에서 추가 14일 동안 추가로 배양되었을 때 CD7+ CD5+ proT 세포를 생산할 수 있었음이 밝혀졌다.

[0234] 또한, 본원에 기술된 조혈 유도 배지("최소 단계 3 배지")를 사용하여 hiPSC로부터 생성된 CD34+ 또는 CD34+ CD7+ 세포는 LP 배지에서 추가 21일 동안 추가로 배양되었을 때 CD3+, CD4+ 및 CD8+ 이중 양성 T 세포를 생산할 수 있었음이 밝혀졌다.

[0235] 완전(HEM7) 및 최소(SV) 조건 둘 다로부터의 CD34+ HPC를 T 세포 증식(LP) 배지를 위한 SCT 배지에서 배양한 다음, HLA-A2와 조합된 항원 MAGE-A4 유래 펩타이드 단편을 특이적으로 인식하고 결합하는 이종성 TCR을 발현하는 렌티바이러스 작제물로 형질도입하였다. 그 후에, 유래된 T 세포를 본원에 기술된 바와 같이 T 세포 성숙(TM) 배지에서 그리고 활성화제와 함께 추가의 단계 6 배지에서 배양하였다. 그 후에, 성숙 T 세포를 KILR™ 검정에서 평가하였다. 항원-특이적 사멸화는 완전(HEM7) 및 최소(SV) 단계 3 조건 둘 다를 사용하여 생산된 T 세포에 의해 관찰되었다(도 5).

[0236] *변형된(HEM7.2) 단계 3 배지를 사용한, 만능성 줄기세포로부터의 T 세포 분화*

[0237] hiPSC 세포주를 hiPSC 유지 배지(mTeSR1 또는 E8 flex)에서 유지시켰다. hiPSC 유지 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하였다. 2 mL의 StemPro34 PLUS(Invitrogen으로부터의 StemPro34; StemPro34 기본 배지, 보충제가 첨가되고 페니실린 스트렙토마이신(1% v/v: Invitrogen) 및 글루타민(2 mM: Invitrogen), 아스코르브산(50 μg/ml: Sigma Aldrich) 및 모노티오글리세롤(100 μM: Sigma Aldrich), 추가로 50 ng/ml의 액티빈으로 보충됨)를 첨가하고, 4시간 동안 인큐베이션하였다. 부피는 배양 플라스크 크기에 의존하고, 전형적으로 적어도 2 ml/9 cm^2, 및 20 ml/150 cm^2이다.

[0238] 4시간 후, 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하여, 잔여 고농도 액티빈 A를 제거하였다. 배지를, 5

ng/ml의 액티빈 A, 10 ng/ml의 BMP4 및 5 ng/ml의 bFGF로 보충된 2 mL의 StemPro34 PLUS로 대체하고, 44시간 동안 인큐베이션하였다(단계 1 배지). 그 후에, 배지를 신선한 단계 1 배지로 대체하고, 10 μM CHIR-99021로 보충하고, 48시간 동안 추가로 배양하였다.

[0239] 제4일에, 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하여, 잔여 단계 1 사이토카인을 제거하였다. 그 후에, 배지를, 100 ng/ml의 SCF 및 15 ng/ml의 VEGF로 보충된 StemPro34 PLUS로 대체하고, 48시간 동안 인큐베이션하였다(단계 2 배지). 그 후에, 배지를 신선한 단계 2 배지로 보충하고, 세포를 추가 48시간 동안 배양하였다.

[0240] 그 후에, 배지를, 표 1에 제시된 단계 3 배지(HEM7) 또는 VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 단독(HEM7.2)을 포함하는 변형된 단계 3 배지에 의해 대체하였다. 세포를 16-18일 동안 48시간마다 1:1 (v/v) 피딩으로 배양하였다. 전형적으로 이는 배지의 수합 및 원심분리(300 g에서, 10분)에 의한 현탁액 중 세포의 수집, 및 현탁액 세포를 신선한 배지(즉, T150 플라스크에 대해 20 ml)와의 배양으로 되돌리는 것을 수반하였다.

[0241] 대략 d16에서, CD34+ 또는 CD34+CD7+ 세포를 전진 배양을 위해 생성된 단층으로부터 단리하였다. CD34+ 세포를 아큐타제(SCT: 37℃에서 30분 동안), 그 후에 37℃에서 30분 동안 콜라게나제 II(Invitrogen: 2 mg/ml)와 함께 순차적인 인큐베이션에 의해 수합하였다. 자기 활성화된 비드(MACS) 단리(Miltenyi: 제조업체의 설명에 따름)를 통한 CD34+ 세포 단리 전에, 세포 현탁액을 수집하고 세척하였다(DMEM/F12에서 300 g에서 12분 동안 x2 원심분리). 세포를 적절한 형광 항체(CD34, CD45, 및 CD7)를 사용하여 유세포분석에 대해 염색하였다.

[0242] CD34+ CD45+ CD7+ 전구 세포의 출현을 표준 단계 3 배지(HEM7)와 변형된 단계 3 배지(HEM7.2) 사이에서 비교하였다(도 6). $CD34^+$ $CD45^+$ $CD7^+$ 세포는 d16에 표준(HEM7) 및 변형된(HEM7.2) 단계 3 조건 둘 다 하에 출현하는 것으로 밝혀졌다(도 6).

[0243] d16에서 단층으로부터 세포의 후속적인 단리 시, NIH2 hiPSC 주로부터의 CD34+ HPC를, SCT LP 배지(도 7)에서 21일 배양, 그리고 추가로 SCT TM 배지에서 추가의 21일 후, proT 세포(CD7+ CD5+)에 기여하는 이의 능력에 대해 평가하였고, 여기서, CD4+ CD8+ CD3+ 발현을 적절한 염색 및 유세포분석 후 평가하였다(도 8).

[0244] 본원에 기술된 조혈 유도 배지("변형된 단계 3 배지")를 사용하여 hiPSC로부터 생성된 CD34+ 세포는 추가 14일 동안 림프 증식(LP) 배지(Stem Cell Technologies)에서 추가로 배양되었을 때 CD7+ CD5+ proT 세포를 생산할 수 있었음이 밝혀졌다.

[0245] 또한, 본원에 기술된 조혈 유도 배지("변형된 단계 3 배지")를 사용하여 hiPSC로부터 생성된 CD34+ 세포는 LP 배지에서 추가 21일 동안 추가로 배양되었을 때 CD3+, CD4+ 및 CD8+ 이중 양성 T 세포를 생산할 수 있었음이 밝혀졌다.

[0246] $CD34^+$ HPC를 제16일에 표준(HEM7) 및 새로운(HEM7.2) 단계 3 조건 둘 다로부터 단리하였다. 전형적으로 세포를 T 세포 증식(LP) 배지에 대해 SCT 전매 배지에서 배양한 다음, MAGE-A4로 형질도입하거나(TD) 형질도입하지 않았다(NTD). 그 후에, 유래된 T 세포를 T 세포 성숙(TM) 배지 및 활성화제(S6)와 함께 추가 단계 6 배지에서 배양하였다. 성숙 T 세포를 KILR 검정에서 평가하였다. 표준(HEM7) 및 변형된(HEM7.2) 단계 3 조건으로부터 생산된 T 세포에 의한 명백한 항원-특이적 사멸화가 관찰되었다(도 9).

[0247] *변형된(HEM7.3) 단계 3 배지를 사용한, 만능성 줄기세포로부터의 T 세포 분화*

[0248] hiPSC 세포주를 hiPSC 유지 배지(mTeSR1 또는 E8 flex)에서 유지시켰다. hiPSC 유지 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하였다. 2 mL의 StemPro34 PLUS(Invitrogen으로부터의 StemPro34; StemPro34 기본 배지, 보충제가 첨가되고 페니실린 스트렙토마이신(1% v/v: Invitrogen) 및 글루타민(2 mM: Invitrogen), 아스코르브산(50 μg/ml: Sigma Aldrich) 및 모노티오글리세롤(100 μM: Sigma Aldrich), 추가로 50 ng/ml의 액티빈으로 보충됨)를 첨가하고, 4시간 동안 인큐베이션하였다. 부피는 배양 플라스크 크기에 의존하고, 전형적으로 적어도 2 ml/9 cm^2, 및 20 ml/150 cm^2이다.

[0249] 4시간 후, 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하여, 잔여 고농도 액티빈 A를 제거하였다. 배지를, 5 ng/ml의 액티빈 A, 10 ng/ml의 BMP4 및 5 ng/ml의 bFGF로 보충된 2 mL의 StemPro34 PLUS로 대체하고, 44시간 동안 인큐베이션하였다(단계 1 배지). 그 후에, 배지를 신선한 단계 1 배지로 대체하고, 10 μM CHIR-99021로 보충하고, 48시간 동안 추가로 배양하였다.

[0250] 제4일에, 배지를 제거하고, 세포를 DMEM/F12로 2회 세척하여, 잔여 단계 1 사이토카인을 제거하였다. 그 후에,

배지를, 100 ng/ml의 SCF 및 15 ng/ml의 VEGF로 보충된 StemPro34 PLUS로 대체하고, 48시간 동안 인큐베이션하였다(단계 2 배지). 그 후에, 배지를 신선한 단계 2 배지로 보충하고, 세포를 추가 48시간 동안 배양하였다.

[0251] 그 후에, 배지를, VEGF, SCF, 트롬보포이에틴(TPO), Flt3 리간드(Flt3L), IL-3, IL-6, IGF-1 및 IL-7 단독(HEM7.3) 또는 HEM7.2를 포함하는 변형된 단계 3 배지에 의해 대체하였다. 세포를 16-18일 동안 48시간마다 1:1 (v/v) 피딩으로 배양하였다. 전형적으로 이는 배지의 수합 및 원심분리(300 g에서, 10분)에 의한 현탁액 중 세포의 수집, 및 현탁액 세포를 신선한 배지(즉, T150 플라스크에 대해 20 ml)와의 배양으로 되돌리는 것을 수반하였다.

[0252] 대략 d16에서, CD34+ 또는 CD34+CD7+ 세포를 전진 배양을 위해 생성된 단층으로부터 단리하였다. CD34+ 세포를 아큐타제(SCT: 37℃에서 30분 동안), 그 후에 37℃에서 30분 동안 콜라게나제 II(Invitrogen: 2 mg/ml)와 함께 순차적인 인큐베이션에 의해 수합하였다. 자기 활성화된 비드(MACS) 단리(Miltenyi: 제조업체의 설명에 따름)를 통한 CD34+ 세포 단리 전에, 세포 현탁액을 수집하고 세척하였다(DMEM/F12에서 300 g에서 12분 동안 x2 원심분리). 세포를 적절한 형광 항체(CD34, CD45, 및 CD7)를 사용하여 유세포분석에 대해 염색하였다.

[0253] 변형된 단계 3 배지(HEM7.3)를 사용하여 CD34+ CD45+ CD7+ 전구 세포의 출현을 평가하였다. $CD34^{+}$ $CD45^{+}$ $CD7^{+}$ 세포는 d16에 변형된(HEM7.3) 단계 3 조건 하에 출현하는 것으로 나타났다.

[0254] d16에서 단층으로부터 세포의 후속적인 단리 시, hiPSC 주로부터의 CD34+ HPC를, SCT LP 배지에서 21일 배양, 그리고 추가로 SCT TM 배지에서 추가의 21일 후, proT 세포(CD7+ CD5+)에 기여하는 이의 능력에 대해 평가하였고, 여기서, CD4+ CD8+ CD3+ 발현을 적절한 염색 및 유세포분석 후 평가하였다.

[0255] **표 1**

시약	최종 농도
StemPro34 PLUS	1 L (2 개의 병이 필요함)
VEGF	15 ng/mL
SCF	100 ng/mL
TPO	30 ng/mL
Flt3L	25 ng/mL
IL-3	25 ng/mL
IL-6	10 ng/mL
IL-7	10 ng/mL
IL-11	5 ng/mL
IGF-1	25 ng/mL
BMP-4	10 ng/mL
bFGF	5 ng/mL
SHH	25 ng/mL
EPO	2 U/mL
안지오텐신 II	10 μg/mL
로사르탄	100 μM

표 1 (Hem7 배지)

[0256]

[0257] 표 2

항체	부피/시험 (μl)
TCRαβ (IP26) PE (BioLegend: 306708)	2.5 μl
TCRγδ (B1) APC (BioLegend: 331212)	5 μl
CD5 (UCHT2) BV421 (BD: 562646)	5 μl
CD7 (CD7-6B7) PerCP Cy5.5 (BioLegend: 343116)	5 μl
CD45 (HI30) BUV395 (BD: 563792)	5 μl
CD4 (OKT4) BV786 (BioLegend: 317442)	5 μl
CD3 (SK7) AF488 (BioLegend: 344810)	5 μl
CD8α (RPA-T8) PE-Cy7 (BD: 557746)	5 μl
CD56 (NCAM16.2) BV605 (BD: 562780)	5 μl
Ef506 BV510 (Invitrogen: 65-0866-14)	1/100 희석

표 2: T 세포의 표현형에 사용되는 항체.

[0258]

[0259] 표 3

StemPro34 PLUS	1 L (2 개의 병이 필요함)
VEGF	15 ng/mL
SCF	100 ng/mL
TPO	30 ng/mL
Flt3L	25 ng/mL
IL-3	25 ng/mL
IL-6	10 ng/mL
IGF-1	25 ng/mL

표 3 (HEM7.2 배지)

[0260]

[0261] 표 4

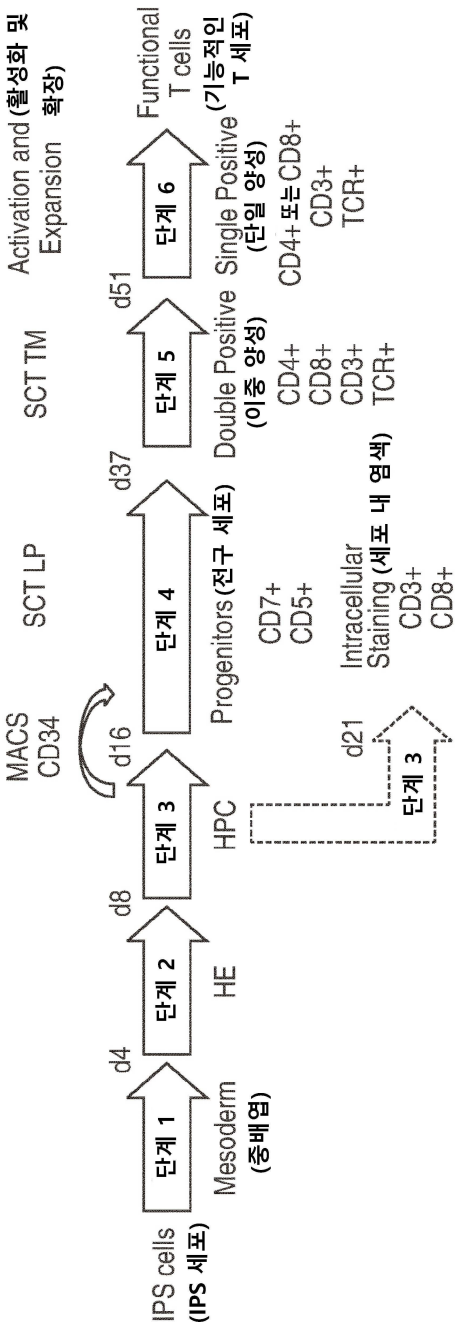
StemPro34 PLUS	1 L (2 개의 병이 필요함)
VEGF	15 ng/mL
SCF	100 ng/mL
TPO	30 ng/mL
Flt3L	25 ng/mL
IL-3	25 ng/mL
IL-6	10 ng/mL
IL-7	10 ng/mL
IGF-1	25 ng/mL

표 4 (HEM7.3 배지)

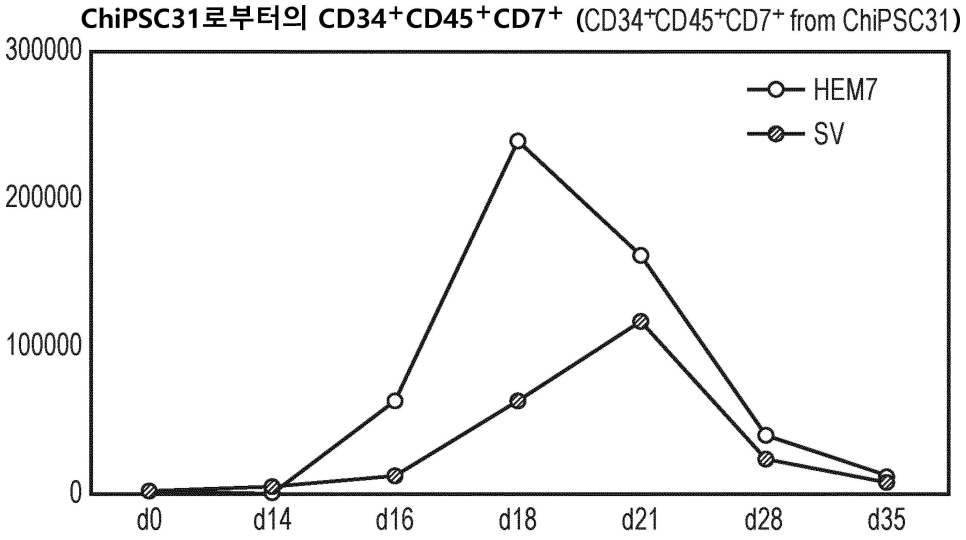
[0262]

도면

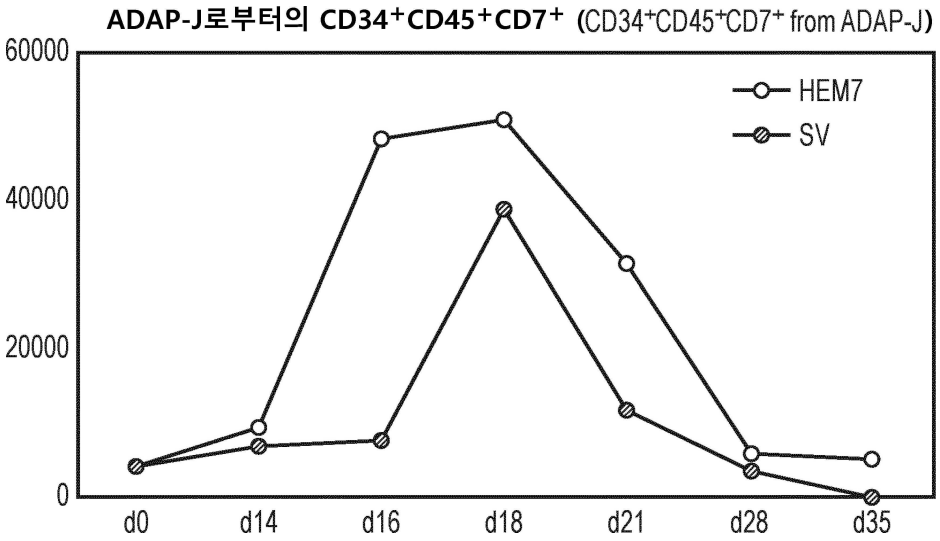
도면1


IPS cells
(IPS 세포)
단계 1
Mesoderm
(중배엽)
d4
단계 2
HE
d8
단계 3
HPC
MACS
CD34
d16
단계 4
Progenitors (전구 세포)
CD7+
CD5+
SCT LP
d37
단계 5
Double Positive
(이중 양성)
CD4+
CD8+
CD3+
TCR+
SCT TM
d51
단계 6
Single Positive
(단일 양성)
CD4+ 또는 CD8+
CD3+
TCR+
Functional
T cells
(기능적인
T 세포)
Activation and (활성화 및
Expansion 확장)
d21
단계 3
Intracellular
Staining (세포 내 염색)
CD3+
CD8+

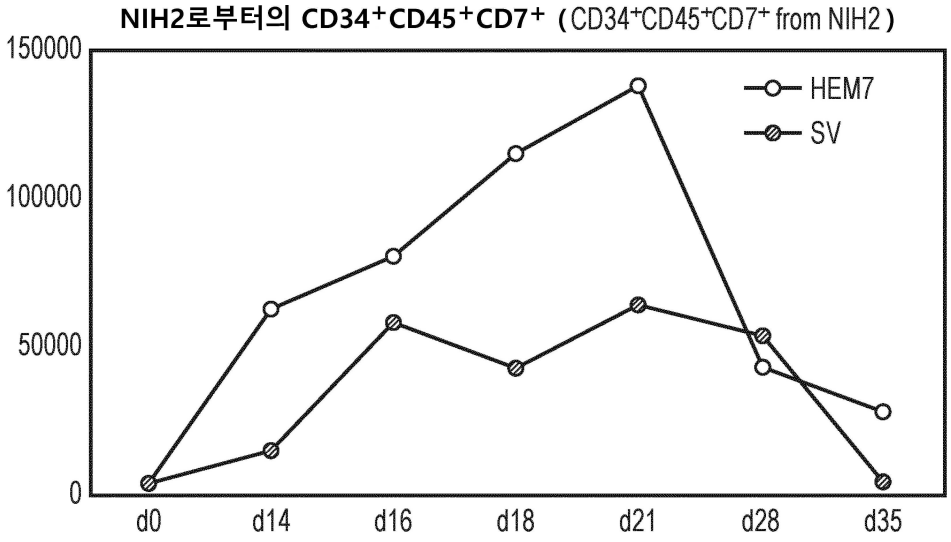
도면2a



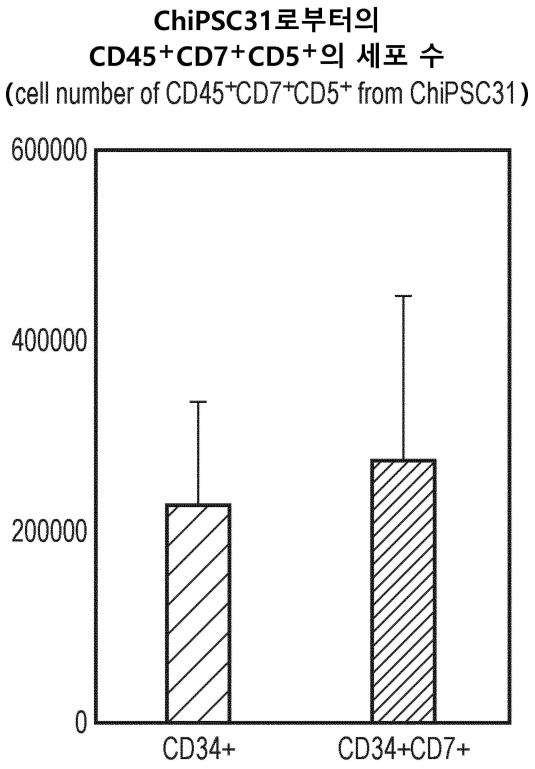
도면2b



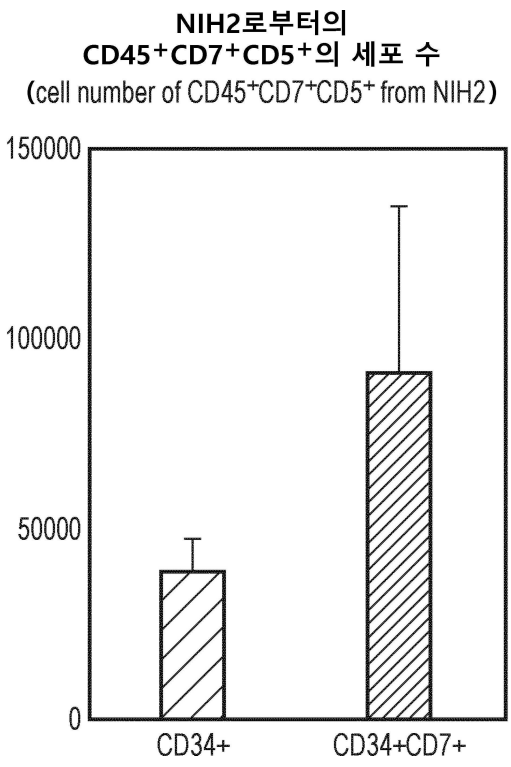
도면2c



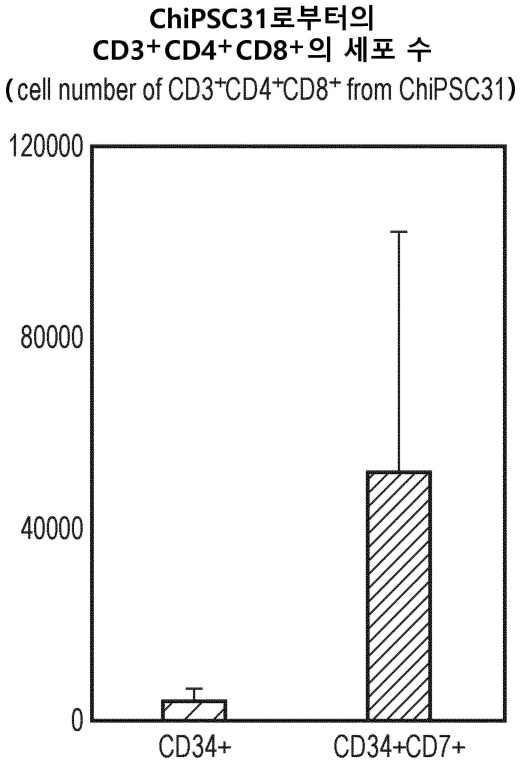
도면3a


ChiPSC31로부터의
CD45+CD7+CD5+의 세포 수
(cell number of CD45+CD7+CD5+ from ChiPSC31)
600000
400000
200000
0
CD34+
CD34+CD7+

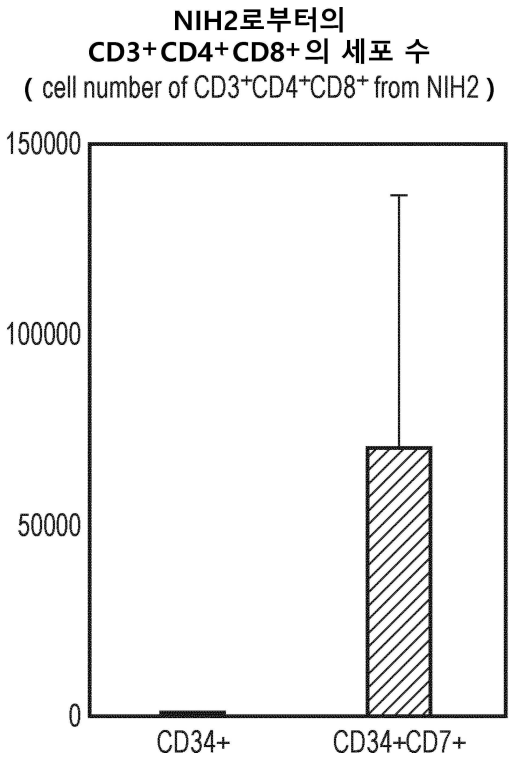
도면3b


NIH2로부터의
CD45+CD7+CD5+의 세포 수
(cell number of CD45+CD7+CD5+ from NIH2)
150000
100000
50000
0
CD34+
CD34+CD7+

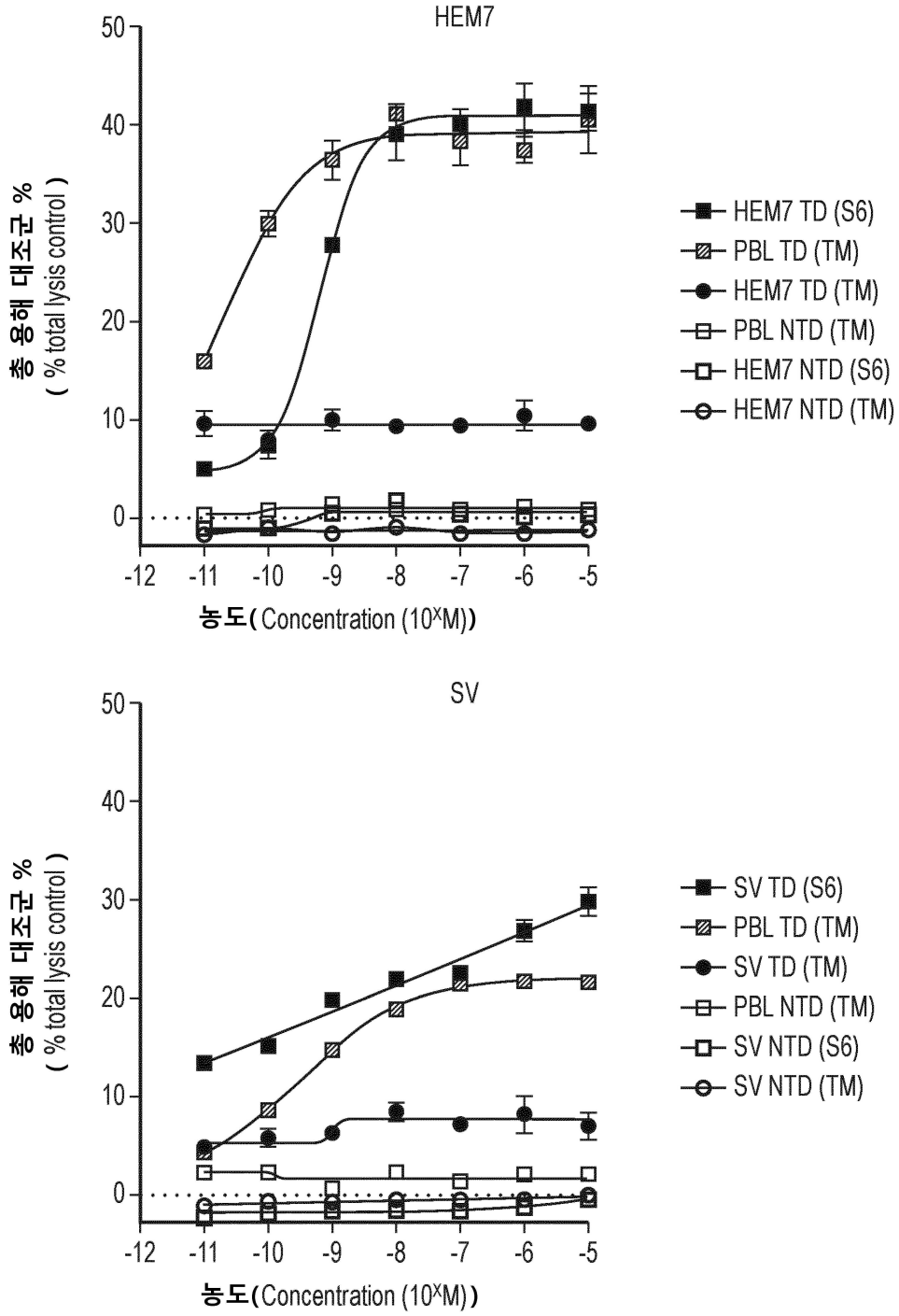
도면4a


ChiPSC31로부터의
CD3+CD4+CD8+의 세포 수
(cell number of CD3+CD4+CD8+ from ChiPSC31)
120000
80000
40000
0
CD34+
CD34+CD7+

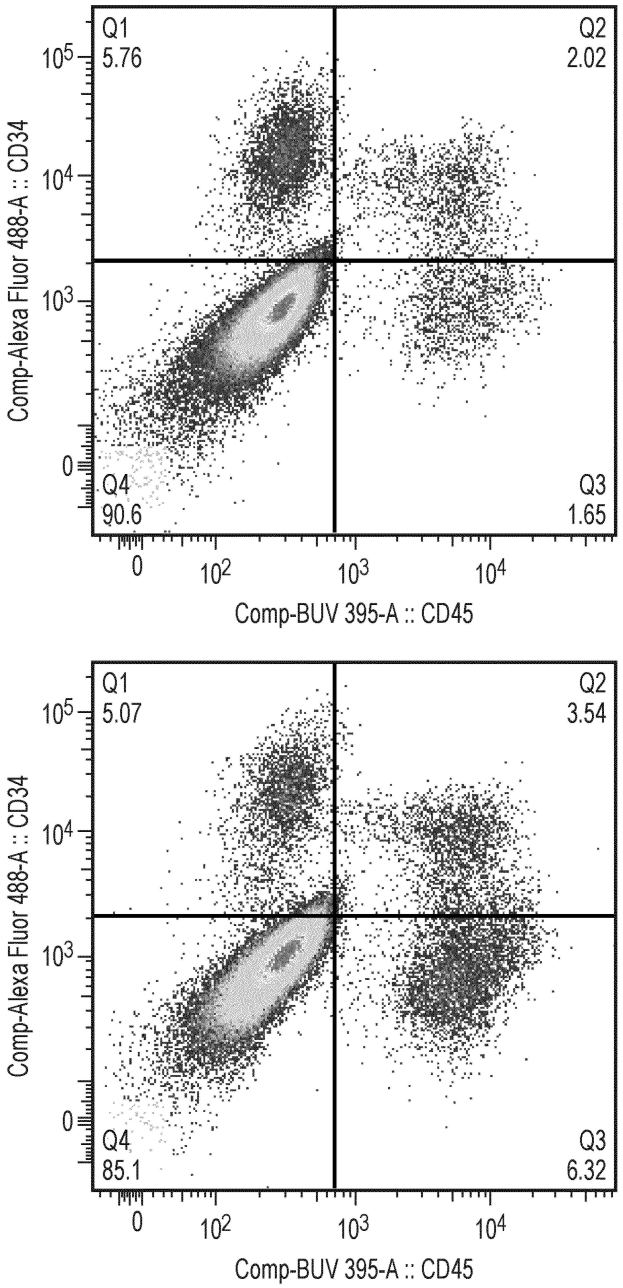
도면4b


NIH2로부터의
CD3+CD4+CD8+의 세포 수
(cell number of CD3+CD4+CD8+ from NIH2)
150000
100000
50000
0
CD34+
CD34+CD7+

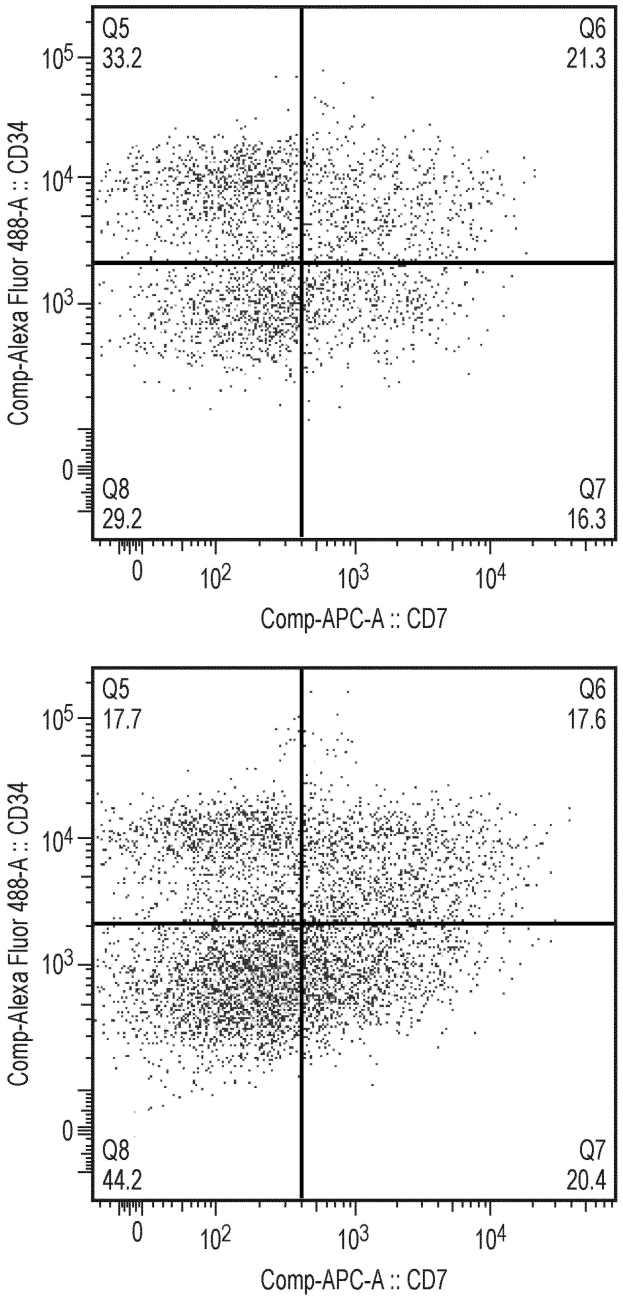
도면5


HEM7
총 용해 대조군 %
(% total lysis control)
50
40
30
20
10
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
농도(Concentration (10XM))
HEM7 TD (S6)
PBL TD (TM)
HEM7 TD (TM)
PBL NTD (TM)
HEM7 NTD (S6)
HEM7 NTD (TM)
SV
총 용해 대조군 %
(% total lysis control)
농도(Concentration (10XM))
SV TD (S6)
PBL TD (TM)
SV TD (TM)
PBL NTD (TM)
SV NTD (S6)
SV NTD (TM)

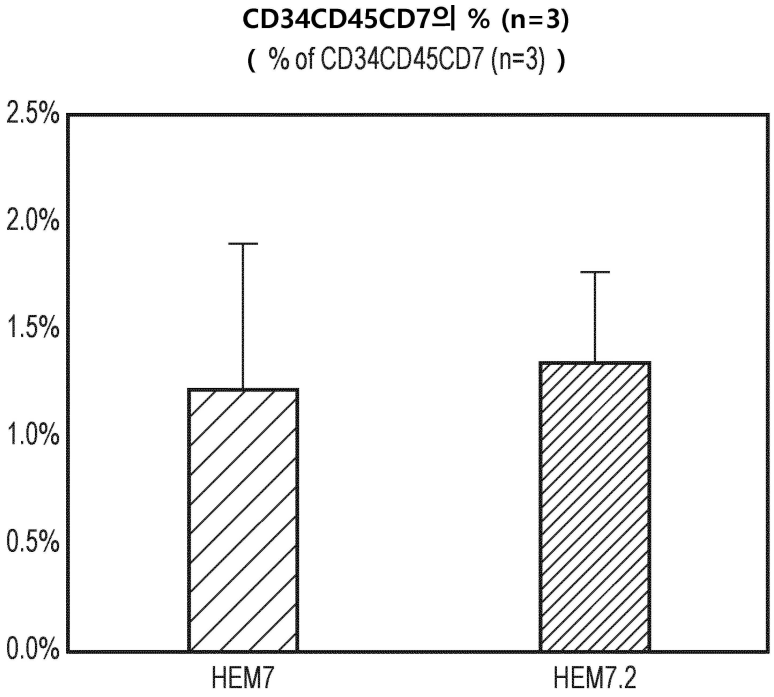
도면6a


Q1
5.76
Q2
2.02
Q4
90.6
Q3
1.65
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD34
Comp-BUV 395-A :: CD45
Q1
5.07
Q2
3.54
Q4
85.1
Q3
6.32
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD34
Comp-BUV 395-A :: CD45

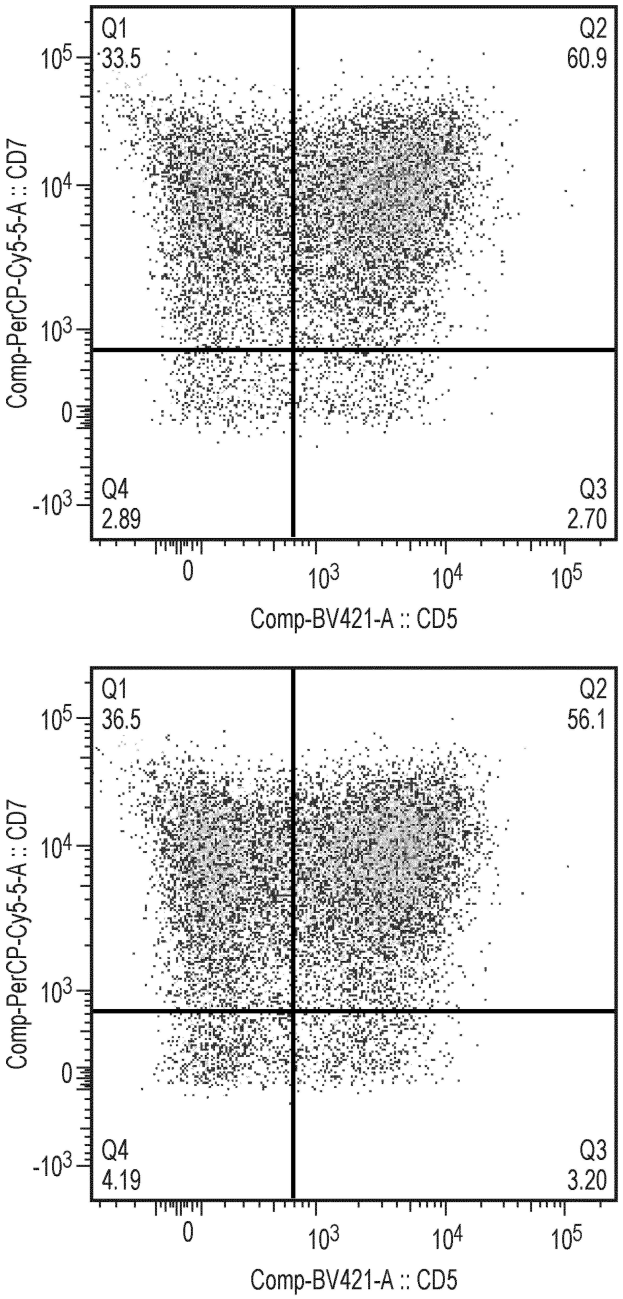
도면6b


Q5
33.2
Q6
21.3
Q8
29.2
Q7
16.3
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD34
Comp-APC-A :: CD7
Q5
17.7
Q6
17.6
Q8
44.2
Q7
20.4
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD34
Comp-APC-A :: CD7

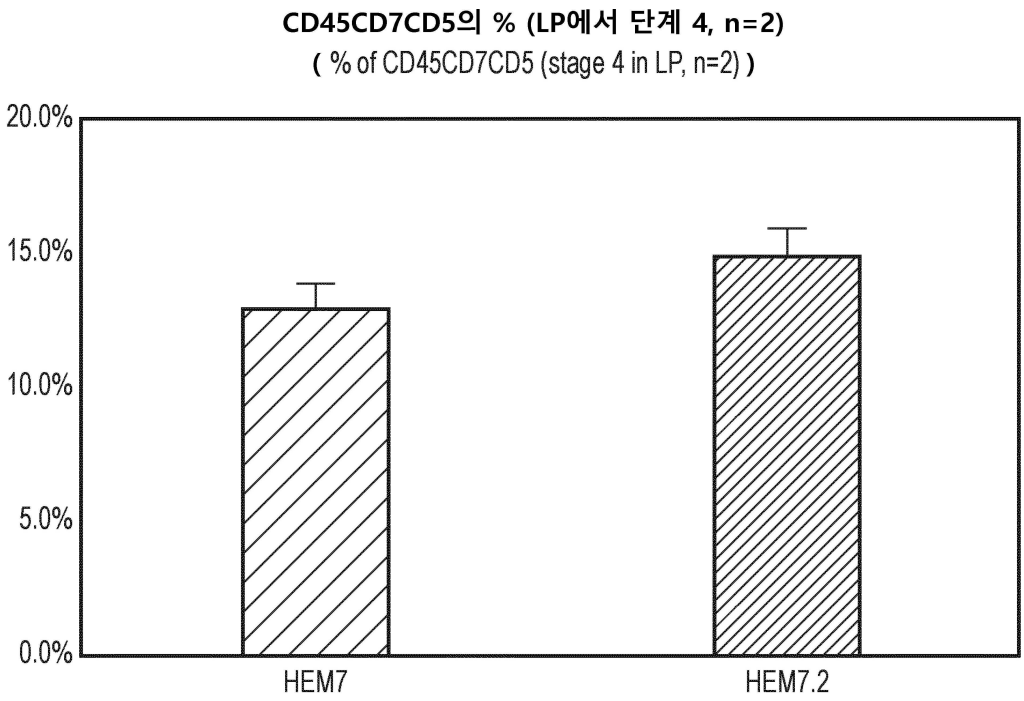
도면6c


CD34CD45CD7의 % (n=3)
(% of CD34CD45CD7 (n=3))
2.5%
2.0%
1.5%
1.0%
0.5%
0.0%
HEM7
HEM7.2

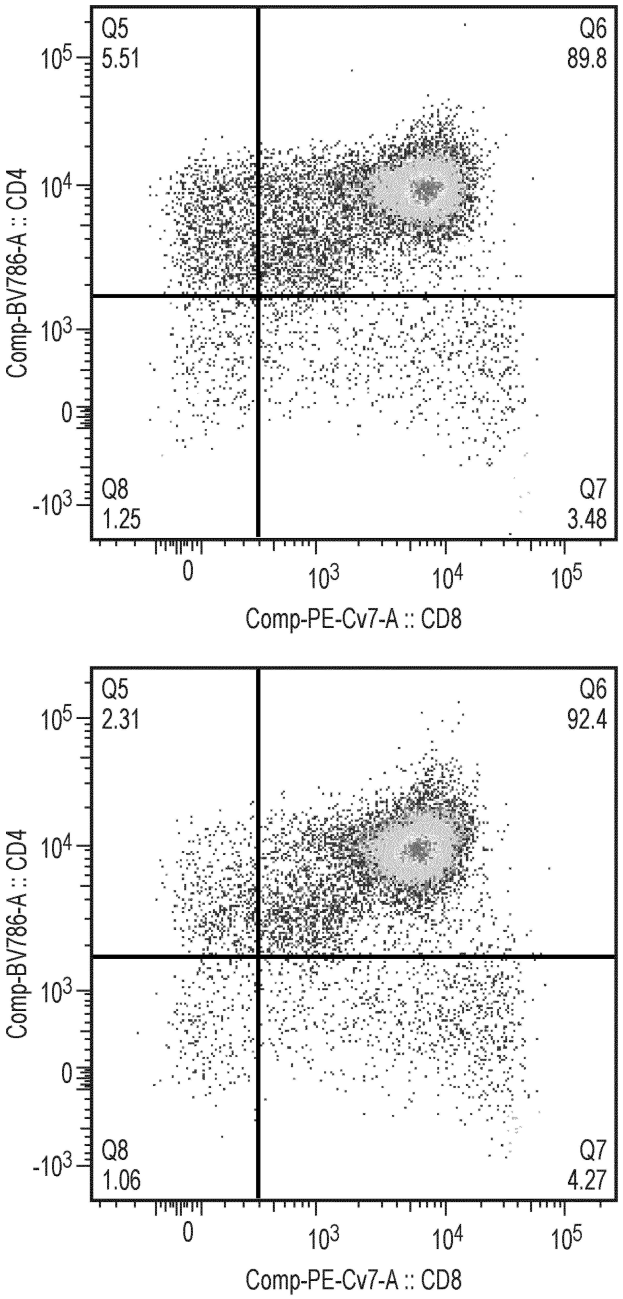
도면7a


Q1
33.5
Q2
60.9
Q4
2.89
Q3
2.70
Comp-PerCP-Cy5-5-A :: CD7
Comp-BV421-A :: CD5
Q1
36.5
Q2
56.1
Q4
4.19
Q3
3.20
Comp-PerCP-Cy5-5-A :: CD7
Comp-BV421-A :: CD5

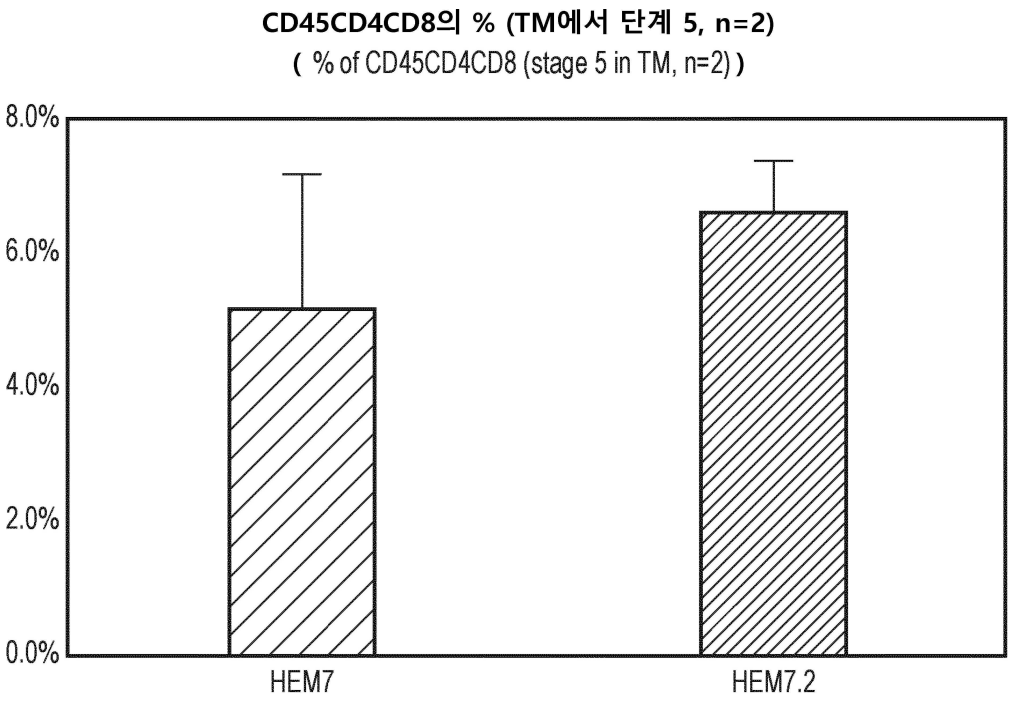
도면7b


CD45CD7CD5의 % (LP에서 단계 4, n=2)
(% of CD45CD7CD5 (stage 4 in LP, n=2))
20.0%
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
HEM7
HEM7.2

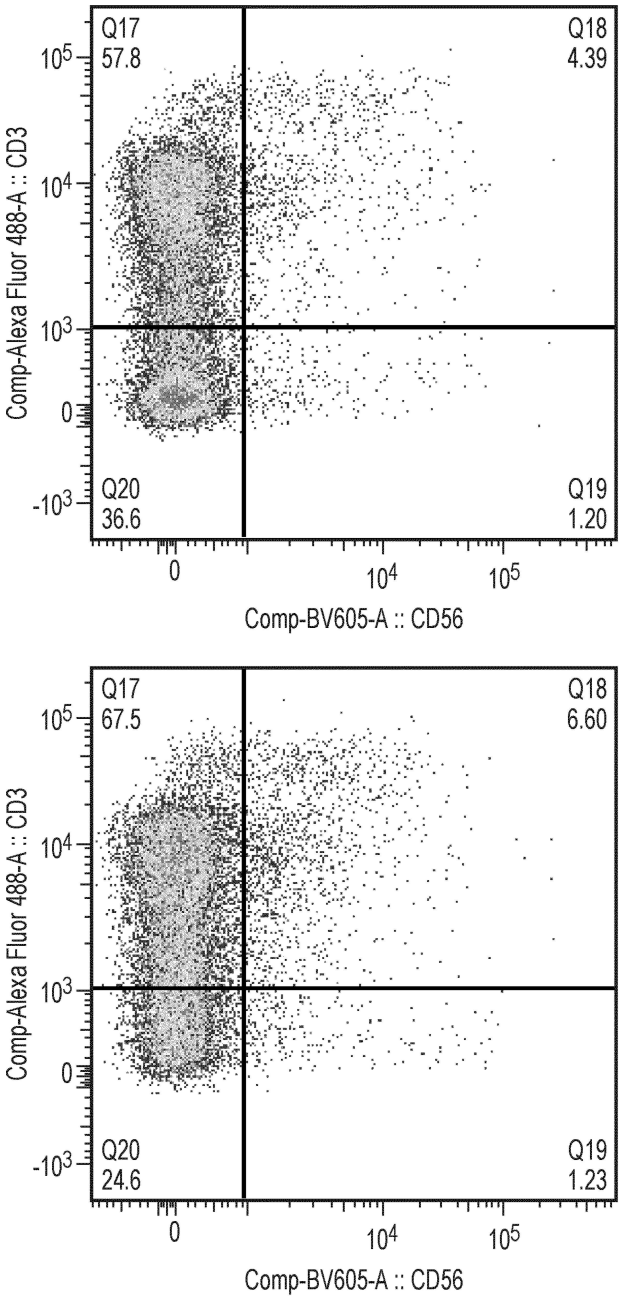
도면8a


Q5
5.51
Q6
89.8
Q8
1.25
Q7
3.48
Comp-BV786-A :: CD4
Comp-PE-Cv7-A :: CD8
Q5
2.31
Q6
92.4
Q8
1.06
Q7
4.27
Comp-BV786-A :: CD4
Comp-PE-Cv7-A :: CD8

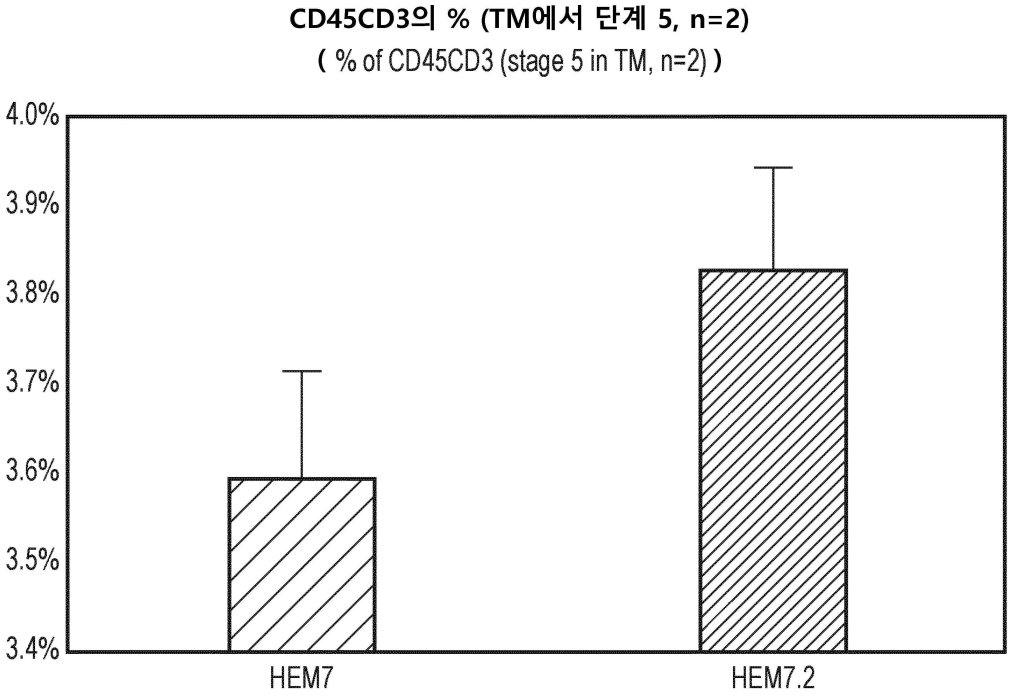
도면8b


CD45CD4CD8의 % (TM에서 단계 5, n=2)
(% of CD45CD4CD8 (stage 5 in TM, n=2))
8.0%
6.0%
4.0%
2.0%
0.0%
HEM7
HEM7.2

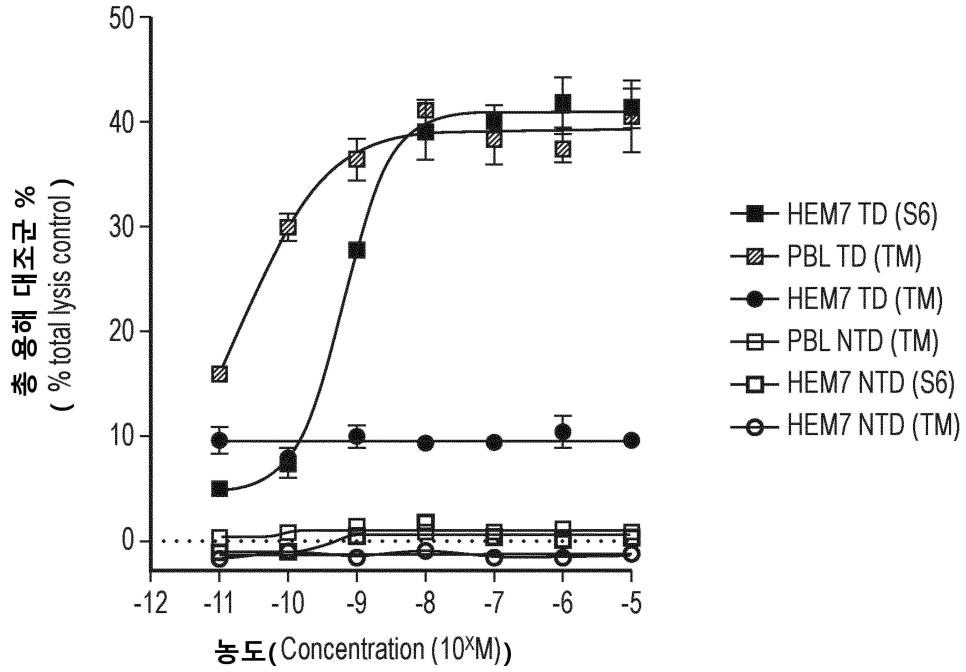
도면8c


Q17
57.8
Q18
4.39
Q20
36.6
Q19
1.20
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD3
Comp-BV605-A :: CD56
Q17
67.5
Q18
6.60
Q20
24.6
Q19
1.23
Comp-Alexa Fluor 488-A :: CD3
Comp-BV605-A :: CD56

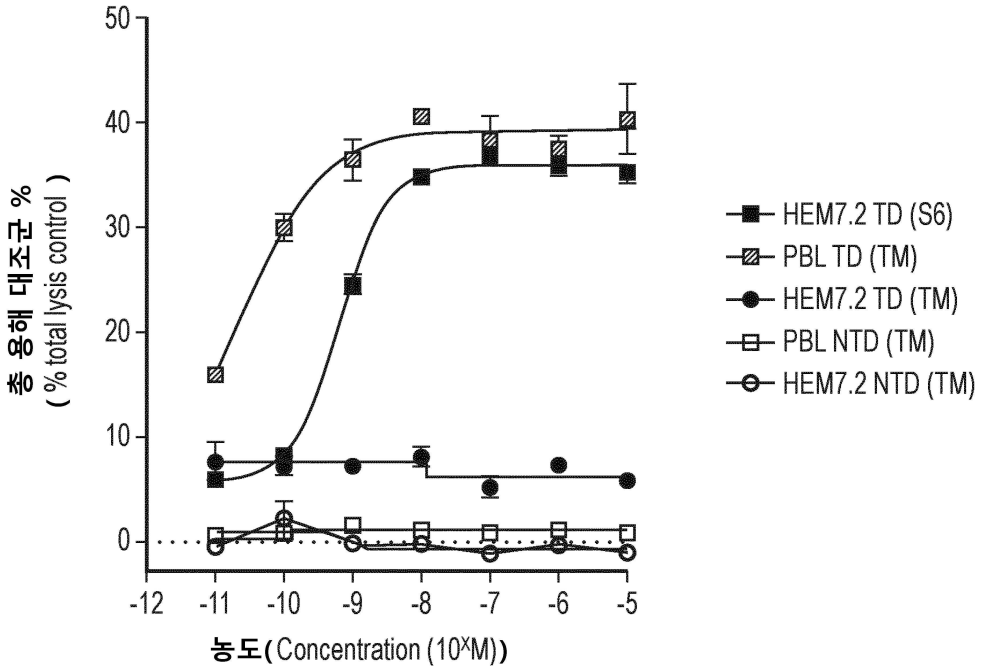
도면8d


CD45CD3의 % (TM에서 단계 5, n=2)
(% of CD45CD3 (stage 5 in TM, n=2))
4.0%
3.9%
3.8%
3.7%
3.6%
3.5%
3.4%
HEM7
HEM7.2

도면9a


총 용해 대조군 %
(% total lysis control)
50
40
30
20
10
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
농도(Concentration (10XM))
HEM7 TD (S6)
PBL TD (TM)
HEM7 TD (TM)
PBL NTD (TM)
HEM7 NTD (S6)
HEM7 NTD (TM)

도면9b


50
40
30
20
10
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
총 용해 대조군 %
(% total lysis control)
농도(Concentration (10XM))
HEM7.2 TD (S6)
PBL TD (TM)
HEM7.2 TD (TM)
PBL NTD (TM)
HEM7.2 NTD (TM)