



등록특허 10-2580997



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월21일
(11) 등록번호 10-2580997
(24) 등록일자 2023년09월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/074* (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0606 (2013.01)
C12N 5/0663 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7023895
- (22) 출원일자(국제) 2018년01월17일
심사청구일자 2021년01월15일
- (85) 번역문제출일자 2019년08월14일
- (65) 공개번호 10-2019-0104407
- (43) 공개일자 2019년09월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/014032
- (87) 국제공개번호 WO 2018/136500
국제공개일자 2018년07월26일
- (30) 우선권주장
62/447,262 2017년01월17일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
WO2012158899 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
론자 워커스빌 아이엔씨.
미합중국 21793 메릴랜드주, 워커스빌, 빅스 포드
로드 8830
- (72) 발명자
니, 영
미국, 메릴랜드 21703, 프레더릭 Apt.6, 메르디언
웨이 4920a
톨리, 조나단, 앤런
미국, 메릴랜드 21793, 워커스빌, 그리니치 드라
이브 127
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
황이남

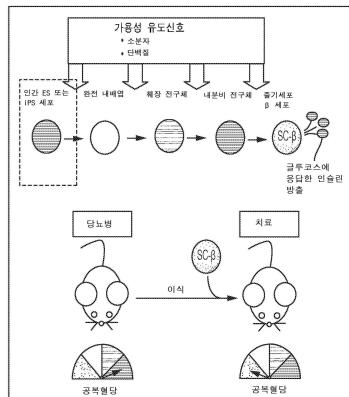
전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 단일세포 인간 만능 줄기세포의 계대 및 수확을 위한 제형

(57) 요약

본 발명의 분야는 세포 분자 생물학 및 줄기세포에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 단일세포 줄기세포, 예컨대 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대(passaging)하기 위한 것으로서, (i) 1 mM 내지 약 30 mM의 시트르산 나트륨; (ii) 10 mM 내지 170 mM의 KCl 또는 NaCl을 포함하는 염; 및 (iii) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘째코 인산완충생리식염수(DPBS)를 포함하는 제형에 관한 것으로서, 이 제형은 약 100 mOsmol/리터 내지 350 mOsmol/리터의 오스몰(삼투압) 농도를 갖는다. 이 제형은 2D 조직 배양기에 부착된 또는 3D 부유식 배양기 (소규모 및 대규모 생물반응기)에서 성장한 만능 줄기세포를 연속 계대 및 제거하기 위해, 또는 단일세포 집단 형태의 줄기세포를 계대할 필요가 있는 기타 다른 응용분야에서 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12N 5/0696 (2013.01)

C12N 2500/14 (2013.01)

(72) 발명자

펠너, 토마스

미국, 메릴랜드 21702, 프레더릭 Apt. 127, 알렉산
드라 코트 114

월시, 패트릭

미국, 메릴랜드 20878, 게이더스버그, 굿 메도우
코트 15009

아마디안 바흐바데라니, 베남

미국, 메릴랜드 21793, 워커스빌, 빙스 포드 로드
8830

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 1 mM 내지 30 mM의 시트르산 나트륨;
- (ii) 30 mM 내지 130 mM의 KCl 또는 NaCl을 포함하는 염; 및
- (iii) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘베코 인산염 완충 염수(DPBS)를 포함하는 단일세포 인간 줄기세포의 수확 및 계대용 제형으로서,

상기 제형은 100 mOsmol/리터 내지 350 mOsmol/리터의 오스몰 농도를 갖는 제형.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 제형의 오스몰 농도는 250 mOsmol/리터 내지 300 mOsmol/리터인 제형.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 시트르산 나트륨의 농도는 5 mMol/리터 내지 15 mMol/리터인 제형.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 염은 80 mMol/리터 내지 120 mMol/리터 농도의 KCl인 제형.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 제형은 pH 7 내지 8을 갖는 제형.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 제형은 pH 7.4 내지 7.8을 갖는 제형.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 있어서,

인간 줄기세포를 더 포함하는 제형.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 인간 줄기세포는 태아 줄기세포, 체세포 줄기세포 및 유도만능 줄기세포로 이루어진 군에서 선택되는 제형.

청구항 13

제 11항에 있어서,

상기 인간 줄기세포는 유도만능 줄기세포인 제형.

청구항 14

제 11항에 있어서,

상기 인간 줄기세포는 표피 줄기세포, 혈액 줄기세포, 조혈 줄기세포, 상피 줄기세포, 심장 줄기세포 및 신경 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 조직-특이적 줄기세포인 제형.

청구항 15

인간 줄기세포(hSCs)를 수화 및 후속 계대하는 방법으로서,

hSCs를 세포 배양 플레이트나 배양기 내의 제 1항, 제 3항 내지 제 5항, 제 8항, 제 9항, 제 11항 및 제 12항 중 어느 한 항에 따른 제형에서 2분 내지 20분간 배양하는 단계를 포함하고, 상기 hSCs는 85% 내지 100%의 세포 생존율을 갖는 단일세포로서 상기 세포 배양 플레이트나 배양기로부터 분리되는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 세포 배양 플레이트나 배양기는 페트리 접시, 다중-웰 세포 배양 플레이트, 적층형 세포 배양 장치, 세포 배양 설비 또는 코니칼튜브으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 hSCs는 생물반응기, 3D 부유식 배양기 또는 코니칼튜브에서 배양되는 방법.

청구항 18

제 15항에 있어서,

단일세포의 다운스트림 프로세싱을 추가로 포함하며, 이 다운스트림 프로세싱은 연속 역류식 원심분리 기술, 제형화, 약병 자동충전, 냉동보존 및 대용량 스크리닝, 유전자조작 및 유도분화로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 인간 줄기세포는 유도만능 줄기세포인 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

2D 조직 배양기에서 단일세포 인간 만능 줄기세포(human pluripotent stem cells, hPSCs)를 수확 및 후속 계대하는 방법으로서,

hPSCs를 제 1항, 제 3항 내지 제 5항, 제 8항, 제 9항, 제 11항, 제 12항, 제 13항 및 제 14항 중 어느 한 항에 따른 제형으로 1:5 내지 1:60의 분할비로 계대하는 단계를 포함하고, 상기 배양은 분할 뒤 10일 이내에 컨플루언스(confluence)에 도달하는 방법.

청구항 25

2D 조직 배양기에서 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 수확 및 후속 계대하는 방법으로서,

- i) hPSCs를 배지에 플레이팅하는 단계;
- ii) 상기 배지를 흡입 제거하는 단계;
- iii) hPSCs를 DPBS로 세척하는 단계;
- iv) 제 1항, 제 3항 내지 제 5항, 제 8항, 제 9항, 제 11항 및 제 12항 중 어느 한 항의 제형을 hPSCs에 가하여 1분 내지 30분간 배양하는 단계; 및
- v) hPSCs를 배양액에 재현탁하는 단계들을 포함하는 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

3D 부유식 배양 생물반응기에서 세포 응집체 형태로 성장한 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 수확 및 후속 계대 방법으로서,

- i) 부유식 배양 생물반응기를 이용하여 세포 응집체 형태의 hPSCs를 배지에서 배양하는 단계;
- ii) 상기 배지로부터 hPSCs를 분리하는 단계;
- iii) 상기 분리된 hPSCs를 DPBS로 세척하는 단계;
- iv) 제 1항, 제 3항 내지 제 5항, 제 8항, 제 9항, 제 11항 및 제 12항 중 어느 한 항의 제형을 hPSCs에 가하고, 교반하며, 그리고 1분 내지 50분간 배양하는 단계; 및
- v) hPSCs를 배양액에 재현탁하는 단계들을 포함하는 방법.

청구항 28

삭제

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명의 분야는 세포 분자 생물학 및 줄기세포에 관한 것이다. 구체적으로는, 본원은 단일세포 줄기세포, 예컨대 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대(passaging)하기 위한 것으로서, (i) 1 mM 내지 약 30 mM의 시트르산나트륨; (ii) 10 mM 내지 170 mM의 KCl 또는 NaCl을 포함하는 염; 및 (iii) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘베코 인산완충생리식염수 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)를 포함하는 제형(formulation)에 관한 것이며, 상기 제형은 약 100 mOsmol/리터 내지 350 mOsmol/리터의 오스몰 농도(osmolarity)를 갖는다.

배경 기술

[0002]

인간 태아 줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs)와 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs)를 포함하는 인간 만능 줄기세포(human pluripotent stem cells, hPSCs)는 각종 체세포로 분화하는 능력을 유지하면서 배양시 무한 증식할 수 있다. 이들 세포는 세포요법 및 재생의학에서 무제한의 세포 공급원으로 그 가치가 높다. 최근 임상실험에 대한 PDA 승인이 증명하는 바와 같이, 인간 태아 줄기세포(hESC)-기반의 세포요법은 벤치(bench) 단계에서 임상(clinic) 단계로 진행되고 있다. 그러나, 현재 이용할 수 있는 전통적인 조직 배양 플라스크 및 T-플라스크 기반의 배양 플랫폼은 hPSCs 생산 확대에 큰 제약이 되고 있는 실정이다. 세포요법 및 재생의학에서 hPSCs의 잠재력을 촉발하기 위해서는, 확대가능한 hPSC 제조공정을 개발해야 한다. 기존의 플라스크 기반 공정을 확대하는 것은 현재의 hPSC 연구를 임상 응용 단계로 이동시키는데 중요한 주춧돌이 된다. 이와 관련한 가장 큰 캘린지 중 하나는 대규모 3D 부유식 배양기 또는 다층 용기에 사용하기 위한 것으로서, 만능 표현형 및 핵형 안정성을 유지하는 확대형 계대법을 구현하는 것이다.

[0003]

인간 PSCs 세포는 개체화할 수 있으며, 즉, 이미지화, 세포 분류 및/또는 부유식 배양에서 균질한 세포 응집체의 형성을 위한 분배 및 균일한 처리를 달성하기 위해 계대 중에 접락(cluster)이 아닌 단일(개별) 세포가 된다. 세포 회수(Cell recovery) 및 세포수와 생존율은 상술한 공정을 성공시키는데 중요할 수 있다. 최대 세포 생존율을 가능케 하기 위해 각종 제형화 방법(가령, 효소 분해법)이 개발되었다. 그러나, hPSCs는 개체화(즉, 단일 세포화) 후 거의 생존하지 못하는데, 그 이유는 이들 세포가 치료에 대해 더 민감하고 쉽게 사멸하기 때문이며, 따라서 보편적인 분해방법을 개발하는 것이 특별한 도전과제가 되었다. 보다 중요한 것은, 기존의 단일세포 분해방법 중 일부(가령, 효소 분해)는 세포의 특성 또는 세포의 유전적 안정성에 영향을 미치는 것으로 공지되어 있으며, 그 이유는 중요한 세포 접착력 및 세포-세포간 상호작용 중개자가 치료 중에 세포 표면으로부터 떨어져 나가기 때문이다. 배양 조건의 질적 수준도 hPSCs의 유지 및 확장에 중요하다. 공급세포 또는 동물에서 배출되는 산물과 관련된 배지 성분들은 세포 배양시 일관성에 종종 큰 영향을 미치며, 이는 중개 연구에 상기 세포를 응용할 가능성이 있을 때, 문제가 더 커질 수 있다.

[0004]

접락 계대(passaging cluster)에 대한 전통적인 접근법과 유사하게, 단일세포 hPSCs의 계대는 종종 세포 생존율 및/또는 민감도에 근거하여 선택된다. 전통적으로, hPSCs는 효소 분해(enzymatic dissociation), 공급세포(feeder cell) 상에서 배양에 이용된 콜라겐 분해효소 (Thomson JA, et al., Science. 282:1145-1147 (1998); Reubinoff BE, et al., Nat Biotechnol. 18:399-404 (2000)) 및 공급 유리 세포(feeder-free cell) 상에서 배양에 이용된 디스파제 (Ludwig TE, et al., Nat Methods. 3:637-646 (2006))에 의해 응집체 형태로 계대된다. 응집체 형태로 세포를 분해하기 위해 세포 스크래퍼 및 기타 계대 기구 등의 기계적 접근법도 개발되었다. 이러한 방법들은 노동집약적이고 상업적 규모의 부착세포(adherent cell)를 생산하는데 사용되는 플랫폼인 다층 세포배양기 내에서 hPSCs를 배양할 때는 적용할 수 없다. 다층 세포배양기에서 성장하는 세포는 스크래핑 작업에 접근할 수가 없다. 또한 기계적 스크래핑은 세포에 심각한 손상을 야기할 수 있다. 스크래핑이 없다면 세포 생존율은 최대 90%로 증가할 수 있다.

[0005]

분화 또는 형질도입 실험에서, TrypLE™ 및 ACCUTASE®을 사용하여 hPSCs를 개체화할 수 있으나, 생존율이 낮아 종종 비정상적인 핵형을 유도한다 (Ellerstrom C, et al., Stem Cells. 25:1690-1696 (2007); Bajpai R, et al., Mol Reprod Dev. 75:818-827 (2008); Thomson A, et al., Cloning Stem Cells. 10:89-106 (2008)). 또한, 상기 방법에서 세포 생존율을 향상시키기 위해서는 Rho-결합 단백질 키나제(Rho-associated protein kinase, ROCK) 저해제 같은 작은 화학물질을 사용해야 하는 경우가 흔하다 (Watanabe K, et al., Nat Biotechnol. 25:681-686 (2007)).

[0006]

이러한 방법들은 모두 장기간 또는 대규모 실험시 비용이 많이 드는 특수한 도구나 시약을 필요로 한다. 이와 동시에, 효소법의 일관성은 일반적으로, 뱃치에서 뱃치로 이동하는 효소의 품질에 영향을 받는다. 이들 방법에 변화를 주어, 세포의 효소 안정성에 영향을 미치지 않으면서 효소의 사용 없이 만능 줄기세포의 중요한 특성을 유지할 수 있는 안전하고 일관되며 재현가능한 접근법을 발견하는 것이 매우 바람직하다.

[0007]

최근에, 일부 hPSC 연구소에서 비효소적 세포 분리 용액, 주로 EDTA (에틸렌디아민 테트라아세트산) 용액으로 hESCs를 계대시키는 방법을 채택했으며, 현재 학술 연구소에서부터 산업쪽으로 확대되고 있다. 세포분해를 위한 시판 EDTA-함유 용액 중 하나는 0.55mM EDTA를 함유하는 VERSENE® EDTA로서, hPSCs를 수확 및 계대시키는데 이용했다. hESCs를 VERSENE® EDTA로 계대하는 일반적인 절차는 배양물을 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 완충액 (예컨대, 둘

베코 인산염-완충 염수; DPBS)로 세척하는 것으로 시작하고, 이어서 배양물을 VERSENE® EDTA에서 4 내지 9분간 배양한다. 다음에, VERSENE® EDTA를 제거하고 세포는 배양액을 피펫 수작업을 통해 살수하여 집락 형태로 표면으로부터 물리적으로 제거한다. 종래의 효소처리후-스크래핑 방법과 비교시 (표 1 참조), 상기 방법의 유리한 점은 (1) 비효소적 용액을 사용하므로, 분리후 세척 또는 원심분리로 효소를 제거할 필요가 없고, (2) 스크래핑 처리가 필요치 않아 - VERSENE® EDTA로 처리한 세포를 표면에서 세척 분리할 수 있는 것이다. 표 1에 기재한 바와 같이, VERSENE® EDTA로 처리하고 스크래핑 없이 분리한 hESCs는 더 높은 분리후 생존율을 갖고, 또한 계대시 새로운 배양면에 훨씬 신속하게 (분단위 대 시간단위) 재부착하게 된다.

표 1

hESCs 수확/계대 방법

| 종래의 효소 및 스크래핑 방법 | VERSENE® EDTA 방법 |
|---|--|
| 1. 배양액을 제거한다 | 1. 배양액을 제거한다 |
| 2. 37°C 의 콜라겐 분해효소 또는 디스파제®에서 2 내지 5분간 배양한다. | 2. Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -무함유 완충제 (예컨대, DPBS)로 처리한다 |
| 3. 콜라겐 분해효소 또는 디스파제®를 제거한다. | 3. 실온의 VERSENE® EDTA에서 4 내지 9분간 배양한다. |
| 4. 배양액으로 3회 세척한다 | 4. VERSENE® EDTA를 제거한다. |
| 5. 세포 스크래퍼로 배양액 안에서 hESCs를 긁어낸다. | 5. 배양액을 살수하여 표면에서 세포를 제거한다. |
| 6. 콜로니 덩어리(colony clump)를 수거 (수확) 또는 새로운 배양기로 이동 (계대)시킨다. | 6. 세포 집락을 수거 (수확)하거나 새로운 배양기로 이동 (계대)시킨다. |

[0009] 그러나, 다층 용기에서 확장하는 hESC에 적용할 경우, VERSENE® EDTA 계대/수확법은 이상적이지 않다.

VERSENE® EDTA는 세포 표면 결합을 파괴하는 것보다 세포-세포간 조합을 붕괴시키는 속도가 더 빠른 것으로 보인다. 6-웰 플레이트 또는 T-플라스크 배양 포맷에서 VERSENE® EDTA를 제거한 후, 세포를 표면에서 제거하려면 피펫 수작업을 통해 배양액을 살수할 때 발생하는 유체 전단력이 필요하다. 그러나, 피펫을 용기 내부로 도입할 수 없기 때문에, 배양액으로 다층 용기내 hESC 배양물을 수작업으로 전단시킬 수 없다. 그러므로, 상기 배양 포맷에서는, VERSENE® EDTA를 배양액으로 교체한 뒤, 강한 태핑 작업으로 세포를 밀어낸다. VERSENE® EDTA로 처리한 hESCs는 배양액에 닿으면 표면에 빨리 재부착되기 때문에, VERSENE® EDTA를 배양액으로 교체한 직후 기계력 (태핑)을 해야 한다. 실제로, 현재의 기술로는 다층 세포 산물에서 전체 배양물의 40 내지 70%를 수확하는 것이 고작이며, 이는 매우 고가의 세포의 수율에 큰 타격을 준다. 수율 증가를 위해 가능한 한 가지 방법은 VERSENE® EDTA를 배양액으로 교체하지 않고 VERSENE® EDTA 존재하에 세포를 제거하는 것이다. 그러나, 이 경우에는 VERSENE® EDTA에 대한 세포의 노출 시간이 증가되며, 이는 핵형이 불안정한 콜로니(colony)를 수확할 위험성이 높아진다. 또한, 최종 수확물에서 VERSENE® EDTA를 제거 및 중성화한 뒤, 분리-후처리 단계가 추가로 수반되므로, 노동강도의 증가를 가져온다. 마지막으로, VERSENE® EDTA 처리를 이용한 계대 공정은, VERSENE® EDTA에 노출시 PSCs가 세포 응집체 또는 콜로니에 존재하기 때문에, 2D 또는 3D에서 단일세포인 PSCs의 연속 계대가 필요한 경우 실행가능한 선택사항이 아니다.

[0010] 본원에서 다양한 문헌을 인용하였으며, 이를 내용 전반을 본원에 참조로서 인용한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 인간 줄기세포, 예컨대, 만능 줄기세포를 수확 및 계대하는 제형, 및 이러한 제형의 용도에 관한 것이다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 줄기세포, 예컨대, 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대하기 위한 것으로서, (i) 1 mM 내지 약 30 mM의 시트르산 나트륨; (ii) 10 mM 내지 170 mM의 KCl이나 NaCl을 포함하는

염; 및 (iii) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘베코 인산염 완충 염수(DPBS)를 포함하는 제형에 관한 것이며, 상기 제형은 약 100 mOsmol/리터 내지 약 350 mOsmol/리터의 오스몰 농도를 갖는다.

과제의 해결 수단

- [0012] 어떤 구현예에서, 이 제형의 오스몰 농도는 약 200 mOsmol/리터 내지 약 300 mOsmol/리터이다. 어떤 구현예에서, 제형의 오스몰 농도는 약 250 mOsmol/리터 내지 300 mOsmol/리터이다.
- [0013] 어떤 구현예에서, 시트르산 나트륨의 농도는 약 5 mMol/리터 내지 약 15 mMol/리터이다.
- [0014] 어떤 구현예에서, 상기 염은 KCl이다. 어떤 구현예에서, KCl의 농도는 약 40 mMol/리터 내지 약 150 mMol/리터이다. 어떤 구현예에서, KCl의 농도는 약 80 mMol/리터 내지 약 120 mMol/리터이다.
- [0015] 어떤 구현예에서, 상기 제형은 약 pH 7 내지 8을 갖는다. 어떤 구현예에서 제형은 약 pH 7.4 내지 7.8을 갖는다. 어떤 구현예에서, 제형은 실질적으로 효소를 함유하지 않는다.
- [0016] 어떤 구현예에서, 상기 제형은 또한 인간 줄기세포, 예컨대, 인간 만능 줄기세포(human pluripotent stem cell)를 더 포함한다. 어떤 구현예에서, 인간 만능 줄기세포는 태아 줄기세포(embryonic stem cell), 체세포 줄기세포(somatic stem cell) 및 유도만능 줄기세포(induced pluripotent stem cell)로 이루어진 군에서 선택된다. 어떤 구현예에서, 인간 줄기세포는 유도만능 줄기세포이다. 어떤 구현예에서, 인간 줄기세포는 표피 줄기세포, 혈액 줄기세포, 조혈 줄기세포, 상피 줄기세포, 심장 줄기세포 및 신경 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 조직-특이적 줄기세포(tissue-specific stem cell)이다.
- [0017] 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 수확 및 계대하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: 세포 배양 플레이트 또는 배양기에서 본 발명에서 상술한 제형을 이용하여 hPSCs를 2분 내지 약 20분간 배양하는 것을 포함하며, 상기 hPSCs는 약 85% 내지 약 100%의 세포 생존율을 갖는 단일세포로서 상기 세포 배양 플레이트 또는 배양기로부터 분리된다. 어떤 구현예에서, 세포 배양 플레이트 또는 배양기는 페트리 접시(petri dish), 다중웰 세포 배양 플레이트(multi-well cell culture plate), 적층형 세포 배양 장치(stacked cell culture apparatus), 세포 배양 설비(cell culture factory) 및 코니칼튜브으로 이루어진 군에서 선택된다. 어떤 구현예에서, hPSCs는 생물반응기, 3D 부유식 배양기 또는 코니칼튜브에서 배양된다. 어떤 구현예에서, 상기 방법은 단일세포의 다운스트림 프로세싱(downstream processing)을 추가로 포함하며, 여기서 다운스트림 프로세싱이란 연속 역류식 원심분리 기술, 제형화, 약병 자동충전(automated vialing), 냉동보존(cryopreservation) 및 대용량 스크리닝(high-throughput screening), 유전자조작 및 유도분화로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0018] 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 만능 줄기세포용 단일세포 계대 용액의 최적화 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: (i) 각각의 단일세포 계대 용액이 하나 이상의 Ca^{2+} 칠레이터(chelator) 및 공지의 오스몰 농도를 가진 것인 복수의 단일세포 계대 용액을 제조하고, 상기 복수의 단일세포 계대 용액 중 각각의 단일세포 계대 용액은 가변 농도 및 가변 오스몰 농도를 갖고; (ii) 상기 복수의 단일세포 계대 용액을 각각 테스트하여 소정의 치료 시간에 분리된 배양물의 백분율 및 소정의 Ca^{2+} 칠레이터 농도 및 오스몰 농도에서 단일세포의 백분율을 결정하고; 및 (iii) 상기 복수의 단일세포 계대 용액 중에서 바람직한 단일세포 계대 용액을 선택하는 단계들을 포함한다.
- [0019] 어떤 구현예에서, 본 발명은 상술한 방법에 따라 수확한 단일세포 계대 용액에 관한 것이다.
- [0020] 어떤 구현예에서, 본 발명은 상술한 제형을 이용하여 hPSCs를 1:5 내지 1:60의 분할율로 계대하는 것을 포함하는 단일세포 hPSCs 수확 및 후속 계대 방법에 관한 것으로서, 상기의 배양은 분할 후 7일 이내에 컨플루언스(confluence)에 도달했다.
- [0021] 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 수확 및 후속 계대하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: (i) hPSCs를 배지에 플레이팅하고, (ii) 배지를 흡입 제거하고, (iii) hPSCs를 DPBS로 세척하고, (iv) 상술한 제형을 hPSCs에 대하여 1분 내지 30분간 배양하고, 및 (v) 상기 hPSCs를 배양액에 재현탁하는 단계들을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단계 (iv)의 제형은 배양액에 hPSCs를 재현탁하기 전에 제거한다.

발명의 효과

- [0022] 어떤 구현예에서, 본 발명은 3D 부유식 생물반응기에서 세포 응집체 형태로 성장한 인간 만능 줄기세포(hPSCs)

를 수확 및 후속 계대하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: (i) 부유식 배양 생물반응기를 이용하여 배지 내에서 세포 응집체 형태의 hPSCs를 배양하고, (ii) 배지로부터 hPSCs를 분리 제거하고, (iii) DPBS로 hPSCs를 세척하고, (iv) 상술한 제형을 가하여 천천히 교반하고 1분 내지 50분간 배양하며, 및 (v) 배양액에 hPSCs를 재현탁하는 단계들을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단계 (iv)의 제형은 배양액에 hPSCs를 재현탁하기 전에 제거한다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 제 0단계의 만능 줄기세포로부터 출발한 유도분화 및 완전 내배엽(definitive endoderm), 췌장 전구세포(pancreatic progenitor cell), 내분비 전구체(endocrine progenitor), 및 최종적으로는 인슐린 분비 베타 췌도 세포(insulin secreting beta islet cells)로 유도시킨 것에 따른 기능성 인간 췌장 β 세포의 시험관내 생성에 관한 개략도이다 (Pagliuca et al., Cell 159:428-439 (2014)).

도 2는 만능 줄기세포를 해동 및 상이한 세포 배양 시스템(배지, 기질 및 계대 용액을 포함하는)을 이용하여 2D (즉, 웰 플레이트 또는 조직 배양 플라스크)에서 확장하고, 이어서 hPSCs를 3D 용기 (비오톤 스피너: Biott Spinner)로 이동시키는 실험 절차에 대한 개략도이다.

도 3은 (i) ESSENTIAL 8[®] 배지 (Thermofisher) + 재조합 비트로넥틴 (rVTN), (ii) NUTRISTEM[®] 배지 (Biological Industries) + 라미닌 및 E-캐드헤린 L&E-Cad, (iii) L7TM 배지 (Lonza) + L7TTM 기질 (Lonza)을 포함하는 L7TM 세포 배양 시스템, (iv) mTeSRTM1 배지 (Stemcell Technologies) + L7TM 기질 (Lonza), 또는 (v) ESSENTIAL 8[®] (Thermofisher) + rVTN에서 배양된 WA27 줄기세포의 평면 배양(planar culture) 결과를 나타낸다. 이들 세포는 다시 표 2에 기재된 바와 같은 VERSENE[®] EDTA 용액 (Lonza), TrypLETM 용액 (ThermoFisher), 또는 3번 제형 ("L7F3")을 이용하여 계대했다. 제 1일 4 x 배율로 세포를 가시화했다. P24는 24회 계대를, T-75는 조직 배양 플라스크- T-75를 각각 의미한다.

도 4는 (i) ESSENTIAL 8[®] 배지 (Thermofisher) + 재조합 비트로넥틴 (rVTN), (ii) NUTRISTEM[®] 배지 (Biological Industries) + 라미닌 및 E-캐드헤린 (L&E-Cad), (iii) L7TM 배지 (Lonza) + L7TM 기질(Lonza)을 포함하는 L7TM 세포 배양 시스템, (iv) mTeSRTM1 배지 (Stemcell Technologies) + L7TM 기질 (Lonza), 또는 (v) ESSENTIAL 8[®] (Thermofisher) + rVTN에서 배양된 WA27 줄기세포의 평면 배양 결과를 나타낸다. 이들 세포는 다시 본 발명에서 개시한 바와 같은 VERSENE[®] EDTA 용액 (Lonza), TrypLETM 용액 (ThermoFisher) 또는 3번 제형 ("L7F3")을 이용하여 계대했다. 제 3일 4 x 배율로 세포를 가시화했다.

도 5는 2D 조직배양 플라스크에서, (i) ESSENTIAL 8[®] + rVTN 기질에서 배양되고 TrypLETM로 계대하거나 또는 (ii) ESSENTIAL 8[®] + rVTN 기질에서 배양되고 3번 제형 ("L7F3")으로 계대하는 세포의 연속 계대배양(sub-culturing) 후 비오톤 스피너(Biott Spinner) 배양시 누트리스템(Nutristem) 배지에서 약 0.6×10^6 세포/mL의 농도로 접종한 H1 세포의 결과를 도시한다. 2D 배양에서 세포 확장 동안 E8 배지에 100, 40 또는 10 ng/mL의 염기성 섬유아세포 성장인자(basic Fibroblast growth factor, bFGF)를 보충했다. 부유식 배양시의 세포는 3번 제형 ("L7F3")을 이용하여 연속 계대배양했다. 세포는 제 4일 이후에 가시화되었다.

도 6은 상기 도 5에 나타낸 바와 같은 다양한 세포 배양액으로 실시한 2D (조직 배양 플라스크) 및 3D 부유식 배양기 (Biott Spinner)에서의 확장 후 H1 세포의 유도분화의 결과를 도시한다. 세포 배양조건에 따라, 제 4단계의 분화시 세포 재배열 췌장 전구세포의 형태를 나타낸다. 도면의 이미지는 부유 상태로 성장 및 3번 제형 ("L7F3")을 이용하여 계대한 세포는 특정의 세포 혈통으로 분화하는 능력을 유지하는 것을 보여준다 (이 경우 내배엽).

도 7은 상기 도 5에 나타낸 바와 같은 다양한 세포 배양액으로 실시한 2D (조직 배양 플라스크) 및 3D 부유식 배양기 (Biott Spinner)에서의 확장 및 췌장 전구세포로의 유도분화 후의 H1 세포에 대한 각종 전사인자 (Oct-4, Sox-17, PDX-1 및 NKX6.1) 발현에 대한 유동 세포측정 분석(flow cytometry analysis)의 결과를 나타낸다. 부유 상태로 성장 및 3번 제형 "L7F3"을 이용하여 계대한 세포는, 만능 줄기세포 표지자 Oct4 및 초기 내배엽 표지자 SOX-17의 부재하여, PDX-1 및 NKX6.1의 고강도 이중 양성 발현을 나타내는 고레벨 췌장 전구세포로의 분

화 능력을 유지한다. 다시 말해, PDX-1과 NKX6.1의 발현은 부유 상태로 성장 및 3번 제형 "L7F3"을 이용하여 계대된 세포가 특정의 세포 혈통으로 분화하는 능력을 유지하는 것을 입증한다.

도 8은 교반하에 및 피펫 수작업 없이 3번 제형 ("L7F3")을 함유하는 3D 배양기 (Biott Spinner)에서 단일세포 부유형 배양물로 분해된 만능 줄기세포 응집체의 이미지를 도시한다. 세포는 부유식 배양에서 0.6×10^6 세포/mL로 접종하고 응집체 형태로 성장했다. 세포 배양액 제거후, 세포 응집체를 60 rpm으로 교반하여 부유 상태를 유지하면서 다양한 배양시간 (20분, 30분 및 40분) 동안 L7F3 계대 용액에 노출했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

인간 줄기세포(hSCs), 예컨대, 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 효소 사용 없이 및/또는 세포 배양기로부터 세포를 분리하기 위한 스크래핑 처리 없이 단일세포를 계대하기 위한 다양한 제형과 방법에 대해 개시한다. 상기 제형 및 방법에 따라, 3D 세포 배양기에서 성장한 hPSCs 뿐만 아니라, 웰 플레이트나 조직배양 플라스크를 포함한 각종 세포 배양기의 표면으로부터 세포를 단일세포로서 수확할 수 있다. 또한, 상기 제형 및 방법은 후속 계대를 위한 세포의 고수확률 및 수확후 세포의 고생존율을 제공한다. 본원에서 상술한 제형 및 방법으로 계대된 만능 줄기세포는 미분화 상태로 잔류하며, 통상적인 줄기세포 표지자를 발현하는 한편 이와 동시에, 분화능력을 유지하고, 수차례의 수확 및 계대 주기 이후에도 3종의 배엽총내 세포로 분화하여 기형종(teratomas)를 발생시킬 수 있다. 이들 hPSCs는 장기간 상기 제형으로 계대된 후 정상적인 핵형을 유지한다.

[0025]

본원의 특허청구범위 및/또는 상세한 설명에서의 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 부정관사 "a (영문)" 또는 "an (영문)"은 "하나"를 뜻하지만 "하나 이상", "적어도 하나" 및 "하나 또는 그 이상" 등과 동일한 의미이다.

[0026]

본원 전체에서 사용되는 용어 "약"은 어떤 수치값을 결정하는데 이용하는 방법/장치의 오차의 고유편차 또는 연구 과제 중에 존재하는 편차를 포함하는 값을 가리킨다. 통상적으로 이 용어는 상황에 따라 대략 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%이나 이보다 적은 변동성을 포함하는 것을 의미한다.

[0027]

특허청구범위에서의 용어 "또는"은 특별히 선택적인 대안을 단독으로 인용하거나 이러한 선택적 대안이 서로에 대해 독립적인 경우를 제외하고 "및/또는"을 의미하는데 사용하며, 다만 본문 명세서는 선택적 대안을 단독으로 인용하는 정의 및 "및/또는"을 모두 뒷받침한다.

[0028]

본원의 상세한 설명 및 특허청구범위에서 사용하는 용어들인 "구성되는" (및 "구성되다(복수형)" 및 "구성되다(단수형)" 등의 형태도 포함), "갖는" (및 "갖다(복수형)" 및 "갖다(단수형)" 등의 형태도 포함), "포함하는" (및 "포함하다(복수형)" 및 "포함하다(단수형)" 등의 형태도 포함) 또는 "함유하는" (및 "함유하다(복수형)" 및 "함유하다(단수형)" 등의 형태도 포함) 등은 포괄적이거나 제한이 없으며, 또한 별도의 인용하지 않은 구성요소나 방법의 단계들을 배제하지 않는 것이다. 본 상세한 설명에서 검토한 구현예는 본 발명의 방법, 시스템, 숙주세포, 발현 벡터 및/또는 조성물에 대해 수행될 수 있는 것으로 간주한다. 또한, 본 발명의 조성물, 시스템, 숙주세포 및/또는 벡터는 본 발명의 방법과 단백질을 달성하는데 사용할 수 있다.

[0029]

"예를 들어" 및 이에 상응하는 약어 "e.g. (예컨대)" (이탈릭체이거나 아닐 수 있다)는 언급한 특정의 용어가 본 발명의 대표적인 실시예 및 구현예임을 의미하며, 특별히 명시적으로 언급하지 않은 한 본 발명에서 참조하거나 인용한 특정의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030]

본 발명은 2D 조직 배양기 및 3D 부유식 배양기로부터 수확한 만능 줄기세포를 단일세포로서 고수율 및 계대후 고세포 생존율로 수확 및 후속 계대하는 비효소적 계대 제형과 방법을 제공한다. 본 발명은 공지 방법의 결점 을 해소하거나 감소시키는 것으로서, hPSCs를 대상으로 측정가능하고 고수율형 계대 및 수확용 제형과 방법을 제공하는 것이다.

[0031]

본 발명은 인간 만능 줄기세포의 수확 및 계대용 제형과 이 제형의 용도에 관한 것이다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대하기 위한 것으로서, (i) 1 mM 내지 약 30 mM의 시트르산 나트륨; (ii) 10 mM 내지 170 mM의 KCl이나 NaCl를 포함하는 염; 및 (iii) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘레코 인산염 완충 염수(DPBS)를 포함하는 제형에 관한 것이며, 상기 제형은 약 100 mOsmol/리터 내지 약 350 mOsmol/리터의 오smol 농도를 갖는다.

[0032]

상기 용어 "줄기세포"는 적어도 어떤 조직의 혈통에 있어 모든 종류의 세포로 분화될 수 있는 능력을 가진 세포를 말한다. 줄기세포는 다른 종류의 세포와 구별되는 2가지 중요한 특징을 가질 수 있다. 첫째, 줄기세포는

세포 분열을 통해 장기간에 걸쳐 스스로 재생되는 비특이적인 세포라는 점이다. 둘째, 적절한 조건에서 분화되어 특정 기능의 세포로 유도할 수 있으며, 이는 분화된 것으로 간주될 수 있다. 여기서 사용하는 용어인 "인간 줄기세포"는 자체 재생 및 적어도 1종의 세포로 분화할 수 있는 인간 세포이다. "인간 줄기세포"는 인간 줄기세포주, 인간 만능세포 (인간 및 인간 유래의 유도만능 줄기세포 및 태아 줄기세포를 포함), 인간 다기능 줄기세포 또는 인간 성체 줄기세포 등을 모두 포함한다. "만능 줄기세포"는 3종의 모든 배엽층 즉, 내배엽, 중배엽 및 외배엽을 생성할 수 있다. 여기서 사용하는 용어인 "성체 줄기세포"는 태아 성장이 완료된 후의 기관 조직에서 유래된 줄기세포, 즉, 비-태아성 줄기세포를 말하며, 이러한 세포는 통상 "체세포 줄기세포"라고 한다. 어떤 구현예에서, 인간 만능 줄기세포는 태아 줄기세포 또는 유도만능 줄기세포이다. 어떤 구현예에서, 인간 줄기세포는 유도만능 줄기세포이다. 어떤 구현예에서, 인간 줄기세포는 표피 줄기세포, 혈액 줄기세포, 조혈 줄기세포, 상피 줄기세포, 심장 줄기세포 및 신경 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 조직-특이적 줄기세포이다.

[0033] 줄기세포는 다양한 조직으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 줄기세포는 외배엽 (표피, 신경, 신경강 및 모낭); 중배엽 (심장 근육, 골격 근육, 제대혈, 간엽, 조혈, 제대 기질 및 다능성 성체 선구물질); 내배엽 (췌장 소도 및 간 난원 세포); 및 생식 (원시 생식) 줄기세포 등에서 선택될 수 있다. 어떤 구현예에서, 인간 줄기세포는 인간 간엽 줄기세포이다. 어떤 구현예에서, 상기 줄기세포는 만능 줄기세포이다. 어떤 구현예에서, 상기 줄기세포는 유도만능 줄기세포이다. 어떤 구현예에서, 인간 만능 줄기세포는 섬유아세포 또는 말초혈액 유래의 단핵 세포, 제대혈 유래 전구세포 또는 골수 유래 줄기세포 및 전구세포로부터 유래된다.

[0034] 어떤 구현예에서, 본 발명은 체세포를 재프로그래姆하여 iPSC를 생성하는 유도인자에 인간 체세포를 접촉시켜 생성된 줄기세포 종류로서 단일 인간 유도만능 줄기세포 (iPSC)를 계대하는 제형에 관한 것이다. 상기 유도인자는 하나 이상의 "재프로그래姆형 성분", 즉, 체세포를 틸-분화하는 성분, 재프로그래ム형 성분을 체세포에 진입 및/ 또는 체세포 내에서 발현시킬 수 있는 "발현능 성분"을 포함한다. 유도인자는 유전자 구조물 또는 융해 단백질일 수 있다.

[0035] 유도인자가 유전자 구조물인 경우, 이 구조물은 OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, 및 C-MYC과 노치 경로 분자, 또는 이의 활성단편이나 유도체 중에서 선택된 하나 이상의 재프로그래ム형 성분을 코딩할 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 보유할 수 있다. 상기 구조물은 복수의 재프로그래ム형 성분들, 또는 1개의 단일 재프로그래ム형 성분을 코딩할 수 있다. 단일 재프로그래ム형 성분은 OCT4, SOX2, LIN28, C-MYC 또는 NANOG 중 하나를 코딩할 수 있다. 대안적으로, 상기 구조물은 OCT4와 SOX2, OCT4와 NANOG, SOX2와 NANOG, OCT4와 LIN28, LIN28과 NANOG 또는 SOX2와 LIN28 중에서 선택된 2개의 재프로그래ム형 성분들을 포함할 수 있다. 상기 구조물은 또한 OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, C-MYC 및 노치 경로 분자 중에서 선택된 2개 이상의 재프로그래ム형 성분의 조합을 포함할 수 있다. 유전자 구조물의 발현능 성분은 렌티바이러스(lentiviral) 또는 에피소말 벡터 골격(episomal vector backbone)일 수 있다.

[0036] 인간 만능 줄기세포의 배양은 포유동물 세포 표준배양과 동일한 다수의 프로토콜을 공유한다. 그러나, 미분화 상태의 인간 만능 줄기세포(hPSCs)의 성공적인 배양 및 유지를 위해서는, 세포가 자체 재생 및 만능성이라는 핵심적인 특징을 유지하도록 보장하는 추가적인 사항을 고려해야 한다. 포유동물 세포 배양에 필요한 기본적인 여러가지 기술이 있는데, 냉동 원액을 해동하고, 세포를 배양기에 플레이팅하고, 배지를 교환하고, 세포를 수확, 계대 및 냉동보존하는 것 등이 여기에 포함된다. 인간 만능 줄기세포를 기능성 세포/특수 세포의 발생에 응용하는 예시로서, 치료 용도로 사용하기 위한 인간 줄기세포의 성장 및 분화에 대한 개괄적 내용을 도 1에서 확인할 수 있다. 수확은 줄기세포를 원하는 용도, 예컨대, 치료 용도를 위해 수거하는 것을 말한다. 계대는 현재의 배양기에서 세포를 분리하여 하나 이상의 새로운 배양기로 이동시키는 것을 말한다. 계대는 과밀에 따른 유해한 영향을 낮추고 배양을 확대하기 위해 필요하다. 어떤 구현예에서, 계대는 배양기에 부착된 세포를 떼어내어 새로운 배양기로 이동시키는 방식으로 현재의 배양기에서 세포를 제거하는 것을 포함한다. 어떤 구현예에서, 계대는 세포 배양액을 제거하고, 세포 응집체를 계대 용액에 노출시키고, 교반 또는 혼합하고, 또한 상기 응집체를 단일세포로 분해시켜서 만능 줄기세포 응집체를 현재의 부유식 배양기 (예, 3D 배양기 또는 생물배양기)에서 제거하는 것을 포함한다.

[0037] 다양한 세포주는 서로 다른 성장 역학성을 갖기 때문에 계대 시간과 조건이 세포주 별로 상이하다. 그러나, 일반적으로 hPSCs는 해동후 처음 몇주간은 천천히 성장하다가 그 속도가 빨라지며 마침내 성장을 정체기에 도달한다. 이어서, 세포가 적절히 배양되는 경우, 세포 성장을 다수의 계대 동안 이 정체기 상태로 유지될 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명의 줄기세포 성장을 매일 관측하여 배양 중인 세포주의 성장 패턴을 형성한다.

- [0038] 어떤 구현예에서, 세포 성장 및 품질을 현미경으로 평가한다. 어떤 구현예에서, (현미경을 통한) 가시 관찰로 언제 얼마나 자주 세포를 계대할 것인지 결정할 수 있다. 2D 조직 배양기, 예컨대, 2D 조직 배양 플라스크에서, 비트로넥틴, 라미닌, 카드헤린 또는 당해 분야에 공지된 기타 세포 기질을 포함하는 하나 이상의 단백질로 사전 코팅한 배양기 표면에 세포가 부착된다. 2D 배양에서, 건강한 미분화 hPSC 콜로니는 일반적으로 균일한 경계부를 갖고 콜로니내 각 세포들이 유사하게 나타난다. 콜로니의 정확한 형태는 세포주 종류별 및 배양조건 (예컨대 사용된 배양법)에 따라 상이하게 된다. 여기서 사용하는 "형태"라는 용어는 소정의 세포 종류 또는 상태와 구별되거나 이와 유사한 세포의 물리적 외형에 관련한 하나 이상의 특징을 설명하는데 사용한다. 어떤 구현예에서, 세포는 세포-표면 접착이 결여된 조건에서 부유식 배양기 (3D 생물배양기)에서 서로 부착되어 구체형 또는 원형의 응집체를 형성한다. 여기서 3D 배양에서의 "형태"는 세포 응집체를 말한다.
- [0039] 인간 만능 줄기세포는 일반적으로 개체화 (즉, 단일세포화) 후 거의 생존하지 못하는데, 그 이유는 이를 세포가 처리에 민감하여 세포 사멸되기 쉽기 때문이며, 따라서 만능 분해법(universal dissociation method)을 개발하는 것이 특별한 도전과제였다. 단일세포 계대를 수행할 때의 세포 생존율을 최대화하고 만능 줄기세포를 확장하고자 다양한 제형을 이용했다. 그러나, 이들 제형은 세포 배양의 일관성에 영향을 줄 수 있는 동물성 산물을 포함하는 경우가 적지 않고 이는 중개연구(translational research)에 세포를 응용할 가능성이 있을 때 더 큰 문제를 일으킬 수도 있다. 만능 줄기세포의 계대 단계에서 분해에 이용하는 방법 중 일부는 콜라겐 분해효소나 디스파제를 이용한 효소 분해 (Stem Cell Technologies), 또는 TrypLE™ 및 ACCUTASE® (종종 유전적 불안정성이나 비정상적 핵형을 유도한다)의 사용, 기계적 접근법, 예컨대 기계적 스크래퍼 및 피펫을 이용한 분쇄 작업 (종종 유의미한 세포사멸 및 계대후 낮은 생존율과 수율 등을 유도한다) 등을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대하는 제형에 관한 것으로서, 상기 제형은 실질적으로 동물의 산물을 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일 인간 만능 줄기세포의 수확 및 계대용 제형에 관한 것으로, 이 제형은 실질적으로 효소를 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 제형은 실질적으로 콜라겐 분해효소, 디스파제, TrypLE™ 및/또는 ACCUTASE®을 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일 인간 만능 줄기세포의 수확 및 계대용 제형에 관한 것으로, 이 제형은 실질적으로 Rho-결합 단백질 키나제 (ROCK) 저해제를 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일 인간 만능 줄기세포의 수확 및 계대용 제형에 관한 것으로, 이 제형은 실질적으로 EDTA를 함유하지 않는다.
- [0040] 상이한 배양조건은 상이한 종류의 분화세포 및 성장변화율을 가져온다. 어떤 구현예에서, 줄기세포는 다음과 같은 조건, 즉: (i) 해동된 세포가 7일, 10일, 14일, 15일, 20일 또는 21일 일령이거나; (ii) 콜로니의 약 30% 초과, 약 40% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과 또는 약 70% 초과가 $200 \mu\text{m}$ 보다 클 경우; (iii) 콜로니의 밀도가 매우 클 경우 (대략 50% 초과, 약 60%, 약 70% 초과 또는 약 80% 초과의 컨플루언스일 때); (iv) 부유식 배양에서 세포가 $50 \mu\text{m}$ 초과, $100 \mu\text{m}$ 초과, $150 \mu\text{m}$ 초과, $200 \mu\text{m}$ 초과, $250 \mu\text{m}$ 초과, $300 \mu\text{m}$ 초과, $350 \mu\text{m}$ 초과, $400 \mu\text{m}$ 초과, $450 \mu\text{m}$ 초과 또는 $500 \mu\text{m}$ 초과의 크기를 가진 세포의 응집체를 형성할 때; 또는 (v) 콜로니가 분화의 증가를 나타낼 때 계대된다.
- [0041] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본원에서 상술한 줄기세포는 계대시 생존한다. 여기서 사용하는 "계대시 생존율"은 상기 제형을 이용하여 모계 배양에서 계대 배양으로 이동시 생존하는 단일세포의 능력을 말한다. 어떤 구현예에서, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 96% 초과, 97% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과의 세포가 여전히 계대 생존 즉, 생존할 수 있다.
- [0042] 본원에서 설명하는 바와 같이, 이 제형은 단일세포 인간 만능 줄기세포의 수확 및 계대를 지원하는 것으로 확인되었다. 본원의 제형은 시트르산 나트륨을 포함한다. 시트르산 나트륨이라는 용어는 1나트륨염, 2나트륨염 및 3나트륨을 포함한 시트르산 나트륨염을 비롯해, 용액내에서 발견되는 경우 나트륨과 약산성 시트르산염을 모두 포함할 수 있다. 당해 분야의 지식을 가진 자라면 기타 다른 I족 염류, 예컨대, 리튬 및 칼륨도 마찬가지로 사용할 수 있으며, 이들이 나트륨염과 균등물로 간주되는 점을 이해할 수 있다.
- [0043] 이론에 기반하지 않더라도, 시트르산 나트륨은 세포-표면 및 세포-세포간 결합에 필요한 2가 양이온인 Ca^{2+} 를 칠레이트화/봉쇄(chelating/sequestering)함으로써, 세포-표면 결합 및 세포-세포간 조합을 방해할 수 있다. 정규 과정(routine)상의 특별한 도전을 목표로 하거나 또는 hPSC 배양 및 제작 방법을 확대하고자 시트르산 나트륨-계열 제형 및 상술한 방법을 고안하고 개발했다. hPSCs는 전형적으로 다세포형 집락/응집체 형태로 계대된다. 그러나, 어떤 구현예에서는 hPSCs를 단일세포 형태로 계대하는 것이 필요하며, (i) 단일세포 혼탁물이 균일한 크기 분포를 갖는 다수의 원형 응집체 (응집체의 크기는 한정된 크기 범위내에 존재함)를 생성하는데 중

요한 경우, 부유식 배양으로 세포를 연속 계대배양할 때, (ii) 유동 세포측정법 또는 세포 선별 장치 같은 세포 특성화 장비를 통해 용이하게 계수 또는 가공하기 위해 단일세포 집단이 필요한 경우, 및/또는 (iii) 만능 줄기 세포로 이루어진 단일세포 집단을 이용하여 분화 공정 같은 다운스트림 프로세싱을 개시하는 경우 등이 여기에 포함된다. 한편, 단일세포 계대는 hPSCs의 저클로닝 효율 및 핵형 기형의 높은 위험성 때문에 피하는 경우가 많다. 본원의 제형 및 방법은 몇가지 중요한 품질 관련 변수들, 예를 들어, 생존율, 수율, 분리후 집락의 크기, 계대 가능성 및 만능 표현형의 유지 능력 등과 관련하여 단일세포 hPSCs를 수확 및 계대하도록 최적화되어 있다. 본원의 제형 및 방법은 노동집약도와 처리시간을 줄이면서 hPSC 배양을 확대하는 통상의 연구소 실험에 사용할 수 있다. 예를 들어, 본원의 제형 및 방법은 세포를 배양기 표면에서 긁어내기 위한 기계적 스크래핑 작업을 줄이고 (또는 스크래핑이 없으며), 세포 수확시 배양물을 분리하기 위해 사용하는 작용제를 제거하는 세척 및 원심분리 작업을 필요로 하지 않는다. 어떤 구현예에서, 본원의 제형 및 방법은 세포가 스크래핑 처리를 적용할 수 없는 다층 세포 배양기에서 성장하는 경우 대규모 hPSC 생산에 적합하다. 어떤 구현예에서, 다층 세포 배양기에서 성장한 hPSCs의 90% 초과를 90% 넘는 생존율로 수확할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본원의 제형 및 방법은 확대가능한 3D 부유식 배양에서 세포 응집체 형태로 성장한 hPSCs의 연속 계대배양 및 단일세포 혼탁물로의 분해 처리에 적합하다. 어떤 구현예에서, 3D 배양에서 성장한 hPSCs의 90% 초과를 90% 넘는 생존율로 수확할 수 있다.

[0044] 어떤 구현예에서, 또 다른 계대 및 수확용 제형을 제공하며, EDTA 및 EGTA, 시트르산 나트륨 이외의 기타 Ca^{2+} 킬레이터, 또는 각종 Ca^{2+} 킬레이터의 조합을 함유하는 제형이 여기에 포함된다. 이러한 모든 시약 (EDTA, EGTA 및 시트르산 나트륨)이 Ca^{2+} 킬레이터이며, 이들은 배양시 부착된 세포를 분리하기 위해 예전부터 사용해왔다. 전술한 바와 같이, VERSENE® EDTA는 통상 일부의 연구소에서 hESCs의 수확 및 계대 용도로 사용했고; EDTA 및 EGTA는 (트립신과 조합하여) 2008년 스코틀랜드 로신 연구소의 Thomson et al. 이 발표한 연구에서 hESCs를 계대하는데 이용했다 (2008) ("Human Embryonic Stem Cells Passaged Using Enzymatic Methods Retain a Normal Karyotype and Express CD30", Cloning and Stem Cells, 10 (1), 1-17). 그러나, 어떤 구현예에서, EDTA (또는 EGTA)로 구성된 계대 제형은 핵형 불안정 콜로니가 생기는 위험성을 증대시킨다. 어떤 구현예에서, EDTA (또는 EGTA)를 최종 수확물로부터 계대 제형을 분리 및 중성화하는 단계에 이어서 추가적인 분리후 처리 단계가 포함되어 노동집약도를 증가시킨다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 EDTA 및/또는 EGTA를 함유하지 않은 수확 및 계대 제형을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본원은 EDTA 및/또는 EGTA 함량을 대폭 감소시킨 제형, 예컨대, 0.05 mM 미만의 EDTA, 0.01 mM 미만의 EDTA, 0.005 mM 미만의 EDTA 또는 0.001 mM 미만의 EDTA를 함유하는 수확 및 계대 제형을 제공한다.

[0045] 계대에 유용한 단일세포 hPSCs를 제공하기에 적합한 것으로 확인된 본원의 제형은 시트르산 나트륨을 1 mM 내지 약 30 mM, 2 mM 내지 약 25 mM, 3 mM 내지 약 20 mM, 또는 5 mM 내지 약 15 mM의 농도로 포함한다. 어떤 구현예에서, 본원의 제형은 약 5 mM, 약 10 mM 또는, 약 15 mM의 농도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 상기 제형은 약 5 mMol/리터 내지 약 15 mMol/리터의 농도의 시트르산 나트륨을 포함한다.

[0046] 본원의 제형은 염을 포함한다. 어떤 구현예에서, 이 염은 염화칼륨(KCl), 염화나트륨(NaCl) 염 또는 이들의 조합물이다. 어떤 구현예에서, 이 염은 NaCl, KCl, LiCl, Na_2HPO_3 , NaH_2PO_3 , K_2HPO_3 , KH_2PO_3 , 및/또는 NaHCO_3 을 포함한다.

[0047] 계대에 유용한 단일세포 hPSCs를 제공하기에 적합한 것으로 확인된 본원의 제형은 NaCl 또는 KCl을 10 mM 내지 170 mM, 20 mM 내지 150 mM, 30 mM 내지 130 mM, 또는 40 mM 내지 120 mM의 농도로 포함한다. 어떤 구현예에서, 이 염은 KCl이다. 어떤 구현예에서, KCl의 농도는 약 40 mMol/리터 내지 약 150 mMol/리터이다. 어떤 구현예에서, KCl의 농도는 약 80 mMol/리터 내지 약 120 mMol/리터이다. 어떤 구현예에서, 이 염은 NaCl이다. 어떤 구현예에서, NaCl의 농도는 약 40 mMol/리터 내지 약 150 mMol/리터이다. 어떤 구현예에서, NaCl의 농도는 약 80 mMol/리터 내지 약 120 mMol/리터이다. 당해 분야의 지식이 있는 자라면, 상기 염의 농도는 원하는 오스몰 농도를 달성하도록 적절히 조정할 수 있음을 이해할 수 있다. 예를 들어, 시트르산 나트륨 (또는 다른 성분)의 농도가 감소할 경우, 원하는 오스몰 농도를 얻기 위하여 염의 함량이 증가할 수 있다. 마찬가지로, 시트르산 나트륨 (또는 다른 성분)의 농도가 증가할 경우, 원하는 오스몰 농도를 얻기 위하여 염의 함량이 감소할 수 있다.

[0048] 본 발명의 제형에 다양한 오스몰 농도를 이용할 수 있다. 상술한 바와 같이, 시트르산 나트륨 염의 농도를 조정하고 제형의 오스몰 농도를 약 100 mOsmol/리터 내지 약 350 mOsmol/리터의 범위로 변경할 경우, 줄기세포 집

락이 아닌 단일세포 만능 줄기세포를 계대하는데 사용할 수 있는 계대 용액을 제공할 수 있다. 어떤 구현예에서, 오스몰 농도를 상술한 바와 같이 감소시키면 hPSCs를 배양기에서 더욱 쉽게 분리할 수 있으며, 예컨대, 기계적 스크래핑 작업이 필요없게 된다. 어떤 구현예에서, 상기 제형은 약 100 mMol/리터 내지 약 350 mMol/리터, 약 125 mMol/리터 내지 약 320 mMol/리터, 약 150 mMol/리터 내지 약 300 mMol/리터, 약 175 mMol/리터 내지 약 275 mMol/리터 또는 약 200 mMol/리터 내지 약 250 mMol/리터의 오스몰 농도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 이 제형은 약 250 mMol/리터, 약 260 mMol/리터, 약 270 mMol/리터, 약 280 mMol/리터, 약 290 mMol/리터 또는 약 300 mMol/리터의 오스몰 농도를 갖는다. 어떤 구현예에서, 제형의 오스몰 농도는 200 mMol/리터 내지 약 300 mMol/리터의 범위이다. 어떤 구현예에서, 제형의 오스몰 농도는 약 250 mMol/리터 내지 약 300 mMol/리터의 범위이다.

[0049] 어떤 구현예에서, 본 발명의 제형은 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘베코 인산염 완충 염수(DPBS)를 포함한다. 둘베코 인산염 완충 염수(DPBS)는 칼슘이나 마그네슘염을 함유하지 않은 평형화된 염 용액으로서, 분해에 앞서 세포의 세척, 세포 또는 조직시료의 이동, 계수 작업을 위한 세포 희석 및 시약 조제 등과 같은 다양한 세포 배양 응용 분야에 이용된다. 칼슘 및 마그네슘을 갖지 않는 제형은 세포분해 전에 배양물로부터 킬레이터를 씻어내는데 필요하다. DPBS는 염화칼륨(0.2 g/l), 인산칼륨 1염기 무수물(0.2 g/l), 염화나트륨(8.0 g/l) 및 인산나트륨 2염기-7수화물(2.160 g/l)을 포함한다.

[0050] 본 발명의 제형은 다양한 pH값을 가질 수 있다. 어떤 구현예에서, 이 제형은 약 pH 7 내지 8을 갖는다. 어떤 구현예에서, 이 제형은 약 pH 7.4 내지 7.8을 갖는다.

[0051] 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대하기 위한 제형에 관한 것으로서, 이 제형은 실질적으로 동물의 산물을 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대하기 위한 제형에 관한 것으로서, 이 제형은 실질적으로 효소를 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 상기 제형은 실질적으로 콜라겐 분해효소, 디스파제, TryPLE™ 및/또는 ACCUTASE®을 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 인간 만능 줄기세포를 수확 및 계대하기 위한 제형에 관한 것으로서, 이 제형은 실질적으로 Rho-결합 단백질 키나제(ROCK) 저해제를 함유하지 않는다. 어떤 구현예에서, 이 제형은 실질적으로 효소를 함유하지 않는다.

[0052] 본 발명의 제형은 단일세포 인간 만능 줄기세포의 수확 및 계대에 적합한 것이다. 따라서, 어떤 구현예에서, 이 제형은 인간 만능 줄기세포를 포함한다. 어떤 구현예에서, 이 제형은 또한 인간 간엽 줄기세포를 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 인간 만능 줄기세포는 태아 줄기세포와 유도만능 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된다. 어떤 구현예에서, 본원에 개시된 발명은 상기 제형 (약 1 mM 내지 약 30 mM의 농도의 시트르산 나트륨, 약 10 mMol/리터 내지 약 170 mMol/리터의 농도의 KCl, 및 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -무함유 둘베코 인산염 완충 염수(DPBS)를 함유한) 및 인간 만능 줄기세포를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0053] 포유동물 세포의 배양에는 다양한 기술과 프로토콜이 사용되는데, 특히: 냉동 원액을 해동하고; 세포를 배양기에 플레이팅하고; 배지를 교환하고; 계대 및 냉동보존하는 단계들을 포함한다. 배양 및 수확 공정에 대한 개략적인 내용을 도 2에서 확인할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 2D 배양에서 인간 만능 줄기세포(hPSCs)의 수확 및 후속 계대 방법에 관한 것으로, 이 방법은: 세포 배양 플레이트 또는 배양기에서 hPSCs를 전술한 바와 같은 수확 및 계대용 제형에서 약 2분 내지 약 20분간 배양하고, 이때 hPSCs는 세포 생존율이 약 85% 내지 약 100%인 단일세포로서 세포 배양 플레이트나 배양기로부터 분리된다. 어떤 구현예에서, hPSCs는 약 5분 내지 약 15분간 또는 약 8 내지 12분간 상기 수확 및 계대용 제형에서 배양된다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 세포 배양액을 제거하고, 세포 응집체를 계대 용액에 대해 약 10분 내지 약 40분간 교반이나 혼합하면서 노출시키고, 및 상기 응집체를 단일세포로 분해함으로써, 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 현재의 부유식 배양기 (즉, 3D 배양기나 생물배양기)로부터 수확 및 후속 계대하는 방법에 관한 것이다.

[0054] 어떤 구현예에서, 약 0.2 mL 내지 약 10 mL의 수확 및 계대용 제형을 세포 배양 플레이트나 배양기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약 0.5 mL 내지 약 5 mL의 수확 및 계대용 제형을 세포 배양 플레이트나 배양기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약 1 mL 내지 약 2 mL의 수확 및 계대 제형을 세포 배양 플레이트나 배양기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약 5 mL 내지 약 10 mL의 수확 및 계대 제형을 부유식 배양기나 생물반응기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약 15 mL 내지 약 40 mL의 수확 및 계대 제형을 부유식 배양기나 생물반응기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약 50 mL 내지 약 100 mL의 수확 및 계대 제형을 부유식 배양기나 생물반응기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약 150 mL 내지 약 500 mL의 수확 및 계대 제형을 부유식 배양기나 생물반응기에 가한다. 어떤 구현예에서, 약

500 mL 내지 약 2000 mL의 수확 및 계대 제형을 부유식 배양기나 생물반응기에 가한다. 수확 및 계대 제형의 양은 배양기의 종류나 크기에 따라 조절할 수 있다.

[0055] 어떤 구현예에서, 세포 배양 플레이트나 배양기는 태평 또는 소용돌이 회전시켜 세포를 표면에서 밀어내는데 도움을 준다. 어떤 구현예에서, 3D 부유식 배양기에서 형성된 세포 응집체는 침전시키고 성장배지를 흡입기 또는 배지 수확관으로 흡입 분리한다. 어떤 구현예에서, 세포를 표면에서 분리하는데 기계적 피랫이나 스크래핑 작업을 활용하지 않는다. 어떤 구현예에서, 계대용 제형의 존재하에 부유식 배양기에서 교반 작업을 통해 세포 응집체를 단일세포로 분해시킨다. 어떤 구현예에서, 생물반응기의 교반 속도는 40 rpm, 50 rpm, 60 rpm, 70 rpm, 80 rpm 또는 90 rpm이다. 어떤 구현예에서, 부유식 배양기에서 계대 용액을 이용한 세포 응집체의 배양시간은 10분, 20분, 30분, 40분 또는 50분이다. 어떤 구현예에서, 배양기간 후에 성장배지를 수확 및 계대 용액에 첨가한다. 어떤 구현예에서, 본원의 수확 및 계대 제형은 성장배지를 첨가하기 전에 제거하지 않는다. 어떤 구현예에서, 배양기간 후에 수확 및 계대 제형내의 hPSCs를 원심분리하고, 수확 및 계대 제형이 포함된 상청액을 흡입분리하고, 펠릿은 Y-27623 (Y 화합물) (Rho-결합 단백질 키나제(ROCK) 저해제, Stemcell Technologies, Cambridge, MA)를 보충한 적정 부피의 성장배지에 재현탁시킨다. 어떤 구현예에서, 수확 및 계대 용액내 hPSCs는 100g 내지 300 g, 예컨대, 200 g의 속도로 약 1분 내지 약 10분, 예컨대, 약 2분 내지 약 5분 또는 약 3분간 원심분리한다.

[0056] 다양한 도관과 용기 (e.g., 세포배양 플레이트나 배양기)가 hPSCs의 배양과 계대에 유용한 것으로 당해 분야의 지식을 가진 자에게 공지되어 있다. 어떤 구현예에서, 세포 배양 플레이트나 배양기는 폐트리 접시, 다중웰 세포 배양 플레이트, 적층형 세포 배양 장치, 세포 배양 설비, 코니칼튜브, 교반기나 임펠러가 장착된 다양한 종류의 스피너 플라스크 또는 임펠러가 장착된 부유식 배양 생물반응기로 이루어진 군에서 선택된다. 어떤 구현예에서, hPSCs는 코니칼튜브에서 배양된다.

[0057] 어떤 구현예에서, 상기 방법은 단일세포의 다운스트림 프로세싱을 더 포함하며, 이 다운스트림 프로세싱은 연속 역류식 원심분리 기술, 영상 촬영, 세포 분류, 제형화, 약병 자동충전, 냉동보존, 대용량 스크리닝, 유전자조작, 유도분화, 및 세포 회수와 세포수가 성공에 중요한, 예컨대, 클론 선택의 비교기준 역할을 하는데 중요한 부유식 배양 작업으로 이루어진 군에서 선택된다.

[0058] 본 발명은 세포 수확 및 계대에 적합한 특정의 오스몰 농도를 갖는 Ca^{2+} 칼레이터 제형, 예컨대, 시트르산 나트륨의 용도를 제공한다. 본 발명의 개시내용은 특정 세포 종류를 위한 인간 만능 줄기세포에 사용할 단일세포 계대 용액 또는 특별한 배양 조건을 찾기 위해 본 발명을 최적화하는데 적합하다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 만능 줄기세포용 단일세포 계대 용액을 최적화하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: (i) 각각이 하나 이상의 Ca^{2+} 칼레이터와 공지의 오스몰 농도를 갖는 복수의 단일세포 계대 용액을 제작하고, 여기서 복수의 단일세포 계대 용액 중 각각은 가변 농도 및 가변 오스몰 농도를 갖고; (ii) 복수의 단일세포 계대 용액 각각을 시험하여 소정의 처리시간에 분리된 배양물의 백분율 및 소정의 Ca^{2+} 칼레이터 농도 및 오스몰 농도에서 단일세포의 백분율을 결정하고, 및 (iii) 복수의 단일세포 계대 용액 중에서 바람직한 단일세포 계대 용액을 선택하는 단계들을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 상술한 방법에 따라 수확한 단일세포 계대 용액에 관한 것이다.

[0059] 어떤 구현예에서, 본 발명은 고생존율, 고수율, 분리후 접락 크기, 연속 계대능, 및 만능 표현형(pluripotent phenotype) (예를 들어, 전형적으로 OCT4, Sox2, Nanog, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-81 등의 전형적으로 줄기세포와 관련된 표지자의 발현)의 유지 및 핵형 안정성 등의 유지에 최적인 제형과 방법을 제공한다.

[0060] 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 hPSCs의 수확 및 후속 계대 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 hPSCs를 상술한 제형으로 1:5 내지 1:60의 분할비로 계대하는 방법에 관한 것으로서, 여기서 배양은 분할 후 3 내지 10일 이내에 컨플라이언스에 도달한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일세포 hPSCs의 수확 및 후속 계대 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 hPSCs를 상술한 제형으로 2×10^5 세포/mL 내지 2×10^6 세포/mL의 접종 세포농도로 계대하는 것을 포함하고, 여기서 배양물은 분할후 3일 내지 6일 이내에 원하는 세포농도에 도달한다.

[0061] 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 만능 줄기세포(hPSCs)를 수확 및 후속 계대 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: (i) hPSCs를 배지에 플레이팅하고, (ii) 배지를 흡입제거하고; (iii) hPSCs를 DPBS로 세척하고; (iv) 상술한 제형을 hPSCs에 가하여 1분 내지 30분간 배양하고; 및 (v) 예컨대 hPSCs를 배양액에 가하여 재현탁하는 단계들을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단계 (iv)의 제형은 배양액에 hPSCs를 재현탁하기 전에 (가령, 여과 또는 원심분리를 통해) 제거한다.

- [0062] 어떤 구현예에서, 본 발명은 인간 만능 줄기세포 (hPSCs)의 수확 및 후속 계대 방법에 관한 것으로서, 이 방법은: (i) 부유식 배양을 위한 생물반응기를 이용하여 배지에서 hPSCs를 배양하고; (ii) 이 배지로부터 hPSCs를 분리 제거하고; (iii) hPSCs를 DPBS로 세척하고; (iv) 상술한 제형을 첨가하여 천천히 교반하고 (가령, 30 내지 70 rpm의 범위에서), 및 1분 내지 50분 동안 배양하고; 및 (v) 배양액에 hPSCs를 첨가 및 재현탁하는 단계들을 포함한다. 어떤 구현예에서, 단계 (iv)의 제형은 배양액에 hPSCs를 재현탁하기 전에 (가령, 여과 또는 원심분리를 통해) 제거한다. 어떤 구현예에서, 단계 (iv)의 제형은 hPSCs를 배양액에 첨가하기 전에 제거하지 않는다.
- [0063] 어떤 구현예에서, 본 발명은 노동집약도와 처리시간을 줄이면서 hPSC 배양을 확장하기 위해 통상의 연구소 실험에 이용할 수 있는 제형 및 그 사용방법을 제공한다.
- [0064] 어떤 구현예에서, 본 발명은 배양기의 표면에서 세포를 제거 및 계대를 위한 단일 hPSCs를 제공하기 위한 기계적 스크래핑을 필요로 하지 않는 제형 및 그 사용방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 배양기의 표면에서 세포를 제거 및 계대를 위한 단일 hPSCs를 제공하기 위해 필요한 기계적 스크래핑을 50%, 80%, 90% 또는 95% 만큼 감소시키는 제형 및 그 사용방법을 제공한다.
- [0065] 어떤 구현예에서, 본 발명은 세포를 배양기 표면으로부터 분리하는데 사용한 계대용 제형을 제거하기 위해 수확된 세포를 세척 및 원심분리할 필요가 없는 제형 및 그 사용방법을 제공한다.
- [0066] 어떤 구현예에서, 본 발명은 평면 또는 다층 세포 배양기에서 성장한 hPSCs의 90% 초과를 90% 넘는 생존율로 수확할 수 있는 제형 및 그 사용방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 평면 또는 다층 세포 배양기에서 성장한 hPSCs의 92% 초과, 94% 초과, 96% 초과 또는 98% 초과를 90% 넘는 생존율로 수확할 수 있는 제형 및 그 사용방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 평면 또는 다층 세포 배양기에서 성장한 hPSCs의 90% 초과를 90% 초과, 92% 초과, 94% 초과, 96% 초과, 98% 초과 또는 99% 초과 생존율로 수확할 수 있는 제형 및 그 사용방법을 제공한다. 본 구현예의 어떤 측면에서, 상기 방법에 따라 예를 들어 90% 이상의 세포를 배양기의 표면으로부터 90% 이상의 세포 생존율로 수확하게 된다.
- [0067] 어떤 구현예에서, 본 발명은 T-플라스크의 hPSCs를 확장하고, 효소를 활용하지 않는 수확 및 계대용 다층 세포 설비로 계대시키며, 이어서 연속 역류식 원심분리 기술 (예를 들어, kSep[®] technology)로 다운스트림 프로세싱 하는 공정에서 사용하는 제형 및 그 사용방법을 제공한다.
- [0068] 어떤 구현예에서, 본 발명은 hPSCs용 세포-탈착 및 세포 분리 제형을 개발하기 위한 제형 및 그 사용방법을 제공하는 것으로서, 계대된 세포는 단일세포이고, 또한 소정의 처리시간에 분리 및 개체화한 배양물의 백분율을 삼투도 및 Ca²⁺ 퀄레이터 농도를 이용하여 제어할 수 있다. 세포 분리 및 세포 개체화에 관련하는 것으로 확인된 두가지 인자는 Ca²⁺ 퀄레이터 농도와 오스몰 농도이다.
- [0069] 어떤 구현예에서, 본 발명은 hPSCs 응집체를 개체화하거나 hPSCs를 마이크로캐리어(microcarrier) 표면으로부터 분리시킨 뒤 2분 내지 50분간 세포 배양기에서 상술한 제형 또는 상술한 방법에 따라 확인된 제형을 이용하여, 부유식 배양기 (3D 생물반응기)에서 성장한 hPSCs를 약 80% 내지 100%의 세포 생존율로 수확 및 후속 계대하기 위한 제형 및 그 사용방법을 제공한다.
- [0070] 어떤 구현예에서, 본 발명은 hPSCs의 수확 및 후속 계대를 위한 제형과 그 사용방법을 제공하며, 이때 hPSCs는 고분할비 (1:5 내지 최고 1:60; 또는 약 100 x 10³/cm² 내지 최저 5 x 10³/cm²의 양으로 시드할 때의 세포 밀도)로 계대되고 배양은 분할 후 10일 이내에 컨플루언스에 도달한다. 어떤 구현예에서, 본 발명은 부유식 배양에서 hPSCs의 수확 및 후속 계대를 위한 제형과 그 사용방법을 제공하며, 이 경우 hPSCs는 2 x 10⁵ 세포/mL 내지 2 x 10⁶ 세포/mL의 시드 밀도로 계대되고 배양물은 6일 이내에 최대 세포수에 도달한다.
- [0071] 어떤 구현예에서, 본 발명은 hPSCs의 수확 및 후속 계대를 위한 제형과 그 사용방법을 제공하며, 이 경우 hPSCs는 만능성 및 50회 이상의 계대시 정상 G-밴드 핵형을 유지한다.
- [0072] 어떤 구현예에서, 본 발명은 단일 미분화 hPSCs를 선택적으로 분리 및 계대하기 위한 제형 및 방법을 제공한다.
- [0073] 어떤 구현예에서, 본 발명은 해동후 고회수율 및 재배열 효율로 단일 hPSCs의 수확 및 후속 냉동보존을 위한 제형 및 방법을 제공한다.

[0074] 어떤 구현예에서, 본 발명은 수확된 단일세포 hPSC를 연속 역류식 원심분리, 제형화, 약병 자동충전 및 냉동보존 기능을 포함하고 냉동기 속도를 제어하는 밀폐 시스템에서 다운스트림 프로세싱하기 위한 제형 및 그 사용방법을 제공한다.

[0075] 어떤 구현예에서, 본 발명은 스크래핑 처리 및 실질적인 생존율 저하 없이 인간 만능 줄기세포의 수확 및 후속 계대를 위한 제형과 그 사용방법을 제공한다. 본 구현예의 일 측면에서, 상기 제형은 예를 들어, 시트르산 나트륨, 염, 인산염 완충 염수 용액을 약 10 내지 170mOsmol/리터의 삼투도로 포함한다.

[0076] 이상에서 개략적으로 설명하였으나, 보다 광범위하고 중요한 본 발명의 특징은 하기의 상세한 설명을 통해 더욱 잘 이해할 수 있으며, 또한 본 발명이 종래 기술에 기여하는 것도 이해할 수 있다. 이하, 본 발명의 다른 특징들에 대해서도 설명하기로 한다.

[0077] 이와 관련하여, 본 발명의 하나 이상의 구현예를 상세히 설명하기에 앞서서, 본 발명의 응용분야는 하기의 상세한 설명 및 도면에 예시된 구성 및 구성요소의 조합에 한정되지 않는 것으로 이해한다. 본 발명은 다른 구현예에서 다양한 방식으로 실시 및 수행할 수 있다. 또한 본원에서 사용한 용어와 단어는 설명을 위한 것이며, 이에 제한되는 것으로 간주하지 않는다.

[0078] 이와 같이, 당해 분야의 지식을 가진 자는 본원에서 기초가 되는 개념이 본 발명의 다수 목적을 수행하기 위한 또 다른 구조, 방법 및 시스템을 설계 고안하기 위한 근거로 용이하게 활용할 수 있는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 사상과 범위를 벗어나지 않는 한도에서 균등한 기술구성이 본 발명에 포함되는 사실이 중요하다.

[0079] 본 발명과 이를 수행할 때의 장점 및 이를 사용함으로써 달성되는 구체적인 목적 등을 보다 잘 이해하기 위해, 첨부 도면 및 본 발명의 바람직한 구현예를 예시하는 기술 내용을 참조하기로 한다.

0080] 실시예

0081] 실시예 1

0082] 다양한 비효소적 세포 분리 제형액 및 그 방법의 사전 스크리닝 및 특징화

[0083] 단일세포 상태의 세포벽으로부터 hPSCs를 분리하는데 도움을 주는 용액을 찾기 위해 일련의 새로운 계대 용액을 고안했다. 기존에는 1 mM 시트르산 나트륨 용액 (570 mOsmol/kg)을 사용했다. 그러나, 세포가 분리될 때 집락이 형성되는 종래의 제형은 계대 제형을 제거하는 추가적인 공정이 필요하다. 새로운 계대 제형군을 하기의 표 2에 열거한다.

표 2

0084] 신규의 비효소적 단일세포 계대 용액

| | |
|--------|--------------------------------|
| 종래의 제형 | 1 mM 시트르산 나트륨 570 mOsmol/kg |
| 1번 제형 | 5 mM 시트르산 나트륨 270 mOsmol/kg |
| 2번 제형 | 10 mM 시트르산 나트륨 270 mOsmol/kg |
| 3번 제형 | 15 mM 시트르산 나트륨 270 mOsmol/kg |

[0085] 상기 제형에 관하여 고생존율을 유지하면서 각각 단일세포 상태의 hPSCs 분리 능력에 대해 시험했다 (데이터는 도시하지 않음). 3번 제형은 더 큰 단일세포 집단의 생성, 분해/계대후 생성된 응집체 백분율 감소 (1번 및 2번 L7 제형과 비교시 3번 L7 제형은 일관적으로 5% 미만의 세포 응집체를 생성한다), 고생존율 (1번 및 2번 L7 제형과 비교시 3번 L7 제형은 일관적으로 90% 이상의 고생존율을 갖는다), 배양시 만능 줄기세포 형태의 유지, 및 2가지 상이한 PSC 세포주 (H1 및 HEU98)로 평가한 결과의 신뢰성 측면에서 1번 및 2번 제형보다 우수한 것으로 나타났다. 분해후 생존율과 세포 응집체 개수는 분해후 세포 혼탁물에서 취한 시료를, 총세포수, 생존하는 세포 총수, 생존율 및 시료내 세포 응집체/집락의 백분율을 평가하기 위해 고안한 세포 계수장치인 계수기 NC-200에 통과시켜 평가했다.

0086] 실시예 2

0087] 평면 배양에서 분해처리 대비 3번 제형의 비교

[0088]

상이한 만능 줄기세포주 및 각종 배지와 기질로 이루어진 세포 배양 시스템에서 3번 제형 계대 용액을 효소적 및 또 다른 비효소적 세포 분리 용액과 비교했다. 종래의 수화/계대법의 단순성을 유지하면서 평면 배양기로부터 수화한 단일세포 hPSCs의 수율을 향상시키는 것을 목적으로 한다. 이 스크리닝 방법은 3가지 상이한 세포주 (H1, WA27 및 HAD106), 4가지 상이한 성장배지 (NUTRISTEM[®], Biological Industries; ESSENTIAL 8[®] 배지 ("E8 배지"), Thermo Fisher Scientific; mTeSR1TM 배지, Stemcell Technologies; L7TM 배지, Lonza), 및 4가지 상이한 기질 (라미닌 & E-카드헤린; 재조합 VTN; Matrigel[®] 기질, Corning; 및 L7TM 기질, Lonza)을 포함한다. 각종 조합물을 하기의 표 3에 열거한다.:

표 3

[0089]

| 세포주 | 배지 | 분해 처리 | 기질 |
|--------|------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| H1 | NUTRISTEM [®] | TrypLE TM | 라미닌 & E-카드헤린 (Semma 프로토콜당) |
| | E8 [®] 배지 | 3번 제형 | rVTN |
| | mTeSR1 [®] | 3번 제형 | L7 TM 기질 |
| | L7 TM 배지 | 3번 제형 | L7 TM 기질 (점차 변화 - 2회 계대) |
| | mTeSR1 (대조군) | TrypLE TM | Matrigel [®] |
| WA27 | NUTRISTEM [®] | TrypLE TM | 라미닌 & E-카드헤린 (Semma 프로토콜당) |
| | E8 [®] 배지 | 3번 제형 | rVTN |
| | mTeSR1 [®] | 3번 제형 | L7 TM 기질 |
| | E8 [®] 배지 (대조군) | VERSENE [®] | rVTN |
| | L7 TM 배지 | 3번 제형 | L7 TM 기질 |
| HAD106 | mTeSR1 TM | 3번 제형 | Matrigel [®] |
| | NUTRISTEM [®] | 3번 제형 | L7 TM 기질 (점차 변화 - 2회 계대) |
| | L7 TM 배지 | 3번 제형 | L7 TM 기질 (점차 변화 - 2회 계대) |
| | NUTRISTEM [®] (대조군) | TrypLE TM | HDF |
| | NUTRISTEM [®] | TrypLE TM | 라미니 & E-카드헤린 (Semma 프로토콜당) |

[0090]

WA27 세포를 플레이트 상의 지정된 배지에서 배양했다. 이어서 사용한 배지를 배양기로부터 원심분리 및 흡입 제거하고 세포를 배양액으로부터 분리했다. 다시 이 세포를 1 mL DPBS/10 cm² 의 Ca²⁺/Mg²⁺-무함유 완충액 (예컨대, DPBS)으로 1회 세척했다. 예열한 1 mL/10 cm²의 계대 용액을 첨가하여 37°C에서 5 내지 15분간 배양했다. 세포를 5분 간격으로 검사했다. 다음에, 배양기를 태평/소용돌이 회전시켜 표면으로부터 세포를 밀어냈다. 이어서, 세포액을 10 mL 부피의 피펫을 이용하여 5회 상하로 피펫처리했다. 분해 반응은 Y 화합물을 보충한 동량 부피의 성장배지를 이용하여 중단시켰다. 이 세포를 200 g로 실온에서 3분간 원심분리했다. 상청액을 흡입제거하고, 세포는 Y 화합물을 보충한 적정 부피의 지정된 성장배지에 혼탁했다.

[0091]

도 3은 지정된 배지 및 기질에서 성장하고, 실시에 1의 3번 제형을 포함하는 지정된 계대 제형을 이용하여 계대한 WA27 세포의 결과를 도시한다. 계대후 제 1일에 촬영한 사진에서 보는 바와 같이, 세포 배양액 (L7 배지, ESSENTIAL 8[®] (E8), NUTRISTEM[®] 및 mTeSR1TM-1 또는 기질 (라미닌 & E-카드헤린; 재조합 VTN; Matrigel[®] 기질, 또는 L7TM 기질)과 관계없이 효소적 계대 TrypLE와 비교시, 3번 계대 제형을 사용하여 계대한 WA27 세포는 이에 필적하는 개체화 세포 및 필적하거나 높은 세포 부착성을 얻었다. Versene(베르신) 계대 용액은 PSCs를 세포집락 형태로 계대하도록 고안되었으므로 (도 3에 도시한 바와 같이), 계대후 단일세포 혼탁액을 생성할 수 없었다. 이 실험을 통해, TrypLETM 와 VERSENE[®] 제형과 비교시 놀랍게도 3번 제형 용도의 시트르산 나트륨 용액이

탁월한 시약인 것으로 확인되었다.

[0092] 도 4는 계대 3일 후의 세포 성장을 보여준다. 3번 제형을 계대 제형으로 사용하면 계대후 세포 성장이 유의미하게 증가하는 결과를 가져온다 (TrypLE™ 및 VERSENE® 계대 제형을 사용하는 경우와 비교하여, L7 세포 배양 시스템 및 EB + L7™ 기질에서 고 컨플루언시로 평가시).

[0093] 상이한 세포 배양 시스템에서 상이한 계대법 간의 정량 비교 결과를 표 4에 나타냈다. 3번 제형은 효소적 계대 TrypLE와 비교시 분해/계대후 생성된 응집체의 백분율, 총 세포수 및 생존율 측면에서 탁월하거나 이에 필적하는 결과를 갖는 것으로 확인되었다. 예상한 바와 같이, 베르센 계대는 단일세포 혼탁물을 생성하는데 실패했다. 카세트법(cassette method)으로서 핵계수기 NC-200을 사용하여 생존율, 분해후 세포 응집체의 수 및 총 생존세포수 등을 산출했다. 효소적 계대시 기형 핵형을 유발할 수 있는 우려를 고려하면, 3번 제형은 수용 가능한 정량적 결과를 가져올 수 있는 보다 안전한 비효소적 계대 용액으로 판단된다.

표 4

| 배지 | 기질 | 계대 제형 | 변환 VCC | 변환 생존율 | 총 세포수 | 응집체 비율(%) |
|--------------|-----------|----------|--------------------|--------|--------------------|-----------|
| NUTRISTEM® | Lam&E-cad | TrypLE™ | 5.38×10^6 | 105.2 | 5.38×10^7 | 5 |
| ESSENTIAL 8® | | VERSENE® | 분할비 1:14 | n/a | n/a | n/a |
| ESSENTIAL 8® | rVTN | 3번 제형 | 5.22×10^6 | 91.0 | 2.76×10^7 | 9 |
| L7™ | L7™ 기질 | 3번 제형 | 5.41×10^6 | 88.9 | 2.41×10^7 | 14 |
| mTeSR™ -1 | L7™ 기질 | 3번 제형 | 5.21×10^6 | 103.7 | 5.21×10^7 | 12 |

[0095] 다수의 배양조건 및 세포, H1 세포주에서 얻은 유사 데이터 (데이터는 도시하지 않음)의 평가를 근거로, 3번 제형 계대 제형과 ESSENTIAL 8® 또는 NUTRISTEM®의 조합을 선택하여 부유식 배양에 대한 연구에서 분석했다.

실시예 3

부유식 배양 (3D, Biott Spinner)에서 분해처리 대비 3번 제형의 비교

[0096] 2D 배양시 다양한 농도의 bFGF를 보충한 세포 배양액에서 H1 세포가 성장한 후 L7 3번 제형을 이용하는 부유식 배양기 (비오토 스피너)로 이동하여 3D의 상기 동일한 세포 배양액에서 성장시켰다. 2D에서 세포 확장 중에, B8 배지에 100, 40 또는 10 ng/mL의 염기성 섬유아세포 성장인자(bFGF)를 보충했다. 다음에, 세포를 배양액으로부터 제거하여 50 mL 코니칼튜브에 담았다. 비오토 스피너 배양기를 10 mL의 DPBS로 세척하고 동일한 코니칼튜브로 이동시켜 잔류 세포를 전달했다. 코니칼튜브를 실온에서 100 g로 1분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 상청액을 흡입제거하고 세포는 30 mL의 DPBS에 재현탁했다. 세포를 다시 실온에서 100 g로 1분간 원심분리하고 상청액은 다시 흡입 제거해다.

[0099] 6 밀리리터의 예열된 3번 제형을 첨가하고, 이 세포를 37°C의 수조에서 15분 내지 20분간 배양했다. 상기 판을 3분마다 소용돌이 회전시켰다. 코니칼튜브를 BSC 내부로 이동시키고 총 부피 10 mL의 피펫으로 세포를 5회 피펫 처리했다. 20 mL의 성장배지 (Y 화합물 함유)를 가하여 반응을 중단시켰다. 다시 세포를 실온에서 200 g으로 5분간 원심분리하고, 상청액을 흡입 제거한 후 남은 세포를 Y 화합물이 보충된 20 mL의 성장배지에 재현탁했다. 최종의 총 부피를 25 mL의 피펫으로 측정했다. 수확된 세포를 NC-200을 이용한 카세트법으로 계수했다. 결과물을 10배로 희석했다 (Y 화합물이 보충된 450 μL의 성장배지 및 50 μL의 세포 혼탁액 이용). 비오토 스피너 배양을 위한 세포 성장 및 생존율은 0.6×10^6 세포/mL의 농도로 접종 4일 후 측정하여 하기의 표 5에 나타낸다. 결과는 수용가능한 세포의 증배 수준 (약 4 내지 5배), 배양물에 잔존하는 응집체의 백분율 (6 내지 12%), 3번 제형 L7을 이용한 세포 계대 후의 응집체 크기 (약 150 내지 200 마이크론의 직경) 등을 보여준다. 처리 방식에 따라, 생존율은 3번 제형 L7로 처리한 세포의 경우 80 내지 84% 이었다. 생존율을 개선하고 배양물에 잔존하는 응집체의 백분율을 감소시키기 위해, 배양시간(15분 내지 20, 30 및 40분)을 늘리고 스피너 플라스크 내부 교반을 통해 3번 제형 L7을 분내지 최적화 처리를 수행하였고, 그 결과를 실시예 5 및 도 8에 요약한다.

표 5

| [0100] | H1 - 배양 시스템 - 누트로시스템 스피너 | 계대 수 # | 세포 계수 (총 생존수) 백만 단위 | 증배율 | 세포 생존율 (생존율 %) | 응집율 (%) | 집락의 직경 (평균) | 표준편차/최소/최대 |
|--------|---------------------------------|--------|------------------------|-----|----------------|---------|-------------|---------------------------|
| | E8/rVTN/TrypLE™ 100 ng/ml | 45 | 80.4 | 4.5 | 86.5 | 5 | 171.29 | 31.93 96.61 261.88 |
| | E8/rVTN/TrypLE™ 40 ng/ml | 45 | 85.2 | 4.7 | 97.0 | 2 | 146.67 | 23.15 96.07 196.03 |
| | E8/rVTN/ 3번 제형 FGF 100 ng/ml | 45 | 74.6 | 4.1 | 83.0 | 12 | 172.15 | 43.28 99.08 338.69 |
| | E8/rVTN/3번 제형 FGF 40 ng/ml | 45 | 85.5 | 4.8 | 80.5 | 12 | 171.94 | 40.81 110.77 311.46 |
| | E8/rVTN/3번 제형 FGF 100 ng/ml | 45 | 74.5 | 4.1 | 84.2 | 6 | 136.6 | 42.77 74.82 378.16 |

[0101] 도 5는 비오토 스피너 배양기의 누트리스템 배지에서 약 0.6×10^6 세포/mL의 농도로 접종한 후 부유식 배양에서 성장한 H1 세포의 결과를 보여준다. 3D 비오토 스피너에서 접종하기 전, 세포들은 2D 조직 배양 플라스크 내에서, (i) ESSENTIAL 8® + rVTN 기질에서 연속 계대배양된 후 TrypLE™으로 계대하거나, 또는 (ii) ESSENTIAL 8® + rVTN 기질에서 연속 계대배양된 후 3번 제형 ("L7F3")으로 계대했다. 2D 배양에서 세포 확장 동안, E8 배지에 100, 40 또는 10 ng/mL의 염기성 섬유아세포 성장인자 (bFGF)를 보충했다. 부유식 배양시 세포들은 3번 제형 ("L7F3")으로 연속 계대배양했으며, 도면은 제 4일의 H1 세포 응집체를 나타낸다. 도면의 이미지는 3번 제형을 이용한 H1 세포의 계대 후 원형 및 구형 세포 응집체가 부유 생성될 수 있음을 보여준다. 응집체의 크기 분포는 2D 배양에서의 처리 및 bFGF 노동에 따라 변한다. 이들 결과는 3D 부유식 배양에서 L7F3을 이용한 hPSCs의 연속 계대의 타당성을 입증하는 것으로, 세포의 성장이나 형태에 영향을 주지 않는다.

[0102] 실시예 4:

[0103] H1 E8 평면 상단 누트리스템 비오토 DD1

[0104] 도 6은 도 1에 도시한 공정에 기초하여 내배엽 혈통으로 분화하는 H1 세포의 결과를 도시한다. 2D (조직 배양 플라스크) 및 3D 부유식 배양기 (비오토 스피너)에서 상이한 세포 배양액에서의 세포 확장 후, 3번 제형 L7을 이용하여 연속 계대배양한 H1 세포를, 제 4단계 분화시 췌장 전구세포를 재배열하는 세포들의 형상에서 확인되는 바와 같이, 상기 유도분화 과정 (즉, 내배엽 혈통으로의 분화)에 사용했다.

[0105] 표 6은 세포 계수 생존율, 응집체 크기, 및 3D 확장과 3번 제형 L7을 이용한 연속 계대배양 후 H1 세포의 유도 분화를 위한 다양한 전사인자 (Oct-4, Sox-17, PDX-1 및 NFKX6.1)의 발현에 관한 유동 세포측정 분석의 결과를 나타낸다. 이들 세포는 고농도 PDX-1 및 NFKX6.1 (췌장 전구세포의 양성 발현을 확인하는데 사용하는 2개의 표지자) 및 극저농도의 만능 줄기세포 표지자 Oct4, 및 초기 내배엽 표지자 SOX-17 등을 나타낸다.

표 6

| [0106] | E8/rVTN/ 3번 제형 FGFb 100 ng/ml | E8/rVTN/ 3번 제형 FGFb 40 ng/ml | E8/rVTN/ 3번 제형 FGFb 10 ng/ml | E8/rVTN/ TrypLE™ FGFb ng/ml 100 | E8/rVTN/ TrypLE™ FGFb 40 ng/ml |
|--------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|--------------------------------------|
| 세포 생존율 | 37.9 | 6.52 | 36.1 | 39.1 | 20.2 |
| 집락의 직경 | 92.664 | 89.1 | 94.932 | 97.956 | 95.904 |
| Pdx1% | 186.71±41.44 | 157.99±48.46 | 186.54±42.42 | 209.28±76.17 | 200.58 ± 55.24 |

| | | | | | |
|---------|----|------|------|------|------|
| NKX6.1% | NA | 35.8 | 62.8 | 20.8 | 30.1 |
| Sox17% | NA | 2.2 | 1.4 | 1.7 | 2.5 |
| Oct4% | NA | 9.1 | 9.1 | 12.4 | 13.5 |

[0107] 도 7, 표 7 및 표 8은 2D (조직 배양 플라스크) 및 3D 부유식 배양기 (가령, 비오톤 스피너)에서 도 5에 나타낸 바와 같은 상이한 세포 배양액에서 세포 확장, 및 이어서 췌장 전구세포로의 유도분화에 따른 H1 세포의 각종 전사인자 (Oct4, Sox-17, PDX-1 및 NKX6.1)의 발현에 관한 유동 세포측정 분석 결과를 도시한다. 부유 성장하고 3번 제형 "L7F3"을 이용하여 계대한 세포는, 만능 줄기세포 표지자 Oct4 및 조기 내배엽 표지자 SOX-17의 부재하에, 고강도 PDX-1 및 NKX6.1 이중 양성 발현을 나타내는 고수준의 전구세포로 분화되는 능력을 유지한다. 다시 말해, PDX-1 및 NKX6.1의 발현은 부유 성장하고 3번 제형 "L7F3" 을 이용하여 계대된 세포가 특정의 세포 협동으로 분화하는 능력을 유지하는 사실을 확인시켜 준다.

표 7

| 발현율(%) | PDX-1 | NKX-6.1 | Oct-4 | Sox-17 |
|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| | Iso/타겟/최종 | Iso/타겟/최종 | Iso/타겟/최종 | Iso/타겟/최종 |
| 3번 제형 FGF-10 | 0.8/97.4/96.6% | 0.9/63.7/62.8% | 0.7/9.8/9.1% | 0.8/2.2/1.4% |
| 3번 제형 FGF-40 | 0.9/94.7/93.8% | 1.0/36.8/35.8% | 1.0/10.1/9.1% | 0.9/3.1/2.2% |
| 3번 제형 FGF-100 | 0.9/95.4/94.5% | 1.0/36.3/35.3% | 1.0/6.7/5.7% | 0.9/3.1/2.2% |

표 8

FACS 요약

| 발현율(%) | PDX-1 | NKX-6.1 | Oct-4 | Sox-17 |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| | Iso/타겟/최종 % | Iso/타겟/최종 % | Iso/타겟/최종 % | Iso/타겟/최종 % |
| Lam FGF-10 | 0.9/89.8/88.9% | 0.8/22.5/21.7% | 1.0/10.6/9.6% | 0.9/4.0/3.1% |
| LamFGF-40 | 1.0/89.5/88.5% | 1.0/18.0/17.0% | 0.9/7.0/6.1% | 1.0/3.5/2.5% |
| LamFGF-100 | 0.9/89.9/89.0% | 1.0/35.5/34.5% | 0.9/5.0/4.1% | 0.9/2.5/1.6% |
| VTNFGF-10 | 1.0/91.9/90.9% | 1.0/45.0/44.0% | 0.9/8.9/8.0% | 0.8/2.9/2.1% |
| VTNFGF-100 | 1.0/90.3/89.3% | 1.1/35.8/34.7% | 1.0/11.6/10.6% | 0.9/6.7/5.8% |
| 3번 제형 FGF-10 | 0.8/97.4/96.6% | 0.9/63.7/62.8% | 0.7/9.8/9.1% | 0.8/2.2/1.4% |
| 3번 제형 3FGF-40 | 0.9/94.7/93.8% | 1.0/36.8/35.8% | 1.0/10.1/9.1% | 0.9/3.1/2.2% |
| 3번 제형 FGF-100 | 0.9/95.4/94.5% | 1.0/36.3/35.3% | 1.0/6.7/5.7% | 0.9/3.1/2.2% |
| TrypLE™ FGF-40 | 1.0/93.8/92.8% | 1.1/31.2/30.1% | 0.8/14.3/13.5% | 0.9/3.4/2.5% |
| TrypLE™ FGF-100 | 0.9/92.6/91.7% | 0.9/21.7/20.8% | 0.9/13.3/12.4% | 0.9/2.6/1.7% |

[0110] 50회 이상의 계대에서도 정상적인 핵형이 존재할 것으로 판단된다.

[0111] 실시예 5

[0112] 수작업 피펫처리 없이 3D 배양에서 줄기세포를 단일세포 혼탁물로 계대

[0113] 앞서 설명한 바와 같이 (실시예 3 참조), 3번 제형 L7을 이용한 추가적인 최적화 처리는 생존율 향상 및 3번 제형 L7을 이용한 분해처리후 잔존하는 세포 응집체의 백분율을 감소시키기 위해 필요했다. 배양시간을 늘리고 (15분 내지 20분, 30분 및 40분) 별도의 관에서 분해처리하는 대신 스피너 플라스크 내부에서 교반함으로써 상기 목적을 달성했다. 이 경우, 교반을 중지하고 3D 배양기 (500 mL 스피너 플라스크)에서 세포 응집체 형태로 성장한 세포들을 침전시켰다. 사용된 배지를 흡입기로 흡입 제거하고 스피너 플라스크 안의 세포들은 100 mL의 3번 제형을 이용하여 37°C의 배양기에서 20분, 30분 또는 40분간 배양했다. 3번 제형으로 배양하는 동안 70

rpm으로 세포를 교반했다. 각 배양물로부터 시료를 채취하고 세포 현탁물을 전도 현미경 (inverted microscope)으로 관찰했다. 상이한 수준의 처리 (3번 제형 처리후 대 3번 제형 처리후, 회전, 및 재현탁) 및 상이한 배양시간에 이미지를 촬영했다. 도 8은 상이한 배양시간 및 상이한 처리 수준으로 3번 제형 L7을 이용하여 분해한 후 생성된 단일세포 현탁물을 나타낸다. 이들 결과는, 3번 제형 L7을 최적화하여 배양시간이 40분인 배양에서 관측되는 응집체의 개수를 감소시킬 수 있음을 보여준다. 표 9는 상이한 배양시간에 관찰된 응집체 수준을 정성분석하여 순위를 나타낸 것으로, 40분간의 배양시 L7 3번 제형을 이용하여 생성한 단일세포의 백분율이 향상되었음을 보여준다.

표 9

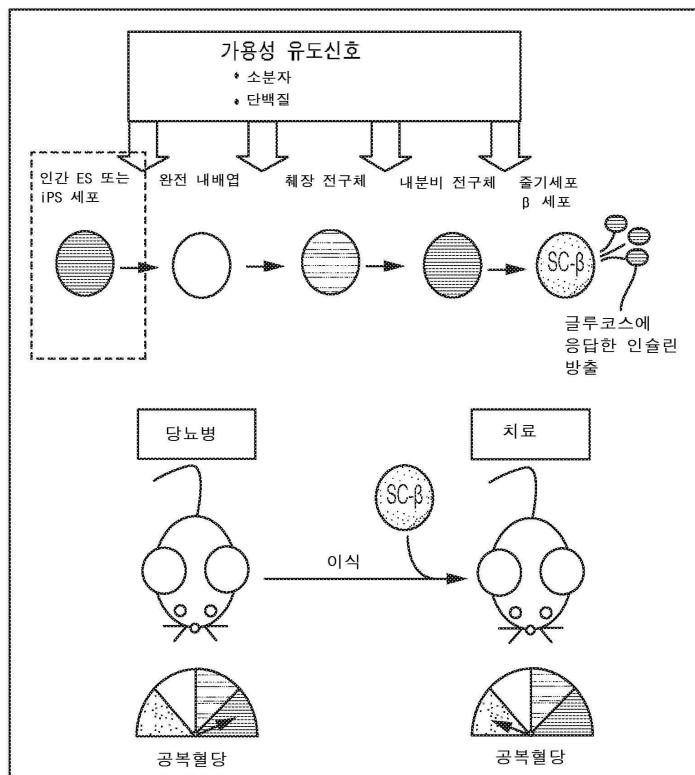
3번 제형 처리후의 응집체 관찰 결과

| 시료 | 3번 제형 배양시간 (분) | 3번 제형 처리 후 | 3번 제형 처리 후 + 회전 및 재현탁 후 | 응집체 순위 |
|----|-------------------|------------|-------------------------|--------|
| 1 | 20 | 있음 | 없음 | 최대 |
| 2 | 30 | 없음 | 없음 | 중간 |
| 3 | 40 | 없음 | 없음 | 최소 |

[0114] 상기 데이터는, 3번 제형 계대 용액을 이용한 3D 부유 배양시 만능 줄기세포 응집체의 분해처리를 수행할 수 있으며, 대규모 생물반응기 시스템에 적용할 수 있음을 시사한다.

도면

도면1



도면2

실험 절차

표준/확립된 배양에서 세포를 해동 및 확장한다



충분한 수의 세포를 생성한다/실험 설계별로 실험을 개시하는 웨
(1개의 6월 플레이트 중 10개의 웨)을 준비한다



지정된 계대 용액을 이용하여 세포를 계대하고 실험 설계별로 각각의
배양물 (즉, 배지 및 기질)에 담는다



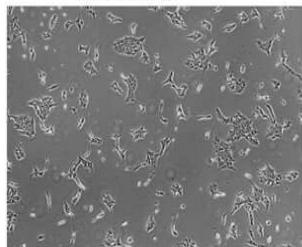
실험 설계별로 각 세포 배양 시스템 (배지, 기질, 계대법)에서
세포를 연속 계대배양한다



각 세포 배양 시스템의 세포를 비오톤 스피너로 계대 (이동)시킨다

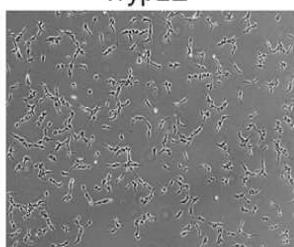
도면3

Versene



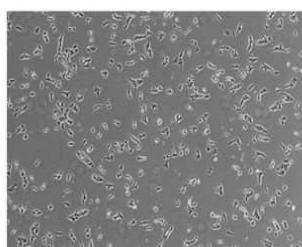
E8 + rVTN

TrypLE

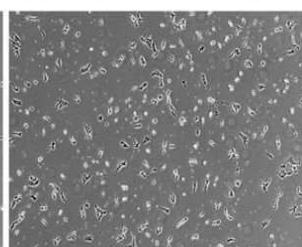


NutriStem + L & E-Cad

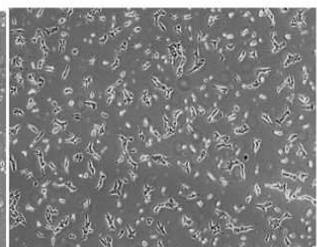
L7 F3



L7 배양 시스템

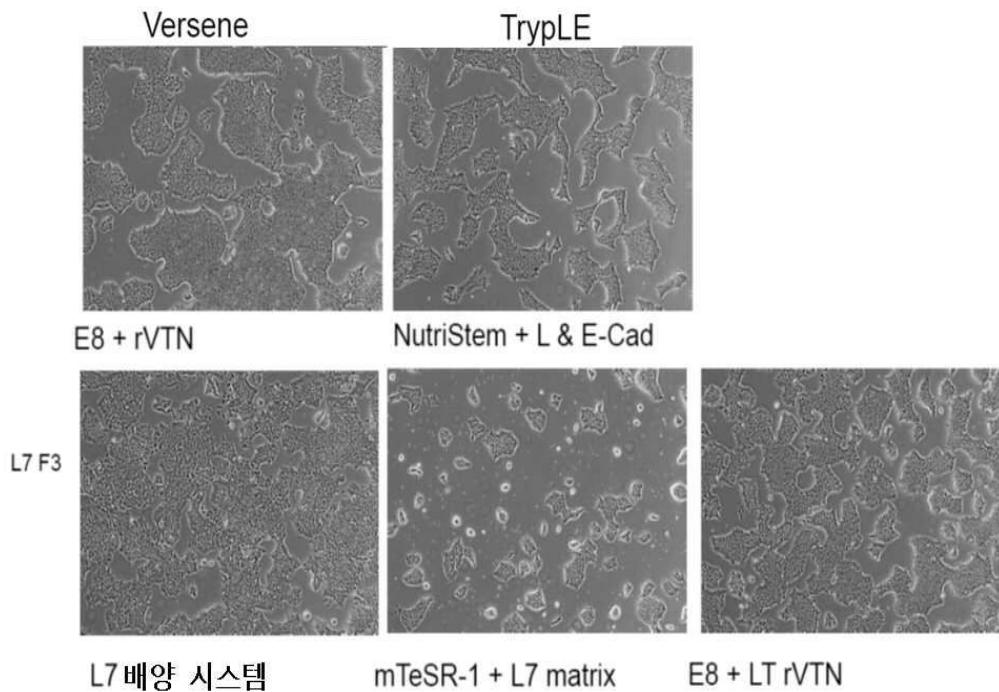


mTeSR-1 + L7 matrix

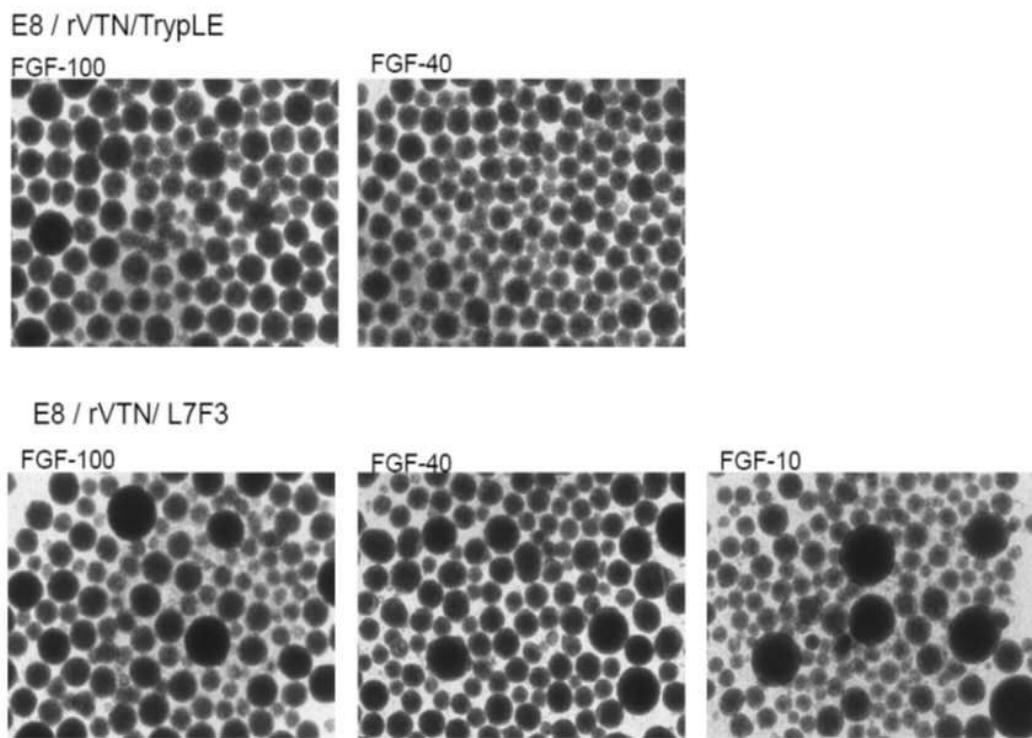


E8 + LT rVTN

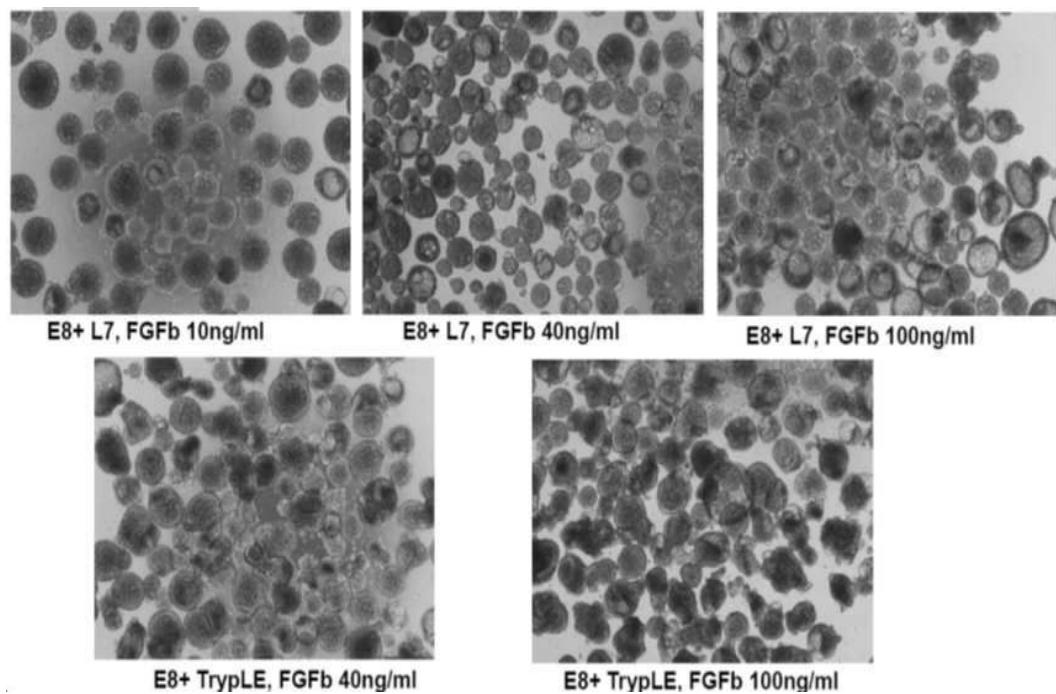
도면4



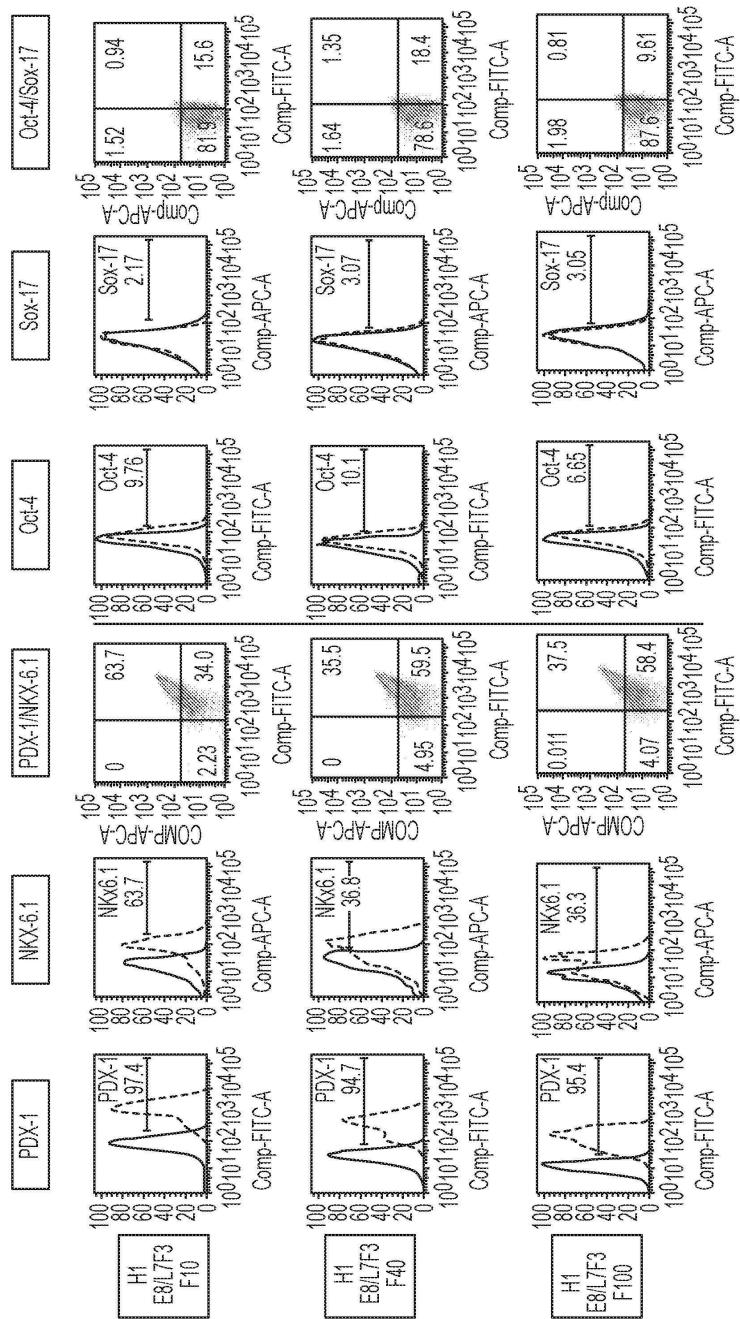
도면5



도면6



도면7



도면8

