(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12N 5/08
A61K 35/39
A61P 1/18

(11) 공개번호 10-2004-0081744
(43) 공개일자 2004년09월22일

(21) 출원번호 10-2004-7009920
(22) 출원일자 2004년06월21일
번역문 제출일자 2004년06월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/041616
(87) 국제공개번호 WO 2003/059072
(86) 국제출원출원일자 2002년12월23일
(87) 국제공개일자 2003년07월24일

(30) 우선권주장 60/342,250 2001년12월21일 미국(US)

(71) 출원인 암사이트 인크.
미국 캘리포니아주 90404 산타 모니카 산타 모니카 블러바드 2825

(72) 발명자 트상웬-기
미국 캘리포니아주 91423 셔먼 오크스 모리슨 스트릿 13161

젱티아늘리
미국 캘리포니아주 90230 쿨버 시티 브래드독 드라이브 11047

왕얀핑
미국 캘리포니아주 90066 로스 앤젤레스 #302 소텔레 불러바드 3260

(74) 대리인 김성기

심사청구 : 없음

(54) 배양 및 캡슐화된 췌장 줄기 세포

요약

본 발명은 포도당에 반응하여 인슐린을 생산하는 안정한 세포주로 동일계(in situ)에서 성숙할 수 있는 췌장 줄기 세포의 초기 분화 단계가 존재한다는 발견에 관한 것이다. 이러한 세포들은 배양물에서 증식 가능함과 동시에 안정하다는 것이 장점이다. 본 발명에 의하면 초기 단계 줄기 세포를 후기 단계 췌장 세포가 되도록 배양하는 단계가 필요치 않다.

명세서

관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2001년 12월 21일자 가명세서 출원 제60/342,250호를 기초로 우선권을 주장하며, 이 출원의 내용은 본원에서 참고문헌으로 포함한다.

연방정부 지원 연구 및 개발 하에 이루어진 발명에 대한 권리에 관한 성명

적용되지 않음

컴팩트 디스크로 제출된 '서열 목록', 표 또는 컴퓨터 프로그램 목록 부록에 관한 언급

적용되지 않음

기술분야

본 발명은 포도당에 반응하여 인슐린을 생산하는 세포의 안정한 배양물을 생산하기 위해 동일계 조건 하에서 캡슐화되어 성숙할 수 있는 췌장 줄기 세포의 초기 분화 단계가 존재함을 발견한 것에 관한 것이다. 이러한 세포들은 배양물에서 증식 가능함과 동시에 안정하고, 후기 발달 단계로 유도될 수 있기 때문에 유용하다. 본 발명에 의하면 이러한 초기 분화 단계 세포를 후기 췌장 세포가 되도록 시험관내에서 배양하는 단계가 필요치 않다.

배경기술

포유동물 췌장은 배아의 전장 아상돌기로부터 발달한다. 배아 아상돌기가 성장함에 따라 분지 형태발생에 의해 도관계가 발달한다. 복부 및 등 원기가 융합된 후, 새로운 장기가 성장하고 성숙하여 두 개의 연결된 구조를 형성하는데, 이것이 외분비계와 내분비계이다. 췌장의 대부분은 소화 효소를 생산하는 포상 세포로 구성된다. 내분비계는 인슐린을 생산하는 β-세포, 글루카곤을 생산하는 α-세포, 및 소마토스타틴을 생산하는 δ-세포를 포함한다. 내분비 세포는 조직화되어 랑게르한스섬이라 불리는 클러스터를 형성한다.

동물 연구를 통해, β-세포 형성에는 적어도 두 가지 메카니즘이 존재한다는 것이 확인되었다: 도관 전구체 세포로부터의 신생 및 성숙 β-세포의 복제. 분화된 β-세포의 복제는 생후시부터 성인에 이르기까지 유지된다. β-세포의 복제는 인슐린에 대한 요구 증가에 의해, 예를 들어 고포도당 주입, 부분적 췌장 절제술에 의해, 또 임신 중에 촉진된다. 이러한 상황에서 β-세포 질량은 세포 비대증(개개의 세포의 부피 확대) 및 과형성(β-세포수의 증가) 둘 다에 의해 급격히 증가한다.

I형 또는 인슐린 의존형 당뇨병(IDDM)에서는 β-세포에 대한 자가 면역 공격으로 인한 β-세포수의 분명한 감소가 존재한다(Eisenbarth, N. Eng. J. Med. 314:1360-1368(1986)). I형 당뇨병의 치료는 I형 당뇨병 환자에서 β-세포수를 증가시키는 것을 포함한다(Bonner-Weir, Endocrin. 141:1926-1929(2000)).

랑게르한스섬을 이용한 당뇨병의 또다른 치료법은 면역 일치 공여자로부터의 췌장 조직을 이식편 수용자에게 이식하는 과정을 포함한다. 일반적으로, 이식편 수 용자는 이식된 장기의 거부 반응을 막기 위해 면역억제제 요법을 받을 것이 요구된다. 최근에 개발된 면역억제제 요법은 인간에서의 임상적 랑게르한스섬 이식의 결과를 개선시켰다. 이 기법은 아직 실험 단계이긴 하나, 랑게르한스섬 이식편이 전체 장기 췌장 이식편과 동일한 기능을 수행할 수 있다면, 이러한 훨씬 더 간단한 수술 절차는 당뇨병 치료에서 중요한 역할을 할 것이다.

인간 랑게르한스섬의 이식은 당뇨병의 효과적인 치료법으로서의 전망을 제시하지만, 현재 이 절차의 유용성을 제한하는 다수의 장애가 존재한다. 한 가지 심각한 장애는 상기 절차에 사용할 충분한 수의 랑게르한스섬을 생산할 수 없다는 점이다. 현재, 이식을 위한 랑게르한스섬을 얻기 위해 사용되는 방법은 일반적으로 췌장 조직의 분리, 주변 조직으로부터 개개의 세포를 해리시키기 위한 췌장 조직의 효소적 분해, 및 구배 원심분리 정제 기법의 사용을 포함한다. 구배 원심분리 정제 기법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 다수의 랑게르한스섬 이식편 센터에 의해 수행된다. 불행히도, 표준 절차로 처리한 단일 췌장으로부터의 랑게르한스섬의 수율은 일반적으로 이식에 불충분하다. 따라서, 이러한 방법의 대안을 찾게 되었고 개발하게 되었다.

초기 단계 췌장 줄기 세포를 선택적으로 증식시키기 위한 방법이 개발되었다. 요약하면, 공여자 췌장으로부터 세포를 분리한 후 이 세포를 고혈청 배지에서 회복시킨 후, 초기 단계 췌장 줄기 세포의 성장을 촉진하는 저혈청 배지로 전환시켰다. 이러한 세포들은 콘디셔닝된 배양 접시 상에서 인슐린 분비 세포 집합체로 성숙하여 융합 상태로 성장할 수 있다. 그러나, 이러한 집합체 세포는 제한된 임상 적 용도만을 지니는데, 그 이유는 바로 이식될 경우, 이 세포는 숙주에서 유해한 면역 반응을 유발할 수 있기 때문이다.

도면의 간단한 설명

도 1: 도 1은 이식 전 캡슐화된 증식 P3 집합체를 나타낸다. 이 세포는 (A) CK19-1, (B) 인슐린, (C) 글루카곤 및 (D) 소마토스타틴에 대하여 면역염색하였다. 배율은 60X이다.

도 2: 도 2는 200개 액체 캡슐 중의 105 HD394i, P3 세포의 이식 전 및 후의 SCID 마우스에서의 혈당 농도를 나타낸다.

도 3: 도 3은 동물로부터 분리한 후의 캡슐화된 증식 P3 집합체를 보여준다. 이 세포는 인슐린 특이적 항체로 염색하였다. 하기 배율로 나타내어진다: (A) 영역 1, 4X; (B) 영역 1, 10X; (C) 영역 1, 60X; (D) 영역 2, 10X; (E) 영역 2, 60X; (F) 영역 2, 60X.

도 4: 도 4는 (A) CK19-1, (B) PDX-1, (C) 인슐린, (D) 글루카곤, 및 (E) 소마스토스타틴에 대해 면역염색한 배양 6개월 후의 분리된 캡슐화된 랑게르한스섬을 보여준다. 배율은 60X였다.

도 5: 도 5는 (A) CK19-1, (B) PDX-1, (C) 인슐린, (D) 글루카곤, (E) 소마스토스타틴 및 (F) 아밀라제에 대해 면역염색한 배양 28개월 후의 분리된 캡슐화된 랑게르한스섬을 보여준다. 배율은 60X였다.

도 6: 도 6은 9개월 이상 동안 배양물에서 유지시킨, 4,000개의 캡슐화된 HD357 랑게르한스섬(200개 캡슐로)의 이식 전 및 후의 누드 래트에서의 혈당 농도 를 보여준다. 118일째 100개의 이식된 캡슐을 회수하였다.

도 7: 도 7은 4,000개의 캡슐화된 HD357 랑게르한스섬(200개 캡슐로)의 수용자 내에서의 경구 혈당 내성 테스트의 결과를 보여준다. 이 테스트는 이식 후 35일째 수행하였다.

도 8: 도 8은 천연 인간 췌장에서의 단백질 발현을 보여준다. 샘플은 하기 단백질에 대하여 면역염색하였다: (A) CK-19, (B) PDX-1, (C) 인슐린, (D) 글루카곤, (E) 아밀라제. 배율은 60X였다.

발명의 요약

본 발명은 (i) 1 cm ^{2} 당 약 180개 세포의 최초 농도로 제1 배양 용기에서 제2 배양 용기로 계대 배양되어, 1 cm ^{2} 당 약 1,800개 세포로 증식할 수 있는 특성, (ii) 증식 및 비증식 세포 둘 다 90% PDX-1 양성이고, 인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비가 1:100 1,000:1인 특성을 보유하는, 증식하는 췌장 세포의 세포 배양물을 캡슐화함으로써 포유동물에게 인슐린을 제공하는 동일계 방법을 제공한다. 캡슐화 후 세포는 상기 세포가 인슐린 분비 세포로 성숙할 수 있도록 허용하는 포유동물에게 이식된다(transplant 또는 implant).

한 구체예에서, 세포는 세포의 집합체로 성숙한다. 이 세포 집합체는 CK19-양성 세포의 맨틀 및 50 5,000개의 췌장 세포의 내부 세포 덩어리를 포함하며, 직경이 50 300 마이크론이다. 본 발명의 또다른 구체예에서 포유동물은 당뇨병이 있는 인간이다.

본 발명의 한 측면에서, 세포 배양물은 인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비가 1:10 100:1이다.

또다른 구체예에서, 캡슐화 과정은 세포를 알기네이트로 둘러싸서 캡슐을 형성하는 단계, 이가 양이온으로 알기네이트를 가교시키는 단계 및 폴리리신 막을 제공하여 캡슐을 밀봉하는 단계를 포함한다.

또다른 구체예에서, 본 발명은 증식할 수 있는 능력, 및 (ii) 증식 및 비증식 세포 둘 다 90% PDX-1 양성이고, 인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비가 1:100 1,000:1인 특성을 보유하는 캡슐화된 췌장 세포를 제공한다.

정의

'캡슐화'란 생화합성 비세포성 물질, 예컨대 나트륨 알기네이트 및 폴리리신에 의해 세포를 둘러싸는 과정을 말한다. 바람직하게는 당과 같은 작은 분자 및 저분자량 단백질이, 캡슐화 세포를 둘러싸는 환경으로부터 흡수되거나 그 환경으로 분비될 수 있다. 동시에 더 큰 분자 및 면역 세포에 의한 캡슐화 세포로의 접근이 제한된다.

'동일계(in situ)'란 캡슐화되는 동안의 세포 성숙 또는 성장을 말한다. 동일계 성장 또는 성숙은 배양 용기 내에서 또는 동물에게 이식한 후 발생할 수 있다.

'성숙한' 또는 '성숙'이란 세포가 미분화 상태에서 분화 상태로 진행하는 과정을 의미한다. 예를 들어, 미분화 췌장 세포는 증식할 수 있고, PDX-1과 같은 특징적인 마커를 발현한다. 성숙 췌장 세포는 증식하지 않으며, 고농도의 췌장 내분 비 호르몬을 분비한다. 예를 들어, 성숙 β-세포는 인슐린을 고농도로 분비한다. 세포 상호작용 및 성숙에 있어서의 변화는 세포가 미분화 세포의 마커를 상실하거나 분화 세포의 마커를 획득할 때 발생한다. 단일 마커의 상실 또는 획득은 세포가 '성숙되었음'을 나타내는 것일 수 있다.

세포와 관련하여 사용되는 '집합체'는 3차원 구조체를 말한다.

'CK-19'란 40 Kd 산성 케라틴, 사이토케라틴 19이다.

'인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비'는 인슐린 및 액틴에 대한 상이한 표지를 사용하여 실시간 PCR에 의해 또는 겔 스캐너를 사용하여 밴드 밀도에 의해 측정한다. 이것은 세포 집단 전체에 대한 평균이다.

'이식하다'란 수용자에게 세포를 이식 또는 배치하는 것이다. 이것은 캡슐화 및 비캡슐화 세포를 포함한다. 세포는 피하, 근육내, 간문내 또는 복강내에 당업계에 공지된 방법에 의해 이식할 수 있다.

표면에 부착된 단층으로서 성장하는 세포의 '계대 배양'이란 접종된 배양물을 부분 융합 상태에서 융합 상태로 이전하는 것을 말하며, 이 시점에서 이 세포들은 배양 용기로부터 제거되어 배양 용기에 저농도로 재접종된다. 그러나 세포들은 융합 상태에 도달하기 전에 계대 배양할 수 있다. 계대 배양은 일반적으로 이들이 성장하여 융합 상태에 도달함에 따라 세포 집단의 증식을 초래한다. 세포 집단의 증식은 최초 접종 밀도에 좌우되지만, 일반적으로 1 10, 1 5, 1 3, 또는 1 2배 증식이다. 따라서 계대 배양은 일반적으로 세포가 배양물에서 여러 회 세포 분열할 수 있을 것을 요한다.

세포의 '집단'이란 특정 분리 또는 배양 절차에 의해 얻어진 다수의 세포를 말한다. 본 발명의 선별 방법은 비교적 균일한 특성을 갖는 집단을 산출하지만, 세포의 집단은 마커 발현 또는 기타 표현형에 대하여 분석할 때 불균질할 수 있다. 세포 집단의 특성은 일반적으로 특정한 성질(예를 들어, 특정 마커에 대해 양성으로 염색되는 세포의 백분율) 또는 전체 집단에 대하여 측정하였을 때의 그 성질의 벌크 평균값(예를 들어, 세포 집단으로부터 제조된 용해물 내의 mRNA의 양)에 의해 정의된다.

'90% PDX-1 양성'이란 무작위적으로 선택된 세포의 통계적 샘플링을 의미한다. 표준 면역화학 기법이 사용되며, 양성으로 염색된 세포는 현미경 하에서 시각적으로 계측한다. 백분율은 적절히 조절된 샘플과 비교함으로써, 즉 동일한 세포를 준비하고, 유사한 이소타입을 갖지만 PDX-1에 대하여 특이적이지 않은 항체를 사용하여 측정한다.

'혈청'이란 혈액 세포 외에 혈액으로부터 분리된 물질을 말한다. 혈청은 일반적으로 원심분리 및 피브린 제거에 의해 혈액 세포의 물리적 분리 또는 혈액 응고에 의해 얻는다. 본원에서 사용되는 혈청은 그 생물학적 활성에 의해 기능적으로 정의될 수 있으며, 혈청은 일반적으로 배양 배지에 첨가될 때 배양물에서 포유동물 세포의 성장을 지지한다. 혈청은 다양한 종(예, 인간, 소, 양, 말, 돼지, 토끼, 닭 등) 및 다양한 발달 단계(예, 태아, 아동 또는 성인)로부터 얻을 수 있다. 특정 구체예에서, '혈청'은 분류된 혈청으로부터 또는 기타 공급원으로부터 얻은 혈청 보강물 또는 대체물, 예를 들어 Select Soytone(벡턴 디킨슨) 또는 기타 시판되는 제 품을 말하기도 한다. 이러한 혈청 등가물은 완전히 또는 부분적으로 정의될 수 있다.

'맨틀'이란 내부 세포 덩어리를 3차원적으로 둘러싸는 세포의 외피를 말한다.

발명의 상세한 설명

본 발명은 췌장 줄기 세포의 초기 분화 단계가 존재하고, 이 췌장 줄기 세포는 캡슐화하는 동안 인슐린 생산 집합체로 성숙할 수 있다는 발견에 관한 것이다. 이러한 췌장 줄기 세포는 췌장으로부터 직접 분리된 캡슐화된 랑게르한스섬의 세포 구조 및 기능을 반복한다. 이 췌장 줄기 세포는 배양물에서 증식할 수 있는 이점을 제공하는 한편, 캡슐화 절차는 응집체를 갖는 세포의 크기 및 수를 제어할 수 있도록 한다.

1. 췌장 세포의 분리 방법

본 발명은 중기의 췌장 줄기 세포군의 인슐린 분비 세포 집합체로의 성숙을 유도하는 방법을 제공한다. 통상적으로, 초기 단계로서 중기 췌장 줄기 세포를 췌장으로부터 분리한다. 췌장으로부터 수거된 세포는, 내분비 및 외분비가 가능한 분화된 세포를 산출할 수 있는 다양한 군이다. 이들 분화된 세포는 췌장 내분비 분자, 예컨대 인슐린, 소마토스타틴, 글루카곤 및 기타 내분비 호르몬뿐 아니라, 췌장 외분비 분자, 예컨대 아밀라제를 발현한다. 또한, 배양된 세포군의 일부는 배양시 복제 및 증식할 수 있다. 따라서, 본 발명에 사용된 중기 췌장 줄기 세포군을 공여 췌장으로부터 분리할 수 있다. 중기 췌장 줄기 세포의 성장을 촉진하는 조건 하에서 새로 분리된 췌장 세포를 배양한다.

A. 공여자 공급원

공여자 공급원은, 배양된 췌장 세포, 췌장 내분비 및 외분비 호르몬을 생성할 수 있는 세포를 형성할 수 있는 또는 기타 공급원으로부터 유래한 하나 이상의 공여자 췌장일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 후속 배양을 위해 분리된 세포를 하나 이상의 공여된 췌장으로부터 얻는다. 본 명세서에 개시된 방법은 췌장의 연령과 무관하다. 따라서, 배아로부터 성체에 이르는 연령 범위의 공여자로부터 분리한 췌장 물질을 사용할 수 있다.

또 다른 구체예에서, 췌장 세포를 배양된 공급원으로부터 분리한다. 예를 들어, 'Microencapsulation of cells'이라는 표제의 미국 특허 제5,762,959호(Soon-Shiong 등)의 미세캡슐화 방법에 따라 제조된 세포를 공여자 세포의 공급원으로서 수거할 수 있다.

B. 췌장 세포군의 분리

췌장이 공여자로부터 수거되면, 각종 방법을 사용하여 배양용 각 세포 또는 작은 세포군을 산출하기 위해 통상적으로 췌장을 처리한다. 그러한 방법에서는 수거된 췌장 조직을 세척하고 효소 분해를 위해 준비해야 한다. 효소 프로세싱을 이용하여 결합 조직을 분해하여 수거된 조직의 실질을 췌장 세포 물질의 더 작은 단위로 나눈다. 수거된 췌장 조직을 하나 이상의 효소로 처리하여 췌장 세포 물질, 부분구조물 및 수거된 장기의 전체 구조물로부터 얻은 개별 췌장 세포를 분리한다. 콜라게나제, DNAse, 리버라제 조제물(미국 특허 제5,830,741호 및 제5,753,485호) 과 기타 효소를 본 명세서에 개시된 방법과 함께 사용한다.

분리된 공급원 물질을 추가 처리하여 하나 이상의 목적하는 세포군을 농축시킬 수 있다. 그러나, 미분획화된 췌장 조직은, 일단 배양을 위해 해리되면 추가의 분리 없이 본 발명의 배양 방법에 직접 사용할 수 있고, 중기 세포군을 산출할 것이다. 일구체예에서, 분리된 췌장 세포 물질은 밀도 구배(예, Nycodenz, Ficoll, 또는 Percoll)를 통해 원심분리에 의해 정제된다. 예를 들어, 미국 특허 제5,739,033호에 개시된 구배법을, 랑게르한스섬에서 처리된 체장 물질을 농축하는 수단으로서 사용할 수 있다. 공여자 공급원으로부터 수거된 세포 혼합물은 통상적으로 이종성이며, 따라서 α-세포, β-세포, δ-세포, 췌관 세포, 선방 세포, 조건적(facultative) 선조 세포 및 기타 췌장 세포 종류를 포함한다.

통상적인 정제 절차로 분리된 세포 물질을 다수의 층 또는 계면으로 분리한다. 통상적으로, 2개의 계면이 형성된다. 상부 계면은 랑게르한스섬이 농축되어 있고 통상적으로 현탁액 중 10 100% 랑게르한스섬 세포를 포함한다. 제2 계면은 통상적으로 랑게르한스섬 세포, 선방 세포 및 췌관 세포를 포함하는 혼합된 세포군이다. 하부층은 펠렛으로서, 구배 바닥에서 형성된다. 통상적으로, 이 층은 주로 (> 80%) 선방 세포, 일부 포집된 랑게르한스섬, 및 일부 췌관 세포를 포함한다. 췌관 세포가 없는 성분을 추가 조작을 위해 별도로 수거할 수 있다.

추가의 조작을 위해 선택된 분획의 세포 성분은, 어떤 구배 분획이 선택되는냐, 그리고 각 분리의 최종 결과에 따라 달라질 것이다. 랑게르한스섬 세포가 목적하는 세포 유형인 경우, 분리된 분획 내에 적절하게 농축된 랑게르한스섬 세포군은 랑게르한스섬 세포를 적어도 10% 100% 포함한다. 농축 후에 다른 췌장 세포 유형 및 농축물을 수거할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 배양 방법은, 사용된 정제 구배에 따라서 제2 계면, 펠렛, 또는 기타 분획으로부터 분리된 세포와 함께 사용할 수 있다.

일 구체예에서, 중기 췌장 세포 배양물은 랑게르한스섬 농축 (상부) 분획으로부터 형성된다. 그러나, 또한 통상적으로 각각 랑게르한스섬, 선방 세포 및 췌관 세포 또는 췌관 세포 무함유 성분, 선방 세포 및 일부 포집된 세포의 혼합 세포군을 포함하는 하부층 분획물과 추가의 이종성 제2 계면을 배양시 사용할 수 있다. 양층은 본 명세서에 개시된 중기 개체군에 대해 발생할 수 있는 세포를 포함하지만, 각 층은 개시된 방법과 함께 사용하기 유리한 구체적인 장점을 가질 수 있다.

II. 중기 췌장 줄기 세포군의 생성 및 증식

A. 일반 세포 배양 절차

일단 췌장 세포가 입수 및 분리되면, 목적하는 중기 개체군의 증식, 또는 다른 구체예에서는 더욱 성숙한 세포 유형의 분화를 위해서 선택한 조건 하에서 이들 세포를 배양한다. 일반적인 세포 배양 방법은 문헌[Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique 4th ed., John Wiley amp; Sons (2000)]에서 찾아볼 수 있다. 통상적으로, 다른 포유류 세포에게 적절한 조건, 예컨대 5% CO_2 의 대기 하에 37°C의 습식 항온기에서 췌장 세포를 배양한다. 당업계에 공지된 각종 기재, 예컨대 보로실리케이트 유리관, 병, 접시, 음전하 표면의 클로닝 링, 플라스틱 조직 배양관, 접시, 플라스크, 다중웰 평판, 성장 표면적(GSA)이 증가된 용기 또는 Esophageal Doppler Monitor(EDM) 피니쉬가 구비된 용기, GSA를 증가시키는 복수의 내부 시이트가 구비된 플라스크, Fenwal bags, 및 기타 배양 용기에서 세포를 배양할 수 있다.

배양을 위한 췌장 세포 물질이 수거 및 선택되거나, 또는 개체군이 융합되어 새로운 기재로 옮기고자 할 때에는, 배양을 위해 세포 개체군을 적절한 조직 배양 용기에 접종한다. 접종 밀도는 개시된 방법을 사용하여 배양된 췌장 세포의 생존율에 영향을 줄 수 있으며, 특정 배양 조건을 위한 최적 접종 밀도는 상이한 밀도 범위에서 세포를 접종하고 생성된 세포 생존 및 증식 속도를 모니터링하여 실험적으로 결정할 수 있다. 일정 범위의 접종 밀도는 배양시 호르몬 분비 세포를 생성하는 데 효과적인 것으로 확인되었다. 통상적으로, 세포 농도는 100 mm 배양 접시당 약 10^2 10^8 세포, 예컨대 100 mm 배양 접시당 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 또는 10^8 세포이지만, 클로닝 절차를 위

해 더 낮은 세포 농도를 사용할 수 있다. 다른 배양 용기를 위한 세포 농도는, 상이한 배양 용기를 위한 상대적인 기재 표면적 및/또는 배지 기체 교환 표면적을 계산하여 조정할 수 있다. 예를 들어, 통상적인 100 mm 배양 접시는 55 cm^2의 기재 표면적을 가지며(상기 Freshney 문헌 참조), 접시당 10,000 세포 농도는 1 cm^2당 약 180 세포에 해당하며, 접시당 100,000 세포 농도는 1 cm^2당 약 1,800 세포에 해당한다. 배양 용기 표면적으로 표시되는 세포 농도는, 배양 표면적당 적절한 배지 부피를 사용하여 배지 부피로 표시되는 세포 농도와 관 련이 있을 수 있다(0.2 0.5 ㎖/cm^2는 정지 배양을 위한 통상적인 범위이다). 10배 증식이 일어났는지 여부를 결정하기 위해서, 효소 분해로 세포를 제거하고 기지 유체 중에서 현미경으로 계수하였다. 성장 및 분화를 조장하는 규명된 세포외 매트릭스 성분(예, 피브로넥틴, 콜라겐 I, Engelbreth-Holm-Swarm 매트릭스, 바람직하게는 콜라겐 IV 또는 라미닌)으로 사전 코팅된 배양 표면에서 세포를 증식시켰다.

표준 세포 배양 증식 방법이 본 발명을 실시하는 데 적합하다. 배양 표면에 부착된 세포가 성장하면, 일반적으로 80 90% 융합에 도달할 때까지 세포는 단층으로서 증식하고, 이 지점에서 세포를 단백 분해로 표면으로부터 방출시키고 새로운 용기 중에서 배양하기 위해 1:2 또는 1:3으로 분할한다. 희석율을 더욱 높인 세포 농도, 일반적으로 1:4 1:10이 적절하지만, 더 낮은 세포 농도도 클로닝 절차에 적당하다. 단백분해 효소 및 킬레이트제의 농도는, 세포가 무혈청 배지(예, 0.025% 트립신 및 0.53 mM EDTA)에서 계대 배양될 때 일반적으로 낮아진다. 배양 배지는 통상 1주 2회 교체하거나, 또는 배지의 pH에 따라 새로운 배지가 필요한 것으로 판단될 때 교체한다.

본 발명의 췌장 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 특정 성분을 함유하거나 또는 특정 성분(특히 혈청)이 결여된 배지가 분리 및 증식 절차의 특정 단계에 바람직하다. 예를 들어, 췌장으로부터 새로 분리한 세포를 고혈청 배지에서 유지하여 세포를 분리 절차로부터 회수할 수 있다. 역으로, 저혈청 배지는 중기 개체군의 선별 및 증식에 유리하다. 따라서, 다수의 배지 조제물이 본 발명의 실시에 유용하다. 본 명세서에 개시된 배지 조제물은 예시 적 목적으로 개시된 것이며, 본 명세서에 개시된 분석법을 사용하여 세포군의 복제 또는 분화에 대한 변형의 효과를 분석함으로써 배지의 중요하지 않은 성분은 단순히 생략, 치환, 변형시키거나 또는 첨가할 수 있다. 예컨대 Stephan 등, Endocrinology 140:5841-54 (1999) 참조.

배양 배지는 일반적으로 무기염, 완충제, 아미노산, 비타민, 에너지원과, 일부 경우에 단백질, 핵산, 탄수화물 또는 지질 대사에 관여하는 유기 중간체 및 전구체 형태의 추가의 영양소를 포함하는 기본 배지를 포함한다. 기본 배지로는 F12, 이글 MEM, 듈베코 변형 MEM (DMEM), RPMI 1640, F12와 DMEM의 1:1 혼합물 등이 있다. 상기 Freshney 문헌 참조. 세포의 성장을 지원하기 위해서, 기본 배지에는 일반적으로 성장 인자, 기타 단백질, 호르몬 및 미량 원소의 공급원이 보충되어 있다. 이들 보충물은 세포의 성장, 유지 및/또는 분화를 돕고, 다른 배지 성분에서의 불순물 또는 독소를 상쇄하며, 기본 배지에 결여된 미량영양소를 제공한다. 여러 배양 배지 중에서, 혈청은 이들 보충물의 공급원이다. 혈청은 각종 포유류 공급원, 예컨대 인간, 소, 양, 말 등으로부터, 그리고 성체, 유년체 또는 태아 공급원으로부터 얻을 수 있다. 상기 Freshney 문헌 참조. 태아 소 혈청이 범용되는 보충물이다. 혈청 농도는 총 배지 부피를 기준으로 한 혈청 부피(%)로 표시되며, 통상적으로 약 0.1 25%, 예컨대 약 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 또는 25% 범위이다. 일부 용도에서, 기본 배지에는, 혈청보다 성장 인자, 호르몬 및 미량영양소의 규명된 또는 반규명된 혼합물이 보충된다. 혈청 대체 보충물의 배합식은 본 명세서에 개시되어 있다. 다른 것들은 당업계에 공지되어 있거나, 시 판된다(상기 Freshney 문헌 참조). 일부 구체예에서, 혈청 농도는 낮지만, 제거되지는 않으며, 규명 또는 반규명된 보충 혼합물을 기본 배지에 첨가한다. 고 농도 또는 저 농도의 혈청을 함유하는 배지가 사용되는 바람직한 용도가 명세서에 개시되어 있다.

B. 고혈청 배지 중에서의 분리된 췌장 세포의 유지 및 증식

공여자 췌장으로부터 수거된 세포는 일반적으로 공여자의 사멸과 분리 절차의 개시 사이에 일정 기간 온 또는 냉 허혈을 진행한다. 또한, 분리 절차 과정에서 췌장 세포에 대해 기계 및 전단 응력을 가할 뿐 아니라 단백 분해를 실시한다. 특정 이론에 구애받지 않으면서, 이들 세포가 경험하는 각종 외상은 조건적 선조 세포와 같은 췌장 줄기 세포군의 증식을 초래하는 각종 세포 프로세스를 상향조절할 수 있다. 분리 또는 정제 직후 저혈청 배지에 세포를 두어 만족스러운 효과를 갖는 중기 세포군을 형성할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 분리 절차 과정에서 세포가 겪는 외상은 세포 생존 및 배양에 대한 적합성에 불리한 영향을 줄 수 있기 때문에, 배양 과정의 효율을 증가시키기 위해서 고 농도의 혈청(예, >4%)을 함유하는 안정화 배지 중에서 새로 분리된 세포를 유지하는 것이 때로는 바람직하다. 유지 기간은 짧다(예, 밤새). 경우에 따라서, 고혈청 배지 중에서 늘어난 증식 기간 동안 세포를 유지할 수 있다.

안정화를 위한 고혈청 배지는 통상적으로 4% 이상의 혈청을 포함하며, 일부 구체예에서 10% 또는 20%와 같은 더 높은 농도의 혈청을 포함한다. 안정화 또는 증식을 위해 사용된 배지는 여러 시판원으로부터 입수할 수 있고 Moore 등의 문헌[J Am Med Assoc 199: 519-524 (1967)]에 개시된 RPMI 1640과 같은 기본 배지로부터 유도할 수 있다. 유지 또는 증식을 위한 예시적인 고혈청 배지는 배지 3 (RPMI 1640 + 1O mM HEPES, 2 mM 글루타민, 5 μM $ZnSO_4$ 및 10% 태아 소 혈청(FBS)) 및 배지 7 (RPMI 1640 + 1O mM HEPES, 2 mM 글루타민, 5 μM $ZnSO_4$, 및 20% FBS) 등이 있다. 목적하는 혈청 농도(예, 4% 9%)에 도달하도록 배지 3 또는 배지 7과 같은 고혈청 배지의 일정 부피를 (본 명세서에 개시된) SM95, SM96, 또는 SM98과 같은 무혈청 배지 일정 부피와 혼합하여 고혈청 배지를 유도할 수 있다.

수거 후에 안정화를 위해서, 고혈청 배지 중에 비교적 고 밀도(예, 배지 7(20% FBS) 70 ㎖중 10 ^{9} 세포)로 세포를 배양 용기 중에서 편리하게 배양한다. 그러나, 더 낮은 세포 밀도와 혈청 농도를 사용할 수도 있다. 통상적으로 비교적 단시간(예, 밤새) 동안 본래 용기 중에 세포를 유지하여 수거 절차로부터 회수할 수 있다.

유지 기간 후에, 본 명세서에 개시된 바와 같이 중기 세포군의 선택 및 증식을 위한 저혈청 배지로 세포를 옮길 수 있다. 경우에 따라서, 혼합형 세포군의 증식을 위해 고혈청 배지에서 세포를 배양할 수 있다. 통상적인 구체예에서, 유지 배양으로부터 얻은 세포를, 배지 3 (10% FBS), 배지 7 (20% FBS), 또는 배지 3과 배지 7의 혼합물 (15% FBS)을 함유하는 새로운 배양 용기에 재접종한다. 보통 이러한 배지 중에서 7 10일간 세포를 배양하고, 그 동안 세포는 융합성으로 증식할 수 있다. 세포가 융합성이 되면, 본 명세서에 개시된 중기 세포군의 선택적 증식을 위해 저혈청 배지로 계대 배양할 수 있다.

C. 저혈청 배지내 배양에 의한 중간 단계 췌장 줄기 세포 군집의 생장 및 증식

췌장 세포를 분리한 다음, 세포를 선택 배지에 옮겨 중간 단계 군집의 출현을 촉진시킨다. 이러한 선택 배지는 췌장 내분비 호르몬의 분비력을 보유하거나 고농도의 췌장 내분비 호르몬을 분비시키는 더 분화된 세포를 성숙시키는 잠재력을 보유하는 세포의 증식을 촉진한다. 일반적으로, 선택 배지는 섬유 아세포 및 간엽 세포를 희생하여 상피 또는 상피-유사 세포의 증식을 촉진할 것이나, 본 발명 방법에서 췌장 세포를 유리하게 사용하기 위해 순수한 상피 배양액이 필요할 것으로는 여겨지지 않았다. 일반적으로, 상피-선택 배지는 각 계대 배양에서의 군집의 생장에 따라 예컨대 2회, 3회, 4회 또는 5회 계대 배양에서 어떤 성장 시기후 거의 순수한 세포(예컨대, 10% 미만의 섬유 아세포 또는 간엽 세포)의 군집을 생성시킬 것이다.

배(胚) 조직으로부터 상피 세포 성장을 촉진시키기 위하여 사용되는 한 유형의 선택 배지는 무혈청 배지이다[예컨대, Stephan 등, *supra* ; Peehl and Ham, *In vitro* 16:526-40(1980)참조]. 상피-특이 배지 및 더 바람직하게는 성장 호르몬 공급원을 함유하는 저혈청 배지를 사용하여 췌장 세포 발달의 마커(예컨대, PDX-1)를 보유하는 성숙한 포유동물로부터 얻은 증식중인 그러나 고농도 췌장 내분비 호르몬을 발현시키는 적절한 조건하에서 더 분화될 수 있는 췌장 세포의 군집을 구별하기 위한 선택을 할 수 있다. 췌장 세포의 배양에 적당한 특정의 상피-선택 배지가 본 원에 개시되어 있으나 상피 또는 상피-유사 세포의 선호적 생장을 촉진하는 업계에 공지된 다른 배지 제제도 사용할 수 있다.

고혈청 배지내에서 일정 기간 유지시킨 후('위닝(weaning)') 또는 해리 및 분리 절차후 선택적 저혈청 배지내로 직접 세포를 옮김으로써('쇼크') 상피-선택적 저혈청 배지로 옮길 수 있다. 어떤 방법도 바람직한 중간 세포 증식의 생성에 적당하다.

1. 선택적 저혈청 배지의 제조

본 맥락에서 사용될 때, '저혈청 배지'는 약 1% 미만의 혈청을 갖는 배지를 의미한다. 따라서, 무혈청 배지는 저혈청 배지의 한 부류이다. 0% 1%의 혈청, 예컨대, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8% 또는 0.9%의 혈청을 포함하는 배지는 무혈청 배지에 적절한 농도의 혈청을 첨가함으로써 또는 소정의 혈청 농도를 얻도록 무혈청 배지 및 혈청-함유 배지를 혼합함으로써 제조될 수 있다.

완전 무혈청 배지는 혈청에 의해 제공되는 생물학적 작용을 대체하는 성장 인자, 기타 단백질, 호르몬 및 미세 영양소의 혼합물로 기초 배지(예, SM96 또는 1:1 F12/DMEM)를 보충함으로써 제조된다. 의도하지 않는 세포(예컨대, 포상 세포 또는 섬유 아세포와 같은 연결 조직 세포)의 성장을 억제하면서 의도하는 세포 군집(예컨대, 중간 세포 군집)의 증식을 촉진할 수 있도록 보충 혼합물로 된 조성물을 용이하게 조작할 수 있다는 점이 무혈청 배지의 이점이다. 보충 혼합물은 또 고율의 증식을 유지하기 위해 줄기 세포 군집의 분화를 막거나 또는 줄기 세포 군집이 더욱 성숙한 세포로 분화하는 것을 촉진할 수 있도록 조작될 수 있다.

a) 성장 호르몬

성장 호르몬(GH)을 함유히는 상피 선택적 배양 배지는 중간 분화의 유용한 췌장 세포 군집의 출현을 촉진하기 위해 사용된다. 특정 이론에 구속되려는 의도는 아니나, GH는 세포 성장을 지지하는 통상적으로 혈청내에서 발견되는 분열촉진성 물질을 대체할 수 있으나 혈청은 덜 바람직한 세포 군집(예컨대, 섬유 아세포 및 간엽 세포)의 과성장을 촉진하는 다른 분열촉진성 인자를 함유하는 것으로 생각된다. 따라서, 혈청을 GH 함유 보충 혼합물로 대체하는 것으로 중간 분화 단계의 세포 군집의 증식을 선택하게 된다. 무혈청 배지내 GH의 작용은 본 발명의 대안 구체예의 다른 보충 성분으로 대체될 수 있으나, GH는 천연 추출물 또는 재조합 단백질로서 용이하게 이용될 수 있으므로 본원에 개시된 방법들에는 GH-함유 배지가 적당한 상피-선택적 배지가 된다.

소마토트로핀으로도 알려져 있는 성장 호르몬은 세포 대사의 여러 양상에 영향을 주고 정상적인 신체 성장 및 젖분비를 촉진하는 뇌하수체 전엽에서 합성되는 폴리펩티드 호르몬이다. GH는 세포에 대한 직접적인 효과 및 IGF-I 및 유

사 분자에 의하여 매개되는 간접적인 효과를 가지는데, 건강한 췌장에서 랑게르한스섬 세포의 성장은 GH 및 상동 호르몬 프로락틴 및 락토젠의 발현에 연결되었다[예컨대, Nielsen 등, *J Mol Med* 77(1):62-6(1999) 참조]. 인간에서, 성숙한 GH는 191 아미노산 잔기를 포함하고 22 kDa의 분자량을 나타낸다. 그러나, 보통 관찰되는 디설파이드 이량체 외에, 인간 GH의 부분들(잔기 1 43 및 44 191)로 이루어진 두 펩티드가 혈청에서 검출되었고 성인의 랑게르한스섬 조직에 대한 뚜렷한 효과를 가진다(예컨대, Lewis 등, *Endocr J* 47 Suppl:S1-8(2000) 참조). 인간 GH의 각종 자연 발생적 유도체, 변종, 대사 생성물 및 공업적 유도체는 글리코실화된 GH, 메티오닐 GH, 20 kDa GH, 아세틸화된 GH, 단백질 분해된 GH, 데스아미도 GH, 설폭사이드 GH 및 말단이 잘린 형태의 GH를 비롯하여 공지이다.

GH는 인간에서 GH-V1 및 GH-V2, 코리오맘모트로핀 및 프로락틴 및 설치류 태판 락토젠 I 및 II 및 다른 소 및 양의 락토젠, 쥐의 프로리페린 I, II 및 III 및 프로리페린-관련 단백질, 소의 프로락틴-관련 단백질 I, II 및 III, 랫의 프로락틴-유사 단백질 A 및 B 및 여러 물고기에서 얻은 소마토락틴과 같은 다른 척추동물에서 얻은 단백질을 비롯한 호르몬의 보존족의 1 구성원이다. 이러한 족의 구성원은 콘센서스 서열 C-x-[ST]-x(2)-[LIVMFY]-x-[LIVMSTA]-P-x(5)-[TALIV]-x(7)-[LIVMFY]-x(6)-[LIVMFY]-x(2)-[STA]-W 또는 C-[LIVMFY]-x(2)-D-[LIVMFYSTA]-x(5)-[LIVMFY]-x(2)-[LIVMFY]-x(2)-C를 특징으로 한다.

본 발명의 실시에 적당한 성장 호르몬은 여러 천연 및 인공 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 종종 동종의 GH를 필요로 하는 GH의 치료적 사용과는 대조적으로 영장류, 포유동물 또는 척추동물에서 얻은 GH는 췌장 세포의 배양을 위한 저혈청 배지의 제제에 사용될 수 있다. 성장 호르몬의 편리한 공급원은 천연 GH 공급원이 풍부한 소의 뇌하수체 추출물(BPE)이다. BPE(75 ㎕/ml 단백질)는 약 0.1 100 ㎕/ml, 바람직하게는 0.5 50 ㎕/ml 및 가장 바람직하게는 5 ㎕/ml 또는 37.5 mg/l로 배양 배지에 포함될 수 있다. 다른 종(예컨대, 돼지, 양 등)에서 얻을 수 있는 뇌하수체 추출물도 유사한 농도로 사용할 수 있다. 뇌하수체 추출물에 존재하는 다 른 인자들은 그 효과를 가능하게 하나 정제된 GH 및 재조합 GH로 만족할만한 결과를 얻을 수도 있다. 재조합 소 및 인간 GH가 널리 사용될 수 있고 GH 활성의 적당한 공급원이다. 재조합 GH는 0.01 100 mg/l, 바람직하게는 0.1 10 ㎕/ml, 더 바람직하게는 약 0.2, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 2 또는 5 ㎕/ml, 가장 바람직하게는 약 1.25 ㎕/ml로 배양 배지에 첨가할 수 있는데, 여기서 재조합 단백질 1 mg은 약 3 IU의 GH에 상당한다.

b) 기타 보충물

완전 무혈청 배지용 기초 배지에 첨가되는 일반적인 성분은 재조합 인간 인슐린(0.1 100 ㎍/ml), 트랜스페린(0.1 100 ㎍/ml), 피부 성장 인자(0.1 100 ng/ml), 에탄올아민(0.1 100 ㎍/ml), 아프로티닌(0.1 100 ㎍/ml), 포도당(0.1 100 mg/ml), 포스포에탄올아민(0.1 10 μM), 트리요오도티로논(0.1 100 pm), 셀레늄(0.1 100 nM), 히드로코르티손(0.01 100 μM), 프로게스테론(0.1 10 nM), 포르스콜린(0.1 100 μM), 헤레굴린(0.1 100 nM) 및 소의 뇌하수체 추출물(0.1 500 ㎍/ml)을 포함한다. 모든 보충 성분이 세포 성장을 지지하기 위해 요청되는 것은 아니며 특정 보충물에 필요하거나 최적인 농도는 단일 성분의 농도를 배제하거나 감소시키고 세포 증식에 대한 효과를 관찰함으로써 경험적으로 결정할 수 있다(Stephan 등, *supra* 참조).

일반적으로, 보충 성분은 동일한 생물학적 특성을 갖는 천연 또는 합성 생성물로 대체될 수 있다. 예컨대, 트리요오도티로논, 히드로코르티손 및 프로게스테론은 모두 동일한 세포내 수용체(티로이드 수용체, 글루코코르티코이드 수용체 및 프 로게스테론 수용체)를 활성화시킨다고 공지된 천연 또는 합성 호르몬으로 대체될 수 있다. 인슐린 및 EGF는 일반적으로 재조합 DNA 방법으로 얻은 인간 단백질이나 천연 공급원으로부터 정제시킨 폴리펩티드, 다른 종으로부터 얻은 폴리펩티드 또는 인슐린 및 EGF 수용체의 다른 작용제에 의하여 대체될 수 있다. 일부 경우 GH는 GH 수용체의 다른 길항제로 대체될 수 있다. 마찬가지로, 헤레굴린, ErbB3 수용체의 리간드는 헤레굴린 이성체 및 다른 ErbB3(예, NRG2, NRG3 및 NRG4), 감각 및 운동 신경-유도 인자, 뉴레스틴 및 Ebp-1, 헤레굴린 α, 헤레굴린 β, 헤레굴린 γ, 뉴레굴린-1 및 뉴레굴린-2(NRG-1 알파, NRG-1 베타, NRG-2 알파 및 NRG-2 베타)로 대체될 수 있다.

예시적인 무혈청 배지는 기초 배지 SM96 및 완전 배지 SM95(이것은 하기 표에 나타낸 바와 같이 보충된 SM96으로 이루어짐)를 포함한다. SM98은 Stephan 등, *supra* 에 의하여 개시된 변형 배지 보충물(14F)로 보충된 1:1 F12/DMEM으로 이루어진다. SM98은 14F보다 헤레굴린을 덜 함유한다(1 ng/ml v. 8 ng/ml). 따라서, SM98은 재조합 인간 인슐린, 10 ㎍/ml; 트랜스페린, ㎍/ml; 피부 성장 인자, 10 ng/ml; 에탄올아민 61; 아프로티닌 25 ㎍/ml; 포도당, 5 mg/ml; 포스포에탄올아민, 141 ng/ml; 트리요오도티로논, 3.365 pg/ml; 셀레늄, 4.325 ng/ml; 히드로코르티손, 181 ng/ml; 프로게스테론, 3.15 ng/ml; 포르스콜린, 410 ng/ml; 헤레굴린, 1 ng/ml 및 소의 뇌하수체 추출물 75 ㎍/ml로 보충된 1:1 F12/DMEM으로 이루어진다. SM95 및 SM98내 헤레굴린 및 EGH의 예시적 공급원은 재조합 인간 EGF(Sigma E9644) 및 인간 헤레굴린-β1(Ramp;D 시스템 396-HB/CF)의 EGF 도메인(아미노산 176-246)이다.

RPMI 1640 배지

(Moore 등, A.M.A., 199:519(1967))

무기염 Mg/L

$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 100

KCl 400.00

$MgSO_4$ (무수물) 48.84

NaCl 5850.00

Na_2HPO_4 (무수물) 800.00

기타 성분 Mg/L

D-포도당 2000.00

글루타티온(환원형) 1.0

HEPES 5958.00

페놀 레드 5.00

아미노산 Mg/L

L-아르기닌 200.00

L-아스파라긴(유리 염기) 50.00

L-아스파르트산 20.00

L-시스틴 · 2HCl 65.00

L-글루탐산 20.00

L-글루타민 300.00

글리신 10.00

L-히스티딘 15.00

L-이소류신 50.00

L-류신 50.00

아미노산 Mg/L

L-리신 · HCl 40.00

L-메티오닌 15.00

L-페닐알라닌 15.00

L-프롤린 20.00

L-세린 30.00

L-트레오닌 20.00

L-트립토판 5.00

L-티로신 · 2Na $_2$ H $_2$ O 29.00

L-발린 20.00

비타민 Mg/L

비오틴 0.20

D-Ca 판토테네이트 0.25

콜린 클로라이드 3.00

폴산 1.00

i-이노시톨 35.00

니아신아미드 1.00

피리독신 · HCl 1.00

리보플라빈 0.20

티아민 · HCl 1.00

티미딘 0.005

비타민 B $_{12}$ 1.04

SM95

무기염 Mg/L

$CaCl_2$ 78.3

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.00165

$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 0.025

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.61

KCl 271

$MgCl_2$ 28.36

$MgSO_4$ 39.06

KH_2PO_4 34

NaCl 7262.75

$NaHCO_3$ 1600

Na_2HPO_4 101.5

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 31.25

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.416

<u>기타 성분 Mg/L</u>

D-포도당 3000

HEPES 1787.25

Na 히폭스안틴 3.2

리놀산 0.066

리포산 0.1525

페놀 레드 4.675

Na 푸트레신 · 2HCl 0.191

Na 피루베이트 137.5

<u>아미노산 Mg/L</u>

L-발린 11.225

L-아르기닌 · HCl 283.75

L-아스파라긴 · H_2O 18.75

L-아스파르트산 16.325

L-시스테인 · H_2O 43.78

L-시스틴 · 2HCl 15.65

L-글루탐산 18.675

L-글루타막스 I 328.5

글리신 89.375

글리신-히스티딜-리신 0.000005

L-히스티딘 HCl · H_2O 38.69

L-이소류신 31.24

L-류신 42.5

L-리신 · HCl 82.125

L-메티오닌 13.12

L-페닐알라닌 22.74

L-프롤린 43.625

L-세린 23.625

L-트레오닌 38.726

L-트립토판 6.51

L-티로신 · $2Na_2H_2O$(비-동물) 35.9

L-발린 38.125

비타민 Mg/L

비오틴 0.037

아스코르빈산 22.5

D-Ca 판토테네이트 1.37

콜린 클로라이드 11.49

폴산 1.826

L-이노시톨 24.3

니아신아미드 1.03

피리독신 · HCl 1.046

리보플라빈 0.13

티아민 · HCl 1.23

티미딘 0.5325

비타민 B_{12} 1.04

보충물 Mg/L

Na 셀레너스산 0.0034

상피 성장 인자 0.005

에탄올아민 0.03

포스포에탄올아민 0.07

아프로티닌 12.5

프로게스테론 0.0016

포르스콜린 0.205

헤레굴린 B 0.004

소의 뇌하수체 추출물 37.5

히드로코르티손 0.0923

r.h. 인슐린 5.05

T_3 0.0000015

L-티록신 Na 0.00002

소의 트랜스페린 APG 7.5

SM96

무기염 Mg/L

$CaCl_2$ 78.3

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.00165

$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 0.025

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.61

KCl 271

$MgCl_2$ 28.36

$MgSO_4$ 39.06

KH_2PO_4 34

NaCl 7262.75

$NaHCO_3$ 1600

Na_2HPO_4 101.5

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 31.25

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.416

기타 성분 Mg/L

D-포도당 3000

HEPES 1787.25

Na 히폭스안틴 3.2

리놀산 0.066

리포산 0.1525

페놀 레드 4.675

Na 푸트레신 · 2HCl 0.191

Na 피루베이트 137.5

아미노산 Mg/L

L-발린 11.225

L-아르기닌 · HCl 283.75

L-아스파라긴 · H_2O 18.75

L-아스파르트산 16.325

L-시스테인 · H_2O 43.78

L-시스틴 · 2HCl 15.65

L-글루탐산 18.675

L-글루타막스 I 328.5

글리신 89.375

글리신-히스티딜-리신 0.000005

L-히스티딘 HCl · H_2O 38.69

L-이소류신 31.24

L-류신 42.5

L-리신 · HCl 82.125

L-메티오닌 13.12

L-페닐알라닌 22.74

L-프롤린 43.625

L-세린 23.625

L-트레오닌 38.726

L-트립토판 6.51

L-티로신 · 2Na_2H_2O(비-동물) 35.9

L-발린 38.1261

<u>비타민 Mg/L</u>

비오틴 0.037

아스코르빈산 22.5

D-Ca 판토테네이트 1.37

콜린 클로라이드 11.49

폴산 1.826

L-이노시톨 24.3

니아신아미드 1.03

피리독신 · HCl 1.046

리보플라빈 0.13

티아민 · HCl 1.23

티미딘 0.6325

비타민 B_{12} 1.04

2. 세포를 저혈청 배지로 옮김

췌장 세포의 배양액을 저혈청 배지로 옮기는 것으로 중간 분화 단계의 정해진 세포의 군집에 대한 선택이 촉진된다. 이러한 세포 군집은 서브배양될 경우 계속 증식할 것이나 PDX-1과 같이 고 발현 수준의 췌장 마커를 유지한다. 무자극의 경우, 이러한 군집은 비교적 저 농도의 췌장 내분비 호르몬(예, 인슐린)을 분비하나 고분비 세포를 얻기 위하여 본 발명 방법에 따라 성숙시킬 수 있다. 췌장 세포의 배양액을 저혈청 배지로 옮기기 위하여, 세포는 고혈청 배지로부터 저혈청 배지로 위닝되거나 분리후 저혈청 배지내에 직접 놓여질 수 있다. SM95 및 SM98과 같은 배지는 적당한 저혈청 배지이나 SM95는 췌장 세포의 성숙시 조금 개선된 인슐린 분비를 초래한다.

중간 세포 군집은 일반적으로 고-분비 내분비 세포로의 추가 분화력 및 증식력을 모두 보유한다. 증식력은 일반적으로 한 밀도에서 접종된 배양액이 제2 밀도로 증식되는 능력으로 평가되는데, 예컨대, 제곱 센티미터당 180 세포로 평판배양된 세포는 단일 계대 배양에서 ml당 1,800 세포까지 증식될 수 있다. 증식 및 계대 배양의 반복 주기에 의하여, 분리된 췌장 세포의 출발 군집은 PDX-1 및 인슐린 mRNA 발현과 같은 내분비성 마커를 보유하고 성숙한 고-분비 내분비 세포로의 분화력을 유지하면서 약 10,000배 이상(예컨대, 약 100배, 500배, 1000배, 5000배, 10,000배, 50,000배, 100,000배, 500,000배 또는 1,000,000배) 증식될 수 있다.

III. 적응 세포 배양

성숙 과정의 예비 단계로서, 중간 단계 췌장 줄기 세포를 적응 배양 조건 하에 성장시킨다. 요약하면, 중간 단계 췌장 줄기 세포를 세포들이 융합되지 않도록 주의하면서 조절된 배양 접시 또는 새로운 배양 접시에서 배양한다. 양 유형의 접시들로부터 얻은 세포를 배합하여, 하기하는 바와 같이 캡슐화하거나 배양 접시에 재접종한다.

A. 조절된 배양 플레이트

조절된 배양 접시는 이전에 중간 단계 췌장 줄기 세포를 성장시키기 위하여 사용되었던 배양 접시이다. 세포들이 단일층을 형성(초기 부차배양 접종 밀도에 따라 달라지나, 통상 약 5일)하면, 트립신 처리하여 그들을 제거한다. 조절된 배양 접시를 생산하기 위하여 100% 합류 세포 배양물의 성장이 요구되는 것은 아니다. 매트릭스의 광범위한 분해를 방지하기 위하여, 저농도 트립신(통상, 표준 세포 배양 기술에서 사용하는 농도의 1/2 또는 1/4)이 바람직하다. 대안적으로, 상기 세포는 제거하나 분비 매트릭스는 남기는 세제를 사용하여 기질을 추출함으로써 상기 세포 단일층을 제거할 수 있다. 문헌[Gospodarowicz et al., Proc Natl Acad Sci USA 77:4094-8(1980)]을 참조하라.

편리하게, 상기 기질 또는 배양 접시에서 미리 성장시켰던 상기 제거된 세포를 분리하고, 동일하나, 이제 조절된 세포 접시에 재파종할 수 있다. 그러나, 상기 기질에 파종되는 상기 배양물 및 상기 기질을 조절한 상기 배양물은 동일한 배양물일 필요는 없다. 따라서, 세포들의 하나의 배양물을 조절된 기질 상에서 성장시키고, 그 세포들을 제거하고, 다른 배양물부터 유래한 세포를 상기 조절된 기질 상에 파종할 수 있다. 상기 조절되는 세포들은 이어서 배양되는 세포들과 동일하거나 상이한 공여자 또는 종으로부터 유래할 수 있다.

B. 적응 배양물을 사용한 세포의 성장

중간 단계 췌장 줄기 세포를 조절되고 새로운 배양 접시의 혼합물로 분리한다. 배양 시간은, 그 세포들이 여전히 증식할 수 있는 한, 중요한 것이 아니다. 바람직한 실시 태양에서, 최근 췌장으로부터 분리한 세포(예, 단지 한 번 또는 두 번 계대배양)를 사용한다. 이전과 같이, 상기 중간 단계 췌장 줄기 세포 집단의 성장을 촉진시키기 위하여, 상기 세포들을 저혈청 배지에서 성장시킨다. 세포들을 그들이 서로 접촉되지 않도록 하는 밀도로 파종하고, 합류에 도달하기 전에 회수하는 것이 바람직하다. 당업자는 파종된 세포들의 수가 합류에 도달하기 전 배양 시간에 영향을 끼칠 것이라는 점을 인식할 것이다.

수확 후, 조절되고 새로운 플레이트에서 유래한 세포들을 배합한다. 새로운 플레이트 상에서 성장한 세포 대 조절된 플레이트 상에서 성장한 세포의 비율은, 일부 세포가 조절된 플레이트 상에서 성장하는 한, 본 발명에서 중요한 것이

아니다.

그 다음, 상기 회수된 세포들을 하기하는 바와 같이 캡슐화하거나, 새로운 조직 배양 플레이트 상에 파종할 수 있다. 적응 배양한 후, 배양물 중에서 성장시킨 세포들은 포도당 조절 방식으로 고농도 인슐린을 증식시키고 분비하는 양자 모두의 능력을 갖는다. 인슐린 대 액틴 비율은 적응 배양 전의 비율과 유사하다.

IV. 중간 증식 췌장 세포의 캡슐화

적응 배양 후 중간 증식 줄기 세포의 캡슐화는 당해 캡슐 내 세포 집합체 형성을 초래한다. 그 집합체는 세포 구조를 가지며, 췌장에서 새로 분리된 캡슐화된 랑게르한스섬(islet)의 단백질 발현 표현형과 유사한 단백질 발현 표현형을 갖는다.

캡슐화는, 숙주 동물의 면역 반응을 최소화하면서, 당뇨병 숙주에 그 췌장 세포를 이식할 수 있게도 한다. 캡슐화 멤브레인의 다공성은, 외래 세포에 대한 숙주 면역 시스템의 접근을 최소화하면서, 당해 캡슐로부터 인슐린과 같은 생체적합 물질이 분비되도록 선택할 수 있다.

캡슐화 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 하기 참고 문헌들에 공개되어 있 다: van Schelfgaarde amp; de Vos, J. Mol. Med. 77:199-201 (1990), Uludge et al. Adv. Drug Del Rev. 42:29-64 (2000) 및 미국 특허 제5,762,959호, 제5,550,178호 및 5,578,314호. 이하에서는 중간 단계 췌장 줄기 세포 캡슐화의 일반적인 과정을 기술한다. 특정 예는 본 출원의 실시예 부분에 기술한다.

A. 캡슐화 물질

캡슐화되는 세포는 하이드로겔로 둘러싸인다. 하이드로겔은 알기네이트, 아가로스 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 비롯한 다양한 물질로부터 제조할 수 있다. 이들 물질은, 이온적으로 또는 공유적으로 가교될 때, 수 중 하이드로겔을 형성한다.

췌장 세포의 캡슐화에 사용하기 위한 바람직한 물질은 만누론산(M) 및 글루론산(G)로 구성된 다당류인 알기네이트이다. 알기네이트는, 칼슘 또는 바륨과 같은 이가 양이온과 가교 결합될 때, 하이드로겔을 형성한다.

B. 캡슐 형성

세포의 캡슐화 실시예로서, 폴리라이신 멤브레인을 사용한 알기네이트 캡슐의 형성을 기술한다. 당업자는, 캡슐이 알기네이트 및 폴리라이신의 변형체 또는 기타 물질을 사용하여 형성될 수도 있고, 그 형성 과정이 캡슐화되는 세포의 기능에 영향을 미치지 않고 유사하게 변형될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 세포들의 기능 시험을 위한 분석은 본 출원의 캡슐화 세포의 이식에 대한 섹션 IV 및 표현형 분석에 대한 섹션 VI에서 제공된다.

세포 및 알기네이트를 함유하는 소적은 소적 형성 장치, 예를 들어, 공기 구 동 소적 생성기 또는 고전압 정전 펄스 시스템에서 생성시킨다. 또한, 중력을 이용하여 소적을 생성시킬 수도 있다. 칼슘과 같은 이온 가교 결합제를 함유하는 용액에서 상기 소적을 항온 처리하여 알기네이트 용액을 겔로 형성시킨다.

멤브레인을 형성시키기 위하여, 폴리라이신을 함유하는 용액 내에 상기 소적을 현탁시킴으로써 상기 다음이온 알기네이트를 다양이온 폴리라이신으로 코팅한다. 당업자는 배양 시간 뿐만 아니라 상기 폴리라이신의 농도 및 분자량을 변화시키면 당해 멤브레인의 다공성에 영향을 미칠 것이라는 점을 인식할 것이다.

하이드로겔 주위에 멤브레인이 형성되면, 사용자는 통상 소듐 시트레이트 용액 내에 캡슐을 침지시켜 칼슘 이온을 제거함으로써 당해 겔을 액화시키는 선택을 할 수 있다. 당업자는 액화가 적절한 상황을 인식할 것이다. 생체적합성을 촉진하기 위한 마지막 단계는 알기네이트 중에 상기 캡슐을 현탁시키는 것 또는 일부 기타 하전 분자를 양으로 하전된 폴리라이신에 결합시키는 것이다.

C. 마이크로캡슐의 매크로캡슐 내로의 혼입

당업자는 일부 상황에서 이식되는 캡슐화 췌장 세포에 대한 숙주 반응을 감소시키기 위하여 추가의 단계가 취해질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 바람직한 방법은 마이크로캡슐을 매크로캡슐 내로 혼입시키는 것이다. 이 기술은 본 명세서에 참고 인용된 미국 특허 제5,545,423호에 기술되어 있다.

요약하면, 마이크로캡슐은 본질적으로 이전 섹션에서 기술된 바와 같이 제조한다. 액화 내부를 갖는 마이크로캡슐을 사용할 수도 있으나, 겔화 내부를 갖는 마이크로캡슐이 바람직하다. 그 다음, 다수의 마이크로캡슐을 겔화 물질의 두

꺼운 층 으로 덮으면, 상기 마이크로캡슐의 다양이온 층은 더욱 효과적으로 면역 시스템으로부터 차폐된다.

상기 마이크로캡슐을 덮는 매크로캡슐 층은 임의의 두께를 가질 수 있으나, 약 1 미크론 이상의 두께를 가지며, 약 50 미크론 이상의 두께가 바람직하다. 상기 매크로캡슐은 마이크로캡슐에 대하여 기술한 바와 같은 하이드로겔을 제조하는 데 적합한 임의의 폴리머로 제조할 수 있고, 이온 또는 공유 결합 방법을 이용하여 가교시킬 수 있다. 매크로캡슐은 원주형, 구형 또는 디스크형(이러한 모양으로 한정되는 것은 아님)을 비롯한 다양한 모양으로 제조할 수 있다. 당업자는 특정 조성의 상기 매크로캡슐이 캡슐화된 세포의 기능에 영향을 미치지 않을 것이며, 또한 본 출원의 교시를 이용하여 상기 캡슐화된 세포의 기능을 분석할 수 있을 것이라는 점을 인식할 것이다.

D. 배양물 내 캡슐화된 세포의 집합 및 그 유지

캡슐화 후, 중간 증식 줄기 세포는 집합체를 형성한다. 그 집합체의 세포 구조 및 단백질 발현 패턴은 본 출원의 섹션 VI에 기술한 바와 같은 면역학적 염색으로 분석할 수 있다. 세포들의 통상의 집합체는 다음과 같은 표현형을 갖는다: 당해 집합체의 내부 세포들이 인슐린, 소마토스타틴 및 글루카곤을 발현시키면서, 세포들의 단일 층이 당해 집합체의 외주를 둘러싸고 CK-19를 발현시킨다. 상기 CK-19 발현 세포는 미분화 세포인 것 같고, 중앙의 호르몬 발현 세포는 성숙 세포인 것 같다.

캡슐화 세포는 캡슐화 랑게르한스섬과 같이 배양물 중에서 성장할 수 있다. 따라서, 캡슐화 중간 증식 줄기 세포는 캡슐화 랑게르한스섬에 대하여 사용하였던 것과 유사한 방식으로 배양물 중에 유지될 수 있다. 이가 양이온을 상기 배양 배지에 첨가하여 액체 상태를 유지시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 하이드로겔이 칼슘과 가교 결합된 알기네이트인 경우, 그 배양 배지에 0.03 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$를 첨가할 수 있다.

V. 캡슐화 췌장 세포의 이식

포유 동물에게 이식(implantation 또는 transplantation)하고, 이어서 내분비 기능을 모니터링하는 것은 랑게르한스섬 이식에 대하여 일반적으로 이용하는 방법에 따라 수행할 수 있다; 예를 들어, 문헌[Ryan et al., Diabetes 50:710-19 (2001); Peck et al., Ann Med 33:186-92 (2001); Shapiro et al., N Engl J Med 343(4):230-8 (2000); Carlsson et al., Ups J Med Sci 105(2):107-23 (2000) 및 Kuhtreiber, WM, Cell Encapsulation Technology and Therapeutics, Birkhauser, Boston, 1999)]을 참고하라. 이식의 바람직한 위치는 복강, 간 및 신낭(kidney capsule)을 포함한다.

A. 마이크로캡슐의 투여량

당업자는 의도된 수용자에 대하여 마이크로캡슐의 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 투여량은 당해 수용자의 인슐린 요구에 따라 달라질 것이다. 마이크로캡슐에 의하여 분비되는 인슐린 농도는 면역학적으로 또는 생물학적 활성량으로 결정될 수 있다. 투여량의 결정시, 수용자의 체중도 고려될 수 있다. 필요한 경우, 상기 캡슐화된 세포에 대한 수용자의 반응을 모니터링하면서 1회 이상의 이식 을 수행할 수 있다. 따라서, 이식에 대한 반응을 캡슐화 세포의 투여량에 대한 가이드로서 사용할 수 있다. 문헌[Ryan et al., Diabetes 50:710-19 (2001)]을 참고하라.

B. 동물내 캡슐화된 세포 기능의 모니터링

수용자내 캡슐화된 세포의 기능은 포도당에 대한 수용자의 반응을 모니터링함으로써 측정할 수 있다. 상기 캡슐화된 세포의 이식은 혈당 농도의 조절로 귀결될 수 있다. 또한, 췌장 내분비 호르몬인 인슐린, 글루카곤 및 소마토스타틴의 농도 증가의 증거는 이식된 캡슐화 세포의 기능을 나타낼 수 있다.

당업자는 혈당의 조절을 다른 방식으로 모니터링할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 체중 및 인슐린 요구와 같이, 혈당을 직접 측정할 수 있다. 경구 포도당 관용성(tolerance) 시험도 주어질 수 있다. 대사 파라미터로서 신장 기능도 측정할 수 있다. 문헌[Soon-Shiong, P. et al., PNAS USA 90:5843-5847 (1993)]을 참조하라.

VI. 표현형 분석

성숙 췌장 세포가 존재하는 시점을 알기 위하여, 생체내 또는 시험관내에서 성장한 췌장 세포로서, 배양의 특정 단계에서 그리고 캡슐화 후 취한 췌장 세포의 표현형을 분석하는 것이 유용하다. 특정 단백질의 발현은 세포 동일성 또는 분화 상태와의 상관 관계 때문에, 그들의 동일성 또는 분화 상태를 평가하기 위하여 마커 유전자 또는 단백질의 발현에 대하여 세포들을 분석할 수 있다. 예를 들어, 새롭게 분리한 췌장 조직에서, 아밀라제의 발현은 당해 세포가 외분비 샘꽈리 세포(acinar cell)임을 확인시켜 주고, 인슐린의 발현은 당해 세포가 내분비 랑게르한스섬 세포임을 확인시켜 준다. 유사하게, 분화의 초기 단계에서의 랑게르한스섬 세포들은 통상 사이토케라틴 CK-19에 대하여 양성적인 반면, 성숙 랑게르한스섬 세포들은 CK-19의 보다 적은 발현을 나타낸다.

표현형 성질은 각 세포 별로 또는 집단 평균으로 분석할 수 있다. 분석 모드는 당해 분석 기술의 방법 및 특정 요구에 따라 달라질 것이다. 따라서, FACS 분석에 의해 현탁된 세포에서 또는 고정된 절편에서 수행하는 면역조직화학에 의한 마커 발현 분석은 개개의 세포가 주어진 마커를 발현하는 빈도 및 강도를 측정한다. 한편, 세포의 전체 집단에 대한 인슐린 대 액틴 mRNA 발현의 평균 비율과 같은 성질을 측정하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 경우에 있어서, 상기 분석은 통상 세포들의 풀에서 mRNA를 수집하고 인슐린 및 액틴 메시지의 총 존재비(abundance)를 측정하는 방식으로 수행한다. 많은 표현형의 성질은 하나의 세포에서 또는 집단에서 분석할 수 있다. 예를 들어, 개개의 세포를 염색함으로써 분비 과립 내 인슐린의 존재에 대하여, 또는 세포들의 풀을 용해(lysing)시킴으로써 총 인슐린 단백질에 대하여, 인슐린 발현을 분석할 수 있다. 유사하게, 동일계 하이브리다이제이션에 의하여 각 세포에 대하여 또는 세포 용해 및 mRNA 수집에 의하여 세포의 집단 전체에 대하여 mRNA 존재비를 측정할 수 있다.

A. 세포 분화 마커

췌장 세포의 집단을 동정하는데 사용할 수 있는 다수의 세포 마커가 있다. 분리 및 배양되는 공여자 세포는 분화된 췌장 세포의 다양한 표현형 및 유전자형 징후를 나타내기 시작한다. 이들 징후 또는 마커에서의 변화는, 초기 증식 후 또는 분리 및 정제 직후, 혈청이 없는 환경에의 상기 췌장 세포의 이동에 대한 응답이다. 상기 표현형 및 유전자형 징후의 예에는 조절(예, 상향 조절 또는 하향 조절)되는 통성 프로제니터 세포 집단에 존재하는 다양한 분자 마커를 포함한다. 이들 분자 마커는 CK-19를 포함하는데, 이는 췌장 통성 줄기 세포의 마커로 가정된다.

통상, 포유동물 줄기 세포는 그들이 그들의 최후 발생 종말점까지 성숙되기 때문에 다수의 발생 단계를 통하여 속행된다. 발생 단계는 종종 세포 발생에 존재 또는 부재하는 마커의 동정에 의해 측정할 수 있다. 인간 내분비 세포는 동일한 방식으로 발생하기 때문에, 다양한 마커를 사용하여, 줄기 세포-유사 표현형에서 가성 랑게르한스섬(pseudoislet) 표현형으로의 전이로서 세포들을 동정할 수 있다.

본 발명의 방법에 의하여 증식 또는 분화되도록 유도되는 세포 내 마커의 발현은 정상 인간 췌장 발생에서 마커 발현의 순서와 일부 유사성을 갖는다. 발생의 매우 초기에, 원시 상피 세포는 호메오도메인 핵 인자(homeodomain nuclear factor)인 초기 세포 마커 PDX-1을 발현시킨다. 세포가 발생함에 따라, 그들은 발아하기 시작하여 도관을 형성한다. 이들 세포는 상피 도관 세포에 대한 마커 사이토케라틴 19를 발현하고, 내분비 세포 발생을 유도하는 PDX-1을 일시적으로 발현시킨다. 이들 세포가 발생을 계속함에 따라, 그들은 인슐린, 소마토스타틴 또는 글루카곤을 발현시키는 능력을 얻는다. 최종 분화 세포는 단지 하나만을 발현시킬 수 있고, α 세포(글루카곤), β 세포(인슐린) 및 δ 세포(소마토스타틴)가 된다. 본 명세서에서 사용한 중간 세포 집단은 발생의 전체 분화 단계보다 적은 단계에서 존 재하고, 증식 능력을 계속 유지하며, 성숙 내분비 세포로 분화될 수 있는 잠재성을 갖는 것으로 여겨진다. 상기 세포들이 실로 발생 경로에서의 실례이거나 또는 단지 시험관내 조작의 결과인 경우, 중간 단계 세포가 내분비 호르몬을 발현시킬 뿐만 아니라 증식시킬 수 있고, 따라서 임의 유형의 랑게르한스섬 세포에서의 결핍을 정정하는데 사용하기 위한 잠재성을 갖는다.

관심 마커는 췌장 내 일시적- 및 조직-특이적 패턴으로 발현되는 분자이다. 문헌[Hollingsworth, Ann N Y Acad Sci 880:38-49 (1999)]을 참조하라. 이들 분자 마커는 세 개의 일반적인 카테고리로 분리된다: 전사 인자, 노치 경로 마커(notch pathway marker) 및 중간 필라멘트 마커. 전사 인자 마커의 예로는 PDX-1, 뉴로(Neuro)D, Nkx-6.1, Isl-1, Pax-6, Ngn-3 및 HES-1이 있다. 노치 경로 마커의 예로는 노치1, 노치2, 노치3, 노치4, 재지드(Jagged)1, 재지드2, D1II 및 RBpjk가 있다. 중간 필라멘트 마커의 예로는 ck19 및 네스틴(Nestin)이 있다.

배양되거나 분리된 세포 내 단백질 및 핵산 마커의 발현 평가 방법은 당업계의 표준이고, 이에는 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR), 노던 블롯 및 동일계 하이브리다이제이션[예컨대, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 2001 supplement) 참조] 및 면역 분석, 예컨대, 절편화 물질의 면역조직화학 분석, 웨스턴 블롯팅, 및, 본래 세포에 접근할 수 있는 마커에 있어서, 유동 세포 계측 분석법(FACS)[예컨대, Harlow and Lane, Using Antibodies; A Laboratory Manual, New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)]이 있다. 내분비 세포 분화의 종래 조직화학 마커도 사용할 수 있다. 면역조직화학에 의하여 조사되는 세포는 현미경 조사를 위하여 유리 챔버 슬라이드 상에 배양할 수 있다. 대안적으로, 종래 조직 배양물에서 성장되는 세포는 당해 배양물에서 손으로 제거하여 절편화용 파라핀 내에 포매할 수 있다. 문헌[Leonard J. et al., Mol. Endocrinol., 1993, Oct 7, (10) 1275-83]의 교시에 따라 PDX-1 항체를 제조할 수 있다.

세포 분화 마커는 다양하며, 종래 면역조직화학에 의해 검출할 수 있다. 일반적인 적용 프로토콜은 다음과 같다.

염색 과정은 상기 슬라이드의 챔버 부분을 제거하는 것부터 시작한다. 완충액으로 세포들을 매우 온화하게 세척하고, 파라포름알데히드 용액에 고정시킨다. 그 다음, 실온에서, 정상 혈청을 함유하는 블로킹 용액(blocking solution) 중에서 세포들을 항온 처리한다. 블로킹 용액 중의 비이온성 세제로 세포들을 투과성으로 하였다. 적당한 희석으로 아래에 나열하는 바와 같은 1차 항체를 블로킹 용액 중에서 제조하고, 세포에 첨가한 후, 항온 처리하였다. 1차 항체로 항온 처리한 후, 세포들을 완충액 중에서 세척하고, 블로킹 용액 중에서 재블로킹하였다.

적당한 희석으로 블로킹 용액 중에서 제조한 2차 항체를 상기 세포들에 첨가한 후, 어둠 속에서 항온 처리하였다. 항온 처리 후, 세포들을 세척하고, 핵을 획스트 염료(Hoechst dye)로 대비염색하였다. 과량의 유체를 제거하고, 상기 슬라이드를 장착한 후, 커버슬라이트도 덮는다. 상기 슬라이드를 건조시키고, 어둠 속에 저장한다.

대안적으로, ABC 방법을 사용하여 면역세포화학을 위하여 상기 세포들을 제 조할 수 있다. 요약하면, 세포들을 파라핀에 포매하고, 파라핀 절편을 갖는 슬라이드를 37 ℃에서 밤새도록 건조시킨다. 상기 세포들을 탈파라핀화하고, 내인성 퍼옥시다제 활성을 나타내는 과산화수소 메탄올 용액에 함침시킨다. 슬라이드를 0.01 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에서 30 분 동안 끓여 특정 에피토프를 회수한다. 슬라이드를 완충액으로 세척하고, 실온에서 습윤 챔버에서 정상 혈청을 사용하여 블로킹하였다.

블로킹 용액에서 제조한 1차 항체를 상기 샘플들에 첨가하고, 습윤 챔버에서 항온 처리한다. 슬라이드를 세척하고, 블로킹 용액에서 제조한 2차 항체로 항온 처리한다. 슬라이드들을 완충액으로 다시 세척하고, 시판 키트(예, Dako Corporation)에서 얻은 ABC 착물 또는 아비딘-호스 레디쉬 퍼옥시다제로 항온처리하였다. 슬라이드들을 다시 세척하고, 디아미노벤지딘 현상 용액; 골드 랩(gold wrap) 중의 우레아 하이드로젼 퍼옥사이드로 항온 처리한다. 증류수로 세척한 후, 슬라이드들을 5 분 동안 메이어 헤마톡실린 중에 함침시킨 후, 물이 무색으로 변하고 핵이 파란색으로 될 때까지 실행 탭 물 중에 슬라이드들을 유지시킨다. 슬라이드를 탈수시키고, 관찰을 위해 장착한다.

B. 인슐린 mRNA 발현

췌장 세포 실체, 분화 또는 성숙을 특성화하기 위하여 사용할 수 있는 하나의 마커는 인슐린 mRNA의 레벨이다. 예를 들면, 본 발명의 중간 세포 모집단은 소정의 범위내에서 인슐린 mRNA의 발현을 나타낸다. 인슐린 mRNA의 정량화 방법의 예로는 노던 블롯, 뉴클레아제 보호 및 프라이머 확대 등이 있다. 한 구체예에서, RNA를 배양 세포의 모집단으로부터 추출하고, 프로인슐린 메시지의 양은 정량적 역전사 PCR에 의하여 측정한다. 역전사에 이어서, 인슐린 cDNA 서열로 하이브리드화하는 프라이머 및, 증폭된 산물의 양이 샘플중에 존재하는 mRNA의 함량과 관련되어 있는 증폭 조건을 사용하여 샘플로부터 인슐린 cDNA를 특이적으로 그리고 정량적으로 증폭시킨다. 참조 [Zhou et al., *J. Biol Chem* 272: 25648-51 (1997)]. 역학적 정량화 절차는 출발 mRNA 레벨을 측정할 수 있기 때문에 바람직하다.

종종, 인슐린 mRNA의 함량은 액틴 특이성 프라이머를 사용하는 동일한 RNA 샘플로부터 특이적으로 증폭시키는 액틴과 같은 구조적으로 발현된 mRNA로 정규화된다. 그래서, 인슐린 mRNA의 발현 레벨은 인슐린 mRNA 증폭 산물 대 액틴 mRNA 증폭 산물의 비, 즉 인슐린: 액틴 mRNA 비율로서 보고될 수 있다. 기타의 췌장 호르몬 (예, 소마토스타틴 또는 글루카곤)을 암호화하는 mRNA의 발현은 동일한 방법에 의하여 정량화될 수 있다.

C. 포도당 자극 인슐린 분비

베타 세포의 중요한 작용 중 하나는 포도당 수치에 따른 이의 인슐린 분비를 조절하는 것이다. 통상적으로, 정적 포도당 자극 (SGS) 분석은 이들이 여러 가지 포도당 수치에 반응하여 인슐린을 분비할 수 있는지의 여부를 구별하기 위하여 증식성 유착 췌장 세포에 대하여 실시할 수 있다. 세포는 일반적으로 거의 융합성이 될 때까지 적절한 기질에서 배양된다. SGS 테스트 3 일전, 배양 배지를 1 g/ℓ의 포도당만을 포함하고 인슐린은 결여되어 있는 동일한 성질을 갖는 배지로 교체한다. 3 일 동안 매일 배지를 교환하고, SGS 테스트를 4일째에 실시한다.

테스트 전에, 배양 배지를 포도당에 대하여 수집하고, 인슐린 분석을 실시하였다. 테스트에 대한 세포를 생성하기 위하여, 세포를 둘베코 인산염 완충 염수 (DPBS) + 0.5% BSA로 2회 세정하고, 매세척마다 5 분간 배양한 후, DPBS 단독으로 1회 배양하고, 5 분간 배양하였다. 세정후, 60 ㎎/dℓ 포도당 (KRB-60)을 포함하는 10 ㎖ (100 mm 접시에서) 또는 5 ㎖ (60 mm 접시에서)의 Krebs-Ringers SGS 용액으로 30 분간 37℃ 배양기에서 세포를 배양하였다. 그 후, 이러한 배양을 반복하였다.

SGS 분석을 실시하기 위하여, 세포를 3 ㎖ (100 mm 접시) 또는 4 ㎖ (T75 플라스크) 또는 2 ㎖ (60 mm 접시) KRB-60에서 37℃에서 20 분간 배양하였다. 배지를 흡기시키고, 회전시킨 후, LG-1 (낮은 포도당 자극 단계)로서 인슐린 분석을 위하여 수집하였다. KRB-450 + theo (450 ㎎/dℓ 포도당을 포함하는 KRB 및 lO mM 테오필린)을 상기와 동일한 부피로 첨가한 후, 세포를 상기와 동일한 조건하에서 배양하였다. 상청액을 HG (자극된 높은 포도당)로서 인슐린 분석을 위하여 수집하였다. 그후, 세포를 KRB-60으로 다시 배양하고, 배지를 LG-2로서 수집하고, 다시 LG-3로서 수집하였다. 배지를 인슐린 분석을 위하여 수집하고, 인슐린 함량을 방사선면역 분석 (RIA) 또는 기타의 적절한 분석에 의하여 측정할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

SGS 테스트의 결과는 HG 인슐린 값을 LG-1 인슐린 값으로 나눈 것으로 정의되는 자극 지수로서 표현하였다. 일반적으로, 기타의 값 (예, 1.5, 2.5, 3.0, 3.5 등)을 특정의 세포 모집단을 정의하는데 사용할 수 있기는 하지만, 약 2 이상의 자극 지수는 SGS 분석에서 양성의 결과로 간주한다.

실시예

하기 실시예는 예시를 위한 것으로서, 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.

실시예 1: 동일계 성숙을 위한 중간 단계 췌장 줄기 세포의 모집단 생성

통상적으로, 중간 단계 췌장 줄기 세포를 공여자의 췌장에서 분리하였다. 분리된 췌장 세포의 혼합 모집단을 중간 단계 췌장 줄기 세포의 성장을 촉진하는 조건하에서 배양하였다.

장기 입수

췌장 세포를 시체의 췌장에서 분리하였다. 췌장을 다수 장기 공여자, 즉 59세의 백인 남성에게서 구하였다. 장기 수집은 장기 공유를 위한 연합 네트워크(UNOS) 및 지방 장기 기증자 단체에 의하여 편성되었다.

췌장을 절제하기 위하여, 복부 대동맥을 신장 동맥의 연결부의 아래로 캐뉼러 처리하였다. 아래 창자간막 정맥의 캐뉼라를 통하여 문맥 관류를 실시하였다. 캐뉼라를 문맥 정맥 및 비장 정맥의 연결부까지 그리고 그 위로 삽입하였다. 문맥 정맥의 연결부에서 비장 정맥의 주위에 2-0 타이를 두었다. 또다른 2-0 타이를 비장 동맥의 주위에 두었다.

지라 정맥을 결찰시키고, 관류를 개시하기 전에 즉시 비장쪽에서 절개하여 개방시켰다. 이러한 방법은 혈압을 높게 하여 랑게르한스섬을 손상시키지 않으면서 췌장 관류를 더욱 효과적으로 이루어지게 한다. 또한, 비장 및 췌장으로부터 간으로 관류물을 배수시키는 것을 방지하게 된다. 망낭을 개방시키고, 정상의 염수 슬 러쉬를 췌장에 가하였다. 1 ℓ의 대동맥 관류후, 비장 동맥을 결찰시켰다.

간 및 신장팀이 비장 정맥 및 하부 위장관을 절개할때 췌장을 잘 보호해둔다. 췌장을 십이지장의 모서리에서 나누어서 췌장으로의 손상 위험을 감소시키고, 오염의 위험성을 감소시킨다.

UW 용액으로 채운 플라스틱 백에 장기를 보관하고, 수송을 위하여 정상의 무균 염수 슬러쉬를 갖는 Nalgene병에 장착하였다.

공여자 췌장으로부터 사람 랑게르한스섬의 분리

췌장 조직을 기계 파열 및 HBSS (1.5 ㎎/㎖)중에서 Liberase를 사용한 소화에 의하여 분리시켰다. 240 ㎖의 Liberase 용액을 도관 캐뉼라를 통하여 췌장에 가하였다. 조직이 약 10 20 분간 부드러워질 때까지 37°C에서 800 ㎖의 템퍼링 비이커에서 장기를 배양하였다.

주도관을 조직 덩어리로부터 분리한 후, 이를 금속 소화실에 옮기고, 자동 순환 소화를 개시하였다. 유리 랑게르한스섬이 샘플에 나타나면, 200 ㎖의 소화물을 수집하고, 120 ㎖ (0.75 ㎎/㎖)의 신선한 Liberase 용액을 추가의 소화를 위하여 이 시스템에 가하였다.

대부분의 랑게르한스섬이 주위 조직으로부터 방출된 후, 소화물을 수집하고, 이를 Medium A10 (RPMI중의 10% FBS)으로 희석하였다. 4°C, 1,000 rpm에서 2 분간 원심분리에 의하여 세포를 A10으로 3회 세정하였다.

미국 특허 제5,739,033호에 기재된 바와 같이 PIPS [UW 용액중의 Nycodenz (노르웨이의 나이코메드 에이에스]의 용액에서 3층 밀도 구배 분리에 의하여 샘꽈리 세포로부터 랑게르한스섬을 분리하였다.

세정한 췌장 세포의 펠릿을 320 ㎖의 PIPS (밀도 1.114)와 혼합하고, 이를 얼음에서 10 분간 배양하였다. 8 개의 250 ㎖의 바닥이 평편한 원심분리관에 70 ㎖의 PIPS (밀도 1.090)를 채웠다. 40 ㎖의 세포/PIPS 현탁액을 각각의 시험관에 하부에 두었다. 2% FBS를 포함한 60 ㎖의 RPMI를 PIPS의 위에 두었다. 쉬지 않고 6 분간 1,500 rpm에서 05, ARC 회전체를 구비한 Sorvall RC-3C Plus를 사용하여 시험관을 원심분리하였다.

상부 계면 (413,400 IEQ, 67% 순도), 하부 계면 (포착된 랑게르한스섬, 랑게르한스섬 분절, 샘꽈리 및 관 세포의 혼합물) 및 펠릿 (주로 샘꽈리 및 도관 세포)을 각각 수집하였다.

세포를 Medium A10으로 2 회 이상 세정한 후, 임상 이식 (75%) 또는 증식 연구 (25%)를 위하여 사용하였다.

초기 단계 췌장 줄기 세포의 선별적 배양

랑게르한스섬 분리후, 약 57% 랑게르한스섬을 포함하는 세포 분획을 증식을 위하여 조직 배양 접시에 즉시 두었다. 초기 배양은 계대 0 (pO) 세포로 지칭한다. 초기에, 세포를 87%의 무혈청 SM 95 및 20% FCS를 포함하는 13% 배지 #7으로 이루어진 혼합 배지에서 성장시켰다. 배지 조성은 이러한 적용의 분비 IIIA2에 기재하였다. 4일째에서의 제1의 배지 변경시, pO 세포를 100% 무혈청 SM95 배지로 교체하였다. 배양 배지를 배양 기간 동안 주당 2회 교체하고, 부유하는 세포를 사용된 배지로 제거하였다.

배양 12 일후, pO 세포는 합류에 도달하였다. 세포를 트립신/EDTA를 사용하여 약 10 분간 배양 접시의 바닥으로부터 분리한 후, 이를 10% FBS HBSS 배지로 세정하였다. pO 세포를 새로운 조직 배양 접시에 1:2의 분할로 계대배양하여 계대 1 (p1) 세포가 되었다. 이러한 세포 계대 및 그 후의 세포 계대에서, 배양 표면 1 ㎠당 약 12,000 개의 세포의 밀도로 파종하였다.

실시예 2: 초기 단계 췌장 줄기 세포의 적응 배양

성숙 단계의 예비 단계로서, 초기 단계 췌장 줄기 세포를 상태조절한 배양 접시 및 새로운 배양 접시의 혼합 접시에서 성장시켰다.

p1 세포를 7 일간 배양한 후, 계대 배양하여 계대 2 (p2) 세포가 되었다. p1으로부터 수거한 세포의 약 2/3를 상태조절한 세포 배양 접시에 파종하였다. 상태조절한 세포 배양 접시를 또다른 공여자, HD 386i로부터의 췌장 세포를 배양하기 위하여 미리 사용하였다. 세포의 나머지 1/3을 상태조절하지 않은 새로운 조직 배양 접시에 파종하였다. 상태 조절한 평판 및 새로운 평판 모두에서의 세포가 계속해서 증식되도록 하였다.

P2 세포를 7 일간 배양하였다. 계대 1 및 2의 합한 세포 팽창의 추정치는 약 10 배이다. 새로운 접시 및 상태조절한 접시로부터의 세포를 수거하고 이를 합하였다. 이들 증식된 세포의 일부분을 새로운 조직 배양 접시에 파종하여 배양된 계대 3 (p3) 세포로 만들었다. 세포의 또다른 부분은 캡슐화된 p3 세포로 지칭하는 알기네이트-폴리리신 마이크로캡슐에 캡슐화시켰다.

실시예 3: 캡슐화시키지 않고 배양액중에서 성장한 p3 세포의 특성화

p3 세포를 새로운 평판에 파종하고, 이를 표준의 배양 조건하에서 무혈청 SM95 배지내에서 성장시켰다. 세포의 시험관내 분석에 의하면, p1 및 p2 세포에 비하여 안정한 수치의 인슐린 및 글루카곤 mRNA가 발현된 것으로 나타났다. 그러나, 포도당 조절 방식으로 높은 수치의 인슐린이 분비된 배양액중의 P3 세포는 P3 세포가 정상의 랑게르한스섬 유사 작용을 갖는다는 것을 시사한다.

인슐린 및 글루카곤 mRNA 수치의 분석

배양된 pO, p2 및 p3 세포로부터의 인슐린 및 글루카곤 mRNA 발현을 RT-PCR 분석으로 측정하였다. RNeasy 미니 키트 (QIAGEN #74104)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 RNA를 분리하였다. 간략하게, 용해 완충액 (10 cm 평판당 650 ㎕)을 세포에 첨가하고, 1회용 세포 스크레이퍼 (Fisher #087732)를 사용하여 수집한 후, QIA 분쇄기 (QIAGEN #79654)를 사용하여 파열시켰다. 총 RNA를 용해물로부터 분리한 후, RiboGreen RNA 정량화 분석 (Molecular Probes #R-11490)을 사용하여 정량화하였다. RNA 샘플을 cDNA 합성때까지 -80℃에서 냉동 보관하였다. 동일한 부분샘플 (0.5 ㎍ 각각)의 각각의 샘플을 Omniscript RT 키트 (QIAGEN #205111)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라서 20 p몰의 올리고-$(dT)_{16}$를 사용하여 역전사시킨 후, 각각의 cDNA 샘플을 100 ㎕로 TE 완충액 pH8.0으로 희석한 후, 이를 -20℃에서 보관하였다. 2 ㎕의 각각의 cDNA 샘플 및 표시한 프라이머를 사용하여 Roche Molecular LightCycler에서 실시간 PCR을 실시하였다. 액틴 및 인슐린을 하이브리드 프로브 프로토콜을 사용하고 DNA Master 혼성 믹스 (Roche #2158825)를 사용하여 제조업자의 지시에 따라 측정하였다. 각각의 생성물의 표준 곡선과의 비교에 의 하여 PCR을 동시에 정량화하였다.

	센스	안티센스	FITC 프로브	LC RED 프로브
베타-악틴	CCTCGCCTTTGCCGATCC 서열 번호 1	AGCCACACGCAGCTCATTGTAGA 서열 번호 3	CCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAA 서열 번호 5	TGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCAC 서열 번호 7
인슐린	GCCATCAAGCACATCACTGT 서열 번호 2	AGAGGGAGCAGATGCTGGTA 서열 번호 4	CAGCCTGCAGCCCTTGGCC 서열 번호 6	TGGAGGGGTCCCTGCAGAAG 서열 번호 8

배양된 pO, p2 및 p3 세포의 인슐린 및 글루카곤 mRNA 발현을 측정하고, 결과를 하기 표 1에 기재하였다. 인슐린 및 글루카곤 mRNA 수치 모두는 3 개의 세포 모두의 계대중에 안정한 수치로 발현되었다.

[표 1]

P3를 통한 HD394-PO의 인슐린 및 글루카곤 mRNA 발현		
계대 횟수	인슐린/악틴 비율	글루카곤/악틴 비율
p0	2.6	1.56
p2	0.2	0.46
p3	3.0	3.9

정적 포도당 자극 (SGS) 분석

세포가 거의 융합될 때까지 배양시켰다. SGS 테스트 3 일전, 배양 배지를 인슐린이 결여되고 1 g/ℓ의 포도당만을 포함하는 유사한 성질을 갖는 배지로 교체하였다. 배지를 3 일간 매일 교체하고, 4일째에 SGS 테스트를 실시하였다.

테스트전에, 배양 배지를 포도당 및 인슐린 분석에 대하여 수집하였다. 테스트를 위한 세포를 생성하기 위하여, 세포를 둘베코 인산염 완충 염수 (DPBS) + 0.5% BSA로 2회 세정하고, 각각의 세정시 5 분간 배양한 후, DPBS 단독으로 1회 배양하고, 또한 5 분간 배양하였다. 세정후, 60 ㎎/㎗의 포도당 (KRB-60)을 포함하는 10 ㎖ (100 mm 접시에서) 또는 5 ㎖ (60 mm 접시에서)의 Krebs-Ringers SGS 용액을 사용하여 30 분간 37℃의 배양기에서 세포를 배양하였다. 이러한 배양을 반복하였다.

SGS 분석을 실시하기 위하여, 세포를 3 ㎖ (100 mm 접시) 또는 4 ㎖ (T75 플라스크) 또는 2 ㎖ (60 mm 접시)의 KRB-60중에서 37℃에서 20 분간 배양하였다. 배지를 흡기 및 회전시키고, LG-1 (낮은 포도당 자극된 단계)로서 인슐린 분석을 위하여 수집하였다. KRB-450 + theo (450 ㎎/㎗ 포도당을 포함하는 KRB 및 10 mM 테오필린)을 상기와 동일한 부피로 첨가하고, 세포를 상기와 동일한 조건하에서 배양하였다. 상청액을 HG (높은 포도당 자극된)로서 인슐린 분석을 위하여 수집하였다. 그후, 세포를 다시 KRB-60로 배양하고, 배지를 LG-2로서 수집하고, 다시 LG-3로서 수집하였다. 배지를 인슐린 분석을 위하여 수집하고, 인슐린 함량을 방사면역분석 (RIA)에 의하여 측정할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

SGS 테스트의 결과를 자극 지수로서 HG 인슐린 값을 LG-1 인슐린값으로 나눈 값으로 종종 표현하였다. 일반적으로, 약 2 이상의 자극 지수는 SGS 분석에서의 양성의 결과로서 간주한다.

하기 표 2에는 캡슐화하지 않은 배양된 p3 세포에 대한 SGS 테스트의 결과를 나타낸다. 세포는 기저 인슐린 방출 수치가 149.5 μU/60 mm 접시/시이고, 자극된 포도당 수치가 781.6 μU/60 mm 접시/시이며, 포도당 자극된 인슐린 방출의 증가는 5.2 배이었다. 또한, 세포는 자극후 인슐린 방출의 정상의 기저 수치로 되돌아갔다. 그리하여, 배양된 p3 세포는 정상의 랑게르한스섬 유사 작용을 나타낸다.

[표 2]

캡슐화되지 않은 HD394-P3 랑게르한스섬의 SGS 테스트 결과				
포도당 자극	낮음 1 (60 ㎎/㎗)	높음 (450 ㎎/㎗)	낮음 2 (60 ㎎/㎗)	낮음 3 (60 ㎎/㎗)
인슐린 방출량	149.5 (μU/㎖)	781.6 (μU/㎖)	348 (μU/㎖)	163.7 (μU/㎖)

실시예 4: P3 세포의 캡슐화 및 응집

추정치 1천 4백만개의 배양된 P2 세포를 높은 G 알기네이트 및 높은 M 알기네이트의 혼합물중에서 캡슐화시켜 캡슐화된 P3 세포로 만들었다. P2 세포를 3 ㎖의 1.4% 알긴산나트륨 용액중에서 현탁시킨 후, 0.33% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 용액에 제트 헤드를 통하여 분무하여 직경이 약 700 미크론인 알기네이트 겔 구체를 포함하는 세포를 형성하였다. 겔 구체를 0.33% $CaCl_2 \cdot 2H_20$ 용액에서 5 9 분간 침지시킨 후, 0.13% $CaCl_2 \cdot 2H_20$ 용액 중에서 8 분간 침지시켰다. 그후, 겔 구체를 0.1%의 폴리-L-리신 용액으로 2 분간 처리하여 막을 형성하고 세포를 그 안에서 캡슐화시켰다. 그후, 캡슐을 0.33% $CaCl_2 \cdot 2H_20$에 1 분간 침지시켰다. 캡슐을 염수로 세정하고, 0.2% 알기네이트에 10 분간 침지시키고, 다시 염수로 세정하였다. 캡슐을 0.05% 폴리리신중에서 5 분간 침지시킨 후, 염수 세정액으로 침지시켰다. 캡슐 내부의 알기네이트 겔은 55 mM의 구연산나트륨을 사용하여 5 분간 처리에 의하여 액화시켰다. 또다른 염수 세정후, 캡슐을 10 분간 0.2% 알기네이트로 처리한 후, 다시 염수로 세정하였다. 캡슐화를 완료하기 위하여 캡슐을 RPMI에서 8 분간 침지시켰다.

24 시간 후, 캡슐내의 세포는 응집을 개시하였으며, 랑게르한스섬 유사 구조 를 형성하였다. 캡슐화된 P3 세포를 T 75 플라스크중의 0.03 mM (30 μM)의 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 및 10%의 태내 송아지 혈청을 포함하는 M4 배지중에서 배양하였다. 배지를 주당 2회 교체하였다. 캡슐화된 세포를 13 일간 시험관내에서 유지한 후, 이를 이식에 사용하였다.

실시예 5: 캡슐화된 집합 P3 인슐린 생성 세포의 특성화

캡슐화 이후 24 시간 이내에, 증식 췌장 세포는 집합시켰는데, 췌장으로부터 직접 단리된 캡슐화된 랑게르한스섬의 것과 유사한 세포 구성을 나타내었다. 생체내 및 시험관내 측정검사는 캡슐화된 증식 췌장 세포가 시험관내 리모델링한 랑게르한스섬과 같이 작용할 수 있었다는 것을 입증해 보여 주었다.

배양액 중에서 성장한 캡슐화된 집합 p3 세포의 조직학

면역조직화학에 의해 검사하고자 하는 세포는 현미경 검사용 유리 체임버 슬라이드 상에서 배양할 수 있다. 대안으로, 종래의 조직 배양액 중에서 성장한 세포 또는 캡슐화된 세포는 배양액으로부터 수작업으로 제거하고, 단편화시키기 위해서 파라핀 중에 매립할 수 있다. PDX-1 항체는 문헌[Leonard J. et al., Mol. Endocrinol., 1993, Oct 7, (10) 1275-83]의 교시내용에 따라 제조할 수 있다.

세포 분화 마커는 다양하며, 종래의 면역조직화학에 의해 검출할 수 있다. 일반적으로 적용 가능한 프로토콜은 다음과 같다.

염색 공정은 슬라이드의 체임버 부분을 제거하면서 개시한다. 세포를 버퍼 중에서 가볍게 세정하고, 파라포름알데히드 용액 중에서 고정하였다. 이어서, 세포를 정상 혈청을 함유하는 블록킹 용액 중에서 실온 하에 항온처리하였다. 세포를 블록킹 용액 중에서 비이온성 세제로 삼투시켰다. 하기 열거한 바와 같이 1차 항체를 적절한 희석으로 블록킹 용액 중에서 제조하고, 세포에 첨가하며, 항온처리하였다. 1차 항체로 항온처리한 후, 세포를 버퍼 중에서 세정하고, 블록킹 용액 중에서 재블록킹하였다.

2차 항체를 적당한 희석으로 블록킹 용액 중에서 제조하고, 세포에 첨가하며, 어두운 곳에서 항온처리하였다. 항온처리한 후, 세포를 세정하고, 핵을 획케스트(Hoechst) 염료인 대비 염색제로 착색하였다. 과량의 유액을 제거하고, 슬라이드를 장입하며, 커버슬라이드로 커버하였다. 슬라이드를 건조시키고, 어두운 곳에 보관하였다,

대안으로, 세포는 ABC 방법을 이용하는 면역조직화학에 의해 제조할 수 있다. 요약하건대, 세포를 파라핀 중에 매립하고, 파라핀 단편을 지닌 슬라이드를 37℃에서 밤새 동안 건조시킨다. 세포를 탈파라핀화하고, 과산화수소 메탄올 용액 중에 침지시켜서 내생적인 퍼옥시다제 활성을 억제시켰다. 슬라이드를 0.01 시트르산염 버퍼(pH 6.0) 중에서 30 분 동안 비등시켜 특정 에피토프를 회수하였다. 슬라이드를 버퍼로 세정하고, 축축한 체임버에서 실온 하에 정상 혈청을 사용하여 블록킹하였다.

볼록킹 용액 중에서 제조한 1차 항체를 샘플에 첨가하고, 축축한 체임버 중에서 항온처리하였다(표 3은 통상적으로 사용된 1차 항체 및 2차 항체를 열거한 것이다). 슬라이드를 세척하고, 블록킹 용액 중에서 제조한 2차 항체로 항온처리하였다. 다시 슬라이드를 세정하고, 상업용 키트(예, Dako Corporation)의 아비딘-호스 레디쉬 퍼옥사이드(Avidin-Horse Reddish Peoxides) 시약 또는 ABC 착물로 항온처리하였다. 다시 슬라이드를 세정하고, 금 랩(gold wrap) 중에서 디아미노벤지딘 현상 용액, 우레아 과산화수소로 항온처리하였다. 증류수로 세척한 후, 슬라이드를 마이어 헤마톡실린(Mayer's Hematoxylin) 중에서 5 분 동안 침지시킨 후, 물이 무색으로 변하고 핵이 청색으로 변할 때까지 흐르는 수도물 중에서 슬라이드를 유지하였다. 슬라이드를 탈수화시키고, 시각화를 위해 장입하였다.

[표 3]

현재 통용되고 있는 1차 항체 및 이들과 함께 사용되는 2차 항체						
1차 항체	제1 희석액		농도(mg/mL)	판매회사	2차 항체	제2 희석액
INS	1:4000	기나아 피그	7.8	Dako	GAM 488	1:500
KI 67	1:250	마우스	0.05	Dako	GAR 488	1:750
CK-19	1:100	마우스	0.04	Dako	GAR 594	1:750
AMYLASE	1:2000	래빗	11	Sigma	GAGP 546	1:500
NGN 3	1:200	마우스	0.25	Transduction		
SST	1:5000	래빗	1	Diasonin	바이오티닐화 염소 항-래빗 IgG	1:200
SST	1:50	마우스	0.14	Biomeda	바이오티닐화 염소 항-래빗 IgG	1:200
PDX	1:1000	래빗	1	Scripps	바이오티닐화 염소 항-래빗 IgG	1:200
KS	1:200	마우스	0.5	Pharminogen *		
GlUCAGON	1:7000	래빗	1	Daisonin		
B-Catein	1:50	마우스	0.25	Transduction		
Actr2		마우스	0.20	Oncogene		

조직학 분석의 경우, 마이크로캡슐 내의 집합체는 CK-19, PDX-1 및 내분비 호르몬에 대하여 면역염색하였다. 결과를 하기 표 1A에 나타내었다. CK-19 염색은 세포의 내부 질량을 둘러싸고 있는 상피의 기저층과 유사한 CK-19 양성 세포의 단일층을 나타내었다. 세포의 내부 질량은 인슐린, 소마토스타틴 및 글루카곤에 대하 여 투명한 염색을 나타내었다(도 1B~1D). 따라서, 캡슐화된 p3 집합체의 염색 패턴은 리모델링한 랑게르한스섬의 것과 유사한 세포 구성을 나타내었다.

집합 후 캡슐화된 p3 세포의 시험관내 작용

캡슐화된 p3 집합체의 시험관내 작용은 SGS 측정검사에 의해 측정하였다(표 4). 세포는 기저 인슐린 방출 농도 3.7 uM/캡슐/시간 및 자극된 당 방출 농도 2.3 uU/캡슐/시간을 보유하였다. 래트는 배양된 p3 세포의 것보다 더 낮았다. 약한 반응의 한가지 설명은 알기네이트가 인슐린에 결합한다는 점이다. SGS 테스트는 세포를 캡슐화한 후 수행하였지만, 단 알기네이트의 인슐린 결합 성능이 충족되기 전에 수행하였다, 인슐린에 대한 알기네이트의 결합은 인슐린-생성 세포를 둘러싸고 있는 알기네이트에 의한 인슐린 염색의 존재에 의해 나타났다(도 3E).

[표 4]

캡슐화된 HD394-p3 랑게르한스섬의 SGS 테스트				
당 자극	저농도 1 (60 mg/dl)	고농도 (450 mg/dl)	저농도 2 (60 mg/dl)	저농도 3 (60 mg/dl)
인슐린 산출량	3.7(uU/ml)	2.3(uU/ml)	3.1(uU/ml)	1.6(uU/ml)

집합 후 캡슐화된 p3 세포의 생체내 작용

캡슐화된 p3 집합체의 생체내 작용을 측정하기 위해서, 캡슐화된 세포를 STZ 유도 당뇨병성 SCID 마우스 내로 이식

하였다. 실험 동물(SCID 마우스)는 스트렙토조토신(220 mg/kg)을 복강내 단일 투여하여 당뇨병을 보유하게 만들었다. 이 동물은 1주일 내에 혈당상승 상태(> 400 mg/dl)가 되었다.

캡슐화된 세포를 이식하기 위해서, 동물의 복벽을 살균하였다. 1 ml 주사기 및 14-게이지 안지오카테터를 사용하여, 120,000 세포를 함유하는 800 마이크로캡슐을 전신 마취 하에 당뇨병성 마우스의 복막 동공 내로 살균 이식하였다.

이식 후 혈당 및 체중을 주기적으로 측정하였다. 혈액 샘플을 헤파린 처리된 유리 모세관을 사용하여 양쪽 눈의 안구공으로부터 수집하였다. 모세관을 원심분리하고, 혈장을 에펜도르프 튜브 내로 수집하였다. 당 농도는 베크만(Beckman) II 당 분석기를 사용하여 측정하였다.

도 2는 캡슐화된 p3 세포가 생체내에서 작용화되었다는 점을 보여준다. 이식 후, 수용자 마우스는 18 일 동안 높은 당 농도를 보유하였다. 그러나, 이식 후 48일째, 수용자는 정상 당 농도를 나타내었다. 정상 당 농도는 이식 후 55일째 추가 테스트에 의해 확인하였다.

이식한 캡슐화된 p3 집합체는 조직학 분석용 수용자 마우스로부터 회수하였다. 이식편 및 (복강내)망, 간 및 신장의 생검(biopsy)을 조직학 연구를 위해 수집하였다. 도 3A~3F는 2가지 크기로 회수된 집합체의 2가지 면적을 나타낸 것들이다. 면역염색은 이식 후 캡슐화된 p3 집합체 내의 인슐린 생성 세포의 존재를 나타내었다. 또한, 주위 알기네이트도 인슐린 양성이었는데, 이는 알기네이트의 인슐린 결합 성능을 입증해 보여주었다(도 3E).

실시예 6: 캡슐화 후 시험관내 리모델링한 랑게르한스섬의 특성화

비교하기 위해서, p3 췌장 세포는 당뇨병 치료를 위한 모델 시스템인, 췌장으로부터 직접 단리된 랑게르한스섬 세포와 비교하였다. 랑게르한스섬 세포는 췌장으로부터 단리한 직후 알기네이트 마이크로캡슐 내에 캡슐화할 때 인지 가능한 구 성을 채택한 것이다. 캡슐화된 랑게르한스섬 세포를 배양액 중에 유지하고, 인슐린 발현 및 SGS 테스트에 의해 측정된 바와 같이 작용적 랑게르한스섬 활성을 보유하였다. 또한, 캠슐화된 랑게르한스섬 세포는 당뇨병성 래트 내로 이식할 때 생체내 작용을 입증해보여 주었다.

시험관내 리모델링한 랑게르한스섬의 캡슐화

사람 랑게르한스섬을 상기 설명한 바와 같이 공여자 췌장으로부터 단리하였는데, 60% 이상의 순도를 보유하였다. 캡슐화 전에, 새롭게 단리한 랑게르한스섬을 비유착성 펜웰(Fenwall) 배양 백 중에서 4 시간 내지 48 시간 동안 혈청을 보유한 M7 배지 중의 현택 배양액 중에 유지하였다. 캡슐화 후, 캡슐화된 랑게르한스섬을 2년 반 이하 동안 배양액 중에 유지하였다. 6개월 동안과 28개월 동안 배양액 중에 유지된 2가지 집단의 캡슐화된 랑게르한스섬(HD 302와 HD 314)를 분석하였다.

상기 설명한 바와 같이 캡슐을 고정하고, 조직학 분석을 위해 단편화하였다. 캡슐 내의 세포를 CK-19, PDX-1, 내분비 호르몬 및 아밀라제에 대하여 염색하였다(도 4A 내지 도 4E는 6개월 동안 유지된 랑게르한스섬을 나타내고, 도 5A 내지 도 5F는 28개월 동안 유지된 랑게르한스섬을 나타낸다).

CK-19 염색은 천연 랑게르한스섬과 캡슐화된 랑게르한스섬 간의 명백한 차이를 나타내었다. 천연 랑게르한스섬 내의 CK-9 양성 세포는 약하게 염색되었고, 조직화된 세포 구조가 인지 불가능하였다. 이와 대조적으로, 시험관내 유지된 랑게르한스섬을 둘러싸고 있는 CK-19 양성 세포의 단일층이 존재하였다. 이러한 세포 구조의 차이는 랑게르한스섬이 췌장 및 시험관내 배양액으로부터 분리한 후에 리모델 링하였다는 점을 보여주었다. 리모델링한 랑게르한스섬으로부터 유래한 CK-19 양성 세포의 독특한 단일층 구조는 상피의 기저층과 유사하였다. 내분비 호르몬의 염색은 인슐린, 글루카곤 및 소마토스타틴 양성 세포가 CK-19 양성 세포에 의해 둘러싸인 내부 세포 질량 내에 존재하였다는 보여준다.

또한, CK-19 양성 세포는 큰 PDX-1 양성이었는데, 이는 그러한 세포가 문헌[Bonner-Weir, et al. PNAS USA 97: 7999-8004(2000)]에 보고된 바와 같이 췌장 선조 세포였다는 것을 시사한다. 주위 CK-19, PDX-1 양성 세포 층은 경시적으로 수와 염색 세기가 감소하는 것으로 나타났다(도 2 및 2 비교).

시험관내 리모델링한 랑게르한스섬의 캡슐화, 시험관내 작용

배양액 중에 9개월 동안 유지한 캡슐화된 랑게르한스섬(HD 357)의 시험관내 작용은 정지 당 자극(SGS) 측정검사를 이용하여 측정검사하였는데, 이 측정검사법은 상이한 당 농도에 반응하여 인슐린을 분비할 수 있는 세포의 성능을 측정하는 것이다.

각각의 마이크로캡슐은 약 0.75 랑게르한스섬 당량을 보유하였다. 결과를 도 5에 나타내었다. SGS 테스트는 기저 인슐린 방출 농도 17 uU/랑게르한스섬 EQ/시간과 자극된 인슐린 방출 농도 73 uU/랑게르한스섬 EQ/시간을 나타내었다, 자극 지수는 4이었다.

[표 5]

캡슐화된 HD 357 랑게르한스섬에 대한 이식전 SGS 테스트, 인슐린 산출량(uU/ml)			
샘플	저농도(60 mg/dl)	고농도(450 mg/dl)	저농도(60 mg/dl)
1	17	73	23
2	16	67	24
3	18	79	25
M + SD	17 + 1	73 + 6	24 + 1

시험관내 리모델링한 랑게르한스섬의 생체내 작용

9개월 동안 배양액 중에 유지한 캡슐화된 랑게르한스섬(HD 357)의 시험관내 작용은 STZ 유도된 당뇨병성 무모 래트 내로 이식함으로써 측정검사하였다(도 6). 래트 1에서, 혈당 농도는 이식한지 2일 이내에 이식전 농도 459 mg/dl에서 99 mg/dl로 감소하였다. 래트 2에서, 혈당 농도는 2일 이내에 이식전 561 mg/dl에서 79 mg/dl로 감소하였다.

래트는 이식후 35일째 경구 내당력 테스트(OGTT)를 수행하였다. 이 동물을 밤새 동안 절식시키거나, 또는 약 10 시간 내지 16 시간 동안 절식시켰다. 절식시킨 후, 혈액 샘플은 혈장 당 측정을 위해 채혈하였다(샘플 0). 동물에게 1.75 gm/kg 당(45% 용액)을 P.O. 급식하였다. 급식한 후, 핼액 샘플을 30 분(샘플 1), 1시간(샘플 2), 90 분(샘플 3) 및 2 시간(샘플 4)에서 수집하였다. 혈액 샘플을 꼬리 정맥 세공을 통해 배출시키고, 헤파린 처리된 모세관을 혈액 수집 및 혈장 분리에 사용하였다. 혈당은 베크만(Beckman) II 당 분석기를 사용하여 측정하였다. 2개의 이식된 래트는 이식후 35일째 OGTT를 실시했을 때 정상적이거나, 거의 정상적이었다(도 7). 비교를 위해서, 정상 값을 표 6에 기재하였다.

[표 6]

경구 내당력 테스트에 있어 정상 값		
혈액 샘플	수집 시간	혈당의 정상 범위
0	절식	70-105 mg, <140 mg/kg
1	30 분	110-170 mg, <200 mg/kg
2	60 분	120-170 mg, <200 mg/kg
3	90 분	100-140 mg, <200 mg/kg
4	120 분	70-120 mg, <140 mg/kg

이식후 59일째, 래트 1은 눈 감염으로 치사되었다. 118일째, 캡슐화된 랑게르한스섬 이식편의 50%를 래트 2로부터 제거하였다. 이후 곧 동물 혈당 농도가 변동하기 시작하였다. 혈당 농도는 이식편 제거 후 43일째 300 mg/dl 농도로 감소하였다. 이식편 제거후 93일째, 혈당 농도는 403 mg/dl이었다.

이러한 최근 연구의 결과는 종래의 예비 임상 및 임상 연구에 따르면 췌장으로부터 직접 유래한 캡슐화된 랑게르한스섬이 시험관내에서 및 생체내에서 모두 작용성을 보유하였다는 것을 추가로 확인시켜 보여주었다.

실시예 7: 사람 췌장의 천연 랑게르한스섬의 특성화

비교의 경우, 랑게르한스섬은 CK-19 및 PDX-1 양성 세포의 위치 및 구성을 결정하기 위해서 췌장 조직 중에서 분석하였다. 인지 가능한 구성은 췌장 조직에서 CK-19 및 PDX-1 양성 세포와 회합된 것으로 발견되지 않았다.

공여자 췌장으로터 유래한 랑게르한스섬의 조직 특성화

공여자 췌장의 조직 샘플은 랑게르한스섬 분리를 위해서 공여자 췌장을 절단시 얻었다. 샘플은 조직 특성화를 위해 처리하였다. 천연 랑게르한스섬 및 이것의 주위 췌장 조직은 CK-19, PDX-1, 내분비 호르몬 및 아밀라제에 대하여 염색하였다(도 8, A-F).

CK-19 염색은 CK-19 양성 세포가 기대한 바와 같이 췌장 전반에 걸쳐 분산되었고, 췌장관 내에 편재화되었다는 것을 보여주었다. 약하게 염색된 CK-19 양성 세포는 랑게르한스섬 내부에서 발견되었지만, 인지 가능한 조직화된 구성을 보유하지는 못하였다. PDX-1에 대한 염색은 랑게르한스섬 내부에서 핵 염색 패턴을 지닌 많은 PDX-1 양성 세포를 나타내었다. CK-19 양성 세포와 PDX-1 양성 세포 간에는 직접적인 중첩이 관찰되지 않았다. 내분비 호르몬 및 아밀라제는 젼형적인 교본형 세포 자극 패턴을 나타내었다.

본 명세서에 설명된 실시예 및 실시양태가 단지 예시만을 목적으로 한 것이므로, 이러한 측면에서 해당 기술 분야의 당업자라면 다양한 변경예 및 변형예는 본 출원의 영역 및 범위, 그리고 부가된 특허청구범위 내에 속하는 것으로 이해할 수 있을 것이다. 모든 공개문헌, 특허 및 특허 출원은 본 발명의 목적을 위해서 그 전체내용이 본 명세서에 참고 인용되어 있다.

[서열목록]

SEQUENCE LISTING

<110> Tsang, Wen-Ghih
Zheng, Tianli
Wang, Yanping
AmCyte Inc.

<120> In Situ Maturation of Cultured Pancreatic Stem Cells Having a Specified, Intermediate Stage of Development

<130> 021164-000210PC

<140> WO PCT/US02/41616
<141> 2002-12-23

<150> US 60/342,250
<151> 2001-12-21

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Beta-actin PCR sense primer

<400> 1
cctcgccttt gccgatcc 18

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:insulin PCR sense primer

<400> 2
gccatcaagc acatcactgt 20

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Beta-actin PCR antisense primer

<400> 3
agccacacgc agctcattgt aga 23

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:insulin PCR
antisense primer

<400> 4
agagggagca gatgctggta 20

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Beta-actin FITC
probe

<400> 5
cccatcgagc acggcatcgt caccaa 26

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:insulin FITC
probe

<400> 6
cagcctgcag cccttggcc 19

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Beta-actin LC
RED probe

<400> 7
tgggacgaca tggagaaaat ctggcaccac 30

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:insulin LC RED
probe

<400> 8
tggaggggtc cctgcagaag 20

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) (i) 1 cm ^{2} 당 약 180개 세포의 최초 농도로 제1 배양 용기에서 제2 배양 용기로 계대 배양되어, 1 cm ^{2} 당 약 1,800개 세포로 증식할 수 있는 능력, 및 (ii) 증식 및 비증식 세포 둘 다 90% PDX-1 양성이고, 인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비가 1:100 1,000:1인 특성

을 보유하는, 증식하는 췌장 세포의 세포 배양물을 캡슐화하는 단계; 및

(b) 상기 캡슐화 세포가 인슐린 분비 세포로 성숙할 수 있도록 허용하는 포유동물에게 이 세포를 삽입하는 단계

를 포함하는 포유동물에게 인슐린을 제공하는 동일계(in situ) 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 세포는 세포의 집합체로 성숙하는 것인 방법.

청구항 3.
제1항에 있어서, 세포는 CK19-양성 세포의 캡슐화 맨틀 및 내부 세포 덩어리를 포함하는 세포의 집합체로 성숙하며, 상기 집합체는 50 5,000개의 췌장 세포를 포함하고 직경이 50 300 마이크론인 방법.

청구항 4.
제1항에 있어서, 포유동물은 당뇨병이 있는 인간인 방법.

청구항 5.
제1항에 있어서, 세포 배양물은 인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비가 1:10 100:1인 방법.

청구항 6.
제1항에 있어서, 캡슐화 단계는 세포를 알기네이트로 둘러싸서 캡슐을 형성하는 단계, 이가 양이온으로 알기네이트를 가교시키는 단계 및 폴리리신 막을 제공하여 캡슐을 밀봉하는 단계를 포함하는 것인 방법.

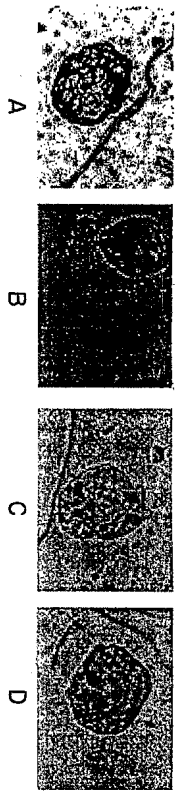
청구항 7.
(i) 1 cm^2 당 약 180개 세포의 최초 농도로 제1 배양 용기에서 제2 배양 용기로 계대 배양되어, 1 cm^2 당 약 1,800개 세포로 증식할 수 있는 능력; 및

(ii) 증식 및 비증식 세포 둘 다 90% PDX-1 양성이고, 인슐린 mRNA 대 액틴 mRNA의 비가 1:100 1000:1인 특성

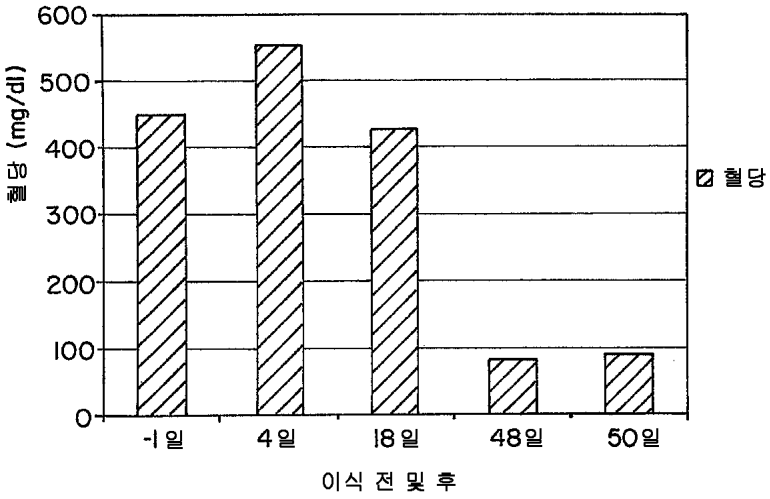
을 보유하는 캡슐화된 췌장 세포를 포함하는 조성물.

도면

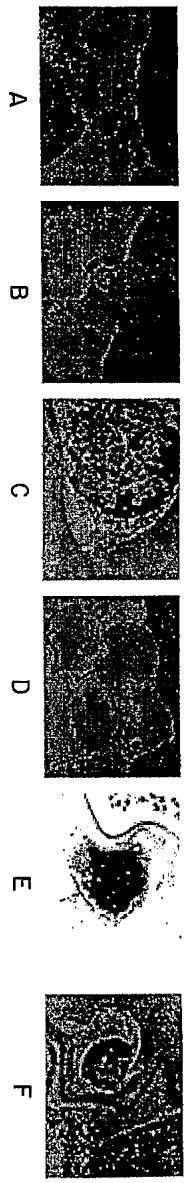
도면1



도면2

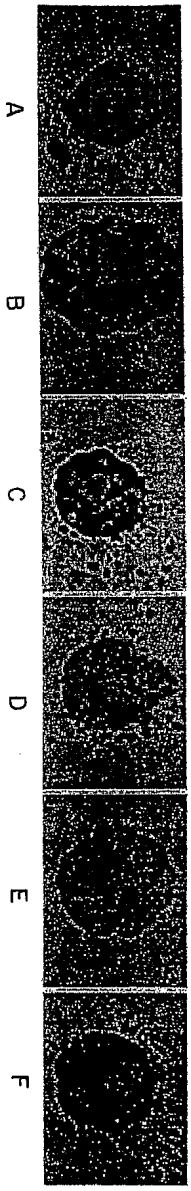

600
500
400
300
200
100
0
혈당 (mg/dl)
-1일
4일
18일
48일
50일
이식 전 및 후
혈당

도면3

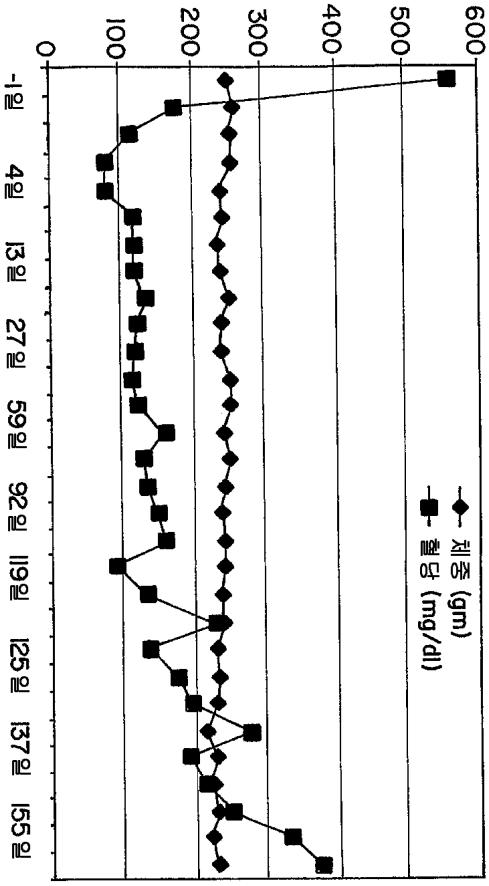

A
B
C
D
E
F

도면4

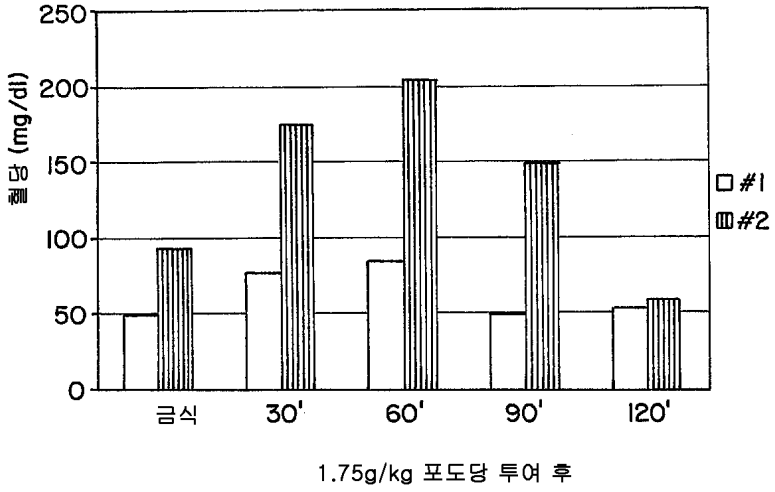
도면5



도면6


0
100
200
300
400
500
600
1일
4일
13일
27일
59일
92일
119일
125일
137일
155일
체중 (gm)
혈당 (mg/dl)

도면7


250
200
150
100
50
0
혈당 (mg/dl)
#1
#2
금식
30'
60'
90'
120'
1.75g/kg 포도당 투여 후

도면8