(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0024075
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/068 (2013.01)
C12N 5/0678 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7041334
(22) 출원일자(국제) 2020년05월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월16일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/063855
(87) 국제공개번호 WO 2020/234250
국제공개일자 2020년11월26일
(30) 우선권주장
1906978.0 2019년05월17일 영국(GB)

(71) 출원인
코닌클리즈케 네덜란드세 아카데미 반 베텐샤펜
네덜란드 암스테르담, 1011제이브이, 클로베니어스부르크발 29
(72) 발명자
데 라우, 윌리브롤더스 바렌드 마리아
네덜란드 위트레흐트 씨티 3584 웁살라란 8 후브레흐트 인스티튜트
클레버스, 요하네스 카로루스
네덜란드 위트레흐트 씨티 3584 웁살라란 8 후브레흐트 인스티튜트
(74) 대리인
한라특허법인(유한)

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **인테그린 작용제를 이용한 향상된 배양 방법**

(57) 요 약

본 발명은 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드의 개선된 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 방법과 함께 사용하기 적합한 배양 배지, 상기 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드 그리고 약물 탐색 및 검증, 독성 검정, 진단 및 치료법에서 상기 배양 방법, 배지 및 오가노이드의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C12N 5/0689 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2501/585 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드를 배양하는 방법으로서, 방법이 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지에서 상기 상피 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 배양 방법은 세포 또는 오가노이드를 인테그린 작용제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 인테그린 작용제가 인테그린의 베타 서브유닛과 상호작용하며, 임의로 베타 서브유닛은 β1, β2, β3 또는 β7인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 인테그린 작용제가 β1 서브유닛과 상호작용하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 인테그린 작용제가 인테그린의 알파 서브유닛과 상호작용하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인테그린 작용제가 항-인테그린 항체, 탈린, 킨들린, 디티오트레이톨 및 옥시스테롤 25-하이드록시콜레스테롤로부터 선택되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 인테그린 작용제가 항-인테그린 항체이며, 임의로 항-인테그린 항체는 JBS2, HP1/3, SNAKA51, PT25-2, PMI-1, MEM-83, NKI-L16, 496B, 12G10, 8A2, TS2/16, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29, 9EG7, mAb 24, MEM-148, KIM127, CBR LFA-1/2, MEM-48, KIM185, AP3, AP5, LIBS6, LIBS2, 10F8, 2B8, 2G3인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 항-인테그린 항체가 TS2/16, 12G10, 8A2, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29 또는 9EG7이며, 또한 임의로 항-인테그린 항체는 TS2/16, 12G10, HUTS-4 또는 8A2이고, 또한 임의로 항-인테그린 항체는 TS2/16, 12G10, HUTS-4인, 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 항체가 인간화된, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 인테그린 작용제가 하기인, 방법:

a. 탈린으로서, 임의로, 킨들린과 조합되어 사용되는, 탈린;

b. 디티오트레이톨과 같은 환원제; 또는

c. 옥시스테롤 25-하이드록시콜레스테롤과 같은 지질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 초래하는, 방법:

a. 오가노이드의 성장; 및/또는

b. 인테그린 작용제가 없이 수행되는 동일한 방법에 비해 4일에 걸친 상피 줄기 세포 성장의 적어도 10%, 20%,

50% 증가.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 세포외 기질과 접촉된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 임의로 세포외 기질은 기저막 추출물 또는 Matrigel인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 합성 기질과 접촉된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 임의로 합성 기질은 중합체, 임의로 폴리에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 하이드로겔을 포함하는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 합성 기질이 하기를 포함하는, 방법:

a. 가교된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 하이드로겔; 및/또는

b. 생체물질, 바람직하게는 세포외 기질 성분으로서, 임의로 하나 이상의 당단백질(임의로 콜라겐, 라미닌, 펄레칸, 파이브로넥틴 또는 파이브로넥틴의 RGD 부착 리간드로부터 선택됨) 및/또는 하나 이상의 탄수화물(임의로 히알루론산)인, 생체물질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 기질 또는 합성 기질이 3차원이고/이거나 현탁 상태인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 방법에 세포를 외인성 세포외 기질과 접촉시키는 단계가 관여되지 않는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상피 줄기 세포가 결장직장, 소장, 위, 췌장, 간, 폐, 유방, 전립샘, 신장, 구강, 코인두, 목, 하인두, 후두, 기관, 피부, 나팔관, 난소, 침샘, 식도, 모낭 및/또는 달팽이 세포로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 Wnt 작용제, BMP 저해제, 분열촉진 성장 인자 및 TGF-베타 저해제 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에서 정의된 바와 같은 배양 배지로서, 제2항 내지 제9항에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 추가로 포함하는 배양 배지.

청구항 19

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 세포외 기질 또는 합성 기질로서, 제2항 내지 제9항에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 추가로 포함하는 기질.

청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드.

청구항 21

제18항에 따른 배양 배지, 및 임의로 제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은, 세포외 기질 또는 합성 기질을 포함하는 조성물.

청구항 22

세포를 배양하기 위한 인테그린 작용제의 용도.

청구항 23

대상체 내로의 이식 전에 세포를 전처리하기 위한 인테그린 작용제의 용도.

청구항 24

세포 이식 방법에서 세포 접착-증강제로 사용하기 위한 인테그린 작용제.

청구항 25

제20항에 있어서, 치료법에서 사용하기 위한 또는 진단에서 사용하기 위한 오가노이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 줄기 세포 또는 오가노이드를 배양하기 위한 시험관내 세포 배양 방법에 관한 것이다. 본 발명은 상기 방법과 함께 사용하기 적합한 배양 배지, 상기 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드 그리고 약물 탐색 및 검증, 독성 검정, 진단 및 치료법에서의 상기 배양 방법, 배지 및 오가노이드의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 배양 중 줄기 세포 또는 오가노이드의 현재 배양 방법은 일반적으로 세포외 기질의 사용을 필요로 한다. 세포외 기질은 신체에 걸쳐 분포된 섬유성, 겔-유사 물질의 다기능성 네트워크로 구성되며, 이는 모든 조직에 대한 구조적 및 생화학적 지지를 제공한다. 기질 단백질은 세포 접착, 증식, 분화 및 아폽토시스가 포함되는 여러 세포성 공정에 연루되었다. 세포외 기질 단백질의 예에는 라미닌, 콜라겐, 당단백질, 프로테오글리칸, 및 글리코스아미노글리칸이 포함되며, 이는 세포 사이의 간질 공간에서 또는 기저막으로서 자가-조립된다. 이들 세포외 기질 단백질은 일부 기질 성분에 결합할 수 있는 매우 다양한 세포 수용체를 통해 세포 기능에 영향을 미칠 수 있다[1].

[0003] 상피 줄기 세포의 배양을 위해 사용될 수 있는, 상업적으로 이용 가능한 세포외 기질의 예에는 엥겔브레스-홀름-슈바름(EHS) 마우스 육종 세포의 기저막 조제물(예로 Cultrex® 기저막 추출물(Trevigen, Inc.) 또는 Matrigel™(BD Biosciences))이 포함된다. 그러나, 이들 세포외 기질의 정확한 조성 및 이들이 세포 기능에 영향을 미치는 기전은 여전히 알려져 있지 않다[2]. 이들 세포외 기질의 정확한 성분이 잘-정의되어 있지 않으므로, 이는 줄기 세포를 배양하는 경우 변동성 원천을 도입할 수 있다.

[0004] 따라서, 기질의 성분이 제어되고 재현 가능한, 이들 세포외 기질에 대한 합성 대체물에 대한 당분야에서의 필요성이 존재한다. 합성 기질은 임의로 세포외 기질 단백질로 보충된, 화학적으로 처리된 배양 디쉬 플라스틱, 또는 침적된 단백질층과 같은 다양한 물질로 제조될 수 있다. 그러나, 당분야에서의 합성 기질은 주요 세포외 기질 단백질만을 함유하며 모든 세포 유형에 적용 가능하지 않다[2]. 또한, 이들 합성 기질이 일부 줄기 세포 정상을 지지할 수 있지만, 이들은 아직 세포외 기질만큼 효율적이지 않다.

[0005] 따라서 줄기 세포의 개선된 배양 방법에 대한 당분야에서의 필요성이 존재한다. 특히, 합성 기질로 줄기 세포의 성장을 개선하는 배양 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0006] **발명의 요약**

[0007] 본 발명은 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드의 배양 방법을 제공하며, 여기서 방법은 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지에서 상기 상피 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 배양 방법은 세포 또는 오가노이드를 인테그린 작용제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 본 발명자들은 상피 줄기 세포 또는 오가노이드의 배양 방법에서, 항체와 같은 인테그린 작용제의 사용이 세포외 기질의 존재 또는 부재 하에

세포 성장의 개선을 초래함을 유리하게 확인하였다.

[0008] 본 발명은 상피 줄기를 위해 적합하고 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 Wnt 작용제, BMP 저해제, 분열촉진 성장 인자 및 TGF-베타 저해제 중 하나 이상을 포함하는, 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 배양 배지를 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 임의의 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드를 제공한다.

[0009] 본 발명의 다른 양태는 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 상피 줄기 및 본 발명의 임의의 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드를 위해 적합한 배양 배지를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 상피 줄기를 위해 적합한 배양 배지 및 세포외 기질 또는 합성 기질을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 세포외 기질 또는 합성 기질을 제공하며, 여기서 기질은 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 추가로 포함한다.

[0010] 추가 양태에서, 본 발명은 세포를 배양하기 위한 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 인테그린 작용제의 용도를 제공한다. 이들에는 대상체 내로의 이식 전에 세포를 사전-처리하기 위한 인테그린 작용제 및 세포 이식 방법에서 세포 접착-증강제로서 사용하기 위한 인테그린 작용제의 용도가 포함된다.

[0011] 본 발명은 또한 약물 스크리닝, 표적 검증, 표적 탐색 또는 독성학을 위한 본 발명의 오가노이드의 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 치료법에서 사용하기 위한 또는 진단에서 사용하기 위한 본 발명의 오가노이드의 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0012] **도 1** - 인테그린 활성 및 비활성 형태의 구조[3].

도 2 - 인간화된 TS2/16 항체의 NUPAGE 분석. 레인 1: 사전 염색된 마커, 레인 2~4는 각각 1:1, 1:1.4 및 1:3의 중쇄 대 경쇄 작제물 비를 나타낸다.

도 3 - 인간화된 TS2/16으로의 K562 세포의 면역형광

도 4 - 인간화된 TS2/16 항체의 기능적 활성의 확인

도 5 - 세포외 기질의 부재 하에 인간화된 TS2/16을 사용하는 상피 줄기 세포의 증강된 성장.

도 6 - 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 배양 배지에서 성장하는 오가노이드의 예

도 7 - Matrigel(Matrigel)과 함께 TS2/16을 사용하는 상피 줄기 세포의 증강된 성장.

도 8 - Matrigel의 인간화된 TS2/16-Dyna 비드 농축을 사용하는 상피 줄기 세포의 증강된 성장. 막대 1은 인간화된 TS2/16 항체로의 처리이며 막대 2는 비처리이다.

도 9 - 세포외 기질의 부재 하에 인간화된 TS2/16 또는 마우스 HUTS-4 Ab를 사용하는 상피 오가노이드 단편(인간 결장)의 증강된 성장. 막대 1은 비처리이며, 막대 2는 인간화된 TS2/16 항체로의 처리이고 막대 3은 HUTS-4 항체로의 처리이다.

도 10 - 세포외 기질의 부재 하에 인간화된 TS2/16을 사용하는 상피 오가노이드 단편(인간 결장)의 증강된 성장. 막대 1은 비처리이며, 막대 2는 인간화된 TS2/16 항체로의 처리이다.

도 11 - 인간화된 TS2/16 항체, HUTS-4 항체를 포함하는 및 항체가 없는 배양 배지에서 성장하는 오가노이드의 예. 모든 배양 조건은 Matrigel을 포함하지 않았다.

도 12 - 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 배양 배지 중(상부) 및 항체를 포함하지 않는 배양 배지에서 오가노이드 단편으로부터 개시된 성장하는 오가노이드의 예.

도 13 - (a) AIIB2 항체의 존재 하의 상피 줄기 세포 성장의 부재; (b) 인간화된 AIIB2 항체를 포함하는 배양 배지 중(오른쪽) 및 항체를 포함하지 않는 배양 배지 중(왼쪽) 오가노이드의 예.

도 14 - (a) AIIB2 항체의 존재 하의 상피 줄기 세포 성장의 부재; (b) 인간화된 AIIB2 항체를 포함하는 배양 배지(오른쪽) 및 항체를 포함하지 않는 배양 배지(왼쪽) 중 오가노이드의 예.

도 15 - (a) AIIB2 항체의 존재 하의 상피 줄기 세포 성장의 부재; (b) 인간화된 AIIB2 항체를 포함하는 배양 배지 중(오른쪽) 및 항체를 포함하지 않는 배양 배지 중(왼쪽) 오가노이드의 예.

도 16 - (a) Matrigel과 함께 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 배양 배지에서 성장하는 췌장 오가노이드의 예;

(b) Matrigel과 함께 인간화된 TS2/16을 사용하는 췌장 상피 줄기 세포의 증강된 성장.

도 17 - (a) Matrigel과 함께 인간화된 TS2/16을 사용하는 폐 상피 줄기 세포의 증강된 성장; (b) Matrigel과 함께 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 배양 배지에서 성장하는 폐 오가노이드의 예.

도 18 - (a) Matrigel과 함께 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 배양 배지에서 성장하는 두부경부 오가노이드의 예; (b) Matrigel과 함께 인간화된 TS2/16을 사용하는 두부경부 상피 줄기 세포의 증강된 성장.

도 19 - Asc8 항체의 존재 하의 상피 줄기 세포의 성장의 부재.

도 20 - 상피 줄기 세포 성장에 대한 β1 인테그린 작용제 TS/16 및 β4 인테그린 작용제 3E1의 상승적 효과. 막대 1은 대조군이며; 막대 2는 0.1 μg/ml의 TS2/16으로의 처리이고; 막대 3은 0.1 μg/ml의 TS2/16 및 0.1 μg/ml의 3E1로의 처리이고; 막대 4는 0.1 μg/ml의 TS2/16 및 1 μg/ml의 3E1로의 처리이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 실시예 섹션에 상세히 설명된 바와 같이, 본 발명자들은 항-인테그린 항체가 상피 줄기 세포 배양 맥락에서 세포외 기질의 신호전달 및 구조적 기능을 모방하는 데 유용할 수 있다고 가정하였다. 상기 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 인테그린 작용제를 생성하였고 이를 세포외 기질의 부재 하에 상피 줄기 세포의 배양 방법에서 시험하였다. 본 발명자들은 놀랍게도 이것이 Matrigel 또는 BME와 같은 세포외 기질이 관여되는 선행 기술의 방법에 보다 필적하였으므로, 이것이 세포외 기질의 부재 하에 상피 줄기 세포 성장 및 오가노이드 형성을 개선하고 성장 효율을 증가시킴을 확인하였다. 또한, 이들은 인테그린 작용제의 첨가가 세포외 기질이 관여되는 배양 방법에 포함되는 경우 성장을 또한 개선함을 확인하였다. 이에 따라 놀랍게도, 본 발명자들은 인테그린 작용제의 첨가가 세포외 기질을 포함하는 및 포함하지 않는 상피 줄기 세포의 배양 방법을 모두 개선함을 나타내었다. 이론에 구애받고자 하지 않고, 본 발명자들은 인테그린 작용제가 신호전달 경로를 활성화하고/하거나 세포외 기질 또는 합성 기질 물질에 대한 상피 줄기 세포의 부착을 촉진하는 구조적 지지를 제공한다고 가정한다. 또한, 본 발명자들은 인테그린 작용제의 첨가가 놀랍게도 세포외 기질의 부재 하에 상피 줄기 세포 성장을 허용할 수 있었으므로, 인테그린 작용제가 세포외 기질의 구조적 및 신호전달 기능을 모방할 수 있다고 가정한다. 인테그린 작용제가 세포외 기질의 부재 하에 상피 줄기 세포 성장을 증강시키는 능력은 이것이 정의되고, 제어되며 재현 가능한 배양 방법을 향한 추가 단계이므로 특히 유리하다.

[0014] 상피 줄기 세포 또는 오가노이드의 성장 속도 개선은 이것이 다양한 적용, 예를 들어, 다량의 물질이 다양하고 상이한 약물을 시험하기 위해 요구되는 약물 스크리닝을 위해 다수의 세포를 이용 가능하게 할 수 있으므로, 또한 유리하다. 단일 시작 원천으로부터 세포를 생성하는 능력은 실험 간 결과를 비교하는 것이 필요한 이러한 적용에 있어서 유리하다. 유사하게, 이는 여러 세포가 이식편에서의 사용을 위해 이용 가능하며 여러 환자에 유용한 공여체로부터 수득된 세포가 이식될 수 있음을 의미한다. 배양 배지에서 세포의 배양은 이의 줄기 세포 표현형을 보유하면서 세포가 증식할 수 있도록 한다. 이들 줄기 세포를 포함하는 오가노이드가 형성된다. 따라서 배양 배지의 사용은 증가된 수의 이들 유용한 줄기 세포를 제공하기 위해 및 이들 세포를 함유하는 오가노이드를 수득하기 위해 유리하다.

[0015] 따라서, 본 발명은 인테그린 작용제를 사용하는 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드의 배양 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드의 배양 방법을 제공하며, 여기서 방법은 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지에서 상기 상피 줄기 세포 또는 오가노이드를 배양하는 단계를 포함하고, 배양 방법은 세포 또는 오가노이드를 인테그린 작용제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0016] **인테그린 작용제**

[0017] 인테그린은 이종이량체성 막통과 접착 수용체로, 이는 세포-세포 및 세포-세포외 기질 상호작용을 지지한다. 이들은 α 및 β 서브유닛의 비-공유 연합에 의해 형성되며, 이는 모든 후생동물에 존재한다. 각각의 서브유닛은 리간드 결합을 매개하는 상대적으로 큰 세포외 도메인 및 짧은 세포질 꼬리(β4 서브유닛 상에서는 제외)를 갖는 유형 I 막통과 당단백질이다. 포유류는 18α 및 8β 서브유닛을 가지며, 이는 조합되어 각각 그 고유한 결합 특이성을 갖는, 적어도 24개의 상이한 이종이량체를 생산할 수 있다[3][9].

[0018] 인테그린의 구조를 도 1에 나타내며 "헤드" 영역(이는 2개 서브유닛 간 주요 접촉점임)이 포함되고, 이는 2개의 막대-유사 "다리"에 의해 지지된다. 인테그린은 인테그린 리간드에 대해 상이한 결합 친화도를 갖는 구별되는 구성을 차용한다. 인테그린 리간드의 예에는 콜라겐, 라미닌, 트롬보스폰딘 및 파이브로넥틴이 포함된다[4]. 접

힘-폐쇄된 및 펼쳐짐-폐쇄된 구성에서 하부 '다리' 및 막통과 영역은 연합된 채 유지되고 리간드-결합은 폐쇄된다. 고친화도 연장된 개방 구성의 차용에는 수용체의 굽힘해제 그리고 다양한 모듈-간 및 모듈-내 이동이 포함되는, 일련의 형태 변화가 관여된다. 접힘-폐쇄된/펼쳐짐-폐쇄된 구성으로부터 연장된-개방 구성으로의 전이는 '인테그린 활성화'로 명명된다. 인테그린 활성화는 α 또는 β 서브유닛을 통해 일어날 수 있다. 인테그린 활성화 및 리간드 결합을 자극하는 여러 항-인테그린 항체(TS2/16 포함)는 알로스테릭하게 기능한다. 항체 결합은 활성 인테그린 신호전달 구성 형태를 안정화함으로써 인테그린의 구성적 평형을 비활성으로부터 활성 형태로 전이시킨다. 따라서 결과는 활성 인테그린 분자의 비율 증가이다[5]. β1 인테그린 서브패밀리를 조사하는 연구는 TS2/16, 12G10, 및 HUTS-4 Fab 항체가 사이클릭 RGD 펩티드에 대해 거의 동일한 고친화도를 유도함을 나타내었으며 이는 이들이 β1 도메인에서 동일한 구성의 리간드-결합 부위를 안정화함을 제시한다[6].

[0019] 따라서, 인테그린 작용제는 인테그린을 활성화하는 제제이다. 다시 말하면, 인테그린 작용제는 인테그린에서 구성적 변화를 유도하고, 이에 따라 인테그린 리간드에 대한 그 결합 친화도를 증가시키는 제제이다. 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 콜라겐, 라미닌, 트롬보스폰딘 또는 파이브로넥틴이 아니다. 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 인테그린을 활성화하며 또한 인테그린에 결합하는 인테그린 리간드의 활성을 모방한다. 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 인테그린의 구성적 상태와 무관하게 인테그린을 활성화할 수 있고, 또한 인테그린에 결합하는 인테그린 리간드의 활성을 모방할 수 있다.

[0020] 이들 인테그린 작용제는 본 발명의 맥락에서 특히 유용할 것으로 예상된다. 인테그린 작용제는 실시예 3 및 참고문헌[17]에 기재된 바와 같이 세포 접착 검정을 사용하여 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 인테그린에 결합하는 리간드의 활성을 또한 모방할 수 있는 인테그린 작용제는 실시예 4에 기재된 바와 같은 검정을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있다.

[0021] 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 사이클릭 RGD 펩티드에 대해 인테그린 작용제 TS2/16과 동일하거나 유사한 친화도를 갖는다. 예를 들어, 인테그린 작용제는 0.2~0.3, 0.20~0.25 또는 0.21~0.23의 FP_{max} 또는 보다 바람직하게는 0.21~0.22의 FP_{max}로 [7]에 기재된 바와 같은 형광 분극화 검정에서 FITC-cRGD에 결합한다. 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 TS2/16과 동일한 인테그린 개방 헤드피스 구성을 안정화할 수 있다.

[0022] 인테그린 작용제 TS2/16과 유사하거나 동일한 사이클릭 RGD 펩티드에 대한 친화도를 갖는 인테그린 작용제는 [7]에 기재된 바와 같은 검정을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있다. TS2/16과 동일한 인테그린 개방 헤드피스 구성을 안정화할 수 있는 인테그린 작용제는 참고문헌 [6]에 기재된 전자 현미경 검정을 사용하여 당업자에 의해 확인될 수 있다. 항-인테그린 항체, 탈린, 킨들린, 디티오트레이톨과 같은 환원제 및 25-하이드록시콜레스테롤과 같은 지질이 포함되는 여러 인테그린 작용제는 당분야에 잘 알려져 있다[8~11]. 바람직한 구현예에서, 인테그린 작용제는 그 세포외 도메인을 통해 인테그린을 활성화한다. 이러한 인테그린 작용제에는 항-인테그린 항체 및 디티오트레이톨과 같은 환원제 및 25-하이드록시콜레스테롤과 같은 지질이 포함된다. 대조적으로 탈린 및 킨들린은 인테그린의 세포내 도메인과의 상호작용을 통해 인테그린을 활성화한다.

[0023] 인테그린에 대한 항체는 활성화 또는 저해 특성을 가질 수 있다. 용어 인테그린 작용제는 자극 또는 활성화 효과를 갖는 항-인테그린 항체만을 포괄한다. 모든 자극 또는 활성화-특이적 항-인테그린 모노클로날 항체는 해리 속도를 감소시킴으로써 리간드-결합 친화도를 증가시키는 것으로 나타나며 2개 클래스로 구분될 수 있다. 항-β1 모노클로날 항체 HUTS-4와 같은 첫 번째 서브클래스는 리간드 및 양이온 결합에 의해 조절되는 에피토프(리간드-유도 결합 부위 "LIBS"로 알려짐)를 인식하는 반면, 두 번째 서브클래스는 리간드 또는 양이온 결합에 의해 영향받지 않는다(여기에는 항-β1 모노클로날 항체, TS2/16이 포함됨).

[0024] 활성화 항-인테그린 항체의 예에는 하기가 포함된다:

[0025] **표 1-자극 항-인테그린 항체의 요약**

인테그린 서브유닛	항체
α2	JBS2
α4	HP1/3
α5	SNAKA51
α11b	PTS25-2, PMI-1
αL	MEM-83, NKI-L16
αX	496B
β1	12G10, 8A2, TS2/16, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29, 9EG7
β2	mAb 24, MEM-148, KIM127, CBR LFA-1/2, MEM-48, KIM185
β4	3E1
β3	AP3, AP5, LIBS6, LIBS2
β7	10F8, 2B8, 2G3

[0026]

[0027] 본 발명자들은 세포 배양 배지에 대한 인테그린 작용제의 첨가가 세포외 기질에 대한 필요성 없이 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있음을 실증하였다. 실시예는 세포 배양 배지에 대한 인간화된 TS2/16 항-인테그린 항체의 첨가가 세포외 기질에 대한 필요성 없이 상피 줄기 세포의 성장을 개선하였음을 나타낸다. 또한, 본 발명자들은 인테그린 작용제의 첨가가 Matrigel(기저막 추출물)인 세포외 기질과 조합된 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있음을 실증하였다. 따라서 본원에서 기재된 바와 같은 인테그린 작용제는 상피 줄기 세포의 배양을 위해 특히 유용하다.

[0028] 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 항-인테그린 항체, 탈린, 킨들린, 디티오트레이톨 및 옥시스테롤 25-하이드록시콜레스테롤로부터 선택된다.

[0029] 임의의 특정 이론에 구애받고자 하지 않고, 인테그린 작용제가 보통 리간드 결합과 연관되는 인테그린의 구성적 상태를 유도할 수 있으므로, 인테그린 작용제는 세포외 기질에 대한 필요성 없이 상피 줄기 세포의 성장을 유리하게 개선할 수 있다. 인테그린 작용제는 인테그린의 고친화도 구성을 유도하고 보통 ECM 성분에 의해 활성화되는 신호전달 경로를 활성화할 수 있다. 실시예는 리간드 및 양이온 결합에 의해 조절되는 항-인테그린 항체(예컨대 HUTS-4), 및 리간드 또는 양이온 결합에 의해 영향받지 않는 것들(예컨대 TS2/16)이 둘 다 상피 줄기 세포의 배양을 위해 특히 유용할 수 있음을 실증한다. 인테그린 작용제는 인테그린의 알파 또는 베타 서브유닛을 통해, 예를 들어, α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 또는 β7과 상호작용함으로써 상호작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 베타 서브유닛 β1, β2, β3, β4 또는 β7과 상호작용한다. 바람직한 구현예에서, 인테그린 작용제는 β1 서브유닛과 상호작용한다.

[0030] 인테그린 작용제는 항-인테그린 항체일 수 있다. 임의의 의혹을 배제하기 위해, 본 발명의 항-인테그린 항체는 자극 항-인테그린 항체이다. 항-인테그린 항체의 예에는 JBS2, HP1/3, SNAKA51, PTS25-2, PMI-1, MEM-83, NKI-L16, 496B, 12G10, 8A2, TS2/16, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29, 9EG7, mAb 24, MEM-148, KIM127, CBR LFA-1/2, MEM-48, KIM185, AP3, AP5, LIBS6, LIBS2, 10F8, 2B8 및 2G3 항체가 포함된다. 일부 구현예에서, TS2/16, 12G10, 8A2, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29 및 9EG7 항체와 같은 항-인테그린 항체는 β1 서브유닛과 상호작용한다. 하나의 구현예에서, 항-인테그린 항체는 β1 서브유닛과 상호작용하며 MAB1778이다(카탈로그 번호: # MAB1778, 이는 웹사이트 https://www.rndsystems.com/products/human-integrin-beta1-cd29-antibody-4b7r_mab1778 에서 이용 가능함).

[0031] TS2/16, 12G10 또는 8A2 항체는 βA 도메인과 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 실시예는 상피 줄기 세포의 배양을 위한 TS2/16 항-인테그린 항체의 유리한 특성을 실증한다. 따라서, 본 발명의 항-인테그린 항체는 바람직하게는 βA 도메인과 상호작용할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 항-인테그린 항체는 TS2/16, 12G10 또는 8A2이다. 다른 바람직한 구현예에서, 항-인테그린 항체는 TS2/16, 12G10 또는 HUTS-4이다. 추가로 바람직한 구현예에서, 항-인테그린 항체는 TS2/16(또는 인간화된 TS2/16) 또는 HUTS-4(또는 인간화된 HUTS-4)이다. 추가로 바람직한 구현예에서 항-인테그린 항체는 TS2/16 또는 인간화된 TS2/16이다. 추가로 바람직한 구현예에서 항-인테그린 항체는 HUTS-4 또는 인간화된 HUTS-4이다. 알려진 활성화 항-인테그린 β1 사슬 항체 에피토프의 요약을 표 2에 제공한다. 이들 에피토프는 2개 그룹에 속한다; 첫 번째는 예측된 리간드-결합 도메인에 위치하는 매우 짧은 잔기 서열(잔기 207~218)로 구성되며, 다른 것은 인테그린의 막 근위 줄기-유사 영역에 위치하는 시스테인-풍부

반복부 내의 또는 근처의 에피토프(잔기 442~629)를 갖는다. 일부 활성화 항-인테그린 β1 사슬 항체는 인테그린이 특성 구성을 갖는 경우에만 효과를 발휘하며 HUTS-4, HUTS-7 및 HUTS-21[12]과 같은 이들 항체는 특정한 생리적 조건[13] 하에서만 노출되는 에피토프에 결합하는 것으로 여겨진다.

[0032] **표 2 - 활성화 항-인테그린 항체 [13] 및 [12]의 요약**

활성화 항체	에피토프 위치	구성 의존성
TS2/16	207-218	없음
8A2	207-218	없음
A1A5	207-218	없음
AG89	426-587	있음
15/7	355-425	있음
HUTS-4	355-425	있음
HUTS-7	355-425	있음
HUTS-21	355-425	있음
9EG7	495-602	있음
QE.2E5	426-587	n.d.
TASC(닭 β1)	304-602	n.d.
JB1B	671-703	n.d.
B3B11	657-670	n.d.

[0033]

[0034] 따라서, 일부 구현예에서 인테그린 작용제(임의로 항-인테그린 항체)는 β1 서브유닛 상의 잔기 207~218 중 적어도 일부와 상호작용한다. 일부 구현예에서 인테그린 작용제(임의로 항-인테그린 항체)는 β1 서브유닛 상의 잔기 442~629 중 적어도 일부와 상호작용한다. 일부 구현예에서 인테그린 작용제(임의로 항-인테그린 항체)는 β1 서브유닛 상의 잔기 335~425 중 적어도 일부와 상호작용한다. 일부 구현예에서, 인테그린의 구성과 무관하게 결합하는 인테그린 작용제는 인테그린을 활성화하는 이의 능력이 생리적 조건에 의존하지 않으므로 바람직하다. 바람직한 구현예에서, 인테그린 항체에 대한 에피토프는 리간드-유도 결합 부위가 아니다. 항-인테그린 항체는 서열 목록 번호 1의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 목록 번호 2의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다.

[0035] 항-인테그린 항체는 또한 인간화될 수 있고, 예를 들어 항-인테그린 항체는 실시예에서 실증된 바와 같은 인간화된 TS2/16 항체일 수 있다. 인간화된 TS2/16 항체는 서열 목록 번호 3의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 목록 번호 4의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 각각 서열 목록 번호 5, 6 및 7의 중쇄 CDR HCDR1, HCDR2 및 HCDR3, 및 각각 서열 목록 번호 8, 9 및 10의 경쇄 CDR LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0036] 실시예는 상피 줄기 세포의 배양을 위해 작용성 항-β4 항체(3E1)와 조합된 작용성 항-β1 인테그린 항체(TS2/16)의 유리하고 상승적인 특성을 실증한다. 따라서, 인테그린 작용제는 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 여러 항-인테그린 항체가 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서 2개의 항-인테그린 항체는 인테그린의 동일한 서브유닛을 표적화하며, 예를 들어 2개 이상의 β1 인테그린 작용제 항체가 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 β1 인테그린 작용제 항체는 TS2/16, 12G10, 8A2, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29 및 9EG7로부터 선택되거나, 바람직하게는 TS2/16, 12G10 및 8A2로부터 선택된다. 일부 구현예에서, TS2/16은 HUTS-4와 조합되어 사용된다.

[0037] 대안적으로 2개의 항-인테그린 항체는 인테그린의 상이한 상이한 서브유닛을 표적화한다. 항-인테그린 항체의 가능한 조합에는 (1) β2 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (2) β3 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (3) β4 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (4) β7 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (5) α2, 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (6) α4 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (7) α5 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (8) α11b 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체; (9) αL 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체 또는 (10) αX 인테그린 작용제 항체와 조합된 β1 인테그린 작용제 항체가 포함된다.

[0038] 바람직한 구현예에서, β1 인테그린 작용제 항체는 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 β4 인테그린 작용제 항체

와 조합되어 사용된다. 바람직한 구현예에서 β1 인테그린 작용제 항체는 TS2/16, 12G10 또는 8A2이다. 바람직한 구현예에서 β4 인테그린 작용제 항체는 3E1이다. 추가로 바람직한 구현예에서, TS2/16 및 3E1는 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 조합되어 사용된다.

[0039] 일부 구현예에서, β1 인테그린 작용제 항체는 β4 인테그린 작용제 항체 및 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β2, β3 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다.

[0040] 일부 구현예에서, β1 인테그린 작용제 항체는 하기와 조합되어 사용된다: (i) β4 인테그린 작용제 항체 및 (ii) 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β2, β3 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체.

[0041] 일부 구현예에서, β2 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, β2 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β3, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0042] 일부 구현예에서, β3 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, β3 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0043] 일부 구현예에서, β4 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, β4 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0044] 일부 구현예에서, β7 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3 및 β4 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, β7 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3 및 β4로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0045] 일부 구현예에서, α2 인테그린 작용제 항체는 α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, α2 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7 로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0046] 일부 구현예에서, α4 인테그린 작용제 항체는 α2, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, α4 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0047] 일부 구현예에서, α5 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, α5 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0048] 일부 구현예에서, α11b 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, α11b 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, αL, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용

된다.

[0049] 일부 구현예에서, αL 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, α11b, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, αL 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αX, β1, β2, β3, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0050] 일부 구현예에서, αX 인테그린 작용제 항체는 α2, α4, α5, α11b, αL, β1, β2, β3, β4 및 β7 중 하나에 결합하는 작용성 항-인테그린 항체와 조합되어 사용된다. 일부 구현예에서, αX 인테그린 작용제 항체는 2개 이상의(예로 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의) 인테그린 작용제 항체로서, 그 각각이 α2, α4, α5, α11b, αL, β1, β2, β3, β4 및 β7로부터 선택되는 상이한 인테그린 서브유닛에 결합하는, 항체와 조합되어 사용된다.

[0051] 다른 바람직한 구현예에서, 인테그린 작용제는 그 결합이 인테그린의 구성에 의존한다. 다른 구현예에서, 인테그린 항체에 대한 에피토프는 리간드-유도 결합 부위이다. 항-인테그린 항체는 HUTS-4일 수 있다.. 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 TS2/16 항체와 동일한 에피토프에 결합한다. 따라서, 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 서열 목록 번호 3의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 목록 번호 4의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 HUTS-4 항체와 동일한 에피토프에 결합한다

[0052] 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 TS2/16 항체와 β1 서브유닛으로의 결합에 대해 경쟁한다. 따라서, 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 서열 목록 번호 3의 중쇄 가변 영역(VH) 및 서열 목록 번호 4의 경쇄 가변 영역(VL)을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합한다. 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 HUTS-4 항체와 β1 서브유닛으로의 결합에 대해 경쟁한다. 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 3E1 항체와 β4 서브유닛으로의 결합에 대해 경쟁한다.

[0053] 종래의 항체는 디설피드 결합에 의해 결합되는 2개의 동일한 중쇄 및 2개의 동일한 경쇄로 이루어진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 불변 영역 및 가변 영역을 함유한다. 각각의 가변 영역은 주로 표적 항원의 에피토프로의 결합에 관여하는 3개의 CDR을 함유한다. 이들은 N-말단으로부터 순차적으로 넘버링되어, CDR1, CDR2, 및 CDR3로 나타내며, 그 중 CDR3 영역이 대부분의 가변 영역을 포함하고 보통 표적에 대한 접촉 잔기의 상당부를 제공한다. 가변 영역의 보다 고도로 보존된 부분은 "프레임워크 영역"으로 불린다. 일부 구현예에서, 항체 부분은 적어도 하나의 중쇄 및 적어도 하나의 경쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 부분은 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄로 구성된다.

[0054] 용어 항체는 본원에서 가장 광의의 개념으로 사용되며, 구체적으로, 그러나 비제한적으로 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE와 같은 임의의 이소형의 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체 포함), 재조합 폴리클로날 항체가 포함되는 폴리클로날 항체, 올리고클로닉(Oligoclonics), 다중특이적 항체, 키메라 항체, 나노바디, 디아바디, 바이트(BiTE's), 탄답(Tandabs), 미메토바디(mimetobodies), 이중특이적 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 탈면역화된 항체 및 항체 단편을 커버한다. 또한, 안티칼린(Anticalins), 안카린(Ankarins) 등과 같은 스캐폴드가 상기 용어 하에 커버될 것이다. 표적 분자의 특정 에피토프에 반응성인 항체는 파지 또는 유사한 벡터에서의 재조합 항체 라이버러리의 선택과 같은 재조합 방법에 의해, 또는 표적 에피토프를 인코딩하는 표적 핵산으로 동물을 면역화함으로써 생성될 수 있다.

[0055] 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 인테그린 서브유닛 내 제1 에피토프에 대한 제1 결합 특이성 및 인테그린 서브유닛 내 제2 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 포함하여 이중특이적이며, 여기서 제1 및 제2 에피토프는 구별되고 중복되지 않는다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 동일한 인테그린 서브유닛, 예를 들어 β1 서브유닛 상에서 상이한 에피토프에 결합한다. 다른 구현예에서, 이중특이적 항체는 상이한 인테그린 서브유닛 상의 에피토프에 결합하며, 예를 들어 이중특이적 항체는 β1 인테그린 서브유닛 내 제1 에피토프에 대한 제1 결합 특이성 및 β3 인테그린 서브유닛 내 제2 에피토프에 대한 제2 결합 특이성을 갖는다.

[0056] 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 항체는 단일 도메인 항체(또한 sdAb 또는 나노바디(Nanobody)로 명명됨), F(ab')2, Fab, Fab', Facb, 또는 단일쇄 Fv(scFv) 단편으로 구성되거나 이를 포함한다. scFv 단편은 항체 경쇄 가변 영역(VL)의 적어도 하나의 단편에 결합된 항체 중쇄 가변 영역(VH)의 적어도 하나의 단편을 함유하는 에피토프-결합 단편이다. 링커는 단일쇄 항체 단편이 유래되는 전체 항체의 표적 분자 결합-특이성을 유지하기 위해 이들이 결합되면 VL 및 VH 영역의 적절한 3-차원 폴딩이 일어나는 것을 보장하도록 선택된 짧은, 가요성 펩티드

일 수 있다. VL 또는 VH 서열의 카복실 말단은 상보적 VL 또는 VH 서열의 아미노산 말단에 링커에 의해 공유 결합될 수 있다.

[0057] 일부 구현예에서, 융합 단백질의 항체 부분은 불변 영역 또는 Fc 영역을 포함한다. Fc 영역은 인간 그리고 소, 염소, 돼지, 마우스, 토끼, 햄스터, 래트 및 기니 피그가 포함되는 다른 동물로부터 단리된 원상태 형태로부터 수득될 수 있거나, 형질전환된 동물 세포 또는 미생물로부터 수득되는, 이의 재조합체 또는 유도체일 수 있다. 이들은 인간 또는 동물 유기체로부터 전체 면역글로불린을 단리하고 이를 단백분해 효소로 처리함으로써 원상태 면역글로불린으로부터 수득될 수 있다. 파파인은 원상태 면역글로불린을 Fab 및 Fc 영역으로 소화시키며, 펩신 처리는 pF'c 및 F(ab)2 단편의 생산을 초래한다. 이들 단편은, 예를 들어, Fc를 단리하기 위해 크기-배제 크로마토그래피를 거칠 수 있다.

[0058] 일부 구현예에서, Fc 영역은 변형된다. 예를 들어, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 원상태 당 사슬, 원상태 형태에 비해 증가된 당 사슬 또는 원상태 형태에 비해 감소된 당 사슬의 형태일 수 있거나, 탈글리코실화된 형태일 수 있다. 면역글로불린 Fc 당 사슬의 증가, 감소 또는 제거는 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용하는 유전 조작 방법과 같은 당분야에서 일반적인 방법에 의해 달성될 수 있다. Fc 영역으로부터의 당 사슬의 제거는 보체(c1q)에 대한 결합 친화도의 급격한 감소 및 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 보체-의존적 세포독성(CDC)의 감소 또는 손실을 초래함으로써, 불필요한 생체내 면역 반응을 유도하지 않는다. 이에 관해, 탈글리코실화되거나 비글리코실화된 형태(후자는, 예를 들어 원핵생물, 바람직하게는 대장균에 의해 생산됨)의 면역글로불린 Fc 영역이 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0059] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE 및 IgM으로부터 유래되거나, 이의 하이브리드(단일쇄 면역글로불린 Fc 영역에 존재하는, 상이한 기원의 2개 이상의 면역글로불린 Fc 영역을 인코딩하는 서열)에 의해 제조되는 Fc 영역일 수 있다. 본 발명에서, 다양한 유형의 하이브리드가 가능하다. 즉, 도메인 하이브리드는 IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 구성되는 군으로부터 선택되는 1 내지 4개 도메인으로 이루어질 수 있으며, 힌지 영역이 포함될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, Fc 영역은 하이브리드이다. 바람직하게는, Fc 영역은 인간 혈액 중 가장 풍부한 단백질에 속하는 IgG 또는 IgM으로부터, 가장 바람직하게는 리간드-결합 단백질의 반감기를 증강시키는 것으로 알려져 있는 IgG로부터 유래된다. 또한, IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 서브클래스로 구분되며, 본 발명에는 이의 조합 또는 하이브리드가 포함된다. IgG2 및 IgG4 서브클래스가 바람직하다.

[0060] 일부 구현예에서, Fc 영역은 IgG 이소형, 예를 들어 IgG1, 바람직하게는 인간 IgG, 또는 인간 IgG1이다.

[0061] 일부 구현예에서, Fc 영역은 ADCC 및/또는 보체 효과기 기능을 침묵화하거나 감소시키기 위해 변형된다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 증가된 FcRn 친화도를 위해 변형된다(반감기를 연장할 수 있음). 적합한 변형은 문헌(Monnet, Céline, *et al.*, "Selection of IgG Variants with Increased FcRn Binding Using Random and Directed Mutageneis: Impact on Effector Functions." Frontiers in Immunology 6:39 (2015))에 기재된다. 일부 구현예에서, 항체는 FcRn 수용체에 결합하는 Fc 도메인 또는 이의 일부를 함유한다. 비제한적 예로서, 적합한 Fc 도메인은 IgA, IgE, IgG 또는 IgM과 같은 면역글로불린 서브클래스로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 Fc 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4로부터 유래된다. 특히 적합한 Fc 도메인에는 인간 항체로부터 유래된 것들이 포함된다.

[0062] 일부 구현예에서, 변형된 Fc 영역은 하기 돌연변이 중 하나 이상, 또는 바람직하게는 전부를 갖는 IgG 변이체이다: E294Del, T307P, 및 N434Y(예로 Monnet 등의 표 6, 엔트리 "C6A-66" 참고). 이들 특정 돌연변이는 ADCC 및 보체 효과기 기능을 침묵화하고 반감기를 증가시킬 것으로 예상된다.

[0063] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 다중특이적, 마우스, 인간, 인간화된, 영장류화된 또는 키메릭 항체 또는 단일쇄 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 인간 또는 인간화된 항체일 수 있다. 하나의 바람직한 구현예에서, 항체는 인간화된 항체이다.

[0064] 일부 구현예에서, 항체는 인테그린에 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합한다. 예를 들어, 항체는 α2, α4, α5, α11b, αL, αX, β1, β2, β3, β4, 및 β7과 같은, 인테그린의 α 또는 β 서브유닛에 결합할 수 있다, 일부 구현예에서, 항체는 인테그린의 서브유닛 β1, β2, β3, β4 또는 β7에 결합하며 바람직한 구현예에서, 항체는 인테그린의 β1 서브유닛에 결합한다. 따라서, 하나의 바람직한 구현예에서, 항체는 인테그린의 β1 서브유닛에 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M 이하

의 K_D로 결합한다. 추가 구현예에서, 인테그린의 β1 서브유닛에 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합하는 제1 항체는 인테그린의 β4 서브유닛에 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M 이하의 K_D로 결합하는 제2 항체와 조합된다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 인테그린의 β1 서브유닛에 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하는 제1 항체는 인테그린의 β4 서브유닛에 10^{-8} M 이하의 K_D로 결합하는 제2 항체와 조합된다.

[0065] 일부 구현예에서, 항체 결합 친화도는 Octet® RED96 시스템(ForteBio, Inc.)을 사용하여 결정된다. 예를 들어, 플래그(Flag)-태그화 β1 서브유닛, 플래그-태그화 β2 서브유닛, 플래그-태그화 β3 서브유닛 또는 플래그-태그화 β7 서브유닛은 항-플래그 바이오센서에 고정화되고 다양한 농도의 용액 중 항체와 인큐베이션될 수 있고, 이어서 결합 데이터가 수집된다. 일부 구현예에서, 항체 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된다.

[0066] 일부 구현예에서, 시험 항체가 인테그린으로의 결합에 대해 참조 항체와 경쟁하는지 여부는 시험관내 결합 경쟁 검정을 사용하여 결정된다. 예를 들어, 플래그-태그화 β1 서브유닛, 플래그-태그화 β2 서브유닛, 플래그-태그화 β3 서브유닛 또는 플래그-태그화 β7 서브유닛은 항-플래그 바이오센서에 고정화될 수 있고, 이어서 고정화된 플래그-태그화 β1, β2, β3 또는 β7 서브유닛에 대한 참조 항체의 연합이 측정된 후(예로, Octet® RED96 시스템(ForteBio, Inc.)을 사용함), 참조 항체의 존재 하에 시험 항체에 대해 고정화된 플래그-태그화 β1, β2, β3 또는 β7 서브유닛을 노출시킴으로써 추가 결합 정도가 평가된다.

[0067] 일부 구현예에서, 항-인테그린 항체는 중쇄-단독 항체이다. 용어 "항체"는 전체 사량체성 항체 및 이의 항원-결합 단편을 포괄한다. 일부 구현예에서, 이의 항원-결합 단편은 VH 도메인, Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, 단일쇄 Fv(scFv) 및 디설피드-결합 Fv(sdFv)로부터 선택된다.

[0068] 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있으며 일반적으로 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이고, 이는 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 이와 같은 프레임에 있다. V_L 도메인과 연관된 VH 도메인을 갖는 항원-결합 단편에서, VH 및 V_L 도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 배치될 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체성이고 VH-VH, VH-V_L 또는 V_L-V_L 이량체를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원-결합 단편은 단량체성 VH 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0069] 특정 구현예에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 결합된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원-결합 단편 내에서 확인될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적인, 예시적 구성에는 하기가 포함된다: (i) VH-C_H1; (ii) VH-C_H2; (iii) VH-C_H3; (iv) VH-C_H1-C_H2; (V) VH-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) VH-C_H2-C_H3; (vii) VH-C_L; (viii) V_L-C_H1 ; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; 및 (xiv) V_L-C_L.

[0070] 상기 기재된 임의의 예시적 구성이 포함되는, 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 가변 및 불변 도메인은 서로 직접 결합될 수 있거나 전체 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 결합될 수 있다. 힌지 또는 링커 영역은 적어도 2개(예로, 5, 10, 15, 20, 40, 60개 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있고, 이는 하나의 폴리펩티드 분자 내 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 간 가요성 또는 반-가요성 결합을 초래한다. 또한, 본 발명의 항체의 항원-결합 단편은 서로와 및/또는 하나 이상의 단량체성 VH 또는 V_L 도메인과(예로, 디설피드 결합(들)에 의해) 비-공유 연합된 상기 기재된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종-이량체 또는 이종-이량체(또는 다른 다량체)를 포함할 수 있다.

[0071] 전체 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일-특이적 또는 다중-특이적(예로, 이중-특이적)일 수 있다. 항체의 다중-특이적 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 2개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별도의 항원에 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에서 개시된 예시적인 이중-특이적 항체 포맷이 포함되는, 임의의 다중-특이적 항체 포맷은 당분야에서 이용 가능한 일상적인 기법을 사용하여 본 발명의 항체의 항원-결합 단편의 맥락에서 사용하기 위해 적응될 수 있다.

[0072] HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 내 CDR을 확인하기 위한 방법 및 기법은 당분야에 잘 알려져 있고 본원에서 개시되는 특정된 HCVR 및/또는 LCVR 아미노산 서열 내 CDR을 확인하기 위해 사용될 수 있다. CDR의 경계를 확인하기

위해 사용될 수 있는 예시적인 관례에는, 예로, Kabat 정의, Chothia 정의, 및 AbM 정의가 포함된다. 일반 용어에서, Kabat 정의는 서열 변동성에 기반하며, Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치에 기반하고, AbM 정의는 Kabat 및 Chothia 접근 간 절충이다. 예로, 문헌(Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 및 Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989))을 참고한다. 항체 내 CDR 서열을 확인하기 위해 공개 데이터베이스도 이용 가능하다.

[0073] 다른 구현예에서, 인테그린 작용제는 항체가 아니다. 예를 들어, 인테그린 작용제는 탈린이거나 인테그린 작용제는 킨들린일 수 있다. 인테그린 작용제는 또한 킨들린과 조합되어 사용되는 탈린일 수 있다. 또 다른 예에서, 인테그린 작용제는 디티오트레이톨과 같은 환원제 또는 옥시스테롤 25-하이드록시콜레스테롤과 같은 지질일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에서 언급된 인테그린 작용제의 임의의 조합이 포함되는, 하나를 초과하는 인테그린 작용제가 사용된다.

[0074] 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 실시예의 인간화된 TS2/16 항체로 수행된 동일한 방법(예로 실시예 4에 제공된 방법에서 시험된 바와 같음)과 비교되는 경우, 청구된 바와 같은 배양 방법에서 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 세포 성장을 초래한다. 일부 구현예에서, 인테그린 작용제는 실시예의 마우스 HUTS-4 항체로 수행된 동일한 방법(예로 실시예 6에 제공된 방법에서 시험된 바와 같음)과 비교되는 경우, 청구된 바와 같은 배양 방법에서 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 세포 성장을 초래한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 인테그린 작용제 없이 수행된 동일한 방법에 비해 4일에 걸친 상피 줄기 세포 성장에서 적어도 10%, 20%, 50% 증가를 초래한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 인테그린 작용제 없이 수행된 동일한 방법에 비해 4일에 걸친 상피 줄기 세포 성장에서 적어도 2-배, 3-배, 4-배 또는 5-배 증가를 초래한다. 상피 줄기 세포 성장은 오가노이드의 수로서 정의될 수 있고 실시예 3, 4 또는 5에서의 방법에 따라 시험될 수 있다.

[0075] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 새로운 오가노이드의 성장을 초래한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 기존 오가노이드의 증식을 초래한다.

[0076] 인테그린 작용제는 배양 배지의 일부로서, 세포외 기질 또는 합성 기질의 성분으로서, 또는 배양 용기에 첨가되는 별도 성분으로서, 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드와 접촉될 수 있다.

[0077] **세포외 기질 및 합성 기질**

[0078] 상피 줄기 세포는 보통 세포 성장을 지지하는 것으로 알려져 있는 외인성 세포외 기질과의 배양에서 성장시킨다(예로 세포가 어떻게 기저막 추출물(BME; Amsbio) 또는 Matrigel(BD Biosciences)에 플레이트접종되는지를 설명하는 [20] 참고). 기저막 추출물(Amsbio) 및 Matrigel™(BD Biosciences)은 엥겔브레스-홀름-슈바름(EHS) 마우스 육종 세포로부터의 기저막 조제물로부터 유래되는 상업적으로 이용 가능한 세포외 기질의 예이다. 그러나, 이들 세포외 기질의 정확한 성분은 잘 정의되어 있지 않고, 이는 상피 줄기 세포를 배양하는 경우 요망되지 않는 변동성 원천을 생성할 수 있다[14].

[0079] 세포외 기질의 성분 부분 및 이들이 작용하는 기전은 완전히 확립되어 있지 않다. 중합체 및 하이드로겔과 같은 세포외 기질에 대한 합성 대체물은 상피 줄기 세포 배양에서 세포외 기질에 의해 달성되는 성장 효율을 충실히 복제할 수 없었다. 세포외 기질 대신 라미닌 및 파이브로넥틴과 같은 세포외 기질 단백질의 사용도 상피 줄기 세포 배양에서 세포외 기질에 의해 달성되는 성장 효율을 복제하지 못했다.

[0080] 예상치 못하게, 실시예는 인테그린 작용제를 포함하는 배양 배지가 세포외 기질의 존재 및 부재 하에 모두 배양 배지에서 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있음을 실증한다. 임의의 특정 이론에 의해 구애받고자 하지 않고, 기능적 세포외 기질에는 구조적 및 신호전달 성분이 관여된다. 합성 기질 단독은 구조적 성분만을 제공하는 것으로 여겨진다. 따라서 인테그린 작용제는 신호전달 성분의 누락 후 오랫동안 추구된 바와 같이 작용하는 것으로 제안되며 추가적인 구조적 지지를 또한 제공할 수 있다.

[0081] 본 실시예는 인테그린 작용제를 포함하는 배양 배지가 놀랍게도 외인성 세포외 기질 없이 배양 중 상피 줄기 세포 성장을 개선할 수 있음을 실증한다. 따라서, 일부 구현예에서 배양 방법에는 세포를 외인성 세포외 기질과 접촉시키는 단계가 관여되지 않는다. 예를 들어, 배양 방법에는 세포를 당단백질을 포함하는 외인성 세포외 기질과 접촉시키는 단계가 관여되지 않으며, 예를 들어 배양 방법에는 세포를 기저막 추출물 또는 Matrigel과 접촉시키는 단계가 관여되지 않는다.

[0082] 인테그린 작용제는 합성 기질과 함께 사용하기 위해 특히 유용하다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 방법은 합성 기질과 접촉된 상피 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 합성 기질의 성분은 제어될 수 있고,

이는 상피 줄기 세포를 배양하는 경우 가능한 변동성을 감소시키며, 이는 배양 중 상피 줄기 세포의 성장 속도, 증식 및/또는 분화의 개선을 도울 수 있다. 합성 기질은 임의의 중합체, 예로 폴리에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 하이드로겔을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 합성 기질은 폴리에틸렌 글리콜 및/또는 하이드로겔을 포함한다. 일부 구현예에서, 합성 기질은 가교된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 하이드로겔을 포함한다.

[0083] 합성 기질은 표면, 비드 상의 또는 (예로 배양 플레이트, 배양 용기 또는 비드 상의) 코팅으로서가 포함되는 임의의 적합한 형태로 제공될 수 있다. 비드는 바람직하게는 마이크로비드이다. 본 실시예에서, 초저부착 표면(Ultra-Low Attachment Surface(Sigma Aldrich))이 사용된다. 상기 표면은 친수성이고 중성으로 하전되는 공유결합된 하이드로겔층이다. 따라서, 일부 구현예에서, 합성 기질은 하이드로겔층이다.

[0084] 일부 구현예에서, 합성 기질은 생체물질, 바람직하게는 세포외 기질 성분을 포함한다. 예를 들어 생체물질은 하나 이상의 당단백질(임의로 콜라겐, 라미닌, 펄레칸, 파이브로넥틴 또는 파이브로넥틴의 RGD 부착 리간드로부터 선택됨) 및/또는 하나 이상의 탄수화물(임의로 히알루론산)을 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 합성 기질의 하나의 예는 프로넥틴(Pronectin(예로 Sigma Z378666))이다. 프로넥틴은 반복되는 구조적 펩티드 단위 간에 배치되는 인간 파이브로넥틴의 RGD 부착 리간드의 여러 카피를 포함하는 비-동물 원천 중합체를 포함한다. 이는 프로넥틴-F 코팅된 비드 형태로 제공될 수 있다. 코어 비드는 지름 125~212 마이크론 크기의 고체 공중합체이다. 따라서, 일부 구현예에서, 합성 기질은 파이브로넥틴의 RGD 부착 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, PEG 겔에는 파이브로넥틴, 라미닌-111, 콜라겐 IV, 히알루론산 및 펄레칸과 같은 세포외 기질 성분이 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 겔 중 파이브로넥틴 단백질은 RGD(Arg-Gly-Asp) 펩티드로 대체될 수 있다[15].

[0085] 합성 기질의 또 다른 예는 [16]에 기재된 바와 같은 4-아암, 말레이미드-종결 폴리(에틸렌 글리콜) 매크로머에 기반한 합성 하이드로겔이다. 매크로머는 접착성 펩티드로 작용화되고 세포의 존재 하에 가교되어 PEG-4MAL 하이드로겔을 생성한다. 하이드로겔 중합체 밀도는 3.5~6.0% wt/vol일 수 있으며, 바람직하게는 하이드로겔 중합체 밀도는 4%이다. 하이드로겔 중합체는 RGD 접착성 펩티드 또는 GPQ-W 가교 펩티드를 포함하도록 제형화될 수 있다.

[0086] 하이드로겔 중합체는 단백질 A/G와 함께 제형화될 수 있다. 단백질 A/G는 단백질 A 및 단백질 G 둘 다의 IgG 결합 도메인을 조합하는 재조합 융합 단백질이다. 단백질 A/G는 링커에 의해 하이드로겔에 연결되며 항체가 부착될 수 있는 프레임워크를 제공한다. 이어서 하이드로겔은 항-인테그린 항체로 포화될 수 있고, 이는 다가 양식으로 제시되는 항체를 야기한다. 합성 ECM의 상기 제형은 ECM의 구조적 및 신호전달 성분이 모두 함께 제공되므로 세포에서 확인되는 천연 ECM 환경을 재생성하는 것을 돕는다. 하이드로겔 겔은 덱스트란 중합체 또는 벤젠-1,3,5-트리카복사미드 중합체로부터 생산될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 하이드로겔은 이의 N-말단에서 항체 결합 단위(Z33 펩티드)를 갖는 엘라스틴(Elsastin) 유사 단백질(ELP)로 제조된다.

[0087] 본 실시예는 또한 외인성 세포외 기질이 존재하는 경우에도 인테그린 작용제가 배양 중 상피 줄기 세포의 개선된 성장 속도를 초래함을 실증한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 세포외 기질(ECM)과 접촉되어 상피 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다. ECM은 상피 세포, 내피 세포, 마루 내배엽 유사 세포(예로 문헌(Hayashi et al. (2004) Matrix Biology 23:47 62)에 기재된 엥겔브레스(Englebreth)-홀름-슈바름 마루 내배엽 유사 세포) 및 연결 조직 세포에 의해 분비된다. 이는 ECM-분비 세포를 배양하고 ECM을 단리함으로써 제조될 수 있거나, 예로 Matrigel 또는 BME로서, 상업적으로 이용 가능하다. 이는 다양한 다당류, 물, 엘라스틴, 및 당단백질을 포함하며, 여기서 당단백질은 콜라겐, 엔탁틴(니도겐), 파이브로넥틴, 및 라미닌을 포함한다. 본원에서 나타낸 바와 같은 ECM은 ECM-분비 세포에 의해 천연 생산된다. 일부 구현예에서, ECM은 엥겔브레스(Englebreth)-홀름-슈바름 마루 내배엽 유사 세포로부터 유래되는 기저막 조제물이다((Hayashi et al. (2004) Matrix Biology 23:47 62)에 기재된 바와 같음).

[0088] 본 발명의 맥락에서 사용되는 경우 ECM은 외인성 ECM이다(이는 본 발명의 배양 배지와 접촉되는 경우 상피 줄기 세포에 의해 천연 분비되는 임의의 세포외 기질 단백질에 부가됨을, 다시 말하면 이는 본 발명의 방법에서 배양되는 상피 줄기 세포 이외의 세포에 의해 생산됨을 의미함).

[0089] 일부 구현예에서, ECM은 3차원 기질이다. 일부 구현예에서, 세포는 ECM에 포매된다. 일부 구현예에서, 세포는 ECM에 부착된다. 본 발명의 배양 배지는 3차원 ECM 내로 확산될 수 있다. 다른 구현예에서, ECM은 현탁 상태이다, 즉 세포는 현탁 시스템에서 ECM과 접촉된다. 일부 구현예에서, ECM은 적어도 1%, 적어도 2% 또는 적어도 3%의 농도로 현탁 상태이다. 일부 구현예에서, ECM은 1% 내지 약 10% 또는 1% 내지 약 5%의 농도로 현탁 상태이다. 현탁 방법은 업스케일 방법을 위해 장점을 가질 수 있다.

[0090] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 방법은 세포외 기질 및/또는 합성 기질과 접촉된 상피 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함한다. "접촉된"은 물리적 또는 기계적 또는 화학적 접촉을 의미하며, 이는 상기 기질로부터 상기 생성 오가노이드 또는 상기 세포 집단을 분리하기 위해 힘을 사용할 필요가 있음을 의미한다. 배양 배지 및/또는 세포는 세포외 기질 또는 합성 기질 상에 배치되거나, 이에 포매되거나 이와 혼합될 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, 배양 배지는 세포외 기질 또는 합성 기질의 상부에 배치된다. 이어서 배양 배지는 제거될 수 있고 요구되는 바에 따라 및 요구되는 경우 보충될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다 보충된다. 성분이 배지로부터 "추가되"거나 "제거되"는 경우, 이는 일부 구현예에서 배지 자체가 세포외 기질 또는 합성 기질로부터 제거된 후 "추가된" 성분을 함유하거나 "제거된" 성분이 배제된 새로운 배지가 세포외 기질 또는 합성 기질 상에 배치됨을 의미할 수 있다.

[0092] 3차원 기질은 3차원 상피 오가노이드의 배양을 지지한다. 따라서 일부 구현예에서, 세포외 기질 또는 합성 기질은 3차원 기질이다.

[0093] 세포외 기질 또는 합성 기질은 상술된 바와 같이 인테그린 작용제를 추가로 포함할 수 있다.

[0094] **상피 줄기 세포 또는 오가노이드의 배양**

[0095] 상피 줄기 세포가 증식되고/되거나 분화되어 오가노이드를 생성함에 따라, 이들은 전형적으로 당분야에 알려진 방법에 따라 정기적 간격으로 계대된다(즉, 분할된다). 계대에는 전형적으로 오가노이드의 기계적 해리, 임의로 이의 세포외 기질 또는 합성 기질로부터의 제거, 수집, 세척, 및 효율적 성장 또는 새로운 오가노이드를 허용하기 적합한 비(예로 1:5 내지 1:20)로의 플레이트접종이 관여된다. 배양 배지는 또한 전형적으로, 요구되는 바에 따라, 정기적 간격으로 보충된다.

[0096] 따라서, 일부 구현예에서 방법은 세포를 1주 2회, 1주 1회, 10일 1회, 2주 1회, 5~20일 1회, 바람직하게는 7~14일 1회 계대하는 단계를 추가로 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, 방법은 1:5 내지 1:20의 비로 세포를 플레이트접종하는 단계를 추가로 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 방법은 배양 배지를 1~3일마다, 1~2일마다, 짝수일마다, 또는 매일 보충하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 바람직한 구현예에서, 방법은 배양 배지를 1~3일마다, 1~2일마다 보충하는 단계를 추가로 포함한다.

[0099] 일부 구현예에서 방법은 상피 줄기 세포를 적어도 5 계대, 예를 들어, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 적어도 12, 적어도 13, 적어도 14, 적어도 15, 적어도 16, 적어도 17, 적어도 18, 적어도 19, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60 계대 동안 또는 6~40 계대, 예를 들어 약 8~35 계대, 10~30 계대, 또는 12~25 계대 동안 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서 방법은 상피 줄기 세포를 8~50, 10~50, 15~50, 20~50, 또는 20~40 계대 동안 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 상피 줄기 세포를 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 보다 바람직하게는 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 24, 적어도 25, 적어도 30개월 이상, 예를 들어 3년 이상 동안 배양하는 단계를 포함한다.

[0100] **상피 줄기 세포 및 배양을 위한 이의 제조**

[0101] 상피 줄기 세포는 단세포 또는 상피 줄기 세포 집단의 일부일 수 있다. 상피 줄기 세포는 오가노이드 및/또는 상피 조직 외식편에 포함될 수 있다. 특정 구현예에서, 상피 줄기 세포는 포유류 상피 줄기 세포, 임의로 인간 또는 마우스 상피 줄기 세포이다. 바람직한 구현예에서, 상피 줄기 세포는 인간 상피 줄기 세포이다. 일부 구현예에서 상피 줄기 세포는 Lgr5 발현을 특징으로 한다.

[0102] 상피 줄기 세포는 성체 조직으로부터 수득된다, 즉 상피 줄기 세포는 성체 상피 줄기 세포이다. 상기 맥락에서 "성체"는 성숙 조직을 의미한다, 즉 신생아 또는 소아는 포함되지만 배아 또는 태아는 배제된다. 대안적으로, 상피 줄기 세포는 배아 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포주로부터 유래되지 않는다, 예로 시험관내 분화되었다.

[0103] 상피 줄기 세포는 결장직장, 소장, 위, 췌장, 간, 폐, 유방, 전립샘, 신장, 구강, 코인두, 목, 하인두, 후두, 기관, 피부, 나팔관, 난소, 침샘, 식도, 모낭 및/또는 달팽이 조직으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서 상피 줄기 세포는 결장직장 세포이다. 다양한 조직으로부터의 상피 줄기 세포의 배양 방법은 이전에 기재되었다(예로 WO2009/022907, WO2010/090513, WO2012/014076, WO2012/168930, WO2015/173425, WO2016/083613, 및 WO2016/083612 및 Clevers, Cell 165(7) 1586-1597, (2016)).

[0104] 조직으로부터 직접 채취된 세포, 즉 신선 단리된 세포는 또한 일차 세포로 나타낸다. 일부 구현예에서 상피 줄기 세포는 일차 상피 줄기 세포이다.

[0105] 일차 세포 배양은 계대되어 이차 세포 배양을 형성할 수 있다. 암 세포를 제외하고, 전통적인 이차 세포 배양은 제한된 수명을 갖는다. 특정 횟수의 집단 배가(예로 50~100세대) 후, 세포는 노화 과정을 거치며 분열을 중단한다. 이차 배양으로부터의 세포는 불멸화되어 연속 세포주가 될 수 있다. 불멸화는 자연 발생할 수 있거나, 바이러스적으로- 또는 화학적으로-유도될 수 있다. 불멸화된 세포주는 또한 암화된 세포로 알려져 있다. 대조적으로, 본 발명의 방법은 불멸화 또는 암화 없이 오가노이드 성장을 통한 상피 줄기 세포의 연속 계대를 허용한다. 따라서 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포는 불멸화 또는 암화된 세포가 아니거나 불멸화된 세포주 또는 암화된 세포주로부터 유래되지 않는다. 본 발명의 장점은 다회 증식 및 계대를 거치는 상피 줄기 세포가 일차 세포의 특징을 보유하며 유전형 또는 표현형 변화를 최소로 갖거나 갖지 않는다는 것이다. 따라서 본 발명의 방법에서 상피 줄기 세포(들)의 시작 집단은 기존 오가노이드로부터 수득되거나 유래될 수 있고 추가 배양되고 증식되어 새로운 세포 및 오가노이드를 생성할 수 있다. 따라서 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포 집단의 상피 줄기 세포는 오가노이드의 일부이거나 오가노이드로부터 단리되거나, 상피 줄기 세포 집단이 오가노이드인 경우, 오가노이드의 일부이거나 오가노이드로부터 단리된다.

[0106] 일부 구현예에서 상피 줄기 세포는 정상 세포이다. 대안적 구현예에서, 상피 줄기 세포는 암 줄기 세포이다. 따라서, 세포는 요구되는 경우, 종양으로부터 수득될 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 방법은 상피를 포함하는 조직 단편을 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포는 조직 단편으로부터 단리된다.

[0108] 오가노이드는 바람직하게는 성체 조직으로부터의 상피 세포, 임의로 Lgr5를 발현하는 성체 조직으로부터의 상피 줄기 세포를 사용하여 수득된다.

[0109] 일부 구현예에서, 오가노이드는 임의로 Lgr5를 발현하는, 단세포로부터 기인한다. 유리하게는, 이는 균일한 세포 집단을 형성하는 것을 허용한다. 상피 줄기 세포를 포함하는 단세포 현탁액이 기계적으로 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포를 포함하는 단세포 현탁액은 기계적 공정 및/또는 효소적 소화를 사용하여 생성된다. 기계적 공정에는 비제한적으로 절제, 마이크로-절제 및 여과가 포함된다.

[0110] 일부 구현예에서, 시작 배양은 세포 덩어리 또는 집단, 예를 들어, 결장직장 단편에 함유된 세포 집단이다. 따라서, 본 발명의 방법은 시작점으로서 단세포를 사용하는 것에 제한되지 않는다.

[0111] 상피 줄기 세포는 당분야에 알려진 임의의 적합한 단리 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 상피층은 수술 표본 또는 생검과 같은, 조직 샘플로부터 마이크로-절제되고, 효소에 의해 소화되고, 여과되고, 생성 세포 현탁액이 플레이트접종된다. 일부 구현예에서, 마이크로-절제는 지방 및 근육과 같은 다른 조직 유형을 제거하기 위한 것이다. 일부 구현예에서, 효소는 트립신, 콜라게나제 또는 아큐타제이다. 일부 구현예에서, 효소는 트립신, 임의로 0.125% 트립신이다. 일부 구현예에서, 샘플은 37℃에서 인큐베이션된 후, 임의로 샘플은, 예를 들어 피펫으로, 2, 5, 10, 또는 15분마다와 같이 반복되는 시간 간격에 손상된다. 일부 구현예에서, 샘플은 37℃에서 0.125% 트립신에서 인큐베이션되고 샘플은 약 10분마다 피펫을 사용하여 전단된다. 일부 구현예에서, 효소적 소화는 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 40분, 약 50분, 또는 약 60분 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 효소적 소화는 적절한 배지에서 희석에 의해 완료된다. 일부 구현예에서, 여과 단계는 100 μm 필터를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 기계적 공정 또는 효소적 소화로부터의 생성 세포 현탁액은 ECM 및 배양 배지와 접촉된다.

[0112] 배양을 위해 상피 줄기 세포를 수득하는 하나의 방법은 상피 줄기 세포가 이의 표면 상에서 Lgr5 및/또는 Lgr6을 발현한다는 사실에 기반한다; 이들 단백질은 대형 G 단백질-커플링 수용체(GPCR) 수퍼패밀리에 속한다(예를 들어, 그 내용의 전문이 본원에 참조로 포함되는, WO 2009/022907 참고). Lgr 서브패밀리는 리간드 결합을 위해 중요한 대형 류신-풍부 외도메인을 운반한다는 점에서 독특하다. 따라서 바람직한 방법은 상술된 바와 같이 상기 상피 조직으로부터 세포 현탁액을 제조하는 단계, 상기 세포 현탁액을 Lgr5 및/또는 6 결합 화합물(예컨대 항체, 예로 WO 2009/022907에 기재된 바와 같은, 예로 항-Lgr5 모노클로날 항체)과 접촉시키는 단계, Lgr5 및/또는 6 결합 화합물을 단리하는 단계, 및 줄기 세포를 상기 결합 화합물로부터 단리하는 단계를 포함한다.

[0113] 배양 후, 방법은 하나 이상의 상피 줄기 세포 또는 오가노이드를 수득하고/하거나 단리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포의 배양 후, 후속 적용에서 사용하기 위해 배양 배지로부터 배양 배지에서 배양된 하나 이상의 줄기 세포 및/또는 하나 이상의 오가노이드를 제거하는 것이 유용할 수 있다. 예를 들어, 후

속 분화를 위해 단세포를 단리하는 것이 유용할 수 있다.

[0114] 본 발명의 방법에서 수득되고/되거나 단리되는 오가노이드는 시작 상피 줄기 세포의 특징을 되풀이할 수 있다. 예를 들어, 배양 배지에서 배양된 세포는 동일한 유전형 및 표현형을 보유하며, 줄기-유사 특성을 갖는 세포(예로 Lgr5 발현을 특징으로 하는 세포)가 포함된다. 이는 이환된 조직으로부터(예로 암성 조직으로부터) 채취된 세포가 해당 질환을 충실히 모델링함을 의미한다. 대안적으로, 분화 배지에서 배양된 세포는 (시작 세포와 비교되는 경우) 보다 성숙하고, 분화된 세포 유형을 포함하는 오가노이드를 초래할 수 있다.

[0115] **상피 줄기 세포 이외의 세포**

[0116] 본 발명의 방법은 상피 줄기 세포 및 상피 오가노이드를 위해서만이 아니라 모든 세포 유형을 위해 유리할 수 있다. 특히, 인테그린 작용제는 여러 세포 유형의 세포 배양을 개선할 수 있다. 예를 들어, 인테그린 작용제는 다른 줄기 세포, 특히 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포(예로 Clevers, Cell 165(7) 1586-1597, (2016) 참고)가 포함되는, 세포외 기질(예컨대 Matrigel 또는 BME)과의 배양으로부터 이익을 갖는 것으로 나타난 다른 줄기 세포를 위해 유리할 수 있다. 배아 줄기 세포 및 유도된 다능성 줄기 세포의 배양에는 종종 줄기 세포의 보다 성숙한 세포 유형으로의 분화가 관여된다. 따라서, 배아 줄기 세포 및 유도된 다능성 줄기 세포의 인테그린 작용제와의 배양은 분화 방법의 맥락에서 특히 유용할 수 있다. 인테그린 작용제는 또한 조혈 줄기 세포 배양에서 특히 유용할 수 있다 - 조혈 줄기 세포는 수십 년 동안 여러 병원에서 일상적으로 사용되어 왔지만, 아직 이들 세포를 배양에서 유용하게 증식시킬 수 없었다. 인테그린 작용제의 첨가는 조혈 줄기 세포 배양을 개선할 것으로 예상된다.

[0117] 따라서, 본 개시가 상피 줄기 세포에 관한 구현예를 기재하는 경우, 상기 구현예는 또한 줄기 세포에 대해(일반적으로), 또는 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포에 대해 개시된다. 본 개시가 상피 줄기 세포에 관한 구현예를 기재하는 경우, 동일한 구현예가 또한 조혈 줄기 세포에 대해 개시된다.

[0118] **공동-배양**

[0119] 본 방법은 비-상피 세포 유형, 임의로 면역 세포와의 공동-배양 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 방법은 본원에서 기재된 바와 같은 오가노이드를 시험관내 배양 중 면역 세포와 혼합하는 단계를 포함한다. 하나의 바람직한 구현예에서, 오가노이드 공동-배양은 본원에서 기재된 바와 같은 공동-배양 배지에서 유지된다.

[0120] 일부 구현예에서, 오가노이드-면역 세포 공동-배양을 제조하는 방법은 하기 단계 중 하나 이상을 포함한다: 오가노이드 배양 배지에서 상피 세포를 배양함으로써 적어도 하나의 오가노이드를 제조하는 단계; 및/또는 면역 세포를 면역 세포 증식 배지에서 배양하는 단계. 일부 구현예에서, 본 방법은 비순수 면역 샘플로부터 면역 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 비순수 면역 샘플로부터 면역 세포를 단리하는 방법은 당분야에 알려져 있다.

[0121] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 수득되는 오가노이드-면역 세포 공동-배양을 제공한다. 본 발명은 또한 약물 스크리닝, 독성학 스크리닝, 연구 및 약물 개발에서 상기 오가노이드-면역 세포 공동-배양의 용도를 제공한다.

[0122] **배양 배지**

[0123] 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는, 예로 WO2009/022907, WO2010/090513, WO2012/014076, WO2012/168930, WO2015/173425, WO2016/083613, WO2016/083612 및 WO2017/149025에 기재된 바와 같이, 당분야에 잘 알려져 있다. 이들 문헌에서 언급되는 배양 배지가 본원에 참조로 포함되며 이들 중 임의의 것이 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다.

[0124] 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포의 배양을 위해 적합한 배양 배지는 Wnt 작용제, BMP 저해제, 분열촉진 성장 인자 및 TGF-베타 저해제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 Wnt 작용제를 포함한다. 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 분열촉진 성장 인자 및/또는 BMP 저해제를 추가로 포함할 수 있다.

[0125] 바람직한 구현예에서 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 Wnt 작용제, BMP 저해제, 분열촉진 성장 인자 및 TGF-베타 저해제를 포함한다. 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 p38 저해제, cAMP 작용제, 프로스타글란딘 경로 활성화제, 니코틴아미드, 가스트린, B27 및 N-아세틸시스테인 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.

[0126] 일부 구현예에서 배양 배지는 인간 또는 동물 세포를 위한 기본 배지(예컨대 임의로 B27이 포함되는 DMEM/F12),

R-스폰딘(spondin) 패밀리 단백질, 분열촉진 성장 인자(예컨대 EGF), BMP 저해제(예컨대 노긴(noggin)), TGF-베타 저해제(예컨대 A83-01), p38 저해제(예컨대 SB202190) 및 임의로 니코틴아미드 및 N-아세틸시스테인을 포함한다.

[0127] 일부 구현예에서 배양 배지는 B27, 니코틴아미드, N-아세틸시스테인, 노긴, R-스폰딘 1, EGF, WNT 조정된 배지(50%, 안정적으로 전달감염된 L 세포를 사용하여 생산됨), TGF-b 유형 I 수용체 저해제 A83-01 및 P38 저해제 SB202190이 포함되는 어드밴스드(advanced) DMEM/F12 배지를 포함한다.

[0128] 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 상피 줄기 세포를 증식시키기 위해 적합한 배양 배지이다. 당업자는 상기 언급된 배양 배지가 상피 줄기 세포를 증식시키기 위해 특히 유용함을 이해할 것이다.

[0129] 다른 구현예에서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 상피 줄기 세포를 분화시키기 위해 적합한 배양 배지이다.

[0130] 본 발명은 본원에서 정의된 바와 같은 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 적합한 배양 배지를 제공하며, 여기서 배양 배지는 본원에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 추가로 포함한다.

[0131] **WNT 작용제**

[0132] 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 적합한 배양 배지는 하나 이상의 Wnt 작용제를 포함할 수 있다. Wnt 작용제는 세포에서 TCF/LEF-매개 전사를 활성화하거나 증강시키는 제제로서 본원에서 정의된다.

[0133] 정규 Wnt 신호전달 경로는 Frizzled(FZD) 수용체 및 LRP를 포함하는 세포-표면 Wnt 수용체 복합체가 보통 분비된 당단백질의 Wnt 패밀리의 구성원과 같은 세포외 신호전달 분자에 의해 활성화되는 경우 일어나는 일련의 이벤트에 의해 정의된다. 이는 axin, GSK-3, 및 단백질 APC가 포함되는 단백질 복합체를 저해하는 디셰벌드(Dishevelled) 패밀리 단백질의 활성화를 초래하여 세포내 β-카테닌을 분해한다. 생성되는 농축된 핵 β-카테닌은 TCF/LEF 패밀리 전사 인자에 의해 전사를 증강시킨다(Driehuis & Clevers, British Journal of Pharmacology (2017) 174 4547-4563).

[0134] R-스폰딘/Rnf43/Lgr 모듈은 정규 Wnt 신호전달을 추가 조절한다. R-스폰딘의 부재 하에, E3 리가제 RNF43/ZNRF3은 FZD를 유비퀴틴화하고, 이에 따라 이를 프로테아좀에 의한 분해를 위해 표시하고 Wnt 신호전달을 저해한다. 세포외 R-스폰딘이 존재하는 경우, 이는 Lgr 수용체를 통해 막-통과 E3 리가제 RNF43/ZNRF3과 상호작용하여, E3 리가제의 작용을 방지할 수 있다. Lgr4, Lgr5 및 Lgr6이 포함되는 Lgr 수용체, 그러나 특히 Lgr5는 상피 줄기 세포 상에서 발현된다. R-스폰딘은 이들 줄기 세포 마커에 의해 모집되어 Wnt 신호전달을 증강시키고, 이에 따라 R-스폰딘 및 Lgr은 상호작용하여 증식을 촉진하고 줄기 세포 다능성을 보유한다. 상기 이유로, R-스폰딘 패밀리 단백질은 장기-생존 오가노이드 배양을 수득하기 위해 상피 줄기 세포 배양에서 특히 유용한 것으로 나타났다.

[0135] 따라서 배양 배지에서 하나 이상의 Wnt 작용제는 분비된 당단백질의 Wnt 패밀리로부터의 Wnt 리간드, 세포내 β-카테닌 분해의 저해제, GSK-3 저해제, TCF/LEF의 활성화제, RNF43 또는 ZNRF3의 저해제, 및 R-스폰딘 패밀리 단백질로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지에서 Wnt 작용제는 R-스폰딘 패밀리 단백질 및 GSK-3 저해제를 포함하며, 임의로 분비된 당단백질의 Wnt 패밀리로부터의 Wnt 리간드를 추가로 포함한다.

[0136] R-스폰딘 패밀리 단백질(또한 본원에서 "R-스폰딘"으로 나타냄)은 R-스폰딘 1, R-스폰딘 2, R-스폰딘 3, R-스폰딘 4 및 이의 유사체, 단편, 변이체 및 유도체로부터 선택될 수 있다. 상기 맥락에서, 단편, 변이체 또는 유도체는 Wnt 수용체 복합체 상에서 E3 리가제 RNF43/ZNRF3의 작용을 방지할 수 있다. R-스폰딘 1, R-스폰딘 2, R-스폰딘 3 및 R-스폰딘 4(또한 본원에서 "R-스폰딘 1~4"로 나타냄)는 모두 Wnt 신호 강화를 위해 필요하고 충분한, 2개의 아미노-말단 퓨린(furin)-유사 반복부, 및 더 카복실 말단 구성원쪽에 위치하는 트롬보스폰딘 도메인을 특징으로 한다(Lau et al. Genome Biol. 2012;13(3):242 (2012). 본 발명에서 사용하기 위해 적합한 R-스폰딘 단편, 변이체 및 유도체의 예는 당업자에게 알려져 있다(예로 Wnt 신호전달을 증강시킬 수 있는 퓨린 도메인 단편을 기재하고 본원에서 참조로 포함되는, WO 2012/140274의 실시예 2 참고). R-스폰딘 패밀리 단백질 유사체의 예에는, 예를 들어, RNF43/ZNRF3/Lgr과 상호작용하는 항체가 포함된다. Wnt 신호전달을 증강시킬 수 있는 작용성 항-Lgr5 항체는 당분야에 알려져 있다(예로 WO 2012/140274의 실시예 3에 기재된 항체 1D9 참고).

[0137] 여러 GSK-3 저해제가 당분야에 알려져 있고(예로 Greengard, P., and Meijer, L. (2004) Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. J Med Chem 47: 935-946; 및 Thomas Kramer, Boris Schmidt, and Fabio Lo Monte,

"Small-Molecule Inhibitors of GSK-3: Structural Insights and Their Application to Alzheimer's Disease Models," International Journal of Alzheimer's Disease, vol. 2012, Article ID 381029, 32 pages, 2012. https://doi.org/10.1155/2012/381029 참고) 상업적으로 이용 가능하다(예로 Santa Cruz Biotechnology로부터 여기: https://www.scbt.com/scbt/browse/GSK-3-beta-inhibitors/_/N-x6oud 에서 이용 가능한 목록을 참고). 임의의 이들 GSK-3 저해제는 본 발명의 맥락에서 사용하기 위해 적합하며 당업자는 IC50 값을 사용하여 적합한 농도를 결정할 수 있을 것이다.

[0138] CHIR-99021(CAS: 252917-06-9; 6-[[2-[[4-(2,4-디클로로페닐)-5-(5-메틸-1H-이미다졸-2-일)-2-피리미딜]아미노]에틸]아미노]-3-피리딘카보니트릴; CT99021)은 GSK-3의 강력하고 선택적인 저해제이다. IC50 값이 0.6 nM 내지 7 nM인 다른 아미노피리미딘 저해제에는 CHIR98014(Axon, Cat 1126), CHIR98023, CHIR99021(상기 참고), TWS119(Tocris, Cat 3835)가 포함된다. 따라서, 일부 구현예에서, GSK-3 저해제는 임의로 CHIR98014, CHIR98023, CHIR99021 또는 TWS119로부터 선택되는, 아미노피리미딘 저해제이다. 일부 구현예에서 GSK-3 저해제는 CHIR-99021이다.

[0139] 임의의 적합한 농도, 예를 들어, 10 nM 내지 500 μM, 10 nM, 내지 400 μM, 10 nM 내지 300 μM, 10 nM 내지 200 μM, 10 nM 내지 100 μM 또는 20 nM 내지 50 μM의 GSK-3 저해제(예로 CHIR-99021)가 사용될 수 있거나, 최종 농도는 약 3 μM이다.

[0140] 분비된 당단백질의 Wnt 패밀리의 Wnt 리간드는 Wnt-1/Int-1, Wnt-2/Irp(InM-관련 단백질), Wnt-2b/13, Wnt-3/Int-4, Wnt-3a(R&D systems), Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-6(Kirikoshi H et al 2001 Biochem Biophys Res Com 283 798-805), Wnt-7a(R&D systems), Wnt-7b, Wnt-8a/8d, Wnt-8b, Wnt-9a/14, Wnt- 9b/14b/15, Wnt-10a, Wnt-10b/12, WnM 1, 및 Wnt-16으로부터 선택될 수 있다. 인간 Wnt 단백질의 개요는 문헌("THE WNT FAMILY OF SECRETED PROTEINS", R&D Systems 카탈로그, 2004)에서 제공된다. 일부 구현예에서, Wnt 리간드는 Wnt-3a, Wnt-5 또는 Wnt-6a이거나, 임의로 Wnt-3a이다. 가용성 Wnt 리간드의 첨가는 인간 상피 줄기 세포의 증식을 위해 특히 유리한 것으로 나타났다(예로 WO2012/168930에 기재된 바와 같음).

[0141] Wnt 작용제는 바람직하게는 동일한 세포 유형에서 평가된 바와 같이, 상기 분자의 부재 하의 상기 Wnt 활성 수준에 비해, 세포 내 Wnt 활성을 적어도 10%, 보다 바람직하게는 적어도 20%, 보다 바람직하게는 적어도 30%, 보다 바람직하게는 적어도 50%, 보다 바람직하게는 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 100%만큼 자극하는 데 효과적인 양으로 배지에 첨가된다. 당업자에게 알려진 바와 같이, Wnt 활성은 Wnt의 전사 활성을 측정함으로써, 예를 들어 pTOPFLASH 및 pFOPFLASH Tcf 루시퍼라제 리포터 작제물에 의해 결정될 수 있다(Korinek et al., 1997. Science 275:1784-1787).

[0142] Wnt-3a와 같은 가용성 Wnt 작용제는 Wnt 조정된 배지 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 약 10% 내지 약 30%, 예로 약 10 ng/ml 내지 약 10 μg/ml, 바람직하게는 약 1 μg/ml의 Wnt 조정된 배지가 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 대리물 Wnt 작용제가 사용될 수 있다(예로 [19] 및 실시예에 기재된 바와 같음).

[0143] R-스폰딘은 R-스폰딘 조정된 배지 형태 또는 재조합 단백질 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 약 10 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 400 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 300 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 또는 약 150 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 바람직하게는 약 150 ng/ml 내지 약 250 ng/ml의 R-스폰딘이 사용될 수 있다. 예를 들어, 배양 배지에서 R-스폰딘의 최종 농도는 약 10 ng/ml, 약 25 ng/ml, 약 50 ng/ml, 약 75 ng/ml, 약 100 ng/ml, 약 125 ng/ml, 약 150 ng/ml, 약 175 ng/ml, 약 200 ng/ml, 약 225 ng/ml, 약 250 ng/ml, 약 275 ng/ml, 약 300 ng/ml, 약 325 ng/ml, 약 350 ng/ml, 약 375 ng/ml, 약 400 ng/ml, 약 450 ng/ml, 또는 약 500 ng/ml일 수 있다.

[0144] 하나 이상의, 예를 들어, 2, 3, 4개 이상의 Wnt 작용제가 배양 배지에서 사용될 수 있다.

[0145] **분열촉진 성장 인자**

[0146] 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 적합한 배양 배지는 분열촉진 성장 인자를 포함할 수 있다. 분열촉진 성장 인자는 전형적으로 미토겐-활성화 단백질 키나제 신호전달 경로를 통해 세포 분열을 유도한다. 여러 수용체 티로신 키나제 리간드는 분열촉진 성장 인자이다. 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 수용체 티로신 키나제에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 하나를 초과하는 수용체 티로신 키나제에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 EGFR, FGFR 또는 HGFR과 같은 수용체 티로신 키나제에 결합하며, 임의로 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 EGF, FGF 및 HGF로부터 선택된다.

[0147] ErbB1 또는 HER1로도 알려져 있는, 표피 성장 인자 수용체(EGFR)는 세포외 단백질 리간드의 표피 성장 인자

(EGF) 패밀리의 구성원에 대한 세포 표면 수용체이다. EGFR은 수용체 티로신 키나제이며 4개의 관련된 단백질(EGFR(HER1/ErbB1), ErbB2(HER2), ErbB3(HER3) 및 ErbB4(HER4))을 포함하는 수용체의 HER 패밀리에 속한다. HER 수용체는 EGF, TGF-알파, 헤파린-결합 EGF 유사 성장 인자, 뉴레귤린, 앰피레귤린, 베타셀룰린, 및 에피레귤린이 포함되는, 상이한 리간드에 대한 결합에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다. 리간드가 수용체의 세포외 도메인에 결합한 후, 수용체는 기능적으로 활성인 이량체(EGFR-EGFR(동종이량체) 또는 EGFR-HER2, EGFR-HER3, EGFR-HER4(이종이량체))를 형성한다. 이량체화는 티로신 키나제 도메인의 활성화를 유도하며, 이는 여러 티로신 잔기 상에서 수용체의 자가인산화를 야기한다. 이는 일정 범위의 어댑터 단백질(예컨대 SHC, GRB2)의 모집을 야기하며 일련의 세포내 신호전달 캐스케이드를 활성화하여 유전자 전사에 영향을 미친다. 따라서, 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 EGFR, HER1, HER2, HER3 또는 HER4에 결합한다. 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 EGFR에 결합한다. 일부 구현예에서, HER2~4 리간드가 EGFR 리간드에 부가하여 배양 배지에 포함된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 뉴레귤린이 EGF에 부가하여 배양 배지에 포함된다. 뉴레귤린은 폐 및 유방 조직의 배양을 위해 유리한 것으로 나타났다(예로 WO2016/083613, 및 WO2016/083612 참고). 일부 구현예에서, 배양 배지에서 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 EGF이다. 임의의 적합한 EGF, 예를 들어, Peprotech로부터 수득되는 EGF가 사용될 수 있다. EGF는 바람직하게는 0.1 ng/ml 내지 500 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 400 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 300 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 200 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 100 ng/ml의 최종 농도로 기본 배양 배지에 첨가되거나, 분열촉진 성장 인자의 최종 농도는 대략 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml 또는 500 ng/ml이고 500 ng/ml 이하이다. 보다 바람직하게는 농도는 적어도 50 ng/ml이고 100 ng/ml 이하이다. 더욱 바람직하게는 농도는 약 50 ng/ml이다. FGF는 세포 표면 티로신 키나제 수용체(FGFR)와 상호작용함으로써 세포를 자극한다. 4개의 가깝게 관련된 수용체(FGFR1~FGFR4)가 확인되었다. 따라서, 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 FGF 수용체 패밀리 구성원에 결합한다. FGF 수용체 패밀리 구성원에는 (비제한적으로) FGFR1, FGFR2, FGFR3 또는 FGFR4가 포함된다. FGFR1~FGFR3 유전자는 여러 이소형을 인코딩하는 것으로 나타났으며, 이들 이소형이 리간드 특이성의 결정에서 결정적일 수 있다. (비제한적으로) FGF2, FGF4, FGF7 및 FGF10이 포함되는, FGF 수용체 패밀리 구성원에 결합하는 몇몇 FGF가 존재한다. 이들은 상업적으로 이용 가능하다. 따라서, 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 FGF이다. 일부 구현예에서, FGF는 FGF2, FGF4, FGF7 및 FGF10으로부터 선택된다. 바람직한 구현예에서, FGF는 FGF2 및/또는 FGF10이다. 가장 바람직한 구현예에서, FGF는 FGF2 및 FGF10이다.

[0148] 대부분의 FGF는 하나를 초과하는 수용체에 결합한다(Ornitz J Biol Chem. 1998 Feb 27;273 (9):5349-57). 그러나, FGF10 및 FGF7은 FGF 가운데 이들이 상피 세포에 의해 배타적으로 발현되는, FGFR2b로 명명된 FGFR2의 특정 이소형과만 상호작용한다는 점에서 독특하다(Igarashi, J Biol Chem. 1998 273(21):13230-5). 따라서, 일부 구현예에서 분열촉진 성장 인자는 FGFR2b에 결합한다. FGF10은 배양 배지에서 특히 유용한 것으로 나타났다. FGF10은 FGFR2 또는 FGFR4에 결합할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 FGFR2 또는 FGFR4에 결합한다. FGF2는 FGFR1, FGFR2, FGFR3 및 FGFR4 모두에 결합한다. 따라서, 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 FGFR1, FGFR2, FGFR3 및 FGFR4 모두에 결합한다.

[0149] 일부 구현예에서, FGF의 최종 농도는 0.1 ng/ml 내지 500 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 400 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 300 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 200 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 100 ng/ml이거나, 분열촉진 성장 인자의 최종 농도는 약 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml 또는 500 ng/ml이다.

[0150] 일부 구현예에서, 배양 배지에서 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 FGF10이다. FGF10에 있어서 바람직한 농도는 대략 0.1 ng/ml 내지 500 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 400 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 300 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 200 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 100 ng/ml이거나, 분열촉진 성장 인자의 최종 농도는 대략 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml 또는 500 ng/ml이고 500 ng/ml 이하이다. FGF10에 대한 보다 바람직한 농도는 약 10 ng/ml이다.

[0151] 일부 구현예에서, 배양 배지에서 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 FGF2이다. FGF2에 대해 바람직한 농도는 대략 0.1 ng/ml 내지 500 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 400 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 300 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 200 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 100 ng/ml이거나, 분열촉진 성장 인자의 최종 농도는 대략 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml 또는 500 ng/ml이고 500 ng/ml 이하이다. FGF2에 대한 보다 바람직한

농도는 약 5 ng/ml이다.

[0152] 간세포 성장 인자/산란 인자(HGF/SF)는 원-종양형성 HGFR에 대한 결합 후 티로신 키나제 신호전달 캐스케이드를 활성화함으로써 세포 성장, 세포 이동성, 및 형태형성을 조절하는 형태형성 인자이다. HGFR은 c-Met 수용체로도 알려져 있다. HGF는 상피 줄기 세포 배양에서 유용한 것으로 나타났다. 따라서, 일부 구현예에서 분열촉진 성장 인자는 HGFR에 결합한다. 일부 구현예에서, 분열촉진 성장 인자는 HGF이다. 임의의 적합한 HGF, 예를 들어, Peprotech로부터 수득된 HGF가 사용될 수 있다. HGF에 있어서 바람직한 농도는 약 1, 10, 20, 25, 50 ng/ml이고, 50 ng/ml 이하이다.

[0153] 일부 구현예에서, 하나를 초과하는 분열촉진 성장 인자, 예로 2개 또는 3개의 분열촉진 성장 인자가 배양 배지에 포함된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 배양 배지에서 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 EGF 및 FGF이다. 일부 구현예에서, 배양 배지에서 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 EGF, FGF2 및 FGF10이다. 일부 구현예에서, 배양 배지에서 하나 이상의 분열촉진 성장 인자는 임의로 약 50 ng/ml의 최종 농도의 EGF, 임의로 약 5 ng/ml의 최종 농도의 FGF2, 및 임의로 약 10 ng/ml의 최종 농도의 FGF10이다.

[0154] 일부 구현예에서 간세포 성장 인자(HGF)가 또한 EGF 및/또는 FGF의 존재 또는 부재 하에 존재한다.

[0155] 일부 구현예에서, 각각의 분열촉진 성장 인자의 최종 농도는 0.1 ng/ml 내지 500 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 400 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 300 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 200 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 1 ng/ml 내지 100 ng/ml이거나, 분열촉진 성장 인자의 최종 농도는 약 1 ng/ml, 2 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 90 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml 또는 500 ng/ml이다.

[0156] **BMP 저해제**

[0157] 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 적합한 배양 배지는 BMP 저해제를 포함할 수 있다. BMP는 2개의 상이한 수용체 세린/트레오닌 키나제, 유형 I 및 유형 II 수용체로 구성되는 수용체 복합체에 이량체성 리간드로서 결합한다. 유형 II 수용체는 유형 I 수용체를 인산화하여, 상기 수용체 키나제의 활성화를 초래한다. 유형 I 수용체는 이후 특정 수용체 기질(SMAD)을 인산화하여, 전사 활성을 야기하는 신호 전달 경로를 초래한다.

[0158] BMP 저해제는 BMP 분자에 결합하여 복합체를 형성하는 제조로서 정의되며 여기서 BMP 활성은, 예를 들어 BMP 수용체에 대한 BMP 분자의 결합을 방지하거나 저해함으로써, 중화된다. 대안적으로, 상기 저해제는 길항제 또는 역 작용제로서 작용하는 제제이다. 상기 유형의 저해제는 BMP 수용체에 결합하고 상기 수용체에 대한 BMP의 결합을 방지한다. 후자 제제의 예는 BMP 수용체에 결합하며 항체-결합 수용체에 대한 BMP의 결합을 방지하는 항체이다.

[0159] BMP 저해제는 동일한 세포 유형에서 평가된 바와 같은, 상기 저해제의 부재 하의 BMP 활성 수준에 비해, 세포 내 BMP-의존적 활성을 최대 90%, 보다 바람직하게는 최대 80%, 보다 바람직하게는 최대 70%, 보다 바람직하게는 최대 50%, 보다 바람직하게는 최대 30%, 보다 바람직하게는 최대 10%, 보다 바람직하게는 0% 저해하는 데 효과적인 양으로 배지에 첨가될 수 있다. 당업자에게 알려진 바와 같이, BMP 활성은, 예를 들어 문헌(Zilberberg et al., 2007. BMC Cell Biol. 8:41)에서 예시된 바와 같이, BMP의 전사 활성을 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0160] 노긴(Peprotech), 코르딘(Chordin) 및 코르딘 도메인을 포함하는 코르딘-유사 단백질(R&D systems), 폴리스타틴(Follistatin) 및 폴리스타틴 도메인을 포함하는 폴리스타틴-관련 단백질(R&D systems), DAN 및 DAN 시스테인-노트(knot) 도메인을 포함하는 DAN-유사 단백질(R&D systems), 스클레로스틴/SOST(R&D systems), 데코린(R&D systems), 및 알파-2 매크로글로불린(R&D systems)이 포함되는 몇몇 클래스의 천연 BMP-결합 단백질이 알려져 있다.

[0161] 따라서, 일부 구현예에서, BMP 저해제는 Cerberus 및 Gremlin(R&D systems)이 포함되는 노긴, DAN, 및 DAN-유사 단백질로부터 선택된다. 이들 확산성 단백질은 다양한 정도의 친화도로 BMP 리간드에 결합하고 신호전달 수용체에 대한 이의 접근을 저해할 수 있다. 임의의 이들 BMP 저해제의 기본 배양 배지에 대한 첨가는 줄기 세포의 손실을 방지한다. 바람직한 BMP 저해제는 노긴이다.

[0162] 일부 구현예에서, BMP 저해제(예로 노긴)의 최종 농도는 약 10 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 400 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 300 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 약 250 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 약 150 ng/ml이거나, 최종 농도는 약 100 ng/ml이다.

[0163] **TGF-베타 저해제**

[0164] 상피 줄기 세포를 배양하기 위해 적합한 배양 배지는 TGF-베타 저해제를 포함할 수 있다. 증식 배지에서 TGF-베타 저해제의 존재는 인간 오가노이드 형성 효율을 증가시키기 위해 특히 유리하다. TGF-베타 신호전달은 전형적으로 유형 I 수용체를 모집하고 인산화하는 유형 II 수용체에 대한 TGF-베타 수퍼패밀리 리간드의 결합으로 시작한다. 이어서 유형 I 수용체가 SMAD를 인산화하고, 이는 핵에서 전사 인자로 작용하고 표적 유전자 발현을 조절한다.

[0165] TGF-베타 수퍼패밀리 리간드는 뼈 형태형성 단백질(BMP), 성장 및 분화 인자(GDF), 항-뮬러 호르몬(AMH), 액티빈(activin), 노달(nodal) 및 TGF-베타를 포함한다. 일반적으로, Smad2 및 Smad3은 TGF-베타/액티빈 경로에서 ALK4, 5 및 7 수용체에 의해 인산화된다. 대조적으로, Smad1, Smad5 및 Smad8은 뼈 형태형성 단백질(BMP) 경로의 일환으로 인산화된다. 그러나, 본 발명의 맥락에서, 당업자는 "TGF-베타 저해제" 또는 "TGF-베타 신호전달의 저해제"가 ALK4, 5 및 7이 관여되고, Smad2 및 Smad3이 관여되는 TGF-베타 경로의 저해제임을 이해할 것이다. TGF-베타 저해제는 BMP 저해제가 아니며, 즉 당업자는 노긴이 본 개시의 맥락에서 TGF-베타 저해제가 아님을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, BMP 저해제가 TGF-베타 저해제에 부가하여 배양 배지에 첨가된다(아래 참고).

[0166] 따라서 TGF-베타 저해제는 본원에서 ALK4, ALK5 또는 ALK7 신호전달 경로로도 나타내는, TGF-베타 신호전달 경로의 활성을 감소시키는 임의의 제제이다. 당분야에 알려져 있고 본 발명과 함께 사용될 수 있는 TGF-베타 신호전달 경로를 손상시키는 여러 방식이 존재한다. 예를 들어, TGF-베타 신호전달은 하기에 의해 손상될 수 있다: 소형-간섭 RNA 전략에 의한 TGF-베타 발현의 저해; 퓨린(TGF-베타 활성화 프로테아제)의 저해; 생리적 저해제에 의한 경로의 저해; TGF-베타 수용체 키나제 1(액티빈 수용체-유사 키나제, ALK5로도 알려져 있음), 모노클로날 항체로의 TGF-베타의 중화; ALK4, ALK7의 소분자 저해제로의 저해; 예로, 이의 생리적 저해제, Smad 7의 과발현에 의한, 또는 Smad가 활성화되는 것을 불능화하는 Smad 부착물로서의 티오레독신의 사용에 의한, Smad 2 및 Smad 3 신호전달의 저해(Fuchs, O. Inhibition of TGF-Signaling for the Treatment of Tumor Metastasis and Fibrotic Diseases. Current Signal Transduction Therapy, Volume 6, Number 1, January 2011, pp. 29-43(15)).

[0167] 성분이 TGF-베타 저해제인지를 결정하기 위한 다양한 방법이 알려져 있고 본 발명과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포가 인간 PAI-1 프로모터 또는 Smad 결합 부위를 포함하는 리포터 작제물로 안정적으로 전달감염되어 루시퍼라제 리포터 유전자를 유도하는 세포성 검정이 사용될 수 있다. 대조군 대비 루시퍼라제 활성의 저해는 화합물 활성의 척도로서 사용될 수 있다(De Gouville et al., Br J Pharmacol. 2005 May; 145(2): 166-177).

[0168] 본 발명에 따른 TGF-베타 저해제는 단백질, 펩티드, 소분자, 소형-간섭 RNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 항체일 수 있다. 저해제는 자연 발생 또는 합성일 수 있다.

[0169] 일부 구현예에서 TGF-베타 저해제는 A83-01과 같은 소분자 저해제이다. A83-01은 ALK4, ALK5 및 ALK7의 상업적으로 이용 가능한 선택적 저해제이다(Tocris cat. no. 2939). 이는 카탈로그에서 TGF-β 유형 I 수용체 ALK5 키나제, 유형 I 액티빈/노달 수용체 ALK4 및 유형 I 노달 수용체 ALK7의 강력한 저해제로 기재되어 있고(IC_{50} 값은 각각 12, 45 및 7.5 nM임), 이는 Smad2의 인산화를 차단하며, ALK-1, -2, -3, -6 및 MAPK 활성은 약하게만 저해한다. 유사한 특성을 갖는 다른 상업적으로 이용 가능한 저해제에는 비제한적으로 A77-01, LY2157299, LY2109761, LY3200882, GW788388, 피르페니돈(Pirfenidone), RepSox, SB431542, SB505124, SB525334, LY364947, SD-208 및 박토세르팁(Vactosertib)이 포함된다. 이들 저해제에 대한 IC50 값은 당분야에 알려져 있고 당업자는 본 출원의 실시예에 제공된 교시에 기반하여 적합한 농도로 적합한 저해제를 선택할 수 있을 것이다.

[0170] 따라서, 일부 구현예에서, TGF-베타 저해제는 ALK4, ALK5 및 ALK7의 저해제, 임의로 ALK4, ALK5 또는 ALK7의 선택적 저해제이다. 예를 들어, TGF-베타 저해제는 ALK4, ALK5 및/또는 ALK7에 결합하고 이를 직접 저해할 수 있다. 일부 구현예에서, TGF-베타 저해제는 Smad2의 인산화를 차단하는 저해제이다. 일부 구현예에서, TGF-베타 저해제는 A83-01, A77-01(Tocris cat. no. 6712) LY2157299(Selleckchem cat. no. S2230), LY2109761(Selleckchem cat. no. S2704), LY3200882(Selleckchem cat. no. S8772), GW788388(Tocris cat. no. 3264), 피르페니돈, RepSox(Tocris cat. no. 3742), SB431542(Tocris cat. no. 1614), SB505124(Tocris cat. no. 3263), SB525334(Tocris cat. no. 3211), LY364947(Tocris cat. no. 2718), SD-208(Tocris cat. no. 3269), 및 박토세르팁(Selleckchem cat. no. S7530)으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, TGF-베타 저해제는 A83-01이다.

[0171] 일부 구현예에서, 하나 이하의 TGF 베타 저해제가 배양 배지에 존재한다. 다른 구현예에서, 하나를 초과하는 TGF 베타 저해제, 예로 2, 3, 4개 이상이 배양 배지에 존재한다.

[0172] 일부 구현예에서, TGF 베타 저해제의 최종 농도는 1 nM 내지 100 μM, 10 nM 내지 100 μM, 100 nM 내지 10 μM, 또는 약 1 μM이며, 예를 들어, 하나 이상의 저해제의 최종 농도는 10 nM 내지 100 μM, 100 nM 내지 10 μM, 또는 약 500 nM이다. 일부 구현예에서, TGF 베타 저해제의 최종 농도는 적어도 5 nM, 예를 들어, 적어도 50 nM, 적어도 100 nM, 적어도 300 nM, 적어도 450 nM, 적어도 475 nM, 예를 들어 5 nM~500 mM, 10 nM~100 mM, 50 nM~700 μM, 50 nM~10 μM, 100 nM~1000 nM, 350~650 nM, 또는 보다 바람직하게는 약 500 nM이다. 일부 구현예에서, TGF-베타 저해제는 약 500 nM의 최종 농도의 A83-01이다.

[0173] 당업자는 TGF-베타 저해제의 적절한 최종 농도가 해당 TGF-베타 저해제에 의존함을 이해할 것이며 당업자는 본 발명에서 사용하기 위한 다른 TGF 베타 저해제의 농도를 어떻게 결정하는지 알 것이다.

[0174] **니코틴아미드**

[0175] 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지는 니코틴아미드를 추가로 포함한다. 니코틴아미드는 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제(PARP) 저해제인, 비타민 B3의 아미드 유도체이며, NAD+의 일차 전구체를 나타낸다. 이는 상업적으로 이용 가능하다(예로 Stemcell Technologies Cat. 07154로부터). 일부 구현예에서, 니코틴아미드는 7~15 mM, 예를 들어 약 10 mM로 존재한다.

[0176] **프로스타글란딘 경로 활성화제**

[0177] 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제(프로스타글란딘 경로 활성화제로도 불림)는 인지질, 아라키돈산(AA), 프로스타글란딘 E2(PGE2), 프로스타글란딘 G2(PGG2), 프로스타글란딘 F2(PGF2), 프로스타글란딘 H2(PGH2), 프로스타글란딘 D2(PGD2)를 포함하는 목록으로부터 선택된 임의의 하나 이상의 화합물일 수 있다. 일부 구현예에서, 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제는 PGE2 및/또는 AA이다. 일부 구현예에서, 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제는 PGE2이다.

[0178] 일부 구현예에서, 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제(예로 PGE2)의 최종 농도는 10 nM 내지 500 μM, 10 nM, 내지 400 μM, 10 nM 내지 300 μM, 10 nM 내지 200 μM, 10 nM 내지 100 μM, 또는 20 nM 내지 50 μM이거나, 최종 농도는 약 1 μM이다.

[0179] 당업자는 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제의 적절한 최종 농도가 해당 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제에 의존함을 이해할 것이며 당업자는 본 발명에서 사용하기 위한 프로스타글란딘 신호전달 경로의 다른 활성화제의 농도를 어떻게 결정하는지 알 것이다.

[0180] **CAMP 활성화제**

[0181] cAMP 경로 활성화제는 세포 내 cAMP의 수준을 증가시키는 임의의 적합한 활성화제일 수 있다. cAMP 경로에는 여러 유형의 호르몬 및 신경전달물질 G-단백질 커플링된 수용체의 활성화가 관여된다. 호르몬 또는 신경전달물질의 그 막-결합 수용체로의 결합은 G-단백질의 α-서브유닛의 활성화를 야기하는 수용체에서의 구성적 변화를 유도한다. 활성화된 G 서브유닛은 아데닐릴 사이클라제를 자극하는 반면, 비-활성화된 G 서브유닛은 이를 저해한다. 아데닐릴 사이클라제의 자극은 세포질 ATP의 cAMP로의 전환을 촉매하고 이에 따라 세포에서 cAMP 수준을 증가시킨다.

[0182] 따라서, 일부 구현예에서, cAMP 경로 활성화제는 아데닐릴 사이클라제 활성화제 또는 cAMP 유사체이다. 적합한 아데닐릴 사이클라제 활성화제의 예에는 포스콜린(forskolin), 포스콜린 유사체 및 콜레라 독소가 포함된다.. 포스콜린 유사체의 예는 당분야에 알려져 있고 NKH477(예로 카탈로그 번호 Tocris 1603)이 포함된다. cAMP 유사체의 예가 또한 당분야에 알려져 있고, 예를 들어, 8-브로모-cAMP가 포함된다. 8-브로모-cAMP는 cAMP보다 포스포디에스터라제에 의한 가수분해에 더 큰 내성을 갖는 세포-투과성 cAMP 유사체이다. 따라서 일부 구현예에서, cAMP 경로 활성화제는 포스콜린, 콜레라 독소, NKH477 및 8-브로모-cAMP로부터 선택된다. 일부 구현예에서, cAMP 경로 활성화제는 포스콜린이다. 일부 구현예에서, cAMP 경로 활성화제는 콜레라 독소가 아니다.

[0183] cAMP 경로 활성화제는 당분야에 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어, cAMP 수준을 측정하는 경쟁적 면역검정을 사용하여 확인될 수 있다. CatchPoint® 사이클릭-AMP 형광 검정 키트(Molecular Devices LLC)는 이러한 면역검정을 수행하기 위해 상업적으로 이용 가능한 키트의 하나의 예이다. 샘플 또는 표준 중 cAMP는 항-cAMP 항체 상의 결합 부위에 대해 홀스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)-표지 cAMP 콘주게이트와 경쟁한다. cAMP의 부재 하에, 대부분의 HRP-cAMP 콘주게이트는 항체에 결합된다. cAMP의 농도 증가는 결합된 콘주게이트의 양을 경쟁적으로 감소

시키고, 이에 따라 측정된 HRP 활성을 감소시킨다. cAMP 경로 활성화제는 대조군 대비, 증가된 수준의 cAMP를 초래하고 측정되는 HRP 활성을 감소시킬 것이다.

[0184] 일부 구현예에서, cAMP 경로 활성화제(예로 포스콜린)의 최종 농도는 10 nM 내지 500 μM, 10 nM, 내지 400 μM, 10 nM 내지 300 μM, 10 nM 내지 200 μM, 10 nM 내지 100 μM, 또는 20 nM 내지 50 μM이거나, 최종 농도는 약 1 μM이다. 일부 구현예에서 cAMP 경로 활성화제는 포스콜린이다. 일부 구현예에서 포스콜린의 최종 농도는 약 1 μM이다.

[0185] 선택되는 농도는 사용되는 cAMP 경로 활성화제에 의존할 수 있고 cAMP 경로 활성화제의 효력에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, NKH477은 일반적으로 8-브로모-cAMP 및 포스콜린보다 강력하다. 보다 강력한 cAMP 경로 활성화제는 동일한 효과에 대해 더 낮은 농도로 사용될 수 있다.

[0186] ***추가 성분***

[0187] 세포 배양을 위한 기본 배지는 전형적으로 다수의 구성분을 함유하며, 이는 배양된 세포의 유지를 지지하기 위해 필요하다. 구성분의 적합한 조합은 하기 개시를 고려하여, 당업자에 의해 용이하게 제형화될 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 기본 배지는 일반적으로 문헌 및 아래에서 보다 상세히 기재된 바와 같은, 아미노산, 비타민, 지질 보충물, 무기 염, 탄소 에너지원, 및 완충액과 같은 표준 세포 배양 구성분을 포함하는 영양 용액을 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 배양 배지는, 예를 들어, 아미노산, 비타민, 지질 보충물, 무기 염, 탄소 에너지원, 및 완충액으로부터 선택되는 하나 이상의 표준 세포 배양 구성분이 추가 보충된다. 적합한 기본 배지는 당업자에게 알려져 있을 것이며, 상업적으로 이용 가능하고, 예로 비제한적 예에는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM), 어드밴스드-DMEM, 최소 필수 배지(MEM), 녹아웃(Knockout)-DMEM(KO-DMEM), 글래스고 최소 필수 배지(G-MEM), 기본 배지 이글(BME), DMEM/햄(Ham's) F12, 어드밴스드 DMEM/햄 F12, 이스코브 변형 둘베코 배지 및 최소 필수 배지(MEM), 햄 F-10, 햄 F-12, 배지 199, 및 RPMI 1640 배지가 포함된다. 예를 들어, 기본 배지는 바람직하게는 글루타맥스, 페니실린/스트렙토마이신 및 HEPES가 보충된, 어드밴스드-DMEM일 수 있다.

[0188] 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지에는 가스트린, B27, N-아세틸시스테인 및 N2로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물이 보충될 수 있다. 따라서 일부 구현예에서 상술된 배양 배지는 가스트린, B27, N2 및 N-아세틸시스테인으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 추가로 포함한다. B27(Invitrogen), N-아세틸시스테인(Sigma) 및 N2(Invitrogen), 가스트린(Sigma)은 세포의 증식을 제어하고 DNA 안정성을 보조하는 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 B27 및 N-아세틸시스테인을 추가로 포함한다.

[0189] 일부 구현예에서, B27 보충물은 '비타민 A 제외 B27 보충물'(Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; 현재 카탈로그 번호 12587010; 및 PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; 카탈로그 번호 F01-002로부터 이용 가능함; Brewer et al., J Neurosci Res., 35(5):567-76, 1993)이 바이오틴, 콜레스테롤, 리놀레산, 리놀렌산, 프로게스테론, 푸트레신, 레티닐 아세테이트, 나트륨 셀레나이트, 트리-요오도티로닌(T3), DL-알파 토코페롤(비타민 E), 알부민, 인슐린 및 트랜스페린을 포함하는 배양 배지를 제형화하기 위해 사용될 수 있다. PAA Laboratories GmbH에서 공급되는 B27 보충물은 다른 구성분 중, 바이오틴, 콜레스테롤, 리놀레산, 리놀렌산, 프로게스테론, 푸트레신, 레티놀, 레티닐 아세테이트, 나트륨 셀레나이트, 트리-요오도티로닌(T3), DL-알파 토코페롤(비타민 E), 알부민, 인슐린 및 트랜스페린을 함유하는 액체 50x 농축물로 주어진다. 이들 구성분 중 적어도 리놀렌산, 레티놀, 레티닐 아세테이트 및 트리-요오도티로닌(T3)은 핵 호르몬 수용체 작용제이다. B27 보충물은 농축물로서 배양 배지에 첨가되거나 배양 배지에 대한 첨가 전에 희석될 수 있다. 이는 1x 최종 농도 또는 다른 최종 농도로 사용될 수 있다. B27 보충물의 사용은 본 발명의 배양 배지 내로 바이오틴, 콜레스테롤, 리놀레산, 리놀렌산, 프로게스테론, 푸트레신, 레티놀, 레티닐 아세테이트, 나트륨 셀레나이트, 트리-요오도티로닌(T3), DL-알파 토코페롤(비타민 E), 알부민, 인슐린 및 트랜스페린을 포함시키기 위한 편리한 방식이다. 또한 이들 성분의 일부 또는 전부가 B27 보충물을 사용하는 대신 배양 배지에 별도로 첨가될 수 있음이 고려된다. 따라서, 배양 배지는 이들 성분의 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 레티노산은 배양 배지에서 사용되는 B27 보충물에 부재하고/하거나 배양 배지에 부재한다.

[0190] 'N2 보충물'은 Invitrogen, Carlsbad, CA; www.invitrogen.com; 카탈로그 번호 17502-048로부터; 및 PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria; www.paa.com; 카탈로그 번호 F005-004(Bottenstein & Sato, PNAS, 76(1):514-517, 1979)로부터 이용 가능하다. PAA Laboratories GmbH에서 공급되는 N2 보충물은 500 μg/ml 인간 트랜스페린, 500 μg/ml 소 인슐린, 0.63 μg/ml 프로게스테론, 1611 μg/ml 푸트레신, 및 0.52 μg/ml 나트륨 셀레나이트를 함유하는 100x 액체 농축물로 주어진다. N2 보충물은 농축물로 배양 배지에 첨가될 수 있거

나 배양 배지에 대한 첨가 전에 희석될 수 있다. 이는 1x 최종 농도로 또는 다른 최종 농도로 사용될 수 있다. N2 보충물의 사용은 본 발명의 배양 배지 내로 트랜스페린, 인슐린, 프로게스테론, 푸트레신 및 나트륨 셀레나이트를 포함시키기 위한 편리한 방식이다. 당연히 이들 성분 중 일부 또는 전부가 N2 보충물을 사용하는 대신 배양 배지에 별도로 첨가될 수 있음이 또한 고려된다. 따라서, 배양 배지는 이들 성분 중 일부 또는 전부를 포함할 수 있다. 배지가 B27을 포함하는 일부 구현예에서, 이는 또한 N2를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, N-아세틸시스테인의 최종 농도는 약 1 nM 내지 약 100 nM, 약 5 nM 내지 약 50 nM, 약 10 nM 내지 약 50 nM, 약 10 nM 내지 약 30 nM, 또는 약 25 nM이다.

[0191] 일부 구현예에서 배양 배지는 ROCK 저해제(Rho-키나제 저해제)를 추가로 포함한다. ROCK 저해제는 새로운 배양을 확립하는 경우 및/또는 세포를 분할(계대)하는 경우 세포의 부착을 위해 특히 유용하다. 적합한 ROCK 저해제는 당분야에 알려져 있고 상업적으로 이용 가능하다(비제한적으로 모두 Tocris로부터 이용 가능한, GSK 269962, GSK 429286, H 1152 디하이드로클로라이드, 글리실-H 1152 디하이드로클로라이드, SR 3677 디하이드로클로라이드, SB 772077B 디하이드로클로라이드 및 Y-27632 디하이드로클로라이드가 포함됨). 일부 구현예에서, ROCK 저해제는 1 μM 내지 100 μM, 1 μM 내지 50 μM, 또는 5 μM 내지 20 μM의 최종 농도이다. 일부 구현예에서, ROCK 저해제는 임의로 약 10 μM의 최종 농도의, Y-27632이다

[0192] 바람직한 구현예에서, 배양 배지는 트롬보포이에틴을 함유하지 않는다.

[0193] 배양 배지는 우태 혈청 또는 송아지태 혈청과 같은 정의되지 않은 성분을 포함하지 않는 것이 바람직하다. 다양한 상이한 혈청 대체 제형물이 상업적으로 이용 가능하고 당업자에게 알려져 있다. 혈청 대체물이 사용되는 경우, 이는 종래의 기법에 따라, 배지의 약 1부피% 내지 30부피%로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 혈청 비함유이다.

[0194] 본 발명의 바람직한 배양 방법은 또한 영양공급 세포가 요구되지 않으므로 유리하다. 영양공급 세포층은 종종 줄기 세포의 배양을 지지하기 위해, 그리고 이의 분화를 저해하기 위해 사용된다. 영양공급 세포의 사용은 이것이 세포의 계대를 복잡하게 하므로(세포가 각각의 계대에서 영양공급 세포로부터 분리되어야 하며, 새로운 영양공급 세포가 각각의 계대에 요구됨) 요망되지 않는다. 영양공급 세포의 사용은 또한 영양공급 세포로 요망되는 세포의 오염을 야기할 수 있다. 이는 임의의 의학적 적용에 있어서 명확히 문제가 되며, 심지어 연구 맥락에서도, 세포 상에서 수행되는 임의의 실험 결과의 분석을 복잡하게 한다.

[0195] 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 방법, 배지 및 조성물은 영양공급 세포-비함유이다. 조성물은 통상적으로 조성물 중 세포가 영양공급 세포층의 부재 하에 적어도 1 계대 동안 배양된 경우 영양공급 세포-비함유인 것으로 간주된다. 본 발명의 영양공급 세포-비함유 조성물은 보통 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만(조성물 중 총 세포수의 %로 표현됨)을 함유하거나, 바람직하게는 영양공급 세포를 전혀 함유하지 않을 것이다.

[0196] 본 발명의 배양 배지는 탈이온, 증류수에서 제형화될 것이다. 본 발명의 배양 배지는 전형적으로 오염을 방지하기 위해 사용 전에, 예로, 자외선, 가열, 조사 또는 여과에 의해 멸균화될 것이다. 배양 배지는 보관 또는 수송을 위해 냉동될 수 있다(예로 -20℃ 또는 -80℃에서). 배지는 오염을 방지하기 위해 하나 이상의 항생제를 함유할 수 있다. 배지는 ml 당 0.1 내독소 단위 미만의 내독소 함량을 가질 수 있거나, ml 당 0.05 내독소 단위 미만의 내독소 함량을 가질 수 있다. 배양 배지의 내독소 함량을 결정하는 방법은 당분야에 알려져 있다.

[0197] 바람직한 세포 배양 배지는 카보네이트-기반 완충액으로 pH 7.4(바람직하게는 pH 7. 2 ~ 7.6 또는 적어도 7.2이고 7.6 이하)로 완충되는 정의된 합성 배지인 반면, 세포는 5% 내지 10% CO2, 또는 적어도 5%이고 10% CO2, 바람직하게는 5% CO2 이하를 포함하는 분위기에서 배양된다.

[0198] 본 발명은 또한 상술된 본 발명의 임의의 하나의 양태에 따른 세포 및/또는 오가노이드, 및 상술된 본 발명의 임의의 하나의 양태에 따른 배양 배지를 포함하는 조성물 또는 세포 배양 용기를 제공한다. 예를 들어, 이러한 조성물 또는 세포 배양 용기는 상술된 배양 배지 중, 본 발명의 방법에 따라 배양된 임의의 수의 세포 또는 오가노이드를 포함할 수 있다.

[0199] 본 발명의 추가 양태에 따르면, 본 발명의 배양 배지를 함유하는 습윤-밀봉 용기가 제공된다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 증식 배지이다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 분화 배지이다. 습윤-밀봉 용기는 오염을 방지하기 위해, 배양 배지의 수송 또는 보관을 위해 바람직할 수 있다. 용기는 플라스크, 플레이트, 병, 단지, 바이알 또는 백과 같은 임의의 적합한 용기일 수 있다.

[0200] **본 발명에서 사용하기 위한 예시적인 배양 배지**

[0201] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 인테그린 작용제, 하나 이상의 수용체 티로신 키나제 리간드(예로 EGF 및/또는 HGF), BMP 저해제(예로 노긴) 및 TGF-β 저해제(예로 A83-01)를 포함한다. 상기 배양 배지는 임의로 하나 이상의 Wnt 작용제(예로 Lgr5 작용제)를 추가로 포함한다. 이들 배지는 모든 조직, 예를 들어, 내장, 위, 췌장, 간, 전립샘, 유방 및 폐를 위해 적합하다.

[0202] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 (i) FGF7 및/또는 FGF10, (ii) 노긴, (iii) Lgr5 작용제 및 (iv) 인테그린 작용제를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 (i) FGF7 및/또는 FGF10, (ii) 노긴, (iii) Lgr5 작용제, (iv) 하나 이상의 추가 수용체 티로신 키나제 리간드(예를 들어, EGF) 및 (v) 인테그린 작용제를 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 ErbB3/4 리간드(예로 인간 뉴레굴린 β-1)를 추가로 포함한다. 이는 특히, 그러나 비제한적으로, 유방 줄기 세포를 배양하기 위해 적합한 배양 배지이다.

[0203] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 인테그린 작용제, EGF, FGF(예로 FGF10), HGF, TGF-β 저해제(예로 A83-01), 니코틴아미드, 하나 이상의 Wnt 작용제(예로 Lgr5 작용제), cAMP 경로 활성화제(예로 포스콜린) 및 가스트린을 포함한다. 상기 배양 배지는 임의로 (i) BMP 저해제(예로 노긴), Wnt 작용제(예로 Wnt 조정된 배지) 및 Rock 저해제(예로 Y27632) 또는 (ii) BMP 활성화제(예로 BMP7)를 추가로 포함한다. 이들 배양 배지는 특히, 그러나 비제한적으로 간 줄기 세포를 배양하기 위해 적합하다.

[0204] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 인테그린 작용제, 하나 이상의 수용체 티로신 키나제 리간드(예로 EGF), BMP 저해제(예로 노긴) 및 하나 이상의 Wnt 작용제(예로 Lgr5 작용제)를 포함한다. 상기 배양 배지는 임의로 테스토스테론을 추가로 포함한다. 이들 배양 배지는 특히, 그러나 비제한적으로 전립샘 줄기 세포를 배양하기 위해 적합하다.

[0205] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 p38 MAP 키나제 저해제(예를 들어, SB 202190), 가스트린 및/또는 니코틴아미드로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 추가로 포함한다.

[0206] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 Rock 저해제(예로 Y27632)를 추가로 포함한다. Rock 저해제의 첨가는 배양의 시작 또는 분할을 위해 유용한 것으로 관찰되었다.

[0207] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 B27 및/또는 N-아세틸시스테인을 추가로 포함한다. 이들 추가 성분은 종종 기본 배지의 성분으로서 배양 배지에 첨가된다.

[0208] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 인테그린 작용제, Lgr5 작용제, BMP 저해제(예를 들어, 노긴), B27, N-아세틸시스테인, 니코틴아미드, ROCK 저해제, TGF-베타 저해제(예를 들어, A83-01), p38 MAP 키나제 저해제(예를 들어, SB 202190), FGF7 및 FGF10, 및 임의로 하기로부터 선택되는 하나 이상의 추가 성분을 포함한다: 하나 이상의 추가 수용체 티로신 키나제 리간드(예를 들어, EGF, 앰피레굴린, TGF-알파, PDGF), p53 안정화제 및 Wnt 작용제(예를 들어, Wnt3a).

[0209] 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 (i) 인테그린 작용제, (ii) 하나 이상의 수용체 티로신 키나제 리간드(예로 EGF 및/또는 HGF), (iii) BMP 저해제(예로 노긴) 및 (iv) TGF 베타 저해제(예로 A83-01), p38 저해제(예로 SB202190) 및/또는 Rock 저해제(예로 Y-27632)를 포함하며, 임의로 하나 이상의 Wnt 작용제(예로 Lgr5 작용제)를 추가로 포함한다.

[0210] 일부 구현예에서, 배양 배지는 (i) 가스트린 및/또는 니코틴아미드, (ii) Notch 저해제(예로 DAPT 및/또는 DBZ) 및/또는 (iii) 프로스타글란딘 경로 활성화제(예로 PGE2 및/또는 AA)를 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 본 발명의 배양 배지는 (i) 인테그린 작용제, (ii) 하나 이상의 수용체 티로신 키나제 리간드(예로 EGF 및/또는 HGF), (iii) BMP 저해제(예로 노긴) 및 (iv) 가스트린, 니코틴아미드, Notch 저해제(예로 DAPT 및/또는 DBZ) 및/또는 프로스타글란딘 경로 활성화제(예로 PGE2 및/또는 AA)를 포함한다.

[0211] 일부 구현예에서, 배양 배지는 cAMP 경로 활성화제(예로 포스콜린) 및/또는 BMP 경로 활성화제(예로 BMP7)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 배양 배지는 BMP 경로 활성화제(예로 BMP7)를 포함하며 BMP 경로 저해제(예로 노긴)를 포함하지 않는다. 이들 배양 배지는 특히, 비제한적으로 간 또는 췌장 줄기 세포를 배양하기 위해 적합하다.

[0212] 일부 구현예에서, 하나 이상의 수용체 티로신 키나제 리간드는 EGF 및/또는 FGF7 및/또는 FGF10과 같은, FGFR2b의 하나 이상의 리간드(예로 1, 2, 3, 4, 또는 4개 초과)이다.

[0213] 일부 구현예에서, BMP 저해제는 노긴이다.

[0214] 일부 구현예에서, 하나 이상의 Wnt 작용제는 Lgr5 작용제, Lgr4 작용제, Lgr6 작용제 또는 Wnt3a이다. 일부 구현예에서, Lgr5 작용제는 R스폰딘, 예로 R스폰딘 1~4 중 임의의 하나이다.

[0215] 일부 구현예에서, 배양 배지는 ErbB3/4 리간드(예로 인간 뉴레귤린 β-1)를 추가로 포함한다.

[0216] 인간 상피 줄기 세포가 배양되는 경우, Wnt3a가 유리하게 배양 배지에 첨가될 수 있다.

[0217] 일부 구현예에서, 배양 배지는 기본 배지를 포함하며 인테그린 작용제, 하나 이상의 수용체 티로신 키나제 리간드(예로 EGF, FGF 및 HGF로부터 선택됨), Notch 저해제(예로 DAPT), 글루코코르티코이드(예로 덱사메타손), TGF-베타 저해제(예로 A83-01) 및 하나 이상의 Wnt 저해제(예로 (i) 임의로 IWP 2, LGK974 및 IWP 1로부터 선택되는, Porc 저해제, 및/또는 (ii) 임의로 iCRT3, CGP049090, PKF118310, PKF115 584, ZTM000990, PNU 74654, BC21, iCRT5, iCRT14 및 FH535로부터 선택되는 β-카테닌 표적 유전자 발현의 저해제)를 추가로 포함하는 분화 배지이다. 일부 구현예에서 분화 배지는 GSK-3 저해제(예로 CHIR99201)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서 분화 배지는 AP-1 자극제(예로 카바콜(carbachol))을 추가로 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서 배양 배지는 EGF, FGF19, HGF, DAPT, IWP2, iCRT3, 덱사메타손, CHIR99021 및 카바콜을 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, 배양 배지는 기본 배지를 포함하고 인테그린 작용제, 하나 이상의 EGFR 경로 저해제(예로 게피티닙(Gefitinib), 아파티닙(Afatinib), MEK 저해제(예로 PD0325901) 및/또는 ERK 저해제(예로 SCH772984)), Notch 저해제(예로 DAPT) 및 하나 이상의 Wnt 저해제(예로 (i) 임의로 IWP 2, LGK974 및 IWP 1로부터 선택되는, Porc 저해제, 및/또는 (ii) 임의로 iCRT3, CGP049090, PKF118310, PKF115 584, ZTM000990, PNU 74654, BC21, iCRT5, iCRT14 및 FH535로부터 선택되는, β-카테닌 표적 유전자 발현의 저해제)를 추가로 포함하는 분화 배지이다.

[0219] 임의의 본 발명의 배양 배지에 있어서, 특정 성분은 암 세포를 위해 남겨질 수 있다.

[0220] **오가노이드**

[0221] 본 발명은 본 발명의 배양 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드를 제공한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상피 줄기 세포를 배양하는 방법은 오가노이드를 수득하는 단계 및/또는 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 설명된 바와 같이, 일부 구현예에서, 오가노이드는 종양 오가노이드이다. 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드는 본원에서 "상피 오가노이드"로도 나타낸다. 상피 오가노이드는 선행 기술에 기재되어 있다(예로 022907, WO2010/090513, WO2012/014076, WO2012/168930, WO2015/173425, WO2016/083613, WO2016/083612 및 WO2017/149025 참고).

[0222] 증식을 위해 적합한 배양 배지를 사용하여 수득 가능하거나 수득되는 상피 오가노이드는 적어도 하나의 상피 줄기 세포를 포함하며, 이는 분열하고 추가 상피 줄기 세포를 생산할 수 있거나 분화된 자손을 생성할 수 있다. 상피 오가노이드는 또한 일부 분화된(또는 보다 분화된) 세포 유형을 포함한다. 이들 분화된 세포 유형은 오가노이드의 형성 동안 자연 발생하고 후술된 바와 같이, 오가노이드의 특징적인 구조적 특성에 기여한다. 상피 오가노이드는 이들이 상피 조직 기원의 보다 분화된 세포 유형 특징을 함유하면서, 오가노이드 내에서 상피 줄기 세포 집단의 증식을 유지한다는 점에서 유리하다. 상피 오가노이드가 상피 줄기 세포의 핵심 존재를 유지하면서 그리고 세포의 유전형 및 표현형 온전성을 유지하면서 증식을 계속할 수 있는 시기는 상피 오가노이드를 선행 기술의 여러 오가노이드와 구별하는 중요한 특성이다. 상피 오가노이드는 또한 세포가 시험관내 증식하고, 분화하고, 자가-기원함에 따라 신속히 발생하는 구별되는 구조를 갖는다. 이들 특성은 아래에서 상세히 기재되어 있다. 상피 오가노이드는 또한 본원에서 기재된 바와 같은, 분화를 위해 적합한 배양 배지에서 후속 배양될 수 있고, 이는 상피 오가노이드에서 분화된 세포의 비율을 증가시킨다.

[0223] 이미지 분석이 세포 형태; 세포 구조; 아폽토시스 또는 세포 용해의 증거; 및 오가노이드 조성 및 구조와 같은 배양에서의 세포 특징을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 주사 전자 현미경 및 투과 전자 현미경과 같은 전자 현미경, 공초점 현미경, 입체현미경, 형광 현미경과 같은 여러 유형의 조영 분석이 당분야에 잘 알려져 있다. 조직학적 분석은 기본적 구조 및 세포 유형을 드러낼 수 있다.

[0224] 일부 구현예에서, 상피 오가노이드는 3차원 구조를 갖는다, 즉 오가노이드는 3차원 오가노이드이다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 상피 세포만 포함한다, 즉 비-상피 세포는 오가노이드에 부재한다. 이는 상피 줄기 세포를 증식시키기 위해 적합한 배양 배지가 상피 줄기 세포를 증식시키기 위해 특별히 설계되기 때문이다. 따라서, 다른 세포 유형이 배양 배지에, 예로 본 발명의 시작 물질인 조직 단편에 일시적으로 존재하더라도, 이들 세포

는 생존할 수 없을 것이고 대신에 순수한 상피 세포 집단을 생성하는 줄기 세포의 더 장기 증식에 의해 대체될 것이다.

[0225] 일부 구현예에서, 오가노이드 내 상피 세포는 관강을 둘러싼다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 관강을 포함하지 않는다(특히 종양 오가노이드는 일반적으로 관강을 갖지 않음). 일부 구현예에서, 상피 세포는 분극화된다(단백질이 상피 세포의 첨단 또는 기저측면 상에서 차별적으로 발현됨을 의미함). 일부 구현예에서 관강은 밀봉된 관강이다(연속적 세포 장벽이 관강의 내용물을 오가노이드를 둘러싼 배지로부터 분리함을 의미함). 일부 구현예에서 오가노이드는 활발하게 분열하고, 예로 오가노이드 또는 세포가 분화 배지로 전달되는 경우, 대응하는 생체내 조직에 존재하는 모든 주요 분화된 세포주로 바람직하게 분화할 수 있는 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 외부측 상에 기본 세포 및 중심에 보다 분화된 세포를 포함한다.

[0226] 일부 구현예에서, 오가노이드는 층화된 상피를 포함한다. "층화된"이란 여러(하나를 초과하는) 층의 세포가 존재함을 의미한다. 이러한 세포는 이의 핵이 종종 세포에 대해 보다 중심에 있는, 즉 분극화되지 않는 경향이 있다. 다층 섹션에서의 세포는 이들 스스로 세포 간에 갭, 또는 관강을 포함하도록 구성될 수 있다.

[0227] 일부 구현예에서 오가노이드는 폴딩되어(또는 오목화되어) 줄기 세포 및 분화된 세포 구획을 형성하는 하나의 단층을 포함한다. 상기 구현예에서, 상피층에 의해 둘러싸인 중심의 밀봉된 관강이 존재할 필요는 없다 - 대신 3차원 오가노이드를 둘러싼 상피의 폴딩이 효과적으로 해제되고 단일층으로 제시된다. 때때로 폴딩된(또는 오목화된) 단층 및 층화된 세포 영역을 구별하는 것이 어려울 수 있다. 일부 구현예에서 오가노이드는 층화된 세포 영역 및 폴딩된 단층 영역을 모두 포함한다. 일부 구현예에서 본 발명의 오가노이드는 다층으로 형성된 섹션 및 세포의 하나의 단층을 포함하는 섹션을 갖는다. 일부 구현예에서 본 발명의 오가노이드는 세포의 하나의 단층을 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 단층을 포함하지 않는다.

[0228] 본 발명에 따른 오가노이드는 적어도 하나의 싹(bud) 및 중심 관강을 갖는 세포층을 보유할 수 있다.

[0229] 일부 구현예에서 본 발명의 오가노이드는 상피 세포를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 한 층의 상피 세포를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서 비-상피 세포는 오가노이드에 부재한다.

[0230] 일부 구현예에서, 오가노이드는 적어도 2개월, 예를 들어 적어도 10주, 적어도 12주, 적어도 14주, 적어도 16주, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 9개월, 적어도 1년 동안 본 발명의 증식 배지에서 배양되었거나 배양될 수 있다.

[0231] 일부 구현예에서, 오가노이드는 적어도 5 계대, 적어도 10 계대, 적어도 15 계대, 또는 적어도 20 계대 동안 배양되었거나 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 오가노이드 또는 상피 줄기 세포 집단은 적어도 10 계대 동안 배양된다.

[0232] 일부 구현예에서, 오가노이드의 세포수는 5 계대, 10 계대, 15 계대, 또는 20 계대에 걸쳐 지수적으로 증가한다. 하나의 바람직한 구현예에서, 오가노이드 또는 상피 줄기 세포 집단의 세포수는 5 계대에 걸쳐 지수적으로 증가한다.

[0233] 일부 구현예에서, 오가노이드는 최대폭 지점에서의 지름이 적어도 50 μm, 적어도 60 μm, 적어도 70 μm, 적어도 80 μm, 적어도 90 μm, 적어도 100 μm, 적어도 125 μm, 적어도 150 μm, 적어도 175 μm, 적어도 200 μm, 적어도 250 μm 이상이다.

[0234] 본 발명의 맥락 내에서, 조직 단편은 성체 조직, 바람직하게는 인간 성체 조직의 일부이다. 대조적으로 오가노이드는 시험관내 증식을 통해 구조적 특성을 개발하며, 이에 따라 조직 단편과 구별된다.

[0235] 하나의 바람직한 구현예에서, 오가노이드는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10주 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개월 이상 동안 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 적어도 3개월, 바람직하게는 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 9개월, 또는 적어도 12개월 이상 동안 배양에서 증식되거나 유지된다. 유리하게는, 본 발명에 의해 제공되는 배양 방법의 사용은 세포 또는 오가노이드가 장기 배양되는 경우 염색체의 수가 안정하게 유지되는 오가노이드 및/또는 세포 집단의 형성을 초래한다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드 또는 상피 줄기 세포 집단은 본 발명의 배양 배지에서 배양 중 2, 4, 6, 8, 10, 12 또는 14주 후 또는 4, 5, 6개월 이상 후 안정한 염색체수를 갖는다. 바람직하게는, 적어도 65%, 적어도 70%, 보다 바람직하게는 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 보다 바람직하게는 적어도 95%, 보다 바람직하게는 적어도 99%의 세포가 본 발명의 배양 배지에서 2, 4, 6, 8, 10, 12 또는 14주 후 또는 4, 5, 6개월 이상 배양 후 정확한 수의 염색체를 갖는다. 인간 상피 세포에 있어서, 정확한 염

색체 수는 46이다. 일부 구현예에서, 오가노이드는 정상 핵형을 갖는다. 핵형을 결정하는 하나의 방법은 중기 확산 분석에 의한다. 당연히, 예로 종양 줄기 세포로부터 유래되는, 종양 오가노이드 내 종양 세포는, 게놈 불안정성이 특정 암의 특성이므로, 반드시 정확한 염색체 수를 갖지는 않을 것임이 이해되어야 한다.

[0236] 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 종양 오가노이드이다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 비암성 상피 줄기 세포의 배양으로부터의 생성 오가노이드와 유사한, 조밀한 구조이다. 다른 구현예에서, 종양 오가노이드는 낭성 구조이다. 일부 구현예에서, 상이한 환자로부터 유래되는 종양 오가노이드는 상이한 형태를 나타낸다. 오가노이드 형태는 명시야 현미경측정이 포함되는 이미지 분석과 같은 기법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0237] 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 종양-특이적 조직병리적 변화 또는 특징을 보유한다. 이러한 변화는 동일한 환자로부터의 종양 조직으로부터 유래되는 오가노이드 및 인접한 상피를 비교함으로써 및/또는 종양 오가노이드를 일차 조직 표본과 비교함으로써 확인될 수 있다.

[0238] 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 조밀한 또는 낭성 구조이다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 암화된 상피 종양 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 주로 암화된 상피 종양 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 암화된 상피 종양 세포만을 함유한다(즉 암화되지 않은 상피 세포는 종양 오가노이드에 부재함). 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 면역-, 연결 조직- 및/또는 용기-요소를 포함하지 않는다. 당업자는 암화된 상피 종양 세포의 존재가 케라틴(KRT5) 면역-염색이 포함되는 다양한 방법에 의해 평가될 수 있음을 이해할 것이다.

[0239] 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 Nutlin-3과 같은 Mdm2 작용제를 추가로 포함하는 본 발명의 배양 배지에서의 배양에 의해 선택된다. Mdm2 작용제는 배양 공정의 전체 또는 부분 동안 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, Nutlin-3은 약 10 μM의 농도로 존재한다. Nutlin-3은 p53 야생형 세포의 성장을 방지한다. P53은 종양 저해인자 유전자이다. 따라서, 예를 들어 p53 유전자의 돌연변이 또는 p53의 다른 조절-이상에 의해 유도되는, 감소된 p53 기능은 종양발생의 공통 원인이다. 따라서 Nutlin-3의 존재 하의 오가노이드 배양은 감소된 수준의 p53 또는 감소된 p53 활성을 갖는 오가노이드를 선택하였고 종양 오가노이드를 선택하기 위한 방법으로 사용될 수 있다.

[0240] 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드 및 종양 오가노이드는 상이한 트랜스크립톰 프로필을 갖는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 함께 클러스터링되며 본 발명의 종양 오가노이드는 트랜스크립톰 분석의 주성분 분석에 기반하여 함께 클러스터링된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드 및 종양 오가노이드는 차별적 유전자 발현을 갖는다. 예를 들어, KLK6 및/또는 EHF는 HNSCC 종양 오가노이드에서 하향조절된다. 반면에, SLCOB1, HOXC13, CALB1, NTS 및/또는 BCHE는 HNSCC 종양 오가노이드에서 상향조절된다. 비-종양 오가노이드 및 종양 오가노이드 간 차별적 발현을 나타낼 수 있는 추가 유전자에는 SDC2, HOXA1, NXPE3 및/또는 HOXC10이 포함된다. 일부 구현예에서, 대응하는 비-종양 오가노이드 및 종양 오가노이드가 비교되는 경우, 50개 초과의 차별적으로 발현되는 유전자, 100개 초과의 차별적으로 발현되는 유전자, 200개 초과의 차별적으로 발현되는 유전자 또는 300개 초과의 차별적으로 발현되는 유전자가 존재한다.

[0241] 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 종양 대비 검출된 돌연변이의 가변적 대립유전자 빈도의 농축을 갖는다. 변이체 대립유전자 빈도는 돌연변이가 샘플 내에서 검출되는 빈도를 나타내며, 예를 들어 이는 특정 돌연변이를 함유하는 시퀀싱 분석으로부터의 판독 백분율로 주어질 수 있다.

[0242] 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드에서의 유전적 변경은 오가노이드가 유래되는 종양의 유전적 변경을 되풀이한다. 유전적 변경에는 단일 뉴클레오티드 변이체 및 소형 삽입 및 결실이 포함된다. 일부 구현예에서, 암 세포로부터 유래되지 않는 본 발명의 오가노이드는 암 세포로부터 유래되는 본 발명의 종양 오가노이드보다 적은 유전적 변경을 함유한다.

[0243] 염색제 분리-이상은 인간 종양에서 빈번하게 관찰되는 이수배수체를 강조한다. 염색체 분리 오류에는 후기 가교 및 다극 분열을 거치고 있는 2-핵화 세포가 포함된다. 분리-이상 비율의 증가는 염색체 불안정성으로 알려진 표현형을 초래하며, 이는 암에서 일반적으로 관찰된다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 염색체 불안정성을 실증한다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 암 세포가 아닌 세포로부터 유래되는 오가노이드 대비 증가된 비율의 염색체 분리 오류를 갖는다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 후기 가교 및/또는 다극 분열을 거치고 있는 2-핵화 세포가 포함되는, 증가된 비율의 염색체 분리 오류를 갖는다.

[0244] 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 정상 핵형을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 종양 오가노이드는 이수배수체를 나타낸다. 오가노이드의 핵형, 즉 염색체의 수는 중기 확산 분석에 의해 결정될 수 있다.

[0245] 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 피하 이식되는 경우 종양원성이다. 인간 오가노이드의 종양원성 잠재력은 마우스 내로의 상기 오가노이드의 피하 이식에 의해 결정될 수 있다. 전형적으로 비-종양 오가노이드의 피하 이식은 오가노이드의 종양 형성 또는 적어도 증식을 초래하지 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 종양 오가노이드는 배양에서 그 종양원성 잠재력을 초래하며 피하 이식 후 모체 종양과 유사한 특성을 갖는 종양을 형성할 수 있다. 이러한 특징에는 암성, 3극 유사분열 모양, 핵 다형성 및/또는 근육 침습으로 간주되는 비정형 수준이 포함될 수 있다.

[0246] 본 발명의 증식 오가노이드는 바람직하게는 적어도 50% 생활성 세포, 보다 바람직하게는 적어도 60% 생활성 세포, 보다 바람직하게는 적어도 70% 생활성 세포, 보다 바람직하게는 적어도 80% 생활성 세포, 보다 바람직하게는 적어도 90% 생활성 세포를 포함한다. 세포의 생활성은 FACS에서 Hoechst 염색 또는 프로피듐 요오다이드 염색을 사용하여 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 하나 이상의 냉동된 오가노이드가 제공된다. 또한 오가노이드 배양을 해리하는 단계 및 이들을 회수 세포 배양 냉동 배지(Gibco)와 같은 냉동 배지와 혼합하는 단계 및 표준 절차에 따라 냉동하는 단계를 포함하는 냉동을 위한 오가노이드를 제조하는 방법이 제공된다. 냉동된 오가노이드를 해동하는 단계, 해동된 오가노이드를 세포외 기질(예로 Matrigel)에 포매하는 단계 및 본 발명의 배양 배지에서 오가노이드를 배양하는 단계를 포함하는 냉동된 오가노이드를 해동하는 방법이 또한 제공된다. 유리하게는, 처음에 해동 후 배양 배지에 Y-27632, 예를 들어, 약 10 uM Y-27632가 보충될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양 배지에 해동 후 처음 1, 2, 3, 4, 5일 이하 동안, 바람직하게는 처음 3 또는 4일 동안 Y-27632가 보충된다. 일부 구현예에서, Y-27632는 처음 3, 4, 5, 6일 이상 후, 바람직하게는 처음 3 또는 4일 후 배양 배지에 존재하지 않는다. 상기 냉동 방법이 본 발명의 오가노이드의 증식을 위해 사용될 수 있다.

[0247] 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드 또는 종양 오가노이드는 초저온보존된다.

[0248] **분화**

[0249] 오가노이드, 또는 오가노이드로부터의 세포는 분화 배지로 전달되고 모든 주요한 분화된 세포 계통으로 분화하도록 허용되거나 유도될 수 있다.

[0250] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법은 증식 배지에서 상피 줄기 세포 또는 줄기 세포의 집단을 배양하는 제1 단계 및 분화 배지에서 증식된 세포 또는 증식 오가노이드를 배양하는 제2 단계를 포함한다. 일부 구현예에서 인테그린 작용제는 이들 단계 중 하나에서만 배양 배지에 포함된다. 다른 구현예에서, 인테그린 작용제는 이들 단계 중 둘 다에서 배양 배지에 포함된다.

[0251] 일부 구현예에서, 분화 배지는 하기: 분열촉진 성장 인자, TGF-베타 저해제, 프로스타글란딘 신호전달 경로의 활성화제, Wnt 작용제, cAMP 경로 활성화제, BMP 저해제 및 니코틴아미드(예로 WO2012/168930에 기재된 바와 같음) 중 하나 이상이 포함되지 않는 본원에서 개시된 바와 같은 배양 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 분화 배지는 동물 또는 인간 세포를 위한 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 분화 배지는 EGFR 경로 저해제, Notch 저해제, Wnt 저해제 또는 BMP 경로 활성화제(예로 WO2017220586에 기재된 바와 같음) 중 하나 이상을 추가로 포함한다.

[0252] 일부 구현예에서, 분화 배지에서 상피 줄기 세포 집단의 배양은 성숙한 상피 세포 마커의 발현 수준을 증가시킨다. 당업자는 정량적 PCR이 포함되는, 유전자 또는 단백질 발현을 결정하기 위한 상이한 기법을 인식한다.

[0253] **오가노이드의 용도**

[0254] 본 발명의 오가노이드는 생체내 상황을 충실히 나타낸다. 이는 정상 조직으로부터 성장시킨 오가노이드 및 이환된 조직으로부터 성장시킨 오가노이드 둘 다에 대해 해당한다. 따라서, 본 발명의 오가노이드는 의약 및 진단에서, 그리고 연구 및 약물 개발에서 유용하다. 정상 생체외 세포/기관 모델의 제공뿐만 아니라, 본 발명의 오가노이드는 질환 및/또는 감염의 생체외 모델로서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 오가노이드는 약물 탐색 및 검증, 표적 탐색 및 검증, 독성학, 감염 모델 및 다른 연구 목적이 포함되는 약물 스크리닝을 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 오가노이드에 의해 연구될 수 있는 질환에는 비제한적으로 유전적 질환, 대사 질환, 병리적 질환 및 염증성 질환이 포함된다. 오가노이드는 또한 이식을 위해 적합하며, 이에 따라 재생 의약을 위한 잠재력을 갖는다. 또한, 오가노이드는 임의의 개별 세포로부터 신속하게 성장시킬 수 있고, 이에 따라, 예로 개인맞춤화된 의약의 맥락에서, 적합한 치료 요법을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 오가노이드의 몇몇 용도는 더 이전 출원(예로 WO2009/022907, WO2010/090513, WO2012/014076, WO2012/168930, WO2015/173425, WO2016/083613, 및 WO2016/083612)에 기재되어 있으며 이들 용도가 또한 본 발명의 오가노이드에 적용된다.

[0255] 실시예는 이들을 이러한 용도를 위해 적합하게 만드는 오가노이드의 특성에 대한 상세사항을 제공하며, 추가적인 구체적 실시예가 아래에 제공된다.

[0256] **약물 스크리닝**

[0257] 본 발명은 약물 스크리닝, 표적 검증, 표적 탐색, 독성학 또는 독성학 스크리닝에서 오가노이드(또는 상기 오가노이드로부터 직접 수득된 세포)의 용도를 제공한다.

[0258] 세포는 바람직하게는 소정 시기 동안 여러 농도의 시험 제제에 노출된다. 노출 기간의 말기에, 배양이 평가된다. 오가노이드는 또한 상피 암종 세포를 특이적으로 표적화하는 약물을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 당업자에게는 본 발명의 오가노이드가 감염성, 염증성 및 신생물 병리에 대한 약물 스크리닝 도구로서 널리 적용 가능할 것임이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 약물 스크리닝, 표적 검증, 표적 탐색, 독성학, 독성학 스크리닝 또는 생체외 세포/기관 모델에서 오가노이드의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 임상 결과를 예측하기 위한 생체외 방법에서 오가노이드의 용도를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 암 약물을 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다.

[0259] 일부 구현예에서, 본 발명의 오가노이드는 약물, 화장품 및/또는 예방 의약으로서 사용하기 위한 적합성에 대해 화학물질, 항체, 천연 산물(식물 추출물) 등의 라이브러리를 시험하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 암 환자로부터의 종양 세포와 같은 관심 환자로부터의 세포 생검은 본 발명의 배양 배지 및 방법을 사용하여 배양된 후 화학적 화합물 또는 화학적 라이브러리로 처리될 수 있다. 이어서 어느 화합물이 환자의 세포를 효과적으로 변형하고, 사멸시키고 및/또는 치료하는지를 결정할 수 있다. 이는 특정 약물에 대한 특정 환자 반응성이 시험되는 것을 허용하고 이에 따라 치료가 특정 환자에 맞춤화될 수 있도록 한다. 따라서, 이는 개인맞춤화된 의약 접근을 허용한다. 일부 구현예에서, 약물 스크리닝 방법은 개인맞춤화된 이론을 가이드하고/하거나 임상 결과를 예측하기 위한 생체외 방법이다. 일부 구현예에서, 본 발명은 개인맞춤화된 치료법을 가이드하기 위한 방법에서 사용하기 위한 오가노이드를 제공한다. 상기 방식으로 약물을 확인하기 위해 오가노이드를 사용하는 데 있어서 추가되는 장점은 이것이 어느 약물 및 화합물이 건강한 조직 상에서 최소 효과를 갖는지 확인하기 위해 정상 오가노이드(건강한 조직으로부터 유래된 오가노이드)를 스크리닝할 수 있다는 것이다. 이는 표적을 벗어난 활성 또는 원치않는 부작용을 최소로 갖는 약물에 대한 스크리닝을 허용한다.

[0260] 일부 구현예에서, 본 발명은 후보 화합물의 효과를 시험하는 방법을 제공하며, 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0261] 임의로 21일 미만 동안, 본 발명의 방법에 따라 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포 집단을 배양하는 단계;

[0262] 생성 세포 집단 또는 생성 오가노이드를 후보 화합물 중 하나 또는 라이브러리에 노출시키는 단계;

[0263] 상기 증식된 오가노이드를 임의의 효과에 대해 평가하는 단계,

[0264] 상기 효과를 유도하는 후보 분자를 잠재 약물로서 확인하는 단계; 및 임의로

[0265] 상기 후보 분자를, 예로 약물로 제공하는 단계.

[0266] 일부 구현예에서, 후보 화합물의 효과를 시험하는 방법은 후보 화합물의 존재 또는 부재 하에 오가노이드를 방사선에 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 후보 화합물의 효과를 시험하는 방법에서 평가되는 효과는 증식의 감소, 또는 손실, 형태적 변화, 세포사 또는 유전자 또는 단백질 발현에서의 변화를 포함하는 목록으로부터 선택된다.

[0267] 후보 분자의 라이브러리는 하나를 초과하는 후보 분자를 포함한다.

[0268] 일부 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다:

[0269] 임의로 21일 미만 동안, 본 발명의 방법에 따라 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포 집단을 배양하는 단계;

[0270] 생성 오가노이드 또는 생성 오가노이드로부터 유래되는 세포 집단을 방사선과 같은 치료, 및/또는 후보 분자 중 하나 또는 라이브러리에 노출시키는 단계;

[0271] 상기 오가노이드 또는 세포 집단을 후보 분자의 임의의 효과에 대해 평가하는 단계; 및

[0272] 상기 효과를 오가노이드의 특성, 예를 들어 PIK3CA, KRAS, HRAS 또는 BRAF가 포함되는 EGFR 신호전달 경로에서의 돌연변이와 같은 하나 이상의 유전적 돌연변이의 존재와 연관시키는 단계.

[0273] 일부 구현예에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다:

[0274] 임의로 21일 미만 동안, 본 발명의 방법에 따라 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포 집단을 배양하는 단계;

[0275] 생성 오가노이드 또는 생성 오가노이드로부터 유래되는 세포 집단을 방사선과 같은 치료, 및/또는 후보 분자 중 하나 또는 라이브러리에 노출시키는 단계;

[0276] 상기 오가노이드 또는 세포 집단을 후보 분자의 임의의 효과에 대해 평가하는 단계;

[0277] 상기 효과를 표준 값 및/또는 이전 관찰과 비교하는 단계; 및 임의로

[0278] 임상 결과를 예측하고/하거나 개인맞춤화된 의약을 선택하는 단계.

[0279] 일부 구현예에서, 오가노이드는 환자 생검으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 오가노이드 또는 상기 오가노이드로부터 유래되는 세포 집단에 대해 요망되는 효과를 유도하는 후보 분자가 상기 환자에 투여된다. 따라서, 하나의 양태에서, 하기 단계를 포함하는 환자를 치료하는 방법이 제공된다:

[0280] a) 환자에서 관심 이환된 조직으로부터 생검을 수득하는 단계;

[0281] b) 바람직하게는 본원에서 기재된 바와 같은 상피 줄기 세포를 배양하는 방법을 사용하여, 생검을 배양하여 오가노이드를 수득하는 단계;

[0282] c) 본 발명의 스크리닝 방법을 사용하여 적합한 약물을 확인하는 단계; 및

[0283] d) 상기 환자를 단계 (c)에서 수득된 약물로 치료하는 단계.

[0284] 일부 구현예에서, 본 발명은 환자에 대한 치료 요법을 선택하는 방법을 제공하며, 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0285] 임의로 환자의 조직으로부터 생검을 수득하는 단계;

[0286] 바람직하게는 본원에서 기재된 바와 같은 상피 줄기 세포를 배양하는 방법을 사용하여, 생검, 생검의 조직 단편, 생검의 상피 줄기 세포 또는 생검의 상피 줄기 세포 집단을 배양하여 오가노이드를 수득하는 단계;

[0287] 생성 오가노이드를 방사선 및/또는 하나 이상의 후보 화합물이 포함되는 치료 요법에 노출시키는 단계;

[0288] 상기 오가노이드를 임의의 효과에 대해 평가하는 단계;

[0289] 상기 효과를 유도하는 치료 요법을 확인하는 단계; 및

[0290] 임의로 환자에 상기 치료를 제공하는 단계.

[0291] **이식 및 의약**

[0292] 본 발명은 재생 의약 및/또는 이식에서의 오가노이드의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 치료 방법을 제공하며 여기서 방법은 동물 또는 인간 내로 오가노이드를 이식하는 단계를 포함한다.

[0293] 일부 구현예에서, 본 발명은 진단 또는 의약에서 사용하기 위한 오가노이드를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 진단 또는 의약에서, 임의로 개인맞춤화된 의약 또는 진단, 또는 재생 의약에서 사용하기 위한 오가노이드를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 오가노이드를 투여하는 단계를 포함하는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 질환 치료용 약제의 제조에서의 본 발명의 오가노이드의 용도를 제공한다.

[0294] **인테그린 작용제의 용도**

[0295] 본 발명은 임의로 본원에서 기재된 임의의 배양 방법 및/또는 배양 배지를 사용하여, 세포를 배양하기 위한 본원에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제의 용도를 제공한다.

[0296] 이는 또한 대상체 내로의 세포 이식 전에 세포를 본원에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제와 시험관내 접촉시키기 위해 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 대상체 내로의 이식 전에 세포를 전-처리하기 위한 인테그린 작용제의 용도를 제공한다.

[0297] 이는 또한 세포 이식을 개선하기 위해 대상체에 직접 인테그린 작용제를 투여하기 위해 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 세포 이식 방법에서 세포 접착-증강제로 사용하기 위한 본원에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 제공한다. 본 발명은 또한 대상체 내로 세포를 이식하는 방법을 제공하며, 여기서 방법은 대상체에 본원에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제의 투여 단계를 포함한다.

[0298] 상기 맥락에서 인테그린 작용제로의 전-처리 또는 투여는 세포 접착을 증강시키고 이식 치료법의 성공률을 개선할 것으로 예상된다. 이는, 예로 세포 이식 치료법으로부터 이익을 얻을 수 있는 인간 질환, 당뇨병 또는 임의의 다른 질환의 치료를 위해, 재생 의약에서 유용할 수 있다.

[0299] 인테그린 작용제의 이러한 용도는 상피 줄기 세포에 대해서뿐만 아니라 모든 세포 유형에 대해 유리할 것으로 예상된다. 특히, 이는 조혈 줄기 세포, 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포가 포함되는 줄기 세포에 대해 유리할 것으로 예상된다. 인테그린 작용제의 용도는 조혈 줄기 세포 배양에서 특히 유용할 것으로 예상되며 - 조혈 줄기 세포가 수십 년 동안 여러 병원에서 일상적으로 사용되어왔음에도 불구하고, 아직 이들 세포를 배양에서 유용하게 증식시킬 수 없었다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포는 줄기 세포, 임의로 상피 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 배아 줄기 세포 또는 유도된 다능성 줄기 세포이다.

[0300] **정의**

[0301] 본원에서 사용되는 동사 "포함한다" 및 그 활용은 그 단어를 뒤따르는 품목이 포함되지만, 구체적으로 언급되지 않는 품목이 제외되지는 않음을 의미하기 위해 비제한적 개념으로 사용된다. 또한 동사 "구성된다"는 필요한 경우, 본원에서 정의된 바와 같은 산물이 구체적으로 확인된 것 이외의 추가 성분(들)을 포함할 수 있음을 의미하는 "본질적으로 구성된다"로 대체될 수 있으며, 상기 추가 성분(들)은 본 발명의 고유한 특징을 변경하지 않는다. 또한 본원에서 정의된 바와 같은 방법은 구체적으로 확인된 것 이외의 추가 단계(들)를 포함할 수 있으며, 상기 추가 단계(들)는 본 발명의 고유한 특징을 변경하지 않는다. 또한, 부정 관사 하나("a" 또는 "an")에 의한 요소의 언급은, 맥락 상 명확히 오직 하나의 요소만 존재할 것을 필요로 하지 않는 한, 하나를 초과하는 요소가 존재할 가능성을 배제하지 않는다. 따라서 부정 관사 하나("a" 또는 "an")는 보통 "적어도 하나"를 의미한다.

[0302] 본원에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 나타내는 값이 +/-10%만큼 변할 수 있음을 의미한다. 값은 또한 정확한 값으로 읽힐 수 있고 이에 따라 용어 "약"은 생략될 수 있다. 예를 들어, 용어 "약 100"은 90~110 및 또한 100을 포괄한다.

[0303] 본 명세서에서 인용되는 모든 특허 및 문헌은 본원에서 이의 전문이 참조로 포함된다.

[0304] 환자에 제제를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법에 대한 임의의 언급은 치료를 위해 상기 방법에서 사용하기 위한 제제뿐만 아니라 치료를 위한 상기 방법에서의 제제의 용도, 및 약제의 제조에서 제제의 용도를 또한 커버한다.

[0305] 하기 실시예는 단지 예시적 목적을 위해 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0306] **구현예**

[0307] 본 발명에는 하기 번호를 매긴 구현예가 포함된다.

[0308] 1. 상피 줄기 세포 또는 상피 줄기 세포를 포함하는 오가노이드를 배양하는 방법으로서, 방법이 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지에서 상기 상피 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 배양 방법은 세포 또는 오가노이드를 인테그린 작용제와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0309] 2. 구현예 1에 있어서, 인테그린 작용제가 인테그린의 베타 서브유닛과 상호작용하는 방법.

[0310] 3. 구현예 2에 있어서, 베타 서브유닛이 β1, β2, β3 또는 β7인 방법.

[0311] 4. 구현예 3에 있어서, 인테그린 작용제가 β1 서브유닛과 상호작용하는 방법.

[0312] 5. 구현예 1에 있어서, 인테그린 작용제가 인테그린의 알파 서브유닛과 상호작용하는 방법.

[0313] 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 인테그린 작용제가 항-인테그린 항체, 탈린, 킨들린, 디티오트레이톨 및 옥시스테롤 25-하이드록시콜레스테롤로부터 선택되는 방법.

[0314] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 인테그린 작용제가 항-인테그린 항체인 방법.

[0315] 8. 구현예 7에 있어서, 항-인테그린 항체가 JBS2, HP1/3, SNAKA51, PT25-2, PMI-1, MEM-83, NKI-L16, 496B, 12G10, 8A2, TS2/16, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29, 9EG7, mAb 24, MEM-148, KIM127, CBR LFA-1/2, MEM-48, KIM185, AP3, AP5, LIBS6, LIBS2, 10F8, 2B8, 2G3인 방법.

[0316] 9. 구현예 8에 있어서, 항-인테그린 항체가 TS2/16, 12G10, 8A2, 15/7, HUTS-4, 8E3, N29 또는 9EG7인 방법.

[0317] 10. 구현예 9에 있어서, 항-인테그린 항체가 TS2/16, 12G10 또는 8A2인 방법.

[0318] 11. 구현예 7 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 항체가 인간화된 방법.

[0319] 12. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 인테그린 작용제가 탈린인 방법.

[0320] 13. 구현예 12에 있어서, 탈린이 킨들린과 조합되어 사용되는 방법.

[0321] 14. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 인테그린 작용제가 디티오트레이톨과 같은 환원제인 방법.

[0322] 15. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 인테그린 작용제가 옥시스테롤 25-하이드록시콜레스테롤과 같은 지질인 방법.

[0323] 16. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 방법이 오가노이드의 성장을 초래하는 방법.

[0324] 17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 방법이 인테그린 작용제 없이 수행된 동일한 방법 대비 4일에 걸친 상피 줄기 세포 성장의 적어도 10%, 20%, 50% 증가를 초래하는 방법.

[0325] 18. 구현예 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 방법이 세포외 기질과 접촉된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0326] 19. 구현예 18에 있어서, 세포외 기질이 기저막 추출물 또는 Matrigel인 방법.

[0327] 20. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 방법이 합성 기질과 접촉된 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0328] 21. 구현예 20에 있어서, 합성 기질이 중합체, 임의로 폴리에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 하이드로겔을 포함하는 방법.

[0329] 22. 구현예 20 또는 21에 있어서, 합성 기질이 가교된 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 하이드로겔을 포함하는 방법.

[0330] 23. 구현예 20 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 합성 기질이 생체물질, 바람직하게는 세포외 기질 성분을 포함하는 방법.

[0331] 24. 구현예 23에 있어서, 생체물질이 하나 이상의 당단백질(임의로 콜라겐, 라미닌, 펄레칸, 파이브로넥틴 또는 파이브로넥틴의 RGD 부착 리간드로부터 선택됨) 및/또는 하나 이상의 탄수화물(임의로 히알루론산)인 방법.

[0332] 25. 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 세포외 기질 또는 합성 기질이 3차원인 방법.

[0333] 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 세포외 기질 또는 합성 기질이 현탁 상태인 방법.

[0334] 27. 구현예 1 내지 17 및 20 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 배양 방법에 세포와 외인성 세포외 기질을 접촉시키는 단계가 관여되지 않는 방법.

[0335] 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포가 임의로 오가노이드 및/또는 상피 조직 외식편에 포함되는, 상피 줄기 세포 집단의 일부인 방법.

[0336] 29. 구현예 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 방법이 비-상피 세포 유형, 임의로 면역 세포와의 공동-배양 단계를 포함하는 방법.

[0337] 30. 구현예 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포가 포유류 세포인 방법.

[0338] 31. 구현예 30에 있어서, 상피 줄기 세포가 인간 세포인 방법.

[0339] 32. 구현예 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포가 결장직장, 소장, 위, 췌장, 간, 폐, 유방, 전립샘, 신장, 구강, 코인두, 목, 하인두, 후두, 기관, 피부, 나팔관, 난소, 침샘, 식도, 모낭 및/또는 달팽이 세포로부터 선택되는 방법.

[0340] 33. 구현예 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포가 결장직장 세포인 방법.

[0341] 34. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 Wnt 작용제, BMP 저해제, 분열촉진 성장 인자 및 TGF-베타 저해제 중 하나 이상을 포함하는 방법.

[0342] 35. 구현예 34에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 Wnt 작용제를 포함하는 방법.

[0343] 36. 구현예 35에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 분열촉진 성장 인자 및/또는 BMP 저해제를 추가로 포함하는 방법.

[0344] 37. 구현예 34 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 Wnt 작용제, BMP 저해제, 분열촉진 성장 인자 및 TGF-베타 저해제를 포함하는 방법.

[0345] 38. 구현예 34 내지 37 중 어느 하나에 있어서, Wnt 작용제가 R-스폰딘 패밀리 단백질, 분비된 당단백질의 Wnt 패밀리의 Wnt 리간드, 세포내 β-카테닌 분해의 저해제, GSK-3 저해제, TCF/LEF의 활성화제, 및 RNF43 또는 ZNRF3의 저해제 중 하나 이상으로부터 선택되는 방법.

[0346] 39. 구현예 34 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 분열촉진 성장 인자가 EGFR, FGFR 또는 HGFR과 같은 수용체 티로신 키나제에 결합하는 방법.

[0347] 40. 구현예 34 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 분열촉진 성장 인자가 EGF, FGF 및 HGF 중 하나 이상인 방법.

[0348] 41. 구현예 34 내지 40 중 어느 하나에 있어서, BMP 저해제가 노긴인 방법.

[0349] 42. 구현예 34 내지 41 중 어느 하나에 있어서, TGF-베타 저해제가 ALK4, ALK5 또는 ALK7 신호전달 경로의 저해제인 방법.

[0350] 43. 구현예 34 내지 42 중 어느 하나에 있어서, TGF-베타 저해제가 A83-01과 같은 소분자 저해제인 방법.

[0351] 44. 구현예 34 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 니코틴아미드, 가스트린, B27 및 N-아세틸시스테인 중 하나 이상을 추가로 포함하는 방법.

[0352] 45. 구현예 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 상피 줄기 세포를 증식시키기 위해 적합한 방법.

[0353] 46. 구현예 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상피 줄기 세포를 위해 적합한 배양 배지가 상피 줄기 세포를 분화시키기 위해 적합한 방법.

[0354] 47. 구현예 34 내지 46 중 어느 하나에서 정의된 바와 같은 배양 배지로서, 배양 배지가 구현예 2 내지 15 중 어느 하나에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 추가로 포함하는 배양 배지.

[0355] 48. 구현예 18 내지 27 중 어느 하나에서 정의된 바와 같은 세포외 기질 또는 합성 기질로서, 기질이 구현예 2 내지 15 중 어느 하나에서 정의된 바와 같은 인테그린 작용제를 추가로 포함하는 기질.

[0356] 49. 구현예 1 내지 46 중 어느 하나의 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 오가노이드.

[0357] 50. 구현예 49에 있어서, 오가노이드가 정상 핵형을 갖는 오가노이드.

[0358] 51. 구현예 49 또는 50에 있어서, 오가노이드가 로제트-유사 구조를 갖는 오가노이드.

[0359] 52. 구현예 49에 있어서, 오가노이드가 종양 오가노이드인 오가노이드.

[0360] 53. 구현예 47에 따른 배양 배지, 및 구현예 49 내지 52 중 어느 하나에 따른 오가노이드를 포함하는 조성물.

[0361] 54. 구현예 47의 배양 배지, 및 임의로 구현예 18 내지 27 중 어느 하나에 정의된 바와 같은 세포외 기질 또는 합성 기질을 포함하는 조성물.

[0362] 55. 세포를 배양하기 위한 인테그린 작용제의 용도.

[0363] 56. 대상체 내로의 이식 전에 세포를 전-처리하기 위한 인테그린 작용제의 용도.

[0364] 57. 세포 이식 방법에서 세포 접착-증강제로 사용하기 위한 인테그린 작용제.

[0365] 58. 구현예 53 또는 54 또는 56에 있어서, 세포가 줄기 세포, 임의로 상피 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 배아 줄기 세포인 용도, 또는 사용하기 위한 인테그린 작용제.

[0366] 59. 약물 스크리닝, 표적 검증, 표적 탐색 또는 독성학을 위한, 구현예 49 내지 52 중 어느 하나에 따른 오가노이드의 용도.

[0367] 60. 치료법에서 사용하기 위한 또는 진단에서 사용하기 위한, 구현예 49 내지 52 중 어느 하나에 따른 오가노이

드.

[0368] **실시예**

[0369] 실시예 1 - 인간화된 TS2/16 항체의 생산

[0370] U-Protein Express BV, Utrecht, The Netherlands에서 인간화된 TS2/16 항체를 생산하였다. 여기에는 합성 유전자 설계 및 코돈 최적화를 통한 항체 가변 도메인의 코딩 서열의 생성이 관여되었다. 중쇄 및 경쇄의 불변 영역과 같은 프레임으로, 5' 및 3' 말단 상에서 BsmBI 제한 부위를 사용하여 항체 발현 벡터 내로의 항체 가변 도메인 합성 단편의 결찰에 의해 발현 벡터를 생성. rPEx 기술을 통해 HEK293 세포 또는 CHO 세포에서 항체 발현 벡터를 일시적으로 생산한 후, 친화도 크로마토그래피(단백질 A), 이온 교환 크로마토그래피 및/또는 및 겔 여과 크로마토그래피를 통해 재조합 항체를 후속 정제.

[0371] 인간화된 항체를 비-환원성 조건 하에 NU-PAGE 트리스-아세테이트 겔/SDS 완충액 시스템(Invitrogen)을 사용하여 분석하였고 생성 NuPAGE 겔은 도 2에서 볼 수 있다. 1:1 및 1:1.5 비의 중쇄 및 경쇄에 대한 발현 플라스미드의 전달감염은 겔 상에서 1:3의 비보다 더 강력한 단백질 밴드를 생산하였다. 인간화된 항체의 중쇄 및 경쇄를 시퀀싱하였고 각각 서열 목록 번호 3 및 4로 확인되었다. 중쇄 및 경쇄의 CDR 영역은 각각 서열 목록 번호 5~7 및 8~10으로 확인되었다.

[0372] 실시예 2 - 인간화된 TS2/16 항체에 의한 인테그린 β1 인식의 시험

[0373] K562 세포(인간 불멸화된 골수성 백혈병 세포주)를 조정된 배지에서 인간화된 TS2/16 항체와 함께 인큐베이션하였다. 인간 적백혈병 세포주 K562는 표면 상에 β1 클래스 인테그린으로서 α5β1만 발현한다[17]. 항체 결합을 1:250의 희석도로 PBS 1% BSA 중 Alexa 488에 콘주게이션된 염소 항-huIgG1(Life Technologies (A11013)과 세포의 인큐베이션을 사용하여 가시화하였다(도 3). 결과는 항체가 세포 표면 상의 인테그린에 성공적으로 결합함을 실증한다.

[0374] 실시예 3 - 인간화된 TS2/16 항체의 기능적 활성 확인

[0375] 인간화된 TS2/16 항체가 파이브로넥틴으로의 세포 접착을 유도하는 능력을 [17]에 기재된 바와 같이 시험하였다. 간략하게, 96-웰 플레이트를 BSA 또는 파이브로넥틴(PBS 중 5 μg/ml)으로 하룻밤 동안 코팅하였다. 이후 임의의 비-특이적 결합 부위를 PBS 중 1% BSA로 30분 동안 차단하였다. 인간 적백혈병 세포주 K562 세포(10^5 세포/웰)를 인간화된 TS2/16의 존재 또는 부재 하에 37℃에서 1 hr 동안 인큐베이션하였다. 실험을 3회씩 수행하였다. 웰을 PBS로 2회 헹구어 미결합 세포를 제거하였다. 결합된 세포를 세포성 ATP-유도 CellTiterGlo 검정(Promega)을 사용하여 정량하였다. 간략하게, CellTiter-Glo® 검정은 존재하는 ATP의 정량에 기반하여 배양 중 생활성 세포수를 결정하며, 이는 대사 활성 세포의 존재를 신호한다.

[0376] 도 4는 인간화된 TS2/16 항체가 대조군 BSA로가 아니라 항체의 비-인간화된 버전에 대해 이전에 실증된 바와 같이 파이브로넥틴으로의 세포 접착을 유도할 수 있음을 실증한다.

[0377] 유사한 실험을 β1 인테그린 서브유닛을 표적화하는 또 다른 항-인테그린 작용제 항체인 MAB1778 항체로 수행하였다. MAB1778도 이들 세포의 접착을 유도할 수 있었다.

[0378] 실시예 4 - 임의의 세포외 기질 성분이 없는 배양 배지 중 상피 줄기 세포의 배양

[0379] 본 발명자들은 인테그린 작용제의 첨가가 임의의 외인성으로 첨가된 세포외 기질 성분을 포함하지 않는 배양 배지에서 상피 줄기 세포 성장을 허용할 것인지 시험하였다. 이전에 언급된 바와 같이, 배양 배지에서 세포외 기질의 존재는 효율적 상피 줄기 세포 성장을 위해 알려진 요구조건이다.

[0380] 단일 인간 상피 결장 줄기 세포를 [18]에 기재된 바와 같이 사용하였다. 단일 인간 상피 결장 줄기 세포를 후술된 바와 같이 배양 배지를 함유하는 Corning UltraLowAttachment 96 웰 평탄 바닥 플레이트 내로 플레이트접종하였다. Corning Ultra-Low Attachment 표면은 폴리스티렌 용기 표면에 공유 결합된 친수성, 중성으로 하전된 코팅이다. 하이드로겔은 특이적 및 비특이적 고정화를 저해하여, 세포를 현탁된 상태로 유도하여 3D 구형체 형성을 가능하게 한다. 코팅은 안정하고, 비세포독성이며, 생물학적으로 비활성이고, 분해-불가능하다.

[0381] 배양 배지는 B27, 니코틴아미드, N-아세틸시스테인, 노긴, R-스폰딘 1, EGF, Wnt 대리물[19], TGF-b 유형 I 수용체 저해제 A83-01 및 P38 저해제 SB202190이 포함되는 어드밴스드 DMEM/F12 배지를 함유하였다. 특히 배양 배지는 세포외 기질을 함유하지 않았다.

[0382] 이어서 단일 인간 상피 결장 줄기 세포를 1:100, 1:200 및 1:400의 희석도로 항체와 또는 항체 없이 TS2/16-조정된 배지(UPE)가 보충된 인간 결장 오가노이드 배지에서 배양하였다. 각각의 처리 조건에 있어서 3회 반복을 수행하였다. 오가노이드의 총 수를 계수함으로써 처리 후 4 및 7일째에 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다(도 5).

[0383] 인테그린 작용제의 첨가는 인간화된 TS2/16 항체를 함유하지 않은 배양 배지 대비 상피 줄기 세포 성장의 증가를 초래하였다(도 5 참고). 인테그린 작용제의 최적 효과는 최저 희석도 1:400에서 관찰되었으나, 증가된 성장율은 시험된 모든 희석도에 걸쳐 나타났다. 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 배양 배지에서 성장하는 오가노이드의 예는 도 6에서 확인할 수 있다.

[0384] 본 발명자들은 놀랍게도 임의의 세포외 기질 성분을 함유하지 않는 배양 배지에 대한 인테그린 작용제의 첨가가 효율적인 상피 줄기 세포 성장을 성공적으로 초래할 수 있음을 실증하였다. 음성 대조군에서 관찰된 바와 같이, 임의의 세포외 기질 성분의 부재 하에 상피 줄기 세포는 유의미하게 성장하지 않는다. 따라서, 세포 또는 오가노이드를 인테그린 작용제와 접촉시키는 단계를 포함하는 배양 방법이 상피 줄기 세포 또는 오가노이드의 개선된 배양 방법에서 사용될 수 있다.

[0385] 본 발명자들은 인테그린 작용제의 첨가가 놀랍게도 세포외 기질의 부재 하에 상피 줄기 세포 성장을 허용할 수 있었으므로, 인테그린 작용제가 세포외 기질의 구조적 및 신호전달 기능을 모방할 수 있다고 가정한다. 임의의 특정 이론에 의해 구애받고자 하지 않고, 인테그린 작용제는 인테그린의 구성 상태를 변경함으로서 이를 인테그린 리간드에 대해 활성화할 수 있다. 이어서 인테그린 작용제는 또한 신호전달 경로를 활성화하고 상피 줄기 세포 성장을 촉진하는 인테그린 리간드의 작용을 모방한다.

[0386] 실시예 5 - 세포외 기질을 포함하는 배양 배지에 대한 인간화된 TS2/16 항체의 첨가

[0387] 결장 상피 줄기 세포를 실시예 4에 기재된 바와 같이 단리하였다. 단일 세포를 [20]에 기재된 바와 같이 B27, 니코틴아미드, N-아세틸시스테인, 노긴, R-스폰딘 1, EGF, WNT 조정된 배지(50%, 안정적으로 전달감염된 L 세포를 사용하여 생산됨), TGF-b 유형 I 수용체 저해제 A83-01 및 P38 저해제 SB202190이 포함된 어드밴스드 DMEM/F12 배지를 포함하는 배지에서 배양하였다. 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서 10 μL 방울의 Matrigel/웰에서 현탁하였다.

[0388] 세포를 대조군으로서 상술된 배지로 처리하거나(도 7 상의 막대 1) 인간화된 TS2/16 항체의 2배 희석액이 보충된 동일한 인간 결장 오가노이드 배지로 처리하였다(도 7 상의 막대 2~4). 상피 줄기 세포의 성장은 상술된 바와 같이 CellTiter-Glo® 발광 세포 생활성 검정(Promega)을 사용하여 측정하였다.

[0389] 결과는 세포의 Matrigel-현탁액과 조합된 배양 배지에 대한 상기 인테그린 작용제의 첨가가 상피 줄기 세포 성장을 증가시킴을 실증한다. 따라서, 인테그린 작용제는 또한 세포외 기질로부터 유래된 신호전달과 조합되어 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있다.

[0390] 이들 결과를 Dyna 비드로 농축된 Matrigel을 사용하여 추가 실험에서 확인하였다. 사용된 Matrigel을 ProtG-코팅 Dyna 비드(Invitrogen/Thermofischer Scientific Ref 10003D) 또는 인간화된 TS2/16 항체로 포화된 ProtG-코팅 Dyna 비드를 첨가함으로써 변형한 것을 제외하고, 결장 상피 줄기 세포를 상기와 같이 단리하고 배양하였다. 도 8은 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는(막대 2) 또는 포함하지 않는(막대 1) 두 처리 결과를 나타낸다. 이들 데이터는 또한 ProtG-코팅 Dyna 비드를 통해 여기에서 다가 제시된 상기 인테그린 작용제의 첨가가 전통적인 Matrigel 유도 상피 세포 성장의 성장을 증강시킴을 나타낸다.

[0391] 결론적으로, 인테그린 작용제는 외인성으로 첨가된 세포외 기질을 포함하거나 포함하지 않는 배양 배지로 이를 가용성 성분으로서 첨가함으로써 상피 줄기 세포 또는 오가노이드의 성장을 자극할 수 있다. 인테그린 작용제는 또한 세포외 기질에 포함되는 경우, 예로 이것이 담체 상에서 가교되고 Matrigel과 직접 혼합되는 경우, 성장을 자극할 수 있다.

[0392] 실시예 6 - 임의의 세포외 기질 성분이 없는 배양 배지에서 상피 줄기 세포의 배양에 대한 HUTS-4의 효과

[0393] 상기 논의된 바와 같이, 연구로 Fab 인테그린 활성화 항체 TS2/16, 12G10 및 HUTS-4가 사이클릭 RGD 펩티드에 대해 거의 동일한 고친화도를 유도할 수 있음을 확인하였다. 상기 관찰은 이들 항체가 β1 도메인에서 리간드-결합 부위의 동일한 구성을 안정화함을 제시한다. 본 발명자들은 또 다른 인테그린 작용제, HUTS-4의 첨가가 임의의 외인성으로 첨가된 세포외 기질 성분을 포함하지 않는 배양 배지에서 상피 줄기 세포 성장을 허용할지 시험하였다.

[0394] 인간 결장 오가노이드의 단편을 Corning UltraLowAttachment 96웰 평탄 바닥 플레이트에서 실시예 4에 기재된 바와 같이 단리하고 배양하였다. 이어서 이들 인간 결장-유래 오가노이드 단편을 1 μg/ml의 최종 농도로 TS2/16 또는 HUTS-4가 보충된 인간 결장 오가노이드 배지에서 배양하거나, 항체 없이 배양하였다. 각각의 처리 조건에 있어서 3회 반복을 수행하였다. CellTiterGlo ATP-기반 검정을 사용하여 살아있는 세포를 정량함으로써 처리 7일 후 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다(도 9).

[0395] 2개의 상이한 인테그린 작용제의 첨가는 인테그린 작용제 항체를 함유하지 않은 대조군 배양 배지 대비 상피 줄기 세포 성장의 증가를 초래하였다(도 9 참고). 모든 3개의 배양 배지 시험에서 성장하는 오가노이드의 예는 도 11에서 확인할 수 있다.

[0396] 본 발명자들은 놀랍게도 임의의 세포외 기질 성분을 함유하지 않는 배양 배지에 대한 2개의 상이한 인테그린 작용제의 첨가가 효율적인 상피 줄기 세포 성장을 성공적으로 초래할 수 있음을 실증하였다. 따라서, 세포 또는 오가노이드를 인테그린 작용제와 접촉시키는 단계를 포함하는 배양 방법은 상피 줄기 세포 또는 오가노이드의 배양 방법을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 이들 데이터는 본원에서 기재된 배양 방법이 특히 인테그린 작용제 TS2/16, 12G10 및 HUTS-4와 유사한 사이클릭 RGD 펩티드에 대한 친화도를 가지는 인테그린 작용제와 함께 효과적일 수 있고/있거나 TS2/16, 12G10 및 HUTS-4와 동일한 개방 헤드피스 구성의 인테그린을 안정화할 수 있음을 실증한다.

[0397] 실시예 7 - 전단된 오가노이드로부터 시작되는 Matrigel의 부재 하의 인간 결장 성장

[0398] 본 발명자들은 인테그린 작용제가 실시예 4에서 사용된 바와 같은 단일 세포보다는 오가노이드의 단편(전단된 오가노이드)으로부터 개시된 임의의 외인성으로 첨가된 세포외 기질 성분을 포함하지 않는 배양 배지에서 상피 줄기 세포 성장을 개선할 수 있는지 시험하였다.

[0399] 좁은 피펫 팁을 통해 앞뒤로 오가노이드를 반복적으로 이동시킴으로써, 오가노이드 단편을 기계적으로 수득하였다. 단편화 정도를 현미경으로 모니터링하였다. 인간 상피 결장 오가노이드의 단편을 실시예 4에 기재된 바와 같은 배양 배지를 함유하는 Corning UltraLowAttachment 96웰 편평 바닥 플레이트 내로 플레이트접종하였다.

[0400] 이어서 인간 상피 결장 오가노이드의 단편을 인간화된 TS2/16이 보충되거나 항체가 없는 인간 결장 오가노이드 배지에서 배양하였다. 각각의 처리 조건에 있어서 5회 반복을 수행하였다. 오가노이드의 총수를 계수함으로써 처리 7일 후 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다.

[0401] 오가노이드의 단편으로 개시된 배양에 대한 인테그린 작용제의 첨가는 인간화된 TS2/16 항체를 함유하지 않은 배양 배지에 비해 증가된 상피 줄기 세포 성장을 초래하였다(도 10 참고). 인간화된 TS2/16 항체를 포함하는 및 항체를 포함하지 않는 배양 배지에서 성장하는 오가노이드의 예는 도 12에서 확인할 수 있다. 단일 상피 줄기 세포가 아니라, 오가노이드의 단편을 사용하여 상피 줄기 세포 배양을 개시하는 것과 연관된 장점이 존재한다. 예를 들어, 오가노이드 성장은 단일 세포가 아니라 오가노이드 단편으로 개시되는 배양에서 보통 개선된다. 또한, 단일 상피 줄기 세포는 보통 트립신으로 오가노이드를 소화함으로써 수득되며, 이는 세포 표면으로부터 인테그린 수용체를 절단할 수 있다. 따라서 세포는 인테그린 작용제에 의한 활성화가 일어날 수 있기 전에 이의 표면 상에서 인테그린 수용체를 대체할 시간이 필요하다.

[0402] 본 발명자들은 놀랍게도 임의의 세포외 기질 성분을 함유하지 않는 배양 배지에 대한 인테그린 작용제의 첨가가 단일 상피 줄기 세포 및 오가노이드의 단편 둘 다로 개시된 배양으로부터 효율적 상피 줄기 세포 성장을 성공적으로 초래할 수 있음을 실증하였다.

[0403] 실시예 8 - Matrigel 및 항체 AIIB2의 존재 하의 인간 결장 성장

[0404] AIIB2는 인테그린의 β1 서브유닛에 결합할 수 있는 알려진 인테그린 길항제 항체이다. 실시예 3에서 시험된 인테그린 작용제와 대조적으로, AIIB2는 ECM 성분 파이브로넥틴, 라미닌 및 콜라겐 IV에 대한 세포 부착을 저해하는 것으로 나타났다[21].

[0405] P26N 및 STEM159N의 인간 결장-유래 오가노이드 단편을 실시예 6에 기재된 바와 같이 단리하였다. 이어서 인간 결장-유래 오가노이드 단편을 실시예 5에 기재된 인간 결장 오가노이드 배지에서 배양하였다. 시험된 일부 조건에서, 단편을 10 μL 방울의 Matrigel/웰에서 현탁하였다. 하기 조건을 다음과 같이 시험하였다:

[0406] a) AIIB2를 포함하거나 항체를 포함하지 않는 Matrigel의 존재 하의 P26N 오가노이드 단편;

[0407] b) AIIB2를 포함하거나 항체를 포함하지 않는 Matrigel의 부재 하의 P26N 오가노이드 단편; 및

[0408] c) Matrigel AIIB2의 존재 하에 또는 항체를 포함하지 않는 STEM159N 오가노이드 단편.

[0409] 각각의 처리 조건에 있어서 2회 반복을 수행하였다. 오가노이드의 총 수를 계수함으로써 처리 7일 후 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다.

[0410] 도 13~15는 배양 배지에서 AIIB2의 존재가 상피 줄기 세포 성장을 방지함을 실증한다. 임의의 특정 이론에 구애받고자 하지 않고, AIIB2의 존재 하의 상피 줄기 세포 성장의 상기 부재는 Matrigel 중 리간드가 인테그린을 활성화하는 것을 차단하는 AIIB2의 능력에 기인한다. 상술된 바와 같이, ECM 또는 인테그린 작용제에서 어느 한 리간드에 의한 인테그린 활성화 없이는, 상피 줄기 세포가 배양에서 성장하고 증식하지 않는다.

[0411] 오가노이드에서 상피 줄기 세포는 세포의 첨단쪽 막이 오가노이드의 관강을 향하는, 기본-바깥 표현형을 갖는다. 상기 분극화는 참고문헌[22]에 기재된 바와 같이, 오가노이드가 Matrigel의 부재 하에 성장하는 경우, 인테그린 β1 수용체에 대한 리간드의 부재로 인해, 첨단쪽이 바깥으로 되돌아간다. 상기 첨단쪽이 바깥인 표현형은 인테그린-연관 ROCK 신호전달이 교란되는 TTC7A 돌연변이를 갖는 환자에서도 관찰된다[23]. 항체가 Matrigel에서 ITGB1 수용체와 세포외 기질 성분의 상호작용을 차단하므로, 상기 분극성의 복귀는 AIIB2와의 Matrigel 배양에서도 유도될 수 있다. AIIB2 유도된 분극성 복귀의 상기 이론은 MDCK 낭에서 최초로 나타났다[24].

[0412] 요약하면, 세포외 기질 성분에서 인테그린 β1 수용체는 기본-바깥 표현형을 갖는 오가노이드의 성장을 확실히 하는 데 필수적이다. 본 발명자들은 놀랍게도 임의의 세포외 기질 성분을 함유하지 않는 배양 배지에 대한 인테그린 작용제의 첨가가 기본-바깥 표현형을 갖는 상피 줄기 세포 성장을 성공적으로 초래할 수 있음을 실증하였다.

[0413] 실시예 9 - 임의의 세포외 기질 성분이 없는 배양 배지에서 췌장 상피 줄기 세포의 배양

[0414] 본 발명자들은 인테그린 작용제가 임의의 외인성으로 첨가된 세포외 기질 성분을 포함하지 않는 배양 배지에서 췌장 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있는지 시험하였다.

[0415] 2개의 독립적 췌장 오가노이드주 W15-50040 및 W15-50020의 단편을 실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 수득하였다. 췌장 세포를 [25]에 기재된 바와 같이 HEPES(1x), 글루타맥스(Glutamax)(1x), 페니실린/스트렙토마이신(1x), B27(1x), 프리모신(Primocin)(1 mg/ml), N-아세틸-L-시스테인(1 mM), Wnt3a-조정된 배지(50% v/v), RSPO1-조정된 배지(10% v/v), 노긴 조정된 배지(10% v/v) 또는 재조합 단백질 (0.1 μg/mL), 표피 성장 인자(EGF, 50 ng/ml), 가스트린(10 nM), 섬유아세포 성장 인자 10(FGF10, 100 ng/ml), 니코틴아미드(10 mM) 및 A83-01(0.5 μM)이 보충된 AdDMEM/F12 배지에서 배양하였다.

[0416] 이어서 이들 인간 췌장-유래 오가노이드 단편을 1 μg/ml의 최종 농도로 TS2/16이 보충되거나 항체가 없는 인간 췌장 오가노이드 배지에서 배양하였다. 각각의 처리 조건에 있어서 3회 반복을 수행하였다. CellTiterGlo ATP-기반 검정을 사용하여 살아있는 세포를 정량함으로써 처리 6일 후에 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다(도 16b). 성장하는 췌장 오가노이드의 예는 도 16a에서 확인할 수 있다.

[0417] 인테그린 작용제의 첨가는 인간화된 TS2/16 항체를 함유하지 않은 배양 배지 대비 췌장 상피 줄기 세포 성장의 증가를 초래하였다(도 16 참고).

[0418] 실시예 10 - 세포외 기질을 포함하는 배양 배지에서 폐 상피 줄기 세포의 배양

[0419] 본 발명자들은 인테그린 작용제가 세포외 기질을 포함하는 배양 배지에 대한 배양 배지에서 폐 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있는지 시험하였다.

[0420] 폐 오가노이드의 단편을 실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 수득하였다. 폐 오가노이드 단편을 [26]에 기재된 바와 같이 어드밴스드 DMEM/F12, HEPES, 프리모신, 페니실린/스트렙토마이신, 글루타맥스 100x, R-스폰딘 1, FGF 7, FGF 10, 노긴, A83-01, Y-27632, SB202190, B27 보충물, N-아세틸시스테인 및 니코틴아미드를 포함하는 배지에서 배양하였다. 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서, 10 μL 방울의 Matrigel/웰에서 현탁하였다.

[0421] 이어서 이들 인간 폐-유래 오가노이드 단편을 1 μg/ml의 최종 농도로 TS2/16이 보충되거나 항체가 없는 인간 폐 오가노이드 배지에서 배양하였다. 각각의 처리 조건에 있어서 3회 반복을 수행하였다. CellTiterGlo ATP-기반 검정을 사용하여 살아있는 세포를 정량함으로써 처리 12일 후에 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다(도 17a). 성장하는 폐 오가노이드의 예는 도 17b에서 확인할 수 있다.

[0422] 인테그린 작용제의 첨가는 인간화된 TS2/16 항체를 함유하지 않은 배양 배지 대비 폐 상피 줄기 세포 성장의 증

가를 초래하였다(도 17 참고).

[0423] 실시예 11 - 세포외 기질을 포함하는 배양 배지에서 두부경부 상피 줄기 세포의 배양

[0424] 본 발명자들은 인테그린 작용제가 임의의 외인성으로 첨가된 세포외 기질 성분을 포함하지 않는 배양 배지에서 두부경부 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있는지 시험하였다.

[0425] 두부경부 오가노이드의 단편을 실시예 6에 기재된 방법을 사용하여 수득하였다. 두부경부 오가노이드 단편을 1x B27 보충물, 1 mM N-아세틸-L-시스테인, 10 mM 니코틴아미드 505, 50 ng/ml 인간 EGF, 500 nM A83-01, 10 ng/ml 인간 FGF10, 5 ng/ml 인간 FGF2, 1 μM 프로스타글란딘 E2, 3 μM CHIR-99021, 1 μM 포스콜린, 4% R-스폰딘 및 4% 노긴을 갖는 어드밴스드 DMEM +/+/+를 포함하는 배지에서 배양하였다. 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서, 10 μL 방울의 Matrigel/웰에서 현탁하였다.

[0426] 이어서 이들 인간 두부경부-유래 오가노이드 단편을 1 μg/ml의 최종 농도로 TS2/16이 보충되거나 항체가 없는 인간 두부경부 오가노이드 배지에서 배양하였다. 각각의 처리 조건에 있어서 3회 반복을 수행하였다. CellTiterGlo ATP-기반 검정을 사용하여 살아있는 세포를 정량함으로써 처리 7일 후에 상피 줄기 세포의 성장률을 측정하였다(도 18b). 성장하는 두부경부 오가노이드의 예는 도 18a에서 확인할 수 있다. 인테그린 작용제의 첨가는 인간화된 TS2/16 항체를 함유하지 않는 배양 배지 대비 두부경부 상피 줄기 세포 성장의 증가를 초래하였다(도 18 참고).

[0427] 실시예 12 - 항체 Asc8의 존재 하의 인간 결장 성장

[0428] Asc8은 인테그린의 β4 서브유닛에 결합하는 알려진 인테그린 길항제 항체이다. Asc8은 세포 접착을 차단하며 상처 봉합을 저해하는 것으로 나타났다 [27].

[0429] 결장 상피 줄기 세포를 실시예 4에 기재된 바와 같이 단리하고 실시예 5에 따라 배지에서 배양하였다. 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서, 10 μL 방울의 Matrigel/웰에서 현탁하였다. 세포를 대조군으로서 상술된 배지로 처리하거나 하기로 처리하였다:

[0430] (a) 최종 농도 0.3 μg/ml의 Asc8.

[0431] (b) 최종 농도 1.2 μg/ml의 Asc8.

[0432] (c) 최종 농도 5 μg/ml의 Asc8.

[0433] (d) 최종 농도 1 μg/ml의 TS2/16.

[0434] 상술된 바와 같이 CellTiter-Glo® 발광 세포 생활성 검정(Promega)을 사용하여 상피 줄기 세포의 성장을 측정하였다.

[0435] 도 19는 배양 배지에서 Asc8의 존재가 상피 줄기 세포 성장을 방지함을 실증한다. 상기 관찰은 실시예 8에 기재된 AIIB2로 관찰된 것과 유사하다. 다시, 임의의 특정 이론에 구애받고자 하지 않고, Asc8의 존재 하에 상피 줄기 세포 성장의 상기 부재는 Matrigel 중 리간드가 인테그린을 활성화하는 것을 차단하는 상기 항체의 능력에 기인하는 것으로 여겨진다.

[0436] 실시예 13 - 여러 인테그린 작용제의 상승적 효과.

[0437] 3E1은 β4 인테그린 작용제 항체이다. 그 천연 리간드 또는 활성화 항체의 인테그린 β4 연루는 β4 세포질의 티로신 인산화를 야기하며, 이는 종양 발생을 위해 중요한 여러 신호전달 경로를 조절한다[28]. 인산화된 Src는 Src 키나제 활성을 증가시키는 라미닌 또는 3E1 자극에 반응하여 A431 세포에서 인테그린 β4 와 연합하는 것으로 나타났다.

[0438] 3E1는 메모리얼 슬로안 케터링 암 센터(Memorial Sloan Kettering Cancer Centre)의 Antibody & Bioresource Core Facility에서 수득하였다. 항체는 또한 Sigma Aldrich에서 카탈로그 번호 MAB1964 하에 판매된다. 결장 상피 줄기 세포를 실시예 4에 기재된 바와 같이 단리하고 실시예 5에 따라 배지에서 배양하였다. 세포를 둥근 바닥 96-웰 플레이트에서, 10 μL 방울의 Matrigel/웰에서 현탁하였다. 세포를 대조군으로서 상술된 배지로 처리하거나(막대 1) 하기로 처리하였다:

[0439] (a) 최종 농도 0.1 μg/ml의 TS2/16(막대 2).

[0440] (b) 최종 농도 0.1 μg/ml의 TS2/16 및 0.1 μg/ml의 3E1(막대 3).

[0441] (c) 최종 농도 0.1 μg/ml의 TS2/16 및 1 μg/ml의 3E1(막대 4).

[0442] 상술된 바와 같이 CellTiter-Glo® 발광 세포 생활성 검정(Promega)을 사용하여 상피 줄기 세포의 성장을 측정하였다. 도 20은 상피 줄기 세포 성장에 대한 β1 인테그린 작용제 TS/16 및 β4 인테그린 작용제 3E1의 상승적 효과를 실증한다. 따라서, 여러 인테그린 작용제가 세포외 기질로부터 유래된 신호전달과 조합되어 상피 줄기 세포의 성장을 개선할 수 있다.

[0443] 상기 실시예에 제시된 데이터는 세포외 기질 성분의 존재 및 부재 하에 다양한 세포 유형에서 효율적 상피 줄기 세포 성장을 성공적으로 달성하는 인테그린 작용제의 놀라운 능력을 실증한다.

[0444] **서열**

[0445] **서열 목록 번호 1** - TS2/16 H-사슬

[0446] MGWSCIILFLVATATGVHSMDVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRL
EWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDKAKNTLYLQMGSLKSEDTAMYYCTRIGYDEDYAMDH
WGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK*

[0447] **서열 목록 번호 2** - TS2-16 kL-사슬

[0448] MGWSCIILFLVATATGVHSEIVVTQSPTTMAASPGDKITITCSVSSIISSNYLHWYSQKPGFSPKLLIY
RTSNLASGVPPRFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSDIPLTFGDGTKLDLKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0449] **서열 목록 번호 3** - 인간화된 TS2/16 H-사슬

[0450] MDVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEWVATISSGGSYTYYPDS
VKGRFTISRDKAKNTLYLQMGSLKSEDTAMYYCTRIGYDEDYAMDHWGQGTSVTVSS

[0451] **서열 목록 번호 4** - 인간화된 TS2/16 L-사슬

[0452] EIVVTQSPTTMAASPGDKITITCSVSSIISSNYLHWYSQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPPRFSGSGS
GTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSDIPLTFGDGTKLDLK

[0453] **서열 목록 번호 5** - 인간화된 TS2/16 H-사슬 HCDR1: GFTFSSYTMS

[0454] **서열 목록 번호 6** - 인간화된 TS2/16 H-사슬 HCDR2: TISSGGSYTYYPDSVKG

[0455] **서열 목록 번호 7** - 인간화된 TS2/16 H-사슬 HCDR3: IGYDEDYAMDH

[0456] **서열 목록 번호 8** - 인간화된 TS2/16 L-사슬 LCDR1: SVSSIISSNYLH

[0457] **서열 목록 번호 9** - 인간화된 TS2/16 L-사슬 LCDR2: RTSNLAS

[0458] **서열 목록 번호 10** - 인간화된 TS2/16 L-사슬 LCDR3: QQGSDIPLT

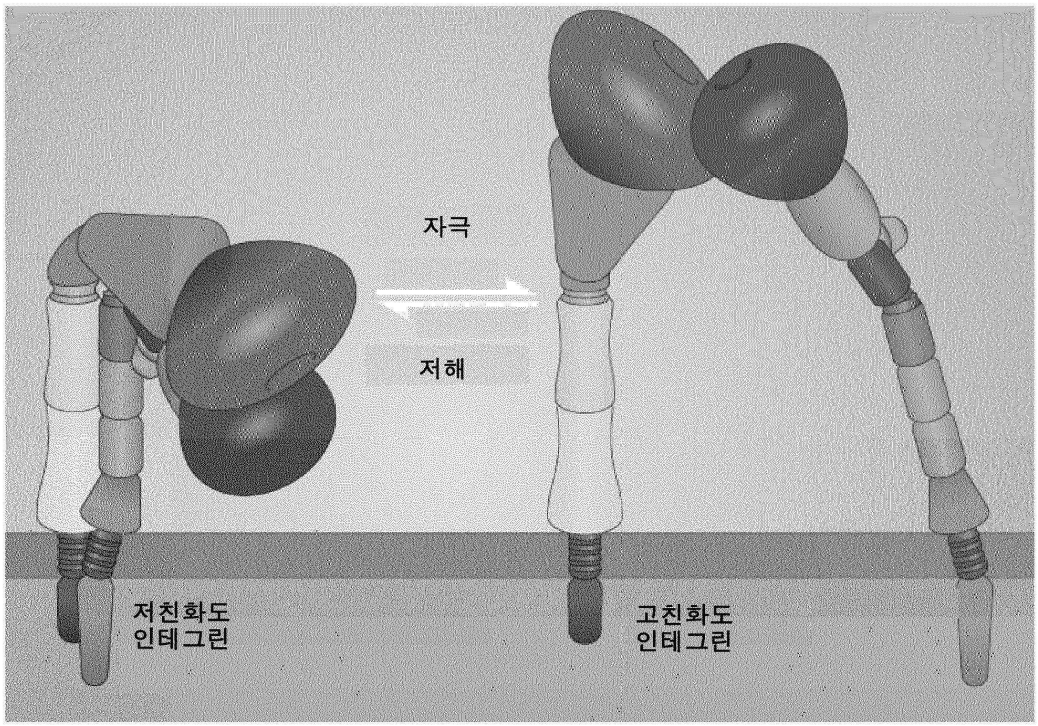
[0459] **참고문헌**

[1] Ahmed and Constant Curr Stem Cell Rep. 2016; 2(3): 197–206.
[2] Hughes *et al.* (2010) Proteomics 10(9):1886-90
[3] Byron *et al.* (2009) Journal of Cell Science 122, 4009-4011
[4] Humphries *et al* (2006) Journal of Cell Science 119: 3901-3903
[5] Humphries (2000) Biochemical Society Transactions vol. 28, part 4
[6] Su *et al.* (2016) PNAS 113 (27) E3872-E3881
[7] Li *et al.* (2017) *EMBO* 36:629-645
[8] Sun *et al.* (2019) Nature Cell Biology 21, 25–31
[9] Calderwood (2004) Journal of Cell Science 117 (5)
[10] Pokharel *et al.* (2019) Nature communications, https://doi.org/10.1038/s41467-019-09453-x
[11] Shattil *et al.* (2010) Nature reviews, 11, 288-300
[12] Luque *et al.* (1996) J. Bio Chem. 271, 19, 11067-11075
[13] Tsuchida *et al.*(1997) FEBS Letters 416, 212-21
[14] Hughes *et al.* (2010) Proteomics 10(9):1886-90
[15] Gjorevski *et al.* (2016) Nature, 539, 560-564
[16] Cruz-Acuña *et al.* (2017) Nat Cell Biol.(11): 1326–1335
[17] Tsuchida *et al.* (1992) FEBS Letters 416 212-216
[18] M van de Wetering *et al.* (2015) Cell.;161(4):933-45
[19] Janda *et al.* (2017) Nature, 545(7653):234-237
[20] Drost *et al.* (2015) Nature 521: 43-47
[21] Hall *et al.* (1990) The Journal of Cell Biology, 110, 2175-2184
[22] Co *et a*l (2019) Cell Reports 26, 2509 – 2520
[23] Bigorgne *et al* (2014) J Clin Invest.124, 328-337
[24] Yu *et al* (2005) Molecular Biology of the cell 16, 433-445
[25] Boj *et al.* (2015) Cell 160(1-2):324-38
[26] Sachs *et al* (2019) EMBO 38(4):e100300. doi:10.15252/embj.2018100300
[27] Egles *et al.* (2010) PlosOne, 5(5): e10528.
[28]Dutta *et al.* (2008) Cancer Res.68:8779–8787

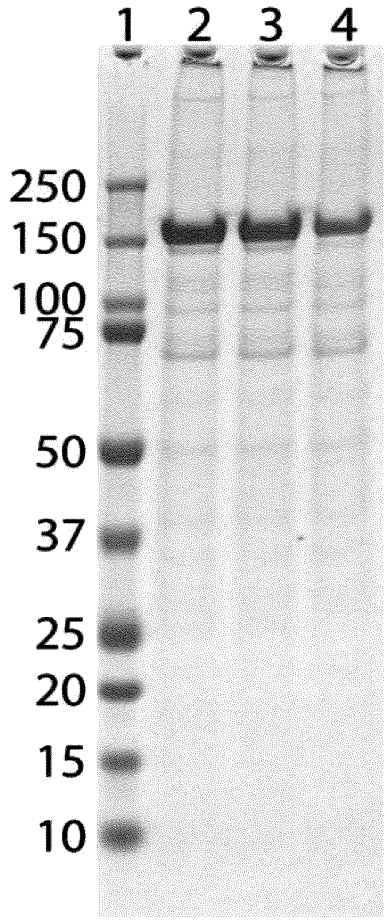
[0460]

도면

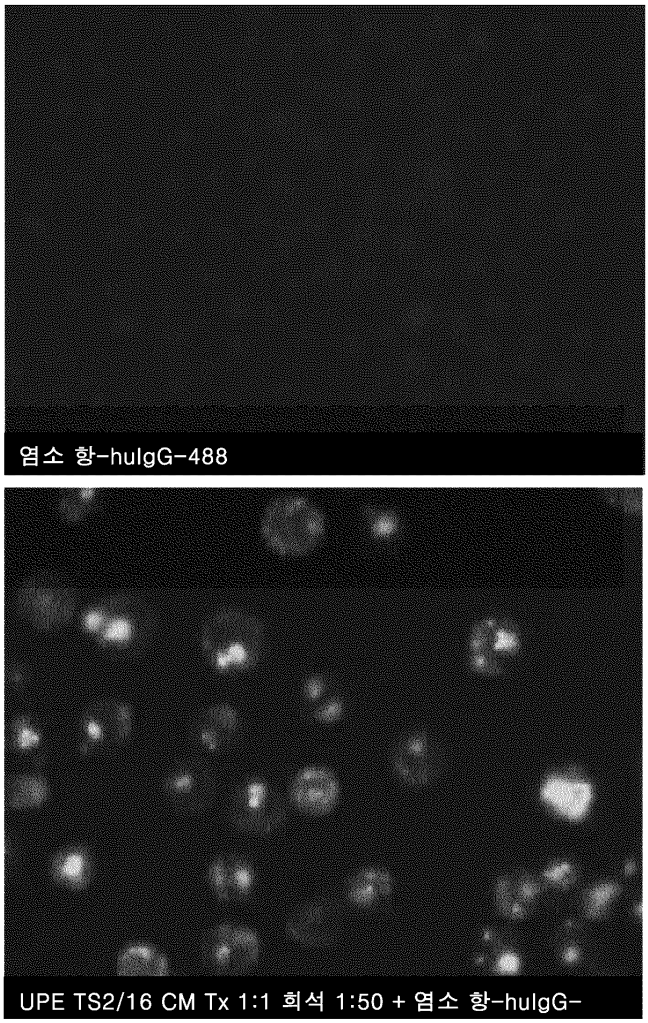
도면1



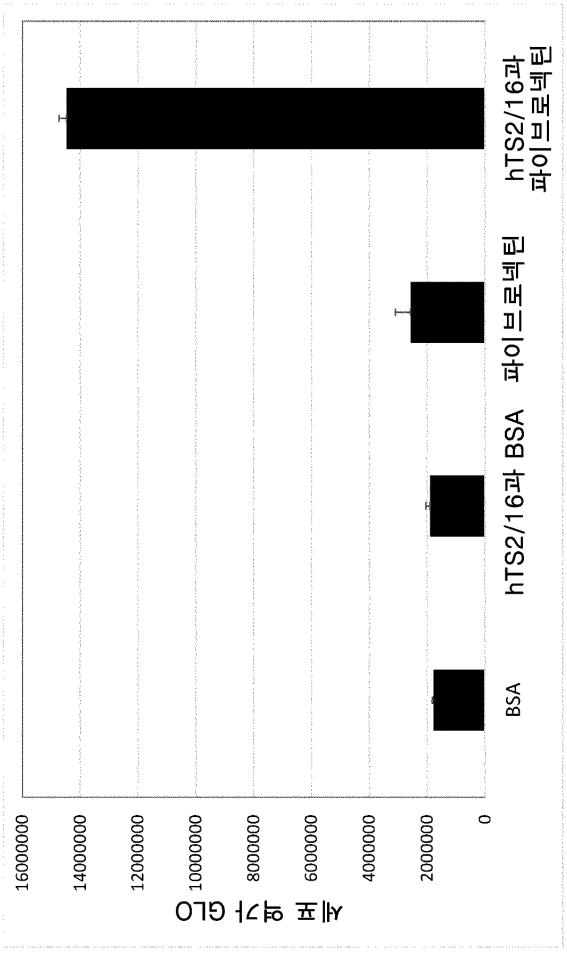
도면2



도면3



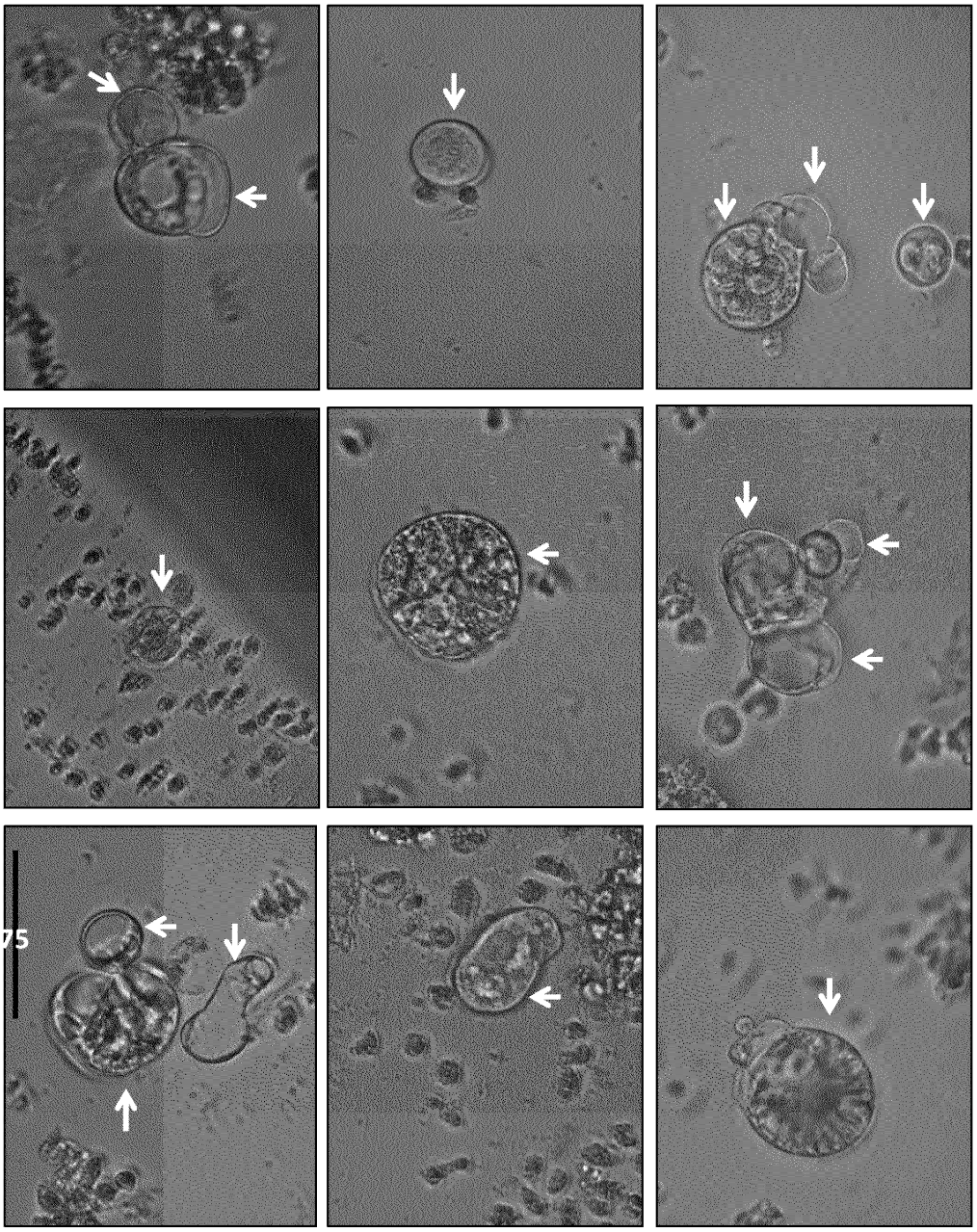
도면4


세포 역가 GLO
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
BSA
hTS2/16과 BSA
파이브로넥틴
hTS2/16과
파이브로넥틴

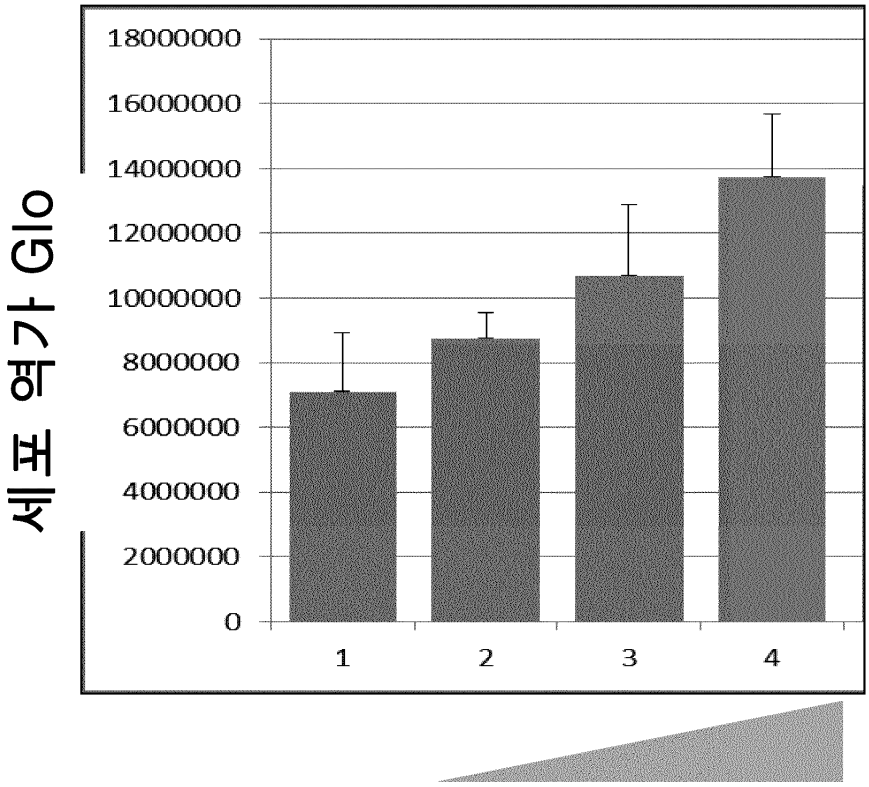
도면5

	Triplo 웰	오가노이드 수	
		일	
		4	7
TS2/16 없음	1	2	12
	2	6	15
	3	3	5
평균		**4**	**10**
TS2/16 1:400	1	13	103
	2	27	72
	3	42	114
평균		**41**	**96**
TS2/16 1:200	1	29	104
	2	41	83
	3	27	80
평균		**32**	**89**
TS2/16 1:100	1	22	75
	2	25	61
	3	25	70
평균		**24**	**69**

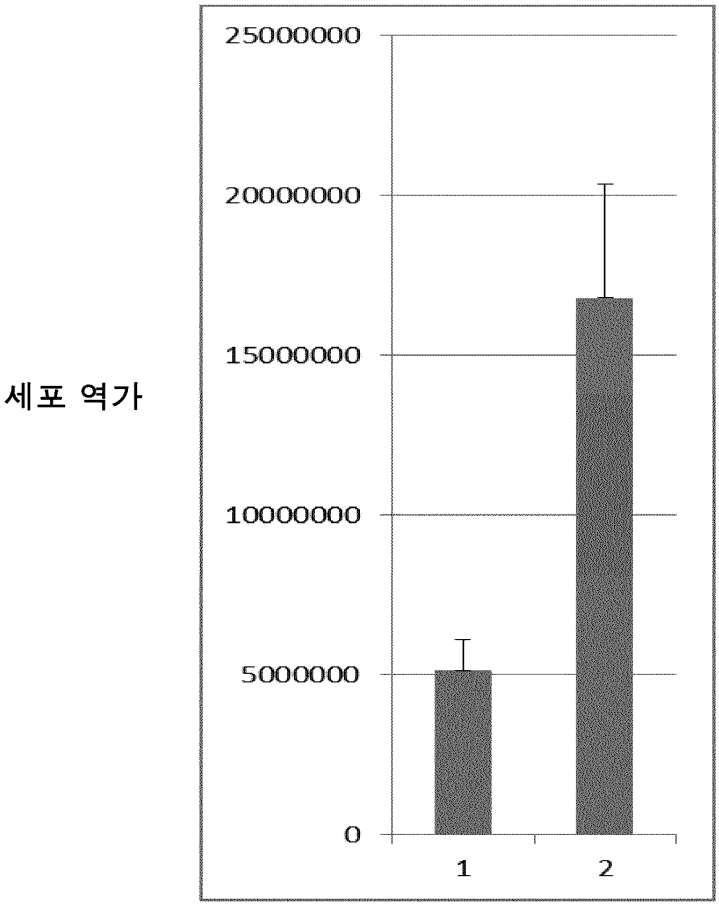
도면6



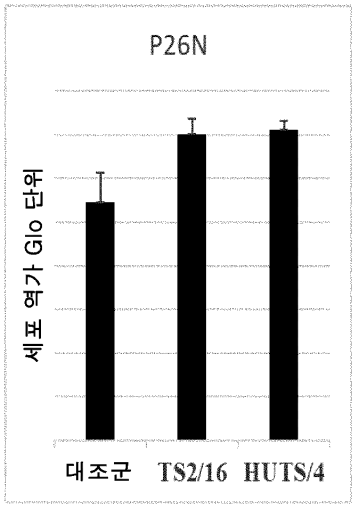
도면7


세포 활성 Glo
18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
1
2
3
4
2배 희석 인간화 TS2/16

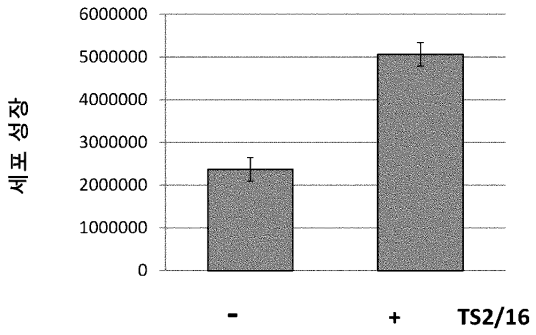
도면8


세포 역가
25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
1
2

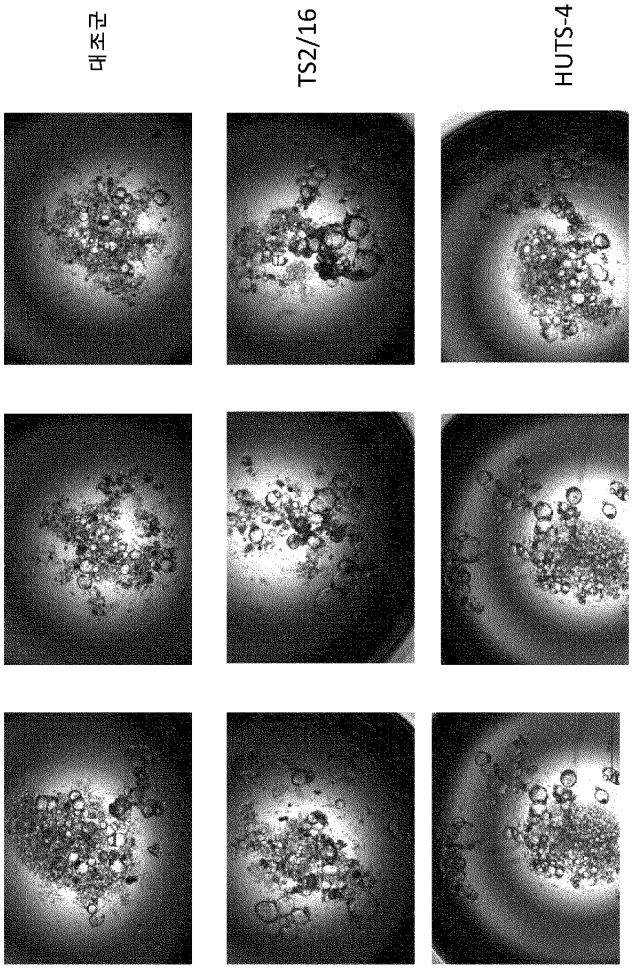
도면9


P26N
세포 역가 Glo 단위
대조군
TS2/16
HUTS/4

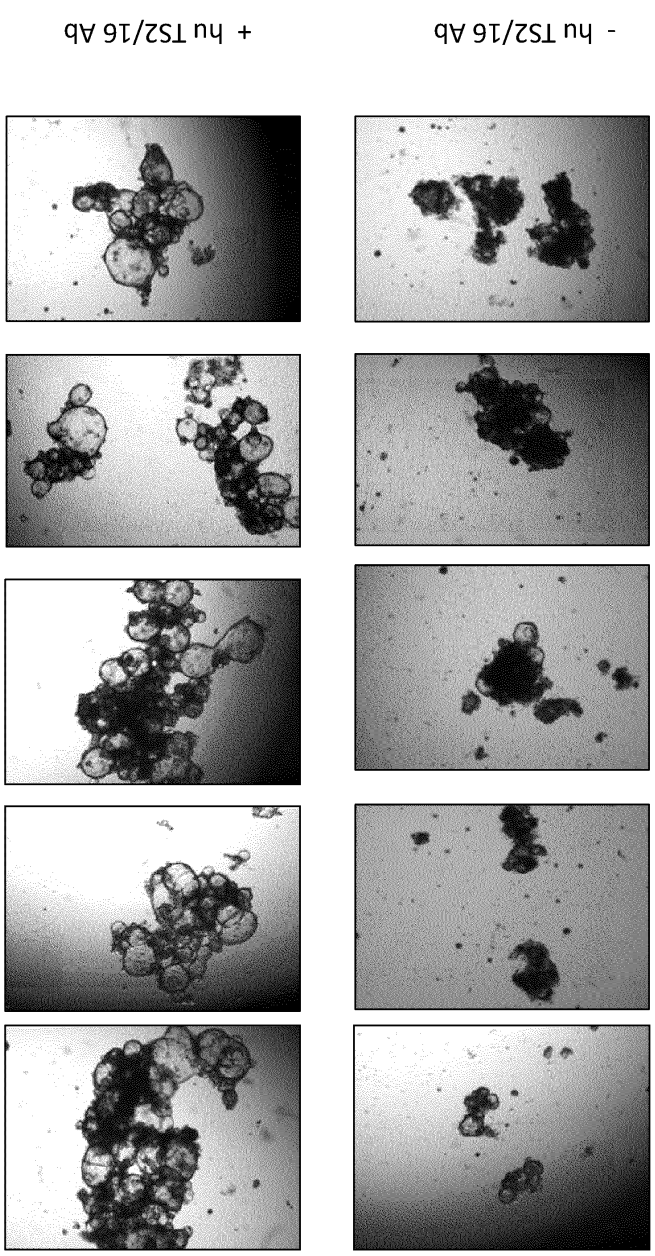
도면10


6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
세포 성장
-
+
TS2/16

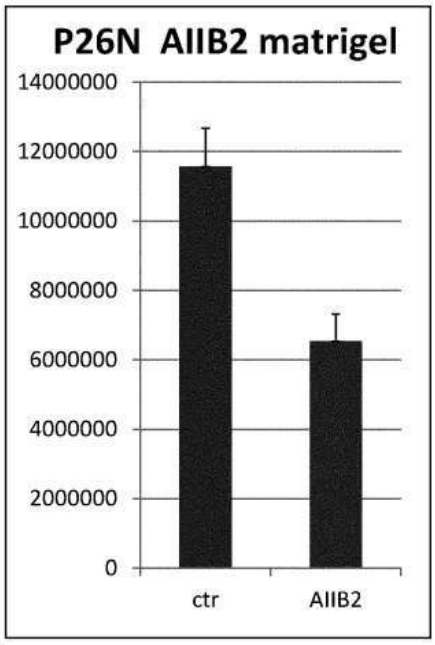
도면11


대조군
TS2/16
HUTS-4

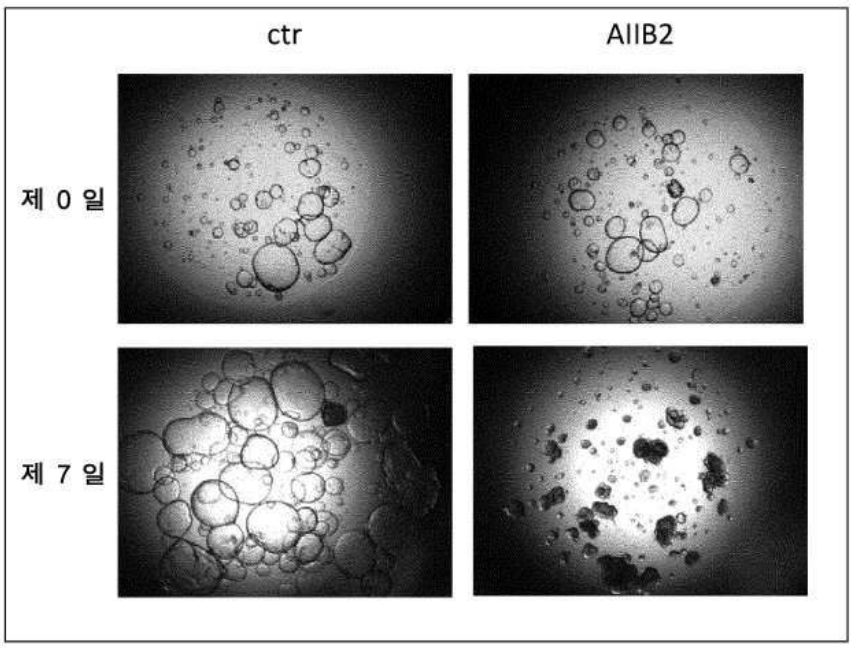
도면12



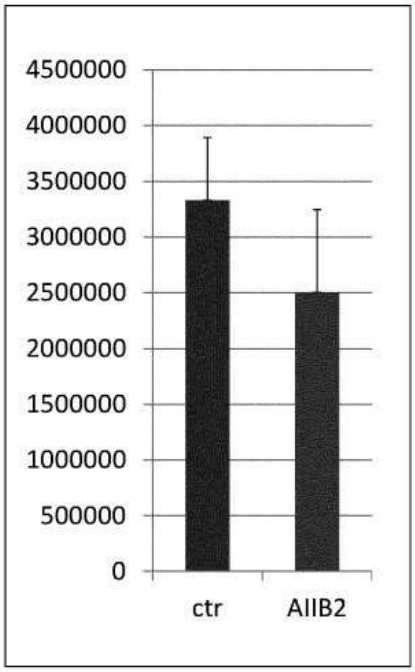
도면13a


P26N AIIB2 matrigel
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
ctr
AIIB2

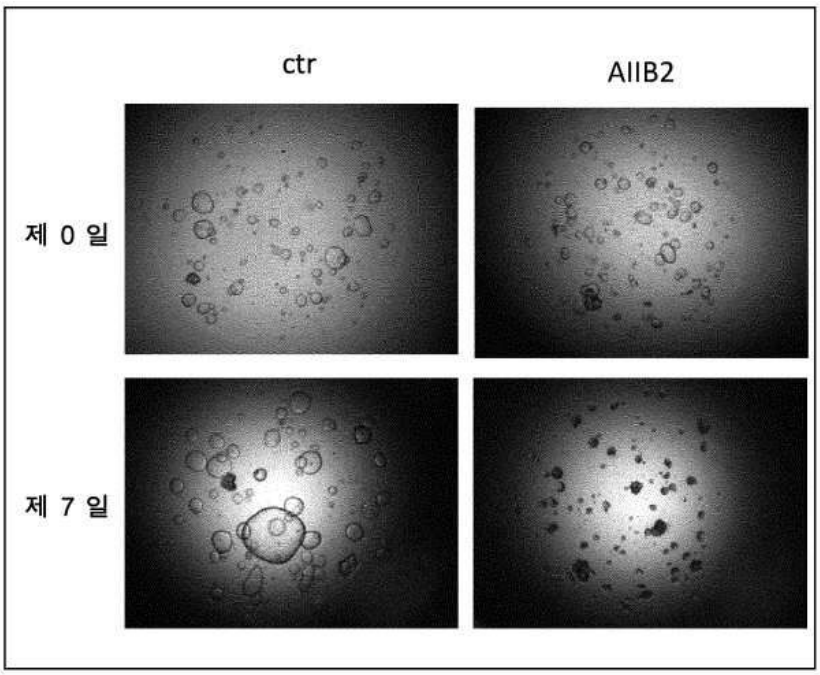
도면13b


ctr
AIIB2
제 0 일
제 7 일

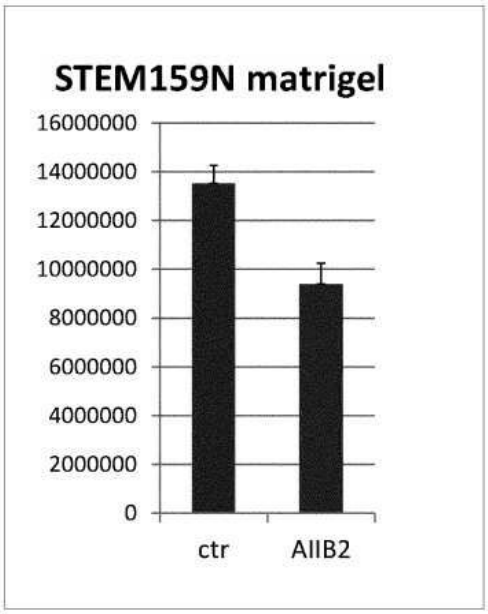
도면14a


4500000
4000000
3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
ctr
AIIB2

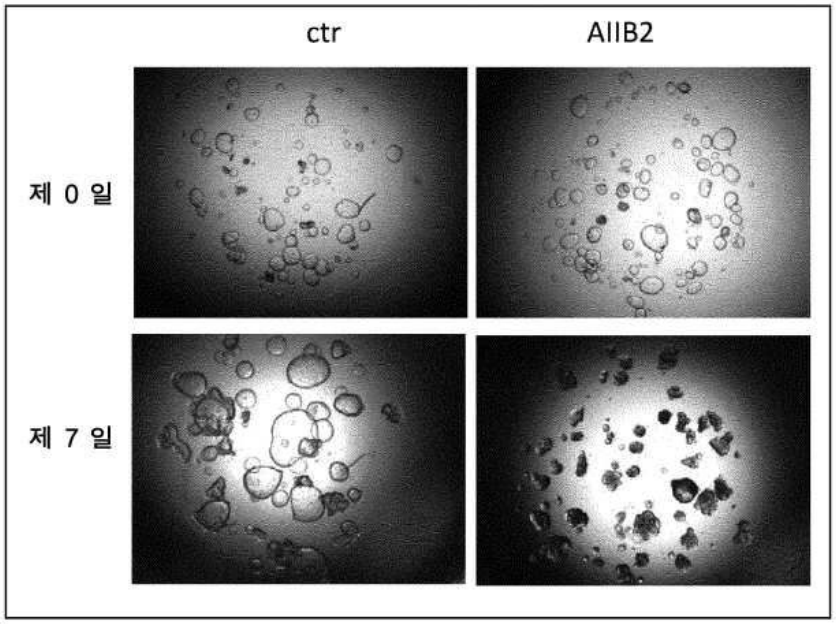
도면14b


ctr
AIIB2
제 0 일
제 7 일

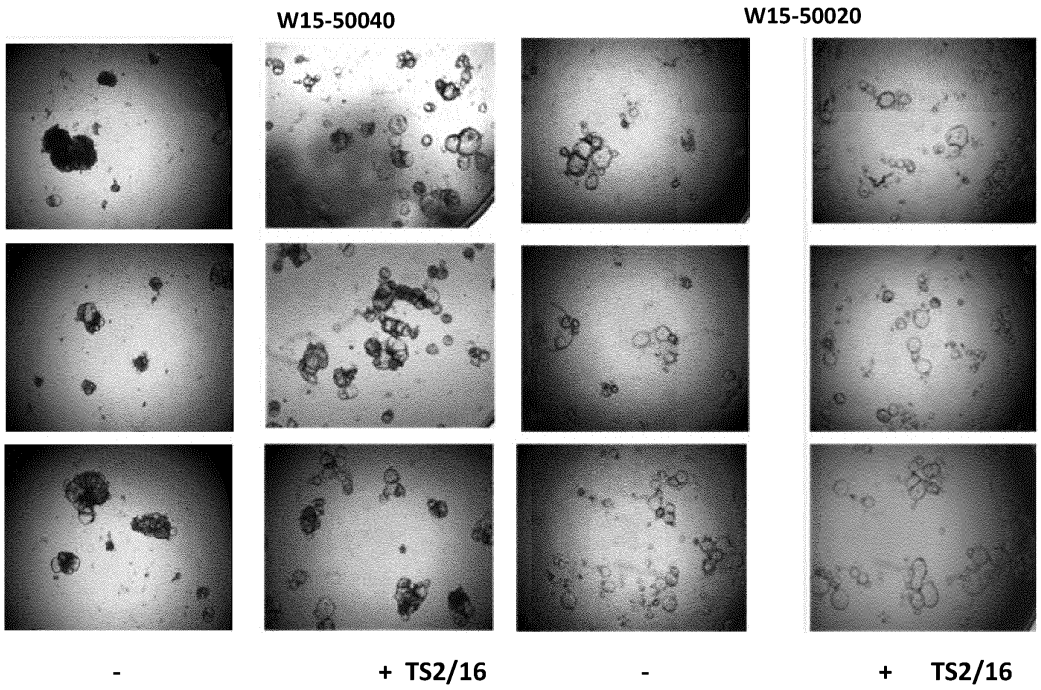
도면15a


STEM159N matrigel
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
ctr
AIIB2

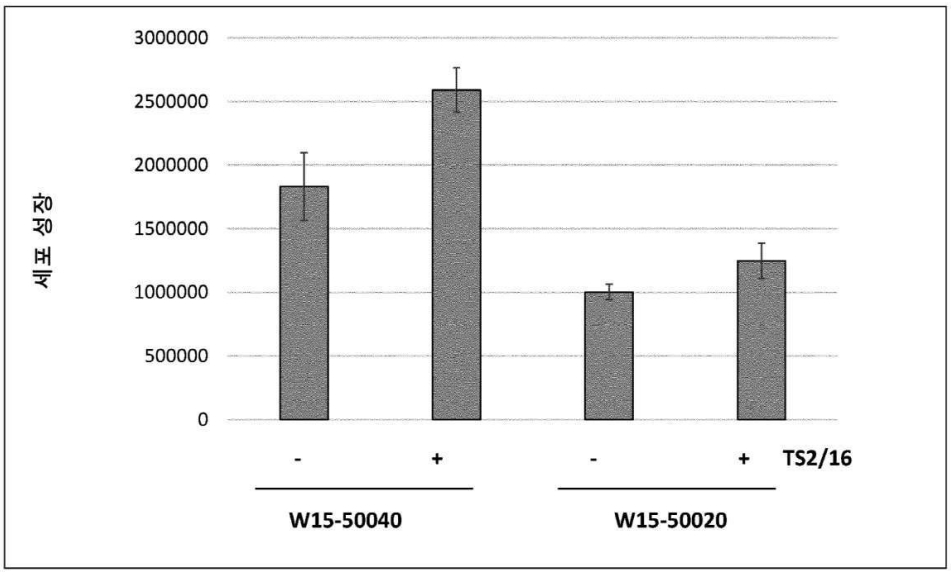
도면15b


ctr
AIIB2
제 0 일
제 7 일

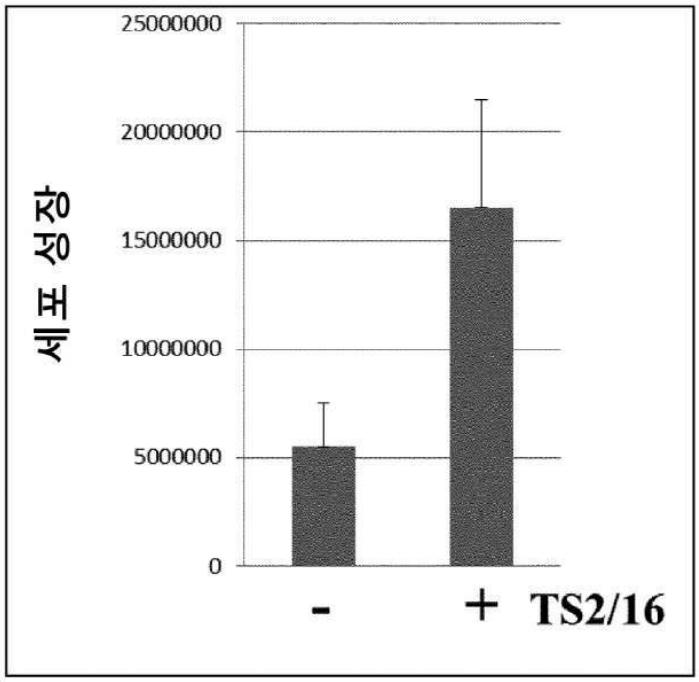
도면16a


W15-50040
W15-50020
-
+ TS2/16
-
+ TS2/16

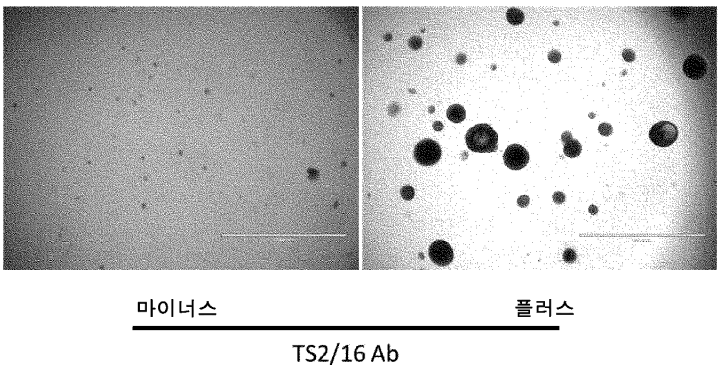
도면16b


3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
세포 성장
-
+
-
+
TS2/16
W15-50040
W15-50020

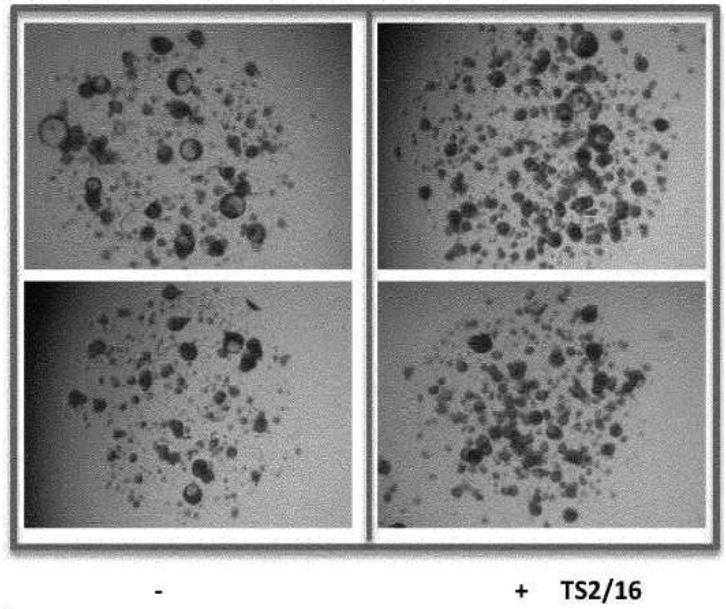
도면17a


25000000
20000000
15000000
10000000
5000000
0
세포 성장
-
+
TS2/16

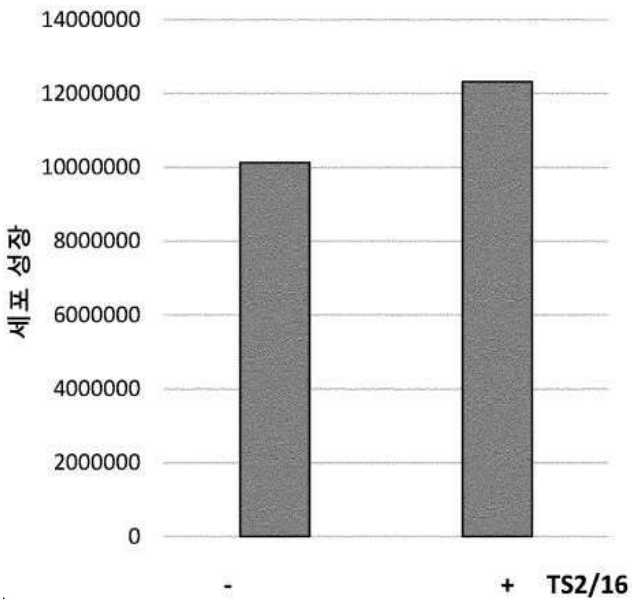
도면17b


마이너스
플러스
TS2/16 Ab

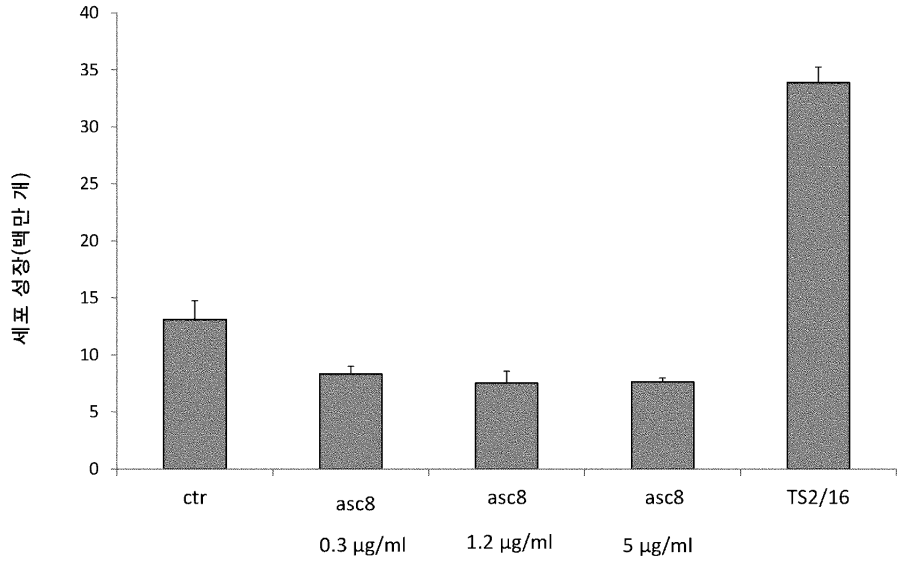
도면18a


-
+ TS2/16

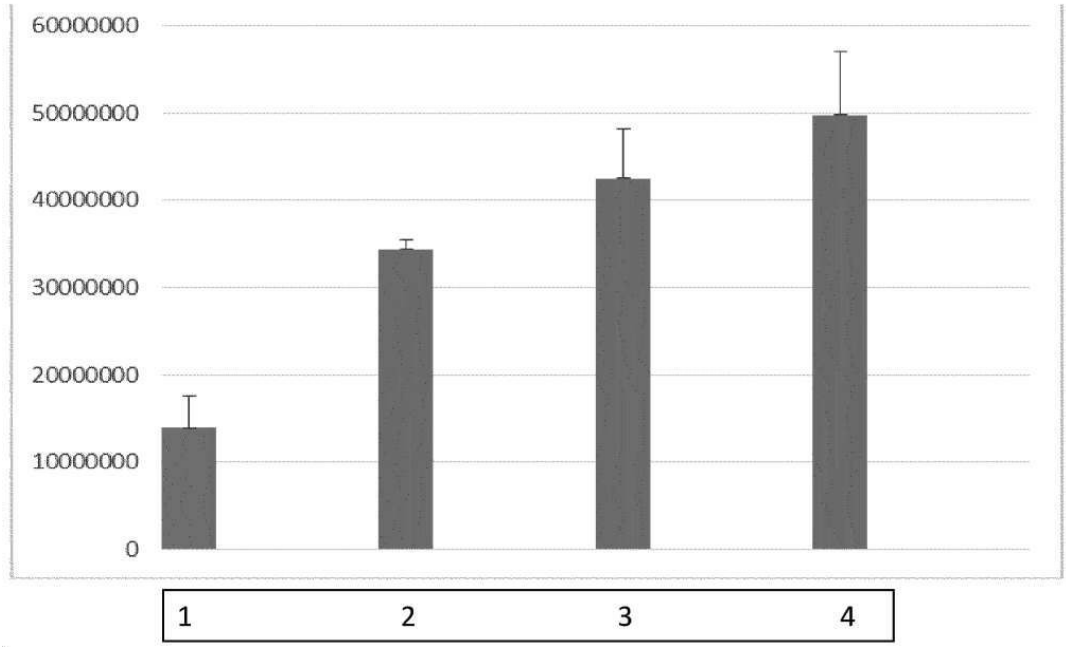
도면18b


14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
세포 성장
-
+ TS2/16

도면19



도면20



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN WETENSCHAPPEN

<120> IMPROVED CULTURE MEDOD USING INTEGRIN AGONIST

<130> P075582WO

<140><141> 2020-05-18

<160> 10

<170> SeqWin2010, version 1.0

<210> 1

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TS2/16 H-chain

<400> 1

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15
Val His Ser Met Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

20 25 30
Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
35 40 45
Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg
50 55 60
Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr
65 70 75 80
Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys

85 90 95
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Gly Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Met Tyr Tyr Cys Thr Arg Ile Gly Tyr Asp Glu Asp Tyr Ala Met Asp
115 120 125
His Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly

145 150 155 160
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

210 215 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro

225 230 235 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

245 250 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

260 265 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro

340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465 470

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TS2-16 kL-chain

<400> 2

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala

20 25 30

Ser Pro Gly Asp Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ile Ile

35 40 45

Ser Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Ser Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly

85 90 95

Thr Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser

100 105 110

Asp Ile Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys Arg

115 120 125

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

130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 3

<211> 121

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 H-chain

<400> 3

Met Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser

20 25 30

Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp

35 40 45

Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Lys Ala Lys Asn Thr Leu

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Gly Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr

85 90 95

Cys Thr Arg Ile Gly Tyr Asp Glu Asp Tyr Ala Met Asp His Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 L-chain

<400> 4

Glu Ile Val Val Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Ile Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ile Ile Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Ser Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Asp Ile Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys
100 105

<210> 5

<

211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 H-chain HCDR1

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 H-chain HCDR2

<400> 6

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 H-chain HCDR3

<400> 7

Ile Gly Tyr Asp Glu Asp Tyr Ala Met Asp His

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 L-chain LCDR1

<400> 8

Ser Val Ser Ser Ile Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Humanised TS2/16 L-chain LCDR2

<400> 9

Ser Val Ser Ser Ile Ile Ser Ser Asn Tyr Leu His

1 5 10

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Humanised TS2/16 L-chain LCDR3

<400> 10

Gln Gln Gly Ser Asp Ile Pro Leu Thr

1 5