



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0096883
(43) 공개일자 2024년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0606 (2013.01)
C12N 2500/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7019582
(22) 출원일자(국제) 2022년11월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월12일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2022/051664
(87) 국제공개번호 WO 2023/082007
국제공개일자 2023년05월19일
(30) 우선권주장
63/278,751 2021년11월12일 미국(US)

(71) 출원인
더 세메스 얼라이언스
캐나다 엔1에이치 6제이2 온타리오 켈프 하이웨이
6 노스 5653
(72) 발명자
라브렉 레미
캐나다 제이0에이치 1더블유0 켈백 생-피에 뢰 다
비농 180
장 시-중
캐나다 제이2에이치 1엑스5 켈백 그랜비 뢰 데 시
니스 55
(74) 대리인
유미특허법인

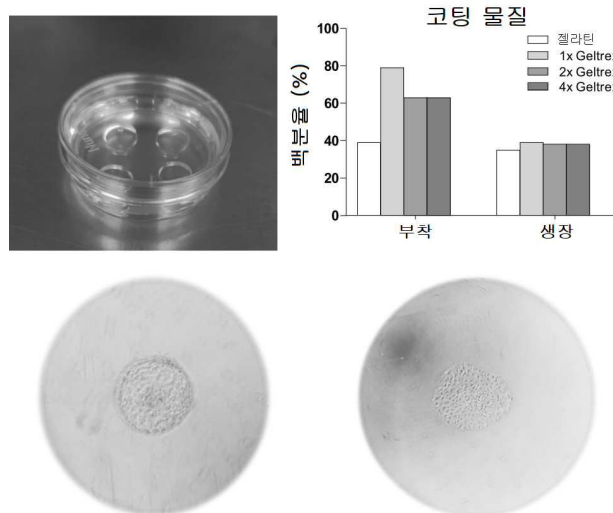
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 나이프 보바인 배아 줄기 세포의 유도

(57) 요약

본 발명은 나이프 보바인 배아 줄기 세포를 유도하는데 이용가능한 방법, 제품 및 조성물에 관한 것이다. 배아 부착 및 성장물의 형성을 가능하게 하는, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머를 포함하는 ECM-코팅 기판을 기술한다. 또한, 보바인 배아를 배양하고 나이프 배아 줄기 세포를 유도하는데 적합한 성장 배지를 제공한다. 나이프 보바인 배아 줄기 세포는 원하는 유전자 특징을 가진 착상 전 배아의 증배, 시험관내 육종 프로그램을 위한 원시 생식 세포/배우체의 유도 및 수의학적 생물제제 및 치료제의 개발 및 전달을 비롯하여 시험관내 육종 프로그램에 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/16 (2013.01)

C12N 2501/235 (2013.01)

C12N 2501/33 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2533/30 (2013.01)

C12N 2533/90 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

나이트 보바인 배아 줄기 세포 (naive bovine embryonic stem cell)를 유도하는 방법으로서, 상기 방법이

- a) 나이트 보바인 배아 줄기 세포를 포함하는 투명대 (ZP)-프리 보바인 배아를 제공하는 단계;
 - b) ZP-프리 보바인 배아를 세포외 매트릭스 (ECM)-코팅 기판과 접촉시키는 단계로서, 상기 ECM-코팅 기판이 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 기판 표면을 포함하는 기판, 및 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 ECM 층을 포함하는, 단계; 및
 - c) 상기 ZP-프리 보바인 배아를 생장 배지의 존재 하에 배양하여, ECM-코팅 기판에 상기 ZP-프리 보바인 배아의 부착, 및 유도된 나이트 보바인 배아 줄기 세포를 포함하는 내세포집단 (ICM) 생장을 유도하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층이 타입 A 젤라틴을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 음으로 하전된 ECM 층이 EHS-ECM을 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기판이 폴리스티렌을 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생장 배지가 다음 중 하나 이상을 포함하는, 방법:

N2B27 구성성분;

Wnt 활성화제 구성성분;

Wnt 저해제 구성성분;

MEK/ERK 저해제 구성성분;

ROCK 저해제 구성성분;

LIF 구성성분;

액티빈 A 구성성분

PKC 저해제; 및

인슐린 구성성분.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생장 배지가 다음을 포함하는, 방법:

N2B27 구성성분;

Wnt 활성화제 구성성분;

Wnt 저해제 구성성분;

MEK/ERK 저해제 구성성분;

ROCK 저해제 구성성분;

LIF 구성성분;

PKC 저해제; 및

인슐린 구성성분.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생장 배지가 액티빈 A 구성성분, 선택적으로 인간 액티빈 A를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 N2B27 구성성분이 B27 보충제 및 N2 보충제를, 선택적으로 약 1% B27 보충제 및 약 0.5% N2 보충제를 포함하거나;

상기 Wnt 활성화제 구성성분이 CHIR99021, BIO, CHIR-98014, LY2090314 및/또는 IM-12를 포함하거나;

상기 Wnt 저해제 구성성분이 XAV939, IWR-1 및/또는 IWP-2를 포함하거나;

상기 MEK/ERK 저해제 구성성분이 PD0325901, 라보세르티닙, GSK1120212, MEK162, PD184352, 트라메티닙, LY3214996 및/또는 울리세르티닙을 포함하거나;

상기 ROCK 저해제 구성성분이 Y27632, 티아조비딘 및/또는 블레비스타틴을 포함하거나;

상기 LIF 구성성분이 인간 LIF를 포함하거나;

상기 PKC 저해제가 Go6983, Go6976, LY317615, LY333531, PKC412, GSK690693, 소트라스타우린, 스타우로스포린, 및/또는 비스인돌릴말레이미드를 포함하거나; 및/또는

상기 인슐린 구성성분이 인슐린을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 ZP-프리 보바인 배아가 3-8일 배아, 선택적으로 6 또는 7일 배아이거나, 또는

상기 ZP-프리 배아가 상실배 (4기); 배반포 (5기); 확장 중 배반포 (6기); 확장된 배반포 (7기); 부화 중 배반포 (8기) 또는 부화된 배반포 (9기)인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 보바인 배아가 효소-보조성 ZP 제거 (enzyme-assisted ZP removal)를 통해 획득되는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 방법이 ZP-프리 보바인 배아를 하기 단계들을 포함하는 효소-보조성 ZP 제거를 통해 획득하는 것을 추가로 포함하는 방법:

- a) 배아를 제공하는 단계;
- b) 상기 배아를 프로테아제 용액과 접촉시키는 단계;
- c) 상기 배아를 상기 프로테아제 용액 중에 인큐베이션하여 ZP를 일부 효소 분해하고 ZP-박형화 배아를 획득하는 단계;
- d) 상기 ZP-박형화 배아를 프로테아제 불활성화 배지와 접촉시켜, 프로테아제를 불활성화하는 단계;
- e) ZP를 파괴하는 단계; 및
- f) 상기 배아를 조작해 배아에서 ZP를 분리하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 단계 c)에서 프로테아제의 농도가 0.1%-0.5%, 선택적으로 약 0.25%인, 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 배아와 프로테아제 용액은 단계 c)에서 약 30-60초간, 선택적으로 약 45초간 인큐베이션하는, 방법.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP는 단계 e)에서 마이크로블레이드를 사용해 파괴되는, 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 f)에서 상기 배아의 조작이 파이펫팅 (pipetting)을 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 배아가 유전자 변형된 것인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 배아가 하나 이상의 바이오마커에 대해 ZP-프리 배아의 하나 이상의 유전자형을 결정하기 위해 유전자 검사를 거친, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커에 대해 상기 ZP-프리 보바인 배아의 하나 이상의 유전자형을 결정하기 위해 유전자 검사를 수행하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 바이오마커에 대한 유전자 검사를 기반으로 상기 ZP-프리 보바인 배아를 선별하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 유도된 나이트 보바인 배아 줄기 세포의 하나 이상의 유전자형을 결정하기 위해 유전자 검사를 수행하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 보바인 배아가 재구성된 이배체 배아로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 보바인 배아가 신선한 배아 (fresh embryo), 선택적으로 신선한 생검 배아로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 보바인 배아가 냉동 배아, 선택적으로 생검-냉동 배아 (biopsied-frozen embryo)로부터 수득된 것인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 냉동 배아를 해동하고, 배아를 회복 배지와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 ZP-프리 보마인 배아를 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 수득하는 것을 포함하는, 방법:

- a) 냉동 배아를 해동하는 단계;
- b) 상기 냉동 배아를 회복 배지와 접촉시키는 단계;
- c) 상기 배아를 조작해 회복 배지 중에 배아로부터 ZP를 분리하는 단계; 및
- d) ZP-프리 보마인 배아를 회복 배지에서 인큐베이션하는 단계.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 회복 배지가 글리코젠 신타제 키나제 3 (GSK-3) 저해제, *MEK/ERK* 키나제 저해제 및 ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 27

제24항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 회복 배지가 CHIR99021, PD0325901 및 Y27632를 포함하는, 방법.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP-프리 배아를 적응 배지와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 적응 배지가 회복 배지와 생장 배지의 조합물을 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 적응 배지가 약 0.3:1 내지 1.7:1, 약 0.5:1 내지 1.5:1 또는 선택적으로 약 1:1 비율의 회복 배지와 생장 배지의 조합물을 포함하는, 방법.

청구항 30

세포외 매트릭스 (ECM)-코팅 기관의 제조 방법으로서, 상기 방법이

- a) 음으로 하전된 표면을 포함하는 기관을 제공하는 단계;
 - b) 음으로 하전된 표면을 생체적합한 폴리머를 포함하는 제1 용액과 접촉시키는 단계로서, 생체적합한 폴리머가 양으로 하전된 것인, 단계;
 - c) 상기 기관을 제1 용액과 접촉시켜 인큐베이션하여, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층을 기관의 음으로 하전된 표면 위에 적층하는 단계;
 - d) 상기 제1 용액을 제거하고, 선택적으로 기관을 세척하는 단계;
 - e) 상기 기관을 세포외 매트릭스 (ECM)를 포함하는 제2 용액과 접촉시키는 단계로서, ECM이 음으로 하전된 것인, 단계; 및
 - f) 상기 기관을 제2 용액과 접촉시켜 인큐베이션하여, 음으로 하전된 ECM의 층을 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층 위에 적층하는 단계
- 를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 생체적합한 폴리머가 타입 A 젤라틴인, 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 ECM이 EHS-ECM을 포함하는, 방법.

청구항 33

제30항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관이 폴리스티렌인, 방법.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된 ECM-코팅 기관.

청구항 35

하기를 포함하는, ECM-코팅 기관:

양으로 하전된 표면을 포함하는 기관;

기관의 음으로 하전된 표면과 접촉된, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층;

양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층과 접촉된, 음으로 하전된 ECM 층.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 생체적합한 폴리머가 타입 A 젤라틴인, ECM-코팅 기관.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 ECM이 EHS-ECM을 포함하는, ECM-코팅 기관.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관이 폴리스티렌인, ECM-코팅 기관.

청구항 39

배아를 배양하기 위한, 선택적으로 ICM 성장물을 유도하기 위한, 및/또는 나이프 배아 줄기 세포를 유도하기 위한, 제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 따른 ECM-코팅 기관의 용도.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 배아가 보바인 배아, 선택적으로 5-7일 보바인 배아인, 용도.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 보바인 배아가 재구성된 이배체 배아인, 용도.

청구항 42

하기를 포함하는, 배지 조성물:

N2B27 구성성분;

Wnt 활성화제 구성성분;

Wnt 저해제 구성성분;

MEK/ERK 저해제 구성성분;

ROCK 저해제 구성성분;

LIF 구성성분;

PKC 저해제; 및

인슐린 구성성분.

청구항 43

제42항에 있어서,

상기 N2B27 구성성분이 B27 보충제 및 N2 보충제를, 선택적으로 약 1% B27 보충제 및 약 0.5% N2 보충제를 포함하거나;

상기 Wnt 활성화제 구성성분이 CHIR99021, BIO, CHIR-98014, LY2090314 또는 IM-12를 포함하거나;

상기 Wnt 저해제 구성성분이 XAV939, IWR-1 또는 IWP-2를 포함하거나;

상기 MEK/ERK 저해제 구성성분이 PD0325901, 라보세르티닙, GSK1120212, MEK162, PD184352, 트라메티닙, LY3214996 또는 울리세르티닙을 포함하거나;

상기 ROCK 저해제 구성성분이 Y27632, 티아조비빈 또는 블레비스타틴을 포함하거나;

상기 LIF 구성성분이 인간 LIF를 포함하거나;

상기 PKC 저해제가 Go6983, Go6976, LY317615, LY333531, PKC412, GSK690693, 소트라스타우린, 스타우로스포린 또는 비스인돌릴말레이미드를 포함하거나; 및/또는

상기 인슐린 구성성분이 인슐린을 포함하는, 배지 조성물.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 액티빈 A 구성성분, 선택적으로 인간 액티빈 A를 추가로 포함하는, 배지 조성물.

청구항 45

배아, 선택적으로 보바인 배아를 배양해 ICM 성장물의 형성을 유도하기 위한, 제42항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 배지 조성물의 용도.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 보바인 배아가 재구성된 이배체 배아인, 용도.

청구항 47

효소-보조성 ZP 제거에 의해 ZP-프리 보바인 배아를 수득하는 방법으로서, 상기 방법이

- a) 배아를 제공하는 단계;
- b) 상기 배아를 프로테아제 용액과 접촉시키는 단계;
- c) 상기 배아를 상기 프로테아제 용액 중에 인큐베이션하여 ZP를 일부 효소 분해하여 ZP-박형화 배아를 수득하는 단계;
- d) 상기 ZP-박형화 배아를 프로테아제 불활성화 배지와 접촉시켜, 프로테아제를 불활성화하는 단계;
- e) ZP를 파괴하는 단계; 및
- f) 상기 배아를 조작해 배아에서 ZP를 분리하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 단계 c)에서 프로테아제의 농도가 0.1%-0.5%, 선택적으로 약 0.25%인, 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 배아 및 프로테아제 용액은 단계 c)에서 약 30-60초간, 선택적으로 약 45초간 인큐베이션하는, 방법.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ZP는 단계 e)에서 마이크로블레이드를 사용해 파괴되는, 방법.

청구항 51

제47항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 f)에서 상기 배아의 조작이 파이펫팅 (pipetting)을 포함하는, 방법.

청구항 52

글리코젠 신타제 키나제 3 (GSK-3) 저해제, *MEK/ERK* 키나제 저해제 및 ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) 저해제를 포함하는, 회복 배지.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 회복 배지가 CHIR99021을 선택적으로 약 3 μ M로, PD0325901을 선택적으로 약 1 μ M로, 그리고 Y27632를 선택적으로 약 10 μ M 포함하는, 배지.

청구항 54

해동, 생검, 유전자 편집 또는 세포 유도 중에 또는 이후에 배아를 회복시키기 위한, 제52항 또는 제53항에 따른 회복 배지의 용도.

청구항 55

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 방법을 이용해 제조된 나이트 보바인 배아 줄기 세포.

청구항 56

육종 계획 또는 유전자 개량 프로그램에서의 제55항에 따른 나이트 보바인 배아 줄기 세포의 용도.

청구항 57

착상 전 배아, 선택적으로 원하는 유전자 특징을 가진 착상 전 배아의 증배; 원시 생식 세포 및/또는 배우체, 선택적으로 시험관내 육종 프로그램을 위한 원시 생식 세포 및/또는 배우체의 유도; 및/또는 수의학적 생물체제 및 치료제의 개발 및 전달을 위한, 제55항에 따른 나이트 보바인 배아 줄기 세포의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2021년 11월 12일자 미국 가출원번호 63/278,751에 대해 우선권의 혜택을 주장하며, 이 문헌의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 보바인 줄기 세포에 관한 것이고, 보다 상세하게는 나이트 보바인 배아 줄기 세포 (naive bovine embryonic stem cell), 관련 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 나이트 배아 줄기 세포는 세포영양막 줄기 세포 및 배아의 내비엽 계통 세포 (extraembryonic endodermal lineage cell)와 같은 배아외 세포를 비롯한 신체 모든 유형의 세포로 분화할 수 있다. 마우스 배반포-유사 구조 (아이블라스토이드 (iblastoid)라고도 함)가 EPS (Expanded Pluripotent Stem)의 분화를 통해 구축되었으며 (Li et al., 2019), 보다 최근에는 인간 아이블라스토이드 구조가 배아 줄기 세포로부터 유래한 나이트 만능성 줄기 세포 (Yu et al., 2021) 또는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPS, Liu et al., 2021)를 이용해 구축되었다. 그러나, 마우스 또는 인간과는 대조적으로, 보바인 나이트 줄기 세포의 유도는 아직까지 보고된 바 없다.

[0006] 착상 전 배아, 보다 구체적으로는 배아의 내세포집단 (ICM) 구조로부터 유래한 보바인 감각된 배아 줄기 세포는 거의 보고된 바 없다 (Bogliotti et al. 2018; Soto et al., 2021). 하지만, 감각된 ESC는 배아외 세포로 분화하지 않으므로, 아이블라스토이드 구조를 구축하는데 이용할 수 없다. 아울러, 감각된 ESC는 시험관내 육종

(breeding)에 이용하기 위한 생식계열 세포의 분화에도 효율적으로 이용하지 못한다 (Hou et al., 2018). 만능성 (착상 전 ICM) 기저 상태를 보이는 나이트 배아 줄기 세포는 감작된 ES보다 더 효율적으로 생식계열 세포로 분화할 수 있다 (De Los Angeles, 2019).

[0007]

일반적으로 낮은 배아 생산율 (배반포 형성을 ~20-30%)로 인해 제한적이지 노동 집약적인 핵 이식 (클로닝) 접근법을 이용하는 경우와는 대조적으로, 보바인 나이트 줄기 세포의 유도는 원하는 특징을 가진 배아의 효율적인 증식을 가능하게 할 수 있다. 배아에서 원하는 유전자 특징은 자연적으로 발생할 수 있는 감수분열, 돌연변이 및 유전자의 이동과 같은 과정들의 결과로 생길 수 있는데, 이는 Smith et al., WO 2020/168422와 같은 보조 생식 기술을 이용하거나 또는 유전자 변형에 의해 달성될 수 있다. 아울러, 동물 및 수의학 과학은 유전자 변형 동물을 대규모로 생산하기 위한 효율적인 플랫폼을 제공하고, 시험관내 육종 프로그램의 중요한 구성 기술을 전달하고, 진보된 수의학 생물체제 및 치료제의 개발과 전달을 가능하게 함으로써, 나이트 줄기 세포 기술로부터 상당한 이점을 구현할 수 있다. 나이트 보바인 배아 줄기 세포 및 아이블라스토이드 생산과 관련한 방법에 대한 필요성이 남아있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008]

(비특허문헌 0001) Anderson KGV, Hamilton WB, Roske F V., Azad A, Knudsen TE, Canham MA, Forrester LM and Brickman JM (2017) Insulin fine-tunes self-renewal pathways governing naive pluripotency and extra-embryonic endoderm. *Nature Cell Biology* 19 1164-1177.

(비특허문헌 0002) Bishop TF and Van Eenennam AL. (2020) Genome editing approaches to augment livestock breeding programs. *J Exp Biol.* 223 (Suppl_1): jeb207159.. doi: 10.1242/jeb.207159.

(비특허문헌 0003) Bogliotti YS, Wu J, Vilarino M, Okamura D, Soto DA, Zhong C, Sakurai M, Sampaio RV, Suzuki K, Izpisua Belmonte JC et al. (2018) Efficient derivation of stable primed pluripotent embryonic stem cells from bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 2090-2095.

(비특허문헌 0004) Bredenkamp N, Stirparo GG, Nichols J, Smith A and Guo G (2019) The Cell-Surface Marker Sushi Containing Domain 2 Facilitates Establishment of Human Naive Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 12.

(비특허문헌 0005) Cosin-Roger J, Ortiz-Masia MD and Barrachina MD (2019) Macrophages as an emerging source of wnt ligands: Relevance in mucosal integrity. *Frontiers in Immunology* 10 2297.

(비특허문헌 0006) De Los Angeles A (2019) Frontiers of Pluripotency. *Methods in Molecular Biology* 2005 3-27.

(비특허문헌 0007) Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A et al. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504.

(비특허문헌 0008) Guo G, Von Meyenn F, Santos F, Chen Y, Reik W, Bertone P, Smith A and Nichols J (2016) Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports* 6.

(비특허문헌 0009) Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW and Jaenisch R (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 9222-9227.

(비특허문헌 0010) Hou Z, An L, Han J, Yuan Y, Chen D and Tian J (2018) Revolutionize livestock breeding in the future: an animal embryo-stem cell breeding system in a dish. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2018 9:1 9 1-11.

(비특허문헌 0011) Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M and Imai H

- (2015) Generation of Naive Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. PLOS ONE 10 e0135403.
- (비특허문헌 0012) Khan SA, Park K mi, Fischer LA, Dong C, Lungjangwa T, Jimenez M, Casalena D, Chew B, Dietmann S, Auld DS et al. (2021) Probing the signaling requirements for naive human pluripotency by high-throughput chemical screening. Cell Reports 35.
- (비특허문헌 0013) Kim H, Wu J, Ye S, Tai CI, Zhou X, Yan H, Li P, Pera M and Ying QL (2013) Modulation of β -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. Nature Communications 4.
- (비특허문헌 0014) Lerman MJ, Lembong J, Muramoto S, Gillen G and Fisher JP (2018) The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. Tissue Engineering - Part B: Reviews 24.
- (비특허문헌 0015) Li R, Zhong C, Yu Y, Liu H, Sakurai M, Yu L, Min Z, Shi L, Wei Y, Takahashi Y et al. (2019) Generation of Blastocyst-like Structures from Mouse Embryonic and Adult Cell Cultures. Cell 179 687-702.e18.
- (비특허문헌 0016) Liu X, Tan JP, Schroder J, Aberkane A, Ouyang JF, Mohenska M, Lim SM, Sun YBY, Chen J, Sun G et al. (2021) Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. Nature 591 627-632.
- (비특허문헌 0017) Park F. (2007) Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? Physiol Genomics. 31: 159-173.
- (비특허문헌 0018) Smith, LC, Labrecque, R, Paredes LMA, Therrien J, and Vigneault, C. 2020. Use of haploid embryonic cells to generate offspring with predetermined genomes. WO 2020/168422.
- (비특허문헌 0019) Solter D and Knowles BB (1975) Immunosurgery of mouse blastocyst. Proc Natl Acad Sci USA 72(12):099-102
- (비특허문헌 0020) Soto DA, Navarro M, Zheng C, Halstead MM, Zhou C, Guiltinan C, Wu J and Ross PJ (2021). Simplification of culture conditions and feeder-free expansion of bovine embryonic stem cells. Scientific Reports 2021 11:1 11 1-15.
- (비특허문헌 0021) Talbot NC, Sparks WO, Powell AM, Kahl S and Caperna TJ (2012) Quantitative and semiquantitative immunoassay of growth factors and cytokines in the conditioned medium of STO and CF-1 mouse feeder cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal 48 1-11.
- (비특허문헌 0022) Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L et al. (2014) Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. Cell Stem Cell 15.
- (비특허문헌 0023) Wang S, Qu Z, Huang Q, Zhang J, Lin S, Yang Y, Meng F, Li J, and Zhang K. (2022) Application of Gene Editing Technology in Resistance Breeding of Livestock. Life (Basel). 12:1070. doi: 10.3390/life12071070.
- (비특허문헌 0024) Yanagida A, Spindlow D, Nichols J, Dattani A, Smith A and Guo G (2021) Naive stem cell blastocyst model captures human embryo lineage segregation. Cell Stem Cell 28.
- (비특허문헌 0025) Yu L, Wei Y, Duan J, Schmitz DA, Sakurai M, Wang L, Wang K, Zhao S, Hon GC and Wu J (2021) Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. Nature 591 620-626.
- (비특허문헌 0026) Zhao L, Gao X, Zheng Y, Wang Z, Zhao G, Ren J, Zhang J, Wu J, Wu B, Chen Y et al. (2021) Establishment of bovine expanded potential stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 118.

발명의 내용

- [0009] 본 발명은 상실배 및 배반포 단계의 배아와 같은 보바인 배아를 이용해 부착 및 생장물 형성 (outgrowth formation)을 달성하고, 보바인 나이브 배아 줄기 세포를 확립하는데 이용가능한 재료 및 방법을 기술한다. 실시예에서 입증한 바와 같이, 층상 ECM-코팅 기관 (layered ECM-coated substrate) 상에 배치된 투명대 (Zona Pellucida, ZP)-결핍 보바인 배아는 통상적인 ECM-코팅 기관 상에 배치된 배아와 비교해 더 우수한 부착율과 생장물 형성을 제공한다.
- [0010] 아울러, 배아 부착 및 생장물 형성뿐 아니라 이러한 생장물로부터 내세포집단 (ICM) 세포의 생장을 뒷받침하여 ICM으로부터 나이브 배아 줄기 세포를 유도할 수 있는, 생장 배지 (outgrowth media) 조성물 및 관련 방법을 기술한다. 본원에 기술된 구현예는 따라서 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 유도하고, 선택적으로 아이블라스토이드 구조물의 구축, 원하는 유전자 특징을 가진 착상 전 배아의 증배 (multiplying), 시험관내 육종 프로그램을 위한 원시 생식 세포 및/또는 배우체의 유도, 및/또는 수의학 생물제제 및 치료제의 개발 및 전달 등의 육종 프로그램에 이용하기 위해 이용가능한 구현예들을 기술한다.
- [0011] 이에, 일 측면에서, 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0012] 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 포함하는 투명대 (ZP)-프리 보바인 배아 (Zona Pellucida-free bovine embryo)를 제공하는 단계;
- [0013] ZP-프리 보바인 배아를 세포외 매트릭스 (ECM)-코팅 기관과 접촉시키는 단계로서, ECM-코팅 기관이 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 기관 표면을 포함하는 기관과 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 ECM 층을 포함하는, 단계; 및
- [0014] ZP-프리 보바인 배아를 생장 배지의 존재 하에 배양해, ZP-프리 보바인 배아가 ECM-코팅 기관에 부착하여 유도되는 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 포함하는 내세포집단 (ICM)의 생장물을 유도하는 단계.
- [0015] 일 구현예에서, 보바인 배아는 유전자 변형된다.
- [0016] 다른 구현예에서, ZP-프리 보바인 배아는 재구성된 이배체 배아 (reconstructed diploid embryo)로부터 획득된다.
- [0017] 일 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 생리학적 pH에서 음으로 하전된다. 일 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 타입 A 젤라틴이다.
- [0018] 일 구현예에서, ECM은 EHS-ECM을 포함한다.
- [0019] 일 구현예에서, 기관을 폴리스티렌을 포함한다.
- [0020] 일 구현예에서, 생장 배지는 기본 배지 (base medium)와, ZP-프리 배아를 ECM 코팅 기관에 부착시키고 피더-프리 배양 시스템에서 ICM의 생장을 유도하는데 유용한 본원에 기술된 하나 이상의 구성성분을 포함한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 생장 배지는 DMEM/F12 및 신경기본 배지 (Neurobasal medium)의 1:1 혼합물; N2B27 구성성분; Wnt 활성화제 구성성분; Wnt 저해제 구성성분; MEK/ERK 저해제 구성성분; ROCK 저해제 구성성분; LIF 구성성분; PKC 저해제 구성성분; 및 인슐린 구성성분 중 하나 이상을 포함한다. 선택적으로, 생장 배지는 액티빈 A 구성성분을 추가로 포함한다.
- [0021] 일 구현예에서, 생장 배지는 N2B27 구성성분; Wnt 활성화제 구성성분; Wnt 저해제 구성성분; MEK/ERK 저해제 구성성분; ROCK 저해제 구성성분; LIF 구성성분; 액티빈 A 구성성분; PKC 저해제; 및 인슐린 구성성분을 포함한다.
- [0022] 일 구현예에서, N2B27 구성성분은 B27 보충제와 N2 보충제, 선택적으로 약 1% B27 보충제 및 약 0.5% N2 보충제를 포함하고; Wnt 활성화제 구성성분은 CHIR99021, BIO, CHIR-98014, LY2090314 및/또는 IM-12를 포함하고; Wnt 저해제 구성성분은 XAV939, IWR-1 및/또는 IWP-2를 포함하고; MEK/ERK 저해제 구성성분은 PD0325901, 라보세르티닙 (Ravoxertinib), GSK1120212, MEK162, PD184352, 트라메티닙 (Trametinib), LY3214996, 및/또는 울리세르티닙 (Ulixertinib)을 포함하고; ROCK 저해제 구성성분은 Y27632, 티아조비빈 (Thiazovivin) 및/또는 블레비스타틴 (Blebbistatin)을 포함하고; LIF 구성성분은 인간 LIF를 포함하고; 액티빈 A는 인간 액티빈 A를 포함하고; PKC 저해제는 Go6983, Go6976, LY317615, LY333531, PKC412, GSK690693, 소트라스타우린 (Sotrastaurin), 스타우로스포르린 (Staurosporine) 및/또는 비스인돌릴말레이미드 (Bisindolylmaleimide)를 포함하고; 및/또는 인슐린 구성성분은 인슐린을 포함한다.
- [0023] 일 구현예에서, ZP-프리 보바인 배아는 상실배 (4기); 배반포 (5기); 확장 중 배반포 (expanding

blastocyst)(6기); 확장된 배반포 (expanded blastocyst)(7기); 부화 중 배반포 (hatching blastocyst) (8기) 또는 부화된 배반포 (hatched blastocyst)(9기)이다.

- [0024] 일 구현예에서, ZP-프리 보바인 배아는 효소-보조성 (enzyme-assisted) ZP 제거에 의해 수득된다.
- [0025] 일 구현예에서, 본 방법은 효소-보조성 ZP 제거를 통해 ZP-프리 보바인 배아를 수득하는 것을 포함한다.
- [0026] 또한, 본 발명은, a) 배아를 제공하는 단계; b) 배아를 프로테아제 용액과 접촉시키는 단계; c) 배아를 프로테아제 용액 중에 인큐베이션하여 ZP를 일부 효소 분해시켜 ZP-박형화 배아 (ZP-thinned embryo)를 수득하는 단계; d) ZP-박형화 배아를 프로테아제 불활성화 배지와 접촉시켜 프로테아제를 불활성화하는 단계; e) ZP를 파괴하는 단계; 및 f) ZP를 배아로부터 분리하도록 배아를 조작하는 단계를 포함하는, 효소-보조성 ZP 제거 방법을 기술한다.
- [0027] 일 구현예에서, 단계 c)에서 프로테아제의 농도는 약 0.1% 내지 약 0.5%, 약 0.2% 내지 0.3%, 또는 약 0.25%이다.
- [0028] 일 구현예에서, 배아 및 프로테아제 용액은 단계 c)에서 약 30-60초 동안, 선택적으로 약 45초간 인큐베이션한다.
- [0029] 일 구현예에서, ZP는 마이크로블레이드 (microblade)를 이용해 단계 e)에서 파괴한다.
- [0030] 일 구현예에서, 단계 f)에서 배아 조작은 파이펫팅 (pipetting)을 포함한다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 방법은 ZP-프리 보바인 배아의 하나 이상의 유전자형을 결정하기 위해 하나 이상의 바이오마커에 대해 유전자 검사를 수행하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0032] 일 구현예에서, 본 방법은 하나 이상의 바이오마커에 대한 유전자 검사를 기초로 ZP-프리 보바인 배아를 선별하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0033] 일 구현예에서, 본 방법은 유전자 검사를 수행해 유도된 나이브 보바인 배아 줄기 세포의 하나 이상의 유전자형을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0034] 일 구현예에서, ZP-프리 보바인 배아는 신선한 배아, 선택적으로 신선한 생검 배아로부터 수득한다.
- [0035] 일 구현예에서, 단계 a)의 배아는 유전자 변형된 배아이다.
- [0036] 일 구현예에서, ZP-프리 보바인 배아는 냉동 배아로부터, 선택적으로 생검-냉동 배아로부터 수득한다.
- [0037] 일 구현예에서, 본 방법은 냉동 배아를 해동하고, 배아를 회복 배지와 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0038] 일 구현예에서, ZP-프리 보바인 배아는 냉동 배아를 해동하는 단계; 냉동 배아를 회복 배지와 접촉시키는 단계; 배아를 조작해 회복 배지 중에 배아로부터 ZP를 분리하는 단계; 및 회복 배지 중에 ZP-프리 보바인 배아를 인큐베이션하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득한다.
- [0039] 일 구현예에서, 회복 배지는 글리코젠 신타제 키나제 3 (GSK-3) 저해제, MEK/ERK 키나제 저해제 및 ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) 저해제를 포함한다.
- [0040] 일 구현예에서, 회복 배지는 CHIR99021, PD0325901 및 Y27632를 포함한다.
- [0041] 일 구현예에서, 본 방법은 ZP-프리 배아를 적응 배지와 함께 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 적응 배지는 회복 배지와 생장 배지의 조합물을 포함한다.
- [0042] 일 구현예에서, 적응 배지는 약 0.5:1 내지 1.5:1, 선택적으로 약 1:1 비율의 회복 배지와 생장 배지의 조합물을 포함한다.
- [0043] 다른 측면에서, 본원에 기술된 방법을 이용해 유도된 나이브 보바인 줄기 세포를 제공한다. 추가적인 측면은 육종 계획 또는 유전자 개선 프로그램에서, 그리고 원하는 유전자 특징을 가진 착상 전 배아를 증배시키고, 시험관내 육종 프로그램을 위한 원시 생식 세포 및/또는 배우체를 수득하고, 및/또는 수의학 생물체제 및 치료제를 개발 및 전달하기 위한, 본원에 기술된 방법을 이용해 유도되는 나이브 보바인 줄기 세포의 용도를 포함한다.
- [0044] 다른 측면에서, 음으로 하전된 표면을 포함하는 기관을 제공하는 단계; 음으로 하전된 표면을 생체적합한 폴리머를 포함하는 제1 용액과 접촉시키는 단계로서, 생체적합한 폴리머가 양으로 하전된 것인, 단계; 기관을 제1 용액과 접촉시켜 인큐베이션하여, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층을 기관의 음으로 하전된 표면 위에 적

층하는 단계; 제1 용액을 제거하고, 선택적으로 기판을 세척하는 단계; 기판을 세포외 매트릭스 (ECM)를 포함하는 제2 용액과 접촉시키는 단계로서, ECM이 음으로 하전된 것인, 단계; 및 기판을 제2 용액과 접촉시켜 인큐베이션하여, 음으로 하전된 ECM의 층을 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층 위에 적층하는 단계를 포함하는, 세포외 매트릭스 (ECM)-코팅 기판의 제조 방법을 제공한다.

[0045] 일 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 타입 A 젤라틴을 포함한다.

[0046] 일 구현예에서, ECM은 EHS-ECM을 포함한다.

[0047] 일 구현예에서, 기판은 폴리스티렌을 포함한다.

[0048] 일 측면은 본원에 기술된 방법에 따라 제조된 ECM-코팅 기판을 포함한다.

[0049] 추가적인 측면은, 양으로 하전된 표면을 포함하는 기판; 기판의 음으로 하전된 표면과 접촉된 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층; 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층과 접촉된 음으로 하전된 ECM 층을 포함하는, ECM-코팅 기판을 포함한다.

[0050] 일 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 타입 A 젤라틴을 포함한다.

[0051] 일 구현예에서, ECM은 EHS-ECM을 포함한다.

[0052] 일 구현예에서, 기판은 폴리스티렌을 포함한다.

[0053] 본 발명의 일 측면은 배아의 배양, 선택적으로 ICM 생장물의 유도 및/또는 나이프 배아 줄기 세포의 유도를 위한, 본원에 기술된 ECM-코팅 기판의 용도를 포함한다.

[0054] 일 구현예에서, 배아는 보바인 배아, 선택적으로 5일 내지 7일 보바인 배아이다.

[0055] 다른 구현예에서, 보바인 배아는 재구성된 이배체 배아이다.

[0056] 일 구현예에서, 배아는 유전자 변형 배아이다.

[0057] 다른 측면에서, 기본 배지와, 배아의 배양, 선택적으로 ICM 생장물의 유도 및/또는 나이프 배아 줄기 세포의 유도를 달성하기 위한 하나 이상의 구성성분을 포함하는, 배지 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 배지 조성물은 다음 중 하나 이상을 포함한다: N2B27 구성성분; Wnt 활성화제 구성성분; Wnt 저해제 구성성분; MEK/ERK 저해제 구성성분; ROCK 저해제 구성성분; LIF 구성성분; PKC 저해제; 및 인슐린 구성성분. 선택적으로, 배지 조성물은 액티빈 A 구성성분을 추가로 포함한다.

[0058] 일 구현예에서, N2B27 구성성분은 약 1% B27 보충제 및 약 0.5% N2 보충제를 포함하고; Wnt 활성화제 구성성분은 CHIR99021, BIO, CHIR-98014, LY2090314 또는 IM-12를 포함하고; Wnt 저해제 구성성분은 XAV939, IWR-1 또는 IWP-2를 포함하고; MEK/ERK 저해제 구성성분 PD0325901, 라보세르티닙, GSK1120212, MEK162, PD184352, 트라메티닙, LY3214996 또는 울리세르티닙을 포함하고; ROCK 저해제 구성성분은 Y27632, 티아조비딘 또는 블레비스타틴을 포함하고; LIF 구성성분은 인간 LIF를 포함하고; 액티빈 A 구성성분은 인간 액티빈 A를 포함하고; PKC 저해제는 Go6983, Go6976, LY317615, LY333531, PKC412, GSK690693, 소트라스타우린, 스타우로스포린 또는 비스인돌릴말레이미드를 포함하고; 및/또는 인슐린 구성성분은 인슐린을 포함한다.

[0059] 추가적인 측면은 배아를 배양하여 ICM 생장물의 형성을 유도하기 위한 본원에 기술된 배지 조성물의 용도를 포함하며, 여기서 배아는 보바인 배아, 재구성된 이배체 보바인 배아 및/또는 유전자 변형 배아이다.

[0060] 추가적인 측면은 다음을 포함하는 회복 배지를 포함한다: 글리코젠 신타제 키나제 3 (GSK-3) 저해제, 선택적으로 CHIR99021, MEK/ERK 키나제 저해제, 선택적으로 PD0325901, 및 ROCK 저해제, 선택적으로 Y27632.

[0061] 진술한 섹션은 단순 예로서 제공되며, 본 개시내용과 첨부된 청구항의 범위를 제한하는 것으로 의도하는 것은 아니다. 본 발명의 조성물 및 방법과 관련한 부가적인 과제 및 이점들은 본 청구항, 설명 및 실시예에 비추어 당해 기술 분야의 당업자라면 이해할 것이다. 예를 들어, 본 발명에 대한 다양한 측면 및 구현예들은 수많은 조합들로 응용될 수 있으며, 이들 모두 본 발명에 의해 명확하게 고려된다. 이러한 부가적인 이점, 과제 및 구현예들은 본 발명의 범위에 명확하게 포함된다. 본 발명의 배경기술을 예시하고, 특정 경우에는 실무와 관련한 부가적인 상세 내용을 제공하기 위해 본원에 이용된 간행물 및 기타 자료들이 원용에 의해 통합되며, 편의상 첨부된 참조문헌 섹션에서 열거한다.

도면의 간단한 설명

[0062]

본 발명의 추가적인 과제, 특징 및 이점들은 본 발명의 예시적인 구현예들을 보여주는 첨부 도면들과 연결하여 기술된 아래 상세한 설명으로부터 명확해질 것이다.

도 1은 여러가지 코팅 물질 상에 배치된 배아의 부착율과 생장율을 결정하기 위한 실험의 결과를 도시한다. (상단 좌측) 코팅 물질을 함유한 Nunc 35mm 배양 디쉬, (상단 우측) 코팅 물질에 따른 부착 및 성장 효율, (하단 좌측) 비-부착 배아, (하단 우측) 부착된 배아.

도 2는 Geltrex 및 30 μ m 포어 셀 스트레이너 (pore cell strainer)를 이용해 제작한 디쉬 표면 사진을 도시한다 (사진 배율; x100).

도 3은 혈장 처리된 폴리스티렌 디쉬 표면에 대한 개략적인 화학 구조를 도시한다.

도 4는 LbL (Layer-by-Layer) 코팅 예를 도시한다.

도 5는 LbL ECM-코팅 기관 이용시 유도 효율 개선을 도시한다. LbL ECM-코팅 기관은 EHS-ECM만 이용한 대조군 프로토콜과 비교해, 높고 안정적인 부착율, TE (영양외배엽 세포) 및 ICM (내세포집단) 생장을 나타내었다.

도 6은 (좌) 프로테아제 처리 디쉬의 개략적인 레이아웃과 (우) ZP가 효소적 처리에 의해 완전히 제거된 프로테아제-처리된 저-품질 배아 사진을 도시한다.

도 7은 ZP-프리 6일 신선한 배지를 도시한다. 배아들 모두 ZP 제거 후 건강한 상태로 보인다.

도 8은 (상단 좌측) 해동 후 회복 디쉬의 레이아웃 개략도, (상단 우측) 해동 후 배아의 회복에 미치는 2iY 배지의 영향을 보여주는 사진을 도시한다. (하단) 2iY 처리 배아가 대조군 배아 배양 배지보다 더 빨리 회복시키고, 배아의 신속한 재-확장에 의해 관찰된 바와 같이 더 우수한 유도 효율을 나타낸다. 2iY 처리 배아는 대조군보다 더 크고 선명한 ICM을 나타내었다 (점선 원).

도 9는 해동 후 배아의 품질에 미치는 2iY 영향을 보여주는 그래프이다. 2iY 처리 배아는 해동 후 회복한 후 더 진전된 발달 단계를 보인다.

도 10은 적응 배지 디쉬 #1 및 디쉬 #2의 레이아웃을 나타낸 개략도이다. 하단은 생장물을 유도하는데 미치는 적응 시간의 영향을 나타낸 그래프이다.

도 11은 다양한 혈청 소스 타입을 이용한 유도 결과를 나타낸 그래프이다. FBS = 소 태아 혈청; KOSR = 낙-아우 혈청 대체제; SR = 혈청 대체제; N2B27 = N2 보충제 + B27 보충제 (실시에 참조).

도 12는 다양한 Wnt 신호전달 경로 및 표적을 나타낸 개략도이다.

도 13은 나이브 줄기 세포 유도에 대한 Forskolin 및 듀얼 키나제 Wnt 경로 변형의 영향을 나타낸 그래프이다.

도 14는 생장물 유도에 대한 IL-6 및 SRC 저해제의 영향을 나타낸 그래프이다. 하단은 다양한 SRC 하류 경로를 나타낸 개략도이다.

도 15는 나이브 생장물의 형성에 대한 MEK 저해제의 영향을 도시한다.

도 16은 나이브 줄기 세포 배지에서 유도 효율을 나타낸 그래프 (좌) 및 t2iLGoY 배지에 의해 유도된 생장물 콜로니를 나타낸 사진이다.

도 17은 (좌) 생장물의 내배엽 분화를 도시한다. ICM 콜로니 (화살표)는 미-분화된 내배엽 세포 (화살촉) 및 분화된 내배엽 세포 (별표)에 의해 덮여있다. (우측) 인슐린 첨가하여 1차 계대배양한 후 ICM 세포 콜로니 (가장자리가 밝은 세포 덩어리).

도 18은 추후에 나이브 보마인 배아 줄기 세포의 유도에 기반하여 원시 생식 세포주 및 배우체를 구축하고 유전자 측면에서 동일한 복수의 배아 (아이플라스토이드라 함)를 생성하기 위한 세포주 유도에 수반되는 개략적인 단계들을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063]

하기 내용은 본 발명을 실시하는데 있어 당해 기술 분야의 당업자를 돕기 위해 제공한 상세한 설명이다. 달리 정의되지 않은 한, 본 발명에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본 발명을 설명하는데 사용된 용어들은 단순히 구체적인 구현예를 기술하기 위한 것일 뿐 개시내용을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특히

출원, 특허, 도면 및 기타 참조문헌들은 그 전체가 원용에 의해 명확하게 포함된다.

[0064] 나아가, 특정 섹션들에 기술된 정의 및 구현예들은 당해 기술 분야의 당업자에게 이해되는 바와 같이 본원에 기술된 다른 적절한 구현예들에도 적용가능한 것으로 의도된다. 예를 들어, 아래 부분에서는 개시내용에 대한 여러가지 측면들을 보다 상세하게 정의한다. 이렇게 정의된 각 측면은 명확하게 달리 명시되지 않은 한 임의의 다른 측면 또는 측면들과 조합될 수 있다. 특히, 본원에 기술된 임의의 특징은 본원에 기술된 임의의 다른 특징 또는 특징들과 조합될 수 있다.

[0065] I. 일반 정의

[0066] 본원에 사용된 바와 같이, 아래 용어들은 달리 명시되지 않은 한 아래에서 부여한 의미를 가질 수 있다. 그러나, 당해 기술 분야의 당업자가 이해하거나 또는 알려져 있는 다른 의미도 가능하며, 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 이해하여야 한다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참조문헌들은 그 전체가 원용에 의해 포함된다. 상충할 경우, 정의를 비롯해 본 명세서를 우선으로 한다. 아울러, 물질, 방법 및 예들은 예시한 것일 뿐 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0067] 수치 범위가 제시된 경우, 문맥상 달리 명확하게 나타내지 않은 한, 범위의 상한 및 하한과 언급된 범위 내 임의의 다른 언급된 또는 중간 값 사이의, 하한 단위의 1/10까지의 각각의 중간 수치가 이러한 언급에 망라되는 것으로, 이해된다. 임의의 하한에서 임의의 상한까지의 범위들이 고려된다. 언급된 범위에서 임의의 특별히 배제되는 제한이 적용된, 더 작은 범위에 포함될 수 있는 더 작은 범위의 상한 및 하한 역시 그 설명에 또한 독립적으로 망라된다. 언급된 범위가 한쪽 또는 양쪽 한계를 포함하는 경우, 이 둘다를 제외하는 범위 역시 그 설명에 포함된다.

[0068] 본원 및 첨부된 청구항에 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an" 및 "the")는 문맥상 명백하게 달리 지칭하지 않은 한 복수의 언급을 망라함을 유념하여야 한다.

[0069] 상세한 설명 및 본 발명의 청구항에서의 모든 수치 값들은 언급된 값을 "약" 또는 "대략"으로 수식하여 표시되고, 당해 기술 분야의 당업자가 예상할 수 있는 실험적인 오차 및 편차가 고려된다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이, 명세서 및 청구항에서, 표현 "및/또는"은 함께 연결된 요소들 중 "어느 하나 또는 양쪽"을 의미하는 것으로 이해하여야 하며, 즉 접속사에 의해 연결된 요소들이 일부 경우에 존재하고, 다른 경우에는 별도로 존재하는 것으로 이해하여야 한다. "및/또는"을 사용해 열거된 여러 요소는 동일한 방식으로 해석되어야 하며, 즉 요소들 중 "하나 이상"이 연합되는 것으로 해석되어야 한다. 구체적으로 식별된 요소와 관련 있거나 또는 관련 없든, "및/또는" 어구에 의해 구체적으로 식별된 요소들 이외의 다른, 기타 요소들도 선택적으로 존재할 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같이, 명세서 및 청구항에서, "또는"은 상기 정의된 바와 같이 "및/또는"과 동일한 의미를 가지는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목들을 분리하는 경우, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적으로 해석되어야 하며, 즉 다수의 요소 또는 목록에서 적어도 하나뿐 아니라 하나 초과, 그리고 선택적으로 열거되지 않은 부가적인 항목들을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. "중 단 하나" 또는 "중 정확하게 하나"와 같이 명확하게 상반되게 언급된 항목만 또는 청구항에서 "로 이루어진"으로 언급된 항목만 다수의 요소 또는 목록에서 정확하게 한가지 요소를 포함하는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 바와 같이 용어 "또는"은 "어느 하나", "중 하나", "중 단 하나" 또는 "중 정확하게 하나"와 같이 배타적인 용어가 선행될 경우, 배타적인 대안 (즉, "하나 또는 다른 하나나 둘다는 아님")을 나타내는 것으로만 해석하여야 한다.

[0072] 청구항에서뿐 아니라 상기 명세서에서, "포괄하는", "비롯하여", "운반하는", "가지는", "함유하는", "수반하는", "보유하는", "로 구성된" 등과 같은 모든 전환 문구는 열린 의미로, 즉 포함하나 이로 제한되지 않는 의미로 이해하여야 한다. 전환 문구 "로 이루어진" 및 "로 필수적으로 이루어진"은 각각 닫힌 또는 반-폐쇄형 전환 문구일 것이다.

[0073] 명세서 및 청구항에서 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 요소들의 목록과 관련하여 표현 "적어도 하나"는 요소 목록에서 어느 하나 또는 그 이상의 요소들로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해하여야 하지만, 요소 목록에 구체적으로 열거된 각각의 모든 요소들 중 적어도 하나를 반드시 포함하는 것은 아니며 요소 목록의 임의 요소들의 조합들을 배제하는 것도 아니다. 이러한 정의는 또한 표현 "적어도 하나"가 구체적으로 식별된 요소와 관련 있든 또는 관련 없든, 지칭하는 요소 목록에서 구체적으로 식별되는 요소들 이외의 다른 요소도 선택적으로 존재할 수 있을 경우도 허용한다.

- [0074] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "약"은 참조 수치에 대한 $\pm 10\%$ - 15% , $\pm 5\%$ - 10% 또는 선택적으로 $\pm$ 약 5% 를 의미한다.
- [0075] 단계 또는 행위 2 이상을 포함하는 본원에 기술된 특정 방법에서, 방법의 단계 또는 행위의 순서는 방법의 단계 또는 행위가 문맥상 달리 명시되지 않은 한 방법의 단계 또는 행위가 언급된 순서로 반드시 제한되는 것은 아닌 것으로 이해하여야 한다.
- [0076] 또한, 본원에 언급된 방법 및 물질과 유사하거나 또는 동등한 임의의 방법 및 물질 역시 본 발명의 실시 또는 검사에 이용할 수 있는 것으로 이해하여야 한다.
- [0077] **II. 방법**
- [0078] 본 발명은 나이브 배아 줄기 세포의 생장물 형성 방법 및 나이브 배아 줄기 세포를 유도하는 방법을 기술한다. 실시예에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 층상 ECM-코팅 기관 및 특수 제형화된 증식 배양을 포함하는 피드-프리 배양 시스템으로 나이브 보바인 줄기 세포의 생장물 형성을 입증하였다. 층상 ECM-코팅 기관 및 생장 배지는 상실배 또는 배반포 단계 (예, 보바인 6일 또는 7일) 배아와 같이 배아에서 유래한 내세포집단 (ICM) 세포의 생체외 또는 시험관내 부착 및 생장을 뒷받침한다. 본원에 기술된 재료 및 방법은 따라서 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 유도 및 유지시키고, 선택적으로 원하는 유전자 특징을 가진 착상 전 배아의 증배 및/또는 아이블라스토이드 구조체의 생산과 같은 육종 프로그램에 이용하고, 시험관내 육종 프로그램을 위한 원시 생식 세포 및/또는 배우체를 유도하고, 수의학적 생물제제 및 치료제를 개발 및 전달하는데 유용하다. 원하는 유전자 특징은 유전자 변형에 의해 또는 천연적인 과정에 의해 생길 수 있다.
- [0079] 이에, 일 측면에서, 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 유도하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 그 방법은 다음을 포함한다:
- [0080] 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 포함하는 투명대 (ZP)-프리 보바인 배아를 제공하는 단계;
- [0081] ZP-프리 보바인 배아를 세포의 매트릭스 (ECM)-코팅 기관과 접촉시키는 단계로서, ECM-코팅 기관이 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 기관 표면을 포함하는 기관과 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 ECM 층을 포함하는, 단계; 및
- [0082] ZP-프리 보바인 배아를 생장 배지의 존재 하에 배양하여, ZP-프리 보바인 배아가 ECM-코팅 기관에 부착되어 유도된 나이브 보바인 배아 줄기 세포를 포함하는 내세포집단 (ICM)의 증식을 유도하는 단계.
- [0083] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "나이브 배아 줄기 세포"는 5일 또는 6일 보바인 배아 등의 상실배 단계의 배아 세포의 분자 특징들을 실질적으로 유지하고, 여전히 미분화된 상태인, 배아 줄기 세포를 지칭하기 위해 사용된다. 나이브 배아 줄기 세포는 배반포 (예, 7일 배아)의 내세포집단 (ICM)에서 발견될 수 있다. 나이브 배아 줄기 세포는 완전한 유기체로 발달할 수 있거나 및/또는 성체 조직 및/또는 세포 타입의 충분한 보완물 (full complement)로 생장할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 나이브 배아 줄기 세포는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPS C)와는 반대로, 외인성으로 발현된 만능성 인자 없이 자가-재생의 미분화된 상태로 유도되어 유지될 수 있다. 마찬가지로, 용어 "나이브 보바인 배아 줄기 세포"는 보바인 기원의 나이브 배아 줄기 세포를 지칭한다.
- [0084] 나이브 보바인 배아 줄기 세포와 같은 나이브 배아 줄기 세포는 예를 들어, 배아의 배아 세포, 예를 들어 상실배 (4기); 배반포 (5기); 확장 중 배반포 (6기); 확장된 배반포 (7기); 부화 중 배반포 (8기) 또는 부화된 배반포 (9기) 등의, 충분히 미-분화된 상태의 조직으로부터 유래할 수 있다. 일 구현예에서, 나이브 보바인 배아 줄기 세포는 3일-8일 보바인 배아, 선택적으로 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 8일 보바인 배아 또는 5-7일 보바인 배아로부터 유래할 수 있다. 일 구현예에서, 보바인 배아는 상실배 (4기); 배반포 (5기); 확장 중 배반포 (6기); 확장된 배반포 (7기); 부화 중 배반포 (8기) 또는 부화된 배반포 (9기)이다. 일 구현예에서, 보바인 배아는 3일-7일 배아, 선택적으로 5-7일 배아 또는 6-7일 배아이다. 일 구현예에서, 배아는 착상 전 배아이다. 일 구현예에서, 배아는 기존에 냉동한 및/또는 생검한 배아이다. 일 구현예에서, 배아는 유전자 변형된다. 일 구현예에서, 배아는 하나 이상의 바이오퍼마에 대한 유전자 검사를 기반으로 선택한다.
- [0085] "유전자 변형 배아"는 배아 세포의 게놈 DNA가 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하도록 및/또는 하나 이상의 내인성 유전자 또는 유전자 산물의 발현 또는 기능 활성화에 영향을 미치는 유전자 간 영역 (intergenic region) 또는 내인성 유전자에 돌연변이(들)를 도입하도록 조작된, 배아를 지칭한다. 보바인 배아에서 성공적인 유전자 변형의 예로는 미세주입법 (U.S. 7,067,713) 및 렌티바이러스 감염 (Park, 2007)에 의한 전이유전자 도입, 그리고 가장 최근에는 아연 핑거 뉴클레아제, 전사 활성화제 유사 작동자 뉴클레아제 (TALEN) 및 CRISPR/Cas

(clustered regularly interspaced short palindromic repeat/ CRISPR associated gene) 시스템 등의 게놈 에디터 및 형질감염을 이용한 게놈 편집 (Bishop and Van Eenennaam, 2020) 등이 있다. 유전자 변형에서 통상적인 보바인 표적은 밀크 단백질 유전자, 예를 들어 β -락토글로불린, β -카세인, 미오스타틴, horned/polled, 내열성을 개선하기 위한 슬리크 헤어코트를 부여하는 프로락틴 수용체 (prolactin receptor conferring a slick haircoat for improving heat tolerance), 및 질환 감수성 또는 회복력에 참여하는 다양한 유전자이다 (Wang et al., 2022).

- [0086] 마찬가지로, "유전자 변형 세포"는 세포의 게놈 DNA가 하나 이상의 외인성 유전자를 발현하거나 및/또는 하나 이상의 내인성 유전자 또는 유전자 산물의 발현 또는 기능적인 활성화에 영향을 미치는 내인성 유전자 또는 유전자 간 영역에 돌연변이(들)를 도입하도록 조작된, 세포를 지칭한다.
- [0087] 투명대 (ZP)는 배아 세포가 배양 기관에 부착하지 못하게 방지한다. 즉, 일 구현예에서, 배아의 ZP는 층상 ECM-코팅 기관 및/또는 생장 배지와와의 접촉 전 제거된다. ZP-프리 배아는 임의의 적절한 방법을 이용해 제공되거나 또는 수득할 수 있다. 예를 들어, ZP는 효소적, 화학적 및/또는 기계적 수단을 이용해 박형화 하거나 및/또는 파괴할 수 있으며, 그런 후 기계적 조작을 통해 배아에서 분리해 ZP-프리 배아를 수득할 수 있다. ZP를 박형화 하거나 및/또는 파괴하기에 적합한 효소적 또는 화학적 수단으로는 예를 들어 프로나제와 같은 프로테아제 또는 산성화된 Tyrode 용액의 이용을 포함한다. ZP를 파괴하기 적합한 기계적 방법은 예를 들어 마이크로블레이드, 마이크로파이펫, 마이크로니들 또는 레이저의 사용을 포함한다. 파괴된 ZP는 예를 들어 파이펫팅과 같은 교반, 볼텍싱 또는 마이크로파이펫 또는 마이크로니들을 이용한 직접 조작에 의해 배아로부터 분리할 수 있다.
- [0088] 일 구현예에서, ZP-프리 배아는 효소-보조성 ZP 제거에 의해 수득한다. 실시예에 기술된 바와 같이, 상실배 (6일) 보바인 배아에 프로테아제를 처리한 다음 ZP를 기계적으로 파괴 및 분리함으로써, 본원에 기술된 바와 같이 나이트 배아 줄기 세포를 유도하기에 적절한 ZP-프리 배아가 수득된다.
- [0089] 통상적인 배아 생검 기법은 예를 들어 마이크로블레이드를 이용해 ZP를 파괴한다. 즉, 일 구현예에서, ZP-프리 배아는 생검 배아로부터 수득한다.
- [0090] 배아에서 요망하는 유전자 특징은 감수분열, 돌연변이 및 유전자 이동과 같은 과정의 결과로 생길 수 있으며, 이는 천연적으로 또는 유전자 변형에 의해 발생할 수 있다. 이에, 일 구현예에서, ZP-프리 배아는 유전자 변형 배아로부터 수득된다.
- [0091] ZP-프리 보바인 배아가 수득되는 배아는 신선한 것이거나 또는 이전에 냉동한 것일 수 있으며, 선택적으로 생검-냉동 배아로부터 수득될 수 있다. 일 구현예에서, 배아는 유전자 검사한 배아 (genetically tested embryo)이다.
- [0092] 일 구현예에서, 보바인 배아는 재구성된 이배체 배아이다. 재구성된 이배체 배아는 예를 들어 Smith et al., WO 2020/168422에 기술되어 있으며, 이 문헌의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본원에 포함된다.
- [0093] 기결정된 게놈을 가진 이배체 배아는 양친 배아를 스크리닝 및 선별한 안드로젠성 (androgenetic) 및 단성생식성 (parthenogenetic) 배아 반수체 세포를 재구성함으로써 시험관내에서 구축할 수 있다 (Smith et al., WO 2020/168422). 재구성된 이배체 배아의 게놈은 생산 형질 (예, 밀크, 지방, 단백질, 지방%, 단백질%, 밀크 단백질 변이체 조성물.g. A2A2 밀크), 육질 형질, 생장 형질, 건강 형질 (예, 체세포 점수, 유방염 내성, 면역 반응, 생존율, 질환 내성), 생식 형질 (예, 임신율, 수정율), 분만 형질 (예, 분만 용이성, 1차 수정까지 분만 (calving to first insemination), 사산), 형태 형질 (예, 뿔 절단 형질 (polled trait), 젖 및 유두 형질, 발 및 다리 형질, 신체 형질, 치수 형질 (dimension trait)), 효율 형질 (예, 사료 효율성 형질, 작업성, 수명, 생산 수명), 새로운 형질 (예, 로봇 착유 형질 (robotic milking trait), 내열성, 활동 형질 및 행동 형질), 및 복합 지수 형질 (composite index trait)(예, LPI (Life Production Index), TPI (Total Production Index), 및 다양한 유해 대립유전자 및 일배체형의 결핍 (예, 왜소증, 노새발, 단척증, 시트룰린혈증, 보바인 백혈구 유착 결핍증)과 같은 유전자 또는 게놈 특징들에 대한 대규모 보안을 위한 엄격한 유전자 척도를 충족하는, 형질, 일배체형 또는 대립유전자의 고유한 조합을 가지도록 구축될 수 있다.
- [0094] 배양 중인 대부분의 세포 (기질 유래 세포는 제외)는 조직 배양 디쉬에서와 같이 시험관내에서 부착 및 증식하기 위해서는 지지층을 필요로 한다. 이러한 지지층은 통상적으로 피더 세포 시스템으로 알려진, (디쉬 상에 바로 부착된) 기질 세포로부터 만들어질 수 있다. 배아 줄기 세포를 배양하는 데에는 마우스 배아 섬유모세포 (MEF) 피더 시스템이 흔히 이용된다. 그러나, 피더 시스템 이용의 한가지 단점은, 마우스와는 다른 종으로부터 유래한 배아 줄기 세포와 같은 세포를 MEF 상에서 배양할 경우, 종-교차 오염이 발생할 가능성이 있다는

것이다. 다른 옵션은 또한 피더-프리 시스템으로 알려진, 지지층으로 단백질 매트릭스를 이용하는 방식이다.

- [0095] Boggliotti 등 (2018)은 낮은 부착율을 보완하기 위해 배아를 배양 디쉬 바닥에 바늘을 사용해 누르는, 보마인 감작된 배아 줄기 세포를 배양하기 위한 피더 시스템의 이용을 기술하고 있다. 그러나, 이러한 기계적인 외력 적용이 세포를 손상시킬 수 있다. 대조적으로, 본원에 기술된 구현에는 세포를 배양 디쉬에 기계적으로 누르지 않고도 거의 분화되지 않은 나이트 배아 줄기 세포의 부착 및 생장물 형성을 달성한다. 일 구현예에서, 본원에 기술된 방법 및 제품은 나이트 배아 줄기 세포를 유도하기 위한 피더-프리 시스템을 제공한다.
- [0096] 예를 들어, 도 5에 나타난 바와 같이, LbL (Layer-by-Layer) 프로토콜을 이용해 구축된, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 결합 층을 가진, ECM-코팅 기관은, Matrigel (Corning) 또는 Geltrex (Invitrogen) 등의 Engelbreth-Holm-Swarm 무라인 육종 세포에서 추출한 ECM을 이용한 대조군 기관과 비교해, 더 우수하고 더 안정적인 부착을뿐 아니라 TE (영양외배엽 세포) 및 ICM (내세포집단) 생장을 나타내었다.
- [0097] 이에, 일 구현예에서, 양으로 하전된 표면; 기관의 음으로 하전된 표면과 접촉된 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층; 및 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층과 접촉된 음으로 하전된 ECM 층을 포함하는 기관을 제공한다.
- [0098] 또한, 본원에 기술된 바와 같이 배아 부착 및 생장물에 적합한 ECM-코팅 기관의 제조 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 본 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0099] a) 음으로 하전된 표면을 포함하는 기관을 제공하는 단계,
- [0100] b) 음으로 하전된 표면을 생체적합한 폴리머를 포함하는 제1 용액과 접촉시키는 단계로서, 생체적합한 폴리머가 양으로 하전된 것인, 단계;
- [0101] c) 기관을 제1 용액과 접촉시켜 인큐베이션하여, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층을 기관의 음으로 하전된 표면 위에 적층하는 단계;
- [0102] d) 제1 용액을 제거하고, 선택적으로 기관을 세척하는 단계;
- [0103] e) 기관을 세포의 매트릭스 (ECM)를 포함하는 제2 용액과 접촉시키는 단계로서, ECM이 음으로 하전된 것인, 단계; 및
- [0104] f) 기관을 제2 용액과 접촉시켜 인큐베이션하여, 음으로 하전된 ECM의 층을 양으로 하전된 생체적합한 폴리머의 층 위에 적층하는 단계.
- [0105] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기관"은 일반적으로 물질들의 층(들)이 적층 또는 부착되는 물리적인 표면을 의미한다. 기관은 단단하거나 또는 유연할 수 있으며, 임의의 적절한 소재, 예를 들어, 폴리스티렌과 같은 플라스틱으로 제작될 수 있다. 기관은 이를 친수성으로 만들도록 처리하거나 및/또는 음 전하와 같은 전하가 표면에 부여될 수 있다. 선택적으로, 기관은 플라즈마 처리된다. 일 구현예에서, 기관은 플라즈마 처리된 폴리스티렌 (조직 배양 플라스틱으로도 알려져 있음)이다.
- [0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생체적합한 폴리머"는 일반적으로 살아있는 조직 또는 세포와 친화적인 폴리머, 예를 들어 무독성이며, 예를 들어 세포의 생존, 생장, 증식 및/또는 기타 생물학적 활성에 부적절한 영향을 미치지 않는 폴리머를 의미한다. 생체적합한 폴리머는 이러한 활성에 대해 불활성일 수 있거나, 및/또는 원하는 활성을 뒷받침할 수 있다. 생체적합한 폴리머는 자연 생성 폴리머일 수 있거나, 자연 생성 폴리머로부터 제조될 수 있거나, 또는 요망하는 특성을 가진 합성 폴리머일 수 있다. 적절한 생체적합한 폴리머는 기관을 폴리머로 코팅하기 위해 이용되는 조건 하에 기관의 표면에 폴리머를 적층 및/또는 부착시키게 되는 특성을 가진다. 폴리머의 적층 또는 부착은 예를 들어 정전기 상호작용, 수소 결합 또는 임의의 기타 적절한 유형의 상호작용(들)을 통해 이루어질 수 있다. 즉, 생체적합한 폴리머의 적절한 특성으로는 예를 들어 코팅시 적용되는 용액의 pH에서 양전하와 같이 전하를 포함할 수 있다. 폴리머와 기관 간의 상호작용은 후속적인 세척 및 ECM 코팅 단계시 적용되는 조건 (예, pH) 뿐 아니라 세포 배양시 적용되는 조건 (예, 생리학적 pH) 하에 유지되어야 한다. 적절한 폴리머로는 젤라틴 타입 A (예, 산-보존 (acid-cured) 조직으로부터 유래)를 포함한다. 즉, 일 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 젤라틴 타입 A, 선택적으로 돼지 젤라틴 타입 A이다.
- [0107] 당해 기술 분야에서 이해되는 바와 같이, 용어 "인큐베이션한다" 또는 "인큐베이션"은 예를 들어 기관, 물질, 조성물 등을 특정 온도에서 또는 온도 범위에서 일정 기간 동안 유지하는 것을 의미한다.
- [0108] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "생리학적 pH"는 pH 약 7.1 내지 약 7.6, 선택적으로 약 7.15 내지 약 7.45, 약

7.2 내지 약 7.4, 약 7.25 내지 약 7.35, 또는 약 7.3을 의미한다.

[0109] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "세포외 매트릭스" 또는 "ECM"은 일반적으로 예를 들어, 생체외 또는 시험관내에서 배양되는 세포 등의 세포의 부착을 제공하고 이의 성장 및 증식을 뒷받침하는, 예를 들어 단백질, 글리코사미노글리칸 (GAG), 및/또는 프로테오글리칸과 같은, 하나 이상의 거대분자 구성성분을 포함하는 생체적합한 매트릭스를 의미한다. 일반적인 ECM 구성성분으로는 라미닌 (laminin), 콜라겐 (예, 콜라겐 I-XIV), 파이브로넥틴, 비트로넥틴 (vitronectin), 엔탁틴 (entactin)/니도젠 (nidogen), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 및/또는 이들의 하나 이상의 기능성 변이체 중 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이, ECM은 통상적으로 EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종 세포로부터 단리된 것과 같은 기저 막 추출물을 포함하며, 이하 "EHS-ECM"으로 언급된다 (예를 들어, 상품명 Matrigel™ (Corning) 및 Geltrex™ (Thermo Fisher)으로 시판됨). 일 구현예에서, EHS-ECM은 예를 들어 라미닌, 콜라겐 IV, 엔탁틴/니도젠 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸을 포함할 수 있다. 대안적으로, 여러가지 조성 및/또는 정제된 구성성분 (예, FN)을 가진 다른 ECM 소스, 및/또는 합성 ECM-유사 기관 (예, RGD 펩타이드 포함) 역시 필요할 경우 코팅 방법에 이용할 수 있다. 당업자에게 이해되는 바와 같이, 적합한 ECM 구성성분(들)의 선택은 비-제한적으로 세포 타입, 분화 단계 및 기타 실험 매개변수 등의 다수의 인자에 따라 결정될 것이다. 예를 들어, EHS-ECM은 보바인 배아를 배양 (예, 부착 및 성장)하는데 적합한 것으로 본원에서 입증되었다. 이에, 일 구현예에서, ECM은 EHS-ECM, 선택적으로 Matrigel 또는 Geltrex이다.

[0110] 본원에 나타난 바와 같이, 보바인 배아의 부착 및 성장물 형성은 배아를 배양하는 성장 배지의 조성예 의해 영향을 받는다. 성장 배지는 예를 들어 기본 배지와, 소형 분자, 성장인자 및/또는 영양분 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 적합한 기본 배지는 당업자가 쉽게 결정할 수 있으며, 비-제한적으로 DMEM/F12, advanced DMEM/F12 및 신경기본 배지 등이 있다. 적합한 보충제 역시 당업자가 쉽게 결정할 수 있으며, 비-제한적으로 MEM 비-필수 아미노산, L-글루타민, Glutamax, 아스코르브산, 인슐린, BSA (fraction V), β -머캅토에탄올 및 페니실린/스트렙토마이신 등이 있다. 본원은 일 측면에서 ICM의 부착 및 성장을 비롯하여 나이트 배아 줄기 세포를 유도 및 유지시키기 위해 이용가능한 성장 배지 구성성분을 제공한다. 일 구현예에서, 성장 배지는 기본 배지 및/또는 보충제뿐 아니라 하나 이상의 성장 배지 구성성분을 포함한다. 일 구현예에서, 성장 배지는 B27 보충제 및 N2 보충제를 포함하는, 선택적으로 약 1% B27 보충제 및 약 0.5% N2 보충제를 포함하는 N2B27 구성성분; Wnt 활성화제 구성성분, 선택적으로 CHIR99021, BIO, CHIR-98014, LY2090314 또는 IM-12; Wnt 저해제 구성성분, 선택적으로 XAV939, IWR-1 또는 IWP-2; MEK/ERK 저해제 구성성분, 선택적으로 PD0325901, 라보세르티닙, GSK1120212, MEK162, PD184352, 트라메티닙, LY3214996 또는 울리세르티닙; ROCK 저해제 구성성분, 선택적으로 Y27632, 티아조비빈 또는 블레비스타틴; LIF 구성성분, 선택적으로 인간 LIF; PKC 저해제, 선택적으로 Go6983, Go6976, LY317615, LY333531, PKC412, GSK690693, 소트라스타우린, 스타우로스포린 또는 비스인돌릴말레이미드; 및 인슐린 구성성분, 선택적으로 인슐린 중 하나 이상을 포함한다. 선택적으로, 성장 배지는 N2B27, CHIR99021 (Wnt 활성화제), XAV939 (Wnt 저해제), PD0325901 (MEK/ERK 저해제), 라보세르티닙 (ERK 특이적인 저해제) Go6983 (PKC 저해제), Y27362 (ROCK 저해제) 및/또는 LIF 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 성장 배지는 액티빈 A 구성성분, 선택적으로 인간 액티빈 A를 추가로 포함한다.

[0111] II. 대상 제품 및 조성물

[0112] 일 측면에서 본 발명은 나이트 보바인 배아 줄기 세포의 유도 및 배양에 유용한 대상 제품 및 조성물을 제공한다.

[0113] 예를 들어, 일 구현예에서 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 기관 표면을 포함하는 기관과, 양으로 하전된 생체적합한 폴리머 층에 인접한 음으로 하전된 ECM 층을 포함하는, ECM-코팅 기관을 제공한다. 일 구현예에서, 생체적합한 폴리머는 타입 A 젤라틴이다. 일 구현예에서, ECM은 EHS-ECM을 포함한다. 일 구현예에서, 기관은 폴리스티렌과 같이 세포 배양에 적합한 플라스틱 기관이다.

[0114] 또한, 본원에 기술된 바와 같이, 보바인 배아의 부착, 성장물 형성을 촉진하거나 및/또는 나이트 보바인 배아 줄기 세포를 유도하는데 적합한 배지 제형을 제공한다.

[0115] 일 구현예에서, 성장 배지는 기본 배지와 본원에서 식별되는 하나 이상의 구성성분을 포함한다. 예를 들어, 일 구현예에서, 성장 배지는 N2B27 구성성분, Wnt 활성화제 구성성분, Wnt 저해제 구성성분, MEK/ERK 저해제 구성성분, ROCK 저해제 구성성분, LIF 구성성분, PKC 저해제 및 인슐린 구성성분 중 하나 이상을 포함한다. 일 구현예에서, 성장 배지는 N2B27 구성성분, Wnt 활성화제 구성성분, Wnt 저해제 구성성분, MEK/ERK 저해제 구성성분, ROCK 저해제 구성성분, LIF 구성성분, PKC 저해제 및 인슐린 구성성분을 포함한다.

- [0116] 일 구현예에서, N2B27 구성성분은 B27 보충제 및 N2 보충제를 포함하고, 선택적으로 약 1% B27 보충제 및 약 0.5% N2 보충제를 포함한다.
- [0117] 일 구현예에서, Wnt 활성제 구성성분은 CHIR99021, BIO, CHIR-98014, LY2090314 또는 IM-12를 포함한다. 선택적으로, Wnt 활성제 구성성분은 CHIR99021을, 선택적으로 약 0.1 μM 내지 약 5 μM 의 농도, 선택적으로 약 1 μM , 내지 약 3 μM , 선택적으로 약 1 μM , 약 2 μM 또는 약 3 μM 의 농도로 포함한다.
- [0118] 일 구현예에서, Wnt 저해제 구성성분은 XAV939, IWR-1 또는 IWP-2를 포함한다. 선택적으로, Wnt 저해제 구성성분은 XAV939를, 선택적으로 약 0.2 μM 내지 약 10 μM , 선택적으로 약 1 μM 내지 약 5 μM , 선택적으로 약 2 μM 의 농도로 포함한다. 선택적으로, Wnt 저해제 구성성분은 IWR-1을, 선택적으로 약 0.25 μM 내지 약 10 μM , 선택적으로 약 1 μM 내지 약 5 μM , 선택적으로 약 2.5 μM 의 농도로 포함한다.
- [0119] 일 구현예에서, MEK/ERK 저해제 구성성분은 PD0325901, 라보세르티닙, GSK1120212, MEK162, PD184352, 트라메티닙, LY3214996 또는 울리세르티닙을 포함한다. 선택적으로, MEK/ERK 저해제 구성성분은 PD0325901 또는 라보세르티닙을 포함한다. 선택적으로, MEK/ERK 저해제 구성성분은 PD0325901을 약 0.05 μM 내지 약 5 μM , 선택적으로 약 0.1 μM 내지 약 2 μM , 선택적으로 약 1 μM 의 농도로 포함한다. 선택적으로, MEK/ERK 저해제 구성성분은 라보세르티닙을 약 0.25 μM 내지 약 10 μM , 선택적으로 약 1 μM 내지 약 5 μM , 선택적으로 약 2.5 μM 농도로 포함한다.
- [0120] 일 구현예에서, ROCK 저해제 구성성분은 Y27632 티아조비딘 또는 블레비스타틴을 포함한다. 선택적으로, ROCK 저해제 구성성분은 Y27632를, 선택적으로 약 0.5 μM 내지 약 20 μM , 선택적으로 약 5 μM 내지 약 10 μM , 선택적으로 약 5 μM 또는 약 10 μM 의 농도로 포함한다.
- [0121] 일 구현예에서, LIF 구성성분은 인간 LIF를, 선택적으로 약 1 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 선택적으로 약 5 ng/ml 내지 약 100 ng/ml, 선택적으로 약 5 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 20 ng/ml 또는 약 100 ng/ml의 농도로 포함한다.
- [0122] 일 구현예에서, 액티빈 A는 인간 액티빈 A를, 선택적으로 약 1 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 선택적으로 약 5 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 선택적으로 약 10 ng/ml 또는 약 20 ng/ml의 농도로 포함한다.
- [0123] 일 구현예에서, PKC 저해제는 Go6983, Go6976, LY317615, LY333531, PKC412, GSK690693, 소트라스타우린, 스타우로스포린 또는 비스인돌릴말레이미드를 포함한다. 선택적으로, PKC 저해제는 Go6983을, 선택적으로 약 0.2 μM 내지 약 25 μM , 선택적으로 약 2 μM 내지 약 2.5 μM , 선택적으로 약 2 μM 또는 약 2.5 μM 의 농도로 포함한다.
- [0124] 일 구현예에서, 인슐린 구성성분은 인슐린 펩타이드를, 선택적으로 약 2 $\mu\text{g/ml}$ 내지 약 200 $\mu\text{g/ml}$, 선택적으로 약 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함한다.
- [0125] 또한, 배아를 해동한 후 회복시키는데 적합한 제형을 제공한다. 도 8 및 9에 나타난 바와 같이, 본원에 기술된 바와 같이 제형화된 회복 배지로 처리된 배아는 대조군과 비교해 더 빠른 배아 재-확장에 의해 관찰된 바와 같이, 더 빠른 회복 및 더 높은 유도 효율성 (derivation efficiency)을 보인다. 회복 배지로 처리된 배아는 또한 대조군과 비교해 더 크고, 더 선명한 ICM을 가진다.
- [0126] 일 구현예에서, 회복 배지는 글리코젠 신타제 키나제 3 (GSK-3) 저해제, MEK/ERK 키나제 저해제 및 ROCK 저해제를 포함한다. 적합한 GSK-3 저해제로는 예를 들어 CHIR99021을 포함한다. 적합한 MEK/ERK 저해제로는 예를 들어 PD0325901을 포함한다. 적합한 ROCK 저해제로는 예를 들어 Y27632를 포함한다. 일 구현예에서, 회복 배지는 CHIR99021을, 선택적으로 0.1 μM 내지 약 5 μM , 선택적으로 약 1 μM 내지 약 3 μM , 선택적으로 약 1 μM , 약 2 μM 또는 약 3 μM 의 농도로; PD0325901을, 선택적으로 약 0.05 μM 내지 약 5 μM , 선택적으로 약 0.1 μM 내지 약 2 μM 또는 약 1 μM 의 농도로; 그리고 Y27632를, 선택적으로 약 0.5 μM 내지 약 20 μM , 선택적으로 약 5 μM 내지 약 10 μM 또는 약 10 μM 의 농도로 포함한다.
- [0127] 또한, 본원에 기술된 바와 같이 ECM-코팅 기관, 생장 배지 및/또는 회복 배지 중 하나 이상을 포함하는 키트를 제공한다. 일 구현예에서, ECM-코팅 기관, 생장 배지 및/또는 회복 배지는 별개의 용기에서 포장된다.
- [0128] 일 측면은 본원에 기술된 방법을 이용하여 유도되는 나이브 보바인 줄기 세포를 포함한다. 일 구현예에서, 나이브 보바인 줄기 세포는 유전자 변형된 줄기 세포이다.

[0129] **III. 용도**

[0130] 또한, 배양 중인 배아의 부착, 배아 세포의 성장 및/또는 나이브 배아 줄기 세포의 유도를 뒷받침하기 위한, 본원에 기술된 제품, 조성물 또는 키트의 용도를 제공한다.

[0131] 예를 들어, 일 구현예는, 배아 및/또는 배아로부터 유래한 세포를 배양하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 ECM-코팅 기관의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, ECM-코팅 기관은 배아의 부착 및/또는 성장뿐 아니라 나이브 배아 줄기 세포, 선택적으로 나이브 보바인 배아 줄기 세포의 유도를 촉진하는데 유용하다.

[0132] 다른 구현예에서, 배아 및/또는 배아로부터 유래한 세포를 배양하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 성장 배지의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 성장 배지는 배아의 부착 및/또는 성장뿐 아니라 나이브 배아 줄기 세포, 선택적으로 나이브 보바인 배아 줄기 세포의 유도를 촉진하는데 유용하다. 일 구현예에서, 성장 배지는 본원에 기술된 바와 같이 ECM-코팅 기관과 조합 사용하기 위한 것이다.

[0133] 다른 구현예에서, 배아, 선택적으로 보바인 배아, 선택적으로 재구성된 이배체 보바인 배아를 처리하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 회복 배지 또는 적응 배지의 용도를 제공한다. 일 구현예에서, 회복 배지는 신선한 배아 또는 이전에 생검 및/또는 냉동한 배아를 처리하는데 이용가능하다. 회복 배지는 또한 배아에 회복 배지가 유익할 수 있는, 예를 들어 ZP 제거, 해동, 생검, 유전자 편집 또는 세포 유도 등의 공정에 유용하다.

[0134] 추가적인 측면은 육종 계획 또는 유전자 개량 프로그램에 또는 원하는 유전자 특징을 가진 착상 전 배아를 증폭시키거나, 시험관내 육종 프로그램용 원시 생식 세포 및/또는 배우체를 유도하거나 및/또는 수의학적 생물체제 및 치료제를 개발 및 전달하기 위한, 본원에 기술된 방법을 이용하여 유래한 나이브 보바인 줄기 세포의 용도를 포함한다.

[0135] 하기 비-제한적인 실시예들은 본 발명을 예시한다:

[0136] **실시예**

[0137] 실시예 1. 코팅 물질의 최적화

[0138] 본 실시예에서는 코팅 물질로서 세포외 매트릭스 코팅 물질 3가지를 검사하였다: 젤라틴 타입 A (Sigma, G1890), Geltrex™ (Thermo Fisher, A1413301) 및 Matrigel™ (Corning, 354277). 구체적으로 언급되지 않은 한, 실시예에서 이용한 EHS-ECM (Extra Cellular Matrix)은 Geltrex 및/또는 Matrigel을 지칭한다.

[0139] 코팅 프로토콜은 다음과 같다:

[0140] 1. 100x 농축 용액으로서 제공된, 코팅 용액 (0.1% 젤라틴 또는 여러가지 농도의 EHS-ECM) 50 μ l 액적 4개를 Nunc 표면 35 mm² 세포 배양 디쉬에 도포하였다 (도 1 참조).

[0141] 2. 코팅 기관을 가습 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 38.5°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0142] 3. 인큐베이션한 후 과량의 코팅 용액은 제거하고, 세포 배양 배지 50 μ l를 코팅된 영역에 도포하고, 미네랄 오일 4 ml로 덮은 후 추가의 배지 50 μ g를 각각의 액적에 첨가하였다.

[0143] 4. 배지를 가습 5% O₂, 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 38.5°C에서 2시간 동안 평형화하였다.

[0144] 5. ZP 제거하고 배아를 적응시킨 후, 배아 1개를 1 마이크로 배양 액적에 배치하여, 성장 유도 (outgrowth derivation)를 개시하였다.

[0145] 6. 48시간 동안 성장시킨 후 1차 부착율을 결정하였으며, 1차 부착 결정 후 바로 1차 배지 교체를 수행하였다.

[0146] 7. 부착율 및 성장율을 매일 평가하였으며, 매일 평가 후 바로 배지를 교체하였다.

[0147] 결과

[0148] 도 1에 나타난 바와 같이, 젤라틴 코팅과 비교해 EHS-ECM 코팅 (Geltrex)에서 더 높은 부착율이 관찰되었으며, 성장물 형성율에는 차이가 관찰되지 않았다.

[0149] EHS-ECM을 여러 농도로 이용하였을 경우 성장 효율에는 차이가 관찰되지 않았다. 전체 부착율이 좋지 않아, 성장 효율이 낮았다.

[0150] 실시예 2. 메쉬를 이용한 흡 표면 코팅

- [0151] 코팅 용액으로 얇은 층으로 제작한 평탄한 표면은 배아를 부착시키기 위한 적절한 '영역'을 제공하지 못할 것으로 가정되었다. 부착율을 개선할 수 있는 지를 검사하기 위해, 메쉬 막에 젤라틴 또는 EHS-ECM 코팅을 코팅하여 홈 표면 (grooved surface)을 준비하였다.
- [0152] 디쉬 제작 프로토콜은 다음과 같다:
- [0153] 1. 셀 스트레이너 막 (30 μm 포어 크기)를 1 cm^2 크기로 절단하였다.
- [0154] 2. 자른 막을 35 mm² 디쉬에 배치하였다.
- [0155] 3. 코팅 물질 (0.5% 젤라틴 또는 1x EHS-ECM) 50 μg 를 자른 막에 적용하였다. 1x EHS-ECM가 실시예 1에서 부착율이 가장 우수하였으므로, 본 실험에서는 이를 선택하였다.
- [0156] 4. 코팅 물질을 가습 인큐베이터에 넣어 38.5°C에서 1시간 동안 중합되게 둔 다음 작업대에서 (충류 후드 하) 실온에서 30분간 건조시켰다.
- [0157] 5. 코팅된 표면을 20분간 UV 살균 처리하였다.
- [0158] 6. 표면 제작된 디쉬를 얼음 위에 놓고, 막을 조심스럽게 제거하였다.
- [0159] **결과**
- [0160] 도 2에 나타난 바와 같이, 이 프로토콜을 이용해 홈 디쉬 표면을 쉽게 제조할 수 있었다. 그러나, 배양 배지를 첨가한 후 홈이 빠르게 붕괴되었다.
- [0161] 실시예 3. LbL (Layer-by-Layer) 프로토콜을 이용해 제작한 ECM-코팅 기관
- [0162] 신선한 배아의 경우 EHS-ECM을 이용할 경우 중간 정도의 부착율이 달성되었지만, 생장은 특히 냉동-해동 배아의 경우에는 유도하기 어려웠다. 실시예 1에 기술된 코팅 프로토콜을 이용해, 배양 액적의 바닥부에서 일부 단백질 파편이 관찰되었다. 단백질 매트릭스가 배양 디쉬 표면에서 탈착된 것으로, 그리고 추가적으로 단백질 매트릭스가 배양 디쉬에 충분히 강하게 부착되지 않은 것으로 추측하였다. 이 문제를 다루기 위해, 코팅 프로토콜을 층별 방식으로 수정하였다.
- [0163] 실시예 1 및 2에서 이용한 Nunc™ delta (플라즈마 처리된) 폴리스티렌 디쉬는 음으로 하전된 표면을 제공한다 (예를 들어 도 3 및 4 참조). 일반적인 ECM 구성성분, 예를 들어 기저 막 추출물 역시 코팅시 적용되는 조건 및 /또는 생리학적 pH에서 음 전하를 띤다. 예를 들어, Geltrex (A14133, Thermo Fisher)은, 코팅시 사용되는 희석제 완충제의 pH인 pH 7.2에서 음 전하를 띤다 (EHS-ECM 등전점: 4-5). 단백질 매트릭스 분자는 표면의 -OH 잔기와 수소 결합을 통해 플라즈마 처리된 폴리스티렌 표면에 부착할 수 있다 (Lerman et al., 2018).
- [0164] 그러나, 이들 구성성분 둘다 비슷한 정전하를 가지고 있어, 양쪽 사이드 간의 상호작용이 비교적 약하다. 그래서, 양으로 하전된 물질을 음으로 하전된 양쪽 구성성분 사이에 "정전기적 접착제"로서 배치하는, "Layer-by-Layer" 방식을 조사하였다 (예를 들어 도 4 참조). 젤라틴 타입 A (통상적으로 돼지로부터 추출)는 등전점이 7-9이고, 젤라틴 타입 B (통상적으로 보마인으로 부터 추출)는 등전점이 4.8-5.1이다. 따라서, 젤라틴 타입 A가 pH 7.2에서 양으로 하전되므로, Layer-by-Layer 프로토콜에서 "정전기 접착제"로서 사용하기 적합한 후보물질이다. 아울러, 젤라틴은 정전기적 안정성뿐 아니라 EHS-ECM과 비슷하게 다양한 단백질 모티프를 제공할 수 있어, 젤라틴 층과 EHS-ECM 층 간의 생물학적 상호작용을 강화할 수 있다.
- [0165] LbL ECM 코팅 기관의 제조 프로토콜은 다음과 같다:
- [0166] 1. 0.1% 젤라틴 타입 A (DMEM/F12 기본 배지로 희석) 40 μg 을 Nunc 35 mm² 세포 배양 디쉬의 표면에 적용해 소형 액적을 만들었다.
- [0167] 2. 디쉬를 가습 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 38.5°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0168] 3. 인큐베이션한 후, 젤라틴 용액을 제거한 다음, DPBS 50 μg 을 Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 와 함께 첨가하여 과량의 젤라틴을 액적으로부터 세척한 후 흡입에 의해 제거하였다. 세척 단계를 2회 더 반복하였다.
- [0169] 4. 1x EHS-ECM 50 μg 을 젤라틴 코팅된 영역에 적용한 다음 가습 5% CO₂ 인큐베이터에 넣어 38.5°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

- [0170] 5. 인큐베이션한 후, EHS-ECM 용액을 제거하고, 배지 50 μg 을 적용하였으며; 액적을 미네랄 오일 4 ml로 덮은 다음 추가의 배지 50 μl 를 각 액적에 첨가하였다.
- [0171] 6. 배지를 5% CO_2 인큐베이터에서 2시간 동안 평형화하였다.
- [0172] **결과**
- [0173] 도 5에 나타난 바와 같이, LBL EHS-ECM 코팅 기관을 이용하였을 경우 대조군 조건 (EHS-ECM 단독)과 비교해 배아의 부착이 개선되었으며, 더 안정적이었다. LbL EHS-ECM 코팅 기관의 아용은 또한 배아로부터 성장물을 생산하는 능력을 급격하게 개선하였다. 성장물은 일반적인 EHS-ECM 코팅 기관과 비교해, 더 양호한 ICM 성장을 보였으며, 궁극적으로 배아 줄기 세포를 구축하였다. 또한, 대조군과 비교해 TE 성장에도 개선이 관찰되었다.
- [0174] 실시예 4. 성장물을 배양하기 위한 배아 준비
- [0175] 배반포로도 지칭되는 배아는 투명대 (ZP)를 형성하는 두꺼운 당단백질로 둘러싸여 있다. 배반포는 발생 중에 확장하기 시작해, 궁극적으로 "부화"되고, 배반포가 "껍질"에서 나오게 될 것이다. 시험관내 배양 약 8일차에 일반적으로 부화 중인 배반포와 부화된 배반포를 수득할 수 있다. 그러나, 시험관내 보바인 배아 배양 배지는 7일까지 발생을 효과적으로 뒷받침할 수 있으며, 그 이후에는 배아를 수여체에 이식하거나 또는 냉동해야 한다. 예비 실험에서, ZP가 배아의 부착을 차단하는 것으로 확인되어, 성장물을 배양하기 전 제거해야 한다. 따라서, 신선물의 경우 6일/7일 배아 및/또는 냉동/해동한 경우에는 7일 배아에서 ZP 제거를 시도하고 개선하기 위해 조사를 수행하였다.
- [0176] 신선한 배아에 대한 효소에 기반한 투명대 (ZP)의 효소 분해 프로토콜
- [0177] 효소에 기반한 방식은 ZP를 제거하기 위해 흔히 이용하는 기법이다. 본 프로토콜에서는 프로테아제 (스트렙토마이세스 그리세우스 (*Streptomyces griseus*), Pronase, Sigma P8811)를 0.05 내지 0.5% 농도로 일반적으로 이용하였다. 그러나, 프로테아제는 당단백질 특이 효소가 아니므로, ZP가 완전히 효소 분해되면 배아가 손상될 수 있다.
- [0178] ZP 효소 분해 프로토콜은 다음과 같다:
- [0179] 1. 프로테아제 처리 디쉬를 준비하였다 (도 6 참조).
- [0180] 2. 배아 하나를 배아 배양 배지에서 배아 취급 배지 (Hepes-완충제화된 배지) 액적 1개로 이동시켰다.
- [0181] 3. 배아를 액적 1에서 3까지 연속 이동시켜 세척하였다.
- [0182] 4. 배아를 프로테아제 액적 (검사 농도: 0.05%; 0.1%; 0.25% 또는 0.5%)으로 이동시키고, ZP의 효소적 분해가 관찰될 때까지 (약 2분) 인큐베이션하였다.
- [0183] 5. 프로테아제-처리 배아를, 배아 취급 배지 중의 10% FBS로 준비한 불활성화 배지의 액적 4, 5 및 6으로 이동시켰다.
- [0184] **결과**
- [0185] 도 6에 나타난 바와 같이, 프로테아제에 장기간 노출하면, (어두운 비-투명 세포에 의해 예시되는 바와 같이) 배아가 자체적으로 분해되어, 세포 손상될 수 있다.
- [0186] 상실배 (예, 보바인 6일) 배아는 (ZP가 배반포 확장으로 인해 더 얇아지기 시작하는 확장된 배반포 단계 (예, 보바인 7일)와 비교해) 매우 두꺼운 ZP를 가지고 있어, 완전한 효소 분해는 최저 농도 (<0.1%)에서 가능하지 않았다.
- [0187] 더 높은 농도 (>0.25%)일 경우, 효소가 FBS에 노출된 후 완전히 불활성화되지 않았으며, 그래서 고 농도의 프로테아제가 배아에 부정적인 영향을 미쳤으며, 그 결과 배아가 단일 할구로 완전히 해리되었다.
- [0188] ZP의 효소 분해 시기는 배아마다 매우 다양하였다. 그래서, 표준화된 프로토콜을 확립하기 매우 어려웠다.
- [0189] 신선한 또는 냉동/해동한 경우의 효소-보조성 ZP 제거 프로토콜
- [0190] 7일차 배아에 대한 기존 배아 생검 프로토콜은 ZP를 뚫게 되는 마이크로-블레이드를 사용해 배아 생검을 수행하는 것이다. 생검에 생성된 ZP의 개구부는 ZP로부터 배아의 방출을 촉진한다. 그러나, 이러한 방식은 훨씬 더 두껍고/단단한 ZP로 인해 상실배 단계 (예, 6일)의 배아에는 쉽게 적용할 수 없다. 따라서, 2가지 프로토콜을 조

합해, 상실배 단계의 배아에 대한 "효소-보조성 ZP 제거 프로토콜"을 개발하였다. 간략하게는, 배아에 ZP를 얇고 부드럽게 만들기 위해 충분한 프로테아제로, 배아의 해리나 세포 손상을 유발하지 않으면서, 처리한다. 그 후, ZP가 얇아진 상실배는 이제 마이크로-블레이드를 이용한 일반적인 생검 기법으로 쉽게 처리할 수 있다.

[0191] ZP 효소 분해 프로토콜은 다음과 같다:

[0192] 1. 0.25% 프로테아제가 함유된 프로테아제 디쉬를 (예를 들어, 도 6에 나타난 바와 같이) 준비하였다. 프로테아제 액적은 사용하기 최대 2시간 전에 준비한다.

[0193] 2. 하나 이상의 배아를 배아 배양 배지로부터 배아 취급 배지로 준비된 액적 1로 옮긴다.

[0194] 3. 배아를 액적 1에서 3까지 이동시켜 행군다.

[0195] 4. 배아를 0.25% 프로테아제 액적으로 옮기고, 45초간 인큐베이션하다.

[0196] 5. 처리된 배아를 배아 취급 배지 중의 10% FBS로 제조된 불활성화 배지의 액적 4, 5 및 6으로 이동시킨다.

[0197] 6. ZP 얇아진 배지를 생검 디쉬로 옮긴다.

[0198] 결과

[0199] 효소-보조성 ZP 제거 프로토콜을 이용해 도 7에 나타난 바와 같이 ZP-프리 상실배를 수득할 수 있다.

[0200] 실시예 5. 생검 냉동 배아의 해동 후 품질을 개선하기 위한 조성물

[0201] 육종 용도로서, 냉동한 생검 배아를 유전자 측면에서 식별해 (예, 바이오마커에 대한 스크리닝), 실무자는 원하는 유전자 특징을 가진 것을 선별할 수 있다. 7일 배아를 생검 및 냉동할 수 있지만, 이러한 배아는 신선한 배아와 비교해 더 많은 스트레스에 노출된다. 생검-냉동 배아는 (생검 절차로 인해) ZP가 개방되어 있어, 부드럽게 파이렛팅함으로써 ZP를 쉽게 제거할 수 있다. 그러나, 생검-냉동-해동 배아는 품질이 일반적으로 신선한 배아보다 좋지 않다. 본원에서는, 저해제 3종, 즉 CHIR99021, PD0325901 및 Y27632를 함유한, 해동 후 회복 배지 (본원에서 "2iY" 배지 또는 "회복 배지"로 지칭)를 기술한다. CHIR99021과 PD0325901은 잘 규명되어 있는 저해제로서, 줄기 세포 분야에서 "2i"로도 알려져 있다. 이들 저해제 2종은 나이트 배아 줄기 세포의 전사 인자 활성화에 참여하는 중요한 경로 2가지를 조절한다 (CHIR99021: GSK3의 저해를 통한 Wnt 경로 활성화제, PD0325901: MEK 경로 저해). Y27632는 ROCK 저해제로서, 액틴 필라멘트 안정제이다. 이들 저해제 3종을, 세포 해동 후 스트레스로부터 보호하고 핵심적인 줄기세포 (stemness) 경로를 조절함으로써 빠른 세포 회복을 촉진하는 능력에 대해, 검사하였다. 본원에 나타난 실험들은, 이 프로토콜이 해동 후 배아의 품질을 현저하게 개선해, 보다 효율적인 성장물의 유도를 가능하게 함을, 입증하였다.

[0202] 프로토콜

[0203] 1. 3 μ M CHIR99021 (2520691, PeproTech), 1 μ M PD0325901 (3911091, PeproTech) 및 10 μ M Y27632 (1293823, PeproTech)를 배아 취급 배지 (2iY 배지)에 첨가하였다.

[0204] 2. 해동 디쉬를 2iY 배지 (도 8 참조) 또는 대조군 배아 배양 배지를 이용해 준비하였다.

[0205] 3. 하나 이상의 배아를 프로토콜에 따라 해동하였다.

[0206] 4. 배아를 2iY 배지 또는 대조군 배아 취급 배지에 넣었다.

[0207] 5. 해동 후 즉시 부드럽게 파이렛팅하여 ZP를 제거하였다.

[0208] 6. 배아를 가슴 인큐베이터에 넣어 6.8% CO₂, 5% O₂ 및 38.5°C 하에 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0209] 7. 충분히 회복되면 (재-확장) 배아를 생장 배지로 옮겼다. 회복은 포배강의 출현으로 검증하였다.

[0210] 결과

[0211] 도 8에 나타난 바와 같이, LbL-ECM 코팅된 디쉬에서 각각 2일 및 4-5일간 점종하였을 경우 2iY 처리된 군은 대조군과 비교해 보다 우수한 부착율 및 성장물 형성율을 나타내었다. 2iY 처리 배아는 배아의 더 빠른 재-확장에 의해 관찰된 바와 같이 대조군 배아 배양 배지와 비교해 더 빠른 회복 및 더 우수한 유도 효율을 나타내었다. 2iY 처리 배아는 4시간 회복 후 대조군 (도 8에서 점선 원)보다 더 컸으며, 뚜렷한 ICM을 나타내었다.

[0212] 2iY 처리 군은 냉동보존으로부터 해동한 후 4시간 경과시 더 진전된 단계를 나타내었으며, 개선된 배아 품질을 나타내었다 (도 9 참조).

[0213] 실시예 6. 배아의 새로운 배양 환경 적응

[0214] 배양 중인 세포, 특히 배아 줄기 세포는 배지 구성성분 및 영양분 수준에 대해 매우 민감하다. 그러나, 특히 완전/시판 배지를 이용할 경우, 세포 배양시 흔히 간과하는 인자 2가지, 즉 배지 삼투압농도 및 pH가 있다. 배아를 배아 취급 배지로부터 MEM (배아 줄기 세포 기저 배지)로 바로 이동시키는 것은 세포에 스트레스를 주는 것으로 관찰되었으며 (테이더는 제시하지 않음), 삼투압농도 및 pH 측정에서 이들 2가지 배지 간에 상당한 차이가 검증되었다 (표 1 참조). 따라서, 적응 배지는 세포를 새로운 미세환경에 점진적으로 적응하게 촉진할 수 있을 것으로 추측하였다.

[0215] 프로토콜

[0216] 1. 해동 배지 및 생장 배지를 1:1 비율로 혼합하였다.

[0217] 2. 적응 디쉬를 도 10에 나타낸 바와 같이 준비하였다.

[0218] 3. 해동 후 회복 후, 배아를 적응 배지 (해동 배지 (예, 배아 취급 배지) 및 생장 배지 (예, DMEM)) 1:1 비율)에서 2회 행군 다음 디쉬 #1에서 적응 액적에 넣었다 (도 10).

[0219] 4. 1시간 적응 후, 배아를 디쉬 #2의 세척 액적들 (생장 배지)로 이동시켜 4회 행구었다.

[0220] 5. 그 후 배아는 접종하기 위해 생장 배지 (DMEM)로 옮겼다.

[0221] 6. 적응된 배아는 이후 LbL 코팅된 마이크로 액적에 넣었다.

[0222] 결과

[0223] 표 1: 다양한 배지들의 pH 및 삼투압농도 (Osm) 측정 결과. 측정 결과는 2세트로 수행하여 수득하였다.

표 1

[0224]

배지	pH	Osm
배아 취급 배지	7.17, 7.15	269, 268
적응	7.21, 7.22	309, 310
생장 배지	7.27, 7.28	353, 353

[0225] 적응 처리에 따른 유도 효율 (배아 접종 후 4-6일에 측정된 부착, TE 생장 및 ICM 생장)을 도 10에 나타낸다. 1시간 적응한 후 유도 효율이 0.5시간 적응 또는 적응하지 않은 대조군과 비교해 개선되었다. 1시간 이상 적응 (2시간 및 4시간 인큐베이션)한 경우 1시간 적응과 비교해 어떠한 차이도 관찰되지 않았다.

[0226] 실시예 7. 배양 배지의 생장물 형성을 지지하는 능력 검사

[0227] 세포 배양 배지는 대사, 생존 및 증식과 같이 세포의 일반적인 유지를 뒷받침하기 위해 다양한 구성성분들을 함유하고 있다. 분화, 자가-재생을 촉진하거나 또는 단순히 세포 성장을 부스팅하기 위해 추가적인 성장인자 또는 저해제도 첨가할 수 있다. 나이트 배아 줄기 세포를 유도하고 이를 미분화된 상태로 유지시키기 위해서는 배양 배지에 성장인자 및 저해제의 조합이 요구된다. 부적절한 첨가제 조합 또는 이들 분자들의 다른 농도는 줄기 세포에 비가역적인 분화를 유발할 수 있다.

[0228] 혈청/혈청 대체제의 타입

[0229] 도 11에 나타낸 바와 같이, 5가지의 서로 다른 혈청 소스/농도 조건을 검사하였다. FBS (10091, Gibco™), 낙아웃 혈청 대체제 (10828-10, Gibco™), 혈청 대체제 (S0638, Sigma), B27 보충제 (17504-044, Gibco™) 및 N2 보충제 (17502-048, Gibco™)를 검사에서 이용하였다. 전통적인 마우스 2iL 배지 (DMEM/F12 + 1% MEM 비-필수 아미노산 + 2 mM Glutamax + 100 μM β-머캅토에탄올 + 100 IU 페니실린/스트렙토마이신 + 3 μM CHIR99021, 1 μM PD0325901 및 100 ng/ml LIF를 포함한 성장인자/저해제)를 10% FBS 및 20% KOSR, 및 1x-, 2x- SR 군의 혈청 검사에 기본 배지로 사용하였다. t2iLGoY 배지 (1:1 혼합물로서, DMEM/F12, 및 신경기본 배지 + 1% MEM 비-필수 아미노산 + 2 mM Glutamax + 50 μg/ml BSA, fraction V + 100 μM β-머캅토에탄올 + 100 IU 페니실린/

스트렙토마이신 + 1 μ M CHIR99021, 1 μ M PD0325901, 10 μ M Y27632, 2.5 μ M Go6983 및 10 ng/ml LIF를 포함하는 성장인자/저해제)는 N2B27 군 검사에 사용하였다. 다른 조합을 이용한 이유는 2iL 배지가 (t2iLGoY 배지와 비교해) 훨씬 더 간단한 제형이어서, FBS; KOSR 또는 SR과 같이 염기성 혈청 소스에 더 적합하기 때문이다.

다른 종들에 널리 이용되는 혈청 소스인 낙-아우 혈청 대체제 (KOSR)는 보바인 배아 생장에 대해서는 매우 낮은 효율성을 나타내었다.

보바인 기원의 구성성분을 함유한 혈청 대체제 (SR)는 KOSR과 비교해 훨씬 우수한 효율성을 나타내었다.

1% B27 보충제 및 0.5% N2 보충제를 함유한 N2B27 배지는 검사한 다른 구성성분과 비교해 보바인 배아 성장 유도 (TE 및 ICM 성장)에 가장 우수한 결과를 나타내었다.

검사한 부가적인 기본 배지 및 기타 구성성분/첨가제

전통적인 2iL 배지: 배지 조성물: DMEM/F12 + 1x 혈청 대체제 + 100 ng/ml 백혈병 저해성 인자 (LIF) + 3 μ M CHIR99021 + 1 μ M PD0325901.

표 2: 마우스 2iL 배지를 이용한 유도율

표 2

배지	기본 배지	기원	혈청 타입	성장인자/저해제	n=	부착 %	TE %	ICM %
2iL	DMEM/F12	6일 배아	N2B27	hLIF: 100 ng/ml CHIR99021: 3 μ M PD0325901: 1 μ M	32	88%	50%	19%

긍정적인 부착율이 수득되었지만, 성장물 형성율이 낮아 ICM 확장은 19%, TE 확장은 50%였다.

나이프 인간 줄기 세포 배지 - NHSM (Gafni et al., 2013): 배지 조성물: DMEM/F12: 신경기본 배지 (1:1 혼합물) + N2B27 혈청 + 8 ng/ml FGF + 1 ng/ml TGF-b + 20 ng/ml LIF + 3 μ M CHIR99021 + 1 μ M PD0325901 + 10 μ M SP600125 + 10 μ M + SB203580

표 3: NHSM 배지를 이용한 유도율

표 3

배지	기본 배지	기원	혈청 타입	성장인자/저해제	n=	부착 %	TE %	ICM %
NHSM	DMEM/F12 및 신경기본 배지의 1:1 혼합물	5일 배아	N2B27	hFGF: 8 ng/ml hTGF-b: 1 ng/ml hLIF: 20 ng/ml CHIR99021: 3 μ M PD0325901: 1 μ M SP600125: 10 μ M SB203580: 10 μ M	30	63%	27%	0%

이 조합은 ICM 확장이 0%로 매우 낮은 효율성을 나타내었다.

포스콜린 배지 (Forskolin media)

포스콜린은 아데닐릴 사이클라제 자극제로서, 세포에서 다수의 신호전달 경로에 참여하는 2차 메신저인 cAMP 수준을 증가시킨다. 포스콜린과 2iL 배지의 조합은 인간 나이브 줄기 세포의 유도에 대해 (Hanna et al., 2010), 그리고 보바인 나이브-유사 만능성 줄기 세포의 리프로그래밍 (Kawaguchi et al., 2015)에 대해 양호한 효율성을 나타내었다.

2iLfk 제형: 전통적인 마우스 2iL 배지 + 10 μ M Forskolin

이러한 조합은 전통적인 2iL 배지 및 NHSM 배지와 비교해 개선된 유도 효율성을 나타내었다 (도 13). 그러나, ICM 유도된 나이브 줄기 세포 콜로니들은 계대 배양 후 2iLfk 배지에서 어떠한 추가적인 확장도 보이지 않았다.

- [0246] *Wnt*의 듀얼 키나제 조절
- [0247] Wnt는 나이트 줄기 세포 신호전달 경로에서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Wnt 활성화제 CHIR99021과 Wnt 저해제, 예를 들어 IWR-1 또는 XAV939 (둘다 동일한 단백질 복합체의 저해제이지만, 각각 서로 다른 유닛을 표적화함)의 조합은 세포질에 β -카테닌 축적을 야기하고, 부착 연결 (adherent junction)의 핵심 성분인 E-카드헤린의 안정화를 통해 마우스 만능성 줄기 세포의 자가-재생을 촉진할 수 있다 (Kim et al. 2013). 2iLfk 배지를 이용할 경우 관찰되는 확장 불량을 극복하기 위한 Wnt의 듀얼 조절 능력을 검사하였다.
- [0248] 듀얼 Wnt 배지의 제형: 1.5 μ M CHIR99021 + 2.5 μ M IWR-1 + 1 μ M PD0325901 + 100 ng/ml LIF + 10 μ M 포스콜린.
- [0249] 도 13에 나타낸 바와 같이, 이 조합은 보바인 배아 줄기 세포에 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다.
- [0250] 보바인 IL-6 (LIF의 슈퍼패밀리) 및 SRCi:
- [0251] 보바인 IL-6 (LIF의 슈퍼패밀리) 및 SRC 저해제를, 인간 나이트 줄기 세포 유도에 이용한 바 있는 t2iLGoY 배지에 사용된 hLIF 및 PD0325901에 대한 대체제로서 각각 검사하였다 (타이트레이션 2i/LIF/Go6983/Y27632, Guo et al., 2016).
- [0252] 먼저 인간 LIF를 t2iLGoY 제형에 사용하였다. 그러나, 인간 및 보바인 LIF의 서열은 서로 다르다. 따라서, LIF의 슈퍼패밀리의 구성원인 보바인 IL-6를 인간 LIF의 대체제로 검사하였다.
- [0253] RTK 저해제로서 SRC 저해제는 성장인자에 의해 유발된 신호전달 경로 대부분에 참여한다 (Theunissen et al., 2014). SRC 저해의 엔드포인트가 궁극적으로 ERK/MEK 경로를 표적으로 함을 인지하여, SRC 저해제를 MEK 경로 저해에 대한 대안적인 새로운 전략으로 검사하였다 (MEKi PD0325901 대신).
- [0254] t2iLGoY 배지의 제형: DMEM/F12:신경기본 배지 (1:1 혼합물) + N2B27 혈청 + 1 μ M CHIR99021 + 1 μ M PD0325901 + 10 ng/ml 인간 LIF + 2.5 μ M Go6983 + 10 μ M Y27632.
- [0255] SRCi 배지의 제형: PD0325901이 2 μ M CGP77675 (SRC 저해제)로 대체되고 인간 LIF가 10 ng/ml 보바인 IL-6으로 대체된, t2iLGoY 배지.
- [0256] 도 14에 나타낸 바와 같이, 인간 LIF 대신 보바인 IL-6으로 또는 MEK 저해제 PD0325901 대신 SRC 저해제 CGP77675로 대체한 경우, 낮은 부착율 또는 낮은 생장물 생성율로, t2iLGoY 배지와 비교해 유도 효율성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 확인되었다.
- [0257] MEK 저해제 (MEKi)
- [0258] Zhao 등 (2021)은, 인간 세포에 대해 이전에 발표된 결과와는 대조적으로, 보바인 ES 세포 배지에서 MEK 저해제를 제거해야 함을 제시하는 결과를 발표하였다. 배지에서 MEK 저해제를 제거하는 방식의 검사를 조사하기 위해 실험을 수행하였다.
- [0259] 표 4: MEK 조절을 이용한 유도율.

표 4

배지	기본 배지	기원	혈청 타입	성장인자/저해제	부착 %	TE %	ICM %
+MEK 저해제	DMEM/F12 및 신경기본 배지의 1:1 혼합물	6일 배아	N2B27	CHIR99021 : 1 μ M PD0325901 : 1 μ M Go6983 : 2.5 μ M Y27632 : 10 μ M hLIF : 20 ng/ml	98%	83%	34%
-MEK 저해제	DMEM/F12 및 신경기본 배지의 1:1 혼합물	6일 배아	N2B27	CHIR99021: 1 μ M Go6983: 2.5 μ M XAV939: 2 μ M hLIF: 20 ng/ml	67%	50%	0%

- [0261] MEK 저해제, PD0325901을 배지에서 제거하면, 명확한 ICM 세포 분화 신호인 배아 강 형성으로 확인된 바와 같이, 유도 효율이 감소하였다 (도 15 참조).

- [0262] PKC 저해제, Go6983
- [0263] 배양 배지 조성물이 최근 개량되어, 지금까지 가장 검사한 우수한 조건, 즉 2iLk 및 t2iLGoY 배지를 2i 및 NHSM 배지와 나란히 검사하였다. 놀랍게도, 도 16에 나타난 바와 같이, t2iLGoY에 PKC 저해제 Go6983를 첨가하면 (Guo et al., 2016) 유도 효율이 개선되었다.
- [0264] t2iLGoY 배지는 비슷한 ICM 생장율을 나타내었지만, 부착 및 생장물 형성, 특히 TE 생장율 측면에서 훨씬 더 우수하였다.
- [0265] t2iLGoY의 제형: DMEM/F12:신경기본 배지 (1:1 혼합물) + N2B27 혈청 + 1 μ M CHIR99021 + 1 μ M PD0325901 + 10 ng/ml LIF + 2.5 μ M Go6983 + 10 μ M Y27632.
- [0266] 인슐린
- [0267] ICM 세포 형태는 전술한 다양한 배지 조성물을 이용한 1차 계대 배양한 이후에는 유지되지 않았다. ICM 세포는 생장물 배양 중에, 그리고 계대 배양 후, 배아의 내배엽 세포 (배반엽하층)로 빠르게 분화되었다.
- [0268] 배지 내 인슐린 농도를 적정하여 이러한 유형의 분화를 극복할 수 있을 것으로 추측되었다 (Anderson et al., 2017).
- [0269] 배지에 20 μ g/ml 인슐린을 첨가하면, 도 17에 나타난 바와 같이, 생장물 배양 중에 배반엽하층의 형성은 관찰되지 않았으며, ICM 세포를 계대배양 후 수득할 수 있었다.
- [0270] ERK 경로 저해
- [0271] Khan 등 (2021)은 인간 나이트 줄기 세포에 대해 가장 우수한 배양 조건을 동정하기 위해 고-성능 화학 스크리닝을 이용하였으며, ERK 경로 저해가 안정적인 인간 나이트 줄기 세포 배양을 유지하는데 핵심적인 인자임을 확인하였다 (Khan et al., 2021).
- [0272] Wnt 경로의 저해는 또한 인간 나이트 줄기 세포 분야에서도 핵심적인 인자인 것으로 부각되었다 (Bredenkamp et al., 2019). Khan 등 (2021) 및 Bredenkamp 등 (2019)에서 비롯한 접근 방식들을 조합해, PXGRY/LA 배지를 조사 및 개발하였다.
- [0273] PXGRY/LA 제형: DMEM/F12:신경기본 배지 (1:1 혼합물) + N2B27 혈청 + 1 μ M PD0325901 + 2 μ M XAV939 + 2 μ M Go6983 + 2.5 μ M 라보세르티닙 + 10 μ M Y27632 + 10 ng/ml LIF + 20 ng/ml 액티빈 A.
- [0274] 표 5에 나타난 바와 같이, Wnt 경로의 활성화 (t2iLGoY 배지 이용) 또는 이의 저해 (PXGRY/LA 배지 이용)는 피더-프리 시스템을 이용한 나이트 생장물 유도에 어떠한 유의한 효율 차이를 나타내지 않았다. 그러나, 나이트 줄기 세포는 일반적으로 피더 세포 상에서 유도 및 유지되며, 나이트 줄기 세포 배지는 이러한 배양 시스템용으로 기술적으로 고안되었다. Cosin-Roger 등 2019 및 Talbot 등 2012에 따르면, 피더 세포는 몇가지 중요한 성장 인자를 방출하고, 더 중요하게는 Wnt 리간드를 방출한다. 피더-프리 시스템과 함께 PXGRY/LA 배지에서, Wnt 경로는 저해될 뿐 아니라, 정상적으로는 피더 세포에서 방출되는 Wnt 리간드가 완전히 고갈된다. 따라서, Wnt 저해 효과가, 피더 세포 상에 유지된 세포와 비교하면, 피더-프리 조건을 이용하는 경우와, 특히 수회 계대 배양한 이후에, 동일하지 않을 수 있다. t2iLGoY는 즉 피더-프리 조건을 이용한 보바인 나이트 세포 유도에 더 적합할 수 있다.
- [0275] 표 5: Wnt 조절에 따른 유도율.

표 5

배지	기본 배지	기원	혈청 타입	성장인자/저해제	부착 %	TE %	ICM %
t2iLGoY	DMEM/F12 및 신경기본 배지의 1:1 혼합물	6일 배아	N2B27	CHIR99021 : μ M PD0325901 : 1 μ M Go6983 : 2.5 μ M Y27632 : 10 μ M hLIF : 20 ng/ml	98%	83%	34%

PXGRY/LA	DMEM/F12 및 신경기 본 배지의 1:1 혼합물	6일 배 아	N2B27	PD0325901: 1 μ M XAV939: 2 μ M Go6983: 2 μ M 라보세르티닙: 2.5 μ M Y27632: 10 μ M hLIF: 20 ng/ml 액티빈 A: 20 ng/ml	100%	90%	33%
----------	------------------------------------	-----------	-------	--	------	-----	-----

실시예 8: 아이블라스토이드 구조체 구축

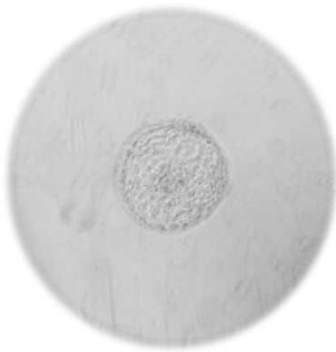
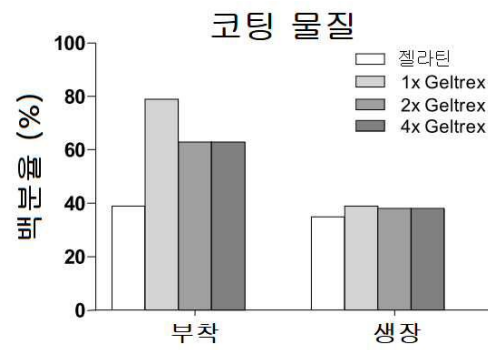
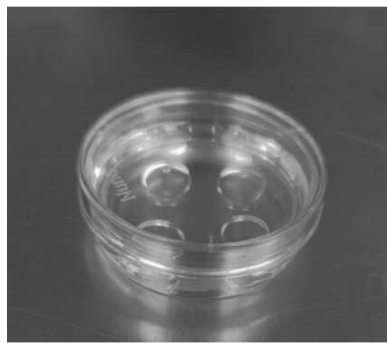
이전 실시예에 기술된 고 효율 프로토콜에 따라 구축한 안정적인 보바인 나이트 줄기 세포를 이용해, Liu et al. (2021), Yu et al. (2021) 및 Yanagida et al. (2021)에서 최근 발표된 방법과 비슷한 방식으로 아이블라스토이드 구조체를 재구성하였다.

프로토콜

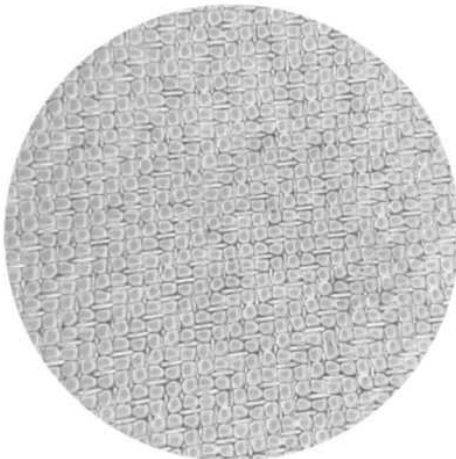
1. 나이트 줄기 세포 콜로니를 효소적 해리 방법을 이용한 단일 세포로 분리한다.
 2. 세포 수를 측정하고, 아이블라스토이드 배지 1에서 세포 밀도 500 세포/ml로 조정한다. 아이블라스토이드 배지 1은 나이트 줄기 세포를 세포영양막 줄기 세포로 분화시켜 배반포의 외층 (TE)이 형성되게 할 것이다.
 3. 비-부착성 둥근-바닥형 96웰 플레이트의 각 웰에 세포 100개 (200 μ g)를 다채널 파이프를 사용해 접종한다.
 4. 48시간 후, 배양 플레이트에서 아이블라스토이드 배지 1을 제거하고, 아이블라스토이드 배지 2 200 μ g을 첨가한다.
 5. 48시간 경과시, 작 확립된 아이블라스토이드를 아이블라스토이드 조작 배지 (Hepes 완충화된 DMEM/F12 + 신경기본 배지)로 옮기고, 일반적인 배아 품질 평가 체계를 기초로 아이블라스토이드의 품질을 평가한다.
 6. Boviteq 배아 냉동 프로토콜에 따라 아이블라스토이드를 냉동한다.
- iBlastoid 배지 1의 제형: Advanced-DMEM/F12 + 0.5% 혈청 대체제 + 1 % MEM NEAA + 1 % Glutamax[™] + 0.1 mM β -머캅토에탄올 + Gentamycin + 2 μ M CHIR99021 + 5 μ M Y27632 + 0.5 mM 발프로익산 + 1 μ M A83-01 + 50 ng/ml EGF.
- iBlastoid 배지 2의 제형: DMEM/F12와, 신경기본 배지 + 1 % MEM NEAA + 1 % Glutamax[™] + 0.1 mM β -머캅토에탄올 + 100 IU/ml Pen/Strep + 100 ng/ml 액티빈 A + 3 μ M CHIR99021 + 10 ng/ml LIF의 1:1 혼합물.

도면

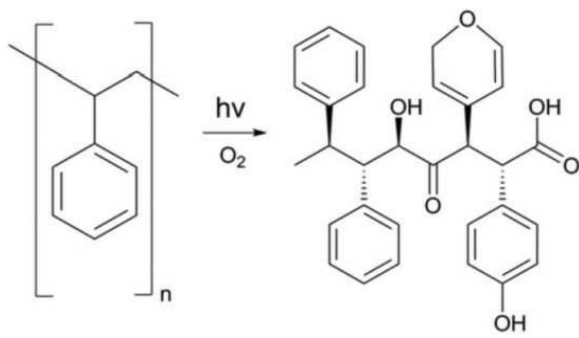
도면1



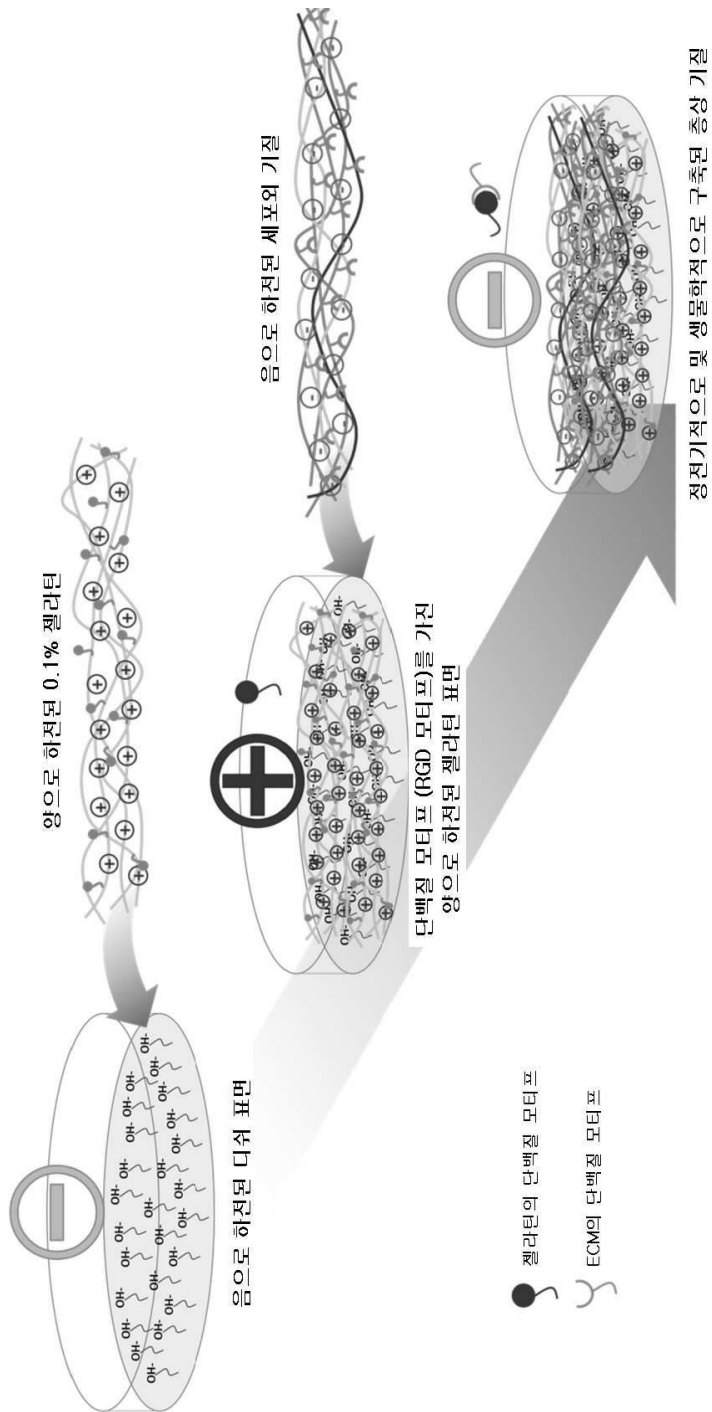
도면2



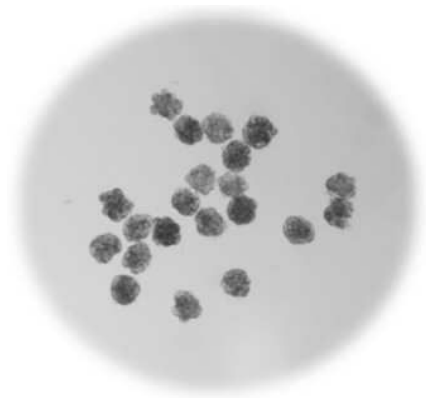
도면3



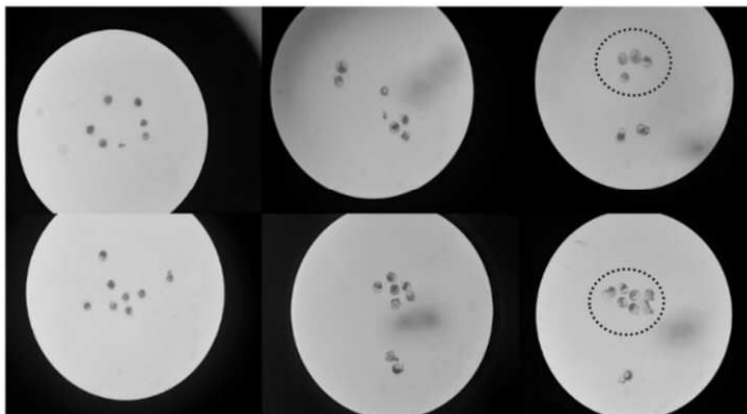
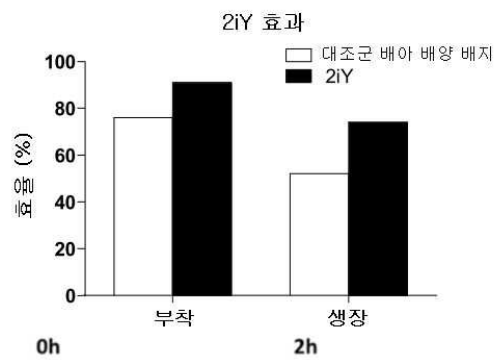
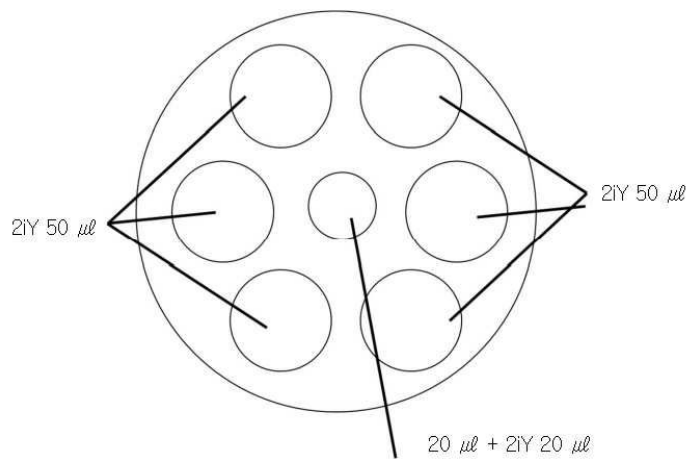
도면4



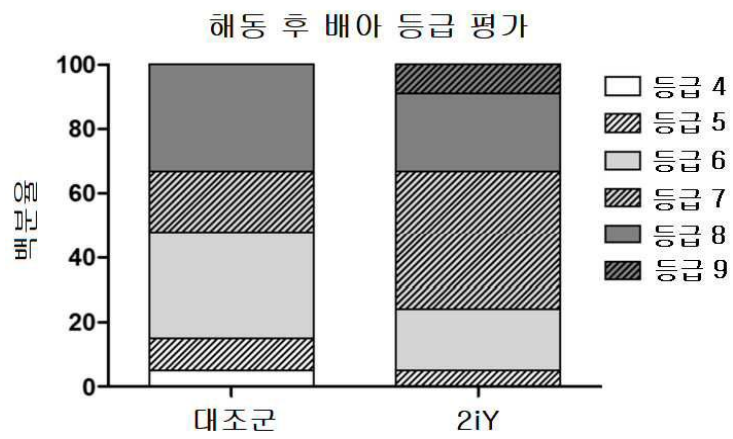
도면7



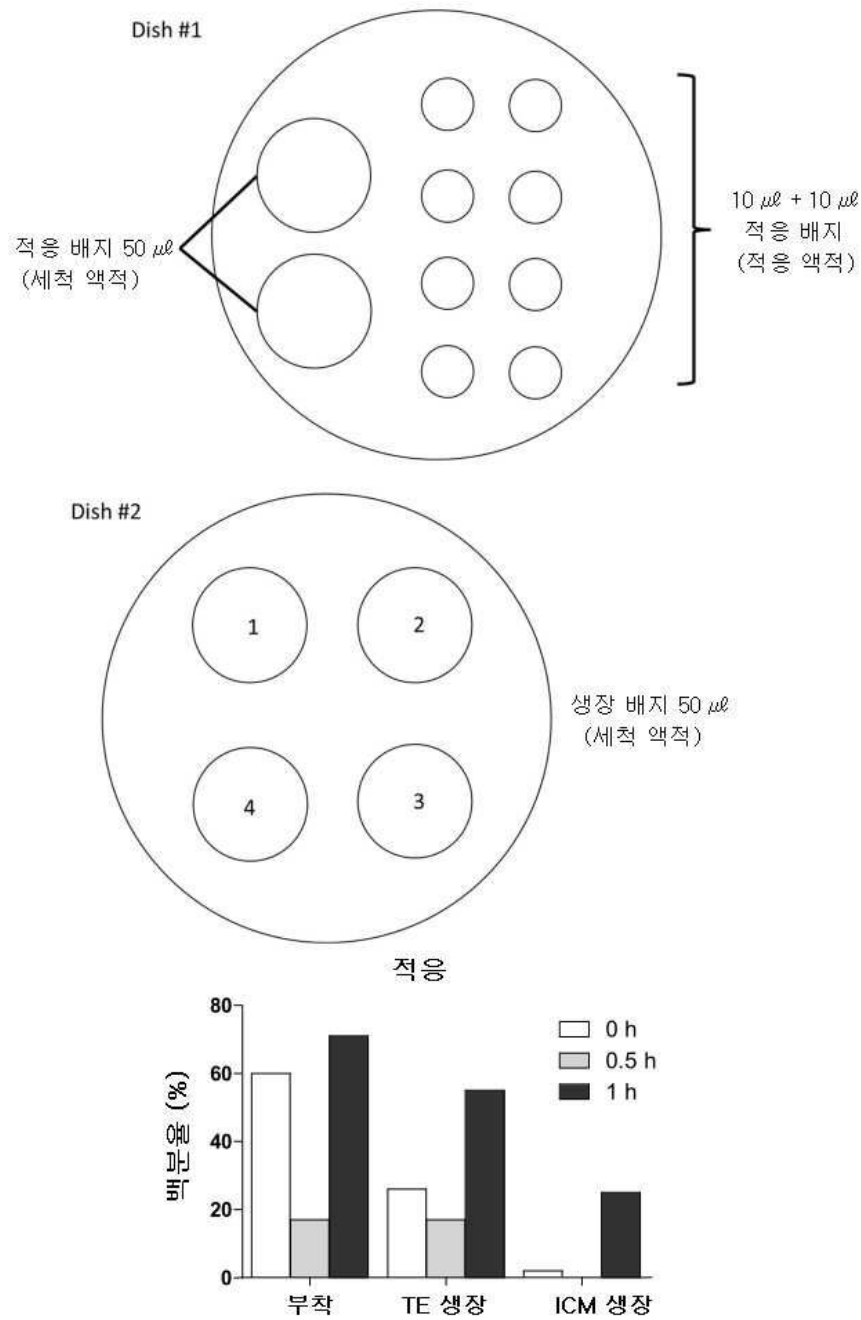
도면8



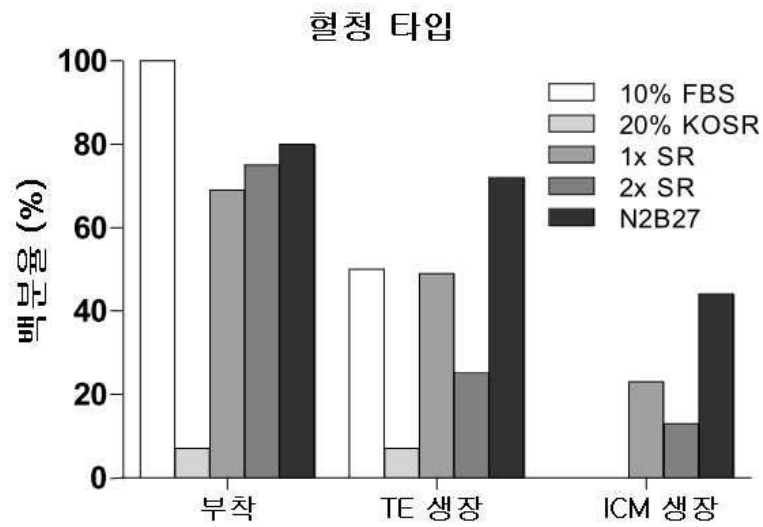
도면9



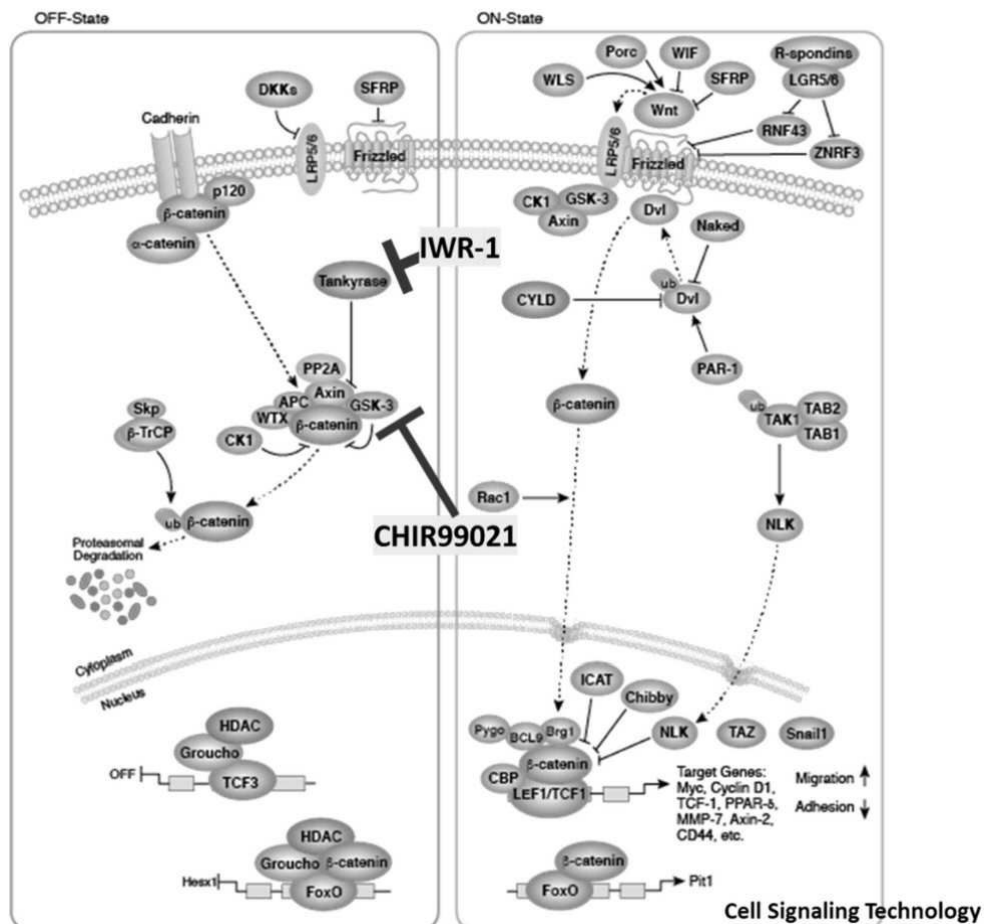
도면10



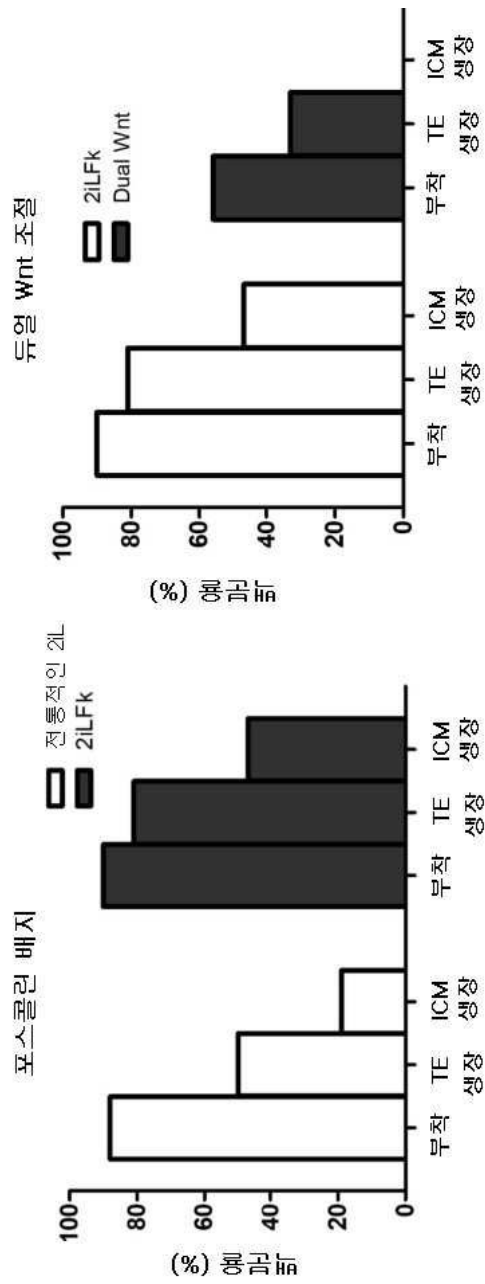
도면11



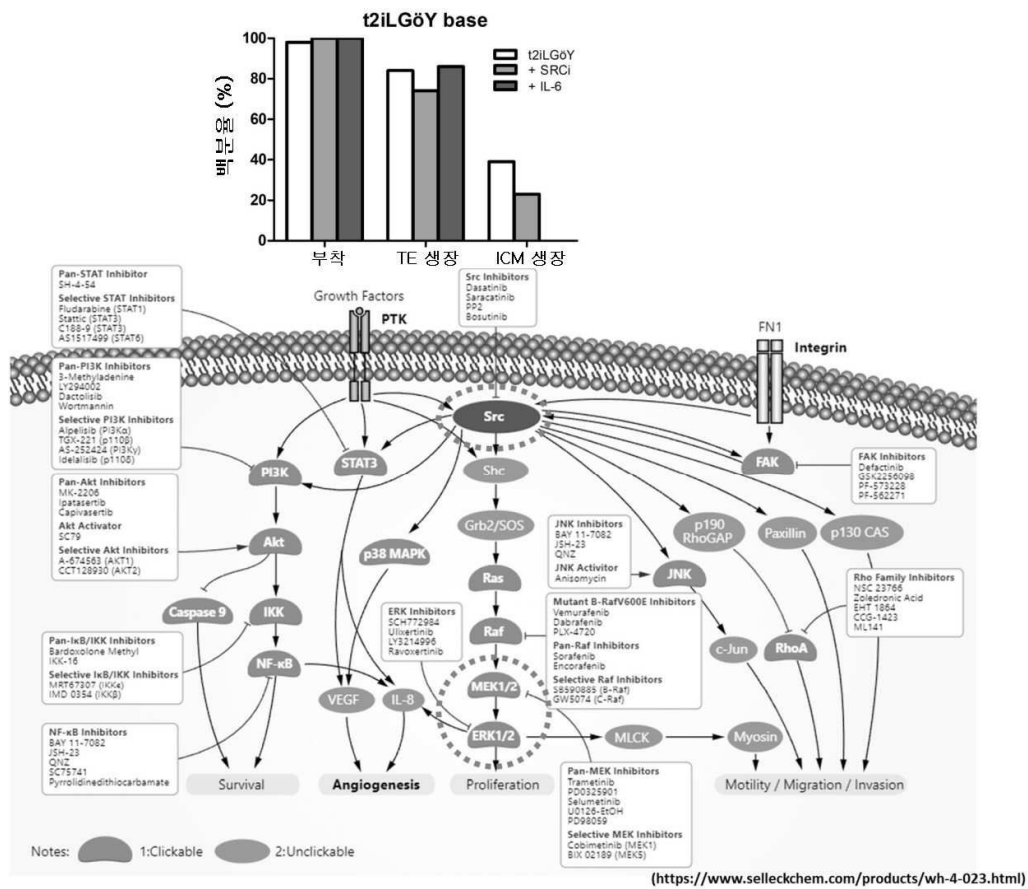
도면12



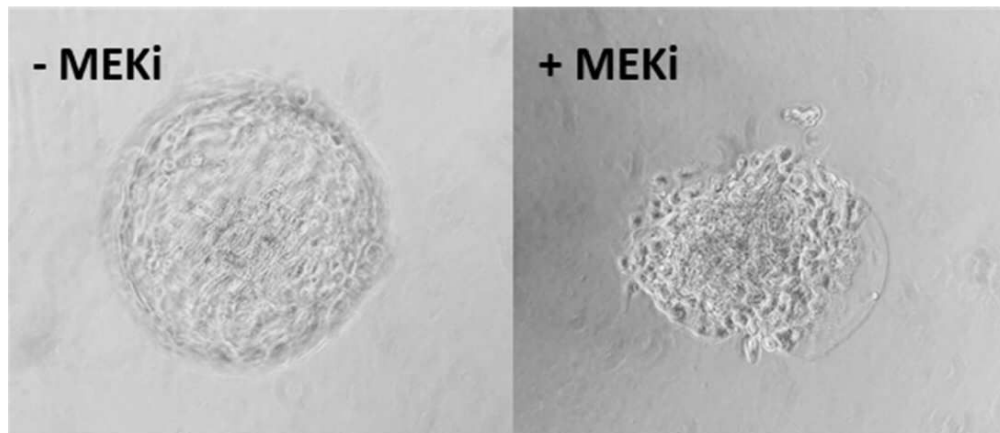
도면13



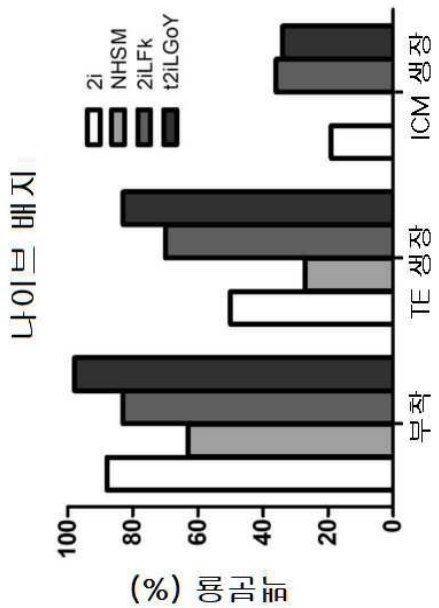
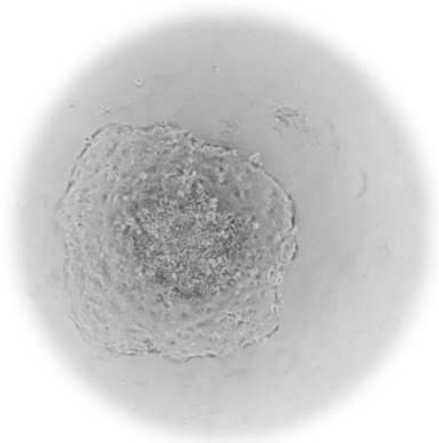
도면14



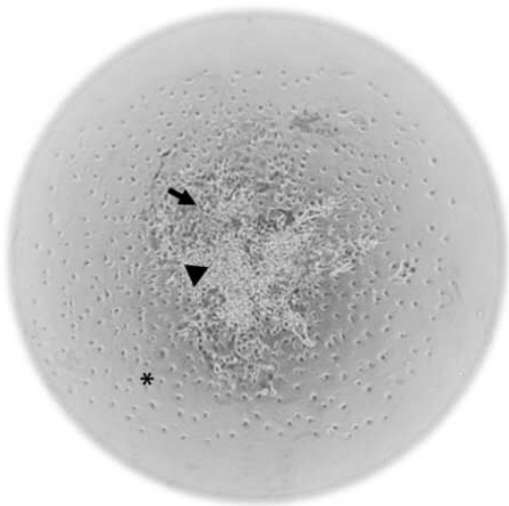
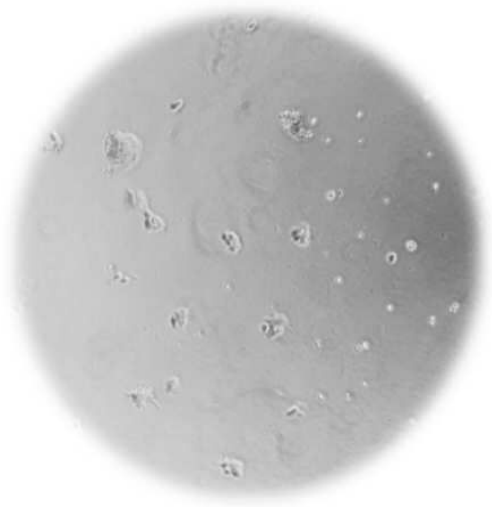
도면15



도면16



도면17



도면 18

