(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월24일
(11) 등록번호 10-1860960
(24) 등록일자 2018년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2012-7026894
(22) 출원일자(국제) 2011년03월17일
심사청구일자 2016년02월23일
(85) 번역문제출일자 2012년10월15일
(65) 공개번호 10-2012-0138810
(43) 공개일자 2012년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2011/000982
(87) 국제공개번호 WO 2011/114237
국제공개일자 2011년09월22일
(30) 우선권주장
12/725,877 2010년03월17일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090091800 A*
Nat Biotechnol. 2006 Feb;24(2):185-7
Nat Methods. 2006 Aug;3(8):637-46.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
트리그베이슨 칼
스웨덴 드주르숄름 18261 로케바겐 8에이
로딘 세르게이
스웨덴, 에스-11348 스톡홀름, 아이쥐에이치. 1202, 하가가탄 22
도모가츠카야 안나
스웨덴 로닌지 14462 센트랄바겐 8에이
(72) 발명자
트리그베이슨 칼
스웨덴 드주르숄름 18261 로케바겐 8에이
로딘 세르게이
스웨덴, 에스-11348 스톡홀름, 아이쥐에이치. 1202, 하가가탄 22
도모가츠카야 안나
스웨덴 로닌지 14462 센트랄바겐 8에이
(74) 대리인
청운특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 유성전

(54) 발명의 명칭 **다능성 인간 줄기세포의 증식을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

미분화된 상태에서 시험관 내에서 인간 배아 줄기 세포를 배양하기 위한 조성물 및 방법이 개시되었다.이러한 점에서, 인간 배아 줄기 세포는 재조합 라미닌-10(라미닌-511)로 코팅된 플레이트 상에서 배양될 때, 증식하며 그들의 다능성을 유지했다.

대 표 도 - 도1

도 . 1

명 세 서

청구범위

청구항 1

기질;

무손상 재조합 라미닌-511 (LN-511 또는 라미닌-10)을 포함하고, 동물 단백질과 지지세포가 모두 결여된 코팅제; 및

지지 세포가 결여되고, 인간 알부민 및 40 ㎍/㎖의 아스코르브산을 포함하는, 화학적으로 한정된 배지;

를 포함하며, 시험관 내에서 성장된 다능성 인간 줄기세포를 자가재생시킬 수 있는 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 배지는 성장인자를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 코팅제는 무손상 재조합 라미닌-511로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

무손상 재조합 라미닌-511 (LN-511 또는 라미닌-10)을 포함하고, 동물 단백질과 지지세포가 모두 결여된 코팅제를 포함하는 기질을 제공하는 단계;

상기 코팅제 상에 인간 줄기세포를 덩어리로 도포하는 단계;

상기 인간 줄기세포를 지지세포가 결여되고, 인간 알부민 및 40 ㎍/㎖의 아스코르브산을 포함하는, 화학적으로 한정된 배지에 노출시키는 단계; 및

상기 인간 줄기세포의 생장물로부터 새로운 줄기세포를 수득하는 단계;

를 포함하는 한정된 인체환경에서 새로운 줄기세포주를 생성하는 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 새로운 줄기세포는 미분화된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 새로운 줄기세포는 동질적인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 인간 줄기세포는 상기 코팅제 상에 단층을 형성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

청구항 5에 있어서,

상기 인간 줄기세포는 미분화된 배아줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

청구항 5에 있어서,

상기 방법은:

상기 새로운 줄기세포를 수확하는 단계;

상기 코팅제를 포함하는 제 2 기질 상에 상기 새로운 줄기세포를 재도포하는 단계;

상기 새로운 줄기세포를 지지세포가 결여되고 화학적으로 한정된 배지에 노출시키는 단계; 및

상기 새로운 줄기세포의 생장물로부터 정제된 줄기세포를 수득하는 단계;

를 더욱 포함하는 방법.

청구항 11

청구항 5에 있어서,

상기 배지는 성장인자를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

무손상 재조합 라미닌-511 (LN-511 또는 라미닌-10)을 포함하고, 동물 단백질과 지지세포가 모두 결여된 코팅제를 포함하는 기질을 제공하는 단계;

상기 코팅제 상에 인간 줄기세포를 덩어리로 도포하는 단계;

상기 인간 줄기세포를 지지세포가 결여되고, 인간 알부민 및 40 ㎍/㎖의 아스코르브산을 포함하는, 화학적으로 한정된 배지에 노출시키는 단계; 및

상기 줄기세포를 주기적으로 수확하고 재도포하는 단계;

를 포함하는 다능성 인간 줄기세포 자가재생을 유지하는 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 배지는 성장인자를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

청구항 14에 있어서,

상기 코팅제는 무손상 재조합 라미닌-511로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련출원에 대한 전후 참조

[0002] 본 출원은, 2007년 1월 4일자로 출원된 미국 가출원 제60/883,406에 대한 우선권을 주장하고 2008년 1월 4일자로 출원된 미국 특허출원 제11/969,620의 부분계속출원이며 2010년 3월 17일자로 출원된, 미국 특허출원 제12/725,877에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 상기의 모든 출원은 여기에 참조로서 전부 포함된다.

[0004] 본 발명은, 다양한 예시 구현에서, 일반적으로 시험관 내에서 성장된 다능성 또는 미분화된 인간 줄기세포의 부착, 증식 및 자가재생 유지를 가능하게 하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 이러한 인간 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 골수 줄기 세포 및 다능성 줄기 세포를 포함한다.

배 경 기 술

[0005] 줄기 세포는 분화된 세포가 순차적으로 유래 되는 미분화된 세포이다. 배아 줄기 세포는 3가지 모든 배엽의 세포로 분화하는 능력을 갖는 넓은 자가재생 능력 및 다능성을 갖는다. 이들은 치료 목적에 유용하며, 조직 대체 치료, 약물 스크리닝, 기능 유전체학 및 프로테오믹스용 세포의 무제한적 공급원으로 제공될 수 있다. (Skottman, H., Dilber, M. S., and Hovatta, O. (2006); The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines; FEBS Lett 580, 2875-2878).

[0006] 인간 배아 세포는 시험관 내에서 다능성 상태를 유지하기 위해서는 지지 세포(feeder cells) 또는 노긴(Noggin)과 같은 분화 억제제 및/또는 Matrigel™ 상에서 배양될 때에는 높은 도스(dose)의 염기성 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factor, FGF)를 필요로 한다(리뷰를 위하여, Skottman, H., Dilber, M. S., and Hovatta, O. (2006); The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines; FEBS Lett 580, 2875-2878 참조). 그러나, 피더 세포를 사용하는 것은 다수의 결점을 갖는다. 예를 들면, 피더 세포는 줄기 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스와 같은 병원체(pathogen)를 포함할 수 있다(Hovatta, O., and Skottman, H. (2005); Feeder-free derivation of human embryonic stem-cell lines; Lancet 365, 1601-1603; Skottman, H., Dilber, M. S., and Hovatta, O. (2006); The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines; FEBS Lett 580, 2875-2878).

[0007] 인간 배아 줄기 세포의 자가 재생을 지지하는 피더(feeder)-부재 시스템은 i)Matrigel™(Richards, M.,Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C., and Bongso, A. (2002); Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells; Nat Biotechnol 20, 933-936); (Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., and Carpenter, M. K. (2001); Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells; Nat Biotechnol 19, 971-974); (Xu, R. H., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T., and Thomson, J. A. (2005); Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells; Nat Methods 2, 185-190); 또는, ii) mouse feeders-derived extracellular matrix (Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M. D., and Lanza, R. (2005); Human embryonic stem cells derived without feeder cells; Lancet 365, 1636-1641)중 하나를 부착성 기질로 필요로 한다. 그러나, 이들 코팅제는 이종성(xenogenic) 기원이고, 따라서 FDA요건에 따라 임상에서 사용될 수 없다(Hovatta, O., and Skottman, H. (2005); Feeder-free derivation of human embryonic stem-cell lines; Lancet 365, 1601-1603). 이들 코팅제는 또한 정의된 시스템 및 비면역원성의 기준을 충족시키지 못하며, 이들의 중요성은 (Hovatta, O., and Skottman, H. (2005); Feeder-free derivation of human embryonic stem-cell lines; Lancet 365, 1601-1603; Skottman, H., Dilber, M. S., and Hovatta, O. (2006); The derivation of clinical-grade human embryonic stem cell lines; FEBS Lett 580, 2875-2878)에 개시되어 있다.

[0008] 상기와 같은 문제점 때문에, 화학적으로 한정되며 이종 비함유(xeno-free)된 인간 배아 줄기(hES)세포용 배양

환경이 중요한 목표가 되어왔다. 이러한 점에서, hES 세포 증식을 위한 기질에 관한 연구가 특히 중요했다. 세포외 메트릭스(Extracellular matrix, ECM) 단백질, 특히 기저막(BM) 성분은 인체 내에서 분화, 표현형 유지 및 많은 유형의 체세포 및 줄기세포의 기능에 관하여 생체 내 지위의 중요한 부분을 구성하며, 따라서 특정한 세포 타입의 자가재생에 대하여 잠재능력을 지닌다. 기저막 단백질 가운데, 라미닌은 세포분화, 부착, 증식, 및 이동에 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다.

[0009] 포유동물의 배아 발생 동안에, 수정된 난모세포는 먼저 2개의 세포로 분할되며, 이후 다시 세포가 복제되어 4세포의 배아를 생성한다. 상기 4세포기에서, 배아 세포는 세포막 단백질 및 새로운 결합조직의 분자(세포외 매트릭스)의 도움으로 함께 붙어 있다. 첫 번째로 나타난 세포외 매트릭스 분자는 라미닌 및 프로테오글리칸(proteoglycan)과 같은 기저막(basement membrane) 단백질이다. 순차적으로, 상기 배아 세포는 3가지 배엽인 외배엽, 내배엽 및 중배엽 세포로 분화하기 시작하여 형태형성(morphogenesis)을 개시한다. 라미닌과 같은 세포외 매트릭스 분자는 세포 표면 수용체와 상호작용하는 역할을 하고, 따라서 부착, 증식, 이동 및 분화와 같은 세포행동을 조절하며(Colognato, H., and Yurchenco, P. D. (2000); Form and function: the laminin family of heterotrimers; Dev Dyn 218, 213-234), 반면 타입 I, II, III 또는 IV 콜라겐과 같은 다른 세포외 매트릭스 성분은 1차적으로 기계적인 지지 기능을 한다(Aumailley, M., and Gayraud, B. (1998); Structure and biological activity of the extracellular matrix; J Mol Med 76, 253-265).

[0010] 라미닌은 알파, 베타, 및 감마 사슬로 이루어진 큰 삼량체(trimeric) 세포외 매트릭스 단백질이다. 5개의 다른 알파 사슬, 3개의 베타 사슬 및 3개의 감마 사슬이 존재하며, 인간 조직에서는 적어도 15개의 상이한 조합이 발견 되었다(Colognato, H., and Yurchenco, P. D. (2000); Form and function: the laminin family of heterotrimers; Dev Dyn 218, 213-234); (Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., et al. (2005); A simplified laminin nomenclature; Matrix Biol 24, 326-332). 이들 분자는 그 역사적인 발견에 기초하여 라미닌-1 내지 라미닌-15로 불리지만, 다른 명명법에서는 예컨대 알파-1, 베타-1 및 감마-1 사슬을 포함하는 라미닌-111(라미닌-1)과 같이 그 사슬의 조성에 기초하여 이소폼(isoform)을 기재한다(laminin nomenclature: (Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C., et al. (2005); A simplified laminin nomenclature; Matrix Biol 24, 326-332)).

[0011] 상기 라미닌 이소폼(isoform)은 조직 특이적인 위치 및 기능뿐만 아니라, 다양한 시간적-공간적인 발현 패턴을 나타낸다. 따라서, LN-211은 1차적으로 근육 세포 및 운동신경 시냅스의 기저막(BMs)에 존재하며, 반면 LN-111은 특정 상피 세포에 대한 초기 배아 및 그 이후 단계에는 제한된다. LN-332는 상피하 기저막(subepithelial BMs)에서 특이적으로 발견되고, LN-411은 상피하 기저막에 위치한다. LN-511은 편재되어 분포하며 초기 배아의 기저막과 대부분의 다 자란 조직(adult tissue)의 기저막에서 발견된다. 라미닌 사슬에서의 많은 돌연변이가 결합성 수포성 표리박리증(junctional epidermolysis bullosa)(α3, β3, γ2 사슬), 선천성 근이영양증(congenital muscular dystrophy)(α2 사슬), 신증후군(nephrotic syndrome)(β2 사슬), 모세혈관 질환(capillary disorder)(α4 사슬)과 같은 중대한 질병을 야기하며, 이는 특이적인 조직에서 세포계보(cell lineage)에 대한 이들의 중요한 역할을 입증한다. 편재하는(ubiquitous) 알파 5, 베타 1, 및 감마 1 사슬에 대한 유전자의 결실은 쥐(mice)에게 치사를 유발하며, 이는 생체 발달에 관한 이들의 필수적인 역할을 강조한다.

[0012] 라미닌은 초기 배아에서 확인된 최초의 세포외 매트릭스(ECM) 단백질 세포이며, 라미닌 사슬은 쥐 배아의 2세포기때 세포 표면에서 관찰되었다. 배아 줄기(ES) 세포의 자연적인 기원인 포배(blastocyst)의 내세포괴(inner cell mass)는 라미닌 알파 5(α5) 사슬을 포함하는 것으로 밝혀졌다.

[0013] 세포외 매트릭스(ECM) 단백질이 시험관 내에서 인간 배아 줄기 세포(hES) 배양을 위한 코팅 기질(coating substrata)로 사용된 많은 연구가 있으나, 그 경우 세포외 매트릭스 단백질의 한정되지않은(undefined) 혼합물 또는 한정되지않은 배지가 사용되었거나, 모든 필요한 분석이 이루어질 만큼 충분히 길게 실험이 수행되지 않았다. 지금까지 인간 배아 줄기 세포에 사용되는 가장 성공적인 지지세포 결여 코팅 물질은 마트리겔(Matrigel)이며, 이는 복합 종양(complex tumor)이고 쥐 엔젤브레스-홀름-스웜(murine Engelbreth-Holm-Swarm, EHS) 육종 종양 조직으로부터 얻어진 기저막-유사(BM-like) 추출물이다. 마트리겔은 쥐 LN-111, 타입 IV 콜라겐, 퍼레칸(perlecan) 및 니도겐(nidogen)을 주로 함유할 뿐만 아니라, 성장인자와 세포 단백질을 포함한 다양한 양의 기타 물질을 함유하므로, 그 조성이 한정되지 않으며 각 배치(batch) 별로 다양하다. 이러한 가변성은 과학적 결과의 재현불가능성(irreproducibility)을 야기하며, 상기 기질이 동물 기원이기 때문에 마트리겔을 인간 세포

치료용 인간 배아줄기 세포의 증식 및 유지를 위해 사용할 수 없게 한다.

[0014] 대부분의 라미닌 이소폼(isoform)은 세포외 매트릭스 단백질과의 광범위한 상호결합 때문에 조직으로부터 자연 상태로 추출하거나 정제하기가 어렵거나 불가능하며, 또한 케라티노사이트(keratinocytes) 및 내피 세포와 같은 세포로부터 미량이 생산될 뿐이다. 최근에서야, LN-332, LN-411 및 LN-511와 같은 라미닌이 인간 재조합 단백질로서 성공적으로 생산되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 상기에도 불구하고, 인간 배아줄기 세포의 배양 및 성장을 위한 조성물 및 방법의 제공이 지속적으로 요구되고 있다. 이와 관련하여, LIF 또는 지지 세포(feeder cell)와 같은 분화억제제의 사용 없이 시험관 내에서 다능성 인간 줄기 세포를 증식 및 생존시킬 수 있는 조성물 및 방법을 제공하는 것은 이점이 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 미분화된 상태로 시험관 내에서 인간 줄기 세포를 배양하기 위하여 세포외 매트릭스와 같은 조성물 및 이를 이용한 방법의 개발에 관한 것이다.

[0017] 특정 라미닌이 시험관 내에서 미분화된 인간 배아 줄기 세포를 성장 및 증식시키기 위하여 한정되고 적합한 세포외 매트릭스를 제공하는 것으로 밝혀졌다. 이것은 지지 세포 및/또는 분화 억제제를 포함하지 않으며, 또는 달리 설명하자면, 배아 줄기 세포가 라미닌 세포외 매트릭스 상에서 성장하고 증식하기 위하여 지지 세포 및/또는 분화 억제제가 필요하지 않다는 것이다. 또한, 다능성 인간 배아 줄기세포가 mTeSR1의 동족체와 같은 화학적으로 한정된 배지내에서 재조합 라미닌-10 (라미닌-511)으로 코팅된 플레이트 상에 배양될 때, 상기 세포는 분화 억제제 없이도 증식하고 그 다능성을 유지할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 여기에 사용된 "화학적으로 한정된"이라는 용어는 배지의 모든 성분이 알려져 있고, 각 성분의 절대적이거나 상대적인 양이 알려져 있으며, 상기 배지가 어떠한 식물 또는 동물 조직도 함유하지 않음을 의미한다.

[0018] 또한, 자연적 인간 배아 줄기 세포 니체(niche)인 인간 재조합 라미닌-511 상에 다른 인간 배아 줄기 세포주를 배양 함으로서, 동물 산물(animal products)이나 지지 세포가 완전히 결여되고, 오직 하나의 한정되지 않은 성분인 96% 이상 순수한 인간 알부민이 함유된 시스템이 구축되었다. 상기 인간 배아 줄기세포가, 적어도 4개월(20 계대)동안 통상적인 핵형(normal karyotype)으로 자가 재생된 후, 3 배엽 모두의 세포계보(cell lineages)를 함유하는 기형종(teratomas)을 발달시킬 수 있다. 인간배아줄기세포가 작은 집단(clump)으로 라미닌-511 상에 도포 되었을 때, 인간배아 줄기 세포는 약 97%의 Oct-4-양성 세포로서 세포 동질성(cellular homogeneity)을 유지하는 단층에 퍼진다. 인간 배아 줄기 세포의 부착은 α6β1 인테그린(integrin)에 의존한다.

[0019] 이들 및 다른 비제한적인 본 발명의 특성들이 이하 상세히 개시된다.

발명의 효과

[0020] 동질적인 단층 인간 배아 줄기 세포 배양의 이용은 줄기 세포에 대한 분화 경로(differentiation pathways) 설계를 위한 더욱 조절 가능한 조건을 제공한다. 이러한 이종 비함유(xeno-free) 및 피더-부재(feeder-free) 시스템은 세포 치료 목적을 위한 세포 계보(cell lineages)의 개발에 유용할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 특허 또는 출원포대는 적어도 하나의 컬러로 수행된 도면을 포함한다. 컬러 도면을 가지는 본 특허 또는 특허출원공보는 요청시 필요한 수수료의 지불에 의해 특허청에 의해 제공될 것이다.

다음은 도면의 간단한 설명으로서, 본 명세서에 개시된 예시 구현예를 설명하기 위한 목적으로 제공되며, 이를 제한할 목적은 아니다.

도 1은 화학적으로 한정된 배지에서 재조합 라미닌-10(라미닌-511)으로 코팅된 플레이트 상의 인간 배아 줄기 세포의 피더-부재(feeder-free)배양한 105일후의 현미경사진(위상차)이다.

도 2는 화학적으로 한정된 배지에서 105일(LN-511, 20계대)동안 라미닌-10(라미닌-511)상에서 배양된 인간 배아

줄기 세포 및 전통적인 배지에서 인간 포피 섬유아세포(foreskin fibroblasts)(대조군)상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포에서, 다능성 마커(Oct4, Nanog), 내부 대조군(GAPDH), 및 분화마커(알파-태아단백(alpha-fetoprotein), 브라키우리(brachyury), Sox1 및 Pax6)의 발현을 보여주는 RT-PCR사진이다. 여기에서, hGADPH, hOct4, hNanog, hBrach, hAFP, hSox1 and hPax6는 각각, GAPDH, Oct4, Nanog, 브라키우리(brachyury), 알파-태아단백(alpha-fetoprotein), Sox1 and Pax6를 나타낸다.

도 3은 라미닌-511상에서 인간 배아 줄기 세포 자가 재생효과를 나타내는 일련의 컬러 현미경사진(면역형광)을 포함한다. 화학적으로 한정된 배지에서 105일(20계대)동안 라미닌-511상에서 배양한 후에, 인간 배아 줄기 세포는 다능성 마커인 Oct4(녹색) 및 Sox2 (붉은색)를 계속 발현한다(LN-511, 20계대). 종래의 배지에서 인간 포피 섬유아세포(foreskin fibroblasts) 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포 또한 다능성 마커인 Oct4 및 Sox2를 발현한다(대조군).

도 4는 다른 코팅제에 인간 배아 줄기 세포의 부착 및 인간 배아 줄기 세포 내에서 라미닌 사슬의 발현을 나타낸다. 도 4a는 LN-511 및 LN-111에 부착된 인간 배아 줄기 세포의 크리스탈 바이올렛 염색를 나타낸다(배율:x5, 내부:x20). 도 4b는 다른 부착 기질에 대한 배아 줄기 세포의 접촉 면적(contact area)을 나타내는 그래프이다. 값들은 평균적인 (폴리-D-라이신(poly-D-lysine) 상에 도포된 세포와 비교하여)상대적 접촉 면적을 보여준다. 통계적 유의도(Statistical significance (P))가 스튜던트티이검정법(Student t-test)에 의해 계산되었다. 에러바(Error bars)는 표준오차(SE)를 나타내며 각각의 바(bar) 내부의 숫자는 독립된 측정의 숫자를 나타낸다(약어:LN, laminins; MG, Matrigel; PL, poly-D-lysine). 도 4c는 HS420 세포로부터 분리된 전체 RNA의 RT-PCR 분석을 나타낸다. 알려진 모든 라미닌 사슬에 대한 프라이머 세트가 사용되었다.

도 5는 인간 배아 줄기세포 표면상의 인테그린(integrin) 수용체와 그들의 LN-511에대한 부착 역할을 보여준다. 도 5a는 서로 다른 항-인테그린 항체에 의한 LN-511에 대한 인간 배아 줄기 세포부착억제를 나타내는 그래프이다. 막대기들은 (좌에서 우로)β1,α6,α1,α2,α3,α4,α5,αV,αVβ3,β2,β3,β4 를 나타낸다(전부 밀리포어(Millipore)로 부터). IgG가 미억제된 세포부착에 대하여 대조군으로 사용되었다. 에러바는 표준오차(n=4)를 보여준다. 통계적 유의도(P)가 스튜던트티이검정법(Student t-test)에 의해 계산되었다. 도 5b는 서로 다른 항-인테그린 항체에 의해 코팅된 표면에 대한 인간 배아 줄기 세포의 부착을 보여주는 또 다른 그래프이다. 막대기들은 (좌에서 우로)β1(100%),β2,β3,β4 및 IgG에 대한 부착을 나타낸다. 에러바는 표준오차(n=4)를 보여준다. 스튜던트티이검정법(Student t-test)에 의해 계산된 통계적 유의도(P)는 **, P<0.01로 보여진다. 도 5c는 LN-511상에서 배양된 다능성(Sox2-양성)인간 배아 줄기 세포내의 β1 인테그린 서브유닛(subunit)과 인테그린 α6의 동시발현(co-expression)을 보여주는 한 세트의 면역 형광 사진이다(배율 x40).

도 6은 O3 배지 및 어떠한 동물유래 성분도 함유하지 않는 H3 배지 내에서 LN-511상에 배양된 HS207의 대표적인 면역염색(immunostaining)분석, RT-PCR, FACS분석, 실시간 정량 RT-PCR 및 정량 웨스턴 블롯(Western blot)분석을 나타낸다. 도 6a는 O3 배지 내에서 LN-511및 마트리겔(Matrigel)상에 배양된 인간 배아 줄기 세포에 대한 성장곡선을 보여준다. 상기 세포는 아래 기술된 바와 같이 장기적인 실험을 통하여 계대 배양되었다. 각각의 TrypLE™ Express 처리 및 연속적인 세척 후에 집단(clumps)내 세포의 3분의 1만이 신선한 LN-511 또는 Matrigel로 코팅된 접시(dishes) 상에 도포하는데 사용되었다. 나머지는 단일 세포 현탁액(suspension) 안에 분리되어 계수되었다. 각각의 코팅제에 대하여 두 개의 독립적인 복제본 안에서 실험이 수행되었다. 다섯 번째 계대 배양 후에, 대다수의 세포가 여전히 다능성 나노그(Nanog)의 마커를 발현했다는 것을 확인하는 면역 형광염색에 의하여 세포의 일부가 고정되고 분석되었다. 도 6b는 O3 배지내 LN-511상에서 20계대(6개월)후에 항-나노그 (Nanog로 표시됨), 항-Sox2 (Sox2) 및 항-Oct4 (Oct4)항체들로 HS207를 면역염색한 것을 보여준다. 오른쪽 패널은 핵 DAPI 염색이다. 동일한 염색이 고배율로 나타나있다(배율: x20. 막대기: 0.15 mm). 도 6c는 지지세포(Feeders로 묘사됨), O3 배지에서 7계대 후의 마트리겔(MG, p7 in O3), H3 배지에서 8계대 후의 LN-511(LN-511, p.8 in H3) 및 O3 배지에서 27계대 후의 LN-511(LN-511, p.27 in O3)상에서 성장된 H207세포로부터 분리된 전체 RNA의 RT-PCR 분석을 보여준다. 다능성 마커인 Oct4 및 나노그(Nanog); 분화 마커인 브라키우리(Brachyury), 알파-태아단백(α-fetoprotein), Sox1, 및 Pax6; 및 글리세르알데히드-3-인산디히드로게나아제(GAPDH)에 대한 항존유전자(housekeeping gene)에 대한 프라이머 세트가 분석되었다. 도 6d에서는, 다능성 마커인 Oct4 (회색 막대기) 및 나노그(Nanog)(흑색 막대기)의 mRNA 전사체(transcripts)의 수를 비교하기 위하여 실험의 시점을 서로 달리하여, LN-511 및 마트리겔(Matrigel) 상에 배양된 HS207세포에서, 지지세포(feeder cells)상에 배양된 HS207세포의 그것과 함께, 실시간 정량 RT-PCR 분석이 사용되었다. 막대기는 (좌에서 우로) 비교를 위하여 표준 값을 갖는 지지세포 층(Feeders)상에 배양된 대조군인 HS207 세포, O3 배지에서 7계대 후에 마트리겔 상에서 배양된 HS207 세포, O3 배지에서 5계대 (LN-511, p.5 in O3), 10계대 (LN-511, p.10 in O3),

16계대 (LN-511, p.16 in 03), 20계대 (LN-511, p.20 in 03)후에 LN-511 상에서 배양된 HS207 세포 및 H3 배지에서 8계대 후에 LN-511상에 배양된 세포에서의 Oct4 및 나노그(Nanog) 발현의 수준을 나타낸다. 에러바는 95%의 신뢰구간(confidence interval)을 보인다. 도 6e는 지지세포, 마트리겔 및 LN-511상에서 시점을 서로 달리하여 서로 다른 배지에서 배양된 HS207 세포 내의 다능성 마커 Oct4 및 Sox2의 웨스턴 블롯(Western blot)에 의해 측정되고 덴시토메트리(densitometry)에 의해 정량된 발현을 나타낸다. 회색 막대기는 Oct4, 흑색 막대기는 Sox2의 발현 수준을 나타낸다. 약어는 도 6d와 유사하다. 에러바는 범위를 나타낸다. 도 6f는 다능성 Oct 4의 세포 표면 마커에 관하여 03 배지에서 LN-511상의 25계대 후의 HS207 세포에 대한 FACS 분석을 보여준다. 양성 세포의 비율은 괄호안에 표시되었다.

도 7은 LN-511상에서 연장된(extensive) 계대 후에 HS207 세포의 다능성을 보여준다. LN-511상에서 15계대 배양한 HS207 세포를 중증합병면역결핍증 쥐(SCID mice)에 피하주사한 후에 3 배엽의 조직 성분으로 구성된 기형종(Teratomas)이 형성되었다. 도 7a는 HE-염색된(HE-staining) 연골(cartilage)을 나타낸다(배율 x100). 도 7b는 발달중인 신경 조직과 장내배엽(intestinal endoderm)을 나타낸다(배상 세포(goblet cells)는 붉은색으로 표시, HE-PAS 염색법, 배율 x400). 도 7c는 발달중인 신장 사구체(kidney glomerulus)를 나타낸다(HE 염색, 배율 x400). 도 7d는 망막색소상피(retinal pigment epithelium)를 나타낸다(HE 염색, 배율 x400). 도 7e는 LN-511상의 20 계대 후의 HS207 세포로부터 형성된 배아유사세포덩어리(embryoid bodies)의 면역염색이 3-배아 세포층: 평활근 액틴(smooth muscle actin)(SM Actin으로 표시됨), 네스틴(Nestin으로 표시됨), MAP-2(MAP-2로 표시됨), 및 알파 태아단백(α-fetoprotein)(AFP로 표시됨)에 관한 마커의 발현을 나타냄을 보여준다.아래 패널은 핵 DAPI 염색이다.

도 8은 LN-511상에서 성장한 서로 다른 인간 배아 줄기 세포의 면역염색 분석을 나타낸다. 도 8은 03 배지 내의 LN-511상에서 5계대(1개월)후의 H1 및 H9 세포가 다능성 Oct4(녹색), 나노그(Nanog, 녹색), 및 Sox2(적색)의 마커를 발현했음을 보여준다. DAPI 염색은 푸른색을 띈다(배율 x20).

도 9는 LN-511상에서 20 계대 후의 HS207 세포의 G-밴딩 염색체 분석(G-banding chromosome analysis)을 나타낸다.

도 10은 03 배지에서 LN-511상에 20 계대 후의 HS207 세포의 다능성(SSEA-4, Tra1-60, Tra1-81)의 세포 표면 마커 및 분화 SSEA-1의 세포 표면 마커에 관한 FACS 분석을 나타낸다. SSEA-4, Tra1-60, 및 Tra1-81 양성세포의 비율이 괄호 안에 표시되었다.

도 11은 03 배지에서 마트리겔상에 10 계대 후의 HS207 세포의 다능성 Oct-4 및 SSEA-4 의 세포 표면 마커에 관한 FACS 분석을 나타낸다. 양성 세포의 비율이 괄호 안에 표시되었다.

도 12는 LN-511, 마트리겔 및 지지 HS207 세포 배양에서 자발적 분화(spontaneous differentiation)의 수준을 나타내는 그래프이다. 03 배지에서 마트리겔(백색 막대기), 03 배지에서 LN-511(회색 막대기) 및 혈청 대체 기초 배지(serum replacement based medium)에서 인간 포피 섬유아세포(흑색 막대기) 상에 각각 배양된 HS207 세포 내의 분화 마커인 Pax6, Sox17, 및 Sox7의 mRNA 전사체의 수를 비교하기 위해 실시간 정량 RT-PCR 분석이 사용되었다. 에러바는 95%의 신뢰구간을 나타낸다.

도 13은 03 배지에서 LN511 상의 인간 배아 줄기 세포주 HS588의 유도(derivation) 초기 단계를 보여주는 한 벌의 사진이다. 도 13a는 내세포괴를 기계적으로 분리하고 LN511 상에 도포 한지 4일 후인 6일째 되는 배반포의 내세포괴(inner cell mass)로부터 성장해 나오며 형태학적으로 전형적인 인간 배아 줄기 세포를 보여준다. 도 13b는 03 배지에서 LN-511 상의 2계대에서 항-나노그(anti-Nanog) 항체로 HS588세포를 면역염색한 것을 보여준다. 도 13c는 상기와 같은 세포를 항-Oct4(anti-Oct4) 항체로 면역염색한 것을 나타낸다.

도 14는 감소 및 비감소 조건하에서 3-8% 구배(gradient) SDS-PAGE를 이용한 항목(article)에서 사용된 인간 재조합 LN-511의 특성을 나타낸다. 시프로 루비 단백질 염색(Sypro Ruby protein staining)을 이용하여 단백질이 시각화되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 미분화된 상태로 시험관 내에서 인간 줄기 세포를 배양하는 조성물 및 방법이 개시된다. 이 점에서, 인간 배아 줄기 세포는 재조합 라미닌-10(라미닌-511)로 코팅된 플레이트 상에서 배양될 때 증식하고 그들의 다능성을 유지했다.

[0023] 사이토카인(cytokines)의 발현, 세포 주기 조절 및 자가 재생 기제(mechanisms)는 인간과 쥐의 배아 줄기에서

서로 다르다. 예를 들어, STAT3 활성화는 쥐 배아 줄기 세포의 자가재생을 위하여 충분하지만, 인간 배아 줄기 세포의 분화를 막지는 못한다. 따라서, 쥐 배아 줄기 세포에서 얻어진 어떠한 결과라도 인간의 그것에 직접 적용하지는 못한다.

[0024] 최근, 피더 부재 및 이종-비함유(xeno-free) 인간 배아 줄기 세포 배양 시스템이 보고 되었다. 상기 시스템은 플라즈마로부터 정제된 인간 알부민 및 배양 접시 코팅용 단백질 혼합물을 포함한다. 상기 인간 단백질 세포 배양 접시 코팅제는 인간 태반으로부터의 열화된(degraded) 단백질의 혼합물인 것으로 나타나며, IV 콜라겐, 비멘틴(vimentin), 피브로넥틴(fibronectin) 및 인간 라미닌을 포함하는 것으로 보고된다. 그것은 몇 가지 유형의 라미닌 단편들과 또한 종종 다른 기저막 단백질 및 피브로넥틴(fibronectin)을 포함한다. 이러한 인간 배아 줄기 세포 조건은 다양하고, 화학적으로 한정된 것으로 여겨지지 않으며, 또한 자가 재생을 제공하는 매트릭스의 성분이 알려지지 않았다.

[0025] 본 발명에서, 출원인들은 배양 중 인간 재조합 LN-511이 단독으로 인간 배아 줄기 세포의 자가 재생을 지지할 수 있는지를 오랜 기간 동안 연구했다. 출원인들은 인간 배아 줄기 세포주 HS420, HS207 및 HS40133을 인간 배아 신장 세포(HEK293)에서 생산된 인간 재조합 LN-511로 미리 코팅된 배양 접시 상에서 배양했다. 두 개의 서로 다른 배양 배지인 O3 및 H3이 사용되었다. O3배지는 상업적으로 구입가능하며 화학적으로 한정된 mTeSR1 배지를 유일한 동물 유래 성분으로서 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 갖는 것으로 변형한 것이었다. 상기 H3 배지는 화학적으로 한정된 이종-비함유(xeno-free)인 TeSR1 배지를 인간혈청알부민(human serum albumin)을 함유한 것으로 변형한 것이었다. 사용된 인간 알부민의 잠재적인 샘플별 다양성(batch-to-batch variability)을 감소시키기 위하여, 출원인들은 투석막 12-14KDa를 이용하여 단백질 용액을 투석했다. 어떠한 동물 유래 성분도 없이 세포를 계대 배양하기 위하여, TrypLE™ Express 효소가 사용되었다. 대조군 세포는 O3 배지의 마트리겔 상에서 또는 혈청 대체 기초 배지(serum replacement based medium)의 지지 세포층 상에서 배양되었다. 출원인들은 인간 배아 줄기 세포의 서로 다른 세포외 매트릭스(ECM) 단백질에 대한 부착을 연구했다. LN-511은 기질(substratum)과 가장 큰 세포 접촉 면적을 제공했다. 인간 유도 다능성 줄기(iPS) 세포주 또한 LN-511 상에서 자가 재생되었다. 상기 부착은 인간 배아 줄기 세포 표면에 가장 풍부한 것으로 나타났던 α6β1 인테그린 에 의존적이었다. LN-511은 인간 배아 줄기 세포 내에서 피더-의존성(feeder-dependent) 세포 배양의 인간 배아 줄기 세포 환경의 일부로서 발현되었고, 초기 배아에서 인간 배아 줄기 세포 부착, 이동 및 증식을 위한 자연적 기질이 될 수 있었다.

[0026] 또한 다능성 인간 배아 줄기 세포가 화학적으로 한정된 배지에서 재조합 인간 라미닌-10(라미닌-511)로 코팅된 플레이트 상에서 배양될 때, 상기 세포는 증식하고 적어도 105일(20계대)동안 그들의 다능성을 유지하는 것으로 밝혀졌다(도 1-3). Oct4, Sox2 및 나노그(Nanog)와 같은 다능성 마커의 발현 및 증식율 또한 안정적이었다.

[0027] 여기에 사용된 바와 같이, "자가 재생(self-renewal)"이라는 용어는 무수히 많은 주기의 세포 분열을 수행하고 미분화된(즉, 다능성인) 상태로 남을 수 있는 줄기 세포의 능력을 의미한다. 다능성 그 자체는 어떠한 세포 타입으로든 분화할 수 있는 줄기세포의 능력을 의미한다. 증식(proliferation)이라는 용어는 분열(divide)할 수 있는 줄기 세포의 능력을 의미한다. 생존(Survival)은 분화된 상태건 미분화된 상태건 간에, 줄기 세포가 살 수 있는 능력을 의미하며, 줄기 세포가 분열 또는 분화할 수 있는 능력을 유지할 것을 요구하지는 않는다.

[0028] 본 발명은 하기 2-세트의 비제한적 실용(working) 실시 예에서 추가로 설명할 것이나, 이들 실시 예는 예시만을 위한 의도로서, 그 개시가 본 명세서에서 언급된 물질, 조건, 공정 파라미터 등을 제한할 의도가 아님이 이해될 것이다. 모든 비율은 달리 언급하지 않는 한 중량에 의한 것이다.

[0029] I. 제 1세트 실험을 위한 방법

[0030] 세포 배양

[0031] 인간 배아 줄기 세포(두 개의 세포주가 사용됨: HS420 and HS207, 모두 Karolinska University Hospital Huddinge, Karolinska Institute, Sweden의 Hovatta 교수에 의해 호의적으로 제공됨)가 mTeSR1 유사 배지인 화학적으로 한정된 배지 내에서 재조합 라미닌-10(라미닌-511)으로 코팅된 플레이트 상에서 배양되었다. 상기 배지는 몇 가지 예외를 제외하고는 "Ludwig, T.E., Bergendahl, V., Levenstein, M.E., Yu, J., Probasco M.D. and Thomsom, J.A. (2006); Feeder-independent culture of human embryonic stem cells; Nat Methods 8, 637-646"에서 기술된 바와 같이 준비되었다. 첫째, 재조합 인간 FGF basic (R@DSystems)이 zbFGF 대신 사용되었고, 소혈청으로부터 얻은 알부민(SIGMA-Aldrich, B4287)이 BSA 단편(fraction) V 대신 사용되었다. 둘째, 이

미 만들어진 배지에 첨가된 인슐린-트랜스페린-셀레늄 보충물(Insulin-Transferrin-Selenium Supplement, Invitrogen)가 상기 항목에서 기술된 방법 대신 성분들의 공급원으로 사용하였다. 상기 인간 배아 줄기 세포는 4-6일 간격으로 TrypLE™ Express (GIBCO)에 노출시킨 덩어리 단위의 계대(passages in clumps)였다. 상기 세포는 실온에서 2분간 상기 효소로 처리되었고, 그 후 상기 배지로 2 차례 세척되었으며, 회수를 위해 부드럽게 긁었다. 상기 세포의 큰 덩어리(clumps)가 부드러운 피펫팅(pipetting)에 의해 부숴졌고, 1:3으로 계대하였다.

[0032] 대조군 인간 배아 줄기 세포는 (Inzunzaa, J., Gertow, K., Stromberg, M.,A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Ahrlund-Richter, L. and Hovatta, O. (2005); Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines in Serum Replacement Medium Using Postnatal Human Fibroblasts as Feeder Cells. Stem Cells 2005;23:544-549)에 개시되어 있는 바와 같이 종래 배지에서 인간 포피 섬유아세포 상에서 유지하였다. 상기 세포는 입체 현미경하에서 외과용 메스(scalpel)를 이용하여 8 조각으로 콜로니(colony)를 잘라냄으로써 기계적으로 계대하였다. 기계적인 분리는 6일 간격으로 수행하였다. 미분화된 세포는 형태에 의해 판정하였으며, 각각의 추가 계대용으로 선택하였다.

[0033]

[0034] 플레이트 코팅

[0035] 96-웰 조직 세포 배양 플레이트(Sarstedt)가 세포외 단백질:쥐 라미닌-111(Invitrogen), 인간 재조합 라미닌-332, 인간 재조합 라미닌-411(Kortesmaa, J., Yurchenco, P., and Tryggvason, K. (2000); Production, purification, and interactions with integrins. J Biol Chem 275, 14853-14859, U.S. Patent 6,638,907), 인간 재조합 라미닌-511(Doi, M., Thyboll, J., Kortesmaa, J., Jansson, K., Iivanainen, A., Parvardeh, M., Timpl, R., Hedin, U., Swedenborg, J., and Tryggvason, K. (2002); Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. J Biol Chem 277, 12741-12748; U.S. Patent 6,933,273), 30 ug/ml (5 ug/mm^2)농도로, 성장인자-고갈(growth factor-depleted) Matrigel™(1:30) (BD Biosciences), 1 mg/ml 의 소 젤라틴(Sigma), 0.1 mg/ml의 폴리-D-라이신 (Sigma)의 멸균용액으로 4℃에서 밤새 코팅되었다.

[0036] 세포 부착 분석

[0037] 부착 분석은 ([Extracellular Matrix Protocols, 2000)에 개시된 대로 수행하였다. 간략히, MaxiSorp 96-웰 플레이트(Nunc)를 전술한 세포외 매트릭스 단백질에의해 코팅하고, 1% 열-변성 BSA 용액에 의해 블로킹하였다. 미분화된 배아 세포는 세포 외 매트릭스가 코팅된 플레이트 상에 800 세포/mm^2의 세포 밀도로 플레이팅하고, 37℃에서 1시간 동안 부착하도록 방치하였다. 미부착된 세포는 세척해 내었으며, 부착된 세포는 5% 글루타르알데히드로 20분간 고정하였고, 0.1% 크리스털 바이올렛으로 염색하였다.

[0038] RT-PCR

[0039] 인간 샘플로부터 제조사의 지침에 따라 Absolutely RNA Microprep Kit (Stratagene)을 이용하여 총RNA를 단리(isolated) 하였다. cDNA는 제조사의 지침에 따라 올리고(dT) 12-18 프라이머 및 수퍼스크립트 II 역전사효소(Invitrogen)를 함유하는 20㎕의 반응 혼합물에서 0.2㎍의 총 RNA를 이용하여 합성하였다. 다양한 cDNA수율을 보정 하기 위하여, 각 PCR 반응을 위한 cDNA양은, 표준으로, 항존유전자(housekeeping gene)인 GADPH의 발현 레벨을 이용하여 조정하였다. GADPH PCR산물(20 사이클, 데이터 미제시)과 동등한 양을 산출하는 cDNA양을 이후의 PCR반응에 사용하였다. cDNA는 인간 샘플에 대해서 표 1의 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 모든 PCR반응은 30 사이클로 구동하였으며(사진에 나타난 GADPH PCR의 경우도 포함), 1U의 Taq DNA Polimerase Recombinant(Invitrogen)를 이용하여 표준조건 하에서 20 ml로 수행하였다. PCR산물은 에티디움 브로마이드를 함유하는 1.5% 아가로즈 겔 상에서 분석하였다.

[0040] 각각의 RNA샘플에 대하여, 게놈 DNA가 단리 되지 않았음을 확인하기 위해 역전사효소 없이 RT-PCR을 수행하였다.

표 1. RT-PCR용 프라이머(인간 샘플)

유전자	전방 프라이머	후방 프라이머	산물 크기 (bp)	Ta, (C)
Oct-4	CGACCATCTGCCGCTTTGAG (SEQ ID NO: 1)	CCCCCTGTCCCCCATTCCTA (SEQ ID NO: 2)	573	61
Nanog	AGCATCCGACTGTAAAGAATCTTCAC (SEQ ID NO: 3)	CGGCCAGTTGTTTTTCTGCCACCT (SEQ ID NO: 4)	433	61
GADPH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA (SEQ ID NO: 5)	TTCACACCCATGACGAACAT (SEQ ID NO: 6)	402	59
Pax6	AACAGACACAGCCCTCACAAAC (SEQ ID NO: 7)	CGGGAACTTGAACTGGAACTGAC (SEQ ID NO: 8)	275	61
AFP	CTTTGGGCTGCTCGCTATGA (SEQ ID NO: 9)	TGGCTTGGAAAGTTCGGGTC (SEQ ID NO: 10)	175	59
Brachyury	GAAGGTGGATCTCAGGTAGC (SEQ ID NO: 11)	CATCTCATTGGTGAGCTCCTT (SEQ ID NO: 12)	251	59
Sox1	CTCACTTTCCTCCGCGTTGCTTCC (SEQ ID NO: 13)	TGCCCTGGTCTTTGTCCTTCATCC (SEQ ID NO: 14)	849	61

[0041]

[0042] 면역형광:

[0043] 면역형광을 위하여, 배아세포는 96-웰 플레이트의 웰에서 4%의파라포름알데히드로 고정하고, 0.1% 트리톤-X로 투과시켰으며, 0.1% 트윈-20(Sigma) PBS 내의 10% 소 태아 혈청(Invitrogen)으로 1시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체와의 배양은 실온에서 1.5시간 동안 수행하였다. 하기 인간 항원에 대한 1차 항체가 사용하였다: Oct4 및 Sox2 (모두 R@DSystems제품). DAPI (Molecular probes)를 갖는 2차 항체(Alexa-488- 및 Alexa 546-표지됨, Molecular probes)와의 배양을 40분간 수행하였다. 배양 사이에, 검체(specimens)는 PBS에서 0.1% 트윈-20으로 3회 내지 5회, 매번 10분씩 세척하였다. 검체는 형광 마운팅(mounting) 배지(Dako) 에서 보존하였고, 형광현미경(Leica) 하에 관찰하였다.

[0044]

[0045] 제 1세트 실험의 결과

[0046] A. 라미닌-511상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포는 피더(Feeders) 없이도 화학적으로 한정된 배지에서 증식하고 다능성을 유지한다.

[0047] 라미닌-511상에서, 인간 배아 줄기 세포는 최소 105일(20계대)동안 화학적으로 한정된 배지에서 다능성을 유지하는 것으로 밝혀졌다.

[0048] 형태: 라미닌-511 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포의 형태는 마트리겔(Matrigel™)(Bendall, S.,C., Stewart, M.,H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Boss M., Lajoie, G. and Bhatia, M. (2007); IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. Nature, 2007 Aug 30;448(7157):1015-21.) 또는 세포외 매트릭스로 코팅된 플레이트(Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M.,D. and Lanza, R.(2005); Human embryonic stem cells derived without feeder cells. Lancet. 2005 May 7-13;365(9471):1601-1603)상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포에 관하여 발견된 형태와 매우 유사했다. 도 1 참조. 그러나, 위에 언급된 두 개의 코팅제와 달리, 재조합 인간 라미닌-511은 이종-비함유(xeno-free), 한정 및 비면역성 성분으로서 FDA요건에 따라 생산될 수 있으며, 임상에서 계속적으로 사용 가능하다.

[0049] RT-PCR 마커: 다능성 마커인 Oct4 및 나노그(Nanog)가 전통적인 배지에서 인간 섬유아세포 포피 상에서 배양된 다능성 배아 줄기 세포와 화학적으로 한정된 배지에서 105일 동안 라미닌-551 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포에 의해 같은 정도로 발현되었다. 도 2 참조.

[0050] 면역형광: 인간 배아 줄기 세포가 전통적인 환경에서 성장한 배아 줄기 세포와 같은 정도로 Oct4 및 Sox2와 같은 다능성 마커를 발현했다. 도 3 참조.

[0051] II. 제 2세트 실험을 위한 방법

[0052] 인간 배아 줄기 세포 배양

[0053] Karolinska Institute에 있는 본 발명자의 실험실에서 본래적으로 유래된 HS207, HS420 및 HS401의 인간 배아 줄기 세포가 37℃, 5% CO_2 하에서 (1) 화학적으로 한정된 O3 배지(mTeSR1 배지의 변형체) 및 (2) 화학적으로 한정된 이종-비함유(xeno-free) H3 배지(TeSR 배지의 변형체)에서 LN-511로 코팅된 실험용 접시 상에서 배양되었다. 임상등급 ≥96% 순수한 인간 알부민을 Octapharma AB, Stockholm으로부터 구입했다. 우선, 세포주들을 소독된 칼을 이용하여 조심스레 스크래칭하여 지지세포층(feeder cell layer)으로부터 작은 조각으로 LN-511상에 운반하였다.

[0054] 단지 몇 방울의 신선한 배지가 추가된 한 계대 후의 첫 째 날을 제외하고는, 1 시간 동안 배양기에서 미리 데워진 신선한 배지가 하루에 한 번씩 세포에 공급되었다.

[0055] 세포를 실온에서 1.5분간 TrypLE™ Express (GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Scotland)에 노출하여 6-7일에 한 번씩 정기적으로 계대(pass) 했다.

[0056] 그 후 세포를 배지가 있는 접시 위에서 두 번 세척했고, 부드럽게 긁었으며, 피페팅해서 작은 조각(단세포 현탁액이 아님)으로 쪼개고 1:2 또는 1:3비율(만약 많은 수의 세포가 요구되면 최대 1:6비율 까지)로 도포했다.

[0057] 같은 균주의 대조군 세포가 O3 배지 내의 마트리겔상 및 인간 포피 섬유아세포상에서 배양되었다. 실험용 접시가 코팅되었다. 사용 전에, 접시는 배양기에서 1시간 동안 미리 데워졌고, 그 후 미리 데워진 배지로 두 번 조심스럽게 세척되었다.

[0058] O3 배지(mTeSR1의 변형체)준비

[0059] Ludwig, Nat. Methods 3:637-646 (2006)에 기술된 바와 같이 165 mg의 티아민(thiamine)과 50 mg의 환원된 글루타티온을 500 ml의 증류수에 첨가하지만, L-아스코르브산(L-ascorbic acid)은 포함하지 않은 재료 A(Stock A)가 준비되었다. 증류수를 GIBCO Invitrogen Corporation으로부터 구입했다. 그 후 상기 용액을 여과(0.22㎛ 필터)하고, 분취(aliquoted) 및 -20℃에서 냉동시켰다.

[0060] 재료 B(Stock B)는 셀레늄(selenium), 인슐린 및 홀로-트랜스페린(holo-transferrin)만 없이 Ludwig에 기술된 바와 같이 준비되었다. 그 후 6㎍의 페놀 레드(Phenol Red)가 추가되었고, 조심스럽게 저은 후, 여과했다. 재료 B는 +4℃에서 최대 두 달간 보관 가능했다.

[0061] 형질전환생장인자(transforming growth factor, TGF)- β1, 피페콜산(pipecolic acid), γ-아미노 뷰티르산(aminobutyric acid, GABA) 및 염화리튬(LiCl)의 재료가 Ludwig에 기술된 바와 같이 준비되었고 저장되었다.

[0062] 100 ml의 O3 배지를 준비하기 위하여 D-MEM/F12 배지를 20 ml의 재료 B, 200 ㎕의 TGF-β1 재료, 13㎕ 의 피페콜산(pipecolic acid) 재료, 200㎕의 GABA 재료, 200 ㎕의 염화리튬 재료, 1ml의 MEM 비필수 아미노산 용액(GIBCO Invitrogen Corporation), 1 ml의 200mM L-글루타민(L-glutamine) 용액(GIBCO Invitrogen Corporation), 및 2 ml의 인슐린-트랜스페린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium) 보충물(GIBCO Invitrogen Corporation)로 보충했다. 염분 평형(salt balance)을 보상하고 배지의 pH를 조정하기 위하여, 145 mg의 염화나트륨(NaCl)과 56 mg의 탄산수소나트륨($NaHCO_3$)을 추가했다. 그 후 상기 용액을 완전히 혼합하였고, 10 N의 수산화 나트륨(NaOH)을 이용하여 실온에서 배지의 pH를 7.4로 조정하였다. 상기 용액을 0.22㎛ 필터를 이용하여 여과한 후, 200 ㎕의 화학적으로 한정된 지질 농축물 (lipid concentrate, GIBCO Invitrogen Corporation)을 추가했다.

[0063] O3 배지는 +4℃에서 최장 1 개월간 저장가능했고, 사용 전에 상기 배지를 96 ng/ml의 재조합 인간 FGF basic (R@D Systems Europe LTD, Abingdon, England) 및 40 ㎍/ml의 아스코르브산(ascorbic acid, SigmaAldrich)으로 보충했다.

[0064] H3 배지(TeSR1의 변형체)의 제조

[0065] 재료 A가 O3 배지에 대하여 상기된 바와 같이 제조되었다.

[0066] 인간 알부민 용액(Albuminativ)을 Octapharma AB, Stockholm, Sweden으로부터 구입했다. 상기 용액을 12-14Kda 투석막 (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA)을 사용하여 각각 3시간 동안 인산-완충액(phosphate-buffered saline, PBS)에 대하여 3 차례, 연속하여 D-MEM/F12 배지에 대하여 한 차례 투석했다. 광학밀도(optical density) 측정을 이용하여 상기 단백질의 용액 내 최종 농도를 평가했다. 이 경우 O3 배지용 재료 B(위에 언급됨)의 경우와 알부민의 농도를 같게 하기 위하여 재료 B를 적당한 부피(농도에 의존)의 투석된 인간 알부민 용액을 사용하여 혼합했다. 미량 원소(Trace elements)와 페놀 레드(phenol red)를 추가했고, 물 대신 D-MEM/F12를 사용했다.

[0067] TGF β1의 재료를 Ludwig에 기술된 바와 같이 제조했고, 다만 소 알부민(bovine albumin) 대신 투석된 인간 알부민을 사용했다. 기타 모든 재료는 상기된 바와 같이 준비했다.

[0068] H3 배지를 O3에 관하여 기술한 바와 같이 혼합했고, 다만 염화나트륨(NaCl)은 전혀 추가하지 않았다.

[0069] 사용 전에 상기 배지를 96 ng/ml의 무담체(carrier free) 재조합 인간 FGF basic (R@D Systems Europe LTD, Abingdon, England) 및 40 ㎍/ml의 아스코르브산(ascorbic acid, SigmaAldrich)으로 보충했다.

[0070] 라미닌 및 기타 코팅물질

[0071] BioLamina, AB, Stockholm으로부터 구할 수 있는 인간 재조합 LN-511이 인간 배아 신장(kidney) 세포(HEK293; ATCC CRL-1573)에서 생산되었고 순차적으로 전장(full-length) 라미닌 γ1, β1, 및 α5구조체로 형질감염(transfected)되었다. 단백질 생산을 위하여, HEK293 세포가 GlutaMax I 및 4.5 g/l 글루코스(glucose, GIBCO Invitrogen Corporation)로 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)내에서 최장 6 일간 배양되었다. 상기 LN-511 분자를 항-FLAG 매트릭스(anti-FLAG matrix, Sigma)를 이용하여 친화-정제(affinity-purified)하고, 3-8% (도. 14) 및 환원 및 비환원조건하에서 4-15% 밀도구배 SDS-PAGE를 이용하여 특정지었다. 상기 단백질을 폴리비닐리덴 이플루오린화물 막(polyvinylidene difluoride membranes)상에서, Sypro Ruby (Bio-Rad) 단백질 염색 및 사슬면역형광(immunostaining of the chains)을 이용하여 시각화하였다. 상기 단백질을 더욱 특정짓기 위하여, 라미닌 α5, β1, 및 γ1 사슬에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot) 분석을 수행했다. 상기 제재(preparations)는 올바른 크기의 세 개의 사슬 모두를 함유했다. 인간 재조합 라미닌-411을 LN-511에서와 유사한 방법으로 생산했다. 기타 모든 세포 외 매트릭스 단백질(ECM proteins)을 앞서 기술된 바와 같이 수득했다.

[0072] 세포 접촉 면적 측정

[0073] MaxiSorp 96-웰 플레이트(Sarstedt, Numbrecht, Germany)를 앞서 기술된 세포 외 매트릭스 단백질(ECM proteins)로 코팅하고 1% 열-변성된(heat-denatured) BSA용액으로 블로킹했다. 미분화된 배아 줄기 세포를 단세포 현탁액(single-cell suspension) 속으로 분리(split)하고, 40㎛ 멸균 세포 체(sieve)로 여과했으며, 700 cells/mm^2의 세포농도로 ECM-코팅된 플레이트 상에 도포하고 37℃에서 1 시간 동안 부착시켰다. 미부착 세포는 세척해 냈으며, 부착된 세포는 5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 20분간 고정하여, 세척하고 0.1% 크리스털 바이올렛(Crystal Violet)으로 염색했다. 6-10 랜덤 필드(random fields) 사진을 찍었고, 13-93 세포의 세포접촉 면적을 Volocity 영상 소프트웨어(Improvision, Waltham, MA, http://www.improvision.com)를 이용하여 측정했다. 퍼지지않은(nonspread) 인간 배아 줄기 세포의 세포 면적을 측정하기 위하여, 20 분간 폴리-D-라이신(poly-D-lysine)상에 세포를 도포하고, 고정 후 상기된 바와 같이 염색했다.

[0074] 항-인테그린 항체를 이용한 부착-차단 분석(Adhesion-blocking Assay)

[0075] 부착-차단 분석을 수행했다. 간략히, 플레이트를 LN-511로 코팅하고 1%의 열-변성된 BSA용액으로 블로킹했다. 배아 줄기 단세포 현탁액을 기능-차단 항-인테그린(function-blocking anti-integrin) 항체(제공자에 의해 추천된 농도)로 30 분간 배양하고, LN-511로 코팅된 플레이트 상에 도포 후, 37℃에서 1시간 동안 부착시켰다. 미

부착된 세포는 제거했으며, 남아있는 세포는 고정하고, 부착된 세포는 5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)로 20분간 고정하고, 세척 후 0.1% 크리스털 바이올렛으로 염색했다. 1시간 후에, 세포로부터 크리스털 바이올렛을 10% 아세트산으로 추출하고 570nm에서 광학 밀도를 측정하여 정량했다.

[0076] 항-인테그린 항체로 코팅된 표면에 대한 세포 부착 분석

[0077] 항-인테그린 특이적 항체로 코팅된 표면에 부착된 세포를 함유(retain)할 정도로 충분한 양으로 발현되는 인테그린 수용체를 확인(identify)하기 위한 분석방법을 계획했다. MaxiSorp 96-웰 플레이트(Nunc)를 정제된 항-인테그린 항체로 +4℃에서 10㎍/ml의 농도로 밤새 코팅한 후, 세척하고 1% BSA용액으로 블로킹했다. 배아 줄기 세포를 항체가 코팅된 플레이트에 도포하고 37℃에서 1 시간 동안 부착시켰다. 미부착된 세포를 제거하고, 남아있는 세포는 고정하고 염색하였으며, 상기된 바와같이 정량했다. 에러바(Error bars)는 SEM을 보여준다.

[0078] RT-PCR

[0079] 제조자의 지시에 따라 Absolutely RNA Microprep 키트 (Stratagene, La Jolla CA, www.stratagene.com)를 이용하여 총 RNA를 분리동정(isolated)했다. 제조자의 지시에 따라 oligo(dT)12-18 프라이머(primers) 및 수퍼스크립트 Ⅱ 역전사효소(Superscript II reverse transcriptase, GIBCO Invitrogen Corporation)를 함유하는 20㎕의 반응 혼합물에서 총 RNA 0.2㎍을 이용하여 cDNA를 합성했다. 다양한 cDNA 수율(yields)을 보상하기 위하여, 각 PCR 반응에 대한 cDNA의 양을 표준으로서 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)에 관한 항존유전자(housekeeping gene)의 발현레벨을 이용하여 조정(calibrated)했다. 연속적인 PCR 반응을 위하여 GAPDH PCR 생산물(20 cycles에서, 데이터 나타나지 않음)과 동등한 양의 cDNA 수득량을 사용했다. 인간 배아 줄기 세포의 서로 다른 다능성 또는 분화 마커의 발현을 분석하기 위하여, 표 2에 기술된 프라이머를 이용하여 cDNA를 증폭했다. 서로 다른 라미닌 사슬의 발현을 분석하기 위하여, 프라이머를 사용했다. 모든 PCR반응은 (그림에 나타난 GAPDH PCR을 포함하여) 30 사이클 수행했으며, 1U 의 Taq DNA Polymerase Recombinant (GIBCO Invitrogen Corporation)를 이용하여 표준조건 하에서 20㎕에서 수행했다. 상기 PCR 산물을 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)를 함유하는 1.5%아가로스 겔(agarose gel)상에서 분석했다. 각 RNA 샘플에 대하여, 게놈 DNA가 분리동정되지 않았음을 확인하기 위하여 역전사효소 없이 RT-PCR을 수행했다.

표 2. RT-PCR용 프라이머(인간 샘플)

[0080]

유전자	전방 프라이머	후방 프라이머	산물크기 (bp)	Ta, (C)
Oct-4	CGACCATCTGCCGCTTTGAG (SEQ ID NO: 1)	CCCCCTGTCCCCCATTCCTA (SEQ ID NO: 2)	573	61
Nanog	AGCATCCGACTGTAAAGAATCTTCAC (SEQ ID NO: 3)	CGGCCAGTTGTTTTTCTGCCACCT (SEQ ID NO: 4)	433	61
GADPH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA (SEQ ID NO: 5)	TTCACACCCATGACGAACAT (SEQ ID NO: 6)	402	59
Pax6	AACAGACACAGCCCTCACAAAC (SEQ ID NO: 7)	CGGGAACTTGAACTGGAACTGAC (SEQ ID NO: 8)	275	61
α-feto protein (AFP)	CTTTGGGCTGCTCGCTATGA (SEQ ID NO: 9)	TGGCTTGGAAAGTTCGGGTC (SEQ ID NO: 10)	175	59
Brachyury	GAAGGTGGATCTCAGGTAGC (SEQ ID NO: 11)	CATCTCATTGGTGAGCTCCTT (SEQ ID NO: 12)	251	59
Sox1	CTCACTTTCCTCCGCGTTGCTTCC (SEQ ID NO: 13)	TGCCCTGGTCTTTGTCCTTCATCC (SEQ ID NO: 14)	849	61

[0081] 면역형광

[0082] 면역형광 연구를 위하여, 배아 줄기 세포를 배양하고 4%의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 8-웰 슬라이드 챔버(slide chamber, BD Biosciences) 또는 96-웰 플레이트 웰에 고정한 후, 0.1% Triton-X로 투과시키고(permeabilized) 한 시간 동안 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 함유하는 인산완충액(phosphate-saline buffer, PBS)에서 10 % 소태아혈청(bovine fetal serum, GIBCO Invitrogen Corporation)으

로 블로킹했다. 실온에서 1.5시간 동안 1차 항체로 배양(Incubation)을 수행했다. 2차 항체와 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes)으로 40분간 배양(Incubation)을 수행했다. 배양 간에(Between incubations), 검체(specimens)를 PBS 버퍼에서 0.1% Tween-20으로 3-5회 세척했다. 검체를 형광 마운팅 배지(fluorescence mounting medium, Dako, Glostrup, Denmark)에서 보존하고, 형광 현미경(Leica, Heerbrugg, Switzerland)하에서 관찰했다.

[0083] 서로 다른 mRNA의 실시간(Real-time) PCR 정량

[0084] 총 RNA를 분리동정하고 RT-PCR을 위해 상기된 바와 같이 cDNA를 합성했다. Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 실시간 정량 RT-PCR Taqman 분석을 수행했다. 관심 있는 mRNA를 위한 프라이머 및 탐침(probe)을 함유하는 미리 개발된 유전자 발현 분석 믹스(gene expression assay mix, Applied Biosystems)를 사용하여 모든 반응을 4반복(quadruplicates)으로 수행했다. RNA 투입(input)을 노멀라이징(normalizing)하기 위해 각 실험에 대한 부가적인 반응은 미리 개발된 GAPDH용 유전자 발현 분석 믹스를 포함했다. 모든 데이터는 7300 System SDS Software v 1.4로 분석했다.

[0085] 웨스턴 블롯(Western Blot) 및 덴시토메트리(Densitometry) 분석

[0086] LN-511상에서 배양 후에, 인간 배아 줄기 세포를 회수하여, 계수(count)하고 원심분리에 의해 펠릿화(pelleted)했으며, 2000 세포/㎕와 같은 농도로 비환원(non-reduced) SDS-PAGE 샘플 버퍼와 혼합한 후, 15초간 5 차례 초음파처리(sonicate)했다. 밀도구배(Gradient) 4-12% 겔을 SDS 전기영동에 사용하고 상기 단백질을 PVDF막에 옮겼다. 막은 2시간 동안 PBS-0.1% Tween buffer에서 밀크(milk) 용액으로 블로킹했다. 0.1% Tween buffer를 가지는 PBS 내의 5% 밀크(milk) 용액 내의 Oct4 및 Sox2(둘다 Millipore 제품)에 대한 1차 항체를 +4℃에서 밤새 막(membranes)과 함께 배양(incubated)했다. 4 차례 세척 후, 0.1% Tween buffer를 가지는 PBS 내의 HRP-결합된(HRP-conjugated) 이차 항체 5% 밀크(milk) 용액(희석 1:1000)을 실온에서 40분간 막과 함께 배양하고, PBS로 5차례 세척했다. Amersham Biosciences사의 화학발광(Chemoluminescent) HRP-기질을 시각화 용도로 사용했다. 필름을 2,400 dpi로 스캔하고 ChemiImager5500 프로그램(1D-Multi Line densitometry mode)으로 분석했다. 마트리겔 및 지지세포(feeder cells) 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포를 양성 대조군(positive control)으로 사용했다.

[0087] FACS 분석

[0088] Trypsin/EDTA로 세포를 배양 접시에서 제거하고, 단세포 현탁액(single cell suspension)으로 분리(dissociated)시킨 후, 얼음으로 냉각된 FACS 버퍼(2% fetal bovine serum, 0.1% sodium azide in Hanks buffer)내에 재현탁(resuspended)했다. 얼음에서 1시간 동안, SSEA-4, SSEA-1 (둘다 R&D Systems, Minneapolis, MN USA 제품), Tra1-60 또는 Tra1-81 (둘다 Millipore, Billerica, MA 제품)에 대한 1차 항체로 배양(Incubation)했다. 그리고 얼음으로 냉각된 FACS 버퍼로 세포를 3 차례 세척했다. 그 후, 암상(in the dark)에서 30분간 1:400 희석비율의 Alexa Fluor 항-마우스 이차항체(anti-mouse secondary antibodies, GIBCO Invitrogen Corporation)와 함께 FACS 버퍼에서 세포를 탐침 표지(probe)했다. 대조군 세포를 마우스 면역글로불린 및 , 계속하여, 상기된 바와 같이 이차항체로 배양했다. FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA)상에서 세포를 분석했다. CellQuest software (Becton Dickinson)로 데이터를 분석했다. Oct4 발현 분석도 수행했다.

[0089] 핵형분석(Karyotyping)

[0090] LN-511 상의 20계대에서 표준 Q-밴딩 기법(standard Q-banding techniques)을 이용하여 핵형분석을 수행했다. 세포 샘플을 최대 4시간 동안 콜세미드(colcemid) KaryoMAX(0.1㎍/ml; Gibco Invitrogen Corporation)로 처리한 후, TrypLE™ Express (Gibco Invitrogen Corporation)로 해리(dissociation)했다. 상기 세포를 원심분리를 통해 펠릿화(pelleted)하고 미리 데워진 0.0375 M KCl 저장성(hypotonic) 용액에서 재현탁(re-suspended)한 후, 10분간 배양(incubated)했다. 이어진 원심분리를 통해, 상기세포를 고정액(fixative)(3:1 메탄올:아세트

산)에서 재현탁했다. 중기 스프레드(Metaphase spreads)를 유리 현미경 슬라이드 상에 준비한 후, 트립신에 간단히 노출하여 G-밴딩하고 4:1의 Gurr's/Leishmann's stain (Sigma-Aldrich Co.)으로 염색했다. 최소 10개의 중기 스프레드(metaphase spreads)를 분석했고, 추가적인 20개를 계수했다.

[0091] 기형종(Teratoma) 형성

[0092] 중증복합면역결핍증(SCID)에 걸린 어린(생후 7주) 쥐의 고환낭(testicular capsule)아래 대략 106개의 세포를 이식하여 기형종 형성 실험을 수행했다. 각 세포주 당 3마리의 동물을 사용했다. 기형종 생장은 매주 촉진(palpation)으로 결정했으며, 이식 8주 후 쥐를 희생시켰다. 상기 기형종을 고정하고, hematoxylin 및 eosin (HE), 또는 hematoxylin, eosin 및 PAS (HE-PAS)로 절편(sections)을 염색했다. 염색된 절편으로부터 분석된 바와 같이, 모든 세 개의 배아 배엽층(embryonic germ line layers)의 조직 성분이 존재하는 것으로 나타났다. 모든 동물 실험은 윤리위원회의 승인하에 Karolinska 대학 병원의 무감염(infection-free) 동물 시설에서 수행되었다.

[0093] 배아유사세포덩어리(Embryoid Body) 형성

[0094] 배아 줄기 세포를 계대 배양하기 위하여 상기된 바와 같이 LN-511이 코팅된 세포 배양 접시로부터 분리했고, 조각으로 쪼갠 후 현탁액 96-웰 플레이트(Sarstedt)에서 배양했다. 여기에 사용된 배지는 2 mM L-글루타민(L-glutamine), 20% 태아종아리혈청(fetal calf serum, GIBCO Invitrogen Corporation), 0.1 mM β-mercaptoethanol (GIBCO Invitrogen Corporation) 및 1% 비필수 아미노산(non-essential amino acids, GIBCO Invitrogen Corporation)로 보충된 Knockout DMEM(GIBCO Invitrogen Corporation)이었다. 현탁액에서 1주일 후, 상기 배아유사세포덩어리(embryoid bodies)를 젤라틴 코팅된 조직 세포 배양 96-웰 플레이트(Sarstedt)로 옮겼고, 1주간 배양한 후, 고정하고, 모든 3개의 배아 배엽층(embryonic germ line layers)(smooth muscle actin, Nestin, MAP-2 및 α-fetoprotein, 모든 3개의 항체는 Millipore제품)의 마커에 대한 항체로 염색했으며, 면역형광에 관하여 상기된 바와 같이 분석했다.

[0095] 통계

[0096] 불균일 분산(unequal variances)에 관하여 스튜던트 양방적 티테스트(Student's two-tailed t-test)로 통계적 유의도(Statistical significance)를 결정했다.

[0097] 제 2세트 실험의 결과

[0098] A. LN-511에의 강한 부착이 기질에 관한 인간 배아 줄기 세포의 넓은 접촉 면적을 야기한다.

[0099] 세포 증식은 그들의 부착 기질에 대한 세포접촉 면적에 강하게 의존적이라는 것이 알려져 있다. 이러한 관념은 쥐 배아 줄기 세포의 서로 다른 라미닌 및 기타 ECM 단백질에 대한 부착 및 증식에 관한 본 발명자의 앞선 발견과 일치한다. 서로 다른 ECM 단백질에 대한 인간 배아 줄기 세포의 부착 특성을 비교하기 위하여, 출원인들은 LN-511, LN-332, LN-411, LN-111, Matrigel 또는 poly-D-lysine 기질 상에서 인간 배아 줄기 세포 부착 분석을 수행했다(도. 4a 및 4b). LN-511상에서 성장한 부착된 인간 배아 줄기 세포의 평균 접촉 면적은 마트리겔 상에 도포된 세포보다 약 1.6배, LN-332상에 도포된 세포보다 약 1.2배 넓었다(도. 4b). 기타 테스트된 코팅제 상에 퍼져있는 배아 줄기 세포는 LN-511상에서의 것보다 훨씬 덜했다.

[0100] B. HS207, HS420 및 HS401 세포는 LN-511을 발현한다.

[0101] 몇몇 인간 배아 줄기 세포주의 세포는 라미닌 α5, β1, 및 γ1 사슬을 발현하는 것으로 보고된다. 이것이 그러한 세포주들의 독특한 특성인지를 알아내기 위하여, 출원인들은 서로 다른 라미닌 사슬에 특이적인 프라이머를 이용하여 HS207, HS420 및 HS401의 세포로부터 유래된 cDNA 상에서 RT-PCR을 수행했다. α1, α2, 및 β2와 함께 α5, β1, 및 γ1 라미닌 사슬에 관한 모든 세 개의 전사체가 용이하게 탐지가능했으며, 모든 세 개의 세포주의 인간 배아 줄기 세포에서 LN-511이 발현되었음을 입증했다(도. 4c). 흥미롭게도, 기존의 보고서와 일치하는 α3 및 β3 라미닌 사슬의 전사는 등록되지 않았으며, LN-332가 배아 줄기 세포에서 생산되지 않았음을 시사

한다.

[0102] C. LN-511과의 접촉은 인간 배아 줄기 세포에서 활발히 발현되는 인테그린α6β1에 의존적이다.

[0103] 잠재적으로 인간 배아 줄기(hES)에 관련되고 LN-511에 결합하는 인테그린 수용체를 확인하기 위하여, 출원인들은 부착-차단(adhesion-blocking) 분석을 수행했다. 배아 세포의 단세포 현탁액을 다양한 인테그린 수용체에 대한 기능-차단(function-blocking) 항체와 함께 배지 내에서 LN-511로 코팅된 접시 상에서 배양(incubated)했다. 모든 실험된 인테그린 서브유닛 가운데, α6 및 β1이 그러한 조건하에서 LN-511과의 상호작용과 관련하여 가장 중요한 것이었다(도. 5a). 단세포 현탁액이 인간 배아 줄기 세포에 대하여 적합한 상태가 아니기 때문에, 같은 결과를 산출하는 세 번의 반복실험을 수행했다(데이터 제시되지 않음).

[0104] 최근 들어 α6 β1이 인간 배아 줄기 세포 표면에서 가장 풍부한 인테그린 이소폼(isoform) 이라는 것이 드러났다. 인간 배아 줄기 세포 표면상에서의 인테그린 서브유닛 양에 관한 질문에 더욱 답하기 위하여, 출원인들은 플라스틱 표면상에 항-인테그린 항체를 부동화(immobilized)시키고 부착된 인간 배아 줄기 세포를 결합시키고 보유할 수 있는 항체를 확인했다. 출원인들은 β1 인테그린 서브유닛에 관한 항체가 가장 강한 부착을 제공하는 반면, β2, β3, 및 β4에 관한 항체는 상기 세포를 표면에 훨씬 열악하게 부착하도록 유지한다는 것을 발견했다(β1에 대한 항체에 대한 부착과 비교하여 각각 19%, 4%, 및 4%)(도. 5b).

[0105] 면역형광 염색은 미분화된(Sox2 양성) 인간 배아 줄기 세포 내에서 α6 및 β1 인테그린 서브유닛의 발현 및 상기 세포의 표면에서 그들이 동일한 위치에 존재함을 확인했다(도. 5c).

[0106] D. 인간 배아 줄기 세포는 화학적으로 한정된 이종비함유(Xeno-free) 배지 내의 인간 재조합 LN-511상에서 최소 4개월간 자가재생한다.

[0107] 자가 재생을 지지하는 LN-511의 능력을 연구하기 위하여, 본 출원인들은 O3 및 H3 배지에서 세 개의 인간 배아 줄기 세포주를 배양했다. 상기 HS207, HS420 및 HS401 세포주는 양쪽 배지 모두에서 왕성하게 증식했다. 정상적으로, 상기 세포들을 작은 덩어리로(in small clumps) 6-7일 마다 1:2 또는 1:3의 비율로 계대 배양했으나, 많은 수의 세포가 필요한 경우 1:6 비율로 계대 배양할 수 있었다. 양쪽 배지에서 세포는 유사한 증식률과 표현형을 나타냈다. 도. 6a에 나타난 바와 같이, LN-511상에서 인간 배아 줄기 세포는 적어도 마트리겔 상에서 성장한 세포와 동등한 정도로 높게 안정적인 비율로 증식했다. 현재, HS420, HS207 및 HS401 세포주는 O3 배지에서 각각 28, 27, 및 25 계대를 거쳤다(5-6 개월 배양). 20 계대후, 세 개의 모든 세포주에 대하여 핵형은 정상적이었다(도. 9). 지금까지는, 상기 HS420 및 HS207 세포주는 H3에서 각각 29 및 27 계대(5 개월) 동안 증식했다. 면역형광 및 RT-PCR 분석은 인간 배아 줄기 세포가 Oct4, Nanog, 및 Sox2와 같은 다능성 마커의 높은 발현 수준을 유지했다는 것을 드러냈다(도. 6b 및 6c).

[0108] 인간 배아 줄기 세포를 계대 배양할 때, 인간 배아 줄기 세포는 단세포 현탁액이 아닌, 작은 덩어리로 도포했다. 흥미롭게도, 이튿날 벌써 상기 세포들은 단층으로 (매우 얇은 디스크 형태로 나타남) 표면에 퍼졌으며, 이는 LN-511로 코팅된 표면에 대한 친화도가 세포간(between cells) 부착보다 심지어 더 높거나 동등했다는 것을 시사한다. 통상적으로, 96-웰 배양 플레이트 상에 도포하는 경우, 상기 세포는 우선 얇은 합류층(confluent layer)을 형성했고, 그 후에 세포의 위쪽에서(on top of cells) 성장하여 세포층을 형성하기 시작했다. LN-511상의 단층과, 지지세포(feeders) 또는 마트리겔 상에서 성장한 세포간에는 차이가 있었고, 여기에서 상기 세포는 덜 동질적이며, 더 두꺼운 콜로니(thicker colonies)를 형성하는 것으로 나타났다.

[0109] 질적으로도, 안정적인 증식률을 가진 Oct4 및 Sox2 양성 세포는 다능성을 상실할 수 있다. 특이적인 다능성 마커의 발현을 정량하기 위하여, 본 출원인들은 서로 다른 시점에 LN-511 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포 샘플을 회수하고, 실시간 정량 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 주요 다능성 마커의 발현 수준을 마트리겔 또는 지지세포(feeder cells)층 상에 도포된 세포의 발현수준과 비교했다(도 6d 및 6e). 실시간 정량 RT-PCR은 양쪽 배지에서 배양된 인간 배아 줄기 세포의 Oct4 및 나노그(Nanog) 발현 수준은 시간에 따라 줄어들지 않았고, 마트리겔 상에 도포된 세포의 발현수준 보다 꾸준히 높았으며, 지지세포(feeder cells)상에 도포된 세포의 발현 수준과 동등했다는 것을 드러냈다. 웨스턴 블롯 정량은 Oct4 및 Sox2에 관한 것과 유사한 결과를 냈다. 형광 활성 세포 분류(fluorescent-activated cell sorting, FACS)에 의한 LN-511상에서 배양된 세포 분석은 대다수의 세포가 다능성 Oct-4, SSEA-4, TRA1-60, 및 TRA1-81 마커를 발현했으며, 단지 소량의 SSEA-1를 발현했다는 것을 입증했다(도. 6f 및 도. 10). 마트리겔 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포의 유사한 분석은 약간 적은 수의 Oct-4 및 SSEA-4 양성 세포를 드러냈다(도. 11).

[0110] LN-511, 마트리겔(Matrigel), 및 지지세포(feeders)상에서 인간 배아 줄기 배양 내의 자발적 분화 수준을 평가하기 위하여, 본 출원인들은 분화 Pax6, Sox17, 및 Sox7의 마커의 발현수준을 비교했다. 실시간 정량 RT-PCR은 20계대(4개월)후 LN-511 배양체(cultures) 및 4계대(1개월)후 마트리겔 배양체(cultures) 내의 3 개의 모든 마커의 비슷한 발현 수준을 나타냈다(도. 12).

[0111] LN-511이 새로운 인간 배아 줄기 세포주 유도(derivation)에 유용한지를 연구하기 위하여, 본 출원인들은 3일(three day)의 여섯 개의 배반포(blastocyst)의 내세포괴(inner cell mass)를 분리동정하고, 그들을 LN-511 상에 도포했다. 상기 세포는 상기 코팅제에 쉽게 부착했으며, 인간 배아 줄기 세포에 대한 전형적인 성장을 형성했다(도. 13a). 배양체에서 10일 후, 상기 생장물(outgrowth)이 기계적으로 조각났으며, 그 일부를 다능성 Nanog 및 Oct4의마커 발현을 나타내도록 염색했다(도. 13b 및 13c). 상기 실험은 윤리 위원회의 승인에 따라 수행되었다.

[0112] E. 인간 배아 줄기 세포는 LN-511 상의 4개월간의 배양 후에 인간 배아의 세 개의 모든 생식 세포 계열로 분화 가능하다.

[0113] O3배지에서 LN-511상에 15, 20 및 20계대 동안 배양된 HS207, HS420 및 HS401세포와 H3 배지에서 23계대 동안 배양된 HS207세포는 중증합병면역결핍증(SCID) 쥐의 고환에 접종(grafted)된 후 기형종(teratomas)을 형성했다. 염색된 절편 분석은 인간 배아의 모든 3개의 배 계통(germ lineages)의 세포로 분화할 수 있는 능력을 확인했다(도. 7a-7d). 발달 잠재력(developmental potential)을 더 시험하기 위하여, O3 배지내의 LN-511 상에서 20계대 후에 세 개의 모든 인간 배아 줄기 세포주를 배아유사세포덩어리(embryoid body)형성 및 세 개의 배엽의 마커 상에서의 계속된 면역염색에 의해 시험관 내에서 시험했다. 상기 염색은 중배엽(mesoderm, smooth muscle actin), 외배엽(ectoderm, Nestin and MAP-2) 및 내배엽(endoderm, α-fetoprotein) 마커의 발현을 나타냈고(도 7e), 따라서 상기 세포의 다능성에 관한 추가적인 증거를 제공했다.

[0114] F. 서로 다른 인간 배아 세포주가 LN-511상에서 자가 재생한다.

[0115] LN-511이 서로 다른 인간 배아 줄기 세포주의 자가 재생을 지지할 수 있는지를 결정하기 위하여, 본 출원인들은 특정화된(characterized) 웰을 배양하고 O3 또는 mTeSR1 배지에서 상기 단백질 상에 배양된 H1 및 H9 인간 배아 줄기 세포주를 광범위하게 사용했다. H1 및 H9 세포는 같은 조건 하에서 HS207, HS420 및 HS401 세포와 유사한 표현형 및 증식률을 가졌다. 면역형광 분석은 LN-511상의 배양에서 5계대(1개월)후에 상기 H1 및 H9세포가 Oct4, Nanog, 및 Sox2와 같은 다능성 마커의 발현을 유지했음을 나타냈다(도. 8).

[0116] III. 고찰

[0117] 본 연구는 LN-511이 최소 20계대 또는 4개월간, 이종비함유(xeno-free)환경 배양에서 인간 배아 줄기 세포의 생존 및 자가재생 지지를 위한 인공적인 위치(niche)를 제공했다는 것을 입증했다. 중요하게도, 상기 세포는 그와 같이 오랜 기간 동안 LN-511상에서 배양된 후에 인간 배아의 모든 세 개의 배 계통(germ lineages)의 세포 계보(cell lineages)를 포함하는 기형종(teratomas)을 형성했다. 화학적으로 한정된 인간 배아 줄기 세포용 이종-비함유(xeno-free) 피더-부재(feeder free) 배양 시스템에 관한 엄청난 요구가 있기 때문에, 여기에 기술된 시스템은 그러한 문제에 관한 해결책을 제공할 것이다.

[0118] 인간 배아 줄기 세포의 자연적인 기원(natural origin)인 배반포(blastocyst)의 내세포괴(inner cell mass)에서 관찰되었기 때문에, LN-511은 인간 배아에서 줄기 세포를 위한 자연적 장소(natural niche)의 일부인 것 같다. 더욱이, 지지 세포 상에서 시험관 내에서 배양된 인간 배아 줄기 세포의 콜로니에서 LN-511이 발현된다. 게다가, 인간 배아 줄기 세포는 LN-511 자체를 발현하며(도. 4c), 또한 상기 단백질은 지지 층(feeder layer) 상에서 그들의 자가 재생에 중요한 배아 줄기 세포 어셈블리(assembly)를 촉진한다. LN-511이 인간 배아 줄기 세포의 자연적인 환경의 일부이므로, LN-511은 시험관 내에서 인간 배아 줄기 세포의 자가 재생을 위한 생물학적으로 관련된 코팅 매트릭스를 제공한다. 최근, LN-111, LN-332 및 LN-511와 같은 몇몇 재조합 인간 라미닌 상에서, 인간 배아 줄기 세포가 96시간 동안 다능성을 유지했다고 보고되었다. 그러나, 쥐 배아 줄기 세포에 관한 앞선 연구는 배아 줄기 세포 자가 재생을 위한 매트릭스 분자의 능력(capacity)을 입증(demonstrate)하기 위하여 세포를 더 오랫동안 배양하는 것이 중요하다는 것을 보여주었다. 그러한 연구에서, 쥐 배아 줄기 세포는 최

소 169일간 LN-511 및 LN-332 양쪽 모두에서 생존하고 증식했으나, LN-511 상에서 배양된 쥐 배아 줄기 세포만이 생식세포 컴피턴트(germ-line competent) 키메라 쥐를 생성할 수 있었다.

[0119] 인간 배아 줄기 세포가 새로운 LN-511로 코팅된 플레이트에 덩어리로 계대 배양된 후에 단층을 형성하는 경향이 있다는 것이 흥미롭다. 이는 LN-511이 정상적으로 인간 배아 줄기 세포에 이동 잠재력(migration potential)을 제공할 수 있었고, 따라서 용해성 영양소와 성장인자의 미약한 운반으로 빽빽한 다층 다발(dense multilayer clusters)을 형성하는 것을 회피할 수 있었음을 시사한다. LN-511 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포에 관한 용해성 인자의 효용성(availability)은, 지지세포(feeders)나 마트리겔 상에서 배양될 때 무성히 자란(overgrown) 배아 줄기 세포 가운데서 통상적으로 나타나는 자발적 분화(spontaneous differentiation) 및 사멸(mortality)을 회피하도록 도울 수 있다. 용해성 인자(soluble factors)의 동등한 효용성(equal availability)이 분화된 세포의 더욱 동질적인 집단을 생성할 수 있었기 때문에, 인간 배아 줄기 세포의 단층은 분화 과정의 발달에 또한 유익할 수 있다.

[0120] 인간 배아 줄기 세포의 모든 집단은, 아마도 자발적 분화(spontaneous differentiation)때문에 어느 정도는 분화된 세포를 포함한다. 인공적인 장소(artificial niche)는 미분화 인간 배아 줄기 세포로 하여금 그것을 콜로니화하거나 자가 재생하도록 경쟁 이점(competition advantages)을 제공해야 한다. 본 출원인들은 실험 도중 어떠한 양성선택(positive selection)도 수행하지 않았지만, 그럼에도 불구하고, FACS를 이용하여 전체 실험과정을 통하여 미분화된 인간 배아 줄기 세포의 비율이 안정적이고도 높았다는 것을 보여 주었다(도. 6f).

[0121] 본 출원인들은 LN-511에 대한 인간 배아 줄기 세포의 부착 기작은 또한 α6β1 인테그린 수용체에 대한 결합에 강하게 의존적임을 보여 주었다. 게다가, 본 출원인들은 β1 인테그린에 대한 항체가 β2, β3, 또는 β4 인테그린보다 인간 배아 줄기 세포의 더욱 강한 부착을 지지한다는 것을 관찰했고, 이는 세포 부착에서 β1 인테그린의 중요한 역할을 강조한다(도. 5b). 최근에, α6β1이 인간 배아 줄기 세포 표면24 상에서 가장 풍부한 인테그린 이소폼(isoform) 이라는 것이 드러났다. 이러한 관찰에 근거하여, 본 출원인들은 α6β1 인테그린을 왕성히 발현하는 인간 배아 줄기 세포는 LN-511이 코팅된 표면에 빨리 부착하고, 효율적으로 이동한 후 그들의 자가 재생을 촉진할 수 있다. 그러한 까닭에, LN-511의 역할은 인간 배아 줄기 세포에게 표면에 대한 초점접착역(focal adhesion) 접촉을 제공하고 그 위에서 이동 가능하도록 하는 것일 수 있다. LN-511 발현이 초기 배아에 한정되지 않고, 다만 많은 성체 조직(adult tissues)의 기저막(basement membranes)에서 발견된다는 사실은 그러한 생각을 지지한다.

[0122] 시간적인 측면에서, LN-511이 코팅된 실험실 플레이트 상에서 인간 배아 줄기 세포 자가 재생으로 얻어진 본 결과는 적어도 쥐 EHS 육종-유래 마트리겔로 또는 인간 지지 세포 상에서 얻어진 것만큼이나 좋은 것이다. 그러나, 인간 LN-511 코팅제의 완전히 한정되고 이종비함유인 조성물은 표준화되고 비가변(non-varying)인 과학적 및 미래 임상 적용의 측면에서 중요한 이점을 가질 수 있다. 또한, 화학적으로 한정된 기질은 같은 목적으로 지지세포를 사용하는 것과 비교하여 주요 이점이있는데, 이는 지지세포가 사이토카인, 성장인자 및 기타 단백질과 같은 그들의 생리활성물질(bioactive molecule) 생산시에 가변적일 수 있고, 대부분 알려져 있지 않으며, 또한 결과에 있어서의 샘플별 다양성(batch-to-batch variability)뿐만아니라, 세균이나 바이러스 감염에 대한 위험에 노출될 수 있기 때문이다. 따라서, 본 연구에서 기술된 LN-511에 기반한 이종비함유(xeno-free) 및 지지세포-부재(feeder-free) 인간 배아 줄기 세포 배양 시스템은 어러한 문제에 관한 중요한 해결책이 될 수 있다. 대다수의 국가에서, 통제 당국은 인간 치료 용도로 의도된 어떠한 반응물질에 대하여도 엄격한 규칙을 적용한다. 인간 재조합 LN-511이 인간 세포에서 생산된 화학적으로 한정된 단백질이기 때문에, 세포 치료용 인간 세포 개발에 적합한 단백질을 생산할 수 있는 생산 프로토콜을 확립하는 것이 가능해 진다. 우수의약품제조관리기준(good manufacturing practice, GMP)으로 쉽게 제조 가능하다.

[0123] TeSR1 배지는 마트리겔(Matrigel)과 사용하도록 공식화(formulated)되었다. 이는 매우 높은 농도로 많은 성장인자를 포함한다. LN-511이 인간 배아 줄기 세포의 우수한 확산(spreading)과 주요 다능성 마커의 높은 평균 발현을 제공하였기 때문에, 배지 조성물을 특히 bFGF와 같은 성장인자의 도즈(doses)를 감소시키기 위하여 최적화하는 가능성이 열려있다. 마트리겔과 달리, LN-511은 샘플별(batch-to-batch) 코팅제로부터 안정적인, 한정된 동질적인 단백질 분자이다. 시험관 내에서 인간 배아 줄기 세포를 배양하기 위해 더욱 한정된 환경을 사용하는 것은 분화의 분자수준 메카니즘을 개발하고 이해하는데 도움을 줄 수 있으며, 시험관 내에서 인간 배아 줄기 세포에 관한 분화 경로 설계에 더욱 조절 가능한 조건을 제공한다.

[0124] 특정한 구현예가 개시되었지만, 현재 예측되지 않거나 않을 수 있는 대체물, 변형, 변경, 개선 및 실질적인 동등물이 출원인 또는 기술분야의 다른 당업자에게 나타날 수 있다. 따라서, 출원된 대로의 및 보정될 수 있는 대

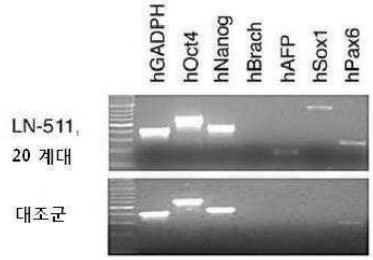
로의 첨부된 청구항은 이러한 모든 대체물, 변형, 변경, 개선 및 실질적인 동등물을 포괄하기 위한 의도이다.

도면

도면1

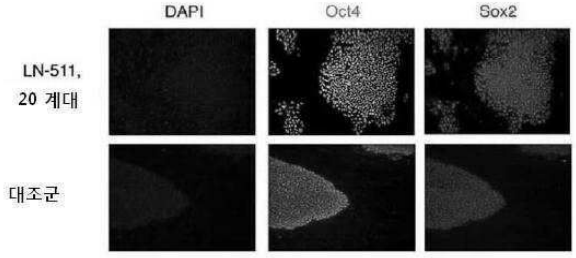
도 . 1

도면2



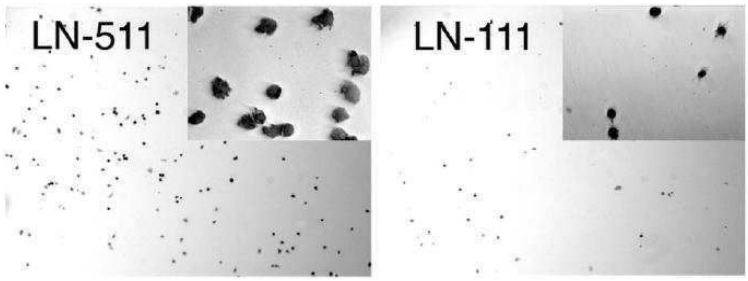
도. 2

도면3



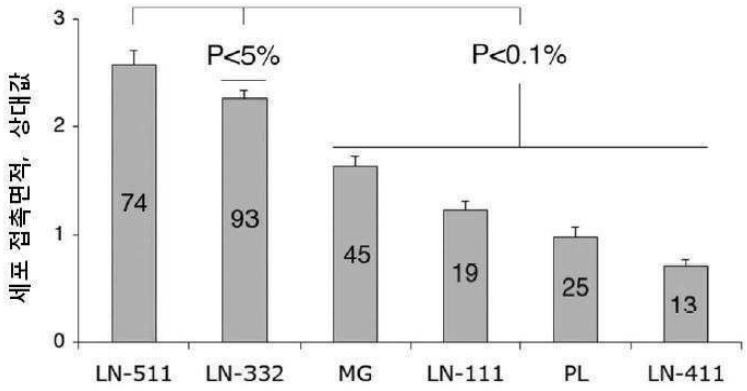
도. 3

도면4a



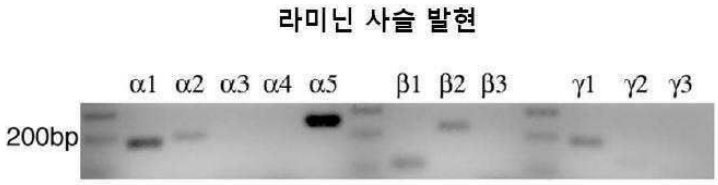
도. 4a

도면4b



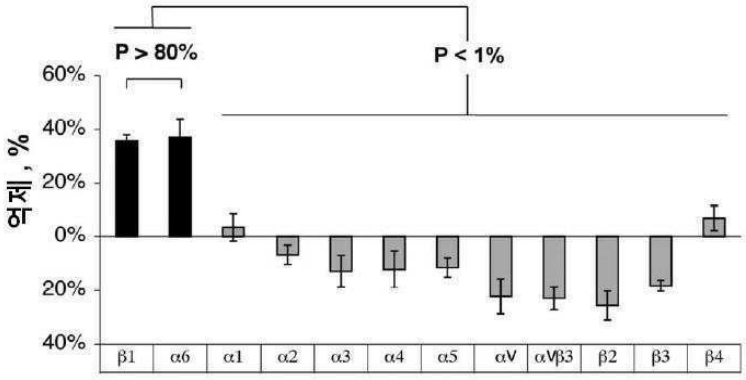
도. 4b

도면4c



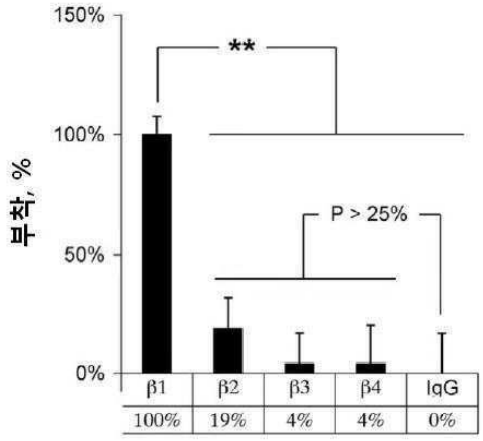
도. 4c

도면5a



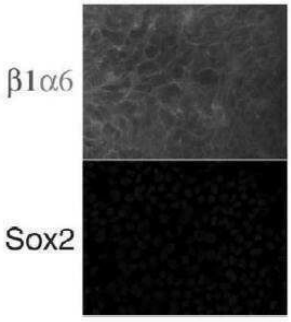
도. 5a

도면5b



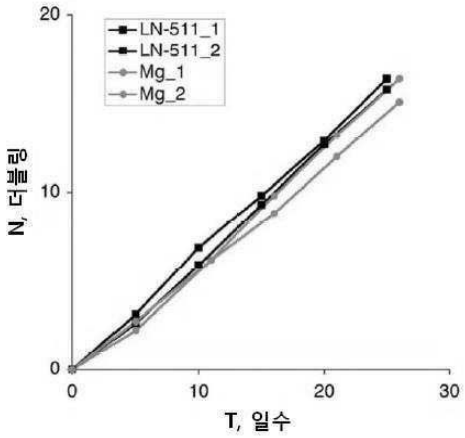
도. 5b

도면5c



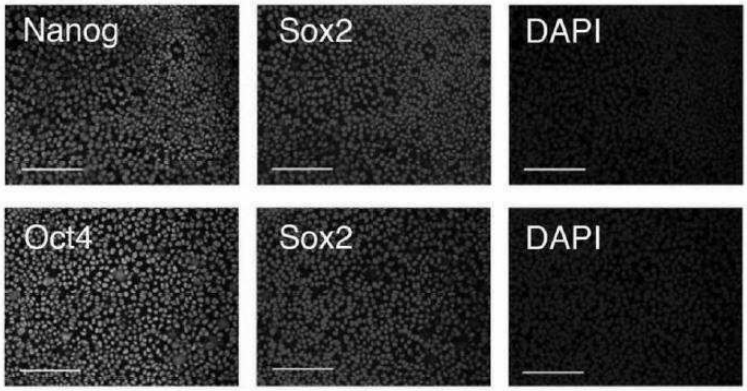
도. 5c

도면6a



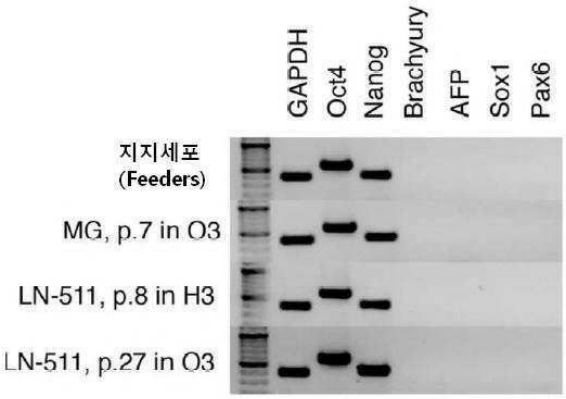
도. 6a

도면6b



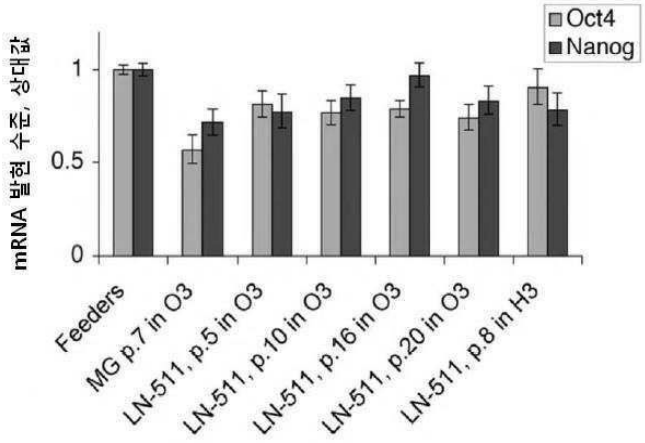
도. 6b

도면6c



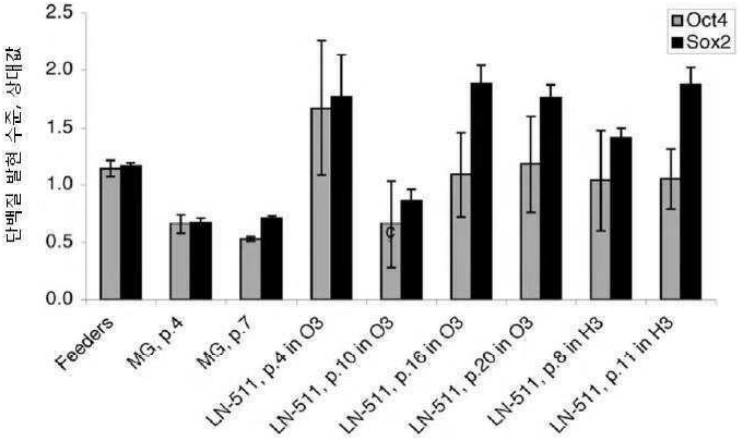
도. 6c

도면6d



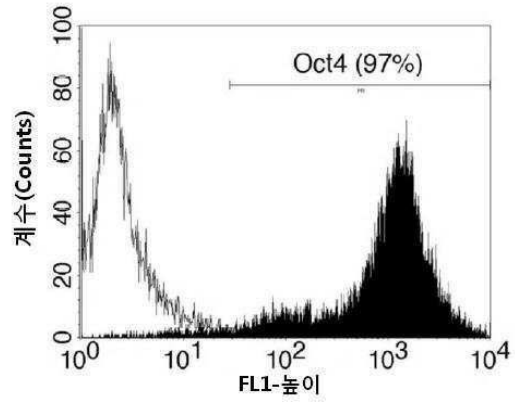
도. 6d

도면6e



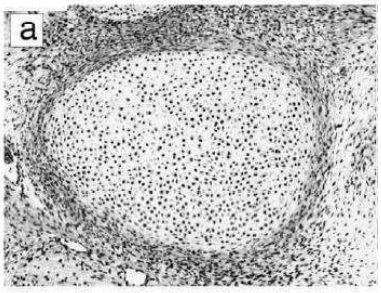
도. 6e

도면6f



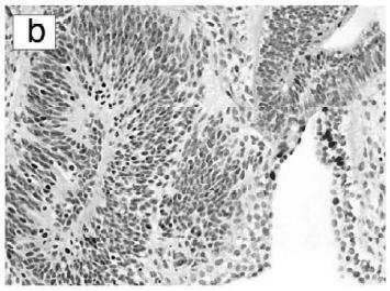
도. 6f

도면7a



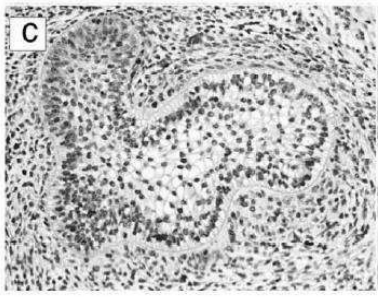
도. 7a

도면7b



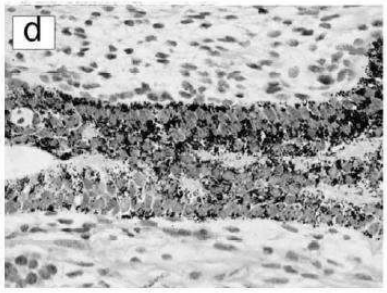
도. 7b

도면7c



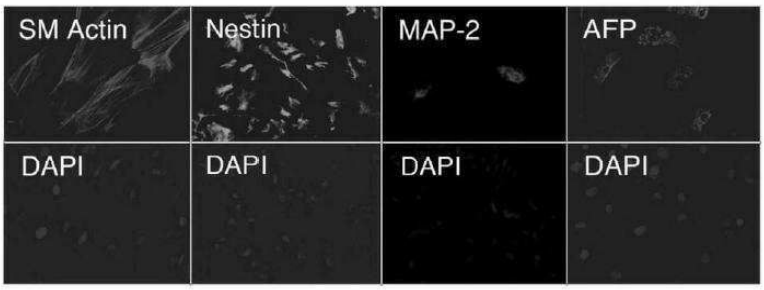
도. 7c

도면7d



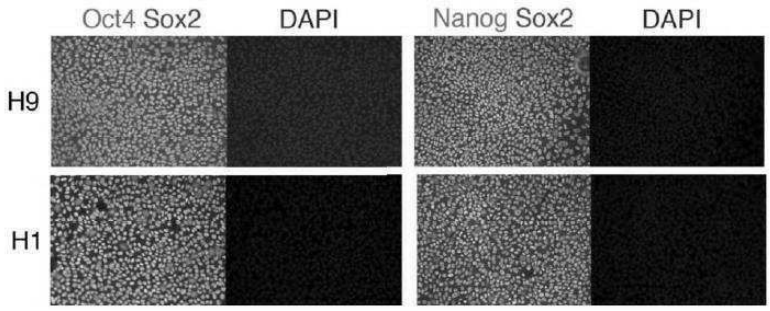
도. 7d

도면7e



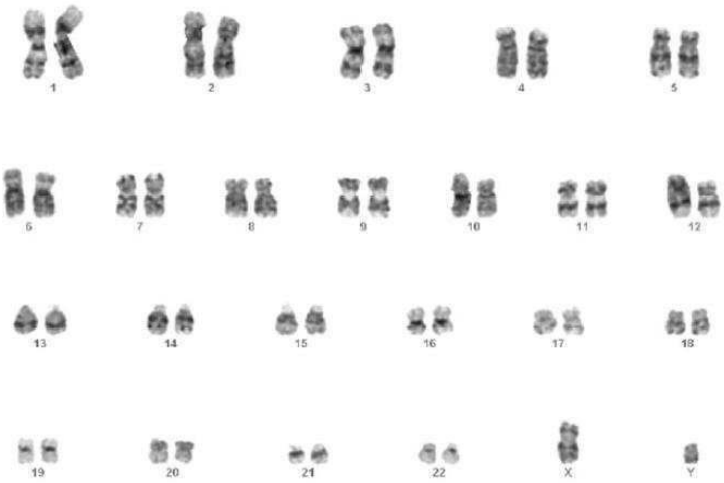
도. 7e

도면8



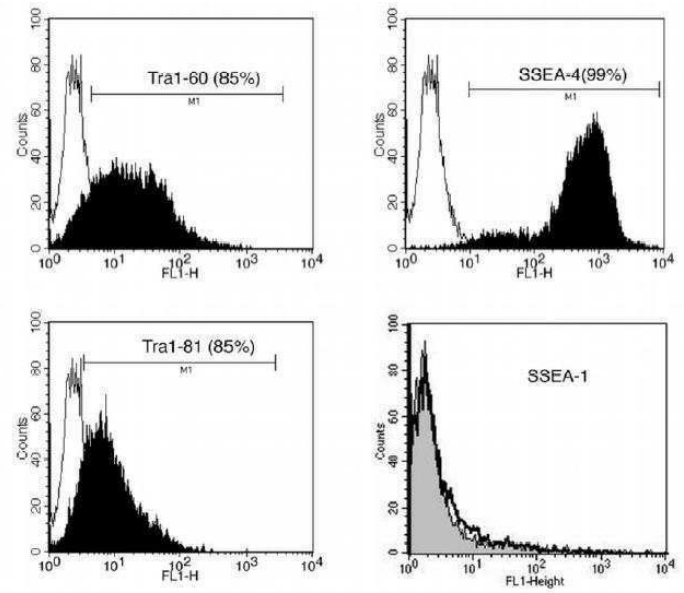
도. 8

도면9



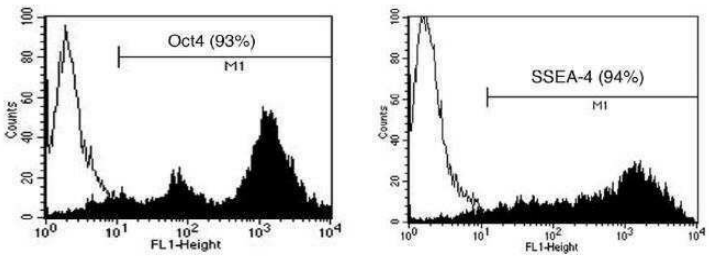
도. 9

도면10



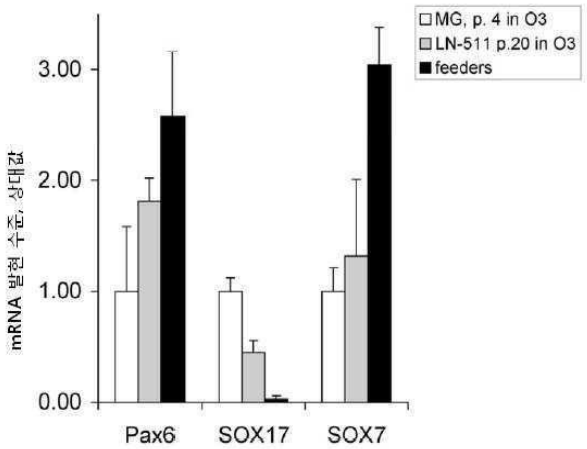
도. 10

도면11



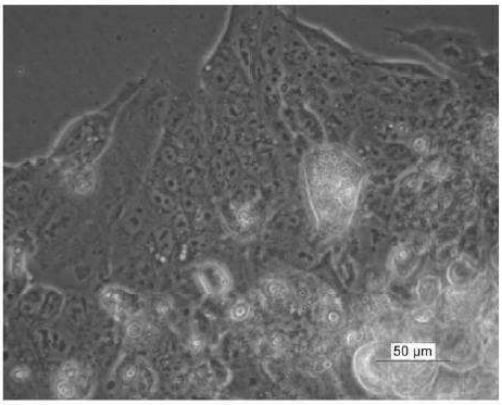
도. 11

도면12



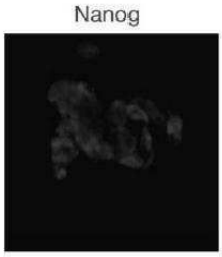
도. 12

도면13a



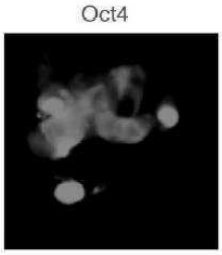
도. 13a

도면13b



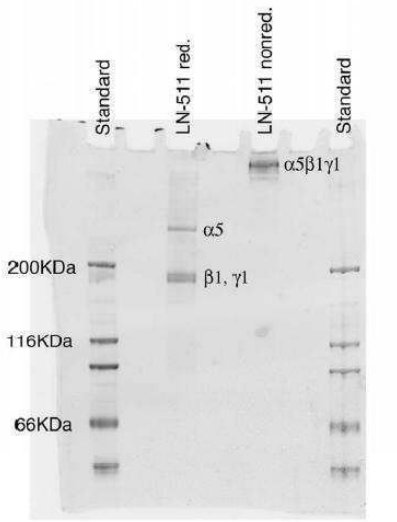
도. 13b

도면13c



도. 13c

도면14



도. 14

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Rodin, Sergey

Domogatskaya, Anna

Tryggvason, Karl

<120> COMPOSITION AND METHOD FOR ENABLING PROLIFERATION OF PLURIPOTENT STEM CELLS

<130> LCTI 2 00001WO04

<150> US 60/883,406

<151> 2007-01-04

<150> US 12/725,877

<151> 2010-03-17

<150> US 11/969,620

<151> 2008-01-04

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cgaccatctg ccgctttgag 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ccccctgtcc cccattccta 20

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

agcatccgac tgtaaagaat cttcac 26

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cggccagttg tttttctgcc acct 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gaaggtgaag gtcggagtca 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ttcacaccca tgacgaacat 20

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

aacagacaca gccctcacaa ac 22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cgggaacttg aactggaact gac 23

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

ctttgggctg ctcgctatga 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

tggcttggaa agttcgggtc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gaaggtggat ctcaggtagc 20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

catctcattg gtgagctcct t 21

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ctcactttcc tccgcgttgc ttcc 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

tgccctggtc tttgtccttc atcc 24