



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0083645
(43) 공개일자 2020년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) A61K 35/12 (2020.01)
A61K 35/15 (2014.01) C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0639 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7018660(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년12월01일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7003655
원출원일자(국제) 2010년12월01일
심사청구일자 2019년03월08일
(85) 번역문제출일자 2020년06월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/058593
(87) 국제공개번호 WO 2011/068896
국제공개일자 2011년06월09일
(30) 우선권주장
61/266,661 2009년12월04일 미국(US)

(71) 출원인
스템 셀 앤드 리제너러티브 메디신 인터내셔널,
인크.
미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브
33
(72) 발명자
김브렐, 에린
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 40 항

(54) 발명의 명칭 인간 배아줄기세포 유래된 혈액모세포로부터 자연 살해 세포 및 수지상 세포를 생성하는 방법

(57) 요약

본 발명은 자연 살해 (NK) 세포 및 수지상 세포 (DC)를 생성하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 중간 세포로서 인간 혈액모세포를 이용하여 NK 세포 및 DC를 생성한다. 다양한 구현예에서, 상기 방법은 기질 영양세포층의 사용을 필요로 하지 않는다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/0646 (2013.01)

A61K 2035/124 (2013.01)

C12N 2501/125 (2013.01)

C12N 2501/22 (2013.01)

C12N 2501/2303 (2013.01)

C12N 2501/2304 (2013.01)

C12N 2501/26 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

SCF, Flt3-리간드(FL) 및 IL3로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 성장 인자를 포함하는 제1 배양 배지에서 영양세포 없는(feeder free) 조건 하에 혈액모세포를 배양하여 자연 살해(NK) 세포를 생성하는 단계를 포함하는, 자연 살해(NK) 세포의 생성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 배양 배지가 액체 배지인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 제1 배양 배지가 반고체 배지인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 반고체 배지가 메틸셀룰로오스를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 반고체 배지에 에리트로포이에틴이 없는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 제1 배양 배지가 IL2, IL6, IL7 및 IL15로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가 성장 인자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, IL7, IL15, SCF 및 FL로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종 이상의 성장 인자를 포함하는 제2 배양 배지에서 영양세포 없는 조건 하에 혈액모세포를 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 제2 배양 배지가 액체 배지인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 혈관모세포가 다분화능 줄기세포로부터 획득되는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 다분화능 줄기세포가 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도 다분화능 줄기세포인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 혈관모세포가 영양세포 없는 조건 하에서 다분화능 줄기세포로부터 획득되는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 혈관모세포가 에리트로포이에틴으로 배양하지 않고 다분화능 줄기세포로부터 획득되는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, NK 세포가 CD56+인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, NK 세포가 CD56-인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 제1 배양 배지가 무혈청(serum-free)인 방법.

청구항 16

(a) 골 형성 단백질 4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 bFGF로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 성장 인자를 포함하는 적어도 하나의 배양 배지에서 영양세포 없는 조건 하에 인간 다분화능 줄기세포를, 분화하여 적어도 조혈 세포 유형, 내피 세포 유형 또는 중배엽 유도체를 생성시킬 수 있는 전구체 세포로 분화시키는 단계, 및

(b) SCF, Flt3-리간드(FL) 및 IL3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 성장 인자를 포함하는 적어도 하나의 배양 배지에서 영양세포 없는 조건 하에 상기 전구체 세포를 NK 세포로 분화시키는 단계

를 포함하는, 인간 다분화능 줄기세포-유래 자연 살해(NK) 세포의 생성 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 인간 다분화능 줄기세포가 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도 다분화능 줄기세포인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, NK 세포가 CD56+인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 단계 (a)의 적어도 하나의 배양 배지가 무혈청인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 단계 (b)의 적어도 하나의 배양 배지가 IL2, IL6, IL7 및 IL15로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 추가 성장 인자를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 단계 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 배양 배지에 에리트로포이에틴이 없는 것인 방법.

청구항 22

제16항에 있어서, IL7, IL15, SCF 및 FL을 포함하는 제2 배양 배지에서 단계 (b)에서의 영양세포 없는 조건 하에 상기 전구체 세포를 NK 세포로 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 23

제16항에 있어서, 단계 (a)의 전구체 세포가 단계 (b) 전에 채집되는 것인 방법.

청구항 24

(a) TPO, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및 Flt3- 리간드 (FL)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 성장 인자를 포함하는 적어도 하나의 배양 배지에서 영양세포 없는 조건 하에 배아체를, 분화하여 적어도 조혈 세포 유형, 내피 세포 유형 또는 중배엽 유도체를 생성시킬 수 있는 전구체 세포로 분화시키는 단계, 및

(b) SCF, FL, IL3, IL7, IL2 및 IL6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3종의 성장 인자를 포함하는 적어도 하나의 배양 배지에서 영양세포 없는 조건 하에 상기 전구체 세포를 NK 세포로 분화시키는 단계

를 포함하는, 자연 살해(NK) 세포의 생성 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 배아체가 다분화능 줄기세포로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 다분화능 줄기세포가 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도 다분화능 줄기세포인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, NK 세포가 CD56+인 방법.

청구항 28

제24항에 있어서, 단계 (a), (b), 또는 두 단계 모두의 적어도 하나의 배양 배지가 무혈청인 방법.

청구항 29

제24항에 있어서, 단계 (a) 및 (b)의 적어도 하나의 배양 배지에 에리트로포이에틴이 없는 것인 방법.

청구항 30

제24항에 있어서, 단계 (a)의 전구체 세포가 단계 (b) 전에 채집되는 것인 방법.

청구항 31

(a) 골 형성 단백질 4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 bFGF를 포함하는 배양 배지에서 배아체를 배양하는 단계,

(b) TPO, VEGF 및 Flt3-리간드(FL)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 성장 인자를 포함하는 배양 배지에서 단계 (a)의 생성물을 배양하는 단계; 및

(c) SCF, FL, IL3, IL7, IL2 및 IL6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3종의 성장 인자를 포함하는 배양 배지에서 (b)의 생성물을 배양하여 자연 살해(NK) 세포를 생성하는 단계

를 포함하고, 상기 배양은 상기 방법의 단계 (a) 내지 (c)에 걸쳐 영양세포 없는 조건 하에서 수행되는 것인, 자연 살해(NK) 세포의 생성 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 배아체가 다분화능 줄기세포로부터 획득되는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 다분화능 줄기세포가 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도 다분화능 줄기세포인 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, NK 세포가 CD56+인 방법.

청구항 35

제31항에 있어서, 단계 (a), (b), 및/또는 (c)의 배양 배지가 무혈청인 방법.

청구항 36

제31항에 있어서, 단계 (a), (b) 및 (c)의 배양 배지에 에리트로포이에틴이 없는 것인 방법.

청구항 37

일련의 배양 배지에서 영양세포 없는 조건 하에 인간 다분화능 줄기세포를 자연 살해(NK) 세포로 분화시킴으로써 NK 세포를 생성하는 단계를 포함하며, 여기에서, (i) 제1 배양 배지는 골 형성 단백질 4(BMP4), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 및 bFGF로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 성장 인자를 포함하는 무혈청 배양 배지이고, (ii) 제2 배양 배지는 TPO, VEGF, Flt3-리간드(FL), bFGF, IL2, IL7 및 IL15로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 성장 인자를 포함하는 무혈청 배양 배지이고, (iii) 제3 배양 배지는 SCF, FL, IL3, IL7, IL2 및 IL6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 3종의 성장 인자를 포함하는 것인, 인간 다분화능

줄기세포-유래 자연 살해(NK) 세포의 생성 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 인간 다분화능 줄기세포가 인간 배아줄기세포 또는 인간 유도 다분화능 줄기세포인 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, NK 세포가 CD56+인 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 제1 배양 배지, 제2 배양 배지, 및 제31 배양 배지에 에리트로포이에틴이 없는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혈액모세포로부터의 자연 살해 (NK) 세포 및 수지상 세포 (DC)의 생성에 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] 인간 및 마우스 배아줄기세포 (ESC)에 대한 연구는, 혈관 (내피 및 평활근 세포) 및 혈액모세포로 불리는 조혈 모세포 계통 모두에 대한 공통적인 전구체가 배양에서 ESC 유래된 배아체로부터 생산될 수 있다는 것을 보여주었다. 발명자들 그룹은 재생 약물에서 생산적인 용도를 위한 중요한 혈청- 및 기질-없는 조건 하에서 다중 hESC 세포주로부터 혈액모세포를 효율적이고 재생가능하게 생성하기 위한 단순한 전략을 개발했다. 이전의 작업은, hESC 유래된 혈액모세포가 적혈구 및 골수성 계통으로 효과적으로 분화될 수 있지만, 면역요법 포텐셜을 갖는 것을 포함하는 림프 계통 세포를 생산하는 능력은 비교적 공지되어 있지 않다는 것을 보여주었다.

[0004] 림프 계통을 통해 생기고 선천적인 면역계의 일부인 자연 살해 (NK) 세포는, 어떤 유형의 종양 세포를 탐지하고 사멸시키는 것으로 발견된 바와 같이 항암 요법에서 사용될 수 있다. (단핵구로부터) 골수성 계통을 통해 대부분 생기고 적응가능한 면역계의 일부인 수지상 세포 (DC)는 미접촉 및 기억 T 세포 모두에 제공하고 그것들을 자극하는 능력을 통해 항원 특이적 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다 (예를 들면, DC 기반 백신 요법).

[0005] 면역요법 포텐셜이 주어지면, 자연 살해 (NK) 세포의 생성 방법 및 수지상 세포 (DC)에 대한 기술에 대한 필요성이 존재한다.

[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 발명의 다양한 구현예는 하기를 포함하는 자연 살해 (NK) 세포의 생성 방법을 제공한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 메틸셀룰로오스, 및 IL2, IL3, IL6, IL7, IL15, SCF 및 FL을 포함하는 제1 사이토킨 혼합물 상에서 상기 혈액모세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 세포를 채집하는 단계; 및 인간 혈청, 및 IL7, IL15, SCF 및 FL을 포함하는 제2 사이토킨 혼합물을 포함하는 액체 배지에서 상기 채집된 세포를 배양하여 NK 세포를 생성하는 단계.

[0009] 다양한 구현예에서, 메틸셀룰로오스는 H4236 메틸셀룰로오스일 수 있다. 다른 구현예에서, 메틸셀룰로오스는 H4536 메틸셀룰로오스일 수 있다.

[0010] 다양한 구현예에서, IL2의 농도는 약 5-10ng/ml일 수 있고, IL3은 약 1-10ng/ml일 수 있고, IL6은 약 1-

10ng/ml일 수 있고, IL7은 약 5-20ng/ml일 수 있고, IL15는 약 5-10ng/ml일 수 있고, SCF는 약 10-50ng/ml일 수 있고, FL은 약 10-50ng/ml일 수 있다.

- [0011] 다양한 구현예에서, 혈액모세포의 배양은 약 6 내지 8일 동안일 수 있다. 다양한 구현예에서, 채집된 세포의 배양은 약 14 내지 21일 동안일 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 방법은 또한, 제2 사이토킨 혼합물을 새롭게 하기 위해 매주의 배지 변화를 포함할 수 있다.
- [0012] 다양한 구현예에서, 혈액모세포는 인간 배아줄기세포 (hESC)로부터 분화될 수 있다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 유도 다분화능 (iPS) 세포로부터 분화될 수 있다.
- [0013] 다양한 구현예에서, NK 세포는 미성숙 NK 세포일 수 있고, CD56+ 및 CD16-일 수 있다. 다른 구현예에서, NK 세포는 성숙 NK 세포일 수 있고, CD56- 및 CD16+, 또는 CD56lo 및 CD16+일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다양한 구현예는 하기를 포함하는 자연 살해 (NK) 세포의 생성 방법을 제공한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 인간 혈청 및 IL2, IL3, IL6, IL7, IL15, 및 SCF를 포함하는 제1 사이토킨 혼합물을 포함하는 액체 배지에서 상기 혈액모세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 세포를 채집하는 단계; 및 인간 혈청 및 IL7, IL15, SCF 및 FL를 포함하는 제2 사이토킨 혼합물을 포함하는 액체 배지에서 상기 채집된 세포를 배양하여 NK를 생성하는 단계.
- [0015] 다양한 구현예에서, IL2의 농도는 약 5-10ng/ml일 수 있고, IL3은 약 1-10ng/ml일 수 있고, IL6은 약 1-10ng/ml일 수 있고, IL7은 약 5-20ng/ml일 수 있고, IL15는 약 5-10 ng/ml일 수 있고, SCF는 약 10-50ng/ml이고, FL은 약 10-50ng/ml일 수 있다.
- [0016] 다양한 구현예에서, 혈액모세포의 배양은 약 6 내지 8일 동안일 수 있다. 다양한 구현예에서, 채집된 세포의 배양은 약 14 내지 21일 동안일 수 있다.
- [0017] 다양한 구현예에서, 본 방법은 또한, 제2 사이토킨 혼합물을 새롭게 하기 위해 매주의 배지 변화를 포함할 수 있다.
- [0018] 다양한 구현예에서, 혈액모세포는 인간 배아줄기세포 (hESC)로부터 분화될 수 있다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 유도 다분화능 (iPS) 세포로부터 분화될 수 있다.
- [0019] 다양한 구현예에서, NK 세포는 미성숙 NK 세포일 수 있고, CD56+ 및 CD16-일 수 있다. 다른 구현예에서, NK 세포는 성숙 NK 세포일 수 있고, CD56- 및 CD16+, 또는 CD56lo 및 CD16+일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다양한 구현예는 본 발명의 방법 중 어떤 것에 의해 생성된 자연 살해 (NK) 세포를 제공한다. 본 발명의 다른 구현예는 본 발명의 방법 중 어떤
- [0021] 것에 의해 생성된 NK 세포의 양을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 다양한 구현예는 하기를 포함하는 수지상 세포 (DC)의 생성 방법을 제공한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 인간 혈청, SCF, FL, IL3 및 GM-CSF를 포함하는 액체 배지에서 상기 혈액모세포를 배양하는 단계; IL4를 상기 액체 배지에 추가하는 단계; 및 추가로 상기 혈액모세포 배양하여 DC를 생성하는 단계.
- [0023] 다양한 구현예에서, 혈액모세포의 배양은 약 7 내지 11일 동안일 수 있다.
- [0024] 다양한 구현예에서, IL4의 부가 후의 혈액모세포의 배양은 약 8 내지 10일 동안일 수 있다.
- [0025] 다양한 구현예에서, 본 방법은 또한, IL1b, TNF α 및 IL6을 포함하는 사이토킨 혼합물을 부가하여 DC의 성숙을 유도하는 것을 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 사이토킨 혼합물은 약 48시간 동안 부가될 수 있다. 다양한 구현예에서, 사이토킨 혼합물은 PGE2, IFN α 2b, poly I:C, IFN γ 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 다양한 구현예에서, 본 방법은 또한, LPS, IFN γ 및/또는 S-28463을 부가하여 DC로부터의 IL12p70 생산 및/또는 DC로부터의 HLA-DR 발현을 자극하는 것을 포함할 수 있다.
- [0027] 다양한 구현예에서, SCF의 농도는 약 20-100 ng/ml일 수 있고, FL은 약 10-50ng/ml일 수 있고, IL3은 약 5-50 ng/ml일 수 있고, GM-CSF는 약 50-100 ng/ml일 수 있고, IL4는 약 50-100 ng/ml일 수 있다. 다양한 구현예에서, IL1b의 농도는 약 10ng/ml일 수 있고, TNF γ 는 약 10 ng/ml일 수 있고, IL6은 약 150 ng/ml일 수 있다. 다양한 구현예에서, PGE2의 농도는 약 1 μ g/ml일 수 있고, IFN α 2b는 약 3000 유닛/ml일 수 있고, poly

I:C는 약 20 $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있고, IFN γ 는 약 20 ng/ml일 수 있다.

[0028] 다양한 구현예에서, DC는 성숙 DC일 수 있고 CD83을 발현시킬 수 있다. 다른 구현예에서, DC는 성숙 DC일 수 있고, CD209, HLA DR 및/또는 CD11c의 발현이 증가된다.

[0029] 본 발명의 다양한 구현예는 본 발명의 방법 중 어떤 것에 의해 생성된 수지상 세포 (DC)을 제공한다. 본 발명의 다른 구현예는 본 발명의 방법 중 어떤 것에 의해 생성된 DC의 양을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물을 제공한다.

[0030] 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

[0031] 예시적인 구현예는 참조된 도면들에서 설명된다. 본 명세서에 개시된 구현예 및 도면들은 제한적이기보다 설명적인 것을 위해 고려된다.

도 1은, 혈액모세포가 본 발명의 다양한 구현예에 따라 조혈모세포 (A-C) 및 혈관 (D-F) 계통 모두를 초래할 수 있는 이중잠재력 전구체 세포라는 것을 보여준다.

도 2는, 면역요법 잠재력을 갖는 세포, 예컨대 수지상 세포가 본 발명의 다양한 구현예에 따라 혈액모세포로부터 분화될 수 있다는 것을 보여준다. A. 분화의 28일째에서의 수지상 세포 표면 마커 발현. B. 성숙 사이토킨에 대한 48시간 노출을 보여주는 막대 그래프는 DC 표면 마커 발현을 증가시킬 수 있다. C.DC를 보여주는 히스토그램은 30 분 검정에서 DQ-난백알부민 항원을 취하고 처리할 수 있다. D. DC의 라이트-김자(Wright-Giemsa) 염색, 20x. E. DC의 라이트-김자 염색, 100x.

도 3은, 림프 유래 사이토킨에의 노출시, hESC 유래된 혈액모세포가 본 발명의 다양한 구현예에 따라 영양세포 없는 배양 시스템에서 CD56low/CD16+ 자연 살해 세포를 초래할 수 있다는 것을 보여준다. A. 메틸셀룰로오스 배양 동안, 혈액모세포의 서브셋은 통상적인 백혈구 항원, CD45를 획득한다. B. 혈액모세포의 액체 배양 (인간 혈청 및 사이토킨의 카테일 함유)로의 이동은 NK 세포 마커, CD56의 획득을 허용한다. C. 총 28-40일 분화 후의 CD56low/CD16+ NK 세포의 출현.

도 4는, 고전적인 51Cr 방출 검정과 유사하게, 세포내 유세포측정법이 본 발명의 다양한 구현예에 따라 NK 매개된 세포독성을 평가하기 위해 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

도 5는, 혈액모세포 유래된 NK 효과기 세포가 본 발명의 구현예에 따라 표준 4시간 공-배양 후 K562 적백혈병 표적 세포에서 아포토시스를 유도할 수 있다는 것을 보여준다.

도 6은 본 발명의 구현예에 따라 NK 세포를 생성하는 과정을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 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.

[0033] 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.

[0034] 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" 및 "상에(on)"를 포함한다.

- [0035] 용어 "배아 줄기세포"(ES 세포)는 본 기술분야에서 사용되는 바와 같이 본원에 사용된다. 이 용어는 세포주로서 연속적으로 계대된 것을 포함하는, 배반포 또는 상실배의 내부 세포 덩어리로부터 유래한 세포를 포함한다. ES 세포는 정자를 이용한 난세포의 수정으로부터 뿐만 아니라 DNA, 핵전이, 단성생식을 이용하거나, HLA 영역에 동형접합성을 갖는 ES 세포를 생성시키는 수단에 의해서 유도될 수 있다. ES 세포는 또한 정자와 난자의 융합, 핵전이식, 단성생식, 융성발생, 또는 염색질의 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 기형종을 발생하는 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다.
- [0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "다분화능 줄기세포"는, 다분화능 줄기세포가 유도되는 방법에 관계없이, 배아 줄기세포, 배아 유래 줄기세포, 및 유도 다분화능 줄기세포를 포함한다. 다분화능 줄기세포는 기능적으로 (a) 면역결핍성(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 다분화능 줄기세포는, 예를 들어 본 기술분야에 알려진 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 예시적인 다분화능 줄기세포는 배반포 단계 배아의 ICM으로부터 유래된 배아 줄기세포뿐만 아니라 (임의로 배아의 나머지를 파괴하지 않고) 분열 단계 또는 상실배 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 다분화능 줄기세포는 인자의 조합(본원에서는 재프로그래밍 인자라 지칭함)을 발현시켜 체세포를 재프로그래밍함으로써 생성된 유도 다분화능 줄기세포(iPS 세포)를 포함한다. iPS 세포는 태아, 생후, 신생아, 유년기, 또는 성인 체세포를 이용하여 생성될 수 있다. 특정 구현예에서, 체세포를 다분화능 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 다분화능 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해 사용될 수 있는 인자는, 예를 들면, Oct 4, Sox2, 나노그, 및 Lin28의 조합을 포함한다. 다른 구현예에서, 체세포는 적어도 2 재프로그래밍 인자, 적어도 3개의 재프로그래밍 인자, 또는 4개의 재프로그래밍 인자를 발현시켜서 재프로그래밍된다. 유도 다분화능 줄기세포는 체세포에서 재프로그래밍 인자의 조합을 발현시켜서 생산될 수 있다. 특정 구현예에서, 적어도 2개의 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. 유도 다분화능 줄기세포는 체세포에서 재프로그래밍 인자의 단백질 전달에 의해 생산될 수 있다. 특정 구현예에서, 적어도 2개의 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.
- [0037] 다른 구현예에서, 추가 재프로그래밍 인자는 확인되고, 단독으로 또는 체세포를 다분화능 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해 하나 이상의 공지된 재프로그래밍 인자와 함께 사용된다. 유도된 다분화능 줄기세포는 기능적으로 정의되며 어떤 다양한 방법(통합 벡터, 비-통합 벡터, 화학적 수단 등) 중 어떤 것을 사용하여 재프로그래밍된 세포를 포함한다.
- [0038] 다분화능 줄기세포는 어떤 종으로부터라도 유래될 수 있다. 배아 줄기세포는, 예를 들어, 마우스, 비-인간 영장류의 다수의 종, 및 인간에서 성공적으로 유도되어 왔으며, 배아 줄기세포 유사 세포는 수많은 추가의 종으로부터 생성되어 왔다. 따라서, 본 기술분야의 숙련자라면, 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, 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.
- [0039] 유사하게, iPS 세포는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. iPS 세포는 마우스 및 인간 세포를 이용하여 성공적

으로 생성되어 왔다. iPS 세포는 배아, 태아, 신생아, 및 성인 조직을 이용하여 성공적으로 생성되어 왔다. 따라서, 임의의 종으로부터라도 그의 공여체 세포를 이용하여 iPS 세포를 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 iPS 세포를 생성할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 종은 멸종 위기에 처한 종이다. 특정 구현예에서, 상기 종은 현재 멸종된 종이다.

[0040] 유도 다분화능 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 섬유아세포, 예컨대 피부 샘플 또는 생검에 의해 얻은 피부 섬유아세포, 활액 조직으로부터의 활막세포, 포피 세포, 볼 세포, 또는 폐 섬유아세포를 포함한다. 비록 피부와 볼이 적절한 세포를 즉시 이용할 수 있고 손쉽게 획득할 수 있는 공급원을 제공하긴 하지만, 실질적으로는 어떤 세포라도 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 체세포는 섬유아세포가 아니다.

[0041] 용어 "혈관모세포" 및 "혈관-콜로니 형성 세포"는 본원에 걸쳐 상호교환적으로 사용될 것이다. 세포는 수많은 구조적 및 기능적 특징을 갖는다. 이들 세포의 특징 중에는 숙주에 투여시 골수 내로 생각하는 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(uni-potent)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.

[0042] 용어 "비-생작성 혈관모세포" 또는 "비-생작성 혈관 세포"는 본원에 걸쳐 혈관-콜로니 형성 세포의 특징 중 일부를 공유하는 세포의 집단을 지칭하고자 사용된다. 그러나, 비-생작성 혈관 세포는 면역결핍성 숙주에 투여되는 경우 골수 내에 정착하지 않는다는 점에서 구별될 수 있다. 이러한 차이에도 불구하고, 비-생작성 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-생작성 혈관 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착되어 있다. 다른 구현예에서, 비-생작성 혈관 세포는 하기 단백질 중 하나 이상(2, 3, 4개)을 발현하지 않는다: CD34, KDR, CD133, CD31. 이론에 얽매임이 없이, 비-생작성 혈관 세포는 혈관-콜로니 형성 세포보다 다소 더 수임적이며 다양한 조혈 세포 유형을 여전히 생산할 수 있는 별개의 줄기세포 세포 집단을 제공할 수 있다.

[0043] 본 발명자들은 인간 ESC로부터 면역요법 포텐셜을 갖는 세포를 생산하기 위해 시험관내 배양 시스템을 개발했다. 이 전략은 중간 세포 공급원으로서 hESC 유래된 혈액모세포의 사용을 수반한다는 점에서 종래기술과 상이하다. 본 발명자들은 영양세포 없는 배양 조건을 사용하여 혈액모세포의 자연 살해(NK) 및 수지상 세포(DC) 모두로의 분화에 관한 것일 수 있었다. 림프 계통을 통해 생기고 선천적인 면역계의 일부인 NK 세포는 어떤 유형의 종양 세포를 탐지하고 사멸시키는 것으로 발견된 바와 같이 항암 요법에서 사용될 수 있다. 대부분 골수성 계통(단핵구로부터)을 통해 생기고 적응가능한 면역계의 일부인 DC는 미접촉 및 기억 T 세포 모두에 제공하고 그것들을 자극하는 능력을 통해 항원 특이적 면역 반응을 향상시키기 위해 사용될 수 있다(예를 들면, DC 기반 백신 요법)

[0044] 다양한 활성화 및 억제 신호 사이의 상호작용은 사이토킨 방출, 자연 세포독성, 및 항체 의존 세포독성인 NK 세포의 3개의 주요 기능을 제어한다. H7 및 HuES-3 hESC 세포주 모두로부터 생성된 혈액모세포를 사용하여, 본 발명자들은 성숙 CD56low/-, CD16+ NK 세포를 생산할 수 있었고, 기질 영양세포층(feeder layer)의 사용을 필요로 하지 않는다는 것을 발견했다. 분화 과정은 혈액모세포 집단의 생산 및 팽창을 위한 사이토킨 및 성장 인자의 세트에 보충된 메틸셀룰로오스에서 배아체를 생성하기 위해 초기 4일 배양, 그 다음 10-14일 배양을 포함한다. 액체 배양 플러스 인간 혈청 및 사이토신의 각테일에서의 추가 14-21 일은, 유세포측정법에 의해 평가된 바와 같이 NK 세포의 분화를 허용한다. 51Cr 방출 검정과 유사한 비-방사성 세포독성 검정은, 이들 혈액모세포 유래된 NK 세포가, 표준 4시간 공-배양 후 표적 K562 적모세포 백혈병 세포에서 아포토시스를 효과적으로 유도할 수 있는 바와 같이 자연 세포독성 기능을 숨겨준다는 것을 보여준다. 중개 세포 공급원으로서 혈액모세포를 사용하면 시험관내에서 분화하기 위한 hESC의 능력 및/또는 효율을 향상시킬 수 있고, 중요하게는, 면역요법 포텐셜을

갖는 세포의 생산을 위한 영양세포 없는 시스템의 개발을 허용할 수 있다.

- [0045] 본 발명의 구현예에는 림프 계통 세포의 생성 방법을 제공한다. 다양한 구현예에서, 본 발명은 자연 살해 (NK) 세포의 생성 방법을 제공한다.
- [0046] 다양한 구현예에서, NK 세포의 생성 방법은 하기를 포함한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 메틸셀룰로오스 및 IL2, IL3, IL6, IL7, IL15, SCF 및 FL 상에 혈액모세포를 플레이팅하고 배양하는 단계; 상기 세포를 채집하는 단계; 및 인간 혈청, IL7, IL15, SCF 및 FL를 포함하는 액체 배지에서 상기 채집된 세포를 플레이팅/배양하는 단계.
- [0047] 다양한 구현예에서, 액체 배지는 매주 변한다. 다양한 구현예에서, 메틸셀룰로오스는 H4236 메틸셀룰로오스이다. 다른 구현예에서, 메틸셀룰로오스는 H4536 메틸셀룰로오스이다. 다양한 구현예에서, 사이토킨의 농도는 IL2 (5-10ng/ml), IL3 (1-10ng/ml), IL6 (1-10ng/ml), IL7 (5-20ng/ml), IL15 (5-10 ng/ml), SCF (10-50ng/ml), 및 FL (10-50ng/ml)이다. 다양한 구현예에서, 세포의 채집은 세포 배양 6-8일 후에 행해진다. 다양한 구현예에서, 세포는, 세포가 재플레이팅된 후 추가 14-21일 동안 배양된다. 다양한 구현예에서, 액체 배지는 α MEM 또는 DMEM:F12이다.
- [0048] 다른 구현예에서, 자연 살해 (NK) 세포의 생성 방법은 하기를 포함한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; IL2, IL3, IL6, IL7, IL15, SCF, 및 인간 혈청을 포함하는 액체 배지에서 상기 혈액모세포를 배양하는 단계; 상기 세포를 채집하는 단계; 및 인간 혈청, IL7, IL15, SCF 및 FL를 포함하는 액체 배지에서 상기 채집된 세포를 배양하는 단계.
- [0049] 다양한 구현예에서, 액체 배지는 매주 변한다. 상기과 유사하게, 다양한 구현예에서, 사이토킨의 농도는 IL2 (5-10ng/ml), IL3 (1-10ng/ml), IL6 (1-10ng/ml), IL7 (5-20ng/ml), IL15 (5-10 ng/ml), SCF (10-50ng/ml), 및 FL (10-50ng/ml)이다. 다양한 구현예에서, 세포의 채집은 세포 배양 6-8일 후에 행해진다. 다양한 구현예에서, 세포는 세포가 재플레이팅된 후 추가 14-21일 동안 배양된다. 다양한 구현예에서, 액체 배지는 α MEM 또는 DMEM:F12이다.
- [0050] 본 발명의 다양한 구현예는 본 발명의 방법에 의해 생성된 자연 살해 세포를 제공한다. 다양한 구현예에서, NK 세포는 본 발명의 방법에 의해 생성된 NK 세포의 양을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물에 제공된다.
- [0051] 본 발명의 다른 구현예는 수지상 세포 (DC)의 생성 방법을 제공한다. 일 구현예에서, DC를 생성하는 방법은 하기를 포함한다: 혈액모세포를 제공하는 단계; 인간 혈청, SCF, FL, IL3 및 GM-CSF를 포함하는 액체 배지에서 상기 혈액모세포를 플레이팅하고 배양하는 단계; IL4를 상기 액체 배지에 부가하는 단계; 및 추가로 세포를 배양하는 단계.
- [0052] 다른 구현예에서, 본 방법은 DC의 성숙을 유도하기 위해 IL1b, TNF α 및 IL6을 포함하는 사이토킨 콕테일을 부가하는 것을 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 사이토킨 콕테일은 PGE2, IFN α 2b, poly I:C, IFN γ 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 사이토킨을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 본 방법은 LPS, IFN γ 및/또는 S-28463을 부가하여 DC로부터의 IL12p70 생산 및/또는 DC로부터의 HLA-DR 발현을 자극하는 것을 추가로 포함한다.
- [0053] 다양한 구현예에서, 액체 배지는 6 내지 7일마다 변한다. 다양한 구현예에서 액체 배지는 α MEM 또는 DMEM:F12이다. 다양한 구현예에서, 세포는 7-11일 동안 배양된다. 다양한 구현예에서, IL4는, 세포가 7-11일 동안 배양된 후 부가된다. 다양한 구현예에서, 세포는 IL4의 부가 후에 추가 8-10일 동안 배양된다.
- [0054] 다양한 구현예에서, 인간 혈청, SCF, FL, IL3 및 GM-CSF의 농도는 인간 혈청 (10-20%), SCF (20-100ng/ml), FL (10-50ng/ml), IL3 (5-50 ng/ml) 및 GM-CSF (50-100 ng/ml)이다. 다른 구현예에서, IL4의 농도는 50-100 ng/ml이다. 다양한 구현예에서, IL1b, TNF α 및 IL6의 농도는 IL1b (10ng/ml), TNF α (10 ng/ml) 및 IL6 (150 ng/ml)이다. 다양한 구현예에서, PGE2, IFN α 2b, poly I:C, 및 IFN γ 의 농도는 PGE2 (1 μ g/ml), IFN α 2b (3000 유닛/ml), poly I:C (20 μ /ml), 및 IFN γ (20 ng/ml)이다.
- [0055] 혈액모세포로부터 수지상 세포를 생산하는 효율은 비교적 우수하기 때문에, DC를 갖는 미래의 다양한 신규 기능 검정을 위한 조건을 최적화하고 그 검정을 개발하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, DC 성숙 콕테일을 포함하는 성분을 변경하면 IL12p70 분비 검정을 개선할 수 있다. 성숙을 위한 6개의 상이한 사이토킨의 콕테일을 현재 사용하지만, LPS 및/또는 IFN γ 의 부가는 모세포 유래된 DC로부터 IL12p70 생산을 자극하기 위해 필요할 수 있다. 유사하게는, 합성 화합물인 S-28463은 IL12p70 생산 및 HLA-DR 발현 모두를 증가시키는데 도움을 줄 수 있

다.

- [0056] 본 발명의 다양한 구현예에는 본 발명의 방법에 의해 생성된 수지상 세포를 제공한다. 다양한 구현예에서, DC는 본 발명의 방법에 의해 생성된 DC의 양을 포함하는 약제학적으로 허용가능한 조성물에서 제공된다.
- [0057] 본 발명의 다양한 구현예에서, 혈액모세포는 하기를 포함하는 방법으로 얻을 수 있다: hESC를 제공하는 단계; 사이토킨을 포함하는 배지에서 상기 hESC를 배양하여 배아체 (EB)를 생성하는 단계; 상기 EB를 분해하는 단계; 개별 세포를 여과하는 단계; 상기 개별 세포를 TPO, VEGF, FL, 및 bFGF를 포함하는 메틸셀룰로오스에 씨딩하는 단계; 및 메틸셀룰로오스로부터 모세포 유사 세포를 채집하는 단계.
- [0058] 다양한 구현예에서 hESC는 먼저 4일 동안 배양된 후 EB를 분해한다. 다양한 구현예에서, 배아체를 생성하기 위한 사이토킨은 VEGF 및 BMP4를 포함한다. 다양한 구현예에서, VEGF 및 BMP4는 EB 형성 내내 사용된다. 다른 구현예에서, 배아체를 생성하기 위한 사이토킨은 bFGF를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, bFGF는, hESC 배양 첫 번째 2일 후에 추가된다. 다양한 구현예에서, EB의 분해는 EB를 트립신으로 분해하고 그 다음 트립신을 혈청 함유 배지로 불활성화시키는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 트립신은 0.05%이다. 다양한 구현예에서, 개별 세포의 여과는 40 μ M 세포 여과기를 통해 개별 세포를 여과하는 것을 포함한다. 다양한 구현예에서, 메틸셀룰로오스는 H4436 또는 H4536 메틸셀룰로오스이다. 다양한 구현예에서 사이토킨의 농도는 TPO (50 μ g/ml), VEGF (50 μ g/ml), FL (50 μ g/ml), 및 bFGF (20-50 μ g/ml)이다. 다양한 구현예에서, 모세포 유사 세포는 6일 내지 10일에 메틸셀룰로오스로부터 채집된다.
- [0059] NK 세포를 생성하는데 사용하기 위한 혈액모세포를 제조하는 것과 같은 특정 구현예에서, 메틸셀룰로오스는 추가 사이토킨을 포함할 수 있다. 이들 추가 사이토킨은 IL2, IL7, IL15 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 다양한 구현예에서, 이들 사이토킨의 농도는 IL2 (1-10 μ g/ml), IL7 (1-20 μ g/ml), 및 IL15 (1-10 μ g/ml)이다. 다양한 구현예에서, 메틸셀룰로오스 배양은 50,000 내지 150,000 세포/ml의 농도에서 플레이팅된다.
- [0060] 특정 구현예에서, 혈액모세포는 에리트로포이에틴 없는 메틸셀룰로오스에서 생성된다. 일 구현예에서, 에리트로포이에틴 없는 메틸셀룰로오스는 H4536 메틸셀룰로오스이다.
- [0061] 대안적인 구현예에서, 다분화능 줄기세포 (iPS 세포 및 인간 iPS 세포 포함)는 hESC 대신에 사용된다. 다른 구현예에서, 혈액모세포는 비-생착 혈액모세포일 수 있다.
- [0062] 그 전체 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.
- [0063] 다양한 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 치료적 유효량의 자연 살해 세포 또는 수지상 세포와 함께 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. "약제학적으로 허용가능한 부형제"는 일반적으로 안정하고, 비독성이며 바람직한 약제학적 조성물의 제조에 유용한 부형제를 의미하고, 수의 용도뿐만 아니라 인간 약제학적 용도에 허용가능한 부형제를 포함한다. 그와 같은 부형제는 고체, 액체, 반고체, 또는, 에어로졸 조성물의 경우에는 기체일 수 있다.
- [0064] 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 어떤 투여 경로를 통한 전달을 위해 제형될 수 있다. "투여 경로"는 에어로졸, 코, 경구, 경점막, 경피 또는 비경구를 비제한적으로 포함하는 당해 기술에 공지된 어떤 투여 경로를 의미한다.
- [0065] "비경구"는, 안와내, 주입, 동맥내, 피막내, 심장내, 피부내, 근육내, 복강내, 폐내, 척수내, 흉골내, 척추강내, 자궁내, 정맥내, 지주막하, 피막밑, 피하, 경점막, 또는 경기관지를 포함하는, 일반적으로 주사와 연관된 투여 경로를 의미한다. 비경구 경로를 통해, 조성물은 주입 또는 주사를 위해 용액 또는 서스펜션의 형태, 또는 동결건조 분말일 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 어떤 약제학적으로 허용가능한 담체를 또한 함유할 수 있다. "약제학적으로 허용가능한 담체"는, 본 명세서에 사용된 바와 같이 하나의 조직, 기관, 또는 신체의 일부로부터 다른 조직, 기관, 또는 신체의 일부까지의 관심 화합물을 전달 또는 이동시키는 것을 수반하는 약제학적으로 허용가능한 물질, 조성물, 또는 비히클을 의미한다. 예를 들면, 담체는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매, 또는 캡슐화 물질, 또는 이들의 조합일 수 있다. 담체의 각 성분은 제형의 다른 성분과 양립할 수 있어야 한다는 점에서 "약제학적으로 허용가능한"이어야 한다. 어떤 조직 또는 접촉할 수 있는 기관과 접촉해서 사용하기에 또

한 적합해야 하고, 이는 독성, 자극, 알러지 반응, 면역원성, 또는 치료 이점보다 지나치게 큰 어떤 다른 합병증의 위험을 갖지 않아야 한다는 것을 의미한다.

[0067] 실시예

[0068] 하기 실시예는 청구된 발명을 더 잘 설명하기 위해 제공되고, 본 발명의 범위의 한정으로서 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 또는 반응물을 개발할 수 있다.

[0069] 실시예 1

[0070] 초기 분화

[0071] 세포 유형 모두에 대한 초기 분화 과정은 동일하고, 배아체 (EB)를 생성하기 위해 스템라인(Stemline) II (Sigma) 플러스 사이토킨에서 hESC의 4일 배양을 포함한다. 사이토킨, VEGF 및 BMP4는 EB 배양 내내 사용되고, 한편 bFGF는 첫 번째 2일 후 추가된다. 총 4일 후, 수득한 EB는 0.05% 트립신으로 분해되고, 그 다음 트립신은 혈청 함유 배지로 불활성화된다. 개별 세포는 40 μ M 세포 여과기를 통해 순차적으로 여과되고, 카운팅되고, 추가 사이토킨, 예컨대 TPO (50 μ g/ml), VEGF(50 μ g/ml), FL (50 μ g/ml) 및 bFGF (20-50 μ g/ml)를 함유하는 H4436 또는 H4536 메틸셀룰로오스 (줄기세포 기술)로 씨딩된다. NK 분화에 대해, 사이토킨 IL2 (1-10 μ g/ml), IL7 (1-20 μ g/ml), 및/또는 IL15 (1-10 μ g/ml)은 또한, 이 단계에서 추가될 수 있다. 메틸셀룰로오스 배양은 혈액모세포 집단의 생산 및 팽창을 위해 50,000 내지 150,000 세포/ml의 농도에서 플레이팅된다. 모세포 유사 세포는 6 내지 10일째 메틸셀룰로오스로부터 채집되고, 하기 과정 중의 하나에 의해 추가 분화된다.

[0072] 실시예 2

[0073] NK 분화

[0074] 모세포는 H4236 메틸셀룰로오스 플러스 IL2 (5-10ng/ml), IL3 (1-10ng/ml), IL6 (1-10ng/ml), IL7 (5-20ng/ml), IL15 (5-10ng/ml), SCF (10-50ng/ml), 및 FL (10-50ng/ml)에서 또는 동일한 사이토킨 및 10-20% 인간 혈청을 함유하는 액체 배양에서 재플레이팅될 수 있다. 6-8일 배양 후, 세포는 채집되고, 액체 배지 (α MEM 또는 DMEM:F12) 플러스 10-20% 인간 혈청 및 사이토킨 IL7 (5-20ng/ml), IL15 (5-10ng/ml), SCF (10-50ng/ml), 및 FL (10-50ng/ml)에서 추가 14-21일 동안 재플레이팅된다. 매주의 배지 변화는 새로운 사이토킨 콕테일을 새롭게 하기 위해 사용된다.

[0075] 유세포분석법은 면역표현형의 세포 및 NK 세포 표면 마커의 획득을 평가하기 위해 분화 과정 내내 간헐적으로 사용된다. 세포 표면 마커는 CD34, CD45, CD56, CD16, CD94, NKG2D, CD3, CD7, CD4, CD8a, 및 CD45RA를 포함한다. 혈액모세포 유래된 NK 세포의 기능을 검사하기 위한 시험은 하기를 포함한다: (1) K562 적백혈병 표적 세포를 사용하는 자연 세포독성 검정, (2) IL12 /IL18에 반응하는 IFN γ 생산 또는 포르볼(phorbol) 미리스테이트 아세테이트 처리, (3) 페르포린 및 그란자임 B 효소의 존재 동안의 세포내 유세포측정법, 및 (4) 라지(Raji) 세포 및 항-CD20 항체를 사용하는 항체 의존 세포독성 검정.

[0076] 지금까지, 본 발명자들은 H7 및 HuES3 hESC 모두로부터 NK 세포를 생성할 수 있었다. ⁵¹Cr 방출 검정과 유사한 비-방사성 세포독성 검정은, 본 발명의 혈액모세포 유래된 NK 세포가, 표준 4시간 공-배양 후 표적 K562 적모세포 백혈병 세포에서 아포토시스를 효과적으로 유도할 수 있는 바와 같이 자연 세포독성 기능을 숨겨준다는 것을 보여준다.

[0077] 실시예 3

[0078] DC 분화

[0079] 모세포는 액체 배지 (α MEM 또는 DMEM:F12) 플러스 10-20% 인간 혈청 및 사이토킨, SCF (20-100 ng/ml), FL (10-50ng/ml), IL3 (5-50 ng/ml), 및 GM-CSF (50-100 ng/ml)에서 플레이팅된다. 7-11일 배양 후, IL4 (50-100 ng/ml)은 배양에 또한 추가되고, 세포는 추가 8-10일 동안 성장이 허용된다. 배지 변화는 6-7일마다 수행된다. 추가 사이토킨 콕테일 (10ng/ml IL1b, 10 ng/ml TNF γ , 150 ng/ml IL6)은 DC의 성숙을 유도하기 위해 48시간 동안 배양에 추가될 수 있다.

[0080] 유세포분석법은 면역표현형의 세포 및 DC 표면 마커의 획득을 평가하기 위해 분화 과정 내내 간헐적으로 사용된다. 세포 표면 마커는 CD11c, CD209 (DC-SIGN), HLA ABC (MHC 제1급), HLA DR (MHC 제2급), CD1a, 및 CD14를

포함한다. 성숙은 T 세포 공-자극 수용체, CD83의 획득에 의해 평가되고, 한편 CD209, HLA DR, 및 CD11c의 발현은 성숙 시에 또한 증가될 수 있다. 추가 사이토킨, 예컨대 1 µg/ml PGE2, 3000 유닛/ml IFN α 2b, 20 µg/ml poly I:C, 또는 IFN γ 20 ng/ml는 어떤 검정에서 DC 기능적 반응을 향상시키기 위해 성숙 각테일에 부가될 수 있다. 혈액모세포 유래된 DC의 기능성을 평가하기 위한 검정은 하기를 포함한다: (1) DQ-난백알부민 (BD Biosciences) 처리를 통한 항원 섭취, (2) 화학유인물질, MIP-3b에 반응하는 트랜스웰(transwell) 이동, (3) HLA-미스매치된 T 세포의 증식을 증가시키기 위해 DC의 능력을 측정하기 위한 동종유도 혼합 림프구 반응 검정, (4) DC 자극 시 IL12-p70 분비, 및 (5) 항원 로딩된 DC가 이전의 항원 준비된 말초 혈액 단핵 세포에서 IFN γ 생산을 유도할 수 있는지를 측정하기 위한 항원 제공 검정.

[0081] 본 발명자들은 HuES3 및 MA01 hESC 모두로부터 DC를 생성할 수 있었다. 48시간 성숙 사이토킨 각테일에 반응하는 CD83, HLA-DR, CD11c, 및 CD209의 상향조절이 관찰되었다. 이들 DC는 30 분 검정에서 DQ-난백알부민을 섭취하고 단백질을 분해할 수 있다는 것이 발견된다.

[0082] 실시예 4

[0083] 혈액모세포 성장 조건의 변경

[0084] 상기 NK 및 DC 분화 과정은 H4436 메틸셀룰로오스에서 성장된 혈액모세포를 사용하여 수행되었다. 그러나, 줄기 세포 기술로부터의 에리트로포이에틴 없는 메틸셀룰로오스인 H4536은 또한, 혈액모세포를 생성하기 위해 효율적으로 사용될 수 있다. 이들 "에포 마이너스(epo minus)" 혈액모세포는 최초 "에포 플러스(epo plus)" 모세포와 아주 유사하고; 다양한 조혈모세포 및 혈관 세포 유형으로 분화할 수 있다. 예비 결과는, H4536의 사용이 혈액모세포의 다양한 조혈모세포 계통 (NK 세포 및 DC 포함)으로의 분화를 위해 H4436 메틸셀룰로오스에 대한 유의미한 이점을 제공할 수 있다는 것을 암시한다. 모세포 성장 배지에서 에포의 부재는 적혈구 마커 CD235a를 발현시키는 세포의 백분율을 감소시키고, CD34, CD45, 및 CD41a를 발현시키는 세포의 백분율을 증가시키는 것으로 발견되었다. 세포 표면 마커 발현에서의 차이에 기인하여, "에포-마이너스" 성장 조건은 골수성 및/또는 림프계통 아래로 분화를 향상시킬 수 있다.

[0085] 실시예 5

[0086] iPS 세포로부터의 MK의 생성

[0087] OP9 공-배양 시스템을 사용하여, 본 발명자들은, MK가 iPS 세포로부터 생성될 수 있다는 것을 보여준다. 몇천 개의 CD41a+ MK는 몇십 만개의 iPS 세포로부터 생성되었다.

[0088] 실시예 6

[0089] 인간 ESC로부터의 NK 세포 분화

[0090] 분화 과정은 하기와 같이 수행되었다:

[0091] H7 ESC는 배아체 (EB)로 4일 동안 분화되었다. EB는 혈액모세포 생산 및 팽창을 위해 10-15일 동안 채집되고 사이토킨 풍부한 메틸셀룰로오스로 이동되었다. 혈액모세포는 채집되고, 3-4일마다 배지의 반 변화와 함께 추가 14-17일 동안에 사이토킨의 패널과 함께, 영양세포 없는 액체 배양 배지 플러스 10-20% 인간 AB 혈청에 두었다.

[0092] 면역아형검사 (유세포측정법 사용):

[0093] 미성숙 NK 세포는 CD56bright, CD16lo, KIRlo, CD117+, CD94-, NKG2D+였다. 상기 과정의 변동을 사용하여, 분화의 32일 후의 생존 세포의 20-30%는 CD56+ CD16-였다. 성숙 NK 세포는 CD56dim, CD16hi, KIRhi, CD117lo/-, CD94+, NKG2D+였다. 상기 과정을 사용하여, 분화의 31일 후의 생존 세포의 20%는 CD56-CD16+였고, 그것의 5%는 CD56loCD16+였다.

[0094] 기능 검정:

[0095] 자연 세포독성: 성숙 NK 세포는 표적 세포, 예컨대 인간 K562 적백혈병, MCF7, U87, PC3, NTERA2 세포의 아포토시스를 도출할 수 있다. "3FC" 검정은 세포독성의 효율을 평가하기 위해 사용된다. 그 검정은 51Cr 방출 검정과 유사하지만, 방사능을 필요로 하지 않는다. 참조 Derby et al., Immunol. Letters 78: 35-39 (2001). 상기 기재된 성숙 NK 세포 (항목 B2-a)의 이종 집단은 표준 4시간 실험에서 K562 세포의 65-70%에서 아포토시스를 도출한다는 것이 발견되었다.

[0096] 항체 의존 세포 매개된 세포독성 (ADCC): NK 세포 표면 상의 FcγRIII (CD16)는 표적 세포에 부착된 항-CD20 항

체의 fc 영역에 결합하고, ADCC를 유도한다. (버킷(Burkett) 림프종으로부터 유래된) 라지(Raji) 세포는 항-CD20 항체와 함께 예비인큐베이션되고, ADCC 검정에서 표적으로서 사용된다. (Tsirigotis et al., J of Steroid Biochem and Mol Bio 108: 267-271 (2008)).

[0097] IFN γ 사이토킨 생산: 미성숙 NK 세포는 PMA (포르볼 미리스테이트 아세테이트) 플러스 아이오노마이신 또는 IL12 플러스 IL18와 함께 밤새 처리에 반응하여 다량의 IFN γ 를 생산한다. IFN γ 분비는 브레펠딘(brefeldin) a 로 차단되고, 세포는 세포내 유세포측정법을 사용하여 세포 표면 마커 및 IFN γ 를 위해 염색된다. 참조 Woll et al. J. of Immunol. 175: 5095-5103 (2005).

[0098] 이중이식 마우스 모델을 사용하는 NK 세포의 생체내 면역요법 잠재력: 생물발광 (루시페라제 함유) K562 세포는 종양의 성장을 위해 NOD/SCID 마우스에 주사되고, 그 다음, NK 세포의 볼러스(bolus) 및 IL2 및 IL15의 매일 IP 주사가 수행된다. 생물발광 이미징화는 생체내 NK 면역요법 잠재력을 경시적으로 모니터링하기 위해 사용된다. 참조: Woll et al. Blood 113 (24): 6094-6101 (2009).

[0099] 실시예 7

[0100] 골수 재모집 세포로서 혈액모세포를 사용하거나 그 세포를 수지상, 자연 살해, T 세포, 및/또는 간엽 줄기세포(MSC)로 분화시켜, 본 발명자는 암, HIV, 및/또는 자가면역 질환과 싸우기 위해 대규모, 효과적인 세포 기반 요법을 생산할 수 있다. 본 발명자들은 40-55% 효율과 함께 hESC 및 iPS 세포 모두로부터 수지상 세포(DC)의 분화를 달성할 수 있었다. 2개의 신규 기능 검정 외에 인간 골수로부터 유래된 DC에 대한 상호 비교는, hESC 유래된 DC가 인간 BM 유래된 DC와 많은 비교가능 특성을 공유한다는 것을 이제 입증했고, 또한 추가 최적화를 필요로 하는 면적을 확인했다. 자연 살해 세포 분화를 위해, 인간 골수 유래된 NK 세포에 대한 상호 비교는, 시험관내 NK 세포 분화가, 골수 세포 공급원을 사용할 때에도 아주 효율적이지는 않다는 것을 입증했다. 본 발명자들은, 모세포 유래된 NK 세포가 자연 세포독성 능력을 나타낸다는 것을 발견했다. 항체 의존 세포독성 검정이 수행된다. T 세포 분화에 대해, 본 발명자들은 노치(Notch) 신호전달을 자극하기 위해 인간 델타-리간드 발현 OP9 적혈구 세포주를 성공적으로 만들었고, 혈액모세포의 T 세포 분화를 자극하기 위해 이 적혈구 세포주를 사용한다.

[0101] 혈액모세포 유래된 수지상 세포 (40-55% 효율)

[0102] 세포 표면 마커: CD11c, 45, 209는 모세포 유래된 DC 및 인간 골수 유래된 DC에 대한 비교가능 발현을 보여주고, 한편 HLA-DR는 인간 BM DC 상에서보다 모세포 DC 상에서 훨씬 낮은 수준으로 발현된다.

[0103] (항원 섭취 및 이동 검정에 대해 이전에 보고된) 기능 검정. IL12-p70 분비: IL12p70는 CD4+ T 세포로부터 Th1 지도된 반응을 도출하기 위해 성숙 DC에 의해 분비된다. 인간 BM 유래된 DC는 >500pg/ml의 IL12p70를 생산할 수 있지만, 모세포 유래된 DC는 성숙시 어떤 검출가능 IL12p70를 생산하지 않았다. 혼합 림프구 반응(MLR) 검정: MLR 검정은 동종유도 T 세포의 증식을 자극하기 위해 DC의 능력을 측정한다. 제대혈 단핵 세포(T 세포를 포함하는 CBMC)는 형광 표지된 반응군으로서 사용되고, 그의 증식은 미성숙 또는 성숙 모세포 유래된 DC로 4-5일 공배양 후에 측정되었다. 예비 결과는, 반응군 세포가 성숙(m)DC에 반응하여 증식한다는 것을 보여준다.

[0104] 혈액모세포 유래된 자연 살해 세포: 세포 표면 마커 CD45, CD7, CD94, CD56, CD16, 및 NKG2D는 모세포 유래된 및 인간 골수 유래된 NK 세포에서 평가되었다.

[0105] NK 분화 효율: 재조합 인간 Sox7 단백질은 NK 분화를 위해 CD34+ 개시 전구체의 풀(pool)을 증가시키기 위한 능력에 대해 연구되었다. 결과는, rhSox7이 CD34+ 세포의 %에 극적으로 영향을 주지 않는다는 것을 암시한다. 쥘과 AFT024는 NK 세포 분화를 위해 중요 세포-세포 접촉 및 분비된 인자를 제공할 수 있는 적혈구 영양세포층으로서 연구되었다. 세포 표면 마커 발현에 의해 나타난 바와 같이, AFT024 적혈구 공-배양은 인간 BM 또는 모세포의 NK 분화를 향상시키지 않았다.

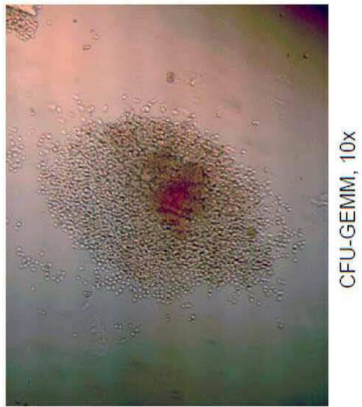
[0106] 혈액모세포 유래된 T 세포: 노치 신호전달은 T 세포 분화에 대해 결정적이다. 그것으로서, 인간 델타 유사 리간드 1(hDLL1)에 대한 cDNA는 MSCV-ires-GFP 기반 레트로바이러스 벡터로 클로닝되었고, OP9 적혈구 세포를 감염시키기 위해 수득한 바이러스 상청액을 사용한다. 바이러스 통합시, OP9 세포는 그의 세포 표면 상에 hDLL1를 발현시킬 것이고, gfp 양성일 것이다. FACS 기반 분류는 감염된 OP9 세포의 이중 풀로부터 최고 gfp-양성 세포를 정제하기 위해 사용되었다. 이들 OP9-hDLL1S (분류를 위해 "S")는 팽창되었고, 특성화되었다. Q-RT-PCR, 면역형광, 및 유세포측정법 모두는 이들 세포에서 hDLL1 단백질의 발현을 입증한다.

[0107] 실시예 8

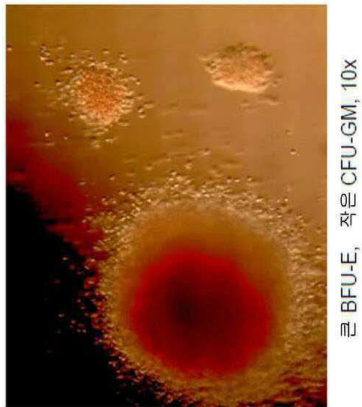
- [0108] 제대혈 및 말초 혈액 단핵 세포 모두는 반응군으로서 사용되고, 본 발명자들은 양성 대조군 효과기로서 인간 골수 유래된 DC를 사용한다.
- [0109] E4BP4 NK 계통 개발을 위해 중요한 것으로 보였고 (참조 Gascoyne et al. Nature Immunology 10(10): 1118-1125, 2009), 더 효율적인 시험관내를 위해 필요한 전사 프로그램을 제공할 수 있다.
- [0110] NK 세포 분화. 본 발명자들은 혈액모세포에서 과발현을 위해 E4BP4 cDNA를 레트로바이러스 벡터로 클로닝하고, NK 분화를 증가시키는 능력을 평가한다. RT-PCR은 다양한 KIR 수용체 아이소형 및 효소, 페르포린 및 그란자임 B (이들은 NK 세포 기능성을 위해 중요하다)의 발현을 모니터링하기 위해 사용된다. 기능 검정을 위해, 본 발명자들은, 모세포 유래된 NK 세포가 자연 세포독성을 나타내고, 이로써 그의 항체 의존 세포독성 (ADCC) 능력이 평가된다는 것을 보여주었다. ADCC 검정을 위한 필요 반응자(reagent)는 버킷(Burkitt) 림프종 유래된 라지(Raji) 세포 및 항-CD20 항체를 포함한다. CD20 마킹된 라지 세포와 NK 세포와의 공-배양은 유세포분석 수단을 통해 모니터링될 특이적 ADCC 반응을 도출해야 한다.
- [0111] NK 참조문헌:
- [0112] 1. Woll, P, et al. J.of Immunology. 175: 5095-5103 (2005).
- [0113] 2. Woll, P et al. Blood113(24):6094-101 (2009).
- [0114] 3. Bordoni et al. Hepatology 39: 1508-1516 (2004).
- [0115] 4. Tabatoabaei-Zavareh et al. PLOS One Issue 2, e232 (2007).
- [0116] 5. McCullar, V et al. Exp. Hematology 36(5): 598-608 (2008).
- [0117] 6. Freud, AG et al. Immunity 22:295-304 (2005).
- [0118] 7. Yu, H et al. Blood 92 (10): 3647-3657 (1998).
- [0119] DC 참조문헌:
- [0120] 1. Su et al. Clinical Cancer Research 14(19): 6207-6217 (2008).
- [0121] 2. Tseng et al. Regenerative Medicine 4(4): 513-526 (2009).
- [0122] 3. Bandi et al. AIDS Research and Therapy 5:1 (2008). (open-access)
- [0123] 4. Slukvin, II et al. J of Immunology 176: 2924-2932 (2006).
- [0124] 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 분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 통상적이고 관습적인 의미로 갖는다는 것이 본 발명자들의 의도이다.
- [0125] 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.
- [0126] 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).

도면

도면1abc



B



A



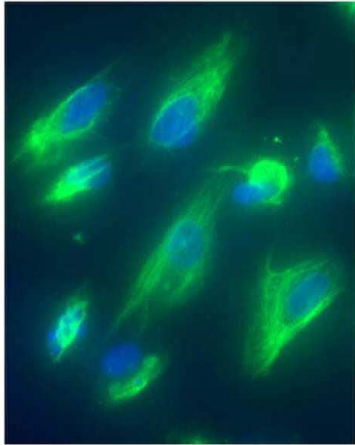
C

도면1d



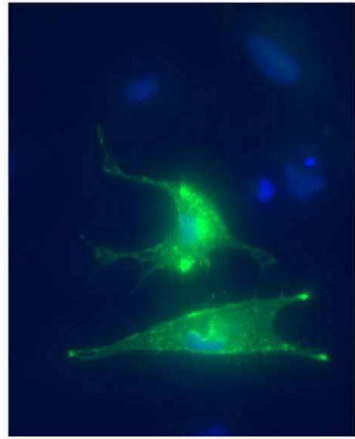
D

도면1ef



내피세포 파생물,
CD31-FITC, dapi, 40x

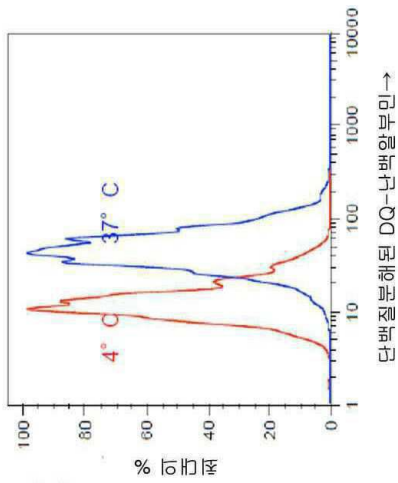
F



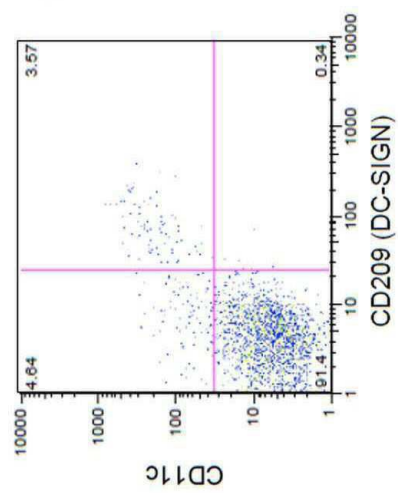
내피세포 파생물,
VE-카드헤린-FITC, dapi, 40x

E

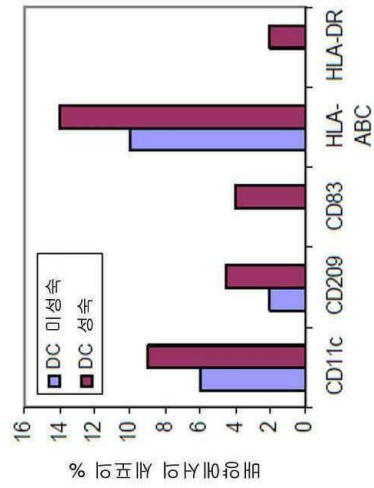
도면2abc



C

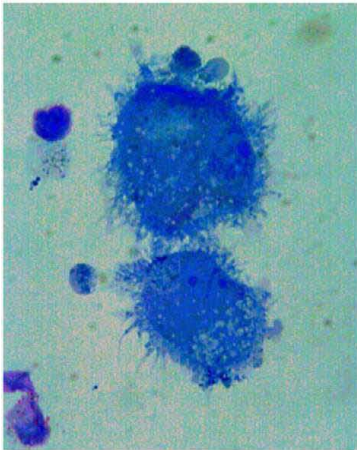


A

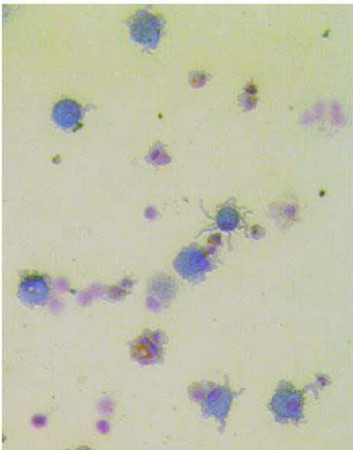


B

도면2de

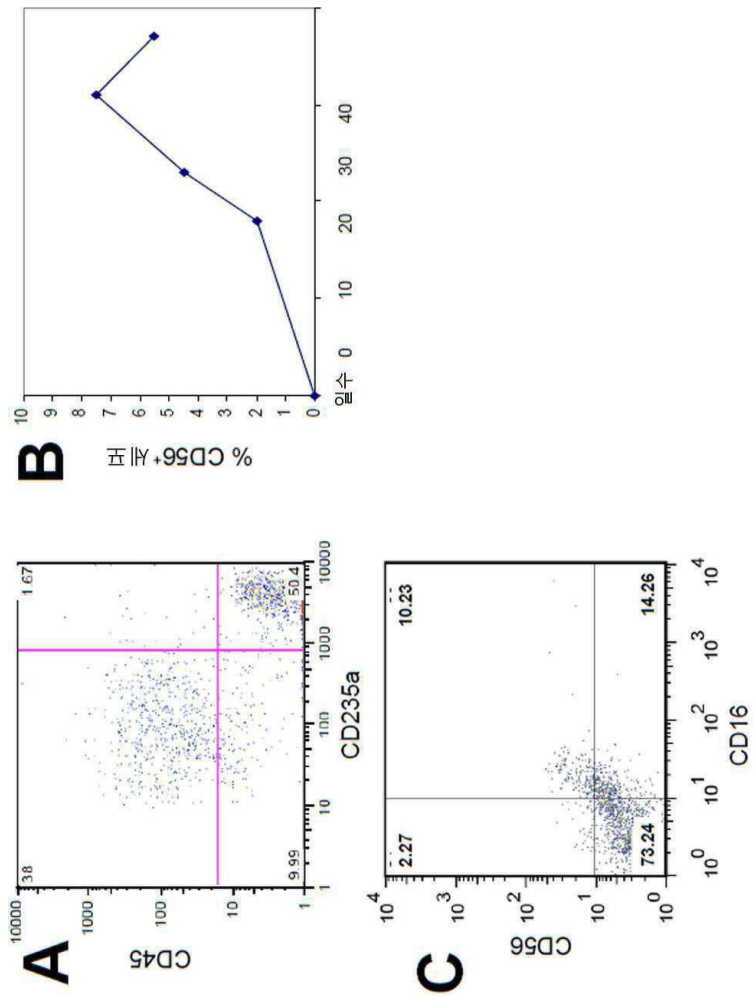


E

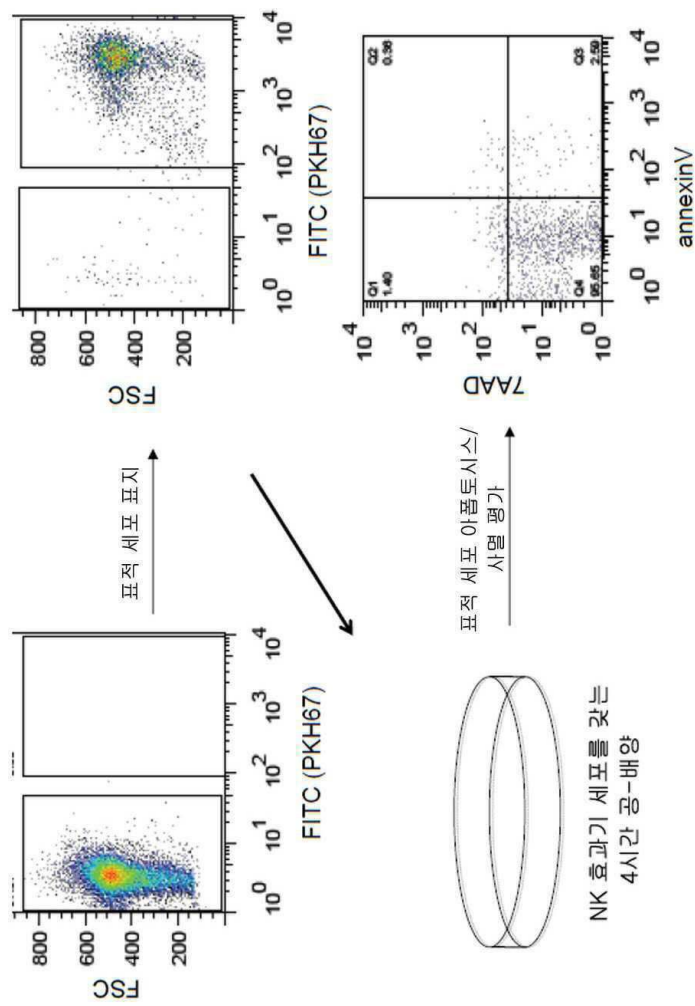


D

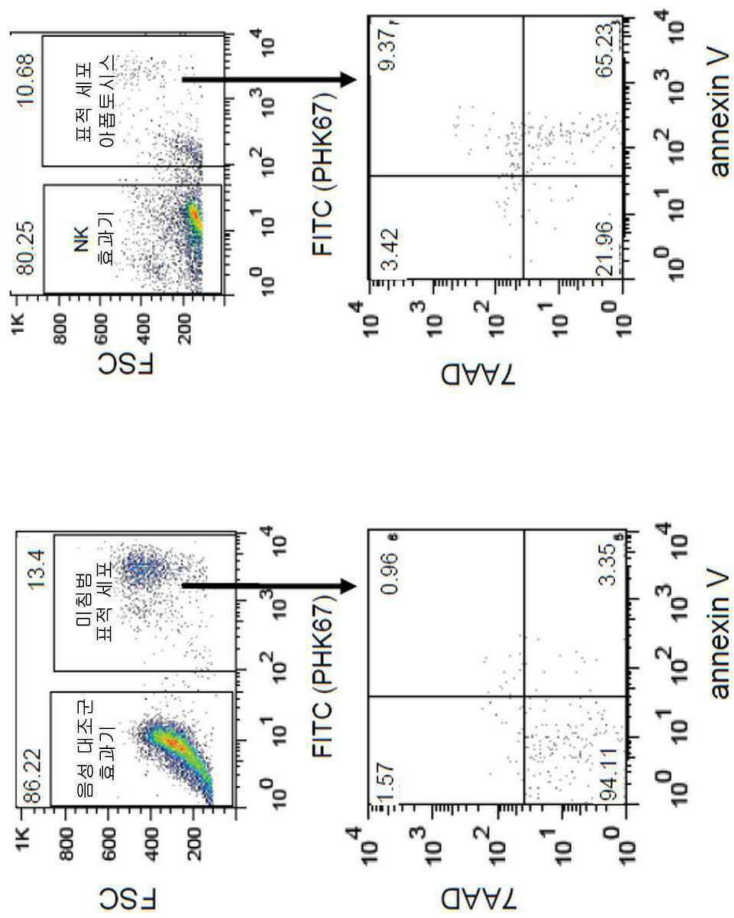
도면3abc



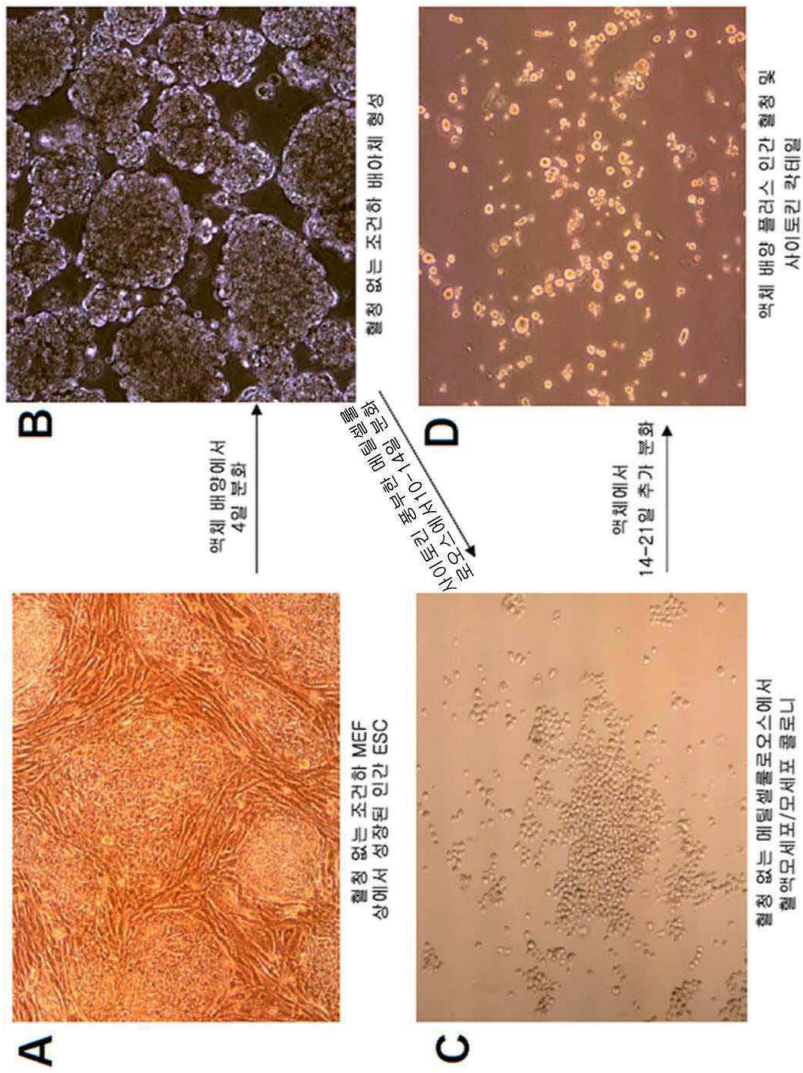
도면4



도면5



도면6abc



도면6de

