



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0079072
(43) 공개일자 2016년07월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0676 (2013.01)
C12N 5/0075 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7014409
- (22) 출원일자(국제) 2014년05월21일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년05월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/038993
- (87) 국제공개번호 WO 2015/065524
국제공개일자 2015년05월07일
- (30) 우선권주장
61/962,158 2013년11월01일 미국(US)
13/998,974 2013년12월30일 미국(US)

- (71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국, 펜실베이니아주 19044, 호삼, 럿지뷰 드라이브 800
- (72) 발명자
프라이어, 벤자민
미국 19044 펜실베이니아 홀슈 리지뷰 드라이브 800/850
라니아우스카스, 다이나
미국 19044 펜실베이니아 홀슈 리지뷰 드라이브 800/850
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한성

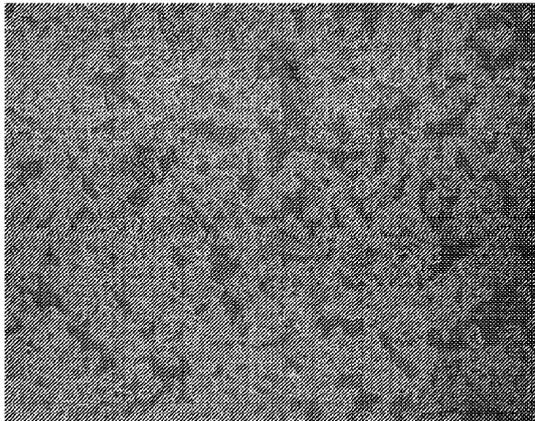
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **체장 내분비 세포로의 분화를 위한 인간 만능 줄기세포의 현탁 및 클러스터링**

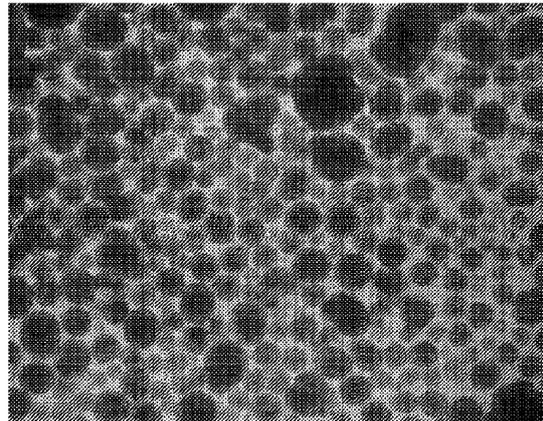
(57) 요약

본 발명은 내배엽 선조세포, 체장 내분비 세포, 중배엽 세포 또는 외배엽 세포로의 분화를 위한 응집된 만능 줄기세포 클러스터를 제조하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 현탁 클러스터링을 사용하여 만능 세포를 배타 세포, 심장 세포 및 신경 세포 계통으로 분화시키는 방법을 개시한다. 본 방법은 응집된 세포 클러스터를 제조하는 단계에 이어서 상기 클러스터를 분화시키는 단계를 포함한다.

대표도 - 도1a



리프팅 직후



비부착성 정치 배양물 중에서 24시간째

(52) CPC특허분류

C12N 5/0606 (2013.01)
C12N 2501/117 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/19 (2013.01)
C12N 2501/385 (2013.01)
C12N 2501/41 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

(72) 발명자

블랙무어, 마르샤

미국 19044 펜실베니아 홀슈 리지뷰 드라이브
800/850

왕, 하이연

미국 19044 펜실베니아 홀슈 리지뷰 드라이브
800/850

리로바, 코스타단카

미국 19477 펜실베니아 스프링 하우스 매킨 로드
1400

넬슨, 셸리

미국 08560 뉴저지 타이터스빌 이21702 트렌튼-하
버튼 로드 1125

로소차, 엘리자베스

미국 08669 뉴저지 라리탄 제이111에프 사우쓰 룬
202 루트 1000

명세서

청구범위

청구항 1

동적 교반 현탁 배양 시스템(dynamically agitated suspension culture system) 내에서 만능 세포(pluripotent cell)를 증폭(expanding) 및 분화시키는방법으로서,

평면 부착성 배양물(planar adherent culture) 중에서 만능 세포를 응집된 세포 클러스터로 배양하는 단계, 및 만능 세포 클러스터를 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 분화시키는 단계를 포함하며,

상기 분화시키는 단계는 Cyp26 억제제의 사용을 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포 주기의 G0/G1기에서의 세포의 백분율을 증가시키는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양은 약 0.1% 내지 약 2%의 소혈청 알부민을 포함하는 환경을 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 환경은 Rho 키나제 억제제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 만능 세포는 부착성인, 방법.

청구항 6

세포 주기의 G0/G1기에서의 세포의 백분율을 증가시키는 방법으로서,

약 0.1% 내지 약 2%의 소혈청 알부민을 포함하는 환경에서 평면 부착성 배양물 중에서 만능 세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계,

상기 평면 부착성 배양물로부터의 만능 줄기세포의 클러스터를 동적 현탁액에 옮기는 단계, 및

상기 동적 현탁액 중의 세포를 소분자 및 선택적으로 TGF β 패밀리를 구성원으로 보충된 배지 중에서 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 소분자는 MCX이고, 상기 TGF β 패밀리를 구성원은 GDF-8인, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 증폭은 Rho 키나제 억제제를 포함하는 환경을 포함하는, 방법.

청구항 9

만능 세포를 완성 내배엽으로 분화시키는 방법으로서,

약 0.1% 내지 약 2%의 소혈청 알부민을 포함하는 환경에서 평면 부착성 배양물 중에서 만능 세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계,

상기 평면 부착성 배양물로부터의 만능 줄기세포의 클러스터를 동적 현탁액에 옮기는 단계, 및

상기 동적 현탁액 중의 세포를 MCX 및 GDF8 또는 WNT3A 및 액티빈 A로 보충된 배지 중에서 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 증폭은 Rho 키나제 억제제를 포함하는 환경을 포함하는, 방법.

청구항 11

동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 줄기세포를 증폭 및 분화시키는 방법으로서, 평면 부착성 배양물 중에서 만능 줄기세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계, 상기 평면 부착성 배양물로부터의 만능 줄기세포의 클러스터를 동적 현탁액에 옮기는 단계, 및 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 상기 만능 세포 클러스터를 분화시키는 단계를 포함하며, 상기 세포는 약 0.1% 내지 약 2%의 소혈청 알부민을 포함하는 환경에서 응집된 세포 클러스터로 증폭되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 만능 세포 클러스터는 분화되어 체장 전구세포 집단, 신경 전구세포 집단 또는 심근세포 전구체 집단을 생성하는, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 만능 줄기세포는 유도 만능 줄기세포, 인간 제대 조직 유래 세포, 만수성 개체 (parthenote), 인간 배아줄기세포(hES) 및 양수 유래 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제11항의 방법에 의해 생성된 분화된 체장 전구세포의 집단을 포함하는 이식가능한 줄기세포 유래 세포 생성물.

청구항 15

동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 세포를 증폭 및 분화시키는 방법으로서,

- a. 약 0.1% 내지 약 2%의 소혈청 알부민을 포함하는 환경에서 평면 부착성 배양물 중에서 만능 세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계,
- b. 상기 평면 부착성 배양물로부터의 만능 세포 클러스터를 효소 또는 킬레이트제를 사용하여 동적 현탁 배양물(dynamic suspension culture)에 옮기는 단계,
- c. 상기 세포 클러스터를 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 유지하는 단계, 및
- d. 상기 만능 세포 클러스터를 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 분화시켜, 체장 전구세포 집단, 신경 전구세포 집단 또는 심근세포 전구체 집단을 생성하는 단계를 포함하며,

분화 환경은 대략 저산소 내지 주위의 약 30% 범위의 산소, 0.1% 내지 약 2% 범위의 지질, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 줄기세포 클러스터는 CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81을 발현하고, CXCR4의 발현은 결여되어 있는, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 증폭 환경은 Rho 키나제 억제제를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 분화 환경은 약 0.1% 내지 약 2%의 소혈청 알부민을 포함하는, 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 만능 세포는 유도 만능 줄기세포, 인간 체대 조직 유래 세포, 반수성 개체, 인간 배아줄기세포(hES) 및 양수 유래 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, β 세포 전사 인자를 발현하는 췌장 전구세포를 생성하는, 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 전사 인자는 PDX1 및/또는 NKX6.1인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원과의 상호참조

[0002] 본 출원은 미국 특허 출원 제13/998,974호(2013년 12월 30일에 출원됨)의 일부 계속 출원으로, 이는 미국 가출원 제61/747,799호(2012년 12월 31일에 출원됨) 및 미국 가출원 제61/962,158호(2013년 11월 1일에 출원됨)에 대한 우선권을 주장하며, 이들은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명은 내배엽 전조세포(endoderm progenitor cell), 췌장 내분비 세포, 중배엽 세포 또는 외배엽 세포로의 분화를 위한 응집된 세포 클러스터에서 만능성을 유지하는 배아줄기세포 및 다른 만능 세포를 제조함을 포함하는 세포 분화의 분야에 관한 것이다. 일 태양에서, 본 발명은 만능 줄기세포의 클러스터를 생성하고 이들을 췌장 내배엽, 췌장 내분비 전구세포(precursor cell), 및 단일-호르몬 췌장 내분비 세포로의 분화를 위하여 현탁 배양물 중에 유지하는 방법을 개시하고 있다.

배경 기술

[0004] 제I형 진성 당뇨병 및 이식가능한 랭게르한스섬의 부족에 대한 세포-대체 요법에서의 진전은 생착(engraftment)에 적절한 인슐린-생성 세포, 또는 β 세포의 공급원을 개발하는 데 관심이 집중되어 왔다. 한 가지 접근법은 배아줄기세포와 같은 만능 줄기세포로부터 기능적 β 세포를 생성하는 것이다.

[0005] 척추동물 배아 발생에서, 만능 세포는 낭배형성(gastrulation)으로 알려진 과정에서 3개의 배엽층(외배엽, 중배엽, 및 내배엽)을 포함하는 세포군을 발생시킨다. 갑상선, 흉선, 췌장, 장, 및 간과 같은 조직은 내배엽으로부터 중간 단계를 거쳐 발생할 것이다. 이 과정에서 중간 단계는 완성 내배엽(definitive endoderm)의 형성이다.

[0006] 낭배형성 말기까지, 내배엽은 내배엽의 전방, 중간 및 후방 영역을 고유하게 표시하는 인자들의 패닐의 발현에 의해 인식될 수 있는 전방-후방 도메인(anterior-posterior domain)으로 분할된다. 예를 들어, HHEX, 및 SOX2는 전방 영역을 확인해주며, 한편 CDX1, 2, 및 4는 내배엽의 후방 영역을 확인해준다.

[0007] 내배엽 조직의 이주에 의해 내배엽은 상이한 중배엽 조직들과 아주 근접해지게 되며, 이는 장관(gut tube)의 국지화를 돕는다. 이는 FGF, Wnt, TGF- β , 레티노산("RA"), 및 BMP 리간드 및 이들의 길항제와 같은 다수의 분비 인자들에 의해 달성된다. 예를 들어, FGF4 및 BMP는 추정 후장 내배엽에서 CDX2 발현을 촉진하며 전방 유전자 HHEX 및 SOX2의 발현을 억제하는 것으로 보고되어 있다(문헌[2000 *Development*, 127:1563-1567]). 또한, WNT 신호전달(signaling)은 후장 발달을 촉진하고 전장 운명을 억제하도록 FGF 신호전달과 병행하여 작동하는 것으로 밝혀져 있다(문헌[2007 *Development*, 134:2207-2217]). 마지막으로, 중간엽에 의해 분비된 레티노산은 전장-후장 경계부를 조절한다(문헌[2002 *Curr Biol*, 12:1215-1220]).

[0008] 특정 전사 인자들의 발현 수준은 조직의 정체(identity)를 지정하는 데 사용될 수 있다. 완성 내배엽이 원시 장관(primitive gut tube)으로 형질전환하는 동안, 장관은 제한된 유전자 발현 패턴에 의해 분자 수준에서 관찰될 수 있는 폭넓은 도메인들로 국지화되게 된다. 예를 들어, 장관 내의 국지화된 췌장 도메인은 PDX1의 매우 높은 발현 및 CDX2 및 SOX2의 매우 낮은 발현을 나타낸다. PDX1, NKX6.1, PTF1A, 및 NKX2.2는 췌장 조직에서 고도로 발현되며; CDX2의 발현은 장 조직에서 높다.

[0009] 췌장의 형성은 완성 내배엽에서 췌장 내배엽으로의 분화로부터 생긴다. 배측(dorsal) 및 복측(ventral) 췌장 도메인은 전장 상피에서 생긴다. 또한, 전장은 식도, 기관, 폐, 갑상선, 위, 간, 췌장 및 담관계를 발생시킨다.

- [0010] 췘장 내배엽의 세포는 췘장-십이지장 호메오박스(homeobox) 유전자 PDX1을 발현한다. PDX1의 부재 하에서는, 췘장은 복측 원기(bud) 및 배측 원기의 형성 이상으로는 발달하지 못한다. 따라서, PDX1 발현이 췘장 기관형성에서 중요한 단계를 표시한다. 성숙한 췘장은 췘장 내배엽의 분화로부터 발생하는 외분비 조직 및 내분비 조직들 모두를 함유한다.
- [0011] 드아무르(D'Amour) 등은 고농도의 액티브 및 저 혈청의 존재 하에서의 인간 배아줄기세포 유래 완성 내배엽의 풍부한 배양물의 생성을 기술하고 있다(문헌[Nature Biotechnol2005, 23:1534-1541]; 미국 특허 제7,704,738호). 전해지는 바에 의하면, 마우스의 신장 피막 아래에 이들 세포를 이식함으로써 내배엽 조직의 특징을 갖는 더욱 성숙한 세포로 분화되었다고 한다(미국 특허 제7,704,738호). 인간 배아줄기세포 유래 완성 내배엽 세포는 FGF10 및 레티노산의 첨가 후에 PDX1 양성 세포로 추가로 분화될 수 있다(미국 특허 출원 공개 제2005/0266554A1호). 후속하여 면역 결핍 마우스의 지방 패드 내에 이들 췘장 전구세포를 이식함으로써 3 내지 4개월의 성숙기 후에 기능적 췘장 내분비 세포의 형성을 가져왔다(미국 특허 제7,993,920호 및 미국 특허 제 7,534,608호).
- [0012] 피스크(Fisk) 등은 인간 배아줄기세포로부터의 췘장 소도 세포의 생성 시스템을 보고한다(미국 특허 제 7,033,831호). 또한, 소분자 억제제가 췘장 내분비 전구세포의 유도에 사용되어 왔다. 예를 들어, TGF-β 수용체 및 BMP 수용체(문헌[Development 2011, 138:861-871]; 문헌[Diabetes 2011, 60:239-247])의 소분자 억제제가 췘장 내분비 세포의 수를 유의하게 향상시키는 데 사용되어 왔다. 게다가, 소분자 활성화제가 완성 내배엽 세포 또는 췘장 전구세포를 생성하는 데 또한 사용되어 왔다(문헌[Curr Opin Cell Biol2009, 21:727-732]; 문헌[Nature Chem Biol 2009, 5:258-265]).
- [0013] 만능 줄기세포와 같은 선조세포를 배양하기 위한 프로토콜을 개선하는 데에 있어서 큰 진전이 이루어져 왔다. PCT 공개 WO2007/026353호(아미트(Amit) 등)는 2차원 배양 시스템 내에서 미분화된 상태로 인간 배아줄기세포를 유지하는 것을 개시하고 있다. 문헌[루드비히(Ludwig) 등, 2006 (Nature Biotechnology, 24:185-7)]은 매트릭스 상에서 인간 배아줄기세포를 배양하기 위한 TeSR1 한정된 배지를 개시하고 있다. 미국 특허 출원 공개 제 2007/0155013호(아카이케(Akaike) 등)는 만능 줄기세포에 부착하는 캐리어를 사용하여 현탁 상태로 만능 줄기세포를 성장시키는 방법을 개시하고 있으며, 미국 특허 출원 공개 제2009/0029462호(버드슬레이(Beardsley) 등)는 마이크로캐리어 또는 세포 캡슐화를 사용하여 현탁 상태로 만능 줄기세포를 증폭시키는(expanding) 방법을 개시하고 있다. PCT 공개 WO 2008/015682호(아미트 등)는 기질 부착성이 없는 배양 조건 하에서 현탁 배양물 중에서 인간 배아줄기세포를 증폭 및 유지하는 방법을 개시하고 있다.
- [0014] 미국 특허 출원 공개 제2008/0159994호(만탈라리스(Mantalaris) 등)는 3차원 배양 시스템 내에서 알기네이트 비드(bead) 내에 캡슐화된 인간 배아줄기세포를 배양하는 방법을 개시하고 있다.
- [0015] 이러한 진전에도 불구하고, 기능적 내분비 세포로 분화될 수 있는 만능 줄기세포를 3차원 배양 시스템 내에서 성공적으로 배양하기 위한 방법에 대한 필요성이 여전히 남아 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 전술한 요약뿐만 아니라 하기의 발명의 상세한 설명도 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 예시할 목적으로, 도면은 본 발명의 실시 형태를 보여준다. 그러나, 본 발명은 예시된 정확한 배열, 실시에 및 수단으로 제한되지 않음을 이해하여야 한다.

도 1a는 실시예 1에 따라 리프팅 직후(좌측 패널) 및 비부착성 정치 배양물 중에 있는 지 24시간 후(우측 패널)의 인간 배아줄기("hES") 세포주 H1의 디스파제(Dispase)[®]-처리된 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 리프팅 후의 세포(좌측 패널)는 단층의 단편들과 유사하였는데, 이때 단편들의 평균 단편 직경은 약 20 내지 30 마이크로미터였으며, 각각의 단편은 세포의 군집(clump)으로 이루어졌다. 비부착성 정치 배양물 중에 있는 지 24시간 후에, 세포는 클러스터-유사 구조를 나타내었다.

도 1b는 실시예 1에 따라 25 mL의 mTeSR[®] 1 배지가 담긴 125 mL 스피너 플라스크 내에서 4일 동안 배양한 후에 인간 배아줄기세포주 H1의 디스파제[®]-처리된 세포에 대한 CD9, SSEA4, CXCR4, TRA-1-60 및 TRA-1-81에 대한 유세포측정법의 결과를 나타낸다. 세포는 분화 마커인 CXCR4는 거의 발현하지 않으면서 만능성 마커(CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81)에 대해서는 고 발현을 나타내었다.

도 1c는 1기 말기의 72 및 96시간 분화 후의 인간 배아줄기세포주 H1의 디스파제[®]-처리된 세포의 현미경 사진을

나타낸다. 도 1c에서는 4X 배율로의 72시간 후(좌측 패널)의, 4X 배율로의 96시간 후(중앙 패널)의 그리고 10X 배율로의 96시간 후(우측 패널)의 느슨한 세포 응집체를 볼 수 있다.

도 1d는 마커 CD9, CD184(CXCR4) 및 CD99에 대한 1기 분화 말기의 인간 배아줄기세포주 H1의 디스파제[®]-처리된 세포에 대한 유세포측정법의 결과를 나타낸다(실시에 1 참조). 도 1d에 나타난 바와 같이, 만능성 마커인 CD9의 발현은 거의 제거되었으며, 한편 완성 내배엽 분화 마커인 CXCR4(CD184) 및 CD99의 발현은 매우 높았다.

도 1e는 미분화된 H1(WA01) hES 세포와 대비하여, 1기 말기의 인간 배아줄기세포주 H1의 디스파제[®]-처리된 세포에 대한 완성 내배엽과 관련된 유전자 및 만능성과 관련된 선택된 유전자의 발현에 대한 정량적인 역전사 폴리머라제 연쇄 반응(qRT-PCR) 결과를 나타낸다(실시에 1 참조). 1기 말기의 세포는, 미분화된 WA01 hES 세포와 대비하여, 만능성 유전자(CD9, NANOG, 및 POU5F1/OCT4)의 발현에 있어서는 급격한 감소를 그리고 완성 내배엽과 관련된 유전자(CXCR4, CERBERUS(CER1), GSC, FOXA2, GATA4, GATA6, MNX1, 및 SOX17)에 있어서는 큰 증가를 나타내었다.

도 1f는 세포가 완성 내배엽으로부터 체장 내배엽을 향하여 추가로 분화됨에 따른 인간 배아줄기세포주 H1의 디스파제[®]-처리된 세포의 현미경 사진을 나타낸다(실시에 1 참조). 2기 1일째(상부 좌측 패널)로부터 2기 3일째(상부 우측 패널)에 이어서 3기 4일째(하부 좌측 패널) 및 4기 1일째(하부 우측 패널)로 분화가 진행됨에 따라 세포 및 세포 클러스터에 대한 명확한 형태학적 변화가 가시적이게 된다.

도 2a는 실시예 2에 따른 만능성 및 분화와 관련된 마커에 대해, EDTA 처리 후의 교반된 현탁 배양물 중에서 2일 배양 후에 그리고 분화 배양물로의 전이 전에 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포에 대한 유세포측정법의 데이터를 나타낸다. 이 데이터는 분화 마커(CXCR4)는 거의 발현하지 않으면서 만능성 마커(CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81)에 대해서는 고 발현을 나타내었다.

도 2b는 실시예 2에 따라 스피너 플라스크 내에서 성장된 1기 3일째 세포 및 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크 내에서 성장된 2기 2일째, 4기 1일째 및 4기 3일째 세포로 분화된 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 현탁 분화된 배양물은 구형 응집체로 실질적으로 균일하고 균질한 세포 집단을 형성하였다.

도 2c는 만능성 및 내배엽 분화의 세포 표면 마커에 대한 1기 말기의 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포에 대한 유세포측정법의 데이터를 나타낸다. 도 2c에서 볼 수 있는 바와 같이, 만능성 마커인 CD9의 발현은 거의 제거되었으며, 한편 완성 내배엽 분화 마커인 CXCR4(CD184)에 대한 발현은 매우 높았다.

도 2d는 미분화된 H1(WA01) hES 세포와 대비하여, 1기 말기의 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포에 대한 완성 내배엽과 관련된 유전자 및 만능성과 관련된 선택된 유전자의 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타낸다(실시에 2 참조). 도 2d는 만능성 유전자(CD9, NANOG, 및 POU5F1/OCT4)의 발현에 있어서는 감소 및 완성 내배엽과 관련된 유전자(CXCR4, CERBERUS("CER1"), FOXA2, GATA4, GATA6, MNX1, 및 SOX17)에 있어서는 큰 증가를 나타낸다.

도 2e는 실시예 2에 따라 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크 내에서 1기로부터 체장 내배엽 세포로 분화된 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포에 대한 분화를 나타내는 마커(NKX6.1, CDX2, SOX2, 및 크로마그라닌)에 대한 유세포측정법의 데이터를 나타낸다. 유세포측정법의 데이터는 두 현탁 포맷 모두에 대해, 기능적 β 세포에 요구되는 전사 인자인 NKX6.1이 고수준이고, 시냅토파이신(데이터는 나타내지 않음) 및 크로모그라닌과 같은 내분비 체장 마커가 고수준임을 나타낸다.

도 2f는 실시예 2에 따른 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크 내에서 현탁에 의해 1기로부터 체장 내배엽 세포로 추가로 분화된 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포에 대한 분화와 관련된 선택된 유전자의 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타낸다. 이 데이터는 WA01 hES 세포에서의 발현과 대비된다. RT-PCR 결과는 체장 전구체 유전자의 고수준의 발현을 나타낸다.

도 3a는 아큐타제(Accutase)[®]로 처리한 후의 정치 배양물로부터 리프팅된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 3a에 나타난 바와 같이, 세포를 작은 응집체로서 표면으로부터 제거하였다.

도 3b는 아큐타제[®]로 처리한 후의 정치 배양물로부터 리프팅되고, 이어서 3일 동안 현탁 배양물 중에서 증폭된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포의 위상차 현미경 사진을 나타낸다. 도 3b에서는 세포 클러스터의 실질적으로

균일한 구형 집단의 형성을 볼 수 있다.

도 3c는 아큐타제[®]로 처리한 후의 정치 배양물로부터 리프팅되고, 이어서 현탁 배양물 중에서 3일 동안 증폭된 다음, 아큐타제[®] 해리를 사용하여 연속 계대배양된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포의 클러스터의 현미경 사진을 나타낸다.

도 4a는 분화의 상이한 단계에서 유도 분화 프로토콜(directed differentiation protocol)을 사용한 세포주 H1의 현탁 배양된 인간 배아줄기세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 4a에서는 분화의 각각의 단계에 있는 세포의 현미경 사진을 볼 수 있다.

도 4b는 분화의 상이한 단계(분화 개시 후의 시간)에서 유도 분화 프로토콜을 사용한 세포주 H1의 현탁 배양된 인간 배아줄기세포에 대한 분화 마커(CXCR4, CD56 및 PDX1)에 대한 유세포측정법의 결과를 나타낸다. 4기 4일째의 분화 과정의 말기에, 높은 백분율의 세포가 PDX1 발현에 대해 양성이었다.

도 4c는 테라사이트(TheraCyte)[™] 장치 내에 캡슐화된 분화된 세포가 이식된 SCID-Bg 마우스의 비공복시 혈당 수준을 나타낸다.

도 5a는 만능성 및 분화와 관련된 마커에 대한 분화 배양물로의 전이 전에 인간 배아줄기세포주 H1의 EDTA-처리된 세포에 대한 유세포측정법의 데이터를 나타낸다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 만능성 마커 CD9, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-80의 고 발현이 관찰되었다.

도 5b는 1기 동안에 3가지 상이한 공급물 세팅에 대한 CXCR4/CD184 및 CD99(분화 마커) 및 CD9(만능성 마커)에 대한 세포의 위상차 영상 및 유세포측정법의 데이터를 나타낸다. 시험된 조건은 다음과 같았다: (A) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음; (B) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체 및 48시간째에 글루코스 볼루스(bolus) 첨가; 및 (C) 1기 전체에 걸쳐 배지 교체는 없으면서, 글루코스 및 GDF8 볼루스를 분화 개시 후 24시간째에 첨가하고, 이어서 글루코스 볼루스를 개시 후 48시간째에 첨가함.

도 5c는 완성 내배엽의 형성 동안 다음의 공급물 세팅을 사용하여 분화된, 췌장 내배엽 형태를 나타내는 분화된 세포의 위상차 영상을 나타낸다: (A) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음; (B) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체 및 48시간째에 글루코스 볼루스 첨가; 및 (C) 1기 전체에 걸쳐 배지 교체는 없으면서, 글루코스 및 GDF8 볼루스를 분화 개시 후 24시간째에 첨가하고, 이어서 글루코스 볼루스를 개시 후 48시간째에 첨가함.

도 5d는 완성 내배엽의 형성 동안 다음의 공급물 세팅을 사용하여 분화된, 4기 말기의 분화된 세포에 대한 췌장 유전자 발현의 선택 마커(NKX6.1 및 크로모그라닌) 및 선택 비-췌장 유전자(CDX2 및 SOX2)에 대한 유세포측정법의 결과를 나타낸다: (A) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음; (B) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체 및 48시간째에 글루코스 볼루스 첨가; 및 (C) 1기 전체에 걸쳐 배지 교체는 없으면서, 글루코스 및 GDF8 볼루스를 분화 개시 후 24시간째에 첨가하고, 이어서 글루코스 볼루스를 개시 후 48시간째에 첨가함.

도 5e는 완성 내배엽의 형성 동안 다음의 공급물 세팅을 사용하여 분화된, 4기 말기의 분화된 세포에 대한 선택 췌장 유전자 발현 및 비-췌장 유전자 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타낸다: (A) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음; (B) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체 및 48시간째에 글루코스 볼루스 첨가; 및 (C) 1기 전체에 걸쳐 배지 교체는 없으면서, 글루코스 및 GDF8 볼루스를 분화 개시 후 24시간째에 첨가하고, 이어서 글루코스 볼루스를 개시 후 48시간째에 첨가함. 데이터는 미분화된 H1(WA01) hES 세포주(1의 배이스라인 발현)와 대비하여 발현에 있어서의 배수 차이로서 나타나 있다.

도 5f는 조건 A(분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음)에 따라 분화된 세포가 이식된 SCID-Bg 마우스에서의 C-펩타이드의 발현을 나타낸다. 각각의 SCID-Bg 마우스에 신장 피막 아래에 500만개의 세포를 이식하였다. 도 5f에 나타난 바와 같이, 이식 후 12주째까지, 인간 C-펩타이드는 1 ng/mL 초과 수준으로 검출가능하였으며, 16주째에 C-펩타이드 수준은 평균 2.5 ng/mL였다.

도 5g는 조건 A(분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음)에 따라 분화된 세포의 투여(예를 들어, 이식) 전 및 후에, 선택된 SCID-Bg 마우스에 대한 글루코스 처리의 영향을 나타낸다. 도 5g에 나타난 바와 같이, 글루코스 처리는 순환 인간 C-펩타이드에 있어서 절식 상태에서의 평균 0.93 ng/mL로부터 급식 상태에서의 2.39 ng/mL로의 유의한 증가를 유도하였다.

도 5h는 조건 A(분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음)에 따라 분화된 세포가 투여된 SCID-Bg 마우스에 대한 스트렙토조토신(STZ) 투여(즉, STZ-유도 당뇨병)의 영향을 나타낸다. 도 5h로부터 명백한 바와 같이, 기능적 GSIS 컴피턴트(competent) 조직의 이식편을 갖는 동물(즉, 세포가 투여된 것)은 비처리된 대조군 - 이는 임상적으로 확실한 당뇨병이 발생되었음 - 과는 달리 정상의 혈당 수준을 유지하였다.

도 6a는 분화 전에 사이토텍스(Cytodex)[®] 3 마이크로캐리어 비드 상에서 성장된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

도 6b는 분화의 다양한 단계에서 사이토텍스[®] 3 마이크로캐리어 비드 상에서 성장된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포의 현미경 사진을 나타낸다.

도 6c는 액티빈 A(AA) 및 WNT3A를 함유하는 배지 중의 플레이트(WNT3A/AA 플레이트), 액티빈 A 및 WNT3A를 함유하는 배지 중의 마이크로캐리어(WNT3A/AA 마이크로캐리어), MCX 및 GDF8을 함유하는 배지 중의 플레이트(MCX/GDF8 플레이트) 및 MCX 및 GDF8을 함유하는 배지 중의 마이크로캐리어(MCX/GDF8 마이크로캐리어) 상에서 성장 및 분화된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포에 대한 분화 일수의 함수로서의 세포 카운트(세포수/cm²)를 나타낸다.

도 6d는 액티빈 A 및 WNT3A를 함유하는 배지 중의 플레이트(WNT3A/AA 플레이트), 액티빈 A 및 WNT3A를 함유하는 배지 중의 마이크로캐리어(WNT3A/AA 마이크로캐리어), MCX 및 GDF8을 함유하는 배지 중의 플레이트(MCX/GDF8 플레이트) 및 MCX 및 GDF8을 함유하는 배지 중의 마이크로캐리어(MCX/GDF8 마이크로캐리어) 상에서 성장 및 분화된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포에 대한 분화 일수의 함수로서의 세포 카운트(세포수/ml)를 나타낸다.

도 6e는 다음의 존재 하에서 마이크로캐리어 배양물 또는 평면 배양물 상에서 성장된 세포의 제1 분화 단계에 대한 유세포측정법의 결과를 나타낸다: CXCR4/CD184(Y-축) 및 CD9(X-축)의 세포 발현의 점 도표로서의 (a) WNT3A 및 AA; 또는 (2) MCX 및 GDF8.

도 6f는 다음의 존재 하에서 마이크로캐리어 배양물 또는 평면 배양물 상에서 성장된 세포의 제1 분화 단계에 대한 유세포측정법의 결과를 나타낸다: 마커(CXCR4 및 CD9) 각각의 총 발현으로서의 (a) WNT3A 및 AA; 또는 (2) MCX 및 GDF8.

도 6g는 다음의 존재 하에서 평면 배양물 상에서 또는 현탁 배양물 중의 마이크로캐리어 비드 상에서 성장시킴으로써 분화된 인간 배아줄기세포주 H1의 세포에 대한 분화와 관련된 선택된 유전자의 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타낸다: (a) WNT3A 및 AA; 또는 (2) MCX 및 GDF8.

도 7은 실시예 7의 프로토콜에 따라 분화된 세포에 대한 1기 1일째로부터 4기 3일째까지의 생물반응기 내에서의 다양한 분화 단계에서의 세포 카운트를 나타낸다. 세포 카운트는 영상-기반 세포측정기(뉴클레오카운터(NucleoCounter)[®])에 의해 측정하였을 때의 백만개 세포/ml로 나타낸다.

도 8은 실시예 7의 분화 프로토콜 동안 시간(분화 일수)의 함수로서의 일평균 생물반응기 배지 pH 수준을 나타낸다. pH 수준은 노바(NOVA) 바이오프로파일(BioProfile)[®] 플렉스(FLEX)(노바 바이오메디칼 코포레이션(Nova Biomedical Corporation), 미국 매사추세츠주 월섬 소재)에 의해 측정하였다.

도 9는 실시예 7의 분화 프로토콜 동안 시간(분화 일수)의 함수로서의 일평균 생물반응기 배지 락테이트 수준을 나타낸다. 락테이트 수준은 노바 바이오프로파일[®] 플렉스(노바 바이오메디칼 코포레이션, 미국 매사추세츠주 월섬 소재)에 의해 측정하였다.

도 10은 실시예 7의 분화 프로토콜 동안 시간(분화 일수)의 함수로서의 일평균 생물반응기 배지 글루코스 수준을 나타낸다. 글루코스 수준은 노바 바이오프로파일[®] 플렉스(노바 바이오메디칼 코포레이션, 미국 매사추세츠주 월섬 소재)에 의해 측정하였다.

도 11은 실시예 7의 프로토콜에 따라 분화된 0기 1일째(즉, 접종 후 24시간째) 세포에 대한, 만능성과 관련된 선택 유전자를 함유하는 만능성 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 미분화된 유전자 발현을 나타낸다.

도 12는 0기 1일째(즉, 접종 후 24시간째) 세포에 대한, 완성 내배엽("DE")과 관련된 선택 유전자를 함유하는 완성 내배엽 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 미분화된 유전자 발현을 나타낸다(실시예 7 참조).

도 13은 0기 3일째(즉, 접종 후 72시간째) 세포에 대한, 만능성과 관련된 선택 유전자를 함유하는 만능성 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 미분화된 유전자 발현을 나타낸다(실시에 7 참조).

도 14는 0기 3일째(즉, 접종 후 72시간째) 세포에 대한, DE와 관련된 선택 유전자를 함유하는 DE 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 미분화된 유전자 발현을 나타낸다(실시에 7 참조).

도 15는 미분화된 0기 3일째(즉, 접종 후 72시간째) 세포에 대해 CD9, CD184/CXCR4, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-81에 대한 형광-활성화 세포 분류(FACS)의 결과를 나타낸다(실시에 7 참조). 결과가 또한 표 8에 나타나있다.

도 16은 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 0기 1일째(즉, 접종 후 24시간째) 및 0기 3일째(즉, 접종 후 72시간째) 세포의 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 미분화된 유전자 발현을 나타낸다. 구체적으로, 도 16은 유도 분화 전 0기 과정 동안 GATA4, GSC, MIXL1 및 T에 대한 유전자 발현에 있어서의 보통의 증가 및 GATA2 발현에 있어서의 100x 이상의 증가를 나타낸다.

도 17은 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 0기 1일째(즉, 접종 후 24시간째) 및 0기 3일째(즉, 접종 후 72시간째) 세포에 대한, DE와 관련된 선택 유전자를 함유하는 DE 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 미분화된 유전자 발현을 나타낸다. 구체적으로, 도 17은 유도 분화 전 0기 과정 동안 CER1, FGF17, 및 FGF4 발현에 있어서의 100x 이상의 증가를 나타낸다.

도 18 및 도 19는 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 1기 1일째 세포에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 18은 1기 1일째 세포에 대한, 만능성과 관련된 선택 유전자를 함유하는 만능성 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 19는 1기 1일째 세포에 대한, DE와 관련된 선택 유전자를 함유하는 DE 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 18 및 도 19는 FOXA2 발현에 있어서의 약 700x 증가 및 CER1, EOMES, FGF17, FGF4, GATA4, GATA6, GSC, MIXL1, 및 T 발현에 있어서의 1000x 증가와 같이 유전자 발현 패턴에서의 유의한 변경을 나타낸다.

도 20 및 도 21은 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 1기 3일째 세포에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 20은 1기 3일째 세포에 대한, 만능성과 관련된 선택 유전자를 함유하는 만능성 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 21은 1기 3일째 세포에 대한, DE와 관련된 선택 유전자를 함유하는 DE 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다.

도 22는 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 1기 3일째 세포에 대한 CD9, CD184(CXCR4로도 알려짐) 및 CD99에 대한 FACS의 결과를 나타낸다. 분화 개시 시에 CD9 발현/CXCR4 음성 만능 세포 집단(도 15)으로부터 1기 말기에 CXCR4 발현 세포(98.3%의 세포가 CXCR4 양성임, ± 1.9 SD)의 균질 집단(도 22)으로의 거의 완전한 전이가 관찰되었다.

도 23은 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 1기 3일째; 2기 1일째; 및 2기 3일째 세포에 대한, DE와 관련된 선택 유전자를 함유하는 DE 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 23은 2기 1 및 3일째에 HNF4 α 및 GATA6 발현 수준이 증가되었으며, 한편 1기 3일째에 고수준으로 발현된 유전자(CXCR4, EOMES, FGF17, FGF4, MNX1, PRDM1, SOX17, 및 VWF)는 2기 말기까지 감소된 발현을 나타내었음을 나타낸다.

도 24는 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 2기 1일째 세포 및 2기 3일째 세포에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 전장 유전자 AFP, PDX1, 및 PROX1의 유전자 발현을 나타낸다. 도 24에 나타난 바와 같이, 이들 유전자의 발현은 증가하였다.

도 25는 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 3기 배지(표 7) 중에서 성장된 3기 3일째 세포에 대한 PDX1, FOXA2, 크로모그라닌 NKX2.2 및 SOX2에 대한 FACS의 결과를 나타낸다. 도 25에 나타난 바와 같이, 세포는 PDX1 및 FOXA2 발현에 의해 측정하였을 때 내배엽 체장 계통과 일치하는 마커를 발현하였다($90.9\% \pm 11.9$ SD가 PDX1 양성이고 $99.2\% \pm 0.6$ SD가 FOXA2 양성임).

도 26은 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 4기, 3기 1일째 및 3기 3일째 세포와 관련된 선택 유전자를 함유하는 4기 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 26은 이들 세포가 체장에서 공통으로 발현되는 다수의 유전자(ARX, GAST, GCG, INS, ISL1, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PAX6, PTF1A, 및 SST)의 증가된 수준을 나타냄을 예시한다.

도 27은 실시에 7의 프로토콜에 따라 분화된 4기 3일째 세포에 대해 NKX6.1, 크로마그라닌(CHGA), CDX2, SOX2,

NKX2.2, PDX1, FOXA2 및 NEUROD에 대한 FACS 결과를 나타낸다. 도 27의 4기 3일째에 나타낸 바와 같이, 세포는 고수준의 PDX1 및 FOXA2 발현을 보유하였으며 체장 내분비 세포(28.1% ± 12.5 SD가 크로모그라닌 양성임) 및 체장 선조세포(58.3% ± 9.7 SD가 NKX6.1에 대해 양성임)의 혼합물과 일치하는 발현 패턴을 추가로 발생시켰다.

도 28은 실시예 7의 프로토콜에 따라 분화된 3기 3일째; 4기 1일째 및 4기 3일째 세포에 대한, 단계 4와 관련된 선택 유전자를 함유하는 4기 어레이에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 28은 체장에서 공통으로 발현되는 유전자(ARX, GAST, GCG, IAPP, INS, ISL1, MAFB, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PAX6, PTF1A, 및 SST)의 증가된 발현 수준을 나타낸다.

도 29는 실시예 7의 프로토콜에 따라 분화된 4기 3일째 세포에 대한 NKX6.1, 크로마그라닌(CHGA), CDX2, SOX2, NKX2.2, PDX1, FOXA2 및 NEUROD에 대한 FACS의 평균 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 29는 상이한 시드 물질 로트(seed material lot)로부터 3 L 스케일로 생성된 체장 전구체의 평균 FACS 발현 패턴을 나타낸다.

도 30은 실시예 7의 프로토콜에 따라 분화된 4기 3일째 세포에 대한 NKX6.1, 크로마그라닌(CHGA), CDX2, SOX2, NKX2.2, PDX1, FOXA2 및 NEUROD에 대한 FACS의 평균 결과를 나타낸다. 4기 3일째 세포에서의 분화 전에, 세포를 증폭시켜 ISM을 형성하고, 이어서 둘 모두 0.5% BSA로 보충된, 주문제작 사내 배지(custom in-house medium) "IH3" 또는 이센셜8(Essential8)TM 중에서 0기에서 성장시켰다. IH3 배지 중에서 성장된 세포는 "IH3-P 성장 세포"이고 이센셜8TM 중에서 성장된 세포는 "EZ8 성장 세포"이다. 상이한 배지 중에서 성장된 세포들 사이에는 발현 패턴에 있어서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

도 31은 0기에서 상이한 pH 수준에서 미리 성장된 4기 3일째 세포에 대한 NKX6.1, 크로마그라닌(CHGA), CDX2, SOX2, NKX2.2, PDX1, FOXA2 및 NEUROD에 대한 FACS의 평균 결과를 나타낸다(실시예 7 참조). 4기 3일째의 세포 프로파일에 있어서 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

도 32는 소포제(Anti-Foam) C로 처리되지 않은 4기 3일째 세포와 소포제 C 에멀전(94 ppm)으로 처리된 4기 3일째 세포에 대한 NKX6.1, 크로모그라닌(CHGA), CDX2, SOX2, NKX2.2, PDX1, FOXA2 및 NEUROD에 대한 FACS의 결과를 비교한다(실시예 7 참조). 소포제 C 에멀전(시그마(Sigma) 카탈로그 번호 A8011)은 4기 3일째 세포의 프로파일에 영향을 미치는 것으로 관찰되지 않았다.

도 33 내지 도 35는 실시예 8의 프로토콜에 따라 분화된 세포에 대한 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 33은 분화 개시 전 24시간째에 세포의 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다(실시예 8 참조). 도 33에 나타낸 바와 같이, 생물반응기로부터의 세포는 만능성에 특징적인 유전자(POU5F1, NANOG, SOX2, 및 ZFP42)에 대해서는 발현을 보유하였으며, 분화에 특징적인 유전자(AFP, 및 FOXA2: 50배 미만의 증가; FOXD3, GATA2, GATA4, GSC, HAND2, MIXL1 및 T: 10배 미만으로 증가된 발현)에 대해서는 최소한의 유도 또는 무유도를 나타내었다. 도 34는 분화 개시 후 24시간째에 세포의 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 35는 분화 개시 후 72시간째에 세포의 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다.

도 36a 내지 도 36e는 실시예 8의 프로토콜에 따라 2기 내지 3 및 4기로부터 분화된 세포에 대한 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 구체적으로, 이들 도면은 2기 1일째; 2기 2일째; 2기 3일째; 3기 3일째; 및, 유전자에 따라서는, 4기 1일째의 세포의 유전자 발현을 나타낸다. 도 36a는 AFP, ATOH1 및 CDX2에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 36b는 GAST, HAND1, HHEX 및 HNF4a에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 36c는 NKX2.2, NKX6.1, OSR1, 및 PDX1에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 36d는 PROX1, PTF1a, SOX17, 및 SOX2에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 36e는 SOX9에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 데이터는 미분화된 H1(WA01) hES 세포수(1의 베이스라인 발현)와 대비하여 발현에 있어서의 차이로서 나타나 있다.

도 37은 실시예 8에서의 프로토콜에 따른 분화의 4기 3일째 세포에 대한 선택 유전자에 대해, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 37에 나타낸 바와 같이, 3기 3일째의 분화 말기에, 세포는 미분화된 H1 인간 배아줄기세포와 대비하여, PDX1의 고 발현 수준(1×10^6 배 초과)의 유도) 및 다른 체장 유전자의 고 발현 수준(ARX, GCG, GAST, INS, ISL, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PTF1a, 및 SST의 1000배 초과)의 유도) 그리고 OCT4/POU5F1 발현의 거의 완전한 손실을 특징으로 하는 체장 선조세포로 분화되었다.

도 38은 실시예 8에 따른 분화 프로토콜 동안의 일일 세포 카운트를 나타낸다. 구체적으로, 도 38은 과정 일수의 함수로서의 세포 밀도를 나타낸다. 도 38은 pH 6.8 및 7.2에서 수행된 2개의 반응기 실시(PRD1205 및 PRD1207)의 분화 프로토콜에 대한 세포 카운트를 나타낸다. 비교를 위해, 세포 드리프트(drift)에 대한 세포

카운트를 또한 나타낸다.

도 39a 내지 도 39d는 실시예 8의 프로토콜에 따라 분화되어 SCID-Bg 마우스 내로 이식된, 4기 3일째 세포의 생체내(*in vivo*) 생물활성을 나타낸다. 세포는 신장 피막 아래에 테트라사이트™ 장치를 통해 피하 이식하거나, 또는 초저부착 디쉬 내에서 인큐베이션(*incubation*)한 후 이식하였다. 마우스를 혈당 및 C-펩타이드 수준에 대해 이식편 이식 후 매 4주마다 모니터링하였다. 도 39a는 시간의 함수로서의 테트라사이트™ 장치 내의 5×10^6 또는 10×10^6 개의 4기 3일째 세포의 이식 후의 C-펩타이드 수준을 나타낸다. 도 39b는 테트라사이트™ 장치 내의 5×10^6 또는 10×10^6 개의 4기 3일째 세포의 이식 후의 동물 내의 비공복시 글루코스 수준을 나타낸다. 도 39b에서의 마우스는 이식 전에 STZ로 처리하여 숙주 β -세포 기능을 제거하였다. 도 39c는 시간(이식 후 주 수)의 함수로서의 테트라사이트™ 장치 내의 미리 동결보존된 4기 3일째 세포의 이식 후에 생성된 C-펩타이드 수준을 나타낸다. 도 39d는 해동 직후(D0) 또는 해동 후 1일째(D1)에 이식된 동결보존되지 않은/새로운 4기 3일째 세포 또는 동결보존된 4기 3일째 세포의 신장 이식편에 의해 처리된 마우스의 C-펩타이드 수준을 비교한다.

도 40a 내지 도 40d는 MCX 화합물 및 GDF-8(도 40a); MCX 단독(도 40b); WNT3A 및 액티빈 A(도 40c); 및 WNT3A 단독(도 40d)으로 1기 1일째에 처리된, 실시예 9의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99, 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 이들 도면은 현탁 배양물 중에, 분화 1일째에 TGF- β 패밀리를 구성원의 부재 하에서의 3 μ M MCX의 첨가가, 1일째에 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8 또는 20 ng/ml WNT-3a + 100 ng/ml 액티빈 A로 세포가 처리될 때 수득된 것과 비교되는 수준으로 완성 내배엽을 생성함을 나타낸다.

도 41a 내지 도 41d는 1기 1일째에 다양한 양의 MCX로 처리된, 실시예 10의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 구체적으로는, 1기 1일째의 세포를 4 μ M의 MCX(도 41a); 3 μ M의 MCX(도 41b); 2 μ M의 MCX(도 41c); 및 1.5 μ M의 MCX(도 41d)로 처리하였다.

도 42a 및 도 42b는 실시예 11의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 구체적으로, 이들 도면은 현탁 배양물에서의 배지 교체 빈도의 역할을 나타낸다. 도 42a는 1기에서의 완전한 배지 교체와 함께 실시예 10의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 도 42b는 3일째에 배지 교체 없이 실시예 10의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 데이터는, 현탁 배양 시스템 내에서, 분화 3일째에 배지 교체된 배양물(도 42a)이 3일째에 배지 교체되지 않은 배양물(도 42b)과 비교되는 효능으로 완성 내배엽을 생성하였음을 시사한다.

도 43a 및 도 43b는 실시예 12의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 구체적으로, 이들 도면은 현탁 배양물에서의 글루타맥스(GlutaMAX)™의 역할을 나타낸다. 1X 글루타맥스™로 보충되거나(도 43a) 또는 글루타맥스™ 또는 어떠한 글루타민도 없는(0 M 글루타맥스™)(도 43b) 배지 중에서 1기에서 세포를 배양하였다. 데이터는, 현탁 배양 시스템 내에서, 글루타맥스™의 첨가가 완성 내배엽이 생성되는 효능에 영향을 미치는 것으로 보이지 않음을 시사한다.

도 44a 내지 도 44d는 실시예 13의 프로토콜에 따라 분화된 세포에 대한 다양한 양의 중탄산나트륨의 영향을 나타낸다. 도 44a 및 도 44b는 1기에서 첨가된 3.64 g/l(도 44a) 또는 2.49 g/l(도 44b)를 사용하여 실시예 13의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 CXCR4, CD99, 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다. 도 44c 및 도 44d는 1기에서 첨가된 3.64 g/l(도 44c) 또는 2.49 g/l(도 44d)를 사용하여 실시예 13의 프로토콜에 따라 3일 동안 분화된 세포의 위상차 현미경 사진을 나타낸다.

도 45는 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 세포에 대한 분화의 함수로서의 세포 밀도에 대한 일일 세포 카운트를 나타낸다. 세포 카운트는 영상-기반 세포측정기(뉴클레오카운터®)를 사용하여 수득하였다.

도 46은 실시예 14의 분화 프로토콜 동안 시간(분화 일수)의 함수로서의 일평균 생물반응기 배지 pH 수준을 나타낸다. pH 수준은 노바 바이오프로파일® 플렉스(노바 바이오메디칼 코포레이션, 미국 매사추세츠주 윌섬 소재)에 의해 측정하였다.

도 47은 실시예 14의 분화 프로토콜 동안 시간(분화 일수)의 함수로서 일평균 생물반응기 배지 글루코스 수준을 나타낸다. 글루코스 수준은 노바 바이오프로파일® 플렉스(노바 바이오메디칼 코포레이션, 미국 매사추세츠주 윌섬 소재)에 의해 측정하였다.

도 48은 실시예 14의 분화 프로토콜 동안 시간(분화 일수)의 함수로서의 일평균 생물반응기 배지 락테이트 수준

을 나타낸다. 락테이트 수준은 노바 바이오프로파일® 플렉스(노바 바이오메디칼 코퍼레이션, 미국 매사추세츠 주 윌섬 소재)에 의해 측정하였다.

도 49는 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 0기 1 내지 3일째 및 1기 1일째 내지 3일째 세포에 대한, 만능성과 관련된 선택 유전자를 함유하는 만능성 어레이에 대해, 미분화된 세포 대비 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 50은 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 0기 1 내지 3일째, 1기 1일째 내지 3일째 및 2기 1일째 내지 3일째 세포에 대한, DE와 관련된 선택 유전자를 함유하는 DE 어레이에 대해, 미분화된 세포 대비 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다.

도 51은 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화되기 전, 0기 세포에 대한서의 만능성과 관련된 마커(CD184/CXCR4, SSEA4, TRA-1-60 및 TRA-1-81)에 대한 FACS의 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 51은 만능성과 관련된 마커의 고 발현을 나타낸다.

도 52는 실시예 14의 프로토콜에 따라 1기 말기까지 분화된 세포의 완성 내배엽 마커 CXCR4, CD99, 및 CD9에 대한 FACS 도표를 나타낸다.

도 53은 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 2기 1일째; 2기 2일째 및 2기 3일째 세포에 대한 GAPDH, AFP, HHEX, HNF4 α , PDX1, 및 PROX1에 대해, 미분화된 세포 대비 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 53은 전장 유전자(AFP, HHEX, PDX1, 및 PROX1)의 발현에 있어서의 증가를 나타낸다.

도 54는 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 2기 1일째 내지 3일째 및 3기 1일째 내지 3일째 세포에 대한 GAPDH, AFP, CDX2, GAST, HNF4A, NKX2-2, OSR1, PDX1 및 PFT1A에 대해, 미분화된 세포 대비 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 발현 수준을 나타낸다. 도 54에 나타난 바와 같이, PDX1에 대한 발현은 2기 3일째 말기에 대조군에 비하여 12,000x로부터 3기 3일째 말기에 대조군에 비하여 739,000x까지 60배 증가하였다.

도 55는 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 3기 1 내지 3일째 및 4기 1일째 내지 3일째 세포에 대한 소정 유전자에 대해, 미분화된 세포 대비 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 발현 수준을 나타낸다. 구체적으로, 도 55의 상부 패널은 GAPDH, AFP, ALB, ARX, CDX2, CHGA, GAST, GCG, IAAP, INS, ISL1, 및 MAFB에 대한 유전자 발현을 나타낸다. 도 55의 하부 패널은 MAFB, MUCS, NEUROD1, NEUROG3, NKX2-2, NKX6-1, PAX4, PDX1, POU5F1, PTF1A, SST 및 ZIC1의 유전자 발현을 나타낸다.

도 56은 실시예 14의 프로토콜에 따라 분화된 세포에 대한 말기 현미경 사진을 나타낸다. 도 56에서는 0기의 그리고 1 내지 4기의 분화 말기의 세포 클러스터의 대표적인 현미경 사진(4X)을 볼 수 있다.

도 57 내지 도 80은 다음의 유전자에 대한 0시간, 6시간, 24시간, 30시간, 48시간 및 72시간의 분화 후 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 분화된 세포에 대해, 미분화된 세포 대비 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다: AFP(도 57); CD99(도 58); CD9(도 59); CDH1(도 60); CDH2(도 61); CDX2(도 62); CER1(도 63); CXCR4(도 64); FGF17(도 65); FGF4(도 66); FOXA(도 67); GADPH(도 68); GATA4(도 69); GATA6(도 70); GSC(도 71); KIT(도 72); MIXL1(도 73); MNX1(도 74); NANOG(도 75); OTX2(도 76); POU5F1(도 77); SOX17(도 78); SOX7(도 79) 및 T(도 80).

도 81은 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 6시간, 24시간, 30시간, 48시간, 및 72시간의 분화 후의 세포에 대한 세포 주기의 G0/G1에서의 세포의 백분율을 나타낸다. 구체적으로, 도 81은 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 처리된 클러스터에 대한 결과를 나타낸다: (1) 순수(neat), (2) 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍(Peprotech)), (3) 3 μ M MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈(R&D Systems), 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독.

도 82는 실시예 15의 프로토콜에 따라 분화된 세포 클러스터에 대한 EDU 처리의 영향을 나타낸다. 좌측 패널은 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 0시간, 6시간, 24시간, 30시간, 48시간 및 72시간의 분화 후의 세포에 대한 세포 주기의 G2/M에서의 세포의 백분율을 나타낸다. 구체적으로, 좌측 패널은 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 처리된 클러스터에 대한 결과를 나타낸다: (1) 순수, (2) 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍), (3) 3 μ M MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독. 하나의 데이터

세트에서는, 이들 클러스터를 또한 EDU로 처리하였다. 도 82의 우측 패널은 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 0시간, 6시간, 24시간, 30시간, 48시간, 및 72시간의 분화에서 EDU 양성인 세포의 %를 나타낸다.

도 83은 실시예 15의 프로토콜에서 사용된 일반적인 작동 파라미터를 나타낸다.

도 84는 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 6시간, 24시간, 30시간, 48시간 및 72시간의 분화 후의 세포의 EDU 혼입량을 나타낸다. 구체적으로, 도 84는 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 처리된 EDU 인큐베이션된 세포 클러스터에 대한 결과를 나타낸다: (1) 순수, (2) 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍), (3) 3 μ M MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독.

도 85는 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 6시간, 24시간, 30시간, 48시간, 및 72시간의 분화 후의 세포에 대한 세포 주기의 G0/G1에서의 세포의 백분율을 나타낸다. 구체적으로, 도 85는 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 처리된 클러스터에 대한 결과를 나타낸다: (1) 순수, (2) 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍), (3) 3 μ M MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독.

도 86은 실시예 15의 다양한 실시 형태에 따라 6시간, 24시간, 30시간, 48시간, 및 72시간의 분화 후의 세포에 대한 세포 주기의 S기에서의 세포의 백분율을 나타낸다. 구체적으로, 도 86은 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 처리된 클러스터에 대한 결과를 나타낸다: (1) 순수, (2) 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍), (3) 3 μ M MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독.

도 87은 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 6시간, 24시간, 30시간, 48시간 및 72시간의 분화 후의 세포에 대한 세포 주기의 S기에서의 세포의 백분율을 나타낸다. 구체적으로, 도 87은 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 처리된 클러스터에 대한 결과를 나타낸다: (1) 순수, (2) 3 μ M MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍), (3) 3 μ M MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독.

도 88a 내지 도 88e는 실시예 15의 프로토콜의 다양한 실시 형태에 따라 0시간, 6시간, 24시간, 30시간, 48시간 및 72시간의 분화 후의 분화된 세포에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88a는 CD99, CD9, CDH1 및 CDH2에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88a는 CXD2, CER1, CXCR4 및 FGF17에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88c는 FGF4, FOXA, GATA4 및 GATA6에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88d는 GSC, KIT, MIXL1 및 MNX1에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88e는 NANOG, OTX2, POU5F1 및 SOX17에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88f는 SOX7 및 T에 대해, 미분화된 세포에 대한 발현 배수로서의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현을 나타낸다. 도 88a 내지 도 88f에 대한 기초 데이터는 도 58 내지 도 67 및 도 69 내지 도 80에 나타나 있다.

도 89는 실시예 16의 프로토콜에 따라 외배엽 분화 배지 중에서 배양된 만능 세포의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 89에 나타난 바와 같이, 세포는 신경 세포 계통을 향해 분화되었다. 구체적으로, 도 89의 좌측 패널은 제대 조직 세포(UTC)로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주(induced pluripotent stem cell line)에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 89의 우측 패널은 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론(sub-clone)에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다.

도 90은 실시예 16의 프로토콜에 따라 중배엽 분화 배지 중에서 배양된 만능 세포의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 90에 나타난 바와 같이, 세포는 심장 세포 계통을 향해 분화되었다.

구체적으로, 도 90의 좌측 패널은 제대 조직 세포(UTC)로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 90의 우측 패널은 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다.

도 91은 실시예 16의 프로토콜에 따라 외배엽 분화 배지 중에서 배양된 만능 세포의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 91에 나타낸 바와 같이, 세포는 신경 세포 계통을 향해 분화되었다. 구체적으로, 도 91의 좌측 패널은 제대 조직 세포(UTC)로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 91의 우측 패널은 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다.

도 92는 실시예 16의 프로토콜에 따라 외배엽 분화 배지 중에서 3일 동안 배양된 만능 세포의, FACS에 의해 측정하였을 때의, PAX6, SOX2, 및 POU5F1/OCT4에 대한 단백질 발현 패턴을 나타낸다. 구체적으로, 도 92의 좌측 패널은 제대 조직 세포(UTC)로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주에 대한 PAX6, SOX2, 및 POU5F1/OCT4에 대한 발현 패턴을 나타낸다. 도 92의 우측 패널은 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론에 대한 PAX6, SOX2, 및 POU5F1/OCT4에 대한 단백질 발현 패턴을 나타낸다.

도 93은 실시예 16의 프로토콜에 따라 중배엽 분화 배지 중에서 배양된 만능 세포의, qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 93에 나타낸 바와 같이, 세포는 심장 세포 계통을 향해 분화되었다. 구체적으로, 도 93의 좌측 패널은 제대 조직 세포(UTC)로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 도 93의 우측 패널은 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론에 대한 유전자 발현 패턴을 나타낸다.

도 94는 실시예 16의 프로토콜에 따라 중배엽 분화 배지 중에서 분화된 세포에 대한 현미경 사진을 나타낸다. 도 94에 나타낸 바와 같이, 세포는 심장 세포 계통을 향해 분화되었다. 구체적으로, 도 94의 좌측 패널은 분화 3일째, 5일째 및 10일째에 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론의 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 94의 우측 패널은 분화 10일 후의 제대 조직 세포로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주(UTC iPSC)의 현미경 사진을 나타낸다.

도 95는 실시예 16의 프로토콜에 따라 외배엽 분화 배지 중에서 분화된 세포에 대한 현미경 사진을 나타낸다. 도 95에 나타낸 바와 같이, 세포는 신경 세포 계통을 향해 분화되었다. 구체적으로, 도 95의 좌측 패널은 분화 3일째, 5일째 및 10일째에 H1 hES 세포주의 WB0106 서브-클론의 세포의 현미경 사진을 나타낸다. 도 95의 우측 패널은 분화 10일 후의 제대 조직 세포로부터 생성된 유도 만능 줄기세포주(UTC iPSC)의 현미경 사진을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 출원은 내배엽 선조세포, 척장 내분비 세포, 중배엽 세포 또는 외배엽 세포로의 분화를 위한 응집된 세포 클러스터에서 만능성을 유지하는 배아줄기세포 및 다른 만능 세포를 제조하는 것에 관한 것이다. 개시내용의 명확함을 위하여, 그리고 제한하지 않고서, 본 발명의 상세한 설명은 본 발명의 소정의 특징, 실시 형태, 또는 응용을 설명하거나 예시하는 하기의 세부 항목으로 나뉘어진다.

[0018] 정의

[0019] 줄기세포는 단일 세포 수준에서 그의 자가-재생 및 분화 능력 둘 모두에 의해 규정되는 미분화된 세포이다. 줄기세포는 자가-재생 선조세포, 비-재생 선조세포, 및 최종 분화된 세포를 포함하는 자손 세포를 생성할 수 있다. 줄기세포는 또한 시험관내(*in vitro*)에서 다수의 배엽층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능적 세포로 분화하는 그의 능력을 특징으로 한다. 또한, 줄기세포는 이식 후에 다수의 배엽층의 조직을 발생시키며, 배반포 내로의 주입 이후, 비록 전부는 아니더라도, 실질적으로 대부분의 조직에 기여한다.

[0020] 줄기세포는 그들의 발생능(developmental potential)에 의해 분류된다. "세포 배양물" 또는 "배양"은 일반적으로 살아있는 유기체로부터 취해져서 제어된 조건 하에서 성장된 ("배양물 중" 또는 "배양된") 세포를 말한다. 1차 세포 배양물은 첫 번째 계대배양(subculture) 전에 유기체로부터 직접 취해진 세포, 조직, 또는 기관의 배양물이다. 세포는 세포 성장 및 분열 중 하나 또는 둘 모두를 촉진시키는 조건 하에서 성장 배지 중에 놓여질 때, 배양물 중에서 증폭되어, 더 큰 세포 집단을 생성한다. 세포가 배양물 중에서 증폭되는 경우, 세포 증식의 속도는 때때로, 세포의 수가 2배가 되는 데 필요한 시간의 양으로 측정된다(배가 시간(doubling time)으로 지칭됨).

- [0021] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "증폭"은, 배양에 의해 만능 줄기세포의 수를, 예를 들어 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 75%, 90%, 100%, 200%, 500%, 1000% 또는 그 이상, 및 이들 백분율 이내의 수준으로 증가시키는 과정이다. 단일의 만능 줄기세포로부터 수득될 수 있는 만능 줄기세포의 수는 만능 줄기세포의 증식 능력에 의존하는 것으로 이해된다. 만능 줄기세포의 증식 능력은 세포의 배가 시간, 즉, 세포가 배양물 중에서 유사분열을 거치는 데 필요한 시간, 및 만능 줄기세포가 미분화된 상태로 유지될 수 있는 기간 - 이는 계대배양의 횟수에 각각의 계대배양 사이의 일수를 곱한 값에 상당함 - 에 의해 계산될 수 있다.
- [0022] 분화는 특화되지 않은("미결정된(uncommitted)") 또는 덜 특화된 세포가 신경 세포 또는 근육 세포와 같은 특화된 세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화된 세포 또는 분화-유도된 세포는 세포 계통 내에서 더 특화된(결정된("committed")) 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "결정된"은 분화 경로에서, 정상 환경 하에 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 서브셋으로 계속 분화될 것이며, 정상 환경 하에 상이한 세포 유형으로 분화될 수 없거나 덜 분화된 세포 유형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행된 세포를 말한다. "탈분화(de-differentiation)"는 세포가 세포의 계통 내의 덜 특화된(또는 결정된) 위치로 되돌아가는 과정을 말한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포 "계통"은 세포의 유전, 즉, 그것이 어느 세포로부터 유래되었는지 그리고 그것이 어떤 세포를 발생시킬 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 그 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 관심있는 계통의 세포의 표현형과 특이적으로 관련된 특징을 말하며, 미결정된 세포가 관심있는 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0023] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심있는 세포에서 차등적으로 발현되는 핵산 또는 폴리펩타이드 분자이다. 이러한 맥락에서, 차등 발현(differential expression)은 미분화된 세포와 대비하여 양성 마커에 대해서는 증가된 수준을 그리고 음성 마커에 대해서는 감소된 수준을 의미한다. 마커 핵산 또는 폴리펩타이드의 검출가능한 수준은 다른 세포와 대비하여 관심있는 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮음으로써, 관심있는 세포가 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것을 사용하여 다른 세포로부터 확인 및 구별될 수 있도록 한다.
- [0024] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포는 특정 마커에 "대하여 양성"이거나 또는 특정 마커가 그 세포에서 충분히 검출될 때 "양성"이다. 유사하게, 세포는 특정 마커에 "대하여 음성"이거나 또는 특정 마커가 그 세포에서 충분히 검출되지 않을 때 "음성"이다. 특히, FACS에 의한 양성은 통상 2% 초과인 반면, FACS에 의한 음성 역치(threshold)는 통상 1% 미만이다. PCR에 의한 양성은 통상 34회 주기(Ct) 미만인 반면; PCR에 의한 음성은 통상 34.5회 주기 초과이다.
- [0025] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "세포 밀도" 및 "시딩 밀도(seeding density)"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 고체 또는 반고체 평면 또는 곡면 기질의 단위 면적당 시딩된 세포의 수를 지칭한다.
- [0026] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "현탁 배양물"은 표면에 부착되기보다는 오히려 배지 중에 현탁된 세포, 단일 세포 또는 클러스터의 배양물을 말한다.
- [0027] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "무혈청(serum free)"은 인간 또는 동물 혈청이 없음을 말한다. 따라서, 무혈청 배양 배지는 혈청 또는 혈청의 일부분을 포함하지 않는다.
- [0028] 세포 배양물 중에서 만능 줄기세포의 기능적 췌장 내분비 세포로의 분화를 복제하기 위한 시도에서, 분화 과정은 종종 다수의 연속 단계를 통해 처리되는 것으로 여겨진다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 다양한 단계들은 본 명세서에 포함된 실시예에 기재된 배양 시간, 및 시약에 의해 규정된다.
- [0029] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "완성 내배엽"은 낭배형성 동안 상배엽(epiblast)으로부터 생기는 세포의 특징을 보유하며, 위장관을 형성하는 세포 및 그의 파생 세포를 말한다. 완성 내배엽 세포는 다음 마커들 중 적어도 하나를 발현한다: FOXA2(간세포 핵 인자 3-β(HNF3β)로도 알려짐), GATA4, GATA6, MNX1, SOX17, CXCR4, 세르베루스(Cerberus), OTX2, 단미중(brachyury), 구스코이드(gooseoid), C-Kit, CD99, 및 MIXL1. 완성 내배엽 세포에 특징적인 마커는CXCR4, FOXA2 및 SOX17을 포함한다. 따라서, 완성 내배엽 세포는 CXCR4, FOXA2, 및 SOX17의 그의 발현을 특징으로 할 수 있다. 게다가, 세포가 1기에서 유지되도록 하는 시간의 길이에 따라, HNF4 α의 증가가 관찰될 수 있다.
- [0030] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 내분비 세포"는 다음 호르몬들 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 및 췌장 폴리펩타이드. 이들 호르몬 외에, 췌장 내분비 세포에 특징적인 마커는 NGN3, NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, ARX, NKX2.2, 및 PAX6 중 하나 이상을 포함한다. β 세포에 특징적인 마커를 발현하는 췌장 내분비 세포는 인슐린 및 다음 전사 인자들 중 적어도 하나

의 발현을 특징으로 할 수 있다: PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3 β , MAFA, PAX4, 및 PAX6.

- [0031] "d1", "d 1", 및 "1일째"; "d2", "d 2", 및 "2일째"; "d3", "d 3", 및 "3일째" 등은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 이들 숫자와 문자의 조합은 본 출원의 단계적 분화 프로토콜 동안의 상이한 단계에서의 인큐베이션의 특정일을 지칭한다.
- [0032] "글루코스" 및 "D-글루코스"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 천연에서 일반적으로 발견되는 당인 텍스트로스를 말한다.
- [0033] 췌장 내분비 선조세포에서 발현되는 단백질 및 이를 인코딩하는 유전자임을 확인시켜 주는 "NeuroD" 및 "NeuroD1"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.
- [0034] "LDN" 및 "LDN-193189"는 미국 매사추세츠주 케임브리지 소재의 스템젠트, 인크.(Stemgent, Inc.)로부터 상표명 스템몰레클(STEMOLECULE)TM로 입수가능한 BMP 수용체 억제제인 ((6-(4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)-3-(피리딘-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘, 하이드로클로라이드; DM-3189))를 말한다.
- [0035] 만능 줄기세포의 단리, 증폭 및 배양
- [0036] 만능 줄기세포는 지정된 TRA-1-60 및 TRA-1-81 항체들 중 하나 이상을 발현할 수 있다(문헌[Thomson *et al.* 1998, *Science* 282:1145-1147]). 시험관내에서의 만능 줄기세포의 분화는 TRA-1-60, 및 TRA-1-81 발현의 손실로 이어진다. 미분화된 만능 줄기세포는 전형적으로 알칼리성 포스파타제 활성을 가지며, 이 활성은 상기 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고, 이어서 기질로서 벡터(Vector)[®] 레드(Red)를 사용하여 발색시킴으로써 검출될 수 있는데, 이는 제조업체(벡터 래보러토리즈, 인크.(Vector Laboratories, Inc.), 미국 캘리포니아주 버링게임 소재)에 의해 기재된 바와 같다. 미분화된 만능 줄기세포는 또한 RT-PCR에 의해 검출할 때, 전형적으로 OCT4 및 TERT를 발현한다.
- [0037] 증식된 만능 줄기세포의 다른 바람직한 표현형은 3개의 모든 배엽층, 즉 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 조직의 세포로 분화될 잠재력이다. 줄기세포의 만능성은, 예를 들어 중중 복합형 면역결핍중("SCID") 마우스 내로 세포를 주사하고, 형성되는 기형종을 4% 파라포름알데하이드를 사용하여 고정시키고, 이어서 이들 3개의 배엽층으로부터의 세포 유형의 증거에 대해 조직학적으로 검사함으로써 확인될 수 있다. 대안적으로, 만능성은 배양체(embryoid body)를 생성하여 3개의 배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.
- [0038] 증식된 만능 줄기세포주는 표준 G-밴딩(banding) 기술을 사용하여 핵형을 결정하고 상응하는 영장류 종의 공개된 핵형과 비교할 수 있다. "정상 핵형"을 가진 세포를 얻는 것이 바람직한데, 이는 세포가, 모든 인간 염색체가 존재하며 눈에 띄게 변경되지 않는 정배수체임을 의미한다. 다양한 영양세포 층(feeder layer)을 사용하는 배양물 중에서, 또는 기질 단백질 코팅된 용기를 사용함으로써, 만능 세포가 용이하게 증폭될 수 있다. 대안적으로, 세포의 일상적 증폭을 위해, mTeSR[®]1 배지(스템 셀 테크놀로지스(Stem Cell Technologies), 캐나다 브리티시컬럼비아주 밴쿠버 소재)와 같은 한정 배지와 조합하여 화학적으로 한정된 표면이 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일부 실시 형태의 방법에 따른 현탁 배양물 중에서의 배양은 세포 생존 및 증식은 촉진하지만 분화는 제한하는 세포 밀도로 만능 줄기세포를 배양 용기 내에 시딩함으로써 달성된다. 전형적으로, 세포의 미분화를 유지하는 시딩 밀도가 사용된다. 줄기세포의 단일-세포 현탁액이 시딩될 수 있지만, 세포의 작은 클러스터가 유리할 수 있음이 이해될 것이다.
- [0040] 현탁 배양물 중에 있는 동안에 만능 줄기세포에 영양물 및 성장 인자의 충분하고 지속적인 공급을 제공하기 위하여, 배양 배지가 매 1일 내지 5일과 같은 소정의 스케줄로 또는 일일 기준으로 교체 또는 보충될 수 있다. 만능 줄기세포의 큰 클러스터는 세포 분화를 야기할 수 있으며, 이에 따라 측정을 실시하여 큰 만능 줄기세포 응집체를 피할 수 있다. 본 발명의 일부 실시 형태에 따르면, 형성된 만능 줄기세포 클러스터는, 예를 들어 매 2 내지 7일마다 해리되고, 단일 세포 또는 작은 세포 군집은 추가의 배양 용기 내로 분할되거나(즉, 계대배양되거나) 동일한 배양 용기 내에 유지되고 대체 또는 추가 배양 배지로 처리된다.
- [0041] 원심분리로부터 얻어진 만능 줄기세포의 펠렛을 포함하는 큰 만능 줄기세포 군집은 효소적 분해 및 기계적 해리 중 하나 또는 둘 모두를 거칠 수 있다. 만능 줄기세포 군집의 효소적 분해는 이 군집을 제IV형 콜라게나제, 디스파제[®] 또는 아큐타제[®]와 같은 효소에 노출시킴으로써 수행될 수 있다. 큰 만능 줄기세포 군집의 기계적 해리는 이 군집을 소정의 크기로 부수도록 설계된 장치를 사용하여 수행할 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, 기계적 해리는 니들(needle) 또는 피펫을 사용하여 수동으로 수행될 수 있다.

- [0042] 본 발명의 일부 실시 형태의 방법에 따라서 현탁 상태로 만능 줄기세포를 배양하는 데 사용된 배양 용기는, 내부에서 배양된 만능 줄기세포가 부착하거나 접촉할 수 없도록 설계된 내부 표면을 갖는 (예를 들어, 만능 줄기세포를 배양하는 데 적합한 순도 등급을 가진) 임의의 조직 배양 용기(예를 들어, 그 표면에 대한 접촉 또는 부착을 방지하기 위하여, 비-조직 배양물 처리된 용기)일 수 있다. 바람직하게는 스케일 조정가능한(scalable) 배양물을 수득하기 위하여, 본 발명의 일부 실시 형태에 따른 배양은 제어된 배양 시스템(바람직하게는 컴퓨터로 제어되는 배양 시스템)을 사용하여 달성되는데, 여기서는 적합한 장치를 사용하여 온도, 교반, pH, 및 산소와 같은 배양 파라미터가 자동적으로 모니터링되고 제어된다. 일단 원하는 배양 파라미터가 결정되면, 만능 줄기세포 증폭 및 분화를 향상시키기 위해 필요에 따라 배양 파라미터의 자동 조절을 위해 시스템을 설정할 수 있다.
- [0043] 만능 줄기세포는 동적 조건 하에서(즉, 만능 줄기세포가 현탁 배양물 중에, 예를 들어 교반 현탁 배양 시스템 내에 있는 동안에 일정하게 움직여지는 조건 하에서) 또는 비-동적 조건(즉, 정지 배양) 하에서, 다회의 계대배양에 걸쳐 이들의 증식성, 만능성 능력 및 핵형 안정성을 보존하면서 배양될 수 있다.
- [0044] 만능 줄기세포의 비-동적 배양의 경우, 만능 줄기세포는 코팅되거나 코팅되지 않은 페트리 디쉬, T-플라스크, 하이퍼플라스크(HyperFlask)®(코닝 인코포레이티드(Corning Incorporated), 미국 뉴욕주 코닝 소재), 셀스택(CellStack)®(코닝 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 코닝 소재) 또는 셀 팩토리(Cell Factory)(눈크(NUNC)™ 셀 팩토리™ 시스템(서모 피셔 사이언티픽, 인크.(Thermo Fisher Scientific, Inc.), 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재) 중에서 배양될 수 있다. 만능 줄기세포의 동적 배양을 위해, 만능 줄기세포는 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크, 스테인리스 강, 유리 또는 일회용 플라스틱 진탕기 또는 교반 탱크 용기와 같은 적합한 용기 내에서 배양될 수 있다. 배양 용기는 제어 유닛에 연결되고, 이에 따라 제어된 배양 시스템을 제공할 수 있다. 배양 용기(예를 들어, 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크)는 연속적으로 또는 간헐적으로 교반될 수 있다. 바람직하게는, 배양 용기는 현탁 상태로 만능 줄기세포를 유지하기 위해 충분히 교반된다.
- [0045] 만능 줄기세포는 성장 및 증폭을 촉진하기에 충분한 영양물 및 환경적 자극을 제공하는 임의의 배지 중에서 배양될 수 있다. 적합한 배지는 E8™, IH3 및 mTeSR[®] 1 또는 mTeSR[®] 2를 포함한다. 배지는 영양물 공급을 새롭게 하고 세포 부산물을 제거하기 위해 주기적으로 교체될 수 있다. 본 발명의 일부 실시 형태에 따르면, 배양 배지는 매일 교체된다.
- [0046] 만능 줄기세포의 공급원
- [0047] 임의의 만능 줄기세포가 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 만능 줄기세포의 예시적 유형은 임신 동안 임의의 시점에서, 전형적으로 그러나 반드시 그렇지는 않지만, 대략 임신 10 내지 12주 전에 취해진 태아 조직, 배아 조직, 또는 전-배아 조직(예를 들어, 배반포)을 비롯하여, 임신 후에 형성된 조직으로부터 유래된 확립된 만능 세포주를 포함한다. 비제한적인 예는, 예를 들어 인간 배아줄기세포주(hESC) H1, H7, 및 H9(위셀 리서치 인스티튜트(WiCell Research Institute), 미국 위스콘신주 매디슨 소재)와 같은, 확립된 인간 배아줄기세포주 또는 인간 배아생식세포주이다. 영양세포(feeder cell)의 부재 하에서 이미 배양된 만능 줄기세포 집단으로부터 취한 세포가 또한 적합하다.
- [0048] 다수의 만능성 관련 전사 인자들, 예를 들어 OCT4, NANOG, Sox2, KLF4, 및 ZFP42의 강제 발현을 사용하여 성체 체세포로부터 유래될 수 있는 유도성 만능 세포(inducible pluripotent cell)(IPS) 또는 재프로그래밍된 만능 세포가 또한 적합하다(문헌[*Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011, 12:165-185]). 본 발명의 방법에 사용되는 인간 배아줄기세포는 또한 톰슨(Thomson) 등에 의해 기재된 바와 같이 제조될 수 있다(미국 특허 제5,843,780호; 문헌[*Science*, 1998, 282:1145-1147]; 문헌[*Curr Top Dev Biol* 1998, 38:133-165]; 문헌[*Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92:7844-7848]). 또한, 예를 들어 BG01v(브레사젠(BresaGen), 미국 조지아주 애선스 소재), 또는 성인 체세포로부터 유래된 세포, 예를 들어 문헌[Takahashi *et al.*, *Cell* 131:1-12 (2007)]에 개시된 세포와 같은 돌연변이체 인간 배아줄기세포주가 적합하다. 본 발명에 사용하기에 적합한 만능 줄기세포는 문헌[Li *et al.* (*Cell Stem Cell* 14: 16-19, 2009)]; 문헌[Maherali *et al.* (*Cell Stem Cell* 1: 55-70, 2007)]; 문헌[Stadtfeld *et al.* (*Cell Stem Cell* 2: 230-240)]; 문헌[Nakagawa *et al.* (*Nature Biotechnology* 26: 101-106, 2008)]; 문헌[Takahashi *et al.* (*Cell* 131: 861-872, 2007)]; 및 미국 특허 출원 공개 제2011-0104805호에 기재된 방법에 따라 파생될 수 있다. 만능 줄기세포의 다른 공급원은 유도 만능 세포(IPS, 문헌[*Cell*, 126(4):663-676])를 포함한다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 세포의 다른 공급원은 인간 계대 조직 유래 세포, 인간 양수 유래 세포, 인간 태반 유래 세포, 및 인간 반수성 개체(parthenote)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 계대 조직 유래 세포는 미국 특허 제7,510,873호의 방법을 사용하여 수득될 수 있으며, 이의 개시내

용은 세포의 단리 및 특징규명에 관한 것인 것과 같이 전체적으로 참고로 포함된다. 다른 실시 형태에서, 태반 조직 유래 세포는 미국 특허 출원 공개 제2005/0058631호의 방법을 사용하여 수득될 수 있으며, 이의 개시내용은 세포의 단리 및 특징규명에 관한 것인 것과 같이 전체적으로 참고로 포함된다. 다른 실시 형태에서, 양수 유래 세포는 미국 특허 출원 공개 제2007/0122903호의 방법을 사용하여 수득될 수 있으며, 이의 개시내용은 세포의 단리 및 특징규명에 관한 것인 것과 같이 이의 전문이 참조로 포함되어 있다.

- [0049] 만능 줄기세포의 특징은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 만능 줄기세포의 추가의 특징이 계속 확인되고 있다. 만능 줄기세포 마커는, 예를 들어 다음 중의 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14개 또는 모두)의 발현을 포함한다: ABCG2, 크립토(cripto), FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 만능 줄기세포는 유세포추정법에 의해 검출할 때 CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3개 또는 모두)을 발현하며, 분화 마커인 CXCR4(CD184로도 알려짐)의 발현은 결여되어 있다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 만능 줄기세포는 RT-PCR에 의해 검출할 때 CD9, NANOG 및 POU5F1/OCT4 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2개 또는 모두)을 발현한다.
- [0050] 예시적인 만능 줄기세포는 인간 배아줄기세포주 H9(NIH 코드: WA09), 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01), 인간 배아줄기세포주 H7(NIH 코드: WA07) 및 인간 배아줄기세포주 SA002(셀라르티스(Cellartis), 스웨덴 소재)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 만능 줄기세포는 인간 배아줄기세포, 예를 들어 H1 hES 세포이다. 대안적인 실시 형태에서, 비-배아 기원의 만능 줄기세포가 사용된다.
- [0051] 만능 줄기세포로부터 채장 내배엽 계통에 특징적인 마커를 발현하는 세포의 분화
- [0052] 만능 줄기세포의 증폭
- [0053] 하기에 기술된 바와 같은 실시 형태들 중 일부에서, 본 발명은 줄기세포들을 단리 및 배양하는 것, 특히 줄기세포 클러스터들을 배양하는 것에 관한 것으로, 이들은 동적 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지한다. 만능 세포 클러스터는 분화되어 기능적 β 세포를 생성할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 방법에 사용된 만능 줄기세포는 바람직하게는, 원하는 종점을 향한 분화 전에 동적 현탁 배양물 중에서 증폭된다. 유리하게는, 만능 줄기세포가 만능성의 손실 없이 적합한 배지 중에서 현탁 상태로 세포의 클러스터로서 배양 및 증폭될 수 있는 것으로 확인되었다. 그러한 배양은 동적 현탁 배양 시스템 내에서 일어날 수 있는데, 여기서는 세포 또는 세포 클러스터가 만능성의 손실을 방지하기 충분하게 계속 움직임이 유지되고 있다. 유용한 동적 현탁 배양 시스템은 배양 성분들을, 예를 들어 교반(stirring), 진탕, 재순환 또는 배지를 통한 가스의 버블링(bubbling)을 통해, 교반(agitater)하기 위한 수단이 구비된 시스템을 포함한다. 그러한 교반은, 세포 클러스터의 충분한 움직임이 유지되어 증폭을 촉진시키고 미성숙 분화를 방지하는 한, 간헐적이거나 연속적일 수 있다. 바람직하게는, 교반은, 예컨대 특정 속도로 회전하는 임펠러를 통한, 연속 교반을 포함한다. 임펠러는 환형 또는 평탄형 바닥을 가질 수 있다. 임펠러의 교반 속도는, 클러스터가 현탁 상태로 유지되고 정착(settling)이 최소화되도록 하는 것이어야 한다. 또한, 임펠러 블레이드의 각은 세포 및 클러스터의 상향 운동을 보조하여 정착을 피하도록 조절될 수 있다. 또한, 임펠러 유형, 각 및 회전 속도는 모두, 세포 및 클러스터가 균일한 콜로이드성 현탁액으로서 나타나도록 조정될 수 있다.
- [0055] 만능 줄기세포 클러스터의 현탁 배양 및 증폭은 일회용 플라스틱, 재사용가능한 플라스틱, 스테인리스 강 또는 유리 용기, 예를 들어 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크와 같은 적절한 동적 배양 시스템에 정치 배양된 줄기세포를 옮김으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 부착성 정치 환경, 즉, 플레이트 또는 디쉬 표면에서 배양된 줄기세포를 먼저 킬레이트제 또는 효소로 처리하여 표면으로부터 제거할 수 있다. 적합한 효소는 제I형 콜라게나제, 디스파제[®](시그마 알드리치 엘엘씨(Sigma Aldrich LLC), 미국 미주리주 세인트루이스 소재) 또는 상표명 아큐타제[®](시그마 알드리치 엘엘씨, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)로 시판되는 구매가능한 제형을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 아큐타제[®]는 콜라겐분해성 및 단백질분해성 효소(감각류로부터 단리됨)를 포함하는 세포 탈착 용액(cell detachment solution)이고 포유류 또는 세균 유래 생성물을 함유하지 않는다. 따라서, 일 실시 형태에서, 효소는 콜라겐분해성 효소 또는 단백질분해성 효소이거나 콜라겐분해성 및 단백질분해성 효소를 포함하는 세포 탈착 용액이다. 적합한 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 만능 줄기세포 배양물은 효소 또는 킬레이트제와 함께, 바람직하게는 콜로니 가장자리가 컬링되고 리프팅되기 시작하지만, 배양 표면으로부터 콜로니의 완전한 탈착이 일어나기 전까지 인큐베이션된다. 일 실시 형태에서, 세포 배양물은 실온에서 인큐베이션된다. 일 실시 형태에서, 세포는

20℃ 초과, 25℃ 초과, 30℃ 초과 또는 35℃ 초과의 온도에서, 예를 들어 약 20℃ 내지 약 40℃의 온도, 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도, 약 30℃ 내지 약 40℃의 온도, 예를 들어 약 37℃의 온도에서 인큐베이션된다. 일 실시 형태에서, 세포는 적어도 약 1분, 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 적어도 약 15분, 적어도 약 20분, 예를 들어 약 1분 내지 약 30분, 약 5분 내지 약 30분, 약 10분 내지 약 25분, 약 15분 내지 약 25분, 예를 들어 약 20분 동안 인큐베이션된다. 일 실시 형태에서, 본 방법은 처리 후의 세포 배양물로부터 효소 또는 킬레이트제를 제거하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 세포 배양물은 효소 또는 킬레이트제의 제거 후, 1회 또는 2회 또는 그 이상 세척된다. 일 실시 형태에서 세포 배양물은 mTeSR®1(스템 셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티시 컬럼비아주 벤쿠버 소재)과 같은 적절한 배양 배지로 세척된다. 일 실시 형태에서, Rho-키나제 억제제(예를 들어, Y-27632, 악소라(Axora) 카탈로그 번호 ALX-270-333, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재). Rho-키나제 억제제는 약 1 내지 약 100 μM, 약 1 내지 90 μM, 약 1 내지 약 80 μM, 약 1 내지 약 70 μM, 약 1 내지 약 60 μM, 약 1 내지 약 50 μM, 약 1 내지 약 40 μM, 약 1 내지 약 30 μM, 약 1 내지 약 20 μM, 약 1 내지 약 15 μM, 약 1 내지 약 10 μM, 또는 약 10 μM의 농도일 수 있다. 일 실시 형태에서, Rho-키나제 억제제는 적어도 1 μM, 적어도 5 μM 또는 적어도 10 μM로 첨가된다. 세포는 정치 배양 시스템의 표면으로부터 스크레이퍼(scraper) 또는 고무 폴리스맨(rubber policeman)을 사용하여 리프팅될 수 있다. 배지 및 세포는 유리 피펫 또는 다른 적합한 수단을 사용하여 동적 배양 시스템에 옮겨질 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 동적 배양 시스템 내의 배지는 매일 교체된다.

[0056] 일 실시 형태에서, 본 발명은 3차원 현탁 배양물 중에서 만능 줄기세포를 배양 및 증폭시키는 방법을 제공한다. 특히, 본 방법은 이들 만능 줄기세포의 응집된 세포 클러스터를 형성함으로써 배양 및 증폭 만능 줄기세포를 제공한다. 세포 클러스터는 세포를 배양하기 전에 만능 줄기세포 배양물을 효소(예를 들어, 중성 프로테아제, 예를 들어 디스파제®) 또는 킬레이트제로 처리한 결과로서 형성될 수 있다. 바람직하게는, 세포는 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템 내에서 배양될 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 발명은 만능 줄기세포의 그러한 클러스터로부터 채장 내배엽 계통에 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 추가로 제공한다.

[0057] 바람직하게는, 세포 클러스터는 응집된 만능 줄기세포이다. 응집된 줄기세포는 하나 이상의 만능성 마커, 예를 들어 마커 CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81 중 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3개 또는 모두)을 발현하고, 하나 이상의 분화 마커의 발현은 결여되어 있는데, 예를 들어 CXCR4의 발현은 결여되어 있다. 일 실시 형태에서, 응집된 줄기세포는 만능성 마커 CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81을 발현하고, 분화 마커 CXCR4의 발현은 결여되어 있다.

[0058] 일 실시 형태는 현탁 배양물 중에서 세포 클러스터로서 만능 줄기세포를 배양하는 방법이다. 세포 클러스터는 동적 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템 내에서 배양된 응집된 만능 줄기세포이다. 세포 클러스터는 세포 리프팅제로서 중성 프로테아제, 예를 들어 디스파제와 같은 효소를 사용하여 평면 부착성 배양물(planar adherent culture)로부터 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템에 옮겨질 수 있다. 예시적인 적합한 효소는 제IV형 콜라게나제, 디스파제® 또는 아큐타제®를 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 세포는 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템, 특히 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지한다.

[0059] 본 발명의 다른 실시 형태는 현탁 배양물 중에서 세포 클러스터로서 만능 줄기세포를 배양하는 방법이며, 여기서 세포 클러스터는 킬레이트제, 예를 들어 EDTA를 사용하여 평면 부착성 배양물로부터 옮겨져서 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템 내에서 배양된 응집된 만능 줄기세포이다. 세포 클러스터는 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템, 특히 교반(동적 교반) 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지한다.

[0060] 본 발명의 다른 실시 형태는 현탁 배양물 중에서 세포 클러스터로서 만능 줄기세포를 배양하는 방법이며, 여기서 세포 클러스터는 효소 아큐타제®를 사용하여 평면 부착성 배양물로부터 옮겨져서 교반 또는 진탕 현탁 배양 시스템 내에서 배양된 응집된 만능 줄기세포이다. 세포 클러스터는 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지한다.

[0061] 본 발명의 세포 클러스터는 중배엽 세포, 예를 들어 심장 세포, 외배엽 세포, 예를 들어 신경 세포, 단일 호르몬 양성 세포 또는 채장 내배엽 세포로 분화될 수 있다. 본 방법은 분화, 예를 들어 채장 내배엽 세포의 채장 전구세포 및 채장 호르몬 발현 세포로의 분화를 추가로 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, 채장 전구세포는 β 세포 전사 인자 PDX1 및 NKX6.1의 발현을 특징으로 한다.

[0062] 일 실시 형태에서, 분화의 단계는 현탁 배양 시스템 내에서의 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 36시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 96시간, 적어도 120시간, 적어도 144시간, 적어도 168시간, 적어도 196

시간 이상, 바람직하게는 약 48시간 내지 약 72시간 후에 수행된다. 분화는 실시예에 기재된 것과 같은 배지 성분들의 단계적 진행을 사용하여 수행할 수 있다(예를 들어, 표 A 및 표 1a 및 표 1c 참조).

- [0063] 바람직한 실시 형태에서, 3차원 세포 클러스터는 평면 부착성 배양물 중에서 만능 줄기세포를 성장시키는 단계; 만능 줄기세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계; 및 평면 부착성 배양물로부터의 만능 줄기세포의 클러스터를 효소 또는 킬레이트제를 사용하여 동적 현탁 배양물에 옮기는 단계에 의해 생성된다. 추가의 바람직한 실시 형태는 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 줄기세포를 증폭 및 분화시키는 방법으로서, 평면 부착성 배양물 중에서 만능 줄기세포를 성장시키는 단계; 만능 줄기세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계; 및 평면 부착성 배양물로부터의 만능 줄기세포의 클러스터를 효소 또는 킬레이트제를 사용하여 동적 현탁 배양물에 옮기는 단계; 및 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 세포 클러스터를 분화시켜 췌장 전구세포 집단을 생성하는 단계에 의한, 방법이다.
- [0064] 다른 실시 형태는 췌장 전구세포로 분화되는 증폭된 만능 줄기세포 클러스터의 현탁으로부터 제조된 분화된 줄기세포를 포함하는 이식가능한 줄기세포 유래 세포 생성물이다. 더 상세하게는, 이식가능한 줄기세포 유래 생성물은 평면 부착성 배양물 중에서 만능 줄기세포를 성장시키는 단계; 만능 줄기세포를 응집된 세포 클러스터로 증폭시키는 단계; 및 평면 부착성 배양물로부터의 만능 줄기세포의 클러스터를 효소 또는 킬레이트제를 사용하여 동적 현탁 배양물에 옮기는 단계; 및 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 세포 클러스터를 분화시키는 단계에 의해 생성된다. 이식가능한 줄기세포 유래 세포 생성물은 바람직하게는 당뇨병을 치료하는 데 사용된다.
- [0065] 다른 실시 형태에서, 본 방법은 기능적 췌장 내분비 세포로의 추가의 생체내 성숙을 위해 당뇨병 동물에의 이식을 포함한다.
- [0066] 다른 실시 형태는 현탁 배양 시스템 내에서 만능 줄기세포를 증폭 및 분화시키는 방법으로서, 평면 부착성 배양물 중에서 만능 줄기세포를 성장시키는 단계; 효소를 사용하여 평면 부착성 배양물로부터 만능 줄기세포를 제거하는 단계; 만능 줄기세포를 정지 배양으로 마이크로캐리어에 부착시키는 단계; 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 세포를 증폭시키는 단계; 및 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능 세포를 분화시켜 췌장 전구세포 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 방법이다.
- [0067] 마이크로캐리어는 세포를 부착시키기 위한 당업계에 공지된 임의의 형태일 수 있으며, 특히 마이크로캐리어는 비드일 수 있다. 마이크로캐리어는 천연 물질 또는 합성 유래 물질로 구성될 수 있다. 예에는 콜라겐-기반 마이크로캐리어, 텍스트란-기반 마이크로캐리어, 또는 셀룰로스-기반 마이크로캐리어가 포함된다. 예를 들어, 마이크로캐리어 비드는 양으로 하전된 표면을 마이크로캐리어에 제공하기 위해 양이온성 트라이메틸 암모늄이 표면에 부착된, 개질된 폴리스티렌 비드일 수 있다. 비드 직경은 약 90 내지 약 200 μm , 대안적으로 약 100 내지 약 190 μm , 대안적으로 약 110 내지 약 180 μm , 대안적으로 약 125 내지 175 μm 직경의 범위일 수 있다. 마이크로캐리어 비드는 또한 가교결합된 텍스트란의 매트릭스에 화학적으로 커플링된 변성된 콜라겐의 얇은 층일 수 있다. 마이크로캐리어 비드는 유리, 세라믹, 중합체(예컨대, 폴리스티렌), 또는 금속일 수 있다. 또한, 마이크로캐리어는 코팅되지 않거나, 규소 또는 콜라겐과 같은 단백질로 코팅될 수 있다. 추가의 태양에서, 마이크로캐리어는 마이크로캐리어에 대한 세포의 결합을 향상시키고 마이크로캐리어로부터의 세포의 방출을 향상시키는 화합물로 구성되거나 이로 코팅될 수 있으며, 이러한 화합물에는 소듐 하이알루로네이트, 폴리(모노스테아로일글리세라이드 코-석신산), 폴리-D,L-락타이드-코-글리콜라이드, 피브로넥틴, 라미닌, 엘라스틴, 라이신, n-아이소프로필 아크릴아미드, 비트로넥틴, 및 콜라겐이 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 예에는 저수준의 생물학적으로 관련된 전기를 생산하는 아연과 구리의 미립자상 갈바닉 커플(particulate galvanic couple)을 갖는 마이크로캐리어; 또는 상자성 칼슘-알기네이트 마이크로캐리어와 같은 상자성체인 마이크로캐리어와 같은, 미세전류를 갖는 마이크로캐리어가 추가로 포함된다.
- [0068] 일부 실시 형태에서, 췌장 내배엽 세포의 집단은 만능 세포 클러스터의 단계적 분화에 의해 수득된다. 일부 실시 형태에서, 만능 세포는 인간 배아 만능 줄기세포이다. 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커를 발현하는 세포는 원시선 전구세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커를 발현하는 세포는 중내배엽 세포이다.
- [0069] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 동적 현탁 배양물 중에서 3 내지 5기 세포를 배양하는 단계를 포함하는 만능 세포를 분화시키는 단계적 방법에 관한 것이다. 일부 실시 형태에서, 생성된 췌장 내배엽 집단은 기능적 췌장 내분비 세포로의 추가의 생체내 성숙을 위해 당뇨병 동물에 이식된다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 사용하기 위한 시스템 또는 키트를 제공한다.

- [0070] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 수득가능한 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다.
- [0071] 본 발명은 치료 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 당뇨병을 앓고 있거나, 이것이 발병될 위험에 있는 환자를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0072] 본 발명은 또한 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 방법에 의해 수득가능하거나 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 특히, 본 발명은 당뇨병을 앓고 있거나, 이것이 발병될 위험에 있는 환자를 치료하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 방법에 의해 수득가능하거나 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 당뇨병은 제1형 또는 제2형 당뇨병일 수 있다.
- [0073] 일 실시 형태에서, 치료 방법은 본 발명의 방법에 의해 수득되거나 수득가능한 세포를 환자에게 이식하는 단계를 포함한다.
- [0074] 일 실시 형태에서, 치료 방법은 만능 줄기세포를 시험관내에서, 예를 들어 본 명세서에 기술된 바와 같은, 1기, 2기, 3기, 4기, 또는 5기 세포로 분화시키는 단계, 및 분화된 세포를 환자에게 이식시키는 단계를 포함한다.
- [0075] 일 실시 형태에서, 본 방법은 만능 줄기세포를 분화시키는 단계 전에, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같이 만능 줄기세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0076] 일 실시 형태에서, 본 방법은 이식 단계 후에, 생체내에서 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0077] 일 실시 형태에서, 환자는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.
- [0078] 일 실시 형태에서, 세포는 분산된 세포로서 이식될 수 있거나, 또는 클러스터로 형성되어 간문맥 내로 주입될 수 있다. 대안적으로, 세포는 숙주 면역 반응으로부터 보호하기 위해 캡슐화되거나 생체적합성의 분해성 중합체 지지체, 다공성 비분해성 장치 내에 제공될 수 있다. 세포는 수령체의 적절한 부위 내로 이식될 수 있다. 이식 부위는, 예를 들어 간, 천연 췌장, 신장 피막하 공간, 장막, 복막, 장막하 공간, 장, 위, 또는 피하 주머니를 포함한다.
- [0079] 생체내에서 이식된 세포의 추가 분화, 생존 또는 활성을 향상시키기 위해, 성장 인자, 산화방지제 또는 항염증제와 같은 추가의 인자가 세포 투여 전에, 세포 투여와 동시에, 또는 세포 투여 후에 투여될 수 있다. 이들 인자는 내인성 세포에 의해 분비되어 원위치에서(in situ) 투여된 세포에 노출될 수 있다. 이식된 세포는 당업계에 알려진 내인성 성장 인자 및 당업계에 알려진 외부로부터 투여된 성장 인자의 임의의 조합에 의해 분화되도록 유도될 수 있다.
- [0080] 이식에 사용되는 세포의 양은 환자의 상태 및 요법에 대한 반응을 포함한 많은 다양한 인자에 의존하며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.
- [0081] 일 실시 형태에서, 치료 방법은 세포를 이식 전에 3차원 지지체 내로 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 세포는 환자에게 이식되기 전에 이 지지체 상에서 시험관내에서 유지될 수 있다. 대안적으로, 세포를 포함하는 지지체는 추가의 시험관내 배양 없이 환자에게 직접 이식될 수 있다. 지지체에는 이식된 세포의 생존과 기능을 촉진하는 적어도 하나의 약제학적 제제가 선택적으로 도입될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 소정 실시 형태에서, 다음 중 하나 이상이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

[0083] [표 A]

성분/조건	단계	적합한 양
액티빈 A(AA)	1 기, 3 기	1 기: 약 100 mg/ml 3 기: 약 5 ng/ml, 약 3 ng/ml 내지 약 6 ng/ml
알부맥스(AlbuMAX)®	3 내지 5 기	약 0.1%
ALK5 억제제	4 기, 5 기	약 1 μM, 약 500 내지 약 1000 nM, 약 600 내지 약 1000 nM, 약 700 내지 약 1000 nM, 약 800 내지 약 1000 nM, 약 100 nM, 약 500 nM 또는 약 1 μM, 약 0.6 내지 약 1 μM
BSA	1 내지 5 기	약 2%, 0.1% 내지 약 2%
Cyp1(Cyp26 억제제)	4 기, 5 기	약 100 nM, 약 80 nM 내지 약 120 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM
FGF7(“F7”)	2 기, 3 기	약 50 ng/mL, 약 30 ng/ml 내지 약 60 ng/ml, 약 25 ng/ml 내지 약 55 ng/ml
GDF8	1 기	약 100 ng/mL, 약 80 ng/ml 내지 약 150 ng/ml, 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml, 약 75 ng/ml 내지 약 150 ng/ml
글루코스	1 내지 5 기	1 내지 4 기: 약 8 mM, 약 1 mM 내지 약 8 mM, 약 3 mM 내지 약 5 mM 또는 3 및 4 기 약 25 mM, 약 10 내지 약 25 mM 또는 5 기 약 11 mM 미만, 약 1 mM 내지 약 10 mM 또는 5 기 약 25 mM 초과, 약 25 mM 내지 약 50 mM
ITS-X	1 내지 5 기	약 1:50,000, 약 1:200, 약 1:1000, 약 1:10,000
LDN	3 기	약 100 nM, 약 80 nM 내지 약 120 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM
L-글루타민	1 내지 5 기	약 2 mM, 약 1 mM 내지 약 3 mM, 약 2 mM 내지 약 6 mM, 약 1 mM 내지 약 6 mM
지질 범위		약 0.1% 내지 약 0.2%, 약 0.05% 내지 약 0.15%, 약 0.15% 내지 약 0.2%

[0084]

성분/조건	단계	적합한 양
MCX	1기	약 3 μM, 약 2 μM, 약 1 μM 내지 약 5 μM, 약 2 μM 내지 약 4 μM, 약 1 μM 내지 약 3 μM, 약 2 μM 내지 약 3 μM
산소 범위	1 내지 5기	저산소 내지 주위의 약 30%, 주위의 약 10% 내지 약 25%, 주위의 약 15% 내지 약 30%
레티노산	3기	약 2 μM, 약 1 μM 내지 약 3 μM, 약 1.5 μM 내지 약 2.5 μM
SANT	3기, 4기	약 0.25 μM, 약 0.1 μM 내지 약 0.3 μM, 약 0.2 내지 약 0.3 μM, 약 0.1 μM 내지 약 0.25 μM
SCIO(A1k5 억제제)	4기	약 100 nM, 약 2 μM
만능 세포로부터 완성 내배엽(DE)으로 분화시키기 위한 시간		48 시간 미만, 30 시간 미만, 24 시간 미만, 18 시간 미만, 약 18 내지 30 시간
TppB 또는 TPB	4기	약 500 nM, 약 100 nM, 약 50 nM 내지 약 550 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM, 약 200 nM 내지 약 500 nM, 약 300 nM 내지 약 550 nM, 약 50 nM, 약 25 nM 내지 약 75 nM
Wnt3A	1기	약 20 ng/ml, 약 10 ng/ml 내지 약 25 ng/ml, 약 18 ng/ml 내지 약 30 ng/ml, 약 18 ng/ml 내지 약 22 ng/ml
Y-27632	0기	약 10 μM, 약 5 μM 내지 약 15 μM, 약 5 μM 내지 약 10 μM

[0085]

[0086]

본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 간행물은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 본 발명을 하기 실시예에 의해 추가로 예시하지만 이에 의해 한정되지는 않는다.

[0087]

실시예

[0088]

본 발명은 다음의 비제한적 실시예에 의해 추가로 예시된다.

[0089]

실시예 1

[0090]

디스파제/중성 프로테아제에 의한 세포주 H1의 인간 배아줄기세포의 현탁 및 클러스터링

[0091]

41회째 계대배양의 인간 배아줄기세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 세포를 PBS(카탈로그 번호 14190, 인비트로젠(Invitrogen))로 1회 세척하고, DMEM/F12(인비트로젠 카탈로그 번호 11330, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재) 중 디스파제[®](중성 프로테아제, 시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨, 카탈로그 번호 D4818, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)의 1 mg/mL 용액으로 처리하였다. 콜로니 가장자리가 컬링되고 리프팅되기 시작하지만, 배양 표면으로부터 콜로니의 완전한 탈착이 일어나기 전까지 37°C에서 15 내지 25분 동안 세포를 인큐베이션하였다. 이어서, 디스파제[®]를 제거하고 배양 디쉬를 10 μM Y-27632(약소라 카탈로그 번호 ALX-270-333, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 함유하는 mTeSR[®]1(스텝 셀 테크놀로지스, 캐나다 브리티시 컬럼비아주 밴쿠버 소재) 배지로 2회 세척하였다. 이어서, 10 μM Y-27632를 함유하는 mTeSR[®]1 배지를 배양 디쉬에 5 mL/60 cm²로 첨가하고, 스크레이퍼 또는 고무 폴리스맨을 사용하여 표면으로부터 세포를 리프팅하였다. 이어서, 배지 및 세포를 유리 피펫을 사용하여 50 mL 원추형 튜브에 옮기고 클러스터를 90 g(rcf)로 3분 동안 원심분리하였다.

[0092]

원심분리 후, 배지를 흡인하고, 세포를 온화하게 재현탁시키고, 225 내지 240 cm²의 총 평면 배양물(1개의 T225 플라스크 또는 4개의 10 cm 디쉬에 상당함, 대략 9000만개의 세포)당 10 μM Y-27632를 함유하는 mTeSR[®]1 배지 12 mL 중에서 짧은 시간에 분쇄하였다. 이어서, 10 μM Y-27632를 갖는 2 mL/웰의 새로운 mTeSR[®]1 배지가 담긴 초저결합 배양 6웰 디쉬(코닝 인코포레이티드, 카탈로그 번호 3471, 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 세포 현탁액을 옮겼다. 이러한 방식으로 리프팅된 세포는 단층의 단편들과 유사하였는데, 이때 리프팅된 단편들의 평균 직경은 약 20 내지 30 마이크로미터였으며(도 1a), 각각의 단편은 세포의 군집으로 이루어졌다. 이들 단층 단편을 2시간 동안 현탁 상태로 인큐베이션하였으며(인큐베이션 시간은 0.5 내지 4시간의 범위일 수 있음), 이 시점에서 단편의 응집체가 관찰되었다. 이어서, 응집체를 10 ml 유리 피펫으로 짧은 시간에 분쇄하고, 하룻밤 인큐베이션(응집체는 현탁 상태로 직접 진행될 수 있음)을 저결합 플레이트 내에서 행하였다(응집체는 또한 비처리

된 세포 배양 플라스틱 및 표준 조직 배양물 처리된 플라스틱 내에서 인큐베이션될 수 있다).

- [0093] 하룻밤 인큐베이션(18 내지 24시간) 후, 세포 및 배지를 50 rpm(30 내지 80+ rpm의 범위일 수 있음)으로 교반되는 25 mL의 mTeSR®1 배지가 담긴 125 mL 스피너 플라스크(코닝 인코포레이티드, 카탈로그 번호 4500-125, 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 직접 옮겨서 대략 75 mL의 최종 부피를 만들었다. 배지를 4일 동안 매일 교체하였다. 만능성을 배양물 중에 있는 지 4일 후에 측정하였으며, 유세포측정법의 결과는 분화 마커(CXCR4)는 거의 발현하지 않으면서 만능성 마커(CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81)에 대해서는 고 발현을 나타내었다. 도 1b를 참조한다. 이들 데이터는, 세포 리프팅제로서 디스파제[®]를 사용하여 평면 부착성 배양 포맷으로부터 현탁 배양물로 H1 hES 세포가 세포 클러스터로서 성공적으로 옮겨지고 교반(동적) 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지할 수 있음을 보여준다. 이 실시예는 또한 교반 현탁 시스템보다는 오히려 플레이트 및 삼각 플라스크를 사용하는 진탕 현탁 시스템 내에서 비견되는 결과로 수행될 수 있다.
- [0094] 현탁 배양물 중에 있는 지 4일 후(분화는 또한 응집체의 형성 후 24 내지 120시간째에 개시될 수 있으며, 바람직하게는 분화 개시 전 2 내지 3일 동안 배양할 수 있음)에, 만능 세포 응집체를 배지 성분들의 단계적 진행으로 분화시켜, 체장 운명을 형성하도록 세포를 유도하였다. 응집체의 분화를 위해 스피너 교반을 65 rpm의 속도로 높였다. 배지 및 성분이 표 1a에 나타나 있다.
- [0095] 1기 말기에, 샘플에 대해 세포측정법 및 PCR을 실시하였다. 현탁 분화된 배양물은 1기 말기에 느슨한 응집체로 균일하고 균질한 세포 집단을 형성하였는데(도 1c), 이때 만능성 마커(CD9)의 발현은 거의 제거되었으며, 한편 완성 내배엽 분화 마커는 매우 높아서, CXCR4(CD184)에 대해서는 97.2%가 양성이고 CD99에 대해서는 97.3%가 양성이었다(도 1d). 이들 결과는 미분화된 WA01 hES 세포와 대비하여, 만능성 유전자(CD9, NANOG, 및 POU5F1/OCT4)의 발현에 있어서는 급격한 감소를 그리고 완성 내배엽과 관련된 유전자(CXCR4, CERBERUS, GSC, FOXA2, GATA4, GATA6, MNX1, 및 SOX17)에 있어서는 큰 증가를 보여준 qRT-PCR 결과와 상관되었다(도 1e).
- [0096] 이어서, 완성 내배엽 클러스터를 TGF- β 패밀리를 구성원인 GDF8을 제거하고, FGF7을 배지에 첨가함으로써 원시 전장을 향해 추가로 분화시켰다. 클러스터를 FGF7과 함께 3일 배양 후, 고 글루코스(25 mM) 및 저농도의 지질 풍부 소혈청 알부민(알부맥스[®](라이프 테크놀로지스 코퍼레이션(Life Technologies Corporation), 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재))을 함유하는 배지 또는 상대적으로 낮은 글루코스 농도(8 mM) 및 2% 무지방산 소혈청 알부민을 함유하는 배지에 올(a11)-트랜스-레티노산을 첨가함으로써 체장 PDX1 발현 운명으로 클러스터를 분화시켰다. 이들 배지에 대한 성분의 상세한 부가사항은 표 1a에 열거되어 있다. 분화 말기에, 체장 전구세포의 마커의 발현에 대해 샘플을 분석하였다. 조건 - 저 글루코스 + 2% FAF-BSA(A) 또는 고 글루코스 + 0.1% 알부맥스[®](B) - 을 사용하여 분화된 클러스터는 유세포측정법에 의해 측정하였을 때, 기능적 β 세포에 요구되는 전사 인자인 NKX6.1을 고수준으로 그리고 시넵토파이신 및 크로모그라닌과 같은 내분비 체장 마커를 고수준으로 발현한 것으로 관찰되었다(표 1b). 이들 결과는 조건 A 및 조건 B 둘 모두로부터 샘플에서 고수준의 다수의 체장 전구체 유전자가 발현되었음을 보여준 RT-PCR 결과와 일치하였다(데이터는 도시되지 않음).
- [0097] 세포 클러스터들이 분화를 통해 완성 내배엽(DE)(도 1c)으로부터 원시 전장으로 그리고 체장 내배엽(도 1f) 쪽으로 진행됨에 따라 이들의 전형적인 형태는 세포 및 세포 클러스터에 대한 가시적인 형태학적 변화를 보여주었다. 전형적으로, 만능 클러스터는 위상차 현미경법에 의해 조밀하고 어둡게 나타나며, 이어서 2기에서 세포가 원시 전장으로 진행됨에 따라 외관이 더 느슨해진다. 이러한 형태는 올-트랜스-레티노산 처리 후에 역전되고 클러스터는 매끄러운 클러스터 경계를 가지면서 다시 더 조밀해지고 균일해진다.
- [0098] 4기까지 조건 B에 따라 분화된 세포를 ALK5 억제제를 함유하는 5기 배지 중에 추가 5일 동안 유지하였다(표 1c 참조). 배양물 중에서 이러한 추가의 성숙은 내분비 마커 발현에 있어서 유의한 증가를 가져왔다: INS, GCG, SST, PPY, 및 PCSK1. 이어서, 세포 클러스터를 IACUC 승인된 연구 프로토콜에 따라 SCID-Bg 마우스의 신장 피막 내로 이식하고, 절식 상태/급식 상태에서의 C-펩타이드를 매 2 내지 4주마다 측정하면서 20주 동안 마우스를 추적하였다. 이식 후 4주째에, 20시간 절식 그리고 이어서 글루코스 자극 후에, C-펩타이드는 검출되지 않았다. 6주째까지, 5 마리의 마우스 중 2 마리는 인간 C-펩타이드에 대해 약간(0.087 및 0.137 ng/mL) 양성을 나타내었으며, 10주째까지, 5 마리의 마우스 중 5 마리가 C-펩타이드에 대해 양성(0.085 내지 0.291 ng/mL)이었다. 16주째에, 20시간 절식 및 글루코스 자극 후에, 모든 4 마리의 마우스(4/4)가 C-펩타이드 발현에 대해 양성(0.377 내지 3.627 ng/mL)이었다.
- [0099] 이들 결과는 만능 세포 응집체가 형성되고, 이어서 현탁 배양물 중에서 분화되어, PDX1 및 NKX6.1과 같은 β 세포 전사 인자의 발현을 특징으로 하는 체장 전구세포 집단을 생성할 수 있음을 나타낸다. 더욱이, 생체내에 이식하여 성숙되게 한 분화된 세포 클러스터는 글루코스 시험투여(challenge)에 따라 인슐린을 생리학적으로 적절

한 수준으로 발현하였다.

[0100] [표 1a]

분화 프로토콜

	1기	2기	3기	4기
기본 배지 (최종 글루코스 농도)	MCDB131 8 mM 글루코스		MCDB131 8 mM 글루코스(A) 또는 25 mM 글루코스(B)	
단백질 보충물	2% 부지방산 소혈청 알부민(FAF-BSA) 및 2 mM L-글루타민		2% 부지방산 소혈청 알부민(FAF-BSA) 및 2 mM L-글루타민(A) 또는 0.1% 알부맥스(소혈청 알부민) 및 2 mM L-글루타민(B)	
성장 인자 및/또는 소분자	0 내지 24 시간 동안 MCX (3 μM) 0 내지 96 시간 동안 GDF8 (100 ng/mL) ITS- X(1:50,000)	FGF7(50 ng/ml) ITS-X(1:50,000)	FGF7(50 ng/ml) ITS-X(1:200) RA(2 μM) SANT(0.25 μM) AA(5 ng/mL) LDN(100 nM)	ITS-X(1:200) SANT(0.25 μM) Cypi(100 nM) TppB(500 nM) LDN(100 nM)
총 일수	4	3	4	5
배지 교체	매 24 시간마다	매 24 시간마다	매 24 시간마다	매 24 시간마다

[0101]

[0102] [표 1b]

선택된 분화 마커에 대한 유세포측정법의 결과

글루코스 (샘플)	BSA	% NKX6.1	% CDX2	% 인슐린	% 시넵토파이신	% 크로모그라닌
저 (A)	2% FAF BSA	55	7	5.5	34.5	26.5
고 (B)	0.1% 알부맥스	48	7	0.5	26.9	30

[0103]

[0104] [표 1c]

분화 프로토콜

	5기
기본 배지 (최종 글루코스 농도)	MCDB131 (25 mM 글루코스)
단백질 보충물	0.1% 알부맥스*(소혈청 알부민) 및 2 mM L-글루타민
성장 인자 및/또는 소분자	ITS-X(1:200) Cypi(100 nM) LDN(100 nM) ALKVi(10 mM)
총 일수	5
배지 교체	매 24 시간마다

[0105]

[0106] 실시예 2

[0107] EDTA에 의한 세포주 H1의 인간 배아줄기세포의 현탁 및 클러스터링

[0108] 41회째 계대배양의 인간 배아줄기세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 세포를 PBS(카탈로그 번호 14190, 인비트로젠)로 1회 세척하고 비효소적 세포 리프팅/계대배양제인 EDTA(론자(Lonza), 카탈로그 번호 17-7-11E)로 처리하였다. 세포를 실온에서 8분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, EDTA를 제거하고 추가 1

분 또는 2분(총 EDTA 노출 시간은 9 내지 10분임) 후에, 플레이트를 10 μ M Y-27632(약소라 카탈로그 번호 ALX-270-333, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)를 함유하는 mTeSR®1로 행구고, 이탈된(dislodged) 세포를 유리 피펫을 사용하여 50 ml 원추형 튜브 내에 수집하였다. 10 μ M Y-27632를 함유하는 mTeSR®1 배지로 플레이트에 1 회의 추가 행굼을 수행하고 이탈된 세포와 혼주하였다(pooled). 일부 세포가 실온에서 EDTA에 대한 9 내지 10 분의 노출 후에 플레이트 상에 남았으며, 리프팅된 세포는 단일 세포 현탁액으로 완전히 분해되지 않았음에 주목한다. 대신, 세포를 작은 응집체로서 표면으로부터 제거하였다. 이어서, 배지 및 세포를 유리 피펫을 사용하여 50 ml 원추형 튜브에 옮기고 세포 카운트를 수행하였다(뉴클레오카운터[®]-케모메텍 에이/에스(ChemoMetec A/S), 카탈로그 번호 YC-T100, 덴마크 소재). 10 μ M Y-27632를 함유하는 추가의 mTeSR®1 배지를 필요에 따라 첨가하여 세포의 농도가 100만 내지 150만개 세포/ml가 되게 하였다.

[0109] 세포는 원심분리하지 않았는데, 클러스터가 느슨하게 응집되어 있어서 만약 원심분리하여 펠렛을 형성하고 피펫으로 재현탁시킨 경우 단일 세포로 분해될 것이기 때문이었다. 대신, 균일한 현탁액이 형성될 때까지, 튜브 내의 배지 및 세포를 온화하게 와동시켰다. 필요하다면, 또한 EDTA 처리의 시간을 연장시켜 단일 세포 현탁액에 가까운 세포를 취할 수 있다. 이어서, 37°C의 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2개의 비-조직 배양물 처리된 6웰 디쉬(백톤 디킨슨(Becton Dickinson), 카탈로그 번호 팔콘(Falcon) 351146, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)에 유리 피펫을 사용하여 3 ml/웰로 세포 현탁액을 옮겼다. 세포를 2시간 동안 현탁 상태로 인큐베이션하였으며, 이 시점에서 응집체가 관찰되었다. 이어서, 응집체를 유리 피펫으로 온화하게 피펫팅함으로써 분쇄하여 큰 응집체를 파괴하여 균질하고 균일한 클러스터 현탁액을 생성하였으며, 이어서 하룻밤 교란되지 않은 상태로 인큐베이션하였다.

[0110] 이어서, 18 내지 24시간 후에, 세포 및 배지를 50 mL 원추형 튜브 내에서 90 g(rcf)로 3분 동안 스핀 다운(spin down)시켰다. 폐배지 상층액(spent media supernatant)을 폐기하고, 세포 응집체를 새로운 mTeSR®1 중에 현탁시키고 현탁액을 37°C의 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 55 rpm으로 교반되는 스피너 플라스크(코닝 인코포레이티드, 카탈로그 번호 4500-125, 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 옮겼다. 배지를 2일 동안 매일 교체하였다. 분화 배양물로의 전이 전에, 교반된 현탁 배양물 중에 있는 지 2일 후에 만능성을 측정하였다. CD9, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CXCR4 발현에 대한 유세포측정법의 결과가 도 2a에서 산포도(scatter plot) 포맷으로 나타나 있다. 이들 데이터는 만능성 마커(CD9, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81)에 대한 고 발현 및 분화 마커(CXCR4)의 저 발현 또는 비발현을 나타낸다. 이들 결과는 비효소적 리프팅 방법을 사용하여 평면 부착성 배양 포맷으로부터 현탁 배양물로 H1 hES 세포가 옮겨져서 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지할 수 있음을 나타낸다.

[0111] 현탁 배양물 중에 있는 지 2일 후에, 만능 세포 응집체를 배지 성분들의 단계적 진행으로 분화시켜, 체장 운명을 형성하도록 세포를 유도하였다. 스피너 교반을 55 rpm의 속도로 유지하였다. 배지 및 성분들이 표 2a에 나타나 있다.

[0112] 1기 말기에, 샘플에 대해 세포측정법 및 PCR을 실시하였다. 현탁 분화된 배양물은 1기 말기에 느슨한 응집체로 균일하고 균질한 세포 집단을 형성하였는데(도 2b), 이때 만능성 마커(CD9)의 발현은 거의 제거되었으며, 한편 완성 내배엽 분화 마커인 CXCR4(CD184)는 3개의 스피너 플라스크에 걸쳐 매우 높아서 95.9% \pm 1.8 SD였다(도 2c). 이들 결과는 미분화된 WA01 hES 세포와 대비하여, 만능성 유전자(CD9, NANOG, 및 POU5F1/OCT4)의 발현에 있어서는 급격한 감소를 그리고 완성 내배엽과 관련된 유전자(CXCR4, CERBERUS, GSC, FOXA2, GATA4, GATA6, MNX1, 및 SOX17)에 있어서는 큰 증가를 보여준 qRT-PCR 결과와 상관되었다(도 2d).

[0113] 이어서, 스피너 플라스크로부터의 완성 내배엽 클러스터를 혼주하고 다른 스피너 플라스크 또는 삼각 플라스크(진탕 교반 시스템)에 분배하였으며, 그리고 GDF8을 제거하고 FGF7을 배지에 첨가함으로써 원시 전장을 향해 추가로 분화되도록 유도하였다. 클러스터를 FGF7과 함께 3일 배양 후, 상대적으로 낮은 글루코스 농도(8 mM) 및 2% 무지방산 소혈청 알부민을 함유하는 배지에 올-트랜스-레티노산을 첨가함으로써 체장 PDX1 발현 운명으로 클러스터를 분화시켰다. 이들 배지에 대한 성분의 상세한 부가사항은 표 2a에 열거되어 있다. 분화 말기에, 체장 전구세포의 마커의 발현에 대해 샘플을 분석하였다. 유세포측정법을 사용하여, 두 현탁 포맷 모두에 대해, 기능적 β 세포에 요구되는 전사 인자인 NKX6.1이 고수준이고, 시넵토피신 및 크로모그라닌과 같은 내분비 체장 마커가 고수준인 것으로 관찰되었다(표 2b 및 도 2e). 이들 결과는 스피너 플라스크 포맷 또는 삼각 플라스크 포맷에서 생성된 샘플에서 매우 유사한 고수준의 다수의 체장 전구체 유전자가 발현되었음을 보여준 RT-PCR 결과와 일치하였다(도 2f).

[0114] 이들 결과는 만능 세포 응집체가 형성되고, 이어서 교반 시스템 또는 진탕 현탁 시스템을 포함한 다수의 현탁 배양 포맷으로 현탁 배양물 중에서 분화되어, PDX1 및 NKX6.1과 같은 β 세포 전사 인자의 발현을 특징으로 하는 췌장 전구세포 집단을 생성할 수 있음을 보여준다.

[0115] [표 2a]

배지 성분 및 분화 프로토콜

	0 기	1 기	2 기	3 기	4 기
기본 배지	mTeSR*1	MCDB131 (8 mM 글루코스) 3.64 g/L NaCO ₃		MCDB131 (8 mM 글루코스) 2.41 g/L NaCO ₃	
보충물	mTeSR*1	2% FAF-BSA 1:50,000 ITS-X 1x 글루타맥스		2% FAF-BSA 1:200 ITS-X 1x 글루타맥스	
성장 인자		GDF8(d2 예민) 100 ng/ml	FGF7 50 ng/ml	FGF7 50 ng/ml	
소분자	Y-27632 (1 일제에만) [10 μM]	MCX (0 내지 24 시간) [2 μM]		RA[2 μM] SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM] LDN(1 일제에만)[100 nM]	SANT[0.25 μM] Cyp[100 nM] ALK5 억제제[1 μM] TPPB[100 nM]
일수	3	3	3	3	3
주:	1 d NTCT 2 일 SF	1 및 2 일제에 배지 교체, d3에 교체 없음	1 및 3 일제에 배지 교체, d2에 교체 없음	1 및 2 일제에 배지 교체, d3에 교체 없음	d1 및 d2에 배지 교체, d3에 교체 없음

[0116]

[0117] [표 2b]

선택된 분화 마커에 대한 유세포측정법의 결과

샘플	% NKX6.1	%CDX2	%SOX2	%NKX2.2	%시넵토포아신	%크로모그라닌
스피너 플라스크(평균)	68.1	4.0	31.3	36.2	27.0	25.3
삼각 플라스크	65.8	7.9	28.1	30.0	30.7	17.0

[0118]

[0119] 실시예 3

[0120] 세포주 H1의 인간 배아줄기세포의 현탁 클러스터링 및 연속 현탁 계대배양

[0121] 매트리지엘(Matrigel)®(코닝 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 코닝 소재)로 코팅된 조직 배양물 처리된 폴리스티렌 상에서 성장된 40회계 계대배양의 인간 배아줄기세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 세포를 PBS(카탈로그 번호 14190, 인비트로젠)로 2회 세척하고 아큐타제®의 1/2 농도 용액(아큐타제® 1부에 대해 PBS 1부, 시그마-알드리치, 카탈로그 번호 A-6964, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)으로 처리하였다. 세포를 실온에서 3.5분 동안 인큐베이션하였다. (아큐타제®는 콜라겐분해성 및 단백질분해성 효소(갑각류로부터 단리됨)로 구성된 세포 탈착 용액이고 포유류 또는 세균 유래 생성물을 함유하지 않는다.) 이어서, 아큐타제®를 제거하고 추가 3분(총 아큐타제® 노출 시간은 6.5분임) 후에, 플레이트를 10 μM Y-27632를 함유하는 mTeSR®1 배지로 행구고, 이탈된 세포를 유리 피펫을 사용하여 50 ml 원추형 튜브 내에 수집하였다. 10 μM Y-27632를 함유하는 mTeSR®1 배지로 플레이트에 1회의 추가 행금을 수행하고 이탈된 세포와 혼주하였다. 일부 세포가 아큐타제®에 대한 노출 후에 플레이트 상에 남았으며, 리프팅된 세포는 단일 세포 현탁액으로 완전히 분해되지 않았다. 오히려, 세포를 작은 응집체로서 표면으로부터 제거하였다(도 3a). 이어서, 배지 및 세포를 유리 피펫을 사용하여 50 ml 원추형 튜브에 옮기고 세포 카운트를 수행하였다. 10 μM Y-27632를 함유하는 추가의 mTeSR®1 배지를 필요에 따라 첨가하여 세포의 농도가 100만 내지 150만개 세포/ml가 되게 하였다.

[0122] 세포는 원심분리하지 않았는데, 클러스터가 느슨하게 응집되어 있어서 만약 원심분리하여 펠렛을 형성하고 피펫으로 재현탁시킨 경우 단일 세포로 분해될 것이기 때문이었다. 대신, 균일한 현탁액이 형성될 때까지, 튜브 내의 배지 및 세포를 온화하게 와동시켰다. 이어서, 37°C의 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 2개의 초저결합 배양 6웰 디쉬에 유리 피펫을 사용하여 3ml/웰로 세포 현탁액을 옮겼다. 세포를 90분 동안 현탁 상태로 인큐베이션하였으며, 이 시점에서 응집체가 관찰되었다. 이어서, 응집체를 짧은 시간에 분쇄하고, 55 rpm으로 교반되는 25 ml mTeSR®1 배지가 담긴 125 ml 스피너 플라스크에 직접 옮겼다(총 최종 부피는 대략 75 mL였음). 배지를 3일 동안 매일 교체하고, 배양물 중에 있는 지 3일째에 만능성을 측정하였다. 클러스터의 위상차 현미경 영상

은 정치 현탁 배양물 중에 있는 지 90분 후에 형성되어 배양물 중에서 3일에 걸쳐 증폭된 클러스터의 균일한 구형 집단을 나타낸다(도 3b). 현탁 배양물 중에 있는 지 3일째의 말기에, 마커 CD9, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CXCR4에 대한 유세포측정법의 결과에 의해 만능성에 대해 세포를 검정하였다. 세포는 만능성 마커(CD9, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81)의 고 발현을 유지하였으며, 분화 마커인 CXCR4에 대해서는 거의 발현을 유지하지 않았다(표 3). 이들 데이터는 효소적 리프팅 방법, 예컨대 아큐타제[®]를 사용하여 평면 부착성 배양 포맷으로부터 현탁 배양물로 H1 hES 세포가 옮겨질 수 있으며, 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능성을 유지할 것임을 나타낸다.

[0123] 이어서, 만능성 클러스터를 추가 20회의 계대배양 동안 아큐타제[®] 해리를 사용하여 연속 계대배양시켰다. 각각의 계대배양에서는, 5000만개의 세포를 50 ml 원추형 튜브 내에 2분 동안 중력 정착시키고, PBS로 2회 세척하고, 37°C 수욕에서 아큐타제[®]의 1/2 농도 용액으로 처리하였는데, 이때 아큐타제[®]의 첨가 후 2분 및 4분째에 튜브를 온화하게 와동시켰다. 6분의 인큐베이션 후에, 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 아큐타제[®]를 튜브로부터 흡인하였다. 이어서, 세포를 추가 3분(총 아큐타제[®] 노출 시간은 9분임) 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 튜브를 10 μM Y-27632를 함유하는 mTeSR[®]1 배지로 행구고, 유리 피펫을 사용하여 2회 분쇄하고, 현탁된 세포를 70 마이크로미터 세포 여과기(비디 팔콘(BD Falcon), 카탈로그 번호 352350, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)에 통과시켰다. 10 μM Y-27632를 함유하는 mTeSR[®]1 배지로 튜브에 2회 추가 행균을 수행하고 세포 여과기에 통과시켰다.

[0124] 균일한 현탁액이 형성될 때까지, 튜브 내의 배지 및 세포를 온화하게 와동시켰다. 이어서, 37°C의 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 초저결합 배양 6웰 디쉬에 유리 피펫을 사용하여 3 ml/웰로 세포 현탁액을 옮기고, 2시간 동안 현탁 상태로 인큐베이션하였으며(0 내지 28시간 시험함), 이 시점에서 80 ml의 최종 부피의 배지가 담긴 유리 스피너 플라스크에 응집체를 옮겼다. 대안적으로, 세포 현탁액은 55 rpm으로 교반되는 스피너 플라스크 또는 40 rpm으로 진탕되는 삼각 플라스크 내에 직접 넣을 수 있었으며, 80 ml의 최종 부피의 배지 중의 교반된 현탁액 중에서 클러스터가 형성되었다(도 3c).

[0125] 이러한 연속 계대배양 방법을 사용하여, 세포를 20회 계대배양하였는데, 이때 각각의 계대배양에서는 대략 1:3의 분할비를 사용하였다. 만능성을 유세포측정법에 의해 각각의 계대배양에서 측정하고 핵형을 염색체 12 및 17에 대해 형광 계내 혼성화(florescent *in-situ* hybridization, FISH) 검정을 사용하여 결정하였으며; 2개의 염색체는 hES 세포에서 잠재적으로 불안정한 것으로 확인되었다. CD9, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CXCR4 발현에 대한 유세포측정법의 결과는 산포도 포맷으로 나타나 있고 만능성 마커에 대한 고 발현 및 분화 마커(CXCR4)의 저 발현 및 비발현을 나타내었으며, 한편 염색체 12 및 17에 대한 FISH 검정은 정상 카피수(copy number)를 나타내었다. 이들 데이터는 H1 hES 세포가 비포유동물의 효소적 세포 해리 방법인 아큐타제[®]를 사용하여 일상적인 연속 계대배양을 행하면서 현탁 배양물 중에서 유지될 수 있으며, 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 만능성 및 안정한 핵형을 유지하여, 20회의 계대배양의 과정에 걸쳐 원래의 투입 세포당 1×10⁹개의 세포를 생성할 것임을 나타낸다. EDTA가 또한 6회의 계대배양 동안 이러한 연속 현탁에 사용될 수 있다.

[0126] [표 3]

마커 CD9, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 CD184 (CXCR4)에 대한 결과에 기초한 시간의 함수로서의 세포의 만능성에 대한 유세포분석법

계대배양 (배양일)	CD9	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81	CD184
1 (3)	92.0%	100.0%	57.4%	58.6%	0.2%
2 (4)	73.3%	99.9%	63.5%	54.3%	0.1%
3 (3)	87.5%	99.7%	65.8%	63.6%	0.1%
4 (4)	86.7%	99.8%	60.9%	68.2%	0.1%
5 (3)	79.3%	99.7%	67.6%	69.9%	0.3%
6 (3)	79.3%	99.7%	67.6%	69.9%	0.3%
7 (3)	93.7%	100.0%	60.1%	58.8%	0.2%
8 (3)	83.0%	99.0%	73.0%	68.0%	0.5%
9 (4)	94.6%	100.0%	65.5%	64.2%	0.1%
10 (4)	96.3%	100.0%	77.3%	75.0%	0.2%
11 (4)	97.3%	100.0%	69.1%	61.3%	0.2%
12 (4)	91.6%	100.0%	56.9%	62.7%	0.6%
13 (4)	97.3%	99.9%	62.9%	63.2%	0.2%
14 (4)	97.1%	100.0%	71.1%	82.4%	1.0%
15 (4)	96.1%	99.6%*	79.0%	74.2%	0.2%
16 (4)	87.7%	99.9%	77.1%	72.5%	0.3%
17 (4)	98.6%	99.7%	69.9%	57.7%	0.3%
18 (4)	97.7%	100.0%	68.6%	56.6%	0.2%
19 (4)	97.1%	100.0%	79.4%	70.4%	0.1%
20 (4)	96.9%	100.0%	57.4%	55.7%	0.4%

[0127]

[0128]

실시예 4

[0129]

세포주 H1의 현탁 배양된 인간 배아줄기세포의 유도 분화

[0130]

40회째 계대배양의 인간 배아줄기세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 세포를 아큐타제[®]를 사용하여 평면 부착성 배양물로부터 리프팅시키고 현탁 배양 포맷으로 옮겼다. 실시예 3에 기술된 방법을 사용하여 30회의 계대배양 동안 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 세포를 유지하였다.

[0131]

표 3에 나타난 바와 같이 처음 20회의 계대배양을 통해 만능성을 확인하였는데, 유세포측정법에 의해 측정된 바와 같이, 안정한 고수준의 만능성 마커가 배양 전체에 걸쳐 유지되었다. 만능성을 확인하고 당뇨병 치료용 세포 공급원을 제공하는 능력을 보여주기 위해, 정상 췌장 발생을 반복하도록 의도된 모르포겐 또는 성장 인자를 함유하는 상이한 배지의 단계적 진행을 통해 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 세포를 췌장 전구체로 분화시켰다. 이 과정은 고 PDX1 및 NKX6.1 동시발현(co-expression)을 특징으로 하는 췌장 전구세포 집단을 발생시킨다. 이들 세포를 이식하였을 때, 이들은, 글루코스에 따라 인슐린을 분비할 수 있는 기능적 글루코스 자극 인슐린 분비 조직으로 추가로 성숙되어 스트렙토조토신 유도 당뇨병 모델에서 정상의 혈당을 유지하였다. 도 4c 및 표 4c를 참조한다.

[0132]

이들 췌장 전구세포를 생성하기 위하여, 16회의 계대배양 동안 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 증폭시키고 유지한 H1 인간 배아줄기세포를 실시예 3에 기술된 방법을 사용하여 분화시켰다. 요약하면, 세포를 30회의 계대배양 동안 증폭시키고, 이들 계대배양의 처음 20회 동안에는 만능성에 대해 시험하였으며; 세포를 16번째 계대배양 시에 분화시켰다. 클러스터 포맷의 만능 세포를 mTeSR[®]1 배지로부터 FBC 용액(표 4a)으로 4°C에서 3시간 동안 옮겨 두었다. 이어서, 세포 클러스터를 사르토리우스 스테딤 바이오스택(Sartorius Stedim Biostat) B-DCU(독일 괴팅엔 소재) 제어 유닛에 의해 조절된 3 리터 유리 현탁 생물반응기로 이동시켜서 표 4b에 따라 55 만개 세포/mL로 분화 배지 중에 현탁시켰다. 온도, pH, 및 용존 산소(DO)에 대해 조절된 폐쇄된 멸균 현탁 생물반응기(펄프로브(FermProbe)[®] pH 전극 225 mm, 모델 번호 F-635, 및 용존 산소 옥시프로브(OxyProbe)[®] 12 mm 센서, 모델 번호 D-145, 미국 캘리포니아주 어바인 소재의 브로드리-제임스 코퍼레이션(Broadley-James Corporation)으로부터 입수됨) 내에서 세포를 14일 유지하였다.

- [0133] 이 실시 내내, 1.6 리터 이하의 총 배지 부피에서 CO₂ 유동의 조절에 의해 pH를 pH 7.4로 유지하면서, 배지 중 탄산염 수준을 3.64 g/L로 유지하였다. 150 cc/min의 일정 가스 유동으로, 1기에 대해서는 20% 용존 산소 설정점을 그리고 2기 이후에 대해서는 30% 용존 산소 설정점을 갖는 사르토리우스 제어 시스템의 제어 하에서 생물 반응기의 헤드스페이스에 CO₂, 공기, 및 O₂를 관류시켰다. 산소 유동은 용존 산소 함량에 따라 조절하고, CO₂ 유동은 pH에 따라 조절하였다. 온도는 전기 가열식 재킷에 의해 실시 내내 37°C로 유지하였다. 실시 개시 시에 그리고 각각의 배지 교체 동안(교체 시마다 배지의 93%가 제거됨), 임펠러(3" 스테인리스 강 피치 블레이드 임펠러가 70 rpm으로 작동됨)를 정지시키고, 테루모(Terumo)TM 튜브 용접기를 사용하여 C-플렉스(C-Flex)[®] 튜빙에 연결된 생물반응기 내의 딥 튜브(dip tube)를 통해 연동 펌프에 의해 배지를 제거하거나 첨가하여 폐쇄된 시스템을 유지하였다. 세포/클러스터의 영상을 각각의 분화 단계의 말기에 촬영하고, 유세포측정법 샘플을 수집하여 1기 3일째에 그리고 3일 후인 2기 말기에 CXCR4 발현에 대해 검정하였다(도 4a). 분화의 개시(표 3, 16 회째 계대배양) 시에 CXCR4 음성 만능 세포 집단으로부터의 CXCR4를 발현하는(98.5%의 세포가 CXCR4 양성임, 도 4b) 세포의 집단으로의 거의 완전한 집단 전이가 관찰되었다. 이어서, 이들 세포는 3일 후인 2기 말기에 거의 CXCR4가 음성인 상태(7.0%의 세포가 CXCR4 양성임)로 전이하였으며, 3기 말기까지 세포는 CD56 양성 단계로 거의 완전하게 전이하였다. 4기 4일째의 분화 과정의 말기에, 세포는 PDX1 발현에 대해 88.5%가 양성이었으며(도 4b), 췌장 내분비 세포(33.5%가 크로모그라닌 양성임) 및 췌장 선조세포(65.7%가 NKX6.1에 대해 양성임)의 혼합물과 일치하는 발현 패턴을 나타내었다. 이러한 단계 특이적인 마커 발현 패턴은 만능성 집단으로부터 췌장 세포로의 효율적인 단계적 분화를 나타내었다. 분화 과정의 말기에, 277만개 세포/mL를 생성하였는데(1.5 리터 중 41억개의 세포), 이는 각각의 투입 hES 세포당 5개의 분화된 세포의 총 질량 증폭을 나타낸다.
- [0134] 실시 말기에, 500 mL를 원심분리 및 세척을 위하여 회수하여 생착, 성숙, 및 기능의 동물 모델에서 시험하였다. 나머지 1000 mL의 세포 현탁액을 kSep[®] 400 시스템(케이비아이 바이오시스템즈(KBI Biosystems), 미국 노스캐롤라이나주 더럼 소재) 내에서 처리하여 완전 폐쇄 루프 시스템으로 세포 생성물을 세척하고, 여과하고, 농축시켰다. 세포 생성물을 1 리터의 출발 부피로부터 4100만개 세포/mL의 최종 농도의 50 mL의 농축된 세포로 농축시켰다. 이어서, 이들 농축된 세포를 자동화 바이알 충전기(필-잇(Fill-It), TAP, 영국 허트포드셔 소재)를 사용하여 1.2 mL의 충전 부피를 갖는 24개 바이알에 분배하고 액체 질소 동결기 내로 넣어서 동결시켰다.
- [0135] 세척하여 표준 원심분리로 농축시킨 500 mL의 분화된 세포를 SCID-Bg 마우스당 500만개의 세포의 투여량으로 이식시켰는데, 신장 피막 바로 아래에 두거나, 면역-보호성 거대 캡슐화 장치(미국 캘리포니아주 어바인 소재의 테트라사이트TM) 내부에 넣어서 피하 이식시켰다(조건당 6마리의 동물). 이식 후 12주째까지, 이식된 세포는 절식 및 이후의 급식에 따라 ELISA(인간 C-펩타이드 주문제작 ELISA 메르코디아(Mercodia) 카탈로그 번호 10-1141-01)에 의해 검출하였을 때 유의한 수준의 순환 인간 C-펩타이드(0.1 ng/mL 초과)를 발현하였고, 16 내지 20주까지 동물은 1 ng/mL를 초과하는 순환 C-펩타이드를 가졌다(표 4c).
- [0136] 이식 후 27주(190일)째에, 장치에 의해 캡슐화된 면역-보호된 이식편을 갖는 2마리의 동물을 단회 고용량의 스트렙토조티신(STZ)으로 각각 처리하여 모든 내인성 마우스 β 섬 세포를 선택적으로 사멸시켜 당뇨병을 유도하였다(250 mg/Kg). 대조군 동물에서 임상적으로 확실한 당뇨병을 유도하는 데 충분한 STZ 처리 후 그 다음 2주 동안, 생착된 동물의 혈당 수준은 정상 범위(150 mg/dL 미만) 내로 유지되었다. 이어서, 이식 후 29주째에 그리고 STZ 투여 후 2주째에, 2 마리의 동물을 글루코스 자극 인슐린 분비(GSIS)에 대해 시험하였으며, 글루코스 투여에 따라 순환 인간 C-펩타이드에 있어서 현저한 증가를 나타내었다. 더욱이, 이식편 각각을 이식 후 209일째(29.5주째)에 제거하였을 때, 동물의 혈당 수준은 500 mg/dL 초과까지 급격히 증가하였다.
- [0137] 이들 결과는 당뇨병을 치료하기 위한 인간 배아줄기세포 유래 세포 생성물이 증폭 및 분화된 줄기세포의 현탁으로부터 제조될 수 있음을 보여준다. 생성물은 스케일 조정가능한 교반 폐쇄 루프 생물반응기 시스템 내에서 생성될 수 있으며, 세포 생성물은 시판되는 cGMP 제조를 위해 필요에 따라 폐쇄 루프 세척 및 농축으로 처리될 수 있다. 이러한 인간 배아줄기세포 유래 세포 생성물은 GSIS 컴피턴스(competence), 혈당 조절 능력, 및 세포 요법의 제거 시의 당뇨병 상태로의 복귀에 의해 보여지는 바와 같이 광범위하게 사용된 당뇨병 동물 모델에서 당뇨병을 치료할 수 있다.

[0138] [표 4a]

FBC 용액의 조성

성분	양(mg/L)	기능	등급
텍스트로스, 무수 형태	901	당	USP ^a
염화칼륨	559	염	USP
중탄산나트륨	2000	완충액	USP
수크로스	6846	당	USP
만니톨	3644	당 알코올	USP
염화칼슘 2 수화물(CaCl ₂ ·2H ₂ O)	70	염	USP
염화마그네슘(MgCl ₂ ·6H ₂ O)	1017	염	USP
중탄산칼륨(KHCO ₃)	500	완충액	USP
일인산칼륨(KH ₂ PO ₄)	1361	완충액	NF ^b /FCC ^c
락토비온산	35830	세포 안정화제	NA ^d
L-글루타티온	922	산화방지제	NA
HCl	pH를 조절하기 위한 양	산	ACS ^e
수산화나트륨	pH를 조절하기 위한 양	염기	NF/FCC
주사용수(WFI)	용액을 제조하기 위한 양	용액 제조	USP

^a USP = 미국 약전(United States Pharmacopeia)

^b NF = 국민 처방집(National Formulary)

^c FCC = 미국 식품화학물질 규격집(Food Chemicals Codex)

^d NA = 해당 없음

^e ACS = 미국 화학회(American Chemical Society)

[0139]

[0140] [표 4b]

배지 성분 및 분화 프로토콜

	1 기	2 기	3 기	4 기
기본 배지 (최종 글루코스 농도)	MCDB131 3.64 g/l NaCO ₃ (8 mM 글루코스)			
단백질/아미노산 보충물	2% 부지방산 소혈청 알부민(FAF-BSA) 및 2 mM L-글루타민			
성장 인자 및/또는 소분자	0 내지 24 시간 동안 MCX(3 μM) 24 내지 72 시간 동안 GDF8(100 ng/mL) ITS-X(1:50,000)	FGF7(50 ng/ml) ITS-X(1:50,000)	FGF7(50 ng/ml) ITS-X(1:200) RA(2 μM) SANT(0.25 μM) AA(5 ng/mL) TppB(200 nM) 0 내지 24 시간 동안 LDN(100 nM) 3 기	ITS-X(1:200) SANT(0.25 μM) Cyp1(100 nM) SCIO(2 μM) TppB(100 nM)
총 일수	3	3	3	5
배지 교체	0 시간째 및 24 시간째	0 시간째 및 48 시간째	0 시간째 및 24 시간째	0 시간째 및 48 시간째 및 96 시간째

(명명법: 0 시간째 = 새로운 단계의 최초 급식; 24 시간째, 48 시간째 또는 96 시간째 = 새로운 단계 배지 후의 시간)

[0141]

[0142] [표 4c]

C-펩타이드 발현(ng/mL)

C-펩타이드(ng/mL)	4 주	8 주	12 주	16 주	20 주	24 주	29 주
신장 피막 이식(N=6)	0.00	0.03	0.19	0.95	2.56		
표준편차	0.00	0.03	0.17	0.71	1.33		
테라사이트 장치 이식(N=6)	0.00	0.02	0.35	0.58	1.45	2.49	2.85
표준편차	0.01	0.01	0.54	0.51	1.02	0.75	0.21

[0143]

[0144] 실시예 5

[0145] 세포주 H1의 부착성 배양된 인간 배아줄기세포의 현탁 포맷에서의 유도 분화

[0146] 41회째 계대배양의 인간 배아줄기세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 세포를, 실시예 2에 기술된 방법을 사용하여, EDTA를 사용하여 평면 부착성 배양물로부터 리프팅시키고 현탁 배양 포맷으로 옮겼다.

[0147] 세포 응집체의 만능성을 도 5a에 나타낸 바와 같이 유세포측정법으로 측정하여 세포가 고도로 만능성임을 나타내는, 만능성 마커 CD9, SSEA4, TRA-1-61, 및 TRA-1-80의 고 발현을 관찰하였다. 이어서, 이들 만능 세포를 정상 췌장 발생의 모르포겐 구동을 반복하도록 의도된 소분자 및 성장 인자를 함유하는 상이한 배지의 단계적 진행을 통해 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 췌장 전구체로 분화시켰다. 이 과정은 췌장 세포 전사 인자인 PDX1 및 NKX6.1의 동시발현을 특징으로 하는 췌장 전구세포 집단을 생성한다. 이들 세포가 이식되는 경우, 이들은 스트렙토조토신 유도 당뇨병 모델에서 고 혈당을 교정할 수 있는 기능적 글루코스 자극 인슐린 분비 조직으로 추가로 성숙된다.

[0148] 췌장 전구세포 집단을 생성하기 위해, mTeSR®1 배지 중에 유지된 클러스터 포맷의 만능 세포를, 제어기 조절된 온도, pH, 및 용존 산소를 갖는 0.2 리터 유리 교반 현탁 생물반응기(다스깁(Dasgip), 카탈로그 번호 DS0200 TBSC, 미국 매사추세츠주 슈루즈버리 소재)에 옮겼다. 만능 세포 클러스터를 생물반응기 내에서 2일 동안 배양하였다. 그 시점에서(1기 0일째), 배지를 교체하고, 세포 응집체가 표 5a에 따라 분화 배지 중에 대략 70만개 세포/mL로 현탁되었을 때 분화를 개시하였다. 이어서, 이 폐쇄된 멸균 현탁 생물반응기 내에서 14일 동안 세포를 유지하였다. 분화 전체에 걸쳐, 0.3 리터의 총 부피에서 CO₂ 유동의 조절에 의해 pH를 7.4로 유지하면서, 배지 중탄산염 수준을 3.64 g/L로 유지하였다. 5 리터/시간의 일정 가스 유동 하에서 30% 용존 산소 설정점을 갖는 다스깁 제어 시스템의 제어 하에서 생물반응기의 헤드스페이스에 CO₂ 및 공기를 스파징하였다(sparged). 공기 유동은 용존 산소 함량에 따라 조절하고, CO₂ 유동은 pH에 따라 조절하였다.

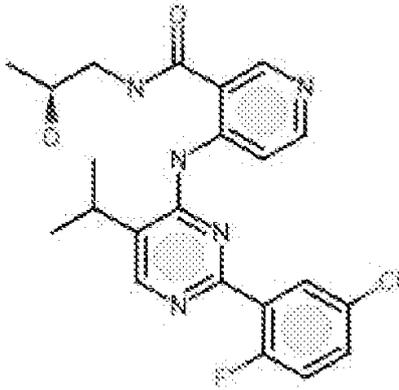
[0149] [표 5a]

배지 성분 및 분화 프로토콜

	1 기	2 기	3 기	4 기
기본 배지 (최종 글루코스 농도)	MCDB131 3.64 g/l NaCO ₃ (8 mM 글루코스)	MCDB131 3.64 g/l NaCO ₃ (8 mM 글루코스)	MCDB131 3.64 g/l NaCO ₃ (8 mM 글루코스)	MCDB131 3.64 g/l NaCO ₃ (8 mM 글루코스)
단백질 보충물	2% 무지방산 소형형 알부민(FAF-BSA) 및 2 mM L-글루타민			
성장 인자 및/또는 소분자	MCX(3 μM) 명시된 바와 같음 GDF8(100 ng/mL) 명시된 바와 같음 ITS-X(1:50,000)	FGF7(50 ng/ml) ITS-X(1:50,000)	FGF7(50 ng/ml) ITS-X(1:200) RA(2 μM) SANT(0.25 μM) AA(5 ng/mL) TppB(200 nM) 0 내지 24 시간 동안 LDN(100 nM) 3 기	ITS-X(1:200) SANT(0.25 μM) Cyp1(100 nM) SCIO(2 μM) TppB(100 nM)
총 일수	3	3	3	5
배지 교체	명시된 바와 같음	0 시간째 및 48 시간째	0 시간째 및 24 시간째	0 시간째 및 48 시간째 및 96 시간째

[0150]

[0151] 이 실시예에 그리고 본 명세서 전체에 걸쳐 사용되는 바와 같이, SCIO는 화학명 4-([2-(5-클로로-2-플루오로페닐)-5-(1-메틸에틸)피리미딘-4-일]아미노)-N-(2-하이드록시프로필)피리딘-3-카르복스아미드이고 CAS 번호 674794-97-9를 갖는 A1k5 억제제이다. SCIO의 화학 구조가 하기에 나타나 있다:



[0152]

[0153]

실시 내내 온도를 37°C로 유지하였다. 실시 개시 시에 그리고 각각의 배지 교체 동안(교체 시마다 배지의 95%가 제거됨), 임펠러를 정지시키고, 테루모™ 튜브 용접기를 사용하여 C-플렉스® 튜빙에 연결된 생물반응기 딥 튜브를 통해 연동 펌프에 의해 배지를 제거하고, 이어서 첨가하여 폐쇄된 시스템을 유지하였다.

[0154]

몇몇 상이한 공급물 세팅을 1기 동안 시험하였다: (a) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 48시간째에는 배지 교체 없음; (b) 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체 및 48시간째에 글루코스 볼루스 첨가; 및 (c) 1기 전체에 걸쳐 배지 교체는 없으면서, 글루코스 및 GDF8 볼루스를 분화 개시 후 24시간째에 첨가하고, 이어서 글루코스 볼루스를 개시 후 48시간째에 첨가함.

[0155]

이 과정의 초기, 중기, 및 말기에서의 세포 카운트를 각각의 반응기에 대해 표 5b에 열거된 바와 같이 얻었다. 1기 말기에, 유세포측정법에 의한 단백질 발현 패턴을 위하여 세포를 샘플링하였다. 조건 A - 완성 내배엽으로의 분화 개시 후 24시간째에 배지 교체, 이어서 그 다음 48시간째에는 배지 교체 없음 - 에서 분화된 세포는 분화 마커(CD99 및 CXCR4)의 유도 및 만능성 마커의 발현(CD9)에 있어서의 감소에 의해 측정된 바와 같이 최상의 결과를 나타내었다(도 5b). 완성 내배엽 형성의 말기에서의 CD9의 더 낮은 발현과 조합된 CXCR4 및 CD99의 더 높은 발현은 체장 유전자의 더 높은 발현, 및 분화에서의 나중의 대안의 기관 운명을 나타내는 유전자의 더 낮은 발현과 상관되었다(도 5d 및 도 5e). 구체적으로, 제1 분화 단계 전체에 걸쳐 배지 교체 없음 또는 대량 급식 포맷으로의 1기에서의 배지에 대한 글루코스의 첨가 중 하나 또는 둘 모두는 1기 말기에 더 낮은 CXCR4 수준을 가져왔으며, 이는 4기 분화의 말기에 매우 상이한 응집체 형태와 상관되었다(도 5c). 구체적으로, 조건 B 및 조건 C는 유세포측정법에 의해 측정하였을 때, 4기 말기에 더 낮은 체장 유전자 발현(NKX6.1 및 CHGA) 및 비-체장 유전자(CDX2 및 SOX2)의 더 높은 발현을 가졌다(도 5d 및 표 5b). 이들 결과는 qRT-PCR에 의해 입증되었는데(도 5e), 조건 A는 조건 C보다 유의하게 더 높은 체장 유전자의 발현을 나타내었으며, 조건 B는 조건 A와 조건 C에 대해 중간인 바와 같다. 더욱이, 조건 C는 대안의 비-체장 운명을 나타내는 유전자, 예를 들어 CDX2, AFP, 및 알부민을 유의하게 더 높은 수준으로 발현하였다(도 5e). 이들 데이터는 완성 내배엽(DE) 형성의 마지막 48시간 동안 배지 교체 없이 생성된, 균질한 고 CXCR4 발현 DE가 순수한 체장 내배엽 집단으로 나중에 전환될 수 있음을 나타낸다.

[0156]

4기 분화의 말기에, 조건 A에 따라 분화된 세포를 생물반응기로부터 회수하여 0.1% FAF-BSA를 함유하는 MCDB131 배지로 세척하고 SCID-Bg 마우스에 이식하였다. 각각의 마우스에 500만개의 세포를 신장 피막 아래에 직접 이식하였다. 이식 후 매 4주째마다 채혈을 수행하고 혈당 및 C-펩타이드를 측정하였다. 이식 후 12주째까지, 인간 C-펩타이드는 ELISA에 의해 1 ng/mL 초과로 수준으로 검출가능하였으며, 16주째에 C-펩타이드 수준은 평균 2.5 ng/mL였다(도 5f). 이식 후 20주째에, 절식 상태 및 이후의 급식 상태의 동물에서 C-펩타이드를 측정하였다. 글루코스 처리는 순환 인간 C-펩타이드에 있어서 절식 상태에서의 0.93 ng/mL로부터 급식 상태에서의 2.39 ng/mL로의 유의한 증가를 유도하였는데(도 5g), 이는 이식된 세포가 기능적 GSIS 컴퍼턴트 조직으로 성숙하였음을 나타낸다. 더욱이, 동물에 스트렙토조토신(STZ) 투여(마우스 β 세포는 인간 β 세포와 비교하여 STZ에 대해 더 민감하여 우선적으로 파괴됨)를 제공하여 당뇨병 상태를 유도한 경우, 기능적 GSIS 컴퍼턴트 조직의 이식편을 갖는 동물은 임상적으로 확실한 당뇨병이 발생된 비처리된 대조군과는 달리 정상의 혈당 수준을 유지하였다(도 5h). 이들 결과는 hES 분화된 세포 이식편을 갖는 동물이 기능적 체장 조직 이식편에 의해 STZ 유도 당뇨병으로부터 보호되었음을 보여준다.

[0157] [표 5b]

세포 카운트 및 유세포측정법의 데이터

만능성 (조건)	생존 세포 밀도(백만개 세포/mL)	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81	
(A)	0.723	93.8	0.2	100	74.3	67.3	
(B)	0.677	92.3	0.2	100	71.7	71	
(C)	0.738	89.9	0.1	100	75.3	72.1	
DE (조건)	생존 세포 밀도(백만개 세포/mL)	CD9	CD184	CD99			
(A)	0.965	1.7	99.6	84.3			
(B)	1.22	4.8	93.1	81.2			
(C)	1.2	8.3	68	34.1			
PE (조건)	생존 세포 밀도(백만개 세포/mL)	NKX6.1	시냅토파이신	CDX2	SOX2	NKX2.2	CHGA
(A)	0.795	47.5	48.4	2.9	23.8	61.7	55.7
(B)	0.98	44.4	38.5	10.3	21.4	45.4	41.5
(C)	1.33	15.4	5.8	37	18.4	9.6	6.7

[0158]

[0159] 실시예 6

[0160] 세포주 H1의 마이크로캐리어 부착성 배양된 인간 배아줄기세포의 현탁 포맷에서의 유도 분화

[0161] 사이토텍스(Cytodex)[®] 3 마이크로캐리어 비드(C3)(시스마-알드리치 컴퍼니 엘엘씨, 미국 미주리주 세인트루이스 소재, 카탈로그 번호 C3275) 400 mg을 15 ml의 돌베코(Dulbecco) PBS(DPBS)가 담긴 20 ml 부피 규소 코팅 유리 신틸레이션 바이알 내에 4 내지 24시간 동안 액침(soak)함으로써 배양을 위해 준비하였다. 사이토텍스[®] 3은 가교결합된 텍스트란의 매트릭스에 화학적으로 커플링된 변성된 콜라겐의 얇은 층으로 이루어진다. 사이토텍스[®] 3 상의 변성된 콜라겐 층은 트립신 및 콜라게나제를 포함한 다양한 프로테아제에 의한 효소분해에 취약하고, 최대 세포 생존력, 기능, 및 완전성(integrity)을 유지하면서 마이크로캐리어로부터 세포를 제거하는 능력을 제공한다.

[0162] 액침 후, 비드를 오토클레이빙하고, 멸균 DPBS로 헹구고, 10 μM Y-27632로 보충된 마우스 배아 섬유아세포 컨디셔닝 배지(MEF-CM) 중에서 재현탁시켰다. 이어서, 100 mg 비드/플라스크의 밀도로 비드를 125 ml 코닝[®] 유리 스피너 플라스크(코닝 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 옮겼다. 비드 및 Y-27632를 갖는 MEF-CM이 담긴 스피너를, 37°C의 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 적어도 60분 동안 평형화시켰다.

[0163] 44회째 계대배양의 인간 배아줄기세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 세포를 TrypLE[™] (라이프 테크놀로지즈 코포레이션, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)를 사용하여 평면 부착물로부터 리프팅시켰다(37°C에서 8분 인큐베이션하여 단일 세포 현탁액을 형성함). 이어서, Y-27632를 갖는 MEF-CM 중에서 세포를 세척 및 현탁시키고, 1100만개의 hES 세포가 정치(정적) 인큐베이션 기간 내에 6시간 동안 비드에 부착되게 하였다. 이어서, Y-27632를 갖는 MEF-CM을 스피너 플라스크에 첨가하여 75 mL의 최종 배지 부피를 만들고, 세포 및 비드를 유리 스피너 플라스크 내에서 50 rpm의 임펠러 속도로 교반하였다. 이러한 방식으로 5일 동안 일일 MEF-CM의 50 mL 배지 교체를 행하면서 세포를 성장시켰다. 배양물 중에 있는 지 5일 후에, 플라스크에는 53×10⁶개의 세포(±12×10⁶ SD)가 들어 있었다. 대조군으로서, 100만개의 H1 hES 세포를 또한 매트릭스[™]의 1:30 희석물로 코팅된 6웰 조직 배양 폴리스티렌 디쉬에 시딩하고 일일 MEF-CM의 배지 교체를 유지하였다.

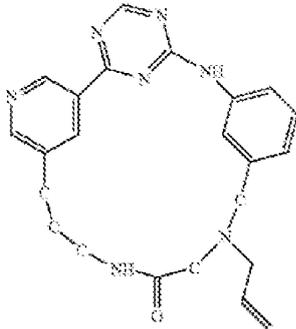
[0164] 이어서, 만능성 배양물 중에 있는 지 5일 후에, 이들 세포를 정상 체장 발생 모르포젠을 반복하도록 의도된 소분자 및 성장 인자 중 하나 또는 둘 모두를 함유하는 상이한 배지의 단계별 진행을 통해 동적 교반 현탁 배양 시스템 내에서 체장 전구체로 분화시켰다. 2가지 배지 제형을 정상 체장 발생을 반복하기 위한 방법으로서 시험하였는데; 하나는 액티빈 A 및 Wnt3A를 사용하여 DE를 형성하였고, 다른 하나는 MCX 화합물을 GDF8과 함께 사용하여 DE를 형성하였다(각각 표 6a 및 표 6b). 배지를 매일 교체하고, 샘플을 RT-PCR 및 유세포측정법에 의해

특징규명하여 세포 특성을 결정하였다. 마이크로캐리어 상의 세포의 위상차 영상을 촬영하였으며, 세포의 분화가 개시되기 전의 만능성 배양물로서의 세포 형태의 시간 경과가 도 6a에 나타나 있다. 배양물 분화를 나타내는 시간 경과가 도 6b에 나타나 있다. 또한, 실험 전체에 걸쳐 다양한 시점에서 세포 카운트를 얻었으며, 결과는 평면 배양물 또는 현탁된 마이크로캐리어 배양물 중에서의 배지 제형에 대한 표면적(도 6c에서 세포수/cm²) 또는 배지 부피(도 6d에서 세포수/mL)의 함수로서 나타나 있다.

[0165] 유세포측정법 및 RT-PCR 둘 모두에 의해 이 과정 전체에 걸쳐 다양한 시점에서 세포를 특징규명하였다. 제1 분화 단계인 완성 내배엽의 형성에 대한 유세포측정법의 결과는 도 6e에서 CXCR4(Y-축) 및 CD9(X-축)의 세포 발현의 점도표로 나타나 있으며, 그 결과는 또한 도 6f에서 각각의 마커의 총 발현으로서 표현되어 있다. 결과는, 모든 조건에서 실질적으로 대부분의 세포가 완성 내배엽을 형성함을 나타내는데, 이때 완성 내배엽의 형성은 CXCR4 발현의 획득 및 만능성 표면 마커인 CD9의 손실에 의해 규정된 바와 같다. 더욱이, 완성 내배엽의 더 효율적인 형성은 MCX / GDF8 마이크로캐리어 > MCX / GDF8 평면 > WNT3A / AA 마이크로캐리어 > WNT3A / AA 평면의 처리의 순으로 순위가 나타난다. MCX / GDF8로 처리된 세포는 CERBERUS(Cer 1), GOOSECOID, 및 FGF17의 더 낮은 발현을 나타내는 바와 같이, 세포에 대한 배지 특이적 영향이 존재하는 것으로 보인다(도 6g). 그러나, 모든 처리 조건은 완성 내배엽 유전자, 즉 CD99, CXCR4, FOXA2, KIT, 및 SOX17의 유사한 발현 수준을 나타낸다(도 6g 및 표 6c). 이들 과정은 체장 세포 전사 인자인 PDX1 및 NKX6.1의 동시발현을 특징으로 하는 체장 전구 세포 집단을 생성한다. 이들 세포가 이식되는 경우, 이들은 스트렙토조토신 유도 당뇨병 모델에서 고혈당을 교정할 수 있는 기능적 글루코스 자극 인슐린 분비 조직으로 추가로 성숙된다.

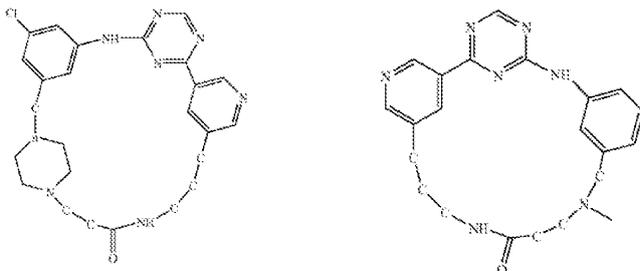
[0166] 하기 표 6a에서 사용된 바와 같이, B27은 킵코(Gibco)® B-27® 보충물(라이프 테크놀로지스 코포레이션, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)이다.

[0167] 이 실시예에 사용된 바와 같이, MCX 화합물은 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로[19.3.1.1-2,6--1-8,12-~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온이며, 이는 하기 화학식(화학식 1)을 갖는다:



[0168]

[0169] 다른 환형 아닐린-피리디노트라이아진이 또한 전술된 MCX 화합물 대신 사용될 수 있다. 그러한 화합물은 14-메틸-3,5,7,14,18,24,28-헵타아자테트라사이클로[20.3.1.1-2,6--1-8,12-]옥타코사-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-노나엔-17-온 및 5-클로로-1,8,10,12,16,22,26,32-옥타아자펜타사이클로[24.2.2.1-3,7--1-9,13--1-14,18-]트라이트라이아콘타-3(33),4,6,9(32),10-,12,14(31),15,17-노나엔-23-온을 포함하지만 이로 한정되지 않는다. 이들 화합물은 하기에 나타나 있다(화학식 2 및 화학식 3):

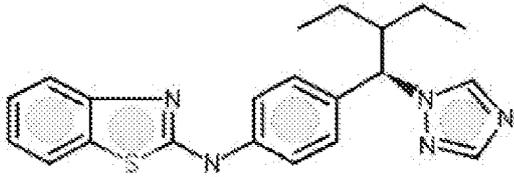


[0170]

[0171] 예시적인 적합한 화합물은 미국 특허 출원 공개 제2010/0015711호에 개시되어 있으며, 이의 개시내용은 MCX 화합물, 관련 환형 아닐린-피리디노트라이아진, 및 이들의 합성에 관한 것인 것과 같이 전체적으로 포함된다.

[0172] 이 실시예에서 4기에 사용된 Cyp26 억제제는 N-{4-[2-에틸-1-(1H-1,2,4-트리아졸-1-일)부틸]페닐}-1,3-벤조티

아졸-2-아민이었는데, 이는 CAS 번호가 201410-53-9이고 하기의 구조를 갖는다:



[0173]

[0174]

이 Cyp26 억제제는 또한 "Cypi"로도 알려져 있다. 이 Cyp26 억제제의 구조 및 합성은 미국 특허 제7,378,433호에 개시되어 있으며, 이의 개시내용은 Cyp26 억제제 및 그의 합성에 관한 것인 것과 같이 전체적으로 포함된다.

[0175]

[표 6a]

배지 제형 및 분화 프로토콜

기본 배지	1 기		2 기	4 기		
	RPMI 11 mM 글루코스		DMEM/F12 17.5 mM 글루코스	DMEM 25 mM 글루코스		
보충물	+0.2% FBS	+0.5% FBS	+2% FBS	+1% B27		
성장 인자	AA (100 ng/ml)	AA (100 ng/ml)	FGF7 (50 ng/ml)	노긴(Noggin) (100 ng/ml)	노긴 (100 ng/ml)	노긴 (100 ng/ml)
및/또는 소분자	Wnt3a (20 ng/ml)			RA (2 μM)	ALK5i (1 μM)	ALK5i (1 μM)
				SANT1 (250 nM)	TPB (50 nM)	
일수	1d	2d	3d	4d	4d	2d

[0176]

[0177]

[표 6b]

배지 제형 및 분화 프로토콜

기본 배지	1 기	2 기	3 기	4 기
		MCDB131 8 mM 글루코스	MCDB131 10.5 mM 글루코스	MCDB131 25 mM 글루코스
보충물	2 % FAF-BSA	2 % FAF-BSA	0.1% 알부맥스®	0.1% 알부맥스®
성장 인자	GDF8 100 ng/ml	FGF7 50 ng/ml	FGF7(50 ng/ml) AA(5 ng/ml) RA(2 μM) SANT(250 μM) LDN 193189	PKC 활성화제(500 nM) SANT(250 nM) LDN 193189 (200 nM) Cyp26 억제제(100 nM)
소분자 효능제/ 길항제	MCX(1 일째에만) 3 μM			
	1:50000 ITS-X	1:50000 ITS-X	1:200 ITS:X	1:200 ITS:X
일수	4	3	4	6

[0178]

[0179] [표 6c]

설명	H1 hES 캘리브레이터 (calibrator)	WNT3A / AA 평균	WNT3A / AA 마이크로캐리어	MCX / GDF8 평균	MCX / GDF8 마이크로캐리어
GAPDH 대조군	1	1	1	1	1
AFP	1	0.6	0.0	4.7	0.0
CD9	1	1.0	0.9	0.3	0.5
CD99	1	10.5	10.9	18.5	7.1
CDH1	1	1.2	0.6	0.5	0.6
CDH2	1	24.8	28.4	47.8	27.8
CDX2	1	23.2	0.0	74.9	27.8
CER1	1	346.2	649.7	8.1	5.6
CXCR4	1	280.3	190.1	153.9	154.7
FGF17	1	1406.4	3174.5	92.0	112.9
FGF4	1	0.8	0.5	0.0	1.1
FOXA2	1	432.5	424.3	588.5	321.2
GATA4	1	252.4	165.3	1100.1	444.9
GATA6	1	607.1	939.9	709.4	312.0
GSC	1	49.0	81.6	0.3	0.6
KIT	1	16.3	17.9	12.3	8.0
MIXL1	1	33.2	95.6	16.0	19.1
MNX1	1	146.3	111.4	595.8	392.6
NANOG	1	0.4	0.5	0.0	0.2
OTX2	1	22.9	26.4	9.1	8.3
OCT4	1	1.5	1.1	0.0	0.5
SOX17	1	751.1	1198.2	1235.0	796.3
SOX7	1	0.6	1.7	5.5	0.7
T	1	64.1	7.1	22.3	212.9

[0180]

[0181] 실시예 7

[0182] H1(WA01) hES 세포주의 서브-클론 - WB0106을 이 실시예에 사용하였다. WB0106은 위셀 리서치 인스티튜트(미국 위스콘신주 매디슨 소재)에서 DDL-13으로 명명된 H1 주 시드 물질로부터 유래되었다. H1 주의WB0106 서브-클론을 23회째 계대배양에서 해동된 DDL-13 바이알로부터 매트릭셀™ 기질 상의 mTeSR[®] 1 배지 내로 유도하고, EDTA를 사용하여 후속적으로 계대배양시켰다. WB0106을 28회째 계대배양에서 동결시키고, 정상 핵형(FISH 및 G-밴드), 체장 선조세포로 분화하는 능력, 및 클러스터를 형성하여 현탁 배양물 중에서 증폭하는 컴피턴시에 기초하여 이들 연구를 위해 선택하였다.

[0183] 이어서, WB0106 WCB 바이알을 T225 플라스크(코닝 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 코닝 소재) 내에서 매트릭셀™의 기질 상의 배지 내로 해동시키고, 제1 계대배양에서 세포를 다수의 T225 플라스크 내로 증폭시켰다. 제2 계대배양에서, 다수의 T225 플라스크로부터의 세포를 합하여 단일의 2-층 셀스택™(CS2)에 시딩하는 데 사용하였다. 일단 CS2가 70% 용합(confluent)을 나타내면, 인접한 펌프 튜빙을 갖는 C-플렉스® 튜빙 조립 캡을 배지 포트에 부착시켜 시스템을 폐쇄하였다. 시스템을 C-플렉스® 튜빙으로 폐쇄시킨 후에, 백(bag) 또는 병을 테루모 용접기를 통해 용접하고, 액체 부피(배지, PBS^{-/-}, 아큐타제[®], 또는 현탁된 세포)를 연동 펌프를 사용하여 옮겼다.

[0184] CS2로부터 세포를 리프팅하기 위해, 세포를 PBS^{-/-}로 1회 세척하고, 이어서 PBS^{-/-}로 희석된 아큐타제[®]의 1/2 농도 용액으로 처리하고 4 내지 5분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 아큐타제[®]를 제거하고, 효소 용액의 적용 후 3분째에, CS2를 탭핑하여 세포 리프팅을 조장하였다. 0.5% BSA로 보충되고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 배지 한 병을 CS2 내로 펌핑하여 잔류하는 아큐타제[®]를 행구어 불활성화시키고, 이어서 행굼액을 수집하였다. 제2 행굼 부피를 첨가하고, 수집하고, 제1 행굼액과 혼주시켰다. 이어서, 200 mL 중 2.0 내지 2.5 × 10⁸개의 세포를 1-층 셀스택® 내로 옮기고, 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 2개의 셀스택® 배지 포트들 사이에 펌프 튜빙이 부착된 C-플렉스® 튜빙의 폐쇄 루프를 사용하여, 세포 현탁액을 연동 펌프에 의해 5분 동안 75 rpm으로 분쇄하여 응집체를 균질화하였다. 폐쇄 루프 튜빙을 멸균 0.2 마이크로미터 필터로 교체하여 가스 교환되도록 하고, 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C에서 하룻밤 셀스택®을 인큐베이션하였다. 하룻밤 인큐베이션(12 내지 22시간, 18시간이 최적임)한 후, 셀스택® 내의 세포는 만능 세포의 둥근 구형 응집체(클러스터)를 형성하였다.

- [0185] 현탁된 세포 클러스터를 함유하는 0.5% BSA로 보충된 배지를, 셀스택®으로부터, 0.5% BSA로 보충된 0.4 리터의 새로운 배지와 함께, 1 리터 일회용 스피너 플라스크(코닝, 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 옮기고, 55 내지 65 rpm으로 유지하였다. 옮긴 후 24시간째에, 1 리터 일회용 스피너 플라스크를 가슴된 5% CO₂ 인큐베이터로부터 꺼내고, 클러스터가 5 내지 10분 동안 정착되게 하였다. 이어서, 용기에 200 mL가 남을 때까지 배지를 흡인한 다음, 400 mL의 추가의 새로운 배양 배지를 스피너 플라스크에 첨가하였다. 이 과정을 2일째의 말기(옮긴 후 48 시간째)에 반복하였다.
- [0186] 3일째의 말기(CS2로부터 스피너 플라스크로 옮긴 후 72시간째)에, 세포 클러스터를 계대배양 및 추가 증폭을 위해 아큐타제® 처리에 의해 해리시켰다. 계대배양 과정은 가슴된 5% CO₂ 인큐베이터로부터 1 리터 일회용 스피너 플라스크를 꺼냄으로써 개시하였다. 플라스크를 생물안전 캐비닛(biosafety cabinet) 내부의 스피너 플레이트 상에 놓아서 세포의 균질한 현탁액을 유지하였다. 세포 현탁액을 100 mL 피펫에 의해 스피너 플라스크로부터 꺼내어서 4개의 175 mL 원추형 폴리카르보네이트 튜브(서모피셔-날진(ThermoFisher-Nalgene); 미국 뉴욕 버팔로 소재) 사이에 고르게 분포시키고 5분 동안 80 내지 200 rcf로 원심분리하였다. 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 폐배지를 흡인하였다. 이어서, 칼슘 또는 마그네슘(DPBS^{-/-})이 없는 25 mL의 DPBS를 각각의 튜브에 첨가하고, 세포를 1개의 원추형 튜브 내로 합치고 5분 동안 80 내지 200 rcf로 원심분리하였다. DPBS^{-/-}를 원추형 튜브로부터 흡인하고, 30 mL의 50% 아큐타제®/50% DPBS^{-/-} 용액을 튜브에 첨가하였다. 세포 클러스터를 1 내지 3회 상하로 피펫팅하고, 이어서 4분 동안 간헐적으로 와동시킨 다음, 5분 동안 80 내지 200 rcf로 원심분리하였다. 이어서, 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 아큐타제®를 가능한 한 완전히 흡인하고, 세포 현탁액이 균일한 유백색으로 나타날 때까지 원추형 튜브를 3 내지 5분 동안 연속적으로 그리고 온화하게 탭핑하였다. 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 0.5% BSA로 보충된 10 mL의 배지를 세포 현탁액에 첨가하고 2 내지 4회 분쇄하여, 잔류하는 아큐타제®를 불활성화시켰다. 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 0.5% BSA로 보충된 90 mL의 배지를 세포에 첨가하고 현탁액을 40 마이크로미터 세포 여과기(비디 팔콘; 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)에 통과시켰다.
- [0187] 100 mL 부피의 여과된 세포 현탁액 중 세포 밀도를 NC-100 뉴클레오카운터®(케모메텍 에이/에스, 덴마크 알레로 드 소재)로 측정하고 추가의 배지를 첨가하여 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 0.5% BSA로 보충된 배지 중에서 1×10^6 개 세포/mL의 최종 세포 농도를 수득하였다. 이어서, 225 mL(2억2500만개의 세포)의 세포 현탁액을 1 리터 일회용 스피너 플라스크에 옮기고 가슴된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 교반 없이 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 플라스크를 인큐베이터로부터 꺼내어서 생물안전 캐비닛 내의 스피너 플레이트 상에서 1 내지 3분 동안 100 rpm으로 교반하였다. 세포 현탁액을 혼합하고 있는 동안, 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 0.5% BSA로 보충된 추가 225 mL의 배지를 세포 현탁액에 첨가하였다. 이어서, 스피너 플라스크를 가슴된 5% CO₂ 인큐베이터에 30분 동안 되돌려 놓았다. 이어서, 플라스크를 인큐베이터로부터 꺼내어서 생물안전 캐비닛 내의 스피너 플레이트 상에서 1 내지 3분 동안 100 rpm으로 교반하였다. 세포 현탁액을 혼합하고 있는 동안, 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 0.5% BSA로 보충된 추가 150 mL의 배지를 세포 현탁액에 첨가하여 600 mL의 최종 부피를 만들고 플라스크를 인큐베이터 내에서 교반된 현탁으로 되돌렸다. 아큐타제® 해리 후 24시간째 및 48시간째 둘 모두에서, 5 내지 10분 동안 세포 클러스터가 플라스크의 바닥에 정착되게 하였다. 어떠한 클러스터 손실도 최소화하는 것을 확보하면서, 400 mL의 폐배지를 흡인에 의해 플라스크로부터 제거하고 새로운 배지로 교체하였다. 이 과정을 사용하여, H1 세포를 기질 상의 부착성 배양물로부터 세포 클러스터로서 현탁 배양물로 전환시켰다.
- [0188] 초기 아큐타제® 처리 후 72시간째에, 세포 클러스터 해리 및 스피너 플라스크 시딩(계대배양)의 과정을 반복하여, 다회의 계대배양(시험된 범위: 1 내지 10회의 계대배양) 동안 현탁 상태로 세포를 유지하였다. 처음 24시간 후에 배지를 제거하지 않고, 200 mL의 새로운 배지를 첨가한 것을 제외하고는 상기 과정을 따랐다. 아큐타제® 해리 후 48시간째에, 5 내지 10분 동안 클러스터가 플라스크의 바닥에 정착되게 하고, 600 mL를 흡인하고, 400 mL의 새로운 배지를 플라스크에 첨가하였다.
- [0189] 이어서, 현탁-계대배양 및 배양된 이들 세포는 나중의 사용을 위해 동결보존 및 저장될 수 있었다. 동결보존을 위한 현탁 증폭된 세포를 제조하기 위하여, 세포를 40 마이크로미터 세포 여과기에 통과시키지 않은 것을 제외

하고는, 현탁 계대배양에 대하여 전술된 바와 같이 세포 클러스터를 아큐타제[®]로 해리시켰다. 각각 1 리터 일회용 플라스크로부터 생성된 100 mL 세포 현탁액에 대한 세포 카운트를 측정하였다. 이어서, 세포 현탁액을 합하고 5분 동안 80 내지 200 rcf로 원심분리하였다. 이어서, 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 가능한 한 완전히 원심분리 튜브로부터 배지를 제거하였다. 이어서, 차가운(4℃ 미만) 크라이오스토(CryoStor)[®]10(스텝 셀 테크놀로지스, 인크., 캐나다 브리티시컬럼비아주 밴쿠버 소재)을 적가하여 1억5000만개의 세포/mL의 최종 농도를 달성하고 세포 용액을 1.8 mL 코닝[®] 동결 바이알(코닝 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 코닝 소재) 또는 15 mL 밀테니(Miltenyi) 동결 백(밀테니 바이오텍 인크.(Miltenyi Biotec Inc.), 미국 캘리포니아주 아우번 소재)에 옮기는 동안 빙욕 중에서 유지하였다.

[0190] 이어서, 현탁 증폭된 세포를 바이알 내에서 다음과 같이 프로그램화 동결기(controlled rate freezer) 내에서 고밀도로 동결시켰다. 챔버를 4℃로 예비-냉각시키고 샘플 바이알 온도가 6℃에 도달할 때까지 온도를 유지하였다. 이어서, 샘플이 -7℃에 도달할 때까지 챔버 온도를 2℃/min으로 강하시켰다. 일단 샘플 바이알이 -7℃에 도달하면, 챔버가 -45℃에 도달할 때까지 챔버를 20℃/min으로 냉각시켰다. 이어서, 챔버 온도가 -25℃에 도달할 때까지 챔버 온도를 10℃/min으로 짧은 시간에 상승되게 한 다음, 샘플 바이알이 -45℃에 도달할 때까지 챔버를 0.8℃/min으로 추가로 냉각시켰다. 이어서, 챔버가 -160℃에 도달할 때까지 챔버 온도를 35℃/min으로 냉각시켰다. 이어서, 챔버 온도를 -160℃에서 적어도 10분 동안 유지하고, 이후에 바이알을 가스상 액체 질소 저장소에 옮겼다.

[0191] 교반 탱크 생물반응기에 접종하기 위하여, 고밀도 동결보존 세포를 액체 질소 저장소로부터 꺼내고, 해동시켜, 폐쇄된 3 리터 유리 생물반응기(다스깁; 독일 울리히 소재)에 시딩하는 데 사용하였다. 4개 또는 5개의 바이알을 가스상 액체 질소 저장소로부터 꺼내어서, 105초 동안 37℃ 수욕 중에 곧바로 넣어 두었다. 이어서, 해동된 바이알 성분을 2 ml 유리 피펫을 통해 50 ml 원추형 튜브에 옮겼다. 이어서, 0.5% BSA를 함유하고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632로 보충된 9 ml의 배지(IH3 또는 이센셜8[™] 배지("E8[™]"))를 튜브에 적가하였다. 이어서, 세포를 80 내지 200 rcf로 5분 동안 원심분리하였다. 튜브로부터의 상층액을 흡인하고, 0.5% BSA를 함유하고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632로 보충된 10 ml의 새로운 배지(IH3 또는 E8[™])를 첨가하고, 세포를 함유하는 부피를 배지 전달 병(Cap2V8[®], 사니슈어(Sanisure), 미국 캘리포니아주 무어파크 소재) 내로 피펫하였다. 이어서, 병의 내용물을 멸균 C-플렉스 튜빙 용접부를 통해 연동 펌프에 의해 생물반응기 내로 직접 펌핑하였다. 만능 줄기세포 접종을 위한 준비 시에, 생물반응기에 1.5 L의 배지(0.5% BSA로 보충되고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 IH3 또는 E8[™])를 준비하고, 37℃로 예비-가온하고, 70 rpm으로 교반하고, CO₂에 의해 6.8 내지 7.1 pH로 조절하였는데, 이때 30%의 용존 산소 설정점(CO₂, 공기, O₂, 및 N₂가 조절됨)을 가졌다. 접종 직후에, 생물반응기를 세포 카운트를 위해 샘플링하고, 배지 부피를 필요에 따라 조절하여 0.225 × 10⁶개 세포/mL의 최종 세포 농도를 획득하였다.

[0192] 교반 탱크 생물반응기 내로 접종된 세포는 연속 교반 탱크 내에서 세포 클러스터를 형성하였으며, 총 3일 동안 반응기 내의 만능성 배지(0.5% BSA로 보충된 IH3 또는 E8[™]) 중에서 유지하였다. 배지를 매일 교체하였는데, 1 내지 1.3 리터의 폐배지를 제거하고 1.5 리터의 새로운 배지를 첨가하는 것으로서, 접종 후 24시간째에 부분 배지 교체를 행하였다. 접종 후 48시간째에, 1.5 내지 1.8 리터의 폐배지를 제거하고 1.5 리터의 새로운 배지를 첨가하였다. 접종 후 72시간째에, 폐배지를 90% 초과하여 제거하고 분화 배지(표 7)를 첨가함으로써 만능 세포 분화를 개시하였다.

[0193] 일단 단계화된 분화 과정이 개시되면, 12일 이상 동안 온도(37℃), pH(분화의 경우 7.4), 및 용존 산소(1기의 경우 10% DO 설정점 및 모든 다른 시기에서는 30% DO 설정점, CO₂, O₂, N₂, 및 공기가 조절됨)에 대해 조절된 폐쇄된 멸균 현탁 생물반응기 내에서 세포를 유지하였다. 분화 과정 전체에 걸쳐, 각각의 배지 교체 시, 딥-튜브를 통한 배지 제거 전에 5 내지 20분 임펠러를 정지시켜 클러스터가 정착되게 하였다. 테루모[™] 튜브 용접기를 사용하여 C-플렉스[®] 튜빙에 연결된 딥 튜브를 통해 연동 펌프에 의해 닫힌 병 또는 백으로/그로부터 생물반응기 내의 배지를 제거하거나 첨가하여 폐쇄된 시스템을 유지하였다. 일단 충분한 배지를 용기에 첨가하여 임펠러가 완전히 잠기면, 임펠러 및 가열기에 재동력공급하였다.

[0194] 생물반응기 과정을 모니터링하기 위하여, 세포 클러스터를 함유하는 배지의 샘플을 매일 수거하여 세포수 및 생존력(뉴클레오카운터[®])을 측정하였으며, 이는 도 7에 나타낸 바와 같다. 0.225 × 10⁶개 생존 세포/mL의 접종물이 증폭되어 4기 3일째에 평균 0.92 × 10⁶개 생존 세포/mL를 생성한 바와 같이, 세포의 일반적인 증폭이 이

과정 동안 관찰되었다. 생물반응기 접종과 만능 세포 클러스터링 및 배양 동안 산성 설정점(pH 7.0 내지 6.8)으로 세포를 유지함으로써, 4기 3일째에서의 평균 세포 산출량은 평균 1.3×10^6 개 세포/mL로 증가하였다(도 7).

[0195] 일일 카운트 외에, 생물반응기 배지 샘플을 노바 바이오프로파일® 플렉스(노바 바이오메디칼 코포레이션, 미국 매사추세츠주 윌섬 소재)에 의해 분석하였다. 반응기 설정점마다, 0기에서의 배지의 pH는 대부분의 배양 배지에 대해 일반적인 7.4의 항상성 표준 pH에 비해 산성이고 반응기 배지 pH는 세포 대사의 결과로서 0기에 걸쳐 감소한 것으로 관찰되었다(도 8). 이들 결과는 6일째의 분화의 말기에 걸쳐 증가하는 락트산 농도 및 감소하는 글루코스 수준의 경향과 상관되었다(도 9 및 도 10). 이와 함께, 이들 데이터는, 반응기 내의 세포가 0기의 그리고 분화의 처음 2개의 단계(1 내지 6일째)에 걸쳐 가장 급속하게 성장하고 글루코스 소비적임을 나타내었다. 그러나, 3기로부터 그 이후로, 반응기 내의 세포 대사(감소된 락테이트 수준 및 증가된 글루코스 수준)는 감소되었는데, 이는 3기에서의 세포수에 있어서의 피크에 이어지는 4기의 과정에 걸친 세포 밀도에 있어서의 감소와 상관되었다.

[0196] pH 및 대사에 있어서의 단계 특이적인 변화가 mRNA 발현 패턴에 있어서의 단계 변화와 매칭되는지를 결정하기 위하여, 만능성, 완성 내배엽(DE), 장관(GT), 또는 4기(S4)로 지정된 4개의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)® 저밀도 어레이(Low Density Array)(라이프 테크놀로지스 코포레이션, 미국 캘리포니아주 갈스배드 소재)를 사용하여 생물반응기 세포 샘플의 시험을 수행하였으며, 그 결과를 모든 실시 및 어레이에 걸쳐 발현을 표준화하기 위하여 대조군으로서의 조직학적으로 미분화된 H1(WB0106) hES 세포 샘플과 대비하였다.

[0197] 이들 어레이를 사용하여, 유전자 발현을 분화의 각각의 단계에 대해 측정하였다. 생물반응기 내로 해동된 시드 물질 세포는 0기 1일째 및 0기 3일째(생물반응기 접종 후 24시간째 및 72시간째: 도 11, 도 12, 도 13, 및 도 14)에서 미분화된 유전자 발현 패턴을 나타낸 것으로 또한 관찰되었다. 이들 결과는 CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81의 고 발현 수준, 및 CXCR4/CD184의 부재를 보여준 유세포측정법의 결과와 잘 상관되었다(도 15 및 표 8). 그렇더라도, 유전자 발현에 대한 유세포측정법 및 qRT-PCR 검정은 만능성 유전자(CD9, MANOG, POU5F1, SOX2, TDGF, 및 ZFP42)에 대한 견고하고 안정한 발현 패턴을 나타내었는데, 이러한 발현 패턴은 GATA4, GSC, MIXL1, 및 T에 대한 유전자 발현에 있어서 약간이긴 하지만 가변적인 증가; 및 유도 분화 전 0기 과정 동안에 일부 샘플에서 CER1, FGF17, FGF4 및 GATA2 발현에 있어서 100x 이상의 증가가 또한 주목되는 안정한 만능성 상태와 일치하였다(도 16 및 도 17).

[0198] 0기의 완료 시(반응기 접종 후 72시간째), MCX 및 GDF8을 함유하는 분화 배지(표 7) 내로 세포를 이동하였다. 이 배지 교체 후 24시간째에, FOXA2 발현에 있어서의 약 700x 증가 및 CER1, EOMES, FGF17, FGF4, GATA4, GATA6, GSC, MIXL1, 및 T 발현에 있어서의 1000x 증가와 같이 유전자 발현 패턴에 있어서의 유의한 변경이 주목되었다(도 18 및 도 19). 이들 증가된 발현 수준은, 세포가 중배엽 운명을 통해 전이되고 있음을 나타내었다. CDX2 수준은 미분화된 세포와 대비하여 1기 1일째에 상승하였지만(대조군과 대비하여 발현에 있어서 470x 증가), 이는 발현에 있어서의 일시적인 증가였으며 CDX2 수준은 1기 1일째부터 1기 3일째까지 94% 하락하여 분화 유도 전에 관찰된 것과 비견되는 수준으로 되돌아갔음이 또한 주목되었다(도 14, 도 19, 및 도 21).

[0199] DE 분화 배지에 노출 후 72시간째에, CXCR4 수준이 피크이고 FOXA2 및 SOX17은 과거 대조군(historical control)에 비하여 1000x 초과하여 발현된 바와 같이, 세포는 완성 내배엽으로의 예정화(specification)와 일치하는 프로파일을 발현하였다. 완성 내배엽과 일치하여, 유전자 CER1, EOMES, FGF17, FGF4, GATA4, GATA6, GSC, MIXL1, 및 T는 1기 1일째에 관찰된 상승된 수준으로부터 하락하였음이 또한 주목되었다(도 20 및 도 21).

[0200] qRT-PCR에 의해 관찰된 유전자 발현에 있어서의 변화는 유세포측정법에 의해 관찰된 결과와 상관되었다. 분화 개시 시에 CD9 발현/CXCR4 음성 만능 세포 집단(도 15)으로부터 1기 말기에 CXCR4 발현 세포(98.3%의 세포가 CXCR4 양성임, ± 1.9 SD)의 균질 집단(도 22)으로의 거의 완전한 전이가 또한 관찰되었다.

[0201] 완성 내배엽 형성(1기)이 완료된 후에, 원시 전장 형성(2기)을 유도하기 위해 사용되는 모르포겐인 FGF7을 함유하는 것으로 배지를 교체하였다. 원시 전장의 형성과 일치하여, 2기 1 및 3일째에 HNF4 α 및 GATA6 발현 수준이 증가되었으며, 한편 1기 3일째에 고수준으로 발현된 유전자(CXCR4, EOMES, FGF17, FGF4, MNX1, PRDM1, SOX17, 및 VWF)는 2기 말기까지 감소된 발현을 나타내었다(도 23). 전장 유전자(AFP, PDX1, 및 PROX1)의 발현은 증가되었다(도 24).

[0202] 세포를 72시간 동안 2기 배지 중에서 배양한 후, 배양물을 3기 배지(표 7)로 교체하였다. 일단 이 배지 중에 있으면, 세포는 PDX1 및 FOXA2 발현에 의해 측정하였을 때 내배엽 체장 계통과 일치하는 마커를 발현하였으며,

이는 도 25에 나타나 있다(90.9% ± 11.9 SD가 PDX1 양성이고, 99.2% ± 0.6 SD가 FOXA2 양성임). 이들 결과는 유전자 발현에 대한 qRT-PCR에 의해 분석된 샘플로부터의 데이터에 의해 확인되었다. PDX1에 대한 유전자 발현은 2기 3일째의 말기(38,000x vs. H1)로부터 3기 1일째의 말기(200,000x vs. H1)까지 24시간 내에 5배 증가하였으며, 48시간 후에 3기 3일째에 다시 2배가 되었다(435,000x vs. H1). 이들 데이터는 세포가 체장 운명으로 예정화되고 있는 증임을 나타낸다(도 26). 이러한 관찰은 체장에서 공통으로 발현되는 다수의 유전자(ARX, GAST, GCG, INS, ISL1, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PAX6, PTF1A, 및 SST)의 증가된 수준에 의해 추가로 지지되었는데, 이는 도 26에 나타난 바와 같다. 게다가, OCT4/POU5F1의 매우 낮은 발현 또는 비발현(대조군의 2 내지 10% 또는 qRT-PCR에 의해 32 내지 37 샘플 Ct) 및 내배엽 계통 AFP, ALB, 및 CDX2-의 다른 마커에 대한 고 발현 수준이 또한 관찰되었는데, 이는 상대적으로 유연한 장관 운명으로부터 체장 수명까지 생물반응기 내에서의 세포 집단의 예정화 및 전이를 추가로 나타낸다.

[0203] 4기 3일째에서의 분화 과정의 말기에서, 세포는 고수준의 PDX1 및 FOXA2 발현을 보유했으며 체장 내분비 세포(28.1% ± 12.5 SD가 크로모그라닌 양성임) 및 체장 선조세포(58.3% ± 9.7 SD가 NKX6.1에 대해 양성임)의 혼합물과 일치하는 발현 패턴을 추가로 발생시켰는데, 이는 도 27에 나타난 바와 같다. 이러한 단계 특이적인 마커 발현 패턴은 만능 집단으로부터 체장 전구세포로의 효율적인 단계적 분화를 나타내었다. 유세포측정법에 의해 관찰된 결과는 qRT-PCR로부터의 데이터에 의해 추가로 확인되었다. 체장에서 공통으로 발현되는 다수의 유전자(ARX, GAST, GCG, IAPP, INS, ISL1, MAFB, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PAX6, PTF1A, 및 SST)는 모두 증가된 발현 수준을 나타내었다(도 28).

[0204] 상이한 시드 물질, 0기 배지, 0기 배지의 pH 및 소포제의 사용과 같은 다수의 과정 변수를 시험하였을 때, 도 27에서 관찰된 발현 패턴은 다수의 실시예에 걸쳐 일관성 있게 유지되었다. 시드 물질의 다수의 공급원을 시험하였으며, 각각은 90% 초과인 FOXA2, 75% 초과인 PDX1, 및 50% 초과인 NKX6.1을 가지면서 체장 내배엽 운명을 효율적으로 생성하였다(도 29). 더욱이, 0.5% BSA로 보충된 "IH3"로 불리는 주문제작 사내 배지 또는 구매가능한 배지, 즉 0.5% BSA로 보충된 이센셜8™ 중에서 세포를 0기에서 성장시켰을 때, 생물반응기 생성물의 발현 패턴에 있어서 유의한 차이가 없었음이 주목되었다(도 30). 0기 배양물에서의 pH의 역할을 검사하였을 때, 상대적으로 낮은 pH(6.8)에서 0기에서 성장된 세포는 평균 실시예와 대비하여 생물반응기 내에서 증가된 증폭을 가졌지만(도 7), 4기 3일째 세포 프로파일에 있어서는 유의한 변화가 없었음(도 31)이 주목되었다. 추가로, 소포제 C에멀전(시그마 카탈로그 번호 A8011)을 94 ppm으로 사용함으로써 스파징에 의해 생성된 버블을 감소시키는 것으로 보였지만, 0기 말기부터 4기 3일째 세포까지의 세포의 프로파일에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(표 9 및 도 32).

[0205] 각각의 생물반응기 분화의 말기에 생성물 세포를 동결보존하였다. 3.63 g/L 중탄산나트륨을 갖는 MCDB131, 또는 3.63 g/L 중탄산나트륨, 글루코스(최종 8 mM), 및 1x 글루타맥스를 갖는 MCDB131 중에서 세포를 세척하고, 이어서 2.43 g/L 중탄산나트륨을 갖는 57.5% MCDB131, 30% 무제노(Xeno-free) KSR, 10% DMSO, 및 2.5% HEPES(최종 농도 25 mM)로 구성된 차가운(4°C 미만) 동결보존 배지에 옮겼다. 이어서, 주위 온도에서 최대 15분 동안 동결보존 매체 중에서 세포 클러스터를 유지하는 냉각 프로파일을 사용하여, 프로그램화 동결기(CRF) 내에서 세포를 동결시키고, 45분 동안 4°C의 온도로 감소시키고, 2.00°C/min으로 -7.0°C(샘플)까지 추가로 감소시켰다. 이어서, 챔버의 온도를 25.0°C/min의 속도로 -45.0°C까지 감소시켜 샘플을 신속하게 냉각시켰다. 이어서, 챔버 온도를 10.0°C/min으로 -25.0°C(챔버)까지 증가시킴으로써 보상 증가를 제공하였다. 이어서, 온도가 -40.0°C에 도달할 때까지 0.2°C/min으로 샘플을 냉각시켰다. 이어서, 챔버를 35.0°C/min의 속도로 -160°C까지 냉각시키고 그 온도에서 15분 동안 유지하였다. 샘플을 CRF 실시의 종료 시에 가스상 액체 질소 저장 용기로 이동하였다.

[0206] 세포를 증기상 액체 질소 저장소로부터 꺼내어서 바이알을 37°C 수욕에 옮김으로써 해동시킬 수 있었다. 작은 빙정이 바이알 내에 남을 때까지, 바이알을 수욕 중에서 2분 미만 동안 온화하게 와동시켰다. 이어서, 바이알 내용물을 50 ml 원추형 튜브에 옮기고,

[0207] 2.43 g/L 중탄산나트륨 및 2% BSA를 갖는 MCDB131 배지를 사용하여 총 20 ml의 최종 용적이 될 때까지 2분에 걸쳐 적가하여 희석시켰다. 이어서, 총 세포수를 뉴클레오카운터®로 측정하고, 세포 현탁액을 초저부착 배양 디쉬에 1시간 동안 옮겨 두었다. 이어서, 세포를 50 ml 원추형 튜브 내에서 배지로부터 단리하고, 상층액을 제거하고 분석 또는 생체내 연구를 위해 세포를 4기 배지 중에 재현탁시켰다.

[0208] 대안적으로, 해동 후, 바이알 처리된 세포를 빈 125 mL 유리 코닝® 스피너 플라스크(코닝, 인코포레이티드, 미국 뉴욕주 코닝 소재)에 옮기고 2.43 g/L 중탄산나트륨 및 2% BSA를 갖는 10 mL MCDB131 배지를 플라스크에 적가하였다. 이어서, 80 mL의 동일한 배지로 최종 부피를 조절하였다. 총 세포수를 뉴클레오카운터®로 측정하

고, 세포 현탁액을 40 내지 65 rpm으로 하룻밤(12 내지 28시간) 교반하였다. 이어서, 세포를 특징규명하거나 생체내 연구를 위해 사용하였다.

[0209] IH3 배지의 조성은 하기에뿐만 아니라 미국 특허 출원 공개 제2013/0236973호에도 나타나 있으며, 이의 개시내용은 적합한 세포 배양 배지에 관한 것인 것과 같이 전체적으로 포함된다. IH3 배지 중의 BSA의 양은 변동될 수 있다.

IH3 배지의 조성	
기본 배지	첨가된 성분
DM-F12	1 X ITS-X, 0.5% 시약-등급 FAF-BSA 1 ng/ml TGF-β1 100 ng/ml bFGF 20 ng/ml IGF-1 0.25 mM 아스코르브산

[0210]

[0211] [표 7]

개시 일/개시 일자:	1 기	2 기	3 기	4 기
기본 배지	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)
보충물	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:50,000 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:50,000 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:200 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:200 ITS-X 글루타맥스 1:100
성장 인자	<u>1 및 2 일째에만</u> GDF8 100 ng/mL	FGF7 50 ng/mL	FGF7 50 ng/mL	없음
소분자	<u>1 일째에만</u> MCX [2 μM]		RA[2 μM] SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM] <u>1 일째에만</u> LDN[100 nM]	SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM]
일수	3	3	3	3
주: 모든 일수는 0H를 지칭함	1 및 2 일째에 배지 교체, 3 일째에 교체 없음	1 및 3 일째에 배지 교체, 2 일째에 교체 없음	1 및 2 일째에 배지 교체, 3 일째에 교체 없음	1 일째에 그리고 S4가 연장된다면 3 일째의 말기에 배지 교체 없음

[0212]

[0213] [표 8]

BX 복제물	시드 물질	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81
1	KC	83.3	0.1	99.9	94.5	85.8
2	HW	95.5	0.2	100	91	84
3	ISM(Pink)	95.8	0.1	100	76.1	36.5
4	ISM(Pink)	93.2	0	99.9	78.6	64.5
5	ISM 1	97.8	0.2	99	74.8	66.4
6	ISM 2	98.6	0.2	100	92.2	86
7	ISM 1	98.1	0.1	99.9	88.8	80.3
8	ISM 1	99.1	0.1	99.9	93.8	83.3
9	ISM 2	97.2	0.1	99.9	88.3	81
10	ISM5	98	0.1	99.3	93.1	85.7
11	ISM6	72.6	0.2	99.9	94.7	88.9
12	ISM6	85.9	0.7	99.4	71.9	54.1
		CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81
	평균	93.6	0.1	99.8	87.8	76.6
	표준편차	8.3	0.1	0.3	7.6	15.5

[0214]

[0215] [표 9]

단계-일수-시간	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81			
S0D3-24H	0.626	95.8	0.1	99.8	87.9	74			
	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	CD9	CD184	CD99					
S1D3-24H	0.9	50.7	98.9	99					
	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	NKX6.1	크로모그라닌	NKX2.2	PDX1	FOXA2			
S4D1-24H	0.943	69.3	14.2	23.6	98.8	99.7			
	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	NKX6.1	크로모그라닌	CDX2	SOX2	NKX2.2	PDX1	FOXA2	NEUROD
S4D3-24H	1.002	66.2	35.6	0.3	15.8	38.1	99	99	45.6

[0216]

[0217] **재료:**

[0218] ● 인간 배아줄기(hES) 세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)

[0219] ● PBS(카탈로그 번호 14190, 인비트로젠)

[0220] ● Y-27632(약소라 카탈로그 번호 ALX-270-333, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)

[0221] ● EDTA(론자, 카탈로그 번호 17-7-11E)

[0222] ● 뉴클레오카운터®(케모메텍 에이/에스, 카탈로그 번호 YC-T100, 덴마크 알레로드 소재)

[0223] ● 비-조직 배양물 처리된 6웰 디쉬(백톤 딕킨슨, 카탈로그 번호 팔콘351146, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이스크 소재)

[0224] ● 아큐타제®(시그마, 카탈로그 번호 A-6964, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)

[0225] ● pH, 및 용존 산소(DO) 생물반응기 프로브(핌프로브® pH 전극 225 mm, 모델 번호 F-635, 및 DO 옥시프로브® 12 mm 센서, 모델 번호 D-145, 미국 캘리포니아주 어바인 소재의 브로들리-제임스 코퍼레이션으로부터 입수됨)

[0226] ● 면역-보호성 거대 캡슐화 장치(테트라사이트™, 미국 캘리포니아주 어바인 소재)

[0227] ● Mm 인간 C-펩타이드 ELISA(메르코디아 카탈로그 번호 10-1141-01)

[0228] ● 글루타맥스™, MCDB131, 및 ITS-X; 인비트로젠

[0229] ● FAF-BSA(프롤리언트(Proliant))

[0230] ● 레티노산, 글루코스 45%(2.5M), SANT(Shh 억제제)(시그마)

[0231] ● GDF8(페프로텍)

[0232] ● MCX

[0233] ● FGF7(알앤디 시스템즈)

- [0234] ●LDN-193189(BMP 수용체 길항제)(스텝젠트)
- [0235] ●TPPB(PKC 활성화제)(켄파트너(ChemPartner))
- [0236] ●MCDB 131 주문제작 배지
- [0237] 실시예 8
- [0238] 동결보존된 생물반응기에 의해 생성된 체장 선조세포 클러스터의 성숙 및 기능
- [0239] 각각의 생물반응기 연구를 위해 충분한 세포를 생성하기 위하여 H1 hES(WB0106) 세포의 31회째 계대배양 마스터 세포 배크 바이알 하나를 해동시켰다. 5개의 매트릭셀™ 코팅된 2-층 셀스택®(CS2)에 시딩하기에 충분한 세포를 생성할 때까지, EDTA 계대배양을 사용하여 매트릭셀™ 상에서 수 회의 계대배양 동안 mTeSR® 1 배지 중에서 부착 조건 하에서 세포를 증폭시켰다. 일단 CS2 내에서 성장하는 부착성 세포가 70% 용합을 나타내면, 인접한 펌프 튜빙을 갖는 C-플렉스® 튜빙 조립 캡을 배지 포트에 부착시켜 시스템을 폐쇄하였다. 시스템을 폐쇄시킨 후에, 백 또는 병을 테루모 용접기를 통해 C-플렉스®에 용접하고, 모든 액체 부피(배지, PBS^{-/-}, 아큐타제®, 또는 현탁된 세포)를 연동 펌프를 사용하여 옮겼다.
- [0240] CS2로부터 세포를 리프팅하기 위해, 칼슘 또는 마그네슘을 갖지 않는 돌베코 인산염 완충 식염수(PBS^{-/-})로 세포를 1회 세척하고, 이어서 동일 부의 PBS^{-/-}로 희석된 아큐타제®의 1/2 농도 용액으로 처리하고 4 내지 5분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 아큐타제® 용액을 제거하고, 효소 용액의 적용 후 3분째에, CS2를 탭핑하여 세포 리프팅을 조장하였다. 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 mTeSR® 1 한 병을 CS2 내로 펌핑하여 잔류하는 아큐타제®를 행구어 불활성화시키고, 이어서 행굼액을 수집하였다. 제2 행굼 부피를 첨가하고, 수집하고, 제1 행굼액과 혼주시켰다. 1.6 내지 2.0 × 10⁹개 세포를 2 리터의 최종 부피로 CS2로부터 회수하였다. 총당 2.0 내지 2.5 × 10⁸개 세포를 4개의 CS2 또는 8개의 1-층 셀스택™ 내로 옮기고 총당 200 mL의 부피로 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0241] 셀스택® 배지 포트들 사이에 인접한 펌프 튜빙이 부착된 C-플렉스® 튜빙의 폐쇄 루프를 사용하여, 세포 현탁액을 연동 펌프에 의해 5분 동안 75 rpm으로 분쇄하여 응집체를 균질화하였다. 이어서, 셀스택®을 가습된 5% CO₂인큐베이터 내에서 37°C에서 18시간 동안 하룻밤 인큐베이션하였다. 이어서, 셀스택®으로부터의 2 리터의 세포 및 배지를 혼주하고, 2개의 3 리터 다스립 생물반응기에 각각 1 리터씩, 생물반응기당 1.5 리터의 새로운 mTeSR® 배지와 함께, 옮겼다. 생물반응기 접종 후 24시간째에 완전한 배지 교체를 행하면서, 분화 개시 전에 추가 2일 동안 mTeSR® 배지와 함께 세포를 유지하였다. 이어서, 표 10에 기재된 바와 같이 분화를 개시하고 유도하였다. 온도(37°C), pH(드리프트, 또는 CO₂에 의해 만능 세포의 경우 6.8 또는 7.2로 그리고 분화의 경우 7.4로 조절됨), 및 용존 산소(30% DO 설정점, CO₂/공기가 조절됨)에 대해 조절된 폐쇄된 멸균 현탁 생물반응기 내에서 총 14일 또는 15일(2일의 mTeSR® + 12일 또는 13일의 단계화된 분화) 동안 세포를 유지하였다. 임펠러를 각각의 배지 교체 전에 5 내지 20분 동안 정지하여 클러스터가 정착되게 하였다. 테루모™ 튜브 용접기를 사용하여 C-플렉스® 튜빙(콜-파머 노스 아메리카(Cole-Parmer North America), 미국 일리노이주 버논힐즈 소재)에 연결된 딥 튜브를 통해 연동 펌프에 의해 배지를 제거하거나 첨가하여 폐쇄된 시스템을 유지하였다. 일단 충분한 배지를 첨가하여 임펠러가 잠기면, 임펠러 및 가열 재킷에 재동력공급하였다.
- [0242] 2개의 생성 실시를 이들 방법을 사용하여 3 리터 반응기 내에서 개시하였다. 첫 번째 반응기 실시에서는, 2개의 상이한 pH 설정점을 만능 배양 배지의 처음 2일에 걸쳐 시험하였다. 반응기 1은 5%의 고정된 CO₂ 가스 주입률과 함께 pH 7.2로 설정하여, 반응기 환경이 세포의 대사 활성으로 인해 시간이 지나면서 산성화됨에 따라 pH는 더 낮게 "드리프트"될 것이다. 반응기 2는 pH를 7.2로 설정하고, 이를 CO₂ 가스 수준에 의해 조절하였다. 두 번째 반응기 실시에서는, pH를 반응기 1의 경우 6.8로 그리고 반응기 2의 경우 7.2로 설정하고, 둘 모두 CO₂ 가스 수준에 의해 조절하였다.
- [0243] 생물반응기 과정을 모니터링하기 위하여, 세포 클러스터를 분화의 각각의 단계 말기에 취하여 유세포측정법에 의해 분석하였다(표 11; 표 12). 분화 개시 시에 CD9 발현/CXCR4 음성 만능 세포 집단으로부터 한정 내배엽 형

성의 완료 시에 CXCR4 발현 세포(96.9 내지 98.1%의 세포가 CXCR4 양성임)의 균질 집단으로의 거의 완전한 전이가 관찰되었다.

- [0244] 유세포측정법에 의해 관찰된 결과는 rt-PCR에 의해 분석된 쌍을 이룬 샘플로부터의 결과와 상관되었다. 만능성으로부터 체장 운명까지의 단계화된 분화에 특징적인 유전자 발현에 대한 과정 전체에 걸쳐 샘플을 시험하였다. 유도 분화의 개시 전에, 만능성 또는 초기 분화 운명과 관련된 유전자 패널에 대한 저밀도 어레이 상에서 생물반응기 세포 클러스터로부터 mRNA를 시험하였다.
- [0245] 생물반응기로부터의 세포는 만능성에 특징적인 유전자(POU5F1, NANOG, SOX2, 및 ZFP42)에 대한 발현을 보유하고 있으며, 미분화된 H1 대조군과 대비하여 분화에 특징적인 유전자(AFP, 및 FOXA2: 50배 미만의 증가; FOXD3, GATA2, GATA4, GSC, HAND2, MIXL1 및 T: 10배 미만으로 증가된 발현)의 최소한의 유도 또는 무유도를 나타낸 것으로 관찰되었다(도 33). 그러나, 일단 세포가 1기 1일째의 분화 배지와 접촉하면, CDX2, CER1, FGF17, FGF4, FOXA2, GATA4, GATA6, GSC, MIXL1, MNX1, 및 단미증(T) 발현의 수준이 미분화된 H1 hES 세포보다 100 내지 1000배 더 크게 증가함에 따라 유전자 발현 패턴은 급격히 변화하였다(도 34). 1기 3일째의 말기(완성 내배엽의 형성)까지, CD9, CDX2, FGF4, MIXL1, NANOG, POU5F1, 및 단미증(T)은 1기 1일째와 대비하여 발현이 감소하였으며, 한편 CD99, CER1, CXCR4, FGF17, GATA4, GATA6, KIT, OTX, 또는 SOX17과 같은 특징적인 완성 내배엽 유전자의 발현은 피크였다(도 35).
- [0246] 1기의 말기에, 세포 배양 배지를 GDF8을 함유하는 것으로부터 FGF7을 함유하는 배지로 교체하였다. 몇몇 상이한 유전자 발현 패턴이 주목되었다: 2기의 과정에 걸쳐 소정 유전자(AFP, ATOH1, HHEX, OSR1, PDX1, PROX1, SOX2, 및 SOX9)의 발현에 있어서의 증가, (HAND1 및 SOX17)의 발현에 있어서의 감소, (HNF4 α)의 전체에 걸친 안정한 고 발현, 또는 (CDX2, GAST, NKX2.2, NKX6.1, 및 PTF1a)의 저/비발현(도 36a 내지 도 36e). 이들 패턴은 반응기 내의 세포가 중배엽 마커(HAND1 및 SOX17)에 대한 전장(AFP, ATOH1, HHEX, HNF4 α , OSR1, PDX1, PROX1, SOX2, 및 SOX9) 발현이 감소되어 가고 있음을 나타내었다. 그러나, 2기 말기까지, 세포는 더 성숙한 장 또는 체장 운명(CDX2, GAST, NKX2.2, NKX6.1, 및 PTF1a)으로 여전히 예정화되지 않았다.
- [0247] 3기의 말기까지, 세포는 PDX1 발현에 의해 측정된 바와 같이 체장 계통으로 예정화되었는데, PDX1 발현은 미분화된 대조군과 대비하여 mRNA에 있어서 100,000배 초과로 증가하였으며(도 36), 유세포측정법에 의해 PDX1을 발현하는 세포가 76 내지 98%인 것(표 11)에 의해 입증되었다. 또한, 체장의 다른 유전자(GAST, NKX2.2, NKX6.1, PROX1, PTF1a, 및 SOX9) 및 AFP 및 CDX2와 같은 장의 유전자의 유도가 관찰되었는데; 이는, 세포가 더 성숙한 운명으로 예정화되기 시작하였음을 나타낸다.
- [0248] 4기 3 또는 4일째에서의 분화 과정의 말기까지, 세포는 체장 내분비 세포(47 내지 54%가 크로모그라닌 양성임) 및 체장 선조세포(33 내지 52%가 NKX6.1에 대해 양성임)의 혼합물과 일치하는 발현 패턴을 나타내었는데, 이는 표 11 및 표 12에 나타낸 바와 같다. 이러한 단계 특이적 마커 발현 패턴은 만능 집단으로부터, 미분화된 H1 인간 배아줄기세포와 대비하여, PDX1의 고 발현 수준(1×10^6 배 초과)의 유도 및 다른 체장 유전자의 고 발현 수준(ARX, GCG, GAST, INS, ISL, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PTF1a, 및 SST의 1000배 초과)의 유도) 그리고 OCT4/POU5F1 발현의 거의 완전한 손실을 특징으로 하는 체장 선조세포로의 효율적인 단계적 분화를 나타내었다(도 37).
- [0249] 분화 과정의 말기에, 0.08 내지 0.45×10^6 개 세포/mL를 생성하였다(도 38: 일일 세포 카운트). 이어서, 이 과정에서 생성된 세포를 동결보존하거나, 또는 테트라사이트™ 장치를 통해 동물 내에 직접 피하 이식하거나 신장 피막 아래에 두었다. 세포를 동결보존시키기 위해, 이를 2.43 g/L 중탄산나트륨을 갖는 57.5% MCDB131, 30% 무제노 KSR, 10% DMSO, 및 2.5% HEPES(최종 농도 25 mM)로 구성된 동결보존 배지에 옮겼다. 일단 세포 클러스터를 주위 온도에서 동결보존 배지 중에 현탁시키면, 동결-바이알을 프로그램화 동결기(CRF)로 15분 이내로 이동해 두었다. 이어서, 챔버 온도를 45분 동안 4°C로 감소시키고, 추가로 2.00°C/min으로 -7.0°C(샘플)까지 감소시켰다. 이어서, 챔버의 온도를 25.0°C/min의 속도로 -45.0°C까지 감소시켜 샘플을 신속하게 냉각시켰다. 이어서, 챔버 온도를 10.0°C/min으로 -25.0°C(챔버)까지 증가시키므로써 보상 증가를 제공하였다. 이어서, 온도가 -40.0°C에 도달할 때까지 0.2°C/min으로 샘플을 냉각시켰다. 이어서, 챔버를 35.0°C/min의 속도로 -160°C까지 냉각시키고 그 온도에서 15분 동안 유지하였다. 샘플을 CRF 실시의 종료 시에 가스상 액체 질소 저장 용기로 이동하였다.
- [0250] 세포를 가스상 액체 질소 중에 저장한 후에, 세포를 저장소로부터 꺼내어서 해동시키고 37°C 수욕으로 옮겼다. 작은 빙정이 바이알 내에 남을 때까지, 바이알을 수욕 중에서 2분 미만 동안 온화하게 와동시켰다. 이어서, 바

이알 내용물을 50 ml 원추형 튜브에 옮기고, 2.43 g/L 중탄산나트륨 및 2% BSA를 갖는MCDB131 배지를 사용하여 총 20 ml의 최종 용적이 될 때까지 2분에 걸쳐 적가하여 희석시켰다. 이어서, 총 세포수를 뉴클레오카운터[®]로 측정하고, 세포 현탁액을 초저부착 배양 디쉬에 1시간 동안 옮겨 두었다. 이어서, 세포를 50 ml 원추형 튜브 내에서 배지로부터 단리하고, 상층액을 제거하고 세포를 4기 배지 중에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 테트라사이트™ 장치를 통해 동물에 피하 이식하거나 또는 신장 피막 아래에 이식하거나 또는 세포를 초저부착 배양 디쉬 내에서 하룻밤 인큐베이션한 후 동물에 이식하였다.

[0251] 동물을 혈당 및 C-펩타이드 수준에 대해 이식편 이식 후 매 4주마다 모니터링하였다. 테트라사이트™ 장치 내부의 비-동결보존된 췌장 전구세포로 처리되거나 또는 신장 피막 아래에 세포를 직접 뚫으로써 처리된 동물은 성숙하여 16주까지 1 ng/mL 초과 C-펩타이드를 발현하였으며 이식 후 20주까지 2 ng/mL의 C-펩타이드에 도달하였다(도 39a 및 도 39d). 더욱이, STZ로 처리하여 숙주 β-세포 기능을 제거한 경우, 생착된 동물은 이식편이 제거될 때까지 정상 혈당(normo-glycemia)을 유지하였는데, 이는, 이식편이 단회 고용량의 STZ에 의해 유도된 당뇨병으로부터 동물을 보호하는 데 컴피턴트를 나타내었음을 나타낸다(도 39b).

[0252] 이 패턴은 또한 동결보존된 세포로 처리된 동물에서 관찰되었다. 해동 후 1시간 동안 배양된 동결보존된 췌장 전구세포(1207B)를 사용한 신장 피막 이식편에 의해 처리된 동물은 16주째 및 20주째에 각각 평균 0.56 ng/mL 및 1.09 ng/mL의 C-펩타이드를 가졌으며, 한편 해동 후 하룻밤 배양된 세포(1207C)는 16주째 및 20주째에 각각 평균 0.81 ng/mL 및 1.35 ng/mL의 C-펩타이드를 가졌다(도 39d). 테트라사이트™ 장치 내부의 동결보존된 췌장 전구세포로 처리된 동물은 16주까지 1 ng/mL 초과 C-펩타이드를 가졌으며, 비-동결보존된 대조군과 유사하게, STZ 처리 후 1주째에 치료적 수준의 C-펩타이드를 발현할 수 있었다(0.98 ng/mL, 도 39c). 이들 결과는 동결보존된 췌장 전구세포가 동물 모델에서 시험될 때 비-동결보존된 대조군과 비견될 정도로 기능할 수 있음을 나타낸다.

[0253] [표 10]

개시일/개시 일자:	0 기	1 기	2 기	3 기	4 기
기본 배지	mTeSR [®] 1	MCDB131 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 (3.64 g/L NaCO ₃)
보충물		2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:50,000 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:50,000 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:200 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:200 ITS-X 글루타맥스 1:100
성장 인자		<u>2 일째에만:</u> GDF8 100 ng/mL	FGF7 50 ng/mL	FGF7 50 ng/mL	없음
소분자	Y-27632 (0 일째에만) [1:1000; 10 μM]	<u>1 일째에만:</u> MCX [3 μM]		RA[2 μM] SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM] <u>1 일째에만</u> LDN [100 nM]	SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM]
일수	3	3	3	3	3
주:		1 및 2 일째에 배지 교체, D3에 교체 없음	1 및 3 일째에 배지 교체, 2 일째에 교체 없음	1 및 2 일째에 배지 교체, D3에 교체 없음	1 일째에만 배지 교체, 3 일째에 글루코스 불루스

주:

- 상기 표 10에서의 기본 배지는 글루타맥스가 보충물에 사용되지 않는 경우 1 내지 5 기에서 5 mM 글루코스를 선택적으로 포함할 수 있다.
- Cyp1(100 nM)가 상기에 나타낸 표 10에서 4 기에서 선택적으로 첨가될 수 있다.

[0254]

[0255] [표 11]

만능성	과정 일수	명칭	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81	
	2	Bx1	78.9	0.1	100	54.5	51.1	
		Bx2	66.5	0.0	100	63.5	72.3	
		명칭	CD9	CD184				
DE(S1D2)	4	BX1	9.9	87.9				
		BX2	19.7	83.1				
DE(S1D3)	5	BX1	17.4	98.1				
		BX2	25.4	96.9				
		명칭	Nkx6.1	Nkx2.2	PDX1			
PE(S3D3)	11	BX1	4.4	25.2	98.6			
		BX2	4.8	28.9	76.2			
		명칭	Nkx6.1	시넵토파이신	CDX2	Sox2	Nkx2.2	크로모 그라닌
PPC(S4d3)	14	BX1	33.2	67.4	2.1	13.0	69.3	51.1
		BX2	35.1	56.9	1.9	11.5	64.4	51.2

[0256]

[0257] [표 12]

만능성	과정 일수	명칭	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81	
	2	BX1	99.8	0.3	100.0	88.6	85.8	
		BX2	99.8	0.3	100.0	86.8	85.9	
		명칭	CD9	CD184	CD99			
DE(S1d3)	5	BX1	88.3	99.2	97.0			
		BX2	78.3	99.3	96.9			
		명칭	Nkx6.1				Nkx2.2	크로모 그라닌
PE(S3d3)	11	BX1	6.3				23.2	8.5
		BX2	1.2				24.6	11.5
		명칭	Nkx6.1	시넵토파이신	CDX2	Sox2	Nkx2.2	크로모 그라닌
PPC(S4d3)	14	BX1	49.0		7.3	13.1	56.1	49.2
		BX2	52.6		3.1	19.9	54.5	47.4
PPC(S4d4)	15	BX1	48.4	53.1	0.4	4.9	60.3	44.3
		BX2	45.7	66.5	0.2	4.5	63.7	54.3

[0258]

교반 탱크 생물반응기 내

에서 세포 응집체에 가해진 전단 응력의 계산

[0259]

3 L 다스깁 생물반응기 내에서 70 rpm의 교반 속도로 혼합된 2.7 리터 다스깁 교반 현탁 생물반응기 내에서 세포 응집체에 가해진 전단 응력을 측정하였다. 전단 응력 값을 계산하기 위하여, 다음에 기재된 바와 같이 가정하였다.

[0260]

가정:

[0261]

1. 세포 응집체에 부과된 최대 전단 응력은 난류성 와류(turbulent eddy)의 결과가 아니다.

[0262]

2. 세포 응집체에 부과된 최대 전단 응력은 응집체-응집체 또는 응집체-임펠러 충돌의 결과가 아니다.

[0263]

3. 배플(baffle)(즉, 딥 튜브 및 프로브)에 의해 부과된 전단 응력은 이들 계산에 반영되지 않는다.

[0264]

본 명세서에서의 계산을 위하여, 하기에 열거된 명명법 및 물리적 파라미터를 사용하였다.

[0265] 명명법:

약어		단위
P	유체 밀도	kg/m ³
μ	유체 점도	Pa s
θ	동점도	m ² /s
τ_{max}	최대 전단 응력	dyn/cm ²
N	교반	rev/sec
P	소비된 동력	kg m ² /s ³
P _N	동력수	무차원
Re	레이놀즈 수	무차원
ε	단위 질량당 소산된 동력	m ² /s ³
D _i	임펠러 직경	M
D _t	탱크 직경	M
W	임펠러 폭	M
V _L	액체 부피	m ³
K ₁ 내지 K ₄	나가타(Nagata) 경험적 상관계식에 기초하여 계산된 값	

[0266]

[0267] 파라미터:

생물반응기 파라미터		
D _i	0.08	m
D _t	0.13	m
W	0.04	m
V _L	0.0024	m ³

배지 파라미터		
밀도(ρ)	1000	kg/m ³
점도(μ)	8.50E-04	Pa s
동점도(θ)	8.50E-07	m ² /s

[0268]

[0269] 열거된 배지 파라미터 및 생물반응기 파라미터를 하기 식에 적용하였다.

[0270] 방정식:

[0271] 레이놀즈 수

$$Re = \frac{\rho N D_i^2}{\mu}$$

[0272]

[0273] 응집체에 대한 최대 전단 응력(문헌[Cherry and Kwon 1990])

$$\tau_{max} = 5.33\rho\sqrt{\varepsilon\theta}$$

[0274]

[0275] 단위 질량당 소산된 동력(ϵ)

$$\epsilon = \frac{P}{V_L \rho}$$

[0276]

[0277] 소비된 동력(P)

$$P = P_N N^3 D_i^5 \rho$$

[0278]

[0279] 동력수 계산은 배플이 없는 교반 탱크의 경우 나가타 (1975)에 의해 도출된 경험적 상관관계식에 기초하였다.

$$P_N = \frac{K_1}{Re} + K_2 \left[\frac{10 + 1.2Re^{0.66}}{10 + 3.2Re^{0.66}} \right]^{K_4}$$

[0280]

[0281] 여기서,

$$K_1 = 14 + \frac{W}{D_t} \left[670 \left(\frac{D_i}{D_t} - 0.6 \right)^2 + 185 \right]$$

$$K_2 = 10^{K_3}$$

$$K_3 = 1.3 - 4 \left[\frac{W}{D_t} - 0.5 \right]^2 - 1.14 \frac{D_i}{D_t}$$

$$K_4 = 1.1 + 4 \left(\frac{W}{D_t} \right) - 2.5 \left[\frac{D_i}{D_t} - 0.5 \right]^2 - 7 \left[\frac{W}{D_t} \right]^4$$

[0282]

[0283] 2.7 L 다스집 생물반응기 내에서 70 rpm의 교반 속도로 세포 응집체에 부과된 최대 전단은 적어도 2.5 dyn/cm²인 것으로 계산되었다. 클러스터의 최외층을 포함하는 세포는 최고 수준의 전단 응력을 겪는다. 이들 전단 응력 값은 기술된 가정에 크게 의존한다.

[0284] 실시예 9

[0285] 세포주 WA01로부터 완성 내배엽으로의 인간 배아줄기세포의 분화: 현탁 배양물에서의 MCX/GDF8의 역할

[0286] 삼각 플라스크/진탕 플라스크, 스피너 플라스크, 또는 코팅되지 않은 초저결합 또는 비-조직 배양물 처리된 6웰 플레이트 내에서, 2% 무지방산 BSA(카탈로그 번호 68700, 프롤리언트, 미국 아이오와주 소재), 1X 글루타맥스™ (카탈로그 번호 35050-079, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 소재), 추가 2.5 mM 글루코스(카탈로그 번호 G8769, 시그마) 및 1:50,000 스톡 농도의 ITS-X(카탈로그 번호 51500056, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 소재)로 보충된, 3.64 g/ml 중탄산나트륨 및 5.5 mM 글루코스(카탈로그 번호 A13051 DJ, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 소재)를 함유하는 MCDB-131 배지 중에, 만능 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01)로부터의 클러스터를 0.25×10^6 내지 2×10^6 개 세포/ml 범위의 세포 밀도로 시딩하였다. 이러한 방식으로 보충된 MCDB-131 배지는 본 출원의 목적을 위해 "1기 기본 배지"로 지칭될 것이다. 3 μ M MCX(GSK3B 억제제, 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온, 미국 특허 출원 제12/494,789호; 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨) 및 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프روتек), 또는 3 μ M MCX 단독, 또는 20 ng/ml WNT-3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재)와 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) 또는 20 ng/ml WNT-3A 단독으로 이 배지 중의 클러스터를 분화 1일째에 처리하였다. 2일째에, 세포를 100 ng/ml GDF8 또는 100 ng/ml 액티빈 A로 보충된 새로운 1기 기본 배지에 옮겼다. 유세포측정법, PCR 및 웨스턴 블롯(Western Blot) 분석을 위해 0시간제(기본 배지 + 보충물의 첨가 직후)부터 분화 개시 후 72시간제까지에 이르는 범위의 다양한 시점에서 샘플을 수집하였다.

[0287] 각각의 조건 하에서, 분화 3일 후에 유세포측정법을 사용하여 세포 표면 마커 CXCR4, CD99 및 CD9를 발현하는 세포의 백분율을 측정함으로써, 완성 내배엽의 생성 효율을 측정하였다. (도 40a 내지 도 40d에서의 FACS 도표

에 나타나 있고 표 13에 요약되어 있는 바와 같은) 데이터는 현탁 배양물 중에, 분화 1일째에 TGF-β 패밀리를 구성원의 부재 하에서의 3 μM MCX의 첨가가, 1일째에 3 μM MCX + 100 ng/ml GDF-8 또는 20 ng/ml WNT-3A + 100 ng/ml 액티빈 A로 세포를 처리하는 경우 획득된 것과 비견되는 수준으로 완성 내배엽을 생성함을 나타낸다.

[0288] [표 13]

처리 (1 일째 → 2 및 3 일째)	CD9 (FACS 에 의한 %)	CD99 (FACS 에 의한 %)	CD184 (부모의 %)
MCX + GDF8 → GDF8	1.5	0.0	95.3/95.4
MCX 단독 → GDF8	6.4	0.0	93.6/93.6
WNT3a + 액티빈 A → 액티빈 A	3.3	22.1	98.1/97.5
WNT3a 단독 → 액티빈 A	31.7	6.2	87.8/86.1

[0289]

[0290] 실시예 10

[0291] 세포주 WA01로부터 완성 내배엽으로의 인간 배아줄기세포의 분화: 현탁액 반응물 중 MCX 화합물 농도의 용량 반응

[0292] 삼각 플라스크/진탕 플라스크 또는 스피너 플라스크 내에서, 실시예 9에 기술된 바와 같은 1기 기본 배지 중에, 만능 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01)로부터의 클러스터를 0.25×10^6 내지 2×10^6 개 세포/ml 범위의 세포 밀도로 시딩하였다. 분화 1일째에는 1.5, 2, 3 또는 4 μM MCX를 함유하는 1기 기본 배지로 그리고 2 일째에는 100 ng/ml GDF-8을 함유하는 새로운 1기 기본 배지로 클러스터를 처리하였다. 3일째에는 배지 교체를 수행하지 않았다. 유세포측정법 및 PCR 분석을 위해 분화의 3일째 말기에 샘플을 수집하였다.

[0293] 이어서, 유세포측정법을 사용하여 세포 표면 마커 CXCR4, CD99 및 CD9를 발현하는 세포의 백분율을 측정함으로써, 완성 내배엽의 생성 효능을 측정하였다. (도 41a 내지 도 41d에서의 FACS 도표에 나타나 있고 표 14에 요약되어 있는 바와 같은) 데이터는 현탁 배양물 중에, 2 μM 미만의 농도에서의 MCX의 첨가가 (더 낮은 백분율의 CXCR4 양성 세포 및 더 높은 백분율의 CD9 양성 세포에 의해 입증되는 바와 같이) 점진적으로 더 적은 수의 완성 내배엽 양성 세포를 생성함을 나타낸다. 또한, 4 μM 초과 농도에서, MCX는 세포에 해로운 영향을 나타내며, 그 결과 감소된 세포 생존력을 가져온다. 그러나, BSA 농도를 증가시킴으로써, MCX의 영향이 조절될 수 있어서, 4 마이크로몰 이상의 농도가 사용되게 할 수 있다. 역으로, 1.5 마이크로몰 이하의 농도를 사용하여, 더 낮은 BSA 농도와 함께 사용되는 경우에, 완성 내배엽을 생성할 수 있다.

[0294] [표 14]

처리	CD9(FACS 에 의한 %)	CD184(FACS 에 의한 %)
4 μM MCX	1.0	95.2
3 μM MCX	0.2	96.0
2 μM MCX	0.2	96.5
1.5 μM MCX	68.4	67.8

[0295]

[0296] 실시예 11

[0297] 세포주 WA01로부터 완성 내배엽으로의 인간 배아줄기세포의 분화: 현탁 배양물에서의 배지 교체 빈도의 역할

[0298] 삼각 플라스크/진탕 플라스크 또는 스피너 플라스크 내에서, 실시예 9에 기술된 바와 같은 1기 기본 배지 중에, 만능 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01)로부터의 클러스터를 0.25×10^6 내지 2×10^6 개 세포/ml 범위의 세포 밀도로 시딩하였다. 분화 1일째에는 3 μM MCX를 함유하는 1기 기본 배지로 그리고 2일째에는 100 ng/ml GDF-8을 함유하는 새로운 1기 기본 배지로 클러스터를 처리하였다. 대조군 배양물은 3일째에 배지 교체를 받았으며; 별개의 용기에 대해서는, 배지 교체를 3일째에 수행하지 않았다. 유세포측정법 및 PCR 분석을 위해 분화의 3일째 말기에 샘플을 수집하였다.

[0299] 이어서, 각각의 조건 하에서, 유세포측정법을 사용하여 세포 표면 마커 CXCR4, CD99 및 CD9를 발현하는 세포의 백분율을 측정함으로써, 완성 내배엽의 생성 효능을 측정하였다. 결과는 도 42a 및 도 42b에 FACS 도표로 나타나 있고 표 15에 요약되어 있다.

[0300] [표 15]

처리	CD9(FACS에 의한 %)	CD99(FACS에 의한 %)	CD184(FACS에 의한 %)
1기에 완전한 배지 교체	0.2	72.4	90.2/89.6
1기 3일째에 급식을 건너뛴	0.9	68.3	89.2/89.8

[0301]

[0302] 실시예 12

[0303] 세포주 WA01로부터 완성 내배엽으로의 인간 배아줄기세포의 분화: 세포 현탁액에서의 글루타맥스™의 사용

[0304] 삼각 플라스크/진탕 플라스크 또는 스피너 플라스크 내에서, 만능 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01)로부터의 클러스터를 0.25×10^6 내지 2×10^6 개 세포/ml 범위의 세포 밀도로 시딩하였다.

[0305] 이 실시예를 수행하여 완성 내배엽을 생성하는 데 글루타맥스™ 보충물이 필요한지의 여부를 결정하였는데, 이는 분화 1일째에 3 μM MCX로 보충되고 2일째에 100 ng/ml GDF-8을 함유하는 새로운 1기 기본 배지로 보충된 글루타맥스™가 함유되거나 함유되지 않은 1기 기본 배지(실시에 9에 기술됨) 중에 클러스터를 현탁시킴으로써 수행하였다. 3일째에는 배지 교체를 수행하지 않았다. 유세포측정법 및 PCR 분석을 위해 분화의 3일째 말기에 샘플을 수집하였다.

[0306] 각각의 조건 하에서, 유세포측정법을 사용하여 세포 표면 마커 CXCR4, CD99 및 CD9를 발현하는 세포의 백분율을 측정함으로써, 완성 내배엽의 생성 효능을 측정하였다. 데이터 및 결과는 도 43a 및 도 43b에 FACS 도표로 나타나 있고 표 16에 요약되어 있다.

[0307] [표 16]

처리	CD9(FACS에 의한 %)	CD99(FACS에 의한 %)	CD184(FACS에 의한 %)
X 글루타맥스™	0.2	93.7	96.8/96.7
0 글루타맥스™	1.3	95.6	97.7/97.3

[0308]

[0309] 실시예 13

[0310] 세포주 WA01로부터 완성 내배엽으로의 인간 배아줄기세포의 분화: 현탁 배양물에서의 중탄산나트륨 농도의 역할

[0311] 삼각 플라스크/진탕 플라스크 또는 스피너 플라스크 내에서, 실시예 9에 기술된 바와 같은 1기 기본 배지(3.64 g/l 중탄산나트륨을 함유함) 중에, 또는 2.43 g/l 중탄산나트륨을 함유하는 변형된 1기 기본 배지 중에, 만능 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01)로부터의 클러스터를 0.25×10^6 내지 2×10^6 개 세포/ml 범위의 세포 밀도로 시딩하였다. 클러스터를 실시예 12에 기술된 바와 같이 MCX 및 GDF-8을 함유하는 1기 기본 배지로 처리하였다. 유세포측정법을 위해 분화의 3일째 말기에 샘플을 수집하였다. 위상차 영상을 또한 분화의 각각의 일수에 캡처하였다.

[0312] 이어서, 유세포측정법을 사용하여 세포 표면 마커 CXCR4, CD99 및 CD9를 발현하는 세포의 백분율을 측정함으로써, 완성 내배엽의 생성 효능을 측정하였다. 데이터는 도 44a 및 도 44b에 FACS 도표로 나타나 있고 표 17에 요약되어 있다. 현탁 배양물에서, 2.43 g/L로 낮은 중탄산나트륨 수준은, 세포가 3.64 g/L를 함유하는 배지 중에서 분화된 경우(평균 97.35%의 세포가 CXCR4를 발현함)보다 덜 효율적으로(평균 87.4%의 세포가 CXCR4를 발현함) 완성 내배엽을 생성하는 것으로 나타난다. 게다가, 위상차 현미경법에 의해 관찰된 바와 같이, 중탄산염 수준에 있어서의 차이는 1기 말기에 클러스터 형태에 있어서의 차이와 상관된 것으로 관찰되었다(도 44c 및 도 44d). 또한, 고 중탄산염 수준 하에 분화된 세포는 2.43 g/L의 중탄산염에서 분화된 세포보다 더 느슨한 클러스터를 형성하는 것으로 밝혀졌다.

[0313] [표 17]

처리	CD9 (FACS에 의한 %)	CD99 (FACS에 의한 %)	CD184 (FACS에 의한 %)
3.64 g/L 중탄산나트륨	5.5	92.7	97.7/97.0
2.43 g/L 중탄산나트륨	12.3	66.7	86.4/88.4

[0314]

[0315] 실시예 14

[0316] 스케일 조정가능한 생물반응기 과정에서 인간 유도 만능 줄기세포로부터 체장 선조세포 클러스터의 생성

[0317] 세포 요법은 용량당 다수(10^8 개 초과)의 세포를 필요로 할 것이다. 이 실시예는 현재의 세포 요법 제조 실시로 가능한 것보다 3 내지 5 자리수 더 큰 크기로 유도 만능 줄기세포(iPS 세포) 덩어리를 분화시킬 수 있는 과정을 보여준다.

[0318] 이 실시예에서는, iPS 세포주를 사용하였다 - UTC(미국 특허 출원 제13/330,931호(미국 특허 출원 공개 제 2013/0157365호)에 이미 기술된 제대 조직 세포로부터 유래되었으며, 이의 개시내용은 iPS 세포주를 유도하는 것에 관한 것인 것과 같이 참고로 포함됨). "풋-프린트" 없는("foot-print" free) 방식으로 플라스미드 형질감염을 사용하여 마우스 배아 영양세포 상에서 세포를 유도하고 15회째 계대배양에서 동결보존하였다.

[0319] 이들 동결보존된 세포로부터, 공급원 물질 바이알을 라이프 테크놀로지스 코포레이션(미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)으로부터의 이센셜 8™ 배지(E8™) 중 인간 재조합 라미닌(hrLaminin, 카탈로그 번호 LN-521, 스웨덴 스톡홀름 소재의 바이오라미나(Biolamina)로부터 입수됨) 상에 직접 해동시켜 사내 시드 물질을 생성함으로써 일련의 세포 배양을 생성하였다. 해동 및 증폭된 이 물질은 "프리-프리 마스터 세포 배양(Pre-Pre Master Cell Bank)"(Pre-Pre MCB)로 명명되었으며, 이는 미래의 배양을 위한 시드 물질로서의 역할을 하였다. 이어서, pre-pre MCB 3을 사용하여, 순차적인 세포 배양, 즉 Pre-MCB, MCB, 및 작업 세포 배양(WCB)을 생성하였다. 이어서, 하나의 WCB 바이알을 E8™ 중에서 3회의 계대배양 동안 EDTA 계대배양을 사용하여 hrLaminin 상에서 해동시키고, 증폭시켰다. 세포를 먼저 해동물로부터 T225 플라스크(코닝; 미국 뉴욕주 코닝 소재) 내로 시딩하고, 이어서 다수의 T225 플라스크 내로 계대배양하였다. 이어서, 다수의 T225 플라스크를 계대배양하고 합하여 단일의 1-층 셀스택™(CS1)에 시딩하였다. 일단 CS1 내의 세포가 융합되면, 세포를 PBS^{-/-}로 1회 세척하고, PBS^{-/-}로 희석된 아큐타제[®]의 1/2 농도 용액으로 처리하고 4 내지 5분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 아큐타제[®]를 제거하고, 효소 용액의 적용 후 3분째에, CS1을 탭핑하여 세포 리프팅을 조작하였다. 0.5% BSA로 보충되고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 E8™을 CS1에 첨가하여 잔류하는 아큐타제[®]를 행구어 불활성화시켰다. 이어서, 행굼액을 수집하고 제2 행굼 부피를 첨가하고, 수집하고, 제1 행굼액과 혼주시켰다.

[0320] 1 리터의 일회용 스피너 플라스크(코닝; 미국 뉴욕주 코닝 소재)에, 0.5% BSA로 보충되고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 배지 중에, 225 mL 리터 중 1×10^6 개 세포/mL의 농도로 세포를 옮겼다. 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 60분 동안 정치 현탁 상태로 세포를 클러스터링되게 하고, 이어서 5분 동안 55 내지 65 rpm으로 교반하고, 0.5% BSA로 보충되고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 225 mL의 추가 배지를 첨가하였다. 정치 배양물 중에서 추가 30분 동안 세포를 정착되게 하고, 이어서 0.5% BSA로 보충되고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632를 함유하는 150 mL의 추가 배지를 스피너 플라스크에 첨가하였다. 이후에, 세포를 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 50 내지 70 rpm으로 연속적으로 교반하였다. 24시간 후에, 스피너 플라스크를 인큐베이터로부터 꺼내고, 클러스터가 5 내지 10분 동안 정착되게 하였다. 이어서, 용기에 200 mL가 남을 때까지 배지를 흡인한 다음, 400 mL의 추가의 새로운 배양 배지를 스피너 플라스크에 첨가하였다. 이 과정을 2일째의 말기(옮긴 후 48시간째)에 반복하였다.

[0321] 이어서, 초기 아큐타제[®] 처리 후 72시간째에, 세포 클러스터 해리 및 스피너 플라스크 시딩(계대배양)의 과정을

반복하여, 다회의 계대배양(시험된 범위: 1 내지 10회의 계대배양) 동안 현탁 상태로 세포를 유지하였다.

- [0322] 이 과정을 사용하여, UTC iPS 세포를 기질 상의 부착성 배양물로부터 세포 클러스터로서 현탁 배양물로 전환시키고, 이어서 현탁 상태로 증폭시켰다. 이어서, 현탁 계대배양 및 배양된 이들 세포를 나중의 사용을 위해 동결보존 및 저장하였다. 동결보존을 위한 현탁 증폭된 세포를 제조하기 위하여, 세포를 40 마이크로미터 세포 여과기에 통과시키지 않은 것을 제외하고는, 전술된 바와 같이 세포 클러스터를 아큐타제[®]로 해리시켰다.
- [0323] 이어서, 각각 1 리터의 일회용 플라스크로부터 세포를 카운트하고, 필요에 따라 합하고, 80 내지 200 rcf로 5분 동안 원심분리하였다. 이어서, 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 가능한 한 완전히 상층액을 제거하였다. 이어서, 차가운(4°C 미만) 크라이오스토[®]10을 적가하여 1억 5000만개의 세포/mL의 최종 농도를 달성하고 세포 용액을 1.8 mL 코닝[®] 동결 바이알(코닝, 미국 뉴욕주 코닝 소재) 또는 15 mL 밀테니 동결 백(밀테니 바이오텍 인크., 미국 캘리포니아주 아우번 소재)에 옮기는 동안 빙욕 중에서 유지하였다.
- [0324] 이어서, 현탁 증폭된 세포를 바이알 내에서 다음과 같이 프로그램화 동결기 내에서 고밀도로 동결시켰다. 챔버를 4°C로 예비-냉각시키고 샘플 바이알 온도가 6°C에 도달할 때까지 온도를 유지하였다. 이어서, 샘플이 -7°C에 도달할 때까지 챔버 온도를 2°C/min으로 강하시켰다. 일단 샘플 바이알이 -7°C에 도달하면, 챔버가 -45°C에 도달할 때까지 챔버를 20°C/min으로 냉각시켰다. 이어서, 챔버 온도가 -25°C에 도달할 때까지 챔버 온도를 10°C/min으로 짧은 시간에 상승되게 한 다음, 샘플 바이알이 -45°C에 도달할 때까지 챔버를 0.8°C/min으로 추가로 냉각시켰다. 이어서, 챔버가 -160°C에 도달할 때까지 챔버 온도를 35°C/min으로 냉각시켰다. 이어서, 챔버 온도를 -160°C에서 적어도 10분 동안 유지하고, 이후에 바이알을 가스상 액체 질소 저장소에 옮겼다.
- [0325] 교반 탱크 생물반응기에 접종하기 위하여, 고밀도 동결보존 세포를 액체 질소 저장소로부터 꺼내고, 해동시켜, 폐쇄된 0.2 리터 유리 생물반응기(다스립; 독일 울리히 소재)에 시딩하는 데 사용하였다. 동결 바이알을 가스상 액체 질소 저장소로부터 꺼내어서, 105초 동안 37°C 수욕 중에 곧바로 넣어 두었다. 이어서, 해동된 바이알 성분을 2 mL 유리 피펫을 통해 50 mL 원추형 튜브에 옮겼다. 이어서, 0.5% BSA를 함유하고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632로 보충된 9 mL의 E8[™]을 튜브에 적가하였다. 이어서, 세포를 80 내지 200 rcf로 5분 동안 원심분리하였다. 이후에, 상층액을 튜브로부터 흡인하고, 0.5% BSA를 함유하고 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632로 보충된 10 mL의 새로운 E8을 첨가하였다. 세포를 함유하는 이 부피를 배지 전달 병(Cap2V8[®], 사니슈어, 미국 캘리포니아주 무어파크 소재) 내로 피펫팅하고, 병 내용물을 멸균 C-플렉스 튜빙 용접부를 통해 연동 펌프에 의해 생물반응기 내로 직접 펌핑하였다. 만능 줄기세포 접종을 위한 준비 시에, 생물반응기에 10 마이크로몰의 Rho 키나제 억제제 Y-27632 및 0.5% BSA로 보충된 E8[™] 0.15 L를 준비하고, 37°C로 예비-가온하고, 70 rpm으로 교반하고, CO₂에 의해 6.8 내지 7.1 pH로 조절하였는데, 이때 30%의 용존 산소 설정점(CO₂, 공기, O₂, 및 N₂가 조절됨)을 가졌다. 접종 직후에, 생물반응기를 세포 카운트를 위해 샘플링하고, 배지 부피를 필요에 따라 조절하여 0.225×10^6 개 세포/mL의 최종 세포 농도를 수득하였다.
- [0326] 교반 탱크 생물반응기 내로 접종된 세포는 연속 교반 탱크 내에서 세포 클러스터를 형성하였다. 접종 후, 세포 클러스터를 반응기 내의 0.5% BSA로 보충된 E8 배지 중에서 3일 동안 유지하였다. 배지를 매일 교체하였는데, 접종 후 24시간째에 폐배지의 90%를 제거하고 0.15 리터의 새로운 배지를 첨가하였다. 접종 후 48시간째에, 폐배지의 90%를 제거하고 0.15 리터의 새로운 배지를 첨가하였다. 접종 후 72시간째에, 폐배지를 90% 초과하여 제거하고 분화 배지(표 18)를 첨가함으로써 만능 세포 분화를 개시하였다.
- [0327] 일단 단계화된 분화 과정이 개시되면, 12일 이상 동안 온도(37°C), pH(분화의 경우 7.4), 및 용존 산소(1기의 경우 10% DO 설정점 및 모든 다른 시기에서는 30% DO 설정점, CO₂, O₂, N₂, 및 공기가 조절됨)에 대해 조절된 폐쇄된 멸균 현탁 생물반응기 내에서 세포를 유지하였다. 분화 과정 전체에 걸쳐, 각각의 배지 교체 시, 딥-튜브를 통한 배지 제거 전에 5 내지 20분 임펠러를 정지시켜 클러스터가 정착되게 하였다. 테루모[™] 튜브 용접기를 사용하여 C-플렉스[®] 튜빙에 연결된 딥 튜브를 통해 연동 펌프에 의해 단힌 병 또는 백으로/그로부터 생물반응기 내의 배지를 제거하거나 첨가하여 폐쇄된 시스템을 유지하였다. 일단 충분한 배지를 용기에 첨가하여 임펠러가 완전히 잠기면, 임펠러 및 가열기에 재동력공급하였다.
- [0328] 생물반응기 과정을 모니터링하기 위하여, 세포 클러스터를 함유하는 배지의 샘플을 매일 수거하여 세포수 및 생존력(뉴클레오카운터[®])을 측정하였으며, 이는 도 45에 나타낸 바와 같다. 0.225×10^6 개 생존 세포/mL의 접종물이 증폭되어 4기 3일째에 0.65×10^6 개 생존 세포/mL를 생성한 바와 같이, 세포의 일반적인 증폭이 이 과정

동안 관찰되었다(도 45).

- [0329] 일일 카운트 외에, 생물반응기 배지 샘플을 노바 바이오프로파일[®] 플렉스(노바 바이오메디칼 코퍼레이션, 미국 매사추세츠주 웰섬 소재)에 의해 분석하였다. 0기(pH 6.8)에서의 반응기 설정점마다, 0기에서의 배지의 pH는 0기에 걸쳐 산성(pH 6.8)이었다(도 46). 0기에서의 산성 설정점은 상대적으로 낮은 락트산에서 세포의 대사 활성을 감소시키는 것으로 나타났으며, 0기 배지 중의 고 글루코스 수준이 관찰되었다. 일단 세포가 3기 말기에 걸쳐 분화되기 시작하면, 세포는 배지 중의 거의 모든 글루코스를 소비하여(도 47) 고수준의 락트산을 생성하였다(도 48). 추가로, 세포 밀도에 있어서의 증가가 1 및 2기의 과정에 걸쳐 관찰되었다(도 45).
- [0330] pH 및 대사에 있어서의 단계 특이적인 변화가 qRT-PCR에 의해 측정하였을 때의 mRNA 발현 패턴에 있어서의 단계 변화와 매칭되는지를 결정하기 위하여, 다음을 행하였다. 만능성, 완성 내배엽(DE), 장관(GT), 또는 4기(S4)로 지정된 4개의 어플라이드 바이오시스템즈 저밀도 어레이를 사용하였다(라이프(Life)[™], 미국 캘리포니아주 칼스 배드 소재). 모든 실시 및 어레이에 걸쳐 발현을 표준화하기 위하여, 대조군으로서의 미분화된 UTCiPS 세포 샘플과 대비하여 배수 차이로서 결과를 제시하고 있다.
- [0331] 이들 어레이를 사용하여, 유전자 발현을 분화의 각각의 단계에서 측정하였다. 이어서, 생물반응기 내로 해동된 시드 물질 세포는 0기 1, 2, 및 3일째(생물반응기 접종 후 24, 48, 및 72시간째: 도 49 및 도 50)에서 미분화된 유전자 발현 패턴을 나타낸 것으로 관찰되었다. 이들 결과는 CD9, SSEA4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81의 고 발현 수준, 및 CXCR4/CD184의 부재를 보여준 유세포측정법의 결과와 잘 상관되었다(도 51). 이들 유세포측정법 및 qRT-PCR의 데이터는, 만능성 유전자(CD9, NANOG, POU5F1, SOX2, TDGF, 및 ZFP42)의 견고하고 안정한 발현 패턴, 및 분화 동안 특징적으로 발현되는 유전자(CD99, CDH2, CDX2, CER1, CXCR4, EOMES, FGF17, FGF4, FOXA2, GATA2, GATA4, GATA6, GSC, HAND2, HNF4 α, KIT, MNX1, MIXL1, PRDM1, PTHR1R, SOX17, SOX7, T, TMPRSS2, 및 VWF)의 비발현을 나타내었는데, 이는 안정한 만능 상태와 일치하는 것이었다.
- [0332] 0기의 완료 시(반응기 접종 후 72시간째), MCX 및 GDF8을 함유하는 분화 배지(표 18) 내로 세포를 이동하였다. 이 배지 교체 후 24시간째에, 유전자 발현 패턴에 있어서의 유의한 변경(도 49 및 도 50; 미분화된 대조군 대비 발현 배수)이 주목되었는데, 예를 들어 FOXA2, HAND2, PRDM1, PTHR1R 및 SOX17 발현에 있어서의 10x 초과와 증가, CER1, FGF4, GATA4, GATA6, GSC, 및 MNX1에 있어서의 100x 초과와 증가, 및 EOMES, FGF17, MIXL1, 및 T 발현에 있어서의 1000x 초과와 증가이다. 이들 증가된 발현 수준은, 세포가 중배엽 운명을 통해 전이되고 있음을 나타내었다. CDX2 수준은 미분화된 세포와 대비하여 1기 1일째에 상승하였지만(대조군과 대비하여 발현에 있어서 2700x 증가), 이는 발현에 있어서의 일시적인 증가였으며 CDX2 수준은 1기 3일째까지 97% 하락하여 분화 유도 전에 관찰된 것과 비견되는 수준이 되었음이 또한 주목되었다(도 49 및 도 50; 미분화된 대조군 대비 발현 배수).
- [0333] 1기 분화 배지에 노출 후 72시간째에, CXCR4 수준이 과거 대조군에 비하여 약 400x로 피크이고 FOXA2는 과거 대조군에 비하여 136x로 발현되고, SOX17은 과거 대조군에 비하여 470,000x로 발현된 바와 같이, 세포는 완성 내배엽으로의 예정화와 일치하는 프로파일을 발현하였다. 완성 내배엽과 일치하여, 1기의 말기(3일째)에서의 CER1, EOMES, FGF4, GSC, MIXL1, 및 T의 유전자 발현은 1기, 1일째에 관찰된 상승된 수준으로부터 하락하였다(도 49 및 도 50; 미분화된 대조군 대비 발현 배수).
- [0334] qRT-PCR에 의해 관찰된 유전자 발현에 있어서의 이들 변화는 유세포측정법에 의해 관찰된 결과와 상관되었다. 분화 개시 시에 CD9 발현/CXCR4 음성 만능 세포 집단(도 51)으로부터 1기 말기에 CXCR4 발현 세포(98.6%의 세포가 CXCR4 양성임)의 균질 집단(도 52)으로의 거의 완전한 전이가 관찰되었다.
- [0335] 완성 내배엽 형성(1기)이 완료된 후에, 원시 전장 형성을 유도하기 위해 사용되는 모르포겐인 FGF7을 함유하는 것으로 배지를 교체하였다. 원시 전장의 형성과 일치하여, 2기 1 및 3일째에 HNF4 α 및 GATA6 발현 수준이 증가되었으며, 한편 1기 3일째에 고수준으로 발현된 유전자(CXCR4, EOMES, FGF17, FGF4, MNX1, PRDM1, SOX17, 및 VWF)는 2기 말기까지 감소된 발현을 나타내었다(도 50 및 도 53; 미분화된 대조군 대비 발현 배수). 전장 유전자(AFP, PDX1, 및 PROX1)의 발현은 증가되었다(도 53; 미분화된 대조군 대비 발현 배수).
- [0336] 세포를 72시간 동안 2기 배지 중에서 배양한 후, 배양물을 3기 배지(표 18)로 교체하였다. 일단 이 배지 중에 있으면, 세포는 유전자 발현에 대해 qRT-PCR 검정에 의해 측정하였을 때 내배엽 체장 계통과 일치하는 마커를 발현하였다. PDX1에 대한 유전자 발현은 2기 3일째 말기에 대조군에 비하여 12,000x로부터 3기 3일째 말기에 대조군에 비하여 739,000x까지 60배 증가하였다. 이들 데이터는 세포가 체장 운명으로 예정화되고 있는 중임을 나타낸다(도 54). 이러한 관찰은 체장에서 공통으로 발현되는 다수의 유전자(ARX, GAST, GCG, INS, ISL1,

NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PAX6, PTF1A, 및 SST)에 대한 미분화된 대조군과 대비하여 증가된 발현 수준에 의해 지지되었는데, 이는 도 54 및 도 55에 나타낸 바와 같다. 흥미롭게도, OCT4/POU5F1 비발현(qRT-PCR에 의한 37 샘플 Ct) 및 내배엽 계통의 다른 마커 AFP, ALB, 및 CDX2에 대한 고 발현 수준이 또한 관찰되었다. 이는, 생물반응기 내의 세포 집단이 만능 세포 집단으로부터 먼저 상대적으로 유연한 장관으로 분화되고, 이어서 췌장 운명으로 추가로 분화되었음을 나타낸다(도 54 및 도 55).

[0337] 4기 분화 과정의 말기에, 세포는 고수준의 PDX1(FACS에 의해 95.6% 양성, qRT-PCR에 의해 대조군에 비하여 약 1,000,000배 유도) 및 FOXA2(FACS에 의해 99.5% 양성) 발현을 보유하였다. 세포는 췌장 선조세포(FACS에 의해 NKX6.1에 대해 39.2%가 양성임) 및 췌장 내분비 세포의 집단(PAX6에 대해서는 9.4%가 양성이고, 크로모그라닌에 대해서는 2.4%가 양성이고, NKX2.2에 대해서는 15.2%가 양성임; 모두 FACS에 의함)과 일치하는 발현 패턴을 나타내었다. 이러한 단계 특이적인 마커 발현 패턴은 만능 집단으로부터 췌장 전구세포로의 효율적인 단계적 분화를 나타내었다. 유세포측정법에 의해 관찰된 이들 결과는 qRT-PCR에 의해 확인되었다. 췌장에서 공통으로 발현되는 다수의 유전자(ARX, GAST, GCG, IAPP, INS, ISL1, MAFB, NEUROD1, NGN3, NKX2.2, NKX6.1, PAX4, PAX6, PTF1A, 및 SST)는 모두 4기 3일째에 증가된 발현 수준을 가졌음이 또한 주목되었다(도 55). 참고로, 각각의 단계의 말기에서의 세포 클러스터의 대표적인 현미경 사진(4x)이 도 56에 나타나 있다.

[0338] [표 18]

개시일/개시 일자:	1 기	2 기	3 기	4 기
기본 배지	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)	MCDB131 주문제작 (3.64 g/L NaCO ₃)
보충물	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:50,000 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:50,000 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:200 ITS-X 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 1:200 ITS-X 글루타맥스 1:100
성장 인자	1 및 2 일째에만: GDF8 100 ng/mL	FGF7 50 ng/mL	FGF7 50 ng/mL	없음
소분자	1 일째에만: MCX [2 μM]		RA[2 μM] SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM] 1 일째에만 LDN [100 nM]	SANT[0.25 μM] TPPB[100 nM]
일수	3	3	3	3
주: 모든 일수는 0H 를 지칭함	1 및 2 일째에 배지 교체, 3 일째에 교체 없음	1 및 3 일째에 배지 교체, 2 일째에 교체 없음	1 및 2 일째에 배지 교체, 3 일째에 교체 없음	1 일째에 그리고 S4 가 연장된다면 3 일째의 말기에 배지 교체

[0339]

[0340] [표 18a]

BX 복제물	시드 물질	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81
1	KC	83.3	0.1	99.9	94.5	85.8
2	HW	95.5	0.2	100	91	84
3	ISM(Pink)	95.8	0.1	100	76.1	36.5
4	ISM(Pink)	93.2	0	99.9	78.6	64.5
5	ISM 1	97.8	0.2	99	74.8	66.4
6	ISM 2	98.6	0.2	100	92.2	86
7	ISM 1	98.1	0.1	99.9	88.8	80.3
8	ISM 1	99.1	0.1	99.9	93.8	83.3
9	ISM 2	97.2	0.1	99.9	88.3	81
10	ISM5	98	0.1	99.3	93.1	85.7
11	ISM6	72.6	0.2	99.9	94.7	88.9
12	ISM6	85.9	0.7	99.4	71.9	54.1
		CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81
	평균	93.6	0.1	99.8	87.8	76.6
	표준편차	8.3	0.1	0.3	7.6	15.5

[0341]

[0342] [표 18b]

단계-일수-시간	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81			
S0D3-24H	0.626	95.8	0.1	99.8	87.9	74			
	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	CD9	CD184	CD99					
S1D3-24H	0.9	50.7	98.9	99					
	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	NKX6.1	크로모그라닌	NKX2.2	PDX1	FOXA2			
S4D1-24H	0.943	69.3	14.2	23.6	98.8	99.7			
	생존 세포 밀도 (백만개 세포/mL)	NKX6.1	크로모그라닌	CDX2	SOX2	NKX2.2	PD PDX1	FOX FOXA2	NEU NEUROD
S4D3-24H	1.002	66.2	35.6	0.3	15.8	38.1	9 99	9 99	45. 45.6

[0343]

[0344] 재료:

- [0345] ●인간 배아줄기(hES) 세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)
- [0346] ●PBS(카탈로그 번호 14190, 인비트로젠)
- [0347] ●Y-27632(악소라 카탈로그 번호 ALX-270-333, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)
- [0348] ●EDTA(론자, 카탈로그 번호 17-7-11E)
- [0349] ●뉴클레오카운터[®]-(케모메텍 에이/에스, 카탈로그 번호 YC-T100, 덴마크 알레로드 소재)
- [0350] ●비-조직 배양물 처리된 6웰 디쉬(백톤 디킨슨, 카탈로그 번호 팔콘351146, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이스크 소재)
- [0351] ●아큐타제[®], (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 A-6964, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)
- [0352] ●pH, 및 용존 산소(DO) 생물반응기 프로브(펄프로브[®] pH 전국 225 mm, 모델 번호 F-635, 및 DO 옥시프로브[®] 12 mm 센서, 모델 번호 D-145, 미국 캘리포니아주 어바인 소재의 브로들리-제임스 코포레이션으로부터 입수됨)
- [0353] ●면역-보호성 거대 캡슐화 장치(테트라사이트[™], 미국 캘리포니아주 어바인 소재)
- [0354] ●인간 C-펩타이드 ELISA(메르코디아 카탈로그 번호 10-1141-01)
- [0355] ●글루타맥스[™], MCDB131, 및 ITS-X; 인비트로젠
- [0356] ●FAF-BSA(프롤리언트)
- [0357] ●레티노산, 글루코스45%(2.5M), SANT(Shh 억제제)(시그마)
- [0358] ●GDF8(페프로텍)
- [0359] ●MCX
- [0360] ●FGF7(알앤디 시스템즈)
- [0361] ●LDN-193189(BMP 수용체 길항제)(스탬젠트)
- [0362] ●TPPB(PKC 활성화제)(켄파트너)
- [0363] 실시예 15
- [0364] 세포주 WA01로부터 완성 내배엽으로의 인간 배아줄기세포의 분화: 현탁 배양물에서의 세포 주기 조절인자로서의 MCX/GDF8의 역할
- [0365] 삼각 플라스크/진탕 플라스크 내에서, 2% 무지방산 BSA(카탈로그 번호 68700, 프롤리언트, 미국 아이오와주 소재), 1X 글루타맥스[™](카탈로그 번호 35050-079, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 소재), 추가 2.5 mM 글루코스(카탈로그 번호 G8769, 시그마) 및 1:50,000 스톱 농도의 ITS-X(카탈로그 번호 51500056, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 소재)로 보충된, 3.64 g/ml 중탄산나트륨 및 5.5 mM 글루코스(카탈로그 번호 A13051 DJ, 인비트로젠, 미국 캘리포니아주 소재)를 함유하는 MCDB-131 배지 중에, 만능 인간 배아줄기세포주 H1(NIH 코드: WA01)로부터의 클러스터를 0.5 x 10⁶개 세포/ml로 시딩하였다. 이러한 방식으로 보충된 MCDB-131 배지는 이 실시예의 목적을 위해 1기 기본 배지 또는 "순수" 배지로 지칭될 것이다. GSK3B 억제제, 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),-3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 - 전체적으로 본 명세서에 참조로 포함된 미국 특허 출원 제12/494,789호 - 은 "MCX"로 지칭될 것이다.
- [0366] 다음의 6가지 조건 중 하나로 분화의 1일째에 클러스터를 처리하였다: (1) 순수, (2) 3 μM MCX + 100 ng/ml GDF-8(카탈로그 번호 120-00, 페프로텍), (3) 3 μM MCX 단독, (4) 100 ng/ml GDF-8 단독, (5) 20 ng/ml WNT-

3A(카탈로그 번호 1324-WN-002, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재) + 100 ng/ml 액티빈 A(카탈로그 번호 338-AC, 알앤디 시스템즈, 미국 미네소타주 소재), 또는 (6) 20 ng/ml WNT-3A 단독.

- [0367] 각각의 조건에서 배지를 분화 개시 후 24 및 48시간째에 교체하였다. 이들 시간에, 조건 1, 2, 3, 및 4에서의 세포는 100 ng/ml GDF8로 보충된 새로운 1기 기본 배지로 교체하였으며, 한편 조건 5 및 6에서의 세포는 100 ng/ml 액티빈 A로 보충된 새로운 1기 기본 배지로 교체하였다.
- [0368] 분화 개시 전 1시간째에, 그리고 분화 개시("0시간째"로서 언급됨) 후 5, 23, 29, 47, 또는 71시간째에, 현탁 샘플을 비-조직 배양물 처리된 6웰 디쉬에 옮기고 Edu(클릭-잇(Click-iT)[®] Edu 키트, 라이프 테크놀로지스 코포레이션, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, Edu 인큐베이션된 세포를 분화 개시 후 0, 6, 24, 30, 48, 또는 72시간째에 유세포측정법에 의해 검정하여 세포 주기의 G0/G1, S, 또는 G2/M기에서의 세포의 백분율을 측정하였다(도 81 내지 도 87).
- [0369] 이 프로토콜 후에, 세포 주기의 G0/G1, S, 또는 G2/M기에서 세포의 백분율에 있어서의 유의한 차이가 관찰되었으며(도 82 내지 도 87), MCX 및 MCX+GDF8 처리된 세포는 다른 4가지 처리 조건과 대비하여 Edu의 혼입 시에 거의 40% 감소를 가짐이 주목되었다(도 81). Edu 혼입에 있어서의 이러한 감소는 MCX+GDF8 처리된 샘플로부터의 G0/G1 세포에 있어서의 38% 증가에 의해 그리고 MCX 단독 처리된 세포에 대한 G0/G1 세포에 있어서의 54% 증가에 의해 매칭되었다. Edu 혼입에 대한 이러한 변화 및 분화 개시 후 6시간째에 G0/G1로의 증가된 전이는 GDF8, WNT3A, WNT-3A + 액티빈 A, 또는 순수 배지로 처리된 세포에서는 관찰되지 않았다. 오히려, GDF8, WNT-3A, WNT-3A + 액티빈 A, 또는 순수 배지로 처리된 세포는 Edu 혼입을 갖는 세포의 백분율에 있어서의 최소한의 감소(평균, 48.1%, SD±1.2) 및 분화 개시 후 6시간째에 G0/G1에서의 세포수에 있어서의 평균 13% 감소(표준편차, ± 5%)를 보여주었는데, 이는 도 81 및 도 82에 나타난 바와 같다.
- [0370] 다른 처리 조건과 대비하여 MCX 또는 MCX+GDF8로 처리된 세포의 경우 G0/G1 값 사이에서 유사한 차이가 연장 시이 과정에서 나중에 관찰되었다. 0시간째 후 30시간째에, MCX 또는 MCX+GDF8 처리된 세포는 WNT-3A + 액티빈 A, GDF8, WNT-3A, 또는 순수 배지로 처리된 세포와 대비하여 G0/G1에서 43 내지 45% 더 적은 세포를 가졌다. MCX 또는 MCX+GDF8로 처리된 세포의 71.9 내지 75.5%가 세포 주기의 G0/G1에서 존재하였으며, 한편 GDF8 처리된 세포의 48.5%, WNT3A 처리된 세포의 55.8%, WNT-3A + 액티빈 A 처리된 세포의 57.7%, 또는 순수 배지 처리된 세포의 49%가 G0/G1에서 존재한 바와 같이, G0/G1 세포들의 백분율 사이의 이러한 갭은 분화 개시 후 48시간째에 유지되었다. EDU 혼입 및 G0/G1 프로파일에서 있어서 관찰된 차이 외에, MCX 또는 MCX+GDF8 처리된 세포는 WNT3A + 액티빈 A, GDF8, WNT-3A, 또는 순수 배지 처리된 세포와 비교할 때 0시간째 후 30 및 48시간째에 세포 주기의 S기에서 15 내지 33% 더 많은 세포를 가졌다(도 84 및 도 85).
- [0371] 데이터(CD99, CD9, CDH1, CDH2, CDX2, CER1, CXCR4, FGF17, FGF4, FOXA2, GATA4, GATA6, GSC, KIT, MIXL1, MNX1, NANOG, OTX2, POU5F1, SOX17, SOX7, 및 T에 대한 유전자 발현, 도 57 내지 도 80 및 도 88a 내지 도 88f에 나타냄)는, 현탁 배양물에서, 분화의 1일째에 TGF-β 패밀리를 구성원인 GDF8과 함께 또는 GDF8 없이 MCX를 첨가함으로써, 완성 내배엽 형성의 말기에 유전자 발현에 의해 측정하였을 때, 세포를 1일째에 20 ng/ml WNT-3A + 100 ng/ml 액티빈 A로 처리하여 수득된 것과 비견될 정도로 완성 내배엽을 생성하였음을 나타내었다. 그러나, 완성 내배엽을 형성하는 과정에 걸쳐 관찰된 세포 주기에 있어서의 차이와 일치하여, 유전자 발현에 있어서의 중간 차이가 관찰되었다. MCX 또는 MCX + GDF8로 처리된 샘플에서는, 분화의 처음 24시간 내에 WNT-3A + 액티빈 A로 처리된 세포 또는 다른 3가지 시험 조건으로 처리된 세포보다 실질적으로 더 높은 수준으로 유전자 T(단미증), GATA4, 및 CDX2를 유도하였다(도 88b, 도 88c, 및 도 88d). 역으로, 만능성(NANOG 및 POU5F1/OCT4)에 대한 유전자 발현은 개시 세포 집단 또는 시험한 다른 4가지 조건과 대비하여 MCX 또는 MCX + GDF8로 처리된 샘플에서 24시간까지 현저히 감소하였다(도 88e). FGF4, FOXA2, 및 SOX17과 같은 유전자에 대한 발현의 유도의 크기는 분화 개시 후 24시간째에 시험된 다른 4가지 조건과 대비하여 MCX 또는 MCX + GDF8 샘플에서 훨씬 더 낮았지만, 48시간까지 모든 샘플은 비견되는 수준으로 FGF4, FOXA2, 및 SOX17을 발현하였다(도 88c 및 도 88e).
- [0372] 실시예 16
- [0373] 스케일 조정가능한 현탁 분화 과정을 사용한 외배엽 및 중배엽 조직의 생성
- [0374] 이 실시예는 만능 줄기세포(PSC)를 증폭 및 분화시켜, 외배엽 또는 중배엽 조직의 생성을 위한 스케일 조정가능한 제조 과정을 달성할 수 있는 과정을 보여준다.
- [0375] 2가지 세포주를 현탁 증폭시켜 이들 연구를 위한 시드 물질을 제공하였다: H1(WA01) hES 세포주의 서브-클론 - WB0106 및 체대 조직 세포(UTC)로부터 생성된 유도 만능 줄기세포(iPSC)주. 앞서의 실시예에서 기술된 바와 같

이, 현탁 증폭된 세포를 프로그램화 동결기 내에서 고밀도로 동결시키고, 이어서 해동시켜 폐쇄된 3 리터 유리 생물반응기(다스깁; 독일 울리히 소재) 또는 사용 후 버리는 3 리터 일회용 생물반응기(모비우스(Mobius)[®], 이엠티 밀리포어 코포레이션(EMD Millipore Corporation), 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재)에 0.225×10^6 개 세포/mL의 최종 세포 농도로 접종하였다. 교반 탱크 생물반응기 내로 접종된 세포는 연속 교반 탱크 내에서 세포 클러스터를 형성하였으며, 총 3일 동안 반응기 내의 만능성 배지(0.5% BSA로 보충된 E8[™]) 중에서 유지하였다. 접종 후 72시간째에, 플라스틱 일회용 삼각 플라스크(PETG 125 mL 플라스크, 카탈로그 번호 4112, 서모 사이언티픽(Thermo Scientific), 미국 뉴욕주 로체스터 소재)에, 이들 각각의 분화 배지(표 19) 중에 세포 클러스터를 옮겨서 중배엽/심장 조직(1) 또는 외배엽/신경 조직(2)을 형성함으로써 만능 세포 분화를 개시하였다.

[0376] 일단 단계적 분화 과정이 개시되면, 가습된 5% CO₂ 인큐베이터 내의 진탕기 플랫폼(MAXQ 416hp, 서모 사이언티픽, 미국 뉴욕주 로체스터 소재) 상에서 100 rpm으로 10일 동안 세포를 유지하였다. 분화 개시 후 1일째, 3일째, 5일째 및 7일째에, 플라스크 내의 배지를 표 19에 기재된 바와 같이 제조된 새로운 배지로 교체하였다. qRT-PCR 샘플을 분화 개시 전에 참조용으로 취한 후 분화 개시 후 3, 5, 7, 및 10일째에 취하였다.

[0377] mRNA 발현 패턴에 있어서의 외배엽 또는 중배엽 특이적인 변화가 qRT-PCR에 의해 검출될 수 있는지를 판단하기 위하여, 만능성, 완성 내배엽(DE), 및 6기(S6)로 지정된 3개의 어플라이드 바이오시스템즈 저밀도 어레이(라이프[™], 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)를 사용하였으며, 그 결과를 발현을 표준화하기 위해 대조군으로서의 적절한 미분화된 만능 줄기세포 샘플과 대비하였다.

[0378] 이들 어레이를 사용하여, 외배엽(도 89) 또는 중배엽(도 90) 분화 배지 중에서 배양된 만능 세포의 유전자 발현 패턴을 결정하였다. 어떠한 조건 하에서든 진탕 플라스크 내에서 분화된 세포는 만능성 어레이에 의해 측정하였을 때 3일째 내지 10일째의 연장된 배양에 걸쳐 NANOG, POU5F1/OCT4, TDGF1, 및 ZFP42와 같은 만능성 유전자에 대한 감소된 만능성 유전자 발현을 보여준 것으로 관찰되었다. CXCR4의 발현은 외배엽 또는 중배엽으로 분화된 hES 또는 iPS 세포로부터의 샘플에서 증가하였다. 이들 결과는 분화에 특징적인 유전자의 고 발현을 나타내는 qRT-PCR 데이터와 상관되었다. 외배엽 분화 배지로 처리된 세포는 분화 개시 후 3 내지 10일째에 qRT-PCR에 의해 증가된 수준의 ARX, NEUROD, NKX6.1, PAX6(100배 초과), 및 ZIC1(1000배 초과)을 발현하였다(도 91). 이들 데이터는 FACS 어레이에 의해 확인되었는데, FACS 어레이는 외배엽 운명으로 분화의 개시를 시작한 후 3일째에, iPSC 및 hES 세포 둘 모두는 SOX2(만능성 및 신경 줄기세포 둘 모두에 필요한 유전자)의 고 발현을 유지하였지만, POU5F1/OCT4(만능성에 필요한 유전자)의 발현을 상실하였으며, 한편 PAX6 발현(신경 및 내분비 분화의 유전자)은 획득하였음을 보여주었다(도 92).

[0379] 중배엽 분화 배지로 처리된 세포에서 분화의 유사한 동태(kinetics)가 또한 관찰되었다. 만능 유전자 발현이 10일의 분화 과정에 걸쳐 하락함에 따라(도 90), 3일째에 조기의 과도적 중배엽 운명에 특징적인 유전자(CER1, EOMES, CKIT, 및 VWF)에 대해 조기 유도가 관찰되었으며, 이들 유전자 발현 수준은 10일째에 거의 베이스라인까지 감소하였다(도 93). 분화 개시 후 3, 5, 7 및 10일째에 특징적인 중배엽 유전자의 발현이 조기에 증가하는 유전자 발현(도 93에서 CDH2, CDX2, GATA6, HNF4 α , MNX1, PRDM1 및 SOX17)을 나타낸 것으로 또한 관찰되었다. 유전자 유도의 동일한 패턴이 iPSC 및 hES 세포 샘플 둘 모두에서 관찰되었는데, 이는 분화 과정이 유도되었으며 본질적으로 자발적이지 않았음을 나타낸다.

[0380] qRT-PCR에 의해 관찰된 유전자 발현에 있어서의 이들 변화는 위상차 현미경법에 의해 관찰되고 클러스터의 동결-단면을 면역염색한 결과와 상관되었다. 중배엽 분화된 현탁 배양물에서 10일째까지, 10개의 클러스터 중 대략 1개가 자발적으로 "억제(beat)"되기 시작하였는데, 이는, 세포가 심근 조직으로 분화되었음을 시사한다(도 94, 좌측 패널, 10일째, 백색 막대). 일부 클러스터의 염색된 단면은 근육 형성을 나타내는, 줄무늬 모양의 말단에서 말단까지의 β -투블린 염색 패턴을 나타내었다(도 94, 우측 패널).

[0381] 두드러지게 상이한 형태학적 패턴이, 중배엽으로 분화된 클러스터와 대비하여, 외배엽 운명으로 분화된 클러스터(도 95, 좌측 패널)에 대해 관찰되었다(도 94). 외배엽 분화 전체에 걸친 클러스터는 중배엽 운명으로 분화된 세포보다 더 크고 조밀하며, 외배엽 분화된 세포는 더 적은 총 β 투블린을 발현하였다. β 투블린을 발현하지 않은 세포들은 신경에 특징적인, 더 수직상인 염색 패턴(도 95, 우측 패널, 백색 화살표)을 나타내었다.

[0382] qRT-PCR 및 FACS 데이터와 조합하여, 이들 결과는 현탁 상태로 बैं킹(banking)되어 증폭된 세포가 유도 및 재현 가능한 방식으로 중배엽 또는 외배엽 운명으로 현탁 배양물 중에서 분화될 수 있음을 나타낸다.

[0383] [표 19]

개시 일/개시 일자:	신경 분화 0 내지 4 일째	신경 분화 5 내지 10 일째	심근 분화 0 내지 6 일째	심근 분화 7 내지 10 일째
기본 배지	MCDB131 (2.5 g/L NaCO ₃ 최종)	MCDB131 주문제작 (2.5 g/L NaCO ₃ 최종)	MCDB131 주문제작 (2.5 g/L NaCO ₃ 최종)	MCDB131 주문제작 (2.5 g/L NaCO ₃)
보충물	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 글루타맥스 1:100 1:100 ITS-X	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 글루타맥스 1:100 1:100 ITS-X 또는 1X B-27	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 글루타맥스 1:100	2% FAF-BSA 2.5 mM 글루코스 글루타맥스 1:100 1X B-27
소분자	LDN [100 nM] ALKV[7.5 μM]	없음	처음 24 시간에만: MCX[2 μM] 3 및 4 일째에만: IWP-4[8 μM]	
일수	3	3	3	3
주: 모든 일수는 개시 후 시간을 지칭함	배지 교체: 0, 1 및 3 일째	배지 교체: 5 및 7 일째	배지 교체: 0, 1, 3, 및 5 일째	배지 교체 7 일째

[0384]

[0385] [표 20]

재료:
인간 제대 조직유래 세포(미국 특허 제 7,510,873 호에 개시된 바와 같음)
유도성 만능 줄기세포
만수성 개체
인간 배아줄기(hES) 세포주 H1(WA01 세포, 위셀, 미국 위스콘신주 매디슨 소재)
PBS(카탈로그 번호 14190, 인비트로젠)
Y-27632(약소라 카탈로그 번호 ALX-270-333, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)
EDTA, (분자, 카탈로그 번호 17-7-11E)
뉴클레오키아우티드®(케모텍 에이/에스, 카탈로그 번호 YC-T100, 덴마크 알레로드 소재)
비-조직 배양물 처리된 6 웰 디쉬(백톤 디킨슨, 카탈로그 번호 팔콘 351146, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크 소재)
아큐타제®, (시그마, 카탈로그 번호 A-6964, 미국 미주리주 세인트루이스 소재)
pH, 및 용존 산소(DO) 생물반응기 프로브(펄프로브® pH 전극 225 mm, 모델 번호 F-635, 및 DO 옥시프로브® 12 mm 센서, 모델 번호 D-145, 미국 캘리포니아주 어바인 소재의 브로들리-제임스 코포레이션으로부터 입수됨)
면역-보호성 거대 캡슐화 장치(테트라사이트™, 미국 캘리포니아주 어바인 소재)
인간 C-웹타이트 ELISA(메르코디아 카탈로그 번호 10-1141-01)
글루타맥스™, MCDB131, 및 ITS-X(라이프 테크놀로지즈 코포레이션, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)
FAF-BSA(프롤리언트)
레티노산, 글루코스 45%(2.5M), SANT(Shh 억제제)(시그마)
GDF8(페프로텍)
MCX
IWP-4(WNT3 억제제); 스템젠트
MCDB131 배지
MCDB131 배지(주문제작됨("MCDB131 주문제작")) - NaCO ₃ 수준을 3.64 g/L 로 상승시키도록 변형됨.

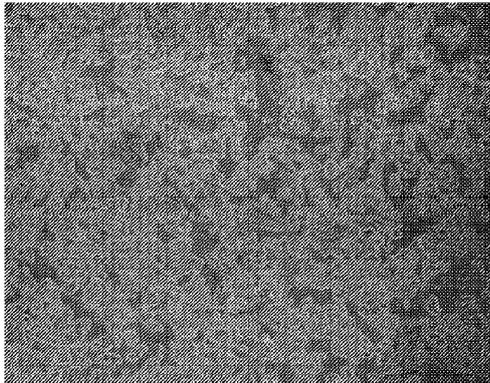
[0386]

[0387]

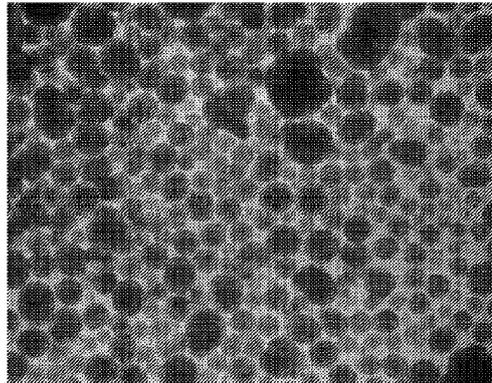
본 발명을 다양한 특정한 재료, 절차 및 실시예를 참고로 하여 본 명세서에서 설명하고 예시하였지만, 본 발명은 그러한 목적을 위해 선택된 재료 및 절차의 특정한 조합에 제한되지 않음이 이해된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 이러한 상세 사항에 대한 다양한 변화가 암시될 수 있다. 본 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되는 것으로 의도되며, 이때 본 발명의 진정한 범주 및 사상은 하기 청구범위에 의해 나타난다. 본 출원에서 언급되는 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면

도면1a

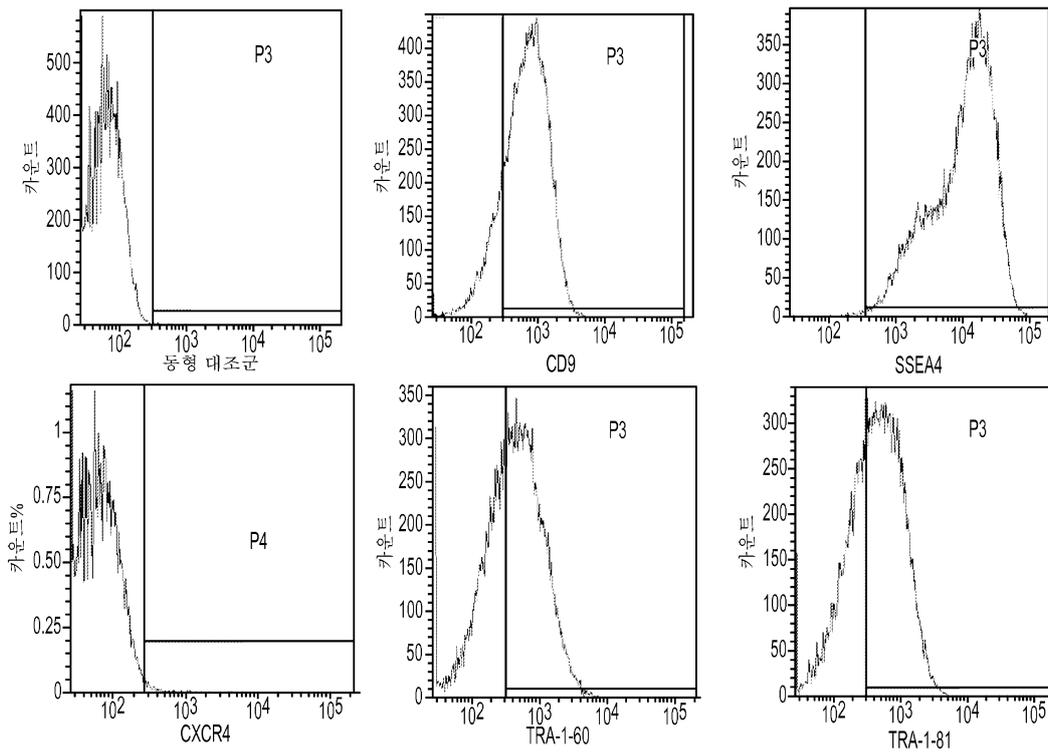


리프팅 직후

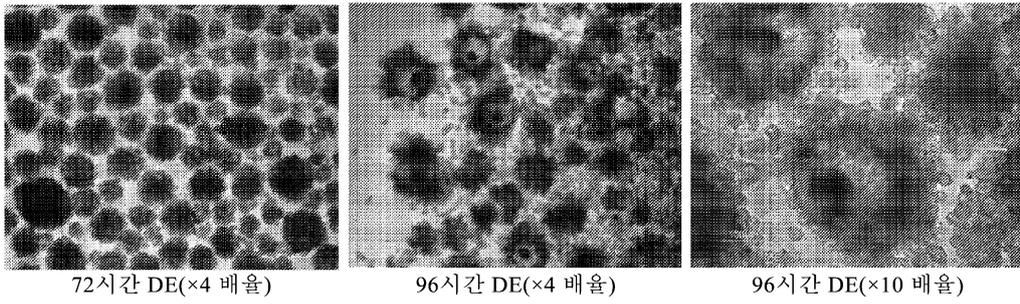


비부착성 정치 배양물 중에서 24시간째

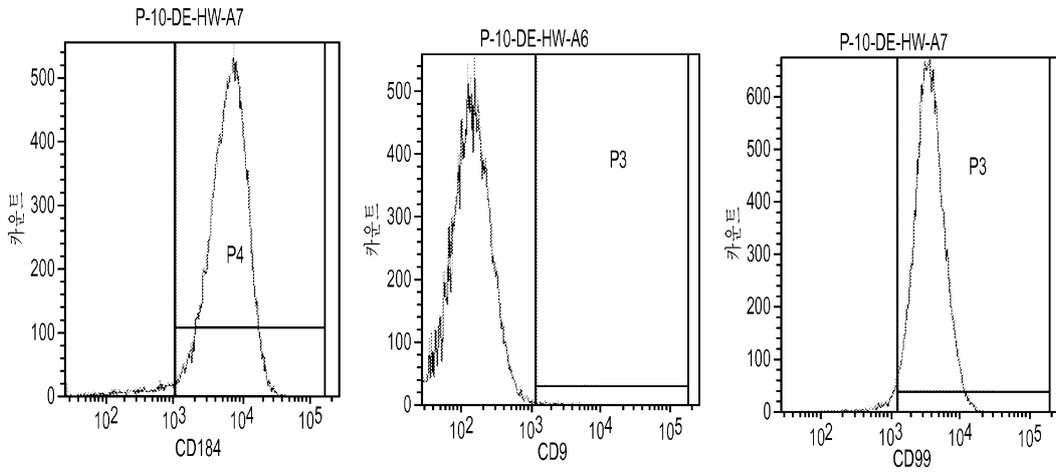
도면1b



도면1c

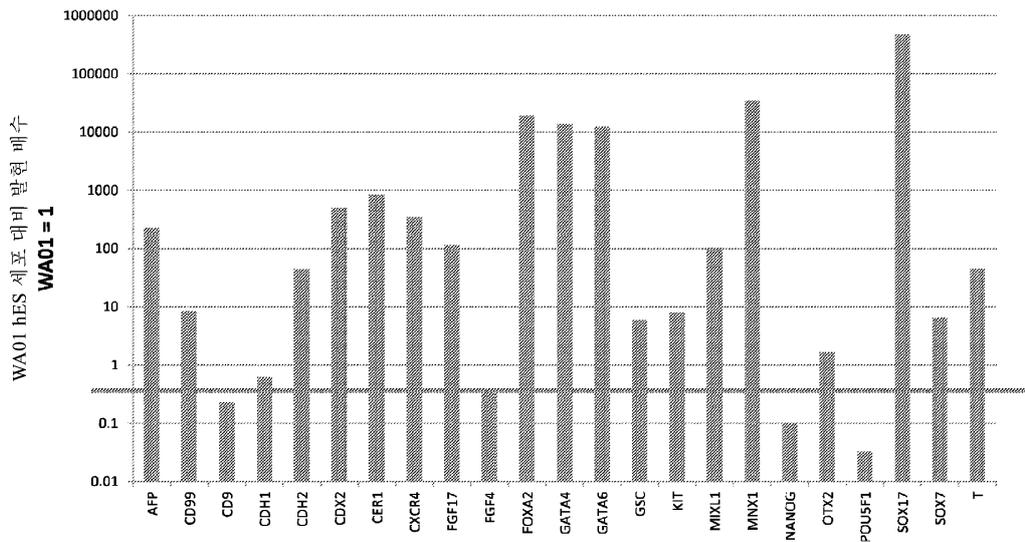


도면1d

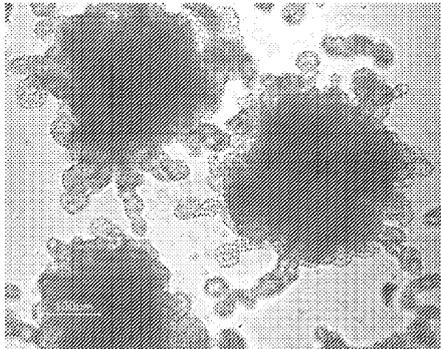


마커	CD184	CD9	CD99
양성인 세포의 %	97.20%	0.50%	97.30%

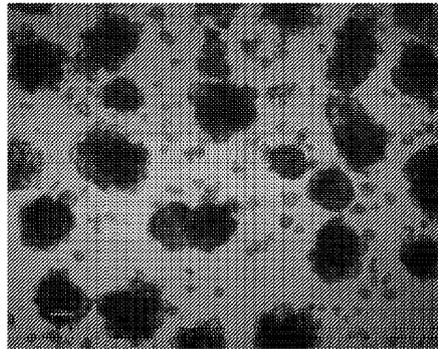
도면1e



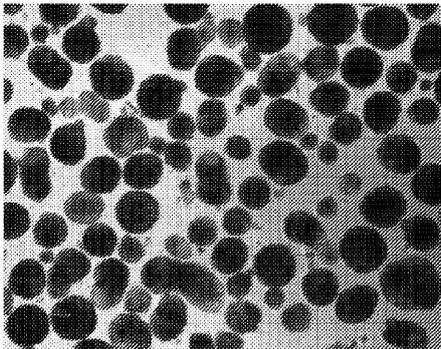
도면1f



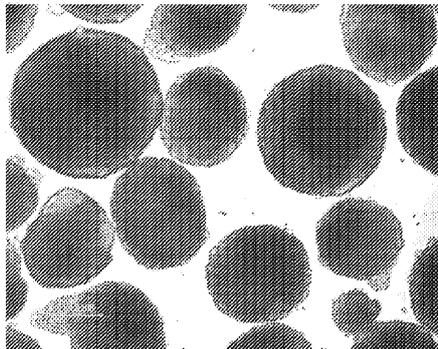
S2-d1(X10)



S2-d3 (X4)

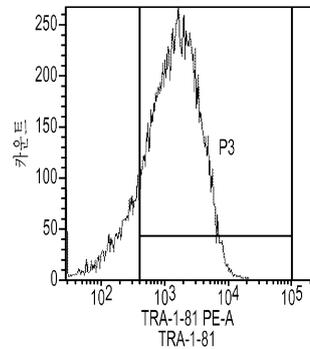
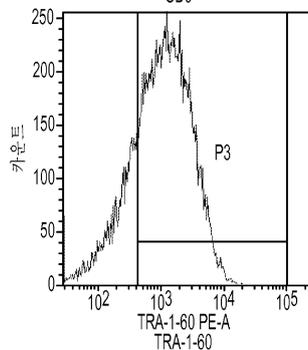
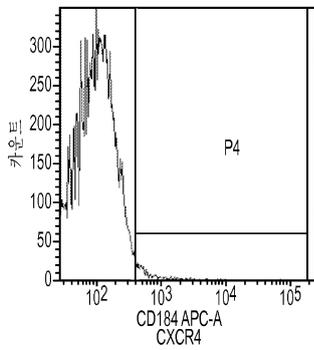
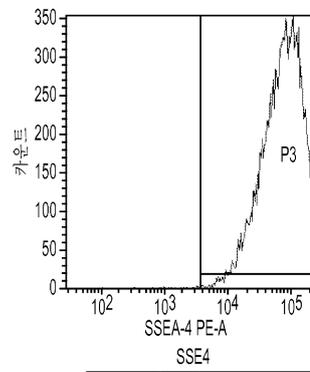
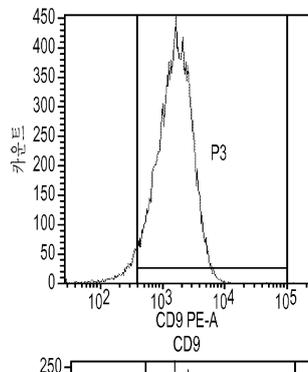
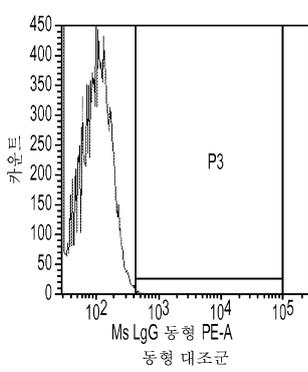


S3-d4(4X)

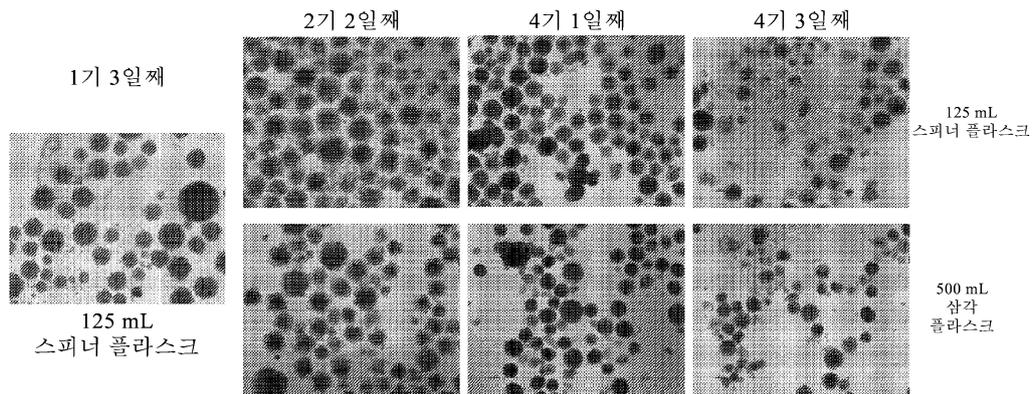


S4-d1(10X)

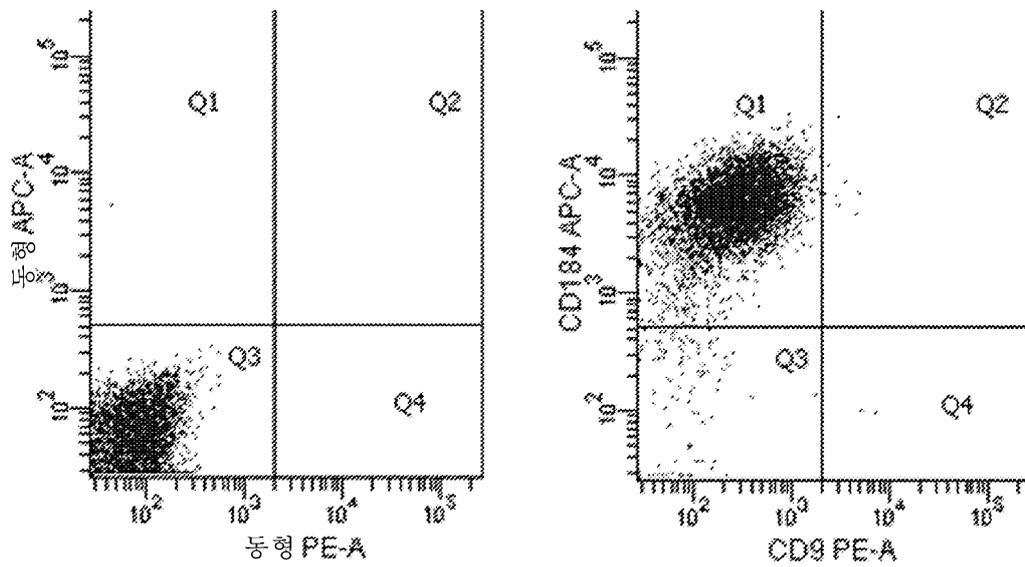
도면2a



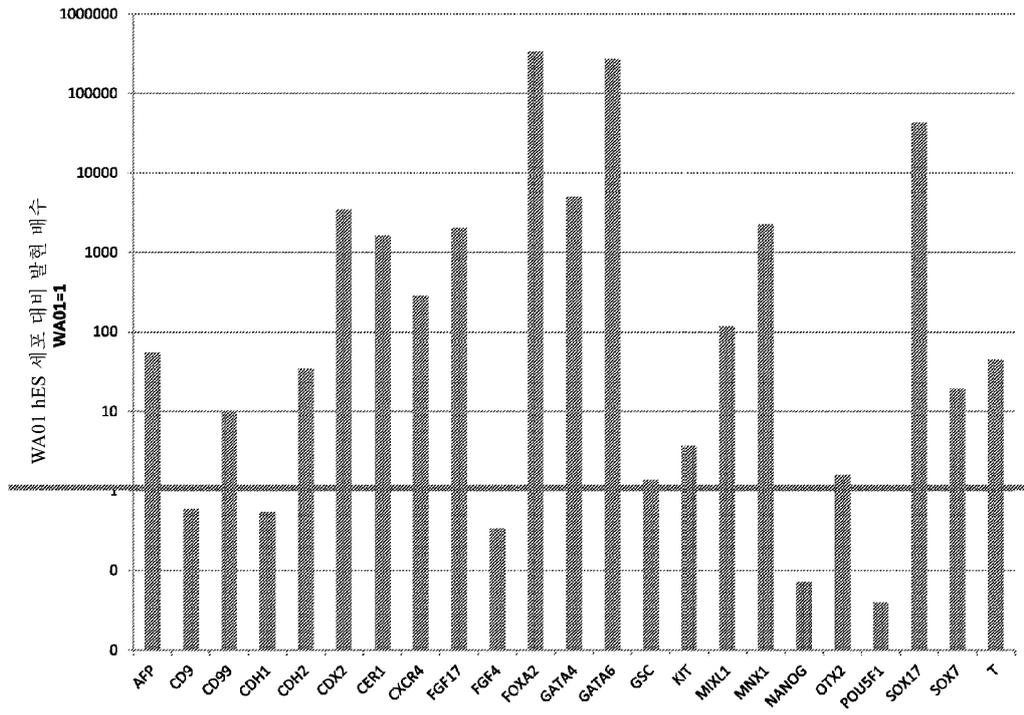
도면2b



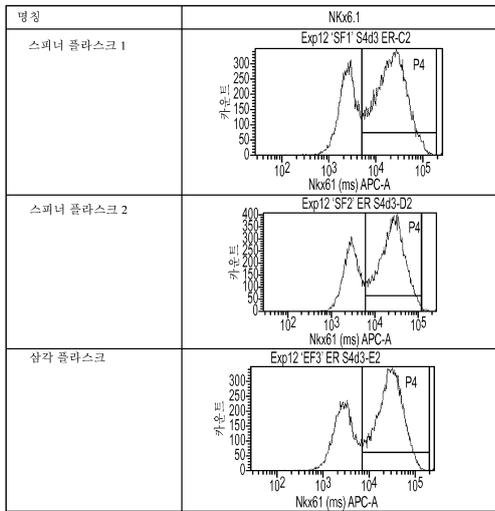
도면2c



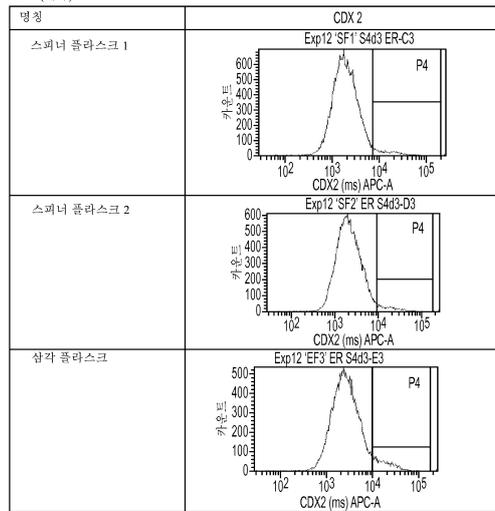
도면2d



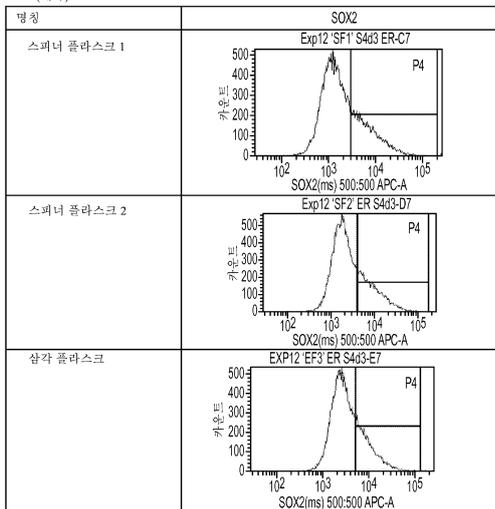
도면2e



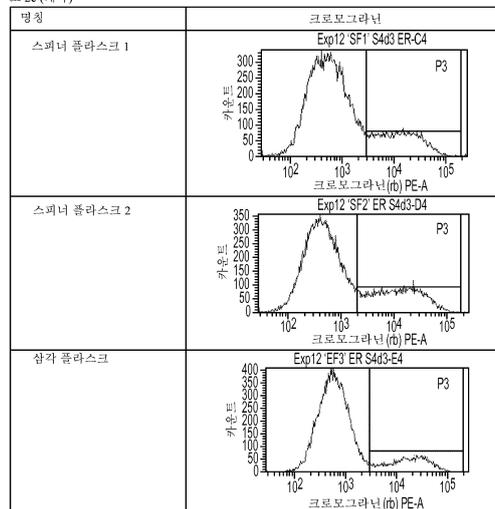
도 2e (계속)



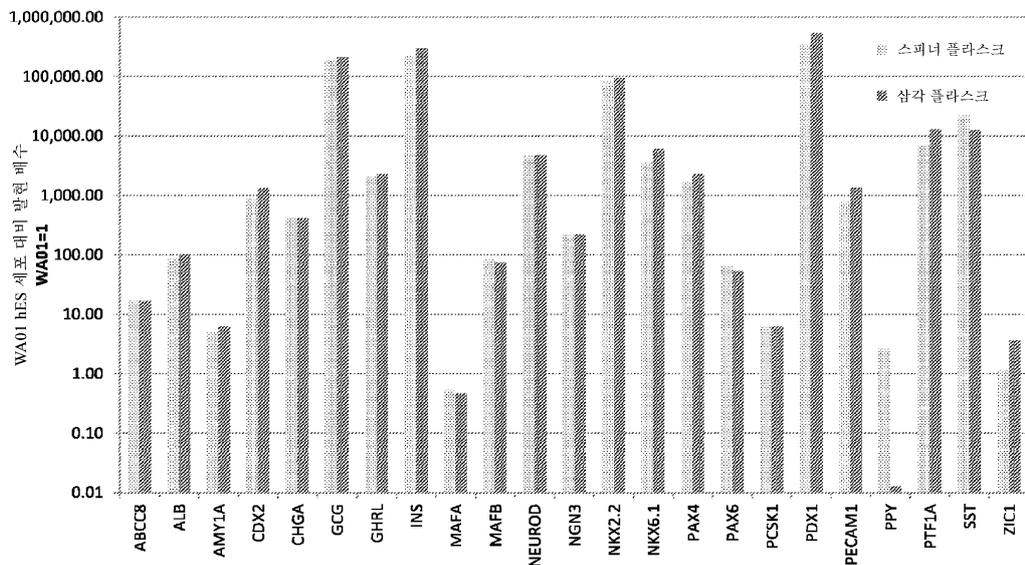
도 2e (계속)



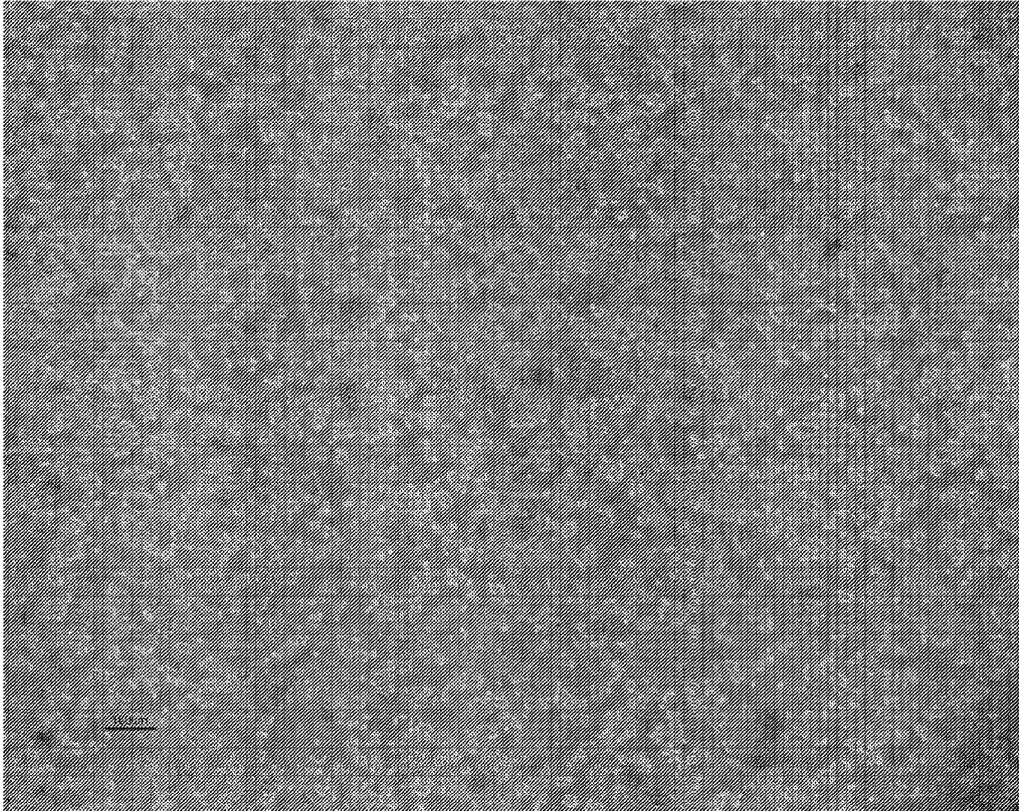
도 2e (계속)



도면2f

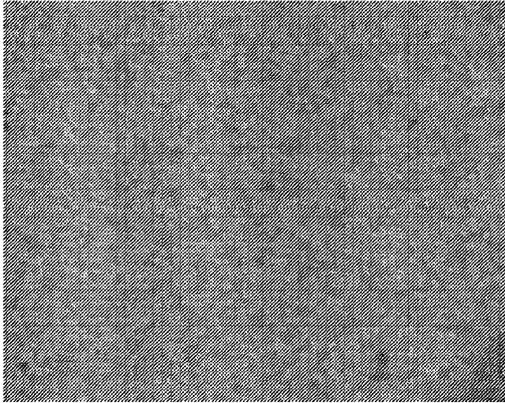


도면3a

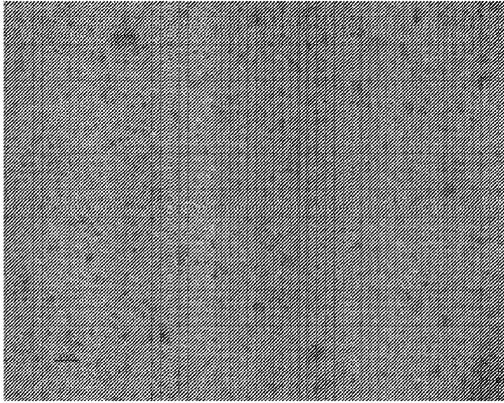


도면3b

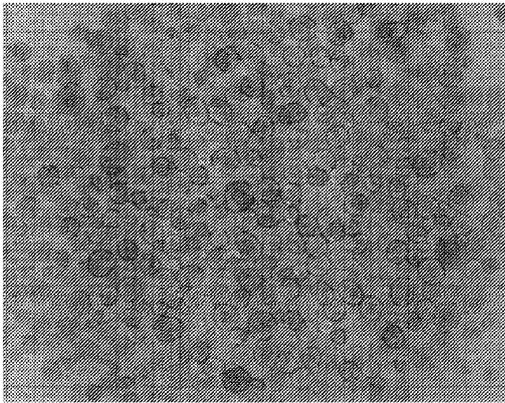
0 시간



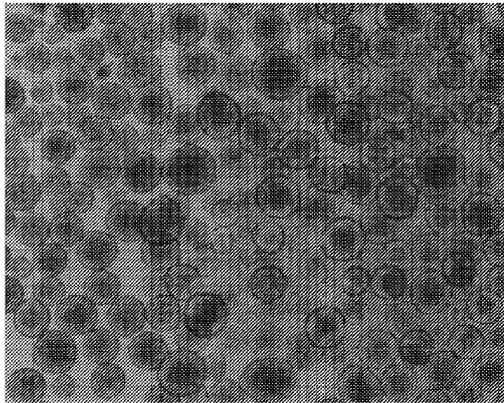
1.5 시간



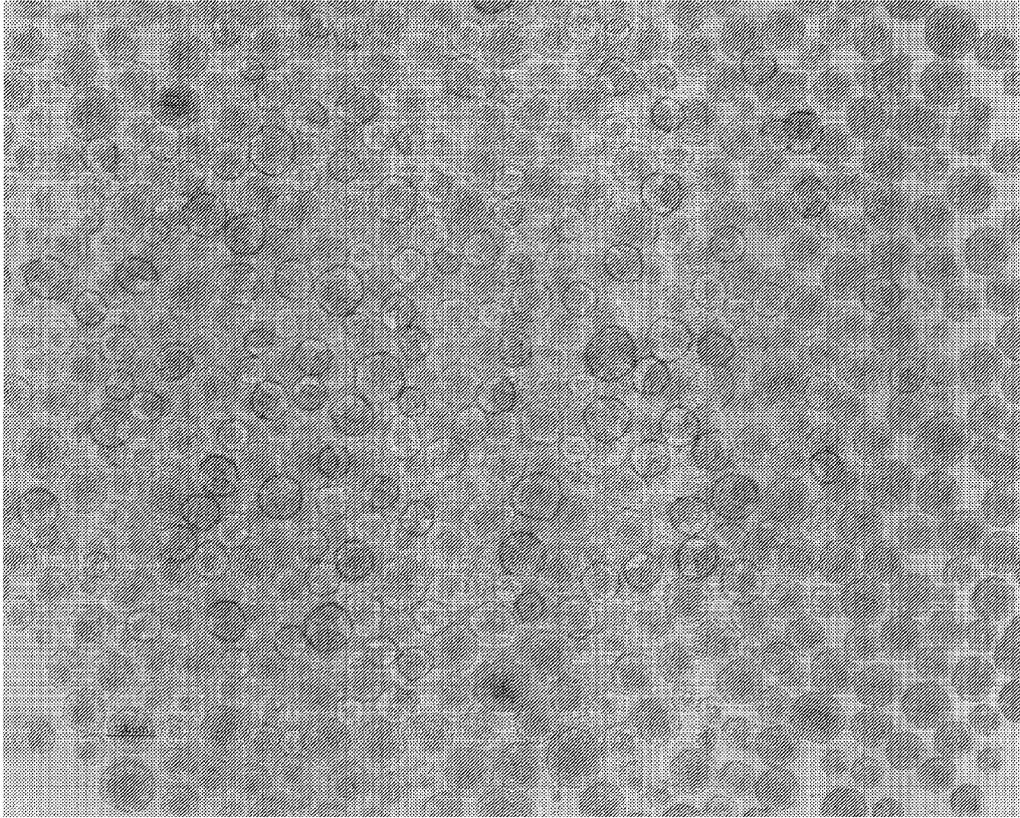
24 시간



72 시간

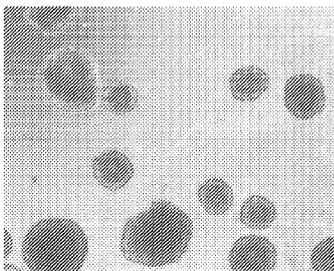


도면3c

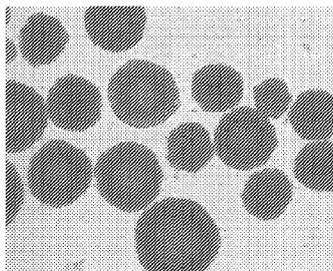


도면4a

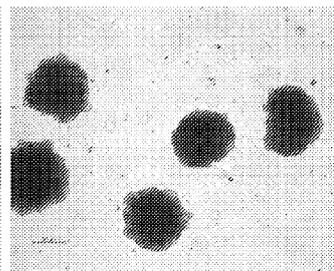
생물반응기 접종물



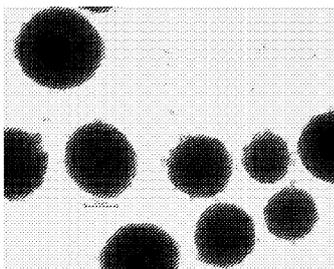
1기 3일째(72시간째)



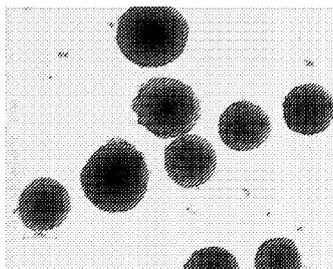
2기 3일째(144시간째)



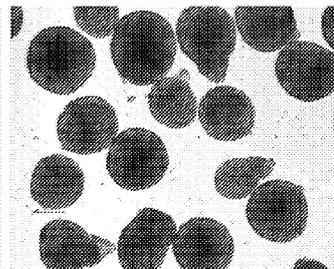
3기 1일째(168시간째)



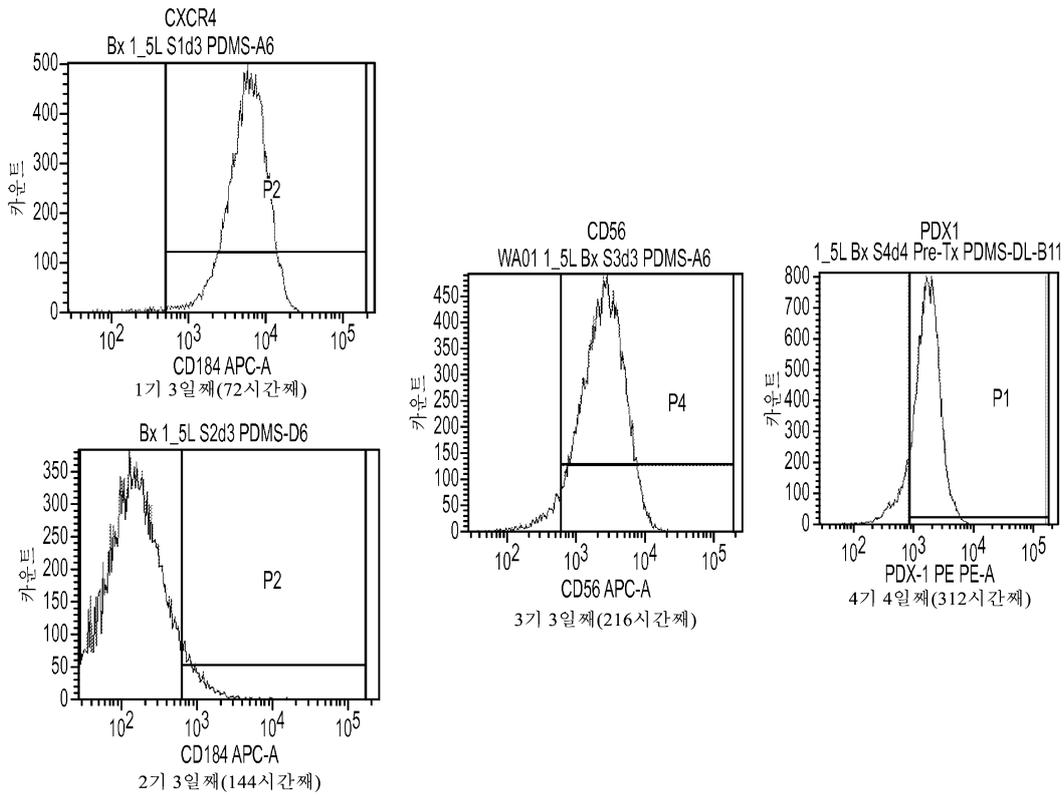
3기 3일째(216시간째)



4기 5일째(336시간째)

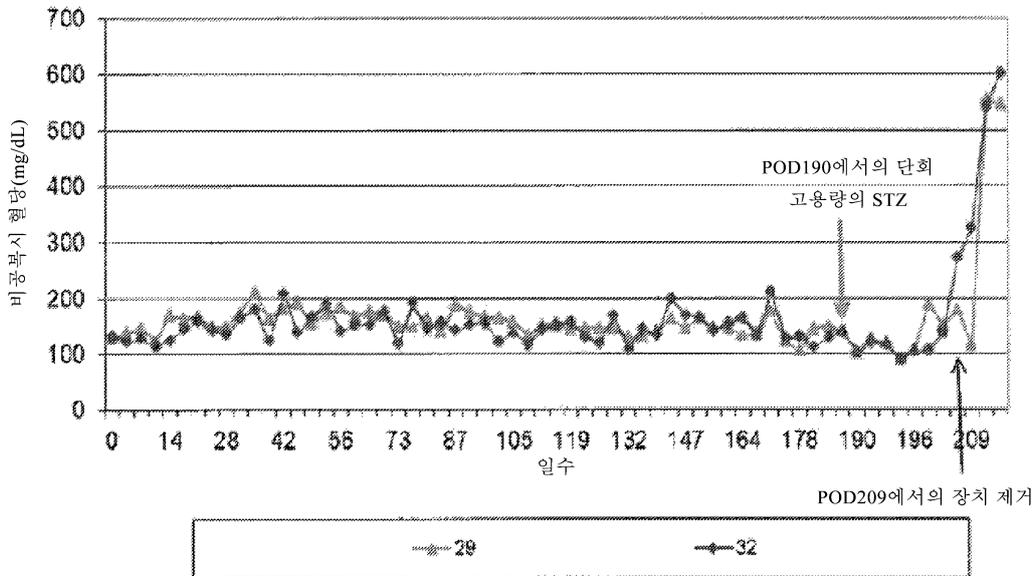


도면4b

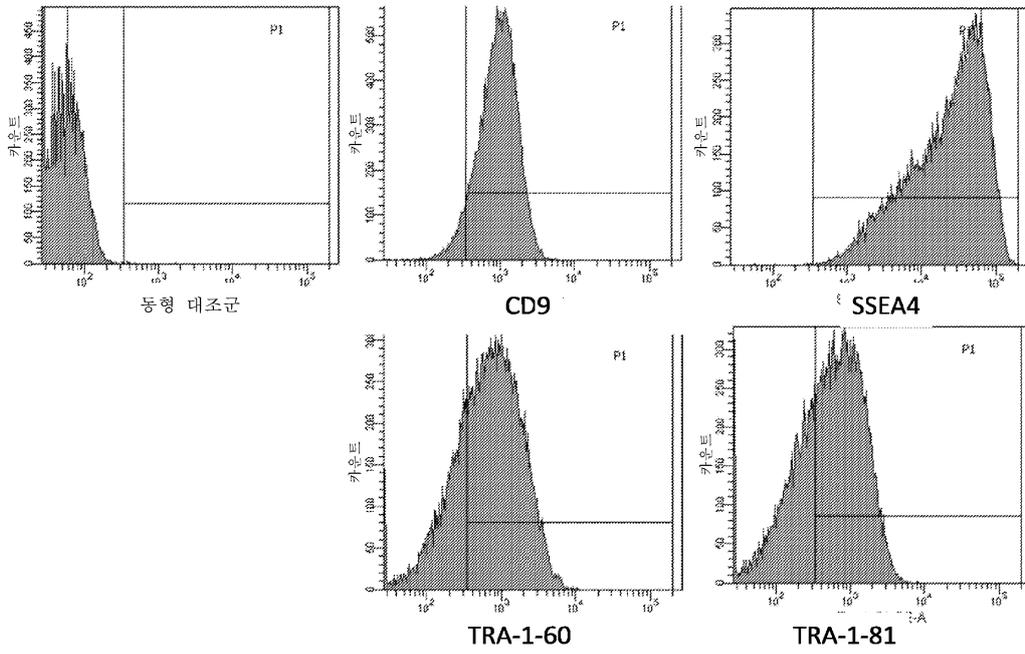


도면4c

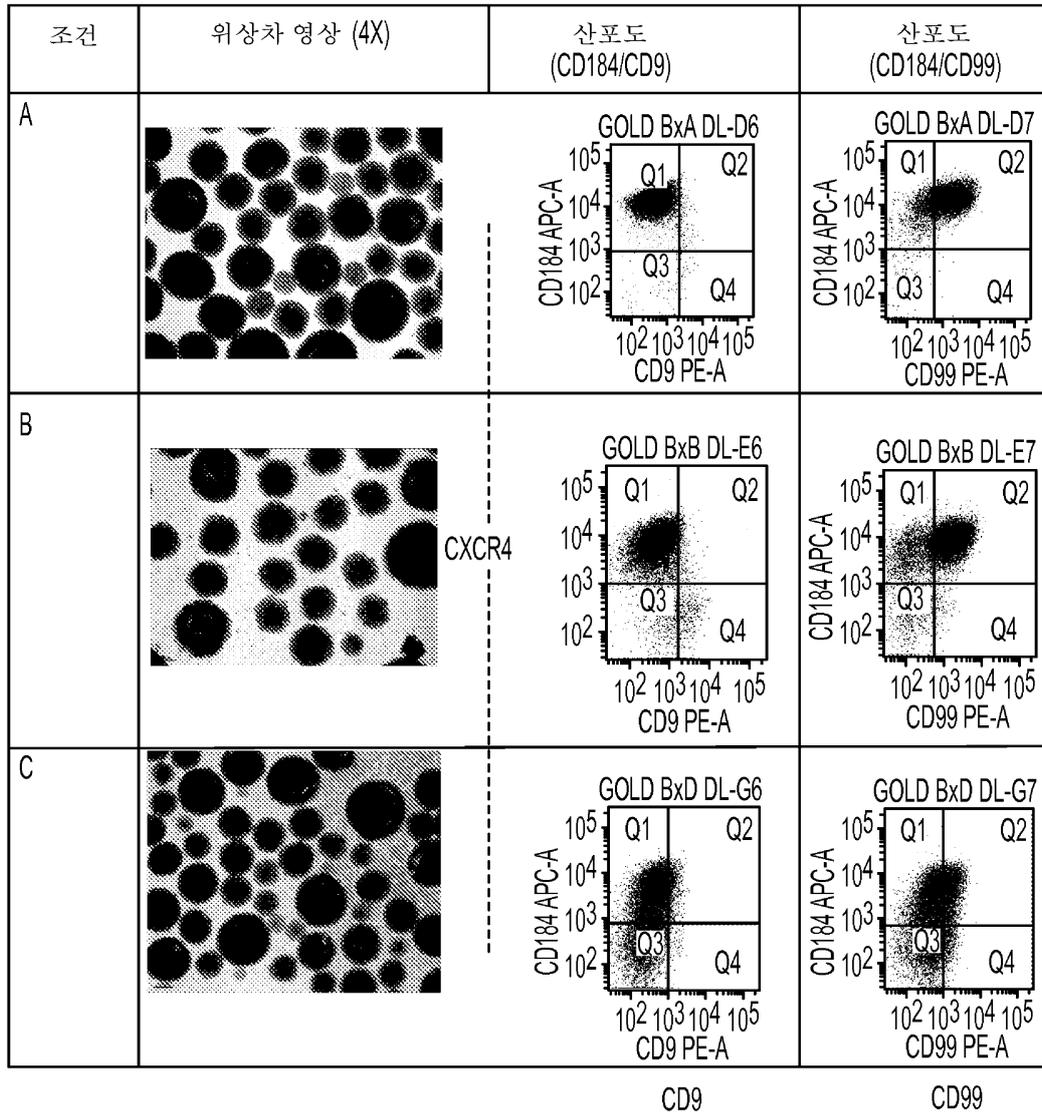
PRD-1130A - 테라사이트 장치 이식 수령체



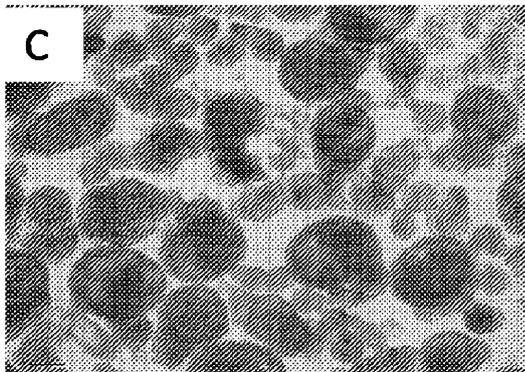
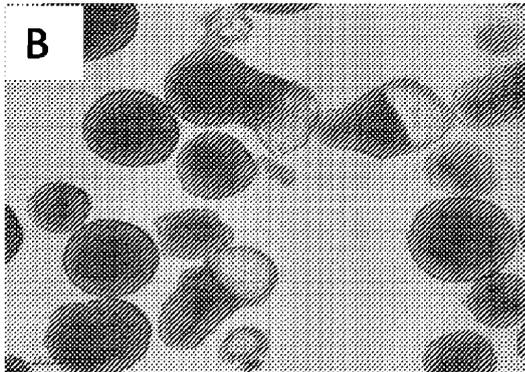
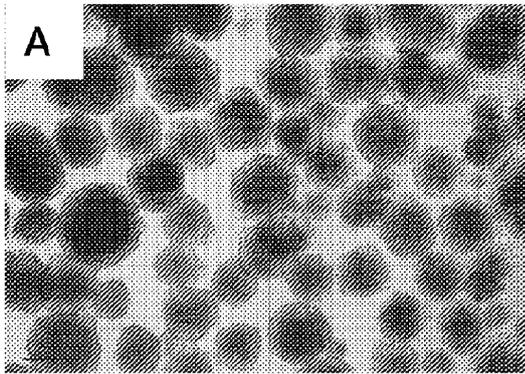
도면5a



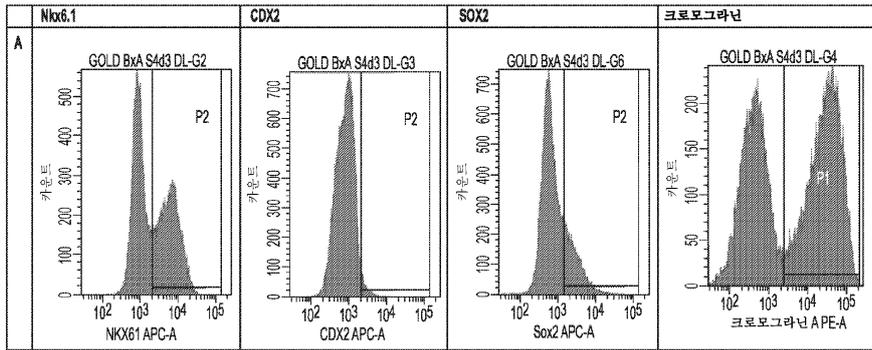
도면5b



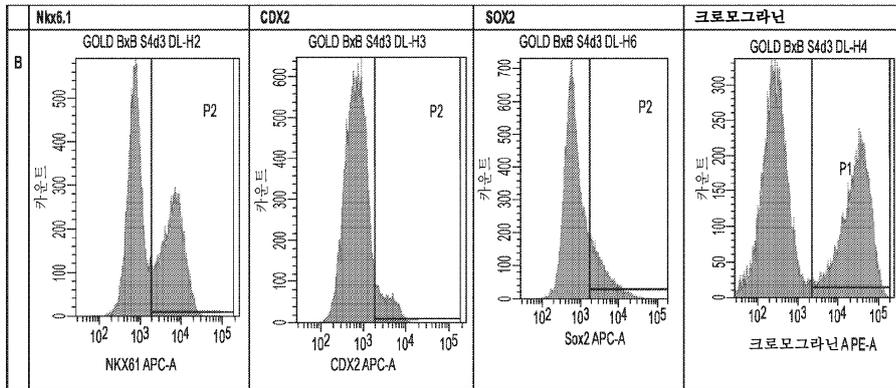
도면5c



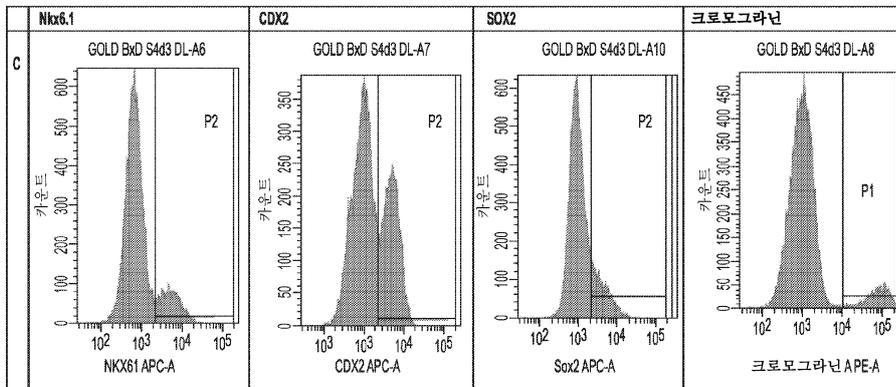
도면5d



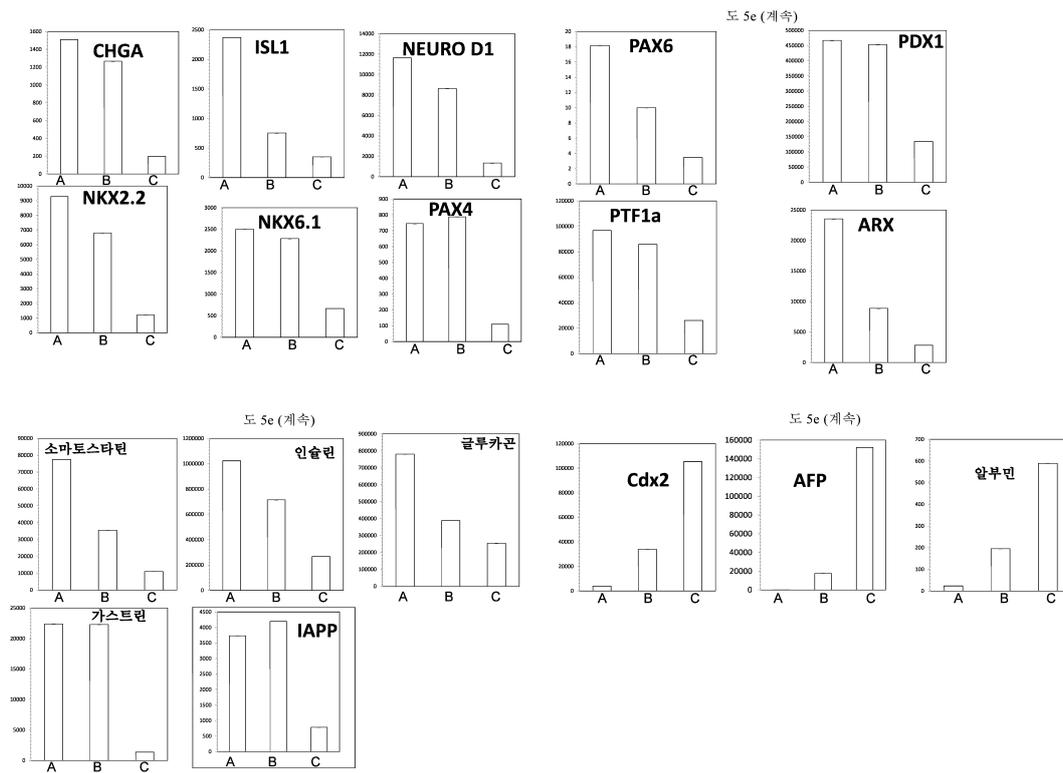
(계속)



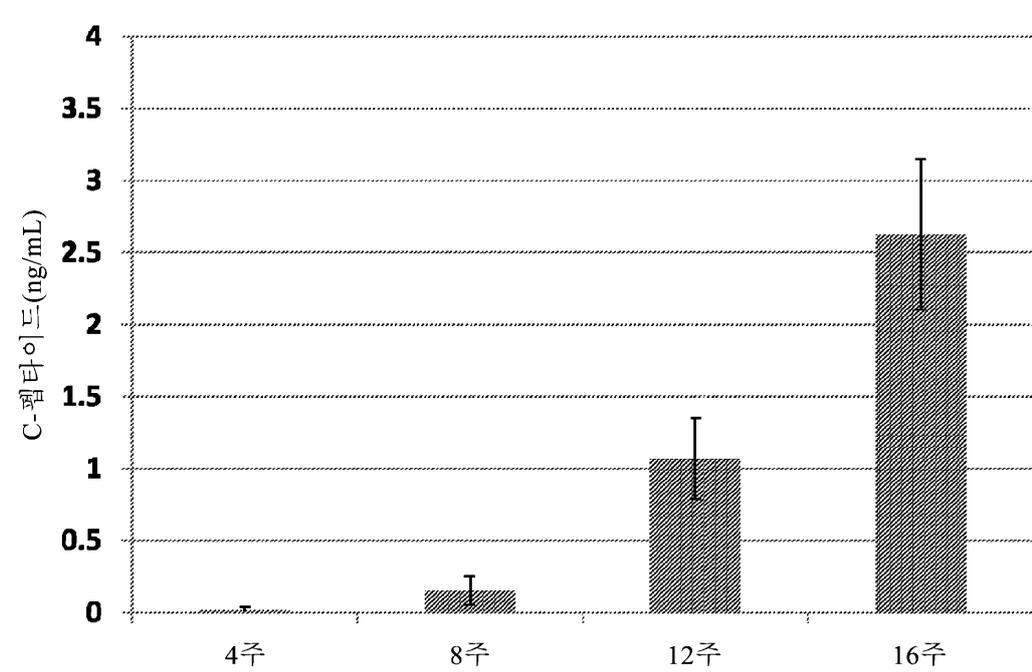
(계속)



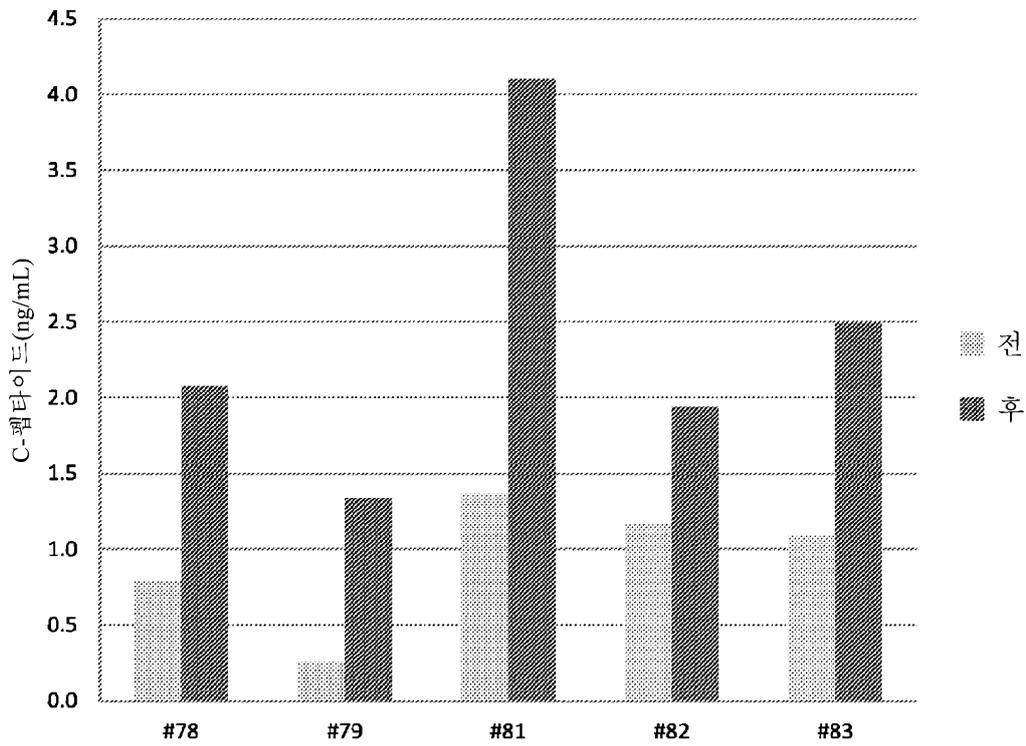
도면5e



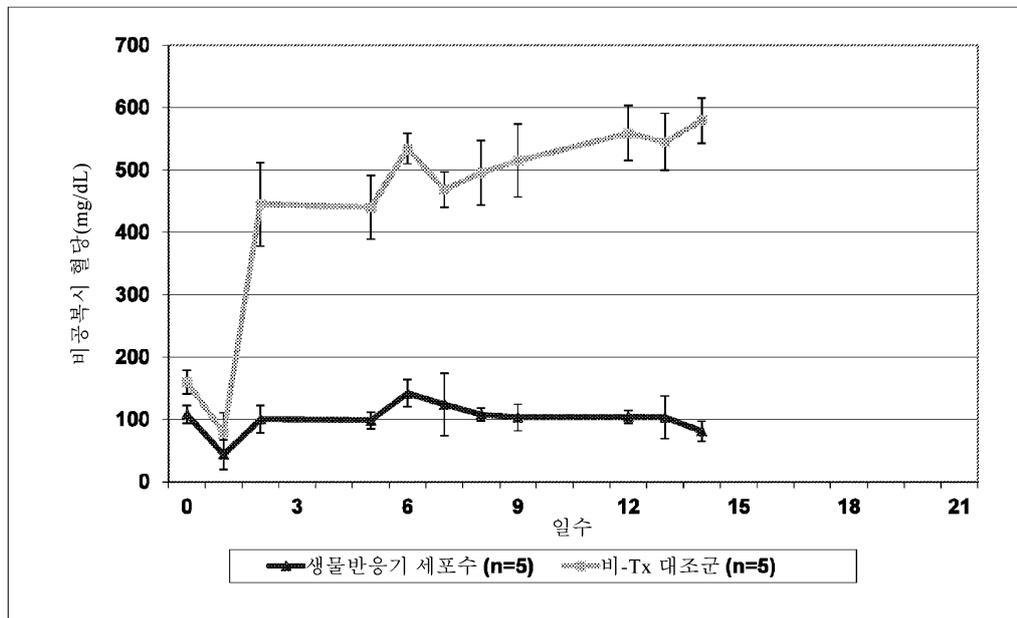
도면5f



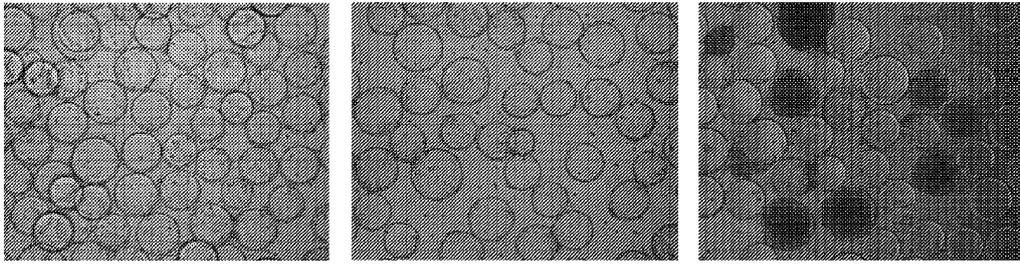
도면5g



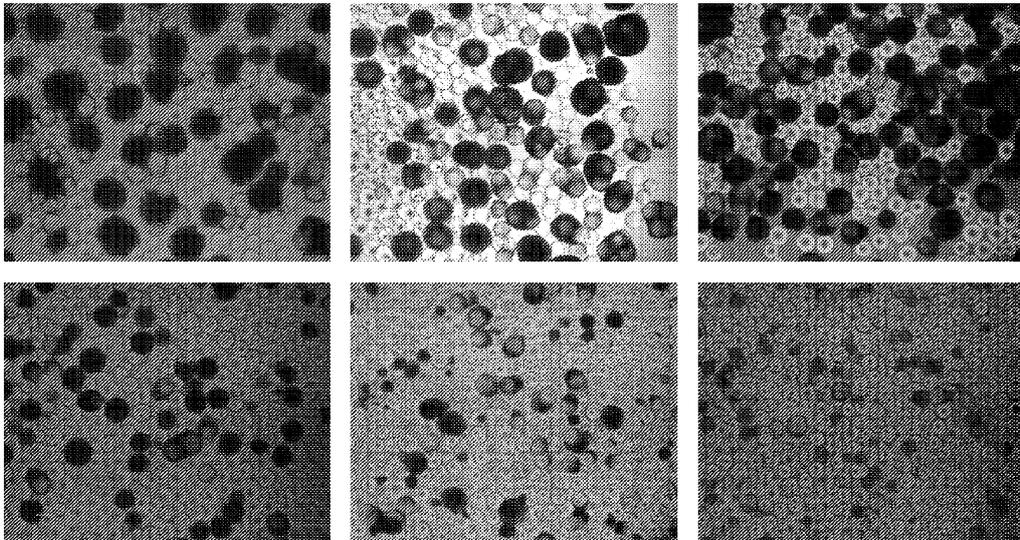
도면5h



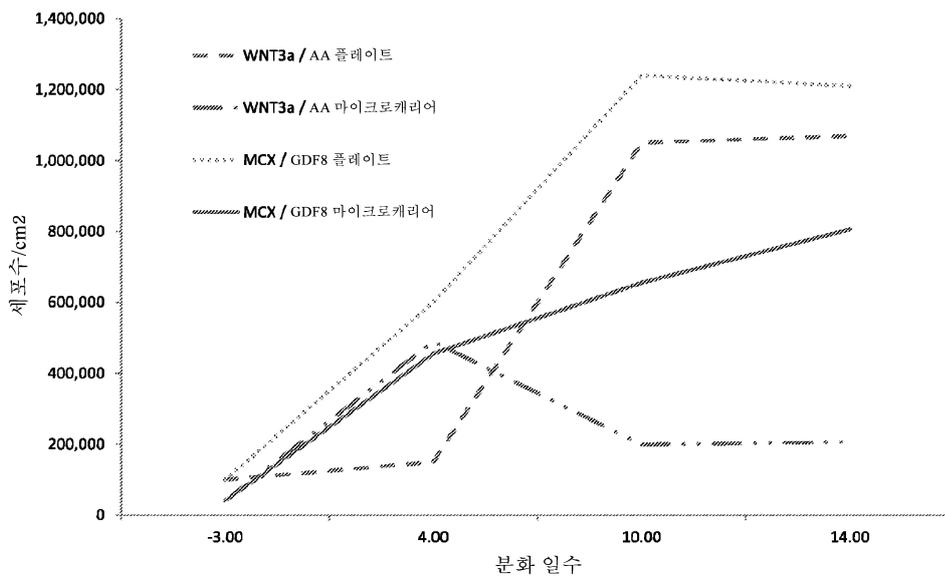
도면6a



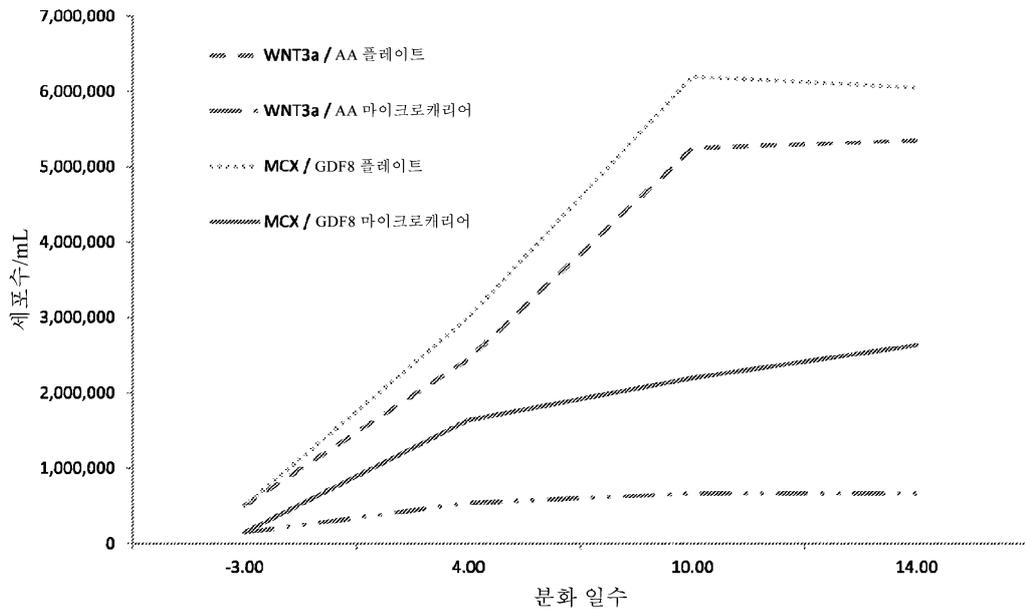
도면6b



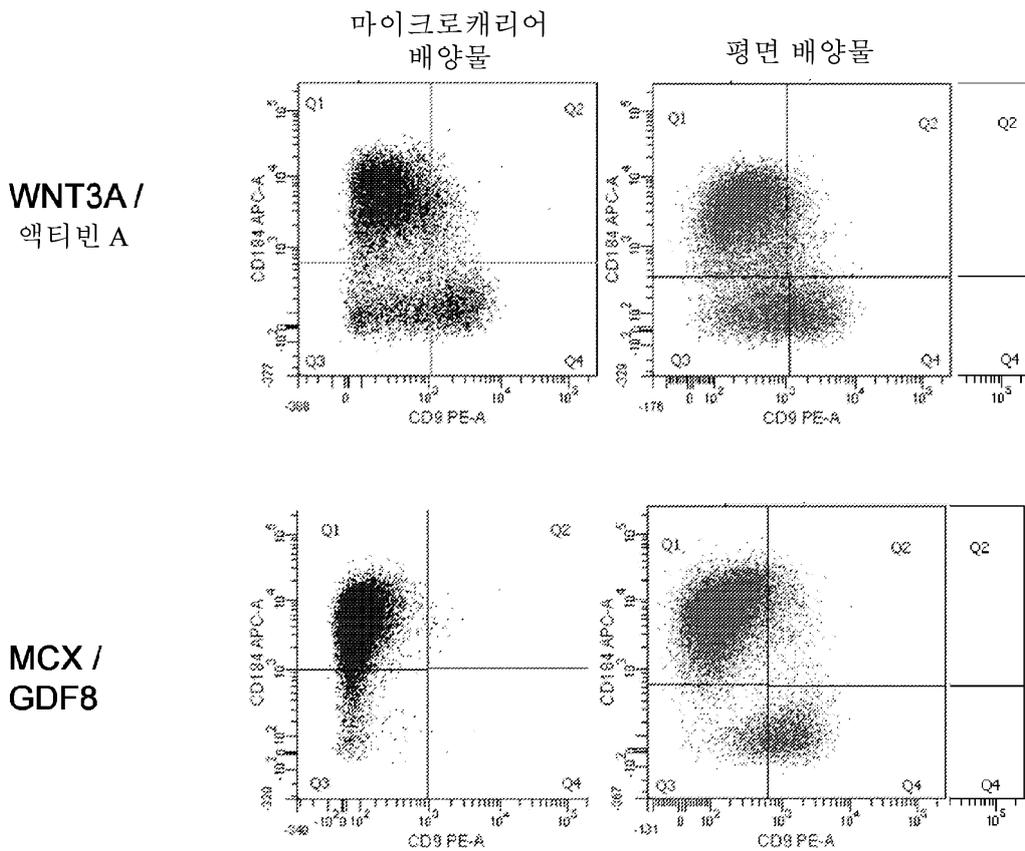
도면6c



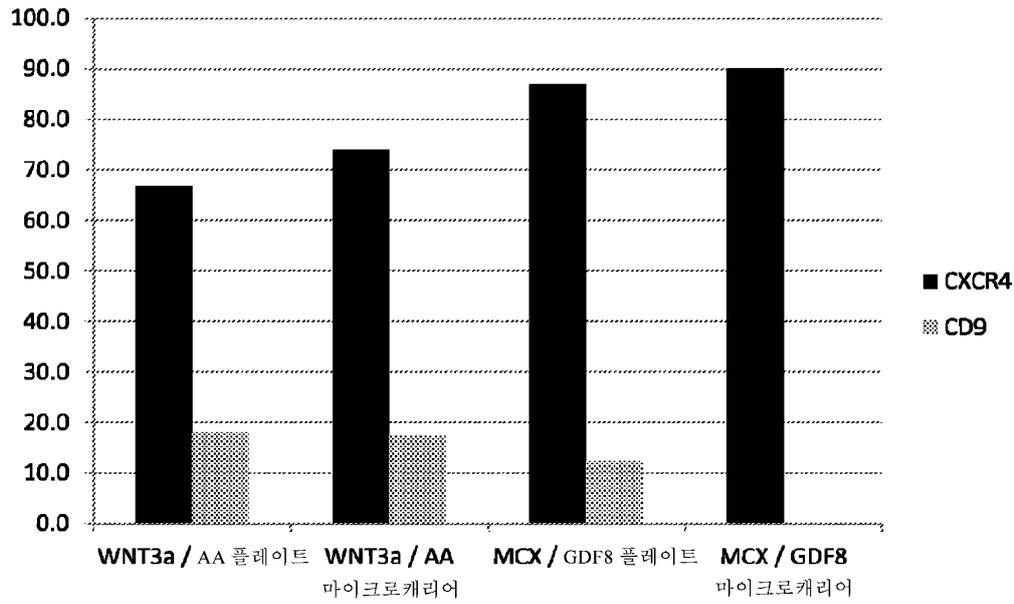
도면6d



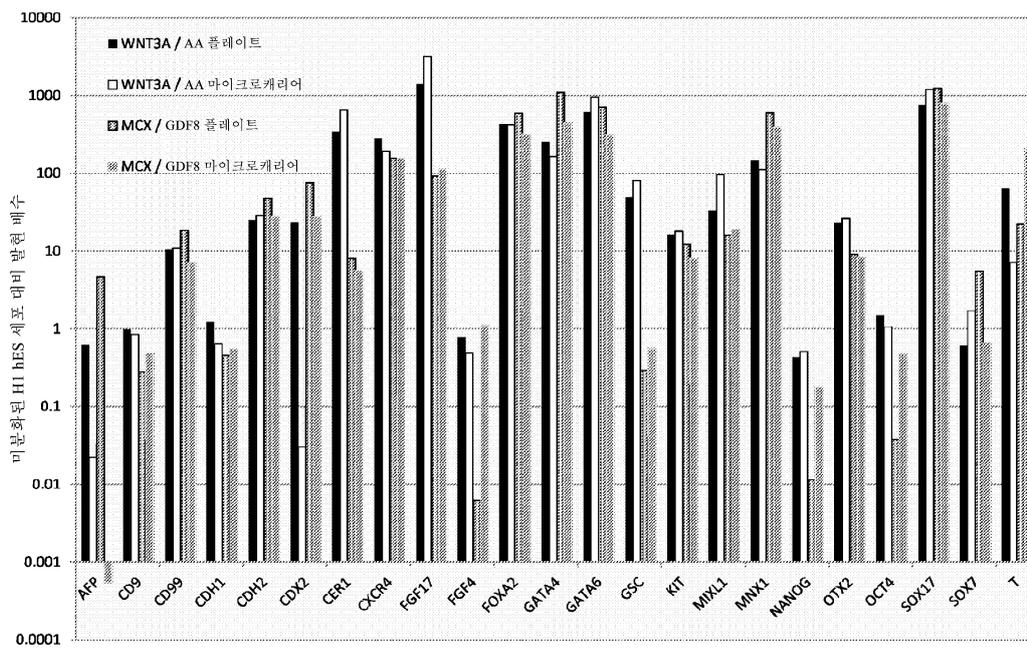
도면6e



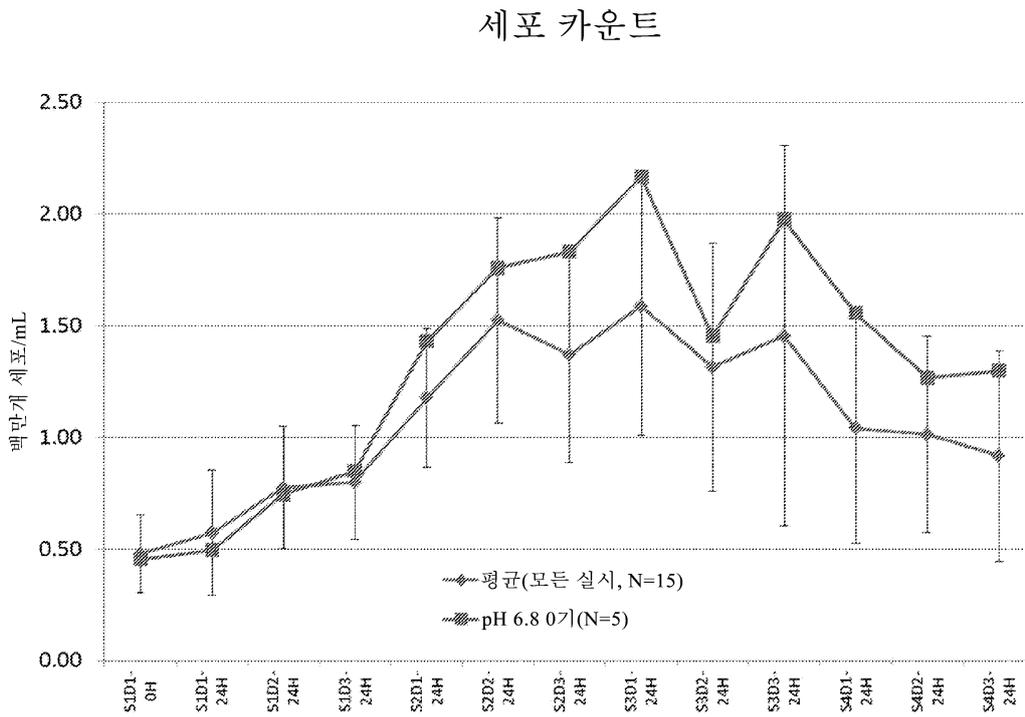
도면6f



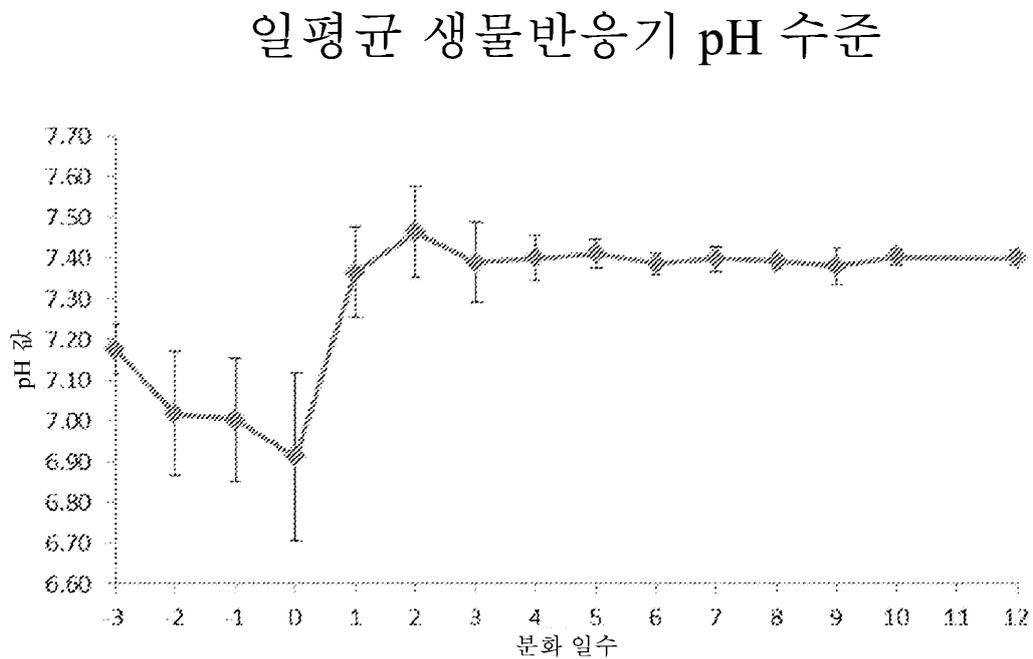
도면6g



도면7

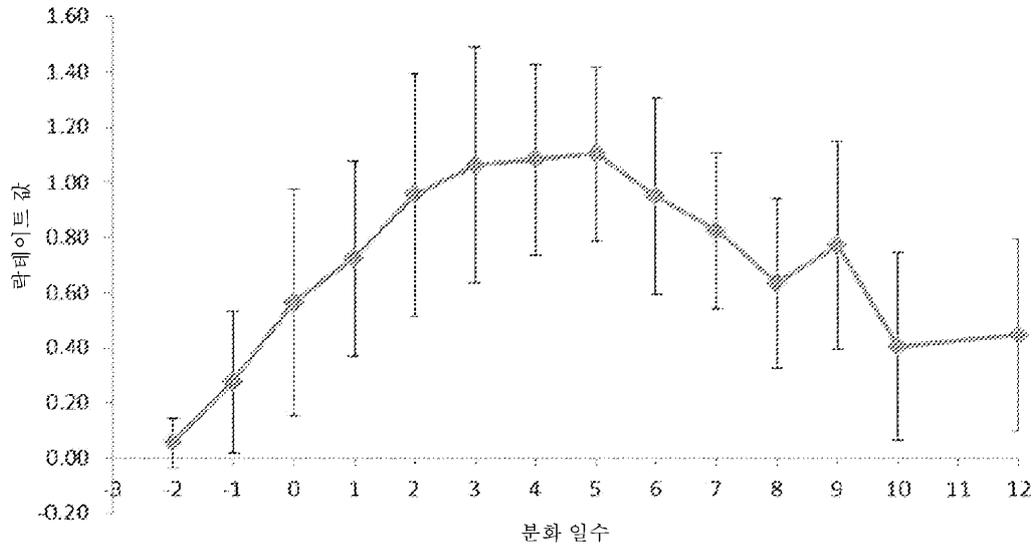


도면8



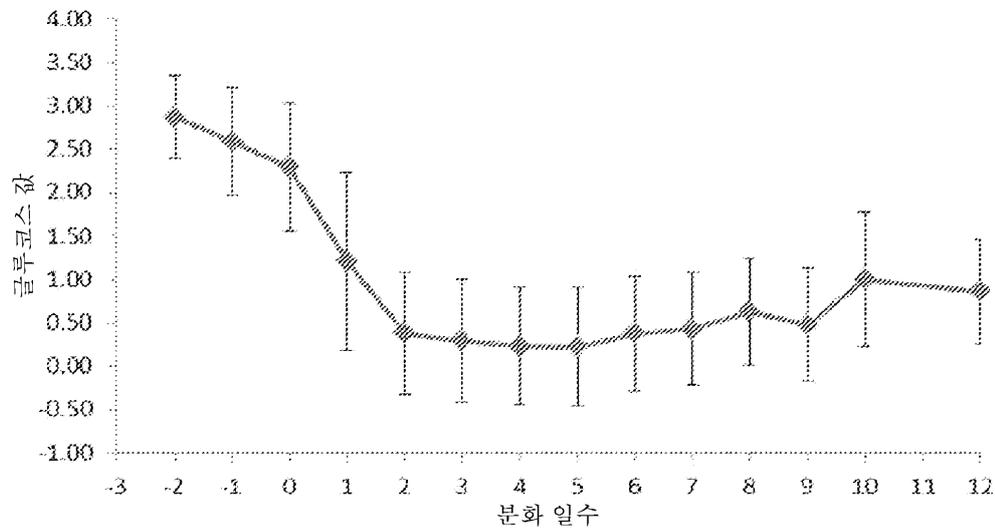
도면9

일평균 생물반응기 락테이트 수준



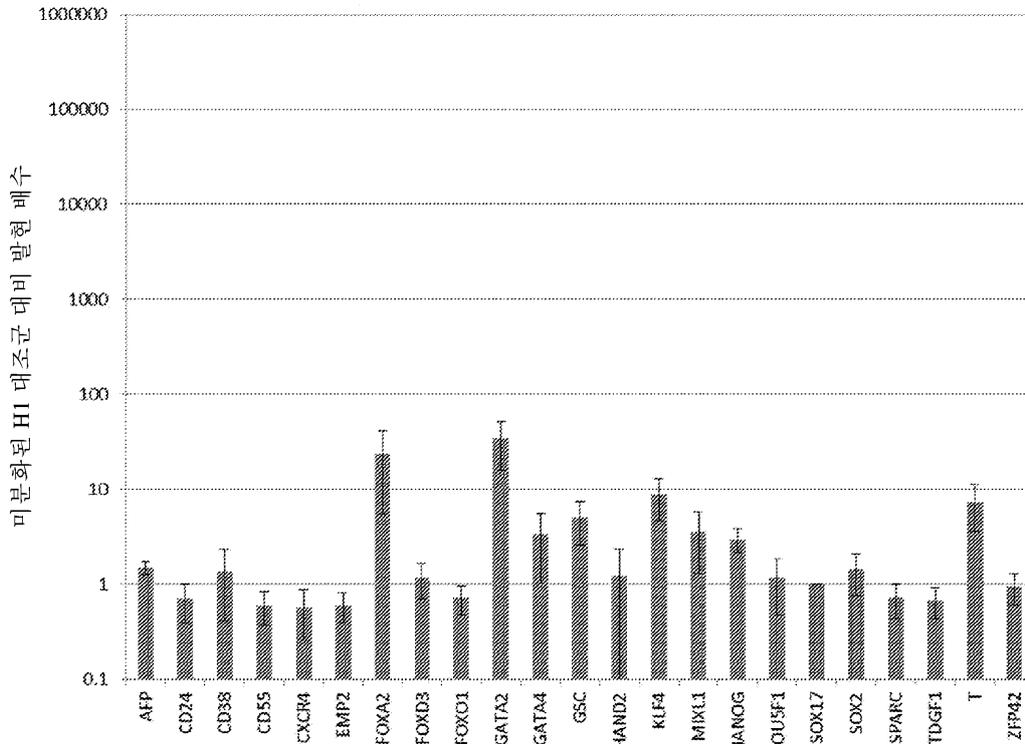
도면10

일평균 생물반응기 글루코스 수준



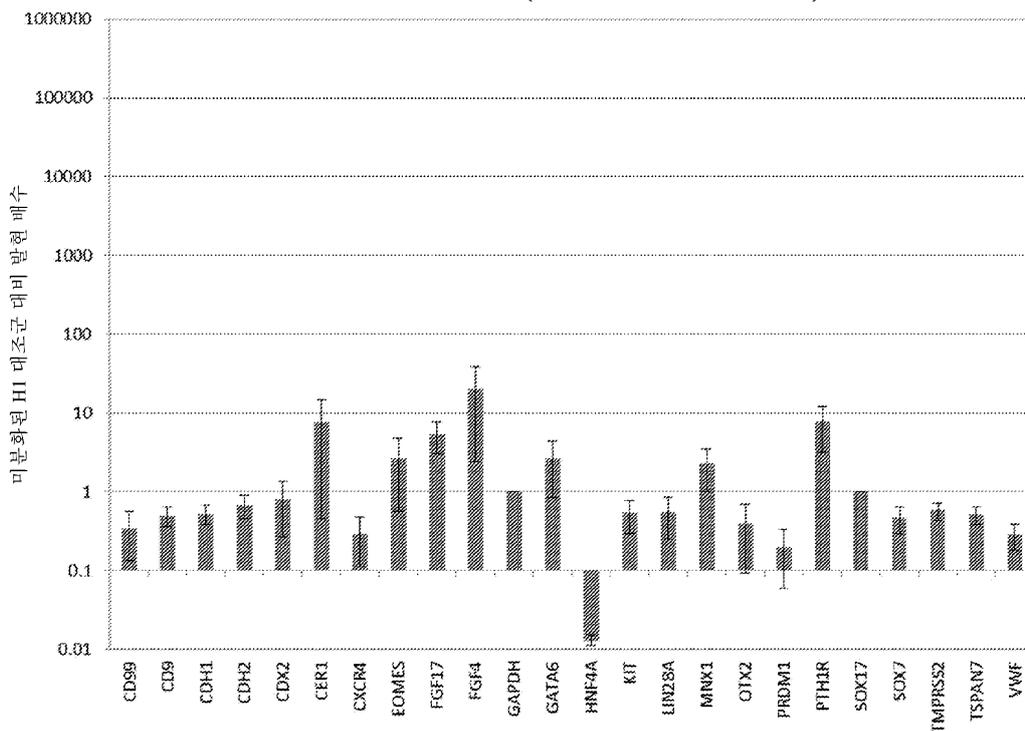
도면11

qRT-PCR(n=12), 만능성 어레이에 의한 0기 1일째 발현의 평균(평균 ± 표준편차)



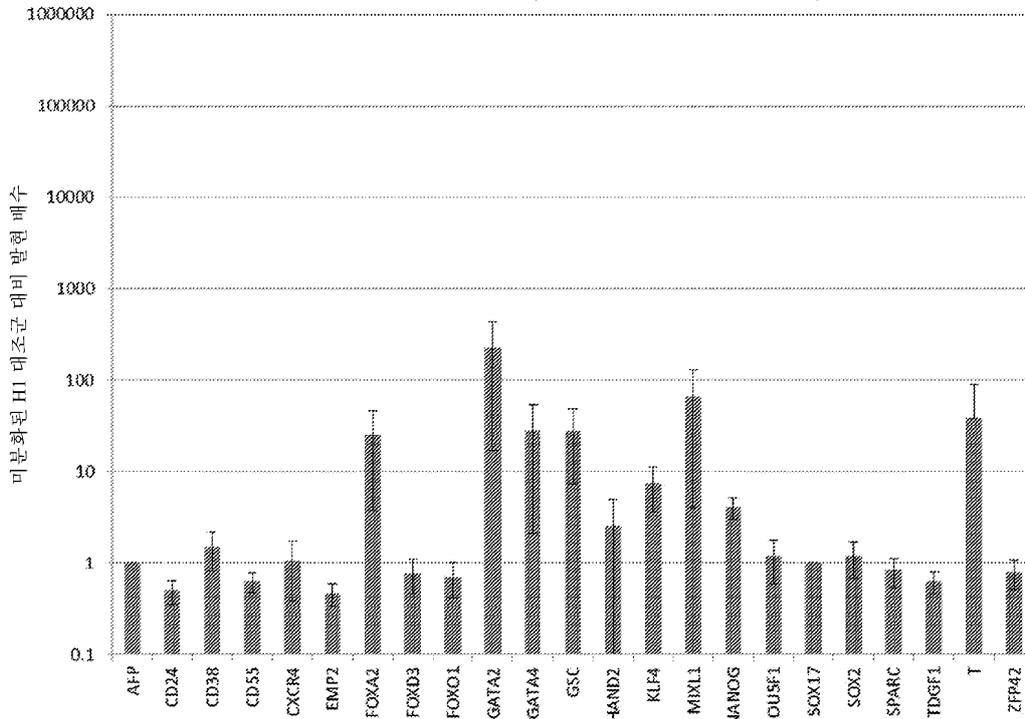
도면12

qRT-PCR(n=10), DE 어레이에 의한 0기 1일째 발현의 평균(평균 ± 표준편차)



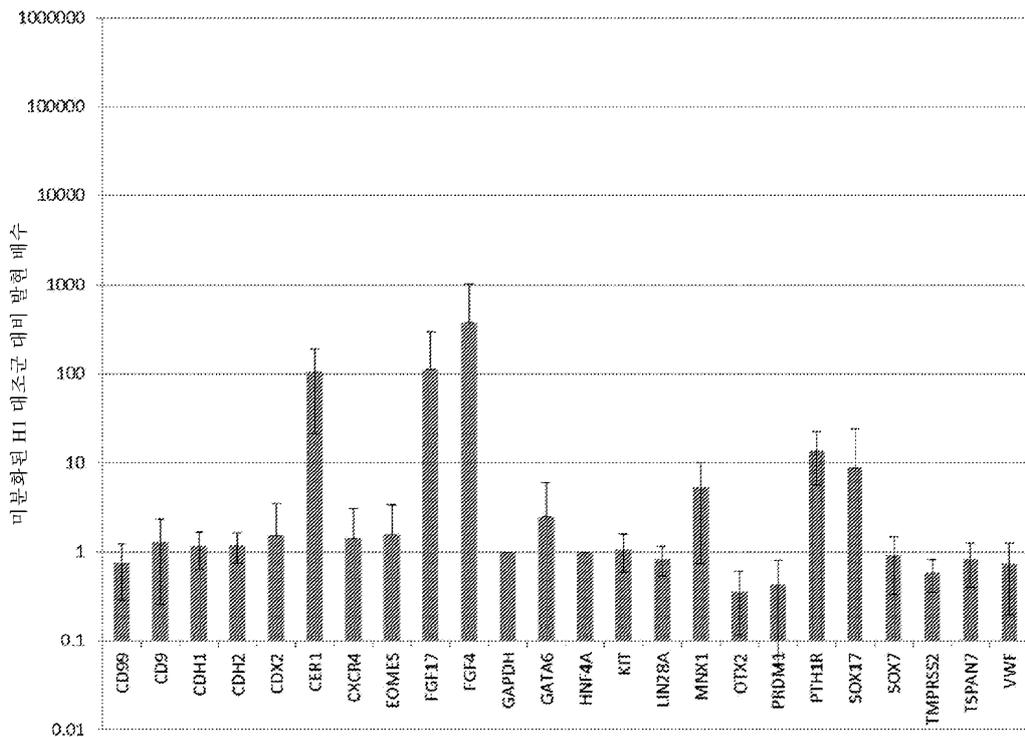
도면13

qRT-PCR(n=12), 만능성 어레이에 의한 0기 3일째 발현의 평균(평균 ± 표준편차)



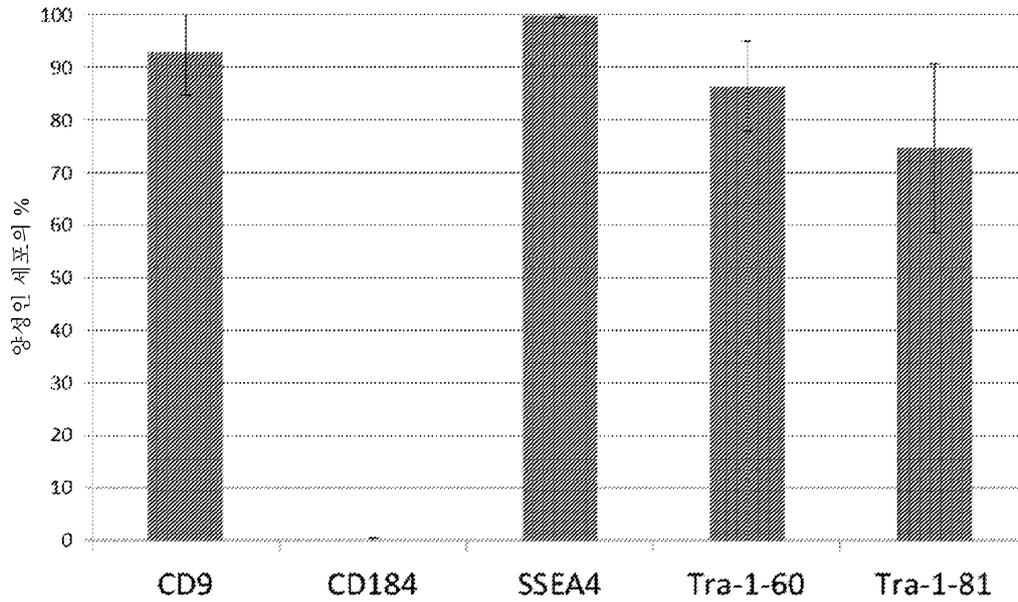
도면14

qRT-PCR(n=10), DE 어레이에 의한 0기 3일째 발현의 평균(평균 ± 표준편차)



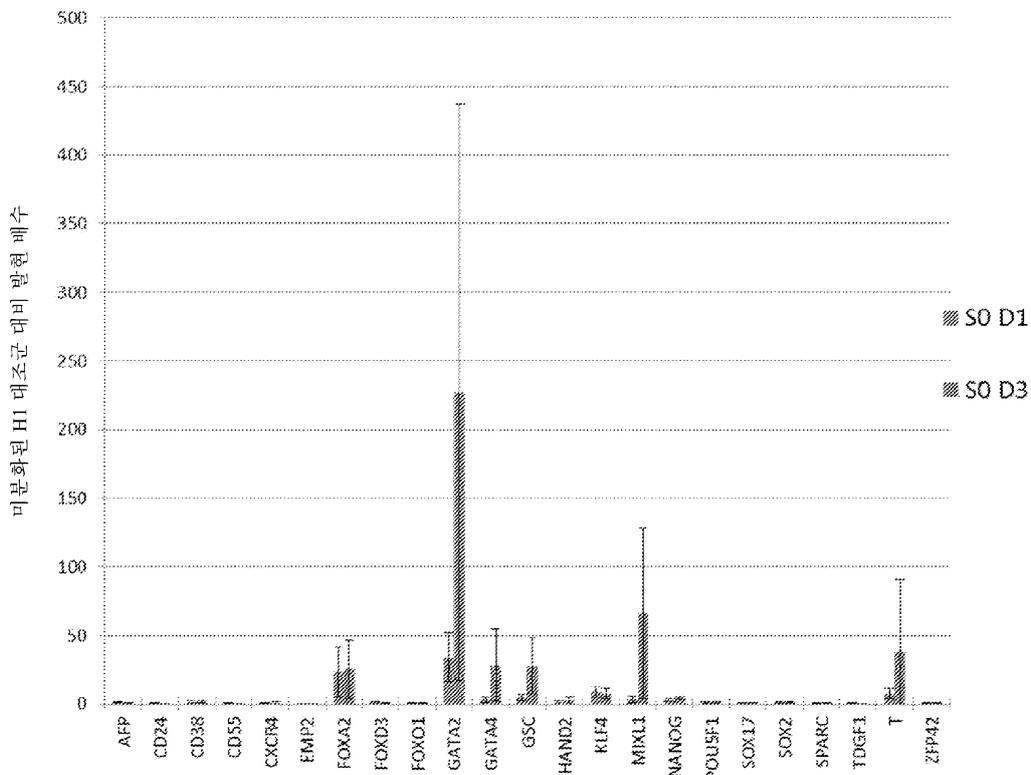
도면15

0기 3일째의 평균 FACS 결과(평균 ± 표준편차)



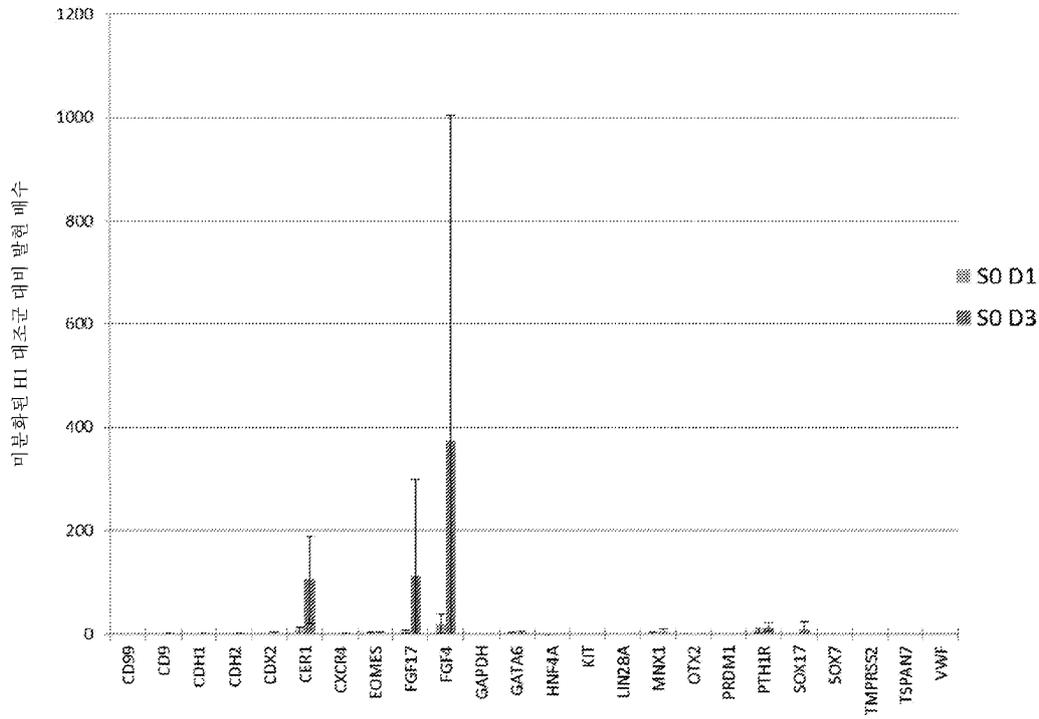
도면16

qRT-PCR 만능성 어레이에 의한 0기 1 및 3일째 발현(n=12, 평균 ± 표준편차)



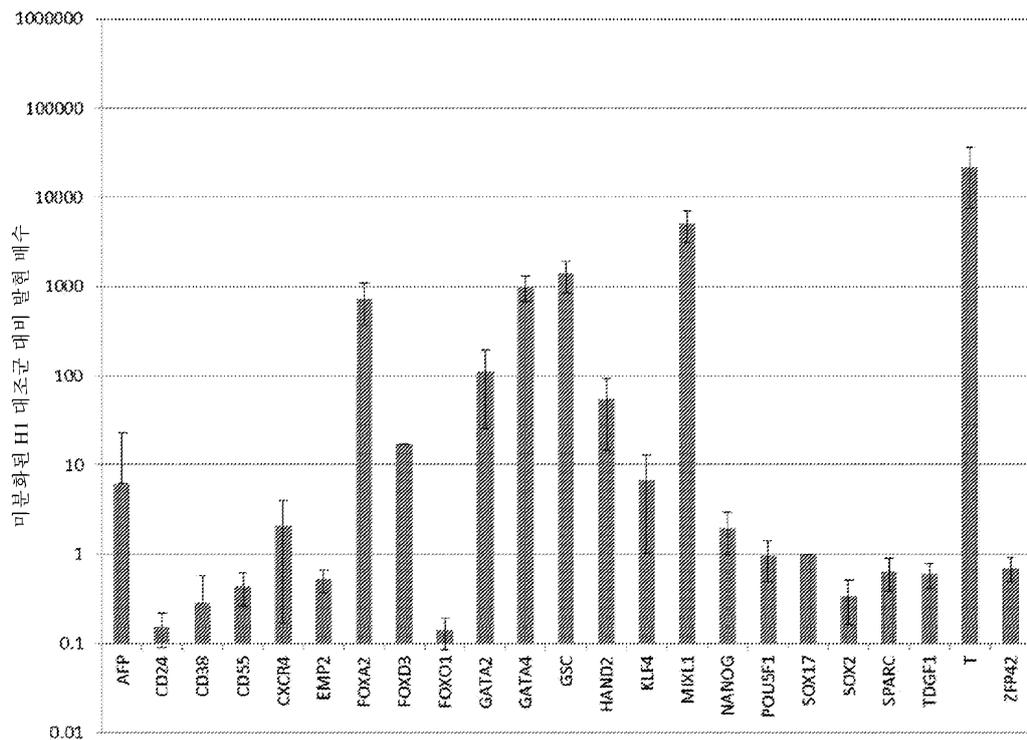
도면17

qRT-PCR DE 어레이에 의한 0기 1 및 3일째 발현(n=10, 평균 ± 표준편차)



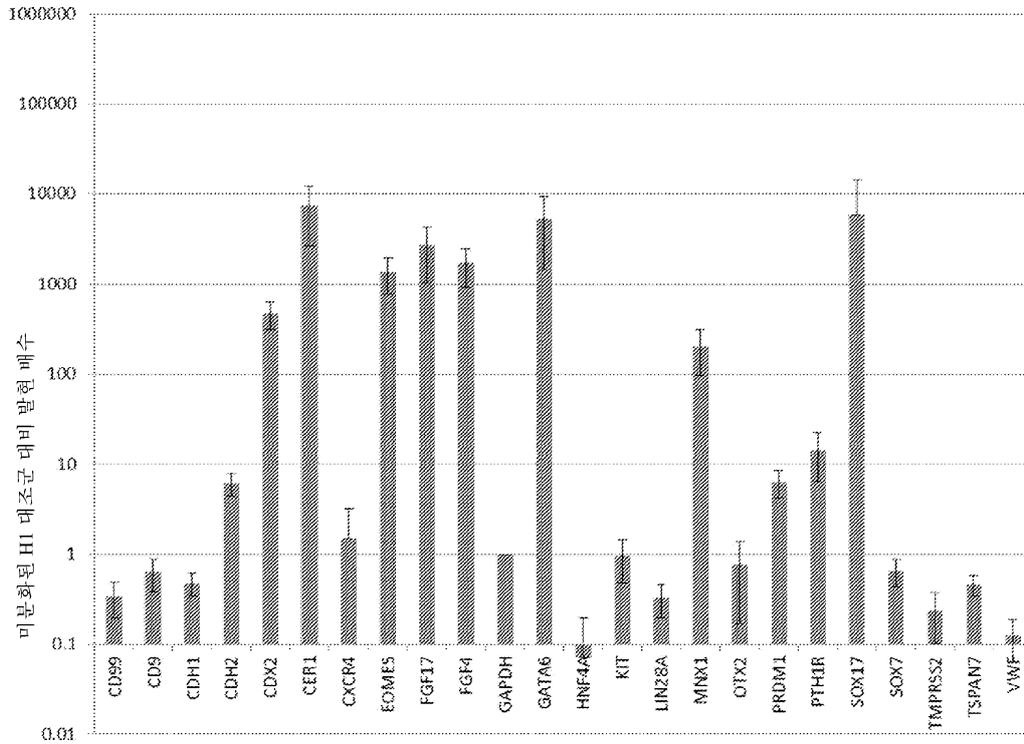
도면18

qRT-PCR 만능성 어레이에 의한 1기 1일째 발현(n=13, 평균 ± 표준편차)



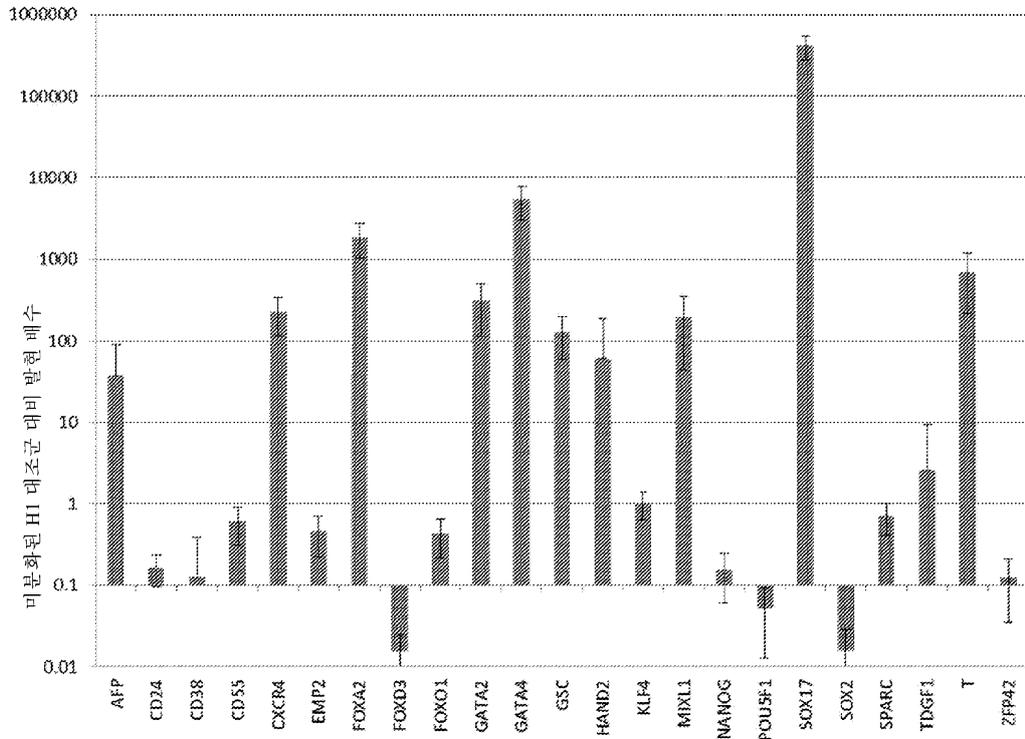
도면19

qRT-PCR DE 어레이에 의한 1기 1일째
발현(n=14, 평균 ± 표준편차)



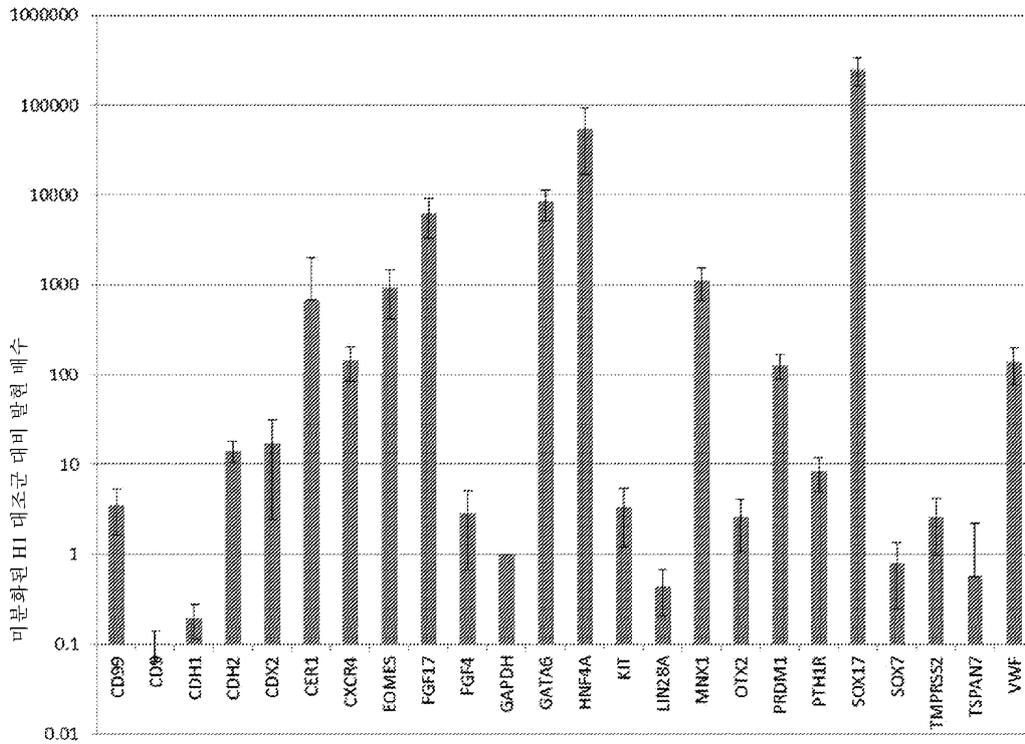
도면20

qRT-PCR 만능성 어레이에 의한 1기 3일째 발현(n=13, 평균 ± 표준편차)



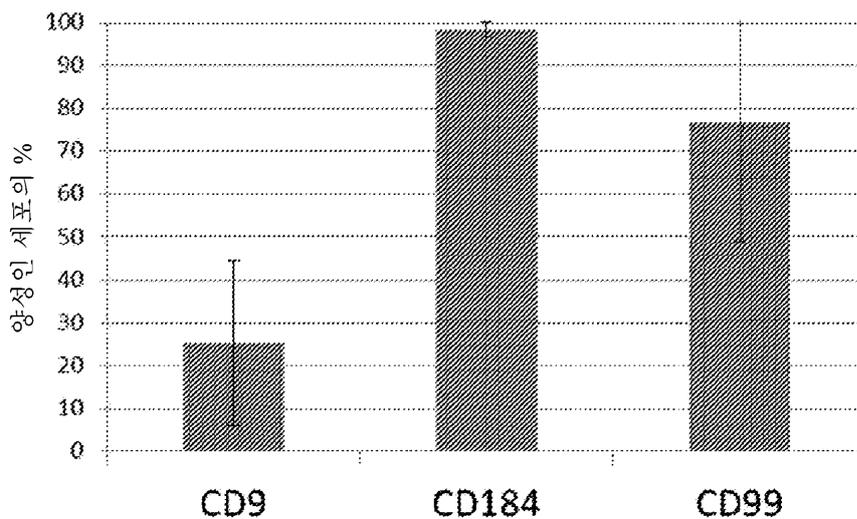
도면21

qRT-PCR DE 어레이에 의한 1기 3일째 발현(n=13, 평균 ± 표준편차)



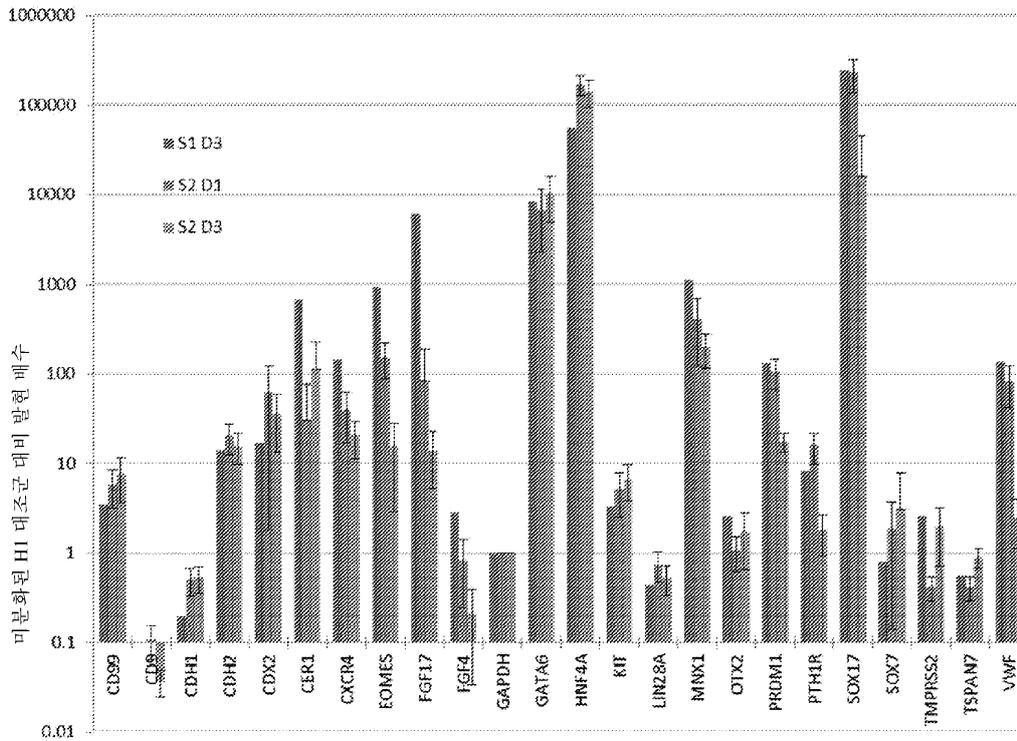
도면22

1기 3일째의 평균 FACS 결과(평균 ± 표준편차)



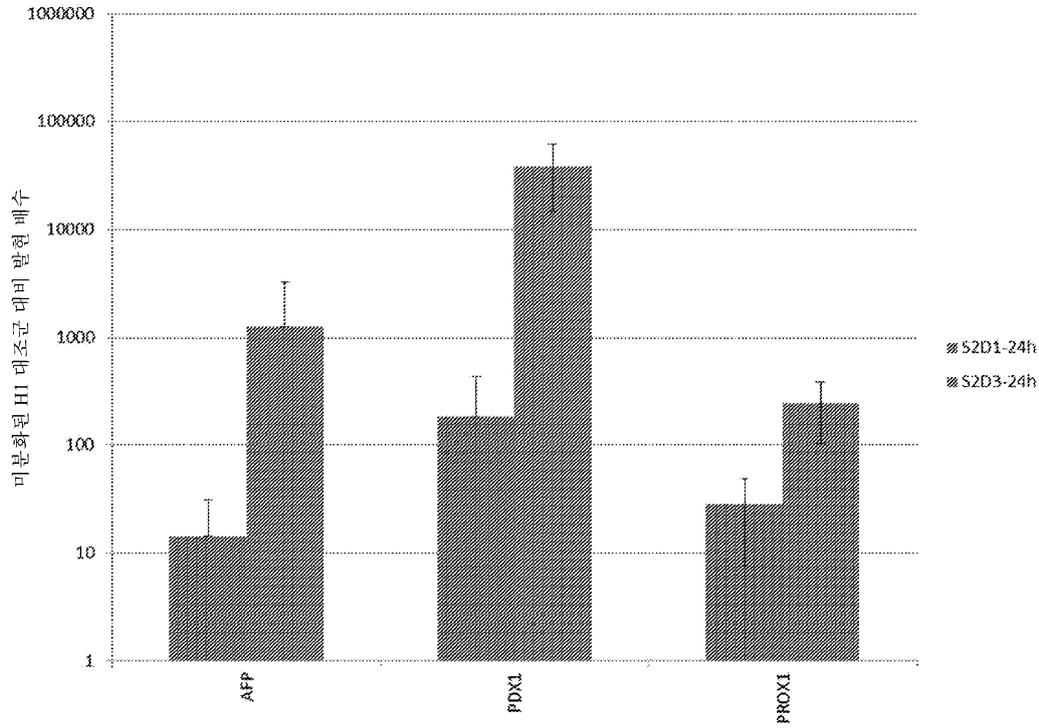
도면23

qRT-PCR DE 어레이에 의한 1기 3일째, 2기 1일째,
 및 2기 3일째 발현(n=14, 평균 ± 표준편차)



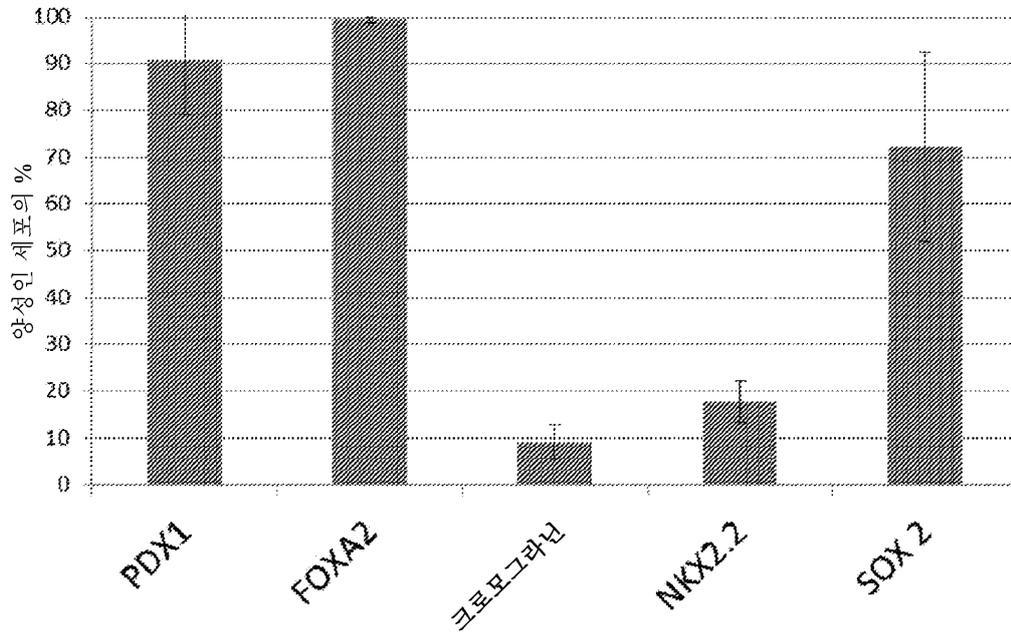
도면24

qRT-PCR GT 어레이에 의한 2기 1 및 3일째
발현(n=14, 평균 ± 표준편차)



도면25

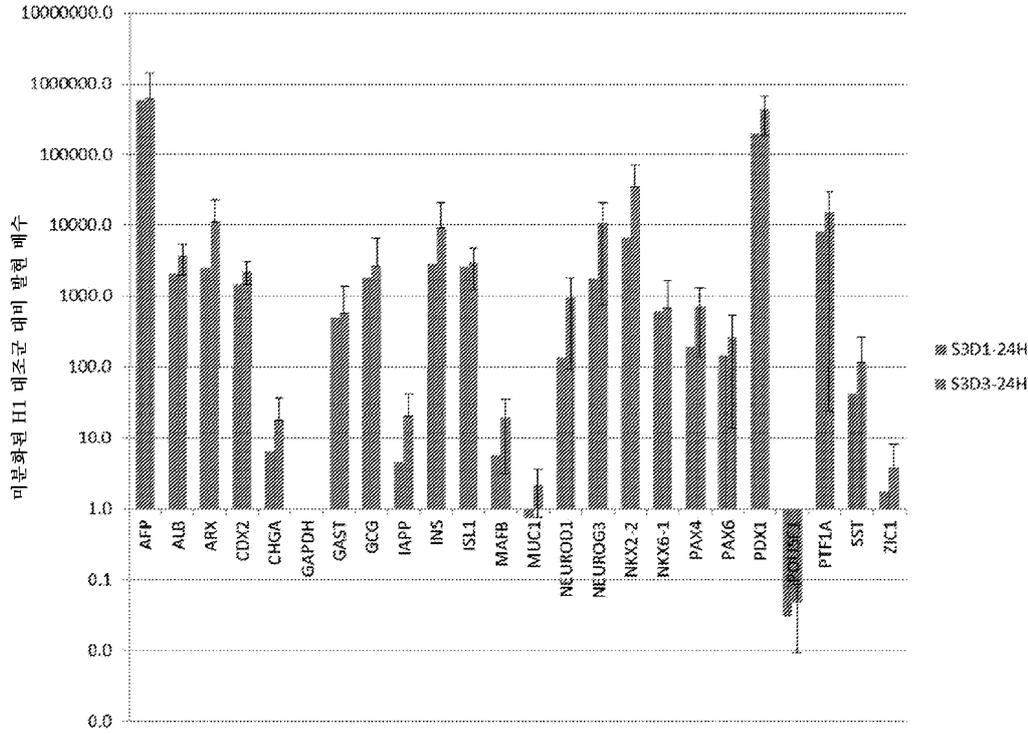
3기 3일째의 평균 FACS 결과(평균 ± 표준편차)



Pdx1	FoxA2	크로모그라닌	Nkx 2.2	SOX 2
90.9	99.2	9.1	17.8	72.3
11.9	0.6	3.6	4.4	20.2

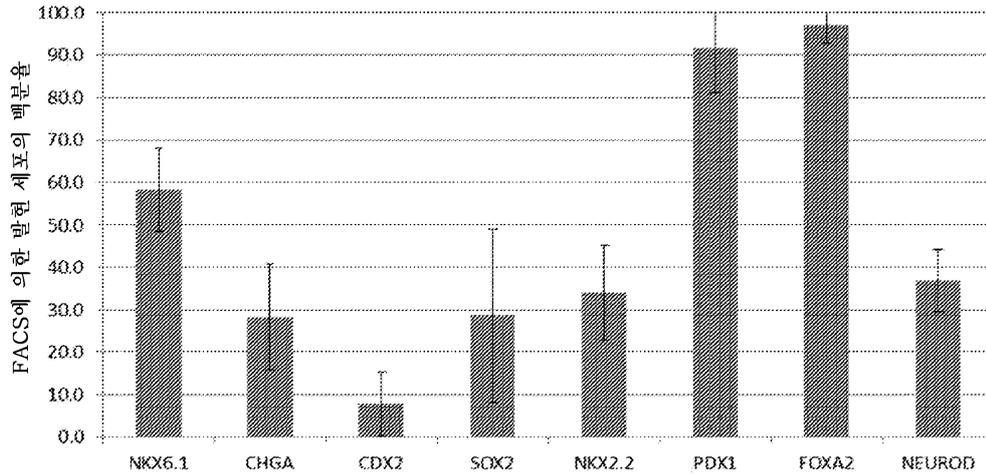
도면26

qRT-PCR S4 어레이에 의한
3기 1 및 3일째 발현
(n=10, 평균 ± 표준편차)



도면27

4기 3일째의 평균 FACS 결과 (평균 ± 표준편차)

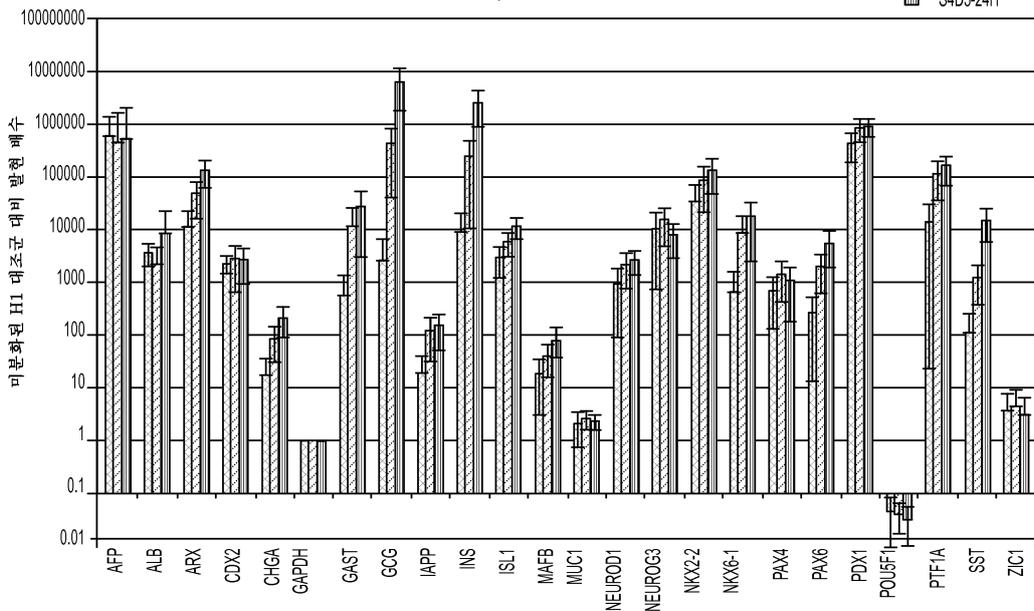


N=13	NKX6.1	CHGA	CDX2	SOX2	NKX2.2	PDX1	FOXA2	NEUROD
전체 평균	58.3	28.1	7.7	28.6	34.0	91.7	97.2	36.9
전체 표준편차	9.7	12.5	7.5	20.4	11.1	10.4	4.3	7.4

도면28

qRT-PCR S4 어레이에 의한 3기 3일째 및 4기 1 및 3일째 발현(n=14, 평균 ± 표준편차)

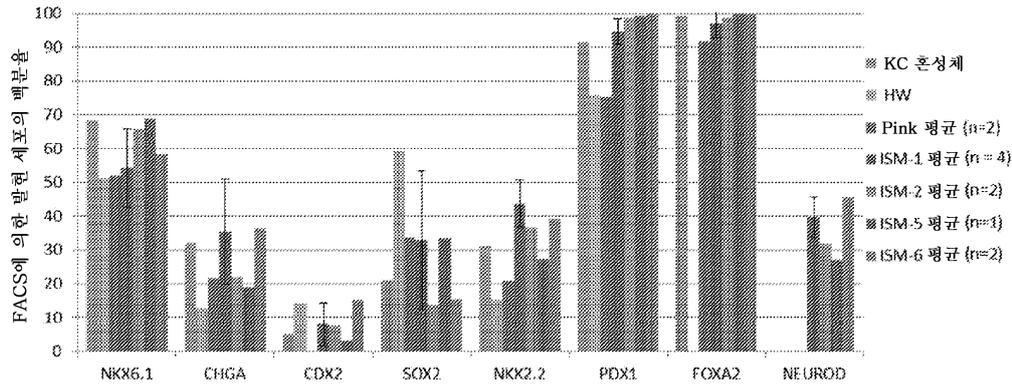
□ S3D3-24H
▨ S4D1-24H
▩ S4D3-24H



도면29

4기 3일째의 평균 FACS 결과 (평균 ± 표준편차)

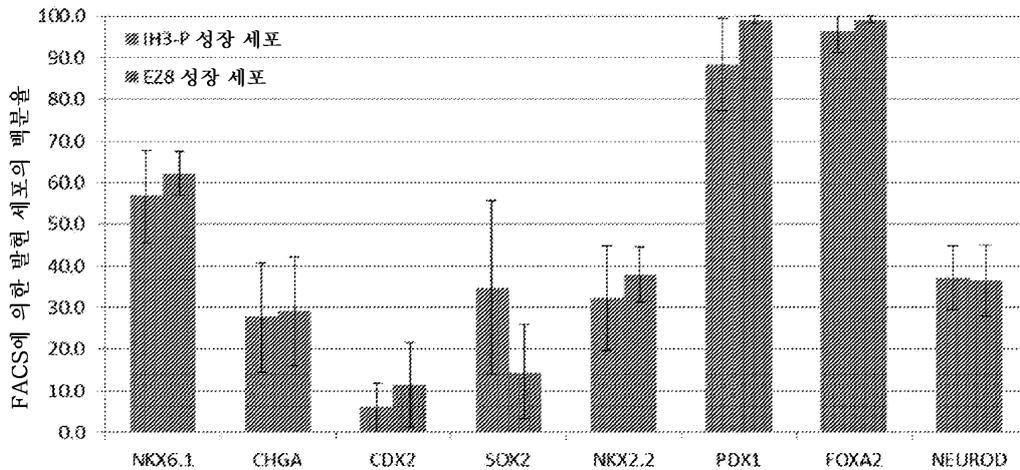
상이한 시드 물질 로트로부터 3 L 스케일로 생성된
췌장 전구체의 평균 FACS 발현 패턴



도면30

4기 3일째의 평균 FACS 결과 (평균 ± 표준편차)

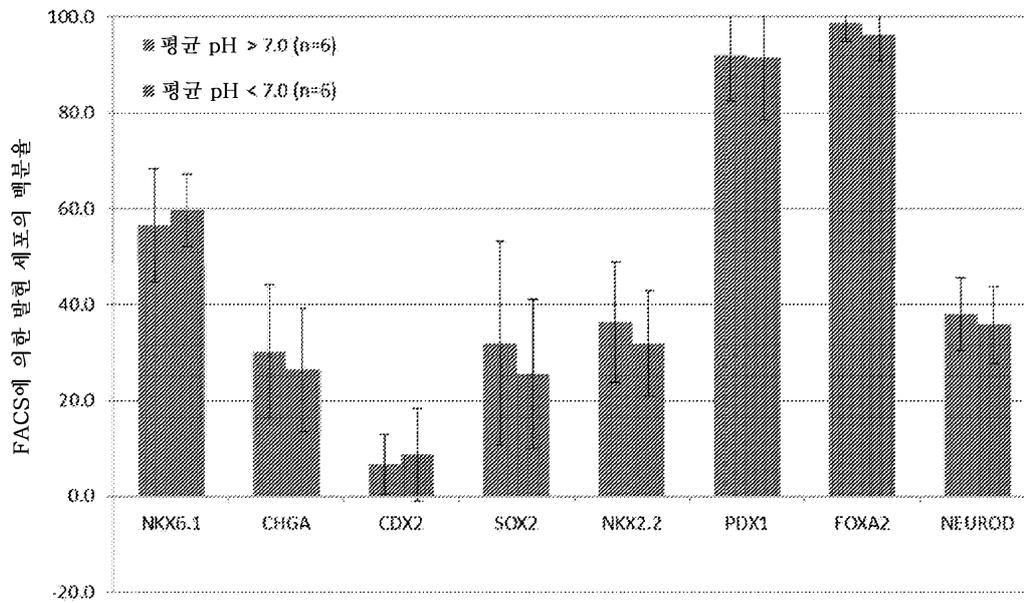
췌장 전구체의 평균 FACS 발현 패턴
(E8 vs. IH3-P) - 3 리터 2013



도면31

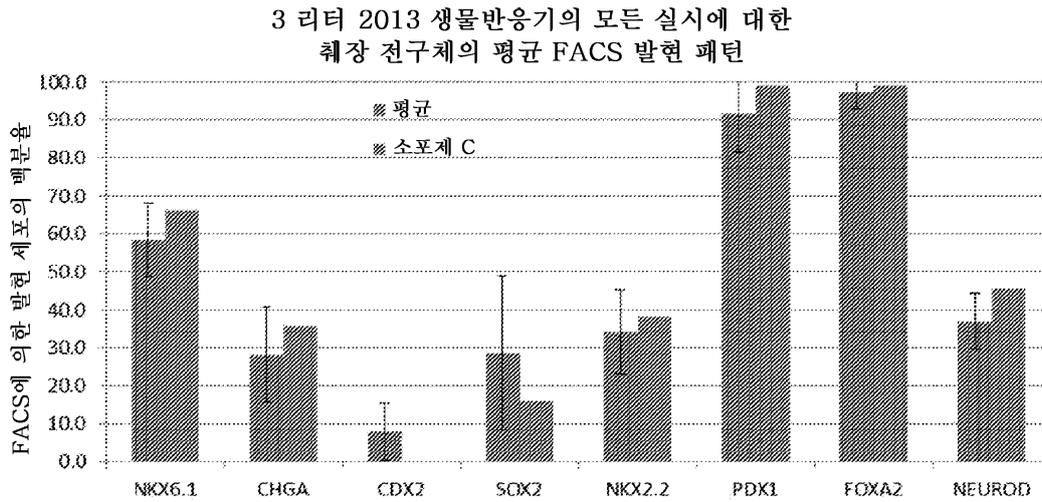
4기 3일째의 평균 FACS 결과 (평균 ± 표준편차)

췌장 전구체의 평균 FACS 발현 패턴
(PP에서의 다양한 pH 대조군) - 3 리터 2013



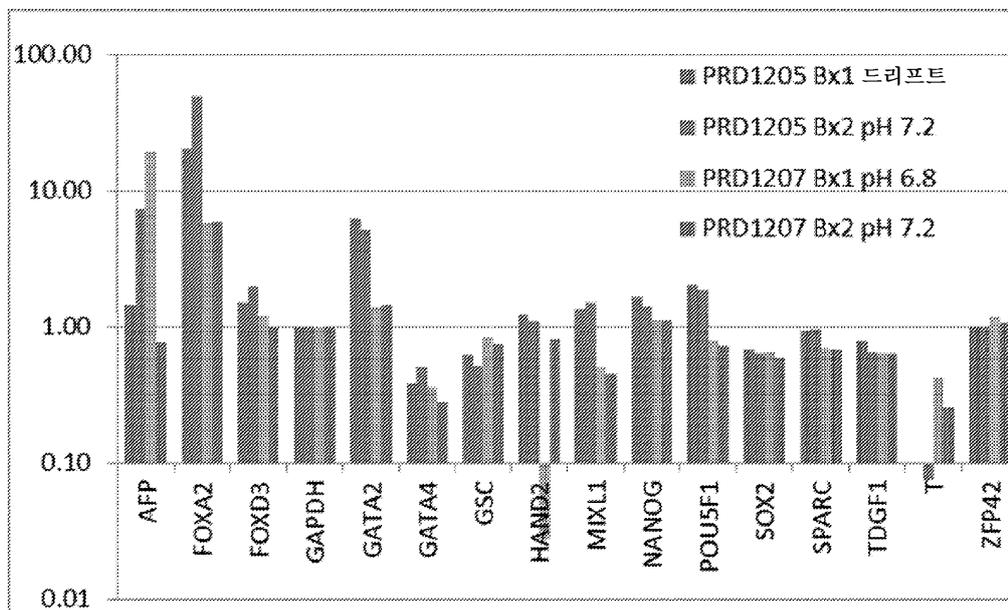
도면32

소포제 C를 사용한 실시 대비 4기 3일째의 평균 FACS 결과 (평균 ± 표준편차)



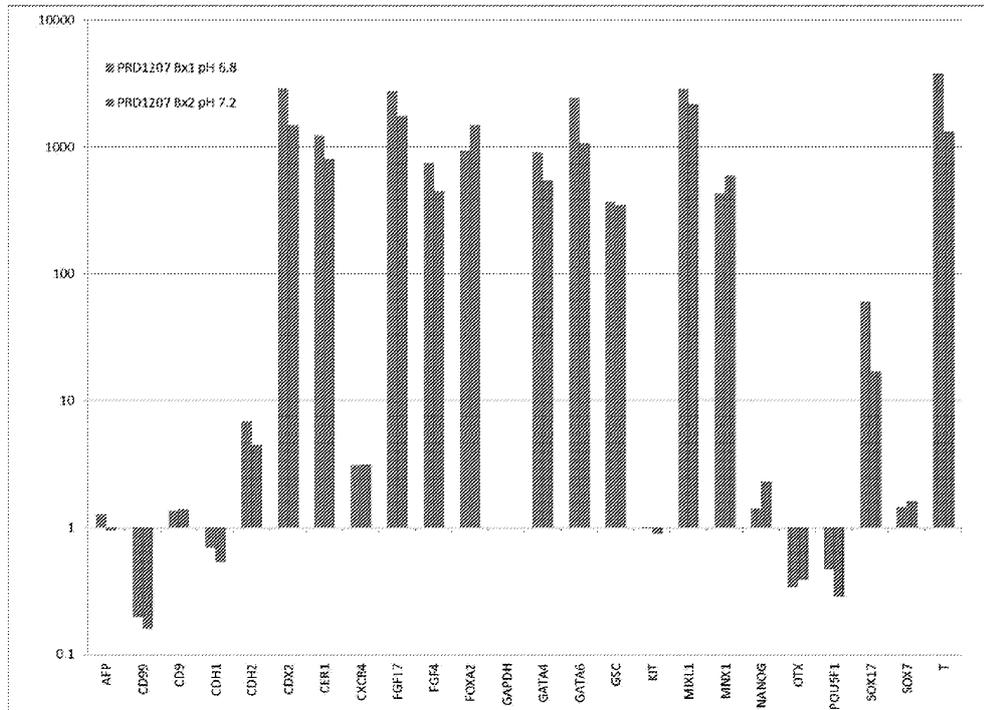
도면33

분화 개시 전 24시간째의 qRT-PCR 발현 수준



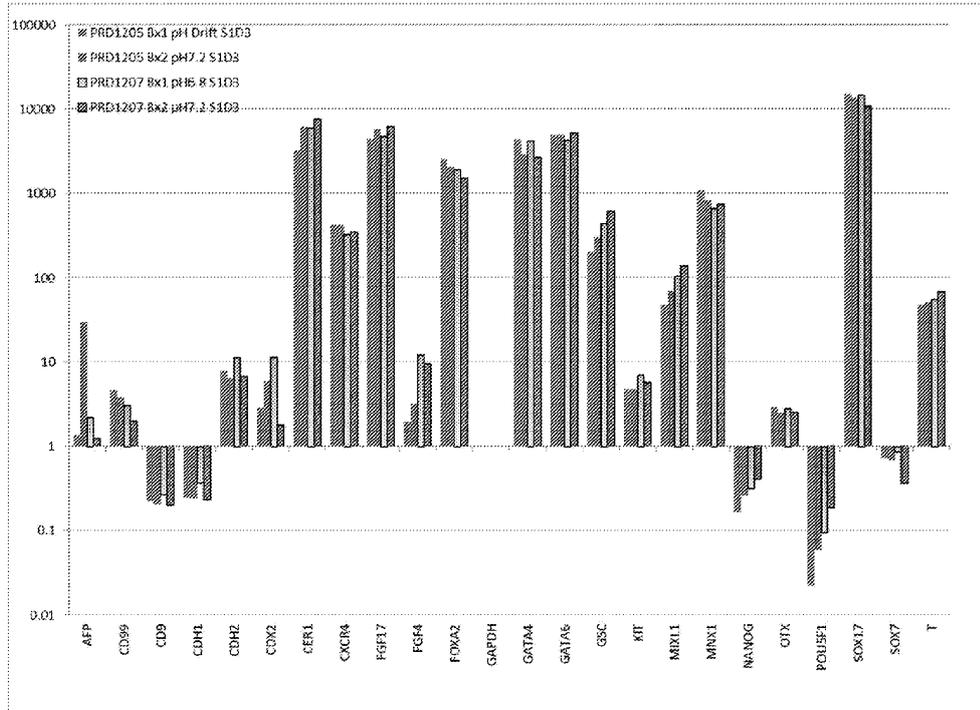
도면34

분화 개시 후 24시간째의 qRT-PCR 발현 수준



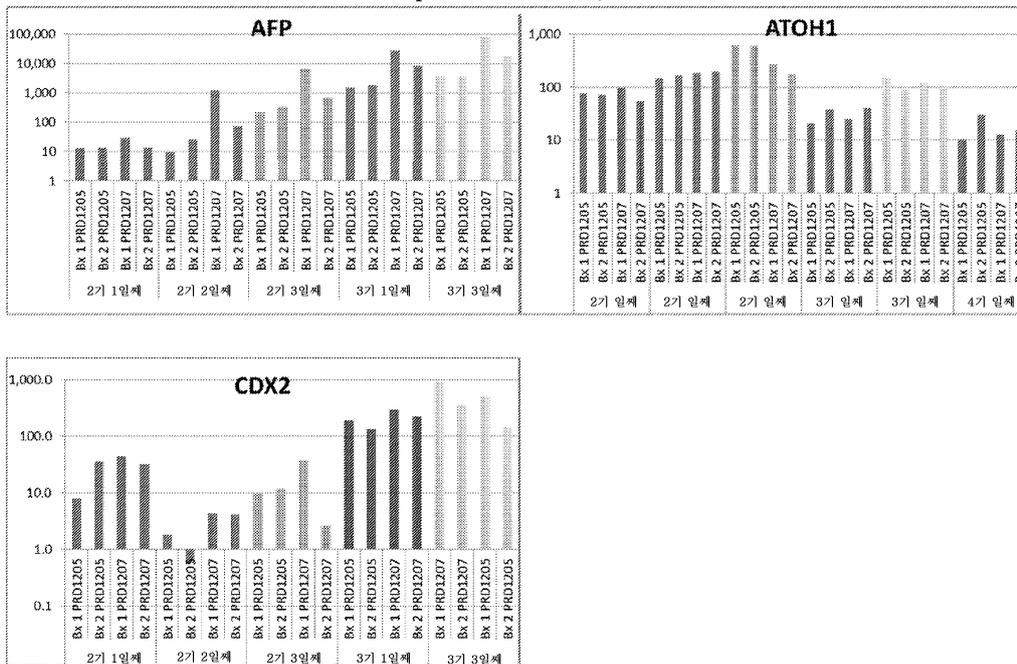
도면35

분화 개시 후 72시간째의 qRT-PCR 발현 수준



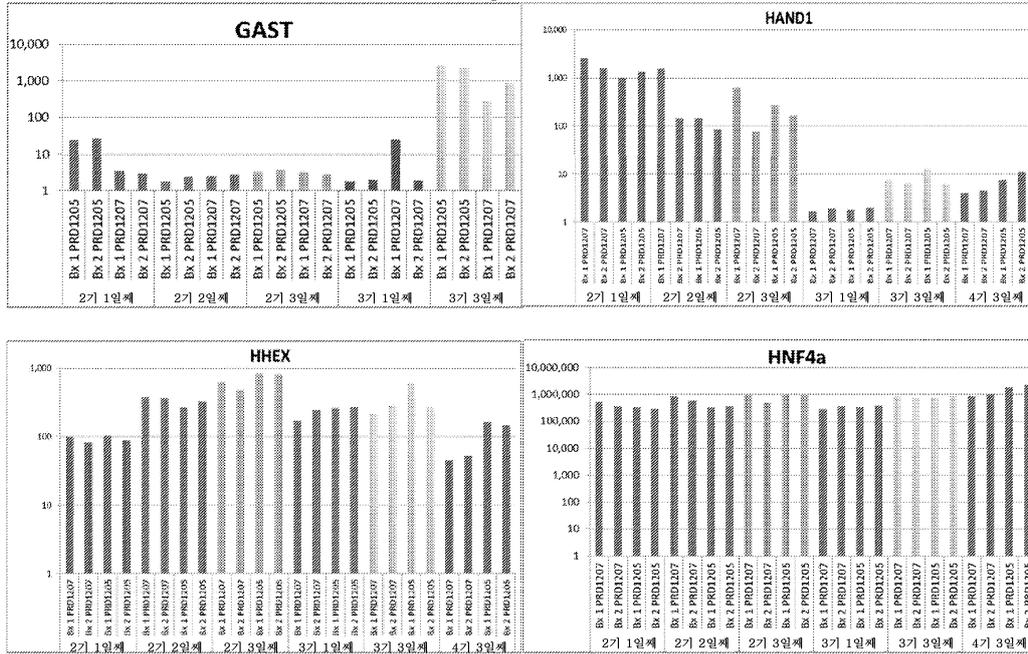
도면36a

분화의 2기로부터 3기 그리고 4기까지의 qRT-PCR 발현 수준



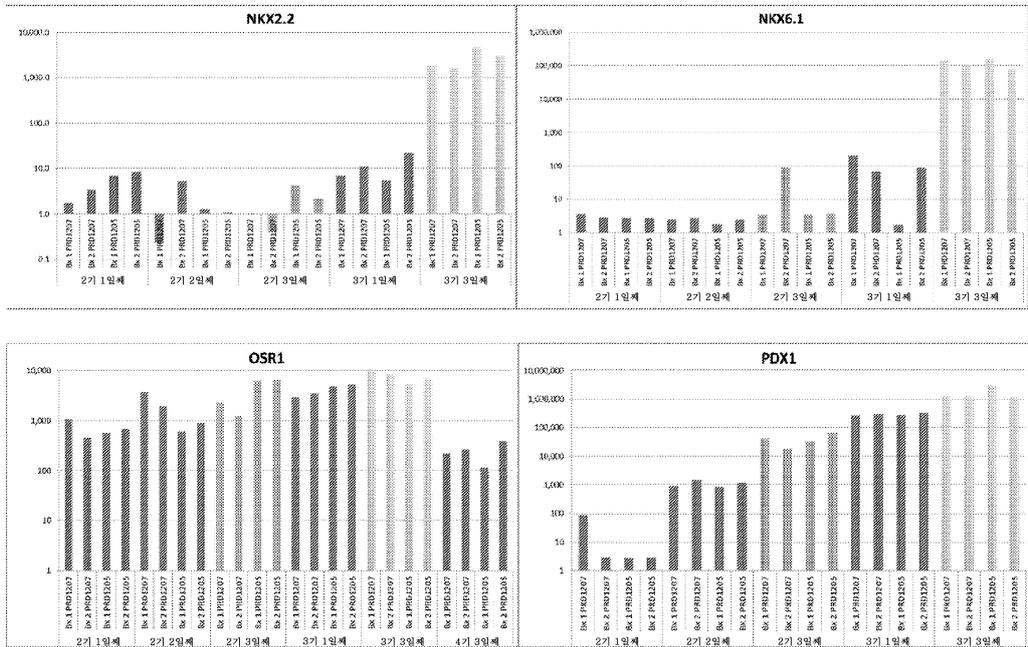
도면36b

분화의 2기로부터 3기 그리고 4기까지의 qRT-PCR 발현 수준



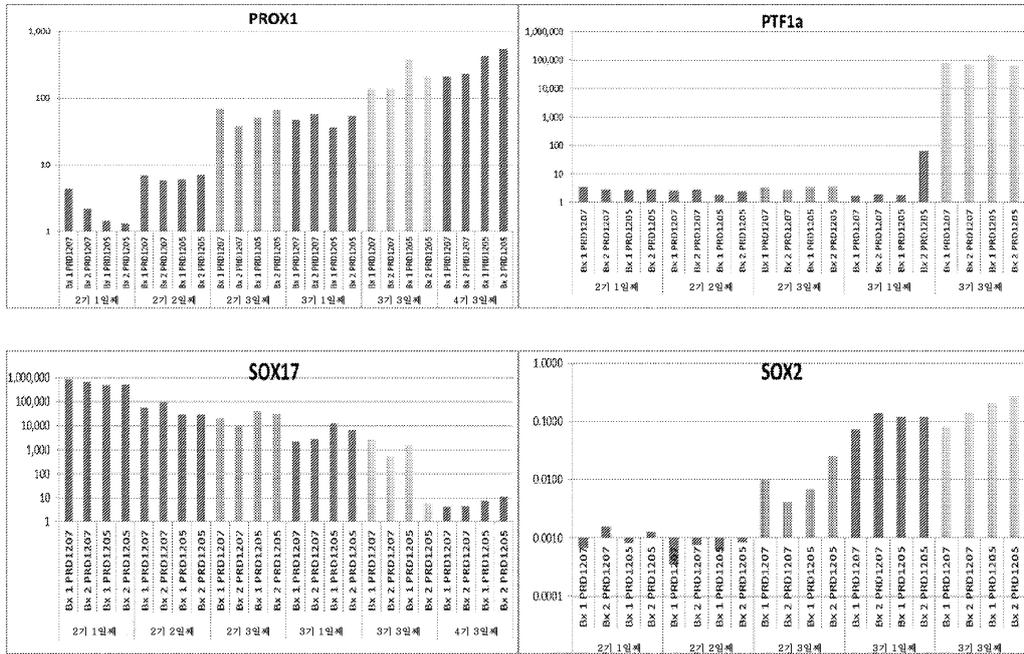
도면36c

분화의 2기로부터 3기 그리고 4기까지의 qRT-PCR 발현 수준



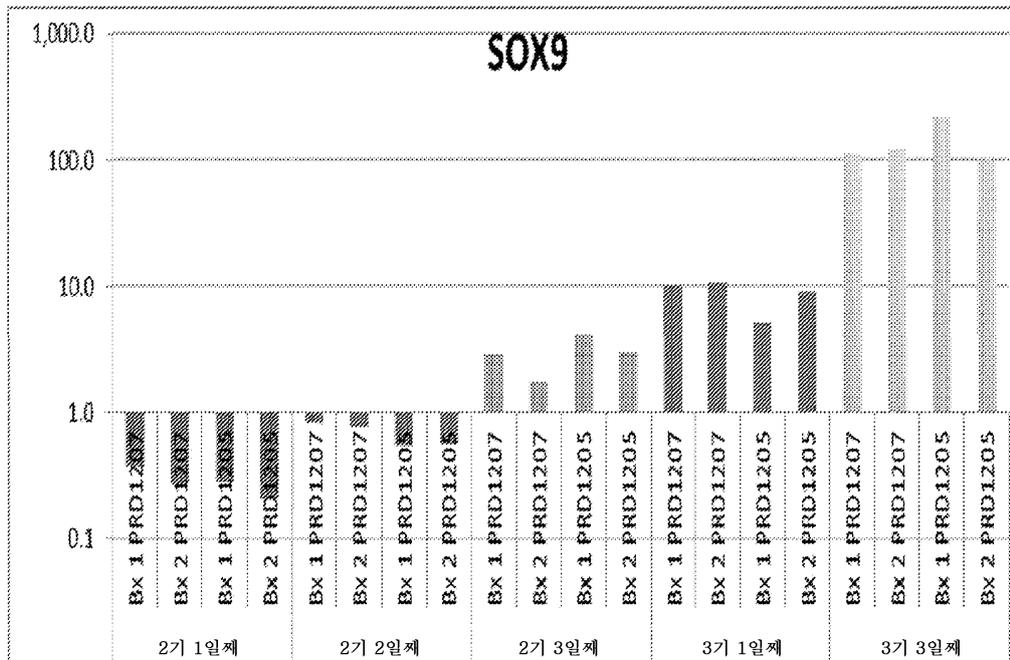
도면36d

분화의 2기로부터 3기 그리고 4기까지의 qRT-PCR 발현 수준



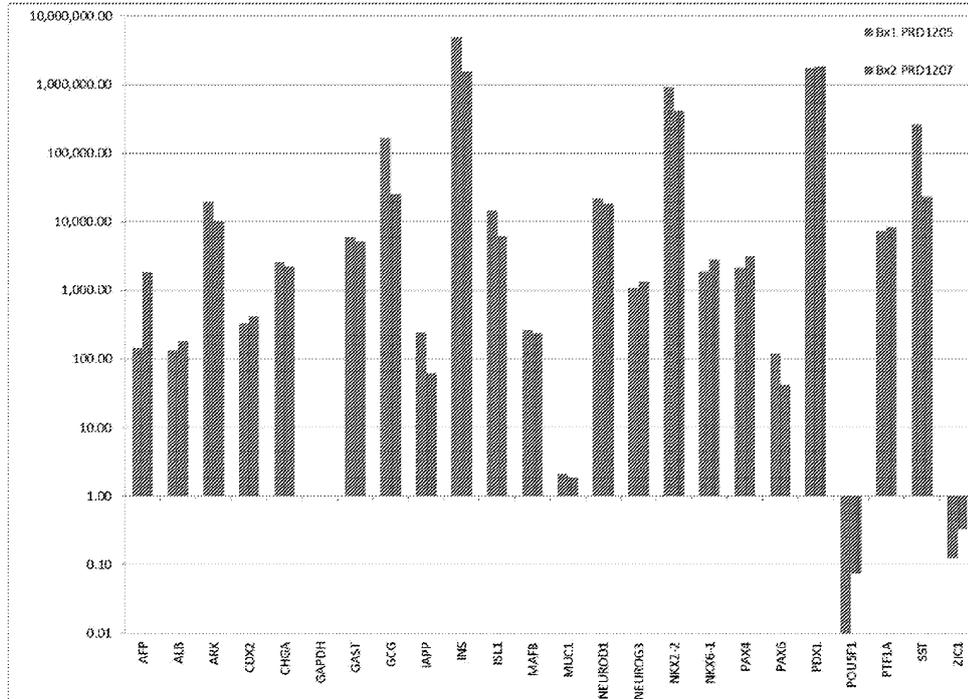
도면36e

분화의 2기로부터 3기 그리고 4기까지의 qRT-PCR 발현 수준



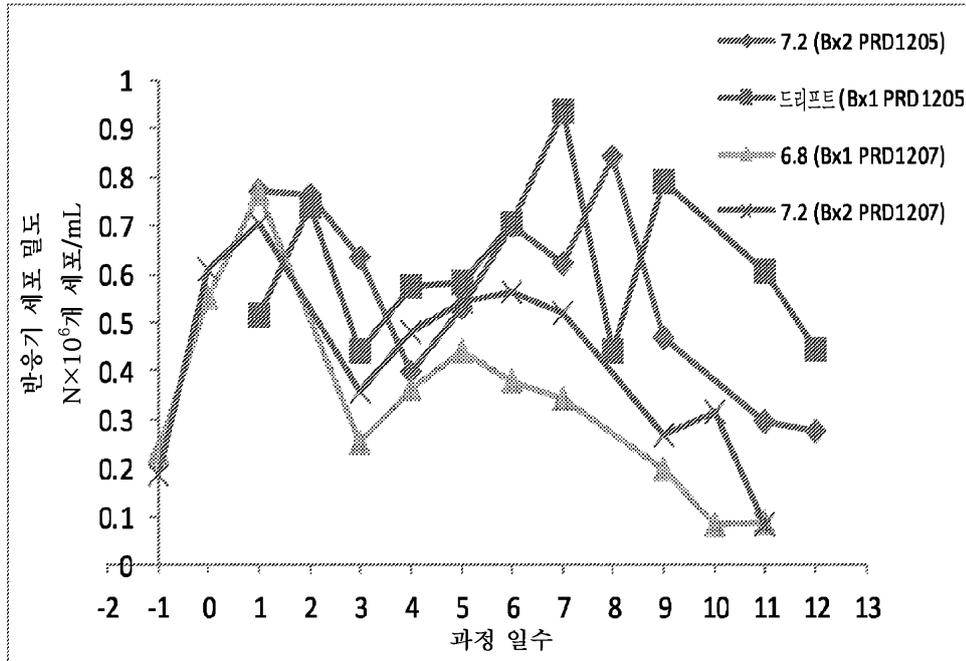
도면37

분화의 4기 3일째에서의 qRT-PCR 발현 수준



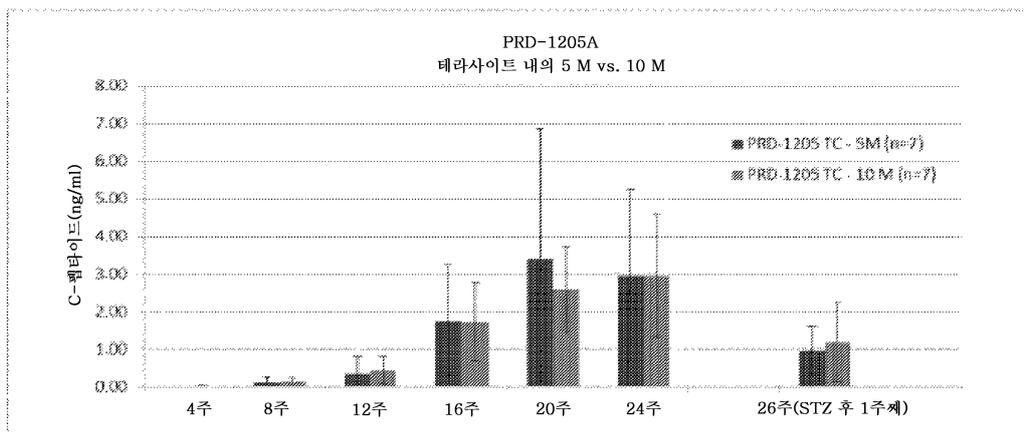
도면38

생물반응기 내의 세포 밀도



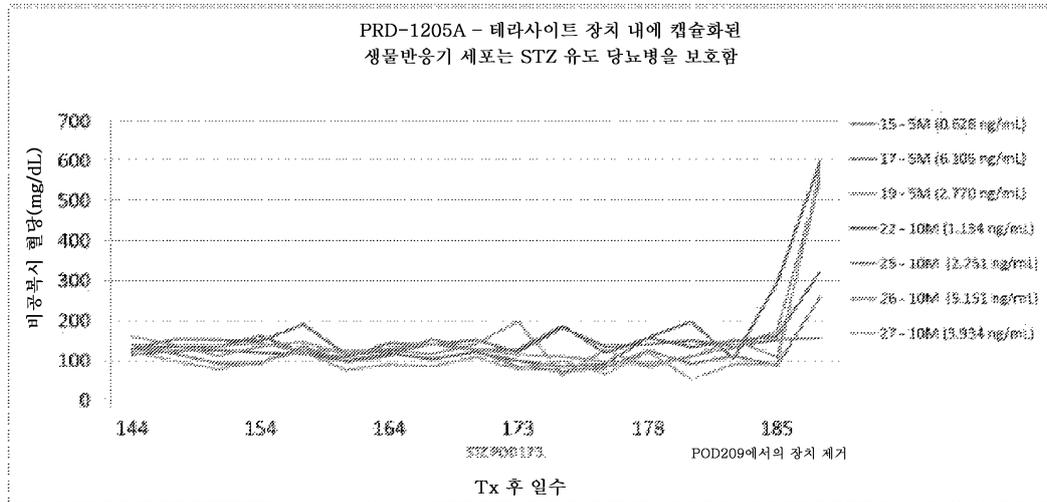
도면39a

생체내에서의 4기 3일째 생물반응기 생성물의 기능



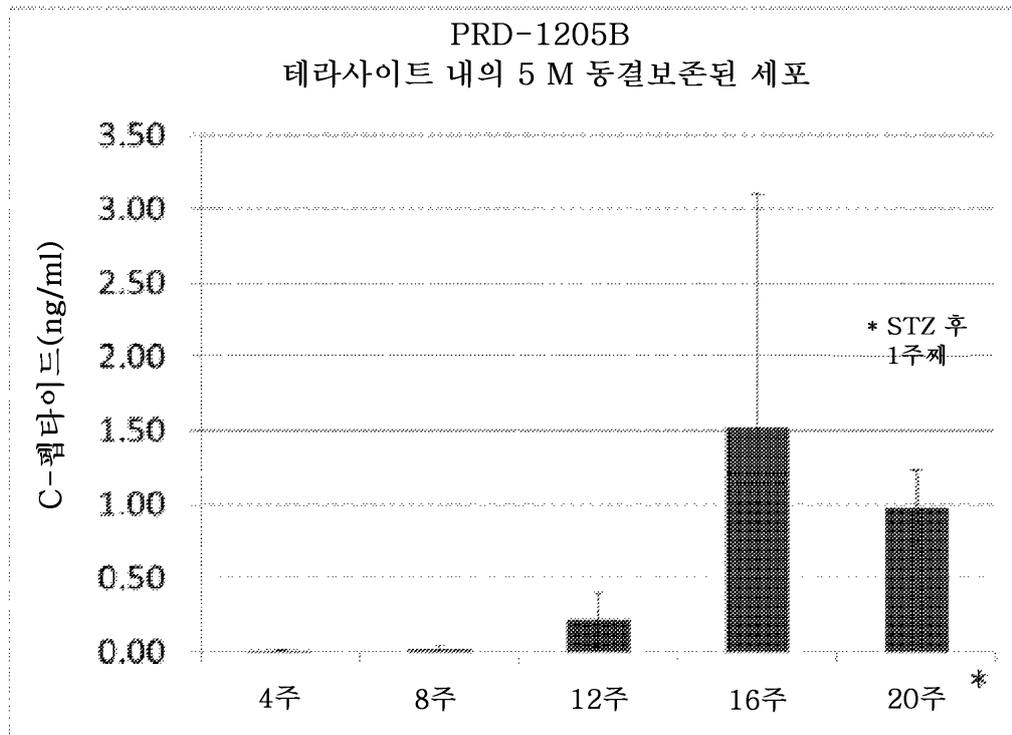
도면39b

생체내에서의 4기 3일째 생물반응기 생성물의 기능



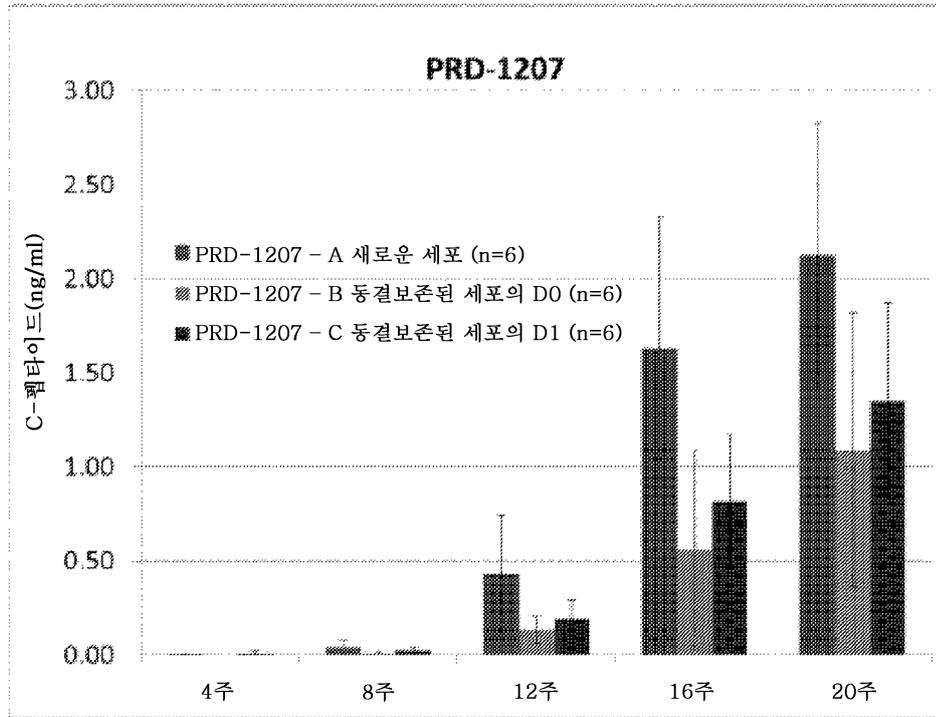
도면39c

생체내에서의 4기 3일째 생물반응기 생성물의 기능

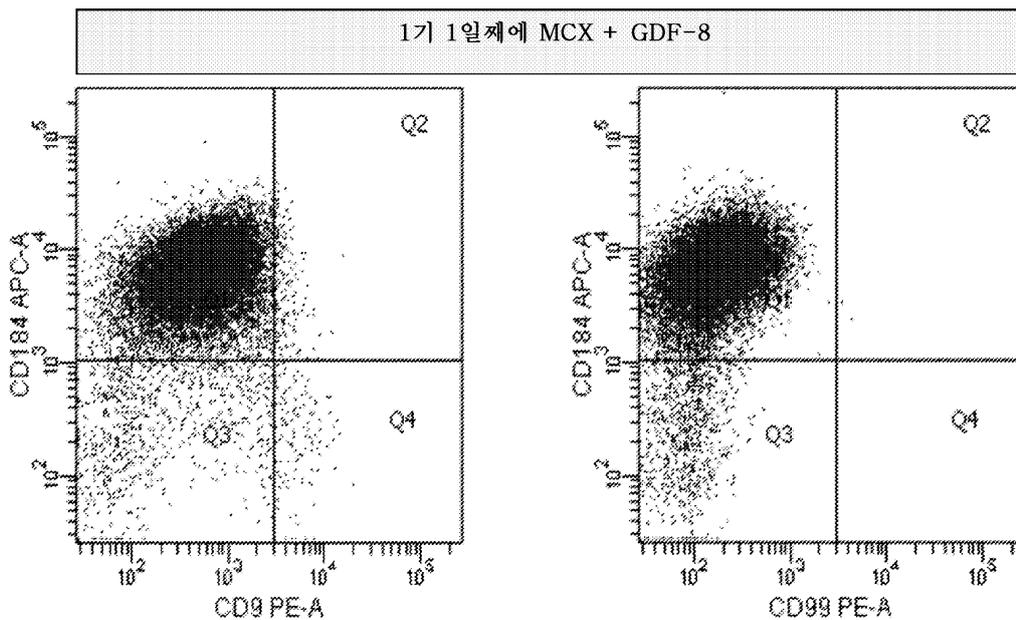


도면39d

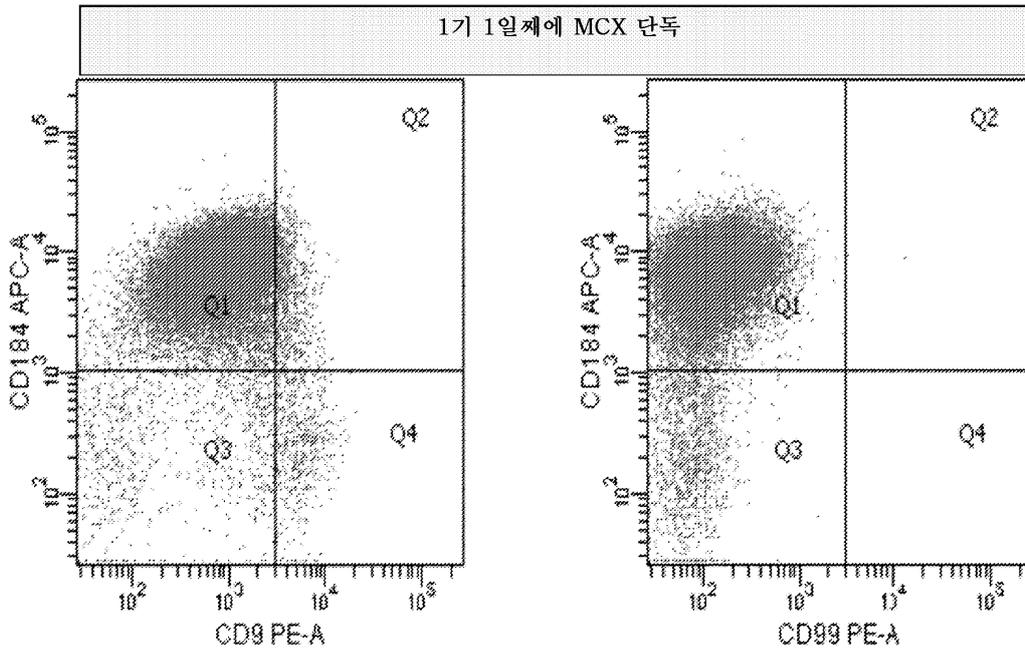
생체내에서의 4기 3일째 생물반응기 생성물의 기능



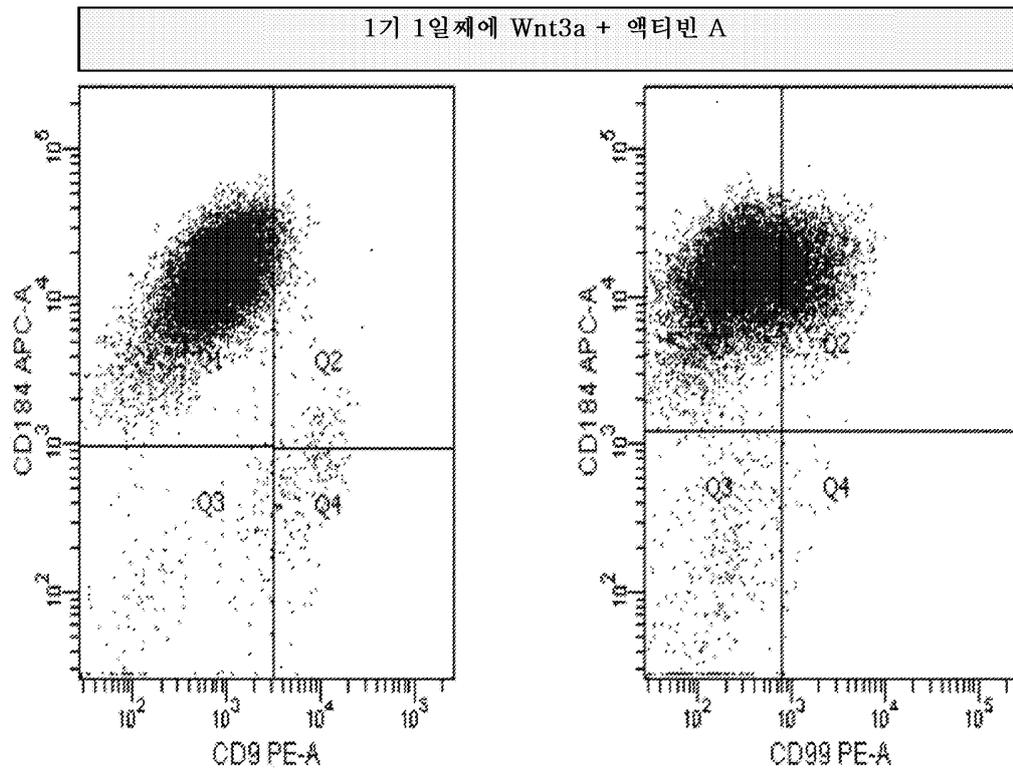
도면40a



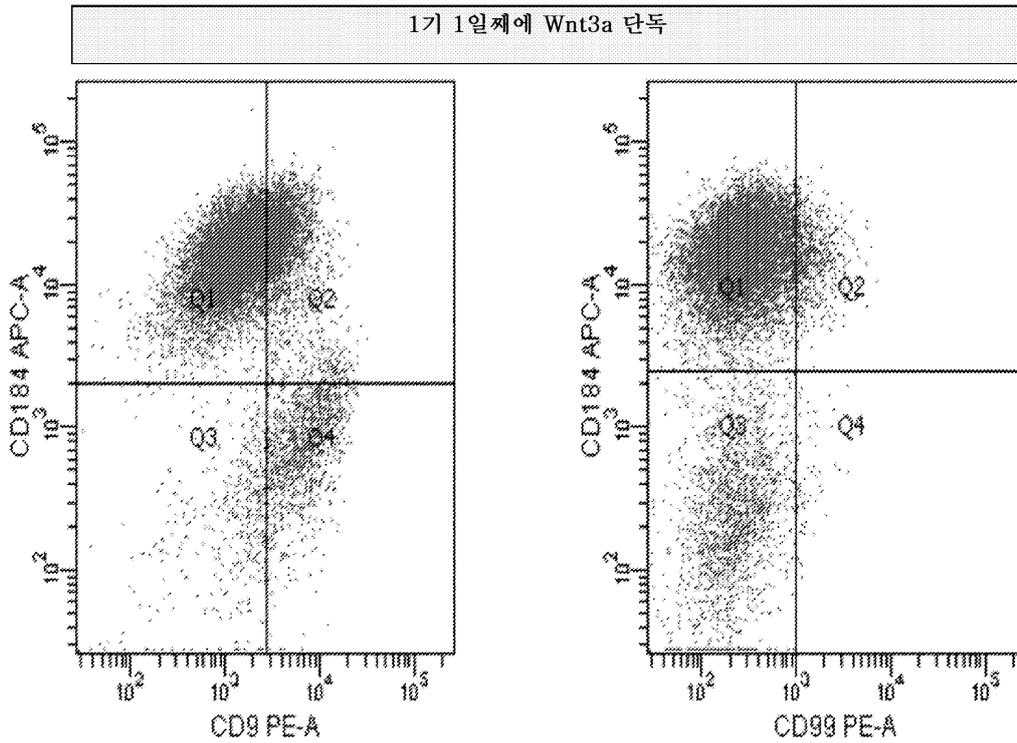
도면40b



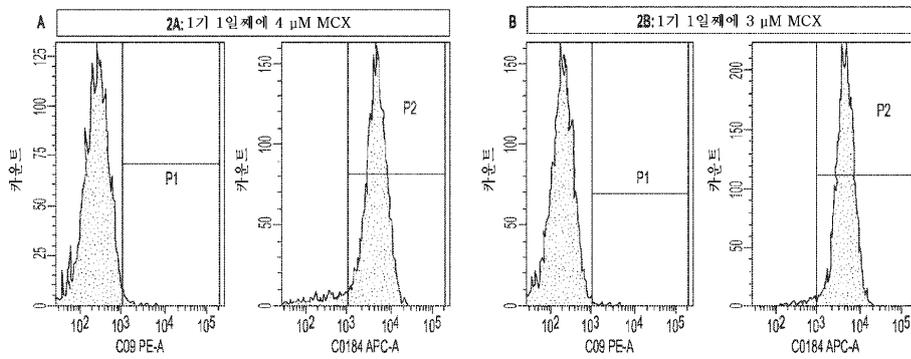
도면40c



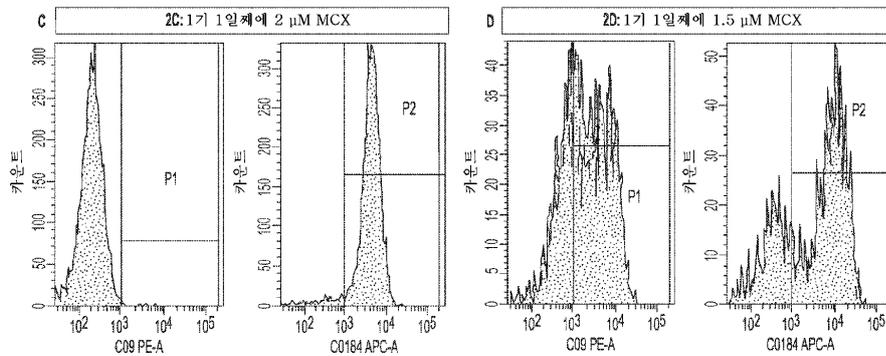
도면40d



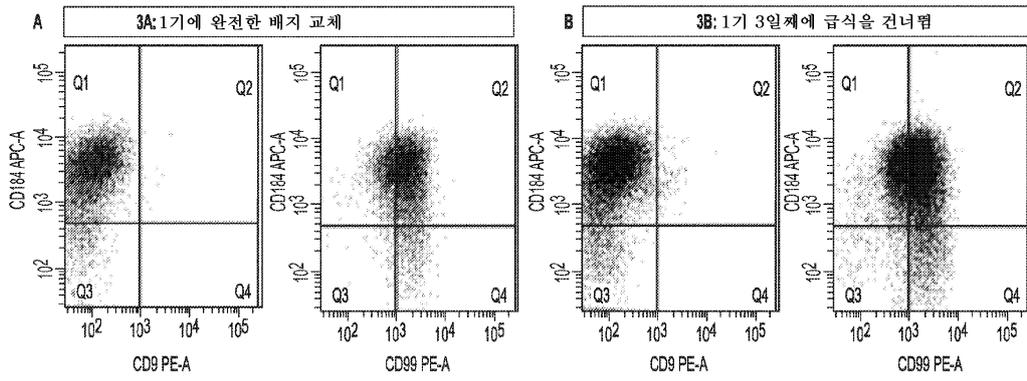
도면41



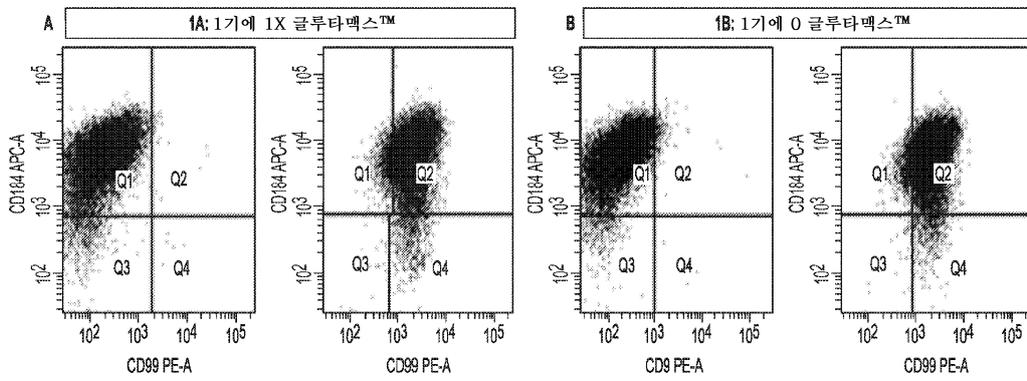
(계속)



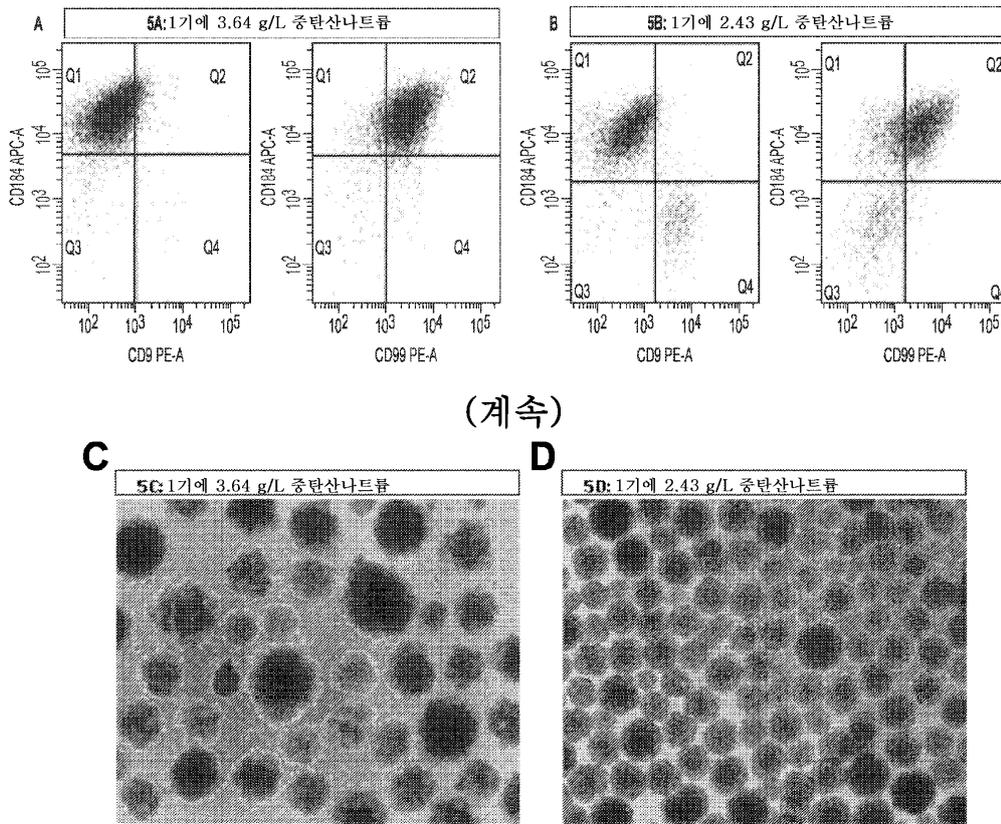
도면42



도면43

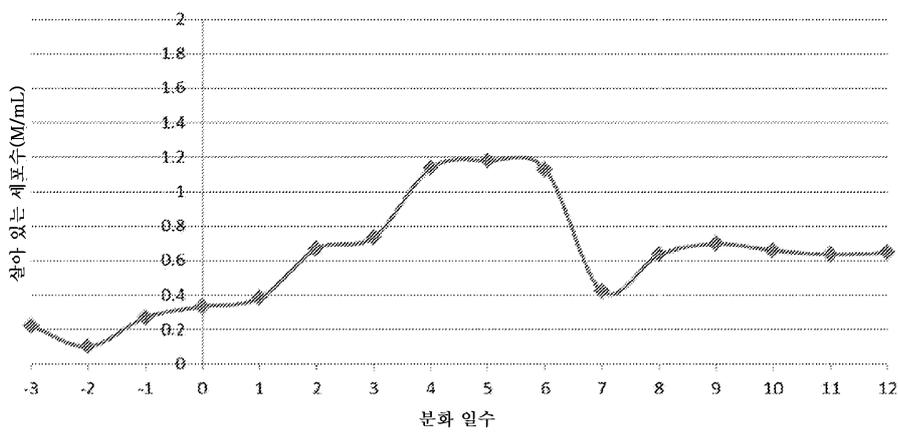


도면44



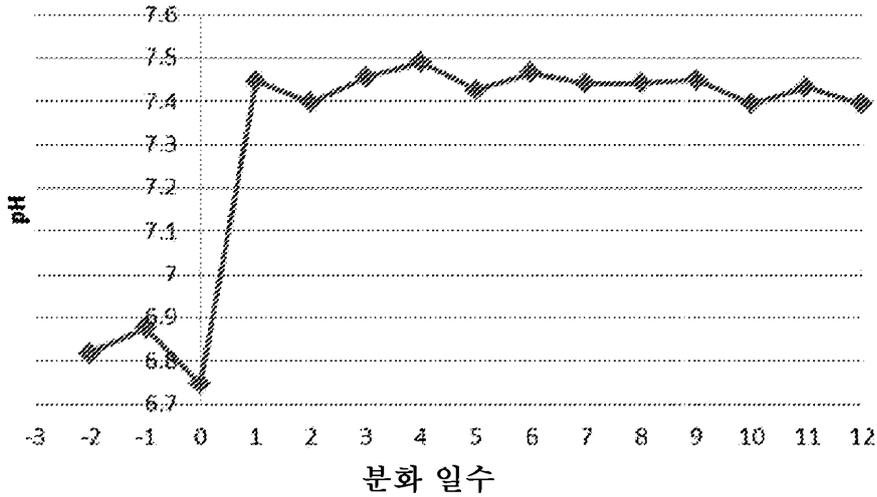
도면45

세포 밀도를 위한 일일 카운트



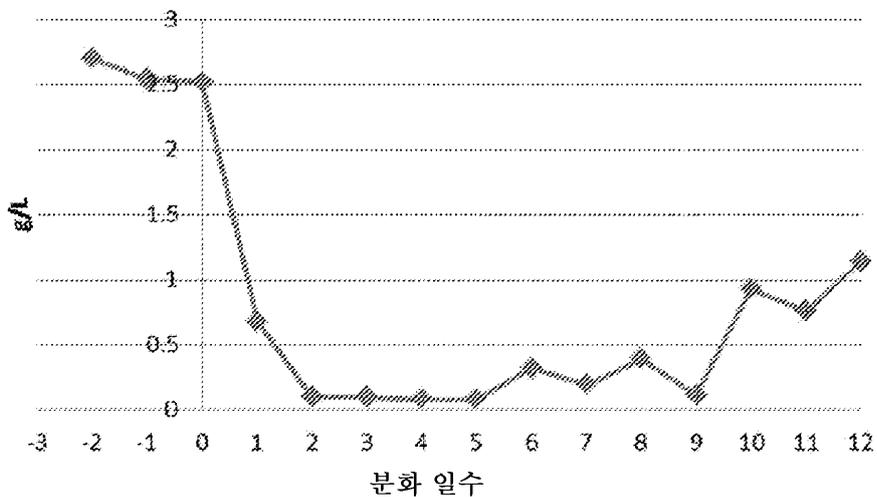
도면46

pH를 위한 일일 배지 샘플링



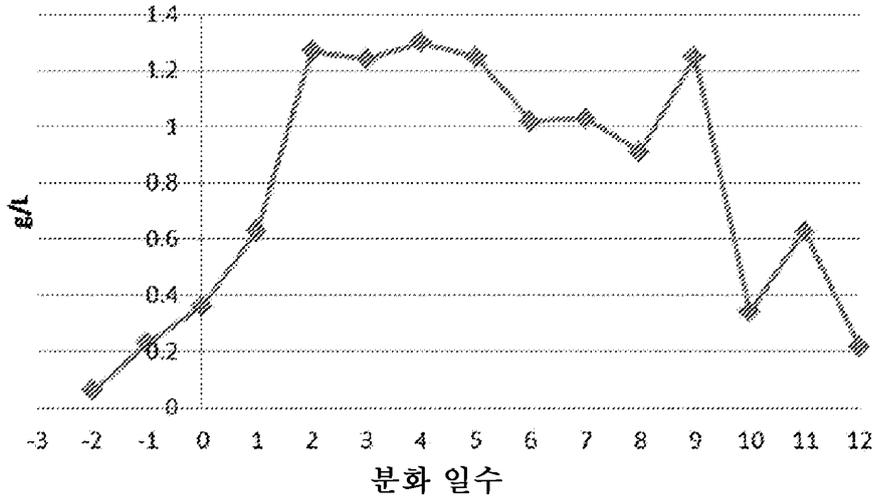
도면47

글루코스(g/L)를 위한 일일 배지 샘플링



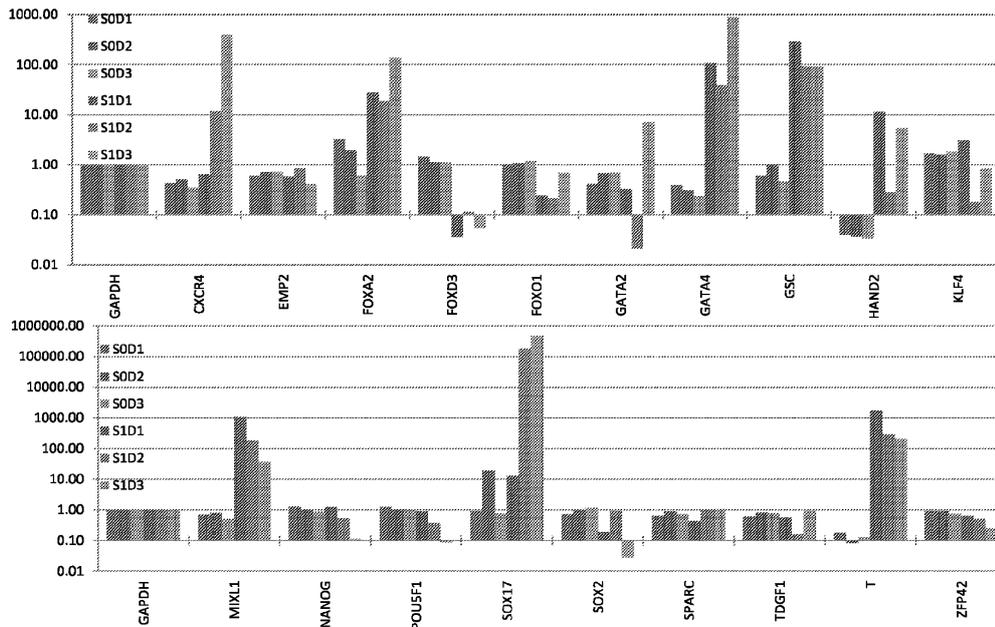
도면48

락테이트(g/L)를 위한 일일 배지 샘플링



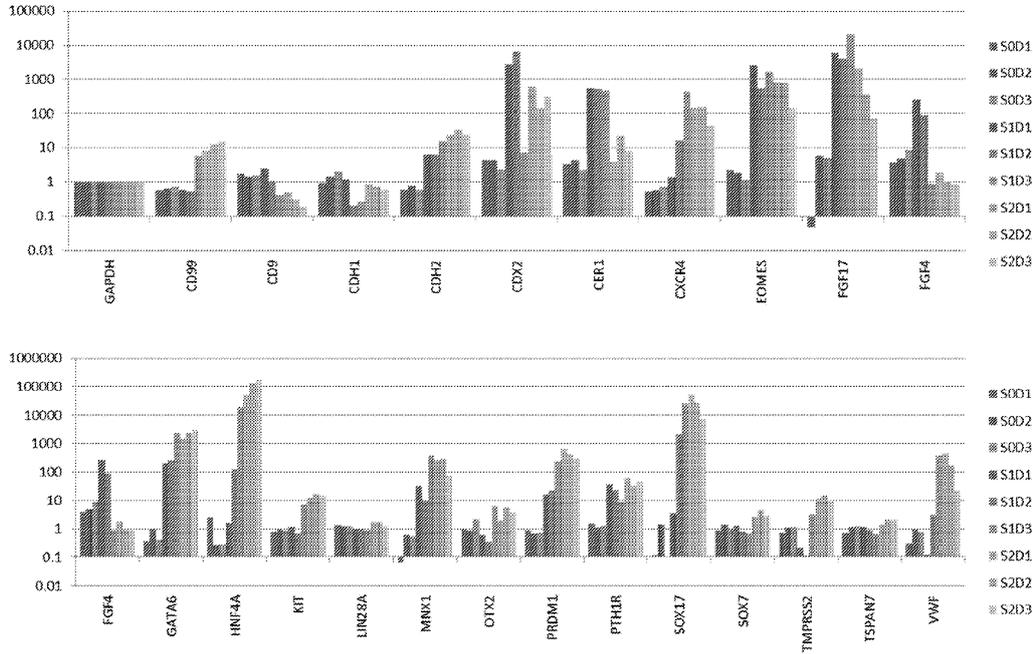
도면49

qRT-PCR, 만능성 어레이에 의한 일일 0 및 1기 발현



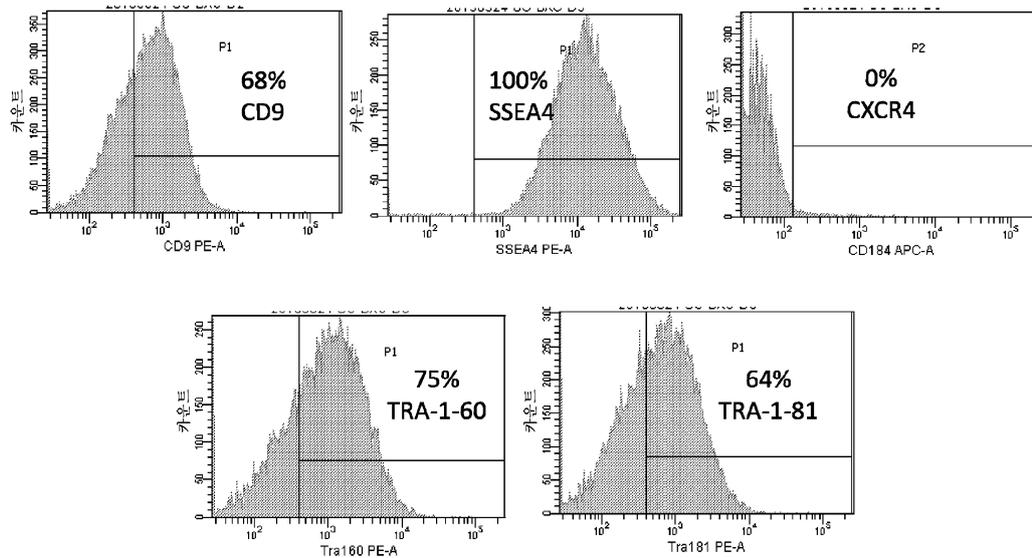
도면50

qRT-PCR, DE 어레이에 의한
일일 0, 1 및 2기 발현



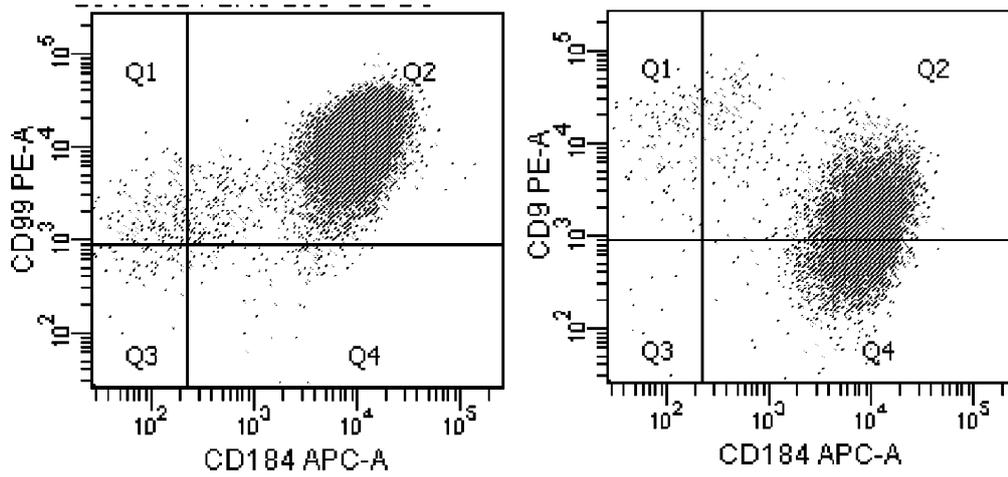
도면51

FACS에 의한 만능 세포 발현



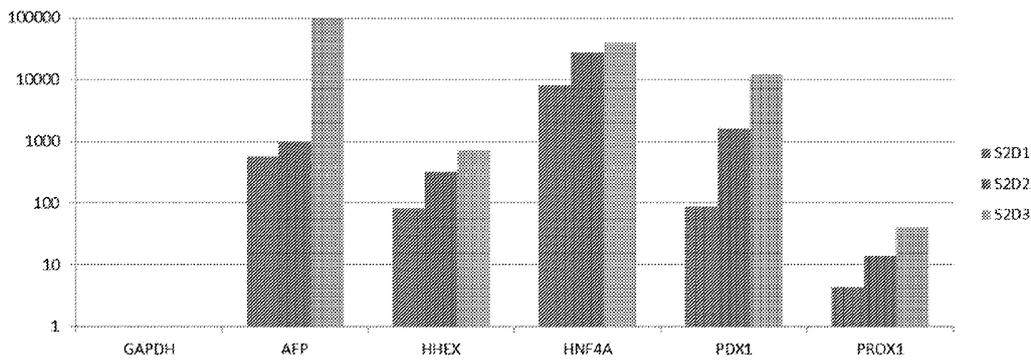
도면52

FACS에 의한 완성 내배엽 세포 발현



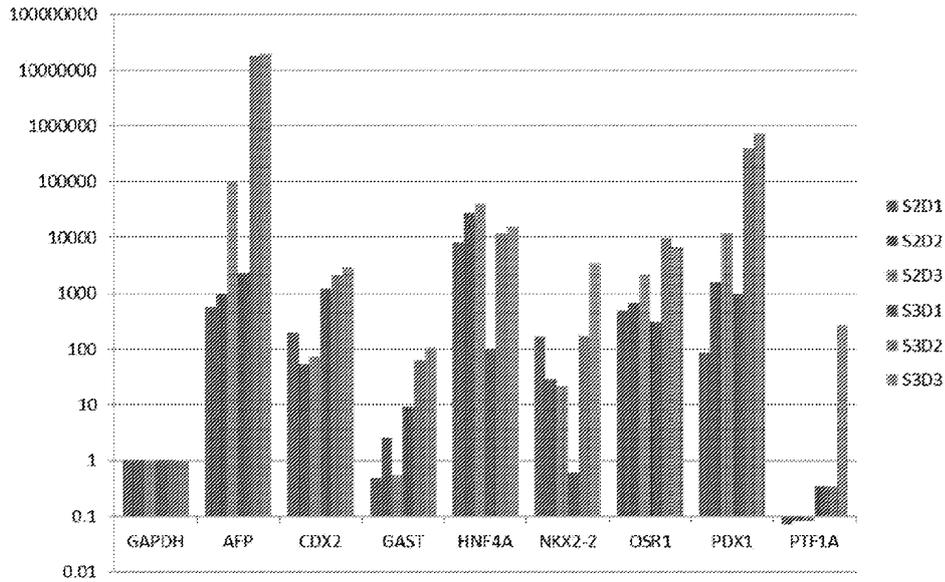
도면53

qRT-PCR에 의한 일일 2기 발현



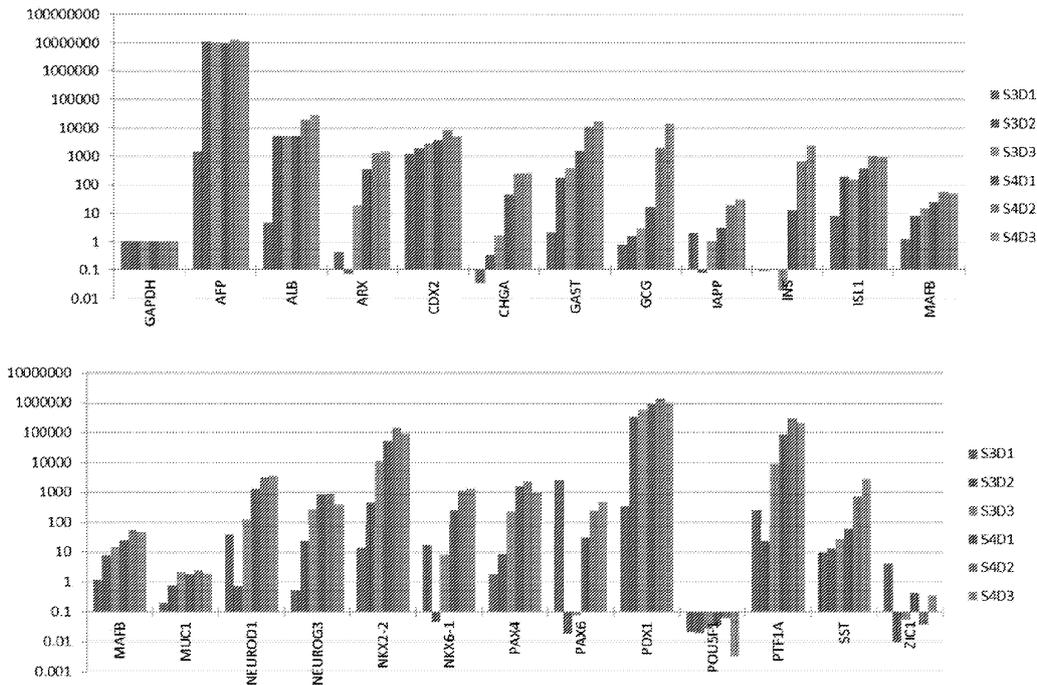
도면54

qRT-PCR에 의한 일일 2 및 3기 발현



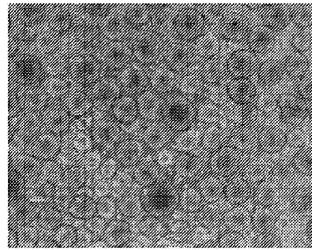
도면55

qRT-PCR에 의한 일일 3 및 4기 발현

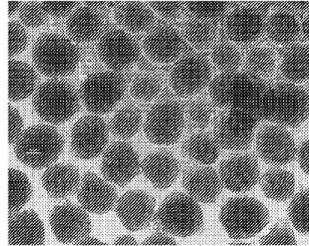


도면56

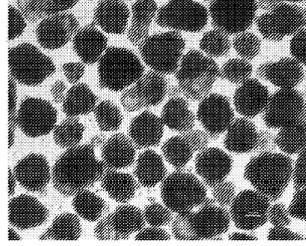
클러스터의 단계 말기의 현미경 사진(4x)



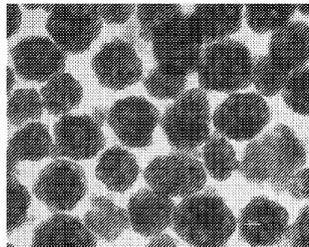
0기



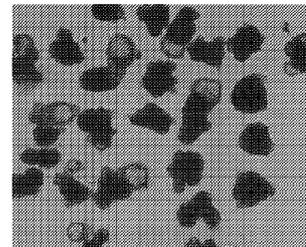
1기



3기

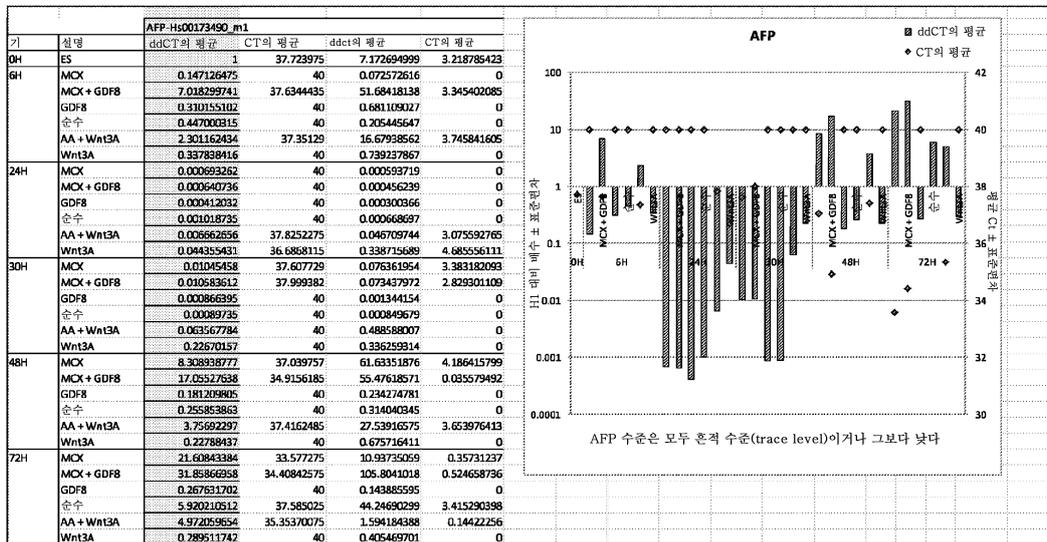


2기

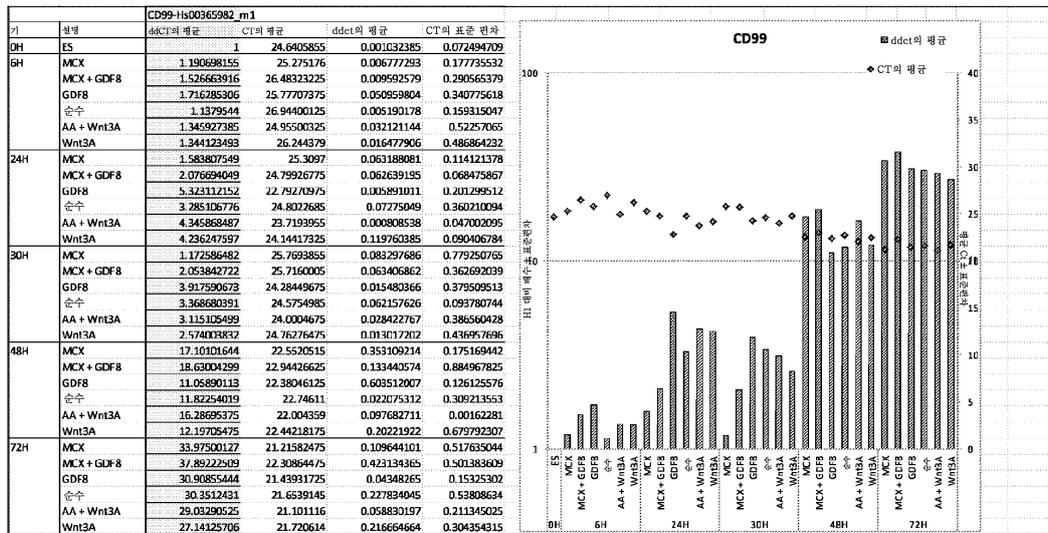


4기

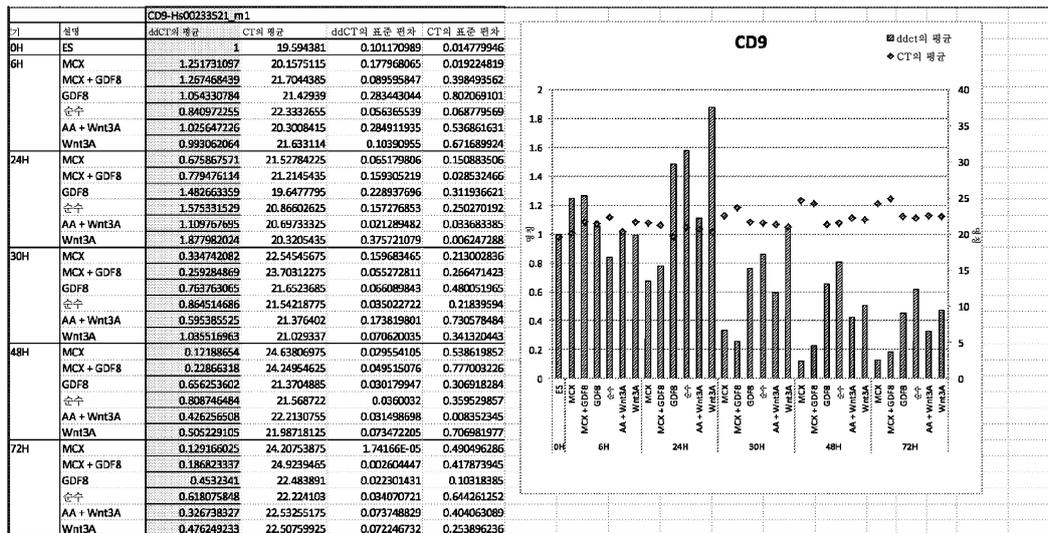
도면57



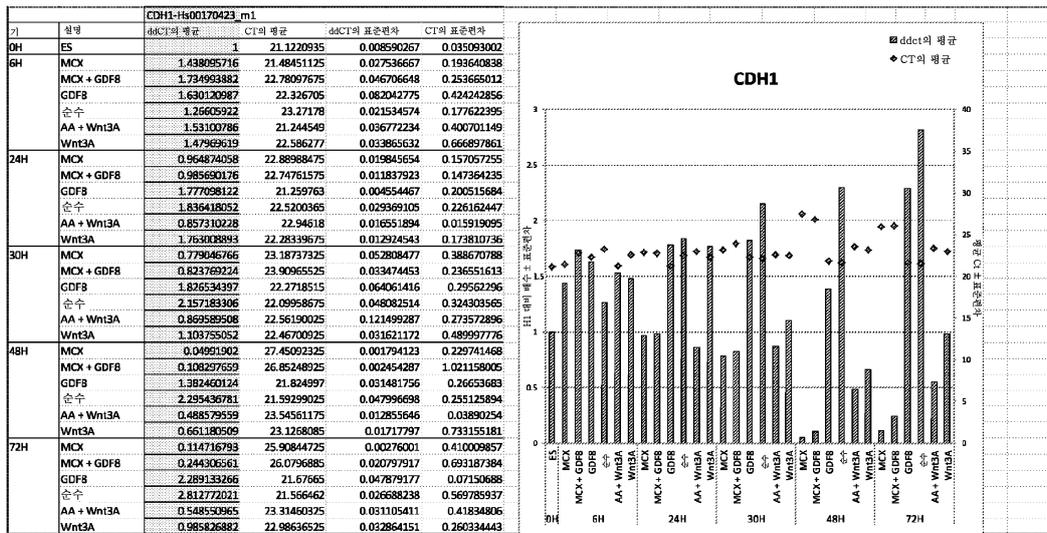
도면58



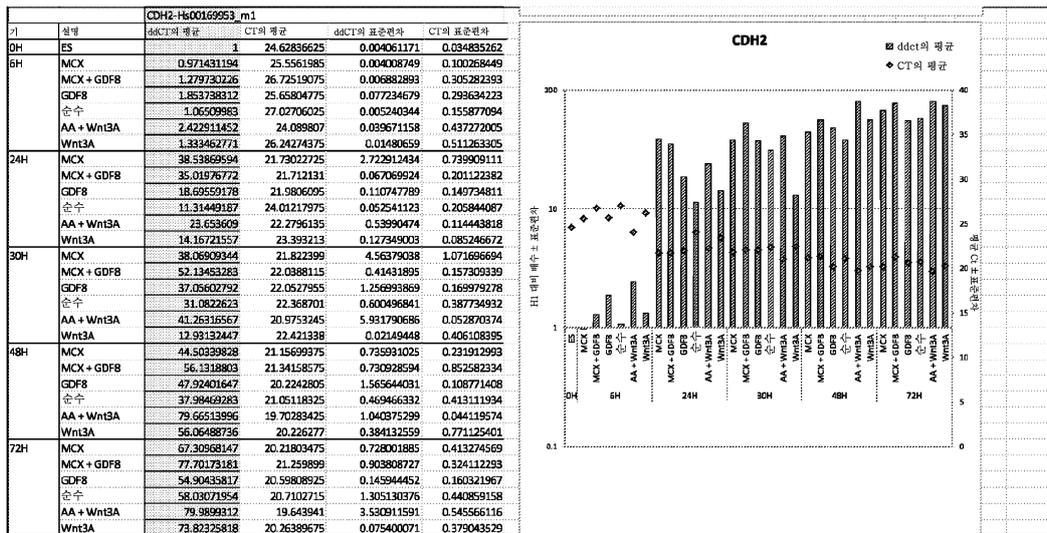
도면59



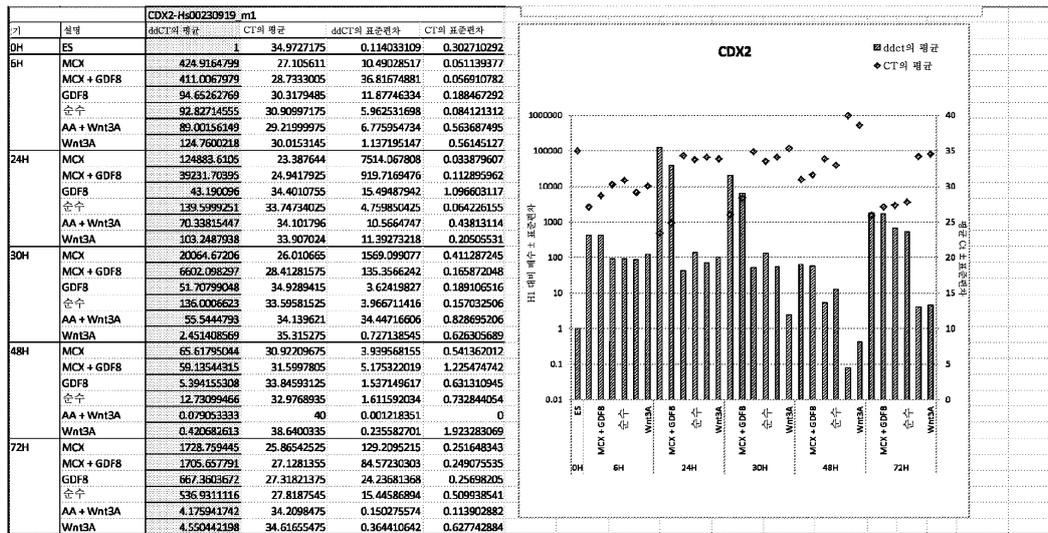
도면60



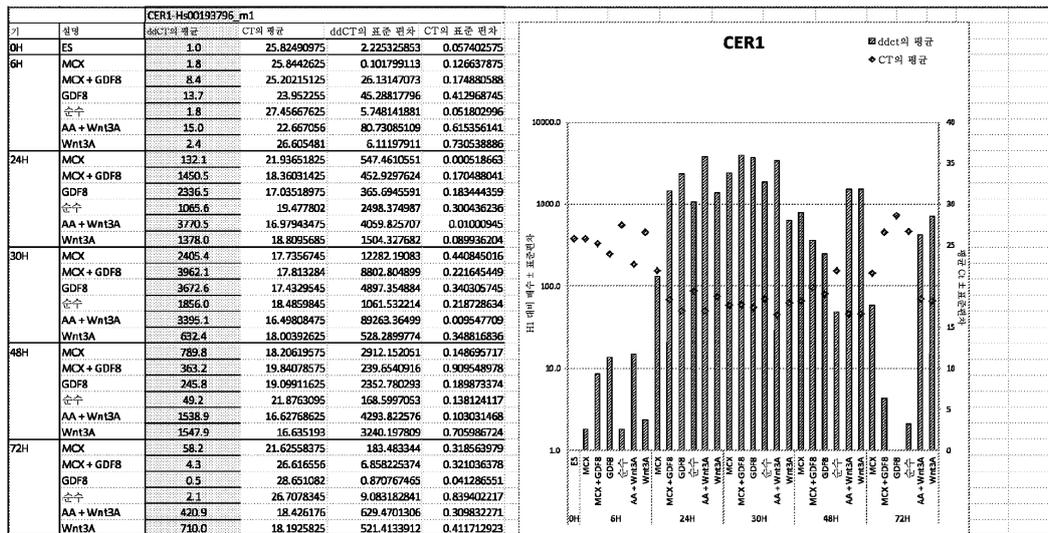
도면61



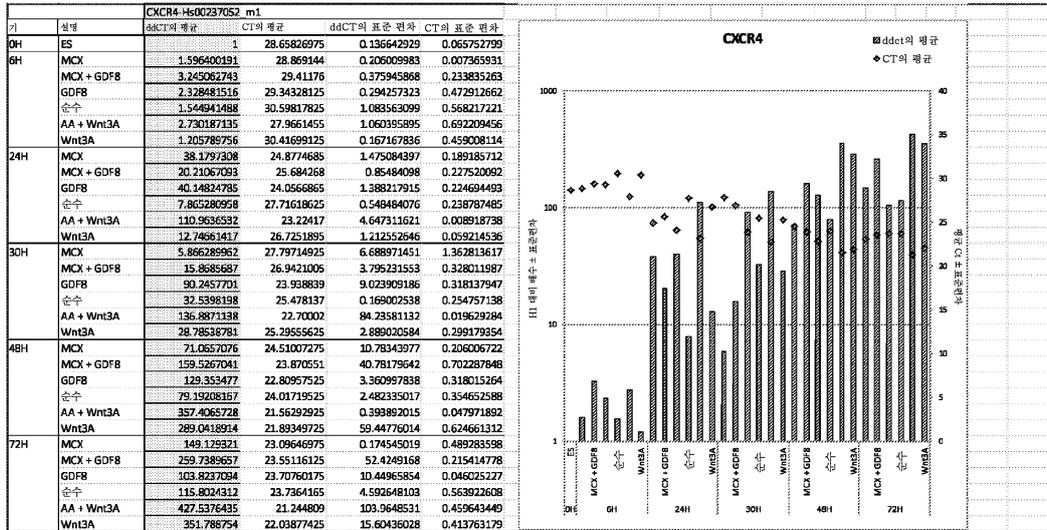
도면62



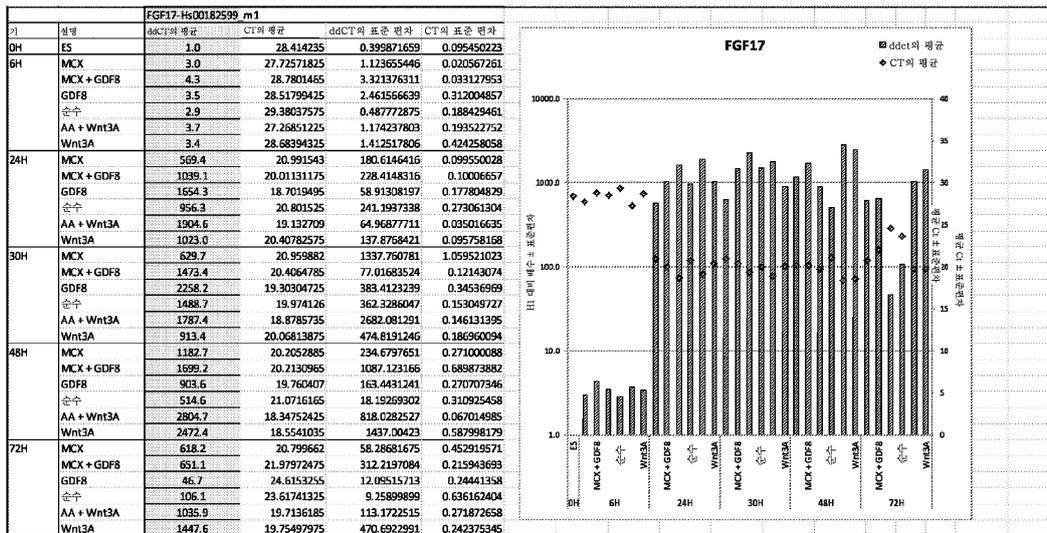
도면63



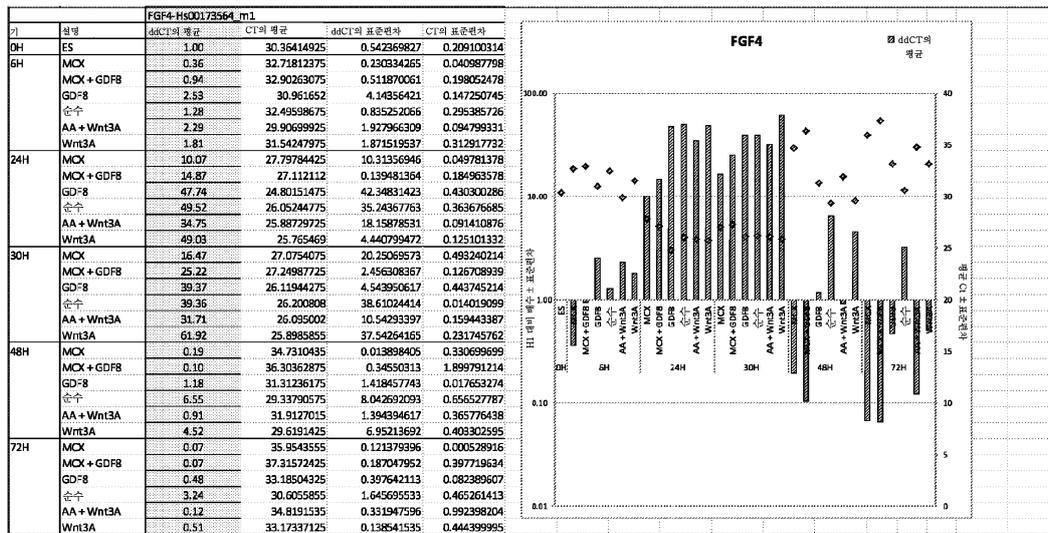
도면64



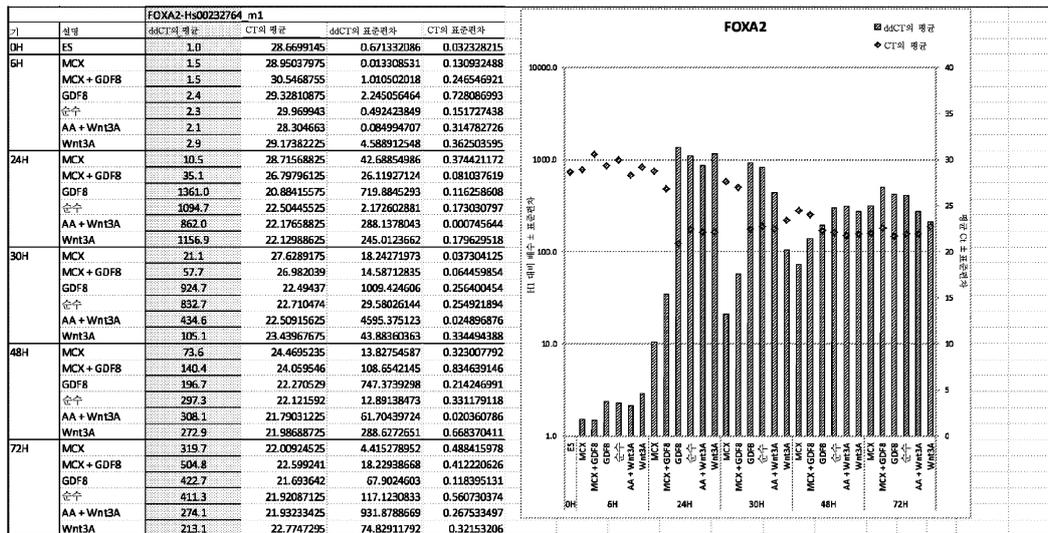
도면65



도면66



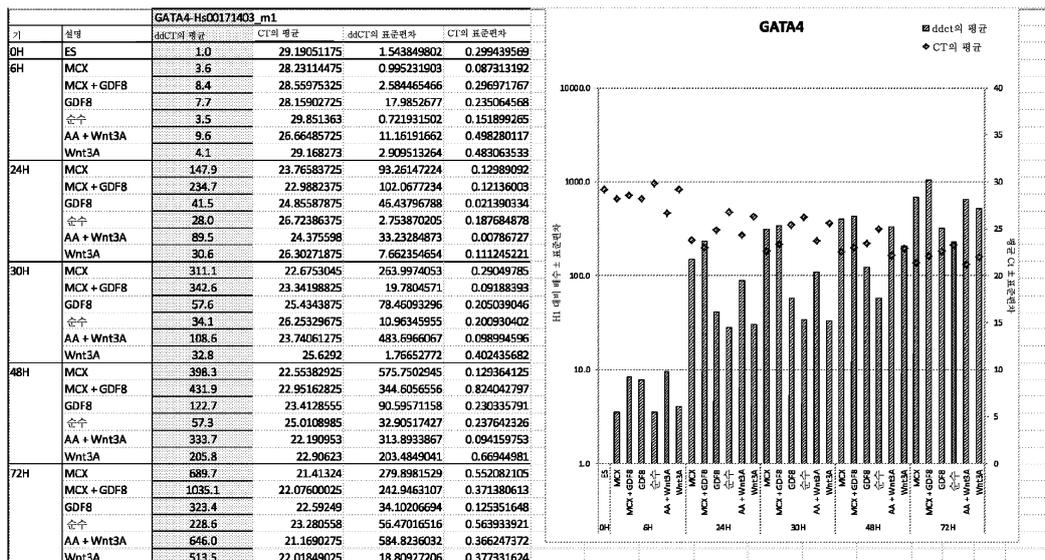
도면67



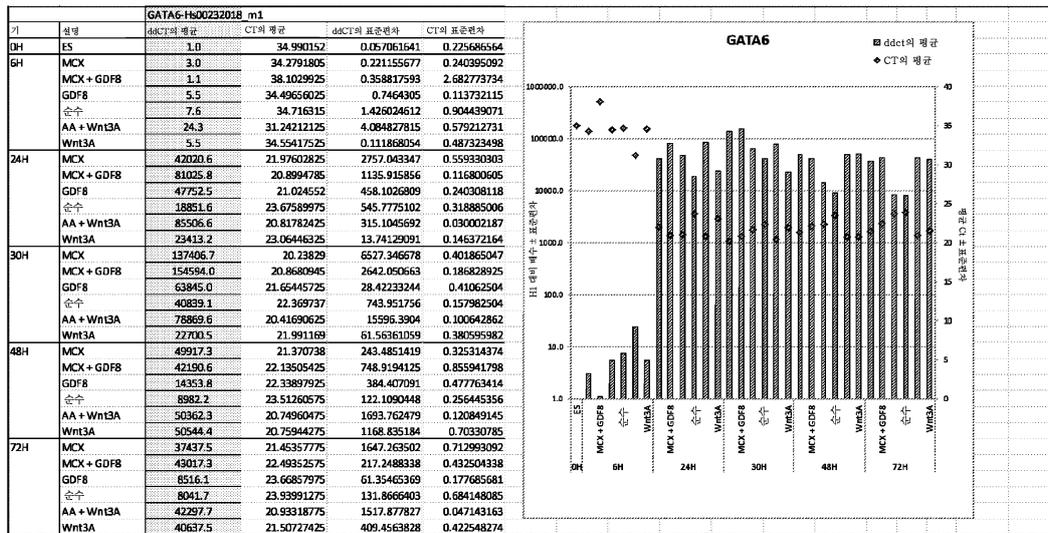
도면68

GAPDH-Hs99999905 m1					
기	설명	ddCT의 평균	CT의 평균	ddCT의 표준편차	CT의 표준편차
0H	ES		1 16.28166375	0	0.063779971
6H	MCX		1 17.167675	0	0.129679848
	MCX + GDF8		1 18.7342185	0	0.343617126
	GDF8		1 18.18648575	0	0.592686651
	순수		1 18.7712785	0	0.120809901
	AA + Wnt3A		1 17.017628	0	0.320456551
	Wnt3A		1 18.310278	0	0.590436991
24H	MCX		1 17.57825175	0	0.225765407
	MCX + GDF8		1 17.4673155	0	0.1874731
	GDF8		1 16.830046	0	0.191957571
	순수		1 18.137209	0	0.172746894
	AA + Wnt3A		1 17.464121	0	0.048572579
	Wnt3A		1 17.842105	0	0.149329638
30H	MCX		1 17.55899375	0	0.161380506
	MCX + GDF8		1 18.367542	0	0.100658065
	GDF8		1 17.879352	0	0.412868336
	순수		1 17.94854725	0	0.249840271
	AA + Wnt3A		1 17.27180625	0	0.452296256
	Wnt3A		1 17.7675545	0	0.394262235
48H	MCX		1 18.28386925	0	0.349895174
	MCX + GDF8		1 18.804283	0	0.945447728
	GDF8		1 17.450945	0	0.342614449
	순수		1 17.9506265	0	0.32497567
	AA + Wnt3A		1 17.670651	0	0.049015228
	Wnt3A		1 17.688332	0	0.819963852
72H	MCX		1 17.94318925	0	0.490391634
	MCX + GDF8		1 19.19202475	0	0.40705415
	GDF8		1 18.0303185	0	0.141377516
	순수		1 18.2179935	0	0.601472099
	AA + Wnt3A		1 17.60177375	0	0.228450291

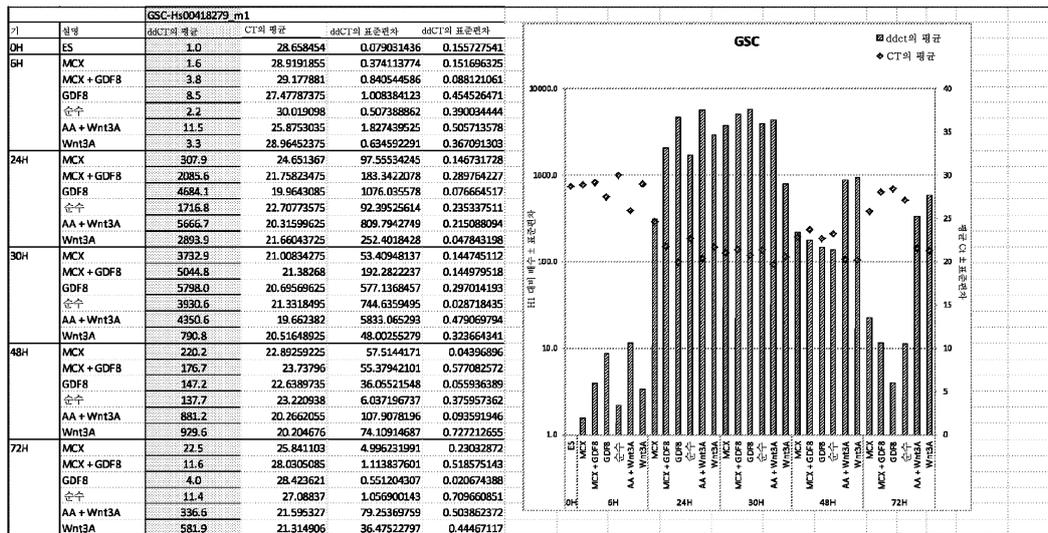
도면69



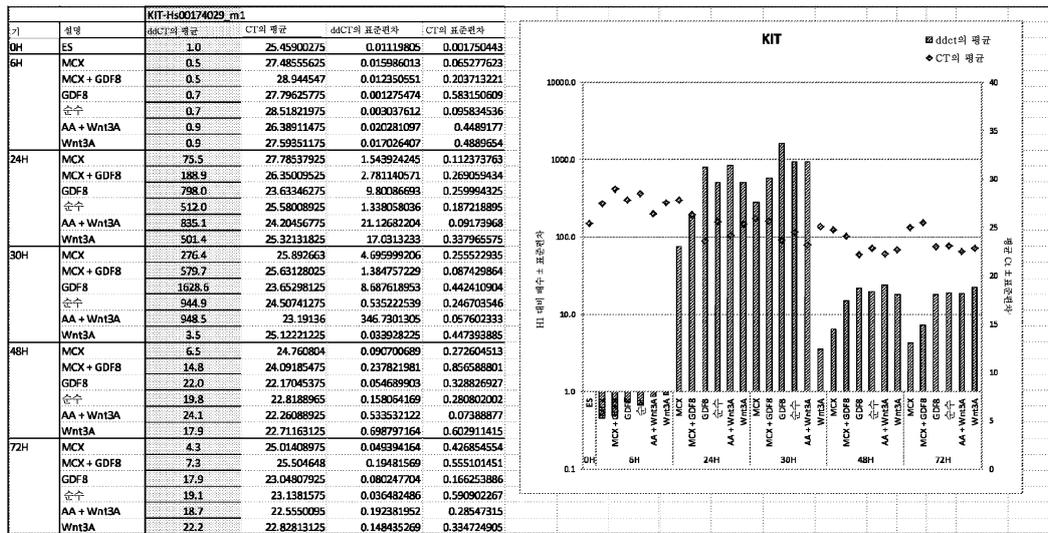
도면70



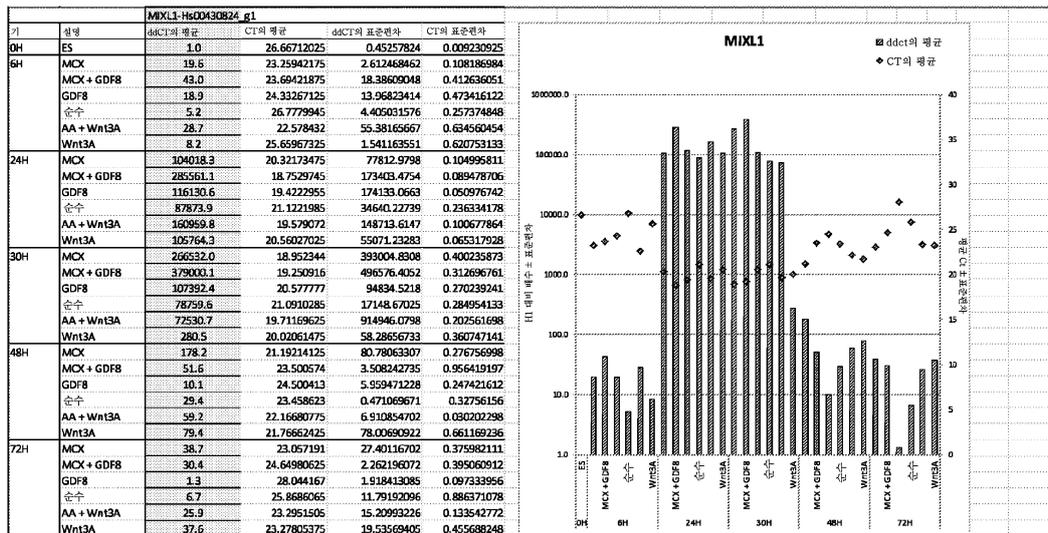
도면71



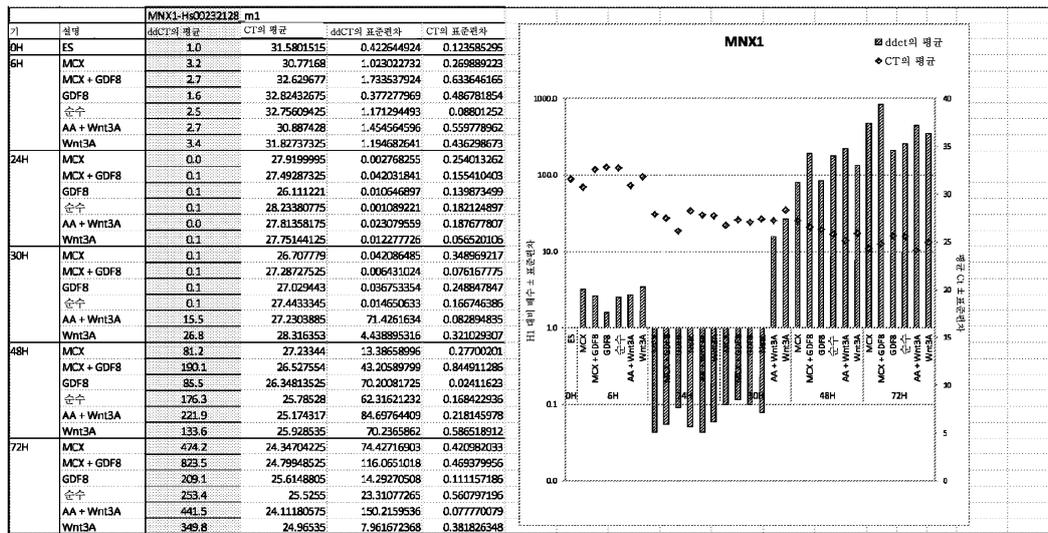
도면72



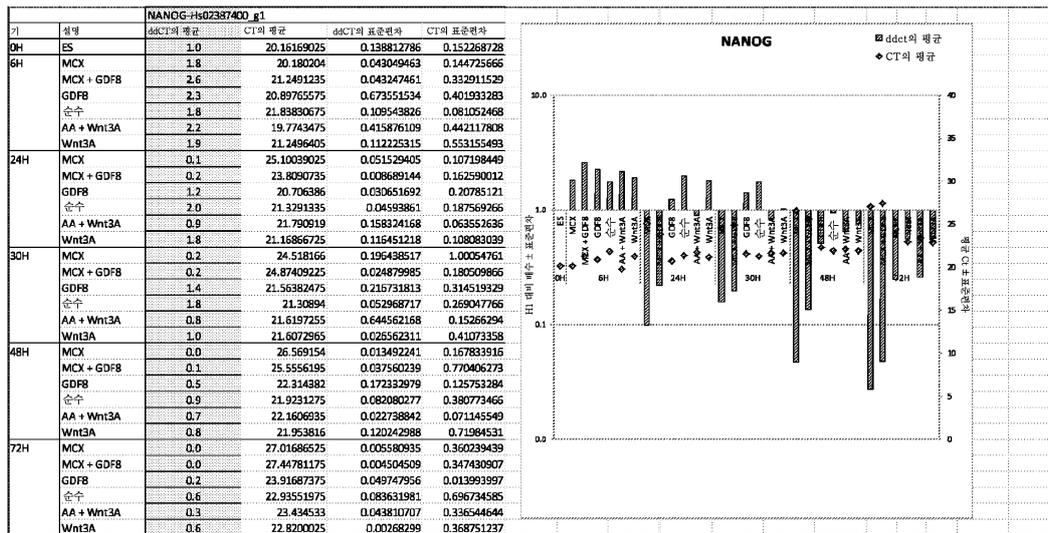
도면73



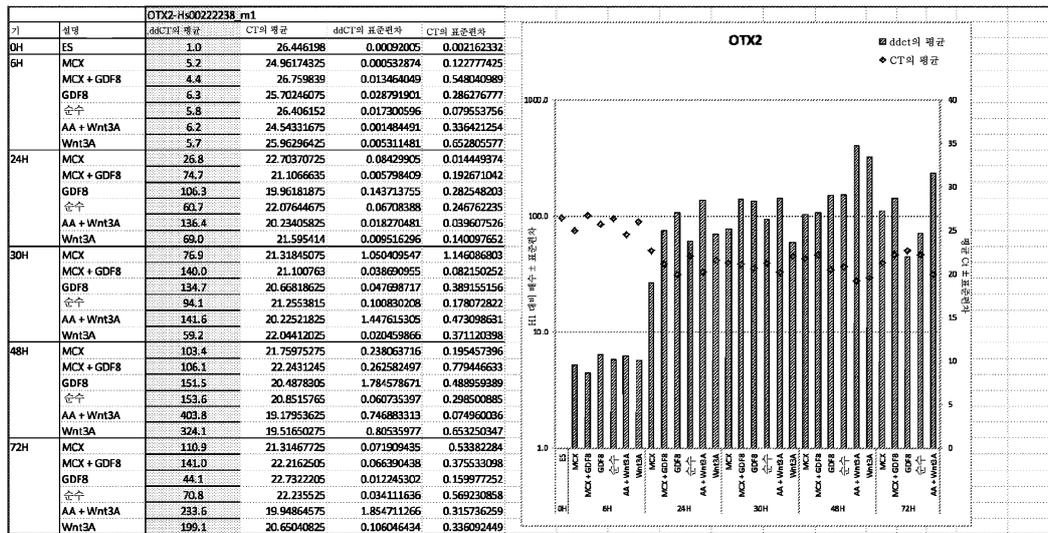
도면74



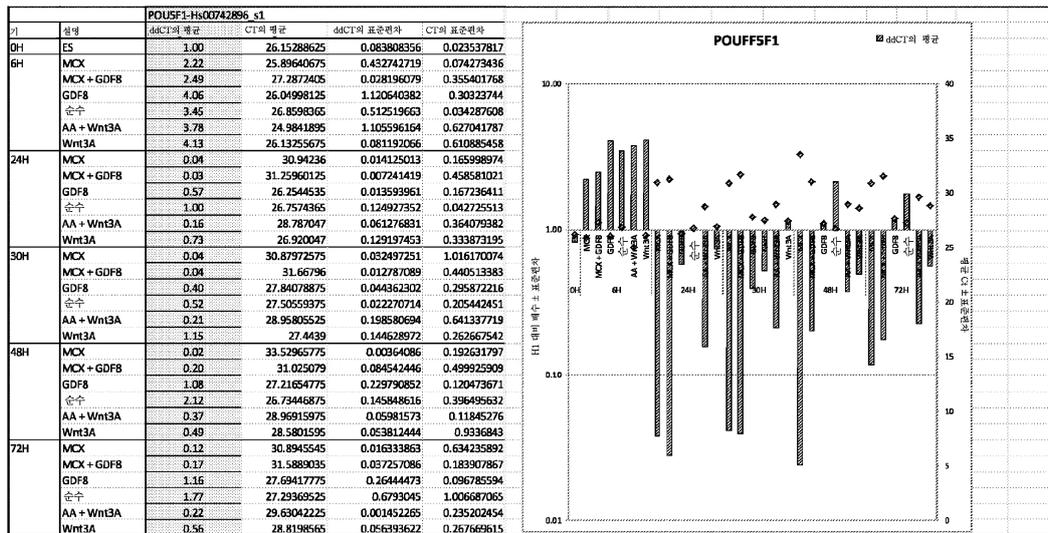
도면75



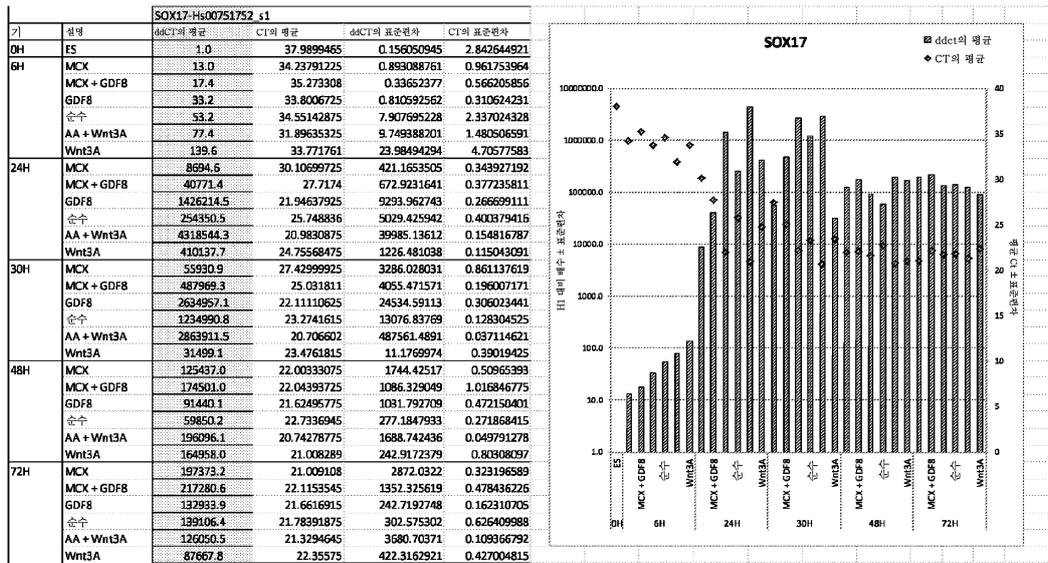
도면76



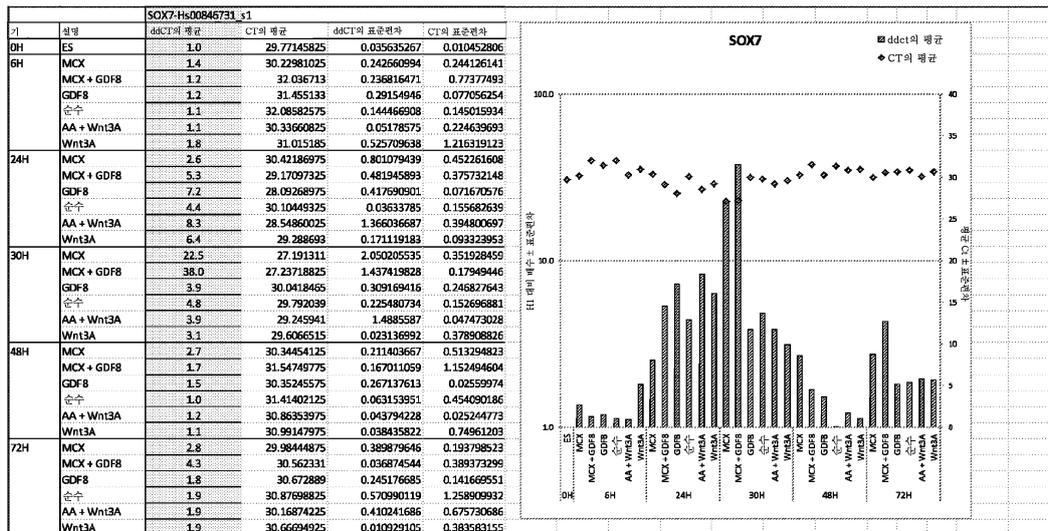
도면77



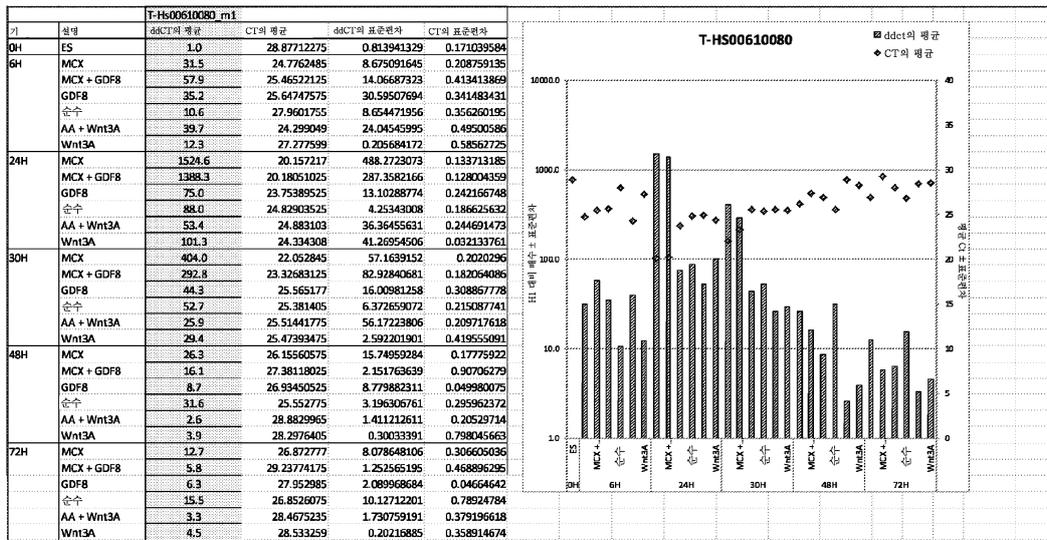
도면78



도면79



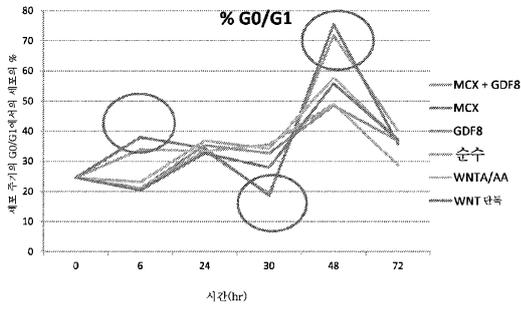
도면80



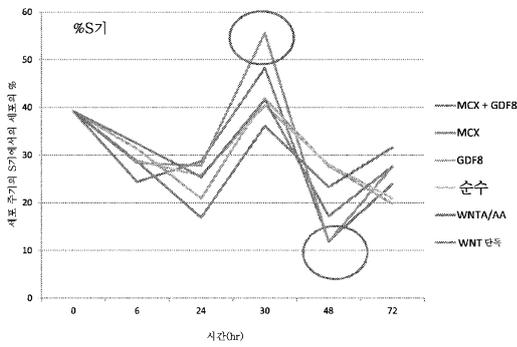
도면81

	시간(hr)					
	0	6	24	30	48	72
G0/G1						
MCX + GDF8	24.6	33.9	33.4	19.2	71.9	40.1
MCX	24.6	38	34.4	18.6	75.5	35.8
GDF8	24.6	20.9	35.3	32.7	48.5	36.8
순수	24.6	21.1	33.4	35.6	49	28.7
WNTA/AA	24.6	23.1	36.8	34.2	57.7	37.1
WNT 단독	24.6	20.4	32.7	27.9	55.8	37.1
S						
MCX + GDF8	39.2	24.4	28.7	48.3	12	23.9
MCX	39.2	28.3	27.8	55.6	11.8	27.6
GDF8	39.2	31.3	20.9	41.9	27.7	19.8
순수	39.2	28.8	25.7	40.4	28	20.9
WNTA/AA	39.2	32.4	25.4	41.6	17.2	27.6
WNT 단독	39.2	28.6	16.9	36.1	23.3	31.6

(계속)



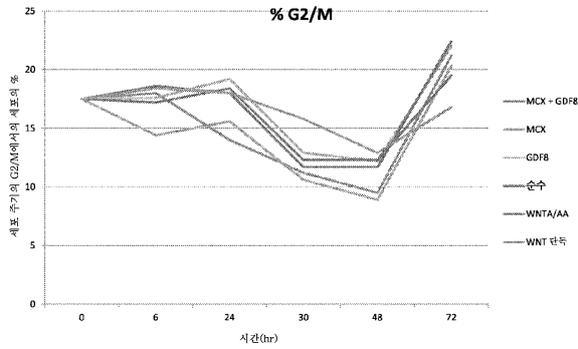
(계속)



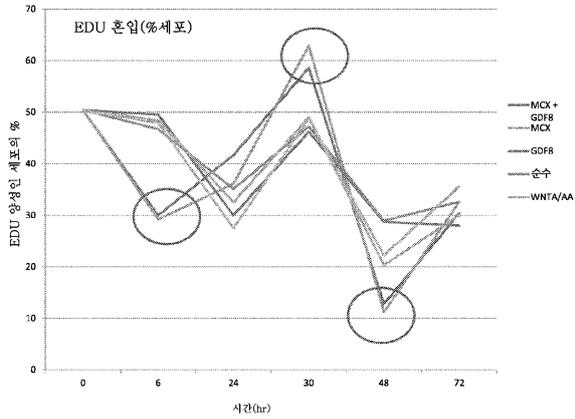
도면82

	시간(hr)					
	0	6	24	30	48	72
M						
MCX + GDF8	17.5	18	14	11.2	9.5	21.2
MCX	17.5	14.4	15.6	10.6	8.9	20.3
GDF8	17.5	17.6	19.2	12.9	12.2	22
순수	17.5	18.6	18	11.7	11.7	22.4
WNTA/AA	17.5	17.2	18.4	12.3	12.3	19.5
WNT 단독	17.5	18.4	18	15.8	12.9	16.8
EDU+	0	6	24	30	48	72
MCX + GDF8	50.4	30	41.7	58.6	12.8	30.4
MCX	50.4	29.2	36.1	62.9	11.2	32.6
GDF8	50.4	49.5	30	46.2	28.7	28
순수	50.4	46.7	35.1	47.2	28.9	32.6
WNTA/AA	50.4	48.4	32.5	49	20.3	30
WNT 단독	50.4	47.9	27.5	48.7	22.2	35.6
DE @ 72hrs	CXCR4	CD99	CD9			
MCX + GDF8	87.4	29.7	0.4			
MCX	96.9	31.7	0.7			
GDF8	95.1	55.8	5.1			
순수	90.1	60.2	9.1			
WNTA/AA	98.1	22.1	3.3			
WNT 단독	87.8	6.2	31.7			

(계속)



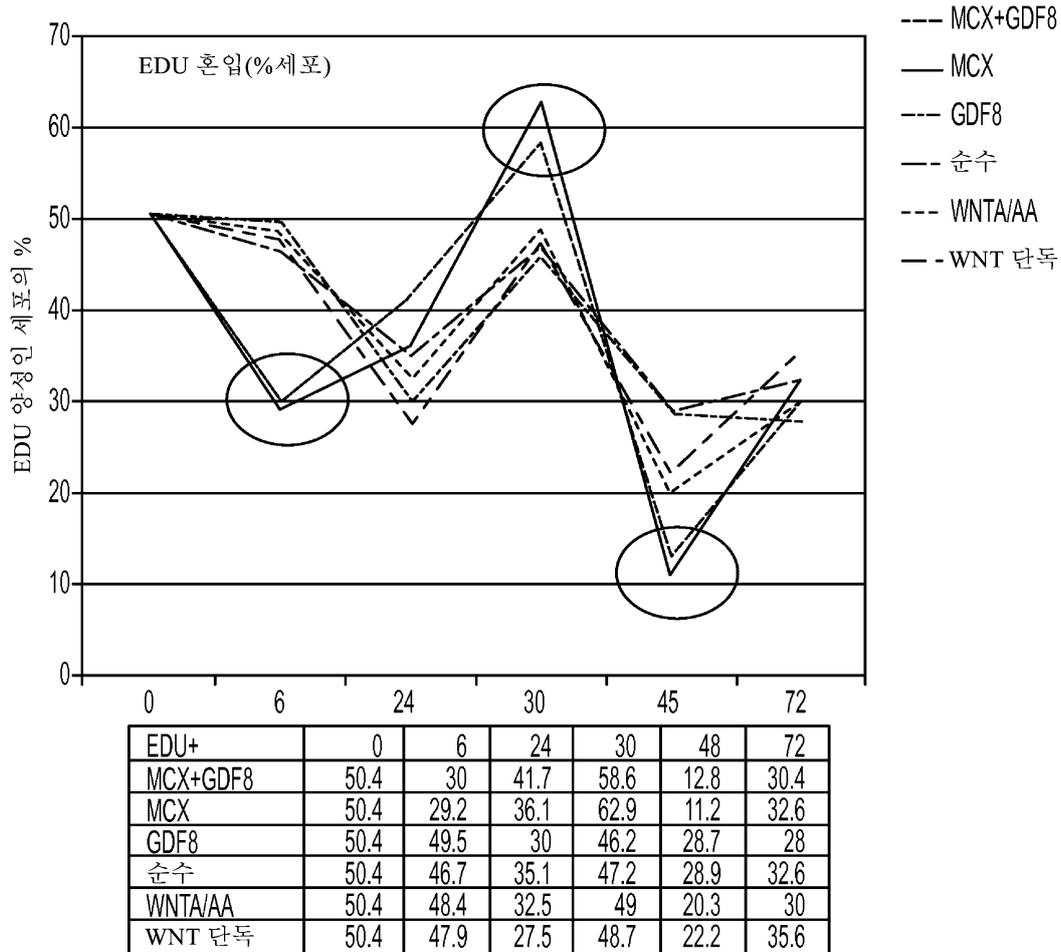
(계속)



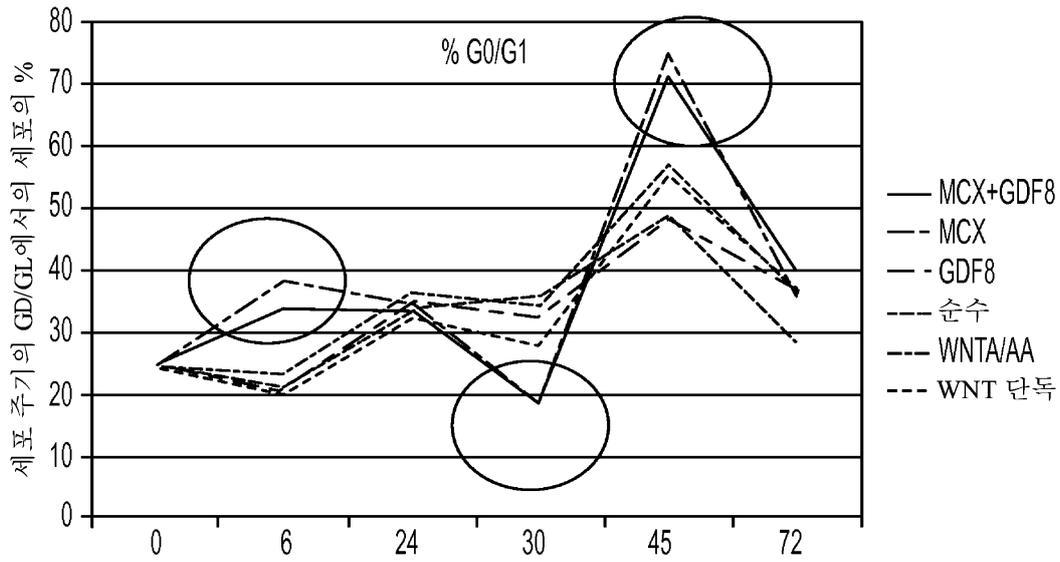
도면83

C+++	오스콜랄 농도 배지 ID	OX 포화	OX 포화	HCO3	기스엔	영양분/	영양분/	세포 밀도	세포 밀도	lg2 유동	lg2 밀도	트라이 위치	중합 Po	배지 유형	세포 lg2 유형	중합제
	342 061311 MB DE Assay				0.92	3.84								다중점		노바 서비스(Nova Service)
1.01	350 061311 M	100	2.3	39.5	5.46	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.01	356 061311 M	100	2.7	39.4	5.49	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.01	356 061311 M	100	2.5	40.7	5.491	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.04	350 061311 M	100	3.9	44.2	5.541	3.801	1.01							다중점		노바 서비스
1	061311 M	100	1.5	33.3	5.441	3.721	1.01							다중점		노바 서비스
1	343 061311 M	100	2.5	34.1	5.49	3.881	1.01							다중점		노바 서비스
0.99	061311 M	100	1.7	29.6	5.46	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
1	337 061311 M	100	1.9	33.4	5.46	3.801	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	E061311 N	100	2.9	27.9	5.36	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	061311 M	100	2.6	25.3	5.5	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	061311 M	100	3.1	24.8	5.461	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.09	061311 M	100	3.6	28	5.44	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
1.09	E061311 N	100	3.7	29.1	5.48	4	1.01							다중점		노바 서비스
1.07	E061311 N	100	3.3	13.2	5.46	3.881	1.01							다중점		노바 서비스
1.07	E061311 N	100	3.6	13.4	5.44	3.96	1.01							다중점		노바 서비스
1.1	E061311 N	100	4.3	27.8	5.44	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
1.11	E061311 N	100	3.5	30	5.5	3.8	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	E061311 N	100	3.3	15.6	5.44	3.84	1.01							다중점		노바 서비스
1.09	E061311 N	100	3.4	16.2	5.5	3.84	1.01							다중점		노바 서비스
1.1	E061311 N	100	3.2	28.3	5.52	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
C+++	오스콜랄 농도 배지 ID	OX 포화	OX 포화	HCO3	기스엔	영양분/	영양분/	세포 밀도	세포 밀도	lg2 유동	lg2 밀도	트라이 위치	중합 Po	배지 유형	세포 lg2 유형	중합제
1.01	350 061311 M	100	2.3	39.5	5.46	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1	061311 M	100	1.5	33.3	5.441	3.721	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	E061311 N	100	2.9	27.9	5.36	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.09	E061311 N	100	3.7	29.1	5.48	4	1.01							다중점		노바 서비스
1.11	E061311 N	100	3.5	30	5.5	3.8	1.01							다중점		노바 서비스
1.01	356 061311 M	100	2.7	39.4	5.49	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1	343 061311 M	100	2.5	34.1	5.49	3.881	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	061311 M	100	2.6	25.3	5.5	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.07	E061311 N	100	3.3	13.2	5.46	3.881	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	E061311 N	100	3.3	15.6	5.44	3.84	1.01							다중점		노바 서비스
1.01	356 061311 M	100	2.5	40.7	5.491	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
0.99	061311 M	100	1.7	29.6	5.46	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
1.08	061311 M	100	3.1	24.8	5.461	3.92	1.01							다중점		노바 서비스
1.07	E061311 N	100	3.6	13.4	5.44	3.96	1.01							다중점		노바 서비스
1.09	E061311 N	100	3.4	16.2	5.5	3.84	1.01							다중점		노바 서비스
1.04	350 061311 M	100	3.9	44.2	5.541	3.801	1.01							다중점		노바 서비스
1	337 061311 M	100	1.9	33.4	5.46	3.801	1.01							다중점		노바 서비스
1.09	061311 M	100	3.6	28	5.44	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
1.1	E061311 N	100	4.3	27.8	5.44	3.88	1.01							다중점		노바 서비스
1.1	E061311 N	100	3.2	28.3	5.52	3.88	1.01							다중점		노바 서비스

도면84

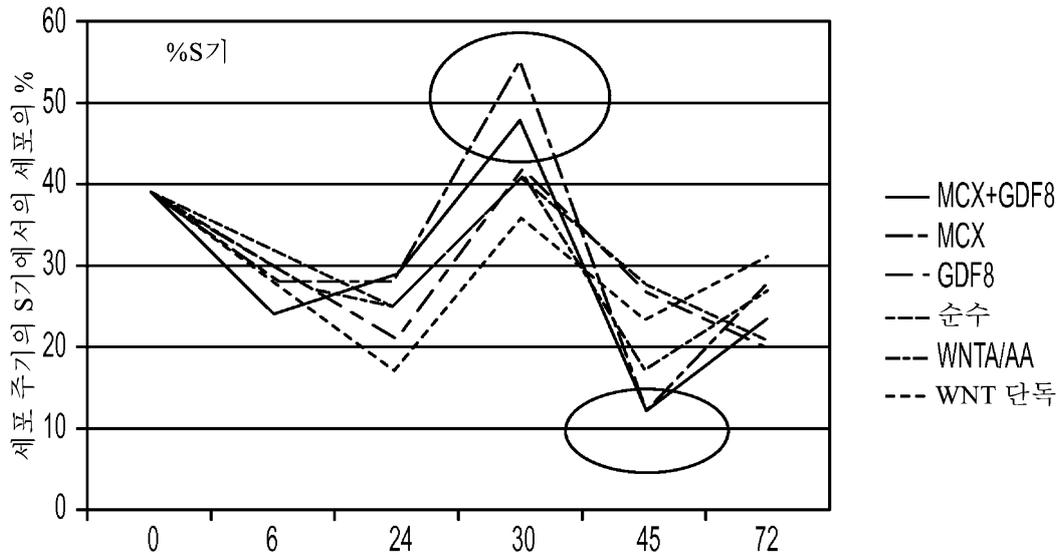


도면85



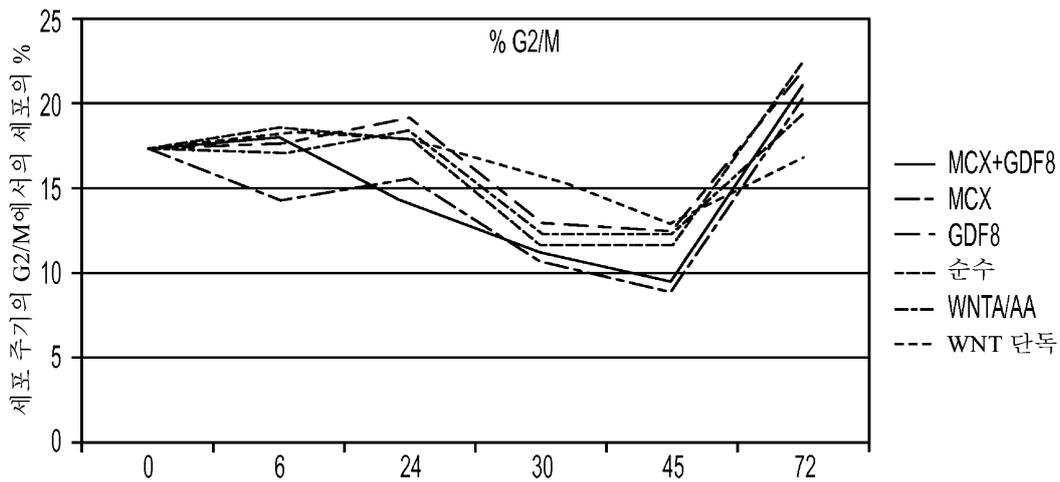
G0/G1	시간(hr)					
	0	6	24	30	48	72
MCX+GDF8	24.6	33.9	33.4	19.2	71.9	40.1
MCX	24.6	38	34.4	18.6	75.5	35.8
GDF8	24.6	20.9	35.3	32.7	48.5	36.8
순수	24.6	21.1	33.4	35.6	49	28.7
WNTA/AA	24.6	23.1	36.8	34.2	57.7	37.1
WNT 단독	24.6	20.4	32.7	27.9	55.8	37.1

도면86



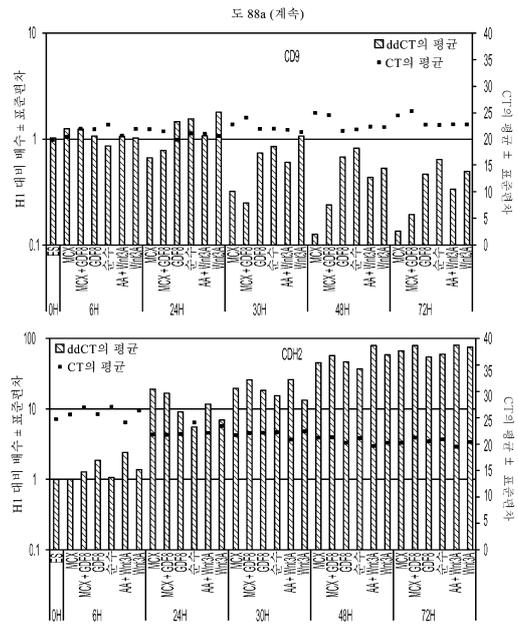
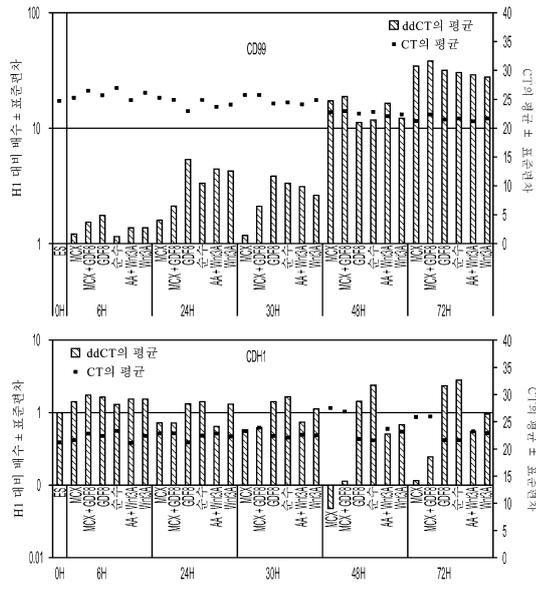
S	0	6	24	30	48	72
MCX+GDF8	39.2	24.4	28.7	48.3	12	23.9
MCX	39.2	28.3	27.8	55.6	11.8	27.6
GDF8	39.2	31.3	20.9	41.9	27.7	19.8
순수	39.2	28.8	25.7	40.4	28	20.9
WNTA/AA	39.2	32.4	25.4	41.6	17.2	27.6
WNT 단독	39.2	28.6	16.9	36.1	23.3	31.6

도면87

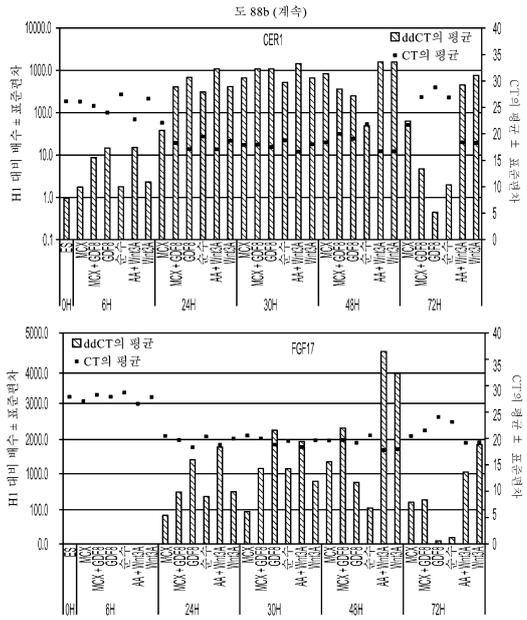
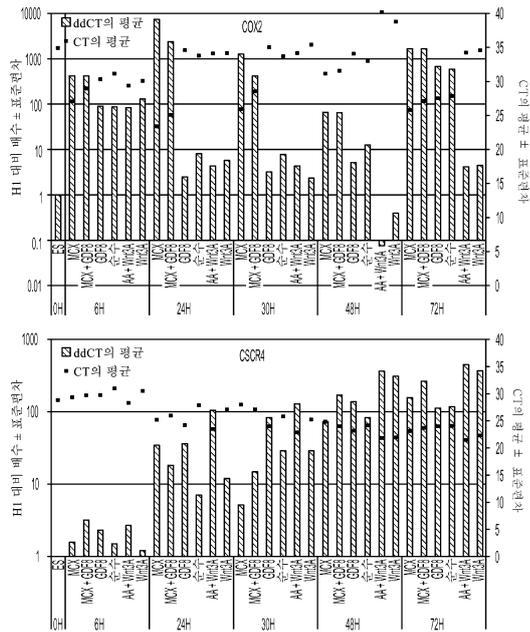


G2/M	0	6	24	30	45	72
MCX+GDF8	17.5	15	14	11.2	9.5	21.2
MCX	17.5	14.4	15.6	10.6	8.9	20.5
GDF8	17.5	17.6	19.2	12.9	12.2	22
순수	17.5	15.6	15	11.7	11.7	22.4
WNTA/AA	17.5	17.2	15.4	12.5	12.5	19.5
WNT 단독	17.5	18.4	15	15.5	12.9	16.5

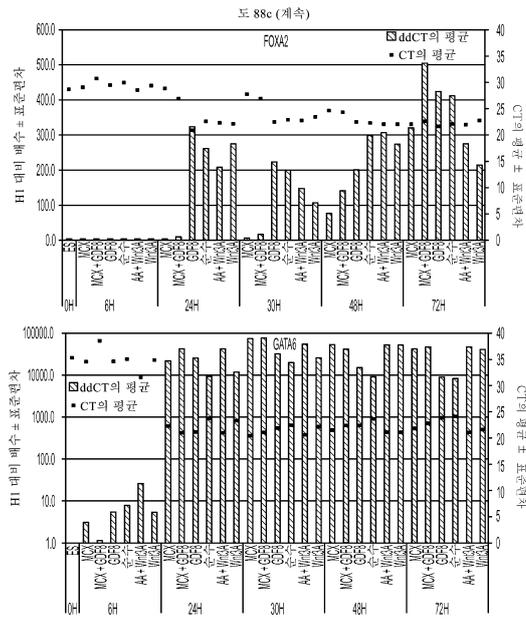
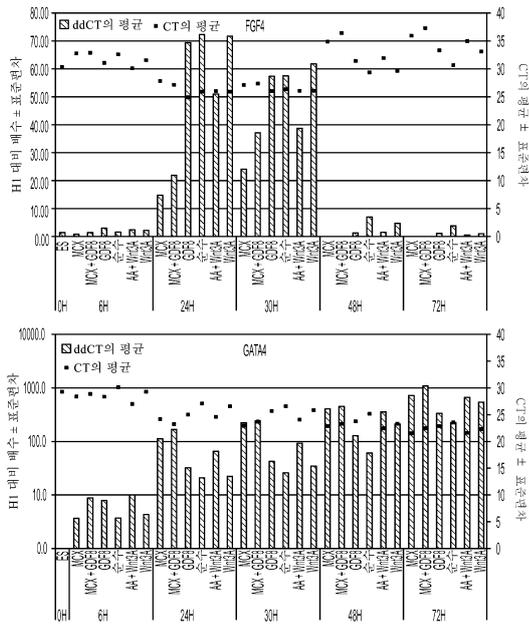
도면88a



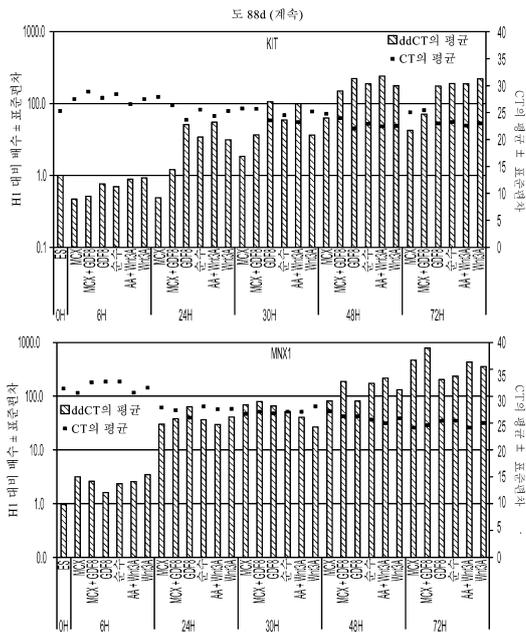
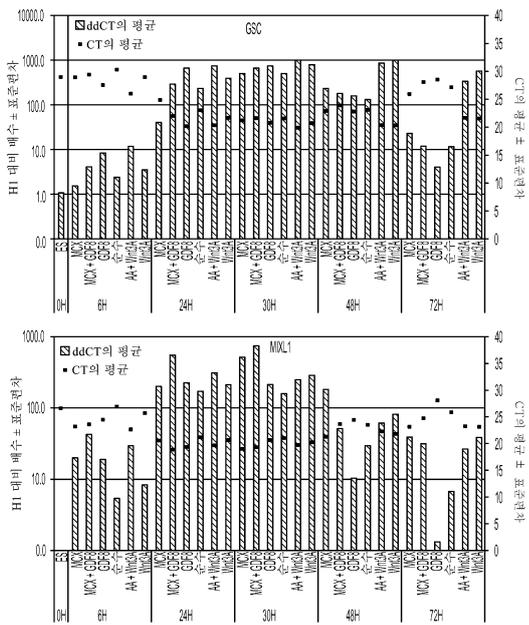
도면88b



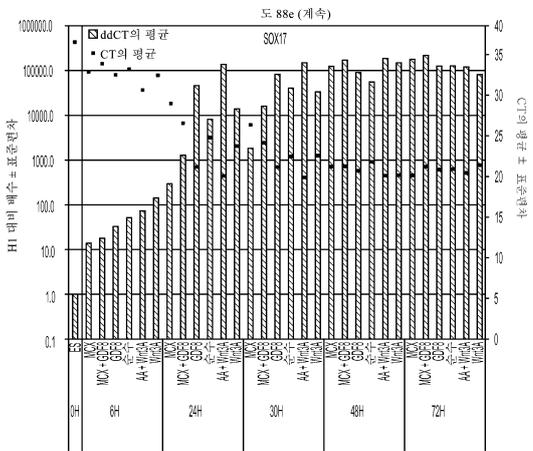
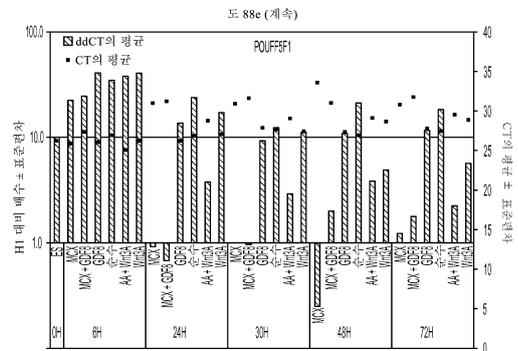
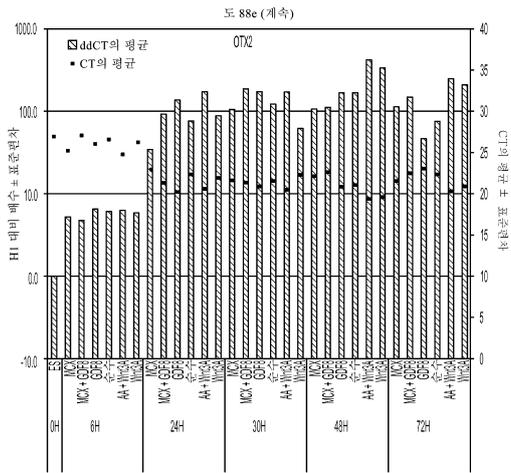
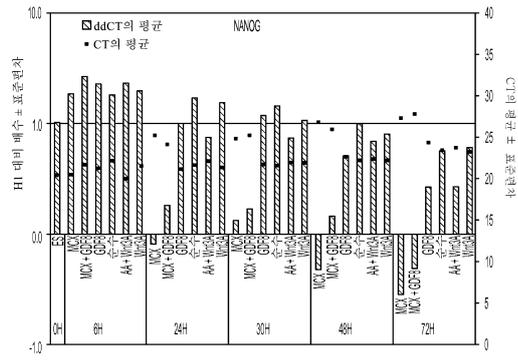
도면88c



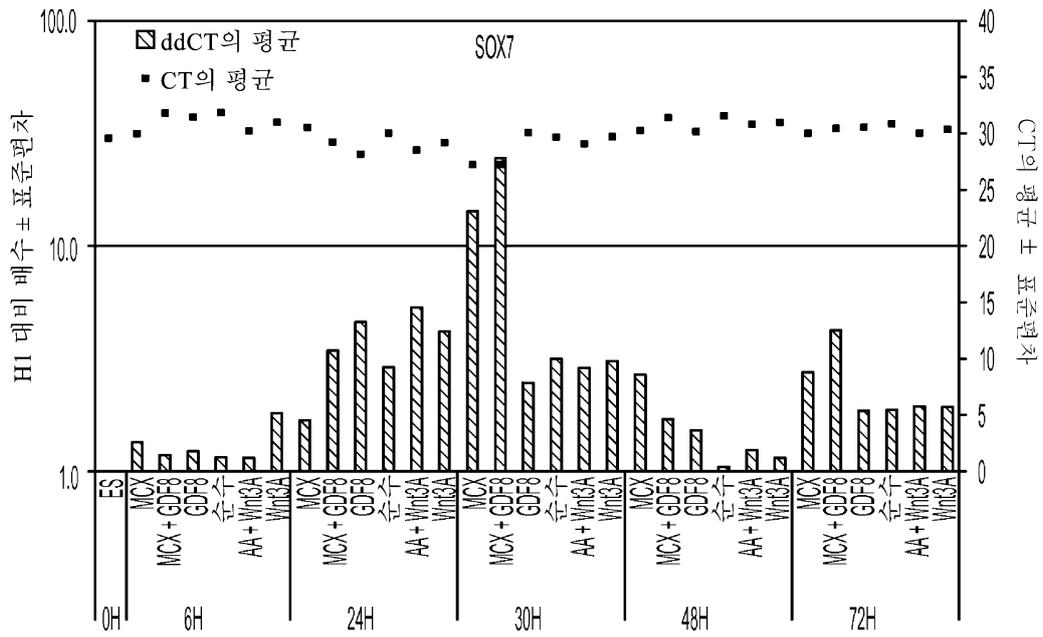
도면88d



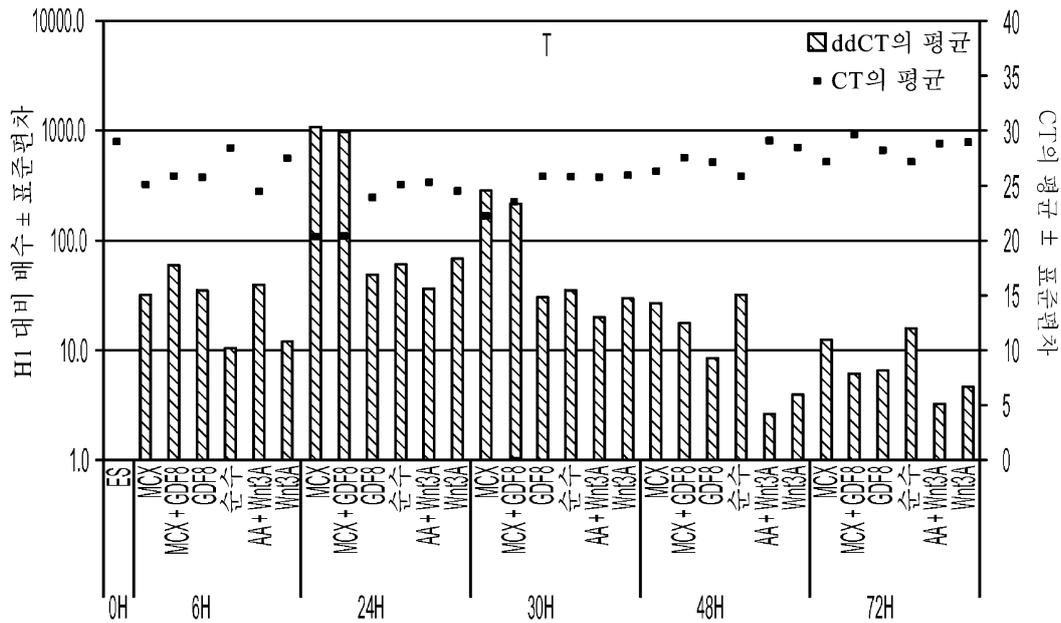
도면88e



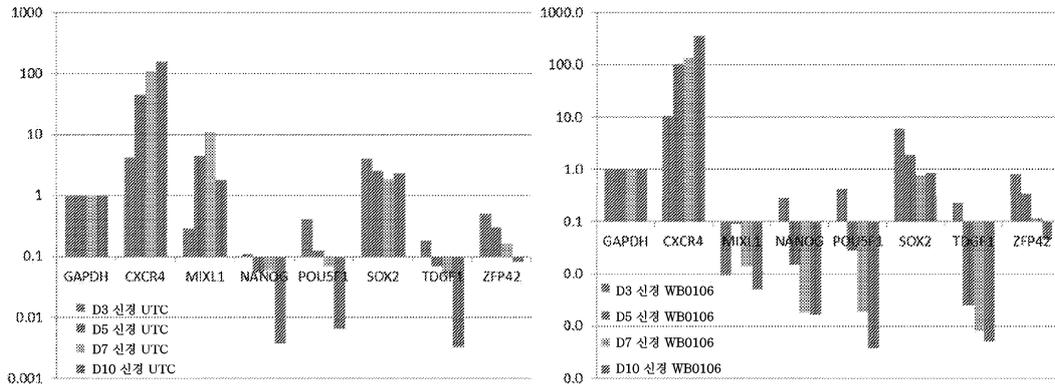
도면88f



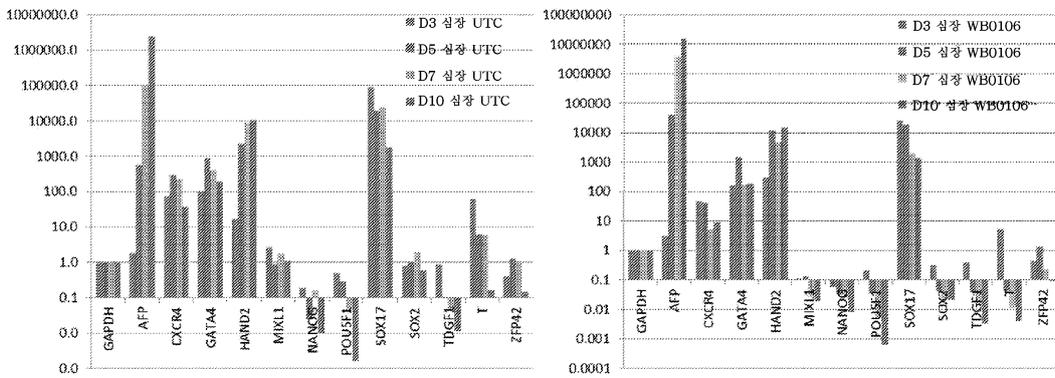
도 88f (계속)



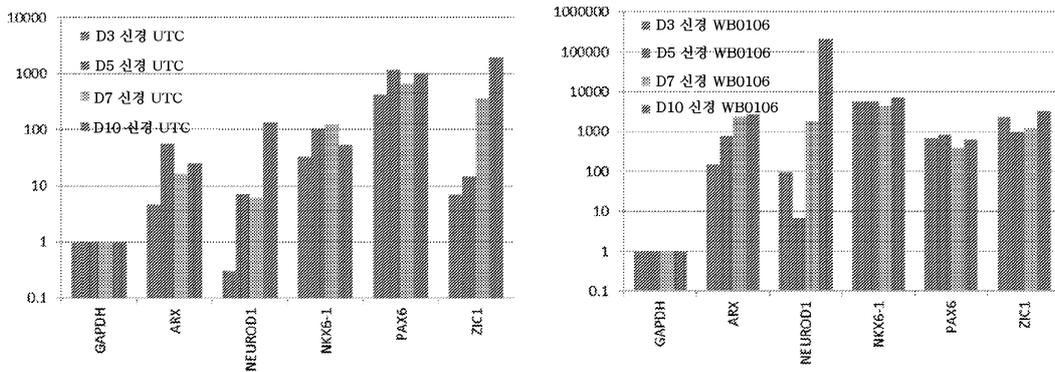
도면89



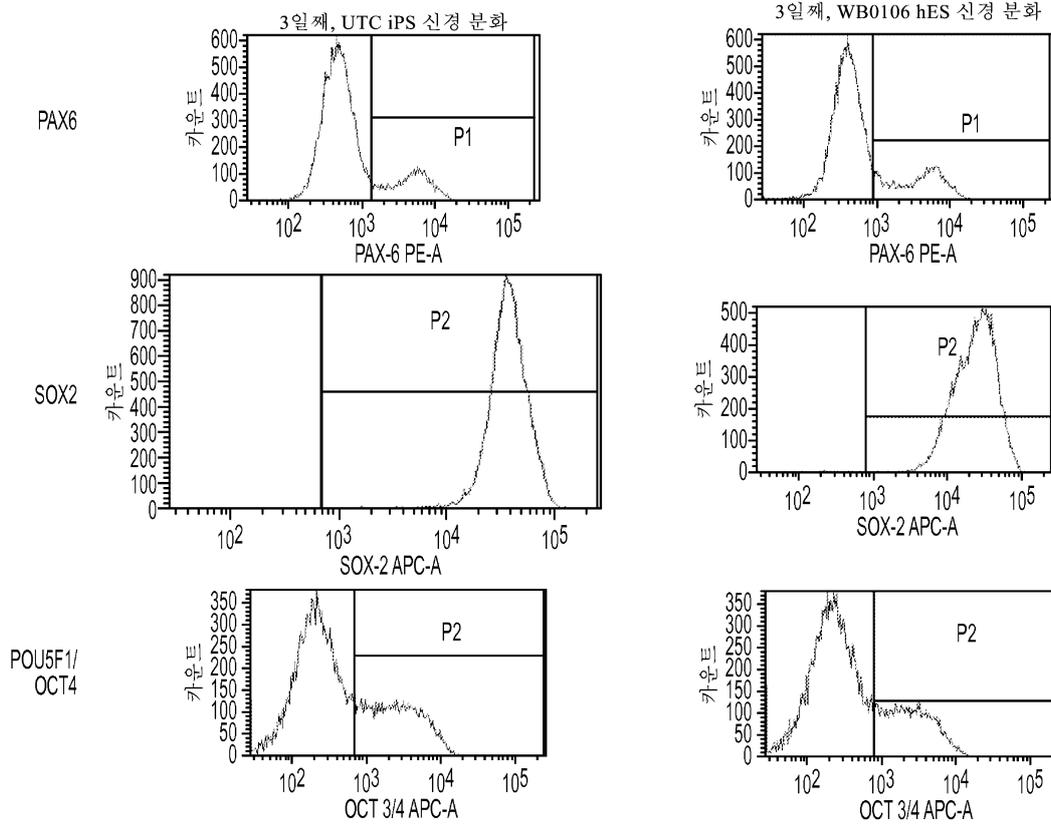
도면90



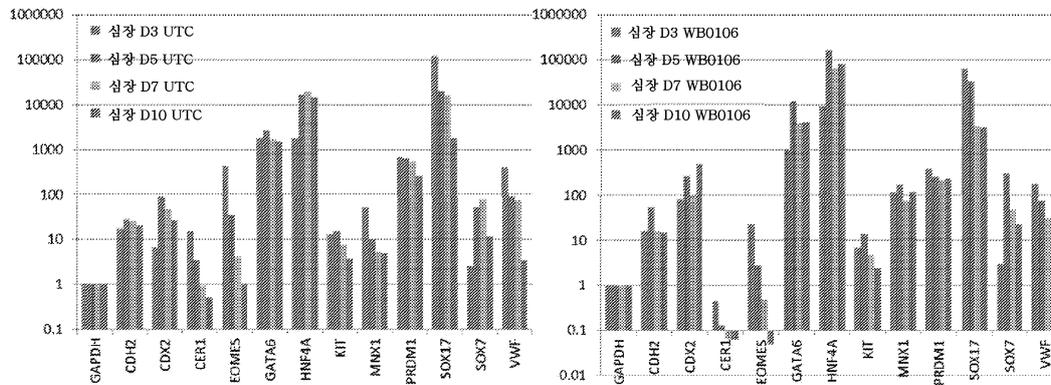
도면91



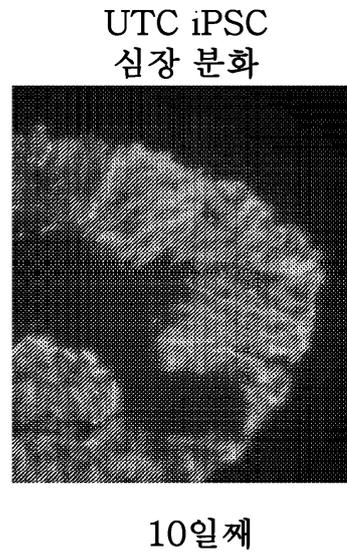
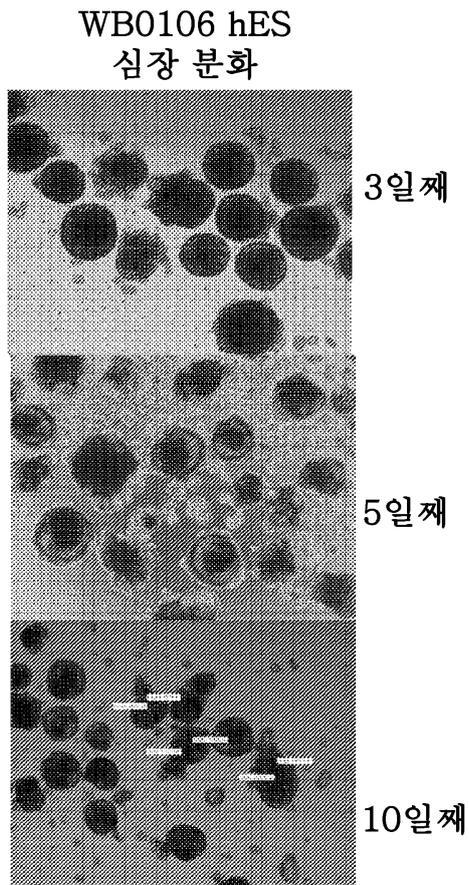
도면92



도면93



도면94



도면95

