



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0131975
(43) 공개일자 2022년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) C12N 5/078 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 5/0634 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7029085
(22) 출원일자(국제) 2021년01월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월23일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/002252
(87) 국제공개번호 WO 2021/149799
국제공개일자 2021년07월29일
(30) 우선권주장
JP-P-2020-010390 2020년01월24일 일본(JP)

(71) 출원인
고쿠리츠다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠
일본, 도쿄, 분쿄구, 혼고 7-초메 3-1
(72) 발명자
야마자키 사토시
일본국 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7초메 3반 1
고 고쿠리츠다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠 내
와타나베 모토오
일본국 1138654 도쿄도 분쿄구 혼고 7초메 3반 1
고 고쿠리츠다이가쿠호우진 도쿄다이가쿠 내
(74) 대리인
특허법인우인

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **인간조혈줄기세포와 같은 혈구계 세포를 배양하기에 적합한 무혈청 배지 및 배양 방법**

(57) 요약

본 발명은 인간 세포를 배양하기에 적합한 무혈청 배지의 조성 및 배양 방법을 개시한다. 본 발명에 따르면, 인간 세포를 배양하는 방법이 제공되며, 이 방법은 인간 세포를 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜과 접촉시키는 것을 포함한다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/50 (2013.01)

C12N 2500/90 (2013.01)

C12N 2501/125 (2013.01)

C12N 2501/145 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 세포를 배양하는 방법으로서,

인간 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,

배양 배지는 혈청 알부민 프리의 배지이며, 첨가제를 함유하고, 첨가제는 폴리비닐알코올 및 수식된 폴리알킬렌 글리콜로 이루어진 군으로부터 선택되고, 또한

(1) 포스포티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;

(2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는

(3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고,

상기 배양에 의해, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 유지 또는 증가하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

인간 세포가 인간조혈줄기세포 및 인간혈구계 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

인간 세포가 조혈줄기세포 이외의 혈구계 세포인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

첨가제가 폴리비닐알코올인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

첨가제가 수식된 폴리알킬렌글리콜인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

수식된 폴리알킬렌글리콜이 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

수식된 폴리알킬렌글리콜이 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜인 방법.

청구항 8

인간 세포를 배양하는 방법으로서,

인간 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,

배양 배지는 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

증가된 인간 세포를 얻는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

인간 세포가 인간조혈줄기세포인 방법.

청구항 11

인간 세포 배양용 배지 조성물로서, 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하는 조성물.

청구항 12

인간 세포와, 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하는 조성물.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

인간 세포가 인간조혈줄기세포인 조성물.

청구항 14

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 얻어지는 인간 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간조혈줄기세포와 같은 혈구계 세포를 배양하기에 적합한 무혈청 배지(특히 알부민 프리)의 조성 및 배양 방법을 개시한다. 본 발명에 따르면, 인간조혈줄기세포와 같은 혈구계 세포를 배양하는 방법이 제공된다. 이 방법은 인간조혈줄기세포와 같은 혈구 세포를 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 연결체 부분에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜과 접촉시키는 것을 함유할 수 있다.

배경 기술

[0002] 조혈줄기세포의 배양에 있어서 화학적으로 정의된 배지를 이용한 증식에 대한 연구가 진행되고 있으며, 마우스의 조혈줄기세포에 대해서는 화학적으로 정의된 배지를 이용한 배양이 가능하다는 것이 밝혀져 있다(비특허문헌 1).

선행기술문헌

비특허문헌

[0003] (비특허문헌 0001) Wilkinson et al., Nature, 571: 117-121, 2019

발명의 내용

- [0004] 본 발명은 인간조혈줄기세포와 같은 혈구계 세포를 배양하기에 적합한 배지(예를 들면, 무혈청 배지, 예를 들면 알부민 프리의 무혈청 배지 또는 사이토카인 프리의 무혈청 배지, 예를 들면 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 무혈청 배지)의 조성 및 배양 방법을 제공한다.
- [0005] 본 발명자들은 마우스의 조혈줄기세포(그 분리 방법에서 유래하여 KSL 세포라고도 칭함)가 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서 폴리비닐알코올(PVA)을 첨가함으로써 장기간에 걸쳐 대량으로 증식할 수 있음을 알아 내어 보고했다(Wilkinson et al., Nature, 571: 117-121, 2019). 그러나, 인간조혈줄기세포의 경우, 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서 증식시키는 방법은 확립되어 있지 않다. 이번 본 발명자들은 인간조혈줄기세포가 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜의 존재하에서 줄기세포성을 유지하면서 현저한 증식을 나타내는 것을 알아내었다. 또한, 그 때 사이토카인 프리의 조건 하에서도 조혈줄기세포의 증식을 유지할 수 있음을 알아내었다. 또한, 동일한 조건 하에서 조혈줄기세포에 더하여, 적아구 및 거핵구, 및 T 세포, B 세포, 대식세포 및 호중구와 같은 백혈구를 포함한 다양한 혈구계 세포의 증식이 가능하다는 것을 알아내었다.
- [0006] 본 발명에 따르면, 이하의 발명이 제공된다.
- [0007] [1] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0008] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,
- [0009] 배양 배지는, 폴리비닐알코올을 함유하는 알부민 프리의 배지(특히 혈청 알부민 프리의 배지)이며, 또한,
- [0010] (1) 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0011] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 포함하고; 또는
- [0012] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 포함하고,
- [0013] 상기 배양에 의해, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 유지되거나 또는 증가하는, 방법.
- [0014] [2] 증가된 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 얻는 것을 포함하는, 상기 [1]에 기재된 방법.
- [0015] [3] 배양 배지가 PI3K 액티베이터를 함유하고 줄기세포인자(SCF)를 함유하지 않는 상기 [1] 또는 [2]에 기재된 방법.
- [0016] [4] 배양 배지가 PI3K 액티베이터 및 TPO의 아고니스트를 함유하는 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0017] [5] 배양 배지가 SCF 및 TPO를 모두 함유하지 않는 상기 [4]에 기재된 방법.
- [0018] [5A] 배양 배지가 사이토카인 프리 배지인 상기 [4] 또는 [5]에 기재된 방법.
- [0019] [6] 배양 배지가 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도[4,5-b]인돌-4-일]시클로헥산-1,4-디아민(UM171)을 추가로 함유하는 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0020] [7] 배양 기간이 7일 이상인, 상기 [6]에 기재된 방법.
- [0021] [8] 알부민을 함유하지 않는 조성물로서,
- [0022] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포와, 폴리비닐알코올과,
- [0023] (1) PI3K 액티베이터와, TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상;
- [0024] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과, TPO 수용체 아고니스트; 또는
- [0025] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트,
- [0026] 를 함유하는 조성물.
- [0027] [9] PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 상기 [8]에 기재된 조성물.
- [0028] [10] 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도[4,5-b]인돌-4-일]시클로헥산-1,4-디아민(UM171)을 추

가로 함유하는 상기 [8] 또는 [9]에 기재된 조성물.

- [0029] [11] 상기 [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 얻어지는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포.
- [0030] [12] 폴리비닐알코올을 함유하고, 알부민을 함유하지 않고, 또한
- [0031] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0032] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0033] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는,
- [0034] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용 배양 배지.
- [0035] [1] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양 또는 제조하는 방법으로서,
- [0036] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,
- [0037] 배양 배지는 폴리비닐알코올을 함유하고, 또한
- [0038] (1) 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0039] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0040] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고,
- [0041] 상기 배양에 의해, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 유지되거나 또는 증가하는, 방법.
- [0042] [2] 상기 배양 배지가 무혈청 배지인 상기 [1]에 기재된 방법.
- [0043] [3] 상기 배양 배지가 화학적으로 정의된 배지인 상기 [1]에 기재된 방법.
- [0044] [4] 상기 배양 배지가 알부민을 실질적으로 함유하지 않는 상기 [1] 내지 [3] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0045] [5] 증가된 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 얻는 것을 포함하는 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0046] [6] 배양 배지가 PI3K 액티베이터를 함유하고 줄기세포인자(SCF)를 함유하지 않는 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0047] [7] 배양 배지가 PI3K 액티베이터 및 TPO의 아고니스트를 함유하는 상기 [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0048] [8] 배양 배지가 SCF 및 TPO를 모두 함유하지 않는 상기 [7]에 기재된 방법.
- [0049] [8A] 배양 배지가 사이토카인 프리의 배지인 상기 [7] 또는 [8]에 기재된 방법.
- [0050] [9] 배양 배지가 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도[4,5-b]인돌-4-일]시클로헥산-1,4-디아민(UM171)을 추가로 함유하는 상기 [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0051] [10] 배양 기간이 7일 이상인 상기 [9]에 기재된 방법.
- [0052] [11] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포와, 알부민의 대체로서 폴리비닐알코올과,
- [0053] (1) PI3K 액티베이터와, TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상;
- [0054] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트; 또는
- [0055] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트, 를 함유하는 조성물.
- [0056] [12] PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 상기 [11]에 기재된 조성물.
- [0057] [13] 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도[4,5-b]인돌-4-일]시클로헥산-1,4-디아민(UM171)을 추가로 함유하는 상기 [11] 또는 [12]에 기재된 조성물.

- [0058] [14] 상기 [1] 내지 [10] 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 얻어지는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포.
- [0059] [15] 알부민의 대체로서 폴리비닐알코올을 함유하고, 또한
- [0060] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0061] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0062] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는,
- [0063] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용의 배양 배지.
- [0064] [16] 무혈청 배지인 상기 [15]에 기재된 배양 배지.
- [0065] [17] 화학적으로 정의된 배지인 상기 [15]에 기재된 배지.
- [0066] [18] 알부민을 함유하지 않는 상기 [15] 내지 [17] 중 어느 하나에 기재된 배지.
- [0067] [19] 인간 세포가 인간조혈줄기세포인 상기 [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0068] [20] 인간 세포가 인간조혈줄기세포인 상기 [11] 내지 [13] 중 어느 하나에 기재된 조성물.
- [0069] [21] 인간 세포가 인간혈구계 세포인 상기 [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 기재된 방법.
- [0070] [22] 인간 세포가 인간혈구계 세포인 상기 [11] 내지 [13] 중 어느 하나에 기재된 조성물.
- [0071] [23] 상기 [1] 내지 [8], [19] 및 [21] 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 얻어지는 인간 세포를 함유하는 배지.
- [0072] [24] 무혈청 배지이고, 알부민 프리 및 사이토카인 프리인, 상기 [23]에 기재된 배지.
- [0073] 본 발명에 따르면, 또한 이하의 발명이 제공된다.
- [0074] [1B] 인간 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0075] 인간 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,
- [0076] 배양 배지는 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하는, 방법.
- [0077] [2B] 증가된 인간 세포를 얻는 것을 포함하는, 상기 [1B]에 기재된 방법.
- [0078] [3B] 인간 세포가 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포인 상기 [1B] 또는 [2B]에 기재된 방법.
- [0079] [4B] 인간 세포 배양용 배지 조성물로서, 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하는 조성물.
- [0080] [5B] 인간 세포와, 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하는 조성물.
- [0081] [6B] 인간 세포가 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포인 상기 [4B] 또는 [5B]에 기재된 조성물.
- [0082] [7B] 상기 [1B] 내지 [3B] 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 얻어지는 인간 세포.
- [0083] [8B] 인간 세포가 인간조혈줄기세포인 상기 [3B]에 기재된 방법.
- [0084] [9B] 인간 세포가 인간조혈줄기세포인 상기 [6B]에 기재된 조성물.
- [0085] [10B] 인간 세포가 인간혈구계 세포인 상기 [3B]에 기재된 방법.
- [0086] [11B] 인간 세포가 인간혈구계 세포인 상기 [6B]에 기재된 조성물.
- [0087] [12B] 상기 [1B] 내지 [3B] 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 얻어지는 인간 세포를 함유하는 배지.
- [0088] [13B] 무혈청 배지이고, 알부민 프리 및 사이토카인 프리인, 상기 [12B]에 기재된 배지.
- [0089] [14B] 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜이, 폴

리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜인, 상기 [1B] 내지 [3B], [8B] 및 [10B] 중 어느 하나에 기재된 방법, 또는 상기 [4B] 내지 [6B], [9B] 및 [11B] 중 어느 하나에 기재된 조성물, 또는, 상기 [12] 또는 [13]에 기재된 배지.

- [0090] [1C] 인간 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0091] 인간 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,
- [0092] 배양 배지는 혈청 알부민 프리의 배지이며, 첨가제를 함유하고, 첨가제는 폴리비닐알코올 및 수식된 폴리알킬렌 글리콜로 이루어진 균으로부터 선택되고, 또한
- [0093] (1) 포스포티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0094] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0095] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고,
- [0096] 상기 배양에 의해, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 유지되거나 또는 증가하는, 방법.
- [0097] [2C] 인간 세포가 인간조혈줄기세포 및 인간혈구계 세포로 이루어진 균으로부터 선택된 세포인 상기 [1C]에 기재된 방법.
- [0098] [3C] 인간 세포가 조혈줄기세포 이외의 혈구계 세포인 상기 [1C]에 기재된 방법.
- [0099] [4C] 첨가제가 폴리비닐알코올인 상기 [3C]에 기재된 방법.
- [0100] [5C] 첨가제가 수식된 폴리알킬렌글리콜인, 상기 [1C] 또는 [2C]에 기재된 방법.
- [0101] [6C] 수식된 폴리알킬렌글리콜이 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜인 상기 [5C]에 기재된 방법.
- [0102] [7C] 수식된 폴리알킬렌글리콜이 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜인 상기 [6C]에 기재된 방법.

도면의 간단한 설명

- [0103] 도 1은 알부민 프리의 무혈청 배지에 있어서 폴리비닐알코올(PVA)을 함유하는 배지 중에서 마우스조혈줄기세포(마우스 KSL 세포) 및 인간조혈줄기세포(CD34+CD38- 세포)를 각각 마우스 및 인간의 10ng/mL의 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 트롬보포이에틴(TPO) 존재하에서 배양한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서, 마우스 및 인간 각각의 조혈줄기세포를 10ng/mL의 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 트롬보포이에틴(TPO)의 존재하에서 배양한 조혈줄기세포에서의 SCF 및 TPO의 하류의 신호 인자의 인산화의 정도를 나타내는 도면이다. 기호 "m"은 마우스조혈줄기세포를 나타내고, "h"는 인간조혈줄기세포를 나타낸다.
- 도 3은 인간조혈줄기세포를 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서, 10ng/mL의 인간 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 인간 트롬보포이에틴(TPO) 존재하, 또한, AKTActivator II(AKTA) 또는 PI3K 액티베이터(PI3Ka)의 존재하에서 배양한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 인간조혈줄기세포를 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하, 또한 100ng/mL의 인간 트롬보포이에틴(TPO) 존재하에서 배양하고, 7일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다. 도 4에서는 SCF를 함유하는 조건과 SCF를 함유하지 않는 조건을 비교하여 배양 7일째의 세포 총 수 및 CD34+ 세포의 수에 조건 사이에 통계학적인 유의차가 인정되지 않는 것을 나타낸다.
- 도 5는 알부민 또는 PVA의 존재하에서 각종 TPO 수용체 아고니스트로 TPO를 대체하여 인간조혈줄기세포를 배양했을 때의 세포수의 추이를 나타낸다. 기호 "Buty"는 Butyramide를 나타내고, "Elt"는 엘트롬보팍(Eltrombopag)을 나타내고, "Ava"는 아바트롬보팍(Avatrombopag)을 나타낸다.
- 도 6은 알부민 및 PVA 중 어느 하나의 존재하에서 각종 TPO 수용체 아고니스트로 TPO를 대체하여 인간조혈줄기세포를 배양했을 때의 7일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다.

도 7은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 PI3K 액티베이터와 TPO 또는 Butyramide(Buty)를 함유하는 배지 중에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 7일째의 세포 총 수, CD34+ 세포의 수와 GEMM 콜로니의 수를 나타낸다. 콜로니의 종류는, 현미경 하에서 콜로니를 채취하고, 사이토스핀 표본을 제작한 후에, 김자 염색을 실시하고, 현미경 하에서 판정을 실시하였다. G는 "과립구", E는 "적아구", m은 "대식세포", M은 "거핵구"를 의미한다.

도 8은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 또는 TPO 수용체 아고니스트 또는 이들의 조합을 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고, 7일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다.

도 9는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 7일째에 얻은 배양물 중의 각 세포 집단의 증식률을 나타낸다.

도 10은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고, 7일째 및 14일째의 세포 총 수의 추이 및 CD34+ 세포의 수의 추이를 나타낸다.

도 11은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 14일째에 얻은 세포의 게이트의 결과를 나타낸다. 좌측 패널은 CD34 및 CD38을 마커로 하는 유세포 분석의 결과이고, 우측 패널은 CD41a 및 CD42b를 마커로 하는 유세포 분석의 결과이다. 도 11의 사진은 얻어진 배양물의 광학 현미경 사진이다.

도 12는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 14일째에 얻은 세포의 콜로니 분석 결과를 나타낸다. 콜로니의 종류는, 현미경 하에서 콜로니를 채취하고, 사이토스핀 표본을 제작한 후에, 김자 염색을 실시하고, 현미경 하에서 판정을 실시하였다. G는 "과립구", E는 "적아구", m은 "대식세포", M은 "거핵구"를 함유하는 콜로니임을 의미한다.

도 13은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터와; TPO 수용체 아고니스트와; SR-1 및 UM171 중 어느 하나 또는 둘 모두; 를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고, 14일째의 총 세포와 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다.

도 14는 조건 1 내지 3의 각각에서 배양하고, 14일째의 총 세포, 및 CD34+ 세포의 증식률, 그리고 CD41+ 세포의 세포수를 나타낸다.

도 15는 조건 1 내지 3 각각에서 배양하고 14일째의 배양물 중의 세포의 유동 세포 계측법의 결과이다. 윗부분은 CD34(횡축) 및 CD38(종축)에 의한 결과를 나타내고, 아랫부분은 CD41a(횡축) 및 CD42b(종축)에 의한 결과를 나타낸다.

도 16은 조건 1 내지 3 각각에서 배양하고, 7일째의 인간조혈줄기세포를 마우스에 이식하고, 12주 후의 마우스의 말초 혈액에서 인간조혈줄기세포의 생착을 나타내는 도면이다.

도 17은 양도된 제대혈을 단핵구 분리한 후 알부민, SCF 및 TPO를 모두 함유하지 않지만 PVA 및 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배지에서 UM171의 존재하 또는 비존재하의 조건에서, 14일간 배양하여 얻어진 배양물의 총 세포수, CD34+ 세포의 비율(%), 생존 세포의 비율(%), 및 CD34+ 세포수를 나타낸다.

도 18은 알부민 비존재하에서의 마우스조혈줄기세포의 시험관내 배양 실험 결과를 나타낸다. 마우스조혈줄기세포의 배양 배지에는, 표시된 성분이 최종 농도로 0.1%의 농도로 함유되어 있다. 보다 구체적으로는, BASF사 제조, 동일 농도의 KOLLIPHOR R P188 bio(188 bio), KOLLIPHOR(상표) P 188 Geismar(188 Geismar), SOL-PLUS(Sol+), KOLLIPHOR(상표) P 407 Geismar(407 Geismar), KOLLIDON(상표) 30 Origin USA(30 USA), KOLLIDON(상표) 17 PF(17 PF), KOLLIDON(상표) 25(25), KOLLIDON(상표)90F(90F), 및 KOLLIDON(상표)12PF(12PF)를 각각 최종 농도 0.1%로 첨가한 상기 배지를 사용하였다.

도 19는 알부민 비존재하의 무혈청 배지에서의 PVA 또는 폴리머 A 존재하에서의 마우스조혈줄기세포의 시험관내 콜로니 형성 실험의 결과를 나타낸다.

도 20은 알부민 비존재하의 무혈청 배지에서 PVA 또는 폴리머 A 존재하에서 배양된 마우스조혈줄기세포의 줄기세포 마커 CD201의 양성률(%)을 나타낸다.

도 21은 알부민 비존재하의 무혈청 배지에서 PVA 또는 폴리머 A 존재하에서 배양된 마우스조혈줄기세포를 조사 마우스에 조혈줄기세포 이식하는 스킴(왼쪽) 및 이식 4주 후의 마우스 말초혈(PB) 중의 키메라(chimera)율(%)을 나타낸다. 키메라율은 전체 혈구 세포 중의 이식조혈줄기세포 유래의 세포의 비율이다.

도 22는 알부민 비존재하의 무혈청 배지에서 PVA 또는 폴리머 A 존재하에서 배양된 마우스조혈줄기세포의 CD34 양성 세포율(%)을 나타낸다.

도 23은 알부민 비존재하의 무혈청 배지에서 PVA 또는 폴리머 A 존재하에서 배양되었을 때 마우스조혈줄기세포의 수의 변화를 나타낸다.

도 24는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 마우스 및 인간 각각의 조혈줄기세포를 10ng/mL의 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 트롬보포이에틴(TPO) 존재하에서 배양된 조혈줄기세포에서의 SCF 및 TPO의 하류의 신호 인자의 인산화 정도를 나타내는 도면이다. 기호 "m"은 마우스조혈줄기세포를 나타내고, "h"는 인간조혈줄기세포를 나타낸다.

도 25는 인간조혈줄기세포를 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 10ng/mL의 인간 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 인간 트롬보포이에틴(TPO)의 존재하 또한, AKTA Activator II(AKTA) 또는 PI3K 액티베이터 (PI3Ka)의 존재하에서 배양한 결과를 나타낸다.

도 26은 인간조혈줄기세포를 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하, 또한 100ng/mL의 인간 트롬보포이에틴(TPO) 존재하에서 배양하고, 7일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다. 도 26에서는 SCF를 포함하는 조건과 SCF를 포함하지 않는 조건을 비교하여 배양 7일째의 세포 총 수 및 CD34+ 세포의 수에 조건 사이에 통계적 유의차가 인정되지 않음을 나타낸다.

도 27은 알부민 또는 PVA의 존재하에서 각종 TPO 수용체 아고니스트로 TPO를 대체하여 인간조혈줄기세포를 배양했을 때의 세포수의 추이를 나타낸다. 기호 "Buty"는 Butyramide를 나타내고, "Elt"는 엘트롬보팍을 나타내고, "Ava"는 아바트롬보팍을 나타낸다.

도 28은 알부민 및 PVA의 어느 하나의 존재하에서 각종 TPO 수용체 아고니스트로 TPO를 대체하여 인간조혈줄기세포를 배양했을 때 7일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다.

도 29는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 PI3K 액티베이터와 TPO 또는 Butyramide(Buty)를 함유하는 배지 중에서 인간조혈줄기세포를 배양하고, 7일째의 세포 총 수, CD34+ 세포의 수 및 GEMM 콜로니의 수를 나타낸다. 콜로니의 종류는, 현미경하에서 콜로니를 채취하고, 사이토스핀 표본을 제작한 후에, 김자 염색을 실시하고, 현미경 하에서 판정을 실시하였다. G는 "과립구", E는 "적아구", m은 "대식세포", M은 "거핵구"를 의미한다.

도 30은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 혹은 TPO 수용체 아고니스트 또는 이들의 조합을 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고, 7일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다.

도 31은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 7일째에 얻은 배양물 중의 각 세포 집단의 증식률을 나타낸다.

도 32는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고, 7일째 및 14일째의 세포 총 수의 추이와 CD34+ 세포의 수의 추이를 나타낸다.

도 33은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 14일째에 얻은 세포의 게이트의 결과를 나타낸다. 좌측 패널은 CD34와 CD38을 마커로 하는 유세포 분석의 결과이고, 우측 패널은 CD41a와 CD42b를 마커로 하는 유세포 분석의 결과이다. 도 33의 사진은 얻어진 배양물의 광학 현미경 사진이다.

도 34는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하고 14일째에 얻은 세포의 콜로니 분석 결과를 나타낸다. 콜로니의 종류는, 현미경 하에서 콜로니를 채취하고, 사이토스핀 표본을 제작한 후에, 김자 염색을 실시하고, 현미경 하에서 판정을 실시하였다. G는 "과립구", E는 "적아구", m은 "대식세포", M은 "거핵구"를

함유하는 콜로니임을 의미한다.

도 35는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 함유하지 않지만, PI3K 액티베이터와; TPO 수용체 아고니스트와; SR-1 및 UM171 중 어느 하나 또는 둘 모두; 를 함유하는 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하여, 14일째의 총 세포와 CD34+ 세포의 증식률을 나타낸다.

도 36은 조건 1 내지 3 각각에서 배양하고, 14일째의 총 세포 및 CD34+ 세포의 증식률 그리고 CD41+ 세포의 세포수를 나타낸다.

도 37은 조건 1 내지 3 각각에서 배양하고, 14일째의 배양물 중의 세포의 유세포 분석의 결과이다. 윗부분은 CD34(횡축) 및 CD38(종축)에 의한 결과를 나타내고, 아랫부분은 CD41a(횡축) 및 CD42b(종축)에 의한 결과를 나타낸다.

도 38은 조건 1 내지 3의 각각에서 배양하고, 7일째의 인간조혈줄기세포를 마우스에 이식하고, 12주 후의 마우스의 말초 혈액 중의 인간조혈줄기세포의 생착을 나타내는 도면이다.

도 39는 양도된 체대혈을 단핵구 분리한 후 알부민, SCF 및 TPO를 모두 함유하지 않지만 PVA 및 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 배지에서 UM171의 존재하 또는 비존재하의 조건에서, 14일간 배양하여 얻어진 배양물의 총 세포수, CD34+ 세포의 비율(%), 생존 세포의 비율(%), 및 CD34+ 세포수를 나타낸다.

도 40은 PVA 또는 SOL-PLUS(상표) 존재하의 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 배지에서 인간 T 세포의 증식을 나타낸다.

도 41은 PVA 또는 SOL-PLUS(상표) 존재하의 알부민 프리 배지에서의 인간조혈줄기세포의 분화 실험의 결과를 나타낸다. 조혈줄기세포로부터 폭넓은 계열의 혈구계 세포가 증식 분화(특히 증식)할 수 있는 것으로 나타났다.

도 42는 만성 골수성 백혈병(CML) 세포가 PVA 또는 SOL-PLUS(상표) 존재하의 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 배지에서 증식할 수 있음을 나타낸다. 도면 중의 "IM+"는 이매티닙 존재하를 의미하고, "IM-"는 이매티닙 비존재하임을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0104] 본 명세서에서, "조혈줄기세포"는 혈구계 세포로 분화될 수 있는 줄기세포이다. 조혈줄기세포는 골수, 체대, 태반 및 말초 혈액으로부터 채취할 수 있다. 인간조혈줄기세포는 CD34 양성 세포이다. 인간에 있어서 조혈줄기세포는 CD34 양성 CD38 음성 세포 분획에 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 인간조혈줄기세포는 CD34 양성 CD38 음성일 수 있다. 조혈줄기세포는 ES 세포 및 iPS 세포와 같은 다능성 줄기세포를 엑스비보에서 분화시켜 얻은 세포여도 된다.
- [0105] 본 명세서에서, "혈구계 세포"는 조혈줄기세포 및 조혈줄기세포가 분화하여 발생하는 세포이다. 혈구계 세포는 분화 단계에 따라 조혈줄기세포, 조혈전구세포 및 혈액 세포로 크게 나누어진다. 조혈줄기세포는 조혈전구세포를 거쳐 혈액 세포로 분화한다. 보다 구체적으로, 조혈줄기세포는 림프아구를 거쳐 림프구(예를 들면, T 세포, B 세포, NK 세포)로 분화될 수 있다. 조혈줄기세포는 또한 조혈전구세포 및 단아구를 거쳐 단핵구로 분화될 수 있다. 조혈줄기세포는 또한 조혈전구세포, 골수아구, 전골수구, 골수구, 후골수구 및 간상핵구를 거쳐 호중구로 분화될 수 있다. 조혈줄기세포는 또한 조혈전구세포 및 골수아구를 거쳐 호산구 또는 호염기구와 같은 과립구계 백혈구, 또는 대식세포로 분화될 수 있다. 조혈줄기세포는 또한 조혈전구세포, 전적아구, 호염기성 적아구, 다염성 적아구 및 정염성 적아구를 거쳐 적혈구로 분화될 수 있다. 조혈줄기세포는 또한 조혈전구세포, 전거핵구 및 거핵구를 거쳐 혈소판을 생산할 수 있다. 이러한 조혈줄기세포에서 분화하여 발생하는 세포는 모두 혈구계 세포이다. 혈구계 세포로는 암세포 및 비암세포를 들 수 있다. 암세포로서는, 예를 들면, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포나 CML 줄기세포를 들 수 있다.
- [0106] 본 명세서에서, "엑스비보"는 생체외를 의미한다. 본 명세서에 있어서, 엑스비보는 인비보(생체내)와 대비하여 사용되고, 생체내에 존재하는 세포를 생체내로부터 생체외로 취출한 상태를 의미한다. 배양은 엑스비보에서 실시될 수 있다.
- [0107] 본 명세서에서, "양성"은 그 직전에 존재하는 용어로 특정된 분자를 세포가 발현하는 것으로 인정됨을 의미한다. 본 명세서에서, "양성"은 단순히 "+"로 표기될 수 있다.
- [0108] 본 명세서에서, "폴리비닐알코올"(PVA)이란, 비닐알코올의 중합체를 의미한다. 폴리비닐알코올은, 아세트산비닐 모노머를 중합시켜 얻어지는 폴리아세트산비닐을 비누화하여 얻을 수 있다. 폴리비닐알코올의 중량평균분자량

(MW)은, 예를 들면, 1kDa~20kDa, 3kDa~17kDa, 5kDa~15kDa, 또는 7kDa~13kDa일 수 있다. 상기 방법으로 폴리아세트산비닐을 비누화하여 PVA를 얻는 경우, 비누화율은 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 99% 이상일 수 있다.

- [0109] 본 명세서에서, "알부민"은 혈장 성분으로 알려진 단백질이다. 알부민은 혈장 단백질의 60%를 차지하는 것으로 알려져 있으며 혈액, 혈청 및 혈장에 대량으로 존재한다. 알부민은 생체내에서 혈액의 삼투압을 유지하거나 지방산 및 호르몬과 같은 생체 물질과 결합하여 이들을 운반하는 작용을 담당하는 것으로 생각된다. 조혈줄기세포의 유지 배양에서도 혈청 알부민의 중요성이 알려져있다. 인간 혈청 알부민(이하, "HSA"라고 하는 경우가 있다)은 인간의 혈청 알부민이며, 예를 들면, GenBank의 등록 번호: AAN17825.1로 등록된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 인간 혈청 알부민일 수 있다.
- [0110] 본 명세서에 있어서, "아고니스트"란, 수용체나 효소 등의 단백질을 활성화시키는 물질을 말한다.
- [0111] 본 명세서에서, "PI3K"는 포스포티딜이노시톨 3-키나아제를 의미한다. PI3K는 세포의 구성 성분인 이노시톨 인지질을 인산화하는 효소이다. 인산화에 의해 생성된 포스포티딜이노시톨 3,4,5-삼인산(PIP3)은 Akt(단백질 키나아제 B라고도 함)를 인산화시키고 그 신호를 하류로 전달한다. 본 명세서에서, "PI3K 액티베이터"는 수용체 티로신 키나아제의 아고니스트 및 PI3K를 활성화시키는 물질을 의미한다. PI3K 액티베이터는 PI3K에 대한 선택성을 가질 수 있다.
- [0112] 본 명세서에서, "TPO"는 트롬보포이에틴을 의미한다. TPO는 조혈줄기세포에서 거핵구로의 분화를 담당하는 단백질이다. TPO는 조혈줄기세포를 공식적으로 유지하는 것에 관여하는 것으로 알려져 있다. 인간 트롬보포이에틴은 예를 들면 GenBank의 등록번호: AAB33390.1로 등록된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 트롬보포이에틴일 수 있다.
- [0113] 본 명세서에서, "TPO 수용체 아고니스트"란, TPO 이외의 물질이며, TPO 수용체를 활성화하는 물질을 의미한다. TPO 수용체 아고니스트로는 TPO 이외의 TPO의 변종, 펩티드 및 TPO 수용체를 활성화시키는 화합물을 들 수 있다. 본 명세서에서 "화합물"은 유기 화합물을 포함하는 개념이다. TPO 수용체 아고니스트는 TPO 수용체에 대한 선택성을 가질 수 있다.
- [0114] 본 명세서에서 줄기세포인자(SCF)는 조혈 기능의 초기 단계에서 작용하는 조혈세포성장인자이다. 인간 줄기세포 인자는 예를 들면 GenBank의 등록번호: AAA85450.1로 등록된 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 이에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 SCF일 수 있다.
- [0115] 본 명세서에서, "배양"은 세포를 그의 증식 또는 유지에 적합한 조건 하에서 인큐베이션하는 것을 의미한다. 인큐베이션은 인간 세포의 경우, 바람직하게는 37°C 및 5% CO₂ 분위기 하에서 실행될 수 있다. "배양"이 증식을 수반하는 경우, "배양"은 증식된 세포의 생산으로 이해된다. 본 명세서에서, "배양"은 무혈청 배지 중에서 실행될 수 있다. 본 명세서에서, "배양"은 화학적으로 정의된 배양 배지 중(또는 완전 합성 배지 중)에서 실행될 수 있다. 화학적으로 정의된 배양 배지는 무혈청 배지이다.
- [0116] 본 명세서에서, "배양 배지"란, 세포의 배양에서 사용되는 배지를 의미한다. 배양 배지는 기본 배지에 필요한 성분을 추가함으로써 제조될 수 있다. 필요한 성분은 pH 조절제, 글루코오스 등의 당원, 항생 물질(예를 들면, 페니실린, 및 스트렙토마이신 등), 및 글루타민 등의 필수 아미노산, 그리고 인슐린, 트랜스페린, 셀레늄(예를 들면, 아셀렌산나트륨) 및 에탄올아민과 같은 배양 첨가물일 수 있다.
- [0117] 본 명세서에서 "함유하지 않음"은 검출 한계 이상의 농도로 함유되지 않거나 또는 완전히 함유되지 않음을 의미한다. 예를 들면, 혈청 또는 알부민이 첨가되지 않은 무혈청 배지는 알부민 프리이며 혈청 또는 알부민을 함유하지 않는다. "알부민 프리"란, 알부민을 검출 한계 이상의 농도로 함유하지 않거나 함유하지 않는 것을 말한다. 또한, "사이토카인 프리"란, 사이토카인을 검출 한계 이상의 농도로 함유하지 않거나 함유하지 않는 것을 말한다. 배지는 알부민 프리일 수 있다. 배지는 사이토카인 프리일 수 있다. 배지는 알부민 프리 또한 사이토카인 프리일 수 있다.
- [0118] 본 명세서에서, "세포 상해성"은 배양 중에 세포수를 감소시키는 작용 또는 세포를 사멸시키는 작용을 갖는 성질을 의미한다. 본 명세서에서, "비세포 상해성"은 배양에 의해 세포수를 감소시키지 않는 성질을 말한다. 물질에 따라 농도를 높임으로써 세포 상해성이 발생할 수 있지만, 이 경우에는 세포 상해성을 일으키지 않을 정도로 농도를 낮추어도 해당 물질에 기대되는 작용이 발생하는 경우에는 비세포 상해성으로 정의될 수 있다. 본 명세서에서, 배지는 세포 상해제를 함유하지 않는다 또는 세포 상해성을 갖는 약제를 함유하지 않는다는, 세포 상해

제 또는 세포 상해성을 갖는 약제를 세포 상해성을 발생시키기에 충분한 양을 함유하지 않는 것을 의미한다. 따라서, 어느 약제가 고농도에서는 세포 상해성을 갖는 경우라도, 세포 상해성을 일으키지 않는 농도로 사용되는 경우에는, 당해 약제는 세포 상해제가 아니고, 세포 상해성을 갖는 약제가 아니다.

[0119] 본 발명자들은 마우스의 조혈줄기세포(그의 분리 방법에 유래하여 KSL 세포라고도 함)가 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서 폴리비닐알코올(PVA)을 첨가함으로써 장기간에 걸쳐 대량으로 증식할 수 있음을 알아내어 보고했다(Wilkinson et al., Nature, 571: 117-121, 2019). 그러나, 인간조혈줄기세포에 관해서는, 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도, 증식시키는 방법은 확립되어 있지 않다. 본 발명자들은 인간조혈줄기세포가 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜의 존재하에서 줄기세포성을 유지하면서 현저한 증식을 나타내는 것을 알아내었다. 본 발명자들은 또한 인간조혈줄기세포가 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도 PVA, SCF 및 TPO의 존재하에서 PI3K 및 Akt 경로를 포함한 다양한 신호 경로의 활성화가 약하다는 것을 알아내었다. 본 발명자들은 또한 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도 PVA, SCF 및 TPO의 존재하에서 PI3K 액티베이터를 첨가함으로써 인간조혈줄기세포 및 인간혈구계 세포가 증식한다는 것을 알아내었다. 본 발명자들은 또한 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도 PVA의 존재하에서 PI3K 액티베이터가 SCF를 완전히 대체할 수 있음을 알아내었다. 본 발명자들은 또한 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도 PVA 및 PI3K 액티베이터의 존재하에서 TPO를 TPO 수용체 아고니스트로 대체할 수 있다는 것을 알아내었다. 본 발명자들은 또한, 인간조혈줄기세포 및 인간혈구계 세포는, 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지 중에서도, 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트의 존재하에서 양호하게 증식할 수 있음을 알아내었으나, 이때 SCF 및 TPO를 배지에 첨가할 필요는 없었다. 본 발명자들은 또한 인간조혈줄기세포가 배지에 UM171을 첨가함으로써 장기간 유지 및 증식할 수 있음을 알아내었다.

[0120] 본 발명에 따르면,

[0121] 인간 세포를 배양하는 방법으로서,

[0122] 인간 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,

[0123] 배양 배지는 혈청 알부민 프리의 배지이며, 첨가제를 함유하고, 첨가제는 폴리비닐알코올 및 수식된 폴리알킬렌글리콜로 이루어진 균으로부터 선택되고, 또한

[0124] (1) 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;

[0125] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는

[0126] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고,

[0127] 상기 배양에 의해, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 유지되거나 증가하는, 방법이 제공된다.

[0128] 인간 세포는 인간조혈줄기세포 및 인간혈구계 세포로 이루어진 균으로부터 선택된 세포일 수 있다. 또한, 인간 세포는 조혈줄기세포 이외의 혈구계 세포일 수 있다. 혈구계 세포는 조혈전구세포 및 혈액 세포로 이루어진 균으로부터 선택된 세포일 수 있다. 혈액계 세포는 림프아구, 림프구(예를 들면, T 세포, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포), 예를 들면 CD3 양성 세포, 골수아구, 전골수구, 골수구, 후골수구, 간상 핵구 및 호중구, 골수아구, 호산구 및 호염기구 등의 과립구계 백혈구, 대식세포, 전적아구, 호염기성 적아구, 다염성 적아구, 정염성 적아구, 및 적혈구, 그리고 전거핵구 및 거핵구로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 세포일 수 있다. 인간 세포는, 예를 들면, 만성 골수성 백혈병(CML) 세포 및 CML 줄기세포로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0129] 일 양태에서는, 첨가제는 알부민을 대체할 수 있는 첨가제일 수 있다. 첨가제는 일 양태에서는 수식된 폴리알킬렌글리콜이다. 또한, 일 양태에서는, 수식된 폴리알킬렌글리콜은 예를 들면 수식된 폴리에틸렌글리콜일 수 있다. 수식된 폴리알킬렌글리콜 또는 수식된 폴리에틸렌글리콜은 바람직하게는 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식될 수 있다.

[0130] 일 양태에서, 첨가제는 폴리비닐알코올일 수 있다.

[0131] 본 발명에 따르면, PVA 또는 수식 폴리알킬렌글리콜을 첨가함으로써, 배양 배지의 혈청 알부민 등의 알부민의

첨가량을 저감할 수 있고, 바람직하게는 배양 배지를 알부민 프리로 할 수 있다. 일 양태에서, 배양 배지는 무혈청 배지일 수 있고, 예를 들면, 알부민 프리의 무혈청 배지일 수 있다.

- [0132] 본 발명에 따르면, PI3K 액티베이터는 SCF를 대체할 수 있다. 본 발명에 따르면, TPO 수용체 아고니스트는 TPO를 대체할 수 있다. 이와 같이 함으로써, 본 발명에 따르면, 배양 배지에 첨가하는 SCF 및 TPO의 양을 저감할 수 있고, 바람직하게는 배양 배지를 사이토카인 프리로 할 수 있다. 일 양태에서, 배양 배지는 무혈청 배지일 수 있고, 예를 들면 사이토카인 프리의 무혈청 배지일 수 있다.
- [0133] 또 다른 실시 형태에서, 배양 배지는 PVA 또는 수식 폴리알킬렌글리콜을 첨가함으로써 배양 배지의 혈청 알부민 등의 알부민의 첨가량을 저감시킬 수 있고, 또한 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 첨가함으로써, 배양 배지의 SCF 및 TPO 첨가량을 저감할 수 있다. 일 양태에서, 배양 배지는 알부민 프리이고, 또한 사이토카인 프리의 무혈청 배지일 수 있다.
- [0134] 또한, 본 발명에 따르면, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0135] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,
- [0136] 배양 배지는 폴리비닐알코올을 함유하고, 알부민을 함유하지 않고, 또한,
- [0137] (1) 포스포티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0138] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 포함하고; 또는
- [0139] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는, 방법이 제공된다. 이 실시 형태에서, 상기 배양은 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수를 증가 또는 유지할 수 있다.
- [0140] 본 발명에 따르면, 배양 배지 중에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0141] 배양 배지 중에서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포와 폴리비닐알코올을 접촉시키는 것과,
- [0142] 배양 배지 중에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포와
- [0143] (1) 포스포티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 접촉시키는 것;
- [0144] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 접촉시키는 것; 또는
- [0145] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 접촉시키는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 이 실시 형태에서, 상기 배양에 의해 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 증가 또는 유지될 수 있다.
- [0146] 본 발명에서, PI3K 액티베이터는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포에 대하여 세포 상해성을 갖는 것을 사용하지 않는다. 즉, 본 발명에서 사용되는 PI3K 액티베이터는 비세포 상해성이다.
- [0147] 또한, 본 발명에서 사용되는 TPO 수용체 아고니스트는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포에 대하여 비세포 상해성이다. PI3K 액티베이터가 비세포 상해성인지 여부는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험에 의해 당업자라면 적절하게 확인할 수 있다. 여기서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험은 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 100ng/mL TPO 및 0.1% PVA를 함유하는 IMDM 배지를 사용하여 확인할 수 있다. 또한, TPO 수용체 아고니스트가 비세포 상해성인지 여부는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험에 의해 당업자라면 적절하게 확인할 수 있다. 여기서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험은 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 10ng/mL SCF 및 0.1% PVA를 포함하는 IMDM 배지를 사용하여 확인할 수 있다.
- [0148] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는,
- [0149] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0150] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과, TPO 수용체 아고니스트를 함유하고;

또는

- [0151] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는,
- [0152] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용 배양 배지일 수 있다.
- [0153] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는,
- [0154] 폴리비닐알코올 또는 수식된 폴리알킬렌글리콜을 함유하고,
- [0155] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0156] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0157] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는,
- [0158] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용 배양 배지일 수 있다.
- [0159] 본 발명의 일 양태에서는, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는,
- [0160] 알부민(특히 혈청 알부민) 프리이며,
- [0161] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0162] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0163] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는,
- [0164] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용 배양 배지일 수 있다.
- [0165] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는,
- [0166] 폴리비닐알코올을 함유하고, 알부민을 함유하지 않고, 또한
- [0167] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0168] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0169] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는,
- [0170] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용 배양 배지일 수 있다.
- [0171] 본 발명의 배양 배지는, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 알부민 비존재하에서 증식시키기 위해, 비세포 상해성의 PI3K 액티베이터의 유효량과 PVA의 유효량을 함유할 수 있다. 본 발명의 배양 배지는 SCF 및 TPO 중 어느 하나 또는 둘 모두를 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 배양 배지는 TPO 대신에 비세포 상해성의 TPO 수용체 아고니스트의 유효량을 함유해도 된다. 본 발명의 배양 배지는 비세포 상해성의 PI3K 액티베이터의 유효량, PVA의 유효량, TPO 및 비세포 상해성의 TPO 수용체 아고니스트의 유효량 중 어느 하나 또는 둘 모두, 및 UM171을 함유해도 된다.
- [0172] 본 발명에 따르면, 인간조혈줄기세포를 배양하는 방법은 인간조혈줄기세포로부터 거핵구 계열의 세포를 제조하는 방법일 수 있다. 이 실시 형태에서, 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고, PI3K 액티베이터는 740Y-P이고, 또한 TPO 수용체 아고니스트는 Butyramide인 배양 배지일 수 있다. 이 특정의 양태에서, 배양 배지는 UM171을 함유하지 않을 수 있다.
- [0173] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법은 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도[4,5-b]인돌-4-일]시클로헥산-1,4-디아민(이하, "UM171"이라고도 함)의 존재하에서 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 UM171을 추가로 포함할 수 있다. 이에 따라, 인간조혈줄기세포는 인간조혈줄기세포로서의 성질을 유지하기 쉬워질 수 있거나, 거핵구 계열의 세포(예를 들면, 거핵구 전구세포 및 거핵구)로의 분화를 억제할 수 있다.
- [0174] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법은 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도[4,5-b]인돌-4-일]시클로헥산-1,4-디아민(이하, "UM171"이라고도 함)의 존재하에서 배양하는 것을 포함하지 않는다. 본 발명

의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 UM171을 더 함유하지 않는다. 이에 의해 인간 조혈줄기세포는 거핵구 계열의 세포(예를 들면, 거핵구 전구세포 및 거핵구)로 분화하기 쉬워진다.

- [0175] 또한, 본 발명에 따르면, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0176] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양 배지 중에서 배양하는 것을 포함하고,
- [0177] 배양 배지는 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜을 함유하는, 방법이 제공된다. 이 방법에서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배지는 알부민을 함유하지 않을 수 있다. 이 방법에서 배양 배지는
 - [0178] (1) 포스포티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
 - [0179] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
 - [0180] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 추가로 함유해도 된다. 이 실시 형태에서, 상기 배양에 의해 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 증가 또는 유지될 수 있다.
- [0181] 본 발명에 따르면, 배양 배지 중에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배양하는 방법으로서,
- [0182] 배양 배지 중에서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜과 접촉시키는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 이 방법에서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배지는 알부민을 함유하지 않을 수 있다. 이 방법은
- [0183] 배양 배지 중에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포와
 - [0184] (1) 포스포티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K) 액티베이터와 트롬보포이에틴(TPO) 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 접촉시키는 것;
 - [0185] (2) 줄기세포인자(SCF) 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 효능제를 접촉시키는 것; 또는
 - [0186] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 접촉시키는 것을 추가로 포함해도 된다. 이 실시 형태에서, 상기 배양에 의해 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 수가 증가 또는 유지될 수 있다.
- [0187] 본 발명자들은 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 일부 TPO 수용체 아고니스트를 함유하는 일부 화합물이 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포에 대하여 세포 상해성을 나타낼 수 있음을 명백히 알 수 있다.
- [0188] 따라서, 본 발명에 따르면, 본 발명에서, PI3K 액티베이터는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포에 대하여 비세포 상해성이다.
- [0189] 본 발명에서, 또한 TPO 수용체 아고니스트는 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포에 대하여 비세포 상해성이다. PI3K 액티베이터가 비세포 상해성인지 여부는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험에 의해 당업자라면 적절하게 확인할 수 있다. 여기서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험은 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 100ng/mL TPO 및 0.1% PVA를 함유하는 IMDM 배지를 사용하여 확인할 수 있다. 또한, TPO 수용체 아고니스트가 비세포 상해성인지 여부는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험에 의해 당업자라면 적절하게 확인할 수 있다. 여기서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양 시험은 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 10ng/mL SCF 및 0.1% PVA를 함유하는 IMDM 배지를 사용하여 확인할 수 있다.
- [0190] 본 발명의 일 양태에서, PI3K 액티베이터는 아미노산 서열 RQIKIWFQNRRMKWKKSDGGYMDMS로 나타내어지는 펩티드로서, Y가 인산화된 펩티드 ("740Y-P"라고도 함)일 수 있다.
- [0191] 본 발명의 일 양태에서, TPO 수용체 아고니스트는 3-[4-[[[4-[2-메톡시-3-(1-tert-부틸-2-옥사펜탄-1-일)페닐]티아졸-2-일]아미노]카르보닐]-2,6-디클로로페닐]-2-메틸프로펜산(이하, "Butyzamide"라고도 함)일 수 있다.
- [0192] 본 발명의 일 양태에서, PI3K 액티베이터는 740Y-P이고, 또한 TPO 수용체 아고니스트는 Butyzamide이다.
- [0193] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지이다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 화학적으로 정의된 배지이다. 본 발명의 일 양태에서, 본

발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 알부민 프리, 사이토카인 프리 또는 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 배지(바람직하게는 무혈청 배지, 보다 바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 알부민 프리의 배지이다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 사이토카인 프리의 배지이다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 배지이다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유해도 된다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이고, 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 배지이며, 폴리비닐알코올, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유한다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 폴리비닐 카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜을 함유하는 배지이다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 폴리비닐 카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜, SCF 대신 PI3K 액티베이터, TPO 대신 TPO 수용체 아고니스트를 함유해도 된다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 폴리비닐 카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유해도 된다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 폴리비닐 카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜, SCF 대신에 PI3K 액티베이터, TPO 대신에 TPO 수용체 아고니스트, 및 4-N-[2-벤질-7-(2-메틸테트라졸-5-일)-9H-피리미도 [4,5-b]인돌-4-일]사이클로헥산-1,4-디아민(UM171)을 함유해도 된다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 알부민 프리 및 사이토카인 프리의 무혈청 배지(바람직하게는 화학적으로 정의된 배지)이며, 폴리비닐 카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜, PI3K 액티베이터, TPO 수용체 아고니스트 및 UM171을 함유해도 된다. 본 명세서에서, 배양액이 "A 대신에 B를 함유한다"란, 배양액에 A를 함유시키지 않지만, 해당 배양액이 B를 함유하는 것을 의미한다.

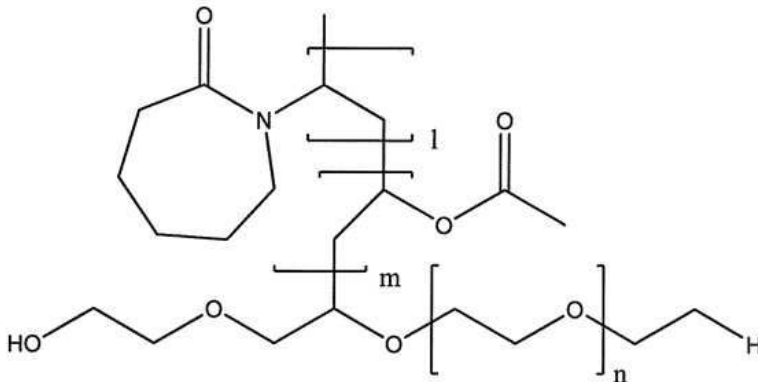
- [0194] 본 발명의 일 양태에서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양을 위한 배지는,
- [0195] 폴리비닐 카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜을 함유하고, 또한
- [0196] (1) PI3K 액티베이터와 TPO 및 TPO 수용체 아고니스트로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 함유하고;
- [0197] (2) SCF 및 PI3K 액티베이터로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상과 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고; 또는
- [0198] (3) PI3K 액티베이터와 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고,
- [0199] 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포용의 배양 배지일 수 있다. 이 양태에서, 배지는 알부민을 함유하지 않을 수 있다. 상기 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양용 배지는 UM171을 더 함유하고 있어도 된다. 상기 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양용 배지는 본 발명의 배양 방법에서 사용할 수 있다. 본 발명의 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양용 배지는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 증식시킬 수 있다. 본 발명의 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양용 배지는 인간조혈줄기세포의 줄기세포 포성을 유지할 수 있다. 본 발명의 인간조혈줄기세포의 배양용 배지는 인간조혈줄기세포를 그의 줄기세포성을 유지하면서 증식시킬 수 있다.
- [0200] 배양 배지는, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 배양에 적합한 것을 적절히 사용할 수 있다. 기초 배지로는 S-clone SF-3 배지, F12 배지, StemSpan(Stem Cell technologies), STEM α(STEM ALPHA), StemPro-34 무혈청 배지(Gibco Invitrogen), StemPro MSC 무혈청 배지(Invitrogen), HSC -CFU 배지(Miltenyl Biotech), S-Clone 무혈청 배지(SF-02, SF-03, CM-B, SF-B)(산코준야쿠), HPGM 배지(산코준야쿠), AIM V 배지(Invit), Marrow MAX 골수 배지(Invitrogen), KnockOut DMEM/F-12 배지(Invitrogen), Stemline 조혈줄기세포 증식 배지(Sigma), SYN 무BY 청청 배지 AbCys SA), MyeloCult 배지(StemCell Technologies), HPG 무혈청 배지(Lonza), UltraCULTURE 배지(Lonza), Opti-MEM 배지(Gibco Invitrogen 등), MEM 배지(Gibco Invitrogen 등), MEM α(Gibco Invitrogen 등), DMEM 배지(Gibco Invitrogen 등), IMDM 배지(Gibco Invitrogen 등), PRMI 1640 배지

(Gibco Invitrogen등), Ham F-12 배지(Gibco 등), RD 배지 등을 사용할 수 있다. 배양 배지는 기초 배지를 포함한다. 배양 배지는, 예를 들면, 인슐린, 트랜스페린(Apo), 아셀렌산나트륨, 및 에탄올아민으로부터 선택되는 하나 이상 또는 전부를 함유해도 된다. 배양 배지는 HEPES, 피루브산나트륨, 비타민류, 아미노산류, 헤파린, 헤파란 황산, 콘드로이틴 황산 등을 함유하고 있어도 된다. 배양 배지는 항생물질(예를 들면, 페니실린 및 스트렙토마이신)을 함유해도 된다. 배양 배지는 글루타민을 함유해도 된다. 배양 배지는, 예를 들어, 인슐린, 트랜스페린(Apo), 아셀렌산나트륨, 에탄올아민, 및 항생물질을 함유해도 되고, 또한 HEPES를 함유해도 된다.

[0201] 본 발명의 배양 배지는 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜(예를 들면, 폴리에틸렌글리콜)을 함유할 수 있다.

[0202] 본 발명의 모든 양태에서, 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜은 하기 화학식을 가질 수 있다:

[0203] [화학식 1]



[0204]

[0205] {식 중, n은 5~50 중 임의의 자연수이고, m은 10~100 중 임의의 자연수이고, l은 10~200 중 임의의 자연수이다.}

[0206] 일 양태에서, n은 5~20, 또는 10~20의 임의의 자연수이고, m은 20~50, 또는 30~40의 임의의 자연수이고, l은 30~100, 또는 50~60 중 임의의 자연수일 수 있다.

[0207] 또한, 수식된 폴리알킬렌글리콜은 상기 에틸렌글리콜 단위가 알킬렌글리콜 단위가 된 화합물일 수 있다. 알킬렌은 탄소수가 1~10, 예를 들면 1-5의 알킬렌일 수 있고, 바람직하게는 탄소수가 2 또는 3일 수 있다.

[0208] 본 발명의 배양 배지는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리에틸렌글리콜 존재하의 환경 하에서 증식시키기 때문에, 비세포 상해성의 PI3K 액티베이터의 유효량과 폴리비닐카프로락탐 블록 및 폴리비닐아세테이트 블록의 공중합체에 의해 수식된 폴리알킬렌글리콜(예를 들면, 폴리에틸렌글리콜)의 유효량을 함유할 수 있다. 여기서, 배지는 알부민을 함유하지 않을 수 있다. 본 발명의 배양 배지는 SCF 및 TPO 중 어느 하나 또는 둘 모두를 추가로 함유할 수 있다. 본 발명의 배양 배지는 TPO 대신에 비세포 상해성의 TPO 수용체 아고니스트의 유효량을 함유해도 된다. 본 발명의 배양 배지는 비세포 상해성의 PI3K 액티베이터의 유효량, PVA의 유효량, TPO 및 비세포 상해성의 TPO 수용체 아고니스트의 유효량 중 어느 하나 또는 둘 모두, 및 UM171을 함유해도 된다.

[0209] 본 발명에 따르면, 인간조혈줄기세포를 배양하는 방법은 인간조혈줄기세포로부터 거핵구 계열의 세포를 제조하는 방법일 수 있다. 이 실시 형태에서, 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고, PI3K 액티베이터는 740Y-P이고, 또한 TPO 수용체 아고니스트는 Butyramide인 배양 배지이다. 이 특정의 양태에서, 배양 배지는 UM171을 함유하지 않을 수 있다.

[0210] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법은 UM171의 존재하에서 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배양 배지는 UM171을 추가로 함유해도 된다.

[0211] 본 발명에서, 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포는 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 증식에 적합한 조건 하에서 배양될 수 있다. 본 발명은 배양물로부터 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 단리하는 것을 추가로 포함해도 된다. 인간조혈줄기세포의 단리는 당업자에게 공지된 방법에 의해 실시될 수 있고, 예를 들면 조혈줄기세포 마커를 사용하여 유세포 분석 등에 의해 실시할 수 있다. 인간조혈줄기세포는 인간조혈줄기

세포로 취득해도 되고, 그 후, 다른 세포로 분화하게 한 후 사용해도 된다. 인간조혈줄기세포로부터 다른 세포로 분화하는 경우에는, 해당 다른 세포의 분화에 적합한 조건하에서 분화시키고 싶은 세포를 배양할 수 있다. 인간혈구계 세포의 단리는 또한 당업자에게 공지된 방법에 의해 실시할 수 있고, 예를 들면, 해당 인간혈구계 세포의 마커를 사용하여 유세포 분석 등에 의해 실시할 수 있다.

- [0212] 본 발명에 따르면, 본 발명의 배양 방법에 의해 얻어진 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포가 제공된다. 본 발명의 배양 방법에 의해 얻어진 인간조혈줄기세포는 CD34 및 바람직하게는 CD38을 마커로서 정제할 수 있다. 본 발명의 배양 방법에 의해 얻어진 인간조혈줄기세포는 종래의 방법으로 얻은 인간조혈줄기세포보다 레시피엔트(recipient)에게 이식 후의 생착율이 좋다. 따라서, 본 발명에 따르면, 본 발명의 배양 방법에 의해 얻어지고, 배양 전과 비교하여 레시피엔트에 이식 후 생착율이 향상된 인간조혈줄기세포가 제공된다.
- [0213] 본 발명의 배양 방법에서, 배양은 피브로넥틴 존재하에서 실시될 수 있다. 본 발명의 배양 방법에서는, 조혈줄기세포와 피브로넥틴이 접촉 가능한 조건 하에서 실시될 수 있다. 배양은 본 발명의 배양 방법에서 바람직하게는, 예를 들면 배양 용기의 내부(예를 들면, 바닥면)가 피브로넥틴으로 코팅된다.
- [0214] 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 알부민을 함유하지 않는 배지는, 혈청 알부민을 0.1(w/v)% 미만, 0.05(w/v)% 미만, 0.01(w/v)% 미만, 0.005(w/v)% 미만, 0.001(w/v)% 미만, 0.0005(w/v)% 미만, 또는 0.0001(w/v)% 미만 밖에 함유하지 않거나, 완전히 함유하지 않는다.
- [0215] 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 제조함 TPO를 함유해도 된다. 제조함 TPO는 예를 들면 포유류의 제조함 TPO일 수 있고, 제조함 인간 TPO일 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, TPO 농도는 20~200ng/mL이고, 보다 바람직하게는 30~150ng/mL이고, 더욱 바람직하게는 40~150ng/mL이며, 예를 들면 100ng/mL로 할 수 있다.
- [0216] 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 제조함 SCF를 더 함유해도 된다. 제조함 SCF는, 예를 들면 포유류의 제조함 SCF일 수 있고, 제조함 인간 SCF일 수 있다. 본 발명의 일 양태에서, SCF 농도는 1~200ng/mL이고, 보다 바람직하게는 1~150ng/mL이고, 더욱 바람직하게는 1~100ng/mL이고, 예를 들면 1~50ng/mL이고, 보다 바람직하게는 1~30ng/mL이고, 더욱 바람직하게는 1~20ng/mL이고, 예를 들면 5~15ng/mL 일 수 있다.
- [0217] 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 제조함 TPO와 제조함 SCF를 함유해도 된다. 이 양태에서, TPO 농도는 20~200ng/mL이고, 보다 바람직하게는 30~150ng/mL이고, 더욱 바람직하게는 40~150ng/mL이며, 예를 들면 100ng/mL 일 수 있고, 또한 SCF 농도는 1~200ng/mL이고, 보다 바람직하게는 1~150ng/mL이고, 더욱 바람직하게는 1~100ng/mL이며, 예를 들면 1~50ng/mL이고, 더욱 보다 바람직하게는 1~30ng/mL이고, 더욱 더 바람직하게는 1~20ng/mL이며, 예를 들면 5~15ng/mL일 수 있다. 특정 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 40~150ng/mL의 제조함 TPO 및 1~50ng/mL의 제조함 SCF를 포함할 수 있다. 일 바람직한 실시 형태에서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 TPO 농도가 SCF 농도보다 높고, 예를 들면 상기 농도 범위에 포함되는 임의의 농도여도 되고, 또한 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 6배 이상, 7배 이상, 8배 이상, 9배 이상, 또는 10배 이상 높아도 된다.
- [0218] 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 Flt3L(특히, 인간 Flt3L)을 더 함유해도 된다. FLT3은 FMS 관련 티로신키나아제3으로 알려진 세포 표면의 수용체(CD135라고도 함)이다. FLT3은 예를 들면 조혈줄기세포의 표면에서 발현된다. FLT3L은 FLT3의 리간드이며, 예를 들면 조혈줄기세포 및 조혈전구세포의 정상적인 발생에 관여한다. 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 Flt3L에 더하여 IL-3 및/또는 GM-CSF를 더 포함할 수 있다. Interleukin-3(IL-3)은 조혈성장인자이며 골수계 전구세포의 증식 및 생존에 중요한 역할을 한다. GM-CSF는 과립구 단핵구 콜로니 자극 인자이며 조혈줄기세포로 분화를 촉진하는 사이토카인이다. GM-CSF는 IL-3 및 IL-5와 협력적으로 작용하여 조혈줄기세포를 골수계 전구세포로 분화시킬 수 있다. 예를 들면, GM-CSF는 조혈줄기세포를 예를 들면 전기 적아구계 전구세포(BFU-E), 과립구 단핵구 콜로니 형성 세포(CFU-GM), 호산구 콜로니 형성 세포(CFU-Eo) 및 호염기구 콜로니 형성 세포(CFU-Ba)로 분화시킬 수 있다. GM-CSF는 CFU-GM을 호중구와 단핵구로, CFU-Eo를 호산구로 분화시키는 작용을 갖는다. CFU-Ba는 IL-3 또는 IL-5에 의해 호염기구로 분화될 수 있다. 따라서, 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 Flt3L을 함유해도 되고, IL-3 및/또는 GM-CSF를 더 함유해도 된다. 또한, 본 발명의 배양 방법은 각 혈구계 세포의 증식 및/또는 분화에 적합한 조건하에서 이루어질 수 있다. 이러한 배양 조건은, 알부민을 함유하는 배지의 배양 조건으로서 잘 알려져 있고, 알부민을 저감 또는 결실시킨 배지를 사용한 본원 발명의 배양 방법에서도 마찬가지로 적용할 수 있다.
- [0219] 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 SCF 대신에 PI3K 액티베이터를 함유하고 및/또는 TPO 대신에 TPO 수용체 아고니스트를 함유해도 된다. 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 SCF 대신 PI3K 액티베이터를 함유

하고, 또한 TPO 대신 TPO 수용체 아고니스트를 함유해도 된다. 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 사이토카인 프리의 배지이며, PI3K 액티베이터 및 TPO 수용체 아고니스트를 함유해도 된다. 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 SCF 대신 PI3K 액티베이터를 함유하고, 또한 TPO 대신 TPO 수용체 아고니스트를 함유하고, 또한 UM171을 추가로 함유해도 된다. 본 발명의 배양 방법에서 사용되는 배지는 사이토카인 프리의 배지이며, PI3K 액티베이터, TPO 수용체 아고니스트 및 UM171을 함유해도 된다.

- [0220] 본 발명의 인간조혈줄기세포의 배양 방법은 조혈줄기세포를 조혈줄기세포의 유지 및/또는 증식에 충분한 조건 하에서 증식시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이 양태에서, 예를 들면, 조혈줄기세포를 배양 개시시부터 10 배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 200배 이상, 300배 이상, 400배 이상 또는 500배 이상으로 증식시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0221] 인간조혈줄기세포의 유지 및/또는 증식에 충분한 조건은, 예를 들면, 상기 배지 중에서 배양하는 조건일 수 있다. 인간조혈줄기세포의 유지 및/또는 증식에 충분한 조건은 바람직하게는, 예를 들면 피브로넥틴 존재 조건일 수 있고, 인간조혈줄기세포와 피브로넥틴이 접촉가능한 조건일 수 있다.
- [0222] 본 발명의 인간혈구계 세포의 배양 방법은 인간혈구계 세포를 상기 인간혈구계 세포의 유지 및/또는 증식에 충분한 조건 하에서 증식시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이 양태에서, 예를 들면, 조혈줄기세포를 배양 개시시부터 10배 이상, 50배 이상, 100배 이상, 200배 이상, 300배 이상, 400배 이상 또는 500배 이상으로 증식시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0223] 본 발명의 배양 방법은,
- [0224] 증식한 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 배지로부터 회수하는 것을 추가로 포함해도 된다. 게다가, 회수된 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포는 농축되거나 단리되어도 된다. 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 농축 또는 분리는 세포 표면 마커를 사용하여 실시할 수 있다. 인간조혈줄기세포의 농축 또는 단리에서 사용할 수 있는 세포 표면 마커로서는, CD34나 CD38을 들 수 있다. 조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 농축 또는 분리는 셀 소터(cell sorter)를 사용하여 실시할 수 있다.
- [0225] 본 발명에 따르면, 엑스비오에서의 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포의 제조 방법으로서, 본 발명의 배양 방법을 포함하는 방법이 제공된다. 본 발명의 제조 방법에서는, 기능적인 인간조혈줄기세포 또는 인간혈구계 세포를 얻을 수 있다.
- [0226] 여기서, 기능적이란, 인간조혈줄기세포 이식에 의해, 이식을 받은 인간 개체(레시피엔트)에서 조혈계를 회복할 수 있는 것을 의미한다.
- [0227] [실시에]
- [0228] 참고예 1: 알부민을 함유하지 않는 배양 배지를 이용한 조혈줄기세포의 증식 시험
- [0229] 본 참고예에서는, 마우스조혈줄기세포(KSL)와 인간조혈줄기세포(CD34+CD38-)를 알부민을 함유하지 않는 배양 배지를 이용하여 증식시키는 시험을 실시하였다. 배양 배지는 Wilkinson et al., Nature, 571: 117-121, 2019에 기재된 폴리비닐알코올(PVA)을 함유하고, 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지로 하였다.
- [0230] 구체적으로는, 마우스조혈줄기세포의 배양에 있어서, 배양 배지는 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민(ITSX), 10mM HEPES, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 100ng/mL 마우스 트롬보포이틴(mTPO) 및 10ng/mL 마우스 줄기세포 인자(mSCF)를 함유하는 F12 배지로 하였다. 상기 배지에는 PVA가 최종 농도 0.1%가 되도록 함유시켰다. 인간조혈줄기세포 배양에 있어서 배양 배지는 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민(ITSX), 25mM HEPES, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 100ng/mL 인간 트롬보포이에틴(hTPO) 및 10ng/mL 인간 줄기세포 인자(hSCF)를 함유하는 IMDM 배지로 하였다. 상기 배지에는 PVA가 최종 농도 0.1%가 되도록 함유시켰다.
- [0231] 이하 실시예에서 사용된 모든 배지에 있어서, 별도의 언급이 없는 한, 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민(ITSX), 25mM HEPES, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민 및 PVA를 함유하는 IMDM 배지(이하, "공통 배지"라고도 함)를 사용했다. 따라서, 이하에서는 공통 배지에 첨가 성분에 초점을 맞추어 배지를 표기한다. 예를 들면, 상기 배지는 공통 배지에 더하여 TPO와 SCF를 함유하기 때문에, 편의상 TPO+SCF 배지라고 부른다. 각 인자의 농도까지 나타내는 경우에는 SCF10+TPO100으로 기재하거나, 또는 S10+T100으로 생략하여 기재할 수도 있다.
- [0232] 마우스조혈줄기세포로는 마우스 골수의 KSL 세포를 사용했다. 구체적으로, 마우스 골수 세포는 경골, 대퇴골,

골반으로부터 분리되고 APC-c-KIT 항체로 염색되었다. c-KIT+ 세포는 항-APC 자기 비드와 LS 컬럼(Miltenyi Biotec)을 사용하여 농축되었다. 그 후, c-KIT 농축 세포를 항-CD34, 항-c-KIT, 항-SCA1 및 스트렙타비딘-APC/eFluor 780으로 90분 동안 염색하기 전에 리니에이지(Lineage) 항체 콕테일(비오틴화 CD4, CD8, CD45R, TER119, 6G/LY-6C 및 CD127)로 염색하였다. 그 후, 세포 집단은 FACS AriaII(BD)를 사용하고, 요오드화프로피듐을 사멸 염색으로서 사용하여, 배지를 함유하는 웰에 직접 선별하여 정제하였다.

- [0233] 인간조혈줄기세포로는 인간 골수의 CD34+CD38- 세포를 사용했다. 구체적으로는, 시판되고 있는 인간 골수 CD34 양성 세포(Lonza 2C-101)를 구입하였다.
- [0234] 결과는 도 1에 나타낸 바와 같았다. Wilkinson et al., 2019에서, 마우스조혈줄기세포는 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에서는 SCF 및 TPO 존재하에서도 장기간의 증식을 유지할 수 없었다. 그러나 Wilkinson et al., 2019에서는, PVA를 배지에 첨가함으로써, 마우스조혈줄기세포는 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에서 장기적으로 증식할 수 있는 것을 나타내고 있다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 마우스조혈줄기세포는 PVA를 함유하고 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에서 양호하게 증식하였으나, 인간조혈줄기세포는 이 배지에서는 양호한 증식은 관찰되지 않았다.
- [0235] 참고예 2: 마우스조혈줄기세포와 인간조혈줄기세포의 신호전달의 차이
- [0236] SCF 및 TPO 존재하에서 마우스조혈줄기세포 및 인간조혈줄기세포의 신호 경로를 분석하였다.
- [0237] 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서 마우스 및 인간 각각의 조혈줄기세포를 10ng/mL의 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 트롬보포이에틴(TPO) 존재하에서 배양한 조혈줄기세포에서의 SCF 및 TPO의 하류의 신호 인자의 인산화 정도를 인산화 면역 염색법으로 분석하였다. 먼저, SCF 및 TPO 신호의 하류의 각 인자의 인산화 상태를 각각의 인자의 인산화 형태 특이적인 항체를 사용하여 검출하였다. 구체적으로는, Akt, PI3K 및 Stat5 등의 대표적인 신호전달 분자에 있어서의 인산화 항체를 이용하여 사이토카인으로 자극한 세포에 반응시킨 후 형광 현미경에 의해 세포에 반응한 항체의 형광 강도를 정량적으로 분석했다.
- [0238] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 조사한 7개의 인자 중, 일부 인자에서는 마우스조혈줄기세포와 인간조혈줄기세포에서 인산화 상태가 다른 인자가 몇 개 발견되었다. 그 중에서, PI3K 및 Akt에 대해서는, SCF 및 TPO 첨가 24시간 후부터 마우스조혈줄기세포에서는 인산화 형태가 많이 얻어진 것에 비해, 인간조혈줄기세포에서는 거의 인산화 형태가 인정되지 않거나 마우스조혈줄기세포에서 인산화 형태량보다 적은 양이 나타났다.
- [0239] 이에, 0.3 μM AKTα(판매사명 Sigma-Aldrich, 제품번호 123871) 또는 20 μM PI3Kα를 첨가한 배양 배지에서 인간조혈줄기세포를 배양하였다. 배양 3일 후, 5일 후 및 7일 후에 세포를 계수하고, 배양 첫날의 세포수를 1로 했을 때의 각 시점에서의 세포수의 비를 구하였다. 이하의 실시예에 있어서, PI3Kα로서는, 740Y-P(판매사명 Tocris, 제품번호 1983)를 사용하였다. 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, PI3Kα의 존재하에서 인간조혈줄기세포는 명확한 증식을 나타내었다. 한편, AKTα에 대해서는, 본 실험의 환경하에서는, 인간조혈줄기세포에 대한 증식 작용은 인정되지 않았다.
- [0240] 다음, 인간조혈줄기세포의 배양과 관련하여 PI3Kα가 SCF를 완전히 대체하는지 여부를 조사하였다. 인간조혈줄기세포용의 상기 배양 배지에 20 μM의 PI3Kα를 첨가한 경우(S10+PI3Kα20+T100)와, 상기 배양 배지에 20 μM의 PI3Kα를 첨가하고, SCF를 제외한 경우(PI3Kα20+T100)로, 인간조혈줄기세포를 7일간 배양한 후, 세포 총 수와 항 CD34 항체를 이용한 세포 정렬(cell sorting)에 의한 단리 CD34+ 세포의 수를 구했다. 결과는 도 4에 나타낸 바와 같았다. 도 4에 나타낸 바와 같이, PI3Kα를 첨가한 경우에는, SCF의 유무에 의해 세포 총 수 및 CD34+ 세포 수에 유의차는 확인되지 않았다.
- [0241] 이어서, 인간조혈줄기세포의 배양과 관련하여, TPO를 TPO 수용체 아고니스트로 대체할 수 있는지 여부를 조사하였다. TPO 수용체 아고니스트로는 Butyzamide, 엘트롬보팍 및 아바트롬보팍이 알려져 있다. 상기 배양 배지로부터 TPO를 제외한 조성에, 0.1% 제조합 인간 혈청 알부민(Albumin Biosciences)의 존재하 또는 PVA 존재하에서, 0.1 μM Butyzamide, 3 μg/mL 엘트롬보팍, 또는 3 μM 아바트롬보팍을 첨가한 배지 중에서 인간조혈줄기세포를 배양하였다. 본 실험에서는 인간조혈줄기세포로서 Mpl32D 세포를 사용했다. 결과는 도 5에 나타낸 바와 같았다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 알부민 존재하에서, Butyzamide, 엘트롬보팍 및 아바트롬보팍은 TPO의 비존재하에서 인간조혈줄기세포의 증식을 지지할 수 있었다. 그에 비해, PVA의 존재하(알부민 비존재하)에서는, TPO의 비존재하에서 Butyzamide는 인간조혈줄기세포에 대하여 현저한 세포 증식 효과를 나타내었지만, 아바트롬보팍에서는 그 효과가 작고, 트롬보팍에서는 효과가 거의 인정되지 않았다.
- [0242] 또한, 구입한 인간 골수 CD34+ 세포(판매사명 Lonza, 제품번호 2C-101) 혹은, 양도된 신선한 체대혈을

microbeads로 CD34+ 세포를 분리한 것을 배양 실험에서 사용하였다. 24웰 플레이트에 1웰당 $0.2\sim 1.0\times 10^5$ 세포를 분주(分注)하고, 인간조혈줄기세포용의 배양 배지로부터 TPO를 제외하고, 상기 TPO 수용체 아고니스트(이하, "TPOago"라고 하는 경우가 있다) 중 하나로 대체하여 실험을 실시했다. 배양 첫날에 대한 배양 7일째의 세포수의 비를 구하였다. 결과는 도 6에 나타낸 바와 같았다. 도 6에 나타낸 바와 같이, 인간조혈줄기세포는 알부민 비존재하 PVA의 존재하에서는, Butyzamide의 존재하에서만 유의한 세포 증식을 나타내었다. 알부민 비존재하 PVA의 존재하에서는, 아바트롬보팍의 존재하 또는 엘트롬보팍의 존재하에서, 조혈줄기세포는 세포 사멸을 일으켰다. 그러나, 이들 TPO 수용체 아고니스트는 생체내 환경에서는 간경변의 외과적 치료 환자 및 재생 불량성 빈혈 환자의 치료에서 사용되는 안전성이 높은 화합물이다. 본 실시예의 결과로부터, 알부민 비존재하 PVA의 존재하에서, 일부 TPO 수용체 아고니스트는 인간조혈줄기세포에 대하여 세포 상해성을 나타낼 수 있음을 나타낸다. 또한, 이것으로부터, TPO 수용체 아고니스트에는 인간조혈줄기세포에 대하여 세포 상해성을 갖는 것이 존재하는 것, 및 인간조혈줄기세포를 배양하기 위해서는, 인간조혈줄기세포에 대해서 세포 상해성을 갖지 않는 것을 사용하면 된다는 것이 시사되었다.

[0243] 이어서, 알부민 비존재하 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 PI3Ka 및 TPO 수용체 아고니스트로 대체할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이하 실시예에서, TPO 수용체 아고니스트로서 Butyzamide를 사용하였다. 구입한 인간 골수 CD34+ 세포(판매사명 Lonza, 제품번호 2C-101) 혹은, 양도된 신선한 제대혈을 microbeads를 사용하여 CD34+ 세포를 상기와 같이 분리하여 배양 실험에서 사용하였다. 24웰 플레이트에 1웰당 $0.2\sim 1.0\times 10^5$ 세포를 분주하고, SCF를 $20\ \mu\text{M}$ PI3Ka로 치환한 조성의 배지(PI3Ka $20\ \mu\text{M}$ +TPO100), 및 SCF를 $20\ \mu\text{M}$ PI3Ka로 치환하고, TPO를 $0.1\ \mu\text{M}$ Butyzamide로 치환한 조성의 배지(PI3Ka $20\ \mu\text{M}$ +TPOago $0.1\ \mu\text{M}$) 중에서 각각 배양하였다. 7일 후에, 세포 총 수를 구하고, 유세포 분석에 의해 CD34+ 세포의 수를 구하였다. 그 후, 배양 개시시와 비교한 증식률을 구했다. 결과는 도 7에 나타낸 바와 같았다. 도 7에 나타낸 바와 같이, Butyzamide는 TPO를 완전히 대체할 수 있음이 밝혀졌다. 또한 배양 전후에 CD34+ 세포를 셀 소터로 분류하고, 100 세포씩 MetocultH4415에 파종하고, 콜로니 분석을 실시하였다. 2주 후에 콜로니를 찍엽하고, 사이토스핀 표본을 제작하고, 김자 염색을 실시한 후, 콜로니의 종류를 현미경 하에서 판정하였다. CD34+ 세포 50개당 GEMM 콜로니를 카운트하고 배양 전과 비교한 콜로니 수의 증가율을 구하였다. 그 결과, GEMM 콜로니 형성 능력에 있어서 Butyzamide는 TPO를 완전히 대체할 수 있음이 밝혀졌다.

[0244] 또한 다음으로, SCF와 TPO를 함유하지 않는 배양 배지에 대해, PI3Ka $20\ \mu\text{M}$, 및 TPOago $0.1\ \mu\text{M}$ 의 어느 하나 또는 모두를 첨가한 배지 중에서, 인간조혈줄기세포의 배양 실험을 실시하였다. 배양 7일째에 총 세포수 및 함유된 CD34+ 세포수를 유세포 분석에 의해 계수하고, 배양 개시시에 대한 증식률을 구하였다. 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, PI3Ka 단독 또는 Butyzamide 단독에서는, 세포의 증가는 확인되지 않았지만, PI3Ka와 TPOago 모두가 존재하는 경우에, 세포수가 현저하게 증가하는 것이 밝혀졌다.

[0245] 또한 다음으로, SCF와 TPO를 PI3Ka와 TPOago로 대체한 배지에서 어느 세포 집단이 증식하기 쉬운지를 조사했다. 양도된 신선한 제대혈을 microbeads를 사용하여 CD34+ 세포를 상기와 같이 분리하여 배양 실험에서 사용하였다. 세포를 항CD34-PE-Cy7항체(제품사명BD Biosciences, 제품번호348791), 항CD38-V450항체(제품사명BD Biosciences, 제품번호646851), 항CD133-PE항체(제품사명Miltenyi Biotec, 제품번호130-080-801), 항CD45RA-APC항체(제품사명BioLegend, 제품번호304112), 및 항CD49f-PE항체(제품사명BioLegend, 제품번호313611)를 사용하여 셀 소터에 의해 분획하였다. 인간 제대혈 유래 조혈줄기세포의 순화 마커로 보고된 CD34+ 분획, CD34+CD38-CD133+ 분획 및 CD34+CD38-CD45RA-CD49f+ 분획 각각에 대해 배양 개시 후 7일째에 총 세포수 및 함유된 CD34+ 세포수를 유세포 분석에 의해 계수하고 배양 개시시에 대한 증식률을 얻었다. 결과는 도 9에 나타낸 바와 같았다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 어느 세포 분획에서도 현저한 세포 증식이 확인되었지만, CD34+CD38-CD133+ 분획 및 CD34+CD38-CD45RA-CD49f+ 분획, 특히 CD34+CD38-CD45RA-CD49f+ 분획에 있어서 세포 증식이 현저했다.

[0246] 참고예 3: 인간조혈줄기세포의 장기 배양 실험

[0247] 인간조혈줄기세포를 상기 인간조혈줄기세포용 배양 배지로서, SCF와 TPO 대신에 PI3Ka $20\ \mu\text{M}$ 및 TPOago $0.1\ \mu\text{M}$ 을 함유하는 배양 배지 중에서 배양하였다. 배양 개시 후 7일째 및 14일째에 상기와 동일하게 하여 세포 총 수 및 CD34+ 세포수를 구하였다. 결과는 도 10에 나타낸 바와 같았다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 세포 총 수는 배양 일수가 경과함에 따라 증가하였지만, 한편, CD34+ 세포수는 7일째보다 14일째에 감소하였다.

[0248] 광학 현미경을 사용하여 배양한 세포를 관찰하면, 14일째에는 거대한 세포가 관찰되었다. 이 거대한 세포가 거핵구 또는 거핵구 전구 세포일 가능성을 확인하기 위해, 항-CD41a-FITC 항체(판매사명 BD Pharmingen, 제품번호

555466) 및 항CD42b 항체(판매자명 BD Pharmingen, 555473)를 사용하여 유세포 분석기에 의해 세포를 분석시켰다. 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 배양 개시 후 14일째의 세포의 대부분은 CD41a+CD42b+의 세포였다. 그러나, 도 11에 나타낸 바와 같이, 이 조건에서도 CD34+CD38- 세포는 증식했다.

[0249] 또한, 배양 개시 후 14일째에 얻어진 배양물 중의 CD34+ 세포를 100 세포씩 MetocultH4415에 과종하고, 콜로니 분석을 실시하였다. 2주 후에 콜로니를 채취하여, 사이토스핀 표본을 제작하였다. 그 후, 표본에 관하여, 감자 염색을 실시한 후, 현미경 하에서 콜로니 종류를 판정하였다. 결과는 도 12에 나타낸 바와 같았다. 콜로니의 종류는 G는 "과립구", E는 "적아구", m은 "대식세포", M은 "거핵구"를 함유하는 콜로니임을 의미한다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 많은 세포 콜로니는 거핵구를 함유한다.

[0250] 참고예 4: 인간조혈줄기세포의 장기 배양에 더욱 적합한 조건의 검토

[0251] 인간조혈줄기세포를 증식시킬 수 있는 화합물의 존재하에서 인간조혈줄기세포의 장기 배양을 시도했다.

[0252] 상기 인간조혈줄기세포용의 배양 배지로서, SCF와 TPO 대신에 PI3Ka 20 μM, 및 TPOago 0.1 μM을 함유하는 배양 배지(PI3Ka 20 μM+TPOago 0.1 μM), 및 해당 배지에 대하여, SR-1(500nM) 및 UM171(35nM) 중 하나 또는 둘 모두를 추가로 첨가하여 제조된 배지(+SR-1, +UM171 및 +SR-1+UM171)를 준비하였다. 구입한 인간 골수 CD34+ 세포(판매사명 Lonza, 제품번호 2C-101) 혹은 양도된 신선한 체대혈을 microbeads를 사용하여 CD34+ 세포를 상기와 같이 분리하여 배양 실험에서 사용하였다. 24웰 플레이트에 1웰당 0.2~1.0×10⁵ 세포를 분주하고, 준비한 배지에서 CD34+ 세포를 배양하였다. 배양 개시 후 14일째에 상기와 동일하게 하여 세포 총 수 및 CD34+ 세포를 계수하고, 배양 개시 전부터의 증식률을 구하였다. 결과는 도 13에 나타낸 바와 같았다. 도 13에 나타낸 바와 같이, UM171을 더 함유하는 배양 배지에서는, 세포 총 수 및 CD34+ 세포수가 증가하고, CD34+ 세포의 증가율은, UM171을 함유하지 않는 배지와 비교하여 UM171을 함유하는 배지에서 유의하게 증가했다. 이에 비해, SR-1은 본 실험 조건에 있어서 세포를 사멸시켰다.

[0253] 또한, 조건 1: 상기 인간조혈줄기세포용의 배양 배지로서, SCF와 TPO 대신에 PI3Ka 20 μM 및 TPOago 0.1 μM을 함유하는 배양 배지(PI3Ka 20 μM+TPOago 0.1 μM)로 14일간 배양하는 것, 조건 2: 7일째 이후는 Butyramide를 함유하지 않는 배지(PI3Ka 20 μM) 조건으로 배양하는 것(Day7-Buty 없음) 및 조건 3: 배양 배지(PI3Ka 20 μM+TPOago 0.1 μM)에 UM171을 추가로 첨가한 배지(+UM171)로 14일간 배양하지만, 3개의 조건 하에서 CD34+ 세포를 배양하여 세포 총 수 및 CD34+ 세포수의 증가율을 구하였다. 또한, CD41+ 세포의 수를 유세포 분석기를 사용하여 구하였다. 결과는 도 14에 나타낸 바와 같았다. 도 14에 나타낸 바와 같이, 배양 개시 후 7일째에 Butyramide를 제외한 배지에서 배양하는 조건 2에서는, 조건 1과 비교하여, CD34+ 세포수가 증가하고, CD41+ 세포수가 감소했다. 도 14에 나타내는 바와 같이, UM171을 더 첨가한 배지에서 배양하는 조건 3에서는, 조건 1이나 2와 비교하여, CD34+ 세포의 증가율이 현저하게 증대하고, CD41+ 세포수가 현저하게 감소했다. 이로부터, PVA, PI3Ka 및 TPOago 존재하의 무혈청 배지 조건에 있어서, UM171은 인간조혈줄기세포를 증식시켜, 거핵구 전구 세포나 거핵구로의 세포의 분화를 억제하는 것이 밝혀졌다(도 15 참조).

[0254] 참고예 5: 배양 후의 CD34+ 세포의 이식 실험

[0255] 조건 1~3의 각각에서 7일간 배양한 인간 CD34+ 세포를 조사 NOG 마우스에 이식하여 세포의 생착을 확인하였다. 구체적으로는, 배양 후의 인간 CD34+ 세포를 1.5Gy의 γ선 조사한 NOG 마우스에 1×10⁴ 세포 이식하였다. 이식 12주 후에, 상기 NOG 마우스의 말초혈을 채취하고, 유세포 분석기를 사용하여 말초혈 중의 세포 성분을 분석하였다. 결과는 도 16에 나타낸 바와 같았다. 도 16에 나타내는 바와 같이, 조건 1 및 2에 있어서, 조혈줄기세포의 생착율이, 배양 전 CD34+ 세포를 이식했을 때에 각각 14.9% 및 11.1%이었던 것이, 배양 후의 CD34+ 세포의 이식은 각각 66.6% 및 54.9%로 증가하였다. 또한, 조건 3에 있어서, 조혈줄기세포의 생착율이, 배양 전 CD34+ 세포를 이식했을 때에 17%이었던 것이, 배양 후의 CD34+ 세포를 이식하면 67%로 증가했다.

[0256] 따라서 알부민 비존재하의 무혈청 배지 조건에 있어서, PVA 존재하에서 PI3K 활성화 제와 TPO 수용체 아고니스트는 인간조혈줄기세포를 양호하게 증식시키는 것, 및 증식한 인간 CD34+ 세포는 조혈줄기세포로서의 성질을 유지하고, 다른 개체에의 이식 후의 생착율을 향상시키는 것이 밝혀졌다. 또한, 인간조혈줄기세포는, 이 조건 하에서 장기 배양하면 그 일부가 거핵구로 분화되어, 이에 의해 거핵구를 얻을 수 있는 한편, 일부가 CD34+ 세포로서 증식하는 경향을 갖는다. 여기에 UM171을 첨가하면 CD34+ 세포의 증식률이 향상되어 거핵구로의 분화를 억제할 수 있는 것도 밝혀졌다.

[0257] 다음, 신선한 인간 체대혈에서 인간 단핵구를 분리했다. 조건 1 및 조건 3에서, 얻어진 세포(5×10⁵ 세포)를 배

양하고, 배양 개시 7일 후 및 14일 후에 총 세포수, CD34+ 세포수, 총 세포에서 차지하는 CD34+ 세포의 비율 및 세포의 생존율을 각각 구했다. 결과는 도 17에 나타난 바와 같았다. 도 17에 나타난 바와 같이, 임의의 조건 하에서도, 인간의 제대혈에서 얻은 단핵구는 배양과 함께 세포 총 수를 감소시켰다. 한편, 조건 3에서는, 총 세포에서 차지하는 CD34+ 세포의 비율이 조건 1보다도 현저하게 향상되었다. 또한, 세포의 생존율도 조건 3에서 조건 1보다 현저히 향상했다. 또한, CD34+ 세포수는 조건 3에서 현저한 증대를 나타낸 것에 비해, 조건 1에서는 세포수는 유지된 점에서는 양호했지만, 세포수의 증가는 확인되지 않았다.

[0258] 실시예 1: 알부민을 함유하지 않는 배양 배지를 이용한 조혈줄기세포의 증식 시험

[0259] 본 실시예에서는 마우스조혈줄기세포(KSL)와 인간조혈줄기세포(CD34+CD38-)를 알부민을 함유하지 않는 배양 배지를 사용하여 증식시키는 시험을 실시했다. 배양 배지는 Wilkinson et al., Nature, 571:117-121, 2019에 기재된 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에 있어서, 폴리비닐알코올(PVA) 대신에 다양한 폴리머를 함유하는 배지로 하였다.

[0260] 구체적으로, 마우스조혈줄기세포의 배양에 있어서, 배양 배지는 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민(ITSX), 10mM HEPES, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 100ng/mL 마우스 트롬보포이틴(mTPO) 및 10ng/mL 마우스 줄기세포인자(mSCF)를 함유하는 Ham's F12 배지로 하였다.

[0261] 인간조혈줄기세포 배양에 있어서 배양 배지는 1% 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민(ITSX), 25mM HEPES, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 100ng/mL 인간 트롬보포이에틴(hTPO) 및 10ng/mL 인간 줄기세포 인자(hSCF)를 함유하는 IMDM 배지로 하였다. 이하의 실시예에서는, 특별히 언급하지 않는 한, 조혈줄기세포의 배양에는, 상기 배양 배지를 사용하였다.

[0262] 배지에 첨가하는 폴리머는 이하와 같다: 폴리비닐피롤리돈 K12, 포비돈 K17, 포비돈, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌글리콜, 폴리비닐카프로락탐-폴리비닐아세트산-폴리에틸렌글리콜 그래프트 코폴리머(이하, "폴리머 A"라고 함)로 하였다. 보다 구체적으로는, BASF사 제조, 동일 농도의 KOLLIPHOR(상표) P188 bio(188 bio), KOLLIPHOR(상표) P 188 Geismar(188 Geismar), SOL-PLUS(Sol+), KOLLIPHOR(상표) P 407 Geismar(407 Geismar), KOLLIDON(상표) 30 Origin USA(30 USA), KOLLIDON(상표) 17 PF(17 PF), KOLLIDON(상표) 25(25), KOLLIDON(상표)90F(90F), 및 KOLLIDON(상표)12PF(12PF)를 각각 최종 농도 0.1%로 첨가한 상기 배지를 준비하였다.

[0263] 마우스조혈줄기세포로는 CD34-CD150+ 마우스 골수의 KSL 세포 분획을 사용하였다. 구체적으로, 마우스 골수 세포는 경골, 대퇴골 및 골반으로부터 분리되고 APC-c-KIT 항체로 염색되었다. c-KIT+ 세포는 항-APC 자기 비드와 LS 컬럼(Miltenyi Biotec)을 사용하여 농축되었다. 그 후, c-KIT 농축 세포를 항-CD34, 항-c-KIT, 항-SCA1 및 스트렙타비딘-APC/eFluor 780으로 90분 동안 염색하기 전에 리니에이지(Lineage) 항체 콕테일(비오틴화 CD4, CD8, CD45R, TER119, 6G/LY-6C 및 CD127)로 염색하였다. 그 후, 세포 집단은 FACS AriaII(BD)를 사용하고, 요오드화프로피듐을 사멸 염색으로서 사용하여, 배지를 함유하는 웰에 직접 선별하여 정제하였다.

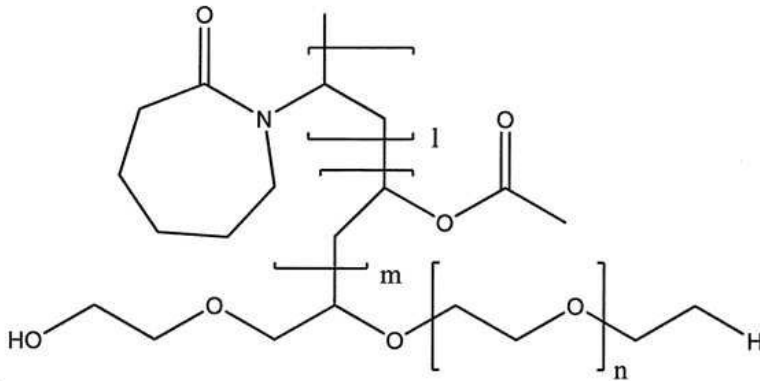
[0264] 인간조혈줄기세포로는 인간 골수의 CD34+CD38- 세포를 사용했다. 구체적으로는, 시판되고 있는 인간 골수 CD34 양성 세포(Lonza 2C-101)를 구입하였다.

[0265] 각각의 배지 중에서 마우스조혈줄기세포를 1주간 배양하고, 배양 후의 세포수를 계수하였다.

[0266] 결과는 도 18에 나타난 바와 같았다. 도 18에 나타난 바와 같이, 마우스조혈줄기세포는 PVA를 함유하는 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에서 양호하게 증식하였으나, PVA 대신 시험한 다른 화합물의 존재하에서는 증식하지 않고, 화합물 A의 존재하에서만 증식이 나타났다.

[0267] SOL-PLUS(상표), 이하 구조를 갖는 화합물이었다:

[0268] [화학식 2]



[0269]

[0270] {식 중, n은 13이고, m은 30이고, l는 57이다.}

[0271] 여기서, Wilkinson et al., 2019에서, 마우스조혈줄기세포는 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에서 SCF 및 TPO 존재하에서도 장기간의 증식을 유지할 수 없었다. 그러나 Wilkinson et al., 2019에서는, Figure 2b에 있어서, PVA를 배지에 첨가함으로써, 마우스조혈줄기세포는 알부민을 함유하지 않는 무혈청 배지에서 장기적으로 증식할 수 있는 것을 나타내고 있다.

[0272] 이를 통해 마우스조혈줄기세포는 알부민 비함유의 무혈청 배지에서도 PVA 또는 폴리머 A의 존재하에서 양호하게 증식한다는 것이 밝혀졌다.

[0273] 마우스조혈줄기세포를 50개/웰의 비율로 분취하고, 0.1%의 PVA 또는 폴리머 A와 SCF 및 TPO의 존재하에서 배양하였다. 결과는 도 19에 나타난 바와 같았다. 도 19에 나타난 바와 같이, 마우스조혈줄기세포는 알부민 비함유의 무혈청 배지 중에서도 PVA 또는 폴리머 A의 존재하에서 양호하게 콜로니 형성되는 것으로 밝혀졌다. 이로부터 PVA 및 폴리머 A의 존재하에서 조혈줄기세포가 세포 분열 능력을 나타내는 것으로 나타났다.

[0274] 증식된 세포 중의 CD201 양성 세포의 비율을 알칼리성 포스파타아제 표식 항마우스 CD201 항체(eBio1560)를 사용하여 확인하였다. 그 결과, 도 20에 나타난 바와 같이, 폴리머 A의 존재하에서 배양한 마우스조혈줄기세포는 PVA보다 많은 비율의 CD201 양성 세포를 갖는 것으로 밝혀졌다. CD201은 조혈줄기세포의 마커로 알려져 있으며, CD201 양성 세포의 비율이 많다는 것은 증식에 의해 줄기세포성이 더 양호하게 유지되었다는 것을 시사하는 것이다.

[0275] 또한, 마우스조혈줄기세포를 최종 농도 0.1%의 폴리머 A 또는 PVA의 존재하에서 1주간 배양하고, 조사 마우스에 이식하였다. 이식 4주 후에 이식된 조사 마우스의 말초혈을 분석하고, 이식된 조혈줄기세포에서 유래하는 혈구의 키메라율을 조사하였다. 그 결과, 폴리머 A 존재하에서 배양한 조혈줄기세포는 PVA에서 배양한 조혈줄기세포와 동등한 키메라율(기여율)을 나타내었다. 이것은 폴리머 A 존재하에서 배양된 조혈줄기세포의 골수 재구축 능력이 PVA 존재하에서 배양된 조혈줄기세포의 골수 재구축 능력과 동등한 것을 나타낸다.

[0276] 실시예 2: 마우스조혈줄기세포와 인간조혈줄기세포의 신호전달의 차이

[0277] SCF 및 TPO 존재하에서 마우스조혈줄기세포 및 인간조혈줄기세포의 신호 경로를 분석하였다.

[0278] 알부민 비존재하 그리고 PVA 존재하에서, 마우스 및 인간 각각의 조혈줄기세포를 10ng/mL의 조직인자(SCF) 및 100ng/mL의 트롬보포이에틴(TPO) 존재하에서 배양한 조혈줄기세포의 SCF 및 TPO의 하류 신호 인자의 인산화 정도를 인산화 면역염색법으로 분석하였다. 먼저, SCF 및 TPO 신호의 하류의 각 인자의 인산화 상태를 각각의 인자의 인산화 형태 특이적인 항체를 사용하여 검출하였다. 구체적으로는, Akt, PI3K 및 Stat5 등의 대표적인 신호전달 분자에 있어서의 인산화 항체를 이용하여 사이토카인으로 자극한 세포에 반응시킨 후에 형광 현미경에 의해 세포에 반응한 항체의 형광 강도를 정량적으로 분석했다.

[0279] 그 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, 조사한 7개의 인자 중, 일부 인자에서는 마우스조혈줄기세포와 인간조혈줄기세포에서 인산화 상태가 다른 인자가 몇 개 발견되었다. 그 중에서, PI3K 및 Akt에 대해서는, SCF 및 TPO 첨가 24시간 후부터 마우스조혈줄기세포에서는 인산화 형태가 많이 얻어진 것에 비해, 인간조혈줄기세포에서는 인산화 형태가 거의 인정되지 않거나 마우스조혈줄기세포의 인산화 형태량보다 적은 양이 나타났다.

[0280] 이에, 0.3 μM AKTa(판매사명 Sigma-Aldrich, 제품번호 123871) 또는 20 μM PI3Ka를 첨가한 배양 배지에서 인간

조혈줄기세포를 배양하였다. 배양 3일 후, 5일 후 및 7일 후에 세포를 계수하고, 배양 첫날의 세포수를 1로 했을 때의 각 시점에서의 세포수의 비를 구했다. 이하의 실시예에 있어서, PI3Ka로서는, 740Y-P(판매사명 Tocris, 제품번호 1983)를 사용하였다. 그 결과, 도 25에 나타낸 바와 같이, PI3Ka의 존재하에서 인간조혈줄기세포는 명확한 증식을 나타내었다. 한편, AKTa에 대해서는, 본 실험의 환경하에서는, 인간조혈줄기세포에 대한 증식 작용은 인정되지 않았다.

[0281] 다음, 인간조혈줄기세포의 배양과 관련하여 PI3Ka가 SCF를 완전히 대체하는지 여부를 조사하였다. 인간조혈줄기세포용의 상기 배양 배지에 20 μ M의 PI3Ka를 첨가한 경우(S10+PI3Ka20+T100)와, 상기 배양 배지에 20 μ M의 PI3Ka를 첨가하고, SCF를 제외한 경우(PI3Ka20+T100)로, 인간조혈줄기세포를 7일간 배양한 후, 세포 총 수와 항 CD34 항체를 이용한 세포 정렬(cell sorting)에 의한 단리 CD34+ 세포의 수를 구했다. 결과는 도 26에 나타낸 바와 같았다. 도 26에 나타낸 바와 같이, PI3Ka를 첨가한 경우에는, SCF의 유무에 의해 세포 총 수 및 CD34+ 세포수에 유의차는 확인되지 않았다.

[0282] 이어서, 인간조혈줄기세포의 배양과 관련하여, TPO를 TPO 수용체 아고니스트로 대체할 수 있는지 여부를 조사하였다. TPO 수용체 아고니스트로는 Butyzamide, 엘트롬보팍 및 아바트롬보팍이 알려져 있다. 상기 배양 배지로부터 TPO를 제외한 조성, 0.1% 재조합 인간 혈청 알부민(Albumin Biosciences)의 존재하 또는 PVA 존재하에서, 0.1 μ M Butyzamide, 3 μ g/mL 엘트롬보팍, 또는 3 μ M 아바트롬보팍을 첨가한 배지 중에서 인간조혈줄기세포를 배양하였다. 본 실험에서는 인간조혈줄기세포로서 Mp132D 세포를 사용했다. 결과는 도 27에 나타낸 바와 같았다. 도 27에 나타낸 바와 같이, 알부민 존재하에서, Butyzamide, 엘트롬보팍 및 아바트롬보팍은 TPO의 비존재하에서 인간조혈줄기세포의 증식을 지지할 수 있었다. 그에 비해, PVA의 존재하(알부민 비존재하)에서는, TPO의 비존재하에서 Butyzamide는 인간조혈줄기세포에 대하여 현저한 세포 증식 효과를 나타내었지만, 아바트롬보팍에서는 그 효과가 작고, 엘트롬보팍에서는 효과가 거의 인정되지 않았다.

[0283] 또한, 구입한 인간 골수 CD34+ 세포(판매사명 Lonza, 제품번호 2C-101) 혹은, 양도된 신선한 제대혈을 microbeads로 CD34+ 세포를 분리한 것을 배양 실험에서 사용하였다. 24웰 플레이트에 1웰당 0.2~1.0 \times 10⁵ 세포를 분주(分注)하고, 인간조혈줄기세포용의 배양 배지로부터 TPO를 제외하고, 상기 TPO 수용체 아고니스트(이하, "TPOago"라고 하는 경우가 있다) 중 하나로 대체하여 실험을 실시했다. 배양 첫날에 대한 배양 7일째의 세포수의 비를 구하였다. 결과는 도 28에 나타낸 바와 같았다. 도 28에 나타낸 바와 같이, 인간조혈줄기세포는 알부민 비존재하 PVA의 존재하에서는, Butyzamide의 존재하에서만 유의한 세포 증식을 나타내었다. 알부민 비존재하 PVA의 존재하에서는, 아바트롬보팍의 존재하 또는 엘트롬보팍의 존재하에서, 조혈줄기세포는 세포 사멸을 일으켰다. 그러나, 이들 TPO 수용체 아고니스트는 생체내 환경에서는 간경변의 외과적 치료 환자 및 재생 불량성 빈혈 환자의 치료에서 사용되는 안전성이 높은 화합물이다. 본 실시예의 결과로부터, 알부민 비존재하 PVA의 존재하에서는, 일부 TPO 수용체 아고니스트는 인간조혈줄기세포에 대하여 세포 상해성을 나타낼 수 있음을 나타낸다. 또한, 이것으로부터, TPO 수용체 아고니스트에는 인간조혈줄기세포에 대하여 세포 상해성을 갖는 것이 존재하는 것, 및 인간조혈줄기세포를 배양하기 위해서는, 인간조혈줄기세포에 대해서 세포 상해성을 갖지 않는 것을 사용하면 된다는 것이 시사되었다.

[0284] 이어서, 알부민 비존재하 PVA 존재하에서 SCF 및 TPO를 PI3Ka 및 TPO 수용체 아고니스트로 대체할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이하 실시예에서, TPO 수용체 아고니스트로서 Butyzamide를 사용하였다. 구입한 인간 골수 CD34+ 세포(판매사명 Lonza, 제품번호 2C-101) 혹은, 양도된 신선한 제대혈을 microbeads를 사용하여 CD34+ 세포를 상기와 같이 분리하여 배양 실험에서 사용하였다. 24웰 플레이트에 웰당 0.2~1.0 \times 10⁵ 세포를 분주하고, SCF를 20 μ M PI3Ka로 치환한 조성의 배지(PI3Ka 20 μ M+TPO100), 및 SCF를 20 μ M PI3Ka로 치환하고, TPO를 0.1 μ M Butyzamide로 치환한 조성의 배지(PI3Ka 20 μ M+TPOago 0.1 μ M) 중에서 각각 배양하였다. 7일 후에, 세포 총 수를 구하고, 유세포 분석에 의해 CD34+ 세포의 수를 구하였다. 그 후, 배양 개시시와 비교한 증식률을 구했다. 결과는 도 29에 나타낸 바와 같았다. 도 29에 나타낸 바와 같이, Butyzamide는 TPO를 완전히 대체할 수 있음이 밝혀졌다. 또한 배양 전후에 CD34+ 세포를 셀 소터로 분류하고, 100 세포씩 MetocultH4415에 파종하고, 콜로니 분석을 실시하였다. 2주 후에 콜로니를 픽업하고, 사이토스핀 표본을 제작하고, 감자 염색을 실시한 후, 콜로니의 종류를 현미경 하에서 판정하였다. CD34+ 세포 50개당 GEMM 콜로니를 카운트하고 배양 전과 비교한 콜로니 수의 증가율을 구하였다. 그 결과, GEMM 콜로니 형성 능력에 있어서 Butyzamide는 TPO를 완전히 대체할 수 있음이 밝혀졌다.

[0285] 또한 다음으로, SCF와 TPO를 함유하지 않는 배양 배지에 대해, PI3Ka 20 μ M, 및 TPOago 0.1 μ M의 어느 하나 또는 모두를 첨가한 배지 중에서, 인간조혈줄기세포의 배양 실험을 실시하였다. 배양 7일째에 총 세포수 및 함유

된 CD34+ 세포수를 유세포 분석에 의해 계수하고, 배양 개시시에 대한 증식률을 구하였다. 그 결과, 도 30에 나타난 바와 같이, PI3Ka 단독 또는 Butyramide 단독에서는, 세포의 증가는 확인되지 않았지만, PI3Ka와 TPOago 모두가 존재하는 경우에, 세포수가 현저하게 증가하는 것이 밝혀졌다.

[0286] 또한 다음으로, SCF와 TPO를 PI3Ka와 TPOago로 대체한 배지에서 어느 세포 집단이 증식하기 쉬운지를 조사했다. 양도된 신선한 제대혈을 microbeads를 사용하여 CD34+ 세포를 상기와 같이 분리하여 배양 실험에서 사용하였다. 세포를 항CD34-PE-Cy7항체(제품사명BD Biosciences, 제품번호348791), 항CD38-V450항체(제품사명BD Biosciences, 제품번호646851), 항CD133-PE항체(제품사명Miltenyi Biotec, 제품번호130-080-801), 항CD45RA-APC항체(제품사명BioLegend, 제품번호304112), 및 항CD49f-PE항체(제품사명BioLegend, 제품번호313611)를 사용하여 셀 소터에 의해 분석하였다. 인간 제대혈 유래 조혈줄기세포의 순화 마커로 보고된 CD34+ 분획, CD34+CD38-CD133+ 분획 및 CD34+CD38-CD45RA-CD49f+ 분획 각각에 대해 배양 개시 후 7일째에 총 세포수 및 함유된 CD34+ 세포수를 유세포 분석에 의해 계수하고 배양 개시시에 대한 증식률을 얻었다. 결과는 도 31에 나타난 바와 같았다. 도 31에 나타난 바와 같이, 어느 세포 분획에서도 현저한 세포 증식이 확인되었지만, CD34+CD38-CD133+ 분획 및 CD34+CD38-CD45RA-CD49f+ 분획, 특히 CD34+CD38-CD45RA-CD49f+ 분획에 있어서 세포 증식이 현저했다.

[0287] 실시예 3: 인간조혈줄기세포의 장기 배양 실험

[0288] 인간조혈줄기세포를 상기 인간조혈줄기세포용 배양 배지로서, SCF와 TPO 대신에 PI3Ka 20 μM 및 TPOago 0.1 μM을 함유하는 배양 배지 중에서 배양하였다. 배양 개시 후 7일째 및 14일째에 상기와 동일하게 하여 세포 총 수 및 CD34+ 세포수를 구하였다. 결과는 도 32에 나타난 바와 같았다. 도 32에 나타난 바와 같이, 세포 총 수는 배양 일수가 경과함에 따라 증가하였지만, 한편, CD34+ 세포수는 7일째보다 14일째에 감소하였다.

[0289] 광학 현미경을 사용하여 배양한 세포를 관찰하면, 14일째에는 거대한 세포가 관찰되었다. 이 거대한 세포가 거핵구 또는 거핵구 전구 세포일 가능성을 확인하기 위해, 항-CD41a-FITC 항체(판매사명 BD Pharmingen, 제품번호 555466) 및 항CD42b 항체(판매사명 BD Pharmingen, 555473)를 사용하여 유세포 분석기에 의해 세포를 분석시켰다. 그 결과, 도 33에 나타난 바와 같이, 배양 개시 후 14일째의 세포의 대부분은 CD41a+CD42b+의 세포였다. 그러나, 도 33에 나타난 바와 같이, 이 조건에서도 CD34+CD38- 세포는 증식했다.

[0290] 또한, 배양 개시 후 14일째에 얻어진 배양물 중의 CD34+ 세포를 100 세포씩 MetocultH4415에 파종하고, 콜로니 분석을 실시하였다. 2주 후에 콜로니를 채취하여, 사이토스핀 표본을 제작하였다. 그 후, 표본에 관하여, 김자염색을 실시한 후, 현미경 하에서 콜로니 종류를 판정하였다. 결과는 도 34에 나타난 바와 같았다. 콜로니의 종류는 G는 "과립구", E는 "적아구", m은 "대식세포", M은 "거핵구"를 함유하는 콜로니임을 의미한다. 도 34에 나타난 바와 같이, 많은 세포 콜로니는 거핵구를 함유한다.

[0291] 실시예 4: 인간조혈줄기세포의 장기 배양에 더욱 적합한 조건의 검토

[0292] 인간조혈줄기세포를 증식시킬 수 있는 화합물의 존재하에서 인간조혈줄기세포의 장기 배양을 시도했다.

[0293] 상기 인간조혈줄기세포용의 배양 배지로서, SCF와 TPO 대신에 PI3Ka 20 μM, 및 TPOago 0.1 μM을 함유하는 배양 배지(PI3Ka 20 μM+TPOago 0.1 μM), 및 해당 배지에 대하여, SR-1(500nM) 및 UM171(35nM) 중 하나 또는 둘 모두를 추가로 첨가하여 제조된 배지(+SR-1, +UM171 및 +SR-1+UM171)를 준비하였다. 구입한 인간 골수 CD34+ 세포(판매사명 Lonza, 제품번호 2C-101) 혹은 양도된 신선한 제대혈을 microbeads를 사용하여 CD34+ 세포를 상기와 같이 분리하여 배양 실험에서 사용하였다. 24웰 플레이트에 1웰당 0.2~1.0×10⁵ 세포를 분주하고, 준비한 배지에서 CD34+ 세포를 배양하였다. 배양 개시 후 14일째에 상기와 동일하게 하여 세포 총 수 및 CD34+ 세포를 계수하고, 배양 개시 전부터의 증식률을 구하였다. 결과는 도 35에 나타난 바와 같았다. 도 35에 나타난 바와 같이, UM171을 더 함유하는 배양 배지에서는, 세포 총 수 및 CD34+ 세포수가 증가하고, CD34+ 세포의 증가율은, UM171을 함유하지 않는 배지와 비교하여 UM171을 함유하는 배지에서 유의하게 증가했다. 이에 비해, SR-1은 본 실험 조건에 있어서 세포를 사멸시켰다.

[0294] 또한, 조건 1: 상기 인간조혈줄기세포용의 배양 배지로서, SCF와 TPO 대신에 PI3Ka 20 μM 및 TPOago 0.1 μM을 함유하는 배양 배지(PI3Ka 20 μM+TPOago 0.1 μM)로 14일간 배양하는 것, 조건 2: 7일째 이후는 Butyramide를 함유하지 않는 배지(PI3Ka 20 μM) 조건으로 배양하는 것(Day7-Buty 없음) 및 조건 3: 배양 배지(PI3Ka 20 μM+TPOago 0.1 μM)에 UM171을 추가로 첨가한 배지(+UM171)로 14일간 배양하지만, 3개의 조건 하에서 CD34+ 세포를 배양하여 세포 총 수 및 CD34+ 세포수의 증가율을 구하였다. 또한, CD41+ 세포의 수를 유세포 분석기를 사용하여 구하였다. 결과는 도 36에 나타난 바와 같았다. 도 36에 나타난 바와 같이, 배양 개시 후 7일째에

Butyzamide를 제외한 배지에서 배양하는 조건 2에서는, 조건 1과 비교하여, CD34+ 세포수가 증가하고, CD41+ 세포수가 감소했다. 도 36에 나타내는 바와 같이, UM171을 더 첨가한 배지에서 배양하는 조건 3에서는, 조건 1이나 2와 비교하여, CD34+ 세포의 증가율이 현저하게 증대하고, CD41+ 세포수가 현저하게 감소했다. 이로부터, PVA, PI3Ka 및 TPOago 존재하의 무혈청 배지 조건에 있어서, UM171은 인간조혈줄기세포를 증식시켜, 거핵구 전구 세포나 거핵구로의 세포의 분화를 억제하는 것이 밝혀졌다(도 37 참조).

[0295] 실시예 5: 배양 후의 CD34+ 세포의 이식 실험

[0296] 조건 1~3의 각각에서 7일간 배양한 인간 CD34+ 세포를 조사 NOG 마우스에 이식하여 세포의 생착을 확인하였다. 구체적으로는, 배양 후의 인간 CD34+ 세포를 1.5Gy의 γ 선 조사한 NOG 마우스에 1×10^4 세포 이식하였다. 이식 12주 후에, 상기 NOG 마우스의 말초혈을 채취하고, 유세포 분석기를 사용하여 말초혈 중의 세포 성분을 분석하였다. 결과는 도 38에 나타낸 바와 같았다. 도 38에 나타내는 바와 같이, 조건 1 및 2에 있어서, 조혈줄기세포의 생착율이, 배양 전 CD34+ 세포를 이식했을 때에 각각 14.9% 및 11.1%이었던 것이, 배양 후의 CD34+ 세포의 이식은 각각 66.6% 및 54.9%로 증가하였다. 또한, 조건 3에 있어서, 조혈줄기세포의 생착율이, 배양 전 CD34+ 세포를 이식했을 때에 17%였던 것이, 배양 후의 CD34+ 세포를 이식하면 67%로 증가했다.

[0297] 따라서 알부민 비존재하의 무혈청 배지 조건에 있어서, PVA 존재하에서 PI3K 활성화 제외 TPO 수용체 아고니스트는 인간조혈줄기세포를 양호하게 증식시키는 것, 및 증식한 인간 CD34+ 세포는 조혈줄기세포로서의 성질을 유지하고, 다른 개체에의 이식 후의 생착율을 향상시키는 것이 밝혀졌다. 또한, 인간조혈줄기세포는, 이 조건 하에서 장기 배양하면 그 일부가 거핵구로 분화되어, 이에 의해 거핵구를 얻을 수 있는 한편, 일부가 CD34+ 세포로서 증식하는 경향을 갖는다. 여기에 UM171을 첨가하면 CD34+ 세포의 증식률이 향상되어 거핵구로의 분화를 억제할 수 있는 것도 밝혀졌다.

[0298] 다음, 신선한 인간 체대혈에서 인간 단핵구를 분리했다. 조건 1 및 조건 3에서, 얻어진 세포(5×10^5 세포)를 배양하고, 배양 개시 7일 후 및 14일 후에 총 세포수, CD34+ 세포수, 총 세포에서 차지하는 CD34+ 세포의 비율 및 세포의 생존율을 각각 구했다. 결과는 도 39에 나타낸 바와 같았다. 도 39에 나타낸 바와 같이, 임의의 조건 하에서도, 인간의 체대혈에서 얻은 단핵구는 배양과 함께 세포 총 수를 감소시켰다. 한편, 조건 3에서는, 총 세포에서 차지하는 CD34+ 세포의 비율이 조건 1보다도 현저하게 향상되었다. 또한, 세포의 생존율도 조건 3에서 조건 1보다 현저히 향상했다. 또한, CD34+ 세포수는 조건 3에서 현저한 증대를 나타낸 것에 비해, 조건 1에서는 세포수는 유지된 점에서는 양호했지만, 세포수의 증가는 확인되지 않았다.

[0299] 실시예 6: 인간조혈줄기세포의 폴리머 A 존재하에서의 배양 실험

[0300] 상기 실시예에 따르면, 인간조혈줄기세포는 마우스조혈줄기세포와는 달리, PI3K 경로의 활성화가 필요하다는 것이 명확해졌고, TPO를 TPO 수용체 아고니스트인 Butyzamide로 대체하는 것이 가능하다는 것이 밝혀졌다. 또한, 인간조혈줄기세포는 장기 배양을 실시하지 않는 경우에는 UM171 비존재하에서 배양할 수 있지만, 장기 배양을 실시하는 경우에는 UM171 존재하에서 배양함으로써 거핵구 계열로의 분화를 억제할 수 있다는 것도 밝혀졌다.

[0301] 이에, 본 실시예에서는, 인간조혈줄기세포를 상기에 있어서 PVA를 폴리머 A 대신에 배양하는 실험, 즉 폴리머 A, PI3K 억제제, TPO 수용체 아고니스트 및 UM171 존재하에서 배양하는 실험을 시도하였다. 대조군으로서, 인간조혈줄기세포를 PVA, PI3K 억제제, TPO 수용체 아고니스트 및 UM171 존재하에서 배양하는 실험으로 하였다. PI3K 억제제로서는 PI3Ka를 사용하고, TPO 수용체 아고니스트로서는 Butyzamide를 사용하고, 농도는 상기 실시예와 같았다.

[0302] 결과는 도 22에 나타낸 바와 같았다. PVA 대신에 폴리머 A 존재하에서 배양된 인간조혈줄기세포는 양호하게 증식하였고, 도 22에 나타낸 바와 같이 CD34 양성 세포의 비율이 높았다. 또한, CD34 양성 세포의 비율은 PVA 존재하보다 폴리머 A 존재하에서 더 높았다. 이로부터 인간조혈줄기세포가 폴리머 A 존재하에서 또한 PI3K 경로를 활성화시킨 조건 하(또한 SCF 비존재하)에 있어서 양호하게 증식하는 것이 시사되었다. 또한, 인간조혈줄기세포는 그 조건 하에서 TPO를 TPO 수용체 아고니스트로 대체하더라도 양호하게 증식할 수 있음을 시사했다. 또한, 인간조혈줄기세포는 UM171 존재하에서 양호하게 증식할 수 있는 것이 밝혀졌다.

[0303] 또한, 세포수의 변화를 시간 경과에 따라 확인하였다. 이 실험에서는 인간조혈줄기세포의 배양 배지에 T cell expansion kit(Milteny Biotec) 및 인간 IL-2(Peprotech)를 첨가한 배지를 사용하여 인간조혈줄기세포를 3주간 배양하였다. 그 결과는 도 23에 나타낸 바와 같았다. 도 23에 나타낸 바와 같이, PVA 존재하 및 폴리머 A 존재하에서, 인간조혈줄기세포는 동등하게 증식하였다.

[0304] 실시예 7: 인간 CD3 양성 세포의 배양

[0305] 인간 CD3 양성 세포를 정상 조건 하에서 T Cell Activation/Expansion Kit, Human(Miltenyi Biotec)을 사용하여 CD28 항체 및 CD3 항체에 의해 자극하여 0.1% PVA 또는 0.1% SOL-PLUS(상표)를 함유하는 알부민 프리 또한 사이토카인 프리의 기초 배지(1% ITSX 및 1% 페니실린을 첨가한 IMDM 배지)에서 6주간 배양하였다. 초기 세포수는 1000개로 하였다. 결과는 도 40에 나타낸 바와 같았다.

[0306] 도 40에 나타낸 바와 같이, CD3 양성 세포(주로 T 세포가 함유됨)는 SOL-PLUS 존재하 및 PVA 존재하 모두에서 양호하게 증식하는 것으로 나타났다. 이로부터 알부민 프리의 배양 배지는 인간 T 세포의 유지 및 증식에서 사용될 수 있는 것이 밝혀졌다.

[0307] 실시예 8: 인간 CD34 양성 세포로부터 혈구 세포로의 분화

[0308] 인간 CD34 양성 세포(조혈줄기세포)를 PVA 또는 SOL-PLUS(상표)를 함유하는 알부민 프리의 기초 배지에서 배양하였다. 초기 세포수는 1000개로 하였다. 조혈줄기세포로부터 혈구 세포로의 분화는 사이토카인 콕테일을 배지에 첨가함으로써 실시되었다. 배양은 10일간 실시하였다. 결과는 도 41에 나타낸 바와 같았다.

[0309] 도 41의 패널 A에 나타낸 바와 같이, CD34 양성 세포를 배양한 배양액 중의 세포수는 SOL-PLUS 존재하 및 PVA 존재하 모두에서 양호하게 증가하였다. 도 41의 패널 B에 나타낸 바와 같이, SOL-PLUS의 존재하의 배양에 의해 얻은 배양액 중의 세포는 거핵구, 적아구, 호중구 및 대식세포를 함유한다. 이 결과로부터, 거의 모든 혈액 세포 계열의 세포가 얻어지고, 또한 각각 증식하고 있었기 때문에, 알부민 프리의 환경하에서도, PVA 또는 SOL-PLUS 등의 첨가제의 존재하에서는, 인간혈구계 세포는 양호하게 증식, 유지 및 분화될 수 있는 것으로 나타났다.

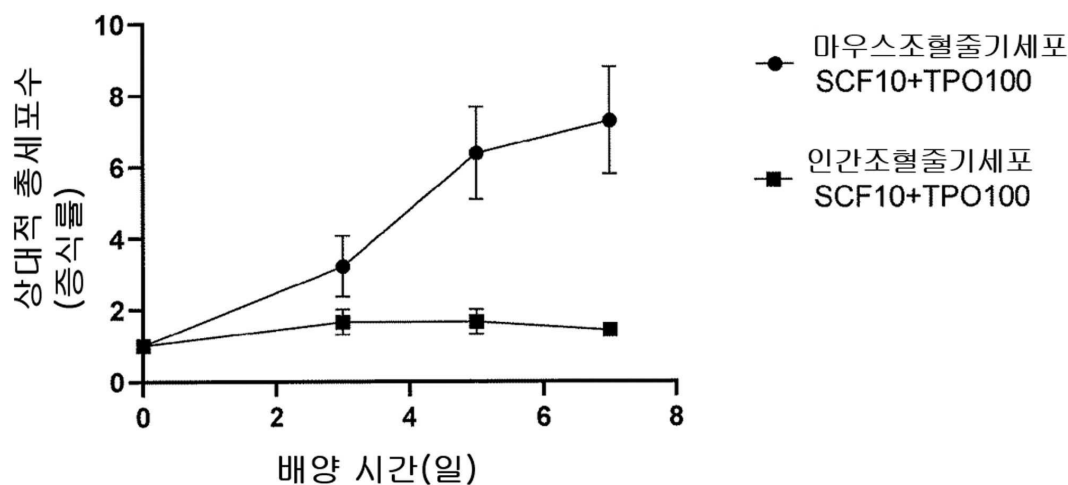
[0310] 실시예 9: 만성 골수성 백혈병(CML) 세포의 배양

[0311] CML(만성 골수성 백혈병) 환자의 골수 세포 샘플을 알부민 프리 및 사이토카인 프리 배양 조건으로 1주간 배양을 실시했다. 배지로서는 0.1% PVA, PI3Ka 20 μM, 및 TPOago 0.1 μM을 첨가한 기초 배지를 사용하였다. 배양은 CML의 원인 유전자인 Bcr-Abl 억제제(이마티닙(IM))의 존재하와 비존재하에서 실시되었다. 결과는 도 42에 나타낸 바와 같았다.

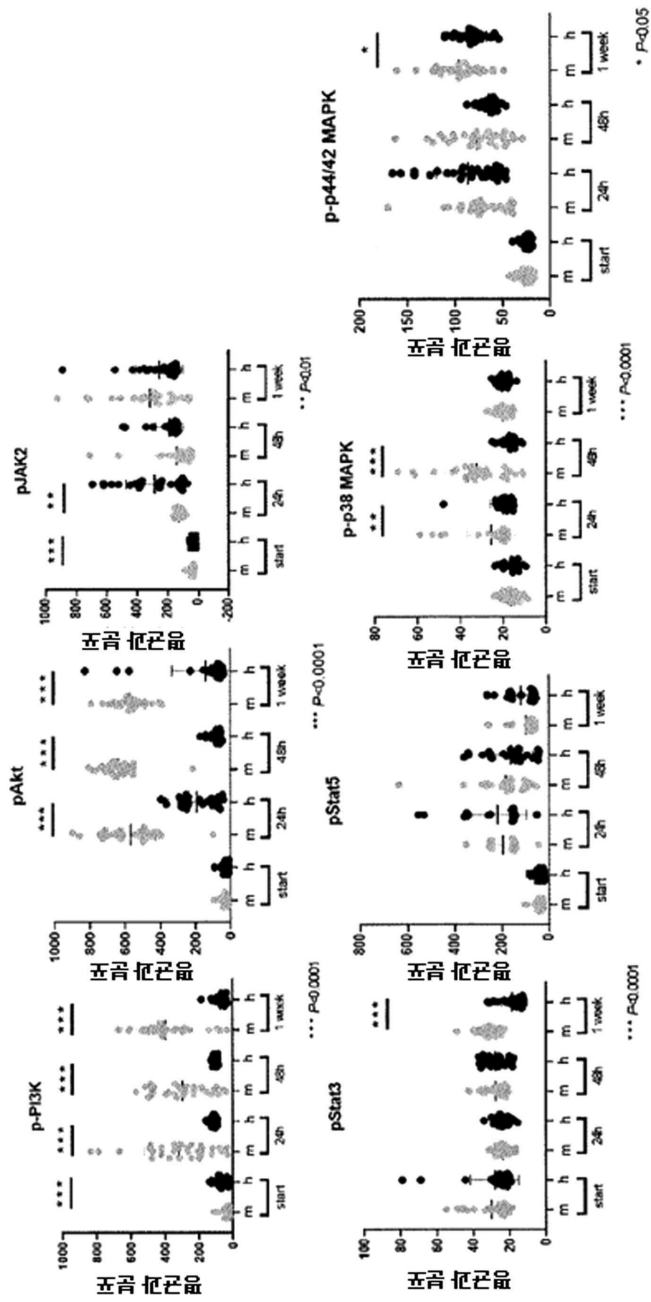
[0312] 그 결과, 도 42에 나타낸 바와 같이, 배양 전의 전체 세포수와 비교하여 IM 비존재하에서는 0.5%의 세포 증식이 확인되고, 특히 백혈병 줄기세포 분획인 CD34 양성 세포에서는 30배 이상, 절대수에서는 6배 이상의 증폭/유지가 확인되었다. 이에 비해, IM 존재하에서는 세포의 대폭적인 증폭이 관찰되지 않았기 때문에, IM+에서 증식한 세포는 CML 백혈병 줄기세포인 것으로 나타났다.

도면

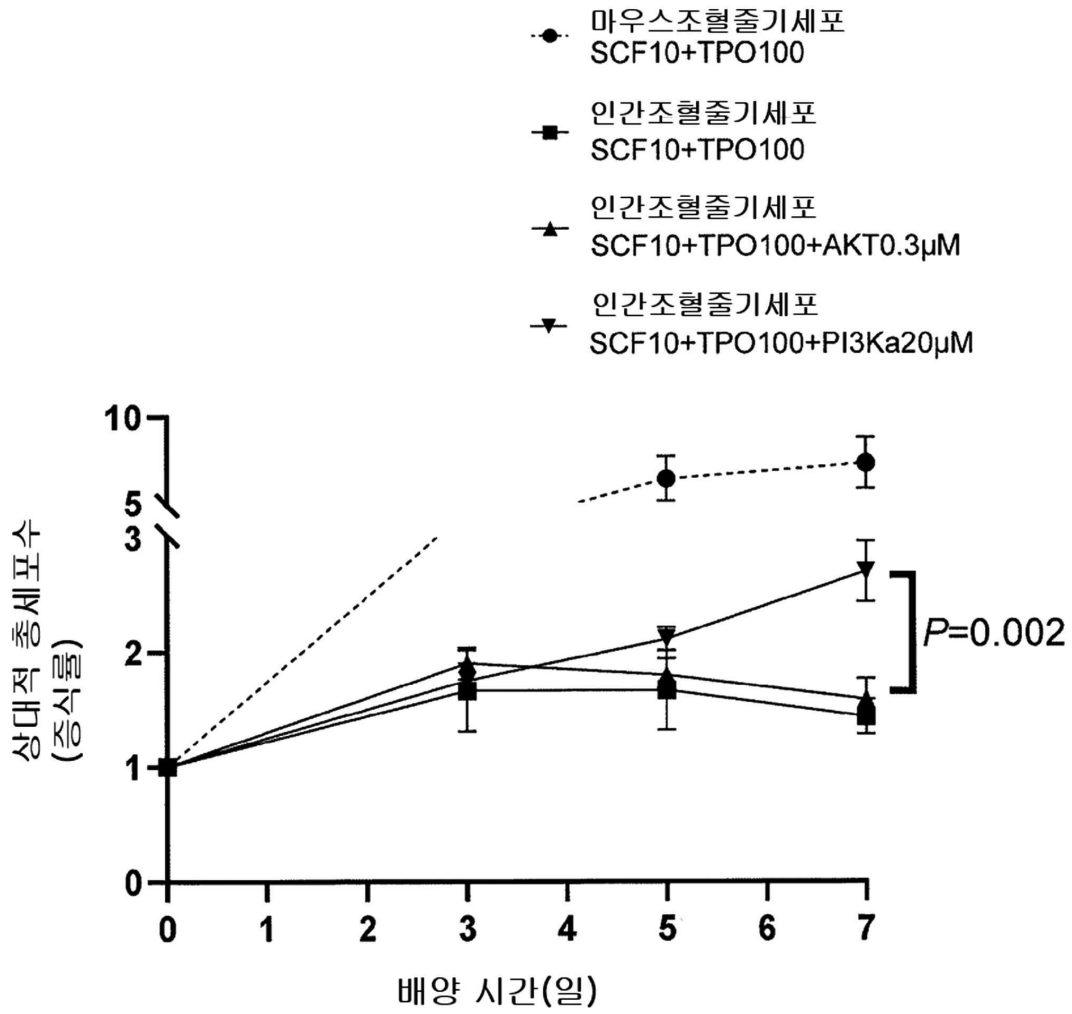
도면1



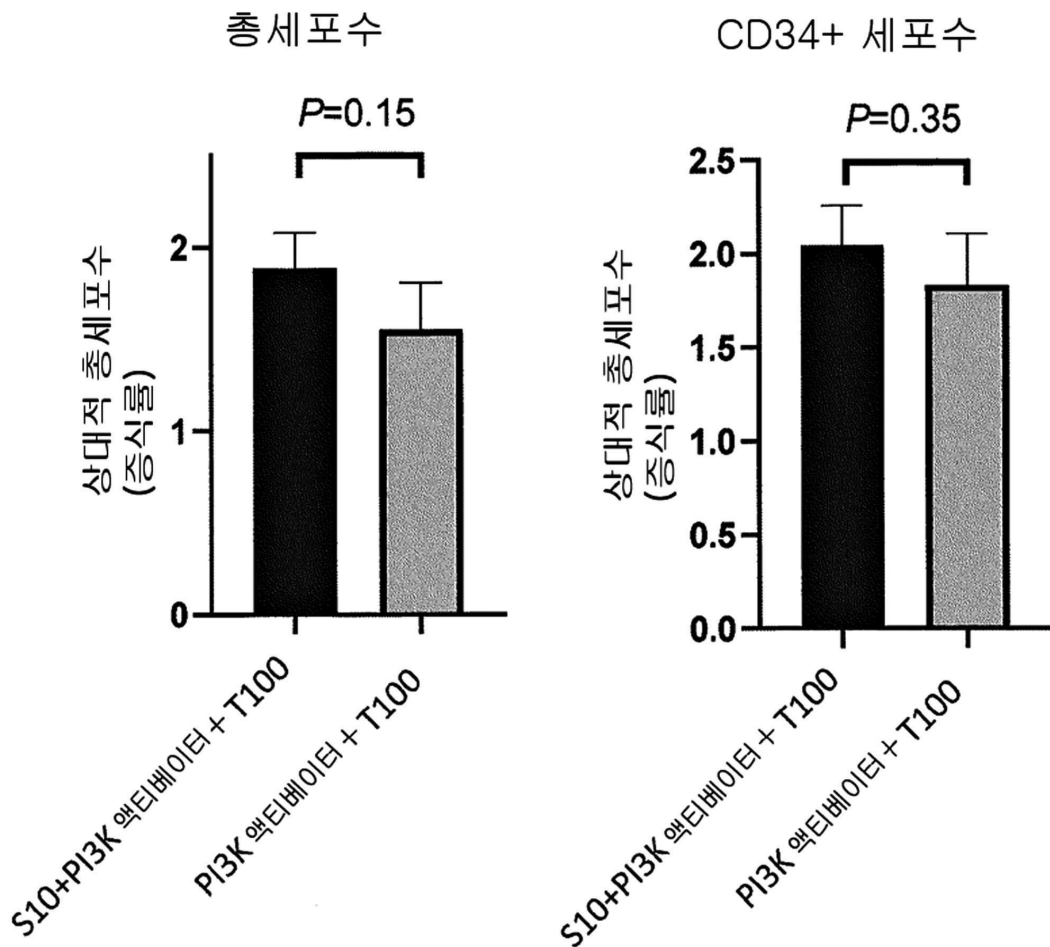
도면2



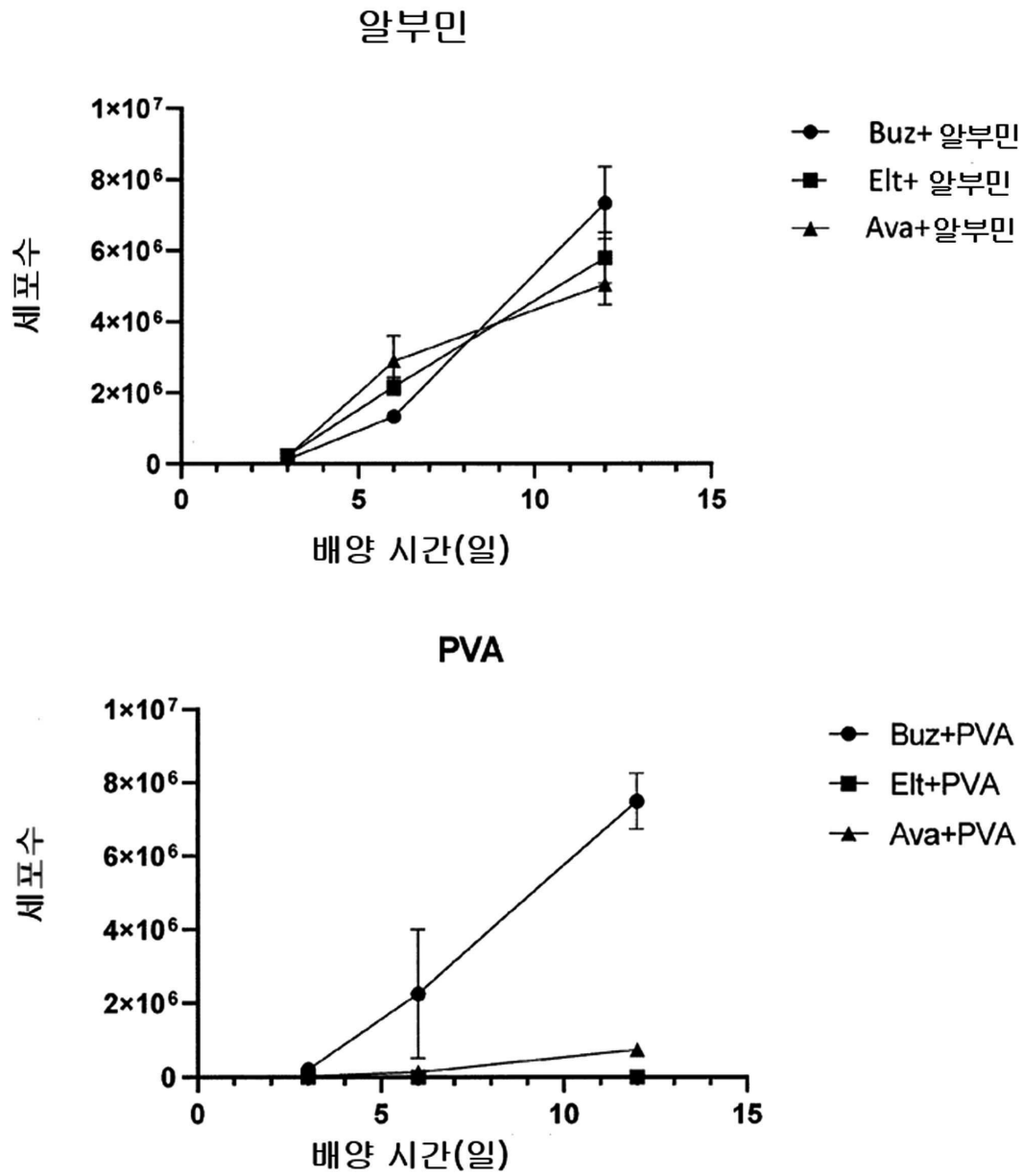
도면3



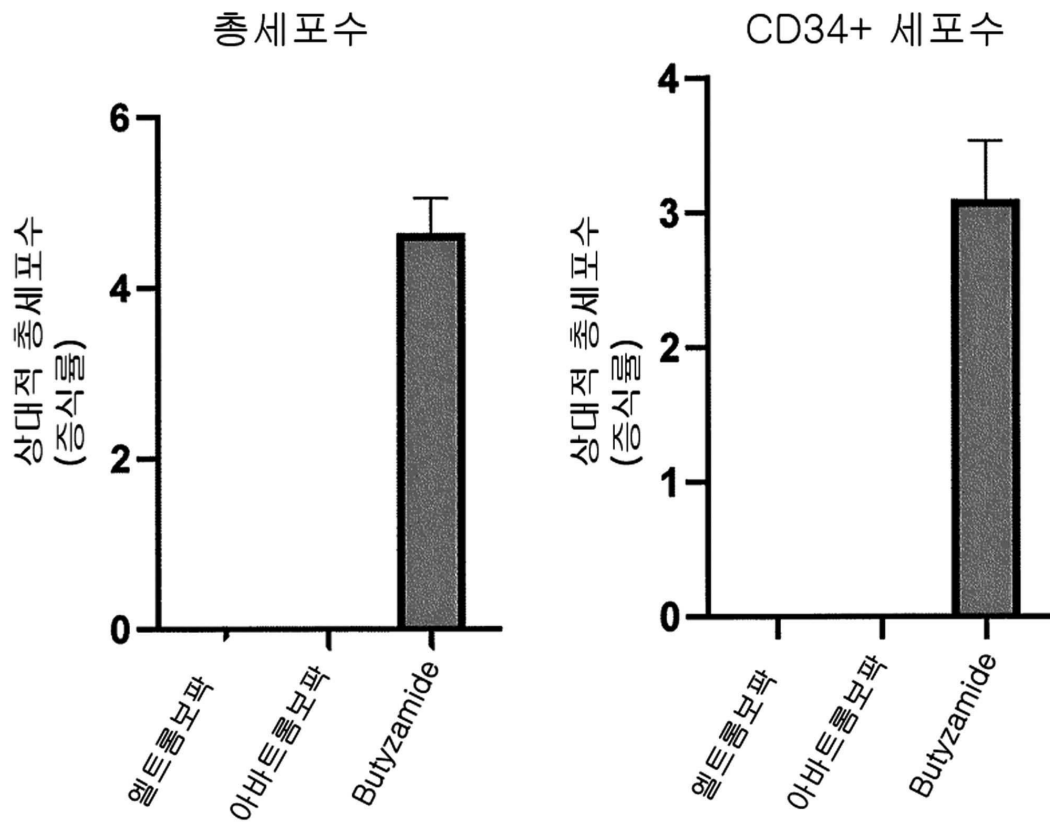
도면4



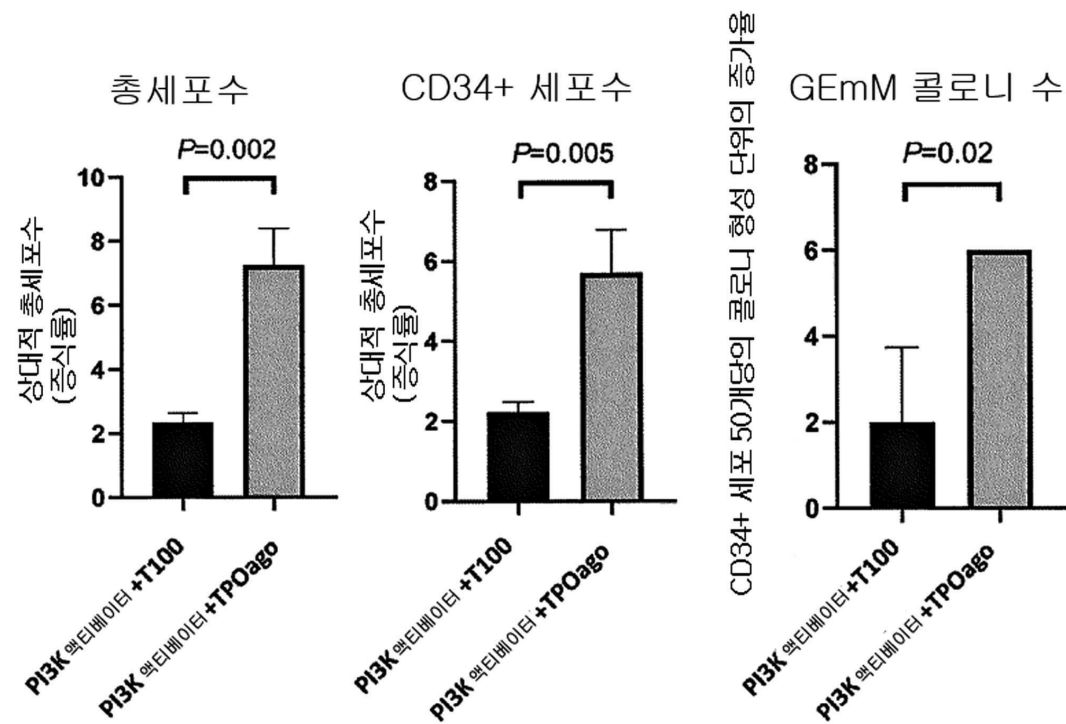
도면5



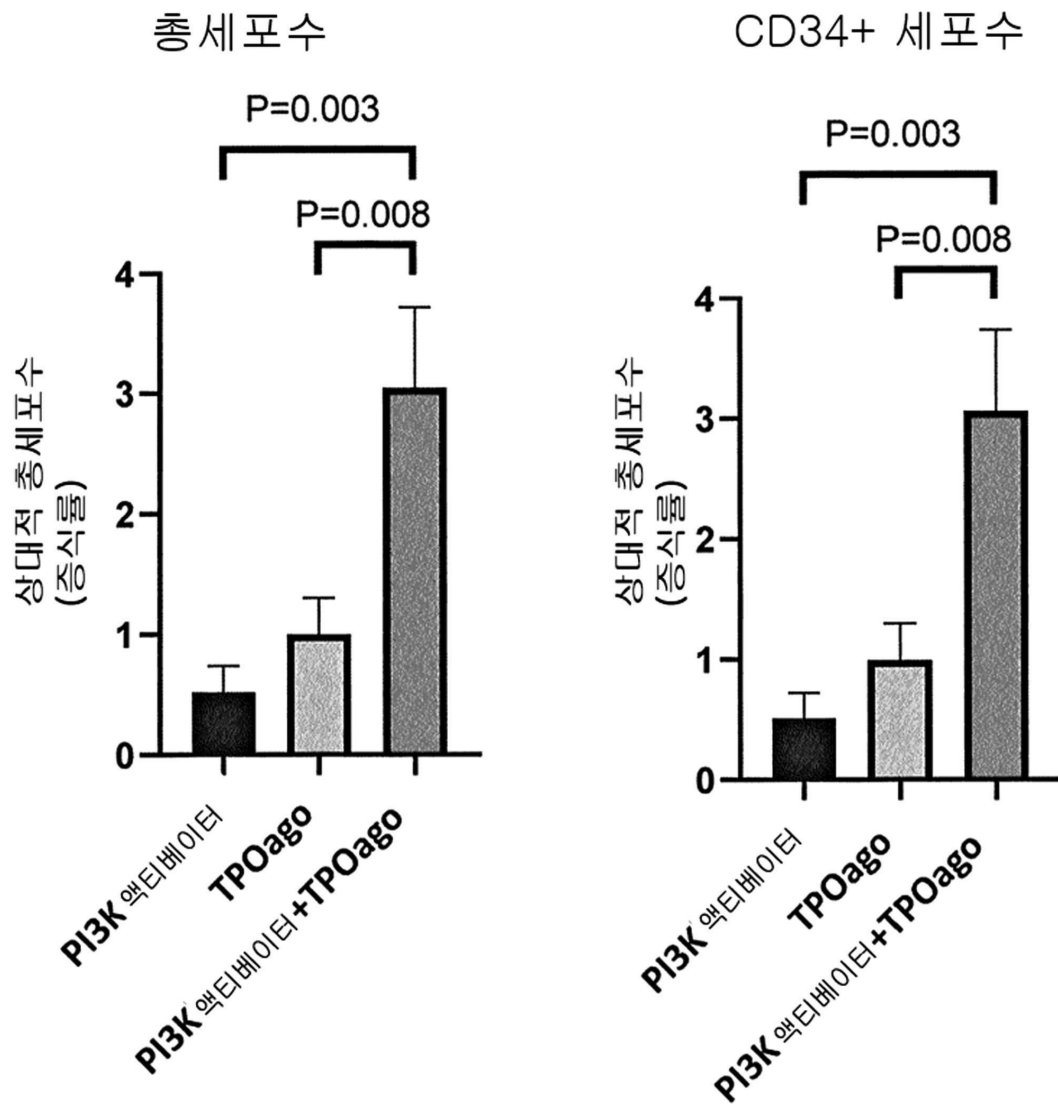
도면6



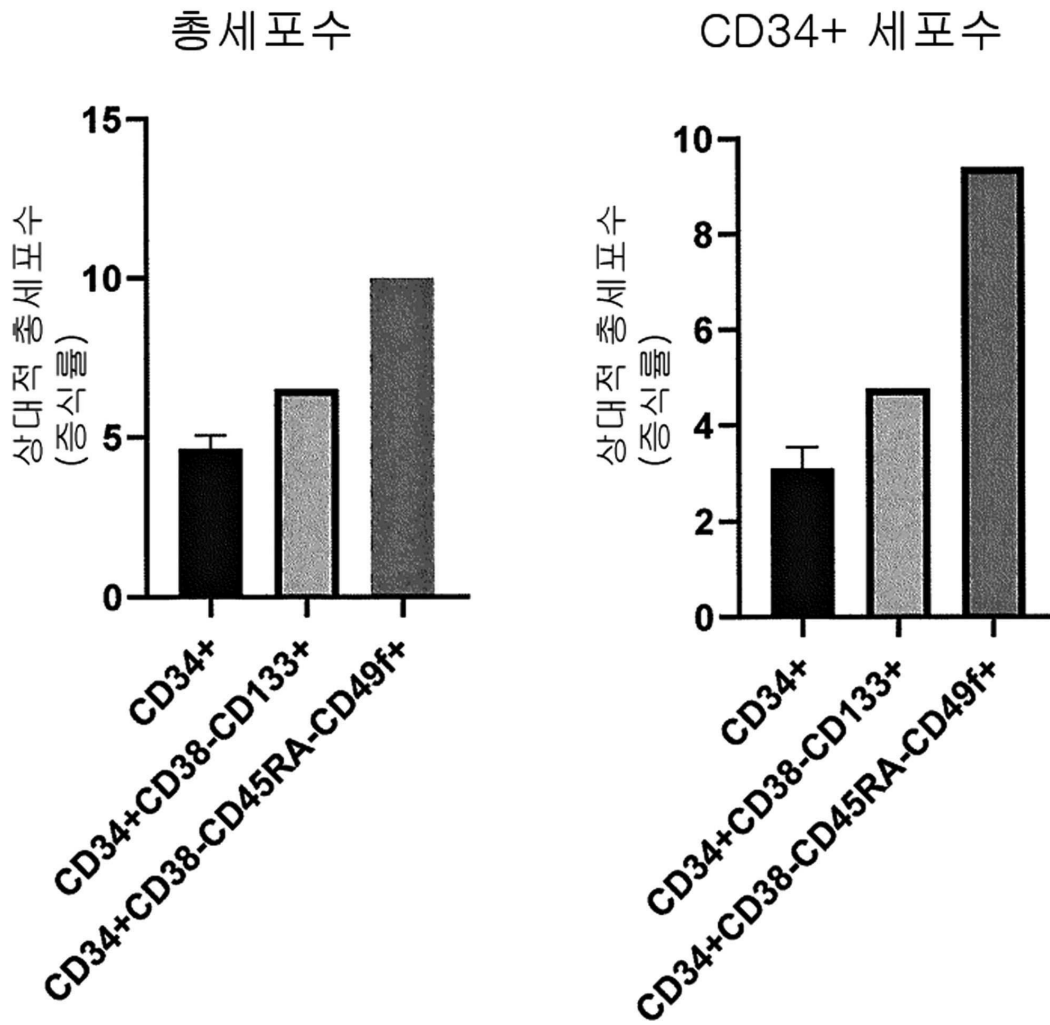
도면7



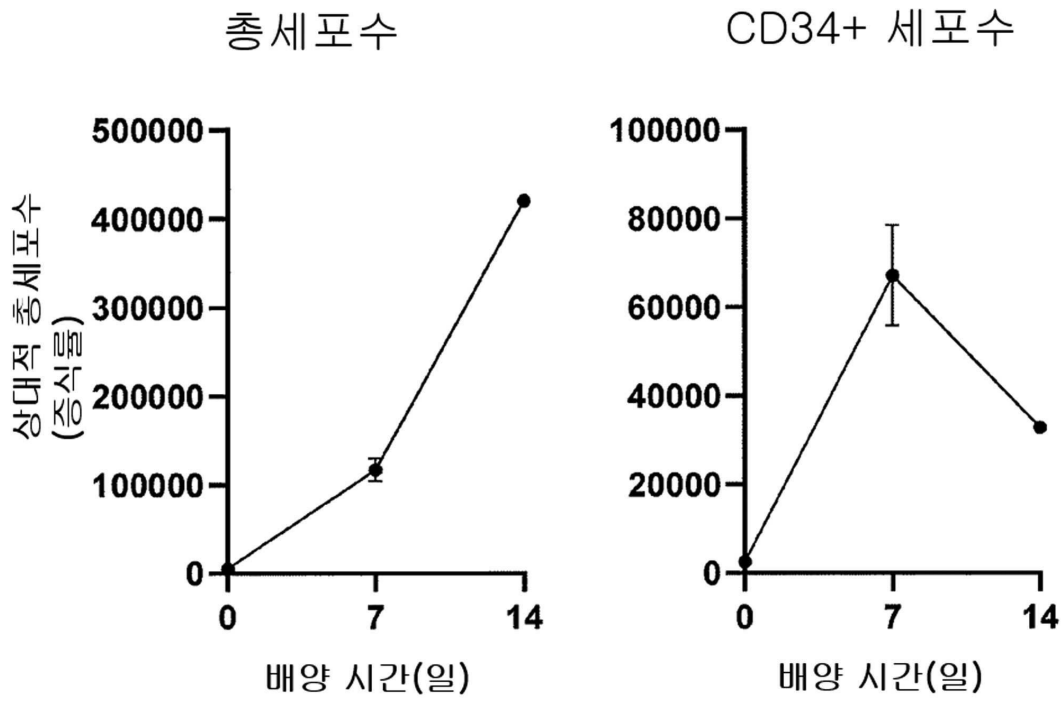
도면8



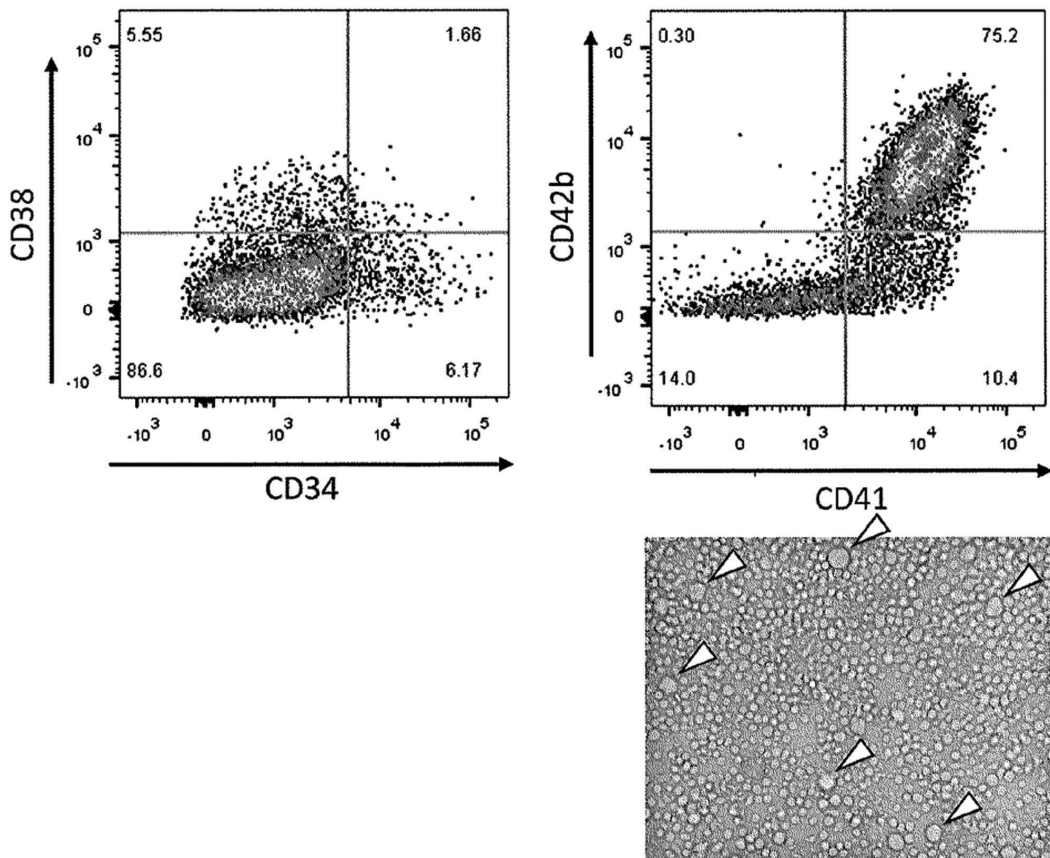
도면9



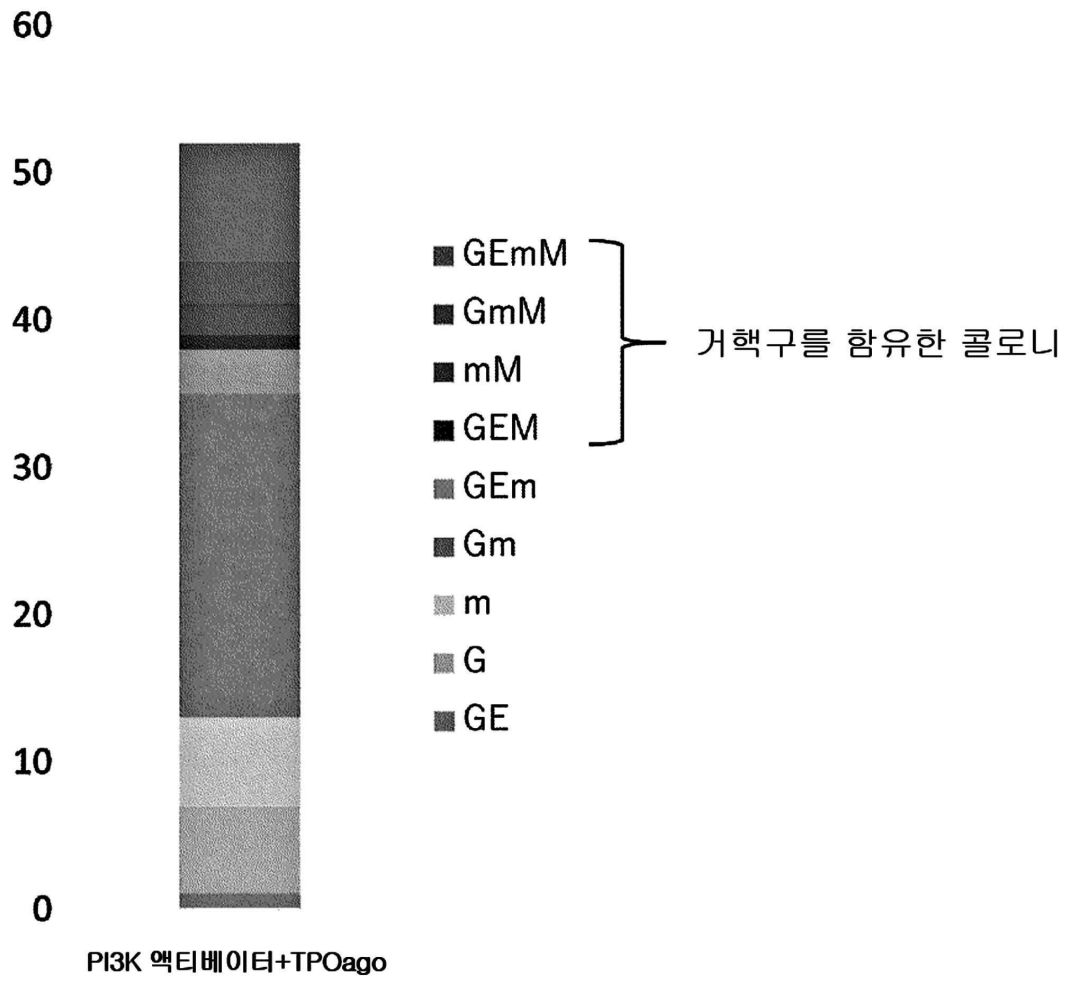
도면10



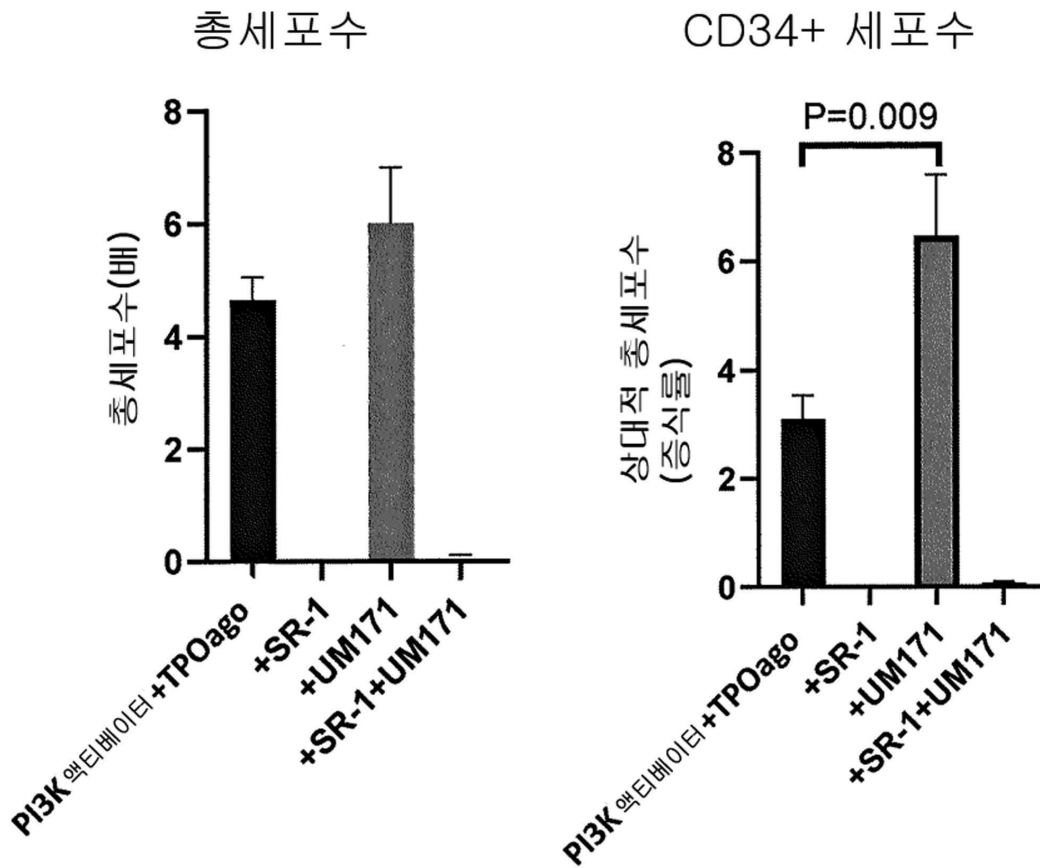
도면11



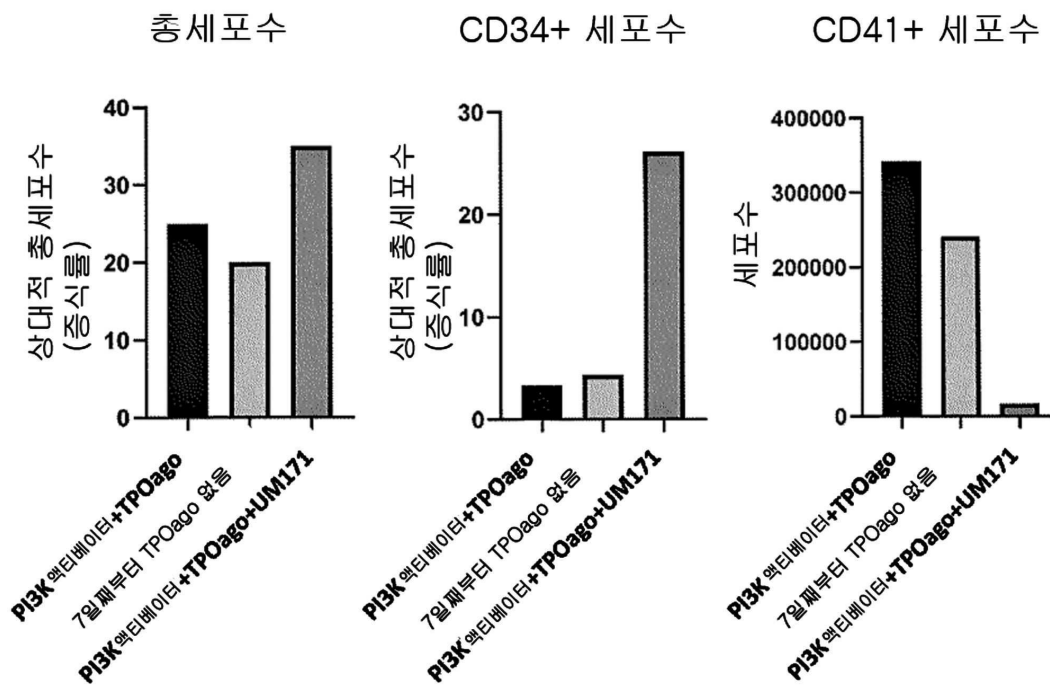
도면12



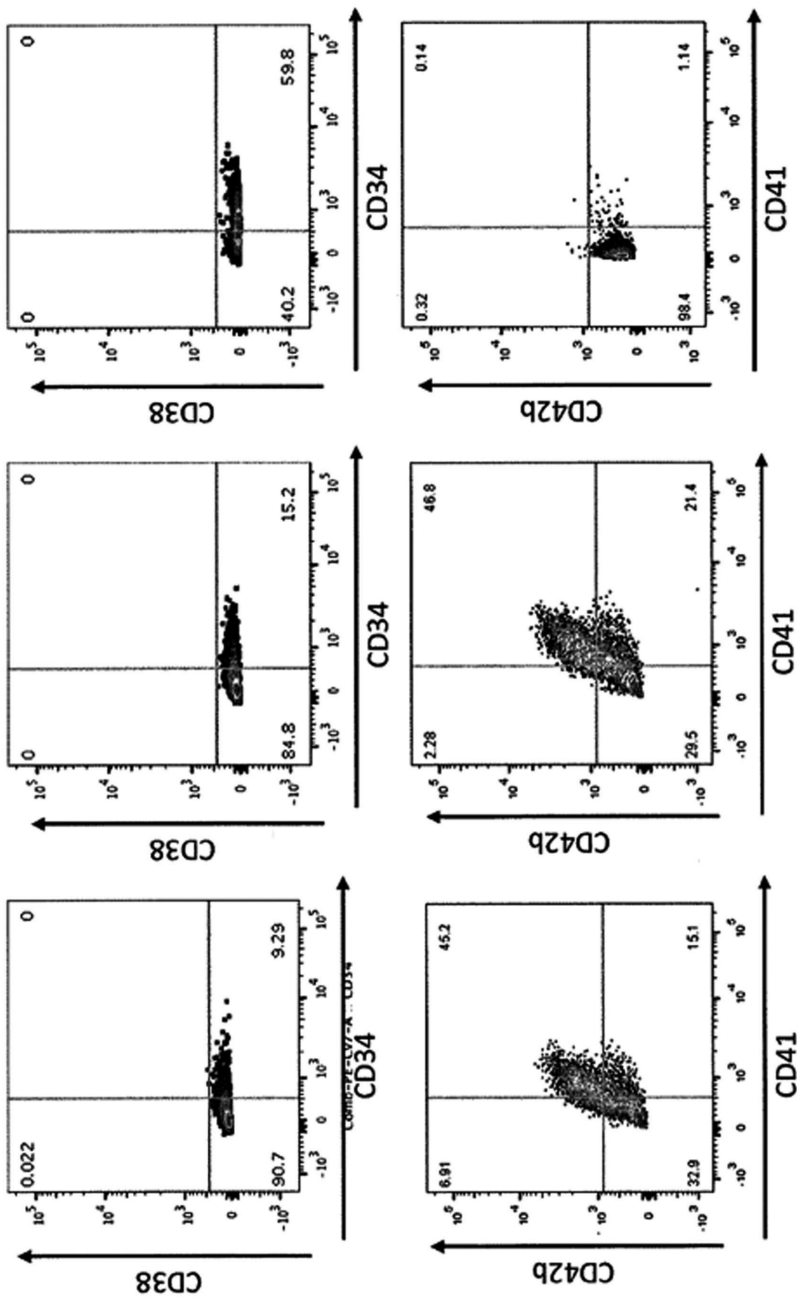
도면13



도면14



도면15

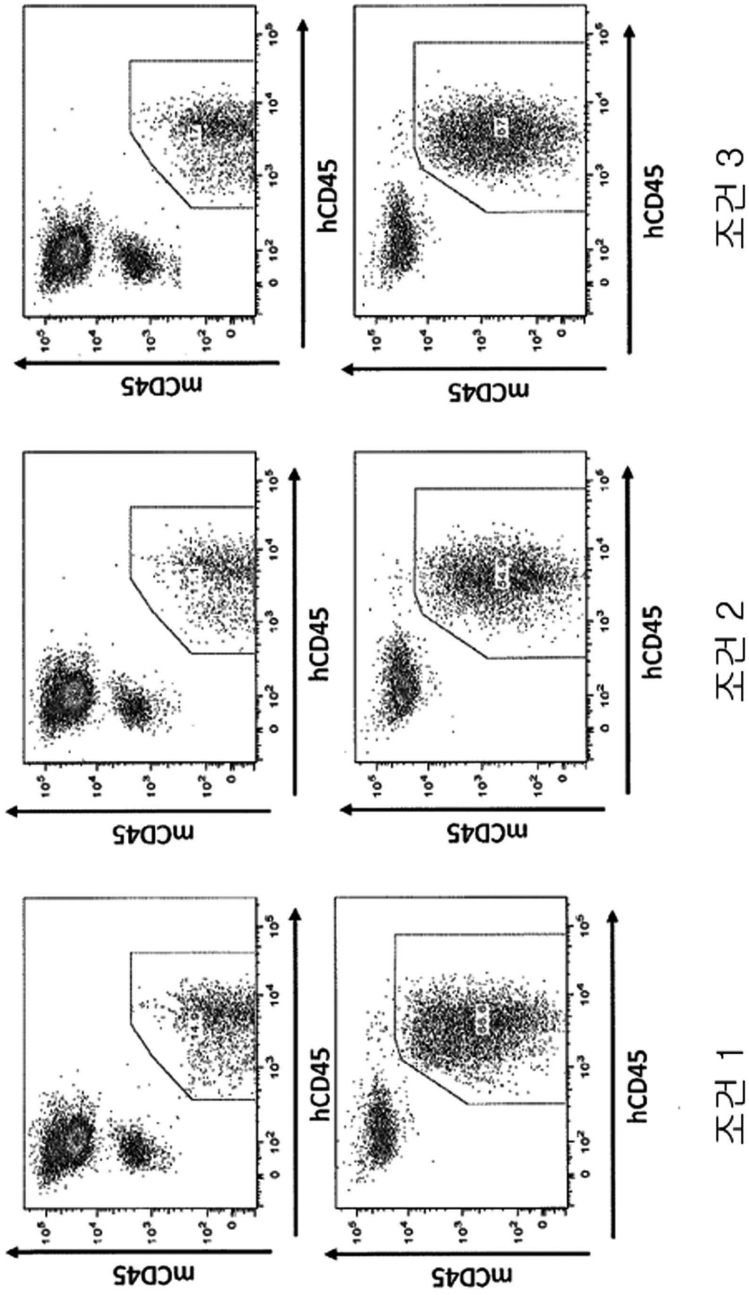


조건 3

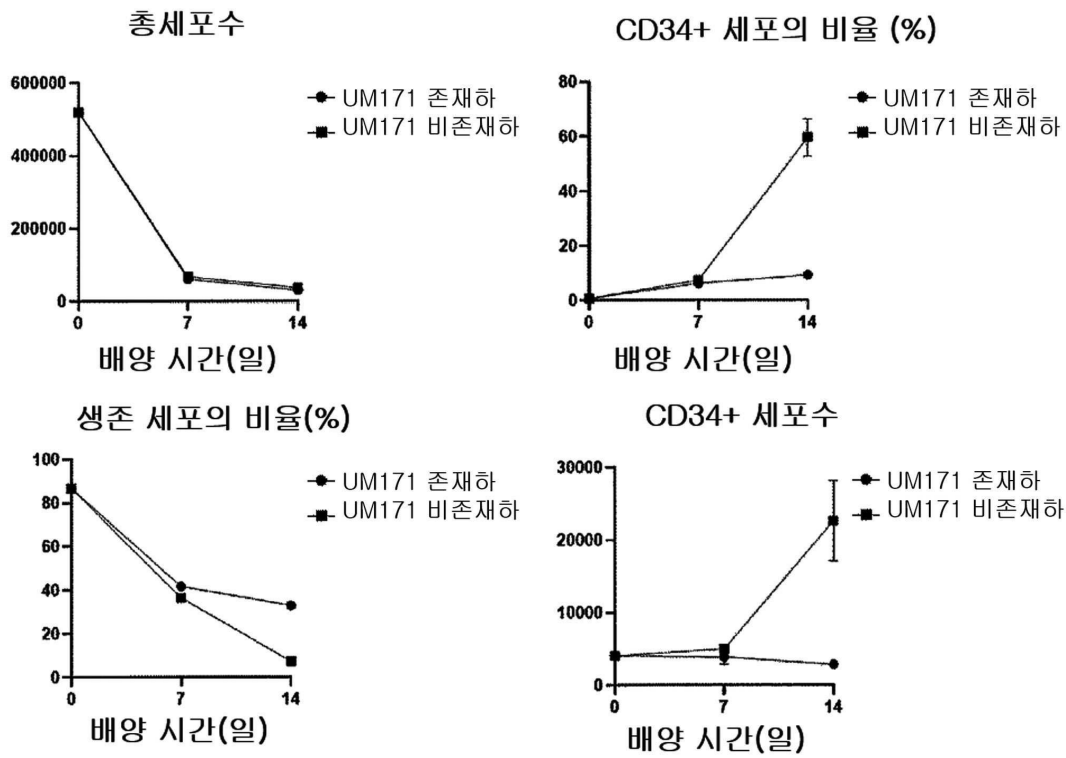
조건 2

조건 1

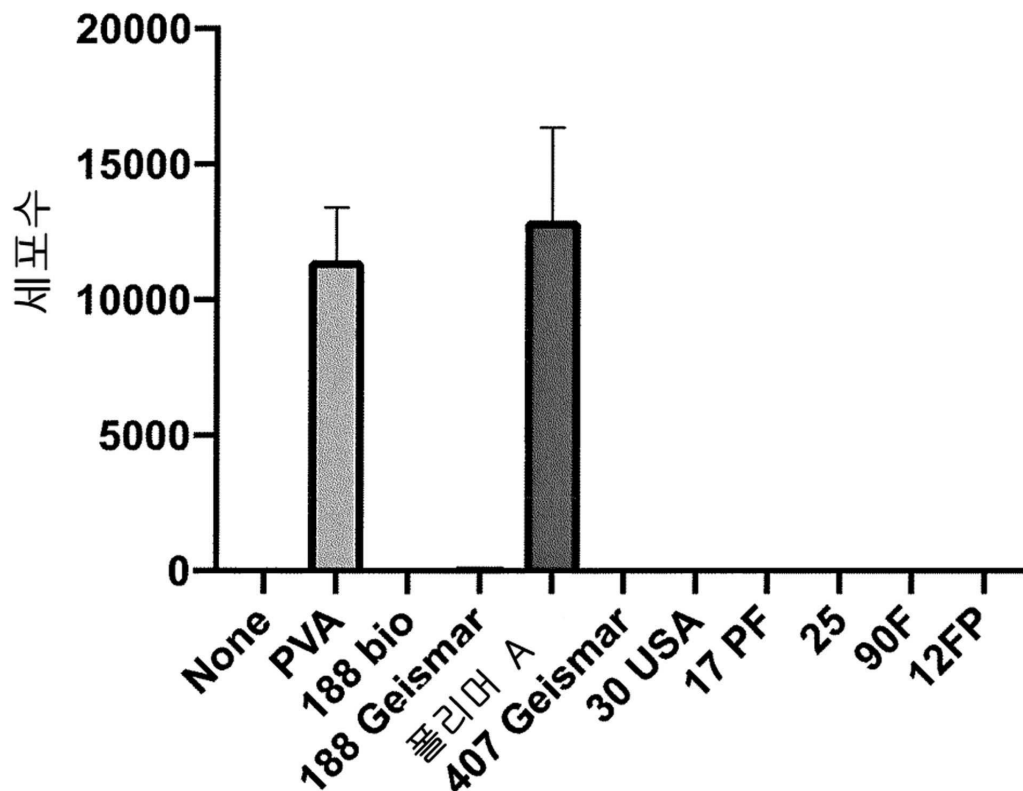
도면16



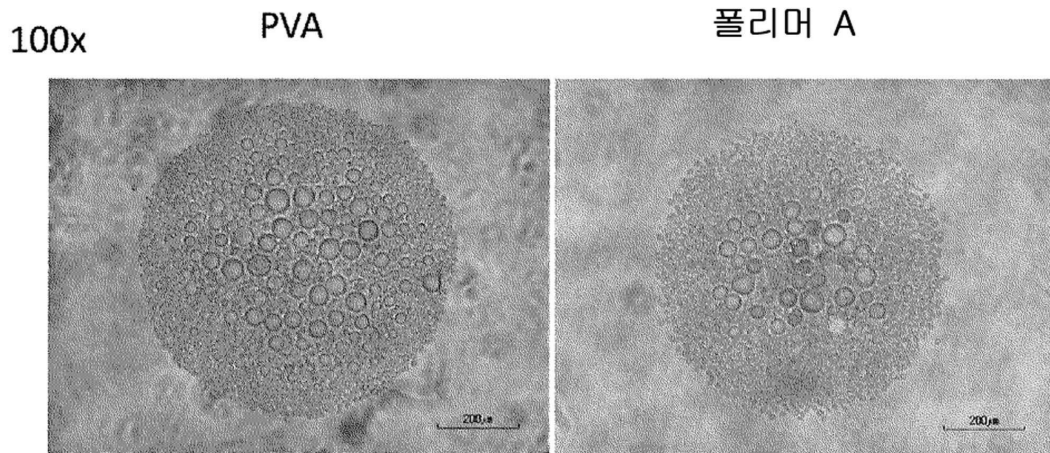
도면17



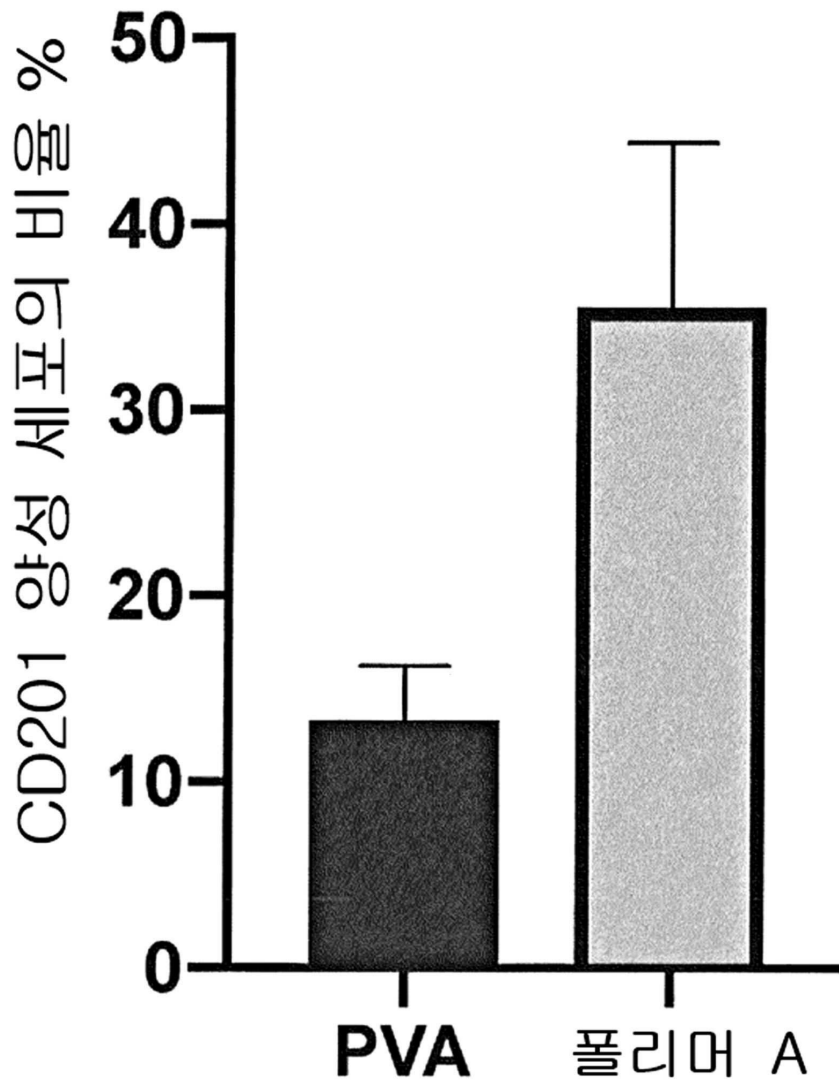
도면18



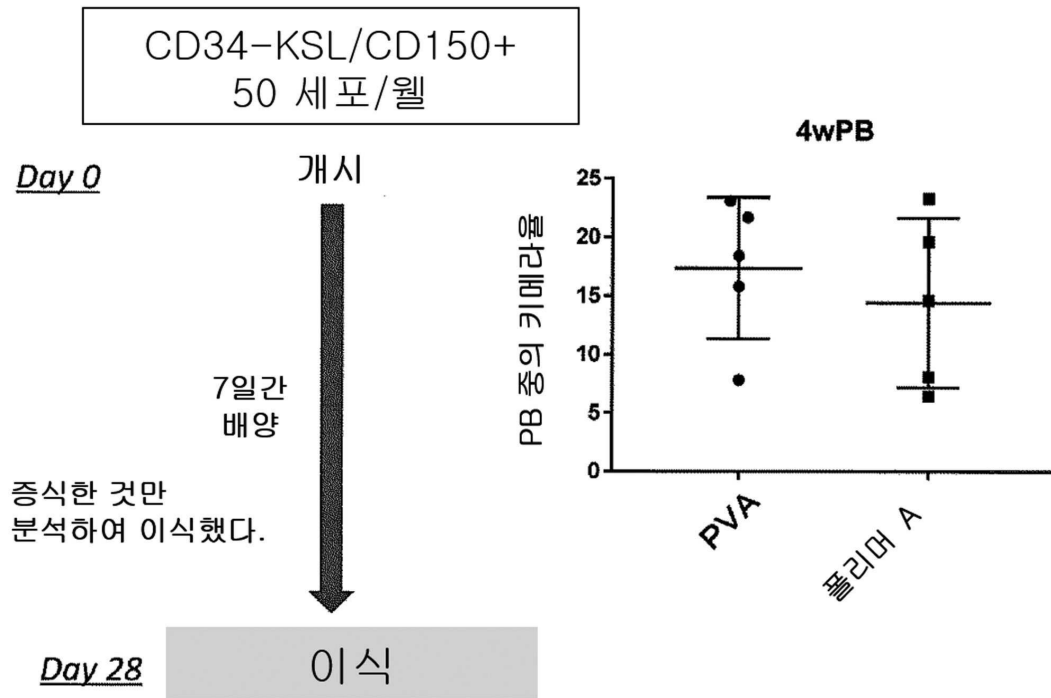
도면19



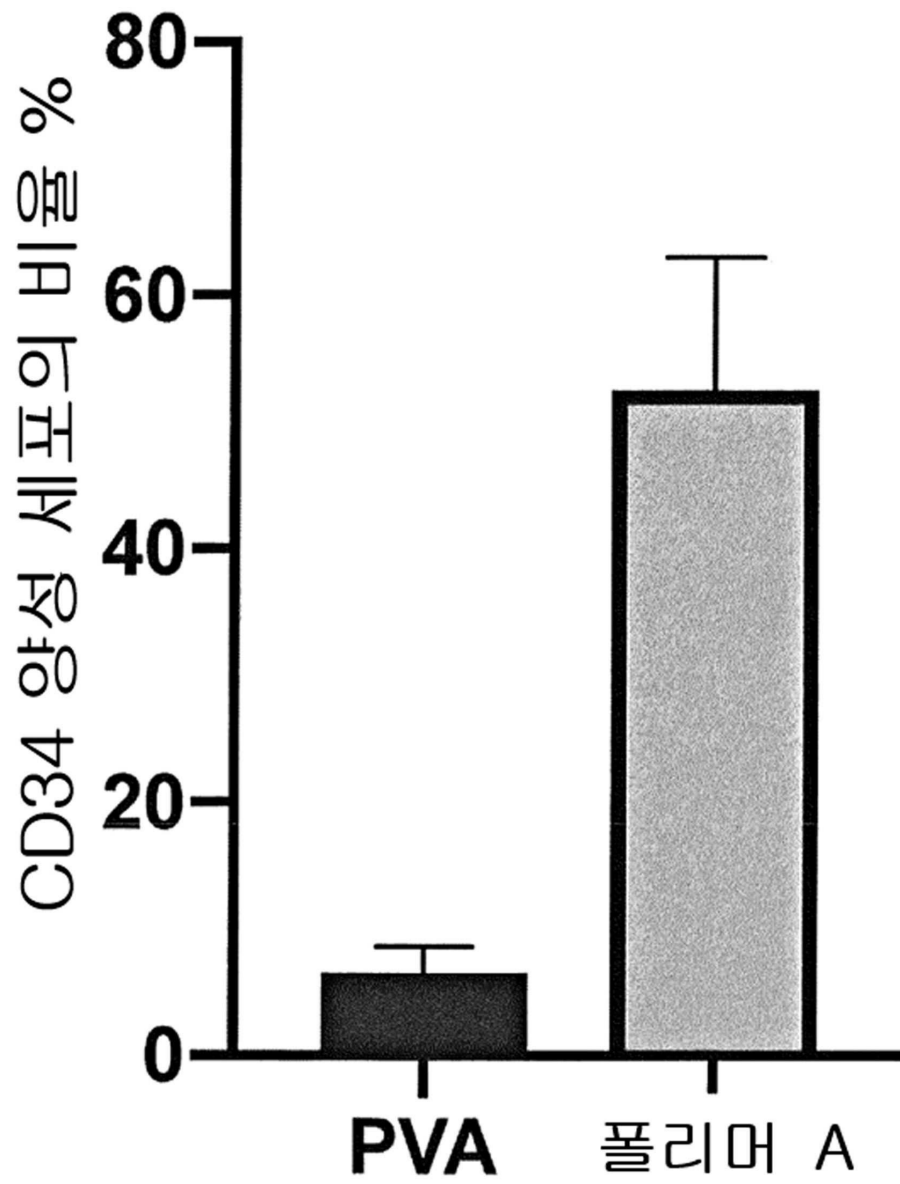
도면20



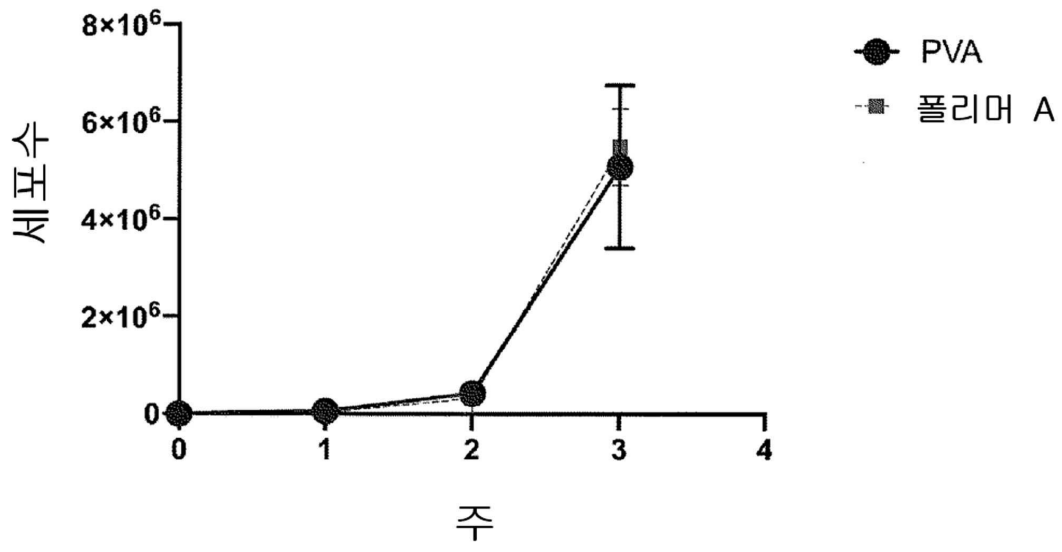
도면21



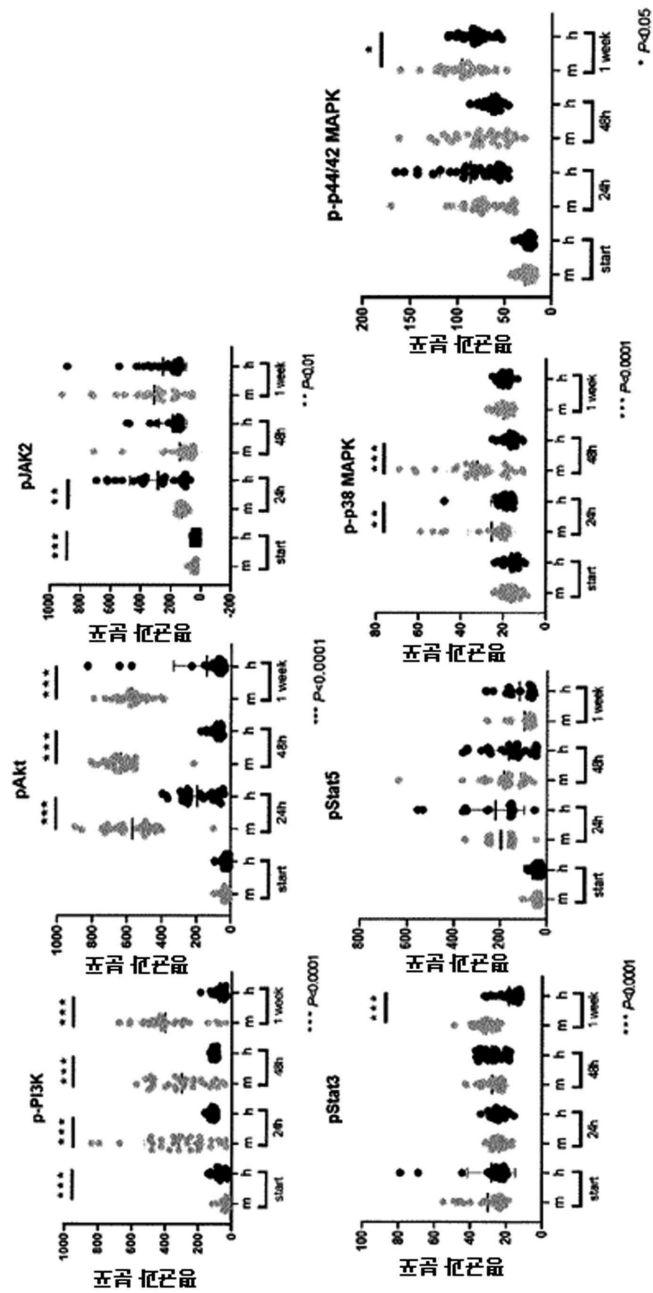
도면22



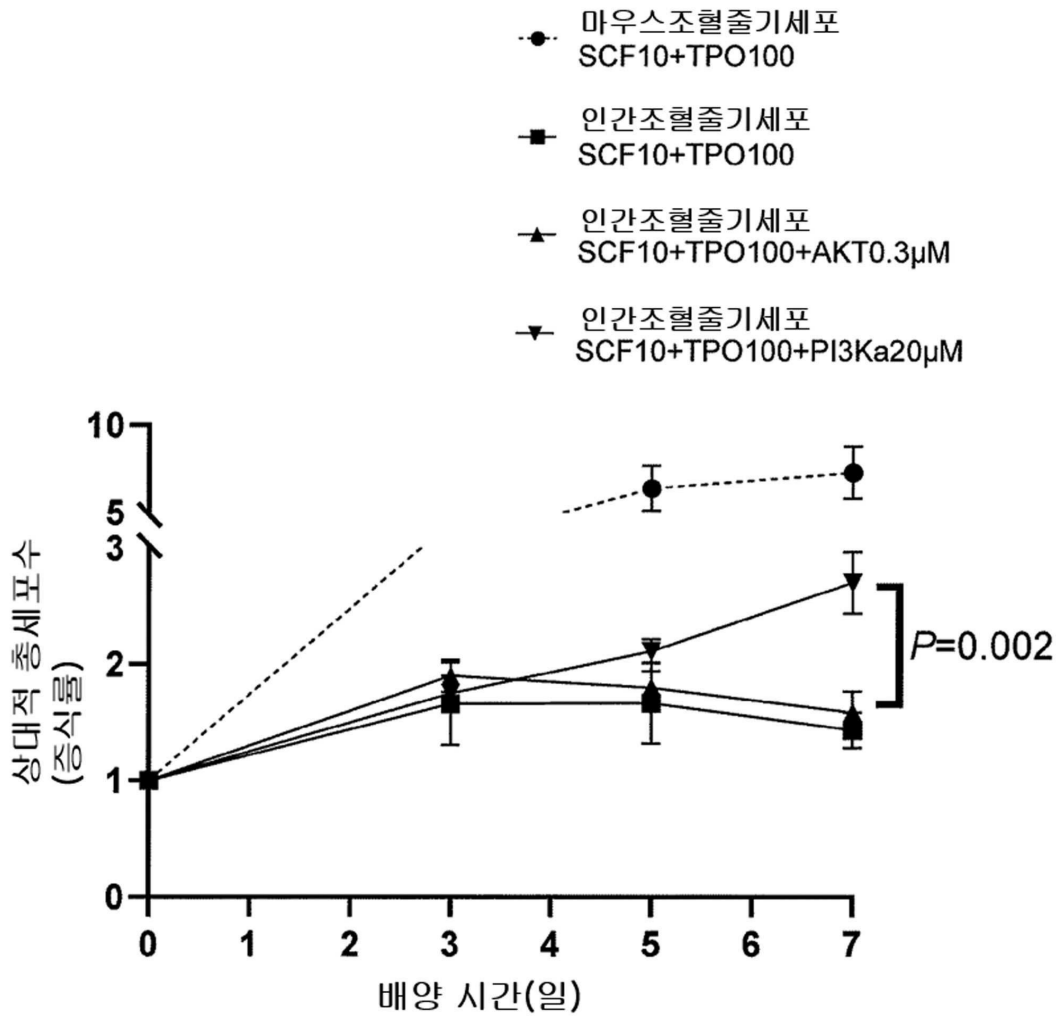
도면23



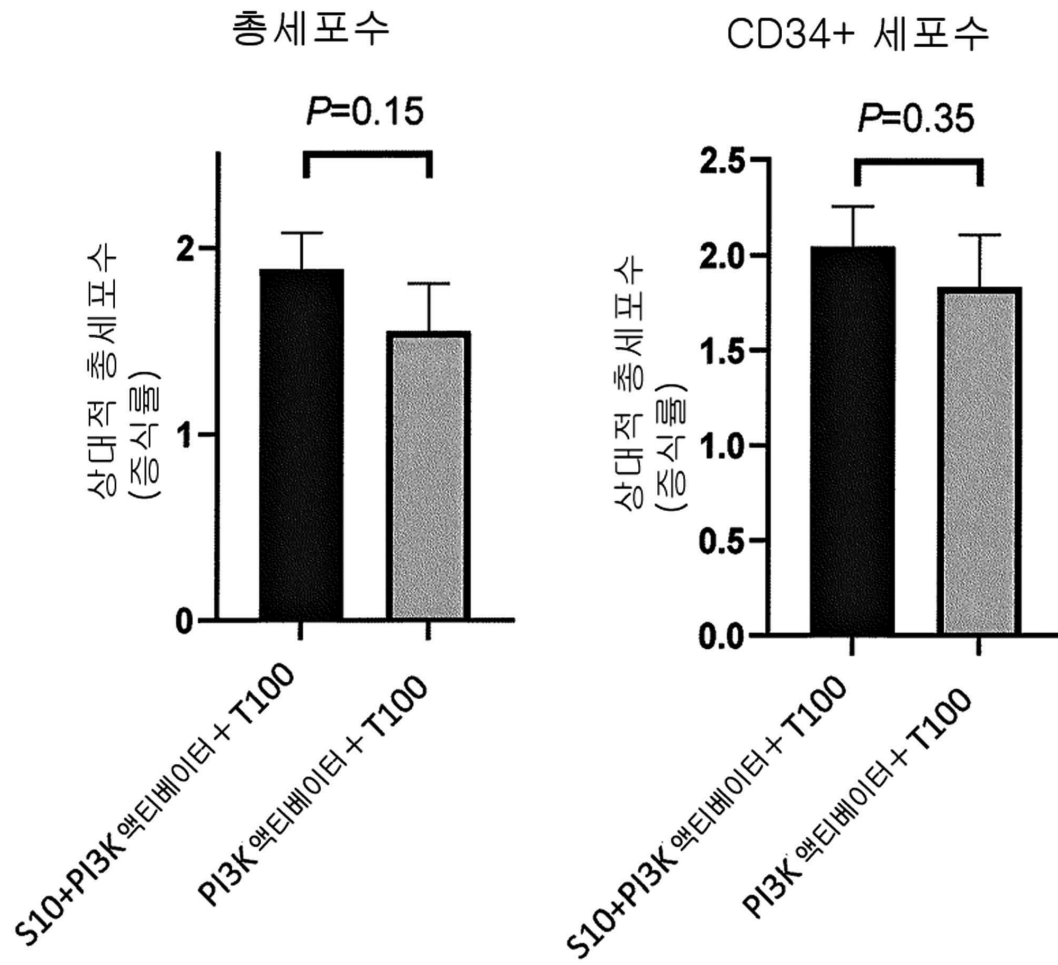
도면24



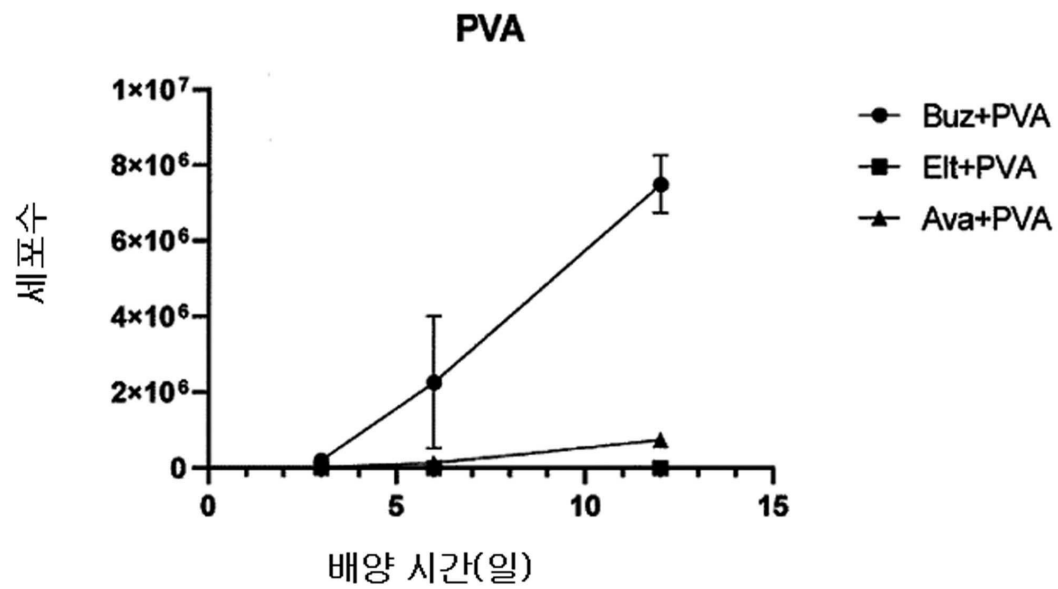
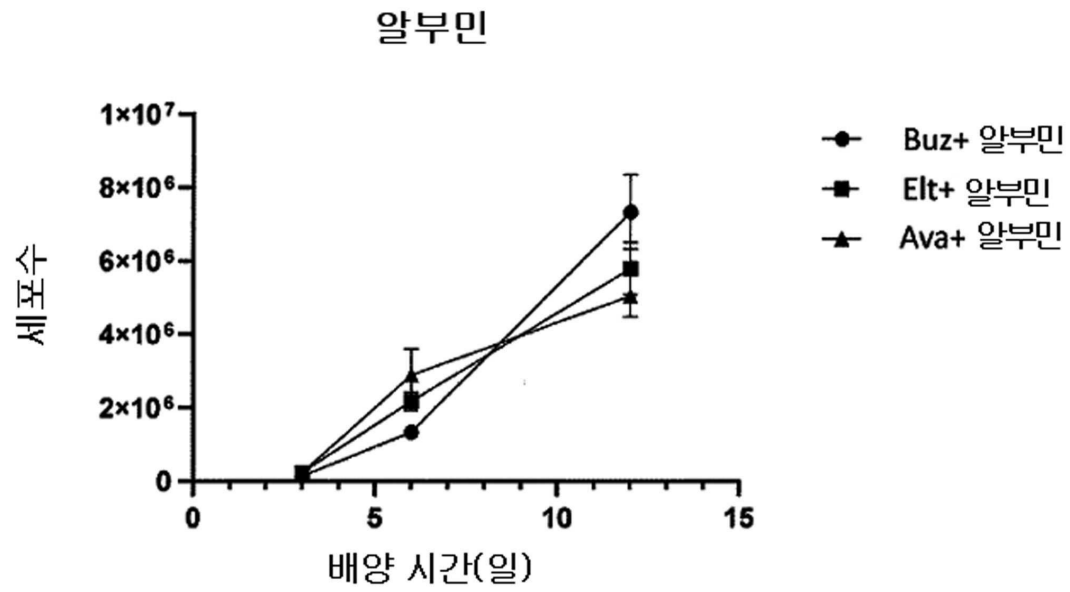
도면25



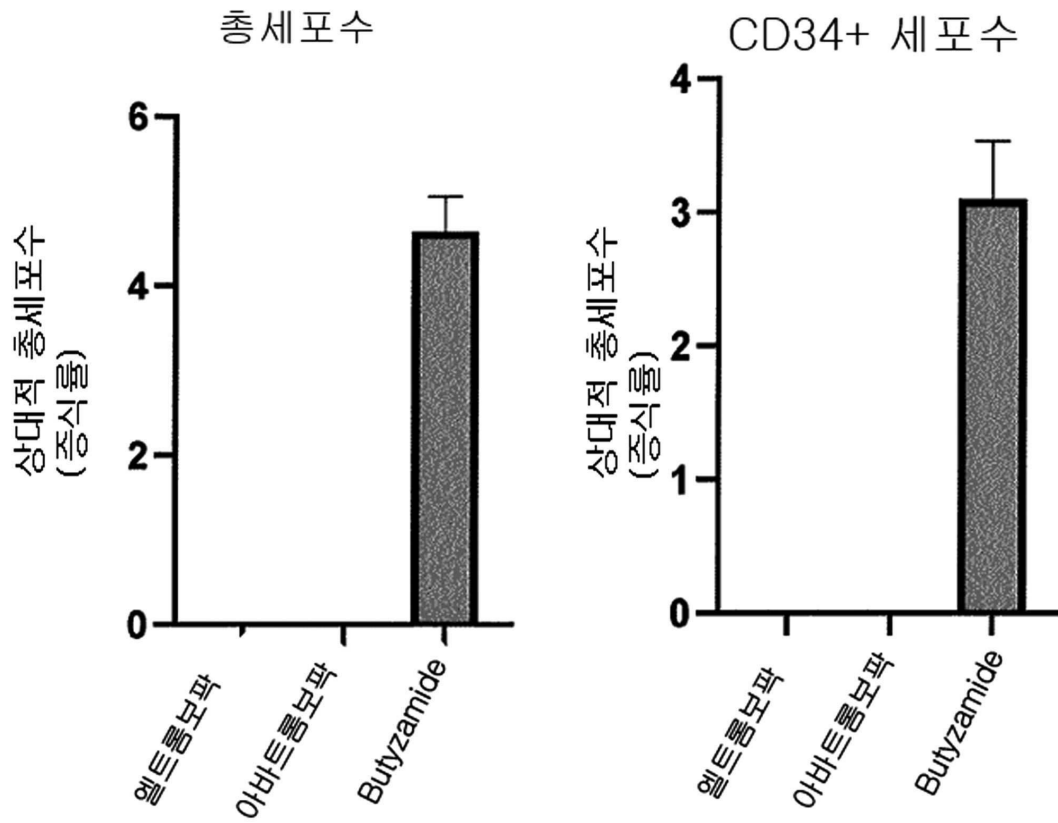
도면26



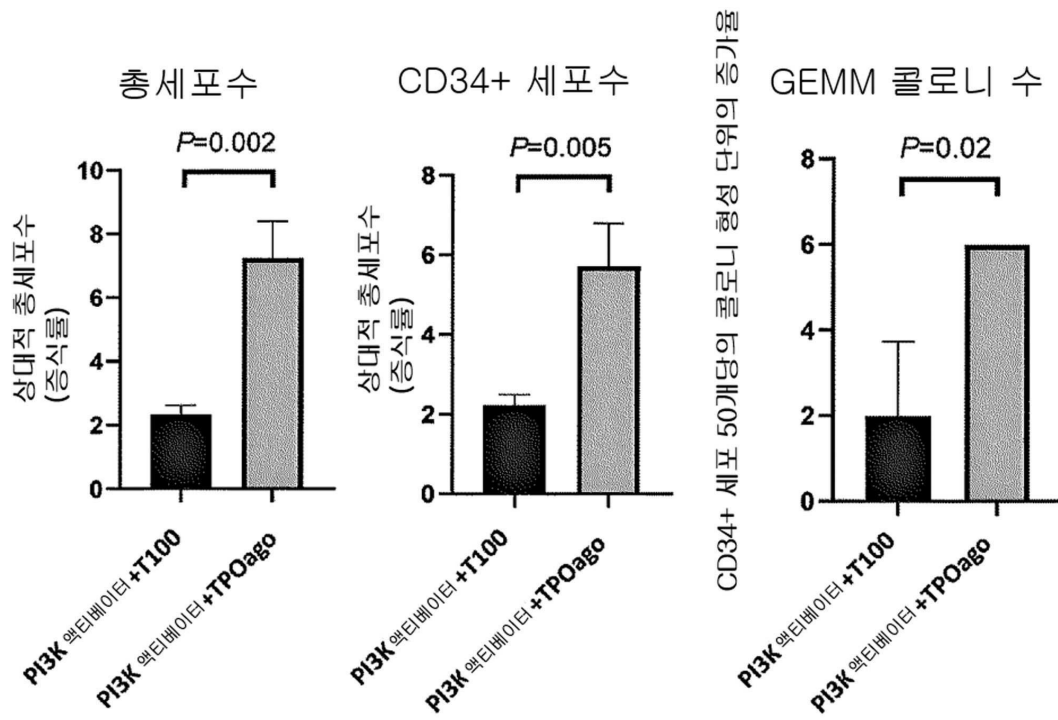
도면27



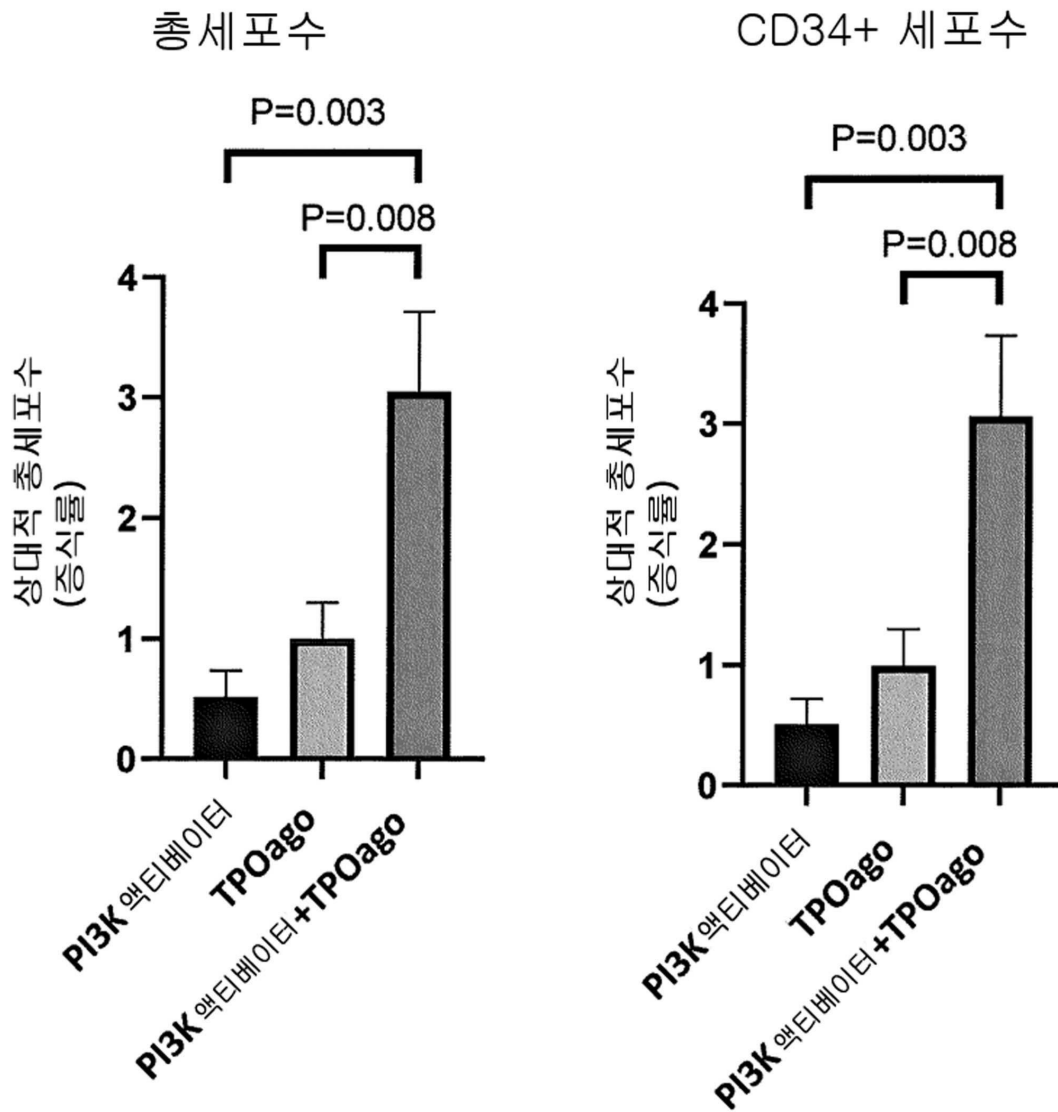
도면28



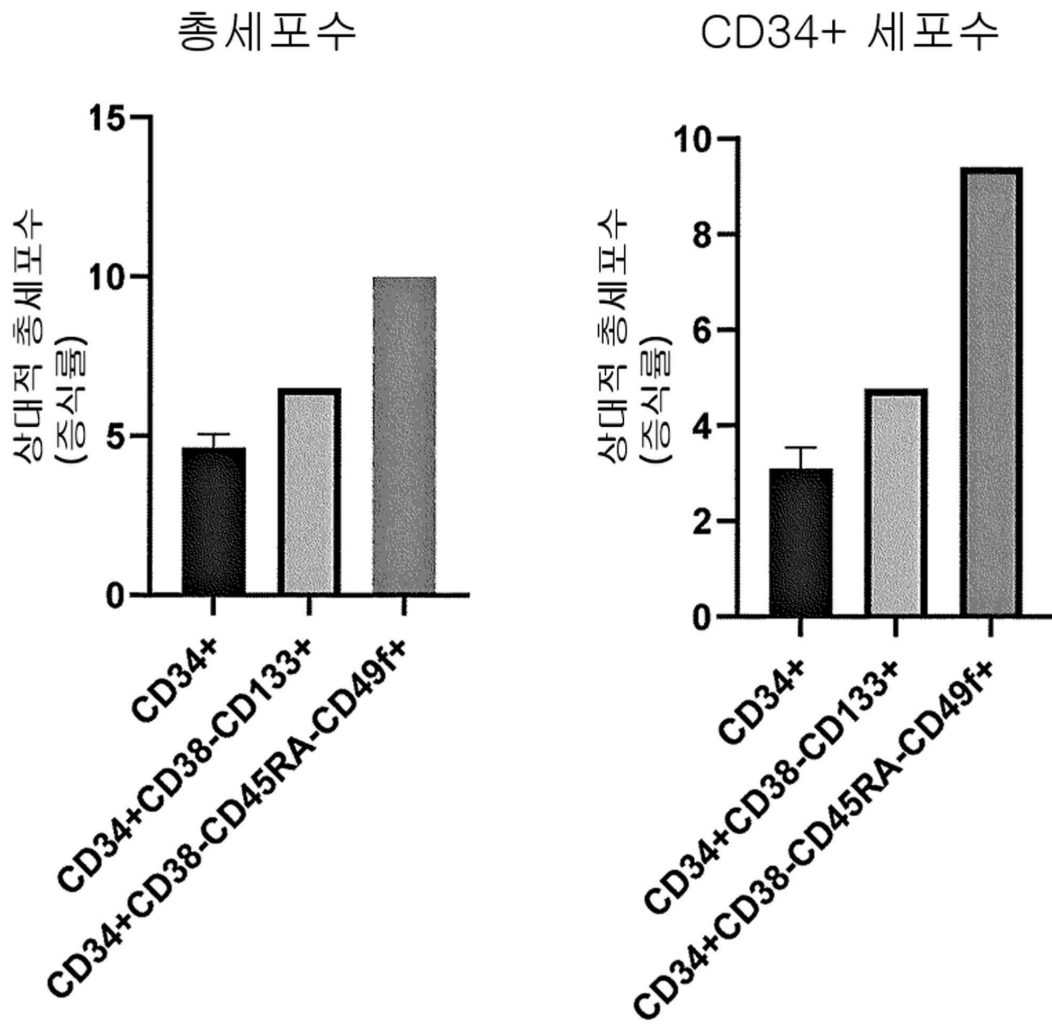
도면29



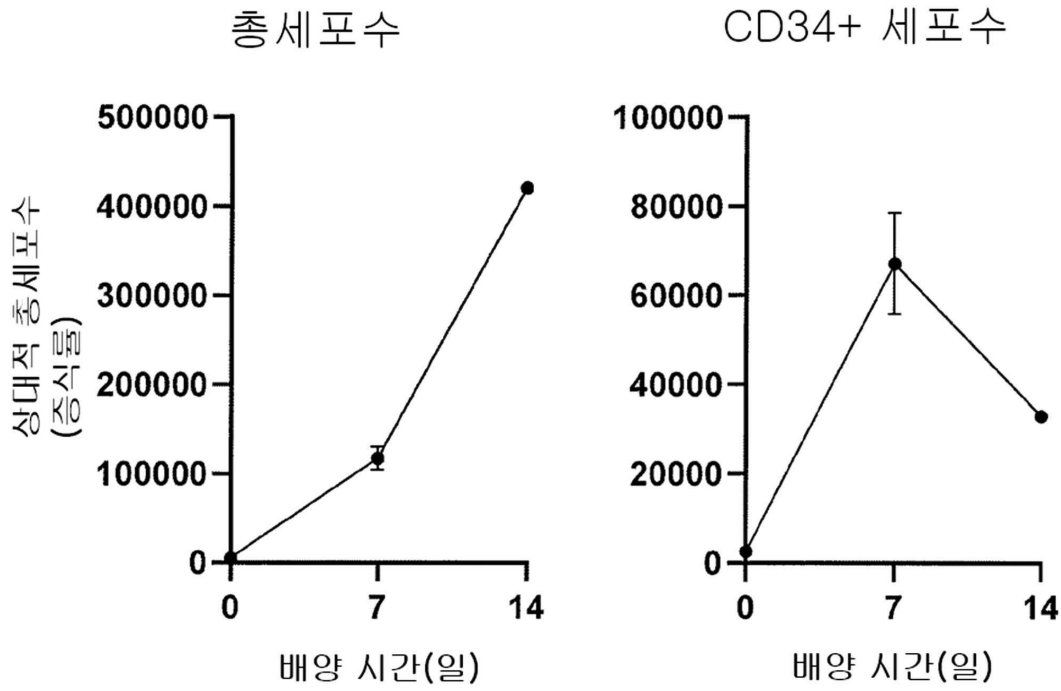
도면30



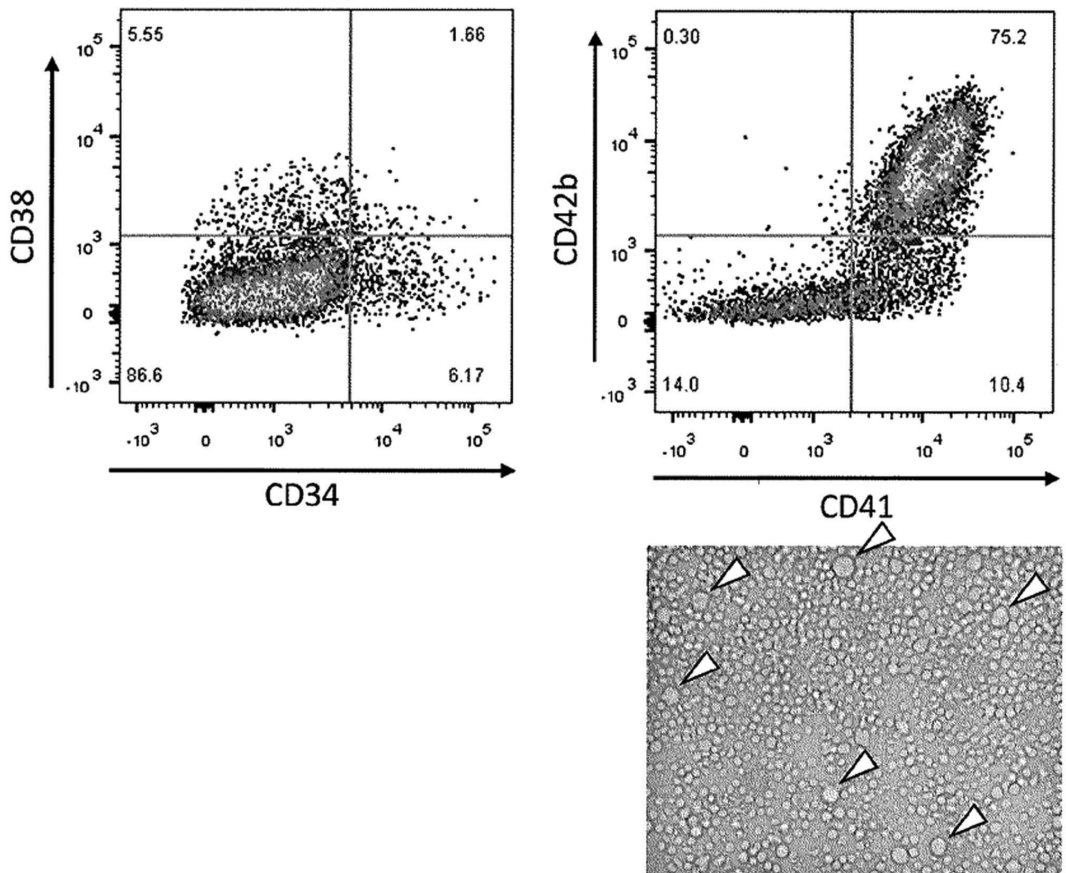
도면31



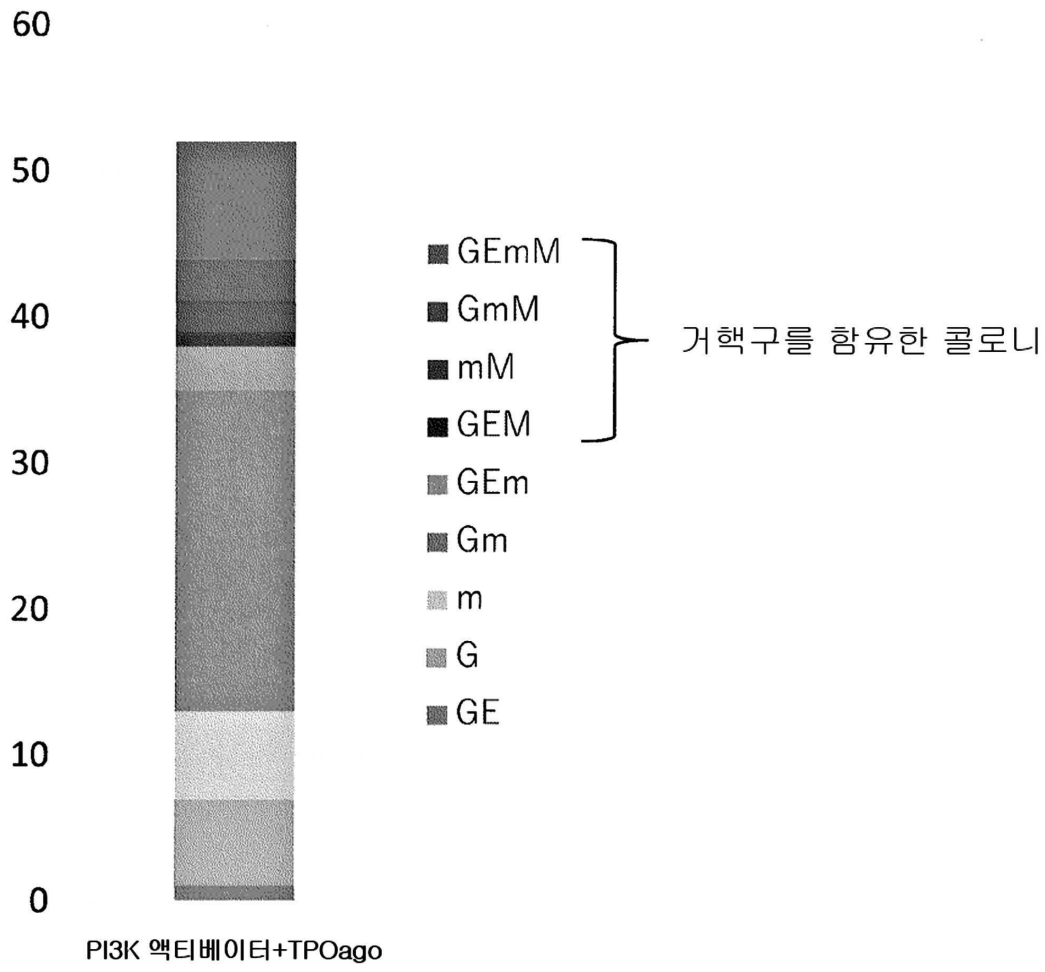
도면32



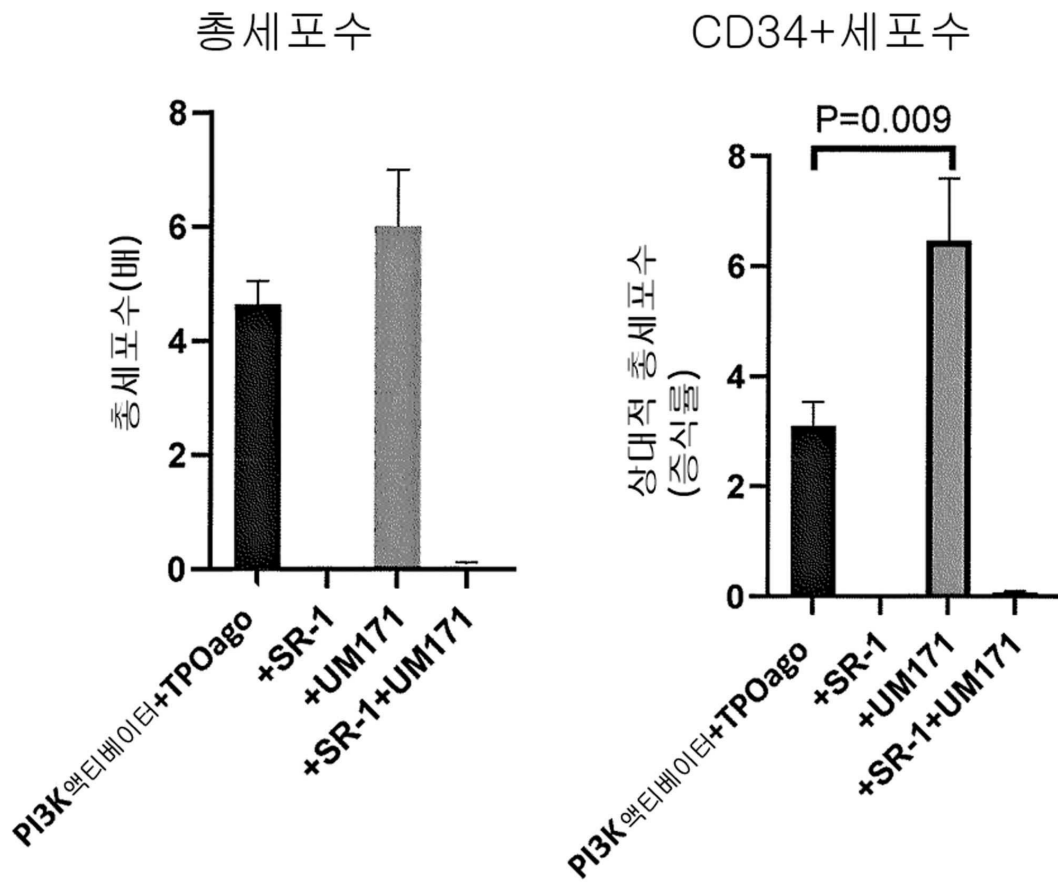
도면33



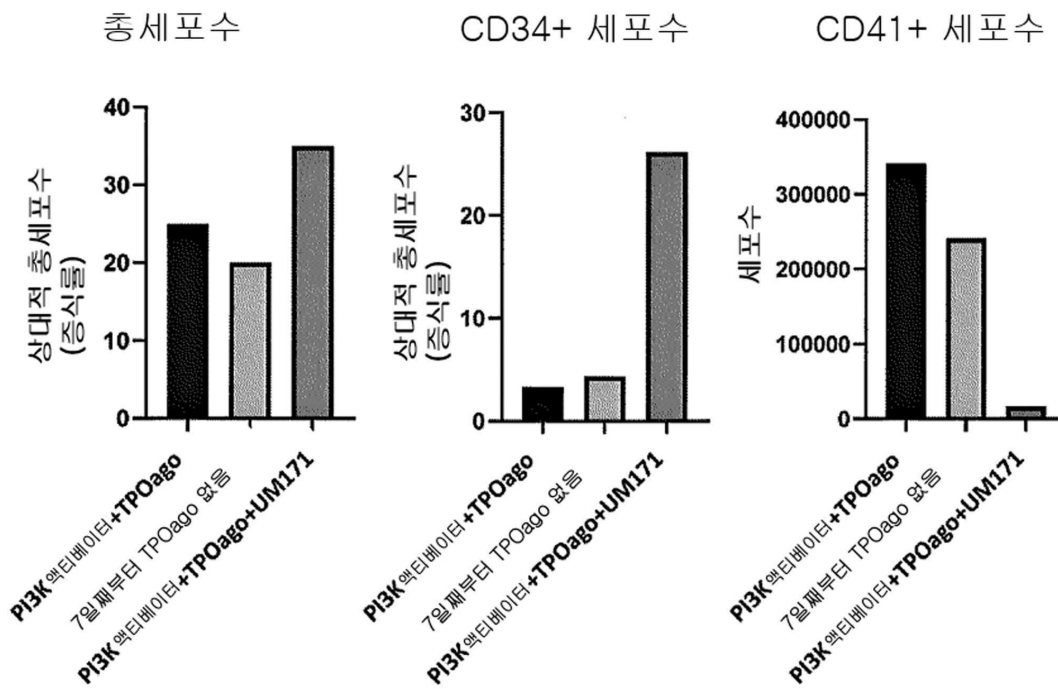
도면34



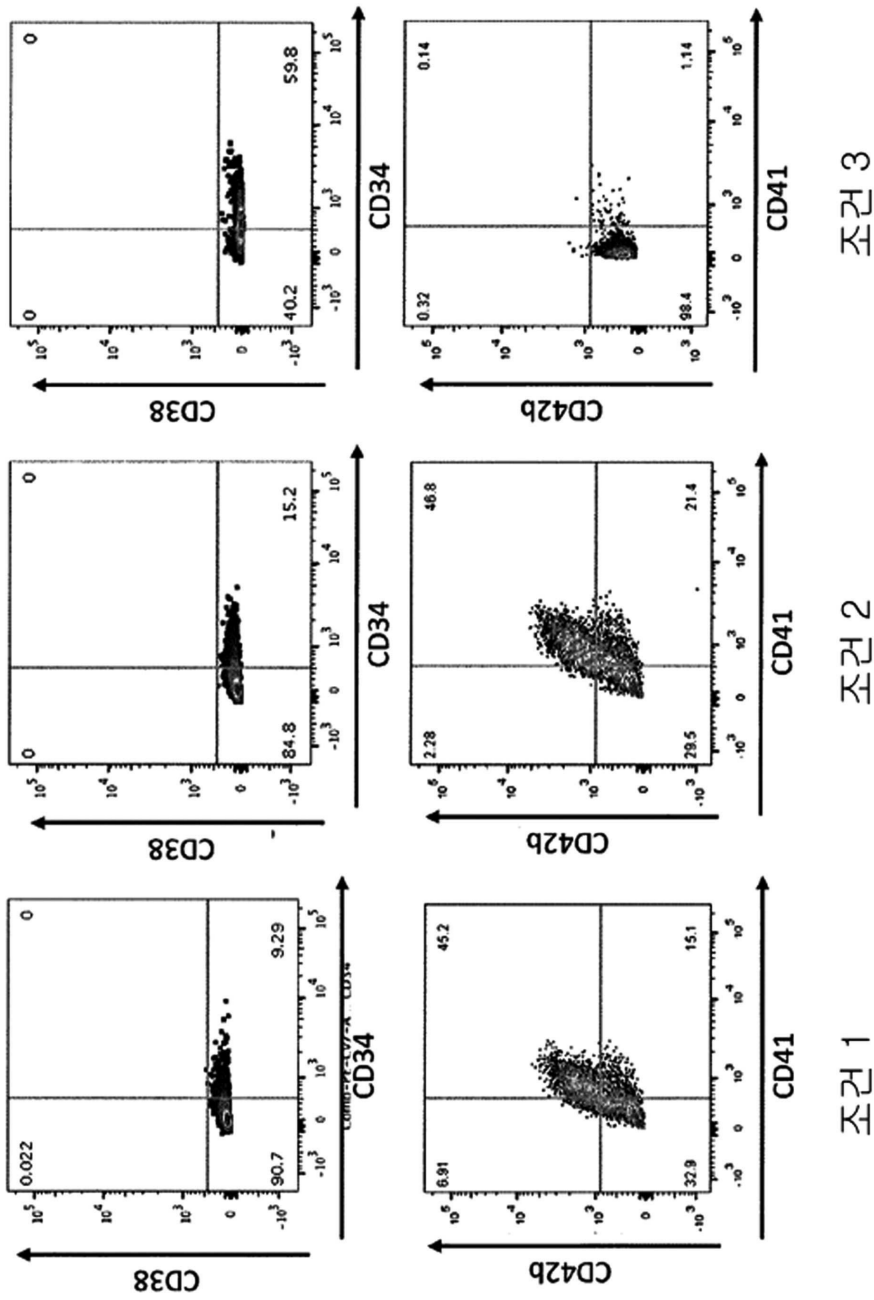
도면35



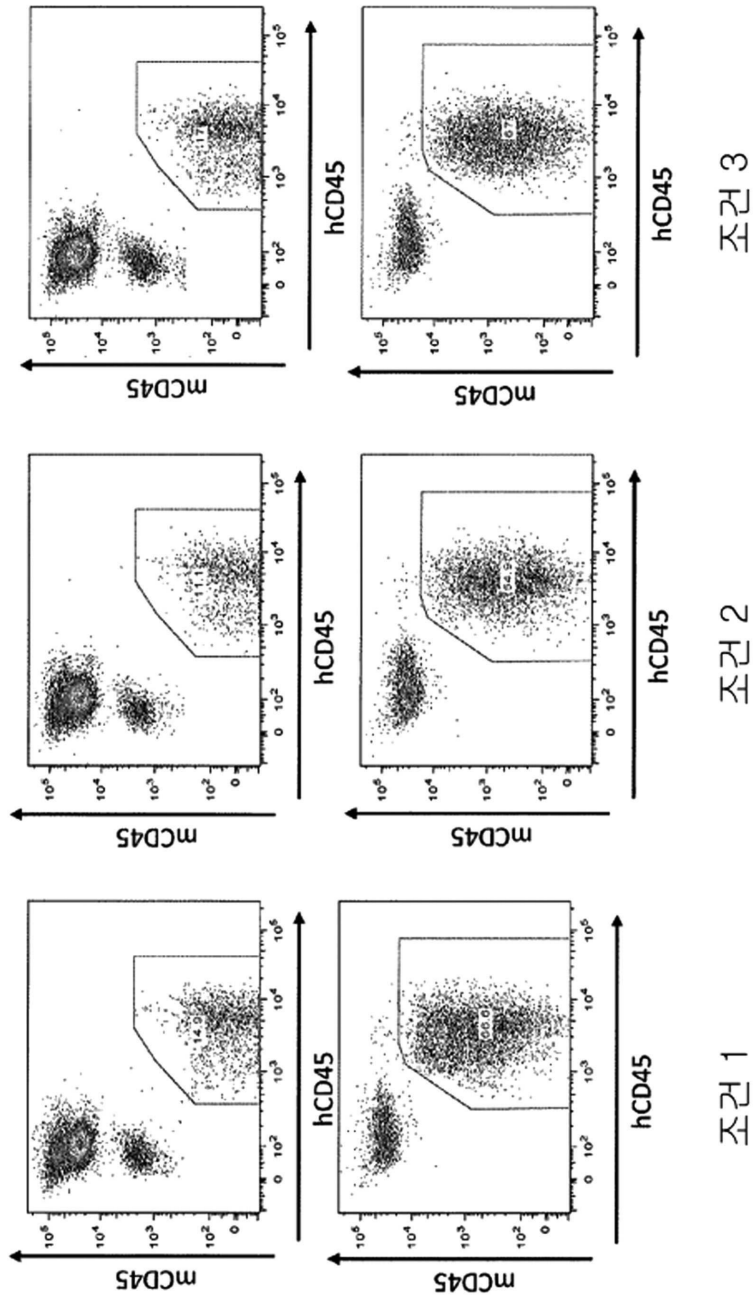
도면36



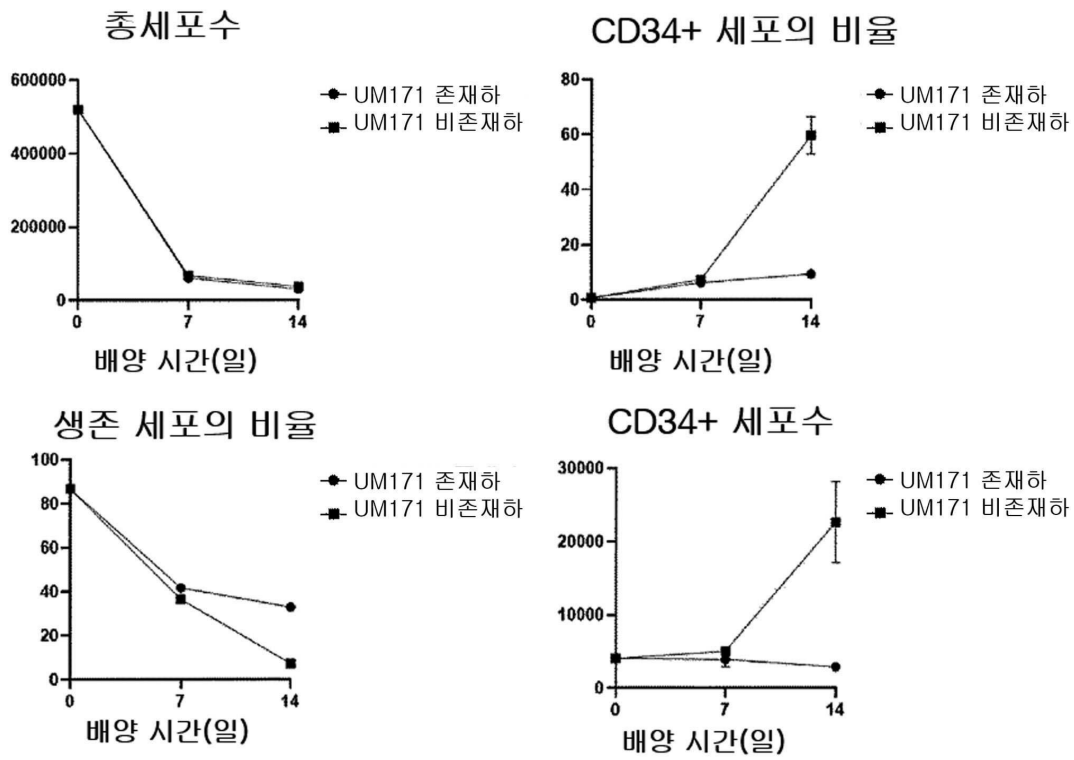
도면37



도면38

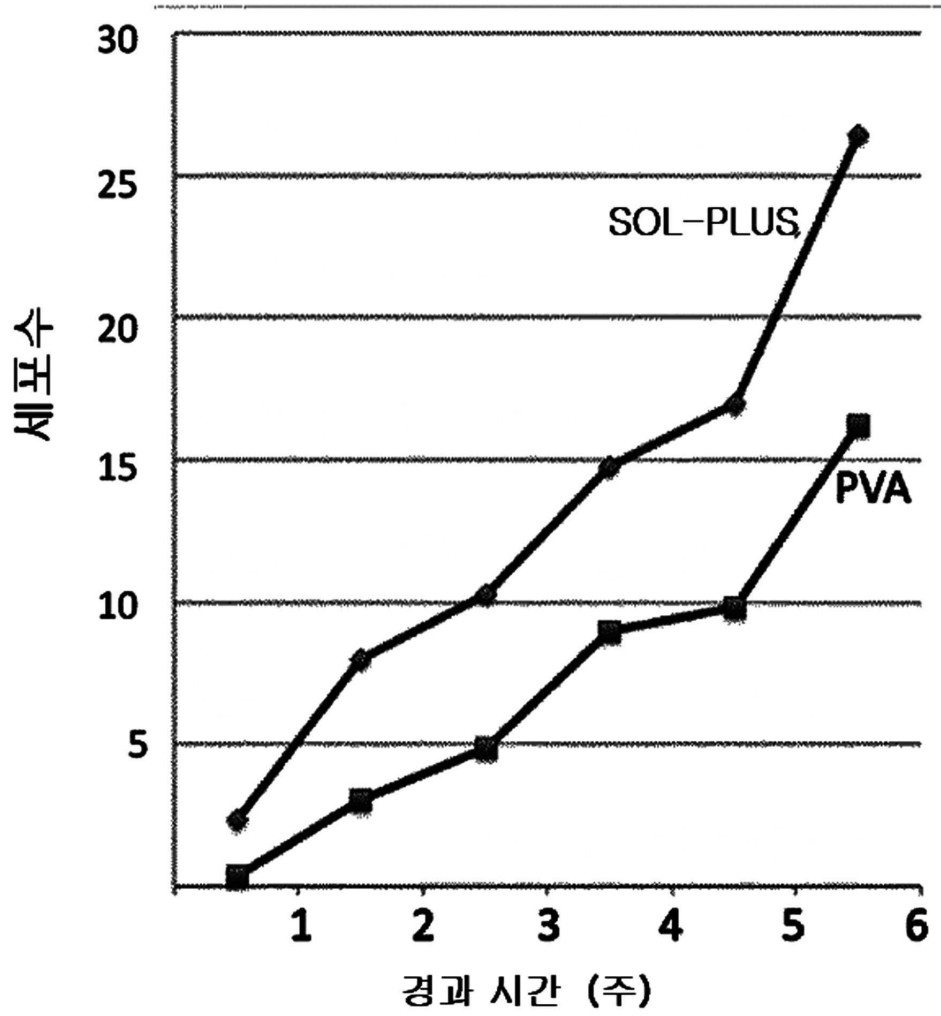


도면39



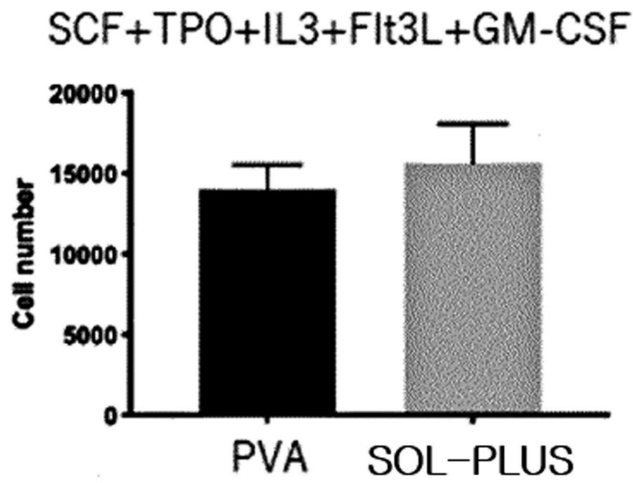
도면40

($\times 10^5$ 세포)



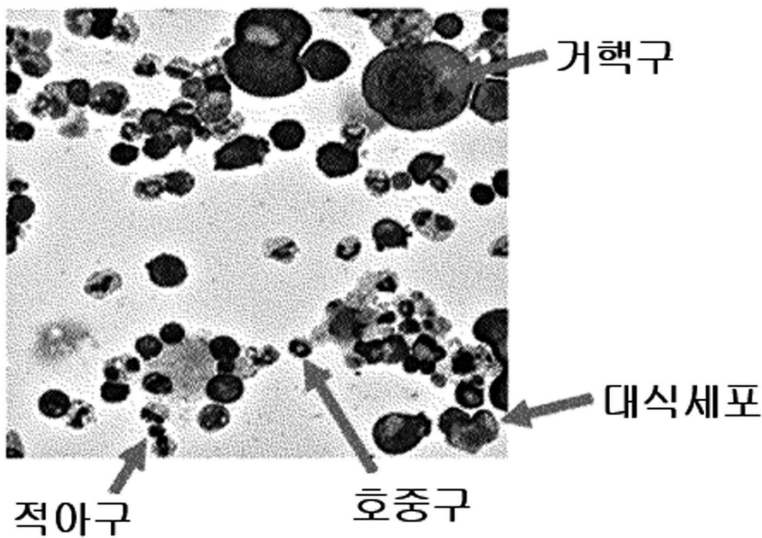
도면41

A



B

SOL-PLUS 에 의한 혈구 분화 세포의 증폭



도면42

