



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월15일
(11) 등록번호 10-1278421
(24) 등록일자 2013년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/07 (2010.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 15/07 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7022588
(22) 출원일자(국제) 2005년04월26일
심사청구일자 2010년02월26일
(85) 번역문제출일자 2006년10월27일
(65) 공개번호 10-2007-0002077
(43) 공개일자 2007년01월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/014239
(87) 국제공개번호 WO 2005/116073
국제공개일자 2005년12월08일
(30) 우선권주장
11/021,618 2004년12월23일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Diabetes, 제52권, 제2016-2024면(2003년)
전체 청구항 수 : 총 13 항

(73) 특허권자
비아싸이트, 인크.
미합중국, 캘리포니아 92121, 샌디에고, 3550 제
네랄 아토믹스 코트 2빌딩 503
(72) 발명자
다무르 케빈알렌
미합중국 캘리포니아 92122 샌디에고 7235 카미니
토 판토자
아구르니크 알란디
미합중국 캘리포니아 92069 산 마르코스 1259 스
트라트포드 코트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이룸

(54) 발명의 명칭 P D X 1 발현 내배엽

심사관 : 이효진

(57) 요약

본 발명은 PDX1-양성 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 및 이의 제조 방법에 관
한 것이다. 또한 본 발명은 충분히 정제된 PDX1-양성 내배엽 세포를 포함하는 세포
개체군뿐만 아니라 다른 세포 형태로부터 PDX1-양성 내배엽 세포를 밀집화, 분리
및 정제하는 방법에 관한 것이다. 또한 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 및 PDX1-음성
완전 내배엽 세포와 같은 내배엽 세포의 분화를 진행시킬 능력이 있는 분화 인자의
동정 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

엘리아제르, 수잔

미합중국 캘리포니아 92126 샌디에고 10372 카민토
판토자

배트지 에마누엘이

미합중국 캘리포니아 92024 엔시니타스 308 선셋
드라이브

(30) 우선권주장

60/566,293 2004년04월27일 미국(US)

60/586,566 2004년07월09일 미국(US)

60/587,942 2004년07월14일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

인간 PDX1 양성 전장 내배엽 세포(human pancreatic-duodenal homoeobox factor-1 positive foregut endoderm cells), PDX1 음성 세포 및 NKX2.2 양성 세포를 포함하는 세포 배양물로서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 장관 전방부로부터 유래된 기관, 조직, 또는 세포로 분화가 가능한 다능성 세포(multipotent cells)이고, 상기 PDX1 양성 전장 내배엽 세포는 NKX2.2이 상기 PDX1 음성 세포보다 많이 발현되는 것을 특징으로 하는, 세포 배양물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 인간 영양 세포(feeder cell)를 포함하고, 상기 인간 영양 세포 이외의 인간세포의 1% 가 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인, 세포 배양물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 10개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포마다 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양물.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 5개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포마다 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양물.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 4개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포마다 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포 배양물.

청구항 14

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 배아 줄기 세포를 추가로 포함하는, 세포 배양물.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 배아 줄기 세포는 상실배 (morula), 배아의 내세포괴 (inner cell mass, ICM) 및 배아의 생식 융기 (gonadal ridges)로 구성된 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된, 세포 배양물.

청구항 16

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 레티노이드를 추가로 포함하는, 세포 배양물.

청구항 17

제 16항에 있어서,

상기 레티노이드는 레티노산 (retinoic acid, RA)인, 세포 배양물.

청구항 18

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 FGF-10를 추가로 포함하는, 세포 배양물.

청구항 19

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 B27을 추가로 포함하는, 세포 배양물.

청구항 20

제 1항에 있어서,

상기 세포 배양물은 RA 및 FGF-10를 모두 추가로 포함하는, 세포 배양물.

청구항 21

제 20항에 있어서,

상기 세포 배양물은 B27을 추가로 포함하는, 세포 배양물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 출원은 미국특허법 제 119조(e)에 따른 미국 특허 가출원 번호 제 60/566,293호 (발명의 명칭: PDX1 발현 내배엽, 출원일: 2004년 4월 27일); 미국 특허 가출원 번호 제 60/587,942호 (발명의 명칭: 완전 내배엽의 분리를 위한 케모카인 세포 표면 수용체, 출원일: 2004년 7월 14일); 및 미국 특허 가출원 번호 제60/586,566호 (발명의 명칭: 완전 내배엽의 분리를 위한 케모카인 세포 표면 수용체, 출원일: 2004년 7월 9일)의 3개의 가출원들을 우선권으로 하는 2004년 12월 23

[0002] 일에 출원된 미국 출원번호 제 11/021,618호 (발명의 명칭: 완전 내배엽)의 일부계속 출원 (continuation-in-part)이다.

[0003] 본 발명은 의학 및 세포 생물학 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 포

[0004] 유류의 PDX1-양성 완전 내배엽 세포를 함유하는 조성물 및 이의 제조, 분리 및 용

[0005] 도에 관한 것이다.

배경기술

[0006] 배아 줄기 (ES) 세포 및 배아 생식 (EG) 세포와 같은 인간 만능성 줄기 세

[0007] 포 (human pluripotent stem cell)는1994년 무 섬유아세포 영양세포 (feeder) 조건

[0008] 하에서 배양물로부터 처음 분리되었으며 (Bongso A et al., 1994), 1997년 섬유아세포 영양세포 조건 하 배양물로부터 분리되었다 (Hogan BL, 1997). 그 후, 톰슨(Thomson), 류비노프 (Reubinoff) 및 샴블로트 (Shamblott)는 유사분열이 불활성화된 영양세포 층(feeder layers)을 이용하여 인간 ES 및 EG의 연속 배양법을 확립하였다 (Reubinoff BE et al., 2000; Shamblott MJ et al., 1998; Thomson JA et

[0009] al., 1998).

[0010]

[0011] 인간 ES 및 EG 세포 (hESCs)는 인간 발생 초기 단계에 대한 연구뿐만 아니

[0012] 라 당뇨병 (diabetes mellitus) 및 파킨슨병 (Parkinson's disease)과 같은 여러 질환 단계에서 치료적 개입 (therapeutic intervention)에 훌륭한 기회를 제공한다. 예를 들어, hESCs로부터 파생된 인슐린-분비 베타-세포 (insulin-producing β -cell)는 공여 체장으로부터 파생된 세포를 사용하는 현재의 세포 치료 과정에 걸쳐 광범

위한 개선을 제공한다. 그러나, 현재 hESCs로부터 인슐린-분비 베타-세포의 발생 방법은 알려진 바 없다. 공여 체장으로부터 유래된 섬 세포 (islet cell)를 이용하는 현재의 당뇨병에 대한 세포 치료법은 그 자체로 이식에 필요한 고품질의 섬 세포의 결핍에 의한 한계가 있다. I형 당뇨 환자를 위한 단일의 세포 치료에는 약 8×10^8 개의 체장 섬 세포의 이식이 요구된다(Shapiro et al., 2000; Shapiro et al., 2001a; Shapiro et al., 2001b). 성공적인 이식을 위해 충분한 섬 세포를 얻기 위해서는 최소 두 개의 건강한 공여자의 기관 (organ)이 요구된다. HESCs는 인간 세포 치료를 위한 고품질의 분화 세포를 다량 발생하기 위한 개시 물질의 원천으로 제공된다.

[0013]

[0014] 세포 치료 적용에 hESCs를 특이적으로 적합하게 하는 두 가지 특성은 만능성 (pluripotency) 및 유전적 변화의 축적 없이 연장된 기간 동안 상기 세포들을 배양하여 유지하도록 하는 능력이다. 만능성은 hESCs를 배외 조직 (extraembryonic tissues; 예: 태반) 및 발생 세포 외의 성숙 유기체의 모든 체세포를 형성하는 총 3개의 초기 배엽 (내배엽, 중배엽, 외배엽)의 파생물 (derivatives)로 분화하도록 하는 능력으로 정의된다. 비록 만능성은 hESCs에게 훌륭한 유용성을 부여하지만, 상기 특성은 이러한 세포들 및 그 파생물들에 대한 연구 및 조작을 위한 특수한 도전을 부과한다. HESCs 배양물을 분화함에 있어 발생될 수 있는 많은 다양한 세포 유형 때문에, 대다수의 세포 유형들은 매우 낮은 효율로 생산된다. 또한, 주어진 임의의 세포 유형의 생산에 대한 평가상의 성공은 결정적으로 적절한 마커 (markers)를 한정하는 것에 좌우된다. 효율적인 유도 분화 획득은 hESCs의 치료적 적용 (therapeutically application)을 위해 매우 중요하다.

[0015] 세포 치료적 적용에 유용한 세포를 생산하기 위한 개시 물질로서 hESCs를 사

[0016] 용하기 위해서는 전술한 문제점들을 극복하는 것이 유용할 것이다. 예를 들어, 섬

[0017] 세포 이식 치료에 요구되는 세포 물질의 농도를 얻기 위해서는 분화의 가장 초기 단계에서 hESCs를 체장 섬/베타-세포 계통으로 효율적으로 유도함이 유리할 것이다.

[0018] 이는 분화 과정상의 효율적인 지향 외에도 체장 섬/베타-세포 계통에 대한 분화 경로를 따른 매개성 세포 유형들을 분리 및 특정하고 분화 이후 단계를 위한 적당한 계통 전구체와 같은 세포들을 사용하는 것이 또한 유리할 것이다.

[0019] 발명의 요약

[0020] 본 발명의 구현예들은 PDX1 발현 (PDX1-양성) 내배엽 세포를 함유하는 조성물뿐만 아니라 이의 제조 방법에 관한 것이다. 부가적인 구현예들은 PDX1-양성 내배엽에서 밀집(enriched)되는 세포 개체군 및 이러한 세포 개체군의 생산을 위한 방법에 관한 것이다. 다른 구현예들은 내배엽 세포에서의 PDX1 발현의 증가를 위한 방법뿐만 아니라 이후의 PDX1- 음성 및/또는 PDX1-양성 내배엽으로의 분화의 확인을 위한 유용한 동정용 인자에 관한 것이다. 본원에 개시된 조성물 및 방법의 일부 구현예로서, PDX1-양성 내배엽 세포는 PDX1-양성 전장 (foregut)/중장(midgut) 내배엽 세포이다. 본원에 개시된 조성물 및 방법의 특징의 바람직한 구현예로서, PDX1-

[0021] 양성 내배엽 세포는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포이다. 다른 바람직한 구현예로서, PDX1-양성 내배엽 세포는 전장 후부의 PDX1-양성 내배엽 세포들이다.

[0022]

[0023] 본 발명의 일부 구현예는 장관 전방부(anterior portion)로부터 파생된 세포, 조직 또는 기관으로 분화 가능한 다능성 세포인 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 함유하는 세포 배양물에 관한 것이다. 일부 구현예로서, 세포 배양물은 인간 세포들을 포함한다. 이러한 인간 세포 배양물에서, PDX1-양성 전장 내배엽은 세포 배양물 내에 인간 세포를 약 2% 이상, 약 5% 이상, 10% 이상 또는 25% 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예로서, 상기 약 2% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상 또는 약 25% 이상은 상기 배양물에 존재하는 어떠한 영양 세포(feeder cells)들의 존재와 상관없이 계산된다. 본원에 개시된 세포 배양물의 특정 구현예에서의 PDX1-양성 전장 내배엽

세포는 HOXA13(homeobox A13) 유전자, HOXC6(homeobox C6) 유전자 및 SOX17로 구성된 군으로부터 선택된 마커(marker)를 발현할 수 있다. 또 다른 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물은 내장(visceral) 내배엽 세포, 벽(parietal) 내배엽 세포 및/또는 신경(neural) 세포가 실질적으로 없는 것이다. 일부 구현예로서, 상기 세포 배양물은 또한 레티노산(retinoic acid, RA)과 같은 레티노이드 화합물, FGF-10 또는 B27 중 하나 이상을 추가적으로 포함하는 것이다.

[0024] 본 발명의 추가적인 구현예로는 장관 전방부(anterior portion)로부터 파생된 세포, 조직 또는 기관으로 분화가 가능한 밀집되거나, 분리되거나 또는 실질적으로 정제된 다능성 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 개체군에 관한 것이다. 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포들은 인간 배아 줄기 세포와 같은 만능성 세포들로부터 유래된 것이다. 본 발명의 다른 구현예는 세포의 약 90% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포이고 PDX1-양성 전장 내배엽 세포가 장관 전방부로부터 파생된 세포, 조직 또는 기관으로 분화가 가능한 다능성 세포인 개체군에 관한 것이다. 바람직한 구현예로서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 상기 세포 개체군 내에 약 95% 이상을 포함하는 것이다. 더욱 바람직한 구현예로서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 상기 세포 개체군 내에 약 98% 이상을 포함하는 것이다.

[0025] 본원에 개시된 추가적인 구현예는 레티노이드와 같은 전장 분화 인자로 실질적으로 PDX1을 발현하지 않는 완전 내배엽 세포(PDX1-음성 완전 내배엽 세포)를 함유하는 세포 배양물 또는 세포 개체군을 제공함으로써 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 생산하는 생산 방법에 관한 것이다. 예를 들어 레티노이드인 RA를 약 0.01 μM 내지 약 50 μM 의 농도 범위에서 제공될 수 있다. 일부 구현예로서, 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화는 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에 FGF-10 및/또는 B27을 제공함으로써 증가된다. 상기 FGF-10은 약 5 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml의 농도 범위에서 제공될 수 있다. 일부 구현예로서, 상기 B27은 약 0.1% 내지 약 20%의 농도범위에서 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에 제공된다. 상기 FGF-10 및/또는 B27은 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에 레티노이드로서 거의 동시에 또는 개개 인자들을 각각의 첨가 간에 몇 시간까지의 간격으로 분별적으로 첨가될 수도 있다. 본 발명의 특정 구현예로서, 상기 레티노이드는 약 4일된 PDX1-음성 완전 내배엽 세포 배양물에 첨가될 수 있다. 일부 구현예로서, 상기 레티노이드는 약 5일된 PDX1-음성 완전 내배엽 세포 배양물에 첨가될 수 있다.

[0026] 추가의 또다른 구현예들은 RA와 같은 레티노이드와 접촉된 세포 배양물 또는 세포 개체군 상에서 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 생산을 보다 더 증가시키기 위한 전장 분화 인자를 사용하는 사용 방법에 관한 것이다. 이러한 구현예에서, 상기

[0027] PDX1-음성 완전 내배엽의 PDX1-양성 전장 내배엽으로의 분화는 액티빈 A(activin A) 및/또는 액티빈 B(activin B)를 세포 배양물 또는 세포 개체군에 제공함으로써 증가된다. 상기 액티빈 A 및/또는 액티빈 B는 약 5 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml의 농도 범위에서 제공될 수 있다. 또 다른 구현예로는 특정 세포 유형의 유지 또는 성장에 의해 미리 조절된 레티노이드를 함유하는 조건화 배지상에서(conditioned medium) PDX1-음성 세포를 분화함으로써 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에서의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 생산을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 세포 유형으로는 배아 줄기 세포 또는 혈청(serum) 또는 액티빈 A, 액티빈 B, 노달(Nodal) 및/또는 뼈 성장촉진 호르몬(bone morphogenic protein, BMP)과 같은 TGF β 상과의 성장인자들을 포함하는 배지에서 분화되는 기타 다른 만능성 세포를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예로서, 상기 조건화 배지는 전체 성장 배지의 약 1% 내지 약 100%의 농도 범위에서 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에 공급된다. TGF β 상과 성장 인자들 및/또는 조건화 배지를 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에 레티노이드로서 거의 동시에 또는 개개 인자들을 각각의 첨가간에 몇 시간까지의 간격을 갖고 분별적으로 첨가할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 구현예는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포상에서 밀집된 세포 개체군을 제조하는 제조 방법에 관한 것이다. 특정 구현예로서, 이러한 방법들은 하나 이상의 만능성 세포 개체군이 상기 PDX1 프로모터(promoter)에 의해 조절되는 하나 이상의 핵산 카피(copy)를 포함하는 만능성 세포 개체군을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 구현예로서, 상기 핵산은 GFP(green fluorescent protein) 또는 이들의 생물학적 활성 단편을 암호화하는 서열을 포함한다. 또 다른 구현예로서, 추가적인 방법 단계들은 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포가

세포장관 전방부로부터 파생된 세포, 조직 또는 기관으로 분화가 가능한 다능성 세포 (multipotent cells)인 PDX1-음성 전장 내배엽 세포를 생산하기 위하여 다능성 세포들을 분화시키는 단계; 및 상기 PDX1-음성 세포로부터 PDX1-양성 세포들을 분리하는 단계를 포함한다. 본원에 개시된 방법들의 일부 구현예로서, 상기 분화 단계는 나아가 상기 만능성 (pluripotent) 세포 개체군에 만능성 세포의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포로의 분화를 촉진 시키기에 충분한 양의 하나 이상의 TGF β 상과 성장인자를 제공하는 단계; 및 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시키기에 충분한 양의 전장 분화 인자를 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포에 제공하는 단계를 포함하는 것이다.

[0029] 본 발명의 일부 구현예는 SOX17-발현 (SOX17-양성) 완전 내배엽 세포들로부터 이러한 세포들에 PDX1 유전자 산물의 발현을 증가시키기에 충분한 양의 분화 인자를 접촉시킴으로서 PDX1 유전자 산물의 발현을 증가 시키는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예로서, 상기 분화 인자는 RA, FGF-10 및 B27로 이루어진 그룹으로부터 선택 되는 것이다.

[0030] 본 발명의 추가적인 구현예는 PDX1-음성 완전 내배엽세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진 시킬 수 있는 분화 인자를 동정하는 동정방법에 관한 것이다. 이러한 방법에서, PDX1-음성 완전 내배엽 세포들을 후보 분화 인자(candidate differentiation factor)와 접촉시키고, 상기 후보 분화 인자와 접촉한 후의 세포 개체군상에서의 PDX1의 발현이 후보 분화 인자와 접촉하기 전의 개체군상에서의 PDX1의 발현과 비교하여 증가하는지 여부가 결정된다. 상기 세포 개체군상에서의 PDX1 발현의 증가는 상기 후보 분화인자가 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있음을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 PDX1의 발현은 정량적 PCR (quantitative polymerase chain reaction, Q-PCR)로 측정된다. 전술한 방법의 일부 구현예로서, 후보 분화 인자와의 접촉 전후의 세포 개체군에서의 상기 HOXA13 및/또는 HOXC6 유전자 발현을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 후보 분화 인자는 예를 들어 RA와 같은 레티노이드인 소분자이다. 그 외에, 기타 후보 분화 인자로는 예를 들어 FGF-10과 같은 성장인자인 폴리펩티드 (polypeptide)이다.

[0031]

[0032] 또한 본 발명의 다른 구현예들은 PDX1-양성 전장 내배엽 세포들의 분화를 촉진시킬 수 있는 분화 인자를 동정하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포들을 후보 분화 인자들과 접촉시키고, 상기 개체군상에서의 상기 후보 분화 인자와 접촉 후에 마커의 발현이 상기 후보 분화 인자와의 접촉 전의 개체군에서 동일한 마커의 발현시와 비교하여 증가되었는지 또는 감소되었는지 여부를 측정한다. 상기 마커의 발현 증가 또는 감소는 상기 후보 분화 인자가 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 분화를 촉진시킬 수 있음을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 마커의 발현은 Q-PCR로 측정된다. 일부 구현예에서, 상기 후보 분화 인자는 예를 들어 RA와 같은 레티노이드인 소분자이다. 그 외에, 후보 분화 인자는 예를 들어 FGF-10과 같은 성장인자인 폴리펩티드이다.

[0033]

[0034] 특정한 판단 관점에서, 본원의 용어 "포함하는(comprising)"은 어떠한 일반적 정의로도 받아들여지지 않는 것일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하는"은 어떠한 부가적인 구성요소들의 포함을 허용하는 "개방된(open)" 언어로 표시되도록 의도한다. 이러한 사실을 염두해 두고, 본 발명의 부가적인 구현예는 하기한 수개 단락과 관련된 것으로 개시된다:

[0035] 1. PDX1-양성 전장 내배엽 세포가 장관 전방부로부터 유래된 세포, 조직 또는 기관으로 분화가 가능한 다능성 세포 (multipotent cells)이고, 인간 세포의 약 2% 이상이 상기 PDX1 (pancreatic-duodenal homoeobox factor-1) 양성 전장 내배엽 세포인 인간 세포를 포함하는 세포 배양물.

[0036] 2. 제 1 단락에 있어서, 상기 인간 세포의 약 5% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인 세포 배양물.

[0037] 3. 제 1 단락에 있어서, 상기 인간 세포의 약 10% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인 세포 배양물.

[0038] 4. 제 1 단락에 있어서, 상기 인간 세포의 약 25% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인 세포 배양물.

[0039] 5. 제 1 단락에 있어서, 인간 영양세포 이외로 인간 세포 중 약 2% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포이고,

상기 인간 영양세포가 상기 배양물에 존재하는 세포 배양물.

[0040] 6. 제 1단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 HOXA13 (homeobox A13) 유전자를 발현하는 세포 배양물.

[0041] 7. 제 1단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 HOXC6 (homeobox C6) 유전자를 발현하는 세포 배양물.

[0042] 8. 제 1단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 SOX17을 발현하는 세포 배양물.

[0043] 9. 제 1단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포에서의 PDX1의 발현이 AFP (alpha-fetoprotein), SOX7, SOX1, ZIC1 및 NFM로 구성된 군으로부터 선택된 마커의 발현보다 큰 세포 배양물.

[0044] 10. 제 1단락에 있어서, 상기 세포 배양물은 내장 내배엽 세포 (visceral endodermal cells), 벽 내배엽 세포 (parietal endodermal) 및 신경 세포 (neural cells)로 구성된 군으로부터 선택된 세포들이 실질적으로 없는 세포 배양물.

[0045] 11. 제 1단락에 있어서, 상기한 세포 배양물에서 약 10개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포마다 약 1개 이상의 PDX1-양성 내배엽 세포가 존재하는 세포 배양물.

[0046] 12. 제 1단락에 있어서, 상기한 세포 배양물에서 약 5개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포마다 약 1개 이상의 PDX1-양성 내배엽 세포가 존재하는 세포 배양물.

[0047] 13. 제 1단락에 있어서, 상기한 세포 배양물에서 약 4개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포마다 적어도 약 1개의 PDX1-양성 내배엽 세포가 존재하는 세포 배양물.

[0048] 14. 제 1단락에 있어서, 세포 배양물에 배아 줄기 세포를 추가로 포함하는 세포 배양물.

[0049] 15. 제 14단락에 있어서, 상기 배아 줄기세포는 상실배 (morula), 배아의 내세포괴 (inner cell mass, ICM) 및 배아의 생식 융기 (gonadal ridges)로 구성된 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된 세포 배양물.

[0050] 16. 제 1단락에 있어서, 상기 세포 배양물에 레티노이드를 추가로 포함하는 세포

[0051] 배양물.

[0052] 17. 제 16단락에 있어서, 상기 레티노이드는 레티노산 (retinoic acid, RA)인 세포 배양물.

[0053] 18. 제 1단락에 있어서, 상기 세포 배양물에 FGF-10를 추가로 포함하는 세포 배양물.

[0054] 19. 제 1단락에 있어서, 상기 세포 배양물에 B27을 추가로 포함하는 세포 배양물.

[0055] 20. 제 1단락에 있어서, 상기 세포 배양물에 RA 및 FGF-10를 모두 추가로 포함하는 세포 배양물.

[0056] 21. 제 20단락에 있어서, 상기 세포 배양물에 B27을 추가로 포함하는 세포 배양물.

[0057] 22. 세포의 약 90% 이상이 장관 전방부로부터 유래된 세포, 조직 또는 기관으로 분화 가능한 다능성 세포인 인간 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인 세포를 포함하는 세포 개체군.

[0058] 23. 제 22단락에 있어서, 상기 세포의 약 95% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인 세포 개체군.

[0059] 24. 제 22단락에 있어서, 상기 세포의 약 98% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포인 세포 개체군.

[0060] 25. 제 22단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포가 HOXA13 유전자를 발현하는 세포 개체군.

[0061] 26. 제 22단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포가 HOXC6 유전자를 발현하는 세포 개체군.

[0062] 27. 제 22단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포가 SOX17을 발현하는 세포 개체군.

[0063] 28. 제 22단락에 있어서, 상기 PDX1의 발현이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포상에서 AFP (alpha-fetoprotein), SOX7, SOX1, ZIC1 및 NFM로 구성된 군으로부터 선택된 마커의 발현보다 큰 세포 개체군.

[0064] 29. PDX1-음성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 개체군을 수득하는 단계 및 상기 세포 개체군에 적어도 PDX1-음성 완전 내배엽 세포 일부의 장관 전방부로부터 파생된 세포, 조직 또는 기관으로 분화할 수 있는 다능성 세포인 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시키기에 충분한 양의 레티노이드를 제공하는 단계를 포함하는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 생산하는 방법.

- [0065] 30. 제 29단락에 있어서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 형성하기에 충분한 시간이 상기 세포 개체군내에 존재하는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 존재를 검출시킴으로 결정되는 충분한 시간을 형성될 PDX1-양성 전장 내배엽 세포에 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0066] 31. 제 29단락에 있어서, 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 약 2% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 분화하는 방법.
- [0067] 32. 제 29단락에 있어서, 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 약 5% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 분화하는 방법.
- [0068] 33. 제 29단락에 있어서, 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 약 10% 이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 분화하는 방법.
- [0069] 34. 제 29단락에 있어서, 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 약 25%이상이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 분화하는 방법.
- [0070] 35. 제 29단락에 있어서, 상기 세포 개체군에서 PDX1-양성 전장내배엽 세포 존재의 검출은 PDX1 발현의 검출을 포함하는 방법.
- [0071] 36. 제 35단락에 있어서, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포에서의 PDX1의 발현이 AFP (alpha-fetoprotein), SOX7, SOX1, ZIC1 및 NFM로 구성된 군으로부터 선택된 마커의 발현보다 큰 방법.
- [0072] 37. 제 35단락에 있어서, 상기 PDX1의 발현은 Q-PCR (quantitative polymerase chain reaction)로 측정되는 방법.
- [0073] 38. 제 35 단락에 있어서, 상기 PDX1의 발현은 면역세포화학법 으로 측정되는 방법.
- [0074] 39. 제 29 단락에 있어서, 상기 레티노이드는 RA인 방법.
- [0075] 40. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 약 0.01 μM 내지 약 50 μM 의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0076] 41. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 약 0.04 μM 내지 약 20 μM 의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0077] 42. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 약 0.1 μM 내지 약 10 μM 의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0078] 43. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 약 0.2 μM 내지 2.5 μM 의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0079] 44. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 약 0.5 μM 내지 약 1.5 μM 의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0080] 45. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 약 1 μM 의 농도로 제공되는 방법.
- [0081] 46. 제 39 단락에 있어서, 상기 RA는 4일 배양된 세포 배양물에 제공되는 방법.
- [0082] 47. 제 29 단락에 있어서, 상기 배양물에 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 생산을 증가시키기 충분한 양으로 FGF-10, FGF-4, 액티빈 A, 액티빈 B, B27, 조건화 배지로 구성된 군으로부터 선택된 인자 및 이러한 인자들의 조합을 상기 배양물에 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.
- [0083] 48. 제 47 단락에 있어서, 상기 인자는 FGF-10, FGF-4, 액티빈 A 및 액티빈 B로 구성된 군으로부터 선택된 방법.
- [0084] 49. 제 48단락에 있어서, 상기 인자는 약 10 ng/ml 내지 약 500 ng/ml의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0085] 50. 제 48 단락에 있어서, 상기 인자는 약 20 ng/ml 내지 약 200 ng/ml의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0086] 51. 제 48 단락에 있어서, 상기 인자는 약 25 ng/ml 내지 약 75 ng/ml의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0087] 52. 제 48 단락에 있어서, 상기 인자는 약 50 ng/ml의 농도로 제공되는 방법.
- [0088] 53. 제 48 단락에 있어서, 상기 인자가 상기 레티노이드와 거의 동시에 제공되는 방법.
- [0089] 54. 제 47 단락에 있어서, 상기 인자는 B27인 방법.
- [0090] 55. 제 54 단락에 있어서, 상기 B27은 전체 배지의 약 0.1% 내지 약 20%의 농도 범위에서 제공되는 방법.

- [0091] 56. 제 54 단락에 있어서, 상기 B27은 전체 배지의 약 0.2% 내지 약 5%의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0092] 57. 제 54 단락에 있어서, 상기 B27은 전체 배지의 약 0.5% 내지 약 2%의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0093] 58. 제 54 단락에 있어서, 상기 B27은 전체 배지의 약 1%의 농도로 제공되는 방법.
- [0094] 59. 제 54 단락에 있어서, 상기 B27은 상기 레티노이드와 거의 동시에 제공되는 방법.
- [0095] 60. 제 47 단락에 있어서, 상기 인자는 조건화 배지인 방법.
- [0096] 61. 제 60 단락에 있어서, 상기 조건화 배지는 전체 배지의 약 10% 내지 약 100%의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0097] 62. 제 60 단락에 있어서, 상기 조건화 배지는 전체 배지의 약 20% 내지 약 80%의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0098] 63. 제 60 단락에 있어서, 상기 조건화 배지는 전체 배지의 약 40% 내지 약 60%의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0099] 64. 제 60 단락에 있어서, 상기 조건화 배지는 전체 배지의 약 50%의 농도 범위에서 제공되는 방법.
- [0100] 65. 제 60 단락에 있어서, 상기 조건화 배지는 상기 레티노이드와 거의 동시에 제공되는 방법.
- [0101] 66. 제 60 단락에 있어서, 상기 조건화 배지는 분화된 인간 배아 줄기 세포 (hESCs)를 세포 배양물 배지에 약 24시간 동안 접촉시켜 제조되는 방법.
- [0102] 67. 제 66 단락에 있어서, 상기 hESCs는 약 5일 동안 3%의 혈청이 보충된 RPMI 배지, 액티빈 A를 포함한 저혈청 RPMI 배지 및 BMP4가 보충된 저혈청 RPMI 배지로 구성된 군으로부터 선택된 세포 배양물 배지에서 분화되는 방법.
- [0103] 68. 제 29 단락의 방법에 의해 생산되는 PDX1-양성전장 내배엽 세포.
- [0104] 69. PDX1 프로모터 조절하에서 GFP (green fluorescent protein) 또는 이의 생물학적으로 활성을 갖는 단편을 코딩하는 유전자를 포함하는, 하나 이상의 핵산 카피(copy)를 하나 이상 포함하는 하나 이상의 만능성 세포 개체군을 수득하는 단계;
- [0105] 장관 전방부로부터 파생된 세포, 조직 또는 기관으로 분화가 가능한 만능성 세포인
- [0106] PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 생산하기 위해 상기 만능성 세포들을 분화시키는 단계; 및 상기 PDX1-음성 세포들로부터 상기 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 분리하는 단계를 포함하는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 밀집된 세포 개체군을 생산하는 방법.
- [0107] 70. 제 69 단락에 있어서, 상기 밀집된 세포 개체군은 약 95% 이상의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 방법.
- [0108] 71. 제 69 단락에 있어서, 상기 밀집된 세포 개체군은 약 98% 이상의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 방법.
- [0109] 72. 제 69 단락에 있어서, 상기 분화 단계는 만능성 세포 개체군에 상기 만능성 세포의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포로의 분화를 촉진시키기에 충분한 양의 하나 이상의 TGF β 상과의 성장 인자를 제공하는 단계 및 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포에 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시키기에 충분한 양의 레티노이드를 제공하는 단계를 추가적으로 포함하는
- [0110] 방법.
- [0111] 73. 제 72 단락에 있어서, 상기 레티노이드는 RA인 방법.
- [0112] 74. 제 69 단락의 방법으로 제조된 밀집된 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 개체군.
- [0113] 75. 완전 내배엽 세포에 PDX1 유전자 산물의 발현을 증가시키기에 충분한 양의 분화 인자를 접촉시킴을 포함하는 SOX17 발현 완전 내배엽 세포에서의 PDX1 유전자 산물의 발현을 증가시키는 방법.
- [0114] 76. 제 75 단락에 있어서, 상기 분화 인자는 레티노이드인 방법.

- [0115] 77. 제 76 단락에 있어서, 상기 분화 인자는 RA인 방법.
- [0116] 78. 제 75 단락에 있어서, 상기 분화 인자는 FGF-10, FGF-4, 액티빈 A, 액티빈 B, B27, 조건화 배지로 구성된 군으로부터 선택된 인자 및 이들의 조합인 방법.
- [0117] 79. PDX1-음성 완전 내배엽 세포를 포함하는 개체군을 수득하는 단계; PDX1-음성 완전 내배엽 세포를 포함하는 상기 개체군에 후보 분화 인자로 접촉시키는 단계;
- [0118] 상기 세포 개체군의 상기 PDX1 발현의 증가가 후보 분화 인자가 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 장관 전방부로부터 유래된 조직 또는 기관으로 분화할 수 있는 만능성 세포로 존재하는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있음을 의미하며 상기 세포 개체군에서의 후보 분화 인자와 접촉한 후 PDX1 발현이 증가되었는지 여부를 후보 분화 인자의 접촉 전의 PDX1 발현과 비교함으로써 결정하는 단계를 포함하는 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있는 분화 인자를 동정하는 방법.
- [0119] 80. 제 79 단락에 있어서, 상기 PDX1 발현은 Q-PCR로 측정되는 방법.
- [0120] 81. 제 79 단락에 있어서, 상기 세포 개체군에서의 후보 분화 인자와의 접촉 전 및
- [0121] 후의 HOXA13 유전자의 발현을 결정하는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0122] 82. 제 79 단락에 있어서, 상기 세포 개체군에서의 후보 분화 인자와의 접촉 전 및 후의 HOXC6 유전자의 발현을 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 방법.
- [0123] 83. 제 79 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 소분자인 방법.
- [0124] 84. 제 83 단락에 있어서, 상기 소분자는 레티노이드인 방법.
- [0125] 85. 제 84 단락에 있어서, 상기 레티노이드는 RA인 방법.
- [0126] 86. 제 79 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 폴리펩티드 (polypeptide)인 방법.
- [0127] 87. 제 79 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 성장 인자인 방법.
- [0128] 88. 제 79 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 FGF-10인 방법.
- [0129] 89. PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 개체군을 수득하는 단계; PDX1-양성 전장 내배엽 세포에 후보 분화 인자를 접촉시키는 단계; 및 상기 후보 분화 인자와 접촉한 후의 마커 발현의 증가 또는 감소를 동일한 마커에 대한 상기 개체군에서의 후보 분화 인자와 접촉하기 전의 발현과 비교함으로써 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 분화를 진행시킬 능력이 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 분화를 촉진할 수 있는 분화 인자를 동정하는 방법.
- [0130] 90. 제 81 단락에 있어서, 상기 마커의 발현은 Q-PCR로 측정되는 방법.
- [0131] 91. 제 81 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 소분자인 방법.
- [0132] 92. 제 81 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 폴리펩티드인 방법.
- [0133] 93. 제 81 단락에 있어서, 상기 후보 분화 인자는 성장 인자인 방법.
- [0134] 94. PDX1의 조절 부위에 작동 가능하게 연계된 리포터 유전자 (reporter gene)를 포함하는 벡터.
- [0135] 95. 제 94 단락에 있어서, 상기 리포터 유전자는 EGFP인 벡터.
- [0136] 96. 제 94 단락의 벡터를 포함하는 세포.
- [0137] 97. PDX1의 조절 부위에 작동 가능하게 연계된 리포터 유전자를 포함하는 세포.
- [0138] 98. 제 97 단락에 있어서, 상기 PDX1 조절 부위에 작동 가능하게 연계된 리포터 유전자는 염색체 내에 삽입된 유전자인 세포.
- [0139] 99. 제 97 단락에 있어서, 상기 리포터 유전자는 EGFP인 세포.
- [0140] 100. 제 97 단락에 있어서, 상기 세포는 만능성인 세포.
- [0141] 101. 제 100 단락에 있어서, 상기 세포는 hESC인 세포.

- [0142] 102. 제 97 단락에 있어서, 상기 세포는 완전 내배엽 세포인 세포.
- [0143] 103. 제 97 단락에 있어서, 상기 세포는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 (PDX1-positive foregut endoderm cell)인 세포.
- [0144] 104. 새로운 세포 배양 배지에 3%의 혈청이 보충된 RPMI, 액티빈 A가 보충된 저혈청 RPMI 및 BMP4가 보충된 저혈청 RPMI로 구성된 군으로부터 선택된 세포 배양 배지에서 약 5일간 분화된 hESCs 개체군을 24시간 동안 접촉하는 단계 및 상기 배지로부터 상기 분화된 hESCs 개체군을 제거하는 단계로 제조되는 조건화 배지.
- [0146] 105. 제 104 단락에 있어서, 상기 새로운 세포 배양 배지는 RPMI인 조건화 배지.
- [0147] 106. 제 105 단락에 있어서, 상기 RPMI는 저혈청 RPMI인 조건화 배지.
- [0148] 107. 새로운 세포 배양 배지에 3%의 혈청이 보충된 RPMI, 액티빈 A가 보충된 저혈청 RPMI 및 BMP4가 보충된 저혈청 RPMI로 구성된 군으로부터 선택된 세포 배양 배지에서 약 5일간 분화된 hESCs 개체군을 24시간 동안 접촉시키는 단계 및 상기 배지로부터 상기 분화된 hESCs 개체군을 제거하는 단계를 포함하는 배지를 조건화하는 방법.
- [0149] 108. 제 107 단락에 있어서, 상기 새로운 세포 배양 배지는 RPMI인 방법.
- [0150] 109. 제 108 단락에 있어서, 상기 RPMI는 저혈청 RPMI인 방법.
- [0151]
- [0152] 상술한 제조 방법 및 조성물은 시험관 내 (in vitro)의 세포 배양물에 관한 것임이 명백할 것이다. 그러나, 상술한 시험관 내의 분화된 세포 조성물은 생체 내(in vivo)로의 적용을 위해서도 이용될 수 있을 것이다.
- [0153] 본 발명의 부가적인 구현예들은 2003년 12월 23일자에 “완전 내배엽” 라는 명칭으로 출원된 미국 가출원번호 제 60/532,004호; 2004년 4월 27일자에 “PDX1 발현 내배엽” 라는 명칭으로 출원된 미국 가출원번호 제 60/566,293호; 2004년 7월 14일자에 “완전 내배엽의 분리를 위한 케모카인 세포 표면 수용체” 라는 명칭으로 출원된 미국 가출원번호 제 60/586,566호; 2004년 7월 14일자에 “완전 내배엽의 분리를 위한 케모카인 세포 표면 수용체” 라는 명칭으로 출원된 미국 가출원번호 제 60/587,942호; 및 2004년 12월 23일자에 “완전 내배엽” 라는 명칭으로 출원된 미국 가출원번호 제 11/021,618호에서도 찾을 수 있다.
- [0154] 본 발명의 구체적인 측면, 특징 및 장점은 하기한 바람직한 구현예에 대한 상세한 기재로부터 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0155] 초기 인간 발생의 결정적인 단계는 낭배형성 (gastrulation)이라 지칭되며, 이는 수정 후 2-3주 동안 일어난다. 낭배형성은 3가지의 원시 배엽이 최초로 지정되며 형성되는 시기이므로 매우 중요하다 (Lu et al., 2001; Schoenwolf and Smith, 2000). 심장, 혈액, 뼈, 골격근 및 그 외 연결 조직이 중배엽으로부터 유래되는데 반하여, 외배엽은 신체 외피 및 신경계 전체의 최종 형성을 담당한다. 완전 내배엽은 식도, 위, 소장 및 대장 및 폐, 간, 흉선, 부갑상선 및 갑상선, 담낭 및 췌장과 같은 장관으로부터 유래된 기관들을 포함하는 모든 장관의 형성을 담당하는 배엽으로 정의된다(Grapin-Botton and Melton, 2000; Kimelman and Griffin, 2000; Tremblay et al., 2000; Wells and Melton, 1999; Wells and Melton, 2000). 완전 내배엽과 원시 내배엽으로 불리는 세포의 완전 분리 계통 간에는 매우 중요한 구분이 이루어져야 한다. 상기 원시 내배엽은 주로 태반 난황의 벽 내배엽 및 내장 내배엽 부위 및 라이헤르트 막 (Reichert's membrane)의 세포외 기질 물질인 배외 조직의 형성을 담당한다.
- [0156] 낭배 형성 동안, 완전 내배엽 형성 과정은 중내배엽 세포 (mesendoderm; 중배엽 또는 내배엽을 형성할 수 있는 세포)가 원시선 (primitive streak)이라 불리는 구조를 통하여 이동하는 세포 이동과 함께 시작된다. 완전 내배엽은 선의 전방부 및 결절 (선의 최전방부의 특수구조)을 통해 이동하는 세포로부터 유래된다. 이동이 일어남에 따라, 완전 내배엽은 가장 먼저 최전방 장관 부위의 형성으로 시작하여 장관의 후방 말단 형성으로 완

결된다.

[0157] 발생 동안의 PDX1 유전자 발현

[0158] PDX1 (소위 STF-1, IDX-1 및 IPF-1라고도 불림)은 췌장 및 문측(rostral) 십이지장의 발생을 위해 필수적인 전사 인자이다. PDX1은 후부 전장 내배엽에서 기인된 췌장 내배엽에서 처음으로 발현되고, 마우스의 E8.5에서 시작되는 외분비 세포 및 내분비 세포를 모두 함께 생산한다. 그 후, PDX1은 베타 (beta) 세포 및 일부

[0159] 델타 (delta) 세포로 한정된다. 이러한 발현 양상은 성체에서 유지된다. 또한 PDX1은 십이지장 형성 직전인 발생 초기에 췌장 내배엽에서도 발현된다. PDX1은 또한 발생 초기에 십이지장 내배엽에서 발현되며, 이는 췌장 형성과 연계되며, 그 후 십이지장 장세포(enterocyte) 및 장내분비세포, 위의 전정부 및 담즙내, 담낭 및 담도내에서 발현된다. 또한 이러한 발현 부위는 췌장 발현이 제한되는 시점에 현저하게 문측 십이지장에 주로 한정된다.

[0160] PDX1-양성 세포 및 이와 관련된 방법

[0161] 본 발명의 구현에는 장관의 전장/중장 부위 (PDX1-양성 전장/중장 내배엽)로부터 유래된 세포, 조직 또는 기관으로 분화될 수 있는 다능성 (multipotent) 세포인 PDX1-1 양성 내배엽 세포의 생산을 위한 신규하고 한정된 방법에 관한 것이다. 본원에서 정의되는 "다능성(multipotent)" 또는 "다능성 세포(multipotent cell)"는 제한된 수의 다른 특정 세포 형태를 유발할 수 있는 세포 유형을 나타낸다. 본원에서 정의되는 "전장(foregut)/중장(midgut)"은 장관의 전방부 세포뿐만 아니라 전장/중장의 이음부의 세포를 포함하는 장관의 중반부를 나타낸다.

[0162] 본 발명의 바람직한 일부 구현에는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 생산하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 이러한 PDX1- 양성 전장 내배엽 세포는 장관 전방부 (PDX1-양성 전장 내배엽)로부터 유래된 세포, 조직 또는 기관으로 분화할 수 있는 다능성 세포이다.

[0163] 본 발명의 추가적인 바람직한 구현에는 전장의 최전방부 세포의 PDX1-양성 내배엽 세포를 생산하기 위한 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 이러한 PDX1-양성 내배엽 세포는 장관의 전장 부분의 최전방부로부터 유래된 세포, 조직 또는 기관으로 분화할 수 있는 다능성 세포이다.

[0164] 본원에 개시된 방법에 따라 생산되는 바와 같은 PDX1-양성 전장 내배엽 세포들은 완전히 분화된 인슐린-생산 베타-세포를 생산하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 형성하기 위하여 PDX1 (PDX1-음성 완전 내배엽 세포 또한 본원에서 완전 내배엽으로도 표시됨)을 실질적으로 발현하지 않는 완전 내배엽 세포를 분화시킴으로서 생산된다. PDX1-음성완전 내배엽 세포는 본원에 개시된 방법 또는 어떠한 다른 공지된 방법으로 배아 줄기 세포와 같은 만능성 세포(pluripotent cells)의 분화에 의해 제조될 수 있다. 만능성 세포로부터 PDX1-음성 완전 내배엽 세포를 생산하기 위한 편리하고 매우 효과적인 방법은 "완전 내배엽 (DEFINITIVE ENDODERM)"이라는 명칭으로 2004년 12월 23일에 출원된 미국특허출원 제 11/021,618호에 기술되어 있다.

[0165] PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 생산 방법들은 다능성 세포로부터 포상세포 (acinar cells), 췌관 세포 (ductal cells) 및 섬 세포 (islet cells)와 같은 췌장 조직 (pancreatic tissues)의 효과적인 생산을 위한 기초를 제공한다. 바람직한 특정 구현예에서, 인간 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 hESCs로부터 파생된 인간 PDX1-음성 완전 내배엽 세포로부터 유래된다. 이러한 인간 PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 기능성 인슐린-생산 베타 -세포의 생산에 이용될 수 있다. 유용한 양의 인슐린-생산 베타-세포를 수득하기 위해, 최종 췌장 (pancreatic) 섬세포 (islet)/베타-세포에 도달하기 전에 발생하는 각각의 분화 단계에 높은 효율성을 갖는 분화가 요구된다.

[0166] PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화가 기능적 췌장 섬세포/베타-세포

의 생산에 대한 초기 단계에서 나타내기 때문에 (도 1 참조), 이 단계에서의 높은 분화 효율이 특히 요구된다.

[0167] PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 효율적인 분화상의 바람직한 관점에서, 본 발명의 일부 측면은 PDX1-음성 완전 내배엽 세포의 약 2-25%가 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 전환되는 시험관내 방법론에 관한 것이다. 전형적으로, 상기 방법들은 한정되고 일시적으로 특정화된 방법으로 배양 및 성장 인자 조건을 적용하는 것을 포함한다. PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 위한 세포 개체군의 부가적인 밀집화는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포에 특이적으로 결합하는 시약을 이용함으로써 세포 개체군 내의 다른 세포로부터 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 분리 및/또는 정제함으로써 달성될 수 있다. 호환적으로, PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 PDX1 발현의 검출을 가능하게 하기 위하여 GFP (green fluorescent protein)와 같은 리포터 유전자로 표지할 수도 있다. 이러한 형광적으로 표지된 세포들은 형광 활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 정제될 수 있다. 본 발명의 추가적인 측면은 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 밀집된 세포 개체군뿐만 아니라 PDX1-양성 전장 내배엽으로 또는 PDX1-양성 전장 내배엽으로부터의 분화과정 상에 유용한 인자를 동정하는 방법에 관한 것이다.

[0168] 세포 배양물 또는 세포 개체군에서 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 양을 결정하기 위하여, 세포 배양물 또는 세포 개체군 내의 다른 세포들로부터 이런 세포 형태를 분별하는 방법이 바람직하다. 따라서, 본 발명의 특정 구현에는 그 존재, 비존재 및/또는 관련 발현 정도에 따라 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 지시하는 세포 마커뿐만 아니라 그러한 마커의 발현을 검출 및 탐지하기 위한 방법에 관한 것이다. 본원에서 정의되는 "발현 (expression)"은 원재료 또는 물질의 생산뿐만 아니라 재료 또는 물질의 생산량이나 그 수준을 의미한다. 따라서, 특정 마커의 발현 결정은 단순히 마커의 존재 또는 부재를 탐지하거나 발현된 마커의 상대적 또는 절대적인 양을 탐지하는 것을 의미한다. 본원에서 정의되는, "마커 (marker)"는 관찰되거나 탐지가능한 모든 분자를 의미한다. 예를 들어, 이 마커는 특정 유전자의 전사체와 같은 핵산, 유전자의 폴리펩티드 산물, 비유전자성 폴리펩티드 산물, 당단백질, 탄수화물, 당지질, 지질, 지질단백질 또는 소분자들 (예를 들어, 분자량이 10,000 amu 이하인 분자들)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0169] 본 발명의 일부 구현예에서, 마커의 존재, 결여 및/또는 발현은 Q-PCR로 측정된다. 예를 들어, PDX1, SOX17, SOX7, SOX1, ZICI, NFM, AFP (alpha-fetoprotein), HOXA13 (homeoboxA13), HOXC6 (homeoboxC6), 및/또는 본원에 개시된 다른 마커들과 같은 특정한 유전적 마커에 의해 생산된 전사체의 양은 Q-PCR로 측정된다. 다른 구현예에서, 상기에서 언급된 유전자에 의한 단백질의 발현을 검출하기 위해 면역조직화화법을 사용한다. 또 다른 구현예에서, Q-PCR 및 면역조직화화 기술은 이러한 마커들의 양 또는 상대적인 비율을 동정 및 검출하는 데에 사용된다.

[0170] 본원에 개시된 분화 및 검출 방법을 이용함으로써, PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 동정하는 것뿐만 아니라 세포 배양물 또는 세포 개체군에서 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 분포 정도를 검출하는 것이 가능하다. 예를 들어, 본 발명의 일부 구현예에서, 생산되는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 또는 세포 개체군은 PDX1-음성 세포 또는 세포 개체군보다 약 2배 이상의 큰 크기 수준으로 PDX1 유전자를 발현한다. 다른 구현예에서, 생산되는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 및 세포 개체군은 PDX1-음성 세포 또는 세포 개체군보다 약 2배 이상의 큰 크기 수준으로 PDX1 유전자를 발현한다. 또 다른 구현예에서, 생산되는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 또는 세포 개체군은 PDX1, SOX17, HOXA13 및 HOXC6로 구성된 군으로부터 선택된 하나 또는 그 이상의 마커를 PDX1-음성 완전 내배엽 세포 또는 세포 개체군보다 약 2배 또는 그 이상의 큰 크기 수준으로 발현한다.

[0171] 본원에 개시된 조성물 또는 방법은 여러가지 유용한 특징을 갖는다. 예를 들어, PDX1-양성 내배엽을 포함하는 세포 배양물 및 세포 개체군 뿐만 아니라 이러한 세포 배양물 및 세포 개체군의 생산을 위한 방법은 인간 발생의 초기 단계의 모델링 (modeling)에 유용하다. 게다가, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 당뇨병과 같은 질병 상태의 치료요법에 도움이 될 수 있다. 예를 들어, PDX1-양성 전장 내배엽은 오직 제한된 수의 조직을 위한 원료로서 제공되기 때문에 이는 순수 조직 또는 세포 유형의 발생시에 사용될 수 있다.

[0172] 만능성 세포로부터 PDX1-음성 완전 내배엽 (완전 내배엽)의 생산

[0173] PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 및/또는 세포 개체군은 처음으로 PDX1-음성 완전 내배엽 ("완전 내배엽"으로도 지칭됨)을 생산함으로써 만능성 세포로부터 생산된다. 완전 내배엽을 포함하는 세

포 배양물 및 밀집된 세포 개체군의 생산을 위한 만능성 세포를 분화시키는 공정은 하기에 간략하게 기술되어 있고 2004년 12월 23일에 "완전 내배엽"라는 명칭으로 미국 특허 출원번호 제 11/021,618호에 상세하게 기술되어 있다. 이들 과정의 일부로서, 개시물질로 사용되는 만능성 세포는 줄기 세포이다. 본 발명의 특정한 공정으로서, 완전 내배엽 세포를 포함하는 완전 내배엽 세포 배양물 및 밀집된 개체군은 배아 줄기세포로부터 생산된다. 본원에서 정의되는 "배아(embryonic)"는 단일 접합체로 발생하여 이 발생된 배우자 세포외에 만능성 또는 분화 전능성 (totipotent) 세포를 더이상 포함하지 않는 다세포 구조로 종결되는 유기체의 모든 범위의 발생 단계를 의미한다.

[0174] 접합체 융합에 의해 유래된 배아에 추가적으로, 용어 "배아의 (embryonic)"는 체세포 (somatic cell) 전달에 의해 유래된 배아를 의미한다. 완전 내배엽 세포의 유래를 위한 바람직한 방법은 완전 내배엽 생산을 위한 개시 물질로서 인간 배아 줄기 세포를 이용하는 것이다. 이러한 만능성 세포는 상실배 (morula), 배아 내세포 (embryonic inner cell) 집단 또는 이러한 배아 생식 융기 (embryonic gonadal ridges)로부터 수득된 세포들로부터 유래된 세포가 될 수 있다. 인간 배아 줄기 세포는 당업계에 잘 알려진 방법을 이용하여 실질적인 분화 없이 만능성 상태로 세포 배양물에서 유지될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어 미국 특허출원번호 제 5,453,357호, 제 5,670,372호, 제 5,690,926호, 제 5,843,780호, 제 6,200,806호 및 제 6,251,671호에 개시되어 있다.

[0175] 본원에 개시되는 방법의 일부 구현예에서, hESCs는 영양세포층(feeder layer)상에서 유지되는 것이다. 본 발명의 구현예에서, hESCs를 만능 상태로 유지토록 하는 본원에 개시된 방법으로 사용가능한 모든 영양세포층이 사용 가능하다. 인간 배아 줄기 세포의 배양을 위해 일반적으로 사용되는 영양세포층 중 하나로 마우스 섬유아세포층을 들 수 있다. 보다 최근에는, 인간 섬유아세포 영양세포층이 hESCs의 배양에 사용되기 위해 개발되었다 (미국특허출원번호 제 2002/0072117호 참고, 상기 문헌들의 개시내용은 전체로서 본원에서 참고로 인용됨). 본원에 개시되는 방법들의 호환 가능한 구현예들은 영양세포층의 사용 없이 만능 hESC의 유지를 가능케 한다. 상기 방법은 미국특허 출원번호 제 2003/0175956호에 개시되어 있으며, 상기 문헌들의 개시내용은 전체로서 본원에서 참고로 인용된다.

[0176] 본원에서 사용되는 인간 배아 줄기 세포는 혈청과 함께 또는 무혈청의 배양 하에서 유지 가능하다. 본 발명의 일부 구현예에서, 혈청 치환이 사용된다. 이외에 미국특허 출원번호 제 2003/0190748호에 개시된 무혈청 배양 기술 (serum-free culture technique)이 사용된다.

[0177] 줄기세포는 완전 내배엽으로 분화될 때까지 관행적인 계대법에 의하여 만능 상태로 배양되어 유지됨이 바람직하다. 본 발명의 일부 과정에서, 완전 내배엽으로

[0178] 의 분화는 줄기세포 배양물에 완전 내배엽으로의 분화를 촉진시키기에 충분한 양의

[0179] TGF β 상과의 성장인자를 제공함으로써 달성된다. 완전 내배엽 생산에 유용한 TGF β 상과의 성장인자는 노달/엑티빈 또는 BMP 하과군으로부터 선택된다. 바람직한 일부 분화 공정으로서, 상기 성장인자는 노달, 엑티빈 A, 엑티빈 B 및 BMP4로 구성된 군으로부터 선택되는 것이다. 추가적으로, 성장인자 Wnt3 및 다른 Wnt 과의 요소들이 완전 내배엽 세포의 생산에 유용하다. 본 발명의 특정 분화 공정으로서, 상기 언급된 성장인자의 모든 조합이 사용될 수 있다.

[0180] 본원에 개시된 만능성 줄기세포의 완전 내배엽으로의 분화 방법의 일부로서, 상기 언급된 성장 인자는 적어도 일부의 줄기세포를 완전 내배엽으로 분화를 촉진하기에 충분한 농도로 세포 배양물 내에 존재하도록 상기 세포에 공급하는 것이다. 일부 과정에서, 상기 성장 인자는 약 5 ng/ml 이상, 약 10 ng/ml 이상, 약 25 ng/ml 이상, 약 50 ng/ml 이상, 약 75 ng/ml 이상, 약 100 ng/ml 이상, 약 200 ng/ml 이상, 약 300 ng/ml 이상, 약 400 ng/ml 이상, 약 500 ng/ml 이상, 약 1000 ng/ml 이상, 약 2000 ng/ml 이상, 약 3000 ng/ml 이상, 약 4000 ng/ml 이상, 약 5000 ng/ml 이상 또는 약 5000 ng/ml 이상의 농도로 세포 배양물 내에 존재하는 것이다.

[0181] 본 발명의 만능성 줄기세포의 완전 내배엽 세포로의 분화를 위한 특정한 공정으로, 상기 언급된 성장 인자들은 첨가된 후 세포 배양물에서 제거되는 것이다. 예를 들어, 상기 성장인자들은 첨가 후 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일 또는 약 10일 내에 제거 가능하다. 바람직하게는, 상기 성장 인자들은 첨가 후 약 4일에 제거된다.

[0182] 본 발명의 완전 내배엽 배양물은 감소된 혈청을 포함하거나 또는 혈청을 포함하지 않는 배지 내에서 배양가능하다. 특정 배지 조건하에서, 혈청 농도는 약 0.05 % (v/v) 내지 약 20 % (v/v)의 범위가 될 수 있다. 예를 들어, 일부 분화 과정에서, 배지 내 혈청 농도는 약 0.05 % (v/v) 이하, 약 0.1 % (v/v) 이하, 약 0.2 % (v/v) 이하, 약 0.3 % (v/v) 이하, 약 0.4 % (v/v) 이하, 약 0.5 % (v/v) 이하, 약 0.6 % (v/v) 이하, 약 0.7 % (v/v) 이하, 약 0.8 % (v/v) 이하, 약 0.9 % (v/v) 이하, 약 1 % (v/v) 이하, 약 2 % (v/v) 이하, 약 3 % (v/v) 이하, 약 4 % (v/v) 이하, 약 5 % (v/v) 이하, 약 6 % (v/v) 이하, 약 7 % (v/v) 이하, 약 8 % (v/v) 이하, 약 9 % (v/v) 이하, 약 10 % (v/v) 이하, 약 15 % (v/v) 이하 또는 약 20 % (v/v) 이하일 수 있다. 일부 과정에서, 완전 내배엽 세포는 혈청 없이 또는 혈청 치환 하에 배양된다. 또 다른 과정에서, 완전 내배엽 세포는 B27 존재 하에서 배양된다. 상기 과정에서, B27은 약 0.1% 내지 약 20% (v/v)의 범위로 공급될 수 있다.

[0183] 만능성 세포의 PDX1-음성 완전 내배엽 (완전 내배엽)으로의 분화 관찰

[0184] hESC 배양물로부터 완전 내배엽세포로의 진행과정은 완전 내배엽의 특징적인 마커의 발현을 결정함으로써 측정될 수 있다. 일부 과정에서, 특정 마커의 발현은 마커의 존재 또는 비존재의 탐지에 의해 측정된다. 호환적으로, 특정 마커의 발현은 세포 배양물 또는 세포 개체군의 세포 내에 존재하는 마커의 수준을 측정함으로써 결정될 수 있다. 상기 과정에서, 마커 발현의 측정은 정성적 또는 정량적일 수 있다. 마커 유전자에 의해 발현되는 마커의 발현을 정량화하는 방법 중의 하나는 정량적 PCR (quantitative PCR)을 이용하는 것이다. Q-PCR 수행 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 당업계에 잘 알려진 다른 방법들도 또한 마커 유전자 발현 정량에 사용될 수 있다. 예를 들어, 마커 유전자 산물의 발현은 관심 있는 마커 유전자 산물에 특이적인 항체를 사용함으로써 탐지 가능하다. 특정 과정에서, hESC2 및 다른 세포 유형에 특징적인 마커 유전자의 현저한 발현 결여뿐만 아니라, 완전 내배엽에 특징적인 마커 유전자의 발현도 결정된다.

[0185]

[0186] 하기 실시예에서 추가적으로 개시되는 바와 같이, 완전 내배엽의 확실한 마커는 SOX17 유전자이다. 이와 같이, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 완전 내배엽 세포는 SOX17 마커 유전자를 발현하여, 결국 SOX17 유전자 산물을 생산한다. 완전 내배엽의 또 다른 마커들은 MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 및 CRIP1들이다. 완전 내배엽 세포는 원시 및 내장 내배엽에 특징적인 SOX7 마커 유전자의 발현보다 더 높은 수준으로 SOX17 마커 유전자를 발현하며 (표 1 참조), 일부 과정에서, SOX17 및 SOX7의 발현이 관찰된다. 다른 과정에서, hESCs의 특징인 SOX17 마커 유전자 및 OCT4 마커 유전자의 발현이 관찰된다. 부가적으로, 완전 내배엽 세포가 SOX17 마커 유전자를 ARP, SPARC 또는 TM (Thrombomodulin) 마커 유전자보다 높은 수준으로 발현하기 때문에 이러한 유전자의 발현도 또한 관찰된다.

[0187] 완전 내배엽의 또 다른 마커는 CXCR4 유전자이다. CXCR4 유전자는 리간드가 화학주성 SDF-1인 세포 표면 케모카인 수용체를 암호화한다. 성체에서 CXCR4 수용체-함유 세포의 주된 역할은 조혈 세포의 골수로의 이동, 림프구 소통 및 다양한 B세포 및 대식세포 혈구 계통의 분화일 것으로 여겨졌다[Kim, C., and Broxmeyer, H. J. Leukocyte Biol. 65, 6-15 (1999)]. 또한 CXCR4 수용체는 T-세포로의 HIV-1의 유입에 대한 공동수용체로서 작용한다[Feng, Y., et al. Science, 272, 872-877, (1996)]. 광범위한 연구들을 통하여, 케모카인 수용체 CXCR4 및 그의 특이적 리간드, SDF-1은 [Kim, C., and Broxmeyer, H., J. Leukocyte Biol. 65, 6-15 (1999)] 마우스의 초기 발생 및 성체기 동안에 발현된다고 알려져 있다 [McGrath, K.E. et al. Dev. Biology 213, 442-456 (1999)]. 유전자 도입 마우스에서 각 유전자가 파괴됨이 증명되었을 때 그 결과로 후기 배아의 치사가 나타나며, 발생시의 CXCR4/SDF1 상호 작용은 이로써 명백해 진다 [Nagasawa et al. Nature, 382, 635-638 (1996)], Ma, Q., et al Immunity, 10, 463-471 (1999)]. 맥그라스 등 (McGrath et al.)은 CXCR4가 초기 낭배 형성 배아 (E 7.5) 시기에서 가장 풍부한 케모카인 수용체 전령 RNA임을 RNA 분해효소 보호 (RNase protection) 및 in situ 혼성화 (in situ hybridization) 방법론을 이용하여 증명하였다. 낭배형성기의 배아에서, CXCR4/SDF-1 신호는 원시-선 배엽 세포의 이동을 유도하는데 주로 관여하는 것으로 나타났으며, 완전 내배엽, 중배엽 및 상기 시기에 나타나는 배외 중배엽에서 발현되는 것으로 나타났다. E7.2-7.8 마우스 배아에서, CXCR4 및 알파-페토단백질은 내장 내배엽의 무발현을 상호 배타적으로 나타낸다 [McGrath, K.E. et al. Dev. Biology 213, 442-456 (1999)].

[0188]

[0189]

분화하는 만능성 세포로부터 생산되는 완전 내배엽 세포는 CXCR4 마커 유전자를 발현하기 때문에, CXCR4의 발현은 완전 내배엽 세포의 생산을 탐지하기 위하여 관찰될 수 있다. 부가적으로, 본원에서 개시된 방법에 의해 생산된 완전 내배엽 세포는 SOX17, MIXL1, GATA4, HNF3b, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 및 CRIP1을 포함하나, 이에 제한되지 않는 완전 내배엽 세포의 다른 마커들을 발현한다. 완전 내배엽 세포가 SOX7 마커 유전자의 발현보다 높은 수준으로 CXCR4 마커 유전자를 발현한 이후로, CXCR4 및 SOX7 둘 모두의 발현이 관찰될 수 있다. 다른 과정에서, CXCR2 마커 유전자 및 OCT4 마커 유전자 둘 모두의 발현이 관찰된다. 부가적으로, 완전 내배엽 세포가 AFP, SPARC 또는 TM (Thrombomodulin) 마커 유전자의 발현보다 높은 수준으로 CXCR4 마커 유전자를 발현하기 때문에, 이러한 유전자들의 발현도 또한 관찰될 수 있다.

[0190]

내배엽 세포의 CXCR4 발현은 SOX17의 발현을 배제하지 않음이 인식되어야 한다. 이와 같이, 본원에 개시된 과정에 의해 생산되는 완전 내배엽 세포는 실질적으로 SOX17 및 CXCR4를 발현하나, AFP, TM, SPARC 또는 PDX1은 실질적으로 발현하지 않는다.

[0191]

완전 내배엽의 밀집화, 분리 및/또는 정제

[0192]

상기에서 개시된 어떠한 하나의 과정에 의해서 생산된 완전 내배엽 세포는 이런 세포에 특이적인 친화 태그(affinity tag)를 사용하여 밀집화, 분리 및/또는 정제될 수 있다. 완전 내배엽 세포를 위한 특이적인 친화 태그의 예로는, 항체, 리간드 또는 완전 내배엽 세포의 세포 표면에는 존재하나, 본원에 개시된 방법에 의해 생산되는 세포 배양물 내에서는 존재하지 않는 폴리펩티드와 같은 마커 분자에 특이적인 다른 결합 시약들을 들 수 있다. 일부 과정에서, CXCR4에 결합하는 항체는 완전 내배엽 세포의 밀집화, 분리 또는 정제를 위해 친화 태그로서 또한 이용될 수 있다. 다른 과정에서, 케모카인 SDF-1 또는 SDF-1에 기초한 다른 분자들은 친화 태그로서 또한 사용될 수 있다. 이러한 분자들은 SDF-1 단편, SDF-1 융합체 (fusions) 또는 SDF-1 유사체 (mimetics)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0193]

[0194]

항체의 제조 및 이들의 세포 분리를 위한 사용 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 이러한 방법들은 본원에 개시된 항체 및 완전 내배엽과 함께 사용하기 위한 수단이 될 수도 있다. 하나의 과정에서, CXCR4에 결합하는 항체는 마그네틱 비드 (magnetic bead)에 부착하고, 그 후 세포간 및 기질의 부착을 줄이기 위해 효소적으로 처리된 세포 배양물 내의 완전 내배엽 세포에 대한 결합을 허용한다. 세포/항체/비드 복합체는 그 후 비드가 결합된 완전 내배엽 세포를 비드가 결합되지 않은 세포들로부터 분리하는데 사용되는 가동성 자기장 (movable magnetic field)에 노출된다. 완전 내배엽 세포가 배양물 내의 다른 세포들로부터 물리적으로 한 번 분리되면, 항체 결합도 분리되고, 세포는 적절한 조직 배양 배지로 옮겨져 배양된다.

[0195]

[0196]

밀집된, 분리 또는 정제된 완전 내배엽 세포 배양물 또는 세포 개체군을 수득하기 위하여 부가적인 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CXCR4 항체를 세포간 및 기질의 부착을 줄이기 위하여 처리된 완전 내배엽-포함 세포 배양물과 배양하였다. 그 후, 세포를 세척, 원심분리 및 재현탁시켰다. 상기 세포 현탁액을 일차 항체 (primary antibody)에 결합할 수 있는 FITC-결합 항체와 같은 이차 항체 (secondary antibody)로 처리하여 배양시켰다. 그 후 세포를 세척하고, 원심분리한 후 완충액으로 재현탁하였다. 그 후 세포 현탁액은 형광 활성화 세포 분류기 (FACS; fluorescence activated cell sorter)를 사용하여 분석되고 분류된다. CXCR4-양성 세포가 CXCR4-음성 세포로부터 분리되어 수집되며, 그 결과로서 상기 세포 유형이 분리된다. 만약 필요하다면, 분리된 세포 조성물은 대체 가능한 친화성-기초(affinity-based) 분리방법을 사용하거나 완전 내배엽에 특이적인 동일 또는 상이한 마커들을 사용하는 추가적인 분류에 의해 더욱 정제될 수 있다.

[0197]

본 발명의 다른 과정에서, 완전 내배엽은 CXCR4에 결합하는 리간드 또는 다른 분자들을 사용하여 밀집화, 분리 및/또는 정제된다. 일부 과정에서, 상기 분자는 SDF-1 또는 이의 단편, 융합체 또는 유사체이다.

[0198]

[0199]

본 발명의 바람직한 과정에서, 완전 내배엽 세포는 줄기세포 배양물이 완전 내배엽 계통으로 분화되도록

유도된 후, 다른 비-완전 내배엽 세포로부터 밀집화, 분리 및/또는 정제된다. 상기에 개시된 밀집화, 분리 및 정제 과정은 분화의 모든 단계에서 상기 배양물과 사용될 수 있다.

[0200]

[0201] 상기에 개시된 과정에 부가적으로, 완전 내배엽 세포는 또한 세포 분리를 위한 다른 기술로도 분리될 수 있다. 부가적으로, 완전 내배엽 세포는 또한 상기 완전 내배엽 세포의 선택적 생존 또는 선택적 증식을 촉진하는 성장 조건하에서 연속 배양 방법 (serial subculture)으로 밀집 또는 분리될 수 있다.

[0202]

[0203] 본원에 개시된 방법을 사용하여, 밀집화, 분리 및/또는 정제된 완전 내배엽 세포 및/또는 조직은 최소한 일부의 분화를 겪은 줄기 세포 배양물 또는 개체군과 같은 만능성 세포 배양물 또는 세포 개체군으로부터 시험관 내 (in vitro)에서 생산될 수 있다. 일부 방법에서, 세포는 무작위적인 분화를 겪는다. 그러나, 바람직한 방법에서 상기 세포들은 첫번째로 완전 내배엽으로 분화되도록 유도되는 것이다. 일부 바람직한 밀집화, 분리 및/또는 정제 방법은 인간 배아 줄기 세포로부터 완전 내배엽의 시험관 내 생산에 관한 것이다. 본원에 개시된 방법을 사용하여, 세포 개체군 또는 세포 배양물은 무처리 세포 개체군 또는 세포 배양물과 비교하여 최소 약 2 내지 약 1000 배 함유량의 완전 내배엽으로 밀집화시킬 수 있다.

[0204] PDX1-음성 완전 내배엽 (완전 내배엽)을 함유하는 조성물

[0205] 상기에서 개시된 방법에 따라 생산된 세포 조성물은 완전 내배엽을 함유하는 세포 배양물 및 완전 내배엽이 부유화된 세포 개체군을 포함한다. 예를 들어, 세포 배양물 내에 약 50-80% 이상의 완전 내배엽 세포를 함유하는 세포 배양물을 생산할 수 있다. 분화 과정의 효율성은 세포 성장 조건, 성장 인자의 농도 및 배양 단계의 타이밍을 포함하나 이에 한정되지는 않으며 상기과 같은 특정 요인의 변경에 의해 조절될 수 있기 때문에, 본원에 개시된 분화 과정은 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 95% 이상의 만능성 세포로부터 완전 내배엽으로의 전환율을 나타낼 수 있다. 예를 들어, CXCR4 수용체에 결합하는 친화성 시약 (affinity reagent)이 사용된 완전 내배엽 세포의 분리 과정에서, 실질적으로 순수한 완전 내배엽 세포 개체군이 회수될 수 있다.

[0206] PDX1-음성 완전 내배엽으로부터 PDX1-양성 전장 내배엽의 생산

[0207] 본원에 개시된 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 배양물 및 개체군은 상기에서 개시된 만능성 세포로부터 유래된 PDX1-음성 완전 내배엽으로부터 생산되는 것이다. 바람직한 방법은 개시 물질로서 인간 배아 줄기 세포를 이용한다. 하나의 구현예에서, hESCs는 먼저 PDX1-음성 완전 내배엽 세포로 전환되며, 이후 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 전환된다. 그러나, PDX1-양성 전장 내배엽의 생산을 위한 개시 물질이 만능성 세포 분화 방법을 이용하여 생산된 완전 내배엽 세포에 한정되지 않음을 인식하여야 한다. 오히려, 이들의 기원에 무관하게 어떠한 PDX1-음성 완전 내배엽 세포라도 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있다.

[0208] 본 발명의 일부 구현예에서, PDX-1음성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군은 또한 PDX-1 양성 전장(foregut) 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 및/또는 밀집된 세포 개체군의 분화를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 PDX1-음성, SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군이 사용된다. 일부 구현예에서, 세포 배양물 또는 세포 개체군은 또한 이전의 분화 단계(완전 내배엽을 위한 다능성 세포의 분화 단계)로부터 남아 있는 액티빈, 노달 및/또는 BMP와 같은 분화 인자들을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 이전 분화 단계에서 이용된 인자들은 PDX1-음성, SOX17-양성 완전 내배엽세포의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를 위해 사용되는 인자를 첨가하기에 앞서 세포 배양물 또는 세포 개체군으로부터 제거된다. 다른 구현예에서, PDX1-음성, SOX17-양성 완전내배엽 세포로 밀집된 세포 개체군은 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 생산을 위한 원료로 이용된다.

[0209] 세포 배양물상의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포는 상기 세포의 PDX1-음성, PDX1-양성 전장 내배엽 세포(전장

분화 인자)로의 분화를 촉진하는 분화 인자를 PDX1-음성, SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물에 제공함으로써 PDX1-양성 내배엽 세포로 분화된다. 본 발명의 일부 구현예에서, 전장 분화 인자는 레티노산(RA)과 같은 레티노이드이다. 일부 구현예에서, 레티노이드는 FGF-4 또는 FGF-10와 같은 섬유아세포 성장 인자와의 결합에 이용된다. 다른 구현예에서, 레티노이드는 성장인자 및/또는 조건화된 배양액의 TGF 상과의 구성 인자들과의 결합에 이용된다.

[0210] “조건화 배지”는 기본 배지와 비교함으로써 변경 가능한 배지를 의미한다. 예를 들어, 배지의 조절은 기본 배지에서 확인되는 원래 수준 (original level)으로부터 영양소 및/또는 성장 인자들과 같은 분자들의 첨가 또는 결핍을 수행할 수 있다.

[0211] 일부 구현예에서, 배지는 특정한 시간 동안, 특정 조건하에서 배지에서 특정한 유형의 배지가 성장 또는 유지되도록 허용함에 의해 조건화된다. 예를 들어, 배지는 한정된 수시간동안 특정한 온도에서 특정된 조성 배지 내에서 hESCs가 증식, 분화 또는 유지되도록 조건화할 수 있다. 당업계에 잘 인지되는 바와 같이, 수많은 세포, 배지 유형, 유지기간 및 환경적인 조건들은 거의 무한대의 조건화 배지들을 생산하기 위해 이용될 수 있을 것이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 배지는 분화된 만능성 세포가 약 1%~ 약 20% 농도의 혈청을 포함하는 배지에서 성장 또는 유지하도록 함으로써 조건화된다. 다른 구현예로서, 배지는 분화된 만능성 세포가 약 1ng/ml 내지 약 1000ng/ml의 액티빈을 포함하는 배지에서 성장 또는 유지하도록 조건화되는 것이다. 또 다른 구현예로서, 배지는 분화된 만능성 세포가 약 1ng/ml 내지 약 1000mg/ml의 BMP4를 포함한 배지에서 성장 또는 유지하도록 조건화하는 것이다. 바람직한 구현예에서, 분화된 hESCs가 24시간 동안 약 25ng/ml 액티빈 A 및 약 2μM RA를 포함하는 RPMI와 같은 배지에서 성장 또는 유지하도록 함으로써 제조된다.

[0212] 본 발명의 일부 구현예에서, PDX1-음성 완전 내배엽에서 PDX1-양성 전장 내배엽으로의 분화를 향상시키기 위해 사용되는 배지를 조건화한 세포는 약 0% 내지 약 20%의 혈청 및/또는 하나 이상의 TGFβ 상과의 성장/분화 인자들을 포함하는 RPMI와 같은 배양액 내에서 약 5일 이상 hESCs와 같은 만능성 세포로부터 분화된 세포들이다. 액티빈 A 및 BMP4와 같은 분화 인자는 약 1ng/ml 내지 약 1000ng/ml의 농도범위에서 제공된다. 본 발명의 특정 구현예에서, 조건화 배지에 사용되는 세포는 약 5일 이상 저혈청 (low serum) RPMI 하에서 hESCs로부터 분화된다. 일부 구현예에 따르면, 저혈청 RPMI는 저 농도의 혈청을 포함하는 배지를 의미하며, 상기 혈청 농도는 제한된 시간에 따라 점차적으로 증가된다. 예를 들어, 하나의 구현예로서, 저혈청 RPMI는 세포 성장의 첫날 약 0.2% FBS의 농도, 세포성장의 둘째날 약 0.5%

[0213] FBS 농도 및 세포 성장의 3번째날부터 5일째까지 약 2% FBS의 농도를 포함하는 것이

[0214] 다. 또 다른 구현예로서, 저혈청 RPMI는 첫째날 약 0%, 둘째날 약 0.2% 및 3 내지

[0215] 6째날 약 0.2%의 농도를 포함하는 것이다. 바람직한 특정 구현예로서, 저혈청 RPMI

[0216] 는 액티빈 A 및 BMP4와 같은 하나 이상의 분화 인자로 보충된 것이다. 조건화된 배

[0217] 지에 사용된 세포들 준비하는 데 있어서 이 배지의 추가적 사용으로서, 저혈청

[0218] RPMI는 PDX1-음성 완전 내배엽 세포로부터 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화를

[0219] 위한 배지로서 이용될 수 있다.

[0220] 조건화 배지는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 성장 또는 유지를 방해하지 않

[0221] 는다는 전제하에서 RPMI가 아닌 배지로부터도 제조될 수 있음은 당업자에게 자명하

[0222] 게 인식될 것이다. 또한 조건화 배지에 사용된 세포는 다양한 형태가 될 수 있음도

[0223] 또한 자명할 것이다. 구현예로서, 새로이 분화된 세포가 조건 배지에 사용되면, 이

[0224] 러한 세포들은 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 성장 또는 유지를 방해하지 않는다는

[0225] 전제하에서 RPMI가 아닌 배지 내에서 분화될 수도 있다. 게다가, 당업자라면 조건

[0226] 화를 위해 사용되는 세포의 조건화 유지 및 준비의 유지에 각각 24시간 또는 5일도

[0227] 요구되지 않으며, 이는 다른 기간 동안으로도 본원에 보고되는 효과를 달성하기에

- [0228] 충분할 것으로 예상되는 바이다.
- [0229] 일반적으로, 섬유아세포 성장인자, 성장인자들의 TGF β 상과의 구성인자,
- [0230] 조건화 배지 또는 이의 전장 분화 인자들의 조합과 레티노이드와의 조합 사용은
- [0231] 레티노이드 단독 사용보다 PDX1-음성 완전 내배엽의 PDX1-양성 전장 내배엽로의
- [0232] 보다 더 큰 분화를 유도한다. 바람직한 구현예에서, RA 및 FGF-10 모두를 PDX1-음
- [0233] 성 완전 내배엽 세포 배양물에 제공되는 것이다. 또 다른 바람직한 구현예로서,
- [0234] PDX1-음성 완전 내배엽 세포는 조건화 배지, 액티빈 A, 액티빈 B 및 RA를 포함하는
- [0235] 세포 배양물 내에서 분화된다.
- [0236] 본원에 개시된 분화 과정의 일부 구현예에 있어서, 상기 전장 분화인자들을 세포에 적어도 일부 상기 PDX1-음성 완전 내배엽 세포 배양물 또는 세포 개체군에 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 분화되는 것을 촉진시키기 위해 충분한 농도로 세포 배양물 또는 세포 개체군 내에 존재하도록 이러한 인자들을 제공하는 것이다. 세포 배양물 및/또는 세포개체군과 연계되어 사용시, "일부(portion)"라는 용어는 세포 배양물 또는 세포 개체군의 양이 0이 아닌 모든 것을 의미하며 이의 범위는 단일 세포로부터 세포 배양물 또는 세포 개체군 전체까지이다.
- [0237] 본 발명의 일부 구현예로서, 레티노이드가 세포 배양물의 세포에 약 0.01 μM 이
- [0238] 상, 약 0.02 μM 이상, 약 0.04 μM 이상, 약 0.08 μM 이상, 약 0.1 μM 이상, 약
- [0239] 0.2 μM 이상, 약 0.3 μM 이상, 약 0.4 μM 이상, 약 0.5 μM 이상, 약 0.6 μM
- [0240] 이상, 약 0.7 μM 이상, 약 0.8 μM 이상, 약 0.9 μM 이상, 약 1 μM 이상, 약
- [0241] 1.1 μM 이상, 약 1.2 μM 이상, 약 1.3 μM 이상, 약 1.4 μM 이상, 약 1.5 μM
- [0242] 이상, 약 1.6 μM 이상, 약 1.7 μM 이상, 약 1.8 μM 이상, 약 1.9 μM 이상, 약
- [0243] 2 μM 이상, 약 2.1 μM 이상, 약 2.2 μM 이상, 약 2.3 μM 이상, 약 2.4 μM 이
- [0244] 상, 약 2.5 μM 이상, 약 2.6 μM 이상, 약 2.7 μM 이상, 약 2.8 μM 이상, 약 2.9
- [0245] μM 이상, 약 3 μM 이상, 약 3.5 μM 이상, 약 4 μM 이상, 약 4.5 μM 이상, 약
- [0246] 5 μM 이상, 약 10 μM 이상, 약 20 μM 이상, 약 30 μM 이상, 약 40 μM 이상 또
- [0247] 는 약 50 μM 이상의 농도로 존재하도록 제공되는 것이다. 본원에서 정의되는 "레
- [0248] 티노이드(retinoid)"는 레티놀, 레티날 또는 레티노산 뿐만 아니라 이들 화합물의
- [0249] 유도체를 의미한다. 바람직한 구현예로서, 레티노이드는 레티노산이다.
- [0250] 본 발명의 다른 구현예로서, 섬유아세포 성장 인자 상과(family)의 하나 이상의 분
- [0251] 화 인자는 세포 배양물 내에 존재하는 것이다. 예를 들어, 일부 구현예로서, FGF-4
- [0252] 이 세포 배양물에 약 10 ng/ml 이상, 약 25 ng/ml 이상, 약 50 ng/ml 이상, 약 75
- [0253] ng/ml 이상, 약 100 ng/ml 이상, 약 200 ng/ml 이상, 약 300 ng/ml 이상, 약 400
- [0254] ng/ml 이상, 약 500 ng/ml 이상 또는 약 1000 ng/ml 이상의 농도로 존재할 수 있
- [0255] 다. 본 발명의 추가적인 구현예에서, FGF-10은 약 10 ng/ml 이상, 약 25 ng/ml 이
- [0256] 상, 약 50 ng/ml 이상, 약 75 ng/ml 이상, 약 100 ng/ml 이상, 약 200 ng/ml 이상,

[0257] 약 300 ng/ml 이상, 약 400 ng/ml 이상, 약 500 ng/ml 이상 또는 약 1000 ng/ml 이

[0258] 상의 농도로 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, FGF-4 또는 FGF-10 모두가 아닌 둘

[0259] 중 하나가 RA와 함께 세포 배양물에 제공되는 것이다. 바람직한 구현예에서, RA는

[0260] 세포 배양물에 1 μ M 로 존재하며, FGF-10는 50 ng/ml의 농도로 존재하는 것이다.

[0261] 본 발명의 일부 구현예에서, TGF β 상과의 성장 인자 및/또는 조건화 배지가 세포

[0262] 배양물 내에 존재하는 것이다. 이들 분화 인자들은 RA 및/또는 이에 한정되는 것은

[0263] 아니나, FGF-4 및 FGF-10를 포함하는 다른 중-전장 (mid-foregut) 분화 인자들과

[0264] 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 액티빈 A 및/또는 액티빈

[0265] B는 전체 배양액의 약 5 ng/ml 이상, 약 10 ng/ml 이상, 약 25 ng/ml 이상, 약 50

[0266] ng/ml 이상, 약 75 ng/ml 이상, 약 100 ng/ml 이상, 약 200 ng/ml 이상, 약 300

[0267] ng/ml 이상, 약 400 ng/ml 이상, 약 500 ng/ml 이상 또는 약 1000 ng/ml 이상의 농

[0268] 도로 세포 배양물에 존재할 수 있다. 본 발명의 추가적인 구현예에서, 조건화 배지

[0269] 는 약 1% 이상, 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이

[0270] 상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약

[0271] 100% 이상의 농도로 세포 배양물 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 액티빈 A, 액티

[0272] 빈 B 및 조건화 배지는 세포 배양물에 RA와 함께 제공되는 것이다. 바람직한 구현

[0273] 예에서, PDX1-음성 완전 내배엽 세포는 약 1 μ M RA, 약 25 ng/ml 액티빈 A 및 분화

[0274] 된 hESCs에 의해 약 24시간 동안 조건화된 저혈청 RPMI를 포함하는 배양물 내에서

[0275] PDX1-양성 전장 내배엽 세포로 분화되며, 상기 분화된 hESCs는 약 100 ng/ml 액티

[0276] 빈 A를 포함하는 저혈청 RPMI에서 약 5일 동안 분화된다. 또 다른 바람직한 구현예

[0277] 에서, 액티빈 B 및/또는 FGF-10는 각각 25 ng/ml 및 50 ng/ml로 또한 배양액 내에

[0278] 존재한다.

[0279] 본 발명의 특정 구현예에서, 상기 전장 분화인자는 이의 첨가 후에 세포 배양물로

[0280] 부터 제거되는 것이다. 예를 들어, 전장 분화인자는 첨가 후 약 하루, 약 이틀, 약

[0281] 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일 또는 약 10일 이내에 제거

[0282] 될 수 있다.

[0283] PDX1-양성 전장 내배엽 세포 배양물은 감소된 혈청을 포함하는 배지 내에서 성장할

[0284] 수 있다. 혈청은 약 0.05% (v/v) 내지 약 20% (v/v)의 농도 범위가 될 수 있다. 일

[0285] 부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 혈청 치환하에서 성장된다. 예를 들

[0286] 어, 특정 구현예에서, 배지의 혈청 농도는 약 0.05% (v/v) 이하, 약 0.1% (v/v) 이

[0287] 하, 약 0.2% (v/v) 이하, 약 0.3% (v/v) 이하, 약 0.4% (v/v) 이하, 약 0.5%

[0288] (v/v) 이하, 약 0.6% (v/v) 이하, 약 0.7% (v/v) 이하, 약 0.8% (v/v) 이하, 약

[0289] 0.9% (v/v) 이하, 약 1% (v/v) 이하, 약 2% (v/v) 이하, 약 3% (v/v) 이하, 약 4%

[0290] (v/v) 이하, 약 5% (v/v) 이하, 약 6% (v/v) 이하, 약 7% (v/v) 이하, 약 8% (v/v)

[0291] 이하, 약 9% (v/v) 이하, 약 10% (v/v) 이하, 약 15% (v/v) 이하 또는 약 20%

[0292] (v/v) 이하일 수 있다. 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 무혈청하

[0293] 에서 성장된다. 다른 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 혈청 치환하에서
 [0294] 성장된다.

[0295] 다른 부가적인 구현예에서, PDX1-양성 내배엽 세포는 B27의 존재하에서 성장된다.

[0296] 이러한 구현예에서, B27은 약 0.1% (v/v) 내지 약 20% (v/v) 또는 약 20% (v/v) 이
 [0297] 상의 농도로 배양액에 제공될 수 있다. 특정 구현예에서, 배양액 내에서 B27의 농
 [0298] 도는 약 0.1% (v/v), 약 0.2% (v/v), 약 0.3% (v/v), 약 0.4% (v/v), 약 0.5%
 [0299] (v/v), 약 0.6% (v/v), 약 0.7% (v/v), 약 0.8% (v/v), 약 0.9% (v/v), 약 1%
 [0300] (v/v), 약 2% (v/v), 약 3% (v/v), 약 4% (v/v), 약 5% (v/v), 약 6% (v/v), 약 7%
 [0301] (v/v), 약 8% (v/v), 약 9% (v/v), 약 10% (v/v), 약 15% (v/v) 또는 약 20% (v/v)
 [0302] 이다. 호환적으로, 첨가된 B27 보충 농도는 상용의 B27 저장용액의 농도 배수로 측
 [0303] 정될 수 있다. 예를 들어, B27은 50X 저장 용액으로써 인비트로젠사 (칼즈배드,
 [0304] CA)으로부터 입수 가능하다. 충분한 용량의 성장 배지에 충분한 양의 저장 용액의
 [0305] 첨가는 요구되는 양의 B27을 보충한 배양액을 생산한다. 예를 들어, 90ml의 성장
 [0306] 배지를 위한 10ml의 50X B27 저장 용액의 첨가는 5X B27로 보충된 성장 배지를 생
 [0307] 산할 것이다. 배지 내에서의 B27 보충 농도는 약 0.1X, 약 0.2X, 약 0.3X, 약
 [0308] 0.4X, 약 0.5X, 약 0.6X, 약 0.7X, 약 0.8X, 약 0.9X, 약 1X, 약 1.1X, 약 1.2X,
 [0309] 약 1.3X, 약 1.4X, 약 1.5X, 약 1.6X, 약 1.7X, 약 1.8X, 약 1.9X, 약 2X, 약
 [0310] 2.5X, 약 3X, 약 3.5X, 약 4X, 약 4.5X, 약 5X, 약 6X, 약 7X, 약 8X, 약 9X, 약
 [0311] 10X, 약 11X, 약 12X, 약 13X, 약 14X, 약 15X, 약 16X, 약 17X, 약 18X, 약 19X,
 [0312] 약 20X 및 약 20X 이상일 수 있다.

[0313] PDX1-양성 내배엽을 위한 PDX1-음성 완전 내배엽의 분화 관찰

[0314] 만능성 세포로부터 완전 내배엽 세포의 분화처럼, PDX1-음성, SOX-17 완전
 [0315] 내배엽의 PDX1-양성 전장 내배엽으로의 이들 세포 유형에 특징적인 마커의 발현을
 [0316] 측정함으로써 관찰할 수 있다. 이러한 관찰은 예를 들어, 하나 이상의 분화 인자
 [0317] 농도 및 환경조건과 같은 다양한 조건하에서 원하는 양의 PDX1-양성 전장 내배엽의
 [0318] 생산에 충분한 시간을 결정할 수 있게 허용한다. 바람직한 구현예에서, 희망하는
 [0319] 양의 PDX1-양성 전장 내배엽의 생산을 위해 충분한 시간은 PDX1의 발현을 탐지함으
 [0320] 로서 결정된다. 본 발명의 구현예에서, 특정한 마커(markers)의 발현은 마커의 존
 [0321] 재 유무를 탐지함으로써 결정된다. 호환적으로, 특정한 마커의 발현은 세포 배양물
 [0322] 또는 세포 개체군 세포 내에서의 어떠한 마커의 존재 수준을 측정함에 의해 결정될
 [0323] 수 있다. 이러한 구현예에서, 마커 발현의 측정은 정성적 또는 정량적일 수 있다.
 [0324] 상술한 바와 같이, 마커 유전자에 의해 생산되는 발현 마커의 정확한 양을 측정하
 [0325] 는 바람직한 방법은 Q-PCR을 사용하는 것이다. 특별한 구현예에서, Q-PCR은 PDX1-
 [0326] 양성 전장 내배엽에 특징적인 마커 유전자의 발현 및 다른 세포 유형의 특징적인
 [0327] 마커 유전자 발현의 부족한 양을 측정함으로써 PDX1-음성, SOX17-양성 완전 내배엽
 [0328] 세포 배양물의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 진행과정을 관찰시 사용된다. 당업

[0329] 계에 알려져 있는 또 다른 방법을 또한 마커 유전자 발현의 양을 측정하기 위해 사
 [0330] 용 될 수 있다. 예를 들어, 마커 유전자 산물의 발현은 관심있는 마커 유전자 산물
 [0331] 에 특이적인 항체를 사용함으로써 탐지될 수 있다. 본 발명의 구현예에서, PDX1-
 [0332] 양성 전장 내배엽에 특이적인 마커 유전자의 발현뿐만 아니라 PDX1-음성 완전 내배
 [0333] 엽, hESCs 및 다른 세포 유형에 특이적인 마커 유전자의 유의적인 발현의 결핍도
 [0334] 또한 측정할 수 있다.

[0335] 추가적으로 하기 실시예에 개시하는 바와 같이, PDX1는 PDX1-양성 전장 내배
 [0336] 엽과 연관된 마커 유전자이다. 이와 같이, 본 발명의 일부 구현예에서, PDX1의 발
 [0337] 현이 측정된다. 다른 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽에서 발현되는 이에 한정
 [0338] 되지는 않으나, SOX17, HOXA13 및/또는 HOXC6를 포함하는 다른 마커들의 발현도 또
 [0339] 한 탐지된다. PDX1는 또한 특정 한 다른 세포 유형 (즉, 내장 내배엽 및 특정 신경
 [0340] 외배엽)에서도 발현될 수 있기 때문에, 본 발명의 일부 구현예는 내장 내배엽 및/
 [0341] 또는 신경 외배엽과 연관된 마커 유전자 발현의 부재 또는 실질적인 부재를 증명하
 [0342] 는 것에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 내장 내배엽 및/또는 신경 외
 [0343] 배엽에서 발현이 측정되는 마커는 SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 및/또는 NFM를 포함하나,
 [0344] 이에 한정되지는 않는다.

[0345] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산되는 PDX1-양성 전장 내배엽
 [0346] 세포 배양물은 SOX7, AFP, SOX1, ZIC1 또는 NFM 마커 유전자를 발현하는 세포가 실
 [0347] 질적으로 없는 것이다. 특정한 구현예에서, 본원에서 개시된 과정에 의해 생산된
 [0348] PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 내장 내배엽, 벽 내배엽 및/또는 신경세포가 실질적
 [0349] 으로 없는 것이다.

[0350] PDX1-양성 전장 내배엽의 밀집, 분리 및/또는 정제

[0351] 본 발명의 추가적인 측면에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 밀집, 분리 및
 [0352] /또는 정제될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포가
 [0353] 밀집된 세포 개체군은 이러한 세포들을 세포 배양물로부터 분리함에 의해 생산된
 [0354] 다.

[0355] 본 발명의 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 형광 표지되며,
 [0356] 이후 형광활성세포분리기(FACS)를 이용하여 비표지 세포로부터 분리된다. 이러한
 [0357] 구현예에서, 녹색형광 단백질(GFP)을 암호화한 핵산 또는 발현 가능한 형광성의 마
 [0358] 커 유전자를 암호화하는 또 다른 핵산이 PDX1-양성 세포를 표지하는 데에 사용된
 [0359] 다. 예를 들어, 일부 구현예에서, GFP를 암호화하는 하나 이상의 핵산의 카피 또는
 [0360] 이의 생물학적으로 활성화된 단편들을 만능성 세포, 바람직하게는 인간 배아줄기세
 [0361] 포의 PDX1조절하에 있는 GFP 유전자 산물 또는 생물학적으로 활성화된 그의 단편을
 [0362] 발현되게 PDX1 프로모터의 다운 스트림(downstream)으로 도입되는 것이다. 일부 구
 [0363] 현예에서, PDX1을 암호화하는 핵산의 전체 암호 부분은 GFP 암호화 핵산 또는 생물

[0364] 학적으로 활성화된 그의 단편에 의해 대체되는 것이다. 다른 구현예에서, GFP 암호

[0365] 화 핵산 또는 생물학적으로 활성화된 그의 단편들은 프레임(frame) 내에서 PDX1를

[0366] 암호화하는 핵산 최소한 일부와 융합되고 융합 단백질을 생성하는 것이다. 이러한

[0367] 구현예에서, 융합 단백질은 GFP와 유사한 형광 활성을 보유한다.

[0368] 상술한 만능성 세포들과 같이 형광성 표지된 세포들은 완전 내배엽 세포로 분화되

[0369] 고, 전기한 PDX1-양성 전장 내배엽으로 분화된다. PDX1-양성 전장 내배엽 세포가

[0370] 형광성 마커 유전자를 발현하기에, PDX1-음성 세포는 발현하지 않아 이들 두 세포

[0371] 유형을 분리할 수 있다. 일부 구현예에서, 형광성 표지된 PDX1-양성 세포 및 비표

[0372] 지 PDX1-음성 세포 혼합물을 포함하는 세포 부유물은 FACS를 사용함으로써 분류된

[0373] 다. PDX1-양성 세포는 PDX1-음성 세포들로부터 분리 회수되며 그 결과로 이러한 세

[0374] 포 유형들을 분리하게 된다. 원한다면, 분리된 세포 조성물은 후에 PDX1-양성 전장

[0375] 내배엽에 특이적인 동일한 또는 상기한 마커를 이용하는 추가적인 분류법에 의해

[0376] 정제될 수 있다.

[0377] 상술한 과정에 추가적으로, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 세포 분리를 위해

[0378] 기타 다른 기술로도 분리가능하다. 추가적으로, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는

[0379] PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 선택적인 생존 또는 선택적인 증식을 촉진하는 성장

[0380] 조건하에서 연속 배양하는 방법에 의해 밀집 또는 분리될 수 있다.

[0381] 상술된 밀집, 분리 및 정제 과정은 분화의 어느 단계에서도 상기한 배양물들

[0382] 에 사용될 수 있음은 인식되어야 할 것이다.

[0383] 본원에 개시한 방법을 사용하여 밀집, 분리 및/또는 정제된 PDX1-양성 전장 내배엽

[0384] 세포 및/또는 조직의 개체군은 시험관 내(in vitro)에서 적어도 일부 분화가 진행

[0385] 된 PDX1-음성, SOX17-양성 완전 내배엽 세포 배양물 또는 세포 개체군으로부터 생

[0386] 산 가능하다. 일부 구현예에서, 상기 세포들은 무작위적으로 분화가 일어난다. 그

[0387] 러나 바람직한 구현예에서, 상기 세포들은 주로 PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의

[0388] 분화로 지향되는 것이다. 바람직한 일부 구현예에서, 분리 및/또는 정제방법은 인

[0389] 간 배아줄기 세포로부터 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 생산의 시험관 내(in vitro)

[0390] 생산에 관한 것이다.

[0391] 본원에 개시된 방법을 이용하여, 비처리된 세포 개체군 또는 세포 배양물과 비교하

[0392] 여 세포 개체군 또는 세포 배양물은 약 2 내지 약 1000배의 PDX1-양성 전장 내배엽

[0393] 세포 함유량을 밀집시키는 것이다. 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포

[0394] 는 비처리된 세포 개체군 또는 세포 배양물과 비교하여 약 5 내지 약 500배로 밀집

[0395] 시키는 것이다. 다른 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 비처리된 세포 개

[0396] 체군 또는 세포 배양물과 비교하여 약 10 내지 약 200배로 밀집시키는 것이다. 다

[0397] 른 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 비처리된 세포 개체군 또는 세포 배

[0398] 양물과 비교하여 약 20 내지 약 100배로 밀집시키는 것이다. 다른 구현예에서,

[0399] PDX1-양성 전장 내배엽 세포는 비처리된 세포 개체군 또는 세포 배양물과 비교하여

- [0400] 약 40 내지 약 80배로 밀집시키는 것이다. 특정 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배
- [0401] 엽세포는 비처리된 세포 개체군 또는 세포 배양물과 비교하여 약 2 내지 약 20배로
- [0402] 밀집시키는 것이다.
- [0403] PDX1-양성 전장 내배엽을 포함하는 조성물
- [0404] 본 발명의 일부 구현예는 장관 (PDX-1양성 전장 내배엽) 전방부로부터 유래된 세
- [0405] 포, 조직 또는 기관으로 분화할 수 있는 다능성 세포인 PDX1-양성 내배엽 세포를
- [0406] 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군과 같은 세포 조성물에 관한 것이다. 특정
- [0407] 구현예에 따라, 상기 PDX1-양성 전장 내배엽은 포유동물 세포이며 바람직한 구현예
- [0408] 로서, 완전 내배엽 세포는 인간 세포이다
- [0409] 본 발명의 다른 구현예는 hESCs, PDX1-음성 완전 내배엽 세포, PDX1-양성 전장 내
- [0410] 배엽 세포 및 중배엽 세포(mesoderm cells)로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상
- [0411] 의 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군과 같은 조성물에 관한 것이다.
- [0412] 일부 구현예에서, hESCs 는 배양물 내 전체 세포의 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3%
- [0413] 이하, 약 2% 이하 또는 약 1% 이하로 포함되는 것이다. 다른 구현예에서, PDX1-음
- [0414] 성 완전 내배엽 세포는 배양물 내의 전체 세포의 약 90% 이하, 약 85% 이하, 약
- [0415] 80% 이하, 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 65% 이하, 약 60% 이하, 약 55% 이하, 약
- [0416] 50% 이하, 약 45% 이하, 약 40% 이하, 약 35% 이하, 약 30% 이하, 약 25% 이하, 약
- [0417] 20% 이하, 약 15% 이하, 약 12% 이하, 약 10% 이하, 약 8% 이하, 약 6% 이하, 약
- [0418] 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하 또는 약 1% 이하로 포함되는 것이
- [0419] 다. 다른 구현예에서, 중배엽 세포는 배양물 내에서 전체 세포의 약 90% 이하, 약
- [0420] 85% 이하, 약 80% 이하, 약 75% 이하, 약 70% 이하, 약 65% 이하, 약 60% 이하, 약
- [0421] 55% 이하, 약 50% 이하, 약 45% 이하, 약 40% 이하, 약 35% 이하, 약 30% 이하, 약
- [0422] 25% 이하, 약 20% 이하, 약 15% 이하, 약 12% 이하, 약 10% 이하, 약 8% 이하, 약
- [0423] 6% 이하, 약 5% 이하, 약 4% 이하, 약 3% 이하, 약 2% 이하 또는 약 1%로 포함되는
- [0424] 것이다.
- [0425] 본 발명의 추가적인 구현예는 본원에 개시된 과정에 의해 생산된 세포 배양물 또는
- [0426] 세포 개체군은 주요 세포 유형으로서 PDX1-양성 전장 내배엽을 포함하는 세포 배양
- [0427] 물 또는 세포 개체군과 같은 조성물에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 본 발명에
- [0428] 개시된 과정은 약 99% 이상, 약 98% 이상, 약 97% 이상, 약 96% 이상, 약 95% 이
- [0429] 상, 약 94% 이상, 약 93% 이상, 약 92% 이상, 약 91% 이상, 약 90% 이상, 약 85%
- [0430] 이상, 약 80% 이상, 약 75% 이상, 약 70% 이상, 약 65% 이상, 약 60% 이상, 약 55%
- [0431] 이상, 약 54% 이상, 약 53% 이상, 약 52% 이상 또는 약 51% 이상의 PDX1-양성 전장
- [0432] 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 및/또는 세포 개체군을 생산한다. 바람직한
- [0433] 구현예에서, 세포 배양물 또는 세포 개체군의 세포는 인간세포를 포함한다. 다른
- [0434] 구현예에서, 본원에 개시된 과정은 약 50% 이상, 약 45% 이상, 약 40% 이상, 약

[0435] 35% 이상, 약 30% 이상, 약 25% 이상, 약 24% 이상, 약 23% 이상, 약 22% 이상,
 [0436] 약 21% 이상, 약 20% 이상, 약 19% 이상, 약 18% 이상, 약 17% 이상, 약 16% 이상,
 [0437] 약 15% 이상, 약 14% 이상, 약 13% 이상, 약 12% 이상, 약 11% 이상, 약 10% 이
 [0438] 상, 약 9% 이상, 약 8% 이상, 약 7% 이상, 약 6% 이상, 약 5% 이상, 약 4% 이상,
 [0439] 약 3% 이상, 약 2% 이상 또는 약 1% 이상 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는
 [0440] 세포 배양물 또는 세포 개체군을 생산한다. 바람직한 구현예에서, 세포 배양물 또
 [0441] 는 세포 개체군의 세포는 인간 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 배양물 또
 [0442] 는 개체군내에서의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 비율(%)은 배양물 내에 잔존하는
 [0443] 영양세포와 관계없이 계산된다.
 [0444]
 [0445] 본 발명의 또 다른 구현예는 PDX1-양성 전장 내배엽 세포와 PDX1-음성 완전
 [0446] 내배엽 세포의 혼합물을 함유하는 세포 배양물 또는 세포 개체군과 같은 조성물에
 [0447] 관한 것이다. 예를 들어 약 95개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 5 개 이상의
 [0448] PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 비율로 구성되는 세포 배양물 또는 세포 개체군을
 [0449] 생산할 수 있다. 다른 구현예에서, 약 5개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 95
 [0450] 개 이상의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 비율로 구성되는 세포 배양 또는 세포 개
 [0451] 체군을 생산할 수 있다. 부가적으로, PDX1-음성 완전 내배엽 세포에 대하여 PDX1-
 [0452] 양성 전장 내배엽 세포의 다른 비율로 구성된 세포 배양물 또는 세포 개체군도 고
 [0453] 려될 수 있다. 예를 들어, 약 1,000,000개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개
 [0454] 의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 100,000개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세
 [0455] 포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 10,000개의 PDX1-음성 완전
 [0456] 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1,000개의 PDX1-음
 [0457] 성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 500개의
 [0458] PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 100
 [0459] 개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율,
 [0460] 약 10개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비
 [0461] 율, 약 5개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포
 [0462] 비율, 약 4개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세
 [0463] 포 비율, 약 2개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배엽
 [0464] 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1개의 PDX1-양성 전장 내배
 [0465] 엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 2개의 PDX1-양성 전장
 [0466] 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 4개의 PDX1-양성 전
 [0467] 장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 5개의 PDX1-양성
 [0468] 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 10개의 PDX1-
 [0469] 양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 20개의
 [0470] PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 50

[0471] 개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세포당
 [0472] 약 100개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내배엽 세
 [0473] 포당 약 1,000개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성 완전 내
 [0474] 배엽 세포당 약 10,000개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의 PDX1-음성
 [0475] 완전 내배엽 세포당 약 100,000개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율, 약 1개의
 [0476] PDX1-음성 완전 내배엽 세포당 약 1,000,000개의 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 비율
 [0477] 로 포함되는 조성물을 고려할 수 있다.

[0478]
 [0479] 본 발명의 일부 구현예에서, PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 생산하는 PDX1-
 [0480] 음성 완전 내배엽 세포는 인간 만능성 줄기 세포와 같은 인간 만능성 세포에서 유
 [0481] 래되는 것이다. 특정 구현예에서, 인간 만능성 세포는 상실배 (morula), 배아의 내
 [0482] 세포 또는 배아의 생식 용기로부터 유래된다. 다른 특정 구현예에서, 인간 만능성
 [0483] 세포는 배아기 전에 발생한 다세포 구조의 성선(gondal) 또는 생식 조직 (germ
 [0484] tissue)으로부터 유래된다.

[0485] 본 발명의 추가적인 구현예는 인간 세포의 약 2% 이상에서 AFP, SOX7, SOX1,
 [0486] ZIC1 및/ 또는 NFM 마커의 발현보다 크게 PDX1 마커가 발현되는 인간 PDX1-양성 전
 [0487] 장 내배엽을 함유하는 인간 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군과 같은
 [0488] 조성물에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 상기 PDX1 마커의 발현은 인간 세포의 약
 [0489] 5% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약
 [0490] 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약
 [0491] 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약
 [0492] 95% 이상 또는 약 98% 이상이 AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/ 또는 NFM 마커의 발현보
 [0493] 다 큰 것이다. 일부 구현예로서, PDX1의 발현이 AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/ 또는
 [0494] NFM 마커의 발현보다 큰 상기 세포 배양물 또는 개체군 내에서의 인간 세포의 비율
 [0495] 은 영양세포와 무관하게 계산되는 것이다.

[0496] 본 발명의 일부 구현예는 인간 세포의 약 2% 이상 내지 약 98% 이상에서의
 [0497] AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/ 또는 NFM의 발현보다 SOX17, HOXA13 및 HOXC6으로 구성
 [0498] 되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현이 큰, 인간 PDX1-양성 전장 내배
 [0499] 엽 세포를 포함하는 세포배양물 또는 세포 개체군과 같은 조성물에 관한 것임도 인
 [0500] 식되어야 할 것이다. 일부 구현예에서, SOX17, HOXA13 및 HOXC6로 구성되는 군으로
 [0501] 부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현이 인간 세포의 약 5% 이상, 약 10% 이상, 약
 [0502] 15% 이상, 약 20% 이상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약
 [0503] 45% 이상, 약 50% 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약
 [0504] 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 및 약 98% 이상에
 [0505] 서의 AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/또는 NFM 마커의 발현보다 큰 것이다. 일부 구현예
 [0506] 에서, AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/또는 NFM의 발현보다 SOX17, HOXA13 및 HOXC6으로

[0507] 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현이 큰 세포 배양물 또는 개체

[0508] 군에서의 인간 세포의 백분율은 영양세포와 무관하게 계산된다.

[0509] 본 발명의 추가적인 구현에는 PDX1 표지의 발현이 인간 세포의 약 2% 이상에

[0510] 서 AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/또는 NFM 마커의 발현보다 큰 인간 내배엽 세포와 같

[0511] 은 포유동물 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군과 같은 조성물

[0512] 에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 상기 PDX1의 발현은 내배엽 세포의 약 5% 이상,

[0513] 내배엽 세포의 약 10% 이상, 내배엽 세포의 약 15% 이상, 내배엽 세포의 약 20% 이

[0514] 상, 내배엽 세포의 약 25% 이상, 내배엽 세포의 약 30% 이상, 내배엽 세포의 약

[0515] 35% 이상, 내배엽 세포의 약 40% 이상, 내배엽 세포의 약 45% 이상, 내배엽 세포의

[0516] 약 50% 이상, 내배엽 세포의 약 55% 이상, 내배엽 세포의 약 60% 이상, 내배엽 세

[0517] 포의 약 65% 이상, 내배엽 세포의 약 70% 이상, 내배엽 세포의 약 75% 이상, 내배

[0518] 엽 세포의 약 80% 이상, 내배엽 세포의 약 85% 이상, 내배엽 세포의 약 90% 이상,

[0519] 내배엽 세포의 약 95% 이상 또는 내배엽 세포의 약 98% 이상에서의 AFP, SOX7,

[0520] SOX1, ZIC1 및/또는 NFM의 발현보다 큰 것이다.

[0521] 본 발명의 다른 구현에는 SOX17, HOXA13 및 HOXC6로 구성되는 군으로부터 선

[0522] 택된 하나 이상의 발현이 내배엽 세포의 2% 이상에서의 AFP, SOX7, SOX1, ZIC1 및/

[0523] 또는 NFM 마커의 발현보다 큰 인간 내배엽 세포와 같은 포유동물 내배엽 세포를 포

[0524] 함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군과 같은 조성물에 관한 것이다. 다른 구현예

[0525] 로서 SOX17, HOXA13 및 HOXC6로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 발현이

[0526] 내배엽 세포의 약 5% 이상, 내배엽 세포의 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이

[0527] 상, 약 25% 이상, 약 30% 이상, 약 35% 이상, 약 40% 이상, 약 45% 이상, 약 50%

[0528] 이상, 약 55% 이상, 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80%

[0529] 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 또는 약 98% 이상에서의 AFP, SOX7,

[0530] SOX1, ZIC1 및/또는 NFM의 발현보다 큰 것이다.

[0531] 본원에 개시된 과정을 이용하여, 실질적으로 다른 세포 유형이 없는 PDX1-

[0532] 양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 조성물들이 생산될 수 있다. 세포 배양물 또는

[0533] 세포 개체군에서의 세포에 있어서, 본원에서 정의되는 용어 “실질적으로 없

[0534] 는(substantially free)”은 세포 배양물 또는 세포 개체군 상에 없는 특정 세포유

[0535] 형이 세포 배양물 또는 세포 개체군에 존재하는 전체 세포수의 약 5% 이하의 양으

[0536] 로 존재하는 것을 의미한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의

[0537] 해 생산된 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 개체군 또는 세포 배양물은 AFP, SOX7,

[0538] SOX1, ZIC1 및/또는 NFM 마커 유전자를 유의적으로 발현하는 세포가 실질적으로 없

[0539] 는 것이다.

[0540] 본 발명의 하나의 구현예로서, 마커 유전자의 발현에 기초한 PDX1-양성 전장

[0541] 내배엽 세포에 대해서는 높은 수준의 PDX1, 낮은 수준의 AFP, 낮은 수준의 SOX7,

[0542] 낮은 수준의 SOX1, 낮은 수준의 ZIC1 및 낮은 수준의 NFM 마커 유전자의 발현으로

- [0543] 설명된다.
- [0544] SOX17-양성 완전 내배엽 세포에서 PDX1의 발현증가
- [0545] 본 발명의 일부 측면은 SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물
- [0546] 또는 세포 개체군에서의 PDX1 유전자 산물의 발현을 증가시키는 방법에 관한 것이
- [0547] 다. 이러한 구현예에서, SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 PDX1 유전자 산물의 발현
- [0548] 을 증가시키기 위해 충분한 양의 분화 인자와 접촉시키는 것이다. 분화 인자와 접
- [0549] 축되는 SOX17-양성 완전 내배엽 세포는 PDX1-음성 또는 PDX1-양성 중 어느 하나일
- [0550] 수 있다. 일부 구현예에서, 분화 인자는 레티노이드일 수 있다. 특정 구현예에서,
- [0551] SOX17-양성 완전 내배엽 세포는 약 0.01 μ M 내지 약 50 μ M의 농도 범위의 레티노이
- [0552] 드와 접촉시킨다. 더욱 바람직한 구현예에서, 레티노이드는 RA이다.
- [0553] 본 발명의 다른 구현예에서, SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배
- [0554] 양물 또는 세포 개체군에서 PDX1 유전자 산물의 발현은 섬유아세포 성장 인자 상과
- [0555] 의 분화 인자와 SOX17-양성 세포의 접촉에 의해 증가된다. 이러한 분화 인자는 단
- [0556] 독 또는 RA와 함께 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, SOX17-양성 완전 내배엽 세
- [0557] 포는 약 10ng/ml 내지 약 1000ng/ml 농도 범위의 섬유아세포 성장인자와 접촉시킨
- [0558] 다. 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 FGF 성장 인자는 FGF-10이다.
- [0559] 본 발명의 일부 구현예에서, SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배
- [0560] 양물 또는 세포 개체군에서 PDX1 유전자 산물의 발현은 SOX17-양성 세포를 B27과
- [0561] 접촉시킴에 의해 증가된다. 이 분화 인자는 단독 또는 레티노이드 및 FGF 상과의
- [0562] 분화 인자 모두 또는 어느 하나와 함께 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에
- [0563] 서, SOX17-양성 완전 내배엽 세포는 0.1% 내지 20% (v/v)의 농도 범위에서 B27과
- [0564] 접촉시키는 것이다. 더욱 바람직하게는, SOX17-양성 완전 내배엽 세포는 RA, FGF-
- [0565] 10 및 B27와 접촉시키는 것이다.
- [0566] SOX17-양성 완전 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군에서
- [0567] PDX1 유전자 산물의 발현 증가를 위한 방법은 감소된 혈청 존재하 또는 무혈청하의
- [0568] 성장 배지에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, SOX17-양성 완전 내배엽 세포는
- [0569] 혈청 치환으로 성장된다.
- [0570] PDX1-음성 완전 내배엽 세포로부터 PDX1-양성 완전 전장 내배엽 세포로의 분화를
- [0571] 촉진할 수 있는 인자의 동정
- [0572] 본 발명의 추가적인 측면은 PDX1-음성 완전 내배엽 세포에서 PDX1-양성 완전
- [0573] 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시킬 수 있는 하나 이상의 분화 인자를 동정하
- [0574] 는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에서, PDX1-음성 완전 내배엽 세포를 포함하는

[0575] 세포 배양물 또는 세포 개체군이 수득되고, 세포 배양물 또는 세포 개체군에서

[0576] PDX1의 발현이 측정된다. PDX1의 발현 측정 후, 세포 배양물 또는 세포 개체군의

[0577] 세포는 후보 분화 인자와 접촉된다. 일부 구현예에서, PDX1의 발현은 상기 세포와

[0578] 후보 분화 인자의 접촉시 또는 접촉 바로 후에 확인된다. 그 후, PDX1의 발현은 상

[0579] 기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후, 한 번 또는 여러 번 확인한다. 만약, 후보

[0580] 분화 인자와의 접촉 후의 PDX1의 발현이 후보 분화 인자와 접촉하기 전의 PDX1 발

[0581] 현과 비교하여 증가한다면, 상기 후보 분화 인자는 PDX1-음성 완전 내배엽 세포에

[0582] 서 PDX1-양성 완전 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진하는 능력이 있는 것으로 동

[0583] 정된다.

[0584] 일부 구현예에서, PDX1-음성 완전 내배엽 세포에서 PDX1-양성 완전 전장 내배

[0585] 엽 세포로의 분화를 촉진시킬 능력이 있는 인자를 동정하는 상기 방법은 세포 배양

[0586] 물 또는 세포 개체군에서 HOXA13 유전자 및/또는 HOXC6의 발현을 동정하는 것도 역

[0587] 시 포함한다. 이러한 구현예에서, HOXA13 유전자 및/또는 HOXC6의 발현은 후보 분

[0588] 화 인자와 접촉하기 전후 모두에서 측정된다. 만약 PDX1 및 HOXA13의 발현이 후보

[0589] 분화 인자와 접촉 후에 후보 분화 인자와 접촉하기 전의 PDX1 및 HOXA13 발현과

[0590] 비교하여 증가되었다면, 상기 후보 분화 인자는 PDX1-음성 완전 내배엽 세포에서

[0591] PDX1-양성 완전 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시킬 능력이 있는 것으로 동정된

[0592] 다. 유사하게, 만약 PDX1 및 HOXA13의 발현이 후보 분화 인자와 접촉한 후에 후보

[0593] 분화 인자와 접촉 전의 PDX1 및 HOXA13 발현과 비교하여 증가되었다면, 후보 분화

[0594] 인자는 PDX1-음성 완전 내배엽 세포에서 PDX1-양성 완전 전장 내배엽 세포로의 분

[0595] 화를 촉진시킬 능력이 있는 것으로 확인된다. 보다 바람직한 구현예에서, 상기 후

[0596] 보 분화 인자는 세포 배양물 또는 세포 개체군의 세포들이 후보 분화 인자와 접촉

[0597] 하는 전후에 PDX1, HOXA13 및 HOXC6의 발현을 측정함에 의해 PDX1-음성 완전 내배

[0598] 엽 세포에서 PDX1-양성 완전 전장 내배엽 세포로의 분화를 촉진시킬 능력이 있는

[0599] 것으로 동정된다. 더욱 바람직한 구현예에서, PDX1, HOXA13 및/또는 HOXC6의 발현

[0600] 은 Q-PCR로 측정된다.

[0601] 일부 구현예에서, PDX1, HOXA13 및 HOXC6의 하나 이상의 발현은 세포와 후보

[0602] 분화 인자가 접촉하기 전보다 세포 배양물 또는 세포 개체군의 세포와 후보 분화

[0603] 인자가 접촉한 때 또는 접촉 바로 후에 결정될 수 있다는 것으로 인식되어야 할 것

[0604] 이다. 이러한 구현예로서, 후보 분화 인자가 접촉한 때 또는 접촉 바로 후의 PDX1,

[0605] HOXA13 및 HOXC6의 하나 이상의 발현은 후보 분화 인자와의 접촉한 후의 PDX1,

[0606] HOXA13 및 HOXC6의 하나 이상의 발현과 한번 또는 여러 번 비교하는 것이다.

[0607] 상술된 방법의 일부 구현예에서, 상기 세포와 후보 분화 인자와의 접촉후에

[0608] 측정되는 PDX1의 발현은 약 1시간 내지 약 10일의 범위에서 한번 또는 여러 번 측

[0609] 정가능하다. 예를 들어, PDX1 발현은 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 1

[0610] 시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 2시간, 상기 세포와 후보 분화 인

[0611] 자의 접촉 후 약 4시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 6시간, 상기 세
 [0612] 포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 8시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후
 [0613] 약 10시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 12시간, 상기 세포와 후보
 [0614] 분화 인자의 접촉 후 약 16시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 24시
 [0615] 간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 2일, 상기 세포와 후보 분화 인자의
 [0616] 접촉 후 약 3일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 4일, 상기 세포와 후보
 [0617] 분화 인자의 접촉 후 약 5일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 6일, 상
 [0618] 기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 7일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉
 [0619] 후 약 8일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 9일, 상기 세포와 후보 분화
 [0620] 인자의 접촉 후 약 10일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 10일 이상에서
 [0621] 측정될 수 있다.

[0622] 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 후보 분화 인자는 폴리펩티드 및 소분
 [0623] 자 같은 화합물로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 후보 폴리펩티드는 성장인자,
 [0624] 사이토카인, 세포외 매트릭스 (extracellular matrix) 단백질 및 합성 펩티드를 포
 [0625] 함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 바람직한 구현예로서, 상기 성장인자는
 [0626] 예를 들어 FGF-10 같은 FGF 상과이다. 후보 소분자는 조합 화학 합성법으로 제조된
 [0627] 화합물 및 스테로이드, 이소프레노이드, 테르페노이드, 페닐프로파노이드, 알카로
 [0628] 이드 및 플라보노이드와 같은 천연 산물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 당
 [0629] 업자에게 있어서는 수많은 종류의 천연 및 합성 소분자가 유용하고 본원에서 개시
 [0630] 된 방법상에 사용하기 위해 고려되는 상기 소분자들은 상기에 구체화된 종류에 제
 [0631] 한되지 않음을 인식해야 할 것이다. 전형적으로, 소분자는 10000amu 이하의 분자
 [0632] 량을 가질 것이다. 더욱 바람직한 구현예는, 소분자는 예를 들어 RA와 같은 레티노
 [0633] 이드이다.

[0634]
 [0635] PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 분화를 촉진시킬 능력을 갖는 인자의 동정

[0636] 본 발명의 다른 측면은 PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 분화를 촉진시킬 능력
 [0637] 이 있는 하나 이상의 분화 인자를 동정하는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법에서,
 [0638] PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 또는 세포 개체군이 수득되고
 [0639] 상기 세포 배양물 또는 세포 개체군에서 마커의 발현이 측정된다. 마커의 발현을
 [0640] 측정한 후, 세포 배양물 또는 세포 개체군의 세포를 후보 분화 인자와 접촉시킨다.
 [0641] 일부 구현예에서, 마커의 발현은 세포와 후보 분화 인자가 접촉할 때 또는 접촉 바
 [0642] 로 후에 측정된다. 동일한 마커의 발현은 세포와 후보 발현 인자의 접촉 후, 한 번
 [0643] 또는 여러 번 측정된다. 만약 마커의 발현이 후보 분화 인자와 접촉 전과 비교하여
 [0644] 후보 분화 인자와 접촉 후 증가 또는 감소되었다면, 후보 분화 인자는 PDX1-양성
 [0645] 전장 내배엽 세포의 분화를 촉진시킬 수 있는 것으로 동정된다. 더욱 바람직하게
 [0646] 는, 마커 발현은 Q-PCR로 측정된다.

[0647] 상술된 방법의 일부 구현예에서, 상기 세포와 후보 분화 인자와의 접촉후에 측
 [0648] 정되는 발현은 약 1시간 내지 약 10일의 범위에서 한번 또는 여러 번 측정가능하
 [0649] 다. 예를 들어, 마커 발현은 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 1시간, 상
 [0650] 기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 2시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접
 [0651] 촉 후 약 4시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 6시간, 상기 세포와 후
 [0652] 보 분화 인자의 접촉 후 약 8시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 10시
 [0653] 간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 12시간, 상기 세포와 후보 분화 인
 [0654] 자의 접촉 후 약 16시간, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 24시간, 상기
 [0655] 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 2일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후
 [0656] 약 3일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 4일, 상기 세포와 후보 분화 인
 [0657] 자의 접촉 후 약 5일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 6일, 상기 세포와
 [0658] 후보 분화 인자의 접촉 후 약 7일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 8일,
 [0659] 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 9일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접
 [0660] 촉 후 약 10일, 상기 세포와 후보 분화 인자의 접촉 후 약 10일 이상의 범위에서
 [0661] 측정될 수 있다.

[0662] 전기한 바와 같이, 본원에 개시된 방법에서 사용하기 위한 후보 분화 인자는
 [0663] 폴리펩티드와 소분자같은 화합물에서 선택될 수 있다.

[0664] 비록 본원에 개시된 각각의 방법들이 PDX1-양성 전장 내배엽 세포와 관련하여
 [0665] 설명되었을지라도, 특정 구현예로서, 이러한 방법들은 본원에 개시된 PDX1-양성 전
 [0666] 장/중장 내배엽 및/또는 장관 전방부의 PDX1-양성 내배엽 세포를 함유하는 조성물
 [0667] 의 생산에도 이용될 수 있음도 인식되어야 할 것이다. 본 명세서에서 개시된 임의
 [0668] 의 PDX1-양성 내배엽 세포 유형은 본원에 개시된 스크리닝 (screening) 방법에도
 [0669] 이용될 수 있다.

[0670] 하기에 본 발명을 일반적으로 기술하였으며, 추가적인 이해는 본원에서 제
 [0671] 공되는 특정 실시예를 참고로 하여 수득될 수 있으나, 이는 발명을 오로지 설명하
 [0672] 고자 함이지, 이에 한정하고자 함이 아니다.

실시예

[0881] 하기의 많은 실시예에 만능성 인간 세포의 용도를 개시한다. 만능성 인간 세포를 생산하는 방법들은 당
 업계에 잘 알려져 있으며 미국 특허출원 제 5,453,357호, 제5,670,372호, 제5,690,926호, 제6,090,622호,
 제6,200,806호 및 제 6,251,671호 뿐만 아니라 미국 특허 공개 제 2004/0229350호를 포함한 수많은 과학 출판
 서적에 기재되어 있다.

[0882] 실시예 1.

[0883] 인간 ES 세포

[0884] 내배엽 발생의 연구를 위하여 배양시 정상 핵형을 유지하는 동시에 만능성
 [0885] (pluripotent)이며 표면적으로 무한 분할될 수 있는 인간 배아 줄기 세포를 사용하

[0886] 었다. ES 세포는 5일생 배아 내세포괴로부터 유래되며 면역학적 또는 기계적 방법
 [0887] 을 이용하여 분리하였다. 특히, 인간 배아 줄기 세포주 hESCyt-25는 고지내용에 입
 [0888] 각한 환자의 동의하에 시험관 내 수정 주기 (in vitro fertilization cycle)의 과
 [0889] 잉 동결 배아로부터 유래되었다. 부화된 배반포를 녹여 ES배지 (DMEM, 20% 우태아
 [0890] 혈청, 비필수아미노산, 베타-머캅토에탄올, ITS 첨가물) 내의 마우스 배아 섬유아
 [0891] 세포 (mouse embryonic fibroblast; MEF) 위에 플레이팅하여 배양하였다. 배는 배
 [0892] 양용기에 부착되었으며 약 2주 후, 미분화된 hESCs 구역은 새 용기의 MEFs로 옮겨
 [0893] 졌다. 이동은 기계적 절단 및 디스파제 (dispase)를 이용한 간단한 효소처리, 세포
 [0894] 군집 (cell cluster)의 기계적 제거, 세척 및 재-플레이팅으로 이뤄진다. 유도
 [0895] (derivation) 이후, hESCyt-25는 연속적으로 100회 이상 계대된다. 완전 내배엽 생
 [0896] 산을 위한 개시 물질로서 인간 배아 줄기 세포주 hESCyt-25를 사용하였다.
 [0897] 줄기 세포 또는 다른 만능성 세포가 본원에 개시된 분화 과정의 개시 물질로서
 [0898] 또한 사용될 수 있음은 당업자에 의해 인식되어야 할 것이다. 예를 들어, 당업
 [0899] 계에 알려진 방법에 의해 분리될 수 있는 배아 생식 용기로부터 수득된 세포는 만
 [0900] 능성 세포 개시물질로서 사용될 수 있다.

[0901] 실시예 2.

[0902] hESCyt-25 의 특정화

[0903] 인간 배아 줄기 세포주, hESCyt-25는 배양시 18개월 이상 정상적인 형태, 핵형, 성
 [0904] 장 및 자가-재생능을 유지하였다. 상기 세포주는 미분화 hESCs의 특징인 OCT4,
 [0905] SSEA-4 및 TRA-1-60 항원들에 대한 강한 면역반응성을 나타내며, 다른 확립된
 [0906] hESCs 세포주와 동일한 형태뿐만 아니라 알칼리 포스파타제 활성 또한 나타낸다.
 [0907] 부가적으로, 또한 인간 줄기세포주인 hESCyt-25는 부유 배양시 쉽게 배아체
 [0908] (embryoid bodies; EBs)를 형성한다. 상기 세포의 만능성 (pluripotent nature)의
 [0909] 증거로서, hESCyt-25는 세 개의 주요 배엽을 나타내는 여러 종류의 세포 유형으로
 [0910] 분화된다. 외배엽 생산은 네스틴 (nestin) 및 다른 성숙 뉴런 (neuron) 마커들의
 [0911] 면역세포화학법 (immunocytochemistry; ICC)을 비롯한 ZIC1에 대한 Q-PCR법으로 입
 [0912] 증되었다. 초기 뉴런 (neuron)의 특징인 신장된 세포의 군집은 베타-III 튜불린 (β -
 [0913] -III tubulin)에 대한 면역세포화학적 염색법으로 확인되었다. 먼저, 부유 배양한
 [0914] 만능 줄기 세포를 배외 계통의 내장 내배엽 (visceral endoderm; VE)으로 분화시키
 [0915] 기 위하여 EBs에 레티논산 (retinoic acid)을 처리하였다. 처리된 세포는 처리 후
 [0916] 54시간까지 내장 내배엽의 두 마커인 알파-페토 단백질 및 SOX7을 높은 수준으로
 [0917] 발현하였다. 단층에서 분화된 세포는 면역세포화학적 염색법에 의해 확인되는 바와
 [0918] 같이, 산발성 패치 (sporadic patches)에서 AFP를 발현하였다. 하기에 개시되는 바
 [0919] 와 같이, AFP 무발현 하에서 SOX17에 대한 실시간 정량적 중합효소 연속반응 (Q-

- [0920] PCR) 및 면역세포화학법에 의해 확인되는 바와 같이, hESCyt-25 세포주도 또한 완
- [0921] 전 내배엽 형성이 가능하였다. 중배엽으로의 분화를 증명하기 위하여, 분화하는
- [0922] EBs의 여러 시점에서 브라키우리 (Brachyury) 유전자 발현을 분석하였다. 브라키우
- [0923] 리 발현은 실험과정 전반에서 점진적으로 증가하였다. 상기한 바와 같이, hESCyt-
- [0924] 25는 세가지 배엽을 나타내는 세포를 형성하는 능력에 의해 확인되는 바와 같이 만
- [0925] 능성 세포주이다.
- [0926] 실시예 3.
- [0927] SOX17 항체의 생산
- [0928] hESC 배양하의 완전 내배엽 동정을 위한 주요 문제점은 적절한 동정 기술의
- [0929] 결핍이다. 따라서 인간 SOX17 단백질에 대한 항체 제조를 수행하였다.
- [0930] 마커SOX17은 낭배형성기 동안 형성되며, 이의 발현은 기관형성 착수 시점
- [0931] 부근까지 (A-P축을 따른 발현 수준이 다양함에도 불구하고) 장관에서 유지되고, 완
- [0932] 전 내배엽에서 전체적으로 발현된다. SOX17은 배외 내배엽 세포의 일부 (subset)에
- [0933] 서도 발현된다. 상기 단백질은 중배엽 또는 외배엽에서는 발현되지 않는다. SOX17
- [0934] 는 배외 계통의 배제를 위한 마커들과 함께 사용시 완전 내배엽 계통에 대한 적절
- [0935] 한 마커로 확인되었다.
- [0936]
- [0937] 본원에 상세하게 개시된 바와 같이, SOX17 항체는 SOX17 양성 완전 내배엽
- [0938] 세포의 생산을 목적으로 하는 다양한 처치 및 분화 과정의 효과를 특이적으로 검사
- [0939] 하기 위해 이용되었다. AFP, SPARC 및 트롬보모듈린에 대한 다른 항체들도 또한 내
- [0940] 장 내배엽 및 벽 내배엽 (배외 내배엽)의 생산을 배제하기 위해 사용되었다.
- [0941] SOX17에 대한 항체를 생산하기 위하여, SOX17 단백질 (도 2)의 카르복시기
- [0942] 말단에 위치한 아미노산 172-414 (서열번호 2)에 상응하는 인간 SOX17 cDNA (서열
- [0943] 번호 1)의 일부를 항체 생산 회사인 GENOVAC (Freiberg, Germany)에서 고안한 과정
- [0944] 에 따라 랫트의 유전적 면역화 과정에 사용하였다. 유전적 면역화 과정은 국제특허
- [0945] 출원공개번호 제 WO 00/29442호 및 제 WO 99/13915호뿐만 아니라 미국 특허 출원
- [0946] 번호 제 5,930,876호, 제 5,817,367호, 제 6,165,993호 및 제 6,261,281호에 개시
- [0947] 되어 있으며, 상기 문헌들의 개시내용은 전체로서 본원에서 참고로 인용된다.
- [0948] 유전적 면역화 과정을 위한 다른 적합한 방법은 또한 비-특허 문헌에 기재되
- [0949] 어 있다. 예를 들어, 배리 등 (Barry et al.)은 유전적 면역에 의한 단일클론 항체
- [0950] 의 생산방법을 개시하였으며 (Biotechniques 16: 616-620, 1994), 상기 문헌의 개
- [0951] 시내용은 전체로서 본원에서 참고로 인용된다. 특정 단백질에 대한 항체 생산을 위

[0952] 한 유전적 면역화 방법의 특징에는 코스타글리아 등의 문헌 [Costaglia et al.,
 [0953] (1998) 감상선염을 유발하는 인간 감상선 자극 호르몬 수용체에 대한 및 천연 수용
 [0954] 체를 인식하는 단일클론 항체의 생산을 허용하는 유전적 면역화, J. Immunol. 160:
 [0955] 1458-1465]; 킬파트릭 등의 문헌 [Kilpatrick et al., (1998) Flt-3 수용체에 대한
 [0956] 설치류 단일 클론 항체의 급속한 생산을 매개하는 유전자총으로 운반된 DNA를 기반
 [0957] 으로 하는 면역화, Hybridoma 17: 569-576]; 쉬모르케 등의 문헌 (Schmolke et
 [0958] al., (1998) DNA 면역화에 의해 생성된 E2-특이적 단일클론 항체에 의한 인간 혈청
 [0959] 내 간염 G 바이러스 입자의 동정, J. Virol. 72: 4541-4545); 크라세만 등의 문헌
 [0960] (Krasemann et al., (1999) 비관습적 항체-기반 면역법에 의한 단백질에 대한 단일
 [0961] 클론 항체의 생성, J. Biotechnol. 73: 119-129) 및 올리비에리 등의 문헌
 [0962] (Ulivieri et al., (1996) 헬리코박터 파이로리의 공포화 세포독소의 한정 구획에
 [0963] 대한 DNA 면역화에 의한 단일클론 항체의 생성, J. Biotechnol. 51: 191-194)에서
 [0964] 찾아볼 수 있으며, 상기 문헌의 개시내용은 전체로서 본원에서 참고로 인용된다.

[0965] 도 3에 나타난 상관 계통수에 도시된 바와 같이, SOX7 및 SOX18은 SOX17과와
 [0966] 가장 근접한 Sox과이다. SOX17 항체가 SOX17에 특이적이며 상기한 가장 근접한
 [0967] 과(family) 구성(member)들과는 반응하지 않음을 확인하기 위해 인간 SOX7 폴리펩
 [0968] 티드를 음성대조군으로 사용하였다. 특히, 웨스턴 블롯 및 ICC를 이용하여 유전적
 [0969] 면역화 과정에 의해 생산된 항체가 SOX17에 특이적임을 확인하기 위하여, SOX7 및
 [0970] 기타 다른 단백질들을 인간 섬유아세포에서 발현시키고, 그 후 SOX17 항체를 이용
 [0971] 하여 교차 반응성을 분석하였다. 예를 들어, 하기의 방법들은 SOX17, SOX7 및 EGFP
 [0972] 발현 벡터들의 제조, 이들의 인간 섬유아세포로의 트랜스펙션 (transfection) 및
 [0973] 웨스턴 블롯을 이용한 분석에 사용되었다. SOX17, SOX7 및 EGFP의 생산을 위해 사
 [0974] 용된 발현 벡터는 각각 pCMV6 (OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD),
 [0975] pCMV-SPORT6 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA)
 [0976] 이었다. 단백질 생산을 위해, 텔로머라제 불멸화 MDX 인간 섬유아세포 (telomerase
 [0977] immortalized MDX human fibroblast)가 리포펙타민 2000 (Lipofectamine 2000,
 [0978] Invitrogen, Carlsbad, CA)의 존재하에서 수퍼코일드 DNA로 임시 트랜스펙션되었
 [0979] 다. 트랜스펙션 36시간 후, 총 세포용해물을 단백질 분해효소 저해제 혼합물
 [0980] (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN)을 포함하는 50 mM TRIS-HCl
 [0981] (pH 8), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% 데옥시콜레이트 (deoxycholate)에 수합하였
 [0982] 다. 100 μ g의 세포단백질의 웨스턴 블롯 분석은 NuPAGE (4-12 % 농도구배 폴리아크
 [0983] 릴아미드, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 SDS-PAGE에 의해 분리하였으며,
 [0984] 전기블롯을 이용하여 PVDF 막 (Hercules, CA) 상으로 이동시킨 후, 10 mM TRIS-HCl
 [0985] (pH 8), 150 mM NaCl, 10% BSA, 0.05 % Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO)으로
 [0986] 1/1000 희석한 랫트 SOX17 항-혈청으로 탐침화한 후, 알칼리 포스파타제가 결합된

[0987] 항-랫트IgG (Alkaline Phosphatase conjugated anti-rat IgG; Jackson

[0988] ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 처리하고, 벡터 블랙 알칼리 포

[0989] 스파타제 염색법(Vector Black Alkaline Phosphatase staining; Vector

[0990] Laboratories, Burlingame, CA)으로 확인하였다. 단백질 크기 표준으로는 광범위

[0991] 색상 마커 (Sigma, St. Louis, MO)를 사용하였다.

[0992] 도 4에서, SOX17, SOX7 또는 EGFP cDNA로 임시 트랜스펙션된 인간 섬유아세

[0993] 포의 단백질 추출물은 웨스턴 블롯에서 SOX17 항체로 표지되었다. 오직 hSOX17이

[0994] 형질도입된 세포의 단백질 추출물만이 인간 SOX17 단백질의 예측된 46Kda 분자량과

[0995] 근접하게 부합되는 51Kda 미만의 밴드를 나타내었다. 다른 인간 SOX7 또는 EGFP가

[0996] 트랜스펙션된 세포의 추출물은 SOX17 항체와 어떠한 반응도 나타내지 않았다. 게다가,

[0997] SOX17 항체는 hSOX17 발현 구조체로 트랜스펙션된 인간 섬유아세포의 핵을 뚜

[0998] 렷하게 표지하였으나, EGFP만을 트랜스펙션한 세포는 표지하지 않았다. 상기와 같

[0999] 이, SOX17 항체는 ICC에 의해 특이성을 나타낸다.

[1000] 실시예 4.

[1001] 완전 내배엽의 표지로서 SOX17 항체의 확인

[1002] SOX17 항체가 인간SOX17 단백질에 특이적이며 또한 완전 내배엽을 인지한다

[1003] 는 증거로서, 부분 분화된 hESCs가 SOX17 및 AFP 항체와 동시 표지되었다. SOX 유

[1004] 전자군의 F 아군과 밀접하게 연관된 구성원인 SOX17, SOX7 및 AFP가 내장 내배엽에

[1005] 서 각각 발현되는 것으로 증명되어 왔다 (도 3). 그러나, 완전 내배엽 세포에서

[1006] AFP 및 SOX7의 발현은 ICC로 탐지가능한 수준이 아니므로, 전환된 완전 내배엽 세

[1007] 포에 대한 음성 마커로 사용될 수 있다. SOX17 항체는 세포의 뚜렷하게 구분되는

[1008] 개체군으로 존재하는 세포 개체군들을 표지하거나 AFP 양성 세포와 혼합된 세포 개

[1009] 체군을 표지하였다. 특히, 도 5A에 나타난 바와 같이, 소수의 SOX17 세포는 AFP로

[1010] 동시 표지되었다 그러나, SOX17+ 세포의 구역 내에는 AFP+ 세포가 거의 없거나 존재

[1011] 하지 않는 구역도 발견되었다 (도 5B). 유사하게, 벽 내배엽이 SOX17을 발현한다고

[1012] 보고되고 있으므로, 벽 내배엽 마커인 SPARC 및/또는 트롬보모듈린 (TM)과 SOX17과

[1013] 의 항체 동시 표지를 벽 내배엽인 SOX17+ 세포를 식별하는데 사용할 수 있다. 도

[1014] 6A-C에 나타난 바와 같이, 트롬보모듈린 및 SOX17로 동시 표지된 벽 내배엽 세포는

[1015] hES 세포의 무작위적 분화로 생산되었다.

[1016]

[1017] 상기 세포 표지 실험으로 보아, 완전 내배엽 세포는

[1018] SOX17hi/AFPlo/[TMlo/SPARClo]의 마커 프로파일(marker profile)로서 식별될 수 있다.

[1019] 다시 말하면, 내장 내배엽의 특징인 AFP 마커 및 벽 내배엽의 특징인 TM 또는

[1020] SPARC 마커의 발현보다 SOX17 마커의 발현이 높다는 것이다. 따라서 SOX17 양성이

- [1021] 며 AFP 음성 및 TM 또는 SPARC 음성인 상기 세포들이 완전 내배엽이다.
- [1022] 완전 내배엽의 전조인 SOX17hi/AFPlo/TMlo/SPARClo 마커 프로파일의 특이성의 추가적인 증거로서, SOX17 및 AFP 유전자 발현을 항체 표지된 세포의 상대적인 숫자와 정량적으로 비교하였다. 도 7A에 나타난 바와 같이, 레티놀산 (내장 내배엽 유도제) 또는 액티빈 A (완전 내배엽 유도제)로 처리한 hESCs는 SOX17 mRNA 발현 수준에서 10배의 차이를 나타내었다. 상기 결과는 SOX17 항체-표지된 세포 수의 10배 차이를 반영하였다 (도 7B). 부가적으로, 도 8A에 나타난 바와 같이, hESCs의 액티빈 A 처리는 비처리군과 비교하여 AFP 유전자 발현을 6.8배 억제하였다. 상기의 결과는, 도 8B-C에 나타난 바와 같이, 상기 배양물 내 AFP 표지된 세포 수의 극적인 감소에 의해 시각적으로 반영되었다. 이를 보다 정량화하기 위해, 상기 AFP 유전자 발현의 약 7배 감소가 AFP 항체-표지된 세포수에 있어서도 유사하게 7배 감소의 결과를 나타냄을 유세포분석 (flow cytometry)에 의한 측정법으로 증명되었다 (도 9A-B). 상기의 결과는 Q-PCR 반영 측정결과에서 보여지는 바와 같은 유전자 발현의 정량적 변화가 항체 염색으로 관찰되는 바와 같은 세포 형태 특성의 변화를 나타낸다는 점에서 매우 의미가 있다.
- [1023]
- [1024] 노달 과 (family)의 요소 (노달, 액티빈 A 및 액티빈 B- NAA)의 존재하에서
- [1025] hESCs의 배양은 초과 시간에 SOX17 항체-표지된 세포를 현저히 증가시켰다. 연속적
- [1026] 인 액티빈 처리 5일 후에 세포의 50% 이상이 SOX17로 표지되었다 (도 10A-F). 액티
- [1027] 빈 처리 5일 후에 AFP로 표지된 세포는 소수이거나 또는 존재하지 않았다.
- [1028] 요약하면, 인간 SOX17 단백질의 카르복시말단242 아미노산에 대하여 제조된
- [1029] 항체는 웨스턴 블롯 상의 인간 SOX17 단백질을 식별하나, SOX17과 가장 가까운 Sox
- [1030] 과인 SOX7은 인식하지 못하였다. SOX17 항체는 SOX17 및 AFP (내장 내배엽)으로 동
- [1031] 시 표지하는 소함량 (<5%)의 세포뿐만 아니라 SOX17+/AFPlo/- (표지된 세포의 95% 이상) 세포가 주인 분화중의 hESC 배양물 세포의 부분도 인식하였다. 액티빈으로 처리된 hESC 배양물은 SOX17 표지된 세포뿐만 아니라 SOX17 유전자 발현의 현저한 상승 및 AFP의 mRNA 및 AFP 항체로 표지된 세포수의 현저한 감소의 결과를 나타내었다.
- [1032] 실시예 5.
- [1033] Q-PCR 유전자 발현 분석
- [1034] 하기의 실험에서, hESC 분화에 미치는 다양한 처치의 효과를 검색하기 위하여
- [1035] 초기 분석인 실시간 정량적 RT-PCR (Q-PCR)을 사용하였다. 특히, 유전자 발현의 실
- [1036] 시간 측정은 Q-PCR에 의해 여러 시점에서 여러 마커 유전자에 대해 분석되었다. 바
- [1037] 람직하지 않은 세포 유형뿐만 아니라 바람직한 세포 유형의 마커 유전자 특성은 세
- [1038] 포 개체군의 전체적인 역학을 보다 잘 이해하기 위해 평가되었다. Q-PCR 분석의 강
- [1039] 점은 이의 극히 높은 민감도 및 그 게놈 서열이 이미 알려진 필수 마커의 개발에
- [1040] 대한 상대적 용이성을 포함한다. 또한, Q-PCR의 극히 높은 민감도는 더 많은 개체
- [1041] 군 내에서 상대적으로 소수인 세포의 유전자 발현 탐지를 가능하게 한다. 부가적으
- [1042] 로, 매우 낮은 수준의 유전자 발현의 탐지능은 개체군 내의 분화 성향
- [1043] (differentiaion bias)"에 대한 표시를 제공한다. 상기 세포 표현형의 명백한 분화
- [1044] 에 앞선 특정 분화 경로로의 성향은 면역 세포 화학적 기법으로는 인식되지 못한
- [1045] 다. 상기한 이유로, Q-PCR은 분화 처리의 성공 여부를 검색하기 위하여 면역 세포
- [1046] 화학적 기법보다 잠재적으로 매우 우수하며 적어도 상보적인 분석 방법을 제공한

[1047] 다. 부가적으로, Q-PCR은 분석의 반-고 처리 (semi-high throughput) 규모량으로
[1048] 정량적 체계로 분화 프로토콜의 성공여부를 평가하기 위한 기전을 제공한다.

[1049] 본원에서 이용된 접근법은 로터 유전자 3000 장비가 장착된 SYBR 녹색 화학
[1050] 법 측정 기기 (SYBR Green chemistry on a Rotor Gene 3000 instrument; Corbett
[1051] Research) 및 2 단계 RT-PCR 체제이다. 상기의 접근법은 추후의 부가적인 마커 유
[1052] 전자의 분석을 위한 cDNA 시료의 저장을 가능하게 하고, 시료간의 역전사 효율상의
[1053] 변이성을 회피할 수 있도록 한다.

[1054] 프라이머는 엑손-엑손 경계 또는 오염된 게노믹 DNA (genomic DNA)로부터 증
[1055] 폭물을 제거하기 위해 수학적으로 결정되는, 가능한 최소 800 bp의 짧은 인트론에
[1056] 걸쳐 놓여 지도록 고안되었다. 인트론을 포함하지 않거나 위유전자 (pseudogene)를
[1057] 가진 마커 유전자가 사용될 때는, RNA 시료에 DNase I 처리가 수행되었다.

[1058] 세포 시료의 유전자 발현에 대한 폭넓은 수준의 기술을 제공하기 위하여, 목표
[1059] 및 비-목표 세포 유형의 다중 마커 유전자 발현을 측정하기 위하여 관례적으로 Q-
[1060] PCR을 사용하였다. hESC 분화 초기에 상응하는 마커 (특히 외배엽, 중배엽, 완전
[1061] 내배엽 및 배외 내배엽) 및 이의 확인된 프라이머 군은 하기 표 1에 나타내었다.
[1062] 상기 프라이머 군의 인간 특이성도 또한 확인되었다. 이는 hESCs가 종종 마우스 영
[1063] 양세포층 상에서 성장한다는 점에서 중요한 요소이다. 가장 전형적으로, 각 정량적
[1064] 결정에 수반되는 생물학적 다양성의 평가를 위하여 각 조건에 대해 시료는 3배수로
[1065] 사용되었고, 독립적으로 2번씩 분석되었다.

[1066] PCR 주형의 생산을 위해, 총 RNA는 RNeasy (Qiagen)를 사용하여 분리하였으
[1067] 며 RiboGreen (Molecular Probes)를 사용하여 정량하였다. 350-500 ng의 총 RNA에
[1068] 대한 역전사는 oligo-dT 및 무작위 프라이머 혼합물을 포함하는 아이스크립트 역전
[1069] 사 키트(iScript reverse transcriptase kit; BioRad)를 사용하여 수행되었다. 그
[1070] 후 각 20 μ L 반응물은 총 부피가 100 μ L이 되도록 희석되었으며, 이들 중 3 μ L가
[1071] 400 nM 정방향 및 역방향 프라이머 및 5 μ L 2X SYBR Green master mix (Qiagen)를
[1072] 함유하는 10 μ L Q-PCR 반응물에 사용되었다. 85-94 $^{\circ}$ C에서 5초간 변성 (각 프라이
[1073] 머 군에 대한 증폭체의 융점에 따라 특이적으로 선택되었다) 후 45초간 60 $^{\circ}$ C에서
[1074] 결합/연장하는 2단계 주기 매개변수가 사용되었다. 각 연장기의 마지막 15초 동안
[1075] 형광 데이터가 수집되었다. 3 부분, 10배 연속 희석물이 각 실행 (run)의 표준 곡
[1076] 선을 산출하기 위해 사용되었으며, 주기 역치 (cycle thresholds; Ct's)는 상기 표
[1077] 준 곡선을 기반으로 한 정량적 값으로 변환되었다. 각 시료에 대한 정량적 값은 하
[1078] 우스키핑 유전자 (housekeeping gene) 수행에 대하여 평균화되었으며, 평균 및 표
[1079] 준 편차는 시료의 3배수에 대해 계산되었다. PCR 주기를 종결하며, 반응 특이성을
[1080] 확인하기 위하여 용해 곡선 (melt curve) 분석이 수행되었다. PCR 증폭체 특유의 T_m의 단일 피크에 의해 단일

특이적 산물을 확인할 수 있었다. 부가적으로, 증폭되지 않는 음성대조군으로서 역전사 효소를 배제한 반응이 수행되었다.

[1081] Q-PCR 방법론의 확립을 위한 첫 번째 단계는 실험체계에 적절한 하우스키핑 유
 [1082] 전자 (HGs)의 검증 단계이다. HG는 RNA 투입(input), RNA 보전 (integrity) 및 RT
 [1083] 효율에 대한 시료간의 평균화를 위해 사용되기 때문에, 적절하고 유의한 평균화를
 [1084] 위해 모든 시료 유형의 전 시기에 일정한 발현 수준을 나타내는 HG가 중요하였다.
 [1085] 분화하는 hESCs의 사이클로필린 G (Cyclophilin G), 히포크산틴 포스포리보실트란
 [1086] 스퍼라제 1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; HPRT), 베타-2-마이크로
 [1087] 글로불린 (beta-2-microglobulin), 히드록시메틸비안 합성효소
 [1088] (hydroxymethylbiance synthase; HMBS), TATA-결합 단백질 (TATA-binding protein;
 [1089] TBP) 및 글루쿠로니다제 베타 (glucuronidase beta; GUS)의 발현 수준을 측정하였
 [1090] 다. 실험 결과는 분화기 전반에 걸쳐 증가되는 베타-2-마이크로글로불린 발현 수준
 [1091] 을 나타내어, 평균화를 위한 이 유전자의 사용은 배제하였다. 다른 유전자들은 처
 [1092] 리군 뿐만 아니라 전 시간에 걸쳐 일정한 발현 수준을 나타내었다. 모든 시료에 대
 [1093] 해 평균화 인자를 계산하기 위해 사이클로필린 G 및 GUS 모두를 통상적으로 사용하
 [1094] 였다. 여러 HGs의 사용은 평균화 과정에 수반되는 다양성을 동시에 감소시키며 상
 [1095] 대적 유전자 발현 값의 신뢰도를 증가시킨다.
 [1096] 평균화에 사용하기 위한 유전자들을 수득한 후, Q-PCR을 서로 상이한 실험적
 [1097] 조건상의 시료간의 많은 마커 유전자들의 상대적 유전자 발현 수준의 결정에 사용
 [1098] 하였다. 사용된 마커 유전자는, 이들이 초기 배엽을 나타내는 특이적 개체군 내에
 [1099] 서 밀집되어 나타내며, 특히 완전 내배엽 및 배외 내배엽에서 상이하게 발현되는
 [1100] 유전자 군에 집중되었기 때문에 선택되었다. 이러한 유전자 및 그들의 상대적 밀집
 [1101] 양상을 표 1에 나타내었다.

표 1

배엽	유전자	발현 도메인 (Domain)
내배엽	SOX17	완전, 내장 및 벽 내배엽
	MIXL1	내배엽 및 중배엽
	GATA4	완전 및 원시 내배엽
	HNF3b	완전 내배엽, 원시 내배엽, 중배엽, 신경관
	GSC	내배엽 및 중배엽
배외	SOX7	내장 내배엽
	AFP	내장 내배엽, 간
	SPARC	벽 내배엽
	TM	벽 내배엽/영양외배엽
외배엽	ZIC1	신경관, 뉴런 전구세포
중배엽	BRACH	초기 중배엽

[1103]

[1104] 여러 유전자가 하나 이상의 배엽에서 발현되므로 동일한 실험 내에서 여러
 [1105] 유전자의 발현 수준을 정량적으로 비교하는 것이 유용하다. SOX17은 완전 내배엽에
 [1106] 서 내장 내배엽 및 벽 내배엽에서 보다 적은 양이 발현된다. SOX7 및 AFP는 내장
 [1107] 내배엽의 발생 초기 시점에 발현된다. SPARC 및 TM은 벽 내배엽에서 발현되며 브라
 [1108] 키우리 (Brachyury)는 초기 중배엽에서 발현된다.

[1109] 완전 내배엽 세포가 고수준의 SOX17 mRNA, 저수준의 AFP 및 SOX7 (내장 내배
 [1110] 엽), SPARC (벽 내배엽) 및 브라키우리 (Brachyury, 중배엽)를 발현할 것이라 예측
 [1111] 되었다. 부가적으로, 초기 외배엽 유도를 배제하기 위해 본 실험에서 ZIC1이 사용
 [1112] 되었다. 결론적으로, GATA4 및 HNF3b는 완전 및 배외 내배엽 모두에서 발현되었으
 [1113] 며, 따라서 완전 내배엽에서 SOX17 발현과 연관되었다 (표 1). 도 11-14에 나타난
 [1114] 대표적 실험은 표 1에 기재된 마커 유전자들이 여러 시료 중에서 어떻게 각각 연관
 [1115] 되는지를 나타내며, 중배엽 및 신경세포유형뿐만 아니라 완전 내배엽 및 배외 내배
 [1116] 엽으로의 분화의 특이적 양상을 강조한다.

[1117] 상기 데이터에 나타난 바와 같이, 액티빈의 증가량이 SOX17 유전자 발현 증가
 [1118] 의 결과를 나타냄이 명백하다. 부가적으로 상기 우세한 SOX17 발현은 배외 내배엽
 [1119] 과 대비됨으로서 완전 내배엽을 대표하는 특징으로 나타내었다. 상기 결과는 SOX17
 [1120] 유전자 발현이 AFP, SOX7 및 SPARC 유전자 발현과 역비례 관계에 있다는 관찰 결과
 [1121] 에서 유래된다.

[1122] 실시예 6.

[1123] 인간 ES 세포의 완전 내배엽으로 유도 분화

[1124] 인간 ES 세포 배양물은 그들의 미분화 상태를 능동적으로 유지하지 않는 조
 [1125] 건 하에서 배양된다면 무작위적으로 분화한다. 상기 이형적 분화는 ZIC1 및 네스틴
 [1126] (외배엽) 및 브라키우리 (중배엽) 발현으로 표시되는 초기 외배엽 및 중배엽 과생
 [1127] 물뿐만 아니라 벽 및 내장 내배엽 (AFP, SPARC 및 SOX7 발현) 모두를 포함하는 배
 [1128] 외 내배엽 세포를 생산하게 된다. 완전 내배엽 세포의 외관은 ES 세포 배양물의 특
 [1129] 이적 항체 마커의 결핍에 의해 실험되거나 구체화되지 못했다. 상기 결핍에 의한
 [1130] 이유 때문에 ES 세포 배양물에서의 초기 완전 내배엽 생산에 대하여 충분하게 연구
 [1131] 되지 못했다. 완전 내배엽 세포에 대한 적절한 항체 시약을 이용할 수 없었기 때문
 [1132] 에, 특정화의 대부분은 외배엽 및 배외 내배엽에 집중 되었다. 전반적으로, 무작위
 [1133] 적으로 분화된 ES 세포 배양물의 SOX17hi 완전 내배엽 세포와 비교할 때 배외 및 신경외배엽 세포 형태가 상당
 히 많은 수로 존재한다.

[1134]

[1135] 미분화된 hESC 군체 (colony)가 섬유아세포 영양세포층 위에서 확장됨에 따

[1136] 라 군체의 가장자리는 군체의 안쪽 내에 존재하는 세포들과는 구별되는 호환적인

[1137] 형태를 취하게 된다. 상기의 바깥쪽 가장자리의 세포 대부분은 그들의 균일한 형태

[1138] 가 적고, 보다 큰 세포 체형 및 높은 수준의 OCT4 발현에 의해 구별될 수 있다. ES

[1139] 세포가 분화됨에 따라 미분화된 ES 세포에 대비하여 OCT 발현 수준은 상승 또는 하

[1140] 향 치환된다고 개시되어 왔다. OCT4 수준의 미분화 역치의 보다 높은 또는 보다 낮

[1141] 은 변경은 만능성 상태로부터 분화 초기 단계의 시작을 알리는 전조일 수가 있다.

[1142] 미분화된 군체를 SOX17 면역세포화학법으로 확인할 때, 때때로 주변의 무작

[1143] 위적 지역 및 미분화된 ESC 군체 사이의 경계면에서 SOX17 양성 세포의 작은 10-15

[1144] 세포군집 (cluster)이 탐지되었다. 상기한 바와 같이, 상기한 바깥쪽 군체 가장자

[1145] 리의 흩어진 고립지 (pocket)는 크기가 확장되고 보다 군집화 됨에 따라, 전형적인

[1146] ESC 형태에서 벗어나는 형태로 분화되는 초기 세포의 일부로 나타난다. 보다 오래

[1147] 되고, 큰 군체 (지름 1-2 mm, >5일생)는 전술한 전형적인 hESC 형태에서 벗어나는

[1148] 형태로 분화되는 일부 군체의 바깥쪽 또는 가장자리 안쪽 구역에서 SOX17 양성,

[1149] AFP 음성 세포의 산발적으로 분리된 패취(patch)를 갖는 데 반하여, 보다 어리고

[1150] 작은 완전하게 분화되지 않은 군체 (< 1mm 4-5일생)는 군체 내 또는 가장자리에

[1151] SOX17 양성 세포가 없는 것으로 나타났다. 만일 이것이 효과적인 SOX17 항체의 초

[1152] 기 개발 형태라면, 이러한 초기 "미분화된" ESC 배양물에서 생성되는 완전 내배엽

[1153] 세포는 이전에 입증된 바 없는 것이다.

[1154] Q-PCR에 의한 SOX17 및 SPARC 유전자 발현 수준의 역비례 관계를 기초로 하여,

[1155] 상기 SOX17 양성, AFP 음성 세포의 대다수는 항체 동시-표지에 의해 벽 내배엽 마

[1156] 커에 대하여 음성으로 나타날 것이다. 이는 도 15A-B에 나타난 바와 같이 TM을 발

[1157] 현하는 벽 내배엽 세포를 위해 특이적으로 입증된다. 노달 인자인 액티빈 A 및 B에

[1158] 대한 노출은 TM 발현 강도 및 TM 양성 세포수 면에서 극적인 감소로 나타났다. 액

[1159] 티빈으로 처리된 세포 배양물에 대한 SOX17, AFP 및 TM 항체를 이용한 삼중 표지에

[1160] 의해, AFP 및 TM에 대해서도 음성인 SOX17 양성 세포들의 군집이 관찰되었다 (도

[1161] 16A-D). 이러한 결과는 분화중인 ESC 배양물 내의 SOX17 양성 내배엽 세포에 대한

[1162] 첫번째 세포상의 입증 결과이다 (도 16A-D 및 17).

[1163] 상기한 SOX17 항체 및 Q-PCR 기술을 이용하여 ESCs로부터 SOX17hi/AFPlo/SPARC/TMlo 완전 내배엽 세포로의 분화가 효과적으로 프로그래밍될 수 있는 몇가지 과정을 조사하였다. SOX17 유전자 발현에 대해 Q-PCR에 의한 개체군 수준 및 SOX17 단백질의 항체 표지에 의해 각 세포 수준에서 측정되는 상기 세포의 수 및 증식능력의 증가에 목적을 두고 다양한 분화 프로토콜을 적용하였다.

[1164] 본 발명자는 먼저 시험관내 세포 배양물 내의 배아 줄기 세포로부터 완전 내배
[1165] 엽 세포 생산에 사용되는 노달/액티빈/BMP와 같은 TGF β 과(family) 성장 인자의
[1166] 효과를 처음으로 분석 및 설명하고자 하였다. 전형적인 실험예에서, 분화 과정의
[1167] 시작을 위해 액티빈 A, 액티빈 B, BMP 또는 상기 성장 인자들의 조합을 미분화된
[1168] 인간 줄기 세포주인 hESCyt-25의 배양물에 첨가하였다.

[1169]
[1170] 도 19에 나타난 바와 같이, 100 ng/ml의 액티빈 A 첨가는 분화 4일째에 미분
[1171] 화된 hESCs에 비하여 SOX17 유전자 발현이 19배나 많이 유도되었다. 액티빈 과의
[1172] 두 번째 요소인 액티빈 B를 액티빈 A와 함께 첨가하면, 조합된 액티빈 처리 4일째
[1173] 에 미분화된 hESCs에 비해 유전자 발현이 37배나 많이 유도되었다. 마지막으로, 노
[1174] 달/액티빈 및 BMP 아군 내 TGF β 과의 세 번째 요소인 BMP4를 액티빈 A 및 액티빈 B
[1175] 와 함께 첨가하면, 미분화된 hESCs에 비해 유전자 발현이 57배나 많이 유도되었다
[1176] (도 19). 무인자 배지 대조군과 비교하였을 때 액티빈들 및 BMP에 의한 SOX17 유도
[1177] 는 4일째 시점에서 5배, 10배 및 15배 유도되었다. 액티빈 A, B 및 BMP에 의한 3중
[1178] 처리 5일 후, SOX17은 hESCs와 비교하여 70배 이상 높게 유도되었다. 상기 데이터
[1179] 는 노달/액티빈 TGF β 과 요소들의 보다 많은 양 및 늘어난 처리시간이 SOX17의 발
[1180] 현을 증가시킴을 나타내는 것이다.

[1181] 노달 및 관련 분자인 액티빈 A, B 및 BMP는 생체 내 또는 시험관 내에서
[1182] SOX17 발현 및 완전 내배엽의 형성을 촉진시킨다. 또한, BMP 첨가는 노달 공동수용
[1183] 체인 크립토 (Cripto)의 추가적인 유도를 통해 가능한 SOX17의 유도 증가를 결과로
[1184] 나타낸다.

[1185] 액티빈 A 및 액티빈 B의 조합과 BMP4와의 공동 사용이 SOX17 유도의 추가적인
[1186] 증가 및 이에 따른 완전 내배엽을 형성한다는 것이 입증되었다. 장기간 (> 4일)의
[1187] 액티빈 A 및 B와 조합된 BMP4 첨가는 완전 내배엽뿐만 아니라 벽 및 내장 내배엽의
[1188] SOX17을 유도할 수도 있다. 따라서 본 발명의 일부 구현예로서, 첨가 4일 내에 처
[1189] 리군으로부터 BMP4를 제거하는 것이 중요하다.

[1190] 개개 세포 수준에서의 TGF β 인자의 처리 효과를 확인하기 위하여, TGF β 인
[1191] 자의 첨가에 따른 시간의 경과에 따른 진행상황을 SOX17 항체 표지를 이용하여 측
[1192] 정하였다. 이미 도 10A-F에 나타난 바와 같이, 전반적인 시간에서 SOX17 표지된 세
[1193] 포의 상대적 수가 극적으로 증가하였다. 상대적 정량 결과(도 20)는 SOX17-표지된
[1194] 세포에서 20배 이상 증가하였다. 상기 결과는 세포수 및 SOX17 유전자 발현 수준
[1195] 모두가 TGF β 인자의 노출 시간에 따라 증가됨을 나타낸다. 도 21에 나타난 바와

- [1196] 같이, 노달, 액티빈 A, 액티빈 B 및 BMP4에 대한 노출 4일 이후, SOX17의 유도 수
- [1197] 준은 미분화된 hESCs에 비해 168배 이상의 수준에 도달하였다. 도 22는 SOX17-양성
- [1198] 세포의 수 또한 농도에 반응함을 나타낸다. 100 ng/mL 또는 그 이상의 액티빈 A 농
- [1199] 도는 SOX 17 유전자 발현 및 세포수의 증가를 효과적으로 유도한다.
- [1200] TGF β 과의 요소들에 추가적으로, Wnt 과의 분자들이 완전 내배엽의 특성화
- [1201] 및/또는 유지에 대해 중요한 역할을 할 것이다. Wnt 분자의 사용은 액티빈을 단독
- [1202] 처리한 군보다 액티빈과 함께 Wnt3a를 함께 처리한 시료에서 SOX17 유전자의 발현
- [1203] 이 증가되는 현상에서 확인되는 바와 같이, hESCs로부터 완전 내배엽으로의 분화를
- [1204] 위해 또한 유용함이 확인되었다 (도 23).
- [1205] 상기한 모든 실험은 첨가된 인자 및 10% 혈청을 포함한 조직 배양 배지를 이용
- [1206] 하여 수행되었다. 놀랍게도, 도 24A-C에 나타난 바와 같이, 첨가된 액티빈의 존재
- [1207] 하에서 혈청의 농도가 SOX17 발현 수준에 영향을 미침을 알 수 있었다. 혈청 수준
- [1208] 이 10%에서 2%로 감소하면, SOX17 발현은 액티빈 A 및 B의 존재하에서 3배 증가하
- [1209] 였다.
- [1210] 마지막으로, 도 25A-D에 도시된 바와 같이, 액티빈이 배양물 내의 SOX17+ 세
- [1211] 포 분열을 유도함을 확인하였다. 화살표는 PCNA/DAPI-표지된 유사분열 판 양상 및
- [1212] 상 비교 유사분열 양상에 의하여 입증되는 바와 같이, 유사분열기상의 OX17/PCNA/DAPI로 표지된 세포들을 나타
- [1213] 낸다.
- [1213] 실시예 7.
- [1214] 완전 내배엽에 대한 마커와 연관되며 중배엽, 외배엽 또는 내장 내배엽의 마커와는
- [1215] 연관되지 않는 케모카인 수용체 4(CXCR4) 발현
- [1216] 상기한 바와 같이, hESC는 TGF β 과, 더욱 상세하게는 액티빈/노달 하과
- [1217] (subfamily)의 사이토카인의 적용에 완전 내배엽 배엽 (definitive endoderm germ
- [1218] layer)으로 분화하도록 유도될 수 있다. 또한, 분화 배양 배지 내의 우태아혈청
- [1219] (FBS)의 비율이 hESCs로부터 완전 내배엽으로의 분화 효율에 영향을 끼친다는 것으
- [1220] 로 나타났다. 배지 내 주어진 액티빈 A의 농도에서, 상기와 같은 효과로, 비교적
- [1221] 높은 농도의 FBS가 완전 내배엽으로의 최대한의 분화를 저해할 것이다. 외인성
- [1222] (exogenous) 액티빈 A의 부재하에서, hESCs로부터 완전 내배엽 계통으로의 분화는
- [1223] 매우 비효율적이며, FBS 농도는 hESCs의 분화 과정에서 보다 약한 영향을 미친다.
- [1224] 상기 실험에서, hESCs는 0.5%, 2.0% 또는 10%의 우태아혈청(Invitrogen,
- [1225] Carlsbad, CA; cat# 61870-036)과 100 ng/mL의 액티빈 A이 첨가되거나 비첨가된
- [1226] RPMI 배지하에서 6일간 배양하여 분화되었다. 또한, 분화 초기 3일간 0.5% 내지

[1227] 2.0% 범위로 농도구배된 FBS를 100 ng/mL의 액티빈 A와 함께 사용하였다. 6일 후,
 [1228] 반복 시료를 각 배양 조건으로부터 수집하였으며, 실시간 정량적 PCR에 의해 관련
 [1229] 유전자 발현을 분석하였다. 남은 세포들은 SOX17 단백질의 면역형광 탐지를 위하여
 [1230] 고정되었다.

[1231] CXCR4의 발현 수준은 사용된 7가지 배양 조건 전반에 걸쳐 극적으로 변화하였
 [1232] 다 (도 26). 일반적으로, CXCR4 발현은 액티빈 A 처리 배양물 (A100)에서 높게 나
 [1233] 타났으며, 외생적 액티빈 A를 투여하지 않은 배양물 (NF)에서는 낮게 나타났다. 또
 [1234] 한, A100 처리 배양물에서, CXCR4 발현은 가장 낮은 농도의 FBS 처리군에서 가장
 [1235] 높았다. 상대적 발현이 액티빈 A를 수용하지 않는 조건과 보다 더욱 일치하도록
 [1236] 조성된 10% FBS 조건 하에서 CXCR4 수준은 뚜렷하게 감소하였다.

[1237] 상기한 바와 같이, SOX17, GSC, MIXL 및 HNF3 β 유전자의 발현은 완전 내배엽
 [1238] 으로서의 세포 특정화에 일치된다. 이러한 7가지 분화 조건 전반에 걸친 상기 4 개
 [1239] 유전자의 상대적 발현은 CXCR4의 발현을 반영한다 (도 27A-D). 이는 CXCR4 또한 완
 [1240] 전 내배엽의 마커임을 증명하는 것이다.

[1241] 외배엽 및 중배엽 계통은 이들이 가진 여러 마커의 발현에 의해 완전 내배엽
 [1242] 으로부터 구별될 수 있다. 초기신경외배엽이 SOX1 및 ZIC1을 발현하는 반면에, 초
 [1243] 기 중배엽은 브라키우리 (Brachyury) 및 MOX1 유전자를 발현한다. 도 28A-D는 외인
 [1244] 성 액티빈 A를 투여하지 않은 배양물에서 중배엽 및 외배엽 유전자 발현이 우위적
 [1245] 으로 밀집되며, 액티빈 A 처리 배양물 중에서 10% FBS 조건이 또한 중배엽 및 외배
 [1246] 엽 마커 발현 수준을 증가시킴을 입증하는 것이다. 상기의 발현 양상은 CXCR4의 발
 [1247] 현 양상과 반대되는 것으로, 이는 CXCR4가 상기 발생단계의 ESCs로부터 유래된 중
 [1248] 배엽 또는 외배엽에서 높게 발현되지 않음을 나타내는 것이다.

[1249] 포유류 발생의 초기에는 배외 계통의 분화 또한 일어난다. 본원과의 특별한
 [1250] 관련성은 SOX17을 포함하는 완전 내배엽과 공통된 여러 유전자의 발현을 공유하는
 [1251] 내장 내배엽의 분화이다. 배외 내장 내배엽과 완전 내배엽의 구별을 위해, 상기의
 [1252] 두 내배엽간의 구별되는 마커로 실험을 수행하여야 한다. SOX7은 내장 내배엽에서
 [1253] 발현되나 완전 내배엽 계통에서는 발현되지 않는 마커를 대표한다. 따라서 SOX7은
 [1254] 발현하지 않으며 왕성한 SOX17 유전자 발현을 나타내는 배양 조건은 완전 내배엽을
 [1255] 포함하지만 내장 내배엽은 포함하지 않는 경향이 있다. 도 28E에 나타난 바와 같
 [1256] 이, 액티빈 A를 투여하지 않은 배양물에서 SOX7가 높은 발현을 나타냈으며, SOX7는
 [1257] FBS가 10% 포함되었을 때에는 액티빈 A의 존재하에서도 증가된 발현을 나타내었다.
 [1258] 이러한 양상은 CXCR4 발현 양상과 반대되는 것이며, 이는 CXCR4가 내장 내배엽에서

- [1259] 높게 발현되지 않음을 제시한다.
- [1260] 상기에 언급된 각 분화 조건 하에서 존재하는 SOX17 면역반응성 (SOX17+) 세포
- [1261] 의 상대적인 세포수도 또한 측정되었다. 고농도의 액티빈 A 및 저농도 (0.5% -
- [1262] 2.0 %)의 FBS 존재 하에서 hESCs가 분화될 때, SOX17+ 세포는 배양물 전체에 편재
- [1263] 하여 분포한다. 고농도의 액티빈과 10% (v/v)의 FBS를 사용하면, SOX17+ 세포는 비
- [1264] 교적 낮은 빈도로 나타나며, 배양물 전체에 고르게 분포하기보다는 항상 분리된 군
- [1265] 집에서 나타난다 (도 29A 및 C, B 및 E). 외인성 액티빈 A의 무첨가군에서 SOX17+
- [1266] 세포의 추가적 감소가 나타났다. 상기 조건 하에서 SOX17+ 세포는 군체에서도 나타
- [1267] 났으며, 상기 군체는 고농도의 액티빈 A와 저농도의 FBS를 처리한 군에서 나타난
- [1268] 군체와 비교하여 더욱 작고 드물게 나타났다 (도 29C 및 F). 상기 결과는 CXCR4 발
- [1269] 현 양상이 완전 내배엽 유전자 발현뿐만 아니라 각 조건하의 완전 내배엽 세포 수
- [1270] 에도 부합됨을 증명한다.
- [1271] 실시예 8.
- [1272] CXCR4 양성 세포의 비율을 증가하여 완전 내배엽을 밀집화하는 분화조건
- [1273] 액티빈 A 농도는 ESCs로부터 유래될 수 있는 완전 내배엽의 효율성에 또한
- [1274] 영향을 미친다. 본 실시예는 액티빈 A 농도의 증가로 인해 배양물 내의 CXCR4+ 세포의 비율이 증가됨을 증명한다.
- [1275] hESCs는 0.5%-2% FBS (분화 초기 3일간 0.5%에서 1.0%에서 2.0%이상 증가시
- [1276] 킴) 및 0, 10 또는 100 ng/mL의 액티빈 A를 첨가한 RPMI 배지에서 분화되었다. 분
- [1277] 화 7일 후, 세포는 2% FBS 및 2mM (EDTA)를 포함하며 Ca²⁺/Mg²⁺가 없는 PBS로 실온에서 5분간 분리하였다. 세
- [1278] 포는 35 μ m의 나일론 필터로 여과되었으며, 계수되고 침전되었다. 침전된 펠렛 세포는 소량의 50% 인간혈청/50%
- [1279] 정상당나귀 혈청으로 재현탁되었으며, 비-특이적 항체 결합 부위를 차단하기 위해 얼음 위에 2분간 배양하였
- [1280] 다. 그 후, 여기에 상기의 재현탁물 50 μ L (약 105 세포수 포함)당 1 μ L의 마우
- [1281] 스 항-CXCR4 항체 (Abcam, cat# ab10403-100)를 첨가하였으며, 얼음 위에서 45분간
- [1282] 표지를 수행하였다. 2% 인간 혈청을 포함한 PBS (완충액) 5 mL로 세포들을 세척하
- [1283] 였고 펠렛화시켰다. 5 mL 완충액으로 두 번째 세척을 마친 후, 105 세포당 50 μ L의 완충액으로 재현탁하였다.
- [1284] 2차 항체 (FITC 결합된 당나귀 항-마우스 Jackson
- [1285] ImmunoResearch, cat# 715-096-151)를 최종농도 5 μ g/mL으로 처리하였으며, 30분
- [1286] 간 표지한 후에 상기 완충액으로 두 번 세척하였다. 5 x 10⁶개의 세포를 완충액으로 재현탁한 후, 유세포분석
- [1287] 핵심 시설 (the flow cytometry core facility; The
- [1288] Scripps Research Institute)의 직원이 형광활성화세포 분류기기 (FACS Vantage,
- [1289] Beckton Dickenson)를 이용하여 분석하고 분류하였다. 세포는 실시간 정량적 PCR에
- [1290] 의한 유전자 발현 분석에 대한 총 RNA의 분리를 위해 RLT 용해완충액 (Qiagen) 내
- [1291] 로 직접 수집되었다.

- [1288]
- [1289] 유세포 분석에 의해 계수된 CXCR4+ 세포수는 분화 배양 배지 내에서 액티빈
- [1290] A 농도가 증가됨에 따라 극적으로 증가하였다 (도 30A-C). CXCR4+ 세포는 R4 게이트 (gate) 내에 속한 것이며, 상기 게이트는 발생빈도의 0.2%가 R4 게이트에 위치하도록 조절하기 위하여 2차 항체-유일 처치 대조군을 이용하여 배치되었다. CXCR4+ 세포수의 극적인 증가는 액티빈 A 농도의 증가에 따른 완전 내배엽 유전자 발현의 확연한 증가 현상과 부합되는 것이다 (도 31A-D).
- [1291] 실시예 9.
- [1292] 완전 내배엽 유전자 발현을 위한 CXCR4 양성 세포의 분리 및 중배엽, 외배엽 및 내
- [1293] 장 내배엽의 마커를 발현하는 세포의 제거
- [1294] 상기 실시예 8에서 확인된 CXCR4+ 및 CXCR4- 세포를 수집하여 관련 유전자 발현을 분석하였으며, 동시에 모 (parent) 개체군의 유전자 발현을 측정하였다.
- [1295] CXCR4 유전자 발현의 상대적 수준은 액티빈 A 농도의 증가와 함께 극적으로
- [1296] 증가하였다 (도 32). 이러한 결과는 CXCR4+ 세포의 액티빈 A 농도-의존적 증가와 관련된다 (도 30A-C). 각 개체군으로부터 CXCR4+ 세포의 분리는 그 개체군에서의 거의 모든 CXCR4 유전자 발현에 의한 것이다. 이는 상기 세포의 수집을 위한 FACS 방법의 효용성을 증명하는 것이다.
- [1297] 유전자 발현 분석은 CXCR4+ 세포가 CXCR4 유전자 발현의 대부분만 아니라, 완
- [1298] 전 내배엽의 다른 마커에 대한 유전자 발현도 포함하는 것으로 분석되었다. 도
- [1299] 31A-D에 나타난 바와 같이, CXCR4+ 세포는 SOX17, GSC, HNF3b 및 MIXL1에 대한 모
- [1300] (parent) A100 개체군에 비하여 보다 더 밀집화되었다. 또한, CXCR4- 분획은 상기
- [1301] 의 완전 내배엽 마커 유전자들을 매우 낮게 발현한다. 게다가, CXCR4+ 및 CXCR4- 개체군은 중배엽, 외배엽 및 배외내배엽 마커의 유전자 발현과는 반대되는 양상을 나타내었다. 도 33A-D는 CXCR4+ 세포는 A100 모개체군에 상대적으로 브라키우리
- [1302] (Brachyury), MOX1, ZIC1 및 SOX7 유전자 발현이 결핍됨을 나타낸다. 상기 A100 모
- [1303] 개체군은 액티빈 A의 낮은 농도 또는 무첨가 조건에서와는 상대적으로 상기 마커들
- [1304] 의 발현면에서 이미 낮게 나타났다. 상기 결과는 고농도의 액티빈 A의 존재하에서
- [1305] hESCs로부터 분화된 CXCR4+ 세포의 분리가 완전 내배엽이 높게 밀집된 개체군 및 실질적으로 순수한 완전 내배엽을 생산함을 나타낸다.
- [1306] 실시예 10.
- [1307] CXCR4를 이용한 세포 개체군 내의 완전 내배엽 세포 정량
- [1308] 세포 배양물 또는 세포 개체군내에 존재하는 완전 내배엽 세포의 비율의
- [1309] 정량을 확인하기 위하여, 본원 및 전체로서 본원에서 참고로 인용되는 2003년 12월
- [1310] 23일에 “완전 내배엽” 이라는 명칭으로 출원된 미국 가출원 번호 제 60/532,004
- [1311] 호에서 측정된 바와 같이, CXCR4 및 완전 내배엽의 다른 마커들을 발현하는 세포를

FACS를 이용해 분석하였다.

상기 실시예들에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여, hESCs는 완전 내배엽을 생산하기 위해 분화되었다. 특히, 분화하는 세포 배양물에서 발현 산물의 수득율 및 순도를 증가시키기 위해, 배지 내의 혈청 농도는 하기와 같이 조정하였다: 1일째 0.2% FBS, 2일째 1.0% FBS 및 3-6일째 2.0% FBS. 분화된 배양물은 3가지의 세포 표면 항원결정기 (epitope)인 E-Cadherin, CXCR4 및 트롬보모듈린 (Thrombomodulin)를 이용한 FACS에 의해 분류되었다. 그 후 다른 세포 유형뿐만 아니라 완전 내배엽 및 배외 내배엽에 대한 마커의 상대적 발현 수준을 결정하기 위해 Q-PCR을 사용하여 분류된 세포 개체군을 분석하였다. 최적의 상태로 분화된 배양물로부터 분류된 CXCR4 세포는 완전 내배엽 세포를 분리시켰으며, 이는 98%이상의 순도를 나타내었다.

표 2는 본원에 개시된 방법을 이용한 hESCs로부터 분화된 완전 내배엽 배양물에 대한 표지 분석을 나타낸 것이다.

표 2

완전 내배엽 배양물의 마커(들)	배양물의 퍼센트 (%)	완전 내배엽의 퍼센트 (%)	배외 내배엽의 퍼센트 (%)	hES세포의 퍼센트 (%)
SOX17	70-80	100		
트롬보모듈린	<2	0	75	
AFP	<1	0	25	
CXCR4	70-80	100	0	
ECAD	10	0		100
기타 (ECAD 음성)	10-20			
합계	100	100	100	100

특히, 표 2는 세포 배양물 내의 세포 중 70%-80%가 CXCR4 및 SOX17 양성 세포 (내배엽)를 포함함을 나타낸다. 상기 SOX17-발현 세포의 2% 이하는 TM (벽 내배엽)을 발현하였으며, 1% 이하는 AFP (내장 내배엽)을 발현하였다. SOX17/CXCR4 양성 세포의 비율로부터 TM-양성 및 AFP-양성 세포 (벽 및 내장 내배엽의 합 총 3%)의 비율을 제외하면, 세포 배양물 내의 약 67% 내지 77%가 완전 내배엽임을 알 수 있다. 세포의 약 10%는 hESCs의 마커인 E-Cadherin (ECAD)에 양성을 나타내었으며, 세포들의 약 10-20%는 다른 세포 유형이었다.

FACS 분리 전에 수득한 분화하는 세포 배양물에서, 완전 내배엽의 순도는 5-6일의 분화과정 내내 $\leq 0.5\%$ 의 FBS 농도를 유지함으로써 상기한 낮은 혈청 처리와 비교하여 향상됨을 확인하였다. 그러나 5-6일의 분화과정 내내 $\leq 0.5\%$ 의 FBS 농도를

- [1337] 갖는 세포 배양물의 유지는 결국에 생산되는 완전 내배엽 세포의 총 수 면에서의
- [1338] 감소 현상을 야기한다.
- [1339] 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 완전 내배엽 세포는 뚜렷한 분화 없이 50일
- [1340] 이상 액티빈이 존재하는 배양물에서 유지되고 확장되었다. 상기의 경우에서, SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3 β 발현은 배양기간 내내 전반적으로 유지된다.
- [1341] 추가적으로, TM, SPARC, OCT4, AFP, SOX7, ZIC1 및 BRACH는 상기 배양물에서 탐지
- [1342] 되지 않았다. 상기 세포들은 뚜렷한 분화 없이 실질적으로 50일 이상 유지 및 확장
- [1343] 될 수 있는 경향을 갖는다.
- [1344] 실시예 11.
- [1345] 완전 내배엽 세포의 부가적 마커
- [1346] 하기의 실험에서, 정제된 완전 내배엽 및 인간 배아 줄기 세포 개체군으로부터
- [1347] 더 RNA를 분리하였다. 유전자 발현은 그 후 각 정제된 개체군 RNA의 유전자 칩 분
- [1348] 석에 의해 분석하였다. 완전 내배엽을 위한 마커로서 배아 줄기 세포에서는 발현되
- [1349] 지 않으며 완전 내배엽에서 발현되는 유전자의 가능성을 연구하기 위해 또한 추가
- [1350] 적으로 Q-PCR이 수행되었다.
- [1351] 인간 배아 줄기 세포 (hESCs)는 20% 탈락 혈청 대체물 (Knockout Serum
- [1352] Replacement), 4 ng/mL 재조합 인간 일반 섬유아세포 성장 인자 (bFGF), 0.1 mM 2-
- [1353] 머캅토에탄올 (2-mercaptoethanol), L-글루타민, 비필수아미노산 및 페니실린/스트
- [1354] 랫토마이신이 첨가된 DMEM/F12 배지에서 유지되었다. hESCs는 100 ng/mL 재조합 인
- [1355] 간 액티빈 A, 우태아혈청 (FBS) 및 페니실린/스트랏토마이신이 첨가된 RPMI 배지에
- [1356] 서 5일간 배양되었으며 완전 내배엽으로 분화되었다. FBS 농도는 하기와 같이 각
- [1357] 일별로 다양하게 처리되었다: 0.1% (1일), 0.2% (2일), 2% (3-5일)
- [1358] 유전자 발현 분석을 위한 hESCs 및 완전 내배엽의 정제된 개체군을 수득하기
- [1359] 위해 형광 활성화 세포 분류법(fluorescence activated cell sorting, FACS)에 의해
- [1360] 세포들이 분리되었다. 면역-정제법 (immuno-purification) 공정으로, hESCs는
- [1361] SSEA4 항원 (R&D Systems, cat# FAB1435P)을 이용, 완전 내배엽은 CXCR4 (R&D
- [1362] Systems, cat# FAB170P)를 이용하여 수행되었다. 세포는 트립신/EDTA (Invitrogen,
- [1363] cat# 25300-054)을 이용하여 분리하였으며, 2% 인체 혈청을 포함하는 인산 완충액
- [1364] (phosphate buffered saline; PBS)으로 세척하였고, 100% 인체 혈청으로 재현탁하
- [1365] 여 비-특이적 결합을 차단하기 위해 10분간 얼음에 놓아두었다. 염색은 파이크오리
- [1366] 스린-결합된 (phycoerythrin-conjugated) 항체 200 μ L를 800 μ L 인간 혈청 내의
- [1367] 5×10^6 세포에 첨가하여 얼음위에 30분 놓아두어 수행하였다. 세포는 PBS완충액 8

- [1368] mL로 2번 세척하였으며, 상기 PBS완충액 1mL로 재현탁하였다. FACS 분리는 스크립
- [1369] 스 연구소 핵심 시설 (the core facility of The Scripps Research Institute)의
- [1370] 형광활성화세포 분류기기 (FACS Vantage, BD Biosciences)를 이용하여 수행하였다.
- [1371] 세포는 RLT 용해완충액으로 바로 수집하였으며, RNA는 RNeasy를 이용하여 제조자의
- [1372] 지시 (Qiagen)에 따라 분리하였다.
- [1373]
- [1374] 정제된 RNA는 발현 양상 데이터의 생성을 위해 아피메트릭스체제 (Affymetrix platform) 및 U133 플러스 2.0 고농도 올리고뉴클레오타이드 어레이 (U133 Plus 2.0 high-density oligonucleotide arrays)를 이용하는 발현 분석(Expression Analysis, Durham, NC)에 2배수로 적용되었다. 주어진 데이터는 군 사이의 비교이며, 이는 hESCs 및 완전 내배엽의 2 개체군 사이에 달리 발현되는 유전자를 식별한다. hESCs에서 확인된 왕성한 발현 수준 상승 변화를 나타내는 유전자는 완전 내배엽에 대해 매우 특징적인 새로운 후보 마커로서 선택되었다. 선택된 유전자들은 상기한 바와 같이 유전자 칩에서 발견된 유전자 발현 변화의 확인 및 hESC 분화 과정 동안 상기 유전자들의 발현 양상 연구를 위해 Q-PCR로 분석되었다.
- [1375]
- [1376] 도 34A-M은 특정 마커에 대한 유전자 발현 결과를 나타낸다. 결과는 100 ng/ml 액티빈 A의 첨가 후 1, 3 및 5일째에, 분화과정의 마지막 5일에 정제된 CXCR4-발현 완전 내배엽 세포 (CXDE) 및 정제된 인간 배아 줄기 세포 (HESC)의 세포 배양물의 분석 결과를 나타낸 것이다. 도 34C 및 G-M의 비교는 6개의 마커 유전자인 FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1 및 CRIP1이 상호 거의 동일한 발현 양상을 나타냈으며, 또한 CXCR4 및 SOX17/SOX7 발현 양상과 일치함이 증명되었다. 상기한 바와 같이, SOX17은 SOX7-발현 배외 내배엽에서만 아니라 완전 내배엽 모두에서 발현된다. SOX7이 완전 내배엽에서 발현되지 않으므로, SOX17/SOX7의 비율은 전체적으로 개체군에서 입증된 SOX17 발현에 기여하는 완전 내배엽의 신뢰성 높은 추정치를 제공한다. 구획 C에 대한 구획 G-L 및 M의 유사성은 FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1,
- [1377] CMKOR1 및 CRIP1들이 완전 내배엽의 마커로 적당하며, 이들이 배외 내배엽 세포에
- [1378] 서 유의하게 발현되지 않음을 나타낸다.
- [1379] 본원에 개시된 Q-PCR 결과는 추가적으로 ICC로 확인될 수 있음도 인식되어야
- [1380] 할 것이다.
- [1381]
- [1382] 실시예 12.
- [1383] 완전 내배엽 배양물에서 PDX1를 특이적 유도하는 레티노산 및 FGF-10
- [1384] 하기의 실험은 RA 및 FGF-10가 완전 내배엽 세포에서의 PDX1 발현을 유도함을 입증
- [1385] 하는 것이다.
- [1386] 인간 ES 세포는 4일 동안 액티빈 첨가 또는 무첨가 상태에서 배양되었다. 4일째에,
- [1387] 세포 배양물에 1 μ M 의 RA 및 50 ng/ml 의 FGF-10가 첨가되었다. RA/FGF-10 첨가
- [1388] 48시간 후, PDX1 마커 유전자 및 전장 내배엽에 비특이적인 다른 마커 유전자의 발
- [1389] 현을 Q-PCR로 정량하였다.
- [1390] 완전 내배엽 세포에 대한 RA의 적용은 내장 내배엽 (SOX7, AFP), 신경 (SOX1,

[1391] ZIC1) 또는 뉴런 (NFM) 유전자 발현 마커의 발현 증가 없이 (도36A-F참조) PDX1 유
 [1392] 전자 발현의 강한 증가를 야기시켰다 (도 35 참조). PDX1 유전자의 발현은 완전 내
 [1393] 배엽 세포를 1 μ M 의 RA 및 50 ng/ml의 FGF-10에 48시간 노출시킨 후에 약 500배
 [1394] 이상의 수준으로 유도되었다. 게다가 이러한 결과들은 RA 적용 전에 액티빈을 무첨
 [1395] 가한 배양물과 상대적으로 비교시 액티빈이 처리된 세포 배양물에서 160 배 높은
 [1396] PDX1 발현이 확인되는 바와 같이 실질적인 PDX1의 유도는 이미 이전에 완전 내배엽
 [1397] (SOX17)으로 분화된 세포 배양물에서만 발생함을 나타낸다.

[1398] 실시예 13.

[1399] FGF-10은 RA 단독 첨가보다 PDX1 발현상에 추가적 증가를 제공함
 [1400] 본 실시예는 RA단독보다 RA 및 FGF-10의 혼합이 PDX1의 발현을 보다 높은 수준으로
 [1401] 유도함을 나타낸다.
 [1402] 이전의 실험에서와 같이, 인간 ES 세포는 4일 동안 액티빈의 첨가 또는 무첨가 상
 [1403] 태에서 배양되었다. 4일 동안 세포들은 하기와 같은 방법 중 하나로 처리되었다:
 [1404] 단독 1 μ M RA; FGF-4와 FGF-10 둘 중 하나와 1 μ M RA의 혼합물; 또는 FGF-4, FGF-
 [1405] 10 둘 및 1 μ M RA의 혼합물. PDX1, SOX7 및 NFM의 발현은 RA 또는 RA/FGF 첨가 96
 [1406] 시간 후 Q-PCR로 정량하였다.
 [1407] 액티빈이 처리된 인간 ES 세포 배양물은 레티노산에 의해 PDX1 유전자 발현 증가가
 [1408] 60-배로 유도되었다. RA가 처리된 배양물에 FGF-4의 첨가는 PDX1의 약한 증가를 유
 [1409] 도하였다 (단독 RA 보다 약 3배 이상). 그러나 FGF-10 및 레티노산을 함께 첨가함
 [1410] 으으로써, PDX1의 유도는 RA 단독 첨가에 비해 60-배 이상 증가되었다 (도 37A 참조
 [1411]). 이런 매우 강한 PDX1의 유도는 액티빈 무처리 또는 RA/FGF 처리보다 1400-배 이
 [1412] 상 더 큰 것이었다. 흥미롭게도, FGF-4 및 FGF-10의 동시 첨가는 FGF-10의 첨가에
 [1413] 의한 유리한 효과를 제거함으로써 FGF-4 첨가에 의한 중정도의 PDX1의 증가만을 나
 [1414] 타냈다.
 [1415] RA/FGF-4 또는 RA/FGF-10 혼합물들의 첨가는 RA/FGF 혼합물에 노출되지 않았을 때
 [1416] 와 비교시 전장 내배엽과 관련이 없는 마커 유전자들의 발현을 증가시키지 않았
 [1417] 다.(도 37-B-C 참조)

[1418] 실시예 14.

[1419] 시험관 내 (in vitro)에서 전장-전방 (A-P)부위에 영향을 미치는 레티노산의 투여
 [1420] 시험관 내 세포 배양에서, A-P 위치에 RA의 투여가 영향을 미치는지 여부를 확인하
 [1421] 기 위해 하기 실험을 수행하였다.
 [1422] 인간 배아 줄기 세포는 4일 동안 액티빈의 무첨가 또는 첨가 상태로 배양되었다. 4
 [1423] 일째에, 배양물에 50 ng/ml의 FGF-10와 0.04 μ M, 0.2 μ M 또는 1.0 μ M의 RA의 혼합
 [1424] 물을 첨가하였다. PDX1 마커 유전자뿐만 아니라 전장 내배엽에 비특이적인 다른 마

- [1425] 커들의 발현도 Q-PCR로 정량하였다.
- [1426] 50 ng/ml의 FGF-10 와 다양한 투여량의 레티노산 조합의 첨가는 특정 전장-전방 부
- [1427] 위의 패턴과 연관된 상이한 패턴의 유전자 발현을 야기했다. 최대 투여용량의 RA
- [1428] (1 μ M)는 전장 내배엽 마커 (HOXA3)의 발현을 선택적으로 유도하며, 또한 PDX1 의
- [1429] 강한 증가를 나타내었다(도 38A-B 참조). RA (0.2 μ M)의 중정도 투여량은 중장 내
- [1430] 배엽 마커들 (CDX1, HOXC6)을 유도하고 (도 38C 및 41E 참조), 반면에 RA (0.04 μ
- [1431] M)의 최소 투여량은 후장 내배엽의 마커 (HOXA13)를 우위적으로 유도한다. RA 용량
- [1432] 은 신경 (SOX1) 또는 신경단위 (NFM) 마커의 상대적인 발현에 대하여 필수적으로
- [1433] 영향을 미치지 않는다 (도 38F-G 참조). 본 실시예는 시험관 내에서 모르포겐
- [1434] (morphogen)으로서의 RA의 용도 및 특히 분화하는 hESCs의 내배엽 유도체인 모르포
- [1435] 겐으로서의 RA의 용도를 강조한다.
- [1436]
- [1437] 실시예 15.
- [1438] B27 보충사용은 PDX1의 발현을 향상시킴
- [1439] 완전 내배엽에서의 PDX1 발현은 인자 수 및 세포 성장/분화 조건을 사용함에 의해
- [1440] 영향을 받을 수 있다. 하기 실험에서, B27 보충의 사용이 완전 내배엽 세포에서의
- [1441] PDX 발현을 향상시킴을 입증한다.
- [1442]
- [1443] 인간 배아 줄기 세포는 고농도의 액티빈 A (100-200 ng/ml in 0.5-2 %
- [1444] FBS/DMEM/F12)를 갖는 마우스 배아 섬유아세포 영양세포에서 4일간 성장한 미분화
- [1445] 된 hES 세포의 처치함에 의해 완전 내배엽로의 분화를 유도하였다. 액티빈 A 무처
- [1446] 치 대조군으로는 액티빈 A의 첨가 없는 0.5-2 % 의 FBS/DMEM/F12를 사용하였다. 4
- [1447] 일째, 배양물은 2% FBS에서 무첨가 액티빈 A 군 (none) 및 2% 혈청 대체물군 (SR)
- [1448] 또는 2%FBS/DMEM/F12 하에서 2 μ M RA 및 50 ng/ml의 FGF-10과 50 ng/ml의 액티빈 A
- [1449] 처치군 (none, +FBS, +B27) 및 2% 혈청 대체물 사용외 유사한 군 (SR)을 얻었다.
- [1450] B27 보충물 (Gibco/BRL)을 1/50로 희석시켜 2%FBS/DMEM/F12 (+B27)에 직접 첨가시
- [1451]켰다. 개개 포인트에서 얻은 이중의 세포 시료들을 및 총 RNA를 분리한 후에 전술
- [1452]한 Q-PCR을 수행하였다.
- [1453] 도 39A-E는 무혈청 B27의 보충이, 무혈청 존건하에서 성장한 세포에서의 마커 유전
- [1454]자 발현과 비교하여 전장 내배엽에 비특이적인 마커 유전자의 발현 증가의 유도 없
- [1455]이 PDX1 유전자의 발현 유도에 대하여 추가적인 이점을 제공함을 나타낸다.
- [1456] 실시예 15.
- [1457] PDX1 유도 증가를 위한 액티빈 B의 사용
- [1458] 본 실시예는 시험관 내 세포 배양물에서 PDX1-음성 세포의 PDX1-양성 세포로의 분

- [1459] 화 증가를 위한 액티빈 B의 사용을 나타낸다.
- [1460] 인간 배아 줄기 세포는 6일간 저혈청/RPMI하 고농도의 액티빈 A (50 ng/ml)로 처
- [1461] 치된 마우스 배아 섬유아세포 영양세포에서 성장한 미분화된 hESCs 세포 처치에 의
- [1462] 해 완전 내배엽으로 분화가 유도되었다. FBS 투여량은 1일째 0%, 2일째에는 0.2%
- [1463] 및 3-6일째에는 2%로 투여했다. 완전 내배엽 생산을 위한 음성 대조군 (NF)는 액티
- [1464] 빈 A 첨가없이 2% FBS/RPMI로 처치하였다. PDX1 발현을 유도하기 위해서, 6일째에
- [1465] 각각의 배양물에 2 의 레티노산이 첨가된 2% FBS/RPMI를 처치하였다. 1일 내지 5일
- [1466] 에 걸쳐 액티빈 A를 처리한 세포 배양물에 다양한 투여량으로 조합된 액티빈 A 및
- [1467] 액티빈 B 처치 또는 50ng/ml의 액티빈 A만 단독처치를 제공하였다. 액티빈 A 무처
- [1468] 치 대조군 세포 배양물 (NF)에는 액티빈 A도 액티빈 B도 제공하지 않았다. 이런
- [1469] RA/액티빈 처치군은 PDX1 유전자 발현을 3일 동안 2배수의 시료로부터 PDX1 유전
- [1470] 자 발현을 시간대별로 Q-PCR로 측정하였다.
- [1471] 도 40A는 25 ng/ml (A25) 또는 50 ng/ml (A50)의 액티빈 A 존재하에서 10-50ng/ml
- [1472] (a10, a25 and a50)의 투여 범위로 액티빈 B를 첨가하여, PDX1 발현이 50 ng/ml의
- [1473] 액티빈 A만 처리한 배양물보다 2-배 이상 증가됨을 나타낸다. 액티빈 B의 첨가에
- [1474] 따른 PDX1의 증가는 HNF6의 발현상의 증가가 없었으며 이는 발생중 이 시점에서 간
- [1475] 뿐만 아니라 췌장에 대한 마커이기도 하다 (도 40B 참조). 이 결과는 췌장으로서의
- [1476] 세포 분화 비율이 간에 비하여 상대적으로 증가됨을 제시한다.
- [1477]
- [1478] 실시예 17.
- [1479] PDX1의 유도 증가를 위한 혈청 첨가의 이용
- [1480] 완전 내배엽에서의 PDX1의 발현은 분화 과정 전체에 걸쳐 존재하는 혈청의
- [1481] 양에 의해 영향을 받는다. 하기 실험은 hESCs가 PDX1-음성 완전 내배엽으로 분화하
- [1482] 는 동안 배양물에서의 혈청 농도가 이러한 세포들이 PDX1-양성 내배엽으로 한층 더
- [1483] 분화되는 동안에 PDX1 발현에 영향을 미친다는 것을 나타낸다.
- [1484] 인간 배아 줄기 세포는 6일간 저혈청/RPMI하 고농도의 액티빈 A (100 ng/ml)로 처
- [1485] 치된 마우스 배아 섬유아세포 영양세포에서 성장한 미분화된 hESCs 세포 처치에 의
- [1486] 해 완전 내배엽으로 분화가 유도된다. FBS 투여량은 1일째 0.1%, 2일째에는 0.5%
- [1487] 및 3-5일째에는 각각 0.5%, 2% 또는 10%로 투여했다. 완전 내배엽 생산을 위한 음
- [1488] 성 대조군 (NF)는 액티빈 A 첨가없이 매일 동일한 2% FBS/RPMI로 처치되었다. PDX1
- [1489] 발현은 RA의 첨가에 의해 6일째에 유도가 시작되었다. 6-7일 동안, 배양물은 0.5%
- [1490] FBS/RPMI에 2 의 레티노산으로 처리하였고, 8일째에는 1 및 9-11일째에는 0.2 으로
- [1491] 처리하였다. 액티빈 A는 레티노산 처리 동안에는 50 ng/ml으로 농도를 낮추었고,
- [1492] 액티빈 A 무처리 대조군 (NF)에서는 처치하지 않았다.
- [1493] 도 41A는 완전 내배엽 유도 3일 기간 동안 (3일, 4일 및 5일)의 FBS 투여가 레티

- [1494] 노산의 처치 동안 PDX1 유전자 발현의 유도 변화 능력을 지속함을 나타낸다. 이것
- [1495] 은 ZIC1 (도 41B) 또는 SOX7 (도 41C) 유전자 발현의 패턴에 유의적인 변화 없이
- [1496] 나타난다.
- [1497] 실시예 18.
- [1498] PDX1의 유도 증가를 위한 조건화 배지의 사용
- [1499] 완전 내배엽 세포에서 PDX1의 발현에 영향을 미치는 다른 인자들 및 성장 조건도
- [1500] 연구되었다. 하기 실험은 PDX1-음성 완전 내배엽 세포로부터 PDX1-양성 내배엽 세
- [1501] 포로의 분화에 대한 조건화 배지의 영향을 나타낸다.
- [1502] 인간 배아 줄기 세포는 5일간 저혈청/RPMI하 고농도의 액티빈 A (100 ng/ml)로 처
- [1503] 치된 마우스 배아 섬유아세포 영양세포에서 성장한 미분화된 hESCs 세포 처치에 의
- [1504] 해 완전 내배엽으로 분화가 유도된다. FBS 투여량은 1일째 0.2%, 2일째에는 0.5%
- [1505] 및 3-5일째에는 2%로 투여했다.
- [1506] 5일째의 액티빈 A 처리로 발생된 완전 내배엽 배양물은 이후 4일 동안 25ng/ml의
- [1507] 액티빈 A를 포함한 2%의 FBS/RPMI에 RA의 첨가로 PDX1 발현 내배엽으로의 분화가
- [1508] 유도되었다. RA를 처음 2일 동안 2 , 3번째 날은 1 및 4번째 날은 0.5 로 첨가하였
- [1509] 다. 이러한 PDX1 유도를 위한 기본 배지는 새로운 (2A25R) 또는 24시간 동안 4개의
- [1510] 서로 다른 세포 개체군 중 하나로 조건화한 후에 제공되었다. 조건화 배지 (CM)는
- [1511] 각 마우스 배아 영양세포 (MEFCM) 또는 하기 3가지 조건 중 하나로 처음 5일 동안
- [1512] 분화된 hESCs로부터 생성되었다; i) 3% FBS/RPMI (CM2), 또는 ii) 액티빈 A (CM3)
- [1513] 또는 iii) 뼈 성장촉진 단백질 4 (BMP4) (CM4). 액티빈 A 또는 BMP4 인자들은 동일
- [1514] 한 전술한 FBS 투여 계획 하 (0.2%, 0.5%, 2%)에서 100 ng/ml으로 제공되었다. 이
- [1515] 러한 3가지 서로 다른 분화 체계로 조절화 가능한 PDX1 유도 배지에 의해 서로 매
- [1516] 우 상이한 3가지 인간 세포 개체군을 수득하였다. 성장 인자의 첨가 없는 3%의
- [1517] FBS 처치 (NF)로 외배아 내배엽, 외배엽 및 중배엽 세포의 많은 부분을 구성하는
- [1518] 이형성 개체군을 수득하였다. 액티빈 A가 처리된 배양물 (A100)에서 완전 내배엽을
- [1519] 큰 비율로 수득하였고, BMP4가 처리된 배양물 (B100)에서 주가 배아 영양세포
- [1520] (trophectoderm)이고 약간의 외배아 내배엽을 수득하였다.
- [1521] 도 42A는 PDX1이 새로운 또는 조건화 배지에서 RA 처리 후 처음 2일에 걸쳐 동량으
- [1522] 로 유도됨을 나타냈다. 그러나 PDX1 발현 3일 째에 새로운 배지 및 MEF로 조절된
- [1523] 배지의 처리로 감소하기 시작했다. 분화된 hESCs는 PDX1 유전자 발현을 유지하거
- [1524] 나 또는 나아가 새로운 배지보다 3 내지 4-배 이상의 수준으로 PDX1 유전자 발현을
- [1525] 증가시키는 조절화 배지를 생산한다. hESC-조절화 배지에서 높은 수준의 PDX1 발현
- [1526] 유지 효과는 새로운 배지에서보다 6 내지 7 배 높게 RA 처리로 획득되는 발현 수준
- [1527] 보다 더욱 증폭된다. 도 42B는 조건화 배지 처리에 의해 PDX1 발현 내배엽 부분에

- [1528] 서 발현되지 않는 유전자인 CDX1가 매우 낮은 수준으로 발현하는 결과를 나타낸다.
- [1529] 이것은 PDX1-발현 내배엽의 전반적인 순도가 완전 내배엽에 분화된 hESC 배양물로
- [1530] 부터 생성된 조건화 배지를 처리함으로써 매우 향상되었음을 나타낸다.
- [1531] 도 43은 PDX1 유전자 발현이 완전 내배엽에 적용된 조건화 배지의 양에 대하여 확
- [1532] 실한 투여 반응을 나타냄을 보여준다. 각 플레이트에 첨가된 배지의 총 부피는 5
- [1533] ml였고, 조건화 배지에 표시된 부피 (도 43)는 새로운 배지 (A25R)로 희석된 것이
- [1534] 다. 4 ml의 새로운 배지에 1 ml의 조건화 배지만이 첨가된 것이 단지 5ml의 새로
- [1535] 운 배지에서 보다 PDX1의 높은 발현 수준을 유도 및 유지할 수 있음이 시사된다.
- [1536] 이는 PDX1-발현 내배엽의 유도를 위한 조건화 배지의 유리한 효과가 상기 세포로
- [1537] 부터 조건화 배지로의 일부 물질 또는 물질들의 유리에 의존적이고 이러한 물질
- [1538] (들)이 PDX1-발현 내배엽의 생산을 농도 의존적으로 향상시킴을 의미한다.
- [1539] 실시예 19.
- [1540] PDX1에 결합하는 항체의 확인
- [1541] PDX1에 결합하는 항체는 세포 개체군에서 PDX1의 발현 유도를 확인하기 위한 유용
- [1542] 한 수단이다. 본 실시예는 PDX1에 대한 토끼 다클론 및 IgY 항체가 이 단백질의 존
- [1543] 재를 확인하기 위해 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [1544] 첫 번째 실험에서, 세포 용해물 내의 PDX1와 결합하는 IgY 항-PDX1 (IgY α -PDX1)
- [1545] 항체는 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되었다. 상기 분석에서, MDX12 인간 섬유아세
- [1546] 포 또는 PDX1 발현 벡터로 24시간 전에 감염된 MDX12 세포로부터 수득한 총 50 μ g의 세포 용해물에 대한 IgY α -PDX1 항체의 결합능을 상호 비교하였다. 세포 용해물을 SDS-PAGE로부터 분리하였고, 전기블롯팅에 의해 막으로 옮겨졌으며, 이후 IgY α -PDX1 알칼라인 포스파타아제가 부착된 토끼 항-IgY (Rb α -IgY) 이차 항체에 따른 일차 항혈청으로 표지하였다. 일차 및 이차 항체의 상이한 희석은 하기 조합들에서 막의 스트립 (strips) 분리에 적용되었다; A (500x 일차 희석, 10,000x 이차 희석), B (2,000x, 10,000x), C (500x, 40,000x), D (2,000x, 40,000), E (8,000x,
- [1547] 삭제
- [1548] 삭제
- [1549] 삭제
- [1550] 삭제
- [1551] 삭제

[1552] 삭제

[1553] 40,000x). 결합은 모든 항체 조합들에 시험된 PDX1 발현 벡터 (PDX1-양성)로 감염된 세포에서 확인되었다. 일차 및 이차 항체를 둘 다 최고 농도로 사용시에 (조합 A) 비-감염된 (PDX1-음성) 섬유아세포에서만 결합이 관찰되었다. 이러한 비-특이적 결합은 감염 및 비-감염된 섬유아세포에서 분자량이 PDX1보다 약간 높은 추가 밴드를 검출함으로써 특징화된다.

[1554] 삭제

[1555] 삭제

[1556] 삭제

[1557] 삭제

[1558] 삭제

[1559] 두 번째 실험에서, 다클론 토끼 항-PDX1 (Rb α -PDX1)와 PDX1의 결합을 면역세포화

[1560] 학법으로 시험했다. 본 실험을 위한 PDX1 발현 세포의 생산을 위해, MS1-V 세포

[1561] (ATCC # CRL-2460)는 일시적으로 PDX1-EGFP (pEGFP-N1을 사용해 제조됨, Clontech)

[1562] 인 발현 벡터로 감염시켰다. 감염된 세포는 이후 Rb α -PDX1 및 α -EGFP 항혈청

[1563] (antisera)으로 함께 표지하였다. 감염된 세포는 EGFP 형광뿐만 아니라 Cy5 가 부

[1564] 착된 이차 항체의 사용을 통한 α -EGFP 면역세포화학을 이용하여 시각화하였다.

[1565] PDX1 면역형광법은 α -Rb Cy3-부착된 이차 항체의 사용을 통해 시각화되었다.

[1566] Rb α -PDX1 및 α -EGFPB 항체의 결합은 GFP 발현과 공동-집중(co-localized)된다.

[1567] 실시예 20.

[1568] 인간 췌장 조직의 면역세포화학

[1569] 본 실시예는 PDX1에 대한 특이성을 가진 항체가 인간 PDX1-양성 세포의 면역세포화

[1570] 학법에 의한 확인에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[1571] 첫 번째 실험에서, 인간 췌장에 삽입된 파라핀을 1/200 희석배수의 기니아 피그

[1572] 항-인슐린 (Gp α -Ins) 일차 항체로 염색후 1/100 희석배수로 Cy2가 부착된 도그

[1573] 항-기니아피그 (D α -GP) 이차 항체로 인슐린을 위해 염색하였다. 두 번째 실험에서,

[1574] 상기와 동일한 인간 췌장 절편에 삽입된 파라핀을 1/300 희석배수로 AF555가 부착

[1575] 된 Rb α -IgY 이차 항체로 염색후에 1/4000 희석배수의 IgY α -PDX1 일차 항체로

[1576] PDX1을 위해 염색하였다. 이 영상은 병합된 후의 일차 및 이차 실험으로부터 수집

[1577] 되었다. 세 번째 실험에서, IgY α -PDX1 항체로 염색된 세포 또한 DAPI로 염색하였

- [1578] 다.
- [1579] 인간 췌장 절편의 분석에서 랑게르한스섬이 강하게 염색됨이 확인되었다. 가장 강
- [1580] 한 PDX1 신호가 섬 (islets, 인슐린-양성)에서 나타남에도 불구하고, 포상 조직
- [1581] (인슐린-음성)에서도 약한 염색이 보여졌다.
- [1582] 실시예 21.
- [1583] 레티노산이 처리된 세포로부터 PDX1의 면역침강
- [1584] RA 존재하에 분화된 완전 내배엽 세포에서의 PDX1 발현 및 RA존재로 분화되지 않은
- [1585] 완전 내배엽 세포에서의 PDX1의 결핍 상태를 확인을 위해, 토끼 항-PDX1 (Rb α -
- [1586] PDX1) 항체를 RA 분화 및 미분화된 완전 내배엽 세포 모두로부터 PDX1을 면역침강
- [1587] 하는 데에 이용하였다. 면역침강된 RA는 IgY α -PDX1 항체를 이용한 웨스턴 블롯
- [1588] 분석법에 의해 검출하였다.
- [1589] 면역 침강을 위한 분화 및 미분화된 완전 내배엽 세포의 용해물을 수득하기 위해,
- [1590] hESCs를 저혈청 (완전 내배엽)을 100 ng/ml의 액티빈 A로 5일 동안 처리하고, 2일
- [1591] 동안 50 ng/ml의 액티빈 A 및 2 μ M의 모두 트랜스체인 RA 처리하고, 1일 동안 1 μ
- [1592] M의 RA처리 및 1 일동안 0.2 μ M의 RA를 처리하였다(PDX1-양성 전장 내배엽). 양성
- [1593] 대조군으로서 세포 용해물을 PDX1 발현 벡터로 감염된 MS1-V 세포 (ATCC # CRL-
- [1594] 2460)로부터 준비되었다. PDX1은 Rb α -PDX1 및 토끼-특이적 이차 항체를 각 용해
- [1595] 물에 첨가함으로써 면역침강되었다. 침강물은 원심분리에 의해 수확되었다. 면역
- [1596] 침강물을 SDS-함유 완충액에서 용해하였고, 폴리아크릴아미드 겔에 로딩 (loaded)
- [1597] 시켰다. 분리 후, 단백질을 전기영동에 의해 막으로 옮기고, 이후 Rb -IgY로 표지
- [1598] 된 이차 항체에 따른 IgY -PDX1 일차 항체로 표지하였다.
- [1599] MS1-V 양성 대조군 세포 뿐만 아니라 8일째 날 (lane d8, RA 처리 시작 3일 후) 및
- [1600] 9일째 날 (lane d9, RA 처리 시작 4일 후)의 세포로부터 수집된 면역 침강물들은
- [1601] 모두 PDX1 단백질에 양성이었다 (도 44 참조). 미분화된 완전 내배엽 세포 (액티
- [1602] 빈 A가 처리된 5일째의 세포 도 44에서 (A)로 표시) 및 미분화된 hESCs (무처리된
- [1603] 5일째의 세포 도 44에서 (NF)로 표시)로부터 얻은 침강물은 PDX1에 음성이었다.
- [1604] 실시예 22.
- [1605] PDX1 프로모터-EGFP 유전자 형질전환 hESC 세포주의 발생
- [1606] 세포 분리를 위한 PDX1 마커를 사용하기 위해, 우리는 발현가능한 리포터 유
- [1607] 전자를 PDX1양성 전장 내배엽 세포에 유전적으로 부착했다. 이 실시예는 PDX1 조절
- [1608] 영역의 조절하에서 리포터 유전자를 포함하는 리포터 카세트(reporter cassette)를
- [1609] 포함하는 벡터의 구조를 개시한다. 또한, 이 실험은 상기 벡터로 감염된 인간배아
- [1610] 줄기세포와 같은 세포뿐만 아니라 이의 계놈을 통합한 상기 리포터 카세트를 갖는

[1611] 세포를 제조하는 방법을 개시한다.

[1612] 유전적으로 리포터 유전자를 부착한 PDX1-발현 완전 내배엽 세포주는 PDX1 유
 [1613] 전자의 조절 영역(프로모터)의 조절하에 GFP 리포터 유전자를 배치함으로써 제조되
 [1614] 었다. 먼저, EGFP 발현이 인간 PDX1 유전자 프로모터에 의해 작동되어 지는 플라스
 [1615] 미드 구조물은 인간 PDX1 조절 영역 (Genbank Accession No. AF 192496)을 갖는 벡
 [1616] 터 pEGFPN1(Clontech)의 CMV 프로모터를 대체함으로써 생성되었으며, 상기 플라스
 [1617] 미드는 PDX1 전사개시 지점의 약 4.4kb 업스트림(upstream)에서 약 85bp 다운스트
 [1618] 림(downstream)의 범위의 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 이 영역은 PDX1 유전자의
 [1619] 특징적인 조절 요소(regulatory elements)를 포함하며, 이는 유전자 변이 마우스에
 [1620] 서 정상적인 PDX1 발현패턴을 주기에 충분하다. 생성된 벡터에서, EGFP의 발현은
 [1621] PDX1 프로모터에 의해 작동된다. 일부 실험예에서, 상기 벡터는 hESCs로 감염되어
 [1622] 질 수 있다.

[1623] PDX1 프로모터/EGFP 카세트는 상기 벡터로부터 절단된 후, 포스포글리세레
 [1624] 이트 키나아제-1(phosphoglycerate kinase-1) 프로모터의 조절하에서 네오마이
 [1625] 신(neomycin) 인산운반효소(phosphotransferase) 유전자를 포함하는 선택 벡터로
 [1626] 서브클론되었다. 선택 카세트는 카세트의 제거를 허용하기 위한 flp 재조합요소 인
 [1627] 식 위치(recombinase recognition sites)에 의해 측면에 배치되었다. 상기 선택 벡
 [1628] 터는 선형화된 후, 표준 리포펙션(lipofection) 방법을 사용하여 hESCs에 도입되었
 [1629] 다. G418에서 선택 10-14일후, 미분화된 유전자 변이 hESC 클론은 분리되고 팽창되
 [1630] 었다.

[1631] 실시예 23.

[1632] PDX1-발현 전장 내배엽의 분리

[1633] 하기 실시예는 PDX1프로모터/EGFP 카세트를 함유하는 hESCs가 PDX1-양성 내
 [1634] 배엽 세포로 분화되고 그 결과로 연속적으로 FACS(fluorescence-activated cell
 [1635] sorting)에 의해 분리됨을 증명한다.

[1636] PDX1프로모터/EGFP 유전자 변이 hESCs은 액티빈A 포함배지에서 5일동안 분
 [1637] 화되고 액티빈 A 및 RA를 함유하는 배지에서 2일간 분화되었다. 분화된 세포는 트
 [1638] 립신 소화법에 의해 획득되었고, Becton Dickinson FACS Diva에서 직접 RNA 분해
 [1639] 완충용액 또는 PBS로 분류되었다. 생존 단일 세포 시료는 EGFP에 게이팅(gating)
 [1640] 없이 수득되었고(live), 생존 단일세포는 EGFP 양성(GFP) 및 GFP 음성(Neg)군으로
 [1641] 게이트되어졌다. 하나의 실험예로, EGFP 양성 분획은 형광강도(Hi 및 Lo)에 따라

- [1642] 두 동일한 크기의 군으로 분리되었다.
- [1643] 하기의 분류에서, 세포 개체군은 Q-PCR 및 면역 세포 화학법에 의해 분석되
- [1644] 었다. Q-PCR 분석을 위하여, Qiagen RNeasy 컬럼을 사용한 RNA가 준비된 후, cDNA
- [1645] 로 전환되었다. Q-PCR은 이전에 기술된 바와 같이 실시하였다. 면역세포화학법 분
- [1646] 석을 위하여, 세포를 PBS로 분리하고, 4% 파라포름알데히드에 10분간 고정하고, 사
- [1647] 이토스핀(Cytospin) 원심분리기를 사용하여 슬라이드 글라스에 부착했다. 사이토케
- [1648] 라틴 19(cytokeratin 19, KRT19)의 1차 항체는 케미콘사(Chemicon), 간세포 핵심
- [1649] 요소 3 베타(hepatocyte nuclear factor; HNF3 β)는 산타 크루즈사(Santa Cruz),
- [1650] 글루코오즈 트랜스포터 2(Glucose Transporter; GLUT2)는 R&D 시스템사(R&D
- [1651] Systems)로부터 구입하여 사용하였다. 적절한 FITC(녹색) 또는 로다민(적색)에 결
- [1652] 합된 이차 항체는 일차항체 결합을 감지하는데 사용되었다.
- [1653] 분화된 세포의 전형적인 FACS 분류는 도 45에 나타내었다. 본 실시예에서
- [1654] PDX1-양성 세포를 분리율은 약 7%이며, 이는 약 1% 내지 약 20% 까지 분화 효율성
- [1655] 에 따라 변화된다.
- [1656] 분류된 세포들은 Q-PCR 분석을 수행한다. 분화된 세포들은 세포내의 PDX1 유전
- [1657] 자 발현과 EGFP형광의 상호작용을 나타내었다. 형광을 나타내지 않는 세포들을 비
- [1658] 교하여, EGFP 양성 세포는 PDX1 발현 수준에서 20 배 이상 증가함을 나타내었다(도
- [1659] 46). 높고 낮은 EGFP 강도 세포들의 부리는 EGFP 발현 수준이 PDX1 발현 수준과 상
- [1660] 관성이 있음을 나타낸다(도 47). PDX1마커 분석에 추가적으로, 분류된 세포들에 대
- [1661] 하여 췌장 내배엽에서 발현되는 여러 유전자의 Q-PCR 분석을 수행하였다. 각각의
- [1662] 이러한 마커 유전자들(NKX2.2, GLUT2, KRT19, HNF4 α 및 HNF3 β)의 생성물은 EGFP
- [1663] 양성 분획에서 모두 밀집화되었다(도 48A-E). 반면에, 신경성 마커 ZIC1 및 GFAP는
- [1664] 분류된 EGFP 발현 세포상에서 밀집화되지 않았다.(도 49A 및 B).
- [1665] 면역세포화학법에 의해, 사실상 분리된 PDX1-양성 세포 모두는 KRT19와 GLUT2를
- [1666] 발현하는 것으로 보여진다. 이 결과는 췌장의 내배엽 계통의 세포들에서도 예상된
- [1667] 다. 이 러한 다수 세포들은 또한 항체 염색법에 의해 HNF3 β 양성이었다.
- [1668] 본원에 개시된 방법, 조성물 및 장치들은 바람직한 대표적 구현예의 대표적인 예
- [1669] 이며, 예시적인 것이지만 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다. 본원 내
- [1670] 용 및 기타 용도로의 변형은 본 발명의 정신 범위 내에서 당업자들에 의해 가능할
- [1671] 것이다. 따라서, 본 발명의 범위 및 정신으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본원

- [1672] 에 개시된 발명에 대한 치환 및 변형이 당업자에게 명백할 것이다.
- [1673] 하기의 청구항 및 본원 명세서 전반에 걸쳐 사용된 바와 같이, 구 -를 필수적으
- [1674] 로 포함하는는 구에 뒤따르는 열거된 모든 요소의 포함을 의미하며, 열거된 요소를
- [1675] 위하여 명세서상에서 특정된 본원에 특정된 활성 또는 작용을 간섭하지 않거나, 기
- [1676] 여하는 다른 요소들로 한정된다. 따라서, 구 -를 필수적으로 포함하는은 열거된 요
- [1677] 소는 필수적이나, 강제적이고, 다른 요소는 선택적이며 열거된 요소의 활성 또는
- [1678] 작용에 대한 영향 여부에 따른 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있음을 나타낸
- [1679] 다.
- [1680] 인용문헌
- [1681] 다수의 문헌 및 특허 문헌들이 본원에 인용되었다.
- [1682] 일부 인용문헌에 있어서, 완전한 인용내용은 본문 내에 있다. 기타 다른 인
- [1683] 용문헌에 있어서, 본문내용의 인용은 저자 및 출판년도별이며, 완전한 문헌 인용은
- [1684] 하기와 같다:
- [1685] Imada, M., Imada, S., Iwasaki, H., Kume, A., Yamaguchi, H., and Moore,
- [1686] E. E. (1987). 페토모듈린 (Fetomodulin): 환상 AMP에 의해 조절되는 태아 발생의
- [1687] 마커 표면 단백질. Dev Biol 122, 483-491.
- [1688] Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C.,
- [1689] Kurohmaru, M., Sanai, Y., Yonekawa, H., Yazaki, K., Tam, P. P., and Hayashi,
- [1690] Y. (2002). Sox17-부재 변이 마우스에서의 완성 장 내배엽의 결핍. Development
- [1691] 129, 2367-2379.
- [1692] Katoh, M. (2002). 정상 조직 및 종양에서의 인간 SOX7의 발현. Int J Mol Med 9,
- [1693] 363-368.
- [1694] Kikuchi, Y., Agathon, A., Alexander, J., Thisse, C., Waldron, S., Yelon, D.,
- [1695] Thisse, B., and Stainier, D. Y. (2001). 카사노바 (casanova)는 제브라피쉬에서
- [1696] 초기 내배엽 형성에 필요충분한 신규 SOX-관련 단백질을 암호화한다. Genes Dev
- [1697] 15, 1493-1505.
- [1698] Kim, C. H., and Broxmeyer, H. E. (1999). 케모카인: 발생 및 효과기 기능을 위한
- [1699] T 및 B 세포의 교통정리를 위한 신호등. J Leukoc Biol 65, 6-15.

- [1700] Kimelman, D., and Griffin, K. J. (2000). 척추동물 중배엽 유도 및 양식화
- [1701] (patterning). *Curr Opin Genet Dev* 10, 350-356.
- [1702] Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ,
- [1703] Keller G. (2004) 배양물의 배아 줄기 세포로부터 완전 내배엽의 발생
- [1704] .*Development*. 131,1651-62.
- [1705] Kumar, A., Novoselov, V., Celeste, A. J., Wolfman, N. M., ten Dijke, P., and
- [1706] Kuehn, M. R. (2001). 노달 신호는 액티빈 및 형질전환 성장 인자-베타 수용체-관
- [1707] 련 Smads를 사용한다. *J Biol Chem* 276, 656-661.
- [1708] Labosky, P. A., Barlow, D. P., and Hogan, B. L. (1994a). 마우스 원시 생식 세
- [1709] 포로부터 유래된 배아 생식 세포주 및 그들의 파생물. *Ciba Found Symp* 182, 157-
- [1710] 168; discussion 168-178.
- [1711] Labosky, P. A., Barlow, D. P., and Hogan, B. L. (1994b). 마우스 배아 생식
- [1712] (EG) 세포주: 배를 통한 유전 및 배아 줄기 (ES) 세포주와 비교한 인슐린-유사 성
- [1713] 장 인자 2 수용체 (Igf2r) 유전자의 메틸화 각인의 차이. *Development* 120, 3197-
- [1714] 3204.
- [1715] Lickert, H., Kutsch, S., Kanzler, B., Tamai, Y., Taketo, M. M., and Kemler,
- [1716] R. (2002). 배아 내배엽의 베타-카테닌 결실에 따른 다중 심장의 형성 *Dev Cell* 3,
- [1717] 171-181.
- [1718] Lu, C. C., Brennan, J., and Robertson, E. J. (2001). 수정부터 낭배형성까지:
- [1719] 마우스 배아의 축 형성. *Curr Opin Genet Dev* 11, 384-392.
- [1720] Ma, Q., Jones, D., and Springer, T. A. (1999). 케모카인 수용체 CXCR4는 골수
- [1721] 미소서식환경 내에서 B 계통 및 과립구 전구체의 보유에 필수적이다. *Immunity* 10,
- [1722] 463-471.
- [1723] McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J.(1999) 케모카인 SDF-1
- [1724] 및 이의 수용체 CXCR4의 배아 발현 및 기능.*Dev Biol*. 213, 442-56.
- [1725] Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H. (2001). TGF-베타/BMP 신호의 발산 및

- [1726] 수렴. J Cell Physiol 187, 265-276.
- [1727] Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S.,
- [1728] Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). CXC 케모카
- [1729] 인인 PBSF/SDF-1의 결핍 마우스에서의 B-세포 림프구 생성 및 골수 조혈 결함.
- [1730] Nature 382, 635-638.
- [1731] Niwa, H. (2001). ES세포의 줄기세포 재생 유지를 위한 분자 기전. Cell Struct
- [1732] Funct 26, 137-148.
- [1733] Ogura, H., Aruga, J., and Mikoshiba, K. (2001). Zic1 및 Zic2 변이 마우스의 행
- [1734] 동이상: 인간 신경 이상에 대한 본보기로서의 관계. Behav Genet 31, 317-324.
- [1735] Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A.
- [1736] (2000). 인간 배반포의 배아 줄기 세포주: 시험관 외 체분화. Nat Biotechnol 18,
- [1737] 399-404.
- [1738] Rodaway, A., and Patient, R. (2001). 중내배엽. 초기 배엽? Cell 105, 169-172.
- [1739] Rodaway, A., Takeda, H., Koshida, S., Broadbent, J., Price, B., Smith, J. C.,
- [1740] Patient, R., and Holder, N. (1999). 난황 세포-유도 TGF-베타과 신호에 의한 제
- [1741] 브라피쉬 생식 고리에서 중배엽 유도 및 FGF에 의한 중배엽 및 내배엽의 구별.
- [1742] Development 126, 3067-3078.
- [1743] Rohr, K. B., Schulte-Merker, S., and Tautz, D. (1999). 뇌 및 원체절 (somites)
- [1744] 에서의 제브라피쉬 zic1 발현은 BMP 및 헛지혹 (hedgehog) 신호에 의해 영향받는
- [1745] 다. Mech Dev 85, 147-159.
- [1746] Schier, A. F. (2003). 척추동물 발생의 노달 신호. Annu Rev Cell Dev Biol 19,
- [1747] 589-621.
- [1748] Schoenwolf, G. C., and Smith, J. L. (2000). 척추동물의 낭배형성 및 초기 중배
- [1749] 엽 양식화 (patterning). Methods Mol Biol 135, 113-125.
- [1750] Shambloott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W.,
- [1751] Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G.R., and Gearhart, J. D. (1998).

- [1752] 인간 원시 생식 세포로부터 만능성 줄기 세포의 유도. Proc Natl Acad Sci U S A
- [1753] 95, 13726-13731.
- [1754] Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock,
- [1755] G. L., Kneteman, N. M., and Rajotte, R. V. (2000). 글루코코르티코이드 없는 면
- [1756] 역억제 처방을 이용한 1형 당뇨병의 일곱 환자에 대한 섬 이식. N Engl J Med 343,
- [1757] 230-238.
- [1758] Shapiro, A. M., Ryan, E. A., and Lakey, J. R. (2001a). 당뇨 치료에 있어 췌장
- [1759] 섬 이식. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15, 241-264.
- [1760] Shapiro, J., Ryan, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., Lakey, J., Korbitt,
- [1761] G. S., and Rajotte, R. V. (2001b). 더 적은 섬세포를 1형 당뇨병환자에 이식할 수
- [1762] 있을까? 인슐린 독립은 섬 이식에 있어 우위 되어야 한다. Bmj 322, 861.
- [1763] Shiozawa, M., Hiraoka, Y., Komatsu, N., Ogawa, M., Sakai, Y., and Aiso, S.
- [1764] (1996). 개구리 (*Xenopus laevis*) xSox7 cDNA의 클로닝 및 특성 부여. Biochim
- [1765] Biophys Acta 1309, 73-76.
- [1766] Smith, J. (1997). 브라키우리 (Brachyury) 및 T-박스 (T-box) 유전자. Curr Opin
- [1767] Genet Dev 7, 474-480.
- [1768] Smith, J. C., Armes, N. A., Conlon, F. L., Tada, M., Umbhauer, M., and
- [1769] Weston, K. M. (1997). 브라키우리 (Brachyury)의 상류 및 하류, 척추동물 중배엽
- [1770] 형성에 필수적인 유전자. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62, 337-346.
- [1771] Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M. G., Jay, P.,
- [1772] and Berta, P. (2001). SOX7 전사 인자: 서열, 염색체 위치, 발현, 전이활성 및
- [1773] Wnt 신호의 간섭. Nucleic Acids Res 29, 4274-4283.
- [1774] Taniguchi, K., Hiraoka, Y., Ogawa, M., Sakai, Y., Kido, S., and Aiso, S.
- [1775] (1999). 마우스 SRY-관련 cDNA, mSox7의 분리 및 특징 부여. Biochim Biophys Acta
- [1776] 1445, 225-231.
- [1777] Technau, U. (2001). 브라키우리 (Brachyury), 원구 및 중배엽의 진화. Bioessays

- [1778] 23, 788-794.
- [1779] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A.,
- [1780] Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). 인간 배반포로부터
- [1781] 유래된 인간 배아 줄기 세포주. Science 282, 1145-1147.
- [1782] Tremblay, K. D., Hoodless, P. A., Bikoff, E. K., and Robertson, E. J. (2000).
- [1783] 마우스 완전 내배엽의 형성은 Smad2-의존 과정이다. Development 127, 3079-3090.
- [1784] Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De
- [1785] Paepe, A., and Speleman, F. (2002). 다중 내부 조절 유전자의 기하학적 평균화에
- [1786] 의한 실시간 정량적 RT-PCR 자료의 정확한 표준화. Genome Biol 3, RESEARCH0034.
- [1787] Varlet, I., Collignon, J., and Robertson, E. J. (1997). 원시 내배엽의 노달 발
- [1788] 현은 마우스 낭배형성동안 전방축 (anterior axis)의 특정화 (specification)를 요
- [1789] 구한다. Development 124, 1033-1044.
- [1790] Vincent, S. D., Dunn, N. R., Hayashi, S., Norris, D. P., and Robertson, E. J.
- [1791] (2003). 마우스 형성체 내의 세포 운명 결정은 변화되는 노달 신호에 의해 좌우된
- [1792] 다. Genes Dev 17, 1646-1662.
- [1793] Weiler-Guettler, H., Aird, W. C., Rayburn, H., Husain, M., and Rosenberg, R.
- [1794] D. (1996). 이식후 마우스 배아의 트롬보모듈린의 발생적 조절 유전자 발현.
- [1795] Development 122, 2271-2281.
- [1796] Weiler-Guettler, H., Yu, K., Soff, G., Gudas, L.J., and Rosenberg, R. D.
- [1797] (1992). F9 배아암세포에서의 환형 AMP 및 레티노이드 산에 의한 트롬보모듈린 유
- [1798] 전자 조절. Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United
- [1799] States Of America 89, 2155-2159.
- [1800] Wells, J. M., and Melton, D. A. (1999). 척추동물의 내배엽 발생. Annu Rev Cell
- [1801] Dev Biol 15, 393-410.
- [1802] Wells, J. M., and Melton, D. A. (2000). 초기 마우스 내배엽은 인접한 배엽의 가
- [1803] 용성 인자에 의해 양식화된다. Development 127, 1563-1572.

[1804] Willison, K. (1990). 마우스 브라키우리 (Brachyury) 유전자 및 중배엽 형성.

[1805] Trends Genet 6, 104-105.

[1806] Zhao, G. Q. (2003). BMP 신호의 유전자 파괴의 중요성. Genesis 35, 43-56.

[1807] Zhou, X., Sasaki, H., Lowe, L., Hogan, B. L., and Kuehn, M. R. (1993). 노달

[1808] 은 낭배형성동안 마우스에서 발현되는 신규한 TGF-베타-유사 유전자이다. Nature

[1809] 361, 543-547.

산업상 이용 가능성

[1810] 본 발명은 PDX1-양성 내배엽 세포를 포함하는 세포 배양물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 충분히 정제된 PDX1-양성 내배엽 세포를 포함하는 세포 개체군뿐만 아니라 다른 세포 형태로부터 PDX1-양성 내배엽 세포를 밀집화, 분리 및 정제하는 방법에 관한 것이다. 또한 PDX1-양성 전장 내배엽 세포 및 PDX1-음성 완전 내배엽 세포와 같은 내배엽 세포의 분화를 진행시킬 능력이 있는 분화 인자의 동정 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0673] 도 1은 hESCs로부터 베타-세포의 생산을 위해 제안된 분화 과정을 도식화한 것이

[0674] 다. 상기 과정의 1단계는 ES 세포가 완전 내배엽 계통으로 전이되는 단계이고, ES

[0675] 세포의 췌장 내배엽, 내분비샘 내배엽 또는 섬/베타-세포로의 추가적인 분화의 알

[0676] 려진 가장 초기 단계 중 하나이다. 상기 과정의 제 2단계는 SOX17-양성/PDX1-음성

[0677] 완전 내배엽이 PDX1-양성 전장 세포로의 전환을 나타낸 것이다. 일부 이러한 전이

[0678] 매개에 유용한 인자들은 이탤릭체로 표기되었다. 한정된 목표 세포들을 위한 관련

[0679] 마커들은 밑줄로 표기되었다.

[0680] 도 2는 보존된 모티프 위치를 나타내고, GENOVAC에 의한 번역화 과정에 사용되

[0681] 는 구역을 강조하여 나타낸 인간 SOX17 cDNA의 도식이다.

[0682] 도 3은 SOX17가 SOX7과 가장 연관성이 깊고, SOX18과는 다소 연관성이 적다는

[0683] 것을 설명하는 상대적 계통수를 도해한 것이다. 상기 SOX17 단백질은 동종 내에서

[0684] SOX군 F하과 (subfamily)의 다른 요소들보다 종 상동성이 비교적 밀접하게 연관된

[0685] 다.

[0686] 도 4는 토끼 항-SOX17 항체를 이용한 웨스턴 블롯이다. 상기 블롯은 섬유아세

[0687] 포에서 과발현된 인간 SOX17 단백질에 대한 항체 특이성 (lane 1) 및 EGFP의 번역

[0688] 반응성 결핍 (lane 2) 또는 가장 밀접하게 연관된 SOX과 요소인 SOX7 (lane 3)를

[0689] 증명한다.

[0690] 도 5A-B는 AFP+가 동시-표지된 (co-labeled) 세포의 유의적인 숫자를 나타내

[0691] 는 SOX17+ 세포 집단(A)을 나타내는 현미경사진이다. 이는 AFP+세포가 없거나 거의

[0692] 없이 관찰된 다른 SOX17+ 집단(B)과는 현저하게 대조적임을 나타낸다.

[0693] 도 6A-C는 벽 내배엽 (parietal endoderm) 및 SOX17을 나타내는 현미경사진이

[0694] 다. 구획 A는 임의적으로 분화된 hES 배양 세포상의 벽 내배엽 세포의 세포 표면에
 [0695] 위치한 인간 트롬보모듈린 (thrombomodulin; TM)의 면역세포화학법을 나타낸 것이
 [0696] 다. 구획 B는 TM 및 SOX17로 이중-표지된 (double-labeled) 구획 A와 동일 구역을
 [0697] 나타낸 것이다. 구획 C는 DAPI 표지된 핵을 보여주는 동일 구역의 역상 이미지가
 [0698] 다. DAPI 표지된 핵과 SOX17 표지의 완벽한 상관관계를 주목바람.

[0699] 도 7A-B는 정량적 PCR (Q-PCR)를 이용한 SOX17 유전자 발현 및 SOX17-특이적
 [0700] 항체를 이용한 항-SOX17 양성 세포를 나타내는 막대 그래프이다. 구획 A는 미분화
 [0701] 된 대조 배지 (SR20)에 비하여 상대적으로 레티노이드산 (retinoid acid; RA)이
 [0702] SOX17 발현을 강력하게 억제하는 반면에 액티빈 A는 SOX17 유전자 발현을 증가시키
 [0703] 는 것을 나타낸다. 구획 B는 상기 변화의 유사한 정도뿐만 아니라 동일한 양식이
 [0704] SOX17+ 세포 수에도 반영됨을 나타내며, 이는 SOX17 유전자 발현의 Q-PCR 측정이 단일 세포 수준에서의 변화를
 잘 반영함을 나타낸다.

[0705] 도 8A는 10% 우태아혈청(FBS) 하에서 임의적으로 분화시키는 세포가 AFP의 강
 [0706] 령한 상향조절을 나타내는 데 반하여, 액티빈 A의 존재하에서 hESCs 분화 배양물이
 [0707] AFP 유전자 발현의 낮은 수준을 유지함을 나타내는 막대그래프이다. 상기 발현 수
 [0708] 준의 차이는 약 7배이다.

[0709] 도 8B-C는 액티빈 A에 의한 AFP 발현 억제가 10 % 우태아혈청 단독 처리군 (상
 [0710] 단)에 비하여, 액티빈 A 처리 조건에서 관찰되는 매우 드물고 작은 AFP+ 세포 집단
 [0711] (하단)이 나타나는 것과 같이, 단일 세포 수준에서도 명백함을 나타내는 두개의 현
 [0712] 미경 이미지들이다.

[0713] 도 9A-B는 유세포 분석을 이용한 AFP+ 세포수의 정량을 나타내는 비교 이미지이
 [0714] 다. 상기 도는 AFP+ 세포 수와 정확하게 상응하는 액티빈 A의 존재(우측 구획) 및
 [0715] 부재(좌측 구획)에서의 AFP 유전자 발현 (도 8A)상의 변화 크기를 증명하며, 또
 [0716] 한 개별 세포 수준에서 일어나는 변화를 나타내는 Q-PCR 분석의 유용성을 뒷받침하
 [0717] 는 것이다.

[0718] 도 10A-F는 5일 이상 hESCs를 노달, 액티빈 A 및 액티빈 B (NAA)에 노출시켰을
 [0719] 때 SOX17+ 세포수의 현저한 증가가 산출됨을 나타내는 현미경 사진이다 (A-C). DAPI 염색된 핵 (D-F)에 나타난
 바와 같이, 각 구역에 존재하는 총세포수에 대한 SOX17+ 세포의 상대적 밀집성을 비교시, 모든 세포의 약 30-50
 %가 5일간의 NAA 처리후에 SOX17에 면역적 반응성을 갖는 것을 확인할 수 있다.

[0720] 도 11은 액티빈 A (Activin A; 0, 10, 30 또는 100 ng/mL)가 농도-의존적으로
 [0721] hESCs 분화 중에 SOX17 유전자 발현을 증가함을 나타내는 막대그래프이다. 증가된
 [0722] 발현은 부착 배양물에 처리한 뒤 3일 후에도 이미 강하게 나타났으며, 연속된 부유
 [0723] 배양물에서 1, 3 및 5일까지 이어졌다.

[0724] 도 12A-C는 MIXL1 (구획 A), GATA4 (구획 B) 및 HNF3b (구획 C)의 발현에 대한
 [0725] 액티빈 A의 효과를 나타내는 막대 그래프이다. 액티빈 A의 농도-의존적인 증가는
 [0726] 또한 완전 내배엽의 다른 세가지 마커인 MIXL1, GATA4 및 HNF3b에서도 관찰된다.

[0727] 액티빈 농도에 따른 증가된 발현 정도는 SOX17에서 관찰된 바와 극히 유사하며, 이
 [0728] 는 액티빈 A가 4가지 유전자 모두를 동시-발현하는 세포 개체군 (SOX17+, MIXL1+,
 [0729] GATA4+ 및 HNF3b+)들을 특정화함을 강력하게 의미한다.

[0730] 도 13A-C는 AFP (구획 A), SOX7 (구획 B) 및 SPARC (구획 C)의 발현에 대한
 [0731] 액티빈 A의 효과를 나타내는 막대그래프이다. 내장 (visceral) 내배엽 마커인 AFP
 [0732] 의 발현은 액티빈 A를 농도-의존적으로 감소시킨다. 원시 내배엽 (SOX7) 및 벽 내
 [0733] 배엽 (SPARC)의 마커들은 어떤 특정 시간 지점에서 변화되지 않거나 억제 상태를
 [0734] 나타내는데, 이는 액티빈 A가 상기 배외 내배엽 세포 유형을 특정화하는데 관여하
 [0735] 지 않음을 나타낸다. 이는 나아가 SOX17, MIXL1, GATA4 및 HNF3b의 증가된 발현이
 [0736] 액티빈 A에 대한 반응으로 완전 내배엽 세포의 수가 증가된 것에 기인한다는 사실
 [0737] 을 뒷받침한다.

[0738] 도 14A-B는 ZIC1 (구획 A) 및 브라키우리 (Brachyury, 구획 B) 발현에 미치
 [0739] 는 액티빈 A의 효과를 나타내는 막대그래프이다. 신경 마커인 ZIC1의 일관된 발현
 [0740] 은 신경 분화에 대하여 액티빈 A가 농도-의존적인 효과가 없음을 나타낸다. 브라키
 [0741] 우리의 억제된 발현에 의해 나타나는 바와 같이, 중배엽 분화의 특이적인 억제는
 [0742] 100 ng/mL의 액티빈 A 처리에 의해 매개된다. 이러한 결과는 중내배엽 전구체로부
 [0743] 터 완전 내배엽의 증가된 특정화(specification)의 결과일 것이다. 저농도의 액티
 [0744] 빈 A 처리 (10 및 30 ng/mL)는 무처리 대조배양물에 상대적으로 후기의 분화 시간
 [0745] 지점에서 브라키우리의 발현을 유지한다.

[0746] 도 15A-B는 액티빈 처리에 따른 감소된 벽 내배엽 분화를 나타내는 현미경
 [0747] 사진이다. TMhi 벽 내배엽 구역은 액티빈을 첨가한 배양물에서는 TM+ 세포로의 분화가 드물게 나타나며 (B), 전
 반적인 TM 면역반응성의 전반적인 강도는 낮은 반면에, 혈청 단독 처리군에서는 분화된 배양물 전반에 걸쳐 발
 견된다 (A).

[0748] 도 16A-D는 액티빈 A 및 액티빈 B의 처리에 따른 마커의 발현을 나타내는 현
 [0749] 미경사진이다. hESCs에 액티빈 A 및 액티빈 B가 4일간 연속적으로 처리되었으며,
 [0750] SOX17, AFP 및 TM 항체로 삼중 표지되었다 (구획A - SOX17; 구획B - AFP; 구획C -
 [0751] TM; 및 구획D - Phase/DAPI). AFP (B) 및 TM (C)의 면역반응성의 완전 부재에 수반
 [0752] 되는 다수의 SOX17 양성 세포 (A)를 주목바람.

[0753] 도 17은 hESCs로부터 시험관 내 (in vitro)의 완전 내배엽 및 내장(visceral) 내배엽의 양상을 나타내는
 현미경 사진이다. 완전 내배엽이 SOX17hi/AFPlo/-의 정반대의 양상을 나타내는데 반하여, 내장 내배엽의 구역은
 AFPhi/SOX17lo/-로 확인된다. 상기의 장 (field)은 상기 두 구역이 서로 근접함에 기인한 선택적인 선발이다.
 그러나, AFPhi 세포의 어떠한 구역으로부터의 완전한 분리시 SOX17hi/AFPlo/- 구역이 관찰되는 다수의 시간들은
 내장 내배엽 세포로부터의 완전 내배엽 세포의 분리된 기점을 제시한다.

[0754] 도 18은 리간드와 수용체의 TGF β 과를 묘사한 도식이다. AR Smads 및 BR
 [0755] Smads를 활성화하는 인자들은 인간 배아 줄기 세포로부터 완전 내배엽을 제조하는
 [0756] 데에 유용하다 (J. Cell Physiol. 187: 265-76 참조).

[0757] 도 19는 TGF β 인자들의 개개 및 조합을 처리한 결과로서, 초과시간의 SOX17

[0758] 발현 유도를 나타내는 막대그래프이다.

[0759] 도 20은 TGF β 인자들의 조합을 처리한 결과로서, 시간에 따른 SOX17+ 세포 수
[0760] 의 증가를 나타내는 막대그래프이다.

[0761] 도 21은 TGF β 인자들의 조합을 처리한 결과로서, 초과시간의 SOX17 발현 유도
[0762] 를 나타내는 막대그래프이다.

[0763] 도 22는 액티빈 A가 농도-의존적으로 SOX17+ 세포수를 증가시킴을 나타내는 막대
[0764] 그래프이다.

[0765] 도 23은 액티빈 A 및 액티빈 B를 처리한 배양물에 Wnt3a의 첨가가 액티빈 A 및
[0766] 액티빈 B만으로 유도된 수준 이상으로 SOX17 발현 수준을 증가시킴을 나타내는 막
[0767] 대그래프이다.

[0768] 도 24A-C는 완전 내배엽으로의 분화가 낮은 우태아혈청 조건에서 강화됨을 나타
[0769] 내는 막대그래프이다. 2% 우태아혈청 포함 배지에 액티빈 A 및 B (2AA)를 첨가한
[0770] hESCs가 10% 우태아혈청 배지에 동일한 처리를 한 경우 (10AA)와 비교하여 SOX17
[0771] 발현 수준을 2-3배 높게 나타내었다 (구획 A). 또한, 완전 내배엽 마커인 MIXL1
[0772] (구획 B)의 발현유도는 또한 동일한 방식으로 영향을 받으며, AFP (내장 내배
[0773] 엽)(구획 C)의 억제 10% 우태아 혈청 조건에서보다 2% 우태아 혈청 조건에서 크
[0774] 다.

[0775] 도 25A-D는 SOX17+ 세포가 배양 중 분할되는 모습을 나타내는 현미경사진이
[0776] 다. SOX17 면역반응성 세포들은 hESCs 군집의 분화모 (differentiating edge)에 존
[0777] 재하며, 아직은 OCT4로 동시-표지되지 않았으나 (구획 C), 증식 세포 핵 항원
[0778] (proliferating cell nuclear antigen; PCNA)으로 표지되었다 (구획 B). 부가적으
[0779] 로, 미분화된 hESCs인 OCT4+ (화살촉 표시) 뿐만 아니라, SOX17+ 세포 (화살 표시)
[0780] 모두에서의 핵의 DAPI 표지에 의해 뚜렷하게 유사 분열하는 모습을 확인할 수 있
[0781] 다.

[0782] 도 26은 여러 배지 조건하에서 hESCs를 분화시키는데 있어서 CXCR4의 상대적
[0783] 발현 수준을 나타내는 막대그래프이다.

[0784] 도 27A-D는 완전 내배엽 마커들이 어떻게 도 26과 동일한 분화 처리 하에서
[0785] CXCR4의 발현에 있어 매우 유사한 양식을 공유하는가를 나타내는 막대 그래프이다.

[0786] 도 28A-E는 중배엽 마커 (BRACHYURY, MOX1), 외배엽 (SOX1, ZIC1) 및 내장
[0787] 내배엽 (SOX7)의 마커들이 어떻게 도 26과 동일한 분화 처리 하에서 CXCR4 발현에
[0788] 대한 역비례 관계를 나타내는가를 보여주는 막대그래프이다.

[0789] 도 29A-F는 도 26-28에 나타난 세가지 배지 조성 하에서 SOX17 면역반응성
[0790] 세포에서의 상대적 차이점을 나타내는 현미경사진이다.

[0791] 도 30A-C는 분화배지에 첨가되는 액티빈 A의 농도 증가에 따른 CXCR4+ 세포
[0792] 수의 증가를 설명하는 유세포 분석 점도 (flowcytometry dot plot)이다.

[0793] 도 31-D는 고농도의 액티빈 A 처리군으로부터 분리된 CXCR4+ 세포 (A100-CX+)가 모집단에 비하여 완전

내배엽 마커들이 한층 많이 밀집되어 있음을 나타내는 막대그래프이다.

[0794] 도 32는 모집단의 유전자 발현뿐만 아니라 형광-활성화 세포 분류 (FACS)를
 [0795] 이용하여 분리된 CXCR4⁺ 및 CXCR4⁻ 세포들의 유전자 발현을 나타내는 막대그래프이
 [0796] 다. 이는 CXCR4⁺ 세포가 각 모집단에서 나타나는 모든 CXCR4 유전자 발현을 본질적
 [0797] 으로 포함하고, CXCR4⁻ 집단은 CXCR4 유전자가 매우 적거나 발현하지 않음을 설명하는 막대그래프이다.

[0798] 도 33A-D는 이미 비-완전 내배엽 마커들의 발현으로 억제된 고농도의 액티
 [0799] 빈 A 처리로부터 분리된 CXCR4⁺ 세포 내 중배엽 (BRACHYURY, MOX1), 외배엽 (ZIC1)
 [0800] 및 내장 내배엽 (SOX7) 유전자 발현의 감소를 증명하는 막대그래프이다.

[0801] 도 34A-M은 완전 내배엽 세포를 식별하는데 사용될 수 있는 마커 유전자의
 [0802] 발현 양상을 나타내는 막대그래프이다. 완전 내배엽 마커인 FGF17, VWF, CALCR,
 [0803] FOXQ1, CMKOR1 및 CRIP1의 발현 분석은 구획 G 내지 L에 각각 나타내었다. 상기한
 [0804] 계통 마커 유전자인 SOX17, SOX7, SOX17/SOX7, TM/ZIC1 및 MOX1의 발현 분석은 구
 [0805] 획 A-F에 각각 나타내었다. 구획 M은 CXCR4의 발현 분석을 나타낸 것이다. 구획 A-
 [0806] M 각각에 대하여, hESCs로 표지된 기둥은 정제된 인간 배아 줄기 세포의 유전자 발
 [0807] 현을 나타내며 2NF는 2 % 우태아혈청으로 처리되고 액티빈이 무첨가된 세포의 유전
 [0808] 자 발현을 나타내고 0.1A100은 0.1% 우태아혈청 및 100 ng/ml 액티빈 A로 처리된
 [0809] 세포의 유전자 발현을 나타내며 1A100은 1% 우태아혈청 및 100 ng/ml 액티빈 A로
 [0810] 처리된 세포의 유전자 발현을 나타내고 2A100은 2% 우태아혈청 및 100 ng/ml 액티
 [0811] 빈 A로 처리된 세포의 유전자 발현을 나타낸다.

[0812] 도 35는 4일째에 레티노산 (RA) 및 섬유아세포 성장 인자 (FGF-10)가 첨가되
 [0813] 어 존재하고 액티빈을 함유하거나 함유하지 않은 hESCs의 세포 배양물에서 PDX1 유
 [0814] 전자의 4일 및 6일 후의 발현 양상을 나타내는 그래프이다.

[0815] 도 36A-F는 4일째에 레티노산 (RA) 및 섬유아세포 성장 인자 (FGF-10) 존재하
 [0816] 에 액티빈 함유 및 비함유시에 hESCs의 세포 배양물에서 마커 유전자의 4일 및 6일
 [0817] 후의 발현 양상을 나타내는 그래프이다. 구획들은 마커 유전자에 따른 발현 정도의
 [0818] 양상을 나타낸 것이다: (A) SOX17; (B) SOX7; (C) AFP; (D) SOX1; (E) ZIC1 및 (F)
 [0819] NFM.

[0820] 도 37A-C은 레티노산 (RA), 섬유아세포 성장 인자(FGF-10) 및 섬유아세포 성
 [0821] 장 인자 (FGF-4)의 조합이 4일째에 첨가되어 존재 또는 존재하지 않는 상태하에서
 [0822] 액티빈을 함유 및 비함유시에, hESCs의 세포 배양물에서의 마커 유전자의 4일 및 8
 [0823] 일 후의 상대적인 발현 양상을 나타내는 그래프이다. 구획들은 마커 유전자에 따른
 [0824] 발현 정도의 양상을 나타낸 것이다:(A) PDX1; (B) SOX7; 및 (C) NFM.

[0825] 도 38A-C은 4일째에 첨가된 1 μ M, 0.2 μ M 또는 0.04 μ M의 레티노산 (RA)과 50
 [0826] ng/ml의 FGF-10와의 조합에 연관된 완전 내배엽 세포 배양물에서의 마커 유전자의
 [0827] 발현 양상을 나타내는 그래프이다. 구획들은 마커 유전자에 따른 발현 정도의 양상
 [0828] 을 나타낸 것이다: (A) PDX1; (B) HOXA3; (C) HOXC6; (D) HOXA13; (E) CDX1; (F)

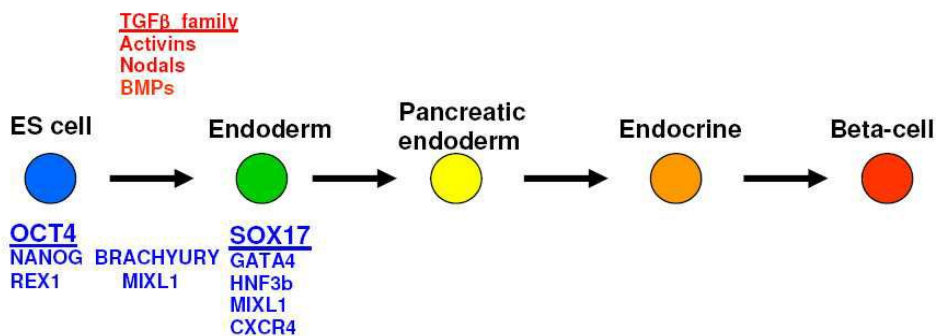
- [0829] SOX1; 및 (G) NFM.
- [0830] 도 39A-E는 레티노산 (RA), 섬유아세포 성장 인자(FGF-10) 및 혈청 대체물
- [0831] (serum replacement, SR), 우태혈청 (fetal bovine serum, FBS) 또는 B27로부터 선
- [0832] 택되는 하나와의 조합 존재하에서는 액티빈을 함유 및 비함유시에 hESCs 배양물에
- [0833] 서 4일 및 8일 후의 마커 유전자의 발현 양상을 나타내는 그래프이다. 구획들은 마
- [0834] 커 유전자에 따른 발현 정도의 양상을 나타낸 것이다: (A) PDX1; (B) SOX7; (C)
- [0835] AFP; (D) ZIC1; 및 (E) NFM.
- [0836] 도 40A-B는 6일 후 (RA 첨가 직전) 및 9일 제 (RA에 노출 3일 후)에 hESCs
- [0837] 배양물에서 췌장 (PDX1, HNF6) 및 간 (HNF6)에 대한 마커 유전자의 발현 양상을 나
- [0838] 타내는 그래프이다. 다양한 조건들은 25 ng/ml (A25) 또는 50 ng/ml (A50)의 액티
- [0839] 빈 A 존재 하에서 10 ng/ml (a10), 25 ng/ml (a25) 또는 50 ng/ml (a50)의 액티빈
- [0840] B의 투여량의 비교를 포함한다. 어떠한 액티빈 A 또는 액티빈 B도 없는 조건 (NF)
- [0841] 은 완전 내배엽 및 PDX1-양성 내배엽의 생산에 대한 음성 대조군으로 제공된다. 구
- [0842] 획들은 마커 유전자에 따른 발현 정도의 양상을 나타낸 것이다: (A) PDX1 및 (B)
- [0843] HNF6.
- [0844] 도 41A-C은 5일째 (레티노산 첨가 직전) 및 RA에 노출된 2, 4 및 6일 후 (각
- [0845] 각 7, 9 및 11일)에 100 ng/ml (A100), 50 ng/ml (A50) 의 액티빈을 포함하거나 또
- [0846] 는 액티빈 A를 포함하지 않은 (NF) hESCs 배양물에서 마커 유전자의 발현 양상을
- [0847] 나타낸 그래프이다. 각 막대 바로 밑의 백분율 표시는 분화 3-5일 동안의 FBS 투여
- [0848] 량을 나타낸 것이다. 시작 7일째에, 0.5%의 FBS를 포함한 RPMI 배지에서 자라는 세
- [0849] 포들에 RA (R)가 처리되었다. RA 농도는 7일째에 2 μ M, 9일째에 1 μ M 및 11일째에는 0.2 μ M로 처리되었다. 구획들은 마커 유전자에 따른 발현 정도의 양상을 나타낸 것이다: (A) PDX1; (B) ZIC1; (C) SOX7.
- [0850] 도 42A-B는 첫 번째로 완전 내배엽의 유도를 위해 적은 양의 FBS에서 액티빈
- [0851] A를 처리하고 (5일), PDX1-발현 내배엽의 유도를 위해 25 ng/ml 의 액티빈 A 및 RA
- [0852] 를 포함하는 새로운 배지 (A25R) 또는 다양한 조건 배지 (MEFCM, CM#2, CM#3 및
- [0853] CM#4) 및 RA를 포함하는 새로운 배지가 처리된 hESCs 배양물에서 마커 유전자의 발
- [0854] 현 양상을 나타낸 그래프이다. 마커의 발현은 5, 6, 7, 8 및 9일에 측정되었다. 구
- [0855] 획들은 마커 유전자에 따른 발현 정도의 양상을 나타낸 것이다: (A) PDX1; (B)
- [0856] CDX1.
- [0857] 도 43은 첫 번째로 완전 내배엽의 유도를 위해 적은 양의 FBS에서 액티빈 A
- [0858] 를 처리하고 (5일), 그 후 액티빈 A 및 레티노산 (A25R) 또는 다양한 양의 RA를 함
- [0859] 유한 조건 배지로 희석된 새로운 배지가 처리된 hESCs 배양물에서 PDX1의 발현 양
- [0860] 상을 나타낸 그래프이다. 배지의 전체 부피는 모든 경우에서 5 ml이다.
- [0861] 도 44는 RA 및 50 ng/ml의 액티빈 A가 첨가된 3일 (d8) 및 4일 (d9) 후, RA
- [0862] 가 처리된 완전 내배엽 세포로부터 PDX1로 면역 침강 (immunoprecipitated)된 웨스
- [0863] 턴 블롯 결과이다.

[0864] 도 45는 PDX1 프로모터의 조절하의 EGFP 리포터 (reporter)로 유전적으로 표
 [0865] 지된 (genetically tagged) PDX1-양성 전장 내배엽 세포의 형광-활성화 세포 분류
 [0866] (fluorescence-activated cell sort, FACS) 결과를 나타낸 개략적인 그래프이다.
 [0867] 도 46은 살아있는 세포 (Live), EGFP-음성 세포 (Neg) 및 EGFP-양성 세포
 [0868] (GFP+) 개체군을 분류하기 위해서 하우스 키팅 유전자 (housekeeping genes)로 표
 [0869] 준화된 PDX1의 발현 정도의 양상을 나타낸 그래프이다.
 [0870] 도 47은 살아있는 세포 (Live), EGFP-음성 세포(Neg), 최저 EGFP 신호 강도를
 [0871] 가진 EGFP-양성 세포 개체군 일부 (Lo) 및 최고 EGFP 신호 강도를 가진 EGFP-양성
 [0872] 세포 개체군 일부 (Hi)를 분류하기 위해서 하우스 키팅 유전자로 표준화된 PDX1 발
 [0873] 현 정도의 양상을 나타낸 그래프이다.
 [0874] 도 48A-E는 살아있는 세포 (Live), EGFP-음성 세포 (Neg) 및 EGFP-양성 세포
 [0875] (GFP+)로 분류된 하우스 키팅 유전자로 표준화된 5가지 췌장 내배엽 마커의 발현
 [0876] 양상을 나타낸 그래프이다. 구획: A NKX2.2; B GLUT2; C HNF3 D KRT19 및 E
 [0877] HNF4.
 [0878] 도 49는 살아있는 세포 (Live), EGFP-음성 세포 (Neg) 및 EGFP-양성 세포
 [0879] (GFP+)로 분류된 표준화된 2 가지 비-췌장 내배엽 마커의 발현 양상을 나타낸 그래
 [0880] 프이다. 구획: A ZIC1 및 B GFAP.

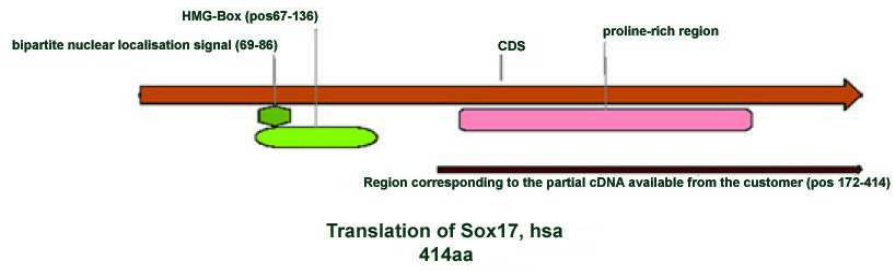
도면

도면1

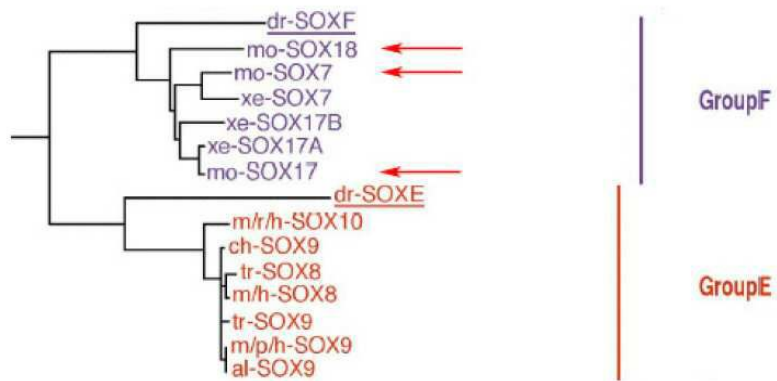
Step-wise β -cell differentiation



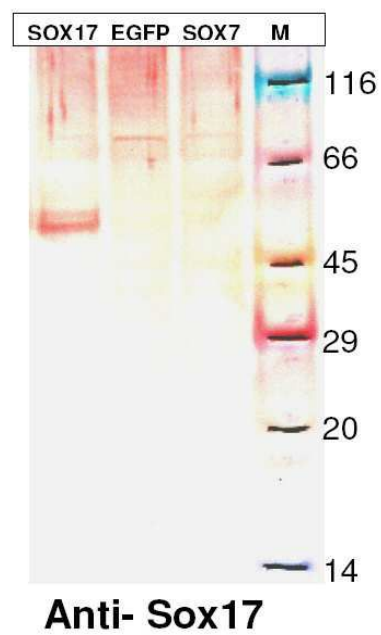
도면2



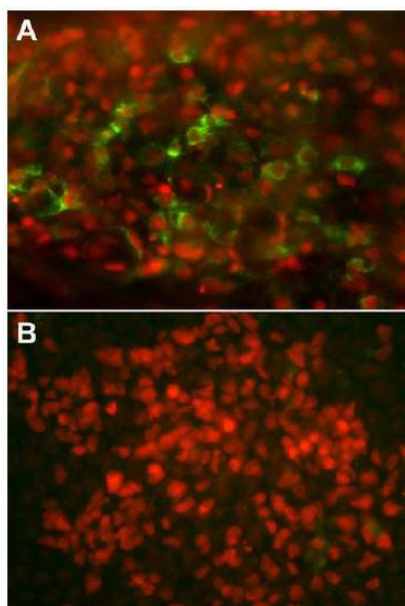
도면3



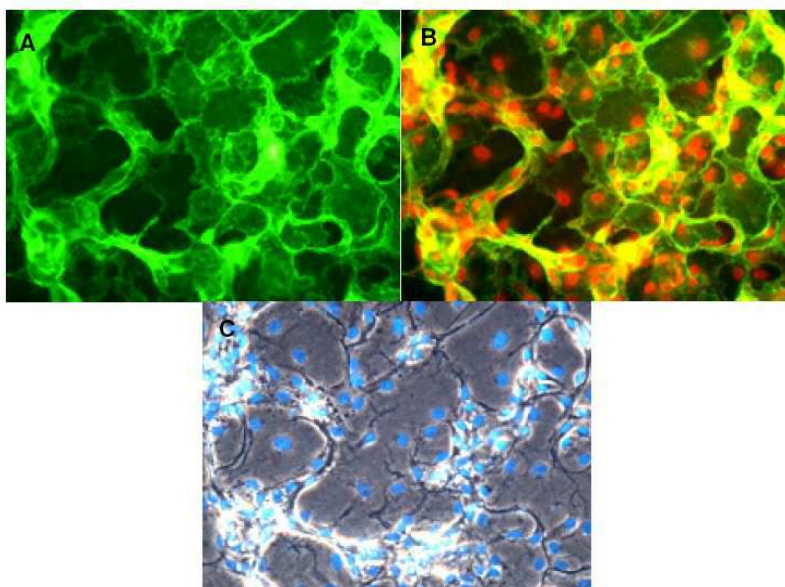
도면4



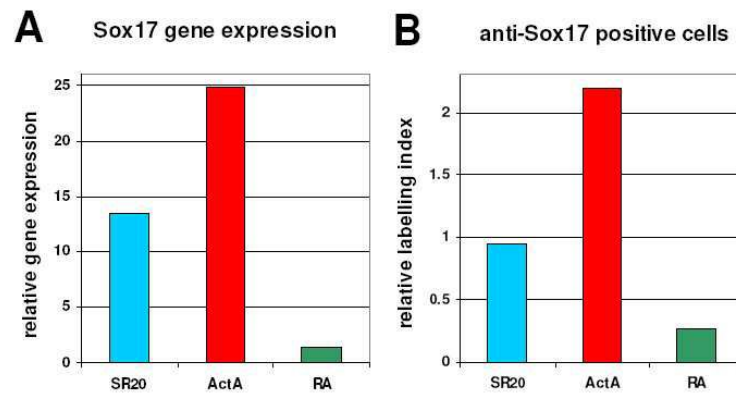
도면5



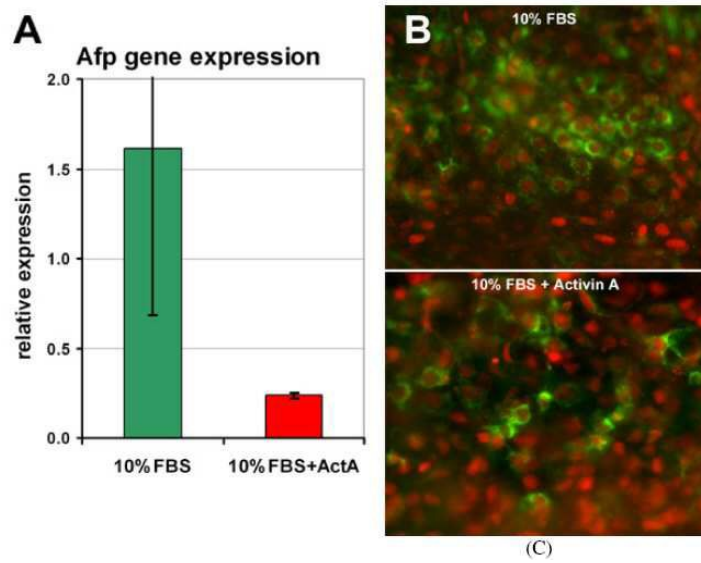
도면6



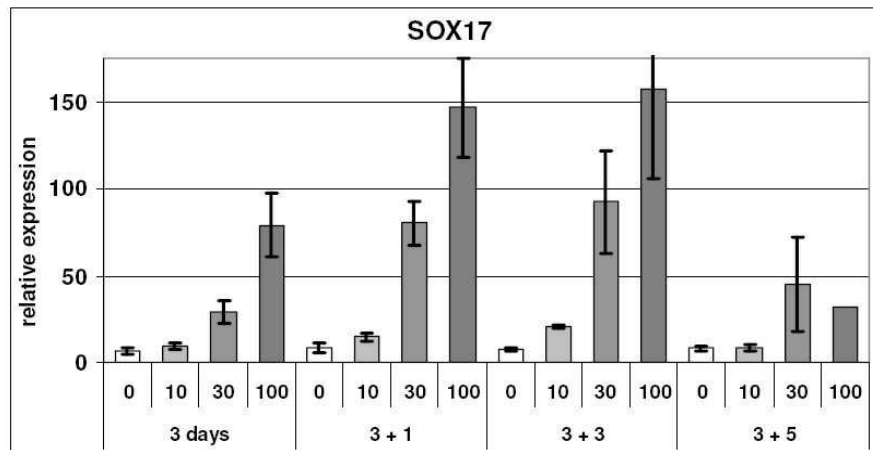
도면7



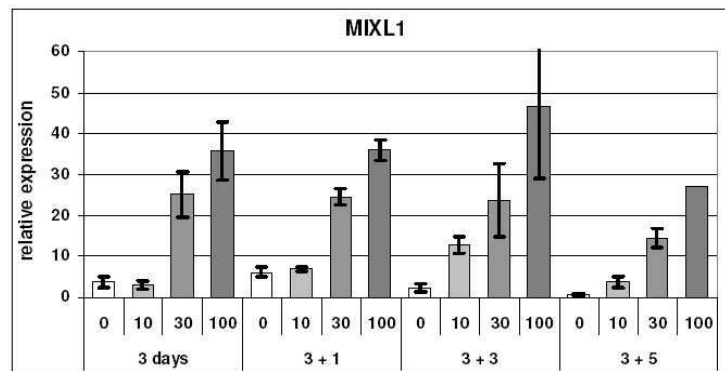
도면8



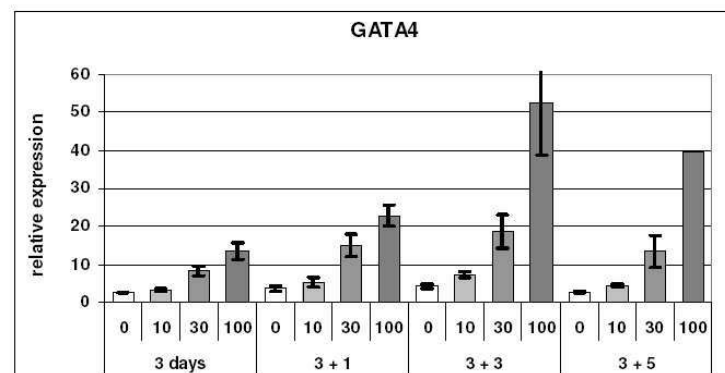
도면11



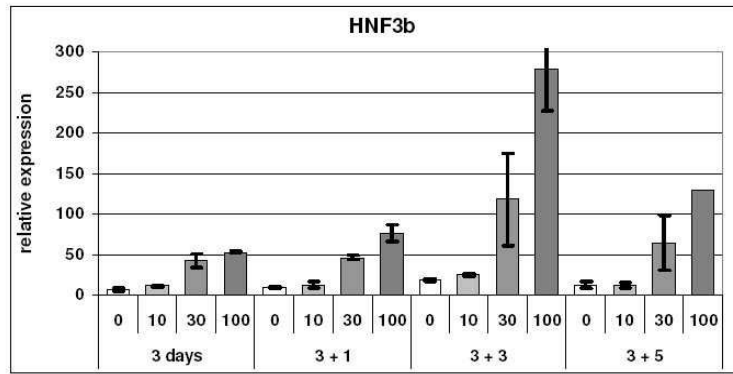
도면12A



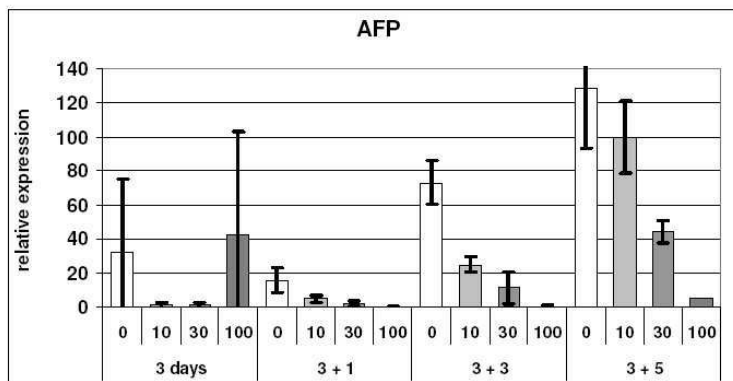
도면12B



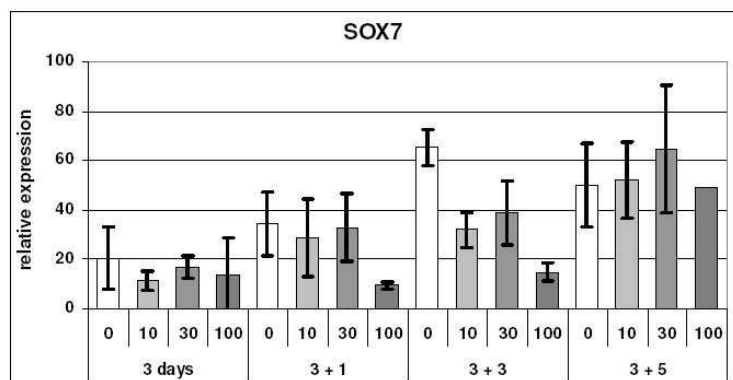
도면12C



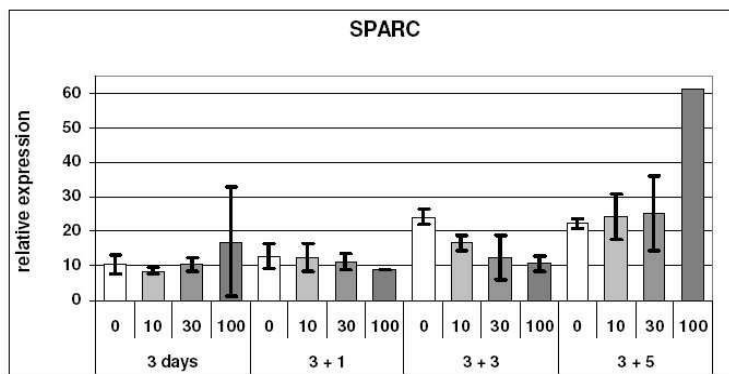
도면13A



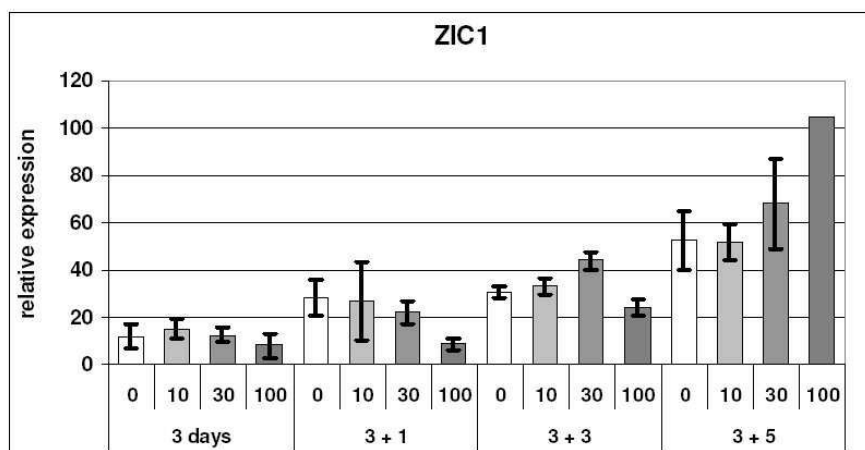
도면13B



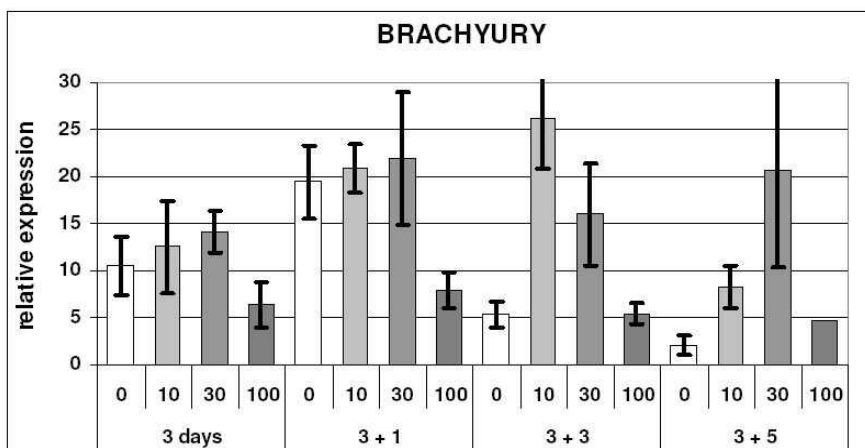
도면13C



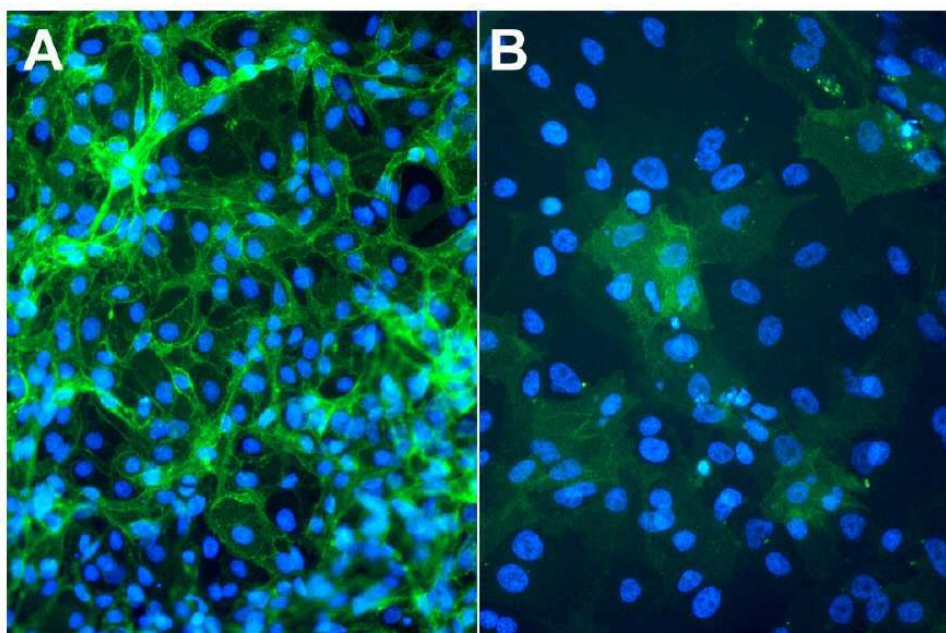
도면14A



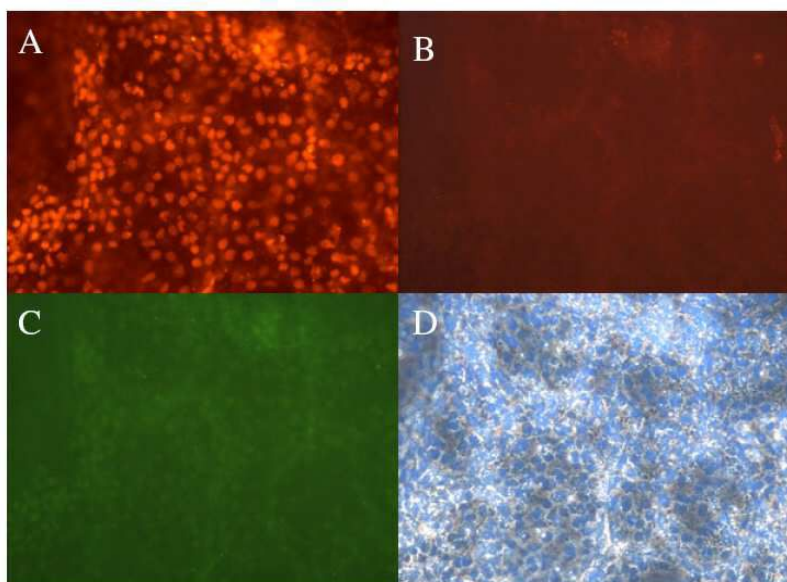
도면14B



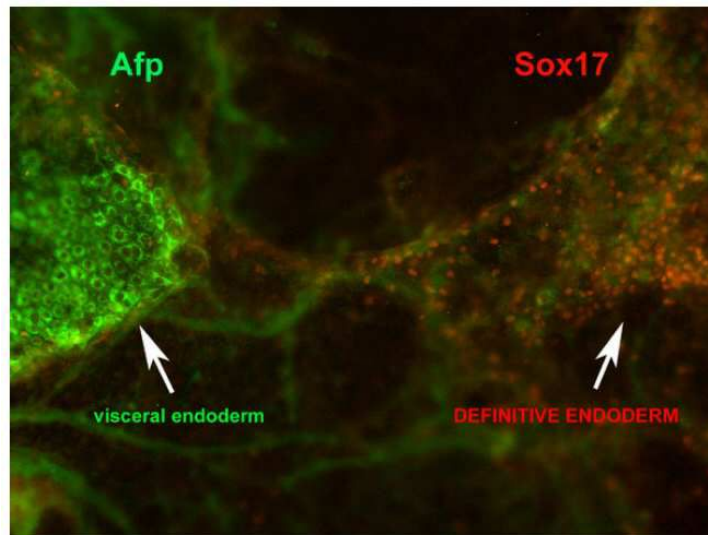
도면15



도면16

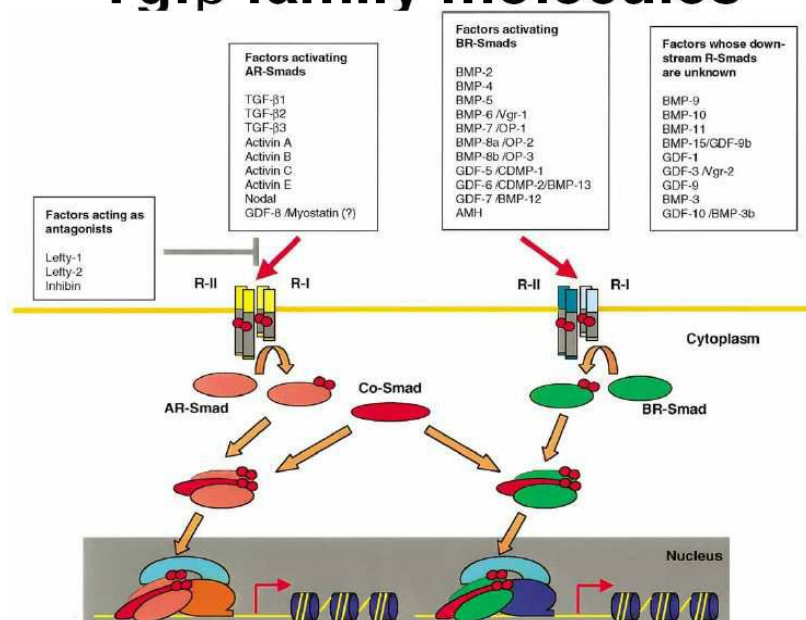


도면17

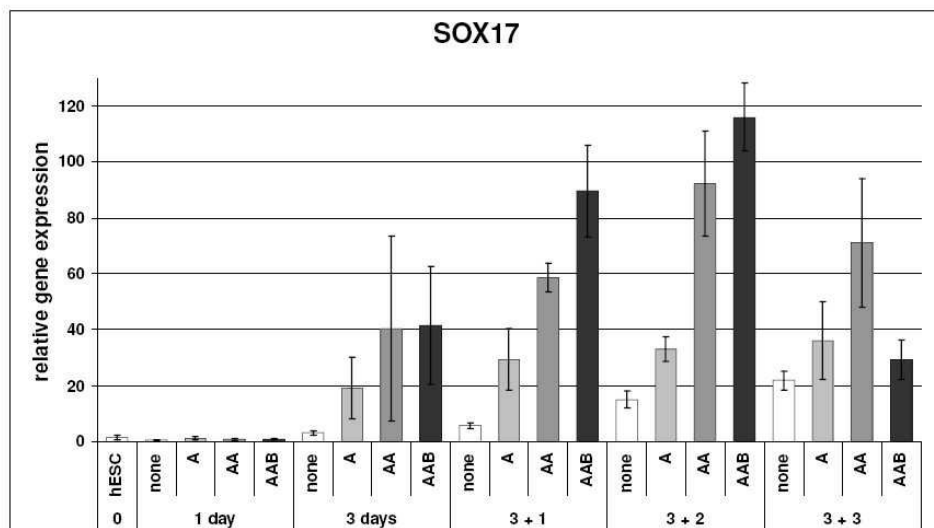


도면18

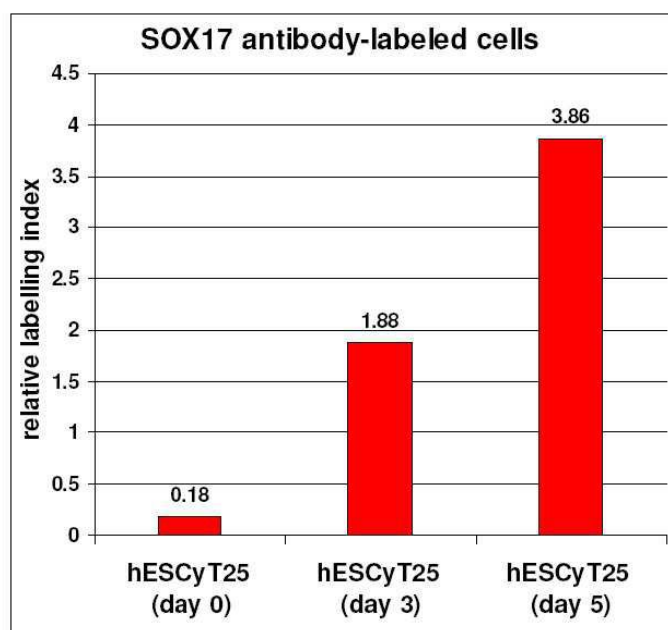
Tgfb β family molecules



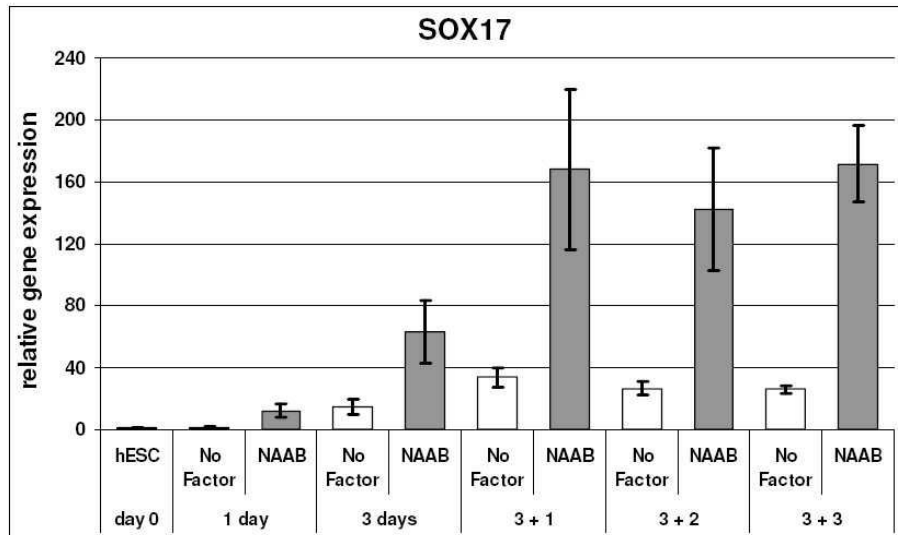
도면19



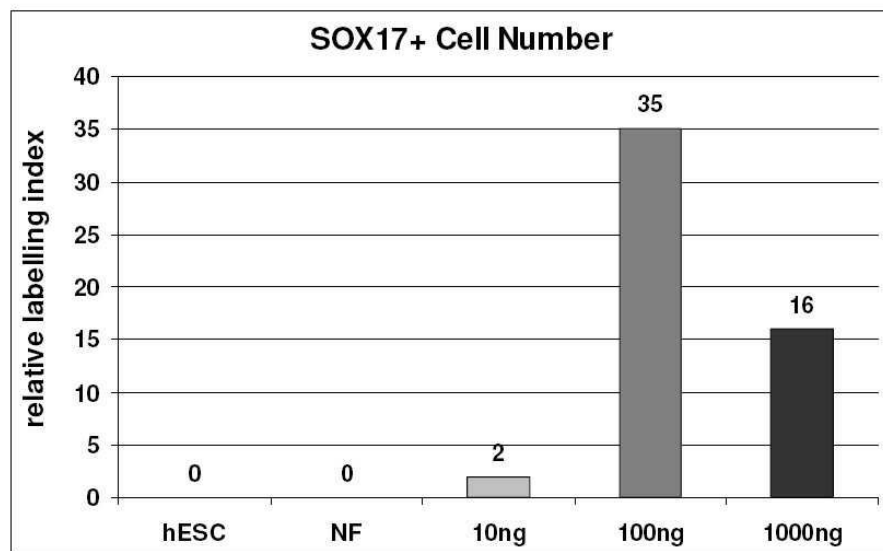
도면20



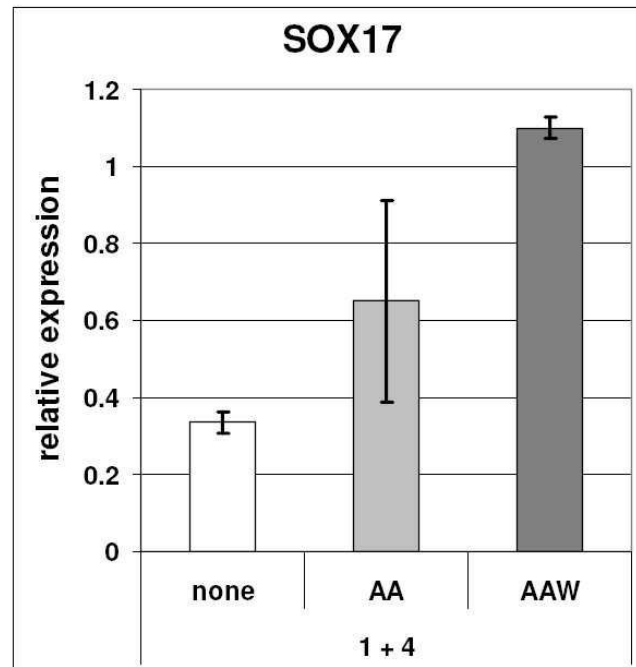
도면21



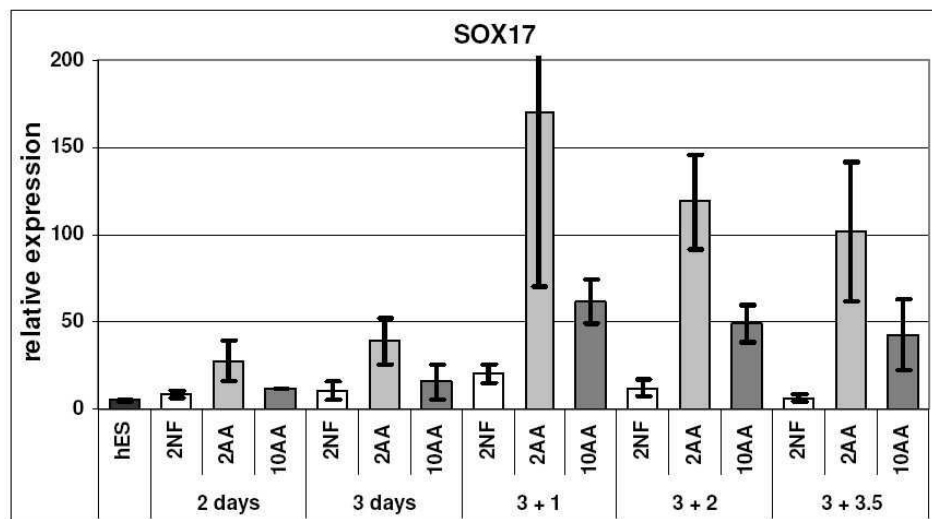
도면22



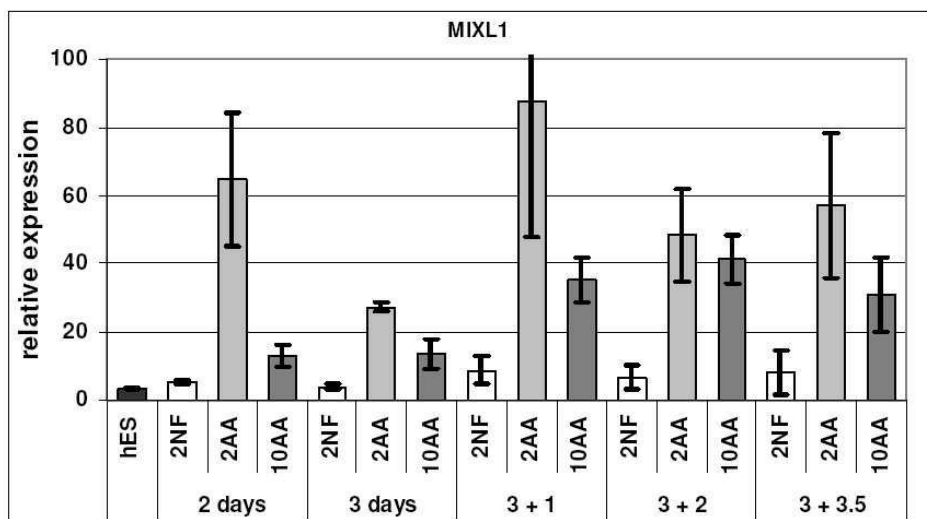
도면23



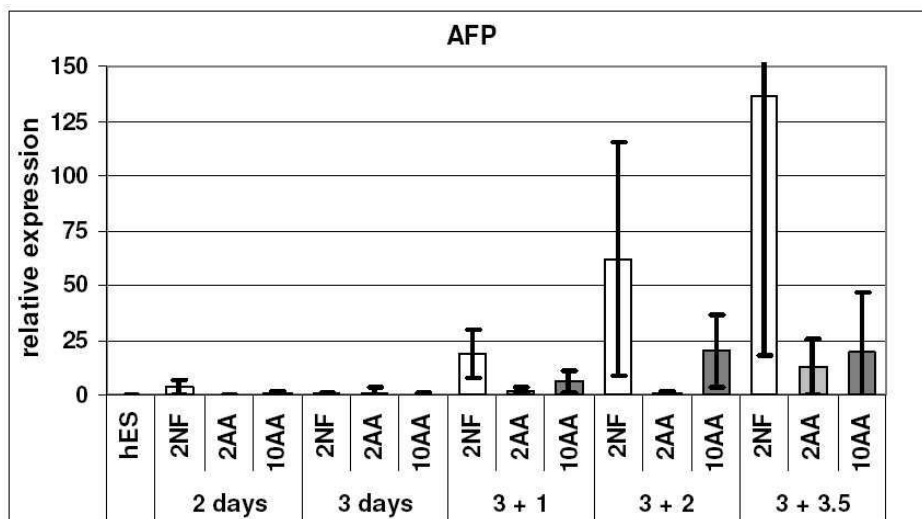
도면24A



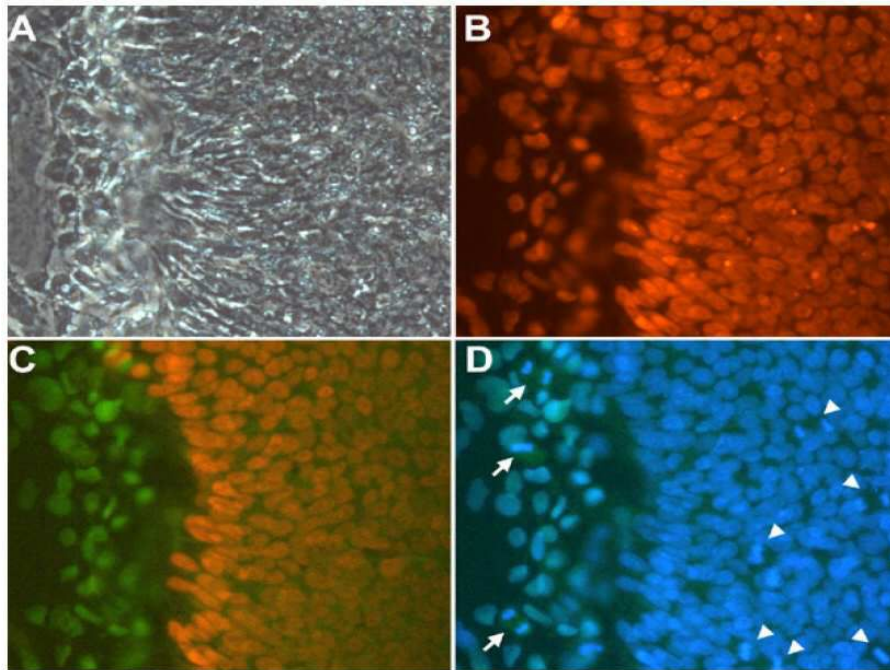
도면24B



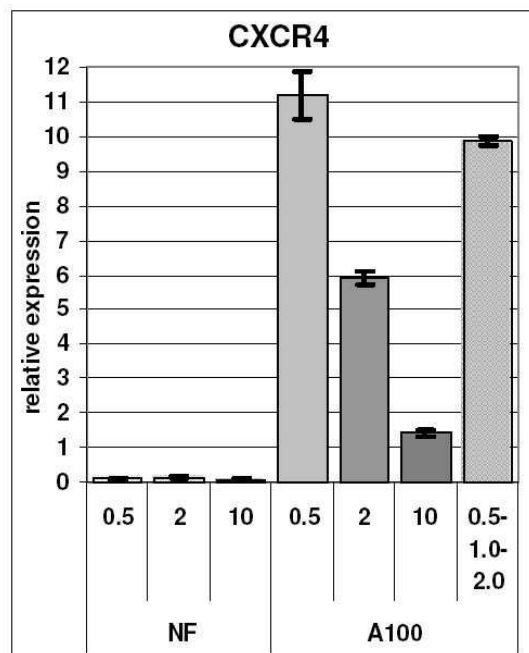
도면24C



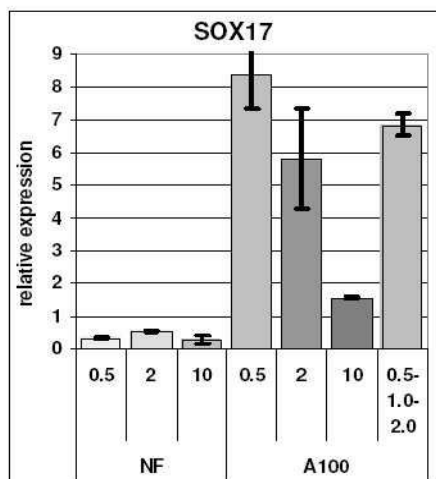
도면25



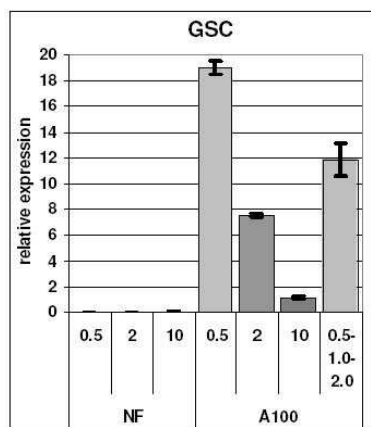
도면26



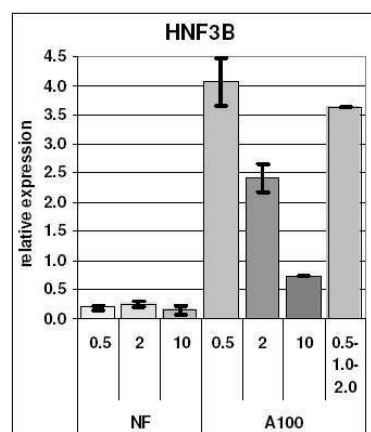
도면27A



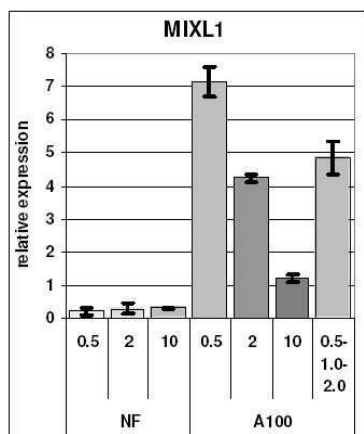
도면27B



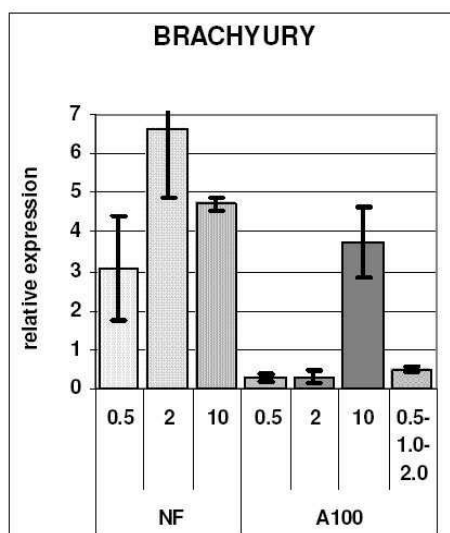
도면27C



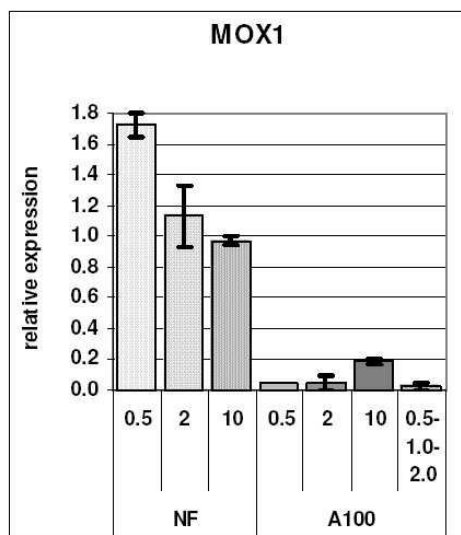
도면27D



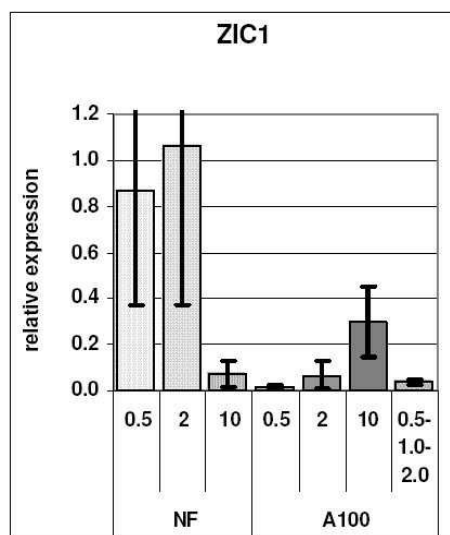
도면28A



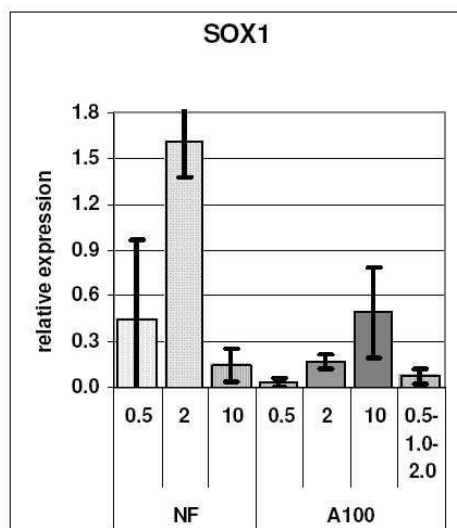
도면28B



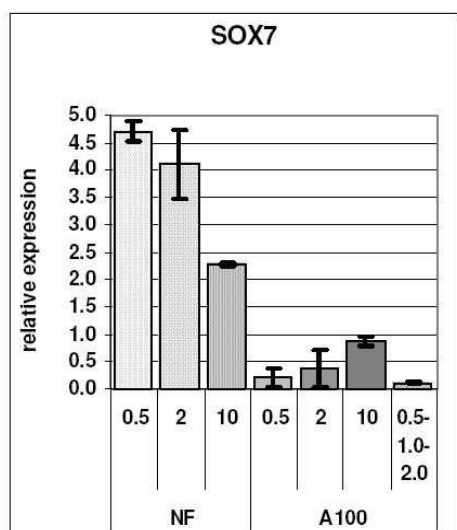
도면28C



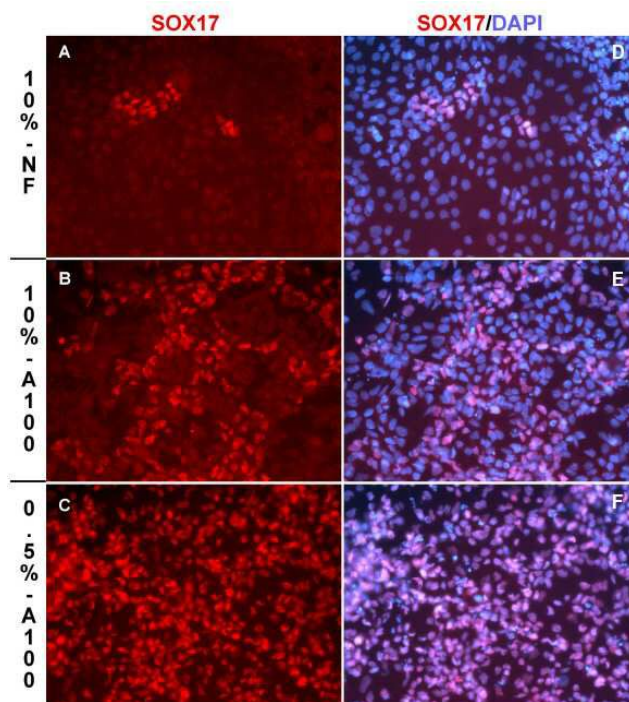
도면28D



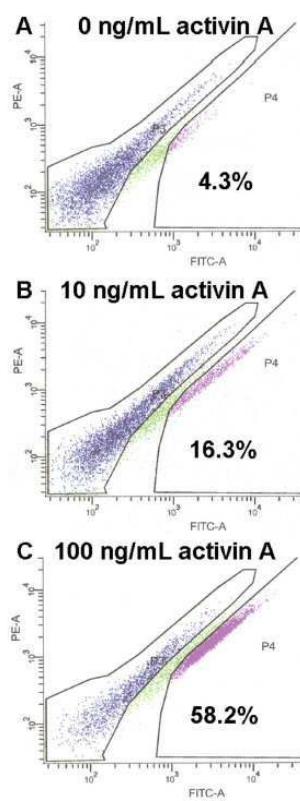
도면28E



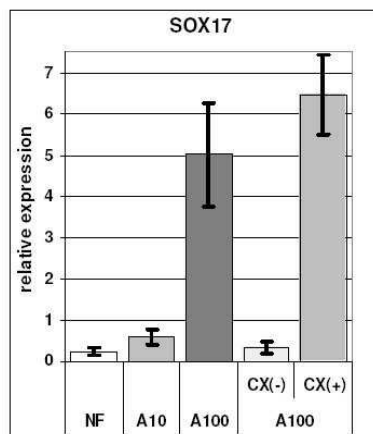
도면29



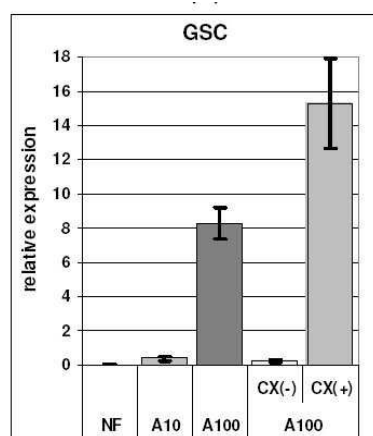
도면30



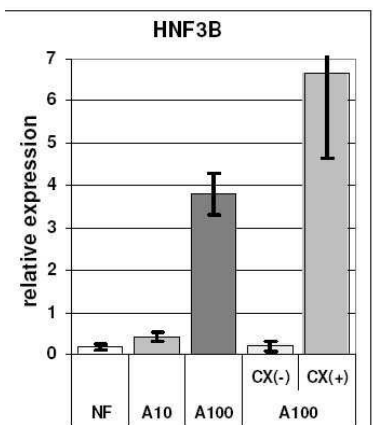
도면31A



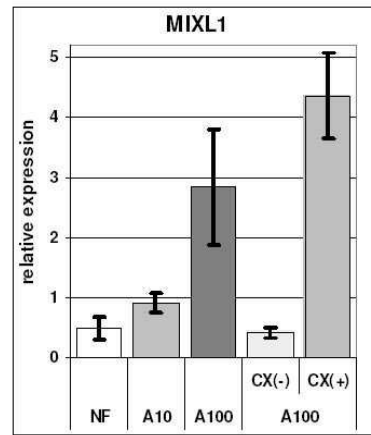
도면31B



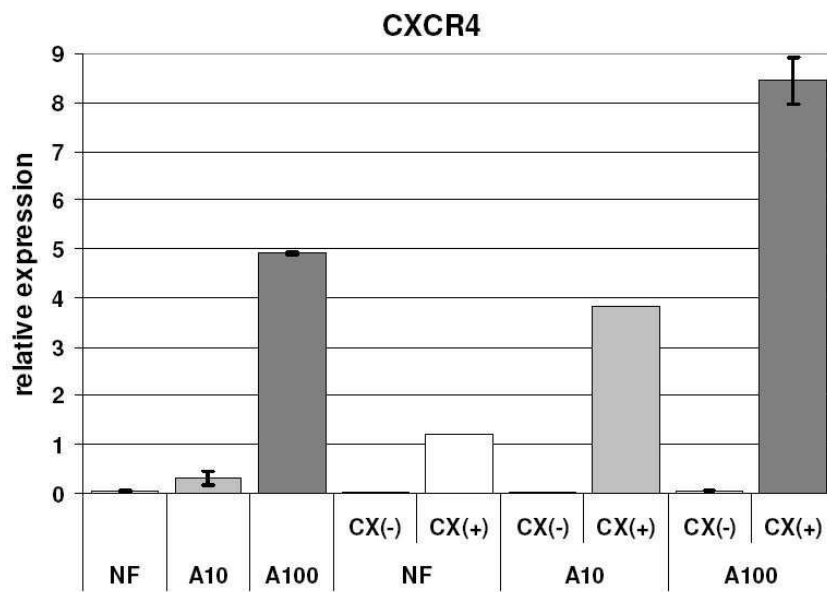
도면31C



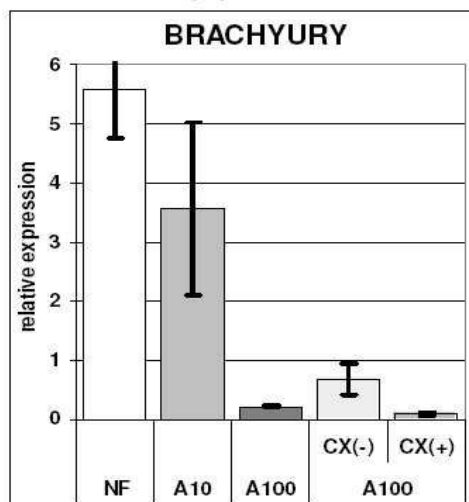
도면31D



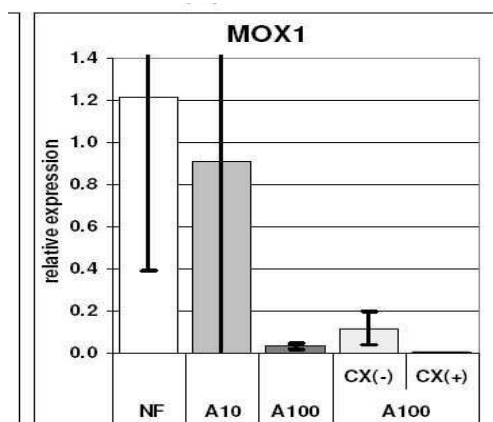
도면32



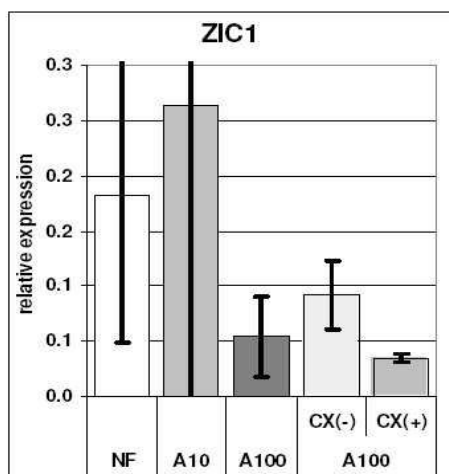
도면33A



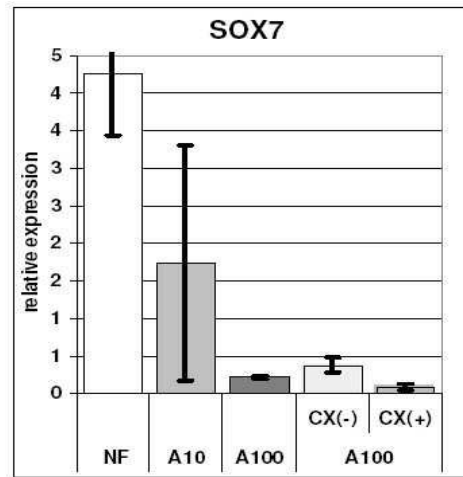
도면33B



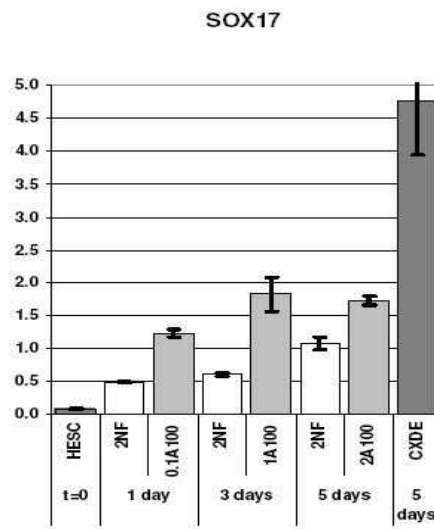
도면33C



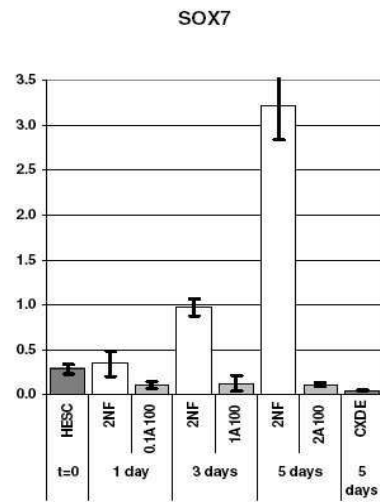
도면33D



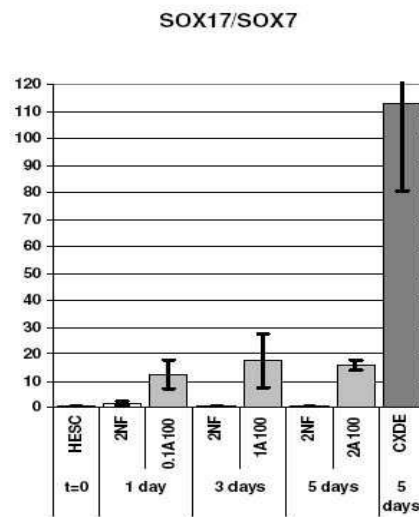
도면34A



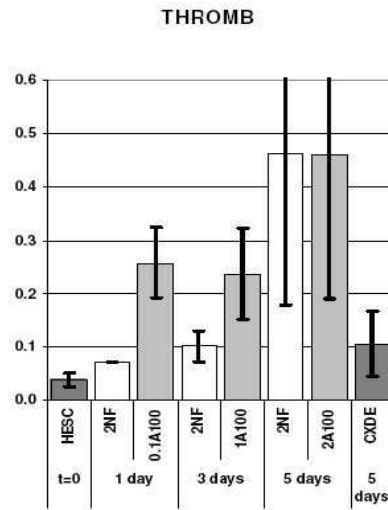
도면34B



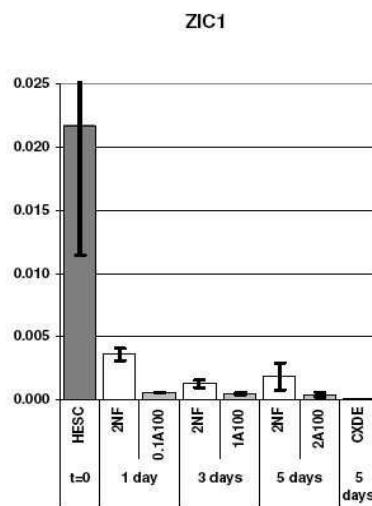
도면34C



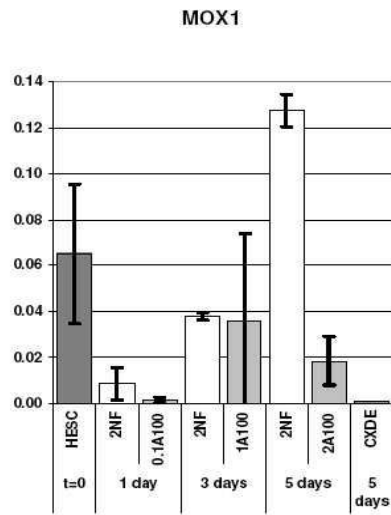
도면34D



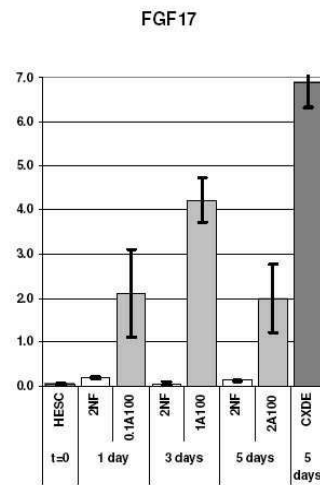
도면34E



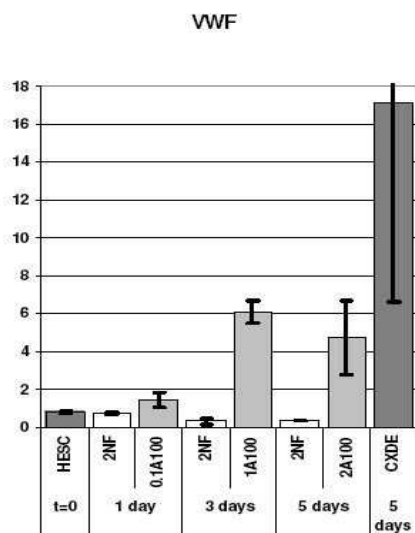
도면34F



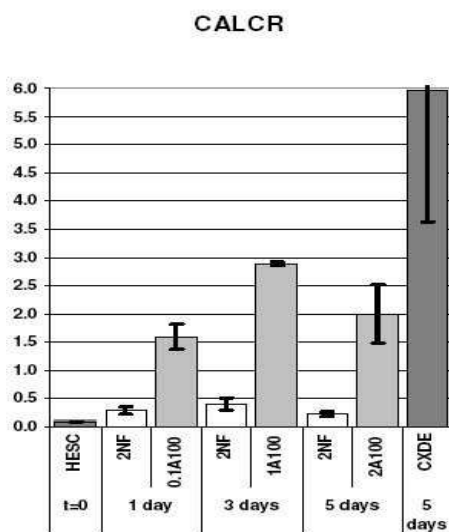
도면34G



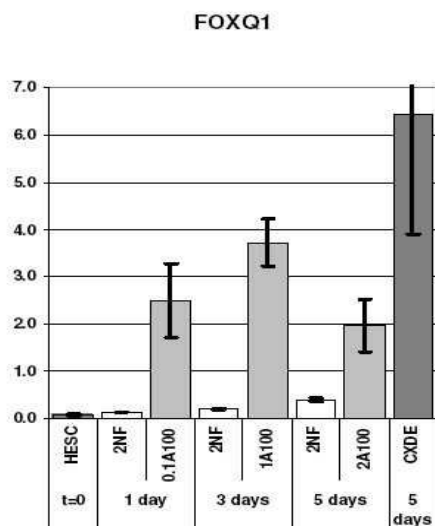
도면34H



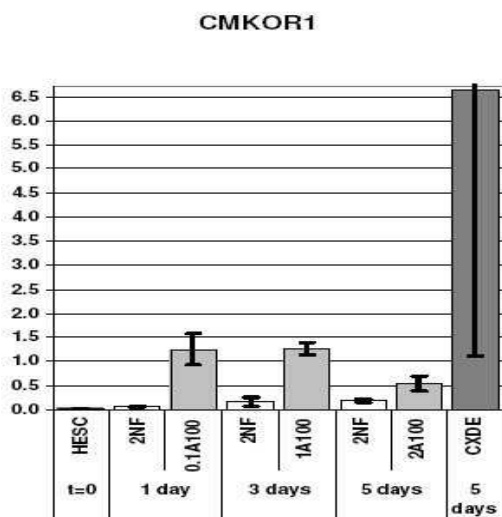
도면34I



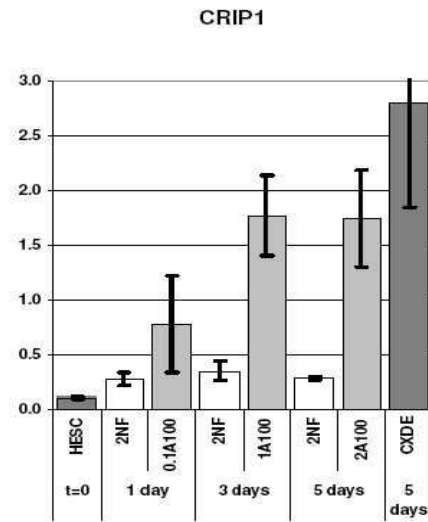
도면34J



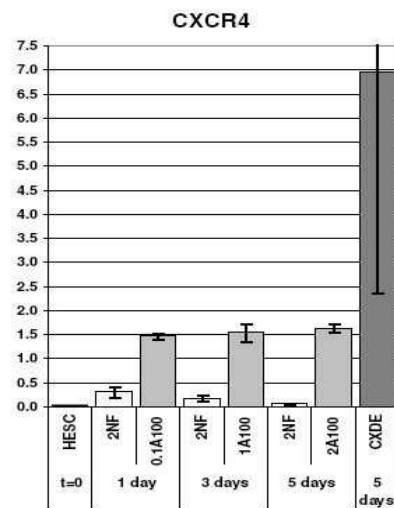
도면34K



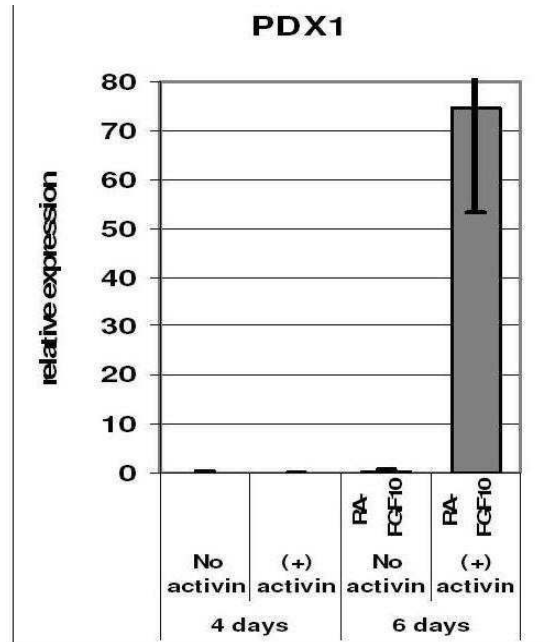
도면34L



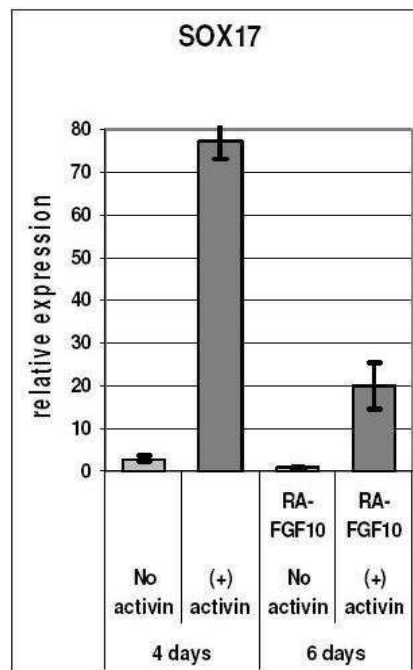
도면34M



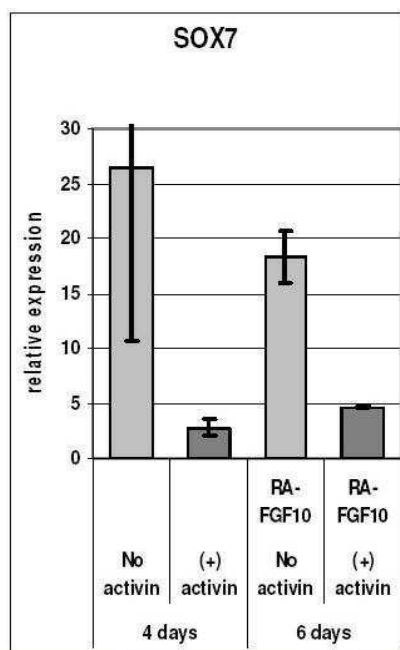
도면35



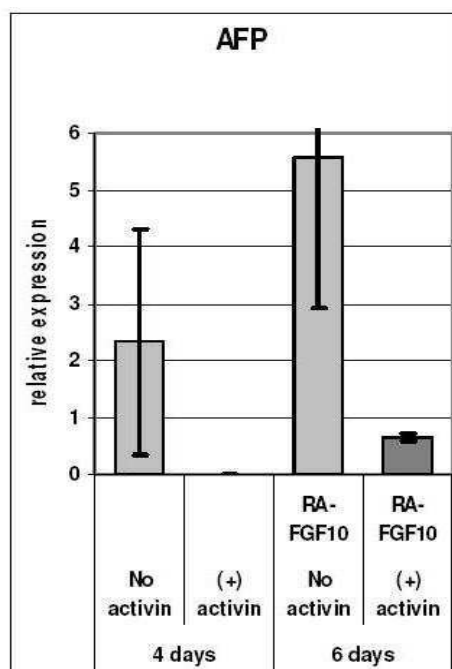
도면36A



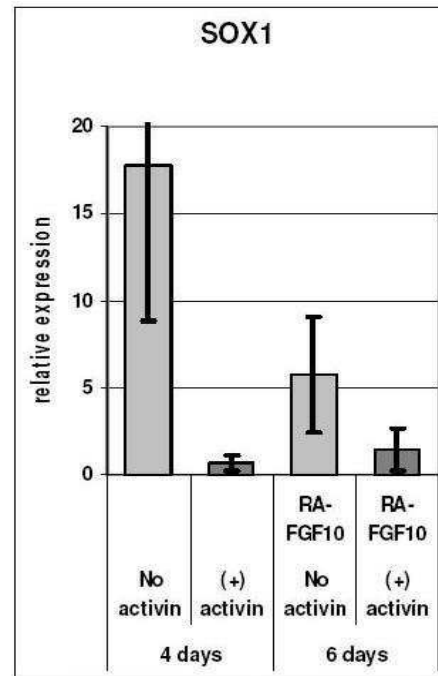
도면36B



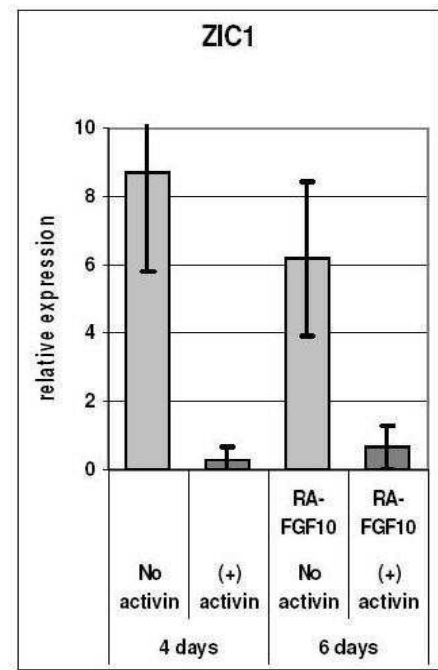
도면36C



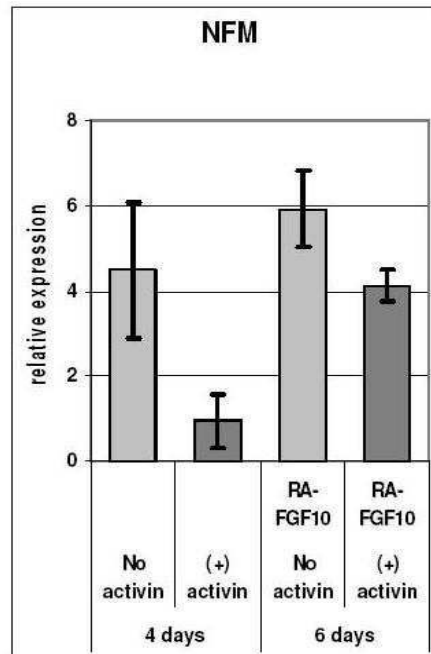
도면36D



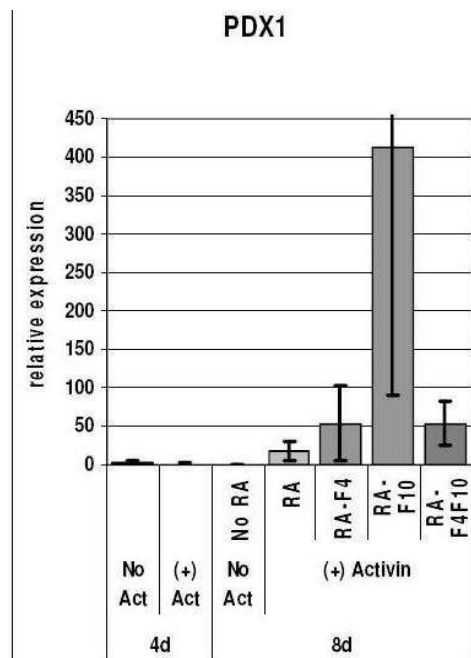
도면36E



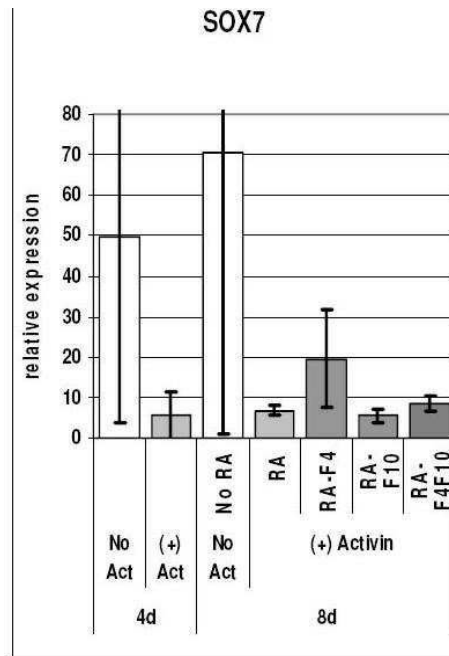
도면36F



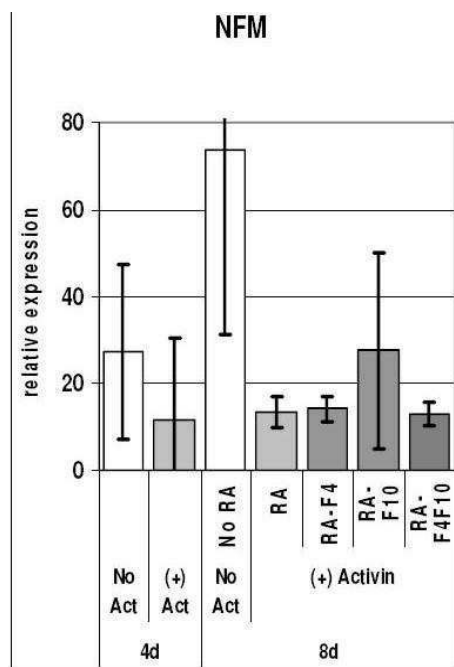
도면37A



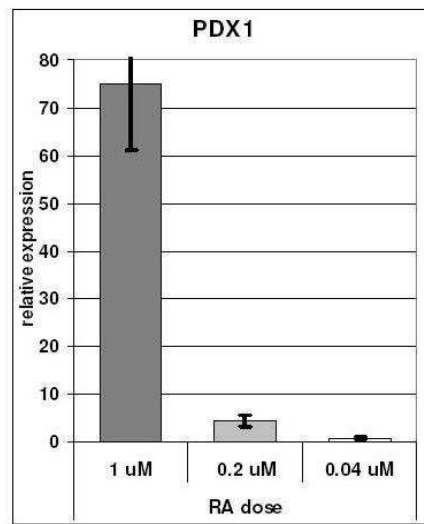
도면37B



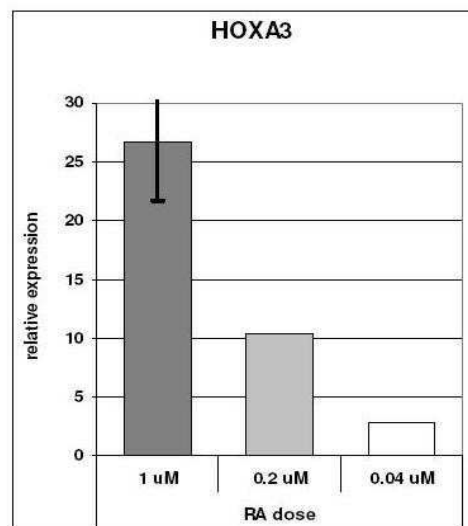
도면37C



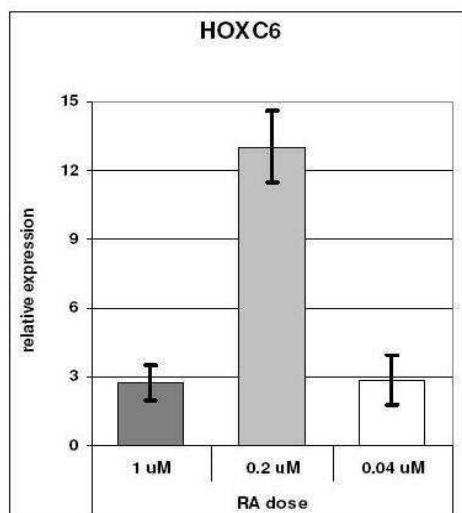
도면38A



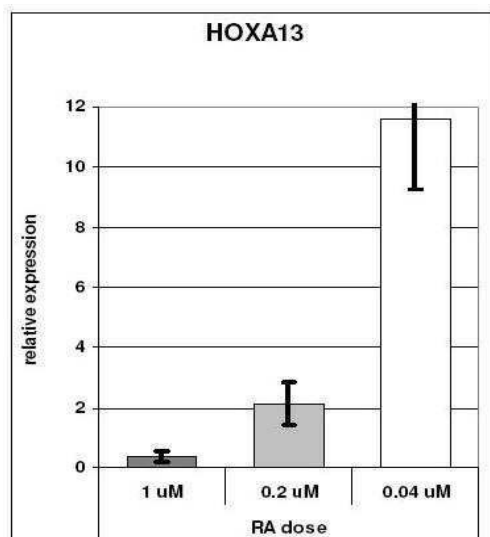
도면38B



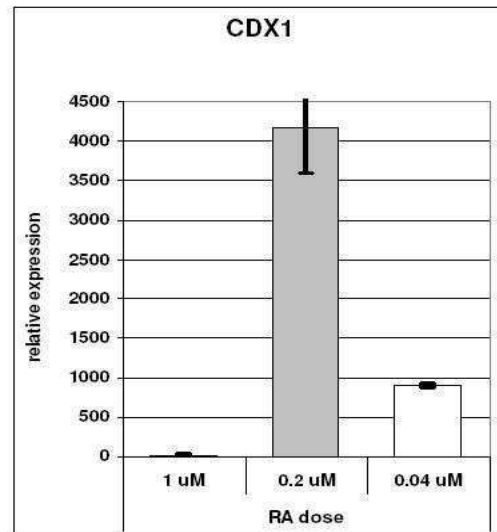
도면38C



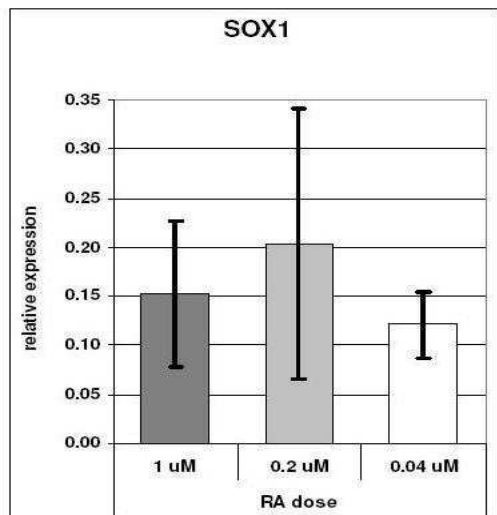
도면38D



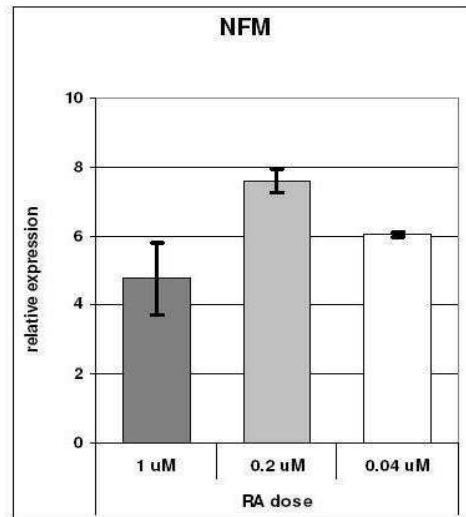
도면38E



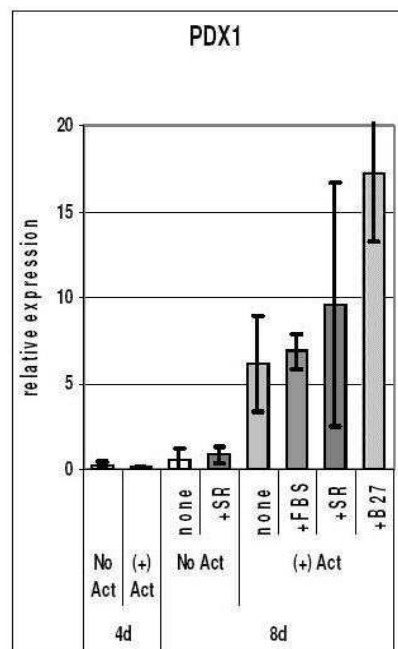
도면38F



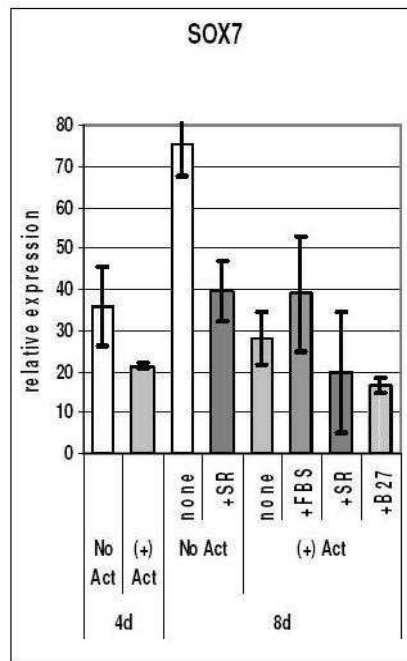
도면38G



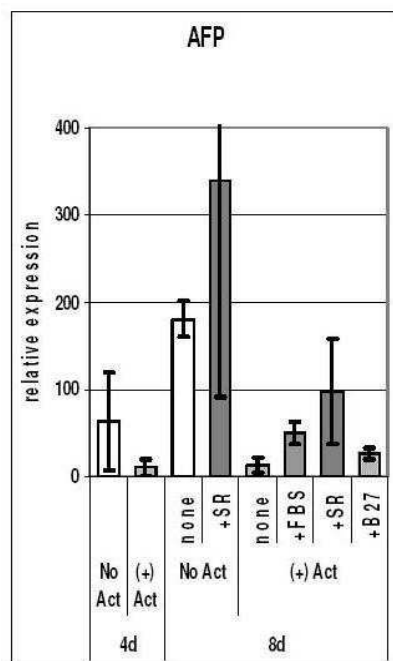
도면39A



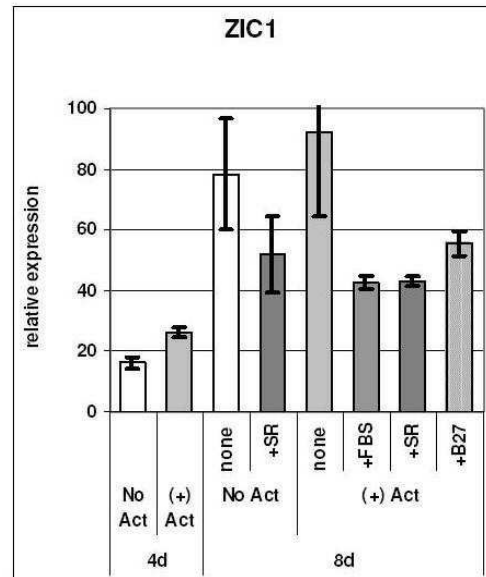
도면39B



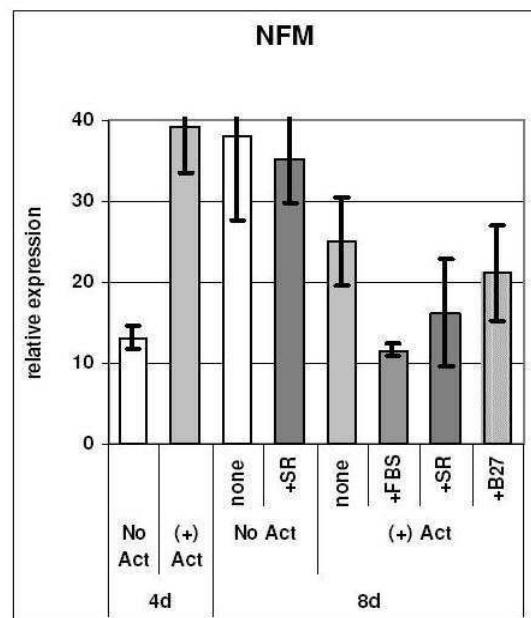
도면39C



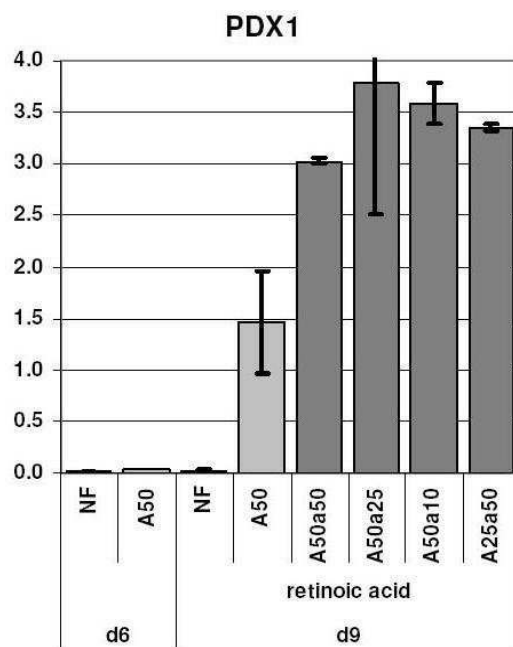
도면39D



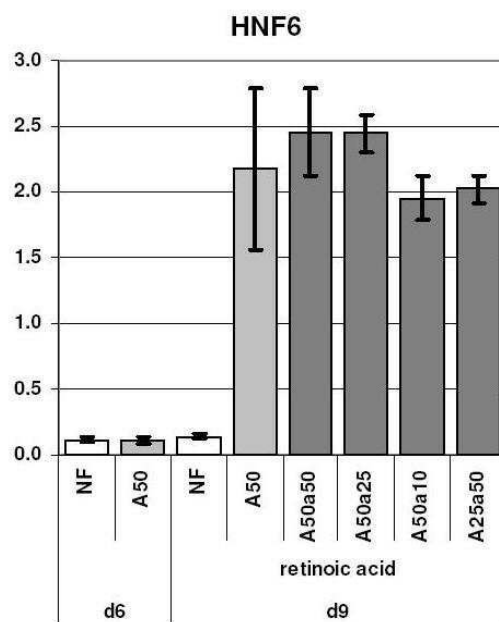
도면39E



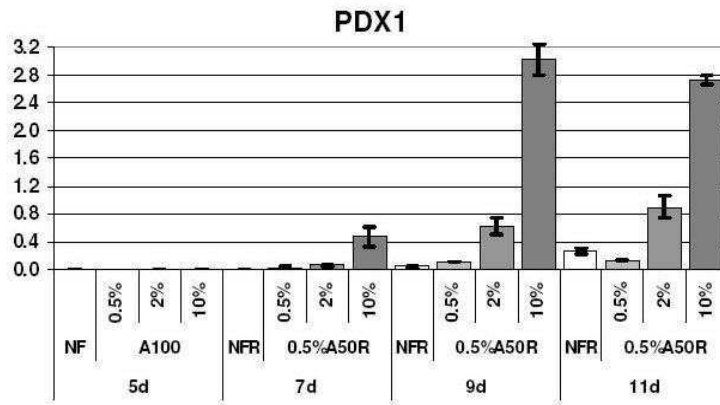
도면40A



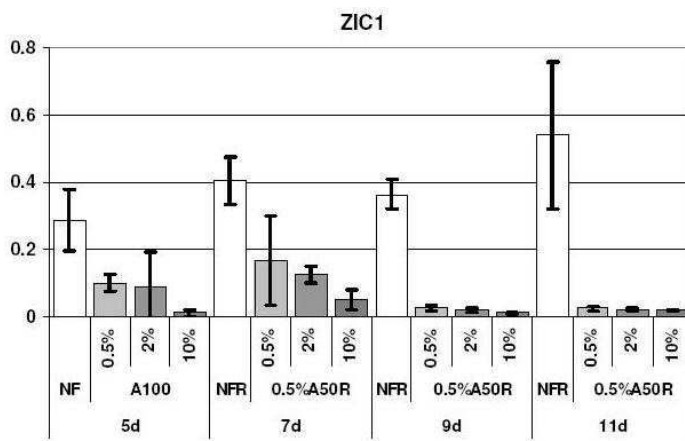
도면40B



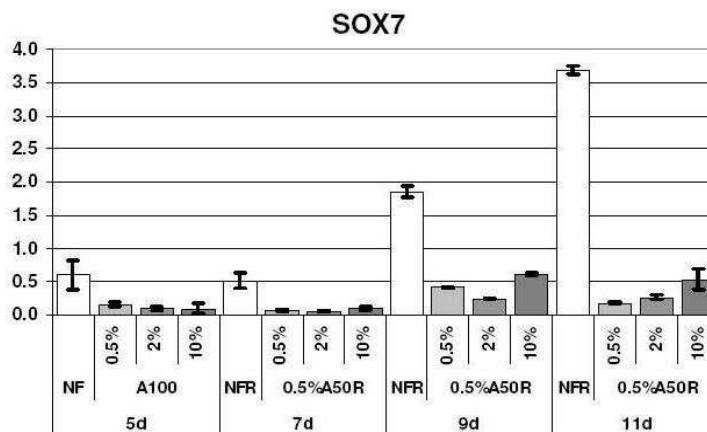
도면41A



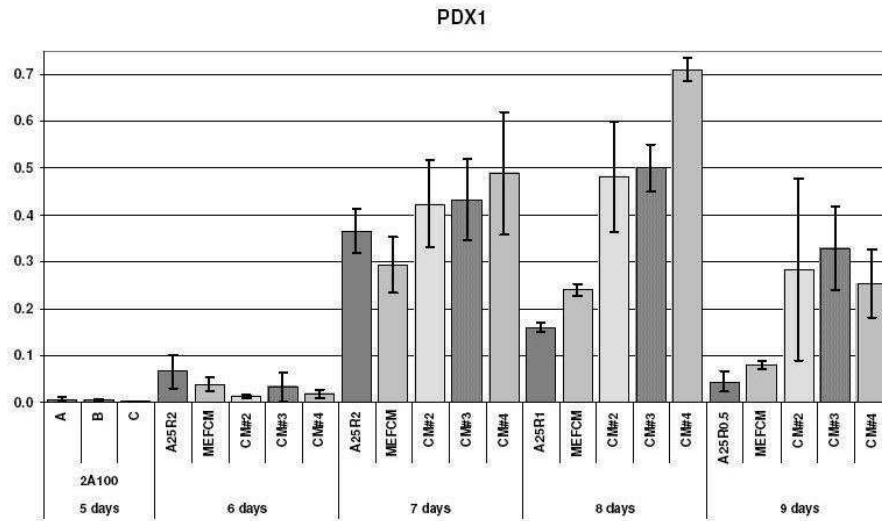
도면41B



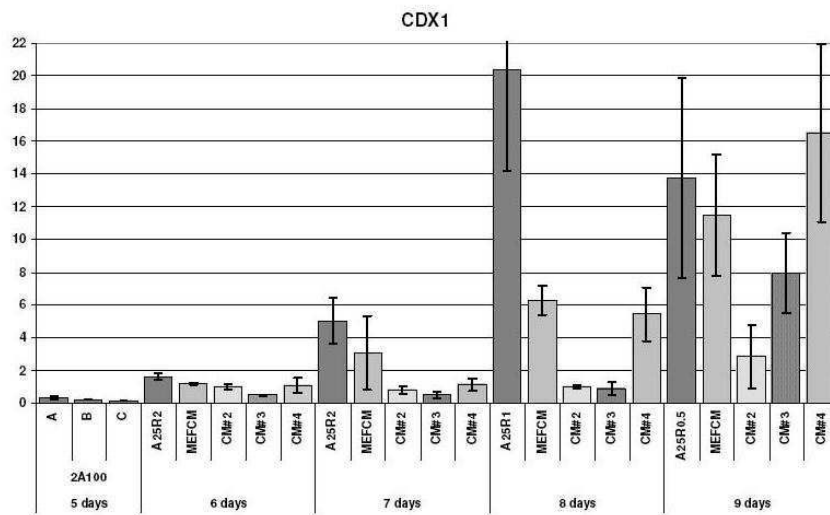
도면41C



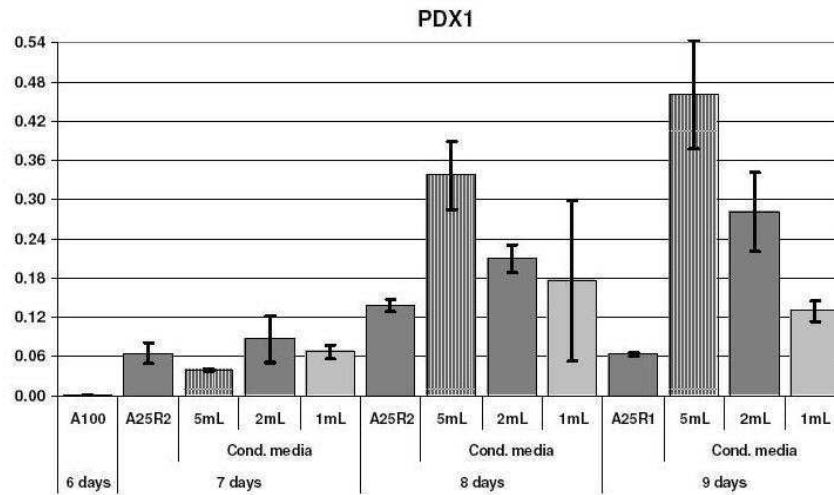
도면42A



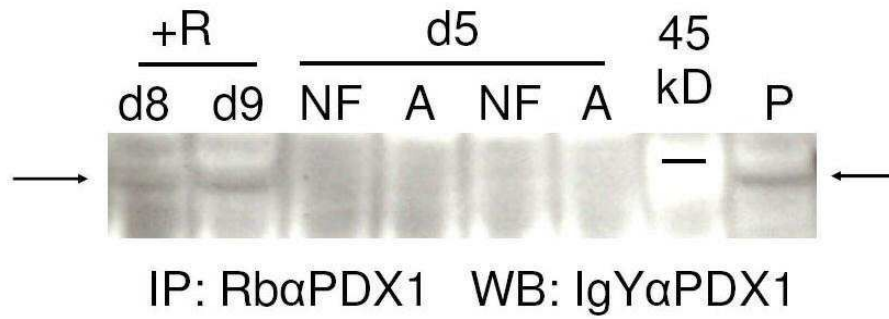
도면42B



도면43



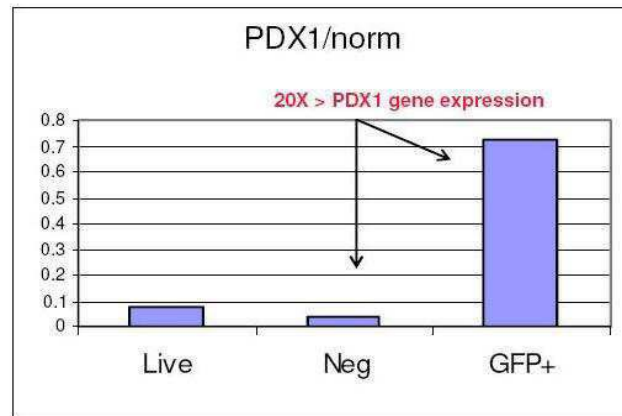
도면44



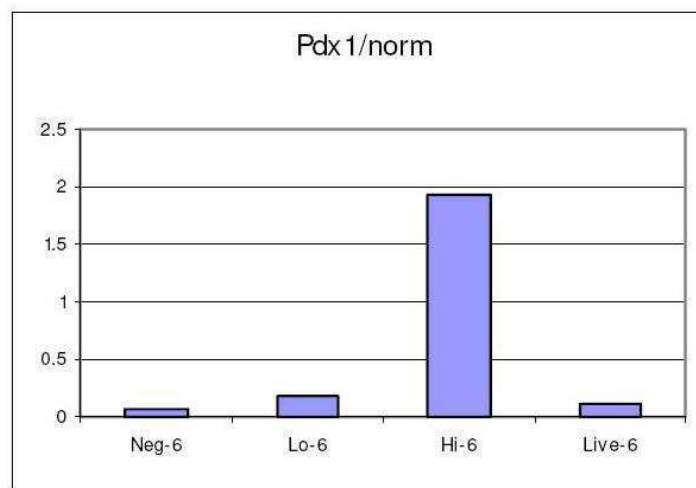
도면45

Tube: pdx 8 day 7			
Population	Number of Events	% of Parent	% of Total
□ - All events	30,000		100.0
■ - Live cells	19,290	64.3	64.3
■ - Single cells	17,303	89.7	57.7
■ - GFP positive	1209	7.0	4.0

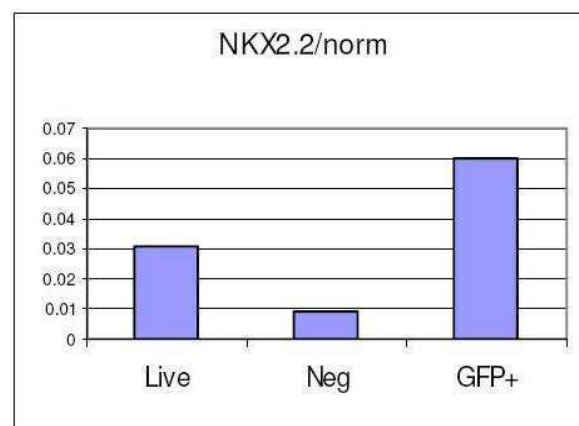
도면46



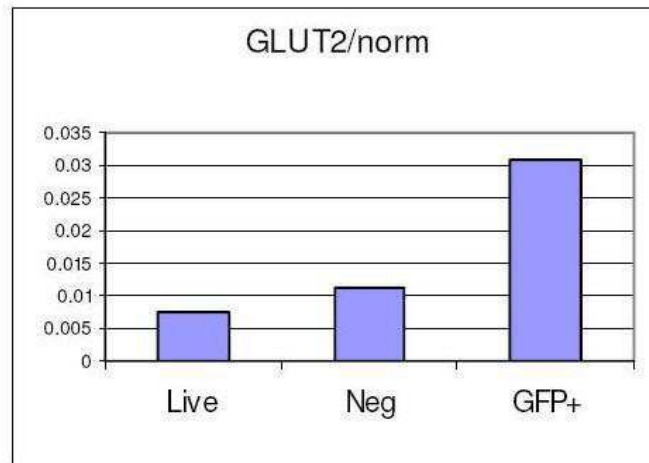
도면47



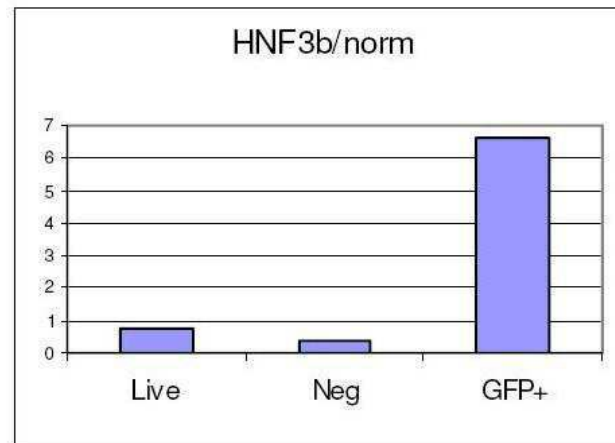
도면48A



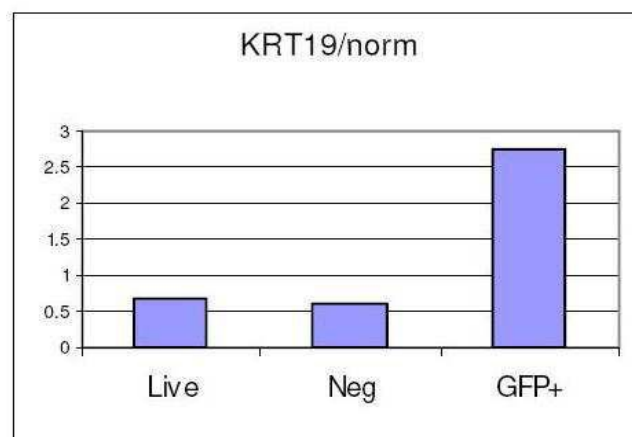
도면48B



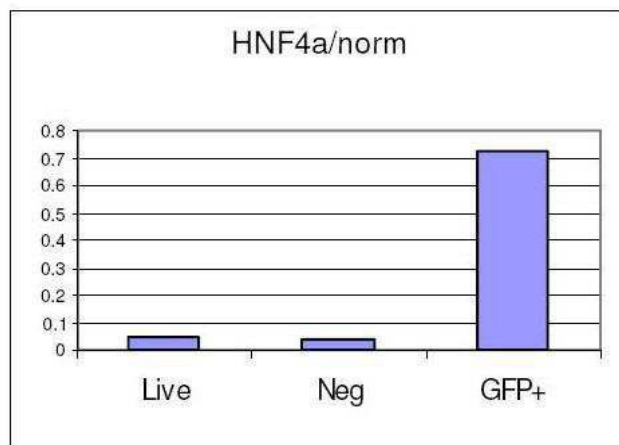
도면48C



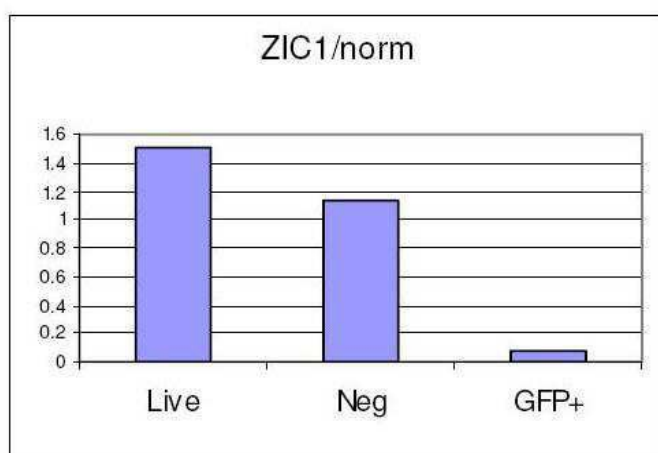
도면48D



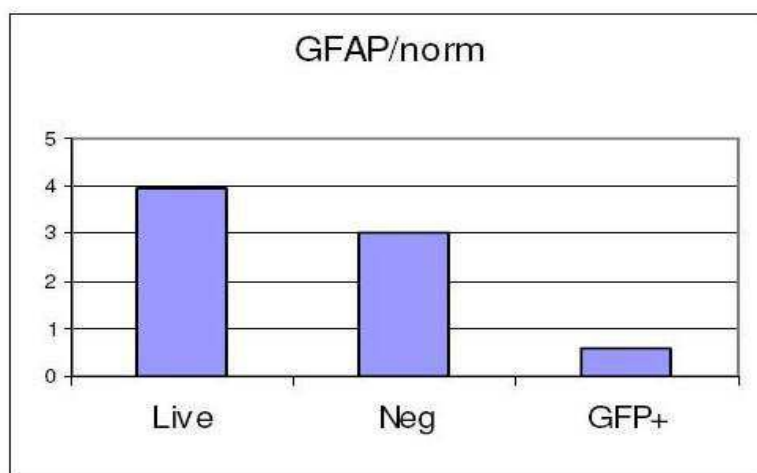
도면48E



도면49A



도면49B



서열 목록

<110> CyThera, Inc

<120> PDX1 EXPRESSING ENDODERM

<130> DIFI/PA06015/MR

<150> US11/021,618

<151> 2004-12-23

<150> US60/587,942

<151> 2004-07-14

<150> US60/586,566

<151> 2004-07-09

<150> US60/566,293

<151> 2004-04-27

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1245

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgagcagcc cggatgcggg atacgccagt gacgaccaga gccagaccca gagcgcgctg 60

cccgcggtga tggccgggct gggcccctgc ccctgggccg agtcgctgag ccccatcggg 120

gacatgaagg tgaaggcgga ggcgccggcg aacagcggag caccggccgg ggccgcgggc 180

cgagccaagg gcgagtcctg tatccggcgg ccgatgaacg ctttcattgt gtgggctaag 240

gacgagcgca agcggctggc gcagcagaat ccagacctgc acaacgccga gttgagcaag 300

atgctgggca agtcgtggaa ggcgctgacg ctggcgagaga agcgccctt cgtggaggag 360

gcagagcggc tgcgctgca gcacatgcag gaccaccca actacaagta ccggccgcgg 420

cggcgcaagc aggtgaagcg gctgaagcgg gtggagggcg gcttcttga cggcctggct 480

gagccgcagg cggccgcgt gggcccgag ggcggccgcg tggccatgga cggcctgggc 540

ctccagticc ccgagcaggg ctccccgcc ggcccgccgc tgcctcctcc gcacatgggc 600

ggccactacc gcgactgcca gactctgggc gcgcctccgc tcgacggcta cccgttgccc 660

acgcccgaca cgtccccgt ggacggcgtg gaccccgacc cggctttctt cgccgccccg 720

atgcccgggg actgcccggc ggccggcacc tacagctacg cgcaggcttc ggactacgt 780

ggcccccg agcctccgc cggctccatg ccccccgac tcggccaga gcccgcggt 840

ccctcgattc cgggcttctt ggccgaccc agcgccttc acgtgtacta cggcgcatg 900

ggctcgccc gggcggggcg cggcgcggc ttccagatgc agccgcaaca ccagcaccag 960

caccagcacc agcaccacc cccgggcccc ggacagcgt cggccctcc ggaggcactg 1020

ccctgcggg acggcacgga cccagtcag cccgcccagc tcctcgggga ggtggaccgc 1080

acggaatttg aacagtatct gcattctgtg tgcaagcctg agatgggcct cccctaccag 1140

gggcatgact ccggtgtgaa tctccccgac agccacgggg ccatttcctc ggtggtgtcc 1200

gacgccagct ccgcgtata ttactgcaac tatctgacg tgtga 1245

<210> 2
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ser Ser Pro Asp Ala Gly Tyr Ala Ser Asp Asp Gln Ser Gln Thr

1	5	10	15
Gln Ser Ala Leu Pro Ala Val Met Ala Gly Leu Gly Pro Cys Pro Trp	20	25	30
Ala Glu Ser Leu Ser Pro Ile Gly Asp Met Lys Val Lys Gly Glu Ala	35	40	45
Pro Ala Asn Ser Gly Ala Pro Ala Gly Ala Ala Gly Arg Ala Lys Gly	50	55	60
Glu Ser Arg Ile Arg Arg Pro Met Asn Ala Phe Met Val Trp Ala Lys	65	70	75
Asp Glu Arg Lys Arg Leu Ala Gln Gln Asn Pro Asp Leu His Asn Ala	85	90	95
Glu Leu Ser Lys Met Leu Gly Lys Ser Trp Lys Ala Leu Thr Leu Ala	100	105	110
Glu Lys Arg Pro Phe Val Glu Glu Ala Glu Arg Leu Arg Val Gln His	115	120	125
Met Gln Asp His Pro Asn Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Arg Arg Lys Gln	130	135	140
Val Lys Arg Leu Lys Arg Val Glu Gly Gly Phe Leu His Gly Leu Ala	145	150	155
Glu Pro Gln Ala Ala Ala Leu Gly Pro Glu Gly Gly Arg Val Ala Met	165	170	175
Asp Gly Leu Gly Leu Gln Phe Pro Glu Gln Gly Phe Pro Ala Gly Pro	180	185	190
Pro Leu Leu Pro Pro His Met Gly Gly His Tyr Arg Asp Cys Gln Ser	195	200	205
Leu Gly Ala Pro Pro Leu Asp Gly Tyr Pro Leu Pro Thr Pro Asp Thr	210	215	220
Ser Pro Leu Asp Gly Val Asp Pro Asp Pro Ala Phe Phe Ala Ala Pro	225	230	235
			240

Met Pro Gly Asp Cys Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Ser Tyr Ala Gln Val
245 250 255

Ser Asp Tyr Ala Gly Pro Pro Glu Pro Pro Ala Gly Pro Met His Pro
260 265 270

Arg Leu Gly Pro Glu Pro Ala Gly Pro Ser Ile Pro Gly Leu Leu Ala
275 280 285

Pro Pro Ser Ala Leu His Val Tyr Tyr Gly Ala Met Gly Ser Pro Gly
290 295 300

Ala Gly Gly Gly Arg Gly Phe Gln Met Gln Pro Gln His Gln His Gln
305 310 315 320

His Gln His Gln His His Pro Pro Gly Pro Gly Gln Pro Ser Pro Pro
325 330 335

Pro Glu Ala Leu Pro Cys Arg Asp Gly Thr Asp Pro Ser Gln Pro Ala
340 345 350

Glu Leu Leu Gly Glu Val Asp Arg Thr Glu Phe Glu Gln Tyr Leu His
355 360 365

Phe Val Cys Lys Pro Glu Met Gly Leu Pro Tyr Gln Gly His Asp Ser
370 375 380

Gly Val Asn Leu Pro Asp Ser His Gly Ala Ile Ser Ser Val Val Ser
385 390 395 400

Asp Ala Ser Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Tyr Pro Asp Val
405 410