



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월20일

(11) 등록번호 10-2580225

(24) 등록일자 2023년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0676 (2013.01)

C12N 2501/10 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-7012999(분할)

(22) 출원일자(국제) 2014년06월11일

심사청구일자 2023년04월17일

(85) 번역문제출일자 2023년04월17일

(65) 공개번호 10-2023-0054767

(43) 공개일자 2023년04월25일

(62) 원출원 특허 10-2022-7013185

원출원일자(국제) 2014년06월11일

심사청구일자 2022년05월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/041992

(87) 국제공개번호 WO 2014/201167

국제공개일자 2014년12월18일

(30) 우선권주장

61/833,898 2013년06월11일 미국(US)

61/972,212 2014년03월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Development, vol.134, pp.2491~2500(2007)

(73) 특허권자

프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지

미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17

(72) 발명자

피터슨 켄 피.

미국 메사추세츠주 02478 벨몬 머틀 스트리트 32

파글리우카 펠리시아 제이.

미국 메사추세츠주 02116 보스턴 코먼웰스 애비뉴 90

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

문두현

전체 청구항 수 : 총 30 항

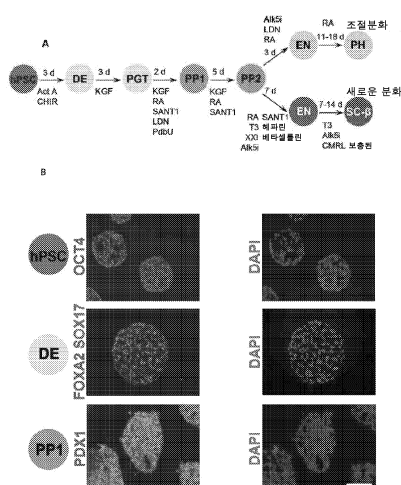
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 SC-β 세포 및 조성물 그리고 그 생성 방법

(57) 요약

β 세포 성숙을 유도하는데 유용한 방법, 조성물, 키트, 및 제제, 및 다양한 적용, 예컨대 세포 요법에서 사용하기 위한 SC-β 세포의 단리된 집단이 본원에 개시되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/385 (2013.01)

C12N 2501/41 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

(72) 발명자

멜턴 더글라스 에이.

미국 메사추세츠주 02421 렉싱턴 슬로컴 로드 22

밀만 제프리 알.

미국 메사추세츠주 02143 서머빌 에이퍼티 44 하이

랜드 애비뉴 270

세겔 마이클 사리스

미국 메사추세츠주 02445 브루클라인 딘 로드 118

거틀러 매즈

미국 메사추세츠주 02143 서머빌 비콘 스트리트 65

명세서

청구범위

청구항 1

세포 집단을 포함하는 조성물로서, 상기 집단은:

- (a) INS, PDX1, NKX6.1 및 하나 이상의 하기 유전자를 발현하는,
PC2, MNX1 또는 ABCC8;
 - (b) 제1 글루코오스 챌린지를 받는 경우 시험관내 글루코오스-자극 인슐린 분비 반응을 나타내는; 및
 - (c) 소마토스타틴 및 글루카곤 중 하나 또는 둘 다를 발현하지 않는,
- 다수의 비-천연 췌장 β -세포를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포는, 제1 글루코오스 챌린지, 제2 글루코오스 챌린지 및 제3 글루코오스 챌린지를 받는 경우, 제1 글루코오스 챌린지, 제2 글루코오스 챌린지 및 제3 글루코오스 챌린지가 순차적으로 적용되는 경우, 시험관내 글루코오스-자극된 인슐린 분비 반응을 나타내는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 시험관내 인간 줄기 세포로부터 생성되는 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 줄기세포는 배아 줄기세포인, 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 줄기세포는 유도된 만능 줄기세포인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 PC2를 발현하는, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 MNX1을 발현하는, 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 ABCC8을 발현하는, 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 크로모그라닌 A를 발현하는, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 C-펩타이드를 발현하는, 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 MAFB를 발현하는, 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포는, 제1 글루코오스 농도에서 제1 글루코오스 챌린지 및 제2 글루코오스 농도에서 제2 글루코오스 챌린지를 받는 경우, 1차 글루코오스 챌린지 및 제2 글루코오스 챌린지가 순차적으로 적용되는 경우, 시험관내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 반응을 나타내고, 상기 제1 글루코오스 농도는 제2 글루코오스 농도보다 높고, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포는 적어도 1.1의 자극 지수를 나타내고, 상기 자극 지수는 제2 글루코오스 농도 대비 제1 글루코오스 농도에 반응하여 분비되는 인슐린의 비와 같은, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 모노호르몬성인, 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포에 의해 분비된 인슐린은, 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 적어도 20mM의 글루코오스에 노출되는 경우 30분 인큐베이션당 1000개 세포당 적어도 0.5 μ IU인, 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 유전적으로 변형된 것인, 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 세포 집단에서 적어도 10%의 세포가 다수의 비-천연 췌장 β -세포인, 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 세포 집단이 세포 클러스터인, 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 조성물이 다수의 세포 클러스터를 포함하는, 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 상기 세포 집단이 다음 중 하나를 포함하는, 조성물:

- a) C-펩타이드-음성/글루카곤-양성 세포;
- b) C-펩타이드-음성/소마토스타틴-양성 세포;
- c) 글루카곤-양성/소마토스타틴-음성 세포;
- d) 글루카곤-음성/소마토스타틴-양성 세포; 또는
- e) 이들의 임의의 조합.

청구항 20

제1항에 있어서, 상기 세포 집단의 적어도 3%가 C-펩타이드-음성/글루카곤-양성 세포 또는 글루카곤-양성/소마토스타틴-음성 세포인, 조성물.

청구항 21

제1항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가:

- a) MNX1을 발현하는;
- b) 시험관내 인간 줄기 세포로부터 생성되는; 및
- c) 천연 β -세포의 유전자 발현 프로파일과 상이한 유전자 발현 프로파일을 갖는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 MAFB를 발현하는, 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 크로모그라닌 A 및 C-펩타이드를 발현하는, 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포는, 제1 글루코오스 챌린지, 제2 글루코오스 챌린지 및 제3 글루코오스 챌린지를 받는 경우, 제1 글루코오스 챌린지, 제2 글루코오스 챌린지 및 제3 글루코오스 챌린지가 순차적으로 적용되는 경우, 시험관내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 반응을 나타내는, 조성물.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 세포 집단이 세포 클러스터인, 조성물.

청구항 26

제21항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 유전적으로 변형된 것인, 조성물.

청구항 27

제21항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 PC2 및 ABCC8을 발현하는, 조성물.

청구항 28

제21항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가:

- a) PC2, ABCC8, MAFB, 크로모그라닌 A 및 C-펩타이드를 발현하는; 및
- b) 제1 글루코오스 챌린지, 제2 글루코오스 챌린지 및 제3 글루코오스 챌린지를 받는 경우, 제1 글루코오스 챌린지, 제2 글루코오스 챌린지 및 제3 글루코오스 챌린지가 순차적으로 적용되는 경우, 시험관내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 반응을 나타내는, 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 다수의 비-천연 췌장 β -세포가 유전적으로 변형된 것인, 조성물.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 세포 집단이 세포 클러스터인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차참조

[0002] 본 출원은 이들의 내용의 전문이 본원에 참고로 편입된 2013년 6월 11일에 출원된 미국 가출원 번호 61/833,898 및 2014년 3월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 61/972,212의 이익을 청구한다.

배경 기술

[0003] 현재까지의 연구는 순차적으로 변하는 글루코오스 수준에 반응하여 적절한 양의 인슐린을 분비하지 않는 비정상적으로 기능하는 인슐린-발현 세포, 또는 마우스 숙주 내로의 이식 3개월 후 기능하는 인슐린-발현 세포로만 성숙할 수 있는 췌장 선조 세포를 생성하였다(Cheng 등, 2012; D'Amour 등, 2005; D'Amour 등, 2006; Kroon 등, 2008; Nostro 등, 2011; Rezanian 등, 2012; Schulz 등, 2012; Xie 등, 2013). "글루코오스 자극된 인슐린 분비"(GSIS) 분석에서 높은 수준의 글루코오스에 반응하여 높은 수준의 인슐린을 방출하고 반복적으로 그렇게 할 수 있는 정상 소도 또는 분산된 성체 β 세포와는 대조적으로, 기존 방법에 의해 생성된 hPSC-유도된 인슐린-발현 세포는 다양한 농도의 글루코오스 첨가에 반응하여 인슐린을 적절하게 분비하지 못한다. 따라서, 정상 소도 또는 성숙 성체 β 세포의 표현형을 나타내는 hPSCs로부터 세포를 유도하는 방법에 대한 필요성이 존재한다.

[0004] 발명의 요약

- [0005] 일부 측면에서, 본 개시내용은 줄기세포-유도된 β 세포 (SC- β)를 제공한다.
- [0006] 일부 구현예에서, 세포는 성숙되어 있다. 일부 구현예에서, 세포는 시험관내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 (GSIS) 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 생체내 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 시험관내 및 생체내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 (GSIS) 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 글루코오스 챌린지에 대한 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 2개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 3개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 세포를 인간 또는 동물에 이식한 직후에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 세포를 인간 또는 동물에 이식한 대략 24 시간 내에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 세포를 인간 또는 동물에 이식한 대략 2 주 내에 관측된다. 일부 구현예에서, 낮은 글루코오스 농도와 비교하여 높은 글루코오스 농도에 반응하여 분비된 인슐린의 비를 특징으로 하는 세포의 자극 지수는 내인성 성숙한 β 세포의 자극 지수와 유사하다. 일부 구현예에서, 자극 지수는 1 이상, 또는 1.1 이상, 또는 1.3 이상, 또는 2 이상, 또는 2.3 이상, 또는 2.6 이상이다. 일부 구현예에서, 세포는 사이토카인에 반응하여 사이토카인-유도된 세포자멸사를 나타낸다. 일부 구현예에서, 사이토카인은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된다: 인터루킨-1 β (IL- β), 인터페론- γ (INF- γ), 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 및 이들의 조합. 일부 구현예에서, 상기 세포로부터의 인슐린 분비는 항-당뇨제에 반응하여 증대된다. 일부 구현예에서, 항-당뇨제는 인크레틴 모방체, 설포닐우레아, 메글리티나이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 분비촉진제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 모노호르몬이다. 일부 구현예에서, 세포는 내인성 성숙한 β 세포의 형태와 닮은 형태를 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 전자 현미경검사 하에서 내인성 성숙한 β 세포의 인슐린 과립과 닮은 캡슐화된 결정성 인슐린 과립을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 낮은 복제 속도를 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 글루코오스 자극된 Ca^{2+} 플럭스 (GSCF)를 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 글루코오스 챌린지에 대한 GSCF 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 2개의 글루코오스 챌린지에 대한 GSCF 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 3개의 글루코오스 챌린지에 대한 GSCF 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포는 증가된 칼슘 흐름을 나타낸다. 일부 구현예에서, 증가된 칼슘 흐름은 증가된 양의 유입 또는 높은 글루코오스 농도에 대해 낮은 비의 유입을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 내인성 성숙한 β 세포에 특유한 적어도 하나의 마커를 발현시킨다: 인슐린, C-펩타이드, PDX1, MAFA, NKX6-1, PAX6, NEUROD1, 글루코키나아제 (GCK), SLC2A1, PCSK1, KCNJ11, ABCC8, SLC30A8, SNAP25, RAB3A, GAD2, PTPRN, NKX2-2, Pax4. 일부 구현예에서, 세포는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현시키지 않는다: a) 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 호르몬 i) 글루카곤 (GCG), 및 ii) 소마토스타틴 (SST); 또는 b) 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 샘파리 세포 마커 i) 아밀라아제, 및 ii) 카복시펩티다아제 A (CPA1); c) 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 α 세포 마커: i) GCG, ii) Arx, iii) Irx1, 및 Irx2; 및 d) 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 관상 세포 마커: i) CFTR, 및 ii) Sox9. 일부 구현예에서, 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 그것의 전구체로부터 시험관 내에서 분화된다: Nkx6-1-양성 β 전조 세포, Pdx1-양성 β 전조 세포, 및 만능 줄기 세포. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포 및 유도된 만능 줄기 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포는 인간의 것이다. 일부 구현예에서, 세포는 유전적으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포는 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 세포당 생산된 인슐린은 높은 글루코오스 농도에서 30 분 인큐베이션당 1000개의 세포당 0.5 내지 10 μ IU이다. 일부 구현예에서, 세포당 생산된 인슐린은 높은 글루코오스 농도에서 30 분 인큐베이션당 1000개의 세포당 2.5 μ IU이다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 생체외에서 일어난다.
- [0007] 일부 측면에서, 본 개시내용은 SC- β 세포를 포함하는 세포주를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포주는 안정되게 인슐린을 발현시킨다. 일부 구현예에서, 세포는 냉동되고, 녹고, 적어도 30개의 계대까지 유의미한 형태적 변화 없이 약 24 내지 44 시간의 배가 시간과 함께 증폭될 수 있다.
- [0008] 일부 측면에서, 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포로부터 SC- β 세포를 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 인슐린-양성 내분비 세포를 포함하는 세포의 집단을, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, a) 형질 전환 성장 인자 β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제 및 b) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제를 포함하는 적어도 2개의 β 세포-성숙 인자와 접촉시켜서, 상기 집단 중 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 단계를 포함한다.
- [0009] 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 하나의 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 2개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포

는 적어도 3개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포의 형태는 내인성 성숙한 β 세포의 형태와 닮아 있다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 (GSIS) 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 SC- β 세포의 대상체로의 이식 즉시 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 SC- β 세포의 대상체로의 이식의 대략 24 시간 내에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 SC- β 세포의 대상체로의 이식의 대략 2 주 내에 관측된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 100 nM 내지 100 μ M의 농도에서 상기 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 10 μ M의 농도에서 상기 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로는 TGF- β 수용체 유형 I 키나아제 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 Akt5 억제제 II를 포함한다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 Akt5 억제제 II의 유사체 또는 유도체를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μ M 내지 10 μ M의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1 μ M의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 트리아이오도티로닌 (T3)를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 임의로 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 10 nM 내지 1 μ M의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 100 nM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 상기 세포의 집단을 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 낭포성 섬유증 막통과 전도도 조절물질 (CFTR) 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 100 nM 내지 100 μ M의 농도에서 CFTR 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 하기의 농도에서 CFTR 억제제와 접촉된다: 10 nM 내지 10 μ M. 일부 구현예에서, CFTR 억제제는 Gly-H101을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 O-GlcNAcase 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 100 nM 내지 100 μ M의 농도에서 O-GlcNAcase 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 하기의 농도에서 O-GlcNAcase 억제제와 접촉된다: 10 nM 내지 10 μ M. 일부 구현예에서, O-GlcNAcase의 억제제는 Thiamet G를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 적합한 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 적합한 배양 배지는 Connought Medical Research Laboratories 1066 보강된 소도 배지 (CMRLS) 또는 CMRLS의 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, CMRLS는 혈청으로 보강된다. 일부 구현예에서, CMRLS는 10% 우태 혈청으로 보강된다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 세포의 진단에서 상기 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 하나의 시험관내 성숙물을 적어도 하나의 SC- β 세포에 도입하는데 충분한 기간 동안 현탁 배양에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 7 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 7 일 내지 21 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 7 내지 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 10 내지 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, β 세포-성숙 인자는 하루 걸러 보충된다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 집단에서 인슐린-양성 내분비 세포의 적어도 1%는 성숙한 SC- β 세포로 유도된다. 일부 구현예에서, 상기 집단에서 인슐린-양성 내분비 세포의 적어도 99%는 성숙한 SC- β 세포로 유도된다. 일부 구현예에서, 상기 집단 중 수득한 세포의 적어도 30%는 SC- β 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 C-펩타이드, 인슐린, NKX6-1, Pdx1를 발현시키고, NKX6-1 및 C-펩타이드를 공발현시킨다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 또한 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 배아 줄기 세포 및 유도된 만능 줄기 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 만능 줄기 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 인간 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 시험관내 SC- β 세포의 발생은 확장가능하다.

- [0010] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 SC- β 세포의 단리된 집단을 제공한다.
- [0011] 일부 측면에서, 본 개시내용은 마이크로캡슐 내에 캡슐화된 SC- β 세포의 단리된 집단을 포함하는 마이크로캡슐을 제공한다.
- [0012] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 SC- β 세포의 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0013] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 SC- β 세포의 단리된 집단을 포함하는 분석을 제공한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 분석은 β 세포 증식, β 세포 복제, β 세포사, β 세포 기능, 면역 공격에 대한 β 세포 감수성, 또는 탈분화 또는 분화에 대한 β 세포 감수성으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 β 세포 운명을 촉진 또

는 억제하는 하나 이상의 후부 제제를 확인하는데 사용한다. 일부 구현예에서, 분석은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 적어도 하나의 SC-β 세포로의 분화를 촉진하는 하나 이상의 후보 제제를 확인하는데 사용한다.

- [0015] 일부 측면에서, 본 개시내용은 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체에게 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 SC-β 세포의 단리된 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 마이크로캡슐 내에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 SC-β 세포가 투여되는 동일한 대상체로부터 수득된 만능 줄기 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 iPS 세포의 집단으로부터 생산되고, 상기 iPS 세포는 SC-β 세포가 투여되는 동일한 대상체로부터 수득된 세포로부터 유도된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다. 일부 구현예에서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 1.5형 당뇨병 및 준당뇨병의 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 대사성 장애를 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다.
- [0016] 일부 측면에서, 본 개시내용은 필요한 대상체에게 투여하기 위한, 청구항 41 내지 102 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 SC-β 세포의 단리된 집단의 용도에 관한 것이다.
- [0017] 일부 구현예에서, SC-β 세포의 단리된 집단은 마이크로캡슐 내에 캡슐화된 상기 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다. 일부 구현예에서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 1.5형 당뇨병 및 준당뇨병의 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 대사성 장애를 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다.
- [0018] 일부 측면에서, 본 개시내용은 a) Alk5 억제제, b) 트리아이오도티로닌 (T3), 임의로 c) 스타우로스포린, 및 임의로 d) CMRLS 또는 CMRLS의 성분을 포함하는 배양 배지를 제공한다.
- [0019] 일부 측면에서, 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포의 시험관내 성숙물을 SC-β 세포로 유도하는, 배양 배지의 용도를 수반하고, 상기 SC-β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 둘 모두의 GSIS 반응을 나타낸다.
- [0020] 일부 측면에서, 본 개시내용은 Pdx1-양성 체장 선조 세포로부터 NKX6-1-양성 체장 선조 세포를 생산하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 Pdx1-양성 체장 선조 세포를 포함하는 세포의 집단을 a) 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, b) 소닉 헤지혹 경로 억제제, 및 임의로 c) 저농도의 레티노산 (RA) 신호전달 경로 활성제를 포함하는 적어도 2개의 β 세포-성숙 인자와, 적어도 5 일의 기간 동안에 접촉시켜 집단 중 적어도 하나의 Pdx1-양성 체장 선조 세포의 NKX6-1-양성 체장 선조 세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하고, 상기 NKX6-1-양성 체장 선조 세포는 NKX6-1를 발현시킨다.
- [0021] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1 ng/mL 내지 100 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 50 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 케라틴생성세포 성장 인자 (KGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF2, FGF8B, FGF10, 및 FGF21로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.01 μM 내지 1.0 μM의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μM의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 RA를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μM 및 0.5 μM의 농도에서 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.25 μM의 농도에서 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 상기 세포의 집단을 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 2 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자에 노출된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 20 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자에 노출된다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린 및 EGF로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 적합한 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, β 세포-성숙 인자는 하루 걸러 보충된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 5일 동안에 현탁 배양에 추가되지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 5일 전에 현탁 배양으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 Pdbu를 포함한다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 5일 동안에 현탁 배양에 추가되지 않는다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 5일 전에 현탁 배양으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, BMP 신호

전달 경로 억제제는 LDN193189를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 집단 중 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 10%는 유도되어 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 상기 집단 중 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 95%는 유도되어 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1, NKX6-1, 및 FoxA2를 발현시킨다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 배아 줄기 세포 및 유도된 만능 줄기 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 만능 줄기 세포의 집단으로부터 생산된다.

- [0022] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 의해 수득된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단을 제공한다.
- [0023] 일부 측면에서, 본 개시내용은 마이크로캡슐 내에 캡슐화된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단을 포함하는 마이크로캡슐을 제공한다.
- [0024] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0025] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단을 포함하는 분석을 제공한다.
- [0026] 일부 구현예에서, 분석은 적어도 하나의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 또는 그것의 전구체의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 촉진하는 하나 이상의 후보 제제를 확인하는데 사용한다.
- [0027] 일부 측면에서, 본 개시내용은 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체에게 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0028] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포가 투여된 동일한 대상체로부터 수득된 만능 줄기 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 마이크로캡슐 내에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다. 일부 구현예에서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 1.5형 당뇨병 및 준당뇨병의 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 대사성 장애를 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다.
- [0029] 일부 측면에서, 본 개시내용은 SC-β 세포로 분화하기 위한, 청구항 113 내지 142 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생산된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단의 용도에 관한 것이다.
- [0030] 일부 측면에서, 본 개시내용은 필요한 대상체에게 투여하기 위한, 본원에서 기재된 방법에 의해 생산된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단의 용도를 수반한다.
- [0031] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 단리된 집단은 마이크로캡슐 내에 캡슐화된 상기 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다. 일부 구현예에서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 1.5형 당뇨병 및 준당뇨병의 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 대사성 장애를 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다.
- [0032] 일부 측면에서, 본 개시내용은 a) KGF, b) SNT1, 및 임의로 c) RA를 포함하는 배양 배지를 제공하고, 상기 배양 배지는 Pdbu 및 LDN 193189이 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 시험관내 분화를 유도하기 위한, 청구항 160의 배양 배지의 용도를 수반한다.
- [0033] 일부 측면에서, 본 개시내용은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로부터 인슐린-양성 내분비 세포를 생산하는 방법을 제공하고, 이 방법은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 포함하는 세포의 집단을, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 a) TGF-β 신호전달 경로 억제제, 및 b) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제를 포함하는 적어도 2개의 β 세포-성숙 인자와 접촉시켜, 상기 집단 중 적어도 하나의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하고, 상기 인슐린-양성 췌장 선조 세포는 인슐린을 발현시킨다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 100 nM 내지 100 μM의 농도에서 상기 TGF-β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 10 μM의 농도에서 상기 TGF-β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로는 TGF-β 수용체 유형 I 키나아제 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로 억제제는 Akt5 억제제 II를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μM 내지 10 μM의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1 μM의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성

성제는 트리아이오도티로닌 (T3)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 상기 세포의 집단을 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 γ -세크레타제 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μM - 10 μM 의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1 μM 의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, γ -세크레타제 억제제는 XXI를 포함한다. 일부 구현예에서, γ -세크레타제 억제제는 DAPT를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 2 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 20 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 저농도의 레티노산 (RA) 신호전달 경로 활성제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.01 μM 내지 1.0 μM 의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μM 의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 RA를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 소닉 헤지혹 (SHH) 경로 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.1 μM 및 0.5 μM 의 농도에서 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 0.25 μM 의 농도에서 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 임의로 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 10 nM 내지 1 μM 의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 100 nM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 상기 세포의 집단을 글루코오스에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1 mM 내지 50 mM의 농도에서 글루코오스에 노출된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 25 mM의 농도에서 글루코오스에 노출된다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 집단에서 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포 중 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는데 충분한 기간 동안 현탁 배양에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 7 일이다. 일부 구현예에서, β 세포-성숙 인자는 하루 걸러 현탁 배양에서 보충된다. 일부 구현예에서, 집단 중NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 15%는 유도되어 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 집단 중NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 99%는 유도되어 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시킨다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 배아 줄기 세포 및 유도된 만능 줄기 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된 만능 줄기 세포의 집단으로부터 생산된다.

- [0034] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 인슐린-양성 내분비 세포의 단리된 집단을 제공한다.
- [0035] 일부 측면에서, 본 개시내용은 마이크로캡슐 내에 캡슐화된 인슐린-양성 내분비 세포의 단리된 집단을 포함하는 마이크로캡슐을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 인슐린-양성 내분비 세포의 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0036] 일부 측면에서, 본 개시내용은 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 대상체에게 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 인슐린-양성 내분비 세포의 단리된 집단을 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0037] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 인슐린-양성 내분비 세포가 투여된 동일한 대상체로부터 수득된 만능 줄기 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 마이크로캡슐 내에 캡슐화된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다. 일부 구현예에서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 1.5형 당뇨병 및 준당뇨병의 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 대사성 장애를 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다.
- [0038] 일부 측면에서, 본 개시내용은 SC- β 세포로 분화하기 위한, 본원에서 기재된 방법에 의해 생산된 인슐린-양성 내분비 세포의 단리된 집단의 용도를 수반한다.
- [0039] 일부 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 투여하는데 필요한,본원에서 기재된 방법 인슐린-양성 내분비 세포의 단리된 집단의 용도를 수반한다.

- [0040] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포의 단리된 집단은 마이크로캡슐 내에 캡슐화된 상기 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다. 일부 구현예에서, 당뇨병은 I형 당뇨병, II형 당뇨병, 1.5형 당뇨병 및 준당뇨병의 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 대사성 장애를 갖거나, 그것을 발달시키는 증가된 위험을 갖는다.
- [0041] 일부 측면에서, 본 개시내용은 a) TGF- β 신호전달 경로 억제제, b) TH 경로 활성화제, 및 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자를 포함하는 배양 배지: i) XXI, ii) 베타셀룰린, iii) 저농도의 RA 신호전달 경로 활성화제, 및 iv) SHH 경로 억제제를 제공한다.
- [0042] 일부 측면에서, 본 개시내용은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 시험관 분화를 인슐린-양성 내분비 세포로 유도하기 위한, 청구항 221의 배양 배지의 용도를 수반한다.
- [0043] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는, SC- β 세포를 생성하는 방법을 제공한다: Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 i) 형질전환 성장 인자 β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 iii) 단백질 키나아제 억제제와 접촉시켜, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 단계로서, 상기 SC- β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 GSIS 반응을 나타내는 단계.
- [0044] 일부 구현예에서, GSIS 반응은 (i) SC- β 세포의 대상체로의 이식 즉시; (ii) 대상체로의 이식의 대략 24 시간 내에; 또는 (iii) 대상체로의 이식의 대략 2 주 내에 관측된다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 (i) 적어도 하나의 글루코오스 셀린지; (ii) 적어도 2개의 순차적인 글루코오스 셀린지; 또는 (iii) 적어도 3개의 순차적인 글루코오스 셀린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포의 형태는 내인성 β 세포의 형태와 닮아 있다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM 내지 100 μ M의 농도에서 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 10 μ M의 농도에서 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로는 TGF- β 수용체 유형 I 키나아제 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 Alk5 억제제 II를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 0.1 μ M 내지 10 μ M의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 1 μ M의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제는 트리아이오도티로닌 (T3)를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 단백질 키나아제 억제제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 10 nM 내지 1 μ M의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 낭포성 섬유증 막통과 전도도 조절물질 (CFTR) 억제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM 및 100 μ M의 농도에서 CFTR 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 10 nM 및 10 μ M의 농도에서 CFTR 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, CFTR 억제제는 Gly-H101을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 O-GlcNAcase 억제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM 및 100 μ M의 농도에서 O-GlcNAcase 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 10 nM 및 10 μ M의 농도에서 O-GlcNAcase 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, O-GlcNAcase의 억제제는 Thiamet G을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 적합한 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 적합한 배양 배지는 Connought Medical Research Laboratories 1066 보강된 소도 배지 (CMRLS) 또는 CMRLS의 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, CMRLS는 혈청으로 보강된다. 일부 구현예에서, CMRLS는 10% 우태 혈청으로 보강된다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는데 충분한 기간 동안 현탁 배양에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 7 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 7 일 내지 21 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 7 내지 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 하루 걸러 보충된다. 일부 구현예에서, 상기 산출된 세포의 적어도 30%는 SC- β 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 C-펩타이드,

인슐린, NKX6-1, Pdx1를 발현시키고, NKX6-1 및 C-펩타이드를 공발현시킨다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 인간 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 시험관내 SC-β 세포의 발생은 확장가능하다.

[0045]

일부 구현예에서, 인슐린-양성, 내분비 세포는 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 i) TGF-β 신호전달 경로 억제제, 및 ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉시켜, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하여 수득되고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시킨다.

[0046]

일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 100 nM 내지 100 μM의 농도에서 TGF-β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 10 μM의 농도에서 TGF-β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로는 TGF-β 수용체 유형 I 키나아제 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로 억제제는 Alk5 억제제 II를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μM 내지 10 μM의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 1 μM의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 트리아이오도티로닌 (T3)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 Pdx1-양성 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 i) SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성제, iii) γ-세크레타제 억제제, iv) 상기 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 및 임의로 v) 단백질 키나아제 억제제 중 적어도 하나와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μM 및 0.5 μM의 농도에서 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.25 μM의 농도에서 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.01 μM 내지 1.0 μM의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μM의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 RA를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μM 내지 10 μM의 농도에서 γ-세크레타제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 1 μM의 농도에서 γ-세크레타제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, γ-세크레타제 억제제는 XXI를 포함한다. 일부 구현예에서, γ-세크레타제 억제제는 DAPT를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 2 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 20 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 단백질 키나아제 억제제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 10 nM 내지 1 μM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 100 nM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 상기 세포의 집단을 글루코오스에 노출시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 1 mM 내지 50 mM의 농도에서 글루코오스에 노출된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 25 mM의 농도에서 글루코오스에 노출된다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는데 충분한 기간 동안 현탁 배양에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 7 일이다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 하루 걸러 보충된다. 일부 구현예에서, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 15%는 유도되어 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 99%는 유도되어 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다.

[0047]

일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) 저농도의 RA 신호전달 경로 활성제와, 5 일의 기간 동안 접촉시켜 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 중 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 수득되고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다.

[0048] 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 1 ng/mL 내지 100 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 50 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 케라틴생성세포 성장 인자 (KGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF2, FGF8B, FGF10, 및 FGF21로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M 및 0.5 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.25 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.01 μ M 내지 1.0 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 RA를 포함한다. 일부 구현예에서, 이 방법은 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 2 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 20 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF를 포함한다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 적합한 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 하루 걸러 보충된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 5일 동안에 현탁 배양에 추가되지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 5일 전에 현탁 배양으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 PdbU를 포함한다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 5일 동안에 현탁 배양에 추가되지 않는다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 5일 전에 현탁 배양으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 LDN193189를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 집단 중 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 10%는 유도되어 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 95%는 유도되어 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다.

[0049] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기의 단계를 포함하는, 만능 세포로부터 SC- β 세포를 생성하는 방법을 제공한다: a) 집단 중 만능 줄기 세포를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키는 단계; b) 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) RA 신호전달 경로 활성제와, 5 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 집단 중 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시키는 단계; c) Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 i) TGF- β 신호전달 경로 억제제, b) TH 신호전달 경로 활성제, 및 임의로 c) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성제, iii) γ -세크레타제 억제제, 및 vi) 상기 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와, 5 내지 7 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시키는 단계; 및 d) 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) 형질전환 성장 인자 β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제, 및 임의로 iii) 단백질 키나아제 억제제와, 7 내지 14 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부를 SC- β 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 SC- β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 GSIS 반응을 나타내는 단계.

[0050] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기의 단계를 포함하는, 만능 세포로부터 SC- β 세포를 생성하는 방법을 제공한다: a) 집단 중 적어도 일부 만능 세포를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키는 단계; b) 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) KGF, ii) Sant1, 및 임의로 iii) 저농도의 RA와, 5 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 집단 중 적어도 하나의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-

1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시키는 단계; c) 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 i) Alk5 억제제 II, ii) T3, 및 임의로 iii) Sant1, iv) RA, v) XXI, 및 vi) 베타셀룰린과, 5 내지 7 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시키는 단계; 및 d) 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) Alk5 억제제 II, ii) T3, 및 임의로 iii) 스타우로스포린과, 7 내지 14 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-생산 내분비 세포의 적어도 일부의 SC-β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부를 SC-β 세포로 분화시키는 단계, 상기 SC-β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 GSIS 반응을 나타내는 단계.

[0051] 일부 측면에서, 개시내용은 만능 줄기 세포로부터 시험관내 분화된 SC-β 세포를 포함하는 인공 소도를 제공한다.

[0052] 일부 측면에서, 개시내용은 만능 줄기 세포로부터 시험관내 분화된 SC-β 세포를 포함하는 인공 췌장을 제공한다.

[0053] 달리 나타내지 않으면, 본 발명의 실시는 전형적으로 당분야의 기술 내인 세포 생물학, 세포 배양, 분자 생물학, 형질전환 생물학, 미생물학, 재조합 핵산(예를 들면, DNA) 기술, 면역학, 및 RNA 간섭(RNAi)의 종래 기술을 채용할 것이다. 특정한 이들 기술의 비제한적인 설명은 하기 간행물에서 확인된다: [Ausubel, F., 등 (eds.), Current Protocols in Molecular, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology, all John Wiley & Sons, N.Y., edition as of December 2008; Sambrook, Russell, and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. and Lane, D., Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2005]. 치료제 및 인간 질환에 관한 비제한적인 정보는 [Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed., McGraw Hill, 2005, Katzung, B. (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, McGraw-Hill/Appleton & Lange; 10th ed. (2006) 또는 11th edition (July 2009)]에서 확인된다. 유전자 및 유전 장애에 관한 비제한적인 정보는 [McKusick, V.A.: Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12th edition) 또는 보다 최근의 온라인 데이터베이스: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2010년 5월 1일자, World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> and in Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA), a database of genes, inherited disorders and traits in animal species (other than human and mouse), <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>]에서 확인된다. 본원에서 언급된 모든 특허, 특허 출원, 및 다른 간행물(예를 들면, 과학 기사, 서적, 웹사이트 및 데이터베이스)은 본원에 그 전문이 참고로 편입된다. 본 명세서 및 임의의 편입된 참조문헌 간에 상충이 있는 경우, 명세서(편입된 참조문헌에 기반할 수 있는 이들의 임의 보정을 포함)가 우선이 된다. 달리 나타내지 않으면, 용어의 분야에서 수용되는 표준 의미가 본원에서 이용된다. 다양한 용어에 대한 표준 약어가 본원에서 이용된다.

도면의 간단한 설명

[0054] 특허 또는 출원 파일은 칼라로 제작된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 칼라 도면을 포함하는 본 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 시 필요 경비를 지급하면 특허청에서 제공될 것이다.

도 1a 및 1b는 이전에 공개된 조절 분화 방법 및 새로 유도된 분화 방법 간의 비교를 나타낸다. 도 1a는 이전에 공개된 조절 분화 방법에 비해 hPSC로부터 INS+ 세포를 생성하기 위한 개시내용의 예시적인 유도된 분화 방법을 비교하는 모식도를 나타낸다. 도 1b는 각각 이전에 공개된 조절 분화 방법을 이용하여 미분화되고(상단부), DE로 분화되고(중간), 및 PP1로 분화되고(하단부) OCT4, SOX17, 및 PDX1로 염색된 HUES8의 조직학적 섹션을 예시한다. 기준자=100 μM.

도 2a, 2b 및 2c는 일차 인간 β 세포와 같이 여러 순차적인 고 글루코오스 챌린지에 반응하여 인슐린을 분비하도록 시험관내 생성된 줄기 세포-유도된 β (SC- β) 세포를 나타낸다. 도 2a, 2b, 및 2c는 순차적으로 2, 20, 2, 20, 2, 및 20 mM 글루코오스로 챌린지된 SC- β (도 2a), 일차 β 세포(도 2b), 및 PH 세포(도 2c)로부터 분비된 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 순차적인 저/고 글루코오스 챌린지 후, 세포를 30 mM KCl로 탈분극화하였다.

도 3a, 3b, 및 3c는 일차 β 세포와 같이 여러 순차적인 고 글루코오스 챌린지에 반응하여 인슐린을 분비하도록 시험관내-유도된 SC- β 세포의 추가의 생물학적 복제물을 나타낸다. 좌측 패널은 도 2에서와 동일하다. 세포 SC- β 세포(SC- β ; 도 3a), 일차 β 세포(1° β ; 도 3b), 및 PH 세포(도 3c)를 순차적으로 2, 20, 2, 20, 2, 및 20 mM 글루코오스 및 30 mM KCl로 챌린지하고 인간 인슐린을 ELISA로 측정하였다.

도 4a, 4b, 4c, 4d 및 4e는 SC- β 세포가 일차 β 세포와 같이 여러 순차적인 고 글루코오스 챌린지에 반응하여 세포질 Ca^{2+} 를 유동시킴을 나타낸다. 도 4a는 Fluo-4 AM 염색을 이용한 세포질 Ca^{2+} 의 집단 수준 및 단일 세포 수준 검출의 도식적 묘사이다. 집단 수준 측정을 개인의 전체 클러스터(모식도에서 큰 빨간색 원으로 표시함) 상에서 취하였고, 온전한 클러스터(작은 빨간색 원으로 표시함) 내의 개별 세포를 단일 세포 분석을 위해 분석하였다. 도 4b는 순차적으로 2, 20, 2, 20, 2, 및 20 mM 글루코오스 및 30 mM KCl로 챌린지된 SC- β 세포, 일차 β 세포, 및 PH 세포에 대한 정규화된 역학적 Fluo-4 형광 세기의 집단 측정을 나타내는 그래프이다. 도 4c는 단일 세포 분석에서 사용된 Fluo-4 AM 염색의 형광 이미지를 나타낸다. 도 4d는 3(노란색), 2(오렌지색), 1(파란색), 및 0(빨간색) 글루코오스 챌린지에 반응한 단일 세포의 위치를 나타내는 대표적인 이미지를 나타낸다. 도 4e는 20 mM 글루코오스에 반응한 SC- β 세포($n=156$), 일차 β 세포($n=114$), 및 PH 세포($n=138$) 빈도의 그래프 정량을 나타낸다. 기준자 = 100 μm .

도 5a, 5b, 5c, 5d, 5e 및 5f는 SC- β 가 단백질 및 유전자 발현 수준에서 인간 β 세포 마커를 발현함을 나타낸다. 도 5a는 C-펩타이드(녹색), NKX6-1(빨간색), 및 소마토스타틴(회색)에 대해 염색된 세포의 면역조직화학 이미지를 나타낸다. 도 5b는 C-펩타이드(녹색) 및 PDX1(빨간색)에 대해 염색된 세포의 면역조직화학 이미지를 나타낸다. 도 5c는 상응하는 DAPI 염색(파란색)과 함께 C-펩타이드(녹색) 및 글루카곤(빨간색)으로 염색된 세포의 면역조직화학 이미지를 나타낸다. 도 5d는 C-펩타이드 및 NKX6-1에 대해 염색된 세포의 대표적인 유세포측정 점 그래프 및 집단 퍼센트를 나타낸다. 도 5e는 INS에 대해 분급된 미분화된 HUES8, PH 세포, 태아 β 세포, 및 성체 일차 β 세포(Hrvatin 등(Hrvatin 등, 2014)의 데이터), 및 INS 및 NKX6-1에 대해 분급된 SC- β 세포(SC- β)의 마이크로어레이로 측정된 모든 유전자에 기반한 계층 클러스터링 분석을 나타낸다. 도 5f는 모든 샘플에 걸쳐 가장 큰 변이를 갖는 100 개 유전자의 열 맵을 나타낸다. CP=C-펩타이드, SST=소마토스타틴, GCG=글루카곤. 기준자=100 μm .

도 6은 DAPI(파란색), 인슐린(녹색), C-펩타이드(빨간색)에 대해 염색된 SC- β 세포 클러스터의 조직학을 나타낸다. 기준자=100 μm .

도 7a, 7b, 및 7c는 SC- β 세포의 추가의 조직학적 염색을 나타낸다. 도 7a는 C-펩타이드(녹색) 및 ISL1(빨간색)에 대한 염색을 나타낸다. 도 7b는 C-펩타이드(녹색) 및 MAFA(빨간색)에 대한 염색을 나타낸다. 도 7c는 C-펩타이드(녹색) 및 MAFB(빨간색)에 대한 염색을 나타낸다. 기준자=100 μm .

도 8a, 8b 및 8c는 C-펩타이드 및 SST(도 8a), C-펩타이드 및 GCG(도 8b), 및 SST 및 GCG(도 8c)에 대해 염색된 SC- β 세포 및 PH 세포의 대표적인 유세포측정 점 그래프 및 집단 퍼센트를 나타낸다.

도 9a, 9b 및 9c는 SC- β 세포 과립이 일차 인간 β 세포 과립과 구조적으로 유사함을 나타낸다. 도 9a는 대표적인 결정화된 인슐린 과립(빨간색), 초기 인슐린 과립(노란색), 및 혼합된 내분비 과립(파란색)을 강조하는 과립의 전자 현미경검사 이미지를 나타낸다. 기준자=500 nm. 도 9b는 (도 9a)에서 강조된 과립의 고배율 이미지를 나타낸다. 기준자=500 nm. 도 9c는 인슐린(더 작은 5 nm 검은색 점) 및/또는 글루카곤(더 큰 15 nm 검은색 점)을 함유하는 과립을 나타내는 면역금 염색으로 표지된 세포의 전자 현미경검사 이미지를 나타낸다. 대표적인 면역금 입자를 빨간색 화살표(인슐린) 및 파란색 화살표(글루카곤)로 강조한다. 기준자=100 nm.

도 10a 및 10b는 hiPSC로부터 생성된 줄기 세포-유도된 β (SC- β) 세포가 일차 인간 β 세포와 같이 여러 순차적인 고 글루코오스 챌린지에 반응하여 인슐린을 시험관내 분비함을 나타낸다. 도 10a 및 10b는 순차적으로 2, 20, 2, 20, 2, 및 20 mM 글루코오스로 챌린지된 비-당뇨병 세포(도 10a) 및 1형 당뇨병 세포(도 10b)로부터 생성된 SC- β 에서 분비된 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다.

도 11a, 11b, 11c, 11d, 11e, 및 11f는 여러 hiPSC 세포주로부터 C-펩타이드 및 NKX6-1에 대해 염색된 세포의

대표적인 유세포측정 점 그래프 및 집단 퍼센트를 나타낸다. 도 11a, 11b, 및 11c는 비-당뇨병 hiPSC 세포주로부터 C-펩타이드 및 NKX6-1에 대해 염색된 세포의 대표적인 유세포측정 점 그래프 및 집단 퍼센트를 나타낸다. 도 11d, 11e, 및 11f는 1형 당뇨병 hiPSC 세포주로부터 C-펩타이드 및 NKX6-1에 대해 염색된 세포의 대표적인 유세포측정 점 그래프 및 집단 퍼센트를 나타낸다.

도 12a, 12b, 12c 및 12d는 이식된 SC-β 세포가 생체내에서 빠르게 기능함을 나타낸다. 도 12a는 SC-β 세포(최종 시험관내 단계에서 1주 동안 배양됨), 일차 인간 β 세포(1° β), 또는 PH 세포가 이식된 개별 마우스 혈청으로부터 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 측정을 이식 2주 후 마우스의 글루코오스 주사 전(흰색 막대) 및 30 분 후(검은색 막대)에 취하였다. 도 12b는 그래프의 존재를 확인하기 위해 C-펩타이드(녹색) 및 PDX1(빨간색)로 염색된 (도 12a)에서 이식된 세포의 면역조직화학 이미지를 나타낸다. 도 12c는 췌장 조상세포가 이식된 개별 마우스 혈청으로부터 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 측정을 이식 2주 후 마우스의 글루코오스 주사 전(흰색 막대) 및 30 분 후(검은색 막대)에 취하였다. 도 12d는 최종 시험관내 단계 중 2주 동안 배양된 SC-β 세포가 이식된 개별 마우스 혈청으로부터 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 측정을 이식 2주 후 마우스의 글루코오스 주사 30 분 후(검은색 막대)에 취하였다. nd=결정되지 않음. 기준자=100 μm.

도 13a 및 13b는 2주 전에 마우스에 이식된 SC-β 세포 및 PH 세포의 추가의 조직학적 섹션을 나타낸다. 도 13a는 DAPI(파란색), C-펩타이드(녹색), 및 GCG(빨간색)에 대해 염색된 그래프의 저배율 이미지를 나타낸다. 기준자 = 200 μm. 도 13b는 C-펩타이드(녹색) 및 GCG(빨간색)에 대해 염색된 그래프의 고배율 이미지를 나타낸다. 기준자 = 100 μm.

도 14a, 14b 및 14c는 SC-β 세포가 더 많은 인슐린을 생체내 분비하도록 하는 마지막 분화 단계에서의 배지의 사용을 나타낸다. 도 14a는 분화 공정의 다양한 단계에서 다양한 배지의 사용을 나타내는 모식도를 나타낸다. 도 14b는 마지막 분화 단계에서 CMRL 배지에 대한 추가의 인자, 예컨대 Sant1, XXI, 및 SSP의 첨가가 고 및 저 글루코오스 챌린지 간 자극 지수로 측정되는 SC-β 세포에 의한 더 우수한 글루코오스 자극된 인슐린 분비(GSIS) 반응을 생성함을 나타낸다. 도 14c는 마지막 분화 단계에서 CMRL 배지에 대한 추가의 인자, 예컨대 Sant1, XXI, 및 SSP의 첨가가 방출된 인슐린 양으로 측정되는 SC-β 세포에 의한 더 우수한 글루코오스 자극된 인슐린 분비(GSIS) 반응을 생성함을 나타낸다.

도 15a, 15b, 15c, 15d, 15e, 15f, 15g, 15h 및 15i는 생성된 SC-β 세포의 생존 및 품질을 증강시킬 수 있는 프로토콜에 대한 변형을 나타낸다. 도 15a는 프로토콜의 도식적 실례이다. 도 15b는 더 많은 순수한 NKX6.1+ 내 분비 클러스터가 변형된 프로토콜을 이용해서 어떻게 생성될 수 있는지를 나타낸다(도 15b). 도 15c는 단계 3-5에서 Rock 억제제의 사용이 어떻게 세포 생존을 개선할 수 있는지를 나타낸다. 도 15d는 니코틴아미드와 함께 액티빈 A의 사용이 어떻게 SOX2를 하향조절하고 세포 생존을 개선할 수 있는지를 나타낸다. 도 15e는 SOX2 및 NKX6-1이 상호 배타적임을 나타낸다. 도 15f는 단계 6에서 스타우로스파우린의 사용이 어떻게 거의 순수한 내분비 집단을 생성하는지를 나타내며 도 15g는 단계 6에서 스타우로스파우린의 사용이 어떻게 더 높은 퍼센트의 NKX6-1/C-펩타이드+ 세포를 생성하는지를 나타낸다. 도 15i는 Alk5i 및 T3만의 사용(도 15H)과 비교되는 경우 단계 5-6에서 Alk5i 및 T3와 조합된 XXI의 사용이 어떻게 NeuroD+ 집단을 증가시키는지를 나타낸다.

도 16a, 16b, 16c, 16d, 16e, 16f, 16g, 16h 및 16i는 당뇨병 요법 또는 약물 발견 플랫폼으로서의 SC-β 세포의 임상적 유용성을 나타낸다. 도 16a는 당뇨병을 치료하기 위한 또는 기능 또는 복제를 개선하기 위한 약물을 스크리닝하기 위한 SC-β 세포의 유용성의 도식적 실례이다. 도 16b는 조사된 당뇨병 약물 및 그것의 일반적인 치료 카테고리를 기재하는 표이다. 도 16c는 2 및 20 mM 글루코오스 중 명시된 약물로 처리된 집중된 SC-β 세포로부터 분비된 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 명시된 p 값은 약물 및 대조군 간에 20 mM 글루코오스에서의 인슐린 값을 비교한다. 도 16d는 처리 없이 DAPI(파란색), C-펩타이드(녹색), 및 Ki67(빨간색)로 염색된 분산된 및 집중된 SC-β 세포의 면역형광 이미지이다. 도 16e는 48시간 동안 프롤라틴으로 처리된, DAPI(파란색), C-펩타이드(녹색), 및 Ki67(빨간색)로 염색된 분산된 및 집중된 SC-β 세포의 면역형광 이미지이다. 도 16f는 C-펩타이드 및 Ki67을 공동 발현하는 세포 분획의 그래프 정량을 나타낸다. *p<0.05. 도 16g는 SC-β 세포(n=6) 또는 PH 세포(n=6)가 이식된 Akita 마우스의 공복 혈당 측정을 나타내는 그래프이다. *동일한 날 두 세포군을 비교하여 p<0.05. 도 16h는 SC-β 세포 또는 PH 세포가 이식된 진행성 당뇨병 Akita 마우스로부터의 혈당 측정을 나타내는 그래프이다. 측정을 2주 전에 이식된 마우스의 글루코오스 주사 전(흰색 막대) 및 20 분 후(검은색 막대)에 취하였다. 글루코오스 측정은 550 mg/dL에서 포화되었다. *글루코오스 주사 후 같은 시점에 2 세포군을 비교하여 p<0.05. 도 16i는 글루코오스 주사 후 20 분에 Akita 마우스의 혈청으로부터 인간 인슐린의 ELISA 측정을 나타내는 그래프이다. 마우스에 이식 2주 후 글루코오스를 챌린지하였다. *2 세포

군을 비교하여 $p < 0.05$. 기준자=50 μm .

도 17은 SC- β 세포(n=6) 또는 PH 세포(n=6)가 이식된 Akita 마우스의 체중을 나타내는 그래프이다. *18 및 28 d 시점에 두 세포군을 비교하여 $p < 0.05$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 발명의 상세한 설명
- [0056] 개시내용의 측면은 세포 요법, 분석(예를 들면, 약물 스크리닝), 및 다양한 치료 방법에서 사용하기 위한 조성물, 방법, 키트, 및 제제에 의해 생산된 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체(예를 들면, iPS 세포, hESCs, 완성 내배엽 세포, 원시 소화관 세포, Pdx1-양성 췌장 선조 세포, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포, Ngn3-양성 내분비 선조 세포 등), 및 SC- β 세포로부터 줄기 세포-유도된 β (SC- β) 세포(예를 들면, 성숙 췌장 β 세포)를 생성하기 위한 조성물, 방법, 키트, 및 제제에 관한 것이다.
- [0057] 또한, 개시내용의 측면은 선별 마커를 채용할 필요 없이 형태적 기준뿐만 아니라 기능적 특징, 예컨대 인슐린을 발현하고, 하나 이상의 글루코오스 켈린지에 반응하여 인슐린을 분비하고, 성숙 GSIS 반응을 나타내고, 생체내 췌장에서 소도로 조직화되며, 전형적으로 약 9-15 μm 직경의 소 스펀들 유사 세포를 갖는 능력에 기반하여 검출 가능한 SC- β 세포의 동정 방법에 관한 것이다.
- [0058] 또한, 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자의 동정 방법에 관한 것이다. 당해분야의 숙련가는 특정한 β 세포 성숙 인자가 기능적인지를 당해기술에 공지된 분석을 이용해서 인지하거나 쉽게 확인할 수 있을 것이다. 예를 들면, β 세포 성숙 인자가 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 SC- β 세포로 전환하는 능력은 본원에서 개시된 바와 같은 분석을 이용해서 평가될 수 있다. 다른 편리한 분석에는 검출가능한 마커, 예컨대 루시페라아제를 인코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 β 세포 마커 결합 부위를 함유하는 리포터 구축물의 전사를 활성화하는 능력의 측정이 포함된다. 하나의 분석에는 후보 β 세포 성숙 인자가 본원에서 개시된 바와 같이 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포를 유도하여, SC- β 세포가 되거나 β 세포의 마커를 발현하거나 성숙 β 세포의 기능적 특징을 나타내는지의 결정이 관여된다. 그와 같은 β 세포 마커의 발현 결정은 임의의 적합한 방법, 예를 들면 면역블로팅을 이용해서 결정될 수 있다. 그와 같은 분석은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 SC- β 세포로 직접 전환하는 제제의 활성을 확인하거나 동정하기 위해 쉽게 이용될 수 있다.
- [0059] 본원에 기재된 본 발명의 방법에 따라 생성된 시험관내-성숙된, SC- β 세포(즉, 췌장 β 세포)는 많은 이점을 나타낸다, 예를 들면 이들은 시험관내 글루코오스 자극된 인슐린 분비를 수행하고, 유전자 발현 및 초미세구조에 의해 인간 소도 β 세포를 모방하고, 마우스 내에 이식되는 경우 인간 인슐린을 분비하고 고혈당증을 완화시키며, 세포 요법(예를 들면, 추가의 및/또는 기능적 β 세포를 필요로 하는 대상체 내로의 이식), 약물 스크리닝(예를 들면, 인슐린 생산/분비, 생존, 탈분화 등에 대해), 연구(예를 들면, 정상 및 당뇨병 β 세포 간 기능 차이를 결정), 및 조직 엔지니어링(예를 들면, 소도를 재구성하는데 있어 제1 세포형으로 SC- β 세포를 위한 새로운 플랫폼을 제공한다).
- [0060] 정의
- [0061] 편의상, 본원, 명세서, 실시예 및 첨부된 청구범위에서 이용된 특정 용어들이 여기에 수집된다. 달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명에 속하는 당해분야의 숙련가가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0062] 용어 "분화된 세포"는 그 원상태 형태에서 본원에서 정의된 용어에서와 같이 만능이 아닌 임의의 1차 세포를 의미한다. 다른 방식으로 언급하면, 용어 "분화된 세포"는 세포 분화 공정에서 덜 특화된 세포형 세포에서 유도된 더 특화된 세포형 세포(예를 들면, 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포)를 나타낸다. 이론에 제한되고자 하지 않고, 정상 개체발생 과정에서의 만능 줄기 세포는 먼저 췌장 세포 및 다른 내배엽 세포형을 형성할 수 있는 내배엽 세포로 분화될 수 있다. 내배엽 세포의 추가 분화는 췌장 경로로 이어지며, 여기서 ~98%의 세포는 외분비, 소도관, 또는 매트릭스 세포가 되고, ~2%는 내분비 세포가 된다. 초기 내분비 세포는 소도 조상세포이며, 이는 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 또는 췌장 폴리펩타이드를 분비하는 인슐린-생산 세포(예를 들면 기능적 내분비 세포)로 추가 분화될 수 있다. 내배엽 세포는 또한 내배엽 기원의 다른 세포, 예를 들면 폐, 간, 장자, 가슴샘 등으로 분화될 수 있다.
- [0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "체세포"는 생식계열 세포와 대조되어, 유기체의 신체를 형성하는 임의 세포

를 나타낸다. 포유동물에서, 생식계열 세포("생식세포"로도 공지됨)는 수정 동안 융합하여 전체 포유동물 배아가 발생하는 접합자로 불리는 세포를 생산하는 정자 및 난자이다. 이들이 제조되는 세포(생식모세포) 및 미분화된 줄기 세포인 정자 및 난자와 달리, 포유동물 신체에서의 모든 다른 세포형은 체세포이다: 내부 기관, 피부, 뼈, 혈액, 및 결합 조직은 모두 체세포로 제조된다. 일부 구현예에서, 체세포는 "비-배아 체세포"로, 이는 배아에 존재하거나 그로부터 획득되지 않고 시험관내에서 그와 같은 세포의 증식으로 생성되지 않는 체세포를 의미한다. 일부 구현예에서, 체세포는 "성체 체세포"로, 이는 배아 또는 태아 이외의 유기체에 존재하거나 이로부터 획득되거나, 시험관내에서 그와 같은 세포의 증식으로 생성되는 세포를 의미한다. 달리 나타내지 않으면, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 인슐린-생산, 글루코오스 반응성 세포로 전환하는 방법은 생체내 및 시험관내에서 모두 수행될 수 있다(여기서 생체내는 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체가 대상체 내에 존재하는 경우 실시되며, 시험관내는 단리된 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 배양 중 유지된 이들의 전구체를 이용해서 실시됨).

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "성체 세포"는 배아 발생 후 신체에 걸쳐 확인되는 세포를 나타낸다.

[0065] 용어 "내배엽 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 매우 초기 배아에서의 세 일차 배세포층 중 하나로부터의 세포를 나타낸다(나머지 두 배세포층은 중배엽 및 외배엽임). 내배엽은 3층의 최내층이다. 내배엽 세포는 먼저 배아 내장이 된 다음 호흡기 및 소화기 도관의 내층(예를 들면 창자), 간 및 췌장으로 분화된다.

[0066] 용어 "내배엽 기원 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 내배엽 세포로부터 발생하거나 분화된 임의의 세포를 나타낸다. 예를 들면, 내배엽 기원 세포에는 간, 폐, 췌장, 가슴샘, 창자, 위 및 갑상샘의 세포가 포함된다. 이론에 구애받지 않고, 간 및 췌장 조상세포(또한 췌장 조상세포로도 불림)는 배아 앞창자의 내배엽 세포로부터 발생한다. 그 특화 직후, 간 및 췌장 조상세포는 현저하게 상이한 세포 기능 및 재생능을 빠르게 획득한다. 이들 변화는 척추동물 간에 고도 보존된 유도 신호 및 유전적 조절 인자에 의해 유발된다. 기관의 발생 및 재생에 대한 관심은 간부전 및 I형 당뇨병의 치료적 처치에서 간세포 및 췌장 β 세포에 대한 강한 필요성에 의해 유도되었다. 다양한 모델 유기체 및 인간에서의 연구는 간 및 췌장 세포의 분화를 야기하고 다양한 줄기 및 조상세포 세포형으로부터 간세포 및 β 세포의 분화를 어떻게 촉진하는지에 대한 지침을 제공하는 진화적으로 보존된 유도 신호 및 전사 인자 네트워크를 드러내었다.

[0067] 용어 "완성 내배엽"은 본원에서 사용된 바와 같이 내배엽 세포로부터 분화되고 SC- β 세포(예를 들면, 췌장 β 세포)로 분화될 수 있는 세포를 나타낸다. 완성 내배엽 세포는 마커 Sox17을 발현한다. 완성 내배엽 세포의 다른 마커 특징에는 비제한적으로 MIXL2, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CXCR4, Cerberus, OTX2, goosecoid, C-Kit, CD99, CMKOR1 및 CRIP1이 포함된다. 특히, 본원의 완성 내배엽 세포는 Sox17을, 일부 구현예에서는 Sox17 및 HNF3B를 발현하며, 유의미한 수준의 GATA4, SPARC, APF 또는 DAB을 발현하지 않는다. 완성 내배엽 세포는 마커 Pdx1에 대해 양성인 아니다(예를 들면 이들은 Pdx1-음성임). 완성 내배엽 세포는 간, 폐, 췌장, 가슴샘, 창자, 위 및 갑상샘의 세포를 포함하는 세포로의 분화능을 갖는다. 완성 내배엽의 Sox17 및 다른 마커의 발현은 숙련자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면 항-Sox17 항체를 이용하는 면역화학, 또는 정량적 RT-PCR에 의해 평가될 수 있다.

[0068] 용어 "췌장 내배엽"은 췌장 β 세포를 포함하는 다중 췌장 계통으로 분화될 수 있지만 비-췌장 계통으로의 분화능은 더 이상 갖지 않는 내배엽 기원 세포를 나타낸다.

[0069] 용어 "원시 소화관 세포" 또는 "소화관 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 내배엽 세포로부터 분화되고 SC- β 세포(예를 들면, 췌장 β 세포)로 분화될 수 있는 세포를 나타낸다. 원시 소화관 세포는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현한다: HNF1- β , HNF3- β 또는 HNF4- α . 원시 소화관 세포는 폐, 간, 췌장, 위, 및 창자의 세포를 포함하는 세포로의 분화능을 갖는다. 원시 소화관의 HNF1- β 및 다른 마커의 발현은, 숙련자에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면 항-HNF1- β 항체를 이용하는 면역화학에 의해 평가될 수 있다.

[0070] 용어 "췌장 조상세포", "췌장 내분비 조상세포", "췌장 전구체" 또는 "췌장 내분비 전구체"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 췌장 내분비 세포, 췌장 외분비 세포 또는 췌관 세포를 형성할 수 있는 췌장 호르몬 발현 세포가 될 수 있는 줄기 세포를 나타낸다. 이들 세포는 적어도 한 유형의 췌장 세포; 예를 들면 인슐린을 생산하는 베타 세포; 글루카곤을 생산하는 알파 세포; 소마토스타틴을 생산하는 델타 세포(또는 D 세포); 및/또는 췌장 폴리펩타이드를 생산하는 F 세포로 분화되도록 위탁된다. 그와 같은 세포는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현할 수 있다: NGN3, NKX2.2, NeuroD, ISL-1, Pax4, Pax6, 또는 ARX.

[0071] 용어 "pdx1-양성 췌장 조상세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 SC- β 세포, 예컨대 췌장 β 세포로의 분화능을

갖는 췌장 내배엽(PE) 세포인 세포를 나타낸다. Pdx1-양성 췌장 조상세포는 마커 Pdx1을 발현한다. 다른 마커에는 비제한적으로 Cdcpl, 또는 Ptf1a, 또는 HNF6 또는 NRx2.2가 포함된다. Pdx1의 발현은 숙련가에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면 항-Pdx1 항체를 이용하는 면역화학, 또는 정량적 RT-PCR에 의해 평가될 수 있다.

[0072] 용어 "pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 인슐린-생산 세포, 예컨대 췌장 β 세포로의 분화능을 갖는 췌장 내배엽(PE) 세포인 세포를 나타낸다. pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포는 마커 Pdx1 및 NKX6-1을 발현한다. 다른 마커에는 비제한적으로 Cdcpl, 또는 Ptf1a, 또는 HNF6 또는 NRx2.2가 포함된다. NKX6-1의 발현은 숙련가에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면 항-NKX6-1 항체를 이용하는 면역화학, 또는 정량적 RT-PCR에 의해 평가될 수 있다.

[0073] 용어 "Ngn3-양성 내분비 조상세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 전사 인자 뉴로게닌-3(Ngn3)을 발현하는 췌장 내분비 세포의 전구체를 나타낸다. 선조 세포는 다능 줄기 세포보다 더 분화되며, 몇몇 세포형으로만 분화될 수 있다. 특히, Ngn3-양성 내분비 선조 세포는 5 개의 췌장 내분비 세포형(α , β , δ , ϵ 및 PP)으로의 분화능을 갖는다. Ngn3의 발현은 숙련가에게 공지된 임의의 방법, 예를 들면 항-Ngn3 항체를 이용하는 면역화학, 또는 정량적 RT-PCR에 의해 평가될 수 있다.

[0074] 용어들 "NeuroD" 및 "NeuroD1"은 상호교환적으로 이용되며, 췌장 내분비 선조 세포에서 발현된 단백질 및 이를 인코딩하는 유전자를 나타낸다.

[0075] 용어들 "인슐린-양성 β -유사 세포" 및 "인슐린-양성 내분비 세포"는 췌장 β 세포를 시사하는 적어도 하나의 마커를 나타내며, 또한 내인성 β 세포의 GSIS 반응 특징이 없는 인슐린을 발현하는 세포(예를 들면, 췌장 내분비 세포)를 나타낸다.

[0076] 이 용어는 인슐린-양성 내분비 세포에 관련되므로, "이들의 전구체"는, 예를 들면 전구체 세포가 인슐린-양성 내분비 세포로 분화되기 적합한 조건 하에 배양되는 경우, 만능 줄기 세포, 완성 내배엽 세포, 원시 소화관 세포, 췌장 선조 세포, 또는 내분비 선조 세포를 포함하는 인슐린-양성 내분비 세포로 분화될 수 있는 임의의 세포를 나타낸다.

[0077] 용어들 "줄기 세포-유도된 β 세포", "SC- β 세포", "기능적 β 세포", "기능적 췌장 β 세포" 및 "성숙 SC- β 세포"는 췌장 β 세포를 시사하는 적어도 하나의 마커(예를 들면, PDX-1 또는 NKX6-1)를 나타내고, 인슐린을 발현하고, 내인성 성숙 β 세포의 GSIS 반응 특징을 나타내는 세포(예를 들면, 췌장 β 세포)를 나타낸다. 일부 구현예에서, "SC- β 세포"는 성숙 췌장 β 세포를 포함한다. 개시내용의 방법은 개시점으로서 임의의 세포를 이용하여(예를 들면, 배아 줄기 세포, 유도된-만능 줄기 세포, 선조 세포, 부분적으로 재프로그래밍된 체세포(예를 들면, 유도된 만능 줄기 세포 및 이것이 유도된 체세포 사이의 중간 상태로 부분적으로 재프로그래밍된 체세포), 다능 세포, 전능 세포, 임의의 전술된 세포의 전환분화된 버전 등을 이용할 수 있으나, 본 발명은 이런 식으로 제한되려는 것이 아님) 임의의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체로부터 SC- β 세포를 유도할 수 있으므로, SC- β 세포가 줄기 세포로부터 (예를 들면, 직접적으로)유도되어야 하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 여러 글루코오스 챌린지(예를 들면, 적어도 하나, 적어도 2, 또는 적어도 3 이상의 순차적인 글루코오스 챌린지)에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 반응은 여러 글루코오스 챌린지에 대한 내인성 소도(예를 들면, 인간 소도)의 반응을 모방한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포의 형태는 내인성 β 세포의 형태를 모방한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응을 모방하는 시험관내 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응을 모방하는 생체내 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응을 모방하는 시험관내 및 생체내 GSIS 반응을 모두 나타낸다. SC- β 세포의 GSIS 반응은 숙주(예를 들면, 인간 또는 동물) 내로의 SC- β 세포의 이식 2주 이내에 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 인슐린을 분비 과립 내로 패키징화한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 캡슐화된 결정성 인슐린 과립을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 1 초과의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 1.1 초과의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 2 초과의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 사이토카인에 반응하여 사이토카인-유도된 세포자멸사를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포로부터의 인슐린 분비는 공지된 항당뇨병 약물(예를 들면, 분비촉진제)에 반응하여 증대된다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 모노호르몬이다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 다른 호르몬, 예컨대 글루카곤, 소마토스타틴 또는 췌장 폴리펩타이드를 비정상적으로 공동 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 낮은 복제율을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 글루코오스에 반응하여 세포내 Ca^{2+} 를 증가시킨다. 용어 "외분비 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 외분배샘, 즉 도관을 통해 그 분비를 배출하는 샘의 세포를 나타낸다. 특정 구현예에서, 외분비 세포는 췌장 외분비 세포

를 나타내며, 이는 작은 창자 내로 분비되는 효소를 생산하는 췌장 세포이다. 이들 효소는 이것이 위장관을 통해 통과하는 음식을 소화시키는 것을 돕는다. 췌장 외분비 세포는 랑게르한스섬으로도 공지되어 있으며, 두 호르몬, 인슐린 및 글루카곤을 분비한다. 췌장 외분비 세포는 몇 개의 세포형 중 하나일 수 있다: 알파-2 세포(호르몬 글루카곤을 생산함); 또는 β 세포(호르몬 인슐린을 제조함); 및 알파-1 세포(조절제 소마토스타틴을 생산함). 비-인슐린-생산 외분비 세포는 본원에서 사용된 바와 같이 알파-2 세포 또는 알파-1 세포를 나타낸다. 용어 췌장 외분비 세포는 혈류 내로 분비되는 호르몬(예를 들면, 인슐린(β 세포로부터 생산됨), 글루카곤(알파-2 세포에 의해 생산됨), 소마토스타틴(델타 세포에 의해 생산됨) 및 췌장 폴리펩타이드(F 세포에 의해 생산됨)를 생산하는 췌장 세포를 나타내는 "췌장 내분비 세포"를 포괄함을 주지하라.

[0078] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "인슐린-생산 세포"는 인슐린을 분비하는 췌장 조상세포, 또는 이들의 전구체로부터 분화된 세포를 나타낸다. 인슐린-생산 세포에는 그 용어가 본원에 기재된 췌장 β 세포뿐만 아니라 항시적 또는 유도적 방식으로 인슐린을 합성하거나(즉, 인슐린 유전자를 전사하고, 프로인슐린 mRNA를 번역하고, 프로인슐린 mRNA를 인슐린 단백질로 변형함), 발현하거나(즉, 인슐린 유전자에 의해 수반되는 표현형 특성을 나타냄), 또는 분비하는(인슐린을 세포외 공간 내로 방출함) 췌장 β -유사 세포(즉, 인슐린-양성, 내분비 세포)가 포함된다. 예를 들면 본 발명의 방법에 따른 인슐린-양성, 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 SC- β 세포로의 분화에 의해 생산되는, 인슐린-생산 세포 집단은 췌장 β 세포 또는 β -유사 세포(예를 들면, 적어도 하나, 또는 적어도 2개 내인성 β 세포 특징을 갖는 세포)이고 내인성 성체 β 세포를 모방하는 GSIS 반응을 나타낼 수 있다. 본 조성물 및 방법의 신규성은 인슐린을 천연 생산하는 집단 내 세포(예를 들면, β 세포)의 존재에 의해 부정되지 않는다. 또한 예를 들면 본원에서 개시된 방법에 의해 생산된 인슐린-생산 세포 집단이 성숙 췌장 β 세포 또는 SC- β 세포를 포함할 수 있고, 또한 비-인슐린-생산 세포(즉 이들이 인슐린을 생산하거나 분비하지 않는다는 것을 제외하고 β 세포 유사 표현형을 갖는 세포)를 함유할 수 있음이 고려된다.

[0079] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "내인성 β 세포", "내인성 성숙 췌장 β 세포" 또는 "내인성 췌장 β 세포"는 췌장의 인슐린-생산 세포 또는 췌장 β 세포(β 세포) 표현형의 세포를 나타낸다. 췌장 β 세포의 표현형은 당해분야의 숙련자에게 잘 알려져 있고, 예를 들면 글루코오스 수준 증가에 반응하는 인슐린 분비, 마커 예컨대 c-펩타이드, Pdx1 폴리펩타이드 및 Glut 2의 발현뿐만 아니라 뚜렷이 다른 형태적 특징, 예컨대 생체내 췌장에서 소도로 조직화되며 전형적으로 약 9-15 μ m 직경의 소 스핀들 유사 세포를 갖는 것이 포함된다.

[0080] 용어 "SC- β 세포", "췌장 β -유사 세포", 및 "성숙 췌장 β -유사"는 본원에서 사용된 바와 같이 내인성 췌장 β 세포에 의해 발현된 인슐린 양의 적어도 15%, 또는 적어도 약 20% 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 100% 또는 100%를 초과, 예컨대 내인성 췌장 β 세포에 의해 분비된 인슐린 양의 적어도 약 1.5-배, 또는 적어도 약 2-배, 또는 적어도 약 2.5-배, 또는 적어도 약 3-배, 또는 적어도 약 4-배 또는 적어도 약 5-배 또는 약 5-배 초과를 발현하거나, 또는 대안적으로 내인성 췌장 β 세포의 적어도 하나, 또는 적어도 2개 특징, 예를 들면 비제한적으로, 글루코오스에 반응하는 인슐린 분비, 및 β 세포 마커, 예컨대 c-펩타이드, Pdx1 및 glut-2의 발현을 나타내는 본원에서 개시된 방법에 의해 생산된 세포를 나타낸다. 일 구현예에서, SC- β 세포는 불멸화된(예를 들면 배양 중 무한히 증식하는) 세포가 아니다. 일 구현예에서, SC- β 세포는 형질전환된 세포, 예를 들면 형질전환 특성, 예컨대 연결 한천에서의 성장, 또는 접착 억제의 부재를 나타내는 세포가 아니다.

[0081] 용어 " β 세포 마커"는 비제한적으로, 단백질, 펩타이드, 핵산, 단백질 및 핵산의 다형성, 스플라이스 변이체, 단백질 또는 핵산의 단편, 요소, 및 췌장 β 세포에서 특이적으로 발현되거나 존재하는 다른 분석물을 나타낸다. 예시적인 β 세포 마커에는 비제한적으로, 췌장 및 십이지장 호메오박스 1(Pdx1) 폴리펩타이드, 인슐린, c-펩타이드, 아밀린, E-카드헤린, Hnf3 β , PCI/3, β 2, Nkx2.2, NKX6-1, GLUT2, PC2, ZnT-8, Isl1, Pax6, Pax4, NeuroD, Hnf1b, Hnf-6, Hnf-3beta, 및 MafA, 및 [Zhang 등, Diabetes. 50(10):2231-6(2001)]에 기재된 것들이 포함된다. 일부 구현예에서, β 세포 마커는 핵의 3-세포 마커이다. 일부 구현예에서, β 세포 마커는 Pdx1 또는 PH3이다.

[0082] 용어 "췌장 내분비 마커"는 비제한적으로 단백질, 펩타이드, 핵산, 단백질 및 핵산의 다형성, 스플라이스 변이체, 단백질 또는 핵산의 단편, 요소, 및 췌장 내분비 세포에서 특이적으로 발현되거나 존재하는 다른 분석물을 나타낸다. 예시적인 췌장 내분비 세포 마커에는 비제한적으로, Ngn-3, NeuroD 및 Islet-1이 포함된다.

[0083] 용어 "비-인슐린-생산 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 항시적으로 또는 유도에 의해 인슐린을 천연 합성하거나, 발현하거나 또는 분비하지 않는 임의의 내배엽 기원 세포를 의미한다. 따라서, 용어 "비-인슐린-생산 세포"에는 본원에서 사용된 바와 같이 췌장 β 세포가 배제된다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 비-인슐린-

생산 세포의 예에는 췌장 비-β 세포, 예컨대 아밀라제 생산 세포, 샘파리 세포, 관상 선암종 세포주 세포(예를 들면, CD18, CD11, 및 Capan-I 세포(Busik 등, 1997; Schaffert 등 1997 참고)가 포함된다. 내배엽 기원 비-췌장 세포, 예를 들면, 비-췌장 줄기 세포 및 예를 들면 간 세포, 가슴샘 세포, 갑상샘 세포, 창자 세포, 폐 세포 및 뇌하수체 세포를 포함하는 다른 내분비 또는 외분비 기관의 세포도 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-인슐린-생산 내배엽 세포는 포유동물 세포 또는 더욱더 구체적으로 인간 세포일 수 있다. 포유동물 췌장 비-소도, 췌장 아밀라제 생산 세포, 췌장 샘파리 세포를 이용한 본 방법의 예가 본원에 제공된다.

[0084] 용어 "표현형"은 실제 유전자형과 무관하게, 특정한 환경적 조건 및 인자 세트 하의 세포 또는 유기체를 정의하는 하나 또는 여러 전체 생물학적 특징을 나타낸다.

[0085] 용어 "만능"은 본원에서 사용된 바와 같이 상이한 조건 하에, 1 초과 분화된 세포형으로 분화하고, 바람직하게는 모든 3개 배세포층의 세포형 특징으로 분화되는 능력을 갖는 세포를 나타낸다. 만능 세포는 일차적으로, 예를 들면 누드 마우스 기형종 형성 분석을 이용해서 1 초과 분화된 세포형으로, 바람직하게는 모든 3개 배엽층으로 분화되는 그것의 능력을 특징으로 한다. 만능성에 대한 바람직한 시험은 각각의 3개 배엽층 세포로의 분화능 시연이지만, 만능성은 또한 배아 줄기(ES) 세포 마커의 발현에 의해 입증된다. 그와 같은 세포의 단순 배양이 이들 스스로 자신을 만능으로 만들지 않는다는 것이 주지되어야 한다. 재프로그래밍된 만능 세포(예를 들면 그 용어가 본원에서 정의된 iPS 세포)는 또한 일반적으로 배양 중 제한된 수의 분열에 대한 능력만을 갖는, 1차 세포 전조 대비 성장 가능성의 손실 없이 연장된 계대능 특징을 갖는다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "iPS 세포" 및 "유도된 만능 줄기 세포"는 상호교환적으로 사용되며 비-만능 세포, 전형적으로 성체 체세포로부터, 예를 들면 하나 이상의 유전자의 강제 발현을 유도함으로써 인공적으로 유도된(예를 들면, 유도되거나 완전 역전에 의한) 만능 줄기 세포를 나타낸다.

[0087] 용어 "조상세포" 또는 "전구체" 세포는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 분화에 의해 이것이 생성할 수 있는 세포에 비해 더 원시인(즉, 완전 분화된 세포에 비해 발생 경로 또는 진행에 있어서 더 초기 단계에 있는) 세포 표현형을 갖는 세포를 나타낸다. 종종, 전조 세포는 또한 유의미한 또는 매우 높은 증식능을 갖는다. 전조 세포는 발생 경로 및 세포가 발생하고 분화되는 환경에 따라, 여러 뚜렷이 다른 분화된 세포형 또는 하나의 분화된 세포형을 생성할 수 있다.

[0088] 용어 "줄기 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이, 결국 분화되거나 분화가능한 딸 세포를 생성할 수 있는 다수의 모세포를 생성하는 능력을 갖는 더 많은 전조 세포를 생성하고 증식할 수 있는 미분화된 세포를 나타낸다. 딸 세포 자체는 모계 발생능을 갖는 하나 이상의 세포를 보유하면서도 차후 하나 이상의 성숙 세포형으로 분화되는 자손을 생산하고 증식하도록 유도될 수 있다. 용어 "줄기 세포"는 특정 상황 하에서 더 특화되거나 분화된 표현형으로 분화되는 능력 또는 잠재력을 가지며, 특정 상황 하에서 실질적으로 분화하지 않고 증식하는 능력을 보유하는 조상세포의 서브셋을 나타낸다. 일 구현예에서, 용어 줄기 세포는 일반적으로 그 후손(자손)이 종종 상이한 방향으로, 분화에 의해, 예를 들면 배아 세포 및 조직의 진행 다양성에서 일어나는 것과 같은 완전히 개별적인 특징을 획득함으로써 특화되는 천연 발생 모세포를 나타낸다. 세포 분화는 많은 세포 분열을 통해 전형적으로 일어나는 복잡한 공정이다. 분화된 세포는 그 자체가 다능 세포 등으로부터 유도되는 다능 세포로부터 유도될 수 있다. 각각의 이들 다능 세포가 줄기 세포로 간주될 수 있지만, 각각 생성할 수 있는 세포형의 범위는 상당히 변할 수 있다. 일부 분화된 세포도 더 큰 발생능의 세포를 생성하는 능력을 갖는다. 그와 같은 능력은 천연일 수도 있고 또는 다양한 인자의 처리 시 인공적으로 유도될 수도 있다. 여러 생물학적 상황에서, 줄기 세포는 또한 이들이 1 초과 뚜렷이 다른 세포형의 자손을 생산할 수 있으므로 "다능"이지만 이것이 "줄기-성"을 위해 필요한 것은 아니다. 자가-재생은 줄기 세포 정의의 다른 전통적 부분으로, 본 문서에서 사용된 바와 같이 필수적이다. 이론 상, 자가-재생은 2개의 주요 기전 중 하나에 의해 일어날 수 있다. 줄기 세포는 하나의 딸 세포가 줄기 상태를 보유하고, 다른 딸 세포가 뚜렷이 다른 특정 기능 및 표현형을 발현하며 비대칭 분열할 수 있다. 대안적으로, 집단 내의 일부 줄기 세포는 두 줄기로 대칭 분열하여 전체적으로 집단 내에 일부 줄기 세포를 유지할 수 있는 반면, 집단 내의 다른 세포는 분화된 자손만을 생성한다. 공식적으로, 줄기 세포로 시작된 세포가 분화된 표현형으로 진행할 수는 있지만, 그 후 당해분야의 숙련가에 의해 종종 "탈분화" 또는 "재프로그래밍" 또는 "역분화"로 불리는 용어인 줄기 세포 표현형으로 "역전되고" 이를 재발현할 수 있음이 가능하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "만능 줄기 세포"에는 배아 줄기 세포, 유도된 만능 줄기 세포, 태반 줄기 세포 등이 포함된다.

[0089] 세포 개체발생의 맥락에서, 형용사 "분화된", 또는 "분화되는"은 상대적인 용어로, "분화된 세포"가 이것이 비교되는 세포에 비해 더 아래의 발생 경로로 진행된 세포라는 것을 의미한다. 따라서, 줄기 세포는 계통-제한된

전구체 세포(예컨대 중배엽 줄기 세포)로 분화될 수 있고, 이는 다시 경로에서 더 아래의 다른 유형의 전구체 세포(예컨대 심근세포 전구체)로, 그 다음 특정 조직 유형에서 특징적인 역할을 수행하고, 더 증식하는 능력을 보유할 수도 보유하지 않을 수도 있는 말기 단계의 분화된 세포로 분화될 수 있다.

[0090] 용어 "배아 줄기 세포"는 배아 배반포의 내세포괴의 만능 줄기 세포를 나타내기 위해 사용된다(미국 특허 번호 5,843,780, 6,200,806 참고). 그와 같은 세포는 체세포 핵 전이로부터 유도된 배반포의 내세포괴로부터 유사하게 수득될 수 있다(예를 들면, 미국 특허 번호 5,945,577, 5,994,619, 6,235,970 참고). 배아 줄기 세포의 구별되는 특징이 배아 줄기 세포 표현형을 정의한다. 따라서, 세포가 다른 세포로부터 구별될 수 있도록 배아 줄기 세포의 하나 이상의 독특한 특징을 보유하는 경우, 세포는 배아 줄기 세포의 표현형을 갖는다. 예시적인 구별되는 배아 줄기 세포 특징에는 비제한적으로 유전자 발현 프로파일, 증식능, 분화능, 핵형, 특정한 배양 조건에 대한 반응성 등이 포함된다.

[0091] 용어 "성체 줄기 세포" 또는 "ASC"는 태아, 소아 및 성체 조직을 포함하는 비-배아 조직으로부터 유도된 임의의 다능 줄기 세포를 나타내기 위해 사용된다. 줄기 세포는 혈액, 골수, 뇌, 후각 상피, 피부, 췌장, 골격 근육, 및 심장 근육을 포함하는 매우 다양한 성체 조직으로부터 단리되었다. 각각의 이러한 줄기 세포는 배양 중 유전자 발현, 인자 반응성, 및 형태에 기반하여 특징분석될 수 있다. 예시적인 성체 줄기 세포에는 신경 줄기 세포, 신경 능선 줄기 세포, 간엽 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 및 췌장 줄기 세포가 포함된다. 상기에서 명시된 바와 같이, 줄기 세포는 사실상 모든 조직에 존재하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명은 줄기 세포 집단이 사실상 모든 동물 조직에서 단리될 수 있다고 이해한다.

[0092] 용어 "췌장"은 소화 효소 및 호르몬을 분비하는 샘 기관을 나타낸다. 인간에서, 췌장은 약 7 in.(17.8 cm) 길이 및 1.5 in.(3.8 cm) 폭의 노란색을 띤 기관이다. 이는 위 아래에 놓이며 위의 하부 말단(유문)에서 항문 개구부로 연장되는 위장관의 근육성 호스형 부분, 작은 창자에 연결된다. 대부분의 췌장 조직은 쓸개부터 간까지 공통관을 통해 십이지장 내로 흐르는 투명한 유체(췌장 주스)를 생산하는 포도형 세포 클러스터로 구성된다. 췌장 주스는 창자 효소와 함께 각각 단백질, 탄수화물, 및 지방의 소화를 완료하는 3개의 소화 효소: 트립타제, 아밀라제, 및 리파제를 함유한다. 췌장의 효소-생산 세포 사이에는 두 개의 호르몬, 인슐린 및 글루카곤을 분비하는 랑게르한스섬으로 불리는 소그룹의 내분비 세포가 분산되어 있다. 췌장 소도는 몇 개 유형의 세포: 호르몬 글루카곤을 생산하는 알파-2 세포; 호르몬 인슐린을 제조하는 β 세포(본원에서 "췌장 β 세포"로도 불림); 및 조절제 소마토스타틴을 생산하는 알파-1 세포를 함유한다. 이들 호르몬은 직접적으로 혈류 내로 분비되며, 함께 혈당 수준을 조절한다. 인슐린은 혈당 수준을 낮추고 간에서 글리코겐(보관된 탄수화물)의 양을 증가시킨다; 글루카곤은 반대 작용을 갖는다. 인슐린-분비 세포가 적절하게 기능하지 못하면 당뇨병 또는 진성 당뇨병이 생긴다.

[0093] 용어 "재프로그래밍"은 본원에서 사용된 바와 같이 체세포의 분화 상태를 변경하거나 역전시키는 공정을 나타낸다. 세포는 재프로그래밍 전에 부분적으로 또는 최종적으로 분화될 수 있다. 재프로그래밍은 체세포 분화 상태의 만능 세포로의 완전 역전을 포괄한다. 그와 같은 분화의 완전 역전은 유도된 만능(iPS) 세포를 생산한다. 재프로그래밍은 본원에서 사용된 바와 같이 세포 분화 상태의 부분적 역전, 예를 들면 다능 상태로 또는 만능도 다능도 아니지만 이것이 생성되는 분화된 세포의 하나 이상의 특정한 특징을 소실한 세포인 체세포의 부분적 반전, 예를 들면 분화된 세포의 상이한 체세포 표현형으로의 직접적인 재프로그래밍도 포괄한다. 재프로그래밍에는 일반적으로 접합자가 성체로 발생하면서 세포 분화 동안 일어나는 핵산 변형(예를 들면, 메틸화), 염색질 응축, 후성유전학적 변화, 게놈 각인 등의 적어도 일부 유전 패턴의 변경, 예를 들면 역전이 관여된다.

[0094] 용어 "제제"는 본원에서 사용된 바와 같이 임의의 화합물 또는 물질, 예컨대, 비제한적으로 소분자, 핵산, 폴리펩타이드, 펩타이드, 약물, 이온 등을 의미한다. "제제"는 비제한적으로 합성 및 천연 발생 단백질성 및 비-단백질성 단위를 포함하는 임의의 화학적, 단위 또는 모이어티일 수 있다. 일부 구현예에서, 제제는 비제한적으로 단백질, 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, DNA자임, 당단백질, siRNAs, 지질단백질, 압타머, 및 이들의 변형 및 조합 등을 포함하는 핵산, 핵산 유사체, 단백질, 항체, 펩타이드, 압타머, 핵산 올리고머, 아미노산, 또는 탄수화물이다. 특정 구현예에서, 제제는 화학적 모이어티를 갖는 소분자이다. 예를 들면, 화학적 모이어티에는 매크롤라이드, 렙토마이신 및 관련된 천연 생성물 또는 이들의 유사체를 포함하는 비치환된 또는 치환된 알킬, 방향족, 또는 헤테로사이클릴 모이어티가 포함된다. 화합물은 원하는 활성 및/또는 특성을 갖는 것으로 공지될 수 있거나, 또는 다양한 화합물 라이브러리로부터 선택될 수 있다.

[0095] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "접촉"(즉, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체와 β 세포 성숙 인자, 또는 β 세포 성숙 인자들의 조합을 접촉)은 β 세포 성숙 인자 및 세포를 시험관내에서 함께 인큐베이션하는 것을 포함하려는 것이다(예를 들면, β 세포 성숙 인자를 배양 중 세포에 첨가함). 일부 구현예

에서, 용어 "접촉"은 대상체에서 천연 발생할 수 있는 본원에서 개시된 바와 같은 화합물에 대한 세포의 생체내 노출(즉, 천연 생리 과정의 결과로 일어날 수 있는 노출)을 포함하려는 것은 아니다. SC-β 세포의 생산에 관련된 구현예에서와 같이 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체와 β 세포 성숙 인자의 접촉 단계는 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들면, 세포는 부착 배양 중, 또는 현탁 배양 중 처리될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 중 처리된다. 개시내용은 세포 클러스터링을 촉진하는 임의의 조건을 고려한다. 세포 클러스터링을 촉진하는 조건의 예에는 비제한적으로 저부착 조직 배양판, 스피너 플라스크, 어그리웰 플레이트 내 현탁 배양이 포함된다. 일부 구현예에서, 본 발명자들은 클러스터가 10% 혈청을 함유하는 배지 중에서 안정하게 유지되었음을 관측하였다. 일부 구현예에서, 클러스터링을 촉진하는 조건에는 저혈청 배지가 포함된다.

[0096] β 세포 성숙 인자와 접촉된 세포가 또한 또 하나의 제제, 예컨대 성장 인자 또는 다른 분화제 또는 세포를 안정화하거나 세포를 추가 분화시키는 환경과 동시에 또는 차후에 접촉될 수 있음이 이해된다.

[0097] 유사하게, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자와 접촉된 다음 적어도 또 하나의 β 세포 성숙 인자와 접촉될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자와 접촉되며, 접촉은 일시적으로 분리되고, 일부 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자와 실질적으로 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 2 개, 적어도 3 개, 적어도 4 개, 적어도 5 개, 적어도 6 개, 적어도 7 개, 적어도 8 개, 적어도 9 개, 또는 적어도 10 개의 β 세포 성숙 인자와 접촉된다.

[0098] 용어 "세포 배양 배지"(또한 본원에서 "배양 배지" 또는 "배지"로 불림)는 본원에서 언급되는 바와 같은 세포 생존력을 유지하며 증식을 지지하는 영양소를 함유하는 세포 배양용 배지이다. 세포 배양 배지는 적절한 조합으로 임의의 하기 물질을 함유할 수 있다: 염(들), 버퍼(들), 아미노산, 글루코오스 또는 다른 당(들), 항생제, 혈청 또는 혈청 대체물질, 및 다른 성분, 예컨대 펩타이드 성장 인자 등. 특정한 세포형에 대해 보통 이용되는 세포 배양 배지는 당해분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0099] 용어 "세포주"는 전형적으로 단일 선조 세포로부터 또는 정의되고/되거나 실질적으로 동일한 선조 세포 집단으로부터 유도된 대개 또는 실질적으로 동일한 세포 집단을 나타낸다. 세포주는 연장된 기간(예를 들면, 수 개월, 수 년, 제한되지 않는 기간 동안) 동안 배양 중 유지되었거나 유지될 수 있다. 이는 세포 상에 제한되지 않는 배양 수명을 부여하는 자발적인 또는 유도된 형질전환 공정을 거쳤을 수 있다. 세포주에는 이와 같이 당해기술에서 인식된 모든 세포주가 포함된다. 세포주의 개별 세포의 적어도 일부 특성이 서로 상이할 수 있도록 세포가 경시적으로 돌연변이 및 가능하게는 후성유전학적 변화를 획득함이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 세포주는 본원에 기재된 SC-β 세포를 포함한다.

[0100] 용어 "외인성"은 그 원상태 공급원 이외의 세포 또는 유기체에 존재하는 물질을 나타낸다. 예를 들면, 용어들 "외인성 핵산" 또는 "외인성 단백질"은 정상적으로 발견되지 않거나 더 적은 양으로 발견되는, 생물학적 시스템, 예컨대 세포 또는 유기체 내로의 인공적인 노력이 관여되는 공정에 의해 도입된 핵산 또는 단백질을 나타낸다. 물질이 유전되는 세포 또는 세포의 선조 내로 도입되는 경우, 물질은 외인성으로 간주될 것이다. 그에 반해서, 용어 "내인성"은 생물학적 시스템에 대해 원상태인 물질을 나타낸다.

[0101] 용어 "발현"은 적용 가능한 경우 비제한적으로 예를 들면 전사, 번역, 폴딩, 변형 및 가공을 포함하는, RNA 및 단백질 생산 그리고 적절하게는 단백질 분비에 관여되는 세포 공정을 나타낸다. "발현 생성물"에는 유전자로부터 전사된 RNA 및 유전자로부터 전사된 mRNA의 번역에 의해 수득된 폴리펩타이드가 포함된다.

[0102] 용어들 "유전적으로 변형된" 또는 "조작된" 세포는 본원에서 사용된 바와 같이 외인성 핵산이 인공적인 노력이 관여되는 공정에 의해 도입된 세포(또는 적어도 일부 핵산이 유전된 그와 같은 세포의 후손)를 나타낸다. 핵산은, 예를 들면 세포에 대해 외인성인 서열을 함유할 수 있으며, 이는 천연 서열(즉, 세포에서 천연 발견되는 서열)을 그러나 비-천연 발생 배열(예를 들면, 상이한 유전자로부터의 프로모터에 연결된 코딩 영역)로, 또는 변경된 버전의 천연 서열 등을 함유할 수 있다. 세포 내로의 핵산 전달 과정은 임의의 적합한 기술에 의해 달성될 수 있다. 적합한 기술에는 칼슘 포스페이트 또는 지질-매개된 형질감염, 전기천공, 및 형질도입 또는 바이러스 벡터를 이용한 감염이 포함된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 이들의 일부는 세포 게놈 내로 통합된다. 핵산은 게놈으로부터 차후에 제거되거나 절제될 수 있지만, 단, 그와 같은 제거 또는 절제는 변형되지 않았지만 다르게 동등한 세포에 비해 세포에서 검출가능한 변경을 일으킨다. 용어 유전적으로 변형된 변형된 RNA의 세포 내로의 직접적 도입(예를 들면, 합성, 변형된 RNA)을 포함하려는 것이 이해되어야 한다. 그와 같은 변형된 합성 RNAs에는 엔도- 및 엑소-뉴클레아제에 의한 신속한 분해를 방지하고 RNA에 대한 세포의 선천성

면역 또는 인터페론 반응을 회피하거나 감소시키기 위한 변형이 포함된다. 변형에는 비제한적으로, 예를 들면 (a) 말단 변형, 예를 들면 5' 말단 변형(인산화 탈인산화, 콘주게이션, 역전된 연결 등), 3' 말단 변형(콘주게이션, DNA 뉴클레오타이드, 역전된 연결 등), (b) 염기 변형, 예를 들면 변형된 염기, 안정화 염기, 탈안정화 염기, 또는 확장된 파트너 레퍼토리와 염기쌍을 형성하는 염기, 또는 접합된 염기를 이용한 대체, (c) 당 변형 (예를 들면, 2' 위치 또는 4' 위치에서) 또는 당의 대체뿐만 아니라 (d) 포스포디에스테르 연결의 변형 또는 대체를 포함하는 뉴클레오사이드간 연결 변형이 포함된다. 그와 같은 변형이 번역을 방해하는(즉, 변형의 부재에 비해 번역에서 50% 이상의 감소를 일으키는-예를 들면, 토끼 망상적혈구 시험관내 번역 분석에서) 범위까지, 변형은 본원에서 기재된 방법 및 조성물에 적합하지 않다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 뉴로게닌 3을 발현하도록 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포의 유전적 변형은 뉴로게닌 3을 인코딩하는 변형된 합성 mRNA의 도입을 포함한다. 뉴로게닌 3을 인코딩하는 변형된 합성 mRNA를 이용한 SC-β 세포의 유전적 변형은 세포로부터 인슐린 생산을 증가시키는 것으로 여겨진다. 임의의 인슐린 생산 세포의 그와 같은 유전적 변형은 그 세포에서 인슐린 생산을 증가시키는 것으로 예상된다.

[0103] 일부 측면에서, 개시내용은 인슐린 유전자위에 검출가능한 마커를 포함하도록 유전적으로 변형된 SC-β 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 검출가능한 마커로 인슐린 유전자위의 두 대립유전자를 모두 대체하도록 변형된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 이것이 글루코오스 챌린지에 반응하여 SC-β 세포에서 인슐린과 함께 발현되도록 인슐린 유전자위 내로 검출가능한 마커를 삽입하도록 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 이것이 글루코오스 챌린지에 반응하여 SC-β 세포에서 인슐린 대신에 발현되도록 인슐린 대신에 인슐린 유전자위 내로 검출가능한 마커를 삽입하도록 유전적으로 변형된다. 예를 들면 형광 단백질(예를 들면, GFP)을 인코딩하는 핵산을 포함하는 임의의 검출가능한 마커가 인슐린 유전자위 내로 삽입될 수 있는 것으로 고려된다. 당해분야의 숙련가는 그와 같은 유전적으로 변형된 SC-β 세포가 다양한 스크리닝 방법에서, 예를 들면 제제에 반응하여 검출가능한 마커에 대해 분석함으로써 β 세포로부터 인슐린 발현 및/또는 분비를 자극하는 제제를 동정하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들면, 두 대립유전자에서(예를 들면, GFP로) 인슐린 유전자를 대체하도록 유전적으로 변형된 SC-β 세포가 시험 제제와 접촉될 수 있고, GFP 발현으로 인해 SC-β 세포를 형광으로 유도하는 제제는 β 세포에서 인슐린 유전자 발현을 활성화할 수 있는 후보 제제로 간주된다. 환언하면, 검출가능한 마커는 그와 같은 유전적으로 변형된 SC-β 세포에서 인슐린 발현에 대한 대리 마커로 사용될 수 있다.

[0104] 용어 "동일성"은 본원에서 사용된 바와 같이 2 개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드의 서열이 동일한 정도를 나타낸다. 평가 윈도우에 걸쳐, 예를 들면 관심 서열 길이에 걸쳐, 관심 서열 및 제2 서열 간의 동일성 퍼센트는 서열을 정렬하고, 동일성을 최대화하기 위한 갭 도입을 허용하는 동일한 잔기와 반대되는 평가 윈도우 내 잔기(뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 수를 결정하고, 윈도우 내에 들어가는 관심 서열 또는 제2 서열(둘 중 더 큰 것) 잔기의 총 수로 나누고, 100을 곱해서 계산될 수 있다. 특정한 동일성 퍼센트를 달성하기 위해 필요한 동일한 잔기의 수를 계산하는 경우, 분수는 가장 가까운 정수로 반올림된다. 동일성 퍼센트는 당해기술에 공지된 다양한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 계산될 수 있다. 예를 들면, 컴퓨터 프로그램, 예컨대 BLAST2, BLASTN, BLASTP, Gapped BLAST 등이 정렬을 생성하고, 관심 서열 간 동일성 퍼센트를 제공한다. [Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993]에서와 같이 변형된 Karlin 및 Altschul의 알고리즘(Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:22264-22268, 1990)이 Altschul 등의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 내로 편입된다(Altschul, 등, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990). 비교 목적을 위한 갭을 포함하는 정렬을 수득하기 위해, Altschul 등[Altschul 등, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997]에 기재된 바와 같이 Gapped BLAST가 이용된다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각 프로그램의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. PAM250 또는 BLOSUM62 매트릭스가 사용될 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립생물공학정보센터(NCBI)를 통해 공개적으로 이용할 수 있다. 이들 프로그램에 대해서는 URL 월드와이드 웹 주소 "ncbi.nlm.nih.gov"를 갖는 웹사이트를 참고하라. 특정한 구현예에서, 동일성 퍼센트는 NCBI에 의해 제공되는 바와 같은 디폴트 파라미터와 함께 BLAST2를 이용하여 계산된다.

[0105] 용어 "단리된" 또는 "부분적으로 정제된"은 본원에서 사용된 바와 같이, 핵산 또는 폴리펩타이드의 경우, 그 천연 공급원에서 발견되는 핵산 또는 폴리펩타이드와 함께 존재하고/존재하거나 세포에 의해 발현되는 경우 핵산 또는 폴리펩타이드와 함께 존재할 또는 분비된 폴리펩타이드의 경우 분비될 적어도 하나의 다른 성분(예를 들면, 핵산 또는 폴리펩타이드)으로부터 분리된 핵산 또는 폴리펩타이드를 나타낸다. 화학적으로 합성된 핵산 또는 폴리펩타이드 또는 시험관내 전사/번역을 이용해서 합성된 것은 "단리된" 것으로 간주된다.

[0106] 용어 "단리된 세포"는 본원에서 사용된 바와 같이 본래 발견된 유기체로부터 제거된 세포 또는 그와 같은 세포

의 후손을 나타낸다. 선택적으로 세포는, 예를 들면 다른 세포의 존재 하에 시험관내 배양되었다. 선택적으로 세포는 제2 유기체 내로 이후에 도입되거나 이것이 단리된 유기체(또는 이것이 후손으로 생성되는 세포) 내로 재도입된다.

- [0107] 본원에서 사용된 바와 같이 단리된 세포 집단에 대한 용어 "단리된 집단"은 혼합된 또는 이중성 세포 집단으로부터 제거되고 분리된 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 단리된 집단은 세포가 단리되거나 농축되는 이중성 집단에 비해 실질적으로 순수한 세포 집단이다.
- [0108] 특정한 세포 집단에 대한 용어 "실질적으로 순수한"은 전체 세포 집단을 이루는 세포에 대해 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 더 바람직하게는 적어도 약 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 95% 순수한 세포 집단을 나타낸다. 다시 말하면, SC- β 세포 집단에 대한 용어들 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된"은 본원에서 용어들에 의해 정의된 SC- β 세포가 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 SC- β 세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 SC- β 세포 집단은 실질적으로 순수한 SC- β 세포 집단이다.
- [0109] 유사하게, 인슐린-양성 내분비 세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의해 정의된 인슐린-양성 내분비 세포가 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 세포를 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 인슐린-양성 내분비 세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 인슐린-양성 내분비 세포 집단은 실질적으로 순수한 인슐린-양성 내분비 세포 집단이다.
- [0110] 유사하게, Ngn3-양성 내분비 조상세포에 대한 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의해 정의된 Ngn3-양성 내분비 조상세포 또는 이들의 자손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 Ngn3-양성 내분비 조상세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 Ngn3-양성 내분비 조상세포 집단은 실질적으로 순수한 Ngn3-양성 내분비 조상세포 집단이다.
- [0111] 유사하게, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의해 정의된 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포 또는 이들의 자손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포 집단은 실질적으로 순수한 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 조상세포 집단이다.
- [0112] 유사하게, Pdx1-양성 췌장 조상세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의해 정의된 Pdx1-양성 췌장 조상세포 또는 이들의 자손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 Pdx1-양성 췌장 조상세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 Pdx1-양성 췌장 조상세포 집단은 실질적으로 순수한 Pdx1-양성 췌장 조상세포 집단이다.
- [0113] 유사하게, 원시 소화관 세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의해 정의된 원시 소화관 세포 또는 이들의 자손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 원시 소화관 세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 원시 소화관 세포 집단은 실질적으로 순수한 원시 소화관 세포 집단이다.
- [0114] 유사하게, 완성 내배엽 세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의해 정의된 완성 내배엽 세포 또는 이들의 자손이 아닌 세포를 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 발명은 완성 내배엽 세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 완성 내배엽 세포 집단은 실질적으로 순수한 완성 내배엽 세포 집단이다.
- [0115] 유사하게, 만능 세포의 "실질적으로 순수한" 또는 "본질적으로 정제된" 집단에 대해서는 본원에서 용어들에 의

해 정의된 만능 세포 또는 이들의 자손이 아닌 약 20% 미만, 더 바람직하게는 약 15%, 10%, 8%, 7% 미만, 가장 바람직하게는 약 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만, 또는 1% 미만보다 적게 함유하는 세포 집단을 나타낸다. 일부 구현 예에서, 본 발명은 만능 세포 집단을 증식시키는 방법을 포괄하며, 여기서 상기 증식된 만능 세포 집단은 실질적으로 순수한 만능 세포 집단이다.

[0116] 용어들 "농축" 또는 "농축된"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 한 유형의 세포 수율(분획)이 개시 배양 또는 제조에서 그 유형의 세포 분획에 비해 적어도 10% 증가됨을 의미한다.

[0117] 용어들 "재생" 또는 "자가-재생" 또는 "증식"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 장기간 및/또는 수 개월 내지 수 년에 걸쳐 동일한 비-특화된 세포형으로 분열하여 자체 재생되는 줄기 세포의 능력을 나타내기 위해 사용된다. 일부 예에서, 증식은 단일 세포의 두 동일한 딸 세포로의 반복된 분열에 의한 세포 증식을 나타낸다.

[0118] 용어 "계통"은 본원에서 사용된 바와 같이 공통 조상을 갖는 세포 또는 공통의 발생 운명을 갖는 세포를 설명한다. 예를 들면, 내배엽 기원 또는 "내배엽 혈통"인 세포의 맥락에서, 이는 세포가 내배엽 세포로부터 유도되었고, 내배엽 계통으로 제한된 경로, 예컨대 완성 내배엽 세포를 생성하는 하나 이상의 발생 계통 경로를 통해 분화될 수 있고, 다시 간 세포, 가슴샘, 췌장, 폐 및 창자로 분화될 수 있음을 의미한다.

[0119] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중발생성"은 상이한 종으로부터 유도되는 세포를 나타낸다.

[0120] "마커"는 본원에서 사용된 바와 같이 세포의 특징 및/또는 표현형을 설명하기 위해 사용된다. 마커는 관심 특징을 포함하는 세포 선택을 위해 사용될 수 있다. 마커는 특정 세포에 따라 변할 것이다. 마커는 특정한 세포형 세포 또는 세포형에 의해 발현된 분자의 형태적, 기능적 또는 생화학적(효소적) 특징인지와 무관한 특징이다. 바람직하게는, 그와 같은 마커는 단백질이며, 더 바람직하게는 당해기술에서 이용가능한 항체 또는 다른 결합 분자에 대한 에피토프를 보유한다. 그러나, 마커는 비제한적으로, 단백질(펩타이드 및 폴리펩타이드), 지질, 당류, 핵산 및 스테로이드를 포함하는 세포에서 확인되는 임의 분자로 구성될 수 있다. 형태적 특징 또는 특성의 예에는 비제한적으로 형상, 크기, 및 핵 대 세포질 비가 포함된다. 기능적 특징 또는 특성의 예에는 비제한적으로 특정 기제에 부착하는 능력, 특정한 염료를 도입하거나 배제하는 능력, 특정한 조건 하에 이동하는 능력, 및 특정한 계통을 따라 분화되는 능력이 포함된다. 마커는 당해분야의 숙련자에게 이용가능한 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다. 마커는 또한 형태적 특징의 부재 또는 단백질, 지질 등의 부재일 수 있다. 마커는 폴리펩타이드 및 다른 형태적 특징의 존재 및 부재의 고유한 특정 패널의 조합일 수 있다.

[0121] 용어 "조정하다"는 당해기술에서의 그 이용과 일관되게 사용된다, 즉 관심 공정, 경로 또는 현상에서의 정성적 또는 정량적 변화, 변경 또는 변형을 유도하거나 촉진함을 의미한다. 비제한적으로, 그와 같은 변화는 공정, 경로 또는 현상의 상이한 성분 또는 분자의 상대 강도 또는 활성의 증가, 감소 또는 변화일 수 있다. "조절물질"은 관심 공정, 경로 또는 현상에서의 정성적 또는 정량적 변화, 변경 또는 변형을 유도하거나 촉진하는 제제이다.

[0122] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "DNA"는 데옥시리보핵산으로 정의된다.

[0123] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 본원에서 "핵산"과 상호교환적으로 사용되어 뉴클레오타이드의 폴리머를 나타낸다. 전형적으로 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 DNA 또는 RNA에서 천연 발견되는 뉴클레오타이드(예를 들면, 아데노신, 티미딘, 구아노신, 시티딘, 우리딘, 데옥시아데노신, 데옥시티미딘, 데옥시구아노신, 및 데옥시시티딘)로 이루어진다. 그러나 용어는 천연 발생 핵산에서 확인되건 확인되지 않건, 화학적으로 또는 생물학적으로 변형된 염기, 변형된 골격 등을 함유하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 분자를 포괄하며, 그와 같은 분자는 특정 적용을 위해 바람직할 수 있다. 본원에서 폴리뉴클레오타이드를 언급하는 경우, 이는 DNA, RNA 모두로 이해되며, 각 경우에 단일- 및 이중-가닥 형태가 모두(그리고 각각의 단일-가닥 분자의 상보체)가 제공된다. "폴리뉴클레오타이드 서열"은 본원에서 사용된 바와 같이 생화학적으로 특정 핵산을 나타내는 폴리뉴클레오타이드 물질 자체 및/또는 서열 정보(즉 염기에 대한 약어로 사용되는 연속 문자)를 나타낼 수 있다. 본원에서 제시되는 폴리뉴클레오타이드 서열은 달리 나타내지 않으면 5'에서 3' 방향으로 제시된다.

[0124] 용어들 "폴리펩타이드"는 본원에서 사용된 바와 같이 아미노산의 폴리머를 나타낸다. 용어들 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 펩타이드는 상대적으로 짧은 폴리펩타이드로, 전형적으로 약 2 내지 60 아미노산 길이이다. 본원에서 사용된 폴리펩타이드는 전형적으로 아미노산, 예컨대 단백질에서 가장 통상적으로 확인되는 20가지 L-아미노산을 함유한다. 그러나, 당해기술에 공지된 다른 아미노산 및/또는 아미노산 유사체가 사용될 수 있다. 폴리펩타이드에서 하나 이상의 아미노산은, 예를 들면 화학적 단위, 예컨대 탄수화물

그룹, 포스페이트 그룹, 지방산 그룹, 콘주게이션용 링커의 부가, 작용화 등에 의해 변형될 수 있다. 이들과 공유적으로 또는 비공유적으로 연관된 비-폴리펩타이드 모이어티를 갖는 폴리펩타이드도 여전히 "폴리펩타이드"로 간주된다. 예시적인 변형에는 당화 및 팔미토일화가 포함된다. 폴리펩타이드는 천연 공급원으로부터 정제되고, 재조합 DNA 기술을 이용해서 생산되고, 화학적 수단, 예컨대 종래의 고체상 펩타이드 합성 등을 통해 합성될 있다. 용어 "폴리펩타이드 서열" 또는 "아미노산 서열"은 본원에서 사용된 바와 같이 생화학적으로 폴리펩타이드를 나타내는 폴리펩타이드 물질 자체 및/또는 서열 정보(즉, 아미노산 명칭에 대한 약어로 사용되는 연속 문자 또는 3문자 암호)를 나타낼 수 있다. 본원에서 제시된 폴리펩타이드 서열은 달리 나타내지 않으면 N-말단에서 C-말단 방향으로 제시된다.

[0125] 폴리펩타이드에 대해 언급하는 용어 "변이체"는, 예를 들면 전장 폴리펩타이드와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드일 수 있다. 변이체는 전장 폴리펩타이드의 단편일 수 있다. 변이체는 천연 발생 스플라이스 변이체일 수 있다. 변이체는 폴리펩타이드 단편과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일한 폴리펩타이드일 수 있고, 여기서 전장 야생형 폴리펩타이드 또는 이들의 도메인이 관심 활성, 예컨대 SC- β 세포, 또는 SC- β 세포가 유도되는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 존재를 검출하는 능력을 갖는 한, 상기 단편은 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%이다. 일부 구현예에서, 도메인은 서열 내의 임의의 아미노산 위치에서 시작하여 C-말단쪽으로 연장되는, 적어도 100, 200, 300, 또는 400 아미노산 길이이다. 단백질 활성을 제거하거나 실질적으로 감소시키기 위해 당해기술에 공지된 변이는 바람직하게는 회피된다. 일부 구현예에서, 변이체에는 전장 폴리펩타이드의 N- 및/또는 C-말단부가 없다, 예를 들면 양 말단 중 하나로부터 최대 10, 20, 또는 50 아미노산이 없다. 일부 구현예에서, 폴리펩타이드는 성숙한(전장) 폴리펩타이드 서열을 가지며, 이는 정상적인 세포내 단백질 분해 가공 동안(예를 들면, 번역중 또는 번역후 가공 동안) 제거된 하나 이상의 부분, 예컨대 신호 펩타이드를 가졌던 폴리펩타이드를 의미한다. 일부 구현예에서, 단백질은 이를 천연 발현하는 세포로부터 이를 정제하는 것 이외의 방법으로 생산되며, 단백질은 키메라성 폴리펩타이드로, 이는 2 이상의 상이한 종으로부터의 부분을 함유함을 의미한다. 일부 구현예에서, 단백질은 이를 천연 발현하는 세포로부터 이를 정제하는 것 이외의 방법으로 생산되며, 단백질은 유도체로, 이는 이들 서열이 단백질의 생물학적 활성을 실질적으로 감소시키지 않는 한, 단백질이 단백질에 관련되지 않는 추가 서열을 포함함을 의미한다.

[0126] 용어 "기능적 단편"은 본원에서 사용된 바와 같이 더 작은 크기의 아미노산 서열을 갖지만 이것이 그 단편인 폴리펩타이드와 실질적으로 상동성인 폴리펩타이드이며, 여기서 폴리펩타이드 서열의 기능적 단편은 이것이 그 단편인 폴리펩타이드와 적어도 약 50%, 또는 60% 또는 70% 또는 80% 또는 90% 또는 100% 또는 100% 초과, 예를 들면 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배 또는 4-배 초과 효과적인 생물 작용을 갖는다. 폴리펩타이드의 기능적 단편은 감소된 항원성, 증가된 DNA 결합(전사 인자에서와 같이), 또는 변경된 RNA 결합(RNA 안정성 또는 분해 조절에서와 같이)이 포함될 수 있는 추가의 기능을 가질 수 있다.

[0127] 용어 "백터"는 DNA 서열이 숙주 세포 내로의 도입을 위해 삽입될 수 있는 캐리어 DNA 분자를 나타낸다. 바람직한 백터는 이들이 연결되는 핵산의 자율 복제 및/또는 발현이 가능한 것들이다. 이들이 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있는 백터는 본원에서 "발현 백터"로 불린다. 따라서, "발현 백터"는 숙주 세포에서 관심 유전자의 발현을 위해 요구되는 필요한 조절 영역을 함유하는 특화된 백터이다. 일부 구현예에서, 관심 유전자는 백터 내의 또 다른 서열에 작동가능하게 연결된다. 백터는 바이러스 백터 또는 비-바이러스 백터일 수 있다. 바이러스 백터가 사용되는 경우, 바이러스 백터가 복제 불량인 것이 바람직하며, 이는 예를 들면 복제를 위해 인코딩하는 모든 바이러스 핵산을 제거하여 달성될 수 있다. 복제 불량 바이러스 백터는 여전히 그 감염 특성을 보유하며, 복제하는 아데노바이러스 백터와 유사한 방식으로 세포에 들어갈 것이지만, 일단 세포에 들어가면 복제 불량 바이러스 백터는 재생하거나 증식하지 않는다. 백터는 또한 DNA 분자를 세포에 전달하기 위한 리포솜 및 나노입자 및 다른 수단을 포괄한다.

[0128] 용어 "작동가능하게 연결된"은 코딩 서열의 발현을 위해 필요한 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 실시하기 위해 코딩 서열에 대해 적절한 위치의 DNA 분자에 배치됨을 의미한다. 상기 동일한 정의는 때때로 발현 백터에서 코딩 서열 및 전사 조절 요소(예를 들면 프로모터, 인핸서, 및 종결 요소)의 배열에 적용된다. 용어 "작동가능하게 연결된"에는 발현될 폴리뉴클레오타이드 서열 전방에 적절한 개시 신호(예를 들면, ATG)를 갖는 것 그리고 발현 조절 서열의 조절 하에 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현 및 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 인코딩된 원하는 폴리펩타이드의 생산을 허용하기 위해 정확한 해독틀을 유지하는 것이 포함된다.

[0129] 용어 "바이러스 백터"는 세포 내 핵산 구축물의 캐리어로서 바이러스, 또는 바이러스-연관된 백터의 사용을 나타낸다. 구축물은 아데노바이러스, 아데노-연관된 바이러스(AAV), 또는 단순 포진 바이러스(HSV) 또는 세포 내

로의 감염 또는 형질도입을 위한 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 기타 벡터와 같은 비-복제성, 불량 바이러스 계통 내로 통합되고 패키징될 수 있다. 벡터는 세포의 계통 내로 편입될 수도 편입되지 않을 수도 있다. 구축물에는 원하는 경우 형질감염을 위한 바이러스 서열이 포함될 수 있다. 대안적으로, 구축물은 에피솜 복제할 수 있는 벡터, 예로 EPV 및 EBV 벡터 내로 편입될 수 있다.

[0130] 용어들 "조절 서열" 및 "프로모터"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 작동가능하게 연결된 단백질 코딩 서열의 전사를 유도하거나 조절하는 핵산 서열, 예컨대 개시 신호, 인핸서, 및 프로모터를 나타낸다. 일부 예에서, 재조합 유전자의 전사는 발현을 의도하는 세포형에서 재조합 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 서열 (또는 다른 전사 조절 서열)의 조절 하에 있다. 재조합 유전자는 단백질의 천연 발생 형태의 전사를 조절하는 서열과 동일하거나 상이한 전사 조절 서열의 조절 하에 있을 수 있음이 또한 이해될 것이다. 일부 예에서, 프로모터 서열은 세포의 합성 기구에 의해 인식되거나, 특정 유전자의 전사를 개시하기 위해 필요한 합성 기구가 도입된다.

[0131] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "전사 인자"는 DNA 결합 도메인을 이용해서 DNA의 특정 부분에 결합하고, DNA로부터 RNA로의 유전 정보의 전달(또는 전사)을 조절하는 시스템의 일부인 단백질을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, "증식하는" 및 "증식"은 세포 분열에 의한 집단 내 세포의 수 증가(성장)를 나타낸다. 세포 증식은 일반적으로 성장 인자 및 다른 미토젠을 포함하는 환경에 반응하여 다중 신호 전달 경로의 조율된 활성화로부터 야기되는 것으로 이해된다. 세포 증식은 또한 세포 증식을 차단하거나 부정적으로 영향을 미치는 기전 및 세포 내- 또는 세포외-신호 작용으로부터의 방출에 의해 촉진될 수 있다.

[0132] 용어 "선별 마커"는 발현되는 경우, 세포에 선별 표현형, 예컨대 세포독성제 또는 세포증식억제제에 대한 내성 (예를 들면, 항생제 내성), 영양 원형양성, 또는 단백질을 발현하는 세포를 그렇지 않은 세포와 구별하는 기준으로 이용될 수 있는 특정한 단백질의 발현을 부여하는 유전자, RNA, 또는 단백질을 나타낸다. 그 발현이 쉽게 검출될 수 있는 단백질, 예컨대 형광 또는 발광 단백질 또는 유색, 형광, 또는 발광 물질("검출가능한 마커")을 생산하는 기질 상에 작용하는 효소가 선별 마커의 서브셋을 구성한다. 만능 세포에서 보통 선택적으로 또는 배타적으로 발현되는 유전자에 대해 원상태의 발현 조절 요소에 연결된 선별 마커의 존재는 만능 상태로 재프로그래밍된 체세포를 동정하고 선택할 수 있게 한다. 다양한 선별 마커 유전자, 예컨대 네오마이신 내성 유전자(neo), 퓨로마이신 내성 유전자(puro), 구아닌 포스포리보실 전달효소(gpt), 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR), 아데노신 데아미나제(ada), 퓨로마이신-N-아세틸전달효소(PAC), 하이그로마이신 내성 유전자(hyg), 다중약물 내성 유전자(mdr), 티미딘 키나아제(TK), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실전달효소(HPRT), 및 hisD 유전자가 사용될 수 있다. 검출가능한 마커에는 녹색 형광 단백질(GFP) 블루, 사파이어, 옐로우, 레드, 오렌지, 및 시안 형광 단백질 그리고 이들의 임의 변이체가 포함된다. 발광 단백질, 예컨대 루시페라아제(예를 들면, 개뿔벌레 또는 *레닐라 루시페라아제*)도 사용된다. 당해분야의 숙련자에게 분명할 바와 같이, 용어 "선별 마커"는 본원에서 사용된 바와 같이 유전자 또는 유전자의 발현 생성물, 예를 들면 인코딩된 단백질을 나타낼 수 있다.

[0133] 일부 구현예에서, 선별 마커는 이를 발현하지 않거나 이를 유의미하게 더 낮은 수준으로 발현하는 세포에 비해, 이를 발현하는 세포 상에 증식 및/또는 생존 이점을 부여한다. 그와 같은 증식 및/또는 생존 이점은 전형적으로 세포가 특정 조건, 즉 "선택적 조건" 하에서 유지되는 경우 일어난다. 효과적인 선택을 보장하기 위해, 세포 집단은 마커를 발현하지 않는 세포가 증식하지 않고/않거나 생존하지 않으며 집단에서 제거되거나 이들의 수가 집단의 단지 매우 작은 분획으로 감소되도록 하는 조건 하에 충분한 기간 동안 유지될 수 있다. 마커를 발현하지 않는 세포를 대부분 또는 완전히 제거하기 위한 선택적 조건 하에 세포 집단을 유지함으로써 증식 및/또는 생존 이점을 부여하는 마커를 발현하는 세포를 선택하는 공정은 본원에서 "양성 선택"으로 불리며, 마커는 "양성 선택을 위해 유용한" 것으로 불린다. 음성 선택 및 음성 선택을 위해 유용한 마커도 특정한 본원에서 기재된 특정 방법에서 관심의 대상이 된다. 그와 같은 마커의 발현은 마커를 발현하지 않거나 이를 유의미하게 더 낮은 수준으로 발현하는 세포에 비해 마커를 발현하는 세포 상에 증식 및/또는 생존 약점을 부여한다(또는 다른 방식으로 고려하면, 마커를 발현하지 않는 세포는 마커를 발현하는 세포에 대해 증식 및/또는 생존 이점을 가짐). 따라서 마커를 발현하는 세포는 충분한 기간 동안 선택 조건 하에 유지되는 경우, 세포 집단으로부터 대부분 또는 완전 제거될 수 있다.

[0134] "리포터 유전자"는 본원에서 사용된 바와 같이 줄기 세포의 표현형에 부가되는 세포 내로 유전적으로 도입된 임의의 유전자를 포괄한다. 본 발명에서 개시된 바와 같은 리포터 유전자는 형광, 발광, 효소 및 내성 유전자뿐만 아니라 당해분야의 숙련가에 의해 쉽게 검출될 수 있는 다른 유전자를 포괄하려는 것이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 리포터 유전자는 특정 줄기 세포, 심혈관 줄기 세포 및 이들의 분화된 자손의 동정을 위한 마커로 사용된다. 리포터 유전자는 일반적으로 리포터 유전자의 발현을 측정함으로써 모니터링되는 하나 이상의 조건에 의

존하는 방식으로 그 발현을 조절하는 서열에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에서, 리포터 유전자의 발현은 생존 세포에서 결정될 수 있다. 생존 세포 리포터 유전자 분석이 사용되는 경우, 리포터 유전자 발현은 다중 시점에, 예를 들면, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 또는 10회 또는 그 초과 시점에서 모니터링될 수 있다. 일부 경우에서, 생존 세포 리포터 분석이 사용되는 경우, 리포터 유전자 발현은 적어도 약 10 분 내지 약 24 시간, 예를 들면 20 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 7 시간, 8 시간, 9 시간, 10 시간, 12 시간, 18 시간 빈도로, 또는 약 10 분 내지 약 24 시간 사이의 임의 정수로부터의 또 하나의 빈도로 모니터링된다.

[0135] 용어들 "대상체" 및 "개인의"는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 세포가 수득될 수 있고/있거나 본원에 기재된 바와 같은 세포를 이용한 예방적 치료를 포함하는 치료가 제공되는 동물, 예를 들면 인간을 나타낸다. 특정 동물, 예컨대 인간 대상체에 대해 특이적인 감염, 질병 또는 질환 상태의 치료를 위해, 용어 대상체는 그 특정 동물을 나타낸다. 본원에서 상호교환적으로 사용된 바와 같이 "비-인간 동물" 및 "비-인간 포유동물"에는 포유 동물, 예컨대 랫트, 마우스, 토끼, 양, 고양이, 개, 소, 돼지, 및 비-인간 영장류가 포함된다. 용어 "대상체"는 또한 비제한적으로 포유동물, 파충류, 양서류 및 어류를 포함하는 임의의 척추동물을 포괄한다. 그러나 유리하게는, 상기 대상체는 포유동물, 예컨대 인간, 또는 다른 포유동물, 예컨대 가축 포유동물, 예를 들면 개, 고양이, 말 등 또는 생산 포유동물, 예를 들면 소, 양, 돼지 등이다.

[0136] 용어들 "당뇨병" 및 "진성 당뇨병"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 세계보건기구는 공복 혈장 글루코오스 농도 7.0 mmol/l(126 mg/dl) 및 진성 당뇨병에 대해서는 그 초과(전혈 6.1 mmol/l 또는 110 mg/dl), 또는 2-시간 글루코오스 수준 11.1 mmol/L 이상(200 mg/dL 이상)의 진단 값을 정의한다. 진성 당뇨병에 대한 고위험을 시사하거나 나타내는 다른 값에는 상승된 동맥압 140/90 mm Hg 이상; 상승된 혈장 트리글리세라이드(1.7 mmol/L; 150 mg/dL) 및/또는 저 HDL-콜레스테롤(남성에 대해 0.9 mmol/L, 35 mg/dl 미만; 여성에 대해 1.0 mmol/L, 39 mg/dL 미만); 중심부 비만(남성: 허리 대 엉덩이 비 0.90 초과; 여성: 허리 대 엉덩이 비 0.85 초과) 및/또는 체질량 지수 30 kg/m² 초과; 비뇨 알부민 배출율 20 µg/분 이상이거나 알부민:크레아티닌 비 30 mg/g 이상인 미세알부민뇨가 포함된다. 용어 당뇨병은 당뇨병의 모든 형태, 예를 들면 I형, II형 및 1.5형을 포괄한다.

[0137] 용어들 "치료한다", "치료하는", "치료" 등에는 단리된 세포에 적용된 바와 같이 세포를 임의 종류의 공정 또는 조건으로 가하거나 세포 상에 임의 종류의 조작 또는 절차를 수행하는 것이 포함된다. 대상체에 적용되는 바와 같이, 용어들은 개인에 대한 의료적 또는 수술적 관심, 케어, 또는 관리의 제공을 나타낸다. 개인은 보통 아프거나 부상을 입었거나, 또는 집단의 평균 멤버에 비해 아프게 될 위험이 증가되고, 그와 같은 관심, 케어, 또는 관리를 필요로 한다.

[0138] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하는" 및 "치료"는 대상체에서 질환의 적어도 하나의 증상 감소 또는 질환에서의 개선이, 예를 들면 유익한 또는 원하는 임상 결과가 되도록 조성물의 효과적인 양을 대상체에게 투여하는 것을 나타낸다. 본 발명의 목적을 위해, 유익한 또는 원하는 임상 결과에는 비제한적으로 하나 이상의 증상 완화, 질환 정도의 약화, 안정된(즉, 악화되지 않은) 질환 상태, 질환 진행의 지체 또는 지연, 질환 상태의 개선 또는 경감, 및 진정(부분적이건 또는 전체적이건)이 검출가능하건 또는 검출불가능하건 포함된다. 치료는 치료를 받지 않는 경우의 기대 생존에 비해 연장되는 생존을 나타낼 수 있다. 따라서, 당해분야의 숙련가는 치료가 질환 상태를 개선할 수 있지만, 질환에 대한 완전 치유가 아닐 수 있음을 인식한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료"에는 예방이 포함된다. 대안적으로, 치료는 질환 진행이 감소되거나 정지되는 경우, "효과적인" 것이다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 경우 기대 생존에 비해 연장된 생존을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 것에는 이미 심장 질병으로 진단된 것들뿐만 아니라 유전적 감수성 또는 다른 인자, 예컨대 체중, 식이 및 건강으로 인해 심장 질병이 발생할 가능성이 있는 것들이 포함된다.

[0139] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "투여하는", "도입하는" 및 "이식하는"은 원하는 부위에 도입된 세포의 적어도 일부 국제화를 일으키는 방법 또는 경로에 의해, 대상체 내로 본 발명의 세포, 예를 들면 SC-β 세포의 배치 맥락에서 상호교환적으로 사용된다. 세포, 예를 들면 SC-β 세포(예를 들면, 췌장 β 세포 또는 췌장 β-유사 세포)는 췌장으로 직접 삽입될 수도 있고, 또는 대안적으로 적어도 일부의 삽입된 세포 또는 세포 성분이 생존가능하게 유지되는 상기 대상체에서의 원하는 위치로 전달을 일으키는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 대상체에 대한 투여 후 세포의 생존 기간은 수 시간, 예를 들면 24 시간만큼 짧은 기간 내지 수 일, 수 년만큼 긴 기간일 수 있다. 일부 예에서, 세포는 또한 비-췌장 위치에서, 예컨대 간 내 또는 피하로, 예를 들면 캡슐(예를 들면, 마이크로캡슐) 내로 투여되어 삽입 위치에 삽입된 세포를 유지하고 삽입된 세포의 이동을 배제할 수 있다.

[0140] 어구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여된"은 본원에서 사용된 바와 같이 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 보

통 주사를 의미하며, 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 뇌실내, 관절내, 안와내, 심장내, 진피내, 복강내, 기관경유, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 뇌척수내, 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다. 어구 "전신 투여", "전신으로 투여된", "말초 투여" 및 "말초 투여된"은 본원에서 사용된 바와 같이 이것이 동물의 시스템으로 들어가고, 이에 따라 대사 및 다른 유사 공정, 예를 들면 피하 투여를 거치도록 직접 중추신경계 내로가 아닌 심혈관 줄기 세포 및/또는 이들의 자손 및/또는 화합물 및/또는 다른 물질의 투여를 의미한다.

[0141] 용어 "조직"은 함께 특정한 특수 기능을 수행하는 특화된 세포 그룹 또는 층을 나타낸다. 용어 "조직-특이적"은 특정 조직으로부터의 세포 공급원을 나타낸다.

[0142] 용어들 "감소한다", "축소된", "축소", "감소" 또는 "억제한다"는 본원에서 모두 사용되어 일반적으로 통계적으로 유의미한 양만큼의 감소를 의미한다. 그러나 혼동을 피하기 위해, "축소된", "축소" 또는 "감소한다" 또는 "억제한다"는 참조 수준에 비해 적어도 10%만큼의 감소, 예를 들면 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 만큼의 감소 또는 최대 100%를 포함하는 감소(즉 참조 샘플에 비해 부재 수준), 또는 참조 수준에 비해 10-100% 사이의 임의 감소를 의미한다.

[0143] 용어들 "증가된", "증가한다" 또는 "증대시킨다" 또는 "활성화한다"는 모두 본원에서 사용되어 일반적으로 통계적으로 유의미한 양만큼의 증가를 의미한다; 임의의 혼동을 피하고자, 용어들 "증가된", "증가한다" 또는 "증대시킨다" 또는 "활성화한다"는 참조 수준에 비해 적어도 10% 증가, 예를 들면 적어도 약 20%, 또는 적어도 약 30%, 또는 적어도 약 40%, 또는 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90% 증가 또는 최대 100% 증가 또는 참조 수준에 비해 10-100% 사이의 임의 증가, 또는 참조 수준에 비해 적어도 약 2-배, 또는 적어도 약 3-배, 또는 적어도 약 4-배, 또는 적어도 약 5-배 또는 적어도 약 10-배 증가, 또는 2-배 내지 10-배 또는 그 초과 사이의 임의 증가를 의미한다.

[0144] 용어 "통계적으로 유의미한" 또는 "유의미하게"는 통계적 유의성을 나타내며 일반적으로 정상 미만 또는 마커 농도 미만의 2 표준 편차(2SD)를 의미한다. 차이가 있는 경우, 용어는 통계적 증거를 나타낸다. 영 가설이 실제로 참인 경우, 영 가설을 부정하기 위한 결정을 수행할 확률로 정의된다. 결정은 종종 p-값을 이용해서 수행된다.

[0145] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "포함하는" 또는 "포함한다"는 본 발명에 필수적인 조성물, 방법 및 이들의 각 성분(들)에 대해 사용되지만, 필수적이긴 아니건 특정되지 않은 요소의 포함에 대해 개방된다.

[0146] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "본질적으로 구성된"은 주어진 구현예에 대해 필요한 요소를 나타낸다. 용어는 본 발명의 구현예의 기본 및 신규 또는 기능적 특징(들)에 실제로 영향을 미치지 않는 추가 요소의 존재를 허용한다.

[0147] 용어 "로 구성된"은 본원에 기재된 바와 같은 조성물, 방법, 및 이들의 각 성분을 나타내며, 구현예의 설명에서 인용되지 않은 임의 요소는 제외된다.

[0148] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태에는 맥락 상 명확히 다르게 나타내지 않는 한 복수의 참조물이 포함된다. 따라서 예를 들면, "방법"에 대한 언급에는 본원에 기재되고/되거나 개시내용 등의 관독 시 당해분야의 숙련자에게 자명해질 유형의 하나 이상의 단계, 및/또는 방법이 포함된다.

[0149] 줄기 세포

[0150] 줄기 세포는 유사 세포 분열을 통해 자체 재생되는 능력을 보유하며, 다양한 범위의 특화된 세포형으로 분화될 수 있는 세포이다. 두 넓은 유형의 포유동물 줄기 세포는 하기와 같다: 배반포에서 확인되는 배아 줄기(ES) 세포, 및 성체 조직에서 확인되는 성체 줄기 세포. 발생 중인 배아에서, 줄기 세포는 모든 특화된 배아 조직으로 분화될 수 있다. 성체 유기체에서, 줄기 세포 및 선조 세포는 신체에 대한 치유 시스템으로 작용하여 특화된 세포를 보충할뿐만 아니라 재생 기관, 예컨대 혈액, 피부 또는 창자 조직의 정상 턴오버를 유지한다. 만능 줄기 세포는 임의의 3 배엽층에서 유도된 세포로 분화될 수 있다.

[0151] SC-β 세포(예를 들면, 성숙 채장 β 세포 또는 β-유사 세포) 또는 이들의 전구체를 생산하기 위한 줄기 세포의 사용에 대한 특정 구현예가 아래에 기재되지만, 배세포는 본원에 기재된 예시적 프로토콜과 유사한 프로토콜을 이용하여 적어도 하나의 SC-β 세포를 제공하기 위해 줄기 세포 대신에 또는 이와 함께 사용될 수 있다. 적합한 배세포는, 예를 들면 마지막 생리 기간 후 약 8-11주에 채취된 인간 태아 물질에 존재하는 원시 배세포로

부터 제조될 수 있다. 예시적인 배세포 제조 방법은, 예를 들면 [Shamblott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 및 미국 특허 번호 6,090,622]에 기재되어 있다.

[0152] 사실상 무한한 복제능 및 대부분의 세포형으로 분화하는 능력을 가진 ES 세포, 예를 들면 인간 배아 줄기 세포(hESCs) 또는 마우스 배아 줄기 세포(mESCs)는 원칙적으로 임상 요법을 위해 분화된 세포를 생성하기 위한 제한되지 않는 원료 물질을 제공한다(<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2006report.htm>, 2006). ES 세포의 하나의 가능한 적용은 먼저 내배엽, 예를 들면 hESCs로부터의 완성 내배엽을 생산한 다음 완성 내배엽을 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체로 추가 분화시키고, 그 다음 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 SC- β 세포로 추가 분화시킴으로써 I형 당뇨병의 세포 대체 요법을 위한 새로운 β 세포를 생성하는 것이다.

[0153] hESC 세포는, 예를 들면 Cowan 등(N Engl. J. Med. 350:1353, 2004) 및 Thomson 등(Science 282:1145, 1998)에 기재되며; 다른 영양류로부터의 배아 줄기 세포, 붉은털원숭이 줄기 세포(Thomson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995), 마모셋 줄기 세포(Thomson 등, Biol. Reprod. 55:254, 1996) 및 인간 배아 생식(hEG) 세포(Shamblott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998)도 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. mESCs는, 예를 들면 Tremml 등(Curr Protoc Stem Cell Biol. Chapter 1:Unit 1C.4, 2008)에 기재된다. 줄기 세포는, 예를 들면 단일분화성, 전능성, 다능성, 또는 만능성일 수 있다. 일부 예에서, 적어도 하나의 배아층, 또는 모든 3 배아층의 유도체인 자손을 생산할 수 있는 영양류 기원의 임의 세포가 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있다.

[0154] 특정 예에서, ES 세포는, 예를 들면 [Cowan 등(N Engl. J. Med. 350:1353, 2004) 및 미국 특허 번호 5,843,780 및 Thomson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995]에 기재된 바와 같이 분리될 수 있다. 예를 들면, hESCs 세포는 [Thomson 등(미국 특허 번호 6,200,806; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 및 Reubinoff 등, Nature Biotech. 18:399, 2000]에 기재된 기술을 이용하여 인간 배반포 세포로부터 제조될 수 있다. hESCs와 균등한 세포형에는 이들의 만능 유도체, 예컨대 원시 외배엽-유사(EPL) 세포, 예를 들면 WO 01/51610(Bresagen)에 개괄된 것이 포함된다. hESCs는 또한 인간 착상-전 배아로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 시험관내 수정된(IVF) 배아가 사용될 수도 있고, 또는 1 세포 인간 배아가 배반포 단계까지 증식될 수도 있다(Bongso 등, Hum Reprod 4: 706, 1989). 배아는 G1.2 및 G2.2 배지 중에서 배반포 단계까지 배양된다(Gardner 등, Fertil. Steril. 69:84, 1998). 투명층은 프로나아제(Sigma)에 대한 짧은 노출에 의해 발생된 배반포로부터 제거된다. 내세포괴는 면역수술에 의해 분리될 수 있고, 여기서 배반포는 30 분 동안 토끼 항-인간 비장 세포 항혈청의 1:50 희석물에 노출된 후 DMEM 중에 3 회, 5 분 동안 세정되고, 3분 동안 기니아 피그 보체(Gibco)의 1:5 희석물에 노출된다(Solter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099, 1975). DMEM 중에서 2회 추가 세정 후, 용해된 영양막외배엽 세포는 온전한 피펫팅에 의해 온전한 내세포괴(ICM)에서 제거되고 ICM이 mEF 영양세포층 상에 접종된다. 9 내지 15 일 후, 내세포괴-유도된 증식물이 칼슘 및 1 mM EDTA를 포함하는 마그네슘 비함유 포스페이트-완충된 염수(PBS)로의 노출에 의해, 디스파아제 또는 트립신으로의 노출에 의해, 또는 마이크로피펫을 이용한 기계적 해리에 의해 덩어리로 해리될 수 있다; 그 다음 신선한 배지 중 mEF 상에 재접종된다. 미분화된 형태를 갖는 성장 중인 콜로니는 마이크로피펫에 의해 개별적으로 선택되고, 덩어리로 기계적으로 해리되고, 재접종될 수 있다. ES-유사 형태는 분명하게 높은 핵 대 세포질 비 그리고 두드러진 인을 갖는 조밀한 콜로니를 특징으로 한다. 이어서 생성 hESCs는 매 1-2 주 마다, 예를 들면 짧은 트립신처리, 둘베코 PBS(2 mM EDTA 함유)로의 노출, IV형 콜라게나제(약 200 U/mL; Gibco)로의 노출 또는 마이크로피펫에 의한 개별 콜로니의 선택에 의해 일상적으로 분할될 수 있다. 일부 예에서, 약 50 내지 100 개 세포의 덩어리 크기가 최적이다. mESCs 세포는, 예를 들면 Conner 등(Curr. Prot. in Mol. Biol. Unit 23.4, 2003)에 의해 기재된 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0155] 배아 줄기 세포는 영양류 중 멤버의 배반포로부터 분리될 수 있다(미국 특허 번호 5,843,780; Thomson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995). 인간 배아 줄기(hES) 세포는 [Thomson 등(미국 특허 번호 6,200,806; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 및 Reubinoff 등, Nature Biotech. 18:399, 2000]에 기재된 기술을 이용해서 인간 배반포 세포로부터 제조될 수 있다. hES 세포에 대한 균등 세포형에는 이들의 만능 유도체, 예컨대 WO 01/51610(Bresagen)에 개괄된 원시 외배엽-유사(EPL) 세포가 포함된다.

[0156] 대안적으로 일부 구현예에서, hES 세포는 인간의 착상 전 배아에서 수득될 수 있다. 대안적으로, 시험관내 수정된(IVF) 배아가 사용될 수도 있고, 또는 1 세포 인간 배아가 배반포 단계까지 증식될 수도 있다(Bongso 등, Hum Reprod 4: 706, 1989). 배아는 G1.2 및 G2.2 배지 중에서 배반포 단계까지 배양된다(Gardner 등, Fertil.

Steril. 69:84, 1998). 투명층은 프로나아제(Sigma)에 대한 짧은 노출에 의해 발생된 배반포로부터 제거된다. 내세포괴는 면역수술에 의해 분리될 수 있고, 여기서 배반포는 30 분 동안 토끼 항-인간 비장 세포 항혈청의 1:50 희석물에 노출된 후 DMEM 중에 3 회, 5 분 동안 세정되고, 3분 동안 기니아 피그 보체(Gibco)의 1:5 희석물에 노출된다(Solter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099, 1975). DMEM 중에 2회 추가 세정 후, 용해된 영양막외배엽 세포는 온전한 피펫팅에 의해 온전한 내세포괴(ICM)에서 제거되고 ICM이 mEF 영양세포층 상에 접종된다.

[0157] 9 내지 15 일 후, 내세포괴-유도된 증식물이 칼슘 및 1 mM EDTA를 포함하는 마그네슘 비함유 포스페이트-완충된 염수(PBS)로의 노출에 의해, 디스파아제 또는 트립신으로의 노출에 의해, 또는 마이크로피펫을 이용한 기계적 해리에 의해 덩어리로 해리될 수 있다; 그 다음 신선한 배지 중 mEF 상에 재접종된다. 미분화된 형태를 갖는 성장 중인 콜로니는 마이크로피펫에 의해 개별적으로 선택되고, 덩어리로 기계적으로 해리되고, 재접종될 수 있다. ES-유사 형태는 분명하게 높은 핵 대 세포질 비 그리고 두드러진 인을 갖는 조밀한 콜로니를 특징으로 한다. 이어서 생성 hESCs는 매 1-2 주 마다, 짧은 트립신처리, 돌베코 PBS(2 mM EDTA 함유)로의 노출, IV형 콜라게나제(약 200 U/mL; Gibco)로의 노출 또는 마이크로피펫에 의한 개별 콜로니의 선택에 의해 일상적으로 분할된다. 약 50 내지 100 개 세포의 덩어리 크기가 최적이다.

[0158] 일부 구현예에서, 인간 배아 생식(hEG) 세포는 원시 내배엽 세포로 분화하기 위해 본원에서 개시된 바와 같은 방법에서 사용될 수 있는 만능 줄기 세포이다. hEG 세포는 마지막 생리 기간 후 약 8-11 주에 채취된 인간 태아 물질에 존재하는 원시 배세포로부터 제조되어 사용될 수 있다. 적합한 제조 방법은 [Shamblott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 및 미국 특허 번호 6,090,622]에 기재되며, 이는 본원에 그 전문이 참고로 편입된다.

[0159] 간단히, 생식기 능선을 가공하여 분열된 세포를 형성한다. EG 성장 배지는 DMEM, 4500 mg/L D-글루코오스, 2200 mg/L mM NaHCO₃; 15% ES 적격 소 태아 혈청(BRL); 2 mM 글루타민(BRL); 1 mM 나트륨 피루베이트(BRL); 1000-2000 U/mL 인간 재조합 백혈병 억제 인자(LIF, Genzyme); 1-2 ng/mL 인간 재조합 bFGF(Genzyme); 및 10 μ M 포르스콜린(10% DMSO 중)이다. 96 웰 조직 배양판은 LIF, bFGF 또는 포르스콜린이 없는 변형된 EG 성장 배지 중에 3 일 동안 배양되고 5000 rad γ -조사로 불활성화된 영양세포(예를 들면, STO 세포, ATCC No. CRL 1503)의 전-융합성 층으로 제조되며 ~0.2 mL의 일차 배세포(PGC) 현탁액이 각각의 웰들에 첨가된다. 초회 계대는 EG 성장 배지 중에서 7-10 일 후에 수행되며, 각각의 웰들을 조사된 STO 마우스 섬유아세포로 사전 제조된 24-웰 배양 접시의 한 웰씩에 옮긴다. EG 세포와 일치하는 세포 형태가 관측될 때까지, 전형적으로 7-30 일 또는 1-4 계대 후까지, 배지를 매일 교체하면서 세포를 배양한다.

[0160] 특정 예에서, 줄기 세포는 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 따라 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자로의 노출 전에 미분화될 수 있는 반면(예를 들면 세포가 특정 계통으로 위탁되지 않음), 다른 예에서는 본원에 기재된 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자(들)의 노출 전에 줄기 세포를 하나 이상의 중간체 세포형으로 분화시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 줄기 세포는 배아 또는 성체 기원의 분화된 세포로부터 이들을 구별하기 위해 사용될 수 있는 미분화된 세포의 형태적, 생물학적 또는 물리적 특성을 나타낼 수 있다. 일부 예에서, 미분화된 세포는 이차원 현미경 시야에서 높은 핵/세포질 비 및 두드러진 인을 갖는 세포 콜로니로 나타날 수 있다. 줄기 세포는 자신일 수도 있고(예를 들면, 실질적으로 임의의 미분화된 세포가 존재하지 않고) 또는 분화된 세포의 존재 하에 사용될 수도 있다. 특정 예에서, 줄기 세포는 적합한 영양소 및 선택적으로 줄기 세포가 성장하고 선택적으로 분화할 수 있도록 하는 다른 세포의 존재 하에 배양될 수 있다. 예를 들면, 배아 섬유아세포 또는 섬유아세포-유사 세포는 줄기 세포의 성장을 보조하기 위해 배양 중 존재할 수 있다. 섬유아세포는 줄기 세포 성장의 한 단계 동안 존재할 수 있지만 반드시 모든 단계에 존재해야 하는 것은 아니다. 예를 들면, 섬유아세포는 제1 배양 단계에서 줄기 세포 배양에 첨가되지만, 하나 이상의 후속 배양 단계에서는 줄기 세포 배양에 첨가되지 않을 수 있다.

[0161] 본 발명의 모든 측면에서 사용된 줄기 세포는 임의 종류의 조직(예를 들면 배아 조직, 예컨대 태아 또는 태아-전 조직, 또는 성체 조직)으로부터 유도된 임의의 세포일 수 있고, 이 줄기 세포는 적절한 조건 하에서 상이한 세포형의 자손, 예를 들면 3 배아층(내배엽, 중배엽, 및 외배엽)의 적어도 하나의 모든 유도체를 생산할 수 있는 특징을 갖는다. 이들 세포형은 확립된 세포주 형태로 제공될 수도 있고, 또는 이들은 일차 배아 조직으로부터 직접 수득되어 즉시 분화를 위해 사용될 수 있다. NIH 인간 배아 줄기 세포 레지스트리에 기재된 세포, 예를 들면 hESBGN-01, hESBGN-02, hESBGN-03, hESBGN-04(BresaGen, Inc.); HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6(ES Cell International); Miz-hES1(MizMedi Hospital-Seoul National University); HSF-1, HSF-

6(University of California at San Francisco); 및 H1, H7, H9, H13, H14(Wisconsin Alumni Research Foundation(WiCell Research Institute))가 포함된다. 일부 구현예에서, 성숙한, 인슐린 양성 세포로의 화학적으로-유도된 분화를 위해 사용된 인간 줄기 세포 또는 만능 줄기 세포의 공급원에는 인간 배아의 파괴가 관여되지 않았다.

[0162] 또 하나의 구현예에서, 줄기 세포는 고형 조직을 포함하는 조직으로부터 단리될 수 있다. 일부 구현예에서, 조직은 피부, 지방 조직(예를 들면 지방 조직), 근육 조직, 심장 또는 심장 조직이다. 다른 구현예에서, 조직은, 예를 들면 비제한적으로, 탭줄 제대혈, 태반, 골수, 또는 연골이다.

[0163] 관심 줄기 세포에는 또한 [Thomson 등(1998) Science 282:1145]에 기재된 인간 배아 줄기(hES) 세포로 예시된, 다양한 유형의 배아 세포; 다른 영장류로부터의 배아 줄기 세포, 예컨대 붉은털원숭이 줄기 세포(Thomson 등(1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844); 마모셋 줄기 세포(Thomson 등(1996) Biol. Reprod. 55:254); 및 인간 배아 생식(hEG) 세포(Shambloft 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998)가 포함된다. 또한 계통 위탁된 줄기 세포, 예컨대 중배엽 줄기 세포 및 다른 초기 심장성 세포(Reyes 등(2001) Blood 98:2615-2625; Eisenberg & Bader(1996) Circ Res. 78(2):205-16 등 참고)가 관심의 대상이다. 줄기 세포는 임의의 포유동물 중, 예를 들면 인간, 말, 소, 돼지, 개, 고양이, 설치류, 예를 들면 마우스, 랫트, 햄스터, 영장류 등으로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 인간 배아는 본원에서 개시된 바와 같은 방법 및 조성물에 대해 사용된 만능 세포 공급원에 대해 파괴되지 않았다.

[0164] ES 세포는 이들이 특정 분화 계통으로 위탁되지 않은 경우, 미분화된 것으로 간주된다. 그와 같은 세포는 배아 또는 성체 기원의 분화된 세포로부터 이들을 구별하는 형태적 특성을 나타낸다. 미분화된 ES 세포는 당해분야의 숙련자에게 쉽게 인식되며, 이차원 현미경 시야에서 전형적으로 높은 핵/세포질 비 및 두드러진 인을 갖는 세포 콜로니로 나타난다. 미분화된 ES 세포는 미분화된 세포의 존재를 검출하기 위한 마커로 사용될 수 있고, 그 폴리펩타이드 생성물이 음성 선택을 위한 마커로 사용될 수 있는 유전자를 발현한다. 예를 들면, 각각 본원에 참고로 편입된 [미국 출원 일련 번호 2003/0224411 A1; Bhattacharya(2004) Blood 103(8):2956-64; 및 Thomson(1998), 상기 문헌]을 참고하라. 인간 ES 세포주는 단계 특이적 배아 항원(SSEA)-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, 및 알칼리성 포스파타제를 포함하는 미분화된 비인간 영장류 ES 및 인간 EC 세포를 특징적으로 나타내는 세포 표면 마커를 발현한다. SSEA-4 에피토프를 수반하는 당-시리즈 당지질 GL7은 SSEA-3 에피토프를 수반하는 당-시리즈 당지질 GbS에 대한 시알산의 부가에 의해 형성된다. 따라서, GL7은 SSEA-3 및 SSEA-4 모두에 대한 항체와 반응한다. 미분화된 인간 ES 세포주는 SSEA-1을 염색하지 않았지만, 분화된 세포는 SSEA-I을 강하게 염색시켰다. 미분화된 형태로 hES 세포를 증식시키기 위한 방법은 WO 99/20741, WO 01/51616, 및 WO 03/020920에 기재되어 있다.

[0165] 내피, 근육, 및/또는 신경 줄기 세포의 적합한 공급원으로부터의 세포 혼합물은 당해기술에 공지된 방법에 의해 포유동물 공여체로부터 수확될 수 있다. 적합한 공급원은 조혈 미세환경이다. 예를 들면, 바람직하게는 가동화된(즉 동원된), 순환 말초 혈액은 대상체로부터 제거될 수 있다. 대안적으로, 골수는 자가 이식을 거치고 있는 포유동물, 예컨대 인간 환자로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는, 예를 들면 Cytori의 CELUTION™ 시스템을 이용하여, 본원에 그 전문이 참고로 편입된 미국 특허 번호 7,390,484 및 7,429,488에 개시된 바와 같이 대상체 지방 조직으로부터 수득될 수 있다.

[0166] 일부 구현예에서, 인간 제대혈 세포(HUCBC)는 본원에서 개시된 바와 같은 방법에서 유용하다. 인간 UBC 세포는 조혈 및 간엽 선조 세포가 풍부한 공급원으로 인식된다(Broxmeyer 등, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4109-4113). 이전에, 탭줄 및 태반 혈액은 영아 출생 시 보통 폐기되는 폐기물로 간주되었다. 탭줄 혈구는 이식가능한 줄기 및 선조 세포의 공급원으로서, 그리고 악성 질환(즉 급성 림프모양 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 및 신경모세포종) 및 비-악성 질환, 예컨대 판코니 빈혈 및 재생불량빈혈(Kohli-Kumar 등, 1993 Br. J. Haematol. 85:419-422; Wagner 등, 1992 Blood 79: 1874-1881; Lu 등, 1996 Crit. Rev. Oncol. Hematol 22:61-78; Lu 등, 1995 Cell Transplantation 4:493-503)의 치료를 위한 골수 재증식 세포의 공급원으로서 사용된다. HUCBC의 뚜렷이 다른 이점은 태아 세포와 매우 유사한 이들 세포의 미성숙한 면역력으로, 이는 숙주에 의한 거부 위험을 크게 감소시킨다(Taylor & Bryson, 1985 J. Immunol. 134:1493-1497). 인간 제대혈은 조직 배양에서 증식될 수 있는 간엽 및 조혈 선조 세포, 및 내피 세포 전구체를 함유한다(Broxmeyer 등, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4109-4113; Kohli-Kumar 등, 1993 Br. J. Haematol. 85:419-422; Wagner 등, 1992 Blood 79: 1874-1881; Lu 등, 1996 Crit. Rev. Oncol. Hematol 22:61-78; Lu 등, 1995 Cell Transplantation 4:493-503; Taylor & Bryson, 1985 J. Immunol. 134:1493-1497 Broxmeyer, 1995 Transfusion 35:694-702; Chen 등, 2001 Stroke 32:2682-2688; Nieda 등, 1997 Br. J.

Haematology 98:775-777; Erices 등, 2000 Br. J. Haematology 109:235-242). 제대혈 중 조혈 선조 세포의 전체 함량은 골수와 동일하거나 이를 초과하며, 또한 매우 증식성이 높은 조혈 세포는 골수에서보다 HUCBC에서 8 배 더 많고, 조혈 마커, 예컨대 CD14, CD34, 및 CD45를 발현한다(Sanchez-Ramos 등, 2001 Exp. Neur. 171:109-115; Bicknese 등, 2002 Cell Transplantation 11:261-264; Lu 등, 1993 J. Exp Med. 178:2089-2096).

[0167] 또 하나의 구현예에서, 만능 세포는 조혈 마이크로-환경 내, 예컨대 순환 말초 혈액, 바람직하게는 말초 혈액, 제대혈, 골수, 태아 간 또는 포유동물의 난황의 단핵 분획으로부터의 세포이다. 줄기 세포, 특히 신경 줄기 세포는 또한 수막을 포함하는 중추신경계로부터 유도될 수 있다.

[0168] 또 하나의 구현예에서, 만능 세포는 유배아체에 존재하며, 짧은 프로테아제 소화로 ES 세포를 수확하고, 미분화된 인간 ESCs의 작은 덩어리가 현탁 배양에서 자라도록 하여 형성된다. 분화는 컨디셔닝된 배지의 회수에 의해 유도된다. 수득한 유배아체는 반-고형 기재 상에 접종된다. 분화된 세포의 형성은 약 7 일 후부터 약 4 주까지 관측될 수 있다. 줄기 세포의 시험관내 배양으로부터의 생존가능한 분화 세포는 유배아체 또는 유사한 구조를 부분적으로 해리하여 세포 응집물을 제공하기 위해 선택된다. 관심 세포를 포함하는 응집물은 응집물에서 세포 대 세포 접촉을 실질적으로 유지하는 방법을 이용하여 표현형 특징에 대해 선택된다.

[0169] 대안적인 구현예에서, 줄기 세포는 재프로그래밍된 줄기 세포, 예컨대 체세포 또는 분화된 세포로부터 유도된 줄기 세포일 수 있다. 그와 같은 구현예에서, 탈-분화된 줄기 세포는, 예를 들면 비제한적으로 신생물 세포, 종양 세포 및 암 세포 또는 대안적으로 유도된 재프로그래밍된 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 또는 iPS 세포일 수 있다.

[0170] 클로닝 및 세포 배양

[0171] 본원에 기재된 기술에서 사용될 수 있는 분자 유전학 및 유전 공학에 대해 예증적인 방법은, 예를 들면 [Current editions of Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Sambrook 등, Cold Spring Harbor); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Miller & Calos eds.); 및 Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel 등 eds., Wiley & Sons)]에서 확인될 수 있다. 세포 생물학, 단백질 화학, 및 항체 기술은, 예를 들면 [Current Protocols in Protein Science(J. E. Colligan 등 eds., Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology(J. S. Bonifacino 등, Wiley & Sons) 및 Current protocols in Immunology(J. E. Colligan 등 eds., Wiley & Sons.)]에서 확인될 수 있다. 유전자 조작에 대해 예증적인 시약, 클로닝 벡터, 및 키트는, 예를 들면 BioRad, Stratagene, Invitrogen, ClonTech, 및 Sigma-Aldrich Co.에서 상업적으로 수득할 수 있다.

[0172] 적합한 세포 배양 방법은, 예를 들면 일반적으로 [Current edition of Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (R. I. Freshney ed., Wiley & Sons); General Techniques of Cell Culture (M. A. Harrison & I. F. Rae, Cambridge Univ. Press), 및 Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols (K. Turksen ed., Humana Press)]에 기재된 세포 배양 방법에서 확인될 수 있다. 적합한 조직 배양 공급물질 및 시약은, 예를 들면 Gibco/BRL, Nalgene-Nunc International, Sigma Chemical Co., 및 ICN Biomedicals에서 상업적으로 이용가능하다.

[0173] 다능 줄기 세포는 당해분야의 숙련가에 의해 증식되고, 분화를 촉진하지 않고 증식을 촉진하는 배양 조건을 이용하여 계속 배양될 수 있다. 예시적인 혈청-함유 ES 배지는 80% DMEM(예컨대 넥아웃 DMEM, Gibco), 20%의 정의된 소 태아 혈청(FBS, Hyclone) 또는 혈청 대체물질(WO 98/30679), 1% 비-필수 아미노산, 1 mM L-글루타민, 및 0.1 mM β-머캅토에탄올로 제조된다. 사용 직전에, 인간 bFGF가 4 ng/mL로 첨가된다(WO 99/20741, Geron Corp.). 전통적으로, ES 세포는 영양세포, 전형적으로 배아 또는 태아 조직으로부터 유도된 섬유아세포의 층 상에 배양된다.

[0174] Geron의 과학자들은 만능 SCs가 영양세포 없이도 미분화된 상태로 유지될 수 있음을 확인하였다. 영양세포가 없는 배양 환경에는 적합한 배양 기재, 특히 세포의 매트릭스, 예컨대 Matrigel® 또는 라미닌이 포함된다. 전형적으로, 효소적 소화는 세포가 완전 분산되기(즉, 콜라게나제 IV를 이용하여 약 5분) 전에 정지된다. 이어서 ~10 내지 2,000 개 세포 덩어리가 추가 분산 없이 기재 상에 직접 접종된다.

[0175] 영양세포-비함유 배양은 분화 없이 세포 증식을 지지하는 인자를 함유하는 영양 배지에 의해 지지된다. 그와 같은 인자는 그와 같은 인자를 분비하는 세포, 예컨대 조사된(~4,000 rad) 일차 마우스 배아 섬유아세포, 텔로머화된 마우스 섬유아세포, 또는 pPS 세포로부터 유도된 섬유아세포-유사 세포와 배지를 배양하여 배지 내로 도입될 수 있다. 배지는 무혈청 배지, 예컨대 20% 혈청 대체물질 및 4 ng/mL bFGF가 보강된 KO DMEM 중 ~5-6x10⁴

cm^{-2} 의 밀도로 영양세포를 접종하여 컨디셔닝될 수 있다. 1-2일 동안 컨디셔닝된 배지는 추가 bFGF로 보강되고 1-2일 동안 만능 SC 배양을 지지하기 위해 사용된다. 영양세포-비함유 배양 방법의 특성은 [국제 특허 공보 WO 01/51616; 및 Xu 등, Nat. Biotechnol. 19:971, 2001]에서 추가 논의된다.

[0176] 현미경 하에서, ES 세포는 높은 핵/세포질 비, 두드러진 인, 및 잘 구별되지 않는 세포 접합을 갖는 조밀한 콜로니 형성으로 나타난다. 영장류 ES 세포는 단계 특이적 배아 항원(SSEA) 3 및 4, 및 Tra-1-60 및 Tra-1-81로 명명된 항체를 이용해서 검출가능한 마커(Thomson 등, Science 282:1145, 1998)를 발현한다. 마우스 ES 세포는 SSEA-1에 대한 양성 대조군으로, 그리고 SSEA-4, Tra-1-60, 및 Tra-1-81에 대한 음성 대조군으로 사용될 수 있다. SSEA-4는 인간 배아 암종(hEC) 세포에 일관되게 존재한다. 시험관내 만능 SCs의 분화는 SSEA-4, Tra-1-60, 및 Tra-1-81 발현의 소실, 및 미분화된 hEG 세포에서도 확인되는 SSEA-1의 증가된 발현을 일으킨다.

[0177] 줄기 세포-유도된 β 세포(SC- β)

[0178] 일부 측면에서, 개시내용은 줄기 세포-유도된 β 세포(SC- β)를 제공한다. 본원에 개시된 SC- β 세포는 원상태 β 세포의 여러 구별되는 특징을 공유하지만, 특정 측면(예를 들면, 유전자 발현 프로파일)에서 상이하다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 원상태가 아니다. 본원에서 사용된 바와 같이, "원상태가 아닌"은 특정 측면에서 SC- β 세포가 자연에 존재하는 β 세포, 즉 원상태 β 세포와 현저히 상이함을 의미한다. 그러나, 이러한 현저한 차이는 전형적으로 특정한 기능적 차이를 나타내는 SC- β 세포를 생성할 수 있는 구조적 특징을 보유함이 이해되어야 하고, 예를 들면 SC- β 세포의 유전자 발현 패턴이 원상태 β 세포와 다르지만, SC- β 세포는 원상태 β 세포와 유사한 방식으로 거동하지만 특정 기능은 원상태 β 세포에 비해 변경될(예를 들면, 개선될) 수 있다. 예를 들면, 도 2e에 나타난 바와 같이, 더 높은 빈도의 SC- β 세포가 원상태 β 세포의 빈도에 비해 20 mM 글루코오스에 반응한다. SC- β 세포 및 원상태 β 세포 간의 다른 차이는 본원에 개시된 데이터에 기반하여 숙련가에게 분명할 것이다.

[0179] 개시내용의 SC- β 세포는 정상 β 세포 기능에 중요한 β 세포의 많은 특징적인 특성을 공유한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 시험관내에서 글루코오스 자극된 인슐린 분비(GSIS) 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 생체내에서 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 시험관내 및 생체내 GSIS 반응을 모방한다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 내인성 성숙 췌장 β 세포의 GSIS 반응과 유사하다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 하나의 글루코오스 챌린지에 대한 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 2개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 3개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 여러 글루코오스 챌린지에 대한 내인성 인간 소도의 GSIS 반응을 모방한다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 세포를 인간 또는 동물에 이식한 직후에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 세포를 인간 또는 동물에 이식한 대략 24 시간 내에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 인간 또는 동물 내로의 세포 이식 후 대략 1 주 이내에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 상기 세포를 인간 또는 동물에 이식한 대략 2 주 내에 관측된다. 일부 구현예에서, 저 글루코오스 농도 대비 고 글루코오스 농도에 반응하여 분비된 인슐린의 비를 특징으로 하는 세포의 자극 지수는 내인성 성숙 췌장 β 세포의 자극 지수와 유사하다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 1 초과의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 1 이상의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 1.1 초과의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 1.1 이상의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 2 초과의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 2 이상의 자극 지수를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 또는 5.0 또는 그 초과의 자극 지수를 나타낸다.

[0180] 일부 구현예에서, SC- β 세포는 사이토카인에 대해 반응하여 사이토카인-유도된 세포자멸사를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 인터루킨-1 β (IL- β), 인터페론- γ (INF- γ), 종양 괴사 인자- α (TNF- α), 및 이들의 조합으로 구성된 그룹에서 선택된 사이토카인에 반응하여 사이토카인-유도된 세포자멸사를 나타낸다.

[0181] 일부 구현예에서, SC- β 세포로부터의 인슐린 분비는 공지된 항-당뇨병 약물(예를 들면, 생체의 또는 시험관내에서 β 세포 상에 작용하는 항-당뇨병 약물, 및/또는 일반적으로 생체내 항-당뇨병 약물)에 반응하여 증대된다. 개시내용은 임의의 공지된 항-당뇨병 약물을 고려한다. 일부 구현예에서, SC- β 세포로부터의 인슐린 분비는 분비촉진제에 반응하여 증대된다. 일부 구현예에서, 분비촉진제는 인크레틴 모방체, 설폰닐우레아, 메글리티나이드, 및 이들의 조합으로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0182] 일부 구현예에서, SC- β 세포는 모노호르몬이다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 내인성 성숙 췌장 β 세포의

형태와 닮은 형태를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 결정성 인슐린 과립을 캡슐화한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 전자 현미경검사 하에서 내인성 성숙 췌장 β 세포의 인슐린 과립을 모방하는 캡슐화된 결정성 인슐린 과립을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 낮은 복제율을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 낮은 복제율을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 프롤락틴을 이용한 치료에 반응하여 C-펩타이드 및 Ki67에 대한 염색으로 측정된 바와 같이, 낮지만 증가하는 복제율을 나타낸다.

[0183] 일부 구현예에서, SC-β 세포는 글루코오스에 반응하여 세포내 Ca^{2+} 을 증가시킨다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 내인성 성숙 췌장 β 세포의 GSCF를 모방하는 글루코오스 자극된 Ca^{2+} 플럭스(GSCF)를 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 여러 글루코오스 챌린지에 대한 내인성 성숙 췌장 β 세포의 GSCF 반응을 모방하는 방식으로 적어도 3개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 GSCF 반응을 나타낸다.

[0184] 일부 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린, C-펩타이드, PDX1, MAFA, NKX6-1, PAX6, NEUROD1, 글루코키나아제 (GCK), SLC2A1, PCSK1, KCNJ11, ABCC8, SLC30A8, SNAP25, RAB3A, GAD2, 및 PTPRN로 구성된 그룹으로부터 선택된 내인성 성숙 췌장 β 세포에 특징적인 적어도 하나의 마커를 발현한다.

[0185] 일부 구현예에서, SC-β 세포는 a) i) 글루카곤(GCG), 및 ii) 소마토스타틴(SST)으로 구성된 그룹으로부터 선택된 호르몬; b) i) 아밀라제, 및 ii) 카복시펩티다아제 A(CPA1)로 구성된 그룹으로부터 선택된 썬파리 세포 마커, c) i) GCG, Arx, Irx1, 및 Irx2로 구성된 그룹으로부터 선택된 α 세포 마커, d) i) CFTR, 및 ii) Sox9로 구성된 그룹으로부터 선택된 관상 세포 마커로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커(예를 들면, 내인성 성숙 췌장 β 세포에 의해 발현되지 않는 마커)를 발현하지 않는다.

[0186] 본 발명은 SC-β 세포가 유도되는 개시 세포에 의해 제한하고자 하지 않으므로, SC-β 세포는 임의의 개시 세포로부터 시험관내 분화된다. 예시적인 개시 세포에는 비제한적으로 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 임의의 전구체, 예컨대 Nkx6-1-양성 췌장 선조 세포, Pdx1-양성 췌장 선조 세포, 및 만능 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 및 유도된 만능 줄기 세포가 포함된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 재프로그래밍된 세포, 부분적으로 재프로그래밍된 세포(즉, 체세포, 예를 들면 유도된 만능 세포 및 이것이 유도된 체세포 사이의 중간체 상태로 존재하도록 부분적으로 재프로그래밍된 섬유아세포), 전환분화된 세포로부터 시험관내 분화된다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 SC-β 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체로부터 시험관내 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 Nkx6-1-양성 췌장 선조 세포, Pdx1-양성 췌장 선조 세포, 및 만능 줄기 세포로 구성된 그룹으로부터 선택된 전구체로부터 시험관내 분화된다. 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포 및 유도된 만능 줄기 세포로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 또는 SC-β 세포가 유도되는 만능 줄기 세포는 인간이다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 인간의 것이다.

[0187] 일부 구현예에서, SC-β 세포는 유전적으로 변형되지 않는다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 세포의 유전자 변형의 부재 하에 원상태 β 세포와 공통으로 공유하는 특성을 수득한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 유전적으로 변형된다.

[0188] 일부 구현예에서, SC-β 세포 당 생산된 인슐린은 고 글루코오스 농도에서 30 분 인큐베이션 당(예를 들면 생체 외) 적어도 0.5 μ IU/1000 개 세포이다.

[0189] 일부 구현예에서, SC-β 세포 당 생산된 인슐린은 고 글루코오스 농도에서 30 분 인큐베이션 당 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4 적어도 5 적어도 6, 적어도 7 적어도 8 또는 적어도 9 μ IU/1000 개 세포이다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 당 생산된 인슐린은 고 글루코오스 농도에서 30 분 인큐베이션 당 0.5 내지 10 μ IU/1000 개 세포이다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 당 생산된 인슐린은 고 글루코오스 농도에서 30 분 인큐베이션 당 대략 2.5 μ IU/1000 개 세포이다.

[0190] 일부 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 SC-β 세포를 포함하는 세포주를 제공한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린을 안정되게 발현한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 적어도 30 세대까지 유의미한 형태 변화 없이 24 내지 44 시간의 배가 시간을 가지며 냉동되고, 해동되고, 증폭될 수 있다.

[0191] SC-β 세포의 생성

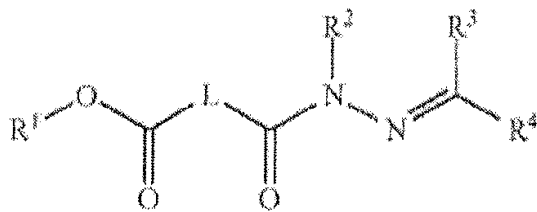
[0192] 개시내용의 측면은 SC-β 세포(예를 들면, 췌장 β 세포)의 생성에 관한 것이다. 일반적으로, 적어도 하나의 SC-β 세포 또는 이들의 전구체, 예를 들면 본원에 개시된 방법에 따라 생산된 췌장 조상세포는 상이한 세포의 혼합물 또는 조합, 예를 들면 세포, 예컨대 Pdx1-양성 췌장 조상세포, 췌장 조상세포 공동-발현 Pdx1 및 NKX6-1, Ngn3-양성 내분비 선조 세포, 인슐린-양성 내분비 세포(예를 들면, β-유사 세포), 및 인슐린-양성 내분비

세포, 및/또는 다른 만능 또는 줄기 세포의 혼합물을 포함할 수 있다.

- [0193] 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체는 원하는 분화 단계로 줄기 세포 또는 만능 세포를 분화시키기 위한 임의의 적합한 배양 프로토콜에 따라 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체는 적어도 하나의 만능 세포가 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체로 분화하기 적합한 조건 하에 그리고 기간 동안 적어도 하나의 만능 세포를 배양하여 생산된다.
- [0194] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체는 SC- β 세포 또는 이들의 전구체의 실질적으로 순수한 집단이다. 일부 구현예에서, SC- β 세포 또는 이들의 전구체의 집단은 만능 세포 또는 분화된 세포의 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 집단 SC- β 세포 또는 이들의 전구체에는 배아 줄기 세포 또는 만능 세포 또는 iPS 세포가 실질적으로 없거나 결여된다.
- [0195] 일부 구현예에서, 체세포, 예를 들면 섬유아세포는 대상체로부터, 예를 들면 조직 생검, 예컨대 피부 생검으로 단리되고, 본원에서 기재된 조성물 및 방법에서 사용하기 위한 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체를 생산하기 위한 추가 분화를 위해 유도된 만능 줄기 세포로 재프로그래밍될 수 있다. 일부 구현예에서, 체세포, 예를 들면 섬유아세포는 당해분야의 숙련자에게 공지된 방법에 의해 배양 중 유지되며, 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 SC- β 세포로 전환되기 전에 증식된다.
- [0196] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체는 당해분야의 숙련자에게 공지된 방법에 의해 배양 중 유지되며, 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 SC- β 세포로 전환되기 전에 증식된다.
- [0197] 게다가, 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체, 예를 들면 체장 조상세포는 췌장, 소, 유인원, 돼지, 말, 양, 또는 인간 세포를 포함하는 비제한적 예를 갖는 임의의 포유동물 중에서 유래될 수 있다. 명확성과 단 순성을 위해, 본원에서 방법의 기재는 포유동물의 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체를 나타내지만, 본원에서 기재된 모든 방법이 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체의 다른 세포형에 쉽게 적용될 수 있음이 이해되어야 한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 SC- β 세포 또는 이들의 전구체는 인간 개인으로부터 유도된다.
- [0198] 만능 줄기 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화 유도
- [0199] 개시내용의 측면에는 완성 내배엽 세포가 관여된다. 본원에서 사용된 완성 내배엽 세포는 임의의 공급원으로부터 유도되거나 임의의 적합한 프로토콜에 따라 생성될 수 있다. 일부 측면에서, 만능 줄기 세포, 예를 들면 iPSCs 또는 hESC는 내배엽 세포로 분화된다. 일부 측면에서, 내배엽 세포는, 예를 들면 원시 소화관 세포, Pdx1-양성 체장 선조 세포, NKX6-1-양성 체장 선조 세포, Ngn3-양성 내분비 선조 세포, 또는 인슐린-양성 내분 비 세포로 추가 분화된 다음 SC- β 세포로 유도 또는 성숙된다.
- [0200] 일부 구현예에서, 줄기 세포는 새로운 기재 상에 접종될 수도 있고 배지가 분화를 억제하는 가용성 인자 또는 세포외 매트릭스를 제거하기 위해 교체될 수도 있다. 이것은 때때로 "직접적 분화 방법"으로 불리며, 본원에 그 전문이 참고로 편입된 국제 특허 공보 WO 01/51616, 및 U.S. 특허 공보 2002/0019046에 일반적인 용어로 기재된 다. 보통 직접적 분화 방법에서는 잔류 영양세포에 의해 야기된 분화 공정에서의 잠재적인 복잡화를 배제하기 위해 영양세포-비함유 줄기 세포 배양으로 시작하는 것이 바람직하다. 또 하나의 접근법은 미분화된 줄기 세포 를 현탁 배양에 적용하는 것으로, 이는 이들이 분화된 및 미분화된 세포 응집물을 형성하도록 빈번하게 유도한 다. 예를 들면, 줄기 세포는 짧은 콜라게나제 소화에 의해 수확되고, 클러스터로 해리되고, 비-부착 세포 배양 판에서 계대될 수 있다. 응집물은 며칠마다 배지가 공급된 다음 적합한 기간, 전형적으로 4-8 일 후 수확될 수 있다. 조건에 따라, 응집물은 일반적으로 상당한 빈도의 내배엽 세포를 포함하는 이종성 세포형 집단을 형성하 며 시작된다. 이어서 응집물이 분산되고, 기재, 예컨대 라미닌 또는 파이브로넥틴 상에서 분화 공정의 다음 단 계를 위해 재접종될 수도 있고; 또는 예를 들면, 비-부착 플레이트 및 적합한 배지를 이용하여 현탁 배양 중 계 대될 수도 있다.
- [0201] 직접적 분화 또는 응집물 중 분화는 적합한 마커, 예컨대 미국 특허 번호 7,326,572에 열거된 것들을 이용하여 내배엽 세포의 존재에 대해 모니터링될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, 분화는 마커, 예컨대 Sox17을 이용 해서 내배엽 세포의 존재에 대해 모니터링될 수 있다. 일단 충분한 비율의 내배엽이 수득되면, 세포가 재접종되 거나 달리 조작되어 또 하나의 분화 단계를 시작할 수 있다. 특정 상황에서, 세포의 분화 또는 유지는 세포가 마이크로매스 클러스터(예를 들면, 50 내지 5,000 개 세포)로 유지되는 경우 증대될 수 있다. 개시내용에 의해 고려된 추가 분화 단계를 도 1에 나타낸다.

[0202] 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 본원에 참고로 편입된 미국 특허 번호 8,507,274("'274 특허")에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물과 만능 줄기 세포를 접촉시켜(예를 들면 배양하여) 생산된다. '274 특허에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물은 세포 투과성 소분자이며, 신호 전달 경로, 유전자 발현 또는 대사를 조정함으로써 세포 공정을 조정할 수 있고, 줄기 세포 분화 프로토콜에서 효과적으로 사용되어 왔다. 소분자는 다량 및 고순도로 합성될 수 있을 뿐만 아니라 편리하게 공급되거나 제거되어, 치료적 적용을 위해 유용하도록 큰 잠재력을 제공할 수 있다. 고처리량 스크린이 ES 세포의 자가 재생(Chen 등, 2006; Desbordes 등, 2008), 마우스 ES 세포(Wu 등, 2004) 또는 신경 선조 세포(Diamandis 등, 2007)의 심장 분화를 지지할 뿐만 아니라 특히 뉴런 및 근육 세포의 특정 세포형을 유도(Ding 및 Schultz, 2004에서 검토됨)할 수 있는 신규한 소분자를 동정하기 위해 수행되었다. '274 특허의 화학식 I의 화합물은 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 세포로 분화시키기 위해 사용될 수 있는 것으로 예상된다.

[0203] 일부 구현예에서, '274 특허의 화학식 I의 화합물은 하기를 포함한다:



화학식 I

[0204] 식 중:

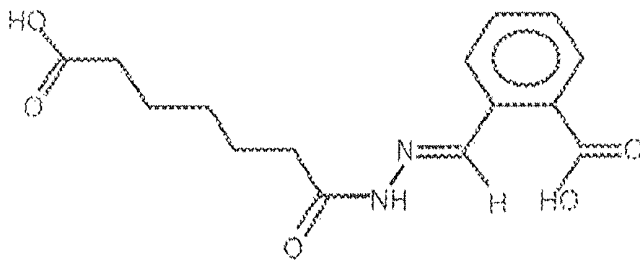
[0205] 식 중:

[0206] R^1 및 R^2 는 독립적으로 H, 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릴, 또는 사이클릴이며, 그 각각은 선택적으로 치환될 수 있고/있거나 하나 이상의 O, N, S, S(O), 및 C(O)로 골격이 방해될 수 있고;

[0207] R^3 및 R^4 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 사이클릴, 또는 사이클릴이며, 그 각각은 선택적으로 치환되거나, 또는 R^3 및 R^4 는 이들이 부착된 탄소와 함께 헤테로사이클릴의 선택적으로 치환된 사이클릴을 형성하고; 및

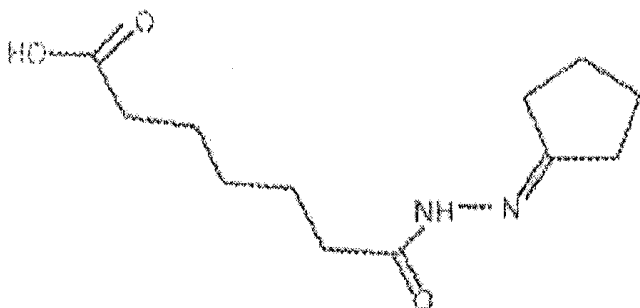
[0208] L은 C_1 - C_{10} 알킬레닐, C_2 - C_{10} 알케닐레닐, 또는 C_2 - C_{10} 알키닐레닐이며, 그 각각은 선택적으로 치환될 수 있고/있거나 하나 이상의 O, N, S, S(O), 및 C(O)로 골격이 방해될 수 있다.

[0209] 일부 구현예에서, '274 특허의 화학식 I의 화합물은 하기 IDE1을 포함한다:



[0210]

[0211] 일부 구현예에서, '274 특허의 화학식 I의 화합물은 하기 IDE2를 포함한다:



[0212]

- [0213] '274 특허는 이렇게 유도된 완성 내배엽 세포의 정체를 확인하기 위한 방법뿐만 아니라 완성 내배엽을 단리하고, 저장하고, 증식시키고, 추가 분화하기 위한 방법을 기재하며, 이것은 모두 숙련가에 의해 이해될 바와 같은 본원에 기재된 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있다.
- [0214] 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 집단 내 적어도 일부 만능 세포를 완성 내배엽 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 만능 세포 집단을 i) TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 및 ii) WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉시켜서 적어도 일부 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화를 유도함으로써 획득될 수 있고, 상기 완성 내배엽 세포는 완성 내배엽의 적어도 하나의 마커 특징을 발현한다.
- [0215] 개시내용은 만능 줄기 세포가 완성 내배엽 세포로 분화하도록 유도하는 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 임의의 성장 인자의(예를 들면, 단독으로, 또는 WNT 신호전달 경로 활성제와 조합된) 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 액티빈 A를 포함한다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 성장 분화 인자 8(GDF8)을 포함한다.
- [0216] 개시내용은 만능 줄기 세포가 완성 내배엽 세포로 분화하도록 유도하는 WNT 신호전달 경로 활성제의(예를 들면, 단독으로, 또는 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자와 조합된) 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 CHIR99021을 포함한다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 Wnt3a 재조합 단백질을 포함한다.
- [0217] 숙련가는 이용된 제제(예를 들면, 성장 인자) 이용된 제제의 농도가 변할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 10 ng/mL - 1000 ng/mL 농도에서 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 100 ng/mL 농도에서 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 20 ng/mL, 30 ng/mL, 40 ng/mL, 50 ng/mL, 60 ng/mL, 70 ng/mL, 80 ng/mL, 또는 90 ng/mL 농도에서 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 91 ng/mL, 92 ng/mL, 93 ng/mL, 94 ng/mL, 95 ng/mL, 96 ng/mL, 97 ng/mL, 98 ng/mL 또는 99 ng/mL 농도에서 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 110 ng/mL, 120 ng/mL, 130 ng/mL, 140 ng/mL, 150 ng/mL, 160 ng/mL, 170 ng/mL, 180 ng/mL, 또는 190 ng/mL 농도에서 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 101 ng/mL, 102 ng/mL, 103 ng/mL, 104 ng/mL, 105 ng/mL, 106 ng/mL, 107 ng/mL, 108 ng/mL 또는 109 ng/mL 농도에서 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다.
- [0218] 일부 구현예에서, 만능 세포는 1.4 μ g/mL - 140 μ g/mL 농도에서 WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 14 μ g/mL 농도에서 WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 2 μ g/mL, 3 μ g/mL, 4 μ g/mL, 5 μ g/mL, 6 μ g/mL, 7 μ g/mL, 8 μ g/mL, 9 μ g/mL, 10 μ g/mL, 11 μ g/mL, 12 μ g/mL 또는 13 μ g/mL 농도에서 WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 15 μ g/mL, 16 μ g/mL, 17 μ g/mL, 18 μ g/mL, 19 μ g/mL, 20 μ g/mL, 21 μ g/mL, 22 μ g/mL, 23 μ g/mL, 24 μ g/mL, 25 μ g/mL, 26 μ g/mL, 27 μ g/mL, 28 μ g/mL, 29 μ g/mL, 또는 30 μ g/mL 농도에서 WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 13.1 μ g/mL, 13.2 μ g/mL, 13.3 μ g/mL, 13.4 μ g/mL, 13.5 μ g/mL, 13.6 μ g/mL, 13.7 μ g/mL, 13.8 μ g/mL, 또는 13.9 μ g/mL 농도에서 WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 14.1 μ g/mL, 14.2 μ g/mL, 14.3 μ g/mL, 14.4 μ g/mL, 14.5 μ g/mL, 14.6 μ g/mL, 14.7 μ g/mL, 14.8 μ g/mL, 또는 14.9 μ g/mL 농도에서 WNT 신호전달 경로 활성제와 접촉된다.
- [0219] 일반적으로, 만능 세포는 적어도 일부 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화를 유도하기 충분한 기간 동안 적합한 배양 배지(예를 들면, 현탁 배양)에서 유지된다. 예시적인 적합한 배양 배지를 아래 표 1에 나타낸다.

[0220] 표 1

제제	양
MCDB131	1L
글루코오스	0.44
NaHCO ₃	2.46g
FAF-BSA	20g
ITS-X	20uL
Glutamax	10mL
비타민 C	0.044g
헤파린	0g
P/S	10mL

[0221]

[0222]

[0223]

일부 구현예에서, 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화에 적합한 배양 배지는 S1 배지를 포함한다.

일부 구현예에서, 만능 세포의 접촉은 현탁 배양 중에 시행된다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 스피너 플라스크에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 3 일이다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 및 WNT 신호전달 경로 활성제는 제1 일에 현탁 배양에 첨가된다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 제2 일에 현탁 배양에 보충된다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 제2 일에 현탁 배양에 보충되지 않는다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 제2 일에 현탁 배양에서 제거된다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 제2 일에 현탁 배양에 보충되며, WNT 신호전달 경로 활성제는 제2 일에 현탁 배양에서 제거되거나 현탁 배양에 보충되지 않는다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 WNT 신호전달 경로 활성제는 모두 제3 일에 현탁 배양에 보충되지 않는다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자 및 WNT 신호전달 경로 활성제는 모두 제3 일에 현탁 배양으로부터 제거된다.

[0224]

본 방법은 세포 집단에서 적어도 하나의 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화를 유도할 수 있다. 일반적으로, 임의의 만능 세포가 본원에 기재된 방법을 이용해서 완성 내배엽 세포로 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 유도된 만능 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 배아 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 만능 세포는 인간 세포를 포함한다.

[0225]

일부 구현예에서, 집단 내 적어도 일부 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화는 만능 세포 집단을 i) 액티빈 A, 및 ii) CHIR99021과 접촉시키는 공정에 의해 집단 내 적어도 일부 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화를 유도하여 달성되며, 상기 완성 내배엽 세포는 완성 내배엽의 적어도 하나의 마커 특징을 발현한다.

[0226]

완성 내배엽 세포를 생산하기 위한 다른 방법은, 예를 들면 미국 출원 공개 US2006/0003446, G. Keller 등; US2006/0003313, K. D'Amour 등, US2005/0158853, K. D'Amour 등, 및 US2005/0260749, Jon Odorico 등에 나타난 방법을 포함하는 당해기술에 공지되어 있고, 그 관련 부분이 본원에 참고로 편입된다.

[0227]

일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 Nodal, Tmprss2, Tmem30b, St14, Spink3, Sh3gl2, Ripk4, Rab15, Npnt, Clic6, Cldn8, Cacna1b, Bnpl1, Anxa4, Emb, FoxA1, Sox17, 및 Rbm35a로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 발현하며, 여기서 적어도 하나의 마커의 발현은 이것이 유도되는 만능 줄기 세포에 비해 완성 내배엽 세포에서 통계적으로 유의미한 양만큼 상향조절된다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 Gata4, SPARC, AFP 및 Dab2로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 마커를 이것이 유도된 만능 줄기 세포에 비해 통계적으로 유의미한 양만큼 발현하지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 Zic1, Pax6, Flk1 및 CD31로 구성된 그룹에서 선택된 적어도 하나의 마커를 이것이 유도된 만능 줄기 세포에 비해 통계적으로 유의미한 양만큼 발현하지 않는다.

[0228]

일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 이것이 유도된 만능 줄기 세포에 비해 통계적으로 유의미한 양만큼 Smad2의 더 높은 인산화 수준을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 생체내 소화관 형성능을 갖는다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 장관 세포의 형태적 특징을 갖는 세포로 분화될 수 있고, 장관 세포의 형태적 특징을 갖는 세포는 FoxA2 및/또는 Claudin6을 발현한다. 일부 구현예에서,

본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 생산된 완성 내배엽 세포는 내배엽 기원 세포로 추가 분화될 수 있다.

[0229] 일부 구현예에서, 만능 줄기 세포 집단은 임의의 분화 전 또는 분화의 제1 단계 동안 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자의 존재 하에 배양된다. 임의의 만능 줄기 세포, 예컨대 인간 만능 줄기 세포, 또는 인간 iPS 세포 또는 본원에서 논의된 바와 같은 임의의 만능 줄기 세포 또는 다른 적합한 만능 줄기 세포를 이용할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 β 세포 성숙 인자는 만능 줄기 세포 집단의 배양 배지에 존재할 수도 있고 또는 만능 줄기 세포 집단의 성장(예를 들면 복제 또는 증식) 동안 주기적으로 또는 볼러스로 첨가될 수 있다. 특정 예에서, 만능 줄기 세포 집단은 임의의 분화 전에 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자에 노출될 수 있다. 다른 예에서, 만능 줄기 세포 집단은 분화의 제1 단계 동안 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자에 노출될 수 있다.

[0230] 완성 내배엽 세포의 원시 소화관 세포로의 분화 유도

[0231] 개시내용의 측면에는 원시 소화관 세포가 관여된다. 본원에서 이용되는 원시 소화관 세포는 임의의 적합한 프로토콜에 따라 임의의 공급원으로부터 유도되거나 생성될 수 있다. 일부 측면에서, 완성 내배엽 세포는 원시 소화관 세포로 분화된다. 일부 측면에서, 원시 소화관 세포는, 예를 들면 Pdx1-양성 췌장 선조 세포, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포, Ngn3-양성 내분비 선조 세포, 인슐린-양성 내분비 세포로 추가 분화된 다음 SC- β 세포로 유도 또는 성숙된다.

[0232] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 집단 내 적어도 일부 완성 내배엽 세포를 원시 소화관 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 완성 내배엽 세포를 섬유아세포 성장 인자(FGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉시켜서 적어도 일부 완성 내배엽 세포를 원시 소화관 세포로의 분화를 유도함으로써 획득될 수 있고, 상기 원시 소화관 세포는 원시 소화관 세포의 적어도 하나의 마커 특징을 발현한다.

[0233] 개시내용은 완성 내배엽 세포를 원시 소화관 세포로 분화하도록 유도하는 FGF 패밀리의 임의의 성장 인자의(예를 들면, 단독으로 또는 다른 인자와 조합된) 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 케라틴생성세포 성장 인자(KGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF2를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF8B를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF10을 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF21을 포함한다.

[0234] 숙련가는 이용된 성장 인자의 농도가 변할 수 있음을 이해할 것이다. 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 5 ng/mL - 500 ng/mL 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 또는 40 ng/mL 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 60 ng/mL, 65 ng/mL, 70 ng/mL, 75 ng/mL, 80 ng/mL, 85 ng/mL, 90 ng/mL, 95 ng/mL 또는 100 ng/mL 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 41 ng/mL, 42 ng/mL, 43 ng/mL, 44 ng/mL, 45 ng/mL, 46 ng/mL, 47 ng/mL, 48 ng/mL 또는 49 ng/mL 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 51 ng/mL, 52 ng/mL, 53 ng/mL, 54 ng/mL, 55 ng/mL, 56 ng/mL, 57 ng/mL, 58 ng/mL 또는 59 ng/mL 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 50 ng/mL 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다.

[0235] 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 적합한 배양 배지 중에 배양된다.

[0236] 일반적으로, 완성 내배엽 세포는 적어도 일부 완성 내배엽 세포의 원시 소화관 세포로의 분화를 유도하기 충분한 기간 동안 적합한 배양 배지(예를 들면, 현탁 배양) 중에 유지된다. 예시적인 적합한 배양 배지를 아래 표 2에 나타낸다.

[0237] 표 2

제제	양
MCDB131	1L
글루코오스	0.44g
NaHCO ₃	1.23g
FAF-BSA	20g
ITS-X	20uL
Glutamax	10mL
비타민 C	0.044g
헤파린	0g
P/S	10mL

[0238]

[0239] 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포의 원시 소화관 세포로의 분화를 위해 적합한 배양 배지는 S2 배지를 포함한다.

[0240] 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포의 접촉은 현탁 배양 중에 시행된다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 스피너 플라스크 중에 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 2 일 내지 5 일이다. 일부 구현예에서, 기간은 3 일이다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 2 일 마다 보충된다.

[0241] 일부 구현예에서, 완성 내배엽 세포는 집단 내의 적어도 일부 완성 내배엽 세포를 원시 소화관 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 완성 내배엽 세포를 KGF와 접촉시켜서 적어도 일부 완성 내배엽 세포의 원시 소화관 세포로의 분화를 유도함으로써 수득될 수 있으며, 상기 원시 소화관 세포는 완성 내배엽의 적어도 하나의 마커 특징을 발현한다.

[0242] 원시 장관 세포의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로의 분화 유도

[0243] 개시내용의 측면에는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포가 관여된다. 본원에서 사용되는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 임의의 공급원으로부터 유도되거나 임의의 적합한 프로토콜에 따라 생성될 수 있다. 일부 측면에서, 원시 소화관 세포는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다. 일부 측면에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는, 예를 들면 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포, Ngn3-양성 내분비 선조 세포, 인슐린-양성 내분비 세포로 추가 분화된 다음 SC-β 세포로 유도 또는 성숙된다.

[0244] 일부 측면에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 집단 내의 적어도 일부 원시 소화관 세포를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 원시 소화관 세포를 i) 적어도 하나의 골 형태형성 단백질(BMP) 신호전달 경로 억제제, ii) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, iii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, iv) 적어도 하나의 레티노산(RA) 신호전달 경로 활성제; 및 v) 적어도 하나의 단백질 키나아제 C 활성제와 접촉시켜, 적어도 일부 원시 소화관 세포의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도함으로써 수득될 수 있고, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1을 발현한다.

[0245] 개시내용은 원시 소화관 세포가 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화하도록(예를 들면, 단독으로 또는 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 적어도 하나의 레티노산 신호전달 경로 활성제, 및 적어도 하나의 단백질 키나아제 C 활성제와의 임의 조합으로) 유도하는 임의의 BMP 신호전달 경로 억제제의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 LDN193189를 포함한다.

[0246] 개시내용은 원시 소화관 세포가 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화하도록(예를 들면, 단독으로 또는 적어도 하나의 BMP 신호전달 경로 억제제, 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 적어도 하나의 레티노산 신호전달 경로 활성제, 및 적어도 하나의 단백질 키나아제 C 활성제와의 임의 조합으로) 유도하는 FGF 패밀리의 임의의 성장 인자의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 케라틴생성세포 성장 인자(KGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF2, FGF8B, FGF10, 및 FGF21로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0247] 개시내용은 원시 소화관 세포가 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화하도록(예를 들면, 단독으로 또는 적어도 하나의 BMP 신호전달 경로 억제제, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 적어도 하나의 레티노산 신호전달 경로 활성제, 및 적어도 하나의 단백질 키나아제 C 활성제와의 임의 조합으로) 유도하는 임의의 SHH 경로 억제

제의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다.

- [0248] 개시내용은 원시 소화관 세포가 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화하도록(예를 들면, 단독으로 또는 적어도 하나의 BMP 신호전달 경로 억제제, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 적어도 하나의 단백질 키나아제 C 활성화제와의 임의 조합으로) 유도하는 임의의 RA 신호전달 경로 활성화제의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성화제는 레티노산을 포함한다.
- [0249] 개시내용은 원시 소화관 세포가 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화하도록(예를 들면, 단독으로 또는 적어도 하나의 BMP 신호전달 경로 억제제, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 적어도 하나의 RA 신호전달 경로 활성화제의 임의 조합으로) 유도하는 임의의 PKC 활성화제의 사용을 고려한다. 일부 구현예에서, PKC 활성화제는 PdbU를 포함한다. 일부 구현예에서, PKC 활성화제는 TPB를 포함한다.
- [0250] 숙련가는 이용된 제제 (예를 들면, 성장 인자)의 농도가 변할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 20 nM 내지 2000 nM의 농도에서 BMP 신호전달 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 BMP 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 110 nM, 120 nM, 130 nM, 140 nM, 150 nM, 160 nM, 170 nM, 180 nM, 또는 190 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 BMP 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 191 nM, 192 nM, 193 nM, 194 nM, 195 nM, 196 nM, 197 nM, 198 nM, 또는 199 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 BMP 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM, 1000 nM, 1100 nM, 1200 nM, 1300 nM, 1400 nM, 1500 nM, 1600 nM, 1700 nM, 1800 nM, 또는 1900 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 BMP 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 210 nM, 220 nM, 230 nM, 240 nM, 250 nM, 260 nM, 270 nM, 280 nM, 또는 290 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 200 nM의 농도에서 BMP 신호전달 경로 억제제와 접촉된다.
- [0251] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 5 ng/mL 내지 500 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 또는 40 ng/mL. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 60 ng/mL, 65 ng/mL, 70 ng/mL, 75 ng/mL, 80 ng/mL, 85 ng/mL, 90 ng/mL, 95 ng/mL 또는 100 ng/mL. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 41 ng/mL, 42 ng/mL, 43 ng/mL, 44 ng/mL, 45 ng/mL, 46 ng/mL, 47 ng/mL, 48 ng/mL 또는 49 ng/mL. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 51 ng/mL, 52 ng/mL, 53 ng/mL, 54 ng/mL, 55 ng/mL, 56 ng/mL, 57 ng/mL, 58 ng/mL 또는 59 ng/mL. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 50 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다.
- [0252] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 0.1 μ M 및 0.5 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다: 0.11 μ M, 0.12 μ M, 0.13 μ M, 0.14 μ M, 0.15 μ M, 0.16 μ M, 0.17 μ M, 0.18 μ M, 0.19 μ M, 0.2 μ M, 0.21 μ M, 0.22 μ M, 0.23 μ M, 또는 0.24 μ M. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다: 0.26 μ M, 0.27 μ M, 0.28 μ M, 0.29 μ M, 0.30 μ M, 0.31 μ M, 0.32 μ M, 0.33 μ M, 0.34 μ M, 0.35 μ M, 0.36 μ M, 0.37 μ M, 0.38 μ M, 0.39 μ M, 0.40 μ M, 0.41 μ M, 0.42 μ M, 0.43 μ M, 0.44 μ M, 0.45 μ M, 0.46 μ M, 0.47 μ M, 0.48 μ M, 0.49 μ M. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 0.25 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다.
- [0253] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 0.01 μ M 내지 1.0 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 0.02 μ M, 0.03 μ M, 0.04 μ M, 0.05 μ M, 0.06 μ M, 0.07 μ M, 0.08 μ M, 또는 0.09 μ M. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 0.20 μ M, 0.30 μ M, 0.40 μ M, 0.50 μ M, 0.60 μ M, 0.70 μ M, 0.80 μ M, 또는 0.90 μ M. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 0.1 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다.
- [0254] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 50 nM 내지 5000 nM의 농도에서 PKC 활성화제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 PKC 활성화제와 접촉된다: 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM, 400 nM, 450 nM, 460 nM, 470 nM, 480 nM, 또는 490 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 PKC 활성화제와 접촉된다: 491 nM, 492 nM, 493 nM, 494 nM, 495 nM, 496 nM, 497 nM, 498

nM, 또는 499 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 PKC 활성화제와 접촉된다: 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM, 1000 nM, 1100 nM, 1200 nM, 1300 nM, 1400 nM, 1500 nM, 1600 nM, 1700 nM, 1800 nM, 1900 nM, 또는 2000 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 PKC 활성화제와 접촉된다: 501 nM, 502 nM, 503 nM, 504 nM, 505 nM, 506 nM, 507 nM, 508 nM, 또는 509 nM, 510 nM, 520 nM, 530 nM, 540 nM, 550 nM, 560 nM, 570 nM, 580 nM, 또는 590 nM. 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 하기의 농도에서 PKC 활성화제와 접촉된다: 500 nM.

[0255] 일반적으로, 원시 소화관 세포는 원시 소화관 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도 하는데 충분한 기간 동안 적합한 배양 배지 (예를 들면, 현탁 배양)에서 유지된다. 예시적인 적합한 배양 배지는 아래의 표 3에서 보여진다.

[0256] 표 3

제제	양
MCDB131	1L
글루코오스	0.44g
NaHCO ₃	1.23
FAF-BSA	20g
ITS-X	5mL
Glutamax	10mL
비타민 C	0.044g
헤파린	0g
P/S	10mL

[0257]

[0258] 일부 구현예에서, S3 배지는 원시 소화관 세포를 췌장 선조 세포로 분화시키기 위해 적합한 배양 배지로서 사용될 수 있다.

[0259] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포의 접촉은 현탁 배양에서 영향받는다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 스피너 플라스크에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 2 일이다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 매일 보충된다.

[0260] 일부 구현예에서, 원시 소화관 세포는 예를 들면, 원시 소화관 세포를 i) LDN193189, ii) KGF, iii) Sant1; iv) RA; 및 iv) PdbU와 접촉시켜, 원시 소화관 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여, 분화하는 집단 중 원시 소화관 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시켜 수득될 수 있고, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1을 발현시킨다.

[0261] Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 NKX6-1+ 췌장 선조 세포로의 분화 유도

[0262] 본 개시내용의 측면은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 수반한다. 본원에서 사용되는 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 임의의 공급원으로부터 유도될 수 있거나 임의의 적합한 프로토콜에 따라 산출될 수 있다. 일부 측면에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다. 일부 측면에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는, 예를 들면, Ngn3-양성 내분비 선조 세포, 또는 인슐린-양성 내분비 세포로 추가로 분화되고, 그 다음 SC-β 세포로 유도 또는 성숙된다.

[0263] 일부 측면에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포로부터 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 생산하는 방법은 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 포함하는 세포의 집단 (예를 들면, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서) a) 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 패밀리로 부터의 적어도 하나의 성장 인자, b) 소닉 헤지혹 경로 억제제, 및 임의로 c) 저농도의 레티노산 (RA) 신호전달 경로 활성화제를 포함하는 적어도 2개의 β 세포-성숙 인자와, 적어도 5 일의 기간 동안에 접촉시켜 집단 중 적어도 하나의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하고, 상기 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 NKX6-1를 발현시킨다.

[0264] 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) FGF 패밀리로 부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) 저농도의 RA 신호전달 경로 활성화제와, 5 일의 기간 동안 접촉시켜 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 중 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 수득되고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다.

- [0265] 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 iii) RA 신호전달 경로 활성화제, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 중 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 수득되고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다.
- [0266] 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 만능 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 iPS 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 ESC 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 최종적인 내배엽 세포의 집단으로부터 생산된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 원시 소화관 세포의 집단으로부터 생산된다.
- [0267] 본 개시내용은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키기도록 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 유도하는 임의의 FGF 패밀리로부터의 성장 인자의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 SHH 경로 억제제, 또는 임의로 적어도 하나의 레티노산 신호전달 경로 활성화제 중 적어도 하나의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 케라틴생성세포 성장 인자 (KGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF2, FGF8B, FGF10, 및 FGF21로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0268] 본 개시내용은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 분화시키기도록 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 유도하기 위한 임의의 SHH 경로 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 또는 적어도 하나의 레티노산 신호전달 경로 활성화제의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다.
- [0269] 본 개시내용은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키기도록 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 유도하는 임의의 RA 신호전달 경로 활성화제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 및 적어도 하나의 SHH 경로 억제제의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성화제는 레티노산을 포함한다.
- [0270] 일부 구현예에서, 본 방법은 세포의 집단 (예를 들면, Pdx1-양성 췌장 선조 세포)를 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 본 개시내용은 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 촉진하는 임의의 EGF 패밀리로부터의 성장 인자의 용도를 고려한다 (예를 들면, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 적어도 하나의 RA 신호전달 경로 활성화제의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF를 포함한다.
- [0271] 숙련가는 이용된 제제 (예를 들면, 성장 인자)의 농도가 변할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 1 ng/mL 내지 100 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL, 20 ng/mL, 25 ng/mL, 30 ng/mL, 35 ng/mL, 또는 40 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 60 ng/mL, 65 ng/mL, 70 ng/mL, 75 ng/mL, 80 ng/mL, 85 ng/mL, 90 ng/mL, 95 개의 ng/mL 또는 100 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 41 ng/mL, 42 ng/mL, 43 ng/mL, 44 ng/mL, 45 ng/mL, 46 ng/mL, 47 ng/mL, 48 ng/mL 또는 49 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 51 ng/mL, 52 ng/mL, 53 ng/mL, 54 ng/mL, 55 ng/mL, 56 ng/mL, 57 ng/mL, 58 ng/mL 또는 59 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 50 ng/mL의 농도에서 FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다.
- [0272] 일부 구현예에서, p Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M 및 0.5 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다: 0.11 μ M, 0.12 μ M, 0.13 μ M, 0.14 μ M, 0.15 μ M, 0.16 μ M, 0.17 μ M, 0.18 μ M, 0.19 μ M, 0.2 μ M, 0.21 μ M, 0.22 μ M, 0.23 μ M, 또는 0.24 μ M. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다: 0.26 μ M, 0.27 μ M, 0.28 μ M, 0.29 μ M, 0.30 μ M, 0.31 μ M, 0.32 μ M, 0.33 μ M, 0.34 μ M, 0.35 μ M, 0.36 μ M, 0.37 μ M, 0.38 μ M, 0.39 μ M, 0.40 μ M,

0.41 μ M, 0.42 μ M, 0.43 μ M, 0.44 μ M, 0.45 μ M, 0.46 μ M, 0.47 μ M, 0.48 μ M, 0.49 μ M. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.25 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다.

[0273] 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.01 μ M 내지 1.0 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.02 μ M, 0.03 μ M, 0.04 μ M, 0.05 μ M, 0.06 μ M, 0.07 μ M, 0.08 μ M, 또는 0.09 μ M. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.20 μ M, 0.30 μ M, 0.40 μ M, 0.05 μ M, 0.60 μ M, 0.70 μ M, 0.80 μ M, 또는 0.90 μ M. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다.

[0274] 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 2 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 3 ng/mL, 4 ng/mL, 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL, 10 ng/mL, 11 ng/mL, 12 ng/mL, 13 ng/mL, 14 ng/mL, 16 ng/mL, 17 ng/mL, 18 ng/mL, 또는 19 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 45 ng/mL, 50 ng/mL, 55 ng/mL, 60 ng/mL, 65 ng/mL, 70 ng/mL, 75 ng/mL, 80 ng/mL, 85 ng/mL, 90 ng/mL, 95 개의 ng/mL, 또는 100 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 21 ng/mL, 22 ng/mL, 23 ng/mL, 24 ng/mL, 25 ng/mL, 26 ng/mL, 27 ng/mL, 28 ng/mL 또는 29 ng/mL. 일부 구현예에서, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 20 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다.

[0275] 일반적으로, Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 집단 중 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하는데 충분한 기간 동안 적합한 배양 배지에서 유지된다. 예시적인 적합한 배양 배지는 상기 표 3에서 보여진다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 스피너 플라스크에서 유지된다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 5 일이다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 하루 걸러 보충된다. 일부 구현예에서, β 세포-성숙 인자는 하루 걸러 보충된다.

[0276] 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 5일 동안에 현탁 배양에 부가되지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 5일 전에 현탁 배양으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 C의 활성제는 Pdbu를 포함한다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 5일 동안에 현탁 배양에 부가되지 않는다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 5일 전에 현탁 배양으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 LDN193189를 포함한다.

[0277] 일부 구현예에서, 상기 집단 중 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 10%는 유도되어 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다. 일부 구현예에서, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 95%는 유도되어 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화된다.

[0278] 일반적으로, 임의의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화될 수 있다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1, NKX6-1 및/또는 FoxA2를 발현시킨다.

[0279] 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) 저농도의 RA 신호전달 경로 활성제와, 5 일의 기간 동안 접촉시켜 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 중 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 수득되고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다.

[0280] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) RA 신호전달 경로 활성제와, 5 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 집단 중 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화시켜서 수득될 수 있다, 상기 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다.

[0281] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 상기 집단 중 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화시켜, 예를 들면, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 i) FGF 패밀

리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) RA 신호전달 경로 활성제와 접촉시켜, 상기 집단 중 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도하여 수득될 수 있고, 상기 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1를 발현시킨다.

[0282] NKX6-1+ 췌장 선조 세포의 인슐린+ 내분비 세포로의 분화 유도

[0283] 본 개시내용의 측면은 인슐린-양성 내분비 세포를 수반한다. 본원에서 사용되는 인슐린-양성 내분비 세포는 임의의 공급원으로부터 유도될 수 있거나 임의의 적합한 프로토콜에 따라 산출될 수 있다. 일부 측면에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다. 일부 측면에서, 인슐린-양성 내분비 세포는, 예를 들면, SC-β 세포로의 유도 또는 성숙에 의해 추가로 분화된다.

[0284] 일부 측면에서, 인슐린-양성 내분비 세포를 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로부터 생산하는 방법은 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 포함하는 세포의 집단 (예를 들면, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서)을 a) TGF-β 신호전달 경로 억제제, 및 b) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제를 포함하는 적어도 2개의 β 세포-성숙 인자와 접촉시켜, 집단 중 적어도 하나의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 것을 포함하고, 상기 인슐린-양성 췌장 선조 세포는 인슐린을 발현시킨다.

[0285] 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포로 분화하도록 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 분화를 유도하는 임의의 TGF-β 신호전달 경로 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 다른 β 세포-성숙 인자, 예를 들면, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제와 함께). 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로는 TGF-β 수용체 유형 I 키나아제 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로 억제제는 Akt5 억제제 II를 포함한다.

[0286] 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포로 분화하도록 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 분화를 유도하는 임의의 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 다른 β 세포-성숙 인자, 예를 들면, TGF-β 신호전달 경로 억제제와 함께). 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 트리아이오도티로닌 (T3)를 포함한다.

[0287] 일부 구현예에서, 본 방법은 세포의 집단 (예를 들면, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포)를 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 Pdx1-양성 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 i) SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성제, iii) γ-세크레타제 억제제, iv) 상기 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 및 임의로 v) 단백질 키나아제 억제제 중 적어도 하나와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 γ-세크레타제 억제제를 포함한다. 본 개시내용은 집단 중 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 γ-세크레타제 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF-β 신호전달 경로 억제제 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제 중 임의의 것과 함께). 일부 구현예에서, γ-세크레타제 억제제는 XXI를 포함한다. 일부 구현예에서, γ-세크레타제 억제제는 DAPT를 포함한다.

[0289] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 포함한다. 본 개시내용은 집단 중 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 EGF 패밀리로부터의 성장 인자의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF-β 신호전달 경로 억제제 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제 중 임의의 것과 함께). 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF를 포함한다.

[0290] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 저농도의 레티노산 (RA) 신호전달 경로 활성제를 포함한다. 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포로 분화하도록 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 분화를 유도하는 임의의 RA 신호전달 경로 활성제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF-β 신호전달 경로 억제제 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제 중 임의의 것과 함께). 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 RA를 포함한다.

[0291] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 소닉 헤지혹 (SHH) 경로 억제제를 포함한다. 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포로 분화하도록 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 분화를 유도하는 임의의 SHH 경로 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF-β 신호전달 경로 억제제 및/또는 갑상선 호르

몬 신호전달 경로 활성화 중 임의의 것과 함께). 일부 구현예에서, SHH 경로 억제제는 Sant1을 포함한다.

[0292] 일부 구현예에서, 세포의 집단 (예를 들면, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포)는 글루코오스에 노출된다.

[0293] 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 임의로 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 본 개시내용은 집단 중 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 단백질 키나아제 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF- β 신호전달 경로 억제제 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화 중 임의의 것과 함께). 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다.

[0294] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 i) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성화제, iii) γ -세크레타제 억제제, iv) TGF- β 신호전달 경로 억제제, v) TH 신호전달 경로 활성화제, 및 vi) 상피 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉시켜, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하여 수득되고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시킨다.

[0295] 숙련가는 이용된 제제 (예를 들면, 성장 인자)의 농도가 변할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0296] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 100 nM 내지 100 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 10 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 또는 900 nM. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 또는 9 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 9.1 μ M, 9.2 μ M, 9.3 μ M, 9.4 μ M, 9.5 μ M, 9.6 μ M, 9.7 μ M, 9.8 μ M 또는 9.9 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 16 μ M, 17 μ M, 18 μ M, 또는 19 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 10.1 μ M, 10.2 μ M, 10.3 μ M, 10.4 μ M, 10.5 μ M, 10.6 μ M, 10.7 μ M, 10.8 μ M 또는 10.9 μ M.

[0297] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 0.1 μ M - 10 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 1 μ M의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 0.2 μ M, 0.3 μ M, 0.4 μ M, 0.5 μ M, 0.6 μ M, 0.7 μ M, 0.8 μ M, 또는 0.9 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 γ 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 1.1 μ M, 1.2 μ M, 1.3 μ M, 1.4 μ M, 1.5 μ M, 1.6 μ M, 1.7 μ M, 1.8 μ M 또는 1.9 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 또는 9 μ M.

[0298] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M - 10 μ M의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 1 μ M의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다: 0.2 μ M, 0.3 μ M, 0.4 μ M, 0.5 μ M, 0.6 μ M, 0.7 μ M, 0.8 μ M, 또는 0.9 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다: 1.1 μ M, 1.2 μ M, 1.3 μ M, 1.4 μ M, 1.5 μ M, 1.6 μ M, 1.7 μ M, 1.8 μ M 또는 1.9 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 γ -세크레타제 억제제와 접촉된다: 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 또는 9 μ M.

[0299] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 2 ng/mL 내지 200 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 3 ng/mL, 4 ng/mL, 5 ng/mL, 6 ng/mL, 7 ng/mL, 8 ng/mL, 9 ng/mL, 10 ng/mL, 11 ng/mL, 12 ng/mL, 13 ng/mL, 14 ng/mL, 16 ng/mL, 17 ng/mL, 18 ng/mL, 또는 19 ng/mL. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자

와 접촉된다: 30 ng/mL, 35 ng/mL, 40 ng/mL, 45 ng/mL, 50 ng/mL, 55 ng/mL, 60 ng/mL, 65 ng/mL, 70 ng/mL, 75 ng/mL, 80 ng/mL, 85 ng/mL, 90 ng/mL, 95 개의 ng/mL, 또는 100 ng/mL. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다: 21 ng/mL, 22 ng/mL, 23 ng/mL, 24 ng/mL, 25 ng/mL, 26 ng/mL, 27 ng/mL, 28 ng/mL 또는 29 ng/mL. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 20 ng/mL의 농도에서 EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉된다.

[0300] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.01 μ M 내지 1.0 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.02 μ M, 0.03 μ M, 0.04 μ M, 0.05 μ M, 0.06 μ M, 0.07 μ M, 0.08 μ M, 또는 0.09 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.20 μ M, 0.30 μ M, 0.40 μ M, 0.05 μ M, 0.60 μ M, 0.70 μ M, 0.80 μ M, 또는 0.90 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M의 농도에서 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다.

[0301] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 저농도의 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.01 μ M 내지 1.0 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 저농도의 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.02 μ M, 0.03 μ M, 0.04 μ M, 0.05 μ M, 0.06 μ M, 0.07 μ M, 0.08 μ M, 또는 0.09 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 저농도의 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.20 μ M, 0.30 μ M, 0.40 μ M, 0.05 μ M, 0.60 μ M, 0.70 μ M, 0.80 μ M, 또는 0.90 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 저농도의 RA 신호전달 경로 활성제와 접촉된다: 0.1 μ M.

[0302] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.1 μ M 및 0.5 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다: 0.11 μ M, 0.12 μ M, 0.13 μ M, 0.14 μ M, 0.15 μ M, 0.16 μ M, 0.17 μ M, 0.18 μ M, 0.19 μ M, 0.2 μ M, 0.21 μ M, 0.22 μ M, 0.23 μ M, 또는 0.24 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다: 0.26 μ M, 0.27 μ M, 0.28 μ M, 0.29 μ M, 0.30 μ M, 0.31 μ M, 0.32 μ M, 0.33 μ M, 0.34 μ M, 0.35 μ M, 0.36 μ M, 0.37 μ M, 0.38 μ M, 0.39 μ M, 0.40 μ M, 0.41 μ M, 0.42 μ M, 0.43 μ M, 0.44 μ M, 0.45 μ M, 0.46 μ M, 0.47 μ M, 0.48 μ M, 0.49 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 0.25 μ M의 농도에서 적어도 하나의 SHH 경로 억제제와 접촉된다.

[0303] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 10 nM - 1 μ M. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 100 nM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 또는 90 nM. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 110 nM, 120 nM, 130 nM, 140 nM, 150 nM, 160 nM, 170 nM, 180 nM 또는 190 nM. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 또는 900 nM.

[0304] 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 하기의 농도에서 글루코오스와 접촉된다: 1 mM 내지 50 mM. 일부 구현예에서, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 25 mM의 농도에서 글루코오스와 접촉된다.

[0305] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 i) TGF- β 신호전달 경로 억제제, b) TH 신호전달 경로 활성제, 및 임의로 c) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성제, iii) γ -세크레타제 억제제, 및 vi) 상기 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와, 5 내지 7 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시켜서 수득될 수 있고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시킨다.

[0306] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 상기 집단 중 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시켜서, 예를 들면, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 i) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성제, iii) γ -세크레타제 억제제, iv) TGF- β 신호전달 경로 억제제, v) TH 신호전달 경로 활성제, 및 vi) 상기 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉시켜, Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도

일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하여 수득될 수 있고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시킨다.

[0307] 일반적으로, 세포의 집단은 배지 집단에서 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포 중 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는데 충분한 기간 동안 적합한 배양 배지에서 유지된다. 예시적인 배양 배지는 표 4에서 보여진다.

[0308] 표 4

제제	농도
MCDB131	1L
글루코오스	3.6g
NaHCO ₃	1.754g
FAF-BSA	20g
ITS-X	5mL
Glutamax	10mL
비타민 C	0.044g
헤파린	10mg
P/S	10mL

[0309]

[0310] 일부 구현예에서, BE5 배지는 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 인슐린-양성 내분비 세포로 분화하기 위한 적합한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 적합한 배양 배지는 표 5에서 보여진다.

[0311] 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 C-펩타이드 및 Nkx6-1를 공-발현시키는 세포의 수를 최대화하는데 충분한 기간을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 5 일이다. 일부 구현예에서, 기간은 5 일 내지 7 일이다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 7 일이다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 (예를 들면, β 세포-성숙 인자가) 매일 보충된다. 일부 구현예에서, 5 일 내지 7 일의 기간은 C-펩타이드 및 Nkx6-1를 공-발현시키는 세포의 수를 최대화한다.

[0312] 일부 구현예에서, 집단 중NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 15%는 유도되어 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다.

[0313] 일부 구현예에서, 집단 중NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 적어도 99%는 유도되어 인슐린-양성 내분비 세포로 분화된다.

[0314] 인슐린+ 내분비 세포의 SC- β 세포로의 성숙 유도

[0315] 본 개시내용의 측면은 SC- β 세포를 수반한다. 본원에서 사용된 SC- β 세포는 임의의 공급원으로부터 유도될 수 있거나 임의의 적합한 프로토콜에 따라 산출될 수 있다. 일부 측면에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 유도되어 SC- β 세포로 성숙된다.

[0316] 일부 측면에서, 본 개시내용은 성숙한, 글루코오스 반응성 β 세포를 생성하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 인슐린-양성 내분비 세포를 포함하는 세포의 집단을 (예를 들면, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서) a) 형질전환 성장 인자- β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제, b) 갑상선 호르몬 (TH) 신호전달 경로 활성제를 포함하는 적어도 2개의 β 세포 성숙 인자와 접촉시켜, 상기 집단 중 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 단계를 포함한다.

[0317] 본 개시내용의 측면은 형태 및 기능에서 내인성 성숙한 β 세포와 닮았지만, 그럼에도 불구하고 원상태 β 세포와는 뚜렷이 다른 SC- β 세포를 생성하는 것을 수반한다. SC- β 세포는 적어도 하나의 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낼 수 있다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 2개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 적어도 3개의 순차적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 다중 글루코오스 챌린지에 대한 내인성 인간 소도의 반응과 닮은 다중 (예를 들면, 순차적인) 글루코오스 챌린지에 대한 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 2개의 연속적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응에서 인슐린을 방출 또는 분비할 수 있다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 3개의 연속적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응에서 인슐린을 방출 또는 분비할 수 있다. 일부 구현예에서, SC- β 세포는 4개의 연속적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응에서 인슐린을 방출 또는 분비할 수 있다. 일부 구현

예에서, SC-β 세포는 5개의 연속적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응에서 인슐린을 방출 또는 분비할 수 있다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 계속되는 연속적인 글루코오스 챌린지에 대한 반응에서 인슐린을 방출 또는 분비할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는, 본원의 실시예에서 기재된 바와 같이 세포내 Ca^{2+} 를 반복적으로 증가시키는 지를 측정하여 순차적인 글루코오스 챌린지에 대해 반응하는 지를 결정하기 위해 분석될 수 있다.

[0318] 일부 구현예에서, SC-β 세포의 형태는 내인성 β 세포의 형태와 닮아 있다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 시험관내 글루코오스 자극된 인슐린 분비 (GSIS) 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 생체내 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 시험관내 및 생체내 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, 시험관내 및/또는 시험관내 GSIS 반응은 내인성 성숙한 β 세포의 GSIS 반응과 닮아 있다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응과 닮은 시험관내 (GSIS) 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응과 닮은 생체내 GSIS 반응을 나타낸다. GSIS 반응은 인간 또는 동물 대상체로의 이식 즉시 관측될 수 있다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 SC-β 세포의 인간 또는 동물 대상체로의 이식의 2 주 내에 관측된다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 SC-β 세포의 인간 또는 동물 대상체로의 이식의 2 주 내에 관측된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포의 GSIS 반응은 SC-β 세포의 인간 또는 동물 대상체로의 이식 후 최대 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 8 주, 9 주, 10 주, 11 주, 12 주, 13 주, 14 주, 15 주, 16 주, 17 주, 18 주, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 또는 최대 1 년 초과에 관측된다.

[0319] 일부 구현예에서, SC-β 세포는 성숙한 내인성 췌장 β 세포의 적어도 하나의 마커를 나타낸다. 예시적인 마커는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: Pdx1, HNF6, Ptf1a, Sox9, FoxA2, Nkx2.2, Ngn3, 및 NKX6-1. 일부 구현예에서, HNF6, Ptf1a, Sox9, FoxA2, Nkx2.2, Ngn3, 및 NKX6-1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 마커의 발현은 SC-β 세포가 유도된 만능 줄기 세포 (예를 들면, 배아 줄기 세포 또는 유도된 만능 세포)에 대해 SC-β 세포에서 통계적으로 유의미한 양에 의해 상향조절된다.

[0320] 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포를 유도하여 SC-β 세포로 분화 및/또는 성숙되도록 하는 임의의 TGF-β 신호전달 경로 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 적어도 하나의 갑상선 호르몬 (TH) 신호전달 경로 활성화제, 또는 임의로 단백질 키나아제 억제제의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로는 TGF-β 수용체 유형 I 키나아제 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF-β 신호전달 경로 억제제는 Alk5 억제제 II를 포함한다.

[0321] 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포를 유도하여 SC-β 세포로 분화 및/또는 성숙되도록 하는 임의의 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 적어도 하나의 TGF-β 신호전달 경로 억제제, 또는 임의로 단백질 키나아제 억제제의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제는 T3를 포함한다.

[0322] 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 세포는 단백질 키나아제 억제제와 임의로 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 단백질 키나아제 억제제와 접촉되지 않는다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포를 유도하여 SC-β 세포로 분화 및/또는 성숙되도록 하는 임의의 단백질 키나아제 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF-β 신호전달 경로 억제제, 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제 중 적어도 하나의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다.

[0323] 일부 구현예에서, 본 방법은 세포의 집단 (예를 들면, 인슐린-양성 내분비 세포)을 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0324] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 낭포성 섬유증 막통과 전도도 조절물질 (CFTR) 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 CFTR 억제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포를 유도하여 SC-β 세포로 분화 및/또는 성숙되도록 하는 임의의 CFTR 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF-β 신호전달 경로 억제제, 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제 중 적어도 하나의 임의의 조합과 함께, 및 임의로 단백질 키나아제 억제제). 일부 구현예에서, CFTR 억제제는 Gly-H101을 포함한다.

[0325] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자는 O-GlcNAcase 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 O-GlcNAcase 억제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 본 개시내용은 인슐린-양성 내분비 세포를 유도하여 SC-β 세포로 분화 및/또는 성숙되도록 하

는 임의의 O-GlcNAcase 억제제의 용도를 고려한다 (예를 들면, 단독으로, 또는 TGF- β 신호전달 경로 억제제, 및/또는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 단백질 키나아제 억제제 중 적어도 하나의 임의의 조합과 함께). 일부 구현예에서, O-GlcNAcase의 억제제는 Thiamet G을 포함한다.

[0326] 숙련가는 이용된 제제 (예를 들면, 성장 인자)의 농도가 변할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 100 nM 내지 100 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 10 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 또는 900 nM. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 또는 9 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 9.1 μ M, 9.2 μ M, 9.3 μ M, 9.4 μ M, 9.5 μ M, 9.6 μ M, 9.7 μ M, 9.8 μ M 또는 9.9 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 11 μ M, 12 μ M, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 16 μ M, 17 μ M, 18 μ M, 또는 19 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 적어도 하나의 TGF- β 신호전달 경로 억제제와 접촉된다: 10.1 μ M, 10.2 μ M, 10.3 μ M, 10.4 μ M, 10.5 μ M, 10.6 μ M, 10.7 μ M, 10.8 μ M 또는 10.9 μ M.

[0327] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 0.1 μ M - 10 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 1 μ M의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 0.2 μ M, 0.3 μ M, 0.4 μ M, 0.5 μ M, 0.6 μ M, 0.7 μ M, 0.8 μ M, 또는 0.9 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 γ 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 1.1 μ M, 1.2 μ M, 1.3 μ M, 1.4 μ M, 1.5 μ M, 1.6 μ M, 1.7 μ M, 1.8 μ M 또는 1.9 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제와 접촉된다: 2 μ M, 3 μ M, 4 μ M, 5 μ M, 6 μ M, 7 μ M, 8 μ M, 또는 9 μ M.

[0328] 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 10 nM - 1 μ M. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 또는 90 nM. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 110 nM, 120 nM, 130 nM, 140 nM, 150 nM, 160 nM, 170 nM, 180 nM 또는 190 nM. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 단백질 키나아제 억제제와 접촉된다: 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 또는 900 nM.

[0329] 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM 내지 100 μ M의 농도에서 CFTR 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 CFTR 억제제와 접촉된다: 10 nM 내지 10 μ M.

[0330] 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 100 nM 내지 100 μ M의 농도에서 O-GlcNAcase 억제제와 접촉된다. 일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 하기의 농도에서 O-GlcNAcase 억제제와 접촉된다: 10 nM 내지 10 μ M.

[0331] 일부 구현예에서, SC- β 세포는 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) 형질전환 성장 인자 β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 iii) 단백질 키나아제 억제제와, 7 내지 14 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부를 SC- β 세포로 분화시켜서 수득될 수 있고, 상기 SC- β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 둘 모두에서 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 내인성 β 세포의 GSIS 반응과 닮아 있다.

[0332] 일부 구현예에서, SC- β 세포는 집단 중 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 SC- β 세포로 분화시켜서, 예를 들면, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 i) 형질전환 성장 인자 β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 iii) 단백질 키나아제 억제제와 접촉시켜서, 적어도 일부 of the Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포의 SC- β

세포로의 시험관내 성숙을 유도하여 수득될 수 있고, 상기 SC-β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응과 닮은 시험관내 및/또는 생체내 둘 모두에서 GSIS 반응을 나타낸다.

[0333] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는, SC-β 세포를 생성하는 방법을 제공한다: Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 i) 형질전환 성장 인자 β (TGF-β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 iii) 단백질 키나아제 억제제와 접촉시켜, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC-β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 단계로서, 상기 SC-β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 둘 모두에서 GSIS 반응을 나타내는 단계. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 내인성 β 세포의 GSIS 반응과 닮아 있다.

[0334] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기의 단계를 포함하는, 만능 세포로부터 SC-β 세포를 생성하는 방법을 제공한다: a) 집단 중 만능 줄기 세포를 Pdx1-양성 체장 선조 세포로 분화시키는 단계; b) 상기 Pdx1-양성 체장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 임의로 iii) RA 신호전달 경로 활성화제와, 5 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 집단 중 상기 Pdx1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부의 NKX6-1-양성 체장 선조 세포로의 분화를 유도하여 상기 Pdx1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 NKX6-1-양성 체장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1을 발현시키는 단계; c) Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서 i) TGF-β 신호전달 경로 억제제, b) TH 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 c) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성화제, iii) γ-세크레타제 억제제, 및 vi) 상기 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와, 5 내지 7 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시키는 단계; 및 d) 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) 형질전환 성장 인자 β (TGF-β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 임의로 iii) 단백질 키나아제 억제제와, 7 내지 14 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC-β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부를 SC-β 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 SC-β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 GSIS 반응을 나타내는 단계. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 내인성 성숙한 β 세포의 GSIS 반응과 닮아 있다.

[0335] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기의 단계를 포함하는, 만능 세포로부터 SC-β 세포를 생성하는 방법을 제공한다: a) 집단 중 적어도 일부 만능 세포를 Pdx1-양성 체장 선조 세포로 분화시키는 단계; b) 상기 Pdx1-양성 체장 선조 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) KGF, ii) Sant1, 및 임의로 iii) 저농도의 RA와, 5 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 집단 중 적어도 하나의 Pdx1-양성 체장 선조 세포의 NKX6-1-양성 체장 선조 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 NKX6-1-양성 체장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1을 발현시키는 단계; c) 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포를 i) Alk5 억제제 II, ii) T3, 및 임의로 iii) Sant1, iv) RA, v) XXI, 및 vi) 베타셀룰린과, 5 내지 7 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 체장 선조 세포의 적어도 일부를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현시키는 단계; 및 d) 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에서, i) Alk5 억제제 II, ii) T3, 및 임의로 iii) 스타우로스포린과, 7 내지 14 일의 기간 동안 하루 걸러 접촉시켜 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-생산 내분비 세포의 적어도 일부의 SC-β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는 과정으로 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부를 SC-β 세포로 분화시키는 단계로서, 상기 SC-β 세포는 내인성 β 세포의 GSIS 반응과 닮아 있는 시험관내 및 생체내 GSIS 반응을 나타내는 단계.

[0336] 일반적으로, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 상기 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC-β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하는데 충분한 기간 동안 적합한 배양 재지에서 유지된다. 예시적인 적합한 배양 배지는 상기의 표 4 및 아래의 표 5에서 보여진다.

[0337] 표 5

CMRL 소도 배지 ("CMRLS")
보강된 CMRL 1066 cat#99-603-CV Mediatech 10% 하이클론 FBS 가 보충됨

[0338]

[0339]

일부 구현예에서, 적합한 배양 배지는 Connought Medical Research Laboratories 1066 보강된 소도 배지 (CMRLS)를 포함한다. 일부 구현예에서, 적합한 배양 배지는 CMRLS의 성분 (예를 들면, 보충의 아연)을 포함한다. 일부 구현예에서, 적합한 배양 배지는 표 3에서 보여진다. 일부 구현예에서, CMRLS는 혈청 (예를 들면, 인간)으로 보강된다. 일부 구현예에서, CMRLS에는 혈청 대체물질 (예를 들면, KOSR)로 보강된다. 일부 구현예에서, CMRLS에는 우태 혈청이 보충된다. 일부 구현예에서, CMRLS는 10% 우태 혈청으로 보강된다. 일부 구현예에서, 분화하는 인슐린-양성 내분비 세포를 SC-β 세포로 분화하는데 적합한 배양 배지는 S3 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 적어도 7 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 7 일 내지 21 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 7 내지 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 10 내지 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 기간은 14 일을 포함한다. 일부 구현예에서, 현탁 배양은 (예를 들면, β 세포-성숙 인자가) 하루 걸로 보충된다.

[0340]

일부 구현예에서, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%는 유도된 to 성숙한 into SC-β 세포. 일부 구현예에서, 적어도 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 99%는 유도되어 SC-β 세포로 성숙된다. 일부 구현예에서, 상기 산출된 세포의 적어도 30%는 SC-β 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 C-펩타이드, 인슐린, NKX6-1, Pdx1를 발현시키고, NKX6-1 및 C-펩타이드를 공발현시킨다.

[0341]

일부 구현예에서, SC-β 세포는 인간 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 시험관내 SC-β 세포의 발생은 확장 가능하다.

[0342]

단리된 세포의 집단

[0343]

개시내용의 측면은 본원에 기재된 방법에 따라 생산된 단리된 세포 집단에 관한 것이다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 집단은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 본원에 기재된 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써 생산된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 집단은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 본원에 기재된 적어도 두 개의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써 생산된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 집단은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 본원에 기재된 적어도 3 개의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써 생산된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 집단은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 본원에 기재된 적어도 4 개의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써 생산된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 집단은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 본원에 기재된 적어도 5 개의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써 생산된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포 집단은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 본원에 기재된 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 적어도 10 개의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써 생산된다.

[0344]

일부 측면에서, 개시내용은 단리된 완성 내배엽 세포 집단을 제공한다. 단리된 완성 내배엽 세포 집단은 집단 내의 적어도 일부 만능 세포를 완성 내배엽 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 만능 세포 집단을 i) TGF-β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, 및 ii) Wnt 신호전달 경로 활성제와 접촉시키는 공정에 의해 집단 내의 적어도 일부 만능 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화를 유도함으로써 획득될 수 있고, 상기 완성 내배엽 세포는 완성 내배엽의 적어도 하나의 마커 특징을 발현한다.

[0345]

일부 측면에서, 개시내용은 단리된 원시 소화관 세포 집단을 제공한다. 단리된 원시 소화관 세포 집단은 집단 내의 적어도 일부 완성 내배엽 세포를 원시 소화관 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 완성 내배엽 세포를 섬유아세포 성장 인자(FGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자와 접촉시키는 공정에 의해 집단 내의 적어도 일부 내배엽 세포의 원시 소화관 세포로의 분화를 유도함으로써 획득될 수 있고, 상기 원시 소화관 세포는 완성 내배엽의 적어도 하나의 마커 특징을 발현한다.

- [0346] 일부 측면에서, 개시내용은 단리된 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 집단을 제공한다. 단리된 Pdx1-양성 췌장 선조 세포 집단은 집단 내의 적어도 일부 원시 소화관 세포를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 원시 소화관 세포를 i) 적어도 하나의 골 형태형성 단백질(BMP) 신호전달 경로 억제제, ii) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, iii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, iv) 적어도 하나의 레티노산(RA) 신호전달 경로 활성화제; 및 v) 적어도 하나의 단백질 키나아제 C 활성화제와 접촉시키는 공정에 의해 적어도 일부 원시 소화관 세포의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도함으로써 취득될 수 있고, 상기 Pdx1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1을 발현한다.
- [0347] 일부 측면에서, 개시내용은 단리된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포 집단을 제공한다. 단리된 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포 집단은 집단 내의 적어도 일부 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 Pdx1-양성 췌장 선조 세포를 i) FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자, ii) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, 및 선택적으로 iii) RA 신호전달 경로 활성화제와 접촉시키는 공정에 의해 집단 내의 적어도 하나의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포의 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도함으로써 취득될 수 있고, 상기 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포는 Pdx1 및 NKX6-1을 발현한다.
- [0348] 일부 측면에서, 개시내용은 단리된 인슐린-양성 내분비 세포 집단을 제공한다. 단리된 인슐린-양성 내분비 세포 집단은 집단 내의 적어도 일부 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 i) TGF- β 신호전달 경로 억제제, ii) TH 신호전달 경로 활성화제, 및 선택적으로 i) 적어도 하나의 SHH 경로 억제제, ii) RA 신호전달 경로 활성화제, iii) γ -세크레타제 억제제, iv) 및 vi) 표피 성장 인자(EGF) 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 β 세포-성숙 인자와 접촉시키는 공정에 의해 적어도 일부 Pdx1-양성, NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포로의 분화를 유도함으로써 취득될 수 있고, 상기 Pdx1-양성, NKX6-1, 인슐린-양성 내분비 세포는 Pdx1, NKX6-1, NKX2-2, Mafk, glis3, Sur1, Kir6.2, Znt8, SLC2A1, SLC2A3 및/또는 인슐린을 발현한다.
- [0349] 일부 측면에서, 개시내용은 단리된 SC- β 세포 집단을 제공한다. 단리된 SC- β 세포 집단은 집단 내의 적어도 일부 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 SC- β 세포로 분화시킴으로써, 예를 들면 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포를 i) 형질전환 성장 인자 β (TGF- β) 신호전달 경로 억제제, ii) 갑상샘 호르몬 신호전달 경로 활성화제, 및 선택적으로 iii) 단백질 키나아제 억제제와 접촉시키는 공정에 의해 적어도 일부 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도함으로써 취득될 수 있고, 상기 SC- β 세포는 시험관내 및/또는 생체내 GSIS 반응을 나타낸다. 일부 구현예에서, GSIS 반응은 내인성 β 세포의 GSIS 반응을 모방한다.
- [0350] 개시내용의 측면에는 본원에 기재된 단리된 세포(예를 들면, SC- β 세포) 집단을 포함하는 마이크로캡슐이 관여된다. 마이크로캡슐은 당해기술에 널리 공지되어 있다. 마이크로캡슐의 적합한 예는 문헌(예를 들면, Jahansouz 등, "Evolution of β -Cell Replacement Therapy in Diabetes Mellitus: Islet Cell Transplantation" *Journal of Transplantation* 2011; Volume 2011, Article ID 247959; Orive 등, "Application of cell encapsulation for controlled delivery of biological therapeutics", *Advanced Drug Delivery Reviews* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.009>; Hernandez 등, "Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010;62:711-730; Murua 등, "Cell microencapsulation technology: Towards clinical application", *Journal of Controlled Release* 2008; 132:76-83; 및 Zanin 등, "The development of encapsulated cell technologies as therapies for neurological and sensory diseases", *Journal of Controlled Release* 2012; 160:3-13)에 기재되어 있다. 마이크로캡슐은 다양한 방식으로 제형화될 수 있다. 예시적인 마이크로캡슐은 외부 알기네이트 막에 의해 커버된 다중양이온 층으로 둘러싸인 알기네이트 코어를 포함한다. 다중양이온 막은 반투과막을 형성하며, 이는 안정성 및 생체적합성을 부여한다. 다중양이온의 예에는 비제한적으로 폴리-L-라이신, 폴리-L-오르니틴, 키토산, 락토 오스 변형된 키토산, 및 광중합된 생체적합물질이 포함된다. 일부 구현예에서, 알기네이트 코어는 변형되어, 예를 들면 RGD 서열(아르기닌, 글리신, 아스파르트산)과 공유 접합된 올리고펩타이드를 갖는 알기네이트 코어를 포함하는 스캐폴드를 생성한다. 일부 구현예에서, 알기네이트 코어는 변형되어, 예를 들면 증대된 안정성의 화학효소적으로 조작된 알기네이트를 갖는 공유 보강된 마이크로캡슐을 생성한다. 일부 구현예에서, 알기네이트 코어는 변형되어, 예를 들면 아크릴레이트 작용화된 인지질의 원 위치 중합에 의해 조립된 막-모방체 필름을 생성한다. 일부 구현예에서, 마이크로캡슐은 에피머라제를 이용해서 효소적으로 변형된 알기네이트로 이루어진다. 일부 구현예에서, 마이크로캡슐은 마이크로캡슐 막의 인접한 층 간 공유 연결을 포함한다. 일부 구현예에서, 마

이크로캡슐은 페놀 모이어티와 커플링된 알기네이트를 포함하는 체 크기 미만의 캡슐을 포함한다. 일부 구현예에서, 마이크로캡슐은 알기네이트-아가로스를 포함하는 스캐폴드를 포함한다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 알기네이트 내에서 캡슐화되기 전에 PEG로 변형된다. 일부 구현예에서, 단리된 세포, 예를 들면 SC-β 세포 집단은 광반응성 리포솜 및 알기네이트 중에 캡슐화된다. 마이크로캡슐에서 이용된 알기네이트는 비제한적으로 PEG, 키토산, PES 중공 섬유, 콜라겐, 하이알루론산, RGD를 포함하는 텍스트란, EHD 및 PEGDA, PMBV 및 PVA, PGSAS, 아가로스, 젤라틴을 포함하는 아가로스, PLGA, 및 이들의 다중층 구현예를 포함하는 다른 적합한 생체적 합물질로 대체될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0351] 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 방법에 따라 생산된 세포 집단을 포함하는 조성물은 또한 체장 소도 세포의 하나 이상의 내분비 폴리펩타이드를 생산하도록 설계된 기계적 디바이스에서 기능적 성분으로 사용될 수 있다. 그 가장 단순한 형태에서, 디바이스는 세포 집단의 통과를 방지하여 이들을 디바이스 내에 보유하지만, 세포 집단에 의해 분비된 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴의 통과는 허용하는 반투과막 뒤에 체장 베타 세포 집단 (예를 들면, 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체 집단에서 생산됨)을 함유한다. 여기에는 전형적으로 세포 클러스터 형태로 마이크로캡슐화되어 탈분화를 억제하는 세포 상호작용을 허용하는 체장 베타 세포 집단이 포함된다. 예를 들면, 미국 특허 번호 4,391,909는 인슐린 크기의 단백질에 투과성이지만 100,000 mol. wt. 초과 분자에는 비투과성이 되도록 가교결합된 > 3,000 mol. wt.의 다당류 폴리머로 제조된 회전타원체 반투과막에 캡슐화된 소도 세포를 기재한다. 미국 특허 번호 6,023,009는 아가로스 및 아가로펙틴으로 제조된 반투과막에 캡슐화된 소도 세포를 기재한다. 이러한 성질의 마이크로캡슐은 당뇨 환자의 체강 내 투여를 위해 채용되며, 박테리아에 대한 감수성 또는 조직적합성 문제의 감소에서 특정한 이점을 갖는 것으로 여겨진다.

[0352] 보다 정교한 디바이스도 당뇨 환자로의 삽입을 위해 또는 체외 요법을 위해 본원에서 기재된 방법에 따라 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체로부터 생산된 체장 베타 세포 집단을 포함하는 사용을 위해 고려된다. 미국 특허 번호 4,378,016은 체외 분절, 피하 분절, 및 호르몬-생산 세포를 함유하는 대체가능한 엔빌로프를 함유하는 인공 내분비샘을 기재한다. 미국 특허 번호 5,674,289는 주변 조직에 개방된 하나 이상의 혈관화 챔버에 반투과막에 의해 분리된 소도 챔버를 갖는 생체인공 체장을 기재한다. 유용한 디바이스는 전형적으로 소도 세포를 함유하도록 채용된 챔버 및 소도 세포로부터 분비된 단백질을 수집하고 또한, 예를 들면 순환 글루코오스 수준의, 소도 세포로의 역 신호전달을 허용할 수 있는 반투과막에 의해 소도 세포로부터 분리된 챔버를 갖는다.

[0353] 개시내용의 측면에는 본원에 기재된 단리된 세포(예를 들면, SC-β 세포) 집단을 포함하는 분석이 관여된다. 일부 구현예에서, 분석은 β 세포 증식, β 세포 복제, 및 β 세포사, β 세포 기능, 면역 공격에 대한 β 세포 감수성, 또는 탈분화 또는 분화에 대한 β 세포 감수성으로 구성된 그룹으로부터 선택된 β 세포 운명을 촉진하거나 억제하는 하나 이상의 후보 제제를 동정하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분석은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 SC-β 세포로의 분화를 촉진하는 하나 이상의 후보 제제를 동정하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분석은 인슐린을 생산하거나 인슐린 생산 또는 분비를 증가시키도록 β 세포를 자극하는 하나 이상의 후보 제제를 동정하기 위해 사용될 수 있다.

[0354] 개시내용은 SC-β 세포가 질환(예를 들면, 당뇨병, 비만, 또는 β 세포-관련된 장애)을 겪는 개인으로부터 추출되거나 단리된 세포에서 유도된 iPS 세포로부터 본원에서 기재된 방법에 따라 생성되고, 이들 SC-β 세포가 질환을 갖지 않는 건강한 개인으로부터의 정상 β 세포와 비교되어 질환에 대한(예를 들면, 후성유전학적 및/또는 유전적) 마커로 유용할 수 있는 SC-β 세포 및 정상 β 세포 간 차이를 동정하는 방법을 고려한다. 일부 구현예에서, β 세포는 당뇨병 개인으로부터 수득되며, 정상 β 세포와 비교된 다음, β 세포가 iPS 세포로 재프로그래밍되고, iPS 세포는 당뇨병 개인에서 수득된 β 세포에 존재하지만 정상 β 세포에 존재하지 않는 유전적 및/또는 후성유전학적 마커에 대해 분석되어 마커(예를 들면, 전-당뇨병)를 동정한다. 일부 구현예에서, 당뇨병 환자로부터 유도된 iPS 세포 및/또는 SC-β가 제제(예를 들면, 당뇨병 표현형에 기여하는 유전자를 조정할 수 있는 제제)를 스크리닝하기 위해 사용된다.

[0355] *인슐린-양성 내분비 세포의 SC-β 세포로의 분화 방법*

[0356] 개시내용의 방법을 이용하여 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 전환에 의해 SC-β 세포를 생성하는 것은 수많은 이점을 갖는다. 먼저, 개시내용의 방법은 개인에 특이적이며 유전적으로 매칭된 세포인 자가조직 SC-β 세포를 생성할 수 있게 한다. 일반적으로, 자가조직 세포는 비-자가조직 세포에 비해 면역학적 거부를 거칠 가능성이 더 적다. 세포는 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체, 예를 들면 개인으로부터의 체세포(예를 들면, 섬유아세포)를 유도된 만능 상태로 재프로그래밍함으로써 수득된 체장 조상세포로부터 유도된 다음 만능 세포를 배양하여 적어도 일부 만능 세포를 적어도 하나의 인슐린-양성 내

분비 세포 또는 이들의 전구체로 분화시키고, 그 다음 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체가 SC- β 세포로 생체내 성숙되도록, 또는 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙을 유도하도록 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 개인 내로 이식된다.

[0357] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체가 수득되는 대상체는 포유동물 대상체, 예컨대 인간 대상체이다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 β 세포 장애를 겪는다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 당뇨병을 겪는다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 전당뇨병을 겪는다. 그와 같은 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생체내에서 SC- β 세포로 분화된 다음, β 세포 장애(예를 들면, 당뇨병)에 대해 상기 대상체를 치료하기 위한 방법에서 세포가 수확된 상기 대상체로 투여된다.

[0358] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 대상체 내(생체내)에 배치되며, 생체내에서 본원에서 개시된 바와 같은 방법에 의해 전환되어 SC- β 세포가 된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 SC- β 세포로의 생체내 전환은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6 개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 SC- β 세포로의 생체내 전환은 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 또는 적어도 6 개의 β 세포 성숙 인자를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여함으로써 달성될 수 있다.

[0359] 일부 구현예에서, 접촉은 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 하나 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함하는 배양 배지 중에 유지함으로써 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 유전적으로 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 본원에서 개시된 바와 같은 하나 이상의 β 세포 마커를 발현하도록, 예를 들면 췌장 및 십이지장 호메오박스 1(PDX-1) 폴리펩타이드, 인슐린, c-펩타이드, 아밀린, E-카드헤린, Hnf3 β , PCI/3, β 2, Nkx2.2, NKX6-1, GLUT2, PC2, ZnT-8, 또는 이들의 실질적으로 상동성인 아미노산 서열, 또는 이들의 기능적 단편 또는 기능적 변이체로부터 선택된 적어도 하나의 폴리펩타이드를 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있다.

[0360] 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체가 시험관내 조건 하에 유지되는 경우, 종래의 조직 배양 조건 및 방법이 사용될 수 있고, 당해분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 다양한 세포의 단리 및 배양 방법은 당해분야의 숙련가의 능력 범위 내에 충분히 속한다.

[0361] 개시내용의 방법에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 일반적으로 표준 조건의 온도, pH, 및 다른 환경적인 조건 하에, 예를 들면 5-10% CO₂를 함유하는 대기에서 37°C에서 조직 배양판에 부착 세포로서 배양될 수 있다. 세포 및/또는 배양 배지는 본원에 기재된 바와 같은 SC- β 세포로의 전환을 달성하도록 적절하게 변형된다. 특정 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체, 예를 들면 췌장 조상세포는 세포의 매트릭스의 하나 이상의 특징을 모사하거나 하나 이상의 세포의 매트릭스 또는 기저막 성분을 포함하는 물질의 존재 상에 또는 중에 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, Matrigel™이 사용된다. 다른 물질에는 단백질 또는 이들의 혼합물, 예컨대 젤라틴, 콜라겐, 파이프록틴 등이 포함된다. 본 발명의 특정 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 세포의 영양세포층의 존재 중에 배양될 수 있다. 그와 같은 세포는, 예를 들면 쥐와 또는 인간 기원의 것일 수 있다. 이들은 또한 원한다면 그것의 증식을 억제하도록 조사되거나, 화학적 불활성제, 예컨대 미토마이신 c를 이용한 치료로 화학적으로 불활성화되거나, 또는 달리 처리될 수 있다. 다른 구현예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 영양세포 없이 배양된다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체는 세포 클러스터링을 촉진하는 조건 하에 배양된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "세포 클러스터링을 촉진하는 조건"은 SC- β 세포로의 세포 분화 동안 세포 클러스터링을 자극하는 임의의 조건을 나타낸다. 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 현탁 배양을 포함한다. Boretti 및 Gooch(Tissue Eng. 2006 Apr; 12(4):939-48)는 최소 부착 조건(저-혈청 배지, 저-부착성 기재) 중 배양이 성체 췌관 상피 세포의 베타 세포로의 시험관내 전환분화에서 세포 클러스터링을 자극했다고 보고한다. 따라서 이론에 구애받지 않고, 일부 구현예에서, 세포 클러스터링을 촉진하는 조건은 최소 부착 조건, 예를 들면 저-혈청 배지, 저-부착성 기재를 포함한다.

[0362] 특정 예에서, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 적어도 하나의 SC- β 세포(예를 들면, 성숙 췌장 β 세포)로 분화시키도록 본원에 기재된 효과적인 양의 β 세포 성숙 인자에 적어도 하나의 인슐

린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 노출시키거나 이와 접촉시킴으로써, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 분화를 유도하도록 β 세포 성숙 인자가 사용될 수 있다.

[0363] 따라서, 본원에서 기재된 방법에 의해 제조된 세포 및 조성물이 본원에 포함된다. β 세포 성숙 인자의 정확한 양 및 유형은 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 수, 원하는 분화 단계 및 수행된 분화 전 단계의 수에 따라 변할 수 있다.

[0364] 특정 예에서, β 세포 성숙 인자는 효과적인 양으로 존재한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "효과적인 양"은 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체 집단 내 세포의 적어도 10% 또는 적어도 20% 또는 적어도 30%의 SC- β 세포로의 분화를 위해 존재해야 하는 화합물의 양을 나타낸다.

[0365] 추가 예에서, β 세포 성숙 인자는 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 배양 배지에 존재할 수도 있고, 또는 대안적으로 β 세포 성숙 인자가 일부 성장 단계 동안 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체에 첨가될 수도 있다.

[0366] SC- β 세포의 존재 확인 및 동정

[0367] SC- β 세포, 예를 들면 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자에 대한 노출에 의해 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 분화 유도로 생산된 성숙 β 세포의 존재를 확인하기 위해 당해분야의 숙련가에게 공통된 임의의 수단을 이용할 수 있다.

[0368] 일부 구현예에서, β 세포 마커, 예를 들면 화학적으로 유도된 SC- β 세포의 존재는 내인성 β 세포를 시사하는 하나 이상의 마커의 존재 또는 부재를 검출함으로써 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 방법에는 성숙 β 세포에 대한 마커의 양성 발현(예를 들면 존재)을 검출하는 단계가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 마커는 시약, 예를 들면 NKX6-1 및 C-펩타이드를 검출하기 위한 시약을 이용해서 검출될 수 있다. 특히, 본원에서 SC- β 세포는 NKX6-1 및 C-펩타이드를 발현하며, 미성숙 β 세포를 시사할 다른 마커(예를 들면, MafB)를 유의미한 수준으로 발현하지 않는다. 마커에 대한 시약은, 예를 들면 RT-PCR 또는 PCR 반응, 예를 들면 반-정량적 또는 정량적 RT-PCR 또는 PCR 반응을 위한 마커 또는 프라이머에 대한 항체일 수 있다. 그와 같은 마커는 SC- β 세포가 생산되었는지를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 항체 또는 다른 검출 시약은 라벨, 예를 들면 검출에서 사용하기 위한 방사선, 형광(예를 들면, GFP) 또는 비색 라벨에 연결될 수 있다. 검출 시약이 프라이머인 경우, 이는 건조 제조물 중에, 예를 들면 동결건조되어, 또는 용액 중에 공급될 수 있다.

[0369] 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체의 SC- β 세포로의 진행은 성숙 β 세포의 마커 특징의 발현을 결정함으로써 모니터링될 수 있다. 일부 공정에서, 특정 마커의 발현은 마커의 존재 또는 부재를 검출함으로써 결정된다. 대안적으로, 특정 마커의 발현은 마커가 세포 배양 또는 세포 집단의 세포에 존재하는 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. 특정 공정에서, SC- β 세포의 특정 마커의 발현뿐만 아니라 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체, 예를 들면 이것이 유도된 만능 줄기 세포 또는 β 세포 선조 세포의 특정 마커의 유의미한 발현의 부재가 결정된다.

[0370] 인슐린-양성 내분비 세포로부터 SC- β 세포(예를 들면, 성숙 β 세포)의 생산 모니터링과 관련되어 기재된 바와 같이, 정성적 또는 반-정량적 기술, 예컨대 블롯 전달 방법 및 면역세포화학이 당해분야의 숙련가에 통상적으로 공지된 방법을 이용해서 마커 발현을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 마커 발현은 당해기술에 보통 공지된 방법에 의해, 기술, 예컨대 정량적-PCR의 사용을 통해 정확하게 정량화될 수 있다. 추가로, 폴리펩타이드 수준에서, 많은 β 세포 소도 호르몬-발현 세포 마커가 분비된 단백질임이 이해될 것이다. 이와 같이, 세포의 마커 함량을 측정하기 위한 기술, 예컨대 ELISA가 이용될 수 있다.

[0371] SC- β 세포는 또한 SC- β 세포가 유도되는 만능 줄기의 마커 특징의 하향 조절을 특징으로 할 수 있다. 예를 들면, 만능 줄기 세포로부터 유도된 SC- β 세포는 이것이 유도된 만능 줄기 세포에서의 발현에 비해 성숙 시 만능 줄기 세포 마커 알칼리성 포스파타제(AP), NANOG, OCT-4, SOX-2, SSEA4, TRA-1-60 또는 TRA-1-81의 통계적으로 유의미한 하향-조절을 특징으로 할 수 있다. 만능 세포 마커에 의해 발현된 다른 마커에는 비제한적으로 알칼리성 포스파타제(AP); ABCG2; 단계 특이적 배아 항원-1(SSEA-1); SSEA-3; SSEA-4; TRA-1-60; TRA-1-81; Tra-2-49/6E; ERas/ECATS, E-카드헤린; β III-튜블린; α -평활근 액틴(α -SMA); 섬유아세포 성장 인자 4(Fgf4), Cripto, Dax1; 아연 핑거 단백질 296(Zfp296); N-아세틸전달효소-1(Nat1); (ES 세포 연관 전사체 1(ECAT1); ESG1/DPPAS/ECAT2; ECAT3; ECAT6; ECAT7; ECAT8; ECAT9; ECAT10; ECAT15-1; ECAT15-2; Fth117; Sa114; 미분화된 배아 세포 전사 인자(Utf1); Rex1; p53; G3PDH; TERT를 포함하는 텔로머라제; 침묵 X 염색체 유전자; Dnmt3a; Dnmt3b; TRIM28; F-박스 함유 단백질 15(Fbx15); Nanog/ECAT4; Oct3/4; Sox2; Klf4; c-Myc; Esrrb;

TDGF1; GABRB3; Zfp42, FoxD3; GDF3; CYP25A1; 발생 만능성-연관 2(DPPA2); T-세포 림프종 브레이크포인트 1(Tcl1); DPPA3/Stella; DPPA4; Dnmt3L; Sox15; Stat3; Grb2; SV40 Large T 항원; HPV16 E6; HPV16 E7, β -카테닌, 및 Bmi1 및 만능성에 대한 다른 일반적 마커 등이 포함되며, 이들 중 적어도 하나 이상은 이들이 유도되는 만능 줄기 세포에 비해 성숙 시 통계적으로 유의미한 양만큼 하향 조절된다.

[0372] 본 발명이 본원의 성숙 β 세포 마커로 열거된 마커에 제한되지 않으며, 본 발명이 또한 마커, 예컨대 세포 표면 마커, 항원, 및 ESTs, RNA(마이크로RNAs 및 안티센스 RNA 포함), DNA(유전자 및 cDNAs 포함), 및 그것의 일부를 포함하는 다른 유전자 생성물을 포괄함이 이해된다.

[0373] SC- β 세포의 농축, 단리 및 정제

[0374] 본 발명의 또 하나의 측면은 혼합된 세포 집단이 SC- β 세포가 유도된 SC- β 세포 및 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체를 포함하도록, 이중성 세포 집단으로부터 SC- β 세포 집단의 단리에 관련된다. 상기-기재된 임의의 공정에 의해 생산된 SC- β 세포 집단은 이것이 유도된 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체 상에 존재하지 않는 SC- β 세포 상에 존재하는 임의의 세포 표면 마커를 이용해서 농축, 단리 및/또는 정제될 수 있다. 그와 같은 세포 표면 마커는 또한 SC- β 세포에 특이적인 친화도 태그를 나타낸다. SC- β 세포에 특이적인 친화도 태그의 예는 SC- β 세포의 세포 표면 상에 존재하지만 다른 세포형(예를 들면 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체) 상에 실질적으로 존재하지 않는 마커 분자, 예컨대 폴리펩타이드에 특이적인 항체, 리간드 또는 다른 결합체이다. 일부 공정에서, SC- β 세포(예를 들면 인간 SC- β 세포) 상의 세포 표면 항원에 결합하는 항체는 본원에서 기재된 방법에 의해 생산된 화학적으로 유도된(예를 들면 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자와 접촉시킴으로써) SC- β 세포의 농축, 단리 또는 정제를 위한 친화도 태그로 사용된다. 그와 같은 항체는 공지되어 있고 상업적으로 이용가능하다.

[0375] 숙련가는 SC- β 세포의 농축, 단리 및/또는 정제를 위한 항체를 이용하기 위한 공정을 쉽게 이해할 것이다. 예를 들면 일부 구현예에서, 시약, 예컨대 항체는 SC- β 세포를 포함하는 세포 집단과 인큐베이션되며, 상기 세포 집단은 세포간 및 기재 부착을 감소시키도록 처리되었다. 이어서 세포 집단이 세정되고, 원심분리되고 재현탁된다. 일부 구현예에서, 항체가 이미 라벨로 표지되지 않은 경우, 세포 현탁액은 2차 항체, 예컨대 일차 항체와 결합할 수 있는 FITC-접합된 항체와 인큐베이션된다. SC- β 세포가 세정되고, 원심분리되고 버퍼 중에 재현탁된다. SC- β 세포 현탁액은 형광 활성화된 세포 정렬기(FACS)를 이용해서 분석되고 분류된다. 항체-결합된, 형광 재프로그래밍된 세포가 비-결합된, 비-형광 세포(예를 들면 미성숙한, 인슐린-생산 세포)로부터 별도로 수집되고, 그렇게 함으로써 세포 현탁액에 존재하는 다른 세포, 예를 들면 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체, 또는 미성숙한, 인슐린-생산 세포(예를 들면 다른 분화된 세포형)로부터 SC- β 세포가 단리된다.

[0376] 본원에 기재된 공정의 또 하나의 구현예에서, SC- β 세포를 포함하는 단리된 세포 조성물은 SC- β 세포에 특이적인 동일한 또는 상이한 마커를 이용한 추가 회로의 분류에 의해 또는 대안적 친화도-기반 방법을 이용하여 추가 정제될 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, FACS 분류는 먼저 단독으로 또는 C-펩타이드 발현과 함께, 또는 대안적으로 본원에 개시된 β 세포 마커와 함께 NKX6-1을 발현하는 SC- β 세포를 세포 집단에서 이들 마커 중 하나를 발현하지 않는 세포(예를 들면 음성 세포)로부터 단리하기 위해 사용된다. 두 번째 FAC 분류, 예를 들면 첫 번째 분류와 상이한 마커에 대해 양성인 세포를 단리하기 위해 FACS를 다시 이용하는 양성 세포의 분류는 재프로그래밍된 세포 집단을 농축시킨다.

[0377] 대안적인 구현예에서, FACS 분류는 대부분의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체 상에 존재하지만 SC- β 세포 상에 존재하지 않는 마커에 대해 부정적으로 분류함으로써 세포를 분리하기 위해 사용된다.

[0378] 본원에 기재된 공정의 일부 구현예에서, SC- β 세포는 항체를 이용하지 않고 형광으로 표지된 뒤 형광 활성화된 세포 정렬기(FACS)를 이용해서 비-표지된 세포로부터 단리된다. 그와 같은 구현예에서, GFP, YFP를 인코딩하는 핵산 또는 발현가능한 형광 마커 유전자를 인코딩하는 또 다른 핵산, 예컨대 루시페라아제를 인코딩하는 유전자가 상기 기재된 방법을 이용해서 재프로그래밍된 세포를 표지하기 위해 사용된다. 예를 들면 일부 구현예에서, GFP 또는 그것의 생물학적 활성 단편을 인코딩하는 핵산의 적어도 하나의 사본은 GFP 유전자 생성물 또는 그것의 생물학적 활성 단편의 발현이 인슐린 프로모터의 조절 하에 있도록 먼저 SC- β 세포로 화학적으로 유도된 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 내로 SC- β 세포에서 발현된 프로모터, 예컨대 인슐린 프로모터의 하류에 도입된다.

[0379] 상기 기재된 절차에 부가하여, 화학적으로 유도된 SC- β 세포는 또한 세포 단리를 위한 다른 기술에 의해 단리될 수 있다. 추가로, SC- β 세포는 또한 SC- β 세포의 선택적 생존 또는 선택적 증식을 촉진하는 성장 조건에서

의 일련의 후속배양 방법에 의해 농축되거나 단리될 수 있다. 그와 같은 방법은 당해분야의 숙련가에 의해 공지되어 있으며, 제제, 예컨대 다른 것들 중에서 인슐린, 액티빈 A, TGF-베타 1, 2, 및 3을 포함하는 TGF-베타 패밀리의 멤버, 골 형태형성 단백질(BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -11, -12, 및 -13), 섬유아세포 성장 인자-1 및 -2, 혈소판-유도 성장 인자-AA, 및 -BB, 혈소판 풍부 혈장, 인슐린-유사 성장 인자(IGF-I, II) 성장 분화 인자(GDF-5, -6, -7, -8, -10, -11, -15), 혈관 내피 세포-유도 성장 인자(VEGF), 간세포 성장 인자(HGF), 플레이오토로핀, 엔도텔린, 표피 성장 인자(EGF), 베타-셀룰린의 사용이 포함될 수 있다. 다른 억제학적 화합물에는, 예를 들면 니코틴아미드, 글루카곤 유사 펩타이드-I(GLP-1) 및 II, GLP-1 및 2 미메티바디, Exendin-4, 레티노산, 부갑상샘 호르몬이 포함될 수 있다.

[0380] 본원에서 기재된 방법을 이용하여, 농축, 단리 및/또는 정제된 SC-β 세포 집단은 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체(본원에서 기재된 방법에 의해 만능 줄기 세포로부터 분화됨)로부터 시험관내 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 바람직한 농축, 단리 및/또는 정제 방법은 인간 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이들의 전구체로부터 인간 SC-β 세포의 시험관내 생산에 관련되며, 이는 인간 만능 줄기 세포, 또는 유도된 인간 만능 줄기(iPS) 세포로부터 분화되었다. 이전에 iPS 세포로부터 유도된, 완성 내배엽 세포로부터 유도된, 인슐린-양성 내분비 세포로부터 SC-β 세포가 분화된 하나의 구현예에서, SC-β 세포는 iPS 세포를 생성하기 위해 세포가 수득된 상기 대상체에 대해 자가조직될 수 있다.

[0381] 본원에서 기재된 방법을 이용하여, SC-β 세포의 단리된 세포 집단은 인슐린-양성 내분비 세포 또는 전구체 집단의 화학적 유도 전 세포 집단에 비해 적어도 약 2- 내지 약 1000-배만큼 SC-β 세포 함량이 농축된다. 일부 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 전구체 집단의 화학적 유도 전 집단에 비해 적어도 약 5- 내지 약 500-배만큼 농축될 수 있다. 다른 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 전구체 집단의 화학적 유도 전 집단에 비해 적어도 약 10- 내지 약 200-배 농축될 수 있다. 또 다른 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 전구체 집단의 화학적 유도 전 집단에 비해 적어도 약 20- 내지 약 100-배 농축될 수 있다. 또 다른 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 전구체 집단의 화학적 유도 전 집단에 비해 적어도 약 40- 내지 약 80-배 농축될 수 있다. 특정 구현예에서, SC-β 세포는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 전구체 집단의 화학적 유도 전 집단에 비해 적어도 약 2- 내지 약 20-배 농축될 수 있다.

[0382] SC-β 세포를 포함하는 조성물

[0383] 본 발명의 일부 구현예는 SC-β 세포를 포함하는 세포 조성물, 예컨대 세포 배양물 또는 세포 집단에 관한 것이고, 상기 SC-β 세포는 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체로부터 유도되었다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 인슐린-양성 내분비 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 NKX6-1-체장 선조 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 Pdx1-체장 선조 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 원시 소화관 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 최종적인 내배엽 세포를 포함한다.

[0384] 어떤 구현예에 따르면, 화학적으로 유도된 SC-β 세포는 포유동물 세포이고, 바람직한 구현예에서, 그와 같은 SC-β 세포는 인간 SC-β 세포이다. 일부 구현예에서, 인슐린-양성 내분비 세포는 최종적인 내배엽 세포 예를 들면 인간 최종적인 내배엽 줄기세포로부터 유도되었다. 어떤 구현예에 따르면, 화학적으로 유도된 Pdx1-양성 체장 조상세포는 포유동물 세포이고, 바람직한 구현예에서, 그와 같은 Pdx1-양성 체장 조상세포는 인간 Pdx1-양성 체장 조상세포이다.

[0385] 본 발명의 다른 구현예는 본원에서 기재된 방법에 의해 생산된 SC-β 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 단리된 세포 집단 또는 세포 배양물에 관한 것이다. 본 발명의 일부 구현예는 본원에서 기재된 방법에 의해 생산된 화학적으로-유도된 SC-β 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 단리된 세포 집단 또는 세포 배양물에 관한 것이다. 그와 같은 구현예에서, SC-β 세포는 SC-β 세포 집단 중 총 세포의 약 90% 미만, 약 85% 미만, 약 80% 미만, 약 75% 미만, 약 70% 미만, 약 65% 미만, 약 60% 미만, 약 55% 미만, 약 50% 미만, 약 45% 미만, 약 40% 미만, 약 35% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 12% 미만, 약 10% 미만, 약 8% 미만, 약 6% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 조성물은 세포 집단 중 총 세포의 약 90% 초과, 예를 들면 약 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 약 99%를 형성하는 SC-β 세포의 집단을 포함하거나, 세포 집단 중 총 세포의 약 적어도 100%는 SC-β 세포이다.

[0386] 본 발명의 어떤 다른 구현예는 SC-β 세포 및 인슐린-양성 내분비 세포 또는 SC-β 세포가 유도된 그것의 전구체의 조합을 포함하는 조성물, 예컨대 단리된 세포 집단 또는 세포 배양물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, SC-β 세포가 유도된 인슐린-양성 내분비 세포는 단리된 세포 집단 또는 배양물 중 총 세포의 약 25% 미만, 약

20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만을 포함한다.

[0387] 본 발명의 추가의 구현예는 본원에서 기재된 과정에 의해 생산되고 화학적으로 유도된 SC-β 세포를 다수 세포 형으로서 포함하는 조성물, 예컨대 단리된 세포 집단 또는 세포 배양물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 방법 및 과정은 하기를 포함하는 단리된 세포 배양 및/또는 세포 집단을 생산한다: 적어도 약 99%, 적어도 약 98%, 적어도 약 97%, 적어도 약 96%, 적어도 약 95%, 적어도 약 94%, 적어도 약 93%, 적어도 약 92%, 적어도 약 91%, 적어도 약 90%, 적어도 약 89%, 적어도 약 88%, 적어도 약 87%, 적어도 약 86%, 적어도 약 85%, 적어도 약 84%, 적어도 약 83%, 적어도 약 82%, 적어도 약 81%, 적어도 약 80%, 적어도 약 79%, 적어도 약 78%, 적어도 약 77%, 적어도 약 76%, 적어도 약 75%, 적어도 약 74%, 적어도 약 73%, 적어도 약 72%, 적어도 약 71%, 적어도 약 70%, 적어도 약 69%, 적어도 약 68%, 적어도 약 67%, 적어도 약 66%, 적어도 약 65%, 적어도 약 64%, 적어도 약 63%, 적어도 약 62%, 적어도 약 61%, 적어도 약 60%, 적어도 약 59%, 적어도 약 58%, 적어도 약 57%, 적어도 약 56%, 적어도 약 55%, 적어도 약 54%, 적어도 약 53%, 적어도 약 52%, 적어도 약 51% 또는 적어도 약 50% SC-β 세포.

[0388] 또 하나의 구현예에서, 세포 (또는 세포 배양물)의 단리된 세포 집단 또는 조성물은 인간 SC-β 세포를 포함한다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 과정은 하기를 포함하는 단리된 세포 집단을 생산할 수 있다: 적어도 약 50%, 적어도 약 45%, 적어도 약 40%, 적어도 약 35%, 적어도 약 30%, 적어도 약 25%, 적어도 약 24%, 적어도 약 23%, 적어도 약 22%, 적어도 약 21%, 적어도 약 20%, 적어도 약 19%, 적어도 약 18%, 적어도 약 17%, 적어도 약 16%, 적어도 약 15%, 적어도 약 14%, 적어도 약 13%, 적어도 약 12%, 적어도 약 11%, 적어도 약 10%, 적어도 약 9%, 적어도 약 8%, 적어도 약 7%, 적어도 약 6%, 적어도 약 5%, 적어도 약 4%, 적어도 약 3%, 적어도 약 2% 또는 적어도 약 1% SC-β 세포. 바람직한 구현예에서, 단리된 세포 집단은 인간 SC-β 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 배양 또는 집단 중 SC-β 세포의 백분율은 배양물에 남아 있는 공급장치 세포에 관한 것 없이 계산된다.

[0389] 본 발명의 또 다른 구현예는 조성물, 예컨대, SC-β 세포 및 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이것으로부터 분화된 그것의 전구체를 포함하는 단리된 세포 집단 또는 세포 배양물의 혼합물에 관한 것이다. 예를 들면, 약 모든 95 개의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체에 대한 적어도 약 5개의 SC-β 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 집단이 생산될 수 있다. 다른 구현예에서, 약 모든 5개의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체에 대해 적어도 약 95 개의 SC-β 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 집단이 생산될 수 있다. 추가로, SC-β 세포 대 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 다른 비를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 집단이 고려된다. 예를 들면, 약 모든 1,000,000, 또는 적어도 100,000개의 세포, 또는 적어도 10,000개의 세포, 또는 적어도 1000개의 세포 또는 500, 또는 적어도 250 또는 적어도 100 또는 적어도 10개의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체에 대해 적어도 약 1개의 SC-β 세포를 포함하는 조성물이 생산될 수 있다.

[0390] 본 발명의 추가 구현예는 조성물, 예컨대, 내인성 β 세포의 적어도 하나의 특징을 나타내는 인간 SC-β 세포를 포함하는, 인간 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 집단에 관한 것이다.

[0391] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 세포 배양 및/또는 세포 SC-β 세포의 집단은 비-재조합 세포인 인간 SC-β 세포를 포함한다. 그와 같은 구현예에서, 세포 배양 및/또는 세포 집단은 재조합 인간 SC-β 세포가 전혀 없거나 실질적으로 없다.

[0392] β 세포 성숙 인자

[0393] 본 개시내용의 측면은, 예를 들면, 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC-β 세포 (예를 들면, 성숙한 췌장 β 세포)로의 성숙 또는 분화를 유도하기 위해 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체를 β 세포 성숙 인자를 접촉시키는 것을 수반한다. 용어 "β 세포 성숙 인자"는 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC-β 세포로의 전환을 촉진하거나 그것에 기여하는 체제를 의미한다. 일부 구현예에서, β 세포 성숙 인자는, 예를 들면, 본원에서 기재된 방법에 따르면 만능 세포 (예를 들면, iPSCs 또는 hESC)의 최종적인 내배엽 세포로의 분화를 유도한다. 일부 구현예에서, β 세포 성숙 인자는, 예를 들면, 본원에서 기재된 방법에 따르면 최종적인 내배엽 세포의 원시 소화관 세포로의 분화를 유도한다. 일부 구현예에서, β 세포 성숙 인자는, 예를 들면, 본원에서 기재된 방법에 따르면 원시 소화관 세포의 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도한다. 일부 구현예에서, β 세포 성숙 인자는, 예를 들면, 본원에서 기재된 방법에 따르면 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포로의 분화를 유도한다. 일부 구현예에서, β 세포 성숙 인자는, 예를 들면, 본원에서 기재된 방법에 따르면 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포의 인슐린-양성 내분비 세포로

의 분화를 유도한다. 일부 구현예에서, β 세포 성숙 인자는, 예를 들면, 본원에서 기재된 방법에 따르면 인슐린-양성 내분비 세포의 SC- β 세포로의 성숙을 유도한다.

[0394] 일반적으로, 본원에서 기재된 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자는 본원에서 기재된 방법에 따른 SC- β 세포를 산출하기 위해 단독으로, 또는 다른 β 세포 성숙 인자와 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 적어도 10개의 β 세포 성숙 인자는 SC- β 세포를 생산하는 방법에서 사용된다.

[0395] *형질전환 성장 인자- β (TGF- β) 슈퍼패밀리*

[0396] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 형질전환 성장 인자- β (TGF- β) 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자의 용도에 관한 것이다. "TGF- β 슈퍼패밀리"는 공지된 TGF β 패밀리 멤버의 구조적 및 기능적 특성을 갖는 단백질을 의미한다. 단백질의 TGF β 패밀리는 구조적 및 기능적 측면 둘 모두를 특징으로 한다. TGF β 시리즈의 단백질, 인히빈 (인히빈 A 및 인히빈 B 포함), 액티빈 (액티빈 A, 액티빈 B, 및 액티빈 AB 포함), MIS (Müllerian 억제 물질), BMP (골 형성 단백질), dpp (데카펜타플레직), Vg-1, MNSF (단클론성 비특이적 억제제 인자), 및 기타를 포함한다. 단백질의 패밀리의 활성은 다양한 세포형에 대한 어떤 수용체와의 특이적 결합을 기반으로 한다. 이러한 패밀리의 멤버는, 특히 그것의 기능과 상관되는 C-말단에서 서열 동일성의 영역을 공유한다. TGF β 패밀리는 100개 초과와 뚜렷이 다른 단백질을 포함하고, 이들 모두는 아미노산 서열 동일성의 적어도 하나의 영역을 공유한다. 패밀리의 멤버는, 비제한적으로, 그것의 유전자은행 수납 번호에 의해 확인된 바와 같이 하기 단백질을 포함한다: P07995, P18331, P08476, Q04998, P03970, P43032, P55102, P27092, P42917, P09529, P27093, P04088, Q04999, P17491, P55104, Q9WUK5, P55103, O88959, O08717, P58166, O61643, P35621, P09534, P48970, Q9NR23, P25703, P30884, P12643, P49001, P21274, O46564, O19006, P22004, P20722, Q04906, Q07104, P30886, P18075, P23359, P22003, P34821, P49003, Q90751, P21275, Q06826, P30885, P34820, Q29607, P12644, Q90752, O46576, P27539, P48969, Q26974, P07713, P91706, P91699, P27091, O42222, Q24735, P20863, O18828, P55106, Q9PTQ2, O14793, O08689, O42221, O18830, O18831, O18836, O35312, O42220, P43026, P43027, P43029, O95390, Q9R229, O93449, Q9Z1W4, Q9BDW8, P43028, Q7Z4P5, P50414, P17246, P54831, P04202, P01137, P09533, P18341, O19011, Q9Z1Y6, P07200, Q9Z217, O95393, P55105, P30371, Q9MZE2, Q07258, Q96S42, P97737, AAA97415.1, NP-776788.1, NP-058824.1, EAL24001.1, 1S4Y, NP-001009856.1, NP-032406.1, NP-999193.1, XP-519063.1, AAG17260.1, CAA40806.1, NP-001009458.1, AAQ55808.1, AAK40341.1, AAP33019.1, AAK21265.1, AAC59738.1, CAI46003.1, B40905, AAQ55811.1, AAK40342.1, XP-540364.1, P55102, AAQ55810.1, NP-990727.1, CAA51163.1, AAD50448.1, JC4862, PN0504, BAB17600.1, AAH56742.1, BAB17596.1, CAG06183.1, CAG05339.1, BAB17601.1, CAB43091.1, A36192, AAA49162.1, AAT42200.1, NP-789822.1, AAA59451.1, AAA59169.1, XP-541000.1, NP-990537.1, NP-002184.1, AAC14187.1, AAP83319.1, AAA59170.1, BAB16973.1, AAM66766.1, WFPGBB, 1201278C, AAH30029.1, CAA49326.1, XP-344131.1, AAH48845.1, XP-148966.3, I48235, B41398, AAH77857.1, AAB26863.1, 1706327A, BAA83804.1, NP-571143.1, CAG00858.1, BAB17599.1, BAB17602.1, AAB61468.1, PN0505, PN0506, CAB43092.1, BAB17598.1, BAA22570.1, BAB16972.1, BAC81672.1, BAA12694.1, BAA08494.1, B36192, C36192, BAB16971.1, NP-034695.1, AAA49160.1, CAA62347.1, AAA49161.1, AAD30132.1, CAA58290.1, NP-005529.1, XP-522443.1, AAM27448.1, XP-538247.1, AAD30133.1, AAC36741.1, AAH10404.1, NP-032408.1, AAN03682.1, XP-509161.1, AAC32311.1, NP-651942.2, AAL51005.1, AAC39083.1, AAH85547.1, NP-571023.1, CAF94113.1, EAL29247.1, AAW30007.1, AAH90232.1, A29619, NP-001007905.1, AAH73508.1, AAD02201.1, NP-999793.1, NP-990542.1, AAF19841.1, AAC97488.1, AAC60038.1, NP 989197.1, NP-571434.1, EAL41229.1, AAT07302.1, CAI19472.1, NP-031582.1, AAA40548.1, XP-535880.1, NP-037239.1, AAT72007.1, XP-418956.1, CAA41634.1, BAC30864.1, CAA38850.1, CAB81657.2, CAA45018.1, CAA45019.1, BAC28247.1, NP-031581.1, NP-990479.1, NP-999820.1, AAB27335.1, S45355, CAB82007.1, XP-534351.1, NP-058874.1, NP-031579.1, 1REW, AAB96785.1, AAB46367.1, CAA05033.1, BAA89012.1, 1ES7, AAP20870.1, BAC24087.1, AAG09784.1, BAC06352.1, AAQ89234.1, AAM27000.1, AAH30959.1, CAG01491.1, NP-571435.1, 1REU, AAC60286.1, BAA24406.1, A36193, AAH55959.1, AAH54647.1, AAH90689.1, CAG09422.1, BAD16743.1, NP-032134.1, XP-532179.1, AAB24876.1, AAH57702.1, AAA82616.1, CAA40222.1, CAB90273.2, XP-342592.1, XP-534896.1, XP-534462.1, 1LXI, XP-417496.1, AAF34179.1, AAL73188.1, CAF96266.1, AAB34226.1, AAB33846.1, AAT12415.1, AA033819.1, AAT72008.1, AAD38402.1, BAB68396.1, CAA45021.1, AAB27337.1, AAP69917.1, AAT12416.1, NP-571396.1, CAA53513.1, AA033820.1, AAA48568.1, BAC02605.1, BAC02604.1, BAC02603.1, BAC02602.1, BAC02601.1, BAC02599.1,

BAC02598.1, BAC02597.1, BAC02595.1, BAC02593.1, BAC02592.1, BAC02590.1, AAD28039.1, AAP74560.1, AAB94786.1, NP-001483.2, XP-528195.1, NP-571417.1, NP-001001557.1, AAH43222.1, AAM33143.1, CAG10381.1, BAA31132.1, EAL39680.1, EAA12482.2, P34820, AAP88972.1, AAP74559.1, CAI16418.1, AAD30538.1, XP-345502.1, NP-038554.1, CAG04089.1, CAD60936.2, NP-031584.1, B55452, AAC60285.1, BAA06410.1, AAH52846.1, NP-031580.1, NP-036959.1, CAA45836.1, CAA45020.1, Q29607, AAB27336.1, XP-547817.1, AAT12414.1, AAM54049.1, AAH78901.1, AA025745.1, NP-570912.1, XP-392194.1, AAD20829.1, AAC97113.1, AAC61694.1, AAH60340.1, AAR97906.1, BAA32227.1, BAB68395.1, BAC02895.1, AAW51451.1, AAF82188.1, XP-544189.1, NP-990568.1, BAC80211.1, AAW82620.1, AAF99597.1, NP-571062.1, CAC44179.1, AAB97467.1, AAT99303.1, AAD28038.1, AAH52168.1, NP-001004122.1, CAA72733.1, NP-032133.2, XP-394252.1, XP-224733.2, JH0801, AAP97721.1, NP-989669.1, S43296, P43029, A55452, AAH32495.1, XP-542974.1, NP-032135.1, AAK30842.1, AAK27794.1, BAC30847.1, EAA12064.2, AAP97720.1, XP-525704.1, AAT07301.1, BAD07014.1, CAF94356.1, AAR27581.1, AAG13400.1, AAC60127.1, CAF92055.1, XP-540103.1, AA020895.1, CAF97447.1, AAS01764.1, BAD08319.1, CAA10268.1, NP-998140.1, AAR03824.1, AAS48405.1, AAS48403.1, AAK53545.1, AAK84666.1, XP-395420.1, AAK56941.1, AAC47555.1, AAR88255.1, EAL33036.1, AAW47740.1, AAW29442.1, NP-722813.1, AAR08901.1, AA015420.2, CAC59700.1, AAL26886.1, AAK71708.1, AAK71707.1, CAC51427.2, AAK67984.1, AAK67983.1, AAK28706.1, P07713, P91706, P91699, CAG02450.1, AAC47552.1, NP-005802.1, XP-343149.1, AW34055.1, XP-538221.1, AAR27580.1, XP-125935.3, AAF21633.1, AAF21630.1, AAD05267.1, Q9Z1W4, NP-031585.2, NP-571094.1, CAD43439.1, CAF99217.1, CAB63584.1, NP-722840.1, CAE46407.1, XP-417667.1, BAC53989.1, BAB19659.1, AAM46922.1, AAA81169.1, AAK28707.1, AAL05943.1, AAB17573.1, CAH25443.1, CAG10269.1, BAD16731.1, EAA00276.2, AAT07320.1, AAT07300.1, AAN15037.1, CAH25442.1, AAK08152.2, 2009388A, AAR12161.1, CAG01961.1, CAB63656.1, CAD67714.1, CAF94162.1, NP-477340.1, EAL24792.1, NP-001009428.1, AAB86686.1, AAT40572.1, AAT40571.1, AAT40569.1, NP-033886.1, AAB49985.1, AAG39266.1, Q26974, AAC77461.1, AAC47262.1, BAC05509.1, NP-055297.1, XP-546146.1, XP-525772.1, NP-060525.2, AAH33585.1, AAH69080.1, CAG12751.1, AAH74757.2, NP-034964.1, NP-038639.1, 042221, AAF02773.1, NP-062024.1, AAR18244.1, AAR14343.1, XP-228285.2, AAT40573.1, AAT94456.1, AAL35278.1, AAL35277.1, AAL17640.1, AAC08035.1, AAB86692.1, CAB40844.1, BAC38637.1, BAB16046.1, AAN63522.1, NP-571041.1, AAB04986.2, AAC26791.1, AAB95254.1, BAA11835.1, AAR18246.1, XP-538528.1, BAA31853.1, AAK18000.1, XP-420540.1, AAL35276.1, AAQ98602.1, CAE71944.1, AAW50585.1, AAV63982.1, AAW29941.1, AAN87890.1, AAT40568.1, CAD57730.1, AAB81508.1, AAS00534.1, AAC59736.1, BAB79498.1, AAA97392.1, AAP85526.1, NP-999600.2, NP-878293.1, BAC82629.1, CAC60268.1, CAG04919.1, AAN10123.1, CAA07707.1, AAK20912.1, AAR88254.1, CAC34629.1, AAL35275.1, AAD46997.1, AAN03842.1, NP-571951.2, CAC50881.1, AAL99367.1, AAL49502.1, AAB71839.1, AAB65415.1, NP-624359.1, NP-990153.1, AAF78069.1, AAK49790.1, NP-919367.2, NP-001192.1, XP-544948.1, AAQ18013.1, AAV38739.1, NP-851298.1, CAA67685.1, AAT67171.1, AAT37502.1, AAD27804.1, AAN76665.1, BAC11909.1, XP-421648.1, CAB63704.1, NP-037306.1, A55706, AAF02780.1, CAG09623.1, NP-067589.1, NP-035707.1, AAV30547.1, AAP49817.1, BAC77407.1, AAL87199.1, CAG07172.1, B36193, CAA33024.1, NP-001009400.1, AAP36538.1, XP-512687.1, XP-510080.1, AAH05513.1, 1KTZ, AAH14690.1, AAA31526.1.

[0397] 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0398] TGF- β 로부터의 성장 인자는 천연적으로 획득되거나 재조합될 수 있다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 액티빈 A를 포함한다. 용어 "액티빈 A"은 액티빈 A의 단편 및 유도체를 포함한다. 예시적인 액티빈 A의 서열은 미국 공개 번호 2009/0155218 ('218 공보')에서 서열식별번호: 1로서 개시된다. 액티빈 A의 다른 비-제한적인 예는 '218 공보의 서열식별번호: 2-16에서 제공되고, 액티빈 A을 인코딩하는 핵산의 비-제한적인 예는 '218 공보의 서열식별번호: 33-34에서 제공된다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 '218 공보의 서열식별번호: 1과 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0399] 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 성장 분화 인자 8 (GDF8)을 포함한다. 용어 "GDF8"은 GDF8의 단편 및 유도체를 포함한다. GDF8 폴리펩타이드의 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서,

TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 인간 GDF8 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 EAX10880)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0400] 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 GDF8, 예를 들면, 성장 분화 인자 11 (GDF11)와 밀접하게 관련된 성장 인자를 포함한다. GDF11의 폴리펩타이드 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 성장 인자는 인간 GDF11 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 AAF21630)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0401] 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 제외한다.

[0402] 일부 구현예에서, TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 모방하는 제제로 대체될 수 있다. TGF- β 슈퍼패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자를 모방하는 예시적인 제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: IDE1 및 IDE2

[0403] *TGF- β 신호전달 경로 억제제*

[0404] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 TGF- β 신호전달 경로 억제제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 TGF- β 신호전달 경로 억제제는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 TGF- β 신호전달 경로 억제제를 제외한다.

[0405] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로는 TGF- β 수용체 유형 I 키나아제 (TGF- β RI) 신호전달을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 ALK5 억제제 II (CAS 446859-33-2, TGF- β RI 키나아제의 ATP-경쟁적 억제제, RepSox로도 공지됨, IUPAC 명: 2-[5-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일]-1,5-나프티리딘을 포함한다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 Alk5 억제제 II의 유사체 또는 유도체이다.

[0406] 일부 구현예에서, Alk5 억제제 II의 유사체 또는 유도체는 식 I의 화합물 (그 전체가 참고로 편입되어 있는 미국 특허 공보 No. 2012/0021519에서 기재됨)이다.

[0407] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 TGF- β 수용체 억제제 (미국 특허 공보 No. 2010/0267731에서 기재됨)이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 ALK5 억제제 (미국 특허 공개 번호 2009/0186076 및 2007/0142376에서 기재됨)을 포함한다.

[0408] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 A 83-01이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 A 83-01이 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 A 83-01을 제외한다.

[0409] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB 431542이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB 431542가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 SB 431542를 제외한다.

[0410] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 D 4476이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 D 4476이 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 D 4476을 제외한다.

[0411] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 GW 788388이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 GW 788388이 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 GW 788388을 제외한다.

[0412] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 LY 364947이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 not LY 364947이 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 LY 364947을 제외한다.

[0413] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 LY 580276이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 LY 580276가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 LY 580276를 제외한다.

[0414] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB 525334이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB 525334가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 SB 525334를 제외한다.

[0415] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB 505124이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SB 505124가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 SB 505124를 제외한다.

- [0416] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SD 208이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 SD 208가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 SD 208를 제외한다.
- [0417] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 GW 6604이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 GW 6604가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 GW 6604를 제외한다.
- [0418] 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 GW 788388이다. 일부 구현예에서, TGF- β 신호전달 경로 억제제는 GW 788388가 아니다. 일부 구현예에서, 본원에서 기재된 조성물 및 방법은 GW 788388를 제외한다.
- [0419] 상기에서 기재된 화합물의 수집으로부터, 하기는 다양한 공급원으로부터 취득될 수 있다: LY-364947, SB-525334, SD-208, 및 SB-505124 (Sigma, P.O. Box 14508, St. Louis, Mo., 63178-9916로부터 이용가능); 616452 및 616453 (Calbiochem (EMD Chemicals, Inc.), 480 S. Democrat Road, Gibbstown, N.J., 08027로부터 이용가능); GW788388 및 GW6604 (GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex, TW8 9GS, United Kingdom로부터 이용가능); LY580276 (Lilly Research, Indianapolis, Ind. 46285로부터 이용가능); 및 SM16 (Biogen Idec, P.O. Box 14627, 5000 Davis Drive, Research Triangle Park, N.C., 27709-4627로부터 이용가능).
- [0420] *WNT 신호전달 경로*
- [0421] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 WNT 신호전달 경로의 활성제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 WNT 신호전달 경로 활성제는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0422] 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 CHIR99021을 포함한다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 CHIR99021의 유도체, 예를 들면, CHIR99021의 염, 예를 들면, 트리하이드로클로라이드, CHIR99021의 하이드로클로라이드 염을 포함한다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 Wnt3a 재조합 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, WNT 신호전달 경로 활성제는 글리코겐 합성효소 키나아제 3 (GSK3) 억제제를 포함한다. 예시적인 GSK3 억제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 3F8, 1070722, AR-A 014418, BIO, 바이오-아세트옥심, FRATide, 10Z-히메니알디신, 인디루빈-3'옥심, 켄파울론, L803, L803-mts, 리툼 카보네이트, NSC 693868, SB 216763, SB 415286, TC-G 24, TCS 2002, TCS 21311, TWS 119, 및 이들 중 임의의 것의 유사체 또는 유도체. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 WNT 신호전달 경로 활성제를 제외한다.
- [0423] *섬유아세포 성장 인자 (FGF) 패밀리*
- [0424] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 FGF 패밀리로부터의 성장 인자의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 FGF 패밀리로부터의 성장 인자는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 FGF 패밀리로부터의 성장 인자를 제외한다.
- [0425] 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 케라틴생성세포 성장 인자 (KGF)를 포함한다. KGF의 폴리펩타이드 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 성장 인자는 인간 KGF 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 AAB21431)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0426] 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF2를 포함한다. FGF2의 폴리펩타이드 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 성장 인자는 인간 FGF2 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 NP_001997)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0427] 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF8B를 포함한다. FGF8B의 폴리펩타이드 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 성장 인자는 인간 FGF8B 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 AAB40954)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

다.

- [0428] 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF10을 포함한다. FGF10의 폴리펩타이드 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 성장 인자는 인간 FGF10 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 CAG46489)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0429] 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 FGF21을 포함한다. FGF21의 폴리펩타이드 서열은 숙련가에게 이용가능하다. 일부 구현예에서, FGF 패밀리로부터의 성장 인자는 인간 FGF21 폴리펩타이드 서열 (유전자은행 수납 AAQ89444.1)와 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%, 또는 그 초과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0430] 골 형성 단백질 (BMP) 신호전달 경로 억제제
- [0431] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 BMP 신호전달 경로 억제제의 용도에 관한 것이다. BMP 신호전달 패밀리는 다양한 서브셋의 TGF- β 슈퍼패밀리이다 (Sebald 등 Biol. Chem. 385:697-710, 2004). Over 20 공지된 BMP 리간드는 3개의 뚜렷이 다른 유형 II (BMPRII, ActRIIa, 및 ActRIIb) 및 적어도 3개의 유형 I (ALK2, ALK3, 및 ALK6) 수용체에 의해 인식된다. 이합체 리간드는 수용체 헤테로머의 조립을 촉진하고, 이것은, 항시적으로-활성인 유형 II 수용체 세린/트레오닌 키나제가 유형 I 수용체 세린/트레오닌 키나제를 인산화하도록 한다. 활성화된 유형 I 수용체는 TGF 신호전달을 또한 촉진하는 SMAD4, co-SMAD와의 복합체에서 핵 전좌를 촉진하기 위해 BMP-반응성 (BR-) SMAD 효과기 (SMADs 1, 5, 및 8)를 인산화한다. 또한, BMP 신호는 SMAD-독립 방식으로 세포내 효과기 예컨대 MAPK p38를 활성화할 수 있다 (Nohe 등 Cell Signal 16:291-299, 2004). 가용성 BMP 길항제 예컨대 노긴, 코르딘, 그램린, 및 폴리스타틴은 리간드 격리에 의해 BMP 신호전달을 제한한다.
- [0432] 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 BMP 신호전달 경로 억제제는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 본원에서 기재된 임의의 측면의 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 BMP 신호전달 경로 억제제를 제외한다.
- [0433] 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 LDN 193189 (LDN193189, 1062368-24-4, LDN-193189, DM 3189, DM-3189로도 공지됨, IUPAC 명: 4-[6-(4-피페라진-1-일페닐)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일]퀴놀론)을 포함한다.
- [0434] 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 LDN 193189의 유사체 또는 유도체, 예를 들면, LDN 193189의 염, 수화물, 용매, 에스테르, 또는 전구약물을 포함한다. 일부 구현예에서, LDN 193189의 유도체 (예를 들면, 염)은 LDN193189 하이드로클로라이드를 포함한다.
- [0435] 일부 구현예에서, BMP 신호전달 경로 억제제는 식 I의 화합물을 포함한다 (미국 특허 공보 No. 2011/0053930).
- [0436] 소닉 헤지혹 (SHH) 신호전달 경로
- [0437] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 SHH 신호전달 경로 억제제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 SHH 신호전달 경로 억제제는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0438] 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 Sant1을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 SANT2를 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 SANT3을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 SANT4를 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 Cur61414을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 포르스콜린을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 토마티딘을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 AY9944을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 트리파라놀을 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 화합물 A 또는 화합물 B (미국 공개 번호 2004/0060568에서 개시됨)를 포함한다. 일부 구현예에서, SHH 신호전달 경로 억제제는 미국 공개 번호 2006/0276391에서 개시된 바와 같이 헤지혹 신호전달 (예를 들면, 사이클로파민 또는 그것의 유도체)에 반대로 작용하는 스테로이드 알칼로이드를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 SHH 신호전달 경로 억제제를 제외한다.

- [0439] 레티노산 신호전달 경로
- [0440] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 레티노산 신호전달의 조절물질의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 레티노산 신호전달의 임의의 조절물질은 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0441] 일부 구현예에서, 레티노산 신호전달의 조절물질 레티노산 신호전달의 활성제를 포함한다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 레티노산을 포함한다. 일부 구현예에서, RA 신호전달 경로 활성제는 레티노산 수용체 작용제를 포함한다. 예시적인 레티노산 수용체 작용제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: CD 1530, AM 580, TTNPB, CD 437, Ch 55, BMS 961, AC 261066, AC 55649, AM 80, BMS 753, 타자로텐, 아다팔렌, 및 CD 2314.
- [0442] 일부 구현예에서, 레티노산 신호전달의 조절물질은 레티노산 신호전달의 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 레티노산 신호전달 경로 억제제는 DEAB (IUPAC 명: 2-[2-(디에틸아미노)에톡시]-3-프로프-2-에닐벤즈알데하이드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 레티노산 신호전달 경로 억제제는 DEAB의 유사체 또는 유도체를 포함한다.
- [0443] 일부 구현예에서, 레티노산 신호전달 경로 억제제는 레티노산 수용체 길항제를 포함한다. 일부 구현예에서, 레티노산 수용체 길항제는 하기를 포함한다: (E)-4-[2-(5,6-디하이드로-5,5-디메틸-8-페닐-2-나프탈렌일)에테닐]벤조산, (E)-4-[(5,6-디하이드로-5,5-디메틸-8-페닐에틸닐)-2-나프탈렌일]에테닐]벤조산, (E)-4-[2-[5,6-디하이드로-5,5-디메틸-8-(2-나프탈렌일)-2-나프탈렌일]에테닐]-벤조산, 및 (E)-4-[2-[5,6-디하이드로-5,5-디메틸-8-(4-메톡시페닐)-2-나프탈렌일]에테닐]벤조산. 일부 구현예에서, 레티노산 수용체 길항제는 하기를 포함한다: BMS 195614 (CAS# 253310 내지 42-8), ER 50891 (CAS# 187400-85-7), BMS 493 (CAS# 170355-78-9), CD 2665 (CAS# 170355-78-9), LE 135 (CAS# 155877-83-1), BMS 453 (CAS # 166977-43-1), 또는 MM 11253 (CAS# 345952-44-5).
- [0444] 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 레티노산 신호전달의 조절물질을 제외한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 레티노산 신호전달 경로 활성제를 제외한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 레티노산 신호전달 경로 억제제를 제외한다.
- [0445] 단백질 키나아제 C
- [0446] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 단백질 키나아제 C 활성제의 용도에 관한 것이다. 단백질 키나아제 C는 단백질 키나아제 효소의 최대 패밀리 중의 하나이고 다양한 동형체로 구성된다. 종래의 동형체는 α , β I, β II, γ 를 포함하고; 신규 동형체는 δ , ϵ , η , θ 를 포함하고; 그리고 이례적인 동형체는 ζ , 및 ι/λ 를 포함한다. PKC 효소는 주로 세포질이지만, 활성화될 때 막으로 이동된다. 세포질에서, PKC는 다른 키나제 또는 오토포스포릴레이트에 의해 인산화된다. 활성화되도록 하기 위해, 일부 PKC 동형체 (예를 들면, PKC- ϵ)는, 분자가 디아실글리세롤 ("DAG") 결합 부위 또는 포스파티딜세린 ("PS") 결합 부위에 결합할 필요가 있다. 다른 것은 전혀 임의의 2차 결합 메신저 없이 활성화될 수 있다. DAG 부위에 결합하는 PKC 활성제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 브리오스타틴, 피콜로구에스, 포르볼 에스테르, 아플리시아톡신, 및 그니디마크린. PS 부위에 결합하는 PKC 활성제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 다중불포화된 지방산 및 그것의 유도체. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 단백질 키나아제 C 활성제가 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0447] 일부 구현예에서, PKC 활성제는 Pdbu를 포함한다. 일부 구현예에서, PKC 활성제는 TPB를 포함한다. 일부 구현예에서, PKC 활성제는 하기를 포함한다: 사이클로프로판화된 다중불포화된 지방산, 사이클로프로판화된 단일불포화된 지방산, 사이클로프로판화된 다중불포화된 지방 알코올, 사이클로프로판화된 단일불포화된 지방 알코올, 사이클로프로판화된 다중불포화된 지방산 에스테르, 사이클로프로판화된 단일불포화된 지방산 에스테르, 사이클로프로판화된 다중불포화된 지방산 설페이트, 사이클로프로판화된 단일불포화된 지방산 설페이트, 사이클로프로판화된 다중불포화된 지방산 포스페이트, 사이클로프로판화된 단일불포화된 지방산 포스페이트, 매크로사이클릭 락톤, DAG 유도체, 이소프레노이드, 옥틸인돌라탐 V, 그니디마크린, 이리팔리달, 인게놀, 나프탈렌설포아미드, 디아실글리세롤 키나아제 억제제, 섬유아세포 성장 인자 18 (FGF-18), 인슐린 성장 인자, 호르몬, 및 성장 인자 활성제 (WIPO 공개 번호 WO/2013/071282에서 기재됨). 일부 구현예에서, 브리오스타틴은 하기를 포함한다: 브리오스타틴-1, 브리오스타틴-2, 브리오스타틴-3, 브리오스타틴-4, 브리오스타틴-5, 브리오스타틴-6, 브리오스타틴

-7, 브리오스타틴-8, 브리오스타틴-9, 브리오스타틴-10, 브리오스타틴-11, 브리오스타틴-12, 브리오스타틴-13, 브리오스타틴-14, 브리오스타틴-15, 브리오스타틴-16, 브리오스타틴-17, 또는 브리오스타틴-18. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 단백질 키나아제 C 활성제를 제외한다.

[0448] γ -세크레타제 억제제

[0449] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 γ -세크레타제 억제제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 γ -세크레타제 억제제가 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 수많은 γ -세크레타제 억제제는 공지되어 있다. 일부 구현예에서, γ -세크레타제 억제제는 XXI를 포함한다. 일부 구현예에서, γ -세크레타제 억제제는 DAPT를 포함한다. 추가의 예시적인 γ -세크레타제 억제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: γ -세크레타제 억제제 (미국 특허 번호 7,049,296, 8,481,499, 8,501,813, 및 WIPO 공개 번호 WO/2013/052700에서 기재됨). 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 γ -세크레타제 억제제를 제외한다.

[0450] 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제

[0451] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제가 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 본원에서 기재된 임의의 측면의 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제를 제외한다. 본원에서 기재된 임의의 측면의 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 본원에서 기재된 T3 또는 T3의 유사체를 제외한다.

[0452] 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 트리아이오도티로닌 (T3)를 포함한다. 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 T3의 유사체 또는 유도체를 포함한다. T3의 예시적인 유사체는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 선택적 및 비-선택적 갑상선모방체, TR β 선택적 작용제-GC-1, GC-24,4-하이드록시-PCB 106, MB07811, MB07344, 3,5-디아이오도타이로프로피온산 (DITPA); 선택적 TR- β 작용제 GC-1; 3-아이오도타이론아민 (T(1)AM) 및 3,3',5-트리아이오도타이로아세트산 (Triac) (호르몬 티록신 (T(4)의 생물활성 대사물); KB-2115 및 KB-141; 타이론아민; SKF L-94901; DIBIT; 3'-AC-T2; 테트라아이오도타이로아세트산 (테트라 c) 및 트리아이오도타이로아세트산 (Triac) (티록신 [T4] 및 트리아이오도티로닌 [T3] 알라닌 사슬의 산화적 탈아미노화 및 탈카복실화를 통해), 3,3',5' '-트리아이오도티로닌 (rT3) (T4 및 T3 탈요오드화를 통해), 3,3'-디아이오도티로닌 (3,3'-T2) 및 3,5-디아이오도티로닌 (T2) (T4, T3, 및 rT3 탈요오드화를 통해), 및 3-아이오도타이론아민 (TIAM) 및 타이론아민 (TOAM) (T4 및 T3 탈요오드화 및 아미노산 탈카복실화를 통해), 뿐만 아니라 TH 구조적 유사체, 예컨대 3,5,3'-트리아이오도타이로프로피온산 (Triprop), 3,5-디브로모-3-페리다지논-1-티로닌 (L-940901), N-[3,5-디메틸-4-(4'-하이드록시-3'-이소프로필페녹시)-페닐]-옥삼산 (CGS 23425), 3,5-디메틸-4-[(4'-하이드록시-3'-이소프로필페닐)-페녹시]아세트산 (GC-1), 3,5-디클로로-4-[(4-하이드록시-3-이소프로필페녹시)페닐]아세트산 (KB-141), 및 3,5-디아이오도타이로프로피온산 (DITPA).

[0453] 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 T3의 전구약물 또는 전구호르몬, 예컨대 T4 갑상선 호르몬 (예를 들면, 티록신 또는 L-3,5,3',5' '-테트라아이오도티로닌)을 포함한다.

[0454] 일부 구현예에서, 갑상선 호르몬 신호전달 경로 활성제는 아이오도티로닌 조성물 (미국 특허 번호 7,163,918에서 기재됨)이다.

[0455] 표피 성장 인자 (EGF) 패밀리

[0456] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 EGF 패밀리로부터의 성장 인자의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 EGF 패밀리로부터의 임의의 성장 인자가 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 베타셀룰린을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF를 포함한다. 표피 성장 인자 (EGF)는 큰 내재성 막 단백질 전구체로부터 단백질분해로 절단된 53 아미노산 사이토카인이자. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 성장 인자는, 미국 특허 번호 7,084,246에서 개시된 바와 같이, 변형 EGF 폴리펩타이드, 예를 들면 인간 야생형 EGF 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 90% 아미노산 동일성을 갖는

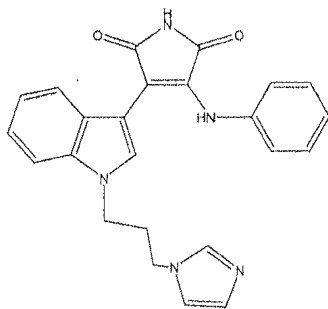
단리된 표피 성장 인자 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 성장 인자는, 미국 특허 번호 8,247,531에서 개시된 바와 같이, EGF 수용체에 결합하고 그것을 작용시키는 조작된 EGF 변종을 포함한다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 적어도 하나의 성장 인자는 EGF 패밀리에 신호전달 경로를 활성화하는 제제로 대체된다. 일부 구현예에서, EGF 패밀리로부터의 성장 인자는 EGF를 모방하는 화합물을 포함한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 EGF 패밀리로부터의 성장 인자를 제외한다.

[0457] 단백질 키나아제 억제제

[0458] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 단백질 키나아제 억제제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 단백질 키나아제 억제제가 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있다는 것이 고려된다.

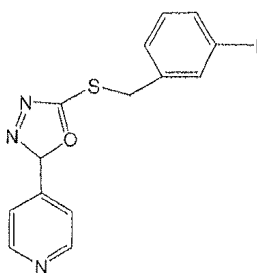
[0459] 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 스타우로스포린의 유사체를 포함한다. 스타우로스포린의 예시적인 유사체는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: Ro-31-8220, 비스인돌릴말레이미드 (Bis) 화합물, 10'-{5'-[(메톡시카보닐)아미노]-2''-메틸}-페닐아미노카보닐스타우로스포린, 스타랄로그 (참고, 예를 들면, Lopez *et al.*, "Staurosporine-derived inhibitors broaden the scope of analog-sensitive kinase technology", *J. Am. Chem. Soc.* 2013; 135(48):18153-18159), 및, cgp41251.

[0460] 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 PKC β 의 억제제이다. 일부 구현예에서, 단백질 키나아제 억제제는 하기 구조 또는 하기와 같은 화합물의 유도체, 유사체 또는 변형을 갖는 PKC β 의 억제제이다:



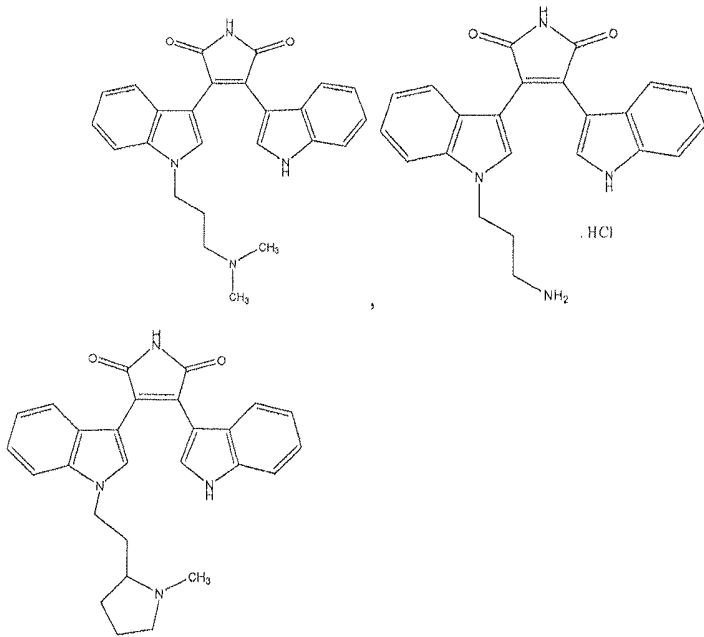
[0461]

[0462] 일부 구현예에서, PKC β 의 억제제는 하기 구조 또는 하기와 같은 화합물의 유도체, 유사체 또는 변형을 갖는 GSK-2 화합물이다:



[0463]

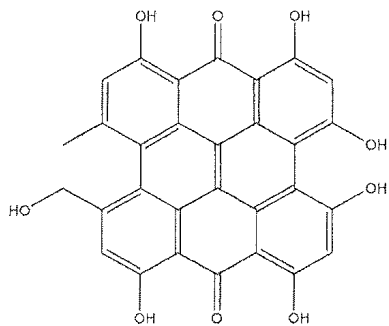
[0464] 일부 구현예에서, PKC의 억제제는 비스인돌릴말레이미드이다. 예시적인 비스인돌릴말레이미드는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 비스인돌릴말레이미드 I, 비스인돌릴말레이미드 II, 비스인돌릴말레이미드 III, 하이드로클로라이드, 또는 유도체, 유사체 또는 변형. 일부 구현예에서, 그것의 유도체 또는 변형 또는 유사체는 하기로부터 선택된 화합물의 유사체의 유도체 또는 변형으로부터 선택된다:



[0465]

[0466]

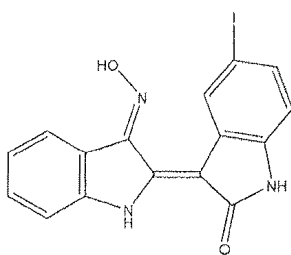
일부 구현예에서, PKC 억제제는 슈도하이페리신, 또는 하기와 같은 화합물의 유도체, 유사체 또는 변형이다:



[0467]

[0468]

일부 구현예에서, PKC 억제제는 하기 화합물의 인디루빈-3-모녹심, 5-아이오도 또는 유도체, 유사체 또는 변형이다:



[0469]

[0470]

어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 단백질 키나아제 억제제를 제외한다.

[0471]

낭포성 섬유증 막통과 전도도 조절물질 (CFTR) 억제제

[0472]

본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 CFTR 억제제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 CFTR 억제제는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0473]

본원에서 사용되는 수많은 CFTR 억제제는 숙련자에게 이용가능하다. 예시적인 CFTR 억제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: CFTR의 LPA2 수용체 작용제 억제제 (미국 공개 번호 2007/0078111에서 개시됨), 하이드라자이드-함유 CFTR 억제제 (미국 특허 번호 7,888,332에서 개시됨), 및 CFTR 억제제 (WIPO 공개 번호 WO/2008/121877에서 개시됨), CFTR 억제제 화합물 (미국 공개 번호 2008/0269206에서 개시됨). 일부 구현예에서, CFTR 억제

제는 글리신 하이드라자이드 기공-폐쇄 CFTR 억제제를 포함한다. 일부 구현예에서, CFTR 억제제는 Gly-H101을 포함한다. 일부 구현예에서, CFTR 억제제는 Gly-H101 유도체 또는 유사체를 포함한다 (참고, 예를 들면, Muanprasat *et al.*, "Discovery of Glycine Hydrazide 기공-폐쇄 CFTR Inhibitors", *J. Gen. Physiol* 2004; 124(2):125-137). 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 CFTR 억제제를 제외한다.

[0474] *O*-GlcNAcase 억제제

[0475] 본 개시내용의 측면은 β 세포 성숙 인자로서 *O*-GlcNAcase 억제제의 용도에 관한 것이다. 단독으로 또는 하나 이상의 다른 β 세포 성숙 인자와 함께, 적어도 하나의 인슐린-생산, 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 SC- β 세포로의 분화를 유도할 수 있는 임의의 *O*-GlcNAcase 억제제는 본원에서 기재된 방법, 조성물, 및 키트에서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 본원에서 사용되는 수많은 *O*-GlcNAcase 억제제는 숙련자에게 이용가능하다. 예시적인 *O*-GlcNAcase 억제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 투과성 글리코시다아제 억제제 (참고, 예를 들면, WIPO 공개 번호 WO/2013/169576 및 WO/2013/166654), 및 선택적 글리코시다아제 억제제 (참고, 예를 들면, WIPO 공개 번호 WO/2013/000084 및 WO/2013/000085). 일부 구현예에서, *O*-GlcNAcase 억제제는 Thiamet G를 포함한다. 어떤 구현예에서, 본원에서 개시된 방법, 조성물, 및 키트는 *O*-GlcNAcase 억제제를 제외한다.

[0476] 혼합 조성물

[0477] 본 발명의 또 하나의 측면은, 예를 들면, 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 분화를 유도하여 SC- β 세포가 되도록 하기 위해 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체, 및 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자의 혼합물에 관한 것이다.

[0478] 본 발명의 또 하나의 측면에서는 조성물, 예컨대 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체 (예를 들면 SC- β 세포에 분화하기 위한 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체의 집단) 및 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자를 포함하는 반응 혼합물에 관한 것이다. 대안적으로, 본 발명은 (i) 인슐린-양성 내분비 세포의 화학적 유도 또는 그것의 전구체의 집단의 SC- β 세포로의 분화에 의해 생산된 SC- β 세포의 집단, 및 (ii) 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자를 포함하는 반응 혼합물에 관한 것이다.

[0479] 일부 구현예에서, 반응 혼합물에 부가된 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자의 농도는, 본원에 기재된 바와 같이 적어도 하나의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 그것의 전구체를 유도하여 SC- β 세포로 분화시키기 위한 충분한 용량이다.

[0480] 일부 구현예에서, 본 조성물은 하기의 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자의 농도를 포함한다: 약 25 nM 내지 10 μ M, 또는 약 25 nM 내지 50 nM, 또는 약 50 nM 내지 100 nM, 또는 약 100 nM 내지 200 nM, 또는 약 200 nM to 약 500 nM 또는 약 500 nM to 약 1 μ M, 또는 약 1 μ M 내지 2 μ M, 또는 약 2 μ M 내지 5 μ M, 또는 약 5개의 μ M 내지 10 μ M.

[0481] 일부 구현예에서, 조성물 또는 혼합물은 하기의 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자의 농도를 포함한다: 적어도 약 5개의 nM, 적어도 약 7 nM, 적어도 약 10 nM, 적어도 약 12 nM, 적어도 약 15 nM, 적어도 약 17 nM, 적어도 약 20 nM, 적어도 약 25 nM, 적어도 약 30 nM, 적어도 약 35 nM, 적어도 약 40 nM, 적어도 약 45 nM, 적어도 약 50 nM, 적어도 약 100 nM 또는 적어도 약 200 nM, 또는 적어도 약 300 nM 또는 적어도 약 400 nM 또는 적어도 약 500 nM 또는 500 nM 초과, 또는 임의의 정수 10 내지 500 nM 또는 임의의 정수 5 내지 50 nM, 또는 임의의 정수 50 내지 100 nM, 또는 임의의 정수 100 nM 내지 200 nM 또는 임의의 정수 200 nM 내지 500 nM. 일부 구현예에서, 조성물 또는 혼합물은 하기의 적어도 하나의 β 세포 성숙 인자의 농도를 포함한다: 적어도 약 0.1 μ M, 또는 적어도 약 0.2 μ M, 또는 적어도 약 0.3 μ M, 또는 적어도 약 0.4 μ M, 또는 적어도 약 0.5 μ M, 또는 적어도 약 1 μ M, 적어도 약 1.5 μ M, 적어도 약 2 μ M, 적어도 약 2.5 μ M, 적어도 약 3 μ M, 적어도 약 3.5 μ M, 적어도 약 4 μ M, 적어도 약 4.5 μ M, 적어도 약 5개의 μ M, 적어도 약 6 μ M, 적어도 약 7 μ M, 적어도 약 8 μ M, 적어도 약 9 μ M, 또는 적어도 약 10 μ M, 또는 10 μ M 초과, 또는 임의의 정수 0.1 내지 0.5 μ M 또는 임의의 정수 약 0.5 내지 10 μ M 또는 임의의 정수 0.1 내지 10 μ M, 또는 임의의 정수 0.5 내지 5 μ M, 또는 임의의 정수 5 내지 10 μ M.

[0482] 조성물 및 키트

[0483] 본원에 기재된 세포(예를 들어, SC- β 세포 또는 성숙한 췌장 β 세포)를 포함하는 조성물이 본원에 기재되어 있다. 일부 양태에서, 상기 조성물은 또한 본원에 기재된 β 세포 성숙 인자 및/또는 세포 배양 배지를 포함한다. 또한 본원에 기재된 화합물을 포함하는 조성물(예를 들어, 본원에 기재된 하나 이상의 화합물을 포함하는

세포 배양 배지)이 본원에 기재되어 있다. 본원에 키트가 기재되어 있다.

- [0484] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기재된 방법을 수행하고 본원에 기재된 SC-β 세포 또는 성숙한 췌장 β 세포를 제조하기 위한 키트에 관한 것이다. 하나의 측면에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체 및 하나 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함하고, 임의로 상기 키트는 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체를 본원에 기재된 방법을 사용하여 SC-β 세포의 집단으로 전환시키기 위한 지침서를 추가로 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 키트는 2개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 3개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 4개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 5개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 6개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 7개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 8개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 9개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 10개 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 만능 세포를 확정적 내배엽 세포로 분화시키기 위한 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 확정적 내배엽 세포를 원시 내장관 세포로 분화시키기 위한 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 원시 내장관 세포를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키기 위한 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시키기 위한 β 세포 성숙 인자를 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 인슐린-양성 내분비 세포를 SC-β 세포로 분화시키기 위한 β 세포 성숙 인자를 포함한다.
- [0485] 일부 양태에서, 상기 키트는 예를 들어, 만능 세포를 확정적 내배엽 세포로 분화시키고, 확정적 내배엽 세포를 원시 내장관 세포로 분화시키기 위한, 원시 내장관 세포를 Pdx1-양성 췌장 선조 세포로 분화시키고 NKX6-1-양성 췌장 선조 세포를 인슐린-양성 내분비 세포로 분화시키고, 인슐린-양성 내분비 세포를 SC-β 세포로 분화시키기 위한 임의의 조합된 β 세포 성숙 인자를 포함한다.
- [0486] 하나의 양태에서, 상기 키트는 예를 들어, 상기 만능 줄기 세포를 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로 분화시키고 후속적으로 SC-β 세포로 분화시키도록 화학적으로 유도하는 화학식 I의 화합물의 효과 또는 능력을 평가하거나 모니터링하기 위한 양성 대조군으로서 사용할 목적으로 만능 줄기 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 상기 키트는 목적하는 만능 줄기 세포 집단(예를 들어, 바람직한 만능 줄기 세포, 예를 들어, iPS 세포)의 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로 또는 SC-β 세포로의 분화를 유도하고, 조절 만능 줄기 세포 집단(양성 대조군)의 분화를 유도하기에 충분한 양의 하나 이상의 β 세포 성숙 인자를 포함할 수 있다.
- [0487] 일부 양태에서, 상기 키트내 화합물은 일부 양태에서 키트의 다른 성분이 실질적으로 없는 수밀 또는 기밀 컨테이너내에 제공될 수 있다. 상기 화합물은 하나 이상의 컨테이너에 공급될 수 있고, 예를 들어, 이것은 만능 줄기 세포를 확정적 내배엽 세포로 유도하고 후속적으로 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로 유도하고 후속적으로 SC-β 세포로 유도하는 소정의 수의 반응, 예를 들어, 1, 2, 3개 이상의 수의 별도의 반응에 대해 충분한 시약을 갖는 컨테이너에 공급될 수 있다. β 세포 성숙 인자는 임의의 형태, 예를 들어, 액체, 건조 또는 동결건조 형태로 제공될 수 있다. 본원에 기재된 화합물(들)(예를 들어, β 세포 성숙 인자)이 실질적으로 순수하고/하거나 멸균성인 것이 바람직하다. 본원에 기재된 화합물(들)이 액체 용액으로 제공되는 경우, 상기 액체 용액은 바람직하게 수용액이고, 멸균 수용액이 바람직하다. 본원에 기재된 화합물(들)이 건조 형태로 제공되는 경우, 일반적으로 적합한 용매를 첨가하여 재구성된다. 상기 용매, 예를 들어, 멸균수 또는 완충액은 임의로 키트에 제공될 수 있다.
- [0488] 일부 양태에서, 상기 키트는 추가로 임의로 정보 자료를 포함한다. 상기 정보 자료는 서술적이거나 지침적이거나 마케팅을 위한 것이거나 본원에 기재된 방법 및/또는 본원에 기재된 방법을 위해 본원에 기재된 화합물(들)의 용도에 관한 다른 자료일 수 있다.
- [0489] 키트의 정보 자료는 이의 지침 또는 정보 자료에 제한되지 않는다. 하나의 양태에서, 상기 정보 자료는 상기 화합물의 제조, 상기 화합물의 분자량, 농도, 유효일, 배치 또는 제조 부위 정보 등을 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 정보 자료는 상기 화합물을 투여하기 위한 방법에 관한 것이다. 추가로, 키트의 정보 자료는 이의 형태로 제한되지 않는다. 많은 경우에, 상기 정보 자료, 예를 들어, 지침서는 프린트물, 예를 들어, 프린트 텍스트, 도면 및/또는 사진, 예를 들어, 표지 또는 프린트 시트로 제공된다. 그러나, 상기 정보 자료는 또한 다른 포맷, 예를 들어, 브레일리, 컴퓨터 판독 자료, 비디오 기록 또는 오디오 기록으로 제공될 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 키트의 정보 자료는 접촉 정보, 예를 들어, 실제 주소, 이메일 주소, 웹사이트 또는

전화번호이고, 여기서, 상기 키트의 사용자는 본원에 기재된 화합물 및/또는 본원에 기재된 방법에서의 용도에 대한 실질적 정보를 수득할 수 있다. 물론, 상기 정보 자료는 또한 임의의 조합된 포맷으로 제공될 수 있다.

[0490] 하나의 양태에서, 상기 정보 자료는 본원에 기재된 방법을 수행하기 위한 적합한 방식, 예를 들어, 적합한 용량, 투여 형태 또는 투여 방식(예를 들어, 본원에 기재된 투여 용량, 투여 형태 또는 투여 방식)로 본원에 기재된 바와 같은 화합물(들)(예를 들어, β 세포 성숙 인자)을 (예를 들어, 시험관내에서 세포로 또는 생체내에서 세포로)을 투여하기 위한 지침을 포함할 수 있다. 또 다른 양태에서, 상기 정보 자료는 본원에 기재된 화합물(들)을 적합한 대상체, 예를 들어, 사람, 예를 들어, 본원에 기재된 장애를 갖거나 이의 위험에 처한 사람 또는 시험관내에서 세포로 투여하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0491] 본원에 기재된 화합물(들)에 추가로, 상기 키트의 조성물은 용매 또는 완충제, 안정화제, 보존제, 방향제(예를 들어, 쓴맛 길항제 또는 감미제), 향제 또는 다른 화장용 성분, 및/또는 예를 들어, 만능 줄기 세포를 유도하기 위한(예를 들어, 시험관내) 또는 본원에 기재된 병태 또는 장애를 치료하기 위한 추가 제제와 같은 다른 성분들을 포함할 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 화합물과는 다른 성분들이 키트에 포함될 수 있지만 다른 조성물 또는 컨테이너에 포함될 수 있다. 상기 양태에서, 상기 키트는 본원에 기재된 화합물(들) 및 다른 성분들을 혼합하거나 다른 성분들과 함께 본원에 기재된 화합물(들)을 사용하기 위한 지침서, 예를 들어, 투여 전 2개의 제제를 조합하는 것에 대한 지침서를 포함할 수 있다.

[0492] 본원에 기재된 바와 같은 β 세포 성숙 인자는 임의의 형태, 예를 들어, 액체, 건조 또는 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 본원에 기재된 화합물(들)은 실질적으로 순수하고/하거나 멸균인 것이 바람직하다. 본원에 기재된 화합물(들)이 액체 용액으로 제공되는 경우, 상기 액체 용액은 바람직하게 수용액이고, 멸균 수용액이 바람직하다. 본원에 기재된 화합물(들)이 건조된 형태로 제공되는 경우, 일반적으로 적합한 용매의 첨가에 의해 재구성된다. 상기 용매, 예를 들어, 멸균수 또는 완충제는 임의로 키트에 제공될 수 있다.

[0493] 상기 키트는 본원에 기재된 바와 같이 하나 이상의 β 세포 성숙 인자를 함유하는 조성물에 대한 하나 이상의 컨테이너를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 키트는 별도의 컨테이너들(예를 들어, 2개의 제제에 대한 2개의 별도의 컨테이너들), 조성물(들)에 대한 칸막이 또는 격실 및 정보 자료를 함유한다. 예를 들어, 상기 조성물은 병, 바이알 또는 주사기에 함유될 수 있고 상기 정보 자료는 플라스틱 슬리브 또는 포장용 통에 함유될 수 있다. 다른 양태에서, 키트의 별도의 요소들은 단일의 칸막이 없는 컨테이너에 함유된다. 예를 들어, 상기 조성물은 라벨 형태의 정보 자료가 부착된 병, 바이알 또는 주사기에 함유된다. 일부 양태에서, 상기 키트는 다수의 (예를 들어, 한 팩)의 개별 컨테이너들을 포함하고, 각각은 하나 이상의 유닛 투여 형태(예를 들어, 본원에 기재된 투여 형태)의 본원에 기재된 화합물을 함유한다. 예를 들어, 상기 키트는 다수의 주사기, 앰пу울, 포일 통 또는 블리스터 팩을 포함하고, 각각은 단일 유닛 용량의 본원에 기재된 화합물을 함유한다. 상기 키트의 컨테이너는 기밀성, 방수(예를 들어, 수분 또는 증발의 변화에 불침투성) 및/또는 광 불투과성일 수 있다.

[0494] 상기 키트는 임의로 조성물의 투여에 적합한 장치, 예를 들어, 주사기, 흡입기, 피펫, 포셉(forcep), 측정 스포, 점적기(예를 들어, 점안기), 면봉 (예를 들어, 면 면봉 또는 목재 면봉) 또는 임의의 상기 전달 장치를 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 장치는 의학 이식 장치, 예를 들어, 수술적 삽입을 위한 팩키징된 장치이다.

[0495] 상기 키트는 또한 SC- β 세포에 대한 마커, 예를 들어, 본원에 기재된 마커의 검출을 위한 성분, 예를 들어, 양성 SC- β 세포의 검출을 위한 시약을 포함할 수 있다. 또는, 일부 양태에서, 상기 키트는 또한 SC- β 세포의 음성 선택을 목적으로 또는 이들 음성 마커를 발현하지 않는 세포(예를 들어, SC- β 세포)의 동정을 위한 SC- β 세포의 음성 마커의 검출을 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 시약은 예를 들어, RT-PCT 또는 PCR 반응, 예를 들어, 반-정량적 또는 정량적 RT-PCR 또는 PCR 반응에 대한 마커 또는 프라이머에 대한 항체일 수 있다. 상기 마커는 iPS 세포가 생성되었는지를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 상기 검출 시약이 항체인 경우, 이것은 건조 제제, 예를 들어, 동결건조 제제 또는 용액으로 공급될 수 있다. 상기 항체 또는 다른 검출 시약은 검출에 사용하기 위한 라벨, 예를 들어, 방사성, 형광성(예를 들어, GFP) 또는 비색 라벨에 연결될 수 있다. 검출 시약이 프라이머인 경우, 이것은 건조 제제, 예를 들어, 동결건조된 제제 또는 용액으로 공급될 수 있다.

[0496] SC- β 세포의 핵형 분석을 수행하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 상기 키트는 핵형 분류를 위한 성분, 예를 들어, 프로브, 염료, 기질, 효소, 항체 또는 세포로부터 핵형을 분석하기 위한 다른 유용한 시약을 포함할 수 있다.

[0497] 상기 키트는 SC- β 세포, 예를 들어, 동일한 유형의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로 부터 유래된,

예를 들어, 양성 세포 유형의 대조군으로서 사용하기 위한 성숙한 췌장 β 세포를 포함할 수 있다.

- [0498] 상기 키트는 또한 정보 자료, 예를 들어, 키트에 포함된 2개 이상의 성분들을 사용하기 위한 지침서를 포함할 수 있다.
- [0499] 상기 정보 자료는 설명을 위한 것이거나, 지침적이거나 마케팅을 위한 것일 수 있거나 본원에 기재된 방법 및/또는 본원에 기재된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 분화시키기 위한 본원에 기재된 화합물(들)의 용도에 관한 다른 자료일 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 정보 자료는 화합물의 제조, 화합물의 분자량, 농도, 만기일, 배치 또는 생산 장소에 관한 정보 등을 포함할 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 정보 자료는 본원에 기재된 하나 이상의 β 세포 성숙 인자의 존재하에 인슐린-양성 내분비 세포 집단을 배양하기 위한 방법에 관한 것이다.
- [0500] *세포를 투여하는 방법*
- [0501] 하나의 양태에서, 본원에 기재된 세포, 예를 들어, SC- β 세포 집단은 이식가능하고, 예를 들어, SC- β 세포 집단은 대상체에 투여될 수 있다. 일부 양태에서, SC- β 세포 집단을 투여받은 대상체는 SC- β 세포로 분화시키기 위해 사용된 만능 줄기 세포가 수득된 대상체와 동일하다(예를 들어, 자가 세포 치료요법을 위한). 일부 양태에서, 대상체는 상이한 대상체이다. 일부 양태에서, 대상체는 I형 당뇨병과 같은 당뇨병을 앓는 대상체이거나 정상 대상체이다. 예를 들어, 이식을 위한 세포(예를 들어, SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물)는 이식, 예를 들어, 기관 이식을 위해 적합한 형태일 수 있다.
- [0502] 상기 방법은 추가로, 세포를 이룰 필요로 하는 대상체, 예를 들어, 포유동물 대상체, 예를 들어, 사람 대상체에 투여함을 추가로 포함할 수 있다. 세포의 공급원은 포유동물이거나 바람직하게는 사람일 수 있다. 세포의 공급원 또는 수용자는 또한 비-사람 대상체, 예를 들어, 동물 모델일 수 있다. 상기 용어 "포유동물"은 마우스, 랫트, 소, 양, 돼지, 토끼, 염소, 말, 몽키, 개, 고양이 및 바람직하게는 사람을 포함하는 유기체를 포함한다. 마찬가지로, 이식가능한 세포는 비-사람 유전자전이 유기체를 포함하는 임의의 상기 유기체로부터 수득될 수 있다. 하나의 양태에서, 상기 이식가능한 세포는 유전자 조작되고, 예를 들어, 상기 세포는 외인성 유전자를 포함하거나 내인성 유전자를 불활성화시키거나 변화시키기 위해 유전자 조작되었다.
- [0503] SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물은 이식가능한 장치를 사용하여 대상체에 투여될 수 있다. 이식가능한 장치 및 관련 기술은 당업계에 공지되어 있고 본원에 기재된 화합물 또는 조성물의 연속 또는 시간 조절된 방출이 요구되는 전달 시스템으로서 유용하다. 추가로, 상기 이식가능한 장치 전달 시스템은 화합물 또는 조성물 전달을 위한 특정 지점(예를 들어, 국소화된 부위, 기관)을 표적화하기 위해 유용하다. 문헌(Negrin et al., Biomaterials, 22(6):563 (2001))을 참조한다. 또 다른 전달 방법을 포함하는 시간 조절된 방출 기술이 또한 본 발명에 사용될 수 있다. 예를 들어, 중합체 기술, 지연 방출 기술 및 캡슐화 기술을 기반으로 하는 시간 조절된 방출 제형(예를 들어, 중합체성, 리포솜성)은 또한 본원에 기재된 화합물 및 조성물의 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0504] *인슐린 생산, 포도당 반응 세포를 포함하는 약제학적 조성물*
- [0505] 대상체에 투여하기 위해, 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생산된 세포 집단, 예를 들어, SC- β 세포 집단(하나 이상의 β 세포 성숙 인자(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 β 세포 성숙 인자)와 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포를 접촉시킴에 의해 생산된)은 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다. 이들 약제학적으로 허용되는 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체(첨가제) 및/또는 희석제와 함께 제형화된 상기된 바와 같은 치료학적 유효량의 SC- β 세포 집단을 포함한다.
- [0506] 하기에 상세히 기재된 바와 같이, 본 발명의 약제학적 조성물은 특이적으로 하기를 위해 적용된 것들을 포함하는 고체 또는 액체 형태의 투여를 위해 제형화될 수 있다: (1) 경구 투여, 예를 들어, 드렌치 (수용액 또는 비-수용액 또는 현탁액), 로젠지, 당의정, 캡슐, 환제, 정제 (예를 들어, 협착, 설하 및 전신 흡수를 위해 표적화된 것들), 볼러스, 산제, 입제, 혀에 적용하기 위한 페이스트; (2) 예를 들어, 멸균 용액 또는 현탁액 또는 서방성 제형으로서, 예를 들어, 피하, 근육내, 정맥내 또는 경막의 주사에 의한 비경구 투여; (3) 예를 들어, 피부에 적용되는 크림, 연고 또는 조절된 방출 패치제 또는 분무제로서 국소 적용; (4) 예를 들어, 폐서리, 크림 또는 기포제로서 질내 또는 직장내; (5) 설하; (6) 안구로; (7) 경피적으로; (8) 경점막으로; 또는 (9) 비강으로. 추가로, 화합물은 환자에게 이식되거나 약물 전달 시스템을 사용하여 주사될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); U.S. Pat. No. 3,773,919; and U.S. Pat.

No. 35 3,270,960]을 참조한다.

- [0507] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용되는"은 완전한 의학적 판단 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 그외 다른 문제점 또는 합병증 없이 합당한 이득/위험 비율에 상응하게 사람 및 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 언급한다.
- [0508] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 해당 화합물을 하나의 기관, 신체 부위로부터 또 다른 기관 또는 신체 부위로 운반하거나 수송하는데 관여하는 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 제조 보조제(예를 들어, 윤활제, 탈크 마그네슘, 칼슘 또는 아연 스테아레이트 또는 스테아르산) 또는 용매 캡슐화 물질과 같은 약제학적으로 허용되는 물질, 조성물 또는 비히클을 의미한다. 각각의 담체는 제형의 다른 성분과 양립가능하고 환자에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용되는"이어야 한다. 약제학적으로 허용되는 담체로서 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 (1) 당, 예를 들어, 락토스, 포도당 및 슈크로스; (2) 전분, 예를 들어, 옥수수 전분 및 감자 전분; (3) 셀룰로스, 및 이의 유도체, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 미세결정 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; (4) 분말 트라가칸트; (5) 맥아; (6) 젤라틴; (7) 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 탈크; (8) 부형제, 예를 들어, 코코아 버터 및 좌제 왁스; (9) 오일, 예를 들어, 땅콩유, 면화씨유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; (10) 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜; (11) 폴리올, 예를 들어, 글리세린, 소르비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); (12) 에스테르, 예를 들어, 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; (13) 한천; (14) 완충제, 예를 들어, 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; (15) 알긴산; (16) 발열원 부재 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알콜; (20) pH 완충 용액; (21) 폴리에스테르, 폴리카보네이트 및/또는 폴리언하이드라이드; (22) 완충제, 예를 들어, 폴리펩타이드 및 아미노산 (23) 혈청 성분, 예를 들어, 혈청 알부민, HDL 및 LDL; (22) C₂-C₁₂ 알콜, 예를 들어, 에탄올; 및 (23) 약제학적 제형에 사용되는 다른 비-독성의 양립가능한 물질을 포함한다. 습윤제, 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 방향제, 향제, 보존제 및 항산화제가 또한 상기 제형 중에 존재할 수 있다. "부형제", "담체", "약제학적으로 허용되는 담체" 등과 같은 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.
- [0509] 세포 집단과 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "치료학적 유효량"은 임의의 의학적 치료에 적용될 수 있는 합당한 이득/위험 비율로 동물에서 세포의 적어도 아집단에서 일부 목적하는 치료학적 효과를 생성하기에 효과적인 세포 집단 중 관련 세포, 예를 들어, SC-β 세포 또는 성숙한 췌장 β 세포 또는 본 발명의 SC-β 세포를 포함하는 조성물의 양을 의미한다. 예를 들어, 당화된 헤모글로빈 수준, 단식 혈액 포도당 수준, 저인슐린혈증 등과 같은 1형, 1.5형 또는 2형 당뇨병의 하나 이상의 증상에서 통계학적으로 유의적인 측정가능한 변화를 생성하기에 충분한 대상체에게 투여되는 SC-β 세포 집단의 양을 의미한다. 치료학적 유효량의 결정은 확실히 당업자의 능력 범위 내에 있다. 일반적으로, 치료학적 유효량은 대상체에서 의학적 병태의 중증도 및 유형 및 다른 약제학적 활성제의 투여 뿐만 아니라 대상체의 병력, 연령, 병태, 성별에 따라 다양할 수 있다.
- [0510] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "투여하다"는 목적하는 효과가 나타나도록 목적하는 부위에 조성물의 적어도 부분적 국소화를 유도하는 방법 또는 경로에 의해 대상체로 조성물을 위치시킴을 언급한다. 본원에 기재된 화합물 또는 조성물은 경구, 또는 정맥내, 근육내, 피하, 경피, 기도(에어로졸), 폐, 비강, 직장 및 국소(협착 및 설하를 포함하는) 투여를 포함하는 비경구 경로를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 적당한 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0511] 예시적인 투여 방식은 주사, 주입, 적하, 흡입 또는 섭취를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. "주사"는 제한 없이 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 심실내, 캡슐내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관지경, 피하, 표피내, 관절내, 캡슐내, 지주막내, 척수내, 뇌척수내, 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 바람직한 양태에서, 상기 조성물은 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다.
- [0512] 질환 또는 장애의 "치료" 또는 "예방" 또는 "완화"는 상기 질환 또는 장애의 개시를 지연시키거나 예방하거나, 상기 질환 또는 장애와 관련된 병태의 진행 또는 중증도를 역전시키거나, 개선하거나, 완화시키거나, 억제하거나, 서행시키거나 진행, 심화 또는 악화를 중단시킴을 의미한다. 하나의 양태에서, 질환 또는 장애의 증상은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%까지 완화된다.
- [0513] 당뇨병의 치료는 표준 의학적 방법에 의해 결정된다. 당뇨병 치료의 목표는 당 수준을 가능하게 안전하게 정상에 가깝게 저하시키는 것이다. 통상적으로 설정된 목표는 식사 전 데실리터 당 80-120 밀리그램 (mg/dl) 및 취침시 100-140 mg/dl이다. 특정 담당의는 환자가 얼마나 종종 저혈당 반응을 갖는지와 같은 다른 인자들에 의존하여 환자에 대한 상이한 표적을 세울 수 있다. 유용한 의학적 시험은 혈당 수준을 결정하기 위한 환자의 혈액

및 뇨에 대한 시험, 당화된 헤모글로빈 수준 (HbA1c; 과거 2 내지 3개월 동안 평균 혈당 수준의 척도, 정상 범위 4-6%)에 대한 시험, 콜레스테롤 및 지방 수준에 대한 시험, 및 뇨 단백질 수준에 대한 시험을 포함한다. 상기 시험은 당업자에게 공지된 표준 시험이다(문헌참조: 예를 들어, American Diabetes Association, 1998). 성공적인 치료 프로그램은 또한 눈 질환, 신장 질환 또는 신경 질환과 같은 당뇨병과 관련된 합병증을 갖는, 프로그램 중 보다 적은 수의 환자를 가짐에 의해 결정될 수 있다.

[0514] 대상체에서 당뇨병의 개시를 지연시키는 것은 당뇨병의 하나 이상의 증상, 예를 들어, 고혈당증, 저인슐린혈증, 당뇨 망막증, 당뇨 신장병증, 맹목, 기억 상실, 신부전증, 심혈관 질환(관상 동맥 질환, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질환, 죽상동맥경화증 및 고혈압을 포함하는), 신경병증, 자율신경 기능부전, 고혈당 고삼투압성 혼수 또는 이의 합병증의 개시에 대한 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 6개월, 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 5년, 적어도 10년, 적어도 20년, 적어도 30년, 적어도 40년 이상 동안의 지연을 언급하고 대상체의 전체 인생을 포함할 수 있다.

[0515] 특정 양태에서, 상기 대상체는 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예를 들어, 사람이다. 상기 용어, "환자" 및 "대상체"는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 바람직하게, 상기 대상체는 포유동물이다. 상기 포유동물은 사람, 비-사람 영장류, 마우스, 랫트, 개, 고양이, 말 또는 소일 수 있지만 이들로 제한되지 않는다. 사람 이외의 포유동물은 1형 당뇨병, 2형 진성 당뇨병 또는 당뇨병 전 병태의 동물 모델을 대표하는 대상체로서 유리하게 사용될 수 있다. 추가로, 본원에 기재된 상기 방법은 가축 및/또는 애완동물을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 대상체는 당뇨병(예를 들어, 1형 또는 2형), 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증, 또는 당뇨병 전 병태로 이전에 진단되었거나 앓고 있거나 이들을 갖고 있는 것으로서 확인되었지만 당뇨병, 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증, 또는 당뇨병 전 병태에 대한 치료를 이미 진행할 필요가 없는 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 당뇨병 또는 당뇨병 전 병태를 앓고 있지 않은 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 당뇨병, 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증 또는 당뇨병 전 병태로 진단되었거나 앓고 있는 것으로서 확인되었지만 당뇨병, 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증 또는 당뇨병 전 병태에 대해 1회 이상의 치료를 받은 결과로서 공지된 당뇨병 위험 인자의 개선을 보여주는 대상체일 수 있다. 대안적으로, 대상체는 또한 이전에 당뇨병, 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증 또는 당뇨병 전 병태를 앓고 있는 것으로서 이전에 진단되지 않았던 대상체일 수 있다. 예를 들어, 대상체는 당뇨병, 당뇨병과 관련된 합병증 또는 당뇨병 전 병태에 대한 하나 이상의 위험 인자를 나타내는 대상체, 당뇨병 위험 인자를 나타내지 않는 대상체 또는 당뇨병, 하나 이상의 당뇨병 관련된 합병증 또는 당뇨병 전 병태에 대해 증상이 없는 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 당뇨병 또는 당뇨병 전 병태를 앓고 있거나 이를 발병할 위험에 처해 있는 대상체일 수 있다. 대상체는 또한 본원에서 정의된 바와 같이 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증 또는 당뇨병 전 병태를 앓고 있는 것으로 진단되었거나 이를 앓고 있는 것으로서 확인된 대상체일 수 있거나, 대안적으로, 이전에 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증 또는 당뇨병 전 병태를 이전에 진단된 적이 없거나 이를 앓고 있는 것으로서 확인되지 않았던 대상체일 수 있다.

[0516] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "SC-β 세포를 필요로 하는 대상체"는 당뇨병(예를 들어, 1형, 1.5형 또는 2형), 당뇨병과 관련된 하나 이상의 합병증 또는 당뇨병 전 병태로 진단되었거나 이를 앓고 있거나 이를 앓고 있거나 이를 발병할 위험에 처해 있는 것으로 확인된 대상체를 언급한다.

[0517] SC-β 세포 집단을 필요로 하는 대상체는 당뇨병 진단을 위해 사용되는 임의의 방법을 사용하여 동정될 수 있다. 예를 들어, 1형 당뇨병은 당화 헤모글로빈(A1C) 시험, 무작위 혈당 시험 및/또는 단식 혈당 시험을 사용하여 진단될 수 있다. 당뇨병 진단을 위한 파라미터는 당업계에서 공지되어 있고 많은 노력 없이 당업자에게 가용하다.

[0518] 몇몇 양태에, 본 발명의 방법은 추가의 SC-β 세포를 필요로 하는 것으로서 동정된 대상체를 선택함을 추가로 포함한다. SC-β 세포 집단을 필요로 하는 대상체는 1형, 1.5형 또는 2형 당뇨병의 증상과 같은 제공된 증상을 기준으로 선택될 수 있다. 당뇨병의 예시적 증상은 과도한 갈증(번갈증), 빈뇨(다뇨증), 극한 기아(다식증), 극한 피로감, 체중 손실, 고혈당증, 저수준의 인슐린, 고혈당(예를 들어, 250mg, 300mg 이상의 당 수준), 뇨에 존재하는 케톤의 존재, 피로, 건조하고/하거나 가려운 피부, 몽롱, 절개 또는 상처의 느린 치유, 통상적인 것 보다 심한 감염, 발 저림 및 쑤심, 당뇨 망막증, 당뇨 신증, 맹목, 기억 상실, 신부전증, 심혈관 질환 (관상 동맥 질환, 말초 동맥 질환, 뇌혈관 질환, 죽상동맥경화증 및 고혈압을 포함하는), 신경증, 자율신경 실조증, 고혈당성 고삼투압 혼수 및 이의 합병증을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0519] 일부 양태에서, 대상체에 투여하기 위한 SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물은 당뇨병 치료 및/또는 항-고혈당 활성을 위해 당업계에 공지된 제제, 예를 들어, 디펩티딜 펩티다제 4(DPP-4)의 억제제(예를 들어, 알로글립틴, 리나글립틴, 삭사글립틴, 시타글립틴, 빌다글립틴, 및 베르베린), 비구아니드(예를 들어, 메트포르민, 부포르민

및 펜포르민), 퍼옥시좀 증식인자-활성화된 수용체 (PPAR) 조절제, 예를 들어, 티아졸리디논(TZD)(예를 들어, 피오글리타존, 리보글리타존, 로시글리타존 및 트로글리타존), 이원 PPAR 효능제 (예를 들어, 알레글리타자르, 무라글리타자르 및 테사글리타자르), 설폰닐우레아 (예를 들어, 아세토헥사미드, 카부타미드, 클로르프로파미드, 글릭라지드, 톨부타미드, 톨라자미드, 글리벤클라미드(글리부리드), 글리피지드, 글리퀴돈, 글리클로피라미드 및 글리메피리드), 메글리티니드("글리니드")(예를 들어, 나테글리니드, 레파글리니드 및 미티글리니드), 글루카곤형 펩타이드-1 (GLP-1) 및 유사체 (예를 들어, 엑센딘-4, 엑세나티드, 리라글루티드, 알비글루티드), 인슐린 및 인슐린 유사체 (예를 들어, 인슐린 리스프로, 인슐린 아스파르트, 인슐린 글루리신, 인슐린 글라르진, 인슐린 데테미르, 엑수베라 및 NPH 인슐린), 알파-글루코시다제 억제제(예를 들어, 아카보스, 미글리톨 및 보글리보스), 아밀린 유사체 (예를 들어, 프람린티드), 나트륨-의존성 포도당 보조수송체 T2(SGLT T2) 억제제 (예를 들어, 다프글리플로진, 레모글리플로진 및 세르글리플로진) 및 기타 (예를 들어, 벤플루오렉스 및 톨레스타트)와 같은 약제학적 활성 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0520] 1형 당뇨병에서, β 세포는 바람직하지 않게 연속된 자가면역 반응에 의해 파괴된다. 따라서, 상기 자가면역 반응은 상기 자가면역 반응을 억제하거나 차단하는 화합물의 사용에 의해 약화될 수 있다. 일부 양태에서, 대상체에 투여하기 위한 SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물은 면역 반응 조절제인 약제학적 활성 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역 반응 조절제"는 대상체에서 자가면역 반응을 억제하는 화합물 (예를 들어, 소분자, 항체, 펩타이드, 핵산, 또는 유전자 치료요법 시약)을 언급한다. 이론에 구애받지 않으면서, 면역 반응 조절자는 염증 사이토킨(예를 들어, IL-12, IL-23 또는 IL-27), 또는 STAT-4의 활성, 활성화 또는 발현을 억제함에 의해 자가면역 반응을 억제한다. 예시적인 면역 반응 조절제는 이의 내용의 전문이 참조로 인용되는 미국 특허 제6,774,130호에 기재된 리소필린(LSF) 및 LSF 유사체로 이루어진 그룹의 구성을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0521] SC- β 세포를 포함하는 조성물은 약제학적 활성 제제 또는 이를 포함하는 조성물의 투여와 동일한 시점 또는 상이한 시점에 대상체에게 투여될 수 있다. 상이한 시점에 투여되는 경우, 대상체에 투여하기 위한 SC- β 세포 집단 및/또는 약제학적 활성 제제를 포함하는 조성물은 다른 조성물 투여의 5분, 10분, 20분, 60분, 2시간, 3시간, 4시간, 8시간, 12시간, 24시간 이내에 투여될 수 있다. SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물 및 약제학적 활성 제제를 포함하는 조성물이 상이한 약제학적 조성물로 투여되는 경우, 투여 경로는 상이할 수 있다. 일부 양태에서, 대상체에 SC- β 세포를 포함하는 조성물을 투여한다. 다른 양태에서, 대상체에 약제학적 활성 제제를 포함하는 조성물을 투여한다. 또 다른 양태에서, 대상체에 약제학적 활성 제제와 혼합된 SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여한다. 또 다른 양태에서, 대상체에 SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물 및 약제학적 활성 제제를 포함하는 조성물을 투여하고, 여기서, 투여는 실질적으로 동시에 또는 서로에 대해 후속적이다.

[0522] SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물 투여의 독성 및 치료학적 효능은 예를 들어, LD50 (집단 50%에 치사적인 용량) 및 ED50 (집단 50%에서 치료학적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위해, 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 과정에 의해 결정될 수 있다. 큰 치료학적 지수를 나타내는 SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물이 바람직하다.

[0523] SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물의 양은 여러개의 잘 확립된 동물 모델을 사용하여 시험될 수 있다.

[0524] 비-비만 당뇨병 (NOD) 마우스는 여러 주령에서 나타나는 인슐린염을 유도하는 유전학적 결함을 갖는다(문헌참조: Yoshida et al., Rev. Immunogenet. 2:140, 2000). 60-90%의 암컷은 20 내지 30주 까지 명백한 당뇨병을 발병한다. 상기 면역-관련된 병리는 사람 1형 당뇨병에서의 병리와 유사한 것으로 나타난다. 1형 당뇨병의 다른 모델은 전이유전자 및 녹아웃 돌연변이를 갖는 마우스이다 (문헌참조: Wong et al., Immunol. Rev. 169:93, 1999). 자발적 1형 당뇨병에 대한 랫트 모델은 최근에 문헌[참조: Lenzen et al. (Diabetologia 44:1189, 2001)]에 의해 보고되었다. 고혈당증은 또한 스트렙토조토신의 단일 복강내 주사에 의해 (문헌참조: Soria et al., Diabetes 49:157, 2000), 또는 연속적 저용량의 스트렙토조토신에 의해 (문헌참조: Ito et al., Environ. Toxicol. Pharmacol. 9:71, 2001) 마우스(>500 mg 포도당/dL)에서 유도될 수 있다. 이식된 섬 세포의 효능을 시험하기 위해, 상기 마우스는 포도당의 정상 수준 (<200 mg/dL)으로의 복귀에 대해 모니터링한다.

[0525] 보다 큰 동물은 만성 고혈당증의 후유증에 대해 우수한 모델을 제공한다. 개는 또한 췌장을 제거하거나 (문헌참조: J. Endocrinol. 158:49, 2001), 갈락토스를 공급함에 의해 (문헌참조: Kador et al., Arch. Ophthalmol. 113:352, 1995) 인슐린 의존성이 될 수 있다. 또한 케이스혼트 개에서 1형 당뇨병에 대한 유전된 모델이 있다 (문헌참조: Am. J. Pathol. 105:194, 1981). 개 모델을 사용한 초기 연구 (문헌참조: Banting et al., Can. Med. Assoc. J. 22:141, 1922)는 1925년 2월에 스톡홀름으로 긴 해변 여행을 캐나다 커플을 유도하였다.

- [0526] 설명을 목적으로, 파일릿 연구는 SC-β 세포 집단을 하기의 동물에게 이식함에 의해 수행할 수 있다: a) 비-당뇨병성 누드 (T-세포 결핍) 마우스; b) 스트렙토조토신 처리에 의해 당뇨병이 부여된 누드 마우스; 및 c) 부분적 췌장 절개 후 섬을 재생하는 과정에 있는 누드 마우스. 이식된 세포의 수는 신장 캡슐, 간 또는 췌장에서 이식된 약 1000 내지 2000개 정상 사람 β 세포와 동등하다. 비-당뇨병성 마우스에 대해, 종점은 이식 생존의 평가 및 생화학적 분석, RIA, ELISA 및 면역조직화학에 의한 인슐린 생성의 결정일 수 있다. 스트렙토조토신 처리되고 부분적으로 췌장 절개된 동물은 또한 생존, 대사 조절(혈당) 및 체중 증가에 대해 평가될 수 있다.
- [0527] 일부 양태에서, 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 수득된 데이터는 사람에서 사용하기 위한 용량 범위를 체계화하는데 사용될 수 있다. 상기 화합물의 용량은 바람직하게 거의 독성을 갖지 않는 ED50을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 상기 용량은 사용되는 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 다양할 수 있다.
- [0528] SC-β 세포 집단을 포함하는 치료학적 용량의 조성물은 또한 처음에 세포 배양 분석으로부터 평가될 수 있다. 용량은 생체내 동물 모델에서 체계화하여 혈장내 순환 포도당에 반응하여 적당한 농도로 인슐린 분비를 성취할 수 있다. 대안적으로, 임의의 특정 용량의 효과는 적합한 생분석에 의해 모니터링할 수 있다.
- [0529] 치료 지속 기간 및 횟수와 관련하여, 숙련된 임상가가 치료가 언제 치료학적 이득을 제공하는지, 언제 용량을 증가시키거나 감소시키는지, 언제 투여 횟수를 증가시키거나 감소시키는지, 언제 치료를 중단하는지, 언제 치료를 개시할지 또는 언제 치료 용법에 다른 변형을 가할지를 결정하기 위해 대상체를 모니터링하는 것이 전형적이다. 투여 스케줄은 폴리펩타이드에 대한 대상체의 민감성과 같은 다수의 임상적 인자에 따라 1주 1회 내지 매일로 다양할 수 있다. 목적하는 용량은 1회로 투여되거나 서브용량, 예를 들어, 2 내지 4회 서브용량으로 나누어 투여되고 일정 기간, 예를 들어, 하루 또는 다른 적당한 스케줄로 투여될 수 있다. 상기 서브용량은 단위 투여 형태로 투여될 수 있다. 일부 양태에서, 투여는 만성이고, 예를 들어, 수주 또는 수개월의 기간 동안 하루 1회 이상의 투여이다. 투여 스케줄의 예는 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6 개월 이상의 기간 동안 하루 1회, 하루 2회, 하루 3회 또는 하루 4회 이상의 투여이다.
- [0530] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 분리된 SC-β 세포 집단의 사용을 제공한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 분리된 SC-β 세포 집단은 약제학적 조성물의 제조, 치료를 필요로 하는 대상체, 예를 들어, 당뇨병을 갖거나, 당뇨병을 발병할 위험에 처해 있는 대상체(예를 들어, 선천성 및 후천성 당뇨병을 갖는 대상체에 제한되지 않는다)로의 이식에 사용하기 위해 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 분리된 SC-β 세포 집단은 유전학적으로 변형시킬 수 있다. 또 다른 측면에서, 상기 피검체는 당뇨병 및/또는 대사 장애를 갖거나 이의 위험에 처할 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 분리된 SC-β 세포 집단은 자가유래 및/또는 동종이계일 수 있다. 일부 양태에서, 상기 대상체는 포유동물이고 다른 양태에서 상기 포유동물은 사람이다.
- [0531] 본원에 기재된 바와 같은 분리된 SC-β 세포 집단의 사용은 SC-β 세포 집단이 인슐린-양성 내분비 세포, 또는 줄기 세포, 예를 들어, 분리된 SC-β 세포가 투여된 대상체로부터 수득되거나 수거된 iPS 세포로부터 유래된 전구체로부터 분화될 수 있다. 이것은 통상의 기술자에 의해 공지된 방법에 의해 줄기 세포로부터 인슐린-양성 내분비 세포로 분화될 수 있고 이어서 본원에 기재된 방법에 의해, 대상체, 특히 실질적으로 다른 시스템으로부터 유래된 세포의 위험 및 제한을 갖지 않는 성숙한 췌장 β형 세포로 이식하기 위한 췌장 β형 세포 또는 췌장 β 세포 특성을 갖는 세포로 추가로 분화될 수 있는 SC-β 세포의 재생 가능한 공급원을 제공하므로써 매우 유리하다.
- [0532] 또 다른 양태에서, 분리된 SC-β 세포 집단(예를 들어, 성숙한 췌장 β 세포 또는 β형 세포)은 인슐린-생산 세포, 예를 들어, 췌장 β 세포 또는 췌장 β형 세포로의 분화를 위한 성질, 또는 내배엽 기원의 세포의 췌장 β 세포로의 발육 경로를 연구하기 위한 모델로서 사용될 수 있다.
- [0533] 일부 양태에서, 인슐린-양성 내분비 세포 또는 SC-β 세포는 유전학적으로 가공하여 마커가 발현되거나 분비되는 경우, 예를 들어, 마커가 인슐린 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있는 경우 발현되는 프로모터에 작동적으로 연결된 마커를 포함하여 상기 마커는 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체가 인슐린을 발현하고 분비하는 SC-β 세포로 분화되는 경우 발현될 수 있다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 섬 β 세포 또는 췌장 β형 세포로 분화하는 세포의 분화 경로를 연구하기 위한 모델로서 사용될 수 있다.
- [0534] 다른 양태에서, 상기 인슐린-생성 포도당 반응성 세포는 췌장에서 및 당뇨병 및 대사 장애의 발병에서 섬 β 세포의 역할을 연구하기 위한 모델로서 사용할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 SC-β 세포는 정상 대상체로부터

또는 돌연변이 및/또는 다형태(예를 들어, Pdx1에서 돌연변이 또는 다형태를 갖는 당뇨병을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있는 소분자 및 다른 치료학적 제제를 동정하기 위해 사용될 수 있는, 유전형의 성숙 개시 당뇨병4(MODY4) 뿐만 아니라 조기-개시 인슐린 의존성 진성 당뇨병(NIDDM)을 유도하는 유전자 Pdx1에서)를 갖는 대상체로부터 기원할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 SC-β 세포는 유전학적으로 조작하여 당뇨병을 앓는 대상체의 치료학적 치료에서 대상체에게 투여하기 전에 Pdx1 유전자의 다형태를 올바르게 할 수 있다. 일부 양태에서, 상기 SC-β 세포는 유전학적으로 조작하여 돌연변이 및/또는 다형태를 가질 수 있다.

[0535] 하나의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 SC-β 세포 집단을 포함하는 유효량의 조성물을 당뇨병 및/또는 대장 장애를 앓는 대상체에게 투여함을 포함하는 대상체에서 당뇨병 또는 대장 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 추가의 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물을 증가된 혈당 수준에 반응하여 인슐린을 생성하기에 충분한 유효량으로 당뇨병을 앓거나 발병할 증가된 위험에 처해 있는 대상체에게 투여함을 포함하는, 당뇨병을 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0536] 상기 방법의 하나의 양태에서, 상기 대상체는 사람이고 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 사람 세포이다. 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 SC-β 세포 집단을 대상체의 체장에 직접 투여하거나 전신 투여하는 것을 고려한다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 SC-β 세포 집단은 대상체에서 임의의 적합한 부위, 예를 들어, 대상체에서 투여되는 경우 증가된 포도당 수준에 반응하여 SC-β 세포 집단이 인슐린을 분비할 수 있는 임의의 적합한 부위로 투여될 수 있다.

[0537] 본 발명은 또한 당업자에게 통상적으로 공지된 유전자 결함, 물리적 손상, 환경적 부담 또는 조건화, 안좋은 건강, 비만 및 기타 당뇨병 위험 인자들의 결과로서 발생하는 당뇨병 또는 대사적 장애를 앓는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 대상체에게 투여된 SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물의 치료 효능은 임상적으로, 수용된 표준 및 시험들에 의해 모니터링할 수 있고, 상기 시험은 예를 들어, (i) 적혈구 세포에서 산소 운반 단백질인 헤모글로빈에 부착된 혈당의 %를 측정함에 의한 과거 2 내지 3개월 동안 대상체 평균 혈당 수준을 지적하는 당화된 헤모글로빈 (A1C) 시험을 포함한다. 혈당 수준이 높을수록 헤모글로빈은 더 많이 부착된 당을 갖는다. 2개의 별도의 시험상에서 6.5% 이상의 A1C 수준은 대상체가 당뇨병을 앓고 있음을 지적한다. 6 내지 6.5%의 시험 값은 대상체가 전당뇨병을 앓음을 시사한다. (ii) 부작위 혈당 시험. 혈액 샘플은 무작위 시점에서 대상체로부터 채혈하고 데실리터 당 200밀리그램(mg/dL) 내지 리터 당 11.1 밀리몰(mmol/L) 이상의 무작위 혈당 수준은 대상체가 당뇨병을 앓고 있음을 지적한다. (iii) 단식 혈당 시험. 혈액 샘플은 밤새 단식 후 대상체로부터 채취한다. 70 내지 99mg/dL (3.9 내지 5.5 mmol/L)의 단식 혈당 수준은 정상이다. 대상체 단식 혈당 수준이 2개의 별도의 시험상에서 126 mg/dL (7 mmol/L) 이상인 경우, 상기 대상체는 당뇨병을 앓고 있는 것이다. 100 내지 125 mg/dL (5.6 내지 6.9 mmol/L)의 혈당 수준은 대상체가 전당뇨병을 앓고 있음을 지적한다. (iv) 경구 포도당 부하 시험. 혈액 샘플은 대상체가 적어도 8시간 또는 밤새 단식 시킨 후 채혈하고 이어서 당 용액을 주입하고 혈당 수준을 2시간 이후 측정한다. 140 mg/dL (7.8 mmol/L) 미만의 혈당 수준은 정상이다. 140 내지 199 mg/dL (7.8 내지 11 mmol/L)의 혈당 수준은 전당뇨병으로 간주된다. 이것은 흔히 손상된 포도당 부하(IGT)로 언급된다. 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 이상의 혈당 수준은 당뇨병을 지적할 수 있다.

[0538] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같이 대상체에게 대한 SC-β 세포 집단의 투여 효과는 개선된 운동 부하 또는 다른 삶의 질 척도 및 감소된 사망률과 관련된다. SC-β 세포 집단을 사용한 세포 치료요법의 효과는 상기 과정 후 수일 내지 수주 기간에 걸쳐 명백할 수 있다. 그러나, 이로온 효과는 상기 과정 후 수시간 정도의 조기에 관찰될 수 있고 수년 동안 지속할 수 있다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단을 사용한 세포 치료요법의 효과는 상기 과정 후 2주 이내에 나타난다.

[0539] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 상기 치료를 필요로 하는 사람 환자 또는 다른 대상체에서 조직 재구성 또는 재생을 위해 사용될 수 있다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단의 조성물은 이들이 의도된 조직 부위로 접목되거나 이동하여 기능적 결핍 영역을 재구성하거나 재생하도록 하는 방식으로 투여될 수 있다. 체장에서 또는 또 다른 목적하는 위치에서 β 세포 집단을 재구성할 수 있는 세포를 투여하기 위해 적응된 특수 장치가 가능하다. 따라서, 상기 SC-β 세포는 주사에 의해 수용자 대상체의 체장으로 투여되거나 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0540] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물은 임상적 치료요법, 연구, 개발 및 상업적 목적에서 다양한 용도를 갖는다. 치료학적 목적을 위해, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 대사적 기능에서 선천적 오류, 질환 병태의 효과(예를 들어, 당뇨병) 또는 상당한 외상 결과(즉, 체장에 대한 손상 또는 섬 β 세포의 손실 또는 이의 손상)와 같은 임의의 인지된 필요를 위한 혈당 수준의 증

가에 반응한 인슐린 생성을 증진시키기 위해 투여될 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 대상체에 투여되어 손상되거나 다르게는 건강하지 않은 조직에 대한 기능을 회복시키고 손상된 조직의 리모델링을 촉진시킬 수 있다.

[0541] 치료학적 투여를 위한 세포 조성물의 적합성을 결정하기 위해, SC-β 세포 집단은 먼저 적합한 동물 모델에서 시험될 수 있다. 하나의 수준에서, 세포는 생체내에서 생존하고 이들의 표현형을 유지하는 능력에 대해 평가한다. SC-β 세포를 포함하는 세포 조성물은 면역결핍 동물 (예를 들어, 누드 마우스, 또는 화학적으로 또는 방사선조사에 의해 면역결핍이 부여된 동물)에게 투여될 수 있다. 조직은 재성장 기간 후 수거되고 상기 투여된 세포 또는 이의 자손이 여전히 존재하는지에 대하여 평가한다.

[0542] 이것은 검출가능한 표지(예를 들어, 녹색 형광 단백질, 또는 β-갈락토시다제)를 발현하고 예비표지된(예를 들어, BrdU 또는 [3H] 티미딘) 세포를 투여하거나 구성 세포 마커(예를 들어, 사람 특이적 항체를 사용하여)의 후속적 검출에 의해 수행될 수 있다. 투여된 SC-β 세포 집단의 존재 및 표현형은 사람 특이적 항체를 사용한 면역조직화학 또는 ELISA에 의해 또는 공개된 서열 데이터에 따른 사람 폴리뉴클레오타이드에 특이적인 증폭을 유발하는 프라이머 및 하이브리드화 조건을 사용한 RT-PCR 분석에 의해 평가될 수 있다.

[0543] 당뇨병을 시험하기 위한 다수의 동물 모델은 상기 시험을 위해 가용하고 예를 들어, 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 제6,187,991호에 기재된 바와 같이 당업계에서 통상적으로 공지되어 있고, 설치류 모델; NOD (비-비만 마우스), BB_{DB} 마우스, KDP 랫트 및 TCR 마우스, 및 당뇨병의 다른 동물 모델이 있다[문헌참조: Rees et al., Diabet Med. 2005 April; 22(4):359-70; Srinivasan K, et al., Indian J Med. Res. 2007 March; 125(3):451-7; Chatzigeorgiou A, et al., In Vivo. 2009 March-April; 23(2):245-58, 본원에 참조로서 인용됨].

[0544] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 임의의 생리학적으로 허용되는 부형제 중에서 투여될 수 있고, 여기서, 상기 SC-β 세포는 복제, 증식 및/또는 접목을 위한 적당한 부위를 발견할 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 주사, 카테터 등에 의해 도입될 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 액체 질소 온도에서 동결될 수 있고 장기간 동안 보관되고 해동될 수 있다. 동결되는 경우, SC-β 세포 집단은 통상적으로 10% DMSO, 50% FCS, 40% RPMI 1640 배지 중에 보관한다. 일단 해동되면, 상기 세포는 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포를 배양함과 관련된 성장 인자 및/또는 공급 세포를 사용하여 증식될 수 있다.

[0545] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 사람 투여를 위해 충분히 멸균된 조건하에 제조된 등장성 부형제를 포함하는 약제학적 조성물 형태로 공급될 수 있다. 의학적 제형에서 일반 원리에 대하여, 문헌 [Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000.]을 참조한다. 세포 부형제, 및 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물의 임의의 수반된 요소들의 선택은 투여를 위해 사용되는 경로 및 장치에 따라 적응된다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물은 또한 SC-β 세포의 접목 또는 기능성 이동을 촉진시키는 하나 이상의 다른 성분들을 포함하거나 수반될 수 있다. 적합한 성분은 SC-β 세포, 또는 상보적 세포 유형, 특히 내피 세포의 접착을 지지하거나 촉진시키는 매트릭스 단백질을 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 조성물은 재흡수성 또는 생분해성 매트릭스 스캐폴드를 포함할 수 있다.

[0546] 일부 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 유전학적으로 변화되어 췌장 β 세포와 같은 인슐린 생산 세포에서 유용한, 예를 들어, 개체에서 유전학적 결함 복구, 선택가능한 마커 등에 유용한 유전자들 또는 하나 이상의 인슐린-양성 내분비로부터 분화된 비-인슐린 생산 세포 또는 이의 전구체에 대한 선별에 유용하거나 이식된 SC-β 세포의 선택적 자살을 위한 유전자들을 도입하는 것이다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 또한 유전학적으로 변형시켜 생존, 대조군 증식 등을 증진시킬 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 기재된 SC-β 세포 집단은 적합한 벡터를 사용한 형질감염 또는 형질도입, 상동성 재조합 또는 다른 적당한 기술에 의해 유전학적으로 변화되어 이들이 목적하는 유전자를 발현한다. 하나의 양태에서, SC-β 세포 집단은 전형적으로 내인성 프로모터하에 있는 후반부에서 텔로머라제 발현을 증가시키는 이중성 프로모터하에, 텔로머라제 촉매 성분(TERT)을 암호화하는 유전자들로 형질감염시킨다(문헌참조: 본원에 참조로서 인용되는 국제 특허 출원 WO 98/14592). 다른 양태에서, 선택가능한 마커는 SC-β 세포 집단의 보다 높은 순도를 제공하기 위해 도입된다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 유전학적으로 8 내지 16시간에 걸쳐 벡터 함유 상등액을 사용하여 변화시킬 수 있고 이어서 1 내지 2일 동안 성장 배지로 교환할 수 있다. 유전학적으로 변화된 SC-β 세포는 푸로마이신, G418, 또는 블라스티시딘과 같은 약물 선택 제제를 사용하여 선택할 수 있고 이어서 재배양할 수 있다.

- [0547] 유전자 치료요법을 사용하여 유전자 생성물을 대체하기 위해, 조직의 재생을 촉진시키기 위해, 질환을 치료하기 위해 또는 대상체로의 이식 후 세포의 생존을 개선(즉, 거부를 차단하기 위해)시키기 위해 세포를 변형시킬 수 있다.
- [0548] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 또한 유전학적으로 조직 재생에 관여하거나 치료학적 유전자를 투여 부위로 전달하는 능력을 증진시키기 위해 변형시킬 수 있다. 벡터는 분화된 세포 유형에서 범-특이적 또는 특이적으로 활성인 프로모터에 작동적으로 연결된 목적하는 유전자에 대한 공지된 암호화 서열을 사용하여 디자인한다. 소마토스타틴, 글루카곤 및 다른 인자들과 같은 다양한 유형의 하나 이상의 성장 인자를 발현하도록 유전학적으로 변형된 세포가 특히 관심 대상이다.
- [0549] 본원에 기재된 바와 같이 외인성 유전자를 표적 SC-β 세포로 전달하기 위해 유용한 많은 벡터들이 가용하다. 상기 벡터는 예피솜성, 예를 들어, 플라스미드, 사이토메갈로바이러스, 아데노바이러스 등과 같은 바이러스 유래된 벡터일 수 있거나 상동성 재조합 또는 무작위 통합으로 통합될 수 있고, 예를 들어, MMLV, HIV-1, ALV, 등과 같은 레트로바이러스 유래된 벡터가 있다. 일부 양태에서, 레트로바이러스 및 적당한 패키징 세포주의 조합은 또한 캡시드 단백질이 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포를 감염시키기 위해 기능하는 용도를 발견할 수 있다. 일반적으로, SC-β 세포 및 바이러스는 배양 배지에서 적어도 약 24시간 동안 배양한다. 일부 양태에서, SC-β 세포는 이어서 일부 응용에서 짧은 간격, 예를 들어, 24 내지 73시간 동안 또는 적어도 2주 동안 배양 배지에 성장시키고 분석 전에 5주 이상 동안 성장하도록 할 수 있다. 통상적으로 사용되는 레트로바이러스 벡터는 "결합성"이고, 즉 생산 감염을 위해 요구되는 바이러스 단백질을 생산할 수 없다. 벡터의 복제는 패키징 세포주에서 성장을 필요로 한다.
- [0550] 레트로바이러스의 숙주 세포 특이성은 외피 단백질, env(p120)에 의해 결정된다. 상기 외피 단백질은 패키징 세포주에 의해 제공된다. 외피 단백질은 적어도 3가지 유형, 에코트로픽, 엠포트로픽 및 크세노트로픽이다. 엑소트로픽 외피 단백질, 예를 들어, MMLV로 패키징된 레트로바이러스는 대부분의 뮤린 및 래트 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 에코트로픽 패키징 세포주는 BOSC23 (Pear et al. (1993) P.N.A.S. 90:8392-8396)을 포함한다. 엠포트로픽 외피 단백질, 예를 들어, 4070A(Danos et al, supra)을 함유하는 레트로바이러스는 사람, 개 및 마우스를 포함하는 대부분의 포유동물 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 엠포트로픽 패키징 세포주는 PA12 (Miller et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437); PA317 (Miller et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902) GRIP (Danos et al. (1988) PNAS 85:6460-6464)를 포함한다. 크세노트로픽 외피 단백질, 예를 들어, AKR env로 패키징된 레트로바이러스는 뮤린 세포를 제외한 대부분의 포유동물 세포 유형을 감염시킬 수 있다. 일부 양태에서, 상기 벡터는 이후에 예를 들어, Cre/Lox와 같은 리컴비나제 시스템, 또는 예를 들어, 헤르페스바이러스 TK, Bcl-Xs, 등과 같은 선택적 독성을 가능하게 하는 유전자를 포함함에 의해 파괴된 이들을 발현하는 세포를 사용하여 이후에 제거되어야만 하는 유전자들을 포함할 수 있다.
- [0551] 적합한 유도성 프로모터는 목적하는 표적 세포 유형, 형질감염된 세포 또는 이의 후손에서 활성화된다. 전사 활성화에 대해, 이것은 전사가 표적 세포에서 적어도 약 100배, 보다 통상적으로는 적어도 약 1000배에 의해 표적 세포에서 상기 기본 수준 이상으로 증가됨을 의도한다. 상이한 세포 유형에 유도되는 다양한 프로모터가 공지되어 있다.
- [0552] 본 발명의 하나의 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 전신투여하거나 표적 해부학상의 부위로 투여하기에 적합하다. SC-β 세포 집단은 대상체의 체장으로 또는 이의 근처에 접목되거나 전신 투여될 수 있고, 예를 들어, 동맥내 또는 정맥내 투여로 제한되지 않는다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 SC-β 세포 집단은 정맥내 및 동맥내 투여, 척추강내 투여, 심실내 투여, 뇌실질내, 두개내, 대조내, 선조체내, 및 내부흑질 투여를 포함하는 비경구 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 임의로, SC-β 세포 집단은 면역 억제제와 연계하여 투여된다.
- [0553] 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 개별 환자의 임상적 병태, 투여 부위 및 투여 방법, 투여 스케줄링, 환자 나이, 성별, 체중 및 의학적 담당자에게 공지된 다른 인자들을 고려하여 우수한 의학적 관행에 따라 투여되고 복용될 수 있다. 따라서 본원의 목적을 위해 약제학적 "유효량"은 당업계에 공지된 바와 같은 상기 고려에 의해 결정된다. 상기 양은 당업자에 의한 적당한 척도로서 선택된 개선된 생존율 또는 보다 신속한 회수율 또는 증상의 개선 또는 제거 및 다른 지표들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 개선을 성취하는데 효과적이어야만 한다. SC-β 세포 집단은 하기 장소에서 대상체에게 투여될 수 있다: 임상, 임상실, 응급실, 병동, 중환자실, 수술실, 카테터 설치실 및 방사선실.
- [0554] 다른 양태에서, SC-β 세포 집단은 이후 이식/주입을 위해 보관된다. SC-β 세포 집단은 하나 이상의 표본 또는

단위로 나누어서 SC-β 세포 집단의 일부가 이후 응용을 위해 유지되고 일부는 대상체에게 즉시 적용될 수 있도록 한다. 세포 बैं크에서 모든 세포 또는 일부 세포의 적당한 내지 장기 보관은 또한 본 발명의 범위 내에 있다 [문헌참조: 본원에 전문이 참조로서 인용되는 미국 특허원 번호 제20030054331호 및 특허원 번호 제W003024215호]. 프로세싱 말기에, 상기 농축된 세포는 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 수용자로 위치시키기 위해 주사기와 같은 전달 장치로 로딩시킬 수 있다.

[0555] 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 단독으로 또는 다른 세포, 조직, 조직 단편, 성장 인자, 예를 들어, VEGF 및 다른 공지된 혈관형성 또는 동맥형성 성장 인자, 생물학적 활성 또는 불활성 화합물, 재흡수성 플라스틱 스캐폴드 또는 집단의 전달, 효능, 관용성 또는 기능을 증진시키도록 의도된 다른 첨가제와 조합하여 적용될 수 있다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 또한 구조적 또는 치료학적 목적의 유도를 위해 세포 기능을 변화시키거나, 증진시키거나 보충하기 위한 방식으로 DNA 삽입 또는 세포 배양에 위치시킴에 의해 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 줄기 세포에 대한 유전자 전달 기술은 문헌(참조: Morizono et al., 2003; Mosca et al., 2000)에 기재된 바와 같이 당업자에 의해 공지되어 있고, 문헌(참조: Walther and Stein, 2000) 및 (참조: Athanasopoulos et al., 2000)에 기재된 바와 같은 바이러스 형질감염 기술 및 보다 구체적으로 아데노-관련 바이러스 유전자 전달 기술을 포함할 수 있다. 비-바이러스 기반 기술은 또한 문헌(참조: Murarnatsu et al., 1998)에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0556] 또 다른 측면에서, 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 혈관형성 촉진 성장 인자를 암호화하는 유전자와 조합될 수 있다. 항-아포토시스 인자 또는 제제를 암호화하는 유전자들이 또한 적용될 수 있다. 유전자(또는 유전자들의 조합)의 첨가는 아데노바이러스 형질도입, "유전자 총", "리포좀" 매개된 형질도입 및 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 매개된 형질도입, 플라스미드 아데노-관련 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 수행될 수 있다. 세포는 시간 경과에 따라 유전자를 방출할 수 있고/있거나 세포로 제공할 수 있는 유전자 전달 비히클을 함유하는 담체 물질과 함께 이식되어 형질도입이 연속하거나 개시될 수 있도록 할 수 있다. 특히, 세포 및/또는 세포를 함유하는 조직이 상기 세포 및/또는 조직이 수득된 환자와는 다른 환자에게 투여되는 경우, 하나 이상의 면역억제제는 이식체의 거부를 감소시키고 바람직하게는 예방하기 위해 세포 및/또는 조직을 수용하는 환자에게 투여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역억제 약물 약물 또는 제제"는 정상의 면역 기능을 억제하거나 차단하는 약제학적 제제를 포함하는 것으로 의도된다. 본원에 기재된 방법과 함께 적합한 면역억제제의 예는 T-세포/B-세포 동시 자극경로를 억제하는 제제, 예를 들어, 참조로서 본원에 인용된 미국 특허 공개 번호 제2002/0182211호에 기재된 바와 같은, CTLA4 및 B7 경로를 통해 T-세포와 B-세포의 커플링을 방해하는 제제를 포함한다. 하나의 양태에서, 면역억제제는 사이클로스포린 A이다. 다른 예는 미오펜릴레이트 모페틸, 라파마이신 및 항-흉선세포 글로불린을 포함한다. 하나의 양태에서, 상기 면역억제 약물은 하나 이상의 다른 치료학적 제제와 함께 투여된다. 상기 면역억제 약물은 투여 경로에 적합하고 목적하는 치료학적 효과를 성취하기에 충분한 용량으로 대상체에게 투여되는 제형으로 투여된다. 또 다른 양태에서, 상기 면역억제 약물은 본 발명의 심혈관 줄기 세포로 내성을 유도하기에 충분한 시간 동안 일시적으로 투여된다.

[0557] 유효량의 SC-β 세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물은 또한 본 발명에 의해 고려된다. 이들 화합물은 임의로 약제학적으로 허용되는 담체, 첨가제 또는 부형제와 함께 유효수의 SC-β 세포를 포함한다. 본 발명의 특정 측면에서, SC-β 세포 집단은 멸균 식염수를 필요로 하는 대상체로 투여된다. 본 발명의 또 다른 측면에서, SC-β 세포 집단은 헵크스 균염 용액(HBSS) 또는 이슬라이트 S, pH 7.4로 투여된다. 다른 방법은 또한 무혈청 세포 배지의 사용을 포함하여 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, SC-β 세포 집단은 혈장 또는 태아 소 혈청 및 DMSO 중에서 투여된다. 대상체로의 SC-β 세포 집단의 전신 투여는 특정 경우에 바람직할 수 있는 반면, 환부 및/또는 손상된 조직 부위 또는 이의 부근에 직접적인 투여가 다른 경우에 바람직할 수 있다.

[0558] 일부 양태에서, SC-β 세포 집단은 임의로, 대상체에 투여하기 전 SC-β 세포 집단의 재구성 또는 해동(동결되는 경우)과 같은 목적하는 목적을 위해 기재된 지침서와 함께 적합한 컨테이너에 패키징될 수 있다.

[0559] 하나의 양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 분리된 SC-β 세포 집단은 상이한 제제와 함께 투여된다. 하나의 양태에서, 상기 SC-β 세포는 대상체에 투여시 분화제와 조합된다. 또 다른 양태에서, 상기 세포는 분화제와는 별도로 대상체에 투여된다. 임의로, 상기 세포가 분화제와 별도로 투여되는 경우, 세포 및 분화제의 투여시 일시적 분리가 있다. 상기 일시적 분리는 약 1분 미만의 시간에서 약 수시간 또는 수일의 범위일 수 있다. 투여를 위한 최적의 타이밍 및 순서의 결정은 당업자에 의해 용이하게 및 통상적으로 결정된다.

[0560] 당뇨병의 진단

- [0561] 1형 당뇨병은 췌장의 인슐린-생성 β 세포의 파괴를 유발하는 자가면역 질환이다. 인슐린의 부재는 신장 역치(약 대부분의 사람들에서 약 190 내지 200mg/dl) 이상의 뇨에서 나타나기 시작하는 단식 혈당의 증가(비당뇨병 사람들에서 약 70 내지 120mg/dL)를 유발한다. 세계 보건 기구는 단식 혈장 포도당 농도의 진단값을 7.0 mmol/l (126 mg/dl)로 정의하고, 진성 당뇨병에 대한 상기 진단값은 전혈 6.1 mmol/l 또는 110 mg/dl로 정의하거나, 11.1mmol/L 이상(200mg/dL 이상)의 2시간 포도당 수준으로 정의한다.
- [0562] 1형 당뇨병은 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 진단 시험을 사용하여 진단될 수 있다: (1) 당화된 헤모글로빈 (A1C) 시험, (2) 무작위 혈당 시험 및/또는 (3) 단식 혈당 시험.
- [0563] 당화 헤모글로빈 (A1C) 시험은 이전의 2개월 내지 3개월 동안의 대상체의 평균 혈당 수준을 반영하는 혈액 시험이다. 상기 시험은 헤모글로빈에 부착된 혈당%를 측정하고 이는 혈당 수준과 서로 관련된다(예를 들어, 혈당 수준이 높을수록 헤모글로빈이 보다 당화되어 있는 것이다). 2개의 별도의 시험상에서 6.5% 이상의 A1C 수준은 당뇨병을 지적한다. 6 내지 6.5%의 결과는 전당뇨병인 것으로 간주되고 이는 당뇨병을 발병할 높은 위험을 지적한다.
- [0564] 상기 무작위 혈당 시험은 당뇨병을 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터 무작위 시점에 혈액 샘플을 수득함을 포함한다. 혈당 값은 데실리터 당 밀리그램 (mg/dL) 또는 리터당 밀리몰 (mmol/L)로 나타낼 수 있다. 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 이상의 무작위 혈당 수준은 대상체가 특히 빈뇨 및 극한 갈증과 같은 당뇨병의 임의의 징후 및 증상과 맞물리는 경우 당뇨병일 확률이 높음을 지적한다.
- [0565] 단식 혈당 시험을 위해, 혈액 샘플은 밤새 단식 후 수득한다. 100 mg/dL (5.6 mmol/L) 미만의 단식 혈당 수준은 정상인 것으로 간주된다. 100 내지 125 mg/dL (5.6 내지 6.9 mmol/L)의 단식 혈당 수준은 전당뇨병인 것으로 간주되고 2개의 별도의 시험상에서 126 mg/dL (7 mmol/L) 이상의 수준은 당뇨병을 지적한다.
- [0566] 1형 당뇨병은 또한 내인성 인슐린 생성의 척도인 C-펩타이드 분석을 사용하여 2형 당뇨병으로부터 구분될 수 있다. 포도당 내성 시험에 의해 결정되는, 항-섬 항체(글루타민 데카복실라제, 인슐린종 관련 펩타이드-2 또는 인슐린에 대한)의 존재 또는 인슐린 내성의 부재는 또한 1형을 지적하고 많은 2형 당뇨병은 내부적으로 인슐린을 계속 생성하고 모두는 일부의 인슐린 내성 정도를 갖는다.
- [0567] GAD 65 항체에 대한 시험은 면역 시스템이 1형 당뇨병 병인에 관여하는 것으로 나타남에 따라 1형과 2형 당뇨병을 구분하기 위한 개선된 시험으로서 제안되었다.
- [0568] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법에 의해 생성되는 SC- β 세포 집단을 사용하여 상기 치료요법을 필요로 하는 대상체에서 섬 기능을 회복시키는 조성물을 제공한다. 부적당한 췌장의 내분비물(인슐린, 글루카곤 또는 소마토스타틴)의 생성과 관련된 임의의 병태 또는 적당히 분비를 조절하지 못하는 능력은 적당히 본 발명에 따라 제조된 세포(예를 들어, SC- β 세포 집단)를 사용한 치료를 위해 고려될 수 있다. 1형 (인슐린-의존성) 진성 당뇨병의 치료가 특히 관심 대상이다.
- [0569] 이를 필요로 하는 대상체는 외인성 인슐린의 투여 및 합당한 위험 프로필에 대해 확인된 장기 의존성을 기준으로 하는 치료를 위해 선택될 수 있다. 상기 대상체는 체중 kg당 대략 10,000개의 SC- β 세포 또는 세포 동등물을 투여받는다. 세포가 자가성이 아닌 경우, 동종이인자형 미스매치를 극복하기 위해, 대상체는 수술전에 면역억제제, 예를 들어, FK506 및 라파마이신(경구로) 및 다클리주맙(정맥내)을 사용하여 치료될 수 있다. SC- β 세포 집단을 포함하는 조성물은 간문맥에서 카테터를 통해 주입될 수 있다. 이어서 대상체는 복근 초음파 및 혈당 시험에 적용하여 간 기능을 결정할 수 있다. 매일 인슐린 요구량을 추적하고 대상체는 요구되는 경우 제2 이식체를 투여받는다. 후속 모니터링은 약물 수준, 면역 기능, 일반 건강 상태 및 환자가 인슐린 무의존성 상태로 유지되는지에 대한 빈번한 혈당 시험을 포함한다.
- [0570] 당뇨병 환자의 관리에 대한 일반적인 방법은 표준 텍스트북[문헌참조: 예를 들어, the Textbook of Internal Medicine, 3rd Edition, by W. N. Kelley ed., Lippincott-Raven, 1997]에 그리고 구체적인 참조문헌[예를 들어, Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text 2nd Edition, by D. Leroith ed., Lippincott Williams & Wilkins 2000; Diabetes (Atlas of Clinical Endocrinology Vol. 2) by C. R. Kahn et al. eds., Blackwell Science 1999; and Medical Management of Type 1 Diabetes 3rd Edition, McGraw Hill 1998]에 제공된다. 1형 당뇨병의 치료를 위한 섬 세포의 사용은 문헌[참조: Cellular Inter-Relationships in the Pancreas: Implications for Islet Transplantation, by L. Rosenberg et al., Chapman & Hall 1999; and Fetal Islet Transplantation, by C. M. Peterson et al. eds., Kluwer 1995]에서 상세하게 논의된다.

- [0571] 항상 대상체 선택, 투여 방식 및 SC-β 세포 집단의 투여에 대한 궁극적 책임은 관리 임상의의 책임이다. 상업적 분배를 목적으로 본원에 기재된 바와 같은 SC-β 세포 집단은 전형적으로 사람 투여용의 충분히 멸균된 조건하에 제조된 등장성 부형제를 포함하는 약제학적 조성물 형태로 제공된다. 본 발명은 또한 이들의 제조, 분배 또는 사용 동안에 임의의 시점에 존재하는 SC-β 세포 집단 세트를 포함한다. SC-β 세포 집단 세트는 용어가 본원에서 정의된 바와 같이 본원에 기재된 2개 이상의 집단 중 임의의 조합을 포함하고 한정된 내배엽 세포가 pdx1-양성 췌장 전조체 세포로 되는 분화 및 성숙한 췌장 β 세포 또는 성숙한 췌장 β 형 세포와 같은 인슐린 생산 세포로의 후속적 분화로 예시되지만 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, SC-β 세포 집단을 포함하는 세포 조성물은 다른 세포 유형, 예를 들어, 때로는 동일한 개념을 공유하는 다른 분화된 세포 유형과 함께 투여(예를 들어 대상체로의 이식)될 수 있다. 상기 세트에서 각각의 세포 유형은 함께 패키징되거나 동일한 설비내 별도의 컨테이너에 패키징되거나 동일한 실체 또는 사업 관련성을 공유하는 상이한 실체의 통제하에 상이한 장소에서 패키징될 수 있다.
- [0572] 세포 조성물의 의학적 제형화와 관련된 일반 원리에 대해서는 문헌[Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996]을 참조한다. 상기 조성물은 임의로 당뇨병의 치료와 같은 요구되는 목적에 대해 기재된 지침서를 갖는 적합한 컨테이너에 패키징된다.
- [0573] 일부 양태에서, SC-β 세포 집단을 포함하는 조성물은 또한 췌장 섬 세포의 내분비 폴리펩타이드 중 하나 이상을 생산하도록 디자인된 기계적 장치에서 기능성 성분으로서 사용될 수 있다. 가장 단순한 형태로, 상기 장치는 세포 집단의 통과를 차단하여 상기 장치내에 세포들을 보유시키지만 세포 집단에 의해 분비되는 인슐린, 글루카곤 또는 소마토스타틴의 통과를 허용하는 반투과성 막에서 SC-β 세포 집단을 함유한다. 이것은 전형적으로 분화를 억제하는 세포 상호작용을 가능하게 하는 세포 클러스터 형태로 미세캡슐화된 SC-β 세포 집단을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제4,391,909호는 가교 결합되어 인슐린 크기의 단백질에는 투과성이지만 100,000 몰 중량 초과 분자에 대해서는 불투과성이도록 하는, 3,000 몰 중량 초과 폴리사카라이드 중합체로 구성된 구형 반투과성 막에 캡슐화된다. 미국 특허 제6,023,009호는 아가로스 및 아가로펙틴으로 구성된 반투과성 막에 캡슐화된 섬 세포를 기재한다. 상기 특성의 마이크로캡슐은 당뇨병 환자의 체강으로 투여를 위해 적용되고 조직적합성 문제점 또는 세균에 대한 민감성을 감소시키는데 있어서 특정 잇점을 갖는 것으로 사료된다.
- [0574] 보다 섬세한 장치는 또한 SC-β 세포 집단을 포함하도록 사용하기 위해, 당뇨병 환자로의 이식을 위해 또는 체외 치료요법을 위해 고려된다. 미국 특허 제4,378,016호는 체외 분절, 피하 분절 및 호르몬 생산 세포를 함유하는 대체가능한 외피를 함유하는 인공 내분비선을 기재한다. 미국 특허 제5,674,289호는 주변 조직에 개방된 하나 이상의 혈관화 챔버들로 반투과성 막에 의해 분리되어 있는 섬 챔버를 갖는 생인공 췌장을 기재한다. 유용한 장치는 전형적으로 섬 세포를 함유하도록 적용된 챔버 및 섬 세포로부터 분비된 단백질을 수거하고 또한 예를 들어, 순환 포도당 수준의 섬 세포로의 시그널 복귀를 허용할 수 있는 반투과성 막에 의해 섬 세포로부터 분리된 챔버를 갖는다.
- [0575] SC-β 세포 또는 췌장 β 세포 집단을 증가시키는 β 세포 성숙 인자들을 동정하는 방법
- [0576] SC-β 세포(예를 들어, 성숙한 췌장 β 세포)의 생성을 증가시키는 β 세포 성숙 인자 또는 제제를 동정하는 방법이 기재되어 있다. 특정 예에서, 고품량 및/또는 고속 처리 스크리닝 방법이 제공된다. 상기 방법은 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체를 하나 이상의 화합물(예를 들어, 라이브러리 화합물 또는 본원에 기재된 화합물)에 노출시키고 상기 화합물이 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로부터 SC-β 세포, 예를 들어, 성숙한 췌장 β 세포의 생성을 증가시키는지를 결정함을 포함한다. 세포는 본원에 기재된 하나 이상의 마커를 사용하여 SC-β 세포(예를 들어, 성숙한 췌장 β 세포)로서 동정될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 라이브러리에 노출전에 분화시킬 수 있다. 다른 예에서, 2개 이상의 화합물은 스크리닝 분석에서 개별적으로 또는 함께 사용될 수 있다. 추가의 예에서, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 다중-웰 플레이트에 위치시킬 수 있고 화합물 라이브러리는 다양한 수의 라이브러리를 다중-웰 플레이트의 상이한 웰에 위치시킴에 의해 스크리닝할 수 있다. 라이브러리의 상기 스크리닝은 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로부터 SC-β 세포, 예를 들어, 성숙한 췌장 β 세포를 생성시킬 수 있는 화합물을 신속히 동정할 수 있다.
- [0577] 일부 양태에서, 상기 방법은 SC-β 세포, 예를 들어, 췌장 β 세포 집단(예를 들어, 여기서, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 50%, 75% 이상이 대상 세포 유형이다)을 분리시킴을 추가로 포함한다.
- [0578] 일부 양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 방법에 의해 생성된 SC-β 세포를 대상체(예를 들어,

I형, II형 또는 1.5형 당뇨병을 갖는 대상체)에 이식시킴을 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 SC-β 세포는 대상체로부터 수득된 줄기 세포로부터 유래한다. 일부 양태에서, SC-β 세포는 대상체와는 다른 공여체, 예를 들어, 대상체의 동족 기원의 줄기 세포로부터 유래한다.

[0579] 하나의 측면에서, 본 발명은 SC-β 세포, 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 성숙한 췌장 β 세포를 특징으로 한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 SC-β 세포를 포함하는 조성물을 특징으로 한다.

[0580] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체; 본원에 기재된 하나 이상의 β 세포 성숙 인자; 및 SC-β 세포(예를 들어, 성숙한 췌장 β 세포)를 생성하기 위해 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체 및 하나 이상의 β 세포 성숙 인자를 사용하기 위한 지침서를 포함하는 키트를 특징으로 한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 성숙한 β 세포에 대한 마커, 예를 들어, 본원에 기재된 마커의 검출을 위한 성분, 예를 들어, β 세포 성숙도의 마커의 검출을 위한 시약, 예를 들어, 마커에 대한 항체; 및 예를 들어, 대조군으로서 사용하기 위한 성숙한 췌장 β 세포를 추가로 포함한다.

[0581] 일부 양태에서, 상기 키트는 내배엽 세포, 예를 들어, 확정 내배엽 세포를 제2 세포 유형의 세포, 예를 들어, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체로 분화시키기 위한 성분; 및 본원에 기재된 내배엽 세포(예를 들어, 확정적 내배엽 세포) 및 제2 유형의 세포, 예를 들어, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체를 생성하기 위한 성분을 사용하기 위한 지침서를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 상기 키트는 제2 세포 유형의 세포에 대한 마커, 예를 들어, 본원에 기재된 마커에 대한 검출을 위한 성분, 예를 들어, Pdx1의 검출을 위한 시약, 마커에 대한 항체, 및 예를 들어, 대조군으로서 사용하기 위한 세포 또는 제2 세포 유형, 예를 들어, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체를 추가로 포함한다.

[0582] 하나의 측면에서, 본 발명은 줄기 세포의 하나 이상의 β 세포 성숙 인자로의 노출시, 하나 이상의 인슐린-양성 췌장 내분비 세포 또는 이의 전구체를 제공하고, 하나 이상의 β 세포 성숙 인자(예를 들어, 본원에 기재된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 β 세포 성숙 인자)를 제공하여 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체를 SC-β 세포(예를 성숙한 췌장 β 세포)로 분화시킴을 포함하는, 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체의 SC-β 세포로의 분화를 촉진시키는 방법을 특징으로 한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 포유동물로부터 기원한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 마우스 또는 사람으로부터 기원한다. 일부 양태에서, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 배아 줄기 세포(예를 들어, 마우스 또는 사람 배아 줄기 세포와 같은 포유동물 배아 줄기 세포)를 배양하여 유래된다. 일부 양태에서, 하나 이상의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 유도 만능 줄기 세포(예를 들어, 마우스 또는 사람 iPS 세포와 같은 포유동물 iPS 세포)를 배양하여 유래된다.

[0583] 일부 양태에서, 다수의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 예를 들어, 다수의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체를 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상의 β 성숙 인자에 접촉시킴에 의해 다수의 성숙 췌장 β 세포 또는 SC-β 세포로 분화된다.

[0584] 일부 양태에서, 다수의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 약 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 또는 16일 이상 동안 β 세포 성숙 인자에 노출시킨다. 일부 양태에서, 다수의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 약 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM 또는 10 μM의 농도로 β 세포 성숙 인자에 노출시킨다. 일부 양태에서, 다수의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 약 250 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 또는 800 nM의 농도로 β 세포 성숙 인자에 노출시킨다. 일부 양태에서, 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%초과의 인슐린-양성 내분비 세포 또는 이의 전구체는 성숙한 췌장 β 세포 또는 SC-β 세포로 분화시킨다.

[0585] 일부 측면에서, 본원은 본원에 기재된 SC-β 세포를 사용하여 작제된 인공 소도를 제공한다. 일부 측면에서, 인공 소도는 예를 들어, 본원에 기재된 방법에 따라 만능 줄기 세포로부터 시험관내 분화된 하나 이상의 SC-β 세포를 포함한다.

[0586] 일부 측면에서, 본원은 만능 줄기 세포로부터 시험관내 분화된 SC-β 세포를 포함하는 인공 췌장을 제공한다.

[0587] 이전의 상세한 기재 및 하기의 실시예는 단지 설명을 위한 것이고 발명의 범위에 대한 제한으로서 간주되지 말아야 하는 것으로 이해된다. 당업자에게 자명한 본원에 기재된 양태에 대한 다양한 변화 및 변형은 본원의 취지 및 범위로부터 벗어나는 것 없이 수행될 수 있다. 추가로, 확인된 모든 특허, 특허원 및 공보는 예를 들어, 본

원의 기재와 연계하여 사용될 수 있는 상기 공보에 기재된 방법을 기술하고 기재할 목적으로 명백히 본원에 참조로 인용된다. 이들 공보는 유일하게 본원의 출원일 전 이들의 기재를 위해 제공된다. 이와 관련하여 어떠한 것도 선행 발명 또는 임의의 다른 이유로 인해 발명자가 상기 기재를 선행일자로 수행되었음을 인정하는 것으로서 해석되지 말아야 한다. 이들 문헌의 내용에 관한 날짜 또는 제공에 대한 모든 진술은 출원인에게 가용한 정보를 기준으로 하고 이들 문헌의 날짜 또는 내용물이 옳다는 것을 인정함을 구성하지 않는다.

[0588] * * *

[0589] 실시예

[0590] 실시예 1 - 시험관내 기능성 췌장 β 세포의 생성

[0591] 요약

[0592] 시험관내 줄기 세포로부터 인슐린 생성 췌장 β 세포의 생성은 당뇨병에서 약물 발견 및 세포 이식 치료요법을 위한 전례없는 세포 공급원을 제공한다. 그러나, 이전에 사람 만능 줄기 세포(hPSC)로부터 생성된 인슐린-생산 세포는 시험관내 및/또는 생체내 기능을 포함하는 실제의 많은 β 세포의 특성이 없다. 본원에 기재된 연구는 시험관내에서 hPSC로부터 SC- β 세포를 생성하는 예시적 확대가능한 분화 프로토콜을 입증한다. 놀랍게도 그리고 예상치 않게, 이들 SC- β 세포는 다수의 연속 포도당 유발반응, 유입 Ca^{2+} , β 세포에서 발견되는 발현 마커 및 분비 과립으로의 펙키지 인슐린에 반응하는 성인 β 세포에 상응하는 양의 인슐린을 분비한다. 개념의 증거로서, SC- β 세포는 또한 시험관내에서 공지된 당뇨병 약물 및 증식 신호에 응답한다. 추가로, 상기 SC- β 세포는 이식 후 즉시 마우스의 혈청에서 고수준의 사람 인슐린을 분비하고 이들 세포의 이식은 당뇨병 마우스에서 즉시 고혈당증을 개선한다. 본원에 기재된 연구는 당뇨병의 치료를 위해서 및 시험관내 β 세포 연구 및 약물 스크리닝을 위해 줄기 세포-유래된 β 세포(즉, SC- β 세포)의 사용에서 주요 진전을 나타낸다.

[0593] 하기의 연구는 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 SC- β 세포의 여러 잇점을 입증하고, 예를 들어, SC- β 세포는 시험관내 포도당 자극된 인슐린 분비를 수행하고, 유전자 발현 및 초미세구조에서 사람 섬 β 세포와 유사하고 사람 인슐린을 분비하며 마우스로 이식되는 경우 고혈당증을 완화시키고 세포 치료요법(예를 들어, 추가적 및/또는 기능적 β 세포를 필요로 하는 대상체로의 이식), 약물 스크리닝(예를 들어, 인슐린 생산/분비, 생존, 분화 등을 위해), 연구(예를 들어, 정상 세포와 당뇨병 β 세포 간의 기능적 차이를 결정하는) 및 조직 스크리닝(예를 들어, 섬을 재구성하는데 있어서 제1 세포 유형으로서 SC- β 세포를 사용하는)를 위한 새로운 플랫폼을 제공한다.

[0594] 서론

[0595] 사람 만능 줄기 세포(hPSC)의 발견은 대체 세포 및 조직이 하루에 질환 치료 또는 약물 스크리닝을 위해 생성될 수 있는 가능성의 길을 열었다. 과거 수십년의 연구는 뉴런 또는 심근세포와 같이 수득하기 어려운 세포를 생성하기 위한 전략의 개발을 통해 상기 분야의 기술이 목표 지점에 보다 근접하도록 하였다(문헌참조: Kriks et al., 2011; Shiba et al., 2012). 이들 세포는 또한 숙주로 접목할 수 있는 동물 모델로 이식하였고, 일부 경우에, 줄기 세포-유래된 심근세포를 사용한 부정맥의 억제(문헌참조: Shiba et al., 2012), 희돌기교 선조체 세포를 사용한 척추 손상 후 운동 능력의 회복(문헌참조: Keirstead et al., 2005), 또는 맹목의 설치류 모델로 망막 상피 세포의 이식후 개선된 시력(문헌참조: Lu et al., 2009)과 같은 이로운 효과를 갖는다.

[0596] 줄기 세포 유래된 조직에 의해 치료될 수 있는 가장 신속하게 성장하는 질환 중 하나는 당뇨병이고 구체 당뇨병 협회에 따르면 전세계에서 3억만명 이상의 사람들에게 영향을 주고 있다. 1형 당뇨병은 췌장 섬에서 β 세포의 자가면역 파괴로부터 비롯되는 반면, 보다 통상적인 2형 당뇨병은 말초 조직 인슐린 내성 및 β 세포 기능부전으로부터 비롯된다. 이들 환자, 특히 1형 당뇨병을 앓는 환자들은 잠재적으로 새로운 기능성 β 세포의 이식을 통해 치유될 수 있다. 파산적 사람 섬의 이식은 환자들이 상기 전략을 통해 5년 이상의 긴 기간 동안 독립적으로 인슐린을 제조할 수 있음을 입증하였지만 상기 방법은 공여자 사람 섬의 부족 때문에 매우 제한된다(문헌참조: Bellin et al., 2012). 줄기 세포로부터 사람 β 세포의 무제한 공급의 생성은 상기 치료요법을 100만명의 새로운 환자들로 확장시킬 수 있다. β 세포는 단지 단일 세포 유형이 생성될 필요가 있고 상기 세포가 면역보호 장치(예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 마이크로캡슐)에서 신체 임의의 곳에 혈관에 근접한 물질로서 위치할 수 있으므로 대표적인 약제를 위한 이상적인 시험 사례이다.

[0597] β 세포 기능 또는 증식을 개선시킬 수 있는 새로운 약물을 동정하기 위한 약제학적 스크리닝은 또한 파산적 섬의 제한된 공급 및 사망 원인의 변화로 인한 다양성, 공여자 유전학적 배경 및 이들의 분리에서 다른 인자에 의해 방해된다. 따라서, SC- β 세포의 일관되고 균일한 공급은 당뇨병에 대해 독특하고 가치있는 약물 발견 플랫폼

품을 제공할 수 있다.

[0598] 지금까지의 연구는 hPSC로부터 시험관내 β 세포 가계를 생성하는 쪽으로 상당히 진전시켰다. 확정적 내배엽 및 후속적 췌장 선조체는 현재 고효율로 분화될 수 있다(문헌참조: Kroon et al., 2008; D'Amour et al., 2006; D'Amour et al., 2005; Rezanian et al., 2012). 중요하게 이들 세포는 설치류로의 이식한지 3개월 내지 4개월 이내에 기능성 β 세포로 추가로 분화될 수 있고(문헌참조: Kroon et al., 2008; Rezanian et al., 2012), 이는 이들이 충분한 시간 및 적당한 신호가 제공되는 경우 β 세포로 전개하는 발육적 잠재력을 함유함을 지적한다. 불행하게도, 세포가 생체내에서 진행되는 수개월의 긴 공정은 블랙 박스로 유지하고 상기 공정이 사람 환자에서 작용하는지가 불명확하다. 다른 연구는 시험관내에서 사람 췌장 선조체로부터 인슐린-생성 세포를 생성시키는데 집중되었다. 그러나, 지금까지 생성된 세포는 실제 β 세포가 아니다. 이들 세포는 시험관내에서 포도당 자극된 인슐린 분비를 수행하는데 실패하고, NKX6-1 또는 PDX1과 같은 적당한 β 세포 마커를 발현시키는데 실패하거나, 글루카곤과 같은 다른 호르몬을 비정상적으로 동시 발현하거나, 생체내 이식 후 기능하는데 실패하거나 이들 비정상적 특징의 조합을 나타낸다(문헌참조: D'Amour et al., 2006; Cheng et al., 2012; Narayanan et al., 2013; Xie et al., 2013; Nostro et al., 2011).

[0599] 본원에 기재된 연구는 시험관내 hPSC로부터의 기능성 사람 β 세포의 실질적으로 무제한적인 대규모 생산을 위한 전략을 제공한다. 3차원 세포 배양 시스템과 조합된 시그널 전달 경로의 후속적 조절을 사용함에 의해, 주요 β 세포 마커를 동시 발현하고 β 세포 초기세포구조적 특징을 나타내는 모노호르몬 인슐린-생산 세포(SC- β 세포)가 생성될 수 있다. 추가로, 이들 세포는 시험관내 및 생체내 둘다에서 사람 섬의 기능을 모방한다. 최종적으로, 상기 세포는 당뇨병을 위한 시험관내 약물 스크리닝 및 생체내 이식 치료요법의 이원 목적을 위한 이들의 유용성의 개념의 증거를 입증한다.

[0600] 결과

[0601] 시험관내 hPSC로부터 포도당 감지 인슐린 분비 β 세포의 생성

[0602] 시험관내 hPSC로부터 기능성 β 세포를 생성하기 위한 예시적 방법은 도 1a에 도시되어 있다. 대다수의 β 세포를 생성하기 위해, 확장가능한 현탁액-기반 배양 시스템은 $>10^8$ 로 hPSC를 생성시킬 수 있고 이후 분화된 세포 유형이 사용되었다(문헌참조: Schulz et al., 2012). 직경이 대략 100 내지 200 μ m인 HUES8 사람 배아 줄기 세포 클러스터는 고도의 순수한 확정적 내배엽으로 유도하고($>95\%$ Sox17+) 후속적으로 이전의 공보로부터 채택된 프로토콜을 사용하여 췌장 선조체 ($>90\%$ PDX1+)로 유도하였다(도 1b)(문헌참조: Schulz et al., 2012; Rezanian et al., 2012). 이어서, FGF 패밀리 구성원 KGF, 헤파타호그 억제제 Sant1, 및 낮은 농도의 레티노산과 배양에서 고수준의 NKX6-1+/PDX1+ 동시-발현 췌장 선조체 클러스터 ($>60\%$ NKX6-1+/PDX1+ 세포)를 생성하는 연장된 시간을 사용한 방법을 동정하였다(도 1a). 이들 췌장 선조체의 마우스로의 이식은 3 내지 4개월 후 생체내 기능성 β 세포를 유발하는 것으로 보고되었다(문헌참조: Rezanian et al., 2012). 이것은 시험관내 기능성 β 세포의 생성 개요를 설명하는 프로토콜을 개발하기 위한 출발점으로서 사용하였다.

[0603] 상기 NKX6-1+/PDX1+ 췌장 선조체 세포는 이어서 이전에 공개된 프로토콜(조절 분화) 또는 새롭게 개발된 프로토콜(새로운 분화)를 사용하여 C-펩타이드-발현 내분비 세포로 분화시켰다. 상기 조절 분화 프로토콜은 모노호르몬 INS+ 및 INS+/GCG+ 또는 INS+/SST+ 폴리호르몬(PH) 세포인 세포를 수개월에 걸쳐 생성시켰다. 명명법 PH를 사용하여 상기 세포 집단을 언급하였다. 한편, 새로운 분화 프로토콜은 헤파타호그 시그널 전달 억제, 레티노산 시그널 전달, 감마-세크레타제 억제, TGF β 시그널 전달 억제, EGF 시그널 전달, 갑상선 호르몬 시그널 전달 및 소도 배지 CMRL 1066을 포함하는 독특한 일련의 배양 단계의 2 내지 3주를 포함했다(문헌참조: Nostro et al., 2011; Rezanian et al., 2012; Thowfeequ et al., 2007; Aguayo-Mazzucato et al., 2013; D'Amour et al., 2006). 상기 새로운 분화 프로토콜로 생성된 C-펩타이드 + 세포는 1차 성인 β (1° β) 세포와 유사한 것으로 추정되고 이와 같이 줄기 세포- β (SC- β) 세포 (즉, SC- β 세포)로 언급된다.

[0604] β 세포의 주요 기능적 특징은 포도당 자극된 인슐린 분비(GSIS)를 반복적으로 수행하는 능력이다. 거의 모든 기존의 지시된 분화 프로토콜은 시험관내 GSIS를 수행하는데 실패하는 hPSC로부터 인슐린-발현 세포를 생성시킨다(문헌참조: D'Amour et al., 2006). 단일 포도당 유발반응에 반응하여 일부 인슐린을 분비할 수 있는 세포를 제조할 수 있는 출발 집단으로서 내배엽 선조체 세포주를 사용하는 하나의 프로토콜이 보고되었다(문헌참조: Cheng et al., 2012). 역으로, 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 SC- β 세포는 적어도 3개의 연속 고포도당 유발반응에 반응할 수 있다. 이들 세포는 1차 성인 β 세포와 유사한 패턴으로 고수준의 인슐린 분비하였고 대조군 프로토콜로부터의 PH 세포는 포도당에 응답하는데 실패하였다(도 2a-2c 및 도 3a-2c). 고포도당(20mM) 대 저포도당(2mM)에서 분비되는 인슐린 비율에 의해 계산된 바와 같은 자극 지수는 1차 성인 β 세포에 비교된

SC-β 세포에 대하여 각각 2.3 ± 0.9 및 2.3 ± 1.4 로 유사하였다. 추가로, SC-β 세포 및 1차 성인 β 세포 둘다에 반응하지 않은 작은 %의 고포도당 유발반응이 있었다. 추가로, SC-β 세포에 의해 20mM 포도당에 반응하는 세포 당 분비되는 인슐린의 양은 1차 성인 β 세포에 의해 분비되는 것과 각각 2.6 ± 1.6 및 $2.5 \pm 1.2 \mu \text{IU}/10^3$ 세포로서 구분될 수 없었다. 함께 종합해 보면, 상기 데이터는 새로운 분화 프로토콜을 사용하여 생성된 SC-β 세포의 시험관내 기능이 이들의 실제 1차 성인 β 대응부와 매우 유사함을 시사한다.

[0605] 새로운 분화 프로토콜을 사용하여 생성된 SC-β 세포의 시험관내 기능성은 후에 세포내 Ca^{2+} 에서의 변화를 측정함에 의해 확인하였다. β 세포는 칼슘 시그널 전달을 통해 변화하는 포도당 수준을 감지하고; 증가하는 포도당 수준은 인슐린 방출을 유발하는데 관여하는 칼슘 이온의 유입을 유발하는 막 탈분극화를 유도한다(문헌참조: Mohammed et al., 2009). 따라서, 형광 칼슘 지시자 염료인 Fluo-4 AM으로 염색된 세포 클러스터에서 칼슘 유입은 실시간 형광 현미경으로 모니터링하였다(도 4a). 상기 방법은 집단 및 단일 세포 수준 둘다에 대한 칼슘 유입의 분석을 허용하였고 SC-β 세포 및 1차 성인 β 세포 둘다가 정상의 GSIS와 일관된 유사한 방식으로 세포내 Ca^{2+} 를 반복적으로 증가시키에 의해 후속적 포도당 유발반응에 응답하고, 대조군 분화 프로토콜로 생성된 PH 세포는 이들의 비정상 GSIS와 일관된 비정상적 칼슘 반응을 나타냈다(도 4b). 단일 세포 분석이 수행되는 경우, 대부분의 개별 SC-β 세포 및 1차 성인 β 세포는 칼슘 유입에 의한 2 내지 3회 연속 포도당 유발반응에 응답하였고, 대부분의 PH 세포는 0개의 유발반응에 응답하였다(도 4c-4e). 설치류 β 세포와 같지 않게, 사람 β 세포는 고포도당에 반응하여 비동조화 정도를 나타내는 것으로 공지되어 있다(문헌참조: Rutter and Hodson, 2013). 이들 데이터는 SC-β 세포 클러스터 내 전체 집단과 개별 세포 둘다가 분리된 섬내 β 세포와 유사하게 기능함을 보여주고 새로운 새로운 분화 프로토콜을 사용하여 생성된 SC-β 세포가 시험관내 기능한다는 결론을 추가로 지지한다.

[0606] hPSC로부터 줄기 세포-유래된 β 세포는 1차 사람 β 세포와 유사하다

[0607] SC-β 세포가 시험관내 1차 성인 β 세포처럼 기능한다는 관찰 후에, 이어서 2개의 세포 집단은 단백질 발현, 유전자 발현 및 초미세구조에 의해 분석하였다. 대부분의 이전에 보고된 hPSC-유래된 인슐린-생산 세포와 같지 않게 이들 SC-β 세포는 정상의 β 세포 마커 PDX1 및 NKX6-1 둘다를 발현한다(도 5a 및 5b). 희귀 비-β 세포 호르몬은 관찰되지만 NKX6-1/C-펩타이드 동시-양성 세포를 사용하여 동시 국소화하지 않는다(도 5c). SC-β 세포는 인슐린과, 프로인슐린 프로세싱의 화학양론적 부산물인 C-펩타이드 둘다에 대해 양성으로 염색되고 이것은 인슐린 염색이 세포-내인성 인슐린 생산으로부터 유래하고(도 6), ISL1, MAFA, 및 MAFB에 대한 염색을 지적한다(도 7a-7c). 유동 세포측정 정량은 본원에 기재된 방법이 파산성 사람 섬에서 발견되는 %와 유사하게 40% NKX6-1/C-펩타이드를 생성할 수 있음을 밝힌다(도 5d). 추가로, 총 C-펩타이드+ 세포의 8%만이 글루카곤을 동시 발현하고 4%는 소마토스타틴을 동시-발현한다(도 8a-8c). 대체로 모노호르몬 세포는 이전에 하나의 연구에서 보고되었지만, 이들 세포는 주요 β 세포 동정 마커 NKX6-1을 발현하거나 생체내 기능하는 것으로 나타나지 않았다(문헌참조: Cheng 2012.) 최근 연구는 보다 높은 수준의 NKX6-1을 생성하는 지시된 분화 프로토콜이 췌장 선조체 이식체에 대해 우수한 이식 결과를 유도함을 보여주었다(문헌참조: Rezanian et al., 2013). 추가로, 조건적인 녹아웃 연구는 NKX6-1 발현이 성인 마우스 섬에서 β 세포 기능에 필수적임을 보여주었고, 이는 본 발명의 세포에서 이들 인자들의 동시-발현이 이들의 기능적 능력의 설명을 도와줄 수 있음을 시사한다(문헌참조: Taylor et al., 2013).

[0608] 여러 주요 β 세포 마커의 상기 개선된 단백질 발현은 이들 세포의 전사적 네트워크가 사람 섬 β 세포와 보다 잘 일치함을 지적했다. 최근 연구는 이전의 프로토콜에 의해 생성된 INS + PH 세포가 성인 섬 INS+ β 세포와 유사하지 않음을 입증하였다(문헌참조: Hrvatin et al., 2014; Xie et al., 2013). 이전에 공개된 프로토콜에 의해 생성된 분류된 INS+ 세포의 마이크로어레이 분석은 이들이 동일한 방법을 통해 분류된 기능적 성인 사람 β 세포와 보다는 태아 β 세포와 클러스터됨을 보여주었다.

[0609] 기재된 SC-β 세포와 성인 사람 섬과 비교하기 위해, INS+/NKX6-1+ 세포는 동일한 방법을 사용하여 분류하였고 마이크로어레이에 의해 글로벌 유전자 발현 분석을 수행하였다. 이전에 공개된 줄기 세포 유래된 INS+ PH 세포와 같지 않게, 본원에 기재된 상기 SC-β 세포는 태아 β 세포 또는 INS+ PH 세포 보다는 사람 성인 β 세포와 보다 친밀하게 클러스터링하였다(도 5e). 추가로, 이들 데이터는 PDX1, MNX1, 및 NKX2-2와 같은 표준 β 세포 유전자의 발현이 이전의 INS+ PH 세포 보다는 SC-β 세포와 성인 사람 β 세포 간에 보다 유사함을 보여주었다. 데이터 세트에서 상부 100개의 가장 차등적으로 발현된 유전자들의 분석은 또한 SC-β 세포 및 성인 사람 β 세포가 이전의 PH 또는 태아 β 세포 보다는 서로간에 보다 유사함을 보여주었다(도 5f). 후기 분화 단계 동안에 배양 배지 조성물에 추가의 최소 변화로 개선될 수 있는 SC-β 세포와 성인 β 세포 간에 차이가 있다.

- [0610] SC-β 세포의 유전자 및 단백질 발현 패턴은 1차 사람 β 세포의 패턴과 유사하기 때문에, 이것은 SC-β 세포가 또한 실제 β 세포가 작용하는 것과 같이 이들의 인슐린 단백질을 적당한 분비 과립으로 패키징해야만 하는 것으로 추정되었다. β 세포는 초기에 할로(halo)를 갖는 담회색이고 광 할로와 함께 암색의 결정화된 다각형 과립으로 추가로 성숙한 분비 과립으로 인슐린을 패키징한다(도 9a). 줄기 세포로부터 생성된 INS+ 세포의 이전의 연구는 이들 세포가 단지 폴리호르몬 및 알파형 과립을 갖고 이것은 암색 할로와 함께 독특하게 둥근 과립임을 밝혔다(문헌참조: D'Amour et al., 2006; Kroon et al., 2008). 이들 결과는 단지 비정상적의 폴리호르몬 및 알파형 과립 및 있더라도 적은 β 세포 과립을 갖는 INS+ 세포를 생성하는 대조군 프로토콜에 대한 개요를 설명한다(도 9a). 한편, 본원에 기재된 방법은 인슐린 단백질을 원형 β 세포 과립으로 패키징하고 결정화하는 SC-β 세포를 생성시켰다(도 9a). 인슐린 과립 및 성숙한 결정화된 인슐린 과립 둘다의 전개가 1차 사람 β 세포 및 SC-β 세포 둘다에서 관찰되었다(도 9b). 이들 과립의 단백질 함량을 확인하기 위해, 면역골드 표지화는 인슐린 및 글루카곤에 대한 입자와 함께 수행하였다. PH 세포 과립은 비정상적으로 인슐린과 글루카곤 단백질 둘다를 함유하는 반면, 1차 사람 β 세포 및 SC-β 세포 과립은 인슐린만을 함유하였다(도 9c). 따라서, SC-β 세포의 초미세구조는 성인 사람 β 세포의 구조를 반영한다.
- [0611] *시험관내 hiPSC로부터 포도당 감지 인슐린 분비 β 세포의 생성*
- [0612] 상기 논의된 바와 같이 hPSC로부터 기능성 β 세포를 발육시키기 위해 사용되는 새로운 분화 프로토콜은 시험관내 hiPSC 세포주로부터 기능성 β 세포를 생성하기 위해 추가로 사용하였다. 상기 hiPSC 세포주는 비-당뇨병 또는 1형 당뇨병 환자로부터 추출하여 성장시킨 피부 섬유아세포와 함께 하바드 iPSC 코어에서 생성시켰다. 배아로부터 생성된 hPSC 세포주와는 대조적으로 hiPSC 세포주는 사람 조직으로부터 생성되었고 이는 기능성 β 세포가 질환을 갖는 환자, 즉 1형 당뇨병을 갖는 환자로부터 직접 발육될 수 있음을 보여준다.
- [0613] 상기 수득한 β 세포는 포도당 유발반응에 적용하여 포도당 자극된 인슐린 분비(GSIS)를 반복적으로 수행하는 이들의 능력을 결정하였다. 본원에 기재된 방법을 사용하여 생성된 다중 β 세포는 3개 이상의 연속적으로 고포도당 유발반응에 응답할 수 있는 것으로 밝혀졌다(도 10a-10b). 상기 특정 실험에서, 비-당뇨병 세포주로부터 유래된 hiPSC-β 세포(1013-3FA)는 1형 당뇨병 세포주(1031SeVA)로부터 유래된 hiPSC-β 세포와 비교하였다. 고포도당(20mM) 및 저포도당(2mM)에서 분비된 인슐린 비율에 의해 계산된 바와 같은 자극 지수는 1형 당뇨병 세포주로부터 유래된 β 세포와 비교하여 비-당뇨병 세포주로부터 유래된 β 세포에 대해서 보다 컸다. 추가로, 2mM 또는 20 mM 포도당 유발반응에 반응하여 세포당 분비된 인슐린의 양은 비-당뇨병 세포주로부터 유래된 β 세포에 대한 것 보다 1형 당뇨병 세포주로부터 유래된 β 세포에 대해서 보다 컸다. 종합해 보면, 이들 데이터는 1형 당뇨병 세포주로부터 유래된 hiPSC-β 세포의 시험관내 기능이 비-당뇨병성 세포 대응물과 유사함을 시사한다.
- [0614] hiPSC-β 세포가 시험관내에서 포도당에 반응함을 관찰한 후, 이어서 본 발명자는 비-당뇨병 및 1형 당뇨병 세포 집단이 단백질 발현, 유전자 발현 및 초미세구조에 의해 얼마나 유사한지를 분석하였다. 3개의 상이한 비-당뇨병 세포주 및 3개의 상이한 1형 당뇨병 세포주를 사용하여 NKX6-1/C-펩타이드의 발현을 결정하였다. hPSC를 사용한 경우에서와 같이, 이들 hiPSC-β 세포는 정상적의 β 세포 마커 PDX1 및 NKX6-1 둘다를 발현하였다(도 11a-11f). 유동 세포측정 정량은 본원에 기재된 방법이 파산적 사람 섬에서 발견되는 %와 유사하게 약 40%의 NKX6-1/C-펩타이드를 생성할 수 있음을 밝힌다(도 5d).
- [0615] *이식 후 생체내 줄기 세포-유래된 β 세포 기능*
- [0616] 따라서 지금까지 기재된 데이터는 시험관내 기능성 사람 β 세포의 생성과 일치한다. 생체내 기능하는 이들의 능력을 추가로 시험하기 위해, 이들 세포는 면역손상된 마우스(도 12a-12d 및 표 S1)의 신장 캡슐하에 이식하였다.

표 S1. SC-β 세포, 알파 β 세포, 및 PH 세포로 이식된 마우스의 혈청으로부터 인간 인슐린의 ELISA 측정

세포형	ms#	인간 인슐린 (μIU/mL)		세포형	ms#	인간 인슐린 (μIU/mL)		세포형	ms#	인간 인슐린 (μIU/mL)	
		0'	30'			0'	30'			0'	30'
SC-β 세포	1	2.2	1.1	1* β 세포	1	1.1	2.8	PH 세포	1	nd	0.4
	2	8.1	2.5		2	1.4	2.0		2	nd	0.1
	3	1.8	4.0		3	0.5	2.4		3	nd	0.1
	4	1.3	3.2		4	0.7	1.4		4	nd	0.4
	5	2.1	2.4		5	1.1	1.7		5	nd	0.4
	6	nd	8.5		6	-0.4	-0.1		6	0.1	0.1
	7	nd	7.5		7	1.4	3.9		7	0.2	0.2
	8	nd	5.9		8	nd	5.1 *		8	0.0	0.3
	9	nd	5.9		9	nd	13.0 *		9	0.0	-0.2
	10	nd	2.9		10	nd	5.1 *		10	0.5	1.2
	11	1.4	5.3		11	nd	1.5 *		11	nd	0.7
	12	1.7	2.6		12	nd	4.4		12	nd	1.0
	13	2.3	4.3		13	nd	7.0		13	nd	1.6
	14	0.9	1.4		14	nd	2.2		14	nd	1.1
	15	nd	3.3		15	nd	3.2		15	0.3	0.6
	16	nd	3.5		16	nd	3.9		16	0.1	0.2
	17	nd	4.3		17	1.0	0.6		17	2.6	0.1
	18	nd	3.2		18	0.9	1.7				
	19	nd	45.0 #		19	5.9	2.6				
	20	nd	36.1 #		20	1.6	2.3				
	21	nd	14.8 #		21	1.0	1.7				
	22	nd	67.5 #								
	23	nd	57.7 #								
	24	nd	3.0								
	25	nd	2.8								
	26	nd	5.6								
	27	nd	7.5								
	28	nd	7.8								
	29	nd	6.4								
	30	5.0	11.4								
	31	4.3	5.1								
	32	3.8	2.5								

ndnd 미측정

최종 단계 동안에 2주 동안 시험관 내에서 배양됨; 1주 동안에 배양된 모든 다른 SC-β 세포

[0617]

[0618]

성인 사람 섬이 이식되는 경우, 사람 인슐린은 2주 이내에 이들 마우스의 혈청에서 검출가능하다. 역으로, 이전에 공개된 췌장 선조체가 마우스로 이식되는 경우, 이식 후 2주째에 어떠한 인슐린도 검출되지 않았다(문헌참조: Kroon et al., 2008; Schulz et al., 2012; Rezanian et al., 2012). 대신, 세포는 3 내지 4 개월 길게 불량하게 이해된 생체내 성숙 단계를 요구한다. 한편, 사람 섬처럼 SC-β 세포는 이식한지 2주 이내에 포도당 유발반응에 응답하여 고수준의 인슐린을 숙주 혈류로 분비한다 (도 12a). 대조군으로서, 본원 발명자는 또한 이전에 공개된 프로토콜을 사용하여 생성된 PH 세포를 이식하였고, 이들 세포는 생체내 포도당에 응답하여 상당한 인슐린 수준을 분비하지 않는 것으로 밝혀졌다(도 12a). 더욱이, 또한 생성된 췌장 선조체가 이전에 공개된 바와 같이 2주 이내에 감지할만한 생체내 인슐린을 생성하는데 실패한 것으로 확인되었다 (도 12c).

[0619]

실제 β 세포가 아닌 일부 인슐린 생산 세포는 반응성 β 세포 보다 차라리 인슐린 펄스처럼 기능하는, 동물의 혈류로 비조절된 방식으로 인슐린을 분비할 수 있다. SC-β 세포가 고수준의 인슐린을 분비하는지 기능적 반응성 방식으로 작용하는지를 시험하기 위해, 급성 포도당 유발반응 전후 둘다에서 마우스의 혈류에서 사람 인슐린의 양을 측정하였다. 사람 섬 이식체 및 SC-β 세포 이식체 둘다에 대해, 시험된 12마리의 마우스 중 9마리는 기능성 포도당이 생체내 이식후 2주째에 인슐린 분비를 자극시킴을 보여주었다(도 12a).

[0620]

최종 생체내 GSIS 유발반응이 수행된 후, 이들 동물을 희생시키고 접목된 신장을 분석용으로 제거하였다. 이들 신장의 조직학적 분절은 신장 캡슐하에 사람 세포의 대형 접목체의 존재를 밝혔다. 이들 접목체의 면역형광 염색은 SC-β 세포 및 사람 섬 접목체가 고수준의 인슐린 발현 세포를 함유함을 보여주었다(도 12b). 또한 상기 INS+ 세포는 또한 기능성 β 세포에 대해 예상된 바와 같이 표준 β 세포 전사 인자 PDX1을 동시 발현하였다. 인슐린 및 글루카곤 염색의 분석은 SC-β 세포가 이식 후 모노호르몬성으로 유지됨을 밝혔다 (도 13a-13b). GCG+ 세포의 최소 집단은 또한 면역형광 및 유동 세포측정 분석에 의해 관찰된 바와 같은 상기 프로토콜에서 생성되고(도 7 및 도10) 이들 세포는 또한 이식 후 생체내에서 관찰된다(도 13).

[0621]

시험관내 인슐린 분비가, 배지, 특히 Alk5 억제제 및 T3 호르몬을 함유하는 보충된 CMRL 배지가 마지막 분화 단계에서 사용된 경우 시간 경과에 따라 시험관내 증가됨이 추가로 관찰되었다. 따라서, SC-β 세포는 추가의 주(상기 마지막 단계 배지에서 1주 대신 2주) 동안 시험관내 배양하고 이들이 또한 생체내에서 보다 인슐린을 분비할지를 알기 위해 관찰하였다. 이들 노화된 세포를 이식한 후, 동일한 수의 이식된 보다 젊은 SC-β 세포 보다 10배 높은 수준의 인슐린이 예상치 않게 관찰되었다(도 12d). 따라서, 사람 SC-β 세포를 사용하여 생체내 성취가능한 인슐린 기능의 수준은 사람 섬의 이식에 의해 성취된 것과 유사하였다. 함께 종합해보면, 이들 이식 데이터는 SC-β 세포가 가변적 및 제한된 공급의 공여된 파산적 섬 또는 이식된 줄기 세포 유래된 췌장 선조체로부터 불량하게 이해되고 불량하게 조절가능한 생체내 성숙 기간에 의존하지 않는 세포 이식을 위한 또 다른

임상적 옵션을 제공할 수 있음을 시사한다.

[0622] 배양 배지

[0623] Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC- β 세포로의 시험관내 성숙화를 유도하기 위해, Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포는 충분한 시간 동안 적합한 배양 배지에 유지시킨다. 본 발명에서, 상기 언급된 바와 같이, Alk5 억제제 및 T3 호르몬을 함유하는 CMRL 배지의 사용은 SC- β 세포가 생체내에서 보다 많은 인슐린을 분비하기 위해 시험관내 배양되도록 하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 분화의 마지막 단계(단계 6)에서 추가 인자의 CMRL 배지로의 첨가(도 14a)는 또한 높고 저포도당 유발반응 간의 자극 지수 또는 방출된 인슐린 양에 의한 측정시 SC- β 세포에 의해 보다 우수한 포도당 자극된 인슐린 분비(GSIS) 반응을 생성생성시키는 것으로 밝혀졌다. 상기 추가의 인자는 Sant1, XXI, 및 SSP를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 고포도당(15mM) 및 저포도당(2.5mM)에서 분비되는 인슐린의 비율에 의해 계산된 바와 같은 자극 지수는 단지 CMRL 배지, Alk5 억제제 및 T3 호르몬을 함유하는 CMRL 배지, 또는 Alk5 억제제 및 T3 호르몬을 함유하는 S3 배지에서 유지된 SC- β 세포 보다 Alk5 억제제, T3 호르몬 및 Sant1, XXI 또는 SSP를 함유하는 CMRL 배지에서 유지되는 SC- β 세포에 대해서 보다 컸다(도 14b). 추가로, 분비된 인슐린의 양은 단지 CMRL 배지, Alk5 억제제 및 T3 호르몬을 함유하는 CMRL 배지, 또는 Alk5 억제제 및 T3 호르몬을 함유하는 S3 배지에서 유지되는 SC- β 세포 보다 Alk5 억제제, T3 호르몬 및 Sant1, XXI 또는 SSP를 함유하는 CMRL 배지에서 유지된 SC- β 세포에 대해서 컸다(도 14c). 이를 종합해보면, 이들 데이터는 SC- β 세포를 Pdx1-양성, NKX6-1-양성, 인슐린-양성 내분비 세포 중 적어도 일부의 SC- β 세포로의 성숙화를 유도하기 위한 최종 분화 단계에서 중요한 CMRL 배지에 SC- β 세포를 유지할 뿐만 아니라 Sant1, XXI, 또는 SSP와 같은 특정 인자의 CMRL 배지로의 추가의 첨가가 세포의 포도당 자극된 인슐린 분비(GSIS)를 증진시킴을 시사한다.

[0624] 세포의 생존 및 기능 증진

[0625] 줄기 세포 분야를 위한 한가지 과제는 약물 스크리닝, 질환 모델링 또는 치료학적 용도를 위해 유용할 수 있는 충분한 양의 SC- β 세포를 생성시키는 것이다. 예를 들어, hES 세포는 배양하기가 기술적으로 어렵고, 세포 탈착 및 분리시 아포토시스에 취약하고, 특히 완전한 분리 후 대량 세포사를 진행하고 낮은 클로닝 효율을 갖는다(문헌참조: Watanabe, K. et al., Nature Biotechnology 25, 681 - 686 (2007)). 결과로서, 생성된 생존 SC- β 세포의 양은 낮을 수 있다. 도 15a에 나타난 방식으로 단계 3과 6 간의 프로토콜을 변형시킴에 의해, 보다 순수한 NKX6.1+ 내분비 클러스터가 생성되고(도 15b) 치료학적으로 유용할 수 있는 보다 많은 SC- β 세포를 유도할 수 있다.

[0626] 단계 3-5에서, 예를 들어, 세포 생존은 rho-관련된 단백질 키나제 억제제 또는 Rock 억제제를 첨가함에 의해 개선될 수 있다. Rock 억제제의 첨가가 분리-유도된 아포토시스를 차단함에 따라서 이들의 클로닝 효율을 증가시킴에 의해 ES 세포의 생존을 증진시키는 것으로 사료된다(문헌참조: Watanabe et al.). Rock 억제제의 예는 Y-27632, Fasudil/HA1077, 및 H-1152를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 세포의 Rock 억제제로의 치료는 세포 생존을 개선시키는 것으로 나타났다(도 15c).

[0627] Rock 억제제로 세포를 처리하는 것 뿐만 아니라, 단계 3-4에서의 세포는 액티빈 A 단독으로 또는 니코틴아미드와 조합하여 처리될 수 있다. 액티빈 A 및 니코틴아미드는 둘다 세포 생존을 개선시키는 것으로 나타났다. 이들이 세포 생존을 개선시키는 한가지 방식은 만능 줄기 세포에 대한 마커인 SOX2를 약 81%에서 약 47%로 하향 조절함에 의한 것이다(도 15d). SOX2 및 NKX6-1은 상호 배타적이지만(도 15e), SOX2의 하향 조절은 성숙한 췌장 β 세포에 대한 마커인 NKX6-1의 상향조절을 유도한다.

[0628] 단계 5-6에서, 세포 생존은 세포를 스타우로스포린으로 처리함에 의해 추가로 증진될 수 있다. 스타우로스포린은 뉴런, 신경교종 및 줄기 세포형 신경구 분화의 활성화제인 것으로 공지되어 있고 또한 아포토시스를 유도하는 것으로 사료된다(문헌참조: Schumacher, et al., Mol. Cell. Neurosci. 2003; 23(4): 669-680). 본 발명에서, 스타우로스포린의 첨가는 췌장 내분비 세포 마커인 크로모그라닌 A, 의 %를 증가시키고(도 15f) NKX6-1.C-펩타이드+ 세포의 %를 증가시킴에 의해(도 15g) 거의 순수한 내분비 집단을 유도하였다.

[0629] 최종적으로, 세포 생존은 세포를 Alk5i, XXI와 조합된 T3, β 세포 성숙을 개선시키는 γ -세크레타제 억제제를 함유하는 배양 배지로 세포를 처리함에 의해 추가로 증진될 수 있다. 도 15h 및 15i에 나타난 바와 같이, 단계 5 및 6에서 XXI의 배지로의 첨가는 뉴로D1+ 집단을 증가시킬 수 있다.

[0630] 이를 종합해보면, 이들 데이터는 프로세싱 전반에 걸쳐 다양한 단계에서 특정 화합물의 세포로의 첨가는 세포 생존을 개선시키고 또한 치료학적으로 유용한 SC- β 세포로 분화될 수 있는 세포 집단을 집적시키는데 중요함을

시사한다.

[0631] 해독 생물학을 위한 SC-β 세포의 용도

[0632] 줄기 세포 분야를 위한 주요 유발반응은 약물 스크리닝, 질환 모델링 또는 치료학적 용도를 위해 유용한 것으로 이들의 정상적으로 개발된 대응물에 충분히 유사한 분화된 세포 유형을 생성시키는 것이다. 본원에 논의된 바와 같은 새로운 분화 프로토콜을 사용하여 생성된 SC-β 세포는 1차 사람 β 세포와 유사한 방식으로 시험관내 및 생체내 둘다에 기능하는 것으로 나타난다. 따라서, 이들 세포는 해독 의학을 위해 유용할 수 있는 것으로 추정되었다(도 16a).

[0633] 2형 당뇨병을 치료하기 위해 가장 통상적인 치료학적 전략 중 하나는 경구 항-당뇨병 약물의 투여이다. 많은 이들 약제학적 제제는 인슐린 분비를 증가시키기 위해 β 세포에 대해 직접 작용한다. 예를 들어, 설폰닐우레아 약물은 칼륨 채널을 차단시킴을 통해 내인성 인슐린의 분비를 증가시킨다(문헌참조: Modi, 2007). β 세포에 대한 현재 약물 스크리닝은 설치류 섬, 형질전환된 세포주 또는 고도로 가변성 및 제한된 파산적 사람 섬의 공급원으로 제한된다. 설치류 대사가 단지 부분적으로 사람 대사를 모방하는 경우, 분석을 위한 사람 β 세포의 일관된 공급원은 매우 가치가 있다. 여기서, 본원 발명자는 SC-β 세포가 시험관내 치료학적 스크리닝을 위해 사용될 수 있는지를 조사하였다.

[0634] 먼저, 본원 발명자는 SC-β 세포가 여러 상이한 부류로부터 기원하는 기존의 항-당뇨병 약물에 응답하는지를 시험하였다(도 16b). LY2608204는 임상적 시험에서 글루코키나제 활성화제이고 리라글루티드, 톨부타미드 및 나테글리니드는 각각 임상적으로 사용된 GLP-1 효능제 및 분비체(설폰닐우레아 및 메글리티니드)의 예이다(문헌참조: Matschinsky, 2009; Modi, 2007; Vetere et al., 2014). 실제로 SC-β 세포는 포도당 유발반응 후 시험관내 인슐린 분비를 증가시킴에 의해 이들 약물을 사용한 치료에 반응하는 경향을 보여주었다(도 16c). 이들 데이터는 SC-β 세포가 추가의 약물 스크리닝을 위한 신규 플랫폼을 제공할 수 있는 관념의 초기 증거를 제공한다.

[0635] 이어서, 본원 발명자는 SC-β 세포가 β 세포 복제를 모델링할 수 있는지를 시험하였다. 환자의 β 세포 매쓰의 증가는 β 세포당 생성되는 인슐린의 양을 증가시킬 필요 없이 총체적으로 보다 많은 인슐린을 생성함에 의해 당 조절을 개선시킬 수 있다. 지금까지, 거의 소수이지만 설치류 또는 세포주 모델에서 β 세포 복제를 촉진시키는 임의의 약물은 사람 β 세포로 해독되었다. β 세포 복제의 호르몬 조절은 프롤락틴 처리를 사용한 사람 임신 및 설치류 연구에서 섬 매쓰의 연구를 통해 제안되었다(문헌참조: Parsons et al., 1992; Labriola et al., 2007; Brelje et al., 2004). 본원 발명자는 프롤락틴을 사용한 치료가 SC-β 세포 집단에서 β 세포 복제를 증가시킬 수 있는지를 시험하였다. 프롤락틴과 함께 SC-β 세포를 배양한 후 세포를 염색하고 C-펩타이드 및 증식 마커 Ki67에 대해 고정시켰다(도 16d 및 16e). 1차 사람 β 세포와 같이, Ki67+ 증식 SC-β 세포의 기본 수는 매우 낮았다($0.20 \pm 0.08\%$ Ki67+/C-펩타이드+) (도 16f). 비처리되고 프롤락틴-처리된 세포의 정량은 프롤락틴의 증가된 증식 다운스트림 쪽으로의 경향($0.39 \pm 0.08\%$ Ki67+/C-펩타이드+)을 밝혔다, 이는 SC-β 세포가 복제 스크리닝에서 증식 신호에 응답할 수 있음을 시사한다(도 16f).

[0636] 최종적으로, 본원 발명자는 SC-β 세포가 직접적으로 당뇨병을 치료하기 위한 세포 치료요법으로서 유용할 수 있는지를 조사하였다. 2형 당뇨병과 같지 않게, 새로운 약제를 통한 β 세포 기능 또는 β 세포 복제의 증가는 췌장 β 세포가 자가면역 공격에 의해 파괴된 1형 당뇨병을 갖는 환자에 거의 치료학적 이득을 갖지 않을 가능성이 높다. 이들 환자는 에드몬톤 이식 프로토콜을 통해 소실된 β 세포를 공여자 타생 섬으로 대체함에 의해 효과적으로 치료될 수 있다(문헌참조: Shapiro et al., 2006).

[0637] 이러한 종류의 중증 당뇨병의 한가지 유용한 모델은 아키타(Akita) 마우스이다. 아키타 마우스는 단백질 미스폴딩, 완전하고 비가역적 β 세포 부전증 및 진행적으로 보다 중증의 고혈당증을 유도하는, 인슐린 유전자에 돌연변이를 함유한다. 아키타 마우스는 신장 캡슐로의 마우스 또는 사람 섬 이식을 통해 정상혈당증으로 회복될 수 있다(문헌참조: Pearson et al., 2008). 따라서, 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 SC-β 세포는 이들이 또한 당뇨병 고혈당증을 조절하는 기능이 있는지를 알기 위해 시험하였다. 상기 결과는 이전의 프로토콜의 PH INS+ 세포가 아닌 젊은 아키타 마우스로의 SC-β 세포의 이식이 이들 동물에서 관찰된 진행적으로 악화된 고혈당증을 역전시킴을 보여주었다(도 16g). SC-β 세포가 이식된 마우스의 단식의 혈당 측정은 평균적으로 200mg/dl의 미만이고 반면, 조절 PH 세포가 이식된 것들은 비-이식된 아키타 마우스에 대해 관찰된 바와 같이 상기 400mg/dl의 진행적으로 보다 고혈당 수준을 보여주었다(도 16g)(문헌참조: Pearson et al., 2008). 예상된 바와 같이, 사람 인슐린 수준은 SC-β 세포 이식된 동물에서 높았고 PH 세포 이식된 대조군 동물에서 거의 검출가능하지 않았다(도 16h). SC-β 세포로 이식된 마우스는 또한 정상화된 인슐린 기능을 지적하는, 대조군

마우스 보다 우수한 체중 유지를 보여주었다(도 17). 따라서, SC-β 세포는 인슐린을 분비할 수 있고 거의 이식 직후 당뇨병 마우스 모델에서 진행성 고혈당증을 역전시킬 수 있다.

[0638] 토론

[0639] 본원에 기재된 연구는 기능성 사람 β 세포가 시험관내 hPSC 및 hiPSC로부터 직접 생성될 수 있음을 입증한다. 총체적으로, 본원에 기재된 데이터는 이들 세포(즉, SC-β 세포)는 이식 후 시험관내 및 생체내 둘다에서 1차 사람 β 세포와 유사하게 기능함을 입증한다. 본원에 기재된 방법에 따라 생성된 SC-β 세포는 β 세포 연구 및 치료를 위해 여러 새로운 기회를 제공한다. 환자 특징 또는 분리 및 극소량의 시험관내 사람 β 세포 복제로 인한 샘플 간의 높은 가변성인 공여된 파산적 섬의 제한된 공급은 지금까지 사람 β 세포 공급을 상당히 제한하였다. 상기 제한은 고속 처리 약물 스크리닝 및 질환 모델링 뿐만 아니라 환자에 대한 이식 옵션을 제한하였다. 단일 68 kg (150lb)의 환자는 섬 이식을 통해 1형 당뇨병을 효과적으로 해결하기 위해서는 대략 3억 4천 내지 7억 4천 8백만 개의 이식된 섬 세포를 필요로 한다(문헌참조: McCall and Shapiro, 2012). 본원에 기재된 상기 전략은 효율적이고 고도로 확장가능하여 일시에 수백만개 내지 수십억개의 SC-β 세포를 성장시키기 위한 단일 연구를 통해 수행가능하게 한다. 당뇨병에 대해 이전에 기재된 줄기 세포 유래된 치료요법과 비교하여 SC-β 세포의 주요 임상적 잇점은 이들 세포가 추가의 생체내 분화의 잠재적으로 예측가능하지 않은 "블랙 박스"를 요구하지 않는 세포 치료요법에 대한 첫번째 기회를 제공한다.

[0640] 1차 사람 β 세포와 같지 않게, SC-β 세포는 또한 임의의 목적하는 유전학적 배경의 세포로부터 생성될 수 있다. 당뇨병 또는 다른 대사적 증후군을 갖는 환자 기원의 iPS 세포는 현재 질환 모델링 및 스트레스 또는 면역 공격에 대한 β 세포 기능 또는 민감성의 연구를 위해 유래되거나 SC-β 세포로 분화될 수 있다. TALEN 및 CRISPR과 같은 기술은 게놈 광범위 연합 연구(GWAS)와 같은 유전학적 분석에 의해 동정된 변이체를 혼입하고 시험하기 위해 ES 또는 iPS 세포의 게놈 에디팅을 가능하게 한다. 유사하게, β 세포 약물 반응은 현재 돌연변이체와 비-돌연변이체 β 세포의 유전학적으로 매칭된 쌍간에 비교될 수 있다(문헌참조: Ding et al., 2013). β 세포 기능 또는 약리유전학에 대한 신규 바이오마커의 동정 및 시험은 또한 이들 기술을 조합함에 의해 가능하다. 따라서, SC-β 세포는 대사 및 당뇨병에서 시험관내 약물 발견 및 특징 분석을 위한 신규한 사람-특이적 플랫폼을 제공한다.

[0641] SC-β 세포의 생성은 또한 섬 및 췌장 기관의 향후 생산을 위해 잠재적으로 유용한 단계를 나타낸다. 줄기 세포 유래된 췌장 세포의 배양물로 신경줄기 세포 또는 내피 세포와 같은 췌장 틈새 세포를 혼입하는 것은 이로울 수 있다(문헌참조: Sneddon et al., 2012; Lammert et al., 2001). 다른 증거는 알파 및 델타 세포의 존재가 정상 β 세포 기능의 정확한 튜닝을 위해 중요할 수 있음을 시사한다(문헌참조: Rodriguez-Diaz et al., 2011). 추가로, 췌장 기관의 조직 가공은 잠재적으로 주의깊게 특정된 구조에서 기능적 외분비 및 도관 조직의 혼입을 요구한다. SC-β 세포의 생성은 마구 줄기 세포 생물학을 통한 임상적 영향을 만들기 위한 단계를 나타낸다.

[0642] 실험적 과정

[0643] 세포 배양

[0644] hPSC 세포주는 37°C 배양기, 5% CO₂, 및 100% 습도에서 70rpm의 9-위치 교반 플레이트 세타트 회전 속도상에 위치된 500ml의 교반 플라스크(Corning, VWR; 89089-814)에서 mTESR1 (StemCell Technologies Inc.; 05850) 중에 미분화된 상태로 유지시켰다. 상기 세포주 HUES8은 사용된 1차 세포주였다. 세포는 아쿠타제를 사용하여 분산시키고 단일 세포로서 10uM Y27632(Abcam; ab120129)와 함께 mTESR 중에서 50만/ml로 단일 세포로서 씨딩하였다. mTESR1 배지는 48시간 후 교환하였다(w/o Y27632). 배양물은 클러스터 직경 크기를 < 300 μm로 유지시키기 위해 배지를 교환한 지 24시간 후 나누었다. 배양물은 규칙적으로 병원체, 핵형 및 만능 마커의 유지를 위해 시험하였다.

[0645] 지시된 분화를 위해 사용된 예시적 배지는 다음과 같았다:

[0646] **S1 배지:** MCDB131 (Cellgro; 15-100-CV) + 8mM D-(+)-포도당 (Sigma; G7528) + 2.46g/L NaHCO₃(Sigma; S3817) + 2% FAF-BSA (Proliant; 68700) + ITS-X (Invitrogen; 51500056) 1:50.000 + 2mM 글루타맥스 (Invitrogen; 35050079) + 0.25mM 비타민 C (Sigma Aldrich; A4544) + 1% Pen/Strep (Cellgro; 30-002-CI).

[0647] **S2 배지:** MCDB131 + 8mM D-포도당 + 1.23g/L NaHCO₃ + 2% FAF-BSA + ITS-X 1:50.000 + 2mM 글루타맥스 + 0.25mM 비타민 C + 1% Pen/Strep.

- [0648] **S3 배지:** MCDB131 + 8mM D-포도당 + 1.23g/L NaHCO₃ + 2% FAF-BSA + ITS-X 1:200 + 2mM Glutamax + 0.25mM 비타민 C + 1% Pen/Strep
- [0649] **BE5 배지:** MCDB131 + 20mM D-포도당 + 1.754g/L NaHCO₃ + 2% FAF-BSA + ITS-X 1:200 + 2mM 글루타맥스 + 0.25mM 비타민 C + 1% Pen/Strep + 헤파린 10 μ g/ml (Sigma; H3149).
- [0650] **CMRLS:** 보충된 CMRL 1066 (Mediatech; 99-603-CV) + 10% FBS (HyCloneTM VWR; 16777) + 1% Pen/Strep.
- [0651] 모든 배지는 0.22 μ m 병 담 필터를 통해 필터 멸균시켰다 (Corning). 모든 하기 배지 교환을 위해, 소분자 및 성장 인자를 낮은 광 후드에서 배지 교환 직전 기본 배지에 첨가하였다.
- [0652] SC- β 세포 분화 개시를 위해, 세포는 50만/ml로 씨당하고 분화는 48시간 후 개시하였다. 배지 교환은 다음과 같았다.
- [0653] 1일: S1 + 100ng/ml Activin A (R&D Systems; 338-AC) + 3 μ M Chir99021 (Stemgent; 04-0004-10)).
- [0654] 2일: S1 + 100ng/ml Activin A. 4일, 6일: S2 + 50ng/ml KGF (Peprotech; AF-100-19)).
- [0655] 7일, 8일: S3 + 50ng/ml KGF + 0.25 μ M Sant1 (Sigma; S4572) + 2 μ M 레티노산 (RA) (Sigma; R2625) + 200nM LDN193189 (단지 7일) (Sigma; SML0559) + 500nM PdBU (EMD Millipore; 524390)).
- [0656] 9일, 11일, 13일: S3 + 50ng/ml KGF + 0.25 μ M Sant1 + 100nM RA.
- [0657] 14일, 16일: BE5 + 0.25 μ M Sant1 + 50nM RA + 1 μ M XXI (EMD Millipore; 565790) + 10 μ M Alk5i II (Axxora; ALX-270-445) + 1 μ M L-3,3',5-트리오도티로닌 (T3) (EMD Millipore; 64245) + 20ng/ml β 셀룰린 (Thermo Fisher Scientific; 50932345)).
- [0658] 18일, 20일: BE5 + 25nM RA + 1 μ M XXI + 10 μ M Alk5i II + 1 μ M T3 + 20ng/ml β 셀룰린.
- [0659] 21일 내지 35일 (2일 마다 배지 교환): CMRLS + 10 μ M Alk5i II + 1 μ M T3. 세포는 28일 내지 32일 후 시험관 내 분석에 의해 시험하였다. 세포는 달리 주지되지 않는 경우 28일째에 이식하였다.
- [0660] 대안적으로, 21일 내지 35일: CMRLS + 10 μ M Alk5i II + 1 μ M T3 + Sant1.
- [0661] 대안적으로, 21일-35일: CMRLS + 10 μ M Alk5i II + 1 μ M T3 + XXI.
- [0662] 대안적으로, 21일 내지 35일: CMRLS + 10 μ M Alk5i II + 1 μ M T3 + SSP.
- [0663] 이전의 공보를 모방하기 위해 PH 대조군 세포의 생성을 위해, 동일한 분화 프로토콜은 14일까지 사용하였다. 14일 및 16일째에, 세포에는 S3 + 1 μ M Alk5i II, 200nM LDN193189, 및 100nM RA를 공급하였다(문헌참조: Rezanian et al., 2012). 18일째 및 이후에 세포에는 격일로 S3 + 100nM RA를 공급하였다. 세포는 실험 분석때까지 상기 배지에 유지시켰다. 세포는 배양물 중에 유지시키고 시간의 영향에 대해 조절하기 위해 SC- β 세포로서 분화 배지에서 동일한 일수 후 시험하였다.
- [0664] **유동 세포측정**
- [0665] 세포는 15ml 팔콘 튜브에서 10 내지 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 TrypLE 익스프레스에서 배양함에 의해 단일 세포 현탁액으로 분산시켰다. 단계 5에서 개시하여, 클러스터는 단일 세포로 분리되기 위해서는 보다 긴 시간이 필요하다. 클러스터는 이들이 P1000과 함께 약하게 상하로 피펫팅함에 의한 혼합시 단일 세포로 분리될때까지 TrypLE 익스프레스 유니트와 배양해야 한다. 상기 TrypLE 익스프레스는 3 내지 4배의 배지로 켄칭시키고 세포는 1000rpm에서 5분 동안 회전 하강시켰다. 세포는 PBS 중에서 2회 세척하고 1.7ml Safe seal 미세원심분리 튜브 (Bioscience Inc.; 11510)로 이동시켰다. 튜브 당 1 내지 10개의 mio 세포를 갖는지 확인하고 하기에서 0.5 내지 1ml의 용적을 사용한다. 세포는 4% 파라포름알데하이드(PFA) (Electron Microscopy Scienc Nm; 15710)에서 재현탁시키고 30분 동안 빙상에서 배양하였다. 세포는 이어서 PBS에서 3회 세척하고 이어서 차단 완충제(PBS + 0.1% TritonX100 (VWR; EM-9400) + 5% 당나귀 혈청(Jackson Immunoresearch; 017-000-121))에서 1시간 동안 빙상에서 배양한다. 고정 후, 세포는 원심분리에 보다 내성이고 고정 후 모든 원심분리는 3분 동안 3000g에서 수행하였다. 세포는 이어서 1차 항체와 함께 차단 완충액 중에서 재현탁시키고 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다.
- [0666] 1차 항체는 달리 주지되지 않는 경우 1:300으로 사용하였다: 염소 항-사람 PDX-1/IPF1 (R&D Systems; AF2419), 마우스 항-NKX6-1 (University of Iowa, Developmental Hybridoma Bank; F55A12-supernatant) (1:100), 토끼

항-크로모그라닌 A (Abcam; ab15160), 래트 항-인슐린 (pro-)/C-펩타이드 (Developmental Studies Hybridoma Bank at the University of Iowa; GN-ID4) (글루카곤 및 소마토스타틴을 첨가할 필요가 있음). 세포는 차단 완충액 중에서 2회 세척하고 이어서 2시간 동안 빙상에서 (광으로부터 보호된) 2차 항체와 차단 완충액 중에서 배양하였다. Alexa Fluor 488, 647 (Life Technologies) 또는 PE (Thermo Fisher Scientific; NC9774252)에 접합된 2차 항체를 사용하여 1차 항체를 가시화하였다. 세포는 이어서 분류 완충액 (PBS + 0.5% BSA (Sigma; A8412)) 중에서 3회 세척하고 최종적으로 500-700 μ l 분류 완충액에 재현탁시키고, 40 μ m 나일론 매쉬를 통해 FACS튜브 (BD Falcon; 352235)로 여과하고, LSR-II FACS 기계 (BD Biosciences)를 사용하여 분석하고 적어도 30,000건이 기록되었다. 상기 결과 분석은 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0667] 면역형광

[0668] 세포를 분산시키고 96웰 플레이트 상에 분주하였다. 배양 1일 후, 세포는 PBS 중에서 세척하고 20분 동안 RT에서 4% PFA에서 고정시켰다. PBS를 사용한 3회 세척 후, 세포는 PBS + 0.1% Triton X-100 + 5% 당나귀 혈청에서 RT에서 1시간 동안 차단시켰다. 모든 1차 항체 배양은 1:500 희석으로 차단 용액에서 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 수행하였다: 염소 항-사람 PDX-1/IPF1, 마우스 항-NKX6-1, 토끼 항-크로모그라닌 A, 래트 항-인슐린 (pro-)/C-펩타이드, Ki67. 세포는 다음날 PBS 중에서 2회 세척하고 이어서 1:500 희석(광으로부터 보호됨)으로 RT에서 1시간 동안 2차 항체로 배양하였다. Alexa Fluor 488, 594 또는 647 (Life Technologies)에 접합된 2차 항체를 사용하여 1차 항체를 가시화하였다. PBS로 3회 세척 후, 모든 핵산은 DAPI (Invitrogen; D1306)로 염색시켜 가시화하였다. 대표적인 이미지는 Olympus IX51 현미경 또는 Zeiss LSC 700 공초점 현미경을 사용하여 촬영하였다. 표적 세포 유형의 %는 어레이 스캔 셀로믹스 고-함량 스크리닝 시스템을 사용하여 정량하였다. 여기서, 30개 이미지는 웰당 획득하고 정량하였다. 항체 스캐닝 및 총 세포 수(DAPI 핵 염색을 기준으로)에 의해 표지된 세포를 정량하여 표적 세포 유형의 %를 획득하였다.

[0669] 면역조직화학

[0670] 세포 클러스터 또는 섬은 1시간 동안 RT에서 4% PFA 중에 침지시켜 고정화시켰다. 샘플은 이어서 PBS로 3회 세척하고, HistogelTM 중에 매립시키고, 조직학적 분석을 위해 절개하였다. 10 μ m 분절은 이어서 Histogel(Thermoscientific; C78-2-G)를 사용하여 탈파라핀화에 적용하고 재탈수시켰다. 항원 구제를 위해 슬라이드를 0.1M EDTA (Ambion; AM9261) 중에 함유시키고 2시간 동안 압력 쿠키 (Proteogenix; 2100 Retriever)에 위치시켰다. 이어서 슬라이드는 1시간 동안 RT에서 PBS + 0.1% Triton X-100 + 5% 당나귀 혈청에서 차단시키고 이어서 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 1차 항체를 사용하여 차단 용액 중에서 배양하였다. 하기의 1차 항체는 달리 주지되지 않는 경우 1:100으로 사용하였다: 염소 항-사람 PDX-1/IPF1, 마우스 항-NKX6-1, 토끼 항-크로모그라닌 A, 래트 항-인슐린(pro-)/C-펩타이드, 글루카곤, 소마토스타틴. 세포는 다음날 PBS 중에서 2회 세척하고 이어서 RT에서 2시간 동안 (광으로부터 보호됨) 2차 항체 배양을 수행하였다. Alexa Fluor 488 또는 594에 접합된 2차 항체를 사용하여 1차 항체를 가시화하였다. PBS로 세척한 후, 상기 조직 슬라이드는 DAPI (Vector Laboratories; H-1200)와 함께 Vectashield 탑재 배지 중에 탑재하고, 커버슬립으로 덮고 네일 폴리쉬로 밀봉하였다. 대표적인 이미지는 Olympus IX51 현미경 또는 Zeiss LSM 510 또는 710 공초점 현미경을 사용하여 촬영하였다.

[0671] 포도당 자극된 인슐린 분비

[0672] Krebs 완충액 (Krb): 128 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.7 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 5 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES (Life Technologies; 15630080), 0.1% BSA (Proliant; 68700)를 갖는 Di H₂O. 용액은 배양기에서 37 $^{\circ}$ C로 균등화시키고 1ml의 용적을 하기의 프로토콜에 사용하였다. 대략적으로 50만개의 세포들을 클러스터로서, 오토클레이빙된 1.7ml의 Safe 밀봉 마이크로원심분리기 튜브로 옮기고 Krb로 2회 세척하였다. 클러스터는 이어서 배양기에서 2시간 동안 2mM 포도당을 함유한 Krb로 예비 배양하여 잔류 인슐린을 제거하였다. 모든 배양에 대해 튜브 뚜껑은 개방시킨 채로 유지시키고 공기 교환을 허용하는 뚜껑으로 덮는 것을 주지할 가치가 있다. 클러스터는 Krb로 2회 세척하고 이어서 정확하게 30분 동안 2mM 포도당을 함유한 Krb로 배양하고 배양 후 200ul의 상등액은 (저포도당 샘플) 수거하였다. 클러스터는 Krb로 2회 세척하고 이어서 정확하게 30분 동안 20mM 포도당을 함유한 Krb로 배양하고 배양 후 200ul의 상등액은 (고포도당 샘플) 수거하였다. 저포도당 및 고포도당을 사용한 유발반응은 2회 추가의 시점에서 반복하였다(총 3개의 쌍을 이룬 유발반응). 최종적으로, 클러스터는 Krb로 2회 세척하고 정확하게 30분 동안 2mM 포도당 + 30mM KCl과 함께 Krb로 배양하고 200ul의 상등액은 배양 (KCl 분극화 유발반응 샘플) 후 수거하였다. KCl 유발반응 후, 클러스터는 Tryple을 사용하여 분산시키고 Viacell(제조업체)로 계수하여 세포 수로 인슐린 분비 양을 정상화시킨다.

- [0673] 분비된 인슐린을 함유하는 상등액 샘플을 이어서 사람 초감도 인슐린 ELISA (ALPCO Diagnostics; 80-INSHUU-E01.1)를 사용하여 프로세싱하고 샘플은 450nm에서 FLUOstar 옵티마 분광측정기(BMG lantech)로 측정하였다. ELISA가 동일한 날짜로 수행되지 않은 경우 샘플은 -80℃에 보관하였다. ELISA 범위 내 인슐린 농도를 얻기 위해 통상적으로 PBS 중 1:100 내지 1:200으로 샘플을 희석하면 충분하였다.
- [0674] 전자 현미경
- [0675] 세포 클러스터를 RT에서 적어도 2시간 동안 0.1M 나트륨 코코딜레이트 완충액(pH 7.4) 중에 1.25% PFA, 2.5% 글루타르알데하이드, 및 0.03% 피크르산을 함유하는 혼합물로 고정화하였다. 이어서 세포 클러스터를 0.1M 카코딜레이트 완충액 중에 세척하고 RT에서 적어도 2시간 동안 1% 오스뮴 테트록사이드 (OsO₄)와 1.5% 칼륨 페로시아니드(KFeCN₆)의 혼합물로 후-고정화시키고, 0.1M 카코딜레이트 완충액 중에서 세척하고 1시간 동안 1% 오스뮴 테트록사이드 (OsO₄)/1.5% 칼륨페로시아니드 (KFeCN₆)로 후고정화시키고, 물로 3회 세척하고 1시간 동안 1% 수성 우라닐 아세테이트 중에서 염색시키고 물에서 2회 세척하고 후속적으로 알코올 등급으로 탈수(각각 10분; 50%, 70%, 90%, 2 x 10분 100%)시켰다. 이어서 상기 샘플은 1시간 동안 프로필렌옥사이드 중에 배양하고 프로필렌옥사이드 및 TAAB Epon (Marivac Canada Inc. St. Laurent, Canada)의 1:1 혼합물에 침투 가동시켰다. 다음날, 상기 샘플은 TAAB Epon 중에 매립하고 48시간 동안 60℃에서 중합시켰다. 초박막 분절(약 60nm)을 Reichert 초절단-S 마이크로톰상에 절단하고, 구리 그리드상에 집어서 올려놓고 0.2% 납 시트레이트로 염색하고 JEOL 1200EX 투과 전자 현미경 또는 TecnaiG2 Spirit BioTWIN로 조사하였다. 이미지는 AMT 2k CCD 카메라로 기록하고 이미지J 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [0676] SCID-베이지 이식 연구
- [0677] 클러스터로서 5백만 개의 hPSC 유래된 세포는 RPMI1640 배지 (Life technologies; 11875-093)에 재현탁시키고, 200ul의 용적으로 PCR 튜브에 분액하고 카테터에 부하 하기 전에 5 내지 10분 동안 빙상에 유지시켰다. 세포 부하물의 제조를 위해, 1mL 주사기에 연결된 각각의 카테터, 주입 세트 23G x ³/₄"(Terumo; SB*S23BL)를 1ml의 5% FBS 혈청(코닝; 35-011-CV) 첨가된 RPMI 배지로 세정하고 이어서 혈청이 첨가되지 않은 0.6ml 의 RPMI 배지를 부하하였다. 클러스터는 실온에서 5분 동안 중력에 의해 카테터 주사기 바늘 상단 부분을 통해 부하하고 카테터 튜빙의 바닥 및 바늘 최정상에 정착하도록 수직으로 놓았다. 세포 제조 단계 동안에, 면역결핍 (SCID/베이지) 마우스 (나이?)를 아베르틴 1.25% (250mg/kg; 0.5ml/25g 1.25% 아베르틴/체중)로 마취시키고, 좌심실 수술 부위를 면도하고 베타딘 및 알코올로 소독하였다. 약 1cm 절개하여 신장을 노출시키고 클러스터는 신장 캡슐 아래에 카테터 바늘을 삽입하고 5백만 개의 균등한 클러스터 세포를 함유하는 약 100ul 용적을 주사함에 의해 신장 캡슐 아래에 주사하였다. 복강은 PDS 흡수가능한 봉합선(POLY-DOX; 2016-06))으로 봉합하고 피부는 수술 클립 (Kent Scientific Corp; INS750346-2)으로 봉합하였다. 마우스는 마취 후 마우스의 신속한 회복을 도와주기 위해 수술/회복 기간 동안에 마이크로-온도 순환 펌프 및 블랭킷(약 37℃) 상에 놓고 수술 후 및 처음 투여 24시간 후 즉시 5mg/mkg 용량의 카르프로펜을 투여하였다. 이식을 위한 평균 시간은 마우스당 대략 3분이다. 상처 클립은 수술한 지 14일 후 제거하고 마우스는 1주에 2회 모니터링하였다.
- [0678] 수술로부터 회복 2주 후, 사람 인슐린의 존재 및 이식된 세포의 포도당 반응성은 포도당 내성 시험(GTT)에 의해 평가하였다. 16시간 동안 밤새 마우스를 단식시킨 후, GTT는 2g D-(+)-포도당/1 kg 체중의 IP 주사 및 란세트 (Featherl 2017-01)를 사용하여 안면 정맥 천공을 통해 주사전 및/또는 주사후의 혈액 수거에 의해 수행하였다. 사람 인슐린은 후속적으로 사람 인슐린 ELISA 키트(ALPCO Diagnostics; 80-INSHUU-E01.1)를 사용하여 정량하였다. 접목체는 SCID 마우스로부터 절개하고 4% PFA (Electron Microscopy Scienc Nm; 15710) 중에 고정화시키고 파라핀에 매립하고 조직학적 분석을 위해 절개하였다.
- [0679] 칼슘 이미징화
- [0680] 약 10 내지 20 hPSC 유래된 클러스터를 매트릭셀로 피복된 96웰 플레이트 상에 분주하고 37℃ 배양기, 5% CO₂, 및 100% 습도에서 24시간 동안 부착되도록 방치하였다. 클러스터는 2.5mM 포도당이 첨가된 예비가온된(37℃) 크랩스 완충액으로 세척하고 이어서 37℃ 배양기에서 45분 동안 2.5mM 포도당 Krb 완충액 중에서 50 μM Ca²⁺-민감성 형광성 프로브 Fluo4-AM (Life Technologies; F14217) 로 배양하였다. 클러스터는 2.5mM 포도당 Krb 완충액으로 세척하고 추가로 15분 동안 37℃ 배양기에서 추가로 배양하였다. 클러스터는 이어서 상이한 웰에서 다중 클러스터 배치의 고해상도 시간 연속 이미지를 획득하기 위해 AxioZoom V16 현미경 (Carl Zeiss)에 배치하였다. Fluo-4는 488nm에서 여기시키고 이의 방출은 490 내지 560nm에서 기록하였다. 시간 연속 이미지는 17초 마다

80x 배율의 단일 세포 해상도로 획득하고 10개 이하의 웰을 1개의 이미지에 이미지화하였다. 이미지화 동안에 포도당 유발반응의 진행 및 자극 시간은 다음과 같았다. 이미지화는 Krb에서 2mM 포도당의 5분 자극으로 개시함에 이어서 Krb 완충액에서 20mM 포도당 5분 자극하였다. 이들 낮고 이어서 고포도당 자극은 2회 이상 반복함에 이어서 이미지화는 Krb 완충액에서 30mM의 5분 자극으로 종료하고 총 이미지화 시간은 35분이었다. 자극 간에, 이미지화는 종료하고 클러스터는 2mM 포도당 Krb 완충액으로 세척하고 이어서 포도당 Krb 완충액을 첨가하였다. 이미지화 35분 동안에 형광 강도의 변화는 이미지화 과정 동안에 클러스터의 이동에 대해 보정하기 위한 StackReg를 적용하고 이미지화 전반에 걸쳐 형광 강도를 측정하기 위한 ROI 매니저를 적용함에 의해 Imagej/Fiji를 사용한 단일 세포 해상도로 분석하였다. 5분 클립의 모든 7회 자극은 데이터 공유를 위해 공개된 유튜브에서 VirtualDub를 사용하여 하나의 무비로 만들었다.

[0681]

세포내 유동 세포측정기 및 유전자 발현 분석

[0682]

MARIS는 문헌[참조: Hrvatin et al., 2014]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 세포는 단일 세포 현탁액으로 수거하고 빙상에서 4% PFA로 고정시키고 1차 항체로 배양함에 이어서 RNasin을 함유하는 완충액에서 1차 항체에 이어서 2차 항체로 배양하였다. 이어서 세포는 FACS로 분류하여 샘플당 적어도 100,000 세포를 획득하였다. 샘플은 이어서 RNA 분리 전에 3시간 동안 50℃에서 분해 완충액 중에서 배양하였다. RNA 농도는 Nanodrop 1000을 사용하여 정량하였다. 이중가닥 cDNA는 적어도 100ng의 총 RNA로부터 역전사에 의해 생성하였다. 증폭된 mRNA (cRNA)는 이어서 비오틴-표지된 뉴클레오타이드로 암색 시험관내 전사에 의해 생성시키고 30℃에서 진공 원심분리에 의해 농축시켰다. 샘플당 적어도 750ng의 cRNA는 전체 게놈 발현 다이렉트 하이브리드화 키트(Illumina)를 사용하여 사람 HT-12 발현 비드칩스(Illumina)에 하이브리드화하였다. 칩은 Illumina Beadstation 500 상에서 스캐닝하였다. 비가공 데이터는 배경 공제 및 랭크 불변 정상화에 의해 조정하였다. 배수 변화를 계산하기 전에, 20의 오프셋을 모든 프로브 세트 수단에 부가하여 네가티브 시그널을 제거하였다. 평균 시그널간의 차이에 대한 p-값은 t-시험에 의해 GenomeStudio에서 계산하고 Illumina 커스텀 폴스 디스커버리 속도(FDR) 모델(Illumina custom false discovery rate (FDR) model)과 함께 벤자미니-호치버그(Benjamini-Hochberg) 방법에 의한 다중 추정 시험에 대해 보정하였다.

[0683]

참조문헌

Aguayo-Mazzucato, C., Zavacki, A.M., Marinelarena, A., Hollister-Lock, J., Khattabi, I.E., Marsili, A., Weir, G.C., Sharma, A., Larsen, P.R., and Bonner-Weir, S. (2013). Thyroid Hormone Promotes Postnatal Rat Pancreatic β -Cell Development and Glucose-Responsive Insulin Secretion Through MAFA. *Diabetes* 62, 1569-580.

Bellin, M.D., Barton, F.B., Heitman, A., Harmon, J., Balamurugan, A.N., Kandaswamy, R., Sutherland, D.E., Alejandro, R., and Hering, B.J. (2012). Potent Induction Immunotherapy Promotes Long-Term Insulin Independence After Islet Transplantation in Type 1 Diabetes. *American Journal of Transplantation* 12, 1576-583.

Brelje, T.C., Stout, L.E., Bhagroo, N.V., and Sorenson, R.L. (2004). Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. *Endocrinology* 145, 4162-175.

Cheng, X., Ying, L., Lu, L., Galvão, A.M., Mills, J.A., Lin, H.C., Kotton, D.N., Shen, S.S., Nostro, M.C., et al. (2012). Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 371-384.

D'Amour, K.A., Agulnick, A.D., Eliazer, S., Kelly, O.G., Kroon, E., and Baetge, E.E. (2005). Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-541.

D'Amour, K.A., Bang, A.G., Eliazer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., and Baetge, E.E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401.

Ding, Q., Lee, Y.-K., Schaefer, E.K., Peters, D., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D., Meissner, T., et al. (2013). A TALEN Genome-Editing System for Generating Human Stem Cell-Based Disease Models. *Cell Stem Cell* 12, 238-251.

Hrvatin, S., O'Donnell, C.W., Deng, F., Millman, J.R., Pagliuca, F.W., Dilorio, P., Rezanian, A., Gifford, D.K., and Melton, D.A. (2014). Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 201400709.

Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience* 25, 4694-4705.

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., and Buch, A. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 480, 547-551.

Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443-452.

[0684]

Labriola, L., Montor, W.R., Krogh, K., Lojudice, F.H., Genzini, T., Goldberg, A.C., Eliaschewitz, F.G., and Sogayar, M.C. (2007). Beneficial effects of prolactin and laminin on human pancreatic islet-cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 263, 120-133.

Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001). Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294, 564-67.

Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27, 2126-135.

Matschinsky, F.M. (2009). Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 8, 399-416.

McCall, M., and Shapiro, A.M.J. (2012). Update on Islet Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007823.

Modi, P. (2007). Diabetes beyond insulin: review of new drugs for treatment of diabetes mellitus. *Curr Drug Discov Technol* 4, 39-47.

Mohammed, J.S., Wang, Y., Harvat, T.A., Oberholzer, J., and Eddington, D.T. (2009). Microfluidic device for multimodal characterization of pancreatic islets. *Lab Chip* 9, 97-106.

Narayanan, K., Lim, V.Y., Shen, J., Tan, Z.W., Rajendran, D., Luo, S.C., Gao, S., Wan, C.A., and Ying, J. (2013). Extracellular matrix-mediated differentiation of human embryonic stem cells: Differentiation to insulin-secreting beta cells. *Tissue Eng Part A* 20, 424-433.

Nostro, M.C., Sarangi, F., Ogawa, S., Holtzinger, A., Corneo, B., Li, X., Micallef, S.J., Park, I.H., Basford, C., et al. (2011). Stage-specific signaling through TGF{beta} family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. *Development* 138, 861-871.

Parsons, J.A., Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459-466.

Pearson, T., Greiner, D.L., and Shultz, L.D. (2008). Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol Chapter 15*, Unit 15.21.

Rezania, A., Bruin, J.E., Riedel, M.J., Mojibian, M., Asadi, A., Xu, J., Gauvin, R., Narayan, K., Karanu, F., et al. (2012). Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-existing Diabetes in Mice. *Diabetes* 61, 2016-029.

Rezania, A., Bruin, J.E., Xu, J., Narayan, K., Fox, J.K., O'Neil, J.J., and Kieffer, T.J. (2013). Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6-1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. *Stem Cells* 31, 2432-442.

[0685]

Rodriguez-Diaz, R., Dando, R., Jacques-Silva, M.C., Fachado, A., Molina, J., Abdulreda, M.H., Ricordi, C., Roper, S.D., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2011). Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat Med* 17, 888-892.

Rutter, G.A., and Hodson, D.J. (2013). Minireview: Intraislet Regulation of Insulin Secretion in Humans. *Molecular Endocrinology* 27, 1984-995.

Schulz, T.C., Lynn, F.C., Young, H.Y., Agulnick, A.D., Babin, M.J., Baetge, E.E., Bang, A.G., Bhoomik, A., Cepa, I., et al. (2012). A Scalable System for Production of Functional Pancreatic Progenitors from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* 7, e37004.

Shapiro, A.M., Ricordi, C., Hering, B.J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R.P., Secchi, A., Brendel, M.D., Berney, T., et al. (2006). International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355, 1318-330.

Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W.Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N.J., Gantz, J., Moyes, K.W., and Reinecke, H. (2012). Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489, 322-25.

Sneddon, J.B., Borowiak, M., and Melton, D.A. (2012). Self-renewal of embryonic-stem-cell-derived progenitors by organ-matched mesenchyme. *Nature* 491, 765-68.

Taylor, B.L., Liu, F.F., and Sander, M. (2013). NKX6-1 Is Essential for Maintaining the Functional State of Pancreatic Beta Cells. *Cell Rep* 4, 1262-275.

Thowfeequ, S., Ralphs, K.L., Yu, W.-, Slack, J.M.W., and Tosh, D. (2007). Betacellulin inhibits amylase and glucagon production and promotes beta cell differentiation in mouse embryonic pancreas. *Diabetologia* 50, 1688-697.

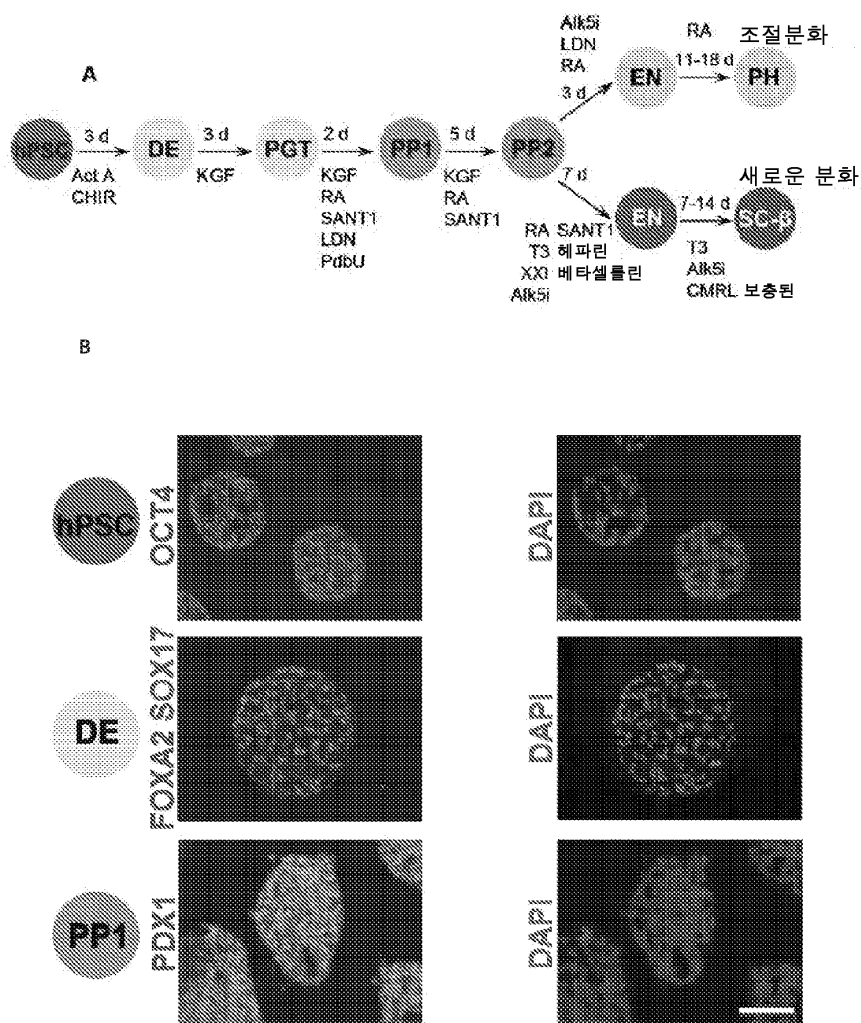
Vetere, A., Choudhary, A., Burns, S.M., and Wagner, B.K. (2014). Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*

Xie, R., Everett, L.J., Lim, H.W., Patel, N.A., Schug, J., Kroon, E., Kelly, O.G., Wang, A., D'Amour, K.A., et al. (2013). Dynamic Chromatin Remodeling Mediated by Polycomb Proteins Orchestrates Pancreatic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 224-237.

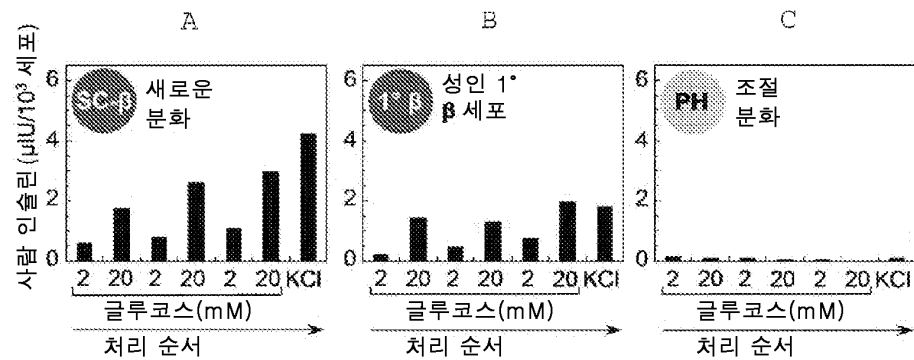
[0686]

도면

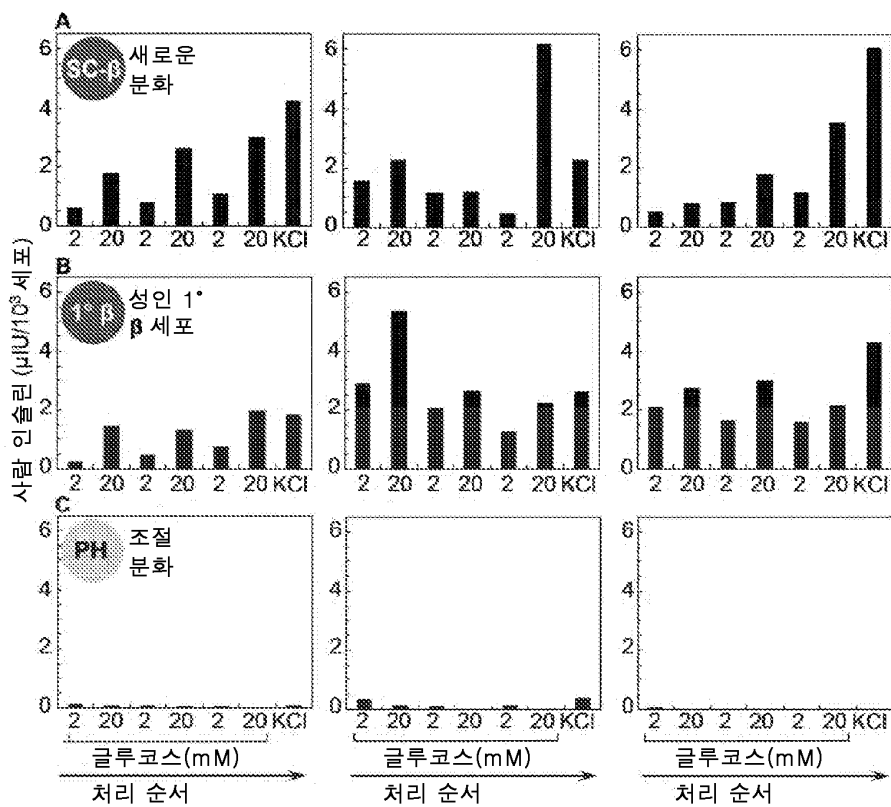
도면1



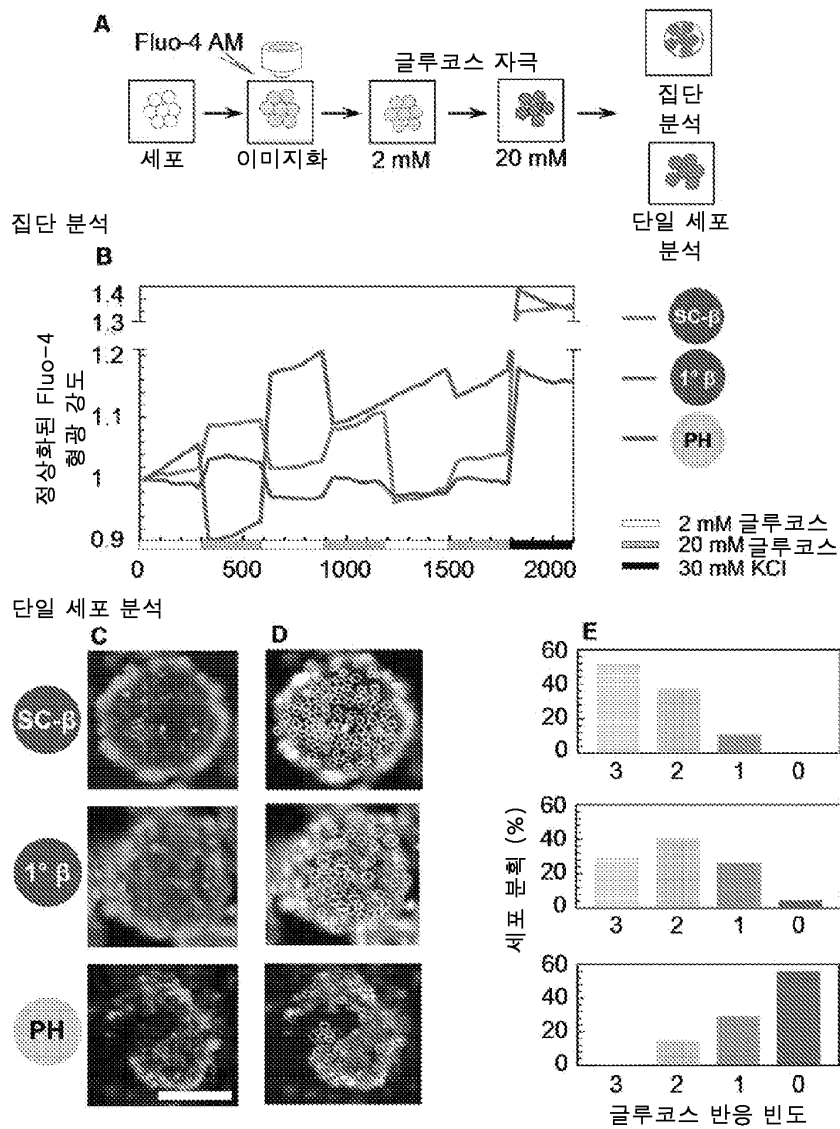
도면2



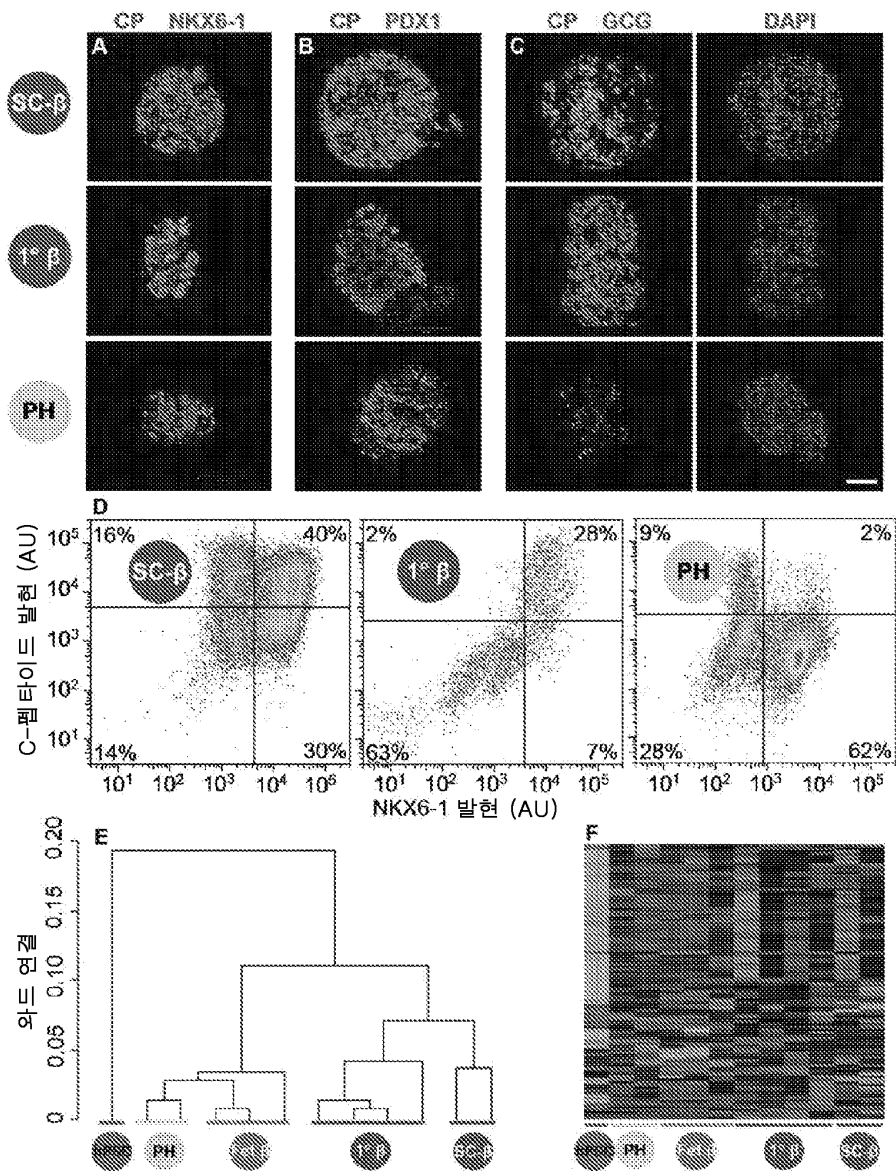
도면3



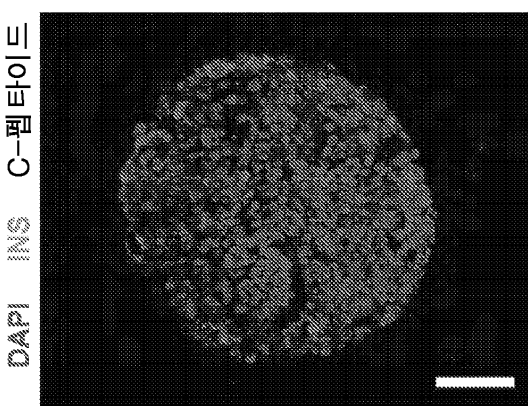
도면4



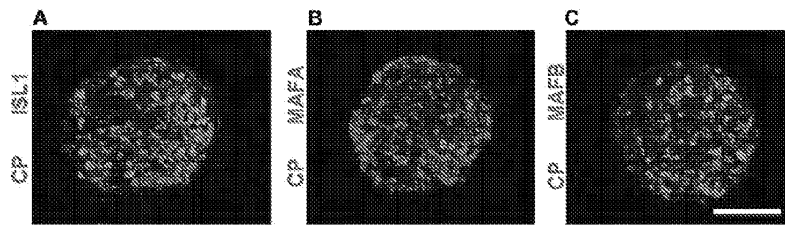
도면5



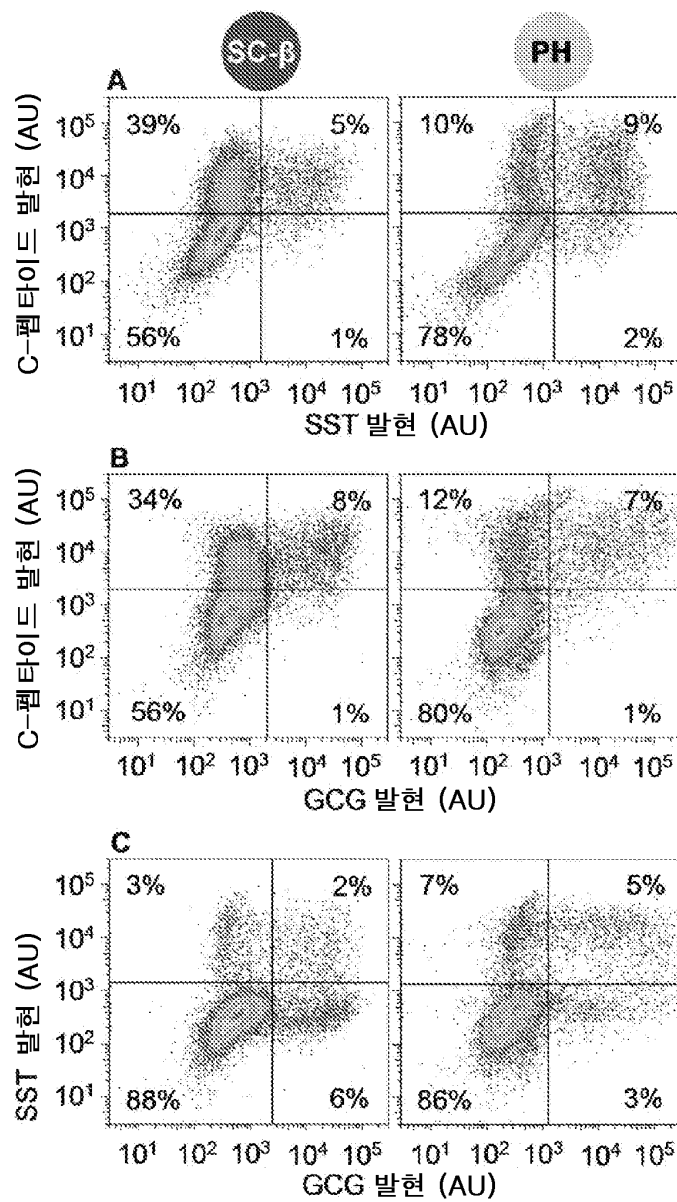
도면6



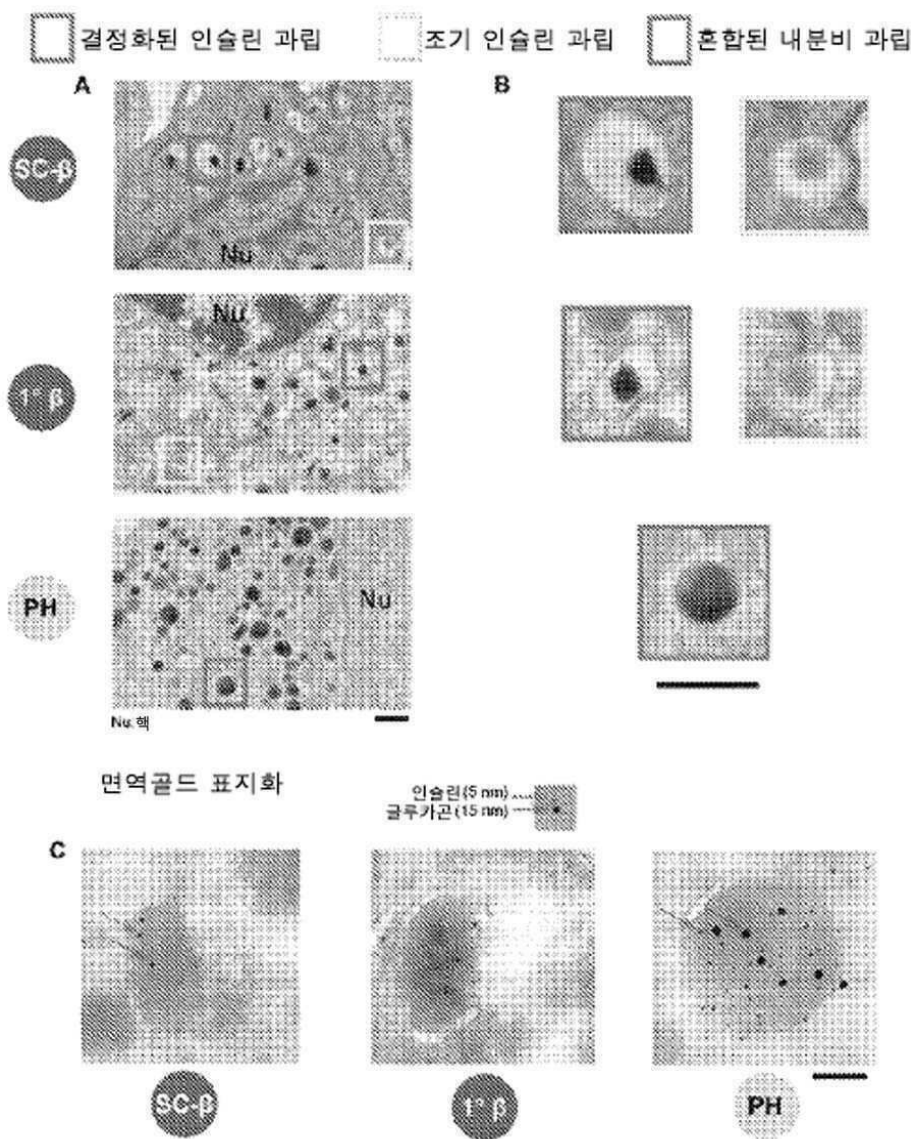
도면7



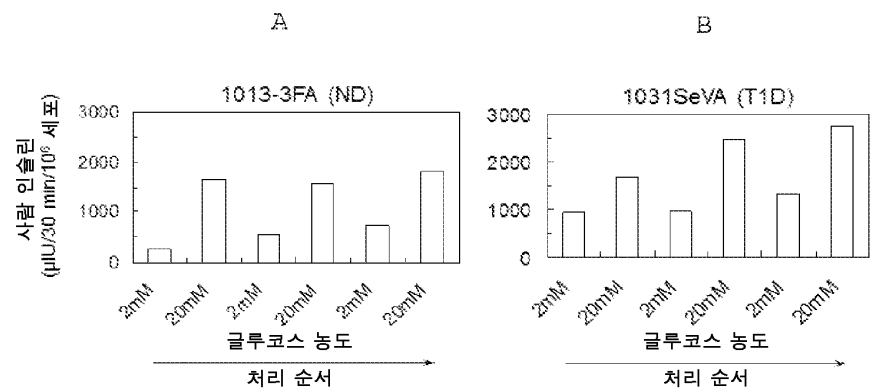
도면8



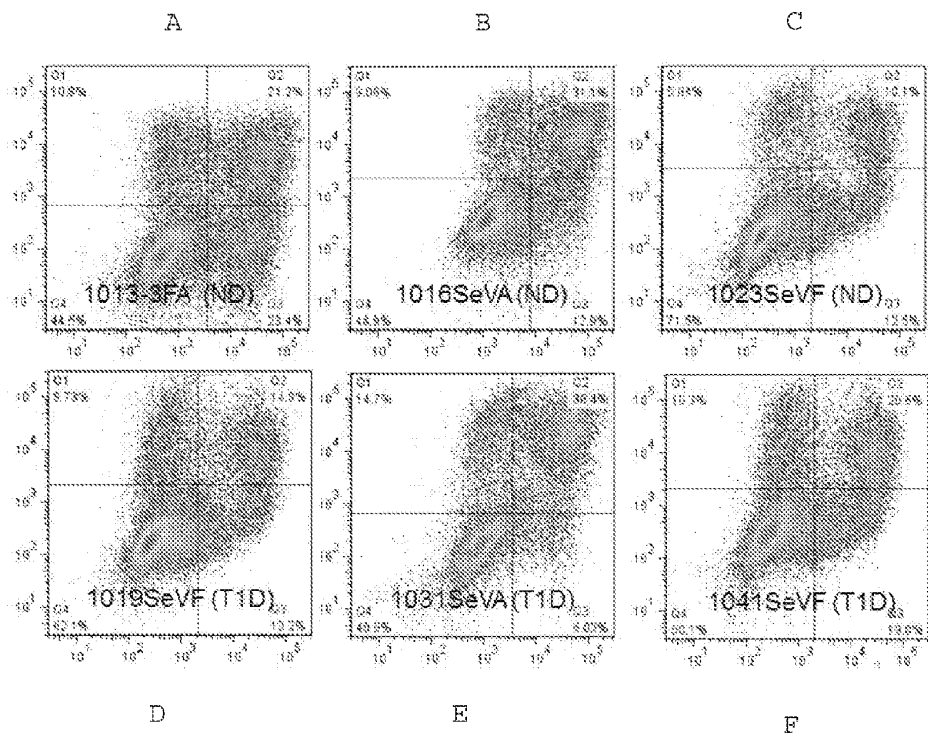
도면9



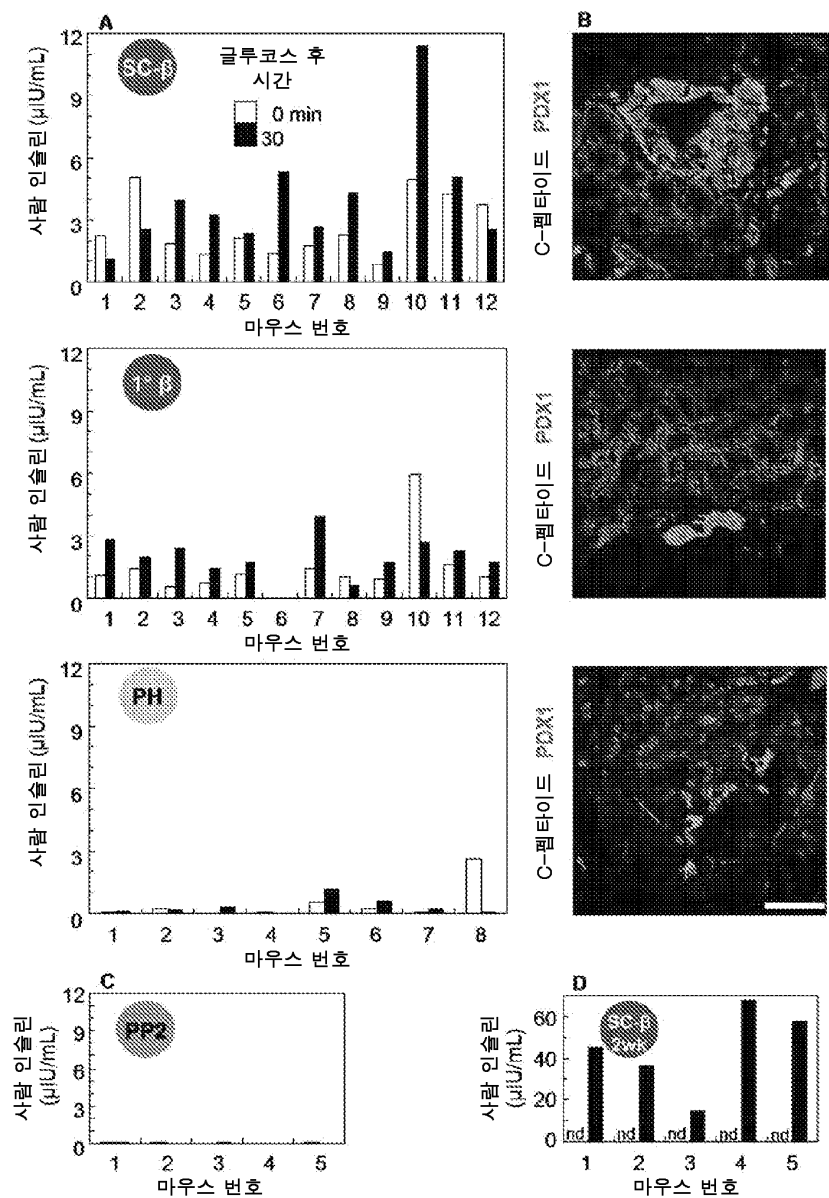
도면10



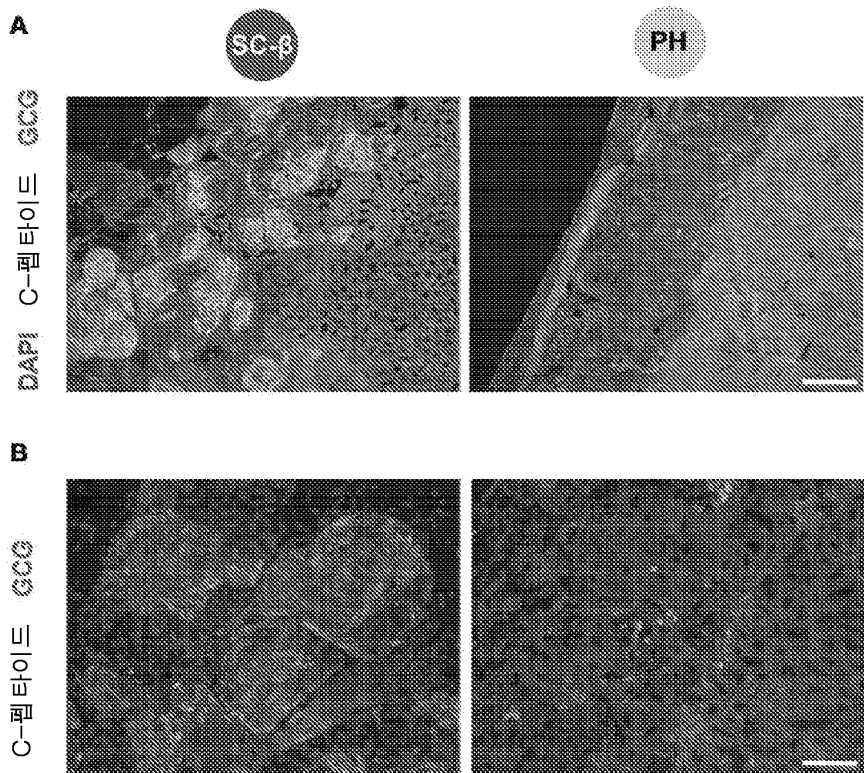
도면11



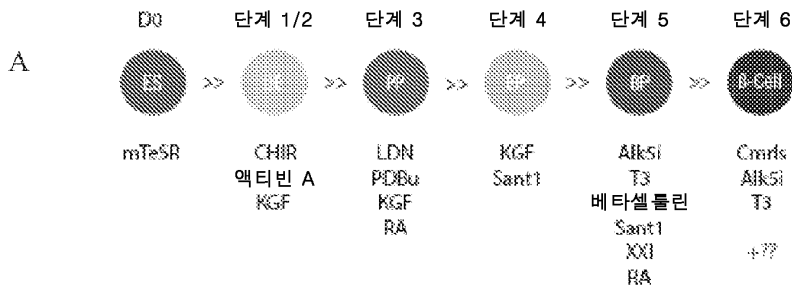
도면12



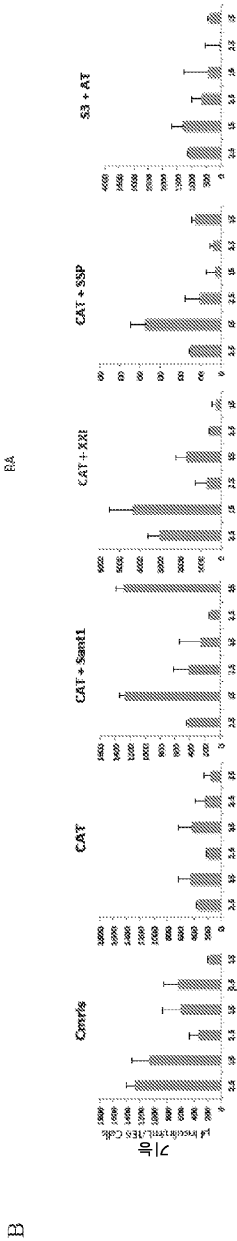
도면13



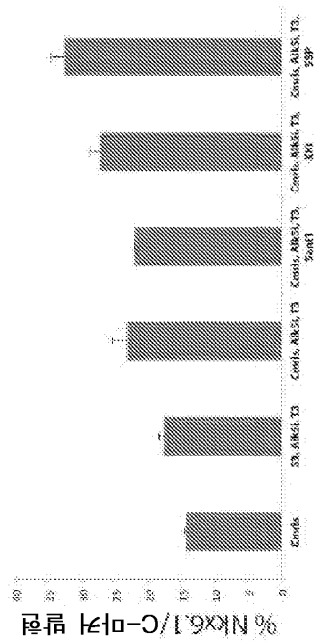
도면14a



도면14b

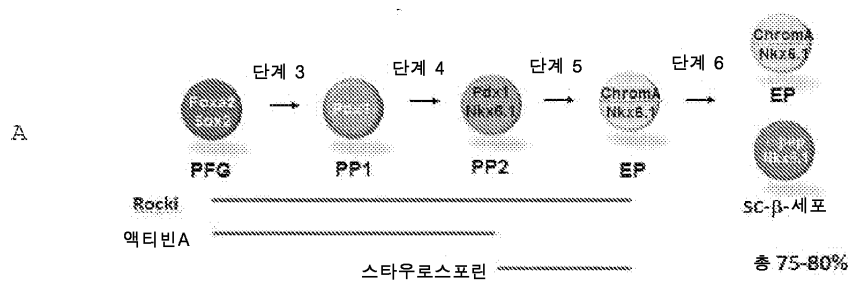


도면 14c

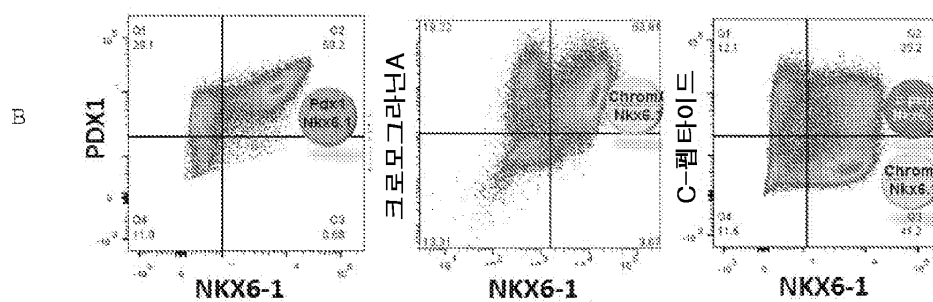


부록 제1호

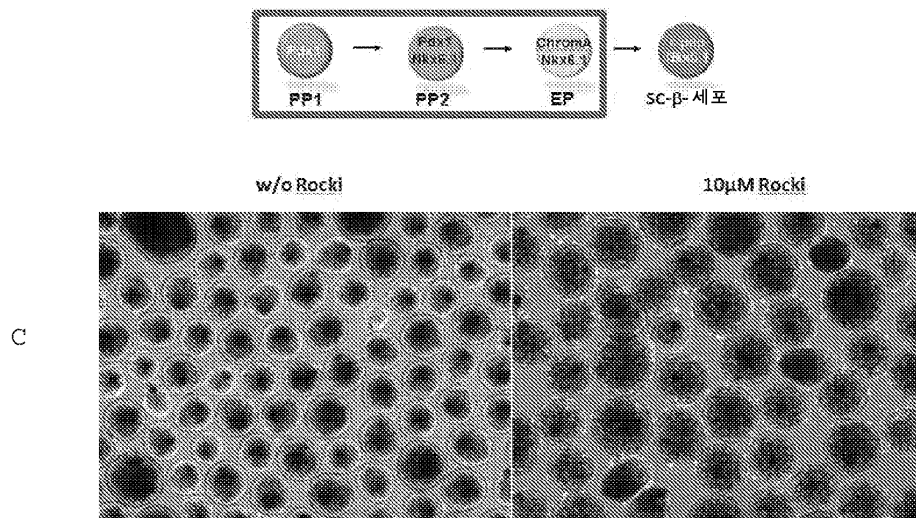
도면 15a



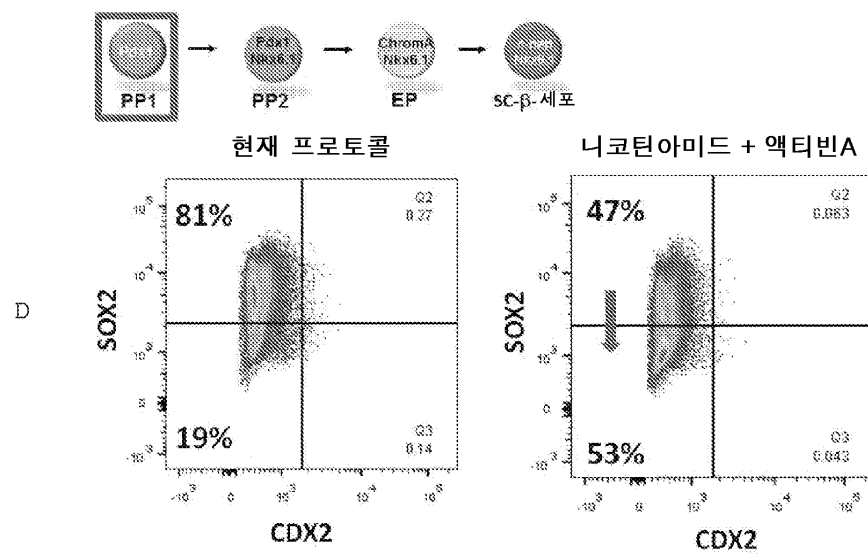
도면 15b



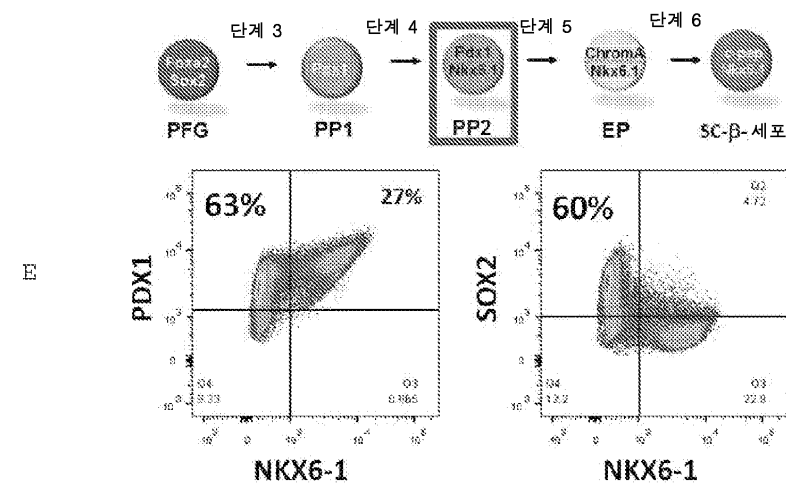
도면15c



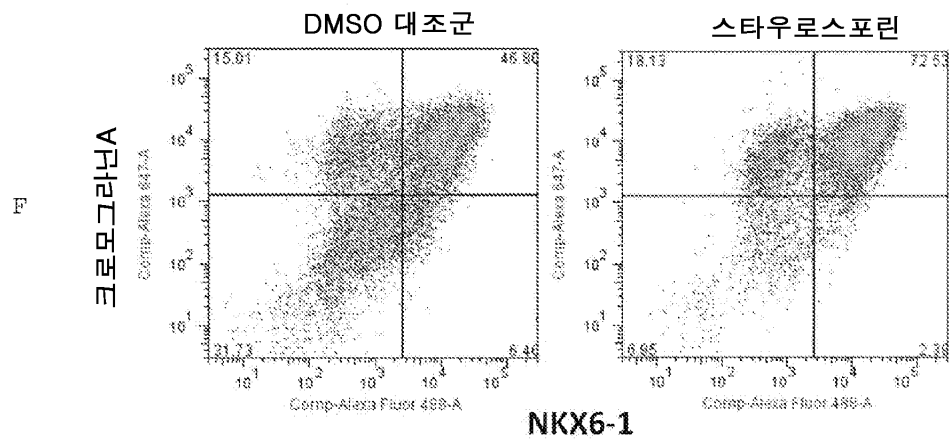
도면15d



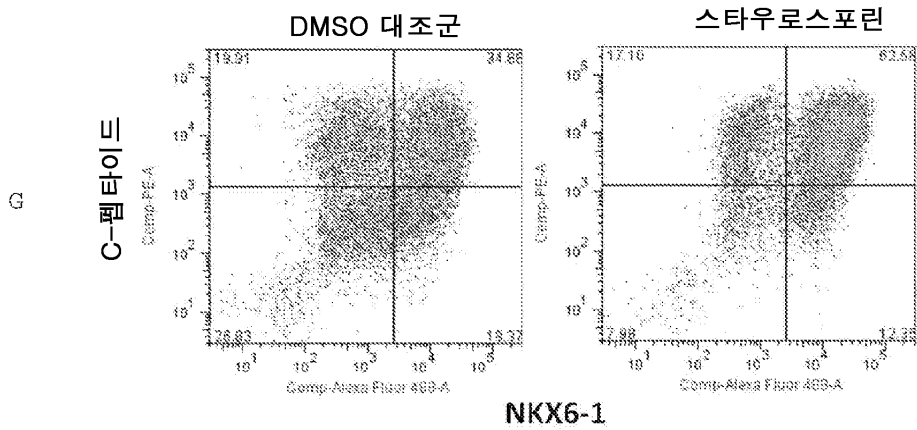
도면15e



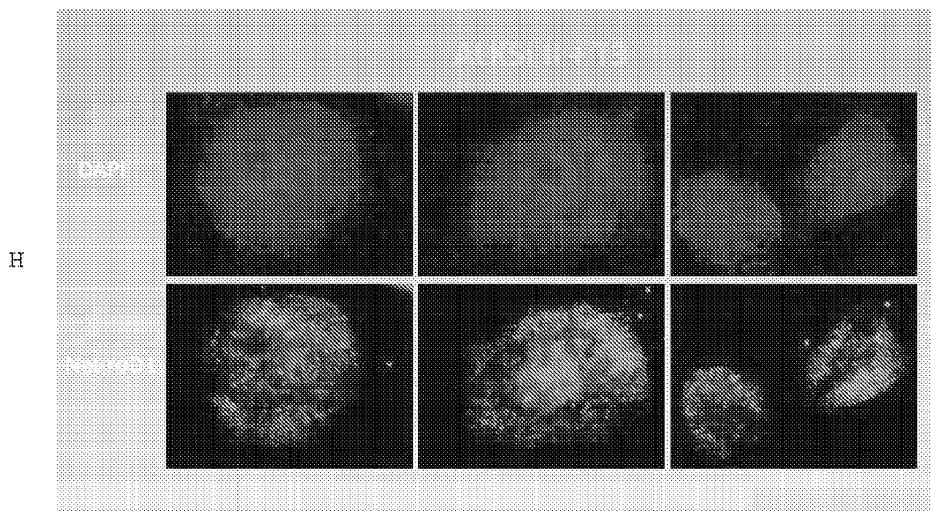
도면15f



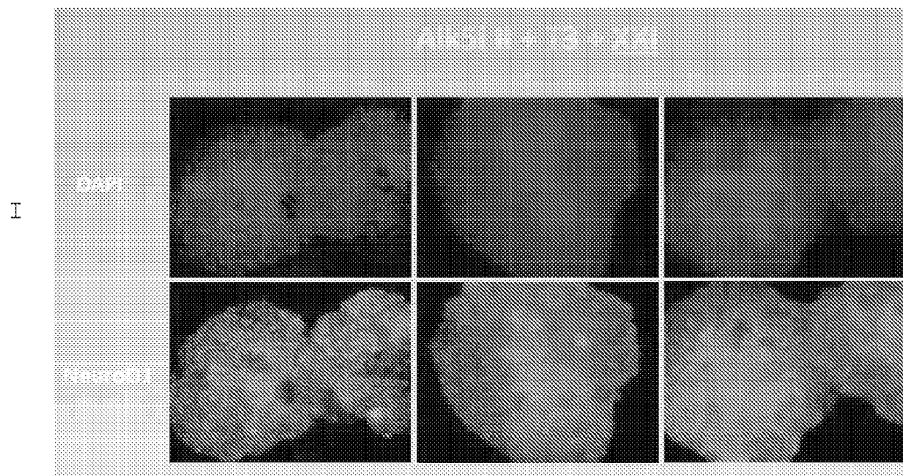
도면15g



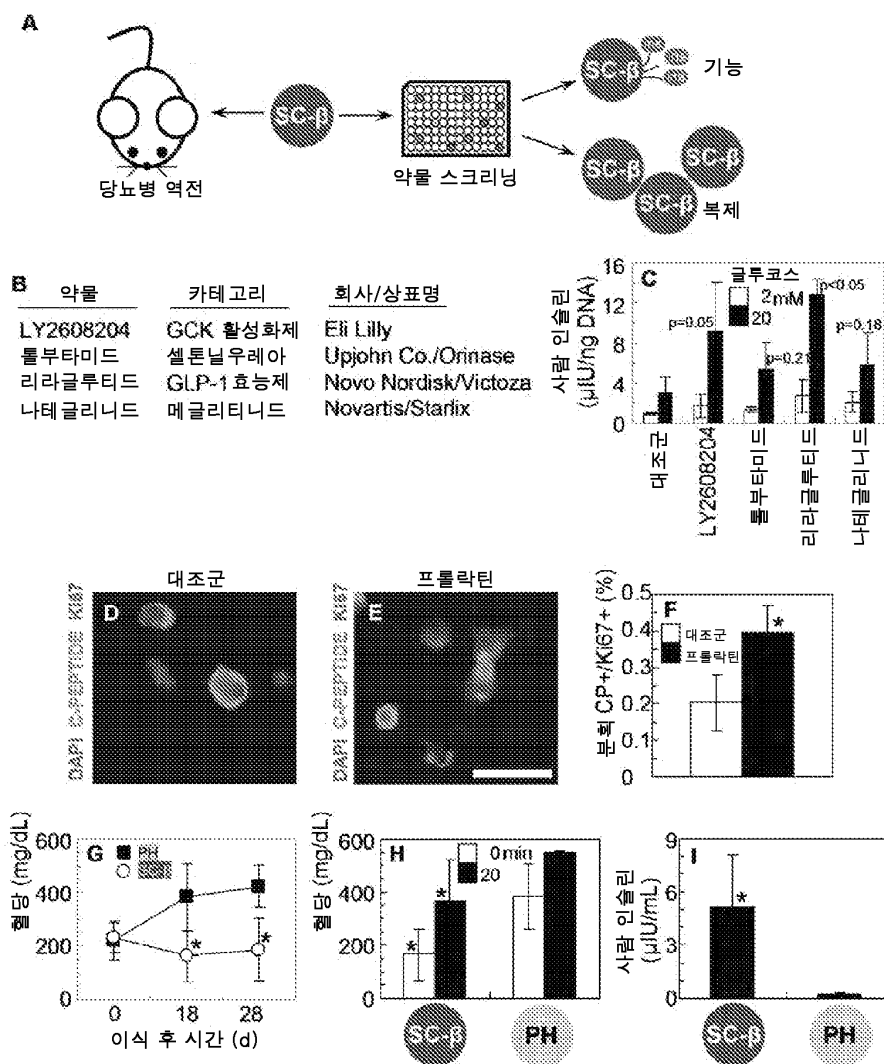
도면15h



도면15i



도면16



도면17

