



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0110653
(43) 공개일자 2024년07월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
C12N 2500/38 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7021309
(22) 출원일자(국제) 2022년11월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년06월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/051195
(87) 국제공개번호 WO 2023/101943
국제공개일자 2023년06월08일
- (30) 우선권주장
63/284,360 2021년11월30일 미국(US)
- (71) 출원인
트레일헤드 바이오시스템즈 인크.
미국 44106 오하이오 클리브랜드 시더 애비뉴 10000
- (72) 발명자
고메스 우엘트쉬, 엔젤리카, 엠.
미국 44106 오하이오 클리브랜드 시더 애비뉴 10000
- (74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 조혈 줄기 세포의 유지 및 확장을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

6일만큼 짧은 기간 동안 조혈 줄기 세포 (HSC)의 확장을 가능하게 하는 화학적으로 규정된 배양 배지를 사용하여 인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키는 방법이 제공된다. 배양 배지, 단리된 세포 집단 및 키트가 또한 제공된다.

대표도

구분	항목	내용
1	배양 배지	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
2	단리된 세포 집단	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
3	키트	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
4	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
5	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
6	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
7	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
8	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
9	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
10	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
11	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
12	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
13	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
14	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
15	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
16	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
17	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
18	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
19	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
20	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
21	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
22	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
23	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
24	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
25	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
26	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
27	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
28	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
29	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
30	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
31	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
32	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
33	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
34	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
35	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
36	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
37	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
38	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
39	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
40	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
41	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
42	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
43	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
44	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
45	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지
46	인간 CD34+ HSC	인간 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키기 위한 화학적으로 규정된 배양 배지

(52) CPC특허분류

C12N 2501/125 (2013.01)

C12N 2501/145 (2013.01)

C12N 2501/15 (2013.01)

C12N 2501/16 (2013.01)

C12N 2501/42 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 확장 또는 유지시키는 방법으로서, 인간 CD34+ HSC를, c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGF β 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, c-kit 리간드가 줄기 세포 인자 (SCF)인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, TPOR 효능제가 트롬보포이에틴 (TPO)인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, TPOR 효능제가 엘트롬보팍, TA-316, TPO 효능제 1, 아바트롬보팍 또는 루수트롬보팍인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, TGF β 경로 효능제가 액티빈 A인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, TGF β 경로 효능제가 알란토라톤인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 항산화제가 비타민 C인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 항산화제가 아스코르브산, 글루타티온, 에베셀렌, N-아세틸-L-시스테인 또는 α -토코페롤인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 생물활성 인지질이 리소포스파티드산 (LPA)인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 생물활성 인지질이 스핑고신-1-포스페이트 (SIP), 세라미드-1-포스페이트 (CIP) 또는 리소포스파티딜콜린 (LPC)인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, AhR 효능제가 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, AhR 효능제가 노르이소볼딘, 피피트린- α 히드로브로마이드, MeBIO, ITE 또는 10-C1-BBQ인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, Notch 효능제가 Yhhu 3792인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, Notch 효능제가 재기드 1-2 또는 DLL1-4인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, HDAC 억제제가 발프로산 (VPA)인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, HDAC 억제제가 보리노스타트, 엔티노스타트, 파노비노스타트, 트리코스타틴 A, 모세티노스타트, 4-페닐부티르산, ACY-775, GSK3117391, 벨리노스타트, 로미렙신, MC1568, 투바스타틴 A, 기비노스타트, 다시노스타트, CUDC-101, 퀴시노스타트, 프라시노스타트, PCI-34051, 드록시노스타트, 아벡시노스타트, RGFP966, AR-42, 리콜리노스타트, 타세디날린, 피메피노스타트, 부티르산나트륨, 쿠르쿠민, M344, 투바신, RG2833, 레스미노스타트, 디발프로엑스 소듐, 스크립타이드, 소듐 페닐부티레이트, 투바스타틴 A, 시나핀산, TMP269, CAY10683, TMP195, UF010, 타스퀴니모드, SKLb-23bb, 이소구아노신, NKL22, 숄포라판, BRD73594, 시타리노스타트, 수베로히드록삼산, BRD3308, 스플리토미신, HPOB, LMK235, 비페닐-4-숄포닐 클로라이드, 넥스투라스타트 A, BML-210, TC-H106, SR-4370, TH34, 투시디노스타트, SIS17, 파르테놀리드, wt161, CAY10603, ACY738, 라드데아닌 A, 티노스타무스틴, 도마티노스타트, BG45 및 ITSA-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, CD34+ HSC가 제대혈로부터의 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, CD34+ HSC가 골수로부터의 것인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, CD34+ HSC가 적어도 6일 동안 배양되는 것인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, CD34+ HSC가 Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+의 표현형을 갖는 것인 방법.

청구항 21

인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 확장 또는 유지시키는 방법으로서, 인간 CD34+ HSC를, 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO), 액티빈 A, 비타민 C, 리소포스파티드산 (LPA), 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ), Yhhu 3792 및 발프로산 (VPA)을 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, SCF가 10 ng/ml의 농도로 존재하고, TPO가 100 ng/ml의 농도로 존재하고, 액티빈 A가 20 ng/ml의 농도로 존재하고, 비타민 C가 100 uM의 농도로 존재하고, LPA가 200 nM의 농도로 존재하고, FICZ가 500 nM의 농도로 존재하고, Yhhu 3792가 750 nM의 농도로 존재하고, VPA가 150 uM의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 23

c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGF β 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는, 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 확장 또는 유지시키기 위한 배양 배지.

청구항 24

제23항에 있어서, c-kit 리간드가 줄기 세포 인자 (SCF)인 배양 배지.

청구항 25

제23항에 있어서, TPOR 효능제가 트롬보포이에틴 (TPO)인 배양 배지.

청구항 26

제23항에 있어서, TPOR 효능제가 엘트롬보콕, TA-316, TPO 효능제 1, 아바트롬보콕 또는 루수트롬보콕인 배양 배지.

청구항 27

제23항에 있어서, TGF β 경로 효능제가 액티빈 A인 배양 배지.

청구항 28

제23항에 있어서, TGF β 경로 효능제가 알란토락톤인 배양 배지.

청구항 29

제23항에 있어서, 항산화제가 비타민 C인 배양 배지.

청구항 30

제23항에 있어서, 항산화제가 아스코르브산, 글루타티온, 에베셀렌, N-아세틸-L-시스테인 또는 α -토코페롤인 배양 배지.

청구항 31

제23항에 있어서, 생물활성 인지질이 리소포스파티드산 (LPA)인 배양 배지.

청구항 32

제23항에 있어서, 생물활성 인지질이 스펅고신-1-포스페이트 (S1P), 세라미드-1-포스페이트 (C1P) 또는 리소포스파티딜콜린 (LPC)인 배양 배지.

청구항 33

제23항에 있어서, AhR 효능제가 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)인 배양 배지.

청구항 34

제23항에 있어서, AhR 효능제가 노르이소볼딘, 피피트린- α 히드로브로마이드, MeBIO, ITE 또는 10-C1-BBQ인 배양 배지.

청구항 35

제23항에 있어서, Notch 효능제가 Yhhu 3792인 배양 배지.

청구항 36

제23항에 있어서, Notch 효능제가 재기드 1-2 또는 DLL1-4인 배양 배지.

청구항 37

제23항에 있어서, HDAC 억제제가 발프로산 (VPA)인 배양 배지.

청구항 38

제23항에 있어서, HDAC 억제제가 보리노스타트, 엔티노스타트, 파노비노스타트, 트리코스타틴 A, 모세티노스타트, 4-페닐부티르산, ACY-775, GSK3117391, 벨리노스타트, 로미렙신, MC1568, 투바스타틴 A, 기비노스타트, 다시노스타트, CUDC-101, 퀴시노스타트, 프라시노스타트, PCI-34051, 드록시노스타트, 아벡시노스타트, RGFP966, AR-42, 리콜리노스타트, 타세디날린, 피메피노스타트, 부티르산나트륨, 쿠르쿠민, M344, 투바신, RG2833, 레스미노스타트, 디발프로엑스 소듐, 스크립타이드, 소듐 페닐부티레이트, 투바스타틴 A, 시나핀산, TMP269, CAY10683, TMP195, UF010, 타스퀴니모드, SKLb-23bb, 이소구아노신, NKL22, 술폴라판, BRD73594, 시타리노스타

트, 수베로히드록삼산, BRD3308, 스플리토미신, HPOB, LMK235, 비페닐-4-술포닐 클로라이드, 넥스투라스타트 A, BML-210, TC-H106, SR-4370, TH34, 투시디노스타트, SIS17, 파르테놀리드, wt161, CAY10603, ACY738, 라드데아닌 A, 티노스타무스틴, 도마티노스타트, BG45 및 ITSA-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 배양 배지.

청구항 39

제23항에 있어서, 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO), 액티빈 A, 비타민 C, 리소포스파티드산 (LPA), 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ), Yhhu 3792 및 발프로산 (VPA)을 포함하는 배양 배지.

청구항 40

제39항에 있어서, SCF가 10 ng/ml의 농도로 존재하고, TPO가 100 ng/ml의 농도로 존재하고, 액티빈 A가 20 ng/ml의 농도로 존재하고, 비타민 C가 100 uM의 농도로 존재하고, LPA가 200 nM의 농도로 존재하고, FICZ가 500 nM의 농도로 존재하고, Yhhu 3792가 750 nM의 농도로 존재하고, VPA가 150 uM의 농도로 존재하는 것인 배양 배지.

청구항 41

인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)의 단리된 세포 배양물로서, c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGFβ 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지에서 배양된 인간 CD34+ HSC를 포함하는 배양물.

청구항 42

인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 유지시키는 방법으로서, 인간 CD34+ HSC를, TGFβ 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하며 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 결여된 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, TGFβ 경로 효능제가 액티빈 A이고, 생물활성 인지질이 리소포스파티드산 (LPA)이고, AhR 효능제가 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)이고, HDAC 억제제가 발프로산 (VPA)인 방법.

청구항 44

제42항에 있어서, LT-HSC가 CRHBP, HOPX 및 LMO2를 또한 발현하는 CD34⁺ 세포인 방법.

청구항 45

TGFβ 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하며 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 결여된, 인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 유지시키기 위한 배양 배지.

청구항 46

인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)의 단리된 세포 배양물로서, TGFβ 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하며 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 결여된 배양 배지에서 배양된 인간 CD34+ LT-HSC를 포함하는 배양물.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 2021년 11월 30일에 출원된 미국 가출원 번호 63/284,360을 우선권 주장한다. 그 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] **발명의 배경 기술**

[0004] 조혈 줄기 세포 (HSC)는 골수 및 림프 계통의 세포를 포함한, 전체 조혈계를 발생시키는 만능, 자기-재생 세포이다. HSC는 골수 및 제대혈에서 자연적으로 발견되는 희귀 세포이고, 말초혈에서는 훨씬 더 드물다. HSC는 전형적으로, CD34의 발현 및 계통 특이적 마커 및 CD38의 발현 결여 (Lin-CD34+CD38-)를 포함한, 특정한 마커의 발현 또는 발현 결여에 의해 정의된다. 동종이체 HSC는 암, 예컨대 백혈병 및 림프종, 및 자가면역 장애를 비롯한 심각한 혈액학적 질환의 치료 수단으로서 줄기 세포 이식에 사용된다. 그러나, 이식에 HSC를 사용할 수 있는 능력은 HSC가 자연적으로 매우 제한적으로 발생한다는 것을 고려해 볼 때, HSC를 배양물 중에서 단리, 확장 및 유지시킬 수 있는 능력을 필요로 한다.

[0005] 다른 시토카인 및 소분자와 함께, 전형적으로 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 보충된 배양 배지를 포함하는, CD34+ HSC를 확장시키기 위한 다양한 배양 시스템이 기재되어 있다. 예를 들어, 니시노 (Nishino) 등은 SCF, TPO, 및 히스톤 아세틸트랜스퍼라제의 강력한 억제제인 가르시놀을 함유하는 배지에서 7일 동안 배양함으로써 HSC를 확장시키는 것을 보고하였다 (Nishino et al. (2011) PLoS One 6:e24298). 힘부르크 (Himburg) 등은 SCF, TPO, Flt-3 리간드, 및 PI3K 신호전달을 활성화시키는 플레이오토로핀을 함유하는 배지에서 배양함으로써 HSC를 확장시키는 것을 보고하였다 (Himburg et al. (2010) Nat. Med. 16:475-482). 제대혈로부터의 CD34+ HSC는 JNK 경로의 억제제가 첨가된 SCF, TPO, Flt-3 리간드 및 저밀도 지단백질을 함유하는 기초 배지에서의 배양에 의해 생체의 확장되었다 (Xiao et al. (2019) Cell. Discovery 5:2). 대안적으로, 제대혈로부터의 CD34+ HSC는 SCF, TPO, Flt-3 및 IL-3을 함유하는 배지에서의 16시간 동안의 배양에 이어, 데아세틸라제 억제제 발프로산 (VPA)과 7일 동안의 추가의 배양에 의해 생체의 확장되었다 (Papa et al. (2019) J. Vis. Exp. DOI:10.3791/59532).

[0006] 아릴 탄화수소 수용체 길항제, 예컨대 퓨린 유도체 SR1은 HSC의 확장을 촉진하는 것으로 보고되었다 (Boitano et al. (2010) Science 329:1345-1348).

[0007] 피옥시슘 증식자-활성화 수용체 (PPAR)- γ 의 길항작용은 HSC의 확장을 촉진하는 것으로 보고되었다 (Guo et al. (2018) Nat. Med. 24:360-367).

[0008] 보다 최근에, 10일 동안 NF κ B 신호전달 경로의 억제제의 첨가는 배양물에서 HSC의 확장을 증가시키는 것으로 보고되었다 (Sun et al. (2021) Exp. Cell. Res. 399:112468).

[0009] 또한, 186개 화학물질의 패널의 스크리닝을 통해, CHIR-99021 (GSK3 억제제), 포르스콜린 (cAMP 활성화제) 및 OAC1 (Oct4 활성화제)의 조합물이 배양물에서 HSC의 유지를 지지하는 화학적 카테일로서 확인되었다 (Jiang et al. (2018) Cell. Discovery 4:59).

[0010] 따라서, 일부 진전이 있었지만, 배양물 중에서 HSC를 확장 및 유지시키기 위한 효율적이고, 강력한 방법 및 조성물이 여전히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0011] **발명의 개요**

[0012] 본 개시내용은 6일만큼 짧은 기간 동안의 배양으로 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)의 확장을 가능하게 하는 화학적으로 규정된 배양 배지를 사용하여, 예를 들어 제대혈 또는 골수 세포로부터의 인간 HSC를 유지 및 확장시키는 방법을 제공한다. 배양 배지는 혈청이 결여되고 줄기 세포에서 특정한 신호전달 경로에 효능작용 또는 길항작용하는 소분자 작용제를 포함하며, 이에 따라 CD34+ HSC 계통을 따라 확장 및 자가-재생이 촉진되어 HSC-연관 바이오마커의 발현을 유도한다. 본 개시내용의 방법은 CD34+ HSC를 확장시키는데 필요한 시간을 유의하게 단축시킨다는 이점을 갖는다. 또한, 배양 배지에서의 소분자 작용제의 사용은 배양 성분의 정확한 제어를 허용한다.

[0013] 따라서, 한 양상에서, 본 개시내용은 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를, c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGF β 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 인간 CD34+ HSC를 유지 또는 확장시키는 방법에 관한 것이다.

[0014] 한 실시양태에서, c-kit 리간드는 줄기 세포 인자 (SCF)이다.

[0015] 한 실시양태에서, TPOR 효능제는 트롬보포이에틴 (TPO)이다. 다른 실시양태에서, TPOR 효능제는 엘트롬보팍,

TA-316, TPO 효능제 1, 아바트롬보팍 또는 루수트롬보팍이다.

- [0016] 한 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 액티빈 A이다. 또 다른 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 알란토락톤이다.
- [0017] 한 실시양태에서, 항산화제는 비타민 C의 형태 (아스코르브산), 예컨대 비타민 C의 안정한 형태인 L-아스코르브산 포스페이트 세스퀴마그네슘 염 수화물 (Vit. C)이다. 다른 실시양태에서, 항산화제는 아스코르브산, 글루타티온, 에베셀렌, N-아세틸-L-시스테인 또는 α -토코페롤이다.
- [0018] 한 실시양태에서, 생물활성 인지질은 리소포스파티드산 (LPA)이다. 다른 실시양태에서, 생물활성 인지질은 스팅고신-1-포스페이트 (S1P), 세라미드-1-포스페이트 (C1P) 또는 리소포스파티딜콜린 (LPC)이다.
- [0019] 한 실시양태에서, AhR 효능제는 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)이다. 다른 실시양태에서, AhR 효능제는 노르이소볼딘, 피피트린- α 히드로브로마이드, MeBIO, ITE 또는 10-C1-BBQ이다.
- [0020] 한 실시양태에서, Notch 효능제는 Yhhu 3792이다. 다른 실시양태에서, Notch 효능제는 재기드 1-2 또는 DLL1-4이다.
- [0021] 한 실시양태에서, HDAC 억제제는 발프로산 (VPA)이다. 다른 실시양태에서, HDAC 억제제는 보리노스타트, 엔티노스타트, 파노비노스타트, 트리코스타틴 A, 모세티노스타트, 4-페닐부티르산, ACY-775, GSK3117391, 벨리노스타트, 로미렙신, MC1568, 투바스타틴 A, 기비노스타트, 다시노스타트, CUDC-101, 퀴시노스타트, 프라시노스타트, PCI-34051, 드록시노스타트, 아벡시노스타트, RGFP966, AR-42, 리콜리노스타트, 타세디날린, 피메피노스타트, 부티르산나트륨, 쿠르쿠민, M344, 투바신, RG2833, 레스미노스타트, 디발프로엑스 소듐, 스크립타이드, 소듐 페닐부티레이트, 투바스타틴 A, 시나핀산, TMP269, CAY10683, TMP195, UF010, 타스퀴니모드, SKLb-23bb, 이소구아노신, NKL22, 술폴라판, BRD73594, 시타리노스타트, 수베로히드록삼산, BRD3308, 스플리토미신, HPOB, LMK235, 비페닐-4-술포닐 클로라이드, 넥스투라스타트 A, BML-210, TC-H106, SR-4370, TH34, 투시디노스타트, SIS17, 파르테놀리드, wt161, CAY10603, ACY738, 라드데아닌 A, 티노스타무스틴, 도마티노스타트, BG45 및 ITSA-1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0022] 한 실시양태에서, 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 유지 또는 확장시키는 방법은 인간 CD34+ HSC를 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO), 액티빈 A, 비타민 C, 리소포스파티드산 (LPA), 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ), Yhhu 3792 및 발프로산 (VPA)을 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, SCF는 10 ng/ml의 농도로 존재하고, TPO는 100 ng/ml의 농도로 존재하고, 액티빈 A는 20 ng/ml의 농도로 존재하고, 비타민 C는 100 μ M의 농도로 존재하고, LPA는 200 nM의 농도로 존재하고, FICZ는 500 nM의 농도로 존재하고, Yhhu 3792는 750 nM의 농도로 존재하고, VPA는 150 μ M의 농도로 존재한다.
- [0023] 본 개시내용의 방법 및 조성물에서, CD34+ HSC는 예를 들어 제대혈 또는 골수로부터의 것일 수 있다.
- [0024] 한 실시양태에서, CD34+ HSC는 본원에 기재된 배지에서 적어도 6일 동안 (예를 들어, 7일, 또는 1주, 또는 그 초과 동안) 배양된다.
- [0025] 한 실시양태에서, CD34+ HSC는 Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+의 표현형을 갖는다.
- [0026] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGF β 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는, 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 확장 또는 유지시키기 위한 배양 배지에 관한 것이다.
- [0027] 한 실시양태에서, c-kit 리간드는 줄기 세포 인자 (SCF)이다.
- [0028] 한 실시양태에서, TPOR 효능제는 트롬보포이에틴 (TPO)이다. 다른 실시양태에서, TPOR 효능제는 엘트롬보팍, TA-316, TPO 효능제 1, 아바트롬보팍 또는 루수트롬보팍이다.
- [0029] 한 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 액티빈 A이다. 또 다른 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 알란토락톤이다.
- [0030] 한 실시양태에서, 항산화제는 비타민 C이다. 다른 실시양태에서, 항산화제는 아스코르브산, 글루타티온, 에베셀렌, N-아세틸-L-시스테인 또는 α -토코페롤이다.
- [0031] 한 실시양태에서, 생물활성 인지질은 리소포스파티드산 (LPA)이다. 다른 실시양태에서, 생물활성 인지질은 스팅고신-1-포스페이트 (S1P), 세라미드-1-포스페이트 (C1P) 또는 리소포스파티딜콜린 (LPC)이다.

- [0032] 한 실시양태에서, AhR 효능제는 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)이다. 다른 실시양태에서, AhR 효능제는 노르이소볼딘, 피피트린- α 히드로브로마이드, MeBIO, ITE 또는 10-Cl-BBQ이다.
- [0033] 한 실시양태에서, Notch 효능제는 Yhhu 3792이다. 다른 실시양태에서, Notch 효능제는 재기트 1-2 또는 DLL1-4이다.
- [0034] 한 실시양태에서, HDAC 억제제는 발프로산 (VPA)이다. 다른 실시양태에서, HDAC 억제제는 보리노스타트, 엔티노스타트, 파노비노스타트, 트리코스타틴 A, 모세티노스타트, 4-페닐부티르산, ACY-775, GSK3117391, 벨리노스타트, 로미렙신, MC1568, 투바스타틴 A, 기비노스타트, 다시노스타트, CUDC-101, 퀴시노스타트, 프라시노스타트, PCI-34051, 드록시노스타트, 아벡시노스타트, RGFP966, AR-42, 리콜리노스타트, 타세디날린, 피메피노스타트, 부티르산나트륨, 쿠르쿠민, M344, 투바신, RG2833, 레스미노스타트, 디발프로엑스 소듐, 스크립타이드, 소듐 페닐부티레이트, 투바스타틴 A, 시나핀산, TMP269, CAY10683, TMP195, UF010, 타스퀴니모드, SKLb-23bb, 이소구아노신, NKL22, 술폴라판, BRD73594, 시타리노스타트, 수베로히드록삼산, BRD3308, 스플리토미신, HPOB, LMK235, 비페닐-4-술포닐 클로라이드, 넥스투라스타트 A, BML-210, TC-H106, SR-4370, TH34, 투시디노스타트, SIS17, 파르테놀리드, wt161, CAY10603, ACY738, 라드데아닌 A, 티노스타무스틴, 도마티노스타트, BG45 및 ITSA-1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0035] 한 실시양태에서, 배양 배지는 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO), 액티빈 A, 비타민 C, 리소포스파티드산 (LPA), 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ), Yhhu 3792 및 발프로산 (VPA)을 포함한다. 한 실시양태에서, SCF는 10 ng/ml의 농도로 존재하고, TPO는 100 ng/ml의 농도로 존재하고, 액티빈 A는 20 ng/ml의 농도로 존재하고, 비타민 C는 100 μ M의 농도로 존재하고, LPA는 200 nM의 농도로 존재하고, FICZ는 500 nM의 농도로 존재하고, Yhhu 3792는 750 nM의 농도로 존재하고, VPA는 150 μ M의 농도로 존재한다.
- [0036] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGF β 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지에서 배양된 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함하는, 인간 CD34+ HSC의 단리된 세포 배양물에 관한 것이다. 적합한 작용제는 상기 기재된 것들을 포함한다.
- [0037] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를, TGF β 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하며 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 결합된 배양 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 유지시키는 방법에 관한 것이다. 적합한 작용제 및 그에 대한 농도의 비제한적 예는 상기 기재된 것들을 포함한다. 한 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 액티빈 A이고, 생물활성 인지질은 리소포스파티드산 (LPA)이고, AhR 효능제는 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)이고, HDAC 억제제는 발프로산 (VPA)이다. 한 실시양태에서, LT-HSC는 CRHBP, HOPX 및 LM02를 또한 발현하는 CD34+ 세포이다.
- [0038] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 TGF β 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하며 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 결합된, 인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 유지시키기 위한 배양 배지를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 TGF β 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하며 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)이 결합된 배양 배지에서 배양된 인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 포함하는, 인간 CD34+ LT-HSC의 단리된 세포 배양물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 GATA2의 최대 발현에 대해 최적화된 8-인자 실험의 HD-DoE 모델로부터의 결과를 보여준다. 모델의 상부 섹션은 GATA2에 대해 최적화될 때 미리 선택된 53개의 유전자의 발현 수준의 예측을 보여준다. 모델의 하부 섹션은 이 모델에서 시험된 이펙터 및 GATA2의 최대 발현에 대한 그의 기여도를 보여준다. 값 칼럼은 모델을 모방하기 위해 각각의 이펙터의 요구되는 농도를 지칭한다.

도 2는 시험된 8개의 이펙터의 농도에 대한 GATA2, CRHBP 및 MEG3 유전자의 발현 수준의 동적 프로파일을 보여준다. GATA2의 발현에 대한 LPA, FCIZ, Vit. C 및 액티빈 A의 긍정적 영향 및 그의 인자 기여도는 각각의 이펙터에 대한 플롯의 기울기에 의해 제시된다.

도 3은 CRHBP의 최대 발현에 대해 최적화된 8-인자 실험의 HD-DoE 모델로부터의 결과를 보여준다. 모델의 상부

섹션은 CRHBP에 대해 최적화될 때 미리 선택된 53개의 유전자의 발현 수준의 예측을 보여준다. 모델의 하부 섹션은 이 모델에서 시험된 이펙터 및 CRHBP의 최대 발현에 대한 그의 기여도를 보여준다. 값 칼럼은 모델을 모방하기 위해 각각의 이펙터의 요구되는 농도를 지칭한다.

도 4는 시험된 5개의 이펙터의 농도에 대한 CRHBP, GATA2 및 MEG3 유전자의 발현 수준의 동적 프로파일을 보여준다. 모든 3개의 유전자의 발현에 대한 VPA의 긍정적 영향 및 그의 인자 기여도는 각각의 이펙터에 대한 플롯의 기울기에 의해 제시된다.

도 5는 CRHBP의 최대 발현에 대해 최적화된 8-인자 실험의 HD-DoE 모델로부터의 결과를 보여준다. 모델의 상부 섹션은 CRHBP에 대해 최적화될 때 미리 선택된 53개의 유전자의 발현 수준의 예측을 보여준다. 모델의 하부 섹션은 이 모델에서 시험된 이펙터 및 CRHBP의 최대 발현에 대한 그의 기여도를 보여준다. 값 칼럼은 모델을 모방하기 위해 각각의 이펙터의 요구되는 농도를 지칭한다.

도 6a-b는 HSC 확장을 위한 4개의 검증된 이펙터 (FICZ, LPA, Vit. C, 액티빈 A)의 농도에 대한 GATA2, HOXA5 및 MEG3 유전자의 발현 수준의 동적 프로파일을 보여준다. 도 6a는 5개의 최종 이펙터 모두의 존재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 보여준다. 도 6b는 다른 것들이 존재하는 동안 최종 이펙터 중 하나의 부재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 보여준다.

도 7a-b는 HSC 확장을 위한 1개의 검증된 이펙터 (VPA)의 농도에 대한 GATA2, HOXA5 및 MEG3 유전자의 발현 수준의 동적 프로파일을 보여준다. 도 7a는 VPA의 존재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 보여준다. 도 7b는 VPA의 부재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 보여준다.

도 8a-b는 HSC 확장을 위한 1개의 검증된 이펙터 (Yhhu 3792)의 농도에 대한 GATA2, HOXA5 및 MEG3 유전자의 발현 수준의 동적 프로파일을 보여준다. 도 8a는 Yhhu 3792의 존재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 보여준다. 도 8b는 Yhhu 3792의 부재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 보여준다.

도 9a-b는 표 1에 제시된 개발된 HSC 레시피 (도 9a) 또는 대조군 레시피 (SCF 및 TPO) (도 9b) 상에서 7일 동안 성장시킨 제대혈 CD34 세포의 유동 세포측정법 분석의 결과를 보여준다. 세포를 라이브/데드 마커인, Lin, CD34, CD38, CD45RA, CD90 및 FVS700에 대한 항체로 염색하여, 분석으로부터 죽은 세포를 배제하였다.

도 10은 CRHBP의 최대 발현에 대해 최적화된 12-인자 실험의 HD-DoE 모델로부터의 결과를 보여준다. 모델의 상부 섹션은 CRHBP에 대해 최적화될 때 미리 선택된 53개의 유전자의 발현 수준의 예측을 보여준다. 모델의 하부 섹션은 이 모델에서 시험된 이펙터 및 CRHBP의 최대 발현에 대한 그의 기여도를 보여준다. 값 칼럼은 모델을 모방하기 위해 각각의 이펙터의 요구되는 농도를 지칭한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 발명의 상세한 설명

[0042] 소분자 기반 접근법을 사용하여 화학적으로 규정된 배양 조건 하에 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)의 유지 및 확장을 가능하게 하는 방법론 및 조성물이 본원에 기재된다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, 고차원 실험 설계 (HD-DoE) 접근법을 사용하여 유전자 발현과 같은 출력 반응에 대해 다중 공정 입력물 (예를 들어, 소분자 효능제 또는 길항제)을 동시에 시험하였다. 이들 실험은 매우 짧은 시간 내에 HSC를 유지 및 확장시키기에 충분한, 특정한 신호전달 경로의 효능제 및/또는 길항제를 포함하는, 화학적으로 규정된 배양 배지의 확인을 가능하게 하였다. 최적화된 배양 배지를 실시예 2에 기재된 바와 같이 개별 효능제 또는 길항제 작용제의 제거 효과를 조사하는 인자 중요도 분석에 의해 추가로 검증하였다. 유동 세포측정법 분석은 실시예 3에 기재된 바와 같이 분화 프로토콜에 의해 생성된 세포의 표현형을 추가로 확인하였다. 실시예 4에 기재된 바와 같이 장기 HSC (LT-HSC)를 유지시키기 위한 하위프로토콜을 또한 결정하였다.

[0043] 본 발명의 다양한 양상이 하기 서브섹션에서 추가로 상세하게 기재된다.

[0044] I. 세포

[0045] 본 개시내용의 배양물에 사용된 출발 세포는 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포이다. 본원에 사용된 용어 "조혈 줄기 세포" (HSC로 약칭됨)는 다양한 상이한 조혈 세포 유형으로 분화하는 능력을 갖는 줄기 세포를 지칭한다. CD34는 HSC에 대한 표면 마커로서 관련 기술분야에 확립되어 있는 막형단 인당단백질이다. 인간 HSC는 인간 제대혈 및 성체 골수를 비롯한 이용가능한 공급원으로부터 용이하게 획득가능하다. HSC는 장기 HSC (LT-HSC) 및 단기 HSC (ST-HSC) 둘 다를 포함한다.

- [0046] 장기 HSC (LT-HSC)는, 비대칭 세포 분열의 과정을 통해 자가-재생되어 줄기 세포 풀을 지속시키거나 또는 단기 HSC (ST-HSC)로 분화하거나, 또는 광범위한 증식 및 분화를 겪어 혈액 계통의 최종 분화된 세포를 생성하는 계통-제한된 전구세포로 분화할 수 있는, 골수 또는 제대혈에서 발견되는 HSC이다. LT-HSC는 Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+ 세포의 분획에서 풍부화된 것으로 여겨진다. LT-HSC는 휴지 상태이고, 배양물 중에서 느리게 분열하며, 제1 세포 분열에 80시간까지 걸린다 (Cheung and Rando (2013) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14:329-340). 대조적으로, 정의에 의하면 단기 HSC (ST-HSC)는 일반적으로 노화 전 4-12주 동안 림프조혈을 일으키는 것으로 설명되는 제한된 자가-재생 능력을 갖는다.
- [0047] 한 실시양태에서, HSC는 CD34를 발현한다 (CD34+). 한 실시양태에서, HSC는 마커 계통의 발현이 결여된다 (Lin-). 한 실시양태에서, HSC는 CD38의 발현이 결여된다 (CD38-). 한 실시양태에서, HSC는 CD45RA의 발현이 결여된다 (CD45RA-). 한 실시양태에서, HSC는 CD90을 발현한다 (CD90+). 한 실시양태에서, HSC는 Lin-CD34+CD38-CD45RA-CD90+ 세포이다.
- [0048] 실시양태에서, HSC는 HSC 표현형과 연관된 하나 이상의 유전자 (본원에서 HSC-연관 유전자 마커로도 지칭됨)를 발현하며, 그의 비제한적 예는 CHRBP, Mecom, Meg3, HOPX, LMO2, CD34, TAL1 및 GATA2를 포함한다.
- [0049] 한 실시양태에서, LT-HSC는 CD34+이다. 한 실시양태에서, LT-HSC는 CD34+이고, 또한 CRHBP, HOPX 및 LMO2를 발현한다.
- [0050] II. 배양 배지 성분
- [0051] CD34+ HSC를 유지 및/또는 확장시키는 본 개시내용의 방법은 인간 CD34+ HSC를 세포 수용체 및/또는 신호전달 경로의 특이적 효능제 및/또는 길항제를 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함한다.
- [0052] 실시예 1에 기재된 바와 같이, c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGFβ 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지는 6일만큼 짧은 기간에서 CD34+ HSC를 유지 및 확장시키는데 충분하였다.
- [0053] 추가로, 실시예 4에 기재된 바와 같이, TGFβ 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지가 LT-HSC를 유지시키기 위해 개발되었다. 이 배양 배지는 c-kit 리간드 및 TPOR 효능제의 결여로 인해 LT-HSC에 단지 낮은 증식 능력을 부여한다.
- [0054] 본원에 사용된 세포 수용체 또는 신호전달 경로의 "효능제"는 세포 수용체 또는 신호전달 경로를 자극 (상향조절)하는 작용제를 지칭하는 것으로 의도된다. 세포 신호전달 경로의 자극은, 예를 들어 신호전달 경로에 관여하는 세포 표면 수용체를 활성화시키는 효능제 (예를 들어, 효능제는 수용체 리간드일 수 있음)의 사용에 의해 세포외에서 개시될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 세포 신호전달의 자극은, 예를 들어 신호전달 경로의 구성요소(들)과 세포내 상호작용하는 소분자 효능제의 사용에 의해 세포내에서 개시될 수 있다.
- [0055] 본원에 사용된 세포 신호전달 경로의 "길항제"는 세포 신호전달 경로를 억제 (하향조절)하는 작용제를 지칭하는 것으로 의도된다. 세포 신호전달 경로의 억제는, 예를 들어 신호전달 경로에 관여하는 세포 표면 수용체를 차단하는 길항제의 사용에 의해 세포외에서 개시될 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 세포 신호전달의 억제는, 예를 들어 신호전달 경로의 구성요소(들)과 세포내 상호작용하는 소분자 길항제의 사용에 의해 세포내에서 개시될 수 있다.
- [0056] c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGFβ 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 상업적으로 입수가 가능하다. 이들은 목적하는 결과, 예를 들어 관심 마커를 발현하는 HSC의 유지 및/또는 확장을 달성하는데 효과적인 농도로 배양 배지에 사용된다. 적합한 효능제 및 길항제 작용제, 및 유효 농도 범위의 비제한적 예는 하기에 추가로 기재된다.
- [0057] c-kit 리간드는 c-kit 수용체 (CD117)에 결합하는 작용제, 분자, 화합물 또는 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, c-kit 리간드는 줄기 세포 인자 (SCF)이다. 한 실시양태에서, SCF는 5-25 ng/ml의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, SCF는 10 ng/ml의 농도로 배지에 존재한다.
- [0058] TPOR 효능제는 트롬보포이에틴 수용체 (TPOR)에 효능작용하는 작용제, 분자, 화합물 또는 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, TPOR 효능제는 트롬보포이에틴 (TPO)이다. 다른 실시양태에서, TPOR 효능제는 엘트롬보팍, TA-316, TPO 효능제 1, 아바트롬보팍 또는 루수트롬보팍이다. 한 실시양태에서, TPOR 효능제는 TPO이고, 이는 50-150 ng/ml의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, TPOR 효능제는 TPO이고, 이는 100 ng/ml의 농도

로 배지에 존재한다.

- [0059] TGF β 경로의 효능제는 TGF β 신호전달 경로에 자극 (활성화)할 수 있는 작용제, 분자, 화합물 또는 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 액티빈 A이다. 또 다른 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 알란토라톤이다. 한 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 액티빈 A이고, 이는 10-30 ng/ml의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, TGF β 경로 효능제는 액티빈 A이고, 이는 20 ng/ml의 농도로 배지에 존재한다.
- [0060] 항산화제는 자유 라디칼에 의해 야기되는 세포에 대한 손상을 방지하거나 늦추는 작용제, 분자, 화합물 또는 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, 항산화제는 비타민 C이다. 한 실시양태에서, 비타민 C는 비타민 C의 안정한 형태인 L-아스코르브산 포스페이트 세스퀴마그네슘 염 수화물 (Vit. C)이다. 다른 실시양태에서, 항산화제는 아스코르브산, 글루타티온, 에베셀렌, N-아세틸-L-시스테인 또는 α -토코페롤이다. 한 실시양태에서, 항산화제는 비타민 C이고, 이는 50-150 μ M의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, 항산화제는 비타민 C이고, 이는 100 μ M의 농도로 배지에 존재한다.
- [0061] 한 실시양태에서, 생물활성 인지질은 리소포스파티드산 (LPA)이다. 다른 실시양태에서, 생물활성 인지질은 스펅고신-1-포스페이트 (S1P), 세라미드-1-포스페이트 (C1P) 또는 리소포스파티딜콜린 (LPC)이다. 한 실시양태에서, 생물활성 인지질은 LPA이고, 이는 100-300 μ M의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, 생물활성 인지질은 LPA이고, 이는 200 μ M의 농도로 배지에 존재한다.
- [0062] AhR의 효능제는 AhR 신호전달 경로를 자극 (활성화)할 수 있는 작용제, 분자, 화합물 또는 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, AhR 효능제는 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)이다. 다른 실시양태에서, AhR 효능제는 노르이소볼딘, 피피트린- α 히드로브로마이드, MeBIO, ITE 또는 10-C1-BBQ이다. 한 실시양태에서, AhR 효능제는 FICZ이고, 이는 250-750 nM의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, AhR 효능제는 FICZ이고, 이는 500 nM의 농도로 배지에 존재한다.
- [0063] Notch의 효능제는 Notch 신호전달 경로를 자극 (활성화)할 수 있는 작용제, 분자, 화합물 또는 물질을 포함한다. 한 실시양태에서, Notch 효능제는 Yhhu 3792이다. 다른 실시양태에서, Notch 효능제는 재기드 1-2 또는 DLL1-4이다. 한 실시양태에서, Notch 효능제는 Yhhu 3792이고, 이는 500-1000 nM의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, Notch 효능제는 Yhhu 3792이고, 이는 750 nM의 농도로 배지에 존재한다.
- [0064] 한 실시양태에서, HDAC 억제제는 발프로산 (VPA)이다. 다른 실시양태에서, HDAC 억제제는 보리노스타트, 엔티노스타트, 파노비노스타트, 트리코스타틴 A, 모세티노스타트, 4-페닐부티르산, ACY-775, GSK3117391, 벨리노스타트, 로미렙신, MC1568, 투바스타틴 A, 기비노스타트, 다시노스타트, CUDC-101, 퀴시노스타트, 프라시노스타트, PCI-34051, 드록시노스타트, 아벡시노스타트, RGFP966, AR-42, 리콜리노스타트, 타세디날린, 피메피노스타트, 부티르산나트륨, 쿠르쿠민, M344, 투바신, RG2833, 레스미노스타트, 디발프로엑스 소듐, 스크립타이드, 소듐 페닐부티레이트, 투바스타틴 A, 시나퀸산, TMP269, CAY10683, TMP195, UF010, 타스퀴니모드, SKLb-23bb, 이소구아노신, NKL22, 술폴라판, BRD73594, 시타리노스타트, 수베로히드록삼산, BRD3308, 스플리토미신, HPOB, LMK235, 비페닐-4-술포닐 클로라이드, 넥스투라스타트 A, BML-210, TC-H106, SR-4370, TH34, 투시디노스타트, SIS17, 파르테놀리드, wt161, CAY10603, ACY738, 라드데아닌 A, 티노스타무스틴, 도마티노스타트, BG45 및 ITSA-1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, HDAC 억제제는 VPA이고, 이는 100-200 μ M의 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, HDAC 억제제는 VPA이고, 이는 150 μ M의 농도로 배지에 존재한다.
- [0065] 한 실시양태에서, 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 확장 또는 유지시키는 방법은 인간 CD34+ HSC를 줄기 세포 인자 (SCF), 트롬보포이에틴 (TPO), 액티빈 A, 비타민 C, 리소포스파티드산 (LPA), 6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ), Yhhu 3792 및 발프로산 (VPA)을 포함하는 배양 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 이들 작용제는 상기 제시된 바와 같은 농도 범위로 배지에 존재한다. 한 실시양태에서, SCF는 10 ng/ml의 농도로 존재하고, TPO는 100 ng/ml의 농도로 존재하고, 액티빈 A는 20 ng/ml의 농도로 존재하고, 비타민 C는 100 μ M의 농도로 존재하고, LPA는 200 nM의 농도로 존재하고, FICZ는 500 nM의 농도로 존재하고, Yhhu 3792는 750 nM의 농도로 존재하고, VPA는 150 μ M의 농도로 존재한다.
- [0066] III. 배양 조건
- [0067] 상기 서브섹션 II에 기재된 화학적으로 규정되고 최적화된 배양 배지와 조합하여, 본 개시내용의 CD34+ HSC를 유지 또는 확장시키는 방법은 세포 배양을 위해 관련 기술분야에 확립된 표준 배양 조건을 이용한다. 예를 들

어, 세포는 37℃에서 및 5% O₂ 및 5% CO₂ 조건 하에 배양될 수 있다. 기초 배지는 보충제가 첨가될 수 있는 출발 배지로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 상업적으로 입수가 가능한 스템스팬™ 스템 II(StemSpan™ SFEM II) 배지가 기초 배지로서 사용된다. 세포는 표준 배양 용기 또는 플레이트, 예컨대 배양 접시, 배양 플라스크 또는 96-웰 플레이트에서 배양될 수 있다.

[0068] 출발 CD34+ HSC는 관련 기술분야에 확립된 방법론에 의해 획득될 수 있다. 인간 CD34+ HSC의 공급원은 제대혈 및 골수를 포함한다. CD34+ HSC는, 예를 들어 표준 자기 풍부화에 의해 획득될 수 있다.

[0069] CD34+ HSC를 확장시키기 위해, 세포는 CD34+ HSC 집단을 확장시키기에 (즉, 배양물 중 CD34+ HSC의 수를 증가시키기에) 충분한 시간 동안 최적화된 배양 배지에서 배양된다. 실시예에 기재된 바와 같이, 6일만큼 짧은 기간 동안 최적화된 배양 배지에서의 CD34+ HSC의 배양이 CD34+ HSC 확장 및 목적하는 세포 마커의 발현에 충분하다는 것이 발견되었다.

[0070] 다양한 실시양태에서, CD34+ HSC는 적어도 하나의, 바람직하게는 복수의 HSC-연관 유전자 마커의 발현을 증가시키기에 충분한 시간 동안 최적화된 배양 배지에서 배양된다. 적합한 HSC-연관 유전자 마커의 비제한적 예는 CHRBP, Mecom, Meg3, HOPX, LMO2, CD34, TAL1 및 GATA2를 포함한다. 실시양태에서, 세포는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개 또는 적어도 8개의 HSC-연관 유전자 마커의 발현 수준을 증가시키기에 충분한 시간 동안 배양된다. 한 실시양태에서, 세포는 적어도 하나의 HSC-연관 유전자 마커 (예를 들어, CHRBP)의 발현 수준을 출발 세포 집단과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%만큼 증가시키기에 충분한 시간 동안 배양된다. 배양된 HSC에서의 유전자 마커의 발현 수준은 관련 기술분야에서 이용가능한 기술 (예를 들어, RNAseq 분석)에 의해 측정될 수 있다.

[0071] 한 실시양태에서, 세포는 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 적어도 10일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주 또는 더 오랫동안 배양된다.

[0072] 배양 배지는 전형적으로 신선한 배지로 규칙적으로 교체된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 배지는 72시간마다 교체된다.

[0073] IV. 용도

[0074] HSC를 유지 및 확장시키기 위한 본 개시내용의 방법 및 조성물은 다양한 용도를 위한 이들 세포 집단의 효율적이고 강력한 이용가능성을 허용한다. 예를 들어, 상기 방법 및 조성물은 조혈-관련 질환 및 장애의 이해를 돕기 위한 생물학을 포함한, HSC 발생 및 분화의 연구에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 방법을 사용하여 생성된 HSC (예를 들어, LT-HSC)는 세포 상에서 발현된 표면 마커에 결합하는 작용제를 사용하여 관련 기술분야에 확립된 방법에 따라 추가로 정제될 수 있다.

[0075] 추가로, 본 개시내용의 방법에 따라 유지 및/또는 확장된 HSC는 질환 또는 장애를 갖는 대상체에게 세포를 전달하는 것 (예를 들어, HSC 이식)을 통해 다양한 조혈 질환 및 장애를 치료하는데 사용하는 것이 고려된다. 조혈 질환 및 장애의 예는 암, 예컨대 백혈병 및 림프종, 혈액 장애 및 자가면역 장애를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0076] V. 조성물

[0077] 다른 양상에서, 본 개시내용은 배양 배지 및 단리된 세포 배양물을 포함하는, HSC를 유지 및 확장시키는 방법과 관련된 조성물을 제공한다.

[0078] 한 양상에서, 본 개시내용은 c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGFβ 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는, 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 유지 또는 확장시키기 위한 배양 배지를 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 TGFβ 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는, 인간 CD34+ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 유지시키기 위한 배양 배지를 제공한다. 적합한 작용제 및 그에 대한 농도의 비제한적 예는 상기 서브섹션 II에 기재된 것들을 포함한다.

[0079] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 c-kit 리간드, TPOR 효능제, TGFβ 경로 효능제, 항산화제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제, Notch 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지에서 배양된 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포 (HSC)를 포함하는, 인간 CD34+ HSC의 단리된 세포 배양물을 제공한다. 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 TGFβ 경로 효능제, 생물활성 인지질, 아릴 탄화수소 수용체

(AhR) 효능제 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하는 배양 배지에서 배양된 인간 CD34⁺ 장기 조혈 줄기 세포 (LT-HSC)를 포함하는, 인간 CD34⁺ LT-HSC의 단리된 세포 배양물을 제공한다. 적합한 작용제 및 그에 대한 농도의 비제한적 예는 상기 서브섹션 II에 기재된 것들을 포함한다.

[0080] 본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 예시되며, 이는 추가로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 출원 전반에 걸쳐 인용된 도면 및 모든 참고문헌, 특허 및 공개 특허 출원의 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다.

[0081] **실시예**

[0082] **실시예 1: 조혈 줄기 세포의 확장 및 유지를 위한 배양 프로토콜 개발**

[0083] 본 실시예에서는, HSC의 확장 및 유지를 위한 배양 배지 레시피를 개발하였다. 예를 들어 제대혈로부터 CD34⁺ 세포를 배양하고, 관련 기술분야에서 Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺로서 확인된 장기 HSC (LT-HSC)로 지칭되는 세포 집단을 확장시키는데 사용될 수 있는, 조혈 줄기 세포의 확장 및 유지를 위한 레시피가 개발되었다.

[0084] 본 실시예는 이전에 문헌 [Bukys et al. (2020) Iscience 23:101346]에 기재된 바와 같은 고차원 실험 설계 (HD-DoE)의 방법을 이용한다. 방법은 컴퓨터화된 설계 기하구조를 사용하여 다중 공정 입력물을 동시에 시험하고, 깊은 이펙터/반응 공간의 수학적 모델링을 제공한다. 방법은 예컨대 세포 분화 동안 복잡한 과정을 제어하는 조합 신호전달 입력물을 찾는 것을 허용한다. 이는 다중의 타당하고 중요한 공정 파라미터의 시험을 허용하며, 이는 이러한 파라미터가 출력 반응, 예컨대 유전자 발현에 영향을 미치기 때문이다. 유전자 발현은, 예를 들어 인간 세포의 표현형의 특징적 특색을 제공하기 때문에, 방법은 어느 신호전달 경로가 세포 운명을 제어하는지를 확인하고 이해하는데 적용될 수 있다. 본 실시예에서, HD-DOE 방법은 HSC의 확장 및 유지를 위한 조건을 찾기 위한 의도로 적용되었다.

[0085] 구체적으로, HSC 레시피를 개발하기 위해, 3-일 처리 후 53개의 미리 선택된 유전자의 2개 세트의 발현에 대한 다중 신호전달 경로의 효능제 및 길항제 (본원에서 이펙터로 불림)의 영향을 시험하였다. 측정된 하위세트 내의 특정 유전자는 HSC에서 고도로 풍부화되고, CRHBP, MLLT3, MEG3, MECOM, HOXA5 및 GATA2를 포함한다. 선택된 이펙터는 소분자 또는 단백질을 포함하며, 이들 중 일부는 HSC의 시험관내 확장 동안 사용된다.

[0086] 이펙터를 시험하기 위해, 소정 범위의 농도에서 48개 이상의 상이한 이펙터 조합에 대한 세포의 반응을 평가할 수 있는 적어도 8개의 인자를 사용한 실험을 설계하였다. 모델을 분석하기 위해, 본 발명자들은 CRHBP, GATA2, MLLT3 및 MEG3을 비롯한 원시 HSC에서 발현되거나 풍부화된 유전자의 발현에 초점을 맞추었다. 유전자 발현 수준에 대한 각각의 이펙터의 영향은 모델링 동안 각각의 이펙터에 대해 계산된 인자 기여도로 불리는 파라미터에 의해 정의된다. 모든 실험은 제대혈로부터 단리된 세포의 CD34⁺ 집단을 사용하여 수행하였다.

[0087] HSC 확장을 위한 레시피를 확인하기 위해, 세포를 줄기 세포 인자 (SCF) 및 트롬보포이에틴 (TPO)을 함유하는 배지에서 3일 동안 다양한 이펙터로 처리하고, 세포의 유전자 발현을 모델링하였다. 한 모델은 특히 GATA2, CRHBP, HOXA5 및 MECOM 및 MEG3의 상향조절에 대한 유망한 결과를 보여주었다. 추가로, 이 모델에서, 본 발명자들은 NOTCH1 상향조절 및 MPO 하향조절을 관찰하였다. MPO는 호중구 및 다른 혈액 전구 세포에서 고도로 발현되는 골수성 마커이다. 이전 연구는 NOTCH1 활성화가 생체내에서 HSC 자기-재생을 증가시킨다는 것을 제시한 바 있다 (Stier et al. (2002) Blood 99:2369-78).

[0088] 도 1에 요약된 결과에 나타난 바와 같이, 한 모델은 특히 GATA2의 최대 발현에 대해 최적화될 때 유망한 결과를 보여주었다. 이 모델은 8개의 인자: LPA, FICZ, 피린테그린, 라미닌521, G0693, Vit.C, G-SCF, 및 액티빈 A를 시험하였다. 이펙터 중 3개 (LPA, FICZ 및 Vit.C)는 각각 20, 21, 및 12 인자 기여도로 관심 유전자의 발현에 대해 긍정적 영향을 나타내었다. CD44는 HSC 생성에 중요한 과정인 내피에서 조혈 전이를 겪는 세포에서 고도로 발현되는 수용체이다 (Oatley et al. (2020) Nat Commun. 11:586). 흥미롭게도, 본 발명자들은 이들이 GATA2에 대해 최적화하였을 때 최대 수준의 CD44를 관찰하였다.

[0089] MEG3은 마우스 및 인간 HSC에서 고도로 발현되고, 초기 전구세포에서 강하게 하향-조절된다 (Sommerkamp et al. (2019) Sci Rep 9:2110). MEG3을 그의 최대 발현 수준으로 만들기 위해, 본 발명자들은 다음으로 MEG3의 최대 발현을 위한 모델을 최적화하였다. 각각 23 및 16 인자 기여도를 갖는 액티빈 A, 및 Vit. C를 포함한 Meg3의 발현에 대해 유의한 긍정적 효과를 갖는 2개의 이펙터를 확인하였다 (도 2). GATA2에 대한 보통의 인자 기여도를 가짐에도 불구하고, 액티빈 A는 MEG3, HOXA5 및 MECOM을 비롯한 많은 다른 HSC 풍부화된 유전자에 결정적인

인자 중 하나였으며, 따라서 액티빈 A는 레시피에 포함된다.

[0090] HSC 유지 및 확장을 위한 레시피를 추가로 개선하기 위해, 추가의 HD-DoE 실험을 수행하였다. 이들 데이터는 확장 프로토콜의 제조에 사용된 추가의 유전자 조절 모델을 생성하였다. 효과적인 운명 제어를 달성하기 위해 신호전달 입력물의 복잡성을 증가시킬 수 있는 추가의 인자를 평가하는 것이 목표였다. 이전과 같이, 본 발명자들은 앞서 언급된 HSC 풍부화된 유전자의 발현에 초점을 맞추었다. 트로포엘라스틴, 지질 혼합물, 프로피오네이트, 비오틴, 겔트렉스, N-아세틸 시스테인, 프로스타글란딘 E2, 및 VPA를 시험하는 8-인자 실험을 수행하였다. 이전 실험과 유사하게, CD34⁺ 세포를 3일 동안 48개 조건의 인자 조합으로 처리하고, 유전자 발현 분석 및 모델링을 수행하였다.

[0091] 도 3에 요약된 결과에 나타난 바와 같이, *CRHBP*에 대해 최적화될 때, 1개의 인자, VPA (히스톤 데아세틸라제 억제제)는 32의 인자 기여도로 유의한 긍정적 영향을 가졌다. 프로피오네이트, 비오틴 및 겔트렉스는 또한 긍정적 영향을 가졌지만, 그의 인자 기여도는 10 미만이었고 (각각 8, 5 및 6), N-아세틸 시스테인은 <1의 긍정적 인자 기여도를 가졌다.

[0092] *CRHBP*에 대한 최적화는 *HOPX* (HSC 줄기세포성에 요구되는 유전자, (Lin et al. (2020) *Oncogene* 39:5112-5123), *NOTCH1*, *SPINK2* (신생 HSC에 풍부한 유전자) 및 *RUNX1* (배아발생 동안 HSC 생성에 요구되는 유전자 (North et al. (2004) *Stem Cells* 22:158-68))의 상향조절에 대한 유망한 결과를 나타내었다. 프로피오네이트, 비오틴 및 겔트렉스는 이와 관련하여 낮은 인자 기여도를 나타내었고, 다른 HSC 풍부화된 유전자를 하향조절할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 VPA를 유지하는 동안 이들 인자를 배제하였다. 동일한 실험이 *GATA2*의 최대 발현에 대해 최적화되었을 때, 33, 25 및 17 인자 기여도를 갖는 VPA, 프로스타글란딘 E2 및 트로포엘라스틴을 포함하는 *GATA2*의 발현에 대한 유의한 긍정적 영향을 갖는 3개의 이펙터가 확인되었다 (도 4). 트로포엘라스틴 및 프로스타글란딘 E2 처리가 다른 HSC 풍부화된 유전자를 하향조절하기 때문에, 본 발명자들은 이들 인자를 배제하지만 VPA를 유지하도록 결정하였다.

[0093] HSC 유지 및 확장을 위한 레시피를 추가로 개선하기 위해, 추가의 HD-DoE 실험을 수행하였다. LPA, Yhhu 3792, 피브로넥틴, TPCA-1, GW9662, Z-vad-fmk, VEGF 및 액티빈 A로 이루어진 또 다른 8-인자 실험을 수행하였다. 이전 실험과 유사하게, CD34⁺ 세포를 3일 동안 48개 조건의 인자의 조합으로 처리한 다음, 유전자 발현 분석 실험을 수행하였다.

[0094] 도 5에 요약된 결과에 나타난 바와 같이, *CRHBP*에 대해 최적화될 때, 1개의 인자 액티빈 A (TGF 베타 패밀리의 효능제)는 26의 인자 기여도로 유의한 긍정적 영향을 가졌으며, 이는 본 발명자들의 이전 결과를 확인시켜 준다. LPA, Yhhu 3792 및 피브로넥틴은 또한 각각 8, 19 및 18의 인자 기여도로 긍정적 영향을 가졌다. *CRHBP* 최적화에 요구되는 조건은 또한 다른 HSC 관련 유전자, 예컨대 *HOXA5*, *NOTCH1*, *MEG3*을 유도하였다. 또한 *LMO2* 및 *LMO4*가 이 조건에서 상향조절되었다. 두 유전자는 HSC에서 풍부화되지만, 다른 혈액 전구세포에 의해서도 발현된다. 레시피의 복잡성을 감소시키기 위해, 본 발명자들은 단지 Yhhu 3792; Notch 신호전달 효능제를 포함하도록 결정하였다.

[0095] 분석된 모든 모델을 고려하여, HSC 풍부화된 유전자, 예컨대 *GATA2*, *CRHBP*, *HOXA5*, *MLLT3*, *MEG3* 및 *NOTCH1*의 발현을 최대화하는 예측된 조건에 기초하여, 본 발명자들은 하기 표 1에 제시된 바와 같이 8개의 이펙터로 구성된, HSC 유지 및 확장을 위한 복합 레시피를 개발하였다:

[0096] 표 1: HSC 유지 및 확장 배양 배지 레시피

이펙터	역할	농도
줄기 세포 인자 (SCF)	C-kit 리간드	10 ng/mL
트롬보포이에틴 (TPO)	TPOR 리간드	100 ng/mL
액티빈 A	TGFb 경로 효능제	20 ng/mL
L-아스코르브산 포스페이트 세스퀴마그네슘 염 수화물 (Vit.C)	항산화제	100 uM
리소포스파티드산 (LPA)	생물활성 인지질	200 nM
6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)	아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제	500 nM
Yhhu 3792	Notch 효능제	750 nM
발프로산 (VPA)	히스톤 데아세틸라제 억제제	150 uM

[0097]

[0098]

실시예 2: HSC 유지 및 확장 배지의 인자 중요도 분석

[0099]

본 실시예에서, 실시예 1에 기재된 바와 같이 확인된 각각의 검증된 인자의 제거의 영향을 평가하기 위해, 동적 프로파일 분석을 사용하고, 다른 것들은 존재하도록 유지하면서 각각의 최종 인자의 부재 하의 관심 유전자의 발현 수준을 비교하였다. 관심 유전자의 발현 수준이 목적하는 결과에 도달가능한지 여부를 밝혀내었기 때문에, 이러한 인자 중요도 분석은 각각의 입력 이펙터의 중요의 정도를 밝혀내었다. 인자 FICZ, LPA, Vit. C 및 액티빈 A에 대한 중요도 분석의 결과가 도 6a-b에 제시된다. VPA에 대한 중요도 분석의 결과는 도 7a-b에 제시된다. Yhhu 3792에 대한 중요도 분석의 결과는 도 8a-b에 제시된다.

[0100]

HSC 확장 레시피에 대해, 6개의 최종 인자 중 각각을 제거하면서 다른 5개의 인자가 존재하도록 하였고, GATA2, HOXA5, CRHBP의 발현 수준을 모든 5개의 인자의 존재와 비교하여 평가하였다. SCF 및 TPO는 세포 성장 및 생존에 영향을 미치는 시토카인이기 때문에, 본 발명자들의 레시피는 이들 시토카인을 또한 포함하였다. FICZ가 제거되었을 때, GATA2 발현에 대한 값은 642에서 512로 감소한 반면, HOXA5 및 MEG3 발현은 변하지 않았다. LPA의 부재는 644에서 525로 줄어든 GATA2의 감소된 발현을 유발하였다. Vit.C의 제거는 MEG3의 수준을 82에서 53으로 감소시켰다. 액티빈 A는 그의 제거가 MEG3 수준을 81에서 40으로 감소시키기 때문에 MEG3에 대한 중요한 인자이다. 액티빈 A는 또한 GATA2 및 HOXA5에 대해 긍정적 영향을 갖지만, 더 낮은 정도로 영향을 미친다.

[0101]

VPA는 HSC를 확장시키는데 사용된 히스톤 데아세틸라제 억제제이다 (Papa et al. (2018) Blood Adv. 2:2766-2779). 일반적으로, 이러한 부류의 약물은 염색질 개방을 촉진하며, 이는 유전자의 상향-조절 또는 억제를 유발할 수 있다. VPA의 제거가 CRHBP의 수준을 285에서 138로 감소시켰기 때문에 VPA를 HSC 레시피에 포함시켰다. VPA가 제거되었을 때 MEG3 수준이 절반으로 (106에서 52로) 감소되었다. 마지막으로, VPA 제거 시 또한 GATA2 수준이 감소되었지만, 보다 낮은 정도로 감소되었다.

[0102]

조혈에 대한 NOTCH 경로의 기능은 복잡하고, 일부 논쟁이 있다 (예를 들어, 문헌 [Huang et al. (2021) Front. Cell Biol. DOI:10.3389/fcell.2020.606448] 참조). 그러나, 이전 연구는 텔타-1에 의한 NOTCH 자극이 인간 CD34⁺CD38⁻ 세포의 재증식 능력을 증진시킨다는 것을 제시한 바 있다. Yhhu 3792는 2018년에 처음 기재된 새로운 NOTCH 효능제이다 (Lu et al. (2018) Stem Cells 36:1273-1285). 본원의 실험은 Yhhu 3792가 HSC 표현형의 프로모터임을 밝혀내었다. Yhhu 3792의 제거는 CRHBP의 수준을 202에서 169로 감소시켰다. 인자 중요도 분석은 임의의 입력물의 제거가 성능에 중요하지 않음을 입증한다. 이는 신호전달 입력물의 높은 복잡성 및 개수로 인해 예상된다.

[0103]

실시예 3: 제대혈 HSC의 유지 및 확장을 위한 배양 배지의 유동 세포측정법 검증

[0104]

실시예 1에 기재된 HSC 배양 레시피를 추가로 검증하기 위해, CD34⁺ 제대혈 유래 세포를 표 1에 제시된 성분을 포함하는 배지에서 7일 동안 성장시키고, 유동 세포측정법 분석을 사용하여 LT-HSC 상태의 마커를 평가하였다. 시험된 마커는 계통 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), CD34, CD38, CD45RA 및 CD90을 포함하였다. 추가적으로, 세포를 대조군으로서 SCF 및 TPO를 함유하는 배지에서 성장시켰고, 이는 HSC 확장을 촉진하기 위해 다른 곳에서도 통상적으로 사용된다. HSC를 확장시키기 위해 통상적으로 사용되는 다른 시토카인, 예컨대 IL3, G-CSF 및 IL6은 사용하지 않았는데, 이는 본 발명자들의 연구가 CD34⁺ 세포를 이들 시토카인의 존재 하에 배양하였을 때 골수 편향의 유도를 나타냈기 때문이다. 각각의 조건에 대해 100,000개의 세포를 플레이팅하였다.

[0105] 세포를 7일 동안 성장시킨 후, 유동 세포측정법 분석을 수행하였다. LT-HSC의 면역표현형, 즉 $Lin^-CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+$ 를 평가하였다. 결과는 도 9a-b에 제시된다. 유동 세포측정법 분석은 HSC 확장 및 유지를 촉진하는 HSC 레시피의 효율을 확인하였다. SCF + TPO (대조군)를 공급하는 조건에서, 세포의 18.3%는 $CD45RA^-$ 및 $CD90^+$ 였다 (모 게이트 ($CD34^+CD38^-$)의 18.3%). 대조적으로, 실시예 1에 기재된 바와 같은 복합 배지 레시피는 세포의 40.9%가 $CD45RA^-$ 및 $CD90^+$ 가 되게 하였다 (모 게이트 ($CD34^+CD38^-$)의 40.9%).

[0106] **실시예 4: LT-HSC 휴지 상태 제어를 위한 조건의 개발**

[0107] 개선된 개수의 LT-HSC를 생성한 실시예 1에 기재된 상기 언급된 조건은 연속 확장과 관련하여 수행하였다. 그러나, LT-HSC의 특징 세트는 항상 휴지와 연관이 있으므로; 임계 수준에서, 생성된 확장된 $CD34^+$ 세포는 골수 내에 상주하는 LT-HSC 집단과 동일하지 않다. 이러한 이유로, 추가의 HD-DOE 실험을 SCF 및 TPO가 없는 기초 배지에서 수행하였다. 이들 실험에서, 설계는 표 1의 인자를 비롯하여, SCF, TPO, FLT-3L, IGFII, Yoda-1 및 시토스포린 B를 더한 12개의 인자로 구성되었다.

[0108] 결과를 도 10에 요약한 한 모델은 특히 *CRHBP*, *HOPX*, *CD34*, *LMO2*의 상향조절에 대한 유망한 결과를 보여주었다. *CRHBP*의 수준은 1118에 도달하여 이 실험에서 극히 높았다. 흥미롭게도, 표 1에 존재하는 많은 인자가 시토카인의 부재 하에 최대 *CRHBP* 발현을 유도하는데 요구되었으며, 이는 세포 줄기세포성에 대한 이들 인자의 중요성을 확인시켜 준다.

[0109] 최대 *CRHBP* 수준을 유도하는 최상의 조건은 하기 표 2에 제시되어 있다.

[0110] **표 2**

이펙터	역할	농도
액틴빈 A	TGFb 경로 효능제	20 ng/mL
리소포스파티드산 (LPA)	생물활성 인지질	200 nM
6-포르밀인돌로[3,2-b]카르바졸 (FICZ)	아릴 탄화수소 수용체 (AhR) 효능제	500 nM
발프로산 (VPA)	히스톤 데아세틸라제 억제제	150 uM

[0111]

[0112] 표 2의 배지를 HSC 배양 및 확장을 위한 전통적인 방법 (SCF+TPO)과 비교하기 위해, 본 발명자들은 수학적 모델링을 통해 전통적인 배지 (SCF+TPO) 또는 표 2의 배지에서 배양될 때 줄기 세포 표현형과 관련된 유전자 수준, 뿐만 아니라 계통 특이적 유전자 수준의 예측을 생성하였다. 이들 예측된 유전자 수준을 하기 표 3에 요약한다:

[0113] 표 3

유전자	정규화된 유전자 발현				
	마커	SCF+TPO	표 2 레시피	SCF+TPO+표 2 레시피	상대적 발현 (표 2/SCF+TPO)
CHRBP	LT-HSC	186	1113	381	5.98
Mecom	LT-HSC	30	34	59	1.1
Meg3	LT-HSC	1	187	117	187
HOPX	LT-HSC	139	325	91	2.33
LMO2	LT-HSC	494	1784	1084	3.61
CD34	LT-HSC + HSC	222	676	471	3.04
TAL1	HSC 수입	110	293	245	2.66
GATA2	HSC+골수 (초기)	619	639	412	1.03
KLF1	적혈구	48	6	37	0.125
MPO	골수 계통	3137	704	1164	0.22
MKI67	증식	249	53	155	0.21
BCL2L11	아포토시스	11	21	33	1.9

[0114]

[0115] 예상된 바와 같이, 표 2 레시피는 SCF 및 TPO를 포함하지 않기 때문에, 증식 (MKI67 수준)은 세포를 이 레시피에 따라 성장시켰을 때 더 낮았다. 그러나, 줄기 세포 관련 유전자, 예컨대 CRHBP, MEG3, HOPX 및 CD34는 SCF+TPO 조건과 비교하여 표 2로부터의 배지에서 고도로 발현되었다. 다른 한편으로는, 계통 수입 세포의 2개의 마커인 KLF1 및 MPO는 SCF+TPO 조건에서 고도로 발현되었다.

[0116] **등가물**

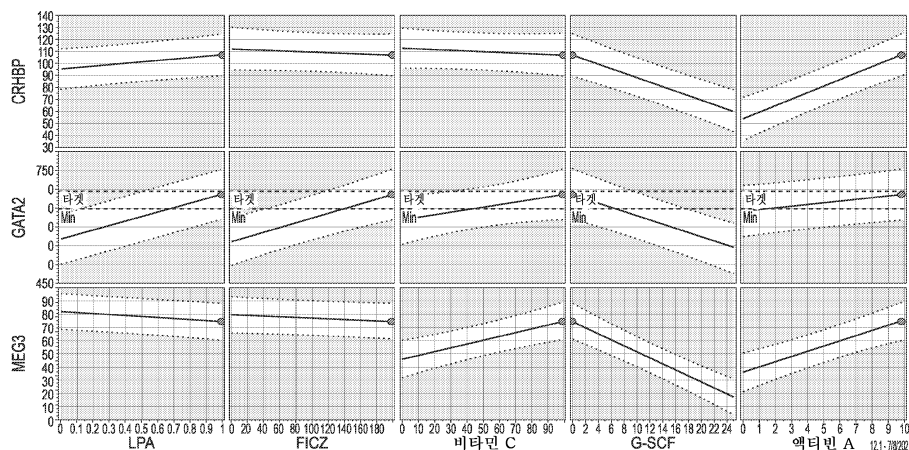
[0117] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태의 많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

도면

도면1

목적	실정점 (#20)	대안적 실정점				
	반응	기준	값	그래프	log(D)	실패 확률
4	CD40LG	예측됨	3.17524			1.3%
5	CD44	예측됨	795.517			
6	CDK6	예측됨	1288.68			
7	CEBPE	예측됨	7.4009			
8	CEBPA	예측됨	268.483			
9	CRHBP	예측됨	106.992			
10	CSF1R	예측됨	21.2693			
11	CSF3R	예측됨	218.082			
12	EPOR	예측됨	33.4814			
13	FES	예측됨	94.0043			
14	FOXP3	예측됨	-0.112418			
15	GATA1	예측됨	499.865			
16	GATA2	최대화	686.491			
17	GATA3	예측됨	15.5737			
18	GFI1	예측됨	84.6102			
19	GYP A	예측됨	11.3508			
20	HOPX	예측됨	27.5538			
21	HOXA5	예측됨	57.5694			
22	IKZF1	예측됨	372.891			
23	IL4R	예측됨	65.9865			
24	IL7R	예측됨	1.21903			
25	IRF8	예측됨	130.416			
26	ITGA2B	예측됨	333.725			
27	KIT	예측됨	278.767			
28	KLF1	예측됨	132.643			
29	LMO2	예측됨	286.551			
30	LMO4	예측됨	411.206			
31	LTB	예측됨	6.99593			
32	MECOM	예측됨	52.8816			
33	MEG3	예측됨	74.6265			
34	MKI67	예측됨	411.63			
35	MLLT3	예측됨	109.901			
36	MME	예측됨	2.05712			
37	MPL	예측됨	47.4526			
38	MPO	예측됨	1493.29			
39	MYB	예측됨	1146.39			
40	NFE2	예측됨	468.508			
41	NOTCH1	예측됨	573.682			
42	PECAM1	예측됨	338.907			
43	PRF1	예측됨	0.888664			
44	PRG2	예측됨	756.221			
45	PTEN	예측됨	26.86			
인자	역할	값	그래프	인자 기여도		
1	LPA	자유		20.7697		
2	FICZ	자유		21.9759		
3	비타민 B12	자유		3.21948		
4	비타민 B12	자유		7.80477		
5	GO693	자유		1.38249		
6	비타민 C	자유		12.1416		
7	G-CSF	자유		24.8876		
8	액티빈 A	자유		7.81846		

도면2

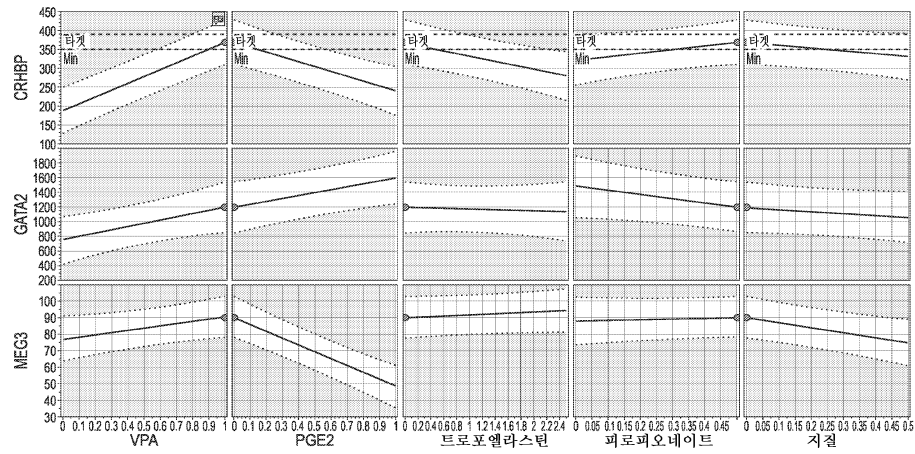


도면3

목적	설정점 (#20)	대안적 설정점			그래프	log(D)	실패 확률
8	CEBPE	예측됨	9.43529		※		
9	CRHBP	최대화	369.434		※	-1.34147	1.2%
10	CSF1R	예측됨	3.54082		※		
11	CSF3R	예측됨	128.626		※		
12	EPOR	예측됨	40.8597		※		
13	FES	예측됨	217.631		※		
14	FOXP3	예측됨	0.0779108	※			
15	GATA1	예측됨	330.994	※			
16	GATA2	예측됨	1198.19		※		
17	GATA3	예측됨	33.5578		※		
18	GF11	예측됨	105.631		※		
19	GYPA	예측됨	3.21258	※			
20	HOPX	예측됨	90.4613		※		
21	HOXA5	예측됨	34.5153		※		
22	IKZF1	예측됨	339.389		※		
23	IL4R	예측됨	139.195		※		
24	IL7R	예측됨	0.910902		※		
25	IRF8	예측됨	29.9996		※		
26	ITGA2B	예측됨	493.594		※		
27	KIT	예측됨	363.511		※		
28	KLF1	예측됨	160.579		※		
29	LMO2	예측됨	756.284		※		
30	LMO4	예측됨	623.298		※		
31	LTB	예측됨	16.0901		※		
32	MECOM	예측됨	18.9506		※		
33	MEG3	예측됨	126.963		※		
34	MKI67	예측됨	351.849		※		
35	MLLT3	예측됨	186.962		※		
36	MME	예측됨	1.73784		※		
37	MPL	예측됨	78.823		※		
38	MPO	예측됨	975.2		※		
39	MYB	예측됨	1443.75		※		
40	NFE2	예측됨	381.374		※		
41	NOTCH1	예측됨	472.744		※		
42	PECAM1	예측됨	331.87		※		
43	PRF1	예측됨	-0.354242	※			
44	PRG2	예측됨	223.831		※		
45	RUNX1	예측됨	143.318		※		
46	RUNX2	예측됨	100.536		※		
47	SPINK2	예측됨	450.83		※		
48	TAL1	예측됨	440.63		※		

인자	역할	값	그래프	인자 기여도
1	트로포엘라스틴	자유	0	16.0304
2	지질	자유	0	6.94801
3	프로피오네이트	자유	0.5	8.4132
4	비오틴	자유	1	5.20161
5	셀트렉스	자유	0.5	6.69586
6	N-아세틸 시스테인	자유	100	0.895603
7	PGE2	자유	0	23.253
8	VPA	자유	1	32.5623

도면4

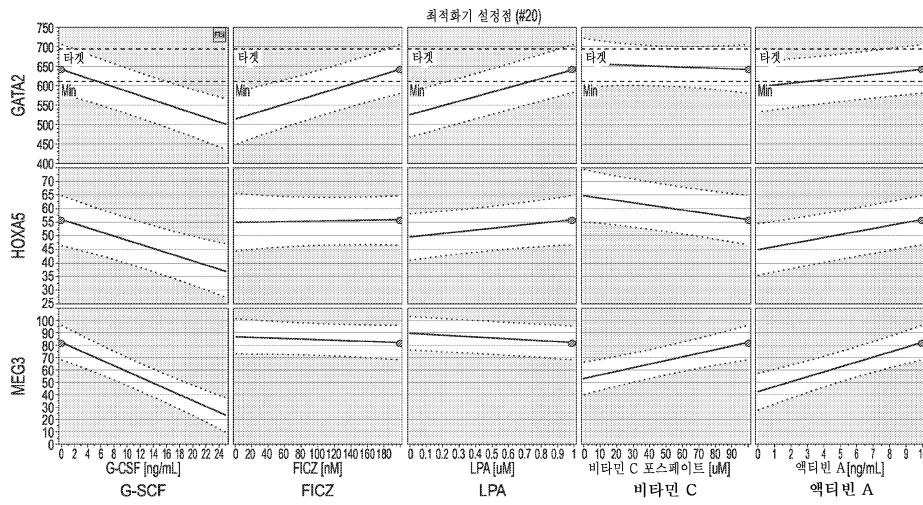


도면5

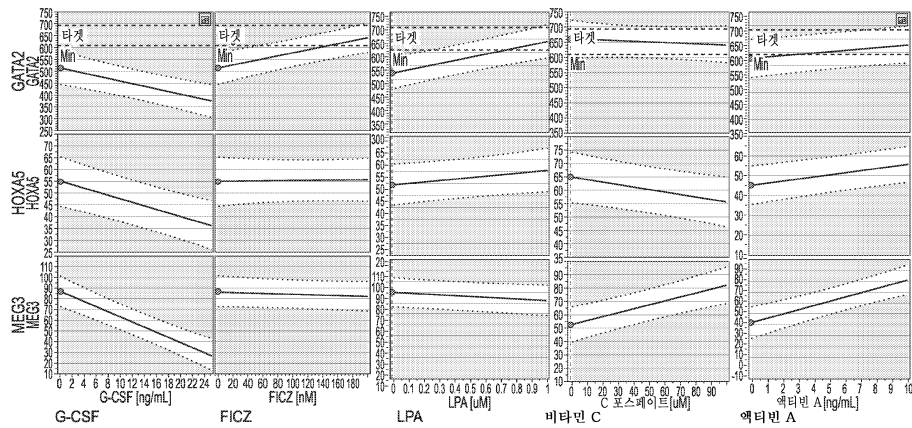
목적	설정 점 (#20)	대안적 설정 점			
반응	기준	값	그래프	log(D)	실패 확률
7 CEBPE	예측됨	1.66055	■		
8 CEBPA	예측됨	258.362	■		
9 CRHBP	과대화	241.929	■	-10	0.49%
10 CSF1R	예측됨	4.85017	■		
11 CSF3R	예측됨	166.462	■		
12 EPOR	예측됨	16.8957	■		
13 FES	예측됨	161.793	■		
14 FOXP3	예측됨	0.717205	■		
15 GATA1	예측됨	368.622	■		
16 GATA2	예측됨	648.778	■		
17 GATA3	예측됨	16.2273	■		
18 GF11	예측됨	95.9478	■		
19 GYPA	예측됨	-0.102	■		
20 HOPX	예측됨	78.2339	■		
21 HOXA5	예측됨	57.8308	■		
22 IKZF1	예측됨	328.989	■		
23 IL4R	예측됨	90.3596	■		
24 IL7R	예측됨	-0.239538	■		
25 IRF8	예측됨	66.0518	■		
26 ITGA2B	예측됨	379.244	■		
27 KIT	예측됨	253.946	■		
28 KLF1	예측됨	89.4802	■		
29 LMO2	예측됨	461.465	■		
30 LMO4	예측됨	307.23	■		
31 LTB	예측됨	10.1158	■		
32 MECOM	예측됨	36.7808	■		
33 MEG3	예측됨	49.2239	■		
34 MKI67	예측됨	360.908	■		
35 MLLT3	예측됨	193.689	■		
36 MME	예측됨	2.55048	■		
37 MPL	예측됨	78.6083	■		
38 MPQ	예측됨	1113.21	■		
39 MYB	예측됨	1330.52	■		
40 NFE2	예측됨	346.149	■		
41 NOTCH1	예측됨	452.271	■		
42 PECAM1	예측됨	391.977	■		
43 PRF1	예측됨	1.46694	■		
44 PRG2	예측됨	232.416	■		
45 RUNX1	예측됨	43.0403	■		
46 RUNX2	예측됨	119.285	■		
47 SPINK2	예측됨	183.902	■		
48 TAL1	예측됨	167.117	■		

인자	역할	값	그래프	인자 기여도
1 LPA	자유	0.999946	■	8.16246
2 Yhhu	자유	0.995907	■	19.5168
3 파브로네티딘	자유	19.7327	■	18.3084
4 tpca-1	자유	11.7004	■	4.87282
5 GW9662	자유	3.16938	■	12.5138
6 Zvad	자유	92.7752	■	4.26584
7 VEGF	자유	0.00184975	■	5.96284
8 액티빈 A	자유	9.99809	■	26.377

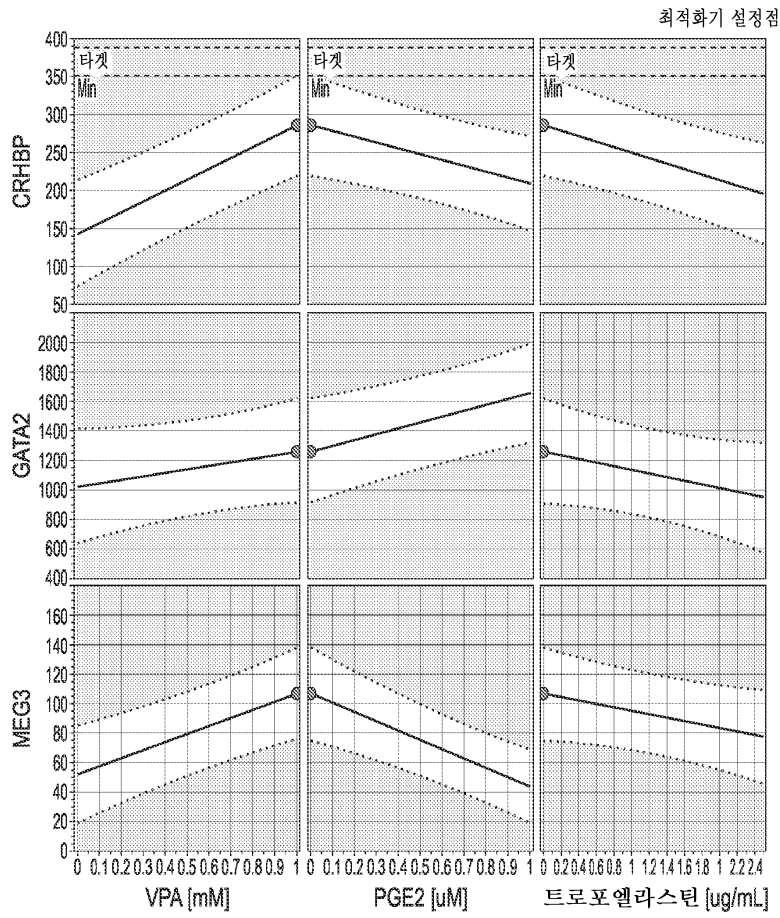
도면6a



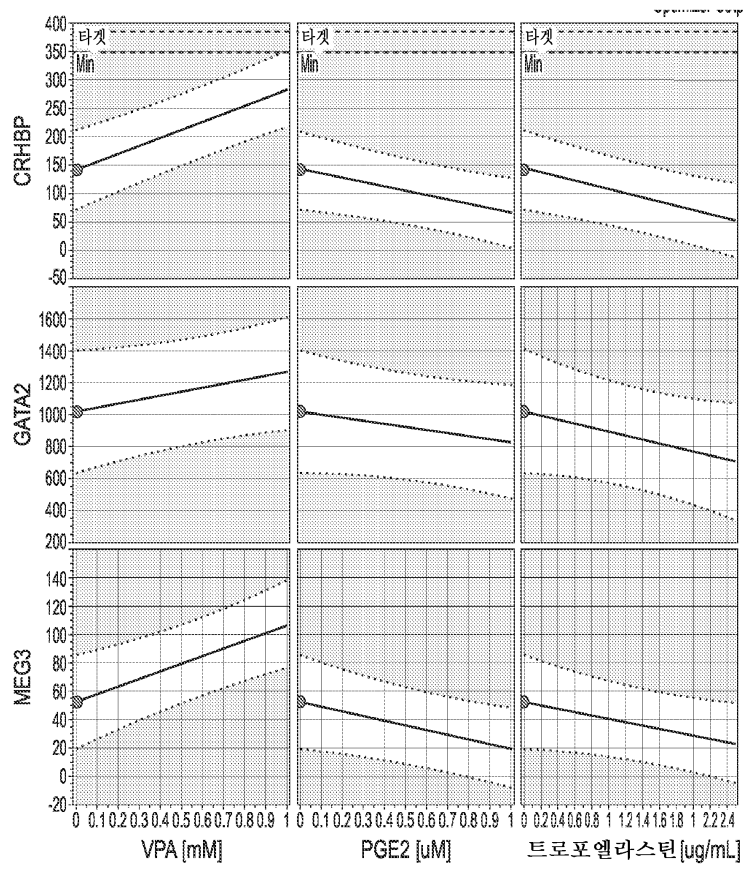
도면6b



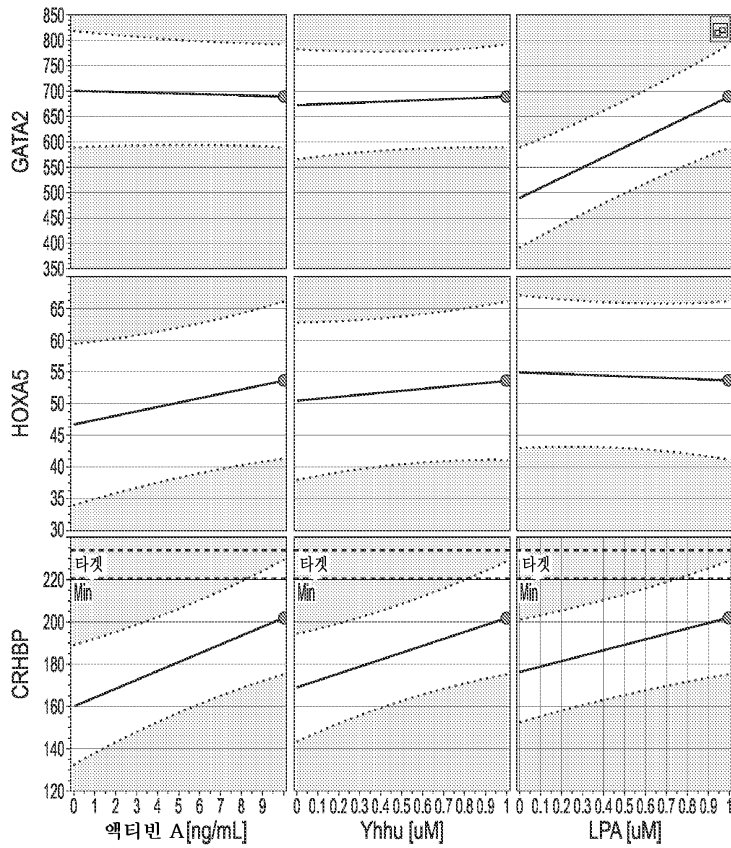
도면7a



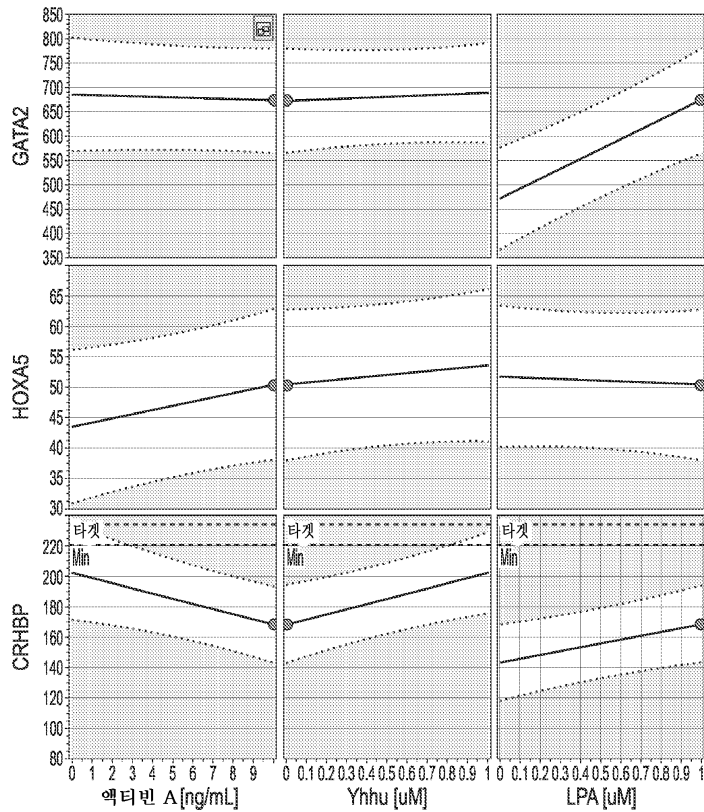
도면7b



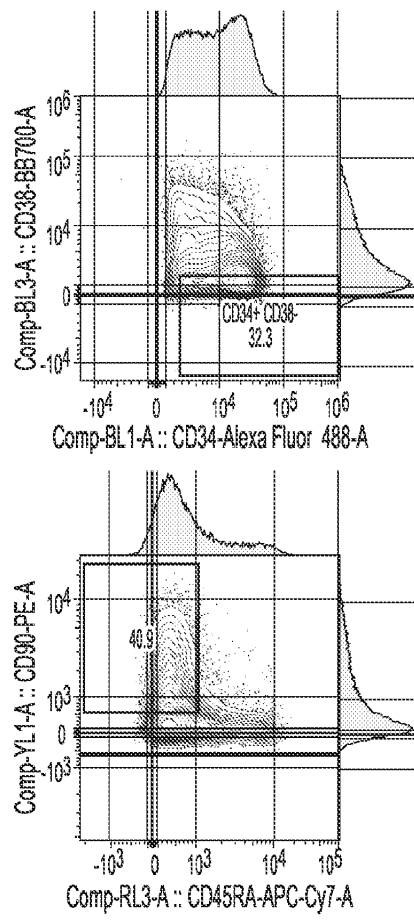
도면8a



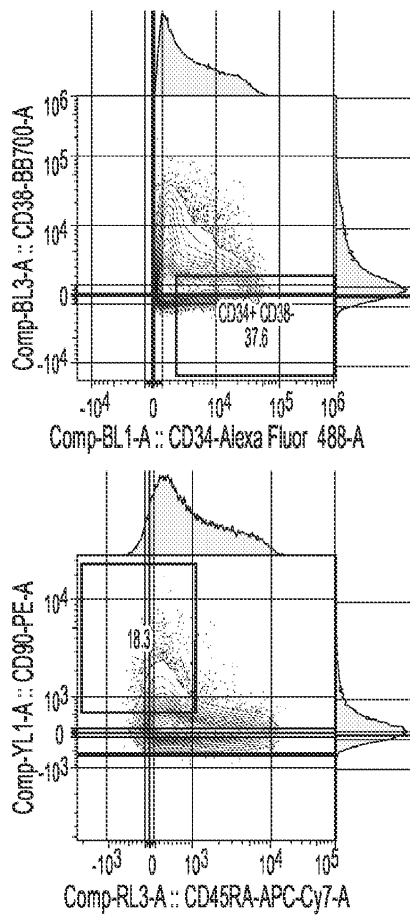
도면8b



도면9a



도면9b



도면10

목적	설정점 (#19)	대안적 설정점			
반응	기준	값	그래프	log(D)	실패 확률
1	BCL2L1	여측됨	6.29755	■	
2	CD34	여측됨	627.665	■	
3	CD4	여측됨	-6.8708	■	
4	CD44	여측됨	534.732	■	
5	CDK6	여측됨	2094.57	■	
6	CEBPA	여측됨	542.018	■	
7	CEBPE	여측됨	-2.88728	■	
8	CRHBP	비대화	1118.12	■	-1.41839 1.8%
9	CSF1R	여측됨	0.0245836	■	
10	CSF3R	여측됨	113.812	■	
11	EPOR	여측됨	26.2454	■	
12	FES	여측됨	98.486	■	
13	GATA1	여측됨	315.689	■	
14	GATA2	여측됨	822.827	■	
15	GATA3	여측됨	7.52837	■	
16	GFI1	여측됨	220.945	■	
17	HOPX	여측됨	291.972	■	
18	HOXA5	여측됨	23.4928	■	
19	IKZF1	여측됨	423.06	■	
20	IL4R	여측됨	70.825	■	
21	IRF8	여측됨	52.2296	■	
22	ITGA2B	여측됨	132.264	■	
23	KIT	여측됨	346.2	■	
24	KLF1	여측됨	7.71605	■	
25	LMO2	여측됨	1741.87	■	
26	LMO4	여측됨	424.876	■	
27	LTB	여측됨	-23.5605	■	
28	MECOM	여측됨	63.713	■	
29	MEG3	여측됨	159.579	■	
30	MKI67	여측됨	140.066	■	
31	MLLT3	여측됨	145.616	■	
32	MPO	여측됨	856.581	■	
33	MYB	여측됨	1323.52	■	
34	NFE2	여측됨	1147.61	■	
35	NOTCH1	여측됨	249.457	■	
36	PECAM1	여측됨	262.366	■	
37	PERF1	여측됨	-0.0248101	■	
38	PRG2	여측됨	210.126	■	
39	RUNX1	여측됨	62.4971	■	
40	RUNX2	여측됨	102.449	■	
41	SPINK2	여측됨	658.789	■	
42	TAL1	여측됨	248.492	■	
43	TPOR	여측됨	143.327	■	
인자	역할	값	그래프	인자 기여도	
1	FLT3L	자유	0.00412618	■	13.6592
2	TPO	자유	0.0640422	■	7.18385
3	SCF	자유	0.000474488	■	21.5924
4	액티빈 A	자유	19.9607	■	5.31204
5	1-아스코르빈산 2-포스페이트	자유	0.103816	■	2.38194
6	LPA	자유	199.833	■	10.4309
7	FGF2	자유	499.978	■	9.38865
8	Yhu	자유	0.125918	■	6.94138
9	VPA	자유	149.934	■	6.91384
10	IGFII	자유	0.000945631	■	9.93003
11	YODA1	자유	499.373	■	0.226152
12	사이토스폰 B	자유	0.205715	■	6.03966