

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2007-0099550 (43) 공개일자 2007년10월09일
(51) Int. Cl. <i>C12N 5/06</i> (2006.01) <i>C12N 5/08</i> (2006.01) <i>C12N 5/02</i> (2006.01) <i>C12N 5/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-7011777 (22) 출원일자 2007년05월23일 심사청구일자 없음 번역문제출일자 2007년05월23일 (86) 국제출원번호 PCT/US2005/038500 국제출원일자 2005년10월25일 (87) 국제공개번호 WO 2006/047569 국제공개일자 2006년05월04일 (30) 우선권주장 60/622,318 2004년10월25일 미국(US)	(71) 출원인 셀러랜트 세라퓨틱스 인코퍼레이티드 미국 94070 캘리포니아주 산 카를로스 인더스트리얼 로드 1531 (72) 발명자 퐁 티모시 씨 미국 94556 캘리포니아주 모라가 샌드링햄 사우스드라이브 170 도넨 아드리아누스 게르트루디스 빌헬무스 미국 85716 애리조나주 투손 이스트 레스터 스트리트 2921 크리스텐슨 줄리 린 미국 95006 캘리포니아주 볼더 크릭 로건 크릭 로드 200 (74) 대리인 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 골수형 세포군의 증량 방법 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 골수 선조 세포의 성장 및 증량을 촉진하는 싸이토카인 및 성장 인자의 혼합물을 함유하는 배지에서 초기 세포군을 배양함으로써 골수 선조 세포를 증량하는 방법에 관한 것이다. 증량된 세포군은 골수말소 요법 및 조혈 줄기 세포 이식에 적용된 환자에서 발생하는 호중구감소증 및/또는 혈소판감소증에 대한 치료로서의 세포의 공급원을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 포유류 숙주에서의 일시적 조혈 재건을 위한 치료 조성물의 제조 방법:

- a) 사이토카인 및 성장 인자 혼합물을 함유하는 배양 배지에서 조혈 줄기 세포를 포함하는 출발 세포군을 생체 외 배양하여 상기 세포군 내에 골수형 전구 세포를 증량시키는 단계; 및
- b) 포유동물 숙주에 대한 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 배지에 상기 골수형 전구 세포를 재분산시키는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 재분산 단계 전에, 상기 증량된 골수형 전구 세포를 냉동보존하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 출발 세포군이 사전에 냉동보존되는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 출발 세포군이 풍부화된 조혈 줄기 세포인 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 출발 세포군이 정제된 조혈 줄기 세포인 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 정제된 조혈 줄기 세포가 분리된 CD34+ CD90+ 세포인 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포가 동종타생 공여자 유래인 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조혈 줄기 세포가 다수의 동종타생 공여자 유래인 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 동종타생 공여자가 서로에 대해 MHC 에서 적어도 부분적으로 미스매치된 것인 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 동종타생 공여자가 서로에 대해 MHC 에서 전부 미스매치된 것인 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 상기 배양 배지가 화학적으로 규정된 것인 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 사이토카인 및 성장 인자 혼합물이 조성 SCF, FL 및 TPO 를 갖는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 사이토카인 및 성장 인자 혼합물이 IL-3, IL-6 또는 IL-11, 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 추가적인 인자를 갖는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물이 조성 SCF, FL, TPO 및 IL-3 을 갖는 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 골수형 전구 세포가 상기 재분산 단계 전에 증량된 세포군으로부터 분리되는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 분리된 골수형 전구 세포가 일반 골수형 전구 세포인 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서, 분리된 골수형 전구 세포가 과립구/마크로파지 전구 세포인 방법.

청구항 18

제 15 항에 있어서, 분리된 골수형 전구 세포가 거핵세포/적혈구 전구 세포인 방법.

청구항 19

하기 단계를 포함하는, 비-골수형 세포의 실질적으로 순수한 군을 함유하는 치료 조성물의 제조 방법:

제 1 항의 방법으로 골수형 전구 세포를 증량시키고, 증량된 세포군으로부터 상기 골수형 전구 세포를 제거하고, 포유동물 숙주에 대한 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 배지에 잔류한 비-골수형 세포를 재현탁시키는 단계.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 분리된 비-골수형 세포가 단기 조혈 줄기 세포를 함유하는 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항의 방법으로 수득되는 증량된 골수형 전구 세포를 함유하는 치료 조성물.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 골수형 전구 세포가 증량된 배양물 중의 총 세포의 약 75% 이상을 포함하는 치료 조성물.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 상기 골수형 전구 세포가 증량된 배양물 중의 총 세포의 약 85% 이상을 포함하는 치료 조성물.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 상기 골수형 전구 세포가 증량된 배양물 중의 총 세포의 약 95% 이상을 포함하는 치료 조성물.

청구항 25

제 21 항에 있어서, 세포가 인간 세포인 치료 조성물.

청구항 26

세포의 증량된 골수형 전구 세포를 함유하는 치료 조성물로서, 상기 골수형 전구 세포가 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물인 조성물.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 상기 증량된 골수형 전구 세포가 냉동보존 배지에 냉동보존되어 있는 치료 조성물.

청구항 28

제 26 항에 있어서, 상기 증량된 골수형 전구 세포가 약제학적으로 허용되는 담체에 현탁된 치료 조성물.

청구항 29

제 26 항에 있어서, 동종타생 골수형 전구 세포가 MHC 에서 적어도 부분적으로 미스매치된 치료 조성물.

청구항 30

제 26 항에 있어서, 동종타생 골수형 전구 세포가 MHC 에서 전부 미스매치된 치료 조성물.

청구항 31

제 26 항에 있어서, 동종타생 골수형 전구 세포가 분리된 일반 골수형 전구 세포인 치료 조성물.

청구항 32

제 26 항에 있어서, 동종타생 골수형 전구 세포가 분리된 과립구/마크로파지 전구 세포인 치료 조성물.

청구항 33

제 26 항에 있어서, 동종타생 골수형 전구 세포가 분리된 거핵세포/적혈구 전구 세포인 치료 조성물.

청구항 34

제 21 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 치료 조성물을 해당 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 조혈 부전을 앓는 인간 환자의 치료 방법.

청구항 35

제 34 항에 있어서, 분리된 HSC 세포의 병용 투여를 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제 34 항에 있어서, 상기 환자에게 하나 이상의 항바이러스 화합물, 항진균 화합물, 항박테리아 화합물, 싸이토카인 또는 성장 인자를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

제 34 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 환자가 조혈 줄기 세포 (HSC) 이식받은 방법.

청구항 38

제 37 항에 있어서, 증량된 골수형 전구 세포가 HSC 이식에 후속하여 투여되는 방법.

청구항 39

제 37 항에 있어서, 증량된 골수형 전구 세포가 HSC 이식과 동시에 투여되는 방법.

청구항 40

제 34 항에 있어서, 상기 인간 환자가 호중구감소증을 앓는 중인 방법.

청구항 41

제 40 항에 있어서, 상기 증량된 골수형 전구 세포가 호중구감소증과 연관된 합병증 치료를 위한 치료 조성물과 투여되는 방법.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 치료 조성물이 항바이러스 화합물, 항진균 화합물 및 항박테리아 화합물의 하나 이상을 함유하는 방법.

청구항 43

제 41 항에 있어서, 치료 조성물이 G-CSF 를 함유하는 방법.

청구항 44

제 41 항에 있어서, 치료 조성물이 GM-CSF 를 함유하는 방법.

청구항 45

제 34 항에 있어서, 상기 인간 환자가 저혈소판혈증을 앓는 방법.

청구항 46

제 45 항에 있어서, 상기 증량된 골수형 전구 세포가 저혈소판혈증과 연관된 합병증 치료를 위한 치료 조성물에 부속적으로 투여되는 방법.

청구항 47

제 46 항에 있어서, 치료 조성물이 항바이러스 화합물, 항진균 화합물 및 항박테리아 화합물의 하나 이상을 함유하는 방법.

청구항 48

제 46 항에 있어서, 치료 조성물이 혈소판 제제를 함유하는 방법.

청구항 49

제 46 항에 있어서, 치료 조성물이 EPO 를 함유하는 방법.

명세서

- <1> 1. 관련 출원에 대한 상호 참조
- <2> 본 출원은 출원 일련 번호 제 60/622,318 호인, 2004 년 10 월 25 일에 출원된, 발명의 명칭이 "(Methods of Expanding Myeloid cell populations and Uses Thereof)" 인 출원에 대해 35 U.S.C. § 119(e) 에 따라 권익을 청구하며, 그의 개시 내용은 본원에 전부 참고문헌으로 포함된다.
- <3> 2. 기술분야
- <4> 본 개시내용은 조혈기관 계통의 단기간 재건을 위한 조성물 및 방법, 및 악화되거나 또는 말소된 조혈과 관련된 상태의 치료를 위한 그의 용도에 관한 것이다.
- <5> 3. 도입부
- <6> 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 은 각종 혈액학적 악성종양에 대한 표준 요법이며, 일부의 경우, 특히 화학요법이 듣지 않는 경우 유일한 실행가능한 치료 선택사항이다. 골수, 말초혈 또는 제대혈이 조혈 줄기 세포 (HSC) 의 전형적인 공급원으로서 제공되나, 말초혈 유래의 세포는 더욱 신속한 접목 특징을 나타내며, 싸이토카인 G-CSF, GM-CSF, 또는 세포감소 약물을 이용한 공여자의 치료에 의해 동원될 수 있다. 제대혈은 쉽게 이용가능하며, 이식편 대 숙주 질환의 더 낮은 발생빈도를 나타내나, 지연되는 접목을 특징으로 한다. 이식 전에, 갖고 있는 질환을 치료하고 수령자로 하여금 공여자 HSC 의 접목에 적합하도록 하기 위해 골수말소 (myeloablative) 투여량의 화학요법 및/또는 방사선 조사를 수령자에 제공한다.
- <7> 일반적으로, 두 가지 유형의 HSCT 가 있다: 자가 및 동종타생. 자가 이식은 수령자 자신의 세포의 융합에 후속하여 골수말소 처리를 수반한다. 자가 세포 이식은 이식편 대 숙주 질환 (GVHD) 의 위험을 최소화하며, 그 결과 합병증이 줄어든다. 골수말소제를 이용하는 화학요법이 HSC 제제 중에 악성종양 제거에 이용되므로, 질환이 화학요법에 무응답성인 경우 자가이식은 문제가 된다. 동종타생 이식에는, 일반적으로 수령자의 MHC 에 맞는 공여자를 이용하는 공여자 줄기 세포의 주입을 수반한다. 동종타생 이식의 한 가지

장점은 악성종양 세포에 대응하여 발생할 수 있는 동반 세포-매개 이식편 대 숙주 반응이다. 그러나, 매치되는 (matched), 유연관계가 없는 공여자 (MUD) 이식은 또한 더욱 강력한 이식편 대 숙주 반응과 연합되므로, 더 높은 치사율을 초래한다.

<8> 골수말소 요법 및 HSCT 과 관련된 몇가지 부가되는 합병증이 있는데, 가장 눈에 띄는 것은 호중구감소증 및 저혈소판혈증이다. 두 상태 모두, 각각의 장애와 연관된 최종 분화된 골수형 세포를 적합하게 벌출할 조혈기관 계통의 무능 및 조혈 부전으로부터 초래된다. 호중구감소증 및 저혈소판증은 또한 조혈 부전의 다른 원인들, 예컨대 치사량의 이온화 조사 (ionizing radiation) 에 대한 의도하지 않은 노출, 유전적 면역결핍, 골수에 영향을 주는 바이러스 감염 및 대사 장애 (예를 들어, 비타민 결핍) 으로 인해 발생할 수 있다.

<9> 호중구감소증은 백혈구, 특히 호중구의 비정상적인 적은 갯수를 특징으로 하는 상태이며, 이는 수명이 짧고 말초혈 중 백혈구에 대해 가장 빈번하다. 호중구 및 기타 다형핵 백혈구는 각종 케모카인의 작용을 통해 감염 부위로 이동하여 감염원에 대한 중요한 면역 응답성을 제공한다. 이식 후 조혈기관 계통의 회복에 필요한 기간 동안, 이식 수령자는 낮은 수준의 순환 호중구를 가져, 박테리아 및 진균 감염, 특히 일반적으로 있는 미생물들, 예컨대 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 및 아스페르길루스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*) 에 의한 기회 감염에 쉽게 걸린다. 지속되는 호중구감소증, 특히 공여자 HSC 의 지연된 접목 (engraftment) 으로 인한 것은 감염 가능성을 증가시키고, 높은 치사율과 연관된다.

<10> 호중구감소증에 대한 한 가지 표준 요법은 G-CSF 의 투여이다. 상기 사이토카인은 과립구 발생을 촉진하며, 또한 호중구의 면역 효과기 응답성을 증강시킨다. G-CSF 는 조혈 줄기 세포 이식 후 회복을 가속시키나, 환자에서의 적은 수의 응답성 조혈 줄기 세포때문에, HSCT 의 부재 하에서의 높은 투여량의 화학요법으로 치료한 환자에 대해서는 유효하지 않을 수 있다.

<11> 또다른 치료 접근법은 감염에 대한 보호를 위해 임시적인 측정자로서 호중구 (과립구 이동주입 (granulocyte transfusion)) 을 수반한다. 공여자에게 G-CSF 또는 GM-CSF 를 처리한 후, 세포를 말초혈의 백혈구분반술 (leukapheresis) 로 수집하고, 수령자에게 투여하여, 순환 호중구 순환을 상승시킨다 (참고문헌은, 예를 들어, Lin, Y-W 등, J. Clin. Microbiol. 41 (10): 4892-4893 (2003)). 상기 방법으로 치료되는 대상체는 증가된 생존율을 보이나, 이식 후 분화된 호중구의 짧은 수명 기간 또는 호중구 활성화에 대한 저장의 부정적 효과 때문에 상기 접근법의 임상적인 효능은 불분명한 것으로 판명된다 (McCullough, J. 등, Transfusion 23(1): 20 (1983)). 더욱이, 호중구 이동주입 (transfusion) 의 효능은 투여된 세포의 갯수와 상관관계가 있으므로, 일반적으로 매치되는 (matched) 형제자매 또는 절반이 매치되는 (haplomatched) 부모 유래의 공여자 세포의 제한된 이용가능성 및 세포 저장 불가능성은 상기 접근법의 일반적인 적용능을 제한할 수 있다.

<12> 저혈소판혈증은 골수형 계통의 또다른 말단 분화 세포, 거핵세포와 연관된 상태이며, 비정상적으로 낮은 혈소판 수준을 특징으로 한다. 혈소판은 혈액 응고 과정에 핵심적이며, 혈관으로부터 혈구의 누출을 방지하기 위해 필요하다. 정상 미만의 혈소판 수준은 출혈의 위험을 증가시키는 결과를 초래하며, 혈소판 수준이 일정 수준 미만으로 떨어질 경우 자발적인 출혈을 초래할 수 있다. 저혈소판증은 악화된 혈소판 생산 및/또는 증가된 제거 속도로 인해 발생할 수 있다. HSCT 설정에서의 저혈소판혈증의 발생은 거핵세포의 악화된 발생으로 초래되며, HSC 의 지연된 접목, 감염으로 인한 합병증 및 GVHD 의 발생으로 인해 늘어난다. 호중구감소증에서와 같이, 생명을 위협하는 임의의 골수말소 치료 후 합병증을 최소화하기 위해 저혈소판혈증의 관리의 중요하다.

<13> 혈소판 이동주입 (Platelet transfusion) 은 저혈소판증 치료를 위한 일상적인 요법이며, 낮은 혈소판 수준과 연관된 심각한 출혈 문제 경감에 유효하다. MHC 가 매치되는 (MHC-matched) 공여자 유래의 혈소판의 이용은 공여자 혈소판에 대한 임의의 부정적인 면역 응답성을 최소화한다. 그러나, 감염과 저혈소판혈증의 연계성은 호중구감소증이 혈소판감소증 상태를 악화시킬 수 있다는 점을 시사하여, 상기 환자에서는 더욱 빈번한 이동주입 (transfusion) 이 필요하다. 추가로, 호중구감소증 치료를 위한 G-CSF 요법의 이용은 저혈소판혈증에 대해서는 제한되는데, 이는 G-CSF 투여에 비례하여 가속되는 혈소판 파괴 때문이다.

<14> 호중구감소증에 대한 면역 보호 세포의 주입 및 저혈소판증에 대한 혈소판의 이동주입 (transfusion) 이 상기 상태의 치료를 위한 실행가능한 접근법으로 남아있지만, 보호 기간을 늘리고, 호중구감소증에 대해서는, 투여를 위한 세포의 더욱 한결같은 공급이 가능하도록 할 것이 요망된다. 더욱이, 두 장애 모두에 대한, 분리된 것 보다는 동시적인 접근이 가능한 치료법이 상기 조혈 부전의 합병증 관리를 개선시킬 것이다.

<15> 4. 개요

- <16> 본 발명의 개시는 조혈 부전으로 인한 합병증의 치료에 유용한 조성물 및 방법을 기재한다. 대상체에서 골수형 계통의 최종 분화 세포 생산에 대한 무능력은 다수의 생명을 위협하는 상태, 가장 눈에 띄게는 호중구감소증 및 저혈소판혈증을 유도한다. 상기 상태와 연관된 세포군의 일시적 치환으로 환자의 내재적 또는 재건 조혈기관 계통이 재생할 수 있으므로, 상기 시간까지는 분화된 골수형 세포의 결핍으로 인해 발생하는 합병증이 완화되거나 또는 방지된다.
- <17> 따라서, 한 국면에서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 포유류 숙주에서의 조혈 재건을 위한 골수형 전구 세포의 치료 조성물의 제조 방법을 제공한다: a) 조혈 줄기 세포를 포함하는 출발 세포군을 적합한 배양 배지에서 생체의 배양하여, 상기 세포군을 증량시키고 상기 세포군 내의 골수형 전구 세포의 수를 증가시키는 단계; 및 b) 포유류 숙주 투여에 적합한 약제학적으로 허용되는 배지에 상기 골수형 전구 세포를 재현탁시키는 단계. 유리하게는, 본원에서 증명되는 바와 같이, 초기 세포군은 한 동종타생 공여자로부터 유도될 수 있거나, 또는 더욱 바람직하게는 다수의 동종타생 공여자로부터 유도될 수 있어, 생체외에서 증량된, 한 공여자 또는 다수의 공여자로부터 수득되는 동종타생 골수형 전구 세포를 제공한다. 공여자는 서로 유연관계가 있거나 또는 유연관계가 없을 수 있으며, 이식 설정에서, 수령자에 대해 유연관계가 있거나 또는 유연관계가 없을 수 있다.
- <18> 놀랍게도, 본원에서 추가로 증명되는 바와 같이, 본 발명의 발명자들은 본 발명의 증량된 골수형 전구 세포가 증량 후 냉동보존될 수 있고, 과립구/마크로파지 선조를 포함하여, 치료 설정에서 조혈 재건시 그의 관능을 여전히 유지할 수 있다고 판단했다. 참고문헌, 예를 들어, U.S. 특허 제 5,004,681 호를 참조하면 조혈 줄기 세포가 냉동보존 후에도 그의 관능을 유지하는 것으로 공지되어 있긴 하지만, 그의 더욱 분화된 후손들은 균일하게 성공적이진 않았고, 이에 따라 임상에서 세포-기재 요법으로서 그의 실용적인 수행은 번잡하다. 본원에서 제공되는 증량된 골수형 선조는 상기 유리한 특징이 있으며, 바람직한 구현예에서, 재현탁 및 환자에 대한 투여 전에 냉동보존된다.
- <19> 증량을 위한 초기 세포군은 말초혈, 동원된 말초혈, 탭줄 제대혈, 골수 및/또는 조혈 줄기 세포가 있는 것으로 공지된 기타 장기, 예컨대 태아 간으로부터 유도될 수 있다. 특히 풍부화되거나 또는 실질적으로 순수한 군으로서, 원하는 세포 마커 표현형결정을 기준으로 세포군은 공급원으로부터 수득된 세포 또는 분리된 세포의 혼합물일 수 있다 (예를 들어, CD34+ 및/또는 CD90+ 및/또는 AC133+ 및/또는 ALDH+ 세포). 바람직하게는, 출발 세포군은 세포 마커 CD34+ 또는 CD90+ 의 존재를 기준으로 하여 HSC 가 풍부하며; 더욱 바람직하게는, 출발 세포군은, 특히 인간 골수형 전구 세포의 증량에 대해, CD34+ 및 CD90+ 두가지 모두인 정제된 HSC 이다. 추가 구현예에서, 세포는 또한 세포 마커 표현형 Lin^{neg/low} 을 갖는다.
- <20> 또다른 국면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 수득되는 증량된 골수형 전구 세포를 포함하는 치료 조성물을 제공한다. 한 구현예에서, 치료 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 내에 증량된 골수형 전구 세포를 포함하거나 또는 실질적으로 이것으로 이루어진다. 또다른 구현예에서, 치료 조성물은 냉동보존 매질 중에 냉동보존된 증량된 골수형 전구 세포를 포함하거나 또는 실질적으로 이것으로 이루어진다. 바람직한 구현예에서, 증량된 골수형 전구 세포는 동종타생이며, 더욱더 바람직하게는, 증량된 골수형 전구 세포는 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물이다. 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물은 MHC 에 하나 이상의 부분적 미스매치를 포함할 수 있는데, 여기서 MHC 미스매치는 여러 공여자들의 MHC 사이에서, 또는 공여자와 수령자 사이에 있거나, 또는 MHC 에서 전부 또는 완전히 미스매치이다. 따라서, 상기 동종타생 세포의 혼합물은 일부 세포들 사이에서 MHC 에서의 부분적 미스매치 및 동 군에서의 다른 세포들 사이에서의 완전한 미스매치를 포함할 수 있다. 특별한 구현예에서, 일시적인 접촉 하에 있는 전구 세포 (예를 들어, 골수형 계통에서 조기에 나타나는 전구세포군) 는 MHC 에서 매치 또는 부분적 미스매치가 있게 되도록 선택되며, 더 분화된 전구 세포는 MHC 에서 부분적 또는 전부 미스매치가 있다.
- <21> 추가 구현예에서, 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물은 분리된 세포들의 혼합물이다. 여기에는, 분리된 CMP, 분리된 GMP, 분리된 MEP, 또는 이들의 조합이 포함된다. 혼합물에 대한 세포는 미증량 골수형 전구 세포로부터, 또는 본원에 기재된 생체의 증량된 세포 배양물로부터 수득될 수 있다. 동종타생 증량 세포의 혼합물에 대해, 동종타생 세포는 증량 전 또는 증량에 후속하여 혼합될 수 있다.
- <22> 또다른 국면에서, 본 발명의 개시는 배양 중 그의 생체의 증량을 통한 골수형 전구 세포의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 골수형 전구 세포를 생산할 수 있는 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 (HSC) 는, 골수형 전구 세포의 증량을 지지하는 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물을 함유하는 배양 배지와 접하며, 이어서 세포는 그의 증량을 촉진하는 적합한 조건 하에 배양된다. 생체의 증량 목적에 적합한 싸이토카인은 IL-1 (예를 들

어, IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF, 및 이들의 유사체들로부터 선택된다. 생체의 증량 목적에 적합한 성장 인자는 c-kit 리간드 (SCF 또는 SF), FLT-3 리간드 (FL), 트롬보포이에틴 (TPO), 에리트로포이에틴 (EPO) 및 이들의 유사체들로부터 선택된다. 본원에 사용된 바와 같이, 유사체에는 자연 발생 형태의 특징적인 생물학적 활성을 가진 싸이토카인 및 성장 인자의 변이체가 포함된다.

<23> 바람직한 구현예에서, 배지는 기조직 세포 (stromal cell) 또는 기타 피더 세포 (feeder cell) 와 같은 세포-기재 증량 물질을 포함하는, 미규정 (정성적으로 또는 정량적으로) 성분이 없는, 화학적으로 규정된 배지이다.

현저하게, 상기 물질들의 포함은 제조 및 조절 측면에서 문제가 될 수 있는데, 원하는 세포 유형을 적절하게 증량시키는 화학적으로 규정된 대체물의 선별 및 개발이 본 발명의 또다른 현저한 기여를 나타낸다.

<24> 한 구현예에서, 그의 베이스 조성물 중 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물에는 줄기 세포 인자 (SCF), FLT-3 리간드 (FL) 및 트롬보포이에틴 (TPO) 이 있다. 바람직한 구현예에서, 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물에는 추가적으로 IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, GM-CSF 및 이들의 조합, 특히 IL-3, IL-6, IL-11 및 이들의 조합으로부터 선택되는 추가적인 싸이토카인이 있다. 이에 따라, 한 구현예에서, 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물은 조성이 SCF, FL, TPO 및 IL-3 이며, 또다른 구현예에서, 혼합물은 조성이 SCF, FL, TPO 및 IL-6 이다. 추가적인 싸이토카인의 한 가지 조합이 IL-6 및 IL-11 여서, 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물의 조성은 SCF, FL, TPO, IL-6 및 IL-11 이다.

<25> 싸이토카인 및 성장 인자의 형태는 그의 자연 발생 생성물, 재조합 생성물, 변이체 또는 유사체, 또는 자연 발생 형태와 동일한 생물학적 활성을 갖는 개질된 형태이다. 싸이토카인은 증량에 이용되는 세포 상에서 활성이 되도록 선택되며, 이에 따라, 형태들 간의 상호-반응성이 각종 싸이토카인 및 성장 인자에 대해 공지되어 있고 즉시 시험가능하므로 싸이토카인의 형태와 세포의 기원 사이의 상기 상관성이 꼭 들어맞는 것은 아니지만, 그의 공급원은 일반적으로 증량에 이용되는 초기 세포의 기원을 반영한다. 이에 따라, 한 구현예에서, 사용되는 싸이토카인은 재조합 인간 (rhu) rhuIL-1 (예를 들어, rhuIL-1 β), rhuIL-3, rhuIL-6, rhuIL-11, rhuG-CSF, rhuGM-CSF 또는 이들의 유사체이다. 유사하게, 사용되는 성장 인자는 재조합 인간 rhuSCF, rhuFL, rhuTPO, rhuEPO, 또는 이들의 유사체이다.

<26> 출발 세포군은 골수형 전구 세포의 정해진 수준까지의 증량을 지지하는 조건 하에 배양된다. 본 발명에 따라 수득되는 증량된 골수형 전구 세포는 일반적으로 일반적인 골수형 전구 세포 (CMP), 과립구/마크로파지 전구 세포 (GMP) 및 거핵세포/적혈구 전구 세포 (MEP) 를 포함한다. 이에 따라, 한 국면에서, 생체의 증량된 배양물은 CMP 세포군이 약 5 배 이상, 약 10 배 이상, 약 20 배 이상, 또는 약 30 배 이상 증량된, 증량된 CMP 를 포함한다. 최종 세포 배양 제제에서 (예를 들어, 세포 수합시), 증량된 배양물은 배양물 중 총 세포의 약 0.5% 이상, 약 1 % 이상, 약 2% 이상, 약 5% 이상, 및 약 10% 이상인 CMP 군을 포함한다.

<27> 또다른 국면에서, 생체의 증량된 배양물은 GMP 세포군이 약 10 배 이상, 약 20 배 이상, 약 40 배 이상, 바람직하게는 약 80 배 이상 증량된 GMP 를 포함한다. 최종 세포 배양물 제제에서, 증량된 배양물은 배양물 중 총 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 바람직하게는 약 50% 이상인 GMP 군을 포함한다. 배양물 중 MEP 세포군은 약 0.1 배 이상, 약 2 배 이상, 약 5 배 이상 및 약 10 배 이상 증량된다. 최종 세포 배양물 제제에서, 증량된 배양물은 배양물 중 최종 세포의 약 0.5% 이상, 약 1 % 이상, 약 2% 이상, 약 5% 이상인 MEP 세포군을 포함한다.

<28> 종합하면, 최종 세포 배양물 제제에 조합되는 총 골수형 전구 세포는 증량된 배양물 중 총 세포의 약 25% 이상, 약 40% 이상, 더욱 바람직하게는 약 50% 초과, 더욱더 바람직하게는 약 60% 또는 70% 이상, 가장 바람직하게는 약 80% 또는 90% 이상, 이상적으로는 약 95% 이상이다.

<29> 생체의 증량으로 제조된 세포는 약제학적으로 허용되는 담체에 재현탁되어 직접 사용될 수 있거나, 또는 대안적으로는 당업자가 이용가능한 각종 세포 정제 기법, 예컨대 FACS 분류, 자력 친화성 분리 및 면역친화성 컬럼에 의한 프로세싱에 적용될 수 있다. 증량된 배양물로부터 분리된 세포군에는, 다른 것들 중에서도 특히, 분리된 골수형 전구 세포, 분리된 CMP, 분리된 GMP 및 분리된 MEP 가 포함된다. 바람직하게는, 분리된 세포군은 실질적으로 순수한 세포군이다.

<30> 본원에 기재된 세포는 치료 및 비-치료 설정에서 각종 적용성을 갖는다. 치료 적용에서, 세포는 조혈이 약화되거나 또는 제거된 대상체의 치료에 사용된다. 세포는, 예컨대 조혈 부전과 연관된 불리한 상태의 발생을 경감시키는 예방 차원에서 또는 조혈 부전과 연관된 합병증을 이미 앓는 대상체의 치료를 위해, 치료적인 이득을 제공하기에 충분한 양으로 대상체에 투여된다. 추가 국면에서, 세포는 HSCT 와 동시에 또는 이에 후속

될, HSCT 설정에 있는 대상체의 치료에 사용된다.

- <31> 호중구감소증 및 저혈소판혈증은 조혈 부전과 연관되는데, 다른 상황에서도 상기 상태가 발생할 수 있지만, 특히 골수말소 요법 중인 대상체에서 그렇다. 본원에 기재된 세포는, 상기 상태의 발생을 경감시키기 위한 예방 차원으로, 또는 대상체가 상기 상태가 되기 쉬운 경우 상기 상태의 치료에 이용가능하다. 다른 치료 적용과 마찬가지로, 치료 형태의 세포에는 증량 또는 비증량 골수형 전구 세포가 포함된다. 호중구감소증 및 저혈소판혈증이 특이적인 골수형 세포 유형의 불충분함과 상관성이 있으므로, 선택된 세포군은 치료할 특정 상태에 맞춰질 수 있다. 한 구현예에서, 세포는 CMP 로, CMP 가 궁극적으로 호중구 및 거핵세포로 발생되므로, 어떤 상태에든 유용하다. 호중구감소증의 경우, 세포는 GMP 일 수 있는데, 이는 GMP 가 궁극적으로 호중구로 발생되기 때문이다. 저혈소판혈증의 경우, 세포는 MEP 일 수 있는데, 이는 MEP 가 궁극적으로 거핵세포로 발생되기 때문이다. 당업자에게는 자명하듯이, 세포군의 조합은 상기 상태들의 치료 뿐만 아니라 상기 기재된 상태들의 치료에도 적용성이 있는 것으로 발견되었다. 분리된 GMP 및 MEP 의 조합은 호중구감소증 및 저혈소판혈증의 동시 치료에도 유용하다. 상기 조합에 대한 CMP 의 추가는 CMP 의 임시적 접목으로 발생하는 더 연장된 보호 및 후속되는 호중구 및 거핵세포의 생산을 제공해야 한다. 기타 조합에는 호중구감소증이 치료의 주 대상인 경우 CMP 및 GMP 가 포함되며, 저혈소판혈증이 치료의 주 대상인 경우 조합은 CMP 및 MEP 일 수 있다.
- <32> 세포는 당업계에 널리 공지된 방법으로 투여된다. 한 구현예에서, 투여는 정맥내 주입으로 된다. 세포의 투여는 단독적인 투여 또는 연쇄적인 투여를 통해 이루어질 수 있다. 연쇄적인 투여를 수반하는 경우, 각각의 투여에 대하여 상이한 세포수 및/또는 상이한 세포군이 이용될 수 있다. 이에 따라, 한 구현예에서, 첫번째 투여는 즉각적인 치료 이익 뿐만 아니라 더욱 연장되는 유효성을 제공하는 세포군 또는 세포군의 조합 (CMP + GMP + 호중구) 으로 되며, 제 2 투여는 제 1 투여의 치료 유효성을 연장시킬 연장된 유효성을 제공하는 세포 (예를 들어, CMP) 를 포함한다. 이들 및 기타 전략들은 당업자에게 자명하다.
- <33> 추가 구현예에서, 본원에 기재된 골수형 전구 세포는 조혈 부전과 연관된 상태, 및/또는 호중구감소증 및 저혈소판혈증의 합병증 치료에 유효한 기타 치료 화합물과 조합하여 사용된다. 한 구현예에서, 부속적 치료는 대상체에서 이미 진행 중인 기회 감염 또는 감염 방지를 위한 항박테리아, 항진균 또는 항바이러스 화합물이다.
- <34> 또다른 구현예에서, 부속적 치료는 골수형 경로에서 골수형 전구 세포의 분화를 늘리는 골수형 전구 세포의 분화 및 동원을 유도하는 효과를 갖는다. 상기 부속적 치료는 내재적이거나 또는 요법의 일부로서 대상체에 투여될 골수형 전구 세포의 분화 및 동원을 유도하는 효과를 갖는다. 한 구현예에서, 특히 호중구감소증의 치료 또는 예방을 위해, G-CSF 또는 GM-CSF 가 세포 투여와 동시에 또는 그에 후속하여 투여된다. 또다른 부속적 치료는, 특히 저혈소판혈증에 대한 부속적 치료로서, EPO 또는 TPO 의 투여를 수반하는데, 이는 EPO 가 MEK 의 전적혈구모세포 (proerythroblast) 및 성숙 적혈구 세포로의 분화를 유도하며, TPO 가 조혈 줄기 세포 및 초기 골수형 전구 세포의 거핵세포 및 성숙 혈소판으로의 성장 및 분화를 유도하는 것으로 나타났기 때문이다.
- <35> 최종 국면에서, 본 개시는 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물, 증량을 위한 초기 세포, 배지 및 생체의 증량 방법 수행에 필요한 기타 부속물을 포함하는 키트를 제공한다. 호중구감소증 및 저혈소판혈증에 대한 치료 목적과 같은 치료 적용을 위한, 증량 또는 비증량 세포군을 사용하려는 키트가 제공된다. 상기 키트는 추가로, 예시로서 이에 제한되지 않는, 완충액, 표지물, 시약 및 키트 사용 방법에 대한 지시사항을 포함할 수 있다.
- <36> 5. 도면의 간단한 설명
- <37> 도 1 은 (A) 세포군 분류 및 분석, (B) 배양물 중 HSC 유래의 골수형 선조의 유도체, 여기서 배양물 유도성 MP 세포는 새로 만들어 사용될 수 있거나 또는 냉동보존될 수 있음, (C) 진균 공격으로부터 호중구감소 마우스를 보호하기 위한 골수형 선조의 이용을 보여주는 실험 고안의 개요도이다.
- <38> 도 2 는 배양물 중 HSC 유래의 골수형 선조의 유도를 나타낸다.
- <39> 도 3 은 동종타생 배양-유도성 골수형 선조에 의한 호중구감소 마우스의 보호를 나타낸다.
- <40> 도 4 는 새로 만든 것과 냉동보존된 것인 골수형 선조의 비교를 나타낸다.
- <41> 도 5 는 마우스에서의 골수형 선조를 이용한 재건을 나타낸다.
- <42> 도 6 은 배양물-유도성 골수형 선조에 의한 보호의 투여량 응답성을 나타낸다.

- <43> 도 7 은 마우스에서의 골수형 선조를 이용한 유효 보호 시간을 나타낸다.
- <44> 도 8 은 혼합 동종타생 배양-유도성 골수형 선조에 의한 호중구감소 마우스의 보호를 나타낸다.
- <45> 도 9A 는 MHC 가 완전히 미스매치된 동종타생 배양된 선조 및 탐지가능한 공여자 키메라 (도 9B) 의 방사선조사 피해보호 능력을 나타낸다.
- <46> 도 10 은 새로 만든 것과 냉동된 것인, MHC 이 완전히 미스매치된 동종타생 골수형 선조로 이식된, 치사량으로 방사선 조사된 마우스에서의 30 일 경과 방사선조사피해보호를 나타낸다.
- <47> 도 11A 및 B 는 7 ml AFC 주머니 및 플라스크에서 인간 증량 데이터를 나타낸다.
- <48> 도 12 는 성장 인자로 처리된 인간 골수형 선조 배양물의 사진을 나타낸다.
- <49> 도 13 은 7 ml AFC 주머니에서의 인간 증량 데이터를 나타낸다.
- <50> 도 14 는 72 ml AFC 주머니에서의 인간 증량 데이터를 나타낸다.
- <51> 도 15 는 인간 골수형 선조의 집락 형성을 나타낸다.
- <52> 도 16 은 줄기 및 선조군에 대한 인간 골수형 선조 배양물의 FACS 분석을 나타낸다.
- <53> 도 17 은 단독적 및 인간 골수형 전구 세포와 조합된 IL-3 및 IL-6 의 영향을 나타낸다.
- <54> 도 18 은 IL-3, IL-6 또는 조합된 골수형 선조 배양물의 집락 형성 검정 결과를 나타낸다.
- <55> 도 19 는 IL-3, IL-6 또는 조합된 골수형 선조 배양물에서의 CFU 의 절대적 갯수를 나타낸다.
- <56> 도 20 은 G-CSF 에 대한 인간 골수형 전구 세포의 응답성을 나타낸다.
- <57> 도 21 은 생체 내에서 G-CSF 에 대한 인간 골수형 전구 세포의 응답성을 나타낸다.
- <58> 도 22 는 이식 1 주 후 인간 MPc 의 접목 및 C-CSF 에 대한 그의 응답성을 나타내는 마우스 골수 및 비장의 FACS 분석이다.
- <59> 도 23 은 NOD/SCID 마우스에서의 인간 배양-유도성 골수형 선조의 FACS 표현형이다.
- <60> 6. 바람직한 구현예의 상세한 설명
- <61> 악성종양 질환에 대한 골수말소 요법 및 조혈 줄기 세포 이식, 화학요법 이후, 또는 높은 투여량의 이온화 방사선조사에 대한 의도하지 않는 노출의 결과로서 발생하는, 호중구감소증 및 저혈소판혈증과 같은 결핍되거나 또는 부전된 조혈계와 관련된 상태의 치료에 유용한 세포 생산 방법을 기재한다. 본원에 기재된 증량된 세포는 초기의 줄기 세포 및 전구 세포의 군과 수임 골수형 전구 세포의 발생을 허용하는 규정된 사이토카인 및 성장 인자 혼합물의 접촉으로 생성되는 수임 골수형 전구 세포 (MP) 를 포함한다. 정해진 배양 조건 하에, 골수형 전구 세포는 바람직하게는 정의된 수준으로 증량한다. 증량된 세포는 그 전부가 사용되거나, 또는 정해진 세포 마커 표현형 및 특징적인 분화 잠재성을 가진 분리된 세포를 제공하기 위한 정제에 적용된다. 분리된 세포군에는 일반적인 골수형 선조 (CMP), 과립구/마크로파지 선조 (GMP), 거핵세포/적혈구 선조 (MEP) 및 이들의 조합이 포함된다. 상기 수임 골수형 전구 세포의 면역결핍 환자로의 주입은 단기간 접목 및/또는 골수형 계통 세포의 최종 분화 세포의 생산을 제공한다. 이는 임시적이긴 하나 최종 분화된 세포, 특히 호중구 및 거핵세포의 연장된 보충을 제공함으로써, 결핍된 조혈 기간을 보충한다.
- <62> HSCT 분야에서, 증량 기법은 주로 이식 목적의 조혈의 영구적인 회복을 위한 HSC 의 군을 증가시키기 위한 것이었다 (Devine, S. M. 등, Bone Marrow Transplantation, 31 :241-252 (2003); Henschler, R. 등, Blood 84(9): 2898-2903 (1994); Bhatia, M. 등, J. Exp. Med. 186:619-624 (1997)). 사용되는 사이토카인 및 성장 인자의 조합은 일반적으로, 골수형 및 림프구 계통의 수임 세포로의 그들의 분화를 제한하면서 HSC 의 바람직한 증량을 초래하려는 것이다. HSCT 의 측면에서 증량되는 HSC 의 갯수는 특히 연관성이 있는데, 이는 주입된 세포의 접목 특성 및 이식 수령자의 생존이, 특히 공여자 및 수령자의 MHC 에서 미스매치가 있는 경우, 주입된 HSC 의 갯수 증가와 상관관계가 있기 때문이다 (Ketterer N. 등, Blood 91 :3148-3155 (1998)). 줄기 세포의 분화를 유도하는 배양 조건은 바람직하지 않은데, 이는 적은 수의 HSC 가 생산되기 때문이다. HSC 는 자가-증식 (self-renewing) 역량을 가졌으므로, 자가-벌충 HSC 군에 대한 선택을 위한 일부의 경우 장기간 배양이 이용된다 (Piacibillo, W. 등, Blood 93(11): 3736-3749 (1999)).

- <63> 대조적으로, 수임 골수형 전구 세포는 자가 개인 역량이 제한되거나 또는 아예 없으며, 이에 따라 HSC 증량에 적합한 배양 조건은 상기 세포의 증량에 최적인 것은 아니다. 한편, 배양된 세포의 최종 분화된 세포 (예를 들어, 호중구 및 거핵세포) 로의 신속한 발생을 촉진하는 사이토카인의 존재성은 바람직하지 않은데, 이는 상기 증량된 세포군이 골수형 분화 경로의 초기에 발견되는 덜 분화된 전구 세포의 주입에 의해 제공되는 연장되는 보호를 제공하지 않을 수 있기 때문이다 (Reichle, A. 등, Bone Marrow Transplantation 32:299-305 (2003); Zimmerman, T. M. 등, Bone Marrow Transplantation 26: 505-510 (2000); Reiffers, J. 등, Lancet 354:1092-1093 (1999)). 이에 따라, 본원에 기재된 증량 접근법이, MP, 특히 CMP 및 GMP 세포의 갯수를 증가시키면서 HSC 의 생성을 제한한다. 증량된 세포군에 존재하는 HSC 는 원칙적으로 단기 재군집 (repopulating) 조혈 줄기 세포 (ST-HSC) 이며, 일반적으로 10% 미만의 증량된 세포, 더욱 바람직하게는 5% 미만, 전형적으로는 2 내지 5% 범위의 증량된 세포군이다. 증량 방법은 자가 또는 동종타생 이식 설정에 사용되는 세포에 적용가능하다.
- <64> 유리하게는, 증량 및/또는 요법에 이용가능한 세포의 갯수를 더 증가시키고, 널리 임상적인 적용을 상업용으로 실현가능하도록 하기 위해, 본원에 기재된 세포군은 바람직하게는 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물을 포함한다. 전형적으로, 동종타생 세포는, 이식 수령자에서 HSC 의 접목을 지연시킬 수 있는 GVHD 및 숙주-대-이식편 반응의 가능성이 있어 HSCT 에는 사용되지 않는다. 대신에, MHC 에 완전한 또는 부분적인 미스매치가 있는 단일 공여자가 일반적으로 HSC 의 공급원으로 사용된다. 그러나, HSCT 의 맥락에서와는 달리, 숙주의 MHC 와 매치되지 않는 동종타생 수임 골수형 전구 세포의 사용은 그의 치료 유효성에 해가 되지 않는데, 이는 영구적인 접목이 상기 분화된 세포 주입의 목적도 아니며 제공되는 효과도 아니기 때문이다. HSC, 및 특히 장기 재군집 HSC 의 소실은 치료 유효성에 결정적이진 않은데, 이는 호중구감소증 및/또는 저혈소판혈증에 대한 임시적인 보호가 수임 골수형 전구 세포에 의해 제공되기 때문이다. 동종타생 골수형 세포의 혼합물은 증량 또는 비증량 세포로부터 제조될 수 있다.
- <65> 6.1 정의
- <66> 본 발명의 개시를 참조하면, 본원 명세서에 사용된 기술적 용어 및 과학 용어는, 달리 명시되지 않는 한 당업자가 이해하는 일반적인 의미를 갖는다. 따라서, 하기 용어는 하기의 의미를 갖는 것을 의도로 한다:
- <67> "동종타생" 은, 구성원들이 유전학적으로 유연관계가 있거나 또는 유전학적으로 유연관계가 없지만 유전학적으로 유사한 동일 종의 구성원들로부터 유도되거나, 또는 그것을 기원으로 하거나 또는 그의 구성원임을 의미한다. "동종타생 이식" 은 수령자가 공여자와 동일한 종일 때, 공여자로부터 수령자로의 세포 또는 장기의 이전을 의미한다.
- <68> "자가" 는 동일한 대상체 또는 환자로부터 유도되거나 또는 그를 기원으로 함을 의미한다. "자가 이식" 은 대상체 자신의 세포 또는 장기의 수합 및 재주입 또는 이식을 의미한다. 자가 세포의 독목적 또는 보충적 사용은 세포를 숙주에 다시 되돌리는 투여의 다수의 부작용, 특히 이식편 대 숙주 반응을 제거 또는 경감시킬 수 있다.
- <69> 본원에 사용된 "화학적으로 규정된 (Chemically-defined)" 은 해당 배지가 그의 구성원에 미량의 오염물질을 포함할 수 있더라도, 비특징화된 보충물을 고의적으로 첨가하지 않은, 정량적으로나 정성적으로 공지된 화학 조성의 배양 배지를 의미한다. 화학적으로 규정된 배지에는 동물 혈청, 기조직 (stromal) 세포와 같은 피더 (feeder) 세포, 및 예를 들어, 섬유모세포로부터 유도된 세포-기재 세포의 물질 등이 있어서는 안된다.
- <70> "수임 골수형 전구 세포" 또는 "골수형 전구 세포" 는 궁극적으로 골수형 계통의 임의의 최종 분화된 세포로 발생할 수 있으나, 일반적으로 림프구 계통의 세포로는 분화하지 않는 다능성 (multipotent) 또는 단능성 (unipotent) 전구 세포를 의미한다. 따라서, "골수형 전구 세포" 는 골수형 계통의 임의의 전구 세포를 의미한다. 골수형 계통의 수임 전구 세포에는 본원에서 정의된 과분화능 (寡分化能; oligopotential) CMP, GMP 및 MEP 이 포함되나, 단능성 적혈구 선조, 거핵세포 선조, 과립구 선조 및 마크로파지 전구 세포도 포함된다. 상이한 세포군의 골수형 전구 세포는 그의 분화 잠재성 및 세포 마커의 특징적인 설정의 존재 여부에 따라 다른 세포들과 구분된다.
- <71> "수임 림프구 전구 세포" 또는 "림프구 전구 세포" 는 궁극적으로 T 세포, B 세포, NK 세포 또는 림프구 수지상 세포와 같은 림프구 계통의 임의의 최종 분화된 세포로 발생할 수 있으나, 일반적으로 골수형 세포로는 분화하지 않는 과분화능 또는 단분화능 전구 세포를 의미한다. 골수형 계통의 세포와 같이, 림프구 선조의 상이한 세포군은 그의 분화 잠재성 및 세포 마커의 특징적인 설정의 존재 여부에 따라 다른 세포들과 구분된다.

- <72> "일반 림프구 전구 세포" 또는 "CLP" 는 B-세포 선조 (BCP), T-세포 선조 (TCP), NK 세포 및 수지상 세포로 될 그의 역량을 특징으로 하는 과분화능 세포를 의미한다. 상기 전구 세포들은 자가 증식 (self-renewing) 역량이 거의 없거나 또는 아예 없으나, T 림프구, B 림프구, NK 세포 및 림프구 수지상 세포가 될 수 있다.
- <73> "일반 골수형 전구 세포" 또는 "CMP" 는 과립구/단핵구 (GMP) 전구 세포 및 거핵세포/적혈구 (MEP) 전구 세포로 될 역량을 특징으로 하는 세포를 의미한다. 상기 전구 세포들은 자가-증식 역량이 제한되거나 또는 아예 없으나, 골수형 수상체 (dendritic), 골수형 적혈구, 적혈구, 거핵세포, 과립구/마크로파지, 과립구 및 마크로파지 세포가 될 수 있다.
- <74> "유사유전자형" 은, 전형적으로는 단일 유전자 자리 (single genetic locus) (즉, 단일 유전자) 인 작은 유전자 영역을 제외하고 구성원들이 유전자적으로 일치하는, 동일한 종의 구성원이거나, 그것으로부터 기원되거나, 또는 그것으로부터 유도됨을 의미한다. "유사유전자형 이식" 은 단일 유전자 자리를 제외하고 수령자가 공여자와 유전자적으로 일치하는, 공여자로부터 수령자로의 세포 또는 장기의 이전을 의미한다.
- <75> "싸이토카인" 은 자연적 상태에서 세포에 의해 제공되며, 싸이토카인 (즉, 자가분비 인자) 또는 다른 세포를 제공하는 세포의 생리학적 상태에 영향을 주는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 싸이토카인은 또한, 그의 산물이 자연 발생 형태와 일치되거나 또는 유사한 구조 및 생물학적 활성을 갖는, 재조합 또는 합성 프로세스에 의해 제공되는 화합물 또는 조성물을 포함한다. 림프카인은 IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는, 림프구에 의해 자연적으로 제공되는 싸이토카인의 자연, 합성 또는 재조합 형태를 의미한다.
- <76> 세포의 맥락에서 "증량" 은 일치되거나 또는 그렇지 않을 수 있는, 초기 세포군의 특징적인 세포 유형 또는 세포 유형들의 갯수 증가를 의미한다. 증량에 사용되는 초기 세포는 증량으로 생성되는 세포와 반드시 동일한 것은 아니다. 예로, 증량된 세포는 초기 세포군의 성장 및 분화에 의해 생성될 수 있다. 증량이라는 용어에서 제외되는 것은 세포의 분화 잠재성을 특징분석하기 위해 사용되는 제한적인 회석 검정이다.
- <77> 세포의 맥락에서 "관능성" 은 세포가 규정된 관능성 검정 또는 검정들에 의해 동정되는 것과 같은, 특이적인 세포 유형과 연관된 정상적인 관능 또는 활성을 수행할 수 있거나 또는 이를 보유함을 의미한다. 예로, "관능성 GMP 세포" 는, 궁극적으로 과립구 및 마크로파지로 분화할 수 있고, 여기서 최종 분화된 세포가 정상적인 과립구 및 마크로파지로서 기능하는 전구 세포이다.
- <78> "이식편 대 숙주 응답성 (Graft-versus-host response)" 또는 "GVH" 또는 "GVHD" 는 상이한 MHC 클래스의 림프구가 숙주로 도입되었을 때, 숙주에 대항하는 공여자 림프구의 반응이 초래되는 세포성 응답성을 의미한다.
- <79> "과립구/마크로파지 전구 세포" 또는 "GMP" 는 일반 골수형 전구 세포로부터 유도되며, 과립구 및 마크로파지 세포가 되지만, 일반적으로 골수형 계통의 적혈구 세포 또는 거핵세포로는 되지 않는 그의 역량을 특징으로 하는 세포를 의미한다.
- <80> "성장 인자" 는 자연 상태에서 세포 증식, 세포 생존 및/또는 분화에 영향을 주는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 세포에 대한 표시된 유효성을 갖는 성장 인자는 또한, 외부 자극에 대한 분비, 결합, 응답 등과 같은 기타 생리학적 프로세스에 영향을 줄 수 있다. 다수의 성장 인자가 세포에 의해 제조되지만, 본원에 사용되는 성장 인자에는 또한 재조합 또는 합성 프로세스로 제조되는 임의의 화합물 또는 조성물로서, 상기 프로세스의 생성물이 자연 발생 성장 인자와 일치되거나 또는 유사한 구조 및 생물학적 활성을 갖게 되는 화합물 또는 조성물이 포함된다. 성장 인자의 예시에는, 상피 성장 인자 (EGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 에리트로포이에틴 (EPO), 트롬보포이에틴 (TPO), 줄기 세포 인자 (SCF) 및 flt-3 리간드 (FL) 및 이들의 유사체가 포함된다.
- <81> "분리된" 은, 자연발생적인 것이든 또는 합성된 것이든, 그의 자연 발생 상태와 연관된 하나 이상의 다른 생성물, 화합물 또는 조성물로부터 분리된 생성물, 화합물 또는 조성물을 의미한다.
- <82> "조혈 줄기 세포" 또는 "HSC" 는, 궁극적으로 B 세포, T 세포, NK 세포, 림프구 수지상 세포, 골수형 수지상 세포, 과립구, 마크로파지, 거핵세포 및 적혈구 세포를 포함하는 조혈기관 계통의 모든 세포 유형으로 분화할 수 있는 클론원성, 자가증식형 다능성 세포를 의미한다. 조혈기관 계통의 다른 세포들과 마찬가지로, HSC 는 일반적으로 세포 마커의 특징적인 설정의 존재로 인해 규정된다. HSC 의 맥락에서 사용되는 경우 "풍부화" 는, 일반적으로는 CD34+ 인 단독 세포 마커의 존재를 기준으로 선택되는 세포군을 의미하며, HSC 의 맥락에서 "정제된" 은 바람직하게는 CD34+ 및 CD90+ 인 2 가지 이상의 마커를 기준으로 선별되는 세포군을 의미한다.

- <83> "마커 표현형결정" 은 그의 표현형 (예를 들어, 분화 상태 및/또는 세포 유형) 결정을 위한 세포에 대한 마커 또는 항원의 동정을 의미한다. 이는 면역표현형결정에 의해 될 수 있는데, 이는 세포에 존재하는 항원을 인식하는 항체를 이용한다. 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있으나, 일반적으로 다른 세포 마커와 최소한의 상호반응성을 갖도록 선택된다. 이는, 다른 세포 마커들은 종들간에 공통되지만, 특정 세포 분화 또는 세포 표면 마커가 세포가 유도되는 동물 종에 대해 독특한 것으로 이해된다. 종들간 동등한 세포 유형을 규정하는 상기 마커들은, 구조 (예를 들어, 아미노산 서열) 에 있어서 중 상이성이 있더라도, 동일한 마커 식별을 제공한다. 세포 마커들에는, 특정 상황에서 세포 분화 (CD) 마커로도 지칭되는 세포 표면 분자 및 유전자 발현 마커가 포함된다. 유전자 발현 마커는 세포 유형 또는 분화 상태를 표시하는 발현된 유전자의 설정이다. 부분적으로, 유전자 발현 프로파일은 비-세포 표면 분자를 포함할 수 있더라도, 세포 표면 마커를 반영할 것이다.
- <84> "거핵세포/적혈구 전구 세포" 또는 "MEP" 는 일반 골수형 전구 세포로부터 유도되는, 적혈구 세포 및 거핵세포가 되나, 일반적으로 과립구, 마크로파지 또는 골수형 수지상 세포는 되지 않는 그의 역량을 특징으로 하는 세포를 의미한다.
- <85> "미스매치된 동종타생" 은 MHC 항원의 규정된 갯수의 혈청학적 또는 분자적 분석과 같은, 당업계에서 이용되는 표준 검정에 의해 결정되는 바와 같은 비일치성 주 조직적합성 복합체 (MHC) 항원 (즉, 단백질) 을 가진 동일한 종의 구성원이거나, 그로부터 유도되거나 또는 그로부터 기원하는 구성원을 의미한다. "부분적 미스매치" 는 일반적으로는 공여자 및 수령자 사이인, 구성원들 간 시험된 MHC 항원의 부분적 매치 (partial match) 를 의미한다. 예로, "절반 미스매치" 는 두 구성원들 사이에 상이한 MHC 항원 유형을 나타내는 것으로 시험된 50% 의 MHC 항원을 의미한다. "전부" 또는 "완전한" 미스매치는 시험된 모든 MHC 항원이 두 구성원 사이에 상이함을 의미한다.
- <86> "골수말소" 또는 "골수말소화 (myeloablation)" 는, 일반적으로 세포독성제 또는 방사선조사에 대한 노출에 의한 조혈기관 계통의 손상 또는 파괴를 의미한다. 골수말소화에는 조혈기관계통을 파괴하는 높은 투여량의 세포독성제 또는 전신 방사선조사에 의해 초래되는 완전한 골수말소화가 포함된다. 이는 비-골수말소 조건에 의해 야기되는 완전한 골수말소 상태보다 덜한 상태가 포함된다. 이에 따라, 비-골수말소 조건화는 대상체의 조혈기관 계통을 완전히 파괴하지는 않는 처리이다.
- <87> "호중구감소증" 은 말초혈에서 호중구 및 기타 다형핵 백혈구의 정상적인 갯수보다 더 적은 것을 의미한다. 일반적으로, 호중구감소 상태는 전체 호중구 수치 (ANC) 를 기준으로 진단되는데, 이는 총 백혈구 갯수에 대해 밴드 및 호중구의 백분율을 곱해 결정된다. 임상적으로, 비정상적인 ANC 는 말초혈의 ml 당 약 1500 개 미만이다. 호중구감소증의 중증도는, ml 당 ANC 가 1000 내지 1500 개이면 약함, ml 당 ANC 가 500 내지 1000 개이면 보통, ml 당 ANC 가 500 개 미만이면 중증으로 분류한다.
- <88> "자가 증식 (self-renewal)" 은 모 세포와 일치하는 특징 (예를 들어, 자가 증식성; self-renewing) 을 가진 하나 이상의 딸세포로 분열 및 생성하는 세포의 능력을 의미한다. 제 2 대 딸세포는 특별한 분화 경로를 거칠 수 있다. 예를 들어, 자가-증식 조혈 줄기 세포는 골수형 또는 림프구 경로로 분화하도록 수임되는 하나의 딸세포 줄기 세포 및 또다른 딸세포 줄기 세포로 분열한다. 수임 전구 세포는 일반적으로 자가-증식 역량을 소실하나, 세포 분열시, 더욱 분화된 (즉, 제한된) 표현형을 나타내는 2 개의 딸세포를 제공한다.
- <89> "단기 재건 조혈 줄기 세포" 또는 "ST-HSC" 는, 제한된, 단기 자가-증식 역량을 가진, 골수형 및 림프구 계통의 세포로 분화하는 그의 역량을 특징으로 하는 조혈 줄기 세포를 의미한다. ST-HSC 는 배양 검정에서 자가-증식 활성의 제한된 기간 때문에 장기 재건 (LT) HSC 와는 구분된다 (예를 들어, 약 8 주; 참고 문헌은, Christensen, J. L. and Weissman, I. L, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2001)).
- <90> 세포에 관해 "분류 (Sorting)" 는 물리적 특징 (예컨대, 예를 들어, 수력분급 또는 기타 크기-기준 기법) 을 기준으로 하거나 또는 마커 존재 하에 하거나 (예컨대, 사이드 스캐터 (SSC) 및 포워드 스캐터 (FSC), 또는 표지된 항체를 이용하는 형광 활성화 세포 분류 (FACS)), 또는 세포 마커 존재 하의 세포 분석, 예컨대, 예를 들어, 자성 세포 분리 시스템과 같은 면역흡수 기법을 포함하는 비분류성 FACS 인 세포의 분리를 의미한다.
- <91> "실질적으로 순수한 세포군" 은, 전체 세포군을 이루는 세포들의 약 59% 이상, 바람직하게는 약 75 내지 80% 이상, 더욱 바람직하게는 약 85 내지 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상인, 특이적인 세포 마커 특징 및 분화 잠재성을 가진 세포군을 의미한다. 이에 따라, "실질적으로 순수한 세포군" 은 약 50% 미만, 바람직하게는 약 20 내지 25% 미만, 더욱 바람직하게는 10 내지 15% 미만, 가장 바람직하게는 약 5% 미만의, 정해진

검정 조건 하에 특이적인 마커 특징 및 분화 잠재성을 나타내지 않는 세포를 포함하는 세포의 군을 의미한다.

- <92> "대상체" 또는 "환자" 는 호환되어 사용되며, 특별한 지시된 경우를 제외하고, 인간 및 비인간 영장류 뿐만 아니라 토끼, 래트, 마우스, 염소, 돼지 및 기타 포유류 종들과 같은 포유류를 의미한다.
- <93> "동계 (syngeneic)" 는, 특히 항원 또는 면역학적 반응에 대해 유전자적으로 일치되는 동일한 종의 구성원으로부터 유도되거나, 그로부터 기원하거나 또는 그러한 구성원을 의미한다. 여기에는 MHC 매칭 (matching) 으로 일치하는 쌍생아가 포함된다. 이에 따라, "동계 이식" 은 공여자와 유전자적으로 일치하는 수령자에게 공여자로부터 세포 또는 장기를 이동시키는 것을 의미한다.
- <94> "저혈소판혈증" 은 일반적으로 약 $100 \times 10^9/L$ 미만으로, 정상 혈소판 수치보다 더 낮음을 의미하며, 특히 약 10 내지 $50 \times 10^9/L$ 이하의 혈소판 수준에서는 혈구응집 시간이 길어지고, 자발적 출혈의 위험이 증가된다. 그러한 상태는 혈소판이 거핵세포에 의한 그의 보충보다 더 빠른 속도로 순환으로부터 소실되는 경우 발생한다. 저혈소판혈증은 혈소판 합성의 부전 및/또는 증가된 혈소판 파괴 속도로 인해 초래될 수 있다.
- <95> "이종발생성" 은 상이한 종들, 예를 들어 인간과 설치류, 인간과 돼지, 인간과 침팬지 등의 구성원으로부터 유래되거나, 그것을 기원으로 하거나, 또는 그의 구성원임을 의미한다. "이종발생성 이식" 은 수령자가 공여자와는 상이한 종인 경우 공여자로부터 수령자로의 세포 또는 장기의 이전을 의미한다.
- <96> 6.2 증량을 위한 세포 유형 및 세포의 공급원
- <97> 본 출원의 개시와 연관된 세포 유형은 조혈기관 계통의 것, 특히 조혈 줄기 세포 및 골수형 계통의 세포이다. 본원에서 세포의 상세한 설명은, 그러한 설명이 당업계의 현재의 지식을 반영하며 본 발명이 본원에 기재된 표현형 마커의 것에만 제한되지 않는다는 것을 이해하는 당업자를 위한 것이다.
- <98> 조혈 줄기 세포 (HSC) 는 자가 증식이 가능한 다능성 줄기 세포이며, 조혈기관 계통의 모든 세포 유형에 대해 허용되는 조건 하에 자라는 그의 능력을 특징으로 한다. HSC 자가 증식은 HSC 과 동일한 자가 증식력 및 분화 잠재력을 가진 하나 이상의 딸세포로 분화 및 생산하는 HSC 세포의 능력을 의미하는데; 즉, 추가적인 HSC 로 세포분열되는 능력이다. 자가 증식은 조혈기관 계통의 보충을 위한 미분화 줄기 세포의 지속적인 공급원을 제공한다. HSC 동정에 유용한 마커 표현형은 당업계에 일반적인 것이다. 인간 HSC 에 대해서, 세포 마커 표현형결정에는 바람직하게는, $CD34^+ CD38^- CD90(Thy1)^+ Lin^-$ 이 포함된다. 마우스 HSC 에 대해서, 예시적인 세포 마커 표현형은 $Sca-1^+ CD90^+$ (참고문헌은, 예를 들어, Spangrude, G.J. 등, Science 1 :661-673 (1988)) 또는 $c-kit^+ Thy^{lo} Lin^- Sca-1^+$ (참고문헌은, Uchida, N. 등, J. Clin. Invest. 101 (5): 961-966 (1998)) 이다. 대안적인 HSC 마커, 예컨대 알데히드 디히드로게나아제 (참고문헌은, Storms 등, Proc. Nat'l Acad. Sci 96:9118-23 (1999) 및 AC133 (참고문헌은, Yin 등, Blood 90:5002-12 (1997) 이 또한 유리한 용도를 찾을 수 있다.
- <99> HSC 는 수임 림프구 또는 골수형 전구 세포가 된다. 본원에 사용된 바와 같이, 수임 골수형 전구 세포는 골수형 계통의 임의의 최종 분화된 세포로 분화할 수 있는 세포군을 의미한다. 골수형 전구 세포에 속하는 것은 일반 골수형 전구 세포 (CMP), 자가 증식 역량이 제한되거나 또는 없지만, 과립구/마크로파지 전구 세포 (GMP) 및 거핵세포/적혈구 전구 세포 (MEP) 을 형성하기 위한 세포 분열이 가능한 것을 특징으로 하는 세포군이다. 비-자가 증식 세포는, 그 어느 것도 모 세포 유형의 분화 잠재성을 갖지 않는 딸 세포를 제공하는 세포 분열을 하고, 그 대신 분화된 딸 세포를 생성하는 세포를 의미한다. CMP 동정에 유용한 마커 표현형에는 당업계에 일반적인 것들이 포함된다. 쥐과동물 기원의 CMP 세포에 대해, 그 세포군은 마커 표현형 $c-Kit^{high} (CD117) CD16^{low} CD34^{low} Sca-1^{neg} Lin^{neg}$ 를 특징으로 하며, 추가로 마커 표현형 $Fc\gamma R^{lo} IL-7R\alpha^{neg} (CD127)$ 을 특징으로 한다. 쥐과동물 CMP 세포군은 또한 B220, CD4, CD8, CD3, Ter119, Gr-1 및 Mac-1 을 포함하는 마커의 표현형의 부재를 특징으로 한다. 인간 기원의 CMP 세포에 대해서는, 그 세포군은 $CD34^+ CD38^+$ 을 특징으로 하며, 추가로 마커 표현형결정 $CD123^+ (IL-3R\alpha) CD45RA^{neg}$ 을 특징으로 한다. 인간 CMP 세포군은 또한 세포 마커 CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 및 CD234a 의 부재를 특징으로 한다. 각종 골수형 전구 세포에 대한 마커 표현형의 설명은, 예를 들어 그의 전문이 본원에 참고문헌으로 포함되는 U.S. 특허 제 6,465,247 호 및 제 6,761,883 호; Akashi, Nature 404: 193-197 (2000) 에 기재되어 있다.

- <100> 골수형 계통의 또다른 수임 전구 세포는 과립구/마크로파지 전구 세포 (GMP) 이다. 상기 전구세포군의 세포는 과립구 (예를 들어, 호염기구, 호산구 및 호중구) 및 마크로파지로 될 그의 역량을 특징으로 한다. 다른 수임 전구 세포들과 마찬가지로, GMP 는 자가 증식 역량이 결핍이다. 쥐과동물 GMP 는 마커 표현형결정 c-Kit^{hi} (CD117) Sca-1^{neg} FcγR^{hi} (CD16) IL-7Rγ^{neg} CD34^{pos} 를 특징으로 한다. 쥐과동물 GMP 는 또한 마커 B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1, Mac-1 및 CD90 의 발현이 결핍이다. 인간 GMP 는 마커 표현형 CD34⁺ CD38⁺ CD123⁺ CD45RA⁺ 을 특징으로 한다. 인간 세포군은 또한 마커 CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 및 CD235a 의 부재를 특징으로 한다.
- <101> 상기 논의와 관련하여, 거핵세포/적혈구 전구 세포 (MEP) 는, CMP 로부터 유도되는데, 수임 거핵세포 선조 및 적혈구 전구 세포로 분화하는 그의 능력을 특징으로 한다. 성숙 거핵세포는 트로모포이에틴에 의해 조절되는 발생 과정인 혈소판 형성에 대한 전구체인 다배수체 세포이다. 적혈구 세포는 적혈구생성인자로 조절되는 과정을 통해 수임 적혈구 전구 세포로부터 형성되며, 궁극적으로는 성숙 적혈구로 분화한다. 쥐과동물 MEP 는 세포 마커 표현형결정 c-Kit^{hi} 및 IL-7Rγ^{neg} 를 특징으로 하며, 추가로 마커 표현형 FcγR^{lo} 및 CD34^{low} 를 특징으로 한다. 쥐과동물 MEP 세포군은 또한 마커 B220, CD4, CD8, CD3, Gr-1 및 CD90 의 부재를 특징으로 한다. 마우스 MEP 에 대한 또다른 예시적인 마커 표현형은 c-kit^{high} Sca-1^{neg} Lin^{neg/low} CD16^{low} CD34^{low} 이다. 인간 MEP 는 마커 표현형 CD34⁺ CD38⁺ CD123^{neg} CD45RA^{neg} 를 특징으로 한다. 인간 MEP 세포군은 또한 마커 CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56 및 CD235a 의 부재를 특징으로 한다.
- <102> 골수형 계통에서 추가로 제한되는 전구 세포는 과립구 선조, 마크로파지 선조, 거핵세포 선조 및 적혈구 선조이다. 과립구 전구 세포는 호산구, 호염기구, 호중구를 포함하는 최종 분화된 과립구로 분화하는 그의 능력을 특징으로 한다. GP 는 일반적으로 골수형 계통의 다른 세포들로 분화하지 않는다. 거핵세포 전구 세포 (MKP) 에 있어서, 상기 세포들은 최종 분화된 거핵세포로는 분화하나, 일반적으로 골수형 계통의 다른 세포로는 분화하지 않는 것을 특징으로 한다 (참고문헌은, 예를 들어, WO 2004/024875).
- <103> 림프구 계통에 대해, "수임 림프구 전구 세포" 는 림프구 계통의 임의의 최종 분화된 세포로 분화할 수 있는 세포를 의미한다. 림프구 전구 세포에 속하는 것은 일반 림프구 전구 세포 (CLP), 자가 증식 역량이 제한되거나 또는 없지만, T 림프구 및 B 림프구 전구 세포의 형성을 위한 세포 분열이 가능한 것을 특징으로 하는 세포군, NK 세포 및 림프구 수지상 세포이다. CLP 동정에 유용한 마커 표현형은 당업계에 일반적인 것이다. 마우스의 CLP 세포에 대해, 그 세포군은 문헌 [Kondo, M. 등, Cell 91 :661-672 (1997)] 에 기재된 마커의 존재를 특징으로 하며, 인간 CLP 에 대해서는, 마커 표현형 CD34⁺ CD38⁺ CD10⁺ IL7R⁺ 이 사용될 수 있고 (Galy, A 등, Immunity, 3:459-473 (1995); Akashi, K. 등, Int. J. Hematol. 69(4): 217-226 (1999)); 상기 문헌들은 본원에 참고문헌으로 포함된다.
- <104> 바람직한 쥐과동물 세포 표면 마커의 개요가 하기 표 1 에 제공되며, 여기서 염색 수준의 적절한 표시는 표에서 해당 칸의 색상으로 나타내는데; 백색은 염색이 없음을, 연회색은 낮은 수준의 염색을, 진회색은 중간 또는 높은 수준의 염색을 나타낸다.

[표 1]

HSC	CD117	CD90.1	Lin1	Sca-1		
CLP	CD117	CD90.1	Lin1	Sca-1	CD127	
MP	CD117	Sca-1	Lin2			
CMP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
GMP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
MEP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9
MKP	CD117	Sca-1	Lin2	CD16/32	CD34	CD9

Lin1: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD11b, TER119

Lin2: CD3, CD4, CD5, CD8, B220, Gr-1, CD90.1, CD127, TER119

<105>

<106>

바람직한 인간 세포 표면 마커의 개요를 하기 표 2 에 제공하며, 여기서 염색 수준의 적절한 표시는 표에서 해당 칸의 색상으로 나타내는데; 백색은 염색이 없음을, 연회색은 낮은 수준의 염색을, 진회색은 중간 또는 높은 수준의 염색을 나타낸다.

【표 2】

HSC	CD34	CD90	Lin1		
CLP	CD34	CD127	CD10	CD38/CD90	Lin
MP	CD34	CD90	Lin2		
CMP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123
GMP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123
MEP	CD34	CD90	Lin2	CD45RA	CD123

Lin 1: CD2, CD3, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD56, CD235a

Lin2a: CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD14, CD19, CD20, CD56, CD235a

Lin 2b: CD10, CD11b, CD14, CD19, CD235a

<107>

<108>

다수의 기타 적합한 세포 표면 마커가 당업자에게 제시되어 공지되어 있거나, 또는 해당 절차에서 식별 및 특징 구분이 가능할 것이며, 상기 마커들은 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 유리한 용도를 나타낼 것이다. 예로, 몇가지 추가적인 잠재적 쥐과동물 마커들은 최근 mRNA 발현의 어레이 분석을 기준으로 각종 골수형 전구세포군에 대해 동정되어 왔다. 참고문헌은, 예를 들어, Iwasaki-Arai, 등, J. Exp. Med. 197:1311-1322 (2003); Akashi, 등, Nature 404:193-197 (2000); Miyamoto, 등, Dev. Cell 3:137-147 (2002); Traver, 등, Blood 98:627-635 (2001); Akashi, 등, Blood 101 :383-390 (2003); Terskikh, A., 등, Blood 102:102:94-101 (2003). 상기 동일한 유형의 mRNA 발현 분석을 기준으로, 추가적인 세포 표면 마커들, 예컨대 CD110, CD114, CD116, CD117, CD127 및 CD135 가 또한 문헌 [Manz, 등, Proc Natl Acad Sci USA 99:11872-11877 (2002)] 에 기재된, 인간에서의 하나 이상의 동정된 골수형 선조 하위군을 분리함에 있어서 용도를 찾을 수 있다.

<109>

본원에 기재된 방법에 있어서, 증량을 위한 세포는 궁극적으로 골수형 계통의 세포들, 즉 과립구, 마크로파지, 거핵세포, 적혈구 세포 및/또는 골수형 수지상 세포로 분화할 수 있는 세포이다. 이들에는, 다른 것들 중에서도 특히, HSC, 및 수입 골수형 전구 세포 CMP, GMP 및 MEP 이 포함된다. 이들 세포는 적절한 특징들, 특히 상기 기재된 분화 잠재성 및 세포 마커 특징들을 갖는다. 한 구현예에서, 증량을 위한 초기 세포에는 마커 표현형결정 $CD34^{+}$ 를 가진 세포가 포함된다. CD34 마커는 상이한 전구 세포 유형들에서 발견되므로, 증량을 위한 출발 세포군은 CD34 를 발현하는 전구 세포의 혼합물일 수 있다. 또다른 구현예에서, 상기 세포들은 마우스 및 기타 설치류에서 발견되는 세포 마커인 세포 마커 표현형 $Sca-1^{pos}$ 를 포함하는 세포이다. $Sca-1^{pos}$ 세포에 대한 선별은 또한, 마우스 수입 골수형 전구 세포가 $Sca-1^{neg}$ 이므로 HSC 용으로 원천적으로 선별됨에도 불구하고, 세포 마커 표현형을 나타내는 세포의 혼합물을 제공한다. 이에 따라, 설치류 골수형 세포 증량에 대한 다른 구현예에서, 세포 마커 표현형 $Lin^{neg/low}$ 이 사용되는데, 여기에는 HSC, CMP 및 GMP 이 포함된다.

<110>

또다른 국면에서, 증량을 위한 출발 세포는 분리된 세포이다. 여기에는 분리된 HSC 이 포함되는데, 이는 싸이토카인 및 성장 인자의 지시된 혼합물의 존재 하에, 골수형 계통의 다른 전구 세포로 추가로 증량되는 CMP 로 발생된다. 또다른 구현예에서, 증량을 위한 출발 세포는 상기 기재된 바와 같은 특징적인 분화 잠재성 및 세포 마커 표현형을 가진 CMP 이다. CMP 는 제한된 자가 증식 역량을 가질 수 있는데, 이에 따라 GMP 및 MEP 로 분화하면서도, 제한된 횟수의 세포 분열을 위한 추가적인 CMP 를 생성하기 위해 증량할 수 있다.

<111>

증량을 위한 세포는 골수, 말초혈, 제대혈 및 조혈 및 골수형 전구 세포를 비호하는 것으로 공지된 기타 공급원을 포함하는, 간, 특히 태아의 간을 포함하는 각종 공급원으로부터 수득될 수 있다. 말초 및 제대혈은 HSC 및 전구 세포의 풍부한 공급원이다. 세포는 당업계에 공지된, 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 수득된다. 예를 들어, 골수 세포의 제조 방법은 문헌 [Sutherland 등, Bone Marrow Processing and Purging: A Practical Guide (Gee, A.P. ed.), CRC Press Inc. (1991))] 에 기재되어 있다. 탯줄 제대혈 또는 태반 제

대혈은 일반적으로, 출산 또는 그 이전에, 태반 분리 이전 또는 이후에 탯줄 정맥의 천공으로 수득된다 (참고문헌은, 예를 들어, Turner, CW. 등, Bone Marrow Transplantation. 10:89 (1992); Bertolini, F. 등, J. Hematother. 4:29 (1995)). HSC 및 골수형 전구 세포는 또한, 다른 혈액 성분들은 공여자에게 되돌리면서 백혈구만 제거하기 위해, 적합한 대상체로부터 취한 혈액을 연속 유동 원심분리 (예를 들어, Cobe BCT Spectra blood cell separators) 로 진행되는 과정인 백혈구분할술에 의해 말초혈로부터 수득될 수 있다. 또다른 유형의 분리 과정은 밀도를 달리한 매질을 통한 원심분리, 예컨대 Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 이다.

<112> 세포들은 본원에 광범위하게 기재된 바와 같이 조혈기관 계통이 있는 임의의 동물 종들로부터 유도된다. 바람직하게는, 적합한 동물에는, 이에 제한되지 않는 예시로 설치류, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 말, 소, 영장류 (예를 들어, 인간) 등이 포함되는 포유류이다. 증량을 위한 세포는 단일 대상체 또는 복수의 대상체로부터 수득될 수 있다. 복수는 둘 이상 (예를 들어, 하나 초과) 을 의미한다. 수득된 세포가 복수의 공여자 유래인 경우, 그의 관계는 상기 정의된 바와 같이 동계, 동종타생 또는 이종발생일 수 있다. 본 발명의 개시의 바람직한 구현에는 하기에 더욱 상세히 설명할, 본원의 증량 방법으로 수득되는 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물에 관한 것이다. 동종타생 세포는 하기에 더 논의되는 바와 같이 따로따로 증량된 후 혼합될 수 있거나, 또는 증량 전에 세포가 혼합될 수 있다.

<113> 적용가능한 경우, 줄기 세포 및 전구 세포는, 대상체에 대한 사이토카인 또는 약물의 투여 전에 골수로부터 말초혈로 동원될 수 있다 (참고문헌은, 예를 들어, Lapidot, T. 등, Exp. Hematol. 30:973-981 (2002)). 동원을 유도할 수 있는 사이토카인 및 케모카인에는, 단지 예시로서 이에 제한되지 않지만, 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 과립구 마크로파지 집락 자극 인자 (GM-CSF), 적혈구생성인자 (Kieffer, A. 등, Exp. Hematol. 23:609-612 (1995)), 줄기 세포 인자 (SCF), AMD3100 (AnorMed, Vancouver, Canada), 인터류킨-8 (IL-8) 및 상기 인자들의 변이체 (예를 들어, 페그필가스트림 (pegfilgrastim), 다르보포이에틴 (darbopoietin)) 이 포함된다. 사이토카인 및/또는 케모카인의 조합, 예컨대 G-CSF 와 SCF 또는 GM-CSF 와 G-CSF 는, 상승적으로 작용하여 동원을 촉진할 수 있으며, 특히 단독 사이토카인 또는 케모카인으로는 효율적인 동원을 나타내지 않는 대상체에 대해, 말초혈에서의 HSC 및 전구 세포의 갯수를 증가시키기 위해 사용될 수 있다 (Morris, C. 등, J. Haematol. 120:413-423 (2003)).

<114> 세포말소제 (cytoablative agent) 는 HSC 및 전구 세포를 동원하기 위한 유도 투여량 (즉, 세포감소 투여량) 으로 사용될 수 있으며, 단독으로든 또는 사이토카인과 조합되든 유용하다. 상기 동원 양태는 대상체가 골수 말소 치료 하에 있을 때 적용가능하며, 더 높은 투여량의 화학요법 전에 수행된다. 동원을 위한 세포감소 약물에는, 다른 것들 중에서도 특히, 시클로포스파마이드 (cyclophosphamide), 이포스파마이드 (ifosfamide), 에토포사이드 (etoposide), 사이토신 아라비노사이드 (cytosine arabinoside) 및 카르보플라틴 (carboplatin) 이 포함된다 (Montillo, M. 등, Leukemia 18:57-62 (2004); Dasgupta, A. 등, J. Infusional Chemother. 6:12 (1996); Wright, D.E. 등, Blood 97(8): 2278-2285 (2001)).

<115> 증량을 위한 세포는 또한 추가적인 선별 및 정제에 적용될 수 있는데, 이는 실질적으로 순수한 세포군을 수득하기 위한 양성 및 음성 선별 방법을 모두 포함할 수 있다. 한 국면에서, 유세포분석으로도 지칭되는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 가 상이한 세포군을 분류 및 분석하기 위해 사용된다. HSC 또는 전구세포군에 특이적인 세포 마커를 가진 세포들은 항체, 또는 일반적으로는 항체의 혼합물로 태깅 (tag) 되는데, 이는 세포 마커에 결합한다. 상이한 마커에 대한 각각의 항체가, 탐지가능한 분자, 특히 다른 항체와 커플링된 다른 형광 염료와 구분될 수 있는 형광 염료에 콘주게이션된다. 태깅되거나 또는 "염색된" 세포의 스트림은 형광색소 및 특정한 표지된 항체의 존재성을 결정하기 위해 검출되는 세포로부터의 발광 스펙트럼이 여기되는 광원을 통과한다. 당업계에서는 다중색상 형광 세포 분류로도 지칭되는 상이한 형광색소의 동시적인 검출로, 상이한 세트의 세포 마커를 나타내는 세포는 군 중의 다른 세포들로부터 동정 및 분리될 수 있다. 예시로서, 이에 제한되지 않는 사이드 스캐터 (SSC), 포워드 스캐터 (FSC), 및 생체 염색 (예를 들어, 프로피디움 요오다이드 이용) 을 포함하는 다른 FACS 기준들은 크기 및 생존능을 기준으로 세포의 선별을 가능하게 한다. HSC 및 전구 세포의 FACS 분류 및 분석은, 다른 것들 중에서도 특히, U.S. 특허 제 5,137,809 호, 제 5,750,397 호, 제 5,840,580 호; 제 6,465,249 호; Manz, M.G. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11872-11877 (2002); 및 Akashi, K. 등, Nature 404(6774): 193-197 (2000)) 에 기재되어 있다. 형광 활성화 세포 분류에 대한 일반적인 안내사항은, 예를 들어 Shapiro, H. M., Practical Flow Cytometry, 4th Ed., Wiley-Liss (2003) 및 Ormerod, M. G., Flow Cytometry: A Practical Approach, 3rd Ed., Oxford University Press (2000) 에 기재되어 있다.

- <116> 출발 세포군의 분리를 위한 또다른 방법은 특이적인 세포 표면 마커와 상호작용하는 항체 또는 리간드와 결합하는 고체 또는 불용성 기관을 이용한다. 면역흡수 기법에서, 세포는 항체 및 제거될 임의의 비결합 세포를 포함하는 기관 (예를 들어, 비드의 컬럼, 플라스크, 자석 입자) 과 접한다. 면역흡수 기법은 임상에서의 수합에서 대량의 세포와 직접 이용가능하도록 규모를 확장시킬 수 있다. 적합한 기관에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, 플라스틱, 셀룰로오스, 텍스트란, 폴리아크릴아미드, 아가로스 및 기타 당업계 공지 것 (예를 들어, Pharmacia Sepharose 6MB macrobeads) 이 포함된다. 자성 또는 상자성 비드를 포함하는 고체 기관이 사용되는 경우, 비드에 결합된 세포는 자석 분리기로 쉽게 분리될 수 있다 (참고문헌은, 예를 들어, Kato, K. and Radbruch, A., Cytometry 14(4): 384-92 (1993); CD34⁺ 직접 분리 키트, Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany). 친화성 크로마토그래피 세포 분리는 일반적으로 그의 표면에 고정된 선별적 리간드를 포함하는 지지체 상에서의 세포 현탁액의 통과를 수반한다. 상기 리간드는 세포 상의 그의 특이적인 표적 분자와 상호작용하고, 매트릭스 상에 포획된다. 결합된 세포는 가동 완충액에 용출제를 첨가하여 방출되며, 유리된 세포는 컬럼을 통해 세척되고, 균질한 군으로서 수합된다. 당업자에게 자명하듯이, 흡수 기법은 특이적 항체를 이용하는 것으로 제한되지 않으며, 비특이적 흡수를 이용할 수도 있다. 예를 들어, 실리카에 대한 흡수는 세포 제조에서 식세포를 제거하는 단순한 과정이다.
- <117> FACS 및 대부분의 회분식 면역흡수 기법은 양성 및 음성 선별 과정을 모두 채용할 수 있다 (참고문헌은, 예를 들어, U.S. 특허 제 5,877,299 호). 양성 선별에서, 원하는 세포는 항체로 표지되고, 잔류하는 비표지/원하지 않는 세포로부터 제거된다. 음성 선별에서, 원하지 않는 세포는 표지되어 제거된다. 채용될 수 있는 또다른 유형의 음성 선별은 원하지 않는 세포의 제거를 위한 항체/보체 처리 또는 면역독소의 이용이다.
- <118> 세포의 정제가 상기 기재된 방법의 조합을 포함한다는 것이 이해될 것이다. 전형적인 조합은 원하지 않는 세포 및 세포 물질의 덩어리를 제거함에 있어서 유효한 초기 과정, 예컨대 백혈구분반술을 포함할 수 있다. 제 2 단계는, 기관에 결합된 항체 상의 면역흡수에 의한 하나 이상의 전구세포군에 대한 일반적인 마커를 발현하는 세포의 분리를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항-CD34 항체를 포함하는 자성 비드는 CD34 항원을 일반적으로 발현하는 HSC, CMP 및 GMP 세포에 결합하여 포획할 수 있다. 상이한 세포 유형의 더욱 고도의 분할을 제공하는 추가적인 단계, 예컨대 특이적인 세포 마커의 설정에 대한 항체를 분류하는 FACS 가 원하는 세포의 실질적으로 순수한 군을 수득하기 위해 이용될 수 있다. 또다른 조합은 항-CD34 항체와 결합되는 자성 비드를 이용한 최초의 분리에 이어 FACS 를 이용한 추가적인 정제 순서를 수반할 수 있다.
- <119> 세포의 분화 잠재성 및 그에 따른 분리된 줄기 세포 또는 전구 세포 유형의 결정은 일반적으로 세포를 각종 최종 분화 세포로의 발생을 허용하는 조건 하에 노출시킴으로써 수행된다. 상기 조건들은 일반적으로 골수형 또는 림프구 계통의 발생을 허용하는 배양 배지에 싸이토카인 및 성장 인자의 혼합물을 포함한다. 집락 형성 배양 검정은, 희석 제한 및 그의 연속되는 발생으로부터 생겨나는 세포 유형의 판단을 통해 시험관 내에서의 세포 배양에 좌우된다. 상기 유형의 일반 검정은 싸이토카인이 보충된 메틸셀룰로오스 배지 기재의 것이다 (예를 들어, MethoCult, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada; Kennedy, M. 등, Nature 386:488-493 (1997)). 조혈 경로에서 분화를 허용하는 싸이토카인 및 성장 인자 제형물은, Manz 등, Proc. Natl Acad. Sci USA 99(18): 11872-11877 (2002); U.S. 특허 제 6,465,249 호; 및 Akashi, K. 등, Nature 404(6774): 193-197 (2000) 에 기재되어 있다. 싸이토카인에는 SCF, FLT-3 리간드, GM-CSF, IL-3, TPO 및 EPO 가 포함된다. 또다른 시험관내 검정은 장기간 배양 출발 세포 (LTC-IC) 검정인데, 이는 일반적으로 조혈을 지지하는 기조직 세포를 이용한다 (참고문헌은, 예를 들어, Ploemacher, R.E. 등, Blood. 74:2755-2763 (1989); 및 Sutherland, H.J. 등, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:3745 (1995)).
- <120> 분리된 세포의 분화 잠재성 결정에 적합한 또다른 유형의 검정은 숙주 동물에 대한 세포의 생체내 투여 및 조혈 기관 계통의 재건 판단에 좌우된다. 수령자는 동종타생 또는 이종발생성 세포 이식 수용의 거부 및 허용을 제한하는 면역약화 (immunocompromised) 또는 면역결핍 (immunodeficient) 상태이다. 상기 종류의 유용한 동물 시스템은 NPD/SCID (Pflumio, F. 등, Blood 88:3731 (1996); Szilvassy S.J. 등, "Hematopoietic Stem Cell Protocol," in Methods in Molecular Medicine, Humana Press (2002); Greiner, D. L. 등, Stem Cells 16(3): 166-177 (1998); Piacibello, W. 등, Blood 93(11): 3736-3749 (1999)) 또는 Rag2 결핍 마우스이다 (Shinkai, Y. 등, Cell 68:855-867 (1992)). 주입된 세포로부터 기원한 세포는 골수, 비장 또는 숙주 동물 유래의 세포를 회수하고, 일반적으로는 FACS 분석으로 특이적인 세포 마커를 나타내는 세포의 존재성 (즉, 마커 표현형) 을 결정하여 판단된다. 이식된 세포에 특이적인 마커의 검출은 내재적 세포와 이식된 세포 사이의 구분을 가능하게 해 준다. 예를 들어, 세포 마커의 인간 형태 (예를 들어, HLA 항원) 에 특이적인 항체는, 이들이 적합한 면역결핍 마우스로 이식되는 경우 인간 세포를 동정해 낸다 (참고문헌은, 예를 들어,

Piacibello, W. 등, 상기 문헌).

- <121> 상기 방법으로 수득된 초기의 세포군은 증량에 직접 사용되거나 또는 이후 사용을 위해 냉동된다. 냉동 세포를 위한 각종 배지 및 프로토콜이 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 냉동 배지는 DMSO 를 약 5 내지 10%, 10 내지 90% 의 혈청 알부민, 및 50 내지 90% 의 배양 배지를 함유한다. 세포 보존에 유용한 기타 첨가제에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, 다당류, 예컨대 트레할로오스 (Scheinkonig, C. 등, Bone Marrow Transplant. 34(6): 531-6 (2004)), 또는 인공 혈장 증량제, 예컨대 고분자량 당질 (예를 들어, 히드록시에틸 전분) 이 포함된다. 일부 구현예에서, 등장성 완충 용액, 예컨대 인산화-완충 식염수가 사용될 수 있다. 예시적인 냉동보존성 조성물에는 4% HSA, 7.5% 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 2% 고분자량 당질이 있는 세포-배양 배지가 있다. 냉동보존을 위한 기타 조성물 및 방법은 널리 공지되어 있으며, 당업계에 알려져 있다 (참고문헌은, 예를 들어, Broxmeyer, H. E. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(2): 645-650 (2003)). 세포는 약 -135°C 미만의 최종 온도에서 보존된다.
- <122> 6.3 골수형 전구 세포의 생체외 증량
- <123> 상기 수득된 초기 세포군은 골수형 전구 세포의 증량을 허용하는 사이토카인 및 성장 인자 혼합물이 있는 배지와 세포를 접촉시켜 생체외에서 증량된다. 그의 자연적인 맥락에서 사이토카인은 일반적으로, 세포가 사이토카인을 생산하는 세포인지 또는 또다른 세포인지를 막론하고, 세포의 생리학적 상태를 조절하는 세포에 의해 제공되는 단백질이다. 림프구에 의해 제공되는 사이토카인은 종종 림포카인 (IL) 으로 기재되나, 본원에서 정의된 바와 같이 사이토카인이다. 사이토카인은 일반적으로 사이토카인에 의해 조절되는 세포 상의 세포 수용체를 통해 작용한다. 마찬가지로, 그의 자연적인 맥락에서 성장 인자는 또한, 세포가 성장 인자를 생산하는 세포인지 또는 또다른 세포인지를 막론하고, 세포의 증식 및 분화에 영향을 미치는, 세포에 의해 제공되는 화합물이다. 사이토카인과 마찬가지로, 성장 인자는 일반적으로 수용체를 통해 세포 상에서 작용한다. 그러나, 본 발명의 개시에서 사이토카인 또는 성장 인자는, 특정 사이토카인이 성장 인자와 마찬가지로 세포의 증식 및 분화에 영향을 주므로, 배제적임을 의미하지 않는다. 이에 따라, 본원에서 특정 사이토카인 및 성장 인자의 설명은 당업계의 지식 현황을 반영하며, 본 개시의 범위를 제한하려는 의미는 아니다.
- <124> 본원의 증량 방법에 대해, 사이토카인 및 성장 인자는 수임 골수형 전구 세포, 예컨대 CMP, GMP 및 MEP 세포군의 증량을 위해 선택된다. 상기 세포들은 자가-증식 역량이 제한되거나 또는 없기 때문에, 배양 조건은, 수임 골수형 선조가 아닌 다른 세포 유형의 성장 및 증량을 제한하거나 또는 최소화하면서 상기 골수형 세포를 발생시키는 세포의 분열은 지지하도록 선택된다.
- <125> 따라서, 증량 조건의 사이토카인은 일반적으로 IL-1 (예를 들어, IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF, CM-CSF 및 이들의 유사체로부터 선택된다. 사이토카인의 형태는 자연 발생 생산물, 재조합 생산물, 변이체, 또는 자연 발생 형태와 유사한 생물학적 활성을 가진 개질된 형태, 예컨대, 예를 들어, 펩티드 모방체 (peptide mimetic) 이다. 사이토카인은 또한 융합 단백질 또는 유전공학적 (engineered) 사이토카인의 군으로부터 선택될 수 있으며, 적합한 비제한적 예시에는 GM-CSF 및 IL-3 의 합성 하이브리드 단백질인 PIXY321 (Curtis, B. M., 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991 88:5809-5813), Epo-IL-3 (Lu, L., 등, Exp. Hematol. 1995 23: 1130-1134), IL-2-IL-6 (Zhao, C. 등, Stem Cells 1994. 12. 1130-1134) 이 포함된다.
- <126> 사이토카인의 공급원은 증량에 사용되는 세포 상에서 활성이 되도록 선택되며, 이에 따라 일반적으로 증량에 사용되는 초기 세포의 기원을 반영한다. 예를 들어, 전구 세포가 인간 기원의 것이면, 자연적인 것이든 재조합된 것이든 사이토카인의 인간 형태가 사용된다. 따라서, 한 구현예에서, 사이토카인은 재조합 인간 rhuIL-1 (예를 들어, ruIL-1 β), rhuIL-3, rhuIL-6, rhuIL-11, rhuG-CSF, rhuGM-CSF, 및 이들의 유사체이다. 그러나, 사이토카인의 형태 및 세포의 기원 사이의 연관성은 반드시 엄격한 것은 아니다. 예로, 마우스 IL-6 가 인간 세포에 영향을 주지 못함에도 불구하고, 인간 IL-6 은 마우스 및 래트 세포에서 영향력을 행사할 수 있다. 상기 유형의 교차 활성은 당업자에게는 자명한 것이며, 공지된 방법으로 쉽게 시험될 수 있다. 특정 사이토카인의 구조 및 기능은 하기 설명에서 언급될 것이며, 이는 당업계의 지식 현황을 반영한다.
- <127> IL-1 은 급성 염증의 상향조절 및 하향조절 (예를 들어, 내피 세포 및 림프구의 활성화), 골 형성 및 리모델링, 인슐린 분비 및 해열에 중요한 역할을 하는 사이토카인의 군이다. 사이토카인의 IL-1 패밀리는 전체적으로 구조적 유사성을 갖는데, 위장된 3 개의 폴딩된 축을 가진 β -배럴로 이루어져 있다 (참고문헌은, 예를 들어, Priestle, J. P. 등, Proc Natl Acad Sci USA 86, 9667-71 (1989)). 본원에서의 방법에는 IL-1 β 가 관련되는데, 이는 일반적으로 IL-1 α 와 함께 마크로파지에 의해 분비된다. 2 개의 아고니스트가 전구체 단백질

(pro-IL-1 α 및 pro-IL-1 β)의 효소 절단에 의해 유도되며, IL-1 수용체에 결합함으로써 그의 생리학적 유효성을 발휘한다. IL- β 에 대한 아미노산 서열 및 그의 상응하는 핵산 서열은 여러가지 공급원으로부터 공지되어 있는데, 여기에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, 쥐과동물 (Telford, J. L. 등, *Nucleic Acids, Res.* 14(24): 9955-9963 (1986)); 토끼 (Young PR and Sylvester D., *Protein Eng.* 2(7): 545-51 (1989)); 래트 (접근 번호 NP 113700 [gi: 13928692]); 돼지 (Huether, M.J. 등, *Gene* 129(2): 285-289 (1993)); 소 (Leong S.R., *Nucleic Acids, Res.* 16:9054-9054(1988)); 고양이 (Daniel, S.L. 등, *Anim. Biotechnol.* 3:117-121 (1992)); 말 (Howard, R.D. 등, *AM. J. Vet Res.* 59:704-711(1998)); 인간 (March, C.J. 등, *Nature* 315:641 (1985); 및 재조합 인간 (Meyers, C. 등, *J. Biol. Chem.* 262(23): 11176-11181 (1987))이 포함된다. IL-1 β 의 변이체는, [Boraschi, D. 등, *Frontiers in Bioscience* 1:270-308 (1995)]에 기재되어 있다. 각종 재조합 형태는 또한 시판되어 입수가 가능하다 (참고문헌은, 예를 들어, 인간 IL-1 β , Promega, Madison, WI, USA; 쥐과동물 IL-1 β , Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada; 및 래트 IL-1 β , Chemicon Int., Temacula, CA, USA). IL-1 β 의 변이체는, 다른 것들 중에서도 특히, Gronenborn, A.M. 등, *Eur. J. Biochem.* 161(1): 37-43 (1986); Antoni, Ge 등, *J. Immunol.* 137(10): 3201-4 (1986); Palaszynski, E.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147(1): 204-11 (1987); 및 Huang, J.J. 등, *FEBS Lett.* 223(2): 294-8 (1987))에 기재되어 있다.

<128> 다중-CSF 로도 공지된 IL-3은 림프구, 상피 세포 및 정상세포에 의해 분비되는 다중계통 세포 사이토카인/성장 인자로, 각종 유형의 혈액 및 조직 세포의 클론성 증식 및 분화, 특히 과립구 및 마크로파지의 분화 및 기능을 자극한다. 이는 조혈 집락 자극 인자 중 하나로 간주된다 (참고문헌은, 예를 들어, Wagemaker, G. 등, *Biotherapy* 2(4): 337-45 (1990)). IL-3에 대한 아미노산 및 핵산 서열이, 다른 것들 중에서도 특히, 쥐과동물 (Fung M.-C. 등, *Nature* 307:233-237(1984)); 래트 (Cohen, D.R. 등, *Nucleic Acids, Res.* 14: 3641-3658(1986); 양 (McInnes CJ. 등, *Gene* 139:289-290 (1994)); 소 (Mwangi S.M. 등, *Gene* 162:309-312(1995)); 침팬지/원숭이 (Burger H. 등, *Biochim. Biophys. Acta* 1217:195-198(1994)); 및 인간 (Yang Y.-C. 등, *Cell* 47:3-10 (1986); Otsuka T. 등, *J. Immunol.* 140:2288-2295(1988))을 포함하는 각종 유기체로부터 동정되었다. IL-3의 변이체는, Lopez, A.F. 등, *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24): 11842-6 (1992); Barry, S.C. 등, *J. Biol. Chem.* 269(11): 8488-92 (1994); 및 Olins, P.O. 등, *J Biol Chem.* 270(40): 23754-60 (1995))에 기재되어 있다.

<129> IL-6은 B-세포 자극 인자 2 (BSF-2) 및 인터페론- β 2로서 공지되어 있으며, B 세포의 면역글로불린 분비 세포로의 분화, 골수종/형질세포종양 성장 및 신경 세포 분화의 유도에 관여한다. IL-6 수용체에 결합하는 IL-6는 단백질 GP130을 포함하는 다중서브유닛 복합체의 형성을 유도하는데, 이는 클래스 I 사이토카인 수용체 슈퍼패밀리에는 일반적이다. IL-6는 4개의 나선 묶음으로 이루어진 일반적인 구조를 갖는데, 여기서 나선의 전면은 수용체와 상호작용한다. IL-6에 대한 아미노산 및 핵산 서열은, 다른 것들 중에서도 특히 마우스 (Chiu, C.P. 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(19): 7099-103 (1988); 래트 (Northemann, W. 등, *J. Biol. Chem.* 264(27): 16072-82 (1989); 토끼 (Perkins, H.D. 등, *Cytokine* 12(6): 555-65 (2000)); 양 (Ebrahimi, B. 등, *Cytokine.* 7(3): 232-236 (1995)); 소 (Droogmans, L. 등, *DNA Seq.* 2(6): 411-3 (1992)); 말 (Swiderski, C.E. 등, *Vet Immunol Immunopathol.* 77(3-4): 213-20 (2000)); 및 인간 (Hirano T. 등, *Nature* 324: 73-76 (1986))에 대해 동정되었다. IL-6의 변이체는, Dagan, S. 등, *Protein Expr. Purif.* 3(4): 290-4 (1992); Zhang, J.G. 등, *Eur J Biochem.* 207(3): 903-13 (1992); 및 Skelly, S.M. 등, *J Biotechnol.* 34(1): 79-86 (1994)에 기재되어 있다. 재조합 형태는, Stoyan, T. 등, *Eur J Biochem.* 216(1): 239-45 (1993); Orita, T. 등, *J Biochem (Tokyo)* 115(2): 345-50 (1994)에 기재되어 있으며, 시판되어 입수가 가능하다.

<130> IL-11은 구조적으로 및 관능적으로 연관된 사이토카인의 IL-6군에 속하며, 이는 상기에 언급한 바와 같이, 그의 생리학적 활성을 발휘하기 위해 트랜스멤브레인 당단백질 gp130를 이용한다. IL-11은 또한 지방형성 저해 인자 (AGIF) 및 오프렐베킨 (oprelvekin)으로 공지되어 있다. IL-11은 다른 사이토카인 및 성장 인자와 상승적으로 작용하여, 줄기 세포의 증식 및 수임 전구 세포로의 분화를 자극하며, 거핵구형성 및 혈소판생성을 촉진하는 것으로 공지되어 있다. IL-11의 대립되는 영향력은, 시험관 내에서는 IL-11이 원시적인 줄기 세포의 군을 유지할 수 있으면서, 생체내에서는 접목을 강화할 수 있는 것으로 생체내 및 시험관내에서 나타난다. 클래스 1 사이토카인으로, IL-11은 또한 4개 나선 묶음 구조를 포함하는 것으로 여겨진다. IL-11의 아미노산 및 핵산 서열은, 다른 것들 중에서도 특히 쥐과동물 (Morris, J. C. 등, *Exp. Hematol.* 24:1369 (1996); 영장류 (Paul, S.R. 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(19): 7512-6 (1990); 및 인간 (Ohsumi, J. 등, *FEBS Lett.* 288:13 (1991))에 대해 동정되었다. IL-11의 재조합 형태 및 변이체는,

[Miyadai, K. 등, BioSci. Biotechnol. Biochem. 60(3): 541-2 (1996); Tacken, I. 등, Eur J Biochem. 265(2): 645-55 (1999)] 에 기재되어 있다.

<131> G-CSF 또는 과립구-집락 자극 인자는 골수가 과립구를 생산하고, 호중구 과립구 전구 세포 및 성숙 호중구의 생존, 증식, 분화 및 관능을 촉진하도록 유도하는 작용을 한다. 이는 다수의 상이한 세포 유형, 예컨대 내피 세포 및 마크로파지에 의해 제공된다. 당단백질로서 자연 발생되지만, 재조합 기법을 통해 제공되는 그의 비-글리코실화 형태인 G-CSF 가 완전 활성이다. 구조적으로는, G-CSF 는 4 개의 알파 나선 묶음의 존재로 알 수 있는 바와 같이, 클래스 1 사이토카인 패밀리와 연관이 있다 (Hill, C. 등, Proc Natl Acad Sci USA 90(11): 5167-71 (1993); Lovejoy, B. 등, J Mol. Biol. 234(3): 640-53 (1993). G-CSF 에 대한 아미노산 및 핵산 서열은, 다른 것들 중에서도 특히 쥐과동물 (Tsuchiya, M. 등, Proc Natl Acad Sci USA. 83(20): 7633-7 (1986); 래트 (Han, S.W. 등, Gene 175(1-2): 101-4 (1996)); 소 (Heidari, M. 및 Kehrl, M. E., Vet. Immunol. Immunopathol. 73(2): 183-91 (2000); 양 (O'Brien, P.M., DNA Seq. 4(5): 339-42 (1994)); 고양이 (Dunham, S. P. and Onions, D.E., 사이토카인 14(6): 347-51 (2001)); 돼지 (Kulmburg, P. 등, Gene 197(1-2): 361-5 (1997)); 및 인간 (Nagata, S. 등, EMBO J. 5: 575-581 (1986)) 에 대해 동정되었다. G-CSF 의 재조합 형태 및 변이체는, Lu, H.S. 등, Arch Biochem Biophys. 268(1): 81-92 (1989); Kuga, T. 등, Biochem Biophys Res Commun. 159(1): 103-11 (1989); 및 Fujii, I. 등, FEBS Lett. 410(2-3): 131-5 (1997)) 에 기재되어 있으며, 시판명 필그라스티 (filgrastim); 레노그라스티 (lenograstim); 플루리포이에틴 (pluripoietin), Neupogen , granulokine (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), 및 granulocyte (Rhone-Poulenc) 로 시판되어 입수가능하다.

<132> 집락 자극 인자 2 로도 공지되어 있는 GM-CSF 또는 과립구-마크로파지 집락 자극 인자는, 과립구, 마크로파지, 호산구 및 적혈구를 포함하는 다양한 계통의 조혈 전구 세포의 성장 및 분화를 자극한다. 이는 4 개 나선 묶음 구조를 가진 클래스 I 사이토카인 패밀리의 일부이며, 과립구-마크로파지 집락 자극 인자 수용체에 대한 결합에 의해 그의 생리학적 유효성을 발휘한다. GM-CSF 에 대해 공지된 아미노산 및 핵산 서열에는, 다른 것들 중에서도 특히, 마우스 (Gough, N. M. 등, Nature 309:763- 767(1984); 양 (McInnes, C.J. and Haig, M.C.K., Gene 105:275-279(1991); 소 (Maliszewski, C.R., Mol. Immunol. 25:843-850(1988)); 및 인간 (Cantrell, M.A. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6250-6254(1985); Lee, F. 등, Proc Natl Acad Sci USA. 82(13): 4360-4 (1985)) 이 포함된다. GM-CSF 의 재조합 형태 및 변이체는, DeLamarter, J. F. 등, EMBO J. 4(10): 2575-81 (1985); Shanafelt A.B. and Kastelein, R.A., Proc Natl Acad Sci USA. 86(13): 4872-6 (1989) 에 기재되어 있으며, 시판명 몰그라모스타틴 (molgramostin) 및 사르크라모스타틴 (sargramostim) 하에 시판되어 입수가능하다.

<133> 증량 목적의 성장 인자는 줄기 세포 인자 (SCF 또는 SF), FLT-3 리간드 (FL), 트롬보포이에틴 (TPO), 적혈구생성인자 (EPO), 및 이들의 유사체로부터 선택된다. 사이토카인과 마찬가지로, 성장 인자 형태는 자연 발생적인 생성물이거나 또는 자연 발생적인 인자와 유사한 생물학적 활성을 가진 재조합 형태이다. 따라서, 한 구현예에서, 성장 인자는 재조합 인간 rhuSCF, rhuFL, rhuTPO, rhuEPO, 및 이들의 유사체이다. 사이토카인의 선별과 마찬가지로, 성장 인자는 증량에 사용되는 세포 상에서 활성이 되도록 선택되며, 이에 따라 상기 기재된 바와 같이 연관성이 엄격한 것은 아니나, 일반적으로 초기 세포의 기원을 반영한다. 예로, 래트 및 마우스 SCF 는 인간 세포 상에서 활성이나, 인간 단백질은 마우스 또는 래트 세포 상에서는 훨씬 덜 활성이다. 상기 유형의 교차활성은 당업자에게는 자명하며, 공지된 방법으로 쉽게 시험될 수 있다. 특이적인 성장 인자의 구조 및 관능은 하기의 설명이 참조가 될 것이며, 이는 당업계의 지식 현황을 반영하며 제한의 의미는 아니다.

<134> SCF 는, c-kit 리간드, 비만 세포 성장 인자 또는 Steel 인자로도 공지되어 있는데, 조혈 계층구조의 다중적 수준에 작용하여, 다른 사이토카인과 조합되어 세포 생존, 증식, 분화, 결합 및 관능적 활성화를 촉진한다. 골수형 계통, 특히 비만 세포의 발생에 특히 중요하지만, 다관능성 줄기 및 전구 세포, 거핵세포 및 림프구 선조의 하위셋에도 작용한다 (Broudy, V.C., Blood 90(4): 1345-1364 (1997)). SCF 는 그의 수용체, C-KIT 에 결합하여 그의 생물학적 유효성을 발휘한다. 자연 발생 SCF 는, 두 가지 모두 생물학적으로 활성인 트랜스멤브레인 형태 또는 가용성 형태로서 골수 기조직 세포에 의해 합성된다. SCF 의 전체적인 구조는 정반대의 4 개 나선 묶음 폴딩 (anti-parallel four-helix bundle fold)을 갖는다 (Zhang, Z. 등, Proc. Natl. Acad. Sci USA 97(14): 7732-7 (2000)). SCF 로도 공지된 아미노산 및 핵산 서열에는, 다른 것들 중에서도 특히, 쥐과동물 (Lyman, S. D. 등, Cell 75(6): 1157-67 (1993)), 래트 (Martin, F.H. 등, Cell 63(1): 203-11 (1990)); 고양이 (Dunham, S.P. and Onions, D. E., DNA Seq. 6(4): 233-7 (1996); 양 (McInnes, C.J. 등,

Cytokine 11 (4): 249-56 (1999)); 개 (Shin, I.S. 등, J Vet Sci. 2(3): 159-66 (2001)); 및 인간 (Martin, F.H. 등, 상기 문헌) 의 것이 공지되어 있다. 제조합 SCF 및 변이체는, Jones, M. D. 등, J. Biol. Chem. 271 :11301 (1996); Lu, H.S. 등, J. Biol. Chem. 271 :11309 (1996); Langley, K.E. 등, Arch. Biochem. Biophys. 295:21 (1992); Lev, S. 등, Mol Cell Biol. 13(4): 2224-34 (1993); 및 Langley, K.E. 등, Arch. Biochem. Biophys. 311 :1): 55-61 (1994) 에 기재되어 있다.

<135>

"FLT-3 리간드" 는, "FL" 또는 "SL 싸이토카인" 또는 "FMS 관련 타이로신 키나아제 3 리간드" 로도 공지되어 있는데, CD34+ 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포 및 원시 전구 세포 상에서 일반적으로 발견되는 타이로신 키나아제 수용체 분자인 flt-3 수용체 (또한, "ACD135" 또는 "Aflk2") 에 결합하는 인자이다. 이는 CD117 (c-kit) 와 같은 다른 인자들과 상승작용하여 시험관내 조혈 줄기 세포 증식을 자극하고 생체내 전구 세포의 증량 및 동원을 자극한다 (Lyman, S. D. and Williams, D.E., Curr. Opin. Hematol. 2(3): 177-81 (1995)). 전장 FLT-3 리간드 (세포외 도메인, 트랜스멤브레인 도메인 및 세포내 도메인으로 이루어짐) 및 가용성 세포외 도메인 모두 생물학적으로 활성이다 (Lyman, S. D. 등, Cell 75:1157 (1993); Lyman, S. D. 등, Blood 83:2795 (1994)). 바람직하게는, FLT-3 리간드는 전장 세포외 도메인의 아미노산 서열을 포함하는 가용성 형태이다. 가용성 FLT-3 리간드의 구조에는, SCF 및 G-CSF 와 마찬가지로, 2 개의 짧은 사슬 알파-나선 묶음이 존재한다는 것이 밝혀졌다 (Savvides, S.N. 등, Nat. Struct. Biol. 7(6): 486-91 (2000)). FL 의 아미노산 및 핵산 서열은, 다른 것들 중에서도, 쥐과동물 (Rosnet, O. 등, OncoGene. 6(9): 1641-50 (1991); 고양이 (Yang S. and Sim, G. K., DNA Seq. 11(1-2): 163-6 (2000); 개 (Yang, S., 상기 문헌); 및 개 (Rosnet, O. 등, Blood. 82(4): 1110-9 (1993)) 에 대해 동정되었다. FLT-3 리간드의 제조합 형태 및 변이체는, 다른 것들 중에서도 특히, [Sudo, Y. 등, Blood 89:3186 (1997) 및 McClanahan, T. 등, Blood 88:3371-3382 (1996)] 에 기재되어 있다.

<136>

트롬보포이에틴 또는 "TPO" 는, 거핵세포 성장 및 분화 인자 (MGDF) 또는 c-Mpl 리간드로도 공지되어 있는데, 거핵세포의 증식 및 분화를 자극하여, 시험관내 및 생체내 혈소판 생산을 증강시키며 (참고문헌은, 예를 들어, Lok, S. 등, Stem Cells 12(6): 586-98 (1994)), TPO 는 프로토-암유발유전자 (proto-oncogene) c-mpl 에 의해 코딩되는 특이적인 세포 표면 수용체에 대한 결합을 통해 그의 영향력을 발휘한다. 다수의 다른 싸이토카인 및 성장 인자와 마찬가지로, TPO 는 서로 수직인 4 개-나선 묶음의 폴딩의 존재를 특징으로 한다 (Feese, M. D. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(7): 1816-21 (2004)). 트롬보포이에틴에 대한 아미노산 및 핵산 서열은, 다른 것들 중에서도 특히 쥐과동물 (Lok.S., Nature 369 (6481): 565-568 (1994)); 래트 (Ogami, K. 등, Gene 158(2): 309-10 (1995)); 및 인간 (Foster, D.C. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(26): 13023-13027 (1994); Bartley, T.D. 등, Cell 77 (7): 1117-1124 (1994)) 에 대해 공지되어 있다. TPO 의 제조합체 및 변이체 형태는, 다른 것들 중에서도 특히, [Souryi, M. 등, Cell 63:1137-1147 (1990); Gurney, A.L. 등, Blood 85(4): 981-8 (1995); Wada, T. 등, Biochem Biophys Res Commun. 213(3): 1091-8 (1995); Park, H. 등, J Biol Chem. 273(1): 256-61 (1998); 및 Jagerschmidt, A. 등, Biochem. J. 333 (Pt 3): 729-34 (1998)] 에 기재되어 있다.

<137>

적혈구생성인자 또는 EPO 는 미성숙 적혈구의 증량 및 성숙화 및 거핵세포 발생을 자극함으로써 적혈구 생산을 조절한다 (참고문헌은, 예를 들어, Fisher, J.W., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 216(3): 358-69 (1997)). 이는 EPO 수용체에 결합함으로써 그의 유효성을 발휘한다. EPO 합성에 대한 1 차적인 부위가 신장의 신장 피질이긴 하지만, 더 낮은 수준의 EPO 가 간 및 골수 중의 마크로파지에 의해 합성된다. EPO 는 4 개의 나선 묶음의 존재를 특징으로 하여, 구조적으로 TPO 와 유사하다 (Feese, M. D. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(7): 1816-21 (2004)). EPO 에 대한 아미노산 및 핵산 서열은, 다른 것들 중에서도 특히, 마우스 (Shoemaker, CB. and Mitsok, L.D. 등, Mol Cell Biol. 6(3): 849-58 (1986)); 래트 (Nagao, M. 등, Biochim. Biophys. Acta. 1171(1): 99-102 (1992)); 양 (Fu, P. 등, Mol Cell Endocrinol. 93(2): 107-16 (1993); 개 (Wen, D. 등, Blood 82(5): 1507-16 (1993)); 소 (Suliman, H.B. 등, Gene 171(2): 275-80 (1996)); 토끼 (Vilalta A. 등, Biochem Biophys Res Commun. 284(3): 823-7 (2001)); 돼지 (Wen, D. 등, 상기 문헌; David, R.B. 등, Domest Anim. Endocrinol. 20(2): 137-47 (2001); 원숭이 (Lin, F.K. 등, Gene. 44(2-3): 201-9 (1986)); 및 인간 (Lin, F.K. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (22): 7580-7584 (1985); Gasson, J.C. 등, Nature 315(6022): 768-71 (1985)) 에 대해 공지되어 있다. EPO 의 제조합 형태 및 변이체는, [Barbone, F.P. 등, Nephrol Dial Transplantation. 14 Suppl 2:80-4 (1999); Boissel, J.P. 등, J. Biol. Chem. 268(21): 15983-93 (1993)] 에 기재되어 있다. EPO 는 시판명 Epogen  (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), Epogin  (Chugai Pharmaceuticals, JAPAN), Eprex  (Janssen-Cilag, Saunderton, UK),

Recormon[®] (Roche, Basel, Switzerland), 및 Procrit[®] (Ortho Biotech., Bridgewater, NJ, USA) 로 시판되어 입수가가능하다.

- <138> 본원에서 사용되는 변이체에는, 싸이토카인 또는 성장 인자 서열 중 임의의 아미노산의 치환, 결실, 삽입을 포함하며, 여기서 변이체는 각각의 싸이토카인 또는 성장 인자와 연관된 생물학적 활성을 보유한다. 하나 이상의 아미노산 잔기의 치환은, 생물학적 활성을 유지하면서도 발생할 수 있고, 일반적으로, 본원에서 "보존성 치환" 으로도 언급되는, 한 아미노산의 상동성 아미노산의 치환을 수반한다. 일부 경우, 비-보존성 치환이 또한 일어날 수 있다. 상동성 아미노산은 소형 무극성 (예를 들어, 시스테인, 프롤린, 알라닌, 트레오닌); 소형 극성 (예를 들어, 세린, 글리신, 아스파르트레이트, 아스파라긴); 중형 극성 (예를 들어, 타이로신, 히스티딘, 트립토판); 대형 무극성 (예를 들어, 페닐알라닌, 메티오닌, 류신, 이소류신, 발린) 을 포함하여, 측쇄의 크기 및 극성 정도를 기준으로 계통화될 수 있다. 상동성 아미노산은 또한 하기와 같이 무리지를 수 있다: 비하전 극성 R 기 (예를 들어, 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민); 산성 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산); 및 염기성 아미노산 (라이신, 아르기닌, 및 히스티딘). 보존성 변이체의 예시에는, 이소류신, 발린, 류신, 또는 메티오닌과 같은 한 소수성 잔기의 다른 것으로의 치환; 한 극성 잔기를 또다른 극성 잔기로 치환, 예컨대 라이신에 대한 아르기닌, 아스파르트산에 대한 글루탐산 또는 아스파라긴에 대한 글루타민; 및 또다른 것에 대한 히드록실화 아미노산 세린 또는 트레오닌의 치환이 포함된다.
- <139> 일부의 경우, 특히 싸이토카인 또는 성장 인자가 물리적으로 분리가능한 구조적 및/또는 관능성 도메인을 갖는 경우, 결실이 훨씬 더 많이 일어날 수도 있지만, 결실은 약 1 내지 약 20 개 잔기의 범위이다. 예로, FL 의 변이체는 절단된 세포외 도메인인데, 이는, 상기 논의된 바와 같이, 트랜스멤브레인 및 세포질 도메인을 포함하는 서열로부터 분리되는 경우 생물학적 활성을 보유한다. 추가로, 아미노산은, 아미노 또는 카르복시 말단 또는 싸이토카인 또는 성장 인자에 존재하는 알파 나선 또는 베타 평면을 합치는 펩티드 영역과 같은, 구조적 도메인을 합치는 아미노산 서열에 부가될 수 있다. 각각의 싸이토카인 및 성장 인자에 대한 변이체는 당업자에게 자명하며, 예시적인 참고문헌은 상기에 제시되었다.
- <140> 싸이토카인 및 성장 인자 조합은 골수형 계통의 최종 분화 세포의 생산을 한정하면서, 수임 골수형 전구 세포를 증량시키기 위해 선택된다. 한 구현예에서, 싸이토카인 및 성장 인자의 혼합물은 기본적인 조성 SCF, FL 및 TPO 를 갖는다. 상기 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물은 HSC 및 다른 선조 세포들이 증량 HSC 의 분화를 제한하고, 다른 것들 중에서도 특히, CMP, GMP 및 MEP 를 포함하여, MP 로 분화되도록 한다.
- <141> 추가 국면에서, 기본적인 조성물은 IL-3, IL-6 또는 IL-11, 또는 이들의 조합을 포함하는, 추가적인 싸이토카인으로 보충된다. 이에 따라, 한 구현예에서, 싸이토카인 및 성장 인자의 혼합물의 조성은 SCF, FL, TPO, 및 IL-3 으로, 인간 골수형 전구 세포를 효율적으로 증대시키는 것으로 나타난 싸이토카인 혼합물이다. 또다른 구현예에서, 싸이토카인 및 성장 인자의 혼합물의 조성은 SCF, FL, TPO, 및 IL-6 으로, 귀과동물 골수형 전구 세포를 효율적으로 증량시키는 것으로 나타난 싸이토카인 혼합물이다. 또다른 구현예에서, 싸이토카인 및 성장 인자의 혼합물의 조성은 SCF, FL, TPO, IL-6 및 IL-11 이다.
- <142> 골수형 계통의 더욱 성숙한 세포가 호중구감소증 및/또는 저혈소판혈증에 대항하는 즉각적인 보호를 증강시키기 위해 필요한 경우, 싸이토카인 G-CSF 또는 GM-CSF 가 상기 싸이토카인 혼합물에 첨가된다. 이는 G-CSF 또는 GM-CSF 이 결핍된 배지에서 성장의 초기 기간 후에 실시되어, 골수형 계통에 추가로 동반될 전구 세포로의 분화를 촉진시키기 전에 더 많은 원시 골수형 전구 세포의 증량을 가능하게 한다.
- <143> 상기의 상이한 싸이토카인 및 성장 인자 혼합물은 특이적 전구 세포의 증량을 쉽게 하기 위해 사용될 수 있다는 점이 이해될 것이다. 특정 세포군의 바람직한 증량은, 세포들이 단독적인 상태 또는 상태들의 조합 (예를 들어, 호중구감소증 및 저혈소판증) 을 치료하기 위해 이용되는 경우, 및 치료 유효 기간이 필요한 경우에 바람직하다. 예로, CMP 는 과립구, 마크로파지, 거핵세포 및 적혈구 세포로 분화할 수 있기 때문에, CMP 의 존재성은 호중구감소증 및 저혈소판혈증 모두에 있어서 장기간의 완화를 제공할 것이다. 한편, 상당한 비율의 GMP 가 있는 세포군은, CMP 및 MEP 와 비교시, GMP 가 과립구 및 마크로파지로는 분화하나 거핵세포로는 분화하지 않으므로, 호중구감소증의 완화는 제공하나 저혈소판혈증에 대해서는 더 적은 치료 효과를 갖는다. 역으로, 상당한 비율의 MEP 가 있는 세포군은, CMP 및 GMP 와 비교시, MEP 가 적혈구 세포 및 거핵세포로는 분화하나 과립구 및 마크로파지로는 분화하지 않으므로, 저혈소판혈증의 완화는 제공하나 호중구감소증에 대해서는 더 적은 치료 효과를 갖는다.
- <144> 증량 배지에서의 싸이토카인 및 성장 인자의 양은 세포 배양물 중 특정 수준까지의 골수형 전구 세포의 증량을

지지하기에 충분한 양이다. 대표적인 구현예로서, SCF 는 적어도 약 1 내지 약 1000 ng/ml, 바람직하게는 약 50 내지 약 100 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. FL 은 일반적으로는 적어도 약 1 내지 약 1000 ng/ml, 바람직하게는 약 30 내지 약 100 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. TPO 는 일반적으로는 적어도 약 0.5 내지 약 500 ng/ml, 바람직하게는 약 5 내지 약 50 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. IL-1 은 일반적으로는 적어도 약 1 내지 약 100 ng/ml, 바람직하게는 약 10 내지 약 50 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. IL-3 은 일반적으로 적어도 약 1 내지 약 100 ng/ml, 바람직하게는 약 10 내지 약 50 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. IL-11 은 일반적으로는 적어도 약 1 내지 약 100 ng/ml, 바람직하게는 약 10 내지 약 50 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. G-CSF 는 일반적으로는 적어도 약 1 내지 약 1000 ng/ml, 바람직하게는 약 10 내지 약 100 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. GM-CSF 는 일반적으로는 적어도 약 1 내지 약 100 ng/ml, 바람직하게는 약 10 내지 약 100 ng/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. 사용되는 경우, EPO 는 일반적으로는 적어도 약 1 내지 약 30 U/ml, 바람직하게는 약 3 내지 약 10 U/ml 의 양인, 증량을 지지하기에 충분한 양으로 사용된다. 일반적인 안내사항으로서, 사이토카인 및 성장 인자의 혼합물은 조혈 줄기 세포의 증량을 제한하면서 골수형 전구 세포의 성장을 자극한다.

<145> 골수형 전구 세포의 증량은 기본 배지에서 수행되는데, 이는 골수형 전구 세포의 증량을 지지하기에 충분한 상 기 기재된 사이토카인 및 성장 인자의 혼합물로 보충된다. 기본 배지는, 아미노산, 탄소 공급원 (예를 들어, 피루베이트, 글루코오스 등), 비타민, 혈청 단백질 (예를 들어, 알부민), 무기염, 2 가 이온, 항생제, 완 충제 및 골수형 전구 세포의 증량을 지지하는 기타 바람직한 규정 성분을 함유할 것이다. 적합한 기저 배지 에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, RPMI 배지, Iscove's 배지, 최소 필수 배지, Dulbeccos Modified Eagles Medium 및 기타 당업계에 공지된 것이 포함된다 (참고문헌은, 예를 들어, U.S. 특허 제 6,733,746 호).

시판되어 입수가 가능한 기본 배지에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, Stemline™ (Sigma Aldrich), StemSpan™ (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), Stempro™ (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) HPGM™ (Cambrex, Walkersville, MD, USA), QBSF™ (Quality Biological, Gaithersburg, MD, USA), X-VIVO (Cambrex Corp., Walkersville, MD, USA) 및 Mesencult™ (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) 이 포함된다. 상기 및 기타 배지의 제형은 당업자에게 자명하다.

<146> 최초의 세포군은 기본 배지에서 사이토카인 및 성장 인자의 혼합물과 접하며, 골수형 전구 세포군의 증량을 위 해 배양된다. 증량은 제 2 일째 내지 제 14 일째에, 바람직하게는 제 4 일째 내지 제 10 일째, 더욱 바람직 하게는 약 제 4 일째 내지 제 8 일째 및/또는 표시된 배수 증량 및 특징적인 세포군이 수득될 때까지 실시된다.

<147> 한 구현예에서, 최종 세포 배양물 제제는 약 0.5 배 이상, 약 1 배 이상, 약 5 배 이상, 약 10 배 이상, 약 20 배 이상, 또는 바람직하게는 약 30 배 이상 증량되는 CMP 세포군을 특징으로 한다. 최종 배양물에서, 골수 형 세포군은 배양물 중 세포 전체의 약 0.5% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상인 CMP 를 포함한다.

<148> 또다른 구현예에서, 최종 세포 배양물 제제는 약 10 배 이상, 약 20 배 이상, 약 40 배 이상, 바람직하게는 약 80 배 이상 증량된 GMP 세포군을 특징으로 한다. 최종 배양물에서, 골수형 세포군은 배양물 중 전체 세포의 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 바람직하게는 약 50% 이상인 GMP 를 포함한다. 이에 따라, 바람직 한 구현예에서, 세포군은 GMP 세포가 바람직하게 풍부하게 되도록 증량된다.

<149> 또다른 추가 구현예에서, 최종 세포 배양물 제제는 약 0.1 배 이상, 약 1 배 이상, 약 2 배 이상, 약 5 배 이상, 바람직하게는 약 10 배 이상 증량된 MEP 세포군을 특징으로 한다. 최종 배양물에서, 골수형 세포군은 배양물 중 전체 세포의 약 0.5% 이상, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 바람직하게는 약 5% 이상인 MEP 를 포함한다.

<150> 일반적으로, 최종 배양물에서, HSC 특징이 있는 세포의 증량은 약 25 배 미만, 바람직하게는 약 15 배 미만, 더 욱 바람직하게는 약 10 배 미만, 가장 바람직하게는 약 5 배 미만으로 제한된다. 일반적으로, HSC 세포의 갯수는 배양물 중 골수형 전구 세포 (예를 들어, CMP, GMP 및 MEP) 의 합계보다 더 적다.

<151> 실용적인 이유로는 덜 바람직하긴 하지만, 일부의 경우 조혈이 발생하는 골수의 미세환경을 맞춰주기 위해 피더 세포 (feeder cell) 를 포함하는 더욱 비정규적인 배양 배지가 사용될 수 있다. 골수 기조직 세포, 내피 세

포 및 간엽 세포가 배양물 중 조혈 세포의 발생 및 유지를 지지하는 인자들을 생산할 수 있고, 골수형 전구 세포의 증량에 이용될 수 있다. 피더 세포 배양물은 또한 세포 증량 및 특이적인 골수형 전구 세포의 발생을 촉진하기 위해 상기 기재된 사이토카인 및 성장 인자의 혼합물로 보충될 수 있다. 피더 세포 기재의 배양물은, U.S. 특허 제 5,879,940 호; Dexter, T.M. 등, J. Cell Physiol. 91 :335-344 (1976); Okubo, T. 등, Cell Structure and Function 25:133-139 (2000); Shapiro, F. 등, J Hematother 5(6): 655-62 (1996)); Coutinho, L. H. 등, "Clonal and long term bone marrow cultures using human bone marrow" in Haematology: A Practical Approach, Testa, N. G. and Molineux, G. 편저, Oxford University, Oxford, UK (1992); 모든 출판물은 참고문헌으로 포함된다) 에 기재되어 있다. 일반적으로, 골수 유래의 단핵 세포들은 적합한 배지 (예를 들어, Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 에서 기조직 세포층이 형성될 때까지 배양된다. 이어서, 배양물에 방사선조사를 하고, 증량에 사용되는 최초 세포군과 함께 시딩된다.

<152> 피더 세포 배양을 근간으로 하는 또다른 방법은, Feugier, P. 등, J Hematother Stem Cell Res 11 (1): 127-38 (2002)) 에 기재되어 있다. 상기 기법은 HSC 및/또는 전구 세포의 성장을 지지할 만큼 충분한 사이토카인 및 성장 인자를 발현하도록 개질된 불멸화 골수 내피 세포를 이용한다. 특이적인 사이토카인 및 성장 인자를 코딩하는 재조합 발현 벡터는 불멸화된 세포주에 도입되고, 세포는 내피 세포를 제공하는 인자의 충을 생성하도록 배양된다. 이어서, 세포에 방사선조사를 하고, 배양물을 증량에 사용되는 세포와 함께 시딩한다. 일반적으로, HSC 및 전구 세포는 상기 배양 조건 하에서는 약하게 고정되거나 또는 고정되지 않는데, 이는 내피 세포로부터 증량된 세포를 씻어내는 것을 가능하게 한다. 본원에서의 목적을 위해, 불멸화 세포에 도입된 사이토카인 및 성장 인자 유전자는 수임 골수형 전구 세포의 증량을 지지하기에 충분한 조합을 반영한다. 따라서, 한 구현예에서, 사이토카인 유전자는 IL-1 (예를 들어, IL-1 β), IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF 또는 CM-CSF 를 코딩하는 것들로부터 선택된다. 유사하게, 성장 인자 유전자는 SCF, FL, TPO 및 EPO 를 코딩하는 것들로부터 선택된다.

<153> 상기에 따르면, 한 구현예에서, SCF, FL 및 TPO 를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터는 피더 세포에 도입된다. 추가 구현예에서, IL-3, IL-6, 또는 IL-11, 또는 이들의 조합을 포함하는 추가적인 사이토카인을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현 벡터는 성장 인자 조합과 함께 사용된다. 이에 따라, 한 구현예에서, 피더 세포에 도입된 유전자는 SCF, FL, TPO 및 IL-3 를 코딩한다. 추가 구현예에서, 세포에 도입된 유전자는 SCF, FL, TPO 및 IL-6 를 코딩한다. 또다른 추가 구현예에서, 유전자는 SCF, FL, TPO, IL-6 및 IL-11 을 코딩한다. 유전자 서열은 증량에 이용되는 세포 상에서 활성인 사이토카인 및 성장 인자 형태를 발현하도록 선택되어, 일반적으로 증량에 사용되는 최초 세포의 기원을 반영한다. 예를 들어, 전구 세포가 인간 기원인 경우, 사이토카인의 인간 형태를 코딩하는 핵산 서열이 사용된다. 증량을 위한 세포가 쥐과동물 기원인 경우, 사이토카인의 쥐과동물 또는 기타 설치류 형태를 코딩하는 핵산 서열이 사용된다. 사용될 수 있는 핵산 서열에는 당업계에 공지된 바와 같은 재조합 형태 또는 변이체를 코딩하는 것이 포함된다. 골수형 전구 세포의 증량을 지지하기에 충분한 각종 기타 유전자 조합은 당업자에게 자명하다.

<154> 상기 방법으로 증량된 세포는 추가 정제없이 사용되거나 또는 당업계에 공지된 각종 기법들, 예컨대 면역친화성 크로마토그래피, 면역 흡수, FACS 분류 또는 상기 기재된 바와 같은 기타 과정들에 의해 상이한 세포군으로 분리된다. 바람직하게는, FACS 분류 또는 면역흡수가 이용된다. 예를 들어, FACS 관문 전략 (gating strategy) 에는 특징적인 전방 스캐터 (세포 크기) 및 측방 스캐터 (세포 밀도) 파라미터를 기준으로 한 살아있는 세포에 대한 최초의 선별, 및 골수형 전구 세포 또는 비-골수형 세포 (예를 들어, Sca-1^{neg} c-kit^{hi}) 에 대한 세포 마커의 발현에 대한 두번째 선별이 있다.

<155> 분리된 세포군은 본원에 기재된 바와 같은 분리된 수임 골수형 전구 세포, 분리된 CMP, 분리된 GMP, 분리된 MEP 을 포함한다. 일부 경우에서, 분리된 비-골수형 세포군은 증량된 배양물로부터의 수임 골수형 세포의 분리로 제조된다. 분리된 세포는 일반적으로 실질적으로 순수한 세포군이고, 여기에는 일반적으로 약 50% 이상, 바람직하게는 약 75 내지 80%, 더욱 바람직하게는 약 85 내지 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의, 특징적인 세포 마커 표현형 및 분화 잠재성이 있는 표시된 세포가 있다.

<156> 6.4 골수형 전구 세포의 동종타생 혼합물

<157> 상기 논의된 바와 같이, 치료 목적으로 충분한 갯수의 세포를 제공하고 시판되어 구할 수 있는 임상용 제품의 생산을 가능하게 하기 위해서, 세포군은 바람직하게는 다수의 동종타생 공여자로부터 획득되는 동종타생 골수형 전구 세포의 혼합물이다. 수령자의 MHC 와 미스매치되는 치료용 세포에 대한 면역 응답성의 가능성이 있음에도 불구하고, 본 발명의 요법은 HSC 에 의한 조혈의 재건으로 제공되는 더 영구적인 보호와 대조되는 임시적

인 보호를 제공한다는 의미가 있다.

- <158> 현저하게, 본원에 기재된 바와 같이, GVHD 의 가능성은 성숙 림프구 세포가 결핍된 분리된 수임 골수형 전구 세포를 이용하여 대대적으로 최소화된다. 한 구현예에서, 이는 투여 전 증량된 세포군으로부터 상기 세포를 제거함으로써 달성된다. 대안적인 바람직한 구현예에서, 이는 실질적으로 순수한 CD34+ CD90+ HSC 의 군으로 출발함으로써 달성된다.
- <159> 동종타생 세포의 혼합물에는, 골수형 전구 세포의 동종타생 혼합물, 분리된 CMP 의 혼합물, 분리된 GMP 의 혼합물, 분리된 MEP 의 혼합물, 또는 이들의 조합이 포함된다. 상기 혼합물 중의 세포는 이식 수령자의 MHC 와 관련해서는 완전 매치된 동종타생, 부분적으로 미스매치된 동종타생 및/또는 전부 미스매치된 동종타생 세포일 수 있으며, 일반적으로는 동일한 부모 대립형질을 가진 동기라는 유연관계가 있는 공여자 또는 유연관계가 없는 공여자 유래일 수 있다. MHC 미스매치 정도의 결정은 당업계에 공지된 표준 시험을 이용한다.
- <160> 예로, 이식 생물학에서 중요한 것으로 식별되는, 인간에서의 MHC 유전자의 6 개 이상의 주된 카테고리가 있다. HLA-A, HLA-B, HLA-C 는 HLA 클래스 I 단백질을 코딩하며, HLA-DR, HLA-DQ 및 HLA-DP 는 HLA 클래스 II 단백질을 코딩한다. 각각의 상기 군에서의 유전자들은, 인간 집단에서 발견되는 다수의 HLA 대립형질 또는 변이체에 반영되는 바와 같이 고도로 다형성이며, 상기 군에서의 개인들 간의 차이는 이식된 세포에 대항하는 면역 응답성의 강도와 연관되어 있다. MHC 매치 정도를 결정하는 표준 방법에서는 HLA-B 와 HLA-DR, 또는 HLA-A, HLA-B 와 HLA-DR 군에서의 대립형질을 검사한다. 이에 따라, 2 또는 3 개의 HLA 군에서는 4 가지 이상, 바람직하게는 6 가지 이상의 MHC 항원으로 각각 시험된다.
- <161> 혈청학적 MHC 시험에서, 각각의 HLA 항원 유형에 대한 항체는 한 대상체 (예를 들어, 공여자) 유래의 세포와 반응시켜 항체와 반응하는 특정 MHC 항원의 존재 또는 부재를 결정한다. 이는 다른 대상체 (예를 들어, 수령자) 의 반응성 프로파일과 비교된다. 항체와 MHC 항원과의 반응은 일반적으로 항체와 세포를 인큐베이션한 후, 세포 해리를 유발하는 보충물을 첨가하여 결정된다 (예를 들어, 림프구 독성 시험). 상기 반응은 반응에서 해리되는 세포의 양에 따라 시험 및 등급화한다 (Mickelson, E. and Petersdorf, E.W., Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E.D. 등, 편저, pg 28-37, Blackwell Scientific, Maiden, MA (1999)). 다른 세포-기재 검정에는 표지화된 항체 또는 효소 연관 면역 검정 (ELISA) 이 포함된다.
- <162> MHC 유형 결정을 위한 분자적인 방법은 일반적으로 HLA 단백질을 코딩하는 특이적인 유전자 서열을 검출하기 위한 합성 프로브 및/또는 프라이머를 이용한다. 합성 올리고뉴클레오타이드는 특정 HLA 유형들과 연관된 제한 효소 절편 길이 다형성을 검출하기 위한 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다 (Vaughn, R.W., Methods in Molecular Biology: MHC Protocols 210:45-60 (2002)). 대안적으로, 프라이머는 HLA 서열 증폭을 위해 사용될 수 있고 (예를 들어, 중합효소 연쇄 반응 또는 라이게이션 연쇄 반응에 의함), 그의 생성물은 추가로 직접적인 DNA 서열분석, 제한 분절 다형성 분석 (RFLP), 또는 일련의 특이적인 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 이용한 혼성화 (SSOP) 로 시험할 수 있다 (Petersdorf, E.W. 등, Blood 92(10): 3515-20 (1998); Morishima, Y. 등, Blood 99(11): 4200-6 (2002); 및 Middleton, D. and Williams, F., Methods in Molecular Biology: MHC Protocols 210:67-112 (2002)).
- <163> "매치된 동종타생" 또는 "미스매치된 동종타생" 의 설명이 인간 MHC 에 제시되는 경우, 이는 각종 동물종에 대한 MHC 에 대해 유사한 분석이 수행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 여기에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, 마우스, 래트 (Gill, T.J. 등, Transplantation Proc. 27(2): 1495-500 (1995)), 소 (Lewin, H.A. 등, Immunol Rev. 167:145-58 (1999)), 개 (Wagner, J. L. 등, J. Hered. 90(1): 35-8 (1999)), 고양이 (O'Brien, S.J. and Yuhki, N., Immunol Rev. 167:133-44 (1999)), 돼지 (Chardon, P. 등, Genet Sel. Evol. 32(2): 109-28 (2000)), 말 (Kydd, J. 등, Vet Immunol Immunopathol. 42(1): 3-60 (1994)), 및 영장류 (Heise, E. R. 등, Genetica 73(1- 2): 53-68 (1987)) 가 포함된다.
- <164> 골수형 전구 세포의 동종타생 혼합물은 MHC 에서 매칭 (matching) 의 정도가 다양할 수 있다. 이에 따라, 한 구현예에서, 임시적 접목 및 분화 중에 있는 전구 세포는, 더욱 즉각적인 치료 효과를 제공하고자 하는 세포보다 수령자와의 MHC 매치 정도가 더 높은 공여자로부터 분리될 수 있다. 예로, CMP 는 수령자의 MHC 와 완전히 또는 부분적으로 매치된 공여자 유래일 수 있으며, GMP 및 MEP 는 미스매치된 공여자 유래일 수 있다. 기타 조합들은 당업자에게 자명할 것이다.
- <165> 세포들의 동종타생 혼합물은 여러가지 방식으로 제조될 수 있다. 한 구현예에서, 세포들은 상이한 공여자로부터 수득되며, 배양물 내에서 그의 증량 전에 혼합된다. 또다른 구현예에서, 상이한 공여자 유래의 골수형

전구 세포는 따로따로 증량된 후, 동종타생 전구 세포의 혼합물을 제공하기 위해 증량 후 혼합된다. 또다른 국면에서, 동종타생 세포들의 혼합물은 상이한 공여자 유래의 골수형 전구 세포를 수득한 후, 수령자에 대한 그의 주입 전에 세포를 혼합함으로써 증량된 세포로부터 제조된다. 증량 또는 비-증량 세포를 사용하는지의 여부에 따라, 본원에서의 구현예에서 동종타생 골수형 전구 세포가, 잠재적으로 치사율이 높은 호중구감소증 및/또는 저혈소판혈증 상태로 인해 제대로 발휘되지 못하는 포유류 대상체의 보호에 유효하다는 것을 보여준다.

<166> 6.5 냉동보존 골수형 전구 세포

<167> 놀랍게도, 본원에서 처음 증명된 바와 같이, 본원에 기재된 증량된 세포군은 후일의 사용을 위해 냉동보존 및 저장될 수 있으며, 그의 관능성을 여전히 보유한다. 상기 기재된 바와 같이, 세포 냉동을 위한 각종 배지 및 프로토콜이 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 세포들은 농축되어, 냉동보호제 및/또는 안정화제가 보충된 배지에 현탁시키고, 냉동시켜 0°C 이하의 온도로 저장된다. 일부 구현예에서, 세포들은 -70°C 이하, 예를 들어 -80°C, 또는 액체 질소 중에 또는 액체 질소의 증기상 중에 저장된다. 세포는 당업계에 공지된 임의의 냉동보호제에 저장될 수 있다. 예를 들어, 냉동보호제는 디메틸 설펝사이드 (DMSO) 또는 글리세롤일 수 있다. 일부 구현예에서, 냉동 배지는 DMSO 을 약 5 내지 10%, 10 내지 90% 의 혈청 알부민, 및 50 내지 90% 의 배양 배지를 함유한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 배지는 DMSO 를 약 7.5%, 약 42.5% 의 혈청 알부민 및 약 50% 의 배양 배지를 함유한다. 세포는 당업계에 공지된 임의의 안정화제에 저장될 수 있다. 예를 들어, 안정화제는 메틸 셀룰로오스 또는 혈청일 수 있다.

<168> 냉동 전에, 세포는 셀 बैं크 (cell bank) 창출을 위해 여러 개의 용기에 나눌 수 있다. 세포를, 예를 들어 유리 또는 플라스틱 바이알 또는 관 또는 주머니에 저장할 수 있다. 세포를 추후 사용해야하는 경우, (하나 이상의 용기에 있는) 냉동보존 세포 중 일부를 셀 बैं크로부터 선택하고, 해동하여 사용할 수 있다.

<169> 6.6 치료

<170> 본원에 기재된 방법으로 제조된 세포는 질환 또는 골수말소 치료에 의해 생긴 조혈에서의 결핍과 관련된 각종 장애의 치료에 사용된다. 본원에 사용된 바와 같이, "치료" 는 치료 차원 또는 예방 차원의 치료, 또는 질환, 장애 또는 바람직하지 않은 상태의 억제 수단을 의미한다. 치료에는, 질환 병후의 발병 이전 및/또는 임상적인 발현 또는 질환 또는 상태의 다른 발현 후 적당한 형태의 세포를 대상체에 투여하여 질환 정도를 경감시키거나, 질환 진행을 막거나 또는 질환을 없애는 것이 포함된다. 질환의 방지에는, 바람직하게는 장애에 대한 발병가능성이 높아진 대상체에서, 장애 또는 질환의 병후 발병을 미루거나 또는 지연시키는 것이 포함된다.

<171> 본원에 기재된 세포로 치료하기에 적합한 상태에는, 호중구 순환량이 감소하는 것을 특징으로 하는 상태인 호중구감소증 및 말초혈에서 혈소판의 정상적인 수준보다 더 낮은 것을 특징으로 하는 상태인 저혈소판증이 포함된다. 두 상태 모두 후천적이거나 또는 선천적인 장애의 결과일 수 있다.

<172> 호중구 수 감소를 야기하는 결함이 있는 조혈 줄기 세포 발생에는, 다른 것들 중에서도 특히 세망 이생성 (reticular dysgenesis), 판코니스 빈혈 (Fanconis's anemia), 체디아크-히가시 증후군 (Chediak-Higashi syndrome) 및 순환성 호중구감소증이 포함된다. 저혈소판혈증에 대해서, 낮은 혈소판 수준은, 다른 것들 중에서도 특히, 비스코트-알드리치 증후군 (Wiskott-Aldrich Syndrome), 저혈소판혈증 (TAR), 및 전신 홍반 루푸스에서 흔하다. 호중구감소증 및 저혈소판혈증의 후천적 형태는 혈액학적 악성종양, 비타민 결핍, 이온화 방사선조사에 대한 노출, 바이러스 감염 (예를 들어, 단핵구증, CMV, HIV, 등) 으로 인한 것과 같은 유사한 상황에서 발생하며, 각종 세포독성 약물을 이용한 치료가 후속한다.

<173> 본 발명의 목적에 있어서, 세포는 호중구감소증 및 저혈소판혈증, 및 그의 동반되는 합병증을 감소시키기 위해, 특히 골수말소제로 치료하거나 또는 HSCT 가 있던 환자에서 기회 감염을 감소시키기 위해 예방차원에서 사용할 수 있다. 이식 설정에서, 골수형 세포는 수령자 자신의 HSC 또는 이식된 HSC 가 조혈을 유지하면서 호중구 및 혈소판 수준을 충분히 상승시킬 때까지, 줄기 세포 이식과 동시에 또는 그에 후속하여 사용될 수 있다. 골수형 전구 세포의 주입은 치료 대상체에서 호중구 및 거핵세포의 수를 증가시킴으로써, 임시적이긴 하지만 호중구감소증 또는 저혈소판혈증 기간에 필요한 보호를 제공한다. 더 분화된 호중구 및 혈소판과는 달리, 골수형 전구세포군을 사용하는 것은, 시험관 내에서 골수형 선조의 임시적인 접목 및 생체내에서의 그의 분화때문에 더 길게 지속되는 보호를 제공한다.

<174> 추가로, CMP, GMP 및 MEP 의 혼합물을 포함하는 세포는 임의의 한 단일한 세포군의 주입에 의해 제공되는 보호보다 더 광범위한 치료 효과를 제공할 역량을 갖는다. 이는, 세포군에서 더 분화된 선조로부터 호중구 및/

또는 혈소판 수준에 대한 빠른 유효성으로 인한 것이며, 이 때 더 원시적인 수임 골수형 선조는 더 분화된 세포가 고갈된 후 필요한 호중구 및 거핵세포를 공급할 시간에 접목 및 발생한다. 전구 세포의 혼합물을 포함하는 세포군을 이용한 주입은 이미 호중구감소증 또는 저혈소판혈증을 앓은 대상체에 적당하며, 분리된 세포군의 주입은 호중구 또는 혈소판 수준이 임계 수준까지는 아직 떨어지지 않는 환자에서의 예방에 적합할 수 있다.

치료가 말초 세포 계수 또는 ANC 의 탐지가능한 증가를 제공할 수 있지만, 상기 증가가 성공적인, 임시적 접목 또는 효능의 믿을만한 표시자는 아니라는 점을 유의한다. 이에 따라, 다른 기준들, 예컨대 감소된 감염율 및/또는 증가된 생존율은 치료 유효성 측정에 이용될 수 있다.

<175> 치료 유효성 달성에 필요한 세포의 양은 특별한 목적에 대한 통상적인 과정에 따라 실험적으로 결정된다. 일반적으로, 치료 목적으로 세포를 투여하기 위해서는, 세포를 약학적 유효 투여량으로 제공한다. "약학적 유효량" 또는 "약학적 유효 투여량" 은 원하는 생리학적 효과 제공에 충분한 양 또는 원하는 결과, 특히 장애 또는 질환의 하나 이상의 병후 또는 발병의 경감 또는 제거를 포함하는, 장애 또는 질환 상태의 치료 달성이 가능한 양이다. 설명과 마찬가지로, 호중구감소증을 앓는 환자에 대한 세포의 투여는 앓고있는 상태가 호전되거나 또는 완화될 때 뿐만 아니라 환자가 질환과 관련된 병후의 정도 또는 기간의 감소를 보고하는 경우에도 치료 효과를 제공하는 것이다. 치료 효과에는 또한, 개선이 현시화되는지 여부와 상관없이, 앓고있는 질환 또는 장애 진행의 방해 또는 서행화가 포함된다. 상기 정의된 약학적 유효 투여량은, 하기에 더 설명될, 세포와 조합되어 사용되는 치료 화합물에도 적용될 것이다.

<176> 주입용 세포에는, 본원에 기재된 바와 같은 규정된 세포 마커 표현형결정 및 특징적인 분화 잠재성이 있는, 추가적인 정제를 하지 않은 증량된 세포군 또는 분리된 세포군이 포함된다. 증량된 세포는 단독적인 대상체로부터 유도될 수 있는데, 여기서 세포는 자가의 것이거나 또는 수령자와 동종타생이다. 따라서, 한 구현예에서, 치료용 세포는 분리된 수임 골수형 선조를 포함한다. 다른 구현예에서, 세포는 분리된 CMP, 분리된 GMP, 분리된 MEP, 또는 이들의 조합을 포함한다. 다른 구현예에서, 주입에 사용되는 세포는 상기 기재된 바와 같이 제조된 비-골수형 세포를 포함한다.

<177> 배양 중에 증량 없이 공여자 대상체로부터 직접 분리한 세포는 증량된 세포와 동일한 치료 목적에 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 바람직하게는, 분리된 세포는 실질적으로 순수한 세포군이다. 이들 증량된 세포는 자가 유래일 수 있는데, 여기서 주입될 세포는, 예컨대 세포말소체로 처리하기 전에 수령자로부터 취득된다. 또다른 구현예에서, 증량된 세포는 수령자에 대해 동종타생인데, 여기서 세포는 수령자의 MHC 와 완전히 매치되거나, 또는 부분적으로 또는 전부 미스매치이다. 상기 기재된 바와 같이, 분리된 증량된 세포는 바람직하게는 동종타생 골수형 세포의 혼합물을 제공할 상이한 공여자로부터 취득된다.

<178> 적당한 숙주에 대한 세포의 이식은 당업계에 일반적으로 사용되는 방법으로 수행된다. 바람직한 투여 방법은 정맥내 주입이다. 주입되는 세포의 수는 성별, 연령, 체중, 질환 또는 장애의 유형, 장애의 진행단계, 세포군에서 원하는 세포의 백분율 (예를 들어, 세포군의 순도), 및 치료 효과 제공에 필요한 세포의 수와 같은 인자들을 고려하여 취한다. 일반적으로, 주입되어 증량된 세포의 수는, 체중에 대해 약 1×10^4 내지 약 1×10^5 세포/kg, 약 1×10^5 내지 약 10×10^6 세포/kg, 바람직하게는 약 1×10^6 세포 내지 약 5×10^6 세포/kg, 또는 필요에 따라 그 이상이다. 일부 구현예에서, 세포는 약제학적으로 허용되는 담체 중에 약 1×10^9 내지 약 5×10^9 개의 세포로 존재한다. 세포는 치료 유효성 제공에 충분한 정해진 시간에 걸쳐 1 회 주입, 또는 연속 주입을 통해 투여된다. 치료가 연속적인 주입을 수반하는 경우, 상이한 세포군이 주입될 수 있다. 하기에 추가로 기재되는 바와 같이, 약제학적으로 허용되는 담체가 환자에 대한 세포의 주입에 이용될 수 있다. 이들은 일반적으로, 예를 들어 완충화 식염수 (예를 들어, 인산 완충화 식염수) 또는 비보충 기저 세포 배양 배지 또는 당업계에 공지된 배지를 포함할 것이다.

<179> 6.7 부속적 치료

<180> 각종 부속적 치료가 상기 기재된 바와 같이 증량되거나 또는 증량되지 않은 세포를 사용하여 이용된다. 호중구감소증 및 관련된 상태의 치료를 위해, 증량된 세포는 주입된 세포의 치료 효과를 증강시키거나 또는 호중구감소증으로 인한 합병증을 치료하는 다른 시약 및 화합물과 병용하여 사용될 수 있다. 한 국면에서, 부속적 치료에는, 다른 것들 중에서도 특히, 항진균제, 항박테리아제 및 항바이러스제가 포함된다. 상기 제제들의 사용은 또한 감염 발생을 감소시키거나 또는 혈소판 파괴를 유도하는 임의의 발생가능한 감염을 피하기 위한 예방으로서 저혈소판혈증의 치료에 유용하다.

- <181> 한 국면에서, 부속적 투여제는 항-진균제이다. 진균 감염은 호중구감소증이 있는 환자의 주된 사망 원인 중 하나인데, 골수말소 요법 및 HSCT 중인 환자에서 심각한 문제점이다. 지연된 접목이 있는 수령자 및 GVHD가 발생하는 환자에게는 일반적으로 오래 가는 호중구감소증이 있는데, 이에 따라 진균 감염에 대한 위험이 크다. 진균 감염의 유형은 다양하며, 여기에는 다른 것들 중에서도 특히, 캔디다증 (예를 들어, 캔디다 크루세이 (*Candida krusei*), 캔디다 갈라브라타 (*Candida glabrata*), 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 캔디다 프로피칼리스 (*Candida tropicalis*) 로 인한 것), 아스페르길루스증 (예를 들어, 아스페르길루스 푸미가투스 (*aspergillus fumigatus*), 아스페르길루스 플라부스 (*aspergillus flavus*) 로 인한 것), 킬곰팡이증 (예를 들어, 리조비움 아리주스 (*rhizobium arrhizus*), 아브시디아 코림비페라 (*absidia corymbifera*), 리조무코르 푸실루스 (*rhizomucor pusillus*) 로 인한 것), 효모균증, 히스토플라스마증 (*histoplasma capsulatum*), 및 콕시디오테스 이미티스 (*coccidioides immitis*) 가 포함된다.
- <182> 부속적 투여를 위한 항진균제는 일반적으로 전신용 항진균제이다. 상기 유형의 한 가지 유용한 항진균제는 폴리엔 마크롤라이드 항생제의 패밀리 유래의 암포테리신 B 이다. 암포테리신 B 는, 테옥시콜레이트와의 복합물로서; 콜레스테아릴 설페이트와의 콜로이드성 현탁액; 및 대두 레시틴, 콜레스테롤 및 디스테아로일포스와 티딜글리세롤로 제조된 리포솜으로 캡슐화된 것을 포함한 여러가지 제형일 수 있다. 기타 제형은 당업계에 공지되어 있다.
- <183> 또다른 항진균제는 플루싸이토신, 불소화 피리미딘이다. 진균에 의한 플루싸이토신의 탈아민화는 5-플루오로우라실, 항-메타볼라이트 및 DNA 합성 저해제를 제공한다. 플루싸이토신은 일반적으로 크립토코코스 (*cryptococcus*) 의 감염 및 캔디다증에 사용된다. 단독으로도 사용되긴 하나, 플루싸이토신은 일반적으로 암포테리신 B 와 병용하여 사용된다.
- <184> 이미다졸 및 트리아졸은 아졸 계열의 항진균제의 광범위한 계열을 대표한다. 이미다졸 및 트리아졸은 스테롤 14- α -디메틸라아제를 저해하여 에르고스테롤의 생합성 부전 및 전자 수송과 같은 세포막 기질의 활성의 파괴를 초래하는 것으로 여겨진다. 아졸 계열의 항-진균제는 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*), 캔디다 글라브라타 (*Candida glabrata*) 및 캔디다 네오포르만스 (*Candida neoformans*) 와 같은 특정 유형의 캔디다증에 유효하다. 전신 투여를 위한 예시적인 아졸 항진균제에는, 다른 것들 중에서도 특히, 케노코자올, 이트라콘자올, 플루코나졸, 에코나졸, 보리코나졸 및 테르카노졸이 포함된다.
- <185> 진균 감염에 더하여, 호중구감소증이 있는 환자는 각종 박테리아성 병원에 감염되기 쉽다. 골수말소 요법 및 HSCT 이 있는 환자는 그람 양성 (*Gram positive*) (예를 들어, 스트렙토코코스 (*streptococcus*) 및 스태필로코코스 아우레우스 (*staphylococcus aureus*)) 및 그람 음성 (*Gram negative*) 박테리아 (예를 들어, 대장균 및 슈도모나스 아에루기노사 (*pseudomonas aeruginosa*)) 모두에 의한 박테리아 감염 비율이 높다. 패혈증이 일반적으로 발생한다. 추가로, 접목 지연 및 스트렙토코코스 뉴모니아 (*streptococcus pneumoniae*) 또는 헤모필러스 인플루엔자 (*haemophilus influenza*) 와 같은 캡슐화 박테리아에 대한 면역 응답성 복원의 악화가 GVHD 이 있는 이식 수령자의 사망율을 증가시킨다.
- <186> 부속적 항박테리아 요법은 특별한 박테리아 병원에 적합한 임의의 공지된 항생제를 이용할 수 있다. 여기에는, 광범위한 항생제 및 대상이 더욱 특화된 항-박테리아 화합물이 모두 포함된다. 증량된 골수형 세포에 적합한 각종 클래스의 항박테리아제에는, 예시로서 이에 제한되지 않으나, 퀴놀론 및 플루오로퀴놀론, β -락탐 항생제, 아미노글리코사이드, 테트라사이클린, 마크롤라이드 및 그의 각종 전구물질 (*cogener*) 이 포함된다. 예시적인 퀴놀론 화합물에는, 시크로플록사신, 오픈록사신, 스파르플록사신, 로메플록사신 및 목시플록사신이 포함된다. 예시적인 β -락탐 항생제에는, 페니실린 (예를 들어, 페니실린 G, 페니실린 V), 앰피실린, 카르베니실린, 메티실린, 카르바페넴 및 세팔로스포린 (예를 들어, 세팔로틴, 세파만돌, 세파클로르, 세포니시드, 세포테탄, 세파톡심, 세프트지덤, 세프트족심, 세페픽) 이 포함된다. 예시적인 아미노글리코사이드에는, 네오마이신, 스트렙토마이신, 카나마이신, 젠타마이신, 토브라마이신, 아미카신 및 네틸마이신이 포함된다. 예시적인 마크롤라이드에는, 에리트로마이신, 클라리트로마이신 및 아지트로마이신이 포함된다. 기타 항생제는 당업자에게 자명하다.
- <187> 바이러스 감염은 또한 골수말소 환자 및 HSCT 에서 문제가 된다. 일반적으로, 바이러스 감염 위험의 증가는 골수말소 요법에 의한 악화된 세포 매개 면역으로부터 기인한다. 다수의 상기 감염들은 혈청양성 환자 또는 혈청양성 공여자의 세포에 존재하는 지연성 바이러스의 재활성화로 인한 것이다. 일반적으로 접하게 되는 바이러스에는, 다른 것들 중에서도 특히, 싸이토메갈로바러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스, 헤레페스바이러스-6, 엡스타인 바아 바이러스; 아데노바이러스 등이 포함된다. 세포 주입과

함께, 선택된 항-바이러스 화합물은 환자가 접하게 되는 바이러스에 적당한 것이다. 유용한 항바이러스 화합물에는, 예시로서 이에 제한되지 않지만, 시도포비르, 간시시클로비르, 이독수리딘, 펜시클로비르, 발칸시클로비르, 발라시클로비르, 비다라빈, 아만타딘, 리만타딘, 자나미비르, 포미비르센, 이미퀴모드 및 리바비린이 포함된다. 레트로바이러스에 대한 치료에는, 다른 것들 중에서도 특히, 뉴클레오시드 역전사 저해제 (예를 들어, 지도부딘, 디다노신, 스타부딘, 잘시타빈, 람비두딘), 비-뉴클레오시드 역전사 저해제 (예를 들어, 네비라핀, 에파비렌즈, 델비루딘), 및 프로테아제 저해제 (예를 들어, 사퀴나비르, 인디나비르, 리토나비르, 넬피나비르, 암프레나비르 및 로피나비르) 가 포함된다.

<188> 항진균제, 항박테리아제 및 항바이러스제는 감염 발생을 감소시키기 위한 예방책으로서, 또는 질환 출현시 사용될 수 있다. 예방은 특히 면역억제 환자에서 일반적인 진균 감염, 및 혈청양성 환자 또는 혈청양성 이식 공여자에서의 바이러스 감염에 대응하기 위해 중요하다. 따라서, 치료 목적이 구현예에는 증량되거나 또는 분리된 골수형 전구 세포와 항진균, 항박테리아 또는 항바이러스 화합물의 조합을 포함한다.

<189> 저혈소판혈증 및 관련 상태에 대한 추가적인 부속적 치료에는, 혈소판 수치를 안전한 수준으로 임시적으로 만들 혈소판의 이동주입 (transfusion) 이 포함된다. 이동주입 (transfusion) 은 이동주입 (transfusion) 된 세포에 의한 혈소판 생산이 회복될 때까지 지속한다.

<190> 추가 구현예에서, 부속적 투여제는 최종 분화된 골수형 세포, 특히 과립구, 마크로파지, 거핵세포 및 적혈구 세포의 분화 및 동원을 증강시키는 사이토카인 또는 성장 인자이다. 과립구 발생을 증강시키기 위해, 사이토카인 C-CSF 및 GM-CSF 가 사용될 수 있다. G-CSF 는 HSCT 에서의 호중구 생산 및 접목 가속화에 유효하다. 또다른 구현예에서, 사이토카인 또는 성장 인자는 트롬보포이에틴이다. TPO 의 투여는 이식된 전구 세포의 접목을 증강시키며, 거핵세포 및 혈소판의 발생을 촉진시킨다 (Fox, N 등, J. Clin. Invest. 110:389-394 (2002); Akahori, .H. 등, Stem Cells 14(6): 678-689 (1996)).

<191> 각종 비히클 및 부형제, 및 투여 경로가, 당업자에게 자명한 바와 같이 부속적 요법에 이용될 수 있다. 대표적인 제형 기법은, 특히, 본원에 전부 참고문헌으로 포함되는 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995) 및 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed, Kibbe, A.H. ed., Washington DC, American Pharmaceutical Association (2000)] 에 교시되어 있다.

<192> 약제학적 조성물은 일반적으로 약제학적으로 허용되는 담체 및 약학적 유효량의 화합물, 또는 이들의 혼합물, 또는 이들의 적합한 염을 함유한다. 약제학적 조성물은 분말, 용액, 현탁액, 에어로졸, 고체, 필, 정제, 캡슐, 겔, 국소용 크림, 좌제, 경피 패치 및 당업계에 공지된 기타 제형물로 제형화될 수 있다.

<193> 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체" 는 약제학적 조성물의 제형화에 있어서 당업자에게 공지된 임의의 표준적인 약제학적으로 허용되는 담체를 함유한다. 이에 따라, 화합물 자체는, 예컨대 약제학적으로 허용되는 염, 또는 콘주게이트는 약제학적으로 허용되는 담체; 예를 들어, 식염수, 인산염 완충 식염수 (PBS), 수성 에탄올 또는 글루코오스의 용액, 만니톨, 텍스트란, 프로필렌 글리콜, 오일 (예를 들어, 식물성 오일, 동물성 오일, 합성 오일 등), 미세결정성 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스, 히드록실프로필 메틸 셀룰로오스, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 포스페이트, 젤라틴, 폴리소르베이트 80 등 중의 제형물로서, 또는 적당한 부형제 중의 고체 제형물로서 제조될 수 있다.

<194> 약제학적 조성물은 종종 추가로 하나 이상의 적당한 완충제 (예를 들어, 중성 완충화 식염수 또는 인산염 완충화 식염수), 탄수화물 (예를 들어, 글루코오스, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란), 만니톨, 단백질, 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신, 산화방지제 (예를 들어, 아스코르브산, 나트륨 메타비설파이트, 부틸화 히드록시톨루엔, 부틸화 히드록시아니솔 등), 세균발육억제제, 킬레이트제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온, 제형물이 수령자의 혈액에 대해 등장성, 저장성 또는 약한 고장성이 되도록 하는 용액, 현탁화제, 증점제, 보존제, 풍미제, 당화제 및 착색 화합물을 포함한다.

<195> 당업자에게 공지된 임의의 적합한 담체가 조성물에 이용될 수 있으며, 상기 유형의 담체는 일반적으로 투여 양태에 따라 변경된다. 치료 조성물은, 예를 들어 경구, 경비, 점막, 직장, 질, 국소, 정맥내, 복막내, 경피, 피하 및 근육내 투여를 포함하는 임의의 적당한 투여 방식을 위해 제형화될 수 있다.

<196> 비경구 투여를 위해, 조성물은 멸균 발열원 제거 물, 오일, 식염수, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜 또는 에탄올과 같은 멸균 액체일 수 있는 약제학적 담체를 사용해 생리학적으로 허용되는 희석제 중의 물질의 용액 또는 현탁액의 주사가능한 투여량으로서 투여될 수 있다. 추가적으로, 보조 물질, 예컨대 습윤제, 계면활성제, pH

완충 물질 등이 조성물에 존재할 수 있다. 약제학적 조성물의 다른 성분들은 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것, 예를 들어 낙화생유, 대두유, 옥수수유, 면실유, 에틸 올레이트 및 이소프로필 미리스테이트의 비수성 용액이다.

<197> 본원에 기재된 약제학적 조성물은 단위-투여량 또는 다중-투여량 용기, 예컨대 밀봉된 앰플 또는 바이알에 제공될 수 있다. 상기 용기들은 일반적으로 제형물이 사용될 때까지 제형물의 멸균성 및 안정성을 유지하도록 하는 방식으로 밀봉된다. 일반적으로, 제형물은 상기 기재된 바와 같이 오일성 또는 수성 비히클 중에 현탁액, 용액 또는 에멀전으로서 저장될 수 있다. 대안적으로, 약제학적 조성물은 사용 직전에 멸균 액체 담체의 첨가만 있으면 되는 냉동-건조 상태로 저장될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 약제학적 조성물은 대상이 되는 증량된 골수형 전구 세포를 적당한 냉동보존 매질에 냉동보존하는 것을 포함하여 제공되며, 이는 이후 환자에 대한 투여에 필요할 때 해동 및 재현탁될 수 있다.

<198> 숙주에 투여되는 양은 피투여물, 투여 목적, 예컨대 예방 또는 치료, 숙주의 상태, 투여 방식, 투여 횟수, 투여 간격 등에 따라 가변적이다. 이것은 당업자에 의해 경험적으로 결정될 수 있으며, 치료 응답성의 정도에 맞게 조정될 수 있다. 적당한 투여량 결정에 있어 고려될 요인들에는, 이에 제한되지 않으나, 대상체의 크기 및 중량, 대상체의 연령 및 성별, 병후의 심각한 정도, 질환의 진행 단계, 제제의 전달 방법, 제제의 반감기 및 제제의 효능이 포함된다. 고려해야 할 질환의 진행 단계에는, 급성 또는 만성, 회귀 (relapsing) 또는 중단 (remitting) 기간, 및 질환의 진행도가 포함된다.

<199> 치료 유효량에 대한, 투여량 및 투여 기간 결정은 당업자의 재량이다. 예를 들어, 초기 유효량은 세포 배양 또는 기타 시험관내 검정으로부터 추산될 수 있다. 세포 배양 검정으로 결정되는 IC_{50} 의 것을 포함하여, 순환 농도 또는 조직 농도를 제공하도록 동물 모델에서 투여량을 제형화할 수 있다.

<200> 추가로, 일반적으로 세포 배양 검정 및/또는 실험 동물로, 일반적으로는 LD_{50} (시험군 50%에 대한 치사 투여량) 및 ED_{50} (시험군 50%에서의 치료 유효)을 결정하여, 독성 및 치료 효능이 결정된다. 안내사항은, 예를 들어 표준 참고 문헌인 [Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed. (Hardman, J.G. 등, 편저) McGraw-Hill, New York, NY (2001)]에서 찾을 수 있다.

<201> 본 발명의 목적에 있어서, 투여 방법은 치료할 상태, 대상체 항체의 형태, 및 약제학적 조성물에 따라 선택된다. 치료 화합물의 투여는, 이에 제한되지 않으나, 피하, 정맥내, 복막내, 근육내 및 가능하다면 특정 장기, 예를 들어 비장 또는 골수에 대한 직접적인 주사를 포함하는 여러가지 방식으로 수행될 수 있으며, 전신 투여가 바람직하다. 약제학적 조성물의 투여는 단일한 경로 또는 동시적인 여러 경로를 통해 있을 수 있다.

<202> 조성물은, 다른 것들 중에서도 특히 주치의에 의해 처방되는 치료 유의사항 및 판단에 따라 1일 1회, 1일 수회 또는 1일 다회 투여될 수 있다.

<203> 6.8 키트

<204> 본원에 기재된 조성물의 기타 구현예는 증량 및/또는 분리된 골수형 전구 세포, 싸이토카인 및 성장 인자 (예를 들어, G-CSF, GM-CSF, TPO) 및/또는 부속적 치료 화합물을 포함하는 키트이다. 라벨은 일반적으로 키트에 동반되며, 임의의 서식 또는 기록 매체를 포함할 수 있고, 이는 키트 내용물의 사용에 대한 안내사항 또는 기타 정보를 제공하는, 전기적 또는 전산 검독이 가능한 형태 (예를 들어, 디스크, 광학 디스크, 메모리 칩, 또는 테이프) 일 수 있다.

<205> 7. 실시예

<206> 7.1 실시예 1: 실험 방법

<207> 마우스 유래 HSC 세포의 제조. 마우스 골수 세포를 수득하기 위해, 동물을 안락사시키고, 대퇴부/경골을 제거하고 근육을 발라낸다. 뼈를 막자사발을 이용해 펄프처럼 부수고, 골수를 나일론 망을 통해 여과하고, 1200 RPM에서 5분 동안 원심분리한다. 세포를 얼음 상에서 1 ml ACK 용액 (0.3M NH_4Cl , 0.2M $KHCO_3$, MiliQ 여과수)에 3내지 4분 동안 재현탁시킨 후, 염색 매질 (2% FCS 및 2 mM EDTA를 함유하는 HANK 완충 식염수, w/o 칼슘, w/o 마그네슘, w/o 페놀 레드)을 이용해 관을 채움으로써 세척한다. 세포를 원심분리하고, 여과하고, 염색 매질에 재현탁시키고, 마우스 IgG (1 mg/ml 스톡의 1:50 희석, Sigma, St Louis MO)를 첨가한다. 세포를 얼음에서 10내지 15분 동안 인큐베이션한 후, CD117 마이크로비드 (Miltenyi Biotech, Auburn CA)

와 10 μ l/마우스의 부피로 최종 100 μ l/마우스 염색 매질의 부피가 되도록 혼합한다. 세포를 얼음 상에서 25 분 동안 인큐베이션한다. 세포를 세척하여, 최종 농도 약 1 ml/마우스로 염색 매질에 재현탁시키고, 나일론 망을 통해 여과한다. 세포를 AutoMACs (Miltenyi, Auburn, CA) 를 이용하여, 제조사의 지시에 따라 이용가능한 설정을 이용하여 풍부화한다.

<208> 풍부화 후, 세포를 염색 매질에 약 1×10^8 세포/ml 로 재현탁시킨 후, 규정된 콘주게이션화 항체 (eBioscience, San Diego, CA) 를 적당한 농도로 첨가한다: Sca-1 알로피코시아닌 (APC), c-kit R-피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7), Thy-1.1 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 계통 (CD3, CD4, CD5, CD8, B220, mac-1, Gr-1 및 Ter119) R-피코에리트린 (PE).

<209> 세포를 얼음에서 25 분 동안 인큐베이션하고, 세척하고 원심분리하고, 염색 매질에 재현탁시킨다. 프로피디움 요오다이드 (PI) 를 첨가해 죽은 세포를 배제시킨다. 마우스 KTLS-HSC, c-kit^{high}Thy^{low}Sca-1^{pos} lineage^{neg} 를 FACS 로 분리한다.

<210> 세포 배양 및 증량. Lin^{neg/low} KTLS-HSC 를 BA 마우스 (H2kb) 로부터 분류해 내고, 싸이토카인 및 성장 인자 조합 c-KitL, FL, TPO 및 IL-6; 펜스트랩 (100x), 글루타맥스 (100x), 2-메르캅토에탄올 (5×10^{-5} M), c-KitL (50 ng/ml), FL (30 ng/ml), TPO (5 ng/ml) 및 IL-6 (10 ng/ml) (Biosource, Camarillo, CA and R & D Systems, Minneapolis, MN) 를 포함하는 500 μ l/웰 무혈청 배지 (X-Vivo15 기본 배지 (Cambrex Bioscience, MD)) 에 플레이팅했다. 세포를 24 웰 플레이트에 약 10,000 세포/웰로 플레이팅한다. 세포를 7 일 동안 배양하여 MP_c (배양물 유도성 MP) 을 수득한다. 세포에 500 μ l/웰로 제 2 일에 공급하고, 제 4 일에는 배지를 새로운 배지로 갈아준다. 제 5 일에, 세포를 1 ml 의 추가적인 새로운 배지가 있는 6 웰 플레이트에 옮긴다. 제 7 일에, 배양된 세포를 수집하고, 2 개의 소량 분취물을 분석용으로 취한다. 분취물을 30,000 개의 비드와 혼합하고, 염색하여 MP (CMP/GMP/MEP) 및 HSC 함량에 대해 분석한다. 추가로, 세포를 트립판 블루로 염색하고, 혈구계수기 상에서 계수한다. 분석 데이터는 HSC 및 MP (CMP/GMP/MEP) 의 배수 증량 및 전체 세포 수에 대한 정보를 제공한다.

<211> 골수형 세포 유형에 대한 시험관내 배양의 분석. 6.7 μ M 비드 (Spherotech, Libertyville, IL) 의 현탁액은 4 내지 5 방울의 비드를 1 ml 의 염색 매질 (SM) 에 첨가하여 제조한다. 비드를 혈구계수기 및 트립판 블루 (1 :10 희석) 를 이용하여 계수한다. 비드를 2×10^6 비드/ml 를 초과하는 스톡 농도로 하고, 현탁액을 사용하는 경우 수일만에 걸쳐 사용 전에 매일 계수한다. 피펫을 사용하여, 20K 비드를 세포의 각 웰에 첨가하여 분석한다. 비드 현탁액은, 비드를 웰에 첨가하기 전 각 샘플 사이에서 와류시킨다. 웰을 여러 샘플, 예를 들어 3 개의 샘플로 나눌 경우, 적당한 갯수의 비드를 다시 첨가하여 (예를 들어, 정상 샘플 = 60K/웰에 대해 3 x 20K 비드), 각 샘플이 분석을 위해 약 20K 비드의 종말점을 갖게 한다.

<212> IL7R 염색을 이용한, 증량된 세포군에서의 마우스 HSC 의 염색: 세포를 각각의 웰에서 덜어내고, 세척한 후 대응하는 원뿔형 FACS 관에 옮긴다. 세포를 5 분 동안 1100 rpm 에서 원심분리하고, 상청액을 제거한다. 50 μ l 의 블로킹 항체 (래트 IgG 및 마우스 IgG 1:50) 를 첨가하고, 10 분 동안 인큐베이션한 후, 추가로 50 내지 100 μ l 의 CD117-바이오틴 (2X 농도) 을 각 관에 첨가한다. 이어서, 암실에서 20 분 동안 얼음에서 인큐베이션하고, 세포를 2 내지 3 ml 의 SM 로 세척하고, 원심분리하고, 적당한 농도의 항체를 이용하는 50 내지 100 μ l 의 하기 항체 용액에 재분산시킨다 (eBioscience, San Diego, CA): 스트렙타비딘 캐스캐이드 블루 (Molecular Probes, Eugene, OR), Sca-1 알로피코시아닌 (APC), Thy-1.1 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), IL-7R $\square$ R-피코에리트린 (PE) 및 B220, Mac-1, GR-1 R-피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7). 이어서, 얼음에서 25 분 동안 인큐베이션하고, 세포를 세척하고, 원심분리하고, PI 을 포함하는 염색 매질에 재분산시킨다. 세포를 FACS 로 HSC 에 대해 분석한다.

<213> IL7R 염색없이 증량된 세포군에서의 mHSC 에 대한 염색. 세포를 각 웰에서 취하고, 세척시킨 후 대응하는 원뿔형 FACS 관에 옮긴다. 세포를 5 분 동안 1100 rpm 으로 원심분리하고, 상청액을 제거한다. 50 μ l 의 블로킹 항체 (래트 IgG 및 마우스 IgG 1 :50) 를 첨가한 후, 적당한 농도의 하기 항체를 이용하는 50 내지 100 μ l 의 항체 용액을 첨가한다 (eBioscience, San Diego, CA): Sca-1 알로피코시아닌 (APC), Thy-1.1 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), c-kit 피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7), B220, Mac-1, GR-1 R-피코에리트린. 이어서, 얼음에서 25 분 동안 인큐베이션하고, 세포를 세척하고 원심분리하고, PI 를 포함하는 염색 매질에 재현탁시킨다. 세포를 FACS 로 HSC 에 대해 분석한다.

- <214> 배양물 증량된 세포군에서의 골수형 선조에 대한 염색: 세포를 상기 기재된 HCS 세포 염색에 대한 것과 동일한 방법으로 준비했다. 50 μ l 의 블로킹 항체 (라트 IgG 및 마우스 IgG 1:50) 와 인큐베이션한 후, 50 내지 100 μ l 의 CD117-바이오틴 (2X 농도) 을 각 관에 첨가한 후, 암실에서 얼음에서 20 분 동안 인큐베이션했다. 세포를 2 내지 3 ml 의 SM 으로 세척하고, 원심분리한 후, 50 내지 100 μ l 의 항체 용액에 적당한 농도로 재현탁시켰다: 스트렙타비딘 캐스캐이드 블루 (Molecular Probes, Eugene, OR), Sca-1 알로피코시아닌 (APC), CD34 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 2.4G2 (Fc $\square$ R) R-피코에리트린 및 B220, Mac-1, GR-1 피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7) (eBioscience, San Diego, CA). 세포를, HSC 분석에 대해 한 것과 같이 FACS 분석용으로 제조한다.
- <215> 성숙 전구 세포 하위세트에 대한 배양 증량 세포의 염색: 세포는 상기 기재된 바와 같이 과정을 거친다. 항체와의 인큐베이션 후, 50-100 μ l 의 CD3-바이오틴, CD4-바이오틴 및 CD8-바이오틴 (2X 농도) 을 각각의 관에 첨가하고, 20 분 동안 암실의 얼음에서 인큐베이션한다. 세포를 2 내지 3 ml 의 염색 매질로 세척하고, 원심분리하고, 50 내지 100 μ l 의 항체 용액에 재분산시킨다: 스트렙타비딘 캐스캐이드 블루 (Molecular Probes, Eugene, OR), B220 (FITC), Ter119 R-피코에리트린 (PE) 및 Mac-1, GR-1 R-피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7) (eBioscience, San Diego, CA)). 얼음에서의 25 분간의 인큐베이션 후, 세포를 상기 기재된 바와 같이 FACS 분석용으로 가공한다.
- <216> 마우스 골수형 전구 세포 분리 - 계통 고갈. 대퇴부 및 경골을 상기 기재된 바와 같이 처리하고, 세포를 1 ml 의 염색 매질에 재분산시킨다. 블로킹 라트 및 마우스 IgG (1:50) 를 첨가하고, 혼합물을 얼음에서 10 내지 15 분 동안 인큐베이션한다. 세포를 계수하고 염색 매질 중에 10^8 세포/ml 까지 만든 후, 바이오틴화 항체를 예정된 희석으로 한다: D3, CD4, CD5, CD8, CD 127, Ter119, Thy-1.1 및 GR-1. 세포를 얼음에서 25 분 동안 인큐베이션하고, 세척하고 원심분리한 후, 40 μ l/마우스 스트렙타비딘 비드 (Miltenyi, Auburn, CA) 에 재분산시킨다. 염색 매질을 100 $\square$ l/마우스로 최종 부피까지 첨가하고, 얼음에서 20 분 동안 인큐베이션하고, 세포를 2 회 세척하고, 염색 매질에 10^8 세포/ml 로 재분산시킨다. 이어서, 나일론 체를 통해 여과시킨다. 계통 양성 세포는 AutoMacs (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) 를 이용하여 민감 고갈 양태를 이용하는 제조사의 지시에 따라 고갈시킨다. 계수 후, 세포를 하기의 항체를 적당한 농도를 포함하는 염색 매질 중에 1×10^8 세포/ml 로 재분산시킨다: 스트렙타비딘 피코에리트린-시아닌 5 탠덤 (PE-Cy5), Sca-1 알로피코시아닌 (APC), CD34 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), 2.4G2 R-피코에리트린 (PE) 및 c-kit R-피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7) (Pharmingen and eBioscience, San Diego, CA). 세포를 항체와 얼음에서 25 분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 원심분리하고, PI 를 포함하는 염색 매질 중에 재분산시킨다. 하기의 FACS 분류 전략을 이용한다: CMP 를 lineage^{neg/lo} c-kit^{pos} Sca-1^{neg} CD34^{pos} 2.4G2^{low} 를 기준으로 분류하고; GMP 는 lineage^{neg/lo} c-kit^{pos} Sca-1^{neg} CD34^{pos} 2.4G2^{pos} 를 기준으로 분류하며; MEP 는 lineage^{neg/lo} c-kit^{pos} Sca-1^{neg} CD34^{low} 2.4G2^{low} 를 기준으로 분류한다.
- <217> 아스페르길루스 푸미가투스 코니디아 (Aspergillus fumigatus conidia) 의 배양 및 접종 및 진균 하중 분석: 냉동 포자 원액 유래의 포자 한 루프를 텍스트로오스 아가 (SDA) 배양 플레이트의 중앙에 위치시키고, 플레이트를 밀봉하고 37 $^{\circ}$ C 에서 임의의 오염 징후에 대한 주기적인 체크와 함께 2 내지 3 일 동안 배양한다. 2 내지 3 일 후, 흑색 포자가 플레이트를 덮었다. 플레이트를 0.05% Tween 80 을 포함하는 5 ml 의 PBS 로 약하게 헹구내고, 포자들이 용액으로 분산될 때까지 플레이트를 살짝 긁어낸다. 포자 스톡은 균사 제거를 위한 멸균 거즈를 통해 코니디아 현탁액을 여과함으로써 제조한다. 용액은 포자로 인해 흑색이며, ml 당 10^8 까지의 코니디아를 포함할 수 있다. 포자 스톡을 4 $^{\circ}$ C 에서 저장한다. 포자를 적정하기 위해, 일련의 희석을 PBS/Tween 80 에서 하고, SDA 플레이트에 플레이팅한다. 밤새 인큐베이션 후, 플레이트를 집락 수에 대해 검사한다. 장기간 포자 저장을 위해선서는, 소정 부피의 수합된 스톡 포자를 같은 부피의 50% 글리세롤과 혼합하고, -80 $^{\circ}$ C 에서 저장한다.
- <218> 마우스에 대한 포자의 주사는 ml 당 1,000 코니디아를 포함하는 코니디아 용액 (Sabourauds 텍스트로오스 아가 플레이트 상에서 적정) 을 이용하여 수행한다. 작업 포자 용액 (100 μ l) 을, 일반적으로 예방 연구에서는 제 8 일에, 치사량의 방사선조사 및 HSC 및/또는 MP 를 이용해 재건 후, 대상 마우스에 대한 꼬리 정맥 주사를 이용하여 정맥내 주사한다. 투여 후, 남은 포자 용액의 100 μ l 분취물을 Sabauroud 텍스트로오스 아가 플레이트에 플레이팅하고, 37 $^{\circ}$ C 에서 인큐베이션한다. 이튿날 집락을 계수하여 주사시 필요한 활성 코니디아의

양을 확인한다.

- <219> 진균 하중 분석. 이소플루란의 흡입에 의한 안락사 후, 아스페르길루스를 꼬리 정맥을 이용해 정맥내 투여한다. 마우스를 희생시키고, 검사용으로 폐를 수합했다. 폐를 Sabourand 텍스트로오스 아가 플레이트에서 배양하여 진균 성장을 검출한다.
- <220> 공여자 세포 존재에 대한 재건 마우스의 스크리닝. 공여자 세포군에 대해 mHSC 및/또는 mMP 로 이식된 마우스의 스크리닝은 0.5 ml 인 PBS 중 5mM EDTA 에 약 10 내지 15 방울의 혈액을 실온에서 수집하여 한다. PBS 중 1 ml 의 2% 텍스트란-500 을 첨가하고, 혼합하고, 37°C 에서 30 내지 45 분 동안 인큐베이션한다. 대부분의 적혈구가 가라앉는다. 수득한 상청액을 새로운 관에 옮기고, 세포를 원심분리 (5 분, 1000 rpm) 로 수집하고, 적혈구를 1.0 ml 의 1 X ACK 로 5 내지 6 분 동안 얼음에서 해리시킨다. 이후 세척하고, 5 분 동안 1200 rpm 에서 원심분리한다. 펠렛이 여전히 적색이라면, 세척 단계를 반복한다. 세포를 래트 IgG 및 마우스 IgG (각각 1:50) 를 이용해 관마다 50 μ l 으로 10 내지 15 분 동안 얼음에서 블로킹한다. 바이오틴 화 Mac-1 및 GR-1 (eBioscience, San Diego, CA) 를 적당한 농도로 첨가하고, 암실 내의 얼음에서 20 분 동안 인큐베이션한다. 세포를 세척하고, 5 분 동안 1200 rpm 에서 원심분리한다. 하기의 항체를 적당한 농도로 첨가한다: Streptavidin Cascade Blue (Molecular Probes, Eugene, OR), CD45.1 알로피코시아닌 (APC), CD45.2 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), B220 R-피코에리트린 시아닌 탠덤 (PE-Cy7) 및 CD3, CD4, CD8 R-피코에리트린 (PE) (eBioscience, San Diego, CA). 이어서, 얼음에서 25 분 인큐베이션을 하고, 세포를 세척하고, 원심분리하고, PI 를 포함하는 SM 에 재분산시킨다. 세포를 FACS 로 분석한다.
- <221> H2 마커를 이용한 공여자 세포에 대한 재건 마우스의 스크리닝. PBS 중 5 mM EDTA 0.5 ml에 약 10 내지 15 방울의 혈액을 실온에서 수집한다. PBS (RT) 중 2% 텍스트란-500 1 ml 을 첨가하고, 혼합물을 37°C 에서 30 내지 45 분 동안 인큐베이션한다. 대부분의 적혈구가 가라앉는다. 상청액을 새 관으로 옮기고, 세포를 원심분리 (5 분, 1000 rpm) 로 수집한다. 적혈구를 얼음에서 1.0 ml 의 1X ACK (0.3M NH_4Cl 0.2M KHCO_3) 로 5 내지 6 분 동안 해리시키고, 세척한 후, 5 분 동안 1200 rpm 에서 원심분리한다. 펠렛이 여전히 진한 적색이면, 단계 4 내지 5 를 반복한다. 세포는, 래트 IgG 및 마우스 IgG (각각 1:50) 를 이용해 관마다 50 μ l 로 10 내지 15 분 동안 얼음에서 블로킹한다. 세포를 20 분 동안 하기의 항체와 함께 염색한다: Mac-1 및 GR-1 피코에리트린-시아닌 7 탠덤 (PE-Cy7), B220 알로피코시아닌 (APC), CD3, CD4 및 CD8 바이오틴 (eBioscience, San Diego, CA).
- <222> 추가적인 항체는 이식에 사용되는 마우스 쌍에 따라 MHC 마커 표지에 사용한다: H2Kd-PE (Balb/c) 및 H2Kb-FITC (C57/B6) 또는 H2Db-PE (C57/B6) 및 H2Dk-Fitc (AKR). 세포를 5 분 동안 1200 rpm 에서 원심분리한 후, 스트렙타비딘 캐스캐이드 블루 (Molecular Probes, Eugene, OR) 로 염색한다. 얼음에서 20 분 인큐베이션 후, 세포를 세척하고, 5 분 동안 1200 rpm 에서 원심분리한 후, PI 로 염색한다. 세포를 FACS 로 분석한다.
- <223> 7.2 실시예 2. 생체의 증량된 냉동보존 동종타생 골수형 선조는 호중구감소증 마우스에서 치사량의 진균에 대해 보호작용을 함
- <224> 본 연구는 HSC 가 생체의에서 대량의 관능성 골수형 선조로 증량될 수 있는지 여부; 생체의 증량된 골수형 선조가, BM 으로부터 분류된 골수형 선조에 의해 제공되는 보호에 필적하게, 치명적인 진균으로부터 동종타생 호중구감소증 마우스를 보호하는지 여부를 시험하며; 골수형 선조가 활성의 소실없이 냉동보존될 수 있다는 것을 보여준다.
- <225> 도 1 은 예시적인 실험 디자인이다. 도 1A 는 분류 및 분석된 세포군을 보여주는데, 상이한 마커 조합이 HSC 및 선조를 구분할 수 있다. CD117^+ , $\text{CD90.1}^{\text{lo}}$, $\text{Lin}^{\text{neg/lo}}$ 및 Sca-1^+ 는 HSC 식별에 이용될 수 있다. CD117^+ , $\text{Lin}^{\text{neg/lo}}$ 및 $\text{Sca-1}^{\text{neg}}$ 는 골수형 선조의 혼합된 군 식별에 이용될 수 있다. 개별적인 하위군들 (CMP, GMP 및 MEP) 은 그의 CD16/CD34 프로파일로 구분될 수 있다. 도 1B 는 배양물 중 HSC 유래의 골수형 선조의 유도를 나타낸다. 배양물 유도성 MPc 는 새로 만들어 사용될 수 있거나 또는 냉동보존될 수 있다. 도 1C 는 진균 공격으로부터 호중구감소증 마우스를 보호하기 위한 골수형 선조의 이용을 보여준다. 몇가지 파라미터들, 예컨대 사용된 세포주, 감염 시간 및 세포의 갯수는 실험마다 달라진다. 전형적인 실험은 BALB/c 숙주 및 C57BL/Ka MP 공여자를 이용한다.
- <226> 마우스. C57BL/6 Ka, Thy-1.1, CD45.2 마우스를 키워, Research Animal Facility of Stem Cells Inc, Palo Alto, CA 에 보관했다. BALB/c 마우스를 Carles River Laboratories 에서 구입했다. 공여자 마우스는

6 내지 8 주령을, 수령자 마우스는 8 내지 16 주령을 사용했다.

- <227> 수령자 마우스는 Cs 방사선조사기로 방사선조사했다. BALB/c 수령자는 3 시간 이상의 간격을 두고 2 회에 걸쳐 총 9.2Gy 를 수용했다. 모든 마우스를 산성수에서 유지했고, 기회 감염을 줄이기 위해 방사선 조사 4 주 동안 항생제 (106 U/L 폴리믹신 B 설페이트 및 1.1 g/L 네오마이신 설페이트) 를 포함하는 물로 바꿨다.
- <228> 진균 감염. 이미 기재된 바 있는 아스페르길루스 푸미가투스 (BitMansour A, 등, Blood 100, 4660-4667) 을 마우스 감염에 사용했다. 간략하게, 상기 진균을 Sabouraud 텍스트로오스 아가 (BD Biosciences, Cockeysville, MD) 에 플레이팅하고, 48 시간 이상 37°C 에서 인큐베이션했다. 진균이 덮힌 곳에서 10 ml PBS + 0.05% Tween80 을 부어 코니디아를 수확했다. 수득한 용액을 가볍게 여과하여 균사를 제거하고, 수득한 코니디아 용액을 4°C 로 유지했다. Sabouraud 아가 플레이트에 대한 일련의 희석물의 플레이팅은 코니디아 농도 결정에 이용했다. 아스페르길루스 푸미가투스가 공격한 마우스에 대해 총 150 μ l 식염수 중의 100 내지 200 코니디아를 꼬리 정맥을 통해 정맥내투여하여 제공했다.
- <229> 유세포분석. KTLS HSC 는 마우스의 대퇴 및 경골 유래의 골수를 낸 후 적혈구의 염화암모늄 해리로 제조했다. 수득한 세포 현탁액은 AutoMacs 장치 및 CD117-마이크로비드 (Miltenyi Biotec) 를 이용하여 CD117⁺ 세포에 대해 풍부화했다. 풍부화 세포는 CD117PE-Cy7(2B8), CD90.1^{FITC} (HIS51), LinPE (CD3(145-2C11), CD4(L3T4), CD5(53-7.3), CD8(53-6.7), CD19(ID3), B220(RA3-6B2), CD11b(M1/70), Gr-1(8C5) TER119 (TER119) 및 Sca-1APC (D7) (EBioscience, San Diego, CA) 에 대해 염색한다. CD117⁺, CD90.1^{lo}, Lin^{neg/lo} 및 Sca-1⁺ 세포를 Becton and Dickinson FACSAria 를 이용하여 이중으로 (산출 분류에 이어 순도 분류) 분류했다. CD90.2 세포주 (예를 들어, BALB/c) 유래의 HSC 는 KLS 세포와 마찬가지로 CD90 염색없이 분류한다.
- <230> 골수형 전구 세포로부터 유도된 골수, CMP, GMP 및 MEP 의 믹스는 상기 기재된 바와 같이 CD117⁺ 세포에 대해 골수를 풍부화함으로써 마우스 골수로부터 분류했다. 세포들은 염색하고, CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg} 세포를 분류했다.
- <231> 세포 배양. 일만개의 Lin^{neg/lo} KTLS HSC 를 마우스 골수로부터 분류하고, 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Biosource), 1% Glutamax (Invitrogen) 및 50 ng/ml c-KitL, 5 ng/ml Tpo, 10 ng/ml IL-6 (Biosource) 및 30 ng/ml Flt3L (R&D Systems) 이 보충된 0.5 ml X-vivo15 (Cambrex) 를 포함하는 24 웰-플레이트에 플레이팅한다. 모든 성장 인자는 마우스 재조합물이다. 배지는 매 이틀마다 첨가한다. 50% 의 배지를 제 4 일째에 갈아주고, 그 시점에 세포를 6 웰 플레이트에 다시 플레이팅한다. 제 7 일째 수합시, 전체 세포 부피는, 2 내지 7x10⁶ 세포를 포함하는 2 ml 이다. 세포를 상기 기재된 바와 같이 성숙 전구 세포의 존재에 대해 분석하고, 바로 사용하거나 또는 냉동보존될 수 있다. 배양 세포는 7.5% DMSO, 42.5% 태아 소 혈청 및 50% Xvivo15 배지 중에 냉동보존했다. 해동시, 세포는 생세포 계수 (트립판 블루) 로 정량한 후, 유세포분석하여, 방사선조사 마우스에 주사하기 전에 냉동해동 프로세스가 선조 프로파일에 영향을 주지 않았다는 것을 확인한다.
- <232> 생체외에서 관능성 골수형 선조로 증량된 HSC. 임상적으로 유용한 요법의 개발을 위해, 골수형 선조를 대량으로 생산하는 것이 바람직하다. 고도로 순수한 KTLS HSC 를 분류하고 HSC 에 작용하는 성장 인자로 보충된 무혈청 배지 (X-vivo15) 에 넣었다. 다수의 상이한 사이토카인 조합을 시험했다 (데이터는 나타내지 않음). KitL, Flt3L, Tpo 및 IL-6 의 조합은, 1 주일이 넘는 기간 동안 C57BL/Ka 유도성 HSC에 대한 총 세포 증량이 평균 500-배가 되도록 플레이팅된 HSC 의 빠른 증식을 유도했지만, 분화는 느려졌다. 배양물에서 7 일 짜에 세포의 유세포분석은 상당한 비율의 세포가 골수형 선조 (CMP, GMP 및 MEP) 뿐만 아니라 HSC 의 다양한 표면 표현형을 갖는다는 것을 나타낸다 (도 2B 에 나타낸 바와 같음). 도 2B 는 C57BL/Ka 세포에 대해 관찰된 바와 같이 평균 증량 갯수를 나타내며, 유사한 전체 증량이 AKR, FVB 및 SJL 을 포함하는 몇몇 다른 세포주 유래의 HSC 에서 관찰되었다. 이식 실험은 상당수의 HSC 가 배양 5 일째에 존재하지만, C57BL/Ka HSC 를 7 일 동안 배양한 후에는 관능성 HSC 가 거의 남아있지 않음을 보여준다.
- <233> 평균적으로, CD117⁺ Lin^{neg/lo} 게이트에서 조합된 각종 선조군의 증량은 이용된 조건 하에 플레이팅된 KTLS-HSC 갯수의 약 100 배를 넘는다. 이에 따라, 이들 배양 조건은 마우스 골수에서 직접 정제할 수 있는 것보다 상당히 더 많은 MP 를 제공한다. 더욱이, 단일한 세포의 메틸셀룰로오스 플레이팅을 이용하여, 표면 마커 표현형 결정으로 동정된 선조군이 예상한 계통 분화 잠재성을 갖는다 (데이터는 나타내지 않음).

- <234> 각종 널리 규정된 골수형 선조에 추가하여, 상기 배양물들은 또한, 적은 수의 상대적으로 성숙한 거핵세포를 포함하여, 더욱 분화된 세포를 포함한다. 그러나, 도 2A 에서 알 수 있듯이, 대부분의 세포는 골수형 수임의 징후를 나타내면서, 최종 분화되며, 다수가 줄기 및 전구 세포의 아세포 특징을 유지한다. 도 2A 는 제 7 일째 배양의 May-Grunwald/Giemsa 염색 싸이토스핀을 나타내는데, 대부분의 세포가 미성숙이며, 다수가 명백하게 골수형 수임이다. 적은 수의 상대적으로 성숙한 거핵세포가 존재한다. 도 2B 는 무혈청 배양에서 제 7 일후의 HSC 로부터, 표면 마커 프로파일로 규정되는 바와 같은, 상이한 유형의 선조의 수율을 나타낸다.
- <235> 생체의 증량된 골수형 선조는 침입성 아스페르길루스로부터 타생 호중구감소증 마우스를 침입성 아스페르길루스로부터 보호한다. 골수 유도성 골수형 선조는 호중구감소증 마우스를 진균 감염으로부터 보호하기 위해 사용되어 왔다. 상기 예시는 배양물 유도성 골수형 선조가 타생 호중구감소증 마우스를 골수 유도성 골수형 선조와 유사한 침입성 진균 감염으로부터 보호한다는 것을 보여준다.
- <236> 재건은 C57BL/Ka, H-2^b 골수 유래의 CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg} 세포 또는 제 7 일 배양유도성 5x10⁵ 개 MPc 세포로 분류되는 8x10⁴ 골수 MP 및 200 개의, 동계 BALB/c HSC (CD117⁺, Lin^{neg/lo}, Sca-1^{neg}, KLS) 를 이용하여 치사량으로 방사선조사된 마우스 (BALB/c, CD90.2, CD45.2, H-2^d) 에서 수행된다. 마우스는 최초의 방사선 조사 및 HSC/MPc 주입 후 제 7 일에 아스페르길루스 푸미가투스 (Aspergillus fumigatus) 의 임상 분리물의 150 코니디아를 이용하여, 꼬리 정맥 주사에 의해 감염된다. 실험은 군 당 15 마리의 마우스를 사용하여 3 회 반복했다 (데이터는 나타내지 않음). 도 3 에 모아놓은 데이터에서 나타나는 바와 같이, 오직 2/15 방사선조사 대조군만이 30 일을 넘게 생존하여 사용된 치사량의 방사선조사 투여량이 상대적으로 적다는 것을 확인했다. 제 0 일째의 200 KLS HSC 의 주사는 방사선조사 마우스를 완전히 구출했으나; 150 A 아스페르길루스 푸미가투스의 주사로 오직 17/44 의 상기 마우스들이 생존했다. 대조적으로, BM MP 를 투여한 45 마리의 마우스 중 34 마리의 (34/45) 마우스 (76%) 및 배양-유도성 세포를 투여한 45 마리의 마우스 중 32 마리의 (32/45) 마우스 (71%) 가 진균 공격에도 생존했고, 배양물-유도성 세포는 세포사를 면했다. 통계적 분석 (logrank) 은 줄기 세포만 있는 군에 비해 BM MP 세포 (p<0.0001) 및 배양물-유도성 세포 (p=0.0014) 에 의해 모두 현저한 보호를 나타냄을 보여준다. BM MP 세포를 수용한 군과 배양물-유도성 세포를 수용한 군 사이에는 30 일째 생존에 있어서 눈에 띄는 차이가 없었다 (p=0.5164). 이에 따라, 생체의 증량된 골수형 선조는 호중구감소증 마우스를 침입성 아스페르길루스증 뿐만 아니라 골수 유도성 골수형 선조로부터 보호한다.
- <237> 냉동보존된 생체의 증량된 타생 골수형 선조가 호중구감소 마우스에서 아스페르길루스증에 대해 보호한다. 성숙 과립구 주입과 대조적으로 골수형 선조를 이용하는 장점은, 사용 전 냉동보존된 전구 세포에 대한 능력이다. 냉동된 MP 세포는 원액으로 비축되어 필요할 때 해동시킬 수 있다.
- <238> 본 연구는 쥐과동물 MPc 을 사용한 표준 진균 실험으로부터 맞춘다. 표준 고안은 KitL, Flt3L, Tpo 및 IL-6 으로 보충된 Xvivo15 에서 7 일간 C57BL/Ka HSC 를 배양하는 것이다. 제 0 일째에, 숙주 마우스 (BALB/c) 는 치사량으로 방사선조사하고 (2x4.4Gy, 4 시간 간격), 같은 날에 MPc 배양물 및 200 BALB/c HSC (KLS) 유래의 5x10⁵ 세포를 주사했다. 제 7 일째에, 마우스에 150 코니디아의 아스페르길루스 푸미카투스를 정맥내 주사했다. 마우스를 매일 관찰하고, 30 일째 생존을 확정했다.
- <239> 본원에 기재된 실험은 (i) MPc 가 여러가지 상이한 경우로 배양되며, (ii) 더욱 초기의 배양물이 냉동되고 액체 질소에 저장되며, (iii) 새로 만든 것과 냉동된 MPc 를 비교하며, (iv) MPc 의 조성을 냉동 전 및 해동 후 유세포분석으로 분석한다는 점이 다르다.
- <240> 마우스 세포는 무혈청 또는 혈청 함유 믹스인 냉동보존 배지 중에 냉동될 수 있다. 모든 연구에 대해, 실험에서는 냉동보존 배지를 함유하는 혈청을 이용했다. 혈청 함유 믹스: (총합 150 ml) 37.5 ml 혈청 및 22.5 ml DMSO 가 있음.
- <241> 1. 세포를 펠렛으로 함
- <242> 2. 무혈청 배지 (IMDM 또는 Xvivo) 에 세포를 재분산시킴
- <243> 3. 물과 얼음이 있는 금속 볼을 준비함
- <244> 4. 얼음물에 재분산된 세포의 관을 놓고, 관을 가볍게 흔들면서 똑같은 부피의 냉동보존 믹스를 위쪽에서 재분산된 세포 쪽으로 천천히 떨어뜨림.

- <245> 5. 바이알에서 혼합물을 피펫팅하고, 냉동 기구를 밤새 -80 로 함.
- <246> 6. 장기간 저장을 위해서는 바이알을 -180 로 옮김.
- <247> 배양된 마우스 세포의 해동:
- <248> 1. 내용물이 대부분 해동될 때까지 바이알을 37℃ 조에서 해동시킴. 무혈청 배지 (IMDM 또는 Xvivo) 에 세포를 재분산시킴.
- <249> 2. DNase 를 포함하는 바이알에서 세포를 천천히 피펫팅하고, 최초 바이알 세포 계수를 위해 소량의 분취물을 취함.
- <250> 3. 배지 및 세포의 느린 혼합이 가능하도록 관을 가볍게 흔들면서, 10 ml 의 배지 (10% NCS 가 없는 IMDM/DMEM 등) 를 세포에 적가함.
- <251> 4. 세포를 빠르게 돌려서 가라앉히고, 염색 배지 (HBSS/2%NCS) 에 재현탁시킴
- <252> 5. 계수함

<253>	12/1/2004	제 14 일, MPc 배양 개시를 위한 BS.BA HSC 의 분류 (냉동 MPc)
	12/8/2004	제 7 일, MPc 수합, 유동으로 분석 및 세포 냉동 (MCM/Terasaki 플레이트에 CD117+ 세포를 플레이팅)
	12/9/2004	MPc 배양 개시를 위한 BS.BA HSC 분류
	12/16/2004	제 0 일, BALB/c HSC 분류, MPc 배양 수합, 65 BALB/c 마우스에게 방사선조사 및 60 BALB/c 마우스에게 MPc (새로 만든 것 또는 냉동된 것) 및/또는 HSC 주사
	12/23/2004	제 7 일. 50 마리의 재건 마우스에 150 코니디아의 아스페르길루스 푸미가투스를 주사
		제 5 일 내지 제 30 일. 생존 및 폐사 마우스를 매일 기록
	2005	4 주차에 시작하여 재건 정도에 대해 마우스를 시험

군	개체 수	HSC	MPc	성장 인자	진균 (코니디아)	경과일
G1: 새로운 MPc	15	200	새로운, 500,000	없음	150	7
G2: 냉동 11/29 MPc	15	200	냉동 500,000	없음	150	7
G3: 냉동 12/8 MPc	15	200	냉동 500,000	없음	150	7
G4: MP 없음	10	200	0	없음	150	7
G5: 방사선조사 대조군	5		0	없음		7
합계	60	11,000	3*7,500,000	없음	8,250	

- <254>
- <255> MP-배양. CD117⁺CD90.1^{low} Lin^{neg/low} Sca-1⁺ HSC 를 하기에 기재된 CD117-풍부화 BS.BA 골수로부터 분류한다. 마우스 HSC 를 분리하고 - 바로 c-kit 마이크로비드에 콘주게이션시킨다. 대퇴 및 경골을 수집하고, 근육을 제거한다. 막자사발을 이용해 부순다. 나일론 망을 통해 여과하고, 5 마리분/관 (10 개의 다리뼈 및 10 개의 팔뼈) 으로 했다. 1200 RPM 에서 5 분 동안 원심분리한다. 1 ml ACK 에 약 3 내지 4 분간 얼음에서 재분산시킨다. 관에 염색 매질을 채워 세척한다. 원심분리한다. 세포를 계수한다. 염색 매질에 약 50 내지 60 μ l 마우스로 재분산시키고, 여과하고, 팁과 필터를 40 내지 50 μ l 로 세척하고, 래트 IgG (1:50)+마우스 IgG (1:50) 를 10 내지 15 분 동안 첨가한다. 염색을 위해 10 μ l 의 전 BM 를 제거한다. 마우스마다, 10 μ l/마우스로 항 c-kit 마이크로비드 (CD117) (물품 식별 번호 5040428046) 를 첨가한다. 주: 상완골이 첨가되는 경우, 12 μ l 비드/마우스로 이용한다. 얼음에서 25 분 인큐베이션한다. 2 회 세척한다. 세포를 재분산시키고, 최종 부피가 약 0.5 내지 1.0 ml/마우스가 되도록 나일론 망으로 여과하고, 팁 및 여과망을 또다른 0.5 ml 로 세척한다. AutoMACs 상에서 세포를 풍부화시키고, 포셀드 (posselds) 프로그램을 이용한다. 대안적으로, 3 내지 4 ml 의 염색 매질로 세척하여 Midi 컬럼을 제작한다. 세포를 나일론 망으로 여과하여 컬럼에 적용시킨다. 컬럼 (10 미만의 마우스/컬럼) 상에서 3 회 세포를 통과시킨다. 컬럼을 5 내지 10 mL 의 염색 매질로 세척한다. 컬럼을 자석에서 치우고, 세포를 컬럼으로

부터 2 배로 흐르게 한다 (주: 10 마리의 마우스 = 중간, 및 5 마리의 마우스 = 미니). 계수하고, 원심분리한다. 세포를 염색 매질과 항체 중에 1×10^8 세포/ml 로 재분산시킨다.

항체	상품 구분번호	역가	
c-kit (2B8) 바이오틴	E000225	1:400	Orc-kit
(2B8) PE-Cy7	E009158	1:400	
Sca-1 APC	E007871	1:200	
Thy-1.1 FITC	E008124	1:400	
계통 PE:			
Ter 119	E005015	1:400	
CD3	E009288	1:100	
CD5	E004526	1:1600	
CD8	E009271	1:200	
B220	E007026	1:800	
CD4	E008789	1:3200	
Mac-1	E005858	1:6400	
GR-1	E008723	1:3200	

<256>

<257>

얼음에서 25 분 동안 인큐베이션하고, 세척하고 원심분리한다. c-kit bio 를 사용한 경우, SM (1×10^8 세포/ml) 에 재분산시킨다. 스트렙타비딘 Cy7-PE (상품구분번호 E006330) 1 :800 로 하여 25 분 동안 얼음에서 염색한다. 세척하고, 원심분리하고, 염색 매질 + PI (1:1000) 에 재분산시키고, 여과한 후 FACS 한다. 사용된 색상에 따라 조판관 (comp tube) 을 설정한다:

항체	상품 구분번호	역가
B220 -PE Cy7	E009142	1:400
B220-Bio	E004692	1:800
Cascade-Blue	65A1-1	1:400
B220-PE	E007026	1:400
B220-FITC	E005965	1:200
B220-APC	E011511	1:200
B220-Cy5PE	E004592	1:800
PI		1:1000
염색 없음		

<258>

<259>

모든 BM 을 염색하고: 세포를 원심분리한다. 100 μ l SM + 항체 (상기 참조) 에 재분산시킨다. 얼음에서 25 분 동안 인큐베이션한다. 세척하고, 원심분리 (2B8-바이오틴이 사용된 경우, 100 μ l (10^7 세포/100 μ l) 에 재분산시키고, 스트렙타비딘 Cy7-PE 1:800 로 25 분 동안 얼음에서 염색한다). 세척하고, 원심분리하고, SM + PI (1 :1000) 에 재분산시키고, 여과한 후 FACS 한다.

<260>

약 3×10^4 HSC 이 MPc 배양 시작에 이용된다. 세포를 Xvivo 15 + 2ME + Pen/Strep + 50 ng/ml KitL + 30 ng/ml Flt3L + 5 ng/ml Tpo + 10 ng/ml IL-6 에서 7 일간 하기 기재된 바와 같이 배양했다.

<261>

골수형 선조 배양에 대한 큰 규모의 마우스 HSC: Lin^{neg/low} KTLS-HSC 를 마우스 골수로부터 분류하고, Pen/Strep, Glutamax 및 β -메르캅토에탄올 뿐만 아니라 KitL, Flt-3L, Tpo 및 IL-6 이 보충된 Xvivo 15 에 웰 당 500 μ l 씩 플레이트한다. 세포를 7 일 동안 배양하여 MPc (배양물 유도성 MP) 을 수득한다. 상기 기간 동안 C57BL/Ka-세포에 대한 예상 증량은 총 200 내지 700 배 증량이며, 10 내지 35% 의 세포가 CD117⁺Lin⁻ 게이트에 속한다. 세포를 2 회 분류하는데, 먼저 수율을 위해, 이어 순도를 위해 최종 분류를 후속한다. 100,000 벌크 분류에 대해, 최초의 분류는 약 300,000 개의 세포를 제공한다. 24 웰 플레이트에서, 10,000 개의 KTLS-HSC 를 웰 당 500 μ l 의 배지에 직접 분류한다. 멸균수를 플레이트의 외벽에 첨가하여 증발을 방지한다. 세포를 포화 습도 인큐베이터에서 37°C, 5% CO₂ 로 인큐베이션한다. 제 2 일째에, 500 μ l 의 새로운 배지를 각 웰에 첨가한다. 제 4 일째에, 배지의 절반 (500 μ l) 을 제거한다 (세포 제거를 방지하기 위해 위쪽으로 조심스럽게 피펫팅한다). 세포를 재분산시키고 (P1000 를 사용하여 상하로 피펫팅) 500 μ l 의 새로운 배지가 있는 6 웰 플레이트 상의 웰로 옮긴다. 24 웰 플레이트 상의 빈 웰은 500 μ l 의 새로운 배지로 채우고, 이를 6 웰 플레이트 상의 동일한 웰에 옮긴다. 전체 부피는 웰 당 1.5 ml 가 되어야

한다. 소정의 세포는 24 웰 플레이트의 바닥에 붙은 채로 있는데, 이들은 제거한다. 제 6 일째에, 500 μ l 의 새로운 배지를 첨가한다. 제 7 일째에, 배양된 세포를 수집하고 분석한다. 추가로, 세포를 프립 판 블루로 염색하고, 혈구계수기를 이용하여 계수한다. 분석 데이터는 HSC 및 MP 의 배수 증량 계산 및 전체 세포수 (CMP/GMP/MEP) 를 위한 정보를 제공한다.

<262> 골수형 선조 배양에 대한 대규모 마우스 HSC 에 대한 시약: 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 X-vivo15 (Cambrex Bio science 04-744Q) (100x) Biosource International Inc., Glutamax (100x) Invitrogen, β -메르 캅토에탄올 (1000x) Sigma Aldrich Fluka Inc. 성장 인자에는 하기의 것이 포함된다:

	제조사	카탈로그 번호	원액 용액	사용 농도
rmKitL	Biosource	PMC2115	25ng/ μ l	50ng/ml
rmFlt3L	R&D	427-FL	25ng/ μ l	30 ng/ml
rmTpo	Biosource	PMC1144	10ng/ μ l	5 ng/ml
rmIL-6	Biosource	PMC0066	10ng/ μ l	10 ng/ml

<263>
<264> 100,000 세포 (500 μ l/웰) 를 위한 배양 배지는 5 ml 완전 Xvivo, 5 μ l IL6, 2.5 μ l TPO, 10 μ l KitL, 6 μ l Flt3L 이다. 100 ml Complete Xvivo 에 대해서는, 100 / μ l β -메르캅토에탄올, 1 ML Pen/Strep, 1 ML Glutamax 이 사용된다.

<265> 배양액에서 7 일 후, 세포를 수확하고 계수한다. 분취물을 하기에 기재된 바와 같이 분석한다. HSC/MP_ 는 4 내지 5 개의 스페로톡 (spherotck) (6.7 uM) 비드를 1 ml 의 염색 매질 (SM) 에 첨가하여 분석한다. 비드를 트립 판 블루에 1:10 으로 희석하고, 혈구계수기를 이용해 계수한다. 비드는 2×10^6 비드/ml 를 초과하는 스톡 농도여야 한다. 각 분석 이전에 비드를 계수한다. 시료마다 30,000 개의 비드를 첨가한다. 적은 분취량의 세포를 분석용 관에 옮긴다. rIgG (1:50) 및 mIgG (1:50) 를 사용하여 얼음에서 10 분 동안 블로킹한다. MP 관에 CD117-바이오틴을 1:200 로 첨가한다. 암실에서 20 분 동안 얼음에서 인큐베이션한다. HSC (Ckit cy7-pE 는 1:400, Sca-1 APC 는 1:200, Thy-1.1 FITC 는 1:200, B220 PE 는 1:800, Mac-1 PE 는 1:800, GR-1 PE 는 1:800) 및 MP (SA-캐스캐이드 블루는 1:400, Sca-1 APC 는 1:200, CD34 FITC 는 1:25, 2.4G2 는 1:50, B220 Cy7-PE 는 1:800, GR-1 Cy7-PE 는 1:800) 항체 믹스를 제조한다. 모든 관을 2 ml sm 로 세척하고, 1100 rpm 에서 5 분 동안 돌린다. 암실에서 20 분 동안 항체 믹스와 함께 얼음에서 인큐베이션한다. 세포를 sm 로 세척하고 돌린다. 세포를 PI 배지에 재현탁시킨다. [PI 배지 (1:1000) 10 ml 스톡: 10 ml sm 중 10 μ l PI].

<266> 간략하게, 유세포 분석은 HSC, CMP, GMP, MEP 및 더 많은 성숙 세포 ($CD11b^+$, $Gr-I^+$, $Ter119^+$) 의 존재성을 결정하기 위해 수행했다. 싸이토스핀 (May-Grunwald/Giemsa 염색으로 염색할 것) 을 만들었다. 주사를 위해서는 약 3 배의 7.5×10^7 배양물이 필요하며, 새로 만든 것은 (1x), 냉동된 것은 (2x) 이 필요하다.

<267> MPc 의 냉동. MPc 는 상기 기재된 바와 같은 HSC 유래 배양이다. 세포는 냉동 전에 유세포분석으로 분석했다. 추가로, 단독 $CD117^+Lin^-$ 세포를 MPc 배지 (Xvivo+KitL, Flt3L, Tpo 및 IL-6) 가 있는 테라사키 (Terasaki) 플레이트에 플레이팅했다. 집락을 형성하는 세포의 백분율은 플레이팅 후 1 주째에 결정한다. 세포는 하기에 기재된 프로토콜에 따라 냉동했다. 세포는 혈청이 없거나 또는 혈청이 포함된 믹스인 냉동보존배지 중에 냉동될 수 있다. 모든 연구 실험에서, 혈청 포함 냉동보존 배지가 사용되었다. 혈청 포함 믹스: (총 150 ml) 37.5 ml 혈청, 90 ml 고분자량 당질, 22.5 ml DMSO. 세포를 펠렛화하고, 세포를 무혈청 배지 (IMDM 또는 Xvivo) 에 재분산시킨다. 얼음 및 물을 이용하여 금속 볼을 제작한다. 재분산된 세포의 관을 얼음물에 위치시키고, 관을 약하게 혼합하면서 재분산된 세포에 동 부피의 냉동보존 믹스를 천천히 떨어뜨린다. 혼합물을 바이알에 피펫팅하고, -80 에서 밤새 냉동 기기에 넣고, 더 긴 저장을 위해서는 바이알을 -180 로 옮긴다.

<268> 냉동 MPc 의 해동. 냉동된 MPc 를 하기에 기재된 바와 같이 해동한다. 내용물이 대부분 해동될 때까지 바이알을 37°C 조에서 해동시킨다. 세포를 무혈청 배지 (IMDM 또는 Xvivo) 에 재분산시킨다. 세포를 DNase 가 포함된 바이알에 천천히 피펫팅하고, 소량의 분취물을 취해 최초의 바이알 세포 계수를 한다. 10 ml 의 배지 (10% NCS 가 있는 IMDM/DMEM 등) 를 세포에 적가하고, 관을 약하게 흔들어 배지와 세포가 서서히 혼합되도록 한다. 배지를 약 1 ml/분으로 첨가한다. 세포를 돌려서 가라앉히고, 염색 매질 (HBSS/2%NCS) 에 재분산시킨다. 이어서, 세포를 RT 에서 1/2 시간 동안 정치시켜 "휴식" 하게 한다. 이에 세포를 계수/염색

또는 플레이팅한다.

<269> 실험에서, 해동에 이어 세포를 약 1 시간 동안 휴식시키고, (i) 트립판 블루/혈구계수기로 계수하고, (ii) PI 배제 유세포 분석으로 생활성을 결정한다. 추가로, 단독 $CD117^{+}Lin^{-}$ MPc 를 플레이팅하고 배양한다.

<270> BALB/c HSC 분류. HSC, $CD117^{+}Lin^{neg/low}Sca-1^{pos}$ 를 상기 기재된 바와 같이 5 마리의 BALB/c 마우스로부터 분류한다. 10,000 HSC (수령자마다 200) 가 필요했다. 분류된 BALB/c HSC 는 배양물 유도성 BS 와 혼합했다. 원하는 비율의, 주사에 사용되는 BA MPc 를, 치사량으로 방사선조사한 BALB/c 마우스에 조사한다.

<271> 진균 주입. 제 7 일째에, 마우스는 꼬리 정맥에 150 코니디아의 아스페르길루스 푸미가투스, 주입된 살아있는 코니디아의 수를 정량하기 위한 Sabauroud-텍스트로오스 아가에서의 주사 용액 부분의 시험을 포함하여, 하기에 기재된 바와 같이 주입한다. 아스페르길루스 주사는 주입 전 각 실험에 대한 코니디아의 농도를 결정한다. 총 부피 150 μ l (평균 1 x PBS + 0.05% tween+코니디아) 를 마우스마다 주입했다. 주사하는 동안, 코니디아 용액은 얼음에서 유지하고, 각각의 주사기 충전 전에 와류시킨다. 주사기로부터 150 μ l 를 SDA 플레이트에 플레이팅하고, 37°C 에서 인큐베이션한다. 이튿날, 집락을 계수하여 주입한 코니디아의 존재성을 확인한다.

<272> 배양물 유도성 골수형 선조가 호중구감소증 마우스에서 걸리기 쉬운 아스페르길루스증을 방지하는 그의 능력을 보유하는지 여부를 증명하기 위해, HSC 를 플레이팅하고, 상기 기재된 바와 같이 배양한다. 7 일 후, 배양물을 수확하고, 유세포분석으로 분석한다. 이어서, 세포를 상기 기재된 바와 같이 냉동보존하고, 액체 질소의 기상에 저장한다. 7 일 이상 경과 후, 바이알을 재빨리 37°C 수조에서 해동시키고, 배지로 2 회 세척했다. 유세포분석을 위해 분취물을 취하고, 남은 세포는 치사량으로 방사선조사한 동종타생 숙주에 대한 주입에 이용한다. 도 4A 는 새로 만든 것이거나 또는 냉동보존된 것을 사용하여 치사량의 방사선조사 및 500,000 개의 동종타생 배양물 유도성 MP 및 200 동계 HSC 로 재건 후 제 7 일째에 아스페르길루스 푸미가타 코니디아가 공격한 마우스의 30 일 생존 데이터인, 새로 만든 MP 에 대한 생존 데이터와 사용 전 냉동보존된 배양물 유도성 골수형 선조를 이용한 것의 생존 데이터를 비교한다. 500,000 개의 새 만든 세포를 수용한 15 마리의 4 개군에서 진균 공격 후 생존은 HSC 만을 수용한 마우스의 것과 확연하게 상이하다 ($p=0.009$, t-test). HSC 만을 제공한 군과 비교했을 때, 냉동보존된 500,000 개의 배양물 유도성 골수형 선조를 수용한 15 마리 마우스의 3 개군에 대해서도 똑같다 ($p=0.0329$). 새로 만들거나 또는 냉동된 골수형 선조를 수용한 군들 사이의 생존성 차이 ($p=0.7205$) 또는 두 경우 모두에 있어서 오직 HSC 만을 수용한 군들 사이의 생존성 차이 ($p=0.5058$) 에 있어서 차이가 없다. 도 4B 는 냉동 전 및 해동 후 배양된 MP 세포의 $CD117^{+}Lin$ 염색 프로파일의 비교이며, 냉동/해동 사이클이 $CD117$ 및 Lin 염색 프로파일에 영향을 주지 않음을 나타낸다. 유사한 결과가 마커에 대한 분석에서 획득되었다 (데이터는 나타내지 않음).

<273> 골수형 선조를 이용한 재건은 일반적으로 단기 접목을 제공한다. 도 5 는 동계 MPc 를 이용한 재건이 제 5 일 (2.25×10^5 세포/마우스), 제 7 일 (8×10^5 세포/마우스), 또는 골수형 선조로서 마우스 골수로부터 직접 분류된 것에서 배양된 C57BL/Ka 세포 (4×10^4 세포/마우스) 로 재건된 후 제 4 주째에 말초혈에서의 접목 수준을 알려준다. 도 5 에 나타난 바와 같이, 아주 적은 (5%) MP-유도성 세포가 투여 후 1 개월 순환하여 존재한다. MP-유도성 세포 수는 경시적으로 사라지며, 투여 제 4 주째에서보다 제 8 주째에 더 낮다 (데이터는 나타내지 않음). 존재하는 세포는 대부분 B-림프구이다. MP-유도 조건 하에 5 일간 배양된 HSC 는 극적으로 상이한 재건 패턴을 나타낸다. 4 주째에, 다수의 순환 세포는 MP-유도성이며, 이들은 3 가지 주된 계통인 골수형 세포, B 세포 및 T 세포를 나타내는 세포를 포함한다. 이는 접목이 잔류 관능성 HSC 에 의한 것이라는 점을 시사한다. MP-유도성 세포 수는 재건 후 8 주째에 훨씬 더 낮아, HSC 접목이 주로 ST-HSC 에 제한된다는 것을 나타낸다. 8 일 동안 배양된 세포의 투여는 순수한 골수형 선조와 매우 유사한 접목 패턴을 나타낸다. 적은 수의 MP-유도성 세포가 보이며, 이들은 주로 장기간 생존 B 세포이다. 이에 따라, 공여자 유도성 세포의 수 및 유형은 배양 기간과 연관되며, 7 일간의 배양은 주입 후 8 주째에 숙주에서 검출되는 적은 수의 MP-유도성 세포를 제공한다.

<274> 도 6 은 배양물 유도성 골수형 선조에 의한 보호의 투여량 응답성을 보여준다. 10 가지의 독립적인 실험으로부터의 조합된 데이터이다. 투여량은 전체 세포수 (도 6A) 또는 MPc 중 $CD117^{+}Lin^{-}$ 세포 (도 6B) 로서 그 래프로 나타낸다. 이들 실험들은 도 5 에 기재된 바와 같이 수행했다. BALB/c 마우스에 치사량으로 방사선조사하고, BALB/c HSC 및 C57BL/Ka MPc 의 주사에 이어, 제 7 일째에 아스페르길루스 푸미가투스 (A.

fumigatus) 로 공격했다.

<275> 배양된 골수형 선조는 신속하게 유효한 보호를 제공한다. 200 개의 동계 HSC 및 250,000 또는 500,000 개의 배양물 유도성 MP 를 제공하여, 치사량으로 방사선조사한 마우스의 재건 후 상이한 시점에 진균을 주사한 15 가지의 구분되는 실험으로부터의 생존 데이터를 조합한 것을 보여준다. 도 7 은 방사선조사 후 처음 2 일 동안 진균 공격에서 생존할 수 있었고; 3 일째에는, 마우스가 감염성 공격에 전적으로 당하기 쉬웠다는 것을 보여준다.

<276> 혼합된 동종타생 배양성 골수형 선조. 본 실험의 목적은 혼합된 동종타생 MPc 가, (i) 단독 공여자 MPc 로서 동일한 증대에 대해 보호하고, (ii) 마우스에 해가 되도록 영향을 주지 않는지 여부를 알기 위한 것이었다. 실험들은 분취물로서 냉동보존된 모아 둔 회분 중의 MPc 가 임상적으로 실제적으로 가치있는 치료성임을 보여준다.

<277> 본 연구는 쥐과동물 MPc 를 이용한 표준적인 진균 실험으로부터 변형된 것이었다. 표준 고안은, KitL, Flt3L, Tpo 및 IL-6 이 보충된 Xvivo 15 에서 7 일 동안의 C57BL/Ka HSC 배양이다. 제 0 일에는, 숙주 마우스 (BALB/c) 를 치사량으로 방사선조사하고 (2 x 4.4Gy, 4 시간 간격), MPc 배양물 및 200 BALB/c HSC (KLS) 유래의 5×10^5 개의 세포로 같은 날에 주사한다. 제 7 일에는 마우스에 150 코니디아의 아스페르길루스 푸미가투스를 정맥내 주사한다. 마우스를 매일 관찰하고, 30 일째 생존을 확인한다.

<278> 본원에 기재된 실험들은, (i) HSC 가 BS.BA, AKR, FVB 및 SJL 마우스로부터 분류 및 배양되고, (ii) 감소된 수의 MPc 가 제공되었고, (iii) 진균이 방사선조사 후 더욱 신속하게 제공되었다는 점에서 다르다.

<279>	1/6/2005	7 일 전, BS.BA, AKR, FVB 및 SJL HSC 를 분류하여 4 개의 별도 MPc 배양을 시작함.
	1/13/2005	제 0 일, BALB/c HSC 를 분류하고, MPc 배양물을 수합하고, 51 마리의 BALB/c 마우스에 방사선조사하고, 45 마리의 BALB/c 마우스에 MPc 및/또는 HSC 를 주사함.
	1/20/2005	제 7 일, 45 마리의 재건 마우스에 200 코니디아의 아스페르길루스 푸미가투스를 주사함.
	1/21/2005 부터 2/13/2005	제 8 일부터 제 30 일, 생존 및 폐사 마우스의 매일 기록
	2005	제 4 주째에 시작하여 재건 수준에 대해 마우스를 시험함.

군	개체수	HSC	BS.BA MPc	AKR/SJL/FVB	진균	결과일
HSC noMP	15	200	0	없음	200 코니디아	7
BS.BA MPc	15	200	500,000	없음	200 코니디아	7
혼합 MPc	15	200	125,000	125,000 각각	200 코니디아	7
방사선조사 대조군	5	0	0	없음	0	n/a
합계	50	9,000	9,375,000	1,875,000 각각	9,000	

<280> 숙주: BALB/c, H-2^d, CD90.2, CD45.2 (Charles Rivers Laboratories). 약 56 마리의 마우스가 필요한데, 51 마리는 숙주로, 5 마리는 HSC-공여자로 필요하다. MPc: C57BL/Ka, H-2^b, CD90.1, CD45.1 (BS.BA, 자체 사육 (bred in house)); MPc:AKR, H-2^k, CD90.1, CD45.2 (CRL); MPc: SJL, H-2^s, CD90.2, CD45.1 (CRL); MPc: FVB, H-2^q, CD90.1, CD45.2 (CRL). 각 세포주에 8 내지 10×10^4 HSC 를 제공하기에 충분한 약 5 내지 10 마리의 마우스가 필요하다. 다른 세포주에 비해 더 많은 BS.BA 세포가 필요하다.

<282> MP-배양. CD117⁺CD90.1^{low}Lin^{neg/low}Sca-1⁺ HSC 는 상기 기재된 바와 같은 CD117-풍부화 BS.BA, AKR 및 FVB 골수로부터 분류된다. SJL HSC 는 CD117⁺Lin^{neg/low}Sca-1⁺ 세포로서 분류된다. 약 3×10^4 개의 HSC 가 MPc 배양을 시작하기 위해 사용된다. 세포를 Xvivo15 + 2ME + Pen/Strep + 50 ng/ml KitL + 30 ng/ml Flt3L + 5 ng/ml Tpo + 10 ng/ml IL-6 에서 상기 기재된 바와 같이 7 일 동안 배양한다. 7 일 후, 배양물에서 세포를 수합하고 계수한다. 분취물을 분석했다. 간략하게, 유세포 분석을 수행하여 HSC, CMP, GMP, MEP 및 더욱 성숙된 세포 (CD11b⁺, Gr-1⁺, Ter119⁺) 의 존재성을 검사했다. 싸이트스핀 (May-Grunwald/Giemsa 염료

로 검색) 을 했다. 주사에는 약 1.5×10^7 개의 배양물 유도성 세포가 필요했다. 과량의 세포를 앞으로의 사용을 위해 냉동보존했다.

<283> BALB/c HSC 분류. HSC, $CD117^{+}Lin^{neg/low}Sca-1^{pos}$ 를 5 BALB/c 마우스로부터 분류했다. 10,000 HSC (수령자마다 200 썩) 이 필요했다. 분류된 BALB/c HSC 를 배양물 유도성 BS.BA MPc 와 원하는 비율로 혼합하고, 치사량으로 방사선조사된 BALB/c 마우스에 대한 주사용으로 사용했다.

<284> 진균 주사. 마우스에 150 코니디아의 아스페르길루스 푸미가투스를 상기 기재된 바와 같이 꼬리 정맥에 주사했다. 주사는, 상기 마우스들이 일반적으로는 제 7 일인 것에 비해 제 4 일에 진균을 수용한다는 점에서 상이하다. 주사된 살아있는 코니디아의 수를 정량하기 위한, Sabauroud-텍스트로오스 아가 상의 주사 용액 부분의 시험을 포함하는 다른 과정들은 똑같다.

<285> 도 8 은 혼합된 동종타생 배양물 유도성 MP 에 의한 호중구감소증 마우스의 보호를 나타낸다. 결과들은 혼합된 동종타생 MP 세포의 유효성을 증명한다. 실험에서는 주요 및 부속 항원에서 전부 미스매치되는 4 가지의 상이한 세포주에서 성장한 세포를 이용했다. 3 가지 세포주 (C57BL/Ka, AKR 및 FVB) 유래의 혼합된 동종타생 냉동/해동 MP 세포 및 절반의 세포 투여량은 장기간 재건없이도 보호를 제공했다 (데이터는 나타내지 않음).

<286> 미스매치된 동종타생 유도성 선조의 방사선에 대한 보호 능력. 본 실험은 AKR MPc 공여자 및 C57/B6Ka 수령자를 이용했다. MP 는 마우스 골수로부터 직접 분류되거나 또는 분류된 HSC 유래의 배양물로부터 유도되었다. 배양된 MP 는 KitL, Flt3L, TPO 및 IL-6 을 함유하는 X-Vivo 배지에서 배양 7 일에 걸쳐 유도되었다. 배양 7 일 후, 세포를 FACS 로 분석하여 c-kit 양성 전구 세포의 빈도를 결정했다. 200,000 또는 500,000 c-kit 양성 계통 음성 선조를 포함하는 소정 투여량의 배양된 세포를 이식했다. 도 9A 는 완전 MHC 미스매치 동종타생 MP 가 이식된, 치사량으로 방사선조사된 마우스로부터의 30 일간 방사선피해보호 데이터를 나타낸다. 생존 마우스는 검출가능한 공여자 키메라가 거의 없다 (도 9B).

<287> 새로 만든 것 및 냉동된 미스매치 동종타생 배양물 유도성 선조의 방사선피해보호 능력의 비교. 본 실험은 AKR MPc 공여자 및 C57/B6Ka 수령자를 이용했다. MP 는 분류된 HSC 유래의 배양물 중에서 유도되었다. 배양된 MP 은 KitL, Flt3L, TPO 및 IL-6 를 포함하는 X-Vivo 배지 중 배양의 7 일에 걸쳐 유도되었다. 배양 7 일 후, 세포를 수확하고, FACS 로 분석하여 c-kit 양성 전구 세포의 빈도를 결정했다. 세포를 치사량으로 방사선조사한 마우스에 직접 주사하거나, 또는 주사 전에 냉동 및 해동시킨다. 200,000 c-kit 양성 계통 음성 선조를 포함하는 소정 투여량의 배양된 세포를 이식했다. 도 10 은 완전히 MHC 미스매치된 동종타생 MP 로 이식된 치사량으로 방사선조사된 마우스에서의 30 일간 방사선피해보호 데이터를 보여준다. 냉동보존된 MP 는 수합시 제공된 MPs 와 동가로 보호한다.

<288> 7.3 실시예 3. 플라스크 및 백에서의 인간 조혈 줄기 세포로부터 출발한 골수형 선조.

<289> 인간 hpHSC (동원된 말초혈 (MPB) 로부터 유도된 $CD34+CD90+$ 세포) 를 건강한 자원자로부터 수득했다. MPB 는 Baxter Isolex 장치를 이용해 $CD34+$ 에 대해 풍부화된다. $CD34$ -풍부화 세포는 추가로 염색하고, 정규 BD FACSAria 의 개질된 Dakocytomation MoFlo 를 이용하여 추가로 염색하여 $CD34+CD90+$ 세포 ("hpHSC") 를 수득한다. Isolex $CD34$ -풍부화 이후 또는 MoFlo 상에서의 $CD34+CD90+$ 분류 후 세포를 새로 만들어 사용하거나 또는 냉동 보존 후에 사용한다. 시료들을 손수 또는 단계별 냉동기를 이용하여 냉동한다.

<290> 인간 세포의 냉동. 세포는 무혈청 또는 혈청 포함 믹스인 냉동보존 배지 중에 냉동될 수 있다. 모든 연구 실험에서, 냉동보존 배지를 포함하는 혈청을 이용한다. 혈청 포함 믹스: (총 150 ml). 37.5 ml 혈청, 90 ml 고분자량 당질, 22.5 ml DMSO. 세포를 펠렛화하고, 세포를 무혈청 배지 (IMDM 또는 Xvivo) 에 재현탁시킨다. 얼음 및 물이 있는 금속 보울을 준비한다. 재현탁시킨 세포의 관을 얼음물에 위치시키고, 관을 가볍게 혼합시키면서 천천히 동부피의 냉동보존 믹스를 위로부터 재현탁시킨 세포로 떨어뜨린다. 바이알에 혼합물을 피펫팅하고, 냉동 용기를 밤새 -80°C 에 두고, 더 긴 저장을 위해서는 바이알을 -180°C 로 옮긴다.

<291> 인간 세포의 해동. 내용물이 대부분 해동될 때까지 바이알을 37°C 조에서 해동한다. 세포를 무혈청 배지 (IMDM 또는 Xvivo) 에 재현탁시킨다. DNase 를 포함하는 바이알에 세포를 천천히 피펫팅하고, 소량의 분취액을 취해 최초의 바이알 세포 계수를 한다. 관을 가볍게 흔들며 10 ml 의 배지 (10% NCS 가 있는 IMDM/DMEM 등) 를 세포에 적가하여 배지 및 세포의 느린 혼합이 가능하게 한다. 약 1 ml/분으로 배지를 첨가한다. 세포를 빨리 돌려서 가라앉히고, 염색매질 (HBSS/2%NCS) 에 세포를 재현탁시킨다. 세포를 RT

에서 ½ 시간 동안 정치시켜 "휴식" 하게 한다. 이어서, 세포를 계수/염색 또는 플레이팅한다.

<292> 달리 언급되지 않는 한, hpHSC 는 웰, 플라스크 또는 주머니에 Xvivo15 + 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% Glutamax 및 100 ng/ml KITL, 100 ng/ml FLT3L, 50 ng/ml TPO 및 10 ng/ml IL-3 중에서 배양한다. 싸이토카인 베이스 믹스는 rhKITL 100 ng/ml (Amgen) 스톡이다: 100 µg/ml; rhTPO 50 ng/ml (Biosource) 스톡: 10 µg/ml; rhFLT3L 100 ng/ml (Amgen)stock: 100 µg/ml; rhIL-3 10 ng/ml(Biosource) 스톡: 10 µg/mL. 일부 실험에서, 하기의 싸이토카인의 부가 효과를 시험했다: rhIL-6 10 ng/ml, rhIL-11 10 ng/ml, rhGM-CSF 10 ng/ml, rhG-CSF 100 ng/mL. 검정에는 세포 계수 (트립판 블루) 및, 일반적으로 제 5, 8 및 11 일째의 유세포분석 (CD34, CD90, CD45RA, CD123, CD15, CD33, CD41, CD19) 이 포함된다.

<293> 주머니 (Bags): 7 ml Vuelife bag (American Fluoroseal, 물품구분번호 1PF-0007), 32 ml (#2P-0032) 또는 72 ml (#2P-0072) 를 사용함.

<294> 주머니의 취급: 인간 세포 취급을 위한 표준 대비책 이용. 주머니에는 샘플을 채워 끌기 위해 사용될 수 있는 1 개 (7 ml 주머니) 또는 2 개의 포트가 있다. 포트에는 샘플 라인 및 주사기가 연결되도록 하는 루어 잠금장치 (luer lock) 가 있다. 7 ml 주머니들은, 일단 약 4 ml 를 초과하여 충전되면, 열릴 때 새어나갈 충분한 압력 하에 있게 되는데, 이들은 루어 잠금장치를 열기 전에는 다물어져 막혀있어야 한다. 주머니를 충전하거나 또는 더 많은 배지를 추가하기 위해서는 주사기를 사용하고, 중력류는 충분하지 않다. 더 큰 주머니는 중력류로 더욱 용이하게 충전될 수 있고, 정기적인 피펫팅과 함께 배지 또는 세포를 추가하는 경우, 막대 피스톤이 없는 주사기가 "칼때기" 로서 연결될 수 있다. 상기 주머니들은 잠금장치를 열기 전에는 집게로 집어둘 필요가 없으며, 이들은 오직 똑바로 세워놓아야 할 뿐이다.

<295> 배양: 주머니들은 일반적으로 Sanyo 인큐베이터에서 배양된다; 37°C, 5% CO₂ 및 1 내지 20% O₂. 인큐베이터는 주머니-배양에 반드시 필요한 것은 아니지만, 완전히 습윤화된다. 주머니들은 기체가 투과할 수 있으나, 물은 투과하지 않는다. 세포 농도는 일반적으로 10⁵ 세포/ml 이다 (범위: 10⁶ 세포/ml 내지 10⁴ 세포/ml). 주머니들은 취급의 용이성 및 멸균성 부가를 위해 페트리 디쉬 (15 cm 직경, 7 또는 30 ml 주머니를 수용할 수 있음) 또는 사각 디쉬 (더 큰 주머니) 에 정치시킬 수 있다.

<296> 샘플링: 정기적인 세포 샘플을 루어 잠금장치가 설치된 1 ml 주사기를 이용하여 주머니로부터 꺼낼 수 있다. 주머니의 내용물을 혼합한다 (세포는 주름처럼 모이는 경향이 있으며, 상기 도면의 회색 점들을 참조). 필요한 경우 집게로 집어두고 (7 ml 주머니), 포트에서 (한쪽의) 마개를 제거한다. 1 ml 주사기를 연결하고, 주머니를 거꾸로 뒤집는다 (주사기가 아래로 향하도록 함). 집게가 있었다면 집게를 제거한다. 세포를 연결관에서 혼합하기 위해 주사기를 수 회 채웠다가 비운다. 주사기를 비우고 (피스톤을 완전히 집어넣는다) 주머니를 다시 뒤집는다 (주사기가 위를 향하도록 함). 공기가 움직이도록 해 샘플 포트의 딱딱한 플라스틱 관을 밀봉한 후 (더욱 특별하게는 충전시킴), 샘플을 관으로 흡입시킨다. 샘플관은 전부 약 0.2 ml 를 포함한다. 필요한 경우 다시 집게로 집어놓고, 주사기를 분리하고 마개와 바꿔놓는다.

<297> 7 ml 주머니에, GF 포함 배지 중의 2 ml 의 세포에 제 3 일 또는 제 4 일에 추가 배지를 첨가하여 (2 내지 3 ml) 배양물을 보충한다. 일부 실험에서, 72 ml 주머니에는, 20 ml 의 배지 중에 약 4 x 10⁶ 세포가 있다 (세포 농도 2 x 10⁵ 세포/ml). 일단 ml 당 세포 밀도가 10⁶ 세포에 접근하면 (대략 제 4 일째), 세포를 희석하여 3 x 10⁵ 내지 2 x 10⁶ 세포/ml 의 밀도를 유지한다. 배지를 제 4 일 및 제 6 일에 첨가하고 (총 부피는 72 ml 가 되도록 함) 제 8 일에 수합 및 냉동시킨다. 세포는 제 8 일에 약 1.5 x 10⁸ 세포까지 증량된다. 15 ml 중의 3 백만개의 세포로 출발하여, 15 ml 의 배지를 제 4 일에 첨가한 후, 제 6 일에 40 ml 의 배지를 첨가하는 일정도 가능하다.

<298> 분석: 상기 기재된 바와 같이 세포 샘플을 취한다. 배양물의 완전한 분석은 일반적으로 제 5, 8 및 12 일에 한다. 여기에는, 유세포분석, 메틸셀룰로오스 중에서의 35 mm 디쉬에서의 500 세포의 플레이팅, 및 May-Grunwald/Giemsa 염색 사이토스핀이 포함된다. 세포 계수는 혈구계수기 및 트립판 블루를 이용하여 매일 한다.

<299> 증량 데이터는 5 명의 다른 공여자로부터 수득했다. 도 11 은 공여자: 1319 로부터의 주머니 및 플라스크에서의 증량 데이터를 나타낸다. 도 11A 는 총 증량을 나타내며, 도 11B 은 동일한 배지/GF (Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO 및 IL-3 이 보충된 Xvivo15) 에서 배양된 공여자 유래의 세포 (CD34+CD90+) 에 대

한 세포 밀도 데이터를 나타낸다. 세포를 상이한 밀도 및 상이한 유형의 주머니 및 플라스크에서 배양했다.

7 ml AFC 주머니에 있는 1×10^5 내지 1×10^6 세포/ml 의 밀도로 출발한다. 점선은 임의의 추가적인 배지를 수용하지 않은 배양을 나타내나, 달성될 수 있는 최대 밀도를 보여준다. 증식 속도는 AFC 주머니에서 성장한 배양과 조직 배양 플라스크에서 성장한 배양 사이에서는 유사하다. 세포 중 일부가 플라스크의 플라스크에 느슨하게 붙어 있는데, Teflon 주머니에 대해서는 그렇지 않다. 제 8 일째 배양의 플라스크 및 주머니에서 성장한 공여자:1319 배양물 유래 세포의 위상차 장면은 주머니 내의 세포가 더욱 증가하여 모이는 경향이 있음을 보여주는데, 이는 더 큰 밀도를 설명한다 (데이터는 나타내지 않음).

<300> 도 12 는 인간 MP 배양 및 성장 인자 처리한 세포의 사진이다. 공여자: 1319, 세포는 플라스크에서 8 일 동안 배양하고 (Xvivo15+PenStrep, Glutamax, 100 ng/ml KITL, 100 ng/ml FLT3L, 50 ng/ml TPO 및 10 ng/ml IL-3), 상이한 성장 인자 (100 ng/ml KITL, 20 ng/ml IL-3 및 300 ng/ml G-CSF) 가 있는 T25 플라스크로 옮겼다.

도 12 는 이동 후 (4 내지 19 일) 상이한 시점에서의 세포를 나타낸다. 과립구의 존재로 제 12 일에 정점을 이루고, 제 19 일까지는 마크로파지만 보인다. 인간 MP 배양물은 형태적으로 성숙한 호중구 및 마크로파지 뿐만 아니라 거핵세포로 분화할 수 있다.

<301> 공여자 1198 및 1202 유래의 주머니에서의 증량 데이터. 상기 두 공여자 유래의세포를 Isolex 풍부화하고, Dakocytomation MoFlo 를 이용해 hpHSC 표현형 ($CD34^+CD90^+$) 에 대해 분류하고 냉동보존 후 분류했다. 세포를 해동하고 표시된 바와 같이 7 ml AFC 주머니에 플레이팅했다. 배지: Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO 및 IL-3 이 보충된 Xvivo15. 도 13A 는 총 증량을 나타내며, 도 13B 는 세포 밀도 데이터를 나타낸다.

속이 빈 기호들은 더 큰 주머니 (하기 참조) 에 플레이팅된 세포를 나타낸다. 2×10^4 세포/ml 로 플레이팅된 세포 및 2×10^5 세포/ml 로 플레이팅된 세포 사이, 또는 7 ml 대 72 ml AFC 주머니에 플레이팅된 세포들 사이에서는 차이가 없다.

<302> 72 ml AFC 주머니에서의, 공여자 1176, 1198, 1202 및 1207 유래의 주머니에서의 증량 데이터. 상기 4 개의 공여자 유래의 세포를 Isolex 풍부화하고, MoFlo 를 이용하여 hpHSC 표현형 ($CD34^+CD90^+$) 에 대해 분류하고, 분류 후 냉동보존했다. 세포를 해동하고 표시된 바와 같이 72 ml AFC 주머니에 플레이팅했다. 배지: Glutamax, PenStrep, KITL, FLT3L, TPO 및 IL-3 이 보충된 Xvivo15. 도 14A 는 총 증량을 나타내며, 도 14B 는 세포에 대한 세포 밀도 데이터를 나타낸다. 최초의 플레이팅 부피: 20 ml 중에 약 4×10^6 세포, 최종 배양 부피 70 ml/주머니. 총 15.6×10^6 세포가 4 개의 주머니에 플레이팅되었고, 8 일 후 총 6.14×10^8 세포를 수합했다 (냉동보존함). 평균 증량 40 배 (30 배 내지 60 배의 범위).

<303> 7.4 실시예 4. 인간 골수형 선조 집락 형성 및 생체내에서의 G CSF 에 대한 응답성

<304> 인간 골수형 선조 배양은 2×10^6 개의 정제된 인간 HSC (해동된 hpHSC) 로 출발하여, 상기 기재된 바와 같이 SCF, Flt3L, TPO, IL-3 이 있는 무혈청 ExVivo-15 이 있는 정적인 AFC 주머니에서 배양한다. 제 5, 8, 11, 13 및 15 일에, MP 세포를 수합하고, 메틸 셀룰로오스에 3 개씩 플레이팅하여 시험관내에서 집락을 형성하는 그들의 잠재성을 평가한다. 도 15A 는 상이한 유형의 집락 (E: 적혈구; M: 마크로파지; G: 과립구; GM: 혼합된 과립구/마크로파지; GEM: 혼합된 골수형/적혈구) 으로 하위분할된 플레이팅 효율 (수득한 집락/플레이팅된 세포) 을 보여주며, 얼마나 많은 선조가 존재하는지를 나타낸다.

<305> 도 15B 는 전체 세포 계수의 플레이팅 효율 배수인 CFU (집락 형성 단위) 의 총 갯수의 증가를 나타낸다. 전체 세포 갯수에서의 상대적으로 더욱 많은 증가때문에 CFU 의 상대적 갯수가 줄어들었지만, 경시적으로 CFU 에서는 증가가 있다.

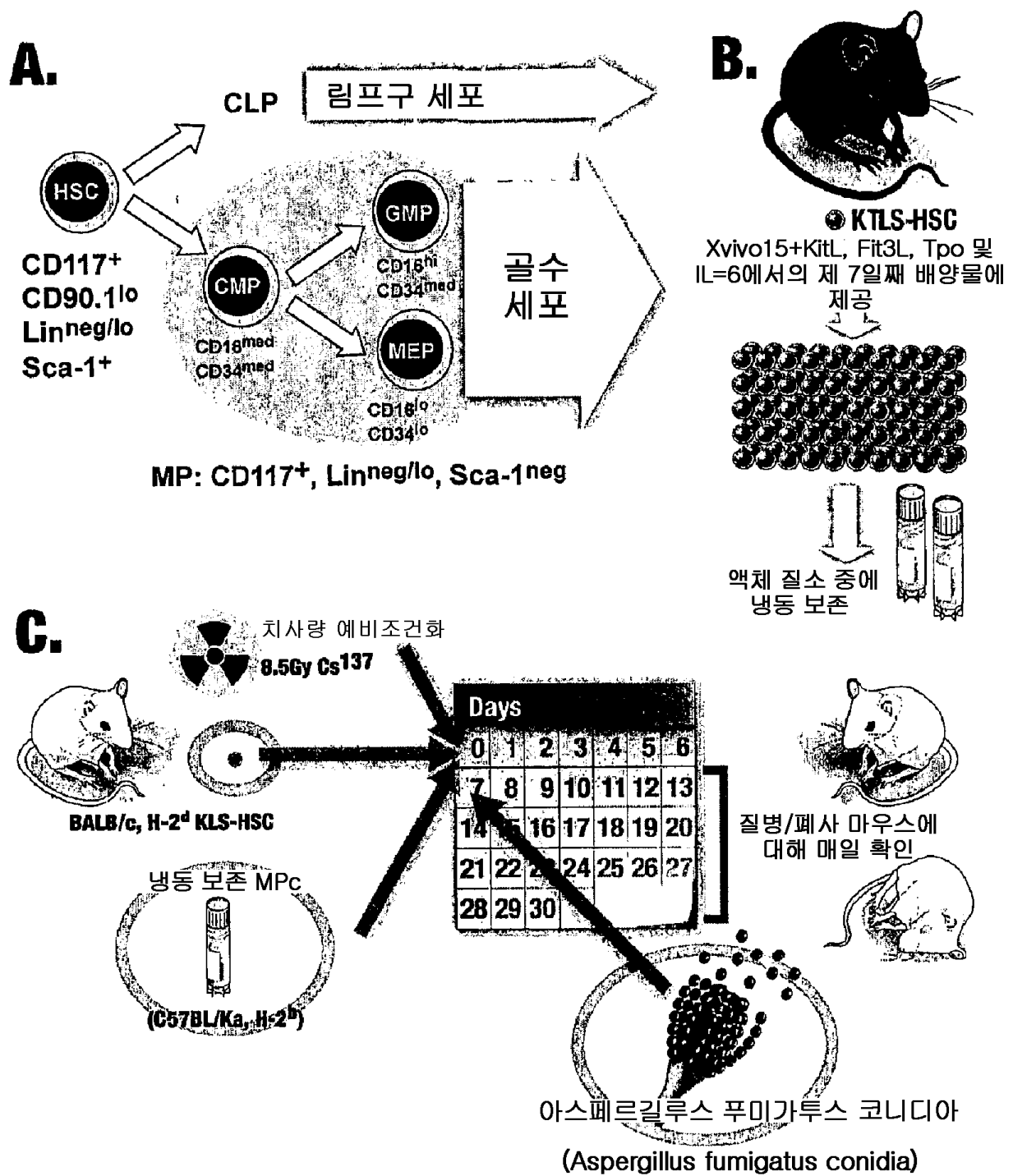
<306> 배양된 MP 의 FACS 분석 및 경시적인 줄기/선조군에서의 변화를 도 16 에 나타냈다. 나타난 그래프들은 살아있는 계통 음성 세포 상에서 프리게이트된다 (pregated). 제 0 일째의 출발 군은 $CD34^+CD90^+$ (상단 우측 게이트) 이며, 이 군은 경시적으로 감소한다. 골수형 선조는 주로 $CD34^+CD90^-$ 게이트 (상단 좌측) 에 있고, 추가적인 데이터는 $CD34^{low/-}$ 세포가 집락을 형성하며 (더 낮은 수준이긴 함), 이에 따라 전체적 선조 모임을 제공한다는 것을 보여준다 (데이터는 나타내지 않음). 상대적인 플레이팅 효율에 대한 $CD34^+CD90^-$ 세포의 상대적인 갯수를 결정하여 (데이터는 나타내지 않음), % $CD34^+$ 세포 및 CFU 사이의 상관성을 결정했다. 근접한 상관성 (데이터는 나타내지 않음) 은 $CD34$ FACS 세포주가 배양에서 선조 갯수에 대한 표식자로서 사용될

수 있음을 시사한다.

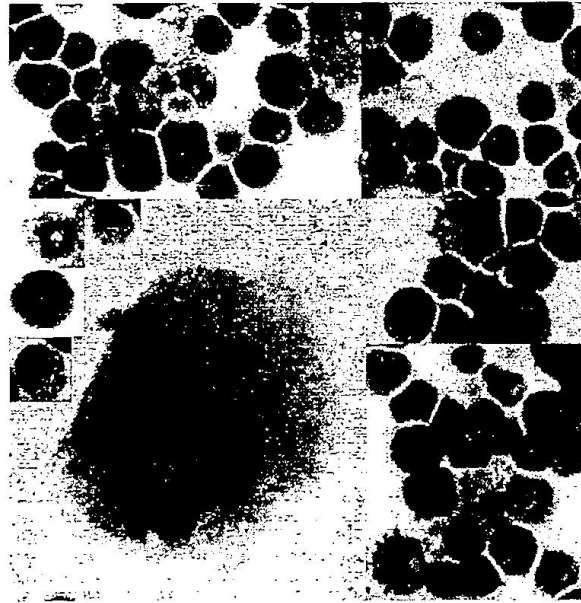
- <307> 도 17 은 인간 MP 세포에 대한 IL-3 및 IL-6 의 단독 또는 조합의 효과를 보여준다. 도 17A 는 세포 밀도 및 ml 당 세포 계수를 보여주며, 도 17B 는 총 세포 계수를 보여준다. 인간 세포는 SCF/Flt3L/TPO 을 포함하는 Xvivo 에서 배양하고, IL-3/IL-6 (10 내지 20 ng/ml) 를 단독으로 또는 조합하여 (10 내지 20 ng/ml) 첨가했다. 세포 계수는 IL-3 가 배양에서 증식 인자로 작용한다는 것을 밝혀냈다.
- <308> 도 18 은 IL-3, IL-6 또는 두 가지 모두를 조합하여 배양한 MP 세포의 집락 형성 검정 결과를 보여준다. 도 47A (제 5 일), 도 47A (제 8 일), 및 도 47C (제 11 일) 은 IL-6 의 첨가가 CFU 갯수를 증가시키며, MP 세포의 선조 잠재성을 유지하도록 돕는다는 것을 증명한다.
- <309> 도 19 는 IL-3, IL-6 또는 두 가지 모두를 조합하여 사용한 MP 배양에서의 CFU 의 절대적인 갯수를 나타낸다. IL-3 및/또는 IL-6 에 대한 응답에서 MPc 유래 CFU 의 총 갯수의 비교. IL-3 의 증식 효과 및 IL-6 의 선조 유지 효과, 상기 두 사이토카인을 조합하면 배양물 중 집락을 개시하는 세포의 총 갯수가 증가한다.
- <310> MPc 는 제 5 일 (도 20A) 또는 제 8 일 (도 21 B) 에 대한 표준 조건 하에서의 배양이다. G-CSF 는 300 ng/ml 로 제 5 일 또는 제 8 일 MPc (그래프에서는 제 0 일) 로 배지에 첨가되며, 세포 성장을 경시적으로 모니터링하고, G-CSF (w/o) 를 수용하지 않은 대조군 배양과 비교했다. 데이터는, 배양의 후기 단계에 첨가되는 경우 경시적으로 세포 수를 증가시키기 위해 사용된다. 이는 또한 본 발명자들의 MP 가 G-CSF 에 응답성이며, 과립구/호중구증의 직접적인 선조일 수 있음을 보여주며, MPc 이식과 조합된 G-CSF 가 환자에서 호중구 갯수를 증가시킨다는 것을 시사한다.
- <311> 도 21 은 생체내에서 G-CSF 에 대한 인간 MP 세포의 응답성을 보여주는 도식이다. 상기 도식은 생체내에서 G-CSF 에 대한 접촉 잠재성, 발생 잠재성 및 응답성을 평가하기 위한 NOD/SCID 마우스에 대한 제 8 일째의 MPc 의 이식 실험을 보여준다.
- <312> 도 22 는 이식 후 1 주째에 인간 MPc 의 접목을 관찰하기 위한 골수 및 비장의 FACS 분석 및 G-CSF 에 대한 그들의 응답성이다. 샘플은 항-인간 CD45 항체로 염색하여 공여자 세포를 검출하고, G-CSF 가 있거나 없는 각 조직에 대한 2 가지의 독립적인 샘플을 보여준다. 골수는 최고 수준의 재건을 보이는데, 이는 G-CSF 의 주사로 증가될 수 있다.
- <313> 도 23 은 NOD/SCID 마우스에서의 인간 MPc 유도성 세포의 FACS 표현형이다. 나타낸 그래프는 살아있는 huCD45+ 세포에 대해 프리게이트한다. CD33 은 초기 골수형 세포에 대한 마커이며, 대다수 또는 인간 세포는 CD33+ 이다. 이는 대부분의 세포가 상기 계통에 수입되어 있음을 나타낸다. CD14 및 CD15 세포주는 더욱 성숙 골수형 세포이며, 이질 염색은 골수형 계통에 대한 수입 및 성숙을 보여준다. 동시에, 상기 시기에는 인간 B 세포 (CD19) 또는 T 세포 (CD3, 나타나지 않음) 가 전혀 검출되지 않았다.
- <314> 본 발명의 상기한 구체적인 구현예들은 상세한 설명 및 기술을 목적으로 제시되었다. 이들은 총망라하거나 또는 본 발명을 개시한 특정 형태로 제한하려는 것이 아니며, 상기 교시의 견지에서 명백하게 많은 변형예 및 다양화가 가능하다. 상기 구현예들은 본 발명의 원칙 및 그의 실용적인 적용을 최선으로 설명하기 위해 선택 및 기재됨으로써, 당업자로 하여금 특별히 고려되는 용도에 맞게 본 발명 및 각종 변형이 있는 변형 구현예를 최선으로 이용할 수 있도록 한다.
- <315> 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 공보 및 참고문헌은, 각 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 참고문헌으로 포함되는 것으로 개별적으로 알려진 것과 다름없이 참고문헌으로 명확히 포함된다.

도면

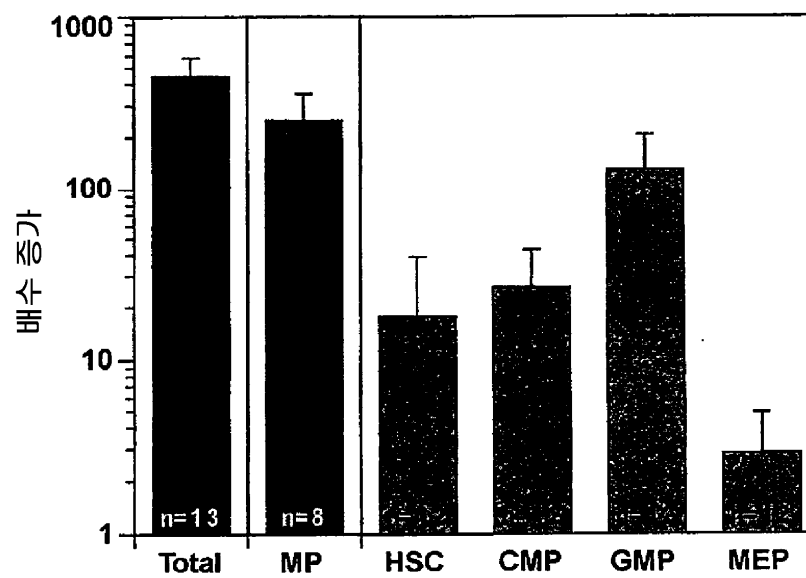
도면1



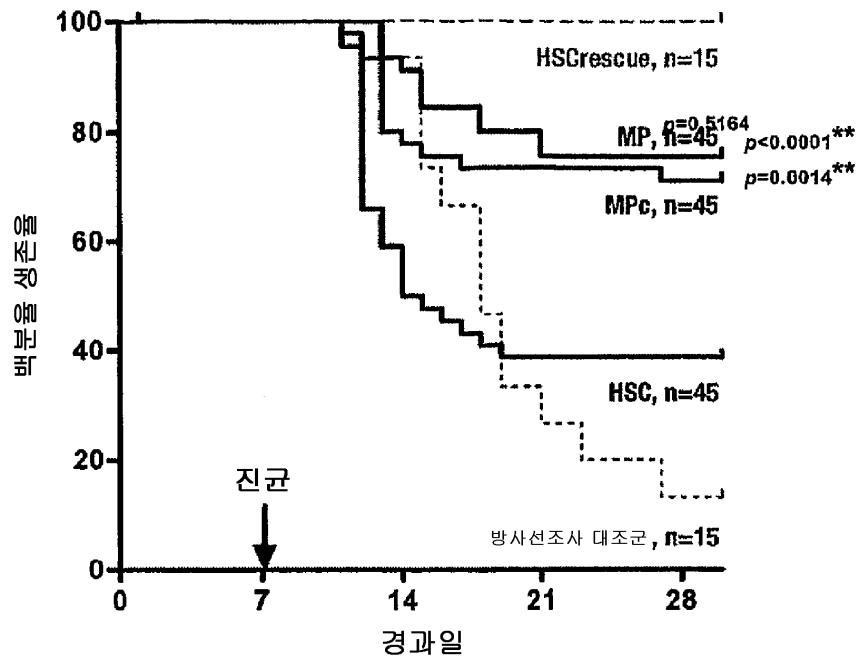
도면2a



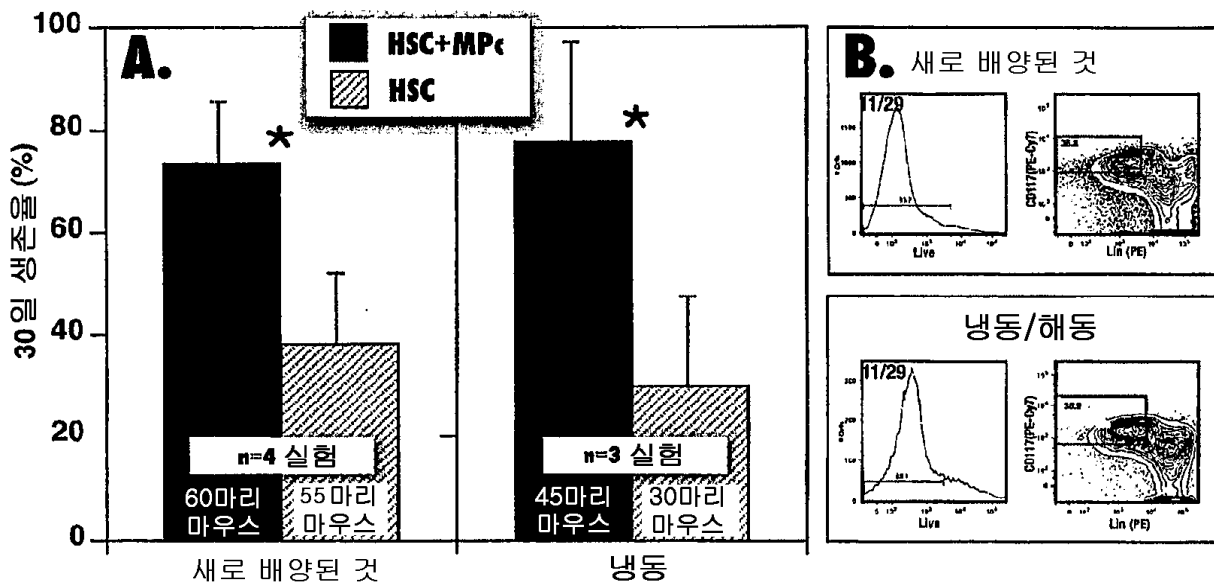
도면2b



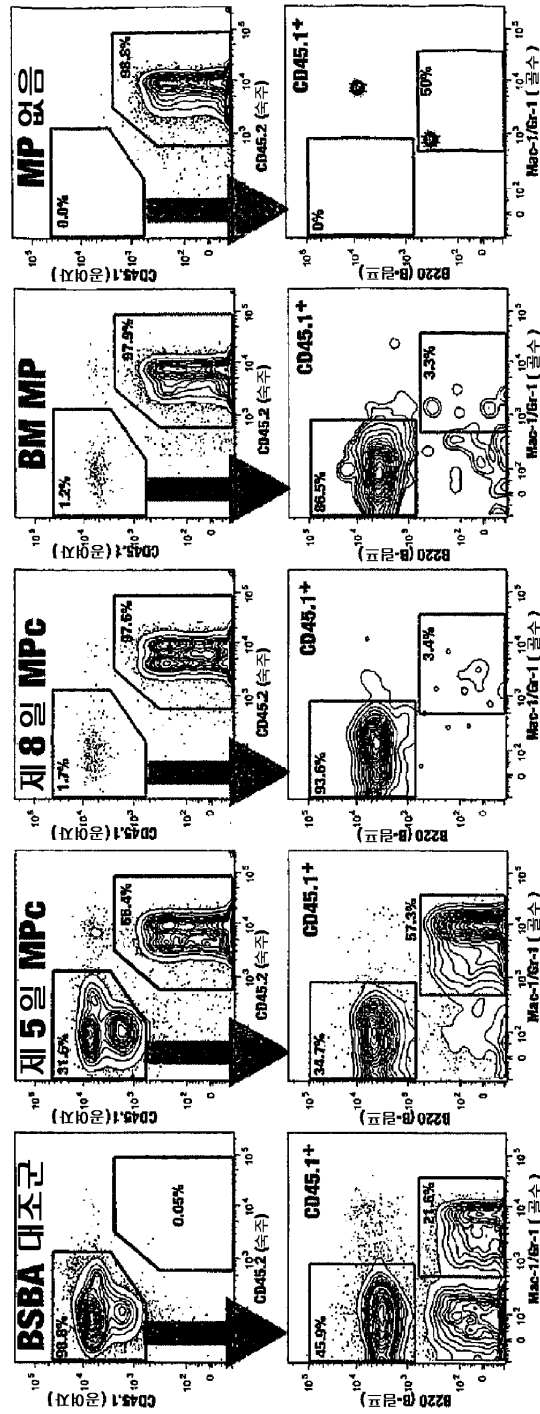
도면3



도면4



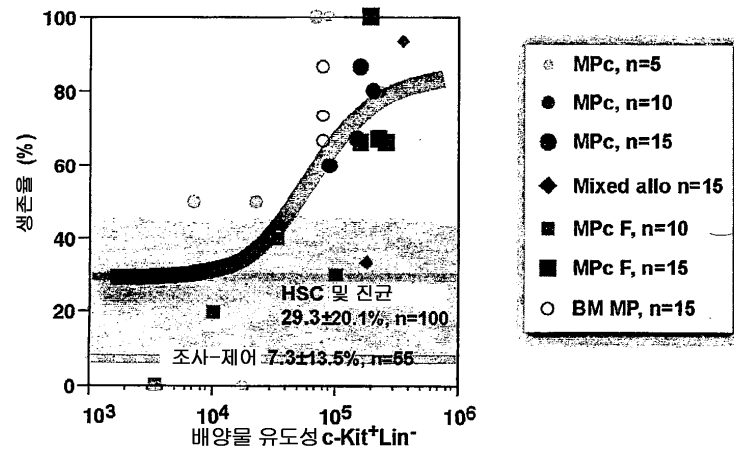
도면5



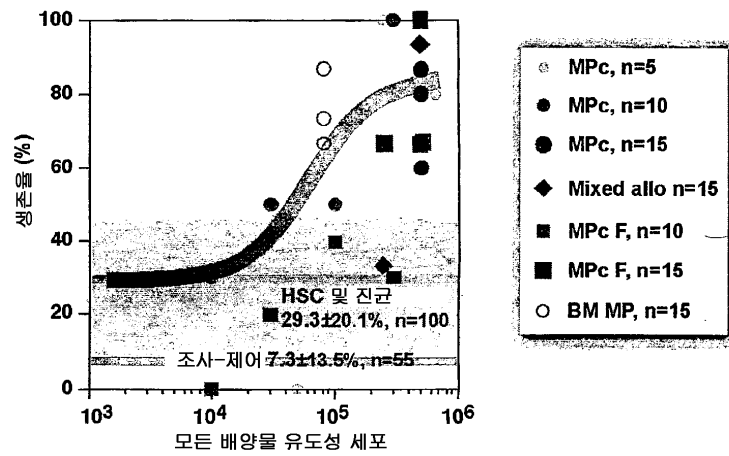
숙주 대조군

공여자 (MPC)
대조군

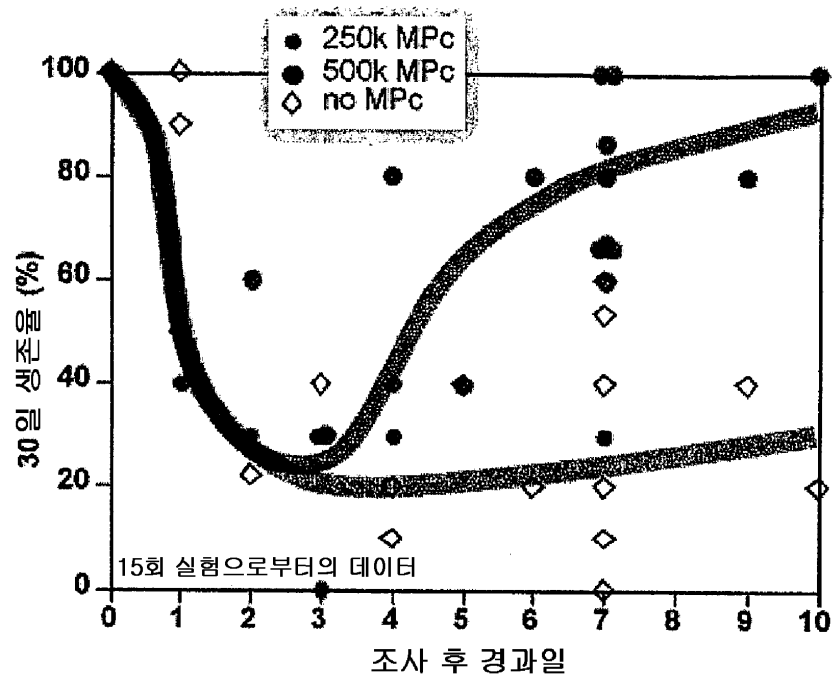
도면6a



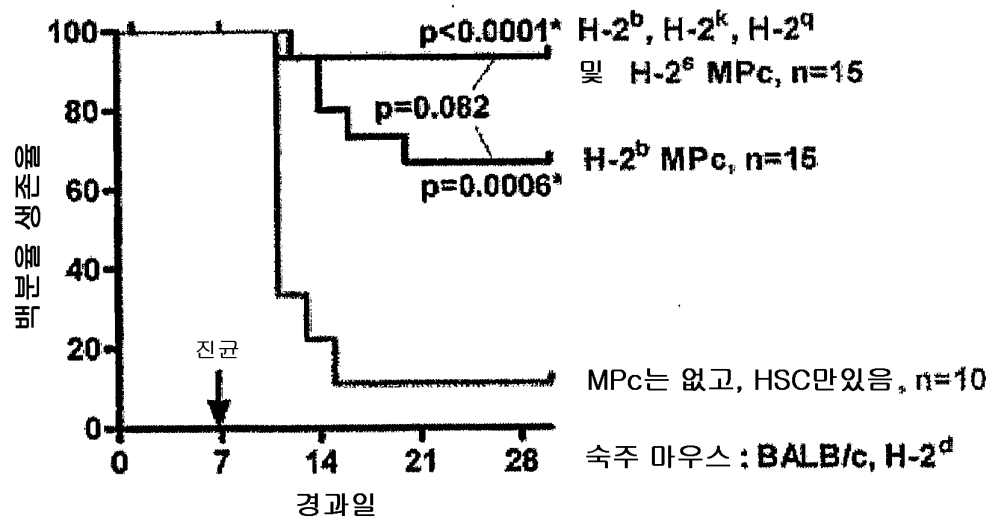
도면6b



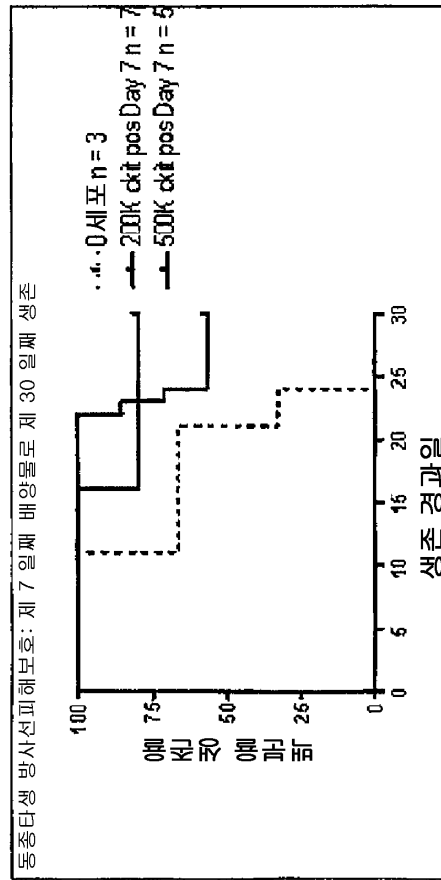
도면7



도면8

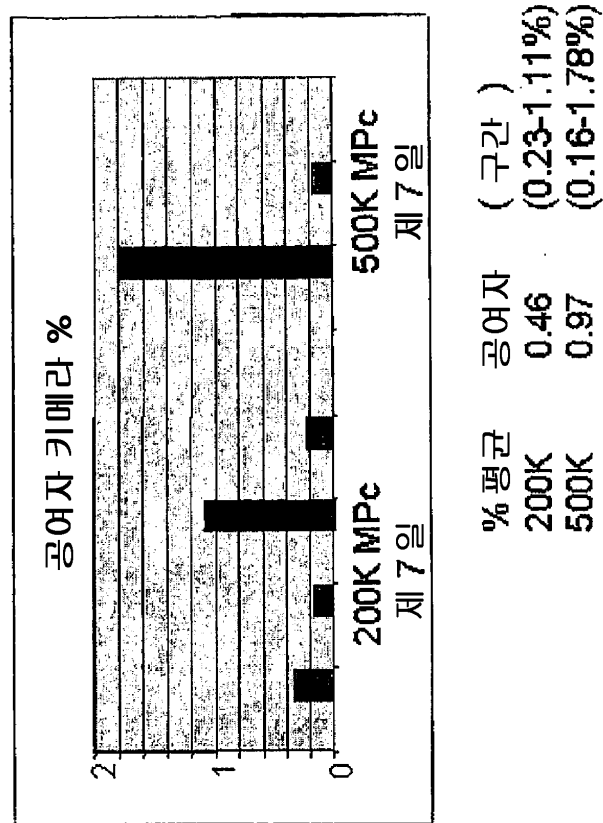


도면9a

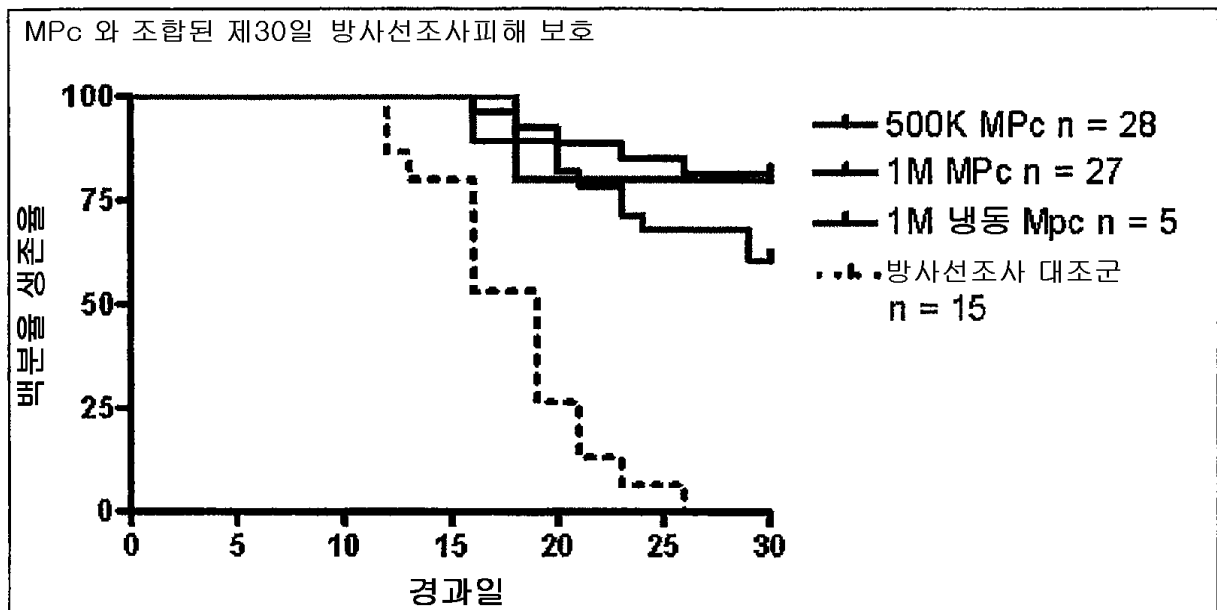


% 평균	공여자	(구간)
200K	0.46	(0.23-1.11%)
500K	0.97	(0.16-1.78%)

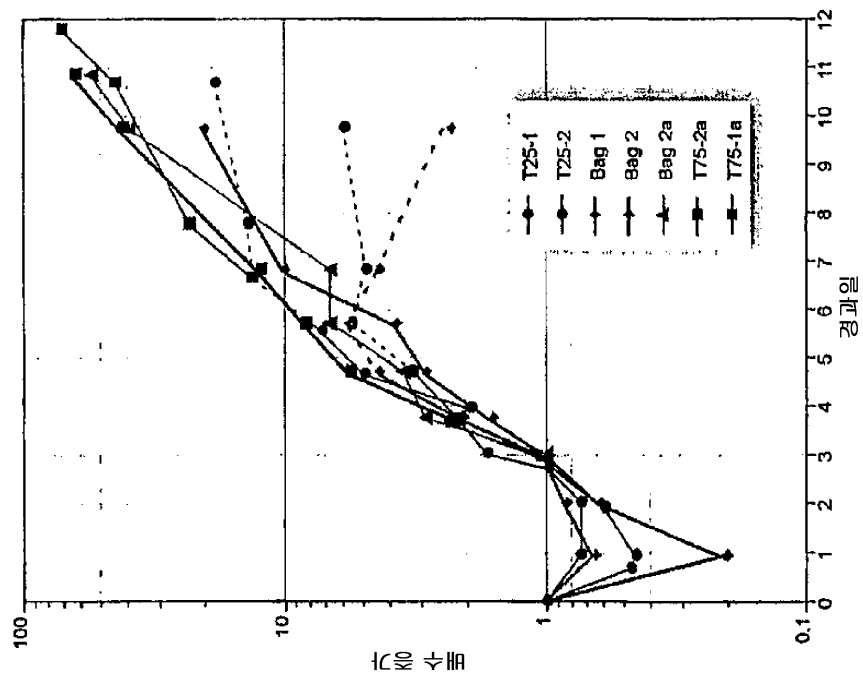
도면9b



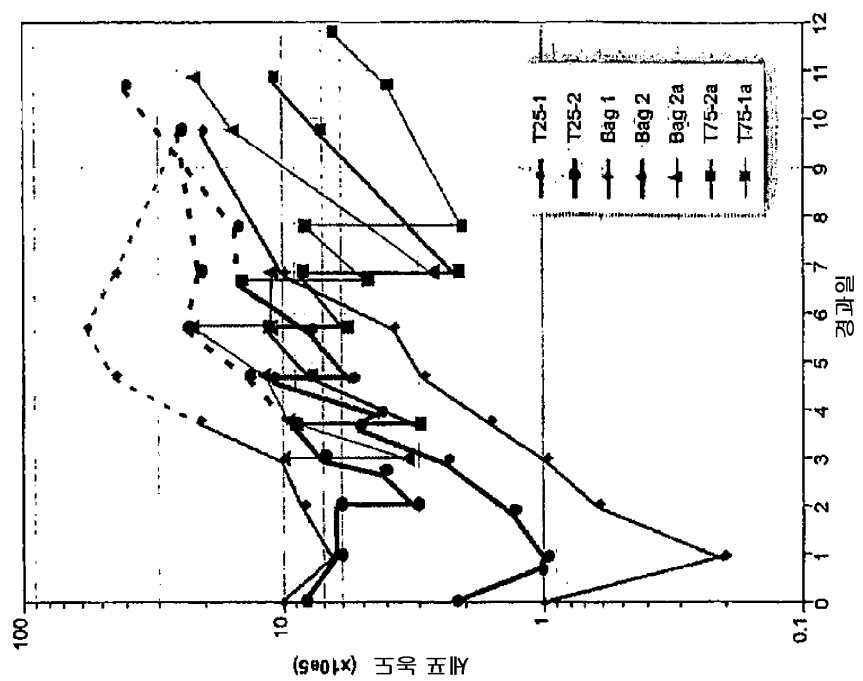
도면10



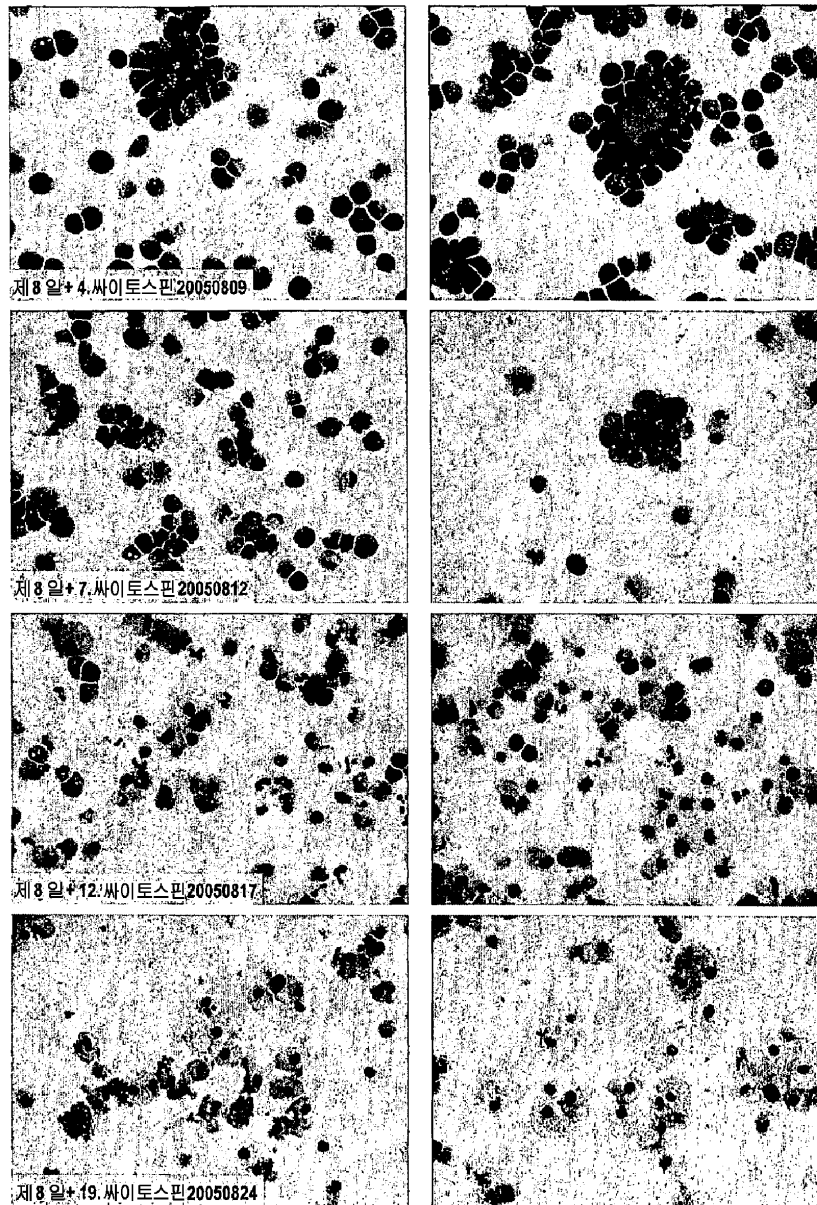
도면11a



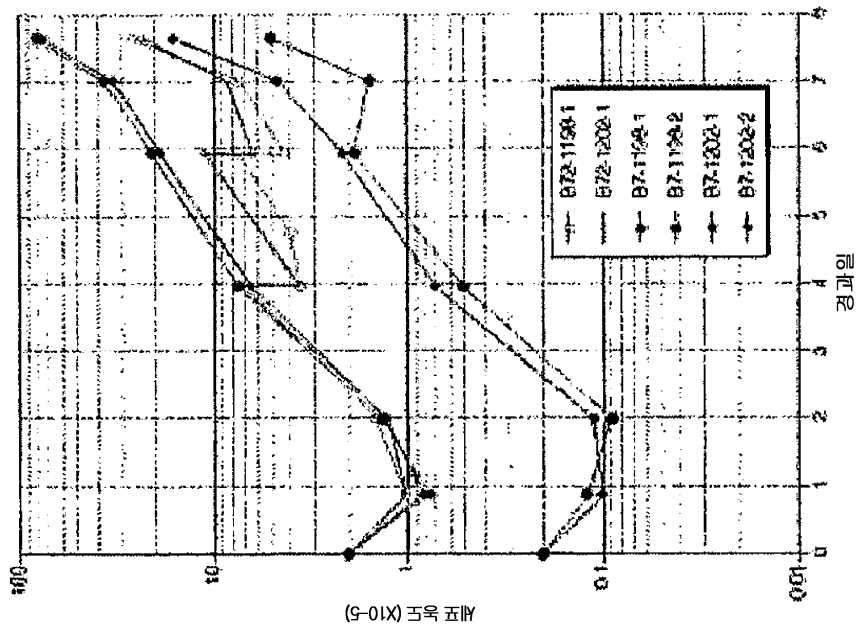
도면11b



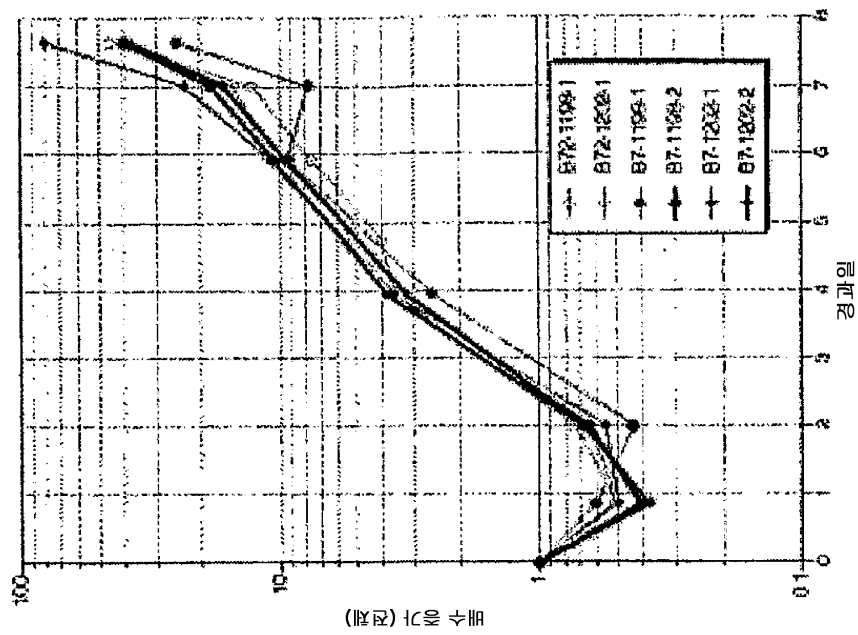
도면12



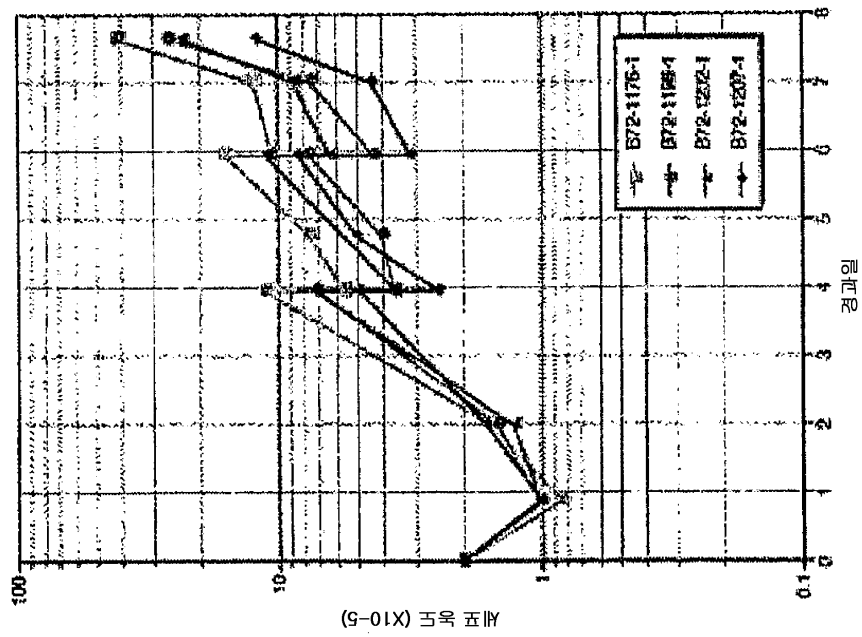
도면13a



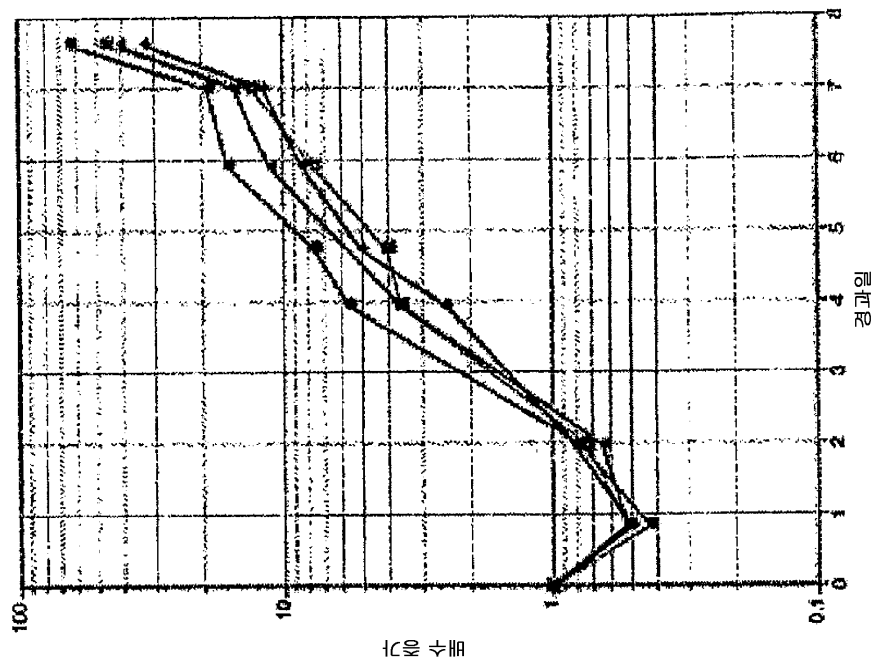
도면13b



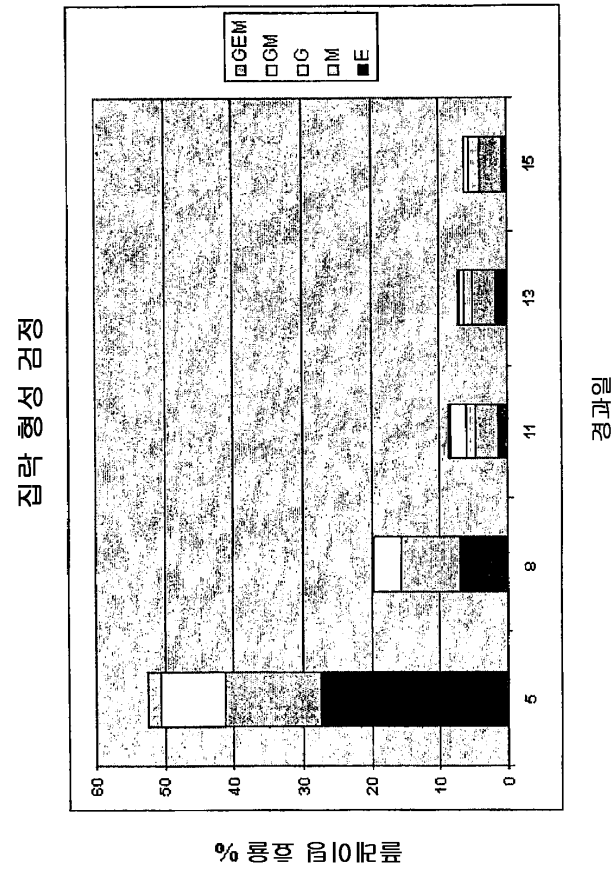
도면14a



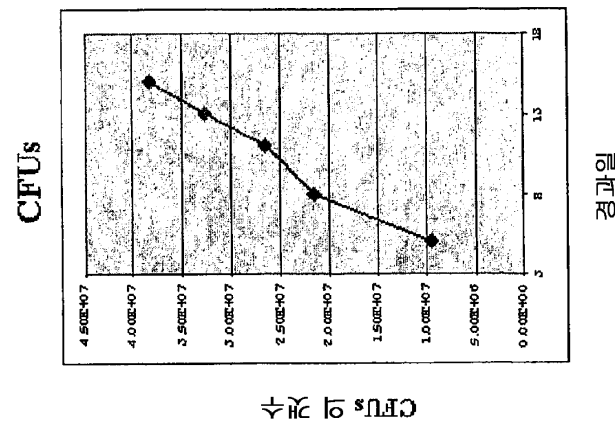
도면14b



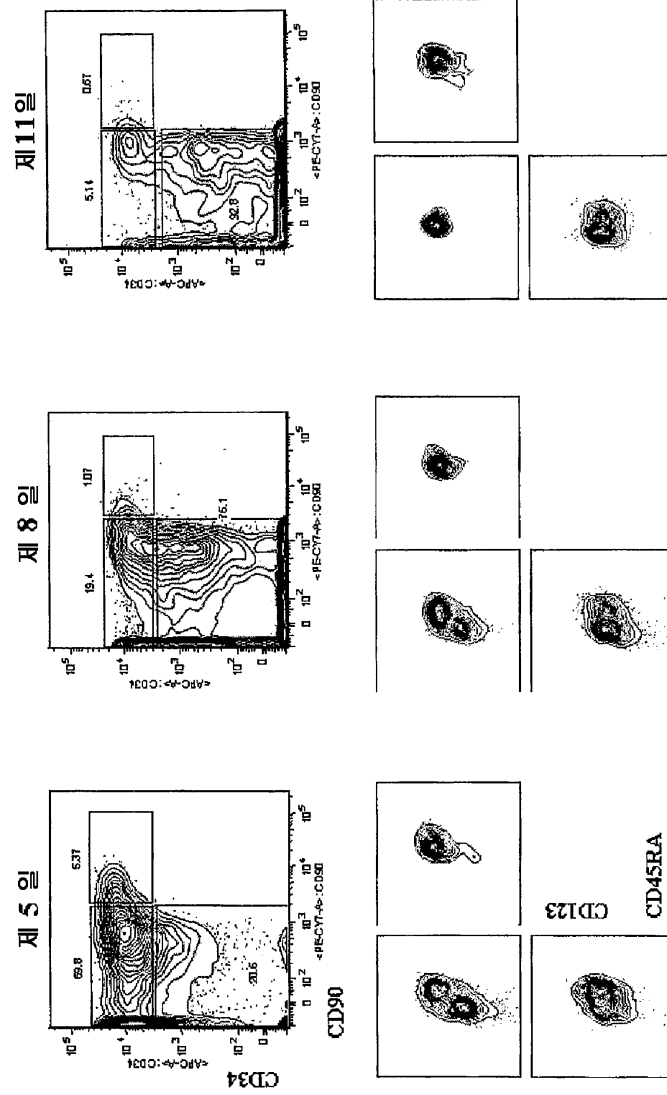
도면15a



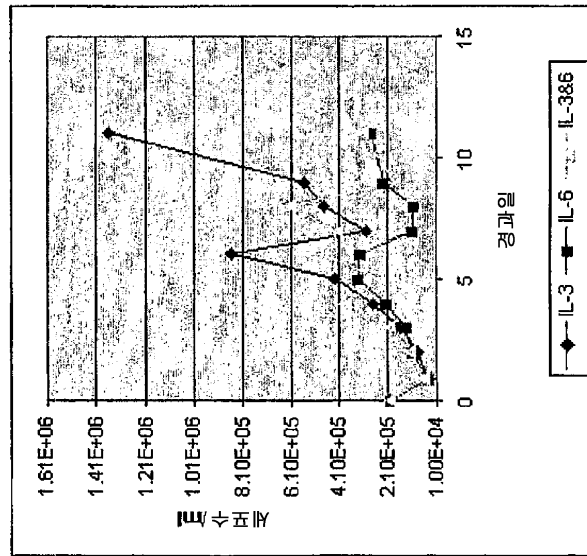
도면15b



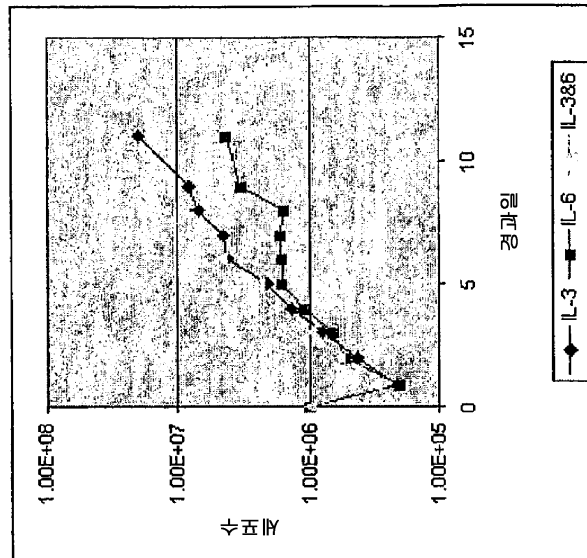
도면16



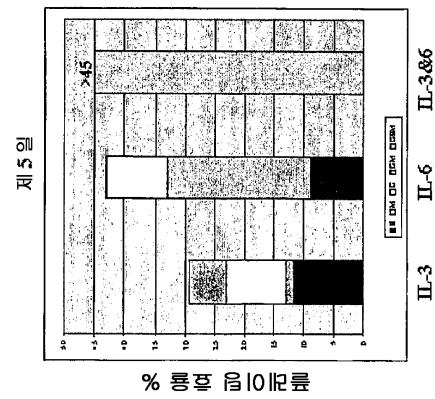
도면17a



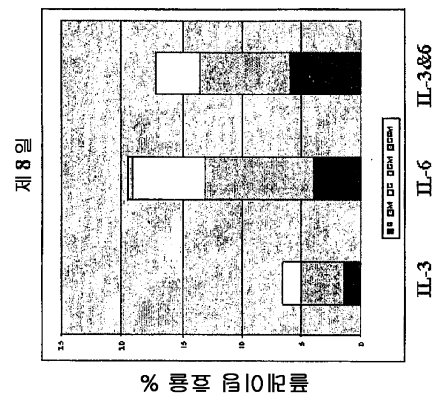
도면17b



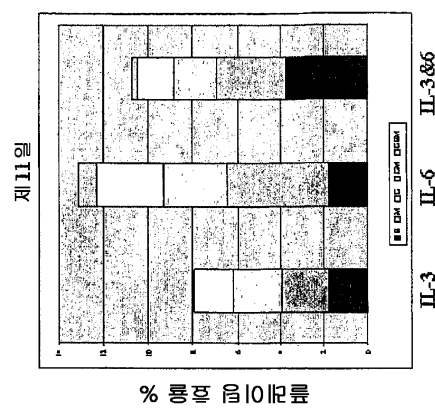
도면18a



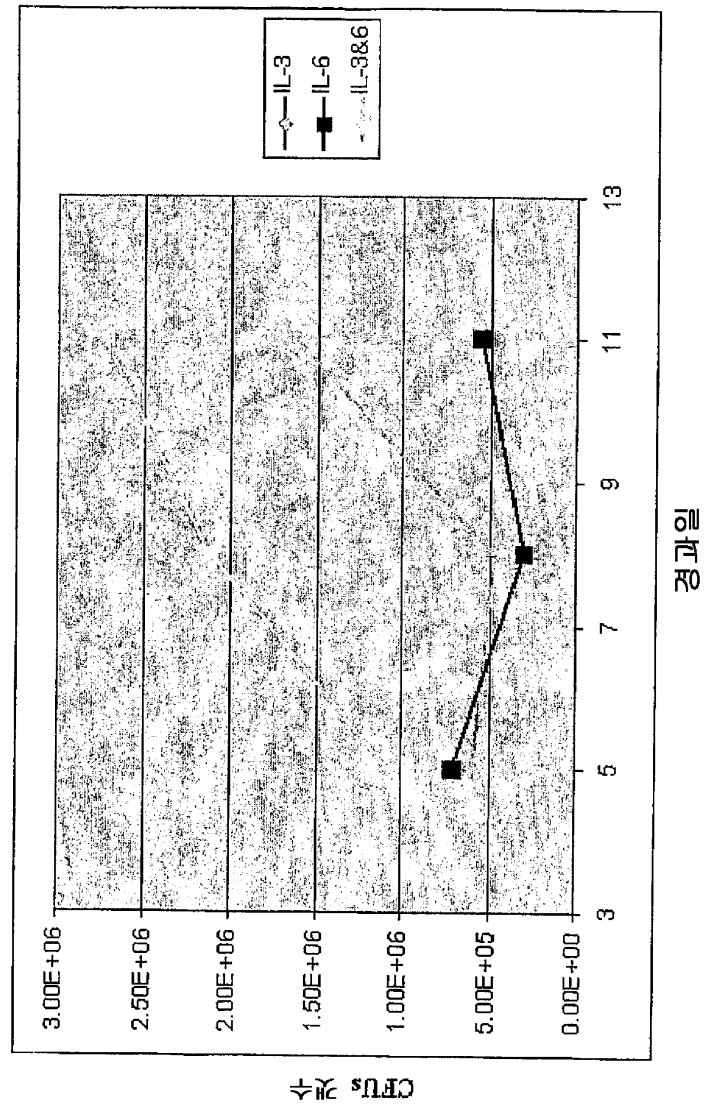
도면18b



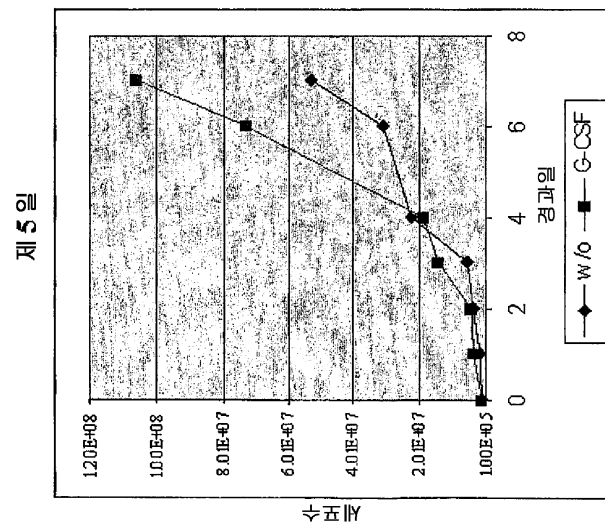
도면18c



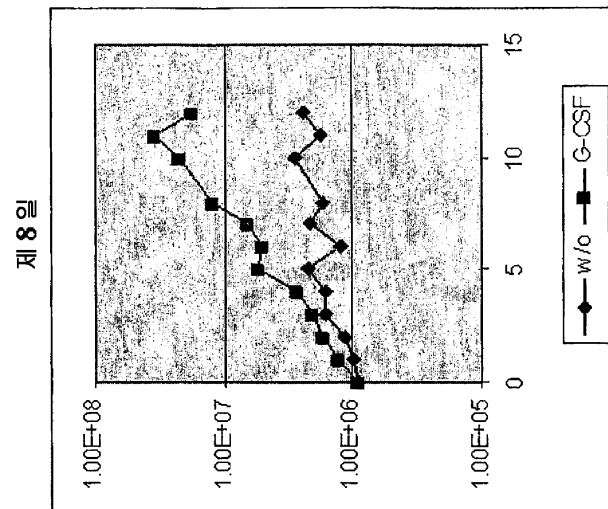
도면19



도면20a



도면20b



도면21

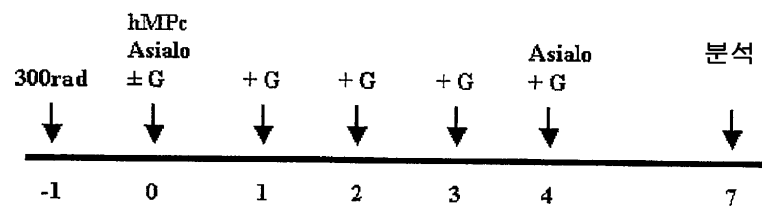
시간 제한

생체내 실험: **d8 MPc**

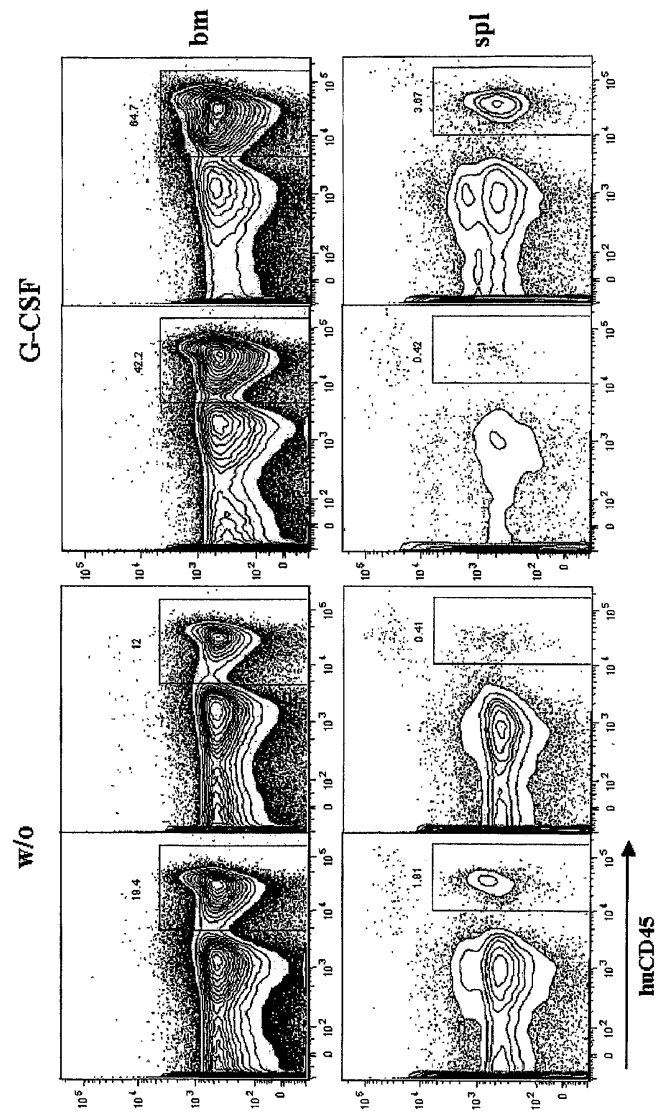
1.5E+07 세포 / 마우스 i.v.

125 µg G-CSF / 마우스 s.c.

50 µl 항-Asialo i.p.



도면22



도면23

