(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014478
(43) 공개일자 2015년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7033897
(22) 출원일자(국제) 2013년05월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년12월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/039940
(87) 국제공개번호 WO 2013/169769
국제공개일자 2013년11월14일
(30) 우선권주장
61/643,684 2012년05월07일 미국(US)

(71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국, 펜실베니아주 19044, 호샴, 럿지뷰 드라이브 800
(72) 발명자
레자니아 알리레자
미국 08869 뉴저지주 라리탄 루트 202 사우스 1000
(74) 대리인
최규팔

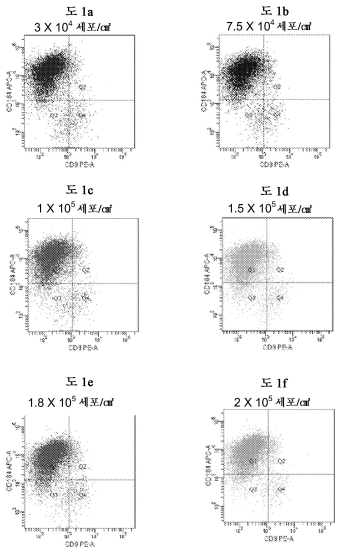
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 발명의 명칭 **인간 배아 줄기 세포의 췌장 내배엽으로의 분화**

(57) 요 약

본 발명은 만능 줄기 세포의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 췌장 내배엽 세포의 집단을 생성하는 방법을 제공하며, 이때 미분화된 만능 세포의 초기 씨딩 밀도는 한정된다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

만능 줄기 세포(pluripotent stem cell)를 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도(seeding density)로 표면에 씨딩하는 단계를 포함하는, 만능 줄기 세포의 배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 마트리겔 (Matrigel)™을 포함하는 표면에 씨딩되는 방법.

청구항 5

만능 줄기 세포를 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩하는 단계; 및 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 (definitive endoderm)을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 만능 줄기 세포의 분화 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 씨딩되는 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 10

만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하고, 이때 만능 줄기 세포는 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩된, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 씨딩되는 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 15

만능 줄기 세포의 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도로 만능 줄기 세포를 제1 표면에 씨딩하는 단계; 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계; 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도로 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 씨딩하는 단계; 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 제1 표면에 씨딩되는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 제2 표면에 씨딩되는 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 제1 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 제2 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 제1 표면 및 상기 제2 표면이 동일한 표면인 방법.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 25

만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계; 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하며; 이때 만능 줄기 세포는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩된, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 상기 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 31

a) 만능 줄기 세포를 표면에 씨딩하는 단계:

b) 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계; 및

c) 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는,

췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩되는 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 씨딩하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 36

제31항에 있어서, 상기 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 37

제31항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 38

제31항에 있어서, 상기 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 39

a) 만능 줄기 세포를 표면에 씨딩하는 단계;

b) 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계;및

c) 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포

함하는,

췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 씨딩되는 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 약 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 씨딩하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 42

제39항에 있어서, 상기 만능 줄기 세포가 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, 상기 배아 줄기 세포가 인간 배아 줄기 세포인 방법.

청구항 44

제39항에 있어서, 상기 표면이 마트리겔 ™을 포함하는 방법.

청구항 45

제39항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 46

제39항에 있어서, 상기 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 47

완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 약 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩하는 단계; 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 상기 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 50

완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 약 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩하는 단계; 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로의 분화 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 인간인 방법.

청구항 53

인간 배아 줄기 세포와 비교하는 경우에, PDX-1, NKX6.1, NGN3, NKX2.2, NeuroD, 및 인슐린으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현 감소, 및 ZIC1과 CDX2의 상향 조절을 보여주고; 이때 인간 배아 줄기 세포는 5×10^5 세포/㎠ 미만의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩되는, 인간 배아 줄기 세포로부터 시험관 내에서 분화된 세포 집단.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 관련 출원과의 상호 참조

[0002] 본 출원은 모든 목적을 위하여 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 가특허 출원 제61/643,684호(출원일: 2012년 5월 7일)의 이익을 주장한다.

[0003] 본 발명은 세포 분화 분야이다. 보다 특히, 본 발명은 인간 만능 세포 및/또는 췌장 내배엽을 가리키는 마커 발현 세포 및 췌장 내분비를 가리키는 마커 발현 세포의 후속되는 효율적인 생성에 유용한 완성 내배엽(definitive endoderm)을 가리키는 마커 발현 세포의 씨딩 밀도 (seeding densities) 범위를 제공한다.

배 경 기 술

[0004] 제I형 진성 당뇨병 및 이식가능한 랑게르한스섬의 부족에 대한 세포-대체 치료법에서의 진전은 생착(engraftment)에 적절한 인슐린-생산 세포, 또는 β 세포의 공급원을 개발하는데 관심이 집중되었다. 한 가지 접근법은 예를 들어 배아 줄기 세포와 같은 만능 줄기 세포로부터의 기능성 β 세포의 생성이다.

[0005] 척추동물 배아 발생에서, 만능 세포는 낭배형성 (gastrulation)으로 알려진 과정에서 삼배엽층(외배엽, 중배엽, 및 내배엽)을 포함하는 세포군을 생성한다. 갑상선, 흉선, 췌장, 소화관, 및 간과 같은 조직은 중간 단계를 통해 내배엽으로부터 발생할 것이다. 이 과정에서 중간 단계는 완성 내배엽의 형성이다. 완성 내배엽 세포는 HNF3베타, GATA4, MIXL1, CXCR4 및 SOX17과 같은 수많은 마커를 발현한다.

[0006] 낭배형성 마지막까지, 내배엽은 내배엽의 전방, 중간 및 후방 영역을 독특하게 표시하는 인자들의 패널의 발현에 의해 인식될 수 있는 전방-후방 도메인(anterior-posterior domain)으로 나누어진다. 예를 들어, Hhex, 및 Sox2는 전방 영역을 확인해 주는 반면, Cdx1, 2, 및 4 는 후방의 절반의 내배엽을 확인해 준다.

[0007] 내배엽 조직의 이주는, 내배엽이 상이한 중배엽 조직들과 아주 근접해지게 하며 이는 장관의 국지화를 돕는다. 이는 많은 분비형 인자들, 예를 들어 FGF, Wnt, TGF-B, 레틴산 (RA), 및 BMP 리간드(ligand) 및 그 길항제에 의해 달성된다. 예를 들어, FGF4 및 BMP는 추정되는 후장 내배엽에서 Cdx2 발현을 촉진하고, 전방 유전자 *Hhex* 및 SOX2 의 발현을 억제한다 (문헌[2000 Development, 127:1563-1567]). WNT 신호전달은 또한 후장 발생을 촉진하고 전장 운명을 저해하도록 FGF 신호전달과 병행하여 작동하는 것으로 밝혀졌다 (문헌[Development 2007, 134:2207-2217]). 마지막으로, 중간엽에 의해 분비된 레틴산은 전장-후장 경계부를 조절한다 (문헌[Curr Biol 2002, 12:1215-1220]).

[0008] 특정 전사 인자들의 발현 수준을 이용하여 조직의 아이덴티티(identity)를 표기할 수 있다. 완성 내배엽의 원시 장관(primitive gut tube)으로의 형질전환 동안, 장관은 제한된 유전자 발현 패턴에 의해 분자 수준에서 관찰될 수 있는 넓은 도메인들 내로 국지화되게 된다. 예를 들어, 장관 내의 국지화된 췌장 도메인은 PDX-1의 매우 높은 발현 및 CDX2 및 SOX2의 매우 낮은 발현을 나타낸다. 이와 유사하게, 높은 수준의 Foxe1의 존재는 식도 조직을 나타내며; NKX2.1은 폐 조직에서 고도로 발현되며; SOX2/Odd1 (OSR1)은 위 조직에서 고도로 발현되며; PROX1/Hhex/AFP의 발현은 간 조직에서 높으며; SOX17은 담도 구조 조직에서 고도로 발현되며; PDX1, NKX6.1/PTf1a, 및 NKX2.2는 췌장 조직에서 고도로 발현되며; CDX2의 발현은 장 조직에서 높다. 상기 요약은 문헌[Dev Dyn 2009, 238:29-42 및 Annu Rev Cell Dev Biol 2009, 25:221-251]으로부터 수정된다.

[0009] 췌장의 형성은 완성 내배엽의 췌장 내배엽으로의 분화에서 일어난다 (문헌[Annu Rev Cell Dev Biol 2009, 25:221-251]; 문헌[2009 Dev Dyn, 238:29-42]). 배측(dorsal) 및 복측(ventra) 췌장 도메인은 전장 상피에서 생긴다. 또한 전장은 식도, 기관, 폐, 갑상선, 위, 간, 췌장 및 담관계가 생기게 한다.

[0010] 췌장 내배엽의 세포는 췌장-십이지장 호메오박스(homeobox) 유전자 PDX1을 발현한다. PDX1의 부재 하에서는,

췌장은 복측 원기(bud) 및 배측 원기의 형성 이상으로는 발달하지 못한다. 따라서, PDX1 발현이 췌장 기관형성에서 중요한 단계를 표시한다. 성숙한 췌장은 다른 세포형 중에서도 외분비 조직 및 내분비 조직을 포함한다. 외분비 및 내분비 조직은 췌장 내배엽의 분화로부터 생긴다.

[0011] 드'아무르(D'Amour) 등은 고농도의 액티빈과 저 혈청의 존재 하에서 인간 배아 줄기 (ES) 세포-유래 완성 내배엽의 농축 배양물의 생성을 기술하고 있다 (문헌[Nature Biotechnol 2005, 23:1534-1541]; 미국 특허 제7,704,738호). 마우스의 신장 피막 하에 이들 세포를 이식하면 내배엽 조직의 특성을 갖는 더욱 성숙한 세포로 분화되었다 (미국 특허 제7,704,738호). 인간 배아 줄기 세포-유래된 완성 내배엽 세포는 FGF-10 및 레틴산의 첨가 후에 PDX1 양성 세포로 추가로 분화될 수 있다 (미국 특허 공개 제2005/0266554A1호). 면역 결핍 마우스의 지방체에서 이들 췌장 전구 세포를 후속적으로 이식하면 3 내지 4개월의 성숙기 이후에 기능성 췌장 내분비 세포가 형성되었다 (미국 특허 제7,993,920호 및 미국 특허 제7,534,608호).

[0012] 피스크(Fisk) 등은 인간 배아 줄기 세포로부터의 췌도 세포의 생성 시스템을 보고한다 (미국 특허 제7,033,831호). 이 경우에, 분화 경로를 세 단계로 나누었다. 먼저 인간 배아 줄기 세포를 부티르산나트륨과 액티빈 A의 배합물을 이용하여 내배엽으로 분화시켰다 (미국 특허 제7,326,572호). 이어서 당해 세포를 EGF 또는 베타셀룰린과 배합된 노긴(Noggin)과 같은 BMP 길항제를 이용하여 배양하여 PDX1 양성 세포를 생성하였다. 마지막 분화는 니코틴아미드에 의해 유도되었다.

[0013] 또한 소분자형 저해제(inhibitor)는 췌장 내분비 전구 세포의 유도에 사용되었다. 예를 들어, TGF-B 수용체 및 BMP 수용체들의 소분자형 저해제 (문헌[Development 2011, 138:861-871]; 문헌[Diabetes 2011, 60:239-247])가 췌장 내분비 세포의 수를 유의하게 향상시키기 위하여 사용되었다. 게다가, 소분자형 활성화제가 완성 내배엽 세포 또는 췌장 전구 세포의 생성에 또한 사용되었다 (문헌[Curr Opin Cell Biol 2009, 21:727-732]; 문헌[Nature Chem Biol 2009, 5:258-265]).

[0014] 인간 만능 줄기 세포로부터 췌장 세포를 생성하는 프로토콜을 개선하는데 있어서 상당한 진전이 있었음에도 불구하고, ES 세포로부터 췌장 세포를 생성하는 그들의 효율이 상이한 그룹에 의해 보고된 결과에는 상당한 정도의 가변성이 존재한다. 이러한 가변성은 ES 주(line)의 차이, 사용된 시약을 포함한 프로토콜의 지속기간, 및 현탁 배양에 대한 부착물의 선택과 같은 요인에 기인했다. 본 발명자는 ES 세포의 완성 내배엽으로의 분화를 지시하는 효율이 세포 밀도에 대해 매우 민감하지 않은 반면에, 췌장 내배엽을 생성하는 효율은 ES 세포의 초기 씨딩 밀도에 상당히 좌우됨을 본 발명에서 입증하고 있다. 특히, 0.8-2 × 10^5 세포/㎠ 범위의 초기 세포 밀도는 췌장 내배엽 및 내분비 마커의 최고 발현을 일으켰다.

발명의 내용

[0015] 한 실시양태로, 본 발명은 만능 줄기 세포를 표면에 씨딩하는 단계를 포함하는 만능 줄기 세포의 배양 방법에 관한 것으로, 이때 만능 줄기 세포는 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 씨딩된다. 일부 실시양태로, 배양된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 배양된 만능 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 만능 줄기 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 (Matrigel)™을 포함한다.

[0016] 한 실시양태로, 본 발명은 만능 줄기 세포를 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩하는 단계, 및 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 만능 줄기 세포의 분화 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태로, 분화된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 분화된 만능 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 만능 줄기 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다.

[0017] 한 실시양태로, 본 발명은 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩된 만능 줄기 세포를 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 사용된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽에 특징적인 마커 발현 세포의 수득 방법에 사용된 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 만능 줄기 세포는 마트리겔 ™을 포함하는 표면에 씨딩했다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다.

[0018] 한 실시양태로, 본 발명은 만능 줄기 세포의 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도로 제1 표면에 씨딩된 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계, 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 췌장 내배엽에 특징적인 마커 발현 세포로의 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도로 제2 표면에 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 씨딩하여 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법을 제공한다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 줄기 세포의 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로의 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 췌장 내배엽에 특징적인 마커 발현 세포로의 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도는 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠이다. 일부 실시양태로, 세포의 분화 방법에 사용된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 실시양태로, 세포의 분화 방법에 사용된 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 실시양태로, 만능 줄기 세포가 씨딩되는 제1 표면은 마트리겔 ™을 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포가 씨딩되는 제2 표면은 마트리겔 ™을 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다. 본 발명의 일부 실시양태로, 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다.

[0019] 한 실시양태로, 본 발명은 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩된 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계, 및 완성 내배엽의 마커 발현 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로의 분화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화하는데 사용되는 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화하는데 사용되는 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화하는데 사용되는 만능 줄기 세포는 마트리겔 ™을 포함하는 표면에 씨딩된다.

[0020] 한 실시양태로, 본 발명은 만능 줄기 세포를 표면에 씨딩하는 단계, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 표면에 씨딩하는 단계, 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 사용된 만능 줄기 세포는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화된 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 줄기 세포는 마트리겔 ™을 포함하는 표면에 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 마트리겔 ™을 포함하는 표면에 씨딩된다.

[0021] 한 실시양태로, 본 발명은 표면에 만능 줄기 세포를 씨딩하는 단계; 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계; 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 사용된 만능 줄기 세포는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화된 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 줄기 세포는 마트리겔 ™을 포함하는 표면에 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 마트리겔 ™을 포함하는 표면에 씨딩된다.

[0022] 한 실시양태로, 본 발명은 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5

세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩하는 단계, 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 사용된 세포는 인간이다.

[0023] 본 발명은 0.8 × 10^5 만능 세포/㎠ 내지 3 × 10^5 만능 세포/㎠의 단계적 분화에 의해 시험관 내에서 수득된 췌장 내배엽 계통(lineage)을 나타내는 마커 발현 세포 집단을 제공한다.

[0024] 본 발명의 한 실시양태로, 췌장 내분비 계통을 나타내는 마커 발현 세포는 0.8 × 10^5 만능 세포/㎠ 내지 3 × 10^5 만능 세포/㎠의 단계적 분화에 의해 시험관 내에서 수득된다.

[0025] 본 발명의 한 실시양태로, 췌장 내배엽 계통을 나타내는 마커 발현 세포는 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 5 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩된 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 단계적 분화에 의해 시험관 내에서 수득된다.

[0026] 본 발명의 한 실시양태로, 췌장 내분비 계통을 나타내는 마커 발현 세포는 1.5 × 10^5 내지 5 × 10^5 세포/㎠로 표면에 씨딩된 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 단계적 분화에 의해 시험관 내에서 수득된다.

도면의 간단한 설명

[0027] <도 1a 내지 도 1f>

도 1a 내지 도 1f는 0.3 × 10^5 세포/㎠ (도 1a), 0.75 × 10^5 세포/㎠ (도 1b), 1 × 10^5 세포/㎠ (도 1c), 1.5 × 10^5 세포/㎠ (도 1d), 1.8 × 10^5 세포/㎠ (도 1e), 및 2 × 10^5 세포/㎠ (도 1f)로 씨딩된 H1 세포에 대한 CXCR4 (Y-축, DE의 마커) 및 CD-9 (X-축, 미분화된 ES 세포의 마커)의 FACS 히스토그램 발현 프로파일을 나타낸다.

<도 2a 내지 도 2g>

도 2a 내지 도 2g는 실시예 1에 제시된 바와 같이 다양한 밀도로 씨딩되고, 이어서 DE로 분화된 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포에서 하기 유전자 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 나타낸다. SOX7 (도 2a), NANOG (도 2b), OCT4 (도 2c), AFP (도 2d), SOX17 (도 2e), FOXA2 (도 2f), 및 CXCR4 (도 2g).

<도 3a 내지 도 3h>

도 3a 내지 도 3h는 다양한 세포 밀도로 씨딩된 DE의 유도 전에 배양물의 위상차 영상(phase contrast images)을 나타낸다: 0.3 × 10^5 세포/㎠ (도 3a), 0.5 × 10^5 세포/㎠ (도 3b), 0.75 × 10^5 세포/㎠ (도 3c), 0.9 × 10^5 세포/㎠ (도 3d), 1 × 10^5 세포/㎠ (도 3e), 1.1 × 10^5 세포/㎠ (도 3f), 1.2 × 10^5 세포/㎠ (도 3g) 및 1.5 × 10^5 세포/㎠ (도 3h).

<도 4a 내지 도 4g>

도 4a 내지 도 4g는 다양한 세포 밀도의 ES 세포로 초기에 씨딩된 DE 4일 배양물의 위상차 영상을 나타낸다: 0.3 × 10^5 세포/㎠ (도 4a), 0.5 × 10^5 세포/㎠ (도 4b), 0.75 × 10^5 세포/㎠ (도 4c), 1 × 10^5 세포/㎠ (도 4d), 1.1 × 10^5 세포/㎠ (도 4e), 1.2 × 10^5 세포/㎠ (도 4f) 및 1.5 × 10^5 세포/㎠ (도 4g).

<도 5a 내지 도 5f>

도 5a 내지 도 5f는 다양한 세포 밀도의 ES 세포로 초기에 씨딩된 제5기 배양물의 위상차 영상을 나타낸다: 5 × 10^4세포/㎠ (도 5a), 7.5 × 10^4 세포/㎠ (도 5b), 1 × 10^5 세포/㎠ (도 5c), 1.5 × 10^5 세포/㎠ (도 5d), 1.8 × 10^5 세포/㎠ (도 5e) 및 2.0 × 10^5 세포/㎠ (도 5f).

<도 6a 내지 도 6j>

도 6a 내지 도 6j는 실시예 2에 제시된 바와 같이 다양한 밀도로 씨딩되고, 이어서 제5기로 분화된 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포에서 하기 유전자 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다: ZIC1 (도

6a), CDX2 (도 6b), PDX-1 (도 6c), NKX6.1 (도 6d), NKX2.2 (도 6e), NGN3 (도 6f), NEUROD (도 6g), 인슐린 (도 6h), HNF4a (도 6i), 및 PTF1a (도 6j).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 개시내용을 분명하게 하고 제한되지 않기 위해, 본 발명의 상세한 설명은 본 발명의 특정 특색, 실시양태 또는 출원을 기술 또는 예시하는 하기 부문으로 구분된다.

[0029] 정의

[0030] 줄기 세포는 단일 세포 수준에서 그의 자기-재생 및 분화 능력 둘 모두에 의해 규정되는 미분화된 세포이다. 줄기 세포는 자기-재생 선구체, 비-재생 선구체, 및 최종 분화된 세포를 포함하는 자손 세포를 생성할 수 있다. 또한 줄기 세포는 *시험관 내에서* 다수의 배엽층 (내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능성 세포로 분화하는 그의 능력을 특징으로 한다. 또한 줄기 세포는 이식 후 다수의 배엽층의 조직이 생기게 하며, 배반포 내로의 주입 이후, 비록 전부는 아니더라도, 사실상 대부분의 조직에 기여한다.

[0031] 줄기 세포는 그들의 발생 잠재력에 의해 다음과 같이 분류된다: (1) 모든 배아 및 배자외 세포 유형이 생기게 할 수 있음을 의미하는 전능성; (2) 모든 배아 세포 유형이 생기게 할 수 있음을 의미하는 만능성; (3) 세포 계통이지만 모두 특정 조직, 기관 또는 생리학적 시스템 내에 있는 서브셋이 생기게 할 수 있음을 의미하는 다능성(예를 들어, 조혈 줄기 세포(hematopoietic stem cell, HSC)는 HSC(자가-재생), 혈구 세포 제한된 소기능성(oligopotent) 전구세포 및 혈액의 정상 성분인 모든 세포 유형 및 요소(예를 들어, 혈소판)를 포함하는 자손을 생성할 수 있음); (4) 다능 줄기 세포보다 더 제한된 서브셋의 세포 계통이 생기게 할 수 있음을 의미하는 소기능성; 및 (5) 단일 세포 계통 (예를 들어, 정자발생 줄기 세포)이 생기게 할 수 있음을 의미하는 단일기능성.

[0032] 분화는 특화되지 않은("미결된") 또는 덜 특화된 세포가 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포와 같은 특화된 세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화된 세포 또는 분화-유도된 세포는 세포 계통 내에서 더욱 특화된 (결정된(committed)) 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "결정된"은 분화 경로에서, 정상 환경 하에 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 서브셋으로 계속 분화할 것이며, 정상 환경 하에 다른 세포 유형으로 분화할 수 없거나 덜 분화된 세포 유형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행된 세포를 말한다. "탈분화"(de-differentiation)는 세포가 세포의 계통 내의 덜 특화된 (또는 결정된) 위치로 되돌아가는 과정을 말한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포의 계통은 세포의 유전, 즉 어느 세포로부터 왔는지 그리고 어떤 세포가 생성되게 할 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 관심있는 계통의 세포의 표현형과 특이적으로 관련되는 특징을 말하며, 미결정 세포가 관심있는 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심있는 세포에서 차등적으로 발현되는 핵산 또는 폴리펩티드 분자이다. 이와 관련하여, 차등적 발현(differential expression)은 미분화 세포에 비하여 양성 마커의 경우 증가된 수준으로, 그리고 음성 마커의 경우에는 감소된 수준을 의미한다. 마커 핵산 또는 폴리펩티드의 검출가능한 수준은 다른 세포에 비하여 관심있는 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮음으로써, 관심있는 세포가 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것을 이용하여 다른 세포로부터 확인되어 구별될 수 있도록 한다.

[0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포는 특정 마커가 그 세포에서 검출될 때 특정 마커에 "대하여 양성"이거나 또는 "양성"이다. 이와 유사하게, 세포는 특정 마커가 그 세포에서 검출되지 않을 때 특정 마커에 "대하여 음성"이거나 또는 "음성"이다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "세포 밀도(Cell density)" 및 "씨딩 밀도(Seeding Density)"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 평면 또는 곡면형 기질의 단위 면적당 씨딩된 세포의 수를 말한다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "제1기(stage 1)" 및 "S1"은 완성 내배엽(DE)에 특징적인 마커 발현 세포를 확인하도록 상호교환가능하게 사용된다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "완성 내배엽"은 낭배형성 도중 외피(epiblast)로 인한 세포의 특징을 갖고 위장관로 및 그의 유도체를 형성하는 세포를 말한다. 완성 내배엽 세포는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현한다: HNF3 베타, GATA4, SOX17, CXCR4, 세르베루스(Cerberus), OTX2, 구스코이드(goosecoid), C-Kit, CD99, 및 MIXL1.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "장관"은 하기 마커들 중 하나 이상을 발현하는, 완성 내배엽으로부터 유래된

세포를 말한다: HNF3-베타, HNF1-베타, 또는 HNF4-알파. 장관 세포는 모든 내배엽 기관, 예를 들어 폐, 간, 췌장, 위, 및 장이 생기게 할 수 있다.

[0039] 원시 장관에 특징적인 마커 발현 세포를 확인해 주는 "제2기" 및 "S2"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0040] "전장 내배엽"은 식도, 폐, 위, 간, 췌장, 담낭, 및 일부분의 십이지장이 생기게 하는 내배엽 세포를 말한다.

[0041] "후방 전장"은 후방 위, 췌장, 간, 및 일부분의 십이지장이 생기게 할 수 있는 내배엽 세포를 말한다.

[0042] "중장 내배엽"(Mid-gut endoderm)은 장들, 십이지장, 맹장 및 상행 결장의 부분들이 생기게 할 수 있는 내배엽 세포를 말한다.

[0043] "후장 내배엽"은 원위 1/3의횡행 결장, 하행 결장S상 결장및직장이 생기게 할 수 있는 내배엽 세포를 말한다.

[0044] "제3기" 및 "S3" 둘 모두는 전장 내배엽에 특징적인 마커 발현 세포를 확인하도록 상호교환가능하게 사용된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "전장 계통에 특징적인 마커 발현 세포"는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포를 말한다: PDX-1, FOXA2, CDX2, SOX2, 및 HNF4 알파.

[0045] 췌장 전장 전구체에 특징적인 마커 발현 세포를 확인하기 위하여 "제4기" 및 "S4"가 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "췌장 전장 전구체 계통에 특징적인 마커 발현 세포"는 하기의 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포를 말한다: PDX-1, NKX6.1, HNF6, FOXA2, PTF1a, Prox1 및 HNF4 알파.

[0046] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "제5기" 및 "S5"는 췌장 내배엽 및 췌장 내분비 전구 세포에 특징적인 마커 발현 세포를 확인하도록 상호교환가능하게 사용된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포"는 하기의 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포를 말한다: PDX1, NKX6.1, HNF1 베타, PTF1 알파, HNF6, HNF4 알파, SOX9, HB9 또는 PROX1. 췌장 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 CDX2 또는 SOX2를 사실상 발현하지 않는다.

[0047] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "췌장 내분비 세포", 또는 "췌장 호르몬 발현 세포", 또는 "췌장 내분비 계통에 특징적인 마커 발현 세포"는 하기의 호르몬 중 하나 이상을 발현할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린(ghrelin), 및 췌장 폴리펩티드.

[0048] "췌장 내분비 전구 세포" 또는 "췌장 내분비 선구 세포"는 췌장 호르몬 발현 세포가 될 수 있는 췌장 내배엽 세포를 말한다. 이러한 세포는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현할 수 있다: NGN3, NKX2.2, NeuroD, ISL-1, Pax4, Pax6, 또는 ARX.

[0049] "d1", "d 1", 및 "1일"; "d2", "d 2", 및 "2일"; "d3", "d 3", 및 "3일" 등은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 이러한 수와 문자의 조합은 본 출원의 단계식 분화 프로토콜 동안 상이한 시기들에서의 인큐베이션 일수를 특정한다.

[0050] "글루코스" 및 "D-글루코스"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 자연에서 일반적으로 발견되는 당인 덱스트로스를 말한다.

[0051] 췌장 내분비 선구 세포에서 발현되는 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 확인하는 "뉴로D" 및 "뉴로D1"은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0052] 미국 캘리포니아주 소재의 스템젠트(Stemgent)로부터 입수가능한 BMP 수용체 저해제를 나타내기 위하여 "LDN" 및 "LDN-193189"가 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0053] 만능 줄기 세포의 단리, 팽창 및 배양

[0054] 만능 줄기 세포는 하나 이상의 시기-특이적 배아 항원(stage-specific embryonic antigens) (SSEA) 3 및 4와, 항체 지정된 Tra-1-60 및 Tra-1-81을 사용하여 검출가능한 마커를 발현시킬 수 있다 (문헌[Thomson 등. 1998, Science 282:1145-1147}]). 시험관 내에서 만능 줄기 세포의 분화는 SSEA-4, Tra-1-60, 및 Tra-1-81 발현의 손실로 이어진다. 미분화된 만능 줄기 세포는 전형적으로 알칼리 포스파타제 활성을 가지며, 이 활성은 상기 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 이어서 제조업자 (미국 캘리포니아주 소재의 벡터 래보러토리즈(Vector Laboratories))가 설명한 바와 같이, 기질로서 벡터 레드(Vector Red)를 이용하여 발색시킴으로써 검출될 수 있다. 미분화된 만능 줄기 세포는 또한 전형적으로 RT-PCR에 의해 검출할 때, OCT4 및 TERT를 발현한다.

[0055] 번식된 만능 줄기 세포의 다른 바람직한 표현형은 모든 삼배엽층의 세포: 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 조직으로 분화하는 잠재력이다. 줄기 세포의 만능성은 예를 들어, 세포를 SCID 마우스 내에 주사하고, 형성된 기형종을 4% 파라포름알데히드를 사용하여 고정시킨 다음에, 삼배엽층으로부터의 세포 유형의 증거에 대해 그들을 조직학적으로 조사함으로써 확인할 수 있다. 대안적으로, 만능성은 배양체 (embryoid body)를 형성하고, 삼배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.

[0056] 번식된 만능 줄기 세포주는 표준 G-밴딩 기술을 이용하여 핵형을 결정하고 상응하는 영장류 종의 공개된 핵형과 비교할 수 있다. "정상 핵형"을 가진 세포를 얻는 것이 바람직하며, 이는 세포가 모든 인간 염색체가 존재하며 눈에 띄게 변경되지 않은 정배수체임을 의미한다. 다양한 지지 세포 층을 사용하는 배양 중에, 또는 기질 단백질 코팅된 용기를 사용함으로써, 만능 세포를 용이하게 증폭시킬 수 있다. 대안적으로, 세포의 일상적 증폭을 위해, mTesr(등록상표)1 배지(캐나다 밴쿠버 소재의 스템셀 테크놀로지스)와 같은 한정 배지와 조합하여 화학적으로 한정된 표면을 사용할 수 있다. EDTA(에틸렌다이아민테트라아세트산)와 같은 다양한 칼슘 킬레이터의 사용, 효소적 방법, 또는 기계적 방법을 사용하여 배양 평판으로부터 만능 세포를 용이하게 제거할 수 있다. 대안적으로, 임의의 기질 단백질 또는 지지 세포 층의 부재 하에 현탁액 중에서 만능 세포를 증폭시킬 수 있다.

[0057] 만능 줄기 세포의 공급원

[0058] 사용될 수 있는 만능 줄기 세포의 유형은 전-배아 조직 (예를 들어, 배반포), 배아 조직, 또는 임신 동안 임의의 시점에, 전형적으로 대략 10 내지 12주의 임신 전에 (그러나 반드시 그러한 것은 아님) 취해진 태아 조직을 포함한, 임신 후 형성된 조직으로부터 유래된 확립된 만능 세포주를 포함한다. 비제한적인 예로는 예를 들어 인간 배아 줄기 세포주들 H1, H7, 및 H9 (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 와이셀 리서치 인스티튜트(WiCell Research Institute))와 같은 확립된 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 또는 인간 배아 생식 세포주가 있다. 지지 세포의 부재 하에서 이미 배양된 만능 줄기 세포 집단으로부터 취한 세포가 또한 적합하다. 다수의 만능성 관련 전사 인자들, 예를 들어 OCT4, Nanog, Sox2, KLF4, 및 ZFP42의 강제된 발현을 이용하여 성체 체세포로부터 유래될 수 있는 유도성 만능 세포(IPS) 또는 재프로그래밍된 만능 세포가 또한 적합하다 (문헌[Annu Rev Genomics Hum Genet 2011, 12:165-185]). 본 발명의 방법에 사용되는 인간 배아 줄기 세포는 또한 톰슨 (Thomson) 등에 의해 기술된 바와 같이 제조될 수 있다 (미국 특허 제5,843,780호; Science, 1998, 282:1145-1147; Curr Top Dev Biol 1998, 38:133-165; Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995, 92:7844-7848).

[0059] 만능 줄기 세포로부터 췌장 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포의 형성

[0060] 만능 줄기 세포의 특징은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 만능 줄기 세포의 추가의 특징은 계속 확인되고 있다. 만능 줄기 세포 마커는 예를 들어, 다음 중 하나 이상의 발현을 포함한다: ABCG2, 크립토(cripto), FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.

[0061] 본 발명에 사용하기에 적절한 만능 줄기 세포는 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포주 H9 (NIH 코드: WA09), 인간 배아 줄기 세포주 H1 (NIH 코드: WA01), 인간 배아 줄기 세포주 H7(NIH 코드: WA07) 및 인간 배아 줄기 세포주 SA002(스웨덴 소재의 셀라르티스(Cellartis))를 포함한다. 또한, 만능 세포의 특징적인 하기의 마커 중 하나 이상을 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적절하다: ABCG2, 크립토, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, 및 Tra 1-81.

[0062] 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커는 SOX17, GATA4, HNF3 베타, GSC, CER1, 노달, FGF8, 브라키어리, 믹스-유사 호메오박스 단백질, FGF4, CD48, 에오메소더민 (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99 및 OTX2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 한 태양에 있어서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 원시선 전구 세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 중내배엽 세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 완성 내배엽 세포이다.

[0063] 췌장 내배엽 계통에 특징적인 마커는 PDX1, NKX6.1, HNF1 베타, PTF1 알파, HNF6, HNF4 알파, SOX9, HB9 및 PROX1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 췌장 내배엽 계통에 특징적인 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 한 태양에 있어서, 췌장 내배엽 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 췌장 내배엽 세포이며, 여기서 PDX-1 및 NKX6.1의 발현은 CDX2 및 SOX2의 발현보다 사실상 더 높다.

[0064] 췌장 내분비 계통에 특징적인 마커는 NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, ARX, NKX2.2, 및 PAX6으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태로, 췌장 내분비 세포는 하기 호르몬 중 하나 이상을 발현할 수 있다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 췌장 폴리펩티드. 췌장 내분비 계통에 특징적인 마커들 중 하나 이

상을 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 한 태양에 있어서, 췌장 내분비 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 췌장 내분비 세포이다. 췌장 내분비 세포는 췌장 호르몬-발현 세포일 수 있다. 대안적으로, 췌장 내분비 세포는 췌장 호르몬-분비 세포일 수 있다.

[0065] 본 발명의 한 태양에 있어서, 췌장 내분비 세포는 β 세포 계통에 특징적인 마커 발현 세포이다. β 세포 계통에 특징적인 마커 발현 세포는 PDX1 및 하기 전사 인자들 중 하나 이상을 발현한다: NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 베타, MAFA, PAX4, 및 PAX6. 본 발명의 한 태양에 있어서, β 세포 계통에 특징적인 마커 발현 세포는β 세포이다.

[0066] 본 발명은 인간 만능 줄기 세포를 약 0.8×10^5 cells/㎠ 내지 약 3.0×10^5 cells/㎠의 밀도로 표면에 씨딩하는 단계를 포함하는 인간 만능 줄기 세포의 배양 방법을 열거한 것이다. 본 발명의 한 태양에 있어서, 인간 만능 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0067] 한 태양에 있어서, 본 발명은 만능 줄기 세포의 분화 방법을 언급하고 있다. 상기 방법은 만능 줄기 세포를 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 표면에 씨딩한 다음, 이어서 만능 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0068] 본 발명은 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩된 인간 배아 만능 줄기 세포의 분화에 의한 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법을 언급하고 있다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0069] 한 태양에 있어서, 본 발명은 만능 세포의 분화를 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도로 제1 표면에 씨딩된, 인간 배아 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계; 및 분화 효율을 최대화하기에 충분한 씨딩 밀도로 제2 표면에 씨딩된, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 인간 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법을 언급하고 있다. 일부 실시양태로, 만능 줄기 세포는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 씨딩된다. 일부 실시양태로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩된다. 일부 태양에 있어서, 인간 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법에서 만능 세포는 배아 줄기 세포를 이용함을 포함한다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0070] 본 발명은 만능 줄기 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시켜 생성된 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법을 언급하고 있다. 여기서 만능 줄기 세포는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩되었다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 사용된 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 사용된 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0071] 한 태양으로, 본 발명은 표면에 만능 줄기 세포를 씨딩하는 단계; 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계;및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 줄기 세포는 약 0.8×10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 약 1.5×10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0×10^5 세포/㎠의 밀도로 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0072] 한 태양으로, 본 발명은 표면에 만능 줄기 세포를 씨딩하는 단계; 만능 줄기 세포를 완성 내배엽을 나타내는 마

커 발현 세포로 분화시키는 단계; 및 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 췌장 내분비 계통을 나타내는 마커 발현 세포의 수득 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 췌장 내분비 계통을 나타내는 마커 발현 세포를 수득하는데 사용되는 만능 줄기 세포는 약 0.8 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 3.0 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 약 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0 × 10^5 세포/㎠의 밀도로 씨딩된다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 만능 줄기 세포는 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 배아 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 세포가 씨딩되는 표면은 마트리겔 ™을 포함한다.

[0073] 한 태양으로, 본 발명은 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 약 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩한 다음, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법을 언급하고 있다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 상기 방법에 사용되는 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 인간 세포이다. 본 발명의 일부 태양에 있어서, 췌장 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다.

[0074] 한 태양으로, 본 발명은 약 1.5 × 10^5 세포/㎠ 내지 약 5.0 × 10^5 세포/㎠의 씨딩 밀도로 표면에 씨딩한 다음, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포를 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포로 분화시킨, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포의 분화 방법에 관한 것이다. 일부 태양으로, 완성 내배엽을 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다. 일부 태양으로, 췌장 내분비를 나타내는 마커 발현 세포는 인간이다.

[0075] 본 발명은 췌장 내배엽 및 내분비 계통으로 효율적으로 분화될 수 있는 ES 세포 밀도의 범위를 기술하고 있다.

[0076] 본 발명의 다른 태양은 췌장 내배엽 및 내분비 계통으로 효율적으로 분화될 수 있는 DE 세포 밀도의 범위를 기술하고 있다.

[0077] 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 간행물은 본 명세서에 이의 전문이 참고로 포함된다. 본 발명을 하기 실시예에 의해 추가로 예시하지만 하기 실시예에 의해 한정되지는 않는다.

[0078] 실시예

[0079] 실시예 1

[0080] 배아 줄기 세포의 씨딩 밀도는 완성 내배엽 마커의 발현에 유의하게 영향을 주지 않는다

[0081] 본 실시예는 ES 세포의 초기 씨딩 밀도가 완성 내배엽 계통의 세포 생성에 유의하게 영향을 주는 지를 알기 위하여 수행하였다.

[0082] 인간 배아 줄기 세포주 H1 (hESC H1)의 세포를 다양한 계대 (계대 40 내지 계대 52)에서 하베스트하고, 10 μM의 Y27632 (록(Rock) 저해제, 카탈로그 번호 Y0503, MO, St. Louis 소재의 시그마알드리치(SigmaAldrich))로 보충된 mTeSR®1 배지 (캐나다 벤쿠버 소재의 스템셀 테크롤노지스(StemCell Technologies)) 또는 MEF-CM (컨디셔닝된 배지)에서 마트리겔 ™ (1:30 희석률; 뉴저지주 프랭클린 레이크 소재의 비디 바이오사이언스(BD Biosciences)) 코팅된 디쉬 위에 하기의 밀도로 단일 세포로서 씨딩했다: 0.3 × 10^5 세포/㎠, 0.5 × 10^5 세포/㎠, 0.75 × 10^5 세포/㎠, 0.9 × 10^5 세포/㎠, 1 × 10^5 세포/㎠, 1.25 × 10^5 세포/㎠, 1.5 × 10^5 세포/㎠, 1.8 × 10^5 세포/㎠, 및 2 × 10^5 세포/㎠. 씨딩한지 48시간 후에, 배양물을 불완전 PBS (Mg 또는 Ca를 포함하지 않는 인산염 완충 염수)에서 대략 30초 동안 세척 및 인큐베이션하였다. 배양물은 다음과 같이 완성 내배엽 (DE) 계통으로 분화되었다:

[0083] 제1기 (완성 내배엽 (DE) - 4일): 세포를 하기의 제1기용 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2%의 무지방산 BSA (카탈로그 번호 68700, 아이오와주 앙키니 소재의 프롤리언트(Proliant)), 0.0012 g/mL의 중탄산나트륨 (카탈로그 번호 S3187, 시그마알드리치), 1X 글루타맥스(GlutaMax)™ (카탈로그 번호 35050-079, 인비트로겐(Invitrogen)), 2.5 mM의 D-글루코스 (카탈로그 번호 G8769, 시그마알드리치), 1:50000X ITS-X (인비트로겐), 100 ng/mL의 GDF8 (미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈 (R&D Systems)) 및 2.5 μM의 MCX 화합물 (GSK3B 저해제, 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 (미국 특허 출원 공개 제2010-0015711호; 그의 전문이

본 명세서에 참고로 포함됨)이 보충된 MCDB-131 배지 (카탈로그 번호 10372-019, 캘리포니아주 칼스바드 소재의 인비트로겐). 세포는 이어서 2%의 무지방산 BSA, 0.0012 g/mL의 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 2.5 mM의 D-글루코스, 100 ng/mL의 GDF8, 및 1:50000X ITS-X가 보충된 MCDB-131 배지에서 다시 3일 동안 배양하였다.

[0084] DE 시기가 끝날 무렵, 샘플을 수집하고, 실시간 PCR 및 형광 활성화 세포 분류법 (FACS)으로 분석하였다. 세포 hESC-유래 세포는 37℃에서 3 내지 5분 동안 TrypLE 익스프레스 (인비트로겐, 카탈로그 번호 12604)에서 인큐베이션시켜 단일-세포 현탁액으로 방출시켰고, 이어서 혈구계를 사용하여 2회 카운팅하였다. 이어서, 세포는 염색용 완충액 (0.2% BSA를 함유하는 PBS) (비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 554657)으로 2회 세척했다. 표면 마커 염색을 위해, 1×10^5 내지 1×10^6개 세포를 100 μl 차단용 완충액 (염색용 완충액으로 1:4 희석된 0.5% 인간 감마-글로불린)에 재-현탁시켰다. 직접 콘쥬게이트된 1차 항체 CD184 APC (알로파이코시아닌, 비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 555976), 및 CD9 PE (비디 바이오사이언스, 카탈로그 번호 555372)를 1:20의 최종 희석률로 세포에 가하고, 30분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 염색된 세포는 BD 염색용 완충액으로 2회 세척하고, 200 μl 염색용 완충액에 재현탁시킨 다음, BD FACS Canto에서 분석하기 전에 생/사 구분을 위해 15 μl의 7AAD에서 인큐베이션시켰다.

[0085] 총 RNA 는 제조업자의 지시에 따라 RNeasy 미니 키트 (퀴아젠(Qiagen); 캘리포니아주 발렌시아 소재)로 추출했고, 고성능 cDNA 역 전사 키트 (캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 사용하여 역-전사시켰다. cDNA는 구입한 태크먼 어레이즈(Taqman Arrays) (어플라이드 바이오시스템즈) 위로 미리-부하시킨 태크먼 유니버설 마스터 믹스(Taqman Universal Master Mix) 및 태크먼 유전자 발현 검정법(Taqman Gene Expression Assays)을 이용하여 증폭시켰다. 데이터는 서열 검출 소프트웨어 (Sequence Detection Software) (어플라이드 바이오시스템즈)를 이용하여 분석했고, ΔΔCt 방법을 이용하여 미분화된 인간 배아 줄기 (hES) 세포로 정규화했다. 모든 프라이머는 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구입했다.

[0086] 도 1a 내지 도 1f는 0.3×10^5 세포/㎠ (도 1a), 0.75×10^5 세포/㎠ (도 1b), 1×10^5 세포/㎠ (도 1c), 1.5×10^5 세포/㎠ (도 1d), 1.8×10^5 세포/㎠ (도 1e), 및 2×10^5 세포/㎠ (도 1f)로 씨딩된 H1 세포에 대한 CXCR4 (Y-축, DE의 마커) 및 CD-9 (X-축, 미분화된 ES 세포의 마커)의 FACS 히스토그램 발현 프로파일을 나타낸다. CXCR4 및 CD9의 발현%는 표 I에 요약되어 있다. 도 1 및 표 I에 제시된 바와 같이, 미분화된 ES 세포의 초기 씨딩 밀도는 CXCR4의 상향 조절 및 CD9의 하향 조절에 의해 측정된 바와 같이 완성 내배엽에 대한 후속 분화에 유의적인 영향을 주지 않았다.

[0087] [표 I]

완성 내배엽 마커 CXCR4 의 발현에 대한 ES 세포의 씨딩 밀도의 효과

ES 세포의 씨딩 밀도 (세포/cm^2)	DE 0 일 세포 밀도 (세포/cm^2)	DE 4 일 세포 밀도 (세포/cm^2)	% CXCR4	% CD9
0.5×10^4	1.1	2.6	93.3	4.9
0.75×10^4	1.25	2.8	93.1	5.6
1.0×10^5	2.23	3.95	93.1	5.3
1.5×10^5	2.87	3.75	90.9	6.5
1.8×10^5	2.58	4.4	93.1	4.7
2.0×10^5	2.8	5.2	92.2	6.1

[0088]

[0089] 도 2a 내지 도 2g는 실시예 1에 제시된 바와 같이 다양한 밀도로 씨딩되고, 이어서 DE로 분화된 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포에서 하기 유전자 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 나타낸다. SOX7 (도 2a), NANOG (도 2b), OCT4 (도 2c), AFP (도 2d), SOX17 (도 2e), FOXA2 (도 2f), 및 CXCR4 (도 2g). FACS 데이터와 일관되게, 마트리겔™- 코팅된 표면에 다양한 밀도로 씨딩된 H1 세포에 대한 DE 시기에 통상 발현되는 유전자 (CXCR4, SOX17, FOXA2) 사이에는 유의한 차이가 없었다. 더욱이, 초기 씨딩 밀도는 배외 내배엽과 관련된 유전자 (AFP, SOX7) 및 만능성 관련 유전자 (OCT4, Nanog)에 대해 유의한 영향이 없었다.

[0090] 도 3 및 도 4는 하기의 다양한 씨딩 밀도로 씨딩된 H1 세포에 대한 DE의 유도 전 (도 3a 내지 도 3g) 및 DE로 분화 개시한 지 4일 후 (도 4a 내지 도 4g) 배양물의 위상차 영상을 도시한 것이다. 3×10^4 세포/㎠ (도 3a 및 도 4a); 5×10^4 세포/㎠ (도 4a 및 도 4b); 7.5×10^4 세포/㎠ (도 4a 및 도 4c); 1×10^5 세포/㎠, 도 4d, ; 도 4e, 1.1×10^5 세포/㎠; 도 4f, 1.2×10^5 세포/㎠; 도 4g, 1.5×10^5 세포/㎠. 도 4는 보다 높은

세포 밀도로 씨딩된 배양물에 비하여 <1 × 10^5 세포/㎠로 씨딩된 배양물의 경우 유의적인 형태학적 차이가 있음을 확실히 보여주고 있다. 그러나, 이러한 차이는 DE와 관련된 유전자/단백질에서는 유의적인 차이로 해석되지 않았다. 이 실시예로부터의 데이터는 초기 씨딩 밀도가 DE와 관련된 마커 발현에 유의적으로 영향을 주지 않았음을 강조하고 있다. 0.3-2 × 10^5 세포/㎠의 범위인 밀도로 씨딩된 ES 세포의 배양물은 DE로 분화시 유사한 효율을 나타냈다.

[0091] 실시예 2

[0092] 배아 줄기 세포의 씨딩 밀도는 췌장 내배엽 및 췌장 내분비 마커의 발현에 유의적으로 영향을 준다.

[0093] 본 실시예는 ES의 초기 씨딩 밀도가 췌장 내배엽/내분비 배양물의 생성에 유의적으로 영향을 주는 지를 알아보기 위하여 수행했다.

[0094] 인간 배아 줄기 세포주 H1 (hESC H1)의 세포를 다양한 계대 (계대 40 내지 계대 52)에서 하베스트하고, 10 μM의 Y27632로 보충된 MEF-CM (컨디셔닝된 배지)에서 마트리겔 ™ (1:30 희석률; 뉴저지주 소재의 비디 바이오사이언스) 코팅된 디쉬 위에 하기의 밀도로 단일 세포로서 씨딩했다:0.5 × 10^5 세포/㎠, 0.75 × 10^5 세포/㎠, 1 × 10^5 세포/㎠, 1.5 × 10^5 세포/㎠, 1.8 × 10^5 세포/㎠, 및 2 × 10^5 세포/㎠. 씨딩한지 48시간 후에, 배양물을 불완전 PBS (Mg 또는 Ca를 포함하지 않는 인산염 완충 염수)에서 대략 30초 동안 세척 및 인큐베이션하였다.

[0095] 배양물은 다음과 같이 췌장 내배엽/내분비 계통으로 분화시켰다:

[0096] a) 제1기 (완성 내배엽 (DE) - 4일): 세포를 하기의 제1기용 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2% 무지방산 BSA (프롤리언트, 카탈로그 번호 68700), 0.0012 g/mL의 중탄산나트륨 (시그마알드리치, 카탈로그 번호 S3187), 1X 글루타맥스™ (인비트로겐, 카탈로그 번호 35050-079), 2.5 mM의 D-글루코스 (시그마알드리치, 카탈로그 번호 G8769), 1:50000X ITS-X (인비트로겐), 100 ng/ml의 GDF8 (알앤디 시스템즈) 및 2.5 μM의 MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지 (인비트로겐, 카탈로그 번호 10372-019). 세포는 이어서 2%의 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml의 중탄산나트륨,1X 글루타맥스™, 2.5 mM의 D-글루코스, 100 ng/ml의 GDF8, 및 1:50000X ITS-X가 보충된 MCDB-131 배지에서 다시 3일 동안 배양하였다.

[0097] b) 제2기 (원시 장관 - 2일): 세포는 1:50000X ITS-X, 0.1% ALBUMAX BSA (인비트로겐); 0.0012 g/ml의 중탄산나트륨; 1X 글루타맥스™; 2.5 mM의 D-글루코스; 및 50 ng/ml의 FGF7로 보충된 MCDB-131 배지를 사용하여 2일 동안 처리했다. 이어서

[0098] c) 제3기 (전장 - 3일): 세포는 1:200으로 희석된 ITS-X; 20 mM의 글루코스; 1X 글루타맥스™; 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨; 0.1% ALBUMAX BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 20 ng/ml의 액티빈-A; 2 μM의 RA; 50 ng/ml의 FGF7; 및 200 nM의 LDN (BMP 수용체 저해제; 카탈로그 번호 04-0019; 캘리포니아주 소재의 스템젠트)으로 보충된 MCDB-131 배지를 사용하여 3일 동안 처리했다.

[0099] d) 제4기 (췌장 전장 전구체 - 3일): 세포는 1:200으로 희석된 ITS-X; 20 mM의 글루코스; 1X 글루타맥스™; 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨; 0.1% ALBUMAX BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 TPB (PKC 활성화제; 카탈로그 번호 565740; 뉴저지주 깁스타운 소재의 이엠디 케미칼즈 (EMD Chemicals)); 200 nM의 LDN-193189; 2 μM의 ALk5 저해제 (문헌[Molecular Pharmacology 2007, 72:152-161]에 기재된, SD-208); 및 100 nM의 CYP26A 저해제 (N-{4-[2-에틸-1-(1H-1, 2, 4-트라이아졸-1-일)부틸]페닐}-1, 3-벤조티아졸-2-아민, 벨지움 소재의 얀센 (Janssen))로 보충된 MCDB-131 배지를 사용하여 3일 동안 처리했다.

[0100] e) 제5기 (췌장 내배엽/내분비 - 3일): 제4기 세포는 1:200으로 희석된 ITS-X; 20 mM의 글루코스; 1X 글루타맥스™; 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨; 0.1% ALBUMAX BSA; 200 nM의 LDN-193189; 100 nM의 CYP26A 저해제, 및 2 μM의 ALk5로 보충된 MCDB-131 배지를 사용하여 3일 동안 처리했다.

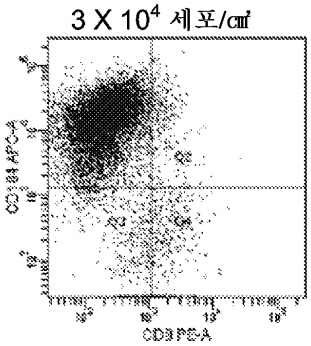
[0101] 제5기가 끝날 무렵, 위상차 영상은 관련된 췌장 내배엽 유전자의 PCR 분석을 위해 mRNA와 함께 시험된 모든 세포 밀도에 대해 수집했다. 도 5a 내지 도 5f는 다양한 세포 밀도의 ES 세포로 초기에 씨딩된 제5기 배양물의 위상차 영상을 나타낸다: 5 × 10^4세포/㎠ (도 5a), 7.5 × 10^4 세포/㎠ (도 5b), 1 × 10^5 세포/㎠ (도 5c), 1.5 × 10^5 세포/㎠ (도 5d), 1.8 × 10^5 세포/㎠ (도 5e) 및 2.0 × 10^5 세포/㎠ (도 5f). 1 × 10^5 세포/㎠ 미만의 밀도로 씨딩된 배양물로부터 분화된 배양물의 극적인 이종성(heterogeneity)은 ES 세포의 초기 세포 밀

도가 후기 배양물의 형태학에 유의적으로 영향을 줌을 나타낸다. 특히, 1.5 × 10^5 세포/㎠보다 높은 밀도로 초기에 씨딩된 배양물로부터 분화된 세포는 배양 디쉬의 영역 전체에 걸쳐 균일한 형태학을 나타냈다.

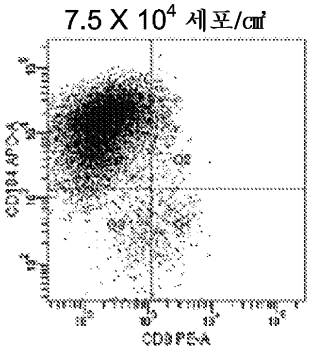
[0102] 도 6a 내지 도 6j는 실시예 2에 제시된 바와 같이 다양한 밀도로 씨딩되고, 이어서 제5기로 분화된 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포에서 하기 유전자 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다: ZIC1 (도 6a), CDX2 (도 6b), PDX-1 (도 6c), NKX6.1 (도 6d), NKX2.2 (도 6e), NGN3 (도 6f), NEUROD (도 6g), 인슐린 (도 6h), HNF4a (도 6i), 및 PTF1a (도 6j). 실시예 1에서 관찰된 효과와 달리, 초기 씨딩 밀도는 췌장 내배엽/내분비 마커의 발현에 극적으로 영향을 주었다. 특히, 1-1.5 × 10^5 세포/㎠ 미만의 초기 씨딩 밀도를 갖는 배양물로부터 분화된 세포는 외배엽 마커 ZIC 1 및 후장 마커, CDX2의 상향 조절을 보이면서, PDX-1, NKX6.1, NGN3, NKX2.2, NeuroD, 및 인슐린의 발현에 있어서 상당한 감소를 나타내었다.실시예 1로부터의 데이터와 함께 이 데이터는 CXCR4 및 다른 DE 관련 유전자의 높은 발현이 췌장 내배엽/내분비 유전자의 생성을 예측하지 못함을 확실히 강조하고 있다. 초기 씨딩 밀도는 췌장 내배엽/내분비 세포의 효율을 조절하는데 중요한 변수인 것으로 나타난다.

도면

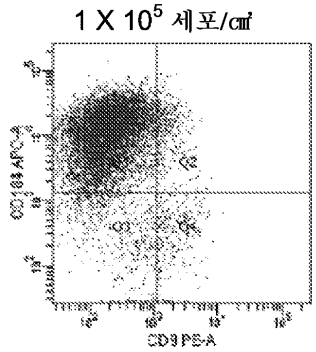
도면1a



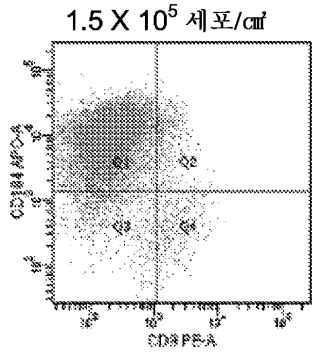
도면1b



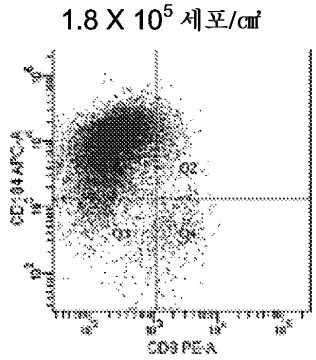
도면1c



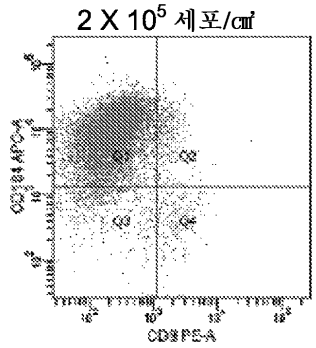
도면1d



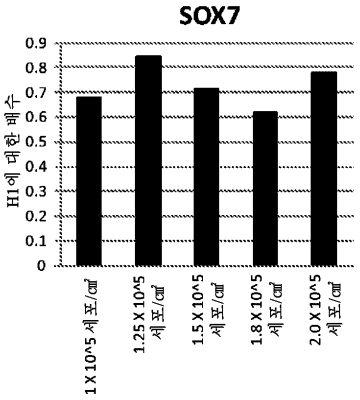
도면1e



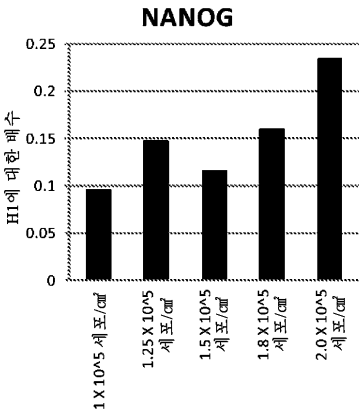
도면1f



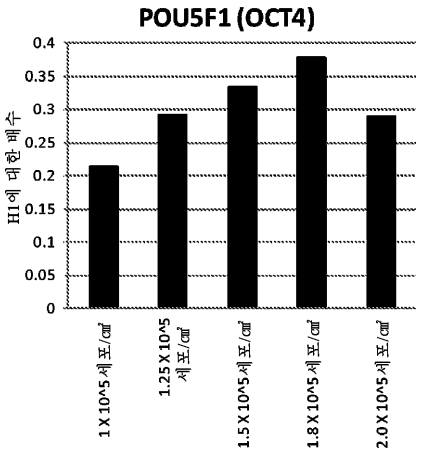
도면2a



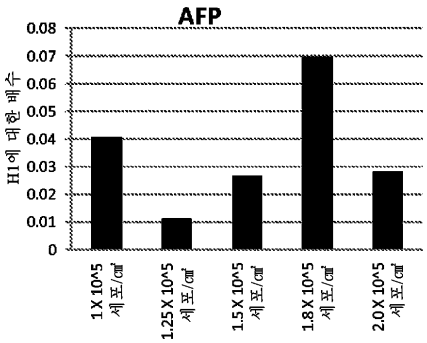
도면2b



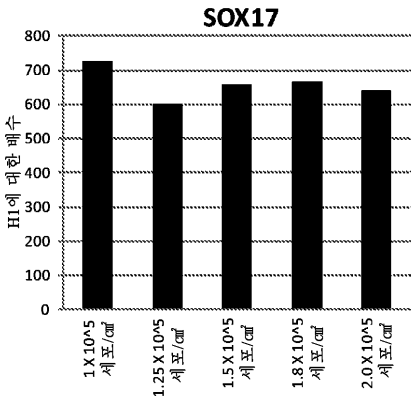
도면2c



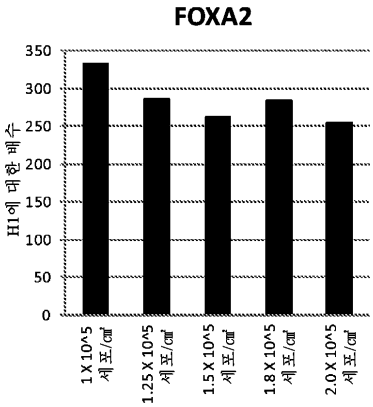
도면2d



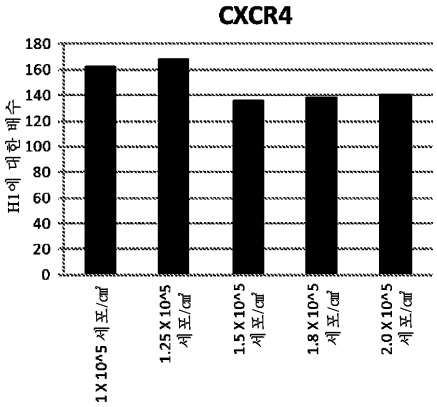
도면2e



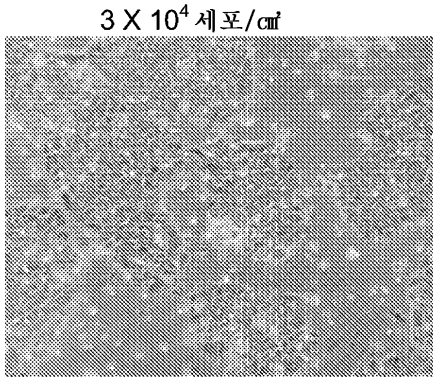
도면2f



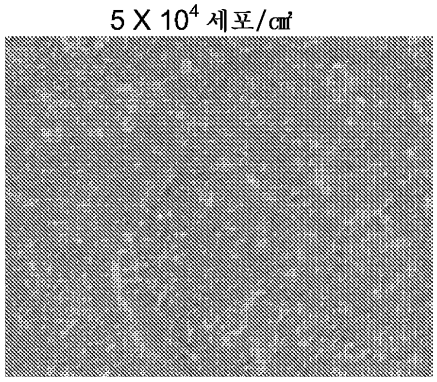
도면2g



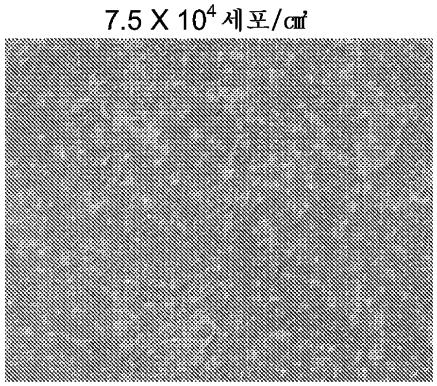
도면3a



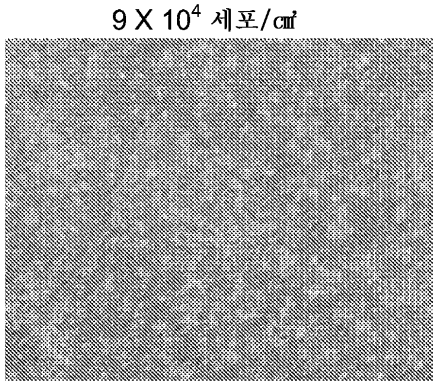
도면3b



도면3c

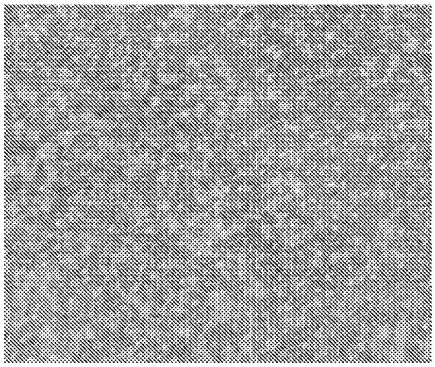


도면3d



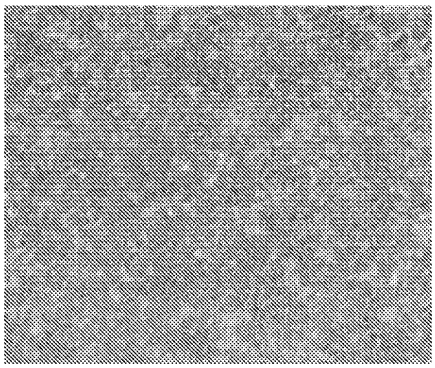
도면3e

1 X 10^5 세포/㎠



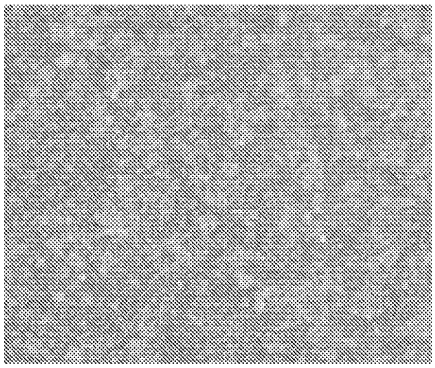
도면3f

1.1 X 10^5 세포/㎠



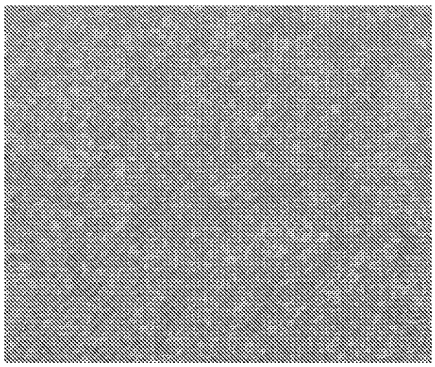
도면3g

1.2 X 10^5 세포/㎠



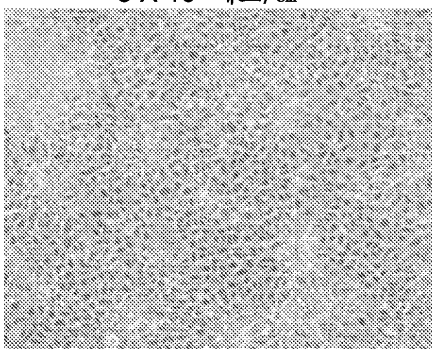
도면3h

1.5 X 10^5 세포/㎠



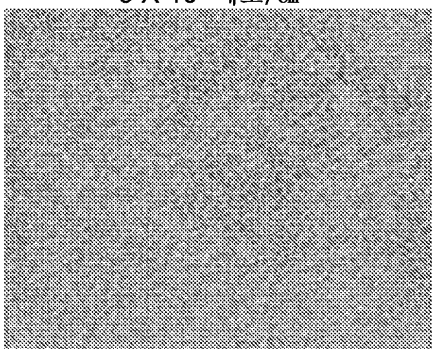
도면4a

3 X 10^4 세포/㎠

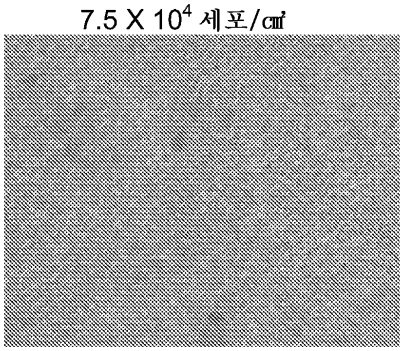


도면4b

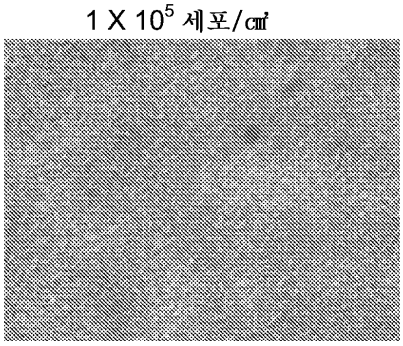
5 X 10^4 세포/㎠



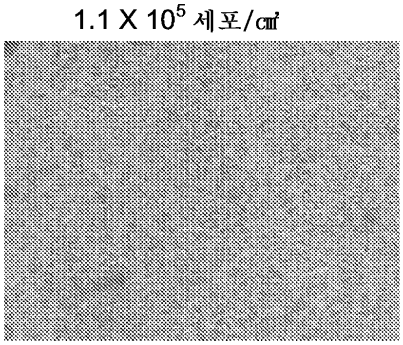
도면4c



도면4d

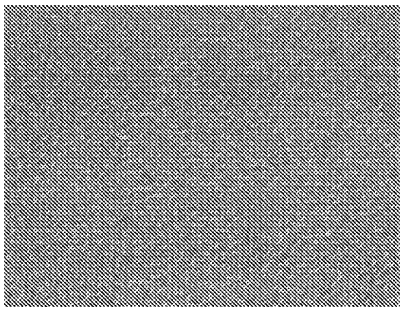


도면4e



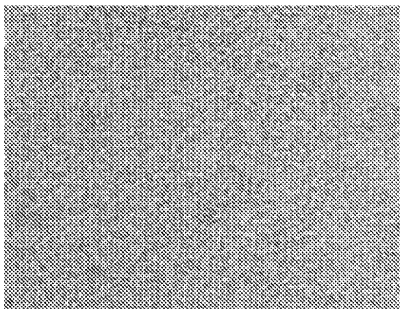
도면4f

1.2 X 10^5 세포/㎠



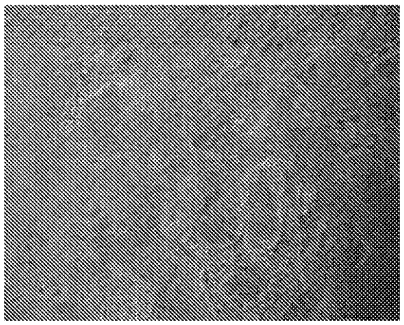
도면4g

1.5 X 10^5 세포/㎠



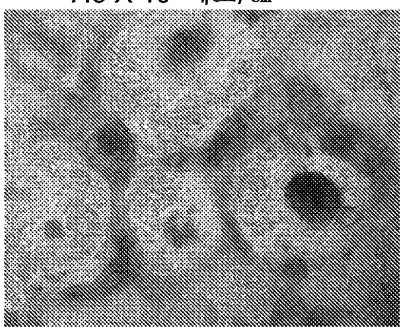
도면5a

5 X 10^4 세포/㎠



도면5b

7.5 X 10^4 세포/㎠



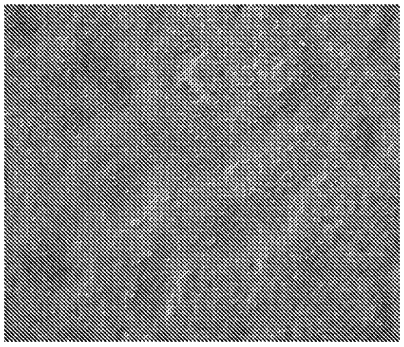
도면5c

1 X 10^5 세포/㎠

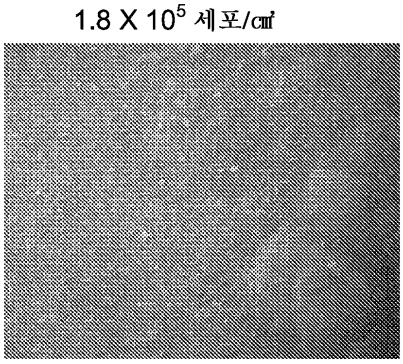


도면5d

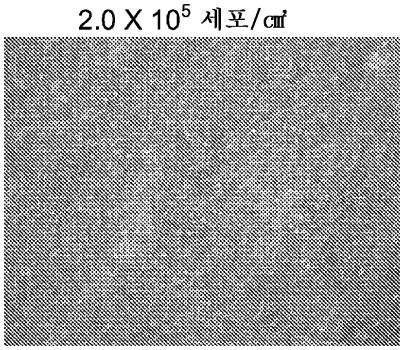
1.5 X 10^5 세포/㎠



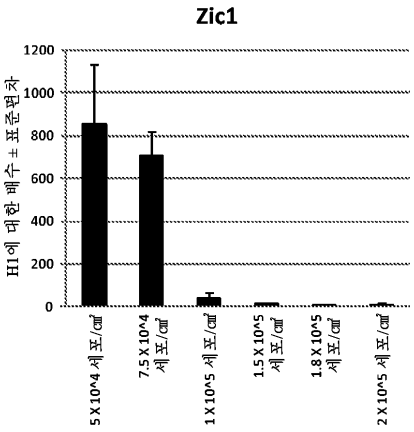
도면5e



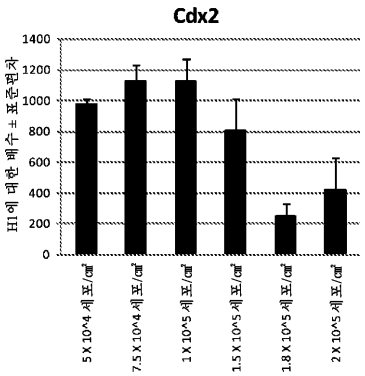
도면5f



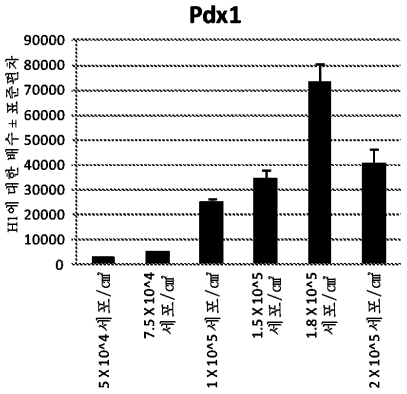
도면6a



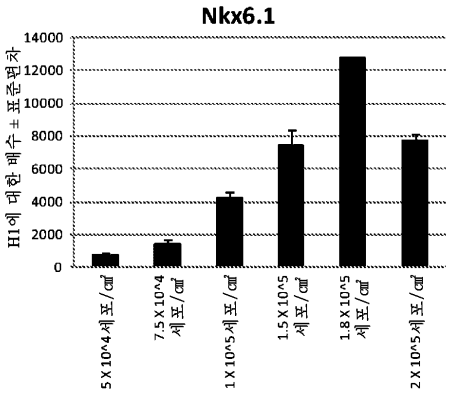
도면6b



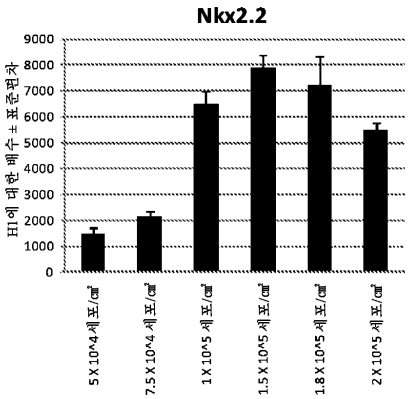
도면6c



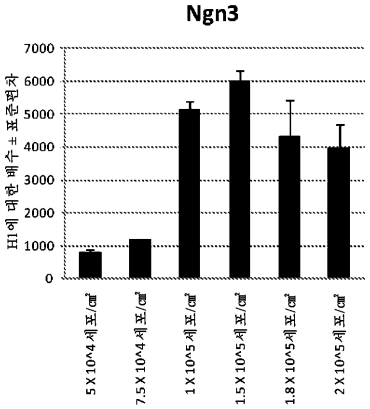
도면6d



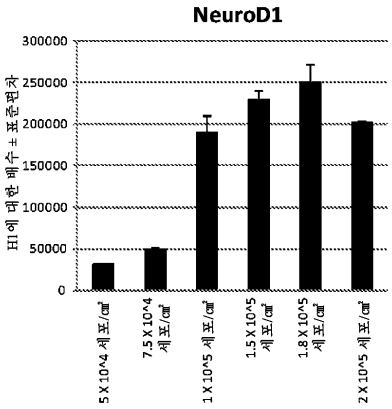
도면6e



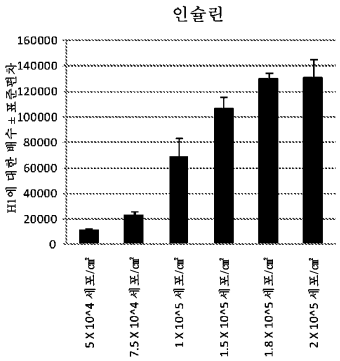
도면6f



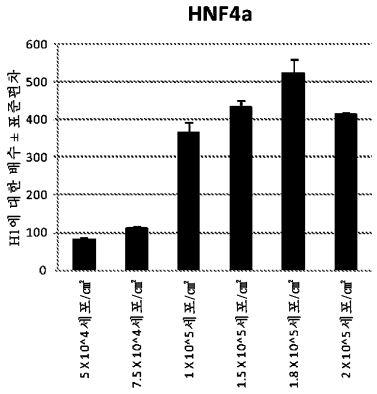
도면6g



도면6h



도면6i



도면6j

