



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월01일
(11) 등록번호 10-1803562
(24) 등록일자 2017년11월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) C07K 14/475 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 출원번호 10-2010-7027292
(22) 출원일자(국제) 2009년05월06일
심사청구일자 2014년05월02일
- (85) 번역문제출일자 2010년12월03일
(65) 공개번호 10-2011-0006705
(43) 공개일자 2011년01월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2009/043050
(87) 국제공개번호 WO 2009/137629
국제공개일자 2009년11월12일
- (30) 우선권주장
61/126,803 2008년05월06일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
W02007120811 A2
- (73) 특허권자
아스텔라스 인스티튜트 포 리제너러티브 메디슨
미국 01752 매사추세츠주 말보로우 로크 드라이브 33
- (72) 발명자
란자, 로버트
미국 01510 매사추세츠주 클린톤 사우쓰 메도우 로드 35
루, 쉬-지앙
미국 01545 매사추세츠주 쉬류즈버리 베가 드라이브 22
- (74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 9 항

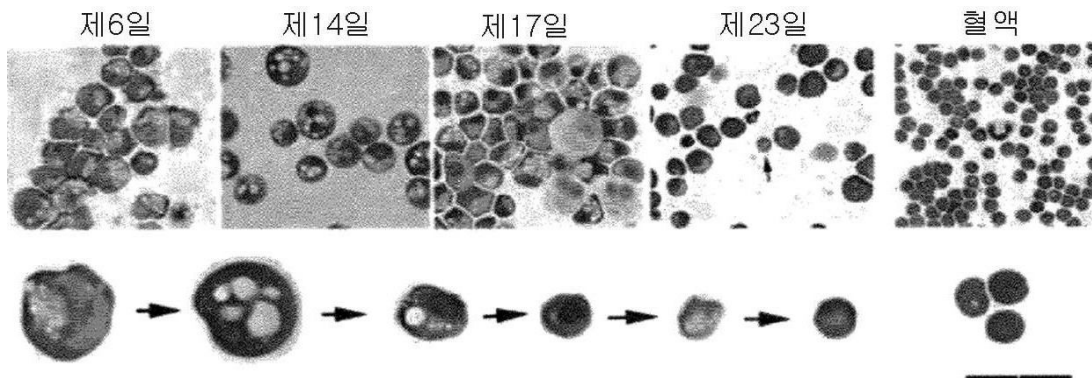
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 다능성 줄기세포로부터 유도된 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 다능성 줄기세포를 사용하여 탈핵 적혈구계 세포를 생성시키는 방법을 제공한다. 이 방법은 대량의 세포의 생산을 가능하게 한다. 기술된 방법에 의해서 수득된 세포는 다양한 연구, 임상 및 치료학적 적용을 위해서 사용될 수 있다. 본 발명에는 또한, 거핵구 및 혈소판을 생성시키는 방법도 제공된다.

대표도



(30) 우선권주장

61/189,491 2008년08월19일 미국(US)

61/190,282 2008년08월26일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 다능성(pluripotent) 줄기세포를 시험관 내 제공하고;

상기 인간 다능성 줄기세포를 적어도 골형성 단백질 4 (BMP4) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 포함하는 무혈청 배지 내에서 배양하여 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포(non-engrafting hemangio cell) 또는 블라스트 세포(blast cell)로 분화시키고;

상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 OP9 기질 세포 또는 인간 간엽 줄기세포(MSCs)와 함께 배양함으로써 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 것을 포함하는, 인간 다능성 줄기세포 유래 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법으로서,

상기 인간 다능성 줄기세포, 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포, 블라스트 세포, OP9 기질 세포 및 인간 간엽 줄기세포는 상기 방법 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장하는 것인,

인간 다능성 줄기세포 유래 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포가 상기 탈핵 적혈구계 세포로 분화되기 전에 증량되는 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 인간 다능성 줄기세포의 상기 혈관아세포로의 분화가, (a) 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체(embryoid bodies)로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 제1 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; 및 (b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내에서 상기 인간 혈관아세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 2 개의 제2 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 시험관 내에서 수행되며,

상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관아세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내

에서 성장되고,

상기 단계 (b)에서 상기 적어도 2 개의 제2 성장 인자는 BMP4 및 VEGF를 포함하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 인간 다능성 줄기세포의 상기 혈관아세포로의 분화가, (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 인간 혈관아세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 추가의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며,

상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관-콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장되는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

청구항 1에 있어서, 상기 인간 다능성 줄기세포의 상기 탈핵 적혈구계 세포로의 분화가, 상기 인간 다능성 줄기세포를 EPO를 포함하는 배양 배지 내에서 배양하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

인간 다능성(pluripotent) 줄기세포를 시험관 내 제공하고;

상기 인간 다능성 줄기세포를 적어도 골형성 단백질 4 (BMP4) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 포함하는 무혈청 배지 내에서 배양하여 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포(non-engrafting hemangio cell) 또는 블라스트 세포(blast cell)로 분화시키고;

상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 EPO를 포함하는 배지 내에서 배양함으로써 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 것을 포함하는, 인간 다능성 줄기세포 유래 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법으로서,

상기 인간 다능성 줄기세포, 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포, 및 블라스트 세포는 상기 방법 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장하는 것인,

인간 다능성 줄기세포 유래 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법.

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

청구항 32에 있어서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포가 상기 적혈구계 세포로 분화되기 전에 증량되는 방법.

청구항 39

삭제

청구항 40

청구항 32에 있어서,

상기 인간 다능성 줄기세포의 상기 혈관아세포로의 분화가, (a) 상기 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 제1 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; 및 (b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내에서 상기 인간 혈관아세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 2 개의 제2 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법에 의해 시험관 내에서 수행되며,

상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관아세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장되고,

단계 (b)에서 상기 적어도 2 개의 제2 성장 인자는 BMP4 및 VEGF를 포함하는 방법.

청구항 41

청구항 40에 있어서,

상기 인간 다능성 줄기세포의 상기 혈관아세포로의 분화가, (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 인간 혈관아세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 추가의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며,

상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관-콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장되는 방법.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다능성 줄기세포로부터 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는데 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명에서의 모든 문헌은 마치 각각의 개별적인 문헌 또는 특허출원이 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것을 나타내는 것과 같이 동일한 정도로 참고로 포함된다. 이하의 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 이것은 본 발명에 제공된 모든 정보가 현재 청구된 발명에 대한 선행기술이거나 그와 관련된 것이라거나, 구체적이거나 암시적으로 참고한 모든 문헌이 선행기술임을 자인하는 것은 아니다.

[0003] 수혈을 위한 가용 혈액에 대한 중대한 필요성이 있다. 적십자 및 그 밖의 다른 혈액 공급자들은 거의 항상 혈액의 부족을 보고한다. 이것은 독특한 혈액형을 갖는 환자, Rh+인 환자에 대해서나, 대규모의 사상자를 발생시키는 사고 또는 재해 이후에 특히 그러하다. 추가로, 전쟁 시에 군대는 외상성 전쟁 관련된 상처의 치료에 사용하기 위한 가용 혈액에 대한 심각한 필요성을 갖는다. 본 발명은 혈액 은행 및 수혈 시에 사용하기 위한 개선된 방법 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 세포 및 방법은 혈액 공여에 대한 전통적인 의존을 넘어서는 안전하고 신뢰할 수 있는 진보를 제공할 것이며, 가용 혈액에 대한 중대한 부족을 예방하는 것을 도와줄 것이다.

발명의 내용

[0004] 발명의 요약

[0005] 이하의 구체예 및 그의 관점은 조성물 및 방법과 관련하여 기술되고 설명되며, 이는 범위를 제한함이 없이 예시적이고 설명적인 것을 의미한다.

[0006] 본 발명은 다능성 줄기세포로부터 유도된 적혈구계 세포 및 탈핵 적혈구계 세포를 제조 및 사용하는 방법을 제공한다.

[0007] 특정의 구체예에서, 본 발명은 다능성 줄기세포를 제공하고; 상기 다능성 줄기세포를 OP9 마우스 기질 세포 또는 인간 간엽 줄기세포(MSCs)와 함께 배양함으로써 상기 다능성 줄기세포를 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포 유래 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

- [0008] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 것은 상기 다능성 줄기세포를 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포 (blast cell)로 분화시키는 것을 포함한다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 상기 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키기 전에 증량시킨다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 Epo, IL-3, 및 SCF를 갖는 스템라인 (Stemline) II 배지 내에서 증량시킨다.
- [0009] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 다능성 줄기세포이며, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 혈관아세포로 분화시키는 것은 (a) 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; (b) 상기 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내의 상기 인간 혈관아세포를 증량 시키기에 충분한 양의 적어도 2 개의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법 (여기서, 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관아세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장시키며, 단계 (b)에서의 상기 적어도 2 개의 성장 인자는 BMP4 및 VEGF를 포함한다)에 의해 시험관 내에서 수행된다. 특정의 구체예에서, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 혈관아세포로 분화시키는 것은 (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관중-콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다.
- [0010] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 다능성 줄기세포이며, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 비-생착성 혈관 세포로 분화시키는 것은 (a) 상기 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; (b) 상기 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내의 상기 인간 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법 (여기서, 상기 배상체는 10-13일 동안 배양되며, 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 비-생착성 혈관 세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다)에 의해 시험관 내에서 수행된다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 상기 비-생착성 혈관 세포로 분화시키는 것은 (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 상기 인간 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 배아 유래 세포, 배상체 및 비-생착성 혈관 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다.
- [0011] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 상기 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 것은 상기 다능성 줄기세포를 EPO를 포함하는 배양 배지 내에서 배양하는 것을 추가로 포함한다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 상기 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 것은, 상기 다능성 줄기세포를 이노시톨, 엽산, 모노티오글리세롤, 트랜스페린, 인슐린, 질산제1철, 황산제1철, BSA, L-글루타민, 페니실린-스트렙토마이신 및 이들의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택된 보충물을 포함하는 배양 배지 내에서 배양하고; 상기 다능성 줄기세포를 하이드로코티존, SCF, IL3, Epo 및 이들의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택된 약제를 추가로 포함하는 상기 배양 배지 내에서 배양하는 것을 추가로 포함한다.
- [0012] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 다능성 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 배아 유래 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 유도된 다능성 줄기세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 분화 전에 유전적으로 조작된다.
- [0013] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 성장 인자는 HOXB4 및 단백질 전달 도메인 (PTD)을 포함하는 융합 단백질이다. 특정의 구체예에서, 상기 HOXB4는 포유동물 HOXB4이다. 특정의 구체예에서, 상기 포유동물 HOXB4는 마우스 또는 인간 HOXB4이다.
- [0014] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 성장 인자는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 (BMP), 줄기세포 인자 (SCF), Flt-3L (FL), 트롬보포이에틴 (TPO) 및 에리트로포이에틴 (EPO)으로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 (BMP), 또는 둘 다는 세포 배양의 0-48 시간 이내에 단계 (a)에 첨가된다. 특정의 구체예에서, 상기 줄기세포 인자 (SCF), Flt-3L (FL) 또는

트롬보포이에틴 (TPO), 또는 이들의 임의 조합물은 단계 (a)의 개시로부터 48-72 시간 이내에 상기 배양물에 첨가된다.

[0015] 특정의 구체예에서, 방법은 단계 (a)에 에리트로포이에틴 (EPO)을 첨가하는 단계를 추가로 포함하거나, 단계 (a) 또는 (d)에 에리트로포이에틴 (EPO)을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0016] 특정의 구체예에서, 본 발명은 상술한 방법에 의해서 생산된 탈핵 적혈구계 세포를 제공한다.

[0017] 본 발명의 다른 구체예는 또한, 다능성 줄기세포를 제공하고; 상기 다능성 줄기세포를 EPO를 포함하는 배지 내에서 배양함으로써 상기 다능성 줄기세포를 적혈구계 세포로 분화시키는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포 유래 적혈구계 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

[0018] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 적혈구계 세포로 분화시키는 것은 상기 다능성 줄기세포를 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포로 분화시키는 것을 포함한다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 상기 적혈구계 세포로 분화되기 전에 증량된다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포, 또는 블라스트 세포는 Epo, IL-3, 및 SCF를 갖는 스템라인 II 배지 내에서 증량된다.

[0019] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 다능성 줄기세포이며, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 혈관아세포로 분화시키는 것은 (a) 상기 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; (b) 상기 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내의 상기 인간 혈관아세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 2 개의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법 (여기서, 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관아세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장시키며, 단계 (b)에서 상기 적어도 2 개의 성장 인자는 BMP4 및 VEGF를 포함한다)에 의해 시험관 내에서 수행된다.

[0020] 특정의 구체예에서, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 혈관아세포로 분화시키는 것은 (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 인간 혈관아세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관중-콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다.

[0021] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 다능성 줄기세포이며, 상기 다능성 줄기세포를 상기 비-생착성 혈관 세포로 분화시키는 것은 (a) 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; (b) 상기 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내의 상기 인간 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법 (여기서, 상기 배상체는 10-13일 동안 배양되며, 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 비-생착성 혈관 세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다)에 의해 시험관 내에서 수행된다.

[0022] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 상기 비-생착성 혈관 세포로 분화시키는 것은 (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 인간 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 비-생착성 혈관 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다.

[0023] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 다능성 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 배아 유래 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 유도된 다능성 줄기세포가다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 분화 전에 유전적으로 조작된다.

[0024] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 성장 인자는 HOXB4 및 단백질 전달 도메인 (PTD)을 포함하는 융합 단백질이다. 특정의 구체예에서, 상기 HOXB4는 포유동물 HOXB4이다. 특정의 구체예에서, 상기 포유동물 HOXB4는 마우스 또는 인간 HOXB4이다.

[0025] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 성장 인자는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 (BMP),

줄기세포 인자 (SCF), Flt-3L (FL), 트롬보포이에틴 (TPO) 및 에리트로포이에틴 (EPO)으로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 (BMP), 또는 둘 다는 세포 배양의 0-48 시간 이내에 단계 (a)에 첨가된다. 특정의 구체예에서, 상기 줄기세포 인자 (SCF), Flt-3L (FL) 또는 트롬보포이에틴 (TPO), 또는 이들의 임의 조합물은 단계 (a)의 개시로부터 48-72 시간 이내에 상기 배양물에 첨가된다.

[0026] 특정의 구체예에서, 방법은 단계 (a)에 에리트로포이에틴 (EPO)을 첨가하는 단계를 추가로 포함하거나, 단계 (a) 또는 (d)에 에리트로포이에틴 (EPO)을 첨가하는 단계를 추가로 포함한다.

[0027] 특정의 구체예에서, 본 발명은 상술한 방법에 의해서 생산된 적혈구계 세포를 제공한다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구체예는 다능성 줄기세포를 제공하고; 상기 다능성 줄기세포를 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포로 분화시키고; 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 TPO를 포함하는 거핵구 (MK) 배양 배지 내에서 배양함으로써 거핵구 또는 혈소판으로 분화시키는 것을 포함하는, 거핵구 또는 혈소판을 생산하는 방법을 제공한다.

[0029] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 다능성 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 배아 유래 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 유도된 다능성 줄기세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 분화 전에 유전적으로 조작된다.

[0030] 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 상기 거핵구 또는 상기 혈소판으로 분화되기 전에 증량된다.

[0031] 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 Epo, IL-3, 및 SCF를 갖는 스템라인 II 내에서 증량된다.

[0032] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 다능성 줄기세포이며, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 혈관아세포로 분화시키는 것은 (a) 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; (b) 상기 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내의 상기 인간 혈관아세포를 증량시키기 위해 충분한 양의 적어도 2 개의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법 (여기서, 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관아세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장시키며, 단계 (b)에서의 상기 적어도 2 개의 성장 인자는 BMP4 및 VEGF를 포함한다)에 의해 시험관 내에서 수행된다.

[0033] 특정의 구체예에서, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 혈관아세포로 분화시키는 것은 (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 인간 혈관아세포를 증량시키기 위해 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 혈관중-콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다.

[0034] 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 상기 거핵구 또는 상기 혈소판으로 분화시키는 것은 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포 배양의 약 6 내지 8일 후에 수행된다.

[0035] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 다능성 줄기세포이며, 상기 인간 다능성 줄기세포를 상기 비-생착성 혈관 세포로 분화시키는 것은 (a) 상기 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 인간 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하는 단계; (b) 상기 배상체를 포함하는 상기 배양물에 상기 배상체 배양물 내의 상기 인간 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기 위해 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 포함하는 방법 (여기서, 상기 배상체는 10-13일 동안 배양되며, 상기 인간 다능성 줄기세포, 배상체 및 비-생착성 혈관 세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다)에 의해 시험관 내에서 수행된다.

[0036] 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포를 상기 비-생착성 혈관 세포로 분화시키는 것은 (c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고; (d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물에 상기 단일 세포를 포함하는 상기 배양물 내에서 상기 인간 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기 위해 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고,

상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 상기 배아 유래 세포, 배상 체 및 비-생착성 혈관 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐 무혈청 배지 내에서 성장된다.

[0037] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 성장 인자는 HOXB4 및 단백질 전달 도메인 (PTD)을 포함하는 융합 단백질이다. 특정의 구체예에서, 상기 HOXB4는 포유동물 HOXB4이다. 특정의 구체예에서, 상기 포유동물 HOXB4는 마우스 또는 인간 HOXB4이다.

[0038] 특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 성장 인자는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 (BMP), 줄기세포 인자 (SCF), Flt-3L (FL), 트롬보포이에틴 (TPO) 및 에리트로포이에틴 (EPO)으로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 골형성 단백질 (BMP), 또는 둘 다는 세포 배양의 0-48 시간 이내에 단계 (a)에 첨가된다. 특정의 구체예에서, 상기 줄기세포 인자 (SCF), Flt-3L (FL) 또는 트롬보포이에틴 (TPO), 또는 이들의 임의 조합물은 단계 (a)의 개시로부터 48-72 시간 이내에 상기 배양물에 첨가된다.

[0039] 본 발명은 또한, 상술한 바와 같은 방법 중의 어느 하나에 의해서 생산된 거핵구 또는 혈소판을 제공한다.

[0040] 또 다른 구체예에서, 본 발명은 (a) 다능성 줄기세포를 제공하고; (b) 상기 다능성 줄기세포를 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 탈핵 적혈구계 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 배아 유래 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 유도된 다능성 줄기세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 분화 전에 유전적으로 조작된다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 단계 (b) 전에 혈관아세포 (예를 들어, 혈관아세포, 혈관중-콜로니 형성 세포, 혈관 세포, 비-생착성 혈관 세포, 또는 블라스트 세포)로 분화된다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포 또는 블라스트 세포는 단계 (b) 전에 증량된다. 특정의 구체예에서, 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15일 동안 증량시킨다. 특정의 구체예에서, 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 약 제3.5일부터 약 제10일까지 증량시킨다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 Epo, IL-3, 및 SCF를 갖는 스템라인 II 배지 내에서 증량된다. 특정의 구체예에서, 혈관아세포 또는 블라스트 세포는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15일 동안 분화된다. 특정의 구체예에서, 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 약 제11일부터 약 제20일까지 분화된다. 특정의 구체예에서, 상기 탈핵 적혈구계 세포는 OP9 또는 MSC 세포와 함께 배양된다. 특정의 구체예에서, 상기 배양물은 Epo로 보충된다. 본 발명은 본 발명의 상기 또는 이하의 관점 및 구체예 중의 어떤 것의 적합한 조합을 모두 포함한다.

[0041] 특정의 구체예에서, 본 발명은 상술한 바와 같은 방법에 의해서 생산된 탈핵 적혈구계 세포를 제공한다.

[0042] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 예를 들어, 본 발명의 구체예의 다양한 특징을 설명하는 첨부된 도면과 함께 이하의 상세한 설명으로부터 명백하게 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0043] 예시적 구체예는 참고가 되는 도면에서 설명된다. 본 발명에 기술된 구체예 및 도면은 제한적인 것이 아니라 설명적인 것으로 간주되도록 의도된다.

도 1은 본 발명의 구체예에 따라서 hESCs로부터 적혈구계 세포의 대규모 생산을 도시한다. (a) 2×10^6 인간 ESCs로부터 유도된 적혈구계 세포 (펠릿). (b), 도 1a로부터의 적혈구계 세포를 인간 전혈의 등가의 헤마토크리트 내에 재현탁시켰다; (c, d) 인간 ESCs로부터 유도된 적혈구계 세포의 형태 (c, 원래 $200 \times$ 및 d, 원래 $1000 \times$). (e) α , ζ , ϵ 및 G_γ 글로빈의 존재를 확인하는 hESC 유래 적혈구계 세포로부터의 헤모글로빈 내의 글로빈 쇄의 전자스프레이 이온화 질량 스펙트럼. 각각의 글로빈에 대해 관찰된 분자량을 나타낸다. (f) hESC 유래 적혈구계 세포의 유동 세포계수 분석. hESCs로부터 유도된 적혈구계 세포를 PE와 컨쥬게이트된 특이적 항체로 표지하고, 팩스칸 유동 세포계수기 (FacScan flow cytometer; Becton Dickinson) 상에서 셀퀘스트 (CellQuest) 프로그램에 의해서 분석하였다. 동일한 염료와 컨쥬게이트된 상응하는 비특이적 이소타입 항체를 음성 대조군으로 사용하였다.

도 2는 본 발명의 구체예에 따르는 hESC 유래 적혈구계 세포의 기능적 특징화를 도시한다. (a) 정상 인간 RBCs

및 인간 ESC 유래 적혈구계 세포의 산소 평형 곡선. 2 개의 곡선은 그들의 중앙 지점에서는 실질적으로 구분할 수 없으며, 그 반면에 인간 ESC 유래 적혈구계 세포의 곡선은 낮고 (화살표) 높은 (화살촉) 산소 포화 백분율에서 왼쪽 방향으로 이동한다. (b) 보어 (Bohr) 효과. (c) 2,3-DPG 고갈의 효과. 실선 (solid lines)은 정상 RBC 대조군을 나타내며, 점선은 인간 ESC 유래 적혈구계 세포를 나타낸다. 각각의 쌍에 대해서, 오른쪽의 선은 신선한 세포를 나타내고, 왼쪽의 선은 2,3-DPG가 고갈된 세포로부터의 곡선이다.

도 3은 본 발명의 구체예에 따라 PCR에 의한 hESC 세포주의 Rh(D) 및 ABO 유전자형의 특징화를 도시한 것이다. (a) RhD 유전자좌의 유전자형 결정 (genotyping): 특이적 프라이머는, Rh(D) 양성 DNA가 사용된 경우에는 1,200-bp (약함) 및 600-bp PCR 생성물이 증폭되고; 그 반면에 RhD-음성 세포로부터의 DNA는 단지 1,200-bp 단편만을 생성하는 Rh 유전자좌에 대해서 디자인되었다. (b, c) ABO 유전자좌의 유전자형 결정: 프라이머의 2 개의 쌍은 ABO 유전자좌의 2 개의 부분을 증폭시키도록 디자인되었다. PCR 생성물을 제한효소로 분해시켜 ABO 타입을 구별하였다. ABO 및 Rh(D) 유전자형은 다음과 같다: WA01, O(+); MA99, B(-); MA133, A(-); WA07 및 MA09, B(+); 및 WA09 및 MA01, A(+). (d) FACS에 의한 MA01 및 MA99 hESCs로부터 유도된 적혈구계 세포에 대한 RhD 항원 발현 분석. MA01 및 MA99 hESCs로부터 유도된 적혈구계 세포를 PE-표지된 모노클로날 항-RhD 항체로 염색하고, FACS에 의해서 분석하였다. (e) hESC 유래 적혈구계 세포의 ABO 타입 특징화. 패널 A (원래 400×), A-항원에 대한 모노클로날 항체에 의해서 염색된 세포; 패널 B (원래 400×), B-항원에 대한 모노클로날 항체에 의해서 염색된 세포.

도 4는 본 발명의 구체예에 따르는, 시험관 내에서의 hESC 유래 적혈구계 세포의 탈핵을 도시한다. (a) 직경은 배양물에서 시간의 경과에 따라 감소한다. 매일의 데이터는, "27e"가 27일에서의 탈핵 세포의 직경을 나타내는 것을 제외하고는 유핵 세포의 직경을 나타낸다. 탈핵 세포는 제8일에 원래의 직경의 절반 미만으로 감소한다. (b) 핵 대 세포질 비는 배양물에서의 시간의 경과에 따라 감소한다. 제8일에 유의적으로 상이한 샘플은 $*P<0.05$, $**P<0.001$, $\#P<0.002$ 로 표시된다. (c, e) 인간 ESCs로부터 유도된 적혈구계 세포를 보충물을 갖는 스템라인 II 배지 내에서 4 주일 동안 시험관내 배양하고, 제36일에 OP9 기질 세포와 공동배양하였다. 제42일에, 세포를 사이토스핀하고, 라이트-김사 (Wright-Giemsa) 염료에 의해서 염색하였다. (c, 원래 200× 및 E, 원래 1000×); (d, f) 인간 혈액으로부터 적혈구도 또한 사이토스핀하고, 라이트-김사로 염색하고, hESC 유래 적혈구계 세포와 비교하였다. (d, 원래 200× 및 F, 원래 1000×) 스케일바 (scale bar) = 10 μ m.

도 5는 본 발명의 구체예에 따르는 적혈구계 발생을 모사한 hESC 유래 적혈구계 세포의 성숙을 도시한 것이다. (a) 성숙한 적혈구 마커인 CD235a의 발현은 시간의 경과에 따라 증가하며, 미숙한 적혈구 마커는 CD71은 시간에 따른 발현의 감소를 나타낸다. (b) hESC 유래 적혈구계 세포에서 β -글로빈 쇄의 발현. 제17일 및 제28일 분화 및 성숙 배양물로부터 수거한 hESC 유래 적혈구계 세포의 사이토스핀 샘플을 인간 β -글로빈 쇄 특이 항체로 염색하였다. (c) 시험관 내에서 hESC 유래 적혈구계 세포의 점진적 성숙. 블라스트 세포로부터 적아구로, 및 결국에는 성숙한 적혈구로의 점진적인 형태적 변화는 그들의 시험관내 분화 및 성숙 중에 헤모글로빈의 상당한 증가 및 크기의 감소를 동반한다. 세포를 라이트-김사 및 벤지딘 둘 다로 염색하였다 (a 및 b, 원래 200×).

도 6은 본 발명의 구체예에 따르는 hESC 유래 적혈구계 세포에서의 글리포린 A의 발현을 도시한 것이다. 제28일 분화 및 성숙 배양물로부터 수거한 hESC 유래 적혈구계 세포의 사이토스핀 샘플을 인간 CD235a 항체로 염색하였다. 세포의 거의 100%가 CD235a에 대해서 양성으로 염색되었다. (원래 200×).

도 7은 본 발명의 구체예에 따르는 hESC 유래 적혈구계 세포에서의 β -글로빈 쇄의 발현을 도시한 것이다. 제28일 분화 및 성숙 배양물로부터 수거한 hESC 유래 적혈구계 세포의 사이토스핀 샘플을 인간 β -글로빈 쇄 특이 항체로 염색하였다. (원래 200×).

도 8은 본 발명의 구체예에 따라 RT-PCR에 의한 β -클러스터 글로빈 유전자 발현의 분석을 도시한 것이다. 상이한 단계에서 분화된 적혈구계 세포를 수거하고, β -, γ - 및 ϵ -글로빈 유전자의 발현을 글로빈 쇄 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR에 의해서 분석하였다. 성인 골수 세포로부터의 RNA를 β -글로빈 유전자에 대한 양성 대조군 및 ϵ -글로빈 유전자에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 제28a일 및 제28b일은 두 개의 별 개의 실험으로부터의 적혈구계 세포이다. BM, 골수.

도 9는 본 발명의 구체예에 따른 블라스트 콜로니의 발생에 대한 BMPs 및 VEGF₁₆₅의 영향을 도시한 것이다. a. 다양한 용량의 BMP-4를 50 ng/ml의 VEGF₁₆₅를 함유하는 EB 배지 내에 첨가하고, 블라스트 콜로니의 용량 의존적 발생이 BMP-4에 대해서 관찰되었다. b. 50 ng/ml의 BMP-4 및 VEGF₁₆₅를 함유하는 EB 배지를 다양한 용량 (0, 10 및 20 ng/ml)의 BMP-2 및 BMP-7로 보충하였다. BMP-2 및 BMP-7은 블라스트 콜로니 발생을 촉진시키지 못하였다.

c. 다양한 용량의 VEGF₁₆₅를 50 ng/ml의 BMP-4를 함유하는 EB 배지에 첨가하였다. 블라스트 콜로니의 발생은 VEGF₁₆₅ 용량의존적이다. **P<0.01, n = 3. 3.5일 EBs로부터의 1×10^5 개의 세포를 웰당 플레이팅하였다.

도 10은 본 발명의 구체예에 따라 상이한 단계 중에 첨가된 bFGF의 블라스트 콜로니 발생에 대한 영향을 도시한 것이다. (a) 다양한 용량의 bFGF를 EB 배지에 첨가하였다; (b) 다양한 용량의 bFGF를 블라스트 콜로니 성장 배지 (BGM)에 보충하였다; (c) 다양한 용량의 bFGF를 EB 배지 및 BGM 둘 다에 첨가하였다. **P<0.01, n = 3. B 및 C. 내피 세포의 네트-워크 (net-work) 유사 구조 형성은 bFGF가 있거나 (B), 없는 (C) BGM 내에서 발생한 BCs로부터 유래하였다. 두 가지 공급원으로부터의 내피 세포는 뚜렷한 차이가 없이 네트-워크 유사 구조를 형성 하였다.

도 11은 본 발명의 구체예에 따르는 3 가지 hESC 세포주으로부터의 블라스트 콜로니의 발생에 대한 bFGF의 영향을 도시한 것이다. 대각선 스트립: 다양한 용량의 bFGF를 BGM에 첨가하였다. 수평 스트립: 다양한 용량의 bFGF를 EB 배지에 첨가하였다. *P<0.05; **P<0.01, n = 3.

도 12는 무-피더 조건 하에서 성장한 hESC가 다능성 마커를 유지하며, 본 발명의 구체예에 따르는 건실한 혈관 아세포 분화를 할 수 있음을 도시한 것이다. 무-피더 조건 하에서 4-5 계대 후에, WA01 세포를 hESC 마커 Oct-4 (a-c: 각각 DAPI, Oct-4 및 통합됨) 및 Tra-1-60 (d-f: 각각 DAPI, TRA-1-60, 및 통합됨)의 발현에 대해서 염색하였다. 패널 G 및 H는 hESCs를 매트릭셀 (Matrigel) (g) 상에서 배양한 경우와 MEFs (h) 상에서 배양한 경우의 콜로니 형태의 차이를 입증한다. 배율: 원래 $\times 100$. 패널 i에서, hESCs는 MEFs 또는 매트릭셀 상에서 성장시킨 다음에 본 발명에 기술된 최적화된 조건 하에서 분화시켰다. MEF 배양된 hESCs에 비해서 훨씬 더 많은 혈관 아세포 증량이 매트릭셀 배양된 세포에서 관찰되었다. *P<0.03, n = 3.

도 13은 본 발명의 구체예에 따라 상이한 조건 하에서 배양된 EBs에서의 유전자 발현의 qRT-PCR 분석을 도시한 것이다. 혈관아세포의 발생과 연관된 다양한 유전자의 발현 레벨은 BMP-4 및 VEGF₁₆₅ 중의 어느 하나 또는 둘 다의 조합의 존재 또는 부재 하에 유도된 EBs에서 분석되었다. β -액틴이 유전자 발현을 표준화하기 위한 내부 대조군으로 사용되었다. 상대적 유전자 발현은 미분화된 hESCs에서 관찰된 평균 발현 레벨과 비교한 폴드 (fold) 차이로 나타낸다. **P<0.002; ***P<0.0004, n = 3.

도 14는 본 발명의 구체예에 따르는 혈관아세포 전구세포에 대한 표면 마커의 확인을 도시한 것이다. EB 세포를 이지셉 키트 (EasySep Kit)를 사용하여 다양한 항체로 강화시킨 다음에, 블라스트 콜로니의 발생을 위해서 플레이팅하였다. **P<0.01, n =3.

도 15는 본 발명의 구체예에 따르는 HOXB4 단백질의 야생형 핵산 서열을 도시한 것이다.

도 16은 본 발명의 구체예에 따르는 HOXB4 단백질의 야생형 핵산 서열을 도시한 것이다.

도 17은 본 발명의 구체예에 따르는 HOXB4의 아미노산 서열을 도시한 것이다.

도 18은 본 발명의 구체예에 따르는 HOXB4의 아미노산 서열을 도시한 것이다.

도 19는 무-피더 조건 하에서 성장시킨 iPSCs (IMR90-1)가 본 발명의 구체예에 따라 다능성 마커를 유지하는 것을 도시한 것이다. 무-피더 조건 하에서의 4-5 계대 후에, iPS(IMR90)-1 세포를 다능성 마커의 발현에 대해서 염색하였다. a, 명시야 (bright field); b, 나노그 (Nanog); c, Oct-4; d, SSEA-4; 및 e, TRA-1-60. 배율: 원래 $\times 200$.

도 20은 본 발명의 구체예에 따르는 iPSC 혈관아세포 분화에 대한 ROCK 억제제의 효과를 도시한 것이다. ROCK 억제제의 부재 (a, 원래 $100 \times$) 및 존재 (b, 원래 $100 \times$) 하에서 플레이팅한 지 24 시간 후에 iPS(IMR90)-1 세포로부터 생성된 EBs; EB 형성 중에 ROCK 억제제의 부재 (c, 원래 $200 \times$), ROCK 억제제의 존재 (d, 원래 $200 \times$), 및 ROCK 억제제와 Art 경로 억제제의 존재 (e, 원래 $200 \times$) 하에서 iPS(IMR90)-1 세포로부터 유도된 블라스트 콜로니; f-j: iPSC 유래 혈관아세포의 조혈 및 내피 세포 분화: f (원래 $200 \times$), CFU-E; g (원래 $100 \times$), CFU-M; h (원래 $40 \times$), CFU-G; i (원래 $400 \times$), VE-카드헤린 (녹색)에 의해서 염색된 내피 세포에 의한 Ac-LDL (적색)의 섭취; j (원래 $40 \times$), 매트릭셀 상에 내피 세포를 플레이팅한 후의 튜브-상 네트워크.

도 21은 본 발명의 구체예에 따르는 hESC 유래 거핵구의 특징화를 도시한 것이다. a. 제4일 거핵구 성숙 배양물로부터의 세포의 FACS 분석. 세포는 거핵구 마커 CD41a, CD42b 및 적혈구계 계통 마커 CD235a로 염색하였다. b. 제6일 성숙 배양물로부터의 게이트화된 (gated) CD41a+ 거핵구의 DNA 함량 (프로피듐 요오다이드 염색)의 FACS 분석. PI 염색의 강도는 로그 스케일로 나타낸다. c. 메이-그룬왈드 김사 (May-grunwald giemsa) 염색된 다배체

거핵구. d. 제6일 거핵구 성숙 배양물의 사이토스핀 제제로부터 CD41 (녹색) 및 VWF (적색)에 의한 성숙 다배체 거핵구의 면역-형광 염색. e. 위상차 영상 (phase contrast image)은 제7일 액체 성숙 배지 내에서 전혈소판 (proplatelet) 형성 거핵구 (적색 화살표)를 나타낸다.

도 22는 본 발명의 구체예에 따르는 시험관내 hESC 유래 혈소판의 FACS 분석을 도시한 것이다. 인간 말초 혈액 혈소판이 대조군으로 사용되었다. hESCs로부터 유도된 CD41a+ 입자는 말초 혈액 혈소판의 FSC 및 SSC 특징과 유사하다.

발명의 상세한 설명

본 발명에 인용된 모든 문헌들은 마치 완전히 기술된 것처럼 그 전체가 참고로 포함된다. 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 숙련된 전문가에 의해서 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 출원에서 사용된 다수의 용어에 대한 일반적인 지침을 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 제공한다.

본 기술분야에서 숙련된 전문가는 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있는 것으로, 본 발명에 기술된 것과 유사 또는 동등한 다수의 방법 및 물질을 인지할 것이다. 실제로, 본 발명은 어떤 식으로든 기술된 방법 및 물질로 제한되지 않는다. 본 발명의 목적에 따라 이하의 용어들은 다음과 같이 정의된다.

본 발명의 설명에서 및 그 다음의 특허청구범위 전체에 걸쳐서 사용된 것으로, 본 공개된 영문의 "단수"의 표현은 문맥이 다른 식으로 명백하게 기술되지 않는 한, 복수형의 언급을 포함한다. 또한, 본 발명의 설명에서 사용된 것으로, "내에"의 의미는 문맥이 다른 식으로 명백하게 기술되지 않는 한은 "내에" 및 "상에"를 포함한다.

본 명세서 전체에 걸쳐서, 단어 "포함한다 (comprise)" 또는 "포함한다 (comprises)" 또는 "포함하는 (comprising)"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 정수의 그룹을 포함하지만, 어떤 다른 정수 또는 정수의 그룹이라도 배제하지는 않는 것으로 이해되어야 한다.

용어 "배아 줄기세포" (ES 세포)는 배아 유래 세포를 나타내며, 본 발명에서는 본 기술분야에서 사용된 것과 같이 사용된다. 이 용어는 인간 세포주으로서 연속 계대한 것을 포함하는, 포배 또는 상실배의 내부 세포 매스로부터 유래한 세포를 포함한다. 인간으로부터의 세포를 나타내기 위해서 사용되는 경우에는, 용어 인간 배아 줄기세포 (hES)가 사용된다. ES 세포는 정자에 의한 난자의 수정으로부터 뿐만 아니라 DNA, 핵전이, 처녀생식을 사용하거나 HLA 부분에 동형접합성을 갖는 ES 세포를 생성시키는 수단에 의해서 유도될 수 있다. ES 세포는 또한, 정자와 난자의 융합, 핵전이, 처녀생식, 융핵발생, 또는 크로마틴의 재프로그래밍 (reprogramming) 및 그에 이어 세포를 생산하기 위한 재프로그래밍된 크로마틴의 원형질막 내로의 통합에 의해서 생산된 접합체, 할구 또는 포배-단계의 포유동물 배아로부터 유도된 세포이다. 배아 줄기세포는 그들의 공급원 또는 이들을 생산하기 위해서 사용된 특정한 방법과는 무관하게, (i) 3 개의 배엽 모두의 세포로 분화하는 능력, (ii) 적어도 Oct-4 및 알칼리성 포스포타제의 발현, 및 (iii) 면역결핍성 동물에게 이식하는 경우에 기형종을 발생시키는 능력을 기초로 하여 확인될 수 있다.

본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "다능성 줄기세포"는 다능성 줄기세포가 유도되는 방법과는 무관하게 배아 줄기세포, 배아 유래 줄기세포, 및 유도된 다능성 줄기세포를 포함한다. 다능성 줄기세포는 기능적으로 (a) 면역결핍성 (SCID) 마우스에게 이식한 경우에 기형종을 유도할 수 있고; (b) 3 개의 배엽 모두의 세포 타입으로 분화할 수 있으며 (예를 들어, 외배엽, 중배엽 및 내배엽 세포 타입으로 분화할 수 있으며); (c) 배아 줄기세포의 하나 또는 그 이상의 마커를 발현하는 (예를 들어, Oct 4, 알칼리성 포스포타제, SSEA-3 표면 항원, SSEA-4 표면 항원, 나노그, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1 등을 발현하는) 줄기세포로 정의된다. 예시적인 다능성 줄기세포는 예를 들어, 본 기술분야에서 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예시적인 다능성 줄기세포의 예로는 포배 단계의 배아의 ICM으로부터 유도된 배아 줄기세포뿐만 아니라 (임의로 배아의 나머지를 파괴함이 없이) 분열 단계 또는 상실배 단계의 배아의 하나 또는 그 이상의 할구로부터 유도된 배아 줄기세포가 포함된다. 이러한 배아 줄기세포는 수정에 의해서, 또는 체세포 핵전이 (SCNT), 처녀생식 및 융핵발생을 포함한 무성생식 방법에 의해서 생산된 배아 물질로부터 생성될 수 있다. 추가의 예시적인 다능성 줄기세포에는 인자들의 조합 (여기서는 재프로그래밍 인자라 칭함)을 발현시켜 체세포를 재프로그래밍함으로써 생성된 유도된 다능성 줄기세

포 (iPS cells)가 포함된다. iPS 세포는 태아, 생후, 신생아, 유년기 또는 성인 체세포를 사용하여 생성될 수 있다. 특정의 구체예에서, 체세포를 다능성 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해서 사용될 수 있는 인자에는 예를 들어, Oct4 (때때로는 Oct 3/4라 칭함), Sox2, c-Myc, 및 Klf4의 조합이 포함된다. 다른 구체예에서, 체세포를 다능성 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해서 사용될 수 있는 인자에는 예를 들어, Oct 4, Sox2, 나노그, 및 Lin28의 조합이 포함된다. 다른 구체예에서, 체세포는 적어도 2 개의 재프로그래밍 인자, 적어도 3 개의 재프로그래밍 인자, 또는 4 개의 재프로그래밍 인자를 발현시킴으로써 재프로그래밍된다. 다른 구체예에서는, 추가의 재프로그래밍 인자를 확인하고, 체세포를 다능성 줄기세포로 재프로그래밍하기 위해서 단독으로 또는 하나 또는 그 이상의 공지된 재프로그래밍 인자와 함께 사용한다. 유도된 다능성 줄기세포는 기능적으로 정의되며, 다양한 방법 (통합성 벡터, 비-통합성 벡터, 화학적 수단 등) 중의 어떤 것을 사용하여 재프로그래밍된 세포를 포함한다.

다능성 줄기세포는 어떤 종으로부터라도 유래할 수 있다. 다능성 줄기세포는 예를 들어, 마우스, 비-인간 영장류의 다수의 종, 및 인간에서 성공적으로 유도되었으며, 배아 줄기-양 세포는 다수의 추가의 종으로부터 생성되었다. 따라서, 본 기술분야에서 숙련된 전문가들은 인간, 비-인간 영장류, 설치류 (마우스, 랫트), 유제동물 (소, 양 등), 개 (사육용 및 야생 개), 고양이 (사육용, 및 사자, 호랑이, 치타와 같은 야생 고양이), 토끼, 햄스터, 저빌쥐, 다람쥐, 기니아 피그, 염소, 코끼리, 판다 (자이언트 판다를 포함), 돼지, 너구리, 말, 얼룩말, 해양 포유동물 (돌고래, 고래 등) 등을 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 어떤 종으로부터라도 배아 줄기세포 및 배아 유래 줄기세포를 생성시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 종은 멸종위기에 처한 종이다. 특정의 구체예에서, 종은 현재 멸종된 종이다.

유사하게, iPS 세포는 어떤 종으로부터라도 유래할 수 있다. iPS 세포는 마우스 및 인간 세포를 사용하여 성공적으로 생성되었다. iPS 세포는 배아, 태아, 신생아 및 성인 조직을 사용하여 성공적으로 생성되었다. 따라서, 전문가는 어떤 종으로부터라도 그의 공여체 세포를 사용하여 iPS 세포를 용이하게 생성시킬 수 있다. 즉, 전문가는 인간, 비-인간 영장류, 설치류 (마우스, 랫트), 유제동물 (소, 양 등), 개 (사육용 및 야생 개), 고양이 (사육용, 및 사자, 호랑이, 치타와 같은 야생 고양이), 토끼, 햄스터, 염소, 코끼리, 판다 (자이언트 판다를 포함), 돼지, 너구리, 말, 얼룩말, 해양 포유동물 (돌고래, 고래 등) 등을 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 어떤 종으로부터라도 iPS 세포를 생성시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 종은 멸종위기에 처한 종이다. 특정의 구체예에서, 종은 현재 멸종된 종이다.

유도된 다능성 줄기세포는 출발점으로서 실질적으로 어떤 발생 단계의 어떤 체세포라도 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 세포는 배아, 태아, 신생아, 유년기 또는 성인 공여체로부터 유래할 수 있다. 사용될 수 있는 체세포의 예로는 피부 샘플 또는 생검조직에 의해서 수득된 피부 섬유아세포, 윤활조직으로부터의 활막세포, 포피 세포, 뺨 세포 (cheek cells), 또는 폐 섬유아세포와 같은 섬유아세포가 포함된다. 비록 피부 및 뺨이 적절한 세포의 쉽게 이용할 수 있고 용이하게 획득할 수 있는 공급원을 제공하지만, 실질적으로는 어떤 세포라도 사용할 수 있다. 특정의 구체예에서, 체세포는 섬유아세포가 아니다.

다능성 줄기세포는 예를 들어, ES 세포 또는 유도된 다능성 줄기세포일 수 있다는 것이 주목해야 한다. 유도된 다능성 줄기세포는 체세포 내에서 재프로그래밍 인자의 조합을 발현시킴으로써 생산될 수 있다. 특정의 구체예에서는, 적어도 2 개의 재프로그래밍 인자가 체세포 내에서 발현되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구체예에서는, 적어도 3 개의 재프로그래밍 인자가 체세포 내에서 발현되어 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다. 다른 구체예에서는, 적어도 4 개의 재프로그래밍 인자를 체세포 내에서 발현시켜 체세포를 성공적으로 재프로그래밍한다.

용어 "단백질 전달 도메인" ("PTD")은 세포막을 횡단하여 세포 내로 전위하거나, 예를 들어, PTD가 부착되는 또 다른 분자 (예를 들어, 단백질 도메인)이 세포막을 횡단하여 세포 내로 전위하는 속도를 제공하거나 증가시키는 모든 아미노산 서열을 나타낸다. 단백질 전달 도메인은 천연적으로 더 큰 단백질의 일부분으로 존재하는 도메인 또는 서열 (예를 들어, HIV TAT와 같은 바이러스 단백질의 PTD)일 수 있거나, 합성 또는 인공 아미노산 서열일 수 있다.

용어 "혈관아세포" 및 "혈관종-콜로니 형성 세포"는 본 출원 전체에 걸쳐서 상호교환하여 사용될 수 있다. 세포는 다수의 구조적 및 기능적 특징을 갖는다. 이들 세포의 특징 중에는 숙주에 투여되는 경우에 골수 내로 정착하는 능력이 있다. 이들 세포는 하나 또는 그 이상의 마커의 발현 (RNA 또는 단백질) 또는 발현의 결여 (RNA 또는 단백질)를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 다수의 구조적 및 기능적 특성을 기초로 하여 기술될 수 있다. 혈관종-콜로니 형성 세포는 적어도 조혈 세포 타입 또는 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다.

혈관중-콜로니 형성 세포는 바람직하게는 양성능 (bi-potential)이며, 적어도 조혈 세포 타입 및 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 혈관중-콜로니 형성 세포는 적어도 단일분화성 (uni-potential)이며, 바람직하게는 양-성능이다. 그러나, 추가로 혈관중-콜로니 형성 세포는 더 큰 정도의 발생 잠재력을 가질 수 있으며, 특정의 구체예에서는 다른 계통의 세포 타입으로 분화할 수 있다. 특정의 구체예에서, 혈관중-콜로니 형성 세포는 심장 세포 (예를 들어, 심근세포) 및/또는 평활근 세포와 같은 다른 중배엽 유도체를 발생시키도록 분화할 수 있다.

용어 "비-생착성 혈관 세포"는 본 출원 전체에 걸쳐서 혈관중-콜로니 형성 세포의 특징의 일부를 공유하는 세포의 새로운 집단을 나타내기 위해서 사용된다. 그러나, 비-생착성 혈관 세포는 이들이 면역결핍성 숙주에 투여되는 경우에 골수 내에 생착하지 않는다는 점에서 구별된다. 이러한 차이에도 불구하고, 비-생착성 혈관 세포는 혈관중-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징/특성 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유할 수 있다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 비-생착성 혈관 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 다른 구체예에서, 비-생착성 혈관 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4개)을 발현하지 않는다: CD34, KDR, CD133, CD31. 이론적으로 엽매임이 없이, 비-생착성 혈관 세포는 혈관중-콜로니 형성 세포보다 다소 더 수임적이지만, 여전히 일련의 조혈 세포 타입을 생성시킬 수 있는 별 개의 줄기세포 집단을 제공할 수 있다.

탈핵 적혈구계 세포

본 발명의 구체예는 일반적으로 인간 다능성 줄기세포를 탈핵 적혈구계 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 적혈구계 세포는 시험관내 및 생체내에서 다양한 용도를 갖는다. 본 발명의 적혈구는 다양한 치료학적 적용을 가질 수 있다. 더구나, 본 발명에 의해서 유도된 증량된 수의 적혈구는 조혈 장애의 치료에 있어서의 신규한 치료학적 전략에서, 또는 혈액 은행에서 이용될 수 있다.

적용의 특정한 구체예에서, 다능성 줄기세포는 혈관아세포 (예를 들어, 혈관아세포, 혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포, 혈관 세포, 또는 블라스트 세포; 참조: 예를 들어, 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함된 미국 출원 제2008/0014180호)이다.

특정의 구체예에서, 적용하는 적혈구는 수혈에 사용될 수 있다. 수혈을 위한 다량의 세포를 생성시키는 능력은 전국적으로 혈액 은행 및 병원에서 겪고 있는 혈액의 만성적 부족을 완화시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법은 수혈을 위한 범용 세포 (universal cells)의 생산을 허용한다. 구체적으로, 0형 및 Rh-인 적혈구는 쉽게 생성될 수 있으며, 수혈을 위한 범용 세포 공급원으로 제공될 수 있다.

본 발명의 방법은 다양한 상업적 및 임상적 적용 분야에 유용한 대량으로 다능성 줄기세포의 시험관내 증량을 허용한다. 특정의 구체예에서, 세포 제제는 적어도 1×10^6 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 세포 제제는 적어도 2×10^6 개의 인간 다능성 줄기세포를 포함하며, 추가의 구체예에서는 적어도 3×10^6 개의 인간 다능성 줄기세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 세포 제제는 적어도 4×10^6 개의 인간 다능성 줄기세포를 포함한다.

본 발명은 10,000 내지 400만 또는 그 이상의 포유동물 (예를 들어, 인간) 혈관아세포를 포함하는 용액, 제제 및 조성물에 관한 것이다. 이러한 용액, 제제 및 조성물 내의 혈관아세포의 수는 10,000 내지 400만 개, 또는 그 이상의 어떤 범위일 수 있다. 이 수는 예를 들어, 20,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만 개 등일 수 있다.

마찬가지로, 본 발명은 적혈구의 제제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 다능성 줄기세포 및/또는 적혈구를 생산, 저장 및 분포시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 인간 또는 동물 환자에게 수혈하는데 적합한 방법 및 용액을 제공한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 적혈구를 제조하는 방법을 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 외상 후에 수혈을 위한 혈액을 제공하는 혈액 은행 및 병원에서 사용하기에, 또는 혈액 관련된 질병 또는 장애를 치료하는데 적합하다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 범용 공여체 세포인 적혈구를 제공한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 기능적이며, 수혈하기 전에 헤모글로빈 F를 발현한다.

특정의 구체예에서, 적혈구는 외상, 수술 중의 혈액 손실, 또는 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환과 같은 혈액 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서, 분화된 적혈구는 외상, 수술 중의 혈액 손실, 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환과 같은 혈액 질환, 또는 악성 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서는, 적혈구의 혼합된 집단이 수혈된다. 다수의 분화된 조혈성 세포 타입, 특히 적혈구는 일반적

으로 생체내에 혼합된 집단으로 존재한다. 구체적으로, 연령 및 분화의 다양한 레벨의 순환 적혈구가 생체내에서 발견된다. 추가로, 적혈구는 더 적은 태아성 헤모글로빈 및 더 많은 성인 헤모글로빈을 발현하도록 시간이 경과함에 따라 성숙한다. 본 발명은 적혈구의 정제된 집단, 또는 다양한 레벨의 연령 및 분화 레벨을 갖는 적혈구의 혼합된 집단의 수혈을 포함한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 태아성 헤모글로빈 (헤모글로빈 F)을 발현하는 적혈구의 수혈을 포함한다. 태아성 헤모글로빈을 발현하는 적혈구의 수혈은 특히, 겸상 적혈구 빈혈의 치료에 유용할 수 있다. 수혈을 위한 대량의 세포를 생성시키는 능력은 전국적으로 혈액 은행 및 병원에서 겪고 있는 혈액의 만성적 부족을 완화시킬 수 있다.

특정의 구체예에서, 본 발명의 방법은 수혈을 위한 범용 세포의 생산을 허용한다. 구체적으로, 타입 O 및 Rh-인 적혈구는 쉽게 생성될 수 있으며, 수혈을 위한 범용 혈액 공급원으로서 제공될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법으로부터 생산된 적혈구는 기능적이다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 수혈하기 전에 헤모글로빈 F를 발현한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 산소를 운반한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구와 동등한 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 75%인 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 50%인 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 25%인 수명을 갖는다.

줄기세포의 성숙한 적혈구로의 분화는 현재의 도전과제이다. 이러한 달성의 영향은 막대한데, 이는 특히 예상치 못한 위기 상황에서 일관성이 없는 공급 및 큰 수요와 함께 항상 혈액 공여체의 부족이 있기 때문이다. 배아 줄기세포 (ESCs)는 O- 범용 혈액의 무제한 공급의 이점을 가지고, 각각의 공여에 의한 질병 스크리닝 및 혈액 타입 결정의 추가의 경비를 피하는 적혈구의 잠재적인 일관되고 신뢰성이 있는 공급원이다. 성숙한 적혈구의 홀마크 (hallmark)는 핵의 상실뿐만 아니라 성숙 헤모글로빈의 생산이다. 본 발명자의 실험실을 포함한 다수의 연구소는 ESCs의 적아구로의 분화를 달성하였으며, 이 적아구는 여전히 그들의 핵을 함유하고, 미숙한 헤모글로빈을 발현한다. 현재까지 탈핵은 인간 배아 줄기세포에 의해서는 달성되지 않았다.

대조적으로, 탈핵은 추가로 발생 중에 함께 있어서 아마도 그들의 탈핵 능력을 도와주는 CD34+ 골수 및 제대혈 줄기세포에 의해서 달성되었다. 말리크 (Malik)는 Epo와 함께 CD34+ 골수 세포로 처리한 지 19일 후에 10-40% 탈핵을 달성하였다 (Malik 1998). 미하라다 (Miharada)는 성장 인자 및 SCF, Epo, IL-3, VEGF, IGF-II, 및 미페프리스톤 (mifepristone)을 포함한 사이토킨의 20-일 처리에 의해서 CD34+ 제대혈 줄기세포로부터 77% 탈핵율을 달성하였다 (Miharada 2006). 두에이 (Douay)는 세포를 MS-5 마우스 기질 라인 또는 간엽 줄기세포 (MSCs)와 공동배양하는 것을 부가하여, 골수 환경에서 발견되는 인자 (SCF, IL-3, Epo, 하이드로코티존)의 각테일 내에서 18-일 프로토콜에 의해 CD34+ 제대혈 줄기세포에서 90-100%의 더 높은 탈핵율을 달성하였다 (Douay 2005). 비록 성장 인자는 적아구가 성숙하는 골수 니체 (niche)의 환경을 모사하기 위해서 사용되지만, 제대혈 및 기질 세포를 물리적 접촉으로부터 분리하고, 동일한 배지에서 성장시켰을 때의 탈핵의 폐지에 의해서 나타나는 바와 같이, 세포 접촉이 또한 탈핵을 시그널링 하기 위해서 필요할 수도 있다. 이들 프로토콜은 제대혈 줄기세포에 대해서 성공적일 수 있지만, ESCs에서의 탈핵은 제공하지 못한다.

특정의 구체예에서, 본 발명의 방법은 OP9 세포를 사용하여 임상적 치료법에 적절한 완전한 시험관내 시스템에서 인간 ESCs 내에서의 분화를 유도한다. 특정의 구체예에서, 제1 단계는 ESCs를 혈관아세포, 혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생작성 혈관 세포 또는 블라스트 세포로 분화시키는 것으로 구성된다. 특정의 구체예에서, 제2 단계는 이들 세포를 Epo, IL-3, SCF, 및 제대혈 탈핵을 위해서 두에이에 의해서 사용된 다양한 보충물 (Douay 2005)을 갖는 스템라인 II 배지 (Sigma)에서 증량시키는 것이다. 특정의 구체예에서, 제3 단계는 OP9 세포를 ESC 유래 적아구에 도입시킬 뿐만 아니라 Epo의 첨가를 수행한다.

특정의 구체예에서, ESCs의 혈관아세포, 혈관중-콜로니 형성 세포 및 비-생작성 혈관 세포로의 분화는 본 발명에 기술된 방법에 따라 생산 및 증량된다.

특정의 구체예에서, 블라스트 세포는 Lu 2006에 기술된 바와 같이 배양된다. 특정의 구체예에서, 제3.25일-제4.25일 배상체로부터 6-8일 블라스트 세포를 골라내거나 여과하고, Epo, IL-3, SCF, 하이드로코티존, 이노시톨, 엽산, 모노-티오글리세롤, 트랜스페린, 인슐린, 질산제1철, 황산제1철 및 소 혈청 알부민을 갖는 스템라인 II 배지 내에 12-30일 동안 플레이트팅한다. 특정의 구체예에서, 블라스트 세포는 그 후에 상기 열거된 동일한 배지 내에서, 그러나 하이드로코티존은 없이 OP9 마우스 기질 세포 또는 인간 간엽 줄기세포 (MSCs)와 함께 공동배양한다. 특정의 구체예에서, 세포는 12일과 29일 사이에 공동배양을 개시한다. 특정의 구체예에서, 세포는 탈핵이 일어나기 전에 12-18일 동안 더 배양한다. 특정의 구체예에서, OP9 세포에 의해서 개시된 탈핵은 기질 성장 후에 3일 만큼 짧은 기간 내에 나타날 수 있다. 특정의 구체예에서, 탈핵은 하이드로코티존, 이노시톨, 엽산, 모

노-티오글리세롤, 트랜스페린, 인슐린, 질산제1철, 황산제1철 및 소 혈청 알부민을 갖는 스템프로34 (Stempro34) 배지 내에서 유도된다. 특정의 구체예에서, 세포는 매 3-4일 마다 급식하며, 매 주일마다 새로운 기질층 상에서 배양한다.

본 발명은 본 발명의 상기 또는 이하의 관점 및 구체예 중의 어떤 것의 적합한 조합 모두를 포함한다.

거핵구 및 혈소판

본 발명은 또한 다능성 줄기세포를 제공하고; 상기 다능성 줄기세포를 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포로 분화시키고; 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 TPO를 포함하는 거핵구 (MK) 배양 배지 내에서 배양함으로써 거핵구 또는 혈소판으로 분화시키는 것을 포함하는, 거핵구 또는 혈소판을 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한, 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 제공하고; 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포를 TPO를 포함하는 거핵구 (MK) 배양 배지 내에서 배양함으로써 거핵구 또는 혈소판으로 분화시키는 것을 포함하는, 거핵구 또는 혈소판을 생산하는 방법을 제공한다.

혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득되거나 생산될 수 있다.

특정의 구체예에서, 본 발명에서 사용된 상기 다능성 줄기세포는 배아 줄기세포 또는 배아 유래 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 유도된 다능성 줄기세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 인간 세포이다. 특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포는 분화 전에 유전적으로 조작된다.

특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 분화되기 전에 상기 거핵구 또는 상기 혈소판으로 증량된다. 특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포는 Epo, IL-3, 및 SCF를 갖는 스템라인 II 배지 내에서 증량된다.

특정의 구체예에서, 상기 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포의 상기 거핵구 또는 상기 혈소판으로의 분화는 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 또는 블라스트 세포 배양의 약 6 내지 8일 후에 이루어진다.

본 발명은 또한, 본 발명에 기술된 바와 같은 방법 중의 어느 하나에 의해서 생산된 거핵구 또는 혈소판을 제공한다.

거핵구 또는 혈소판을 생산하는 방법은 후속 실시예에 더 상세히 기술된다.

혈관중-콜로니 형성 세포

본 발명은 인간 다능성 줄기세포로부터 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 생성 및 증량시키는 방법, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함하는 제제 및 조성물, 혈관중-콜로니 형성 세포로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 다양한 세포 타입을 생산하는 방법, 혈관중-콜로니 형성 세포를 치료학적으로 사용하는 방법, 및 혈관중-콜로니 형성 세포로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 다양한 세포 타입을 치료학적으로 사용하는 방법을 제공한다.

여기서, 본 발명자들은 혈관아세포성 전구세포의 건설한 생성을 위한 더 간단하고 더 효율적인 방법을 보고한다. 불필요한 몇 가지 고가의 인자를 배제하는 것 이외에도, 골형성 단백질-4 (BMP-4) 및 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)가 분화의 초기 단계 중에 다능성 줄기세포로부터 혈관아세포성 수임 (commitment) 및 발생을 유도하는데 필요하고 충분한 것으로 입증되었다. BMP-4 및 VEGF는 T-brachyury, KDR, CD31 및 LMO2 유전자 발현을 현저하게 상향-조절하는 반면에 Oct-4 발현은 극적으로 하향-조절한다. 성장 및 증량 중에 기본 섬유아세포 성장 인자 (bFGF)의 첨가는 hESCs의 하나의 6-웰 플레이트로부터 약 1×10^8 BCs를 일관되게 생성하여 BC 발생을 더 증진시키는 것으로 밝혀졌다.

본 발명은 또한, ES 세포, 포배 또는 할구, 태반 또는 제대조직으로부터의 제대혈, 말초 혈액, 골수 또는 다른 조직을 포함하는 어떤 공급원으로부터, 또는 본 기술분야에서 공지된 어떤 다른 수단에 의해서 수득된 포유동물 혈관중-콜로니 형성 세포를 증량시키는 방법을 제공한다. 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 또한, 인간 다능성 줄기세포로부터 생성될 수도 있다. 인간 다능성 줄기세포는 세포의 실질적으로 동종 집단, 세포의 이종 집단, 또는 배아 조직의 전부 또는 일부일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 다능성 줄기세포의 예로서, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 인간 배아 줄기세포로부터 생성될 수 있다. 이러한 배아 줄기세포에는 수정, 체세포 핵전이 (SCNT), 처녀생식, 융핵발생, 또는 다른 성적 또는 무성적 수단에 의해서 생산되는지 여부와는

관계없이, 예를 들어, 포배, 플레이팅된 ICMS, 하나 또는 그 이상의 할구, 또는 착상-단계전 배아 또는 배아-유사 구조의 다른 부분으로부터, 또는 이들을 사용하여 유도된 배아 줄기세포가 포함된다.

특정의 구체예에서, 혈관아세포는 혈소판 및 적혈구를 포함하는 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 조혈 세포로 더 분화될 수 있다. 이러한 세포는 수혈에서 사용될 수 있다. 수혈을 위한 대량의 세포를 생성시키는 능력은 전국적으로 혈액 은행 및 병원에서 겪고 있는 혈액의 만성적 부족을 완화시킬 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법은 수혈을 위한 범용 세포 (universal cells)의 생산을 허용한다. 구체적으로, 0형 및 Rh-인 적혈구는 쉽게 생성될 수 있으며, 수혈을 위한 범용 세포 공급원으로 제공될 수 있다.

본 발명의 방법은 다양한 상업적 및 임상적 적용 분야에 유용한 혈관아세포의 시험관내 대량 증량을 허용한다. 시험관 내에서 혈관아세포의 증량은 혈관아세포의 증식을 나타낸다. 본 발명의 방법은 인간 혈관아세포를 상업적으로 유용한 양에 도달하도록 증량시킬 수 있지만, 본 발명은 또한 대량의 인간 혈관아세포, 및 대량의 인간 혈관아세포 (예를 들어, 적어도 10,000, 100,000, 또는 500,000 개의 세포)를 포함하는 세포 제제에 관한 것이다. 특정의 구체예에서, 세포 제제는 적어도 1×10^6 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 세포 제제는 적어도 2×10^6 개의 인간 혈관아세포를 포함하며, 추가의 구체예에서는 3×10^6 개의 인간 혈관아세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 세포 제제는 적어도 4×10^6 개의 인간 혈관아세포를 포함한다.

본 발명은 10,000 내지 400만 또는 그 이상의 포유동물 (예를 들어, 인간) 혈관아세포를 포함하는 용액, 제제, 및 조성물에 관한 것이다. 이러한 용액, 제제 및 조성물 내의 혈관아세포의 수는 10,000 내지 400만 개, 또는 그 이상의 범위 사이의 어떤 수라도 될 수 있다. 이 수는 예를 들어, 20,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만 개 등일 수 있다.

유사하게, 본 발명은 인간 혈관아세포 자손 세포 (예를 들어, 인간 조혈 줄기세포를 포함하는 인간 조혈 세포, 및 내피 세포)의 제제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 혈관아세포 및/또는 혈관아세포 계통 세포를 생산, 저장 및 분포시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 인간 또는 동물 환자에게 수혈하는데 적합한 방법 및 용액을 제공한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 적혈구 및/또는 혈소판, 및/또는 수혈을 위한 다른 조혈 세포 타입을 제조하는 방법을 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 외상 후에 수혈을 위한 혈액을 제공하는 혈액 은행 및 병원에서 사용하기에, 또는 혈액 관련된 질병 또는 장애를 치료하는데 적합하다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 범용 공여체 세포인 적혈구를 제공한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 기능적이며, 수혈하기 전에 헤모글로빈 F를 발현한다.

본 발명은 또한, 인간 혈관종-콜로니 형성 세포, 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 실질적으로 정제된 집단을 포함하는 세포 배양물, 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 포함하는 약제학적 제제, 및 혈관종-콜로니 형성 세포의 동결보존된 제제를 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 상태의 치료가 필요한 환자에서 상태를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 용도를 제공한다. 대신으로, 본 발명은 상태의 치료가 필요한 환자에서 상태를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 세포 배양물의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한, 필요한 환자에서 상태를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서의 약제학적 제제의 용도를 제공한다.

혈관종-콜로니 형성 세포는 그들의 구조적 특성을 기초로 하여 식별 및 특징화될 수 있다. 구체적으로, 및 특정의 구체예에서, 이들 세포는 이들이 단지 서로에 대해서 느슨하게 부착성이라는 (다른 혈관종-콜로니 형성 세포에 대해서 느슨하게 부착성) 점에서 독특하다. 이들 세포는 단지 서로에 대해서 느슨하게 부착성이기 때문에, 혈관종-콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리시킬 수 있다. 세포는 효소적 분리나 기계적 및 효소적 분리의 조합이 아닌 기계적 분리 단독으로도 세포의 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 분리시키는데 충분하게 서로에 대해서 충분히 느슨하게 부착성이다. 즉, 기계적 분리는 세포 집합체의 효소적 분리 이후에 관찰된 것과 비교하여 실질적인 세포 상처 또는 사망을 야기할 만큼 큰 힘을 필요로 하지 않는다.

더구나, 혈관종-콜로니 형성 세포는 하나 또는 그 이상의 마커의 발현 또는 발현의 결여 (유전자의 레벨 또는 단백질의 레벨에서 평가됨)을 기초로 하여 식별되거나 특징화될 수 있다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 혈관종-콜로니 형성 세포는 다음의 세포 표면 마커 중의 하나 또는 그 이상의 발현의 결여를 기초로 하여 식별되거나 특징화될 수 있다 (예를 들어, 세포는 다음의 마커 중의 적어도 하나, 적어도 2 개, 적어도 3 개 또는 적어도 4 개의 발현의 결여를 기초로 하여 특징화될 수 있다): CD34, KDR, CD133, 또는 CD31. 추가로 또는

대신으로, 혈관중-콜로니 형성 세포는 GATA2 및/또는 LMO2의 발현을 기초로 하여 식별되거나 특징화될 수 있다. 추가로 또는 대신으로, 혈관중-콜로니 형성 세포는 발현 마커의 발현 또는 이의 결여를 기초로 하여 식별되거나 특징화될 수 있다.

본 발명의 혈관중-콜로니 형성 세포는 이들 구조적 또는 기능적 특징 중의 하나 또는 어떤 조합을 기초로 하여 식별되거나 특징화될 수 있다. 이들 세포는 예를 들어, 배아 조직, 출산전 조직, 또는 주산기 조직과 같은 다수의 공급원 중의 어떤 것으로부터나 유도될 수 있지만, 용어 "혈관중-콜로니 형성 세포"는 공급원과는 관계없이 적어도 조혈 세포 타입 및/또는 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있고, 전술한 구조적 또는 기능적 특성 중의 하나 또는 그 이상을 갖는 세포에 적용함을 유의하라.

특정의 구체예에서, BCs의 전구체에 대한 마커(들)는 초기 배양 후에 BCs를 선택하기 위해서 사용될 수 있다.

특정의 구체예에서, 혈관중-콜로니는 배상체를 형성함이 없이 다능성 세포로부터 생산된다.

배상체 및 혈관아세포를 수득하기 위한 다능성 줄기세포의 시험관내 분화

본 발명은 인간 다능성 줄기세포로부터, 인간 포배 또는 할구로부터 유도된 인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키는 방법을 제공한다. 이렇게 생산된 혈관아세포는 정제되고/되거나 분리될 수 있다.

인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 또한, 인간 다능성 줄기세포로부터 생성될 수 있다. 인간 다능성 줄기세포는 세포의 실질적으로 동종 집단, 세포의 이종 집단, 또는 배아 조직의 전부 또는 일부일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 다능성 줄기세포의 예로서, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 인간 배아 줄기세포로부터 생성될 수 있다. 이러한 배아 줄기세포에는 수정, 체세포 핵전이 (SCNT), 처녀생식, 융핵발생, 또는 다른 성적 또는 무성적 수단에 의해서 생산되는지 여부와는 관계없이, 예를 들어, 포배, 플레이팅된 ICMs, 하나 또는 그 이상의 할구, 또는 착상-단계전 배아 또는 배아-유사 구조의 다른 부분으로부터, 또는 이들을 사용하여 유도된 배아 줄기세포가 포함된다.

추가로 또는 대신으로, 혈관중-콜로니 형성 세포는 다른 다능성 줄기세포로부터 생성될 수 있다. 예를 들어, 혈관중-콜로니 형성 세포는 수정, 체세포 핵전이 (SCNT), 처녀생식, 융핵발생, 또는 다른 성적 또는 무성적 수단에 의해서 생산되는지 여부와는 관계없이, 플레이팅된 배아, ICMs, 포배, 영양세포/트로펙토덤 (trophectoderm) 세포, 하나 또는 그 이상의 할구, 영양세포 줄기세포, 배아 생식 세포, 또는 착상-단계전 배아 또는 배아-유사 구조의 다른 부분으로부터 또는 이들을 사용하여 (배아 줄기세포 유도체화의 단계를 반드시 거칠 필요가 없이) 생성될 수 있다. 유사하게, 혈관중-콜로니 형성 세포는 다능성 줄기세포로부터 부분적으로 분화된 세포 또는 세포주를 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 배아 줄기세포가 혈관중-콜로니 형성 세포보다 더 발생적으로 원시적인 세포를 생산하기 위해서 사용되면, 발생 가능성 및 적응성의 관점에서 이러한 다능성 줄기세포는 다음에 혈관중-콜로니 형성 세포를 생성시키기 위해서 사용될 수 있다.

추가로 또는 대신에, 혈관중-콜로니 형성 세포는 제대, 제대혈, 양수, 양수 줄기세포 및 태반을 포함한 (단, 제한되지는 않는다) 기타 출산전 또는 주산기 공급원으로부터 생성될 수 있다.

혈관중-콜로니 형성 세포가 인간 배아 조직으로부터 생성되는 경우에, 배상체 형성의 단계가 필요할 수 있음을 주목하여야 한다. 그러나, 배상체 형성이 적어도 부분적으로, 초기 발생 중에 나타나는 배엽의 삼차원 상호작용을 반복하는 것을 돕도록 제공된다는 점을 감안하면, 이러한 단계는 다능성 줄기세포가 이미, 실질적으로 배상체 형성과 동일한 목적을 제공하는 구조 또는 조직화를 갖는 경우에는 반드시 필요하지는 않다. 예를 들어, 혈관중-콜로니 형성 세포가 플레이팅된 포배로부터 생성되는 경우에, 삼차원적 조직화의 레벨은 이미 포배 내의 세포 중에 존재한다. 이와 같이, 배상체 형성의 단계는 세포내 시그널, 유도성 자극, 또는 삼차원적 구성을 제공하기 위해서 반드시 필요하지 않다.

본 발명의 방법 및 용도는 다능성 줄기세포 또는 배아 유래 세포로부터 혈관중-콜로니 형성 세포를 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 배아 유래 세포는 배아 줄기세포이다. 특정의 다른 구체예에서, 배아 유래 세포는 플레이팅된 배아, ICMs, 포배, 영양세포/트로펙토덤 세포, 하나 또는 그 이상의 할구, 영양세포 줄기세포, 또는 초기 착상전 배아의 다른 부분이다. 전술한 것 중의 어느 것의 경우라도, 배아 유래 세포는 수정, 체세포 핵전이 (SCNT), 처녀생식, 융핵발생, 또는 다른 성적 또는 무성적 수단에 의해서 생산된 배아로부터 유도될 수 있다.

본 출원 전체적으로, 방법이 배아 줄기세포로부터 혈관중-콜로니 형성 세포를 생성시키는 것을 구체적으로 언급하여 기술된 경우에, 본 발명은 다른 다능성 줄기세포 또는 배아 유래 세포로부터, 또는 이들을 사용하여, 그리

고 동일한 치료학적 적용 분야 중의 어떤 것을 위해서 생성된 세포를 사용하여 혈관중-콜로니 형성 세포를 생성시키는 것도 마찬가지로 고려한다.

본 발명의 특정한 관점에서, 인간 배아 줄기세포는 이 방법의 출발물질일 수 있다. 배아 줄기세포는 피더 세포의 존재 또는 부재 하에서와 같이 본 기술분야에서 공지된 어떤 방법으로나 배양될 수 있다.

배아 줄기세포는 혈청을 함유하는 배지 내의 현탁액으로 배상체 ("EBs")를 형성할 수 있다 [Wang *et al.* 2005 J Exp Med (201):1603-1614; Wang *et al.* 2004 Immunity (21): 31-41; Chadwick *et al.* 2003 Blood (102): 906 - 915]. 그러나, 혈청의 첨가는 실험에서의 가변성, 비용, 감염성 작용제에 대한 가능성, 및 제한된 공급을 포함한 특정한 과제를 제시한다. 추가로, 임상적 및 특정의 상업적 적용을 위해서, 혈청의 사용은 생물학적 제품을 관리하는 추가의 미국 및 국제적 규제 준수사항을 필요로 한다.

본 발명은 혈청을 사용하지 않고 다능성 줄기세포로부터 인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키는 방법을 제공한다. 무혈청 조건은 혈청을 필요로 하는 조건보다 GMP (good manufacturing process) 하에서의 대량 생산에 더 도움이 된다. 더구나, 무혈청 조건은 배지에 첨가된 특정 인자의 반감기를 연장시킨다 (예를 들어, 배지 내에서 성장 인자, 사이토킨 및 HOXB4를 포함한 단백질의 반감기는 혈청이 존재하지 않는 경우에 증가한다). 특정의 구체예에서, 배지는 BMP4 및 VEGF로 보충된다. 특정의 구체예에서, 무혈청 배지가 인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키기 위한 본 발명의 방법 전체에 걸쳐서 사용된다.

인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키는 이 방법의 제1 단계에서는, 인간 줄기세포를 무혈청 배지 내에서 성장시키고, 배상체로의 분화를 유도한다. 배상체 형성을 유도하기 위해서는 배아 줄기세포를 펠릿화시키고, 하나 또는 그 이상의 형태발생 인자 및 사이토킨이 보충된 무혈청 배지 내에 (예를 들어, 스템라인 (Stemline) I 또는 II 배지 (Sigma™) 내에) 재현탁시킨 다음에, 저부착 (low attachment) (예를 들어, 초저 부착) 배양 접시 상에 플레이트하였다. 형태발생 인자 및 사이토킨에는 골형성 단백질 (예를 들어, BMP2, BMP-4, BMP-7, 단 BMP-3은 아님) 및 VEGF, SCF 및 FL이 포함될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 골형성 단백질 및 VEGF는 단독으로, 또는 다른 인자와 함께 사용될 수 있다. 형태발생 인자 및 사이토킨은 세포 배양의 0-48 시간에 배지에 첨가될 수 있다. 이들 조건 하에서의 배양 후에, 트롬보포이에틴 (TPO), Flt-3 리간드 및 줄기세포 인자 (SCF)를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 초기 조혈성 증량 사이토킨의 존재 하에서의 배양은 플레이트된 ES 세포가 EBs를 형성하도록 한다. TPO, Flt-3 리간드 및 SCF 이외에도, VEGF, BMP-4, 및 HoxB4가 또한 배지에 첨가될 수도 있다. 하나의 구체예에서는, 인간 ES 세포를 우선 BMP-4 및 VEGF₁₆₅ (예를 들어, 25-100 ng/ml)의 존재 하에서 성장시키고, 이어서 BMP-4, VEGF₁₆₅, SCF, TPO, 및 FLT3 리간드 (예를 들어, 10-50 ng/ml) 및 HoxB4 (예를 들어, 1.5-5 µg/ml)의 본 발명에 기술된 바와 같은 삼중 단백질 전달 도메인-HoxB4 융합 단백질)의 존재 하에서 성장한다. 상기 추가의 인자는 플레이트한 지 48-72 시간 후에 첨가될 수 있다.

이러한 본 발명의 방법에서, 인간 혈관아세포는 초기 배상체 ("EBs")로부터 분리된다. 초기 EBs로부터 혈관아세포를 분리시키는 것은 시험관 내에서 세포의 증량을 뒷받침한다. 인간 세포의 경우에, 혈관아세포는 10일 미만 동안 성장시킨 EBs로부터 수득될 수 있다. 본 발명의 특정한 구체예에서, 혈관아세포는 2-6일 동안 인간 EBs 내에서 발생한다. 하나의 구체예에 따르면, 혈관아세포는 4-8일 동안 성장시킨 인간 EBs로부터 확인 및 분리될 수 있다. 다른 구체예에서, 인간 EBs는 혈관아세포를 분리시키기 전에 2-5일 동안 성장한다. 특정의 구체예에서, 인간 EBs는 혈관아세포를 분리시키기 전에 3-4.5일 동안 성장한다.

특정의 구체예에서는, 초기 EBs를 세척하고 분리시킨다 (예를 들어, 트립신/EDTA 또는 콜라게나제 B에 의해서). 그 후, 선택된 수의 세포 (예를 들어, $2-5 \times 10^5$ 세포)를 혈관아세포 성장을 위해서 최적화된 무혈청 메틸셀룰로즈 배지 (예를 들어, BL-CFU 배지, 예를 들어, Stem Cell Technologies Catalogue H4436, 또는 혈관아세포 증량 배지 (HGM), 또는 MDM 중의 1.0% 메틸셀룰로즈, 1-2% 소혈청 알부민, 0.1 mM 2-머캅토에탄올, 10 µg/ml rh-인슐린, 200 µg/ml 철 포화된 인간 트랜스페린, 20 ng/ml rh-GM-CSF, 20 ng/ml rh-IL-3, 20 ng/ml rh-IL-6, 20 ng/ml rh-G-CSF를 함유하는 모든 배지)("rh"는 "재조합체 인간"을 의미한다)와 혼합시킨다. 이 배지를 초기 단계 사이토킨 (EPO, TPO, SCF, FL, FLt-3, VEGF, BMP2, BMP4 및 BMP7와 같은 (단, BMP3은 아니다) BMPs를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다) 및 HOXB4 (또는 또 다른 호메오박스 단백질)로 보충한다. 특정의 구체예에서는, 에리트로포이에틴 (EPO)이 배지에 첨가된다. 추가의 구체예에서는, EPO, SCF, VEGF, BMP-4 및 HoxB4가 배지에 첨가된다. 추가의 구체예에서, 세포는 EPO, TPO 및 FL의 존재 하에서 성장한다. H9가 출발 인간 ES 세포주인 특정의 구체예에서는, EPO, TPO 및 FL이 배지에 첨가된다. EPO, TPO 및 FL 이외에도, H9 또는 다른 ES 세포로부터 유도된 세포에 대한 배지는 VEGF, BMP-4, 및 HoxB4를 추가로 포함할 수 있다.

혈관아세포를 포함하는, 이 방법에 의해서 이렇게 수득된 세포 (세포는 BL-CFU 배지 내에 있을 수 있다)를 초저 부착 배양 접시 상에 플레이팅하고, CO₂ 배양기 내에서 배양하여 혈관아세포 콜로니로 성장한다. 일부의 세포는 이차 EBs를 형성시킬 수 있다. 약 3-6일 후에, 및 일부의 경우에는 3-4.5일 후에, 혈관아세포 콜로니가 관찰된다. 혈관아세포 콜로니는 그들의 독특한 포도-양 형태에 의해서 및/또는 이들의 작은 크기에 의해서 이차 EBs와 같은 다른 세포로부터 구별될 수 있다. 또한, 혈관아세포는 특정한 마커의 발현 (예를 들어, 초기 조혈 및 내피 세포 마커 둘 다의 발현) 뿐만 아니라 적어도 조혈 및 내피 세포 둘 다로 분화하는 그들의 능력에 의해서 확인될 수 있다 (이하 참조: 혈관아세포 계통 세포의 유도). 예를 들어, 혈관아세포는 성숙한 내피 또는 조혈 세포의 특징적인 특정한 특색을 결여하지만, 이들 세포는 특정의 마커 (예를 들어, CD71+)의 존재 및 다른 마커 (예를 들어, CD34-)의 부재로 확인될 수 있다. 혈관아세포는 또한, GATA-1 및 GATA-2 단백질, CXCR-4, 및 TPO 및 EPO 수용체를 발현할 수도 있다. 또한, 혈관아세포는 다른 마커 (예를 들어, CD31, CD34, KDR, 또는 다른 부착 분자)의 부재 또는 낮은 발현을 특징으로 할 수 있다. 추가로, 혈관아세포는 특정의 유전자 (예를 들어, SCL, LMO2, FLT-1, 배아성 태아 글로빈 유전자, NF-E2, GATA-1, EKLF, ICAM-4, 글리코포린, 및 EPO 수용체와 같은 혈관아세포 및 초기 원시 적아구 발생과 연관된 유전자)의 발현을 특징으로 할 수 있다.

따라서, 혈관아세포는 크기 (다른 세포보다 더 작음)에 의해서 분리될 수 있거나, 면역친화성 칼럼 크로마토그래피에 의한 것과 같이 안티-CD71+ 항체에 의해서 정제될 수 있다.

혈관아세포는 다음의 과정에 따라 크기 및/또는 형태에 의해서 분리될 수 있다. 성장의 6 내지 7일 후에, 세포 혼합물은 등갈며 다수의 세포의 클럼프 (clump)를 나타내는 EBs, 및 포도 모양이며 EBs 보다 더 작고 단일 세포인 혈관아세포를 함유한다. 따라서, 혈관아세포는 그들의 형태 및 크기를 기준으로 하여 분리될 수 있다. 혈관아세포를 예를 들어, 현미경 하에서 세포 혼합물을 관찰할 때에 수작업으로 골라낼 수 있다. 이어서 세포는 콜로니로 성장할 수 있으며, 각각의 콜로니는 100-150 개의 세포를 갖는다.

상술한 바와 같이 유도된 인간 혈관아세포 콜로니를 골라내고, 메틸셀룰로즈 CFU-배지 상에 재플레이팅하여 조혈성 CFUs를 형성시킨다. 특정의 구체예에서, CFU-배지는 스템셀 테크놀로지스 (StemCell Technologies) H4436을 포함한다. 추가의 구체예에서는, 혈관아세포를 사이토킨 및 다른 인자가 보충된 스템라인 (Stemline) II 배지 내에 플레이팅한다. 예를 들어, 각각의 BL-CFC 콜로니를 손으로 골라내고, 이 BL-CFC 콜로니를 제조용 인간 SCF (예를 들어, 20 ng/ml), TPO (예를 들어, 20 ng/ml), FL (예를 들어, 20 ng/ml), IL-3 (예를 들어, 20 ng/ml), VEGF (예를 들어, 20 ng/ml), G-CSF (예를 들어, 20 ng/ml), BMP-4 (예를 들어, 15 ng/ml), IL-6 (예를 들어, 10 ng/ml), IGF-1 (예를 들어, 10 ng/ml), 내피 세포 성장 보충물 (ECGS, 예를 들어, 100 µg/ml), Epo (예를 들어, 3 U/ml)을 갖는 스템라인 II (Stemline II)를 함유하는 피브로넥틴-코팅된 플레이트에 옮길 수 있다. 시험관 내에서 1 주일 동안 성장시킨 후에, 비-부착성 조혈 세포를 조심스럽게 피펫팅하여 제거하고 조혈성 CFU 시험을 위해서 직접 사용할 수 있다. 비-부착성 세포를 제거한 후에, 부착성 집단을 EGM-2 내피 세포 배지 (캠브렉스 (Cambrex™) 중에서 1 주일 더 성장시킨 다음에 vWF의 발현에 대해서 검사할 수 있다.

시험관 내에서의 혈관아세포의 증량

본 발명의 특정한 관점은 혈관아세포의 시험관내 증량에 관한 것이다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해서 증량된 혈관아세포는 상술한 바와 같은 인간 배아 줄기세포로부터 유도된 초기 배상체로부터 수득된다.

인간 배아 줄기세포 (hES 세포)로부터 혈관아세포를 유도하는 것 이외에도, 증량되는 혈관아세포는 포유동물 배아 [Ogawa *et al.* 2001 *Int Rev Immunol* (20):21-44, US 특허공개 제2004/0052771호], 태반 및 제대조직으로부터의 제대혈 [Pelosi, *et al.* 2002 *Blood* (100): 3203-3208; Cogle *et al.* 2004 *Blood* (103):133-5], 말초 혈액 및 골수 [Pelosi *et al.* 2002 *Hematopoiesis* (100): 3203-3208]와 같은 다른 포유동물 공급원으로부터 분리될 수도 있다. 특정의 구체예에서, 증량되는 비-인간 혈관아세포는 비-인간 (예를 들어, 마우스 및 비-인간 영장류) 배아 줄기세포로부터 생성될 수 있다. 특정의 구체예에서, 혈관아세포는 예를 들어, 자기 비드 양성 선택 (magnetic bead positive selection) 또는 정제 기술 (예를 들어, MACS 칼럼)과 같은 방법에 의해서 제대혈 (UCB) 또는 골수로부터 수득된다. 세포는 그들의 CD71+ 상태를 기초로 하여 선택될 수 있으며, CD34-로 확인될 수 있다. 추가로, 분리된 혈관아세포는 조혈 및 내피 세포 계통 둘 다를 발생시키는 그들의 가능성에 대해서 시험할 수 있다. 특정의 구체예에서, 배아, 제대혈, 말초 혈액, 골수 또는 다른 조직으로부터 분리 또는 정제되고, 임의로 강화된 혈관아세포는 95% 이상 순수하다.

골수 유래 세포는 출산전 (예를 들어, 배아 또는 태아), 유아 (예를 들어, 인간에서 출생부터 약 3세까지), 소아 (예를 들어, 인간에서 약 3세부터 약 13세까지), 청소년 (예를 들어, 인간에서 약 13세부터 약 18세까지),

청장년 (young adult) (예를 들어, 인간에서 약 18세부터 약 35세까지), 성인 (예를 들어, 인간에서 약 35세부터 약 55세까지), 또는 노인 (예를 들어, 인간에서 약 55세부터 그 이상)을 포함하는 공여체 각각의 발육의 어떤 단계로부터나 수득될 수 있다.

인간 골수는 예를 들어, 수술 중인 환자의 절개된 흉골로부터 긁어냄으로써 수확할 수 있다. 그 후, 골수는 0.1 내지 1 mm의 용적의 조직 클럼프 내에 보존된 다음에 마우스 배아 피더층 (feeder layer) (예를 들어, 미토마이신 C-처리되거나 조사된 피더층) 상에서 성장시킬 수 있다. 골수 세포는 플레이트에 부착하며, 1-2 주일의 배양 기간에 걸쳐서 혈관아세포는 형태적 특징 및/또는 세포 마커를 기초로 하여 확인하고 분리시킬 수 있다 [참조: 미국 특허공개 제2004/0052771호]. 그 후, 이어서 세포를 본 발명에 기술된 방법에 따라 무혈청 조건 하에서 성장 및 증량시킬 수 있다.

또한, 골수 세포, 및 혈액 또는 다른 조직으로부터의 세포를 분획화하여 혈관아세포를 수득할 수 있다. 분획화의 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 일반적으로 양성 선택 (즉, 특별한 특성을 기초로 하는 세포의 체류) 및 음성 선택 (즉, 특별한 특성을 기초로 하는 세포의 제거) 둘 다를 포함한다. 골수 유래 세포의 분획화 및 강화를 위한 방법은 인간 및 마우스 세포에 대해서 가장 잘 특징화된다.

골수 유래 또는 다른 세포를 분획화하고 강화시키기 위하여 본 기술분야에는 다양한 방법이 공지되어 있다. CD71을 발현하는 세포에 대해 강화시키는 것과 같은 양성 선택방법이 사용될 수 있다. 또한, CD3, CD10, CD11b, CD14, CD16, CD15, CD16, CD19, CD20, CD32, CD45, CD45R/B220 또는 Ly6G를 발현하는 세포를 제거하거나 감소시키는 음성 선택방법을 단독으로 또는 양성 선택기술과 함께 사용할 수도 있다. 골수 세포의 경우에, 공여체 골수 유래 세포가 자가 유래한 것이 아니면 음성 선택을 세포 제제에 대해 수행하여 분화된 T 세포를 감소 또는 제거할 수 있다.

일반적으로, 골수 유래, 혈액 또는 다른 세포의 선택/강화를 위해서 사용되는 방법은 밀도 원심분리방법도 또한 유용하지만, 면역친화성 기술을 이용할 수 있다. 면역친화성 기술은 본 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이 다양한 형태를 취할 수 있지만, 일반적으로는 어떤 타입의 분리기술과 함께 항체 또는 항체 유도체를 이용할 수 있다. 분리기술은 일반적으로 항체에 의해서 결합된 세포 및 항체에 의해서 결합되지 않은 세포의 물리적 분리를 제공하지만, 일부의 경우에는 항체에 의해서 결합된 세포를 사멸시키는 분리기술이 음성 선택을 위해서 사용될 수 있다.

형광 활성화 세포 분류 (FACS), 팬닝 (panning), 면역자기 분리, 면역친화성 크로마토그래피, 항체 매개된 보체 고정화, 면역독소, 밀도 구배 분리 등을 포함한 임의의 적합한 면역친화성 기술이라도 골수 유래, 혈액 또는 다른 세포로부터 혈관아세포를 선택/강화시키기 위해서 이용될 수 있다. 면역친화성 과정에서 처리한 후에, 목적하는 세포 (양성 선택의 경우에는 면역친화성 시약에 의해서 결합된 세포, 및 음성적 선택의 경우에는 면역친화성 시약에 의해서 결합되지 않은 세포)를 수집하고, 면역친화성 선택/강화의 추가의 라운드에 적용할 수 있다.

면역친화성 선택/강화는 일반적으로, 골수 유래 세포를 포함하는 세포의 제제를 항체 또는 항체 유도 친화성 시약 (예를 들어, 소정의 표면 마커에 대해 특이적인 항체)과 함께 배양한 다음에, 결합된 친화성 시약을 이용하여 항체가 결합된 세포에 관해서 또는 그에 대비하여 선택함으로써 수행된다. 선택방법은 일반적으로, 결합된 친화성 시약의 존재 또는 부재에 따라 단일 세포를 함유하는 소적 (droplets)을 상이한 용기 내로 유도하거나 (FACS), 고체상 기질에 결합된 (직접 또는 간접적으로) 항체를 이용하거나 (팬닝, 면역친화성 크로마토그래피), 자기장을 이용하여 친화성 시약을 통해서 자기 입자에 결합된 세포를 수집함으로써 (면역자기 분리) 수행될 수 있는 것과 같은 물리적 분리를 포함한다. 대신으로, 원치 않는 세포는 세포독성 공격을 친화성 시약에 의해서 결합된 세포에 향하게 하는 친화성 시약을 사용하여 골수 유래 세포 제제로부터 제거될 수 있다. 세포독성 공격은 친화성 시약에 의해서 활성화될 수 있거나 (예를 들어, 보체 고정화), 친화성 시약 (예를 들어, 리신 B 쇄와 같은 면역독소)에 의해 표적 세포에 국재화될 수 있다.

상술한 방법은 골수 유래 또는 혈액 세포의 제제로부터 세포를 강화시키는 것을 언급하고 있지만, 본 기술분야에서 숙련된 전문가가 유사한 양성 및 음성 선택 기술이 다른 조직으로부터의 세포 제제에 적용될 수 있음을 인지할 것이다.

본 발명의 특징의 관점은 혈관아세포의 시험관내 증량에 관한 것이다. 특징의 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해서 증량된 혈관아세포는 상술한 바와 같이 인간 배아 줄기세포로부터 유도된 초기 배상체로부터 수득된다. 다른 구체예에서, 혈관아세포는 인간 조직 (예를 들어, 태반 또는 제대혈, 말초 혈액, 골수 등)으로부터 분리 또는 강화된다.

특정의 구체예에서, 혈관아세포는 호메오도메인 (homeodomain) 단백질 (또한, 본 발명에서는 호메오박스 단백질로 칭함)의 존재 하에서 증량된다. 추가의 구체예에서, 혈관아세포는 HOXB4의 존재 하에서 증량된다. 특정의 구체예에서, HOXB4는 혈관아세포를 증량시키는 방법 전체에 걸쳐서 혈관아세포에 첨가된다.

HOXB4는 골수의 줄기세포 분획에서 생체내 발현되며, 이어서 분화 중에 하향-조절되는 호메오도메인 전사 인자이다 (또한, HOX2F, HOX2, HOX-2.6, 및 랫트에서는 HOXA5로 불림). HOXB4 유전자의 발현은 원시 줄기세포 표현형의 유지와 연관된다 [Sauvageau *et al.* 1995 *Genes Dev* 9: 1753-1765; Buske *et al.* 2002 *Blood* 100: 862-868; Thorsteinsdottir *et al.* 1999 *Blood* 94: 2605-2612; Antonchuk *et al.* 2001 *Exp Hematol* 29: 1125-1134].

혈관아세포를 생성 및 증량시키는 본 발명의 방법에서 사용된 HOXB4에는 전체 길이 HOXB4 (예를 들어, 공공 수탁번호 GI:13273315 (도 17), GI:29351568 (도 18)로 명시되는 HOXB4 폴리펩타이드) 뿐만 아니라 그의 모든 기능적 변이체 및 활성 단편이 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 야생형 HOXB4 단백질은 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3의 아미노산 서열, 또는 이러한 단백질의 어떤 다른 대체 대립유전자 형태에 의해서 코딩될 수 있다. 이러한 서열은 진뱅크 (Genbank)와 같은 공공연히 이용할 수 있는 데이터베이스를 통해서 입수할 수 있다. 추가로, HOXB4는 세포 내에서 이소성으로 (ectopically) 발현될 수 있거나, 배지 내에 제공될 수 있다. 이소성으로 발현된 HOXB4는 유도성 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 배지 내에 제공된 HOXB4는 또 다른 세포 타입 (예를 들어, 피더층)에 의해서 분비될 수 있거나, 배지에 직접 첨가될 수 있다.

본 발명은 또한, HOXB4를 포함하는 융합 단백질 (전체 길이 HOXB4, 또는 HOXB4 기능적 변이체 또는 HOXB4의 활성 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함)에 관한 것이다. HOXB4 이외에도, 이 융합 단백질은 또한, 어떤 추가의 단백질, 단백질 도메인 또는 펩타이드를 포함할 수 있다. 특정의 구체예에서, HOXB4는 단백질 전달 도메인 (PTD)에 결합하여 단백질이 배지로부터 세포 내로 전위하고, 이어서 핵 구획 내로 전위하도록 할 수 있다. 융합 단백질은 단백질 도메인 사이에 위치하는 하나 또는 그 이상의 링커 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

HOXB4의 기능적 변이체는 HOXB4의 돌연변이체 및 대립유전자 변이체, 및 그의 활성 단편을 포함한다. HOXB4의 기능적 변이체는 본 발명의 방법에 따라 혈관아세포를 증량시킬 수 있는 모든 HOXB4 폴리펩타이드 및 그의 활성 단편을 포함한다. HOXB4 기능적 변이체는 또한, 천연 HOXB4 단백질에 비해서 더 큰 전사 활성을 나타내는 HOXB4 폴리펩타이드를 포함한다. HOXB4 변이체는 야생형 HOXB4에 관해서 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 첨가 및/또는 결실을 갖는 단백질을 포함한다. HOXB4 변이체는 또한, SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 3에 제공된 서열과 적어도 75% 유사한 폴리펩타이드를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 따라서, HOXB4 변이체는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 3에 제공된 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 95%, 및 99% 유사한 폴리펩타이드를 포함한다.

HOXB4 변이체는 또한, 그의 보체를 코딩한 핵산 서열에 대해서 적어도 80% 동일한 핵산 서열에 의해서 코딩된 폴리펩타이드를 포함한다 (예를 들어, 야생형 HOXB4 단백질은 SEQ ID NO: 2 (GI:85376187; 도 15) 또는 SEQ ID NO: 4 (GI:29351567; 도 16)의 핵산 서열에 의해서 코딩될 수 있다). 따라서, HOXB4 변이체는 SEQ ID NO: 2 또는 SEQ ID NO: 4에 제공된 서열 또는 그에 대한 보체와 85%, 90%, 95%, 및 99% 동일한 핵산 서열에 의해서 코딩된 HOXB4 폴리펩타이드를 포함한다.

HOXB4를 코딩한 핵산 서열은 또한, SEQ ID NO: 2 또는 4의 핵산 서열에 엄밀한 조건 하에서 하이브리드화하는 모든 핵산 서열, 그에 대한 보체 또는 그의 단편을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 유사하게, 유전자 코드에서의 변성으로 인하여 SEQ ID NO: 2 또는 4에 기술된 바와 같은 핵산과 상이한 핵산도 본 발명의 범주에 포함된다. HOXB4 변이체 폴리펩타이드는 또한, 스플라이스 (splice) 변이체 또는 다른 천연적으로 존재하는 HOXB4 단백질 또는 핵산 서열을 포함한다.

HOXB4의 활성 단편은 본 발명의 방법에 따라 혈관아세포를 유지시킬 수 있는 전체 길이 HOXB4 폴리펩타이드의 모든 단편을 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다. 따라서, 하나의 구체예에서, 본 발명의 HOXB4 단백질은 예를 들어, 전체 길이 HOXB4의 N-말단 31, 32, 또는 33 아미노산과 같은 N-말단의 일부가 결여된 HOXB4 단백질이다.

HOXB4 단백질 중의 어떤 것이라도 추가의 단백질 또는 단백질 도메인과 융합될 수 있다. 예를 들어, HOXB4는 단백질 전달 도메인 (PTD)에 결합될 수 있다.

HOXB4에 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결된 단백질 전달 도메인은 HOXB4가 세포막을 횡단하여 전위하도록 함으로써 단백질이 궁극적으로 세포의 핵 구획에 도달할 수 있도록 한다.

HOXB4 단백질과 융합할 수 있는 PTDs에는 HIV 전사활성화 단백질 (transactivating protein; TAT)의 PTD (Tat

47-57) [Schwarze and Dowdy 2000 *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 45-48; Krosi *et al.* 2003 *Nature Medicine* (9): 1428-1432]가 포함된다. HIV TAT 단백질의 경우에, 막 전위 활성을 부여하는 아미노산 서열은 잔기 47-57 (YGRKKRRQRRR, SEQ ID NO: 5)에 해당한다 [Ho *et al.*, 2001, *Cancer Research* 61: 473-477; Vives *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 16010-16017]. 이 서열은 단독으로 단백질 전위 활성을 부여할 수 있다. TAT PTD는 또한, 9 개의 아미노산 펩타이드 서열 RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 6)일 수도 있다 [Park *et al.* *Mol Cells* 2002 (30):202-8]. TAT PTD 서열은 YARKARRQARR (SEQ ID NO: 7), YARAAARQARA (SEQ ID NO: 8), YARAARRAARR (SEQ ID NO: 9) 및 RARAARRAARA (SEQ ID NO: 10)를 포함하는, 문헌 [Ho *et al.*, 2001, *Cancer Research* 61: 473-477] (그의 기술 내용은 참고로 본 명세서에 참고로 포함된다)에 기술된 펩타이드 서열 중의 어떤 것이라도 될 수 있다.

본 발명의 HOXB4 단백질에 융합될 수 있는 PTDs를 함유하는 다른 단백질에는 헤르페스 심플렉스 (herpes simplex) 바이러스 1 (HSV-1) DNA-결합 단백질 VP22 및 드로소필라 안테나페디아 (*Drosophila Antennapedia*; Antp) 호메오틱 (homeotic) 전사 인자가 포함된다 [Schwarze *et al.* 2000 *Trends Cell Biol.* (10): 290-295]. Antp의 경우에는, 아미노산 43-58 (RQIKIWFQNRRMKWKK, SEQ ID NO: 11)이 단백질 전달 도메인을 나타내며, HSV VP22의 경우에 PTD는 잔기 DAATATGRSAASRPTERPRAPARSASRPRPVE (SEQ ID NO: 12)로 표현된다. 대신으로, HeptaARG (RRRRRRR, SEQ ID NO: 13) 또는 전달 활성을 부여하는 인공적 펩타이드가 본 발명의 PTD로 사용될 수도 있다.

추가적 구체예에서, PTD는 중복되거나 다중화된 PTD 펩타이드일 수 있다. 특정의 구체예에서, PTD는 TAT PTD 펩타이드 YARAAARQARA (SEQ ID NO: 14) 중의 하나 또는 그 이상이다. 특정의 구체예에서, PTD는 3 개의 TAT PTD 펩타이드 YARAAARQARA (SEQ ID NO: 15)로 구성된 멀티머 (multimer)이다. 예를 들어, 삼중 합성 단백질 전달 도메인 (tPTD)과 같은 멀티머성 PTD에 융합되거나 연결된 HOXB4 단백질은 세포에서 감소된 불안정성 및 증가된 안정성을 나타낼 수 있다. 이러한 HOXB4 구조물은 또한, 무혈청 배지 내에서, 및 hES 세포의 존재 하에서 안정할 수 있다.

융합 단백질을 코드화한 융합 유전자를 제조하는 기술은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다. 본질적으로, 상이한 폴리펩타이드 서열에 대해 코드화한 다양한 DNA 단편의 결합은 통상적인 기술에 따라 수행된다. 또 다른 구체예에서, 융합 유전자는 자동화 DNA 합성기를 포함하는 통상적인 기술에 의해서 합성될 수 있다. 대신으로, 유전자 단편의 PCR 증폭은 후에 어니일링되어 키메릭 유전자 서열을 생성시키는 2 개의 연속적인 유전자 단편 사이에 상보적 오버행 (overhang)을 발생시키는 앵커 프라이머 (anchor primers)를 사용하여 수행될 수 있다 [참조: 예를 들어, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons: 1992].

특정의 구체예에서, 폴리-(His) 서열과 같은 정제 선도 서열을 코드화한 융합 유전자는 HOXB4 폴리펩타이드 또는 HOXB4-융합 단백질의 원하는 부분의 N-말단에 연결되어 융합 단백질이 Ni^{2+} 금속 수지를 사용한 친화성 크로마토그래피에 의해서 정제가 가능하도록 할 수 있다. 그 후, 정제 선도 서열은 이어서 엔테로키나제에 의해서 제거되어 정제된 HOXB4 폴리펩타이드를 제공할 수 있다 [참조: 예를 들어, Hochuli *et al.*, (1987) *J. Chromatography* 411:177; and Janknecht *et al.*, *PNAS USA* 88:8972].

특정의 구체예에서, HOXB4 단백질 또는 그의 기능적 변이체 또는 활성 도메인은 개입 링커 서열이 있거나 없이 제2 단백질 또는 단백질 도메인 (예를 들어, PTD)의 C-말단 또는 N-말단에 연결된다. 링커의 정확한 길이 및 서열 및 연결된 서열에 대한 그의 배향은 달라질 수 있다. 링커는 예를 들어, 2, 10, 20, 30, 또는 그 이상의 아미노산을 포함할 수 있으며, 용해도, 길이, 입체적 분리 등과 같은 바람직한 특성을 기초로 하여 선택될 수 있다. 특별한 구체예에서, 링커는 예를 들어, 융합 단백질의 정제, 검출 또는 변형에 유용한 기능적 서열을 포함할 수 있다. 특정의 구체예에서, 링커는 2 개 또는 그 이상의 글리신의 폴리펩타이드를 포함한다.

단백질 도메인 및/또는 이에 의해 도메인이 융합되는 링커는 HOXB4의 유효성, 안정성 및/또는 기능적 특징을 변화시키도록 변형될 수 있다.

특정의 구체예에서, HOXB4는 혈관아세포 내에서 이소성으로 발현되거나, 배지 내에 제공된다. 이소성으로 발현된 HOXB4는 조절 서열에 작동적으로 연결될 수 있다. 조절 서열은 본 기술분야에서 인지되어 있으며, HOXB4 폴리펩타이드의 발현을 지시하도록 선택된다.

배지 내에 제공된 HOXB4는 또 다른 세포 타입에 의해서 분비될 수 있다. 또 다른 세포 타입은 배출성 HOXB4를 발현하도록 형질도입된 마우스 기질 세포 층과 같은 피더층일 수 있다. 예를 들어, HOXB4는 시그널 펩타이드, 또는 단백질의 방출 (export) 및 분비를 용이하게 하는 소수성 서열을 포함하도록 융합되거나 조작될 수 있다.

대신으로, PTD에 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결된 융합 단백질과 같은 HOXB4는 배지에 직접 첨가될 수 있다. 추가로, HOXB4는 레트로바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 상에 보유될 수 있다. 이러한 벡터는 그들의 배양물 내에서 혈관아세포 또는 다른 세포를 형질도입시킬 수 있다.

사용된 HOXB4 단백질에 따라, 특별한 구체예에서 HOXB4는 혈관아세포의 증량 중의 선택된 시간에 배지에 첨가된다. 혈관아세포는 무혈청 배지 내에서 증량되기 때문에, HOXB4는 비교적 안정하다. 따라서, 특정의 구체예에서, HOXB4 단백질 또는 융합 단백질은 인간 혈관아세포에 매일 첨가된다. 다른 구체예에서, HOXB4 단백질 또는 융합 단백질은 격일로 첨가되며, 또 다른 구체예에서 HOXB4 단백질 또는 융합 단백질은 매 2일마다 첨가된다. 하나의 구체예에서, HOXB4 융합 단백질인 HOXB4-PTD는 배지에 매 2일마다 첨가된다.

특정의 구체예에서, 혈관아세포는 이러한 세포를 증량시키기에 충분한 양으로 존재하는 어떤 다른 성장 인자 또는 단백질의 존재 하에서 증량될 수 있다.

인간 또는 비-인간 ES 세포, 골수, 태반 또는 제대혈, 말초 혈액 또는 다른 조직을 포함한 임의의 공급원으로부터 수득된 혈관아세포는 상술한 방법에 따라 증량될 수 있다. 따라서, 특정의 구체예에서, 선택된 수의 정제된 혈관아세포 또는 강화된 세포를 혈관아세포 성장을 위해서 최적화된 무혈청 메틸셀룰로즈 배지 (예를 들어, BL-CFU 배지)와 혼합시킨다. 이 배지는 초기 단계 사이토킨 (EPO, TPO, FL, VGF, BMP2, BMP4 및 BMP7와 같은 BMPs (단, BMP3는 아님)를 포함하나, 이들로 제한되지는 않는다) 및 HOXB4로 보충될 수 있다. 특정의 구체예에서는, 에리트르포이에틴 (EPO)이 배지에 첨가된다. 특정의 구체예에서는, EPO, TPO 및 FL이 배지에 첨가된다. 그 후, 세포를 초저 부착 배양 접시 상에 플레이팅하고, CO₂ 배양기 내에서 성장한다. 상기 언급한 바와 같이, 혈관아세포 콜로니는 독특한 포도 모양의 형태를 나타내며, 다른 세포보다 비교적 더 작고, 따라서 다른 세포로부터 구별될 수 있다. 혈관아세포는 또한, 마커에 대해서뿐만 아니라 조혈 또는 내피 세포 계통에서 더 분화하는 그들의 능력에 대해서 시험할 수 있다. 혈관아세포는 이어서 분리되고, 시험관 내에서 증량된다. 증량을 위해서 사용될 수 있는 배지에는 초기 단계 사이토킨 및 HOXB4가 보충된, 혈관아세포 성장을 위해서 최적화된 무혈청 메틸셀룰로즈 배지 (예를 들어, BL-CFU)가 포함된다. 초기 단계 사이토킨에는 EPO, TPO, FL, VEGF, BMP2, BMP4 및 BMP7와 같은 BMPs (단, BMP3는 아님)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 특정의 구체예에서는, 에리트르포이에틴 (EPO)이 배지에 첨가된다. 추가의 구체예에서는, EPO, TPO 및 FL이 배지에 첨가된다.

따라서, 혈관아세포를 증량시키기 위한 배지는 VEGF, SCF, EPO, BMP-4, 및 HoxB4를 포함할 수 있으며; 특정의 구체예에서, 배지는 추가로 TPO 및 FL을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 약 3.5일 동안 배양된 EBs로부터 제조된 단일 세포를 수집하고, 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA (Invitrogen)에 의해서 2-5 분 동안 분리시켰으며, 단일 세포 현탁액은 22G 니들 (needle)을 통해서 3-5 회 통과시킴으로써 제조되었다. 세포를 1,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리시킴으로써 수집하였다. 세포 펠렛을 50-200 μ l의 스템라인 (Stemline) I 배지에 재현탁시켰다. 혈관아세포를 증량시키기 위해서, 2 내지 5×10^5 개의 hES 세포의 분화로부터 유도된 단일 세포 현탁액을 50 ng/ml의 Tpo 및 FL의 존재/부재 하에 이스코브 (Iscove) MDM 내의 1.0% 메틸셀룰로즈, 1-2% 소 혈청 알부민, 0.1 mM 2-머캅토에탄올, 10 μ g/ml rh-인슐린, 200 μ g/ml 철 포화된 인간 트랜스페린, 20 ng/ml rh-GM-CSF, 20 ng/ml rh-IL-3, 20 ng/ml rh-IL-6, 20 ng/ml rh-G-CSF, 3 내지 6 유닛/ml rh-Epo, 50 ng/ml rh-SCF, 50 ng/ml rh-VEGF 및 50 ng/ml rh-BMP-4, 및 1.5 μ g/ml의 tPTD-HoxB4를 함유하는 2 ml의 혈관아세포 증량 배지 (HGM)와 혼합시켰다. 세포 혼합물을 초저 접시 상에 플레이팅하고, 5% CO₂ 하에 37°C에서 4-6일 동안 배양하였다.

특정의 상황에서는, 혈관아세포를 환자 또는 환자 일가로부터 수득하고, 상기 혈관아세포를 시험관 내에서 증량시키는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 상황에는 예를 들어, 양성 화학요법 또는 방사선 요법을 받도록 계획된 환자, 또는 자가 유래 HSC 이식 (환자 자신의 줄기세포를 사용함)이 사용될 수 있는 다른 상황이 포함된다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 증량된 혈관아세포 또는 혈관아세포 계통 세포를 사용하여 세포 기반 치료법을 필요로 하는 환자 (예를 들어, 조혈성 재구성 또는 치료, 또는 혈관 성장 또는 허혈을 포함한 혈관 상처의 치료가 필요한 환자, 이하 참조)를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 혈관아세포는 환자 또는 환자 일가의 골수, 혈액 또는 다른 조직으로부터 수득된다. 따라서, 특정의 구체예에서, 혈관아세포 (또는 혈관아세포 계통 세포)가 필요한 환자를 치료하는 방법은 환자 또는 환자 일가로부터 혈관아세포를 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 환자 또는 환자 일가로부터 분리된 혈관아세포는 본 발명의 방법에 따라 시험관 내에서 증량되고, 이어서 환자에 투여될 수 있다. 대신으로, 증량된 혈관아세포는 환자 치료 전에 조혈 세포 또는 내피 세포를 발생하도록 더 성장시킬 수 있다.

또한, 체세포 핵 전이와 같이 본 기술분야에서 공지된 어떤 방법을 사용하여 이러한 환자로부터 인간 ES 세포를 수득할 수도 있다. 그 후, 해당 환자의 혈관아세포는 본 발명의 방법을 사용하여 그 자신의 ES 세포로부터 생성 및 증량될 수 있다. 이들 혈관아세포 또는 그의 계통 유도체는 해당 환자 또는 그의 일가에 투여될 수 있다.

본 발명의 방법을 사용하여, 인간 혈관아세포는 상업적인 대량에 도달하도록 증량되며, 이것은 이어서 다양한 치료학적 및 임상적 적용 분야에서 사용될 수 있다. 더구나, 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득된 혈관아세포는 임상적 적용에 사용하기 위한 조혈 또는 내피 세포 계통을 발생시키도록 더 분화될 수 있다.

인간 ES 세포로부터 인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키기 위한 본 발명의 방법으로부터 수득된 혈관아세포는 적어도 내피 세포 또는 조혈 세포로 분화하는 가능성을 갖는다 (즉, 이들은 적어도 양-성능이다). 다른 혈관아세포도 역시 양성능일 수 있다. 또 다른 혈관아세포는 조혈 및 내피 세포가 아닌 세포로 분화할 수 있으며, 즉 이들은 다중- 또는 다능성이다).

감소된 복잡성 혈관아세포를 수득하기 위한 인간 배아 줄기세포에서 MHC 유전자의 조작

본 발명의 인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키는 방법을 위한 출발점으로 사용된 인간 배아 줄기세포는 또한, 각각 인간 집단에 존재하는 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성 또는 동형접합성인 인가 배아 줄기세포의 라이브러리로부터 유도될 수 있다. 특정의 구체예에서, 줄기세포의 상기 라이브러리의 각각의 구성원은 라이브러리의 나머지 구성원에 관한 MHC 대립유전자의 상이한 세트에 대해서 반접합성이거나 동형접합성이다. 특정의 구체예에서, 줄기세포의 라이브러리는 인간 집단에 존재하는 모든 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성이거나 동형접합성이다. 본 발명의 맥락에서, 하나 또는 그 이상의 조직적합성 항원 유전자에 대해서 동형접합성인 줄기세포는 하나 또는 그 이상의 (일부의 구체예에서는 모든) 이러한 유전자에 대해서 공접합성 (nullizygous)인 세포를 포함한다. 유전자좌에 대해서 공접합성이라는 것은 유전자가 그 좌 (locus)에서 존재하지 않는다는 것, 즉 해당 유전자의 대립유전자 둘 모두가 결실되거나 불활성화된 것을 의미한다. 모든 MHC 유전자에 대해서 공접합성인 줄기세포는 예를 들어, 유전자 표적화 및/또는 이형접합성의 상실 (LOH)과 같은 본 기술분야에서 공지된 표준 방법에 의해서 생산될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허공개 US 20040091936, US 20030217374 및 US 20030232430, 및 US 임시출원 제60/729,173호를 참고로 하며, 이들 모두의 기술내용은 참고로 본 명세서에 참고로 포함된다.

따라서, 본 발명은 감소된 MHC 복잡성 (complexity)을 갖는, 혈관아세포의 라이브러리를 포함한 혈관아세포를 수득하는 방법에 관한 것이다. 감소된 MHC 복잡성을 갖는 혈관아세포 및 혈관아세포 계통 세포는 환자 정합성 (matching)과 연관된 곤란성을 제거할 수 있기 때문에 치료학적 적용을 위해서 이용할 수 있는 세포의 공급을 증가시킬 수 있다. 이러한 세포는 MHC 컴플렉스의 유전자에 대해서 반접합성이거나 동형접합성인 되도록 조작된 줄기세포로부터 유도될 수 있다.

인간 ES 세포는 세포의 MHC 컴플렉스 내의 자매 염색체의 대립유전자 중의 하나에 대한 변형을 포함할 수 있다. 유전자 표적화와 같은 유전자 변형을 생성시키는 다양한 방법을 사용하여 MHC 컴플렉스 내의 유전자를 변형시킬 수 있다. 추가로, 세포 내의 MHC 컴플렉스의 변형된 대립유전자는 이어서 동일한 대립유전자가 자매 염색체 상에 존재하도록 동형접합성이 되게 조작될 수 있다. 이형접합성의 상실 (LOH)과 같은 방법을 이용하여 MHC 컴플렉스 내에 동형접합성 대립유전자를 갖도록 세포를 조작할 수 있다. 예를 들어, 어버이 대립유전자로부터의 MHC 유전자의 세트 내의 하나 또는 그 이상의 유전자를 표적화하여 반접합성 세포를 생성시킬 수 있다. MHC 유전자의 상이한 세트는 유전자 표적화 또는 LOH에 의해서 제거하여 공 라인 (null line)을 만들 수 있다. 이러한 공 라인을 추가로 배아 세포주으로 사용할 수 있으며, 여기서는 HLA 유전자의 어레이, 또는 개별 유전자를 탈락시켜 다른 식으로 균일한 유전적 배경을 갖는 반접합성 또는 동형접합성 은행을 만들 수 있다.

하나의 관점에서, 라이브러리의 각각의 구성원이 적어도 하나의 HLA에 대해서 동형접합성인 ES 세포주의 라이브러리를 사용하여 본 발명의 방법에 따라 혈관아세포를 유도한다. 또 다른 관점에서, 본 발명은 혈관아세포 (및/또는 혈관아세포 계통 세포)의 라이브러리를 제공하며, 여기서는 ES 세포의 몇 개의 라인이 선택되고, 혈관아세포로 분화된다. 이들 혈관아세포 및/또는 혈관아세포 계통 세포가 세포 기반 치료법이 필요한 환자를 위해서 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 특정한 구체예는 감소된 복잡성의 배아 줄기세포로부터 유도된 인간 혈관아세포, 조혈 줄기세포 또는 인간 내피 세포를 필요한 환자에 투여하는 방법에 관한 것이다. 특정의 구체예에서, 이 방법은 (a) 인간 혈관아세포, 조혈 줄기세포 또는 인간 내피 세포를 그에 투여하는 것을 포함하는 치료가 필요한 환자를 확인하는 단계; (b) 환자의 세포의 표면 상에서 발현된 MHC 단백질을 확인하는 단계; (c) 시험관 내에서 인간 혈

관아세포를 생성 및 증량시키는 본 발명의 방법에 의해서 만들어진 감소된 MHC 복잡성의 인간 혈관아세포의 라이브러리를 제공하는 단계; (d) 상기 라이브러리로부터 환자의 세포 상의 이 환자의 MHC 단백질과 정합하는 인간 혈관아세포를 선택하는 단계; (e) 임의로, 단계 (d)에서 확인된 인간 혈관아세포를 필요에 따라, 인간 조혈줄기세포, 내피 세포 또는 둘 다로 분화시키거나, 또는 이들 두 가지 계통 중의 하나 또는 둘 다로 더 분화되는 세포로 분화시키는 단계; (f) 단계 (d) 및/또는 (e)로부터의 세포 중의 어떤 것을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함한다. 이 방법은 예를 들어, 병원, 진료소, 진찰실 및 그 밖의 다른 건강케어시설과 같은 지역 센터에서 수행될 수 있다. 추가로, 환자에 대해서 정합성인 것으로 선택된 혈관아세포는 적은 세포 수로 저장된 경우에, 환자 치료 전에 증량시킬 수 있다.

인간 혈관중-콜로니 형성 세포/혈관아세포

특정의 관점에서, 본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 제공한다. 이들 세포는 다양한 치료학적 및 그 밖의 다른 용도를 갖는 독특한 원시 세포 타입이다. 더구나, 이 세포 타입은 적어도 조혈 및/또는 내피 계통의 발생을 연구하기 위한 중요한 도구를 제공한다. 이와 같이, 본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함하는 다양한 제제 (약제학적 제제 포함) 및 조성물뿐만 아니라 혈관중-콜로니 형성 세포로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 하나 또는 그 이상의 세포 타입을 포함하는 제제 (약제학적 제제 포함) 및 조성물을 목적으로 한다.

본 발명의 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 (a) 적어도 조혈 세포 타입 또는 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있고; (b) 적어도 조혈 세포 타입 및 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있으며; (c) 서로에 대해 (다른 인간 혈관중-콜로니 형성 세포에 대해) 느슨하게 부착성이고; (d) CD34 단백질을 발현하지 않으며; (e) CD31 단백질을 발현하지 않고; (f) KDR 단백질을 발현하지 않으며; (g) CD133 단백질을 발현하지 않고; (h) GATA2 단백질을 발현시키며; (i) LMO2 단백질을 발현하는 구조적 특징 중의 적어도 하나를 갖는다. 특정의 구체예에서, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 본 발명에 상세히 설명한 구조적 또는 기능적 특징 중의 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 또는 적어도 9 개를 갖는다.

본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 제공한다. 이러한 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 다른 인간 혈관중-콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착성인 것으로 특징화된다. 대신으로 또는 추가로, 이들 세포는 또한, 특정 마커의 발현 또는 발현의 결여를 기초로 하여 기술될 수 있다. 예를 들어, 이들 세포는 또한, 다음의 단백질 중의 적어도 하나의 발현의 결여를 기초로 하여 기술될 수 있다: CD34, KDR, CD133, 및 CD31.

상기에 상세히 설명한 바와 같이, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 흥미로운 특성 중의 하나는 이들이 서로에 대해 느슨하게 부착성이라는 점이다. 이들 세포는 단지 서로에 대해서 느슨하게 부착성이기 때문에, 혈관중-콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 분리기술이 필요없이 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있다. 세포는 효소적 분리나 기계적 및 효소적 분리의 조합이 아닌 기계적 분리 단독으로도 세포의 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 분리시키는데 충분하게 서로에 대해서 충분히 느슨하게 부착성이다. 즉, 기계적 분리는 실질적인 세포 상처 또는 사망을 야기할 만큼 큰 힘을 필요로 하지 않는다.

이 특성은 세포를 기술하고, 이들을 다른 세포 타입으로부터 표현형적으로 구별하는데 유용할 뿐만 아니라 상당한 치료학적 영향력을 갖는다. 예를 들어, 비교적 큰 개수 (1×10^6 보다 크거나, 1×10^7 보다도 크거나, 1×10^8 보다도 크다)의 혈관중-콜로니 형성 세포를 혈병 또는 색전을 야기할 위험이 실질적으로 적거나, 폐 내에서 머물게 할 위험이 실질적으로 적은 인간 또는 다른 동물에게 주사할 수 있다. 이것은 세포 치료법에 있어서의 상당한 진보이다. 비교적 큰 개수의 세포를 안전하게 투여하는 능력은 세포 치료법을 실용적이며, 증가하는 수의 질병 및 상태의 효과적인 치료에 가능하도록 만든다.

용어 "느슨하게 부착성"은 상기에서 정성적으로 기술되며, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 서로에 대한 행동을 나타낸다. 혈관중-콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리시킬 수 있다. 세포는 효소적 분리나 기계적 및 효소적 분리의 조합이 아닌 기계적 분리 단독으로도 세포의 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 분리시키는데 충분하게 서로에 대해서 충분히 느슨하게 부착성이다. 즉, 기계적 분리는 실질적인 세포 상처 또는 사망을 야기할 만큼 큰 힘을 필요로 하지 않는다.

이 용어는 또한 더 정량적으로 기술될 수도 있다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 용어 "느슨하게 부착성"은 배

양물 내의 세포의 적어도 50%가 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 혈관중-콜로니 형성 세포의 배양물 또는 콜로니를 나타내기 위해서 사용된다. 다른 구체예에서, 이 용어는 배양물 내의 세포의 적어도 60%, 65%, 70%, 또는 75%가 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 배양물을 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 이 용어는 배양물 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%까지도 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 배양물을 나타낸다.

효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 혈관중-콜로니 형성 세포를 분리시키는 능력은 기계적 분리 이후의 세포의 건강 및 생존도를 기초로 하여 더 정량화될 수 있다. 즉, 효소적 기술이 없는 분리가 상당수의 세포가 상처되거나 사멸할 만큼 큰 기계적 힘을 필요로 한다면 세포는 본 발명에서 정의된 바와 같은 느슨하게 부착성인 것이 아니다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 용어 "느슨하게 부착성"은 동일한 세포를 효소적 분리기술을 사용하여 분리시킨 경우에 관찰된 것에 비해서 세포의 건강 또는 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서, 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 세포의 배양물을 나타낸다. 예를 들어, 세포의 건강 또는 생존도는 동일한 세포의 배양물을 효소적 분리기술을 사용하여 분리시킨 경우에 관찰된 것과 비교하여 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만까지도 감소한다.

예시적인 효소적 분리기술에는 트립신, 콜라게나제, 또는 세포-세포 또는 세포-매트릭스 상호작용을 붕괴시키는 다른 효소에 의한 처리가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 예시적인 기계적 분리기술에는 피펫을 통한 1 회 또는 그 이상의 통과가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

본 발명에 따른 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 구조적으로 및 기능적으로 정의된다. 이러한 세포는 배아 조직, 출산전 조직, 주산기 조직, 및 성인 조직까지를 포함한 다수의 공급원 중의 어떤 것으로부터라도 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포는 인간 배아 줄기세포, 다른 배아 유래 세포 (포배, 할구, ICMs, 배아, 영양세포/트로포토타 세포, 영양세포 줄기세포, 원시 생식 세포, 배아 생식 세포 등), 양수, 양수 줄기세포, 태반, 태반 줄기세포, 및 체대로부터 생성될 수 있다.

본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함하는 조성물, 및 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함하는 제제 (약제학적 제제 포함)를 제공한다. 본 발명의 이들 관점의 특정한 특징은 이하에 상세히 기술된다. 본 발명은 본 발명의 이하의 관점 및 구체예 중의 어떤 것의 조합도 포함한다.

하나의 관점에서, 본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 제공한다. 이 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 다른 인간 혈관중-콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LM2 단백질을 발현한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 제공한다. 이 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있으며, 세포는 다음의 단백질 중의 어떤 것이라도 발현하지 않는다: CD34, CD31, KDR, 및 CD133. 특정의 구체예에서, 세포는 다른 인간 혈관중-콜로니 형성 세포에 느슨하게 부착성이다. 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LM2 단백질을 발현한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 실질적으로 정제된 집단을 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 세포는 분화하여 적어도 조혈 및 내피 세포 타입을 생산할 수 있으며, 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LM2 단백질을 발현한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 배아 조직으로부터 분화된 인간 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 특정의 구체예에서, 혈관중-콜로니 형성 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있으며, 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적

어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 특정의 구체예에서, 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 특정의 구체예에서, 혈관종-콜로니 형성 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 약제학적 제제는 임의의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여서도 제조될 수 있다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 다음의 단백질 CD34, CD31, KDR, 및 CD133 중의 어떤 것이라도 발현하지 않는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 특정의 구체예에서, 혈관종-콜로니 형성 세포는 분화하여 적어도 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 생산할 수 있다. 특정의 구체예에서, 혈관종-콜로니 형성 세포는 서로에 대해서 느슨하게 부착성이다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 약제학적 제제는 임의의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여서도 제조될 수 있다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 구체예에서, 조성물 또는 약제학적 제제는 적어도 1×10^5 개의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 포함한다. 전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 다른 구체예에서, 조성물 또는 약제학적 제제는 적어도 1×10^6 , 적어도 5×10^6 , 적어도 1×10^7 , 또는 1×10^7 개 이상의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 포함한다.

추가적 세포, 조성물, 및 제제는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 혈관종-콜로니 형성 세포로부터 분화된 하나 또는 그 이상의 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 포함하는 조성물 및 제제를 포함한다. 예시적인 조혈 세포 타입에는 조혈 줄기세포, 혈소판, RBCs, 림프구, 거핵구 등이 포함된다. 추가적 예로서, 본 발명은 혈관종-콜로니 형성 세포로부터 분화된 하나 또는 그 이상의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 중배엽 세포 타입과 같은 하나 또는 그 이상의 다른 세포 타입을 포함하는 조성물 및 제제를 포함한다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 구체예에서, 본 발명은 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 이들로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포의 동결보존된 제제를 제공한다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 구체예에서, 본 발명은 인간 혈관종-콜로니 형성 세포, 또는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 조성물 또는 제제의 치료학적 용도를 제공한다. 이러한 세포 및 제제는 명세서 전체에 걸쳐서 상세하게 설명된 상태 또는 질병 중의 어떤 것의 치료뿐만 아니라 혈액 은행산업에도 사용될 수 있다. 더구나, 인간 혈관종-콜로니 형성 세포로부터 분화된 세포, 또는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 조성물 또는 제제는 명세서 전체에 걸쳐서 상세하게 설명된 상태 또는 질병 중의 어떤 것의 치료에 치료학적으로뿐만 아니라 혈액 은행산업에도 사용될 수 있다.

본 발명의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포는 치료학적으로 사용될 수 있다. 추가로 또는 대신으로, 인간 혈관종-콜로니 형성 세포는 내피 및 조혈 계통의 발생을 연구하는데 사용되거나, 예를 들어, (i) 인간 혈관종-콜로니 형성 세포를 유지시키거나, (ii) 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 하나 또는 그 이상의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포 타입으로의 분화를 촉진시키기 위해서 사용될 수 있는 인자를 확인하기 위한 스크리닝 시험에서 사용될 수 있다. 더구나, 인간 혈관종-콜로니 형성 세포는 시험관내 또는 생체내 사용을 위한 하나 또는 그 이상의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포 타입을 생성시키기 위해서 사용될 수 있다.

본 발명의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포는 본 발명에 기술된 질병 또는 상태 중의 어떤 것을 치료하는 것을 포함하는, (단, 이들로 제한되지는 않는다) 본 발명에 기술된 방법 또는 적용 분야 중의 어떤 것에서나 사용될 수

있다.

시험관 내에서 증량된 혈관아세포를 포함하는 세포 제제

본 발명의 특징의 구체예에서, 포유동물 (인간을 포함) 혈관아세포는 상업적인 양에 도달하도록 증량되며, 다양한 치료학적 및 임상적 적용 분야에서 사용된다. 특별한 구체예에서, 혈관아세포는 대략 10,000 내지 400만 개 (또는 그 이상)의 세포 수에 도달하도록 증량된다. 이들 세포 수는 초기 제제로 출발한 지 3-4일 이내에 도달할 수 있다. 따라서, 본 발명은 대량의 혈관아세포를 포함하는 제제에 관한 것이며, 상기 제제는 적어도 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만, 200만, 300만 또는 400만 개의 세포를 포함한다.

본 발명은 또한, 대량의 혈관아세포를 포함하는 용액, 조성물 및 제제를 제공하며, 상기의 용액, 상기의 조성물 및 상기의 제제는 적어도 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만, 200만, 300만 또는 400만 개의 세포를 포함한다. 혈관아세포는 인간의 것일 수 있다.

본 발명의 다른 관점은 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득된 혈관아세포를 후에 임상적 적용 분야에서 사용되는 조혈 또는 내피 세포 계통, 또는 둘 다로 분화시키는데 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한, 대량의 조혈 또는 내피 세포를 포함하는 세포 제제에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득된 혈관아세포를 조혈 및 내피 세포가 아닌 다른 세포 계통으로 분화시키는데 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한, 대량의 다른 혈관아세포 유래 세포를 포함하는 세포 제제에 관한 것이다.

대량 (예를 들어, 수천 또는 수백만)의 혈관아세포를 포함하는 조성물 및 제제는 상술한 바와 같이 수득된 혈관아세포를 증량시킴으로써 수득될 수 있다. 따라서, 본 발명은 ES 세포 (예를 들어, 인간 ES 세포)를 증량시킴으로써 달성된 혈관아세포, 또는 제대혈, 말초 혈액 또는 골수로부터 수득된 혈관아세포를 대량으로 포함하는 조성물 및 제제에 관한 것이다. 추가로, 증량의 방법은 예를 들어, 마우스, 랫트, 소, 또는 비-인간 영장류 기원의 혈관아세포에 적용될 수 있기 때문에, 본 발명은 또한 인간 이외에도 다른 종의 혈관아세포를 대량으로 포함하는 조성물 및 제제에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해서 증량되는 혈관아세포는 양성능일 수 있으며, 즉 내피 세포 또는 조혈 줄기세포로 분화할 수 있다. 특징의 구체예에서, 인간 ES 세포로부터 생성되고 증량된 인간 혈관아세포는 양-성능이다. 혈관중-콜로니 형성 세포는 적어도 조혈 세포 타입 또는 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 혈관중-콜로니 형성 세포는 바람직하게는 양성능이며, 적어도 조혈 세포 타입 및 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 혈관중-콜로니 형성 세포는 적어도 단일-분화성이며, 바람직하게는 양-성능이다. 그러나, 추가로 혈관중-콜로니 형성 세포는 더 큰 정도의 발생 잠재력을 가질 수 있으며, 특징의 구체예에서는 다른 계통의 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 특징의 구체예에서, 혈관중-콜로니 형성 세포는 심장 세포 (예를 들어, 심근세포) 및/또는 평활근 세포와 같은 다른 중배엽 유도체를 발생시키도록 분화할 수 있다.

포유동물 혈관아세포 마커

상술한 바와 같이, 혈관중-콜로니 형성 세포는 성숙한 내피 또는 조혈 세포의 특징적인 특정한 특색을 결여한다. 그러나, 이들 혈관중-콜로니 형성 세포 또는 혈관아세포는 예를 들어, CD71+, GATA-1 및 GATA-2 단백질, CXCR-4, 및 TPO 및 EPO 수용체와 같은 다양한 마커에 의해서 확인될 수 있다. 추가의 구체예에서, 혈관아세포는 LMO-2를 발현한다. 혈관아세포는 추가로 다른 마커의 낮은 발현 또는 발현의 부재를 특징으로 할 수 있다. 따라서, 혈관아세포는 CD34- CD31-, 및 KDR-일 수 있다. 추가의 구체예에서, 혈관아세포는 CD34-, CD31-, KDR-, 및 CD133-일 수 있다.

따라서, 특징의 구체예에서, 본 발명의 방법에 의해서 생성되고 증량된 혈관아세포는 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함된 WO2007/120811의 표 2에 열거된 마커 중의 어느 하나 또는 그 이상의 존재 또는 부재에 의해서 특징화된다. 예를 들어, 혈관아세포는 "BL-CFC" 하에서 "-"로 표시된, 표 2에 열거된 마커 중의 어느 하나 또는 그 이상의 발현에 대해서 음성을 테스트할 수 있다. 따라서, 일부의 구체예에서, 혈관아세포는 CD34 발현에 대해서 음성일 수 있다. 세포는 추가로 또는 대신으로 CD31, CD133, 및/또는 KDR 발현에 대해서 음성일 수 있다. 추가의 구체예에서, 혈관아세포는 표 2에서 "+"로 표시된 마커 중의 어떤 것이라도 발현할 수 있다. 예를 들어, 세포는 마커 LMO-2 및 GATA-2 중의 하나 또는 그 이상을 발현할 수 있다. 마커의 발현은 예를 들어, 단백질 발현에 대해서 시험하는 면역조직화학 또는 면역블롯팅, 또는 RNA 레벨에서의 발현에 대해 시험하는 mRNA 분석과 같은 어떤 방법에 의해서라도 평가될 수 있다.

혈관아세포 계통 세포의 유도

본 발명의 방법 및 세포 제제는 또한, 혈관아세포 유도체 세포에 관한 것이다. 본 발명에 의해서 생성되고 증량

된 인간 혈관아세포 및 본 발명의 방법에 의해서 증량된 포유동물 혈관아세포는 시험관 내에서 분화하여 조혈 세포 (조혈 줄기세포 (HSCs)를 포함) 또는 내피 세포뿐만 아니라 이들 두 가지 계통에서 더 분화되는 세포를 수득할 수 있다. 이들 세포는 이어서 이하에 기술되는 치료학적 및 상업적 적용 분야에서 사용될 수 있다.

특정의 구체예에서, 조혈 세포는 혈관아세포를 3-10일 동안 무혈청 BL-CFU 내에서 성장시킴으로써 유도된다. 다른 구체예에서, hES 유래 BL-CFC 세포의 단일-세포 현탁액은 10-14일 동안 성장한다. 무혈청 조건이 생산 증대 및 규제 지침에 대한 순응을 용이하게 할 뿐만 아니라 비용을 감소시키는 한은 무혈청 조건을 유지시키는 것은 최적이다. 본 발명의 혈관아세포는 또한, 인간 조혈 줄기세포를 유지하고, BSA (예를 들어, 1% BSA), 인슐린 (예를 들어, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인간 인슐린), 트랜스페린 배지 또는 트랜스페린 (예를 들어, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인간 트랜스페린), L-글루타민, 베타-머캅토에탄올 (예를 들어, 10^{-4} M), 및 성장 인자를 포함하는 무혈청 헴 (Hem)-배양물 내에서 성장시킬 수도 있다 [Bhatia *et al.* 1997 *J Exp Med* (186): 619-624]. 성장 인자는 SCF (예를 들어, 300 ng/ml), 과립구-콜로니-자극 인자 (G-CSF) (예를 들어, 50 ng/ml), Flt-3 (예를 들어, 300 ng/ml), IL-3 (예를 들어, 10 ng/ml), 및 IL-6 (예를 들어, 10 ng/ml)을 포함할 수 있다. 혈관아세포로부터 조혈 세포를 수득하는데 유용한 다른 인자에는 트롬보포이에틴 (TPO) 및 VEGF [참조: 예를 들어, Wang *et al.* 2005 *Ann NY Acad Sci* (1044): 29-40] 및 BMP-4가 포함된다. 혈관아세포는 또한, 다중계통 (multilineage) 조혈 성장 인자 콕테일로 보충된 무혈청 메틸셀룰로즈 배지 내에서 성장시킬 수 있다. 따라서, 혈관아세포는 BSA, 포화된 인간 트랜스페린, 인간 LDL을 포함하며, 초기 작용 성장 인자 (예를 들어, c-키트 리간드, flt3 리간드), 다중계통 성장 인자 (예를 들어, IL-3, 과립구 대식세포-CSF (GM-CSF)), 및 단일계통 성장 인자 (예를 들어, G-CSF, M-CSF, EPO, TPO), VEGF, 및 bFGF가 보충된 이스코브 변형된 돌베코 배지 (IMDM) 내의 메틸셀룰로즈에서 성장시킬 수 있다. 대신으로, 혈관아세포는 조혈 세포의 하나의 타입 (예를 들어, 적혈구, 대식세포 또는 과립구)의 성장을 지지하기 위한 단일계통 성장 인자를 포함하는 배지 내에서 성장시킬 수 있다.

하나의 구체예에서는, 혈관아세포 콜로니를 스템라인 I 배지 내에 재현탁시킨다. 그 후, 세포를 1 ml의 무혈청 조혈성 CFU 배지 (H4436, Stem Cell Technologies™)+1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 tPTD-HoxB4 및 0.5% EX-CYTE (Serologicals Proteins Inc.™)와 혼합시킨다. 그 후, 세포 혼합물을 비처리된 세포 배양 플레이트 상에 플레이팅하고, 37°C에서 10-14일 동안 배양하였다. 초기 플레이팅한 지 10-14일 후에 야기된 조혈성 CFUs는 라이트-김사 염료 (Wright-Giemsa dye)에 의한 염색과 같은 방법에 의해서 형태적으로 특징화될 수 있다.

조혈 세포는 또한, 본 기술분야에서 공지된 다른 조건을 사용하여 (예를 들어, IMDM, 30% 태아 송아지 혈청 (FCS), 1% 소 혈청 알부민 (BSA), 10^{-4} M 베타-머캅토에탄올, 및 2 mM L-글루타민을 포함하는 배지 내에서) 혈관아세포로부터 유도될 수 있다. 추가로, 다른 구체예에서는 기본 섬유아세포 성장 인자를 사용하여 EBs 내에서 BL-CFC 빈도 둘 다를 촉진시키고, 조혈성 분화를 촉진시킬 수 있다 [Faloon *et al.* 2000 *Development* (127): 1931-1941]. 또 다른 구체예에서는, 성장 인자 헤만지오포이에틴 (hemangiopoietin) (HAPO)을 사용하여 혈관아세포의 성장 및 조혈성 분화를 촉진시킨다 [Liu *et al.* 2004 *Blood* (103): 4449-4456]. 조혈 세포로의 분화는 예를 들어, CD45 상태 (CD45+) 및 CFU 시험에 의해서 평가될 수 있다.

조혈 세포를 형성시키기 위해서, 인간 혈관아세포는 CFU-배지 내에서 3-10일 동안, 또는 임의로 더 긴 기간 (예를 들어, 10-14일) 동안 성장시킬 수 있다. 본 발명의 인간 혈관아세포는 과립구, 적혈구, 대식세포 및 거핵구를 포함하는 CFUs (CFU-GEMM/mix) 뿐만 아니라 후자의 세포 타입 중의 단지 하나만을 함유하는 콜로니 형성 유닛 (예를 들어, CFU-G, CFU-E, CFU-M, 및 CFU-GM)를 형성할 수 있다. 특정의 구체예에서는, hES 유래 BL-CFC 세포의 단일-세포 현탁액을 10-14일 동안 성장시켜 예를 들어, 적혈구, 골수, 대식세포, 및 다중계통 조혈 세포와 같은 조혈 세포를 유도한다.

본 발명의 다른 관점은 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득되고 증량된 인간 혈관아세포 또는 증량된 포유동물 혈관아세포로부터 유도된 내피 세포에 관한 것이다. 혈관아세포는 내피 성숙에 바람직한 조건에서 성장시킬 수 있다.

본 발명의 특정한 구체예에서, 내피 세포를 수득하기 위해서는 혈관아세포를 우선 피브로넥틴-코팅된 표면상에 플레이팅하고, 3-5일 후에 (또는 다른 구체예에서는 3-7일 후에) 매트릭셀의 두꺼운 층 위에 재플레이팅하여 내피 세포로의 분화를 지지하였다. 이들 조건은 혈관아세포 발생 중에 확립된 무혈청 조건을 유지시킨다. 대신으로, 혈관아세포는 내피 세포로의 분화를 지지하는 것으로 공지된 배지 내에서 성장시킬 수 있다. 이러한 조건에는 예를 들어, 20% 태아 소 혈청 (FBS), 50 ng/ml 내피 세포 성장 보충물 (즉, 뇌하수체 추출물), 10 IU/ml 헤파린, 및 5 ng/ml 인간 VEGF-A₁₆₅를 포함하는 엔도-배양 (Endo-culture)이 포함된다 [Terramani *et al.* 2000 *In*

vitro Cell Dev Biol Anim (36): 125-132]. 본 기술분야에서 공지된 다른 조건에는 25% FCS/말 혈청, 및 일부의 구체예에서는 헤파린 (예를 들어, 10 U/ml), 인슐린-양 성장 인자 (IGF1) (예를 들어, 2 ng), 및 EC 성장 보충물 (ECGS, *e.g.*, 100 µg)로 보충된 배지가 포함된다. 성장 인자 VEGF 및 EGF는 또한, 내피 분화를 지지하기 위해서 HAP0와 함께 사용될 수도 있다 [Liu *et al.* 2004]. 혈관아세포는 또한, 콜라겐 및 피브로넥틴으로 코팅된 접시 상에 집중하여 내피 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다. 세포를 폰 빌리브란트 인자 (von Willebrand factor; vWF) 및 내피 산화질소 신타제 (eNOS) 및 시험관 내에서 내피 네트워크를 형성하는 능력에 대해서 분석할 수 있다.

따라서, 내피 세포를 형성시키기 위해서는 상술한 방법에 의해서 유도된 혈관아세포 콜로니를 골라내어 내피 분화의 제1 단계를 위해서 최적화된 피브로넥틴-코팅된 배양물 상에 재플레이팅한다. 세포를 EGM-2 또는 EGM-2MV 완전 배지 (캄브렉스 (Cambrex™)) 내에 플레이팅할 수 있다. 3 내지 5일 후, 및 대체 구체예에서는 3 내지 7일 후에, 세포를 매트릭스의 층과 같은 내피 분화를 지지하는 표면에 재플레이팅한다. 배양의 16-24 시간 후에, 분지된 튜브-코드 (tube-cords)의 형성은 일반적인 내피 세포 행동을 시사한다. LDL 섭취와 같은 내피-특이적 시험을 또한 사용하여 이들 세포가 내피 성질의 것임을 확인할 수 있다.

본 발명의 다른 관점에서, 본 발명에 의해서 생성 및 증량된 인간 혈관아세포 및 본 발명의 방법에 의해서 증량된 포유동물 혈관아세포는 시험관 내에서 분화되어 다른 세포뿐만 아니라 이들 세포 계통으로부터 더 분화된 세포를 수득할 수 있다. 혈관아세포는 조혈 및 내피 세포로 분화하는 것을 넘어서는 더 큰 정도의 발생 잠재력을 가질 수 있기 때문에, 이러한 추가의 세포 계통은 본 발명에 의해서 생성 및 증량된 인간 혈관아세포 및 본 발명의 방법에 의해서 증량된 포유동물 혈관아세포로부터 유도될 수 있다.

비-생작성 혈관 세포

본 발명은 이전에 확인된 혈관아세포 및 혈관중-콜로니 형성 세포의 몇 가지 특징을 공유하는 신규의 세포 집단을 제공한다. 그러나, 본 발명에 기술된 신규의 세포 집단은 면역결핍성 동물에 투여하는 경우에 골수 내에 정착하지 않는다는 점에서 구별된다. 이러한 신규의 전구세포 세포 집단은 기본적인 발생 및 줄기세포 생물학의 연구에 유용하며, 시험관 내 및 생체 내에서 부분적으로 및 말단적으로 분화된 세포 타입을 생성시키는데 유용하고, 치료제의 개발에 유용하다. 추가로, 이들 세포는 예를 들어, (i) 비-생작성 혈관 세포의 증량을 촉진시키는 인자 또는 조건, 및 (ii) 비-생작성 혈관 세포로부터 하나 또는 그 이상의 분화된 세포 타입의 생성을 촉진시키는 인자 또는 조건을 확인하기 위한 스크리닝 시험에서 사용될 수 있다. 확인된 인자 및 조건은 세포 기반 및 무세포 치료법에서, 배지 및 제제의 생산 시에, 및 발생 및 줄기세포 생물학의 시험에서 사용될 수 있다.

개관

본 발명은 비-생작성 혈관 세포, 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 조성물 및 제제, 비-생작성 혈관 세포를 생산하고 증량시키는 방법, 비-생작성 혈관 세포로부터 분화된 세포 타입을 생산하는 방법, 및 비-생작성 혈관 세포 또는 이들로부터 유도된 세포를 치료학적으로 사용하는 방법을 제공한다.

본 발명에 기술된 방법은 인간 비-생작성 혈관 세포를 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 그러나, 세포는 마우스, 랫트, 토끼, 소, 개, 고양이, 양, 돼지 및 비-인간 영장류를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 다른 종으로부터 수득될 수 있다.

본 발명은 ES 세포, 포배 또는 할구, 태반 또는 제대 조직으로부터의 제대혈, 말초 혈액, 골수, 또는 그 밖의 다른 조직을 포함한 어떤 공급원으로부터나, 또는 본 기술분야에서 공지된 어떤 다른 수단에 의해서 수득된 포유동물 비-생작성 혈관 세포를 증량시키는 방법을 제공한다. 특정의 구체예에서, 인간 비-생작성 혈관 세포는 배아 줄기세포 또는 그 밖의 다른 다능성 줄기세포로부터 수득된다. 예를 들어, 인간 비-생작성 혈관 세포는 배아 줄기세포로부터 뿐만 아니라 iPS 세포로부터도 생성될 수 있다. 다른 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 인간 배아 유래 세포로부터 생성된다. 인간 배아 유래 세포는 세포의 실질적으로 동종 집단, 세포의 이종 집단, 또는 배아 조직의 전부 또는 일부일 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 배아 유래 세포의 예로서, 인간 비-생작성 혈관 세포는 인간 배아 줄기세포로부터 생성될 수 있다. 이러한 배아 줄기세포는 수정, 체세포 핵전이 (SCNT), 처녀생식, 융핵발생, 또는 다른 성적 또는 무성적 수단에 의해서 생산되는지 여부와는 관계없이, 예를 들어, 포배, 플레이팅된 ICMs, 하나 또는 그 이상의 할구, 또는 착상-단계전 배아 또는 배아-유사 구조의 다른 부분으로부터, 또는 이들을 사용하여 유도된 배아 줄기세포를 포함한다. 특정의 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 다능성 줄기세포로부터 생성된다. 다능성 줄기세포의 예로는 배아 줄기세포 및 iPS 세포가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 특정의 구체예에서, 인간 비-생작성 혈관 세포는 비-다능성 세포로부터 생성된다.

비-다능성 세포에는 피부, 뼈, 혈액, 결합조직, 심장, 신장, 폐, 간 또는 그 밖의 다른 내부 기관으로부터 유도된 세포와 같은 체세포가 포함될 수 있다. 특정의 구체예에서, 비-다능성 세포는 섬유아세포와 같은 결합조직으로부터 유도된 세포일 수 있다. 특정의 구체예에서, 비-다능성 세포는 성인 조직으로부터 유도된 세포이다.

특정의 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 혈소판 및 적혈구를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 조혈 줄기세포 및/또는 조혈성 세포 타입으로 더 분화될 수 있다. 이러한 세포는 수혈에서, 또는 다른 치료법에서 사용될 수 있다. 이러한 세포는 다수의 용도를 갖지만, 특별히 중요한 용도는 수혈을 위한 혈액의 이용도를 개선시키는데 있을 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 비-생작성 혈관 세포로부터 분화된 적혈구를 제공한다. 이러한 분화된 적혈구는 수혈을 위해서 사용될 수 있다.

본 발명의 추가의 관점은 필요한 사람들을 위한 수혈에 사용하기 위하여 비-생작성 혈관 세포로부터 분화된 조혈 세포를 생성시키는 방법에 관한 것이다. 특정의 구체예에서, 분화된 조혈 세포는 외상, 수술 중의 혈액 손실, 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환과 같은 혈액 질환, 또는 악성 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 외상, 수술 중의 혈액 손실, 또는 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환과 같은 혈액 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서는, 적혈구의 혼합된 집단이 수혈된다. 다수의 분화된 조혈성 세포 타입, 특히 적혈구는 일반적으로 생체내에 혼합된 집단으로 존재한다. 구체적으로, 연령 및 분화의 다양한 레벨의 순환 적혈구가 생체내에서 발견된다. 추가로, 적혈구는 더 적은 태아성 헤모글로빈 및 더 많은 성인 헤모글로빈을 발현하도록 시간이 경과함에 따라 성숙한다. 본 발명은 적혈구의 정제된 집단, 또는 다양한 레벨의 연령 및 분화를 갖는 적혈구의 혼합된 집단의 수혈을 포함한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 태아성 헤모글로빈 (헤모글로빈 F)을 발현하는 적혈구의 수혈을 포함한다. 태아성 헤모글로빈을 발현하는 적혈구의 수혈은 특히, 겸상 적혈구 빈혈의 치료에 유용할 수 있다. 수혈을 위한 대량의 세포를 생성시키는 능력은 전국적으로 혈액 은행 및 병원에서 겪고 있는 혈액의 만성적 부족을 완화시킬 수 있다.

특정의 구체예에서, 본 발명의 방법은 수혈을 위한 범용 세포의 생산을 허용한다. 구체적으로, 타입 O 및 Rh-인 적혈구는 쉽게 생성될 수 있으며, 수혈을 위한 범용 혈액 공급원으로서 제공될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법으로부터 생산된 적혈구는 기능적이다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 수혈하기 전에 헤모글로빈 F를 발현시킨다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 산소를 운반한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구와 동등한 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 75%인 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 50%인 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 25%인 수명을 갖는다.

특정의 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 더 큰 발생적 잠재성을 가질 수 있으며, 분화하여 내피 세포 타입, 평활근 세포 타입, 또는 심장 세포 타입을 생산할 수 있다.

본 발명의 방법은 다양한 상업적 및 임상적 적용을 위해서 유용한 대량으로 비-생작성 혈관 세포의 시험관내 증량을 허용한다. 시험관 내에서 비-생작성 혈관 세포의 증량은 비-생작성 혈관 세포의 증식을 나타낸다. 본 발명의 방법은 상업적으로 유용한 양에 도달하도록 인간 비-생작성 혈관 세포의 증량을 가능하게 하는 한편, 본 발명은 또한 대량의 비-생작성 혈관 세포, 및 대량의 인간 비-생작성 혈관 세포 (예를 들어, 적어도 10,000, 100,000, 또는 500,000 개의 세포)를 포함하는 세포 제제에 관한 것이다. 특정의 구체예에서, 세포 제제는 적어도 1×10^6 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 세포 제제는 적어도 2×10^6 개의 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함하며, 추가의 구체예에서는 적어도 3×10^6 개의 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 세포 제제는 적어도 4×10^6 개의 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함한다. 이들 세포 제제는 정제되거나 실질적으로 정제될 수 있음을 알아야 한다. 그러나, 특정의 구체예에서, 적합한 세포 제제는 비-생작성 혈관 세포 및 혈관중-콜로니 형성 세포의 혼합물을 포함한다. 혼합물은 더 큰 비율의 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 혼합물 및 더 큰 비율의 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함하는 혼합물을 포함하는, 어떤 비율이라도 될 수 있다.

본 발명은 10,000 내지 400만 또는 그 이상의 포유동물 (예를 들어, 인간) 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 용액, 제제 또는 조성물에 관한 것이다. 이러한 용액, 제제, 및 조성물 내의 비-생작성 혈관 세포의 수는 10,000 내지 400만 또는 그 이상의 범위 내의 어떤 수라도 될 수 있다. 이 수는 예를 들어, 20,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만 개 등일 수 있다.

유사하게, 본 발명은 인간 비-생작성 혈관 자손 세포 (예를 들어, 인간 조혈 줄기세포를 포함한 인간 조혈 세포)의 제제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로, 비-생작성 혈관 세포 및/또는 비-생작성 혈관 세포 자손을 생

산, 저장 및 배포하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 또한, 인간 또는 동물 환자에게 수혈하는데 적합한 방법 및 용액을 제공한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 수혈을 위한 적혈구 및/또는 혈소판, 및/또는 다른 조혈 세포 타입을 제조하는 방법을 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 외상 이후의 수혈을 위한 혈액을 제공하기 위하여 혈액 은행 및 병원에서, 또는 혈액 관련된 질병 또는 장애를 치료하는데 있어서 사용하기에 적합하다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 범용 공여체 세포인 적혈구를 제공한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 기능적이며, 수혈하기 전에 헤모글로빈 F를 발현한다.

본 발명은 또한, 인간 비-생착성 혈관 세포, 인간 비-생착성 혈관 세포의 실질적으로 정제된 집단을 포함하는 세포 배양물, 인간 비-생착성 혈관 세포를 포함하는 약제학적 제제, 및 비-생착성 혈관 세포의 동결보존된 제제를 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 상태의 치료가 필요한 환자에서 상태를 치료하는 약제를 제조하는데 있어서의 인간 비-생착성 혈관 세포의 용도를 제공한다. 대신으로, 본 발명은 상태의 치료가 필요한 환자에서 상태를 치료하는 약제를 제조하는데 있어서의 세포 배양물의 용도를 제공한다. 본 발명은 또한 필요한 환자에게서 상태를 치료하는 약제를 제조하는데 있어서의 약제학적 제제의 용도를 제공한다.

비-생착성 혈관 세포는 그들의 구조적 특성 및/또는 기능적 특성을 기초로 하여 확인되고 특징화될 수 있다. 이들 전구세포 세포는 면역결핍성 숙주에 투여하는 경우에, 생착하지 않는다. 특정의 구체예에서, 이들 세포는 이들이 서로에 대해서 느슨하게 부착성이라는 (다른 비-생착성 혈관 세포에 대해서 느슨하게 부착성이라는) 점에서 독특하다. 세포가 느슨하게 부착성인 구체예에서, 비-생착성 혈관 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 분리 기술에 대한 필요성이 없이 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 효소적 분리나 기계적 및 효소적 분리의 조합이 아닌 기계적 분리 단독으로도 세포의 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 분리시키는데 충분하게 서로에 대해서 충분히 느슨하게 부착성이다. 즉, 기계적 분리는 세포 집합체의 효소적 분리 이후에 관찰된 것과 비교하여 실질적인 세포 상처 또는 사망을 야기할 만큼 큰 힘을 필요로 하지 않는다.

특정의 구체예에서, 비-생착성 혈관 세포는 하나 또는 그 이상의 마커의 발현 또는 발현의 결여 (유전자의 레벨 또는 단백질의 레벨에서 평가됨)를 기초로 하여 더 확인되거나 특징화될 수 있다. 특정의 구체예에서, 비-생착성 혈관 세포 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 하나 또는 그 이상의 특징을 갖는다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 비-생착성 혈관 세포는 다음의 세포 표면 마커 중의 하나 또는 그 이상의 발현의 결여를 기초로 하여 확인되거나 특징화될 수 있다 (예를 들어, 세포는 다음의 마커 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3 또는 적어도 4 개의 발현의 결여를 기초로 하여 특징화될 수 있다): CD34, KDR, CD133, 또는 CD31. 추가로 또는 대신으로, 비-생착성 혈관 세포는 GATA2 및/또는 LMO2의 발현을 기초로 하여 확인되거나 특징화될 수 있다.

인간 비-생착성 혈관 세포

특정의 관점에서, 본 발명은 인간 비-생착성 혈관 세포를 제공한다. 이들 세포는 다양한 치료학적 및 다른 용도를 갖는 독특한 원시적 세포 타입이다. 더구나, 이 세포 타입은 적어도 조혈성 계통의 발생을 연구하는 중요한 도구를 제공한다. 이와 같이, 본 발명은 인간 비-생착성 혈관 세포를 포함하는 다양한 제제 (약제학적 제제 포함) 및 조성물뿐만 아니라 비-생착성 혈관 세포로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 하나 또는 그 이상의 세포 타입을 포함하는 제제 (약제학적 제제 포함) 및 조성물을 포함한다. 어떤 특정한 이론에 얽매임이 없이, 이들 세포는 다수의 조혈 세포 타입을 생성시키는 능력을 보유하는 독특하고, (혈관종-콜로니 형성 세포보다) 다소 더 수임적인 줄기세포 집단을 나타낸다.

본 발명의 비-생착성 혈관 세포는 혈관종-콜로니 형성 세포에 대해서 기술된 구조적 또는 기능적 특징 중의 하나 또는 어떤 조합을 기초로 하여 확인되거나 특징화될 수 있다. 이들 세포는 다수의 공급원 중의 어떤 것, 예를 들어, 배아 조직, 출산전 조직 또는 주산기 조직으로부터 유도될 수 있지만, 용어 "비-생착성 혈관 세포"는 공급원과는 무관하게, 생착하지 않으며, 적어도 하나의 조혈 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있고, 임의로 진술한 구조적 또는 기능적 특성 중의 하나 또는 그 이상을 갖는 세포에 적용된다.

설명을 위해서, 본 발명의 인간 비-생착성 혈관 세포는 면역결핍성 숙주에 투여되는 경우에 생착하지 않으며, (a) 적어도 하나의 조혈 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있고; (b) 적어도 조혈 세포 타입 및 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있으며; (c) 서로에 대해 (다른 비-생착성 혈관 세포에 대해) 느슨하게 부착성이고; (d) CD34 단백질을 발현하지 않으며; (e) CD31 단백질을 발현하지 않고; (f) KDR 단백질을 발현하지 않으며; (g) CD133 단백질을 발현하지 않고; (h) GATA2 단백질을 발현시키며; (i) LMO2 단백질을 발현한다는 구조적 특징 중의 적어도 하나를 갖는다. 특정의 구체예에서, 인간 비-생착성 혈관 세포는 본 발명에 상세하게 기술된

구조적 또는 기능적 특징 중의 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 또는 적어도 9 개를 갖는다.

상기에 상세히 기술된 바와 같이, 인간 비-생착성 혈관 세포의 관심있는 특성 중의 하나는 이들이 서로에 대해 느슨하게 부착성이라는 점이다. 이들 세포는 단지 서로에 대해서 느슨하게 부착성이기 때문에, 비-생착성 혈관 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리시킬 수 있다. 세포는 효소적 분리나 이들의 조합이 아닌 기계적 분리 단독으로도 세포의 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 분리시키는데 충분하게 서로에 대해서 충분히 느슨하게 부착성이다. 즉, 기계적 분리는 실질적인 세포 상처 또는 사망을 야기할 만큼 큰 힘을 필요로 하지 않는다.

이 특성은 세포를 기술하고, 이들을 다른 세포 타입으로부터 표현형적으로 구별하는데 유용할 뿐만 아니라 상당한 치료학적 영향력을 갖는다. 예를 들어, 비교적 큰 개수 (1×10^6 보다 크거나, 1×10^7 보다도 크거나, 1×10^8 보다도 크다)의 비-생착성 혈관 세포를 혈병 또는 색전을 야기할 위험이 실질적으로 적거나, 폐 내에서 머물게 할 위험이 실질적으로 적은 인간 또는 다른 동물에게 주사할 수 있다. 이것은 세포 치료법에 있어서의 상당한 진보이다. 비교적 큰 개수의 세포를 안전하게 투여하는 능력은 세포 치료법을 실용적이며, 증가하는 수의 질병 및 상태의 효과적인 치료에 가능하도록 만든다.

용어 "느슨하게 부착성"은 상기에서 정성적으로 기술되며, 인간 비-생착성 혈관 세포의 서로에 대한 행동을 나타낸다. 비-생착성 혈관 세포의 배양물 또는 콜로니는 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리시킬 수 있다. 세포는 효소적 분리나 이들의 조합이 아닌 기계적 분리 단독으로도 세포의 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서 배양물 또는 콜로니를 분리시키는데 충분하게 서로에 대해서 충분히 느슨하게 부착성이다. 즉, 기계적 분리는 실질적인 세포 상처 또는 사망을 야기할 만큼 큰 힘을 필요로 하지 않는다.

이 용어는 또한 더 정량적으로 기술될 수도 있다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 용어 "느슨하게 부착성"은 배양물 내의 세포의 적어도 50%가 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 비-생착성 혈관 세포의 배양물 또는 콜로니를 나타내기 위해서 사용된다. 다른 구체예에서, 이 용어는 배양물 내의 세포의 적어도 60%, 65%, 70%, 또는 75%가 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 배양물을 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 이 용어는 배양물 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%까지도 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 배양물을 나타낸다.

효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이, 단지 기계적 분리기술을 사용하여 비-생착성 혈관 세포를 분리시키는 능력은 기계적 분리 이후의 세포의 건강 및 생존도를 기초로 하여 더 정량화될 수 있다. 즉, 효소적 기술이 없는 분리가 상당수의 세포가 상처되거나 사멸할 만큼 큰 기계적 힘을 필요로 한다면 세포는 본 발명에서 정의된 바와 같은 느슨하게 부착성인 것이 아니다. 예를 들어, 특정의 구체예에서, 용어 "느슨하게 부착성"은 동일한 세포를 효소적 분리기술을 사용하여 분리시킨 경우에 관찰된 것에 비해서 세포의 건강 또는 생존도를 실질적으로 상처시키지 않으면서, 효소적 분리기술에 대한 필요성이 없이 단지 기계적 분리기술을 사용하여 단일 세포로 분리될 수 있는 세포의 배양물을 나타낸다. 예를 들어, 세포의 건강 또는 생존도는 동일한 세포의 배양물을 효소적 분리기술을 사용하여 분리시킨 경우에 관찰된 것과 비교하여 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 미만, 또는 1% 미만까지도 감소한다.

예시적인 효소적 분리기술에는 트립신, 콜라게나제, 또는 세포-세포 또는 세포-매트릭스 상호작용을 붕괴시키는 다른 효소에 의한 처리가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 예시적인 기계적 분리기술에는 피펫을 통한 1 회 또는 그 이상의 통과가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다.

본 발명에 따른 인간 비-생착성 혈관 세포는 구조적으로 및 기능적으로 정의된다. 이러한 세포는 배아 조직, 출산전 조직, 주산기 조직, 및 성인 조직까지를 포함한 다수의 공급원 중의 어떤 것으로부터라도 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 비-생착성 혈관 세포는 인간 배아 줄기세포, 다른 배아 유래 세포 (포배, 할구, ICMs, 배아, 영양세포/트로펙토덤 세포, 영양세포 줄기세포, 원시 생식 세포, 배아 생식 세포 등), 양수, 양수 줄기세포, 태반, 태반 줄기세포, 및 제대로부터 생성될 수 있다. 더욱 일반적으로, 비-생착성 혈관 세포는 배아 줄기세포 또는 다능성 줄기세포와 같은 다능성 세포로부터 생성될 수 있다. 예시적인 다능성 줄기세포에는 배아 줄기세포 및 유도된 다능성 줄기세포 (iPS 세포)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 인간 비-생착성 혈관 세포는 또한, 피부, 뼈, 혈액, 결합조직, 심장, 신장, 폐, 간 또는 어떤 다른 내부 기관으로부터 유도된 세포를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 체세포와 같은 비-다능성 세포로부터 생성될 수도 있다. 특정의 구체예에서,

비-다능성 세포는 섬유아세포와 같은 결합조직으로부터 유도된 세포일 수 있다. 특정의 구체예에서, 비-다능성 세포는 성인 조직으로부터 유도된 세포이다.

본 발명은 비-생작성 혈관 세포 (예를 들어, 인간 세포), 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 조성물, 및 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 제제 (약제학적 제제 포함)를 제공한다. 본 발명은 본 발명의 이하의 관점 및 구체예 중의 어떤 것의 조합뿐만 아니라 그 전체가 참고로 포함된 미국 출원 제11/787,262호에 제공된 기술과의 조합도 포함한다.

상기에 상세히 기술된 바와 같이, 혈관중-콜로니 형성 세포 및/또는 비-생작성 혈관 세포는 다능성 세포 (배아 줄기세포, 배아 유래 세포, 및 유도된 다능성 줄기세포)를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 다양한 세포로부터 생산될 수 있다.

하나의 관점에서, 본 발명은 비-생작성 혈관 세포 (예를 들어, 인간 세포)를 제공한다. 이 세포는 분화하여 적어도 하나의 조혈 세포 타입을 생산할 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 다른 인간 비-생작성 혈관 세포에 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 비-생작성 혈관 세포 (예를 들어, 인간 세포)의 실질적으로 정제된 집단을 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 세포는 분화하여 적어도 조혈 세포 타입을 생산할 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 배아 조직으로부터 분화된 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 다능성 세포 (다능성 줄기세포)로부터 분화된 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 특정의 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 분화하여 적어도 조혈 세포 타입을 생산할 수 있으며, 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 분화하여 적어도 조혈 세포 타입을 생산할 수 있는 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 세포 배양물을 제공한다. 특정의 구체예에서, 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유한다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 분화하여 적어도 조혈 세포 타입을 생산할 수 있는 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 특정의 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 서로에 대해 느슨하게 부착성이다. 특정의 구체예에서, 세포는 CD34 단백질을 발현하지 않는다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 다음의 단백질 중의 하나 또는 그 이상을 발현하지 않는다 (예를 들어, 세포는 다음의 단백질 중의 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 또는 적어도 4 개를 발현하지 않는다): CD34, CD31, CD133, KDR. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 GATA2 및/또는 LMO2 단백질을 발현한다. 특정의 다른 구체예에서, 세포는 인간 혈관중-콜로니 형성 세포의 기능적 또는 구조적 특징 중의 하나 또는 그 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개)을 공유한다. 약제학적 제제는 임의의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여서도 제조될 수 있다.

또 다른 관점에서, 본 발명은 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 약제학적 제제를 제공한다. 약제학적 제제는 임의의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 사용하여서도 제조될 수 있다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 구체예에서, 조성물 또는 약제학적 제제는 적어도 1×10^5 개의 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함한다. 전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 다른 구체예에서, 조성물 또는 약제학적 제제는 적어도 1×10^6 , 적어도 5×10^6 , 적어도 1×10^7 , 또는 1×10^7 개 이상의 인간 비-생작성 혈관 세포를 포함한다. 특정한 구체예에서, 제제는 정제되거나 실질적으로 정제된 제제이다. 다른 구체예에서, 제제는 비-생작성 혈관 세포 및 다른 세포 타입의 혼합물, 예를 들어, 비-생작성 혈관 세포 및 혈관중-콜로니 형성 세포의 혼합물을 포함한다.

추가적 세포, 조성물, 및 제제는 인간 비-생작성 혈관 세포로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 비-생작성 혈관 세포로부터 분화된 하나 또는 그 이상의 조혈 및/또는 내피 세포 타입을 포함하는 조성물 및 제제를 포함한다. 예시적인 조혈 세포 타입에는 조혈 줄기세포, 혈소판, RBCs, 림프구, 거핵구 등이 포함된다. 추가적 예로서, 본 발명은 비-생작성 혈관 세포로부터 분화된 하나 또는 그 이상의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 중배엽 세포 타입과 같은 하나 또는 그 이상의 다른 세포 타입을 포함하는 조성물 및 제제를 포함한다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 구체예에서, 본 발명은 인간 비-생작성 혈관 세포 또는 이들로부터 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포의 동결보존된 제제를 제공한다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정한 구체예에서, 본 발명은 인간 비-생작성 혈관 세포, 또는 인간 비-생작성 혈관 세포의 조성물 또는 제제의 치료학적 용도를 제공한다. 이러한 세포 및 제제는 명세서 전체에 걸쳐서 상세하게 설명된 상태 또는 질병 중의 어떤 것의 치료뿐만 아니라 혈액 은행산업에도 사용될 수 있다. 더구나, 인간 비-생작성 혈관 세포로부터 분화된 세포, 또는 인간 비-생작성 혈관 세포의 조성물 또는 제제는 명세서 전체에 걸쳐서 상세하게 설명된 상태 또는 질병 중의 어떤 것의 치료에 치료학적으로 사용될 수 있다.

본 발명의 인간 비-생작성 혈관 세포는 치료학적으로 사용될 수 있다. 추가로 또는 대신으로, 인간 비-생작성 혈관 세포는 내피 및 조혈 계통의 발생을 연구하는데 사용되거나, 예를 들어, (i) 인간 비-생작성 혈관 세포를 유지시키거나, (ii) 인간 비-생작성 혈관 세포의 하나 또는 그 이상의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포 타입으로의 분화를 촉진시키기 위해서 사용될 수 있는 인자를 확인하기 위한 스크리닝 시험에서 사용될 수 있다. 더구나, 인간 비-생작성 혈관 세포는 시험관내 또는 생체내 사용을 위한 하나 또는 그 이상의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포 타입을 생성시키기 위해서 사용될 수 있다.

본 발명의 인간 비-생작성 혈관 세포는 본 발명에 기술된 질병 또는 상태 중의 어떤 것을 치료하는 것을 포함하는, (단, 이들로 제한되지는 않는다) 본 발명에 기술된 방법 또는 적용 분야 중의 어떤 것에서나 사용될 수 있다. 예시적인 질병 및 상태는 그 전체가 참고로 포함된 미국 출원 제11/787,262호에 더 언급되어 있다. 추가로, 인간 혈관중-콜로니 형성 세포 및 비-생작성 혈관 세포는 기능적 적혈구를 포함한 분화된 조혈 세포 타입을 생산하기 위해서 사용될 수 있다.

시험관 내에서 증량된 혈관아세포를 포함하는 세포 제제

본 발명의 특정한 구체예에서, 포유동물 (인간을 포함) 비-생작성 혈관 세포는 상업적인 양에 도달하도록 증량되며, 다양한 치료학적 및 임상적 적용 분야에서 사용된다. 특별한 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 대략 10,000 내지 400만 개(또는 그 이상)의 세포 수에 도달하도록 증량된다. 이들 세포 수는 초기 제제로 출발한 지 3-4일 이내에 도달할 수 있다. 따라서, 본 발명은 대량의 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 제제에 관한 것이며, 상기 제제는 적어도 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만, 200만, 300만 또는 400만 개의 세포를 포함한다.

본 발명은 또한, 대량의 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 용액, 조성물 및 제제를 제공하며, 상기의 용액, 상기의 조성물 및 상기의 제제는 적어도 10,000, 50,000, 100,000, 500,000, 100만, 200만, 300만 또는 400만 개의 세포를 포함한다. 비-생작성 혈관 세포는 인간의 것일 수 있다. 용액은 정제되거나, 실질적으로 정제되거나, 혈관중-콜로니 형성 세포를 포함한 (단, 이들로 제한되지는 않는다) 다른 전구세포 세포 타입과의 혼합물일 수 있다.

본 발명의 다른 관점은 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득된 비-생작성 혈관 세포를 후에 임상적 적용 분야에서 사용되는 조혈 또는 내피 세포 계통, 또는 둘 다로 분화시키는데 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 또한,

대량의 부분적으로 또는 말단적으로 분화된 세포 타입을 포함하는 세포 제제에 관한 것이다.

대량 (예를 들어, 수천 또는 수백만)의 비-생작성 혈관 세포를 포함하는 조성물 및 제제는 상술한 바와 같이 수득된 비-생작성 혈관 세포를 증량시킴으로써 수득될 수 있다. 따라서, 본 발명은 ES 세포 (예를 들어, 인간 ES 세포)를 증량시킴으로써 달성된 비-생작성 혈관 세포, 또는 제대혈, 말초 혈액 또는 골수로부터 수득된 비-생작성 혈관 세포를 대량으로 포함하는 조성물 및 제제에 관한 것이다. 추가로, 증량의 방법은 예를 들어, 마우스, 랫트, 소, 또는 비-인간 영장류 기원의 비-생작성 혈관 세포에 적용될 수 있기 때문에, 본 발명은 또한 인간 이외에도 다른 종의 비-생작성 혈관 세포를 대량으로 포함하는 조성물 및 제제에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해서 증량되는 비-생작성 혈관 세포는 양성능일 수 있으며, 즉 내피 세포 또는 조혈 줄기세포로 분화할 수 있다. 특정의 구체예에서, 인간 ES 세포로부터 생성되고 증량된 인간 비-생작성 혈관 세포는 양-성능이다. 비-생작성 혈관 세포는 적어도 조혈 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 비-생작성 혈관 세포는 특정의 구체예에서 양성능이며, 적어도 조혈 세포 타입 및 내피 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 비-생작성 혈관 세포는 적어도 단일-분화성이며, 양성능일 수 있다. 그러나, 추가로 비-생작성 혈관 세포는 더 큰 정도의 발생 잠재력을 가질 수 있으며, 특정의 구체예에서는 다른 계통의 세포 타입을 발생시키도록 분화할 수 있다. 특정의 구체예에서, 비-생작성 혈관 세포는 심장 세포 (예를 들어, 심근세포) 및/또는 평활근 세포와 같은 다른 중배엽 유도체를 발생시키도록 분화할 수 있다.

추가로, 비-생작성 혈관 세포는 예를 들어, (i) 세포의 하나 또는 그 이상의 조혈 세포 타입으로의 분화를 촉진시키거나, (ii) 세포의 증식 및/또는 생존을 촉진시켜 세포 은행 및 저장을 용이하게 하는 약제를 확인하는 스크리닝 시험에서 사용될 수 있다. 비-생작성 혈관 세포는 또한, 기본적 발생 생물학을 시험하기 위해서 사용될 수 있거나, 혈관중-콜로니 형성 세포와 비교하여 2 개의 관련된 줄기세포 집단 사이의 발생적 차이를 확인할 수 있다.

인간 혈관아세포, 비-생작성 혈관 세포, 혈관아세포 계통 세포 및 비-생작성 혈관 계통 세포의 임상적 및 상업적 구체예

세포 기반 치료법

인간 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포는 생체 내에서 조혈 또는 내피 세포로 분화하는 가능성을 갖는 한편, 이들은 이들 두 가지 세포 타입 중의 어느 하나가 필요하거나 치료를 개선시킬 수 있는 세포 기반 치료에 사용될 수 있다. 또한, 환자는 혈관아세포 계통 세포 또는 비-생작성 혈관 계통 세포 (즉, 조혈 세포 및/또는 내피 세포)를 포함하는 어떤 치료법 또는 치료에 의해서나 치료될 수 있다. 이하의 항목에서는 본 발명의 방법에 의해서 생성되고 증량되거나, 본 발명의 방법에 의해서 증량된 본 발명의 인간 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포를 사용하는 방법을 기술한다.

본 발명의 특정의 구체예에서, 조혈 세포를 증가시키거나 치료하는 치료 및 혈관 성장을 증가시키고/시키거나 혈관 수복을 촉진시키기 위한 치료가 포함된다. 따라서, 특정의 관점에서 본 발명은 조혈 세포 또는 혈관 성장 또는 수복이 필요한 환자를 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 대상체의 혈관 내에 주사하거나, 수술을 통해서 대상체의 혈관에 투여할 수 있다. 환자 또는 대상체는 인간일 수 있다.

본 발명의 특정의 구체예에서, 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 이식에서 사용되며, 여기서는 다른 식으로 HSC 이식이 사용될 수 있다. 이러한 이식은 예를 들어, 급성 또는 만성 백혈병, 재생 불량성 빈혈 및 다양한 면역결핍 증후군뿐만 아니라 다양한 비-혈액학적 악성종양 및 자가-면역 장애를 갖는 환자의 치료를 위한 조혈 재구성에서, 및 고용량 화학요법 및/또는 방사선요법 이후의 치료-유도된 형성부전으로부터 환자를 구제하기 위해서 사용될 수 있다. 이러한 이식은 생체내 또는 생체외에서 (예를 들어, 골수 이식에서) 달성될 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서, 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 조혈 재구성 또는 조혈 치료가 필요한 환자를 치료하기 위해서 사용된다. 이러한 환자는 예를 들어, 탈라세미아 (thalassemias), 겸상 적혈구 빈혈, 재생불량성 빈혈 (또한, 저형성성 빈혈로도 불림), 혈구감소증, 골수 형성부전, 혈소판 결핍증, 백혈병과 같은 조혈성 악성종양, 발작성 야간 혈색뇨증 (PNH), 및 ADA (예를 들어, 데아미나제 (ADA)-결핍성 중증 복합 면역결핍증 (SCID))을 갖는 환자를 포함한다.

따라서, 본 발명의 특별한 구체예는 본 발명의 혈관아세포를 사용하여 조혈 재구성 또는 조혈 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 필요한 환자를 선택하고, 본 발명의 방법에 따라 인간

혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 생성 및 증량시키거나, 증량시키고, 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 환자에 투여하는 것을 포함하는, 조혈 재구성 또는 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 대신으로, 이 방법은 생성 및 증량된 또는 증량된 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 인간 조혈 세포로 분화시키고, 이어서 조혈 세포를 환자에 투여하는 것을 포함할 수 있다.

대체 구체예는 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 대규모로 생산하고, 필요한 환자를 선택하기 전에 저장하는 방법을 포함한다. 따라서, 본 발명의 다른 구체예는 필요한 환자를 선택하고, 상술한 방법에 따라 이미 분리 및 증량된 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 주문하고, 상기 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 환자에 투여하는 것을 포함하는, 조혈 재구성 또는 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 마찬가지로, 이 방법은 상기 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 인간 조혈 세포로 분화시키고, 상기 조혈 세포를 환자에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 추가의 구체예에서는, 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성 또는 동형접합성인 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 성장시키고, 임의로 상업적 양으로 성장시키고, 임의로 사업체에 의해서 저장한다. 환자가 이러한 세포, 혈관아세포 계통 세포 또는 비-생작성 혈관 계통 세포에 대한 필요성을 나타내면, 임상 의 또는 병원은 사업체에 이러한 세포를 주문할 것이다.

본 발명의 인간 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포는 혈관형성성 미소환경 하에서 증식하여 내피 세포로 분화하기 때문에, 인간 혈관아세포는 새로운 혈관을 제공하거나, 환자의 상해 부위에서 상처된 혈관의 수복을 유도하는 치료학적 방식으로 사용될 수 있다. 따라서, 특정의 관점에서, 본 발명은 새로운 혈관 성장을 촉진시키거나 상해를 입은 맥관구조를 수복하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 심근경색, 뇌졸중 및 허혈성 뇌, 당뇨병 동물 또는 환자에게서 나타나는 허혈성 사지 및 창상을 포함하는 허혈성 사지 및 피부 창상, 및 망막에서의 허혈성 재관류 상해와 같은 내피 상해를 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 본 발명의 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포에 의해서 치료될 수 있는 그 밖의 다른 허혈성 상태에는 신장 허혈, 폐 허혈, 및 허혈성 심근병이 포함된다. 혈관아세포는 또한, 풍선 혈관성형술 또는 혈관내 스텐트(stent)의 배치 이후에 상해를 입은 혈관을 수복하는 것을 돕기 위해 사용될 수도 있다. 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 추가로, 조직 이식, 수술에, 및 방사선 상해 이후에 사용될 수도 있다. 또한, 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 죽상동맥경화증의 진행을 치료 및/또는 예방할 뿐만 아니라 전신 경화증 및 레이노즈(Raynaud) 현상(RP)에서 나타나는 내피 세포 상처를 수복하기 위해서 사용될 수 있다 [Blann *et al.* 1993 *J Rheumatol.* (20):1325-30].

따라서, 본 발명은 필요한 환자에게 혈관 성장 또는 수복을 제공하는데 연루된 다양한 방법을 제공한다. 하나의 구체예에서, 본 발명은 상술한 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 정제된 제제의 유효량을 환자에 투여하여 허혈 조직 내에서 새로운 혈관 형성을 유도하는 것을 포함하는, 필요한 환자에게서 허혈성 조직 내에서 새로운 혈관의 형성을 유도하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명의 특정한 관점은 필요한 환자를 선택하고, 상술한 바와 같은 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 분리하고, 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 환자에 투여하는 것을 포함하는, 필요한 환자에게서 혈관 형성을 증진시키는 방법을 제공한다. 또 다른 관점에서, 본 발명은 필요한 환자를 선택하고, 상술한 바와 같이 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 증량시키거나, 생성 및 증량시키고, 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 인간에 투여하는 것을 포함하는, 필요한 환자에게서 상해를 입은 혈관을 치료하는 방법을 제공한다. 전술한 구체예 이외에도, 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 대규모로 생산되어 혈관아세포를 필요로 하는 환자를 선택하기 전에 저장될 수 있다. 추가의 구체예에서는, 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성이거나 동형접합성인 혈관아세포를 성장시키고, 임의로 상업적 양으로 성장시키고, 임의로 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포 치료를 위한 환자를 선택하기 전에 저장한다. 전술한 혈관아세포, 비-생작성 혈관 세포, 또는 이들 세포의 세포 제제 중의 어떤 것이라도 순환 내로(정맥 내로) 직접 투여될 수 있다. 특정의 구체예에서(예를 들어, 혈관 수복이 망막에 대한 허혈/재관류 상해의 치료 시와 같이 눈에서 필요한 경우), 혈관아세포, 비-생작성 혈관 세포, 또는 이들 세포의 세포 제제는 초자체내 주사에 의해서 투여할 수 있다.

혈관아세포, 비-생작성 혈관 세포, 및 이들의 유도체 세포의 용액 또는 제제의 투여는 어떤 경로에 의해서나 달성될 수 있으며, 사례별로 결정될 수 있다. 또한, 혈관아세포 또는 그의 유도체 세포의 이들 용액 또는 제제의 투여되는 유효량은 치료학적으로 효과적인 양이며, 사례별로 결정될 수 있다.

추가적 구체예에서, 혈관아세포 계통 세포 또는 비-생작성 혈관 계통 세포는 예를 들어, 상술한 적응증의 치료를 포함한 치료학적 적용에 사용된다. 따라서, 본 발명에 기술된 방법에 의해서 생성 및 증량되거나 증량된 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 시험관 내에서 분화되어 우선 조혈 및/또는 내피 세포를 수득한 다음에, 이들 2 가지 계통에서 더 분화된 세포를 수득한다. 이들 세포는 이어서 조혈성 상태를 치료하거나, 조혈 재구성

을 위해서, 또는 예를 들어, 허혈 또는 혈관 상해의 치료를 위해서 대상체 또는 환자에 투여할 수 있다.

본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득된 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포로부터 유도된 HSCs는 더 성장시켜 HSCs를 증량시키고/시키거나 다른 조혈 계통 세포 타입을 유도한다. 본 발명의 특정한 관점은 이식에 있어서의 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포로부터 유도된 HSCs의 용도에 관한 것이다. 추가의 구체예에서, 분화된 조혈 세포 (예를 들어, 과립구, 적혈구, 골수양 세포, 거핵구, 혈소판, 대식세포, 비만세포 및 호중구 [Wiles and Keller 1991 Development (111): 259])는 수혈 요법과 같은 다양한 치료에서, 또는 감염의 치료를 위해서 사용된다. 따라서, 본 발명의 다른 구체예는 본 발명의 혈관아세포로부터 유도된 HSCs 또는 조혈 계통 세포를 사용하여 조혈 재구성 또는 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

따라서, 특정의 관점에서 본 발명은 필요한 환자를 선택하고, 본 발명의 방법에 따라 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 증량시키거나 분리 및 증량시키고, 상기 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 조혈 줄기 세포 및/또는 성숙 조혈 세포로 분화시키고, 조혈 세포를 환자에 투여하는 것을 포함하는, 조혈 세포 또는 치료가 필요한 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 다른 관점에서, 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포는 본 발명에 기술된 방법에 따라 내피 세포를 발생시키도록 성장한다. 내피 세포는 이어서 새로운 혈관을 제공하거나, 환자의 상해 부위에서 상처된 혈관의 수복을 유도하기 위해서 사용될 수 있다. 따라서, 특정의 관점에서 본 발명은 새로운 혈관 성장을 촉진시키거나 상해를 입은 맥관구조를 수복시키는 방법에 관한 것이며, 여기서는 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포로부터 유도된 내피 세포가 치료법으로 사용된다. 내피 세포는 심근경색 및 폐 허혈, 뇌졸중 및 허혈성 뇌, 당뇨병 동물 또는 환자에서 나타나는 허혈성 사지 및 창상을 포함하는 허혈성 사지 및 피부 창상, 망막에서의 허혈성 재관류 상해, 신장 허혈과 같은 내피 상해를 치료하기 위해서 사용될 수 있다. 내피 세포는 또한, 풍선 혈관성형술 또는 혈관내 스텐트의 배치 이후에 상해를 입은 혈관을 수복하는 것을 돕기 위해서뿐만 아니라 이식, 수술에, 및 방사선 상해 이후에 사용될 수도 있다. 또한, 내피 세포는 죽상동맥경화증의 진행을 치료 및/또는 예방할 뿐만 아니라 전신 경화증 및 레이노즈 현상에서 나타나는 내피 세포 상처를 수복하기 위해서 사용될 수 있다.

내피 세포는 더 분화될 수 있으며, 적절한 경우에 이들 세포는 선행 단락에 열거된 것과 같은 "내피 세포" 질병 또는 상태 중의 하나 또는 그 이상을 치료하는데 사용될 수 있다.

따라서, 본 발명의 특정한 관점은 필요한 환자를 선택하고, 본 발명의 방법에 따라 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 증량시키거나 분리 및 증량시키고, 상기 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 내피 세포로 분화시키고, 내피 세포를 환자에 투여하는 것을 포함하는, 내피 또는 혈관 상해가 있거나 혈관 성장 또는 수복을 필요로 하는 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

혈액 은행

본 발명의 또 다른 관점은 수혈에 적합한 조혈 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 이러한 세포 및 방법은 다양한 용도를 갖지만, 특별히 중요한 용도는 수혈을 위한 혈액의 이용성을 개선시키는 것일 수 있다. 특정의 바람직한 구체예에서, 본 발명은 혈관아세포/혈관중-콜로니 형성 유닛 또는 비-생착성 혈관 세포로부터 분화된 적혈구를 제공한다. 이러한 분화된 적혈구는 수혈을 위해서 사용될 수 있다.

본 발명의 추가의 관점은 그를 필요로 하는 사람을 위한 혈액 수혈에 사용하기 위하여 혈관아세포/혈관중-콜로니 형성 유닛 또는 비-생착성 혈관 세포로부터 분화된 조혈 세포를 생성시키는 방법에 관한 것이다. 특정의 구체예에서, 분화된 조혈 세포는 외상, 수술 중의 혈액 손실, 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환과 같은 혈액 질환, 또는 악성 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 외상, 수술 중의 혈액 손실, 또는 빈혈, 겸상 적혈구 빈혈, 또는 용혈성 질환과 같은 혈액 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서는, 혈소판이 선천적 혈소판 장애 또는 악성 질환을 치료하기 위해서 수혈된다. 특정의 구체예에서는, 적혈구 및 혈소판의 혼합된 집단이 수혈된다.

다수의 분화된 조혈 세포 타입, 특히 적혈구는 일반적으로 생체내에 혼합된 집단으로 존재하는 것으로 인지하여야 한다. 구체적으로, 연령 및 분화의 다양한 레벨의 순환 적혈구가 생체내에서 발견된다. 추가로, 적혈구는 더 적은 태아성 헤모글로빈 및 더 많은 성인 헤모글로빈을 발현하도록 시간이 경과함에 따라 성숙한다. 본 발명은 적혈구의 정제된 집단, 또는 다양한 레벨의 연령 및 분화를 갖는 적혈구의 혼합된 집단의 수혈을 포함한다. 특별한 구체예에서, 본 발명은 태아성 헤모글로빈 (헤모글로빈 F)을 발현하는 적혈구의 수혈을 포함한다.

본 발명은,

(a) 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 제공하고;

(b) 상기 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 분화된 조혈 세포로 분화시키는 단계를 포함하는,

시험관 내에서 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 및 비-생착성 혈관 세포로부터 분화된 조혈 세포를 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한,

(a) 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 제공하고;

(b) 상기 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 분화된 조혈 세포로 분화시키고;

(c) 상기 분화된 조혈 세포로 혈액 수혈을 수행하는 단계를 포함하는,

인간 혈관종-콜로니 형성 세포 및 비-생착성 혈관 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 사용하여 혈액 수혈을 수행하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한,

(a) 인간 배아 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 배아 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하고;

(b) 배상체를 포함하는 상기 배양물에, 상기 배상체 배양물 내의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 증량시키기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하고;

(c) 상기 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 분화된 조혈 세포로 분화시키고;

(d) 상기 분화된 조혈 세포로 혈액 수혈을 수행하는 단계를 포함하는,

인간 혈관종-콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 사용하여 혈액 수혈을 수행하는 방법을 제공한다.

특정의 구체예에서, 상기 줄기세포, 배상체 및 혈관종-콜로니 형성 세포는 상기 방법의 단계 (a) 및 (b) 전체에 걸쳐서 무혈청 배지 내에서 성장된다.

본 발명은 또한,

(a) 인간 다능성 줄기세포를 포함하는 세포 배양물을, 상기 다능성 줄기세포의 배상체로의 분화를 유도하기에 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자의 존재 하에 무혈청 배지 내에서 배양하고;

(b) 배상체를 포함하는 상기의 배양물에, 상기 배상체 배양물 내에서 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 증량시키는데 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기의 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하고;

(c) 상기 배상체를 단일 세포로 분리시키고;

(d) 상기 단일 세포를 포함하는 상기의 배양물에, 상기 단일 세포를 포함하는 상기의 배양물 내에서 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 증량시키는데 충분한 양의 적어도 하나의 성장 인자를 첨가하고, 상기의 배양물을 무혈청 배지 내에서 계속 배양하고;

(e) 상기 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 분화된 조혈 세포로 분화시키고;

(f) 상기 분화된 조혈 세포로 혈액 수혈을 수행하는 단계를 포함하는,

인간 혈관종-콜로니 형성 세포로부터 시험관 내에서 분화된 조혈 세포를 사용하여 혈액 수혈을 수행하는 방법을 제공한다.

특정의 구체예에서, 상기 다능성 줄기세포, 배상체, 혈관종-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포 및 단일 세포는 상기 방법의 단계 (a)-(d) 전체에 걸쳐서 무혈청 배지 내에서 성장된다.

특정의 구체예에서, 다능성 줄기세포는 배아 줄기세포가다.

특정의 구체예에서, 성장 인자는 호메오박스 단백질, 또는 그의 기능적 변이체 또는 활성 단편을 포함하는 단백질이다. 특정의 구체예에서, 호메오박스 단백질은 HOXB4 단백질, 또는 그의 기능적 변이체 또는 활성 단편이다.

특정의 구체예에서, 분화된 조혈 세포는 적혈구, 혈소판 및 식세포와 같은 단일 세포 타입으로 생산된다. 그러나, 단일 세포 타입이 생산되는 경우에, 세포 타입은 특별한 세포 타입의 성숙도 또는 분화의 레벨의 관점에서 이종일 수 있음을 인지하여야 한다. 예를 들어, 분화된 적혈구는 성숙도의 레벨 및 세포 연령의 관점에서 이종일 수 있다. 이론적으로 얹매이지는 않지만, 적혈구 세포의 이러한 이종은 적혈구가 생체 내에 존재하는 방식과 유사하기 때문에 유익할 수 있다.

특정의 구체예에서, 단일 세포 타입은 혈액 내에 존재하는 분화된 세포 타입의 비율과 동등하게 혼합된다. 특정의 구체예에서, 다수의 분화된 조혈 세포 타입은 동일한 단계에서 생산된다. 특정의 구체예에서, 식세포는 과립구, 호중구, 호염기구, 호산구, 림프구 또는 단핵구로부터 선택된다. 특정의 구체예에서, 조혈 세포 타입은 혈액 내에 존재하는 분화된 조혈 세포 타입의 비율과 거의 동등한 비율로 생산되는데, 96%의 적혈구, 1%의 혈소판 및 3%의 식세포이다. 특정의 구체예에서는, 수혈 전에 혈장이 분화된 조혈 세포에 첨가된다. 특정의 구체예에서, 충전 세포 (packed cells), 예를 들어, 충전 적혈구는 혈장의 부재 또는 실질적인 부재 하에서 수혈된다.

특정의 구체예에서, 본 발명의 방법으로부터 생산된 분화된 조혈 세포는 기능적이다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법으로부터 생산된 혈소판은 기능적이다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법으로부터 생산된 식세포는 기능적이다. 특정의 구체예에서, 본 발명의 방법으로부터 생산된 적혈구는 기능적이다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 수혈 전에 헤모글로빈 F를 발현한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 산소를 운반한다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구와 동등한 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 75%의 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 50%의 수명을 갖는다. 특정의 구체예에서, 적혈구는 천연적으로 유도된 적혈구의 수명의 25%의 수명을 갖는다.

특정의 구체예에서, 본 발명의 방법은 100 mm 접시당 1×10^6 세포를 생산한다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 2×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 3×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 4×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 5×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 6×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 7×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 8×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 9×10^6 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 1×10^7 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 5×10^7 세포가 생산된다. 특정의 구체예에서는, 100 mm 접시당 1×10^8 세포가 생산된다.

특정의 구체예에서, 분화 단계는 상기 거론한 바와 같이 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 공지된 조건을 사용하여 수행된다. 특정의 구체예에서, 분화 단계는 세포를 적혈구로 분화시키는데 특이적인 방법을 사용하여 수행된다 [참조: WO 2005/118780, 본 명세서에 참고로 포함된다]. 특정의 구체예에서, 분화 단계는 세포를 혈소판으로 분화시키는데 특이적인 방법을 사용하여 수행된다. 특정의 구체예에서, 분화 단계는 세포를 백혈구로 분화시키는데 특이적인 방법을 사용하여 수행된다.

본 발명에 따라 사용될 수 있는 분화제에는 인터페론-알파 A, 인터페론-알파 A/D, 인터페론-베타, 인터페론-감마, 인터페론-감마-유도성 단백질-10, 인터류킨-1, 인터류킨-2, 인터류킨-3, 인터류킨-4, 인터류킨-5, 인터류킨-6, 인터류킨-7, 인터류킨-8, 인터류킨-9, 인터류킨-10, 인터류킨-11, 인터류킨-12, 인터류킨-13, 인터류킨-15, 인터류킨-17, 각질세포 성장 인자, 랩틴, 백혈병 억제 인자, 대식세포 콜로니-자극 인자, 및 대식세포 염증성 단백질-1 알파와 같은 사이토킨이 포함된다.

본 발명에 따른 분화제에는 또한, 성장 인자, 예를 들어, 6Ckine (재조합체), 액티빈 A, 알파A-인터페론, 알파-인터페론, 암피레굴린, 안지오키톤, B-내피 세포 성장 인자, 베타 셀룰린, B-인터페론, 뇌 유래 신경영양성 인자, C10 (재조합체), 카디오토로핀-1, 섬모 신경영양성 인자, 사이토킨-유도된 호중구 화학주성인자-1, 내피 세포 성장 보충물, 에오타신, 표피 성장 인자, 상피 호중구 활성화 펩타이드-78, 에리트로포이에틴, 에스트로겐 수용체-알파, 에스트로겐 수용체-B, 섬유아세포 성장 인자 (산성/염기성, 헤파린 안정화됨, 재조합체), FLT-

3/FLK-2 리간드 (FLT-3 리간드), 감마-인터페론, 신경교 세포주 유래 신경영양성 인자, Gly-His-Lys, 과립구 콜로니-자극 인자, 과립구 대식세포 콜로니-자극 인자, GRO-알파/MGSA, GRO-B, GRO-감마, HCC-1, 헤파린-결합 표피 성장 인자 유사 성장 인자, 간세포 성장 인자, 히레귤린-알파 (EGF 도메인), 인슐린 성장 인자 결합 단백질-1, 인슐린-양 성장 인자 결합 단백질-1/IGF-1 컴플렉스, 인슐린-양 성장 인자, 인슐린-양 성장 인자 II, 2.5S 신경 성장 인자 (NGF), 7S-NGF, 대식세포 염증성 단백질-1B, 대식세포 염증성 단백질-2, 대식세포 염증성 단백질-3 알파, 대식세포 염증성 단백질-3B, 단핵구 화학주성 단백질-1, 단핵구 화학주성 단백질-2, 단핵구 화학주성 단백질-3, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, NGF-B (인간 또는 랫트 재조합체), 온코스타틴 M (인간 또는 마우스 재조합체), 너하수체 추출물, 태반 성장 인자, 혈소판 유래 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 플레이오토로핀, 란테스, 줄기세포 인자, 기질 세포 유래 인자 1B/프리-B 세포 성장 자극 인자, 트롬보포에틴, 변형 성장 인자 알파, 변형 성장 인자-B1, 변형 성장 인자-B2, 변형 성장 인자-B3, 변형 성장 인자-B5, 종양 괴사 인자 (알파 및 B), 및 혈관 내피 성장 인자가 포함된다.

본 발명에 따른 분화제에는 또한, 호르몬 및 호르몬 길항제, 예를 들어, 17 β -에스트라디올, 부신피질자극성 호르몬, 아드레노메둘린, 알파-멜라닌세포 자극 호르몬, 융모성 고나도트로핀, 코르티코스테로이드-결합 글로불린, 코르티코스테론, 텍사메타존, 에스트리올, 여포 자극 호르몬, 가스트린 1, 글루카곤, 고나도트로핀, 하이드로코르티손, 인슐린, 인슐린-양 성장 인자 결합 단백질, L-3,3',5'-트리요오도티로닌, L-3,3',5'-트리요오도티로닌, 랩틴, 황체화 호르몬, L-티록신, 멜라토닌, MZ-4, 옥시토신, 부갑상선 호르몬, PEC-60, 너하수체 성장 호르몬, 프로게스테론, 프로락틴, 세크레틴, 성 호르몬 결합 글로불린, 갑상선 자극 호르몬, 티로트로핀 방출 인자, 티록신-결합 글로불린, 및 바소프레신이 포함된다.

또한, 본 발명에 따른 분화제에는 세포의 매트릭스 성분, 예를 들어, 피브로넥틴, 피브로넥틴의 단백질분해성 단편, 라미닌, 트롬보스폰딘, 아그레칸, 및 신데칸이 포함된다.

본 발명에 따른 분화제에는 또한, 다양한 인자에 대한 항체, 예를 들어, 항-저밀도 지질단백질 수용체 항체, 항-프로게스테론 수용체, 내부 항체, 항-알파 인터페론 수용체 2 항체, 항-c-c 케모킨 수용체 1 항체, 항-CD 118 항체, 항-CD 119 항체, 항-콜로니 자극 인자-1 항체, 항-CSF-1 수용체/c-fms 항체, 항-표피 성장 인자 (AB-3) 항체, 항-표피 성장 인자 수용체 항체, 항-표피 성장 인자 수용체, 포스포-특이적 항체, 항-표피 성장 인자 (AB-1) 항체, 항-에리트르포이에틴 수용체 항체, 항-에스트로겐 수용체 항체, 항-에스트로겐 수용체, C-말단 항체, 항-에스트로겐 수용체-B 항체, 항-섬유아세포 성장 인자 수용체 항체, 항-섬유아세포 성장 인자, 염기성 항체, 항-감마-인터페론 수용체 2 항체, 항-감마-인터페론 인간 재조합 항체, 항-GFR 알파-1 C-말단 항체, 항-GFR 알파-2 C-말단 항체, 항-과립구 콜로니-자극 인자 (AB-1) 항체, 항-과립구 콜로니-자극 인자 수용체 항체, 항-인슐린 수용체 항체, 항-인슐린-양 성장 인자-1 수용체 항체, 항-인터류킨-6 인간 재조합체 항체, 항-인터류킨-1 인간 재조합체 항체, 항-인터류킨-2 인간 재조합체 항체, 항-랩틴 마우스 재조합체 항체, 항-신경 성장 인자 수용체 항체, 항-p60, 닭 항체, 항-부갑상선 호르몬-양 단백질 항체, 항-혈소판 유래 성장 인자 수용체 항체, 항-혈소판 유래 성장 인자 수용체-B 항체, 항-혈소판 유래 성장 인자-알파 항체, 항-프로게스테론 수용체 항체, 항-레티노산 수용체-알파 항체, 항-갑상선 호르몬 핵 수용체 항체, 항-갑상선 호르몬 핵 수용체-알파 1/Bi 항체, 항-트랜스페린 수용체/CD71 항체, 항-변형 성장 인자-알파 항체, 항-변형 성장 인자-B3 항체, 항-종양 괴사 인자-알파 항체, 및 항-혈관 내피 성장 인자 항체가 포함된다.

본 발명은 또한, 상술한 바와 같은 잠재적 환자 수용체에 대해서 정합성인 세포를 제공할 수 있는 분화된 조혈 세포의 라이브러리를 제공한다. 특정의 구체예에서, 세포는 동결 저장된다. 따라서, 하나의 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 조직적합성 항원에 대해서 동형접합성인 분화된 조혈 세포 제제를 제공하는 단계를 포함하는, 제약 사업을 수행하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 본 발명에 기술된 방법에 의해서 증량될 수 있는 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 라이브러리를 포함하는 이러한 세포의 은행으로부터 선택되고, 여기서 각각의 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포 제제는 인간 집단 내에 존재하는 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성 또는 동형접합성이며, 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 상기한 은행은 세포의 은행의 다른 구성원에 관한 MHC 대립유전자의 상이한 세트에 대해서 각각 반접합성 또는 동형접합성인 세포를 포함한다. 상기 언급한 바와 같이, 유전자 표적화 또는 이형접합성의 상실은 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포를 유도하기 위해서 사용된 반접합성 또는 동형접합성 MHC 대립유전자 줄기세포를 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 모든 혈액 타입의 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 은행에 포함된다. 특정의 구체예에서, 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 환자에 대해서 정합성이어서 환자 자신의 혈액 타입의 분화된 조혈 세포가 생산되는 것을 보장한다. 특정의 구체예에서, 혈관종-콜로니 형성 세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 항원성 인자 A,

B, Rh, 또는 이들의 어떤 조합에 대해서도 음성이다. 특정의 구체예에서, 분화된 조혈 세포는 범용 공여체 세포이다. 예를 들어, 타입 0 및 Rh 음성인 조혈 세포는 혈액 수혈을 위해서 범용적으로 사용될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 범용적 수혈을 위한 타입 0, Rh 음성 적혈구를 생산하는 방법을 제공한다.

특정의 구체예에서, 혈관중-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포로부터 분화된 적혈구는 태아성 헤모글로빈을 발현한다. 태아성 헤모글로빈을 발현하는 적혈구의 수혈은 겸상 적혈구 빈혈의 치료에 특히 유용할 수 있다. 이와 같이, 본 발명은 겸상 적혈구 빈혈을 치료하는 개선된 방법을 제공한다.

하나의 구체예에서, 특별한 혈관중-콜로니 형성 세포 제제 또는 비-생착성 혈관 세포 제제가 환자에게 적합한 것으로 선택된 후, 이것은 그 후에 환자 치료에 적절한 양에 도달하도록 증량되며, 수용체에게 세포를 투여하기 전에 분화된 조혈 세포를 수득하도록 분화된다. 제약 사업을 수행하는 방법은 또한, 판매를 위해서 제제를 배포하는 배포 시스템을 확립하는 것을 포함할 수 있거나, 약제학적 제제를 시판하기 위한 판매 그룹을 확립하는 것을 포함할 수 있다.

전술한 것 중의 어느 것에서나, 혈관중-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포는 직접 분화될 수 있거나, 혈관중-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포는 추후의 사용을 위해서 동결될 수 있다. 특정의 구체예에서, 본 발명은 추후에 해동 및 증량시키는데 적합하며, 또한 조혈 또는 내피 계통으로 분화시키는데 적합한 혈관중-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포의 동결 배양물을 제공한다.

인간 혈관중-콜로니 형성 세포 또는 비-생착성 혈관 세포는 혈액 수혈에 사용될 수 있는 상당한 수의 조혈 세포 타입을 생성시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상당한 수의 균질하거나 이종인 집단 RBCs 및/또는 혈소판은 인간 혈관중-콜로니 형성 세포로부터 생성될 수 있다. 혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포 및 이들로부터 분화된 조혈 세포 타입은 공여된 혈액 생성물에 대해서 현재 수행되는 것처럼 은행에 비축될 수 있으며, 수혈 및 다른 치료에 사용된다. 이들 생성물의 은행에의 비축은 공여된 혈액 생성물의 임상적 부족을 완화시키는 것을 도와줄 수 있다. 추가로, 혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포 및 유도체 생성물은 시험관내에서 유전적으로 조작되어 범용 공여체 혈액 생성물을 제공할 수 있다.

이와 같이, 특정의 관점에서 본 발명은 혈액 은행 사업을 수행하는 방법을 제공한다. 대상 은행 사업은 혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포 및/또는 이들로부터 생성된 조혈 세포 타입 (예를 들어, RBCs, 혈소판, 림프구 등)의 유도체화 및 저장 (장기간 또는 단기간)을 포함한다. 세포는 장기간 저장을 위해서 동결보존될 수 있거나, 비교적 단기간 저장을 위해서 배양물 내에 유지될 수 있다. 세포는 현재 이용가능한 혈액 생성물의 형을 결정하는 것과 거의 동일한 방식으로 형을 결정하고 교차-적합시험을 할 수 있으며, 세포는 타입을 기초로 하여 저장될 수 있다. 추가로, 특정의 구체예에서, 세포는 A 음성 및/또는 B 음성 및/또는 Rh 음성인 세포를 특이적으로 생성하도록 변형되어 어떤 환자에게나 수혈하는데 범용적으로 또는 거의 범용적으로 적합한 세포를 생산할 수 있다.

혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포 및/또는 분화된 조혈 세포 타입은 명세서 전체에 걸쳐서 상세히 설명된 본 발명의 방법 중의 어떤 것이라도 사용하여 생성될 수 있음을 주목하여야 한다.

혈액 은행 사업을 수행하는 방법의 특정의 구체예에서, 세포 (혈관중-콜로니 형성 세포, 비-생착성 혈관 세포 및/또는 분화된 조혈 세포 타입)는 하나 또는 그 이상의 중앙 시설에서 생성 및 저장된다. 그 후, 세포는 예를 들어, 환자 케어에 사용하기 위하여 병원 또는 치료 시설에 옮겨질 수 있다. 특정의 구체예에서, 세포는 동결보존된 상태로 유지되고, 병원 또는 다른 치료 시설로부터의 주문에 따라 수혈을 위해서 특정적으로 해동하여 준비한다. 이러한 주문은 정기적인 주문 (예를 들어, 특정한 수의 유닛의 세포의 특정한 양을 생성 및 제공함) 일 수 있다.

특정의 구체예에서, 방법은 은행에 비축된 생성물과 연관된 비용에 관해서 병원 또는 보험 회사에게 계산서로 청구하는 시스템을 포함한다.

전술한 것 중의 어떤 것의 특정의 구체예에서, 세포는 세포 수, 용적, 또는 사용자가 환자에 투여되는 용량을 정량하고/하거나 표준 혈액 수혈 중에 투여되는 이들 용량을 비교하는 것을 허용하는 어떤 유닛을 기초로 하여 배분될 수 있다.

특정의 구체예에서, 세포는 세포의 혼합된 집단으로 생성, 저장 및 투여된다. 예를 들어, 제제는 다양한 발생 단계뿐만 아니라 별 개의 세포 타입의 세포를 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 세포는 단일 세포 타입의 실질적으로 정제된 제제로서 생성, 저장 및/또는 투여된다.

특정의 구체예에서, 세포의 제제는 하나 또는 그 이상의 감염성 질병에 대해서 스크리닝된다. 스크리닝은 생성 또는 저장 전 또는 후에 일어날 수 있다. 예를 들어, 세포의 제제는 간염, HIV, 또는 이들 생성물의 수용체에게 전염될 수 있는 다른 혈액 유래 감염성 질병을 확인하기 위해서 스크리닝될 수 있다.

이식 수용체에서의 내성의 유도

본 발명의 방법에 의해서 생성 및 증량되거나, 본 발명의 방법에 의해서 증량된 인간 혈관아세포를 사용하여 면역원성 내성을 유도할 수 있다. 면역원성 내성은 다른 식으로는, 예를 들어, 수용체 내로 비자기 (nonself) MHC 항원 (예를 들어, 이식 및 내성화 혈관아세포와 공유된 항원)의 도입에 대한 반응으로 나타날 수 있는 이식 수용체의 면역반응의 억제를 나타낸다. 따라서, 내성은 면역억제제를 사용하여 유발될 수 있는 광범위 면역 억제와는 대조적인 것으로서 특정의 공여체 항원에 의해서 유도된 면역반응의 억제를 나타낸다. 내성은 체액성, 세포성, 또는 체액성 및 세포성 둘 다의 반응을 포함할 수 있다. 내성은 기존의 성숙한 공여체 반응성 T 세포의 제거 및/또는 불활성화뿐만 아니라 새로이 발생하는 공여체 반응성 T 세포의 장기간 (예를 들어, 평생 동안의) 제거 및/또는 불활성화를 포함할 수 있다.

인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키는 본 발명에 기술된 방법은 내성을 유도하기 위한 몇 가지의 이점을 제공한다. 본 발명의 방법은 이전에 수득할 수 없는 대량의 인간 혈관아세포의 생성을 제공한다. 대량의 인간 혈관아세포는 덜 독성인 전제조건화 프로토콜에 의해 이식 수용체에서의 내성의 유도를 허용한다. 더구나, 본 발명의 방법은 각각이 인간 집단에 존재하는 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성 또는 동형접합성인 인간 혈관아세포의 라이브러리의 생성을 제공하며, 여기서 혈관아세포의 상기 라이브러리의 각각의 구성원은 라이브러리 내의 다른 구성원에 관한 MHC 대립유전자의 상이한 세트에 대해서 반접합성이거나 동형접합성이다. 이러한 인간 혈관아세포의 라이브러리는 세포가 어떤 이용가능한 공여체 이식편에 대해서라도 정합하게 선택될 수 있도록 내성화 인간 혈관아세포의 선택에 사용될 수 있다.

골수 이식 및 조혈성 또는 혼합된 키메리즘 (chimerism)의 후속 확립은 쥐 및 인간 모델 둘 다에서 조혈 줄기세포로부터 유도된 새로운 조직 타입에 대해 특이적인 내성을 유도하는 것으로 이전에 나타났다. 조혈성 또는 혼합된 키메리즘은 공여체 및 수용체 줄기세포 둘 다로부터 유도된 조혈 세포의 수용체 내로의 생산을 나타낸다. 따라서, 수용체가 조혈성 키메리즘을 달성하면, 수용체는 공여체-특이적 항원에 대해서 내성이 될 것이다. 내성을 유도하는 다수의 프로토콜에서, 수용체에 투여된 내성화 공여체 세포는 수용체의 골수 내로 정착한다. 공여체 세포에 대해 수용체 골수 내에서의 조혈성 공간을 창조하기 위해서, 일부의 프로토콜은 조혈성 공간을 창조하는 단계를 필요로 하며 (예를 들어, 전신 조사에 의해서), 이러한 단계는 일반적으로 수용체에게 독성이거나 유해하다. 그러나, 매우 대량의 공여체 내성화 세포를 이용할 수 있다면, 조사가 완전히 제거됨으로써 덜 독성인 전제조건화 레지멘의 이점을 갖는 조혈성 또는 혼합된 키메리즘을 달성할 수 있다는 것이 설치류 모델로부터 입증된다. 따라서, 혼합된 키메리즘은 예를 들어, 특이적인 비-골수박멸성 수용체 조건화에 의해서 달성될 수 있다.

따라서, 본 발명에 기술된 신규의 방법은 대량의 인간 혈관아세포의 생산을 가능하게 하기 때문에, 본 발명은 덜 엄격하거나 덜 독성인 조건화 프로토콜에 의해서 면역 내성을 유도하는 이점을 제공한다. 예를 들어, 충분한 수의 내성화 공여체 세포가 사용된다면, 조혈성 공간 창조 단계는 제거될 수 있다.

따라서, 본 발명의 특정의 구체예에서, 본 발명에 기술된 방법에 의해서 생성 및 증량되거나, 증량된 인간 혈관아세포는 면역학적 내성을 유도하기 위해서 사용될 수 있다. 어떤 이론에 의해서 이전에 얻어지는 것을 원하지는 않지만, 인간 혈관아세포는 수용체의 골수로 유도하고, 혼합된 키메리즘을 생성시키기 위해서 수용체의 골수 내에 정착시킴으로써 면역학적 내성을 유도할 수 있다.

특정의 구체예에서, 공여체 인간 혈관아세포는 이식편을 이식하거나, 기관, 조직 또는 세포를 공여체로부터 수용체 환자에게 이식하기 전에 수용체 환자에게 (예를 들어, 정맥내 주사에 의해서) 투여된다. 특정의 구체예에서, 인간 혈관아세포는 필요한 환자 (예를 들어, 이식편 또는 이식 수용체)에게서 내성을 유도하기 위해서 투여된다. 따라서, 특정의 구체예에서 인간 수용체 환자에게서 내성을 유도하는 방법은 (a) 이식 또는 세포 치료법을 필요로 하는 환자를 선택하고; (b) 상기 환자에게 공여체로부터 유도되거나, 공여체에 대해서 정합성인 인간 혈관아세포를 투여하고 (여기서, 상기 혈관아세포는 본 발명의 방법에 따라 생성 및 증량되거나 증량된다); (c) 공여체 기관, 조직 또는 세포 이식편을 수용체 환자 내에 이식하는 (여기서, 상기 혈관아세포는 공여체 항원에 대한 내성을 유도한다) 단계를 포함한다. 특정의 구체예에서, 환자는 기관, 조직 또는 세포 치료법을 받을 것이며, 여기서 기관, 조직 또는 세포는 공여체 또는 공여체 세포 공급원으로부터 수득된다. 예를 들어, 공여체로부터의 혈관아세포는 (1) 본 발명에 기술된 방법에 따라 증량되어 대량의 공여체 내성화 세포를 생성시킬 수 있는

며, (2) 시험관 내에서 증량 및 분화되어 조혈 또는 내피 세포 또는 조직을 수득할 수 있으며, 이들을 이어서 수용체 환자에게 이식할 수 있다. 다른 구체예에서, 기관, 조직 또는 세포 치료법은 공여체 혈관아세포로부터 유도되지 않지만, 공여체 혈관아세포에 대해서 정합성이다.

본 명세서에서 사용된 것으로서, 용어 "정합성 (matched)"은 HLA 타이핑 (typing)이 공여체와 수용체 (예를 들어, 이식편) 사이에서 일만큼 유사한지에 관한 것이다. 하나의 구체예에서, 공여체 혈관아세포 및 이식편에 관한 용어 "정합성"은 거부반응이 나타나지 않도록 하는 MHC 클래스 I에서 및/또는 MHC 클래스 II 대립유전자에서의 정합하는 정도를 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 공여체 혈관아세포 및 이식편에 관한 용어 "정합성"은 공여체 이식편이 그의 정합성 공여체 혈관아세포에 의해서 내성화되도록 하는 MHC 클래스 I에서 및/또는 MHC 클래스 II 대립유전자에서의 정합하는 정도를 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 공여체 혈관아세포 및 이식편에 관한 용어 "정합성"은 면역억제가 필요하지 않도록 하는 MHC 클래스 I에서 및/또는 MHC 클래스 II 대립유전자에서의 정합하는 정도를 나타낸다.

동종이계 (allogeneic) 항원 또는 동종이계 이식편에 대한 내성을 유도하는 본 발명에 기술된 방법은 공여체와 수용체 사이에서와 같이 이식 거부반응이 일어날 정도로 MHC 유전자와 또는 다른 유전자좌에서 부정합 (mismatch)이 있는 경우에 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 특정의 구체예에서는 적어도 하나의 MHC 유전자좌, 또는 인식 및 거부반응을 매개하는 적어도 하나의 다른 유전자좌, 예를 들어, 마이너 (minor) 항원 유전자좌가 부정합일 수 있다. 일부의 구체예에서, 예를 들어, 수용체 및 공여체의 HLA 대립유전자는 부정합하며, 하나 또는 그 이상의 부정합된 항원을 제공한다. 클래스 I 및 클래스 II MHC 유전자좌에 관해서, 공여체 및 수용체는 예를 들어, 클래스 I에서 정합성이고, 클래스 II에서는 부정합성이거나; 클래스 I에서는 부정합성이고, 클래스 II에서는 정합성이거나; 클래스 I에서 부정합성이고, 클래스 II에서 부정합성이거나; 클래스 I에서 정합성이고, 클래스 II에서 정합성일 수 있다. 이들 조합 중의 어느 것에서나, 인식 및 거부반응을 조절하는 다른 유전자좌, 예를 들어, 마이너 항원 유전자좌는 정합성이거나 부정합성일 수 있다. MHC 클래스 I에서의 부정합은 하나 또는 그 이상의 MHC 클래스 I 유전자좌에서 부정합인 것, 예를 들어, HLA-A, HLA-B, 또는 HLA-C 중의 하나 또는 그 이상에서 부정합인 것을 의미한다. MHC 클래스 II에서의 부정합은 하나 또는 그 이상의 MHC 클래스 II 유전자좌에서 부정합인 것, 예를 들어, DPA, DPB, DQA, DQB, DRA, 또는 DRB 중의 하나 또는 그 이상에서 부정합인 것을 의미한다. 예를 들어, 혈관아세포 및 이식편은 클래스 II HLA-DRB1 및 DQB1 대립유전자에서 정합성일 수 있다. 혈관아세포 및 이식편은 2 개 또는 그 이상의 클래스 I HLA-A, B, 또는 C 대립유전자에서 더 정합성일 수 있다 (정합성 DRB1 및 DQB1 대립유전자 이외에도).

다른 구체예에서, 내성화 공여체 세포는 본 발명에 기술된 방법에 의해서 생성 및 증량되거나 증량된 혈관아세포로부터 유도된 세포이다. 이 구체예에 따르면, 공여체 인간 혈관아세포는 시험관 내에서 분화되어 공여체 조혈 줄기세포를 발생시키며, 다음에 공여체 조혈 줄기세포는 수용체 환자에 투여되어 내성을 유도한다. 상기 방법 중의 어느 것에서나, 공여체 혈관아세포 또는 이들로부터 유도된 조혈 줄기세포는 상기 수용체에 투여되어 상기 수용체에서 내성을 유도함으로써 수용체 환자를 정합성 (공여체 내성화 세포에 관해서) 이식 또는 이식편에 대해서 준비시킨다.

다른 구체예에서, 내성을 유도하는 방법은 (혈관아세포 또는 이들로부터 유도된 조혈 줄기세포의 생착을 촉진시키기 위해서) 조혈성 공간을 창조하는 단계(들)를 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 내성을 유도하는 방법은 예를 들어, 기존에 공여체 반응성 T 세포를 제거하고/하거나 불활성화시킴으로써 공여체 혈관아세포 또는 이들로부터 유도된 조혈 줄기세포의 거부반응을 일시적으로 억제하는 단계(들)를 추가로 포함한다. 조혈성 공간을 창조하기 위해서, 방법은 조사 (예를 들어, 전신, 림프구 또는 선택적 흉선 조사)를 포함할 수 있다. 공여체 세포의 거부반응을 예방하기 위해서, 이 방법은 약물 또는 항체 (예를 들어, 세포 증식의 억제제, 항대사산물, 또는 항-T 세포 또는 항-CD8 또는 항-CD4 항체), 및/또는 공여체 세포의 생존 및 생착 및 혼합된 키메라즘의 형성을 촉진시키는 다른 치료 (예를 들어, 상기 수용체에 대한 기질 세포 또는 성장 인자, 사이토킨 등, 또는 수용체의 천연 항체를 고갈시키거나 불활성화시키는 다른 약제의 투여)를 추가로 포함할 수 있다. 특정의 구체예에서, 수용체 내로 조혈성 공간을 창조하고/하거나 공여체 세포의 생존을 촉진시키는 조사, 항체, 약물 및/또는 다른 약제는 수용체에게서 흉선 세포 및/또는 T 세포를 불활성화시키는데 충분하다. 조혈성 공간을 창조하고/하거나 공여체 세포의 거부반응을 일시적으로 억제하는 이러한 단계는 예를 들어, 상기 수용체에게 공여체 혈관아세포를 도입시키기 전에 수행될 수 있다. 대신으로, 환자는 공여체 내성화 세포의 투여와 동시에 T 세포를 차단하거나 제거하거나 불활성화시키는 약제 또는 방법을 제공받을 수 있다.

특정의 구체예에서는, 조혈성 공간 창조 및 면역억제 방법의 조합이 사용된다. 예를 들어, 수용체는 항-T 세포 항체를 저용량의 전신 조사 및/또는 흉선 조사와 함께 제공받을 수 있다. 하나의 구체예에서, 수용체는 항-CD4

및 항-CD8 항체를 제공받고, 이어서 온화한 비골수박탈성 용량의 전신 조사 (예를 들어, 골수가 회복할 수 없는 상태로 되게 하지 않으면서 수용체 골수의 분획을 제거하는 용량) 및 선택적 흉선 조사 또는 대신으로, 추가의 용량의 T 세포-불활성화 항체 또는 공동자극성 차단시약 (예를 들어, CTLA4-Ig 및/또는 항-CD40L 항체)을 제공할 수 있다. 조사 이후에, 공여체 비만세포 또는 이들로부터 유도된 조혈 줄기세포를 수용체에 투여할 수 있다 (예를 들어, 정맥내 주사에 의해서). 이 구체예에서, 공여체 세포의 생착을 촉진시키는 전신 조사는 대량의 공여체 인간 혈관아세포 또는 이들로부터 유도된 조혈 줄기세포를 투여함으로써 대체될 수 있다. 이러한 대량의 공여체 인간 세포의 수득은 본 발명에 기술된 방법에 따라 달성될 수 있다.

또 다른 구체예에서, 수용체 T 세포를 고갈시키거나 불활성화시키는 치료는 투여된 공여체 내성화 인간 혈관아 세포의 생착의 억제를 예방하거나 생존을 촉진시키는 것을 도와줄 수 있다. 또 다른 구체예에서, 이 방법은 수용체 환자에게서 공여체 반응성 세포의 클로날 결실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 환자는 온화한 용량의 전신 조사를 제공받고, 이어서 공여체 인간 혈관아세포의 투여 및 T 세포 공동자극성 차단을 제공받을 수 있다. 대신으로, 환자는 조사를 하지 않고 T 세포 공동자극성 차단 및 대량의 공여체 인간 혈관아세포의 투여를 제공받을 수 있다.

또 다른 구체예에서, 내성은 수용체의 골수박탈성 조건화가 없이 달성될 수 있다. 하나의 구체예에서, 수용체는 공여체 인간 혈관아세포를 공여체 혈관아세포의 생착을 촉진시키는 항-CD40L과 함께 제공받을 수 있다. 예를 들어, 수용체는 항-CD40L 모노클로날 항체와 함께 대량의 공여체 혈관아세포를 제공받고, 이어서 며칠 이내에 일정 용량의 CTLA4-Ig를 제공받을 수 있다. 이러한 프로토콜은 공여체 반응성 T 세포를 결실시키고, CD40-CD40L 상호작용을 차단할 수 있다. 시험관 내에서 인간 혈관아세포를 생성 및 증량시키는 본 발명에 기술된 신규의 방법은 이러한 온화한 내성 프로토콜을 실행할 수 있도록 만든다.

수용체 조건화 및/또는 공여체 반응성 T 세포의 고갈 또는 차단 이후에, 본 발명의 방법에 의해서 생성된 공여체 내성화 인간 혈관아세포를 수용체에 투여한다. 공여체 인간 혈관아세포는 공여체로부터의 조직 또는 세포 공급원으로부터 수득된 혈관아세포로부터 유도될 수 있다. 대신으로, 공여체 인간 혈관아세포는 공여체와 정합성인 상이한 비-공여체 공급원으로부터 수득될 수 있다.

특정의 구체예에서, 내성은 공여체 인간 혈관아세포를 수회 투여로 투여함으로써 (예를 들어, 공여체 세포의 2, 3, 4, 또는 그 이상의 투여에 의해서) 수용체 환자에게서 유도된다. 따라서, 내성은 공여체 내성화 세포의 수회 투여를 포함하는 방법에 의해서 유도될 수 있으며, 여기서 수회 투여는 1 주일 또는 그 미만의 기간 이내에 수용체에게 제공된다.

특정의 구체예에서, 면역학적 내성을 유도하는 본 발명의 인간 혈관아세포의 능력은 다양한 실험적 모델 시스템을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, SCID 마우스에서 인간 면역 시스템을 확립시키는 능력을 사용하여 실험적 모델에서 인간 면역 반응을 시험하였다. 인간 태아 간 및 흉선 조직을 사용하여 면역-부적격 마우스 수용체 내로 기능적 인간 면역 시스템을 재구성할 수 있다는 것이 이전에 밝혀졌다. 마찬가지로, 본 발명의 인간 혈관아세포의 기능적 수용력 (capacity)은 유사한 실험적 모델 시스템을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 마우스에서 기능적 인간 면역 시스템을 확립하는데 있어서 인간 태아 간을 대체시키는 인간 혈관아세포의 능력은 상술한 실험적 모델을 사용하여 평가될 수 있다. 추가로, 기능적 인간 면역 시스템을 갖는 마우스에서 (예를 들어, 인간 태아 간 및 흉선 조직을 사용하여 SCID 마우스에서 인간 면역 시스템을 확립하여 hu-SCID 마우스를 생산한 경우), 인간 "공여체" 혈관아세포 (hu-SCID 마우스를 확립하기 위하여 사용된 태아 간 및 흉선 조직에 관하여 부정합됨)는 혼합된 키메리즘을 달성하기 위해서 상술한 방법에 따라 hu-SCID 마우스에 투여될 수 있다. 그 후에, 공여체 항원에 대한 내성은 공여체 혈관아세포에 관해서 정합성인 동종이식편을 이식하여 시험할 수 있다.

특정의 구체예에서, 본 발명은 세포 조합물에 관한 것이다. 효과적인 세포 조합물은 2 개의 성분을 포함한다: 면역학적 내성을 유도하기 위한 제1 세포 타입, 및 필요한 기능을 재생시키는 제2 세포 타입. 두 가지 세포 타입은 모두 본 발명의 방법에 의해서 생산되고, 동일한 공여체로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 공여체로부터의 인간 혈관아세포가 내성화 공여체 세포로 사용될 수 있다. 공여체로부터의 세포 (예를 들어, 배아 줄기세포, 다능성 줄기세포 또는 초기 전구세포 세포, 또는 혈관아세포)는 또한, 예를 들어, 조혈 세포 또는 내피 세포 (본 발명에 기술된 바와 같음), 회돌기교세포, 간세포, 심근세포 또는 심근세포 전구체와 같은 신경 세포, 또는 골아세포 및 이들의 전구세포를 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 따라서, 공여체 인간 혈관아세포를 사용하여 수용체가 상기 공여체 혈관아세포로부터 또는 상기 공여체 배아 또는 다능성 줄기세포로부터 유도된 세포 또는 조직에 대해서 내성이 되도록 수용체에서 내성을 유도할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 본 발명의 세포 조합물의 두 개의 세포 성분은 상이한 공급원 또는 공여체로부터 수득될 수 있으며, 여기서 두 개의 공급원 또는 공여체는 정합된다. 예를 들어, 혈관아세포는 배아 줄기세포 공급원으로부터 생성될 수 있는 반면에, 이식 세포 또는 조직은 인간 혈관아세포를 생성시키기 위해서 사용된 배아 줄기세포 공급원과는 상이한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 이러한 구체예에서, 두 개의 공급원은 정합된다.

본 발명에 기술된 치료학적 목적 중의 어떤 것인 경우라도, 면역내성을 위한 인간 혈관아세포 또는 이들로부터 유도된 조혈 세포는 인간 투여를 위해서 충분한 멸균 조건 하에서 제조된 등장성 부형제를 포함하는 약제학적 조성물의 형태로 공급될 수 있다.

유전자 요법에서의 혈관아세포

본 발명의 다른 관점은 유전자 요법에서의 혈관아세포, 비-생작성 혈관 세포, 또는 이들로부터 분화된 조혈 또는 내피 세포, 또는 다시 이들 세포로부터 더 분화된 세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 포유동물 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 제제를 사용하여 치료학적 유전자의 유전자 생성물에 의한 치료를 받을 수 있는 상태를 갖는 환자에게 치료학적 유전자를 송달할 수 있다. 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포는 혈관형성 (예를 들어, 허혈성 조직 내에서 측부지의 형성을 유도하는 VEGF), 조혈 (예를 들어, 적혈구 생산을 유도하는 에리트로포이에틴), 혈관 기능 (예를 들어, 정맥류를 수복시키기 위해서 혈관 평활근의 증식을 유도하는 성장 인자) 또는 혈구 기능 (예를 들어, 출혈을 감소시키는 응고 인자)에 포함되거나 영향을 미치는 치료학적 유전자, 또는 분비된 단백질, 예를 들어, 성장 호르몬에 대해서 코드화한 치료학적 유전자를 송달하는데 특히 유용하다. 유전자 치료를 위한 방법은 본 기술분야에서 공지되어 있다 [참조: 예를 들어, 미국 특허 제5,399,346호 (Anderson *et al.*)]. 유전자 물질을 송달하기 위한 생체적합성 캡셀체는 PCT 공개 제W0 95/05452호 (Baetge *et al.*)에 기술되어 있다. 골수 유래 세포 내로 유전자를 전이시키는 방법은 또한 이전에 보고되었다 [참조: 미국 특허 제6,410,015호 (Gordon *et al.*)]. 치료학적 유전자는 질병 예방 또는 치료에 포함되는 유전자 생성물 또는 단백질을 코드화한 유전자, 또는 질병 예방 또는 치료에 포함되는 세포 조절성 효과를 갖는 유전자와 같은 임상적 유용성을 갖는 어떤 유전자라도 될 수 있다. 유전자 생성물은 환자에게서 결함이 있거나 누락된 유전자 생성물, 단백질 또는 세포 조절성 효과를 치환시킴으로써 환자에게서 질병 또는 상태를 예방 또는 치료할 수 있다.

따라서, 본 발명은 추가로 필요한 환자를 선택하고, 세포가 치료학적 유전자를 운반하도록 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 제제를 변형시키고, 변형된 제제를 환자에 투여하는 것을 포함하는, 유전자 요법을 받을 수 있는 상태를 갖는 환자에게 치료학적 유전자를 송달하는 방법을 제공한다. 제제는 본 기술분야에서 일반적으로 공지된 기술에 의해서 변형될 수 있다. 변형은 포유동물 혈관아세포 내로 유전자 생성물을 코드화한 DNA 또는 RNA 절편을 삽입하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 유전자는 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 치료학적 효과를 증진시킨다. 유전자는 변형된 혈관아세포가 치료학적 유전자 생성물을 생산하거나 환자의 신체에서 원하는 치료학적 효과를 가질 수 있도록 하는 방식으로 삽입된다. 하나의 구체예에서, 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포는 골수와 같이 원래 환자로부터 획득된 세포 공급원으로부터 제조된다. 유전자는 유전자 전이 과정 중의 어떤 것이나, 예를 들어, 네이키드 (naked) DNA 혼입, DNA의 직접 주입, 수용체 매개된 DNA 섭취, 레트로바이러스 매개된 형질감염, 바이러스 매개된 형질감염, 비-바이러스성 형질감염, 지질 매개된 형질감염, 전기전이 (electrotransfer), 전기천공, 인산칼슘 매개된 형질감염, 미량주사 또는 프로테오포솜 (이들은 모두 유전자 요법 벡터의 사용을 포함할 수 있다)을 사용하여 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포 내로 삽입될 수 있다. 레트로바이러스 벡터 이외에, DNA 바이러스 및 다른 RNA 바이러스로부터 유도된 것을 포함하는 다른 벡터가 사용될 수 있다. RNA 바이러스를 사용한 경우에 명백한 바와 같이, 이러한 바이러스는 이러한 RNA 바이러스로 형질감염된 혈관아세포가 따라서, 치료학적 유전자 생성물을 코드화한 DNA를 갖추고 있도록 원하는 약제를 코드화한 RNA를 포함한다. 유전자의 세포 내로의 도입을 성취하기 위한 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있다 [참조: 예를 들어, Ausubel, *id.*].

본 발명의 또 다른 관점에 따르면, 치료학적 유전자를 운반하도록 변형된 인간 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 정제된 제제는 치료학적 유전자의 송달에 의해서 질병을 예방 및/또는 치료하는 유전자 요법에서의 제제의 사용에 설명서를 추가로 포함하는 용기 또는 상업용 패키지 (packages) 내에 제공될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가로 본 발명의 포유동물 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 제제 (여기서 이 제제는 제제의 세포가 치료학적 유전자를 동반하도록 변형된다), 및 유전자 요법에 의한 치료를 받을 수 있는 상태를 갖는 환자를 치료하는데 관한 설명서를 포함하는 상업용 패키지 (즉, 키트)를 제공한다.

그 밖의 다른 상업적 적용 및 방법

본 발명의 특정한 관점은 인간 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포를 상업적 양에 도달하도록 증량시키는데 관

한 것이다. 특별한 구체예에서, 인간 혈관아세포 및 비-생착성 혈관 세포는 대규모로 생산되고, 필요한 경우에 저장되며, 병원, 임상 의 또는 다른 건강관리 시설에 공급된다. 일단 환자가 예를 들어, 허혈 또는 혈관 상해와 같은 적응증을 나타내거나, 조혈성 재구성을 필요로 한다면, 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 시기 적절한 방식으로 주문하고 공급받을 수 있다. 따라서, 본 발명은 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 세포가 상업적 규모에 도달하도록 생성 및 증량시키는 방법, 상기 방법으로부터 유도된 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 포함하는 세포 제제뿐만 아니라, 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 병원 및 임상 의에게 제공하는 (즉, 생산하고, 임의로 저장하고, 판매하는) 방법에 관한 것이다. 추가로, 혈관아세포 계통 세포 또는 비-생착성 혈관 계통 세포는 시험관 내에서 생산될 수 있으며, 임의로 저장되고, 병원 및 임상 의에게 판매될 수 있다.

따라서, 본 발명의 특정한 관점은 본 발명에 기술된 방법에 의해서 증량된 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 생산, 저장, 및 배포하는 방법에 관한 것이다. 시험관 내에서 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 생성 및 증량시킨 후에, 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 수확하고, 정제하고, 환자의 치료 전에 임의로 저장할 수 있다. 대신으로, 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 계통 세포가 바람직한 상황에서 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포는 환자의 치료 전에 시험관 내에서 더 분화될 수 있다. 따라서, 특별한 구체예에서 본 발명은 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 병원, 건강관리 센터, 및 임상 의에게 공급하는 방법을 제공하며, 이에 의해서 본 발명에 기술된 방법에 의해서 생산된 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포, 혈관아세포 계통 세포, 또는 비-생착성 혈관 계통 세포는 저장되고, 병원, 건강관리 센터, 또는 임상 의에 의한 요구에 따라 주문하여 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포, 혈관아세포 계통 또는 비-생착성 혈관 계통 치료법이 필요한 환자에 투여된다. 대체 구체예에서는, 병원, 건강관리 센터 또는 임상 의가 환자의 특정한 데이터를 기초로 하여 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 주문하고, 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 환자의 상세한 상황에 따라 생산하고, 이어서 주문을 한 병원 또는 임상 의에게 공급한다.

본 발명의 추가의 관점은 잠재적인 환자 수용체에게 정합성 세포를 제공할 수 있는 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포, 혈관아세포 계통 세포, 및/또는 비-생착성 혈관 계통 세포의 라이브러리에 관한 것이다. 따라서, 하나의 구체예에서, 본 발명은 적어도 하나의 조직적합성 항원에 대해서 동형접합성인 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포 제제를 제공하는 단계를 포함하는, 제약 사업을 수행하는 방법을 제공하며, 여기서 세포는 본 발명에 기술된 방법에 의해서 증량될 수 있는 인간 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포의 라이브러리를 포함하는 이러한 세포의 은행으로부터 선택되고, 각각의 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포 제제는 인간 집단 내에 존재하는 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해서 반접합성이거나 동형접합성이며, 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포의 상기 은행은 세포의 은행 내의 다른 구성원에 관한 MHC 대립유전자의 상이한 세트에 대해서 각각 반접합성 또는 동형접합성인 세포를 포함한다. 상기 언급한 바와 같이, 유전자 표적화 또는 이형접합성의 상실을 사용하여 혈관아세포를 유도하기 위해서 사용된 반접합성 또는 동형접합성 MHC 대립유전자 줄기세포를 생성시킬 수 있다. 하나의 구체예에서, 특별한 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포 제제를 환자에게 적합하도록 선택한 후에, 이것을 이어서 환자 치료에 적절한 양에 도달하도록 증량시킨다. 이러한 방법은 세포를 수용체에 투여하기 전에 혈관아세포 또는 비-생착성 혈관 세포를 분화시켜 조혈 및/또는 내피 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 제약 사업을 수행하는 방법은 또한, 판매를 위해서 제제를 배포하는 배포 시스템을 확립하는 것을 포함할 수 있거나, 약제학적 제제를 시판하기 위한 판매 그룹을 확립하는 것을 포함할 수 있다.

본 발명의 다른 관점은 제약, 화학 또는 생물공학 회사, 병원, 또는 학원 또는 연구기관과 같은 세팅에서 연구 도구로서 본 발명의 인간 혈관아세포 및 비-생착성 혈관 세포의 용도에 관한 것이다. 예를 들어, 인간 혈관아세포, 비-생착성 혈관 세포 및 이들의 유도체 세포 (예를 들어, 내피 세포)를 사용하여 혈관형성 및 항-혈관형성 인자를 스크리닝하고 평가할 수 있거나, 조직 공학에서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 기술된 방법에 의해서 수득되고 증량된 혈관아세포 및 비-생착성 혈관 세포는 조혈 및 내피 세포로 분화하는 이중 잠재력을 갖기 때문에, 이들은 조혈 및 맥관형성의 세포 및 분자 생물학을 위해서 사용될 수 있다. 추가로, 인간 혈관아세포 및 비-생착성 혈관 세포는 조혈 및 맥관형성에서 역할을 하는 이들 세포, 유전자, 성장 인자, 및 분화 인자의 신규한 마커의 발견을 위해서, 또는 약물 발견 및 잠재적으로 독성 또는 케어성 약제에 대한 스크리닝 시험의 개발을 위해서 사용될 수 있다.

본 발명의 다른 구체예에서, 혈관아세포 및 비-생착성 혈관 계통 세포 (예를 들어, 혈구)는 또한, 상업적으로 사용된다. 조혈 세포는 임상 적 및 연구적 용도로 사용될 수 있는 헤모글로빈 및 성장 인자와 같은 혈액 생성물을 생성시키기 위해서 사용될 수 있다.

본 발명은 또한, 환자로부터 인간 ES 세포를 수득한 다음에, ES 세포로부터 유도된 인간 혈관아세포 또는 비-생

작성 혈관 세포를 생성 및 증량시키는 방법을 포함한다. 이들 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포는 저장될 수 있다. 또한, 이들 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포를 사용하여 ES 세포가 수득된 환자 또는 환자의 일가를 치료할 수 있다.

상술한 방법 및 적용은 혈관아세포 또는 비-생작성 혈관 세포의 치료, 약제학적 제제, 및 저장과 관련된 것이기 때문에, 본 발명은 또한, 이러한 적용에 적합한 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포의 용액에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 환자에게 주사하기에 적합한 혈관아세포 및 비-생작성 혈관 세포의 용액에 관한 것이다. 이러한 용액은 생리학적으로 허용되는 액체 (예를 들어, 생리 식염수, 완충 식염수, 또는 평형 염 용액) 중에서 제제화된 세포를 포함할 수 있다. 용액은 임의로 생체 내에서 세포 분화를 촉진시키는 인자를 포함할 수 있다. 용액은 골수 이식을 위해서 이용된 본 기술분야에서 허용되는 방법에 따라 혈관 투여 (예를 들어, 정맥내 주입)에 의해서 환자에 투여될 수 있다. 일부의 구체예에서, 세포 용액은 말초 정맥, 표재성 말초 정맥 내로, 또는 대신으로, 중심 정맥 투여 (예를 들어, 중심 정맥 카테터를 통해서)에 의해서 투여된다. 용액 내의 세포의 수는 적어도 약 10^2 및 약 10^9 세포수 미만일 수 있다. 다른 구체예에서, 용액 내의 세포의 수는 약 10^1 , 10^2 , 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 또는 10^8 내지 약 5×10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 또는 10^9 의 범위일 수 있으며, 여기서 상한 및 하한은 하한이 항상 상한보다 작아야 한다는 것을 제외하고는 독립적으로 선택된다. 추가로, 세포는 단일 또는 다중 투여로 투여될 수 있다.

본 발명은 이제 단지 설명적이며, 상술한 본 발명을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 하는 이하의 실시예를 참고로 하여 더 상세하게 기술될 것이다.

실시예

이하의 실시예는 특허청구된 발명을 더 잘 설명하기 위하여 제공되며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되지는 않는다. 특정한 물질이 언급되는 경우에, 이것은 단지 설명을 목적으로 하며, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 기술분야에서 숙련된 전문가는 본 발명의 범주를 벗어나지 않고, 발명적 능력의 사용하지 않고도 동등한 수단 또는 반응물을 개발할 수 있다.

실시예 1

재료 및 방법

hESCs로부터 혈관아세포를 경유하는 적혈구계 세포의 생성 및 증량

4 개의 인간 ESC 라인이 본 시험에서 사용되었다: H1 (National Institutes of Health는 WA01로 등록함), MA01 및 MA99 (Advanced Cell Technology에서 유도됨), 및 HuES-3 (문헌 [Cowan *et al.*, N.Engl.J.Med. 2004;350:1353-1356]에 의해서 확립되고, Harvard Stem Cell Institute로부터 수득함). hESCs는 이들이 80% 합류에 도달할 때까지 완전 hESC 배지 내의 미토마이신 C-처리된 마우스 배아 섬유아세포 (MEF) 상에서 성장시켰다. 4 단계 과정이 hESCs로부터 적혈구계 세포의 생성 및 증량을 위해서 사용되었다.

단계 1, EB 형성 및 혈관아세포 전구체 유도 (제[-]3.5-0일): 혈관아세포 전구체 (중배엽) 형성을 유도하기 위해서, EBs는 BMP-4, VEGF165 (각각 50 ng/ml, R&D Systems) 및 염기성 FGF (20 ng/ml, Invitrogen)를 갖는 3-4 ml 무혈청 스템라인(Stemline) 배지 (Sigma) 내에서 EB 배양 웰 (초저 6-웰 플레이트, Corning) 당 hESCs의 하나의 웰을 플레이팅함으로써 형성되었다. 배지의 절반은 48 시간 후에 SCF, Tpo 및 FLT3 리간드 (각각 20 ng/ml, R&D Systems)를 첨가하여 재생시켰다.

단계 2, 혈관아세포 증량 (제0-10일): 3.5일 후에, EBs를 수거하고, 트립신으로 분리시켰다. 세포를 G21 니들을 통해서 3 회 통과시키고, 40 μ m 필터를 통해서 여과함으로써 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 스템라인 II 배지 내에 재현탁시킨 후에, 세포를 블라스트-콜로니 성장 배지 (BGM)(5×10^5 개의 세포/ml)와 혼합시키고, 100 mm 초저 접시 내에 플레이팅하였다 (10 ml/접시). 배양물을 BGM 내에서 9-10일 동안 증량시켰다. BGM에 대한 20 ng/ml의 bFGF 및 2 μ g/ml의 재조합 tPTD-HOXB4 융합 단백질의 첨가는 조혈 세포 증식을 상당히 증진시키는 것으로 밝혀졌다. HOXB4 단백질은 마우스 및 인간 ESC 분화 시스템 둘 다에서 조혈성 발생을 촉진시키는 것으로 나타났다 [Helgason *et al.*, Blood 1996;87:2740-2749; Kyba *et al.*, Cell 2002;109:29-37; Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2005;102:19081-19086; Bowles *et al.*, Stem Cells 2006;24:1359-1369; Pilat *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 2005; 102:12101-12106; Lu *et al.*, Stem Cells Dev. 2007;16:547-560]. 포도-양 블라스트 콜로니는 통상적으로, 4-6일 후에 현미경에 의해서 볼 수 있었으며, 빠르게 밖으로 향해서 증

량되었다. 추가의 BGM을 첨가하여 블라스트 세포의 밀도를 $1-2 \times 10^6$ 세포/ml에서 유지시켰다.

단계 3, 적혈구계 세포 분화 및 증량 (제11-20일): 단계 2의 종료 시에 세포 밀도는 종종 매우 높았다 ($\geq 2 \times 10^6$ /ml). HOXB4가 없이 3 유닛/ml의 Epo (총 Epo는 6 유닛/ml이다)를 함유하는 동일한 용적의 BGM을 첨가하여 기존의 BGM을 보충하였다. 블라스트 세포를 추가로 5일 동안 더 증량시키고, 적혈구계 세포로 분화시켰다. 추가의 증량을 위해서는, 적혈구계 세포를 150 mm 페트리 (Petri) 접시에 옮기고, SCF (100 ng/ml), Epo (3 유닛/ml) 및 0.5% 메틸셀룰로즈를 함유하는 스템라인 II 기반 배지를 매 2-3일 마다 첨가하였다. (세포가 유희에 도달하면, 세포를 1:3의 비로 분할하여 추가로 7일 동안 최대 증량 [세포 밀도 $2-4 \times 10^6$ /ml]이 이루어지도록 하는 것이 매우 중요하였다).

단계 4, 적혈구계 세포의 강화 (제21일): 단계 3으로부터 수득된 적혈구계 세포를 5 용적의 IMDM+0.5% BSA 배지 내에서 희석시키고, 1000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 수거하였다. 세포 펠렛을 0.5% BSA를 함유하는 IMDM 배지로 2 회 세척하고, 조직 배양 플라스크 내에 밤새 플레이팅하여 비적혈구계 세포 (통상적으로 더 큰 세포)가 부착하도록 하였다. 그 후, 비-부착 세포를 단시간의 원심분리에 의해서 수거하였다.

제3.5일 EB 분리단계 후에 BGM 내에서의 플레이팅은 적혈구계 배양의 제0일로 표시되었다. 전체 과정을 위한 기간은 BGM 배지 내에 EB 세포를 플레이팅한 것으로부터 19-21일이었으며, 최종 배양 용적은 $5-6 \times 10^6$ MA01 hESCs의 경우에 3-4 리터였다. MA99, H1 및 HuES-3으로부터 RBC 생성의 효율은 MA01 hESCs (상응하게 작은 최종 배양 용적에 의해서)로부터의 효율보다 약 5-6 배 더 작은 것으로 관찰되었다. 이 과정으로부터 수득된 RBCs는 (추가적 성숙 및 탈핵을 위해서 배양물에 투입하기 전에) 기능적 특징화, 유동 세포계수 및 헤모글로빈 분석을 위해서 사용되었다. 더 큰 스케일의 배양 실험은 hESC 세포주 MA01 (n = 6), H1 (n = 2), HuES-3 (n = 2), 및 MA99 (n = 1)를 사용하여 수행되었다.

추가적 성숙을 위해서, 제18-19일 (단계 3)에 수거된 세포를 0.5% BSA를 함유하는 IMDM으로 희석하고 (1:5 희석), 450g에서 10 분 동안 원심분리시켰다. 세포를 RBCs에 관해서 부분적으로 강화시키기 위해, 세포 펠렛의 상부 백색 부분을 길고 가는 침단부를 갖는 피펫을 사용하여 제거하였다. 그 후, RBCs를 SCF (100 ng/ml) 및 Epo (3 유닛/ml)를 함유하는 스템프로 (StemPro)-34 SCF (Invitrogen) 배지 내에 2×10^6 세포/ml의 밀도로 플레이팅하였다. 세포를 매 2일 마다 배지를 교환하면서 6일 동안 배양한 다음에, 추가로 4-5일 동안 Epo (3 유닛/ml)를 함유하는 스템프로-34로 교체하였다. 이들 세포를 β -글로빈 쇄 및 벤지딘 염색 분석을 위해서 사용하였다.

적혈구계 세포의 FACS 분석

Chemicon으로부터 구입하는 RhD 및 HbF 시험 (ComDF)을 제외하고는 건주게이트된 항체 및 상응하는 이소타입 대조군은 모두 Pharmingen/BD Biosciences로부터 구입하였다. 사용된 항체는 HLAabc, Duffy 그룹, CD14, CD15, CD34, CD35, CD36, CD41, CD44, CD45, CD71, CD133, CD184 (CXCR4), GPA, RhD 및 HbF였다. 적혈구계 세포를 19-21일에 수거하고, 0.1% BSA를 함유하는 PBS 중에서 2 회 세척하고, 제조자가 제안한 건주게이트된 항체의 농도에 따라 4°C에서 30 분 동안 염색하였다. 그 후, 염색된 세포를 PBS+0.1% BSA 중에서 2 회 세척하고, 1% 파라포름알데히드가 보충된 세척 완충액으로 고정시켰다. RhD 및 HbF 시험은 염색 전에 PBS 중의 0.5% 글루타르알데히드/0.1% BSA 전고정화 처리 및 PBS 중의 0.1% 트리톤 X/0.1% BSA 투과화 단계를 포함하는 제조자의 프로토콜에 따라 수행하였다.

ComDF 시약으로 실온에서 15 분 동안 염색한 후에, 세포를 PBS 중의 0.1% BSA 내에서 1 회 세척하고, 1% 파라포름알데히드가 보충된 세척 완충액 중에서 고정시켰다. 그 후, 샘플을 유동 세포계수기 (FacScan, Becton Dickinson)를 사용하여 분석하였다. 세포 집단은 셀퀘스트 (CellQuest) 프로그램 (Becton Dickinson)으로 분석하였다.

헤모글로빈의 기능적 분석

19-21일에 수거된 세포를 0.9% NaCl 중에서 3 회 세척한 다음에, 9 용적의 물에 현탁시키고, 사포닌으로 용해시키고, 600×g에서의 원심분리에 의해 투명하게 하였다. 그 후, 헤모글로빈을 셀룰로즈 아세테이트 전기영동에 의해서 분리시켰다. 산소 평형 곡선은 헤모스-아날라이저, 모델 B (Hemox-Analyzer, Model B; TCS Scientific Corp., New Hope, PA)를 사용하여 결정하였다. 가스상 구배는 질소 및 실내 공기를 사용하여 수득하였으며, 곡선은 양 방향으로 주행하였다. 이전에 기술된 바와 같이 [Honig *et al.*, Am.J.Hematol. 1990;34:199-203;

Honig *et al.*, J.Biol.Chem. 1990;265:126-132] 단지 무시할 수 있는 히스테리시스 (histerisis)를 나타내는 주행 (runs)으로부터의 데이터만을 사용하였다. 글로빈 질량 스펙트럼은 리 (Lee) 등에 의해서 기술된 바와 같이 [Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005;19:2629-2635] 보야거 (Voyager)-DE Pro MALDI-TOF 질량 분석계 (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 수득하였다. 간략하면, C18 및 C4 수지로 충전된 짐팁스 (ZipTips; Millipore, Billerica, MA)를 사용하여 각각 펩타이드 및 단백질의 MS 분석을 위한 용액을 제조하였다. 시아노-4-하이드록시신남산 (CHCA) 및 시나편산 (SA)을 각각 펩타이드 및 단백질의 매트릭스로 사용하였다. 매트릭스 용액 (0.1% TFA를 함유하는 50% 아세토니트릴의 수용액 1 ml 중에 3-10 mg CHCA 또는 SA)의 분취량 (1.3 ml)를 사용하여 짐팁스로부터 펩타이드/단백질을 용출시키고, MALDI-TOF (매트릭스-결합된 레이저 탈착/이온화 비행시간 (time-of-flight)) 표적 상에 스포팅하였다. 337 nm 펄스화 질소 레이저 (pulsed nitrogen laser)가 장착된 보야거-DE PRO 질량 분석계 (Applied Biosystems)를 사용하여 샘플을 분석하였다. 단백질 질량은 양성-이온 선형 모드 (positive-ion linear mode)를 사용하여 측정하였다. 외부 질량 검정은 m/z 12362에서 사이토크롬 c (말), m/z 16952에서 아포미오글로빈 (말), 및 m/z 39212에서 아돌라제 (토끼 근육)의 혼합물의 피크를 사용하여 수행되었다.

RhD 및 ABO 유전자형 결정

PCR에 의한 hES 세포주의 RhD 유전자형 결정은 미미하게 변형된 것으로 문헌 [Arce *et al.*, Blood 1993;82:651-655; 및 Simsek *et al.*, Blood 1995;85:2975-2980]에 보고되었다. 모든 hES 세포는 MEF 상에서 유지되었기 때문에, 본 발명자들은 단지 인간 DNA 서열을 증폭시킨 한 쌍의 인간 DNA 특이적 PCR 프라이머를 디자인하였다. ABO식 혈액 그룹의 유전자형 결정은 ABO식 혈액 그룹 개체들 사이의 글리코실트랜스퍼라제의 다형현상을 기초로 하여 개발되었다 [Yamamoto *et al.*, Nature 1990;345:229-233].

hESC 유래 적혈구계 세포의 특징화

다양한 시점에 수거된 세포를 저속 (<1000 rpm)으로 슈퍼프로스트 플러스 슬라이드 (superfrost plus slides) (VWR) 상에 사이토스핀하였다. 슬라이드를 건조시키고, 라이트-검사 염료로 5 분 동안 염색하고, 증류수로 3 회 세척하였다. 면역형광 염색을 위해서, 사이토스핀 슬라이드를 4% 파라포름알데히드 중에서 15 분 동안 고정시키고, 30 분 동안 1% BSA 중에서 배양하고, CD235a/글리코포린 A (Dako), CD71 (BD Biosciences), 또는 인간 β -글로빈 쇄 특이 항체 (Santa Cruz Biotechnology)의 1:200 일차 항체 중에서 4°C로 밤새 배양하였다. 그 후, 세포를 로다민 또는 FITC (Jackson ImmunoResearch Lab)에 컨쥬게이트된 1:200 이차 항-마우스 IgG 내에서 1 시간 동안 배양하였다. 총 헤모글로빈 염색을 위해서, 상기에 개략적으로 기술된 적혈구계 증량 성숙 프로토콜을 사용하여 상이한 분화 단계에서의 세포를 수거하고, 슬라이드 상에 사이토스핀하였다. 공기 건조된 사이토스핀 샘플을 100% 메탄올 중에서 10 분 동안 고정시켰다. 10 분 동안 PBS로 세척한 후에, 세포를 제조자의 설명에 따라 3',3-디아미노벤지딘 시약 (Sigma)으로 염색하였다. 헤모글로빈을 함유하는 세포 (예를 들어, 모두 RBCs)는 갈색으로 염색되었으며, 세포의 핵은 라이트-검사에 의해서 청색으로 염색되었다.

면역학적 혈액 타입 특징화를 위해서, 적혈구계 세포를 19-21일에 수거하고, 유리 슬라이드 상에 사이토스핀하고, 모노클로날 항-인간 혈액 그룹 A 및 B 항체 (Virogen, MA)로 4°C에서 밤새 염색하였다. 그 후, 슬라이드를 로다민 또는 FITC (Jackson ImmunoResearch Lab)로 표지된 상응하는 이차 항체와 함께 30-60 분 동안 배양하였다. 최종 세척 후에, 세포를 형광 현미경에 의해서 검사하였다.

RT-PCR 분석

상기에 개략적으로 기술된 적혈구계 증량 프로토콜을 사용하여 상이한 단계에서 분화된 적혈구계 세포를 수거하고, β -, γ - 및 ϵ -글로빈 유전자의 발현을 RT-PCR에 의해서 분석하였다. 간략하면, 총 RNA를 RNA이지 마이크로 키트 (RNAeasy Micro Kit; Qiagen)를 사용하여 분리시키고, cDNA 풀 (pools)을 이전에 보고된 바와 같이 [Lu *et al.*, Blood 2004;103:4134-4141] SMART cDNA 합성 키트 (Clontech)를 사용하여 구성하였다. 이전에 보고된 바와 같이 [Qiu *et al.*, Blood 2008;111:2400-2408] β -, γ - 및 ϵ -글로빈 유전자에 대해서 특이적인 프라이머를 사용하여 상응하는 메시지 (messages)를 증폭시켰다. PCR 생성물을 2.5% 아가로즈 겔 상에서 분리시키고, 에티뮴 브로마이드 형광에 의해서 가시화시켰다.

시험관 내에서 hESC 유래 적혈구계 세포의 탈핵

블라스트 세포는 제7일까지 상술한 바와 같이 배양하였다.

단계 1: BGM 내의 제7일 블라스트 세포를 여과하고, 문헌 [Giarratana *et al.*, Nat.Biotechnol. 2005;23:69-74]에 기초한 보충물을 갖는 스텝라인 II (Sigma) 내에 플레이팅하였다. 이들은 40 $\mu\text{g/ml}$ 이노시톨, 10 $\mu\text{g/ml}$

엽산, 160 μM 모노티오글리세롤, 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 트랜스페린, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린, 90 ng/ml 질산제1철, 900 ng/ml 황산제1철, 10 mg/ml BSA (Stem Cell Technologies), 4 mM L-글루타민 (Gibco), 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)을 포함하였다. 모든 시약은 다른 식으로 언급되지 않는 한 Sigma로부터 입수하였다.

단계 2: 이 배지 내에서 처음 7일 동안 (제7-14일), 세포는 1 μM 하이드로코티존, 100 ng/ml SCF (Invitrogen), 5 ng/ml IL3 (Invitrogen) 및 3IU/ml Epo (Cell Sciences) 중에서 배양하였으며, 1×10^6 세포/ml에서 유지시켰다.

단계 3: 제14일 이후에, SCF 및 IL3은 중단하고, Epo는 계속하였다. 세포를 2×10^6 세포/ml로 유지시켰다. 배지는 며칠마다 교환하였다.

단계 4: 세포를 상술한 보충물 및 Epo를 갖는 스템라인 II 내에서 다양한 시점 (제19-36일)에 인간 간엽 줄기세포 (MSC, Lonza) 또는 OP9 마우스 기질 세포와 공동배양하였다. 공동배양 전에, MSCs를 MSC 성장 배지 (MSCGM, Lonza) 내에서 증량시키고, OP9 세포를 4 mM L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)을 갖는 α -MEM (Invitrogen) 내의 20% FBS (Atlas) 중에서 증량시켰다.

세포 규격 (dimensions)의 통계학적 분석

사이토스핀된 라이트-김사 염색 슬라이드 상의 세포 및 핵의 면적은 사이온 이미지 (Scion Image)를 사용하여 탈핵 프로토콜 중에 측정하였다. 세포질의 면적은 전체 세포 면적과 핵 면적 사이의 차이 및 핵 대 세포질 비 (N/C)로서 계산되었다. 직경은 핵의 면적으로부터 계산하였다. 각각의 시점에서 직경과 N/C 사이의 차이는 분산 분석 (ANOVA)에 이은 호움 검정 (Holm's test)에 의해서 측정하였다. 데이터는 적어도 $P < 0.05$ 의 유의성을 가지고 평균 $\pm$ 표준 편차로 표현하였다.

실시예 2

hESCs의 적혈구로의 분화

블라스트 세포 (BCs)는 이전에 기술된 바와 같이 hESCs로부터 생성되었다 [Lu *et al.*, Nat.Methods 2007;4:501-509]. [1] 미분화된 hESCs로부터 EB 형성, [2] BC 형성 및 증량, [3] 적혈구의 매스 집단으로의 적혈구계 분화 및 증폭, 및 [4] 적혈구의 강화를 포함하는 4-단계 프로토콜을 사용하여 BCs를 적혈구계 계통으로 분화시켰다. 초기-단계 EBs는 형태원 (morphogen) 및 초기 조혈성 사이토킨의 조합물로 보충된 무혈청 배지 내에서 배양된 hESCs로부터 생성되었다. 그 후, EBs를 분리시키고, 각각의 세포를 BCs의 성장 및 증량을 위해서 무혈청 반고체 블라스트-콜로니 성장 배지 (BGM) 내에 플레이팅하였다. 포도-양 블라스트 콜로니는 3일의 초기에 나타났으며, 4일부터 빠르게 증량하였다. 그 후, BCs는 며칠 동안 BGM 및 Epo를 첨가함으로써 적혈구계 세포로 증식 및 분화하도록 유도되었다. 적혈구계 세포를 더 증량시키기 위해서, SCF, Epo, 및 메틸셀룰로스를 함유하는 스템라인 II 기반 배지를 1 주일 동안 매 2 또는 3일마다 첨가하였다. 그 후, 세포를 BSA가 첨가된 IMDM 내에서 희석하고, 단시간 원심분리시켜 수거하고, 조직배양 플라스크 내에 밤새 플레이팅하여 비적혈구계 세포가 부착하도록 하였다. 나머지 비-부착 세포를 수거하였다 (95% 이상의 적혈구계 세포를 나타냄) (도 1a, 1b, 1c 및 1d). BGM 배지 내에 bFGF (20 ng/ml) 및 HOXB4 단백질 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가하는 증량 및 분화의 이 최적화된 (19-21일) 프로토콜을 사용하여, MA01 hESCs의 한 개의 6-웰 플레이트 ($\sim 1.2 \times 10^7$ 세포)로부터 $3.86 \pm 1.19 \times 10^{10}$ (평균 $\pm$ SD, $n=6$) RBCs가 생성되었다. RBCs는 또한, H1 ($n=2$), HuES-3 ($n=2$), 및 MA99 ($n=1$) hESCs로부터 높은 효율로 생성되었지만, 수율은 MA01 hESCs로부터 수득된 것보다 5-6 배 적었다. 본 발명자들은 hESCs의 품질이 RBCs의 고-효율 생성을 위해서 가장 중요한 인자 중의 하나이며; 고품질 hESCs (즉, hESC 배양물은 약 80% 합류하지만 서로 접촉하지 않은 상태에서, 현미경 하에서 관찰되는 바와 같이 분화의 최소 징후를 갖는 꼭 맞는 경계를 갖는 콜로니로 구성되고; 중등도의 속도로 성장하며; 3-5일에 합류하면서 1:3 분할하고; 거의 모든 세포에 대해서 다능성 마커로 양성 염색되어야 하며; 재플레이팅한 지 24 시간 후에 균일한 EBs를 형성하여야 한다)는 통상적으로 다수의 EB 세포 (예를 들어, 2×10^6 고품질 hESCs는 3.5일 후에 $\sim 2-3 \times 10^6$ EB 세포를 생성시킬 수 있다)를 생성시키는 것을 확인하였다. 또한, 분화 및 증량 배지 내에 0.2-0.5% 메틸셀룰로스가 존재하는 것은 세포가 응집하는 것을 방지하여 증진된 증량을 제공한다는 것을 주목하였다.

실시예 3

hESC 유래 RBCs의 특징화

형태적으로, 상기 (19-21일) 프로토콜을 사용하여 수득된 RBCs는 유핵화되었으며 (>95%), 약 10 μ m의 평균 직경을 갖는 완전한 적혈구보다 실질적으로 더 컸다. 김사-라이트 염색은 세포질 내에 헤모글로빈이 풍부함을 나타내었다 (도 1c 및 1d). 세포의 동일성은 면역학적 특징화에 의해서 확인되었다 (표 1 및 도 1f). 65%를 초과하는 세포는 태아성 헤모글로빈 (HbF)을 발현하였으며, >75%는 CD71 양성이었으며, 세포의 30%는 CD235a를 발현하였으며, 반면에 세포의 대부분은 골수단핵구성 또는 거핵구성 항원 (모든 세포는 CD14에 대해서 음성인 반면에, 세포의 0.4%는 CD15를 발현하였고; 세포의 8.6%는 CD41을 발현하였다) 및 전구세포 항원 (0.3%의 세포는 CD34에 대해서 양성이었으며; 10%의 세포는 CD35를 발현하였고, 5%의 세포는 CD36에 대해서 양성이었다)을 발현하지 않았다 (표 1). 본 발명자들은 BCs가 케모킨 수용체 CXCR413을 발현한다는 것을 이전에 밝혔다. 그러나, 본 발명자들은 hESC 유래 RBCs의 표면 상에서 CXCR4 또는 CD133의 발현을 검출하지 않았으며, 이는 시험관 내에서 체대혈 전구세포로부터 증량된 적혈구계 세포로부터의 관찰결과와 일치한다 [Giarratana *et al.*, Nat.Biotechnol. 2005;23:69-74; Miharada *et al.*, Nat.Biotechnol. 2006;24:1255-1256]. 흥미롭게도, 세포 중의 소수만이 HLA (<5%) 또는 두피 (Duffy) (0%) 그룹 항원을 발현하였거나 어느 것도 이들을 발현하지 않았으며, 이 관찰결과는 hESC로부터 유도된 CD34+CD38- 조혈성 전구체에 대해서도 또한 관찰되었다 [Lu *et al.*, Blood 2004;103:4134-4141].

질량 스펙트럼 분석은 MA01 및 H1 hESC로부터 제19-21일에 수득된 RBCs에서 확인되는 주된 글로빈 타입이 배아성 ζ - 및 ϵ -쇄 및 태아성 G γ -쇄를 포함하는 것을 나타내었다 (도 1e). 상당한 양의 α -쇄가 또한 존재하였지만, A γ -도 성인 β -글로빈 쇄도 검출될 수 없었다. 그럼에도 불구하고, 이들 결과는 이들 세포에서의 헤모글로빈 합성이 배아성 및 초기 태아성 발생 단계에 상응하며, hESC로부터 유도된 완전하게 나타나는 적혈구계 세포조차도 거의 또는 전혀 성숙 글로빈이 없이 높은 레벨의 배아성 및 태아성 글로빈을 공동발현한다는 것을 나타내는 최근의 보고와 일치한다는 것을 입증한다 [Lu *et al.*, Blood 2004;103:4134-4141; Chang *et al.*, Blood 2006;108:1515-1523; Qiu *et al.*, Blood 2008;111:2400-2408; Lu *et al.*, Stem Cells Dev. 2007;16:547-560].

실시예 4

기능적 분석

6 개의 별 개의 실험에서, hESC 유래 적혈구계 세포 (제19-21일 배양물)의 산소 평형 곡선은 정상적인 성인 RBC의 경우와 매우 유사하거나 (도 2a), 다소 오른쪽으로 이동하였다. 도 2a에 설명된 산소 평형 곡선은 이상성 (biphasic) 외관을 갖는다. 산소 포화의 하부 말단에서, 그의 곡선은 정상인 경우의 왼쪽에 있으며, 이것은 형상이 쌍곡선이다 (화살표). 그들의 중앙점에서, 2 개의 곡선은 실질적으로 동일하며, 더 높은 포화 레벨에서 ESC 유래 적혈구계 세포의 곡선은 다시 정상인 경우의 왼쪽으로 약간 옮겨진다 (화살촉). 힐 (Hill)의 n 계수는 또한, 정상 대조군의 경우와 유사하였다 (도 2c). ESC 유래 적혈구계 세포는 생리학적 및 더 높은 pH 값에서 동등한 보어 (Bohr) 효과를 나타내었지만, 더 낮은 pH에서는 더 적은 이동을 나타내었다 (도 2b). 이들 세포의 2,3-디포스포글리세레이트 (2,3-DPG) 고갈에 대한 반응은 정상 대조군에서보다 상당히 작았으며 (도 2c), 이것은 Hb F와 2,3-DPG 사이의 상호작용의 공지된 결여와 일치한다 [Maurer *et al.*, Nature 1970;227:388-390]. 이들 결과는 hESC 유래 RBCs가 정상 성인 적혈구의 경우와 동등한 산소 운반 특성을 갖는다는 것을 입증한다.

실시예 5

hESC로부터 RhD(-) RBCs의 생성

O/RhD(-) RBCs의 제조는 RhD(-) 부정합 환자에게 수혈하는 경우에 동종면역을 방지하는데 실질적으로 도움을 줄 수 있다. 서구 국가에서 범용 공여체 RBCs (O-)에 대해 예상되는 필요성은 RhD(-) 타입이 덜 우세한 한국, 일본 및 중국과 같은 아시아 국가들에서보다 더 크다 (각각 <0.5% 대 15%). PCR에 의한 유전자형 분석은 시험한 20 개의 hESC 세포주 중의 단지 2 개, 즉 MA99 및 MA133이 RhD(-)였음을 나타내었다 (도 3a). 19-21일 배양물로부터의 적혈구계 세포가 FACS 및 면역학적 분석을 위해서 사용되었다. FACS 분석은 MA01로부터 생성된 RBCs가 그들의 표면상에서 RhD 항원을 발현한 반면에, MA99로부터 유도된 세포는 RhD 항원의 발현을 결여하였음을 입증하였으며 (도 3d), 이것은 게놈성 DNA PCR 분석의 결과를 뒷받침한다 (도 3a). A 및 B 항원에 대한 모노클로날 항체를 사용하는 면역세포화학 분석은, MA01 세포로부터 생성된 RBCs 중의 약 5%는 A 항원을 발현하였지만 B 항원은 발현하지 않았으며 (도 3e), 이는 MA01 세포가 A(+)의 표현형을 갖는다는 것을 입증하고; MA99 세포로부터 유도된 RBCs 중의 약 5%는 A 항원이 아닌 B 항원을 발현하고 (도 3e), 이것은 MA99 세포가 B(-) 표현형을 가짐을 시사하는 반면에, MA01 세포로부터 유도된 RBCs는 A 항원도 B 항원도 발현하지 않아서 MA01 세포를 O-타입으로 확인하였음을 나타내었으며, 이것은 게놈성 PCR 분석의 결과와 일치한다 (도 3b 및 3c). 그러나, 모든 적혈구계 세포가 세포의 초기 발생단계를 반영할 수 있는 A 또는 B 항원을 발현하지 않았다는 것은 가치가 없다

[Wada *et al.*, Blood 1990;75:505-511; Hosoi *et al.*, Transfusion 2003;43:65-71].

실시예 6

시험관 내에서 hESC 유래 적혈구계 세포의 탈핵 및 성숙

중요한 과학적 및 임상적 문제는 hESC 유래 적혈구계 세포가 시험관 내에서 성숙하여 탈핵 적혈구를 생성할 수 있는지 여부이다. 이를 조사하기 위해서, 몇 개의 상이한 전략 및 배양 조건을 시험하였다. 문헌 [Giarratana *et al.*, Nat.Biotechnol. 2005;23:69-74]에 보고된 보충물 및 사이토킨을 갖는 조혈 줄기세포 증량 배지는 시험한 다른 조건보다 상당히 더 높은 효율로 hESC 유래 적혈구계 세포의 성장, 증량, 성숙 및 탈핵을 지지한 것으로 확인되었다. 기질 세포가 없이 이 조건에서 배양된 블라스트 세포는 10-30% 탈핵을 야기하였으며, 반면에 MSC 기질 세포 상에서의 배양은 약 30% 탈핵을 야기하였으며, OP9 기질 세포층은 탈핵 과정을 더 증진시켰다. 적혈구계 세포의 약 30-65% ($40 \pm 17\%$ [평균 $\pm$ SD, $n = 4$])는 이들 세포를 비-기질성 5 주일 배양물로부터 OP9 기질층으로 옮기고, 36일부터 42일까지 공동배양한 경우에 탈핵되었다 (도 4c 및 4e). 탈핵된 적혈구 (도 4c 및 4e)는 정상 인간 혈액으로부터의 성숙한 RBCs와 유사한 염색 패턴 및 크기를 나타낸다 (도 4d 및 4f). 이들 적아구는 BD 매트릭셀 시스템을 사용하여 MEFs가 없이 hESCs로부터 유도되었다. 비-기질성 조건 (MSC 또는 OP9에 대한 전이가 없음)에서 유지된 적아구가 10-30% 탈핵할 수 있었다는 사실은 탈핵이 무-피더 하에서 완전하게 달성될 수 있었음을 시사한다.

6 개의 실험 모두는 모두 다양한 레벨의 탈핵 및 30-50-배의 증량을 나타내는 hESC 세포주 H1 ($n = 3$), MA01 ($n = 2$) 및 huES-3 ($n = 1$)을 사용하여 수행되었다. 기질 세포, 특히 OP9는 비-기질성 조건에 비해서 장기간 배양 후에 세포의 생존을 증진시킬 수 있었다.

탈핵과 연관된 현상을 더 조사하기 위해서, 적혈구 성숙의 과정과 관련된 다수의 특징을 예시하였다. 탈핵이 나타나기 전에는 세포 크기 및 핵 대 세포질 비 (N/C)의 점진적인 감소가 관찰되었다. OP9 기질층에 전이시키기 전에 이들 세포의 크기 및 N/C는 제8일에 직경 $18.3 \mu\text{m}$ 로부터 제27일에 유헤화된 세포의 경우에는 $12.9 \mu\text{m}$ 로 ($p < 0.001$) 및 탈핵된 세포의 경우에는 $7.5 \mu\text{m}$ 로 ($p < 0.001$), N/C 비는 제8일에 0.82로부터 제27일까지에는 0.30으로 상당히 감소하였으며 ($p < 0.001$, 도 4a 및 4b), 이것은 과정 중에서의 실질적인 핵 응축을 시사한다. 라이트-김사 염색은 청색에서 자주색으로, 분홍색 염색으로 점차적인 진행을 나타내었으며, 이것은 전적아구에서 다염성 적아구로, 정염성 정적아구로의 전이를 나타내는 것이다. 이들 세포는 제8일에 초기 적아구 마커인 CD71의 높은 레벨을 발현하였지만 시간의 경과에 따라 이들의 발현은 감소였으며, 그 반면에 이들은 성숙 적혈구 마커인 CD235a (글리코포린 A)를 무시할 수 있는 레벨로 낮게 나타냈지만 이들의 발현은 그들의 성숙에 따라 극적으로 상승하였다 (도 5a 및 도 6). 벤지딘 염색은 또한, 시간의 경과에 따라 이들 세포 내에서 헤모글로빈의 점진적인 축적 및 세포 크기의 감소를 나타내었다 (도 5c).

예비 실험은 미숙한 탈핵 적혈구계 세포가 주로 배아성 ζ - 및 ϵ -글로빈 쇠 및 태아성 γ -글로빈 쇠를 발현하였음을 확인하였다 (도 1e). 비록 상당한 양의 α -쇄가 이들 세포 내에 존재하였지만, 성숙 β -글로빈 쇠는 검출되지 않았다. 후속 시험은 적혈구계 세포가 시험관 내에서 추가의 분화 및 성숙에 따라 성인의 완전한 β -글로빈 쇠를 발현하는 능력을 갖는지 여부를 결정하기 위해서 수행되었다. 글로빈 쇠 특이적 면역형광 분석은 세포가 성인 β -글로빈 쇠의 발현 (제17일에 0%, 도 5b)을 시험관내 배양의 28일 후에 약 16.37%로 상승시켰음을 나타내었다 (일부의 세포는 β -글로빈 쇠를 매우 높은 레벨로 발현하였다, 도 5B 및 도 7). 이들 세포에서 β -글로빈 쇠 유전자의 발현은 글로빈 쇠 특이적 RT-PCR 분석에 의해서 확인되었다 [Qiu *et al.*, Blood 2008;111:2400-2408] (도 8). 최근의 보고 [Zambidis *et al.*, [abstract]. 6th ISSCR Annual Meeting 2008;357]와 일치하여, 본 발명자들은 또한, 모든 세포가 β -글로빈 쇠 발현 상태와는 관계없이 태아성 γ -글로빈 쇠를 발현하였음을 관찰하였다.

[표 1]

FACS 분석에 의한 hESC 유래 적혈구계 세포의 특징화

항체	양성 범위 (% n = 5)	평균 (평균±SE)
HbF	40.03 - 96.60	66.79±9.88
CD47	95.00 - 99.21	97.51±0.85
GPA	21.31 - 41.93	30.10±3.79
CD71	59.40 - 83.39	76.07±4.33
CD44	18.61 - 44.56	30.72±4.55
CD45	10.06 - 40.21	22.23±5.45
CD41	4.44 - 20.16	8.61±2.98
CD14	0	0
CD15	0.20 - 0.60	0.38±0.08
CD34	0 - 1.62	0.34±0.32
CD35	5.82 - 17.46	9.79±2.00
CD36	1.08 - 13.30	4.99±2.14
CD133	0	0
CD184 (CXCR-4)	0	0
Duffy	0	0
HLAabc	0.75 - 6.25	4.15±1.14

실시예 7

RhD 및 ABO 유전자형 결정

PCR에 의한 hES 세포주의 RhD 유전자형 결정은 약간의 변형을 하여 아르케 (Arce) 등 및 심섹 (Simsek) 등에 의해서 보고되었다 [Arce *et al.*, Molecular cloning of RhD cDNA derived from a gene present in RhD-positive, but not RhD-negative individuals. Blood 1993;82:651-655; Simsek *et al.* Rapid Rh D genotyping by polymerase chain reaction-based amplification of DNA. Blood 1995;85:2975-2980]. 모든 hES 세포는 MEF 상에서 유지되었기 때문에, 모든 발명자들은 단지 인간 DNA 서열을 증폭시킨 한 쌍의 인간 DNA 특이적 PCR 프라이머를 디자인하였다. PCR 프라이머는 RhD-F, 5'-tgaccctgagatggctgtcacc-3' (SEQ ID NO: 34) 및 RhD-R, 5'-agcaacgataccagttgtct-3' (SEQ ID NO: 35)였으며, 이들은 엑손 4와 5 사이의 인트론 4를 증폭시키며, RhD 음성 개체로부터의 DNA에 의해서 단지 1,200 bp 단편만을 생성시키는 반면에 RhD 양성 개체에서는 100 bp 및 1,200 bp (이것은 증폭의 단편 크기로 인하여 약하다)가 생성된다. 이 전략은 혈청학적으로 결정된 표현형과 완전히 일치하는 것으로 확인되었다 [Simsek *et al.*, Blood 1995]. 간략하면, 게놈성 DNA를 QIAamp DNA 미니 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 hES 세포로부터 분리시켰으며, 50 μ l 중에서의 반응당 200 ng의 DNA가 PCR 증폭을 위해서 사용되었다. PCR 조건: 7 분 동안 72°C에서의 최종 연장을 가지고 35 사이클 동안에 45 초 동안 94°C, 1.5 분 동안 60°C, 및 2.0 분 동안 72°C. PCR 생성물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 분리시키고, 에티뮴 브로마이드 염색에 의해서 가시화시켰다. RhD 양성 및 음성 개체에 의한 정상 인간 혈액의 단핵성 세포로부터의 DNA가 양성 및 음성 대조군으로 사용되었다.

ABO식 혈액 그룹의 유전자형 결정은 ABO식 혈액 그룹 개체들 사이의 글리코실트랜스퍼라제의 다형현상을 기초로 하여 개발되었다 [Yamamoto *et al.*, Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. Nature 1990;345:229-233]. 우선, 인간 특이적 PCR 프라이머는 뉴클레오타이드 258을 둘러싸는 DNA 단편을 증폭시키도록 디자인되었으며, 여기서 O 대립유전자는 이 부위에서 하나의 뉴클레오타이드 (G) 결실을 함유하고, 제한효소 *Kpn* I에 대한 절단 부위를 생성시키지만, 제한효소 *Bst* EII의 절단 부위는 제거한다. 그 후, PCR 생성물을 *Kpn* I 및 *Bst* EII에 의한 제한 분해에 적용하였다: O/O 유전자형으로부터의 PCR 생성물은 단지 *Kpn* I에 의해서 분해되어 2 개의 새로운 짧은 단편을 생성시킬 수 있지만, *Bst* EII의 분해에 대해서는 저항성인 한편, A/A, B/B 및 A/B 유전자형으로부터의 PCR 생성물은 *Kpn* I 분해에 대해서 저항성이며, 단지 *Bst* EII에 의해서 절단되고, 그 반면에 A/O 또는 B/O의 유전자형으로부터의 PCR 생성물은 두 가지 효소 모두에 의해서 부분적으로 분해될 수 있다. 따라서, 첫 번째 PCR 증폭 및 제한 분해는 O 혈액형과 비-O 혈액형을 구별할 수 있다. 결과를 기초로 하여, PCR 프라이머의 두 번째 세트는 뉴클레오타이드 700의 부분을 증폭시키도록 디자인되었으며, 여기서 A 및 O 대립유전자는 둘 다 *Msp* I에 의해서 분해될 수 있는 G 뉴클레오타이드를 함유하는 한편, B 대립유전자는 *Alu* I 절단 부위를 생성시키는 이 위치에서 A 뉴클레오타이드를 갖는다. 글리코실트랜스퍼라제의 2 개의 진단적 위치에서의 2 개의 별도의 PCR 증폭과 4 개의 제한효소 분해의 조합은 A, B 또는 O 대립유전자를 명백하게 구별할 수 있다. 간략하면, PCR 반응을 뉴클레오타이드 258의 부분을 증폭시키는 프라이머의 세트 (프라이머: O-타입-F, 5'-gccgtgtgccagagcgcatgt-3' (SEQ ID NO: 36), O-타입-R, 5'-aatgtccacagtcactcgccac-3' (SEQ ID NO: 37), PCR 생성물, 268 bp)를 사용하여 수행하였으며, PCR 생성물은 퀴아젠 키트 (Qiagen Kit)에 의해서 정제하고, *Kpn* I 및 *Bst* EII에 의해서 분해시키고, 2% 아가로스 겔 상에서 분리시켜 에티뮴 브로마이드 염색에 의해서 가시화시켰다. O/O 유전자형의 경우에, *Kpn* I는 174 bp 및 93 bp 단편을 생성하며, *Bst* EII는 PCR 생성물을 절단

하지 못하고; A/A, B/B 및 A/B 유전자형의 경우에 *Kpn* I는 PCR 생성물을 절단하지 못하고, *Bst* EII는 174 bp 및 93 bp 단편을 생성시키며; A/O 또는 B/O 유전자형의 경우에 *Kpn* I 및 *Bst* EII는 둘 다 PCR 생성물을 부분적으로 절단하며, 267 bp (원형), 174 bp 및 93 bp 단편을 생성시킨다. 뉴클레오타이드 700의 부분을 증폭시키는 두 번째 PCR 증폭이 수행하였으며 (프라이머: AB-타입-F, 5'-tgctggaggtgcgcgcctacaag-3' (SEQ ID NO: 38), AB-타입-R, 5'-gtagaaatcgccctcgctcttg-3' (SEQ ID NO: 39), PCR 생성물, 278 bp), PCR 생성물을 정제하고, *Alu* I 및 *Msp* I로 분해시키고, 상기한 바와 같이 분리시켰다. B/B 유전자형의 경우에, *Alu* I 분해는 187 bp+91 bp 단편을 생성시키며, *Msp* I 분해는 206 bp+47 bp를 생성시킨다. A/A, A/O 및 O/O 유전자형의 경우에, *Alu* I는 PCR 생성물을 절단하지 못하며, *Msp* I는 187 bp+47 bp 단편을 생성시킨다. A/B 또는 B/O 유전자형의 경우에, *Alu* I는 278 bp (절단 없음)+187 bp+91 bp 단편을 생성시키고; *Msp* I는 206 bp 및 187 bp+47 bp 단편을 생성시킨다.

실시예 8

재료 및 방법

hESCs의 배양

hESC 세포주 WA01(H1), HUES3, 및 MA01을 사용하였으며, 이전에 기술된 바와 같이 유지시켰다⁽⁶⁾. 간략하면, hESCs는 완전 hESC 배지 내의 미토마이신 C-처리된 마우스 배아 섬유아세포 (MEF) 상에서 성장시켰다. hESCs는 합류 (confluence)에 도달하기 전에 매 3-5일 마다 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA를 사용하여 계대시켰다. 그 후, 무-피더 배양을 위해서 세포를 루드비히 등 (Ludwig *et al.*)의 제제를 기초로 하는 완전 변형된 TeSRTM1 (mTeSRTM1) 배지 (Stem Cell Technologies, Inc.) 내의 hESC-적격 매트릭스 (BD Biosciences) 상에서 성장시켰다^(7,8). 세포는 제조자의 제안된 설명에 따라 유지시켰다. 간략하면, 세포는 이들이 약 90% 합류에 도달하면, 통상적으로 1:3 내지 1:6의 분할비로 매 5-7일 마다 계대시켰다. 그 후, 세포를 디스파제 (1 mg/ml BD, Biosciences)로 처리하고, 37°C에서 3-5 분 동안 배양하여 콜로니의 분리를 개시하였다. 콜로니를 DMEM/F12 (Mediatech)로 세척하여 디스파제 용액을 제거하였다. 콜로니를 조직 배양 플라스틱으로부터 이탈시키기 위해서, 웰을 DMEM/F12로 코팅하고, 모든 콜로니가 옮겨질 때까지 부드럽게 긁어내었다. 콜로니를 원뿔형 튜브에 옮기고, 웰을 DMEM/F12로 세척하고, 세포를 모아서 웰 내에 잔류하는 모든 것을 수거하였다. 이들을 1000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하였다. 세포 펠릿을 mTeSRTM1 배지 내에 재현탁시키고, 웰당 2 ml의 mTeSRTM1 배지 내의 매트릭스 코팅된 6 웰 플레이트에 옮겼다. 세포를 5% CO₂ 하에 37°C에서 유지시키고, mTeSRTM1 배지는 매일 다시 보충하였다.

면역형광성 세포화학 분석

무-피더 hESC 콜로니를 면역형광을 사용하여 Oct-4 및 Tra-1-60 발현에 대해서 시험하였다. 세포를 4% 파라포름 알데히드 (PFA)로 고정시키고, PBS로 세척하고, PBS 중의 5% 표준 염소 혈청 (Vector Labs), 1% BSA (Sigma) 및 0.2% 트리톤-X-100 (Sigma)으로 실온에서 30 분 동안 차단시켰다. 세포를 차단 용액 중에서 Oct-4 (Santa Cruz Biotechnology) 또는 Tra-1-60 (Millipore/Chemicon)에 대한 일차 항체와 함께 밤새 4°C에서 배양하고, PBS로 세척하고, 차단 용액 중에서 비오틴 컨쥬게이트된 이차 항체 (Jackson ImmunoResearch Labs)와 함께 실온에서 45 분 동안 배양하였다. 더 세척한 후에, 세포를 알렉사 (Alexa) 954 컨쥬게이트된 스트렙타비딘 (Invitrogen/ Molecular probes)과 함께 실온에서 15 분 동안 배양하고, 이어서 PBS로 광범한 최종 세척을 수행하였다. 세포를 DAPI를 갖는 프로롱 골드 (Prolong Gold) (Invitrogen /Molecular Probes) 내에 탑재하였다.

hESCs로부터 혈관아세포의 분화

MEFs 상에서 배양된 hESCs를 혈관아세포로 유도하기 위해서, 80-90% 합류성 플레이트를 0.05% 트립신 분해에 의해서 분리시켰다. 무-피더 hESCs를 혈관아세포로 분화시키기 위해서, 85-90% 융합성 세포를 상술한 프로토콜을 사용하여 매트릭스 매트릭스로부터 분리시켰다. 두 가지 조건으로부터의 세포를 이전에 기술된 바와 같이 상이한 용량의 BMP-4, VEGF 및 bFGF를 갖는 스텔라인 II (Sigma) 배지 내의 초저 접시 (Ultra-Low dishes; Corning, NY) 상에 플레이팅하였다⁽²⁾. 배지의 절반을 48 시간 후에, 상이한 실험 조건에 따라 동일한 사이토킨을 함유하는 신선한 배지 또는 SCF, FLT3 리간드 (FL) 및 Tpo (20 ng/ml, R&D System)를 더한 동일한 배지로 교체하였다. 3.5일 후에, EBs를 수집하고, 0.05% 트립신으로 분리시켰다. 단일-세포 현탁액은 세포를 22-게이지 니들을 통해서 및 40-μm 세포 스트레이너 (strainer)를 통해서 통과시킴으로써 수득하고, 원심분리에 의해서 수

거하고, 50-100 μl 의 스태라인 II 배지 내에 재현탁시켰다. 세포 (0.75×10^5 내지 1×10^5)를 이전에 기술된 바와 같이 2.5 ml의 블라스트 콜로니 성장 배지 (BGM)와 혼합시키고⁽²⁾, 초저 접시 내에 플레이팅하고, 37°C에서 배양하였다. MEF 및 무-피더 hESCs 둘 다로부터 유도된 블라스트 콜로니는 플레이팅한 지 3-4일 후에 관찰되었으며, 그 직후에 빠른 증량이 이어졌다. 블라스트 세포 (BC)는 현행 시험에서 제6일 블라스트 콜로니로부터 수득된 세포로 정의된다.

혈관아세포 전구체의 강화

잠재적 BC 전구체 표면 마커 CD31, CD34, KDR, CXCR-4, CD133, ACE, PCLP1, PDGFR α , Tie-2, Nrp-2, Tpo-R 및 bFGFR-1이 세포 강화를 위해서 선택되었다. 모든 항체는 마우스 모노클로날 IgG 이소타입이며, 이들은 다음과 같다: CD31 및 CD34 (Dako Cytomation), KDR 및 Tpo-R (R&D Systems, Inc.), CXCR-4 (Abcam Inc.), Nrp-2, ACE, PCLP1 및 PDGFR α (Santa Cruz Biotechnology), Tie-2 (Cell Signaling Technology, Inc.), bFGFR-1 (Zymed Laboratories), 및 CD133 (Miltenyi Biotech). 항체 콕테일 조립은 이지셉 (EasySep) "두-잇-유어셀프 (Do-it-Yourself)" 선택 키트 (Stem Cell Technologies)에 의해서 수행되었다. EBs로부터 유도된 세포 현탁액을 1200 rpm에서 4 분 동안 원심분리시키고, 2% FBS/1 mM EDTA 완충액을 갖는 PBS 중에 $1-2 \times 10^6$ 세포/100 μl 의 농도로 재현탁시켰다. 세포를 RT에서 15 분 동안 상이한 항체 콕테일과 혼합시킨 다음에, 이지셉 나노입자 (EasySep Nanoparticle)와 함께 RT에서 추가로 10 분 동안 배양하였다. 세포를 갖는 튜브를 마그네트 홀더 (Magnet holder) 내에 배치하였을 때 상등액을 부어버린 후에, 양성 선택된 세포를 분리시켰다. 항체 선택된 양성 세포 (1×10^5)를 2.5 ml의 BGM과 혼합시키고, 블라스트 콜로니 발생을 위해서 플레이팅하였다.

실시간 RT-PCR 및 데이터 분석

전체 RNA를 제조자의 프로토콜에 따라 알렌이지 마이크로 키트 (RNeasy Micro Kits; Qiagen)를 사용하여 EBs 또는 미분화된 hESCs로부터 추출하였다. cDNAs는 매뉴얼 설명서에 따라 BD SMART PCR cDNA 합성 키트 (BD Biosciences)를 사용하여 합성하였다. 실시간 RT-PCR (qRT-PCR)은 풀벨로시티 SYBR 그린 QPCR 마스터 믹스 (FullVelocity SYBR Green QPCR Master Mix; Stratagene)를 사용하여 수행하였다. 반응은 반응당 다음의 성분을 사용하여 삼중으로 설정하였다: 50 ng의 주형, 0.2 마이크로몰의 각각의 프라이머 및 1X 마스터 믹스. 사용된 프라이머의 유전자 특이적 서열은 표 1에 열거하였으며, 모든 프라이머에 대한 어니일링 온도는 55°C이다. 증폭 및 실시간 데이터 획득은 MxPro 버전 3.0 소프트웨어를 갖는 스트라타젠 (Stratagene) Mx3005P에서 수행하였다. 다음의 사이클 조건이 사용되었다: 10 분 동안 95°C의 하나의 사이클에 이어서 30 초 동안 95°C, 1 분 동안 55°C, 30 초 동안 72°C의 40 사이클에 이어서 1 분 동안 95°C, 30 초 동안 55°C 및 30 초 동안 95°C의 최종 사이클. 각각의 표적 유전자의 상대적 정량화는 $\Delta\Delta C_T$ 방법을 사용하여 β -액틴 (ΔC_T)에 대한 사이클 역치 (C_T) 표준화를 기초로 하여 수행되었다⁽⁹⁾. 상대적 유전자 발현 데이터는 실시간 정량적 PCR 및 2^{(-델타 델타 C(T))} 방법을 사용하여 분석하였으며⁽⁹⁾, 여기서 실험적 샘플 내의 각각의 검사한 유전자의 ΔC_T 는 미분화된 hESC 대조군 샘플 ($\Delta\Delta C_T$) 내의 각각의 유전자의 평균 ΔC_T 와 비교하였다. 그 후, 발현에 있어서의 폴드 (fold) 변화를 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 로 계산하였다. 음성 폴드 차이 데이터는 다음의 수학적식을 사용하여 선형 "발현에서의 폴드 변화" 값으로 전환시켰다: 발현에서의 선형 폴드 변화 = -(1/발현에서의 폴드 변화).

통계학적 분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 그룹간 비교는 그래프패드 프리즘 (GraphPad Prism), 버전 4, 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA)를 사용하여 언페어드 스튜던트 t-시험 (unpaired Student's t-test)에 의해서 수행하였다. $p < 0.05$ 는 통계학적으로 유의적인 것으로 해석되었다.

실시예 9

BMP-4 및 VEGFs는 둘 다 혈관아세포 발생을 위해서 필요하다

혈관아세포 및 조혈 계통 쪽으로의 hESC 분화를 유도하기 위한 무혈청 시스템은 이전에 기술되었다^(2,10). BMP-4, VEGF, 및 초기 조혈성 사이토킨의 콕테일이 사용되었지만, 개별 인자의 절대적인 필요성 및 최적 농도는 검사하지 않았다. 미래의 연구 및 임상적 적용을 위한 혈관아세포를 생성시키는데 필요한 비용 및 노력을 감소시키기 위해서, 발명자들은 hESCs로부터 블라스트 콜로니의 효율적인 발생에 대한 VEGFs, BMPs, 및 3 가지 초기 조혈성

사이토킨 (TPO, FL 및 SCF)의 최소 필요성 및 효과를 특이적으로 검사하였다. BMP-4는 무혈청 조건 하에서 블라스트 콜로니를 발생시키는데 절대적으로 필요한 것으로 밝혀졌다. EB 형성 중에 배지 내에 BMP-4의 보충이 없이는 블라스트 콜로니가 획득되지 않았으며, BMP-4의 뚜렷한 용량-반응 효과는 hESCs로부터 블라스트 콜로니의 형성에 관해서 관찰되었다 (도 9a). 더구나, BMP-4는 BMP 패밀리의 다른 구성원에 의해서 치환될 수 없었다. BMP-2 및 BMP-7 단독, 또는 두 개의 조합은 BC 발생을 촉진시키는데 실패하였다. 더구나, BMP-4를 함유하는 EB 배지 내에 BMP-2 및 BMP-7의 보충은 효과를 나타내지 않았거나 (10 ng/ml), 블라스트 콜로니 발생을 억제하였다 (20 ng/ml) (도 9b). 그러나, 블라스트 콜로니 성장 배지 (BGM) 내의 BMP-4, 및 BMP-2 및/또는 BMP-7의 첨가는 블라스트 콜로니의 발생에 대해서 어떤 효과도 갖지 않았으며, 이것은 BMP-4만이 중배엽/혈관아세포성 구체화 (specification) 단계를 촉진시키며, BCs의 성장 및 증량은 촉진시키지 않음을 시사한다. 유사하게, VEGF₁₆₅가 EB 형성 배지로부터 제거되면 블라스트 콜로니는 발생하지 않았다. VEGF₁₆₅는 용량 의존적 방식으로 블라스트 콜로니의 발생을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다 (도 9c). 단지 KDR 및 FLT1 수용체에 결합할 수 있는 VEGF 구성원의 이소형태인 VEGF₁₂₁은 hESCs로부터 블라스트 콜로니의 발생을 촉진시키는데 VEGF₁₆₅의 대용물로 사용될 수 있으며; 무혈청 조건 하에서의 최적 용량인 50 ng/ml의 VEGF₁₆₅ 또는 VEGF₁₂₁이 EB 배지 내에 첨가된 경우에 거의 동일한 수의 블라스트 콜로니 (68±5 대 67±12)가 발생하였다. 그러나, BMP-4와는 대조적으로 VEGF가 BGM 내에 부재하는 경우에는 블라스트 콜로니가 획득되지 않았으며, 이는 VEGF가 중배엽/혈관아세포성 구체화의 초기 단계에서 및 BCs의 성장 및 증량에 있어서 모두 중요한 역할을 한다는 것을 입증한다.

발명자들의 최초의 보고서에서⁽²⁾, TPO, FL 및 SCF는 초기 조혈 전구세포 성장 및 증량을 더 촉진시키기 위한 노력으로 EB 배지 내에 hESCs를 플레이팅한 지 48 시간 후에 첨가되었다. 여기서는 TPO, FL, 및 SCF가 중배엽/혈관아세포성 계통 쪽으로의 hESCs의 구체화에 어떤 역할이라도 하는지 여부를 검사하였다. EBs는 50 ng/ml의 BMP-4 및 VEGF를 갖는 스템라인 II 내에 hESCs를 플레이팅함으로써 형성되었으며, 48 시간 후에 2 개의 웰로 분할하여, 하나의 웰에는 20 ng/ml의 TPO, FL 및 SCF를 첨가하고, 다른 웰에는 추가의 인자를 첨가하지 않고, EBs를 추가로 36 시간 동안 배양하였다. 그 후, EBs를 수거하고, 단일 세포 현탁액을 획득하여 블라스트 콜로니 형성을 위해서 플레이팅하였다. 본 발명자들의 결과는 EB 형성 중에 TPO, FL 및 SCF의 보충은 블라스트 콜로니의 발생에 효과가 없었으며, TPO, FL 및 SCF에 의해서 처리되거나 처리되지 않은 EBs로부터 유도된 1×10^5 개의 세포당 각각 242 ± 16 대 287 ± 33 블라스트 콜로니가 발생하였다.

실시예 10

bFGF는 hESCs로부터 혈관아세포의 성장을 촉진시키지만 수임 (commitment)을 촉진시키지는 않는다.

이전의 시험은 초기 분화 중에 bFGF의 보충이 쥐 및 인간 ESC 조혈성 발생을 촉진시킨다는 것을 나타내었다^(12,13,14,5). 따라서, 본 발명자들은 EB 분화 단계 중에 bFGF의 첨가가 hESCs로부터 블라스트 콜로니 형성을 증진시킬 수 있는지 여부를 연구하였다. EB 형성 중에 bFGF의 첨가는 블라스트 콜로니의 발생에 영향을 미치지 않으며, 실제로 고용량 (40 ng/ml)에서는 다수의 hESC 세포주으로부터 블라스트 콜로니의 형성을 억제하였다 (도 10a 및 도 11). 이와는 대조적으로, BGM 내에서 bFGF의 첨가는 블라스트 콜로니의 발생을 상당히 증진시켰다 (도 10a, 도 11). 블라스트 콜로니의 수 ($p < 0.001$) 및 BCs의 총수는 bFGF 보충이 없는 경우의 BGM에 비해서 상당히 증가하였다. BGM 내에서 최적 용량 (20 ng/ml)의 bFGF에 의해서, 블라스트 콜로니는 더 크고 더 건강하며, 본 발명자들은 일관되게 6일의 성장 후에 고품질 WA01 hESCs (약 1.2×10^7 세포)의 한 개의 6-웰 플레이트로부터 약 1×10^8 BCs를 수확하였으며, 이것은 bFGF의 보충이 없는 BGM으로부터 획득된 것보다 8 ± 1 배 더 큰 것이다.

bFGF의 보충이 있거나 없이 생성된 BGc의 계통 분화 잠재력을 연구하기 위해서, 동등한 수의 플링된 BCs를 전술한 바와 같이 조혈 및 내피 계통 분화를 위해서 플레이팅하였다⁽²⁾. 조혈성 CFU 형성을 위해서, 129 ± 9 및 86 ± 22 CFUs/ 10^4 BCs가 각각 bFGF (20 ng/ml)의 보충이 있거나 없는 BGMs로부터 유도된 BCs로부터 형성되었다. 더구나, 두 개의 그룹 사이에서 상이한 CFUs (CFU-mix, CFU-G, CFU-M 및 CFU-E)의 발생에 대해서는 차이가 관찰되지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 내피 계통 분화를 위해서는, bFGF 보충이 없는 BGM으로부터 유도된 BCs (55±3%)보다 bFGF (20 ng/ml)를 갖는 BGM으로부터 더 많은 BCs (62±3%)가 내피 세포로 분화하였다. 두 가지 공급원으로부터의 내피 세포는 매트릭셀 상에 플레이팅한 후에 효율적으로 모세-혈관 유사 구조를 형성하였다 (도 10b 및 2c). 이들 결과는 bFGF가 BCs의 성장을 촉진시키지만, 선택적인 계통 분화는 야기하지 않음을 시사

한다.

실시예 11

피더 세포가 없이 유지된 hESCs로부터 혈관아세포의 건설한 생성

MEF 피더층 상에서 유지된 hESCs는 비인간 시알산 N-글리코릴뉴라민산 (Neu5Gc)을 함유하며^(15,7,8), Neu5Gc의 동물 공급원은 인간 보체와의 강력한 면역원성 반응을 야기할 수 있는 것으로 보고되었다. MEF 피더층 상에서의 hESCs의 배양은 동물 Neu5Gc의 완전한 제거를 방지하며, 이들 조건 하에서 유지된 hESC 세포주으로부터 생성된 혈관아세포의 잠재적인 임상적 적용에 대한 관심을 상승시킨다. 따라서, 본 발명자들은 혈관아세포가 MEF 피더가 없이 유지된 hESCs로부터 생성될 수 있는지 여부를 결정하는 단계를 채택하였다. 3 개의 hESC 세포주를 디스파제와 함께 hESC-적격 매트릭스 상에서 계대시키고, 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 mTeSR 배지 내에 유지시켰다. 이들의 미분화된 상태는 Oct-4 및 Tra-1-60 항원의 발현에 대한 면역형광 염색 및 콜로니 형태에 의해서 확인하였다 (도 12a-12h). 이들 세포를 수거하고, 상술한 최적화 조건을 사용하여 BCs의 발생에 이용하였다. 흥미롭게, 동일한 수의 EB 세포를 플레이팅한 경우에 MEF 피더층 상에서 배양한 hESCs에 비해서 무-피더 hESCs에 의해서 상당히 더 큰 수의 BCs가 관찰되었다 (도 12i, $p < 0.05$). 이들 결과는 시험한 3 개의 hESC 세포주 WA01, MA01 및 HUES-3 모두에 대해서 관찰되었다 (데이터는 나타내지 않음).

실시예 12

혈관아세포 발생에 대한 BMP-4 및 VEGF의 효과를 뒷받침하는 기전

hESCs로부터 혈관아세포 발생에 대한 BMP-4 및 VEGF의 효과를 뒷받침하는 분자 기전을 상세히 조사하기 위해서, 본 발명자들은 각각의 인자의 존재 및 부재 하뿐만 아니라 BMP-4 및 VEGF의 조합의 존재 하의 스템라인 II 배지 내에서 형성된 3.5일 된 EBs에서 혈관아세포의 발생과 연관된 유전자의 발현을 비교하였다. 유전자 발현은 실시간 RT-PCR (qRT-PCR)에 의해서 분석하였으며, 미분화된 hESCs에서의 그들의 레벨과 비교하였다. 어떤 인자도 없이 형성된 EBs는 미분화된 hESCs보다 hESCs에 대한 마커인 OCT-4를 더 높은 레벨로 발현하였다. EB 배지 내에서 VEGF의 보충은 OCT-4 발현의 중등도의 하향 조절을 유도하였으며; 반면에 BMP-4 또는 BMP-4와 VEGF의 첨가는 OCT-4 발현의 상당한 감소를 야기하였다 ($p < 0.0005$, 도 13). OCT-4 발현에 대한 BMP-4 및 VEGF의 상가적 효과는 없었다. 중배엽 세포에서 발현된 최초의 마커인 T-brachyury 유전자의 발현은 BMP-4 및 VEGF 둘 다를 함유하는 배양물로부터 유도된 EBs (이 경우에는 그의 발현에서 상당한 증가를 나타낸다)를 제외하고는 모든 샘플에서 하향조절되었다 ($p < 0.0005$). 유사한 발현 패턴은 CD31 및 LMO2의 경우에 관찰되었으며; 발현의 상당히 증가된 레벨은 단지 BMP-4 및 VEGF의 조합에 노출된 EBs 내에서만 검출되었다 ($p < 0.0005$). 최대로 연구된 VEGF 수용체 중의 하나인 KDR은 모든 hESC 세포주에서 발현되는 것으로 나타났으며^(4,5); 그의 발현은 외인성 인자의 첨가가 없고, BMP-4 또는 VEGF를 단독으로 보충한 배지로부터 유도된 EBs에서 극적으로 하향 조절되었다. 그러나, KDR 발현에서의 중등도이지만 상당한 증가는 hESCs로부터 혈관아세포의 효율적인 발생을 촉진시키는 조건인 BMP-4 및 VEGF의 존재 하에서 형성된 EBs에서 관찰되었다 ($p < 0.002$). 놀랍게도, 최근의 보고와는 대조적으로⁽¹⁴⁾, MixL 및 SCL/TAL-1 유전자의 발현에 있어서의 상당한 감소는 모든 조건에서 형성된 EBs에서 검출되었다. 하나의 가능한 설명은 상이한 무혈청 배지 내에서의 성장이 이들 유전자에서 상이한 발현을 야기하였다는 것이다. 그럼에도 불구하고, 이들 결과는 hESCs로부터 중배엽/혈관아세포의 수입 및 발생이 블라스트 콜로니 발생의 결과와 일관되게 BMP-4 및 VEGF 둘 다를 필요로 한다는 것을 시사한다 (도 9).

실시예 13

블라스트 세포의 전구세포에 대한 표면 마커의 확인

본 발명자들의 최초의 방법에서⁽²⁾, BCs는 규정된 인자로 보충된 1% 메틸셀룰로즈 내에 3.5일 EBs 세포를 재플레이팅함으로써 BCs를 생성시켰다. 이 전략은 조혈 및 내피 세포를 형성하는 잠재력을 갖는 BCs를 확인하는 경우에 중요하며, 이것은 또한 hESCs로부터 BCs를 생성시키는 경우에 재현가능하다. 그러나, 이러한 접근방법은 표준 조직배양 배양기 내의 접시를 이용하며, 따라서 규모화 회전 생물반응기에 적용시킬 수 없다. 이러한 제한은 주로 3.5일 EBs로부터의 세포가 이중성이며, 미분화된 hESCs (단지 세포의 일부분이 BC 전구세포가다)를 포함한다는 사실에 기인한다. 따라서, 액체 배양물 내에서 이 이중 집단을 재플레이팅하는 것은 임상적 적용에서의 그들의 가능한 사용을 제외하고는, 미분화된 hESCs로부터 이차 EBs의 형성을 포함한 모든 세포의 성장을 유도할 수 있다. 그러나, BCs의 전구세포에 대한 마커(들)를 확인할 수 있다면, 정제된 전구세포를 BCs의 스케일 증대 생산을 위해서 회전 생물반응기에 적합한 액체 배양물 내에 접종할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 중배엽 유

도체의 발생과 연관된 12 개의 세포 표면 분자를 선택하였다. 상응하는 항체를 사용하여 3.5일 EBs로부터 세포를 강화시켰으며, 강화된 세포를 블라스트 콜로니 형성능에 대해서 시험하였다. 도 14에 나타난 바와 같이, 3.5 일 EBs로부터의 KDR+ 세포는 미분화된 대조 세포보다 3 배 더 많은 블라스트 콜로니를 생성하였으며 ($p < 0.01$), 이것은 이전의 연구와 일치한다⁽⁵⁾. 본 발명자들은 또한 CD31+ 및 CD34+ 강화 집단을 플레이팅한 후에 블라스트 콜로니의 중등도의 증가 (~1.5 배)를 확인하였지만, 증가는 통계학적 유의성에 도달하지는 못하였다. 다른 강화된 집단은 모두 미분화된 대조 세포와 비교하여 동등하거나 더 적은 블라스트 콜로니를 생산하였으며, 이것은 BC 전구세포가 이들 분자를 발현하지 않는다는 것을 나타낸다. 시험한 모든 항체의 비결합된 (유동하는) 세포는 또한 미분화된 세포와 유사한 블라스트 콜로니를 형성하였으며, 이것은 KDR+, CD34+ 및 CD31+ 세포조차도 블라스트 콜로니를 형성할 수 있는 세포의 매우 제한된 부분을 나타냄을 시사한다.

[표 1]

qRT-PCR에서 사용된 유전자 특이적 프라이머의 서열

유전자	정방향 프라이머, 5'-3'	SEQ ID NO	역방향 프라이머, 5'-3'	SEQ ID NO	Ref
OCT-4	GAAGGTATTCAGCCAAACGC	16	GTTACAGAACCACACTCGGA	17	NA
BRACH	TGCTTCCTGAGACCCAGTT	18	GATCACTTCTTTCCCTTGCATCAAG	19	(33)
MixL1	CCGAGTCCAGGATCCAGGTA	20	CTCTGACGCCGAGACTTGG	21	(33)
KDR/F1k1	CCAGCCAAGCTGTCTCAGT	22	CTGCATGTCAGGTGCAAAG	23	(4)
CD31	GAGTCTGCTGACCCCTTCTG	24	ATTTTGACCGTCCAGTCC	25	(4)
Sc1/TAL1	ATGAGATGGAGATTACTGATG	26	GCCCCGTTACATTCTGCT	27	(4)
LMO2	AACTGGGCCGGAAGCTCT	28	CTTGAACATTCCAGGTGATACA	29	(4)
GAPDH	CGATGCTGGCGCTGAGTAC	30	CCACCACTGACACGTTGGC	31	NA
β -액틴	GCGGGAAATCGTGCCTGACA	32	GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCG	33	NA

실시예 14

인간 ES 세포로부터 인간 혈관종-콜로니 형성 세포의 생성

인간 ES 세포 배양. 이 연구에서 사용된 hES 세포주는 이전에 기술된 HI 및 H9 (WA01 및 WA09로 NIH-등록됨) 및 어드밴스드 셀 테크놀로지 (Advanced Cell Technology)에서 유도된 4 개의 라인 (MA01, MA03, MA40, 및 MA09)이었다. 미분화된 인간 ES 세포는 이들이 80% 함류에 도달할 때까지 완전 hES 배지 내에서 불활성화된 (미토마이신 C-처리됨) 마우스 배아 섬유아세포 (MEF) 세포 상에서 배양하였다 [Klimanskaya & McMahon; Approaches of derivation and maintenance of human ES cells: Detailed procedures and alternatives, in Handbook of Stem Cells. Volume 1: Embryonic Stem Cells, ed. Lanza, R. *et al.* (Elsevier/Academic Press, San Diego, 2004)]. 그 후, 미분화된 hES 세포를 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA (Invitrogen)에 의해서 2-5 분 동안 분리시키고, 1,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리함으로써 수거하였다.

EB 형성. 혈관아세포 전구체 (중배엽) 형성을 유도하기 위해서, hES 세포 (2×10^5 개의 세포/ml)를 BMP-4 및 VEGF₁₆₅ (50 ng/ml, R&D Systems)를 첨가한 무혈청 스템라인 배지 (예를 들어, 스템라인 I 또는 II, Sigma™) 내의 초저 부착 접시 (Corning) 상에 플레이팅하고, 5% CO₂ 중에서 배양하였다. 약 48 시간 후에, EB 배지를 재공급하고, 초기 조혈/내피 성장 인자의 각테일로 보충하였다. 예를 들어, 배지의 절반을 제거하고, 새로운 배지를 동일한 최종 농도의 BMP-4 및 VEGF와 더불어 SCF, TPO 및 FLT3 리간드 (20 ng/ml, R&D Systems)와 함께 첨가하였다. 이 삼중단백질 전달 도메인 (tPTD)-HoxB4 융합 단백질 (1.5 μ g/ml)을 48-72 시간 사이에 배양 배지에 첨가하여 혈관아세포 및 그의 전구체를 증량시켰다.

혈관아세포 증량. 3.5-5일 후에, EBs를 수거하고, 0.05% 트립신-0.53 mM EDTA (Invitrogen)에 의해서 2-5 분 동안 분리시키고, 단일 세포 현탁액은 22G 니들을 통해서 3-5 회 통과시킴으로써 제조하였다. 세포를 1,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하여 수거하고, 계수하였다. 세포 펠릿을 50-200 ml의 무혈청 스템라인 배지 내에 재현

탁시켰다. 혈관아세포를 증량시키기 위하여, 2 내지 5×10^5 개의 hES 세포의 분화로부터 유도된 EBs로부터의 단일 세포 현탁액을 이스코브 (Iscove) MDM 내의 1.0% 메틸셀룰로즈, 1-2% 소 혈청 알부민, 0.1 mM 2-머캅토에탄올 및 성장 인자의 각테일을 함유하는 2 ml BL-CFC/혈관아세포 증량 배지 (BGM)와 혼합시켰다. 예를 들어, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rh-인슐린, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 철 포화된 인간 트랜스페린, 20 ng/ml rh-GM-CSF, 20 ng/ml rh-IL-3, 20 ng/ml rh-IL-6, 20 ng/ml rh-G-CSF, 3 내지 6 유닛/ml rh-EPO, 50 ng/ml rh-SCF, 50 ng/ml rh-FLT3 리간드, 50 ng/ml rh-VEGF 및 50 ng/ml rh-BMP-4) ("rh"는 "재조합 인간"을 나타낸다) 및 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 tPTD-HoxB4 융합 단백질을 50 ng/ml의 TPO 및 FL이 있거나 없이 첨가하였다. 세포 혼합물을 초저 부착 접시 상에 플레이팅하고, 5% CO₂ 하에 37°C에서 4-7일 동안 배양하였다. 4-6일 후에, 포도-양 혈관아세포 블라스트 콜로니 (BL-CFCs 또는 BCs라 칭함)를 현미경에 의해서 볼 수 있었다. hES-유도된 블라스트 콜로니의 사이토스핀 (cytospin) 제제 및 라이트-김사 (Wright-Giemsa) 염색은 미성숙 블라스트 세포의 형태적 특징을 확인하였다. 이들 결과를 다른 hES 세포주 (WA09 [H9], MA01, MA03, MA40 및 MA09)에 연장시키기 위해서, FL 및 Tpo의 보충물이 BC 콜로니의 지속적인 성장을 위해서 필요하였다 (FL 및 Tpo의 부재 하에서는, 적은 (10-20 개의 세포) hES-BCs가 획득되었으며, 4-8일 후에 사망하였다). Epo는 시험한 모든 hES 세포주에서 BC 형성 및 성장에 필수적이었다. 이들 세포는 상술한 잘-규정된 재현가능한 조건 하에서 쉽게 증량될 수 있었다 (hES의 하나의 6-웰 플레이트는 약 6.1 ± 0.66 [평균 $\pm$ SD] $\times 10^6$ 혈관아세포를 생성하였다).

BL-CFC 면역세포화학적 분석을 위해서, 정제된 BL-CFCs를 폴리리신 처리된 유리 슬라이드 상에 사이토스핀 (cytospin) 처리하고, 4% 파라포름알데히드 내에 고정시켰다. 대부분의 유전자의 발현을 검사하기 위해서, 일차 항체를 4°C에서 밤새 배양하고, 이어서 형광 염료 표지된 이차 항체와 함께 배양하고, 마지막으로 형광 현미경 하에서 검사하였다. 정상 인간 BM 세포, K562 세포 및 HUVEC이 대조군으로 사용되었다.

면역세포화학적 분석은 hES 세포 유래 BL-CFCs 또는 BCs가 GATA-1 및 GATA-2 단백질, LMO2 단백질, CXCR-4, TPO 및 EPO 수용체를 발현하였으며, CD71, 트랜스페린 수용체에 대해 특이적인 항체와 쉽게 반응하였음을 밝혀 내었다 (표 1 및 도 16d-v). 세포는 CD31, CD34 및 KDR, 또는 다른 유착 분자를 거의 또는 전혀 발현하지 않았다. 11/787,262에 더 상세히 기술된 바와 같이, 세포는 혈관중-콜로니 형성 세포이다.

실시예 15

별 개의 세포 타입의 증량: 비-생작성 혈관 세포

상기 및 11/787,262에 상세히 기술된 바와 같이, 혈관중-콜로니 형성 세포는 약 4-7일 동안의 증량 후에 생성되었다. 특정의 조건 하에서, 7일을 넘어선 EBs의 추가의 배양은 다량의 별 개의 세포 타입을 생산하였다. 전체적으로 기술된 바와 같이, 이 별 개의 전구세포 세포 타입은 비-생작성 혈관 세포라 칭한다.

EBs는 상술한 바와 같이 배양하였다. 증량 프로토콜의 제7일에, 혈관중-콜로니 형성 세포를 나타내는 포도-양 클러스터의 형성 이후에 5 ml의 BL-배지를 세포의 포도-양 클러스터의 이들 배양물의 상부에 첨가하였다. 배양물은 반고체이며, 10 ml의 메틸셀룰로즈 배지를 함유한다. 신선한 배지를 첨가한 후에, 세포를 추가로 3-6일, EB 형성-후 배양물에서 총 10-13일 동안 배양하였다.

신선한 배지의 첨가는 이들 연장된 배양기간 중에 연속적인 세포 증식 및 생존을 크게 증진시켰다. 배양물에서 10-13일 후에, 세포를 클러스터로부터 정제하였다. 혈관중-콜로니 형성 세포와 마찬가지로, 이들 비-생작성 혈관 세포는 포도-양 클러스터를 형성하였으며, 서로에 대해 느슨하게 부착성이었다. 그러나, 이하에 상세히 기술한 바와 같이 이들 세포는 이전에 확인된 혈관중-콜로니 형성 세포와 동일하지 않았다.

세포를 제10일에 클러스터로부터 분리시키고, 상기 세포의 수율을 제7일에 수거하여 일반적으로 관찰된 혈관중-콜로니 형성 세포의 수율과 비교한 경우에, 본 발명자들은 수득된 세포의 수에 있어서 극적인 증가를 관찰하였다. 구체적으로, 제7일에 대비하여 제10일에는 5 배 이상 더 많은 세포가 정제되었다. 이와 같이, 더 다량의 비-생작성 혈관 세포가 쉽게 생산될 수 있으며, 예를 들어, 더 다량의 분화된 세포 타입을 생산하기 위해서 사용될 수 있다.

10-13일의 증량 배양 후에 확인된 세포는 다수의 관점에서 이전에 확인된 혈관중-콜로니 형성 세포와 유사하다. 예를 들어, 세포는 일반적으로 서로에 대해 느슨하게 부착성이다 (혈관중-콜로니 형성 세포와 같음). 추가로, 10-13일의 증량 배양 후에 확인된 세포는 시험관 내에서 분화하여 조혈 세포 타입을 생산하였다. 구체적으로, 비-생작성 혈관 세포는 조혈성 CFUs를 형성하는 능력을 보유한다. 세포는 10-13일의 배양 후에 포도-양 클러스터로부터 분리하였으며, 조혈성 CFUs의 성장을 지지하는 사이토키ンを 함유하는 반고체 메틸셀룰로즈 배지 내에

플레이팅하였다. 10-12일의 배양 후에, 적혈구 CFUs, 과립구 CFUs, 대식세포 CFUs, 및 혼합된 조혈성 CFUs가 관찰되었으며, 따라서 조혈 세포 타입을 생산하는 잠재력을 입증하였다.

본 발명에 기술된 혈관종-콜로니 형성 세포와 비-생작성 혈관 세포 사이의 유사성에도 불구하고, 이들 세포는 동일한 분화 잠재력을 갖지 않는다. 어떤 특별한 이론에 의해서 얽매는 것을 원치 않지만, 비-생작성 혈관 세포는 혈관종-콜로니 형성 세포와는 대조적으로, 면역결핍성 동물에게 생체내 송달된 경우에 더 이상 골수 내에 생착할 수 없는 발생적으로 별개인 세포 타입을 나타낼 수 있다. 구체적으로, $1-5 \times 10^6$ 개의 인간 비-생작성 혈관 세포 (예를 들어, EB 형성-후 10-13일 동안 배양된 세포)를 NOD/SCID 마우스에 투여하였다. 24 마리의 마우스의 검사는 골수 또는 비장 내에서 인간 세포의 생착을 밝혀내는데 실패하였다. 이와는 대조적으로, 유사한 수의 인간 혈관종-콜로니 형성 세포 (예를 들어, 6-8일 동안 배양된 세포)를 NOD/SCID 마우스에 투여하고, 12 마리의 동물 모두의 골수 내에 생착된 인간 세포를 검사하였다.

본 발명의 다른 설명적 방법, 조성물, 제제 및 특징은 다음의 서류에 기술되어 있다: 2007년 4월 13일에 출원된 미국 출원 제11/787,262호 (발명의 명칭: "Hemangio-Colony Forming Cells"). 이 출원의 내용은 이에 의해서 그 전체가 참고로 포함된다.

출원인은 미국 출원 제11/787,262호에 기술된 대상의 조합을 포함한 특허가능한 대상에 대한 기술된 설명적 구체예의 모든 작동가능한 조합을 고려하였음에 특히 주의하여야 한다. 예를 들어, 본 발명에서 제공된 비-생작성 혈관 세포는 (i) 미국 출원 제11/787,262호에 기술된 세포의 특성 중의 하나 또는 그 이상을 가질 수 있고, (ii) 미국 출원 제11/787,262호에 기술된 바와 같이 조성물, 제제, 동결보존된 제제, 또는 정제되거나 혼합된 용액으로 제제화될 수 있으며, (iii) 미국 출원 제11/787,262호에 기술된 바와 같이 치료학적으로, 및 혈액 은행에서 사용될 수 있고, (iv) 미국 출원 제11/787,262호에 기술된 바와 같이 시험관 내 또는 생체 내에서 사용하기 위한 부분적으로 및 말단적으로 분화된 세포 타입을 생성시키기 위해서 사용될 수 있다. 더구나, 비-생작성 혈관 세포는 본 발명 및 미국 출원 제11/787,262호에 기술된 방법 중의 어떤 것을 사용하여 ES 세포, ED 세포, 다능성 줄기세포 (iPS 세포를 포함) 등으로부터 유도될 수 있다.

실시예 16

인간 iPSCs로부터 혈관아세포의 효율적인 생성

본 발명에 기술된 다수의 hESC 세포주으로부터 대량의 혈관아세포를 효율적이고 재현적으로 생성시키는 방법을 기초로 하여 [참조: 또한 Lu *et al.* Nat Methods 2007;4:501-509; Lu *et al.* Regen Med 2008;3:693-704], 본 발명자들은 추가로, 이전에 보고된 것보다 1000-배 이상 더 효율적인 큰 스케일 (약 10^{10} 내지 10^{11} 세포/6-웰 플레이트 hESCs)로 hESCs를 혈관아세포성 전구세포를 거쳐서 적혈구계 세포로 분화시키기 위해서 혈관아세포 플랫폼 (platform)을 사용하였다. 상기에서 검토한 바와 같이, 세포는 정상 RBCs와 동등한 산소-수송 능력을 가지며, pH (보어 (Bohr) 효과) 및 2,3-디포스포글리세레이트 (DPG)의 변화에 대해 반응한다 [참조: 또한, Lu *et al.* Blood 2008;112:4475-4484]. 중요하게는, 적혈구계 세포는 크기의 점진적인 감소 및 글리코포린 A 발현, 크로마틴 및 핵 응축의 증가, 및 완전한 성인 β -글로빈 쇄의 증가된 발현을 포함하는 다수의 성숙 현상을 시험관 내에서 겪었다. 글로빈 쇄 특이적 면역형광 분석은 세포 (17일에 0%)가 성인 β -글로빈 쇄의 발현을 시험관내 배양의 28일 후에 16.37%로 상승시킨 것으로 나타났다. 이 과정은 약 6-8 μ m의 직경을 갖는 RBCs를 생성시키는 세포의 30-60%에서 농축핵의 돌출을 야기한다. 결과는 hESC 유래 혈관아세포를 대규모로 기능적 산소-운반 적혈구로 분화 및 성숙시키는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.

인간 iPSCs는 다수의 특징을 hESCs와 공유하며, 줄기세포의 중요한 새로운 공급원을 나타낸다. O(-) 유전자형을 갖는 iPSC 라인의 확인은 ABO 및 RhD 상화성 (및 무-병원균성) "범용 공여체" RBCs의 생산을 가능하게 할 수 있으며, 환자의 특정 iPSC 라인을 사용하여 시험관 내에서 수혈을 위한 환자 자신의 혈소판의 생성을 허용할 수 있다. 그러나, 특히 혈관아세포 쪽으로 지시된 분화를 겪는 iPSCs의 능력에 대해서는 거의 보고되지 않았다. 최근의 보고 [Choi *et al.*, STEM CELLS 2009;27(3):559-567]는 조혈 및 내피 분화를 수득하는 OP9 피더 기반 배양 시스템을 이용하여 인간 iPSCs에 의한 시험을 기술하였으며, 인간 iPSCs의 잠재력을 입증하였다. 마찬가지로, 장 (Zhang) 등은 [Circ Res 2009;104:e30-e41.] 비록 hESCs에 비해 낮은 효율이지만 EB 방법을 사용하여 인간 iPSCs로부터 기능적 심근세포를 유도하는 것을 기술하였다. 따라서, 인간 iPSCs로부터 혈관아세포의 효율적인 생성이 본 발명에 기술된다. 본 발명자들은 hESC 시스템에 의한 그들의 경험을 이용하여, 인간 iPSCs로부터 혈관아세포의 효율적인 생성을 위한 조건을 기술한다.

고품질 iPSCs의 생성

발명자들의 예비 시험 중의 몇 가지에서, 이들은 최적화된 hESC 분화 조건을 사용하여 인간 IMR90 (도 20c) 및 Adult4-3 iPSCs (데이터는 나타내지 않음)로부터 혈관아세포 콜로니를 생성시킬 수 있다. 비록 이들의 효율은 hESCs에 비해서 훨씬 더 낮았지만, 이들은 인간 iPSCs의 혈관아세포 분화 잠재력을 명백하게 입증하였다. 관찰된 낮은 효율은 다수의 인자에 기인할 수 있으며, 이들 인자 중의 하나는 iPSCs의 품질이다. 발명자들은 이것이 혈관아세포의 고효율 생성을 위한 가장 중요한 인자 중의 하나인 것을 관찰하였다. 고품질 hESC 배양물은 약 80% 합류하지만 서로 접촉하지 않은 상태에서, 현미경 하에서 관찰되는 바와 같이 분화의 최소 징후를 갖는 꼭 맞는 경계를 갖는 콜로니로 구성된다. 이들은 중등도의 속도로 성장하며: 1:3 분할 계대된 hESCs는 거의 모든 세포에서 다능성 마커의 양성 염색과 함께 3-5일에 합류에 도달할 수 있다. 고품질 hESCs는 통상적으로 다수의 EB 세포를 생성시킨다 (예를 들어, 2×10^6 고품질 hESCs는 3.5일 후에 $\sim 2-3 \times 10^6$ EB 세포를 생성시킬 수 있다). 고품질 iPSCs를 획득하기 위한 중요한 단계에는 다음이 포함된다: (1) **트립신 대비 콜라게나제와 함께 계대시킴**: 본 발명자들은 기계적으로 계대된 배양물로부터의 초기 순응을 수행한 후에 hESCs가 트립신/EDTA에 의해서 계대될 수 있음을 입증하였다 [Klimanskaya *et al.* 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]. 본 발명자들의 경험에서, 트립신은 콜로니 사이의 조기 접촉을 제거하고, 자발적인 분화를 제한할 수 있는 더 적은 세포 클럼프 (2-5 세포) 및 더 균일하게 분포된 유사한 크기의 콜로니를 형성한 단일 세포를 생산하기 때문에, 이것이 광범하게 사용된 콜라게나제 IV보다 더 잘 작용하며, 반면에 콜라게나제 계대는 더 광범한 분화를 나타내며, 더 낮은 분할비에서 또는 배양물의 원하는 밀도에 도달하기 전에 계대되어야 하는 더 큰 콜로니를 제공한다. 전반적으로, 트립신/EDTA 계대는 콜라게나제보다 3-4 배 더 빨리 배양물의 스케일을 증대시키고, 균질한 세포 집단을 획득하는 능력을 허용한다. 이들 관찰결과는 또한, 인간 iPSCs의 경우에도 타당할 수 있다. 본 발명자들의 실험은 인간 iPSCs가 트립신 분해에 순응할 수 있으며, 이들 세포는 20 계대 이상이 지난 후에 미분화된 상태를 유지하는 것을 나타내었다; (2) **마우스 배아 섬유아세포 (MEF 피더)와 함께 또는 무-피더로 유지**: hESCs 및 iPSCs의 장기간 유지는 MEF 피더를 필요로 하였다. MEF 피더층 상에서의 hESCs 및 iPSCs의 배양은 동물 성분의 완전한 제거를 방지하며, 이들 조건 하에서 유지된 hESCs 및 iPSCs로부터 생성된 유도체의 잠재적인 임상적 적용에 대한 관심을 상승시킨다. 따라서, 제1 단계는 혈관아세포가 mTeSR 배지 내의 매트릭스 상에서 유지된 hESCs로부터 생성될 수 있는지 여부를 결정하기 위해서 채택되었다. 본 발명자들은 동일한 수의 EB 세포가 시험한 3 개의 hESC 세포주 WA01, MA01 및 HuES-3 모두에 대해서 플레이팅 된 경우에 ($p < 0.05$), MEF 피더층 상에서 배양된 hESCs에 비해 더 많은 수 (3-배 증가)의 혈관아세포가 무-피더 hESCs에 의해서 생성되었음을 입증하였다 [Lu *et al.* Regen Med 2008;3:693-704]. 그 후, 본 발명자들은 상기 무-피더 시스템에서 인간 iPSCs를 배양하는 실험을 개시하였으며, 무-피더 조건에서 유지된 인간 iPSCs는 Nanog, Oct-4, SSEA-4, 및 Tra-1-60의 다능성 마커를 발현하였다 (도 19). 무-피더 조건으로부터의 인간 iPSCs가 고효율로 혈관아세포로 분화할 수 있는지 여부를 시험할 수 있다.

배상체 (EB) 형성 및 분화의 최적화: 인간

iPSCs는 세포 분리 후, 및 hESCs에 대해서 또한 관찰된 현상인 EB 형성 중에 열등한 생존능을 나타낸다. 무혈청 EB 형성 배지에 선택적 Rho-연관된 키나제 (ROCK) 억제제 Y-27632의 첨가는 hESCs가 세포소멸하는 것을 방지하며, EB 형성을 증진시키고, 분화를 촉진시키는 것으로 나타났다 [Watanabe *et al.* Nat Biotechnol 2007;25:681-686]. 실험은 무혈청 EB 형성 및 분화 배지 내에서 Y-27632의 보충이 대조 배지보다 인간 iPS(IMR90)-1 세포로부터 EBs의 더 우수한 형성을 제공하였음을 나타내었으며: 스템라인 II 배지와 단지 사이토킨 내에서의 EBs는 통상적으로, 24 시간 후에 다수의 사멸 세포를 가지면서 더 작았으며; 반면에 Y-27632가 첨가된 배지 내에서의 EBs는 이들을 둘러싼 다수의 더 적은 사멸 세포를 가지면서 평탄하고 크며 (도 20a 및 20b), 이것은 더 건강한 EBs가 형성되었음을 나타낸다. 블라스트 콜로니 형성을 위해서 플레이팅한 후에, Y-27632로 처리된 EBs로부터의 세포는 Y-27632 처리가 없는 EBs로부터 유도된 것보다 상당히 더 많고 더 건강한 블라스트 콜로니를 발생시키는데 (도 20c 및 20d), >2 배 더 많은 혈관아세포를 생성시켰다. 이전의 연구는 또한, 본 발명에 기술된 EB 형성 시스템에서 사용된 스템라인 II 배지를 포함한 거의 모든 세포 배양 배지 내의 성분인 인슐린이 아마도 PI3K/Akt 시그널링 경로를 통해서 hESC 중배엽 분화의 강력한 억제제임을 시사하였다. PI3K/Akt 시그널링 경로의 억제는 무혈청 조건에서의 hESCs의 중배엽 분화를 증진시켰다 [Freund *et al.* Stem Cells 2008;26:724-733]. 결과는 EB 형성 및 분화 배지에서 PI3K/Akt 시그널링 경로 억제제에 의한 보충은 MA09 hESCs로부터 혈관아세포의 형성을 실질적으로 증가시켰음을 나타내었다. 대조군으로부터의 접시와 비교하

여 혈관아세포의 >2.5 배 증가가 PI3K/Akt 억제제로 처리한 접시로부터 수득되었다. 마찬가지로, EB 형성 중에 PI3K/Akt 시그널링 경로 억제제를 단독으로 또는 Y-27632와 함께 보충하는 것은 대조군보다 iPS(IMR90)-1 세포로부터 더 많고 더 건강한 블라스트 콜로니를 제공하였는데 (도 20e), PI3K/Akt 억제제 처리된 EBs 및 PI3K/Akt 억제제와 ROCK 억제제로 처리된 EBs는 각각 2.1-배 및 2.6 배 더 많은 혈관아세포를 생산한다. 그 후, 혈관아세포를 정제하고, 조혈 또는 내피 세포 분화를 위한 조건 하에서 플레이팅하였다. 도 20f-20j에서 나타낸 바와 같이, 이들 세포는 적절한 조건 하에서 재플레이팅한 후에 조혈 및 내피 세포 둘 모두로 분화하였다.

실시예 17

hESCs의 거핵구 및 혈소판으로의 지시된 분화

다능성 인간 배아 줄기세포 (hESCs) 및 iPS 세포는 수혈요법에서 사용된 혈액 세포에 대한 잠재적인 대체 공급원이다. 또한, 혈액으로의 지시된 hESC 분화는 조혈의 개체발생을 시험하기 위한 유용한 도구를 제공할 수 있다. hESCs의 수혈가능한 거핵구/혈소판으로의 효율적인 지시된 분화는 임상적으로 매우 중요하다. 그러나, 인간 ESCs로부터 거핵구 및 혈소판을 생성시키는 이전에 보고된 방법은, 1) hESCs로부터 거핵구/혈소판의 수율이 너무 낮고, 2) 이들이 불확정한 동물 기질 세포 (예를 들어, OP9)를 필요로 하며, 3) 이들 방법은 대량 생산을 위해서 스케일을 증대시키는 것이 어려울 수 있기 때문에, 잠재적인 임상적 적용에는 문제가 있다 [Gaur *et al.* J Thromb Haemost 2006;4:436-442; Takayama *et al.* Blood 2008;111:5298-5306]. 잘-정의된 조건을 사용하여 다수의 hESC 세포주로부터 대량의 혈관아세포 (블라스트 세포, BCs)를 효율적으로 생성시키는 확고한 모델 시스템이 본 발명에 기술된다 [참조: 또한, Lu *et al.* Nat Methods 2007;4:501-509; Lu *et al.* Regen Med 2008;3:693-704]. 이들 BCs는 본 발명에 기술된 바와 같이 대규모로 기능적 RBCs를 생산하도록 더 유도될 수 있다 [참조: 또한, Lu *et al.* Blood 2008; 112:4475-4484]. RBCs 및 거핵구는 공통적인 전구세포로부터 유래하기 때문에, 본 발명자들의 hESC 유래 혈관아세포로부터 거핵구 및 혈소판을 생산하는 가능성을 탐색하였다.

거핵구를 생성시키기 위한 배양 방법의 다이어그램

무혈청 hES 세포 → 배상체 제 3.5-4일 → 블라스트 배양 제6일 → 거핵구 배양 제7일

지금까지 3 개의 hESC 세포주를 MK 생성을 위해서 시험하였다: H1, H7 및 HuES-3. 표준 프로토콜을 사용하여 혈관아세포를 생성시켰다 [참조: 또한, Lu *et al.* Nat Methods 2007;4:501-509; Lu *et al.* Regen Med 2008;3:693-704]. 간략하면, 인간 ES 세포를 무혈청 배지 내에서 배양하고, 배상체 (EB) 배양을 위해서 수확하였다. 제3 내지 4일 EB 세포를 수거하고, 단일 세포 현탁액으로 제조하였다. 5×10^5 개의 EB 세포를 혈관아세포의 생산을 위해서 1 ml 블라스트 성장 배지 내에 재현탁시켰다. 현탁액 내의 MK 배양 현탁액을 제공하기 위해서 제8일 혈관아세포 배양물로부터 세포를 수확하였다. 요약하면, hESCs로부터 거핵구 및 혈소판을 효율적으로 생성시키는 혈관아세포 모델 시스템을 성공적으로 변형시켰다. 개선된 블라스트 배양방법을 사용하여, 본 발명자들은 이제 일상적으로, 혈관아세포 배양의 6 내지 8일 후에 100만 hESCs로부터 1000만 블라스트 세포를 생산할 수 있다 [참조: 또한, Lu *et al.* Regen Med 2008;3:693-704]. 거핵구 계통 쪽으로 지시된 분화를 위해서는, 이들 블라스트 세포를 수확하고, TPO를 포함하는 규정된 성장 인자가 보충된 무혈청 배지 내의 액체 거핵구 성숙 배양물로 플레이팅한다. 이 배양의 초기 단계에서는 세포 수에 있어서 1.5 내지 2 배 증가가 통상적으로 수득된다. 현재의 조건 하에서 제한된 증량은 다른 계통으로 수입된 세포의 사망 및 거핵구의 핵내분열의 개시에 기인하는 것 같다. 액체 성숙 배양의 제4일까지, 90% 이상의 CD41a+ 거핵구가 정제의 필요가 없이 달성될 수 있다 (도 21a). 이들 CD41a+ 거핵구의 대부분은 거핵구에 대한 추가의 마커인 CD42b를 공동-발현한다. 결과적으로, 800만 내지 900만 CD41a+ 거핵구가 14 내지 15일에 100만 hESCs로부터 생산될 수 있다. 비교하여, 타카야마 (Takayama) 등에 의한 가장 최근의 논문은 OP9 기질 세포 및 태아 소 혈청을 사용하여 100만 hESCs로부터 200만 CD41a+ 거핵구 (총 집단의 50%)의 생산을 보고하였다 [Takayama *et al.* Blood 2008;111:5298-5306]. 명백하게, 본 발명에 기술된 혈관아세포 시스템은 hESCs로부터 거핵구의 시험관내 생성에 대한 상당한 개선을 나타낸다.

세포 표면 마커 이외에도, 김사 염색은 성숙 배양물에서의 거핵구는 세포 크기가 증가하고, 핵내분열을 겪으며, 다배체가 되는 것을 나타낸다 (도 21c). 더구나, 세포 과립 내의 폰 빌리브란트 인자 (VWF)의 특이적 면역염색은 세포질 성숙과정이 이들 세포 내에서 나타났음을 시사한다 (도 21d). 액체 성숙 배양의 제6일까지, CD41a+ 세포의 50% 이상은 FACS 분석에 의해서 >4n DNA 함량을 나타낸다 (도 21b). 중요하게는, 이들 시험관내 유도된 거핵구는 혈전형성을 향하는 필수 단계인 전혈소판 형성을 나타냄으로써 말단 분화를 겪는다 (도 21e). 본 발명에 기술된 현재의 조건에 의해서, 전혈소판 형성 세포는 액체 배양물 중에서 3일 정도로 빨리 관찰되며, 통상적으로 제7 내지 8일까지 생존 세포의 2-3%의 피크에 도달한다.

원심분리에 의해서 세포를 제거한 후에, 거핵구 성숙 배양물의 상등액은 혈소판 생성에 대해서 검사하였다. 실제로, CD41a+ 입자가 검출되며, 이들의 전방 및 측면 분산 특성은 본 발명자들의 FACS 분석에서 사용된 인간 말초 혈액 혈소판 대조군과 매우 유사하다 (도 22).

참고문헌

1. Wagner RC: Endothelial cell embryology and growth. *Adv.Microcirc.* 9, 45-75 (1980).
2. Lu SJ, Feng Q, Caballero S *et al*: Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat.Methods* 4(6), 501-509 (2007).
3. Wang L, Li L, Shojaei F *et al*: Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity.* 21(1), 31-41 (2004).
4. 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* 106(3), 860-870 (2005).
5. Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, Schwantz S, Keller G: Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 109(7), 2679-2687 (2007).
6. Klimanskaya I, McMahon J. Approaches of derivation and maintenance of human ES cells: Detailed procedures and alternatives. In: *Handbook of Stem Cells. Volume 1: Embryonic Stem Cells*. Lanza Rea (Eds.). Elsevier/Academic Press, (2004).
7. Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME, Yu J, Probasco MD, Thomson JA: Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat.Methods* 3(8), 637-646 (2006).
8. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM *et al*: Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat.Biotechnol.* 24(2), 185-187 (2006).
9. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4), 402-408 (2001).
10. Lu SJ, Feng Q, Ivanova Y *et al*: Recombinant HoxB4 Fusion Proteins Enhance Hematopoietic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 16(4), 547-560 (2007).
11. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M: Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92(6), 735-745 (1998).
12. Faloon P, Arentson E, Kazarov A *et al*: Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 127(9), 1931-1941 (2000).
13. Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, Kouskoff V: The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development* 135(8), 1525-1535 (2008).
14. Pick M, Azzola L, Mossman A, Stanley EG, Elefanty AG: Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells* 25(9), 2206-2214 (2007).
15. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A: Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat.Med.* 11(2), 228-232 (2005).
16. Huber TL, Zhou Y, Mead PE, Zon LI: Cooperative effects of growth factors involved in the induction of hematopoietic mesoderm. *Blood* 92(11), 4128-4137 (1998).

17. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL: Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* 9(17), 2105-2116 (1995).
18. Johansson BM, Wiles MV: Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol.Cell Biol.* 15(1), 141-151 (1995).
19. Wiles MV, Johansson BM: Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp.Cell Res.* 247(1), 241-248 (1999).
20. Nakayama N, Lee J, Chiu L: Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells *in vitro*. *Blood* 95(7), 2275-2283 (2000).
21. Li F, Lu S-J, Vida L, Thomson JA, Honig GR: Bone morphogenetic protein-4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells *in vitro*. *Blood* 98(2), 335-342 (2001).
22. 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.* 32(10), 1000-1009 (2004).
23. Chadwick K, Wang L, Li L *et al*: Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003 102(3), 906-915 (2003).
24. Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M: VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 103(7), 2504-2512 (2004).
25. Park C, Afrikanova I, Chung YS *et al*: A hierarchical order of factors in the generation of FLK- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development* 131(11), 2749-2762 (2004).
26. Xu C, Rosler E, Jiang J *et al*: Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* 23(3), 315-323 (2005).
27. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA: Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat.Methods* 2(3), 185-190 (2005).
28. Levenstein ME, Ludwig TE, Xu RH *et al*: Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24(3), 568-574 (2006).
29. Yeoh JS, van OR, Weersing E *et al*: Fibroblast growth factor-1 and -2 preserve long-term repopulating ability of hematopoietic stem cells in serum-free cultures. *Stem Cells* 24(6), 1564-1572 (2006).
30. Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M: Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for *in vitro* cardiomyocyte development. *Circ.Res.* 93(5), 414-420 (2003).
31. de HG, Weersing E, Dontje B *et al*: *In vitro* generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Dev.Cell* 4(2), 241-251 (2003).
32. Ginis I, Luo Y, Miura T *et al*: Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev.Biol.* 269(2), 360-380 (2004).
33. D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE: Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat.Biotechnol.* 23(12), 1534-1541 (2005).

본 발명의 다양한 구체예는 상세한 설명에서 상기에 기술하였다. 이들 설명은 상기 구체예를 직접적으로 기술하고 있지만, 본 기술분야에서 숙련된 전문가들은 본 발명에 제시되고 기술된 특징의 구체예에 대한 변형 및/또는 변화를 생각해낼 수 있는 것으로 이해된다. 이 설명의 범위에 속하는 이러한 변형 또는 변화 중의 어떤 것이라도 역시 본 발명에 포함시키고자 한다. 구체적으로 언급되지 않는 한, 명세서 및 특허청구범위 내의 단어 및 문

구는 적용가능한 기술분야(들)에서 통상적으로 숙련된 전문가에게 통상적이며 관습적인 의미를 갖는 것이 본 발명자들의 의사이다.

본 출원의 출원일 당시에 본 출원인에게 알려진 발명의 다양한 구체예에 대한 상기한 설명이 제시되었으며, 예증 및 설명을 목적으로 하는 것이다. 본 설명은 총망라한 것도 아니고 기술된 정확한 형태로 본 발명을 제한하고자 하는 것도 아니며, 상기한 가르침에 비추어 다수의 변형 및 변화가 이루어질 수 있다. 기술된 구체예는 본 발명의 원리 및 그의 실제적인 적용을 설명하기 위해서, 및 본 기술분야에서 숙련된 타인이 본 발명을 다양한 구체예에서 및 고려된 특정한 용도에 적합한 다양한 변형으로 이용할 수 있도록 제공된다. 따라서, 본 발명은 본 발명을 수행하기 위해서 기술된 특별한 구체예로 제한하고자 하지 않는다.

본 발명의 특별한 구체예가 제시되고 기술되어 있지만, 본 명세서에서의 가르침을 기초로 하여 본 발명 및 그의 더 광범한 관점으로부터 벗어남이 없이 변화 및 변형이 이루어질 수 있으며, 따라서 첨부된 특허청구범위가 본 발명의 진의 및 범주 내에 있는 이러한 변화 및 변형 모두를 그의 범주 내에 포함한다는 것은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 명백할 것이다. 일반적으로, 본 발명에서 사용된 용어가 일반적으로 "개방형" 용어라는 것은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 이해될 것이다 (예를 들어, 용어 "포함하는 (including)"은 "포함하나 제한되지는 않는 ("including but not limited to")으로 해석되어야 하며, 용어 "갖는 (having)"은 "적어도 갖는 (having at least)"으로 해석되어야 하며, 용어 "포함한다 (includes)"는 "포함하나 제한되지는 않는다 ("includes but is not limited to")으로 해석되어야 하는 것 등이다).

도면

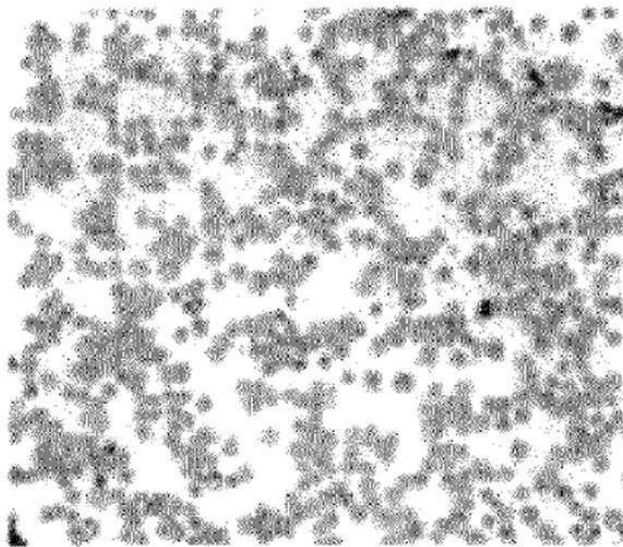
도면1a



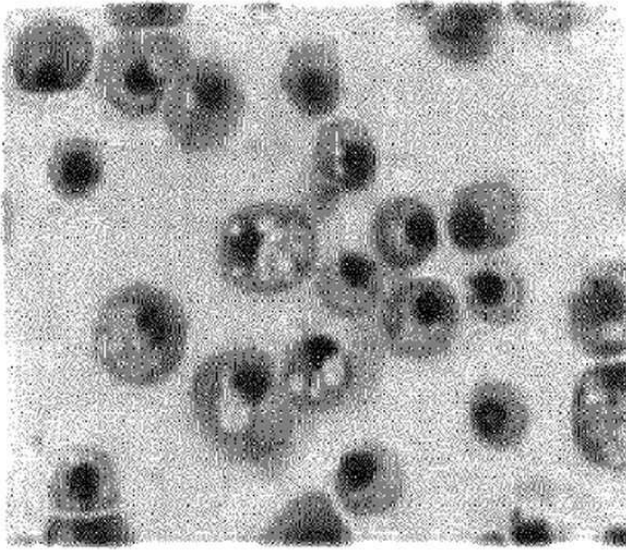
도면1b



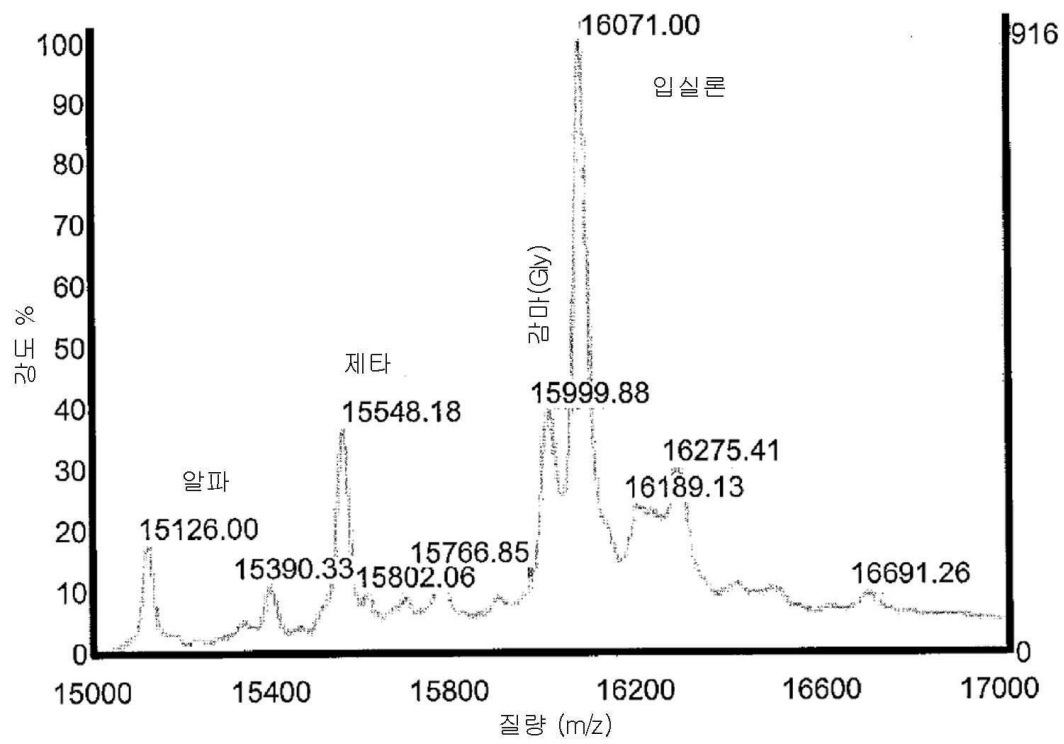
도면1c



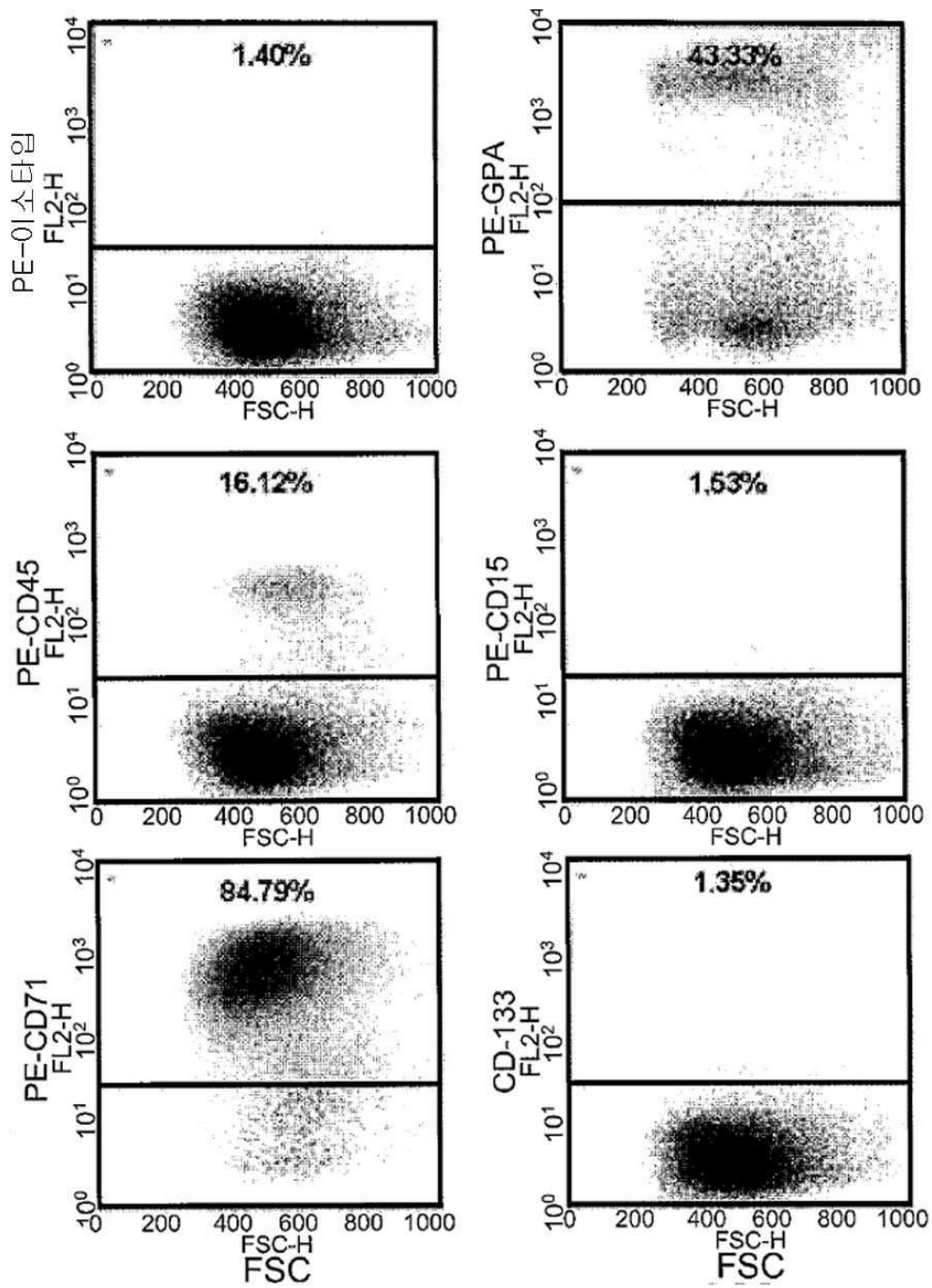
도면1d



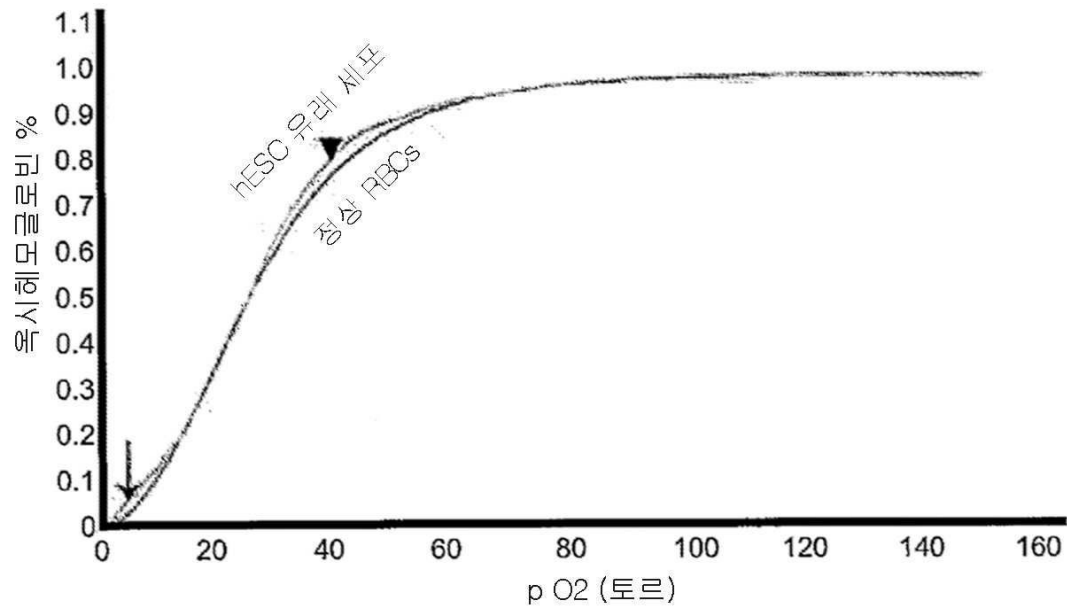
도면1e



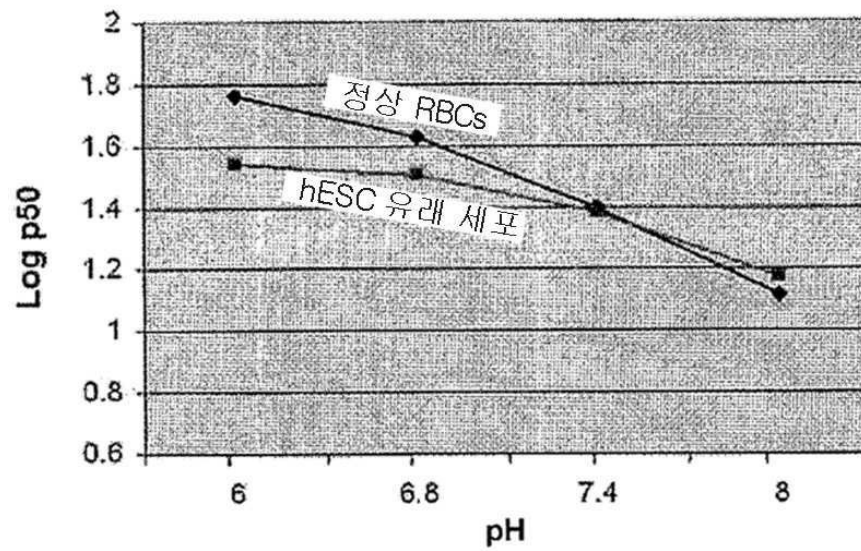
도면1f



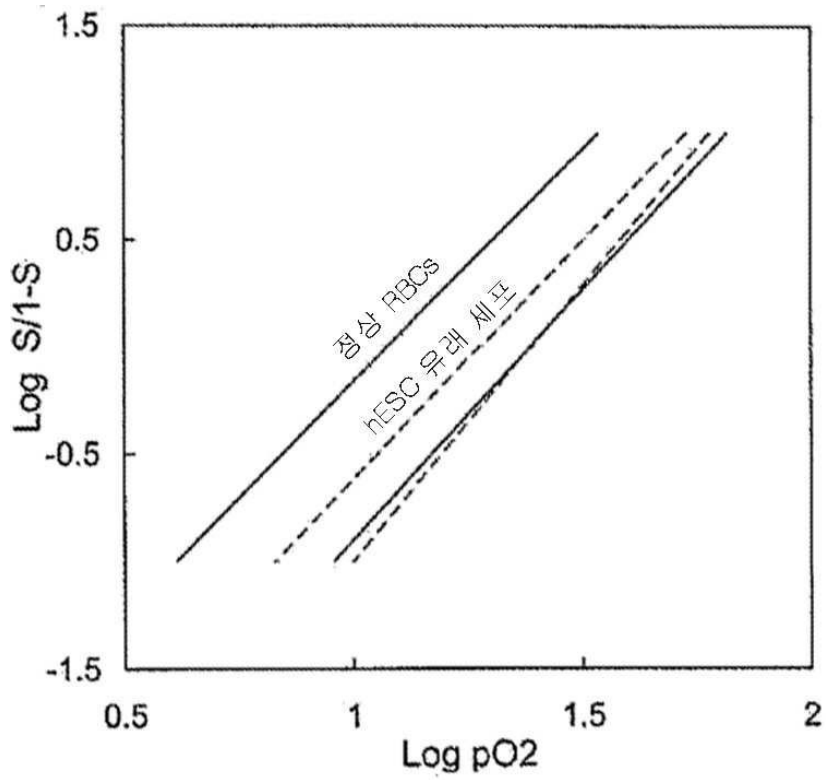
도면2a



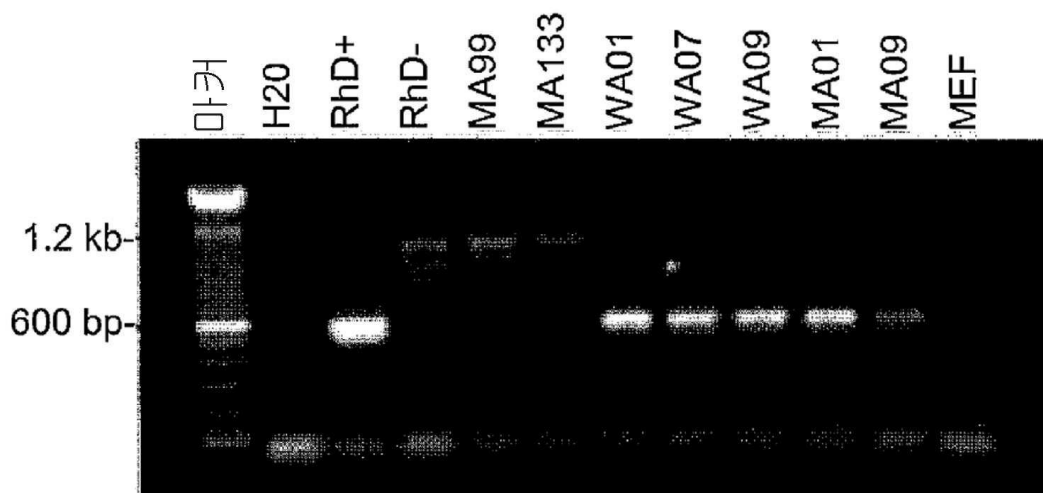
도면2b



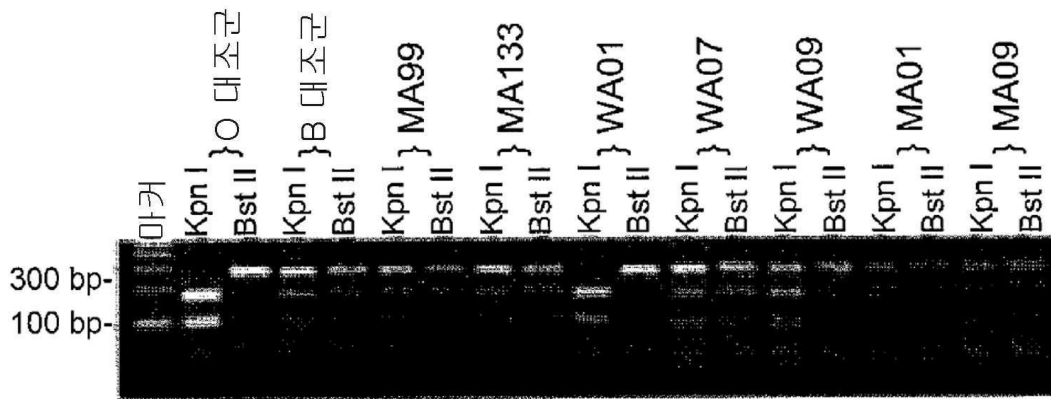
도면2c



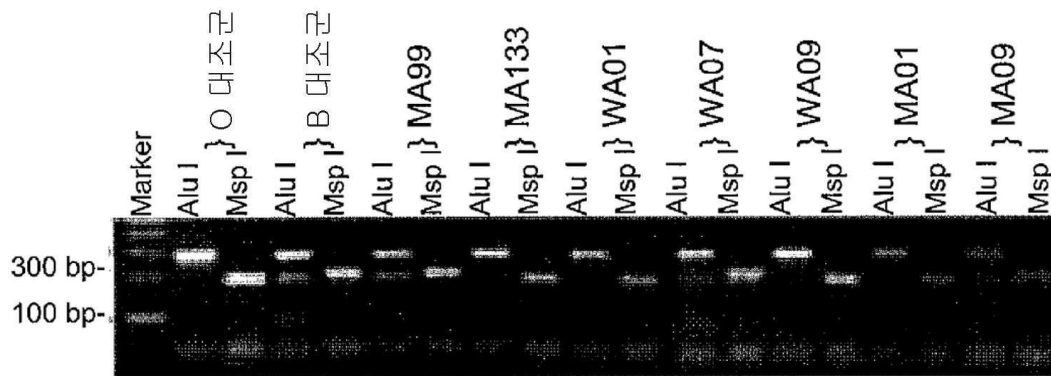
도면3a



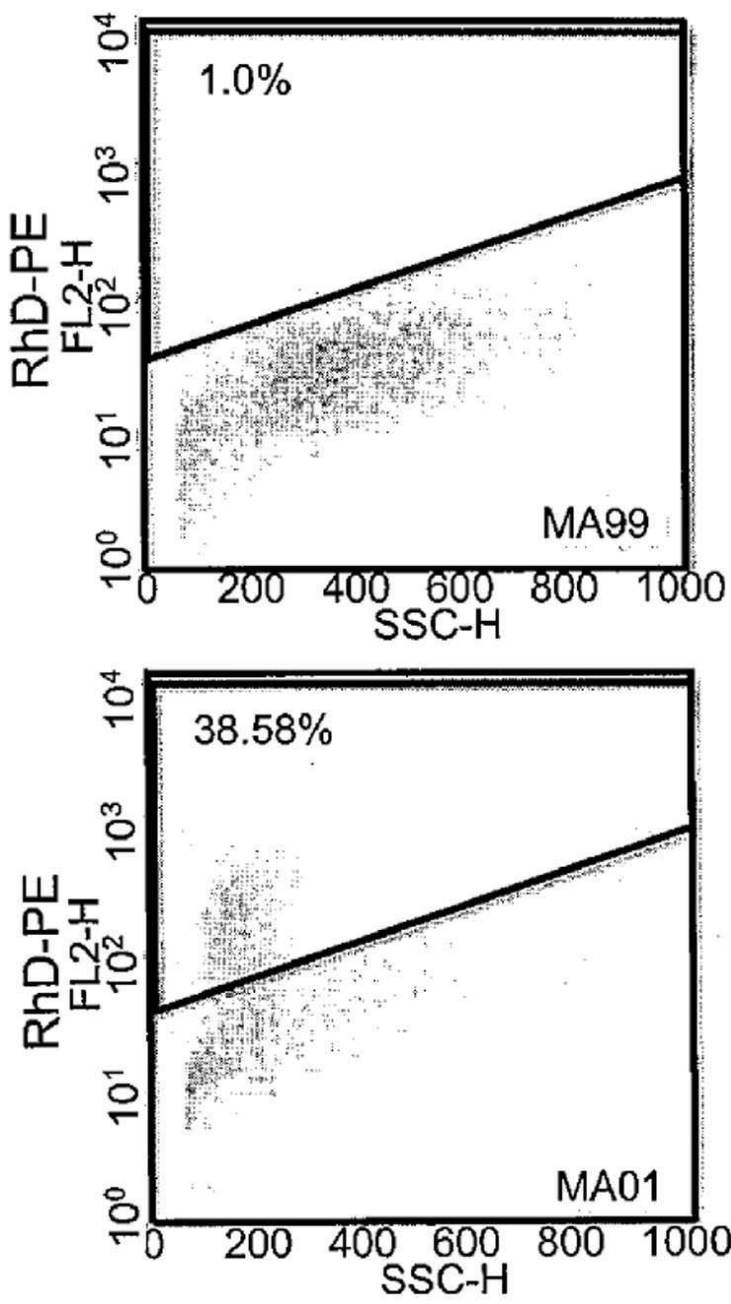
도면3b



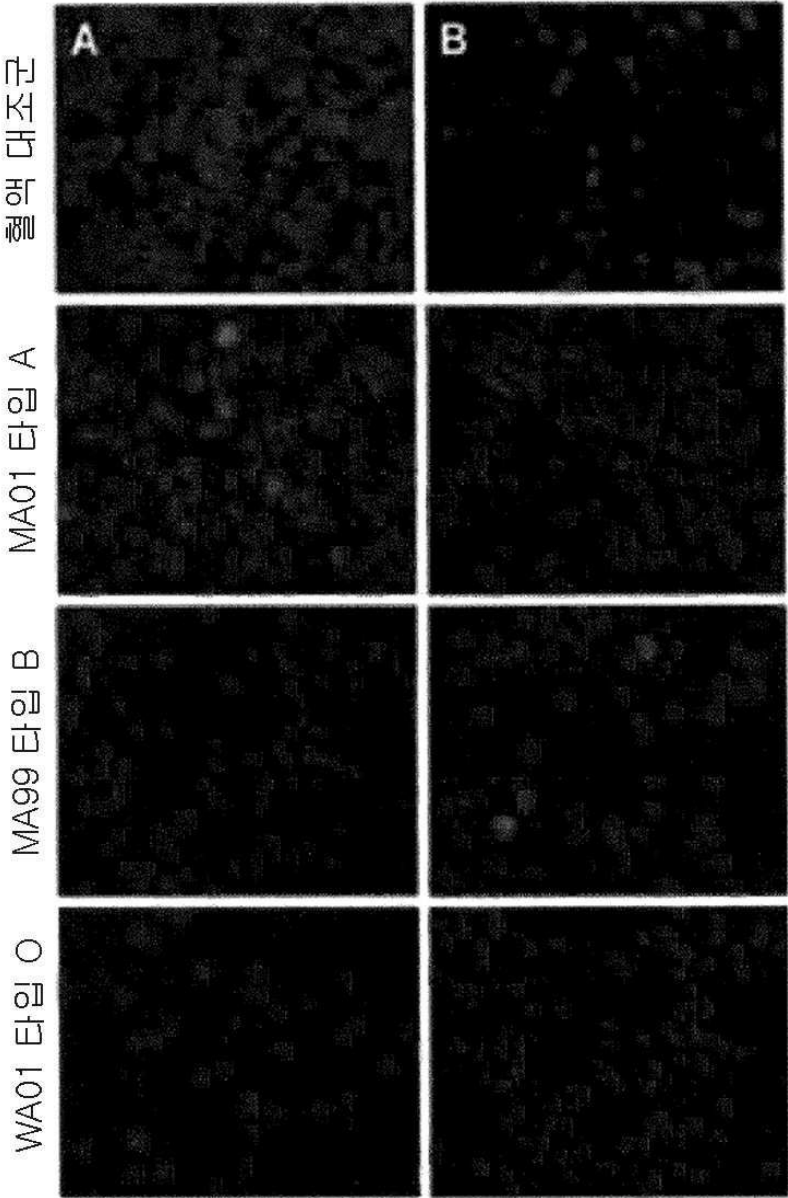
도면3c



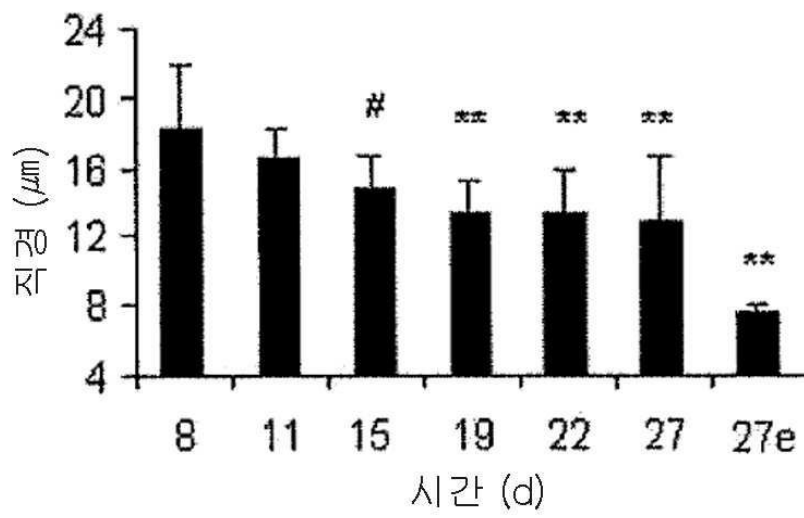
도면3d



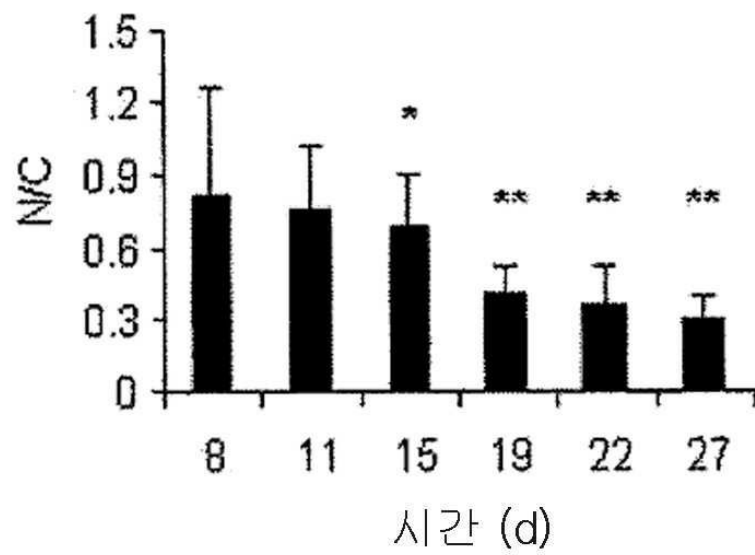
도면3e



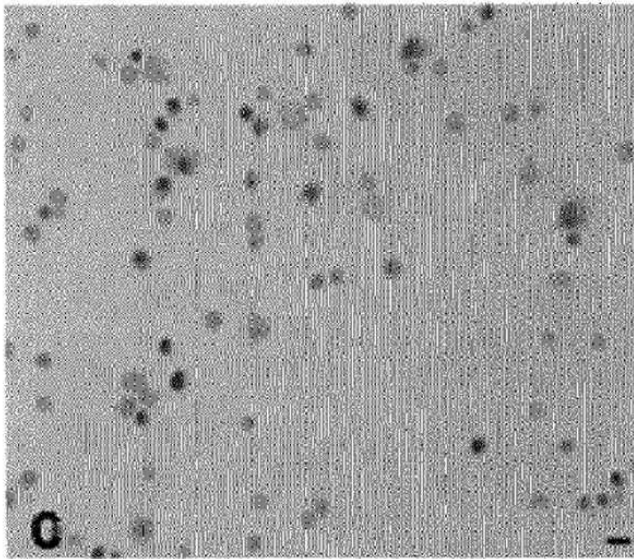
도면4a



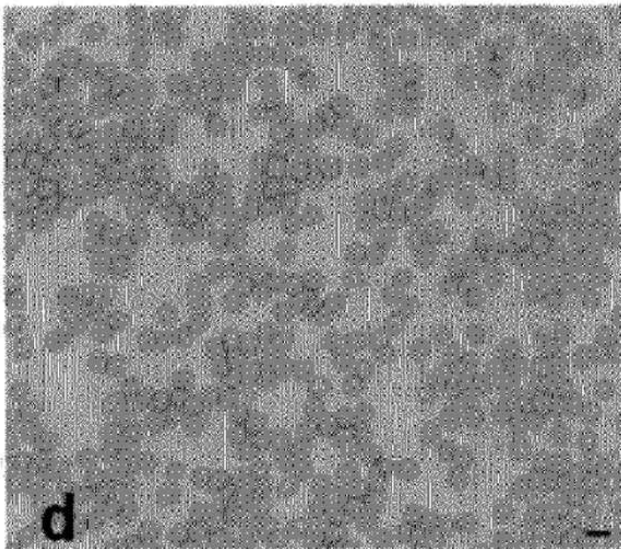
도면4b



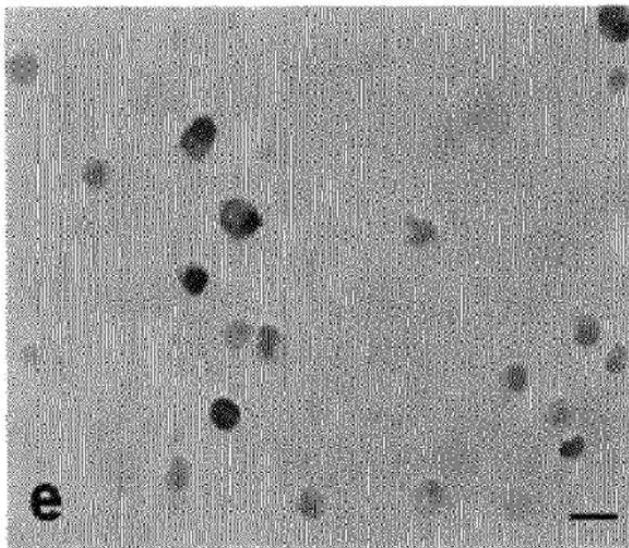
도면4c



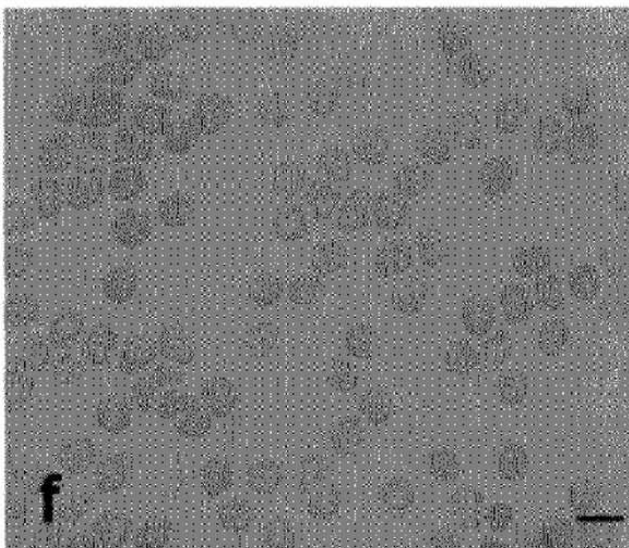
도면4d



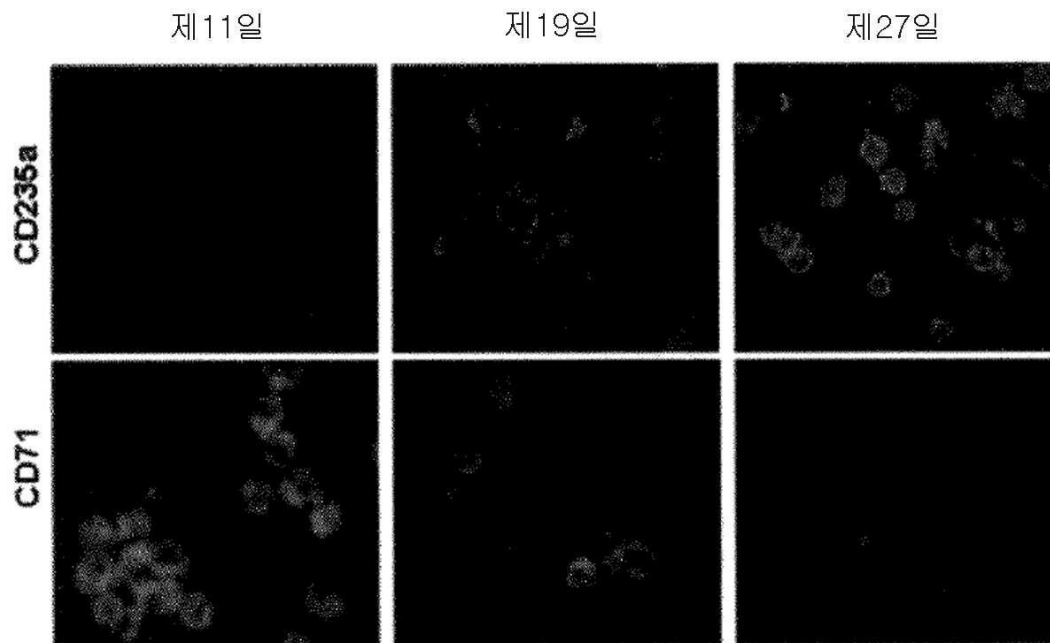
도면4e



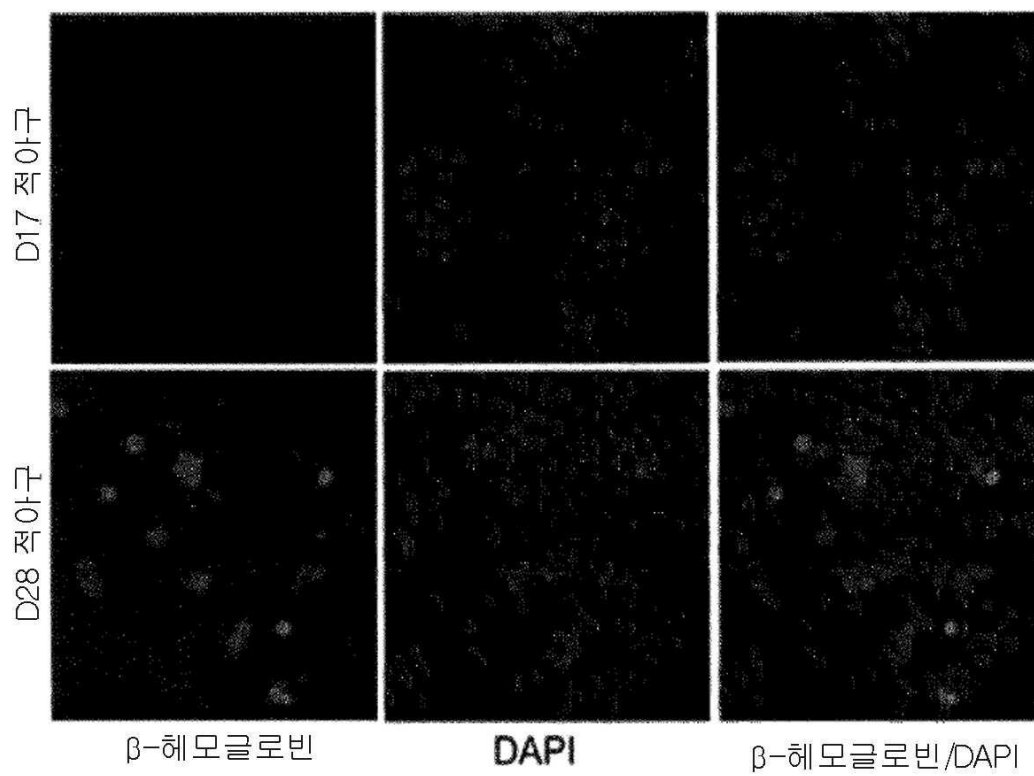
도면4f



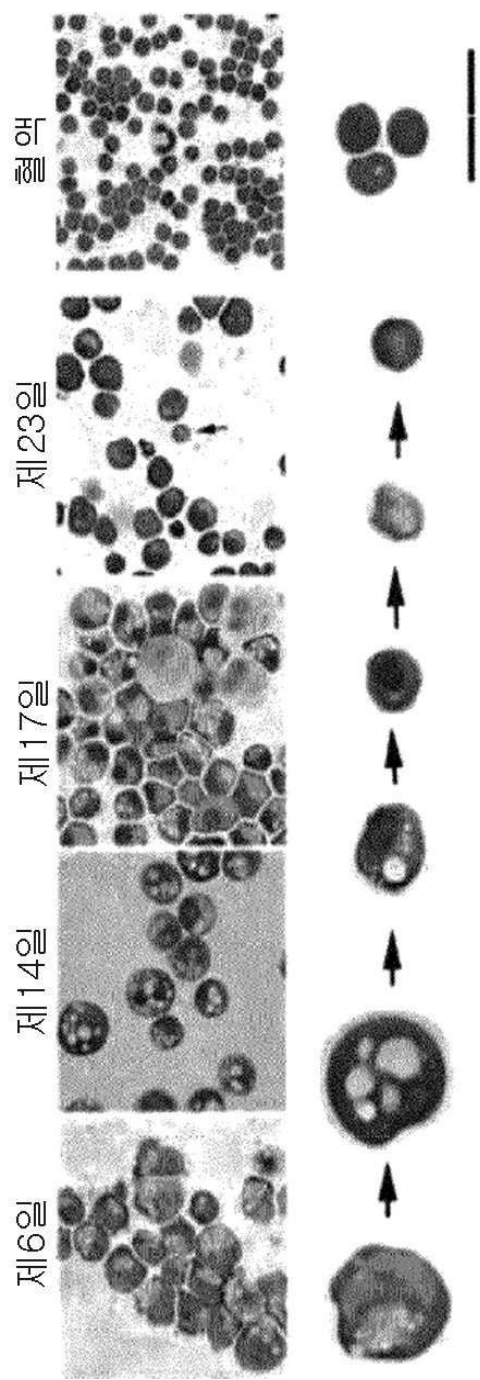
도면5a



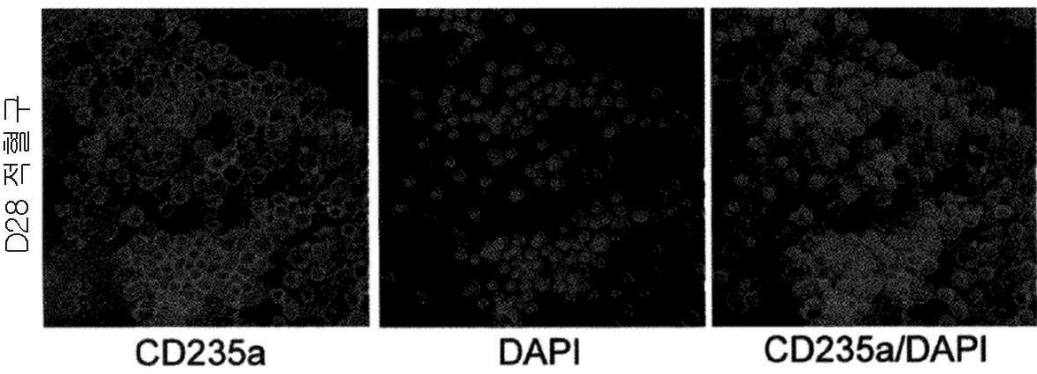
도면5b



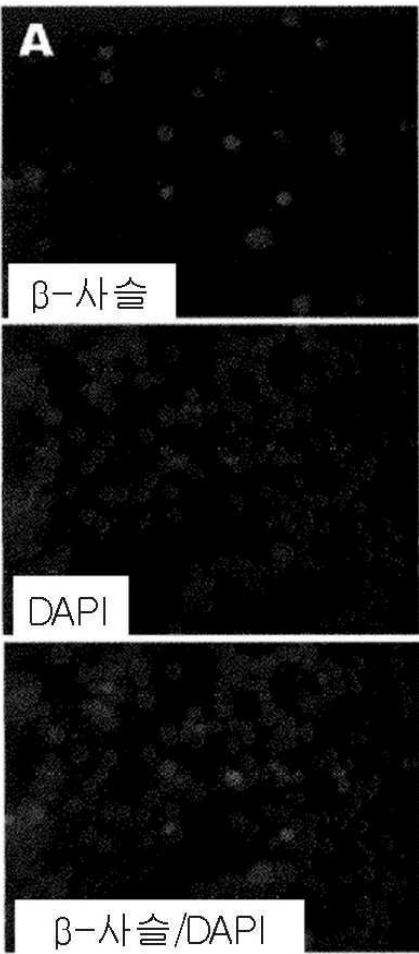
도면5c



도면6



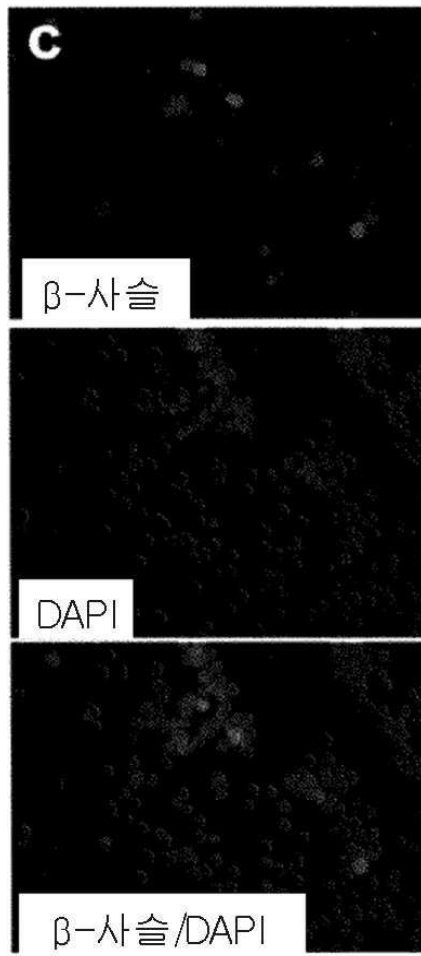
도면7a



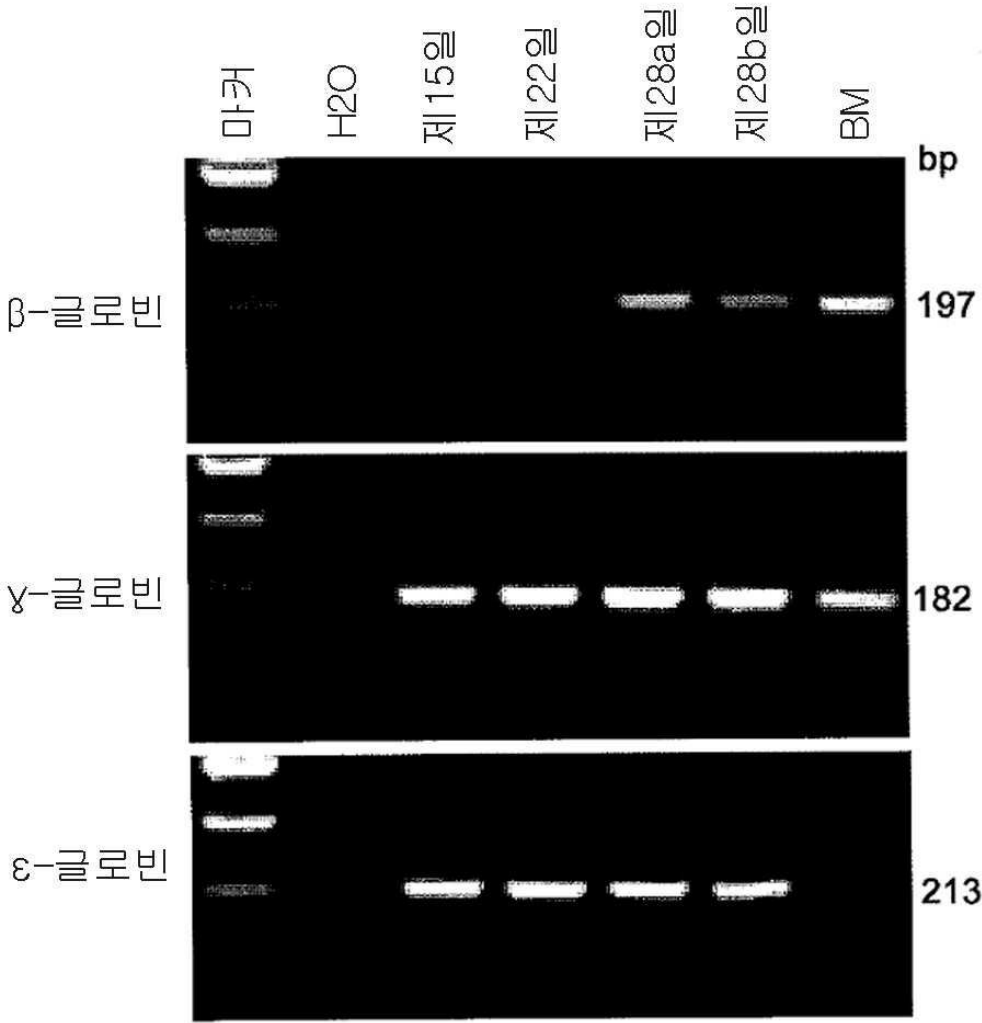
도면7b



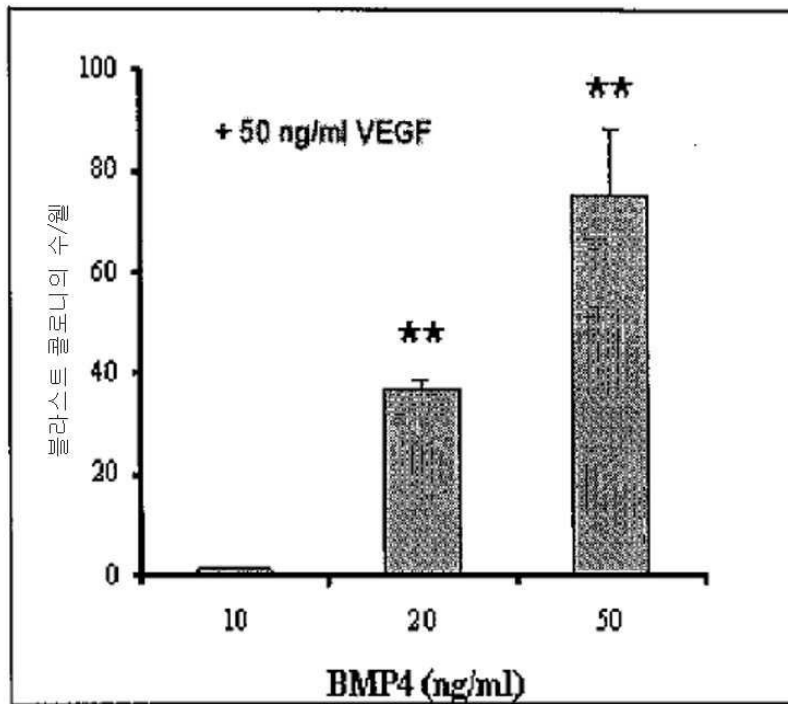
도면7c



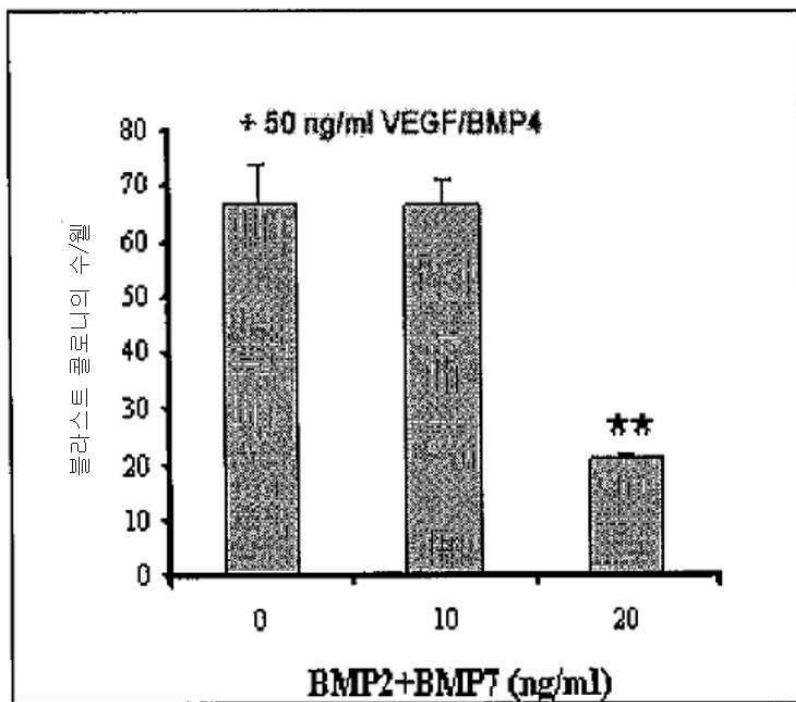
도면8



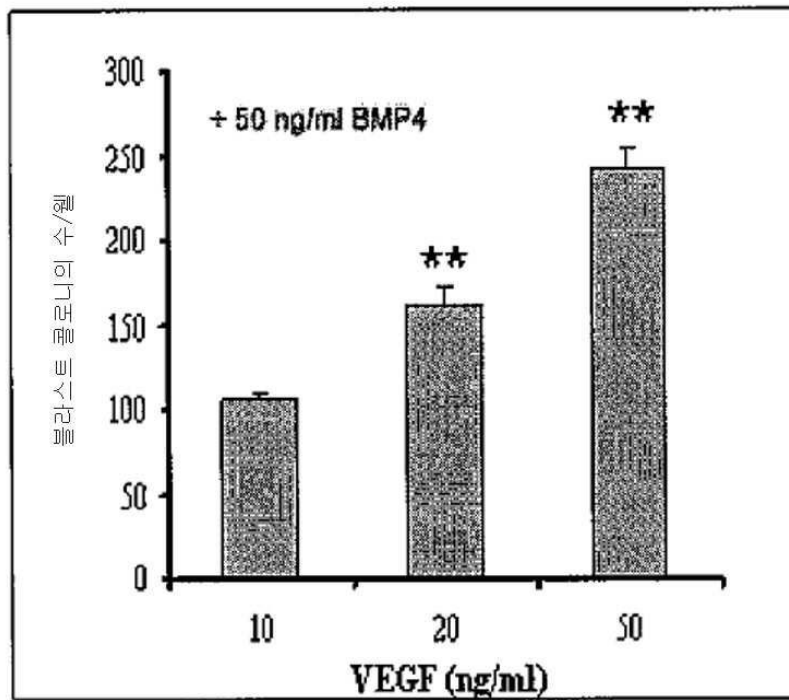
도면9a



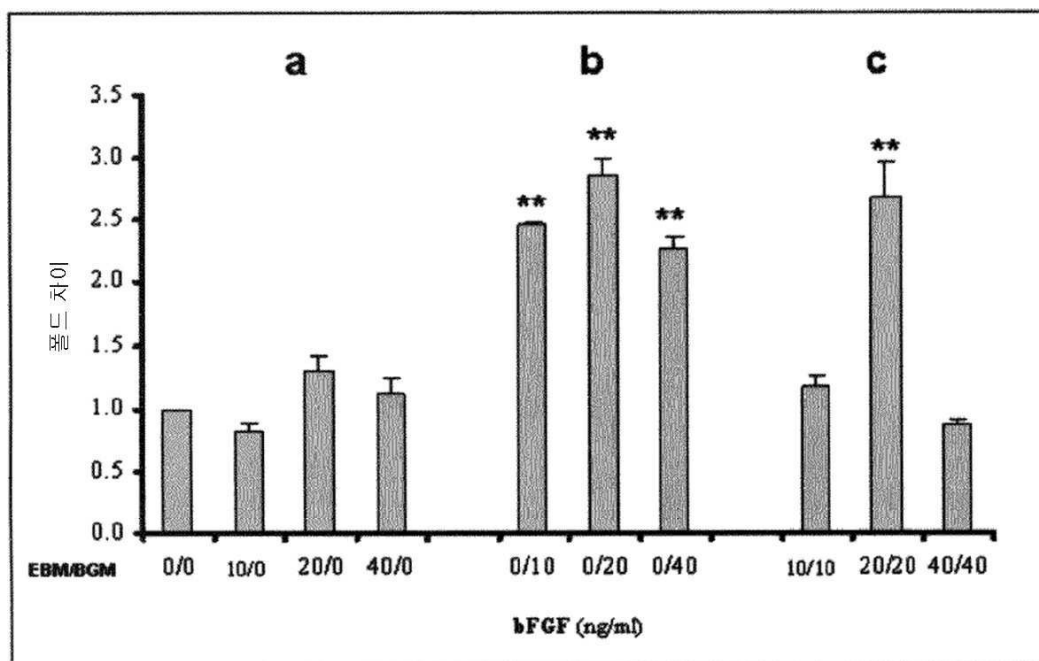
도면9b



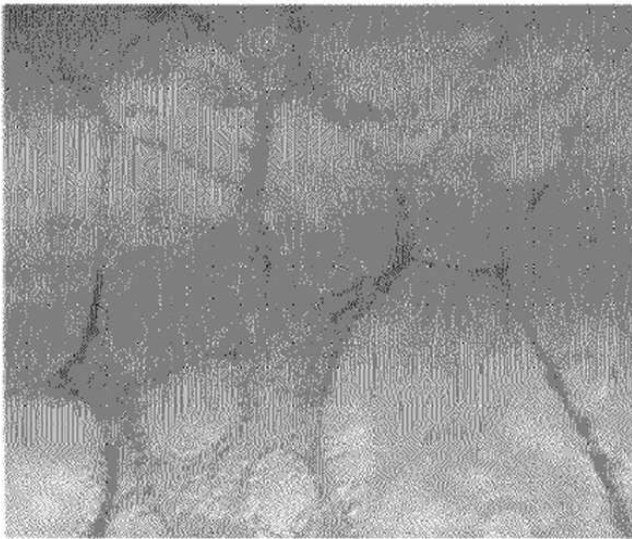
도면9c



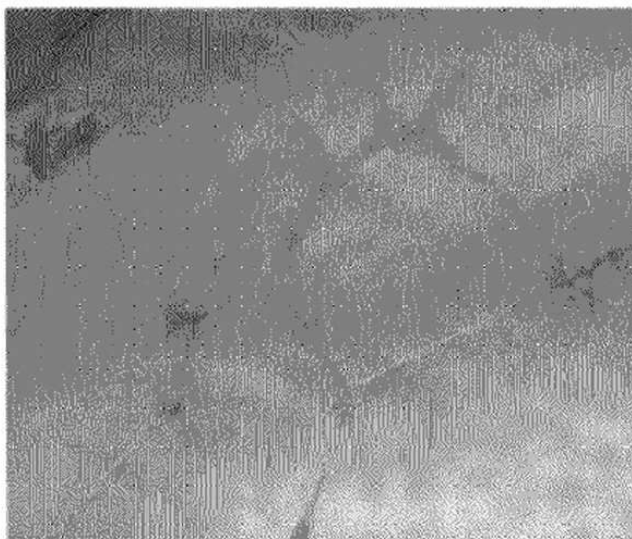
도면10a



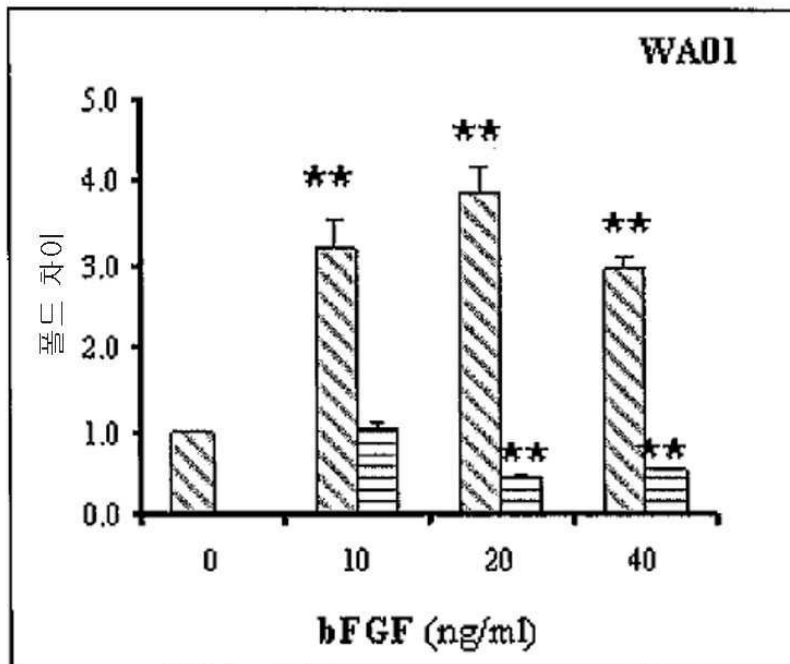
도면10b



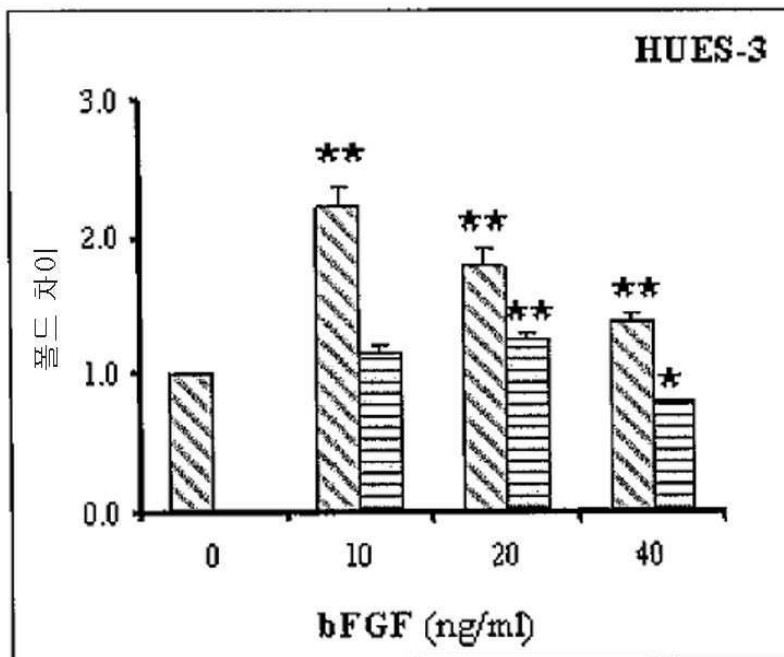
도면10c



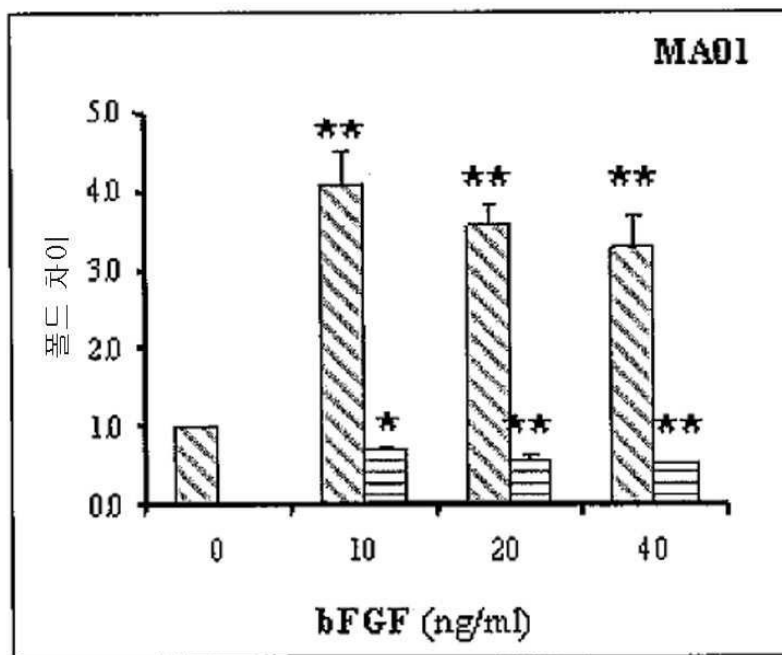
도면11a



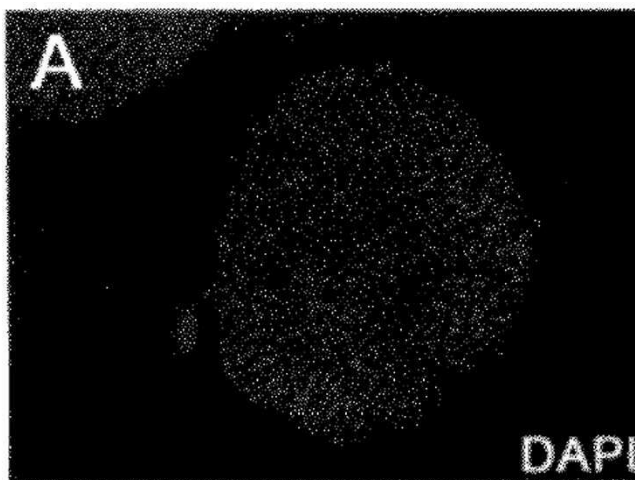
도면11b



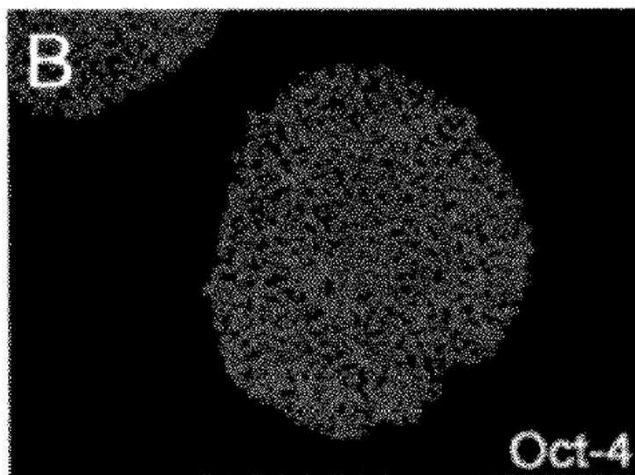
도면11c



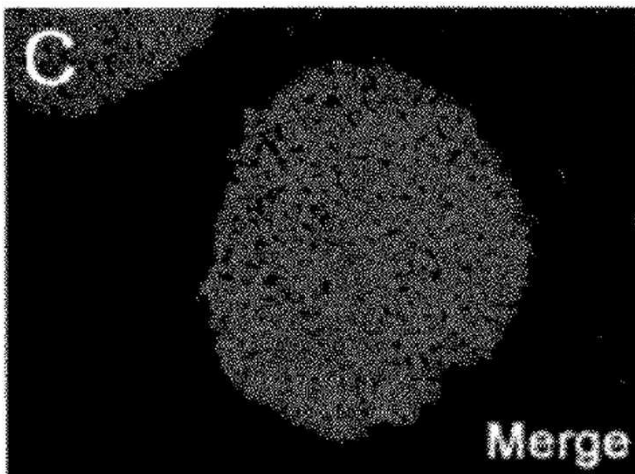
도면12a



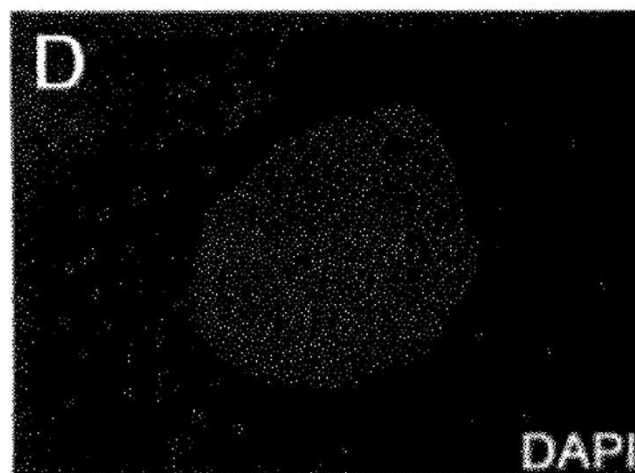
도면12b



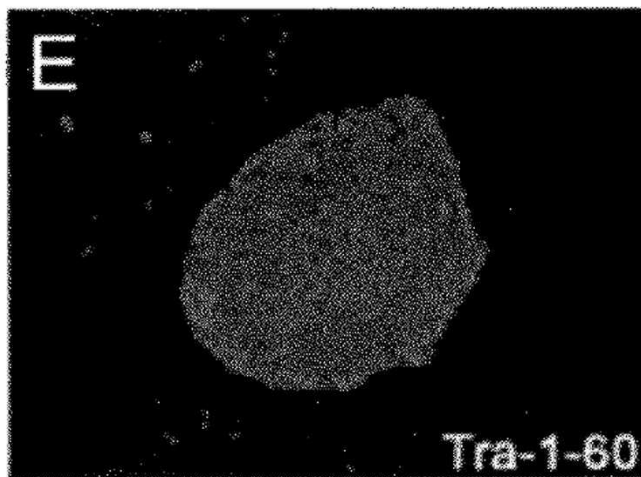
도면12c



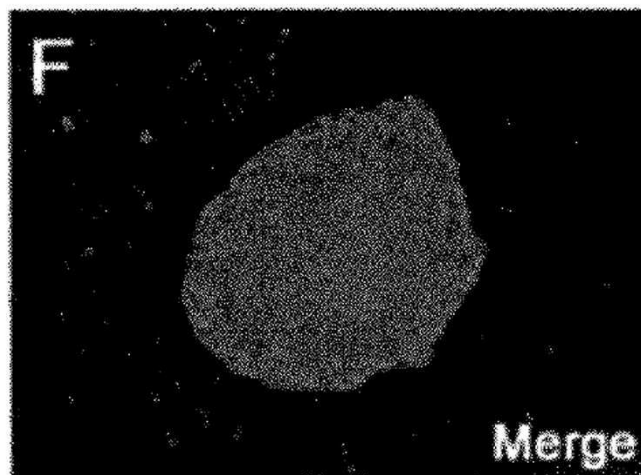
도면12d



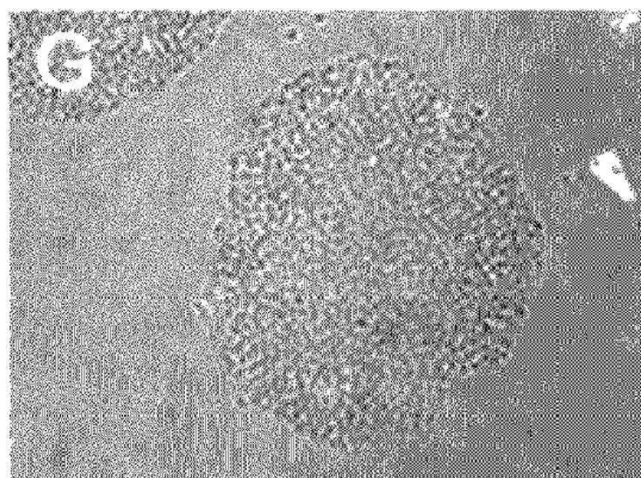
도면12e



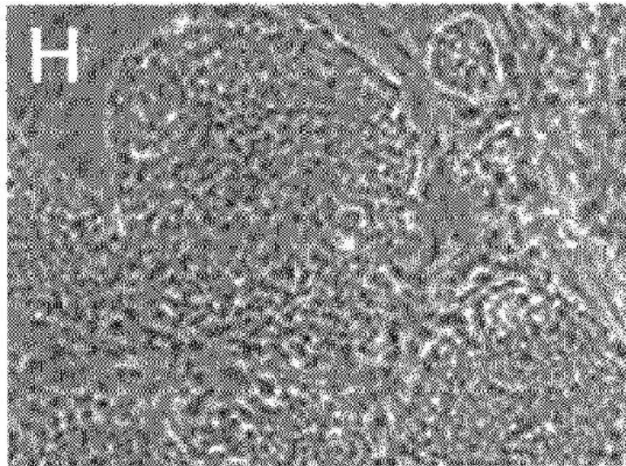
도면12f



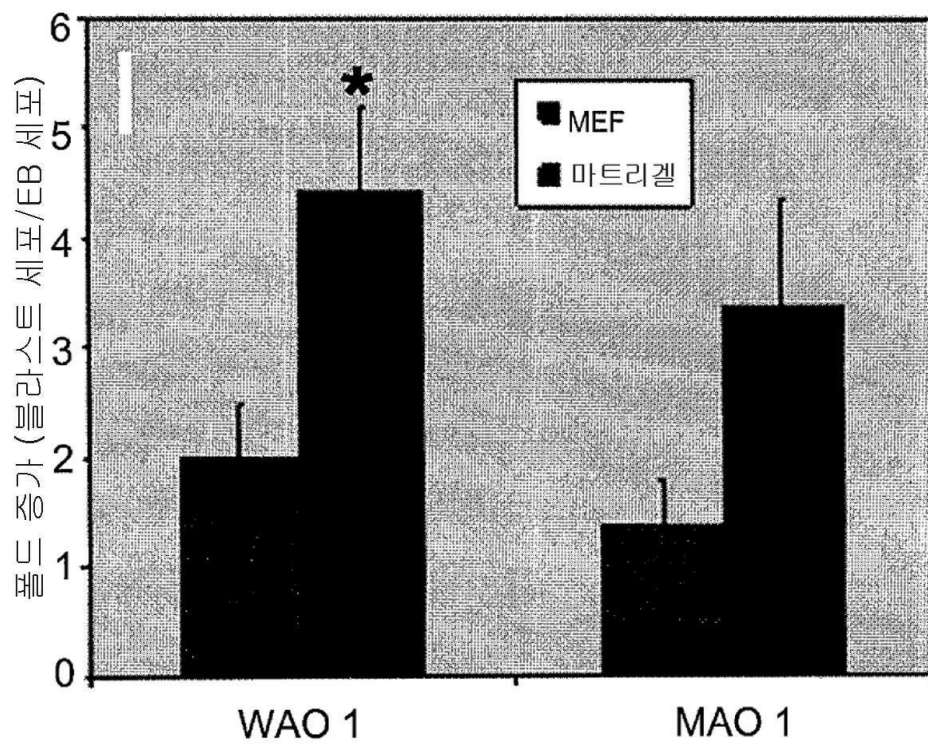
도면12g



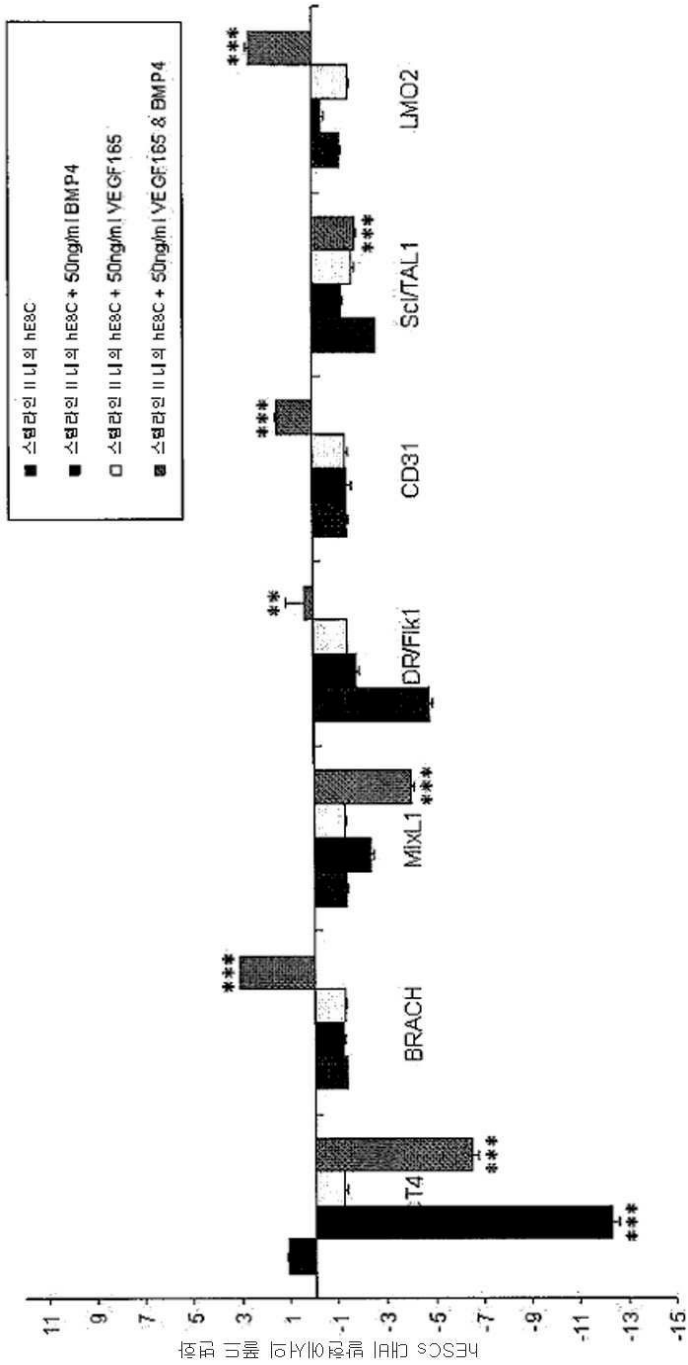
도면12h



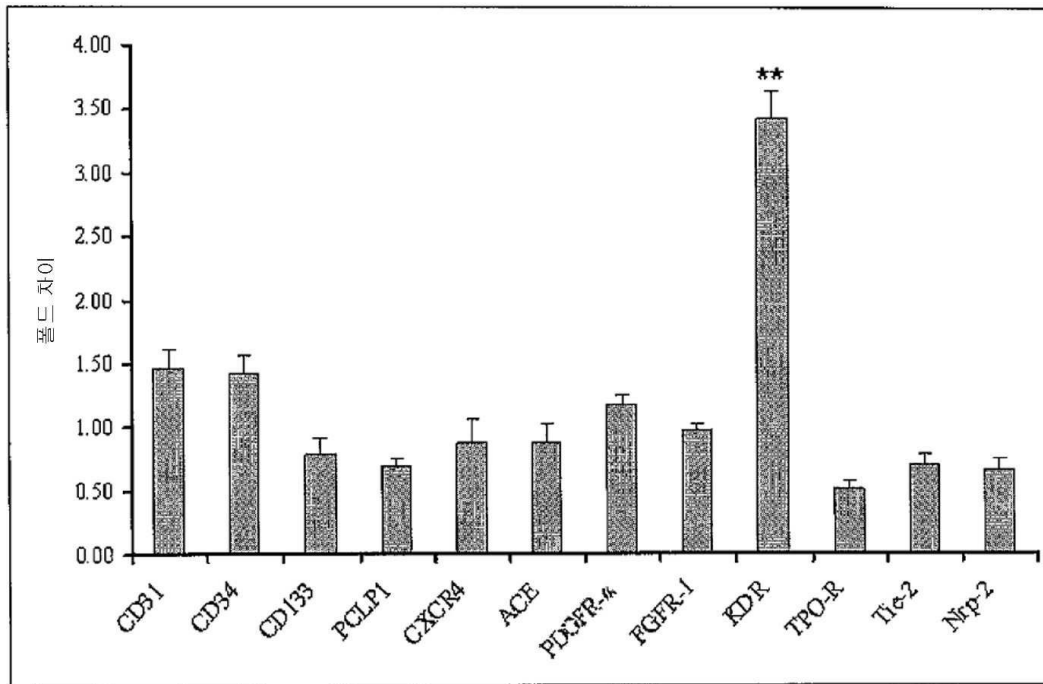
도면12i



도면13



도면14



도면15

(SEQ ID NO: 2)

```

1  ggaaaaacgag tcaggggtcg gaataaattt tagtatattt tgtgggcaat tcccagaaat
61  taatggctat gagttctttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat
121 gcgaggaata ttacagagc gattacctac ccagcgacca ctgcgccggg tactacgcgc
181 gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg cttcgggcgc cgcgcgcggt
241 gcaccgtgca gcgctacgcg gcctgcgggg accctggggc ccgcgcgcct ccgccaccac
301 ccccgccgcc cccgccaccg cccggtctgt cccctcgggc tccctgogccg ccaccgcgcg
361 gggccctcct cccggagccc ggccagcgct gcgaggcggt cagcagcagc ccccgccgcg
421 ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacccca gccctgccca ctccgcgtgc aaagagcccc
481 tcgtctaccc ctggatgcgc aaagttaacg tgagcacggt aaaccccaat tacgcccggc
541 gggagcccaa gcgctctcgg accgcctaca cgcgccagca ggtcttgagg ctggagaagg
601 aatttcaact caaccgctac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgcc caccgcgtct
661 gcctctccga gcgccagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcatgaag tggaaaaaag
721 accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggcaggctca gccggagggc
781 cccttgggcg gcccaatgga ggcccccgcg cgtcttagtg ccccgccacg cgggagccac
841 gaacctcggt gtgggggtgg gcagttagtg caggggatgg ggtgggggga caggaggggg
901 ccctggggcc tgggccccgg aaaaatctat ctgccctccc ccacacttta tatacgaata
961 aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg
1021 agggccccc agaagcaaga ttcaaatctc ttgctttctt tcttaaaaaa aagaaaaaga
1081 aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaagaga aataggagga ggctgcagct
1141 cctcgtttcc agctttggcg aagatggatc cacgtttcat ctttaatcac gccaggctcca
1201 ggcccatctg tcttgtttcc tctgccgagg agaagacggg cctcggtggc gaccattacc
1261 tcgacaccgg ctaacaaatg aggccggctc cggccgcctc cgcctctgct actgccgctg
1321 ctggaagaca gcctggattt cctttctttg tccccactc ccgataccca gcgaaagcac
1381 cctctgactg ccagatagtg cagtgttttg gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca
1441 tcttctgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca ccgtgggggt
1501 gggggtgggc aacagaggag gggagcaagt agggaagggg gtggccttga caactcagga
1561 gtgagcagga aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagacccggg agggccttcc
1621 tctgaaaggg caagccaagc catgcttggc agggtgaggg gccagttgag ttctgggagc
1681 tgggcactac tctgccagtc cagagtgtga cagcagaagc ctctctccta gactgaaaat
1741 gaattgtgaa ctaggaaata aaatgtgccc ctcccagctt gggaggagga tgttgacagag
1801 ccctctccca tagtttatta tgttgcatcg tttattatta ttattgataa tattattatt
1861 actatttttt tgtgtcatgt gagtctcttc tctttttctc tttctgacat tccaaaacca
1921 gggcccttcc tacctctggg gctgcttgag tctagaaccc ttcgatatgt tgaatatctg
1981 tgtgctgtac agagtgcaca tagaaataaa tgtttgggtt cttgtgacca gcaaaaaaaa
2041 aa

```

도면16

(SEQ ID NO: 4)

```

1 ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaattt tagtatattt tgtgggcaat tcccagaaat
61 taatggctat gagttctttt ttgatcaact caaactatgt cgacccaag ttccctccat
121 gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctgcgccggg tactacgccg
181 gcgggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg ctgcggcggt cgcgcggtgt
241 gcacggtgca gcgctacgcg gcttgcgggg accctggggc cccgcgcctt ccgccaccac
301 cccgcgcggt cccgcgcacc cccggtctgt cccctcgggc tcttgcgcgt ccaccgcgcg
361 gggccctcct cccggagccc ggccagcgct gcgaggcggt cagcagcagc ccccccgcgc
421 ctccctgctc ccagaacccc ctgcacccca gcccgtccca ctccgcgtgc aaagagcccg
481 tctgtctacc ctggatgcgc aaagtccacg tgagcacggt aaacccaat tacgcccggc
541 gggagcccaa gcgtctctcg accgcctaca cgcgccagca ggtcttgagg ctggagaagg
601 aatttacta caaccgctac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgcc cagcgctctt
661 gcctctccga gcgccagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcatgaag tggaaaaaag
721 accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtgggtg gccaggctca gccggagggc
781 cccctggcgc gcccaatgga ggcccccgcg cgtctagtgt ccccgccacg cgggagccac
841 gaacctcggg gtgggggtgg gcagtgagtg caggggatgg ggtggggggg caggaggggg
901 ccttggggcc tggggcccggt aaaaatctat ctgccctccc ccacacttta tatacgataa
961 aacgcagaag agggggagggt gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg
1021 agggccccc agaaagcaaga ttcaaatctc ttgctttctt tcttaaaaaa aagaaaaaga
1081 aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct
1141 cctcgttttc agctttggcg aagatggatc cacgtttcat ctttaatcac gccaggtcca
1201 ggcccatctg tcttgtttcc tctgcccagg agaagacggg cctcgggtgc gaccattacc
1261 tcgacacccg ctaacaaatg agggcccggt cggccgcctc cgcctctgct actgcccgtg
1321 ctggaagaca gcttgattt cctttctttg tccccactc ccgataccca gcgaaagcac
1381 cctctgactg ccagatagtg cagtgttttg gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca
1441 tctttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgctca cccacttcca cgttgggggt
1501 gggggtgggc aacagaggag gggagcaagt agggagggg gtggccttga caactcagga
1561 gtgagcagg aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagaccggg agggccttcc
1621 tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc aggggtgagg gccagttgag ttctgggagc
1681 tgggcactac tctgccagtc cagagtgtga cagcagaagc ctctctccta gactgaaat
1741 gaattgtgaa ctaggaaata aaatgtgccc ctcccagctt gggaggagga tgttgacag
1801 cctctcctca tagtttatta tgttgcatcg ttattatlaa ttattgataa tattattatt
1861 actatttttt tgtgtcatgt gactcctctc tccctttctc ttcttgacat tccaaaacca
1921 ggccctctcc tactctggg gctgcttgag tctagaaccc ttctgtatgt tgaatatctg
1981 tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgttttggtt cttgtgaaaa aaaaaaaaaa

```

도면17

(SEQ ID NO: 1)

```

1 MAMSSFLINS NYVDPKFPFC EEYSQSDYLP SDHSPGYAG GQRRESSFQP EAGFGRRRAAC
61 TVQRYAACRD PGPPPPPPPP PPPPPPPGLS PRAPAPPPAG ALLPEPGQRC EAVSSSPPPP
121 PCAQNPLHPS PSHSACKEPV VYPWMRKVHV STVNPNYAGG EPKRSRTAYT RQQVLELEKE
181 FHYNRYLTRR RRVEIAHALC LSERQIKIWF QNRRMKWKKD HKLPNTKIRS GGAAGSAGGP
241 PGRPNCGPRA L

```

도면18

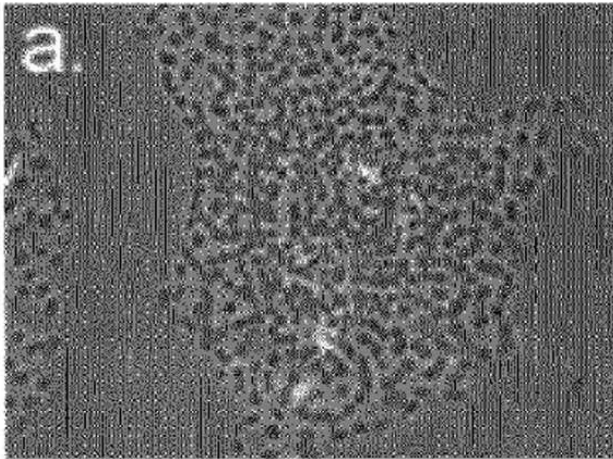
(SEQ ID NO: 3)

```

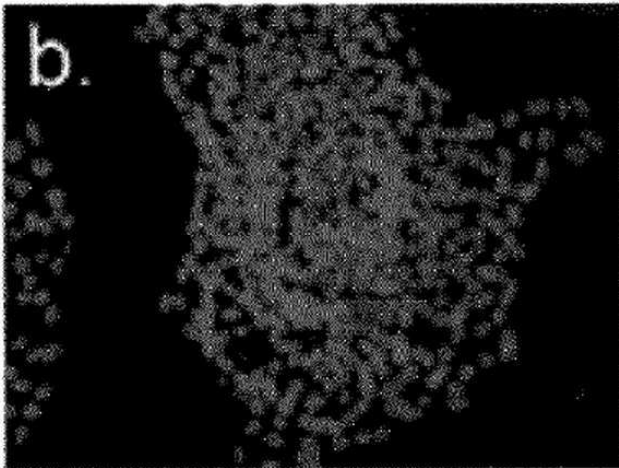
1 MAMSSFLINS NYVDPKFPFC EEYSQSDYLP SDHSPGYAG GQRRESSFQP EAGFGRRRAAC
61 TVQRYAACRD PGPPPPPPPP PPPPPPPGLS PRAPAPPPAG ALLPEPGQRC EAVSSSPPPP
121 PCAQNPLHPS PSHSACKEPV VYPWMRKVHV STVNPNYAGG EPKRSRTAYT RQQVLELEKE
181 FHYNRYLTRR RRVEIAHALC LSERQIKIWF QNRRMKWKKD HKLPNTKIRS GGAAGSAGGP
241 PGRPNCGPRA L

```

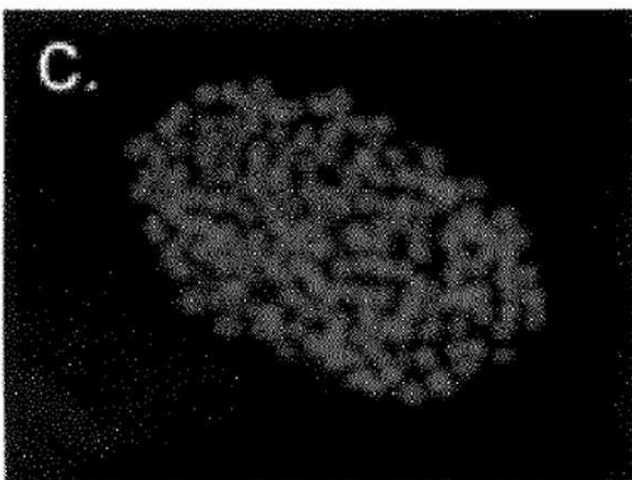
도면19a



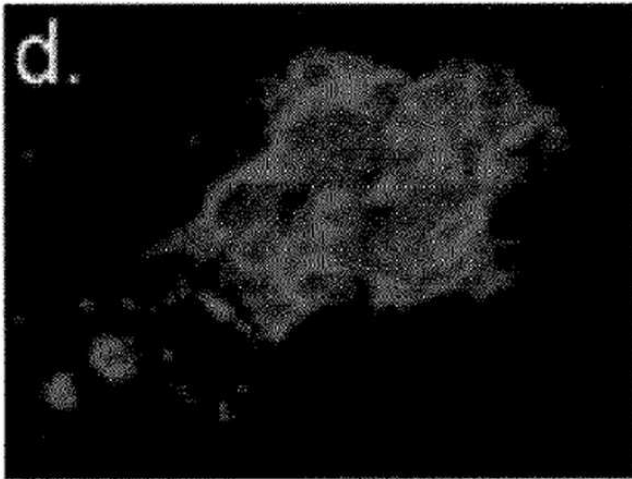
도면19b



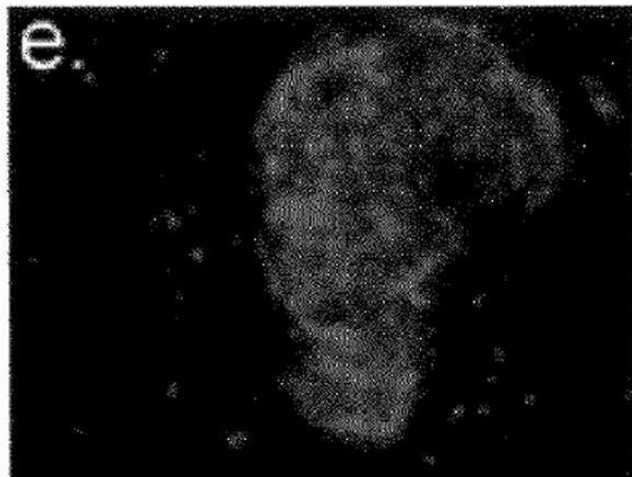
도면19c



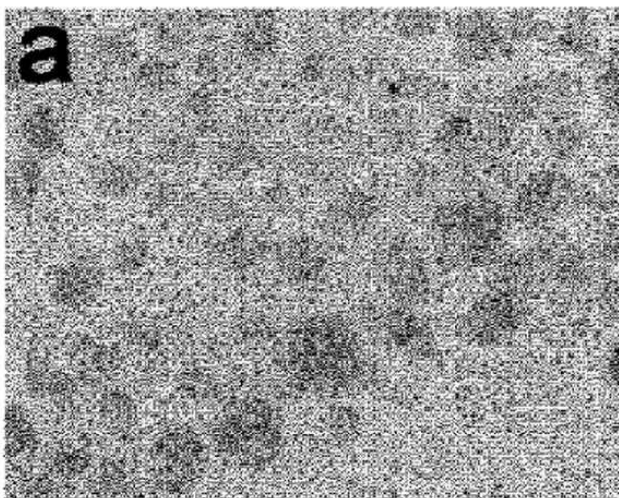
도면19d



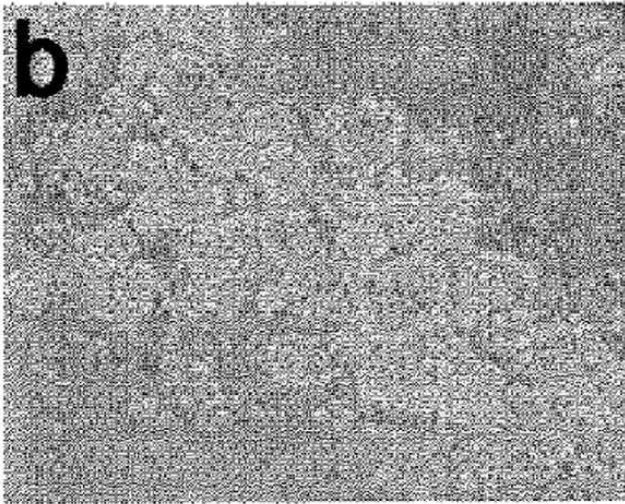
도면19e



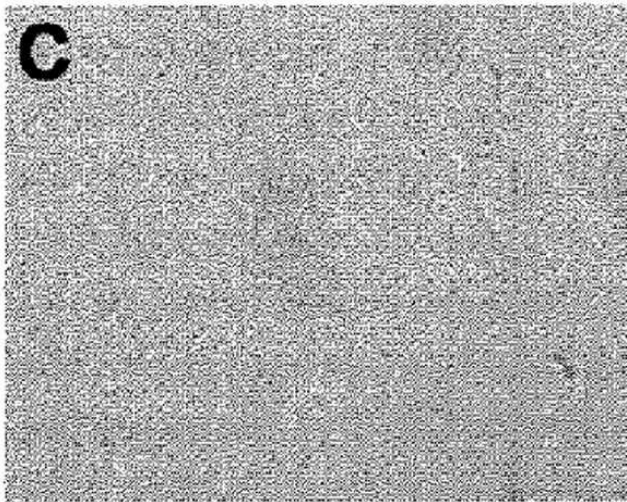
도면20a



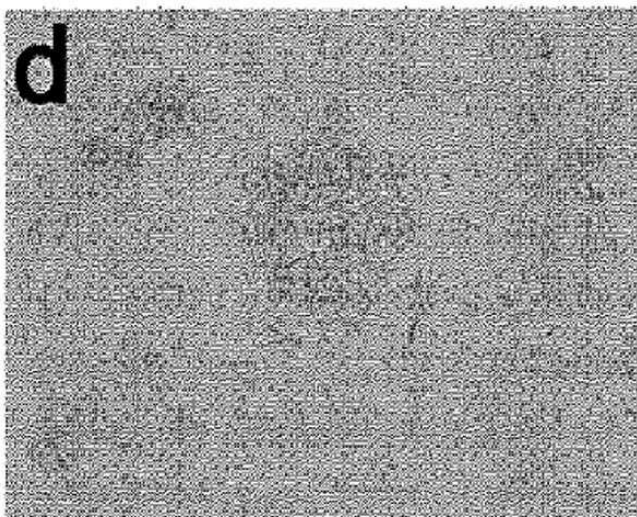
도면20b



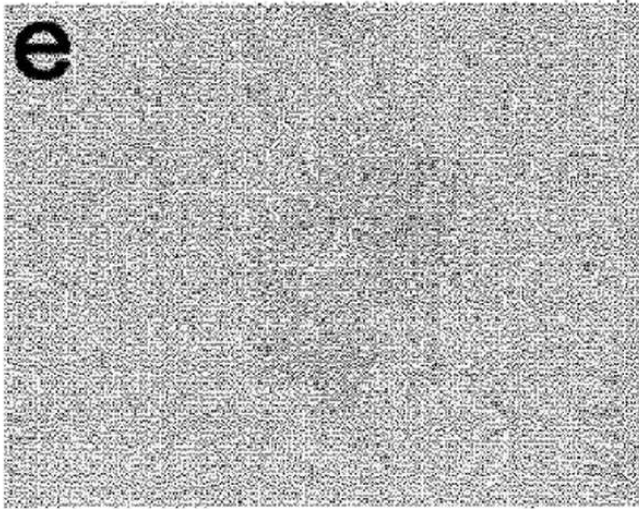
도면20c



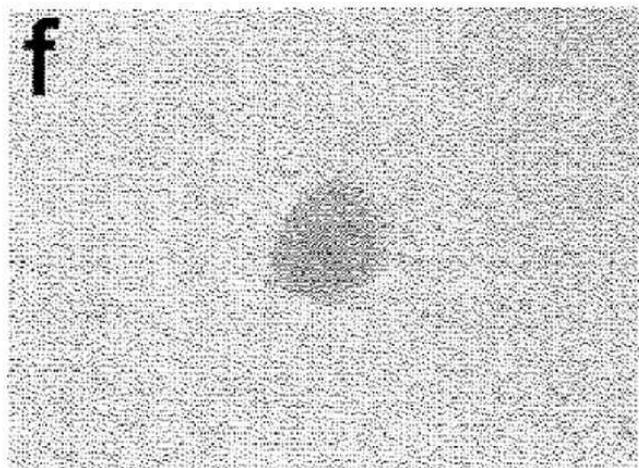
도면20d



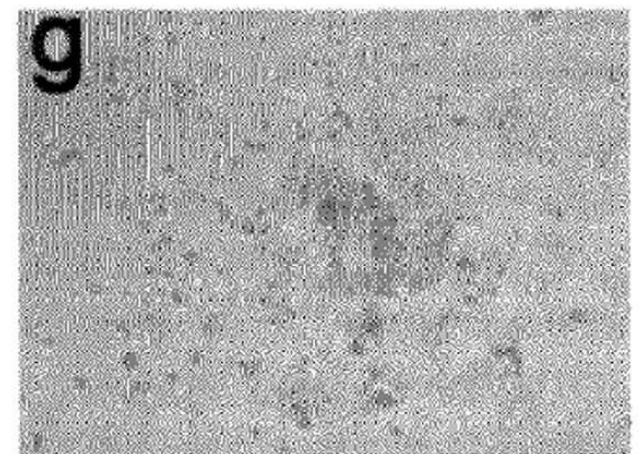
도면20e



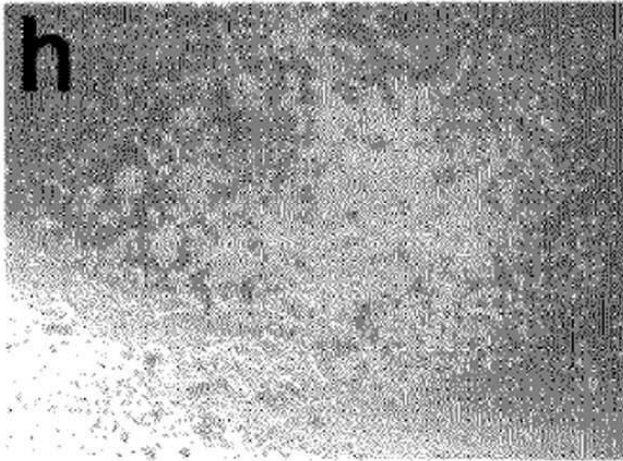
도면20f



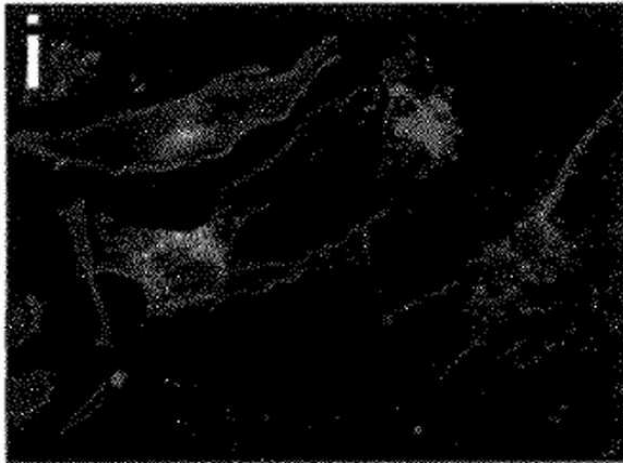
도면20g



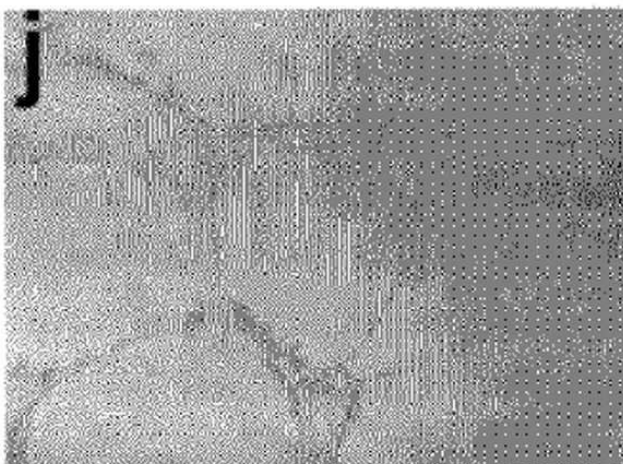
도면20h



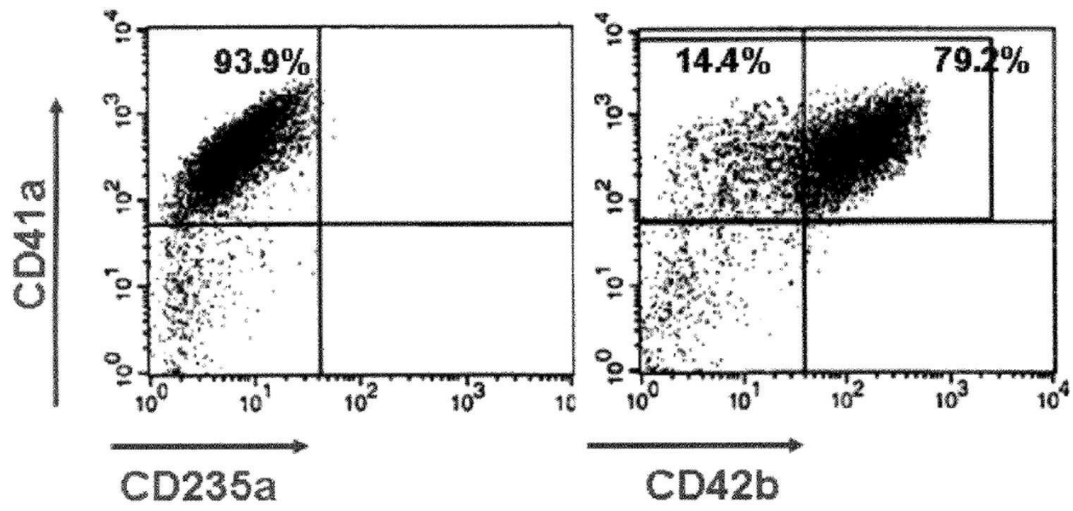
도면20i



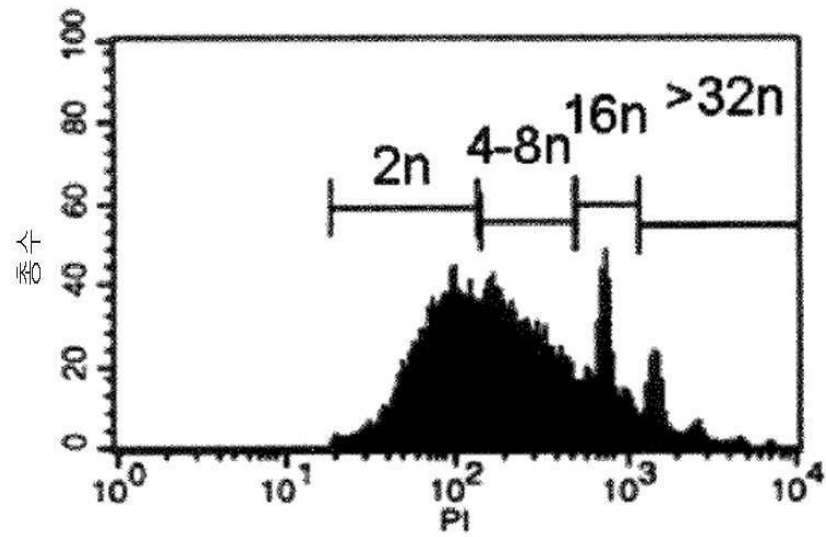
도면20j



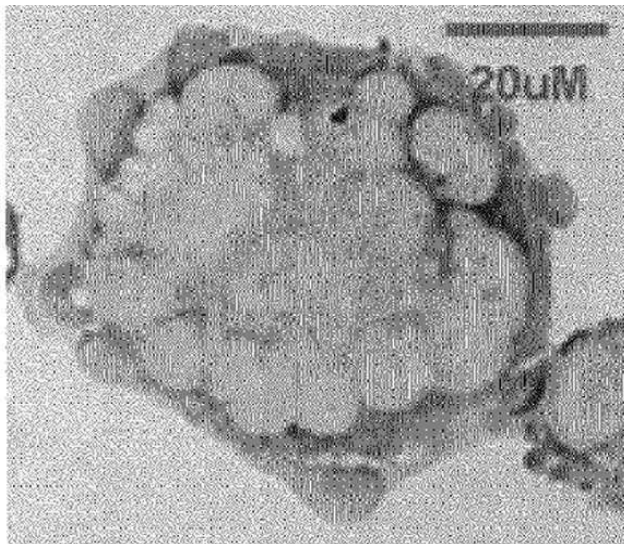
도면21a



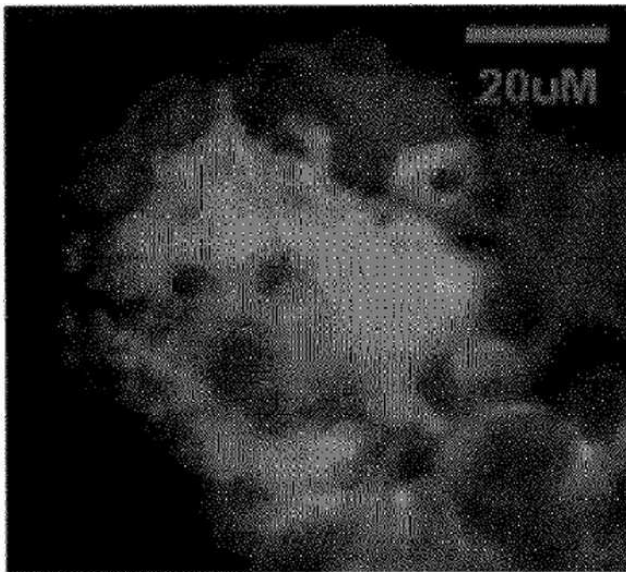
도면21b



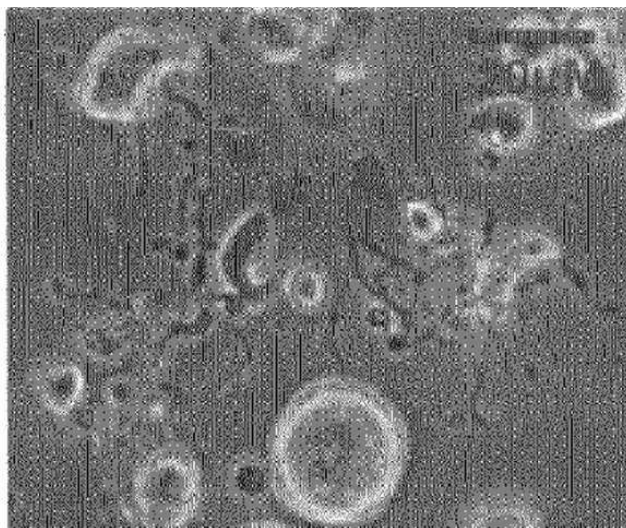
도면21c



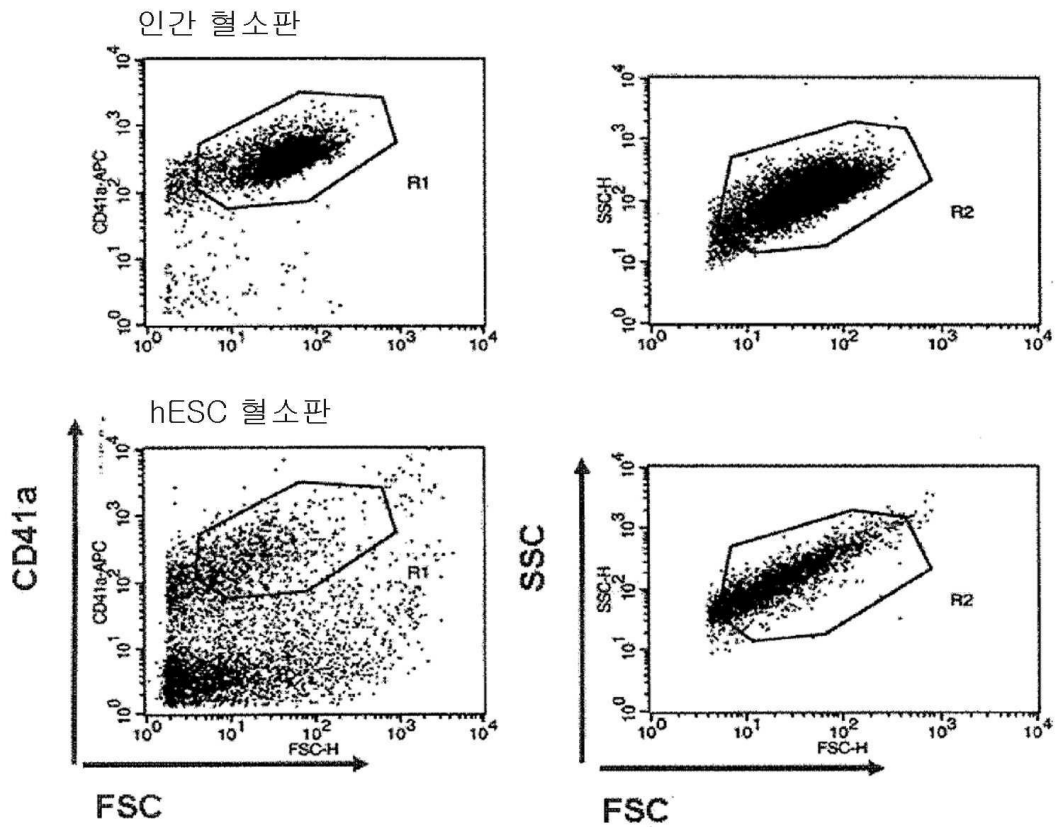
도면21d



도면21e



도면22



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Advanced Cell Technology, Inc.

LANZA, Robert

LU, Shi-Jiang

<120> METHODS FOR PRODUCING ENUCLEATED ERYTHROID CELLS DERIVED FROM
PLURIPOTENT STEM CELLS

<130> 83179-5-21

<150> 61/126,803

<151> 2008-05-06

<150> 61/189,491

<151> 2008-08-19

<150> 61/190,282

<151> 2008-08-26

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys

1 5 10 15
Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp

20 25 30
His Ser Pro Gly Tyr Tyr Ala Gly Gly Gln Arg Arg Glu Ser Ser Phe

35 40 45
Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg

50 55 60
Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

65 70 75 80
Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro

85 90 95
Pro Pro Ala Gly Ala Leu Leu Pro Glu Pro Gly Gln Arg Cys Glu Ala

100 105 110
Val Ser Ser Ser Pro Pro Pro Pro Pro Cys Ala Gln Asn Pro Leu His

115 120 125
Pro Ser Pro Ser His Ser Ala Cys Lys Glu Pro Val Val Tyr Pro Trp

130 135 140
Met Arg Lys Val His Val Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Ala Gly Gly

145 150 155 160
Glu Pro Lys Arg Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu

165 170 175
Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg

180 185 190
Val Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile

195 200 205
Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp His Lys Leu Pro

210	215	220	
Asn Thr Lys Ile Arg Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser Ala Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Pro Gly Arg Pro Asn Gly Gly Pro Arg Ala Leu			
	245	250	

<210> 2

<211> 2042

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaatTT tagtatattt tgtgggcaat tcccagaaat      60

taatggctat gagtTctttt ttgatcaact caaactatgt cgaccccaag ttccctccat      120
gcgaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctgcccggg tactacgccg      180
gcggccagag gcgagagagc agcttccagc cggaggcggg cttcgggcgg cgcgcggcgt      240
gcaccgtgca gcgtacgcg gcctgccggg accctgggcc cccgccgcct ccgccaccac      300
ccccgccgc cccgccaccg cccgtctgtt ccctcgggc tctgcgccg ccaccgccg      360
gggccctcct cccggagccc ggccagcgtt gcgaggcggg cagcagcagc ccccgccgc      420
ctccctgcgc ccagaacccc ctgcacccca gcccgTccca ctccgcgtgc aaagagcccc      480

tcgtctaccc ctggatgcgc aaagtTcacg tgagcacggt aaaccccaat tacgccggcg      540
gggagcccaa gcgtctcTcg accgcctaca cgcgccagca ggtctTggag ctggagaagg      600
aatTtacta caaccgtac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgcc cacgcgtctt      660
gcctctccga gcgccagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcatgaag tggaaaaaag      720
accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggagagctca gccggagggc      780
ccctggccg gcccaatgga ggcccccgcg cgctctagtT ccccgccagc cgggagccac      840
gaacctcggg gtgggggtgg gcagtgagtg caggggatgg ggtgggggga caggaggggg      900

ccctggggcc tgggccccgg aaaaatctat ctgccctccc ccacacttta tatacgaata      960
aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg      1020
aggccccccc agaagcaaga ttcaaatctc ttgctttctt tcttaaaaaa aagaaaaaga      1080
aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct      1140
cctcgTtttc agctttggcg aagatggatc cacgtttcat ctttaatcac gccaggtcca      1200
ggcccatctg tcttgtttcc tctgccgagg agaagacggg cctcggtggc gaccattacc      1260

```

tcgacacccg ctaacaaatg aggcccggct cggccgcctc cgcctctgct actgccgctg 1320

ctggaagaca gcctggattt cttttctttg tccccactc ccgataccca gcgaaagcac 1380

ctcttgactg ccagatagtg cagtgttttg gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca 1440

tctttcgtgc ccattcactg agggccagaa tgactgtca ccacttcca ccgtgggggtt 1500

gggggtgggc aacagaggag gggagcaagt aggggaagggg gtggccttga caactcagga 1560

gtgagcagga aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagaccggg agggccttcc 1620

tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc aggggtgaggg gccagttgag ttctgggagc 1680

tgggcactac tctgccagtc cagagtgtga cagcagaagc ctctctcta gactgaaaat 1740

gaatgtgaaa ctaggaaata aaatgtgccc ctcccagtct gggaggagga tgttgcagag 1800

ccctctccca tagtttatta tgttgcatcg ttattatta ttattgataa tattattatt 1860

actatTTTTT tgtgtcatgt gagtctctc tcttttctc tttctgacat tccaaaacca 1920

ggcccccttc tactctggg gctgcttgag tctagaacct ttcgtatgtg tgaatatctg 1980

tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgtttggttt cttgtgacca gcaaaaaaaaa 2040

aa 2042

<210> 3

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ala Met Ser Ser Phe Leu Ile Asn Ser Asn Tyr Val Asp Pro Lys

1 5 10 15

Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Ser Asp Tyr Leu Pro Ser Asp

20 25 30

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

35 40 45

Gln Pro Glu Ala Gly Phe Gly Arg Arg Ala Ala Cys Thr Val Gln Arg

50 55 60

Tyr Ala Ala Cys Arg Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

65 70 75 80

Pro Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Ser Pro Arg Ala Pro Ala Pro

85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 2040

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ggaaaacgag tcaggggtcg gaataaat	60
ttatgctat gattctttt ttgatcaact caaactatgt cgacccaag ttcctccat	120
gagaggaata ttcacagagc gattacctac ccagcgacca ctgcccggg tactacgccg	180
gcggccagag gcgagagagc agcttcagc cggaggcggg cttcgggcgg gcgcggcgt	240
gcaccgtgca gcgtacgcg gcctgccggg accctgggccc cccgcgcct ccgccaccac	300
ccccgccgc cccgccaccg cccgtctgt ccctcgggc tcctgcgcg ccaccgcgcg	360

gggccctcct cccggagccc ggccagcgct gcgaggcggc cagcagcagc ccccgccgc 420

ctccctgcgc ccagaacccc ctgcaccca gcccgctcca ctcccgctgc aaagagcccc 480

tcgtctaccc ctggatgcgc aaagttcacg tgagcacggt aaacccaat tacgccggcg 540

gggagcccaa gcgctctcgg accgcctaca cgcgccagca ggtcttggag ctggagaagg 600

aatttacta caaccgtac ctgacacggc gccggagggt ggagatcgcc cagcgctct 660

gcctctccga gccccagatc aagatctggt tccagaaccg gcgcatgaag tggaaaaaag 720

accacaagtt gcccaacacc aagatccgct cgggtggtgc ggagagctca gccggagggc 780

cccctggcgc gcccaatgga ggcccccgcg cgtcttagtg ccccgccagc cgggagccac 840

gaacctcggg gtgggggtgg gcagtgcgtg caggggatgg ggtgggggga caggaggggg 900

ccctggggcc tgggccccgg aaaaatctat ctccctccc ccacacttta tatacgaata 960

aacgcagaag agggggaggg gaagctttat ttatagaaat gacaatagag ggccacgggg 1020

aggccccccc agaagcaaga ttcaaatctc ttgctttctt tcttaaaaaa aagaaaaaga 1080

aaaagcaaga agaaggaaga aagaaaaaga cagaaagaga aataggagga ggctgcagct 1140

cctcgttttc agctttggcg aagatggatc caggtttcat ctttaatcac gccaggtcca 1200

ggcccatctg tcttgtttcc tctgccgagg agaagacggg cctcgggtggc gaccattacc 1260

tcgacacccg ctaacaaatg agggccggct cggccgcctc cgcctctgct actgccgctg 1320

ctggaagaca gcctggattt cttttctttg tccccactc ccgatacca gcgaaagcac 1380

cctctgactg ccagatagtg cagtgttttg gtcacggtaa cacacacaca ctctccctca 1440

tctttcgtgc ccattactg agggccagaa tgactgtca cccacttcca ccgtggggtt 1500

gggggtgggc aacagaggag gggagcaagt agggaagggg gtggccttga caactcagga 1560

gtgagcaggg aaattgagtc caaggaaaaa gagagactca gagacccggg agggccttcc 1620

tctgaaaggc caagccaagc catgcttggc agggtagggg gccagttgag ttctgggagc 1680

tgggcactac tctgccagtc cagagttgta cagcagaagc ctctctccta gactgaaat 1740

gaatgtgaaa ctaggaaata aaatgtgcc cctccagtct gggaggagga tgttcagag 1800

ccctctccca tagtttatta tgttgcacg tttattatta ttattgataa tattattatt 1860

actatTTTT tgtgtcatgt gactcctctc tcctttctc tttctgacat tccaaaacca 1920

ggcccttcc tacctctggg gctgcttgag tctagaacct ttcgtatgtg tgaatatctg 1980

tgtgctgtac agagtgacaa tagaaataaa tgtttggttt cttgtgaaaa aaaaaaaaaa 2040

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 5

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 7

Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Gln Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 8

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 9

Tyr Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 10

Arg Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Drosophila antennapedia

<400> 11

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

1 5 10 15

<210> 12

<211> 34

<212> PRT

<213> Herpes simplex virus 1

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Glu

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 14

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic construct

<400> 15

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

gaaggtattc agccaaacgc 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

gttacagaac cacactcgga 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 18
 tgcttcctg agaccagtt 20
 <210> 19
 <211> 25

 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 gatcattct ttcctttgca tcaag 25
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 ccgagtcag gatccaggta 20
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 ctctgacgcc gagacttgg 19
 <210> 22
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 ccagccaagc tgtctcagt 19

 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 ctgcatgtca ggttgcaaag 20

<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	24	
	gagtcctgct gacccttctg	20
<210>	25	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	25	
	attttgcacc gtccagtcc	19
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	26	
	atgagatgga gattactgat g	21
<210>	27	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	27	
	gccccgttca cattctgct	19
<210>	28	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	28	
	aactgggccg gaagctct	18
<210>	29	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	

<400> 29	
cttgaacat tccagtgat aca	23
<210> 30	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 30	
cgatgctggc gctgagtac	19
<210> 31	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
ccaccactga cacgttggc	19
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	
gcgggaaatc gtgcgtgaca	20
<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
gatggagttg aaggtagttt cg	22
<210> 34	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	
tgaccctgag atggctgtca cc	22
<210> 35	

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 agcaacgata cccagtttgt ct 22
 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 gccgtgtgcc agaggcgcat gt 22

 <210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 aatgtccaca gtcactcgcc ac 22
 <210> 38
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 tgctggaggt gcgcgcctac aag 23
 <210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 gtagaatatcg ccctcgctct tg 22