



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005792
(43) 공개일자 2024년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0781 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0635 (2023.05)
C12N 2500/99 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7040926
(22) 출원일자(국제) 2022년04월29일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월27일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2022/050662
(87) 국제공개번호 WO 2022/226659
국제공개일자 2022년11월03일
(30) 우선권주장
63/182,054 2021년04월30일 미국(US)

(71) 출원인
스템셀 테크놀로지스 캐나다 인크.
캐나다, 브이6에이 1비6, 브리티쉬 콜롬비아, 벤쿠버, 1618 스테이션 스트리트
(72) 발명자
타바타베이-자바레 누신
캐나다 브이6에이 1비6 브리티쉬 콜롬비아 벤쿠버
1618 스테이션 스트리트 스위트 500
브라우어 패트릭
캐나다 브이6에이 1비6 브리티쉬 콜롬비아 벤쿠버
1618 스테이션 스트리트 스위트 500
(74) 대리인
특허법인아주

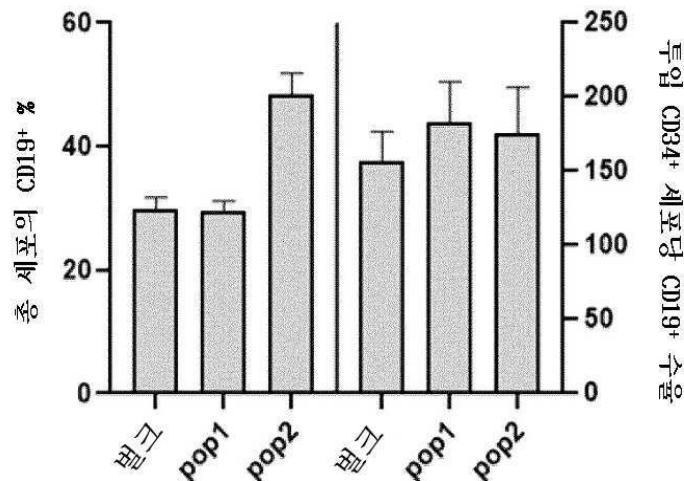
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 B 계통 세포의 분화 및 확장을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

세포를 B 세포 계통으로 유도 분화시키기 위한 배지, 키트 및 방법이 개시된다. 개시된 분화 접근법은 원시 세포 또는 다능성 줄기 세포 유래 세포를 취하여 하나 이상의 단계별 배지 체제를 사용하여 하나 이상의 중간 세포 집단을 통해 B 계통 세포를 산출할 수 있다. 따라서, 유도 분화 작업흐름을 수행하기 위한 배지 및 보충제는 하나 이상의 기본 배지 및 여기에 첨가될 하나 이상의 보충제를 함유하는 키트에 포함될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 2501/125 (2013.01)
C12N 2501/145 (2013.01)
C12N 2501/23 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2303 (2013.01)
C12N 2501/2304 (2013.01)
C12N 2501/2306 (2013.01)
C12N 2501/26 (2013.01)
C12N 2506/11 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법으로서,

CD34⁺ 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC) 집단을 기본 배지, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는 유도 배지와 접촉시키는 단계; 및

상기 HSPC 집단을 상기 유도 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하여 B 세포 전구체 집단을 수득하는 단계를 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HSPC 집단은 제대혈 또는 골수로부터 농축되거나, 다능성 줄기 세포(PSC)로부터 분화되는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 B 세포 전구체 집단이 CD10 또는 CD19 중 하나 또는 둘 다를 발현하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유도 배지가 SCF 또는 TPO를 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 B 세포 전구체 집단을 분화 배지와 접촉시키는 단계 및 상기 B 세포 전구체 집단을 상기 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하는 단계를 추가로 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, CD19⁺ B 계통 세포 집단을 수득하는 단계를 추가로 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 유도 배지에서 상기 HSPC 집단을 배양한 후보다 더 많은 CD19⁺ B 계통 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 CD19⁺ B 계통 세포의 적어도 일부가 IgM⁺ 세포인, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 분화 배지가 기본 배지, SCF, TPO 및 FLT3L 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 CD19⁺ B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지와 접촉시키는 단계 및 상기 CD19⁺ B 계통 세포

집단을 상기 하류 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하는 단계를 추가로 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 분화 배지에서 상기 B 세포 전구체 집단을 배양한 후보다 더 많은 IgM^+ 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 IgM^+ 세포의 적어도 일부가 항체 분비 세포인, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 하류 분화 배지가 기본 배지, 인간 CD40의 리간드, 및 상기 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 방법.

청구항 14

B 계통 세포 집단을 제조하는 방법으로서,

B 세포 전구체 집단을 기본 배지, SCF, TPO 및 FLT3L 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는 분화 배지와 접촉시키는 단계; 및

상기 B 세포 전구체 집단을 상기 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하여 B 계통 세포 집단을 수득하는 단계를 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 B 세포 전구체 집단이 CD10 또는 CD19 중 하나 또는 둘 다를 발현하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 B 세포 전구체 집단이 체대혈 또는 골수로부터 농축되거나 다능성 줄기 세포(PSC)로부터 분화된 CD34^+ 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC) 집단으로부터 유래되는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 B 계통 세포 집단은 CD19를 발현하고 상기 B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단을 산출하기 위해 유도 배지에서 HSPC 집단을 배양한 후보다 더 많은 CD19^+ 세포를 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, CD19^+ B 계통 세포의 적어도 일부가 IgM^+ 세포인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지와 접촉시키는 단계 및 상기 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하는 단계를 추가로 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 분화 배지에서 상기 B 세포 전구체 집단을 배양한 후보다 더 많은 IgM^+ 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, IgM^+ 세포의 적어도 일부가 항체 분비 세포인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 하류 분화 배지가 기본 배지, 인간 CD40의 리간드, 및 상기 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 유도 배지가 무혈청인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 유도 배지가 기본 배지, 적어도 하나의 사이토카인, 및 SCF, TPO 및 FLT3L 중 하나 이상을 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 다른 사이토카인이 IL-3, IL-6 또는 IL-7 중 하나 이상인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 다른 사이토카인이 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 피더 세포 무함유 조건 하에서 수행되는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 피더 세포 무함유 조건이 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자를 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 세포외 기질 단백질 또는 상기 세포 부착 분자가 가용화되거나, 또는 배양 용기 표면에 코팅되는, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 세포외 기질 단백질 또는 상기 세포 부착 분자가 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌, ECM1, SPARC, 오스테오폢틴, 혈관 세포 부착 분자, 고정화된 SCF 단백질, 또는 이들 중 임의의 조합인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 피더 세포 무함유 조건은 가용화되거나 배양 용기의 표면에 코팅된 세포 부착 분자 또는 세포외 기질 단백질의 부재 하인, B 계통 세포 집단을 제조하는 방법.

청구항 32

B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트로서,

기본 배지; 및

줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는 적어도 하나의 보충제

를 포함하는, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 33

제32항에 있어서, 제2 보충제를 추가로 포함하는, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 제2 보충제가 줄기세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 적어도 하나의 보충제의 제제가 제2 보충제와 상이한 것인, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 보충제를 추가로 포함하는, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 37

제36항에 있어서, 제3 보충제가 인간 CD40의 리간드 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 38

제32항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 사이토카인이 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상인, B 계통 세포의 유도 분화를 위한 키트.

청구항 39

B 세포 전구체의 유도용 배지로서, 기본 배지, 줄기세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 세포 전구체의 유도용 배지.

청구항 40

B 계통 세포의 분화용 배지로서, 기본 배지, 줄기세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 세포 전구체의 유도용 배지.

청구항 41

B 계통 세포의 하류 분화용 배지로서, 기본 배지, 인간 CD40의 리간드 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는, B 세포 전구체의 유도용 배지.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 사이토카인이 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상인, B 세포 전구체의 유도용 배지.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

본 출원은 2021년 4월 30일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/182,054호의 우선권에 대한 이익을 주장하며, 이

출원의 전체 내용은 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 개시내용은 세포 배양 적용에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 조혈 세포를 사용한 세포 배양 적용에 관한 것이며, 보다 더 구체적으로는 B 세포의 하나 이상의 집단(들)과 관련된 세포 배양 적용에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 포유동물의 혈액은 림프구, 혈소판, 적혈구 및 이들의 직접 및 간접적인 전구체를 포함하는 다양한 세포 유형으로 구성된다. 백혈구는 백혈구 세포라고 지칭될 수 있으며, 이는 숙주의 면역계에서 기능한다. 백혈구는 B 세포, T 세포, NK 세포, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 호산구, 호염기구 및 호중구로 더 세분화될 수 있다. 이러한 백혈구는 각각 숙주의 면역계에서 특정 기능을 수행한다.

[0006] B 세포는 다른 혈액 세포와 마찬가지로 자가 재생이 가능하고 각 혈액 세포 계통으로 분화할 수 있는 조혈 줄기/전구 세포(HSPC)에서 유래한다. B 세포는 체액성 면역의 핵심 구성 요소이며 (표면에 발현된 B 세포 수용체를 통해) 항원과 결합시에 항체를 분비한다.

[0007] 생체 내에서 포유동물 B 세포는 골수에서 발달하며, HSPC에서부터 시작하여 pro-B 세포, pre-B 세포 및 미성숙 B 세포를 포함하는 다양한 발달 단계를 거쳐 진행된다. 미성숙 B 세포는 2차 림프 기관(예컨대, 비장, 흉선 등)에서 기억 B 세포로 성숙하고, 2차 림프 기관 또는 골수에서는 형질모세포 및 형질 세포(즉, 항체 생산 세포)로 성숙한다. 시험관내 또는 생체외에서 이러한 발달 단계를 반복하는 것은 제한된 성공만을 거두었다. 특히, 조직 유래 세포 또는 다능성 줄기 세포("PSC")를 기원 물질로 사용하는 무혈청 및 피더(feeder) 세포 무함 유 배양 시스템에서 이러한 발달 단계를 반복하는 것은 불가능했다.

[0008] 1차 조직 유래 세포 및 PSC 둘 다는 특히 임상 적용에 적절한 B 계통 세포의 균질하고 맞춤 가능한 대규모 집단을 생성할 수 있는 기회를 제공한다. 또한, 분화된 PSC는 질환 모델링이나 세포 치료법 적용을 용이하게 하는 유전자 조작 방법을 가능하게 한다.

[0009] 환경에서 항원을 감지하고 자극 시 대량의 항체를 분비하여 표적을 중화시키는 것에 대한 연루성을 감안하면, B 세포는 집중적인 연구 및 치료적 관심의 대상이다. 따라서, PSC에서 기원하는 것이든 또는 제대혈 또는 골수에서 단리된 적절한 전구체에서 기원하는 것이든 간에 상관없이 전구체 집단으로부터의 배양물에서 미성숙 및 성숙 B 계통 세포를 획득하기 위한 효율적인 수단을 필요로 한다.

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 배지에 첨가되는 배지 조성물 및/또는 보충제, 및 조혈 줄기/전구 세포(HSPC)를 배양/분화시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 기본 배지에 첨가되는 단계별 배지 및/또는 보충제를 사용하여 HSPC를 다양한 B 세포 계통으로 단계적으로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 개시내용의 일 양상에서, $CD34^{+}$ 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC)의 집단을 기본 배지, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는 유도 배지와 접촉시키는 단계; 및 유도 배지에서 HSPC 집단을 무혈청 조건 하에 배양하여 B 세포 전구체 집단을 획득하는 단계를 포함하는, B 세포 전구체 집단을 제조하는 유도 분화 방법이 제공된다.

[0012] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-3, IL-6 또는 IL-7 중 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상이다.

[0013] 일 실시형태에서, HSPC 집단은 제대혈 또는 골수로부터 농축되거나, 다능성 줄기 세포(PSC)로부터 분화된다.

[0014] 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단은 CD10 또는 CD19 중 하나 또는 둘 다를 발현한다.

[0015] 일 실시형태에서, 유도 배지는 SCF 또는 TPO를 포함한다.

[0016] 일 실시형태에서, 방법은 B 세포 전구체 집단을 분화 배지와 접촉시키는 단계 및 B 세포 전구체 집단을 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 $CD19^{+}$ B 계통 세포 집단을 획득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0017] 일 실시형태에서, 방법은 유도 배지에서 HSPC 집단을 배양한 후보다 더 많은 $CD19^{+}$ B 계통 세포를 획득하는 단

계를 추가로 포함할 수 있다.

- [0018] 일 실시형태에서, $CD19^{+}$ B 계통 세포의 적어도 일부는 IgM^{+} 세포이다.
- [0019] 일 실시형태에서, 분화 배지는 기본 배지, SCF, TPO 및 FLT3L 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0020] 일 실시형태에서, 방법은 $CD19^{+}$ B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지와 접촉시키는 단계 및 $CD19^{+}$ B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 분화 배지에서 B 세포 전구체 집단을 배양한 후보다 더 많은 IgM^{+} 세포를 수득하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 일 실시형태에서, IgM^{+} 세포의 적어도 일부는 항체 분비 세포이다.
- [0022] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 기본 배지, 인간 CD40의 리간드, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0023] 일 실시형태에서, 방법은 피더 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 일 실시형태에서, 피더 세포 무함유 조건은 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자를 포함한다. 일 실시형태에서, 피더 세포 무함유 조건은 배양 용기의 표면에 코팅되거나 가용화된 세포 부착 분자 또는 세포외 기질 단백질의 부재 하에 있다.
- [0024] 일 실시형태에서, 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 배양 용기의 표면에 코팅되거나 가용화된다. 일 실시형태에서, 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌, ECM1, SPARC, 오스테오폰틴, 혈관 세포 부착 분자, 고정된 SCF 단백질, 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0025] 본 개시내용의 또 다른 양상에서, B 세포 전구체 집단을 기본 배지, SCF, TPO 및 FLT3L 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함하는 분화 배지와 접촉시키는 단계, 및 B 세포 전구체 집단을 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하여 B 계통 세포의 집단을 수득하는 단계를 포함하는, B 계통 세포 집단을 제조하기 위한 유도 분화 방법이 제공된다.
- [0026] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-3, IL-6 또는 IL-7 중 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상이다.
- [0027] 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단은 CD10 또는 CD19 중 하나 또는 둘 다를 발현한다.
- [0028] 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단은 제대혈 또는 골수로부터 농축되거나, 또는 다능성 줄기 세포(PSC)로부터 분화되는 $CD34^{+}$ 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC) 집단으로부터 유래된다.
- [0029] 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 CD19를 발현한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단을 산출하기 위해 유도 배지에서 HSPC 집단을 배양한 후보다 더 많은 $CD19^{+}$ 세포를 포함한다.
- [0030] 일 실시형태에서, 유도 배지는 무혈청이다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 기본 배지, 적어도 하나의 사이토카인, 및 SCF, TPO 및 FLT3L 중 하나 이상을 포함한다.
- [0031] 일 실시형태에서, $CD19^{+}$ B 계통 세포의 적어도 일부는 IgM^{+} 세포이다.
- [0032] 일 실시형태에서, 방법은 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지와 접촉시키는 단계 및 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지에서 무혈청 조건 하에 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 방법은 분화 배지에서 B 세포 전구체 집단을 배양한 후보다 더 많은 IgM^{+} 세포를 수득하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 일 실시형태에서, IgM^{+} 세포의 적어도 일부는 항체 분비 세포이다.
- [0034] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 기본 배지, 인간 CD40의 리간드, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0035] 일 실시형태에서, 방법은 피더 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 일 실시형태에서, 피더 세포 무함유 조건은 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자를 포함한다. 일 실시형태에서, 피더 세포 무함유 조건은 배양 용기의 표면에 코팅되거나 가용화된 세포 부착 분자 또는 세포외 기질 단백질의 부재 하에 있다.

- [0036] 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 배양 용기의 표면에 코팅되거나 가용화된다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌, ECM1, SPARC, 오스테오키프틴, 혈관 세포 부착 분자, 고정된 SCF 단백질, 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0037] 본 개시내용의 또 다른 양상에서, B 계통 세포를 유도 분화시키기 위한 키트로서, 기본 배지, 및 적어도 하나의 보충제를 포함하는 키트가 제공된다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 보충제는 줄기세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0038] 일 실시형태에서, 키트는 제2 보충제를 추가로 포함한다.
- [0039] 일 실시형태에서, 제2 보충제는 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0040] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 보충제의 제제는 제2 보충제와 상이하다.
- [0041] 일 실시형태에서, 키트는 제3 보충제를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 제3 보충제는 인간 CD40의 리간드 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0042] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상이다.
- [0043] 본 개시내용의 다른 양상에서, B 세포 전구체, B 계통 세포, 또는 B 계통 세포 하류의 세포, 예컨대 IgM⁺ 세포 및/또는 항체 분비 세포의 유도 분화를 위한 배지가 제공된다.
- [0044] 본 개시내용의 일 양상에서는 B 세포 전구체의 유도를 위한 배지가 제공된다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 기본 배지, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0045] 본 개시내용의 일 양상에서는 B 계통 세포의 분화를 위한 배지가 제공된다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 기본 배지, 줄기 세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나, 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0046] 본 개시내용의 일 양상에서는 B 계통 세포 하류의 세포를 하류 분화시키기 위한 배지가 제공된다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 기본 배지, 인간 CD40의 리간드 및 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다.
- [0047] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 배지에 포함된 적어도 하나의 사이토카인은 IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상이다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 본 명세서에 기술된 다양한 실시형태를 더 잘 이해하고 이러한 다양한 실시형태가 어떻게 실행될 수 있는지를 더 명확하게 보여주기 위해, 예시적으로 적어도 하나의 실시예의 실시형태를 보여주는 첨부 도면을 참조할 것이며, 이제 이에 대해 기술된다. 도면은 본 명세서에 기술된 교시 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

도 1은 단일 인간 제대혈 공여자 샘플로부터 농축된 CD34⁺ HSPC의 대표적인 유세포 분석 플롯을 보여준다. 농축된 CD34⁺ 세포 집단(즉, "벌크")을 염색한 다음, Lin⁻(Lin에는 CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56 및 CD66b가 포함됨)에 대해 분류했다(A). (A)의 세포는 추가로 분류하여 B 세포 운명의 추정상의 전구 세포의 2가지 더 특화된 집단인, (B)의 Lin⁻CD34⁺CD38^{-/lo/mid}CD10⁻ 세포("집단 1" 또는 "pop1"); 및 (B)의 Lin⁻CD34⁺CD38^{mid}CD10⁺ 세포("집단 2" 또는 "pop2")를 수득했다. pop1 세포는 과립구, 단핵구, 림프성 및 적혈구 자손에 대한 다수의 잠재력을 갖고 있는 반면, pop2 세포는 림프성 계통에 제한된다.

도 2는 CD34⁺ HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체 유도의 결과를 요약한 막대 그래프를 보여준다. pop2 세포는 여러 유도 배지 제제("SUPPLCTL" 기준 배지 및 표시된 사이토카인/성장 인자가 결여된 제제)에서 14일 동안 배양하여 선택된 성장 인자 또는 사이토카인의 부재 효과를 테스트했다. 14일 후, CD19⁺를 발현하는 세포(B)의 B 세포 전구체(A)의 빈도 및 수율을 결정했다. 제시된 결과는 1 내지 3회의 독립적인 실험의 평균이다.

도 3은 $CD34^{+}$ HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체 유도 결과를 요약한 막대 그래프를 보여준다. pop1 및 pop2 세포는 TPO를 제외하지만 표시된 사이토카인을 단독으로 또는 조합으로 추가로 포함하는 유도 배지에서 14일 동안 별도로 배양했다. pop2 유래 세포의 경우 막대 그래프는 전체 배수 확장(A), B 세포 전구체의 빈도 및 수율(B), $CD19^{+}$ 를 발현하는 세포의 빈도 및 수율(C), $CD10$ 및 $CD19$ 발현을 분석한 샘플 흐름 플롯(D)을 보여준다. pop1 세포의 경우, 막대 그래프는 전체 배수 확장(E), B 세포 전구체의 빈도 및 수율(F), $CD19^{+}$ B 계통 세포의 빈도 및 수율(G), 및 $CD10$ 및 $CD19$ 발현을 분석한 샘플 흐름 플롯(H)을 보여준다. 제시된 결과는 2 내지 8회의 독립적인 실험의 평균이다.

도 4는 $CD34^{+}$ HSPC 유래 B 세포 전구체 집단으로부터 $CD19^{+}$ B 계통 세포 분화의 결과를 요약한 막대 그래프를 보여준다. pop2 세포는 먼저 도 2의 대조군 제제에서 14일 동안 배양한 다음, 표시된 바와 같이 개별 인자 및 조합 인자를 제외한 다양한 분화 배지 제제("DiM")로 옮겨 추가 14일 동안 배양했다. 배양 28일 후, 산출 세포 중 B 세포 전구체(A), $CD19^{+}$ B 계통 세포(B) 및 IgM^{+} 세포(C)의 빈도 및 수율을 결정했다. 제시된 결과는 1 내지 3회의 독립적인 실험의 평균이다.

도 5는 본 개시내용의 배지에서 $CD34^{+}$ HSPC의 분화 효율을 비교하는 막대 그래프를 보여준다. pop1 세포와 pop2 세포는 2가지 유도 배지 버전에서 14일 동안 별도로 배양했고, 그 다음 도 4의 분화 배지 제제로 옮겨 14일 더 배양했다. pop2 유래 세포의 경우 막대 그래프는 B 세포 전구체의 빈도 및 수율(A), $CD19^{+}$ B 계통 세포의 빈도 및 수율(B), 및 세포의 $CD19^{+}$ 분율의 함수로서 IgM^{+} 세포의 빈도 및 수율(C)을 보여준다. pop 1 세포의 경우, 막대 그래프는 B 세포 전구체의 빈도 및 수율(D), $CD19^{+}$ B 계통 세포의 빈도 및 수율(E), 및 세포의 $CD19^{+}$ 분율의 함수로서 IgM^{+} 세포의 빈도 및 수율(F)을 보여준다. 제시된 결과는 4회의 독립적인 실험의 평균이다.

도 6은 $CD34^{+}$ HSPC 유래 B 세포 전구체의 집단으로부터의 $CD19^{+}$ B 계통 세포 분화 결과를 요약한 막대 그래프를 보여준다. pop1 세포는 먼저 도 2에 제시되었지만, 도 3 내지 5에 사용된 것과는 상이한 유도 배지 제제에서 14일 동안 배양했다. 결과적으로 생성된 B-세포 전구체는 본 개시내용의 분화 배지로 옮겨 14일 더 배양했다. 28일 후, B 세포 전구체(A) 및 $CD19^{+}$ B 계통 세포(B)의 빈도 및 수율을 결정했다. 제시된 결과는 1 내지 5회 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준 오차이다.

도 7은 B 계통 세포의 분화에 대한 연장된 배양 효과를 비교하는 막대 그래프를 보여준다. pop1 세포는 먼저 유도 배지에서 14일 동안 배양했고, 그 다음 분화 배지로 옮겨 14일 또는 28일 더 배양했다. 막대 그래프는 $CD19^{+}$ B 계통 세포(A) 및 세포의 $CD19^{+}$ 분율의 함수로서 IgM^{+} 세포(B)의 빈도 및 수율을 보여준다. 제시된 결과는 4회의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준 오차이다.

도 8은 벌크 $CD34^{+}$ 세포, pop1 $CD34^{+}$ 세포, 또는 pop2 $CD34^{+}$ 세포로부터 시작하여 본 개시내용의 배지 제제 및 방법을 사용하여 분화된 28일차 $CD19^{+}$ 세포의 빈도 및 수율을 요약한 막대 그래프를 보여준다. 막대는 최소 23개의 독립적인 데이터 점의 평균을 나타낸다.

도 9는 $CD19^{+}$ B 계통 세포로부터 IgM^{+} 세포의 분화 효율을 최적화하기 위한 실험 결과를 보여준다. pop1 또는 벌크 세포를 유도 배지에서 14일 동안 별도로 배양하고, 분화 배지로 옮겨 추가 14일 동안 배양했다. 그 후, 28일차 세포를 다양한 하류 분화 배지("DDM") 제제, 즉 음성 대조군 및 인간 $CD40$ 의 리간드 및 상이한 사이토카인/성장 인자를 포함하는 2가지 제제에서 별도로 배양했다. 35일차 pop1 유래 세포는 $CD19^{+}$ B 계통 세포(A) 및 세포의 $CD19^{+}$ 분율의 함수로서 IgM^{+} 세포(B)의 빈도 및 수율에 대해 분석했다. 제시된 결과는 적어도 4회의 독립적인 실험의 평균이다. 35일차 pop1 유래 세포는 또한 ELISPOT 검정에서 IgM (적색/회색) 및 IgG (청색/흑색) 분비에 대해 테스트했다. 산출 항체 분비 세포의 수와 함께 대표적인 이미지가 대조군 세포(Ci) 및 표시된 하류 분화 배지에서 배양된 세포(Cii 및 Ciii)에 대해 제시된다. 35일차 벌크 유래 세포는 $CD19^{+}$ B 계통 세포(D) 및 세포의 $CD19^{+}$ 분율의 함수로서 IgM^{+} 세포(E)의 빈도 및 수율에 대해 분석했다. 제시된 결과는 적어도 3회의 독립적인 실험의 평균이다.

도 10은 인간 PSC-유래 CD34⁺ HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체를 유도한 결과를 보여준다. PSC 유래 CD34⁺ HSPC는 본 개시내용의 유도 배치에서, 표시된 바와 같은 상이한 코팅 물질의 부재 또는 존재 하에 14일 동안 배양했다. 제시된 결과는 적어도 2회의 독립적인 실험(A)의 평균이다. 상이한 코팅 물질의 부재 또는 존재 하에 배양된 28일차 세포 집단을 유세포분석에 의해 CD10 및 CD19 발현에 대해 분석했다(B). PSC 유래 또는 제대혈 유래 벌크 세포는 본 명세서에 기술된 유도/분화 프로토콜에 대한 표시된 시점에서의 EBF1(C) 및 PAX5(D)의 발현에 대해 qRT-PCR로 분석했다. 28일차 세포 집단은 유세포 분석으로 CD10 및 CD19 발현과 CD19 및 CD20 발현(E)에 대해 분석했다. 막대는 적어도 1회 실험의 평균 +/- 표준 오차를 나타낸다.

도 11은 제대혈 유래 CD34⁺ 세포의 유도/분화에 대한 상이한 코팅의 효과를 요약한 막대 그래프를 보여준다. pop1 세포는 표시된 코팅에서 유도 배치 하에 14일 동안 배양했고, B 세포 전구체(A) 및 CD19 발현 세포(B)의 빈도 및 수율을 결정했다. 14일차 세포는 표시된 코팅에서 분화 배치 하에 추가 14일 동안 배양했고, 28일차 CD19⁺ B 계통 세포의 빈도 및 수율(C)과 세포의 CD19⁺ 분율의 함수로서 IgM⁺ 세포의 빈도(D)를 결정했다. 제시된 결과는 적어도 2회의 독립적인 실험의 평균이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 본 개시내용은 배지에 첨가되는 배지 조성물 및/또는 보충제, 및 HSPC를 배양/분화시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 단계별 배지 및/또는 기본 배지에 첨가되는 보충제를 사용하여 HSPC를 다양한 B 세포 계통으로 분화시키는 것에 관한 것이다.
- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조혈 줄기 또는 전구 세포" 또는 "HSPC"는 자가 재생할 수 있고/있거나 조혈 계통의 보다 특화된 세포로 분화할 수 있는 조혈 계통의 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, HSPC는 세포 집단에 포함될 수 있으며, HSPC의 집단은 50% 초과 순수, 60% 초과 순수, 70% 초과 순수, 80% 초과 순수 또는 90% 초과 순수인 것일 수 있다. HSPC는 골수(BM), 제대혈(CB), 배아부터 성인 말초혈액(PB)까지, 흉선, 말초 림프절, 위장관, 편도선, 임신 자궁, 간, 비장, 태반 또는 HSPC의 국제화된 집단을 갖는 임의의 다른 조직으로부터 수득할 수 있다. 일부 실시형태에서, HSPC(또는 HSPC의 집단)는 조직 공급원 또는 HSPC를 포함하는 다른 세포 집단으로부터 면역자기 분리 또는 형광 활성화 세포 분류에 의해 농축된다. HSPC는 또한 유도 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 미경험 줄기 세포, 확장 줄기 세포 등과 같은 다능성 줄기 세포로부터 분화될 수 있다. HSPC의 특징은 막관통 포스포단백질 CD34의 발현이므로, HSPC는 CD34⁺ 세포라고 지칭될 수 있다. 인간 HSPC는 CD45 및 CD34의 발현에 의해 추가로 정의되며, HSPC 하위세트를 구별하는 데 사용될 수 있는 CD38, CD43, CD45RO, CD45RA, CD10, CD49f, CD59, CD90, CD109, CD117, CD133, CD166, HLA-DR, CD201, 및 인테그린-알파 3과 같은 마커의 조합에 의해 추가로 정의될 수 있다. HSPC는 글리코포린 A, CD3, CD4, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20 및 CD56과 같은 마커의 발현이 결여되거나, 단지 낮은 발현을 나타낼 수 있다; 이러한 표지는 더 성숙한 혈액 세포를 특징지을 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는 용어 "다능성 줄기 세포" 또는 "PSC"는 자가 재생 및/또는 임의의 3개의 배아 배엽 중 임의의 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포를 지칭한다. 배아 줄기 세포와 같은 PSC는 배반포로부터 단리되어 유지 또는 분화 세포 배양 조건으로 처리될 수 있다. 유도 다능성 줄기 세포와 같은 PSC는 Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 등과 같은 특정 다능성 유전자의 강제 발현에 의해 임의의 세포 유형으로부터 유래될 수 있다. 다능성 유전자의 발현은 안정적으로 또는 일시적으로든지 간에 암호 영역을 숙주 세포 내로 도입시키거나 또는 이러한 유전자의 내인성 카피를 활성화시키는 인자를 도입시킴으로써 강요될 수 있다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 "B 세포 전구체" 또는 "B 세포 전구체들"은 HSPC보다 더 특화된 것이지만, B 세포와 같은 하나 이상의 림프성 세포 유형으로 추가로 분화할 수 있는 세포 유형을 지칭한다. B 세포 전구체는 조직 유래 또는 PSC 유래이든지 간에 HSPC의 직계 자손일 수 있거나 HSPC로부터 추가로 제거될 수 있다. 또한, B 세포 전구체는 B 세포와 같은 하류 림프성 세포 유형으로 직접 분화될 수 있거나, B 세포가 되기 전에 하나 이상의 추가 분화 단계를 거칠 수 있다. B 세포 전구체의 1가지 예는 표현형 마커 CD10 또는 CD19 중 하나에 대해 양성인 세포이다. 일례에서, CD10⁺ B 세포 전구체는 CD19에 대해 음성이며, 이러한 세포는 B 계통에 관련되지 않을 수 있다. 일례에서, CD19⁺ B 세포 전구체는 CD10에 대해 음성이며, 이러한 세포는 B 계통에 관련될 수 있다. B 세포 전구체에 의해 발현될 수 있는 다른 표현형 마커로는 CD20, CD45RA, CD34, CD38, CD161, CD122, CD117, CD127 및/또는 인테그린 β7을 포함한다. 또한, B 세포 전구체에 의해 발현되지 않을 수 있는 표현형 마커의 예로는 CD10, CD19, CD20, CD45RA, CD34, CD38, CD161, CD122, CD117, CD127 및/또는 인테그린 β7을 포함

한다. 본 명세서에서, 명시적으로 언급되지 않는 한, B 세포 전구체 집단은 하나 이상의 하류 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포의 동종 집단 또는 세포의 이종 집단을 지칭할 수 있다. 일 실시형태에서, B 세포 전구체는 임의의 유형의 B 계통 세포로 분화될 수 있다. 일 실시형태에서, B 세포 전구체는 이중 양성 $CD10^+CD19^+$ B 계통 세포로만 분화시키는 것과 같이 그의 분화 능력이 더욱 제한될 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 용어 "B 계통 세포"는 조직 유래이든 PSC 유래이든지 간에 HSPC로부터 분화될 수 있는 조혈 계통의 림프구 유형을 지칭하며 B 세포 전구체보다 더 특화/관련된다. 보다 구체적으로, B 계통 세포는 다 림프성 전구 세포(MLP) 또는 공통 림프구 전구 세포(CLP)로부터 유래될 수 있다. 초기 B 계통 세포는 $CD10$ 및 $CD19$ 표면 마커 둘 다의 발현을 특징으로 할 수 있으며, 보다 성숙한 미경험 B 세포는 $CD19$ 를 발현하지만 $CD10$ 은 발현하지 않는다. 일부 실시형태에서, B 계통 세포는 $CD19$ 를 발현할 수 있지만($CD10$ 은 아님), 그럼에도 불구하고 하나 이상의 다른 마커에 기초하여 B 세포 전구체와 구별될 수 있다. 일 실시형태에서, 이중 양성 $CD10^+CD19^+$ B 계통 세포는 하나 또는 다른 마커의 발현을 상실할 수 있지만, 그럼에도 불구하고 B 계통에 계속 관련될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용에 따라 B 세포 전구체를 유도한 후 일부 $CD19^+$ 세포가 그 중에 포함될 수 있고, 이러한 $CD19^+$ 세포는 B 계통 세포일 수 있거나, 세포의 보다 원시적인 하위세트일 수 있으며; 그럼에도 불구하고 B 계통 세포의 빈도는 유도 배지에 노출 후 획득되는 세포를 분화 배지에 노출시키면 증가할 것이다. 달리 말하면, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단에 비해 $CD19$ 를 발현하는 세포의 빈도가 더 높은 것을 특징으로 할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 용어 "B 세포" 또는 "B 세포들"은 B 계통 세포로부터 분화되는 세포 유형을 지칭한다. B 세포는 전형적으로 T-, NK- 및 적혈구골수-특이적 마커의 부재; $CD19$, $CD20$, B 세포 수용체(즉, 표면 IgM), IgG, IgD, IgA, IgE 중 하나 이상의 발현; $CD138$; 및 이들의 이펙터 기능을 특징으로 한다. 보다 구체적으로, B 세포의 이펙터 기능은 항체 생산을 포함할 수 있다. B 세포 유형인 형질 세포 및 형질모세포는 항체를 분비하며 $CD138$ (형질 세포), $CD38$ 및 $CD27$ 의 발현을 특징으로 한다. PSC 또는 HSPC로부터 B 세포의 분화는 일반적으로 PSC 유래 증배엽 전구체 및/또는 림프구 전구 세포(예컨대, PSC 유래 림프구 전구 세포)와 같은 하나 이상의 전구 세포 집단에 의해 중재된다.

[0055] 배지 및 방법

[0056] 본 개시내용의 방법은 조직- 또는 PSC-유래 조혈 전구 세포를 하나 이상의 중간 세포 집단을 통해 미성숙 또는 성숙한 B 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. HSPC, 및 기타 유도된 하류 세포 유형을 분화시키기 위한 본 명세서에 개시된 방법은 바람직하게는 시험관내 방법이다. 이하에 개시된 본 개시내용의 배지는 본 개시내용의 방법을 수행하는 데 사용될 수 있고, 따라서 본 개시내용의 독립적인 양상이다.

[0057] 본 개시내용의 유도 분화 방법은 $CD34^+$ HSPC 집단을 유도 배지와 접촉시키는 단계, 및 B 세포 전구체 집단을 유도하기에 충분한 시간 동안 유도 배지에서 HSPC 집단을 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, B 계통 세포로의 제한된 분화도 이 단계 동안 발생할 수 있다.

[0058] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 유도 분화 방법은 B 세포 전구체 집단을 유도한다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 유도 분화 방법은 B 계통 세포 집단을 유도한다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 유도 분화 방법은 IgM^+ 및/또는 항체 분비 세포의 집단을 유도한다.

[0059] 유도 배지는 HSPC를 B 세포 전구체 집단으로 분화시키는 데 사용될 수 있는 임의의 배지이다. 바람직한 실시형태에서, 유도 배지는 무혈청이다. 유도 배지가 무혈청이라면, 이러한 배지에 혈청 대체 보충제, 예컨대 BIT 9500 혈청 대체물(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09500) 또는 기타 상업적으로 입수 용이한 혈청 대체 용액을 포함하는 것을 필요로 할 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 임의의 세포를 배양하거나 분화시키는 데 필요한 혈청에 일반적으로 존재하는 성분은 유도 배지에 허용되는 농도로 개별적으로 첨가될 수 있다. 일 실시형태에서, 혈청에 일반적으로 존재하는 성분은 알부민이다. 알부민이 유도 배지(혈청 대신)에 포함된다면, 이는 임의의 종에서 유래된 것일 수 있지만, 전형적으로 소 또는 인간이다. 일부 실시형태에서, 알부민은 재조합성일 수 있다.

[0060] 대안적으로 "SUPPLCTL" 배지로도 지칭되는 본 개시내용의 유도 배지는 HSPC를 배양하고 B 세포 전구체의 유도를 지원하기 위해 적절하게 제형화된 기본 배지를 포함할 것이다. 따라서, 적합한 기본 배지는 조혈 계통의 세포, 특히 B 세포 전구체 및/또는 B 계통 세포 및/또는 IgM^+ 세포의 배양을 지원하는 임의의 기본 배지이다. 예시적

인 기본 배지로는 STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #100-171), STEMdiff™ 조혈 기본 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #05311), STEMdiff™ APEL™2 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #05270), StemSpan™ AOF 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #100-0130), StemSpan™ SFEM & SFEM II, ImmunoCult™ XF(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09650, 09655, 10981), 또는 목적에 맞는 임의의 다른 상업적으로 입수 용이한 기본 배지를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 기본 배지를 제형화하는 공통 성분으로는 염, 완충제, 지질, 아미노산, 미량 원소, 특정 단백질, 비타민, 무기질, 환원제 등을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 기본 배지는 HSPC의 분화 및 이의 B 세포 전구체(들)의 유도를 지원하기 위해 최적화된다.

- [0061] 일 실시형태에서, 유도 배지는 줄기세포 인자(SCF), 트롬보포이에틴(TPO) 및 FMS-유사 티로신 키나제 3 리간드(FLT3L) 중 적어도 하나를 포함한다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 SCF, TPO 및 FLT3L 중 2개 이상을 포함한다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 SCF, TPO 및 FLT3L을 각각 포함한다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 SCF 또는 TPO를 포함한다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 TPO, SCF 및 FLT3L 중 1개, 2개 또는 각각을 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 TPO 및 SCF 중 하나 또는 둘 다를 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 TPO를 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 SCF를 포함하지 않는다.
- [0062] SCF가 유도 배지에 포함되는 경우, 여기서 SCF 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL의 범위일 수 있다.
- [0063] FLT3L이 유도 배지에 포함되는 경우, 여기서 FLT3L 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0064] TPO가 유도 배지에 포함되는 경우, 여기서 TPO 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0065] 일 실시형태에서, 유도 배지는 적어도 하나의 다른 사이토카인을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 하나 이상의 인터루킨이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IL-17 및 IL-21 중 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-3, IL-6 또는 IL-7, 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0066] 유도 배지에 포함된 적어도 하나의 다른 사이토카인의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0067] 일 실시형태에서, 유도 배지는 HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체 집단의 유도를 더욱 향상시키기 위해 하나 이상의 추가 사이토카인 또는 성장 인자, 또는 소분자를 추가로 포함한다. 유도 배지에 포함될 수 있는 하나 이상의 추가 사이토카인 또는 성장 인자의 비제한적인 예로는 에리스로포이에틴(EPO), 인슐린 성장 인자 1(IGF-1) 및 인슐린 성장 인자 2(IGF-2), B 세포 활성화 인자(BAFF), 증식 유도 리간드(APRIL) 및 인터페론 감마(IFN- γ)를 포함한다.
- [0068] 유도 배지에 포함된 하나 이상의 추가 성장 인자의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0069] 일 실시형태에서, 유도 배지는 완전 배지로 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 유도 배지는 사용 전에 새로 제조될 수 있고, 따라서 기본 배지는 기본 배지에 첨가될 하나 이상의 보충제와 별도로 저장될 수 있다. 일례에서, 성장 인자 및 사이토카인은 유도/분화 방법에서 완전 유도 배지를 사용하기 직전에 기본 배지에 첨가될 하나 이상의 보충제에서 조합될 수 있다.
- [0070] 유도 배지에 포함될 성장 인자 및 사이토카인은 다양한 상업적 공급업체로부터 공급될 수 있고, 재조합성일 수 있다.
- [0071] 본 개시내용의 유도 배지는 HSPC 집단의 배양을 지원하기 위해 기질과 상승작용할 수 있다. 일 실시형태에서, 간질 세포 또는 피더 세포는 본 개시내용의 세포 배양 배지와 함께 사용될 수 있다. 이러한 세포의 비배타적인 예로는 배아 간 세포주 EL08.1D2, AFT024 세포, OP9 세포, MS-5 또는 M2-10B4 세포, 마우스 배아 섬유아세포 또는 배아 대동맥-생식선 중신(aorta-gonad mesonephros: AGM)으로부터의 간질 세포를 포함한다.
- [0072] 일 실시형태에서, HSPC 집단의 배양은 피더 세포 무함유 및/또는 간질 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 이러한 접근법은 간질/피더 세포에 의해 사전에 조절된 배지를 활용할 수 있거나, 이러한 시스템은 간질/피더 세포 대체물을 활용할 수 있다. 간질/피더 세포 대체물은 배양 중인 세포에 적절한 신호 또는 접촉 부위를 제공하는 하나 이상의 한정된 구성요소를 포함할 수 있다. 이러한 구성요소는 유도 배지에 포함(예컨대, 가용화)되거나

배양 용기의 내부 배양 표면 또는 세포 배양 배지에 현탁된 고체 표면, 예컨대 입자, 비드, 마이크로캐리어 등에 적용되는 코팅으로 사용될 수 있다. 이러한 구성요소의 비배타적인 예는 피브로넥틴 코팅, 젤라틴 코팅, 콜라겐 코팅, 고정된 Notch 리간드, 또는 StemSpan™ 림프계 분화 코팅 보충제(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09925) 또는 Matrigel(Corning)과 같은 코팅을 포함할 수 있다.

[0073] 일 실시형태에서, HSPC 집단의 배양은 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자의 존재 하에(피더 세포 및/또는 간질 세포 지지체의 부재 하에) 이루어진다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 유도 배지에 가용화되거나 유도 배지와 접촉하는 표면에 코팅된다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질은 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌, ECM1, SPARC 또는 오스테오폰틴이다. 일 실시형태에서, 세포 부착 분자는 혈관 세포 부착 분자(예를 들어 VCAM-1) 또는 고정된 SCF 단백질(예를 들어 SCF-Fc)이다.

[0074] 일 실시형태에서, 전술한 단백질의 상이한 조합이 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포 부착 분자의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질(들)과 세포 부착 분자(들)의 조합이 사용된다.

[0075] 사용되는 경우, 유도 배지와 상승작용하는 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자의 농도는 약 0.1 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ (또는 96웰 플레이트의 경우 0.03 내지 30 $\mu\text{g/웰}$), 약 0.2 내지 50 $\mu\text{g/mL}$ (또는 96웰 플레이트의 경우 0.06 내지 15 $\mu\text{g/웰}$), 또는 약 0.5 내지 20 $\mu\text{g/mL}$ (또는 96웰 플레이트의 경우 0.15 내지 6 $\mu\text{g/웰}$)이다.

[0076] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 배지는 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자와 함께 사용하는 것에 의존하지 않는다.

[0077] 유도 배지에서 HSPC 집단을 배양하는 것은 이들의 생존력 또는 하류 계통으로 분화시키는 능력에 영향을 주지 않는 임의의 시간 기간 동안일 수 있다. 일 실시형태에서, HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체 집단을 유도하기 위한 유도 분화 방법은 약 1 내지 28일, 약 3 내지 25일, 약 5 내지 21일, 또는 약 7 내지 14일 동안 유도 배지에서 $\text{CD}34^+$ HSPC 집단을 배양하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체 집단을 유도하기 위한 유도 분화 방법은 약 3 내지 14일 동안 유도 배지에서 $\text{CD}34^+$ HSPC 집단을 배양하는 것을 포함한다.

[0078] 일 실시형태에서, 유도된 세포의 1% 이상은 B 세포 전구체(예를 들어, $\text{CD}10$ 를 발현함)이다. 일 실시형태에서, 유도된 세포의 5% 이상은 B 세포 전구체이다. 일 실시형태에서, 유도된 세포의 10% 이상은 B 세포 전구체이다. 일 실시형태에서, 유도된 세포의 20% 이상은 B 세포 전구체이다. 일 실시형태에서, 유도된 세포의 30% 이상은 B 세포 전구체이다. 일 실시형태에서, 유도된 세포의 40% 이상은 B 세포 전구체이다. 일 실시형태에서, 유도된 세포의 50% 이상은 B 세포 전구체이다. 추가로, 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용하여 유도된 세포의 1% 이상은 $\text{CD}19$ 를 발현한다. 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용하여 유도된 세포의 5% 이상은 $\text{CD}19$ 를 발현한다. 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용하여 유도된 세포의 10% 이상은 $\text{CD}19$ 를 발현한다. 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용하여 유도된 세포의 20% 이상은 $\text{CD}19$ 를 발현한다. 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용하여 유도된 세포의 30% 이상은 $\text{CD}19$ 를 발현한다. 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용하여 유도된 세포의 40% 이상은 $\text{CD}19$ 를 발현한다.

[0079] 일 실시형태에서, (유도 배지를 사용하여) B 세포 전구체의 유도 시 나타날 수 있는 $\text{CD}19^+$ 세포는 B 계통 세포일 수 있다. 일 실시형태에서, (유도 배지를 사용하여) B 세포 전구체의 유도 시 나타날 수 있는 $\text{CD}19^+$ 세포는 B 계통 세포가 아니라, 오히려 보다 원시적인 세포 또는 이의 전구 세포일 수 있다. 일 실시형태에서, 전술한 유형의 세포 둘 다는 유도 배지에서 배양 후 수득한 세포에 포함될 수 있다.

[0080] 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용한 B 세포 전구체의 유도는 투입 세포당 1개 이상의 $\text{CD}10^+$ 세포, 투입 세포당 5개 이상의 $\text{CD}10^+$ 세포, 투입 세포당 10개 이상의 $\text{CD}10^+$ 세포, 투입 세포당 20개 이상의 $\text{CD}10^+$ 세포, 투입 세포당 50개 이상의 $\text{CD}10^+$ 세포, 투입 세포당 100개 이상의 $\text{CD}10^+$ 세포를 산출한다. 추가로, 일 실시형태에서, 유도 배지를 사용한 B 세포 전구체의 유도는 투입 세포당 1개 이상의 $\text{CD}19^+$ 세포, 투입 세포당 5개 이상의 $\text{CD}19^+$ 세포, 투입 세포당 10개 이상의 $\text{CD}19^+$ 세포, 투입 세포당 20개 이상의 $\text{CD}19^+$ 세포, 투입 세포당 50개 이상의 $\text{CD}19^+$ 세포, 또는 투입 세포당 100개 이상의 $\text{CD}19^+$ 세포를 산출한다.

[0081] 또 다른 양상에서, 본 개시내용의 유도 분화 방법은 B 세포 전구체 집단을 분화 배지와 접촉시키는 단계, 및 B

세포 전구체 집단을 분화 배지에서 B 계통 세포를 수득하기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 추가로 포함한다.

[0082] 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단은 CD10 또는 CD19 중 하나 또는 둘 다를 발현한다.

[0083] 일 실시형태에서, B 계통 세포는 $CD19^+$ 세포이다. 일 실시형태에서, B 계통 세포는 이중 양성 $CD10^+CD19^+$ 이다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 유도 배지에서 $CD34^+$ HSPC 집단을 배양한 후(즉, 유도 배지를 사용하여 B 세포 전구체 집단의 유도 후)보다 더 많은 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 2배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 3배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 4배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 5배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 10배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 20배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 B 세포 전구체 집단의 유도를 따른 것보다 50배 이상의 $CD19^+$ 세포를 포함한다.

[0084] 분화 배지는 B 세포 전구체 집단을 분화(B 계통 세포 집단으로)시키는 데 사용될 수 있는 임의의 배지이다. 바람직한 실시형태에서, 분화 배지는 무혈청이다. 분화 배지가 무혈청인 경우, 이러한 배지에는 BIT 9500 혈청 대체물(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09500) 또는 다른 상업적으로 입수 용이한 혈청 대체 용액과 같은 혈청 대체 보충제를 포함하는 것이 필요할 수도 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 임의의 세포를 배양하거나 분화시키는 데 필요한 혈청에 일반적으로 존재하는 성분은 분화 배지에 허용 가능한 농도로 개별적으로 첨가될 수 있다. 일 실시형태에서, 혈청에 일반적으로 존재하는 성분은 알부민이다. 알부민이 분화 배지(혈청 대신)에 포함된다면, 이는 임의의 종에서 유래될 수 있지만, 전형적으로 소 또는 인간이다. 일부 실시형태에서, 알부민은 재조합성일 수 있다.

[0085] 대안적으로 "DiM" 배지라고도 지칭되는 본 개시내용의 분화 배지는 HSPC 및/또는 B 세포 전구체 및/또는 B 계통 세포 및/또는 IgM^+ 세포를 배양하기 위해 적절하게 제형화된 기본 배지를 포함할 것이다. 따라서, 적합한 기본 배지는 조혈 계통의 세포, 특히 B 계통 세포의 배양을 지원하는 임의의 기본 배지이다. 예시적인 기본 배지로는 STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #100-171), STEMdiff™ 조혈 기본 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #05311), STEMdiff™ APEL™2 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #05270), StemSpan™ AOF 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #100-0130), StemSpan™ SFEM & SFEM II, ImmunoCult™ XF(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09650, 09655, 10981), 또는 목적에 맞는 임의의 다른 상업적으로 입수 용이한 기본 배지를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 기본 배지를 제형화하는 데 사용되는 공통 성분으로는 염, 완충제, 지질, 아미노산, 미량 원소, 특정 단백질, 비타민, 무기질, 환원제 등을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 기본 배지는 HSPC의 분화 및 이로부터 B 세포 전구체(들)의 유도, 및 B 계통 세포의 추가 분화를 지원하도록 최적화된다.

[0086] 일 실시형태에서, 분화 배지는 FLT3L, TPO 및 SCF 중 적어도 하나를 포함한다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 FLT3L, TPO 및 SCF 중 2개 이상을 포함한다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 FLT3L, TPO 및 SCF 각각을 포함한다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 FLT3L, TPO 및 SCF 각각과 적어도 하나의 다른 사이토카인을 포함한다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 SCF 또는 TPO를 포함한다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 TPO, SCF 및 FLT3L 중 하나 또는 각각을 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 TPO 및 SCF 중 하나 또는 둘 다를 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 TPO를 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 SCF를 포함하지 않는다.

[0087] SCF가 분화 배지에 포함되는 경우, 여기서 SCF의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.

[0088] FLT3L이 분화 배지에 포함되는 경우, 여기서 FLT3L의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.

- [0089] TPO가 분화 배지에 포함되는 경우, 여기서 TPO의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0090] 일 실시형태에서, 분화 배지는 적어도 하나의 다른 사이토카인을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 하나 이상의 인터루킨이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IL-17 및 IL-21 중 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-3, IL-6 또는 IL-7, 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0091] 분화 배지 내 적어도 하나의 다른 사이토카인의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0092] 일 실시형태에서, 분화 배지는 B 세포 전구체 집단으로부터 B 계통 세포의 분화를 더욱 향상시키기 위해 하나 이상의 추가적인 사이토카인 또는 성장 인자, 또는 소분자를 추가로 포함한다. 분화 배지에 포함될 수 있는 하나 이상의 추가 사이토카인 또는 성장 인자의 비제한적인 예로는 에리스로포이에틴(EPO), 인슐린 성장 인자 1(IGF-1) 및 인슐린 성장 인자 2(IGF-2), B 세포 활성화 인자(BAFF), 증식 유도 리간드(APRIL) 및 인터페론 감마(IFN- γ)를 포함한다.
- [0093] 분화 배지에 포함된 하나 이상의 추가 사이토카인 또는 성장 인자의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0094] 일 실시형태에서, 분화 배지는 완전 배지로서 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 분화 배지는 사용 전에 새로 제조될 수 있으며, 이에 따라 기본 배지는 기본 배지에 첨가될 하나 이상의 보충제와 별도로 저장될 수 있다. 일례에서, 성장 인자 및 사이토카인은 보충제에 조합될 수 있으며, 유도/분화 방법에서 완전 분화 배지를 사용하기 직전에 기본 배지에 첨가될 수 있다.
- [0095] 분화 배지에 포함될 성장 인자 및 사이토카인은 다양한 상업적 공급업체로부터 공급될 수 있으며 재조합성일 수 있다.
- [0096] 본 개시내용의 분화 배지는 B 세포 전구체 집단의 배양을 지원하기 위해(B 계통 세포의 분화를 위해) 기질과 상승작용할 수 있다. 일 실시형태에서, 간질 세포 또는 피더 세포는 본 개시내용의 세포 배양 배지와 함께 사용될 수 있다. 이러한 세포의 비배타적인 예로는 배아 간 세포주 EL08.1D2, AFT024 세포, OP9 세포, MS-5 또는 M2-10B4 세포, 마우스 배아 섬유아세포 또는 배아 대동맥-생식선 중신으로부터의 간질 세포를 포함한다.
- [0097] 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단의 배양은 피더 세포 무함유 및/또는 간질 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 이러한 접근법은 간질/피더 세포에 의해 사전에 조절된 배지를 활용할 수 있거나, 이러한 시스템은 간질/피더 세포 대체물을 활용할 수 있다. 간질/피더 세포 대체물은 배양 중인 세포에 적절한 신호 또는 부착 부위를 제공하는 하나 이상의 한정된 구성요소를 포함할 수 있다. 이러한 구성요소는 분화 배지에 포함될 수 있거나, 배양 용기의 내부 배양 표면에 적용되거나, 또는 입자, 비드, 마이크로캐리어 등과 같이, 세포 배양 배지에 현탁된 고체 표면에 적용된 코팅으로서 사용될 수 있다. 이러한 구성요소의 비배타적인 예는 피브로넥틴 코팅, 젤라틴 코팅, 콜라겐 코팅 또는 Matrigel(Corning)을 포함할 수 있다.
- [0098] 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단의 배양은 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자의 존재 하에(반면, 피더 세포 및/또는 간질 세포 지지체의 부재 하에) 이루어진다. 일 실시형태에서, 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 분화 배지에 가용화되거나 분화 배지와 접촉하는 표면에 코팅된다. 일 실시형태에서, 세포외 기질 단백질은 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌, ECM1, SPARC 또는 오스테오폰틴이다. 일 실시형태에서, 세포 부착 분자는 혈관 세포 부착 분자(예를 들어, VCAM-1) 또는 고정된 SCF 단백질(예를 들어, SCF-Fc)이다.
- [0099] 일 실시형태에서, 전술한 단백질의 상이한 조합이 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포외 기질 단백질의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포 부착 분자의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포외 기질 단백질(들)과 세포 부착 분자(들)의 조합이 사용된다.
- [0100] 분화 배지와 상승작용하는 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자의 농도는 포함되는 경우, 약 0.1 내지 100 μ g/mL(또는 96웰 플레이트의 경우 0.03 내지 30 μ g/웰), 약 0.2 내지 50 μ g/mL(또는 96웰 플레이트의 경우 0.06 내지 15 μ g/웰), 또는 약 0.5 내지 20 μ g/mL(또는 96웰 플레이트의 경우 0.15 내지 6 μ g/웰)의 범위이다.
- [0101] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 배지는 세포외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자와 함께 사용하는 것에 의존하

지 않는다.

- [0102] 분화 배지에서 B 세포 전구체 집단의 배양은 이들의 생존력 또는 하류 계통으로의 분화 능력에 영향을 주지 않는 임의의 시간 기간 동안일 수 있다. 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단을 B 계통 세포 집단으로 분화시키는 방법은 B 세포 전구체 집단을 분화 배지에서 약 1 내지 28일, 약 3 내지 25일, 약 5 내지 21일, 또는 약 7 내지 14일 동안 배양하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, B 세포 전구체 집단을 B 계통 세포 집단으로 분화시키는 방법은 B 세포 전구체 집단을 분화 배지에서 약 3 내지 14일 동안 배양하는 것을 포함한다.
- [0103] 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 1% 이상은 B 계통 세포(예를 들어, CD19를 발현함)이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 5% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 10% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 20% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 30% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 40% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 50% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 60% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 70% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 80% 이상은 B 계통 세포이다. 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용하여 분화된 세포의 90% 이상은 B 계통 세포이다.
- [0104] 일 실시형태에서, CD19⁺ B 계통 세포(분화 배지를 사용하여 분화된)의 적어도 일부는 IgM⁺ 세포이다. 일 실시형태에서, 약 1% 이상의 CD19⁺ B 계통 세포는 IgM⁺ 세포이다. 일 실시형태에서, 약 2% 이상의 CD19⁺ B 계통 세포는 IgM⁺ 세포이다. 일 실시형태에서, 약 3% 이상의 CD19⁺ B 계통 세포는 IgM⁺ 세포이다. 일 실시형태에서, 약 4% 이상의 CD19⁺ B 계통 세포는 IgM⁺ 세포이다. 일 실시형태에서, 약 5% 이상의 CD19⁺ B 계통 세포는 IgM⁺ 세포이다. 일 실시형태에서, 약 10% 이상의 CD19⁺ B 계통 세포는 IgM⁺ 세포이다.
- [0105] 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용한 B 계통 세포의 분화는 투입 세포당 10개 이상의 CD19⁺ 세포, 투입 세포당 25개 이상의 CD19⁺ 세포, 투입 세포당 50개 이상의 CD19⁺ 세포, 투입 세포당 100개 이상의 CD19⁺ 세포, 투입 세포당 250개 이상의 CD19⁺ 세포, 투입 세포당 500개 이상의 CD19⁺ 세포, 투입 세포당 1000개 이상의 CD19⁺ 세포, 또는 투입 세포당 2000개 이상의 CD19⁺ 세포를 산출한다. 추가로, 일 실시형태에서, 분화 배지를 사용한 B 계통 세포의 분화는 투입 세포당 1개 이상의 IgM⁺ 세포, 투입 세포당 5개 이상의 IgM⁺ 세포, 투입 세포당 10개 이상의 IgM⁺ 세포, 투입 세포당 20개 이상의 IgM⁺ 세포, 투입 세포당 50개 이상의 IgM⁺ 세포, 또는 투입 세포당 100개 이상의 IgM⁺ 세포를 산출한다.
- [0106] 또 다른 양상에서, 본 개시내용의 유도 분화 방법은 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지와 접촉시키는 단계, 및 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지에서 IgM⁺ 세포(및/또는 항체 분비 세포)를 수득하고/하거나 확장시키기에 충분한 시간 동안 배양하는 단계를 포함한다.
- [0107] 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단은 CD19⁺ 세포, 예컨대, 이중 양성 CD10⁺CD19⁺ B 계통 세포 또는 단일 양성 CD19⁺ 세포를 포함하거나 이들의 집단이다.
- [0108] 일 실시형태에서, 방법은 본 개시내용의 분화 배지에서 배양한 후의 세포 산출물(예를 들어, B 계통 세포의 집단) 중에 또는 CD19⁺ 세포 집단(예를 들어, 이중 양성 CD10⁺CD19⁺ B 계통 세포) 중에 포함된 것보다 하류 분화 배지에서 배양한 후에 더 많은 IgM⁺ 세포를 수득하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0109] 하류 분화 배지(IgM⁺ 세포의 분화 및 확장 배지로도 간주될 수 있음)는 B 계통 세포 집단을 (IgM⁺ 세포 집단으로) 분화시키거나, 또는 IgM⁺ 세포를 확장시키는 데 사용될 수 있는 임의의 배지이다. 바람직한 실시형태에서, 하류 분화 배지는 무혈청이다. 하위 분화 배지가 무혈청인 경우, 이러한 배지에 BIT 9500 혈청 대체물(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09500) 또는 기타 상업적으로 입수 용이한 혈청 대체 용액과 같은 혈청 대체 보충제를 포함할 필요가 있을 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 임의의 세포를 배양하거나 분화시키는 데 필요한 혈청에 일반적으로 존재하는 성분은 허용되는 농도로 하류 분화 배지에 개별적으로 첨가될 수 있다. 일

실시형태에서, 혈청에 일반적으로 존재하는 성분은 알부민이다. 알부민이 하류 분화 배지(혈청 대신)에 포함된다면, 이는 임의의 종에서 유래되는 것일 수 있지만, 전형적으로 소 또는 인간이다. 일부 실시형태에서, 알부민은 재조합성일 수 있다.

[0110] 본 개시내용의 하류 분화 배지는 대안적으로 "DDM" 배지라고도 지칭되는 것으로서, HSPC를 배양하고 B 세포 전구체의 유도, IgM⁺ 세포를 비롯한 B 계통 세포의 분화를 지원하기에 적절하게 제형화된 기본 배지를 포함할 것이다. 따라서, 적합한 기본 배지는 조혈 계통의 세포, 특히 B 계통 세포의 배양을 지원하는 임의의 기본 배지이다. 예시적인 기본 배지로는 STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #100-171), STEMdiff™ 조혈 기본 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #05311), STEMdiff™ APEL™2 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #05270), StemSpan™ AOF 배지(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #100-0130), StemSpan™ SFEM & SFEM II, ImmunoCult™ XF(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09650, 09655, 10981), 또는 목적에 맞는 임의의 다른 상업적으로 입수 용이한 기본 배지를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 기본 배지를 제형화하는 데 사용되는 공통 성분으로는 염, 완충제, 지질, 아미노산, 미량 원소, 특정 단백질, 비타민, 무기질, 환원제 등을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 기본 배지는 HSPC의 B 계통 세포, 예를 들어, IgM⁺ 세포로의 분화를 최적으로 지원하도록 제형화된다.

[0111] 한 실시양태에서, 하류 분화 배지는 인간 CD40의 리간드를 포함한다. 인간 CD40의 리간드는 천연 형태로 단리되고/되거나 사용될 수 있다. 대안적으로, 인간 CD40의 리간드는 증가된 활성 및/또는 반감기 및/또는 안정성을 위해 조작될 수 있다. 천연이든 조작된 것이든 간에 CD40의 리간드는 상업적 공급업체로부터 조달될 수 있으며 재조합성일 수 있다.

[0112] 하류 분화에서 CD40의 리간드는 포함된다면, 약 10 ng/mL 내지 5 µg/mL, 약 25 ng/mL 내지 2 µg/mL, 약 50 ng/mL 내지 1 µg/mL, 또는 약 100 ng/mL 및 500 ng/mL 범위의 농도로 존재할 수 있다.

[0113] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 적어도 하나의 다른 사이토카인을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 하나 이상의 인터루킨이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IL-17 및 IL-21 중 하나 이상이다. 일 실시형태에서, 적어도 하나의 다른 사이토카인은 IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10 또는 IL-21 중 하나 이상, 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0114] 하류 분화 배지 내 적어도 하나의 다른 사이토카인(또는 적어도 하나의 다른 사이토카인 각각)의 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.

[0115] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 B 계통 세포 집단으로부터 IgM⁺ 세포 및 항체 분비 세포의 분화를 추가로 향상시키기 위해 하나 이상의 추가적인 사이토카인 또는 성장 인자, 또는 소분자를 추가로 포함할 수 있다. 분화 배지에 포함될 수 있는 하나 이상의 추가 사이토카인 또는 성장 인자의 비제한적인 예로는 에리스로포이에틴(EPO), 인슐린 성장 인자 1(IGF-1), 인슐린 성장 인자 2(IGF-2), B 세포 활성화 인자(BAFF), 증식 유도 리간드(APRIL) 및 인터페론 감마(IFN-γ)를 포함한다.

[0116] 하류 분화 배지에 포함된 하나 이상의 추가 성장 인자의 농도는 약 0.1 ng/mL 내지 1 µg/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.

[0117] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에 포함된 하나 이상의 추가 성장 인자는 SCF, TPO 및 FLT3L 중 하나 이상으로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 SCF, TPO 및 FLT3L 중 2개 이상을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 SCF, TPO 및 FLT3L을 각각 포함하거나 전혀 포함하지 않을 수 있다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 SCF 및 FLT3L 중 하나 또는 둘 다를 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 TPO를 포함하지 않고, SCF 및 FLT3L 중 하나 또는 둘 다를 포함하지 않는다.

[0118] SCF가 하류 분화 배지에 포함되는 경우, 여기서 SCF 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.

[0119] FLT3L이 하류 분화 배지에 포함되는 경우, 여기서 FLT3L 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.

- [0120] TPO가 하류 분화 배지에 포함되는 경우, 여기서 TPO 농도는 약 0.5 ng/mL 내지 500 ng/mL, 약 1 ng/mL 내지 250 ng/mL, 약 5 ng/mL 내지 100 ng/mL, 또는 약 10 ng/mL 내지 50 ng/mL 범위일 수 있다.
- [0121] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 기본 배지 및 CD40의 리간드와 적어도 하나의 다른 사이토카인 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 기본 배지 및 CD40의 리간드, 적어도 하나의 다른 사이토카인, 및 적어도 하나의 추가 사이토카인 중 하나 이상을 포함한다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 기본 배지, CD40의 리간드 및 적어도 하나의 추가 사이토카인 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.
- [0122] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 완전 배지로서 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지는 사용 전에 새로 제조될 수 있고, 따라서 기본 배지는 기본 배지에 첨가될 하나 이상의 보충제와 별도로 저장될 수 있다. 일례에서, 성장 인자 및 사이토카인은 보충제에 조합될 수 있으며, 유도/분화 방법에서 완전 하류 분화 배지를 사용하기 직전에 기본 배지에 첨가될 수 있다.
- [0123] 하류 분화 배지에 포함될 성장 인자 및 사이토카인은 다양한 상업적 공급업체로부터 공급될 수 있으며 재조합성일 수 있다.
- [0124] 본 개시내용의 하류 분화 배지는 B 계통 세포 집단의 배양을 지원하기 위한 기질과 상승작용할 수 있다. 일 실시형태에서, 간질 세포 또는 피더 세포는 본 개시내용의 세포 배양 배지와 함께 사용될 수 있다. 이러한 세포의 비배타적인 예로는 배아 간 세포주 EL08.1D2, AFT024 세포, OP9 세포, MS-5 또는 M2-10B4 세포, 마우스 배아 섬유아세포 또는 배아 대동맥-생식선 중신(AGM)으로부터의 간질 세포를 포함한다.
- [0125] 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단의 배양은 피더 세포 무함유 및/또는 간질 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 이러한 접근법은 간질/피더 세포에 의해 사전에 조절된 배지를 활용할 수 있거나, 이러한 시스템은 간질/피더 세포 대체물을 활용할 수 있다. 간질/피더 세포 대체물은 배양 중인 세포에 적절한 신호 또는 부착 부위를 제공하는 하나 이상의 한정된 구성요소를 포함할 수 있다. 이러한 구성요소는 하류 분화 배지에 포함될 수 있거나, 배양 용기의 내부 배양 표면 또는 입자, 비드, 마이크로캐리어 등과 같이 세포 배양 배지에 현탁된 고체 표면에 적용된 코팅으로서 사용될 수 있다. 이러한 구성요소의 비배타적인 예는 피브로넥틴 코팅, 젤라틴 코팅, 콜라겐 코팅 또는 Matrigel(Corning)을 포함할 수 있다.
- [0126] 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단의 배양은 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자의 존재 하에(반면, 피더 세포 및/또는 간질 세포 지지체의 부재 하에) 이루어진다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자는 하류 분화 배지에 가용화되거나 하류 분화 배지와 접촉하는 표면에 코팅된다. 일 실시형태에서, 세포 외 기질 단백질은 피브로넥틴, 비트로넥틴, 라미닌, ECM1, SPARC 또는 오스테오펀틴이다. 일 실시형태에서, 세포 부착 분자는 혈관 세포 부착 분자(예를 들어, VCAM-1) 또는 고정된 SCF 단백질(예를 들어 SCF-Fc)이다.
- [0127] 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질과 세포 부착 분자의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포 부착 분자의 조합이 사용된다. 일 실시형태에서, 세포의 기질 단백질(들)과 세포 부착 분자(들)의 조합이 사용된다.
- [0128] 하류 분화 배지와 상승작용하는 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자의 농도는 포함된 경우, 약 0.1 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ (또는 96웰 플레이트의 경우 0.03 내지 30 $\mu\text{g/웰}$), 약 0.2 내지 50 $\mu\text{g/mL}$ (또는 96웰 플레이트의 경우 0.06 내지 15 $\mu\text{g/웰}$), 또는 약 0.5 내지 20 $\mu\text{g/mL}$ (또는 96웰 플레이트의 경우 0.15 내지 6 $\mu\text{g/웰}$) 범위이다.
- [0129] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 배지는 세포의 기질 단백질 또는 세포 부착 분자와 함께 사용하는 것에 의존하지 않는다.
- [0130] 하류 분화 배지에서 B 계통 세포 집단을 배양하는 것은 이들의 생존력 또는 하류 계통으로 분화시키는 능력에 영향을 주지 않는 임의의 시간 기간 동안일 수 있다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단을 IgM^+ 세포 및/또는 항체 분비 세포 집단으로 분화시키는 방법은 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지에서 약 1일 내지 28일, 약 3일 내지 25일, 약 5일 내지 21일, 또는 약 7일 내지 14일 동안 배양하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, B 계통 세포 집단을 IgM^+ 세포 집단으로 분화시키는 방법은 B 계통 세포 집단을 하류 분화 배지에서 약 3 내지 21일 동안 배양하는 것을 포함한다.
- [0131] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 10% 이상은 CD19^+ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 20% 이상은 CD19^+ 세포이다. 일 실시형태에서, 하

류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 30% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 40% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 50% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 60% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 70% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 80% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 세포의 90% 이상은 $CD19^{+}$ 세포이다.

[0132] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 1%는 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 2%는 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 3%는 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 4%는 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 5% 이상은 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 10% 이상은 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 15% 이상은 IgM^{+} 세포이다. 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 B 계통 세포를 배양한 후 $CD19^{+}$ 세포의 20% 이상은 IgM^{+} 세포이다.

[0133] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지를 사용한 B 계통 세포의 하류 분화는 투입 세포당 50개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 투입 세포당 100개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 투입 세포당 250개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 투입 세포당 500개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 투입 세포당 1000개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 투입 세포당 2000개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 투입 세포당 3000개 이상의 $CD19^{+}$ 세포, 또는 투입 세포당 4000개 이상의 $CD19^{+}$ 세포를 산출한다. 추가로, 일 실시형태에서, 하류 분화 배지를 사용한 B 계통 세포의 하류 분화는 투입 세포당 10개 이상의 IgM^{+} 세포, 투입 세포당 25개 이상의 IgM^{+} 세포, 투입 세포당 50개 이상의 IgM^{+} 세포, 투입 세포당 100개 이상의 IgM^{+} 세포, 투입 세포당 150개 이상의 IgM^{+} 세포, 또는 투입 세포당 200개 이상의 IgM^{+} 세포를 산출한다.

[0134] 일 실시형태에서, 하류 분화 배지에서 배양 후, 산출 세포의 약 0.5% 이상은 항체 분비 세포이다. 일 실시형태에서, 산출 세포의 약 1% 이상은 항체 분비 세포이다. 일 실시형태에서, 산출 세포의 약 2% 이상은 항체 분비 세포이다. 일 실시형태에서, 산출 세포의 약 3% 이상은 항체 분비 세포이다. 일 실시형태에서, 산출 세포의 약 4% 이상은 항체 분비 세포이다. 일 실시형태에서, 산출 세포의 약 5% 이상은 항체 분비 세포이다. 일 실시형태에서, 산출 세포의 약 10% 이상은 항체 분비 세포이다.

[0135] 일 실시형태에서, 항체 분비 세포는 $CD19^{+}$ 이다. 일 실시형태에서, 항체 분비 세포는 $CD19^{-}$ 이고, 이러한 항체 분비 세포 집단은 $CD138^{+}$ 일 수 있다. 일 실시형태에서, 항체 분비 세포는 IgM^{-} 이다. 일 실시형태에서, 항체 분비 세포는 IgM 또는 IgG 를 분비한다.

[0136] HSPC가 PSC 유래인 본 명세서에 개시된 방법의 실시형태에서, PSC는 무혈청 조건 하에서 배양될 수 있다. 동일 하거나 상이일 실시형태에서, PSC는 간질 세포 무함유 조건 및/또는 피더 세포 무함유 조건 하에서 배양될 수 있다. PSC로부터 $CD34^{+}$ HSPC를 분화시키는 것은 상업적으로 입수가능한 키트, 예컨대 STEMdiff™ 조혈 키트 (STEMCELL Technologies) 또는 STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지를 EB 보충제 A 및 EB 보충제 B (STEMCELL Technologies)와 함께 사용하여 수행될 수 있다. 이 단계에서, 또는 본 명세서에 개시된 이 방법의 임의의 단계에서, 방법의 다음 단계로 진행하기 전에 관심 세포를 정제/농축하는 것이 바람직할 수 있다. 세포를 정제/농축하는 방식, 예컨대 면역자기 세포 분리 또는 형광 활성화 세포 분류 등을 통한 방식은 공지되어 있다.

[0137] IgM^{+} B 세포는 ($IgM^{+}IgD^{+}$ 전이 B 세포 단계를 통해) $IgM^{+}IgD^{+}$ 미경험 B 세포, IgM 항체 분비 세포, 또는 이소형

전환 시, IgG^+ , IgE^+ 또는 IgA^+ 기억 B 세포 또는 형질 세포로 추가로 성숙할 수 있다. 이러한 기억 B 세포는 또한 항체 분비 세포(IgM , IgG , IgE 또는 IgA 를 분비할 수 있음)로 분화될 수 있다.

- [0138] 일 실시형태에서, PSC 유래 HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체 집단을 유도하는 방법은 전술한 바와 같이 PSC를 HSPC로 분화시키기 전에 PSC를 응집체로 형성시키는 단계, 및 그 다음 이러한 PSC-유래 HSPC를 유도 배지 조건으로 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0139] PSC는 임의의 알려진 접근법을 사용하여 응집체로 형성될 수 있다. 예를 들어, PSC의 응집체는 원하는 수의 PSC를 튜브 바닥이나 세포 배양 플레이트의 웰에 침착시킴으로써 형성될 수 있다. 또는, 균일한 크기의 PSC 응집체를 효율적이고 재현 가능하게 형성되도록 하기 위해 Aggrewell™ 마이크로웰 장치(STEMCELL Technologies)의 웰에 바람직한 PSC의 수를 침착시켜 응집체를 형성할 수도 있다.
- [0140] 일 실시형태에서, 응집체를 형성시키는 데 사용되는 PSC의 수는 약 1 내지 100,000개이다. 일 실시형태에서, 응집체를 형성시키는 데 사용되는 PSC의 수는 약 10 내지 10,000개이다. 일 실시형태에서, 응집체를 형성시키는 데 사용되는 PSC의 수는 약 100 내지 1,000개이다.
- [0141] 따라서, 일 실시형태에서, PSC의 응집체는 마이크로웰 장치에서 형성될 수 있다. 일 실시형태에서, PSC의 응집체는 약 1000개 세포 또는 약 500개 세포로부터 형성된다.
- [0142] i) HSPC를 농축하거나, ii) PSC를 중배엽 전구체로 분화시키거나, iii) PSC 유래 또는 조직 유래이든지 간에 HSPC로부터 B 세포 전구체 집단을 유도하거나, iv) B 세포 전구체로부터 B 계통 세포를 분화시키거나, v) B 계통 세포로부터 IgM^+ 및/또는 IgM 분비 세포를 분화시키거나, 또는 vi) B 계통 세포 또는 후기 세포 유형으로부터 IgG^+ 및/또는 IgG 분비 세포를 분화시키기 위한 배지 및 그 방법을 개시하는 것 외에도, 본 명세서에 개시된 다양한 배지는 무혈청 및/또는 피더 세포 무함유 또는 간질 세포 무함유 조건 여부에 관계없이, PSC 또는 조직 유래 HSPC를 미성숙 또는 성숙 B 세포로 단계적 분화시키기 위한 시스템 또는 키트에 포함될 수 있다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 전체 시스템은 무혈청 및/또는 피더 세포 무함유 또는 간질 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 시스템의 특정 양상만이 무혈청 및/또는 피더 세포 무함유 또는 간질 세포 무함유 조건 하에서 수행된다. 예를 들어, 그러나 전술한 것의 일반성을 제한함이 없이, PSC를 중배엽 전구체로, PSC-유래 중배엽 전구체를 조혈 전구 세포로, PSC-유래 조혈 전구 세포를 림프계 전구 세포(예를 들어 B 세포 전구체 집단)로 분화시키고, B 세포 전구체를 B 계통 세포로 분화시키고, B 계통 세포를 IgM 발현(및/또는 IgM 분비 세포) 및/또는 IgG 발현(및/또는 IgG 분비 세포)로 분화시키는 것은 무혈청 및/또는 피더 세포 무함유 또는 간질 세포 무함유 조건 하에 수행되는 반면, 추가 하류 단계는 수행되거나 수행되지 않을 수 있다. 반대로, 시스템의 초기 단계는 무혈청 및/또는 피더 세포 무함유 또는 간질 세포 무함유 조건 하에 수행되거나 수행되지 않을 수 있는 반면, 후속 단계는 무혈청 및/또는 간질세포 무함유 조건 하에 수행된다.
- [0144] 일 실시형태에서, 이러한 시스템 또는 키트는 PSC 작업흐름의 정황에서 다음 구성요소 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 이상을 포함할 수 있다: PSC를 중배엽 전구체로 분화시키기 위한 제1 배양 시스템; PSC 유래 중배엽 전구체를 조혈 전구 세포로 분화시키기 위한 제2 배양 시스템; PSC 유래 조혈 전구 세포를 하나 이상의 림프계 전구 세포의 하위세트로 분화시키기 위한 제3 배양 시스템; PSC 유래 림프계 전구 세포(예를 들어, B 세포 전구체 집단)를 분화시키기 위한 제4 배양 시스템; PSC 유래 림프계 전구 세포(예를 들어, B 세포 전구체 집단)를 B 계통 세포 집단으로 분화시키기 위한 제5 배양 시스템; B 계통 세포 집단을 IgM 발현(및/또는 IgM 분비 세포) 및/또는 IgG 발현(및/또는 IgG 분비 세포)로 분화시키기 위한 제6 배양 시스템; 코팅 기재; HSPC 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제1 키트; B 세포 전구체 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제2 키트; B 계통 세포 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제3 키트; 미성숙 B 세포 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제4 키트; 및 성숙한 B 세포 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제5 키트.
- [0145] 일 실시형태에서, 이러한 시스템 또는 키트는 1차 $CD34^+$ 세포 또는 조직 유래 $CD34^+$ 세포 작업흐름의 정황에서 다음 구성요소 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 이상을 포함할 수 있다: $CD34^+$ HSPC 집단으로부터 B 세포 전구체를 유도하기 위한 제1 배양 시스템; B 세포 전구체 집단으로부터 B 계통 세포를 분화시키기 위한 제2 배양 시스템; B 계통 세포 집단으로부터 IgM^+ 또는 IgM 분비 세포를 추가로 분화시키기 위한 제3 배양 시스템; 코팅 기재; HSPC 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제1 키트; B 세포 전구체 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제2 키트; B 계통 세포 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제3 키트; 미성숙 B 세

포 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제4 키트; 및 성숙한 B 세포 집단을 양성 또는 음성적으로 농축하기 위한 제5 키트.

[0146] 본 명세서에 개시된 배지 또는 본 명세서에 개시된 방법으로 수득한 세포는 임의의 하류 검정 또는 목적을 위해 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 세포(B 세포 전구체 집단, $CD19^+$ 또는 $CD10^+CD19^+$ B 계통 세포 집단, 또는 IgM^+ 또는 IgM 분비 세포이든지 간에)는 암과 같은 B 세포 질환 또는 B 세포 발달의 생물학을 연구하기 위한 연구 적용에 사용될 수 있다.

[0147] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 세포는 조혈(예를 들어, B 세포) 장애를 앓고 있는 환자와 같이 필요한 환자에게 이식 목적으로 사용될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 필요한 환자에게 이식될 세포는 B 세포 전구체 집단, $CD19^+$ 또는 $CD10^+CD19^+$ B 계통 세포 집단, 또는 IgM^+ 또는 Ig 분비 세포, 예컨대 IgM 및/또는 IgG일 수 있다. 이러한 세포는 하나 이상의 이식유전자를 도입하거나, 하나 이상의 DNA 단편을 제거하거나, 또는 하나 이상의 저형성 또는 과형성 돌연변이를 생성하기 위해 공지된 유전자 편집 기술을 사용하여 편집될 수 있다. 일 실시형태에서, 이식될 세포는 PSC 유래이고, 따라서 동종이계 세포의 잠재적으로 보편적인 공급원이다. 일 실시형태에서, 이식될 세포는 조직 유래이고, 따라서 잠재적으로 자가 세포의 공급원이다.

[0148] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 세포는 독성 연구 또는 약물 스크린과 같은 테스트 조건에 대한 반응성을 평가하는 데 사용될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 기원 세포는 무질환 상태 또는 질환 상태에 상응할 수 있다. 일 실시형태에서, 질환 상태는 유전자 편집 기술 등에 의해 기초 세포 또는 세포들 내로 도입될 수 있다.

[0149] 다음의 비제한적인 실시예는 본 개시내용을 예시한다.

[0150] 실시예

[0151] 실시예 1: 공여자 샘플로부터의 $CD34^+$ HSPC 농축

[0152] 제대혈 단위는 상업적 공급업체로부터 조달되었고 $CD34^+$ HSPC는 EasySep 인간 제대혈 $CD34$ 양성 선택 키트 II(STEMCELL Technologies)를 사용하여 농축시킨 후, 10% DMSO가 포함된 혈청에 동결시키거나 신선한 것으로 사용했다. 이어서, $CD34^+$ 세포를 염색한 다음 Lin^- (Lin에는 $CD3$, $CD14$, $CD15$, $CD16$, $CD19$, $CD56$ 및 $CD66b$ 가 포함됨), $CD34^+CD38^{-/mid/low}$ $CD10^-$ 세포에 대해 분류(FACS Aria)했고, "pop1"이라고 명명했다. 대조군으로서 사용된 제2의 보다 한정적인 분류된 집단은 $Lin^-CD34^+CD38^{mid}CD10^+$ 였고, "pop2"라고 명명했다(도 1).

[0153] 실시예 2: 유세포분석 및 세포 수 및 수율의 결정

[0154] 본 개시내용에 개괄된 유도 분화 프로토콜의 임의의 단계에서 샘플을 수확할 수 있고 이의 표현형을 유세포분석으로 평가할 수 있다. 다음 일반 프로토콜은 $CD34$, $CD10$, $CD19$, $CD20$ 및 IgM을 측정하는 데에 동일하게 적용된다.

[0155] 간략하게, 세포 샘플은 원심분리에 의해 수확하고 적절하게 세척했다. 그런 다음, 세포 샘플을 선택 항원에 대한 형광단 접합 항체로 염색하고 CytoFLEX S™ 유세포분석기(Beckman-Coulter)에서 분석했다. 광산란 프로파일과 DRAQ7 염색을 통해 사세포를 배제시켰다.

[0156] 총 생세포 수는 NucleoCounter NC250(Chemometec)을 제조업체의 권장에 따라 사용하여 수득했다. 아크리딘 오렌지와 DAPI(AO/DAPI)의 혼합물로 염색하기 전에 필요에 따라 세포를 희석했다. 이 혼합물에서 AO는 세포막을 표지화하고 DAPI는 사세포/죽어가는 세포의 핵산을 표지화하여 - 함께 샘플 내 생존 세포 대 비-생존 세포를 사진으로 감별할 수 있도록 한다. 그런 다음 NC250 소프트웨어는 결과 이미지를 분석하고 생존 세포 농도를 포함한 세포 수를 보고한다. 투입 세포당 특정 세포의 수율을 계산하기 위해 총 생존 수에 주어진 세포 유형의 빈도(%)를 곱했다. 예를 들어, 투입 $CD34^+$ 세포당 $CD10^+$ 세포의 수율을 계산하기 위해, 먼저 생존 세포 수에 유세포분석에 의해 수득한 $CD10^+$ 를 곱한다. 그런 다음 이 숫자를 투입 세포(투입 $CD34^+$ 세포의 경우) 수로 나누어 최종 값을 수득했다. 투입 $CD34^+$ 세포 수는 한 웰에서 배양된 총 세포에 세포 분리 후 $CD34^+$ 세포의 빈도를 곱하여 수득했다.

[0157] 실시예 3: 제대혈 유래 $CD34^+$ HSPC로부터 B 세포 전구체 유도

- [0158] 실시예 1의 농축된 $CD34^{+}$ HSPC는 유도 배지에서 B 세포 전구체로 분화되었다. 유도 배지는 전형적으로 기본 배지, 예컨대 StemSpan™ SFEMII(STEMCELL Technologies, 카탈로그 #09655) 및 다양한 단계별 사이토카인 및 성장 인자를 포함했다. 유도 배지의 초기 반복은 SCF, TPO, FLT3L 및 IL-7을 포함했고, 실험은 이러한 인자들의 상이한 조합을 테스트하여 수행했다(도 2, 도 3 및 도 6).
- [0159] 간략하게 설명하면, pop2 세포는 본질적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 농축된 $CD34^{+}$ HSPC 집단으로부터 분류되었고, 테스트된 유도 배지 제제에 24-웰 플레이트의 웰당 5000개의 세포를 파종했다. 상이한 배지 제제에서 배양한 지 14일 후, 산출 세포를 유세포분석에 의해 $CD10^{+}$ (도 2A) 및 $CD19^{+}$ (도 2B) 세포 빈도 및 수율에 대해 분석했다.
- [0160] 제대혈 유래 $CD34^{+}$ HSPC로부터 B 세포 전구체를 유도하기 위한 유도 배지에는 TPO가 필요하지 않은 것으로 관찰되었다. TPO가 유도 배지에 필요하지 않다는 것을 확인한 후, 이러한 유도 배지에 첨가된 다른 사이토카인(예컨대, IL-3 및/또는 IL-6)의 효과를 테스트했다.
- [0161] 간략하게 설명하면, pop2 세포는 본질적으로 상기 기재된 바와 같이 $CD34^{+}$ HSPC의 농축된 집단으로부터 분류하고, 파종하고, 배양했다. 상이한 배지 제제에서 배양한 지 14일 후, 산출 세포를 총 배수 확장(도 3A), $CD10^{+}$ 세포 빈도 및 수율(도 3B) 및 $CD19^{+}$ 세포 빈도 및 수율(도 3C)에 대해 유세포분석으로 분석했다. 유세포분석에 의해 분석된 14일차 세포의 예시적인 플롯은 도 3D에 제시된다.
- [0162] 유도 배지에 조합이 아닌 IL-3 또는 IL-6 중 어느 하나를 단독으로 포함시키면 pop2 세포로부터 $CD10^{+}$ 세포의 수율이 개선되었고, IL-3 단독은 pop2 세포로부터 $CD19^{+}$ 세포의 수율을 개선시키는 것으로 관찰되었다.
- [0163] 상기에 수행되고 보고된 것과 유사한 실험은 pop1 세포를 사용하여 수행했고, 이는 실시예 1에 기술된 바와 같이 농축, 분류 및 파종되었다. 상이한 배지 제제에서 배양 14일 후, 산출 세포를 유세포분석에 의해 총 배수 확장(도 3E), $CD10^{+}$ 세포 빈도 및 수율(도 3F), 및 $CD19^{+}$ 세포 빈도 및 수율(도 3G)에 대해 분석했다. 유세포분석에 의해 분석된 14일차 세포의 예시적인 플롯은 도 3H에 제시된다.
- [0164] IL-3 또는 IL-6을 단독으로 또는 조합으로 포함시키면, 유도 배지에서 14일 후 pop1 세포로부터 $CD10^{+}$ 세포의 수율이 개선되는 것으로 관찰되었다.
- [0165] 실시예 4: 제대혈 유래 B 세포 전구체로부터 $CD19^{+}$ B 계통 세포의 분화
- [0166] B 세포 전구체는 본질적으로 실시예 3에 기술된 바와 같이 $CD34^{+}$ HSPC(즉, pop2 세포)로부터 유도되고, 하기 기술된 바와 같이 $CD19^{+}$ B 계통 세포로 분화되었다.
- [0167] 초기 실험에서, pop2 세포는 대조군 유도 배지(예컨대, SUPPLCTL)에서 14일 동안 배양했다. 14일 후, 세포는 다양한 분화 배지 제제로 옮겨 추가 14일 동안 배양했다. 테스트된 분화 배지 조건은 도 4에 표시된 바와 같이, SCF, TPO, IL-7 또는 FLT3L 중 하나 또는 그 이상이 결여되도록 제형화했다. 28일차 세포는 $CD10^{+}$ 세포(도 4A), $CD19^{+}$ B 계통 세포(도 4B) 및 $CD19^{+}$ 세포의 함수로서 IgM^{+} 세포(도 4C)의 빈도 및 수율에 대해 유세포분석으로 분석했다.
- [0168] 모든 분화 배지 제제는 분석된 각 세포 집단에 걸쳐 상당한 빈도 및 수율을 초래하는 것으로 관찰되었다.
- [0169] 후속 실험에서, 실시예 3에 기술된 유도 배지를 14일 동안 사용하여 pop2 세포로부터 B 세포 전구체를 유도했다. 14일 후, 산출 세포를 수확하고, 계수하고, $CD10$ 및 $CD19$ 의 발현에 대해 유세포측정으로 분석하고, 24웰 플레이트의 웰당 $1-2 \times 10^5$ 개 세포로 상기 문단에 기술된 바와 같이 분화 배지에 다시 파종했다. 배양 2주 후, 모든 조건이 수확되고, 계수되고, $CD10$, $CD19$ 및 IgM 의 발현에 대해 유세포측정에 의해 분석되었다(데이터는 미제시). 유도 배지에 IL-6의 포함은 분화 배지와 상승작용하여 가장 높은 수의 $CD19^{+}$ B 계통 세포를 산출하는 것으로 관찰되었다(데이터는 미제시).
- [0170] 상기 발견을 확인하기 위해, pop2 세포를 유도 배지 제제(실시예 3 및 본 실시예에 기술된 바와 같음)에서 14일

동안 배양한 다음, 산출 세포를 수확하고, 계수하고, 유세포분석으로 CD10 및 CD19와 같은 마커의 발현에 대해 분석했다. 14일차 세포는 분화 배지 제제(이 실시예에서 위에 설명됨)에서 추가 14일 동안 배양하고, 그 다음 수확하고, 계수하고, 유세포분석으로 CD10(도 5A), CD19(도 5B), 및 IgM(도 5C)의 발현(및 빈도 및 수율)에 대해 분석했다. pop1 세포도 마찬가지로 배양하고 CD10(도 5D), CD19(도 5E) 및 IgM(도 5F)의 발현(및 빈도 및 수율)에 대해 유세포분석으로 분석했다.

[0171] pop2 세포의 경우, 개발된 유도 및 분화 프로토콜은 투입 세포당 대략 150개의 $CD19^+$ B 계통 세포의 강력한 수율을 생성할 수 있었다. 또한, 투입 세포당 대략 10개의 IgM^+ 세포가 생성될 수 있었다. 농축된 $CD34^+$ HSPC의 5%만이 pop2 세포에 해당한다는 점을 고려하면, 무혈청 및 피더 세포 무함유 조건에서의 이러한 효율은 상당한 것이다. pop1 세포로부터 시작하는 것 외에 pop2 세포의 정황에서 관찰되는 바와 같이, 개발된 유도 및 분화 프로토콜은 투입 세포당 대략 300개의 $CD19^+$ B 계통 세포의 강력한 수율을 생성할 수 있었다(도 5E). 또한, 투입 세포당 5개 초과 IgM^+ 세포가 생성될 수 있었다(도 5F).

[0172] 본 실시예에서 수행되고 상기에 보고된 실험과 유사하게, 실시예 1에 기술된 바와 같이 pop1 세포를 농축하고 단리한 다음, SCF는 결여되지만 IL-3 또는 IL-6을 단독으로 또는 조합으로 포함하는 유도 배지 제제에서 24 웰 플레이트의 웰당 5000개의 세포를 파종했다. 14일 후, 산출 세포를 수확하고, 계수하고, CD10 및 CD19의 발현에 대해 유세포분석으로 분석하고, 분화 배지(본 실시예의 상기에 기술됨)에 $1-2 \times 10^5$ 개 세포/웰씩 다시 파종했다. 배양 14일 후, 모든 조건마다 수확하고, 계수하고, CD10, CD19 및 IgM의 발현에 대해 유세포분석으로 분석했다(데이터는 미제시). 전술한 바와 같이, 28일차 세포를 수확하고, 계수하고 유세포분석으로 CD10(도 6A) 및 CD19(도 6B)의 발현에 대해 분석했다.

[0173] pop2 세포의 정황에서, 하지만 이 경우 pop1 세포로부터 시작하여 관찰되는 바와 같이, 상이한 유도 배지 제제에 IL-6의 포함은 분화 배지와 상승작용하여 $CD19^+$ B 계통 세포의 가장 높은 빈도 및 수율을 산출했다.

[0174] $CD19^+$ B 계통 세포 및 IgM^+ 세포의 빈도 및 수율을 증가시키기 위한 노력의 일환으로, 분화 배지에서 배양 기간을 14일에서 28일로 연장시켰다. 42일 프로토콜(유도 배지에서 14일, 분화 배지에서 28일) 후, pop1-유도 $CD19^+$ B 계통 세포의 빈도 및 수율(도 7A)과 $CD19^+$ 세포 중 IgM^+ 세포의 빈도(도 7B)가 현저하게 증가했다. pop1 세포는 $CD34^+$ HSPC의 농축 집단에서 pop2 세포보다 더욱 우세하지만, 무혈청 및 피더 세포 무함유 조건을 사용하여 달성된 결과는 그럼에도 불구하고 상당한 것이다.

[0175] 각각의 시작 세포 집단(벌크 $CD34^+$, pop1 및 pop2)에 대해, $CD19^+$ B 계통 세포의 빈도 및 수율에 대한 종합적인 요약은 도 8에 도시된다. 각 세포 집단은 실시예 3 및 본 실시예에 기술된 바와 같이 유도 배지 조건으로 14일 동안 별도로 처리했고, 그 다음 본 실시예에 기술된 바와 같이 14일 동안 분화 배지 조건으로 옮겨 배양했다. $CD34^+$ 세포의 시작 집단에 관계없이, 배지를 사용하고 본 개시내용의 방법을 실시함으로써 $CD19^+$ 세포의 현저한 빈도 및 수율이 달성될 수 있음이 분명하다.

[0176] 실시예 5: 체대혈 유래 $CD19^+$ B 계통 세포의 IgM^+ 세포로의 하류 분화 최적화

[0177] IgM^+ 세포의 산출량은 분화 배지에서 연장된 배양 기간으로 개선될 수 있지만, IgM^+ 세포 산출량을 향상시키는 다른 방법이 탐구되었다. 구체적으로, IgM^+ 세포 산출량을 향상시키기 위해 배양 배지 첨가제의 효과를 조사했다.

[0178] 간략하게 설명하면, 24웰 플레이트의 웰당 5000개의 pop2 세포를 (도 3에서와 같이) 유도 배지 제제에 파종했고, 배양 14일 후 산출 세포를 24웰 플레이트의 웰당 1 내지 2×10^5 개 세포로 유도 배지(도 4 및 도 5에서와 같이)에 다시 파종하여 추가 14일 동안 배양했다. 배양 28일 후, 산출 세포는 24웰 플레이트의 웰당 1 내지 2×10^5 개 세포로 다시 파종하고, 다양한 하류 분화 배지: 사이토카인 또는 성장 인자 없이 기본 SFEM II 배지(STEMCELL Technologies)("DDM"); CD40L 및 사이토카인의 조합이 보충된 SFEMII(STEMCELL Technologies) 기본 배지("DDMa"); 및 CD40L 및 사이토카인의 조합이 보충된 분화 배지("DDMb")에서 7일 동안 배양했다. 35일 프로토콜 후, 산출 세포를 수확하고, 계수하고, CD19(도 9A) 및 IgM(도 9B)의 발현에 대해 유세포 분석으로 분석

했다. 35일차 산출 세포에 의한 IgM 및 IgG의 분비는 ELISPOT(ImmunoSpot Human IgM/IgG-B-Cell Specific Double-Color ELISPOT 키트)에 의해 확인되었다. StemSpan™ SFEMII 기본 배지 대조군(도 9Ci)과 비교하여, CD40L이 보충된 하류 분화 배지에서는 IgM(적색/회색 점) 및 IgG(청색/흑색 점) 둘 다의 증가된 수가 검출되었다(도 9Cii 및 도 9Ciii). 실제로, CD19 및 IgM 발현 세포의 산출량(수율 측면에서)은 CD40L 함유 조건에서 달성되었다.

[0179] pop2 세포의 경우, 벌크 세포로부터 시작하여 IgM⁺ 세포를 분화시키기 위한 배양 배지 첨가제의 효과를 조사했다. 벌크 세포는 pop2 세포에 대해 기술된 바와 같이 파종하고, 배양하고, 분석했다(도 9D 및 도 9E). pop2 세포에 대해 관찰된 바와 같이, CD40L 함유 하류 분화 배지 체제에서 벌크 세포는 대조군 조건과 비교하여 CD19- 및 IgM-발현 세포의 산출량(수율 측면에서)의 현저한 증가를 나타냈다.

[0180] 실시예 6: PSC의 유지

[0181] hPSC를 사용하여 B 세포 전구체를 유도한 경우, 이를 mTeSR™1(STEMCELL Technologies), TeSR™-E8(STEMCELL Technologies) 또는 mTeSR™ Plus(STEMCELL Technologies) 배지에서 Matrigel™ 코팅 플레이트 상에서 제조업체 권장에 따라 6-8일 동안 유지시켰다. 완전 배지 변경은 필요에 따라 수행했다. PSC 콜로니는 유지 배양물에서 새로 코팅된 Matrigel™ 플레이트 상으로 덩어리로 계대배양했다. PSC가 하류 검정에 사용된 경우, 콜로니는 ACCUTASE™(STEMCELL Technologies)를 사용하여 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 해리시켜 단세포 현탁액을 수득했다.

[0182] 실시예 7: PSC 응집체의 형성 및 분화

[0183] 실시예 6에 따라 단세포 현탁액을 수득하기 전에, 부착 방지 행균 용액(STEMCELL Technologies)을 사용하여 마이크로웰 장치에 대한 세포의 부착을 감소시키는 것을 포함하여, 제조업체의 권장에 따라 24-웰 또는 6-웰 Aggrewell™ 400 플레이트(STEMCELL Technologies)를 준비했다. 권장된 인큐베이션 후, 부착 방지 행균 용액을 버리고 각 웰을 15mM HEPES가 포함된 DMEM-F12의 동일한 부피로 한 번 행균처리했다.

[0184] 마이크로웰 장치를 준비한 후, 실시예 6에 따라 해리된 hPSC를 EB 형성 배지(STEMdiff™ 조혈-EB 보충제 A가 보충된 STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지(STEMCELL Technologies)) 및 10 μM Y-27632(STEMCELL Technologies)에서 마이크로웰 장치의 하나 이상의 웰에 파종했다. 마이크로웰 장치의 6웰 형식을 사용하는 실시형태에서, 2.5mL의 EB 형성 배지를 마이크로웰 장치의 웰에 첨가했다. 다음으로, EB 형성 배지에 있는 세포 현탁액(약 1.4×10^6 개 세포/mL) 2.5mL를 추가로 웰에 첨가하고 마이크로웰 장치를 잠시 원심분리한 후 37°C에서 인큐베이션했다. 24웰 형식의 마이크로웰 장치를 사용하는 경우, 웰당 부피는 이에 따라 2mL/웰로 줄여야 한다. 마이크로웰 장치의 각 웰에서 최종 세포 농도는 24웰 플레이트의 경우 약 3×10^5 개 세포/mL, 6×10^5 개 세포/웰, 또는 6웰 플레이트의 경우 7×10^5 개 세포/mL, 또는 3.5×10^6 개 세포/웰이어야 한다.

[0185] 실시예 8: 조혈 전구 세포로 응집체의 분화

[0186] 응집체는 실시예 7에 기술된 바와 같이 준비했고, 응집체를 형성한 후 2일차에 마이크로웰 장치의 각 웰에 있는 배지 2.5mL를 조심스럽게 제거하여 응집체를 건드림이 없이 폐기했다. 2.5mL 부피의 신선한 EB 배지 A(STEMdiff™ 조혈-EB 보충제 A(STEMCELL Technologies)가 보충된 STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지(STEMCELL Technologies))를 각 웰에 첨가하고 마이크로웰 장치를 37°C에서 인큐베이션했다.

[0187] 3일차에, 중배엽 중간체(예를 들어, 중배엽 전구체)가 형성되면, 마이크로웰 장치의 각 웰에 있는 배지 2.5mL를 조심스럽게 제거하여 응집체를 건드림이 없이 폐기했다. STEMdiff™ 조혈-EB 보충제 B(STEMCELL Technologies)가 보충된 2.5mL 부피의 신선한 EB 배지 B(STEMdiff™ 조혈-EB 기본 배지(STEMCELL Technologies))를 각 웰에 첨가하고 37°C에서 인큐베이션하여 중배엽 전구 세포를 조혈 전구 세포로 분화시켰다.

[0188] 5일차에, 마이크로웰 장치의 각 웰에서 응집체를 수확하고 37 μm 가역 필터(STEMCELL Technologies)를 통과시켜 그 표면 상에 응집체를 단리시켰다. 새로운 튜브 상에 필터를 뒤집어 놓고 메쉬에 대해 2.5mL/웰의 새로운 EB 배지 B를 직행하게 하여 응집체의 여액을 새로운 튜브에 침착시켰다(마이크로웰 장치의 24웰 형식의 경우 1mL/웰이 사용됨). 이렇게 얻은 응집체는 전체 부피를 비조직 배양물-처리된 플레이트에 첨가하기 전에 부드럽게 재현탁시킨 다음 37°C에서 인큐베이션했다. 6웰 플레이트의 각 웰에 7일차에 2.5mL의 신선한 EB 배지 B(또는 24웰 플레이트의 경우 1mL/웰)를 채운 다음, 37°C에서 인큐베이션했다. 10일차에, 응집체를 파괴하지 않도록 주의하면서 신선한 EB 배지 B로 배지 절반을 교체한 다음, 추가 2일 동안 37°C에서 인큐베이션했다.

[0189] 실시예 9: 조혈 전구 세포의 농축

[0190] 실시예 8의 응집체를 각 웰에서 수확하여 개별 15mL 튜브로 옮겼다. 튜브를 300xg에서 5-10분 동안 원심분리했다. 상층액을 흡인하고 콜라게나제 II형 - 2500U/mL(STEMCELL Technologies)(Cat#07418) 1mL를 각 튜브에 첨가하고 37°C에서 20분 동안 인큐베이션했다. 그 후, TryPLE™ Express 3mL를 첨가하고 각 튜브를 추가 20분 동안 인큐베이션했다.

[0191] 인큐베이션 후, 각 튜브에 6mL의 DMEM/F12를 채우고 37 μ m 필터를 통해 여과했다. 용출액은 300xg에서 5 내지 10분 동안 원심분리하고 상층액을 폐기했다. 펠릿화된 세포를 CD34⁺ 농축 프로토콜(EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit II, STEMCELL Technologies)로 처리했다. 자기 분리 횟수가 4회에서 2회로 줄어든 것을 제외하고는 CD34⁺ 농축에 대한 제조업체의 권장을 따랐다. H1, H9, WLS-1C, STiPS-M001 및 STiPS-F016 PSC 라인은 CD34⁺ 조혈 전구 세포로 효율적으로 분화되었다.

[0192] 실시예 10: hPSC 유래 CD34⁺ HSPC로부터 B 세포 전구체 유도

[0193] 실시예 9의 농축된 CD34⁺ HSPC를 24웰 플레이트의 웰당 2.5×10^4 개 세포의 밀도로 파종하고, 유도 배지에서 세포 외 기질 단백질 또는 세포 부착 분자, 또는 MS-5 간질 세포의 다양한 코팅의 존재 하에 14일 동안 배양했다. 유도 배지는 전형적으로 실시예 3 및 4에서와 같이 기본 배지, 예컨대 StemSpan™ SFEM II(STEMCELL Technologies), 및 다양한 단계별 사이토카인 및 성장 인자를 포함했다. 유도 배지의 초기 반복물은 IGF-1을 추가로 포함시켜, 위에 기술된 바와 같이 제형화했고, 14일 후 산출물인 H9 유래 세포는 CD10 및 CD19 발현에 대해 분석했다.

[0194] hPSC가 피브로블라스트 또는 콜라겐1로 코팅된 웰에서 배양되었을 때 B 세포 전구체의 가장 높은 빈도가 생성되었으며, 이는 Matrigel™ 코팅(도 10A) 또는 MS-5 간질 세포(데이터는 미제시)와 같은 보다 전통적인 접근법을 능가하는 것이었다. 또한, hPSC가 세포외 기질로 코팅되지 않거나 VCAM-1 및 SCF-Fc 중 하나 또는 둘 다로 코팅된 웰에서 배양되었을 때 B 세포 전구체의 상당한 빈도가 생성되는 것으로 관찰되었다(도 10B).

[0195] PSC 유래 CD34⁺ HSPC 세포는 이러한 세포에서 마커 전사 인자의 발현을 제대혈 유래 CD34⁺ HSPC 세포에서의 발현 수준과 비교함으로써 B 계통 세포로 분화시키는 능력에 대해 조사했다. B 세포 특정 전사 인자 EBF1 발현의 상대적인 배수 변화는 PSC 유래 CD34⁺ HSPC 및 제대혈 유래 CD34⁺ HSPC 세포 모두에서 시간이 지남에 따라 감소하는 것으로 관찰되었다(도 10C). B 세포 전용 인자 PAX5 발현의 배수 변화는 PSC 유래 CD34⁺ HSPC 및 제대혈 유래 CD34⁺ HSPC 세포 모두에서 분화 프로토콜 동안 증가했는데(도 10D), 이는 PSC 유래 분화 세포가 제대혈-유래 대응물과 유사한 전사 프로그램을 가졌음을 시사한다.

[0196] 실시예 11: hPSC 유래 B 세포 전구체로부터 CD19⁺ B 계통 세포의 분화

[0197] VCAM-1 및/또는 SCF-Fc 코팅 또는 코팅되지 않은 플레이트에서 실시예 10에 기술된 바와 같이 생성된 B 세포 전구체를 VCAM-1 코팅된 플레이트에 24-웰 플레이트의 웰당 5.0×10^4 개 세포로 다시 파종하고, 본질적으로 실시예 4에 기술된 것과 같지만 IGF-1을 추가로 포함하는 분화 배지에서 14일 동안 배양했다. 28일차에 H9 유래 세포를 수확하고 CD10 및 CD19의 발현(도 10E) 및 CD19 및 CD20의 발현(도 10E)에 대해 유세포분석으로 분석했다.

[0198] CD19 발현성 H9 유래 세포의 집단은 CD20도 발현했는데, 이는 기술된 무혈청 및 피더 세포 무함유 조건이 CD19⁺ B 계통 세포를 생성할 수 있음을 시사한다.

[0199] 실시예 12: 코팅 존재 하에 제대혈 유래 CD34⁺ HSPC로부터 B 세포 전구체 및 CD19⁺ B 계통 세포의 생성

[0200] pop1 세포로부터 B 세포 전구체를 유도하고 B 세포 전구체를 CD19⁺ B 계통 세포로 분화시키는 상황에서 (무코팅과 비교하여) 세포외 기질 단백질 코팅 또는 세포 부착 분자 코팅의 효과를 또한 테스트했다.

[0201] 간략히 설명하면, pop1 세포는 실시예 1에 기술된 바와 같이 분류하고 본질적으로 실시예 3에 기술된 바와 같이, TPO 무함유 유도 배지에 24웰 플레이트의 웰당 5000개 세포의 밀도로 파종했다(도 2). 상이한 코팅의 존재 하에 유도 배지에서 14일간 배양한 후, 각 산출 세포 집단을 수확하고 CD10⁺(도 11A) 및 CD19⁺(도 11B) 빈도

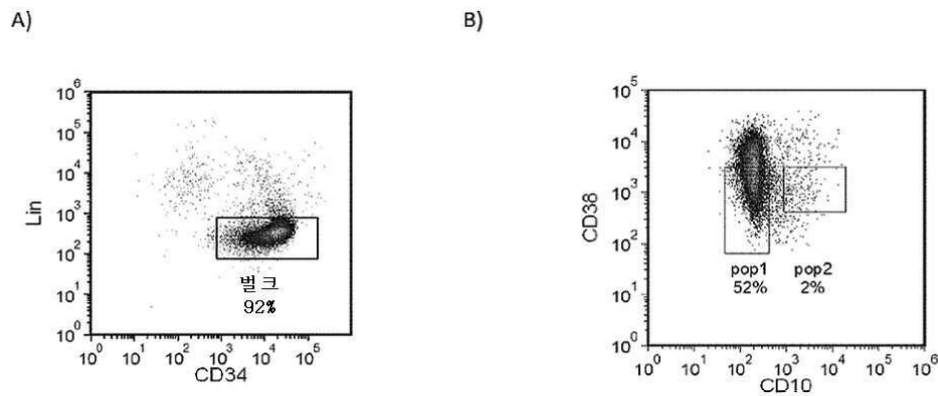
및 수율에 대해 유세포 분석으로 분석했다. 다음으로, 14일차에 세포를 24웰 플레이트의 해당 코팅된 웰에 웰당 1 내지 1.5×10^5 개 세포로 다시 파종하고, 본질적으로 실시예 4에 기술된 바와 같이 분화 배지의 존재 하에 배양했다. 28일차에 세포를 수확하고, $CD19^+$ 세포 빈도 및 수율(도 11C) 및 $CD19^+$ 세포 중에서 IgM^+ 세포 빈도(도 11D)에 대해 유세포분석으로 분석했다.

[0202]

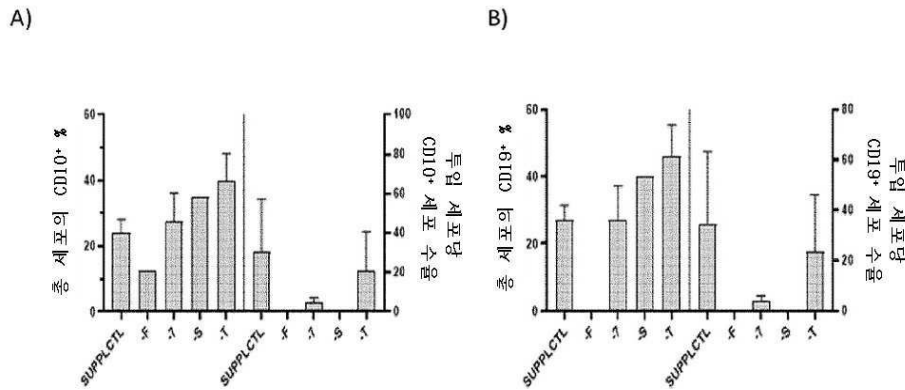
테스트된 코팅은 14일차에 B 세포 전구체의 유도에 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 14일차에 $CD19$ 발현 세포의 생성에 양성적으로 영향을 미치지 않았다. 흥미롭게도, 테스트된 코팅 중 소정의 것은 14일차에 $CD19$ 발현 세포의 생성에 해로울 수 있는 것으로 나타났다. 28일차에 $CD19^+$ B 계통 세포의 생성 및 28일차에 IgM 발현 세포의 생성에 관해 동일한 일반적인 결론이 도출될 수 있었다.

도면

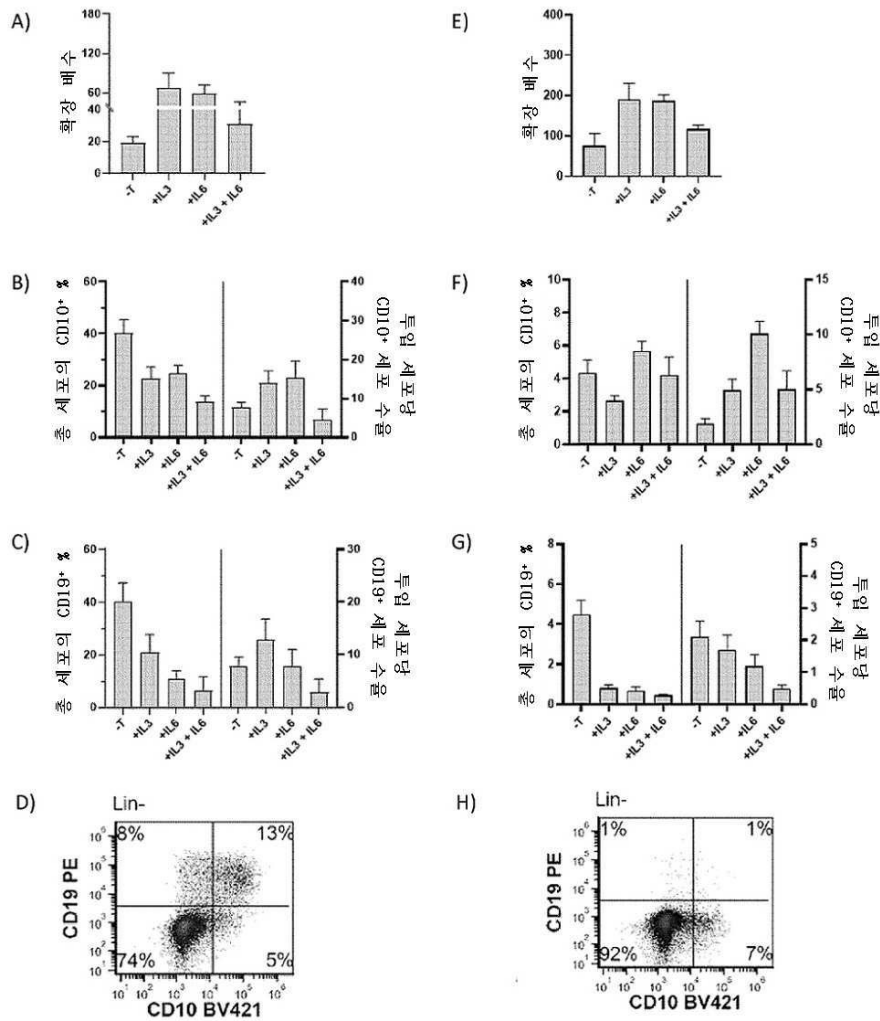
도면1



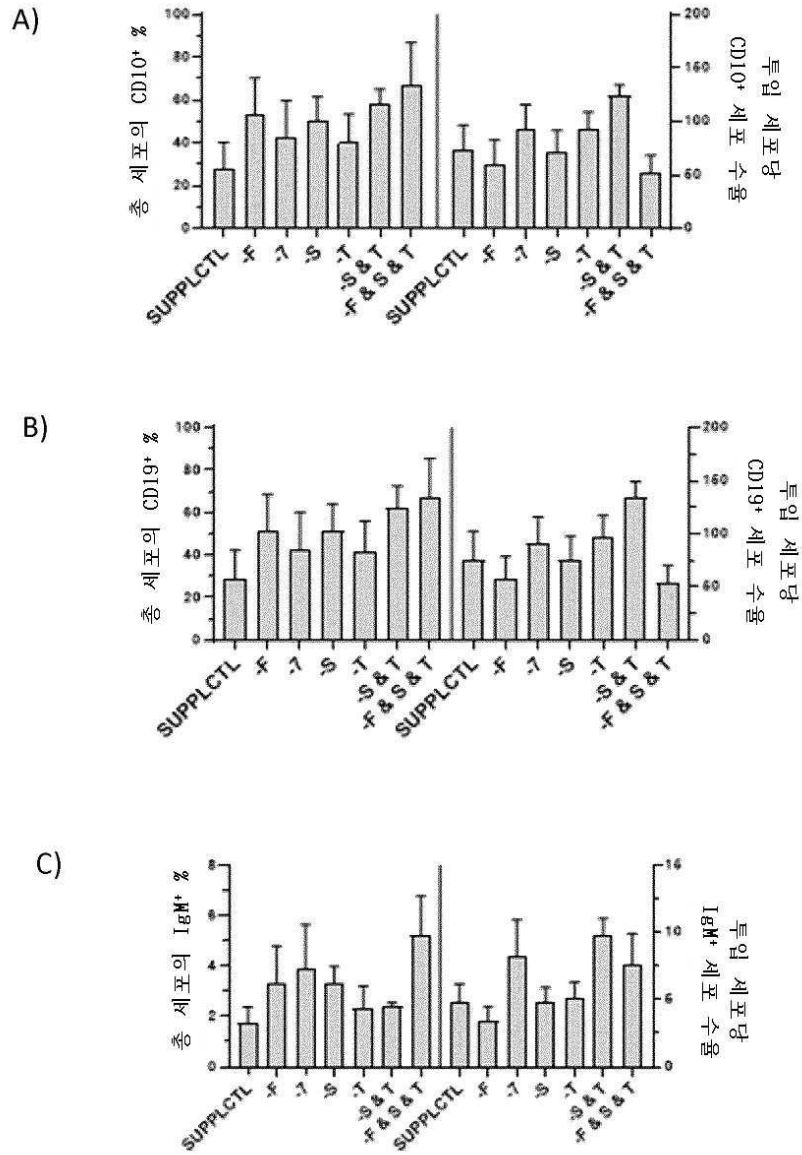
도면2



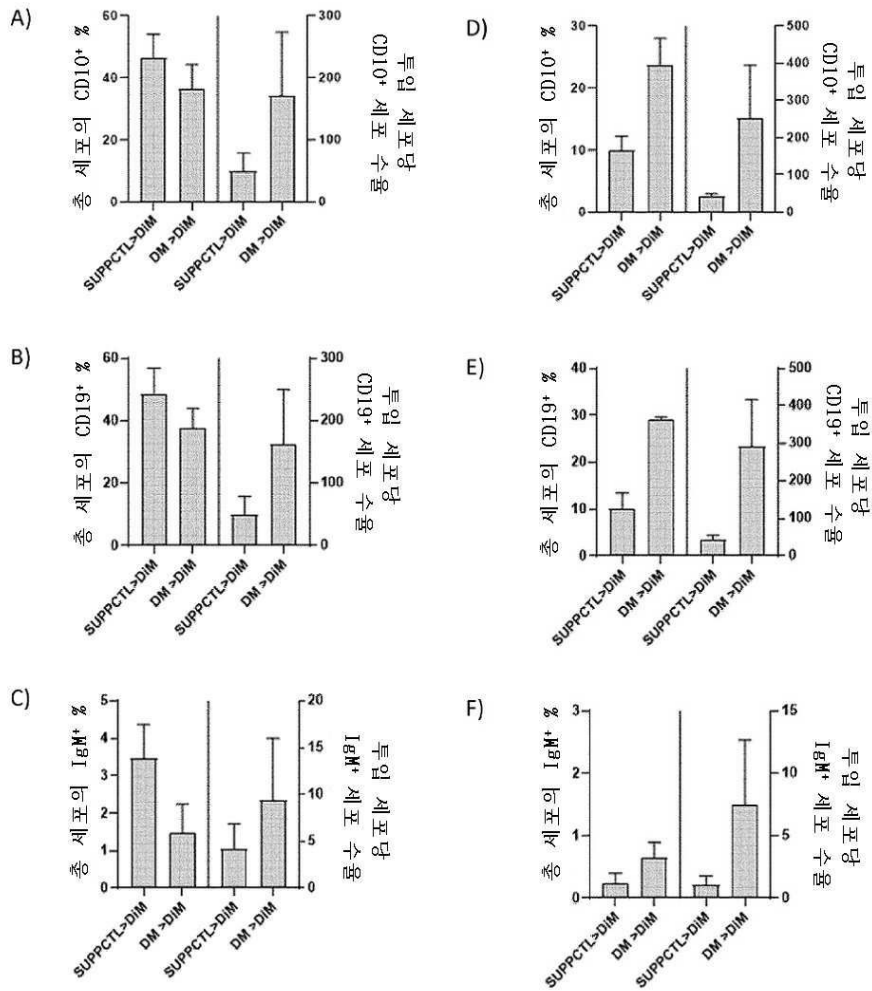
도면3



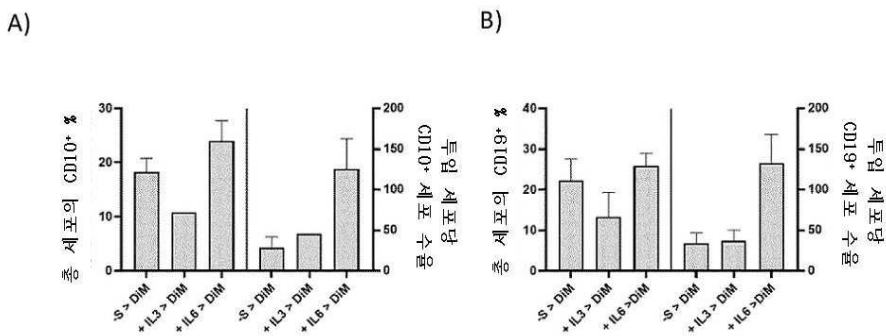
도면4



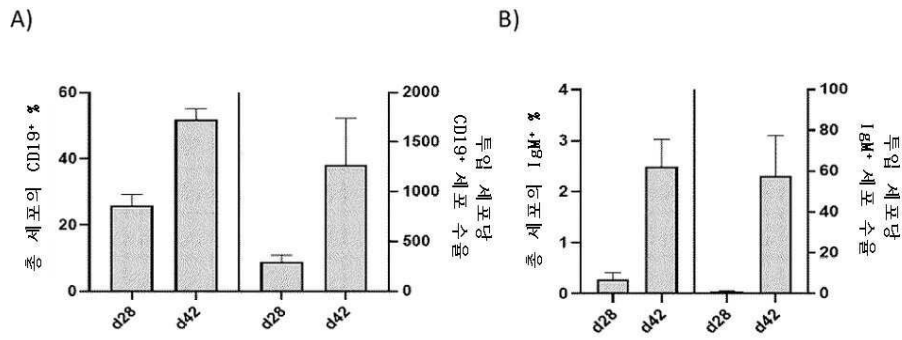
도면5



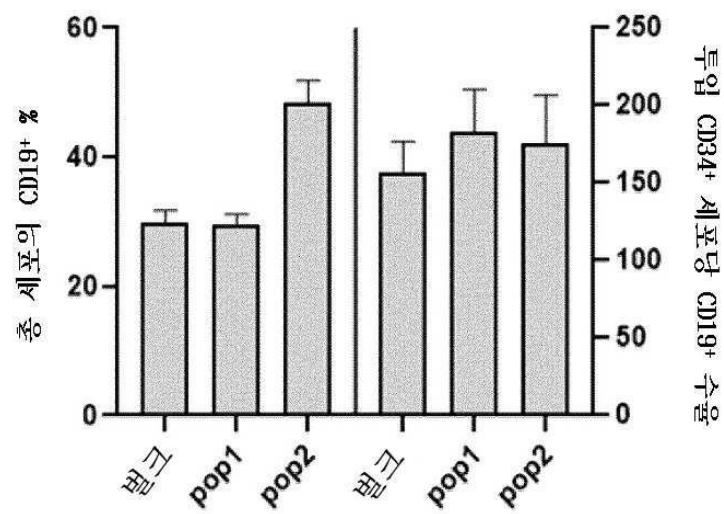
도면6



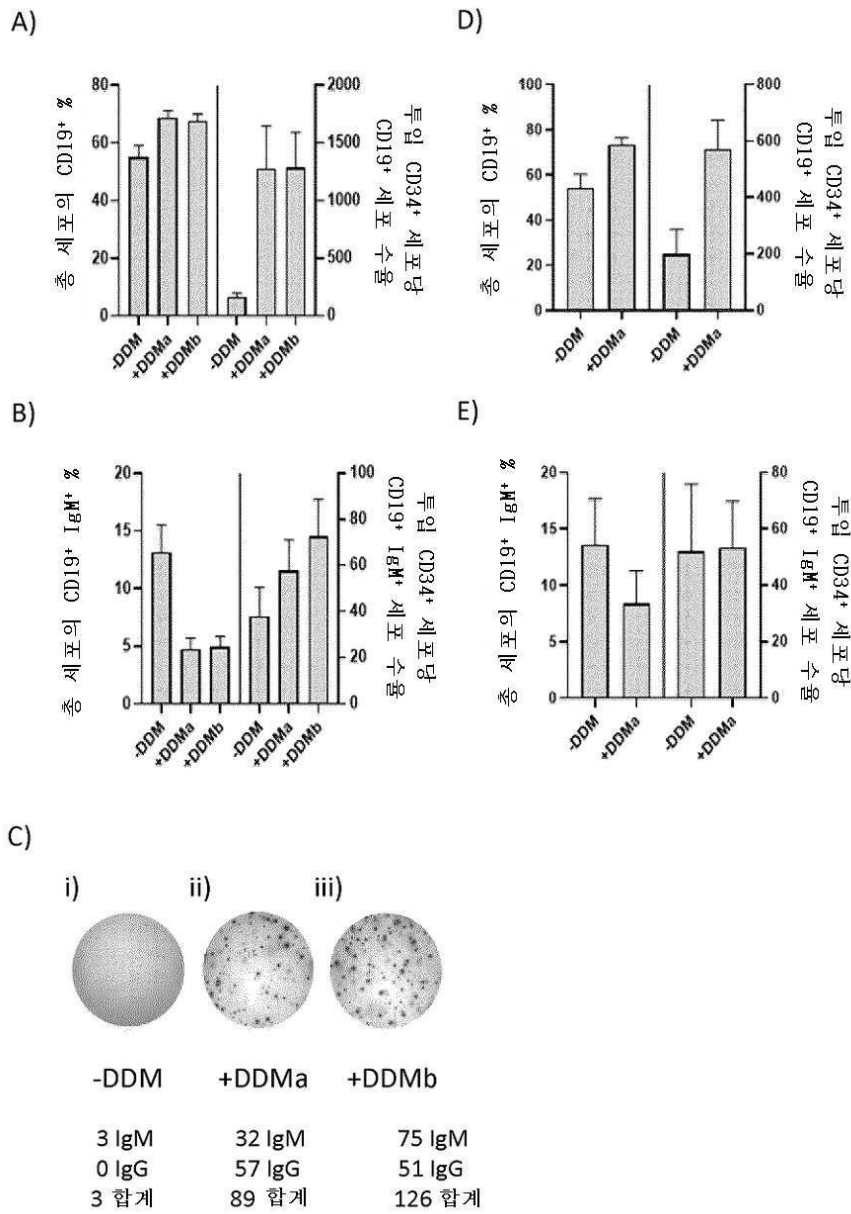
도면7



도면8



도면9



도면11

