



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2021-0068050  
(43) 공개일자 2021년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/079 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0622 (2013.01)  
C12N 2500/38 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-7011488  
(22) 출원일자(국제) 2019년09월19일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2021년04월19일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/052015  
(87) 국제공개번호 WO 2020/061371  
국제공개일자 2020년03월26일  
(30) 우선권주장  
62/733,621 2018년09월19일 미국(US)

(71) 출원인  
리니지 셀 테라퓨틱스, 인크.  
미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 소크 애비뉴  
2173 스위트 200  
(72) 발명자  
네어, 레카, 알.  
미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 솔크 애비뉴  
2173 스위트 200  
카이저, 스테파니  
미국 94043 캘리포니아주 마운틴 뷰 시에라 비스  
타 애비뉴 255  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 **동적 현탁 배양에서 만능 줄기 세포를 분화시키는 방법**

**(57) 요약**

TGFβ/액티빈(Activin)/노달(Nodal) 신호전달 및 BMP 신호전달의 소형 분자 또는 단백질 억제제를 사용하여 동적 현탁 배양에서 만능 줄기 세포를 신경외배엽으로 분화시키는 방법이 제공된다. 만능 줄기 세포 예컨대 인간 배아 줄기 세포를 먼저 신경외배엽으로, 그 후 추가로 신경교 전구 세포로, 그리고 추가로 희소돌기아교세포 전구 세포(OPC)로 분화시키는 방법 및 프로토콜, 및 그에 의해 수득된 조성물이 또한 제공된다. 본 개시내용의 방법은 분화 과정의 제7일까지 신경외배엽 전구 세포를, 분화 과정의 제21일까지 신경교 전구 세포를, 분화 과정의 제42일까지 OPC를 재현가능하게 생산한다.

(52) CPC특허분류

C12N 2501/115 (2013.01)

C12N 2501/15 (2013.01)

C12N 2501/155 (2013.01)

C12N 2501/16 (2013.01)

C12N 2501/165 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

C12N 2533/52 (2013.01)

(72) 발명자

**파리크, 아브히라스, 에스.**

미국 90049 캘리포니아주 로스앤젤레스 메이필드  
애비뉴 11944 아파트먼트 103

**쇼캇-뫼타즈, 우즈마**

미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 솔크 애비뉴  
2173 스위트 200

**화이틀리, 에릭, 미카엘**

미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 솔크 애비뉴  
2173 스위트 200

**먼리, 나탄, 씨.**

미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 솔크 애비뉴  
2173 스위트 200

**할버스타트, 크레이그, 알.**

미국 92008 캘리포니아주 칼스배드 솔크 애비뉴  
2173 스위트 200

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

a) 미분화된 인간 만능 줄기 세포의 비-배아체 (비-EB) 응집물의 현탁 배양물을 수득하는 단계이며, 여기서 인간 만능 줄기 세포가 미분화 상태로 유지되는 것인 단계;

b) 제1 기간 동안 형질전환 성장 인자 베타 (TGF $\beta$ )/액티빈(Activin)/노달(Nodal) 신호전달의 적어도 하나의 억제제 및 골 형태형성 단백질 (BMP) 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 a)로부터의 비-EB 응집물을 배양함으로써, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 단계;

c) 제2 기간 동안 레티노산 및 스무든드(Smoothened) 수용체의 적어도 하나의 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 b)로부터의 비-EB 응집물을 배양하는 단계; 및

d) 세포가 신경교 전구 세포로 성숙되었을 때까지, 추가 기간 동안 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) 및 표피 성장 인자 (EGF)의 존재 하에 동적 현탁액에서 c)로부터의 응집물을 배양하는 단계

를 포함하는, 미분화된 인간 만능 줄기 세포로부터 신경교 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, d)로부터 비-EB 응집물을 수확하고, 이를 기재 상에 플레이팅함으로써, 응집물로부터의 세포 이동을 발생시키는 추가 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 기재가 재조합 인간 라미닌-521인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포 (hESC)인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 인간 유도 만능 줄기 세포 (hiPSC)인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 액티빈 수용체-유사 키나제 5 (ALK5)의 억제제인 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 SB431542, LY2157299, GW788388, A-77-01, A-83-01 및 SB505124로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 SB431542인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 액티빈 수용체-유사 키나제 2 (ALK2)의 억제제인 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 도르소모르핀(Dorsomorphin), DMH-1, K02288, ML3467, LDN193189 및 노긴(Noggin) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 도르소모르핀인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 적어도 1개의 스무든드 수용체 효능제가 퍼모파민(Purmorphamine), 스무든드 아고니스트 (Smoothened Agonist) (SAG, CAS 364590-63-6) 및 소닉 헤지호그(Sonic Hedgehog) (SHH) 단백질로 이루어진 군 으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 적어도 1개의 스무든드 수용체 효능제가 퍼모파민인 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 제1 기간이 약 3 내지 4일인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 제2 기간이 약 3일인 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 단계 a) 내지 d)가 약 21일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항의 방법에 따라 수득된 신경교 전구 세포를 포함하는 분화된 세포 집단.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 신경교 전구 세포가 칼슘 전압-게이팅 채널 보조 서브유닛 감마 4 (CACNG4), 지방산 결합 단백질 7 (FABP7), 및 성 결정 영역 Y-박스 6 (SOX6) 으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것인 분화된 세포 집단.

**청구항 19**

- a) 제1항의 방법에 따라 신경교 전구 세포를 수득하는 단계;
  - b) a)로부터 세포를 수확하고, 이를 기재 상에 플레이팅함으로써, 응집물로부터의 세포 이동을 발생시키는 단계; 및
  - c) 세포가 희소돌기아교세포 전구 세포 (OPC)로 성숙되었을 때까지, 추가 기간 동안 b)로부터의 세포를 표피 성장 인자 (EGF) 및 혈소판-유래 성장 인자 AA (PDGF-AA)의 존재 하에 부착성으로 배양하는 단계를 포함하고,
- 여기서 OPC가 신경/신경교 항원 2 (NG2), 혈소판-유래 성장 인자 수용체 A (PDGFR α), 및 강글리오시드 GD3 (GD3) 으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것인,
- 미분화된 인간 만능 줄기 세포로부터 OPC를 포함하는 세포 집단을 수득하는 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 부착 배양이 약 21일의 기간 동안 수행되는 것인 방법.

**청구항 21**

제19항에 있어서, 부착 배양이 (i) 세포 부착 펩티드 및 (ii) 라미닌 및 비트로넥틴 으로부터 선택된 세포외 매트릭스 으로부터 선택된 기재 상에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 22**

제19항에 있어서, 부착 배양이 재조합 인간 라미닌-521 상에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 23**

제19항에 있어서, 부착 배양이 라미닌-511 E8 단편 상에서 수행되는 것인 방법.

**청구항 24**

제19항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 hESC인 방법.

**청구항 25**

제19항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 hiPSC인 방법

**청구항 26**

제19항의 방법에 따라 수득된 OPC를 포함하는 분화된 세포 집단.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 60%가 NG2 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 70%가 NG2 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 80%가 NG2 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 30**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 90%가 NG2 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 31**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 60%가 PDGFR  $\alpha$  양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 32**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 70%가 PDGFR  $\alpha$  양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 33**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 80%가 PDGFR  $\alpha$  양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 34**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 90%가 PDGFR  $\alpha$  양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 35**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 60%가 GD3 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 36**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 70%가 GD3 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 37**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 80%가 GD3 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 38**

제26항에 있어서, 세포의 적어도 90%가 GD3 양성인 분화된 세포 집단.

**청구항 39**

- a) 미분화된 인간 만능 줄기 세포의 비-배아체 (비-EB) 응집물의 현탁 배양물을 수득하는 단계이며, 여기서 인간 만능 줄기 세포가 미분화 상태로 유지되는 것인 단계;
- b) 제1 기간 동안 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제 및 골 형태 형성 단백질 (BMP) 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 a)로부터의 비-EB 응집물을 배양함으로써, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 단계;
- c) 세포가 페어드 박스(paired box) 6 (PAX6) 양성 신경외배엽 세포로 성숙되었을 때까지, 제2 기간 동안 레티노산 및 스무든드 수용체의 적어도 하나의 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 b)로부터의 비-EB 응집물을 배양하는 단계

를 포함하는, 인간 만능 줄기 세포의 신경외배엽 세포로의 분화를 유도하는 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포 (hESC)인 방법.

**청구항 41**

제39항에 있어서, 인간 만능 줄기 세포가 인간 유도 만능 줄기 세포 (hiPSC)인 방법.

**청구항 42**

제39항에 있어서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 액티빈 수용체-유사 키나제 5 (ALK5)의 억제제인 방법.

**청구항 43**

제39항에 있어서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 SB431542, LY2157299, GW788388, A-77-01, A-83-01 및 SB505124로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 44**

제39항에 있어서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 SB431542인 방법.

**청구항 45**

제39항에 있어서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 액티빈 수용체-유사 키나제 2 (ALK2)의 억제제인 방법.

**청구항 46**

제39항에 있어서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 도르소모르핀, DMH-1, K02288, ML3467, LDN193189 및 노긴 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 47**

제39항에 있어서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제가 도르소모르핀인 방법.

**청구항 48**

제39항에 있어서, 적어도 1개의 스무든드 수용체 효능제가 퍼모파민, 스무든드 아고니스트 (SAG, CAS 364590-63-6) 및 소닉 헤지호그 (SHH) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 49**

제39항에 있어서, 적어도 1개의 스무든드 수용체 효능제가 퍼모파민인 방법.

**청구항 50**

제39항에 있어서, 제1 기간이 약 3 내지 4일인 방법.

**청구항 51**

제39항에 있어서, 제2 기간이 약 3일인 방법.

**청구항 52**

제39항에 있어서, 단계 a) 내지 c)가 약 7 내지 8일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

**청구항 53**

제39항의 방법에 따라 수득된 PAX6 양성 신경외배엽 세포를 포함하는 분화된 세포 집단.

**청구항 54**

제53항에 있어서, PAX6 양성 신경외배엽 세포가 Hes 패밀리의 BHLH 전사 인자 5 (HES5) 및 아연 핑거 및 BTB 도메인 함유 16 (ZBTB16)으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 추가로 발현하는 것인 분화된 세포 집단.

**청구항 55**

a) 탈응집되었고 단일-세포 현탁액을 형성하는 미분화된 인간 만능 줄기 세포를 동적 현탁액에서 배양하여 비-배아체 (비-EB) 응집물을 수득하는 단계이며, 여기서 비-EB 응집물 내의 인간 만능 줄기 세포가 미분화 상태로 유지되는 것인 단계;

b) 제1 기간 동안 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제 및 골 형태 형성 단백질 (BMP) 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 a)로부터의 비-EB 응집물을 배양함으로써, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 단계;

c) 제2 기간 동안 레티노산 및 스무든드 수용체의 적어도 하나의 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 b)로부터의 비-EB 응집물을 배양하는 단계; 및

d) 세포가 신경교 전구 세포로 성숙되었을 때까지, 추가 기간 동안 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) 및 표피 성장 인자 (EGF)의 존재 하에 동적 현탁액에서 c)로부터의 응집물을 배양하는 단계

를 포함하는, 미분화된 인간 만능 줄기 세포로부터 신경교 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

**분야**

본 개시내용은 세포 생물학, 및 신경외배엽 및 신경교 계통 세포, 예컨대 희소돌기아교세포 전구 세포의 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 개시내용은 TGFβ/액티빈(Activin)/노달(Nodal) 신호전달 및 BMP 신호전달의 소형 분자 또는 단백질 억제제를 사용하여 동적 현탁 배양에서 만능 줄기 세포를 신경외배엽으로 분화시키는 신규 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은 만능 줄기 세포 예컨대 인간 배아 줄기 세포를 먼저 신경외배엽으로, 그 후 추가로 신경교 전구 세포로, 그리고 추가로 희소돌기아교세포 전구 세포로 분화시키는 신규 방법을 추가로 제공한다. 추가로 본 개시내용은 하나 이상의 마커를 발현하는 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 신경외배엽 세포, 신경교 전구 세포 및 희소돌기아교세포 전구 세포에 관한 것이다.

**배경 기술**

**배경**

희소돌기아교세포 전구 세포 (OPC)는 미엘린-생산 희소돌기아교세포로 성숙되는 중추 신경계 (CNS) 내의 신경교 세포의 아유형이다. 희소돌기아교세포는 미엘린 수초를 생산하고, 이는 뉴런 축삭을 절연시키고, 미엘린 수초가 상실된 CNS 병변에서 미엘린을 재형성시킨다. 희소돌기아교세포는 뉴런 생존을 촉진하는 신경영양 인자의 생산을 포함하는 다른 메커니즘을 통해 신경보호에 또한 기여한다 (Wilkins A, Chandran S, Compston A. A

role for oligodendrocyte-derived IGF-1 in trophic support of cortical neurons. 2001 *Glia*. 36(1):48-57; Dai X, Lercher LD, Clinton PM, Du Y, Livingston DL, Vieira C, Yang L, Shen MM, Dreyfus CF. The trophic role of oligodendrocytes in the basal forebrain. 2003 *J Neurosci*. 23(13):5846-53; Du Y, Dreyfus CF. Oligodendrocytes as providers of growth factors. 2002 *J Neurosci Res*. 68(6):647-54). 따라서, 희소돌기 아교세포는 미엘린 탈락 및 미엘린 이상형성 장애 (예컨대 다발 경화증, 부신백색질형성장애증 및 부신척수신경병증), 기타 신경변성 장애 (예컨대 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 및 헌팅턴병) 및 급성 척수 손상 (SCI)에 대한 중요한 치료 표적이다.

[0005]

OPC는 CNS를 이루는 다양한 뉴런 및 신경교 세포를 생성시킬 신경 전구체를 발생시키는 신경외배엽 (일명 신경외배엽 또는 신경관 상피)으로부터 유래된다. 인간 만능 줄기 세포 예컨대 배아 줄기 세포 (ESC) 및 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)를 세포 요법에 사용될 수 있는 OPC로 분화시키기 위한 여러 방법이 개발되었다. 신경외배엽 계통 세포 및 신경 전구 세포로의 유도의 초기 단계를 위해, 대부분의 기존의 프로토콜은 꼬리화제(caudalizing agent) 레티노산의 존재 하에서의 정적 비-부착 배양에서의 배아체 (EB), 그리고 후속적으로 신경구 (neurosphere)의 형성에 의존한다 (Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. 2005 *Glia*. 49(3):385-96; Izrael M, Zhang P, Kaufman R, Shinder V, Ella R, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Chebath J, Revel M. Human oligodendrocytes derived from embryonic stem cells: Effect of noggin on phenotypic differentiation *in vitro* and on myelination *in vivo*. 2007 *Mol. Cell. Neurosci*. 34: 310-323; Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. 2009 *Nat. Protoc*. 4:1614-1622). 부착 조건 하에서의 대안적인 분화 프로토콜이 또한 보고되었다 (Hu Z, Li T, Zhang X, Chen Y. Hepatocyte growth factor enhances the generation of high-purity oligodendrocytes from human embryonic stem cells. 2009 *Differentiation*. 78: 117-184). EB-기반 및 부착 분화 프로토콜 양쪽 모두 수율을 최적화하기 위해 신경 전구물질의 수동 선택을 필요로 하고, 쉽게 확장가능하지 않아서, 대량의 요법-등급 세포를 제조하기 위한 그의 유용성을 제한한다. 추가적으로, 신경외배엽 계통 밖의 소수의 세포 유형이 분화 공정 동안 지속되어, 상피 세포 또는 연골세포 전구 세포를 예를 들어 포함하는 최종 OPC 집단 내의 바람직하지 않은 세포 유형에 기여할 수 있다 (Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Oct;6(10):1917-1929).

[0006]

더욱 최근에, 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)/액티빈/노달 신호전달의 억제제를 골 형태형성 단백질 (BMP) 신호전달의 억제제와 동반적으로 사용하는 것에 의해 신경 유도 (신경외배엽 형성)의 효율을 개선하는 방법이 개발되었다. 이러한 공정, 일명 이중 SMAD 억제는 인간 배아 줄기 세포의 신경외배엽 계통 세포로의 효율적인 분화를 촉진하는 것으로 나타났다 (Chambers SM, Craft CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain, M. Studer, L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. 2009 *Nat Biotechnol*. 27(3):275-280). 표준 이중 SMAD 억제 프로토콜에서, 부착 단층 배양에서 신경 유도 및 후속 분화 단계가 수행되어, EB-기반 신경 유도 방법에 의해 생성된 고도로 이질적인 세포 집단을 제거하고, 비-신경 세포를 최소화한다. 이러한 방법은 만능 줄기 세포로부터 신경교 전구 세포 및 OPC를 생성시키는 데 성공적으로 사용되었다 (Douvaras P, Wang J, Zimmer M, Hanchuk S, O'Bara MA, Sadiq S, Sim FJ, Goldman J, Fossati V. Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. 2014 *Stem Cell Reports*. 3(2):250-9). 그러나, 3차원 (3D) 배양 방법에 비교하여 부착 단층 배양의 한가지 단점은 이의 제한된 확장가능성 및 수율이다. 또한, 3D 배양 환경은 천연 세포 미세환경을 모방한다; 3D 세포 배양 기술을 사용하여 성장된 세포는 (2D) 부착 단층에서 성장된 세포보다 천연 조직 및 기관에 더 밀접하게 유사한 것으로 생각된다. 최종적으로, 부착 단층 배양은 규정되지 않은 성분 및 동물-유래 성분, 예컨대 매트릭셀(Matrigel)® 및 녹아웃 혈청 대체물 (KSR)의 사용에 의존한다.

[0007]

이러한 제약을 다루기 위해, 이중 SMAD 억제와 EB 형성을 조합하는 방법이 최근 개발되고 테스트되었다 (Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, Nelander J, Wood J, Lundblad M, Lindvall O, Parmar M. Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. 2012 *Cell Rep*. 1(6):703-14; Crompton LA, Byrne ML, Taylor H, Kerrigan TL, Bru-Mercier G, Badger JL, Barbuti PA, Jo J, Tyler SJ, Allen SJ, Kunath T, Cho K, Caldwell MA. Stepwise, non-adherent differentiation of human pluripotent stem cells to generate basal forebrain cholinergic

neurons via hedgehog signaling. 2013 *Stem Cell Res.* 11(3):1206-21; Pauly MG, Krajka V, Stengel F, Seibler P, Klein C, Capetian P. Adherent vs. Free-Floating Neural Induction by Dual SMAD Inhibition for Neurosphere Cultures Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. 2018 *Front Cell Dev Biol.* 6:3). EB-기반 방법에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달 및 BMP 신호전달의 소형 분자 억제제가 정적 비-부착 배양에서 형성된 EB에 적용된다. 그러나, EB-기반 이중 SMAD 억제는 대량의 표적화된 세포의 생산을 위해 쉽게 확장가능하지 않고, 수득된 세포에서의 더 큰 정도의 다양성을 발생시키는데, 이는, 부분적으로, EB의 정적 배양이 상이한 크기의 응집물들이 형성되는 것을 발생시키고, 공정 전반에 걸쳐 빈번한 분쇄를 필요로 하기 때문이다 (Crompton LA, Byrne ML, Taylor H, Kerrigan TL, Bru-Mercier G, Badger JL, Barbuti PA, Jo J, Tyler SJ, Allen SJ, Kunath T, Cho K, Caldwell MA. Stepwise, non-adherent differentiation of human pluripotent stem cells to generate basal forebrain cholinergic neurons via hedgehog signaling. 2013 *Stem Cell Res.* 11(3):1206-21).

[0008] 만능 줄기 세포를 신경외배엽으로, 그리고 추가로 신경교 전구 세포 및 OPC로 분화시키는 개선된 방법이 요구된다. 이상적으로, 이같은 방법은 표적화된 세포 유형을 일관적으로, 그리고 재현가능하게 생산하면서 세포 요법 용도를 위해 충분한 양의 분화된 세포를 생산하도록 쉽게 확장가능하여야 한다.

**발명의 내용**

[0009] **개요**

[0010] 본원에 기술된 다양한 실시양태에서, 특히, 본 개시내용은 바이오리액터에서 수행될 수 있고 대규모 배양으로 개조될 수 있는 동적 현탁 배양에서 인간 만능 줄기 세포 예컨대 ESC 및 iPSC를 신경외배엽 및 신경교 세포로 분화시키는 견고하고 신뢰할 수 있는 프로토콜을 제공한다. 동적 현탁 배양에서 신경외배엽으로, 그리고 추가로 신경교 세포로의 분화를 유도하고, 이어서 신경교 세포를 OPC로 분화시키는 것에 의해 인간 만능 줄기 세포를 OPC로 분화시키는 프로토콜이 또한 제공된다.

[0011] 본 개시내용은, 부분적으로, 출발 물질인 만능 줄기 세포가 동적 현탁액에서 비-EB 응집물로 응집될 수 있고, 여기서 만능 줄기 세포가 미분화로 유지되며, 이어서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 하나 이상의 억제제 및 BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제를 사용하는 것에 의해 동적 현탁액 내에 있으면서 응집물이 신경외배엽으로 분화되도록 유도될 수 있다는 발견을 기초로 한다. 부착 배양 및 EB-기반 방법과 대조적으로, 본 개시내용에 따라 동적 현탁액에서 만능 줄기 세포를 분화시키는 것은 출발 물질로부터 대량의 표적화된 신경외배엽 계통 세포를 생산하기 위한 확장가능하고, 재현가능하며, 제어가능한 공정을 제공한다.

[0012] 본 개시내용의 방법은 분화 공정의 제7일까지 신경외배엽 전구 세포를, 분화 공정의 제21일까지 신경교 전구 세포를, 분화 공정의 제42일까지 OPC를 재현가능하게 생산한다. 본 개시내용에 따라 생산된 OPC가 시험관 내에서 상피 낭종 형성과 연관된 마커를 포함하는 비-OPC 마커를 더 낮은 수준으로 발현한다는 것을 제외하고, 본 개시내용에 따라 생산된 제42일 OPC는 (그의 전반적인 마커 발현 프로파일의 관점에서) 척수 손상을 치료하기 위해 현재 임상 시험 중인 대안적인 방법을 사용하여 생성된 OPC (Priest CA, Manley NC, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regen Med.* 2015 Nov;10(8):939-58; Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Oct;6(10):1917-1929)에 필적한다

[0013] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 미분화된 인간 만능 줄기 세포로부터 신경교 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 (a) 미분화된 인간 만능 줄기 세포의 비-배아체 (비-EB) 응집물의 현탁 배양물을 수득하는 단계이며, 여기서 인간 만능 줄기 세포가 미분화 상태로 유지되는 것인 단계; (b) 제1 기간 동안 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제 및 골 형태형성 단백질 (BMP) 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 (a)로부터의 비-EB 응집물을 배양함으로써, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 단계; (c) 제2 기간 동안 레티노산 및 스무드드(Smoothened) 수용체의 적어도 하나의 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 (b)로부터의 비-EB 응집물을 배양하는 단계; 및 (d) 세포가 신경교 전구 세포로 성숙되었을 때까지, 추가 기간 동안 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) 및 표피 성장 인자 (EGF)의 존재 하에 동적 현탁액에서 (c)로부터의 응집물을 배양하는 단계를 포함한다.

- [0014] 특정 실시양태에서, 제1 기간은 약 3 내지 4일이다. 특정 실시양태에서, 제2 기간은 약 4일이다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 및 (b)는 약 7 내지 8일의 기간에 걸쳐 수행된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (d)는 약 21일의 기간에 걸쳐 수행된다.
- [0015] 특정 실시양태에서, 방법은 (d)로부터 비-EB 응집물을 수확하고, 이를 기재 상에 플레이팅함으로써, 응집물로부터의 세포 이동을 발생시키는 추가 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 기재는 세포 부착 펩티드이다. 다른 실시양태에서, 기재는 세포외 매트릭스 단백질이다. 특정 실시양태에서, 기재는 재조합 인간 라미닌-521이다. 다른 실시양태에서, 기재는 비트로넥틴 또는 라미닌-511 E8 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 기재는 합성 기재, 예를 들어, 신세스맥스(Synthemax)®-II SC 기재이다.
- [0016] 추가 실시양태에서, 방법은 세포가 OPC로 성숙되었을 때까지, 추가 기간 동안 응집물로부터 이동된 세포를 표피 성장 인자 (EGF) 및 혈소판-유래 성장 인자 AA (PDGF-AA)의 존재 하에 기재 상에 부착성으로 배양하는 추가 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 기재는 세포 부착 펩티드이다. 다른 실시양태에서, 기재는 세포외 매트릭스 단백질이다. 특정 실시양태에서, 기재는 재조합 인간 라미닌-521이다. 다른 실시양태에서, 기재는 비트로넥틴 또는 라미닌-511 E8 단편이다. 특정 실시양태에서, 부착 배양은 약 21일 동안 수행된다.
- [0017] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 미분화된 인간 만능 줄기 세포의 비-배아체 (비-EB) 응집물의 현탁 배양물을 수득하는 단계이며, 여기서 인간 만능 줄기 세포가 미분화 상태로 유지되는 것인 단계; (b) 제1 기간 동안 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제 및 골 형태형성 단백질 (BMP) 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 (a)로부터의 비-EB 응집물을 배양함으로써, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 단계; 및 (c) 세포가 페어드 박스(paired box) 6 (PAX6) 양성 신경외배엽 세포로 성숙되었을 때까지, 제2 기간 동안 레티노산 및 스무든드 수용체의 적어도 하나의 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 (b)로부터의 비-EB 응집물을 배양하는 단계를 포함하는, 인간 만능 줄기 세포의 신경외배엽 세포로의 분화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0018] 특정 실시양태에서, 제1 기간은 약 3 내지 4일이다. 특정 실시양태에서, 제2 기간은 약 4일이다. 특정 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (c)는 약 7 내지 8일의 기간에 걸쳐 수행된다.
- [0019] 추가적인 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 탈응집되었고 단일-세포 현탁액을 형성하는 미분화된 인간 만능 줄기 세포를 동적 현탁액에서 배양하여 비-배아체 (비-EB) 응집물을 수득하는 단계이며, 여기서 비-EB 응집물 내의 인간 만능 줄기 세포가 미분화 상태로 유지되는 것인 단계; (b) 제1 기간 동안 형질전환 성장 인자 베타 (TGFβ)/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제 및 골 형태형성 단백질 (BMP) 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 (a)로부터의 비-EB 응집물을 배양함으로써, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 단계; (c) 제2 기간 동안 레티노산 및 스무든드 수용체의 적어도 하나의 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 (b)로부터의 비-EB 응집물을 배양하는 단계; 및 (d) 세포가 신경교 전구 세포로 성숙되었을 때까지, 추가 기간 동안 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) 및 표피 성장 인자 (EGF)의 존재 하에 동적 현탁액에서 (c)로부터의 응집물을 배양하는 단계를 포함하는, 미분화된 인간 만능 줄기 세포로부터 신경교 전구 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 방법을 제공한다.
- [0020] 특정 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 액티빈 수용체-유사 키나제 5 (ALK5)의 억제제이다. 다른 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 SB431542, LY2157299, GW788388, A-77-01, A-83-01 및 SB505124로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 억제제는 SB431542이다.
- [0021] 특정 실시양태에서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 액티빈 수용체-유사 키나제 2 (ALK2)의 억제제이다. 다른 실시양태에서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 도르소모르핀(Dorsomorphin), DMH-1, K02288, ML3467, LDN193189 및 노긴(Noggin) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, BMP 신호전달의 억제제는 도르소모르핀이다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 적어도 1개의 스무든드 수용체 효능제는 퍼모파민(Purmorphamine), 스무든드 아고니스트 (Smoothed Agonist) (SAG, CAS 364590-63-6) 및 소닉 헤지호그(Sonic Hedgehog) (SHH) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 스무든드 수용체 효능제는 퍼모파민이다.
- [0023] 추가적인 실시양태는 본 개시내용의 방법에 따라 수득된 PAX6 양성 신경외배엽 세포를 포함하는 분화된 세포 집단이다. 특정 실시양태에서, PAX6 양성 신경외배엽 세포는 HES5 및 ZBTB16으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 추가로 발현한다.

[0024] 또 다른 실시양태는 본 개시내용의 방법에 따라 수득된 신경교 전구 세포를 포함하는 분화된 세포 집단이다. 특정 실시양태에서, 신경교 전구 세포는 칼슘 전압-게이팅 채널 보조 서브유닛 감마 4 (CACNG4), 지방산 결합 단백질 7 (FABP7), 및 성 결정 영역 Y-박스 6 (SOX6)으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다.

[0025] 또 다른 실시양태는 본 개시내용의 방법에 따라 수득된 OPC를 포함하는 분화된 세포 집단이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 방법에 따라 생산된 OPC는 신경/신경교 항원 2 (NG2), 혈소판-유래 성장 인자 수용체 A (PDGFR α) 및 강글리오시드 GD3 (GD3) (GD3은 일명 항-디시알로강글리오시드 및 강글리오시드 GD3 신타제이다)으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다. 따라서, 예를 들어, 본 발명에 따라 제조된 OPC는 NG2, PDGFR α, 또는 GD3; NG2 및 PDGFR α, NG2 및 GD3, 또는 PDGFR α 및 GD3의 조합; 또는 NG2, PDGFR α 및 GD3의 조합을 발현할 수 있다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 60%의 NG2 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 70%의 NG2 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 80%의 NG2 양성인 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 90%의 NG2 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 98%의 NG2 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 60%의 PDGFR α 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 70%의 PDGFR α 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 80%의 PDGFR α 양성인 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 90%의 PDGFR α 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 98%의 PDGFR α 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 60%의 GD3 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 70%의 GD3 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 80%의 GD3 양성인 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 90%의 GD3 양성인 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 분화된 세포 집단은 적어도 98%의 GD3 양성인 세포를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

[0026] **도면의 간단한 설명**

도 1은 본 개시내용에 따라 인간 배아 줄기 세포가 신경외배엽 (제7일)으로, 그리고 추가로 신경교 전구 세포 (제21일) 및 희소돌기아교세포 전구 세포 (제42일)로 분화되는 것을 도시하는 도식이다. DS = 동적 현탁액, TGFβ/액틴/노달 신호전달 (SB431542 이외의 것) 및 BMP 신호전달 (도르소모르핀 이외의 것)의 여러 추가적인 소형 분자 억제제가 테스트되었고, 신경외배엽으로의 분화를 유도하는 것에서 동등하게 잘 작동하는 것으로 밝혀졌다 (실시예 7).

도 2는 만능성 마커에 대해 면역세포화학에 의해 염색된 본 개시내용에 따른 미분화된 인간 배아 줄기 세포 (uhESC)의 대표적인 현미경사진을 나타낸다. 윗줄 및 아랫줄의 현미경사진 각각은 DAPI, Nanog, 및 Oct4 (윗줄) 또는 DAPI, Nanog, 및 Sox2 (아랫줄)에 대해 염색되고 IN 셀 애널리저(IN Cell Analyzer) 2000 상에서 영상화된 uhESC의 단일 영상화 필드를 나타낸다. 오른쪽 하단 패널의 척도 막대가 도면 내의 모든 영상에 적용된다.

도 3은 본 개시내용에 따라 현탁액에서 비-배아체 (비-EB) 응집물로서 생성되고 면역세포화학에 의해 염색된 신경외배엽 전구 세포의 대표적인 현미경사진을 나타낸다. 현미경사진의 윗줄 및 아랫줄은 2개의 대표적인 실험으로부터 생성되고 DAPI (왼쪽 패널), PAX6 (중간 패널), 및 PSA-NCAM (오른쪽 패널)에 대해 면역세포화학에 의해 염색된 신경외배엽 전구 세포의 응집물을 나타낸다. 염색된 세포 응집물은 IN 셀 애널리저 2000 상에서 영상화되었다. 오른쪽 하단 패널의 척도 막대가 도면 내의 모든 영상에 적용된다.

도 4는 본 개시내용에 따라 생성되고 면역세포화학에 의해 염색된 희소돌기아교세포 전구 세포의 대표적인 현미경사진을 나타낸다. 현미경사진의 윗줄 및 아랫줄은 2개의 대표적인 실험으로부터 생성되고 DAPI (왼쪽 패널), 및 NG2 (오른쪽 패널)에 대해 면역세포화학에 의해 염색된 희소돌기아교세포 전구 세포를 나타낸다. 염색된 세포는 IN 셀 애널리저 2000 상에서 영상화되었다. 오른쪽 하단 패널의 척도 막대가 도면 내의 모든 영상에 적용된다.

도 5는 현탁액에서의 세포 응집물의 형성 전 및 24시간 후의 uhESC의 유전자 발현 프로파일의 상관관계 플롯을 나타낸다. 각각의 상관관계 플롯은 2개의 별개의 실험으로부터의 제-1일 (응집물 형성 전) 대 제0일 (응집물 형성 24시간 후)에 대한 유전자 발현 프로파일의 비교를 나타낸다. 각각의 플롯에 대해, 데이터 포인트는 실시예 6에 기술된 바와 같이 플루이디엄(Fluidigm) qPCR에 의해 평가되고 정규화된 ΔCT로서 계산된 76개의 유전자

각각을 나타낸다. R-제곱 값이 각각의 플롯의 왼쪽 상단 모서리에 제시되고, 이는 JMP 소프트웨어 (SAS, 미국 노스캐롤라이나주 캐리)를 사용하여 최적 적합 선을 기초로 계산되었다.

**도 6**은 상이한 소형 분자 조합을 사용하여 현탁액에서 신경외배엽 전구 세포로 분화된 uhESC의 제7일 유전자 발현 프로파일의 상관관계 플롯을 나타낸다. 각각의 상관관계 플롯은 SB431542 + 도르소모르핀 대 각각의 플롯의 y축에 지시된 대안적인 소형 분자 조합으로 처리된 세포에 대한 제7일 유전자 발현 프로파일의 비교를 나타낸다. 각각의 플롯에 대해, 데이터 포인트는 실시예 7에 기술된 바와 같이 플루이다임 qPCR에 의해 평가되고 정규화된  $\Delta CT$ 로서 계산된 96개의 유전자 각각을 나타낸다. R-제곱 값이 각각의 플롯의 왼쪽 상단 모서리에 제시되고, 이는 JMP 소프트웨어 (SAS, 미국 노스캐롤라이나주 캐리)를 사용하여 최적 적합 선을 기초로 계산되었다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0027] **상세한 설명**
- [0028] 본 설명은 본 개시내용이 실행될 수 있는 모든 상이한 방식, 또는 본 개시내용에 부가될 수 있는 모든 특색의 상세한 카탈로그이도록 의도되지 않는다. 예를 들어, 한 실시양태와 관련하여 예시된 특색이 다른 실시양태 내로 혼입될 수 있고, 특정 실시양태와 관련하여 예시된 특색이 이러한 실시양태로부터 제거될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 특색 또는 특색의 조합이 배제 또는 생략될 수 있다는 것을 구상한다. 추가적으로, 본원에서 제안된 다양한 실시양태에 대한 다수의 변경 및 부가가 본 개시내용의 견지에서 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 이는 본 개시내용으로부터 벗어나지 않는다. 다른 경우에, 널리 공지되어 있는 구조, 인터페이스 및 공정은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않기 위해 상세하게 제시되지 않았다. 본 명세서의 어떠한 부분도 본 발명의 전체 범주의 임의의 부분의 부정에 영향을 미치지도록 해석되지 않는 것이 의도된다. 따라서, 하기의 설명은 본 개시내용의 일부 특정한 측면을 예시하도록, 그리고 그의 모든 순열, 조합 및 변경을 철저히 상술하지 않도록 의도된다.
- [0029] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서의 개시내용의 설명에서 사용된 용어는 특정 실시양태를 기술하기 위한 목적일 뿐이고, 본 개시내용을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0030] 본원에서 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그의 전문이 참고로 포함된다.
- [0031] 문맥적으로 달리 지시되지 않는 한, 본원에 기술된 개시내용의 다양한 특색이 임의의 조합으로 사용될 수 있는 것으로 구체적으로 의도된다. 또한, 본 개시내용은 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 특색 또는 특색의 조합이 배제 또는 생략될 수 있다는 것도 구상한다.
- [0032] 본원에 개시된 방법은 기술된 방법을 달성하기 위한 하나 이상의 단계 또는 행위를 포함할 수 있다. 방법 단계 및/또는 행위는 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 서로 상호교환될 수 있다. 달리 말하면, 측면의 적합한 운영을 위해 특정 순서의 단계 또는 행위가 요구되지 않는 한, 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 특정 단계 및/또는 행위의 순서 및/또는 사용이 변형될 수 있다.
- [0033] 본 개시내용 및 첨부된 청구범위의 기술에서 사용된 바와 같이, 단수형 형태는 문맥적으로 명확하게 달리 지시되지 않는 한 복수형 형태를 또한 포함하도록 의도된다.
- [0034] 본원에서 사용된 바와 같이, "및/또는"은 연관된 열거된 항목 중 하나 이상의 임의의 모든 가능한 조합, 뿐만 아니라 대안 ("또는")으로 해석되는 경우의 조합의 결여를 지칭하고 포함한다.
- [0035] 측정가능한 값 예컨대 백분율, 밀도, 부피 등을 지칭할 때 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "약" 및 "대략적으로"는 특정된 양의  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$ ,  $\pm 0.5\%$ , 또는 심지어  $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미한다.
- [0036] 본원에서 사용된 바와 같이, "X와 Y 사이" 및 "약 X와 Y 사이"와 같은 구절은 X 및 Y를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "약 X와 Y 사이"와 같은 구절은 "약 X와 약 Y 사이"를 의미하고, "약 X 내지 Y"와 같은 구절은 "약 X 내지 약 Y"를 의미한다.
- [0037] 본원에서 사용된 바와 같이, "희소돌기아교세포 전구 세포" (OPC)는 신경외배엽/신경교 계통의 것이고, 특징적인 마커인 신경/신경교 항원 2 (NG2)를 발현하며, 희소돌기아교세포로 분화될 수 있는, 중추 신경계에서 확인되는 세포를 지칭한다. 본 발명의 방법에 따라 제조된 OPC는 NG2, PDGFR $\alpha$  및 GD3으로부터 선택된 마커 중 하나 이상을 또한 발현할 수 있다.

- [0038] 용어 "신경교 계통 세포", "신경교 전구 세포" 및 "신경교 세포"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 신경외배엽/신경 전구 세포로부터 유래된 비-뉴런 CNS 세포를 지칭한다. 신경교 전구 세포는 추가로 분화되어 OPC/회소돌기아교세포 또는 성상세포를 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 신경교 전구 세포는 칼슘 전압-게이팅 채널 보조 서브유닛 감마 4 (CACNG4), 지방산 결합 단백질 7 (FABP7), 및 성 결정 영역 Y-박스 6 (SOX6)으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다.
- [0039] 용어 "신경외배엽", "신경외배엽 세포", "신경외배엽 전구물질", "신경외배엽 전구체", "신경 전구체" 및 "신경 전구물질"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 신경 전구물질 경로를 따라 분화될 수 있고 CNS 뉴런, 회소돌기아교세포, 성상세포 및 뇌실막 세포를 형성할 수 있는 세포를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 신경외배엽 세포는 페어드 박스 6 (PAX6), Hes 패밀리 BHLH 전사 인자 5 (HES5) 및 아연 핑거 및 BTB 도메인 함유 16 (ZBTB16)으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현한다.
- [0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "배아체" (EB)는 3가지 배엽층 모두로의 자발적 분화가 진행된 만능 줄기 세포로부터 유래된 3차원 세포 응집물을 지칭한다. EB는 만능 줄기 세포가 분화를 억제하는 배양 조건으로부터 제거될 때 형성된다. 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포의 경우, 배양 배지로부터의 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) 및 형질전환 성장 인자 베타 (TGF $\beta$ )의 제거가 3가지 배엽층 모두로의 자발적 분화 및 EB 형성을 발생시킨다.
- [0041] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "비-배아체 응집물"은 만능 줄기 세포가 미분화로 유지되는 경우에 만능 줄기 세포로부터 형성되는 3차원 세포 응집물을 지칭한다. 본 개시내용에서, 만능성을 유지하고 자발적 분화를 억제하는 세포 배양 조건 (즉, bFGF 및 TGF $\beta$ 가 배지로부터 제거되지 않음) 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물이 형성된다. 후속적으로, 미분화된 세포 응집물이 bFGF 및 TGF $\beta$ 의 동시 제거 및 신경외배엽 분화 인자, 예컨대 골 형태형성 단백질 신호전달 경로의 억제제와 조합된 TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달 경로의 억제제의 첨가에 의해 신경외배엽 전구 세포를 향해 지시된다.
- [0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달 억제제"는 형질전환 성장 인자 베타 (TGF $\beta$ )/액티빈/노달 신호전달 경로를 따르는 신호전달을 하향조절할 수 있는 소형 분자 또는 단백질 조정인자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달 억제제는 1형 TGF $\beta$  수용체 (TGF $\beta$ R1), 일명 액티빈 수용체-유사 키나제 5 (ALK5)를 직접적으로 표적화한다. 특정 실시양태에서, TGF $\beta$ /액티빈/노달 신호전달 억제제는 SB431542, LY2157299, GW788388, A-77-01, A-83-01 및 SB505124로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0043] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "BMP 신호전달 억제제"는 골 형태형성 단백질 (BMP) 신호전달 경로를 따르는 신호전달을 하향조절할 수 있는 소형 분자 또는 단백질 조정인자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, BMP 신호전달 억제제는 I형 액티빈 A 수용체 (ACVR1), 일명 액티빈 수용체-유사 키나제 2 (ALK2)를 직접적으로 표적화한다. 특정 실시양태에서, BMP 신호전달 억제제는 도르소모르핀, DMH-1, K02288, ML3467, LDN193189 및 노긴 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0044] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "스무든드 효능제" 또는 "스무든드 수용체 효능제"는 소닉 헤지호그 (SHH) 신호전달 경로의 일부분인 G-단백질 커플링 수용체 스무든드에 직접 결합하여 이를 활성화시킬 수 있는 소형 분자 또는 단백질 조정인자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 스무든드 수용체 효능제는 퍼모파민, 스무든드 아고니스트 (SAG, CAS 364590-63-6) 및 소닉 헤지호그 (SHH) 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0045] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "바람직하지 않은 세포 유형"은 이식 시 이소성 조직의 형성을 발생시킬 수 있거나 또는 본원에 기술된 바와 같은 낭종 검정법에서 하나 이상의 낭종의 형성을 발생시킬 수 있는, 신경외배엽 계통 밖의 세포를 지칭한다. 한 실시양태에서, "바람직하지 않은 세포 유형"은 상피 계통 세포, 예컨대 신경 전구 세포 및 상피 세포 둘 다에 의해 발현되는 마커인 CD49f에 대해 양성인 세포, 또는 만능 세포 및 상피 세포 둘 다에 의해 발현되는 2개의 마커인 CLDN6 또는 EpCAM에 대해 양성인 세포를 포함할 수 있다.
- [0046] 본원에서 사용된 바와 같이, "이식(implantation)" 또는 "이식(transplantation)"은 적절한 전달 기술을 사용하여 (예를 들어, 주사 장치를 사용하여) 표적 조직 내로 세포 집단을 투여하는 것을 지칭한다.
- [0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체"는 동물 또는 인간을 지칭한다.
- [0048] 본원에서 사용된 바와 같이, "~를 필요로 하는 대상체"는 중추 신경계 내의 조직이 손상된 동물 또는 인간을 지칭한다. 한 실시양태에서, 동물 또는 인간은 운동 기능의 상실을 겪고 있다.
- [0049] 본원에서 상호교환가능하게 사용된 바와 같은 용어 "중추 신경계" 및 "CNS"는 척추동물의 뇌 및 척수를 포함하

지만 이에 제한되지 않는, 신체의 하나 이상의 활동을 제어하는 신경 조직의 복합체를 지칭한다.

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, 병태 또는 질환과 관련된 "치료" 또는 "치료함"은 병태 또는 질환이 환자에서 나타난 후에 바람직하게는 임상 결과를 포함하는 이롭거나 원하는 결과를 수득하기 위한 접근법이다. 질환과 관련된 이롭거나 원하는 결과는 하기 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 질환과 연관된 병태의 개선, 질환 치유, 질환의 중증도 감소, 질환 진행의 지연, 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 경감, 질환을 앓는 이의 삶의 질의 증가, 생존 연장, 및 그의 임의의 조합. 마찬가지로, 본 개시내용의 목적을 위해, 병태와 관련된 이롭거나 원하는 결과는 하기 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 병태 개선, 병태 치유, 병태의 중증도 감소, 병태 진행의 지연, 병태와 연관된 하나 이상의 증상의 경감, 병태를 앓는 이의 삶의 질의 증가, 생존 연장, 및 그의 임의의 조합.

[0051] **미분화된 만능 줄기 세포의 증식 및 배양**

[0052] 본 개시내용에 따른 만능 줄기 세포의 분화는 임의의 적절한 만능 줄기 세포를 출발 물질로 사용하여 수행될 수 있다. 한 실시양태에서, 방법은 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 세포주에서 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)를 사용하여 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 H1, H7, H9, H13, 또는 H14 세포주로부터 유래된 세포를 사용하여 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 영양류 만능 줄기 (pPS) 세포주에서 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 수정 없이 hESC를 생산하도록 자극된 배아인 반수성개체(parthenote)로부터 유래된 미분화된 줄기 세포를 사용하여 수행될 수 있다.

[0053] 미분화된 만능 줄기 세포의 증식 및 배양 방법이 기존에 기술되었다. 만능 줄기 세포의 조직 및 세포 배양과 관련하여, 독자는 관련 기술 분야에서 입수가능한 다수의 간행물 중 임의의 것, 예를 들어, 문헌 [*Teratocarcinomas and Embryonic Stem cells: A Practical Approach* (E. J. Robertson, Ed., IRL Press Ltd. 1987)]; [*Guide to Techniques in Mouse Development* (P. M. Wasserman et al., Eds., Academic Press 1993)]; [*Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro* (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993)]; [*Properties and Uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy* (P. D. Rathjen et al., Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998)]; 및 [R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells*, Wiley-Liss, New York, 2000]을 참조할 수 있다.

[0054] 미분화된 만능 줄기 세포는 피더(feeder) 세포가 첨가되지 않으면서 미분화 상태로 유지될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [(2004) Rosler et al., *Dev. Dynam.* 229:259]을 참조한다). 전형적으로, 피더가 없는 배양물은 분화 없이 세포의 증식을 촉진하는 인자를 함유하는 영양 배지에 의해 지지된다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,800,480을 참조한다). 한 실시양태에서, 이같은 인자를 함유하는 컨디셔닝 배지가 사용될 수 있다. 컨디셔닝 배지는 배지를 이같은 인자를 분비하는 세포와 함께 배양하는 것에 의해 수득될 수 있다. 적절한 세포는 방사선이 조사된 (~4,000 Rad) 1차 마우스 배아 섬유아세포, 텔로머화 마우스 섬유아세포, 또는 pPS 세포로부터 유래된 섬유아세포-유사 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다 (미국 특허 번호 6,642,048). 무혈청 배지, 예컨대 20% 혈청 교체물 및 4 ng/mL bFGF가 보충된 녹-아웃 DMEM에 피터를 플레이팅하는 것에 의해 배지가 컨디셔닝될 수 있다. 1-2일 동안 컨디셔닝된 배지에 추가 bFGF가 보충될 수 있고, 이는 1-2일 동안 pPS 세포 배양을 지지하는 데 사용될 수 있다 (예를 들어, WO 01/51616; 문헌 [Xu et al., (2001) *Nat. Biotechnol.* 19:971]을 참조한다).

[0055] 대안적으로, 미분화된 형태의 세포의 증식을 촉진하는 첨가 인자 (예컨대 섬유아세포 성장 인자 또는 포스콜린)가 보충된 신선하거나 컨디셔닝되지 않은 배지가 사용될 수 있다. 비-제한적인 예는 40-80 ng/mL의 bFGF가 보충되고 임의적으로 SCF (15 ng/mL), 또는 Flt3 리간드 (75 ng/mL)를 함유하는 기본 배지 예컨대 X-VIVO™ 10 (론자(Lonza), 메릴랜드주 워커스빌) 또는 QBSF™-60 (퀄리티 바이올로지컬 인크(Quality Biological Inc.), 메릴랜드주 게이더스버그)을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Xu et al., (2005) *Stem Cells* 23(3):315]을 참조한다). 이러한 배지 제형들은 다른 시스템에서의 속도의 2-3배로 세포 성장을 지지하는 장점을 갖는다 (예를 들어, WO 03/020920을 참조한다). 한 실시양태에서, 미분화된 만능 세포 예컨대 hES 세포가 bFGF 및 TGFβ를 포함하는 배지에서 배양될 수 있다. bFGF의 비-제한적인 예시적인 농도는 약 80 ng/ml를 포함한다. TGFβ의 비-제한적인 예시적인 농도는 약 0.5 ng/ml를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 미분화된 만능 줄기 세포는 상업적으로 입수가능한 완전 배지 mTeSR™ (스텝 셀 테크놀로지즈(Stem Cell Technologies), 캐나다 밴쿠버)에서 유지될 수 있다.

[0056] 미분화된 만능 세포는 피더 세포, 전형적으로는 배아 또는 태아 조직으로부터 유래된 섬유아세포의 층에서 배양될 수 있다 (Thomson et al. (1998) *Science* 282:1145). 피더 세포는 인간 또는 무린 공급원으로부터 유래될

수 있다. 인간 피더 세포는 다양한 인간 조직으로부터 단리될 수 있거나, 또는 인간 배아 줄기 세포의 섬유아 세포 세포로의 분화를 통해 유래될 수 있다 (예를 들어, WO 01/51616을 참조한다). 사용될 수 있는 인간 피더 세포는 대반 섬유아세포 (예를 들어, 문헌 [Genbacev et al. (2005) *Fertil. Steril.* 83(5):1517]을 참조한다), 나팔관 상피 세포 (예를 들어, 문헌 [Richards et al. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20:933]을 참조한다), 포피 섬유아세포 (예를 들어, 문헌 [Amit et al. (2003) *Biol. Reprod.* 68:2150]을 참조한다), 및 자궁 내막 세포 (예를 들어, 문헌 [Lee et al. (2005) *Biol. Reprod.* 72(1):42]을 참조한다)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 다양한 고체 표면이 미분화된 만능 세포의 배양에서 사용될 수 있다. 이러한 고체 표면은 상업적으로 입수가능한 표준 조직 배양 플라스크 또는 세포 배양 플레이트, 예컨대 6웰, 24웰, 96웰, 또는 144웰 플레이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 다른 고체 표면은 마이크로캐리어 및 디스크를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 미분화된 만능 세포를 성장시키는 데 적절한 고체 표면은 유리 또는 플라스틱 예컨대 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리카르보네이트, 폴리테트라플루오르에틸렌, 멜리넥스, 써마녹스, 또는 그의 조합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 물질로 제조될 수 있다. 적절한 표면은 하나 이상의 중합체, 예를 들어, 하나 이상의 아크릴레이트를 포함할 수 있다. 고체 표면은 형상 면에서 3차원일 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2005/0031598에서, 3차원 고체 표면의 비-제한적인 예가 기존에 기술되었다.

[0058] 미분화된 줄기 세포는 피더가 없는 조건 하에 성장 기재 상에서 성장될 수도 있다. 성장 기재는 매트릭셀® 매트릭스 (예를 들어, 매트릭셀®, 매트릭셀® GFR), 재조합 라미닌, 라미닌-511 재조합 단편 E8 또는 비트로벡틴 일 수 있다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 성장 기재는 재조합 인간 라미닌-521 (바이오라미나 (Biolamina), 스웨덴; 코닝 인크(Corning Inc.) (뉴욕주, 코닝)에 의해 유통됨)이다. 다른 실시양태에서, 기재는 합성 기재, 예를 들어, 신쎄맥스®-II SC 기재이다.

[0059] 미분화된 줄기 세포는 다양한 방법 예컨대 콜라게나제의 사용 또는 수동 스크래핑을 사용하여 계대 또는 계대배양될 수 있다. 미분화된 줄기 세포는 단일 세포 현탁액을 생성시키는 효소 수단에 의해, 예컨대 아큐타제 (Accutase)® (시그마 알드리치(Sigma Aldrich) (미주리주)에 의해 유통됨) 또는 유사한 트립시나제를 사용하여 계대배양될 수 있다. 대안적으로, 미분화된 줄기 세포는 비-효소 수단, 예컨대 PBS 내의 0.5 mM EDTA를 사용하여, 또는 ReLeSR™ (스템 셀 테크놀로지스, 캐나다 밴쿠버)을 사용하여 계대배양될 수 있다.

[0060] 한 실시양태에서, 복수의 미분화된 줄기 세포가 약 3 내지 약 10일 이내에 전면성장에 도달하도록 허용하는 시딩 밀도로 시딩되거나 계대배양된다. 한 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $6.0 \times 10^3$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $5.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $5.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $3.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  범위일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $6.0 \times 10^3$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $6.0 \times 10^3$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $9.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $7.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $7.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $9.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $7.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $8.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $2.0 \times 10^4$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $9.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $3.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $8.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $4.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $7.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $5.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $6.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다. 한 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $5.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $4.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $4.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $2.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $3.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $2.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $3.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다.

[0061] 다양한 적절한 세포 배양 및 계대배양 기술 중 임의의 것이 본 개시내용의 방법에 따라 줄기 세포를 배양하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포의 계대배양으로부터 약 2일 후에 시작하여 배양 배지가 매일 완전히 교환될 수 있다. 한 실시양태에서, 배양이 약 90% 콜로니 커버리지에 도달했을 때, 정량을 위한 단일 세포 현탁액을 달성하기 위해 하나 이상의 적절한 시약, 예를 들어, 아큐타제®를 사용하여 후속 배양을 위해 세포를 탈착

시키고 시딩할 수 있다. 한 실시양태에서, 그 후, 세포를 적절한 성장 기재 (예를 들어, 제조함 인간 라미닌-521)에 세포가 적절한 기간에 걸쳐, 예를 들어, 약 3 내지 10일 이내에 전면성장에 도달하도록 허용하는 시딩 밀도로 시딩하기 전에, 미분화된 줄기 세포를 계대배양할 수 있다. 한 실시양태에서, 미분화된 줄기 세포는 콜라게나제 IV를 사용하여 계대배양되고, 제조함 라미닌 상에서 확장될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 미분화된 줄기 세포는 콜라게나제 IV를 사용하여 계대배양되고, 매트릭셀® 상에서 확장될 수 있다. 한 실시양태에서, 미분화된 줄기 세포는 ReLeSR™을 사용하여 계대배양되고, 제조함 인간 라미닌-521 상에서 확장될 수 있다.

[0062] 미분화된 줄기 세포를 시딩하기 위해, 시딩 밀도는 약  $6.0 \times 10^3$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $5.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $5.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $3.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $6.0 \times 10^3$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $6.0 \times 10^3$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $9.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $7.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $7.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $9.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $7.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $8.0 \times 10^3$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $1.0 \times 10^4$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $2.0 \times 10^4$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $9.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $3.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $8.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $4.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $7.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $5.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $6.0 \times 10^4$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다. 한 실시양태에서, 시딩 밀도는 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $5.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.0 \times 10^5$ 개의 세포/성장 표면  $\text{cm}^2$  내지 약  $4.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $1.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $4.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 예컨대 약  $2.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $3.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ , 또는 예컨대 약  $2.5 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$  내지 약  $3.0 \times 10^5$ 개의 세포/ $\text{cm}^2$ 의 범위일 수 있다.

[0063] **미분화된 만능 줄기 세포의 신경 유도**

[0064] 본 개시내용은 TGFβ/액티빈/노달 신호전달 및 BMP 신호전달의 소형 분자 및 단백질 조절인자를 사용하여 만능 줄기 세포를 신경외배엽으로, 그리고 추가로 신경교 전구 세포 및 OPC로 분화시키는 방법을 제공한다. 임의의 특정 이론에 제한되지 않으면서, 본 발명가들은 출발 물질인 만능 줄기 세포가 동적 현탁액에서 비-EB 응집물로 응집될 수 있고, 여기서 만능 줄기 세포는 미분화로 유지되며, 이어서, 응집물이 TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 하나 이상의 억제제 및 BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제 (이중 SMAD 억제제)를 사용하는 것에 의해 동적 현탁액에 있으면서 신경외배엽으로 분화되도록 유도될 수 있다는 것을 발견하였다. 부착 배양 및 EB-기반 방법과 대조적으로, 동적 현탁액은 출발 물질로부터 대량의 세포를 생산하기 위한 확장가능하고, 재현가능하며 제어가능한 공정을 제공한다. 동적 현탁액에서의 이중 SMAD 억제제를 위한 방법이 본원에서 상세하게 기술된다.

[0065] 한 실시양태에서, 방법은 TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 하나 이상의 억제제 및 BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제의 존재 하에 소형 비-EB 응집물을 형성하였지만 미분화로 유지되는 미분화된 줄기 세포를 동적 현탁액에서 배양함으로써, 신경 유도를 개시시키는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 억제제는 소형 분자이다. 다른 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 억제제는 단백질이다. 일부 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 억제제의 직접적인 표적은 ALK5, 일명 1형 TGFβ 수용체 (TGFβR1)이다. 특정 실시양태에서, BMP 신호전달의 억제제는 소형 분자이다. 다른 실시양태에서, BMP 신호전달의 억제제는 단백질이다. 일부 실시양태에서, BMP 신호전달의 억제제의 직접적인 표적은 ALK2, 일명 I형 액티빈 A 수용체 (ACVR1)이다. 특정 실시양태에서, 이중 SMAD 억제제 후속적으로, 생성된 세포가 하나 이상의 스무든드 수용체 효능제 및 레티노산의 존재 하에 동적 현탁액에서 배양된다.

[0066] 특정 실시양태에서, TGFβ/액티빈/노달 신호전달의 억제제는 SB431542, LY2157299, GW788388, A-77-01, A-83-01 및 SB505124, 및 그의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, BMP 신호전달의 억제제는 도르소모르핀, DMH-1, K02288, ML3467, LDN193189 및 노긴 단백질로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, 스무든드 효능제는 퍼모파민, SAG (CAS 364590-63-6), SSH 단백질, 및 그의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0067] 한 실시양태에서, 도 1에 도시된 바와 같이, 방법은 미분화 상태로 유지되는 만능 줄기 세포를 포함하는 비-EB 응집물을 획득하는 단계; 제1 기간 동안 소형 분자 SB431542 및 도르소모르핀의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 단계; 및 후속적으로 제2 기간 동안 스무든드 효능제 및 레티노산의 존재 하에 동적 현탁액에서 응집물을 배양하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 기간 및 제2 기간은 각각 약 1 내지 약 4일, 예컨대 약 1일, 예컨대 약 2일, 예컨대 약 3일, 예컨대 약 4일의 범위일 수 있다.
- [0068] 한 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 100  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 5  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 15  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 20  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 25  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 30  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 35  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 40  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 45  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 50  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 55  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 60  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 65  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 70  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 75  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 80  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 85  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 90  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 95  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 20  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 13  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 8  $\mu\text{M}$  내지 약 20  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 8  $\mu\text{M}$  내지 약 13  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 9  $\mu\text{M}$  내지 약 11  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 20  $\mu\text{M}$  내지 약 40  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 20  $\mu\text{M}$  내지 약 33  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 28  $\mu\text{M}$  내지 약 40  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 28  $\mu\text{M}$  내지 약 33  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 29  $\mu\text{M}$  내지 약 31  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 40  $\mu\text{M}$  내지 약 60  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 40  $\mu\text{M}$  내지 약 53  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 48  $\mu\text{M}$  내지 약 55  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 48  $\mu\text{M}$  내지 약 53  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 49  $\mu\text{M}$  내지 약 51  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 60  $\mu\text{M}$  내지 약 80  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 60  $\mu\text{M}$  내지 약 73  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 68  $\mu\text{M}$  내지 약 75  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 68  $\mu\text{M}$  내지 약 73  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 69  $\mu\text{M}$  내지 약 71  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 80  $\mu\text{M}$  내지 약 100  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 80  $\mu\text{M}$  내지 약 93  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 88  $\mu\text{M}$  내지 약 95  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 88  $\mu\text{M}$  내지 약 93  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 89  $\mu\text{M}$  내지 약 91  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 농도의 SB431542의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0069] 한 실시양태에서, 방법은 약 250 nM 내지 약 250  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 약 50  $\mu\text{M}$ , 약 100  $\mu\text{M}$ , 약 150  $\mu\text{M}$ , 또는 약 200  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 ALK5 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 ALK5 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0070] 한 실시양태에서, 방법은 약 250 nM 내지 약 250  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 약 50  $\mu\text{M}$ , 약 100  $\mu\text{M}$ , 약 150  $\mu\text{M}$ , 또는 약 200  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 LY364947의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 LY364947의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0071] 한 실시양태에서, 방법은 약 250 nM 내지 약 250  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 약 50  $\mu\text{M}$ , 약 100  $\mu\text{M}$ , 약 150  $\mu\text{M}$ , 또는 약 200  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 GW788388의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 GW788388의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0072] 한 실시양태에서, 방법은 약 250 nM 내지 약 250  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 약 50  $\mu\text{M}$ , 약 100  $\mu\text{M}$ , 약 150  $\mu\text{M}$ , 또는 약 200  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 A-77-01의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 A-77-01의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0073] 한 실시양태에서, 방법은 약 250 nM 내지 약 250  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 약 50  $\mu\text{M}$ , 약 100  $\mu\text{M}$ , 약 150  $\mu\text{M}$ , 또는 약 200  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 A-83-01의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 A-83-01의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0074] 한 실시양태에서, 방법은 약 250 nM 내지 약 250  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 약 50  $\mu\text{M}$ , 약 100  $\mu\text{M}$ , 약 150  $\mu\text{M}$ , 또는 약 200  $\mu\text{M}$  범위의 농도의 SB505124의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$ 의 SB505124의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을

배양하는 것을 포함한다.

- [0075] 한 실시양태에서, 방법은 약 0.2  $\mu\text{M}$  내지 약 20  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.8  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 2  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 2.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 3  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 3.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 4  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 4.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 5.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 6  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 6.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 7  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 7.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 8  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 8.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 9  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 10  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 11  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 12  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 13  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 14  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 15  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 16  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 17  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 18  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 19  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 도르소모르핀의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 0.2  $\mu\text{M}$  내지 약 1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.2  $\mu\text{M}$  내지 약 0.9  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.3  $\mu\text{M}$  내지 약 0.8  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.4  $\mu\text{M}$  내지 약 0.7  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 0.5  $\mu\text{M}$  내지 약 0.6  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 도르소모르핀의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 10  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 9  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 2  $\mu\text{M}$  내지 약 8  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 3  $\mu\text{M}$  내지 약 7  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 4  $\mu\text{M}$  내지 약 6  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 도르소모르핀의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 10  $\mu\text{M}$  내지 약 20  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 10  $\mu\text{M}$  내지 약 19  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 12  $\mu\text{M}$  내지 약 18  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 13  $\mu\text{M}$  내지 약 17  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 14  $\mu\text{M}$  내지 약 16  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 도르소모르핀의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 2  $\mu\text{M}$ 의 농도의 도르소모르핀의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0076] 한 실시양태에서, 방법은 약 1 nM 내지 약 20  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 10 nM, 약 50 nM, 약 100 nM, 약 150 nM, 약 200 nM, 약 500 nM, 약 1  $\mu\text{M}$ , 약 5  $\mu\text{M}$ , 약 10  $\mu\text{M}$ , 또는 약 15  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 ALK2 억제제의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0077] 한 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 10  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 DMH-1의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 2  $\mu\text{M}$ 의 DMH-1의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0078] 한 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 10  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 K02288의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 2  $\mu\text{M}$ 의 K02288의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0079] 한 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 10  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 ML347의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 2  $\mu\text{M}$ 의 ML347의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0080] 한 실시양태에서, 방법은 약 0.05  $\mu\text{M}$  내지 약 5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.08  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.2  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.3  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.4  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.6  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.7  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.8  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.9  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 2  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 3  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 4  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 퍼모파민의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 0.05  $\mu\text{M}$  내지 약 0.1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.06  $\mu\text{M}$  내지 약 0.09  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 0.07  $\mu\text{M}$  내지 약 0.08  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 퍼모파민의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 0.1  $\mu\text{M}$  내지 약 1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.2  $\mu\text{M}$  내지 약 0.9  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.3  $\mu\text{M}$  내지 약 0.8  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 0.4  $\mu\text{M}$  내지 약 0.7  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 0.5  $\mu\text{M}$  내지 약 0.6  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 퍼모파민의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 1  $\mu\text{M}$  내지 약 4  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 2  $\mu\text{M}$  내지 약 5  $\mu\text{M}$ , 또는 예컨대 약 2  $\mu\text{M}$  내지 약 4  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 퍼모파민의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 확장되었지만 미분화된 ESC를 약 0.5  $\mu\text{M}$ 의 농도의 퍼모파민과 함께 인큐베이션하는 것을 포함한다.
- [0081] 한 실시양태에서, 방법은 약 2.5 nM 내지 약 5  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 50 nM, 약 100 nM, 약 250 nM, 약 500 nM, 약 750 nM, 약 1  $\mu\text{M}$ , 또는 약 2.5  $\mu\text{M}$ 의 범위의 농도의 스무든드 효능제의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.
- [0082] 한 실시양태에서, 방법은 약 10 nM 내지 약 1  $\mu\text{M}$ , 예컨대 약 10 nM 내지 약 100 nM, 예컨대 약 100 nM 내지 약 500 nM, 또는 예컨대 약 500 nM 내지 약 1000 nM의 범위의 농도의 SAG의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB

응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 0.5  $\mu\text{M}$ 의 SHH의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.

[0083] 한 실시양태에서, 방법은 약 2.5 nM 내지 약 250 nM, 예컨대 약 2.5 nM 내지 약 10 nM, 예컨대 약 10 nM 내지 약 100 nM, 또는 예컨대 약 100 nM 내지 약 250 nM의 범위의 농도의 SHH 단백질의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 약 25 nM의 SHH 단백질의 존재 하에 동적 현탁액에서 비-EB 응집물을 배양하는 것을 포함한다.

[0084] 동적 현탁 배양에 적절한 임의의 세포 배양 용기 또는 반응기가 본 개시내용에서 구상되는 분화 단계용으로 사용될 수 있다. 전형적으로 용기 벽은 배양된 세포의 부착에 대해 불활성이거나 또는 저항성이다. 세포가 침강되는 것을 방지하는 수단, 예컨대 자기에 의해 또는 기계적으로 구동되는 교반 막대 또는 패들과 같은 교반 메커니즘, 진탕 메커니즘 (전형적으로, 외부에 의해 용기에 부착됨), 또는 반전 메커니즘 (즉, 세포에 대한 중력의 방향을 변화시키도록 용기를 회전시키는 장치)도 있다.

[0085] 공정 개발을 위한 현탁 배양에 적절한 용기는 통상적인 범위의 상업적으로 입수가 가능한 스피너, 로커 백, 또는 셰이커 플라스크를 포함한다. 상업적 생산에 적절한 예시적인 바이오리액터는 버티컬휠(VerticalWheel)<sup>TM</sup> 바이오리액터 (PBS 바이오테크(PBS Biotech), 캘리포니아주 캐머틸로)를 포함한다.

[0086] **OPC 조성물**

[0087] 본 개시내용의 방법은 세포 요법에 적절한 희소돌기아교세포 전구 세포 (OPC)를 포함하는 조성물을 수득하는 데 사용될 수 있다. 본 개시내용에 따라 수득된 OPC는 OPC에 특징적인 높은 수준의 프로테오글리칸 NG2, 및 바람직하지 않은 세포 유형과 연관된 낮은 수준의 비-OPC 마커, 예컨대 CD49f (신경 전구 세포 및 상피 세포 둘 다에 의해 발현될 수 있고 시험관 내 낭종 형성과 연관됨) (Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. 2003 Methods. 3:256-68), 또는 CLDN6 및 EpCAM (만능 세포 및 상피 세포 둘 다에 의해 발현되는 2개의 마커) (Lin D, Guo Y, Li Y, Ruan Y, Zhang M, Jin X, Yang M, Lu Y, Song P, Zhao S, Dong B, Xie Y, Dang Q, Quan C. Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6 regulation and functions. *Oncol Rep.* 2017 Aug;38(2):875-885; Huang L, Yang Y, Yang F, Liu S, Zhu Z, Lei Z, Guo J. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *Int J Mol Med.* 2018 Oct;42(4):1771-1785)을 발현한다.

[0088] 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 생성된 OPC는 인간 만능 줄기 세포의 시험관 내에서 분화된 자손이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC는 인간 배아 줄기 세포의 시험관 내에서 분화된 자손이다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC는 유도 만능 줄기 (iPS) 세포의 시험관 내에서 분화된 자손이다.

[0089] 예를 들어, 세포 집단의 몇 %가 특정 마커 또는 마커 세트에 대해 양성인지를 결정하거나 또는 OPC 집단 내에 존재하는 바람직하지 않은 세포 유형을 확인하기 위해, 수득된 OPC 집단의 하나 이상의 특성을 유동 세포측정법을 사용하여 다양한 세포 마커를 정량하는 것에 의해 결정할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에 따라 제조된 OPC는 NG2, PDGFR  $\alpha$  및 GD3으로부터 선택된 마커 중 하나 이상을 발현한다.

[0090] 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 30% 내지 약 100%의 NG2 양성 세포, 예컨대 적어도 약 35%, 예컨대 적어도 약 40%, 예컨대 적어도 약 45%, 예컨대 적어도 약 50%, 예컨대 적어도 약 55%, 예컨대 적어도 약 60%, 예컨대 적어도 약 65%, 예컨대 적어도 약 70%, 예컨대 적어도 약 75%, 예컨대 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85%, 예컨대 적어도 약 90%, 예컨대 적어도 약 95%, 예컨대 적어도 약 98%, 예컨대 적어도 약 99%, 예컨대 적어도 약 99.5%, 예컨대 적어도 약 99.8%, 또는 예컨대 적어도 약 99.9%의 NG2 양성 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 45% 내지 약 75%의 NG2 양성 세포, 예컨대 약 45% 내지 약 50%, 예컨대 약 50% 내지 약 55%, 예컨대 약 55% 내지 약 60%, 예컨대 약 60% 내지 약 65%, 예컨대 약 65% 내지 약 70%, 예컨대 약 70% 내지 약 75%, 예컨대 약 50% 내지 약 70%, 예컨대 약 55% 내지 약 65%, 또는 예컨대 약 58% 내지 약 63%의 NG2 양성 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 60% 내지 약 90%의 NG2 양성 세포, 예컨대 약 60% 내지 약 65%, 예컨대 약 65% 내지 약 70%의 양성 세포를 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 30% 내지 약 100%의 PDGFR  $\alpha$  양성 세포, 예컨대 적어도 약 35%, 예컨대 적어도 약 40%, 예컨대 적어도 약 45%, 예컨대 적어도 약 50%, 예컨대 적어도 약 55%, 예컨대 적어도 약 60%, 예컨대 적어도 약 65%, 예컨대 적어도 약 70%, 예컨대 적어도 약 75%, 예

컨대 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85%, 예컨대 적어도 약 90%, 예컨대 적어도 약 95%, 예컨대 적어도 약 98%, 예컨대 적어도 약 99%, 예컨대 적어도 약 99.5%, 예컨대 적어도 약 99.8%, 또는 예컨대 적어도 약 99.9%의 PDGFR α 양성 세포를 포함할 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 45% 내지 약 75%의 PDGFR α 양성 세포, 예컨대 약 45% 내지 약 50%, 예컨대 약 50% 내지 약 55%, 예컨대 약 55% 내지 약 60%, 예컨대 약 60% 내지 약 65%, 예컨대 약 65% 내지 약 70%, 예컨대 약 70% 내지 약 75%, 예컨대 약 50% 내지 약 70%, 예컨대 약 55% 내지 약 65%, 또는 예컨대 약 58% 내지 약 63%의 PDGFR α 양성 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 60% 내지 약 90%의 PDGFR α 양성 세포, 예컨대 약 60% 내지 약 65%, 예컨대 약 65% 내지 약 70%의 양성 세포를 포함할 수 있다. 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 30% 내지 약 100%의 GD3 양성 세포, 예컨대 적어도 약 35%, 예컨대 적어도 약 40%, 예컨대 적어도 약 45%, 예컨대 적어도 약 50%, 예컨대 적어도 약 55%, 예컨대 적어도 약 60%, 예컨대 적어도 약 65%, 예컨대 적어도 약 70%, 예컨대 적어도 약 75%, 예컨대 적어도 약 80%, 예컨대 적어도 약 85%, 예컨대 적어도 약 90%, 예컨대 적어도 약 95%, 예컨대 적어도 약 98%, 예컨대 적어도 약 99%, 예컨대 적어도 약 99.5%, 예컨대 적어도 약 99.8%, 또는 예컨대 적어도 약 99.9% GD3의 양성 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 45% 내지 약 75%의 GD3 양성 세포, 예컨대 약 45% 내지 약 50%, 예컨대 약 50% 내지 약 55%, 예컨대 약 55% 내지 약 60%, 예컨대 약 60% 내지 약 65%, 예컨대 약 65% 내지 약 70%, 예컨대 약 70% 내지 약 75%, 예컨대 약 50% 내지 약 70%, 예컨대 약 55% 내지 약 65%, 또는 예컨대 약 58% 내지 약 63%의 GD3 양성 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 약 60% 내지 약 90%의 GD3 양성 세포, 예컨대 약 60% 내지 약 65%, 예컨대 약 65% 내지 약 70%의 양성 세포를 포함할 수 있다.

[0091] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 본 개시내용의 실시예 8에 기술된 바와 같은 낭종 검정법에서 100,000개의 세포 당 4개 이하의 상피 낭종을 형성할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 낭종 검정법에서 100,000개의 세포 당 3개 이하의 상피 낭종을 형성할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 낭종 검정법에서 100,000개의 세포 당 2개 이하의 상피 낭종을 형성할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은 본 개시내용의 실시예 8에 기술된 바와 같은 낭종 검정법에서 100,000개의 세포 당 1개 이하의 상피 낭종을 형성할 수 있다.

[0092] 바람직하지 않은 세포 유형

[0093] 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 집단은, 예를 들어, 유동 세포측정법에 의한 바람직하지 않은 세포 유형과 연관된 마커의 정량에 의해 측정 시, 낮은 수준의 바람직하지 않은 세포 유형을 함유한다. 비제한적 예에서, 본 개시내용에 따라 수득된 제42일 OPC는 상피 세포 연관 마커인 EpCAM, CD49f, 및 CLDN6을 발현하는 세포를 0% 내지 4%로 함유하였다 (실시예 5, 표 2).

[0094] 바람직하지 않은 세포 유형과 연관된 마커는 약 20% 미만의 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 약 19% 미만, 예컨대 약 18% 미만, 예컨대 약 17% 미만, 예컨대 약 16% 미만, 예컨대 약 15% 미만, 예컨대 약 14% 미만, 예컨대 약 13% 미만, 예컨대 약 12% 미만, 예컨대 약 11% 미만, 예컨대 약 10% 미만, 예컨대 약 9% 미만, 예컨대 약 8% 미만, 예컨대 약 7% 미만, 예컨대 약 6% 미만, 예컨대 약 5% 미만, 예컨대 약 4% 미만, 예컨대 약 3% 미만, 예컨대 약 2% 미만, 예컨대 약 1% 미만, 예컨대 약 0.5% 미만, 예컨대 약 0.1% 미만, 예컨대 약 0.05% 미만, 또는 예컨대 약 0.01% 미만의 바람직하지 않은 세포 유형을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 약 15% 내지 약 20%의 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 약 19% 내지 약 20%, 예컨대 약 18% 내지 약 20%, 예컨대 약 17% 내지 약 20%, 예컨대 약 16% 내지 약 20%, 예컨대 약 15% 내지 약 19%, 또는 예컨대 약 16% 내지 약 18%의 바람직하지 않은 세포 유형을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 집단은 약 10% 내지 약 15%의 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 약 14% 내지 약 15%, 예컨대 약 13% 내지 약 15%, 예컨대 약 12% 내지 약 15%, 예컨대 약 11% 내지 약 15%, 또는 예컨대 약 12% 내지 약 14%의 바람직하지 않은 세포 유형을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 약 1% 내지 약 10%의 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 약 2% 내지 약 10%, 예컨대 약 1% 내지 약 9%, 예컨대 약 2% 내지 약 8%, 예컨대 약 3% 내지 약 7%, 또는 예컨대 약 4% 내지 약 6%의 바람직하지 않은 세포 유형을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 약 0.1% 내지 약 1%의 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 약 0.2% 내지 약 1%, 예컨대 약 0.1% 내지 약 0.9%, 예컨대 약 0.2% 내지 약 0.8%, 예컨대 약 0.3% 내지 약 0.7%, 또는 예컨대 약 0.4% 내지 약 0.6%의 바람직하지 않은 세포 유형을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 집단은 약 0.01% 내지 약 0.1%의 바람직하지 않은 세포 유형, 예컨대 약 0.02% 내지 약 0.1%, 예컨대 약 0.01% 내지 약 0.09%, 예컨대 약 0.02% 내지 약 0.08%, 예컨대 약 0.03% 내지 약 0.07%, 또는 예컨대 약 0.04% 내지 약 0.06%의 바람직하지 않은 세포 유형을 포함할 수 있다. 한 실시

양태에서, 낮은 수준의 바람직하지 않은 세포 유형은 약 15% 미만의 바람직하지 않은 세포 유형의 존재를 나타낼 수 있다.

[0095] 한 실시양태에서, 바람직하지 않은 세포 유형은 CD49f, CLDN6, 또는 EpCAM으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 세포를 포함할 수 있다.

[0096] 제형

[0097] 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체는 디메틸 술폭시드 (DMSO)를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약상 허용되는 담체는 디메틸 술폭시드를 포함하지 않는다. 한 실시양태에서, 조성물은 -80°C 내지 -195°C 이하에서의 냉동보관용으로 개조될 수 있다.

[0098] 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 대상체의 척수로 직접 주사를 통해 투여하기 위해 제형될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 대상체로의 뇌내, 뇌실내, 경막내, 비강내, 또는 수조내 투여를 위해 제형될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 대상체의 뇌 내의 경색 강 내로 직접 또는 이에 근접하여 주사하는 것을 통해 투여하기 위해 제형될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 이식을 통한 투여를 위해 제형될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 용액으로서 제형될 수 있다.

[0099] 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $1 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $3 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $4 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $5 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $6 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $7 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $8 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $9 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $1 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $3 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $4 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $5 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $6 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $7 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $8 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $9 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $1 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $3 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $4 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 또는 예컨대 약  $5 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $5 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $4 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^8$  내지 약  $5 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $3 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^8$  내지 약  $4 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 또는 예컨대 약  $3 \times 10^8$  내지 약  $5 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 약  $1 \times 10^7$  내지 약  $1 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^7$  내지 약  $9 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $3 \times 10^7$  내지 약  $8 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $4 \times 10^7$  내지 약  $7 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 또는 예컨대 약  $5 \times 10^7$  내지 약  $6 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 약  $1 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $2 \times 10^6$  내지 약  $9 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $3 \times 10^6$  내지 약  $8 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 약  $4 \times 10^6$  내지 약  $7 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 또는 예컨대 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $6 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 적어도 약  $1 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $2 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $3 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $4 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $5 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $6 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $7 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $8 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $9 \times 10^6$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $1 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $2 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $3 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 예컨대 적어도 약  $4 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터, 또는 예컨대 적어도 약  $5 \times 10^7$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다. 한 실시양태에

서, 본 개시내용에 따른 조성물은 최대 약  $1 \times 10^8$ 개의 세포 이상, 예컨대 최대 약  $2 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터 이상, 예컨대 최대 약  $3 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터 이상, 예컨대 최대 약  $4 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터 이상, 예컨대 최대 약  $5 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터 이상, 또는 예컨대 최대 약  $6 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다.

[0100] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약  $4 \times 10^7$  내지 약  $2 \times 10^8$ 개의 세포/밀리리터를 포함할 수 있다.

[0101] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약 10 마이크로리터 내지 약 5 밀리리터, 예컨대 약 20 마이크로리터, 예컨대 약 30 마이크로리터, 예컨대 약 40 마이크로리터, 예컨대 약 50 마이크로리터, 예컨대 약 60 마이크로리터, 예컨대 약 70 마이크로리터, 예컨대 약 80 마이크로리터, 예컨대 약 90 마이크로리터, 예컨대 약 100 마이크로리터, 예컨대 약 200 마이크로리터, 예컨대 약 300 마이크로리터, 예컨대 약 400 마이크로리터, 예컨대 약 500 마이크로리터, 예컨대 약 600 마이크로리터, 예컨대 약 700 마이크로리터, 예컨대 약 800 마이크로리터, 예컨대 약 900 마이크로리터, 예컨대 약 1 밀리리터, 예컨대 약 1.5 밀리리터, 예컨대 약 2 밀리리터, 예컨대 약 2.5 밀리리터, 예컨대 약 3 밀리리터, 예컨대 약 3.5 밀리리터, 예컨대 약 4 밀리리터, 또는 예컨대 약 4.5 밀리리터 범위의 부피를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 약 10 마이크로리터 내지 약 100 마이크로리터, 예컨대 약 20 마이크로리터 내지 약 90 마이크로리터, 예컨대 약 30 마이크로리터 내지 약 80 마이크로리터, 예컨대 약 40 마이크로리터 내지 약 70 마이크로리터, 또는 예컨대 약 50 마이크로리터 내지 약 60 마이크로리터 범위의 부피를 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 약 100 마이크로리터 내지 약 1 밀리리터, 예컨대 약 200 마이크로리터 내지 약 900 마이크로리터, 예컨대 약 300 마이크로리터 내지 약 800 마이크로리터, 예컨대 약 400 마이크로리터 내지 약 700 마이크로리터, 또는 예컨대 약 500 마이크로리터 내지 약 600 마이크로리터 범위의 부피를 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 조성물은 약 1 밀리리터 내지 약 5 밀리리터, 예컨대 약 2 밀리리터 내지 약 5 밀리리터, 예컨대 약 1 밀리리터 내지 약 4 밀리리터, 예컨대 약 1 밀리리터 내지 약 3 밀리리터, 예컨대 약 2 밀리리터 내지 약 4 밀리리터, 또는 예컨대 약 3 밀리리터 내지 약 5 밀리리터 범위의 부피를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약 20 마이크로리터 내지 약 500 마이크로리터의 부피를 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약 50 마이크로리터 내지 약 100 마이크로리터의 부피를 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약 50 마이크로리터 내지 약 200 마이크로리터의 부피를 가질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 약 20 마이크로리터 내지 약 400 마이크로리터의 부피를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 조성물은 냉동보관용으로 또는 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 위해 구성된 용기 내에 있을 수 있다. 한 실시양태에서, 용기는 미리 채워진 주사기일 수 있다.

[0102] **사용 방법**

[0103] 본 개시내용에 따라 수득된 OPC 조성물은 치료를 필요로 하는 대상체에서 하나 이상의 신경학적 기능을 개선하기 위한 세포 요법에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 OPC 세포 집단은 이를 필요로 하는 대상체 내로 주사 또는 이식될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포 집단은 척수 손상, 뇌졸중 또는 다발 경화증을 치료하기 위해 이를 필요로 하는 대상체 내로 이식될 수 있다.

[0104] 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포 집단은 대상체 내의 이식 부위에서 벗겨진 액손의 미엘린화를 유도할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 따라 생성된 세포 집단은 생착 및 이동을 위한 개선된 능력을 나타낼 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법에 따라 생성된 세포 집단은 대상체에서 신경 조직의 손상 후 복구 또는 재생을 개선할 수 있다.

[0105] 본 개시내용에 따른 세포 집단은 요법을 필요로 하는 대상체에서 대상체 내로 집단을 이식한 후에 감각 기능을 개선할 수 있다. 감각 기능에서의 개선을 척수 손상의 신경학적 분류에 대한 국제 표준(International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury) (ISNCSCI) 검사를 사용하여, 예컨대 핀 찌르기 및 가벼운 접촉 감각에 대해 우측 및 좌측에 대한 감각 수준을 결정하여 평가할 수 있다. 본 개시내용에 따른 세포 집단은 요법을 필요로 하는 대상체에서 대상체 내로 집단을 이식한 후에 운동 기능을 개선할 수 있다. 개선된 운동 기능을 ISNCSCI 검사를 사용하여, 예컨대 전체 마비, 촉진가능하거나 또는 가시적인 수축, 능동적인 움직임, 중력에 대한 전체 운동 범위, 및 충분한 저항에 대해 우측 및 좌측에 대한 운동 수준을 결정하여 평가할 수 있다.

- [0106] 본 개시내용에 따른 세포 집단은 12개월 이하 이내에 손상-유도 중추 신경계 실질 공동화의 부피를 감소시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포 집단은 6개월 이하, 5개월 이하, 4개월 이하, 3개월 이하, 2개월 이하 또는 1개월 미만 이내에 대상체에서 손상-유도 중추 신경계 실질 공동화의 부피를 감소시킬 수 있다.
- [0107] 본 발명이 일반적으로 기술되었지만, 특정되지 않는 한 예시의 방식으로 제공되고 본 개시내용을 제한하도록 의도되지 않는 하기의 실시예를 참조로 본 발명이 더욱 쉽게 이해될 것이다.
- [0108] **실시예**
- [0109] **실시예 1- 미분화된 인간 배아 줄기 세포의 배양 및 확장**
- [0110] H1 세포주 (WA01; Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6; 282(5391):1145-7)로부터 생성된 제조용 세포 은행 (WCB)으로부터의 미분화된 인간 배아 줄기 세포 (uhESC)를 제조용 인간 라미닌-521 (코닝(Corning) # 354224)이 코팅된, 조직 배양 처리 폴리스티렌 225 cm<sup>2</sup> 배양 플라스크 (코닝 # 431082) 상에서 완전 mTeSR™-1 배지 (스템 셀 테크놀로지스 # 85850)에서 배양하였다. 세포가 약 80-90% 전면성장에 도달했을 때까지 배지를 매일 완전히 교환한 후, ReLeSR™ 시약 (스템 셀 테크놀로지스 # 05872)을 사용하여 uhESC를 계대시켰다. ReLeSR™-리프트 uhESC 세포를 새로운 라미닌-521 코팅 225 cm<sup>2</sup> 플라스크에 시딩하고, 시딩 2일 후 매일 배지 교환을 재개하였다. 실시예 2에 기술된 바와 같은 신경외배엽 전구 세포로의 분화 전에, 실험에 따라, WCB로부터의 배양된 uhESC를 2 내지 5회의 계대 동안 이러한 방식으로 확장시켰다.
- [0111] **실시예 2 - 동적 현탁 배양에서 인간 배아 줄기 세포를 신경외배엽 전구체로 분화시키는 방법**
- [0112] 제-1일: 확장된 uhESC (약 90% 전면성장)를 단일 세포 현탁액을 형성하도록 아큐타제® (스템 셀 테크놀로지스 # 07920)로 탈착 및 탈응집시켜, 정확한 세포 카운트 및 균일한 시딩 밀도를 허용하였다. 그 후, 탈응집된 uhESC를 동적 현탁 배양을 위해 1×10<sup>6</sup> 개의 생존 세포/mL의 농도로 PBS-0.1 또는 PBS-0.5 미니 바이오리액터 시스템(Mini Bioreactor System) (PBS 바이오테크(PBS Biotech)) 내로 시딩하고, 각각 35 RPM 또는 25 RPM으로 회전하도록 설정하였다 (제-1일). 세포를 신경외 배지 (GPM; 2% B27 보충물 (깁코(Gibco) 카탈로그 번호 17504-044), 및 0.04 μg/mL 트리-아이오도-티로닌 (시그마(Sigma) 카탈로그 번호 T5516-1MG)이 보충된 DMEM/F12 (깁코 카탈로그 번호 10565-018)로 이루어짐)와 세포 생존을 지지하기 위해 10 μM Rho 키나제 억제제 (RI, 토크리스(Tocris) 카탈로그 번호 1254)가 보충된 미분화된 hESC 배양 배지 (실시예 1에서와 같음)의 1:1 혼합물에 시딩하였다. 최초의 24시간 이내에, uhESC의 균일한 소형 응집물이 형성되었다. 배양체 (EB) 형성과 대조적으로, 소형 응집물 내의 세포는 자발적으로 분화되기 시작하지 않았고, qPCR에 의해 측정된 바와 같은 마커 발현에 의해 실연된 바와 같이 만능성을 유지하였다 (도 5).
- [0113] 제0일-제3일: 신경외배엽으로의 분화를 개시하기 위해, 소형 비-EB 응집물을 10 μM SB431542 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 카탈로그 번호 S4317) 및 2 μM 도르소모르핀 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 P5499)이 보충된 GPM에서 다음 4일 동안 각각 45 또는 32 RPM으로 회전하는 PBS-0.1 또는 PBS-0.5 미니 바이오리액터에서 동적 현탁액에서 배양하였다. 응집물이 침강하도록 허용하고, 소비된 배지의 70-80%를 제거하고, 동일한 부피의 10 μM SB431542 및 2 μM 도르소모르핀이 보충된 GPM으로 교체하는 것에 의해 배지를 매일 보급하였다.
- [0114] 제4일-제6일: 세포를 0.5 μM 피모파민 (리프로셀(Reprocell), 카탈로그 번호 04-0009), 1 μM 레티노산 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 R2625), 및 150 μM 아스코르브산 (시그마 알드리치, 카탈로그 번호 A4544)이 보충된 GPM에서 45 RPM (PBS-0.1 미니 바이오리액터) 또는 32 RPM (PBS-0.5 미니 바이오리액터)으로 추가 3일 동안 동적 현탁액에서 추가로 배양하였다. 응집물이 침강하도록 허용하고, 소비된 배지의 70-80%를 제거하고, 동일한 부피의 0.5 μM 피모파민, 1 μM 레티노산, 및 150 μM 아스코르브산이 보충된 GPM으로 교체하는 것에 의해 배지를 매일 보급하였다.
- [0115] 제7일: 분화된 세포의 서브세트를 동적 현탁 배양 분화 공정의 제7일에 수집하고, 면역세포화학 (ICC) (실시예 5에 기술된 바와 같음) 및 qPCR (실시예 6에 기술된 바와 같음)에 의한 마커 발현에 대한 분석에 적용하였다. 제7일까지, 세포는 신경외배엽에 특징적인 마커를 발현하였다 (표 2, 도 3). 나머지 제7일 세포를 각각 실시예 3 및 4에 기술된 바와 같이 신경외 배지 및 추가로 희소돌기아교세포 전구 세포로의 분화에 적용하였다.
- [0116] **실시예 3 - 동적 현탁 배양에서 인간 배아 줄기 세포를 신경외 배지 세포로 분화시키는 방법**
- [0117] uhESC의 신경외배엽/신경 전구 세포로의 분화 (제0일-제6일)를 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였다. 제7

일에, 분화 배지를 20 ng/mL 인간 염기성 섬유아세포 성장 인자 (hbFGF, 써모 피셔(Thermo Fisher), 카탈로그# PHG0263), 10 ng/mL 표피 성장 인자 (EGF, 써모 피셔, 카탈로그# PHG0311), 및 10 μM RI가 보충된 GPM으로 변형시키는 것에 의해 신경교 전구 세포로의 분화가 시작되었다. 세포 응집물을 다음 2주 (제8일-제20일) 동안 20 ng/mL bFGF 및 10 ng/mL EGF가 보충된 GPM에서 45 rpm (PBS-0.1 미니 바이오리액터) 또는 32 RPM (PBS-0.5 미니 바이오리액터)으로 동적 현탁액에서 유지시켰고, 배지를 중력 침강 및 70-80% 배지 교환을 사용하여 매일 보급하였다. 제14일에 신선한 배지에 10 μM RI를 또한 첨가하였다.

[0118] 분화된 세포의 서브세트를 동적 현탁 배양 분화 공정의 제21일에 수집하고, qPCR (실시에 6에 기술된 바와 같음)에 의한 마커 발현에 대한 분석에 적용하였다. 제21일까지, 분화된 세포가 신경교 계통 세포와 일치하는 마커를 발현하였다 (표 2).

[0119] **실시에 4 - 인간 배아 줄기 세포를 희소돌기아교세포 전구 세포로 분화시키는 방법**

[0120] 실시예 3에서 수득된 신경교 계통 전구물질 세포가 추가로 희소돌기아교세포 전구 세포로 분화되었다. 제0일-제20일에 대한 분화 프로토콜은 실시예 2 및 3에 기술된 바와 같았다. 제21일에, 응집물을 동적 현탁 배양에서 재조합 인간 라미닌-521 (rhLN-521)로 코팅된 조직 배양 용기 상에서의 부착 배양으로 옮겼다. 예를 들어, 60 mL의 응집물 현탁액이 있는 1×PBS-0.1L 미니 바이오리액터로 시작하여, 60 mL의 배양물을 각각 30 mL의 배양물이 있는 2×T75 플라스크로 분할하였다. 제21일에 시작하여 분화 공정 종료까지 계속해서, 세포를 20 ng/mL EGF 및 10 ng/mL 혈소판-유래 성장 인자-AA (PDGF-AA, 펩프로테크(PeproTech), 카탈로그# AF-100-13A)가 보충된 GPM에서 배양하였고, 격일로 전체 배지 교체가 수행되었다. 제28일 및 제35일에, 세포 배양물을 TrypLE™ 셀렉트(TrypLE™ Select) (써모 피셔, 카탈로그# A12859-01)를 사용하여 탈착시키고, 카운팅하고, rhLN-521-코팅 용기 상에 4×10<sup>4</sup>개의 생존 세포/cm<sup>2</sup>로 시딩하였다. 제35일에 시작하여 제42일에 수확할 때까지 격일로 GPM을 교체하였다.

[0121] 분화된 세포의 서브세트를 분화 공정의 제42일에 수집하고, 유동 세포측정법 (실시에 5에 기술된 바와 같음), 면역세포화학 (실시에 5에 기술된 바와 같음) 및 qPCR (실시에 6에 기술된 바와 같음)에 의한 마커 발현에 대한 분석에 적용하였다. 제42일까지, 분화된 세포가 3가지 분석 방법에 의해 측정된 바와 같이 희소돌기아교세포 전구 세포에 특징적인 마커를 발현하였다 (표 1, 표 2, 도 4).

[0122] 제42일에 OPC를 수확하였다. 세포를 TrypLE™ 셀렉트를 사용하여 용기로부터 탈착시키고, 카운팅하고, 냉동보관 전에 크라이오스토어10(CryoStor10) (바이올라이프 솔루션즈(BioLife Solutions), 카탈로그# 210102)에서 다시 제형하였다.

[0123] **실시에 5 - 면역세포화학 및 유동 세포측정법에 의한 분화된 세포 집단의 특성화**

[0124] 세포 집단에서의 단백질 마커 발현의 상이한 측면들을 검출하고 특성화하기 위해 유동 세포측정법 및 면역세포화학 (ICC)을 사용할 수 있다. 유동 세포측정법을 사용하여 소정의 단백질 마커 프로파일을 나타내는 집단 내의 개별적인 세포의 백분율을 정량할 수 있는 한편, ICC는 각각의 단백질 마커의 세포하 국소화에 관한 추가적인 정보를 제공하고, 단일 세포 또는 세포 응집물에 적용될 수 있다. 이러한 단백질 프로파일링 접근법 중 하나 또는 둘 다를 사용함으로써, 본 발명가들은 본 개시내용의 방법에 따른 인간 배아 줄기 세포의 신경외배엽 전구 세포, 신경교 전구 세포, 및 희소돌기아교세포 전구 세포로의 분화를 추적하였다.

[0125] 현탁액에서 신경외배엽 전구 세포로 분화된 인간 배아 줄기 세포에 대해, 출발 물질 (미분화된 만능 세포) 및 분화된 제7일 세포 응집물에서의 단백질 마커 발현이 ICC에 의해 특성화되었다. 부착성 만능 세포 및 세포 응집물을 실온 (RT)에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드 (PFA)에서 고정시켰다. 고정된 세포 및 응집물을 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세정한 후, 고정된 응집물을 순차적으로 증가되는 농도의 수크로스 용액 (10%, 20%, 및 30% 중량/부피) 내에 각각 RT에서 30분 동안, RT에서 30분 동안, 그리고 4°C에서 철야로 놓았다. 수크로스 교체 후, 응집물을 티슈-텍(Tissue-Tek) 최적 절단 온도 (OCT) 용액 (사쿠라 파인텍 USA(Sakura Finetek USA) # 4583)에 매립하고, -80°C에서 냉동하였다. OCT-매립 응집물을 -20°C로 가온하고, 냉동미세절단기 (모델 CM3050 S, 라이카 바이오시스템즈(Leica Biosystems), 미국 일리노이주 버팔로 그로브)를 사용하여 30 μm 절편으로 절단하고, 폴리-L-라이신 (시그마-알드리치 # P4707)이 코팅된 유리 슬라이드 상에 마운팅하였다. 면역세포화학 염색을 수행하기 위해, 고정된 부착성 세포 및 슬라이드-마운팅 응집물 절편을 투과화하고, 2시간 동안 실온 (RT)에서 PBS 내의 0.1% 트리톤(Triton)™ X-100/2% 정상 염소 혈청/1% 소 혈청 알부민으로 이루어진 차단 용액에서 차단하였다. 투과화 및 차단 후, 부착성 세포 및 응집물 절편을 철야로 4°C에서 트리톤™ X-100이 없고 관심 단백질 마커에 대해 특이적인 1차 항체 (만능 세포를 검출하기 위한 Nanog (앱캠(Abcam) # ab21624), Oct4

(밀리포어(Millipore) # MAB4401), 및 Sox2 (엡캠 # ab92494), 또는 신경외배엽 전구 세포를 검출하기 위한 PAX6 (BD 파민젠(BD Pharmingen) # 561462) 및 PSA-NCAM (인비트로젠(Invitrogen) # 14-9118-80)을 포함함)을 함유하는 차단 용액에서 인큐베이션하였다. 그 후, 부착성 세포 및 응집물 절편을 PBS로 3회 세정한 후, 빛으로부터 보호하면서 1시간 동안 RT에서 트리톤™ X-100이 없는 차단 용액에서 선택된 1차 항체에 대해 특이적인 2차 항체 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI) 대비-염색제와 함께 인큐베이션하였다. 부착성 세포 및 응집물 절편을 PBS로 3회 세정하고, IN 셀 애널리저 2000 (GE 헬스케어(GE Healthcare), 미국 펜실베이니아주 피츠버그)을 사용하여 영상화하였다.

[0126] **도 2 및 도 3**은 출발 만능 세포 집단 및 제7일 신경외배엽 전구 세포에 대한 대표적인 ICC 데이터를 각각 나타낸다. **도 2**에 나타난 바와 같이, 미분화된 인간 배아 줄기 세포의 출발 집단은 정규 만능성 마커인 Nanog, Oct4, 및 Sox2를 발현하였다 (Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Apr 6;10(4):440-54). 7일의 분화 후, 2개의 대표적인 실험으로부터의 세포 응집물은 신경외배엽 전구 세포의 특징적인 2개의 단백질 마커인 PAX6 및 PSA-NCAM을 발현하였다 (**도 3**, 문헌 [Lippmann ES, Williams CE, Ruhl DA, Estevez-Silva MC, Chapman ER, Coon JJ, Ashton RS. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm. *Stem Cell Reports*. 2015 Apr 14;4(4):632-44]; [Kim DS, Lee DR, Kim HS, Yoo JE, Jung SJ, Lim BY, Jang J, Kang HC, You S, Hwang DY, Leem JW, Nam TS, Cho SR, Kim DW. Highly pure and expandable PSA-NCAM-positive neural precursors from human ESC and iPSC-derived neural rosettes. *PLoS One*. 2012;7(7):e39715]).

[0127] 회소돌기아교세포 전구 세포로 제42일까지 분화된 인간 배아 줄기 세포에 대해, 생성된 단일 세포 집단에서의 단백질 마커 발현이 유동 세포측정법 및 ICC 둘 다에 의해 특성화되었다.

[0128] ICC에 의해 회소돌기아교세포 전구 세포의 단백질 마커 발현을 특성화하기 위해, 투과화가 2분 동안 RT에서 100% 메탄올로 수행되고 차단 용액이 PBS 내의 10% 소 태아 혈청으로 이루어진 것을 제외하고는, 슬라이드에 마운팅된 응집물 절편에 대해 상기 기술된 바와 같이 염색을 수행하였다.

[0129] **도 4**는 제42일 회소돌기아교세포 전구 세포에 대한 대표적인 ICC 데이터를 나타낸다. 2개의 대표적인 실험으로부터의 생성된 단일 세포 집단이 회소돌기아교세포 전구 세포 마커 NG2를 발현하였다 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 2014 Sep 3;34(36):11929-47).

[0130] 유동 세포측정법에 의해 제42일의 세포 표면 마커를 정량하기 위해, 세포를 해동 배지 (DMEM 배지 내의 10% 소 태아 혈청)에서 해동시키고, 원심분리하고, 염색 완충제 (PBS 내의 2% 소 태아 혈청/0.05% 아지드화나트륨)에 재현탁시켰다. 세포를 NG2 (인비트로젠 # 37-2300), GD3 (밀리포어 # MAB2053), A2B5 (BD # 563775), CD49f (밀리포어 # CBL458P), EpCAM (다코(Dako) # M080401-2) 및 CLDN6 (써모 피셔 # MA5-24076)을 포함하는 관심 마커에 대해 특이적인 1차 항체, 및 그의 아이소형 대조군과 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 세포를 염색 완충제로 세정하여 미결합 항체를 제거하였다; 미결합 항체의 경우, 그 후 세포를 적합한 형광단-결합 2차 항체와 함께 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하였다. 세포를 세정한 후, 아이오딘화프로피듐을 첨가하여 죽은 세포를 분리하였다. 일부 경우에, 세포를 매트릭셀 (코닝 # 356231)로 코팅된 조직 배양 용기에서 철야로 37°C/5% CO2에서 배양하여 실시예 4에 기술된 제42일 수확 절차에 대한 감수성을 나타낸 단백질 마커를 회수한 후, TrypLE™ 셀렉트 (써모 피셔 # A12859-01)로 수확하고, 상기 기술된 바와 같이 유동 세포측정법 분석을 위해 염색하였다. 모든 세포가 어튠 NxT(Attune NxT) (써모 피셔, 미국 매사추세츠주 월섬) 유동 세포측정기 상에서 분석되었다. 소정의 단백질 마커를 발현하는 세포의 백분율을 계산하기 위해, 아이오딘화프로피듐으로 염색된 죽은 세포를 게이팅하였고, 상응하는 항체에 결합된 생존 세포의 수가 아이소형 대조군 항체에 대한 비-특이적 결합을 나타낸 세포의 수에 대해 수정한 후에 분석된 총 세포수의 비율로서 표현되었다.

[0131] **표 1**은 실시예 4에 기술된 방법에 따라 생성된 제42일 회소돌기아교세포 전구 세포에 대한 대표적인 유동 세포측정법 데이터를 나타낸다. 2회의 대표적인 실행에 대해 제시된 바와 같이, 생성된 세포 집단 내의 높은 비율의 세포가 NG2 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the

cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014 Sep 3;34(36):11929-47), 및 GD3 (Gallo V, Zhou JM, McBain CJ, Wright P, Knutson PL, Armstrong RC. Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K<sup>+</sup> channel block. *J Neurosci.* 1996 Apr 15;16(8):2659-70)을 포함하는 특징적인 희소돌기아교세포 마커, 뿐만 아니라 프리(pre)-OPC 마커인 A2B5 (Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2005 May 11;25(19):4694-705)를 발현하였다. 추가적으로, 생성된 집단에서 신경 전구체/상피 마커 CD49f (Krebsbach PH, Villa-Diaz LG. The Role of Integrin  $\alpha 6$  (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells Dev.* 2017 Aug 1;26(15):1090-1099) 및 상피 마커 CLDN6 (Lin D, Guo Y, Li Y, Ruan Y, Zhang M, Jin X, Yang M, Lu Y, Song P, Zhao S, Dong B, Xie Y, Dang Q, Quan C. Bioinformatic analysis reveals potential properties of human Claudin-6 regulation and functions. *Oncol Rep.* 2017 Aug;38(2):875-885) 및 EpCAM (Huang L, Yang Y, Yang F, Liu S, Zhu Z, Lei Z, Guo J. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *Int J Mol Med.* 2018 Oct;42(4):1771-1785)을 포함하는 비-OPC 마커가 최소로 검출되었다.

[0132] 표 1. 본 개시내용에 따른 방법에 의해 생산된 희소돌기아교세포 전구 세포에 대한 대표적인 유동 세포측정법 데이터

	OPC/프리-OPC 마커			비-OPC 마커		
	NG2	GD3	A2B5	CD49f	CLDN6	EpCAM
실험 1	98%	74%	22%	2%	2%	1%
실험 2	89%	72%	49%	4%	2%	0%

[0133]

[0134] 척수 손상을 치료하기 위해 현재 임상 시험 중이고 또 다른 방법을 사용하여 생성된 OPC에 비교했을 때 (Priest CA, Manley NC, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury. *Regen Med.* 2015 Nov;10(8):939-58; Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med.* 2017 Oct;6(10):1917-1929), 본 개시내용에 기술된 방법에 의해 생성된 세포 집단은 희소돌기아교세포 전구 세포 마커 NG2에 대해 양성인 세포의 더 높은 비율 및 비-OPC 마커 CD49f, CLDN6, 및 EpCAM의 감소된 발현을 발생시켰다.

[0135] 실시예 6 - 유전자 발현 프로파일링에 의한 분화된 세포 집단의 특성화

[0136] 출발 만능 세포 집단의 세포 표현형, 및 신경외배엽 전구 세포, 신경교 전구 세포 및 희소돌기아교세포 전구 세포의 생성을 포함하는 각각의 분화 단계를 특성화하기 위해 유전자 발현 프로파일링을 사용할 수 있다. 유전자 발현 프로파일링은 마이크로어레이 및 RNA-seq과 같은 방법을 사용하는 전체적인 트랜스크립톰 프로파일링, 및 정량적 실시간 PCR (qPCR)과 같은 증가된 감수성의 방법을 사용하는 표적화된 유전자 프로파일링 둘 다를 포함한다.

[0137] 유전자 발현 프로파일링을 수행하기 위해, 세포를 퀴아젠(Qiagen) RLT 용해 완충제 (퀴아젠 # 79216)에서 용해시키고, 제조사의 지침에 따라 퀴아젠 RNeasy 미니 키트 (퀴아젠 # 74106)를 사용하여 RNA를 정제하였다. qPCR-기반 분석을 위해, 그 후 정제된 RNA를 제조사의 지침에 따라 인비트로젠 수퍼스크립트 IV VILO 마스터믹스(Invitrogen Superscript IV VILO Mastermix) (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific) # 11756050)를 사용하여 표준 방법에 따라 cDNA로 전환시켰다. 그 후, 표적 유전자 및 기준 하우스킵핑 유전자의 상대적 발현 수준을 제조사의 지침에 따라 유전자-특이적 프라이머-프로브 세트 (어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)의 택맨(Taqman) 유전자 발현 검정법, 써모 피셔 사이언티픽 # 4331182)를 사용하여 정량하였다. 소정의 표적 유전자 세트의 상대적 발현 수준을 결정하기 위해, ABI 7900HT 실시간 서열 검출 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈), 바이오마크 HD 시스템(BioMark HD System) (플루이다임) 또는 등가물에서 PCR 반응을 수행하였다. 각각의 표적 유전자를 하나 이상의 기준 유전자, 예컨대 GAPDH에 대해 정규화하여 그의 상대적 발현 수준을 결정하였다.

[0138] 도 5는 3차원 세포 응집물의 형성 전 (제-1일) 및 24시간 후의 소형 비-배아체 (비-EB) 응집물의 형성 후 (제0일, 신경외배엽 분화의 개시 직전)의 수확 시의 uhESC의 대표적인 qPCR 분석을 나타낸다. 2개의 대표적인 실험

이 수행되었고, RNA 샘플을 수집하고, 상기 기술된 방법을 사용하여 qPCR에 의한 유전자 발현 프로파일링에 대해 프로세싱하였다. 만능성 및 초기 분화에 대한 공지된 마커로 이루어진 76개 유전자 패널을 사용하여 플루리다임 qPCR을 수행하였다. 각각의 유전자에 대해, 정규화된  $\Delta CT$  값이 5개의 하우스키핑 유전자 (ACTB, GAPDH, EP300, PGK1, SMAD1)의 평균에 대해 상대적으로 계산되었다. 제-1일 대 제0일에 대한 모든  $\Delta CT$  값의 생성된 상관관계 플롯이 도 5에서 제시되고, 이는 제0일 소형 비-EB 응집물 내의 세포가 만능성 유전자의 발현을 유지하였고, 제-1일 uhESC와 유사한 테스트된 마커의 전체 발현 프로파일을 가졌다는 것을 나타낸다. 이는 대표적인 실험 둘 다에 대해 uhESC의 응집물 형성 24시간 후 (제0일 uhESC)에 만능성 마커 NANOG, LIN28A, 및 SOX2의 높은 수준을 나타내는 표 2에 제시된 기준선에 대해 상대적인 배수 변화의 계산에 의해 추가로 지지된다.

[0139] 표 2는 본 개시내용에 따른 방법에 의해 생성된 세포 집단에서의 만능성 유전자, 신경외배엽 전구체 유전자, 신경교 전구체 유전자, 및 희소돌기아교세포 전구체 유전자의 발현을 측정하는 2개의 대표적인 실험으로부터의 qPCR 결과를 나타낸다. RNA 샘플을 하기의 시점에 수집하였다: uhESC 세포 응집물 형성 개시 24시간 후 및 분화 전 (제0일), 신경외배엽 전구체로의 분화 후 (제7일), 신경교 전구체로의 분화 후 (제21일), 및 희소돌기아교세포 전구체로의 분화 후 (제42일). RNA 샘플을 상기 기술된 방법을 사용하여 qPCR에 대해 프로세싱하였다. 3개의 만능성 유전자 (NANOG, LIN28A, SOX2), 3개의 신경외배엽 전구체 유전자 (PAX6, HES5, ZBTB16), 3개의 신경교 전구체 유전자 (CACGN4, FABP7, SOX6), 및 3개의 희소돌기아교세포 전구체 유전자 (CSPG4, PDGFR $\alpha$ , DCN)를 포함하는, 각각의 분화 상태를 지시하는 유전자의 선택된 패널을 정량하였다. 각각의 유전자에 대해, 정규화된  $\Delta CT$  값이 5개의 하우스키핑 유전자 (ACTB, GAPDH, EP300, PGK1, SMAD1)의 평균을 사용하여 계산되었고, 기준선 (정량 한계 미만의 발현)에 대해 상대적인 배수 발현이  $\Delta \Delta CT$  방법을 사용하여 계산되었다.

[0140] 표 2. 본 개시내용에 따라 OPC로 분화된 H1 uhESC에서의 만능성, 신경외배엽 전구 세포 (NEPC), 신경교 전구 세포 (GPC), 및 희소돌기아교세포 전구 세포 (OPC)에 대한 유전자 마커의 qPCR 분석

	실험 1 제0일 uhESC	실험 2 제0일 uhESC	실험 1 제7일 NEPC	실험 2 제7일 NEPC	실험 1 제21일 GPC	실험 2 제21일 GPC	실험 1 제42일 OPC	실험 2 제42일 OPC
만능성 유전자								
NANOG	236	244	2	2	2	1	2	1
LIN28A	410	203	240	160	3	1	2	1
SOX2	603	628	1381	1337	661	453	12	18
신경외배엽 전구 세포 (NEPC) 유전자								
PAX6	1	2	971	1329	180	193	2	2
HES5	1	2	295	555	384	511	2	1
ZBTB16	1	2	154	166	70	47	5	1
신경교 전구 세포 (GPC) 유전자								
CACGN4	21	20	96	169	377	474	86	73
FABP7	6	7	7	6	407	221	14	13
SOX6	1	2	6	6	36	58	6	8
희소돌기아교세포 전구 세포 (OPC) 유전자								
CSPG4	5	2	2	2	2	1	234	225
PDGFR $\alpha$	1	2	4	2	4	2	32	88
DCN	1	2	2	2	30	17	753	803

[0141] 표 2를 참조하면, 본 개시내용에 따른 방법에 의한 7일 동안의 uhESC의 분화는 NANOG의 하향 조절, 및 LIN28A, SOX2, PAX6, HES5, 및 ZBTB16의 발현을 포함하는, 신경외배엽 전구 세포와 일치한 유전자 발현 프로파일을 발생 시켰다 (Patterson M, Chan DN, Ha I, Case D, Cui Y, Van Handel B, Mikkola HK, Lowly WE. Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell Res.* 2012 Jan;22(1):178-93; Lippmann ES, Williams CE, Ruhl DA, Estevez-Silva MC, Chapman ER, Coon JJ, Ashton RS. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm. *Stem Cell Reports.* 2015 Apr 14;4(4):632-44; Woo SM, Kim J, Han HW, Chae JI, Son MY, Cho S, Chung HM, Han YM, Kang YK. Notch signaling is required for maintaining stem-cell features of neuroprogenitor cells derived from human embryonic stem cells. *BMC Neurosci.* 2009 Aug 17;10:97; Avantsaggiato V, Pandolfi PP, Ruthardt M, Hawe N, Acampora D, Pelicci PG, Simeone A. Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci.* 1995 Jul;15(7 Pt 1):4927-42).

[0143] 21일의 현탁액-기반 분화 후, 생성된 세포 집단은 만능성 및 신경외배엽 전구 세포 마커의 하향 조절 및

CACNG4, FABP7, 및 SOX6의 유도를 포함하는, 신경교 전구 세포와 일치한 유전자 발현 프로파일을 나타냈다 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guamieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014 Sep 3;34(36):11929-47; Petit A, Sanders AD, Kennedy TE, Tetzlaff W, Glattfelder KJ, Dalley RA, Puchalski RB, Jones AR, Roskams AJ. Adult spinal cord radial glia display a unique progenitor phenotype. *PLoS One.* 2011;6(9):e24538; Baroti T, Zimmermann Y, Schillinger A, Liu L, Lommes P, Wegner M, Stolt CC. Transcription factors Sox5 and Sox6 exert direct and indirect influences on oligodendroglial migration in spinal cord and forebrain. *Glia.* 2016 Jan;64(1):122-38).

[0144] 본 개시내용에 기술된 방법에 따른 42일의 분화 후, 생성된 세포 집단은 초기 계통 마커의 하향 조절 및 CSPG4 (NG2), PDGFR  $\alpha$ , 및 DCN의 유도를 포함하는, 희소돌기아교세포 전구체와 일치하는 마커를 발현하였다 (Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guamieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014 Sep 3;34(36):11929-47).

[0145] 실시예 7 - TGFBR1/액티빈/노달 신호전달 및 BMP 신호전달의 대안적 소형 분자 억제제를 사용한 인간 배아 줄기 세포의 신경외배엽 전구 세포로의 분화

[0146] 실시예 2에서 사용된 소형 분자 억제제 (SB431542 및 도르소모르핀)에 더하여, TGF  $\beta$  R1/액티빈/노달 신호전달 및 BMP 신호전달의 대안적인 소형 분자 억제제를 현탁액에서 인간 배아 줄기 세포를 신경외배엽 전구체로 분화시키는 능력에 대해 테스트하였다. 표 3은 테스트된 대안적인 소형 분자 억제제를 열거한다. 각각의 조건을 울트라 로우 어태치먼트(Ultra Low Attachment) 6웰 조직 배양 플레이트 (코닝 # 3471)의 이중 웰에서 테스트하였다.

[0147] 표 3. 현탁액에서 인간 배아 줄기 세포를 신경외배엽 전구체로 분화시키는 데 사용된 소형 분자 억제제

억제제	테스트 농도	1차 결합 표적(들)	판매자 카탈로그 #
<b>TGF<math>\beta</math>1/액티빈/노달 억제제</b>			
SB431542	10 $\mu$ M	ALK5, ALK4, ALK7	시그마-알드리치 # S4317
LY2 157299	10 $\mu$ M	ALK5	에이팩스바이오 # A8348
GW788388	10 $\mu$ M	ALK5, ALK4, ALK7	에이팩스바이오 # A8301
A-77-01	10 $\mu$ M	ALK5	에이팩스바이오 # A3132
A-83-01	10 $\mu$ M	ALK5, ALK4, ALK7	에이팩스바이오 # A3133
SB505124	10 $\mu$ M	ALK5, ALK4, ALK7	에이팩스바이오 # A3799
<b>BMP 억제제</b>			
도르소모르핀	2 $\mu$ M	ALK2, ALK3, ALK6	시그마-알드리치 # P5499
DMH-1	2 $\mu$ M	ALK2, ALK3	에이팩스바이오 # B3686
K02288	2 $\mu$ M	ALK2, ALK1, ALK3, ALK6	에이팩스바이오 # B2286
ML347	2 $\mu$ M	ALK2, ALK1	에이팩스바이오 # B3688

[0148]

[0149] 분화 제7일에, 세포를 수집하고, 실시예 6에 기술된 바와 같이 RNA 추출 및 qPCR에 의한 유전자 발현 프로파일링을 위해 프로세싱하였다. 각각의 유전자에 대해, 정규화된  $\Delta$ CT 값이 5개의 하우스키핑 유전자 (ACTB, GAPDH, EP300, PGK1, SMAD1)의 평균에 대해 상대적으로 계산되었고, 기준선 (정량 한계 미만의 발현)에 대해 상대적인 배수 발현이  $\Delta \Delta$ CT 방법을 사용하여 계산되었다. 표 4는 각각의 소형 분자 조합의 생물학적 사본에 대

한 배수 발현 값 (기준선에 대해 상대적임)의 평균을 나타낸다. 표 4를 참조로, 각각의 테스트된 소형 분자 조합으로의 현탁액에서의 7일 동안의 uhESC의 분화는 만능성 마커 NANOG의 하향 조절 및 LIN28A, SOX2, PAX6, HES5, 및 ZBTB16을 포함하는 신경외배엽 전구 세포 표현형과 연관된 유전자의 유사한 정도의 유지된 발현 또는 유도를 발생시켰다.

[0150] 각각의 소형 분자 조합으로의 처리 후의 생성된 제7일 세포 표현형의 더욱 포괄적인 비교를 수득하기 위해, 만능성, 신경외배엽 전구 세포, 신경관 패턴형성, 신경교 전구 세포, 희소돌기아교세포 전구 세포, 신경 능선 세포, 뉴런, 성상세포, 혈관주위세포, 슈반 세포, 및 상피 세포에 대한 공지된 마커로 이루어진 96개 유전자 패널을 사용하여 플루리다임 qPCR을 수행하였다. 도 6을 참조로, 정규화된 ΔCT 값의 회귀 플롯에 의한 각각의 대안적인 소형 분자 조합에 대한 제7일 세포 표현형 대 SB431542 + 도르소모르핀으로의 처리에 의해 생성된 세포 표현형의 비교는 테스트된 각각의 소형 분자 조합으로 유사한 전체적 세포 표현형이 달성될 수 있었다는 것을 나타냈다. 총괄적으로, 표 4 및 도 6에 제시된 결과는 (i) TGFβR1/액티빈/노달 신호전달 억제제와 (ii) BMP 신호전달 억제제의 다양한 조합이 본 개시내용의 방법을 사용하여 현탁액에서 uhESC를 신경외배엽 전구 세포로, 그리고 추가로 신경교 전구 세포 및 희소돌기아교세포 전구 세포로 분화시키는 데 사용될 수 있다는 것을 지지한다.

[0151] 표 4. 소형 분자 억제제의 상이한 조합을 사용하여 NEPC로 분화된 H1 uhESC에서의 만능성 및 신경외배엽 전구 세포 (NEPC)에 대한 유전자 마커의 qPCR 분석

	SB431542 + 도르소	SB431542 + DMH-1	SB431542 + K02288	SB431542 + 1V1L347	LY2157299 + 도르소	GW788388 + 도르소	A-77-01+ 도르소	A-83-01+ 도르소	SB505124 + 도르소
만능성 유전자									
NANOG	2	4	1	1	3	2	3	2	2
LIN28A	518	473	684	565	554	607	648	646	596
SOX2	1335	1488	1412	1257	1325	1270	1385	1395	1349
신경외배엽 전구 세포 유전자									
PAX6	791	836	741	615	748	692	791	514	765
HES5	1025	862	1047	698	1040	1012	876	650	980
ZBTB16	201	192	210	220	203	198	198	159	188

[0152] 실시예 8 - 시험관 내 낭종 검정법을 사용한 분화된 OPC 집단 내의 외래 상피 계통 세포의 존재의 평가

[0154] 본 개시내용에 따라 생성된 OPC 집단 내의 바람직하지 않은 상피 계통 세포의 존재를 시험관 내 낭종 검정법을 사용하여 테스트하였다. 본질적으로 문헌 [Debnath et al. (Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. 2003 *Methods*. 3:256-68)]의 프로토콜에 따라 낭종 검정법이 수행되었다. 간략하게, OPC를 20일의 기간 동안 상피 낭종 형성을 자극하는 것으로 공지된 인자의 존재 하에 3D 배양 시스템에서 성장시켰다. 낭종의 육안 검출에 더하여, 상피 마커 CD49f의 기저층막 단백질 발현을 함유하는 낭종 구조물의 존재가 면역세포화학을 사용하여 또한 평가되었다.

[0155] OPC를 매트릭셀® (코닝)의 패드 상으로 낭종-지지 배지 내에  $21.9 \times 10^3$  개의 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 시딩하였다 (총  $0.5 \times 10^6$  개의 세포를 24웰 플레이트의 12개의 웰에 시딩하였다). 세포를 20일 동안 배양하였다. 제20일에, 라이브 낭종 카운트를 수행하였다. 세포 회수 용액 (코닝 # 354253)을 사용하여 매트릭셀®을 용해시키고, 세포를 얼음 상에서 5분 동안 4% 파라포름알데히드 (PFA)에 고정시키고, 철야로 차단 완충제에서 투과화시켰다. 이어서, 낭종을 CD49f (ITGA6), 팔로이딘에 대해 염색하고, DAPI로 대비-염색하였다. IN 셀 애널라이저 2000 (GE 헬스케어 라이프 사이언시즈(GE Healthcare Life Sciences))을 사용하여 낭종을 영상화하고, 낭종 빈도, 크기 및 염색 강도를 IN 셀 디벨로퍼 소프트웨어(IN Cell Developer Software) (GE 헬스케어 라이프 사이언시즈) 및 MATLAB™ (매스워크스(Mathworks))을 사용하여 정량하였다.

[0156] 표 5를 참조로, 본 개시내용에 따른 방법을 사용하여 2개의 대표적인 실행으로부터 생성되고 시험관 내 낭종 검정법에서 테스트된 OPC는 기존에 생체 내에서 상피 낭종 형성을 일으키는 것으로 밝혀진 대안적인 방법 (Manley NC, Priest CA, Denham J, Wirth ED 3rd, Lebkowski JS. Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cells: Preclinical Efficacy and Safety in Cervical Spinal Cord Injury. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Oct;6(10):1917-1929)에 의해 생성된 OPC의 3개의 대조군 로트 (대조군 A, 대조군 B 및 대조군 C)의 것보다 더 적은 낭종을 생산하였다. 이러한 결과를 기초로, 본 개시내용에 따라 생성된 OPC가 생체 내에서 상피 낭종을 거의 형성하지 않거나 또는 형성하지 않을 것으로 예상된다.

[0157] 표 5. 본 개시내용에 따른 방법에 의해 생산된 희소돌기아교세포 전구 세포에 대한 대표적인 낭종 검정법 결과

	대조군 A	대조군 B	대조군 C	실행 1	실행 2
낭종/100,000개의 세포 입력	6.2	16.8	25.6	0.4	0.4

[0158]

[0159]

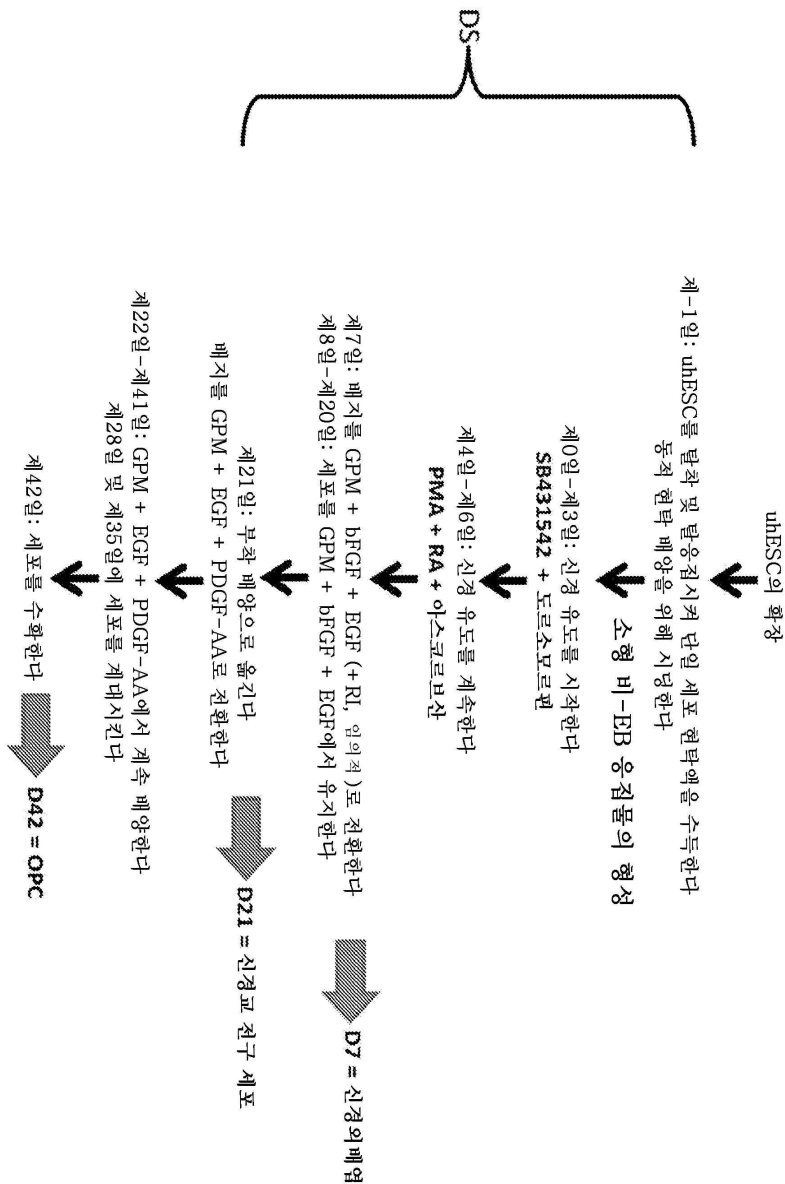
본 개시내용이 특정 실시양태를 참조로 기술되었지만, 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변화가 이루어질 수 있고 등가물이 그의 요소를 대체할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 추가적으로, 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않으면서 특정 상황 또는 물질을 본 개시내용의 교시내용에 적응시키도록 많은 변형이 이루어질 수 있다.

[0160]

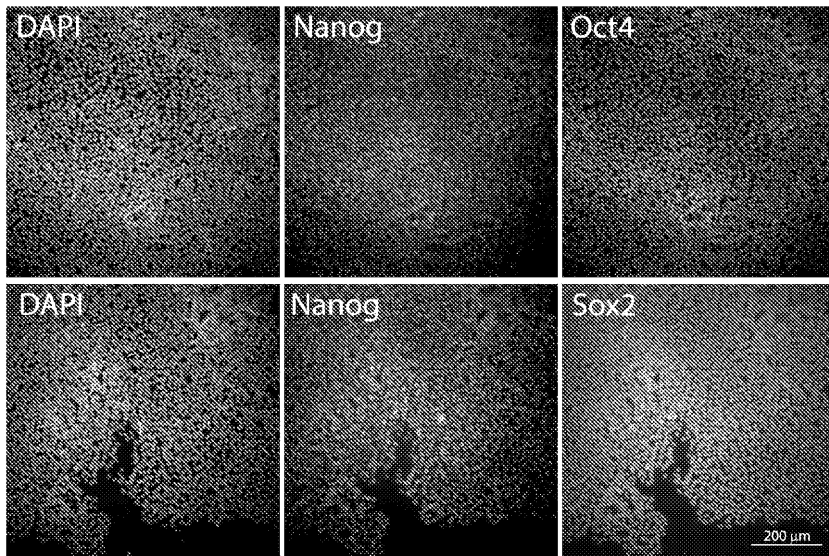
따라서, 본 개시내용이 본 개시내용을 수행하기 위해 구상된 최상의 방식으로서 개시된 특정 실시양태에 제한되지 않고, 본 개시내용이 첨부된 청구범위의 범주 및 취지 내에 속하는 모든 측면을 포함할 것으로 의도된다.

**도면**

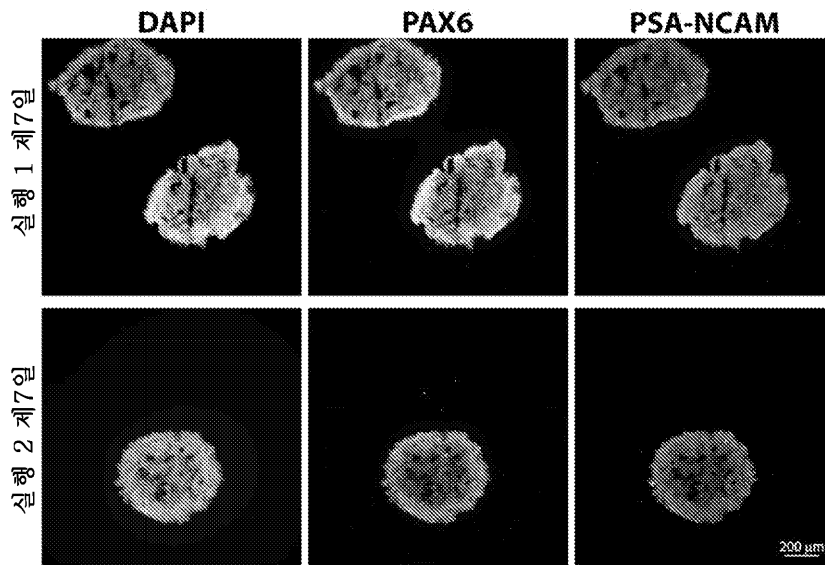
**도면1**



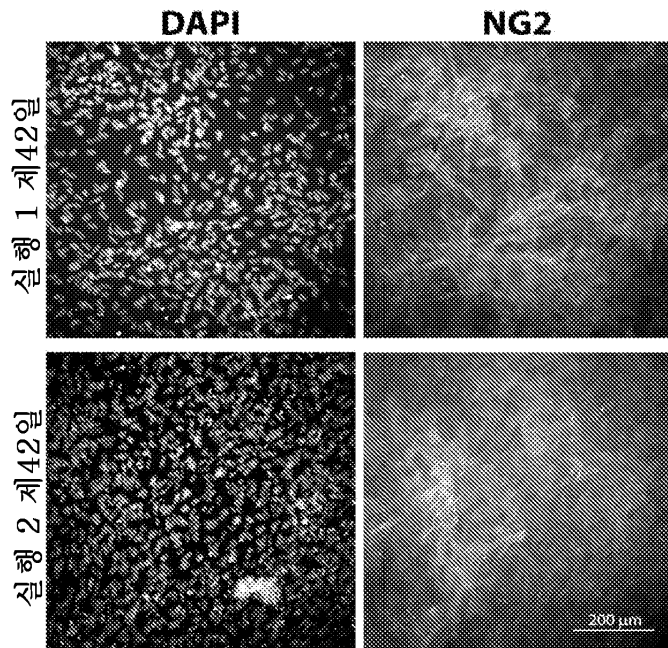
도면2



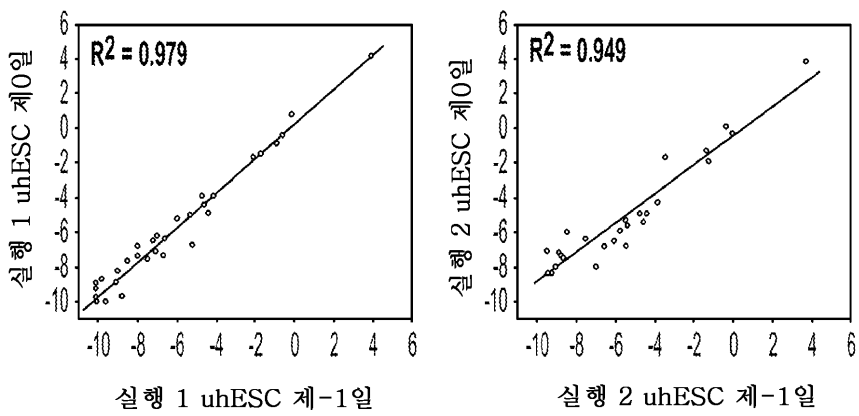
도면3



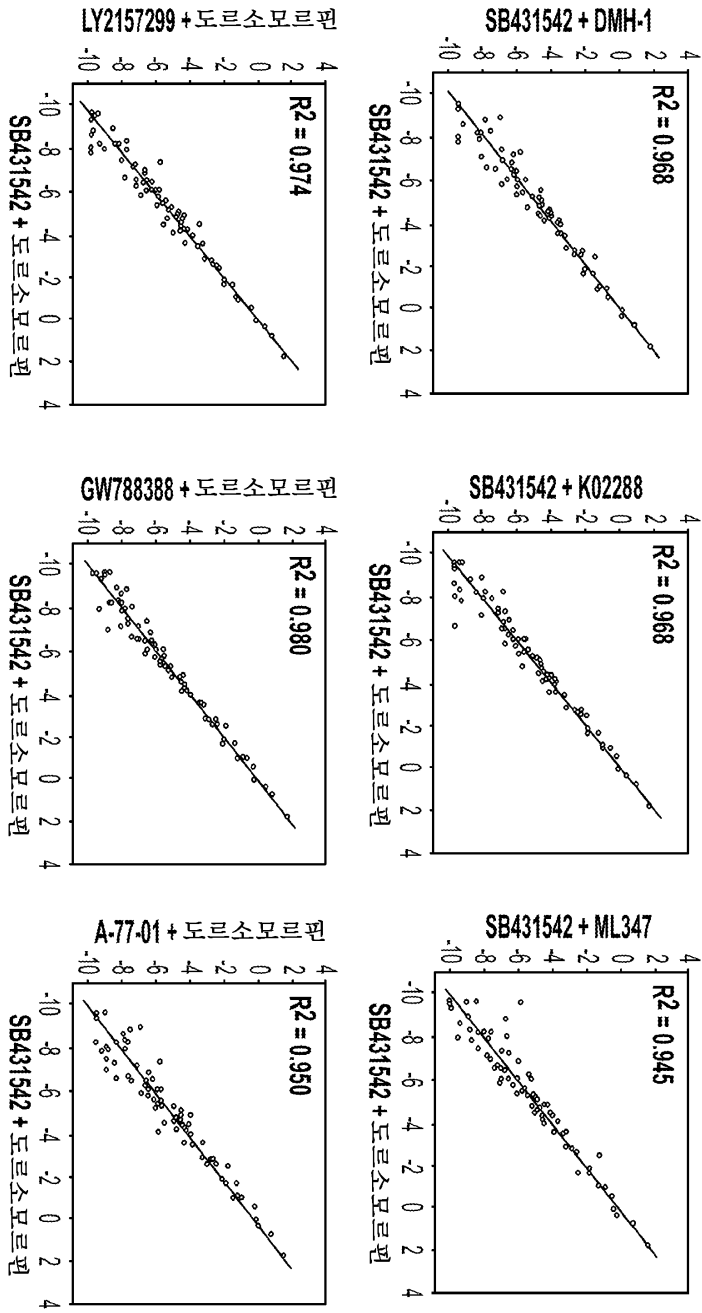
도면4



도면5



도면6a



도면6b

