



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0086301
 (43) 공개일자 2018년07월30일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) *C12N 5/00* (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0644 (2013.01)
C12N 2500/90 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7021160(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2010년12월03일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2012-7017368
 원출원일자(국제) 2010년12월03일
 심사청구일자 2015년12월02일
- (85) 번역문제출일자 2018년07월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2010/058990
- (87) 국제공개번호 WO 2011/069127
 국제공개일자 2011년06월09일
- (30) 우선권주장
 61/266,939 2009년12월04일 미국(US)
 61/384,165 2010년09월17일 미국(US)

- (71) 출원인
 스템 셀 앤드 리제너러티브 메디신 인터내셔널,
 인크.
 미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브
 33
- (72) 발명자
 리, 팽
 미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브
 33
 루, 쉬-지앙
 미국 01545 매사추세츠주 슈루즈버리 베가 드라이브
 22
- (74) 대리인
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 기질 없는 조건 하에서 인간 배아줄기세포로부터 기능적 거핵구 및 혈소판의 대규모 생성

(57) 요약

본 발명은 거핵구 및 혈소판의 생성 방법을 제공한다. 다양한 구현예에서, 상기 방법은 혈청 및 기질 없는 조건 하에서 거핵구 및 혈소판으로의 분화를 위한 인간 배아줄기세포 유래된 혈액모세포의 용도를 포함한다. 이 시스템에서, hESC는 배상체 형성 및 혈액모세포 분화를 통한 거핵구에 관한 것이다. 혈소판 수혈이 필요한 대상체의 치료 방법이 또한 제공된다.

(52) CPC특허분류

C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/145 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2501/2311 (2013.01)
C12N 2501/26 (2013.01)
C12N 2501/91 (2013.01)
C12N 2502/1394 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 혈액모세포를 제공하는 단계;
- (ii) 상기 혈액모세포를 무혈청 조건 하에 TPO 및 SCF 존재 하에 배양하여 미성숙 거핵구 (MK)로 분화시키는 단계; 및
- (iii) 상기 미성숙 거핵구를 4 내지 6일간 배양하여 핵내 유사분열을 겪어 성숙한 거핵구를 얻는 단계를 포함하는, 성숙한 거핵구의 생성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 혈액모세포가 다능성 줄기세포로부터 시험관내에서 분화되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 다능성 줄기세포가 인간 배아줄기세포 (hESC)인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 다능성 줄기세포가 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 다능성 줄기세포의 분화가 다능성 줄기세포를 분리하고, 상기 다능성 줄기세포를, 성장 인자, 또는 BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3 리간드, SCF 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 배양하여 배상체 (EB)를 형성하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 배지가 BMP-4 및 VEGF를 포함하고, 상기 다능성 줄기세포의 배양이 48시간 기간 동안 수행되어 EB를 형성하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 BMP-4의 농도가 50 ng/ml이고, VEGF가 50 ng/ml인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 형성된 EB가 화학적 및/또는 기계적으로 분리되고, 배양 배지의 적어도 일부가 성장 인자, 또는 BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3 리간드, SCF 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 대체되어 혈액모세포를 생성하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 bFGF의 농도가 20 ng/ml이고, TPO는 50-100 ng/ml이고, Flt3 리간드가 50 ng/ml이고, SCF가 50 ng/ml인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 분리된 EB가 모세포 콜로니 성장 배지에서 3 내지 4일 기간 동안 배양되어 혈액모세포를 생성하는 것인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 배지가 IL6, 에스트라디올, 비타민 B3, 하나 이상의 세포외 매트릭스 단백질 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제4항에 있어서, 상기 iPSC가 인간 기원의 체세포로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 체세포가 성체 조직으로부터 유래하는 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 체세포가 태아 조직으로부터 유래하는 것인 방법.

청구항 15

제5항에 있어서, 상기 배지가 스템라인 II 배지인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 혈액모세포의 MK로의 분화가 TPO, SCF, 및 IL11을 포함하는 배지에서 2 내지 8일 기간 동안 배양하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 TPO의 농도가 50 ng/ml이고, SCF가 20 ng/ml이고, IL11이 20 ng/ml인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 배양 배지의 적어도 일부를, TPO, SCF, 및 IL11을 포함하는 배지로 2 내지 3일마다 대체하여 혈액모세포를 MK로 분화시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 배지가 스템라인 II 배지인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기능적 거핵구 및 혈소판의 생산, 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본원의 모든 문헌들은 마치 각각의 개별적인 문헌 또는 특허출원이 명확히 그리고 개별적으로 참고로써 포함된다고 표시되는 것과 같은 동일한 정도로 참고로써 포함된다. 하기 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본원에 제공된 임의의 정보가 현재 청구된 발명에 대한 선행 기술이거나 그와 관련된다는 점, 또는 명확하게 또는 암시적으로 참고한 임의의 문헌이 선행 기술이라는 점을 인정하는 것은 아니다.

[0003] 혈관 손상 후, 혈소판은 손상된 혈관에 빠르게 부착하여 혈전 형성을 일으키는 복잡한 일련의 사건을 촉발시킨다. 혈소판 수혈에 대한 요구가 지난 수십 년간 계속적으로 증가해왔다⁵¹. 혈소판은 단지 일주일 미만 동안 보관될 수 있어서, 공여자 의존성 프로그램을 위한 지속적인 도전을 불러 일으킨다. 혈소판 공급 부족은, 특히 많은 수혈이 필요한 환자에게, 잠재적으로 생명을 위협하는 결과를 가져올 수 있다. 또한 반복된 수혈은 면역 매개 숙주 반응과 연관된 불응성 반응을 유발할 수도 있으며, 많은 비용이 소요되는 환자 매칭(matching)이 필요할 수 있다^{52:53}. 시험관내에서 환자-매칭된 혈소판을 생성하는 능력은 이러한 임상학적 시나리오에 상당한 이점을 제공할 것이다.

[0004] 혈소판 공급의 제약은 독특한/희귀한 혈액형을 갖는 수혈-의존 환자, 특히 동종면역된 환자, 및, 흔히 발생하듯이, 혈소판 동종면역을 발생시키는 암 또는 백혈병을 갖는 환자에게 잠재적으로 생명을 위협하는 결과를 가져올 수 있다. 수혈된 인간 혈소판의 반감기가 4-5일이기 때문에, 빈번한 혈소판 수혈이 임상학적으로 필요하다. 더욱이, 자원자 기증 프로그램으로부터 얻은 혈소판은 다양한 병원균에 오염될 끊임없는 위험성이 있다. 혈소판은

냉동 보관될 수 없으며, 따라서 시험관내에서 혈소판을 생성하는 능력이 임상학적 환경에서 혈소판 대체 요법에 상당한 진전을 제공할 것이다. 십여년 이상 동안, 골수(BM), 제대혈(CB) 또는 말초혈(PB)로부터 얻은 인간 조혈 모세포(HSC, CD34+)가 거핵구(MK) 및 혈소판 생성을 위해 연구되어 왔다. 사이토카인, 성장 인자 및/또는 기질 영양세포의 조합을 이용하여, HSC로부터 기능적 혈소판이 성공적으로 생산되어왔다^{1,2}. 그러나, HSC는 여전히 공여자로부터 얻어지며 현재의 배양 조건 하에서 제한된 증폭 능력을 가지는데, 이것이 아마도 대규모 생산 및 미래의 임상학적 응용을 막을 것이다.

[0005] 인간 배아 줄기세포(hESC)는 시험관내에서 무한히 증식하고 증폭할 수 있으므로, 인간 요법에 잠재적으로 무궁무진하고 공여자가 필요없는 세포의 공급원을 제공한다. hESC의 조혈세포로의 분화가 과거 수십년간 시험관내에서 광범위하게 조사되어왔다. hESC의 유래된 조혈적 분화는 두 가지 상이한 유형의 배양 시스템에 의해 시험관내에서 성공적으로 달성되어 왔다. 이들 중 하나는 혈청-함유 배지에서 기질 영양세포와 함께 hESC를 공-배양하는 것을 이용한다^{3,4}. 두 번째 유형의 과정은 혈청과 함께/혈청 없이 사이토카인의 존재 하에 극저(ultra-low) 세포 결합 플레이트에서 현탁 배양 조건을 이용하는데⁵⁻⁷, 그 단점은 EB의 형성이다. 조혈 전구체 뿐만 아니라, 적혈구계, 골수성, 대식세포, 거핵구성 및 림프계 계통을 대표하는 성숙한 기능적 자손(progeny)들이 상기 두 가지의 분화하는 hESC 배양 시스템에서 확인되어 왔다^{3-6,8-14}. 또한 종래 연구들은 혈청의 존재 하에 기질 세포와 공-배양함으로써 hESC로부터 거핵구/혈소판을 생성하였다^{15,16}. hESC로부터 유래된 혈소판은, 효율적으로 그리고 대규모로 생성될 수만 있다면, 수혈 의학 목적을 위한 잠재력을 갖는다. 더욱 중요하게는, 혈소판은 핵이 없으며 단지 최소한의 유전 물질만을 함유하고 있고, 수혈 전에 방사능 처리되어, 미분화된 hESC와 같은 임의의 오염 세포를 효과적으로 제거할 수 있다. 그러므로, 안전성이 문제되지 않을 것이다. 그러나, 상기 연구에서 거핵구/혈소판의 수율이 낮았다^{15,16}. hESC를 균일한 거핵구성 집단 및 이어서 기능적 혈소판으로 효율적이면서 제어되게 분화시킬 필요성이 여전히 남아 있다.

[0006] 발명의 요약

[0007] 하기 구현예 및 이의 측면이 기재되어 있고, 범위를 한정하지 않으면서 예시적이고 설명적인 것을 의미하는 조성물 및 방법과 함께 설명된다.

[0008] 본 발명은 하기를 포함하는 거핵구의 생성 방법을 제공한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 및 상기 혈액모세포를 거핵구 (MK)로 분화시키는 단계. 어떤 구현예에서, 혈액모세포는 다능성 줄기세포로부터 시험관내에서 분화될 수 있다. 어떤 구현예에서, 다능성 줄기세포는 인간 배아줄기세포 (hESC)일 수 있다. 어떤 구현예에서, 다능성 줄기세포는 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)일 수 있다. 어떤 구현예에서, iPSC는 인간 기원의 체세포로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 체세포는 성체 조직으로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 체세포는 태아 조직으로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 다능성 줄기세포의 분화는 다능성 줄기세포를 분리하고 성장 인자, 또는 BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3 리간드, SCF 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 배지로 상기 다능성 줄기세포를 배양하여 배상체 (EB)를 형성하는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 BMP-4 및 VEGF를 포함할 수 있고, 다능성 줄기세포의 배양은 약 48시간 동안 수행되어 EB를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, BMP-4의 농도는 50 ng/ml일 수 있고, VEGF는 50 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 스템라인(Stemline) II 배지일 수 있다.

[0009] 어떤 구현예에서, 상기 형성된 EB는 화학적 및/또는 기계적으로 분리될 수 있고 배양 배지의 적어도 일부는 성장 인자, 또는 BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3 리간드, SCF 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 배지로 대체되어 혈액모세포를 생성할 수 있다. 어떤 구현예에서, bFGF의 농도는 20 ng/ml일 수 있고, TPO는 50-100 ng/ml일 수 있고, Flt3 리간드는 50 ng/ml일 수 있고, SCF는 50 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 IL6, 에스트라디올, 비타민 B3, 하나 이상의 세포외 매트릭스 단백질 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다. 어떤 구현예에서, 분리된 EB는 모세포 콜로니 성장 배지에서 약 3 내지 4일 동안 배양되어 혈액모세포를 생성할 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 구현예는 하기를 포함하는 거핵구의 생성 방법을 제공한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 및 상기 혈액모세포를 거핵구 (MK)로 분화시키는 단계. 어떤 구현예에서, 혈액모세포의 MK로의 분화는 상기 혈액모세포를 성장 인자, 또는 TPO, SCF, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토카인을 포함하는 배지에서 약 2 내지 8일 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, TPO의 농도는 50 ng/ml일 수 있고, SCF는 20 ng/ml일 수 있고, IL11는 20 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 스템라인 II 배지일 수

있다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 또한, 상기 배양 배지의 적어도 일부를, 성장 인자, 또는 TPO, SCF, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 2 내지 3일마다 대체하여 혈액모세포를 MK로 분화시키는 것을 포함할 수 있다.

[0011] 본 발명은 또한, 하기를 포함하는 혈소판의 생성 방법을 제공한다: 거핵구 (MK)를 제공하는 단계; 및 상기 MK를 배양하여 혈소판으로 분화시키는 단계. 어떤 구현예에서, MK는 혈액모세포로부터 분화될 수 있다. 어떤 구현예에서, 혈액모세포의 MK로의 분화는 상기 혈액모세포를 성장 인자, 또는 TPO, SCF, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지에서 약 2 내지 8일 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, TPO의 농도는 50 ng/ml일 수 있고, SCF는 20 ng/ml일 수 있고, IL11는 20 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 스템라인 II 배지일 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 또한, 상기 배양 배지의 적어도 일부를, 성장 인자, 또는 TPO, SCF, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 2 내지 3일마다 대체하여 혈액모세포를 MK로 분화시키는 것을 포함할 수 있다.

[0012] 어떤 구현예에서, 혈액모세포는 다능성 줄기세포로부터 시험관내에서 분화될 수 있다. 어떤 구현예에서, 다능성 줄기세포는 인간 배아줄기세포 (hESC)일 수 있다. 어떤 구현예에서, 다능성 줄기세포는 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)일 수 있다. 어떤 구현예에서, iPSC는 인간 기원의 체세포로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 체세포는 성체 조직으로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 체세포는 태아 조직으로부터 유래될 수 있다. 어떤 구현예에서, 다능성 줄기세포의 분화는 다능성 줄기세포를 분리하고 다능성 줄기세포를, 성장 인자, 또는 BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3 리간드, SCF 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지에서 배양하여 배상체 (EB)를 형성하는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 BMP-4 및 VEGF를 포함할 수 있고, 다능성 줄기세포의 배양은 약 48시간 동안 수행되어 EB를 형성할 수 있다. 어떤 구현예에서, BMP-4의 농도는 50 ng/ml일 수 있고, VEGF는 50 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 스템라인 II 배지일 수 있다.

[0013] 어떤 구현예에서, 상기 형성된 EB는 화학적 및/또는 기계적으로 분리될 수 있고, 배양 배지의 적어도 일부는 성장 인자, 또는 BMP-4, VEGF, bFGF, TPO, Flt3 리간드, SCF 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 대체되어 혈액모세포를 생성할 수 있다. 어떤 구현예에서, bFGF의 농도는 20 ng/ml일 수 있고, TPO는 50-100 ng/ml일 수 있고, Flt3 리간드는 50 ng/ml일 수 있고, SCF는 50 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 추가로, IL6, 에스트라디올, 비타민 B3, 하나 이상의 세포외 매트릭스 단백질 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 분리된 EB는 모세포 콜로니 성장 배지에서 약 3 내지 4일 동안 배양되어 혈액모세포를 생성할 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예는 하기를 포함하는 혈소판의 생성 방법을 제공한다: 거핵구 (MK)를 제공하는 단계; 및 상기 MK를 배양하여 혈소판으로 분화시키는 단계.

[0016] 어떤 구현예에서, MK는 제현탁되고 적어도 4일 동안 성장 인자, 또는 TPO, SCF, 나트륨 헤파린, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지에서 배양되어 혈소판으로 분화할 수 있다. 어떤 구현예에서, TPO의 농도는 100 ng/ml일 수 있고, SCF는 50 ng/ml일 수 있고, 나트륨 헤파린은 25 유닛/ml일 수 있고, IL11는 20 ng/ml일 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 또한, MK 배양의 적어도 4 일 후에 GM 6001 또는 IL3의 부가를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 또한, 배지의 적어도 일부를, 성장 인자, 또는 TPO, SCF, 나트륨 헤파린, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 적어도 2일마다 대체하는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 IMDM 배지일 수 있다.

[0017] 어떤 구현예에서, MK는 분리되고, 성장 인자, 또는 TPO, SCF, 나트륨 헤파린, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지에서 유사분열 정지된 영양세포층(feeder layer) 상에서 적어도 4일 동안 배양되어 혈소판으로 분화할 수 있다. 어떤 구현예에서, 영양세포층은 OP9 세포를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 영양세포층은 C3H 10T1/2 세포를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 또한, MK 배양의 적어도 4일 후 GM 6001 또는 IL3의 부가를 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 본 방법은 또한, 배지의 적어도 일부를, 성장 인자, 또는 TPO, SCF, 나트륨 헤파린, IL11 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 포함하는 배지로 적어도 2일마다 대체하는 것을 포함할 수 있다. 어떤 구현예에서, 배지는 IMDM 배지일 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법 중 어떤 것으로부터 생성된 거핵구의 양을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 본 발명의 방법 중 어떤 것으로부터 생성된 혈소판의 양을 제공한다. 어떤 구현예에서, 혈소판은 혈소판의 대상체에 투여시 대상체의 HLA 동종면역 반응에 기여하지 않는 용액에서 보관될 수 있다. 어떤 구현예에서, 혈소판은 아피라제 및/또는 EDTA의 존재에서 활성화될 수 없다.

[0020] 본 발명은 또한, 하기를 포함하는 세포 분화의 모듈레이터의 스크리닝 방법을 제공한다: 거핵구 (MK)의 양을 제공하는 단계; 상기 MK를 시험 화합물과 접촉시키는 단계; MK와 시험 화합물 사이의 접촉으로부터 기능적 효과의 존재 또는 부재를 측정하는 단계; 여기서 상기 기능적 효과의 존재는, 시험 화합물이 거핵구형성 인자, 트롬보포이에틴 인자, 및/또는 세포 분화를 조절하는 조절 인자일 수 있다는 것을 나타내고, 상기 기능적 효과의 부재는, 시험 화합물이 거핵구형성 인자, 트롬보포이에틴 인자, 및/또는 세포 분화를 조절하는 조절 인자일 수 없다는 것을 나타낸다. 본 발명은 또한, 하기를 포함하는 혈소판 수혈이 필요한 대상체의 치료 방법을 제공한다: 혈액모세포의 양을 제공하는 단계; 상기 혈액모세포를 배양하여 거핵구 (MK)로 분화시키는 단계; 상기 MK를 시험관내에서 배양하여 혈소판으로 분화시키는 단계; 상기 시험관내 분화된 혈소판의 양을 제공하는 단계; 및 상기 시험관내 분화된 혈소판의 양을 혈소판 수혈이 필요한 대상체에게 투여하여, 혈소판 수혈이 필요한 대상체를 치료하는 단계. 어떤 구현예에서, 시험관내 분화된 혈소판은 대상체에 조화되어 면역 매개된 숙주 반응을 감소하거나 제거할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 본 발명의 구현예의 다양한 특징을 예로써 설명하는, 수반되는 도면과 함께 취해진 하기의 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 예시적인 구현예는 참조된 도면들에서 설명된다. 본 명세서에 개시된 구현예 및 도면들은 제한적이기보다 설명적인 것을 위해 고려된다.

도 1은, hESC 유래된 모세포가 본 발명의 다양한 구현예에 따라 거핵구 전구체를 생성한다는 것을 묘사한다. A. 혈청 및 기질 없는 조건 하에서 hESC로부터 거핵구를 생성하는 흐름도. 이전에 기재된 바와 같이, hESC는 EB를 만들기 위해 서스펜션에서 배양되었다. EB는 4일째 채집되었고 메틸셀룰로오스 기반 반고체 혈액모세포 배양물 전에 트립신으로 단세포로 분리되었다. 모세포는 MK 배양물을 위해 6 내지 8일째 배양물로부터 채집되었고, 그 다음 이 배양물은 서스펜션에서 4 내지 6일에 성숙 거핵구를 생산했다. B. 6일째 모세포 콜로니 (상 콘트라스트, 왼쪽) 및 모세포 (김사(Giemsa) 염색, 오른쪽)의 대표적인 이미지. C. 막대 그래프는 HUES3 및 H1 hESC 유래된 BC에 대한 CFU-MK 콜로니 검정을 보여준다. D. 현미경 이미지는 H1 hESC 유래된 BC로부터 생성된 CD41 염색된 CFU-MK 콜로니를 보여준다. 삽입물은 거핵구로부터 세포 과정을 보여준다. E. FACS 분석은 3개의 상이한 hESC 세포주: HUES3, MA01 및 MA09로부터 모세포 배양물에서 CD41a+ 세포의 백분율의 차이를 보여준다.

도 2는, 모세포 배양물로부터의 이중잠재력 전구체가 본 발명의 다양한 구현예에 따라 적혈구 및 거핵구 계통 모두를 만든다는 것을 묘사한다. A. 6일째 HUES3 유래된 모세포의 FACS 분석은 CD41a 및 CD235a 마커 (왼쪽) 및 분류된 CD41a+CD235a+ 세포 (오른쪽)의 발현에 의해 한정된 별개의 집단을 보여준다. B. CD41a+CD235a- 또는 CD41a+CD235a+ 세포로부터 유래된 CFU-MK 콜로니의 이미지. 막대 그래프는 CFU-MK 콜로니 검정의 정량화를 보여준다. C. CD41a-CD235a+ 또는 CD41a+CD235a+ 세포로부터 유래된 CFU-E 콜로니의 이미지. 막대 그래프는 CFU-E 콜로니 검정의 정량화를 보여준다.

도 3은 본 발명의 다양한 구현예에 따라 기질 없는 조건 하에서 hESC 유래된 모세포로부터 지정 거핵구 분화를 묘사한다. A. 거핵구 분화 및 팽창에 대한 TPO, SCF 및 다른 사이토킨/인자의 효과. B. 시간대별 실험은 6 일 배양 동안 CD41a+ 거핵구의 팽창을 보여준다. C. 6일째 모세포 배양물 및 4일째 MK 배양의 FACS 분석은 CD41a, CD42b 및 CD235a 계통 마커의 발현 수준의 변화를 보여준다. CD235a+세포는 MK 배양에서 사라졌지만, 생존 세포의 90% 초과는 CD41a+가 되었다. 작은 수의 CD41a+ 세포는 6일째 모세포 배양물 (하부 패널, 왼쪽)에서 CD42b에 대해 양성이었다. MK 배양에서 4일째까지, 대다수의 CD41a+ 세포는 또한 거핵구 (하부 패널, 오른쪽)의 성숙을 나타내는 높은 수준의 CD42b를 발현시켰다.

도 4는, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 시험관내 생성된 거핵구의 특성화를 묘사한다. A. 시간대별 실험은 6 일째 MK 배양 동안 세포 크기의 증가 (상부 패널) 및 세포 크기 분포의 변화 (하부 패널)를 보여준다. 세포 크기 (직경)은 김사 염색과 함께 사이토스핀 슬라이드를 사용하여 측정되었다. B. 김사 염색 이미지는 배수체 거핵구를 보여준다. C. FACS 점도표는 6일째 MK 배양으로부터 CD41a+ 거핵구 내의 CD42b 및 CD42a 거핵구/혈소판 특이적 당단백질 모두의 발현을 보여준다. D. 면역형광 이미지는 4일째 MK 배양으로부터 배수체 거핵구에서 CD41 염색 및 vWF 염색을 보여준다. E. RT-PCR 결과는 시험관내 MK 생성의 상이한 단계에서 에리트르/거핵구형

성을 조절하는 전사 인자의 발현 수준을 보여준다. 총 RNA는 RNA 용이 미니프리트(mini-prep) 키트 (Qiagen)으로 ES, 4일째 EB, BC (6 내지 8일째) 및 4일째 MK로부터 분리되었다. 2ug 총 RNA는 iScript 키트 (Biorad)를 사용하여 cDNA 합성을 위해 사용되었다. GAPDH RT-PCR는 각 샘플을 위한 입력 cDNA의 양에 대한 대조군으로서 행해졌다. F. 대표적인 상 콘트라스트 이미지는 4일째 MK 배양에서 거핵구를 형성하는 전혈소판을 보여준다.

도 5는, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 혈액모세포/모세포 및 조혈모 세포를 향한 hiPSC 및 hESC의 분화를 묘사한다. A. hESC (i, x100)로부터 유래된 혈액모세포/모세포 (ii, x400)는 CD71 (x1000), CXCR4 (x1000) 및 Tpo 수용체 (x1000)로 염색되었다. B. hiPSC (i, x100)로부터 유래된 혈액모세포/모세포 (ii, x400)는 CD71 (x1000), CXCR4 (x1000) 및 Tpo 수용체 (x1000)로 염색되었다. C. 재플레이팅 후 14일에 hiPSC-모세포로부터 발달된 다중 유형의 조혈모세포 콜로니 형성 유닛 (CFU), CFU-E, CFU-GM 및 CFU-Mk에 대해 x100, CFU-G에 대해 x40. (D) 내피 세포 (i, x200)로 분화된 hiPSC로부터 유래된 혈액모세포/모세포; Matrigel (ii, x40), 발현된 vWF (적색) 및 CD31 (iii, 녹색, x400) 뿐만 아니라 LDL 섭취 능력 (iv, 적색 x400)을 갖는 VE-Cadherin (iv, 녹색)에 대한 혈관 유사 네트워크로부터 형성된 hiPSC 유래된 내피세포.

도 6은 본 발명의 다양한 구현예에 따라 기능적 ES 유래된 혈소판 (ES-PLT)의 생성을 묘사한다. A. 점도표는 OP9 공-배양 (최상부 왼쪽)으로부터 유래된 전방 산란 (FSC) 및 측면 산란 (SSC) 특징 ES-PLT를 보여준다. 통문 (Gating)은 인간 혈소판을 기준으로 설정되었다. 최상부 오른쪽 패널은 ES-PLT에 대한 CD41a (y축) 및 CD42b (x축)의 발현을 보여준다. 휴지기 ES-PLT (중간 패널)과 비교할 때, 트롬빈 (1u/ml) 처리된 ES-PLT는 증가된 PAC1 결합을 보여주었다. 평균 형광 세기는 트롬빈 처리된 ES-PLT에서 대략 2배 증가했다. B. MA01 및 MA09 임상 등급 hESC로부터 유래된 ES-PLT는 트롬빈 처리에 대한 반응에서 PAC1 결합을 또한 보여준다.

도 7은, 고정화된 피브리노겐에 대한 ES-PLT 결합을 묘사하고, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 미세응집물을 형성한다. A. 퍼짐 검정은 혈소판 (왼쪽 패널)을 보여주고, ES-PLT (오른쪽 패널)은 피브리노겐으로 코팅된 유리 슬라이드 상에 퍼질 수 있다. 이 과정이 인테그린 수용체 신호전달에 의존하는 것은, RGDS의 첨가가 퍼짐을 차단하기 때문이다. ADP (+ADP) 또는 트롬빈 (+T)의 첨가는 피브리노겐 단독 (Con)과 비교하여 피브리노겐 상에 퍼짐 과정을 향상시킨다. F-액틴 섬유 및 형성 사상족의 인테그린 의존 재배열은 CD41a (녹색) 및 팔로이딘 (F-액틴, 적색)의 형광 염색에 의해 보여진다. B. 미세응집물 형성 검정. 동일한 수의 PKH67 (녹색) 표지된 혈소판 (상부 패널) 또는 ES-PLT (하부 패널)는 미표지된 혈소판과 혼합되어 트롬빈 (0.5u/ml)의 자극 하에서 응집물을 형성한다. 상 콘트라스트 및 형광 이미지는 표지된 ES-PLT의 미세응집물로의 참여를 인간 혈소판 대조군과 비교하는 것을 보여준다. C. FACS 분석의 히스토그램은 ES-PLT에서 HLA 발현을 보여준다. 혈소판은 대조군 (왼쪽)으로서 사용되었다.

도 8은, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 hESC로부터 생성된 거핵구 및 혈소판의 특성화를 보여준다. A. 4일째 MK 배양으로부터 CD41a 및 42b 항원의 발현에 대한 세포의 FACS 분석; B. 검사 염색 이미지는 배수체 거핵구 (100x)를 보여준다. C. 면역형광 이미지는 4일째 배양물 (상부 패널 40x, 하부 패널 100x)로부터 배수체 MK에서 CD41, vWF 및 DAPI 염색을 보여준다. D. DNA 함량에 대한 MK의 FACS 분석; E. 대표적인 상 콘트라스트 이미지는 4일째 MK 배양 (40x)에서 거핵구를 형성하는 전혈소판을 보여준다, F. FACS 점도표는 hESC로부터 유래된 혈소판에 대한 전방 산란 (FSC), 측면 산란 (SSC) 특징 (왼쪽 패널) 및 CD41a 및 CD42b의 발현 (오른쪽 패널)을 보여준다. 통문은 인간 혈소판을 기준으로 설정되었다. G. 휴지기 (왼쪽 패널) 및 트롬빈 (1U/ml) 처리된 hESC-혈소판 (오른쪽 패널)에 대한 PAC1 결합 검정.

도 9는 본 발명의 다양한 구현예에 따라 hESC로부터 생성된 혈소판의 기능적 특성화를 묘사한다. A 및 B. 마이크로티터 챔버 슬라이드는 100 μ g/mL 피브리노겐으로 코팅되었다. 인간 혈소판 (A) 및 hESC-혈소판 (B)는 90분 동안 퍼질 수 있었다. 부착 혈소판은 Alexa Fluor 568 팔로이딘, FITC 접합된 항인간 CD41a 항체 및 DAPI로 염색되었고, 형광 현미경 (100x) 하에서 촬영되었다. 혈소판은 지시된 바와 같이 RGDS (1mM), ADP (20 μ M) 또는 트롬빈 (T, 1U/ml)으로 또한 처리되었다. C 및 D. 미세응집물 형성 검정. 동일한 수의 PKH67 (녹색) 표지된 인간 혈소판 (C) 또는 hESC-혈소판 (D)는 미표지된 혈소판과 혼합되어 트롬빈 (0.5 U/ml)의 자극 하에서 응집물을 형성한다. 상 콘트라스트 (왼쪽 패널) 및 형광 이미지 (중앙 패널)는 합병되어 (오른쪽 패널) 표지된 혈소판 (C, 오른쪽 패널) 및 hESC 혈소판 (D, 오른쪽 패널)의 미세응집물로의 참여를 보여준다. E 및 F. hESC-혈소판 (1.5×10^7 /ml, E) 및 혈소판 (1.5×10^7 /ml, F)는 혈소판 고갈 혈장에서 재현탁되었다. 트롬빈 (2 U/ml) 및 $CaCl_2$ (10 mM)는 혈소판 서스펜션에 첨가되어 덩어리 형성/수축 (E 및 F, 왼쪽 패널)을 유래한다. 혈장은 단독으로 응성 대조군으로서 사용되었다. 덩어리 냉동절편은 항-인간 CD41 및 항-인간 피브리린 항체, 그 다음 2차 로다민 접합된 항-라빗 IgG 및 FITC 접합된 항-마우스 IgM 항체로 각각 면역염색되었다. 이미지는 형광 현미경 (20x) 하

에서 촬영되었다.

도 10은 본 발명의 다양한 구현예에 따라 생존 마우스에서 레이저 유도된 세동맥 손상의 부위에서 hESC-PLT을 발달 마우스 혈소판 혈전에의 혼입을 묘사한다. 칼세인 AM 표지된 인간 혈소판 또는 ESC 유래된 혈소판, 50-100 μl ($5-10 \times 10^5$ 혈소판)는 레이저 유도된 혈관 손상 직후에 대퇴 동맥 캐놀라를 통해 주입된다. 발달 마우스 혈소판 혈전은 Dylight 649-표지된 항-CD42 ($0.05 \mu\text{g/g}$ 체중)의 주입에 의해 모니터링되었다. 2-3 혈전의 생성 후, 표지된 혈소판은 ReoPro($200 \mu\text{l}$ 에서 2×10^6 인간 혈소판에 대한 $20 \mu\text{g}$)로 예비처리되었고, 동일한 마우스에서 혈관 손상 후 주입되었다. 다른 2-3 혈전이 생성되었다. 데이터는 혈관 손상을 따라 3분 동안 수집되었다. A. 대표적인 형광 이미지는 혈관 손상을 따라 3개의 시점 (0, 1/2 Tmax, 및 Tmax)에서 보여진다. 백색 삼각형 내의 면적의 확대된 이미지는 하부에서 보여진다. 바 = $10 \mu\text{m}$. B 및 C. 미세혈관 (B)으로 순환하고 혈관 손상 (C)의 부위에서 발달 마우스 혈소판 혈전에 혼입된, 표지된 인간 혈소판의 수는 혈관 손상 후 3분에 걸쳐 카운트되었다. 데이터는 평균 \pm S.E.M. (마우스에서 $n = 5-8$ 혈전)을 나타낸다. * $P < 0.05$ 및 ** $P < 0.01$ 대 대조군, 스튜던트 t-시험(Student t-test).

도 11은, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 영양세포 및 혈청 없는 조건 하에서 생성된 hESC-혈소판의 퍼짐 검정을 묘사한다. 마이크로티터 챔버 슬라이드는 $100 \mu\text{g/mL}$ 피브리노겐 (상부 패널) 또는 $30 \mu\text{g/mL}$ vWF (중간 및 하부 패널)로 코팅되었다. hESC-혈소판은 90분 동안 퍼질 수 있었다. 부착 혈소판은 Alexa Fluor 568 팔로이딘, FITC 접합된 항-인간 CD41a 항체 및 DAPI로 염색되었고, 형광 현미경하에서 촬영되었다.

도 12는 본 발명의 다양한 구현예에 따라 혈소판의 PAC-1 결합 검정을 묘사한다. 혈소판은 트롬빈 (1U/mL)으로 (오른쪽) 또는 없이 (왼쪽) 처리되었고, 그 다음 PAC-1 결합은 FACS 분석으로 수행되었다.

도 13은, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 상이한 hESC 세포주로부터 생성된 hESC-혈소판의 특성화를 묘사한다. A. 임상 등급 MA01 및 MA09 hESC 세포로부터 유래된 hESC-혈소판에 대한 CD41a 및 CD42b 발현. B. 트롬빈 처리 (1U/mL)에 대한 반응에서, MA01 및 MA09 hESC 유래된 혈소판은 휴지기 대조군 (상부 패널)과 비교하여 증가된 PAC-1 결합 (하부 패널)을 보여준다. C. hESC-혈소판은 IgG 아이소타입 대조군 염색과 비교하여 HLA-ABC 발현을 나타낸다. FACS 분석의 히스토그램은 hESC-혈소판에서 HLA 발현을 보여준다. 혈소판은 대조군 (왼쪽)으로서 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본원에 인용된 모든 참고문헌들은 마치 완전히 제시된 것처럼 그 전체가 참조로써 포함된다. 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌[Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); 및 Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001)]은 본 기술분야의 숙련자에게 본 출원에 사용된 다수의 용어에 대한 일반적인 지침을 제공한다.
- [0024] 본 기술분야의 숙련자는 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있는 것으로 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 다수의 방법 및 물질을 인지할 것이다. 실제로, 본 발명은 결코 기술된 방법 및 물질에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어들은 아래에 정의된다.
- [0025] 본원 명세서 및 뒤따르는 청구항에 걸쳐 사용된 바와 같이, 영문의 "단수"의 의미는 문맥이 다른 식으로 명백하게 지시하지 않는 한, 복수형의 언급을 포함한다. 또한, 본원 명세서에 사용된 바와 같이, "내에(in)"의 의미는 문맥이 다른 식으로 명백하게 지시하지 않는 한, "내에(in)" 및 "상에(on)"를 포함한다.
- [0026] 용어 "배아 줄기세포"(ES 세포)는 본 기술분야에서 사용되는 바와 같이 본원에 사용된다. 이 용어는 세포주로서 연속적으로 계대된 것을 포함하는, 배반포(blastocyst) 또는 상실배(morula)의 내부 세포 덩어리(inner cell mass)로부터 유래한 세포를 포함한다. ES 세포는 정자를 이용한 난세포의 수정으로부터 뿐만 아니라 DNA, 핵전이, 단성생식(parthenogenesis)을 이용하거나, HLA 영역에 동형접합성(homozygosity)을 갖는 ES 세포를 생성시키는 수단에 의해서 유래될 수 있다. ES 세포는 또한 정자와 난자의 융합, 핵전이식, 단성생식, 융성발생(androgenesis), 또는 염색질(chromatin)의 재프로그래밍(reprogramming) 및 그에 이어 세포를 생산하기 위한

재프로그래밍된 염색질의 원형질막 내로의 통합에 의해서 생산된 접합체(zygote), 할구, 또는 배반포-단계의 포유동물의 배아로부터 유래된 세포이다. 배아 줄기세포는 그들의 공급원이나 이들을 생산하기 위해 사용된 특정 방법에 관계없이, (i) 3개의 배엽(germ layer) 모두의 세포로 분화하는 능력, (ii) 적어도 Oct 4 및 알칼라인 포스파타아제의 발현, 및 (iii) 면역 결핍성 동물 내로 이식되는 경우 기형종(teratoma)을 발생하는 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다.

[0027] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다능성 줄기세포"는, 다능성 줄기세포가 유래되는 방법에 관계없이, 배아 줄기세포, 배아 유래 줄기세포, 및 유래된 다능성 줄기세포를 포함한다. 다능성 줄기세포는 기능적으로 (a) 면역 결핍성(SCID) 마우스에 이식되는 경우 기형종을 유도할 수 있고; (b) 3개의 배엽 모두의 세포 유형으로 분화할 수 있고(예를 들면, 외배엽, 중배엽, 및 내배엽 세포 유형으로 분화할 수 있고); (c) 배아 줄기세포의 하나 이상의 마커를 발현하는(예를 들면, Oct 4, 알칼라인 포스파타아제, SSEA-3 표면 항원, SSEA-4 표면 항원, 나노그(nanog), TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1 등을 발현하는) 줄기세포로 정의된다. 예시적인 다능성 줄기세포는, 예를 들어 본 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예시적인 다능성 줄기세포는 배반포 단계 배아의 ICM으로부터 유래된 배아 줄기세포뿐만 아니라 (임의로 배아의 나머지를 파괴하지 않고) 분열 단계 또는 상질배 단계 배아의 하나 이상의 할구로부터 유래된 배아 줄기세포를 포함한다. 상기 배아 줄기세포는 수정에 의해서, 또는 체세포 핵전이(SCNT), 단성생식, 및 융성발생을 포함하는 무성 수단에 의해 생산된 배아 물질로부터 생성될 수 있다. 추가의 예시적인 다능성 줄기세포는 인자의 조합(본원에서는 재프로그래밍 인자라 지칭함)을 발현시켜 체세포를 재프로그래밍함으로써 생성된 유래된 다능성 줄기세포(iPSC)를 포함한다. iPSC는 태아, 생후, 신생아, 유년기, 또는 성인 체세포를 이용하여 생성될 수 있다.

[0028] 특정 구현예에서, 체세포를 다능성 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해 사용될 수 있는 인자는, 예를 들어 Oct 4(때때로 Oct 3/4으로 지칭함), Sox2, c-Myc, 및 Klf4의 조합을 포함한다. 다른 구현예에서, 체세포를 다능성 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해 사용될 수 있는 인자는, 예를 들면, Oct 4, Sox2, 나노그, 및 Lin28의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 적어도 두 개의 재프로그래밍 인자가 체세포에서 발현되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구현예에서, 적어도 3개의 재프로그래밍 인자가 체세포에서 발현되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구현예에서, 적어도 4개의 재프로그래밍 인자가 체세포에서 발현되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구현예에서, 부가적인 재프로그래밍 인자가 확인되며, 단독으로 또는 체세포를 다능성 줄기세포 세포로 재프로그래밍하는 하나 이상의 공지된 재프로그래밍 인자와 함께 사용된다. 실제로 다능성 줄기세포는 기능적으로 정의되며 다양한 방법(통합 벡터, 비-통합 벡터, 화학적 수단 등) 중 어느 하나를 이용하여 재프로그래밍된 세포를 포함한다.

[0029] 유래된 다능성 줄기세포는 체세포에서 재프로그래밍 인자의 단백질 전달에 의해 생산될 수 있다. 특정 구현예에서, 적어도 두 개의 재프로그래밍 단백질이 체세포 내로 전달되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구현예에서, 적어도 3개의 재프로그래밍 단백질이 체세포 내로 전달되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구현예에서, 적어도 4개의 재프로그래밍 단백질이 체세포 내로 전달되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다.

[0030] 다능성 줄기세포는 어떤 종으로부터라도 유래될 수 있다. 배아 줄기세포는, 예를 들어, 마우스, 비-인간 영장류의 다수의 종, 및 인간에서 성공적으로 유래되어 왔으며, 배아 줄기세포 유사 세포는 수많은 추가의 종으로부터 생성되어 왔다. 따라서, 본 기술분야의 숙련자라면, 인간, 비-인간 영장류, 설치류(마우스, 랫트), 유제류(ungulate)(소, 양 등), 개(애완용 및 야생 개), 고양이(애완용 및 사자, 호랑이, 치타와 같은 야생 고양이), 토끼, 햄스터, 게르빌루스쥐, 다람쥐, 기니아피그, 염소, 코끼리, 팬더(자이언트 팬더 포함), 돼지, 너구리, 말, 얼룩말, 해양 포유동물(돌고래, 고래 등) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 종으로부터 배아 줄기세포 및 배아 유래된 줄기세포를 생성할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 종은 멸종 위기에 처한 종이다. 특정 구현예에서, 상기 종은 현재 멸종된 종이다.

[0031] 유사하게, iPSC는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 이들 iPSC는 마우스 및 인간 세포(hiPSC)를 이용하여 성공적으로 생성되어 왔다. 더욱이, iPSC는 배아, 태아, 신생아, 및 성인 조직을 이용하여 성공적으로 생성되어 왔다. 따라서, 임의의 종으로부터라도 그의 공여체 세포를 이용하여 iPSC를 용이하게 생성할 수 있다. 그러므로, 인간, 비-인간 영장류, 설치류(마우스, 랫트), 유제류(소, 양 등), 개(애완용 및 야생 개), 고양이(애완용 및 사자, 호랑이, 치타와 같은 야생 고양이), 토끼, 햄스터, 염소, 코끼리, 팬더(자이언트 팬더 포함), 돼지, 너구리, 말, 얼룩말, 해양 포유동물(돌고래, 고래 등)을 포함하나 이에 제한되지 않는 임의의 종으로부터 iPSC를 생성할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 종은 멸종 위기에 처한 종이다. 특정 구현예에서, 상기 종은 현

재 멸종된 종이다.

- [0032] 유래된 다능성 줄기세포는 출발점으로서 실질적으로 어떤 발생 단계의 어떤 체세포라도 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 세포는 배아, 태아, 신생아, 유년기, 또는 성인 공여자로부터 유래될 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 체세포는 섬유모세포, 예컨대 피부 샘플 또는 생검에 의해 얻은 피부 섬유모세포, 활액 조직으로부터의 활막세포(synoviocyte), 포피 세포, 불 세포, 또는 폐 섬유모세포를 포함한다. 비록 피부와 불이 적절한 세포를 즉시 이용할 수 있고 손쉽게 획득할 수 있는 공급원을 제공하긴 하지만, 실질적으로는 어떤 세포라도 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 체세포는 섬유모세포가 아니다.
- [0033] 용어 "혈관모세포(hemangioblast)" 및 "혈관-콜로니 형성 세포(hemangio-colony forming cell)"는 본원에 걸쳐 상호교환적으로 사용될 것이다. 세포는 수많은 구조적 및 기능적 특징을 갖는다. 이들 세포의 특징 중에는 숙주에 투여시 골수 내로 정착하는 능력이 있다. 이들 세포는 하나 이상의 마커의 발현(RNA 또는 단백질) 또는 발현 부족(RNA 또는 단백질)을 포함하나 이에 제한되지 않는, 수많은 구조적 및 기능적 특성에 기초하여 설명될 수 있다. 혈관-콜로니 형성 세포는 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 또는 내피 세포 유형을 생성시킬 수 있다. 혈관-콜로니 형성 세포는 바람직하게는 양성능(bipotent)이며, 분화하여 적어도 조혈 세포 유형 및 내피 세포 유형을 생성시킬 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 혈관-콜로니 형성 세포는 적어도 단성능(unipotent)이며, 바람직하게는 양성능이다. 하지만, 추가로 혈관-콜로니 형성 세포는 더 큰 정도의 발생 잠재력을 가질 수 있으며, 특정 구현예에서, 분화하여 다른 계통의 세포 유형을 생성시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 혈관-콜로니 형성 세포는 분화하여 심장 세포(예를 들면, 심근세포) 및/또는 평활근 세포와 같은 다른 중배엽 유도체를 생성시킬 수 있다.
- [0034] 용어 "비-생착성 혈관모세포" 및 "비-생착성 혈관 세포"는 본원에 걸쳐 혈관-콜로니 형성 세포의 특징 중 일부를 공유하는 세포의 집단을 지칭하고자 사용된다. 그러나, 비-생착성 혈관 세포는 면역결핍성 숙주에 투여되는 경우 골수 내에 정착하지 않는다는 점에서 구별될 수 있다. 이러한 차이에도 불구하고, 비-생착성 혈관 세포는 혈관-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징 및 특성 중 하나 이상(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유할 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 비-생착성 혈관 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착되어 있다. 다른 구현예에서, 비-생착성 혈관 세포는 하기 단백질 중 하나 이상(2, 3, 4개)을 발현하지 않는다: CD34, KDR, CD133, CD31. 이론에 얽매임이 없이, 비-생착성 혈관 세포는 혈관-콜로니 형성 세포보다 다소 더 수밀적이며 다양한 조혈 세포 유형을 여전히 생산할 수 있는 별개의 줄기세포 세포 집단을 제공할 수 있다.
- [0035] 혈소판 공급의 제약은 수혈-의존 환자에게 잠재적으로 생명을 위협하는 결과를 가져올 수 있다. hESC는 시험관 내에서 무한히 증식될 수 있으며, 인간 요법을 위한 잠재적으로 무궁무진하고 공여자가 필요없는 혈소판의 공급원에 해당한다. 매칭되거나 감소된 부적합성(incompatibility)을 갖는 hESC주 은행을 창출하는 능력은 잠재적으로 면역 억제 약물 및/또는 면역 조절 프로토콜에 대한 요구를 감소시키거나 제거할 수 있다. 유래된 다능성 줄기세포(iPSC)의 도래로^{41:42:43:44}, 혈소판 동종면역이 발생하는 수혈-의존 환자를 위해 환자-특이적 혈소판을 생산하도록 이들 기술을 조정하는 것이 가능할 수 있다.
- [0036] 공여자로부터 회수된 혈소판은 매우 제한된 보존 기한을 가지며 환자들에게서 예방적 수혈이 점차 요구된다. 공여자 의존 제대혈 또는 골수 CD34+ 인간 조혈모세포와는 달리, 인간 배아 줄기세포(hESC)는 제어된 조건 하에서 시험관내에서 연속적으로 혈소판을 생산하기 위한 유망한 대안적인 공급원이 될 수 있다. 본 발명자들은 무혈청(serum-free) 및 기질이 없는(stromal-free) 조건 하에서 hESC로부터 거핵구(MK)를 생성하는 신규한 시스템을 개발하였다. 이 시스템에서, hESC는 배상체 형성 및 혈관모세포 분화를 통해 거핵구로 유래된다. CD41a 및 CD235a 마커를 모두 발현하는 일시적인 양성능 세포 집단이 혈관모세포 배양 말기에 확인되어 왔다. 이들 세포는 FACS 분류 및 CFU 분석에 의해 증명된 바와 같이 MK 및 적혈구계 세포 모두를 생성할 수 있다. 무혈청 현탁 배양에서 TPO, SCF 및 다른 사이토카인의 존재 하에, 14-15일에 hESC로부터 MK까지 최대 100배의 증폭이 달성될 수 있다. 이 시스템은 hESC로부터 MK를 생성하는 강력한 시험관내 방법에 해당한다. OP9 세포 위에 도말되는 경우, hESC 유래 MK는 혈소판 유사 입자(ES-PLT)를 생성할 수 있다. 이들 ES-PLT는 트롬빈 자극에 즉각 반응하며 미세응집(micro-aggregate) 형성에 참여할 수 있다.
- [0037] 무혈청 및 기질이 없는 조건 하에서 hESC로부터 기능적 거핵구를 생성하는 효율적인 방법이 기술된다. 현 시스템에서, 중간체로서 혈관모세포(본원에서 모세포 세포(BC)로도 칭함)를 이용하여 hESC가 거핵구 분화 쪽으로 유도되었고¹⁷, 1×10^6 세포의 hESC로부터 최대 1×10^8 거핵구가 생성되었는데, 이는 타카야마(Takayama) 등에 의해 가장 최근에 보고된 방법보다 약 10-20배 더 효과적이다¹⁶. 추가 정제없이, 현탁 배양물로부터의 살아있는 세포

중 >90%가 CD41a+이고 이들 세포의 대부분은 또한 CD42a 및 CD42b를 발현하고 있다. 이들 시험관내 유래 MK 세포는, 세포질 과립에서의 vWF의 김사(Giemsa) 염색 및 면역 형광 염색에 의해 증명된 바와 같이, 핵내 유사분열(endomitosis)을 겪어 성숙한 배수체(polyploid) MK가 될 수 있다. 중요하게도, 전혈소판 형성 세포가 MK 배양의 후기 단계에서 꾸준히 발견되는데, 이는 이 시스템에서 생성된 MK가 영양세포가 없는 조건 하에서 말단(terminal) 분화를 겪을 수 있음을 보여준다. 이들 결과들은 또한 OP9 기질 세포 위에 도말되는 경우, 이들 거핵구가 혈액 혈소판의 기능적 특성을 공유하는 혈소판 유사 입자를 생성하였음을 보여준다.

[0038] 제어된 조건 하에 공급원 세포로서 hESC를 이용하여 대규모의 시험관내 거핵구 생산을 위해 조정될 수 있는 효율적인 시스템이 본원에 설명된다. 상기 세포는 CD41a, CD42a 및 CD42b를 발현하였고, 핵내 유사분열을 겪었으며, 성숙한 배수체 MK를 형성하였다. 추가 성숙시, 이들은 트롬빈 자극에 의해 활성화될 수 있고 피브리노겐 및 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자(vWF) 표면 위에서 확산될 수 있는 혈소판을 생성하였다. 상기 hESC 유래 혈소판은 또한 미세응집괴를 형성하였고, 정상적인 인간 혈액 혈소판과 비슷한 방식으로 혈병(clot) 형성 및 퇴축(retraction)을 촉진하였다. 중요하게도, 이들 결과들은 또한 이들 시험관내 유래 거핵구가 이들의 혈액 대응물과 기능적으로 유사한 혈소판을 생산할 수 있었음을 증명하였다. 이들 ES-PLT는 부착하고 확산하는 이들의 능력, 및 정상적인 혈액 혈소판과 함께 미세응집괴를 형성할 수 있는 이들의 능력을 보임으로써 혈소판 작용제(agonist)에 즉시 반응한다. 어떠한 기질 세포나 핸드-피킹(hand-picking) 공정이 거핵구 생산에 관련되어 있지 않기 때문에, 현재의 플랫폼은 또한 기질이 없이 혈소판을 생성하기 위한 조건의 확립을 가능하게 할 것이다. 최근에 공개된 3-D 바이오반응기 시스템을 포함하는 다른 곳에서, 시험관내 혈소판 생산을 위해 기질이 없는 조건이 기술되어 왔기 때문에, 이것은 기술적으로 가능하다³⁰. 종래에 에스트라디올, 비타민 B3 및 세포외 매트릭스 단백질을 포함하는 인자들이 혈소판 생산을 향상시킨다고 보고되어 왔다³¹⁻³³. 이들 인자들은 기질 세포 없이 거핵구 성숙 및 혈소판 생산을 자극하는 시스템에서 시험된다.

[0039] 무혈청 및 기질이 없는 조건 하에서 거핵구를 생산하는 것은 잘 정의된 조건 하에서 거핵구형성 및 혈소판형성(thrombopoiesis)을 조절하는데 중요한 인자들을 선별하게 해 줄 것이다. 이들 미래 연구에서 확인된 인자들은 미래의 임상학적 응용에 기여할 지도 모른다. 또한 이 분야에서의 진보가 아마도 계통 결정(lineage commitment), 증폭 및 성숙을 포함하는 다양한 측면의 거핵구형성을 조절하는 세포 및 분자 메커니즘에 통찰력을 제공할 것이다. 본 발명자들의 모세포 배양물에서의 양성능 CD41a+CD235a+ 집단의 확인이 틀림없이 적혈구계대 거핵구성 세포의 계통 설명으로의 기계론적 연구를 촉진할 것이다. 최근에, 클림첸코(Klimchenko) 등은 OP9 기질 세포 상의 인간 ES 세포의 조혈 분화로부터 CD41a 및 CD235a 모두를 공-발현하는 비슷한 거핵구/적혈구계 양성능 세포들을 보고하였다³⁴. 이들 세포들은 적혈구생성 대 거핵구형성의 분기점을 대표하는 것 같다. 이 집단에 대한 상세한 연구들이 아마도 조혈 동안의 이 중요한 공정을 조절하는데 관여하는 사건을 밝힐 것이다.

[0040] 상기 시스템은 hESC로부터 거핵구 분화의 순차적인 유도를 통합시킨다. 임상학적 응용을 위한 이 시스템의 일관성 및 효율을 개선하기 위해 인-프로세스(in-process) 제어의 추가적인 최적화 및 확립이 수행될 수 있다. 현 단계에서, 거핵구 성숙을 조절하는 근본적인 세포 또는 세포의 메커니즘은 완전히 정의되지 않고 있다. 이들 세포 대부분은 MK 배양물에서 여전히 2배체(diploid)이기 때문에, 배수체화 및 세포질 성숙을 촉진하는 다른 인자들이 확인될 필요가 있으며 시험관내에서 유래된 거핵구의 말단 분화를 촉진시키기 위해 상기 시스템 내에 포함될 필요가 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 시스템에서, ROCK 키나아제 억제제가 초기 단계에서 거핵구의 핵내 유사분열을 유도할 수 있다. 그러나, 이 효과는 아마도 분화하는 거핵구의 조직화된 세포 및 핵 성숙의 차단 때문이라기 보다는 염색체 분리(segregation) 및 세포질 분열(cytokinesis)의 인위적인 차단 때문이다. 시험관내 거핵구 수율, 말단 분화 상태 및 정의된 조건 하에서 기능적 혈소판의 다운스트림(downstream) 생산을 위한 최적의 결과를 달성하기 위해, 증폭, 핵내 유사분열 및 세포질 성숙 간에 균형을 이루는 것이 중요하다.

[0041] 이러한 현재의 결과들은 시험관내에서 유래된 혈소판이 작용제 자극으로 유래된 인테그린 수용체 리모델링 및 혈소판 확산에 즉시 반응한다는 것을 증명하였다. 또한, 시험관내에서 유래된 혈소판은 혈장 혈소판과 함께 작용하여 응집괴를 형성할 수 있다. 이들 시험관내에서 유래된 인간 혈소판은 또한 생체내에서도 기능할 수 있다. 인간 ES 세포 유래 혈소판에 대해 본 발명자들이 수행한 FACS 특성규명 및 3가지 기능 시험(PAC1 결합 분석, 확산 분석 및 미세응괴 분석)은 시험관내에서 생산된 혈소판이 정상적인 혈액 혈소판의 형태적 및 기능적 특성을 공유하고 있다는 것을 보여준다. 니치(Nichii) 등에 의한 최근 보고는 시험관내에서 유래된 마우스 ES 세포 유래의 혈소판의 생체내 기능성이 유망한 결과로 시험되었음을 보여준다³⁵.

[0042] 시험관내 연구들은 생물 내에서 혈소판 혈전의 생성 및 증식 동안에 일어나는 무수한 혈류역학적 사건들을 모방

할 수는 없다. 새로운 생체(intravital) 영상 기술의 이용가능성이 복잡한 생체내 시스템에서 혈관 손상 후 일어나는 혈소판- 의존성 혈전 과정을 직접 조사하고 정량화하는 수단을 제공한다. 생체 고속 광시야 현미경 관찰을 이용하여, 본 발명자들은 hESC 유래 혈소판이, 정상적인 인간 혈액 혈소판과 유사하게, 살아있는 마우스에서 레이저 유도된 세동맥 벽 손상 부위에 있는 발전하는 마우스 혈소판 혈전 내로 통합된다는 것을 증명하였다. hESC 유래 혈소판과 대조군 혈소판을 리오프로(ReoPro)로 전처리시 혈전에 통합되는 혈소판의 수가 현저히 감소하였고, 이는 상기 결합이 α IIb β 3 인테그린에 의해 매개되었음을 확인시켜준다. 이들 결과들은 hESC 유래 혈소판이 살아있는 동물에서 혈관 손상 부위에서 기능적이라는 가치 있는 증거를 제공한다.

[0043] 혈소판은 조직에 부착하고 혈관 손상에 대한 반응으로 서로 부착하는 무핵 세포이다. 이 과정은 일차적으로 혈소판 인테그린 α IIb β 3에 의해 매개되는데, 이는 vWF 및 피브리노겐과 같은 몇 가지 부착성 기질에 결합하여 성장하는 혈전에서 혈소판을 연결하고 추가로 활성화시킨다³⁶. 본원에서의 결과들은 hESC로부터 생성된 혈소판이 시험관내에서 그리고 살아있는 동물 내에서 정상적인 혈액 혈소판과 기능적으로 유사하다는 것을 증명한다. hESC-PLT는 피브리노겐 및 vWF 코팅된 표면 위에서 부착하고 확산하는 능력 뿐만 아니라 생리학적 작용제로 자극되는 경우 응집하는 능력을 포함하는, 지혈과 관련된 중요한 기능을 갖는 것으로 나타났다. 중요하게도, hESC로부터 유래된 혈소판이 피브린 혈병을 퇴축시킬 수 있음이 최초로 제시된다. 일차적인 지혈에서의 이들의 중추적인 역할 이외에, 상기 결과들은 hESC-PLT가 피브린과 상호작용함으로써 응고를 촉진하고, 이것이 인테그린-매개된 신축가능한 움직임에 의해 창상 치유를 촉진할 수 있음을 보여준다.

[0044] 중요한 과학적 및 임상학적 이슈는 hESC 유래 혈소판이 복잡한 생체내 환경에서 기능적인지 여부이다. 최근에 몇몇 그룹에 의해 사용된 레이저-손상 혈전증 모델을 포함하여, 수많은 실험 모델들이 마우스에서 혈전 형성을 연구하기 위해 과거 수십년 사이에 확립되어 왔다^{37:38:39}. 상기 레이저 유도된 혈전증 모델은 손상 후 5-30초 정도로 빠르게 혈소판 혈전 형성을 개시한다. 그러므로, 이 모델은 신속하게 제거되는 인간 혈소판과 hESC-PLT의 발전하는 마우스 혈소판 혈전 내로의 실시간 통합을 관찰할 수 있게 해주며, 이것은 수많은 신호전달 경로, 효소 캐스케이드(cascade) 뿐만 아니라, 무수한 세포 및 단백질 성분들의 상호작용을 포함한다. 이 모델은 또한 트롬빈 유래된 혈전증과 연관된 염증 반응을 반영한다.

[0045] 레이저 유도된 혈관 손상 모델을 이용한, 생체 현미경 관찰 분석은 hESC-PLT가 혈액 혈소판과 마찬가지로 혈관 손상 후 α IIb β 3 인테그린을 통해 발전하는 마우스 혈소판 혈전 내로 통합된다는 것을 증명한다. 마우스 혈소판 혈전과 상호작용하는 hESC-PLT의 수는 인간 혈액 혈소판의 수보다 더 낮았는데(도 9C), 이는 활성화된 인간 혈액 혈소판과 비교하여 활성화된 hESC-PLT에 결합하는 PAC-1의 감소 때문일 수 있다(도 7G 및 도 11). 이들 결과들은 hESC-PLT가 생체내 혈관 손상 부위에서 기능적이라는 명확한 증거를 제공한다.

[0046] 두 가지 종래 연구들은 hESC로부터의 MK의 생성을 보고하였다. 이들 시스템에서의 수율은 매우 낮으며(본원에 보고된 것보다 <100배), 현 시스템과는 달리, 혈청이 첨가된 동물 기질 세포와의 공-배양에 의존한다^{15:16}. 더욱이, 이들 중 단지 하나가 시험관내에서 기능적인 hESC-혈소판의 생성을 증명하였지만, 이들의 생체내 기능성은 보고되지 않았다¹⁶. hESC 분화에서의 이들 두 개의 변수의 제거는 동물 생성물에 대한 노출 없이 혈소판을 생성할 수 있게 해준다. 본 연구에서 사용된 영양세포 없는 시스템이 높은 효율로 MK를 생성한다는 것이 관찰되었음에도 불구하고, 영양세포 없는 조건 하에서 기능적 혈소판을 생성하는 최종 단계는 OP9 세포 공-배양 시스템보다 덜 효율적이다.

[0047] 그러므로, 이들 결과들은 OP9 기질 세포가 hESC-MK로부터의 기능적 혈소판의 생성을 향상시킬 수 있는 부가적인 지지 인자들을 제공한다는 것을 제시한다. 근본적인 메커니즘이 계속 연구되어야 한다. 혈소판 형성은, 막과 미세소관의 정교한 재편성 및 파립과 세포 소기관의 정확한 분포를 갖는, 매우 복잡한 과정이다⁴⁰. 최근에 혈소판 생물발생(biogenesis)의 이해의 진전에도 불구하고, 막 재편성, 전구혈소판의 개시, 혈소판 세포 소기관 및 분비성 파립의 운송, 및 혈소판 크기의 제어의 근간이 되는 기계론적 세부사항이 계속 설명되어야 한다. 무혈청 및 영양세포 없는 조건 하에서 MK를 생성하는 능력이, 계통 결정, 증폭 및 성숙을 포함하는, 잘 정의된 조건 하에서 다양한 측면의 거핵구 형성을 조절하는데 중요한 인자들을 선별하는 데 도움이 될 것이다.

[0048] 거핵구

[0049] 본 발명의 다양한 구현에는 기질 없는 조건 하에서 인간 배아줄기세포 및 다능성 줄기세포 (iPSC 및 hiPSC 포함)로부터 기능적 거핵구를 생성하는 방법을 제공한다. hiPSC 및 hESC를 포함하는 다능성 줄기세포는 중간체로서 혈액모세포/모세포를 사용하여 거핵구 분화로 향하는 것으로 지도된다.

- [0050] 일 구현예에서, 본 방법은 하기를 포함한다: 혈액모세포 (모세포라고도 칭함)를 제공하는 단계; 및 혈액모세포를 거핵구로 분화시키는 단계. 일 구현예에서, 혈액모세포는 인간 혈액모세포이다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 hESC로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 재프로그래밍 체세포로부터 유래된 인간 iPSC (hiPSC)이다. 일 구현예에서, 체세포는 태아 조직으로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 체세포는 성체 조직으로부터 유래된다. 대안적인 구현예에서, 혈액모세포는 비-생착 혈액모세포일 수 있다.
- [0051] 일 구현예에서, 혈액모세포의 거핵구로의 분화는 하기를 포함한다: TPO, SCF로 보충된 배지에서 6 내지 8일째 혈액모세포를 정제 및 플레이팅하여 MK를 향하는 BC 분화를 유래한다. 다양한 구현예에서, 농도는 TPO (50 ng/ml) 및 SCF (20 ng/ml)이다. 다른 구현예에서, 농도는 TPO (100 ng/ml) 및 SCF (50 ng/ml). 다른 구현예에서, 배지는 IL11 (예를 들면, 20 ng/ml)로 또한 보충된다. 추가 구현예에서, MK는 CD41a, CD42a 및 CD42b를 발현시킨다. 대안적인 구현예에서, 배지는 IL6, IL11, VEGF, bFGF, 에스트라디올, 비타민 B3, 및/또는 세포의 매트릭스 단백질로 또한 보충된다. 추가 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및/또는 IL11로 보충된 배지를 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및/또는 IL11로 보충된 배지의 적어도 일부를 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 포함한다. 대안적인 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및/또는 IL11로 보충된 배지의 반을 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 추가로 포함한다. 다양한 구현예에서, 약 1 내지 5×10^5 세포/ml가 플레이팅된다. 다양한 구현예에서, 스템라인 II 배지가 사용된다.
- [0052] 다른 구현예에서, 본 발명은 하기를 포함하는 세포 분화의 모듈레이터의 스크리닝 방법을 제공한다: 거핵구 (MK)의 양을 제공하는 단계; 상기 MK를 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및 MK와 시험 화합물 사이의 접촉으로부터 기능적 효과의 존재 또는 부재를 측정하는 단계, 여기서 상기 기능적 효과의 존재는, 시험 화합물이 거핵구형성 인자, 트롬보포이에틴 인자, 및/또는 세포 분화를 조절하는 조절 인자라는 것을 나타내고, 상기 기능적 효과의 부재는, 시험 화합물이 거핵구형성 인자, 트롬보포이에틴 인자, 및/또는 세포 분화를 조절하는 조절 인자가 아니라는 것을 나타낸다. 다른 구현예에서, 거핵구형성 인자, 트롬보포이에틴 인자, 및/또는 조절 인자는 팽창, 핵내유사분열, 세포질 성숙, 및 기능적 혈소판의 말단 분화와 관련된다.
- [0053] 혈소판
- [0054] 본 발명의 다른 구현예는 인간 배아줄기세포 및 다능성 줄기세포 (iPSC 및 hiPSC 포함)로부터 혈소판의 생성 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 하기를 포함한다: 인간 배아줄기세포 (hESC)를 제공하는 단계; 배상체 (EB)를 형성하는 단계; 혈액모세포 (모세포 (BC)로도 칭함)를 생성하는 단계; 상기 BC를 거핵구로 분화시키는 단계; 및 상기 거핵구를 혈소판으로 분화시키는 단계. 대안적인 구현예에서, 혈액모세포는 비-생착 혈액모세포일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 다른 구현예는 다능성 줄기세포로부터 혈소판의 생성 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 하기를 포함한다: 다능성 줄기세포를 제공하는 단계; 배상체 (EB)를 형성하는 단계; 혈액모세포 (모세포 (BC)로도 칭함)를 생성하는 단계; 상기 BC를 거핵구로 분화시키는 단계; 및 상기 거핵구를 혈소판으로 분화시키는 단계. 일 구현예에서, 혈액모세포는 인간 혈액모세포이다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 hESC로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)로부터 유래된다. 일 구현예에서, iPSC는 재프로그래밍 체세포로부터 유래된 인간 iPSC (hiPSC)이다. 일 구현예에서, 체세포는 태아 조직으로부터 유래한다. 다른 구현예에서, 체세포는 성체 조직으로부터 유래한다. 대안적인 구현예에서, 혈액모세포는 비-생착 혈액모세포일 수 있다.
- [0056] 다른 구현예에서, 혈소판의 생성 방법은 하기를 포함한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 상기 혈액모세포를 거핵구로 분화시키는 단계; 및 상기 거핵구를 혈소판으로 분화시키는 단계. 대안적인 구현예에서, 혈액모세포는 비-생착 혈액모세포일 수 있다. 혈액모세포의 거핵구로의 분화 과정은 상기에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 혈액모세포는 인간 혈액모세포이다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 hESC로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 유도 다능성 줄기세포 (iPSC)로부터 유래된다. 일 구현예에서, iPSC는 재프로그래밍 체세포로부터 유래된 인간 iPSC (hiPSC)이다. 일 구현예에서, 체세포는 태아 조직으로부터 유래한다. 다른 구현예에서, 체세포는 성체 조직으로부터 유래한다. 대안적인 구현예에서, 혈액모세포는 비-생착 혈액모세포일 수 있다.
- [0057] 다양한 구현예에서, 거핵구의 혈소판으로의 분화 방법은 거핵구의 배양을 계속하여 상기 거핵구가 혈소판으로

분화하도록 하는 것을 포함한다. 다양한 구현예에서, 거핵구의 혈소판으로의 분화 방법은 영양세포 없는 조건하에서 수행되고, 거핵구를 4 내지 6일째 거핵구 배양으로부터 수집하는 단계; 및 상기 거핵구를 TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린으로 보충된 배지에서 재현탁시키는 단계를 포함한다. 어떤 구현예에서, TPO (100 ng/ml), SCF (50 ng/ml), 및 나트륨 헤파린 (25 유닛/ml)의 농도. 어떤 구현예에서, 배지는 IL11 (예를 들면, 20 ng/ml)으로 또한 보충된다. 대안적인 구현예에서, 배지는 IL3, IL6, IL11, VEGF, bFGF, 에스트라디올, 비타민 B3, 및/또는 세포외 매트릭스 단백질로 또한 보충된다. 어떤 구현예에서, IL3은 4 내지 7일째 거핵구 배양에서 추가된다. 다른 구현예에서, 금속단백질분해효소 억제제 GM 6001은 4일째 거핵구 배양 후 추가된다. 어떤 구현예에서, 배지는 IMDM 배지이다. 추가 구현예에서, TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린 및 임의로 IL11을 포함하는 배지는 2일마다 대체된다. 다른 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린 및 임의로 IL11을 포함하는 배지의 적어도 일부를 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 추가로 포함한다. 대안적인 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린 및 임의로 IL11을 포함하는 배지의 반을 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 혈소판은 4일째 내지 12일째 거핵구 배양에서 수집된다. 다양한 구현예에서, 거핵구의 혈소판으로의 분화 방법은 거핵구의 배양을 계속하여 상기 거핵구를 혈소판으로 분화하도록 하는 것을 포함한다. 다양한 구현예에서, 다양한 인자는 거핵구로부터 효율적인 혈소판 형성을 개선한다. 다양한 구현예에서, IL6, IL3, 노치(Notch), 또는 다른 유형의 사이토킨, 인터류킨, 성장 인자, 소분자 및 이들의 조합은 거핵구로부터 혈소판 분화의 효율을 개선한다.

[0058] 다른 구현예에서, 거핵구를 혈소판으로 분화시키는 방법은 상기 거핵구를 OP9 기질 세포 또는 C3H 10T1/2 세포와 함께 공-배양시키는 것을 포함한다. 다양한 구현예에서, 상기 거핵구를 OP9 기질 세포 또는 C3H 10T1/2 세포와 함께 공-배양시키는 것은 상기 거핵구를 4 내지 6일째 거핵구 배양으로부터 수집하는 단계; 및 상기 거핵구를 TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린으로 보충된 배지에서 재현탁시키는 단계를 포함한다. 어떤 구현예에서, TPO (100 ng/ml), SCF (50 ng/ml), 및 나트륨 헤파린 (25 유닛/ml)의 농도. 어떤 구현예에서, 배지는 IL11 (예를 들면, 20 ng/ml)로 또한 보충된다. 대안적인 구현예에서, 배지는 IL3, IL6, IL11, VEGF, bFGF, 에스트라디올, 비타민 B3, 및/또는 세포외 매트릭스 단백질로 또한 보충된다. 어떤 구현예에서, IL3은 4 내지 7일째 거핵구 배양에 추가된다. 다른 구현예에서, 금속단백질분해효소 억제제 GM 6001은 4일째 거핵구 배양 후 추가된다. 추가 구현예에서, TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린 및 임의로 IL11을 포함하는 배지는 2일마다 대체된다. 다른 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린 및 임의로 IL11을 포함하는 배지의 적어도 일부를 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 추가로 포함한다. 대안적인 구현예에서, 본 방법은 TPO, SCF, 및 나트륨 헤파린 및 임의로 IL11을 포함하는 배지의 반을 새로운 배지로 2 내지 3일마다 대체하는 것을 추가로 포함한다. 다양한 구현예에서, 다양한 인자는 거핵구로부터 효율적인 혈소판 형성을 개선한다. 다양한 구현예에서, IL6, IL3, 노치(Notch), 또는 다른 유형의 사이토킨, 인터류킨, 성장 인자, 소분자 및 이들의 조합은 거핵구로부터 혈소판 분화의 효율을 개선한다.

[0059] 추가 구현예에서, 혈소판은 4일째 내지 12일째 거핵구 배양으로부터 수집된다. 어떤 구현예에서, 혈소판은 밀도 구배 원심분리법을 사용하여 정제된다. 추가 구현예에서, 상기 밀도 구배 원심분리법은 페콜(Percoll) 배지를 사용한다. 다른 구현예에서, 혈소판 정제법은 CD41a 음성인 입자를 분리한다. 다른 구현예에서, 혈소판 정제법은 세포 생존도 및 형태적 속성을 유지한다. 다른 구현예에서, 혈소판은 CD41a 및 CD42b를 발현시킨다. 다른 구현예에서, 혈소판은 트롬빈 자극에 대해 반응한다. 다른 구현예에서, 혈소판은 피브리노겐 및 폰 빌레브란트(von Willebrand) 인자(vWF) 표면 상에서 퍼질 수 있다. 대안적인 구현예에서, 혈소판은 PAC-1 결합 및 인테그린 활성화에 대한 능력을 갖는다. 다른 구현예에서, 혈소판은 미세응집물을 형성하고 덩어리 형성 및 수축을 촉진한다. 다른 구현예에서, 혈소판은 아피라제 및/또는 EDTA의 존재에서 활성화된다.

[0060] 본 발명의 다양한 구현예는 hESC 유래된 혈소판을 사용하는 방법을 제공한다. 어떤 구현예에서, hESC 유래된 혈소판은 혈소판 수혈에서 사용된다. 이 방법은 hESC 유래된 혈소판의 양을 제공하는 단계; 및 hESC 유래된 혈소판의 양을 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, hESC 유래된 혈소판은 환자 조화된 혈소판일 수 있다. 다른 구현예에서, 혈소판은 iPSC로부터 유래된다. 어떤 구현예에서, 혈소판은 hiPSC로부터 유래된다. 다른 구현예에서, 혈소판은 혈소판의 대상체로의 투여시 대상체에서 HLA 동종면역 반응에 기여하지 않는 용액에서 보관된다.

[0061] 혈액모세포

[0062] 다양한 구현예에서, 혈액모세포는 하기를 포함하는 방법으로 생성될 수 있다: 인간 배아줄기세포(hESC)를 제공하는 단계; 배상체(EB)를 형성하는 단계; 및 모세포(BC)를 생성하는 단계. 대안적인 구현예에서, 상기 방법은 다능성 줄기세포(iPSC 및 hiPSC 포함)를 제공하는 단계; 배상체(EB)를 형성하는 단계; 및 모세포(BC)를 생성

하는 단계를 포함한다. 어떤 구현예에서, iPSC는 재프로그래밍 체세포로부터 유래된다. 일 구현예에서, 체세포는 배아 조직으로부터 유래한다. 다른 구현예에서, 체세포는 성체 조직으로부터 유래한다.

- [0063] 일 구현예에서, EB의 형성은 하기를 포함한다: hESC를 분리하는 단계; 상기 분리된 hESC를 BMP-4 및 VEGF로 보충된 배지로 약 48시간 동안 플레이팅하는 단계; 및 상기 배지의 반을 BMP-4, VEGF, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및/또는 Tpo를 포함하는 새로운 배지로 대체하는 단계. 다른 구현예에서, BMP-4, VEGF, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및/또는 Tpo로 보충된 배지는 2일마다 대체된다. 다른 구현예에서, BMP-4, VEGF, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및/또는 Tpo로 보충된 배지의 적어도 일부는 2일마다 대체된다. 대안적인 구현예에서, 다능성 줄기세포 (iPSC 및 hiPSC 포함)는 hESC 대신에 사용된다.
- [0064] 다양한 구현예에서, hESC의 분리는 hESC을 트립신으로 분리하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 트립신의 농도는 0.05%이다. 다양한 구현예에서, 배지는 스템라인 II 배지이다. 다양한 구현예에서, BMP-4 및 VEGF의 농도는 모두 50 ng/ml이다. 다양한 구현예에서, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및 Tpo의 농도는 bFGF (20 ng/ml), SCF (50 ng/ml), Flt3 리간드 (50 ng/ml) 및 Tpo (50 ng/ml)이다. 대안적인 구현예에서, 배지는 IL6, IL11, VEGF, bFGF, 에스트라디올, 비타민 B3, 및/또는 세포의 매트릭스 단백질로 또한 보충된다. 다른 구현예에서, EB의 형성은 세포의 계속적 배양을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, BMP-4, VEGF, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및/또는 Tpo로 보충된 배지는 2일마다 대체된다. 다른 구현예에서, BMP-4, VEGF, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및/또는 Tpo로 보충된 배지의 적어도 일부는 2일마다 대체된다. 일 구현예에서, BMP-4, VEGF, bFGF, SCF, Flt3 리간드 및/또는 Tpo로 보충된 배지의 반은 2일마다 대체된다.
- [0065] 일 구현예에서, 혈액모세포의 생성은 하기를 포함한다: 배상체 (EB)를 4일째 EB 배양물에서 수집하는 단계; 상기 EB를 분리하는 단계; 단세포 서스펜션을 얻는 단계; 생존 세포를 모세포 콜로니 성장 배지 (BGM)와 혼합하는 단계; 및 생존 세포를 플레이팅하여 혈액모세포를 생성하는 단계.
- [0066] 다양한 구현예에서 EB의 분리는 트립신에 의한 분리를 포함한다. 다양한 구현예에서, 단세포 서스펜션을 얻는 것은 세포를 22-게이지 니들 및 40 μm 세포 여과기를 통해 통과시키고, 상기 세포를 원심분리로 수집하고, 세포를 배지에서 재현탁시키는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 배지는 스템라인 II 배지이다. 다양한 구현예에서, 생존 세포의 모세포 콜로니 성장 배지 (BGM)와의 혼합은 1 내지 2×10^5 세포/ml를 BGM와 혼합시키는 것을 포함한다. 추가 구현예에서, 모세포 콜로니는 생존 세포의 플레이팅 후 3-4일 동안 형성되어 세포 혈액모세포를 생성한다. 추가 구현예에서, 혈액모세포는 쉽게 팽창된다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 CD71 양성, CXCR4 양성이고, TPO 수용체를 발현시킨다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 CD31 음성, CD 34 음성, 및 KDR 음성이다.
- [0067] 그 전체가 완전히 기재된 바와 같이 참고로 본 명세서에 통합되어 있는 국제 출원 번호 PCT/US09/43050 및 PCT/US09/43043 (모두 2009년 5월 6일 출원)은, 혈액모세포 및 비-생착 혈액모세포의 생성에 대한 추가 안내를 제공한다.
- [0068] 실시예
- [0069] 하기 실시예는 청구된 발명을 더 잘 설명하기 위해 제공되고, 본 발명의 범위의 한계로서 해석되어서는 안 된다. 특정 물질이 언급된 정도로, 단지 설명을 위한 것이고, 본 발명을 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 당해 기술의 숙련가는 창의적인 능력의 연습없이 그리고 본 발명의 범위의 이탈없이 동등한 수단 및 반응물을 개발할 수 있다.
- [0070] 실시예 1
- [0071] hESC의 배양
- [0072] 본 연구에서 사용된 인간 ESC 세포주 (HUES3, H1, MA01 및 MA09)는 이전에 기재된 바와 같이 유지되었다¹⁸. 요약하면, 8 ng/ml bFGF로 보충된 완전한 hESC 성장 배지에서 마이토마이신 C 처리된 마우스 배아 섬유모세포 (MEF) 상에서 성장되었다. hESC는 0.05% 트립신-EDTA를 사용하여 60-80% 포화도에서 3-4일마다 통과되었다. 세포는 5% CO₂ 하에서 37 °C에서 유지되었고, 배지는 매일 보충되었다.
- [0073] 실시예 2
- [0074] 배상체 (EB) 형성 및 모세포 (BC)의 생성
- [0075] EB 형성 및 BC 생성의 과정은 이전에 보고된 바와 같이 수행되었다^{17,19}. 요약하면, 70% 포화도에서의 hESC는

0.05% 트립신으로 분리되었고, Ultra-Low 디쉬 (Corning, NY)에서 BMP-4, VEGF (50 ng/ml)로 보충된 스템라인 II (Sigma) 배지와 함께 플레이팅되었다. 상기 배지의 받은 48 시간 후 동일한 사이토킨 플러스 bFGF 20 ng/ml, SCF, Flt3 리간드 (FL) 및 Tpo (50 ng/ml 각각, R&D 시스템)를 함유하는 새로운 배지로 대체되었다. 4일째, EB는 수집되었고, 0.05% 트립신으로 분리되었다. 단세포 서스펜션은 세포를 22-게이지 니들 및 40 μm 세포 여과기를 통해 통과시켜서 얻고, 원심분리로 수집되고, 스템라인 II 배지에서 재현탁되었다. 생존 세포는 트립판 블루 배제법으로 카운팅되었고, 1 내지 2×10⁵/ml는 이전에 기재된 바와 같이 모세포 콜로니 성장 배지 (BGM)와 혼합되었고, Ultra-Low 디쉬에서 플레이팅되었다. 모세포 콜로니는 플레이팅 후 3-4 일에 관찰되었고, 신속한 팽창이 일어났다.

- [0076] 실시예 3
- [0077] 거핵구 분화 배양
- [0078] 6 내지 8일째 모세포 배양으로부터의 BC는 정제되었고, MK를 향하여 BC 분화를 유도하도록 50 ng/ml TPO, 20 ng/ml SCF 및 다른 사이토킨으로 보충된 스템라인 II 배지에서 플레이팅되었다(1 내지 5×10⁵/ml). MK 배양 배지의 받은 새로운 배지로 2 또는 3일마다 대체되었다.
- [0079] OP9 기질 세포는 15% 우태 혈청 (Hyclone)과 함께 α-MEM에서 유지되었다.
- [0080] 포화 OP9 세포는 공-배양 전일에 100 ng/ml 마이토마이신-C로 처리되었다. 세포는 PBS로 2회 완만하게 세정되었고, 공-배양 전에 OP9 배양 배지에서 밤새 회수되었다. OP9 공-배양에 대해, 4 내지 6일째 MK 배양으로부터의 거핵구는 수집되었고, 타카야마 (Takayama) 등에서 기재된 바와 같이 100 ng/ml TPO, 50 ng/ml SCF 및 25 유닛/ml 나트륨 헤파린으로 보충된 IMDM 배지에서 재현탁되었고¹⁶, 2일마다 새롭게 했다. 혈소판 유사 입자는 분석을 위해 4일째 내지 12일째 수집되었다.
- [0081] 실시예 4
- [0082] FACS 분석
- [0083] 모세포 배양 또는 거핵구 배양으로부터의 배양은 FACS Caliber 상에서 유세포측정법 분석으로 일상적으로 모니터링되었다. 계통 마커, CD41a, CD42a, CD42b 및 CD235a (BD Biosciences)에 대한 형광색소 접합된 항체는 거핵구 및 적혈구 계통을 특성화하기 위해 사용되었다. 항체는 5% 신생 송아지 혈청을 갖는 PBS에서 새롭게 준비되었다(CD42a 및 CD42b 항체에 대해 1:100 희석; CD41a 항체에 대해 1:250 희석; CD235a 항체에 대해 1:2000). 전형적으로 1 내지 2×10⁵ 세포는 항체 표지화를 위해 사용되었다. 세포는 얼음 상에서 1시간 동안 100 μl 항체 카테일에서 염색되었고, 그 다음 버퍼로 2회 세정되었고, 1 μg/ml 프로피듐 아이오다이드로 보충된 250 μl 버퍼에서 재현탁되었다. HLA-ABC의 발현 수준을 검출하기 위해, 혈소판은 대조군으로서 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) 접합된 항-인간 HLA-ABC 항체 또는 FITC 접합된 마우스 면역글로불린 G (IgG)와 함께 인큐베이션되었다. 그 다음, 샘플은 유세포측정기 (FACSCalibur, Becton Dickinson)를 사용하여 분석되었고, 데이터는 Cellquest 또는 Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석되었다. 세포 분류는 UMASS Medical School Core Facility에서 BD FACS Aria 시스템 상에서 수행되었다. 분류된 세포는 10 분 동안 1000 rpm에서 원심분리로 수집되었고, 콜로니 형성 검정을 위해 적합한 배지에서 재현탁되었다.
- [0084] 실시예 5
- [0085] Megacult-C 및 메틸셀룰로오스를 갖는 콜로니 형성 검정
- [0086] Megacult-C 및 H4436 메틸셀룰로오스 배지 (Stem Cell Technology)는 CFU-MK 및 CFU-E 콜로니 형성 검정을 위해 사용되었다. 플레이팅 10 일 후, CFU-MK 배양은 제조자에 의해 제안된 바와 같이 탈수, 고정되었고, 항-CD41 항체로 염색되었다. CFU-MK 콜로니는 Megacult-C 프로토콜에서 제공된 표준에 따라 채점되었다. CFU-E 콜로니는 12일째에 채점되었다.
- [0087] 실시예 6
- [0088] 사이토스핀(Cytospin) 준비, 검사 염색 및 면역형광 현미경검사
- [0089] 모세포 배양 또는 거핵구 배양으로부터의 세포 (1 내지 2×10⁴)은 사이토-원심분리 (Cytopro)로 폴리리신 코팅된 슬라이드 상에서 사이토스피닝되었다. 슬라이드는 Wright-Giemsa (Sigma) 또는 면역형광 염색을 위해 사용되

었다. 항-CD41 (DAKO, 1:100) 및 항-vWF (DAKO, 1:200) 항체는 사이토스핀 준비에서 거핵구를 확인하기 위해 사용되었다. 모든 인큐베이션은 실온에서 수행되었다. 세포는 30분 동안 동물 없는 블락커(blocker) (Vector Laboratories)로 차단되었다. 세포는 1시간 동안 일차 항체로 인큐베이션되고, 그 다음 PBS로 3회 세정되었다. 하기 인큐베이션 및 세정은 어두운 곳에서 수행되었다. 그 다음, 세포는 이차 항체 (1:200 각각)로 30분 동안 인큐베이션되었다. 세포는 다시 PBS로 3회 세정되었다. PBS 중 호케스트 염료(Hoechst dye, 1 µg/ml)는 5분 동안 핵 DNA를 염색하기 위해 사용되었고 추가 3x PBS 세정이 수행되었다. 그 다음, 슬라이드는 올리고, 형광 현미경 (Olympus BXV) 하에서 검사되었다. 형광 이미지는 QICAM Fast 카메라 (Qimaging, Canada)를 사용하여 캡처되었고, QCapture Pro 버전 5.1 소프트웨어 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD)로 분석되었다. 상 콘트라스트 생존 세포 이미지는 Nikon 현미경, PAXCAM 디지털 카메라 및 PAX-it 소프트웨어를 사용하여 캡처되었다.

[0090] 실시예 7

[0091] 혈소판의 준비

[0092] 인간 말초 혈소판은 1 U/mL 아피라제 및 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)를 갖는 혈소판 풍부한 혈장 (AllCells, Emeryville, CA)의 편차 원심분리에 의해 분리되었다. 혈소판은 세정되었고, 변성 Tyrode의 버퍼 (12 mM NaHCO₃, 138 mM NaCl, 5.5 mM 글루코오스, 2.9 mM KCl, 0.42 mM NaHPO₄, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂)에서 재현탁되었다. hESC (ES-PLT)로부터 유래된 혈소판을 함유하는 배양 배지는 완만하게 수집되었고, 아피라제 (1 U/ml) 및 EDTA (5 mM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)는 혈소판 활성화를 방지하기 위해 부가되었고, 그 다음 10분 동안 300g에서 회전되어 세포를 펠렛화했다. 상청액은 새로운 튜브로 이동되고, 아피라제 (1 U/ml) 및 EDTA (5 mM)의 존재에서 10분 동안 1000g에서 원심분리되어 혈소판을 수집했다. 그 다음, 혈소판은 한번 세정되고 변성 Tyrode의 버퍼에서 재현탁되었다. 세정된 혈소판은 기능적 검정 전 1-2시간 동안에 37 °C에서 인큐베이션되었다.

[0093] 실시예 8

[0094] 고정화된 피브리노겐 상의 혈소판 퍼짐

[0095] 마이크로티터를 갖는 챔버 슬라이드 (Nalgen Nunc, Rochester, NY)는 4 °C에서 밤새 0.1M NaHCO₃ (pH 8.3) 중 100 pg/mL 피브리노겐 (Sigma)으로 코팅되었다. 세정된 인간 말초 혈소판 또는 hESC-혈소판 (1×10⁷/mL)는 37 °C에서 90분 동안 부착되고, 피브리노겐 코팅된 웰 상에서 퍼졌다. 일부 샘플에서, 혈소판은 로딩 전 5분 동안에 인테그린 길항제, RGDS 펩타이드와 함께 예비인큐베이트되었다. 다른 샘플에서, 혈소판은 ADP (10 µM) 또는 트롬빈 (1 U/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)와 혼합되었고, 피브리노겐 코팅된 웰 상에 즉시 로딩되었다. PBS 세정 후, 세포는 고정되었고, 투과되었고, Alexa Fluor 568 팔로이딘 (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC 접합된 항-인간 CD41a 항체 (Dako cytometry, Carpinteria, CA) 및 DAPI로 염색되었다. 부착 혈소판은 100x/1.40 오일 목표에서 PlanApo 렌즈를 사용하여 Olympus BX51 형광 현미경 (MVI, Avon, MA)으로 보았다. 이미지는 QICAM Fast 카메라 (QImaging, Surrey, BC Canada)를 사용하여 얻고, Q Capture 버전 5.1 소프트웨어 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD)으로 처리되었다.

[0096] 실시예 9

[0097] 혈소판 응집

[0098] 세정된 인간 말초 혈소판 및 hESC-혈소판은 변성 Tyrode 버퍼에서 재현탁되었고, PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (10 µM, Sigma, St. Louis, MO)로 표지되었다. 인간 말초 혈소판 (6×10⁷)는 450 µl 큐벳 (Chronolog, Havertown, PA)에서, 형광 표지된 인간 말초 혈소판 (3×10⁵) 또는 hESC-혈소판 (3×10⁵)와 혼합되고, 그 다음 트롬빈 (0.5 U/mL)이 첨가되고, 1200 rpm에서 37 °C에서 교반되어 혈소판 응집을 일으켰다. 대조군 실험에서, RGDS 펩타이드는 37 °C에서 5 분 동안 혈소판과 예비인큐베이션된 후, 트롬빈이 부가되고, 상기와 같이 응집 검정에서 수행되었다. 50 µL 버퍼 중 혈소판 미세응집물은 유리 슬라이드 상에서 퍼지고, 형광 현미경 하에서 보였다.

[0099] 실시예 10

[0100] PAC-1 결합 검정

[0101] 트롬빈 자극 유무에 따른 ES-PLT (1 U/ml, 실온에서 20분 동안 인큐베이션)는 변성 Tyrode 버퍼에서 APC 접합된

CD41a, PE 접합된 CD42b 및 FITC 접합된 PAC-1 항체로 염색되었다. 그 다음, 샘플은 유세포측정기 (FACSCalibur, Becton Dickinson)를 사용하여 분석되었고, 전방 산란 및 측면 산란 통문은 대조군로서 인간 혈 소관을 사용하여 결정되었다. FACS 데이터는 Cellquest 또는 Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석되었다.

[0102] 실시예 11

[0103] hESC 생성된 거핵구로부터 유래된 모세포 (BC)

[0104] 본 발명자들의 이전 연구는, hESC로부터 유래된 BC가 적합한 조건 하에서 적혈구 세포로 시험관내에서 효율적으로 분화될 수 있다는 것을 보여주었다²⁰. 거핵구 (MK) 및 적혈구가 포유동물 조혈작용 동안에 통상적인 선조를 공유하기 때문에, 본 발명자들은, hESC로부터 유래된 BC가 또한 TPO 및 다른 사이토킨을 갖는 거핵구 촉진 조건 하에서 거핵구로 분화될 수 있다는 결론을 내렸다. 도 1A에서 설명된 바와 같은 유사한 전략은 hESC로부터의 MK로 분화되는 것으로 고안되었다. 초기 단계 EB는 이전에 보고된 바와 같이 모르포겐 및 초기 조혈모세포 사이토킨의 조합으로 보충된 무혈청 배지에서 배양된 hESC로부터 생성되었다^{17;19}. 그 다음, EB는 분리되고, 개별 세포는 BC의 성장 및 팽창을 위해 무혈청 반고체 모세포-콜로니 성장 배지 (BGM)에서 플레이팅되었다. 포도 유사 모세포 콜로니는 먼저 3 일 배양의 초에 나타났고, 4일째 내지 6일째 빠르게 팽창했다. 이 단계에서, BC는 사이토스핀 준비 시에 직경 ~15 μm 의 크기를 갖는 형태에서 비교적 균일했다 (도 1B). 이들 BC는 먼저, 콜로니 형성 유닛 (CFU)-MK 검정에 의해 거핵구 잠재력에 대해 시험되었다. 도 1C 및 1D에 보여진 바와 같이, HUES3 및 H1 세포 모두로부터 유래된 6일째 BC는 재플레이팅 후 10-12일째에 CFU-MK 콜로니를 발단시켰고, 이들 콜로니는 CD41에 대해 양성인 것으로 염색되었다. 일부 CFU-MK 콜로니에서, 세포 과정 유사 전혈소관은 CD41 양성 세포에서 관찰되었다 (도 1D 삽입물). 이들 결과는, hESC 유래된 BC가 거핵구로 분화될 수 있다는 것을 설명한다. 동시에, 그의 CFU-MK 잠재력에서 유의미한 차이는 HUES3 및 H1 세포주 사이에서 관찰되었다. HUES3로부터 유래된 BC는 동일한 수의 H1 모세포보다 대략 3.5 배 더 많은 CFU-MK 콜로니를 생성했다.

[0105] 초기 BGM 배지는 효율적인 BC 생성을 위해 EPO를 함유하고 적혈구 세포 (CD235a+)는 늦은 단계의 모세포 배양에서 지배적인 것으로 되었다²⁰. 본 발명자들의 실험으로부터, 결과는, EB 형성 (hESC의 플레이팅 후 2일) 및 모세포 콜로니 성장 및 팽창의 제2 국면 동안의 더 높은 농도의 TPO (100 ng/ml) 및 SCF (50 ng/ml)는 모세포 배양의 끝에 CD41a+ 세포의 백분율을 증가시킨다는 것을 보여주었다. BGM 배지 중 IL-11 (20 ng/ml)의 부가는 모세포 배양의 6 내지 8일째에서 CD41a+ 세포의 비를 또한 증가시켰다. 따라서, 본 발명자들은 모세포 배양에서 이들 변형을 채택하여 현연구에서 거핵구 계통 결정을 개선했다. HUES3, MA01 및 MA09 hESC 세포주는 변형된 조건으로 시험되었다. 모든 3개의 세포주는 거핵구 잠재력을 보여주었다. CFU-MK 검정 (도 1C)에서의 관찰과 유사하게, 상이한 hESC 세포주로부터 생성된 BC (6 내지 8일째)에서 CD41a+ 세포의 백분율에서의 유의미한 차이는 FACS 분석에 의해 관찰되었다. 예를 들면, MA01 및 MA09 세포주보다 더 유의미하게 더 많은 HUES3 세포로부터의 BC의 32.9±8.4 % (n=13) (P<0.001, 스튜던트 시험). MA01 또는 MA09 유래된 모세포에서, 이들 세포들의 15.3%±5.8 % (n=5) 또는 17.2%±3.7 % (n=5)는 각각 CD41a+였다 (도 1E).

[0106] 실시예 12

[0107] 이중잠재력 모세포는 적혈구 및 거핵구 모두를 생기게 했다

[0108] 대부분의 팽창이 모세포 배양에서 5일째 내지 8일째에 생기고, 일부 모세포 콜로니는 이 기간 동안에 적색으로 변했고, 이는 적혈구 결정 및 헤모글로빈 합성을 나타낸다. FACS 분석은, 거핵구 마커 CD41a 및 적혈구 마커 CD235a: CD41a+CD235a-, CD41a-CD235a+, CD41a+CD235a + 및 CD41a-CD235a- 집단의 발현에 의해 한정된 BC에서 4개의 별개의 세포 집단이 있었다는 것을 보여주었다 (도 2A). CD41a 및 CD235a 이중 양성 집단이 적혈구 및 거핵구 계통 모두를 위한 마커를 공유하기 때문에, 이들 세포가 계통 모두에 대해 이중잠재력 전구체를 나타내는지를 시험했다.

[0109] 그 다음, 6일째 모세포 배양으로부터의 분류된 CD41a+CD235a-, CD41a-CD235a+ 및 CD41a+CD235a+ 세포는, CFU-MK 또는 CFU-E 전구체에 대한 2개의 콜로니 형성 검정에 의해 시험되었다. 같은 수의 분류된 세포는 이들 콜로니 검정을 위해 플레이팅되었다. 기대한 바와 같이, CD41a+CD235a- 및 CD41a-CD235a+는 CFU-MK 및 CFU-E 콜로니를 각각 생성했다. 동시에, 유사한 수의 CFU-MK 콜로니는 CD41a+CD235a- 및 CD41a+CD235a+ 세포에 의해 생성되었고, 비교가능 수의 CFU-E는 CD41a-CD235a+ 및 CD41a+CD235a+ 세포에 의해 발달되었다 (도 2 B 및 C). 따라서, 이들 결과는, CD41a+CD235a+ 세포가 거핵구 및 적혈구 계통 모두를 위한 이중잠재력 전구체라는 것을 보여준다. 이들 CD41a+CD235a+ 세포는 일시적인 집단인 것으로 보였고, 거핵구 분화 배양에서 배양된 직후

사라졌다.

[0110] 실시예 13

[0111] hESC 유래된 BC로부터 거핵구 팽창 및 성숙을 이끌기 위한 한정된 배양 조건의 확립

[0112] 거핵구의 분화를 추가로 이끌기 위해, 메틸셀룰로오스 반고체 배양으로부터의 6 내지 8일째 BC는 채집되었고, 그 다음 무혈청 배지, 즉, MK 배양을 위한 사이토킨으로 보충된 스템라인 II에서 재현탁되었다. CD41a+ 세포의 세포수는 서스펜션 배양 동안 팽창 거핵구를 측정하기 위해 관독으로서 사용되었고, 이는 CD41a+ (FACS) 및 총 생존 세포수 (트립판 블루 배제법)의 백분율을 증가시킴으로써 계산되었다. 초기 시험은, 고농도 TPO (50 내지 100 µg)이 단독으로, BC로부터의 CD41a+ 거핵구의 팽창을 지지하는데 충분하지 않았다는 것을 보여주었다. 배지 중 SCF의 부가 (20 ng/ml)는 CD41a+ 거핵구의 수율을 유의적으로 증가시켰다 (도 3A). 사이토킨 및 인자의 패널은 또한, BC로부터의 거핵구의 고순도 및 총수율을 달성하기 위해 시험되었다. IL9 및 BMP4를 포함하는 이들 인자는 다른 시스템에서 거핵구 촉진 인자로서 이전에 보고되었다^{21,22}.

[0113] 도 3A에서 보여진 바와 같이, IL9 및 BMP4의 부가는 TPO 및 SCF 단독과 비교하여 CD41+ 세포의 수율을 개선시키는 명백한 효과를 보여주지 않았다. 그러나, 어떤 인자는 CD41+ 세포 (나타나지 않음)의 백분율을 약간 증가시켰다. IL6, IL11, VEGF 및 bFGF 모두는 추가 공급없이 4일째 액체 배양에서 거핵구의 수율을 약간 증가시켰다. 그러나, 이들 인자의 공동 혼합은 지속적인 상승작용 효과를 보여주지 못했다 (나타나지 않음). 또한, 혈청 또는 메틸셀룰로오스 매트릭스의 배양에의 부가가 또한 시도되었고; 이들 변형은 CD41 거핵구의 수율을 유의적으로 개선하지 못했다. 물론, 거핵구 핵내유사분열 및 전혈소관 형성을 촉진하는 것으로 보여진 특이적 ROCK 신호 전달 억제제(Y27632)^{23,24}가 시험되었다. 4일째 MK 배양 동안의 10 µM ROCK 억제제의 포함은 배수체 세포의 백분율을 극적으로 증가시켰다 (데이터는 보여지지 않음). 그러나, 4 일 배양의 끝에 CD41+ 세포수를 동시에 감소시켰고; 따라서 최종 MK 배양 조건으로부터 배제되었다.

[0114] 초기 시험으로부터 결과를 기반으로, TPO 50 ng/ml, SCF 20 ng/ml, 및 IL11 20 ng/ml는 BC로부터의 최적화된 거핵구 분화 및 팽창을 달성하기 위해 MK 배양 배지에 포함된다. IL11은 거핵구의 팽창 및 성숙 모두를 향상시키는 것으로 이전에 보고되었다^{25,26}. 도 3B는 액체 배양의 시간대별 실험을 보여준다. 6일 배양 기간에 걸쳐, CD41+ 거핵구의 세포수에서의 5배 증가가 현재 조건 하에서 관찰되었다. FACS 분석은 2개의 거핵구 마커 CD41a, CD42b 및 적혈구 마커 CD235a를 위한 6일째 BCS 및 4일째 MK 배양에 대해 수행되었다. MK 배양에서, 적혈구 세포 (CD235a+)는 2 내지 3일 내에 빨리 죽었다. 뚜렷한 콘트라스트에서, CD41a+ 거핵구는 극적으로 증가되었다. MK 배양에서 4일째까지, 90% 초과와 생존 세포는 CD41a를 발현시켰고, 이들 세포의 대략 80%는 CD42b에 대해 또한 양성되었고, 이는 성숙 거핵구에서 중요한 역할을 한다 (도 3C)²⁷.

[0115] 실시예 14

[0116] BC로부터 유래된 거핵구의 특성화

[0117] 거핵구의 분화 및 성숙을 나타내는 세포 표면 마커의 변화와 일치하여, 평균 세포 크기는 MK 배양 동안에 점진적으로 증가했다. 성숙 거핵구는 세포 크기에서 더 크게 그리고 더 이질적으로 되었다 (도 4A). 1일째 MK 배양에서, 약 65% 세포는 10 내지 20 µm의 직경을 가졌다. 상기 세포의 나머지는 20 내지 30 µm였다. 6일째까지, 20%초과의 세포는 사이토스핀 준비에서 40 마이크론 보다 더 컸다. 세포의 작은 백분율은 MK 배양에서 배수체 세포의 표현형을 설명했다 (도 4B). CD42b (GP1b-알파) 외에, 당단백질 CD42a (GPIX)은 또한, MK 배양으로부터 CD41a+ 거핵구 내에 크게 발현되었다 (도 4C). CD41 및 vWF를 위한 면역형광 염색은 또한, 거핵구 세포질 과립에서 특징적인 vWF 발현을 시험하기 위해 수행되었다. 도 4D에서 보여진 바와 같이, 성숙 거핵구 표현형을 갖는 큰 그리고 배수체 세포는 CD41에 대해 양성으로 염색되었고, 세포질 내의 vWF의 과립 축적이 탐지되었다.

[0118] 더욱이, RT-PCR 분석은 에리트르/거핵구형성을 위해 GATA1, GATA2, Fli1, FOG 및 NFE2를 포함하는 중대한 전사 조절인자의 발현 수준을 시험하기 위해 수행되었다 (도 4E). 모든 이들 전사 인자는 배상체 단계에서 강하게 포함되며 6일째 모세포 배양에서 지속적 발현을 보여주었다. 흥미롭게는, RNA 수준 GATA2 및 FOG는, BC가 거핵구 분화 및 성숙을 향하여 인도될 때 4일째 MK 배양에서 하향 조절되었다. 그러나, 이러한 관찰의 기계적 함의는 아직 결정되지 않았다. RT-PCR 결과는 ES, EB, BC 및 MK 배양 동안에 5개의 적혈구-거핵구 전사 인자 GATA1, GATA2, Fli1, FOG1, 및 NF-E2의 발현을 보여주었다.

[0119] 실시예 15

[0120] hESC로부터 거핵구로의 증폭

[0121] 시험한 모든 hESC 세포주는, 세포주 간 효율이 다르긴 하지만, 무혈청 및 기질이 없는 배양 조건 하에서 거핵구 (CD41a+로 정의됨)를 생성할 수 있었다. EB(증폭 1.5 내지 6배), 모세포(5 내지 12 배) 및 MK 배양물(1.5 내지 4 배)을 통해 hESC로부터 증폭 후, 상기 시스템은 100만개로 출발한 인간 ES 세포로부터 최대 1억개의 CD41a+ 거핵구를 생산할 수 있다. HUES3 및 두 개의 임상학적 등급의 단할구 유래 hESC 세포주인 MA01 및 MA09에 대한 거핵구 생산 능력이 표 1에 요약되어 있다.

[0122] 표 1. hESC로부터 거핵구의 생성

[0123] MK 배양물로부터 생성된 CD41a+ 세포의 백분율을 FACS에 의해 결정하였다. EB, 모세포 및 MK 배양물을 통한 각 단계에서 배수 증폭을 곱함으로써 hESC로부터 거핵구로의 총 배수 증폭을 계산하였다. HuES3 실험 B는 100만개의 ES 세포로부터의 MK 세포의 실제 수이다.

hESC 세포주	실험	hESC로부터 거핵세포(CD41a+)로의 배수 팽창
HUES3	실험 A	111
	실험 B	96
	실험 C	30
	실험 D	21
	실험 E	37
	실험 F	16
MA01	실험	16
MA09	실험	113

[0124]

[0125] 실시예 16

[0126] hiPSC는 시험관내에서 혈관모세포/BC, 조혈 및 내피 세포로 분화할 수 있다

[0127] 본 발명자들은 톰슨(Thomson) 재프로그래밍 방법(Oct-4, Sox-2, 나노그(nanog), 및 Lin28의 렌티바이러스 발현)에 의해 생성된 hiPSC를 이용하여 비슷한 결과를 달성하였다. 이는 세포주 IMR90-1, 포피-1-1, 포피-4-1 및 포피-4-3을 포함한다. 별개로, 야마나카 재프로그래밍 방법(Oct-4, Sox-2, Klf4, 및 c-Myc의 레트로바이러스 발현)에 의해 생성된 hiPSC를 유사하게 수행하였다. 이는 세포주 rv-hiPS01, rv-hiPS02, rvhiPS03 및 rv-hiPS04를 포함한다. 이들 hiPSC 세포주들은 전분화능의 표준 마커를 발현하였고, 보고된 바와 같이 SCID 마우스에 및 접종 후 기형종을 형성하였으며, hESC과 형태학적으로 구별할 수 없었다(데이터 미제시). 본원에 기술된 방법을 이용시, hiPSC 세포주는 BC를 생성할 수 있었다. 우선, hiPSC를 BC의 성장을 위해 최적화된 조건 하에서 EB로 분화시키고, 각각의 EB 세포를 모세포 콜로니 성장용 모세포-성장/증폭 배지(BGM)에 도말하였다. 모든 hiPSC 세포주로부터 유래된 EB 세포가 도말 6일 후 모세포 콜로니를 성장시켰다. 다른 hiPSC 세포주의 경우 다양한 효율이 관찰되었다(표 2). 그럼에도 불구하고, hESC로부터 유래된 BC에서 관찰된 바와 같이(도 5A), hiPSC로부터 유래된 이들 BC는 혈관모세포 마커 CD71, CXCR-4 및 Tpo 수용체를 발현하였으나(도 5B), 이들 대부분의 BC는 면역세포화학 분석에 의해 증명된 바와 같이 CD31, CD34 및 KDR을 발현하지 않았다. 다양한 사이토카인이 첨가된 혈관 콜로니-형성 배지에 10 내지 14일간 재도말한 후, 적혈구계(CFU-E), 골수성(CFU-G 및 CFU-GM), 및 대식세포(CFU-M, 미제시) 조혈 세포 콜로니가 생성되었다(도 5C). BC는 또한 거핵구로 분화할 잠재력을 가진 CFU-MK를 형성하였다(도 5C-iv). 더욱이, 재프로그래밍 단백질 Oct4, Sox2, Klf4, 및 c-Myc의 형질감염과 같이, 무바이러스 벡터를 이용하여 생성된 hiPSC는 BC 성장, MK 및 혈소판 생성을 위한 비슷한 잠재력을 증명한다. 이들 결과들은 상이한 전달 시스템(렌티바이러스, 레트로바이러스, 형질감염)을 이용하여 재프로그래밍 인자들의 상이한 조합으로 생성된 hiPSC가 무혈청 조건 하에서 혈관모세포, 조혈 및 내피 계통으로 분화할 수 있음을 명확히 증명한다.

표 2. 인간 유도 다능성 줄기세포(hiPS)의 분화 효율

공급원	hiPSC							
	통슨 방법 (Thomson Method, Oct-4, Sox-2, Nanog, Lin28)				야마나카 방법 (Yamanaka Method, Oct-4, Sox-2, Nanog, Lin28)			
세포주	IMR90	Foreskin 1-1	Foreskin 4-1	Foreskin 4-3	Rv-siPS01	Rv-siPS02	Rv-siPS03	Rv-siPS04
BC 효율	+++	±	±	±	±	±	±	±
CFU 효율	+	±	±	±	±	±	±	±

[0128]

[0129]

* 도말된 모든 100,000개의 EB 세포의 경우, (±)는 주로 0개의 콜로니 또는 간혹 얻어지는 10개 아래의 콜로니의 결과를 나타내고, (+)는 일정하게 얻어지는 적은 수의 콜로니(10 내지 30개)의 결과를 나타내며, (++)는 50개의 모세포 콜로니까지의 보통의 효율을 나타낸다.

[0130]

실시예 17

[0131]

hESC 유래 거핵구는 OP9 기질 세포 상에서 기능적 혈소판을 생성한다

[0132]

MK 배양 4일째부터, 적은 수(대략 1 내지 2%) hESC 유래 거핵구가 현미경 하에서 전혈소판-유사 공정을 형성하는 것으로 꾸준히 관찰되었다(도 4F). 이 관찰은 기질이 없는 시스템 하에서 생성된 거핵구가 말단 분화 과정을 겪을 수 있음을 제시한다.

[0133]

최근에, 타카야마(Takayama) 등은 기능적 ES 유래 혈소판(ES-PLT)을 생산하기 위한 기질 세포 OP9 기반의 공-배양 시스템을 기술하였다¹⁶. 본 발명자들은 상기 세포가 기능적으로 혈소판을 만들 수 있음을 보여주기 위해 원리 증명으로서 이 OP9 시스템 상에서 거핵구를 시험하기로 결정하였다. MK 배양으로부터 생성된(HUES3, MA01 및 MA09로부터 유래된) 거핵구를 원래의 보고에 기술된 것처럼 TPO 100 ng/ml, SCF 50 ng/ml 및 헤파린 25 U/ml이 첨가된 동일한 배지 내에서 유사분열이 정지된 OP9 세포 상에 도말하였다. OP9 기질층 위에 도말한 지 4일만에 전혈소판 형성 세포(PFC) 및 혈소판 유사 입자(ES-PLT)가 나타났다. 6일부터 12일까지 2일마다 배양 배지로부터 ES-PLT를 회수하였다. 100만개의 hESC 유래 MK로부터, 이 기간 동안 배양으로부터 대략 20만 내지 50만개의 ES-PLT가 회수될 수 있다. 종래 보고보다 낮은 상기 ES-PLT 생산 효율은 배양 조건의 급격한 변화의 결과일 수 있다. 또한, OP9와의 공-배양은 도말된 거핵구의 배수성(polyploidy)을 현저히 증가시키지 않았으며, 이 역시 낮은 혈소판 수율/거핵구를 설명할 수 있다. 그럼에도 불구하고, OP9-공배양으로부터 회수된 ES-PLT를 대상으로 정상 혈액 혈소판에게 있어 중요한 기능성을 추가로 시험하였다.

[0134]

실시예 18

[0135]

트롬빈 활성화된 ES-PLT는 기능적 인테그린 수용체 결합 활성을 갖는다

[0136]

인테그린-매개된 혈소판 응집은 생체내 혈전 형성에 필수적이다. 순환에서, 혈소판은 그 부착성 수용체를 통해 손상된 혈관에 부착한다. 상기 일차적인 부착은 신호전달 캐스캐이드를 개시하게 하여 혈소판 인테그린 αIIbβ3의 활성화를 야기하고, 혈소판의 안정적 부착, 응집 및 혈전 형성을 야기한다. 트롬빈과 같은 혈소판 작용제는 인테그린 αIIbβ3의 리간드 결합 기능을 활성화시킨다. 그의 주요 리간드 피브리노겐의 결합은 인테그린-의존성 혈소판 안정적 부착 및 응집을 매개한다. αIIbβ3의 활성화는 또한 인테그린 세포외-내 신호전달을 매개하여 혈소판 세포 골격 재편성 및 확산을 야기한다.

[0137]

OP9 공-배양으로부터 생성된 ES-PLT를 대상으로 혈소판의 주요 작용제인 트롬빈에 의한 활성화를 시험하였다. FACS 분석에 의해 인테그린 αIIbβ3 수용체의 활성화된 형태에만 결합하는, FITC 결합된 PAC-1 단일클론 항체를 이용한 결합 분석에 의해, 인테그린 αIIbβ3 활성화를 조사하였다. 타이로드(Tyrode) 완충액에 재현탁한 ES-PLT를 항-인간 CD41a(인테그린 αIIb) 항체, CD42b 및 PAC-1 항체의 각테일과 함께 배양하였다. 그리고 나서, 이들의 표면 상에서 CD41a 및 CD42b 당단백질 모두를 발현하는 ES-PLT를 PAC-1 결합 활성을 위해 차단(gate)하였다. 트롬빈 자극시, PAC-1 결합이 나머지 대조군과 비교하여 트롬빈 처리된 ES-PLT에서 증가하였다. 이 결과는 ES-PLT가 혈소판 작용제로부터의 자극에 즉시 반응하였음을 보여준다(도 6A). ES-PLT는 두 개의 임상학적 등급의 hESC 세포주인 MA01 및 MA09를 포함하는 3개의 hESC 세포주로부터 유도되었다. 3개의 모든 세포주

는 트롬빈 자극에 대한 반응으로 PAC-1 결합이 가능한 ES-PLT를 생성할 수 있었다(도 6B).

- [0138] ES-PLT에서의 인테그린 세포외-내 신호전달 기능적 특성을 유리 슬라이드 위에 고정된 피브리노겐 상에서의 확산 분석에 의해 추가로 평가하였다. 슬라이드를 항-인간 CD41a 항체 및 DAPI로 염색하여 혈소판을 확인하였다. 인간 혈장 혈소판 대조군과 유사하게도, ES-PLT는 피브리노겐-코팅된 표면 상에 부착하고 확산하였으며, 기능적 혈소판과 유사한 F-액틴 필라멘트의 재배열을 증명하였다. 혈소판 인테그린 수용체에 대한 피브리노겐 결합을 차단하는 RGDS 펩타이드는 피브리노겐-코팅된 표면 상에서 ES-PLT의 부착 및 확산을 폐지하였으며, 이는 상기 확산이 인테그린 의존성을 보여준다. 작용제의 부재시, 일부 혈소판은 주로 사상족(filopodia) 형성과 함께 피브리노겐 상에서 불완전한 확산을 나타내었다. 혈소판 작용제인 ADP 또는 트롬빈으로 자극되는 경우, 대조군 혈장 혈소판 및 ES-PLT 모두 증가된 층상위족(lamellipodia) 및 액틴 스트레스 섬유 형성을 나타내었다(도 7A).
- [0139] 실시예 19
- [0140] ES-PLT는 미세-혈전 형성에 참여할 수 있다
- [0141] 혈소판의 중요한 기능인 작용제-유래된 응집을 형성하는 이들의 능력을 조사하기 위해, ES-PLT를 녹색 형광 염료로 표지하고 혈장 유래 혈소판과 혼합하였다. 교반 조건 하에서 트롬빈 자극에 대한 반응으로, 위상차 및 형광 현미경 하에서 혈소판 미세응집괴가 관찰되었다. 형광 표지된 hESC-혈소판은 인간 혈장 유래 혈소판과 함께 상기 미세응집괴 내로 고르게 통합되었다. 트롬빈 유래된 혈소판 응집은 인테그린 길항제인 RGDS에 의해 억제되었으며, 이는 이것이 인테그린-의존성을 보여준다(도 7B). 이들 결과들은 ES-PLT가 작용제-유래된 미세응집괴를 형성하는데 있어 혈액 혈소판과 함께 작용할 수 있음을 증명하였다. 요약하면, 이들 결과들은 상기 배양 시스템으로부터 유래된 ES-PLT가 인간 말초혈 혈소판과 기능적으로 비슷하며, 이들 ES-PLT가 생리학적 혈소판 작용제에 의해 자극될 수 있음을 보여주었다.
- [0142] 실시예 20
- [0143] ES-PLT 상에서의 HLA 계열(class) I의 발현
- [0144] 인간 말초 혈소판은 면역 관련 굴절성(refractive) 혈소판 수혈에 기여할 수 있는 계열 I 인간 백혈구 항원(HLA-ABC)을 합성하고 발현한다²⁸. 그리하여, ES-PLT 상에서의 HLA 계열 I의 발현을 또한 유세포측정법에 의해 조사하였다. 정상적인 혈장 유래 혈소판은 높은 수준의 HLA-ABC 발현을 나타내었다. ES-PLT는 HLA 계열 I의 비슷한 발현 수준(평균 형광 강도)을 나타내었다. 혈소판에서의 HLA의 드 노보(de novo) 합성 이외에도, 수용성 HLA 항원이 혈장으로부터 흡수될 수 있다고 보고되어 왔다²⁹. 배양 조건에서 hESC로부터 유래된 혈소판은 다른 혈액 세포로부터 HLA 항원을 함유하는 혈장을 피할 수 있으며, 따라서 혈소판 동종면역의 빈도를 감소시킨다.
- [0145] 실시예 21
- [0146] hESC 유래 혈관모세포/BC로부터의 MK의 대규모 생성
- [0147] hESC 유래 BC가 또한 MK로 분화하도록 유래될 수 있는지 결정하기 위하여 실험을 수행하였다. 모세포 배양물을 TPO, SCF, 및 IL-11을 함유하는 무혈청 스템라인(Stemline) II 배지에서 6일간 분화시킨 후, CD41+ MK에서의 5배 증가가 얻어졌다. FACS 분석은 또한 CD235a+ 세포(적혈구계 세포)의 급격한 감소를 나타내었지만, 분화 초기 단계 동안에 CD41a+ 및 CD42b+ 세포(MK)의 급격한 증가를 나타내었다. 4일에, 세포의 90% 이상이 CD41a를 발현하였고, 세포의 약 80%가 CD42b(MK의 성숙에 있어서 중요한 기능적 역할을 함)에 대해 양성이었다²⁷(도 8A). CD42b 이외에도, 당단백질 CD42a 역시 CD41a+ MK의 표면 상에서 높게 발현되었다(데이터 미제시). 6일에, 세포의 20% 이상이 40 μm 크기보다 더 컸으며, >30%가 4N보다 큰 DNA 함량을 갖는 배수체였다(도 8B 및 8D). 큰 배수체 세포 상에서의 CD41 및 vWF에 대한 면역형광 염색은 CD41-양성 막 염색과 함께 세포질 내에서의 vWF의 특징적인 과립상 축적을 나타내었고(도 8C), 이는 세포가 성숙한 MK였음을 확인시켜준다.
- [0148] 시험한 모든 hESC 세포주(WA07 [H7], HuES-3, MA01, 및 MA09)들은, 다양한 효율이 관찰되었음에도 불구하고, 이들 무혈청 및 영양세포가 없는 배양 조건 하에서 MK를 생성하였다(표 3). 8번의 별도의 실험에서, hESC로부터 CD41a+ MK 세포로의 세포의 총 증폭은 HuES-3 및 MA09 hESC 세포주의 경우 각각 30 내지 111배 및 18 내지 113배의 범위였으며, MA09 hESC의 6-웰 플레이트 당 최대 6×10^8 개의 CD41a+ MK가 생성되었다($\approx 1.0 \times 10^7$ hESC, 표 3). 총 효율은 종래 공개된 방법보다 대략 2 규모 정도 높았다¹⁶.

표 3. 혈액모세포를 통한 hESC로부터 거핵세포의 산출

hESC	실험	산출된 CD41+ MK (x10 ⁵)	hESC로부터 배수 평창
HuES-3	1	7	30
	2	15	111
	3	114	95
	4	118	104
MA09	1	22	113
	2	53	29
	3	191	18
	4	604	53

[0149]

[0150]

살아있는 세포의 총 수(트리판 블루 배제법)와 CD41a+ 세포의 백분율(FACS 분석)을 곱하여 배양으로부터의 CD41+ MK 세포수를 계산하였다. 모든 EB 세포 또는 BC가 이후 배양에 사용된 것은 아니므로, EB, BC 및 MK 배양을 통한 각 단계에서의 배수 증폭을 곱함으로써 hESC로부터 MK로의 총 배수 증폭을 계산하였다.

[0151]

실시에 22

[0152]

hESC-MK로부터의 기능적 혈소판의 산출

[0153]

무혈청 및 영양세포 없는 MK 배양 4일째부터, 대략 1-2%의 MK가 전혈소판-유사 세포 공정을 형성하는 것으로 관찰되었다(도 8E). 기능적 혈소판이 영양세포 없는 조건 하에서 생성되었는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 FACS 분석에 의해 hESC 유래 혈소판(hESC-PLT) 상에서의 CD41a/CD42b 발현을 조사하였다. 상기 결과들은 영양세포 없는 조건 하에서 생성된 대다수의 hESC-PLT(혈액 혈소판 대조군의 전방 산란(Forward Scatter) 및 측방 산란(Side Scatter) 패턴에 따라 차단됨)가 CD41a를 발현하였음을 보여주었다. 하지만, 이들 hESC-PLT의 5% 미만이 CD42b 양성이었다. 최근 연구들은 금속단백질분해효소(metalloproteinase) 억제제 GM6001이 마우스 ESC 유래 혈소판 상에서의 CD42b의 발현을 현저히 증가시켰음을 보여주었다³⁵. 인간 ESC-PLT 분화의 후기 단계 동안에 GM6001을 보충한 경우(100 μM), CD41a 및 CD42b 이중 양성 hESC-PLT가 약 15%까지 증가하였다. 고정화된 피브리노겐 및 vWF 상에서의 인테그린 의존성 확산 분석에 의해 영양세포 없이 생성된 hESC-PLT의 기능을 평가하였다. 항-인간 CD41a 항체 및 DAPI 염색을 이용하여 혈소판을 확인하였다. 영양세포 없이 생성된 hESC-PLT는 피브리노겐 및 vWF-코팅된 표면 상에서 확산될 수 있었고(도 11), 이는 이들 hESC-PLT가 시험관내에서 기능적임을 보여준다.

[0154]

OP9 또는 C3H 10T1/2 마우스 기질 세포는 시험관내 혈소판 생물발생을 지지하는 것으로 나타났다. OP9 기질 세포와의 공-배양이 hESC-MK로부터의 기능적 혈소판의 생산을 촉진하는지 여부를 시험하였다. HuES-3, MA01 및 MA09 세포로부터 생성된 MK를, 종래에 기술된 바와 같이, TPO, SCF, 및 헤파린을 첨가된 동일한 배지 내의 유사 분열이 정지된 OP9 세포 위로 도말하였다¹⁶. OP9 기질층 위로 도말한 지 4일만에 전혈소판-형성 세포 및 hESC-PLT가 나타났다. 6일부터 12일까지 2일마다 배양 배지로부터 hESC-PLT를 회수하고, CD41a 및 CD42b 발현을 분석하였다. 기질 없는 조건 하에서 생성된 hESC-PLT와는 달리, 대다수의 CD41a+ hESC-PLT는 또한 CD42b를 발현하였다(도 8F, 오른쪽 패널).

[0155]

영양세포 없는 조건 하에서 생성된 hESC-PLT와 유사하게도, OP9 세포 공-배양으로 생산된 hESC-PLT는 피브리노겐- (도 9B) 및 vWF-코팅된 표면 상에 부착하고 확산하였다. 혈소판 인테그린 수용체에 대한 피브리노겐 결합을 차단하는 RGDS 펩타이드는 피브리노겐-코팅된 표면 상에서 인간 혈액 혈소판 및 hESC-PLT 모두의 부착 및 확산을 폐지하였다(도 9B). 팔로이딘(Phalloidin) 염색은, 인간 혈액 혈소판에서와 유사하게(도 9A), ADP 및 트롬빈으로 자극된 hESC-PLT에서 F-액틴 스트레스 섬유의 형성을 나타내었다(도 9B). 영양세포 없는 조건 하에서 또는 OP9 기질 세포 상에서 생성된 hESC-PLT의 크기는 인간 혈액 혈소판보다 약간 더 크며, 시험관내에서 마우스 ES 세포를 이용하여 생성된 혈소판과 비슷하다³⁵.

[0156]

또한, OP9 공-배양물에서 HuES-3 세포로부터 생성된 hESC-PLT를 대상으로, 혈소판의 주요 작용제인 트롬빈에 의한 활성화를 시험하였다. 피브리노겐 모방체로서 PAC-1 단일클론 항체는 인테그린 αIIbβ3 수용체의 활성화된 형태에만 결합한다. 트롬빈 자극시, OP9 공-배양물로부터 생성된 hESC-PLT 상에서 PAC-1 결합 분석을 수행하였다. 나머지 대조군과 비교하여 트롬빈 처리된 hESC-PLT에서 PAC-1 결합이 대략 5배 증가하였다(도 8G). 트롬빈 자극 후 PAC-1 결합의 증가가 말초 혈소판 대조군보다 약하긴 하지만(hESC-PLT 24.8% 대 혈액 혈소판 58.6%, 도

12), 타카야마 등에 의해 종래에 보고된 hESC로부터 생성된 혈소판과 비슷하다¹⁶. 두 개의 임상학적 등급의 hESC 세포주인 MA01 및 MA09로부터 유래된 hESC-PLT 역시 CD41a 및 CD42b 항원을 발현하였고(도 13A), 트롬빈 자극에 대한 반응으로 PAC-1에 결합할 수 있었다(도 13B). hESC-PLT는 또한 이들 표면 상에서 HLA 계열 I 항원을 발현하였다(도 13C).

[0157] 실시예 23

[0158] hESC-PLT는 미세응집괴 형성 및 혈병 형성/퇴축에 참여한다

[0159] 손상된 혈관벽으로의 혈소판 부착은 신호전달 캐스캐이드를 개시하게 하여 혈소판 인테그린 α IIb β 3의 활성화를 야기한다. 활성화된 인테그린은 혈소판 응집 및 혈전 형성을 매개한다⁴⁵. 혈소판의 증추적 기능인 작용제 유래 응집을 형성하는 이들의 능력을 조사하기 위해, hESC-PLT를 녹색 형광 염료로 표지하고 인간 혈액 혈소판과 혼합하였다. 교반 조건 하에서 트롬빈 자극에 대한 반응으로, 위상차 및 형광 현미경을 이용하여 hESC-PLT 및 혈액 혈소판에 의한 미세응집괴의 형성이 증명되었다(도 9D). 상기 표지된 hESC-PLT는 인간 혈액 혈소판과 함께 미세응집괴 내로 통합되었다. 이들 미세응집괴에서의 hESC-PLT의 분포는 형광 염료로 표지된 동일한 수의 혈액 혈소판의 분포와 유사하였다(도 9C). 이들 결과들은 hESC-PLT가 작용제-유래된 미세응집괴 형성에 있어서 인간 혈액 혈소판과 함께 작용한다는 것을 증명한다.

[0160] 혈관 손상 부위에서, 활성화된 혈소판은 혈장 피브리노겐으로부터 생성된 피브린과 상호작용하여, 혈전 형성 및 혈병 퇴축을 야기한다⁴⁶. 혈병 형성 및 퇴축을 촉진하는 이들의 능력을 조사하기 위해, hESC-PLT를 혈소판-결핍된 혈장에 현탁시키고 트롬빈을 첨가하여 혈병 형성 및 퇴축을 유도하였다. 1시간을 초과하는 트롬빈 자극에도 불구하고 추가 혈소판을 보충하지 않은 혈소판-결핍된 혈장에서는 혈병이 형성되지 않았다. 반면, 혈소판-결핍된 혈장에 hESC-PLT를 추가한 경우 트롬빈 자극 후 30분이 되지 않아 혈병 형성 및 퇴축을 야기하였다(도 9E, 좌측 패널). hESC-PLT 혈병의 냉동절편의 면역형광 염색은, 인간 혈액 혈소판을 이용하여 형성된 혈병 절편과 유사하게(도 9F), 피브린 및 CD41a 모두에 대해 양성 염색된 메쉬와 같은 망을 나타내었다(도 9E, 오른쪽 패널). 이들 결과들은 hESC-PLT가 피브린 혈병 형성을 촉진하며 인테그린 α IIb β 3 의존성 수축 능력을 가져 치밀한 혈소판 마개(plug)를 형성한다는 것을 보여준다.

[0161] 실시예 24

[0162] hESC-PLT는 살아있는 마우스에서 레이저 유도된 세동맥의 손상 부위에 있는 성장하는 혈소판 혈전 내로 통합된다.

[0163] hESC-PLT가 생체내에서 기능적인지 결정하기 위해, 본 발명자들은 살아있는 마우스에서 형광 생체 현미경 관찰을 수행하였다. 거고근(cremaster muscle) 세동맥을 아주 가는 레이저 제거(ablation)에 의해 손상시켰다. 종래에 기술된 바와 같이 혈관 손상 후 70-95초의 Tmax에서 신속하게 마우스 혈소판 혈전이 형성되었다⁴⁷. 손상 후 $5-10 \times 10^5$ 개의 인간 말초 혈소판을 주입한 경우, 41.0 ± 2.8 개의 순환하는 혈소판이 미세혈관에서 검출되었다(도 10B). 이들 중에, 6.4 ± 1.1 혈소판이 혈관 손상 후 Tmax(73초)에서 혈관 손상 부위에 있는 성장하는 마우스 혈소판 혈전 내로 통합되었다(도 10A 및 10C, 비디오 1(미제시)). 성장하는 마우스 혈소판 혈전 내로의 인간 혈액 혈소판의 통합이 α IIb β 3 인테그린에 의해 매개된다는 것을 확인하기 위해, 주입하기 전에 인간 혈소판을 리오프로(ReoPro)(인간 혈소판 상의 α IIb β 3 인테그린에 결합하여 그 기능을 억제하는 인간-젓과 키메릭 단일클론 항체의 Fab 단편⁴⁸)로 전처리하였다. 순환하는 혈소판의 수가 리오프로에 의해 현저히 영향을 받지 않은 반면 (32.4 ± 4.4 , 도 10B), 성장하는 혈소판 혈전에 결합하는 인간 혈소판의 수는 리오프로의 처리에 의해 혈관 손상 후 Tmax(67초)에서 1.6 ± 0.5 까지 현저히 감소하였다(도 10A 및 10C, 비디오 2(미제시), $P < 0.01$). 이들 결과들은 인간 혈소판이 혈관 손상 부위에 있는 성장하는 마우스 혈소판 혈전에 결합한다는 것과, 상기 결합이 α IIb β 3 인테그린에 의해 매개된다는 것을 보여준다. 리오프로는 혈관 손상 부위에서 마우스 혈소판 혈전 형성에 영향을 미치지 않았다.

[0164] 혈관 손상 후, $5-10 \times 10^5$ 개의 hESC-PLT를 주입한 경우, 34.8 ± 1.7 개의 순환하는 혈소판이 미세순환에서 검출되었다(도 10B). 이들 중에, 4.3 ± 0.7 개의 혈소판이 손상 후 Tmax(72초)에서 혈관 손상 부위에 있는 성장하는 마우스 혈소판 혈전에 결합하였다(도 10A 및 10C, 비디오 3(미제시)). 손상 부위에 있는 성장하는 마우스 혈소판 혈전 내로 통합되는 인간 혈액 혈소판 및 hESC-PLT의 수는 통계학적으로 유의하지 않았다($P = 0.28$). 리오프로로 hESC-PLT를 전처리하는 경우, 혈관 손상 후 Tmax(99초)에서 마우스 혈소판 혈전 내로 통합되는 혈소판의 수

가 1.2 ± 0.4 개로 현저히 감소하였다(도 10A 및 C, 보충 비디오 4, $P < 0.05$). 이들 결과들은, hESC-PLT가, 정상 대조군 혈액 혈소판처럼, 생체내 혈관 손상 부위에서 기능적임을 보여준다.

- [0165] 실시예 25
- [0166] 동물
- [0167] 수컷 야생형 마우스(C57BL/6, 6-8주령)를 잭슨 실험실(Bar Harbor, ME)로부터 구입하였다. 일리노이스 대학 동물 보호 및 사용 위원회가 모든 동물 보호 및 실험 과정을 승인하였다.
- [0168] 실시예 26
- [0169] 혈관모세포/BC를 통한 hESC로부터의 MK의 생성
- [0170] hESC 세포주(HuES-3, H7 [WA07], MA01, 및 MA09)로부터의 혈관모세포/BC 생성을 종래 보고된 바와 같이 수행하였다^{17:20}. 6일 내지 8일 배양으로부터 BC를 정제하고, 50 ng/ml TPO, 20 ng/ml SCF 및 20 ng/ml IL-11(Peprotech)이 첨가된 스템라인(Stemline) II 배지에 도말하여(1 내지 5×10^5 /ml) MK 쪽으로의 BC 분화를 유도하였다. 2 또는 3일마다 MK 배양 배지 중 절반을 새로운 배지로 교환하였다. 영양세포 없는 조건 하에서 또는 OP9 또는 C3H 10T1/2 기질 세포와의 공-배양 하에서 MK로부터의 혈소판 생성을 수행하였다. 영양세포 없는 조건의 경우, 4일 내지 6일 MK 배양으로부터 MK를 회수하고, 기술한 바와 같이 100 ng/ml TPO, 50 ng/ml SCF 및 25 U/ml 헤파린 나트륨이 첨가된 IMDM 배지에 재현탁하였고¹⁶, 2일마다 배지를 교환하였다. 분석을 위해 4일 내지 12일까지 혈소판을 회수하였다. 일부 실험의 경우 후기 분화 배양에 GM6001(100 μ M)을 첨가하였다. 공-배양 실험을 위해, OP9 또는 C3H 10T1/2 기질 세포를 15% 우태아혈청을 갖는 α -MEM(Hyclone)에 유지시켰다. 증식한 OP9 또는 C3H 10T1/2 세포를 공-배양 전날 100 ng/ml 미토마이신(mitomycin)-C로 처리하였다. 세포를 PBS로 부드럽게 2회 세척하고 공-배양에 앞서 OP9 배양 배지에서 밤새 회수하였다. 4일 내지 6일 MK 배양물로부터 MK를 회수하고 전술한 바와 같은 배지를 사용하여 OP9 또는 CH1/2 기질 세포 위로 도말하였다. 분석을 위해 4일 내지 12일까지 혈소판을 회수하였다.
- [0171] 실시예 27
- [0172] FACS 분석
- [0173] 모세포 배양 또는 MK 배양으로부터 얻은 세포를 FACSCalibur(Becton Dickinson) 또는 Accuri C6 세포측정기(Accuri Cytometers) 상에서 유세포측정법 분석에 의해 통상적으로 관찰한다. 계통 마커 CD41a, CD42a, CD42b 및 CD235a (BD Biosciences)을 위한 형광색소(fluorochrome)-결합된 항체를 사용하여 MK 및 적혈구계 계통을 규명하였다. 항체를 5% 우태아혈청(FBS)을 갖는 PBS에서 새롭게 준비하였다(CD42a 및 CD42b 항체의 경우 1:100 희석; CD41a 항체의 경우 1:250 희석; CD235a 항체의 경우 1:2000 희석). 통상적으로 1 내지 2×10^5 세포를 항체 표지에 사용하였다. 세포를 얼음 위에서 1시간 동안 100 μ l 항체 각테일 중에서 염색한 다음, 완충액으로 2회 세척하고, 1 μ g/ml 프로피디움 요오드화물이 첨가된 250 μ l 완충액에 재현탁시켰다. HLA-ABC의 발현 수준을 검출하기 위해, 혈소판을 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-결합된 항-인간 HLA-ABC 항체 또는 대조군으로서 FITC-결합된 마우스 면역글로불린 G(IgG)와 함께 배양하였다. 그리고 나서, 상기 시료를 FACSCalibur로 분석하였고, 데이터를 Cellquest 또는 Flowjo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. UMASS 의과 대학 핵심 설비에 있는 BD FACSAria 시스템 상에서 세포 분류를 수행하였다. 분류된 세포를 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수하고, 콜로니 형성 분석을 위해 적절한 배지에 재현탁시켰다. 배수체 분석을 위해, 4일 MK 배양으로부터의 세포를 70% 에탄올에 2시간 동안 고정시켰다. 그리고 나서, 세포를 PBS 완충액에서 1회 세척한 다음, 4 °C에서 밤새 PBS 완충액에서 20 μ g/ml 프로피디움 요오드화물 (Sigma), 20 μ g/ml RNase A (Sigma)로 염색하였다. 세포 DNA 함량을 Accuri C6 세포측정기 상에서 분석하였다.
- [0174] 실시예 28
- [0175] 사이토스핀(Cytospin) 제제, 검사(Giemsa) 및 면역형광 염색
- [0176] 모세포 배양 또는 MK 배양 중 어느 하나로부터 얻은 세포(1 내지 2×10^4)를 폴리라이신 코팅된 슬라이드(Wessco) 상에서 사이토스핀(cytospin)하였다. 슬라이드를 라이트-검사(Wright-Giemsa, Sigma) 또는 면역형광 염색 중 어느 하나를 위해 사용하였다. 사이토스핀 제제에서 MK를 확인하기 위해, 항-CD41(DAKO, 1:100) 및 항-vWF(DAKO, 1:200) 항체를 사용하였다. 모든 배양은 상온에서 수행하였다. 세포를 무-동물 차단제(Vector

Laboratories)로 30분간 차단시키고, 1차 항체와 함께 1시간 동안 배양한 다음, PBS로 3회 세척하였다. 이후 어두운 곳에서 배양 및 세척을 수행하였다. 세포를 2차 항체(각각 1:200)와 함께 30분간 배양하고, 다시 PBS에서 3회 세척하였다. PBS 중의 DAPI(1 μg/ml)를 사용하여 5분간 핵 DNA를 염색한 후, 부가적인 3x PBS 세척을 수행하였다. 그리고 나서 슬라이드를 얹어 올림푸스 BX51 형광 현미경(MVI, Avon, MA) 하에서 조사하였다. 형광 영상을 QICAM Fast 카메라(QImaging, Surrey, BC, Canada)를 이용하여 캡처하고, Q 캡처 프로 버전 5.1 소프트웨어(Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD)로 분석하였다. 위상차 살아있는 세포 영상을 니콘 현미경, PAXCAM 디지털 카메라 및 PAX-it 소프트웨어를 이용하여 캡처하였다.

[0177] 실시예 29

[0178] 인간 혈액 혈소판 및 hESC 유래 혈소판의 제조

[0179] 인간 혈소판을 전술한 바와 같이 분리하였다⁴⁹. 요약하면, 구연산나트륨으로 처리한 인간 혈액을 200g에서 20분간 원심분리하여 인간 혈소판이 풍부한 혈장을 제조하였다. 상정액을 회수하고 0.5 μM PGE1 및 10% 구연산나트륨 완충액의 존재하에 700g에서 10분간 원심분리하였다. 펠렛을 0.15 μM PGE1를 함유하는 HEPES-Tyrode 완충액(12 mM NaHCO₃, 138 mM NaCl, 5.5 mM 글루코스, 2.9 mM KCl, 0.42 mM NaHPO₄, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂)으로 재현탁시키고, 800g에서 5분간 원심분리하였다. 펠렛을 0.1% 지방산이 없는 소 혈청 알부민, 2 mM CaCl₂, 및 1 mM MgCl₂를 함유하는 RPMI1640에 재현탁시켰다. 세척된 혈소판의 최종 현탁액을 1×10⁷ 혈소판/ml로 조정하였다. 혈액 시료를 얻는 것에 대한 승인은 일리노이스-시카고 대학 검토 위원회로부터 얻었다. 설명 동의서가 제공되었다. 일부 실험에서, 시판중인 공급원(AllCells, Emeryville, CA)으로부터 인간 혈액 시료들을 또한 얻었다. hESC-PLT의 경우, hESC-PLT를 함유하는 배양 배지를 부드럽게 회수하였고, 혈소판 활성화를 방지하기 위해 아피라제(1 U/ml) 및 EDTA(5 mM)(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)를 첨가하였다. hESC-PLT를 풍부하게 하고, 전술한 바와 같이 세척하였다. 기능적 분석에 앞서, 세척된 혈액 혈소판 및 hESC-PLT를 37 °C에서 0.5-2시간 동안 배양하였다.

[0180] 실시예 30

[0181] 고정화된 피브리노겐 및 vWF 상에서의 혈소판 확산

[0182] 마이크로타이타 웰(microtiter well)(Nalgen Nunc, Rochester, NY)을 갖는 챔버 슬라이드를 밤새 4 °C에서 0.1M NaHCO₃(pH 8.3) 중의 100 μg/mL 피브리노겐 또는 vWF(30 g/ml)(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)으로 코팅하였다. 세척된 인간 혈액 혈소판 또는 hESC-PLT(1×10⁷/mL)를 37 °C에서 90분간 피브리노겐 코팅된 웰에 부착시키고 확산시켰다. 일부 실험에서, 로딩하기 전에 혈소판을 5분간 인테그린 길항제인 RGDS 펩타이드와 전배양하였다. 다른 실험에서, 혈소판을 ADP(20 μM) 또는 트롬빈(1 U/ml)(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)과 혼합하고, 즉시 피브리노겐 또는 vWF 코팅된 웰 위에 로딩하였다. PBS 완충액으로 세척한 후, 세포를 고정시키고, 투과시키고, Alexa Fluor 568 팔로딘(Molecular Probes, Eugene, OR), FITC 결합된 항-인간 CD41a 항체(Dako cytometry, Carpinteria, CA) 및 DAPI로 염색하였다. 부착성 혈소판을 100x/1.40 오일 대물렌즈에서 플랜아포(PlanApo) 렌즈를 이용하여 올림푸스 BX51 형광 현미경으로 살펴보았다. QICAM Fast 카메라를 이용하여 영상을 얻고 Q 캡처 버전 5.1 소프트웨어로 가공하였다.

[0183] 실시예 31

[0184] 혈소판 미세응집괴의 형성

[0185] 세척된 인간 혈액 혈소판 및 hESC-PLT를 변형된 타이로드 완충액에 재현탁시키고, PKH67 녹색 형광 세포 링커(10 μM, Sigma, St. Louis, MO)로 표지하였다. 인간 혈액 혈소판(6×10⁷)을 450 μL 큐벳(Chronolog, Havertown, PA)에서 형광-표지된 인간 혈액 혈소판(3×10⁵) 또는 hESC-PLT(3×10⁵)과 혼합하고, 트롬빈(0.5 U/mL)으로 처리한 다음, 37 °C에서 1200 rpm으로 교반하여 혈소판 응집을 촉발시켰다. 대조군 실험에서, 트롬빈 첨가 전에, 37 °C에서 5분간 혈소판을 RGDS 펩타이드와 전배양하고, 상기와 같이 응집 분석을 수행하였다. 50 μL 완충액 중의 혈소판 미세응집괴를 유리 슬라이드 위로 펼치고 올림푸스 BX51 형광 현미경 하에서 시각화하였다.

[0186] 실시예 32

[0187] PAC-1 결합 분석

- [0188] 트롬빈 자극과 함께(1U/ml, 상온에서 20분간 배양) 또는 트롬빈 자극이 없이, 인간 혈액 혈소판 또는 hESC-PLT를 변형된 타이로드 완충액에서 APC-결합된 CD41a, PE-결합된 CD42b 및 FITC-결합된 PAC-1 항체로 염색하였다. 그리고 나서, 상기 시료를 FACSCalibur를 이용하여 분석하였다. 대조군으로서 인간 혈액 혈소판을 이용하여 전방 산란 및 측방 산란 게이팅(gating)을 결정하였다. 유세포분석법 데이터를 Cellquest 또는 Flowjo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.
- [0189] 실시예 33
- [0190] 혈병 형성 및 퇴축
- [0191] 인간 혈액 혈소판 또는 hESC-PLT(대략 1.5×10^7 /ml)를 실리콘으로 처리한 유리 튜브(Kimble Chase, Vineland, NJ) 내에서 50 μ l 혈소판-결집된 혈장에 재용해시켰다. 세포에 트롬빈(2 U/ml) 및 10 mM CaCl_2 를 첨가하여 혈병 형성 및 퇴축을 유도하였다. 상기 혈병이 37 °C에서 1시간 동안 퇴축되게 하고 사진을 촬영하였다. 혈병을 조직-Tek OCT 화합물 및 조직-Tek 냉동주형(Cryomold)(Sakura Finetek, Torrance, CA)에 포매시킨 다음, 드라이 아이스에서 동결시켰다. 동결절편기(cryostat microtome) Microm HM 560(Thermo Scientific, Kalamazoo, MI)을 이용하여 10 μ m의 혈병 절편을 제조하였다.
- [0192] 슬라이드를 메탄올/아세톤(1:3)으로 30분간 고정시키고, PBS로 세척한 다음, 0.1% 트리트론 X-100, 0.1 M Tris, 10 mM EGTA, 0.15 NaCl, 5 mM MgCl_2 및 1% 소 혈청 알부민(BSA), pH 7.5으로 투과시켰다. 5% BSA로 차단하고 세척한 후, 절편을 토끼 항-인간 인테그린 α IIb(클론 H-160) 및 마우스 항-인간 피브리노겐(클론 UC45) 항체(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)로 면역염색하였다. 그리고 나서, 절편을 로다민(rhodamine)에 결합된 1:200 이차 항-토끼 IgG 및 FITC 항체와 결합된 항-마우스 IgM(Jackson ImmunoResearch Lab)에서 1시간 동안 배양하였다. 영상을 전술한 바와 같이 촬영하였다.
- [0193] 실시예 34
- [0194] 생체 현미경 관찰
- [0195] 종래에 기술된 바와 같이^{47:50}, 거고근 미세순환의 광시야, 다중 채널의 생체 현미경 관찰을 수행하였다. 수컷 마우스를 케타민(125 mg/kg, Bedford Laboratories, Bedford, OH) 및 자일라진(25 mg/kg, Akorn Inc., Decatur, IL)의 복강내 주사에 의해 마취시켰다. 기관내 튜브(tracheal tube)를 삽입하고, 마우스를 열체어 담요(37°C) 위에 두었다. 마취상태를 유지하기 위해, 케타민 및 자일라진 용액 50 μ l를 경정맥(jugular vein)에 설치된 캐뉼러를 통해 30분마다 투여하였다. 또한, 10 U/ml 헤파린을 함유하는 식염수가 충전된 캐뉼러를 고동맥(femoral artery)에 설치하였다. 음낭(scrotum)을 절개한 후, 거고근을 생체 현미경 관찰 트레이 위로 꺼내었다. 상기 근육 제제를 실험 내내 열체어되고(37 °C) 공기가 통하는(95% N_2 , 5% CO_2) 중탄산-완충 식염수로 적셨다.
- [0196] 종래에 기술된 바와 같이⁴⁷, 거고근 세동맥 벽을 마이크로포인트(Micropoint) 레이저 시스템(Photonics Instruments, South Windsor, CT)에 의해 손상시켰다. 성장하는 마우스 혈소판 혈전을 Dylight 649-표지된 항-CD42(Emfret Analytics, 0.05 μ g/g 체중)의 주입에 의해 관찰하였다. 내부 혈관 벽 상에서 하나 또는 두 개의 맥박을 제거하여 혈소판 혈전 형성을 개시하게 하였다. 인간 혈액 혈소판 또는 hESC-PLT를 칼세인(calcein) AM(Invitrogen)으로 표지하였다.
- [0197] 혈관 손상 후 바로 고동맥 캐뉼러를 통해 50-100 μ l($5-10 \times 10^5$ 혈소판)를 주입하였다. 앞서 형성된 혈전으로부터의 어떠한 기여를 피하기 위해 앞선 혈전의 상류를 따라 형성된 새로운 혈전을 이용하여, 하나의 마우스에서 다수의 혈전을 연구하였다. 앞서 주입된 표지된 인간 혈소판이 완전히 제거된 후에 새로운 혈전이 생성되었다. 2-3 혈전의 생성 후, 200 μ l의 2×10^6 인간 혈소판에 대하여 20 μ g의 리오프로(ReoPro)(Centocor)로 전처리된 표지된 인간 혈소판 50-100 μ l를 동일한 마우스에서 혈관 손상 후 주입하였다. 또 다른 2-3 혈전이 생성되었다. 상이한 마우스에서 인간 혈액 혈소판 및 hESC-PLT를 연구하였다. 60x 대물렌즈를 갖는 올림푸스 BX61WI 현미경을 이용하여 미세혈관 데이터를 얻었다. 증폭장치(Video Scope International, Dulles, VA)를 통해 고속 디지털 카메라(Hamamatsu C9300)로 디지털 영상을 캡처하였다. 슬라이드북(Slidebook) v5.0(Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO)을 이용하여 형광 영상을 분석하였다. 10-100 밀리초의 노출 시간으로 형광 영상을 캡처하고 명시 야상(bright field image)을 20 밀리초의 노출 시간으로 캡처하였다. 혈관벽 손상 후 3분 동안 데이터를 수집하였다. 이미지 분석을 간소화하기 위해, 각 의사색채(pseudocolor)의

강도의 동적 범위를 2진화하였다. 미세혈관에서 순환하며 혈관 손상 부위에 있는 성장하는 마우스 혈소판 혈전 내로 통합되는 인간 혈소판의 수를 혈관 손상 후 3분 이상 계수하였다.

- [0198] 실시예 35
- [0199] 통계적 분석
- [0200] 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism, GraphPad Software)을 이용한 2개의 그룹의 비교를 위해 스튜던트 t-검정에 의해 데이터를 통계적으로 분석하였다. 차이를 $P < 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주하였다.
- [0201] 실시예 36
- [0202] 혈관모세포로부터 생성된 혈소판을 위한 밀도 원심분리법을 이용한 혈소판 정제 방법
- [0203] MK 분화 배양으로부터 얻은 혈소판은 CD41a 음성인 입자를 포함한다. 이들 입자들은 MK 분화 배양으로부터 얻은 입자의 최대 50%를 차지할 수 있으며, 혈소판 제제의 순도를 높이는 것이 바람직하다. 저 점도 퍼콜(Percol1) 배지와 같이, 생존도 및 형태학적 강도를 보존하는 배지를 이용한 밀도 원심분리법을 사용하여 혈소판으로부터 CD41a 음성 입자를 분리하였다. 박막 내로 분리된 인간 말초 혈소판을, PAC-1 결합 및 인테그린 활성화를 위한 능력을 폐지하지 않고, CD41a 음성 입자로부터 제거하였다.
- [0204] 본 발명의 다양한 구현예가 상세한 설명에 기술되어 있다. 이들 설명이 상기 구현예를 직접적으로 기술하긴 하지만, 본 기술분야의 숙련자라면 본원에 제시되고 기술된 특정 구현예에 대한 변형 및/또는 변화를 생각해 낼 수 있는 것으로 이해된다. 본 명세서의 범위 내에 속하는 상기 변형 또는 변화 중 어떤 것이라도 역시 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다. 명확히 나타내지 않는 한, 명세서 및 청구항 내의 단어 및 문구들은 응용가능한 분야(들)에서 통상의 기술을 가진 자에게 통상적이고 관습적인 의미로 갖는다는 것이 본 발명자들의 의도이다.
- [0205] 본 출원의 출원일 당시에 본 출원인에게 알려진 발명의 다양한 구현예에 대한 전술한 설명이 제공되며 예시 및 설명의 목적으로 의도된다. 본 명세서는 총망라하는 것도 아니고 개시된 정확한 형태로 본 발명을 제한하고자 하는 것이 아니며, 상기 교시에 비추어 다수의 변형 및 변화가 이루어질 수 있다. 기술된 구현예는 본 발명의 원리 및 그 실제적인 응용을 설명하는 역할을 하며, 본 기술분야의 숙련자가 본 발명을 다양한 구현예에서 및 고려된 특정 용도에 적합한 다양한 변형으로 이용할 수 있게 하는 역할을 한다. 그러므로, 본 발명을 수행하기 위해 개시된 특정 구현예로 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0206] 본 발명의 특정 구현예가 제시되고 기술되었음에도 불구하고, 본원의 교시에 기초하여, 본 발명 및 그 광범위한 양태로부터 벗어남이 없이 변화 및 변형이 이뤄질 수 있으며, 따라서 첨부된 청구항이 본 발명의 진의 및 범주 내에 속하는 이러한 변화 및 변형 모두를 그의 범주 내에 포함한다는 것은 본 기술분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 용어는 "개방형" 용어로 의도된다는 것이 기술분야의 숙련자에 의해서 이해될 것이다(예컨대, 용어 "포함하는(including)"은 "포함하나 제한되지 않는"으로 해석되어야 하고, 용어 "갖는(having)"은 "적어도 갖는"으로 해석되어야 하며, 용어 "포함한다(includes)"는 "포함하지만 제한되지 않는"으로 해석되어야 한다)

참조문헌

1. Guerriero R, Mattia G, Testa U et al. Stromal cell-derived factor lalpha increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. Blood 2001;97:2587-2595.
2. Matsunaga T, Tanaka I, Kobune M et al. Ex vivo large-scale generation of human platelets from cord blood CD34+ cells. Stem Cells 2006;24:2877-2887.
3. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 2001;98.:10716-10721.
4. Lu S-J, Li F, Vida L, Honig GR. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. Blood 2004;103:4134-4141.
5. Chadwick K, Wang L, Li L et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood 2003 2003;102:906-915.
6. Chang KH, Nelson AM, Cao H et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. Blood 2006;108:1515-1523.

[0207]

7. Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp.Hematol.* 2004;32:1000-1009.
8. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2005;105:617-626.
9. Wang L, Menendez P, Shojaei F et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J.Exp.Med.* 2005;201:1603-1614.
10. Woll PS, Martin CH, Miller JS, Kaufman DS. Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. *J.Immunol.* 2005;175:5095- 5103.
11. Zambidis ET, Peault B, Park TS, Bunz F, Civin CI. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* 2005;106:860-870.
12. Qiu C, Hanson E, Olivier E et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp.Hematol.* 2005;33:1450-1458.

[0208]

13. Zhan X, Dravid G, Ye Z et al. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet* 2004;364:163-171.
14. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* 2008;3:85-98.
15. Gaur M, Kamata T, Wang S et al. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. *J.Thromb.Haemost.* 2006;4:436-442.
16. Takayama N, Nishikii H, Usui J et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. *Blood* 2008;111:5298-5306.
17. Lu SJ, Feng Q, Caballero S et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat.Methods* 2007;4:501-509.
18. Klimanskaya I, McMahon J. Approaches of derivation and maintenance of human ES cells: Detailed procedures and alternatives. In: Lanza Rea, ed. *Handbook of Stem Cells. Volume 1: Embryonic Stem Cells.* New York, USA: Elsevier/Academic Press; 2004:437- 449.
19. Lu SJ, Luo C, Holton K et al. Robust generation of

[0209]

hemangioblastic progenitors from human embryonic stem cells. *Regen.Med.* 2008;3:693-704.

20. Lu SJ, Feng Q, Park JS et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;112:4475-4484.

21. Fujiki H, Kimura T, Minamiguchi H et al. Role of human interleukin-9 as a megakaryocyte potentiator in culture. *Exp.Hematol.* 2002;30:1373-1380.

22. Jeanpierre S, Nicolini FE, Kaniewski B et al. BMP4 regulation of human megakaryocytic differentiation is involved in thrombopoietin signaling. *Blood* 2008;112:3154-3163.

23. Lordier L, Jalil A, Aurade F et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* 2008;112:3164-3174.

24. Chang Y, Aurade F, Larbret F et al. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood* 2007;109:4229-4236.

25. Taguchi K, Saitoh M, Arai Y et al. Disparate effects of interleukin 11 and thrombopoietin on megakaryocytopoiesis in vitro. *Cytokine* 2001;15:241-249.

26. Philipp CS, Remmler J, Zucker-Franklin D. The effects of Mpl-ligand, interleukin-6 and interleukin-11 on megakaryocyte and platelet

[0210]

alpha-granule proteins. *Thromb.Haemost.* 1998;80:968-975.

27. Kanaji T, Russell S, Cunningham J et al. Megakaryocyte proliferation and ploidy regulated by the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibalpha. *Blood* 2004;104:3161-3168.

28. Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis. *Br.J.Haematol.* 1993;84:451-456.

29. Lalezari P, Driscoll AM. Ability of thrombocytes to acquire HLA specificity from plasma. *Blood* 1982;59:167-170.

30. Sullenbarger B, Bahng JH, Gruner R, Kotov N, Lasky LC. Prolonged continuous in vitro human platelet production using three-dimensional scaffolds. *Exp.Hematol.* 2009;37:101-110.

31. Giammona LM, Fuhrken PG, Papoutsakis ET, Miller WM. Nicotinamide (vitamin B3) increases the polyploidisation and proplatelet formation of cultured primary human megakaryocytes. *Br.J.Haematol.* 2006;135:554-566.

32. Nagata Y, Yoshikawa J, Hashimoto A et al. Proplatelet formation of megakaryocytes is triggered by autocrine-synthesized estradiol. *Genes Dev.* 2003;17:2864-2869.

33. Larson MK, Watson SP. Regulation of proplatelet formation and platelet release by integrin alpha IIb beta3. *Blood* 2006;108:1509-1514.

[0211]

34. Klimchenko O, Mori M, Distefano A et al. A common bipotent progenitor generates the erythroid and megakaryocyte lineages in embryonic stem cell-derived primitive hematopoiesis. *Blood* 2009;114:1506-1517.

35. Nishikii H, Eto K, Tamura N et al. Metalloproteinase regulation improves in vitro generation of efficacious platelets from mouse embryonic stem cells. *J.Exp.Med.* 2008;205:1917-1927.

36. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl.J.Med.* 2008; 359: 938-949.

37. Day SM, Reeve JL, et al. Murine thrombosis models. *Thromb.Haemost.* 2004; 92: 486-494.

38. Sachs UJ and Nieswandt B. In vivo thrombus formation in murine models. *Circ.Res.* 2007; 100: 979-991.

39. Furie B and Furie BC. In vivo thrombus formation. *J.Thromb.Haemost.* 2007; 5 Suppl 1: 12-17.

40. Junt T, Schulze H, et al. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science* 2007; 317: 1767-1770.

41. Yu J, Hu J, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324: 797-801.

42. Takahashi K, Tanabe K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.

[0212]

43. Yu J, Vodyanik MA, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920.

44. Kim D, Kim CH, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 472-476.

45. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1992; 4: 766-771.

46. Chen YP, O'Toole TE, et al. A point mutation in the integrin beta 3 cytoplasmic domain (S752-->P) impairs bidirectional signaling through alpha IIb beta 3 (platelet glycoprotein IIb-IIIa). *Blood* 1994; 84: 1857-1865.

47. Cho J, Furie BC, et al. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J.Clin.Invest* 2008; 118: 1123-1131.

48. Collier BS. Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. *Thromb. Haemost.* 2001; 86: 427-443.

49. Cho J, Mosher DF. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood* 2006; 107: 3555-3563.

50. Falati S, Gross P, et al. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in

[0213]

the mouse. *Nat.Med.* 2002; 8: 1175-1181.

51. Reems JA, Pineault N, and Sun S. In vitro megakaryocyte production and platelet biogenesis: state of the art. *Transfus. Med.Rev.* 2010; 24: 33-43.

52. Chockalingam P, Sacher RA. Management of patients' refractory to platelet transfusion. *J.Infus.Nurs.* 2007; 30 : 220-225.

53. Hod E, Schwartz J. Platelet transfusion refractoriness. *Br.J.Haematol.* 2008; 142: 348-360.

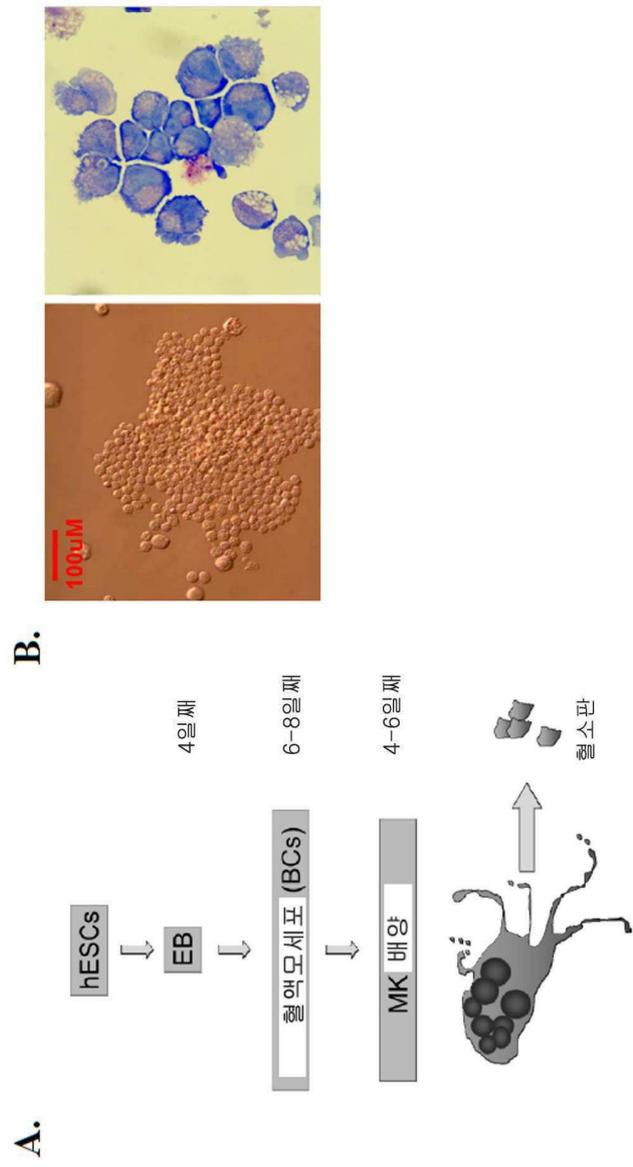
54. Tian X, Kaufman DS. Differentiation of embryonic stem cells towards hematopoietic cells: progress and pitfalls. *Curr.Opin.Hematol.* 2008; 15: 312-318.

55. Wang L, Menendez P, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J.Exp.Med.* 2005; 201: 1603-1614.

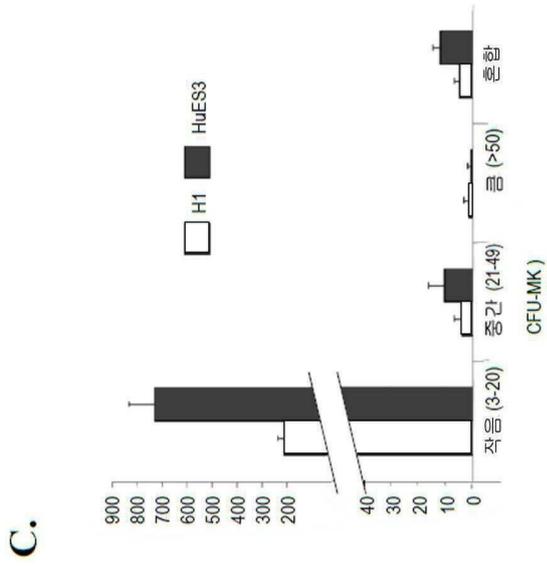
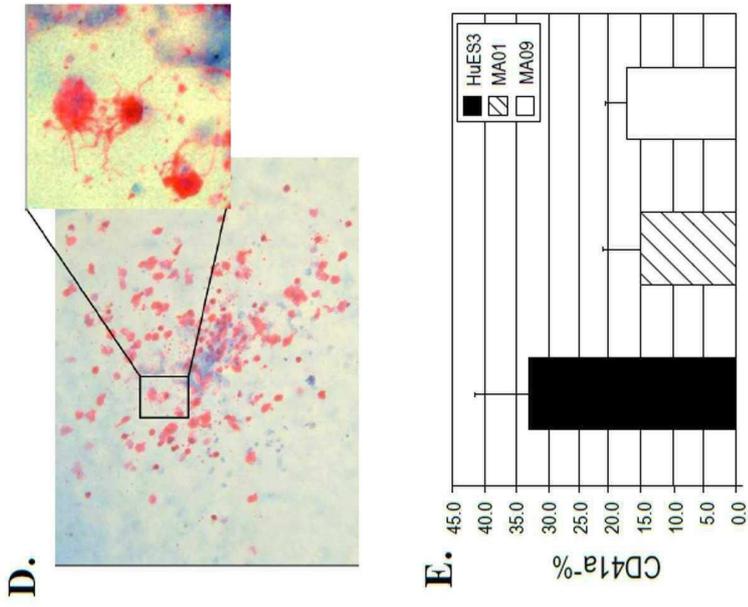
[0214]

도면

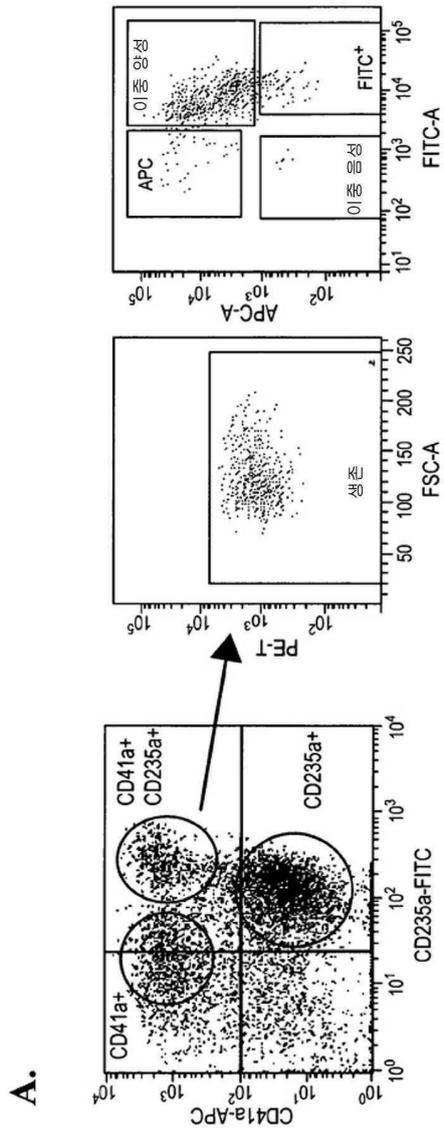
도면1ab



도면1cde

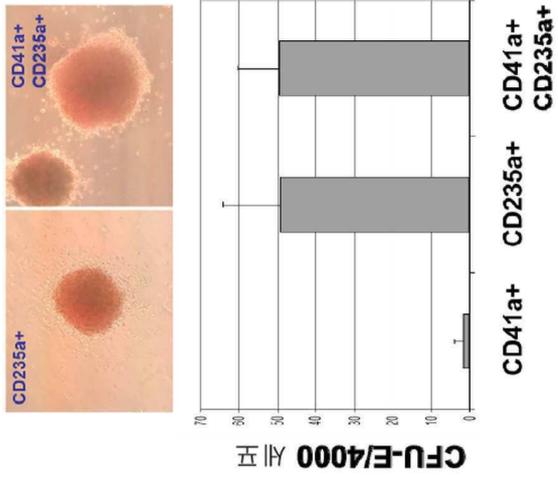


도면2a

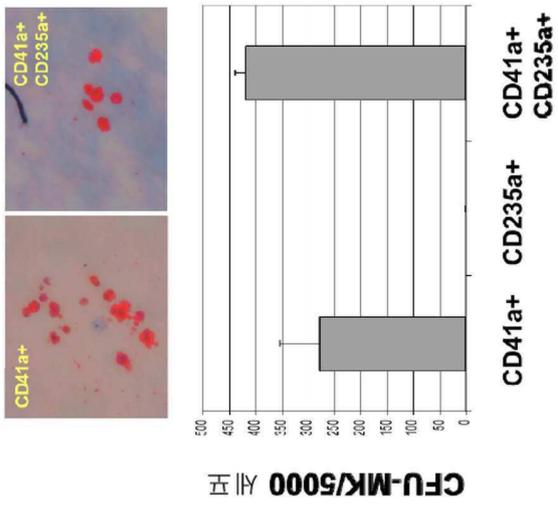


도면2bc

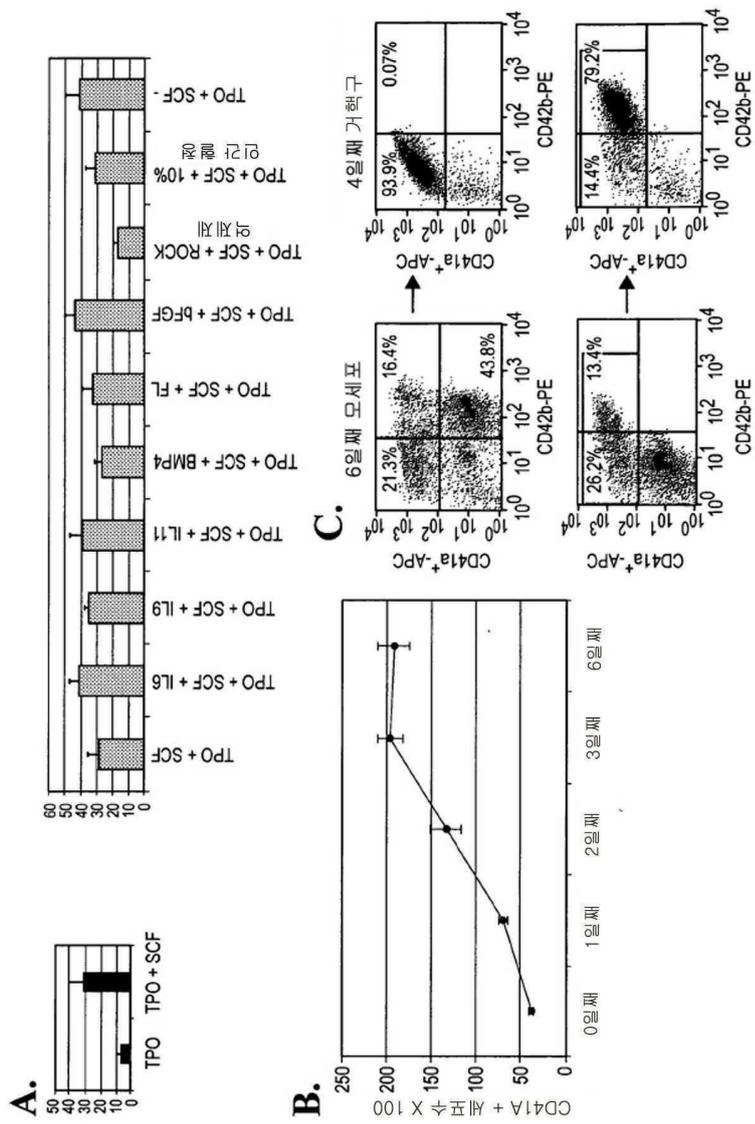
C.



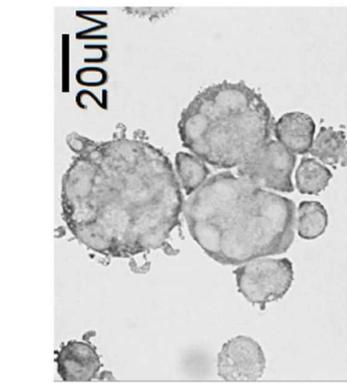
B.



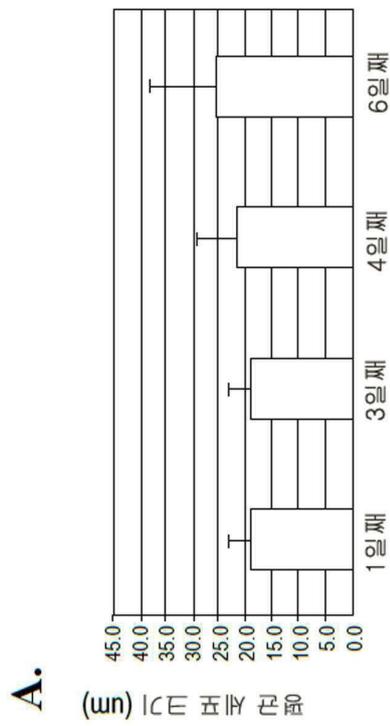
도면3abc



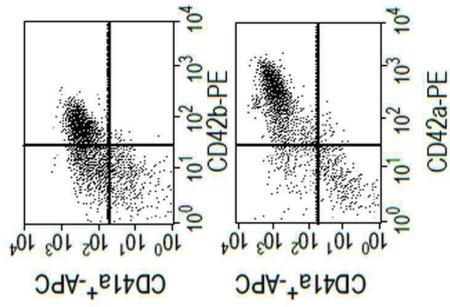
도면4abc



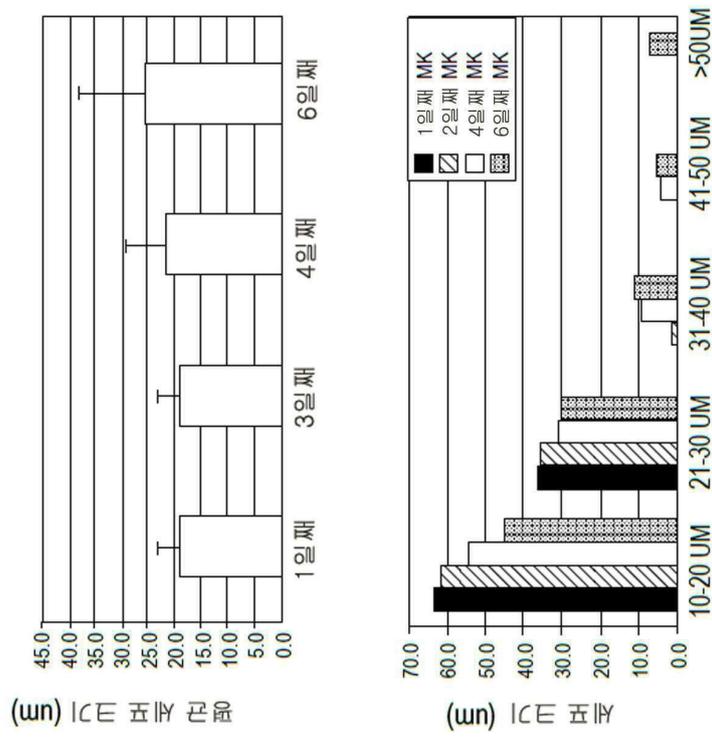
B.



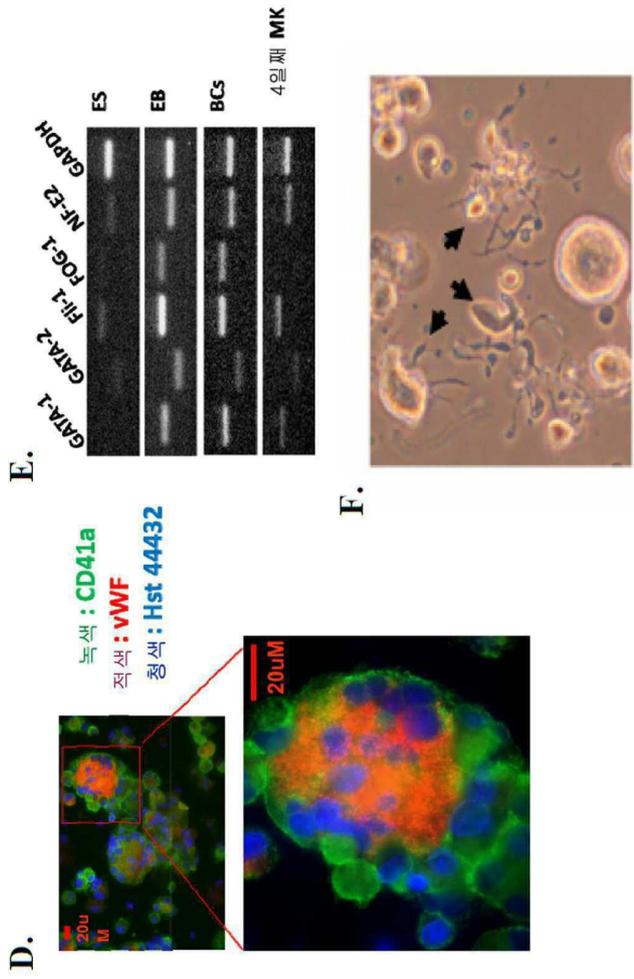
C.



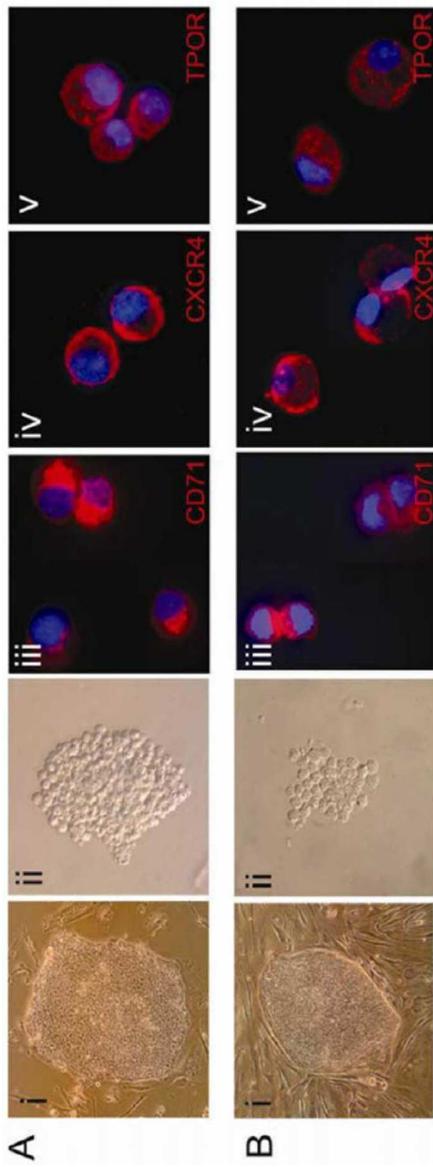
A.



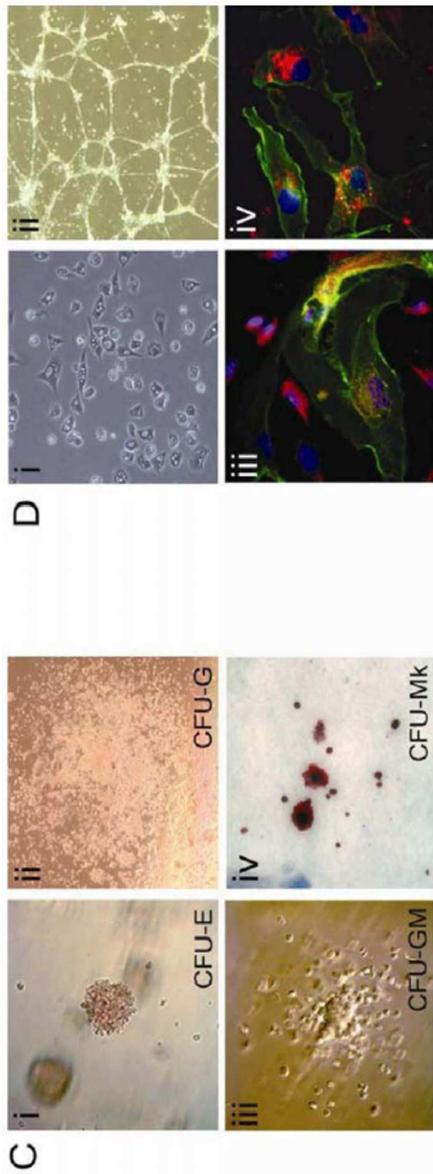
도면4def



도면5ab

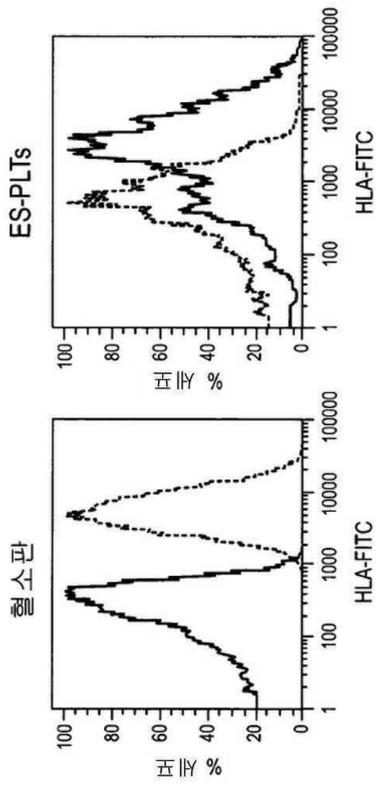


도면5cd

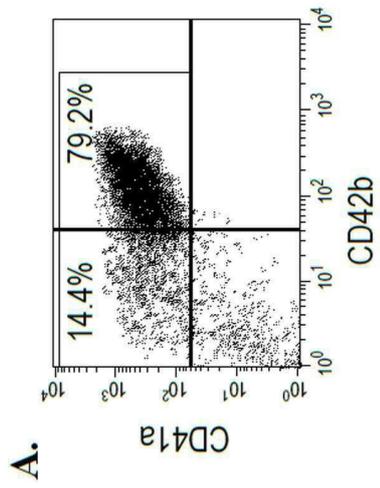
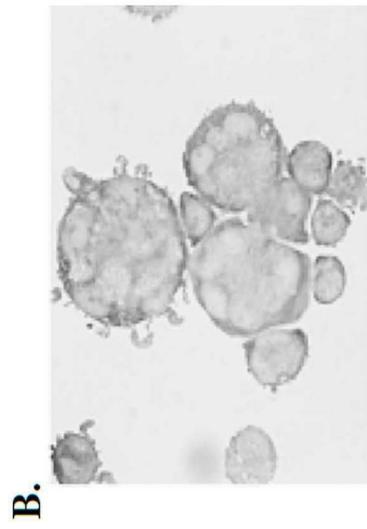


도면7c

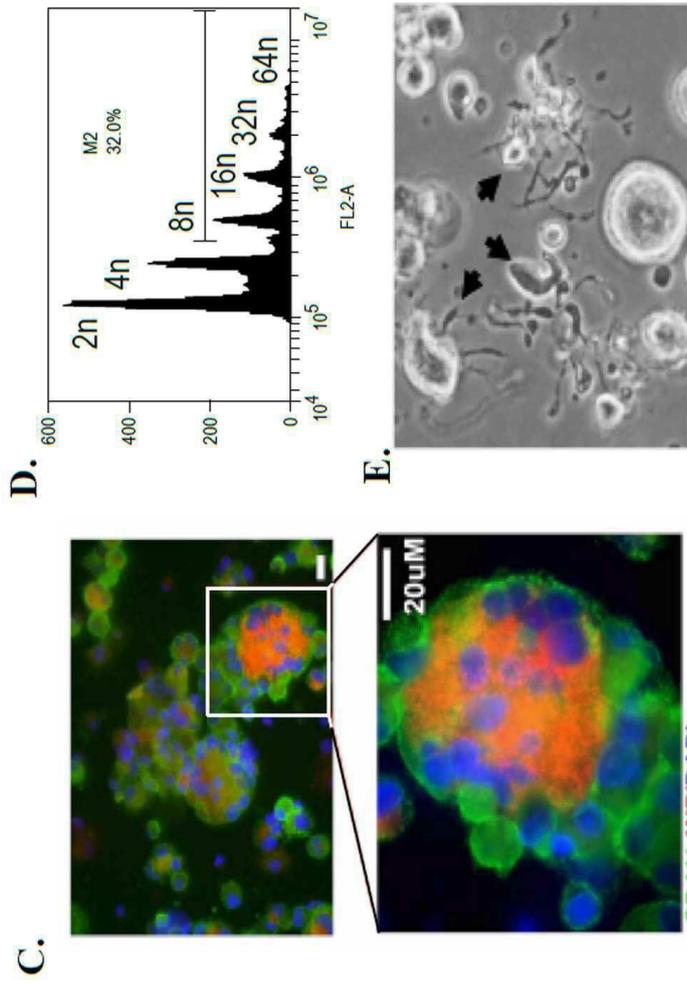
C.



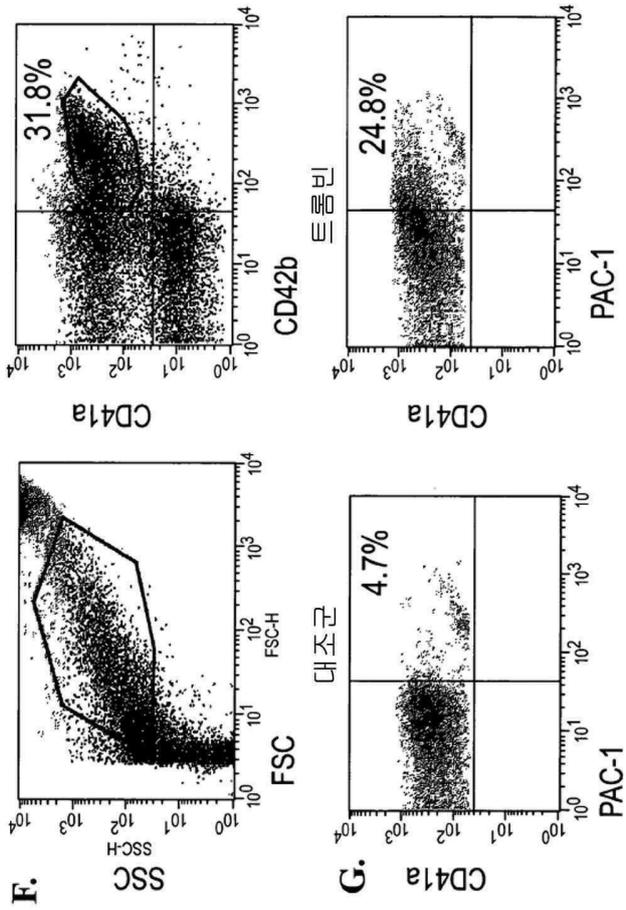
도면8ab



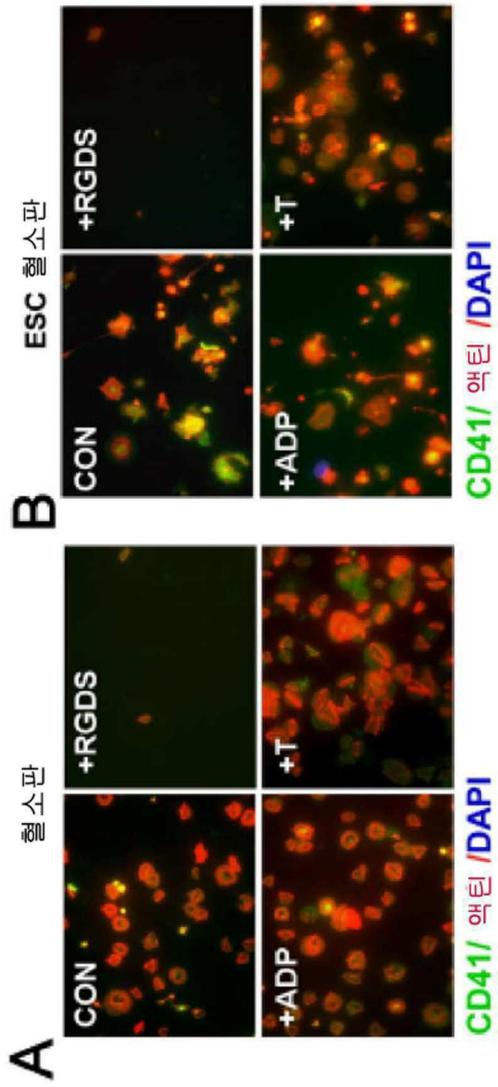
도면8cde



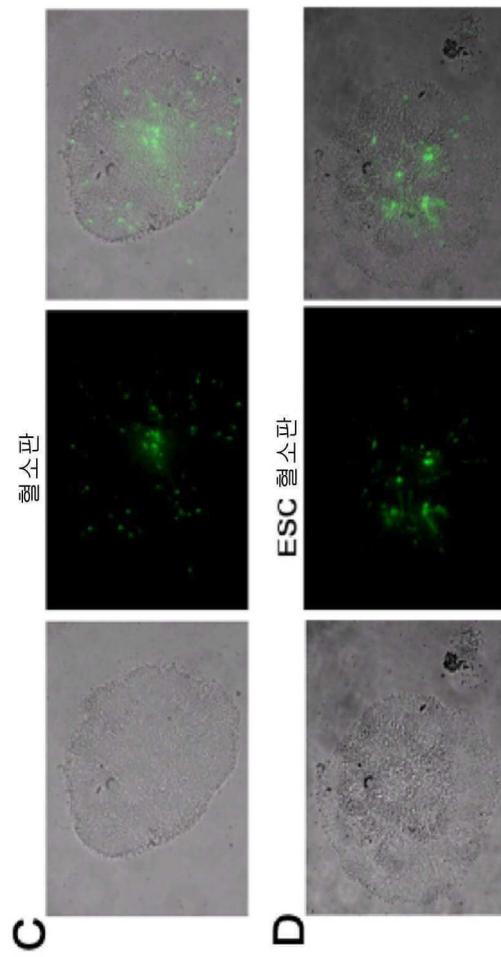
도면8fg



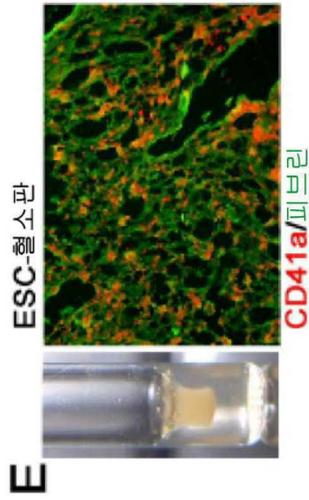
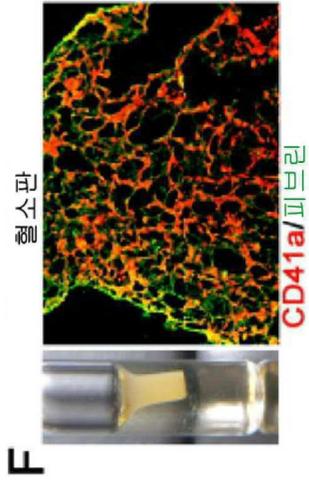
도면9ab



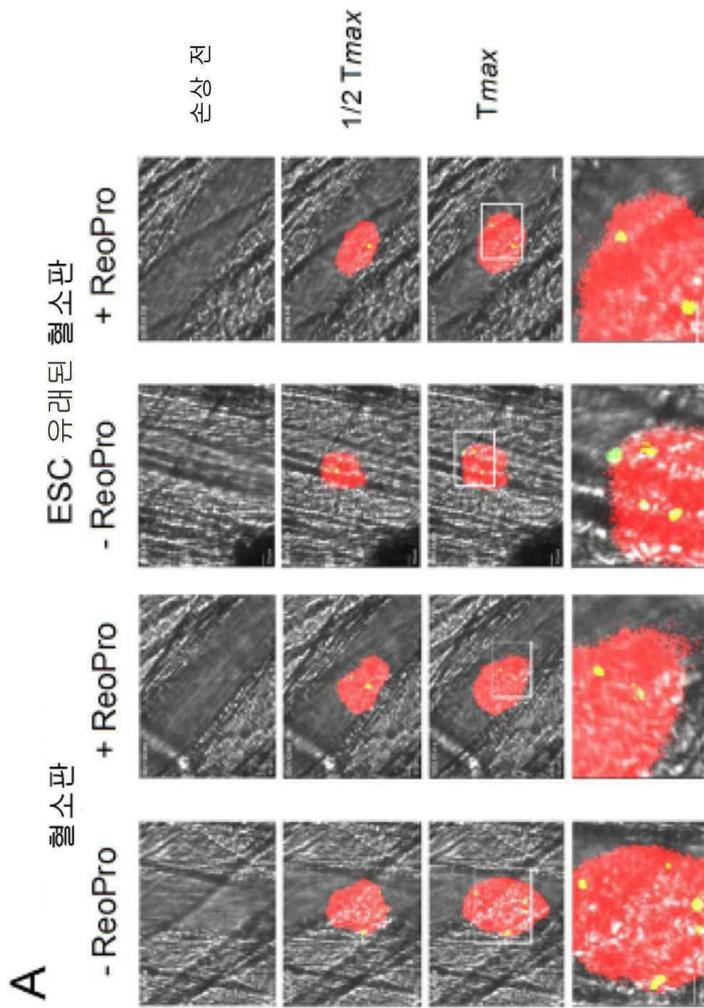
도면9cd



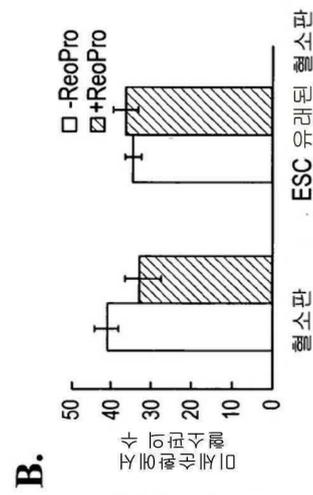
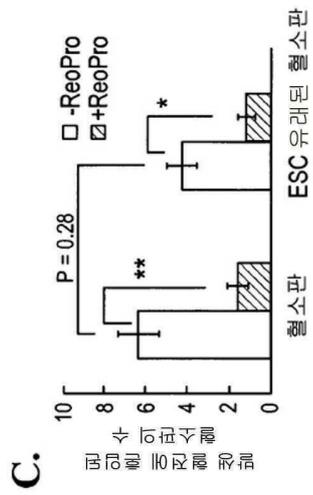
도면9ef



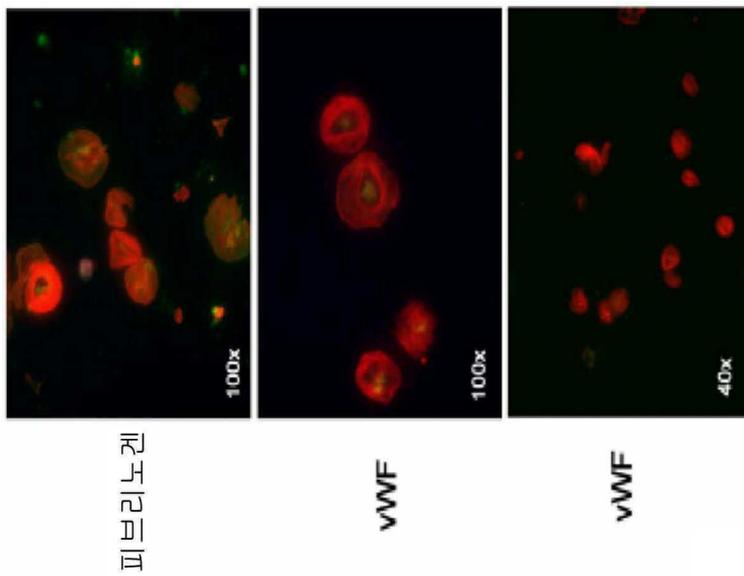
도면10a



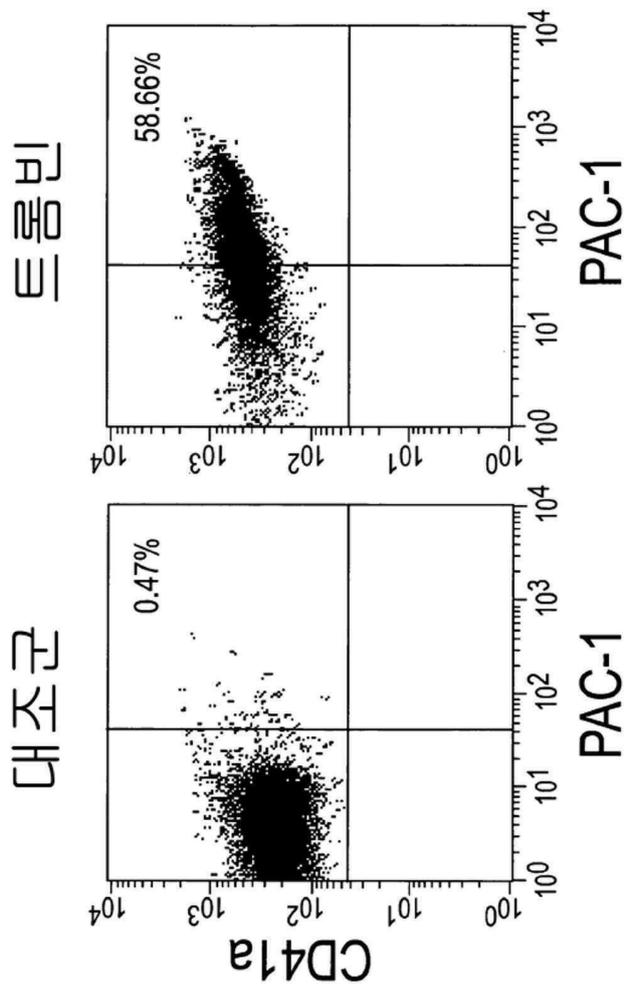
도면10bc



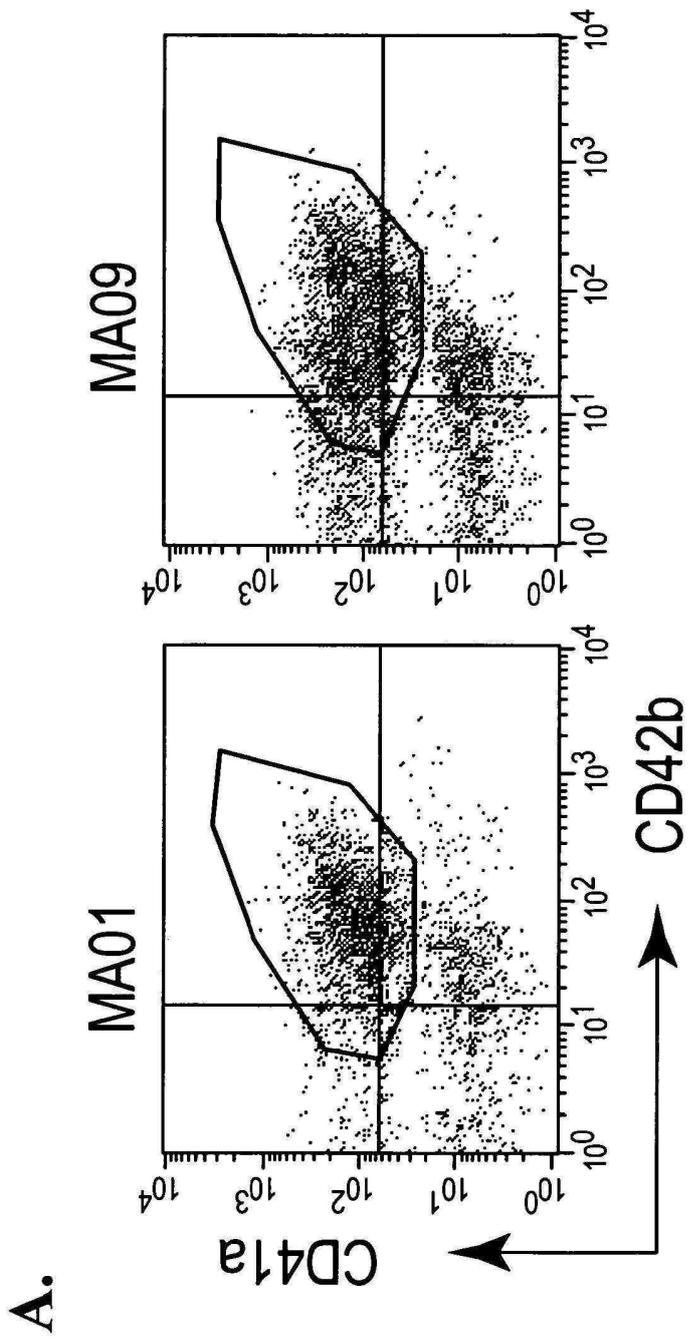
도면11



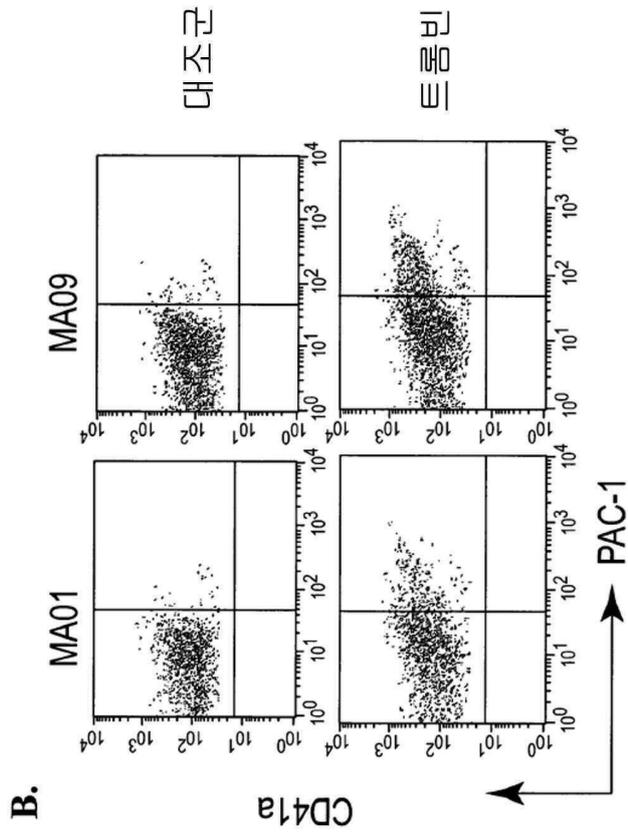
도면12



도면13a



도면13b



도면13c

