(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월25일
(11) 등록번호 10-2651433
(24) 등록일자 2024년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/078* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/069 (2013.01)
C12N 5/0634 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2022-7014323(분할)
(22) 출원일자(국제) 2007년04월13일
심사청구일자 2022년05월27일
(85) 번역문제출일자 2022년04월27일
(65) 공개번호 10-2022-0057664
(43) 공개일자 2022년05월09일
(62) 원출원 특허 10-2021-7007639
원출원일자(국제) 2007년04월13일
심사청구일자 2021년04월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/009106
(87) 국제공개번호 WO 2007/120811
국제공개일자 2007년10월25일
(30) 우선권주장
60/792,224 2006년04월14일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨
미국, 매사추세츠 (우편번호 01581), 웨스트버러, 테크놀로지 드라이브 9
(72) 발명자
란자 로버트
미국 01510 매사추세츠 클린턴 사우스 메도우 로드 35
루 쉬-지앙
미국 01545 매사추세츠 슈루즈버리 베가 드라이브 22
(74) 대리인
양영준, 김영

(56) 선행기술조사문헌
Guo, H. et al., Experimental Hematology, 2003, vol.31, pp.650-658*
Tian, X. et al., Experimental Hematology (2004) 32:1000-1009*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 20 항 심사관 : 이효진

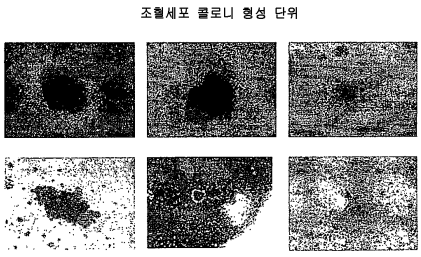
(54) 발명의 명칭 **혈관 콜로니 형성 세포**

(57) 요 약

본 명세서는 시험관내에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법과, 이러한 세포를 증식시키고 사용하는 방법을 개시한다. 이 방법에 의하면 다수의 혈관 콜로니 형성 세포뿐만 아니라 조혈 세포 및 내피 세포와 같은 유도체 세포도 생성할 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법으로 얻은 세포는 각종 연구, 임상 및 치료

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



용도에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
C12N 2506/02 (2013.01)

(30) 우선권주장
60/801,993 2006년05월19일 미국(US)
60/846,163 2006년09월20일 미국(US)
60/852,142 2006년10월16일 미국(US)
60/860,676 2006년11월22일 미국(US)
60/918,832 2007년03월19일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 골 형태형성 단백질 4(BMP-4)를 포함하는 무혈청 배지 중에서 인간 배아 줄기 세포를 배양하는 단계;

(b) VEGF, BMP-4 및 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF)를 포함하는 무혈청 배지 중에서 단계 (a)에서 제조된 세포를 배양하여 배상체를 형성시키는 단계;

(c) 상기 배상체를 단일 세포로 해체시키는 단계; 및

(d) 인슐린, 트랜스페린, 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-6(IL-6), 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF), 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO), FLT3(FL), 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 골 형태형성 단백질 4(BMP-4)로 이루어지는 군에서 선택되는 2종 이상의 성장 인자를 포함하는 무혈청 배지 중에서 상기 단일 세포를 배양하여 인간 혈관 콜로니 형성 세포(human hemangio-colony forming cell)를 생성시키는 단계

를 포함하는 인간 배아 줄기 세포 유래의 혈관 콜로니 형성 세포를 생성시키는 방법으로서,

상기 인간 배아 줄기 세포 유래의 혈관 콜로니 형성 세포가 조혈 세포 및 내피 세포로 분화할 수 있는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인간 배아 줄기 세포가 단계 (a)의 골 형태형성 단백질 4(BMP-4) 및 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 포함하는 무혈청 배지에서 세포 배양의 적어도 첫 48 시간 동안 배양되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 (b)가 세포 배양의 48~72 시간 내에 수행되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계 (d)가 세포 배양의 72 시간 후에 수행되는 것인 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 단계 (d)에서의 무혈청 배지가 메틸셀룰로오스를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (a), 단계 (b) 및/또는 단계 (d)에서의 배지가 에리스로포이에틴(EPO)을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 단계 (a), 단계 (b) 및 단계 (d)의 배양이 저부착 조건 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단계 (a)에서 VEGF의 농도가 25~100 ng/ml이고, BMP-4의 농도가 25~100 ng/ml인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 VEGF의 농도가 25～100 ng/ml이고, BMP-4의 농도가 25～100 ng/ml인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 단계 (d)에서 인슐린의 농도가 10 μg/ml이고, 트랜스페린의 농도가 200 μg/ml이고, GM-CSF의 농도가 20 ng/ml이고, IL-3의 농도가 20 ng/ml이고, IL-6의 농도가 10 ng/ml 또는 20 ng/ml이고, G-CSF의 농도가 20 ng/ml이고, SCF의 농도가 20 ng/ml 또는 50 ng/ml이고, TPO의 농도가 20 ng/ml 또는 50 ng/ml이고, FL의 농도가 20 ng/ml 또는 50 ng/ml이고, VEGF의 농도가 25～100 ng/ml이고, BMP-4의 농도가 25～100 ng/ml인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 단계 (d)에서의 배지가 HOX 단백질을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 HOX 단백질이 단백질 전달 도메인(PTD)와 HOXB4의 융합 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 융합 단백질이 서열 번호 14의 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드 카피를 하나 이상 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 정제하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 정제하기 위해 항-CD71 항체를 사용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분리하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 배아 줄기 세포는 배아 줄기 세포의 라이브러리로부터 유래되고, 상기 라이브러리의 배아 줄기 세포는 각 인간 집단에 존재하는 하나 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성이고, 상기 라이브러리의 각 구성원은 상기 배아 줄기 세포의 라이브러리의 나머지 구성원에 대한 상이한 세트의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성이어서, 각 인간 집단에 존재하는 하나 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성인 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 생성하고, 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리의 각 구성원은 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리의 나머지 구성원에 대한 상이한 세트의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포는 각 인간 집단에 존재하는 모든 MHC 대립유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성이어서, 각 인간 집단에 존재하는 모든 MHC 대립유전자에 대해 반접합성 또는 동형접합성인 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 생성하는 것인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 조혈 세포로 분화시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 내피 세포로 분화시키는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 배아 줄기 세포의 배상체로의 분화를 유도하는 데 충분한 양의 하나 이상의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지에서 인간 배아 유래의 줄기 세포를 배양하는 제1 단계, 및 배상체를 포함하는 배지에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양의 하나 이상의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지에서 배상체를 배양하는 제2 단계의 2단계 공정을 이용하여 시험관 내에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포 제제에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 조혈 계통 또는 내피 계통으로 인간 혈관 콜로니 형성 단위를 분화시키는 방법뿐만 아니라, 혈관 콜로니 형성 세포로부터 부분 또는 완전 분화된 세포형를 제조하는 방법에 관한 것이다. 혈관 콜로니 형성 세포 및 이로부터 분화된 세포는 시험관내 및 생체내에서 용도가 다양하다. 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 시험관 내에서 다량으로 생성하는 능력은, 무엇보다도 각종 치료 용도에서 유용한 다수의 인간 혈관 콜로니 형성 유도체 세포형, 예컨대 인간 조혈모세포 또는 내피 세포, 분화된 조혈 세포, 예컨대 적혈구 및 혈소판의 유도 가능성을 제공한다. 또한, 본 발명에 의해 유도된 증식된 수의 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 조혈 세포 및 내피 세포 질환 치료에 있어서 신규한 치료 전략법으로 또는 혈액 은행에서 이용할 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 조혈모세포(HSC)는 자가재생할 수 있으며, 모든 혈액 세포 계통으로 발생할 수 있다. 골수에 존재하는 이들 세포는 성체 조혈계의 기본이 된다. 이들 세포의 이식은 오늘날 임상에서 적용되는 가장 일반적인 세포계 요법이다.

[0003] HSC 이식은 급성 또는 만성 백혈병, 재생불량성 빈혈 및 각종 면역부전 증후군뿐 아니라, 각종 악성 비-혈액 종양 및 자가면역 질환 환자의 치료에 이용된다. 악성 혈액 종양 환자의 경우, HSC를 이식하면 고용량의 화학요법 및/또는 방사선요법 후에 발생할 수 있는 치료로 인한 형성부전증으로부터 환자를 구할 수 있다.

[0004] HSC 이식의 임상적 유용성은 광범위하지만, 체성 HSC 이식이 필요한 환자 중 2/3은 일치형 공여자가 없기 때문에 3가지 주요 HSC의 공급원(인간 골수, 가동화 말초혈 및 제대혈)은 제한되고 있다. 예를 들면, 임의의 특정 환자의 경우에, 형제자매의 인간 백혈구 항원(HLA)이 동일하게 일치할 가능성은 25%뿐이다.

[0005] HLA는 면역계가 세포를 자가(신체에 속함) 또는 비자가(외래 또는 신체 밖에서 유래)로서 확인하는 것을 보조하는 세포 표면 상의 단백질이다. 이 HLA 단백질은 주조직적합성 복합체, 즉 MHC로서 알려진 인간 6번 염색체 상에 위치한 영역을 형성하는 유전자 클러스터가 코딩하는데, 이식편 거부반응에 있어서 MHC 유전자좌가 코딩하는 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, HLA 단백질을 MHC 단백질이라고도 한다. 이식물의 MHC 분자가 수용자의 MHC 분자와 일치(부합)하면 임상적 이식의 성공률을 유의적으로 향상시킬 수 있지만, HLA가 동일한 형제자매 사이에서 이식을 하는 경우라고 해도, 거부반응을 예방하지 못한다. 그러한 거부반응은 부조직적합성 항원 간의 차이로 인해 촉발될 수 있다. 이들 다형 항원은 일반적으로 이식 조직 세포 상의 MHC 분자에 결합된 "비자가" 펩티드이며, 면역억제약물을 사용하지 않으면, MHC 항원이 일치하는 경우에도 종종 부조직적합성 항원간의 차이로 인해 이식물 수용자의 면역계가 결국 이식물을 거부하게 된다.

[0006] I형 및 II형 HLA 각각에는 3가지 종류가 있다. I형 및 II형 HLA가 일치하는 사람(보통은 형제자매)을 관련 공여자라고 한다. 수용자와 공여자 간에 I형 HLA-A, HLA-B, HLA-C와, II형 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1의 일치는 생존률 증가과 연관된다(Morishima 등, 2002 Blood (99):4200-6). 일치하는 관련 공여자가 없는 환자의 경우에는, 공여자 은행을 통해 조사하여 HLA 유형이 일치하는 사람을 구할 수 있다. 그러나, HSC 이식물과 같은 세포 또는 조직 이식물이 필요한 환자의 수는 이식에 적합한 이용가능한 세포 및 조직 공급량보다 훨씬 많다. 이러한 상황하에서, 수용자의 HMC 단백질과 이식물의 MHC 단백질이 양호하게 일치하는 것이 흔히 불가능하다는 것은 놀라운 일이 아니다. 따라서, 많은 이식물 수용자들은 MHC 일치형 이식물을 얻을 수 있을 때까지 기다리거나, 또는 MHC 일치형이 아닌 이식물을 수용한 후 고용량의 면역억제 약물을 견디고 거부반응 위험을 감수해야 한다. 따라서,

HSC를 생성 및 조작하는 능력 및/또는 수용자의 이식물에 대한 내성을 유도하는 능력은 인간 질병의 치료 및 관리에 있어서 상당히 유리할 것이다.

[0007] 조류 배아 연구와, 이후의 개구리 및 포유동물에서의 연구를 기초로, 혈액 및 내피의 발생 프로그램이 밀접하게 연관되어 있다는 것이 입증되었다. 예를 들어, 내피 세포 및 조혈 세포는 난황낭의 혈도에서 동시에 아주 근접하게 나타난다. 난황낭의 혈도는 난황낭을 콜로니화한 중배엽 세포의 응집체로부터 유도된다. 이들 응집체의 중심은 배아 조혈 세포로 발생하는 반면, 주변군은 내부 혈액 세포를 둘러싸는 혈관을 형성하는 내피 세포로 분화한다. 이들 관찰 결과는 내피 세포와 조혈 세포의 선조가 공통된다는 생각을 뒷받침하는 것이다.

[0008] 또한, 제브라피쉬 및 마우스 배아에 있어서 내피 계통 및 조혈 계통은 모두 특정 유전자, 예컨대 *Flk1, Flt1, Tie1, Tie2, CD34, Sc1,* 및 *Runx1*의 발현을 공유한다(Fina 등, 1990 Blood (75): 2417-2426; Millauer 등, 1993 Cell (72): 835-846; Yamaguchi 등, 1993 Development (118): 489-498; Anagnostou 등, 1994 PNAS USA (91): 3974-3978; Kallianpur 등, 1994 Blood (83): 1200-12081; Young 등, 1995 Blood (85): 96-105, Asahara 등, 1997 Science (275): 964-967; Kabrun 등, 1997 Development (124): 2039-2048). 마찬가지로, 특정 유전자 돌연변이는 내피 세포 및 조혈 세포 발생에 모두 영향을 미친다(Shalaby 등, 1995 Mature (376): 62-66; Robb 등, 1995 PNAS USA (92): 7075-7079; Shivdasani 등, 1995 Nature (373): 432-434; Stainier 등, 1995 Development (121): 3141-3150; Bollerot 등, 2005 APMIS (113): 790-803). 또한, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)에 대한 수용체인 *Flk1* 또는 *Flt1*이 결실되면 마우스 배아에서 조혈 및 내피 발생이 중단된다.

[0009] 마우스 배아 줄기 세포로부터 마우스 혈관모세포의 시험관내 생성이 문헌에 보고된 바 있다(Choi 등, 1998 Development 125: 727-732). 또한, 조혈 세포 및 내피 세포 둘다로 발생할 수 있는 인간 전구 세포를 인간 ES 세포로부터 유도하였지만(Wang 등, 2004 Immunity (21): 31-41 및 Wang 등, J Exp Med (201): 1603-1614), 기껏해야 많은 세포에서 소량으로만 유도된다. 또한, 혈관모세포 전구 세포의 시험관내 증식을 위한 방법 또는 조건은 없다.

[0010] 따라서, 다수의 인간 혈관모세포와 혈관모세포 유도체 세포형, 즉 조혈 세포 및 내피 세포를 생성하고 증식시키는 방법과 그러한 양의 혈관모세포 또는 유도체 세포형을 포함하는 모든 용액/혼합물에 대한 필요성은 여전하다. 이러한 방법은 이식을 위한 세포의 이용가능성을 증가시키고, 면역학적 내성의 유도에서와 같은 각종 다른 치료 용도에서 유용하다.

[0011] 또한, 수혈용으로 이용가능한 혈액에 대한 필요성도 중요하다. 적십자와 다른 혈액 공급업체들은 혈액이 거의 항상 부족하다고 한다. 이는 특히 특유의 혈액형 환자, Rh+ 환자, 또는 대량 사상자를 초래하는 사고 또는 재난 후에 실제 그러하다. 또한, 전쟁시 군대에서는 교전과 관련된 외상성 상처 치료에 사용하기 위해 이용가능한 혈액이 급히 필요하다. 본 발명은 혈액 은행 및 수혈에 사용하기 위한 분화된 조혈 세포를 제공한다. 본 발명의 세포 및 방법은 전통적으로 헌혈에 의존하던 것을 초월한 안전하고 신뢰할 만한 진보를 이룰 것이며, 이용가능한 혈액이 결정적으로 부족하게 되는 것을 방지하는데 도움이 될 것이다.

발명의 내용

[0012] 발명의 개요

[0013] 본 발명은 인간 혈관모세포 또는 혈관 콜로니 형성 세포를 시험관내에서 생성하고 증식시키는 방법을 제공함으로써 상기 개시된 문제점을 해소한다. 본원에 개시된 신규한 방법에 의해 인간 혈관모세포 또는 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키는 능력으로 인해 각종 치료 용도에 사용할 수 있는 세포를 생산할 수 있다. 또한, 본 발명은 치료 용도에 사용할 수 있는 인간 혈관모세포 또는 혈관 콜로니 형성 계통 세포(즉, 조혈 세포 및 내피 세포)를 생성하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 상업적 규모로 사용할 수 있는 다수의 인간 혈관모세포 또는 혈관 콜로니 형성 세포뿐 아니라, 조혈 세포 및 내피 세포, 그리고 이로부터 분화된 세포를 생성할 수 있다는 점에서도 또한 유용하다.

[0014] 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 시험관내에서 생성하고 증식시키는 방법으로서,

[0015] (a) 인간 배아 유래 세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 하나 이상의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지에서 인간 배아 유래 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계; 및

[0016] (b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에 하나 이상의 성장 인자를 첨가하고 무혈청 배지에서 상기 배양물을 계속 배양하는 단계로서, 상기 성장 인자는 상기 배상체 배양물 중에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양으로 존재하는 단계를 포함하며,

[0017] 상기 줄기 세포, 배상체 및 혈관 콜로니 형성 세포는 (a) 및 (b) 단계를 통해 무혈청 배지에서 배양되는 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 시험관내에서 생성하고 증식시키는 방법으로서,

[0019] (a) 인간 배아 유래 세포 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 하나 이상의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지에서 인간 배아 유래 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계;

[0020] (b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에 하나 이상의 성장 인자를 첨가하고 무혈청 배지에서 상기 배양물을 계속 배양하는 단계로서, 상기 성장 인자는 상기 배상체 배양물 중에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양으로 존재하는 단계;

[0021] (c) 상기 배상체를 단일 세포로 해체시키는 단계;

[0022] (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 하나 이상의 성장 인자를 첨가하고 무혈청 배지에서 상기 배양물을 계속 배양하는 단계로서, 상기 성장 인자는 상기 단일 세포를 포함하는 배양물 중에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양으로 존재하는 단계를 포함하며,

[0023] 상기 줄기 세포, 배상체 및 혈관 콜로니 형성 세포는 상기 (a) 내지 (d) 단계를 통해 무혈청 배지에서 배양되는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아 줄기 세포이다.

[0025] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법의 특정 실시형태에서, 성장 인자는 호메오박스 단백질 또는 이의 기능성 변이체 또는 활성 단편을 포함하는 단백질이다. 특정 실시형태에서, 호메오박스 단백질은 HOXB4 또는 이의 기능성 변이체 또는 활성 단편을 포함하는 단백질이다. HOXB4가 마우스 및 인간 HOXB4를 비롯한 포유동물 HOXB4인 것도 고려된다. HOXB4 단백질은 전길이 HOXB4 단백질이다. 추가의 실시형태에서, HOXB4는 서열 번호 1 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다.

[0026] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법의 특정 실시형태에서, HOXB4를 포함하는 성장 인자는 HOXB4와 단백질 전달 도메인(PTD)을 포함하는 융합 단백질이다. 추가의 실시형태에서, PTD 및 HOXB4는 링커를 통해 접합된다. 추가의 실시형태에서, PTD는 TAT 단백질, 이의 기능성 변이체 또는 활성 단편(TAT 폴리펩티드 포함)이다. 특정 실시형태에서, TAT 단백질은 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, PTD는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 가지는 TAT 폴리펩티드의 하나 이상의 카피를 포함한다. 특정 실시형태에서, PTD는 서열 번호 15이다.

[0027] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법의 특정 실시형태에서, 성장 인자는 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 골 형태형성 단백질(BMP), 줄기 세포 인자(SCF), Flt-3L(FL), 트롬보포이에틴(TPO) 및 에리스로포이에틴(EPO)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가의 실시형태에서, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 또는 골 형태형성 단백질(BMP), 또는 둘다를, hES 세포를 포함하는 세포 배양물의 배양 0~48 시간 내에 배양 단계 (a)에 첨가한다. 또 다른 추가의 실시형태에서, 줄기 세포 인자(SCF), Flt-3L(FL) 또는 트롬보포이에틴(TOP), 또는 이의 임의의 조합을 배양 단계 (a)의 개시후 48~72 시간 내에 hES 세포를 포함하는 세포 배양물에 첨가한다.

[0028] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법의 특정 실시형태에서, HOXB4 단백질 또는 이의 기능성 변이체 또는 활성 단편(또는 도메인)을 포함하는 성장 인자를 상기 단계(들)에 첨가하는데, 이 때 상기 단백질은 복수회, 예를 들어 1일 1회 또는 격일 1회 첨가된다.

[0029] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식시키는 방법의 특정 실시형태에서, 호메오박스 단백질을 포함하는 성장 인자를 단계 (a) 개시 후 48~72 시간 내에 단계 (b)에 첨가한다. 본 발명의 방법의 특정 실시형태에서, HOXB4 단백질 또는 이의 기능성 변이체 또는 활성 단편을 단계 (a) 개시 후 48~72 시간 내에 단계 (b)에 첨가한다.

[0030] 특정 실시형태에서, 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법은 단계 (b)에 에리스로포이에틴(EPO)을 첨가하는 단계를 더 포함한다. 특정 실시형태에서, 0016 단락에 기재한 본 발명의 방법은 단계 (b) 및 (d)에 에리스로포이에틴(EPO)을 첨가하는 단계를 더 포함한다.

[0031] 특정 실시형태에서, 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 정제하고/하거나 분리하는 단계 (s)를 더 포함한다. 혈관 콜로니 형성 세포는 항-CD71 항체에 의한 면

역친화성 컬럼 크로마토그래피를 이용함으로써 정제할 수 있다. 혈관 콜로니 형성 세포는 크기 및/또는 형태에 의해 분리될 수 있다.

[0032] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법인 특정 실시형태에서, 인간 배아 유래 줄기 세포를 포함하는 세포 배양물은 인간 배아 줄기 세포의 라이브러리로부터 유래하며, 상기 인간 배아 줄기 세포의 라이브러리는 각각 인간 집단에 존재한 하나 이상의 MHC 대립 유전자에 대해 반접합체 또는 동종접합체인 줄기 세포를 포함하며, 상기 줄기 세포의 라이브러리 중 각 멤버는 상기 라이브러리 중 나머지 멤버에 관한 다른 세트의 MHC 대립 유전자에 대해 반접합체 또는 동종접합체이다. 추가 실시형태에서, 인간 배아 줄기 세포의 라이브러리는 인간 집단에 존재한 모든 MHC 대립유전자에 대해 반접합체 또는 동종접합체인 줄기 세포를 포함한다. 이들 방법은 각각 인간 집단에 존재한 하나 이상의 MHC 대립 유전자에 대해 반접합체 또는 동종접합체인, 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 생성하며, 상기 줄기 세포의 라이브러리의 각 멤버는 상기 라이브러리 중 나머지 멤버에 관한 다른 세트의 MHC 대립 유전자에 대해 반접합체 또는 동종접합체이다. 추가 실시형태에서, 이들 방법은 인간 집단에 존재한 모든 MHC 대립 유전자에 대해 반접합체 또는 동종접합체인 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 생성한다. 따라서, 본 발명은 또한 이러한 방법에 의해 제조된 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 제공한다. 이 라이브러리는 다음과 같이 사용될 수 있다.

[0033] 본 발명은 치료가 필요한 환자에게 인간 조혈모세포 또는 인간 내피 세포를 투여하는 것을 포함하여 상기 환자를 치료하는 방법으로서,

[0034] (a) 상기 환자를 선택하는 단계;

[0035] (b) 상기 환자의 세포 표면상에 발현된 MHC 단백질을 확인하는 단계;

[0036] (c) 이전 0024 단락에 기재한 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 제공하는 단계;

[0037] (d) 상기 환자의 세포 상에 상기 환자의 MHC 단백질과 일치(부합)하는 라이브러리로부터 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 선택하는 단계;

[0038] (e) 단계 (d)에서 확인된 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 필요에 따라 인간 조혈모세포, 내피 세포 또는 두 세포 모두로 분화하는 단계;

[0039] (f) 단계 (e)로부터 상기 조혈모세포, 내피 세포 또는 두 세포 모두를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 지역 센터, 이를테면 병원 또는 의료 센터, 또는 임의의 다른 적합한 시설에서 이 방법을 수행할 수 있다.

[0040] 특정 실시형태에서, 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법은 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 인간 조혈모세포로 분화를 유도하는데 적합한 조건하에 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 성장시키는 단계를 더 포함한다.

[0041] 특정 실시형태에서, 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법은 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 인간 내피 세포로 분화를 유도하는데 적합한 조건하에 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 성장시키는 단계를 더 포함한다. 추가 실시형태에서, 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 인간 내피 세포로 분화를 유도하는데 적합한 조건은 섬유결합소 피복 배양 플레이트 상에서 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 성장시키는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명의 특정 실시형태에서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법으로 10,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 50,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 100,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 500,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 1×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 2×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 3×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포 또는 4×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성한다. 이들 방법에 의해 10,000 내지 4 백만 개의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함할 수 있는 세포액을 생성한다.

[0043] 따라서, 본 발명은 또한 10,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 50,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 100,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 500,000개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 1×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 2×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 3×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포 또는 4×10^6개 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 인간 혈관 콜로니 형성 세포(무

혈청 배지에서 성장될 수 있는)의 용액을 제공한다. 이들 용액을 피험체에 주사가능할 수 있다. 이들 용액은 무혈청일 수 있다. 이들 용액 중 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 적어도 조혈 세포 및 내피 세포로 분화할 수 있지만 다른 세포형으로 분화할 발생 능력이 더 크다. 본 발명은 또한 혈관 콜로니 형성 세포, 조혈 세포 또는 내피 세포의 투여에 의해 치료될 수 있는 질환을 치료하는 의약의 제조를 위한 이들 용액의 용도를 제공한다.

[0044] 본 발명은 또한 이전 단락에 기재한 상기 세포액을 분리하는 단계 및 상기 세포를 환자에게 주사하는데 적합한 용액에 넣는 단계를 포함하는 환자에게 주사하는데 적합한 인간 혈관 콜로니 형성 세포 용액을 제조하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 이전 단락에 기재한 상기 세포액을 분리하는 단계 및 상기 세포를 냉동에 적합한 용액에 넣는 단계를 포함하는 냉동에 적합한 인간 혈관 콜로니 형성 세포 용액을 제조하는 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명은 또한 인간 조혈모세포의 투여가 필요한 환자에게 인간 조혈모세포를 투여하는 방법으로서,

[0046] (a) 인간 조혈모세포의 투여가 필요한 환자를 선택하는 단계;

[0047] (b) 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 공급하는 단계;

[0048] (c) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 조혈모세포로 분화하는 단계; 및

[0049] (d) 상기 인간 조혈모세포의 일부 또는 전부를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명은 또한 인간 조혈모세포의 투여가 필요한 환자에게 인간 조혈모세포를 투여하는 방법으로서,

[0051] (a) 인간 조혈모세포의 투여가 필요한 환자를 선택하는 단계;

[0052] (b) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 세포수 10,000개 이상의 양으로 공급하는 단계;

[0053] (c) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 조혈모세포로 분화하는 단계; 및

[0054] (d) 상기 인간 조혈모세포의 일부 또는 전부를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0055] 본 발명은 또한 인간 내피 세포의 투여가 필요한 환자에게 인간 내피 세포를 투여하는 방법으로서,

[0056] (a) 인간 내피 세포의 투여가 필요한 환자를 선택하는 단계;

[0057] (b) 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 공급하는 단계;

[0058] (c) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 내피 세포로 분화하는 단계; 및

[0059] (d) 상기 인간 내피 세포의 일부 또는 전부를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명은 또한 인간 내피 세포의 투여가 필요한 환자에게 인간 내피 세포를 투여하는 방법으로서,

[0061] (a) 인간 내피 세포의 투여가 필요한 환자를 선택하는 단계;

[0062] (b) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 세포수 10,000개 이상의 양으로 공급하는 단계;

[0063] (c) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 내피 세포로 분화하는 단계; 및

[0064] (d) 상기 인간 내피 세포의 일부 또는 전부를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0065] 특정 실시형태에서, 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 10,000 내지 4 백만 개의 세포수의 양으로 존재한다.

[0066] 본 발명은 또한 내피 세포 질환의 치료가 필요한 환자의 내피 세포 질환을 치료하는 방법으로서,

[0067] (a) 내피 세포 질환의 치료가 필요한 환자를 선택하는 단계;

[0068] (b) 상기에 기재한 방법에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 공급하는 단계;

[0069] (c) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 내피 세포로 분화하는 단계; 및

[0070] (d) 상기 인간 내피 세포의 일부 또는 전부를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0071] 본 발명은 또한 내피 세포 질환의 치료가 필요한 환자의 내피 세포 질환을 치료하는 방법으로서,

[0072] (a) 내피 세포 질환의 치료가 필요한 환자를 선택하는 단계;

[0073] (b) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 세포수 10,000개 이상의 양으로 공급하는 단계;

[0074] (c) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 내피 세포로 분화하는 단계; 및

[0075] (d) 상기 인간 내피 세포의 일부 또는 전부를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0076] 특정 실시형태에서, 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 10,000 내지 4 백만 개의 세포수의 양으로 존재한다.

[0077] 이들 방법에 의해 치료될 내피 세포 질환은 심근 경색증, 발작, 죽상 동맥경화증 및 허혈을 포함한다. 허혈은 뇌, 팔다리, 심장, 폐, 피부 및 눈에서 일어날 수 있다.

[0078] 본 발명은 시험관 내에서 인간 조혈모세포를 제조하는 방법으로서,

[0079] (a) 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 공급하는 단계; 및

[0080] (b) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 인간 조혈모세포로 분화를 유도하는데 적합한 조건하에 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 성장시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0081] 본 발명은 시험관 내에서 인간 내피 세포를 제조하는 방법으로서,

[0082] (a) 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 공급하는 단계; 및

[0083] (b) 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 인간 내피 세포로 분화를 유도하는데 적합한 조건하에 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 성장시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0084] 본 발명은 또한 상기 혈관모세포의 증식을 지지하는데 충분한 양으로 호메오박스 단백질(이를테면 HOXB4)을 포함하는 단백질 또는 그의 기능성 등가물 또는 활성 단편의 존재하에 포유동물의 혈관 콜로니 형성 세포를 무혈청 배지 중에서 성장시키는 것을 포함하는 혈관 콜로니 형성 세포를 증식하는 방법을 제공한다. 증식될 상기 혈관 콜로니 형성 세포는 제대 혈액, 말초 혈액, 또는 골수로부터 농축되거나, 정제되거나, 또는 분리될 수 있다. 상기 혈관 콜로니 형성 세포는 인간 혈관 콜로니 형성 세포일 수 있다. 이 방법에 의해 10,000 내지 4×10^6 개, 또는 그 이상의 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 용액을 생성할 수 있다. 이 방법에서 사용된 HOXB4 단백질은 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 생성하고 증식하는 방법에 사용하는데 적합한 임의 단백질일 수 있다.

[0085] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 생성되고 증식되거나 증식된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 사용하는 면역 내성의 유도 방법을 제공한다. 내성화 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 조직적합성 마커를 동종 이식편과 공유하도록 선택되며, 환자에 의해 필요한 세포 기능을 재생하는 동종 이식편 또는 세포 치료 전에 또는 이와 동시에 인간 수용자에게 투여될 수 있다. 이어서 생성된 면역 내성은 동종 이식편 또는 세포 치료의 급성 또는 만성 거부 위험을 줄인다.

[0086] 본원에서 개시된 방법에 의해 생성된 다수의 혈관 콜로니 형성 세포는 독성 전처리가 제외될 수 있는 내성 프로토콜을 가능하게 한다. 공여자 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 이식편의 이식 전에 또는 공여자의 혈관 콜로니 형성 세포에 대해 부합하는 기관, 조직, 또는 세포들의 이식 전에 인간 수용자에게 투여될 수 있다. 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포 및 이식편은 동일한 공여자로부터 얻을 수 있다. 상기 이식편은 분화된 공여자 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 유래할 수 있다. 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포 및 이식편은 별도로 공여자들과 부합하는 다른 공여자로부터 얻을 수 있다. 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 인간 수용자에게 투여되어 내성이 필요한 수용자에게 내성을 유도할 수 있다.

[0087] 특정 실시형태에서, 본 발명은 공여자 동종 이식편에 대해 인간 수용자의 내성을 유도하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 (a) 상기 수용자에게 T 세포 공자극(co-stimulation)을 억제하는 약제를 투여하는 단계, (b) 상기 수용자에게 본원에서 기재한 방법에 따라, 생성되고 증식되거나, 증식되는 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 도입하는 단계, 및 (c) 상기 동종 이식편을 상기 수용자에게 이식하는 단계를 포함한다. 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포(공여자 세포)는 수용자가 동종 이식편을 용인하게 한다. 특정 실시형태에서, T 세포 공자극을 억제하는 약제는 CD40 리간드-CD40 공자극 상호작용을 억제하거나 차단하는 약제이다. 이 방법은 CD28-B7 상호작용을 억제하는 약제를 투여하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 방법은 흉선 조사 및/또는 T 세포 결핍 또는 불활성화를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 이전에 언급된 방법은 또한 전신 조사에 의해 생성된 조혈 공간(hematopoietic space)의 부재하에 혼합된 키메라 현상을 나타낼 수 있다.

[0088] 본 발명은 또한 공여자 동종 이식편에 대해 인간 수용자의 내성을 증진하는 방법을 제공하며, 이 방법은 (a) 상기 수용자 중 흉선 공간(thymic space)을 생성하는 단계; (b) 상기 수용자의 공여자 반응성 T 세포를 줄이거나

불활성화하는 단계; (c) 상기 공여자의 공여자 인간 혈관 콜로니 형성 세포 또는 상기 공여자에게 부합하는 공여자 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 상기 수용자에게 도입하는 단계; 및 (d) 상기 동종 이식편을 상기 수용자에게 이식하는 단계를 포함하며, 상기 공여자 혈관 콜로니 형성 세포는 동종 이식편에 대해 내성을 유도한다. 특정 실시형태에서, 이 방법은 조혈 공간 생성 조사를 포함하지 않는다. 이 방법은 상기 수용자에게 흉선 조사(분별할 수 있음), 스테로이드, 코르티코스테로이드, 브레퀴나르(brequinar), 또는 면역억제제 또는 약물 중에서 선택된 하나 이상의 치료법으로 치료함으로써 흉선 공간을 생성하는 것을 포함할 수 있다.

[0089] 본 발명은 또한 수혈에 사용하는데 적합한 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 수혈에 사용할 수 있는 적혈구를 생성하는 방법을 제공한다. 그 자체로서, 본 발명은 헌혈을 이용할 수 있는 혈액의 만성적 결핍을 완화하는데 도움이 되는 용액을 제공한다.

[0090] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0091] (a) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하는 단계; 및

[0092] (b) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계를 포함한다.

[0093] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 이용하는 수혈 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0094] (a) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하는 단계;

[0095] (b) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0096] (c) 상기 분화된 조혈 세포로 수혈하는 단계를 포함한다.

[0097] 특정 실시형태에서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 냉동 배양물로부터 회수된다.

[0098] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 이용하는 수혈 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0099] (a) 인간 배아 유래 세포의 배상체로 분화를 유도하는데 충분한 양으로 하나 이상의 성장 인자의 존재하에 상기 인간 배아 유래 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계;

[0100] (b) 하나 이상의 성장 인자를 배상체를 포함하는 상기 배양물에 첨가하는 단계;

[0101] (c) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0102] (d) 상기 분화된 조혈 세포를 수혈하는 단계를 포함하며,

[0103] 여기서, 상기 성장 인자는 상기 배상체 배양물에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식하는데 충분한 양으로 존재한다.

[0104] 특정 실시형태에서, 상기 배아 유래 세포, 배상체 및 혈관 콜로니 형성 세포는 상기 방법 중 단계 (a) 동안 무혈청 배지에서 성장한다.

[0105] 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아 줄기 세포이다.

[0106] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 이용하는 수혈 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0107] (a) 인간 배아 유래 세포의 배상체로 분화를 유도하는데 충분한 양으로 하나 이상의 성장 인자의 존재하에 상기 인간 배아 유래 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계;

[0108] (b) 하나 이상의 성장 인자를 배상체를 포함하는 상기 배양물에 첨가하는 단계;

[0109] (c) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0110] (d) 상기 분화된 조혈 세포를 수혈하는 단계를 포함하며,

[0111] 여기서, 상기 성장 인자는 상기 배상체 배양물에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식하는데 충분한 양으로 존재한다.

[0112] 특정 실시형태에서, 상기 줄기 세포, 배상체 및 혈관 콜로니 형성 세포는 상기 방법 중 단계 (a) 및 (b) 동안

무혈청 배지에서 성장한다.

[0113] 본 발명의 특정 실시형태에서, 상기 배아 유래 세포는 배아 줄기 세포이다.

[0114] 특정 실시형태에서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포는 냉동 배양물로부터 회수한다.

[0115] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 이용하는 수혈 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0116] (a) 인간 배아 유래 세포의 배상체로 분화를 유도하는데 충분한 양으로 하나 이상의 성장 인자의 존재하에 상기 인간 배아 유래 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계;

[0117] (b) 하나 이상의 성장 인자를 배상체를 포함하는 상기 배양물에 첨가하는 단계(여기서, 상기 성장 인자는 상기 배상체 배양물에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식하는데 충분한 양으로 존재한다);

[0118] (c) 상기 배상체를 단일 세포로 해체하는 단계;

[0119] (d) 하나 이상의 성장 인자를 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 첨가하는 단계(여기서, 상기 성장 인자는 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에서 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식하는데 충분한 양으로 존재한다);

[0120] (e) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0121] (f) 상기 분화된 조혈 세포를 수혈하는 단계를 포함한다.

[0122] 특정 실시형태에서, 상기 줄기 세포, 배상체 및 혈관 콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a)~(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지에서 성장된다.

[0123] 본 발명의 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아 줄기 세포이다.

[0124] 특정 실시형태에서, 성장 인자는 호메오박스 단백질, 또는 이것의 기능성 변형체 또는 활성 단편을 포함하는 단백질이다. 특정 실시형태에서, 호메오박스 단백질은 HOXB4 단백질, 또는 이것의 기능성 변형체 또는 활성 변형체를 포함한다.

[0125] 특정 실시형태에서, 분화 조혈 세포는 단일 세포 유형으로서 생성된다. 특정 실시형태에서, 단일 세포 유형은 적혈구, 혈소판 또는 식세포로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 식세포는 과립구: 호중구, 호염기구, 호산구, 림프구 또는 단핵구로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 적혈구는 헤모글로빈 F를 발현한다. 특정 실시형태에서, 단일 세포 유형은 혈 중에서 발견되는 분화 세포 유형의 비율을 적절히 균등하게 하기 위해서 혼합하며, 여기서 혈 중에서 발견되는 분화 세포 유형의 비율은 96% 적혈구, 1% 혈소판 및 3% 식세포이다.

[0126] 특정 실시형태에서, 복수 분화 조혈 세포 유형은 동일한 단계에서 생성된다. 특정 실시형태에서, 복수 분화 조혈 세포 유형은 적혈구, 혈소판 또는 식세포로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 식세포는 과립구: 호중구, 호염기구, 호산구, 림프구 또는 단핵구로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 적혈구는 헤모글로빈 F를 발현한다. 특정 실시형태에서, 복수 분화 조혈 세포 유형은 혈 중에서 발견된 분화 조혈 세포 유형의 비율과 적절히 균등한 비율로 생성되며, 여기서 혈 중에서 발견되는 분화 세포 유형의 비율은 96% 적혈구, 1% 혈소판 및 3% 식세포이다.

[0127] 특정 실시형태에서, 혈장은 수혈 전에 분화 조혈 세포에 첨가된다.

[0128] 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 환자 자신의 혈액형의 분화 조혈 세포가 생성되는 것을 보장하도록 환자와 일치된다. 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 항원 인자 A, B, Rh 또는 이들의 임의 조합에 대하여 음성이다. 특정 실시형태에서, 분화 조혈 세포는 적혈구이고, 여기서 적혈구를 분화하는 단계는 에리스로포이에틴(EPO)을 포함한다.

[0129] 본 발명은 또한 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착된다.

[0130] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착된다.

[0131] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착되며, 그리고 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다.

[0132] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 다음의 단백질: CD23, CD31, KDR 및 CD133 중 어느 것이든 발현하지 않는다.

[0133] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다.

[0134] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다.

[0135] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 실질적으로 정제된 집합체를 포함하는 세포 배양물을 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 부착되며, 그리고 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다.

[0136] 특정 실시형태에서, 본 발명은 배아 유래 세포로부터 분화된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공하며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다.

[0137] 특정 실시형태에서, 세포 배양물은 1×10^6 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포 배양물은 5×10^6 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한다.

[0138] 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아 줄기 세포주이다. 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아(embryo), 할구(blastomere), 포배(blastocyt) 또는 내부 세포괴(inner cell mass)로부터 선택된다.

[0139] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 제제를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다.

[0140] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 제제를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다.

[0141] 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 제제를 제공하며, 그 세포는 분화되어 적어도 조혈 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있으며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 다음의 단백질: CD34, CD31, KDR 및 CD133 중 어느 것이든 발현하지 않는다.

[0142] 특정 실시형태에서, 약학 제제는 1×10^6 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한다. 특정 실시형태에서, 약학 제제는 5×10^6 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한다.

[0143] 특정 실시형태에서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 제제는 배아 유래 세포루부터 분화된다. 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아 줄기 세포이다. 특정 실시형태에서, 배아 유래 세포는 배아, 할구, 포배 또는 내부 세포괴로부터 선택된다.

[0144] 특정 실시형태에서, 본 발명은 전술한 문단 중 어느 것이든 문단에 기술된 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 냉동보존된 제제를 제공한다.

[0145] 특정 실시형태에서, 본 발명은 1×10^6 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 냉동보존된 제제를 제공하며, 여기서 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 다음의 단백질: CD34, CD31, KDR 및 CD133 중 어느 것이든 발현하지 않는다.

[0146] 특정 실시형태에서, 냉동보존된 제제는 5×10^6 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한다.

[0147] 특정 실시형태에서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 냉동보존된 제제는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정 실시형태에서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 냉동보존된 제제는 CD34, CD31, CD133 및

KDR 단백질을 발현하지 않는다. 특정 실시형태에서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 냉동보존된 제제는 LMO2 및 GATA2 단백질을 발현하지 않는다.

[0148] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 조혈 세포를 포함하는 배양물을 제공한다.

[0149] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 내피 세포를 포함하는 배양물을 제공한다.

[0150] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 평활근 세포를 포함하는 배양물을 제공한다.

[0151] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 심근세포(cardiomyocyte)를 포함하는 배양물을 제공한다.

[0152] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 필요로 하는 환자에 있어서의 병태를 치료하는 약제의 제조에서의 상기 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 용도를 제공한다.

[0153] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 세포 배양물을 필요로 하는 환자에 있어서의 병태를 치료하는 약제의 제조에서의 상기 세포 배양물의 용도를 제공한다.

[0154] 특정 실시형태에서, 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 약학 제제를 필요로 하는 환자에 있어서의 병태를 치료하는 약제의 제조에서의 상기 약학 제제의 용도를 제공한다.

[0155] 본 발명은 본 발명의 전술한 양태 및 실시형태 중 임의의 것들로 된 조합을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0156] 도 1은 H1-GFP ES 세포로부터 생성된 혈관아세포로부터 유도된 조혈 CFU를 예시한 것이다.

도 2는 무혈청 (Stemline) 배양 배지 중에 배양된 적혈구계(erythroid) 콜로니 형성 유닛(CFU-E)의 세포 형태를 예시한 것이다.

도 3은 무혈청 (Stemline) 배양 배지 중에 배양된 다능성(multipotent) 콜로니 형성 유닛(CFU-GEMM/Mix)의 세포 형태를 예시한 것이다.

도 4는 무혈청 (Stemline) 배양 배지 중에 배양된 다능성 콜로니 형성 유닛(CFU-GEMM/Mix)의 세포 형태를 예시한 것이다.

도 5는 무혈청 (Stemline) 배양 배지 중에 배양된 과립구 콜로니 형성 유닛(CFU-G) 및 대식세포 콜로니 형성 유닛(CFU-M)의 세포 형태를 예시한 것이다.

도 6은 무혈청 (Stemline) 배양 배지 중에 배양된 과립구/대식세포 콜로니 형성 유닛(CFU-GM) 및 거핵구 대식세포 콜로니 형성 유닛(CFU-Mk)의 세포 형태를 예시한 것이다.

도 7은 매트리겔-계(Matrigel-based) 배지 상에서 (a) H9 ES 세포 및 (b) ACT30 ES 세포로부터 유도된 혈관아세포의 재플레이팅을 수행한 후 튜브-코드(tube-cord) 구조의 형성을 예시한 것이다.

도 8은, 실시예 2에 설명되어 있는 바와 같이, EGM-2 배지 중에서 피브로넥틴-코팅된 플레이트 상에 그리고 이어서 매트리겔 상에 배양된 H1-GFP ES 세포로부터 생성된 혈관아세포의 튜브-코드 구조를 예시한 것이다. 또한 도 8은, 실시예 2에 설명되어 있는 바와 같이, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 표지화된 Ac-LDL에 의해 항온 처리될 때 세포에 의한 Ac-LDL의 흡수를 예시한 것이다. 중간 패널 상부 및 우측 패널 상부는 위상차 사진(phase contrast picture)을 나타낸다.

도 9는, 실시예 2에 설명되어 있는 바와 같이, EGM-2 배지 중에서 피브로넥틴-코팅된 플레이트 상에 배양된 H1-GFP ES 세포로부터 생성된 혈관아세포에서 폰 빌레브란트 인자(vWF)의 발현(엷은 회색 염색)을 예시한 것이다.

도 10은, 실시예 4에 설명되어 있는 바와 같이, SCID 마우스 내로 주입된 헤마톡실린 및 에오신(H&E)-염색된 매트리겔 플러그의 단면내 혈관의 형성을 예시한 것이다.

도 11은, 실시예 4에 설명되어 있는 바와 같이, 인간 특이적 핵 항체에 대한 양성 염색(엷은 회색 염색)에 의해 나타난 바와 같은, 매트리겔 플러그의 단면으로부터 얻은 혈관이 인간 혈관아세포로부터 유도된 세포인 점을 예

시한 것이다.

도 12는 인간 HOXB4의 mRNA 서열(수탁 번호: NM_024015.4; GI: 85376187)(서열 번호: 2)을 예시한 것이다.

도 13은 인간 HOXB4의 아미노산 서열(수탁 번호: NP_076920.1; GI: 13273315)(서열 번호: 1)을 예시한 것이다.

도 14는 인간 HOXB4의 mRNA 서열(수탁 번호: BC049204.1; GI: 29351567)(서열 번호: 4)을 예시한 것이다.

도 15는 인간 HOXB4의 아미노산 서열(수탁 번호: AAH49204.1; GI: 29351568)(서열 번호: 3)을 예시한 것이다.

도 16은, 실시예 1 및 실시예 2에 설명되어 있는 바와 같이, 인간 ES 세포로부터 유도된 혈관아세포(BL-CFC)의 표현형 특성화를 예시한 것이다: (a) 혈관아세포 콜로니 또는 아세포 콜로니(BL-CFC 또는 BC, ×400); (b) 이차적 EB(×400); (c) 라이트-지엠사(Wright-Giemsa) 염색에 의한 아세포(hES-BC 세포)(×1000); (d-f) GATA-1 염색: (d) GATA-1로 염색된 아세포(×600); (e) GATA-1 및 DAPI로 염색된 아세포(×600); (f) GATA-1 및 DAPI로 염색된 BM 세포(×400); (g-i) LMO2 염색: (g) LMO2로 염색된 아세포(×600); (h) LMO2 및 DAPI로 염색된 아세포(×600); (i) LMO2 및 DAPI로 염색된 K562 세포(×1000); (j-m) CD71 염색(밝은 회색 또는 엷은 회색): (j) CD71로 염색된 아세포(×600); (k) CD71 및 DAPI로 염색된 아세포(×600); (m) CD71 및 DAPI로 염색된 BM 세포(×1000); (n-p) CXCR-4 염색(밝은 회색 또는 엷은 회색): (n) CXCR-4로 염색된 아세포(×600); (o) CXCR-4 및 DAPI로 염색된 아세포(×600); (p) CXCR-4 및 DAPI로 염색된 BM 세포(×600); (q-s) Epo-수용체 염색(중간 회색): (q) Epo-수용체로 염색된 아세포(×600); (r) Epo-수용체 및 DAPI로 염색된 아세포(×600); (s) Epo-수용체 및 DAPI로 염색된 BM 세포(×600); (t-v) Tpo-수용체 염색(중간 회색): (t) Tpo-수용체로 염색된 아세포(×600); (u) Tpo-수용체 및 DAPI로 염색된 아세포(×600); (v) Tpo-수용체 및 DAPI로 염색된 BM 세포(×1000). 유의: 패널 (d) 및 (n)에서 hES-BC (혈관아세포) 세포는 GATA-1 및 CXCR-4 항체로 이중 염색하였지만, 개별적으로 표시하였고; 패널 (q) 및 (t)에서 hES-BC (혈관아세포) 세포는 또한 Epo-수용체 항체 및 Tpo-수용체 항체로 이중 염색하고, 개별적으로 표시하였다.

도 17은 시험관내 인간 ES 세포로부터 유도된 혈관아세포 (BL-CFC 또는 아세포)의 기능성 특성화를 예시한 것이다: (a-d) 정제된 혈관아세포로부터 유도된 조혈 CFU): (a) CFU-적혈구계(×100); (b) CFU-과립구(×100); (c) CFU-대식세포(×100); 및 (d) CFU-다계통(multilineage)(혼합물, ×100); (e-h) CFU-세포의 라이트-지엠사 염색: (e) 적혈구계(×1000); (f) 과립구(×1000); (g) 대식세포(×400); 및 (h) 혼합물(×1000); (i-k) CFU 세포의 면역염색: (i) CD235a로 염색된 CFU-적혈구계 세포(화살표, ×1000); (j) CD13으로 염색된 CFU-과립구 세포(화살표, ×1000); (k) CD45로 염색된 CFU-혼성물 세포(화살표, ×1000); (m-p 및 v-y) 풀링된 CFU 세포의 FACS 분석: (m) 마우스 IgG 이소타입 대조군; (n) CD45; (o) CD13; 및 (p) CD235; (v) 마우스 IgG 이소타입 대조군; (w) CD45 및 CD235a; (x) CD13 및 CD45; 및 (y) CD13 및 CD235a; (q-u 및 z-cc) 정제된 혈관아세포, 또는 아세포 또는 hES-BC 세포로부터 유도된 내피 세포: (q) 혈관아세포로부터 유도된 부착성 세포를 플레이팅한 후 매트리겔 상에 형성된 모세관 유사 구조(×100); (r) 혈관아세포로부터 유도된 내피 세포에 의한 Ac-LDL 흡수(회색)(×200); (s) 핵이 DAPI로 염색되어 있는 혈관아세포-유도된 내피 세포에서 vWF의 발현(화살표)(×600); (t) 핵(도면내 원형 피처)가 DAPI로 염색되어 있는 혈관아세포-유도된 내피 세포에서 PEC AMI(밝은 염색)의 편재화(×200); (u) 핵(도면내 원형 피처)이 DAPI에 의해 염색되어 있는 혈관아세포-유도된 내피 세포에서 VE-카드헤린의 편재화(화살표)(×200); (z) Ac-LDL 업데이트(화살표 헤드부) 및 vWF 발현(화살표, ×600); (aa) Ac-LDL의 업데이트(화살표 헤드부) 및 VE-카드헤린의 발현(화살표 헤드부, ×600); (bb) vWF의 발현(화살표) 및 CD31의 발현(화살표 헤드부, ×600); (cc) VE-카드헤린의 발현(화살표) 및 CD31의 발현(화살표 헤드부, ×600). 실시예 2를 참조할 수 있다.

도 18은 hES 세포로부터 유도된 아세포 콜로니의 클론원성(clonogenicity)를 예시한 것이다: (a-c) 아세포 콜로니의 클론원성: (a) 및 (b) 아세포 콜로니의 클론 기원을 입증한, WA01-GFP와 MA01 EB의 혼합물에서 발육된 2가지 아세포 콜로니: (a) 상 이미지(×100); (b) GFP 이미지(×100); (c) 단일 세포로부터 발육된 아세포 콜로니(×400); (d-e) 조혈 계통 및 내피 계통 양자가 관찰되는(×200), 액체 배양물에서 단일 아세포 콜로니의 증식: (d) ×200; (e) ×400; (f-h) 단일 BC로부터 유도된 내피 세포: (f) 단일 BC로부터 유도된 부착성 세포를 플레이팅한 후 매트리겔 상에 형성된 모세관 유사 구조(×100); (g) 핵이 DAPI로 염색되어 있는, 단일 BC로부터 유도된 내피 세포에 의한 Ac-LDL 흡수(화살표)(×400); (h) 핵이 DAPI로 염색되어 있는, 단일 BC-유도된 내피 세포에서 vWF의 발현(화살표)(×400); (i-m) 단일 BC로부터 유도된 조혈 CFU: (i) CFU-적혈구계(×100); (j) CFU-과립구(×100); (k) CFU-대식세포(×100); 및 (m) CFU-다계통(혼합물, ×100). 겔은 WA01-GFP+ 세포와 MA01-GFP- 세포의 플레이팅 혼합물로부터 유도된 GFP+ 및 GFP- hES-BC (혈관아세포)에서 GFP 서열의 PCR 분석의

결과를 나타낸다. 레인: WA01-GFP+, 모체 WA01/GFP+ hES 세포; MA01-GFP-, 모체 MA01 hES 세포; H_2O, 물 음성 대조군; BC-GFP+, 세포 혼합 플레이팅으로부터 흡수된 GFP 양성 BC; 1-10, 세포-혼합 플레이팅으로부터 흡수된 GFP 음성 BC. 마이오게닌 유전자는 PCR 반응 대조군으로 사용하였다. 실시예 2를 참조할 수 있다.

도 19는 tPTD-HOXB4 융합 단백질의 특징을 제공한다. (A) 6xHis-융합된 tPTD-HOXB4 재조합 단백질을 *E. coli*에서 발현시키고 니켈 프로밴드(ProBand) 수지를 통해 정제하였다. 탈염화된 tPTD-HOXB4 단백질의 두 뱃치((1) 및 (2)로 표시함)에 대해서 SDS-PAGE 겔을 통해 이의 순도 및 농도를 확인하였다. (B) tPTD-HOXB4 단백질은 5% FBS를 포함하는 배지 중에서는 불안정하지만, (C) 생존 ES 세포를 포함하는 무혈청 배지 중에서는 무결 상태를 유지하였다(N = 줄기세포 II 배지 단독; h = 시간).

도 20은 hES-유도된 혈관모세포를 전신 주입한 후 허혈성 망막 혈관구조가 강건하게 복구되는 것을 보여주는 도면이다. 망막 허혈증은 마우스 안구의 전실에 대해 정수압을 2시간 정도 가하여 유도하였다. 7일 후 형광 표지된(GFP+) 혈관모세포를 유리체 내 또는 정맥 내로 주입하였다. 1일 후 이 동물을 안락사시켰다. 안구를 적출하여 절개하여, 망막을 편평하게 고정시키고 레이저 주사 공초점 현미경을 통해 영상화하거나 영상화를 위해 절편화하였다. (a) 배경에 녹색 형광 발광이 없는 전형적인 망막의 혈관 해부도를 보여주는 대표적인 대조군(미손상) 안구의 병합도로서, 개별 GFP+(하부 삽입부) 및 GFP-(상부 삽입부) 채널을 또한 확인할 수 있다; (b) 허혈성 혈관구조로 도입된 형광 표지된(GFP+) 혈관모세포-유도된 세포(혈관구조의 밝은 부분)를 보여주는, 동일 동물의 처리된 안구의 병합도이다; 실시예 5에 기술한 바와 같이, 개별 녹색(GFP+ 혈관모세포, 하부 삽입부) 및 미표지 세포(상부 삽입부)를 또한 볼 수 있다; (c) 미손상 대조군(GFP 형광 발광 없음(밝거나 연한 회색))의 병합도이다, (d) 및 (e)는 전신 혈관모세포 투여 이후 2일(d) 및 7일(e)의 허혈성 안구의 병합도이다(GFP+ 세포는 밝거나 연한 회색으로 보임). (f, X600, 공초점), 형광 면역세포 화학으로 I/R 손상을 입은 마우스 안구의 횡단면에서 존재하는 손상된 혈관구조에 대해 혈관모세포(hES-BC)-유도된 내피 세포를 공존시켰다; 내경계막에 인접한 신경절 세포층 내 혈관 내강의 고배율 확대도에서는 주변에 내피 세포(화살촉, CD31) 및 혈관모세포(hES-BC)로부터 유도된 성숙한 내피 세포(들)(화살표, 인간 핵 항원)로 둘러쌓여진 내강을 볼 수 있다. 삽입 상부 및 중간 패널은 복합 영상을 만들기 위해 사용된 개별 인간 핵 항원 및 CD31 채널이다. 하부 패널은 상기와 동일한 영역의 저배율 확대도로서, 박스는 모든 패널에 나타낸 부분을 보여준다. V = 유리체; IPL = 내부 망상층; RPE = 망막 색소 상피 세포층; Ch = 맥락막. 실시예 5 를 참조한다.

도 21은 당뇨병성 래트의 망막 혈관구조에 혈관모세포, 또는 미분화 세포 또는 hES-BC 세포가 도입된 것을 보여주는 도면이다. (a) 및 (b)는 유리체 내 혈관모세포 투여 후 2일 경 당뇨병성 래트의 망막 혈관구조의 병합 영상으로서, 여기서는 대형 혈관 및 소형 혈관 둘다에 대량으로 혈관모세포가 도입되었음을 보여준다(밝거나 연한 회색 부분); (c) 혈관모세포의 투여 후 2일 경 대조군(비당뇨병성) 래트의 병합도로서, 혈관모세포(또는 혈관모세포-유도된 세포)가 혈관구조로 도입되지 않았고 망막의 상부 상에 위치하는 시트를 형성하는 것으로 나타났다(연회색층). (d, X100), 유리체 내 미분화 세포 주입후 2일경 비당뇨병성 대조군 래트 유래 절편은 인간 핵 항원 염색에 대해서는 음성이었지만, 내피에 대해서는 분명하게 양성이었다(CD31, 화살표). (e, X100) 및 (f, X600, 공초점)는 유리체 내 혈관모세포 주입후 2일경 당뇨병성 래트 유래의 래트 안구 절편으로서, CD31 및 인간 핵 항원 항체로 염색하였는데, 유리체와 신경 망막을 분리하는 내경계막에 대해 바로 후면에 존재하는 망막의 신경절 세포층 내 혈관 내강의 내층 세포에 CD31 및 인간 핵 항원이 공존 염색된 것을 분명하게 볼 수 있다(밝은 부분을 가리키는 화살표). 실시예 6을 참조한다.

도 22는 혈관모세포 주입 후 허혈성 뒷다리 근육 및 경색된 심장에서의 내피 분화를 보여주는 도면이다. a, b, h 및 i: 경색된 심장에서 혈관모세포 또는 hES-BC 세포의 분화. (a (200X)), 인간 특이적 vWF 항체로 면역 염색한 대조군 마우스 유래의 경색 심근 절편으로서, 인간 vWF로 염색되지 않은 것으로 나타났다; (b, 200X) 및 (i, X600 공초점), 인간 특이적 vWF 항체로 면역 염색한, 혈관모세포의 주입후 4주경의 경색 심근 절편이다((b) 및 (i)에서 연회색 또는 밝은 부분); (h) 샴 수술, 배지 대조군 및 혈관모세포를 처리한 마우스의 생존 곡선이다. c-g: 허혈성 뒷다리 근육에서 혈관모세포의 분화. (c, 50X), 인간 특이적 vWF 항체로 면역염색한 대조군 마우스 유래의 뒷다리 근육 절편으로서, 인간 vWF로 염색되지 않은 것으로 나타났다; (d, 50x) 및 (e, 600X, 공초점), 인간 특이적 vWF 항체로 면역염색한, 혈관모세포 주입후 4주경 허혈성 뒷다리 근육 절편이다(연회색); (f) 수술적으로 유도시킨 허혈성 다리들에 대한 혈류 복원을 나타내는 도면이다. 뒷다리 혈류는 6×10^5 혈관모세포를 부여받은 마우스 및 배지만을 받은 마우스에서 결찰이후 3 내지 30일간 연속적으로 모니터링하였다. 혈류는 비허혈성 다리에 대한 허혈성 다리에서의 유속으로서 산출하였다; (g) 레이저 도플러 혈류 영상. 대조군(배지) 및 BC 세포를 주입한 허혈성 동물(각 군에 대해서 n=6임)의 영상이다. 실시예 7 및 8을 참조한다.

도 23은 심근 경색(MI) 마우스 유래의 심장 조직 절편에 대한 GFP(가장 연하거나 밝은 부분) 및 cTnI(중간 회색)의 면역염색을 보여주는 도면이다. 실시예 8을 참조한다. 화살표는 주입된 혈관모세포(hES-BC)로부터 유도된 이중 양성 염색 세포를 가리킨다.

도 24는 평활근으로 혈관모세포(hES-BC)가 분화한 것을 나타내는 도면이다. 혈관모세포(hES-BC)에서 단리한 RNA의 PCR을 통해 확인시 혈관모세포는 평활근 특이적 유전자를 발현하였다. 혈관모세포(hES-BC)는 또한 시험관내에서도 평활근 세포로 분화하였다. 칼포닌 및 α-SMA에 대한 면역염색에 따르면 분화된 세포는 이들 두 평활근 세포 마커를 발현하는 것으로 나타났다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0157] 상세한 설명

[0158] 여기서 기술된 본 발명을 완전하게 이해시키기 위해서, 하기에 상세한 설명을 기술한다.

[0159] 달리 정의하지 않으면, 본 발명에서 사용되는 모든 기술적 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것이다. 본 발명에서 기술하는 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료를 본 발명 또는 본 발명을 시험하는데 사용할 수 있지만, 적합한 방법 및 재료를 하기에 기술한다. 이 물질, 재료 및 실시예는 설명을 위한 것일 뿐이며, 이에 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0160] 본 발명에서 언급한 모든 출판물, 특허, 특허 공개서 및 출원서 및 기타 문헌을 전체로 참조하여 포함시킨다.

[0161] 본 명세서 전반에 걸쳐서, 단어 "포함하다" 또는 이의 이형태 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 언급한 정수 또는 정수 군을 포함시키는 것이며 임의 다른 정수 또는 정수 군을 배제하려는 것이 아니다.

[0162] 본 발명을 더욱 명확하게 하기 위해, 여기서 하기 용어 및 정의를 제공한다.

[0163] 용어 "인간 배아 줄기 세포"(hES 세포)는 당분야에서 사용되는 것과 동일한 의미로서 본 발명에서 사용한다. 이 용어는 세포주로서 연속 계대배양할 수 있는 인간 상실배 또는 배반포의 내부 세포군에서 유도된 세포를 포함한다. hES 세포는 정자 또는 DNA를 이용한 난세포의 수정, 핵이식, 처녀생식으로부터, 또는 HLA 영역에 동형접합체를 이용한 hES 세포의 생성 방법을 통해 유도할 수 있다. 인간 ES 세포는 또한, 정자와 난세포의 융합, 핵이식, 처녀생식, 또는 염색질의 재프로그램화 및 세포 생산을 위해 상기 재프로그램화된 염색질을 원형질막으로 후속 도입하는 것을 통해 생산된, 접합체, 난할구, 또는 배반포 단계의 포유류 배아로부터 유도된 세포이다. 본 발명의 인간 배아 줄기 세포는 ACT-4, No.3, H1, H7, H9, H14 및 ACT30 배아 줄기 세포를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0164] 용어 "단백질 전달 도메인"("PTD")은 세포막을 가로질러서 세포내로 전위되거나 또는 예를 들어, PTD가 부착되는 다른 분자(예컨대 단백질 도메인)가 세포막을 가로질러 세포내로 전위되는 속도를 증가시키거나 속도를 부여하는 임의 아미노산 서열을 의미하는 것이다. 단백질 전달 도메인은 거대 단백질의 일부로서 천연적으로 발생한 도메인 또는 서열(예를 들어, 바이러스 단백질 예컨대 HIV TAT의 PTD)이거나 또는 합성 또는 인공 아미노산 서열일 수 있다.

[0165] *개요*

[0166] 본 발명은 인간 배아 유래 세포 유래의 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 생성 및 증식을 위한 방법, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 조제물 및 조성물, 혈관 콜로니 형성 세포로부터 부분적으로 또는 최종적으로 분화된 다양한 세포 유형들을 생산하는 방법, 혈관 콜로니 형성 세포를 치료적으로 사용하는 방법, 및 혈관 콜로니 형성 세포로부터 부분적으로 또는 최종적으로 분화된 다양한 세포 유형들을 치료적으로 사용하는 방법을 제공한다.

[0167] 용어 "혈관모세포(hemangioblast)" 및 "혈관 콜로니 형성 세포(hemangio-colony forming cell)"는 본 출원서 전반에 걸쳐서 상호교환적으로 사용된다. 이들 세포는 이에 제한되는 것은 아니지만, 하나 이상의 마커의 발현(RNA 또는 단백질) 또는 발현 결여(RNA 또는 단백질)를 비롯한 다양한 구조적 및 기능적 특성을 기초로 설명할 수 있다. 혈관 콜로니 형성 세포는 적어도 조혈 세포 유형 또는 내피 세포 유형을 생성하도록 분화할수 있다. 혈관 콜로니 형성 세포는 바람직하게 양성능(bipotential)이고 적어도 조혈 세포 유형 및 내피 세포 유형을 생성하도록 분화할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 혈관 콜로니 형성 세포는 적어도 단성능이고, 바람직하게는 양성능이다. 그러나, 추가적으로 혈관 콜로니 형성 세포는 상당한 정도의 발생 능력을 가질 수 있고, 일정 실시형태에서는, 다른 계통의 세포 유형을 생성하도록 분화할 수 있다. 일 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 다

른 중배엽 유도체 예컨대 심장 세포(예를 들어, 심근세포) 및/또는 평활근 세포를 생성하도록 분화할 수 있다.

[0168] 본 발명은 또한, ES 세포, 배반포 또는 난할구, 태반 또는 탯줄 조직 유래 제대혈, 말초 혈액, 골수 또는 다른 조직을 포함하는 임의 공급원에서 얻거나, 또는 당분야의 다른 방법에 의해 얻은 포유류 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키는 방법을 제공한다. 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 또한 인간 배아 유래 세포로부터 생성시킬 수 있다. 인간 배아 유래 세포는 실질적으로 동종 세포 개체군, 이종 세포 개체군, 또는 배아 조직의 일부 또는 전부일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용할 수 있는 배아 유래 세포의 예로서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 인간 배아 줄기 세포로부터 생성시킬 수 있다. 이러한 배아 줄기 세포는 예를 들어, 배반포, 플레이팅된 ICM, 하나 이상의 난할구, 또는 수정, 체세포 핵이식(SCNT), 처녀생식, 동정생식, 또는 기타 유성 또는 무성 방식 등에 의한 생산 방식과는 무관하게, 착상전 단계 배아 또는 배아 유사 구조물의 다른 부분을 이용하거나, 이로부터 유도된 배아 줄기 세포를 포함한다.

[0169] 일정 실시형태에서, 혈관모세포는 혈소판 및 적혈구 세포를 포함하는 조혈 세포로 더욱 분화될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 세포는 수혈시에 사용할 수 있다. 수혈을 위한 대량의 세포를 생성하는 능력은 나라 전체의 혈액 은행 및 병원에서 겪고있는 만성적인 혈액 부족을 경감시키게 된다. 일정 실시형태에서, 본 발명의 방법은 수혈을 위한 만능(universal) 세포를 생산가능하게 한다. 구체적으로, O형 및 Rh-형인 적혈구 세포를 용이하게 생성할 수 있고 수혈용의 만능 혈액 공급원으로서 제공된다.

[0170] 본 발명의 방법은 다양한 상업적 및 임상적 응용 분야에서 유용하게 혈관모세포를 다량으로 시험관 내에서 증폭시키는 것이 가능하다. 시험관 내 혈관모세포의 증폭은 혈관모세포를 증식시키는 것을 의미한다. 본 발명의 방법은 인간 조혈 세포의 증식량이 상업적으로 유용한 양에 도달할 수 있게하며, 또한 본 발명은 다량의 혈관모세포 및 다량의 인간 혈관모세포(예를 들어, 10,000, 100,000 또는 500,000 세포 이상)를 포함하는 세포 조제물에 관한 것이다. 일정 실시형태에서, 세포 조제물은 1×10^6 세포 이상을 포함한다. 다른 실시형태에서, 세포 조제물은 인간 혈관모세포를 2×10^6 세포 이상으로 포함하고, 또 다른 실시형태에서는 인간 혈관모세포를 3×10^6 세포 이상으로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 세포 조제물은 인간 혈관모세포를 4×10^6 세포 이상으로 포함한다.

[0171] 본 발명은 10,000 내지 4백만 이상의 포유류(예컨대 인간) 혈관모세포를 포함하는 용액, 조제물 및 조성물에 관한 것이다. 이러한 용액, 조제물 및 조성물 중 혈관모세포의 수는 10,000 내지 4백만 또는 그 이상의 범위 내임의 수일 수 있다. 이 수는 예를 들어, 20,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1백만 등일 수 있다.

[0172] 유사하게, 본 발명은 인간 혈관모세포의 자손 세포의 조제물(예를 들어, 인간 조혈모세포를 포함하는 인간 조혈세포, 및 내피 세포 등)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 혈관모세포 및/또는 혈관모세포 계통 세포를 생산, 보관 및 분배하는 방법에 관한 것이다.

[0173] 본 발명은 또한 인간 또는 동물 환자에게 수혈하기 위해 적합한 방법 및 용액을 제공한다. 구체적인 실시형태에서, 본 발명은 수혈을 위한 적혈 세포 및/또는 혈소판, 및/또는 다른 조혈 세포 유형을 제조하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 혈관 관련 질환 또는 질병의 치료에서, 또는 외상 후 수혈을 위한 혈액을 제공하는 혈액 은행 및 병원에서 사용하기 적합하다. 일 실시형태에서, 본 발명은 만능 공여자 세포인 적혈 세포를 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 적혈 세포는 수혈전에 기능성이고 헤모글로불린 F를 발현한다.

[0174] 본 발명은 또한, 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 실질적으로 정제된 개체군을 포함하는 세포 배양물, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 조제물 및 혈관 콜로니 형성 세포의 동결보존 조제물을 제공한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 병태의 치료를 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하기 위한 약물 제조에서의 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 용도를 제공한다. 다르게, 본 발명은 병태의 치료를 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하기 위한 약물의 제조에서의 세포 배양물의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한, 병태의 치료를 필요로 하는 환자에서 병태를 치료하기 위한 약물의 제조에서의 약학 조제물의 용도를 제공한다.

[0175] 혈관 콜로니 형성 세포는 이들의 구조적 특성을 기초로 동정하고 특징을 규명할 수 있다. 구체적으로, 일 실시형태에서, 이들 세포는 서로 느슨하게만 부착한다는 점에서 독특하다(다른 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착). 이들 세포는 상호 느슨하게만 부착하기 때문에, 혈관 콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 해체 방법을 필요로 하지 않고 기계적 해체법만을 사용하여 단일 세포로 해체시킬 수 있다. 이 세포는 효소적 해체 또는 기계적 해체와효소적 해체의 조합보다는, 기계적 해체만으로도 실질적으로 세포의 생존능을 손상시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 충분히 탈응집화시키기에 충분하게 상호 느슨하게 부착되어 있다. 달리 말하면, 효소적인 세포 응집물의 해체 이후에 관찰되는 것과 비교하여 실질적으로 세포 손상 또는 사멸을 야기할 정

도로 강한 힘이 가해지는 기계적 해체를 필요로 하지 않는다.

[0176] 또한, 혈관 콜로니 형성 세포는 하나 이상의 마커의 발현 또는 발현 결여(유전자 수준 또는 단백질 수준에서 평가시)를 기초로 동정하거나 또는 특징을 규명할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 하나 이상의 하기 세포 표면 마커의 발현 결여(예를 들어, 하기 마커의 하나 이상, 둘 이상, 셋 이상 또는 넷 이상의 발현 결여를 기초로 상기 세포의 특징을 규명함)를 기초로 동정하거나 또는 특징을 규명할 수 있다: CD34, KDR, CD133 또는 CD31. 다르게 또는 추가적으로, 혈관 콜로니 형성 세포는 GATA2 및/또는 LMO2의 발현을 기초로 동정하거나 또는 특징을 규명할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 혈관 콜로니 형성 세포는 표 2에 분석한 하나 이상의 마커의 발현 결여 또는 발현(유전자 수준 또는 단백질 수준에서 평가시)을 기초로 동정하거나 특징을 규명할 수 있다.

[0177] 본 발명의 혈관 콜로니 형성 세포는 이들의 구조적 또는 기능적 특징 중 하나 또는 이의 임의 조합을 기초로 동정하거나 특징을 규명할 수 있다. 이들 세포가 임의의 다수 공급원, 예를 들어, 배아 조직, 출생기 조직, 또는 주산기 조직으로부터 유도될 수 있지만, 용어 "혈관 콜로니 형성 세포"는 공급원과 무관하게, 적어도 조혈 세포 유형 및/또는 내피 세포 유형을 생성하도록 분화할 수 있고, 전술한 구조적 또는 기술적 특성을 갖는 세포에 대해 사용한다는 것을 유념한다.

[0178] ***배상체 및 혈관모세포를 얻기 위한 인간 배아 줄기 세포의 시험관내 분화***

[0179] 본 발명은 인간 배아 줄기 세포로부터 또는 인간 포배 또는 할구에서 유도되는 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키는 방법을 제공한다. 이렇게 생성되는 혈관모세포는 정제 및/또는 분리될 수 있다.

[0180] 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 또한 인간 배아에서 유도되는 세포로부터 형성될 수 있다. 인간 배아에서 유도되는 세포는 실질적으로 동종인 세포 군집, 이종 세포 군집 또는 배아 조직의 일부 또는 전부일 수 있다. 본 발명 방법에 사용될 수 있는, 배아에서 유도되는 세포의 예로서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 배아 줄기 세포로부터 발생시킬 수 있다. 이러한 배아 줄기 세포는, 수정, 체세포 핵전이(SCNT), 단성 생식, 웅성 발생 또는 기타 생식 또는 비생식 수단에 의하여 생성되는가와는 무관하게, 예컨대 포배, 플레이팅된 ICM, 하나 이상의 할구 또는 착상전 단계의 배아 또는 배아 유사 구조의 다른 부분으로부터 또는 이들을 사용하여 유도되는 배아 줄기 세포를 포함한다.

[0181] 추가로 또는 택일적으로, 혈관 콜로니 형성 세포는 다른 배아에서 유도되는 세포로부터 생성시킬 수 있다. 예컨대, 혈관 콜로니 형성 세포는, 수정, 체세포 핵전이(SCNT), 단성 생식, 웅성 발생 또는 기타 생식 또는 비생식 수단에 의하여 생성되는가와는 무관하게, (반드시 배아 줄기 세포 유도 단계를 거칠 필요 없이) 플레이팅된 배아, ICM, 포배, 영양막/영양막배엽 세포, 하나 이상의 할구, 영양막 줄기 세포, 배아 생식 세포 또는 착상전 단계의 배아 또는 배아 유사 구조의 다른 부분으로부터 또는 이들을 사용하여 생성시킬 수 있다. 마찬가지로, 혈관 콜로니 형성 세포는 배아에서 유도되는 세포로부터 부분적으로 분화된 세포 또는 세포주를 사용하여 생성시킬 수 있다. 예컨대, 인간 배아 줄기 세포주를 사용하여 발달 가능성 및 적응성 면에서 혈관 콜로니 형성 세포보다 발달학적으로 더 초기의 세포를 생성시키는 경우, 이러한 배아에서 유도되는 세포를 사용하여 혈관 콜로니 형성 세포를 발생시킬 수 있다.

[0182] 추가로 또는 택일적으로, 혈관 콜로니 형성 세포는 비제한적으로 제대, 제대혈, 양수, 양수 줄기 세포 및 태반을 포함하는 다른 태아기 또는 주산기 공급원으로부터 발생시킬 수 있다.

[0183] 혈관 콜로니 형성 세포를 인간 배아 조직으로부터 생성시키는 경우 배상체 형성 단계가 필요할 수 있다. 그러나, 배상체 형성은 초기 발달 동안 발생하는 배엽의 3차원적 상호 작용을 반복하는 데 적어도 부분적으로 도움이 되므로, 배아에서 유도되는 세포가 이미 배상체 형성과 실질적으로 동일한 목적을 위한 조직화 또는 구조를 갖는 경우, 이러한 단계가 반드시 필요하지는 않다. 예컨대, 혈관 콜로니 형성 세포를 플레이팅된 포배로부터 생성시킬 경우, 포배 세포 중에 일정 수준의 3차원적 조직화가 이미 존재한다. 따라서, 세포간 신호, 유도 신호 또는 3차원적 구조를 제공하는 데 배상체 형성 단계가 반드시 필요하지는 않다.

[0184] 본 발명의 방법 및 용도는 배아에서 유도되는 세포로부터 혈관 콜로니 형성 세포를 생성시키는 데 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 배아에서 유도되는 세포는 배아 줄기 세포이다. 다른 특정 실시형태에서, 배아에서 유도되는 세포는 플레이팅된 배아, ICM, 포배, 영양막/영양막배엽 세포, 하나 이상의 할구, 영양막 줄기 세포 또는 초기 착상전 배아의 다른 부분이다. 상기한 것들 중 임의에 대하여, 배아에서 유도되는 세포는 수정, 체세포 핵전이(SCNT), 단성 생식, 웅성 발생 또는 기타 생식 또는 비생식 수단에 의하여 생성되는 배아에서 유래될 수 있다.

[0185] 본 출원을 통하여, 배아 줄기 세포로부터 혈관 콜로니 형성 세포를 특이적으로 생성시키는 것과 관련하여 본 발명을 개시하는 경우, 본 발명은 또한 배아에서 유도되는 다른 세포로부터 또는 이것을 사용하여 그리고 임의의 동일한 치료 용도를 위하여 생성시킨 세포를 사용하여 혈관 콜로니 형성 세포를 생성시키는 것을 포함한다.

[0186] 본 발명의 일부 양태에서, 인간 배아 줄기 세포는 이 방법의 출발 재료일 수 있다. 배아 줄기 세포는 예컨대 영양 공급 세포의 존재 또는 부재하에 업계에 공지된 임의의 방법으로 배양될 수 있다.

[0187] 배아 줄기 세포는 혈청을 함유하는 배지 중 현탁물로 배상체("EB")를 형성할 수 있다(Wang et al. 2005 J Exp Med (201): 1603-1614 ; Wang et al. 2004 Immunity (21): 31-41; Chadwick et al. 2003 Blood (102): 906-915). 그러나, 혈청의 첨가는 실험에서의 가변성, 비용, 감염성 제제의 가능성 및 공급 제한을 비롯한 약간의 문제가 있다. 또한, 임상적 용도 및 특정 상업적 용도에서, 혈청의 사용은 생물학적 생성물을 규제하는 추가의 미국 및 국제 규제 준수를 필요로 한다.

[0188] 본 발명은 혈청이 사용되지 않은 배아 줄기 세포로부터 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키는 방법을 제공한다. 무혈청 조건이 혈청을 필요로 하는 조건보다 양호한 제조 공정(GMP) 가이드라인 하에서의 대규모 제조에 더 유리하다. 또한, 무혈청 조건은 배지에 첨가되는 특정 인자의 반감기를 연장시킨다(예컨대, 혈청이 존재하는 않는 경우, 배지에서 성장 인자, 사이토카인 및 HOXB4를 포함하는 단백질의 반감기가 증가됨). 특정 실시형태에서는, 무혈청 배지가 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키기 위한 본 발명 방법을 통해 사용된다.

[0189] 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키기 위한 본 방법의 제1 단계에서, 인간 줄기 세포는 무혈청 배지에서 성장되어 배상체로 분화되도록 유도된다. 배상체 형성을 유도하기 위하여, 배아 줄기 세포를 펠릿화하여 하나 이상의 형태형성 인자 및 사이토카인을 보충한 다음 저부착 (예컨대, 초저부착) 배양 플레이트에 플레이팅한 무혈청 배지에 (예컨대, Stemline I 또는 II 배지(Sigma™) 중에) 재현탁시킬 수 있다. 형태형성 인자 및 사이토카인은 골 형태형성 단백질 (예컨대, BMP2, BMP-4, BMP-7, 그러나 BMP-3은 아님) 및 VEGF, SCF 및 FL을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 골 형태형성 단백질 및 VEGF는 단독으로 또는 다른 인자와 함께 사용될 수 있다. 형태형성 인자 및 사이토카인은 세포 배양 0~48 시간부터 배지에 첨가될 수 있다. 이러한 조건 하에 항온처리한 후, 혈소판 형성 인자(TPO), Flt-3 리간드 및 줄기 세포 인자(SCF)를 포함하나 이에 한정되지 않는 초기 조혈 증식 사이토카인의 존재하에서 항온처리하면 플레이팅된 ES 세포가 EB를 형성할 수 있다. TPO, Flt-3 리간드 및 SCF 이외에, VEGF, BMP-4 및 HoxB4도 또한 배지에 첨가될 수 있다. 일 실시형태에서, 인간 ES 세포를 먼저 BMP-4 및 $VEGF_{165}$ (예컨대, 25~100 ng/ml)의 존재하에 성장시킨 다음, BMP-4, $VEGF_{165}$, SCF, TPO 및 FLT3 리간드 (예컨대, 10~50 ng/ml) 및 HoxB4 (예컨대, 본원에 개시된 바와 같은 1.5~5 μg/ml의 트리플 단백질 전달 도메인-HoxB4 융합 단백질)의 존재하에 성장시킨다. 추가의 인자를 플레이팅 후 48~72 시간에 첨가할 수 있다.

[0190] 본 발명의 이 방법에서, 인간 혈관모세포는 초기 배상체("EB")로부터 분리된다. 초기 EB로부터 혈관모세포를 분리하는 것은 시험관내 세포의 증식을 지원한다. 인간 세포에서, 혈관모세포는 10일 미만 동안 성장한 EB로부터 얻을 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 혈관모세포는 2~6일 동안 성장한 인간 EB에서 발생한다. 일 실시형태에 따르면, 혈관모세포를 확인하여 4~6일 동안 성장한 인간 EB로부터 분리할 수 있다. 다른 실시형태에서는, 혈관모세포를 분리하기 전에 인간 EB를 2~5일 동안 성장시킨다. 특정 실시형태에서는, 혈관모세포를 분리하기 전에 인간 EB를 3~4.5일 동안 성장시킨다.

[0191] 특정 실시형태에서, 초기 EB를 세정하고 (예컨대, 트립신/EDTA 또는 콜라겐 분해 효소 B에 의하여) 분리한다. 선택된 수의 세포 (예컨대, 2~5 x 10^5 세포)를 혈관모세포 성장을 위해 최적화된 무혈청 메틸셀룰로오스 배지 (예컨대, BL-CFU 배지, 예컨대 Stem Cell Technologies Catalogue H4436, 또는 혈관모세포 증식 배지(HGM), 또는 MDM 중 1.0% 메틸셀룰로오스, 1~2% 소 혈청 알부민, 0.1 mM 2-머캅토에탄올, 10 μg/ml rh-인슐린, 200 μg/ml의 철결합 인간 트랜스페린, 20 ng/ml의 rh-GM-CSF, 20 ng/ml의 rh-IL-3, 20 ng/ml의 rh-IL-6, 20 ng/ml의 rh-G-CSF를 함유하는 임의의 배지)("rh"는 "재조합 인간"을 의미함)와 혼합한다. 이러한 배지에는 초기 단계 사이토카인(EPO, TPO, SCF, FL, FLt-3, VEGF, BMP, 예컨대 BMP2, BMP4 및 BMP7을 포함하나 이에 한정되지 않음, 그러나 BMP3는 아님) 및 HOXB4 (또는 또다른 호메오박스 단백질)을 보충할 수 있다. 특정 실시형태에서는, 에리스로포이에틴(EPO)을 배지에 첨가한다. 추가의 실시형태에서는, EPO, SCF, VEGF, BMP-4 및 HoxB4를 배지에 첨가한다. 추가의 실시형태에서는, 세포를 EPO, TPO 및 FL의 존재하에 성장시킨다. H9가 출발 인간 ES 세포주인 특정 실시형태에서는, EPO, TPO 및 FL을 배지에 첨가한다. EPO, TPO 및 FL 이외에, H9로부터 유도된 세포 또는 다른 ES 세포를 위한 배지는 VEGF, BMP-4 및 HoxB4를 더 포함할 수 있다.

[0192] 혈관모세포를 포함하는, 본 방법에 의하여 얻어지는 세포 (상기 세포는 BL-CFU 배지 내에 있을 수 있음)를 초저

부착 배양 플레이트에 플레이팅하고 CO_2 항온처리기에서 항온처리하여 혈관모세포 콜로니를 성장시킨다. 일부 세포는 2차 EB를 형성할 수 있다. 대략 3~6일 후, 일부 경우 3~4.5일 후, 혈관모세포 콜로니가 관찰된다. 혈관모세포 콜로니는 특징적인 포도상 형태 및/또는 작은 크기에 의하여 2차 EB와 같은 다른 세포와 구별될 수 있다. 또한, 혈관모세포는 특정 마커의 발현 (예컨대, 초기 조혈 세포 마커 및 내피 세포 마커의 발현) 및 적어도 조혈 세포 및 내피 세포로의 분화능(이하, 혈관모세포 계통 세포 유도 참조)으로 확인될 수 있다. 예컨대, 혈관모세포는 성숙한 내피 세포 또는 조혈 세포의 특징적인 일정한 특징을 결여하여도, 이들 세포는 (예컨대 CD71+와 같은) 특정 마커의 존재 및 다른 마커 (예컨대, CD34-)의 부재로 확인될 수 있다. 혈관모세포는 또한 GATA-1 및 GATA-2 단백질, CXCR-4, 및 TPO와 EPO 수용체를 발현시킬 수 있다. 또한, 혈관모세포는 다른 마커 (예컨대, CD31, CD34, KDR, 또는 다른 부착 분자)의 발현이 낮거나 없는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 혈관모세포는 특정 유전자, 예컨대 혈관모세포 및 초기의 미발달 적모세포 발달과 관련된 유전자, 예컨대 SCL, LMO2, FLT-I, 배아 태아 글로빈 유전자, NF-E2, GATA-1, EKLF, ICAM-4, 글리코포리운스 및 EPO 수용체의 발현을 특징으로 할 수 있다.

[0193] 따라서, 혈관모세포는 크기(다른 세포보다 작음)에 의하여 분리하거나 또는 예컨대 면역 친화성 컬럼 크로마토그래피에 의하여 안티-CD71+ 항체로 정제할 수 있다.

[0194] 혈관모세포는 이하의 절차에 의하여 크기 및/또는 형태에 의해 분리될 수 있다. 6~7일 성장 후, 상기 세포 혼합물은 EB(이것은 둥글고 다수의 세포의 덩어리임) 및 혈관모세포(이것은 포도상이며, EB보다 작고, 단일 세포임)를 함유한다. 따라서, 혈관모세포는 형태 및 크기를 기준으로 하여 분리할 수 있다. 혈관모세포는 예컨대 세포 혼합물을 현미경으로 관찰하는 경우 수작업으로 골라낼 수 있다. 이후 세포를 콜로니(각 콜로니는 100~150개의 세포를 가짐)로 성장시킬 수 있다.

[0195] 상기 개시한 바와 같이 유도되는 인간 혈관모세포 콜로니를 골라내어 메틸셀룰로오스 CFU-배지 상에서 재플레이팅하여 조혈 CFU를 형성할 수 있다. 특정 실시형태에서, CFU-배지는 StemCell Technologies H4436을 포함한다. 추가의 실시형태에서는, 혈관모세포를 사이토카인 및 다른 인자를 보충한 Stemline II 배지에서 플레이팅한다. 예컨대, 개개의 BL-CFC 콜로니를 손으로 집어 Stemline II와 재조합 인간 SCF (예컨대, 20 ng/ml), TPO (예컨대, 20 ng/ml), FL (예컨대, 20 ng/ml), IL-3 (예컨대, 20 ng/ml) VEGF (예컨대, 20 ng/ml), G-CSF (예컨대, 20n ng/ml), BMP-4 (예컨대, 15 ng/ml), IL-6 (예컨대, 10 ng/ml), IGF-1 (예컨대, 10 ng/ml), 내피 세포 성장 보충물 (ECGS, 예컨대, 100 μg/ml), Epo (예컨대, 3 U/ml)를 함유하는 피브로넥틴-코팅 플레이트에 옮길 수 있다. 시험관내에서 1주일 성장시킨 후, 조심스럽게 피펫으로 채취하여 비부착 조혈 세포를 제거하고 조혈 CFU 분석에 직접 사용할 수 있다. 비부착 세포를 제거한 후, 부착 군집을 EGM-2 내피 세포 배지(Cambrex™)에서 1주일 동안 성장시킨 다음 vWF의 발현을 조사할 수 있다.

[0196] ***시험관내 혈관모세포 증식***

[0197] 본 발명의 특정 양태는 혈관모세포의 시험관내 증식에 관한 것이다. 특정 실시형태에서, 본 발명 방법으로 증식되는 혈관모세포는 상기 개시한 바와 같이 인간 배아 줄기 세포로부터 유도되는 초기 배상체로부터 얻어진다.

[0198] 인간 배아 줄기 세포(hES 세포)로부터 혈관모세포를 유도하는 외에, 증식시킬 혈관모세포는 또한 포유동물 배아 (Ogawa et al. 2001 *Int Rev Immunol* (20): 21-44, 미국 특허 공보 2004/0052771호), 제대 조직 및 태반으로부터의 제대혈 (Pelosi, et al. 2002 Blood (100): 3203-3208; Cogle et al. 2004 Blood (103): 133-5), 말초 혈액 및 골수 (Pelosi et al. 2002 Hematopoiesis (100) : 3203-3208)와 같은 다른 포유동물 공급원으로부터 분리할 수 있다. 특정 실시형태에서는, 증식시킬 비인간 혈관모세포를 (마우스 및 비인간 영장류와 같은) 비인간 배아 줄기 세포로부터 생성시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 혈관모세포는 예컨대 자기 비드 양성 선별 또는 정제 기술(예컨대, MACS 컬럼)과 같은 방법에 의하여 제대혈(UCB) 또는 골수로부터 얻어진다. 세포는 그 CD71+ 상태를 기준으로 하여 선택될 수 있으며 CD34-로서 확인될 수 있다. 또한, 분리된 혈관모세포는 조혈 세포 계통 및 내피 세포 계통을 생성시킬 가능성에 대하여 시험될 수 있다. 특정 실시형태에서, 분리 또는 정제되고 임의로 배아, 제대혈, 말초 혈액, 골수 또는 다른 조직으로부터 농후화된 혈관모세포는 순도가 95%를 초과한다.

[0199] 골수 유래 세포는 출생전 (예컨대, 배아 또는 태아), 유아기 (예컨대, 인간에서 출생으로부터 대략 3세), 아동기 (예컨대, 인간에서 약 3세부터 약 13세), 사춘기 (예컨대, 인간에서 약 13세 내지 약 18세), 청년기 (예컨대, 인간에서 약 18세 내지 약 35세), 장년기 (인간에서 약 35세 내지 약 55세) 또는 노년기 (예컨대, 인간에서 약 55세 이상)를 비롯한 공여자 개인의 임의의 발달 단계로부터 얻어질 수 있다.

[0200] 인간 골수는 예컨대 수술 중의 환자의 분층 흉골로부터 채취하여 얻을 수 있다. 이후 골수는 부피로 0.1~1 mm^3의 조직 덩어리에 보존한 다음 마우스 배아 영양 공급 층 (예컨대, 미토마이신 C-처리 또는 조사된 영양 공급층)에서 성장시킬 수 있다. 골수 세포는 1~2주의 배양 기간에 걸쳐 플레이트에 부착하며, 혈관모세포는 형태 특성 및/또는 세포 마커를 기준으로 하여 확인 및 분리될 수 있다 (미국 특허 공보 2004/0052771호 참조). 이후 세포를 본원에 개시된 방법에 따라 무혈청 조건에서 성장 및 증식시킬 수 있다.

[0201] 또한, 골수 세포 및 혈액 또는 다른 조직에서 유래하는 세포를 분별하여 혈관모세포를 얻을 수 있다. 분별 방법은 업계에 널리 공지되어 있으며, 일반적으로 양성 선별 (즉, 특정 특성을 기준으로 한 세포의 유지) 및 음성 선별 (즉, 특정 특성을 기준으로 한 세포의 제거)을 모두 포함한다. 골수 유래 세포의 농후화 및 분별 방법은 인간 및 마우스 세포에 대하여 가장 특징적이다.

[0202] 골수 유래 세포 또는 다른 세포의 각종 농후화 및 분별 방법이 업계에 공지되어 있다. CD71을 발현시키는 세포의 농후화와 같은 양성 선별 방법을 사용할 수 있다. CD3, CD10, CD11b, CD14 , CD16, CD15, CD16, CD19, CD20, CD32, CD45, CD45R/B220 또는 Ly6G를 발현시키는 세포를 제거 또는 감소시키는 음성 선별 방법도 단독으로 또는 양성 선별 기술과 함께 사용할 수 있다. 골수 세포의 경우, 공여자 골수 유래 세포가 자가 조직이 아닐 경우, 분화된 T 세포를 감소 또는 제거시키기 위하여 세포 제조물에서 음성 선별을 실시할 수 있다.

[0203] 일반적으로, 골수 유래 세포, 혈액 세포 또는 다른 세포의 선택/농후화에 사용되는 방법은 면역 친화성 기술을 이용하지만, 밀도 원심분리 방법도 유용하다. 면역 친화성 기술은 업계에 공지된 바와 같은 다양한 형태를 취할 수 있지만, 일반적으로 항체 또는 항체 유도체를 일부 유형의 분리 기술과 함께 이용한다. 상기 분리 기술은 일반적으로 항체에 의하여 결합된 세포 및 항체에 의하여 결합되지 않은 세포를 물리적으로 분리시키지만, 일부 경우 항체에 의하여 결합된 세포를 사멸시키는 분리 기술이 음성 선별에 사용될 수 있다.

[0204] 형광-활성 세포 분류(FACS), 패닝, 면역자기 분리, 면역 친화성 크로마토그래피, 항체-매개 보체 고정, 면역독소, 밀도 구배 분리 등을 비롯한 임의의 적당한 면역 친화성 기술을 골수 유래 세포, 혈액 세포 또는 다른 세포에서 유래하는 혈관모세포의 선택/농후화에 이용할 수 있다. 면역 친화성 과정에서 처리한 후, 소정 세포 (양성 선별의 경우 면역 친화성 시약에 의하여 결합된 세포, 음성 선별의 경우 면역 친화성 시약에 의하여 결합되지 않은 세포)를 수거하여 추가 회수의 면역 친화성 선택/농후화를 거치게 할 수 있다.

[0205] 면역 친화성 선택/보강은 통상적으로 골수에서 유도된 세포를 포함하는 세포의 제제를 항체 또는 항체에서 유도된 친화성 시약(예, 소정 표면 마커에 대해 특이적인 항체)으로 배양한 후, 항체가 결합된 세포를 위해 또는 세포에 대해 선택하는 데에 결합된 친화성 시약을 사용함으로써 실시한다. 선택 공정은 일반적으로, 고상 기질에 (직접 또는 간접) 결합된 항체를 이용하여(패닝, 면역 친화성 크로마토그래피) 또는 친화성 시약을 통해 자기 입자에 결합된 세포를 수집하는 데에 자기장을 이용하여(면역 자기 분리), 결합된 친화성 시약의 존재 또는 부재(FACS)에 따라 단일 세포를 함유하는 액적을 상이한 용기에 유도함으로써 달성될 수 있는 물리적 분리를 수반한다. 대안적으로, 세포 독성 손상을 친화성 시약에 의해 결합된 세포에 유도하는 친화성 시약을 이용하여 골수에서 유도된 세포 제제로부터 원하지 않는 세포를 제거할 수 있다. 세포 독성 손상은 친화성 시약에 의해 활성화될 수 있거나(예, 보체 결합), 또는 친화성 시약에 의해 목표 세포에 국소화시킬 수 있다(예, 리신 B 사슬과 같은 면역 독소).

[0206] 상기 설명한 방법은 골수에서 유도된 세포 또는 혈액 세포의 제제로부터 세포를 보강하는 것에 관한 것이지만, 당업자는 유사한 양성 및 음성 선택 기술을 다른 조직으로부터 나온 세포 제제에 적용할 수 있음을 인지할 것이다.

[0207] 본 발명의 특정 양태는 혈관모세포의 시험관내 증식에 관한 것이다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법에 의해 증식된 혈관모세포는 상기 설명한 바와 같은 인간 배아 줄기 세포로부터 유도된 조기 배상체로부터 얻는다. 다른 실시형태에서, 혈관모세포는 인간 조직(예, 태반 또는 제대 혈액, 말초 혈액, 골수 등)으로부터 단리 또는 보강한다.

[0208] 특정 실시형태에서, 혈관모세포는 호메오도메인 단백질(본 명세서에서 호메오박스 단백질로도 지칭함)의 존재하에 증식시킨다. 추가의 실시형태에서, 혈관모세포는 HOXB4의 존재 하에 증식시킨다. 특정 실시형태에서, HOXB4는 혈관모세포의 증식 방법을 통해 혈관모세포에 첨가한다.

[0209] HOXB4는 골수의 줄기 세포 분획에서 세포내 발현되고 이어서 분화 동안 하향 조절되는 호메오도메인 전사 인자이다(HOX2F, HOX2, HOX-2.6, 그리고 래트에서는 HOXA5로도 지칭됨). HOXB4 유전자의 발현은 원시 줄기 세포 표현형의 유지와 관련되어 있다[문헌(Sauvageau et al. 1995 Genes Dev 9: 1753-1765; Buske et al. 2002 Blood

100: 862-868; Thorsteinsdottir et al. 1999 Blood 94: 2605- 2612; Antonchuk et al. 2001 Exp Hematol 29: 1125-1134)].

[0210] 본 발명의 방법에서 혈관모세포의 생성 및 증식에 사용되는 HOXB4는 전체 길이 HOXB4(예, 공개 수탁 번호 GI: 13273315, GI: 29351568로 특정된 HOXB4 폴리펩티드) 뿐 아니라 이의 임의의 기능성 변이체 및 활성 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 야생형 HOXB4 단백질은 서열 번호 1, 서열 번호 3의 아미노산 서열 또는 이러한 단백질의 임의의 다른 대안적인 대립유전자 형태로 코딩될 수 있다. 이러한 서열은 Genbank와 같이 공개적으로 입수 가능한 데이터 베이스를 통해 접근할 수 있다. 또한, HOXB4는 세포 내에서 엑토피컬(ectopical)하게 발현될 수 있거나 배지에 제공될 수 있다. 엑토피컬하게 발현된 HOXB4는 유발 촉진자에 실시 가능하게 연결될 수 있다. 배지에 제공된 HOXB4는 다른 세포 형태(예컨대, 피더층)에 의해 분비되거나 또는 배지에 직접 첨가될 수 있다.

[0211] 본 발명은 또한 HOXB4(전체 길이 HOXB4 또는 HOXB4 기능성 변이체 또는 HOXB4의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질 포함)를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. HOXB4 이외에, 이 융합 단백질은 또한 임의의 추가의 단백질, 단백질 도메인 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, HOXB4는 배지로부터 세포에 그리고 이어서 핵 구역에 단백질이 전위될 수 있도록, 단백질 전달 도메인(PTD)에 결합할 수 있다. 융합 단백질은 단백질 도메인 사이에 위치한 1 이상의 링커 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0212] HOXB4의 기능성 변이체는 HOXB4의 돌연변이 및 대립유전자 변이체 및 이의 활성 단편을 포함한다. HOXB4의 기능성 변이체는 본 발명의 방법에 따라 혈관모세포를 증식시킬 수 있는 임의의 HOXB4 폴리펩티드 및 이의 활성 단편을 포함한다. HOXB4 기능성 변이체는 또한 본래의 HOXB4 단백지에 비해 전사 활성이 더 큰 HOXB4 폴리펩티드를 포함한다. HOXB4 변이체는 야생형 HOXB4와 관련하여 1 이상의 아미노산이 치환, 부가 및/또는 결실된 단백질을 포함한다. HOXB4 변이체는 또한 서열 번호 1 또는 서열 번호 3에 제공된 서열과 75% 이상 유사한 폴리펩티드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, HOXB4 변이체는 서열 번호 1 또는 서열 번호 3에 제공된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95% 및 99% 유사한 폴리펩티드를 포함한다.

[0213] HOXB4 변이체는 또한 이의 보체를 코딩하는 핵산 서열과 80% 이상 동일한 핵산 서열로 코딩된 폴리펩티드를 포함한다[예컨대 야생형 HOXB4 단백질은 서열 번호 2(GI: 85376187) 또는 서열 번호 4(GI: 29351567)의 핵산 서열에 의해 코딩될 수 있음]. 따라서, HOXB4 변이체는 서열 번호 2 또는 서열 번호 4에 제공된 서열과 85%, 90%, 95% 및 99% 동일한 핵산 서열 또는 이의 상보 서열로 코딩된 HOXB4 폴리펩티드를 포함한다.

[0214] HOXB4를 코딩하는 핵산 서열은 엄격한 조건 하에서 서열 번호 2 또는 4의 핵산 서열에 보합 결합하는 임의의 핵산 서열 또는 이의 상보 서열 또능 이의 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 유사하게, 유전자 코드의 축퇴성으로 인해 서열 번호 2 또는 4에 기재된 바의 핵산과 상이한 핵산도 본 발명의 범위에 포함된다. HOXB4 변이체 폴리펩티드는 또한 스플라이스 변이체 또는 다른 자연 발생 HOXB4 단백질 또는 핵산 서열을 포함한다.

[0215] HOXB4의 활성 단편은 본 발명의 방법에 따라 혈관모세포를 유지할 수 있는 전체 길이 HOXB4 폴리펩티드의 임의의 단편을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 일실시형태에서, 본 발명의 HOXB4 단백질은 N 말단의 일부, 예컨대 전체 길이 HOXB4의 N 말단 31, 32, 또는 33 아미노산이 결실된 HOXB4 단백질이다. HOXB4 단백질 중 임의의 것은 추가의 단백질 또는 단백질 도메인으로 융합될 수 있다. 예컨대, HOXB4는 단백질 전달 도메인(PTD)에 연결될 수 있다.

[0216] HOXB4에 공유 또는 비공유 결합된 단백질 전달 도메인은 HOBX4가 세포막을 가로질러 전위하게 하여, 단백질이 세포의 핵 구역에 최종적으로 도달할 수 있다.

[0217] HOXB4 단백질로 융합될 수 있는 PTD는 HIV 전사 활성 단백질(TAT)(Tat 47-57)의 PTD를 포함한다[문헌(Schwarze and Dowdy 2000 Trends Pharmacol. Sci. 21: 45-48; Krosl et al. 2003 Nature Medicine (9) : 1428-1432)]. HIV TAT 단백질에 있어서, 막 전위 활성을 부여하는 아미노산 서열은 잔기 47-57(YGRKKRRQRRR, 서열 번호 5)에 해당한다[문헌(Ho et al., 2001, Cancer Research 61: 473-477; Vives et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 16010- 16017)]. 이 서열은 단독으로 단백질 전위 활성을 부여한다. TAT PTD는 또한 9개의 아미노산 펩티드 서열 RKKRRQRRR(서열 번호 6)[문헌((Park et al. MoI Cells 2002 (30):202-8)]. TAT PTD 서열은 YARKARRQARR(서열 번호 7), YARAAARQARA(서열 번호 8), YARAARRAARR(서열 번호 9) 및 RARAARRAARA(서열 번호 10)을 비롯하여 문헌(Ho et al., 2001, Cancer Research 61: 473-477)(이의 개시 내용을 본 명세서에서 참고로 인용함)에 개시된 펩티드 서열 중 임의의 것일 수 있다.

[0218] 본 발명의 HOXB4 단백질에 융합될 수 있는 PTD를 포함하는 다른 단백질은 단순 포진 바이러스 1(HSV-I) DNA 결

합 단백질 VP22 및 초파리 안테나페디아(Drosophila Antennapedia, Antp) 호메오틱 전사 인자를 포함한다[문헌(Schwarze et al. 2000 Trends Cell Biol. (10): 290-295)]. Antp에 대해서 아미노산 43-58(RQIKIWFQNRRMKWKK, 서열 번호 11)은 단백질 전달 도메인을 나타내며, HSV VP22에 대해서 PTD는 잔기 DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE(서열 번호 12)로 표시된다. 대안적으로, 전달 활성을 부여하는 인공 펩티드 또는 HeptaARG(RRRRRRR, 서열 번호 13)가 본 발명의 PTD로서 사용될 수 있다.

[0219] 추가의 실시형태에서, PTD 펩티드는 이중화 또는 다중화된 PTD 펩티드일 수 있다. 특정 실시형태에서, PTD는 TAT PTD 펩티드 YARAAARQARA(서열 번호 14) 중 1 이상이다. 특정 실시형태에서, PTD는 TAT PTD 펩티드 YARAAARQARA(서열 번호 15) 중 3개로 구성된 멀티머이다. 예컨대 삼중화 합성 단백질 전달 도메인(tPTD)과 같은 멀티머 PTD에 융합 또는 결합된 HOXB4 단백질은 세포 내에서 감소된 불안정성 및 증가된 안정성을 나타낼 수 있다. 이러한 HOXB4 구조는 또한 hES 세포의 존재 하에 그리고 무혈청 배지 내에서 안정적일 수 있다.

[0220] 융합 단밸질을 코딩하는 융합 유전자의 제조 기술은 당업계에 공지되어 있다. 실질적으로, 상이한 폴리펩티드 서열을 코딩하는 다양한 DNA 단편의 연결은 통상적인 기술에 따라 수행한다. 다른 실시형태에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성기를 비롯한 통상적인 기술에 의해 합성할 수 있다. 대안적으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 후속하여 어닐링 처리하여 키메라 유전자 서열을 생성시킬 수 있는 2개의 연속 유전자 단편 사이에 보완적 현수를 유발하는 앵커 프라이머(anchor primer)를 사용하여 수행할 수 있다[예컨대 문헌(Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992) 참조].

[0221] 특정 실시형태에서, 폴리-(His) 서열과 같이 정제 선도 서열을 코딩하는 융합 유전자가 HOXB4 폴리펩티드 또는 HOXB4-융합 단백질의 소정 부분의 N 말단에 결합되어, Ni^{2+} 금속 수지를 이용하는 친화성 크로마토그래피에 의해 융합 단백질이 정제될 수 있다. 그 다음 정제 선도 서열을 이이서 엔테로키나아제로 처리하여 제거하여 정제된 HOXB4 폴리펩티드를 제공할 수 있다[예컨대 문헌(Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411:177; and Janknecht et al., PNAS USA 88:8972) 참조].

[0222] 특정 실시형태에서, HOXB4 단백질 또는 이의 기능성 변이체 또는 활성 도메인은 링커 서열을 개재하거나 개재하지 않고 제2 단백질 또는 단백질 도메인(예, PDT)의 C 말단 또는 N 말단에 연결된다. 링커의 정확한 길이 및 서열 및 연결된 서열에 대한 이의 배향은 다양할 수 있다. 링커는 예컨대 2, 10, 20, 30 개 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 용해도, 길이, 입체 분리 등과 같은 소정 특성을 기준으로 선택할 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 예컨대 융합 단백질의 정제, 검출 또는 개질에 유용한 기능성 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 2개 이상의 글리신의 폴리펩티드를 포함한다.

[0223] 도메인이 융합되는 단백질 도메인 및/또는 링커를 개질하여 HOXB4의 효율, 안정성 및/또는 기능 특성을 변경할 수 있다.

[0224] 특정 실시형태에서, HOXB4는 혈관모세포 내에서 엑토피컬하게 발현되거나 또는 배지에 제공된다. 엑토피컬하게 발현된 HOXB4는 조절 서열에 실시 가능하게 연결된다. 조절 서열은 당업계에 인지되어 있으며, HOXB4 폴리펩티드의 발현을 유도하기 위해 선택된다.

[0225] 배지에 제공된 HOXB4는 다른 세포 유형에 의해 분비될 수 있다. 다른 세포 유형은 분비 가능한 HOXB4를 발현하기 위해 전달된 마우스 간질 세포층과 같은 피더층일 수 있다. 예컨대, HOXB4는 단백질의 유출 및 분비를 촉진하는 소수성 서열 또는 단일 펩티드를 포함하도록 융합 또는 조작될 수 있다. 대안적으로, PTD에 공유 또는 비공유 결합된 융합 단백질과 같은 HOXB4는 배지에 직접 첨가될 수 있다. 추가적으로, HOXB4는 레트로바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 상에 매개될 수 있다. 이러한 벡터는 이의 배양물에서 혈관모세포 또는 다른 세포를 전달할 수 있다.

[0226] 특정 실시형태에서, 사용되는 HOXB4 단백질에 따라, 혈관모세포의 증식 동안 선택된 시간에서 HOXB4를 배지에 첨가한다. 혈관모세포는 무혈청 배지에서 증식되기 때문에, HOXB4는 비교적 안정적이다. 따라서 특정 실시형태에서, HOXB4 단백질 또는 융합 단백질을 매일 인간 혈관모세포에 첨가한다. 다른 실시형태에서 HOXB4 단백질 또는 융합 단백질을 격일로 첨가하고, 또 다른 실시형태에서 HOXB4 단백질 또는 융합 단백질을 이틀마다 첨가한다. 일실시형태에서, HOXB4 융합 단백질, HOXB4-PTD는 이틀마다 배지에 첨가한다.

[0227] 특정 실시형태에서, 혈관모세포는 이러한 세포를 증식시키기에 충분한 양으로 존재하는 임의의 다른 성장 인자 또는 단백질의 존재 하에 증식시킬 수 있다.

[0228] 인간 또는 비인간 ES 세포, 골수, 태반 또는 배꼽 제대 혈액, 말초 혈액 또는 다른 조직을 비롯한 임의의 공급

원으로부터 얻은 혈관모세포를 상기 설명한 방법에 따라 증식시킬 수 있다. 따라서 특정 실시형태에서, 선택된 수의 정제된 혈관모세포 또는 보강된 세포를 혈관모세포 성장에 대해 최적화된 무혈청 메틸셀룰로오스 배지(예, BL-CFU 배지, 실시예 1 및 2 참조)와 혼합한다. 이 배지를 초기 단계 사이토카인(EPO, TPO, FL, VGF, BMP 유사 BMP2, BMP4 및 BMP7을 포함하지만 이에 한정되지 않음, BMP3 제외) 및 HOXB4로 보완될 수 있다. 특정 실시형태에서, 에리스로단백질(EPO)을 배지에 첨가한다. 특정 실시형태에서, EPO, TPO 및 FL을 배지에 첨가한다. 그 다음, 세포를 초저 부착 배양 플레이트에 놓고 CO_2 인큐베이터에서 성장시킨다. 상기 언급한 바와 같이, 혈관모세포 콜리니는 특유의 포도 유사 외형을 나타내고, 다른 세포보다 비교적 작으며, 따라서 다른 세포 유형과 구별될 수 있다. 혈관모세포에 대해 또한 마커 뿐 아니라, 조혈 세포 또는 내피 세포 혈통으로 더 분화될 수 있는 이의 능력을 시험할 수 있다. 혈관모세포를 이어서 단리하고 시험관내에서 증식시킨다. 증식에 사용될 수 있는 배지는 초기 단계 사이토카인 및 HOXB4로 보완된 혈관모세포 성장에 대해 최적화된 무혈청 메틸셀룰로오스 배지(예, BL-CFU)를 포함한다. 초기 단계 사이토카인은 EPO, TPO, FL, VEGF, BMP 유사 BMP2, BMP4 및 BMP7을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, BMP3은 제외한다. 특정 실시형태에서, 에리스로단백질(EPO)을 배지에 첨가한다. 추가의 실시형태에서, EPO, TPO 및 FL을 배지에 첨가한다.

[0229] 따라서, 혈관모세포 증식용 배지는 VEGF, SCF, EPO, BMP-4 및 HoxB4를 포함할 수 있으며, 특정 실시형태에서 배지는 TPO 및 FL을 더 포함할 수 있다. 약 3.5 일 동안 배양된 EB로부터 제조된 단일 세포를 수집하고, 2 내지 5 분 동안 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA(Invitrogen)로 해리하고, 22G 바늘을 3 내지 5 회 통과시켜 단일 세포 현탁액을 제조하였다. 5 분 동안 1,000 rpm에서 원심분리하여 세포를 수집하였다. 세포 펠렛을 50 내지 200 ㎕의 Stemline I 배지에 재현탁시켰다. 혈관모세포를 증식시키기 위해, $2\sim5\times10^5$ hES 세포의 분화에서 유도된 단일 세포 현탁액을, 50 ng/㎖의 Tpo 및 FL을 함유하거나 함유하지 않고, Isocve의 MDM 중 1.0%의 메틸셀룰로오스, 1 내지 2%의 소혈청 알부민, 0.1 mM의 2-머캅토에탄올, 10 ㎍/㎖의 rh-인슐린, 200 ㎍/㎖의 철로 포화된 인간 트랜스페린, 20 ng/㎖의 rh-GM-CSF, 20 ng/㎖의 rh-IL-3, 20 ng/㎖의 rh-IL-6, 20 ng/㎖의 rh-G-CSF, 3-6 단위/㎖의 rh-Epo, 50 ng/㎖의 rh-SCF, 50 ng/㎖의 rh-VEGF, 50 ng/㎖의 rh-BMP-4 및 1.5 ㎍/㎖의 tPTD-HoxB4를 함유하는 2 ㎖의 혈관모세포 증식 배지(HGM)와 혼합하였다. 세포 혼합물을 초저 플레이트에 놓고, 4 내지 6 일 동안 5% CO_2 내에서 37℃에서 배양하였다.

[0230] 특정 상황에서는, 환자 또는 환자 친척으로부터 혈관모세포를 얻어 상기 혈관모세포를 시험관내에서 증식시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 상황은 예컨대 화학 요법 또는 방사선 치료를 시작하기로 계획되어 있는 환자, 또는 (환자 자신의 줄기 세포를 이용하는) 자가 HSC 이식을 이용할 수 있는 다른 상황을 포함한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 증식된 혈관모세포 또는 혈관모세포 혈통 세포를 이용하여, 세포에 기초한 치료를 필요로 하는 환자(예컨대, 조혈 재구성 또는 치료, 또는 허혈을 비롯한 혈관 손상의 치료 또는 혈관 성장을 필요로 하는 환자, 하기 참조)를 치료하는 방법으로서, 혈관모세포를 환자 또는 환자 친척의 골수, 혈액 또는 다른 조직으로부터 얻는 치료 방법을 제공한다. 따라서 특정 실시형태에서, 혈관모세포(또는 혈관모세포 혈통 세포)를 필요로 하는 환자의 치료 방법은 환자 또는 환자 친척으로부터 혈관모세포를 단리하는 단계를 포함할 수 있다. 환자 또는 환자 친척으로부터 단리한 혈관모세포는 본 발명의 방법에 따라 시험관내에서 증식시키고 이어서 환자에게 투여할 수 있다. 대안적으로, 증식된 혈관모세포는 더 성장시켜 환자 치료 전에 조혈 세포 또는 내피 세포를 생성시킬 수 있다.

[0231] 체세포 핵 이식과 같은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 이러한 환자로부터 인간 ES 세포를 얻을 수도 있다. 그 다음, 본 발명의 방법을 이용하여 이 환자의 혈관모세포를 생성시키고, 그의 고유한 ES 세포로부터 증식시킨다. 이들 혈관모세포 또는 이의 혈통 유도체를 그 환자에게 또는 그의 친척에게 투여할 수 있다.

[0232] 본 발명의 방법을 사용하여, 인간 혈관모세포를 증식시켜 이어서 다양한 치료 및 임상 분야에서 사용될 수 있는 상업적 대량에 도달하도록 한다. 또한, 본원에 개시된 방법으로 얻은 혈관모세포를 더 분화시켜 임상 분야에서 사용하기 위한 조혈 세포 또는 내피 세포 계통을 발생시킬 수 있다.

[0233] 인간 ES 세포로부터 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키는 본 발명의 방법으로부터 얻은 혈관모세포는 적어도 내피 세포 또는 조혈 세포로 분화할 잠재성을 가진다(즉, 그것들은 적어도 양쪽 잠재성임). 다른 혈관모세포 또한 양쪽 잠재성일 수 있다. 그러나 다른 혈관모세포는 조혈 세포 및 내피 세포 외에 다른 세포로 분화될 수도 있다(즉, 그것들은 복합 또는 다수 잠재성임).

[0234] ***복잡성이 감소된 혈관모세포를 얻기 위한 인간 배아 줄기 세포 중 MHC 유전***자의 처리

[0235] 본 발명에 따른 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키는 방법에 있어서 출발 지점으로서 사용되는 인간 배아 줄

기 세포는 또한 인간 배아 줄기 세포의 라이브러리로부터 유래될 수 있고, 이들 중 각각은 인간 개체군에 존재하는 1 이상의 MHC 대립유전자에 반접합 또는 동형접합이다. 소정의 실시형태에 있어서, 상기 줄기 세포 라이브러리의 각 구성원은 상기 라이브러리의 나머지 구성원에 비해 상이한 세트의 MHC 대립유전자에 대해 반접합 또는 동형접합이다. 소정의 실시형태에 있어서, 상기 줄기 세포의 라이브러리는 인간 개체군에 존재하는 모든 MHC 대립유전자에 대해 반접합 또는 동형접합이다. 본 발명에 있어서, 1 이상의 조직적합 항원 유전자에 동형접합인 줄기 세포는 1 이상의 (및 약간의 실시형태에서, 모든) 그러한 유전자에 대해 무접합인 세포를 포함한다. 유전자 좌에 대한 무접합은 상기 유전자가 그 유전자 좌에서 0, 즉 그 유전자의 대립유전자 둘 다가 소실되거나 비활성화된 것을 의미한다. 모든 MHC 유전자에 무접합인 줄기 세포는 당업계에 공지된 표준 방법, 예컨대 유전자 타겟팅 및/또는 이중접합성의 결손(LOH)에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 US 20040091936, US 20030217374 및 US 20030232430, 및 US 가출원 번호 제60/729,173호를 참고한다(이들 모두의 개시내용은 본원에 참고로서 포함됨).

[0236] 따라서, 본 발명은 MHC 복잡성이 감소된 혈관모세포의 라이브러리를 포함하는 혈관모세포를 얻는 방법에 관한 것이다. MHC 복잡성이 감소된 혈관모세포 및 혈관모세포 계통 세포는 그것이 환자 일치와 관련된 어려움들을 제거할 때 치료 분야에서 이용가능한 세포의 공급이 증가할 것이다. 그러한 세포는 MHC 복합체의 유전자에 대해 반접합 또는 동형접합이 되도록 처리된 줄기 세포로부터 유래될 수 있다.

[0237] 인간 ES 세포는 세포의 MHC 복합체에서 자매 염색체의 대립유전자 중 하나로의 변형을 포함할 수 있다. 유전자 타겟팅과 같은 유전자 변형을 생성시키는 다양한 방법은 MHC 복합체에서 유전자를 변형시키는 데 이용될 수 있다. 또한, 상기 세포에서 MHC 복합체의 변형된 대립유전자는 이어서 동형접합이 되도록 처리하여, 동일한 대립유전자가 자매 염색체에 존재하도록 할 수 있다. 이중접합성의 결손(LOH)과 같은 방법은 세포가 MHC 복합체에서 동형접합 대립유전자를 가지도록 처리하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 어버이 대립유전자로부터의 한 세트의 MHC 유전자 중 1 이상의 유전자가 타겟이 되어 반접합 세포를 생성시킬 수 있다. 다른 세트의 MHC 유전자는 유전자 타겟팅 또는 LOH에 의해 제거되어 널(null) 세포주를 만들 수 있다. 이 널 세포주는 다수의 HLA 유전자, 또는 개별 유전자를 떨어뜨려 다른 점에서 균일한 유전적 배경을 가진 반접합 또는 동형접합 뱅크를 제조하는 배아 세포주로서 또한 사용될 수 있다.

[0238] 일 양태에 있어서, 라이브러리의 각 구성원이 1 이상의 HLA 유전자에 대해 동형접합인 ES 세포주의 라이브러리는 본 발명의 방법에 따라 혈관모세포를 유도하는 데 사용된다. 다른 일 양태에 있어서, 본 발명은 혈관모세포 (및/또는 혈관모세포 계통 세포)의 라이브러리를 제공하는데, 이때 몇개의 ES 세포주가 선택되어 혈관모세포로 분화된다. 이러한 혈관모세포 및/또는 혈관모세포 계통 세포는 세포계 치료가 필요한 환자에게 사용될 수 있다.

[0239] 따라서, 본 발명의 소정의 실시형태는 복잡성이 감소된 배아 줄기 세포로부터 유래된 인간 혈관모세포, 조혈모세포, 또는 인간 내피 세포를 이를 필요로하는 환자에게 투여하는 방법에 관한 것이다. 소정의 실시형태에서, 이 방법은 (a)인간 혈관모세포, 조혈모세포 또는 인간 내피 세포를 그 또는 그녀에게 투여하는 것을 포함하는 치료가 필요한 환자를 확인하는 단계; (b) 환자의 세포 표면에서 발현된 MHC 단백질을 확인하는 단계; (c) 본 발명의 시험관내 인간 혈관모세포를 생성 및 증식시키는 방법에 의해 제조된, MHC 복잡성이 감소된 인간 혈관모세포의 라이브러리를 제공하는 단계; (d) 이 환자의 MHC 단백질을 그 또는 그녀의 세포에 일치시키는 라이브러리로부터 인간 혈관모세포 세포를 선택하는 단계; (e) 선택적으로 단계 (d)에서 확인된 인간 혈관모세포 세포를 인간 조혈모세포, 내피 세포 또는 둘 다, 또는 필요에 따라 이들 두 계통 중 하나 또는 둘 다에서 추가 분화되는 세포로 분화시키는 단계; (f) 단계 (d) 및/또는 (e)로부터의 임의의 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 이 방법은 지역 센터, 예컨대 병원, 클리닉, 진료실 및 다른 건강 관리 시설에서 수행될 수 있다. 또한, 환자에게 일치하는 것으로 선택된 혈관모세포는, 적은 세포수로 저장되는 경우, 환자 치료에 앞서 증식될 수 있다.

[0240] ***인간 혈관 콜로니 형성 세포/혈관모세포***

[0241] 소정의 양태에 있어서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공한다. 이들 세포는 다양한 치료 및 다른 용도를 가진 유일한 초생 세포 유형이다. 또한, 이 세포 유형은 적어도 조혈 및/또는 내피 계통의 진화를 연구하는 데 중요한 도구를 제공한다. 이처럼, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 조성물 및 다양한 조제물(약학 조제물 포함) 뿐 아니라, 혈관 콜로니 형성 세포로부터 부분적 또는 정기적으로 분화된 1 이상의 세포 유형을 포함하는 조성물 및 조제물(약학 조제물 포함)에 관한 것이다.

[0242] "혈관모세포" 및 "혈관 콜로니 형성 세포"라는 용어는 본 출원 전체에서 교환하여 사용될 것이다. 이들 세포는 이에 국한 되는 것은 아니나 1 이상의 마커의 발현(RNA 또는 단백질) 또는 발현 부족(RNA 또는 단백질)을 포함

하는 다수의 구조적 및 기능적 특성을 기초로 기술될 수 있다. 혈관 콜로니 형성 세포는 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 또는 내피 세포 유형을 발생시킬 수 있다. 혈관 콜로니 형성 세포는 양쪽 잠재성이고 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 및 내피 세포 유형을 발생시킬 수 있는 것이 바람직하다. 이처럼, 본 발명의 혈관 콜로니 형성 세포는 적어도 단일 잠재성이고, 바람직하게는 양쪽 잠재성이다. 추가적으로 하지만, 혈관 콜로니 형성 세포는 더 큰 수준의 진화 잠재성을 가질 수 있고, 소정의 실시형태에 있어서, 분화하여 다른 계통의 세포 유형을 발생시킬 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 상기 혈관 콜로니 형성 세포는 분화하여 심장 세포(예를 들어, 심근 세포) 및/또는 평활근 세포와 같은 다른 중배엽 유도체를 생성할 수 있다.

[0243] 또한, 혈관 콜로니 형성 세포는 그들의 구조적 특성에 기초하여 확인되거나 특성화될 수 있다. 구체적으로, 그리고 소정의 실시형태에 있어서, 이들 세포는 그것들이 단지 느슨하게 서로 부착되어 있다(다른 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착한다)는 점에서 유일하다. 이들 세포가 서로 단지 느슨하게 부착하고 있기 때문에, 혈관 콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 단지 기계적인 해리 기술을 이용하여 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이 단일 세포로 해리될 수 있다. 상기 세포는 효소적 해리 또는 기계적 및 효소적 해리의 조합보다는 기계적 해리만으로, 상기 세포의 생존 능력을 실질적으로 손상시키지 않으면서 상기 배양물 또는 콜로니를 해체시키기에 충분하다. 즉, 기계적인 해리는 세포 집합체의 효소적 해리에 이어 관찰되는 것과 비교할 때 실질적인 세포 손상 또는 죽음을 야기할 정도로 많은 힘을 필요로 하지 않는다.

[0244] 또한, 혈관 콜로니 형성 세포는 1 이상의 마커의 발현 또는 발현 부족(유전자 농도 또는 단백질의 농도로 평가)에 기초하여 확인되거나 특성화될 수 있다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 다음의 세포 표면 마커: CD34, KDR, CD133, 또는 CD31 중 1 이상의 발현 부족을 기초로 확인되거나 특성화될 수 있다(예를 들어, 상기 세포는 상기 마커 중 1 이상, 2 이상, 3 이상 또는 4 이상의 발현 부족을 기초로 특성화될 수 있음). 부가적으로 또는 대안으로, 혈관 콜로니 형성 세포는 GATA2 및/또는 LMO2의 발현에 기초하여 확인되거나 특성화될 수 있다. 부가적으로 또는 대안으로, 혈관 콜로니 형성 세포는 표 2에서 분석한 1 이상의 마커의 발현 또는 발현 부족(유전자의 농도 또는 단백질의 농도로 평가)에 기초하여 확인되거나 특성화될 수 있다.

[0245] 본 발명의 혈관 콜로니 형성 세포는 이러한 구조적 또는 기능적 특성 중 하나 또는 임의의 조합에 기초하여 확인되거나 특성화될 수 있다. 이들 세포가 임의의 다수 공급원, 예를 들어 배아 조직, 태아 조직 또는 주생기 조직으로부터 유래될 수 있지만, "혈관 콜로니 형성 세포"라는 용어는 공급원에 관계없이, 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있고 전술한 구조적 또는 기능적 특성 중 1 이상을 가지는 세포에 적용된다.

[0246] 설명하기 위해, 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 하기의 구조적 특성 중 1 이상을 가진다: (a) 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있음; (b) 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 및 내피 세포 유형을 생성할 수 있음; (c) 서로(다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에) 느슨하게 부착함; (d) CD34 단백질을 발현하지 않음; (e) CD31 단백질을 발현하지 않음; (f) KDR 단백질을 발현하지 않음; (g) CD133 단백질을 발현하지 않음; (h) GATA2 단백질을 발현함; (i) LMO2 단백질을 발현함. 소정의 실시형태에 있어서, 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 본원에 기재된 구조적 또는 기능적 특성 중 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상 또는 9 이상을 가진다.

[0247] 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공한다. 이러한 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있다. 소정의 실시형태에 있어서, 상기 세포는 다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착하는 것을 특징으로 한다. 대안으로 또는 부가적으로, 이들 세포는 또한 소정의 마커의 발현 또는 발현 부족을 기초로 기술될 수 있다. 예를 들어, 이들 세포는 또한 하기의 단백질: CD34, KDR, CD133 및 CD31 중 1 이상의 발현 부족을 기초로 기술될 수 있다.

[0248] 전술한 바와 같이, 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 흥미로운 특성들 중 하나는 서로 느슨하게 부착하고 있다는 것이다. 이들 세포는 단지 서로 느슨하게 부착하고 있기 때문에, 혈관 콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 단지 기계적 해리 기술에 의해 효소적 해리 기술의 필요 없이 단일 세포로 해리될 수 있다. 상기 세포는 서로 충분히 느슨하게 부착하고 있어서, 효소적 해리 또는 이들의 조합보다는 기계적 해리만으로 상기 세포의 생존 능력을 실질적으로 손상시키지 않고 상기 배양물 또는 콜로니를 해체시키기에 충분하다. 즉, 기계적 해리는 세포 손상 또는 죽음을 야기할 정도로 많은 힘을 필요로 하지 않는다.

[0249] 이 특성은 상기 세포를 기술하고 그것들을 다른 세포 유형과 표현형으로 구분하는 데 유용할 뿐 아니라, 중요한 치료상 의미를 가진다. 예를 들어, 비교적 대량($1x10^6$보다 크거나 또는 심지어 $1x10^7$보다 크거나 또는 심지어

$1x10^8$보다 큼)의 혈관 콜로니 형성 세포가 응혈 또는 색전, 또는 다른점에서 폐에서의 멈춤을 야기할 위험이 실질적으로 적은 인간 또는 다른 동물에 주입될 수 있다. 이는 세포상 치료에 있어서 중요한 진보이다. 비교적 대량의 세포를 안전하게 투여하는 능력은 세포성 치료가 증가하는 다수의 질환 및 병태의 효과적인 치료에 있어서 실용적이고 가능하도록 한다.

[0250] "느슨하게 부착된(부착성이 약한)"이란 용어는 앞에서 정성적으로 기술되었고, 서로에 대한 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 행위를 가리킨다. 혈관 콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 단지 기계적 해리 기술을 이용하여 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이 단일 세포로 해리될 수 있다. 상기 세포는 서로 충분히 느슨하게 부착하고 있어서, 효소적 해리 또는 이들의 조합보다는 기계적 해리만으로 상기 세포의 생존 능력을 실질적으로 손상시키지 않고 상기 배양물 또는 콜로니를 해체시키기에 충분하다. 즉, 기계적 해리는 세포 손상 또는 죽음을 야기할 정도로 많은 힘을 필요로 하지 않는다.

[0251] 또한, 상기 용어는 더욱 정량적으로 기술될 수도 있다. 예를 들어 그리고 소정의 실시형태에 있어서, "느슨하게 부착한"이란 용어는 상기 배양물 중 세포의 50% 이상이 단지 기계적 해리 기술을 이용하고 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이 단일 세포로 해리될 수 있는 혈관 콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니를 가리키는 데 사용된다. 다른 실시형태에 있어서, 상기 용어는 상기 배양물 중 세포의 60%, 65%, 70% 또는 75% 이상이 단지 기계적 해리 기술을 이용하고 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이 단일 세포로 해리될 수 있는 배양물을 가리킨다. 또 다른 실시형태에 있어서, 상기 용어는 상기 배양물 중 세포의 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 심지어 100%가 단지 기계적 해리 기술을 이용하고 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이 단일 세포로 해리될 수 있는 배양물을 가리킨다.

[0252] 단지 기계적 해리 기술을 이용하고 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 해리시키는 능력은, 기계적 해리에 따른 상기 세포의 건강 및 생존 능력을 기초로 또한 평가될 수 있다. 즉, 효소적 해리가 없는 해리가 상기 세포 중 상당 수를 손상시키거나 죽일 정도로 많은 기계적 힘을 요구하는 경우, 상기 세포는 본원에서 정의한 바와 같이 느슨하게 부착하고 있지 않다. 예를 들어 그리고 소정의 실시형태에 있어서, "느슨하게 부착한"이란 용어는 단지 기계적 해리 기술을 이용하여 효소적 해리 기술에 대한 필요 없이, 동일한 세포를 효소적 해리 기술을 이용하여 해리한 것과 비교할 때, 상기 세포의 건강 또는 생존 능력에 실질적인 손상을 주지 않고 단일 세포로 해리될 수 있는 세포의 배양물을 가리킨다. 예를 들어, 상기 세포의 건강 또는 생존 능력은 동일한 세포의 배양물을 효소적 해리 기술을 이용하여 해리하는 경우에 관찰한 것과 비교할 때, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%보다 적게, 또는 심지어는 1%보다 적게 감소된다.

[0253] 실예가되는 효소적 해리 기술로는, 이에 국한되는 것은 아니지만, 트립신, 콜라게나제, 또는 세포-세포 또는 세포-매트릭스 상호작용을 파괴하는 다른 효소를 사용한 처리가 있다. 실예가되는 기계적 해리 기술로는, 이에 국한되는 것은 아니지만, 파이펫을 통한 1 이상의 통과가 있다.

[0254] 본 발명에 따르는 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 구조적으로 및 기능적으로 정의된다. 이러한 세포는 배아 조직, 태아 조직, 주상 조직, 및 심지어 성인 조직을 포함하는 많은 공급원들 중 임의의 공급원으로부터 생성될 수 있다. 예의 방식으로, 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 인간 배아 줄기 세포, 다른 배아 유도 세포(배반포, 난할구, ICM, 배아, 영양막/영양막배엽 세포, 영양막 줄기 세포, 원시 생식 세포, 배아 생식 세포 등), 양수, 양막 줄기 세포, 태반, 태반 줄기 세포, 및 탯줄로부터 생성될 수 있다.

[0255] 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 조성물, 및 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 제제(약학 제제 포함)를 제공한다. 본 발명의 이러한 양태의 특정한 특징은 하기 자세히 기재되어 있다. 본 발명은 본 발명의 하기 양태 및 실시형태의 임의의 조합을 포함한다.

[0256] 하나의 양태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공한다. 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착된다. 특정 실시형태에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 하기 단백질 중 하나 이상을 발현하지 않는다(예를 들면, 세포는 하기 단백질 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상을 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(예를 들면, 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다.

[0257] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공한다. 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는

내피 세포 유형을 생성할 수 있고, 세포는 임의의 하기 단백질을 발현하지 않는다: CD34, CD31, KDR, 및 CD133. 특정 실시형태에서, 세포는 다른 인간 혈관 콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착된다. 다른 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(예를 들면, 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다.

[0258] 또 다른 양태에서, 본 발명은 실질적으로 정제된 개체수의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 세포는 분화하여 적어도 조혈 및 내피 세포 유형을 생성할 수 있고, 세포는 서로 느슨하게 부착된다. 특정 실시형태에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 하기 단백질 중 하나 이상을 발현하지 않는다(예를 들면, 세포는 하기 단백질 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상을 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다.

[0259] 또 다른 양태에서, 본 발명은 배아 조직으로부터 분화된 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 다른 느슨하게 부착된다. 특정 실시형태에서, 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있고, 세포는 서로 느슨하게 부착된다. 특정 실시형태에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 하기 단백질 중 하나 이상을 발현하지 않는다(예를 들면, 세포는 하기 단백질 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상을 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다.

[0260] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공하고, 그 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 서로 느슨하게 부착된다. 특정 실시형태에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 하기 단백질 중 하나 이상을 발현하지 않는다(예를 들면, 세포는 하기 단백질 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상을 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다.

[0261] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 제제를 제공하고, 그 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있다. 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다. 특정 실시형태에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 하기 단백질 중 하나 이상을 발현하지 않는다(예를 들면, 세포는 하기 단백질 중 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 또는 4개 이상을 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다. 약학 제제는 임의의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.

[0262] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함하는 약학 제제를 제공하고, 그 혈관 콜로니 형성 세포는 임의의 하기 단백질을 발현하지 않는다: CD34, CD31, KDR, 및 CD133. 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 생성할 수 있다. 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 서로 느슨하게 부착된다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 마커 중 하나 이상(1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)을 발현하거나 또는 발현하지 않는다. 다른 특정 실시형태에서, 세포는 표 2에 기재된 바와 같은 발현 프로파일을 갖는다. 약학 제제는 임의의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.

[0263] 상술한 것 중 특정 실시형태에서, 조성물 또는 약학 제제는 1×10^5 이상의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한

다. 상술한 것 중 다른 특정 실시형태에서, 조성물 또는 약학 제제는 1×10^6 이상, 5×10^6 이상, 1×10^7 이상, 또는 1×10^7 초과의 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 포함한다.

[0264] 추가 세포, 조성물, 및 제제는 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 부분 또는 말단 분화된 세포를 포함한다. 예를 들면, 본 발명은 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 하나 이상의 조혈 및/또는 내피 세포 유형을 포함하는 조성물 및 제제를 포함한다. 예시적인 조혈 세포 유형은 조혈 줄기 세포, 혈소판, RBC, 림프구, 거핵구 등을 포함한다. 추가 예의 방식으로, 본 발명은 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된, 하나 이상의 다른 세포 유형, 예를 들면, 하나 이상의 부분 또는 말단 분화된 중배엽성 세포 유형을 포함하는 조성물 및 제제를 포함한다.

[0265] 상술한 것 중 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 세포 또는 그 세포로부터 부분 또는 말단 분화된 세포의 냉동보존 제제를 제공한다.

[0266] 상술한 것 중 특정 실시형태에서, 본 발명은 인간 혈관 콜로니 형성 세포, 또는 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 조성물 또는 제제의 치료 용도를 제공한다. 이러한 세포 및 제제는 명세서를 통해서 기술된 것뿐만 아니라, 혈액 은행 산업에서의 임의의 증상 또는 질환 치료시 사용할 수 있다. 추가로, 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 세포, 또는 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 조성물 또는 제제는 명세서를 통해서 기술된 것뿐만 아니라, 혈액 은행 산업에서의 임의의 증상 또는 질환 치료시 치료학적으로 사용할 수 있다.

[0267] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포 치료학적으로 사용할 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 내피 및 조혈 계보의 분화를 연구하기 위해 또는 진단 검사에서 예를 들면, (i) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 유지시키기 위해 또는 (ii) 인간 혈관 콜로니 형성 세포의, 하나 이상의 부분 또는 말단 분화된 세포 유형로의 분화를 촉진시키기 위해 사용할 수 있는 인자를 확인하기 위해 사용할 수 있다. 추가로, 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 실험실내 또는 생체내 사용에 대한 하나 이상의 부분 또는 말단 분화된 세포 유형을 생성시키기 위해 사용할 수 있다.

[0268] 본 발명의 인간 혈관 콜로니 형성 세포는, 본원에 기재된 임의의 질환 또는 상태의 치료시를 포함(이로 제한되지 않음)하여, 본원에 기재된 임의의 방법 또는 이용분야에서 사용할 수 있다.

[0269] ***실험실내에서 증식된 혈관모세포를 포함하는 세포 제제***

[0270] 본 발명의 특정 실시형태에서, 포유동물(인간 포함) 혈관모세포는 상업용 수량에 도달하도록 증식되고 다양한 치료학적 및 임상적 이용분야에서 사용한다. 특정 실시형태에서, 혈관모세포는 10,000 내지 4 백만(또는 이상)의 차수로 세포 수에 도달하도록 증식된다. 이러한 세포 수는 출발 초기 제제의 3 내지 4 일 내에 도달할 수 있다. 따라서, 본 발명은 다량의 혈관모세포를 포함하는 제제로서, 상기 제제가 적어도 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1 백만, 2 백만, 3 백만 또는 4 백만의 세포를 포함하는 제제에 관한 것이다.

[0271] 또한, 본 발명은 다량의 혈관모세포를 포함하는 용액, 조성물, 및 제제로서, 상기 용액, 상기 조성물, 및 상기 제제가 적어도 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 1 백만, 2 백만, 3 백만 또는 4 백만의 세포를 포함하는 용액, 조성물, 및 제제에 관한 것이다. 혈관모세포는 인간일 수 있다.

[0272] 본 발명의 다른 양태는 본원에 개시된 방법에 의해 수득된 혈관모세포를, 임상적 이용분야에서 후속적으로 사용되는, 조혈 또는 내피 세포 계보, 또는 계보 둘 다로 분화시키는 것에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 다량의 조혈 또는 내피 세포를 포함하는 세포 제제에 관한 것이다. 본 발명은 또한 본원에 개시된 방법에 의해 수득된 혈관모세포를 조혈 및 내피 세포 이외의 다른 세포 계보로 분화시키는 것에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 다량의 다른 혈관모세포 분화 세포를 포함하는 세포 제제에 관한 것이다.

[0273] 다량(예, 천만 또는 백만)의 혈관모세포를 포함하는 조성물 및 제제는 본원에 기재된 바대로 수득한 혈관모세포를 증식시킴으로써 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명은 ES 세포(예를 들면, 인간 ES 세포) 또는 제대혈, 말초혈 또는 골수혈로부터 수득된 혈관모세포를 증식시킴으로써 성취된 다량의 혈관모세포를 포함하는 조성물 및 제제에 관한 것이다. 추가로, 증식 방법으로서, 예를 들면, 마우스, 래트, 소, 또는 비인간 영장류의 혈관모세포에 이용된다. 또한, 본 발명은 인간 이외의 다른 종의 다량의 혈관모세포를 포함하는 조성물 및 제제에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 증식된 혈관모세포는 이분화성(bi-potential)일 수 있다. 즉, 그 세포는 내피 세포 또는 조혈 줄기 세포로 분화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 인간 ES 세포로부터 생성되고 증식된 인간 혈관모세포는 이분화성이다. 혈관 콜로니 형성 세포는 적어도 조혈 세포 유형 또는 내피 세포 유형을 제공하기 위해 분화될 수 있다. 혈관 콜로니 형성 세포는 바람직하게는 이분화성이고 적어도 조혈 세포 유형 및 내피 세포 유형을 제공하기 위해 분화될 수 있다. 그러한 기능에 있어서, 본 발명의 혈관 콜로니 형성 세포는 적어도 단일분

화성(uni-potential), 바람직하게는 이분화성이다. 추가로 그러나, 혈관 콜로니 형성 세포는 높은 정도의 발생 잠재력을 가질 수 있고, 특정 실시형태에서, 다른 계보의 세포 유형을 제공하기 위해 분화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 다른 중배엽성 분화체, 예를 들면, 심장 세포(예를 들면, 심근세포) 및/또는 평활근 세포를 제공하기 위해 분화될 수 있다.

[0274] ***포유동물 혈관모세포 세포 마커***

[0275] 상기 기재된 바대로, 혈관 콜로니 형성 세포는 성체 내피 또는 조혈 세포의 특징적인 특정한 특성이 부족하다. 그러나, 이러한 혈관 콜로니 형성 세포 또는 혈관모세포는, 예를 들면, CD71+, GATA-1 및 GATA-2 단백질, CXCR-4, 및 TPO 및 EPO 수용체 등과 같은 다양한 마커에 의해 확인할 수 있다. 추가 실시형태에서, 혈관모세포는 LMO-2를 발현한다. 추가로, 혈관모세포는 다른 마커의 부재 또는 낮은 발현에 의해 특징지어진다. 따라서, 혈관모세포는 CD34- CD31-, 및 KDR-일 수 잇다. 추가 실시형태에서, 혈관모세포 CD34-, CD31-, KDR-, 및 CD133-일 수 있다.

[0276] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식된 혈관모세포는 표 2에 기재된 임의의 하나 이상의 마커의 존재 또는 부재에 의해 특징지어진다. 예를 들면, 혈관모세포는 "BL-CFC"하에 "-"로 표시된 표 2에 기재된 임의의 하나 이상의 마커의 발현에 대한 시험에 음성일 수 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 혈관모세포는 CD34 발현에 대해 음성일 수 있다. 세포는 추가로 또는 대안적으로 CD31, CD133, 및/또는 KDR 발현에 대해 음성일 수 있다. 추가 실시형태에서, 혈관모세포는 "+"로 표 2에 표시된 임의의 마커를 발현할 수 있다. 예를 들면, 세포는 마커 중 하나 이상을 발현할 수 있다. LMO-2 및 GATA-2. 마커의 발현은, 예를 들면, 단백질 발현을 시험하기 위한 면역조직화학 또는 면역압지(immunoblotting), 또는 RNA 수준에서 발현을 시험하기 위한 mRNA 분석과 같은 임의의 방법에 의해 검정할 수 있다.

[0277] ***혈관모세포 계보 세포의 분화***

[0278] 또한, 본 발명의 방법 및 세포 제제는 혈관모세포 분화 세포에 관한 것이다. 본 발명에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관모세포 및 본 발명의 방법에 의해 증식된 포유동물 혈관모세포는 실험실내에서 분화하여 조혈 세포(조혈 줄기 세포(HSC) 포함) 또는 내피 세포뿐만 아니라, 이러한 2종 계보에서 추가로 분화된 세포를 수득할 수 있다. 이러한 세포는 하기 기재된 치료학적 및 상업적 이용분야에서 후속적으로 사용할 수 있다.

[0279] 특정 실시형태에서, 조혈 세포는 혈관모세포를 무혈청 BL-CFU에서 3~10 일 동안 성장시켜 유도한다. 또다른 실시형태에서, hES-유도된 BL-CFC 세포의 단일 세포 현탁액을 10~14 일 동안 성장시킨다. 무혈청 조건이 확대 생산 및 조절 지침과의 적합성뿐만 아니라 비용 감소를 촉진하는 한 무혈청 조건을 유지하는 것이 가장 바람직하다. 본 발명의 혈관모세포는 또한 무혈청 Hem-배양으로 성장시킬 수 있으며(Bhatia et al . 1997 J Exp Med (186) : 619-624), 이는 인간 조혈모세포를 유지시키고 BSA(예를 들어, 1% BSA), 인슐린(예를 들어, 5 μg/ml 인간 인슐린), 트랜스페린 배지 또는 트랜스페린(예를 들어, 100 μg/ml 인간 트랜스페린), L-글루타민, 베타-메르캅토에탄올(예를 들어, 10^{-4} M) 및 성장 인자를 포함한다. 성장 인자는 SCF(예를 들어, 300 ng/ml), 과립구-콜로니-자극 인자(G-CSF)(예를 들어, 50 ng/ml), Flt-3(예를 들어, 300 ng/ml), IL-3(예를 들어, 10 ng/ml) 및 IL-6(예를 들어, 10 ng/ml)를 포함할 수 있다. 혈관모세포로부터 조혈 세포를 얻는 데 유용한 다른 인자로는 혈소판형성인자(TPO) 및 VEGF(예를 들어, 문헌[Wang et al. 2005 Ann NY Acad Sex (1044) : 29-40] 참조) 및 BMP-4를 들 수 있다. 상기 혈관모세포는 또한 다혈통 조혈 성장 인자 칵테일을 보충한 무혈청 메틸셀룰로스 배지에서 성장할 수 있다. 따라서, 혈관모세포는 조기 활성 성장 인자(예를 들어, c-kit 리간드, flt3 리간드), 다혈통 성장 인자(예를 들어, IL-3, 과립구 대식세포-CSF(GM-CSF)) 및 단일혈통 성장 인자(예를 들어, G-CSF, M-CSF, EPO, TPO)), VEGF 및 bFGF를 보충하고 BSA, 포화 인간 트랜스페린, 인간 LDL를 포함하는 이스코브 개질된 둘베코 배지(IMDM: Iscove modified Dulbecco medium) 중 메틸셀룰로스에서 성장할 수 있다. 대안적으로, 혈관모세포는 조혈 세포(예를 들어, 적혈구, 대식세포 또는 과립구)의 한 유형의 성장을 지원하는 단일혈통 성장 인자를 포함하는 배지에서 성장할 수 있다.

[0280] 한 실시형태에서, 혈관모세포 콜로니는 Stemline I 배지에서 재현탁된다. 이어서, 세포를 무혈청 조혈 CFU 배지(H4436, Stem Cell Technologies™) 1 ml + tPTD-HoxB4 및 0.5% EX-CYTE(Serologicals Proteins Inc.™) 1.5 μg/ml와 혼합한다. 이어서, 세포 혼합물을 세포 배양 미처리 플레이트 상에서 플레이팅하고, 37℃에서 10~14 일 동안 항온처리하였다. 초기 플레이팅 10~14 일 후 발생하는 조혈 CFU는 형태학적으로, 예컨대 Wright-Giemsa 염료에 의해 염색되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0281] 조혈 세포는 또한 당업계에 공지된 기타 조건을 이용하여 혈관모세포로부터 유도할 수 있다(예를 들어, IMDM,

30% 소 태아 혈청(FCS), 1% 소혈청 알부민(BSA) , 10^{-4} M 베타-메르캅토에탄올 및 2 mM L-글루타민을 포함하는 배지에서). 또한, 다른 실시형태에서, 염기성 섬유아세포 성장 인자를 사용하여 EB 내에서 BL-CFC 둘 모두의 빈도를 향상시키고, 조혈 분화를 촉진할 수 있다(Faloon et al. 2000 Development (127) : 1931-1941). 또다른 실시형태에서, 성장 인자 조혈(HAPO)을 이용하여 혈관모세포의 성장 및 조혈 분화를 촉진한다(Liu et al. 2004 Blood (103) : 4449-4456). 조혈 세포로의 분화는, 예를 들어 CD45 상태(CD45+) 및 CFU 분석에 의해 평가할 수 있다.

[0282] 조혈 세포를 형성하기 위해, 인간 혈관모세포는 CFU-배지에서 3~10 일 동안, 또는 임의로 보다 긴 시간(예를 들어, 10~24 일) 동안 성장할 수 있다. 본 발명의 인간 혈관모세포는 과립구, 적혈구, 대식세포 및 거핵세포(CFU-GEMM/혼합)를 포함하는 CFU뿐만 아니라, 이후 세포 유형 중 단 하나를 함유하는 유닛을 형성하는 콜로니(예를 들어, CFU-G, CFU-E, CFU-M 및 CFU-GM)를 형성할 수 있다. 특정 실시형태에서, hES-유도된 BL-CFC 세포의 단일 세포 현탁액은 10~14 일 동안 성장하여, 예를 들어 적혈구, 골수, 대식세포 및 다혈통 조혈 세포와 같은 조혈 세포를 유도한다.

[0283] 본 발명의 또다른 양태는 본 원에서 기술된 방법에 의해 수득되고 증식된 인간 혈관모세포, 또는 이에 의해 증식된 포유 동물 혈관모세포로부터 유도된 내피 세포에 관한 것이다. 혈관모세포는 상피 성숙에 바람직한 조건에서 성장할 수 있다.

[0284] 본 발명의 특정 실시형태에서, 내피 세포를 얻기 위해, 혈관모세포를 우선 파이브로넥틴 코팅된 표면으로 플레이팅하고, 3~5 일(또는, 다른 실시형태에서 3~7일 후) 후에 Matrigel의 두꺼운 층으로 재플레이팅하여 내피 세포로의 분화를 지원한다. 상기 조건은 혈관모세포 발달 중에 형성되는 무혈청 조건을 유지시킨다. 대안적으로, 혈관모세포는 공지된 배지에서 성장하여 내피 세포로의 분화를 지원한다. 이러한 조건은, 예를 들어 20% 태아 소혈청(FBS), 50 ng/ml 내피 세포 성장 보충물(즉, 뇌하수체 추출물) , 10 IU/ml 헤파린 및 5 ng/ml 인간 VEGF-A_{165}를 포함하는 Endo-배양을 포함한다(Terramani et al. 2000 In Vitro Cell Dev Biol Anim (36) : 125-132). 당업계에 공지된 또다른 조건으로는 25% FCS/말 혈청을 보충한 배지가 있으며, 일부 실시형태에서는 헤파린(예를 들어, 10 U/ml) , 인슐린 유사 성장 인자(IGF1)(예를 들어, 2 ng) 및 EC 성장 보충물(ECGS, 예를 들어 100 μg)을 보충한 배지가 있다. 성장 인자 VEGF 및 EGF를 또한 HAPO와 함께 사용하여 내피 분화를 지원할 수 있다(Liu et al . 2004). 혈관모세포는 또한 콜라겐 및 파이브로넥틴으로 코팅된 플레이트 상으로 시딩되어, 예를 들어 내피 세포로의 분화를 촉진할 수 있다. 세포는 폰 빌레브란트 인자(vWF: von Willebrand factor) 및 내피 산화질소 합성효소(eNOS) 및 시험관내 내피 네트워크 형성능에 대해서 분석할 수 있다.

[0285] 따라서, 내피 세포를 형성하기 위해, 전술한 방법에 의해 유도된 혈관모세포 콜로니를 피킹하고, 내피 분화로의 제1 단계에 최적화된 파이브로넥틴 코팅된 배양 플레이트 상에 재플레이팅한다. 상기 세포는 EGM-2 또는 EGM-2MV 완전 배지(Cambrex™)에서 프레이팅할 수 있다. 3~5 일, 대안적인 실시형태에서는 3~7 일 후에, 상기 세포를 내피 분화를 지원하는 Matrigel 층과 같은 표면 상에 재플레이팅한다. 항온처리 16~24 시간 후, 분지형 튜브 코드(branched tube-cord)의 형성(예를 들어, 도 8 참조)으로 전형적인 내피 세포 거동이 확인된다. 내피 특정 분석, 예컨대 LDL-흡수는 또한 상기 세포가 내피 특징을 갖는다는 것을 확인하는 데 이용할 수 있다.

[0286] 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명에 의해 생성되고 증식된 인간 혈관모세포 및 본 발명의 방법에 의해 증식된 포유 동물 혈관모세포는 시험관 내에서 분화되어 다른 세포뿐만 아니라, 상기 세포 혈통으로부터 추가로 분화된 세포를 얻을 수 있다. 이러한 추가적인 세포 혈통은 본 발명에 의해 생성되고 증식된 혈관모세포 및 본 발명의 방법에 의해 증식된 포유 동물 혈관모세포로부터 유도될 수 있는데, 이는 상기 혈관모세포가 조혈 및 내피 세포로의 분화 후의 잠재적인 발달 정도가 더욱 클 수 있기 때문이다.

[0287] ***인간 혈관모세포 및 혈관모세포 혈통 세포의 임상적 및 상업적 실시형태***

[0288] *세포 요법*

[0289] 인간 혈관모세포는 생체 내에서 다른 조혈 또는 내피 세포로 분화할 가능성이 있는 반면에, 이들은 상기 2개의 세포 유형이 필요하거나 치료를 향상시킬 수 있는 세포 치료에서 사용될 수 있다. 또한, 혈관모세포 혈통 세포(즉, 조혈 세포 및/또는 내피 세포)를 포함하는 임의의 요법 또는 치료에 의해 처치될 수 있다. 하기 부분은 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식되거나, 본 발명의 방법에 의해 증식된 본 발명의 인간 혈관모세포를 사용하는 방법을 기술한다.

[0290] 본 발명의 특정 실시형태에서, 조혈 세포를 증가시키거나 치료하는 치치 및 혈관 성장 증가 및/또는 혈관 회복 촉진을 위한 처치가 고려된다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 조혈 세포 또는 혈관 성장 또는 회복이 필요한 환자를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 혈관모세포는 피험체의 혈관에 주사하거나, 수술을 통해 피험체의 혈관에 투여할 수 있다. 상기 환자 및 피험체는 인간일 수 있다.

[0291] 본 발명의 특정 실시형태에서, 인간 혈관모세포는 이식에 사용되며, 이와 다른 경우에는 HSC 이식이 사용될 수 있다. 이러한 이식은, 예를 들어 급성 또는 만성 백혈병, 무형성 빈혈 및 다양한 면역결핍증뿐만 아니라, 다양한 비혈액학적 악성 종양 및 자가면역 장애를 앓는 환자의 치료를 위한 조혈 재구성에 이용하고, 높은 투여량의 화학요법 및/또는 방사선요법 후의 치료 유발성 형성부전으로부터 환자를 구제하는 데 이용할 수 있다. 이러한 이식은 생체 내 또는 생체 외에서 실시할 수 있다(예를 들어, 골수 이식).

[0292] 본 발명의 다른 실시형태에서, 인간 혈관모세포는 조혈 재구성 또는 조혈 치료가 필요한 환자를 치료하는 데 사용된다. 이러한 환자로는, 예를 들어 지중해 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈증, 무형성 빈혈증(저형성 빈혈증이라고도 일컬음), 혈구 감소증, 골수 저형성증, 혈소판 결핍증, 조혈 악성 종양, 예컨대 백혈병, 야간 발작성 혈뇨증(PNH) 및 ADA(예를 들어, 탈아미노효소(ADA)-결핍 중증복합면역결핍증(SCID))를 앓는 환자를 들 수 있다.

[0293] 따라서, 본 발명의 구체적인 실시형태는 본 발명의 혈관모세포를 이용한 조혈 재구성 또는 조혈 치료를 필요로 하는 환자의 치료 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 조혈 재구성 또는 치료를 필요로 하는 환자의 치료 방법으로서, 이를 필요로 하는 환자의 선별, 본 발명의 방법에 따른 인간 혈관모세포의 생성과 증식 또는 증식, 상기 인간 혈관모세포의 환자로의 투여를 포함하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 상기 방법은 생성 및 증식되거나 증식된 인간 혈관모세포를 인간 조혈 세포로 분화시킨 후, 조혈 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0294] 대안적인 실시형태는 인간 혈관모세포를 대규모로 생성하고 이를 필요로 하는 환자의 선별에 앞서 보관하는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명의 또다른 실시형태는 조혈 재구성 또는 치료를 필요로 하는 환자의 치료 방법으로서, 이를 필요로 하는 환자의 선택, 전술한 방법에 따라 이미 분리되고 증식된 인간 혈관모세포에 대한 처방, 및 상기 인간 혈관모세포의 상기 환자로의 투여를 포함하는 방법에 관한 것이다. 마찬가지로, 상기 방법은 상기 인간 혈관모세포를 인간 조혈 세포로 분화시키는 것과 상기 조혈 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 추가 실시형태에서, 1 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반접합이거나 동형접합인 혈관모세포를 성장시키고, 임의로 상업적인 양으로 성장시키며, 임의로 기업체가 보관한다. 환자가 이러한 세포 또는 혈관모세포 혈통 세포를 필요로 하는 경우, 임상의 또는 병원은 사업체에 이러한 세포를 주문하게 된다.

[0295] 본 발명의 인간 혈관모세포는 혈관형성 미소 서식 환경 하에서 내피 세포로 증식 및 분화하기 때문에, 인간 혈관모세포는 치료적 방식으로 사용되어 환자의 상처 분위에서 새로운 혈관을 제공하거나 손상 혈관의 회복을 유도할 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명은 새로운 혈관의 성장 또는 손상 혈관계의 회복을 촉진시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 인간 혈관모세포는 내피 손상, 예컨대 심근경색, 뇌졸중 및 허혈성 뇌, 허혈성 사지 및 허혈성 사지를 포함하는 피부 상처 및 당뇨병 동물 또는 환자에게서 발생하는 상처, 및 망막에서의 허혈성 재관류 손상을 치료하는 데 사용할 수 있다. 본 발명의 혈관모세포로 치료할 수 있는 기타 허혈성 병태로는 신장 허혈, 폐 허혈 및 허혈성 심근병증을 들 수 있다. 혈관모세포는 또한 기구 혈관형성 또는 내혈관 스텐트의 발달 후 손상된 혈관의 회복을 돕는데 사용할 수 있다. 혈관모세포는 또한 조직 이식, 수술에서, 및 방사선 손상 후에 사용할 수 있다. 또한, 혈관모세포는 아테롬성 동맥 경화증의 치료 및/또는 진전의 방지뿐만 아니라 전신 경화증 및 레이노드 현상(RP)에서 발생하는 내피 세포 손상을 회복시키는 데 사용할 수 있다(Blann et al. 1993 J Rheumatol. (20) :1325-30).

[0296] 따라서, 본 발명은 혈관 성장의 제공과 이를 필요로 하는 환자의 회복과 관련된 다양한 방법을 제공한다. 한 실시형태에서, 본 발명은 허혈성 조직에서의 새로운 혈관 형성을 이를 필요로 하는 환자에서 유도하는 방법으로서, 상기 환자에 전술한 인간 혈관모세포의 정제된 제제를 유효량으로 투여하여 상기 허혈성 조직에 새로운 혈관이 형성되도록 하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명의 특정 양태는 혈관형성을 이를 필요로 하는 환자에게서 증대시키는 방법으로서, 이를 필요로 하는 환자의 선별, 상기 기술한 바와 같은 인간 혈관모세포의 분리, 및 상기 혈관모세포의 상기 환자로의 투여를 포함하는 방법을 제공한다. 또다른 양태에서, 본 발명은 손상된 혈관의 치료를 필요로 하는 환자에서 손상된 혈관을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 환자의 선별, 전술한 바와 같은 인간 혈관모세포의 증식 또는 생성과 증식, 및 상기 혈관모세포의 상기 환자로의 투여를 포함하는 방법을 제공한다. 전술한 실시형태 이외에, 혈관모세포는 대규모로 생성하고, 혈관모세포를 필요로 하는 환자의 선별 이전에 보관할 수 있다. 추가 실시형태에서, 1 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반접합

이거나 동형접합인 혈관모세포를 성장시키고, 임의로 상업적인 양으로 성장시키며, 혈관모세포 치료의 대상으로 환자를 선별하기 전에 임의로 보관한다. 전술한 혈관모세포 또는 혈관모세포 제제 중 임의의 것을 순환계에 직접(정맥 내로) 투여할 수 있다. 특정 실시형태(예를 들어, 눈에서의 혈관 회복이 필요한 경우, 예컨대 망막의 허혈/재관류 손상의 치료의 경우), 혈관모세포 또는 혈관모세포 제제는 유리체 내 주사에 의해 투여할 수 있다.

[0297] 혈관모세포 또는 이의 유도체 세포의 용액 또는 제제는 임의의 경로로 투여할 수 있고, 이러한 투여는 개별적으로 결정할 수 있다. 또한, 혈관모세포 또는 이의 유도체 세포의 용액 또는 제제의 투여되는 유효량은 치료적으로 유효하고 개별적으로 결정될 수 있는 양이다.

[0298] 추가 양태에서, 혈관모세포 혈통 세포는 치료적 용도, 예컨대 전술한 징후의 치료에서 사용된다. 따라서, 본 원에서 기술되는 방법으로 생성 및 증식되거나 증식되는 혈관모세포는 우선 시험관 내에서 분화되어 조혈 및/또는 내피 세포를 산출한 후, 상기 2개의 혈통에서 추가로 분화되는 세포를 산출한다. 이러한 세포들은 이후, 예를 들어 조혈 병태의 치료, 또는 조혈 재구성, 또는 허혈 또는 혈관 손상의 치료를 위해 피험체 또는 환자에게 투여할 수 있다.

[0299] 본 원에서 개시되는 방법에 의해 수득되는 인간 혈관모세포로부터 유도되는 HSC는 성장하여 추가로 HSC를 증식시키고, 및/또는 다른 조혈 혈통 세포 유형을 유도한다. 본 발명의 특정 양태는 이식 중 혈관모세포로부터 유도된 HSC의 용도에 관한 것이다. 추가 실시형태에서, 분화된 조혈 세포(예컨대, 과립구, 적혈구, 골수 세포, 거핵세포, 혈소판, 대식세포, 비만 세포 및 호중성 백혈구(Wiles and Keller 1991 Development (111) : 259)가 다양한 치료, 예컨대 수혈 요법 또는 감염 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명의 다른 실시형태는 본 발명의 혈관모세포로부터 유도된 HSC 또는 조혈 혈통 세포를 이용한 조혈 재구성 또는 치료를 필요로 하는 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

[0300] 따라서, 일부 양태에서, 본 발명은 조혈 세포를 필요로 하는 환자의 치료 방법 또는 치료를 필요로 하는 환자를 선택하는 단계, 본 발명의 방법에 따라 인간 혈관모세포를 증식하거나 또는 분리 및 증식하는 단계, 상기 혈관모세포를 조혈모세포 및/또는 성숙 조혈 세포로 분화시키는 단계, 및 상기 조혈 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료에 관한 것이다.

[0301] 본 발명의 다른 양태에서, 혈관모세포는 여기에 개시된 방법에 따라 성장하여 내피 세포를 발생시킨다. 상기 내피는 이후 환자의 손상 부위에서 손상된 혈관의 복구를 유도하거나 또는 새로운 혈관을 제공하는데 사용될 수 있다. 따라서 일부 양태에서, 본 발명은 새로운 혈관 성장을 촉진하거나 또는 손상된 맥관 구조를 복구하는 방법에 관한 것이며, 여기서 혈관모세포로부터 유도된 내피 세포가 치료제로 사용된다. 상기 내피 세포는 내피 손상, 예를 들어 심근 경색 및 폐 허혈, 발작 및 허혈성 뇌손상, 사지 허혈 및 사지 허혈을 포함하는 피부 손상 및 당뇨병 동물이나 환자에 발생하는 손상, 망막내 허혈성 재관류 손상, 신장 허혈을 치료하는데 사용될 수 있다. 상기 내피 세포는 또한 기구 혈관 형성술 또는 혈관내 스탠트뿐 아니라 그래프팅에서의 배치, 수술 및 이후의 방사선 손상 이후에 손상된 혈관의 복구를 돕는데 사용될 수 있다. 또한, 상기 내피 세포는 아테롬성 동맥경화증 진행의 치료 및/또는 예방뿐 아니라, 전신 경화증 및 레이노 현상에서 발생하는 내피 세포 손상을 복구하는데 사용될 수 있다.

[0302] 상기 내피 세포는 더욱 분화될 수 있고, 이들 세포는 예를 들어 상기 문단에 열거된 하나 이상의 상기 "내피 세포" 질병 또는 상태를 치료하는데 적절히 사용될 수 있다.

[0303] 따라서, 본 발명의 일부 양태는 치료를 필요로 하는 환자를 선택하는 단계, 본 발명의 방법에 따라 인간 혈관모세포를 증식하거나 또는 분리 및 증식하는 단계, 상기 혈관모세포를 내피 세포로 분화시키는 단계, 및 상기 내피 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 내피 또는 혈관 손상을 갖는 환자 또는 혈관 성장이나 복구를 필요로 하는 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

[0304] 혈액 은행

[0305] 본 발명의 또 다른 양태는 이식에 적합한 조혈 세포을 생성하는 방법을 제공한다. 이러한 세포 및 방법은 수많은 용도를 갖지만, 특히 중요한 용도는 이식용 혈액의 적합성을 향상시키는 것에 있을 것이다. 바람직한 일부 실시형태에서, 본 발명은 혈관모세포/혈관 콜로니 형성 단위로부터 분화된 적혈구를 제공한다. 이러한 분화된 적혈구는 이식에 사용될 수 있다.

[0306] 본 발명의 또 다른 양태는 혈관모세포/혈관 콜로니 형성 단위로부터 분화된, 이를 필요로 하는 자를 위한 수혈에 사용되는 조혈 세포를 생성하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 분화된 조혈 세포는 외상, 수술 중 혈액 손실, 혈액 질환, 예를 들어 빈혈, 겸상적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환, 또는 악성 질환을 치료하기 위해

이식된다. 일부 실시형태에서, 적혈구는 외상, 수술 중 혈액 손실, 또는 혈액 질환, 예를 들어 빈혈, 겸상적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환을 치료하기 위해 이식된다. 일부 실시형태에서, 혈소판은 선천성 혈소판 질환 또는 악성 질환을 치료하기 위해 이식된다. 일부 실시형태에서, 적혈구 및 혈소판의 혼합군이 이식된다.

[0307] 많은 분화된 조혈 세포 종류, 특히 적혈구는 일반적으로 생체내 혼합군으로 존재함을 주의해야 한다. 특히, 다양한 연령 및 분화 수준의 순환 적혈구가 생체내에서 발견된다. 또한, 적혈구는 시간이 흐르면서 성숙되어 더 적은 태아 헤모글로불린 및 더 많은 성체 헤모글로빈을 발현한다. 본 발명은 적혈구의 순수군 또는 다양한 연령 수준 및 분화 수준을 갖는 적혈구의 혼합군 모두의 이식을 고려한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 태아 헤모글로빈 (헤모글로빈 F)을 발현하는 적혈구의 이식을 고려한다.

[0308] 본 발명은 시험관내 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 조혈 세포를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0309] (a) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하는 단계; 및

[0310] (b) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계.

[0311] 본 발명은 또한 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관내 분화된 조혈 세포를 사용한 수혈을 수행하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0312] (a) 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 제공하는 단계;

[0313] (b) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0314] (c) 상기 분화된 조혈 세포로 수혈을 수행하는 단계.

[0315] 본 발명은 또한 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관내 분화되었던 조혈 세포를 사용한 수혈을 수행하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0316] (a) 배아 줄기 세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 하나 이상의 성장 인자의 존재 하에서, 무혈청 배지내에 인간 배아 줄기 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계;

[0317] (b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에 하나 이상의 성장 인자를 가하고, 무혈청 배지내 상기 배양물을 계속 배양하는 단계로서, 상기 성장 인자가 상기 배상체 배양물내 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양인 것인 단계;

[0318] (c) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0319] (d) 상기 분화된 조혈 세포로 수혈을 수행하는 단계.

[0320] 일부 실시형태에서, 상기 줄기 세포, 배상체 및 혈관 콜로니 형성은 무혈청 배지내에서 상기 방법의 단계 (a) 및 (b)를 통해 성장한다.

[0321] 본 발명은 또한 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 시험관내 분화된 조혈 세포를 사용한 수혈을 수행하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0322] (a) 배아 유도 세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 하나 이상의 성장 인자의 존재 하에서, 무혈청 배지내에 인간 배아 유도 세포를 포함하는 세포 배양물을 배양하는 단계;

[0323] (b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에 하나 이상의 성장 인자를 가하고, 무혈청 배지내 상기 배양물을 계속 배양하는 단계로서, 상기 성장 인자가 상기 배상체 배양물내 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양인 것인 단계;

[0324] (c) 상기 배상체를 단일 세포로 해체시키는 단계;

[0325] (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 하나 이상의 성장 인자를 가하고, 무혈청 배지내 상기 배양물을 계속 배양하는 단계로서, 상기 성장 인자가 상기 단일 세포를 포함하는 배양물내 인간 혈관 콜로니 형성 세포를 증식시키기에 충분한 양인 것인 단계;

[0326] (e) 상기 혈관 콜로니 형성 세포를 분화된 조혈 세포로 분화하는 단계; 및

[0327] (f) 상기 분화된 조혈 세포로 수혈을 수행하는 단계.

[0328] 일부 실시형태에서, 상기 배아 유도 세포, 배상체, 혈관 콜로니 형성 세포 및 단일 세포는 무혈청 배지내에서

상기 방법의 단계 (a) 내지 (d)를 통해 성장한다.

[0329] 일부 실시형태에서, 상기 배아 유도 세포는 배아 줄기 세포이다.

[0330] 일부 실시형태에서, 상기 성장 인자는 호메오박스 단백질, 또는 그들의 기능성 변이체 또는 활성 단편을 포함하는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 상기 호메오박스 단백질은 HOXB4 단백질, 또는 그들의 기능성 변이체 또는 활성 단편을 포함한다.

[0331] 일부 실시형태에서, 상기 분화된 조혈 세포는 단일 세포 형태, 예를 들어 적혈구, 혈소판, 및 식세포로서 생성된다. 그러나, 단일 세포 형태가 생성될 때, 상기 세포 형태는 특정 세포 형태의 성숙도 또는 분화도 수준의 측면에서 이종일 수 있음을 주의해야 한다. 예로서, 분화된 적혈구는 성숙도 및 세포 연령 수준의 측면에서 이종일 수 있다. 이론에 의해 구속되는 것은 아니나, 이러한 적혈구 세포의 이종성은 적혈구가 생체내 발견되는 방식을 모방하기 때문에, 이로울 수 있다.

[0332] 일부 실시형태에서, 상기 단일 세포 형태는 혈액내에서 발견되는 분화된 세포 형태의 비율과 동일하게 혼합된다. 일부 실시형태에서, 다중 분화된 조혈 세포 형태가 동일한 단계에서 생성된다. 일부 실시형태에서, 상기 식세포는 과립성 백혈구: 호중성 백혈구, 호염구, 호산구, 림프구 또는 단핵구로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 상기 조혈 세포 형태는 혈액내에서 발견되는 분화된 조혈 세포 형태의 비율(96% 적혈구, 1% 혈소판, 및 3% 식세포)과 거의 동일한 비율로 생성된다. 일부 실시형태에서, 이식 전에 상기 분화된 조혈모세포에 혈장이 첨가된다. 일부 실시형태에서, 충전 세포, 예를 들어 충전 적혈구는 혈장의 부존재 또는 실질적인 부존재 하에서 이식된다.

[0333] 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법으로부터 생성된 분화된 조혈 세포는 기능성이다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법으로부터 생성된 혈소판은 기능성이다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법으로부터 생성된 식세포는 기능성이다. 일부 실시형태에서, 본 출원의 방법으로부터 생성된 적혈구는 기능성이다. 일부 실시형태에서, 상기 적혈구는 이식 전에 헤모글로빈 F를 발현한다. 일부 실시형태에서, 상기 적혈구는 산소를 운반한다. 일부 실시형태에서, 상기 적혈구는 자연적으로 유도된 적혈구와 동일한 수명을 갖는다. 일부 실시형태에서, 상기 적혈구는 자연적으로 유도된 적혈구 수명의 75%의 수명을 갖는다. 일부 실시형태에서, 상기 적혈구는 자연적으로 유도된 적혈구 수명의 50%의 수명을 갖는다. 일부 실시형태에서, 상기 적혈구는 자연적으로 유도된 적혈구 수명의 25%의 수명을 갖는다.

[0334] 일부 실시형태에서, 본 출원 방법은 100 mm 디쉬 당 1 x 10^6 세포를 생성한다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 2 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 3 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 4 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 5 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 6 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 7 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 8 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 9 x 10^6 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 1 x 10^7 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 5 x 10^7 세포가 생성된다. 일부 실시형태에서, 100 mm 디쉬 당 1 x 10^8 세포가 생성된다.

[0335] 일부 실시형태에서, 상기 분화 단계는 상기 기술분야의 기술자에게 공지된 조건을 사용하여 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 분화 단계는 세포에서 적혈구로의 분화에 특이적인 방법을 사용하여 수행된다 (참조로서 여기에 통합되는 WO 2005/118780 참고). 일부 실시형태에서, 상기 분화 단계는 세포에서 혈소판으로의 분화에 특이적인 방법을 사용하여 수행된다. 일부 실시형태에서, 상기 분화 단계는 세포에서 백혈구로의 분화에 특이적인 방법을 사용하여 수행된다.

[0336] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 분화제는 사이토카인, 예를 들어 인터페론-알파 A, 인터페론-알파 A/D, 인터페론-베타, 인터페론-감마, 인터페론-감마-유도성 단백질-10, 인터루킨-1, 인터루킨-2, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-5, 인터루킨-6, 인터루킨-7, 인터루킨-8, 인터루킨-9, 인터루킨-10, 인터루킨-1, 인터루킨-12, 인터루킨-13, 인터루킨-15, 인터루킨-17, 케라티노사이트 성장 인자, 렙틴, 백혈병 저해 인자, 대식 세포 콜로니 자극 인자, 및 대식 세포 염증 단백질-1 알파를 포함한다.

[0337] 본 발명에 따른 분화제는 또한 성장 인자, 예를 들어 6Ckine (재조합), 액티빈 A, 알파A-인터페론, 알파-인터페

론, 암피레귤린, 안지오제닌, B-내피 세포 성장 인자, 베타 셀룰린, B-인터페론, 뇌유인성 신경영양 인자, C10 (재조합), 카디오트로핀-1, 섬모 신경영양 인자, 사이토카인 유도 호중성 백혈구 화학주성체-1, 내피 세포 성장 보조제, 에오탁신, 표피 성장 인자, 상피 호중성 백혈구 활성화 펩티드-78, 에리스로포이에틴, 에스트로겐 수용체-알파, 에스트로겐 수용체-B, 섬유아세포 성장 인자 (산성/염기성, 헤파린 안정화, 재조합), FLT-3/FLK-2 리간드 (FLT-3 리간드), 감마-인터페론, 신경교 세포주 유도 신경영양 인자, Gly-His-Lys, 과립성 백혈구 콜로니 자극 인자, 과립성 백혈구 대식 세포 콜로니 자극 인자, GRO-알파/MGSA, GRO-B, GRO-감마, HCC-1, 헤파린 결합 표피 성장 인자 유사 성장 인자, 간세포 성장 인자, 헤레귤린-알파 (EGF domain), 인슐린 성장 인자 결합 단백질-1, 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질-1/IGF-1 복합체, 인슐린 유사 성장 인자, 인슐린 유사 성장 인자 II, 2.5S 신경 성장 인자 (NGF), 7S-NGF, 대식 세포 염증 단백질-1B, 대식 세포 염증 단백질-2, 대식 세포 염증 단백질-3 알파, 대식 세포 염증 단백질-3B, 단핵 세포 주화성 단백질-1, 단핵 세포 주화성 단백질-2, 단핵 세포 주화성 단백질-3, 신경 영양 인자-3, 신경 영 양인자-4, NGF-B (인간 또는 래트 재조합), 온코스타틴 M (인간 또는 마우스 재조합), 뇌하수체 추출물, 태반 성장 인자, 혈소판 유도 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유도 성장 인자, 플레이오트로핀, rantes, 줄기 세포 인자, 기질 세포 유도인자 1B/pre-B 세포 성장 자극 인자, 트롬보포에틴, 변형 성장 인자 알파, 변형 성장 인자-B1, 변형 성장 인자-B2, 변형 성장 인자-B3, 변형 성장 인자-B5, 종양 괴사 인자 (알파 및 B), 및 혈관 내피 성장 인자를 포함한다.

[0338] 본 발명에 따른 분화제는 호르몬 및 호르몬 길항제, 예컨대 17B-에스트라디올, 부신피질자극 호르몬, 아드레노메둘린, 알파-멜라닌세포 자극 호르몬, 융모막 성 생식선 자극 호르몬, 코르티코스테로이드 결합 글로불린, 코르티코스테론, 덱사메타손, 에스트리올, 여포 자극 호르몬, 가스트린 1, 글루카곤, 성선 자극 호르몬, 히드로코르티손, 인슐린, 인슐린형 성장 인자 결합 단백질, L-3,3',5'-트리요오도티로닌, L-3,3',5-트리요오도티로닌, 렙틴, 황체(leutinizing) 호르몬, L-티로신, 멜라토닌, MZ-4, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, PEC-60, 뇌하수체 성장 호르몬, 프로게스테론, 프로락틴, 세크레틴, 성 호르몬 결합 글로불린, 갑상선 자극 호르몬, 갑상선 자극 호르몬 방출 인자, 티로신 결합 글로불린, 및 바소프레신을 포함한다.

[0339] 또한, 본 발명에 따른 분화제는 세포외 기질 성분, 예컨대 피브로넥틴, 피브로넥틴의 단백질 조혈 콜로니 형성 세포가수분해 단편, 라미닌, 트롬보스포딘, 집합체(aggrecan), 및 신데잔을 포함한다.

[0340] 본 발명에 따른 분화제는 또한 각종 인자에 대한 항체, 예컨대 항 저밀도 지단백질 수용체 항체, 항 프로게스테론 수용체, 내부 항체, 항-알파 인터페론 수용체 쇄 2 항체, 항-c-c 케모카인 수용체 1 항체, 항-CD 118 항체, 항-CD 119 항체, 항 콜로니 자극 요인-1 항체, 항 CSF-1 수용체/c-핀 항체, 항 상피성 성장 인자 (AB-3) 항체, 항 상피성 성장 인자 수용체 항체, 항 상피성 성장 인자 수용체, 인 특이적 항체, 항 상피성 성장 인자 (AB-1) 항체, 항 에리스로포이에틴 수용체 항체, 항 에스트로겐 수용체 항체, 항 에스트로겐 수용체, C 말단 항체, 항 에스트로겐 수용체-B 항체, 항 섬유아세포 성장 인자 수용체 항체, 항 섬유아세포 성장 인자, 기본 항체, 항 감마 인터페론 수용체 쇄 항체, 항 감마 인터페론 인간 재조합 항체, 항 GFR 알파-1 C 말단 항체, 항 GFR 알파-2 C 말단 항체, 항 과립구 콜로니 자극 인자 (AB-1) 항체, 항 과립구 콜로니-자극 인자 수용체 항체, 항 인슐린 수용체 항체, 항 인슐린형 성장 인자-1 수용체 항체, 항 인터루킨-6 인간 재조합 항체, 항 인터루킨-1 인간 재조합 항체, 항 인터루킨-2 인간 재조합 항체, 항 렙틴 마우스 재조합 항체, 항 신경 성장 인자 수용체 항체, 항 p60, 닭 항체, 항 부갑상선 호르몬형 단백질 항체, 항 혈소판 유래 성장 인자 수용체 항체, 항 혈소판 유래 성장 인자 수용체-B 항체, 항 혈소판 유래 성장 인자-알파 항체, 항 프로게스테론 수용체 항체, 항 레티노산 수용체-알파 항체, 항 갑상선 호르몬 핵 수용체 항체, 항 갑상선 호르몬 핵 수용체-알파 1/Bi 항체, 항 트렌스페린 수용체/CD71 항체, 항 형질변환 성장 인자-알파 항체, 항 형질변환 성장 인자-B3 항체, 항 종양 괴사 인자-알파 항체, 및 항 혈관 내피 성장 인자 항체를 포함한다.

[0341] 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같이 잠재적 환자 수용자에게 일치된 세포를 제공할 수 있는 분화된 조혈 세포의 라이브러리를 제공한다. 특정 실시형태에 있어서, 세포는 동결 상태로 보관된다. 따라서, 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 하나 이상의 적합성 항원에 대해 동형접합성인 분화된 조혈 세포 조제물을 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 세포는 본원에 개시된 방법에 의해 증식할 수 있는 인간 혈관 콜로니 형성 세포의 라이브러리를 포함하는 세포들의 은행에서 선택되고, 각 혈관 콜로니 형성 세포 조제물은 인간 집단에 존재하는 하나 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성이거나 동형접합성이며, 상기 혈관 콜로니 형성 세포의 은행은 세포 은행의 나머지 구성원에 대하여 상이한 세트의 MHC 대립유전자에 대해 각각 반접합성이거나 동형접합성인 세포들을 포함하는 제약 사업의 실시 방법을 제공한다. 상기 언급된 바와 같이, 유전자 적중법(targeting) 또는 이형 접합성의 손실법을 사용하여 혈관 콜로니 형성 세포를 유도하는데 사용된 반접합체 또는 동형접합체 MHC 대립유전자 줄기 세포를 생성할 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, 모든 혈액형의 혈관 콜로니 형성 세포가 은행에 포함된

다. 특정 실시형태에 있어서, 혈관 콜로니 형성 세포가 환자에게 일치함으로써 환자 자신의 혈액형의 분화된 조혈 세포가 생산되는 것을 보장한다. 특정 실시형태에 있어서, 혈관 콜로니 형성 세포는 항원 인자 A, B, Rh, 또는 이의 임의의 조합에 대해 음성이다. 특정 실시형태에 있어서, 분화된 조혈 세포는 보편적인 공여 세포이다. 예를 들어, O형의 Rh 마이너스인 조혈 세포는 혈액 수혈에 보편적으로 사용될 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, 본 발명은 보편적 수혈을 위한 O형의 Rh 마이너스 적혈구의 생산 방법을 제공한다.

[0342] 특정 실시형태에 있어서, 혈관 콜로니 형성 세포로부터 분화된 적혈구는 태아 헤모글로빈을 발현한다. 태아 헤모글로빈을 발현하는 적혈구의 수혈은 특히 겸상 적혈구 빈혈증의 치료시에 유용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 겸상 적혈구 빈혈증의 치료를 위한 개선된 방법을 제공한다.

[0343] 일 실시형태에 있어서, 특정 혈관 콜로니 형성 세포 조제물을 환자에게 적당하게 선택한 후, 이후 이것을 증식시켜 환자의 치료에 적합한 양에 도달하면 분화시켜 분화된 조혈 세포를 얻은 후 수용자에게 세포를 투여한다. 제약 사업의 실시 방법은 또한 판매용 조제물의 분배를 위한 분배 시스템을 확립시키는 것을 포함할 수 있거나 또는 약학 조제물을 마케팅하기 위한 판매 군을 확립시키는 것을 포함할 수도 있다.

[0344] 임의의 상기 내용에서, 혈관 콜로니 형성 세포는 바로 분화시킬 수 있거나 혈관 콜로니 형성 세포는 후속 사용을 위해 동결시킬 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, 본 발명은 후속 해동 및 증식에 적당하고, 또한 조혈 세포 또는 내피 계통으로의 분화에 적당한 혈관 콜로니 형성 세포의 동결 배양법을 제공한다.

[0345] 인간 혈관 콜로니 형성 세포는 수혈에 사용할 수 있는 상당수의 조혈 세포 유형을 생성하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 상당수의 동종성 또는 이종성 집단인 RBC 및/또는 혈소판은 인간 혈관 콜로니 형성 세포로부터 생성될 수 있다. 이로부터 분화된 혈관 콜로니 형성 세포 및 조혈 세포 유형은 예치될 수 있어서, 혈액 제품을 널리 공여하고, 수혈 및 기타 치료에 사용한다. 이러한 제품을 예치하는 것은 공여된 혈액 제품의 위험한 보관을 완화하도록 도울 것이다. 추가적으로, 혈관 콜로니 형성 세포 및 유도 제품은 생체내 유전적으로 조작되어 보편적인 공여 혈액 제품을 제공할 수 있다.

[0346] 따라서, 특정 양태에 있어서, 본 발명은 혈액 은행 사업의 실시 방법을 제공한다. 피험체 은행 사업은 이로부터 생성된 혈관 콜로니 형성 세포 및/또는 조혈 세포 유형(예, RBC, 혈소판, 림프구 등)의 유도 및 보관(장기간 또는 단기간)에 관여한다. 세포들은 장기간 보관을 위해 저온 보존되거나, 비교적 단기간 보관을 위해 배양 상태로 유지될 수 있다. 현재 사용 가능한 혈액 제품을 분류하는 것과 매우 동일한 방식으로 세포들을 분류하여 교차 일치시킬 수 있고, 이 세포들은 유형을 기준으로 보관할 수 있다. 추가적으로 그리고 특정 실시형태에 있어서, 세포를 변형시켜 A 음성 및/또는 B 음성 및/또는 Rh 음성인 세포를 특이적으로 생성시킴으로써 보편적이거나 거의 보편적으로 임의의 환자에게 수혈하는데 적당한 세포를 생산할 수 있다.

[0347] 혈관 콜로니 형성 세포 및/또는 분화된 조혈 세포 유형은 명세서를 통해 상세화한 임의의 본 발명의 방법을 사용하여 생성할 수 있음을 유념해야 한다.

[0348] 혈액 은행 사업의 실시 방법의 특정 실시형태에 있어서, 세포(혈관 콜로니 형성 세포 및/또는 분화된 조혈 세포 유형)는 하나 이상의 주요 시설에서 생성하고 보관한다. 이후 세포는, 예를 들어 환자 치료시 사용하기 위해 병원 또는 치료 시설로 전달될 수 있다. 다른 특정 실시형태에 있어서, 세포는 저온 보존 상태로 유지되고 병원 또는 기타 치료 시설의 규정을 기초로 수혈을 위해 이를 특별하게 해동하여 준비시킨다. 그러한 규정은 의사 규정(standing orders)(예컨대, 일정수의 단위의 세포의 일정량을 생성시키고 제공함)일 수 있다

[0349] 특정 실시형태에 있어서, 방법은 병원에 청구하기 위한 시스템 또는 예치된 제품과 관련된 비용을 위한 보험 회사를 포함한다.

[0350] 임의의 상기 내용 중 특정 실시형태에 있어서, 세포들은, 환자에게 투여될 투여량을 정량하고/하거나 표준 혈액 수혈 동안 투여되는 투여량을 비교하기 위하여 사용자에게 허용되는 세포 수, 부피, 또는 임의의 단위를 기준으로 할당될 수 있다.

[0351] 특정 실시형태에 있어서, 세포는 혼합된 세포 집단으로 생성, 보관, 및 투여된다. 예를 들어, 조제물은 별개의 세포 유형과 마찬가지로 변화된 발생 단계의 세포를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 세포는 단일 세포 유형의 실질적으로 정제된 조제물로 생성, 보관, 및/또는 투여된다.

[0352] 특정 실시형태에 있어서, 세포의 조제물은 하나 이상의 감염 질병에 대해 선별된다. 선별은 발생 또는 보관 전 또는 후에 일어날 수 있다. 예를 들어, 세포의 조제물은 상기 제품의 수용자에게 전달될 수 있는 간염, HIV, 또는 기타 혈인성 감염 질병을 확인하기 위해 선별될 수 있다.

[0353] 이식체 수용자 내에서의 내성 유도

[0354] 본 발명의 방법에 의해 생성되고 증식되거나, 또는 본 발명의 방법에 의해 증식된 인간 혈관모세포를 사용하여 면역 내성을 유도할 수 있다. 면역 내성이란, 예를 들어 수용자에게 비자가(nonself) MHC 항원(예, 이식체 및 내성화된 혈관모세포와 공유된 항원)의 도입에 대해 그렇지 않으면 발생하는 이식체 수용자의 면역 반응의 억제를 말한다. 따라서, 내성이란 면역 억제제를 사용하여 이끌어내질 수 있는 광범위한 스펙트럼의 면역 억제와 반대로 특이적 공여자 항원에 의해 유도되는 면역 반응의 억제를 말한다. 내성은 채액성 반응, 세포성 반응, 또는 채액성 및 세포성 둘다의 반응을 수반할 수 있다. 내성은 선재하는 성숙한 공여자 반응성 T 세포의 제거 및/또는 불활성화, 및 신규로 발생한 공여자 반응성 T 세포의 장기간(예, 일생)의 제거 및/또는 불활성화를 포함할 수 있다.

[0355] 본 발명에 기재된 인간 혈관모세포의 생성 및 증식 방법은 내성을 유도하는데 여러 개의 이득을 제공한다. 본 발명의 방법은 막대하고, 종래에는 얻기 어려운 수의 인간 혈관모세포를 생성시킨다. 막대한 양의 인간 혈관모세포는 덜 유해한 미리 조정된 프로토콜을 이용하여 이식체 수용자에서 내성을 유도할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 인간 혈관모세포의 라이브러리를 생성하기 위해 제공되고, 여기서 이의 각각은 인간 집단에 존재하는 하나 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성이거나 동형접합성이며, 상기 혈관모세포의 라이브러리 중 각 구성원은 라이브러리 내 다른 구성원에 대해 상이한 세트의 MHC 대립유전자에 대해 반접합성이거나 동형접합성이다. 그러한 인간 혈관모세포의 라이브러리는 세포를 선택하여 임의의 사용 가능한 공여자 이식체와 일치할 수 있도록 내성이 된 인간 혈관모세포의 선택에 사용될 수 있다.

[0356] 조혈 세포 또는 혼합된 키메라 현상의 골수 이식 및 후속 확립(establishment)은 이전에 쥐과 및 인간 모델 모두에서 조혈모세포로부터 유래된 새로운 조직 유형에 대해 특이적 내성을 유도한다는 것을 제시하였다. 조혈 세포 또는 혼합된 키메라 현상이란 공여자 및 수용자 줄기 세포 둘다로부터 유래된 조혈 세포의 수용자에서 생산되는 것을 말한다. 따라서, 수용자가 조혈 세포 키메라 현상을 실현하는 경우, 수용자는 공여자 특이적 항체에 대해 내성을 갖게 될 것이다. 내성 유도에 대한 다수의 프로토콜에서, 수용자에게 투여되는 내성이 있는 공여자 세포는 수용자의 골수로 이식한다. 공여자 세포에 대해 수용자의 골수에서 조혈 세포 공간이 형성되기 위해, 일부 프로토콜은 (예를 들어, 전신에의 조사에 의해) 조혈 세포 공간을 형성하는 단계를 요구하는데, 그러한 단계는 전형적으로 수용자에게 유해하거나 해롭다. 하지만, 매우 막대한 수의 공여자 내성이 있는 세포가 사용 가능한 경우, 조사가 완전하게 제거될 수 있어서 덜 유해하게 미리 조정된 처방 계획의 이점과 함께 조혈 세포 또는 혼합된 키메라 현상을 실현한다는 설치류 모델로부터의 증거가 있다. 따라서, 혼합된 키메라 현상은, 예를 들어 특이적 골수비파괴성 수용자의 조절로 실현될 수 있다.

[0357] 따라서, 본원에 기재된 신규 방법이 막대한 수의 인간 혈관모세포를 생산할 수 있기 때문에, 본 발명은 조절 프로토콜이 덜 혹독하거나 덜 유해한 면역 내성이 유도되는 이점을 제공한다. 예를 들어, 조혈 세포 공간 형성 단계는 충분한 수의 내성이 있는 공여자 세포가 사용되는 경우 생략될 수 있다.

[0358] 따라서, 본 발명의 특정 실시형태에 있어서, 본원에 기재된 방법에 의해 생성되고 증식되거나 또는 증식된 인간 혈관모세포를 사용하여 면역 내성을 유도할 수 있다. 상기 메카니즘을 기초로 임의의 이론에 의해 구속되기를 희망하지 않는 반면, 인간 혈관모세포는 수용자의 골수에 수용되고 수용자의 골수로 이식되어 혼합된 키메라 현상을 생산함으로써 면역 내성을 유도할 수 있다.

[0359] 특정 실시형태에 있어서, 공여자 인간 혈관모세포는, 수용자 환자에게 공여자로부터의 이식체를 이식하거나 기관, 조직, 또는 세포를 이식하기 전에 (예를 들어, 정맥 주사에 의해) 수용자 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에 있어서, 인간 혈관모세포는 내성의 유도의 필요가 있는 환자(예, 이식조직 또는 이식체 수용자)에게 내성을 유도하기 위해 투여된다. 따라서, 특정 실시형태에 있어서, 인간 수용자 환자에서 내성을 유도하는 방법은 (a) 이식 또는 세포 치료의 필요가 있는 환자를 선택하는 단계, (b) 공여자로부터 유래되거나 공여자에게 일치(부합)하는 인간 혈관모세포를 상기 환자에게 투여하는 단계로서, 여기서 상기 혈관모세포는 본 발명에 따라 생성되고 증식되거나 증식되는 것인 단계, 및 (c) 수용자 환자에게 공여자의 기관, 조직, 또는 세포 이식체를 이식하는 단계로서, 여기서 상기 혈관모세포는 공여자 항원에 대한 내성을 유도하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 환자는 기관, 조직, 또는 세포 치료를 수용할 것이며, 여기서 상기 기관, 조직, 또는 세포는 공여자 또는 공여자 세포원으로부터 얻어진다. 예를 들어, 공여자로부터의 혈관모세포는 (1) 상기 기재된 방법에 따라 증식되어 다수의 공여자 내성 세포를 생성하고, (2) 생체내 증식되고 분화되어 조혈 세포 또는 내피 세포 또는 조직을 얻는데, 이는 후속으로 수용자 환자에게 이식될 수 있다. 다른 실시형태에 있어서, 기관, 조직, 또는 세포 치료는 공여자 혈관모세포로부터 유래되지 않지만 공여자 혈관모세포와 일치한다.

[0360] 본원에 사용된 용어 "일치된(부합된)"이란 공여자와 수용자(예, 이식체) 간의 HLA 유형이 얼마나 유사한지에 관한 것이다. 일 실시형태에 있어서, 공여자 혈관모세포 및 이식체에 대해 용어 "일치된"이란 거부 반응이 일어나지 않도록 MHC I형 및/또는 MHC II형 대립유전자와의 일치도를 말한다. 또다른 실시형태에 있어서, 공여자 혈관모세포 및 이식체에 대해 용어 "일치된"이란 공여자 이식체가 이의 일치하는 공여자 혈관모세포에 의해 내성화되도록 MHC I형 및/또는 MHC II형 대립유전자와의 일치도를 말한다. 또다른 실시형태에 있어서, 공여자 혈관모세포 및 이식체에 대해 용어 "일치된"이란 면역 억제가 요구되지 않도록 MHC I형 및/또는 MHC II형 대립유전자와의 일치도를 말한다.

[0361] 동종이계 항원 또는 동종이계 그래프트(graft)에 대해 내성을 유도하기 위한 전술한 방법들은, 공여체와 수용체 간에, MHC 유전자좌 또는 기타 유전자좌에서 그래프트 거부반응을 초래할 정도의 불일치가 존재하는 경우 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 특정 실시형태에서, 1개 이상의 MHC 유전자좌에서 또는 인식 및 거부반응을 매개하는 다른 1개 이상의 유전자좌에서, 예를 들어, 극소 항원 유전자좌에서 불일치가 일어날 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 수용체와 공여체의 HLA 대립유전자가 불일치되어 하나 이상의 불일치된 항원을 초래한다. I형 및 II형 MHC 유전자좌의 경우, 공여체와 수용체는 예를 들어, I형에서 일치되고, II형에서 불일치되며; I형에서 불일치되고, II형에서 일치되며; I형에서 불일치되고, II형에서 불일치되며; I형에서 일치되고, II형에서 일치될 수 있다. 인식 및 거부반응을 통제하는 다른 유전자좌의 임의의 조합에서, 예를 들어, 극소 항원 유전자좌가 일치 또는 불일치될 수 있다. MHC I형에서 불일치된다는 것은 하나 이상의 MHC I형 유전자좌가 불일치된다는 것을 의미하며, 예를 들어, HLA-A, HLA-B, 또는 HLA-C 중 하나 이상에서 불일치된다는 것을 의미한다. MHC II형에서 불일치된다는 것은 하나 이상의 MHC II형 유전자좌가 불일치된다는 것을 의미하며, 예를 들어, DPA, DPB, DQA, DQB, DRA, 또는 DRB 중 하나 이상에서 불일치된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 혈관모세포(hemangioblast)와 그래프트는 II형 HLA-DRB1 및 DQB1 대립유전자에서 일치될 수 있다. 혈관모세포와 그래프트는 (일치된 DRB1 및 DQB1 대립유전자에 추가하여) 2개 이상의 I형 HLA-A, B, 또는 C, 대립유전자에서 일치될 수 있다.

[0362] 다른 실시형태에서, 내성화된(tolerizing) 공여체 세포는 전술한 방법에 의해 생성 및 증식 또는 증식된 혈관모세포로부터 유래된 세포이다. 이 실시형태에 따르면, 공여체 인간 혈관모세포는 시험관내 분화되어 공여체 조혈모세포를 생성하며, 이 공여체 조혈모세포를 수용체 환자에 투여하여 내성을 유도한다. 상기 방법들 중 일부의 경우, 공여체 혈관모세포 또는 그로부터 유래된 조혈모세포를 상기 수용체에 투여하고, 상기 수용체에서 내성을 유도함으로써, (공여체 내성화 세포에 대해) 일치된 이식 또는 그래프트를 준비한다.

[0363] 다른 실시형태에서, 내성을 유도하는 방법은, 조혈 스페이스를 생성하는 단계(이로써 혈관모세포 또는 그로부터 유래된 조혈모세포의 그래프트화를 촉진함)를 더 포함한다. 다른 실시형태에서, 내성을 유도하는 방법은, 예를 들어, 선재하는 공여체-반응성 T 세포를 제거 및/또는 불활성화함으로써, 공여체 혈관모세포 또는 그로부터 유래된 조혈모세포의 거부 반응을 일시적으로 저해하는 단계(들)을 더 포함한다. 조혈 스페이스를 생성하기 위해, 이 방법은 조사(irradiation)(예, 전신, 림프구, 또는 선택적 흉선 조사)를 포함할 수 있다. 공여체 세포의 거부반응을 예방하기 위해, 이 방법은 약물 또는 항체(예, 세포 증식 저해제, 항대사제, 또는 항-T 세포 또는 항-CD8 또는 항-CD4 항체)의 투여, 및/또는 공여체 세포의 그래프트화 및 생존, 및 혼합 키메라 현상의 형성을 촉진하는 기타 처리(예, 스트로마 세포 또는 성장 인자, 사이토카인 등을 상기 수용체에 투여, 또는 수용체의 천연 항체를 고갈 또는 불활성화시키는 다른 제제들의 투여)를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 수용체 내에서 공여체의 생존을 촉진하고/하거나, 조혈 스페이스를 생성하기 위해, 투여되는 조사, 항체, 약물 및/또는 기타 제제들은, 수용체에서 흉선세포 및/또는 T 세포를 불활성화하기에 충분하다. 이러한 조혈 스페이스를 생성하고/하거나, 공여체 세포의 거부반응을 일시적으로 저해하는 단계는, 예를 들어, 공여체 혈관모세포를 상기 수용체에 도입시키기 이전에 수행될 수 있다. 대안적으로, 환자에게 제제를 섭취시키거나, 또는 공여체 내성화 세포의 투여와 동시에 T-세포를 차단, 제거 또는 불활성화하는 방법을 시행할 수도 있다.

[0364] 특정 실시형태에서, 조혈 스페이스 생성과 면역억제법을 조합하여 사용한다. 예를 들어, 수용체에 항-T 세포 항체 섭취를 저용량 전신 조사 및/또는 흉선 조사와 함께 수행한다. 한 실시형태에서, 수용체에 항-CD4 및 항-CD8 항체를 섭취시키고, 그 후 온화한, 비골수파괴성(nonmyeloablative) 용량의 전신 조사(예, 골수가 회복불가능하게 되지 않도록 수용체의 골수 분획을 제거하는 용량)와 선택적인 흉선 조사를 수행하거나, 대안적으로 추가적인 용량의 T 세포 불활성화 항체 또는 공동자극 차단 시약(예, CTLA4-Ig 및/또는 항-CD40L 항체)를 섭취시킨다. 조사 이후, 공여체 혈관모세포 또는 그로부터 유래된 조혈모세포를 수용체에 (예, 정맥 주사에 의해) 투여할 수 있다. 이 실시형태에서, 공여체 세포의 그래프트화를 촉진하기 위한 전신 조사는, 여러 공여체 인간 혈관모세포 또는 그로부터 유래된 조혈모세포를 투여하는 것으로 대체될 수 있다. 이러한 여러 공여체 인간 세포를 얻는 것

은 전술한 방법에 따라 성취될 수 있다.

[0365] 다른 실시형태에서, 수용체 T 세포를 고갈 또는 불활성화하기 위한 처리는, 투여된 공여체 내성화 인간 혈관모세포의 생존을 촉진하고 그래프트화 저해를 예방하는데 도움을 줄 수 있다. 다른 실시형태에서, 이 방법은 수용체 환자에서 공여체 반응 세포의 클론 고갈을 포함할 수 있다. 예를 들어, 환자에 온화한 투여량의 전신 조사를 수행한 후, T 세포 공동자극 차단 및 공여체 인간 혈관모세포의 투여를 수행할 수 있다. 대안적으로, 환자에게 조사없이 T 세포 공동자극 차단 및 여러 공여체 인간 혈액모세로의 투여를 수행할 수도 있다.

[0366] 다른 실시형태에서, 수용체의 골수파괴 조절없이 내성을 얻을 수도 있다. 한 실시형태에서, 수용체에 공여체 인간 혈관모세포를 공여체 혈관모세포의 그래프트화를 용이하게 하기 위해 항-CD40L과 함께 섭취시킬 수 있다. 예를 들어, 수용체에 여러 공여체 혈관모세포를 항-CD40L 단일클론 항체와 함께 섭취시킨 후, 몇일 이내에 CTLA4-Ig 투여량을 섭취시킨다. 이러한 프로토콜은 공여체 반응성 T 세포를 제거하고, CD40-CD40L 상호작용을 차단시킨다. 인간 혈관모세포를 시험관내 생성 및 증대시키기 위한 전술한 신규 방법은 이러한 온화한 내성 프로토콜을 실행가능하게 해준다.

[0367] 수용체 조절 및/또는 공여체 반응성 T 세포의 고갈 또는 차단 이후, 본 발명의 방법으로 생성한 공여체 내성화 인간 혈관모세포를 수용체에 투여한다. 공여체 인간 혈관모세포는 공여체로부터의 조직 또는 세포원에서 수득한 혈관모세포에서 유래될 수 있다. 대안적으로, 공여체 인간 혈관모세포는 공여체와 일치하는 상이한 비공여체원으로부터 수득할 수 있다.

[0368] 특정 실시형태에서, 공여체 인간 혈관모세포를 다중 투여로(예를 들어, 2, 3, 4 또는 그 이상의 공여체 세포의 투여) 투여함으로써 내성이 유도된다. 따라서, 내성은 공여체 내성화 세포의 다중 투여를 포함하는 방법으로 유도될 수 있으며, 여기서 다중 투여는 주 또는 그 미만의 기간 내에 수용체에 행해진다.

[0369] 특정 실시형태에서, 본 발명 인간 혈관모세포가 면역 내성을 유도하는 능력은 상이한 실험 모델 시스템을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, SCID 마우스에 인간 면역 시스템을 수립하는 능력은 실험 모델 내에서 인간 면역 반응을 연구하는데 사용되어 왔다. 인간 태아 간 및 흉선 조직을 사용하여 면역 부전 마우스 수용체에서 기능적인 인간 면역 시스템을 재구성할 수 있다는 것은 이미 밝혀졌다. 유사하게, 본 발명 인간 혈관모세포의 기능적 역량을 유사한 실험 모델 시스템을 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 마우스 내 기능적인 인간 면역 시스템을 설립하는데 인간 태아 간을 대체하는 인간 혈관모세포의 능력은, 전술한 실험 모델을 사용하여 평가될 수 있다. 또한, 기능적인 인간 면역 시스템을 갖는 마우스에서(예를 들어, 인간 태아 간 및 흉선 조직을 SCID 마우스 내 인간 면역 시스템을 설립하는데 사용하여 hu-SCID 마우스를 생산한 경우), 혼합 키메라 현상을 얻기 위해, 인간 "공여체" 혈관모세포(hu-SCID 마우스를 설립하는데 사용된 태아 간 및 흉선 조직에 대해 불일치)를 전술한 방법 중 어느 하나에 따라 hu-SCID 마우스에 투여할 수 있다. 이후, 공여체 혈관모세포에 대해 일치하는 동종이식편(allograft)을 이들 동물에 이식하는 경우에, 공여체 항원에 대한 내성을 평가할 수 있다.

[0370] 특정 실시형태에서, 본 발명은 세포 배합물에 관한 것이다. 효과적인 세포 배합물은 다음의 2 성분을 포함한다: 면역 내성을 유도하는 제1 세포 유형 및 필요한 기능을 재생하는 제2 세포 유형. 두 가지 세포 유형은 본 발명의 방법으로 제조될 수 있으며 동일한 공여체로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 공여체 유래 인간 혈관모세포가 내성화 공여체 세포로 사용될 수 있다. 공여체 유래 세포(예, 배아 줄기 세포, 다능성(pluripotent) 줄기 세포 또는 초기 선조 세포, 또는 혈관모세포) 또한 사용되어, 예를 들어, 조혈 세포 또는 내피 세포(여기 서술됨), 신경 세포, 예를 들어, 희돌기교세포, 간세포, 심근아세포 또는 심근아세포 선조세포, 또는 조골세포 및 이들의 선조세포를 생성할 수 있다. 따라서, 상기 공여체 혈관모세포 또는 상기 공여체 배아 또는 다능성 줄기 세포에서 유래된 세포 또는 조직에 수용체가 내성을 갖도록, 공여체 인간 혈관모세포를 수용체에서 내성을 유도하는데 사용할 수 있다.

[0371] 다른 실시형태에서, 본 발명의 세포 배합물의 두 세포 성분을 상이한 공급원 또는 공여체에서 얻을 수 있으며, 이때 2개의 공급원 또는 공여체는 일치한다. 예를 들어, 혈관모세포를 배아 줄기 세포 공급원에서 생성할 수 있으며, 그래프트 세포 또는 조직은 인간 혈관모세포를 생성하는데 사용된 배아 줄기 세포 공급원과 상이한 공급원에서 수득할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 두 개의 공급원은 일치한다.

[0372] 본 명세서에 서술된 치료 목적 중 어느 것을 위해, 면역내성을 위한 인간 혈관모세포 또는 그로부터 유래된 조혈 세포가, 인간 투여를 위한 충분한 멸균 조건하에서 제조된 등장 첨가제를 포함하는 약학 조성물의 형태로 제공될 수 있다.

[0373] 유전자 치료법에서 혈관모세포

[0374] 본 발명의 다른 양태는 혈관모세포 세포, 또는 그로부터 분화된 조혈 또는 내피 세포, 또는 차례로 이들 세포로부터 추가 분화된 세포를 유전자 치료법에 이용하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 표유류 혈관모세포의 제제는, 치료 유전자의 유전자 산물에 의해 치료될 수 있는 질병을 갖는 환자에게 치료 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. 혈관모세포는 신생혈관형성(예, 허혈성 조직에서 부행(collaterals)의 형성을 유도하는 VEGF), 조혈작용(예, 적혈구 생성을 유도하는 에리스로포이에틴), 혈관 기능(예, 동맥류를 치료하기 위해 혈관 평활근의 증식을 유도하는 성장 인자) 또는 혈액 세포 기능(예, 출혈을 감소시키는 응고 인자) 또는 분비 호르몬(예, 성장 호르몬)에 대한 코드에 관여하거나 영향을 주는 치료 유전자를 전달하는데 특히 유용하다. 유전자 치료법에 대한 방법들은 선행기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국특허 제5,399,346호(Anderson et al.)을 참고할 수 있다. 유전 물질을 전달하기 위한 생체적합성 캡슐에 대해서는 PCT 공개 WO 95/05452(Baetge et al.)에 기술되어 있다. 골수 유래 세포에 유전자를 전달하는 방법에 대해서도 이미 보고되었다(미국특허 제6,410,015호(Gordon et al.) 참고). 치료 유전자는 질병 예방 또는 치료에 관여하는 유전자 산물 또는 단백질을 암호화하는 유전자, 또는 질병 예방 또는 치료에 관여하는 세포 조절 효과를 갖는 유전자와 같이, 임상적 유용성을 갖는 임의의 유전자일 수 있다. 이러한 유전자 산물은 환자에서 결함이 있거나 소실된 유전자 산물, 단백질을 대체하거나 세포 조절 효과를 가져, 환자의 질병 또는 질환의 예방 또는 치료를 가능하게 할 수 있다.

[0375] 따라서, 본 발명은 유전자 치료법을 받아야 할 질병을 갖는 환자에게 치료 유전자를 전달하는 방법을 추가로 제공하며, 이 방법은 이를 필요로 하는 환자를 선별하는 단계, 세포가 치료 유전자를 보유하도록 혈관모세포 제제를 변형시키는 단계, 및 환자에게 변형된 제제를 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 제제는 본 기술분야에 일반적으로 공지된 기법들에 의해 변형될 수 있다. 변형에는 혈관모세포의 치료 효과를 증강시키는 유전자 산물을 암호화하는 DNA 또는 RNA 단편을 포유류 혈관모세포에 삽입하는 것이 포함될 수 있다. 변형된 혈관모세포가 환자 신체에서 치료 유전자 산물을 생산하거나 소정의 치료 효과를 갖도록 하는 방식으로 유전자를 삽입한다. 한 실시형태에서, 혈관모세포는 골수와 같이 환자로부터 수득한 세포 공급원으로부터 제조된다. 임의의 유전자 전달 절차, 예를 들어, 네이키드 DNA 통합, DNA의 직접 주입, 수용체 매개된 DNA 섭취, 레트로바이러스 매개된 형질감염, 바이러스 매개된 형질감염, 비바이러스 형질감염, 지질 매개된 형질감염, 전자전달, 전기영동, 인산칼슘 매개된 형질감염, 마이크로주입 또는 프로테오리포좀(이 모든 방법에는 유전자 치료법 벡터를 포함할 수 있음)을 사용하여, 유전자를 혈액모세로에 삽입할 수 있다. 기타 벡터로는 레트로바이러스 벡터 말고도, DNA 바이러스 및 기타 RNA 바이러스로부터 유래된 벡터를 사용할 수 있다. RNA 바이러스를 사용하는 경우 명백한 바와 같이, 이러한 바이러스는, 이러한 RNA 바이러스로 형질감염된 혈관모세포가 치료 유전자 산물을 암호화하는 DNA를 제공하도록, 소정의 약제를 암호화하는 RNA를 포함한다. 유전자를 세포에 도입하는 방법은 본 기술분야에 잘 알려져 있다(예를 들어, Ausubel, id. 참고) .

[0376] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 치료 유전자를 보유하도록 변형된 인간 혈관모세포의 정제된 제제가, 용기 또는 상업적 패키지로 제공될 수 있으며, 이러한 용기 또는 상업적 패키지는 치료 유전자 전달에 의해 질병을 예방 및/또는 치료하기 위한 유전자 치료법에서 제제의 사용을 위한 설명서를 더 포함한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 포유류 혈관모세포의 제제(이러한 제제는 제제의 세포가 치료 유전자를 보유하도록 변형됨), 및 유전자 치료법으로 치료가능한 질병을 갖는 환자를 치료하기 위한 설명서를 포함하는 상업적 패키지(즉, 킷트)를 추가로 제공한다.

[0377] ***기타 상업적 응용 및 방법***

[0378] 본 발명의 특정 양태는 인간 혈관모세포를 상업적 양으로 증대시키고자 한다. 특정 실시형태에서, 인간 혈관모세포를 대규모로 생산하고, 필요한 경우 저장하여, 병원, 임상의 또는 기타 헬스케어 기관에 공급한다. 환자가 예를 들어, 허혈 또는 혈관 손상과 같은 처방을 받은 경우, 또는 조혈 재구성이 요구되는 경우, 인간 혈액모세를 주문하여 제때에 공급할 수 있다. 따라서, 본 발명은 상업적 규모로 세포를 얻기 위해 인간 혈관모세포를 생성 및 증대시키는 방법; 상기 방법으로부터 유래된 인간 혈관모세포를 포함하는 세포 제제, 및 인간 혈관모세포를 병원 및 임상에 제공(즉, 생산, 필요한 경우 저장, 및 판매)하는 방법에 관한 것이다. 추가적으로, 혈관모세포 계통 세포를 시험관내 생산하고, 필요한 경우 저장하며, 병원 및 임상의에게 판매할 수 있다.

[0379] 따라서, 본 발명의 특정 양태는 본 명세서에 기술된 방법에 의해 증대된 혈관모세포를 생산, 저장 및 분배하는 방법에 관한 것이다. 인간 혈관모세포를 시험관내에서 생산 및 증대시킨 후, 환자 치료에 앞서 인간 혈관모세포를 회수, 정제, 및 필요한 경우 저장할 수 있다. 대안적으로, 혈관모세포 계통 세포가 바람직한 경우, 환자 치료에 앞서, 인간 혈관모세포를 시험관내에서 추가적으로 분화시킬 수도 있다. 따라서, 특정 실시형태에서는, 본 발명은 혈관모세포를 병원, 헬스케어 센터, 및 임상의에게 공급하는 방법을 제공하며, 본 명세서에 공개된 방법에 의해 생산된 혈관모세포 또는 혈관모세포 계통 세포는 저장되고, 병원, 헬스케어 센터 또는 임상의의 요구에

의해 주문되어, 혈관모세포 또는 혈관모세포 계통 치료법이 요구되는 환자에게 투여된다. 대안적인 실시형태에서, 병원, 헬스케어 센터, 또는 임상의는 환자의 특정 데이타에 기초하여 인간 혈관모세포를 주문하며, 인간 혈관모세포를 환자의 상태에 따라 생산하여 주문을 한 병원 또는 임상의에게 공급된다.

[0380] 본 발명의 추가적인 양태는 잠재적인 환자 수용체에 일치하는 세포를 제공할 수 있는 혈관모세포 및/또는 혈관모세포 계통 세포의 라이브러리에 관한 것이다. 따라서, 한 실시형태에서, 본 발명은 1개 이상의 조직접합성 항원에 대해 동질인(homozygous) 혈관모세포 제제를 제공하는 단계를 포함하는 약학 비지니스를 수행하는 방법을 제공하며, 이때 세포는 본 명세서에 공개된 방법에 의해 증대될 수 있는 인간 혈관모세포 라이브러리를 포함하는 이러한 세포 은행으로부터 선택되고, 각각의 혈관모세포 제제는 인간 군집에 존재하는 1개 이상의 MHC 대립유전자에 대해 반동질(hemizygous)이거나 동질이며, 상기 혈관모세포 은행은 세포 은행의 다른 멤버와 비교시 MHC 대립유전자의 상이한 셋트에 대해 각각 반동질이거나 동질이다. 전술한 바와 같이, 유전자 표적화 또는 이질성(heterozygosity)의 소실은, 혈관모세포를 유도하는데 사용되는 반동질 또는 동질의 MHC 대립유전자 줄기세포를 생성하는데 사용될 수 있다. 한 실시형태에서, 환자에게 적합하도록 특정 혈관모세포 제제를 선택한 후, 환자 치료에 적절한 양으로 증대시킬 수 있다. 이러한 방법은 수용체에 세포를 투여하기에 앞서, 혈관모세포를 분화시켜 조혈 및/또는 내피 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 약학 비지니스를 수행하는 방법은 또한 판매용 제제를 분배하는 분배 시스템을 수행하는 것을 포함할 수 있으며, 약학 제제의 마켓팅을 위한 판매군을 설립하는 것을 포함할 수도 있다.

[0381] 본 발명의 다른 양태는 약학적, 화학적, 또는 바이오기술 회사와 같은 설비내 조사기기, 병원, 또는 학술 또는 연구소에서 본 발명의 인간 혈액 모세포의 이용에 관한 것이다. 예를 들어, 인간 혈액 모세포 및 혈액 모세포 유도 세포(예를 들어, 내피 세포)는 신생혈관 및 항-신생혈관 인자를 스크린 및 평가하는데 사용될 수 있으며 또는 조직 엔지니어링에 사용될 수 있다. 또한, 여기에 공지된 방법에 의해 얻어지고 확장된 혈관모세포는 조혈 및 내피 세포로 분화될 수 있는 이중의 가능성을 가지고 있기 때문에, 이들은 조혈 및 혈관형성의 세포 및 분자 생물학용으로 사용될 수 있다. 더 나아가, 인간 혈관모세포는 이들 세포, 유전자, 성장 인자, 및 조혈과 혈관생성에 역할을 담당하는 분화 인자의 새로운 마커의 발견, 또는 잠재적인 독성 또는 보호제를 위한 스크리닝 어세이의 발전 및 약물 발견을 위해 사용될 수 있다.

[0382] 본 발명의 다른 실시형태에서, (혈액 세포와 같은) 혈관모세포 계통 세포는 또한 상업적으로 사용될 수 있다. 조혈 세포는 임상 및 리서치 적용을 위해 사용될 수 있는, 헤모글로빈 및 성장인자와 같은, 혈액 생성물을 생성하는데 사용될 수 있다.

[0383] 본 발명은 또한 환자로부터 얻은 인간 ES 세포 수득 방법 및 ES 세포로부터 유래된 인간 혈관모세포 팽창 방법을 포함한다. 이 혈관모세포들은 저장될 수 있다. 또한 이 혈관모세포들은 ES를 얻은 환자 또는 이 환자의 친척을 치료하는데에 사용될 수 있다.

[0384] 상기 기술한 방법 및 적용은 혈관모세포의 치료, 약학적 제제 및 저장에 관한 것으로, 본 발명은 또한 이런 적용에 적합한 혈관모세포 용액에 관한 것이다. 그러므로, 본 발명은 환자에게 주사용으로 적합한 혈관모세포의 용액에 관한 것이다. 이런 용액은 생리학적으로 허용되는 액체(예를 들어, 생리 식염수, 완충 식염수 또는 균형 식염수 용액)내에서 제제화된 세포를 포함할 수 있다. 용액은 선택적으로 생체내 세포 분화를 촉진하는 인자를 포함할 수 있다. 용액은 골수이식용으로 사용되는 방법을 허용하는 기술에 따라, 환자에게 혈관 투여(예를 들어, 정맥내 주입)함으로써 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 용액은 말초 혈관, 표면 말초 혈관, 또는 대안으로 중심 정맥 투여(예를 들어, 중심 정맥 카테터를 통함)내로 투여된다. 용액내 세포의 수는 약 10^2 이상이며 약 10^9 세포 미만일 수 있다. 다른 실시형태에서, 용액내 세포의 수는 약 10^1, 10^2, $5X10^2$, 10^3, $5X10^3$, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 또는 10^8 내지 약 $5X10^2$, 10^3, $5X10^3$, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 또는 10^{10}의 범위일 수 있으며, 하한선이 항상 상한성 미만인 것을 제외하고, 상한선 및 하한선은 비독립적으로 선택된다. 더 나아가, 세포는 단일 또는 복합 투여로 투여될 수 있다.

[0385] 본 발명은 다음의 실시예를 참고로 하여 보다 구체적으로 기술될 것이며, 이는 단지 설명으로, 상기 기술한 발명의 제한으로 고려되지 않을 것이다.

[0386] **[실시예]**

[0387] **실시예 1 : 조혈 및 내피 가능성을 모두 보이는 인간 ES 세포로부터 유래된** 혈관모세포

[0388] 인간 배아 줄기 세포계 H1과 H9를 마우스 배아 섬유아세포(MEFs)의 ES 세포 배지에서 배양한다. 배양된 인간

ES 세포들을 200g에서 원심분리하여 분리, 펠렛화하고, 배상체(EB) 형성 배지에서 재현탁한다. EB 형성 배지는 BMP-4 및 VEGF가 보충된 혈청-유리 Stemline 배지(Sigma®)을 포함한다. 이 후 세포들을 초저 부착(ultra-low attachment) 배양 플레이트위에 플레이팅하고, CO_2 인큐베이터에서 배양한다. 24-48시간 후, 초기 조혈 사이토카인(TPO, Flt-3계, 및 SCF)을 가하고, EB를 형성하기 위해 또 다른 24-48시간동안 배양한다.

[0389] 배상체(EB)는 2-6일 동안 또는 선택적으로 2-5일 동안 배양되고, 이 후 PBS로 수집, 세척하여, 트립신/EDTA를 사용한 단일 세포 현탁액으로 해제한다. EB의 수를 측정하고, 대략 5-10 X 10^6 세포/mL을 BL-CFU 배지(Stem Cell Technology™)을 포함하고 사이토카인 및 PTD-HOXB4 융합 단백질로 보충된 혈관모세포 성장에 최적화된 무혈청 메틸셀룰로오스 배지에서 배양한다. 이 후 세포들은 혈관모세포 콜로니의 성장을 시키기 위해 새로운 초저 부착 배양 플레이트위에 재플레이팅한다.

[0390] EB는 혈관모세포 콜로니의 형성을 위해 매일 모니터링한다. 대략 3일째에, 혈관모세포 콜로니의 형성이 관찰된다. 혈관모세포는 매우 특징적인 포도형(grape-like) 세포 형태에 의해 특정된다.

[0391] 세포들의 일부는 다시 EB를 형성할 수 있을 것이다(제2 EBs). 제2 EBs는 도 16b에서 보이는 것과 같이, 포도형 형태를 갖지 않는다. 혈관모세포는 또한 제2 EBs보다 작다.

[0392] 이후 이들 혈관모세포 콜로니들은 선택, 가려지고 및 조혈 콜로니-형성 유닛(CFUs) 형성 및 더 분화하는 능력을 검사하기 위해, 메틸셀룰로오스 CFU-배지내로 재플레이팅된다. 유사하게, 이들 혈관모세포 콜로니들은 선택, 가려지고 및 내피 분화로의 첫 단계를 위해 최적화된 피브로넥틴-코팅 배양 플레이트위에 다시 재플레이팅한다.

[0393] 이 선택된 혈관모세포 콜로니들로부터 조혈 전구 세포의 발생을 검사하기 위해, 과립구, 적혈구, 대식세포 및 거대핵세포를 위한 콜로니-형성 유닛(CFU)의 성장은 성장이후 다음 3-10일동안 측정된다.

[0394] 이 분리된 혈관모세포 콜로니로부터 내피 세포의 발생을 검사하기 위해, Matrigel의 두꺼운 층내로 재플레이팅될 때, 분지된 관-척수(tube-cord)를 형성하는 혈관모세포의 능력을 측정한다.

[0395] 내피 세포로 분화하는 분리된 혈관모세포 콜로니의 능력은 또한 내피 세포 표면 마커의 존재 또는 LDL uptake와 같은 다른 내피-특이 어세이를 이용하여 확인할 수 있다.

[0396] **실시예 2 : 혈관모세포 또는 hESC 유래 BC 세포의 부차적인 특징**

[0397] 인간 ES 세포 배양. 본 스터디에 사용되는 hES 세포계는 이전에 기술된 (WA01, WA07, 및 WA09으로 NIH-등록된) H1, H7, 및 H9 세포계 및 Advanced Cell Technology에서 유래된 4개의 계(MA01, MA03, MA40, 및 MA09)이다. 미분화된 인간 ES 세포는 80% 합류될 때까지, 완전한 hES 배지에서 비활성(미토마이신 C-처리된) 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 세포에서 배양된다(Klimanskaya & McMahon,- Approaches of derivation and maintenance of human ES cells: Detailed procedures and alternatives, in Handbook of Stem Cells. Volume 1: Embryonic Stem Cells, ed. Lanza, R. et.al. (Elsevier/Academic Press, San Diego, 2004). 그리고 나서, 미분화된 hES 세포를 2-5분 동안 0.05% 트립신-0.53mM EDTA(Invitrogen™)로 분리하고, 5분 동안 1,000rpm으로 원심분리하여 수집한다.

[0398] EB 형성. 혈관모세포 전구체(중배엽) 형성을 유도하기 위해, hES 세포(2 내지 5 X 10^5 세포/ml)을 BMP-4 및 $VEGF_{165}$ (50 ng/ml, R&D Systems™)의 첨가된 무혈청 Stemline 배지(예를 들어, Stemline I 또는 II, Sigma™) 내 초저 부착 플레이트(Corning™)위에 플레이팅하고, 5% CO_2에서 배양한다. 약 48시간 이후, EB 배지는 초기 조혈/내피 성장 인자의 혼합물(cockatil)로 공급 및 보충한다. 예를 들어, 배지의 반을 48시간 이후에 제거하고, 새로운 배지에 SCF, TPO 및 FLT3 리간드(20 ng/ml, R&D Systems)을 더하여 BMP-4 및 VEGF의 동일한 최종 농도로 가했다. 트리플 단백질 형질 도입, 도메인(tPTD) -HoxB4 융합 단백질(1.5㎍/ml)을 혈관모세포 및 이의 전구체를 증식시키기 위해 48-72시간동안 배양 배지에 가했다.

[0399] 혈관모세포 또는 아세포(blast) 증식. 3.5-5일 후, EBs를 2-5분 동안 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA(Invitrogen™)으로 분리, 수집하고, 단일 세포 현탁액을 22G 바늘을 통해 3-5회 및 40㎛M 스트레이너를 통과시켜 제조한다. 세포들은 5분동안 1,000rpm에서 원심분리하여 수집되고 카운트된다. 세포 펠렛은 무혈청 Stemline 배지의 50-200㎕에서 재현탁된다. 혈관모세포를 증식하기 위해, 2 내지 5 X 10^5 hES 세포의 분화로부터 유래된 EBs로부터 얻은 단일 세포 현탁액은 Iscove의 MDM, 1-2% 소 혈청 알부민, 0.1mM 2-메르캅토에탄올 및 성장인자의 혼합물내 1.0% 메틸셀룰로오스를 포함하는 2ml의 BL-CFC/혈관모세포 증식 배지(BGM)로 혼합된다. 예

를 들어, 10㎍/ml rh-인슐린, 200㎍/ml 철 포화 인간 트랜스페린, 20 ng/ml rh-GM-CSF, 20ng/ml rh-IL- 3, 20ng/ml rh-IL-6, 20ng/ml rh-G-CSF, 3 내지 6 유닛/ml rh-EPO, 50ng/ml rh-SCF, 50ng/ml rh-FLt3 리간드, 50ng/ml rh-VEGF 및 50ng/ml rh-BMP-4) ("rh"는 "인간 재조합"을 나타냄), 및 TPO 및 FL의 1.5㎍/ml의 포함/불포함된 tPTD-HoxB4 융합 단백질의 1.5㎍/ml을 가했다. 세포 혼합물은 초저 부착 플레이트(예를 들어 6-웰 플레이트의 1 웰 내 2-5 X 10^5 세포/2ml)에 플레이팅하고 4-7일 동안 37℃, 5% CO_2에서 배양했다. 4-6일 후, 포도형 혈관모세포 아세포 콜로니(BL-CFCs 또는 BCs로 나타냄)들은 도 16a에서 보이는 것과 같이, 현미경에 의해 관찰되었다.

[0400] WA01 hES 세포 및 MA01 hES 세포로부터 얻은 개별 세포의 약 0.35 ± 0.01% 및 0.52 ± 0.06%는 각각 포도형 모세포 콜로니들(BCs)내로 발육되었다. 시작 3일째, BCs는 <10 세포를 포함하고, 4일 내지 6일동안 빠르게 증식하여 >100 세포가 되었다(도 16a). 콜로니들은 일반적으로 2차 EBs보다 덜 밀집되고 형태적으로 더 균일했다(Fig. 16b). hES 유래 모세포 콜로니들의 Wright-Giemsa 염색 및 사이토스핀(cytospin) 제조는 미성숙 아세포의 형태적 특징을 확인했다(도 16c). 다른 hES 세포계(WA07 [H7] , WA09 [H9] , MA01, MA03, MA09, 및 MA40)로이 결과들을 확대하기 위해, FL(50ng/ml) 및 Tpo(50ng/ml)의 보충물은 BC 콜로니의 지속적인 성장을 위해 필요하다(FL과 Tpo가 없다면, 수득된 작은(10-20 세포) hES-BCs들은 4-8일 이후 죽는다). 다른 hESC계들간 관찰되는 모순은 Bowles et al.에 의해 이전에 관찰된 것과 같이 이 세포계의 내인적 특성에 기인한 것일 수 있다(2006 Stem Cells 24: 1359-1369). Epo(인간 재조합 Epo의 3-6 units/ml)는 또한 시험된 모든 hES의 성장 및 BC 형성에 필수적이었다.

[0401] 시간 과정(2일 내지 6일)은 EB내 인간 BL-CFC 형성을 시험하고, 좁은 시간 주기는 인간 ESC 유래 EBs가 많은 수의 BL-CFCs(또는 hES- BCs)를 생성하는 동안 발견되었다. 2일째, EBs는 낮은 빈도에서 hES-BCs를 생성하였으며(WA01 hES cells의 경우, 57.3 ± 7.4 BCs/1 x 10^5 EB cells, 평균 ± SE, n=3; MA01 hES cells의 경우, 395 ± 10.4 BCs/1 x 10^5 EB cells, n=3), 그리고 6일째 조혈(적혈구) 전구체가 발생했다. 그러나, 3.5일째, EBs는 양 포배(WA01 및 WA09) 및 단일 분할세포(MA01 및 MA09)로부터 유래된 hESC 계를 포함하는, 모든 시험 hESC계내에서 다수의 혈관모세포 또는 hES-BCs(WA01 hES 세포의 경우, 347.4 ± 11.1 BCs/1 X 10^5EB 세포, n=3; MA01 hES 세포의 경우, 523.3 ± 60.1 BCs/1 x 10^5 EB 세포, n=3)를 생성했다. 효율(efficiency)은 hESC계와 성장 조건에 따라 달라짐에도 불구하고(표 1 참조), WA01-GFP 및 MA01 hES세포(12-13 X 10^6 세포)의 하나의 6-웰 플레이트는 각각 약 22.18 ± 3.51 X 10^5(6-8일 동안 증식, 평균 ± SE, n=17), 그리고 49.73 ± 7.23 X 10^6 (6-8일 동안 증식, n=9) 그리고 396.4 ± 91.63 x10^6 (10-13일 동안 증식, n=6)의 혈관모세포 또는 hES- BC 세포를 생성했다. 그러므로, 세포들은 상기 기술한 잘 정의되고 재생가능한 조건하에서 쉽게 증식될 수 있다.

표 1

표 1

다른 hES 세포계통에서 유래된 hES-BC세포의 효율(Efficiency)

hES 세포주	hES-BC 세포 (10^5)*/1 x 10^6 hES 세포
WA01(H1)	11.7; 26.7; 8.4; 20.0; 22.8; 31.9; 27.5; 8.4; 10.0; 16.7; 8.8; 14.2; 9.4; 7.5; 10.0; 52.5; 및 28.0 (17회 실험)*
WA07 (H7)	6.5 및 17.0 (2회 실험)*
WA09 (H9)	1.8; 2.0; 및 2.2 (3회 실험)*
MA01	22.5; 25.0; 45.0; 42.5; 32.5; 42.8; 27.1; 80.0; 및 55.5 (9회 실험)* 156.7; 220.8; 437.5; 192.0; 325.0; 및 650.0 (6회 실험)#
MA09	6.5 및 11.3 (2회 실험)*
MA40	2.2; 2.5; 및 3.0 (3회 실험)*

* hES-BC 세포는 6-8일동안 BGM 내에서 배양된 이후, 수집 및 정제되고, 이 후 세포 수는 혈구계로 측정했다. 효율은 표준 6-웰 플레이트내 hES 세포의 2 x 10^6 세포/웰에 기초하여 계산되었다.
# BCs는 10-13일동안 증식되었다.

[0402]

[0404] 혈관모세포의 냉동보존. 혈관모세포(또는 아세포 또는 hES-BC 세포)는 무혈청 배지로 냉동보존될 수 있다. 혈관모세포의 냉동보존을 위해, 정제된 세포를 동일한 두 부분으로 나눴다: 이 세포의 반을 두 조혈 CFU 어세이 및

내피 세포 발달을 위해 직접 플레이팅하고, 다른 반은 Stemline 배지의 8% DMSO에 재현탁하여 액체 질소내 저장하였다. 그리고 나서 세포는 조혈 및 내피 발달 가능성을 위해 해동하여 시험하였다. 해동하고 나서, 혈관모세포들을 여기 기술한 바와 같이 조혈 및 내피계 발달을 위해 플레이팅하고, 신선한, 정제된 세포와 비교하였다. 내피 세포계통의 경우, 냉동 과정이후 세포의 78 ± 2%(평균 + SE, n=3)가 회수된 반면, 총 조혈 CFUs의 61 ± 7%(n=3)와 CFU-적혈구의 46 ± 4% (n=3)가 신선한 hES-BC 세포와 비교할 때 남았다. CFU-혼합을 위한 더 원시적인 다잠재성 전구체의 손실은 액체 질소 저장에서 hES-BC 세포 회수이후에는 없는 것으로 관찰되었다.

[0405] 혈관모세포의 특징. BL-CFC 면역 세포 화학 분석에 있어서, 정제된 BL-CFCs는 폴리리신 처리한 글라스 슬라이드 위에 사이토스펀(cytospun)하고 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 최대 유전자의 발현을 시험하기 위해, 제1 항체를 4℃에서 밤새동안 배양하고, 다음 형광 염료로 제2 항체를 라벨링하고, 마지막으로 형광 현미경으로 시험하였다. 정상 인간 BM 세포, K562 세포 및 HUVEC를 대조군으로 사용하였다.

[0406] 면역세포화학 분석은 hES 세포 유래 BL-CFCs 또는 BCs가 CD31, CD34 및 KDR가 없는 단백질, 또는 다른 부착 분자와 관련된 여러 혈관모세포를 발현하는 것을 밝혔다. hES-BCs는 GATA-1(도 16d 및 16e) 및 GATA-2 단백질을 나타낸다. GATA-1는 두 원시(배아) 및 최종(성체) 조혈 모두에 필수적인 아연 핑거 전사 인자이며, 마우스의 혈관모세포내에서 발현된다 (Ferreira et al. 2005 *MoI Cell Biol* 25: 1215-1227 and Yokomizo et al. 2007 EMBO *J* 26: 184-196). GATA-2는 혈관모세포 발달 및 분화내 다양한 단계에서 작용하는 아연 핑거 전사 인자이다 (Lugus et al. 2007 *Development* 134: 393-405)). hES 세포 유래 BL-CFCs 또는 BCs는 또한 LMO2(혈관모세포 발달에 중요한 LIM-도메인 단백질(Gering et al. 2003 *Development* 130: 6187-6199)(도 16g 및 16h)과 CXCR-4 (도 16n 및 16o)을 나타낸다. CXCR-4은 케모카인 SDF-I용 수용체로, hESCs, 조혈모세포 및 마우스 혈관모세포에서 유래된 내피 세포의 표면에서 발현된다. CXCR-4 는 골수내 조혈 전구체의 이동, 저류 및 발달에 중요한 역할을 한다. 세포들은 부가적으로 TPO 및 EPO 수용체(도 16t 및 16u, 및 16q 및 16r, 및 표 1)를 나타내고, CD71, 트랜스퍼린 수용체용 특이 항체에 쉽게 반응한다(도 16j 및 16k) (표 2 및 도 16d-v 참고). 세포들은 다른 부착 분자들 또는 CD31, CD34 및 KDR를 거의 또는 발현시키지 않는다(표 2). CD34, CD31, 및 KDR 발현의 부재, 및 CD133 발현의 부재는 표면 마커 발현의 독특한 프로파일이다.

[0407] 유전자 프로파일 분석에 있어서, 총 RNA는 정제된 BL-CFCs/hES-BC 세포, 3.5일된 EBs 및 미분화된 ES 세포로부터 RNAeasy kit(Qiagen)를 사용하여 분리된다. 절단된 안티센스 cRNA는 메사추세츠(Worcester, MA) 대학의 코어 게놈 패실리티에서 인간 U133.2 어레이(Affymetrix®, Inc)로 혼성화를 위해 사용되었다. β-클러스터 글로빈 유전자의 발현 프로파일을 위해, 개별 CFU 클로니들은 선택되고, RNA는 분리 및 증폭되고, β-, γ- 및 ε-글로빈 유전자 발현은 이전에 기술된 것(Lu et al. 2004 Blood (103) : 4134-4141)으로 분석되었다.

[0408] Affymetrix™ 어레이에 의한 분자 프로파일은 혈관모세포와 관련한 유전자내 상당한 증가 및 초기 단계 EBs와 비교하여 초기 원시 적혈구모세포의 발달을 나타낸다(표 2). SCL 및 LMO2, 혈관모세포 발생에 중요한 두 유전자 (D'Souza et al. 2005 Blood (105): 3862-3870; Park et al. 2004 Development (131): 2749-2762; Gering et al. 2003 Development (130): 6187-6199))뿐만 아니라 FLT-I (VEGF용 수용체)는 BL-CFCs/모세포 콜로니내에서 쉽게 검출되었다. 배아(ε-글로빈, 549 배) 및 (γ-글로빈, 817 배) 글로빈 유전자 발현은 BL-CFCs/hES-BCs내에서 극적으로 증가하였다; NF-E2(12 배), GATA-1(6 배), EKLF(7 배), ICAM-4(4 배), 글리코포린(14 배) 및 Epo 수용체(4 배) 메시지(message) 수치 또한 중증도로 증가하였다.

표 2

Affymetric 어레이 및 면역세포화학에 의한 BL-CFC(hES-BCs)의 특징

Affymetrix 어레이			면역세포화학	
Genes (유전자)	EBs	BL-CFC	Antibodies (항체)	BL-CFC
Hemangioblasts (혈액모세포)				
GATA-1	+			
GATA-2	+			
TAL1/SCL	-	+	β- 카테닌	+
LMO2	+	+↑	CXCR-4	+
GATA-2	+	+	Tpo-수용체	+
FLT1	-	+	Epo-수용체	+
EGR-1	+			
HSC 및 *Erythrioblast* (적혈구모세포)			CD71 (트랜스페린 수용체)	+
뉴로키닌 B1	+			
Epo-수용체	+	+↑	KDR	-
c-Kit	+	-	PECAM-1 (CD31)	-
CXCR-4	+	+	VE-cadherin	-
GATA-1	-	+	CD34	-
NF-E2	-	+	OCT-4	-
EKLF	-	+	Nanog	-
ICAM4 (CD242)	-	+	TRA-I-88	-
밴드3 (CD233)	-	+	SSEA-4	-
밴드7.2	+	-	CD41	-
글리코포린(Glycophorins)	-	+	CD43	+
Arkrin-1	-	+	인테그린 α4	—
c-Myc	+	+↑	인테그린 β1	±
ε-글로빈	-	+		
γ-글로빈	-	+		
PF-4	-	+		
PDGF-R2 (CD140A)	+	-		
Pim-1	+	+↑		
Endothelial Cell (내피세포)				
Tie-2	+	-		
VE- 캐더린	-	+		
MADCAM1	-	+		
DOC1	-	+		
EZFIT	-	+		
인테그린 β3 (CD61)	-	+		
셀렉틴 -P (CD62)	-	+		
VEGF	+	-		
Undifferentiated ES Cell (미분화 ES 세포)				
OCT-4	+	-		
TRA-1	+	+↓		
Wnt5a	+	-		
FGF-R	+	+↓		
FGF-R2	+	-		
FGF-R3	+	-		
Mesoderm (중배엽)				
BMP-4	+	-		
BMP-2	+	-		
BMP-7	-	+		
BMP-R1A	+	-		
AVC-R2B	+	+↓		
MEST	+	+↓		
Brunchy T	+	-		
Adhesion molecules (부착 분자)				
E- 캐더린	+	-		
P- 캐더린	+	-		
N- 캐더린	+	+↓		
인테그린 β5	+	-		
인테그린 β1	+	+↓		
코넥신 43	+	+↓		

면역화학용 : +, 중간 내지 강한 염색; -, 음성 염색; ±, 매우 약한 염색.
Affymetrix 어레이용 : +, 백그라운 초과 수치 발현 ; -, 백그라운 미만 수치 발현;
+↑, BL-CFC에서의 발현 수치는 EBs에서의 발현 수치보다 높음; +↓, BL-CFC에서의 발현 수치는 EBs에서의 발현 수치보다 낮음.

[0410]

[0411]

[0412] 혈관모세포의 기능적 특성화. 포도상의 혈관모세포 콜로니를 피킹하고 해부 현미경 하에서 수동적으로 단리하여

무혈청 Stemline(Stemline I) 배지에 재현탁하였다. 그런 다음 이 세포를 후술하는 방법으로 계통 잠재성(lineage potential)에 대해 시험하였다.

[0413] hES-모세포의 클론 형성능(Clonality). hES-모세포 콜로니가 복제적이고 통상적인 이분화능(bipotential) 전구 세포로부터 유래되는지 여부를 결정하기 위해, 마우스 연구(Choi et al. 1998 *Development*(125) : 725- 732; Kennedy et al . 1997 *Nature*(386): 488-493)에 이미 기재된 바와 같은 세포 혼합 실험을 수행하였다. WA01-GFP의 EB로부터의 세포 및 MA01 hES 세포를 혼합하고 BGM에 플레이팅하였다. hES-모세포 콜로니를 4-6 시간 후에 위상 및 형광 현미경으로 조사하였다. 일련의 3ro , 모세포 콜로니의 100%(77개 중 77개)가 GFP 양성 또는 GFP 음성이라는 것이 밝혀졌다(혼합 BC는 관찰되지 않았음, 도 18a 및 18b)

[0414] GFP 음성 콜로니가 비활성 GFP 유전자를 가진 세포를 함유하는 가능성을 배제하기 위해, GFP 양성 및 GFP 음성 콜로니를 GFP 서열의 존재에 대해 조사하였다. 혼합 실험으로부터 12개의 개별 GFP 양성 및 12개의 개별 GFP 음성 콜로니를 위상 및 형광 현미경 하에서 핸드피킹했다. 유전자의 DNA를 MicroDNA kit(Qiagen™)로 단리시켰고, GFP 특이wjrR 반응을 수행하였다. PCR 반응에 대한 내부 대조군으로서, 미오게닌 프라이머를 모든 PCR 반응에 포함시켰는데, 이것은 245 bp의 단편을 생성시킨다. PCR 생성물을 2% 아가로오스 겔에서 분리시켰고 에티디우라 브로마이드 염색에 의해 시각화시켰다. 폴리메라아제 연쇄 반응(PCR) 분석은 모든 음성 콜로니에서 GFP 유전자 서열의 부재를 확인시켜주었다(도 18, PCR 분석).

[0415] 희석 연구로 1차 및 2차 BC의 클론형성성(clonogenicity)을 또한 확인하였다(표 3, 도 18c). 한계 희석 연구는 분화된 EB로부터 상이한 수(1.5×10^3 ~ 1.5×10^4)의 세포를 이용하여 수행되었다. 단일 EB-세포 현탁액을 150 ml BGM(100 세포s/ml)으로 희석시킨 후, 이들을 15 울트라-로우 96-웰 플레이트에 플레이팅하고 BC 발생을 위해 37℃에서 배양하였다. 모세포 콜로니의 클론 원인을 확인하기 위해, 이 평판을 플레이팅 후 4시간 2명의 연구원에 의해 마스킹된 조건 하에서 체크하였다. 이중 또는 삼중 세포 덩어리를 가진 웰은 추가 조사로부터 배제시켰다.

[0416] 마우스 ES 세포 연구에서 Kennedy 외(1997 *Nature* 386: 488-493)에 의해 보고된 바와 같이, 인간 모세포 콜로니(hES-BC 또는 BC) 발생은 또한 적은 세포 수에서 발생이 빈약하고 세포 밀도 의존적이다. 7개의 BC는 15개의 96-웰 플레이트로부터 발생하였다(도 18c). 추가적인 한계 희석 연구는 BC가 2차 BC를 생성하는 잠재성을 가진 세포를 함유하는지를 결정하기 위해 수행하였다.

[0417] 2차 BC 성장에 대해, 1차 모세포 콜로니를 핸드피킹하고 단일 세포로 분리시켰다. 그런 다음 단일 세포를 20 ml BGM과 혼합하여(각각 200, 300, 및 1000 세포) 일련의 희석물을 만들었고, 6개의 울트라-로우 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다(0.1 ml/웰). 이중 또는 삼중 세포 덩어리를 가진 웰은 연구로부터 배제시켰다. 1차 BC와 동일한 형태상의 특징을 가진 29개의 2차 BC는 모두 5개의 96-웰 플레이트로부터 발생하였다. 이러한 실험은 1차 및 2차 hES-BC의 클론형성성을 확인하였다(표 3).

[0418] hES-모세포 콜로니의 이분화 능력(bipotential capacity). 클론적으로 유도된 모세포의 이분화 능력을 설명하기 위해 두개의 전략을 사용하였다. 첫번째 방법에서, 단일 BC 증식을 위해, 개별 hES-BC 콜로니를 핸드피킹하고 조혈 및 내피 계통의 성장을 지지하는 성장 인자를 가진 Stemline II를 함유하는 피브로넥틴 피복된 48-웰 플레이트로 옮겼다. 액체 배양에서의 성장 인자는 재조합 인간 SCF(20 ng/ml), Tpo(20ng/ml), FL(20 ng/ml), IL-3(20 ng/ml) VEGF(20 ng/ml), G-CSF(20n ng/ml), BMP-4(15 ng/ml), IL-6(10 ng/ml), IGF-I(10 ng/ml), 내피 세포 성장 보충인자(ECGS, 100 μg/ml) 및 Epo(3 U/ml)를 함유하였다. 배양 1주일 후, 비부착 조혈 세포를 온화하게 피페팅하여 제거하고, 조혈 CFU 분석에 직접 사용하였다. 비부착 세포를 제거한 후, 부착 집단을 EGM-2 내피 세포 배지(Cambrex™)에서 1주 이상 배양한 다음, vWF의 발현을 조사하였다.

[0419] 개별 BL-CFC를 조혈 및 내피 계통의 성장을 지지하는 성장 인자를 포함하는 액체 배양에 옮겼을 때, 비부착 및 부착 세포 모두 60% 이상(24 중 15) BL-CFC를 발생시켰고(도 18d 및 18e, 표 2); 다양한 조혈 사이토카인으로 보충된 반고형 배지에 재플레이팅 후 이들의 65%(24 중 16)는 적혈구(도 18i), 골수(도 18j 및 18k) 및 다계통(도 18m)을 포함하는 조혈 콜로니를 형성하였다. 개별 BC의 95% 이상(24 중 23)은 부착, 스트로마 유사 세포를 발생시켰는데, 이것은 Ac-LDL을 흡수하며(도 18g) vWF을 발현하는(도 18h) Matrigel(도 18f)에 모세 혈관 구조를 형성하였다.

[0420] 두번째 방법에서, 1차 및 2차 모세포 콜로니로부터의 개별 BC를 피킹하고 두개의 군으로 나누었다; 하나의 군은 조혈 CFU에 대해 시험하였으며 다른 하나의 군은 내피 전구 세포 형성에 대해 시험하였다. 1차 BC에 대해, 90% 이상(24 중 22)이 조혈 및 내피 계통을 발생시켰고; 100% 및 92%가 각각 조혈 및 내피 세포를 발생시켰다(표

3). 유사하게, 한계 희석 실험으로부터의 7개의 개별 BC도 조혈 및 내피 계통으로 분화하는 이들의 잠재성에 대해 조사하였다. 5개의 BC는 조혈 및 내피 자손 세포 모두를 생성하였고(표 3), 통상의 실험으로부터의 BC와 비교하여 낮은 효율을 나타내였는데(71% vs. 92%), 이것은 발생 조건이 최적이 아니기 때문일 수 있다. 29개의 2차 BC에 대해, 절반 이상(29 중 15)이 조혈 및 내피 계통을 발생시킨 반면, 6(21%) 및 3(10%)은 각각 조혈 또는 내피 세포 만을 생성시켰다(표 3). 비록 1차 BC가 조혈 및 내피 세포의 전구체를 포함하여 이종 집단을 포함한다고 해도, 2차 한계 희석 실험은 1차 BC에서 혈관모세포의 존재를 명백하게 나타낸다.

[0421] [표 3]

[0422] 클론 유래 모세포 콜로니로부터의 조혈 및 내피 계통 발생

표 3

[0423]

	콜로니 수	조혈 계통(%)	내피 계통(%)	조혈 및 내피 계통(%)
1차 BC*	24	16(67)	23(96)	15(62)
2차 BC**	24	24(100)	22(92)	22(92)
한계희석으로부터 유래된 1차 BC	7	6(86)	6(86)	5(71)
2차 BC	29	21(72)	20(69)	15(52)

*개별 BC를 피브로넥틴 피복된 플라스틱 웰에 조혈 및 내피 사이토카인을 모두 포함하는 액체 배양물로 옮겼다. 배양 1주 후, 비부착 및 부착 세포를 제거하고 조혈 CFU 및 내피 세포 발생에 대해 조사하였다.

**개별 BC를 EGM-2 배지로 옮겼다; 세포의 절반을 내피 계통 발생을 위한 피브로넥틴 피복 웰에 배양하였고, 나머지 절반은 조혈 CFU 분석을 위해 직접 플레이팅하였다.

[0424] 조혈 전구 세포 분석. 조혈 전구 세포 분석을 위해, 세포의 절반을 무혈청 조혈 콜로니 형성 단위(CFU) 배지(H4436, Stem Cell Technologies™) 1 ml와 0.5% EX-CYTE(Serologicals 단백질s Inc.™) 및 tPTD-HoxB4 1.5 μg/ml와 혼합하였다. 세포는 또한 Iscove's MDM 중 1.0% 메틸셀룰로오스, 1-2% 소 혈청 알부민, 0.1 mM 2- 머캅토에탄올 , 10 μg/ml rh-인슐린, 200 μg/ml 철 포화된 인간 트랜스페린, 20 ng/ml rh-GM-CSF, 20 ng/ml rh-IL-3, 20 ng/ml rh-lL-6, 20 ng/ml rh-G-CSF, 3 units/ml rh-Epo, 50 ng/ml rh-SCF) 및 1.5 to 5 μg/ml PTD-HoxB4 융합 단백질을 함유하는 무혈청 조혈 콜로니 형성 세포 분석 배지와 혼합시킬 수 있다. 세포 혼합물을 미처리 12-웰 세포 배양 플레이트에 플레이팅하고 37℃에서 10-14일간 배양하였다. 조혈 CFU를 최초 플레이팅 후 10-14일 현미경 하에서 조사하였다. 형태적 특성화를 위해, 단일 조혈 CFU를 피킹하여 PBS로 2회 세척하고, 유리 슬라이드 상으로 사이토스핀하고, Wright-Giemsa 염료로 염색하여, 세포 형태를 현미경 하에서 조사하였다. 도 1에 보여지는 바와 같이, 혈관모세포의 조혈 잠재성의 예시로서 조혈 CFU는 Hl-GFP ES 세포로부터 생성된 혈관모세포로부터 관찰되었다.

[0425] 관찰된 다른 조혈 CFU의 형태는 도 2 내지 6에 도시한다. 적혈구를 위한 CFU(CFU-E)는 도 2에서 보여지는 형태에 특징이 있었다. 다기능 CFU(CFU-GEMM/Mix)는 도 3 및 도 4에 보여지는 형태에 특징이 있었다. 과립백혈구를 위한 CFU(CFU-G) 및 대식세포를 위한 CFU(CFU-M)은 도 5에서 보여지는 형태에 특징이 있었다. 과립백혈구/대식세포를 위한 CFU(CFU-GM) 및 거핵구(megakaryocyte) 대식세포를 위한 CFU(CFU-Mk)는 도 6에서 보여지는 형태에 특징이 있었다.

[0426] 혈관모세포의 조혈 잠재능의 다른 예시로서, 단일 세포 현탁액을 10 - 14일동안 상술한 다양한 사이토카인을 함유하는 무혈청 메틸셀룰로오스 배지에 플레이팅하였을 때 적혈구 콜로니(도 17a), 과립백혈구(도 17b), 대식세포(도 17c) 및 다계통(도 17d) 조혈 세포가 또한 관찰되었다. CD235a(적혈구), CD13(골수) 및 CD45(백혈구)에 대한 항체를 이용한 PACS 분석(도 17v-y), Wright-Giemsa 염색(도 17e-g) 및 면역염색(도 17i-k)으로 이들의 조혈 계통의 동일성을 확인하였다. 대부분의 CFU(>50%)는 적혈구 코어를 가진 다계통이었으며, 플레이팅 후 수일 내에 형성되었다(예컨대 도 1 참조).

[0427] 적혈구 콜로니는 밝은 적색을 가진 원시 적혈구의 것과 유사하였으며, Wright- Giemsa 염색은 모든 적혈구가 핵이 형성되었다는 것을 보여주었다(도 17e-g). 적혈구의 발생 단계를 더 구별하기 위해, CFU 콜로니를 β-클러스터 글로빈 유전자의 발현 패턴에 대해 분석하였다(Lu et al. 2004 *Blood*(103) : 4134-4141). 모든 적혈구 및 다계통 콜로니는 배아 ε-글로빈 유전자를 주로 발현하였고; β-글로빈 유전자 메시지는 검출되지 않았으며(나

타낸 데이터 없음), 원시 난황낭과 같은 상태를 암시하였다.

[0428] 면역학적 특성화를 위해, 유리 슬라이드 상에 사이토스핀된 CFU-E, CFU-G, 및 CFU-Mix 세포를 항-인간 CD235a, CD13, 및 CD45 항체로 염색시켰다. 도 17 m-p에 주어진 FACS 분석을 위해, 하나의 웰로부터 수집된 CFU 세포는 마우스 IgG1 이소타입 대조군, CD235a, CD13, 및 CD45로 염색시켰고, Coulter 흐름 세포 측정기로 분석하였다. Wright- Giemsa 염색, 면역염색, 및 FACS 분석으로 이들의 조혈 계통의 동일성을 확인하였다(도 17e-p).

[0429] 도 17v-y에 주어진 FACS 분석을 위해, LSRII 흐름 세포 측정기(BD Biosciences™)에서 표준 절차를 이용하여 3색 세포측정 분석을 수행하였다. 세포를 다양한 유형의 조혈 CFU를 가진 웰로부터 수집하였고, IMDM 배지 5 부피로 메틸셀룰로오스를 희석함으로써 단리시켰다. 단일 세포 현탁액을 부분으로 나누고 이소타입 대조군 또는 항원 특이적 항체로 염색시켰다. 사용된 항체 조합은 플루오레세인-이소티오시아네이트(FITC)에 접합된 CD235a, R-피코에리트린(R-PE)에 접합된 CD45 및 알로피코시아닌(APC)에 접합된 CD13이었다. 또한 세포의 일정 부분은 또한 이소타입 대조군로서 APC, PE, 및 FITC에 접합된 마우스 IgG로 염색시켰다(BD Bioscience™). 샘플을 LSRII 흐름 세포 측정기에서 조작하였고, FlowJo™ 버젼 6.3.2 소프트웨어로 분석하였다.

[0430] 내피 전구 세포 분석. 내피 전구 세포 분석을 위해, 세포의 나머지 반을 3-7일동안 EGM-2 또는 EGM-2MV 완전 배지(Cambrex™)에서 피브로넥틴 피복된 플레이트(BD Bioscience™) 상에 플레이팅하였다. 단리된 혈관모세포 콜로니의 내피 세포로 분화하는 능력은 또한 Matrigel 상의 관 형성, LDL 흡수 및 내피 세포 표면 마커의 존재를 검출하는 면역조직화학을 이용하여 확인되었다.

[0431] *Matrigel 상의 관 형성.* Matrigel(BD Bioscience™)을 4-웰 조직 배양 플레이트(0.2 ml) 또는 96-웰 플레이트(0.05 ml)인 각각의 웰에 첨가하고, 37℃에서 45 - 90분간 고형화하였다. 겔형성 후, 상기 배양물로부터 유래된 0.5 - 1.5 X 10^5 세포를 함유하는 EGM-2 또는 EGM-2MV 배지에 세포 현탁액 0.2-0.3 ml(예컨대, 96-웰 플레이트에 대해 0.1 ml)를 Matrigel의 상부에 위치시키고 37℃, 5% CO_2에서 배양시켰다. 모세관 유사 (관) 구조의 형성을 16-24 시간 배양 후 체크하였다. 도 7은 H9(a) 및 ACT30(b) 세포로부터 유래된 혈관모세포의 관-코드(cord) 형성의 대표적인 사진을 나타낸다; Matrigel 기재 배지 상에 재플레이팅 후, 혈관모세포는 모세혈관 유사 구조를 형성하고 또한 Ac-LDL를 흡수하는 부착 세포를 발생시켰다. 도 8(a)은 또한 H1-GFP 세포로부터 유래된 내피 잠재성을 가진 혈관모세포의 관-코드 구조의 대표적인 사진을 도시한다. 또한, 도 17q는 혈관모세포로부터 유래된 부착 세포의 재플레이팅 후 Matrigel 상에 형성된 모세관 유사 구조를 도시한다. 이러한 세포는 또한 AC-LDL를 흡수할 수 있다(데이터는 나타내지 않음).

[0432] *AC-LDL 흡수.* 피브로넥틴 피복된 웰에서 3-7일간 성장된 혈관모세포를 Alexa Fluor 647-표지 AC-LDL(Invitrogen™) 10 μg/ml와 첨가하고 4-6 시간동안 배양하였다. 그런 다음 세포를 1 X PBS로 3회 세척하고 30분동안 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. AC-LDL의 흡수는 형광 현미경 하에서 시각화되었다. 예를 들어, 도 8b는 H1-GFP 세포로부터 유래된 혈관모세포의 AC-LDL 흡수를 나타낸다. 도 17z 및 17aa는 또한 AlexaFluor 594 표지 AC-LDL와의 배양이 내피 세포의 중단(punctuate) 염색 패턴 특성을 나타낸다는 것을 보여준다.

[0433] *면역세포화학.* 피브로넥틴 피복 웰 상에서 3-7일간 성장한 혈관모세포를 1 X PBS로 3회 세척시키고 4% 파라포름알데피드로 30분간 고정시켰다. von Willebrand 인자(vWF), PECAM-1(CD31), VE-카드헤린, KDR 및 CD34의 발현을 위해, 세포를 투과시킨 다음 1차 항-인간 vWF(Dako™ 또는 Chemicon™), PECAM-1 및 KDR(Cell Signaling Technologies™), VE-카드헤린(R&D Systems™), 및 CD34(Dako) 항체와 함께 각각 4℃에서 밤새 배양시킨 후, Rhodamine 또는 FITC(Jackson Laboratory™)로 표지된 상응하는 2차 항체로 30-60분간 배양시켰다. vWF 단백질의 발현은 또한 염소 항-마우스 IgG-Alexa Fluor 647 2차 항체(Jackson Laboratory™)와 함께 30-60분간 배양함으로써 검출되었다. 최종 세척 후, 세포를 형광 현미경 하에서 체크하였다. 도 9는 H1-GFP ES 세포로부터 유래된 혈관모세포에서의 vWF 발현을 나타낸다. 도 17s는 또한 혈관모세포 유래 내피 세포에서의 vWF의 발현(화살)을 나타낸다. 혈관 유사 구조에서의 부착 세포는 PECAM-1(CD31), KDR 및 VE-카드헤린에 대해 양성이었다(도 17t, 17u, 및 17z-17cc).

[0434] 또한 신생혈관 형성은 부착 세포 또는 핸드피킹된 BL-CFC를 Matrigel과 혼합하고 4-5주간 생체 내 이식하는 경우에 관찰되었다. Matrigel 플러그의 조직학적 검사는 인간 특이적 핵 및 vWF 항체와 면역 반응성인 미세관의 존재를 확인시켰다. 도 10 및 11 참조.

[0435] **실시예 3: 대표적인 HOXB4 단백질을 제조 및 정제하는 방법**

[0436] 대표적인 HOXB4 단백질을 제조하고 정제한다. 이것은 TAT-HA-HOXB4 융합 단백질이다.

[0437] pTAT-HA-HoxB4 발현 벡터는 N-말단 TAT PTD를 포함하는, pTAT-HA 발현 벡터의 NcoI 및 EcoRI 부위(a gift from Dr. SF. Dowdy, University of California San Diego, La Jolla, CA) 내로 N-말단 32 아미노산을 보유 및 미보유하는 HoxB4 ORF(open reading frame)를 포함하는 PCR 단편(센스 프라이머 5'- TAC CTA CCC ATG GAC CAC TCG CCC-3'(SEQ ID NO: 16) 및 안티센스 프라이머 5'-TCG TGG CTC CCG AAT TCG GGG GCA-3'(SEQ ID NO: 17))을 클로닝함으로써 생성시켰다. 생성된 pTAT-HA-HoxB4 플라스미드는 서열 분석에 의해 확인되었고 BL21(DE3)pLysS 박테리아(Invitrogene™) 내로 형질전환되었다.

[0438] 대수기에서 성장하는 박테리아 세포는 30℃에서 4시간동안 1 mM IPTG 로 유도시키고 원심분리에 의해 수집하였다. 6xHis 융합된 재조합 TAT-HoxB4 단백질은 숙주 박테리아에 의해 포함체 내에 격리된 것이 밝혀졌으므로, 세포를 변성 용액(6 M 구아니디늄, 20 mM $NaPO_4$, 및 0.5 M NaCl, pH 7.8)에서 초음파 처리함으로써 분쇄시키고, 그런 다음 6xHis 융합된 TAT-HoxB4 재조합 단백질을 니켈 수지(ProBond resin,Invitrogen™)에 결합시켰다. 수회 세척 후, TAT-HoxB4 융합 단백질을 20 mM $NaPO_4$, pH 4.0, 0.5 M NaCl, 8 M 우레아 및 10 mM 이미다졸에서 용출시켰다. 그런 다음 TAT-HoxB4 융합 단백질을 Sephadex G-25 컬럼에서 IMDM 배지 내로 탈염하고, 부분으로 나누고 즉시 -80℃에서 보관하였다.

[0439] TAT-HoxB4 융합 단백질의 순도 및 농도를 SDS-PAGE 겔 전기이동에 의해 측정하였고, Coomassie 블루 염색으로 시각화하였다. 정제된 TAT-HA-HoxB4 재조합 단백질은 ≒37 KD 단백질로서 작용하였다. 정제된 TAT-HA-HoxB4 단백질의 농도는 동일한 겔에서 BSA 단백질 표준과 비교하여 평가되었다.

[0440] 컴퓨터 모델링에 기초하여, 문헌 [Ho et al. (2001 Cancer Res 61: 474-477)]은 변형된 PTD가 시험관 내 및 생체 내 모두에서 본래의 TAT PTD에 비해 상당히 향상된 단백질 전달 가능성을 보유한다는 사실을 입증하였다. 변형된 PTD-HA-HoxB4 융합 단백질을 제조하기 위해, 센스 5'-CGA TGG GGA TCC GGC TAC GCA CGC GCA GCT GCG CGC CAG GCT CGC GCC GGT GGA TCC ACC ATG-3'(서열번호 18) 및 안티센스 5'-CAT GGT GGA TCC ACC GGC GCG AGC CTG GCG CGC AGC TGC GCG TGC GTA GCC GGA TCC CCA TCG-3'(서열번호 19) 올리고를 BamHI로 분해하였고, 키트(Qiagen™)를 사용하여 정제하였다. 그 다음 pTAT-HA-HoxB4 플라스미드 내 TAT 단편을 변형된 PTD 단편으로 치환하였고, 삼중화(triplicated) PTD 삽입물을 제한 단편 크기에 기초하여 선별하였고, DNA 서열 분석으로 확인하였다. 이 플라스미드는 ptPTD-HA-HoxB4로서 지칭한다. pTAT-HA-HoxB4 및 ptPTD-HA-HoxB4 플라스미드는 BL21(DE3) pLysS 박테리아(Invitrogen™)로 형질 전환하였고, 4시간 동안 30℃에서 1 mM IPTG를 첨가함으로써 HoxB4 융합 단백질 발현을 유도하였다. 6xHis-융합된 재조합 TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 단백질을 숙주 박테리아에 의해 봉입체 내로 격리하였고, 세포를 변성 용액(6M 구아니디늄, 20 mM $NaPO_4$ 및 0.5 M NaCl, pH 7.8)에서 초음파 처리에 의해 파괴한 다음, 6xHis-융합된 TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 재조합 단백질을 니켈 수지(ProBond resin, Invitrogen™)에 결합하였다. 수회의 세척 후, TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 융합 단백질을 20 mM $NaPO_4$, pH 4.0, 0.5 M NaCl, 8 M 우레아 + 10 mM 이미다졸에서 용출시켰다. TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 융합 단백질을 Sephadex G-25 컬럼에서 IMDM 배지로 탈염(desalt)하였고, 분취하여, -80℃에서 즉시 저장하였다. TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 융합 단백질의 순도 및 농도는 SDS-PAGE 겔 전기영동법으로 결정하였고, 쿠마시 블루 염색(Coomassie blue staining)으로 시각화하였다. 정제된 TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 재조합 단백질은 ≈38 KD 단백질로서 작용한다. 정제된 TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 단백질의 농도는 동일한 겔에서 BSA 단백질 표준물과 비교함으로써 추정하였다. 안정성 시험을 위해, TAT-HoxB4 및 tPTDHoxB4 단백질을 울트라 로우(Ultra low) 24-웰 플레이트 내 생존하는 hESC를 함유하는 스템라인(Stemline) II 배지 또는 5% FBS를 함유하는 IMDM 배지에 첨가하였고, 37℃에서 배양하였다. 배지의 분취액을 다양한 시간에서 제거하였고, SDS-PAGE 겔 전기영동법으로 처리하였고, 쿠마시 블루 염색으로 시각화하였다.

[0441] 문헌 [Beslu et al. (2002 Blood 100: 22a)]에는 HoxB4의 N-말단의 최초 31개의 아미노산이 이의 기능을 위해 생략될 수 있고, N-말단 33개의 아미노산의 제거는 더 안정한 단백질을 생성한다는 사실이 기록되었다. 이 결과는 전체 길이 TAT-HoxB4 단백질이 불안정하였고, 수회의 융해 주기 후 ≈30 KD 단백질을 형성한 반면, N-말단-제거된 TAT-HoxB4 및 tPTD-HoxB4 단백질이 반복된 융해 및 37℃에서 하룻밤동안 배양 후 이의 본래의 모양을 유지하였음을 확인시켰다(도 19C). 도 19A에서 도시한 바와 같이, tPTD-HoxB4 및 TATHoxB4는 변성 조건 및 탈염 조건 하에서 다수의 컬럼 크로마토그래피 후 비교적 순수한 단백질이 되었다. 정제된 tPTD-HoxB4 단백질은 BSA 단백질 표준물과 비교하여 추청한 것으로서, 250 내지 300 μg/ml의 PBS 또는 IMDM 배지 중 최대 용해도를 가지면서, 본래의 SDS-PAGE 하에서 단일 ≈38 KD 밴드로서 작용하였다. TAT-HoxB4 융합 단백질로부터 유사한 결과를 얻는다.

[0442] 문헌 [Krosl et al. (2003 Nat Medicine 9: 1428-1432)]에는 TAT-HoxB4 단백질은 FBS를 함유하는 환경에서 매우 불안정하고, 생물학적 기능을 유지하기 위해서는 매 두시간마다 새롭게 해주어야 한다고 설명하였다. 본 명세서에서 존재하는 결과는 tPTD-HoxB4가 5% FBS를 함유하는 배지에서 불안정하였고, 1시간 미만의 반감기를 가지는 것을 확인시켰다.(도 19B), 70℃에서 30분 동안의 FBS 전처리는 대부분의 효소 활동을 제거하였다. 이의 안정성을 추가 조사하기 위해, tPTD-HoxB4 단백질을 무혈청 스템라인 배지에 첨가하였고, 37℃에서 hESC으로 배양하였다. 도 19C에서 도시한 바와 같이, hESC으로의 48시간 배양 후에도, tPTD-HoxB4 단백질의 실질적인 단편이 검출될 수 있었다.

[0443] **실시예 4: SCID 마우스에 이식된 매트리겔 플러그가 내피 세포를 발생시킨다**

[0444] 혈관모세포 유래 내피 세포 또는 H1-GFP 인간 ES 세포로부터 유래한 순수한 혈관모세포(1×10^6 세포)를 정제하였고, 700 ㎕의 매트리겔(BD Biosciences™)에서 재현탁하였다. 이 세포를 4주령 SCID 마우스(Jackson Laboratory™)의 척추 영역에 피하 주사하였다. 주사 후 5주째, 동물로부터 매트리겔 플러그를 제거하였고, 이 플러그로부터 동결 표본을 제조하였다. 매트리겔 플러그의 횡단면을 고정하였고, 표준 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색 뿐만 아니라 항-인간 특이적 핵 항체(MAB1281, Chemicon™) 및 인간 특이적 항-vWF 항체 후, 형광 염료 표지화된 해당 2차 항체(MAB1281를 위한 염소 항-마우스 IgG-텍사르 레드 2차 항체)를 이용하는 면역조직화학법으로 염색하였다. 도 10은 H&E 염색된 매트리겔 플러그의 횡단면 내 혈관을 입증하고, 도 11은 매트리겔 플러그의 횡단면 내 혈관이 인간 특이적 핵 항체에 대해 양성인, 인간 혈관모세포로부터 유래한 세포인 것을 입증한다.

[0445] **실시예 5: 안구의 생체 내 허혈/재관류 연구**

[0446] 2가지 기술, 유리체내 주사 및 양자이입(adoptive transfer)을 이용하여, 생체 내 복구 과정에 대한 hES 유래 혈관모세포의 기여도를 직접적으로 조사하였다. 허혈/재관류(I/R) 손상은 안내압의 상승을 유발하였다. I/R이 손상된 모델은 혈관폐색(vaso-obliteration) 및 무세포 모세관의 생성을 포함하는 망막 내피에 대한 손상을 일으킨다. 망막 I/R 손상 후 7일째, 마우스에 6일째 혈관모세포("hES-BC"로서도 지칭됨)로부터 수집된 형광 표지화된 혈관모세포를 후안구동(retro-orbital)을 통해 전신 주사하였거나(n=13), 또는 유리체내 주사하였다(n=4).

[0447] 주사 후 1일째, 마우스를 안락사시켰고, 망막을 제거하였고, 로다민-접합된 리시누스 코뮤니스 아글루티닌 I로 표지화하였다. 이러한 아글루티닌은 내피 세포에 의해 특이적으로 발현된 당단백질에 결합하므로, 혈관 외부 표면을 형광 표지화하는 데 이용된다.

[0448] 공초점 현미경은 혈관모세포(hES-BC) 유래 내피 세포에 대한 녹색 형광 표지를 입증하였고, 이는 33.5 ± 10 %의 손상된 안구의 망막 맥관구조를 나타냈다. 대조군 안구(도 20a 및 20b, 각각)에서는 녹색 형광이 관찰되지 않았고, 이는 혈관모세포(hES-BC) 세포가 단지 손상된 영역으로만 동화되는 무세포 영역으로 돌아가고, 손상된 망막 내에 비관류성(non-perfused) 무세포 모세관의 재내피화를 일으킨다는 사실을 입증한다(도 21a 및 21b). 이러한 복구 과정은 동일한 방식으로 모든 동물(n=17)에서 관찰되었다.

[0449] I/R 손상된 동물의 두번째 군(n=6)을 전술한 바와 같이 취급한 다음, 희생시키기 전에, 혈관의 혈관 루멘(vascular lumen)을 시각화하고, 결정적으로 이러한 세포에 의해 회복된 혈관을 열렸고, 따라서 기능성인 것을 입증하기 위해 3-5 ㎖의 TRITC-접합된(conjugated) 덱스트란을 사용하여 관류 고정하였다. 적색 염색은 열린 혈관을 나타냈고, 녹색 염색은 혈관모세포(hES-BC) 유래 내피 세포를 입증하였고, 황색 염색은 혈관모세포(hES-BC) 세포가 열린 맥관구조를 발생시킨 위치를 보여주었다. 도 21d는 hES-BC 세포 주사 후 2일째, 황색(적색 및 녹색, 연한 회색으로 나타남) 형광을 갖는 대혈관을 도시하고, 이는 세포가 혈관 벽으로 통합되었고, 혈관이 관류되었음을 나타낸다. 이 동물에서 특히 현저한 것은 녹색으로만 관찰되었던 다수의 미세혈관이었고, 이는 열린 루멘을 발생시키기에 충분하게 성숙되지 않은 새로운 곁 보상 신생맥관구조(collateral compensatory neovasculature)를 나타내는 것으로 보였고, 따라서 비관류된 채로 남아있었다. 도 20c는 동일한 동물의 비손상된 대조군 안구를 도시하고, 명백하게 BC 세포가 어떠한 방식으로도 비손상된 맥관구조와 연관되지 않았음을 입증한다. hES-BC 세포 주사 후 7일째에 희생된 마우스로부터의 망막 편평 표본(mount)에서, 녹색 관(비루멘화, 비관류성 혈관)의 수는 2일째 희생된 마우스에 비해 적었다. TRITC-덱스트란(적색)으로 관류된 hES-BC 세포 유래 혈관(녹색)을 나타내는 황색 혈관(연한 회색 또는 백색으로 나타남)이 더 많이 존재하였다. 이는 완전하게 기능성인 혈관을 나타내고, 혈관모세포(hES-BC) 세포가 손상된 안구의 혈관 내로 통합되었고, 관류된 미세혈관을 갖는 면적을 더 넓히게 하였음을 입증하였다(도 20e).

[0450] 형광 면역조직화학법은 혈관모세포(hES-BC) 세포 유래 내피 세포를 동시 위치시켜(colocalize) I/R 손상을 받은

마우스 안구의 횡단면 내 손상된 맥관구조가 나타나게 하고, 손상된 안구로부터의 망막 내 신경절 세포 층의 혈관의 대표적인 횡단면을 도시한다(도 20f). 혈관의 항-CD31 염색과 인간 핵 항원 염색의 동시 위치는 맥관구조 내 내피 세포 중 일부가 혈관모세포 (hES-BC) 세포로부터 유래하였음을 제시한다. 도 20f는 내경계막에 인접하는 신경절 세포 층 내 혈관 루멘의 고배율 사진을 도시한다. 루멘은 내피 세포에 의해 둘러싸여 있고(도 20f, 화살촉, CD31), 혈관모세포(hES-BC) 세포로부터 유래한 성숙한 내피 세포(들)에 의해 둘러싸여 있다(도 20f, 화살표, 인간 핵 항원).

[0451] 방법. 생체 내 허혈/재관류 연구를 위해, C57BL6/J 마우스(Jackson Laboratory)는 연구의 초반에 7 내지 10주령이었다. 허혈/재관류 손상은 안내압(IOP)의 상승을 유발하였다. 허혈의 유발 동안 마우스를 흡입 마취(이소플루란 증기) 하에 두었다. 안구의 전방(anterior chamber)을 식염수 주입 라인에 부착된 30-게이지 바늘로 캐뉼러를 꽂았고, 안구 전방에 2시간의 정수압(80-90 mmHg, Tono Pen에 의해 측정; Medtronic Solan, Jacksonville, Fla) 처리하였다. 이는 홍채의 백색증 및 적색 반사의 손실에 의해 확인되는 바와 같은 망막 허혈을 일으킨다. 120분 후, 바늘을 제거하였고, IOP를 정상화하였고, 이는 재관류 손상을 일으킨다. 반대쪽 안구는 대조군으로서 작용하였다.

[0452] 망막 허혈 재관류 손상 후 7일째, 마우스에 6일째 hES-BCs로부터 수집된 형광 표지화된 혈관모세포를 후안구동을 통해 전신 주사하였거나(n=13) 또는 유리체내 주사하였다(n=4). 혈관모세포의 형광 바이탈 표지화는 제조사의 설명서에 따라 염료 PKH-67(Sigma-Aldrich™)을 사용하여 수행하였다. 전신 주사의 경우, 각 마우스는 4×10^5 표지화된 혈관모세포를 100 ㎕ 투여한 반면, 유리체내 주사의 경우 각 마우스는 5×10^4 혈관모세포를 2 ㎕ 투여하였다. 유리체내 주사 군의 반대쪽 대조군 안구에는 무균성 등장 식염수의 당량 부피를 주사하였다. 1일 후 마우스를 안락사시켰고, 안구를 제거하였고, 4% 파라포름알데히드에서 1시간 동안 고정하였다. 세척 후, 가장자리 절개술(circumferential limbic incision)로 안구를 절개하여 각막 및 수정체를 제거한 후, 유리체액을 제거하였다. 그 다음 비손상된 신경 망막을 아래 맥락막으로부터 이를 온화하게 떼어냄으로써 제거하였다. 비손상된 망막을 균질화(permeabilization) 완충액에 위치시켰다. 망막을 단리하였고, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl 및 0.1% Tween 20(pH 7.5) 중 1:1000 로다민-접합된 알. 코뮤니스 아글루티닌 I (Vector Laboratories) 내에서 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 24시간 후, 망막을 40℃에서 24시간 동안 10 mM HEPES 및 150 mM NaCl에서 세척한 다음, 플로리다 대학교(Gainesville)의 광학 현미경 시설에서의 MRC-1024 공초점 레이저 현미경(Confocal Laser Scanning Microscope)(BioRad)를 사용하는 이미지화를 위해 커버슬립 상에 표본화하였다. 대안적으로, Zeiss 레이저 스캐닝 공초점 현미경을 이용하여 망막을 이미지화하였다.

[0453] Zeiss 공초점 레이저 현미경을 사용하여 현미경 검사하는 경우, 망막은 유리 커버슬립 상에 위치시켰고, 이의 만곡은 속눈썹 가장자리에서 시신경유두의 1 ㎜ 이내까지 연장되는 4 또는 5번의 방사능 절개술에 의해 편평하게 되었다. 표본화된 망막의 동시성 적색 및 녹색 형광 디지털 이미지 캡처는 10X 또는 20X 대물렌즈를 사용하여 Zeiss 공초점 레이저 현미경으로 이루어졌다. z-구획 깊이는 2 ㎛로 일정하게 유지하였고, 신경 망막의 두께를 통과하여 전체 망막 혈관계(표면, 중간부 및 깊은 혈관 플렉시를 포함)를 스캐닝하였고, 형광 채널당 전형적으로 25-35개의 z-구획 이미지가 발생된다. 이미지 캡처는 망막의 중간부 주변의 임의적 위치에서 이루어졌고, 이 모델에서 대부분의 혈관 손상이 전형적으로 관찰되는 곳이 이 영역이기 때문이다. 3-차원 z-스택은 3개의 혈관 플렉시가 단일 2-차원 평면으로 보일 수 있도록 ImageJ 소프트웨어(ImageJ 1.37c, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html)를 사용하여 편평화시켰다.

[0454] 오른쪽 안구가 I/R 손상 처리된 마우스의 두번째 군(n=6)은 대략 2×10^5 PKH-67 표지화된 hES-BC 또는 혈관모세포를 왼쪽 후안구동 주사로 100 ㎕ 투여 받았다. 마우스는 손상 후 2일째 및 7일째(각 n=3) 안락사시켰고, 좌심실 구멍을 통해 4% 완충된 파라포름알데히드에서 3-5 ㎖ TRITC-접합된 텍스트란(Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, 5 mg/ml)로 관류하였다. 그 다음 안구를 제거하였고, 절개하였고, 앞서 기술한 바와 같은 공초점 현미경에 의한 디지털 이미지 캡처를 위해 망막을 편평하게 표본화하였다. 반대쪽(비손상) 안구는 대조군으로서 작용하였다. 이러한 관류 고정 방법은 기능성 혈관만을 관류할 수 있기 때문에, 열린 혈관의 시각화를 허용한다.

[0455] **실시예 6 : 당뇨병 모델의 생체 내 복구**

[0456] 생체 내 복구는 3개월 초과의 제2 유형 당뇨병이 있는 자발적으로 당뇨병성 비만인 BBZDR/Wor 래트로 연구하였다. 이 래트는 무세포 모세관 및 내피 기능이상, 외막세포 손실 및 혈액 망막 장애 파괴를 포함하는 예비-증식성 당뇨병 망막병증의 다수의 특징을 발생시킨다(문헌 [Shi et al . 1998 Blood (92): 362-367; Asahara et al . 1997 Science (275) : 964-967; Kalka et al . 2000 Circ. Res. (86) : 1198-1202; Murohara et al. 2000

J. Clin. Invest. (105) : 1527-1536; Urbich et al. 2004 Trends Cardiovasc. Med. (14): 318-322] 참조).

[0457] 3개월 이상 당뇨병이 지속된 수컷의 비만인 제2 유형 당뇨병성 BBZDR/Wor 래트(Biomedical Research models, Worcester, MA)와 마른 연령 일치 대조군 및 성 일치 대조군을 사용하여 손상된 모세관의 재내피화에 참여하는 BC의 능력을 조사하였다. 래트는 세포를 투여하기 1일 전부터 연구 기간 동안 계속하여 시클로스포린을 근육 내 주사(2 mg/Kg/일)함으로써 면역 억제하였다. hES-EBc를 원심분리로 펠렛화하였고, 3 × 104/㎕의 농도로 무균성 식염수에서 재현탁시켰고, 5 ㎕의 이 현탁액을 각 6개의 당뇨병성 및 대조군 래트의 각 안구내로 주사하였다. hES-BC 투여 후 2일째(n=3 당뇨병성, n=3 대조군) 및 7일째(n=3 당뇨병성, n=3 대조군) 동물을 안락사시켰다. 각 처리군으로부터 6개의 안구 중 4개를 처리하였고, 망막 편평 표본은 혈관을 시각화하기 위해 로다민-접합된 알. 코큐니스를 이용하여 마우스 I/R 연구에서 기술한 바와 같이 제조하였다. 래트 망막은 추가적으로 단일클론 항-GFP(Chemicon™, Temecula, CA; PBS 중 1:250)와 반응한 후 FITC-접합된 염소 항-마우스 IgG (Abeam™, Cambridge, MA; PBS 중 1:200)와 반응하여 GFP-발현 BC를 시각화하였다. 마우스 I/R 연구에서 기술한 바와 같은 공초점 현미경으로 디지털 이미지 캡처를 수행하였다.

[0458] 각 처리 군으로부터의 나머지 2개의 안구를 고정하였고, 2.5M 수크로즈에서 탈수한 다음, 냉동절단을 위해 OCT 배지로 삽입하였다. 50개 이상의 절편(10 μm 두께, 매 10번째 절편을 유지함)을 수집하였고, 모노클론 래트 항-CD31(Abeam™, PBS 중 1:100), 토끼 항인간 vWF(Sigma-Aldrich™, PBS 중 1:200) 및 1:50 바이오티닐화 항인간 핵 항원과 반응시킨 후, FITC-접합된 항-래트 IgG(Sigma-Aldrich®, PBS 중 1:320) 및 AMCA-접합된 염소 항-토끼 IgG(Vector Laboratories™, Burlingame, VT, PBS 중 1:75) 및 마지막으로 텍사스 레드-접합된 스트렙타비딘(Vector Laboratories, PBS 중 1:500)와 반응시켰다(배양 사이에 적절한 세척 있음). 그 다음 절편을 Vectashield antifade 배지(Vector Laboratories™)에서 표본화하였고, 스팟 CCD 카메라와 연결된 Zeiss Axioplan 2 형광 현미경으로 디지털 이미지를 캡처하였다.

[0459] I/R 마우스 모델에서와 같이, 유리체내 투여된 hES-BC 세포(혈관모세포)가 넓은 맥관구조 및 좁은 맥관구조(도 21a 및 21b) 모두를 갖는 영역 내로 광범위하게 통합되었다. 도 20b는 또한 거의 모두 녹색이고, 매우 급격하게 좁아지는 대혈관(도 21b의 오른쪽 위의 연한 회색 혈관)을 나타낸다. 이러한 "핀치 오프" 혈관은 예비-증식성 당뇨병 망막병증의 특징이고, 이때 미소혈전증(microthrombi)은 혈관 변성 및 하류 허혈을 일으킨다. 이러한 핀치된 넓은 혈관으로부터의 광범위하게 분지화되고, 연속되는 소 혈관은 녹색 BC 세포의 고도의 통합을 보여준다(도 21에서의 연한 회색으로 도시함). 대조적으로, 녹색 hES-BC 세포는 비당뇨병성 대조군 동물으로부터의 안구내 잔류 혈관과 동시 위치하지 않았다. 비당뇨병성 대조군 동물로부터의 안구는 BC 세포가 비손상된 맥관구조내로 통합되는 것이 아니라, hES-BC 세포의 유리체내 투여 후 망막의 끝에 시트로서 남아있다는 것을 확인시켰다(도 21c, 연색 회색 영역)

[0460] 면역조직화학적 분석에 의해, 유리체와 신경 망막을 분리하는 내부 경계 막 직후부의, 당뇨병성 래트 망막의 신경절 세포 층내 세포 라이닝 혈관 루멘내 인간 핵 항원 및 CD31을 이용하는 동시국소화 염색(colocalized staining)을 확인하였다(도 21e 및 21f). 이 해부학적 위치는 외견상의 망막 혈관총의 위치이며, 당뇨병에서 혈관 병리학의 전형적인 위치이다. 이러한 정확한 국소화 및 강력한 통합에 의해 혈관모세포가 당뇨병성 망막증에 관련된 혈관의 수복에 참여하는 것을 명백하게 확인하였다. 대부분의 절편들은, 주변이 내피(CD31) 및 인간 핵 항원 마커 둘 다에 대해 염색되는 세포로 라이닝된 명백히 가시적인 루멘을 가진 혈관을 나타낸 반면(도 21e 및 21f의 화살표), BC 세포도 주입한 비당뇨병성 대조군 래트 안구내 혈관모세포(hES-BC) 세포 통합의 증거는 확인할 수 없었다(도 21d, 화살표).

[0461] **실시예 7: 뮤린 후지 허혈 모델에서 생체내 수복**

[0462] 또한, 뮤린 후지 허혈 모델을 통해 혈관 내피 세포를 생성할 수 있는 BC 세포의 능력을 조사하였다. 실험은 8주령 내지 12 주령 (20~30 g) NOD-SCID β2 마우스(Jackson Laboratory)를 이용하여 수행하였다. 우측 후지의 허혈은 대퇴 동맥 연결술을 이용하여 유도하였고, 혈관모세포(hES-BC) (6 x 10^5 hES-BC 세포) 또는 무세포 배지를 상기 연결술 시술 직후 허혈성 근육 주변 부위에 주입하였다.

[0463] 주입한 혈관모세포(hES-BC)의 생리적인 기능을 입증하기 위해, 우측 허혈성 후지 혈행을 4주 동안 모니터링하고, 좌측의 정상 후지의 혈행과 비교하였다. 면역형광 기법을 이용하여 인간 특이적 vWF(R and D systme™, MN)를 검출하였고, 이식된 혈관모세포(hES-BC) 유래의 혈관 내피 세포를 확인하였다. Alexa Fluor 594와 접합된 제2 항체를 사용하였다. 혈행 분석을 위해, 레이저 도플러 혈액 이미징 기법을 사용하여 대퇴 동맥 연결 이전(0일) 및 이후(3일부터 30일) 마우스의 혈행을 분석하였으며, 혈행 속도는 비허혈성 다리에서의 혈

행에 대한 허혈성 다리에서의 혈행의 비율로서 계산하였다.

[0464] 도 22f 및 도 22g에서 확인할 수 있는 바와 같이, 혈관모세포(hES-BC)는 배지 대조군에 비해 허혈성 다리에서의 혈행 속도의 회복을 유의적으로 증강시켰다($p < 0.0001$). 이러한 개선은 정상 혈행 속도가 얻어질 때까지 4주 동안 지속되었다.

[0465] 허혈성 근육 내로 hES-모세포 콜로니 세포를 주입한지 4주째에, 동물을 희생시키고 인간 특이적 vWF에 대해 면역염색하였다. 근육내 부위는 인간 특이적 vWF 세포의 양성 염색을 보유하는 것으로 확인되었는데, 이는 혈관 조직화를 나타내는 것이다(도 22 d-e). 무세포 배지가 주입된 경색된 근육으로부터 취한 대조군 조직은 인간 vWF 염색을 나타내지 않았다(도 22c).

[0466] **실시예 8 : 뮤린 심근 경색 모델에서 생체내 수복**

[0467] 뮤린 심근 경색(MI) 모델을 이용한 일련의 실험에서, 이미 기술한 바와 같이[참조: Yang et al., 2002 J. Appl. Physiol (93): 1140-1151], 좌측 관상 동맥의 연결에 의해 8 주령 내지 12 주령 (~20~30 g) NOD-SCID β2 마우스(Jackson Laboratory™)에서 심근 경색을 유도하였다. 심근 경색을 유도하고 15분 후에, H1-GFP hES 세포 유래의 3 x 10^5 GFP-혈관모세포(hES-BC) 또는 무세포 배지를 허혈성 심근 및 허혈성 심근의 주변에 이식하였다. 실험 프로토콜은 메모리얼 슬로안-케터링 암 센터의 동물 보호 위원회로부터 승인받았다. 혈관모세포(hES-BC) 주입후 30일째에, 주입된 혈관모세포(hES-BC)의 71%(12/17)는 생존한 반면, 배지 대조군을 주입한 동물의 경우 42%(8/19)가 생존하였다(도 22h, $p < 0.002$).

[0468] 허혈성 심근 및 허혈성 심근의 주변에 혈관모세포(hES-BC)를 주입하고 4주째에 동물을 희생시키고, 신속하게 심장을 적출한 후 PBS 중에서 세척하였다. 심장은 조직 냉동 배지(Fisher Scientific™, NJ)내에 포매시켰다. 냉동 조직은 10-㎛ 슬라이드로 절편화하였다.

[0469] 면역염색을 위해 회수한 경색된 조직으로부터 재생 조직 부위가 인간 vWF에 대해 특이적으로 염색되는 상당수의 내피 세포를 함유하고 있는 것을 확인하였다. 공초점 현미경으로 경색된 조직내 미세혈관의 루멘 내로 인간 특이적 vWF-양성 내피 세포의 혼입을 확인하였다(도 22i). 이들 세포는 근접하게 회합되어 있었으나, 아직까지 고도로 조직화된 혈관 조직을 형성하지는 않았다(도 22b). 대조군 마우스로부터 취한 경색된 심장 조직 내에서 검출할 수 있는 인간 vWF 양성 세포는 없었다.

[0470] 또한, 이식된 혈관모세포(hES-BC)는 심근 세포를 생성시켰다. 이식된 혈관모세포(hES-BC)로부터 재생된 심근 세포를 확인하기 위해, 이중 면역형광 염색 기법을 사용하여 H1-GFP hES 세포(Santa Cruz Biotechnology Inc.™, CA) 유래의 인간 세포에서만 발현되는 GFP 및 cTnI, 심근 세포 마커(Santa Cruz Biotechnology Inc.™, CA)를 검출하였다. GFP를 위해서는 Alexa Fluor 488 또는 TnI를 위해서는 Alexa Fluor 594와 접합된 제2 항체를 사용하였다. 이미지는 형광 현미경으로 촬영하였다. N=3. 도 23은 MI 마우스에서 GFP(가장 밝게 염색된 부위) 및 cTnI(중간 정도로 흐린 부위)의 면역염색을 나타내고; GFP 및 cTnI에 대해 양성으로 염색된 세포는 주입된 hES-BC 세포로부터 유래한 심근 세포였다(도 23, 배율 200x). 화살표는 주입된 hES-BC 세포로부터 유래한 이중 양성 염색 세포를 나타낸다.

[0471] 실시예 7 및 실시예 8의 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 혈관모세포는 심근 경색 후의 사망률을 감소시켰으며, 허혈성 후지에서 거의 정상 수준으로 혈행을 회복시켰다.

[0472] **실시예 9: 혈관모세포 또는 hES-BC 세포는 시험관 내에서 평활근 세포를 생**성시킬 수 있다.

[0473] 본 발명의 혈관모세포 또는 hES-BC 세포는 또한 평활근 세포로 분화될 수 있으며, 따라서 특정 실시형태에서 전능세포(pluripotent)일 수 있다.

[0474] 혈관모세포(hES-BC) 내에서 유전자 발현을 조사하기 위해, 6일째에 세포를 해부 현미경 하에서 주의깊게 취하고, 전체 RNA를 분리하였다. RNAeasy 마이크로 키트(Qiagen™)를 이용하여, 상기 RNA로부터 단일 스트랜드 cDNA를 합성하였는데, 이때 SMART II 및 CDS 프라이머(Clonetech™)와 슈퍼스크립트 III 역전사효소(Invitrogen™)를 사용하였으며, cDNA 풀은 SMART cDNA 합성 키트(Clonetech™)를 이용하여 구성하였다. 평활근 유전자 발현 패턴은 SM22, 평활근 액틴(α-SMA), GAPDH(특질 대조군) 및 평활근 칼포닌(CNN1)에 대해 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR로 분석하였다. 인간 대동맥 평활근 세포(AoSM) 유래의 전체 RNA는 양성 대조군으로 사

용하였으며, 마우스 섬유아세포 3T3 전체 RNA는 음성 대조군으로 사용하였다. PCR 생성물은 1% 아가로즈 겔 상에서 분리하였고, EtBr 형광에 의해 노출시켰다.

[0475] 도 24는 혈관모세포(hES-BC)가 평활근 특이성 유전자 CNN1, α-SMA 및 SM22를 발현하는 것을 보여 준다.

[0476] 본 발명의 혈관모세포로부터 평활근 세포를 유도하기 위해, 평활근 배지(Lonza™) 내 피브로넥틴 코팅된 배양 슬라이드(BD Bioscience™)상에 정제한 혈관모세포(hES-BC)를 플레이팅하고 2-9일간 분화를 유도하였다. 다음으로, 세포를 15분간 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 1X PBS로 세척하고, 0.4% Triton X100으로 투과화(permeabilize)하였다. 평활근 단백질의 발현의 검출을 위해, 투과화한 세포를 4℃에서 밤새 칼포닌(CNN1) 및 α-SMA(Dako)에 대해 1차 항체와 함께 배양한 뒤, 로다민 표지된 2차 항체를 이용하고 형광 현미경으로 검사하였다.

[0477] 도 24에 제시한 결과는 상기 조건하에서의 시험관내 분화 뒤에 어떤 혈관모세포(hES-BC)는 CNN1 및 α-SMA 양성 평활근 세포를 발생시킨다는 것을 명백히 입증한다.

[0478] **실시예 10: 마우스 모델계에서 이식 수용자에서의 면역 관용의 유도**

[0479] 본 발명의 방법에 따라 생성 및 증식된 인간 혈관모세포는 이식 수용자에서 공여자 특이적 관용을 유도하는 데 이용할 수 있다. 혈관모세포 또는 유도된 조혈모세포는 세포가 다수로 제공될 때 무조건 수용자(unconditioned recipient)에 이식될 수 있다. 이식되어 키메라 현상을 발생시키는 혈관모세포의 능력은 마우스를 인간 면역 세포로 재구성한 면역저하 NOD/SCID-Tg 마우스 모델계에서 시험할 수 있다. 면역결핍 NOD/SCID-Tg 마우스는 전신 조사(irradiation)로 처리하고 같은 날에 인간 공여자 혈관모세포를 주사할 수 있다. 인간 태아 흉선 및 태아 간 단편을 마우스의 신장 피막(capsule) 하부에 이식하여 인간 림프구생성 및 인간 면역계의 재구성을 달성한다. 이식된 인간 흉선 및 간 단편은 인간 공여자 혈관모세포에 대해 불일치(mismatch)한다. 다음으로, 제3의 비일치(non-match) 이식편에 대한 관용과 비교하여, 인간 혈관모세포에 대해 일치된(match) 이식편에 대한 관용을 마우스에 대해 시험할 수 있다.

[0480] 이식을 최적화하기 위해, 흉선 조사의 투여에 의해 흉선강(thymic space)을 유도할 수 있다. 마우스 모델에서, 수용자 마우스는 항-CD4 및 항-CD8 mAb과 같은 항-T 세포 mAb를 수용할 수 있고, 0일째에 7 Gy 흉선 조사, 그리고 0 내지 4일째에 인간 혈관모세포를 수용할 수 있다.

[0481] 관용을 평가하기 위해, 혼합 림프구 반응 및 세포 매개 림프구 용해 연구를 수행할 수 있다.

[0482] 또한, hu-SCID 마우스 또는 유사한 모델계에서 키메라 현상을 유도하는 혈관모세포의 능력을 시험하기 위해 상기 기술한 방법에서 인간 태아 간 단편을 인간 혈관모세포로 대용할 수 있다.

[0483] **실시예 11: 이식 수용자에서의 면역 관용의 유도**

[0484] 인간에서, 관용은 본 발명의 방법에 의해 생성 및 증식 또는 증식된 다수의 인간 혈관모세포를 이용하여 달성할 수 있다.

[0485] 말초 키메라 현상은 전신 조사의 필요 없이 다수의 혈관모세포를 통해 달성할 수 있다. 그러나, 중추 결손성(central deletional) 관용을 달성하기 위해서는, 높은 수준의 흉선 내 키메라 현상이 발달되도록 하기 위해 흉선에 강(space)을 생성하는 것이 최적일 수 있다. 흉선 내 강은 특이적 조사에 의해 또는 항-T 세포 항체의 다수의 투여의 이용에 의해 또는 흉선을 고갈시키는 약물에 의해 달성할 수 있다.

[0486] 이식된 장기, 조직 또는 세포가 환자에서 생존하는 시간(이식편 생존)을 늘리기 위해 그리고 이식 절차에서 요구되는 면역 억제의 수준을 줄이기 위해 다음 절차를 설계한다. 장기는 임의의 장기, 예컨대 간, 신장, 췌장 또는 심장일 수 있다. 조직은 임의의 유형의 조직, 예컨대 피부, 뼈, 각막, 힘줄, 인대, 심장 판막 등이 될 수 있다. 세포 또는 세포 요법은 조혈 세포(예컨대 허혈 치료로서의 간엽 줄기 세포 또는 혈액 장애의 치료를 위한 기타 세포와 같은), 당뇨병 치료를 위한 인슐린 분비성 췌장 베타 세포와 같은 췌장 세포, 황반 변성의 치료를 위한 망막 색소 상피 세포, 및 신경 장애의 치료를 위한 세포 기반 요법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0487] 본 방법은 다음 단계들 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 공통자극 차단(costimulatory blockade) 또는 수용자 T 세포의 불활성화; 관용 유도 세포, 예컨대 인간 혈관모세포의 이식; 선택적으로, 공여자 기질조직의 이식 또는 인간 사이토킨의 투여; 및 흉선 조사의 투여. 충분히 많은 개수의 공여자 인간 혈관모세포와 흉선 조사 및/또는 T 세포 공통자극 차단의 조합은 전신 조사의 필요성을 현저히 감소 또는 제거한다. 본 방법은 이들 단계들 중

임의의 것 또는 전부를 포함할 수 있고, 단계들은 다음 순서로 수행할 수 있다.

[0488] 먼저, 말의 항-인간 흉선세포 글로불린(ATG) 또는 기타 고갈성 항 T 세포 고갈제의 조제물을 수용자에 정맥 주사한다. 이 항체 조제물은 성숙한 T 세포를 제거한다. 만일 제거되지 않으면, 성숙한 T 세포는 인간 혈관모세포 또는 이로부터 유도되는 조혈모세포, 그리고 민감화 후에는 이식편 자체의 양쪽 모두의 거부를 촉진할 수 있다. ATG 조제물은 자연 살상(NK) 세포를 또한 제거한다. NK 세포는 이식된 장기에는 아마도 효과를 나타내지 않지만, 새로 도입된 인간 혈관모세포를 거부하도록 즉각 작용할 수 있다.

[0489] 수용자 T 세포가 이식 후에 재생하는 시간 동안 수용자 흉선 내 공여자 항원의 존재는 수용자 T 세포를 관용화하는 데 중요하다. 만일 수용자 T 세포가 재생하기 전에 공여자 인간 혈관모세포가 수용자 흉선에서 확립되어 관용을 유도할 수 없으면, 비골수제거성(non-myeloablative) 치료법 전체를 통해 항-수용자 T 세포 항체의 반복된 투여량이 필요할 수 있다. 수용자 T 세포의 연속적 고갈이 수 주 동안 요구될 수 있다.

[0490] 비골수형성 과정에서의 제2 단계는 특정 성장 인자 또는 사이토카인을 제공하여, 인간 공여자의 혈관모세포 또는 줄기 세포의 접종(engraftment)을 촉진하기 위한 것일 수 있다.

[0491] 그 후 공여자의 인간 혈관모세포(또는 공여자와 일치하는 것)는 수용자에게 주사될 수 있다. 공여 세포는 수용자의 적절한 위치에 자리잡고 수용자의 나머지 세포와 인접하여 성장하고 증식하여, 키메라 림프조혈기계 모집단을 형성한다. 이러한 과정에 의해, 새롭게 형성된 B 세포 (및 이들이 생성하는 항체)가 공여자 항원에 노출되어, 상기 이식이 자가이식으로 인식될 것이다.

[0492] 인간 혈관모세포 또는 유래된 조혈모세포 접종이 달성되는 수용자의 T 세포 수준에서 공여자에 대한 내성도 관찰된다. 일치된 장기 이식이 조혈기계 또는 골수 키메라현상이 일어난 후 몇 달이 지난 수용자에서 일어나는 경우에, 이식이 면역 시스템의 체액성 및 세포성 가지(arm) 양쪽 모두에서 받아들여져야한다. 이러한 접근은 수용자인 환자의 정상 건강 및 면역력이 장기 이식 시점에는 회복될 수 있도록 인간 공여자 혈관모세포의 이식 후 충분히 오랜 후에도 장기 이식의 수행을 가능하게 하는 추가 이점을 갖는다.

[0493] 조혈 공간을 생성하는 많은 방법이 전신 조사(irradiation)를 사용하여 접종을 촉진시킨다. 조사의 필요성은 많은 수의 공여자 혈관모세포를 투여함으로써 실질적으로 감소되거나 제거될 수 있다. 공여자 인간 혈관모세포의 투여는 예를 들어, 흉선 공간을 유도하는 흉선 조사 또는 T 세포 공동자극 차단과 같은 처치와 함께 이루어질 수 있다.

[0494] 마지막으로, T 세포, 특히 흉선 또는 림프절 T 세포는 수용자에게 단기간 동안 면역억제제, 예를 들어, 사이클로스포린 또는 기타 제제를 투여함으로써 더욱 억제될 수 있다.

[0495] 내성을 측정하기 위하여, 혼합 림프구 반응 및 세포 매개 림프구 용해 연구가 수용자에서 이루어질 수 있다.

[0496] 이러한 과정 중 어느 것이나 이식된 장기, 조직 또는 세포의 생존을 도울 수 있지만, 최상의 결과는 상기 단계의 일부 또는 전부가 조합으로 사용되는 경우에 얻어질 수 있다.

[0497] **실시예 12: 인간 RBC 수혈**

[0498] 본 발명의 방법에 의해 제조된 적혈구(RBC)의 생존력 및 기능성을 확인하기 위하여, 인간 RBC를 사용한 수혈이 NOD-scid 마우스에서 수행된다. 마우스는 수혈 1주일 전에 넴부탈 마취 하에서 비장적출된다. 수용자는 수혈 직전에 출혈시켜, 헤마토크릿을 25%로 떨어뜨린다. 출혈 후 1 시간 이내에, 수용자는 0.5 mL PBS 내의 6 x 10^9 인간 RBV를 정맥 주사를 통해 수혈받는다. 초기에 수혈되는 세포는 형광 모니터링의 목적을 위해 카르복시플루오레세인 디아세테이트(CFSE)로 표지된다. 수혈은 2일째에 그리고 이후 매 4일마다 반복된다. 수혈 후 1일째 그리고 이후 4주 동안 매 4일마다 헤파린처리된 모세관으로 꼬리 틈(tail nick)으로부터 20 ㎕의 혈액을 수집하여 수용자 마우스를 모니터링한다. RBC 및 인간 RBC의 퍼센트는 현미경 검사 및 FITC-항-Fy6 항체를 사용하는 유세포 분석기에 의해 측정된다. 이식된 세포의 반감기가 측정된다. 헤모글로빈 F의 발현을 측정하여 RBC의 산소 수송능을 검증한다. RBC이 헤모글로빈 F를 발현하고 일반적으로 유래된 RBC과 견줄 수 있는 반감기를 갖는 것이 기대된다. 따라서, RBC가 기능성일 것이 기대된다.

[0499] 본 명세서는 잘 정의된 그리고 재현가능한 조건 하에서 혈관모세포, 또는 인간 ES-BC 세포가 확실히 유래되고 증식되는 것을 증명하며, 제기능을 발휘하지 못하는 혈관구조를 갖는 환자를 위한 끊임없는 세포원을 나타낸다. 이러한 세포의 농도는 이용률로 한정되지 않으며, 오히려 개별적인 정확한 임상 요구에 맞출 수 있다. 의사가 필요하다고 판단하는 경우, 환자의 전생애에 걸쳐 동일한 세포 집단이 반복적으로 주입되는 것도 가능할

것이다. 또한, 일치하는 또는 감소된 복잡성의 HLA hES 라인의 은행을 만들어내는 능력은 면역억제 약물 및/또는 면역조절 프로토콜 모두의 필요를 잠재적으로 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0500] 본 명세서는 또한 배아 줄기 세포로부터 유래된 혈관모세포가 4가지 서로 다른 동물 모델에서 혈관 복구를 달성하는데 사용될 수 있음을 처음으로 증명한다. 새로운 혈관의 형성은 빠르고 활발하여, hES 유래 혈관모세포가 생체 내에서 활발한 복구 잠재력을 가지고 있음을 보여준다. 이러한 결과는 또한 혈관성 질병을 갖는 환자에서 혈관화 및 기능을 회복하는데 혈관모세포가 사용될 수 있음을 나타낸다. 따라서 혈관모세포와 같은 내피 전구체 세포의 입양 전이(adoptive transfer)는 혈관 흐름을 회복시키고 모세관 밀도를 증가시키며, 사지 손실을 감소시키고, 심근 손상으로부터의 회복을 촉진하는데 유용할 수 있다.

[0501] 본 명세서는 또한 수혈에 사용하기 위한 분화된 세포 종류를 생성하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서는 수혈에서 사용하기 위한 적혈구를 생성하는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 적혈구는 헤모글로빈 F를 발현한다.

[0502] 모든 실험은 눈 및 시각 연구에 동물을 사용하기 위한 ARVO 규정의 교의 및 플로리다 대학의 동물 관리 및 사용 위원회가 허가한 프로토콜에 따라 수행된다.

서열 목록

서열 번호 1 (인간 HOXB4 아미노산 서열 - 진뱅크 수탁 번호 **GI:13273315**)

```
1   mamssflinsnyvdpkfppceeysqsdylpsdhspgyyagggrressfqpeagfgrraac
61  tvqryaacrdpgpppppppppppppglsprapapppagallpepgqrceavssspppp
121 pcaqnplhpspshsackepvvypwmrkvhvstvnpnyaggepkrsrtaytrqqvleleke
181 fhynryltrrrrveiahalclserqikiwfqnrrmkwkkdhklpntkirsggaagsaggp
241 pgrpnggpral
```

서열 번호 2 (인간 HOXB4 DNA 서열 - 진뱅크 수탁 번호 **GI:85376187**)

```
1    GGAAAACGAGTCAGGGGTCGGAATAAATTTTAGTATATTTTGTGGGCAATTCCCAGAAAT
61   TAATGGCTATGAGTTCTTTTTTGATCAACTCAAACTATGTCGACCCCAAGTTCCCTCCAT
121  GCGAGGAATATTCACAGAGCGATTACCTACCCAGCGACCACTCGCCCGGGTACTACGCCG
181  GCGGCCAGAGGCGAGAGAGCAGCTTCCAGCCGGAGGCGGGCTTCGGGCGGCGCGCGGCGT
241  GCACCGTGCAGCGCTACGCGGCCTGCCGGGACCCTGGGCCCCCGCCGCCTCCGCCACCAC
301  CCCCGCCGCCCCCGCCACCGCCCGGTCTGTCCCCTCGGGCTCCTGCGCCGCCACCCGCCG
361  GGGCCCTCCTCCCGGAGCCCGGCCAGCGCTGCGAGGCGGTCAGCAGCAGCCCCCCGCCGC
421  CTCCCTGCGCCCAGAACCCCCTGCACCCCAGCCCGTCCCACTCCGCGTGCAAAGAGCCCG
481  TCGTCTACCCCTGGATGCGCAAAGTTCACGTGAGCACGGTAAACCCCAATTACGCCGGCG
541  GGGAGCCCAAGCGCTCTCGGACCGCCTACACGCGCCAGCAGGTCTTGGAGCTGGAGAAGG
601  AATTTCACTACAACCGCTACCTGACACGGCGCCGGAGGGTGGAGATCGCCCACGCGCTCT
661  GCCTCTCCGAGCGCCAGATCAAGATCTGGTTCCAGAACCGGCGCATGAAGTGGAAAAAAG
721  ACCACAAGTTGCCCAACACCAAGATCCGCTCGGGTGGTGCGGCAGGCTCAGCCGGAGGGC
781  CCCCTGGCCGGCCCAATGGAGGCCCCCGCGCGCTCTAGTGCCCCCGCACGCGGGAGCCAC
841  GAACCTCGGGGTGGGGGTGGGCAGTGAGTGCAGGGGATGGGGTGGGGGGACAGGAGGGGG
901  CCCTGGGGCCTGGGCCCCGGAAAAATCTATCTGCCCTCCCCCACACTTTATATACGAATA
961  AACGCAGAAGAGGGGGAGGGGAAGCTTTATTTATAGAAATGACAATAGAGGGCCACGGGG
1021 AGGCCCCCCCAGAAGCAAGATTCAAATCTCTTGCTTTCTTTCTTAAAAAAAAGAAAAAGA
1081 AAAAGCAAGAAGAAGGAAGAAAGAAAAAGACAGAAAGAGAAATAGGAGGAGGCTGCAGCT
1141 CCTCGTTTTCAGCTTTGGCGAAGATGGATCCACGTTTCATCTTTAATCACGCCAGGTCCA
1201 GGCCCATCTGTCTTGTTTCCTCTGCCGAGGAGAAGACGGGCCTCGGTGGCGACCATTACC
1261 TCGACACCCGCTAACAAATGAGGCCCGGCTCGGCCGCCTCCGCCTCTGCTACTGCCGCTG
1321 CTGGAAGACAGCCTGGATTTCCTTTCTTTGTCCCCCACTCCCGATACCCAGCGAAAGCAC
1381 CCTCTGACTGCCAGATAGTGCAGTGTTTTGGTCACGGTAACACACACACACTCTCCCTCA
1441 TCTTTCGTGCCCATTCACTGAGGGCCAGAATGACTGCTCACCCACTTCCACCGTGGGGTT
1501 GGGGGTGGGCAACAGAGGAGGGGAGCAAGTAGGGAAGGGGGTGGCCTTGACAACTCAGGA
1561 GTGAGCAGGAAAATTGAGTCCAAGGAAAAAGAGAGACTCAGAGACCCGGGAGGGCCTTCC
1621 TCTGAAAGGCCAAGCCAAGCCATGCTTGGCAGGGTGAGGGGCCAGTTGAGTTCTGGGAGC
1681 TGGGCACTACTCTGCCAGTCCAGAGTTGTACAGCAGAAGCCTCTCTCCTAGACTGAAAAT
1741 GAATGTGAAACTAGGAAATAAAATGTGCCCCTCCCAGTCTGGGAGGAGGATGTTGCAGAG
1801 CCCTCTCCCATAGTTTATTATGTTGCATCGTTTATTATTATTATTGATAATATTATTATT
1861 ACTATTTTTTTGTGTCATGTGAGTCCTCTCTCCTTTTCTCTTTCTGACATTCCAAAACCA
1921 GGCCCCTTCCTACCTCTGGGGCTGCTTGAGTCTAGAACCCTTCGTATGTGTGAATATCTG
1981 TGTGCTGTACAGAGTGACAATAGAAATAAATGTTTGGTTTCTTGTGACCAGCAAAAAAAA
2041 AA
```

[0503]

서열 번호 3 (인간 HOXB4 아미노산 서열 - 진뱅크 수탁 번호 **GI:29351568)**

```
1    mamssflinsnyvdpkfppceeysqsdylpsdhspgyyaggqrressfqpeagfgrraac
61   tvqryaacrdpgpppppppppppppppglsprapapppagallpepgqrceavsssppp
121  pcaqnplhpspshsackepvvypwmrkvhvstvnpnyaggepkrsrtaytrqqvleleke
181  fhynryltrrrrveiahalclserqikiwfqnrrmkwkkdhklpntkirsggaagsaggp
241  pgrpnggpral
```

서열 번호 4 (인간 HOXB4 DNA 서열 - 진뱅크 수탁 번호 **GI:29351567)**

```
1     GGAAAACGAGTCAGGGGTCGGAATAAATTTTAGTATATTTTGTGGGCAATTCCCAGAAAT
61    TAATGGCTATGAGTTCTTTTTTGATCAACTCAAACTATGTCGACCCCAAGTTCCCTCCAT
121   GCGAGGAATATTCACAGAGCGATTACCTACCCAGCGACCACTCGCCCGGGTACTACGCCG
181   GCGGCCAGAGGCGAGAGAGCAGCTTCCAGCCGGAGGCGGGCTTCGGGCGGCGCGCGGCGT
241   GCACCGTGCAGCGCTACGCGGCCTGCCGGGACCCTGGGCCCCCGCCGCCTCCGCCACCAC
301   CCCCGCCGCCCCCGCCACCGCCCGGTCTGTCCCCTCGGGCTCCTGCGCCGCCACCCGCCG
361   GGGCCCTCCTCCCGGAGCCCGGCCAGCGCTGCGAGGCGGTCAGCAGCAGCCCCCCGCCGC
421   CTCCCTGCGCCCAGAACCCCCTGCACCCCAGCCCGTCCCACTCCGCGTGCAAAGAGCCCG
481   TCGTCTACCCCTGGATGCGCAAAGTTCACGTGAGCACGGTAAACCCCAATTACGCCGGCG
541   GGGAGCCCAAGCGCTCTCGGACCGCCTACACGCGCCAGCAGGTCTTGGAGCTGGAGAAGG
601   AATTTCACTACAACCGCTACCTGACACGGCGCCGGAGGGTGGAGATCGCCCACGCGCTCT
661   GCCTCTCCGAGCGCCAGATCAAGATCTGGTTCCAGAACCGGCGCATGAAGTGGAAAAAAG
721   ACCACAAGTTGCCCAACACCAAGATCCGCTCGGGTGGTGCGGCAGGCTCAGCCGGAGGGC
781   CCCCTGGCCGGCCCAATGGAGGCCCCCGCGCGCTCTAGTGCCCCCGCACGCGGGAGCCAC
841   GAACCTCGGGGTGGGGGTGGGCAGTGAGTGCAGGGGATGGGGTGGGGGGACAGGAGGGGG
901   CCCTGGGGCCTGGGCCCCGGAAAAATCTATCTGCCCTCCCCCACACTTTATATACGAATA
961   AACGCAGAAGAGGGGGAGGGGAAGCTTTATTTATAGAAATGACAATAGAGGGCCACGGGG
1021  AGGCCCCCCCCAGAAGCAAGATTCAAATCTCTTGCTTTCTTTCTTAAAAAAAAGAAAAAGA
1081  AAAAGCAAGAAGAAGGAAGAAAGAAAAAGACAGAAAGAGAAATAGGAGGAGGCTGCAGCT
1141  CCTCGTTTTCAGCTTTGGCGAAGATGGATCCACGTTTCATCTTTAATCACGCCAGGTCCA
1201  GGCCCATCTGTCTTGTTTCCTCTGCCGAGGAGAAGACGGGCCTCGGTGGCGACCATTACC
1261  TCGACACCCGCTAACAAATGAGGCCCGGCTCGGCCGCCTCCGCCTCTGCTACTGCCGCTG
1321  CTGGAAGACAGCCTGGATTTCCTTTCTTTGTCCCCCACTCCCGATACCCAGCGAAAGCAC
1381  CCTCTGACTGCCAGATAGTGCAGTGTTTTGGTCACGGTAACACACACACACTCTCCCTCA
1441  TCTTTCGTGCCCATTCACTGAGGGCCAGAATGACTGCTCACCCACTTCCACCGTGGGGTT
1501  GGGGGTGGGCAACAGAGGAGGGGAGCAAGTAGGGAAGGGGGTGGCCTTGACAACTCAGGA
1561  GTGAGCAGGGAAATTGAGTCCAAGGAAAAAGAGAGACTCAGAGACCCGGGAGGGCCTTCC
1621  TCTGAAAGGCCAAGCCAAGCCATGCTTGGCAGGGTGAGGGGCCAGTTGAGTTCTGGGAGC
1681  TGGGCACTACTCTGCCAGTCCAGAGTTGTACAGCAGAAGCCTCTCTCCTAGACTGAAAAT
1741  GAATGTGAAACTAGGAAATAAAATGTGCCCCTCCCAGTCTGGGAGGAGGATGTTGCAGAG
1801  CCCTCTCCCATAGTTTATTATGTTGCATCGTTTATTATTATTATTGATAATATTATTATT
1861  ACTATTTTTTTGTGTCATGTGAGTCCTCTCTCCTTTTCTCTTTCTGACATTCCAAAACCA
1921  GGCCCCTTCCTACCTCTGGGGCTGCTTGAGTCTAGAACCCTTCGTATGTGTGAATATCTG
1981  TGTGCTGTACAGAGTGACAATAGAAATAAATGTTTGGTTTCTTGTGAAAAAAAAAAAAAA
```

서열 번호 5 (막 전좌 활성을 부여하는 HIV TAT 단백질 잔기 47-57)

YGRKKRRQRRR

서열 번호 **6 (TAT PTD)**

RKKRRQRRR

[0504]

서열 번호 **7** **(TAT PTD)**

YARKARRQARR

서열 번호 **8** **(TAT PTD)**

YARAAARQARA

서열 번호 **9** **(TAT PTD)**

YARAARRAARR

서열 번호 **10** **(TAT PTD)**

RARAARRAARA

서열 번호 **11** **(Antp PTD)**

RQIKIWFQNRRMKWKK

서열 번호 **12** **(HSV VP22 PTD)**

DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE

서열 번호 **13** **(HeptaARG PTD)**

RRRRRRR

서열 번호 **14** (TAT PTD)

YARAAARQARA

서열 번호 **15** (TAT PTD – 3개의 다량체)

YARAAARQARAYARAAARQARAYARAAARQARA

서열 번호 **16** (pTAT-HA-HoxB4에 대한 센스 프라이머)

TAC CTA CCC ATG GAC CAC TCG CCC

서열 번호 **17** (pTAT-HA-HoxB4에 대한 안티센스 프라이머)

TCG TGG CTC CCG AAT TCG GGG GCA

서열 번호 **18** (변형된 pTAT-HA-HoxB4 에 대한 센스 프라이머)

CGA TGG GGA TCC GGC TAC GCA CGC GCA GCT GCG CGC CAG GCT CGC GCC GGT GGA TCC ACC ATG

[0505]

서열 번호 **19** (변형된 pTAT-HA-HoxB4에 대한 안티센스 프라이머)

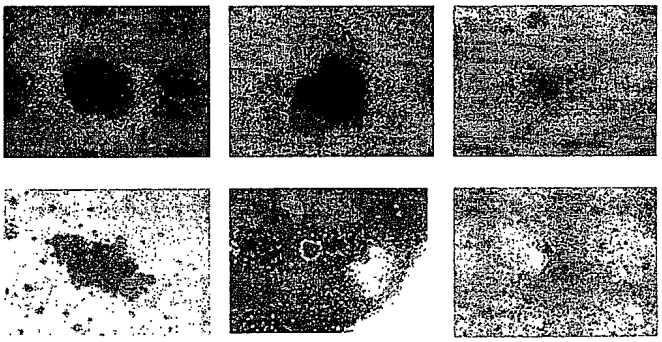
CAT GGT GGA TCC ACC GGC GCG AGC CTG GCG CGC AGC TGC GCG TGC GTA GCC GGA TCC CCA TCG

[0506]

도면

도면1

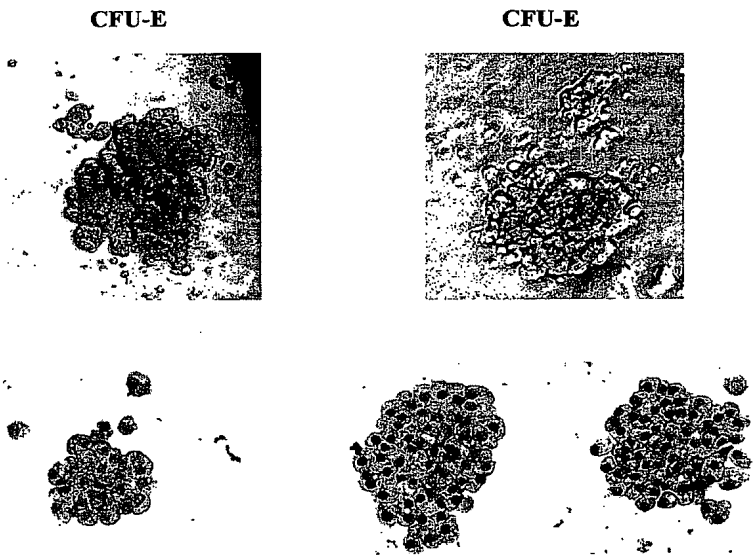
조혈세포 콜로니 형성 단위



혈관모세포 재플레이팅으로부터 유도된 조혈세포 CFU

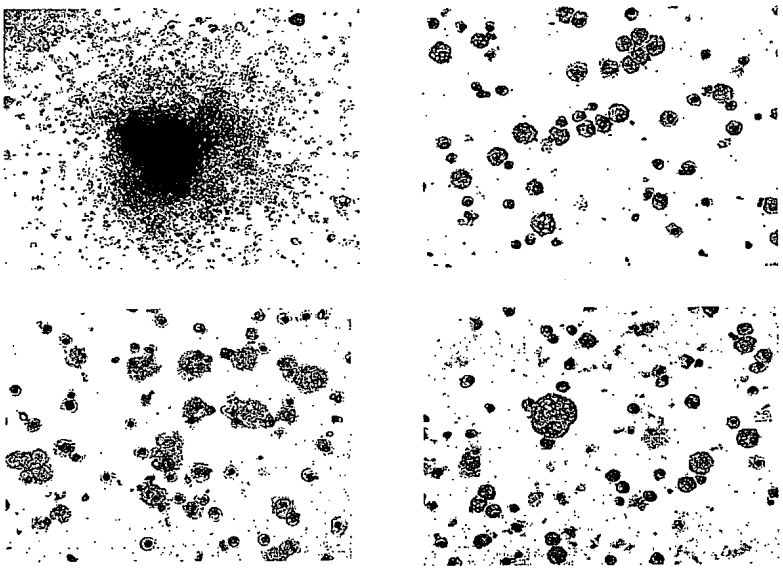
도면2

적혈구 콜로니 형성 단위



도면3

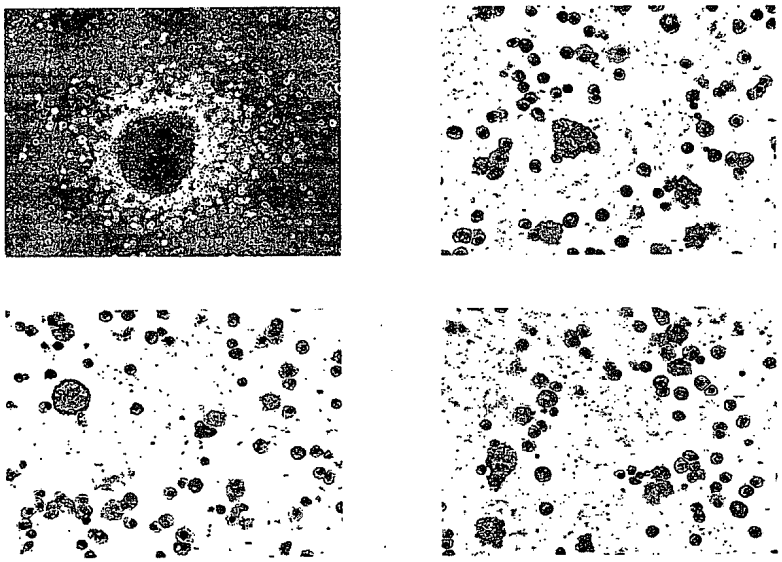
다분화능 콜로니 형성 단위



CFU-GEMM/혼합물

도면4

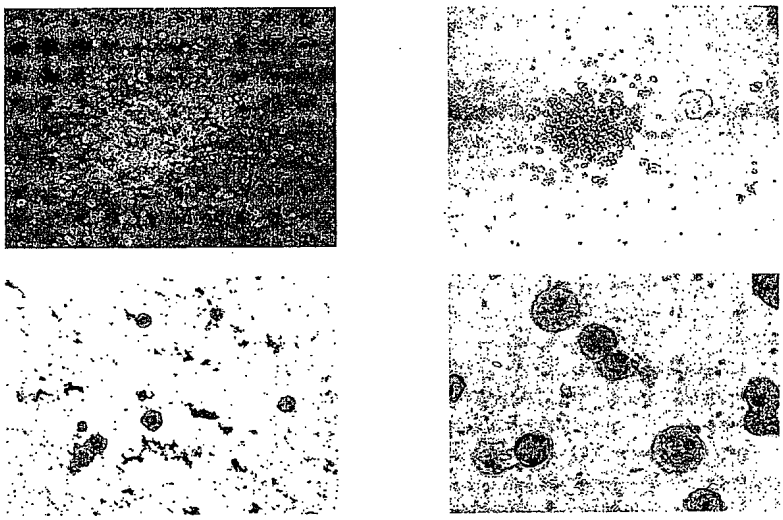
다분화능 콜로니 형성 단위



CFU-GEMM/혼합물

도면5

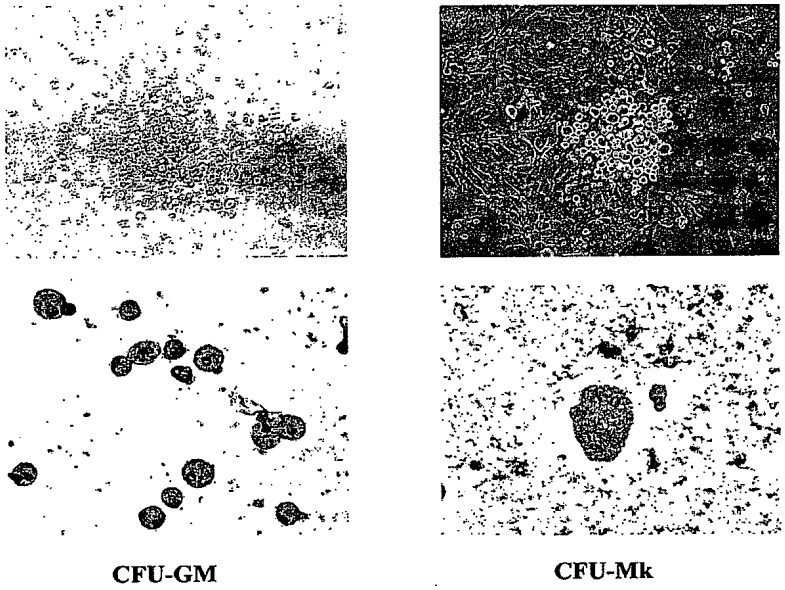
과립구 콜로니 형성 단위(CFU-G) 및 대식세포 콜로니 형성 단위(CFU-M)



CFU-G　　CFU-M

도면6

과립구/대식세포 콜로니 형성 단위(CFU-GM) 및
거핵구/대식세포 콜로니 형성 단위(CFU-Mk)

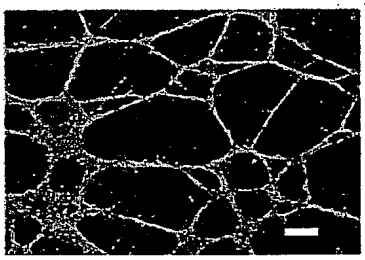


CFU-GM　　CFU-Mk

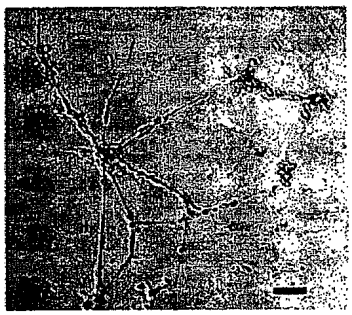
도면7

매트리겔을 주성분으로 하는 배지에 혈관모세포를 재플레이팅하면
부착성 세포가 생성되고 모세관/혈관 유사 구조가 형성됨

a) 매트리겔 상에 재플레이팅된 혈관모세포(H9 ES 세포 유래)의 튜브-코드 형성

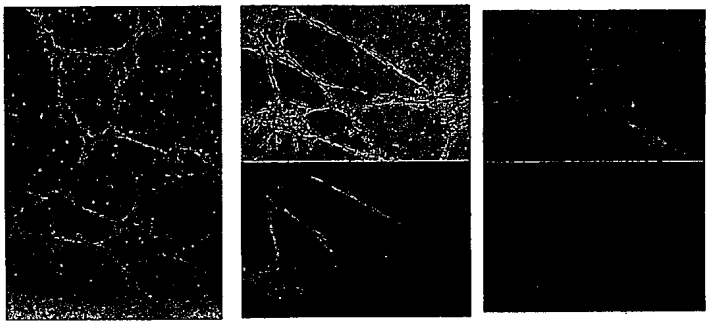


b) 매트리겔 상에 재플레이팅된 혈관모세포(ACT30 ES 세포 유래)의
튜브-코드 형성



도면8

H1-GFP ES 세포 유래 혈관모세포의 재플레이팅 후의 튜브-코드 형성



코드 형성 상 및 GFP AC-LDL 흡수

혈관모세포 재플레이팅으로부터 유도된 내피 세포

도면9

재플레이팅된 혈관모세포에서의 폰 빌레브란트 인자(vWF)의 발현



vWF 발현 (X40)

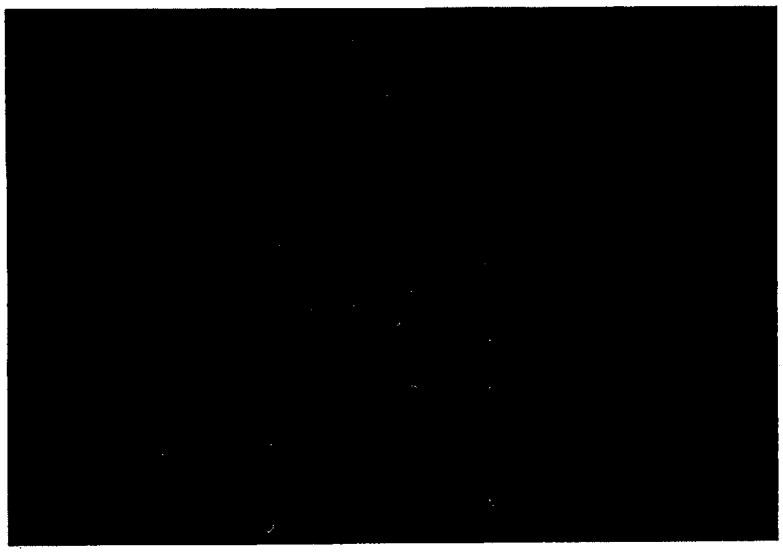
도면10

SCID 마우스에 주사된 매트리겔 플러그에서의 혈관 형성



도면11

인간 특이적 핵 항체에 대해 양성인 매트리겔 플러그 염색에서의 혈관



도면12

호모 사피엔스 호메오박스 B4(HOXB4), mRNA (서열 번호 2)
NM_024015.4 GI:85376187

```
   1 GGAAAACGAG TCAGGGGTCG GAATAAATTT TAGTATATTT TGTGGGCAAT TCCCAGAAAT
  61 TAATGGCTAT GAGTTCTTTT TTGATCAACT CAAACTATGT CGACCCCAAG TTCCCTCCAT
 121 GCGAGGAATA TTCACAGAGC GATTACCTAC CCAGCGACCA CTCGCCCGGG TACTACGCCG
 181 GCGGCCAGAG GCGAGAGAGC AGCTTCCAGC CGGAGGCGGG CTTCGGGCGG CGCGCGGCGT
 241 GCACCGTGCA GCGCTACGCG GCCTGCCGGG ACCCTGGGCC CCCGCCGCCT CCGCCACCAC
 301 CCCCGCCGCC CCCGCCACCG CCCGGTCTGT CCCCTCGGGC TCCTGCGCCG CCACCCGCCG
 361 GGGCCCTCCT CCCGGAGCCC GGCCAGCGCT GCGAGGCGGT CAGCAGCAGC CCCCCGCCGC
 421 CTCCCTGCGC CCAGAACCCC CTGCACCCCA GCCCGTCCCA CTCCGCGTGC AAAGAGCCCG
 481 TCGTCTACCC CTGGATGCGC AAAGTTCACG TGAGCACGGT AAACCCCAAT TACGCCGGCG
 541 GGGAGCCCAA GCGCTCTCGG ACCGCCTACA CGCGCCAGCA GGTCTTGGAG CTGGAGAAGG
 601 AATTTCACTA CAACCGCTAC CTGACACGGC GCCGGAGGGT GGAGATCGCC CACGCGCTCT
 661 GCCTCTCCGA GCGCCAGATC AAGATCTGGT TCCAGAACCG GCGCATGAAG TGGAAAAAAG
 721 ACCACAAGTT GCCCAACACC AAGATCCGCT CGGGTGGTGC GGCAGGCTCA GCCGGAGGGC
 781 CCCCTGGCCG GCCCAATGGA GGCCCCCGCG CGCTCTAGTG CCCCCGCACG CGGGAGCCAC
 841 GAACCTCGGG GTGGGGGTGG GCAGTGAGTG CAGGGGATGG GGTGGGGGGA CAGGAGGGGG
 901 CCCTGGGGCC TGGGCCCCGG AAAAATCTAT CTGCCCTCCC CCACACTTTA TATACGAATA
 961 AACGCAGAAG AGGGGGAGGG GAAGCTTTAT TTATAGAAAT GACAATAGAG GGCCACGGGG
1021 AGGCCCCCCC AGAAGCAAGA TTCAAATCTC TTGCTTTCTT TCTTAAAAAA AAGAAAAAGA
1081 AAAAGCAAGA AGAAGGAAGA AAGAAAAAGA CAGAAAGAGA AATAGGAGGA GGCTGCAGCT
1141 CCTCGTTTTC AGCTTTGGCG AAGATGGATC CACGTTTCAT CTTTAATCAC GCCAGGTCCA
1201 GGCCCATCTG TCTTGTTTCC TCTGCCGAGG AGAAGACGGG CCTCGGTGGC GACCATTACC
1261 TCGACACCCG CTAACAAATG AGGCCCGGCT CGGCCGCCTC CGCCTCTGCT ACTGCCGCTG
1321 CTGGAAGACA GCCTGGATTT CCTTTCTTTG TCCCCCACTC CCGATACCCA GCGAAAGCAC
1381 CCTCTGACTG CCAGATAGTG CAGTGTTTTG GTCACGGTAA CACACACACA CTCTCCCTCA
1441 TCTTTCGTGC CCATTCACTG AGGGCCAGAA TGACTGCTCA CCCACTTCCA CCGTGGGGTT
1501 GGGGGTGGGC AACAGAGGAG GGGAGCAAGT AGGGAAGGGG GTGGCCTTGA CAACTCAGGA
1561 GTGAGCAGGA AAATTGAGTC CAAGGAAAAA GAGAGACTCA GAGACCCGGG AGGGCCTTCC
1621 TCTGAAAGGC CAAGCCAAGC CATGCTTGGC AGGGTGAGGG GCCAGTTGAG TTCTGGGAGC
1681 TGGGCACTAC TCTGCCAGTC CAGAGTTGTA CAGCAGAAGC CTCTCTCCTA GACTGAAAAT
1741 GAATGTGAAA CTAGGAAATA AAATGTGCCC CTCCCAGTCT GGGAGGAGGA TGTTGCAGAG
1801 CCCTCTCCCA TAGTTTATTA TGTTGCATCG TTTATTATTA TTATTGATAA TATTATTATT
1861 ACTATTTTTT TGTGTCATGT GAGTCCTCTC TCCTTTTCTC TTTCTGACAT TCCAAAACCA
1921 GGCCCCTTCC TACCTCTGGG GCTGCTTGAG TCTAGAACCC TTCGTATGTG TGAATATCTG
1981 TGTGCTGTAC AGAGTGACAA TAGAAATAAA TGTTTGGTTT CTTGTGACCA GCAAAAAAAA
2041 AA
```

도면13

인간 HOXB4의 아미노산 서열 (서열 번호 1)
NP_076920.1 GI:13273315

```
  1 mamssflins nyvdpkfppc eeysqsdylp sdhspgyyag gqrressfqp eagfgrraac
 61 tvqryaacrd pgpppppppp pppppppgls prapapppag allpepgqrc eavsssppp
121 pcaqnplhps pshsackepv vypwmrkvhv stvnpnyagg epkrsrtayt rqqvleleke
181 fhynryltrr rrveiahalc lserqikiwf qnrrmkwkkd hklpntkirs ggaagsaggp
241 pgrpnggpra l
```

163-221 = 호메오도메인

도면14

호모 사피엔스 호메오박스 B4 (HOXB4), mRNA (서열 번호 4)
BC049204.1 GI:29351567

```
   1 GGAAAACGAG TCAGGGGTCG GAATAAATTT TAGTATATTT TGTGGGCAAT TCCCAGAAAT
  61 TAATGGCTAT GAGTTCTTTT TTGATCAACT CAAACTATGT CGACCCCAAG TTCCCTCCAT
 121 GCGAGGAATA TTCACAGAGC GATTACCTAC CCAGCGACCA CTCGCCCGGG TACTACGCCG
 181 GCGGCCAGAG GCGAGAGAGC AGCTTCCAGC CGGAGGCGGG CTTCGGGCGG CGCGCGGCGT
 241 GCACCGTGCA GCGCTACGCG GCCTGCCGGG ACCCTGGGCC CCCGCCGCCT CCGCCACCAC
 301 CCCCGCCGCC CCCGCCACCG CCCGGTCTGT CCCCTCGGGC TCCTGCGCCG CCACCCGCCG
 361 GGGCCCTCCT CCCGGAGCCC GGCCAGCGCT GCGAGGCGGT CAGCAGCAGC CCCCCGCCGC
 421 CTCCCTGCGC CCAGAACCCC CTGCACCCCA GCCCGTCCCA CTCCGCGTGC AAAGAGCCCG
 481 TCGTCTACCC CTGGATGCGC AAAGTTCACG TGAGCACGGT AAACCCCAAT TACGCCGGCG
 541 GGGAGCCCAA GCGCTCTCGG ACCGCCTACA CGCGCCAGCA GGTCTTGGAG CTGGAGAAGG
 601 AATTTCACTA CAACCGCTAC CTGACACGGC GCCGGAGGGT GGAGATCGCC CACGCGCTCT
 661 GCCTCTCCGA GCGCCAGATC AAGATCTGGT TCCAGAACCG GCGCATGAAG TGGAAAAAAG
 721 ACCACAAGTT GCCCAACACC AAGATCCGCT CGGGTGGTGC GGCAGGCTCA GCCGGAGGGC
 781 CCCCTGGCCG GCCCAATGGA GGCCCCCGCG CGCTCTAGTG CCCCCGCACG CGGGAGCCAC
 841 GAACCTCGGG GTGGGGGTGG GCAGTGAGTG CAGGGGATGG GGTGGGGGGA CAGGAGGGGG
 901 CCCTGGGGCC TGGGCCCCGG AAAAATCTAT CTGCCCTCCC CCACACTTTA TATACGAATA
 961 AACGCAGAAG AGGGGGAGGG GAAGCTTTAT TTATAGAAAT GACAATAGAG GGCCACGGGG
1021 AGGCCCCCCC AGAAGCAAGA TTCAAATCTC TTGCTTTCTT TCTTAAAAAA AAGAAAAAGA
1081 AAAAGCAAGA AGAAGGAAGA AAGAAAAAGA CAGAAAGAGA AATAGGAGGA GGCTGCAGCT
1141 CCTCGTTTTC AGCTTTGGCG AAGATGGATC CACGTTTCAT CTTTAATCAC GCCAGGTCCA
1201 GGCCCATCTG TCTTGTTTCC TCTGCCGAGG AGAAGACGGG CCTCGGTGGC GACCATTACC
1261 TCGACACCCG CTAACAAATG AGGCCCGGCT CGGCCGCCTC CGCCTCTGCT ACTGCCGCTG
1321 CTGGAAGACA GCCTGGATTT CCTTTCTTTG TCCCCCACTC CCGATACCCA GCGAAAGCAC
1381 CCTCTGACTG CCAGATAGTG CAGTGTTTTG GTCACGGTAA CACACACACA CTCTCCCTCA
1441 TCTTTCGTGC CCATTCACTG AGGGCCAGAA TGACTGCTCA CCCACTTCCA CCGTGGGGTT
1501 GGGGGTGGGC AACAGAGGAG GGGAGCAAGT AGGGAAGGGG GTGGCCTTGA CAACTCAGGA
1561 GTGAGCAGGG AAATTGAGTC CAAGGAAAAA GAGAGACTCA GAGACCCGGG AGGGCCTTCC
1621 TCTGAAAGGC CAAGCCAAGC CATGCTTGGC AGGGTGAGGG GCCAGTTGAG TTCTGGGAGC
1681 TGGGCACTAC TCTGCCAGTC CAGAGTTGTA CAGCAGAAGC CTCTCTCCTA GACTGAAAAT
1741 GAATGTGAAA CTAGGAAATA AAATGTGCCC CTCCCAGTCT GGGAGGAGGA TGTTGCAGAG
1801 CCCTCTCCCA TAGTTTATTA TGTTGCATCG TTTATTATTA TTATTGATAA TATTATTATT
1861 ACTATTTTTT TGTGTCATGT GAGTCCTCTC TCCTTTTCTC TTTCTGACAT TCCAAAACCA
1921 GGCCCCTTCC TACCTCTGGG GCTGCTTGAG TCTAGAACCC TTCGTATGTG TGAATATCTG
1981 TGTGCTGTAC AGAGTGACAA TAGAAATAAA TGTTTGGTTT CTTGTGAAAA AAAAAAAAAA
```

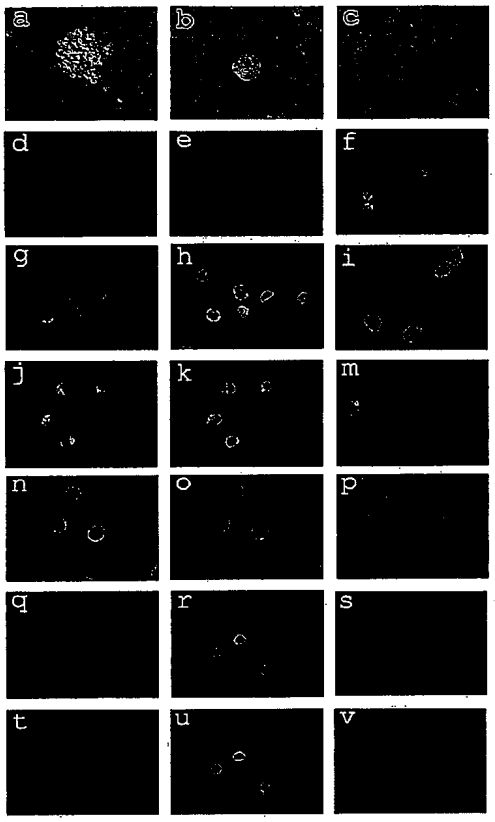
도면15

인간 HOXB4의 아미노산 서열 (서열 번호 3)
AAH49204.1 GI:29351568

```
  1 mamssflins nyvdpkfppc eeysqsdylp sdhspgyyag gqrressfqp eagfgrraac
 61 tvqryaacrd pgpppppppp pppppppgls prapapppag allpepgqrc eavsssppp
121 pcaqnplhps pshsackepv vypwmrkvhv stvnpnyagg epkrsrtayt rqqvleleke
181 fhynryltrr rrveiahalc lserqikiwf qnrrmkwkkd hklpntkirs ggaagsaggp
241 pgrpnggpra l
```

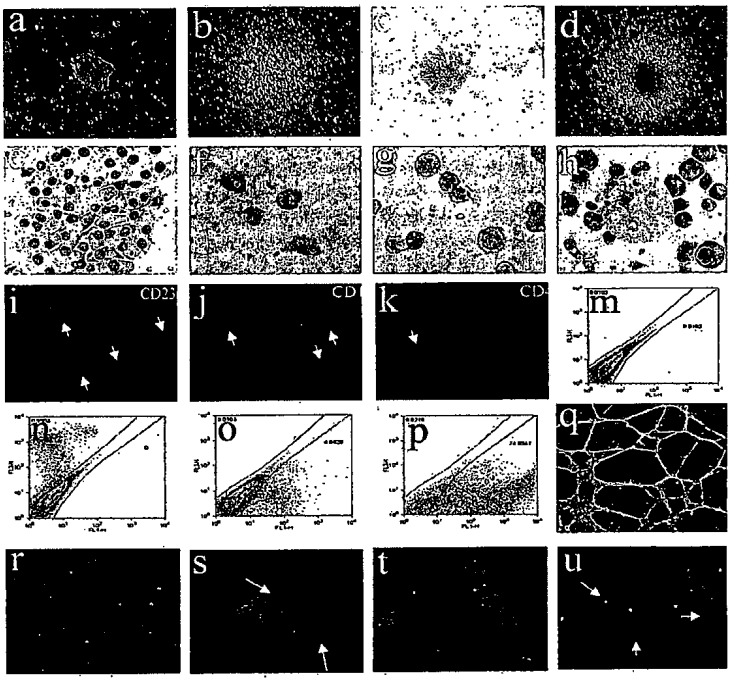
도면16

인간 ES 세포 유래의 혈관모세포(BL-CFC)의 표현형 분석



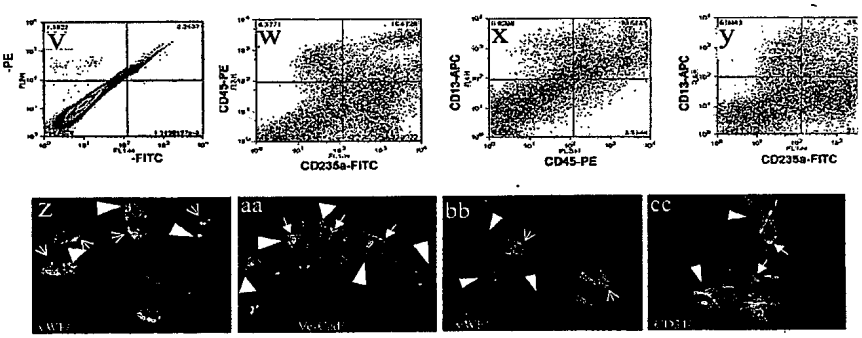
도면17au

시험관내에서 혈관모세포(BL-CFC)로부터 유래된 세포의 기능 분석



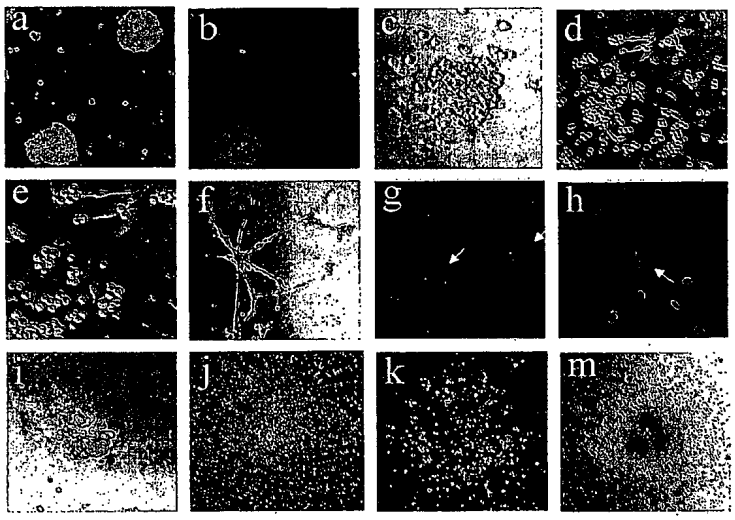
도면17vcc

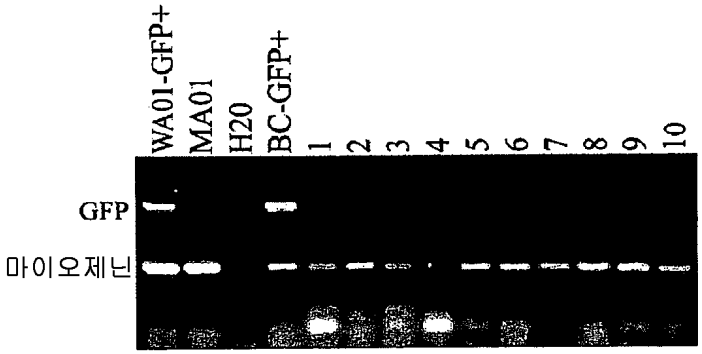
시험관내에서 혈관모세포(BL-CFC)로부터 유래된 세포의 기능 분석



도면18

hES 세포 유래의 모세포 콜로니의 클론 형성성

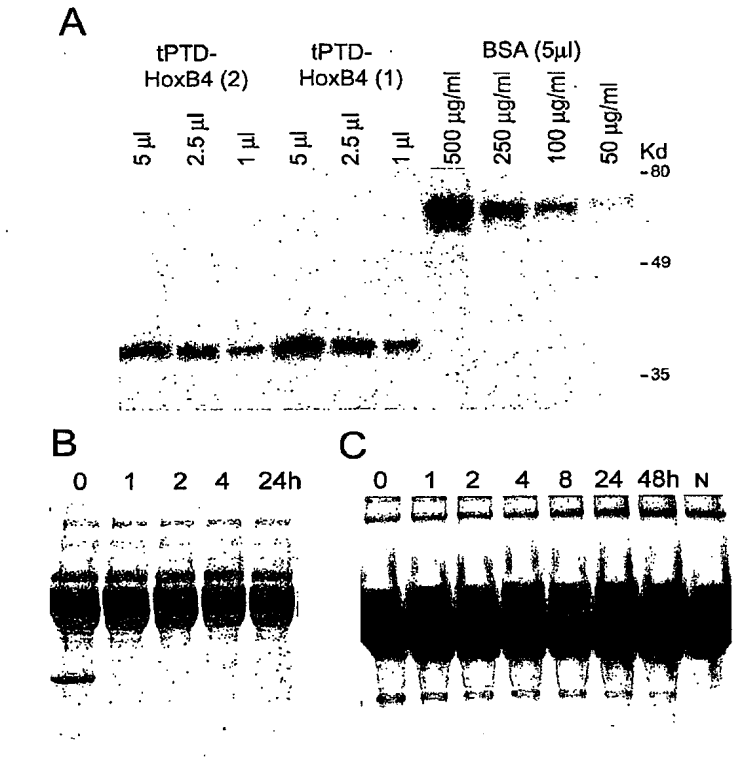




클론 형성성을 확인시켜주는 PCR 분석:
GFP 음성 콜로니는 비활성 GFP 유전자를 포함하지 않음

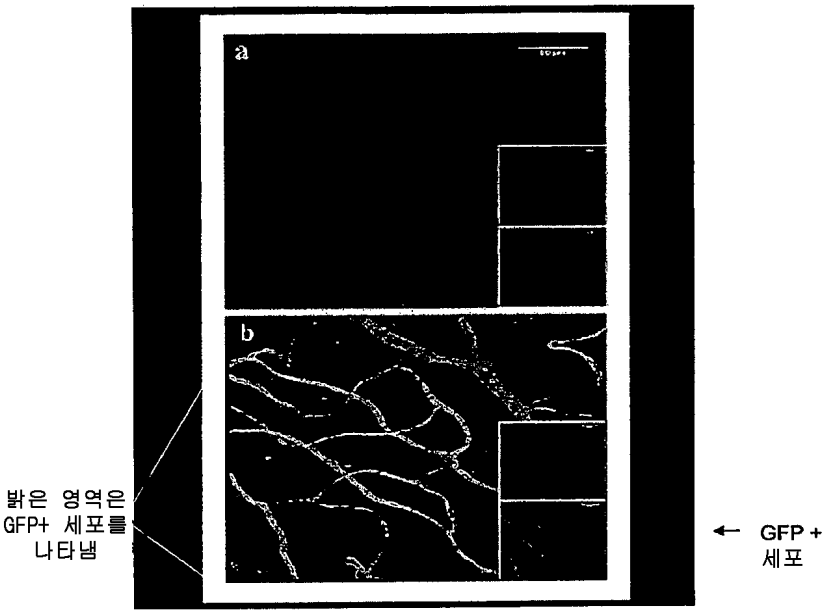
도면19

기능성 재조합 HOXB4 단백질의 생산 및 분석



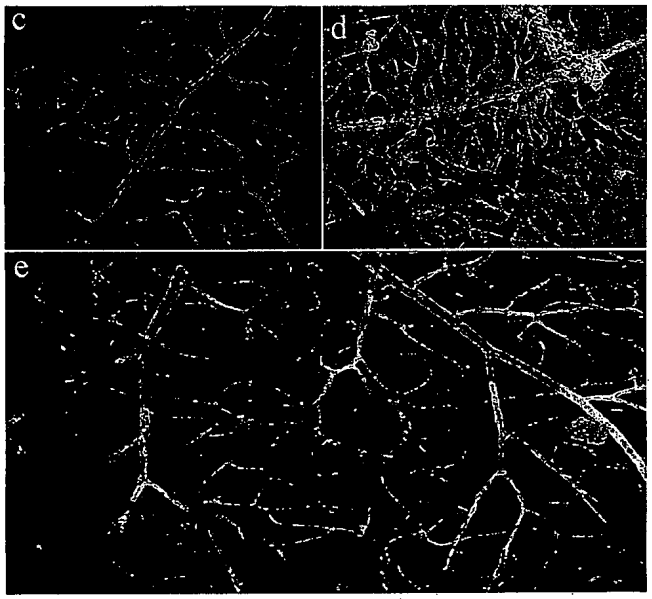
도면20ab

hES 유래 혈관모세포 주사 후의 허혈성 망막 맥관구조의 활발한 회복



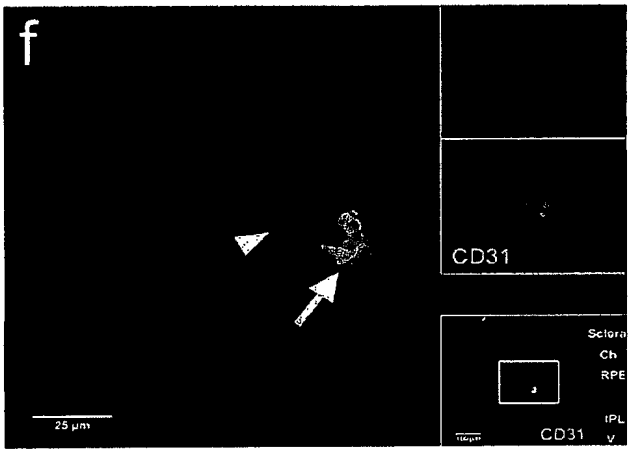
도면20ce

hES 유래 혈관모세포 주사 후의 허혈성 망막 맥관구조의 활발한 회복



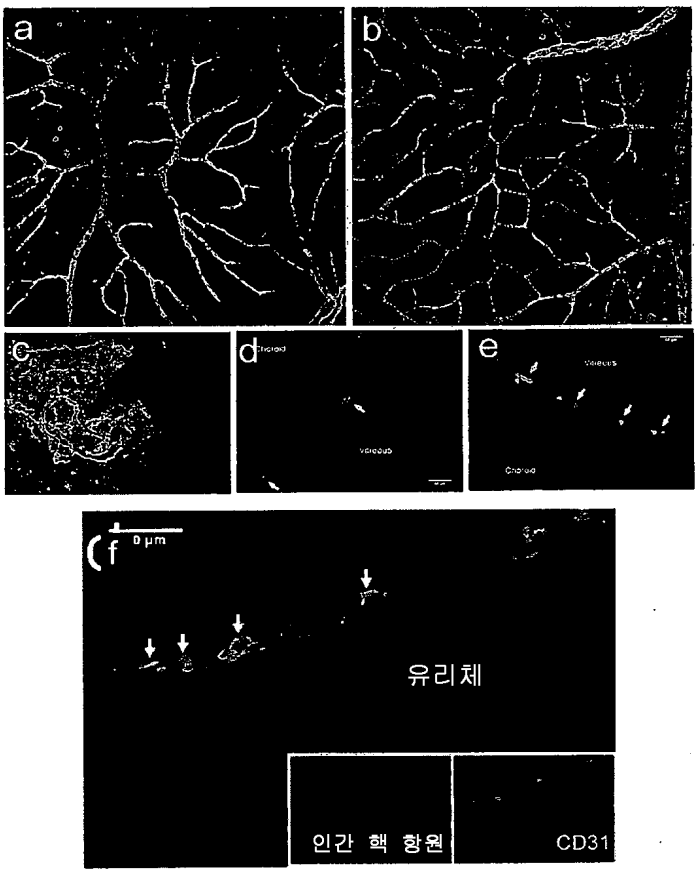
도면20f

hES 유래 혈관모세포 주사 후의 허혈성 망막 맥관구조의 활발한 회복



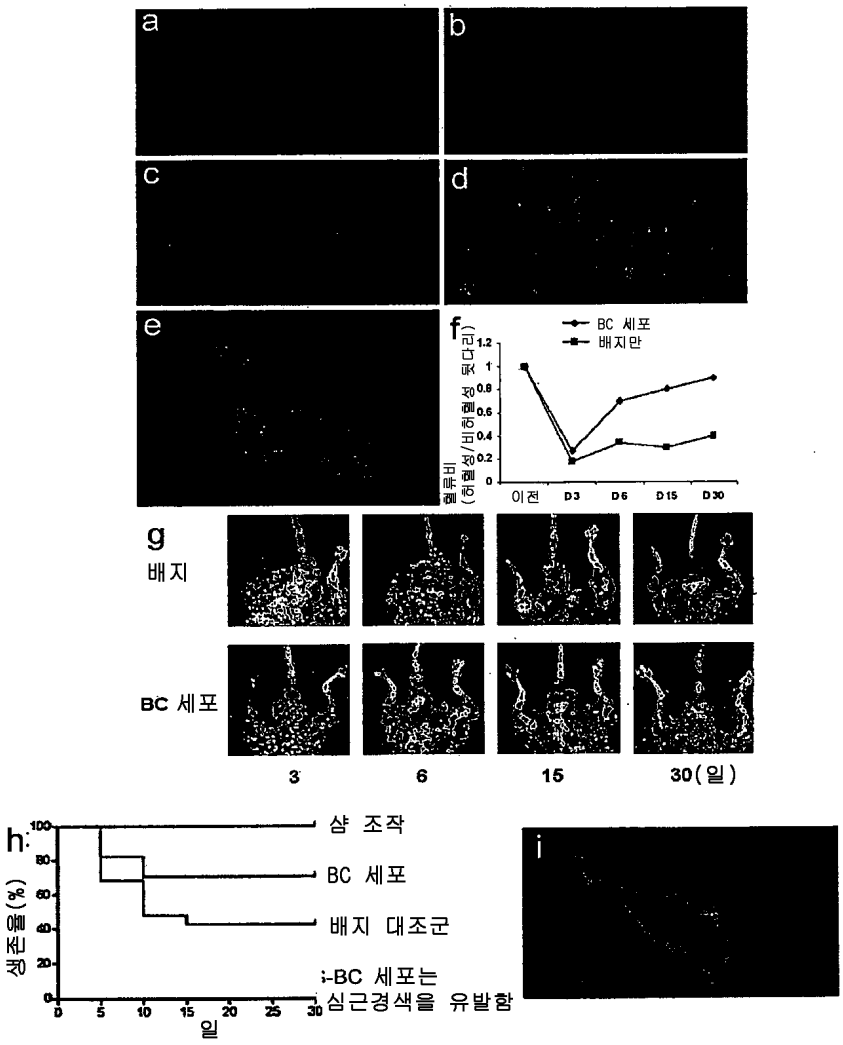
도면21

당뇨병 래트의 망막 맥관구조로의 혈관모세포(모세포)의 흡입



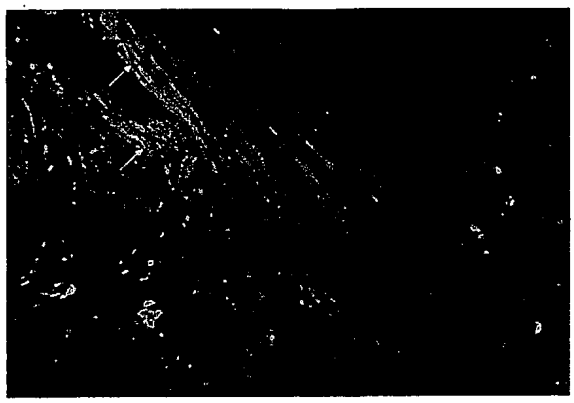
도면22

혈관모세포(hES-BC 세포) 주사 후 허혈성 뒷다리 근육 및 경색 심장에서의 내피 세포 분화



도면23

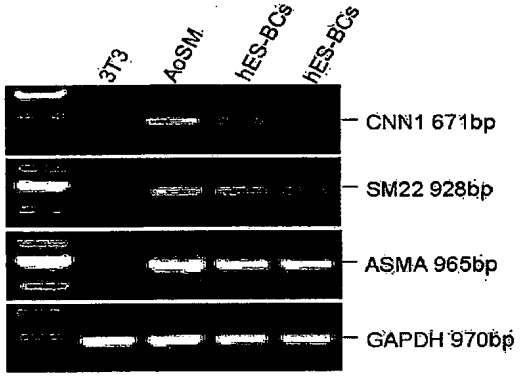
이식된 hES-BC 세포는 심근경색 후 심근세포를 생성함

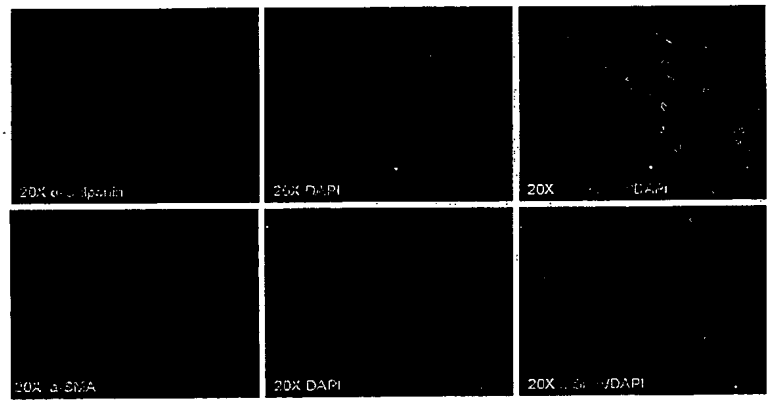




도면24

시험관내에서 혈관모세포 또는 hES-BC 세포로부터 유래된 평활근 세포





서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> LANZA, ROBERT

LU, SHI-JIANG

<120> HEMANGIO-COLONY FORMING CELLS

<130> 103080-P01-080

<140> 11/787,262

<141> 2007-04-13

<150> 60/792,224

<151> 2006-04-14

<150> 60/801,993

<151> 2006-05-19

<150> 60/846,163

<151> 2006-09-20

<150> 60/852,142

<151> 2006-10-16

<150> 60/860,676

<151> 2006-11-22

<150> 60/918,832

<151> 2007-03-19

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 251

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys
1 5 10 15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp
20 25 30

His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly Gln Arg Arg Glu Ser Ser Phe
35 40 45

Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg
50 55 60

Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro
85 90 95

Pro Pro Ala Gly Ala Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln Arg Cys Glu Ala
100 105 110

Val Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln Asn Pro Leu His
115 120 125

Pro Ser Pro Ser His Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val Val Tyr Pro Trp
130 135 140

Met Arg Lys Val His Val Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Gly
145 150 155 160

Glu Pro Lys Arg Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu
165 170 175
Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
180 185 190

Val Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile
195 200 205
Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp His Lys Leu Pro
210 215 220
Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240
Pro Gly Arg Pro Asn Gly Gly Pro Arg Ala Leu
245 250

<210> 2
<211> 2042
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 2
ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaattt tagtatattt tgtgggcaat tcccagaaat 60
taatggctat gagttctttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat 120
gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctcgcccggg tactacgccg 180
gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg cttcgggcgg cgcgcggcgt 240
gcaccgtgca gcgctacgcg gcctgccggg accctgggcc cccgccgcct ccgccaccac 300
ccccgccgcc cccgccaccg cccggtctgt cccctcgggc tcctgcgccg ccacccgccg 360

gggccctcct cccggagccc ggccagcgct gcgaggcggt cagcagcagc cccccgccgc 420
ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacccca gcccgtccca ctccgcgtgc aaagagcccg 480
tcgtctaccc ctggatgcgc aaagttcacg tgagcacggt aaaccccaat tacgccggcg 540
gggagcccaa gcgctctcgg accgcctaca cgcgccagca ggtcttggag ctggagaagg 600
aatttcacta caaccgctac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgcc cacgcgctct 660
gcctctccga gcgccagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcatgaag tggaaaaaag 720
accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggcaggctca gccggagggc 780

cccctggccg gcccaatgga ggcccccgcg cgctctagtg cccccgcacg cgggagccac 840

gaacctcggg gtgggggtgg gcagtgagtg caggggatgg ggtgggggga caggaggggg 900

ccctggggcc tgggccccgg aaaaatctat ctgccctccc ccacacttta tatacgaata 960

aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg 1020

aggccccccc agaagcaaga ttcaaatctc ttgctttctt tcttaaaaaa aagaaaaaga 1080

aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct 1140

cctcgttttc agctttggcg aagatggatc cacgtttcat ctttaatcac gccaggtcca 1200

ggcccatctg tcttgtttcc tctgccgagg agaagacggg cctcggtggc gaccattacc 1260

tcgacacccg ctaacaaatg aggcccggct cggccgcctc cgcctctgct actgccgctg 1320

ctggaagaca gcctggattt cctttctttg tcccccactc ccgataccca gcgaaagcac 1380

cctctgactg ccagatagtg cagtgttttg gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca 1440

tctttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca ccgtggggtt 1500

gggggtgggc aacagaggag gggagcaagt agggaagggg gtggccttga caactcagga 1560

gtgagcagga aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagacccggg agggccttcc 1620

tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc agggtgaggg gccagttgag ttctgggagc 1680

tgggcactac tctgccagtc cagagttgta cagcagaagc ctctctccta gactgaaaat 1740

gaatgtgaaa ctaggaaata aaatgtgccc ctcccagtct gggaggagga tgttgcagag 1800

ccctctccca tagtttatta tgttgcatcg tttattatta ttattgataa tattattatt 1860

actatttttt tgtgtcatgt gagtcctctc tccttttctc tttctgacat tccaaaacca 1920

ggccccttcc tacctctggg gctgcttgag tctagaaccc ttcgtatgtg tgaatatctg 1980

tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgtttggttt cttgtgacca gcaaaaaaaa 2040

aa 2042

<210> 3

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys
1 5 10 15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp
20 25 30

His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly Gln Arg Arg Glu Ser Ser Phe

35 40 45

Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg
50 55 60

Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro
85 90 95

Pro Pro Ala Gly Ala Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln Arg Cys Glu Ala
100 105 110

Val Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln Asn Pro Leu His
115 120 125

Pro Ser Pro Ser His Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val Val Tyr Pro Trp
130 135 140

Met Arg Lys Val His Val Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Gly
145 150 155 160

Glu Pro Lys Arg Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu
165 170 175

Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
180 185 190

Val Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile
195 200 205

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp His Lys Leu Pro
210 215 220

Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Gly Pro
225 230 235 240

Pro Gly Arg Pro Asn Gly Gly Pro Arg Ala Leu
245 250

<210> 4

<211> 2040

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaattt tagtatattt tgtgggcaat tcccagaaat 60

taatggctat gagttctttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat 120

gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctcgcccggg tactacgccg 180

gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg cttcgggcgg cgcgcggcgt 240

gcaccgtgca gcgctacgcg gcctgccggg accctgggcc cccgccgcct ccgccaccac 300

ccccgccgcc cccgccaccg cccggtctgt cccctcgggc tcctgcgccg ccacccgccg 360

gggccctcct cccggagccc ggccagcgct gcgaggcggt cagcagcagc cccccgccgc 420

ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacccca gcccgtccca ctccgcgtgc aaagagcccg 480

tcgtctaccc ctggatgcgc aaagttcacg tgagcacggt aaaccccaat tacgccggcg 540

gggagcccaa gcgctctcgg accgcctaca cgcgccagca ggtcttggag ctggagaagg 600

aatttcacta caaccgctac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgcc cacgcgctct 660

gcctctccga gcgccagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcatgaag tggaaaaaag 720

accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggcaggctca gccggagggc 780

cccctggccg gcccaatgga ggcccccgcg cgctctagtg cccccgcacg cgggagccac 840

gaacctcggg gtgggggtgg gcagtgagtg caggggatgg ggtgggggga caggaggggg 900

ccctggggcc tgggccccgg aaaaatctat ctgccctccc ccacacttta tatacgaata 960

aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg 1020

aggccccccc agaagcaaga ttcaaatctc ttgctttctt tcttaaaaaa aagaaaaaga 1080

aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct 1140

cctcgttttc agctttggcg aagatggatc cacgtttcat ctttaatcac gccaggtcca 1200

ggcccatctg tcttgtttcc tctgccgagg agaagacggg cctcggtggc gaccattacc 1260

tcgacacccg ctaacaaatg aggcccggct cggccgcctc cgcctctgct actgccgctg 1320

ctggaagaca gcctggattt cctttctttg tcccccactc ccgataccca gcgaaagcac 1380

cctctgactg ccagatagtg cagtgttttg gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca 1440

tctttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca ccgtggggtt 1500

gggggtgggc aacagaggag gggagcaagt agggaagggg gtggccttga caactcagga 1560

gtgagcaggg aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagacccggg agggccttcc 1620

tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc agggtgaggg gccagttgag ttctgggagc 1680

tgggcactac tctgccagtc cagagttgta cagcagaagc ctctctccta gactgaaaat 1740

gaatgtgaaa ctaggaaata aaatgtgccc ctcccagtct gggaggagga tgttgcagag 1800

ccctctccca tagtttatta tgttgcatcg tttattatta ttattgataa tattattatt 1860

actatttttt tgtgtcatgt gagtcctctc tccttttctc tttctgacat tccaaaacca 1920

ggcccccttcc tacctctggg gctgcttgag tctagaaccc ttcgtatgtg tgaatatctg 1980

tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgtttggttt cttgtgaaaa aaaaaaaaaa 2040

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 7

Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 8

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 9

Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<

210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 10

Arg Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila melanogaster

<400> 11

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> human herpesvirus 1

<400> 12

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr

1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro

20 25 30

Val Glu

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 14

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 15

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Tyr Ala Arg Ala Ala

1 5 10 15

Ala Arg Gln Ala Arg Ala Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg

20 25 30

Ala

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 16

tacctaccca tggaccactc gccc 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 17

tcgtggctcc cgaattcggg ggca 24

<210> 18

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 18

cgatggggat ccggctacgc acgcgcagct gcgcgccagg ctcgcgccgg tggatccacc 60

atg 63

<210> 19

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 19

catggtggat ccaccggcgc gagcctggcg cgcagctgcg cgtgcgtagc cggatcccca 60

tcg 63