



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0164012
(43) 공개일자 2022년12월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) A61K 35/30 (2015.01)
A61P 25/16 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7038245
- (22) 출원일자(국제) 2021년04월02일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년11월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/025596
- (87) 국제공개번호 WO 2021/203009
국제공개일자 2021년10월07일
- (30) 우선권주장
63/004,138 2020년04월02일 미국(US)

- (71) 출원인
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
- (72) 발명자
스튜더 로렌즈
미국 뉴욕주 10128 뉴욕 이스트 88번 스트리트 360
김태완
미국 뉴욕주 10044 뉴욕 #10에프 메인 스트리트 425
구소연
미국 뉴욕주 10128 뉴욕 아파트먼트 6비 써드 애비뉴 1619
- (74) 대리인
특허법인태평양

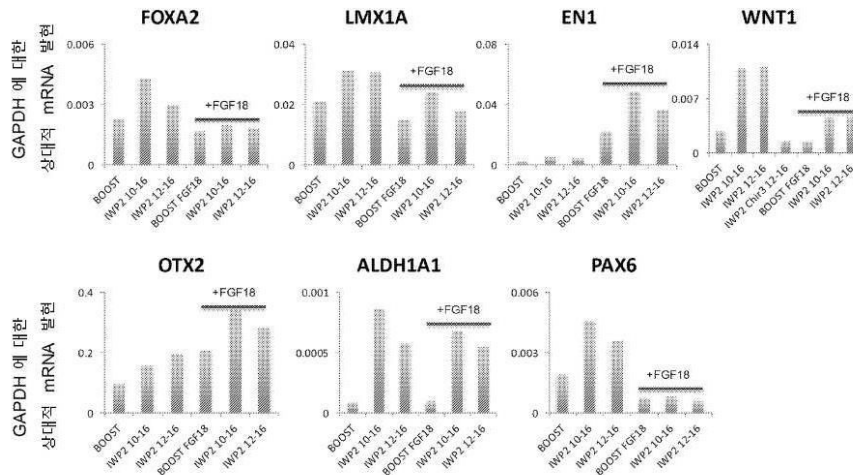
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 **중간뇌 도파민 뉴런의 생성 방법, 중간뇌 뉴런 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 중간뇌 도파민 뉴런 및 이의 전구체를 생성하는 방법, 이러한 방법에 의해 생성된 중간뇌 도파민 뉴런 및 이의 전구체 및 이러한 세포를 포함하는 조성물, 및 신경계 장애를 예방, 모델링, 및/또는 치료하기 위한 이의 용도를 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/16 (2018.01)

C12N 2501/113 (2013.01)

C12N 2501/41 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

줄기 세포를 SMAD(Small Mothers Against Decapentaplegic) 신호전달의 적어도 하나의 억제제, 소닉 헤지호그(SHH) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제, 및 윙리스(Wnt) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 접촉시키는 단계; 및

세포를 섬유아세포 성장 인자(FGF) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제 및 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉시켜 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현하는 분화된 세포의 개체군을 수득하는 단계;를 포함하는, 줄기세포의 분화를 유도하는 시험관 내 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일에 개시되는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 15일 이내에 개시되는 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일에 개시되는 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 10일, 11일, 12일, 또는 13일에 개시되는 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 적어도 약 1일 동안 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉되는 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 최대 약 30일 또는 최대 약 25일 동안 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉되는 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 약 5일, 약 15일, 또는 약 20일 동안 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉되는 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 4일, 5일, 6일, 7일, 14일, 15일, 19일, 또는 20일 동안 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉되는 방법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 상기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일 또는 적어도 약 10일에 개시되는 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 상기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이내, 또는 18일 이내에 개시되는 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 상기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일에 개시되는 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 상기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 10일, 11일, 12일, 또는 13일에 개시되는 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 적어도 약 1일 동안 및/또는 최대 약 20일 동안; 적어도 약 3일 동안 및/또는 최대 약 10일 동안; 또는 적어도 4일 동안 및/또는 최대 7일 동안 접촉되는 방법.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 약 5일 동안 접촉되는 방법.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 4일, 5일, 6일, 또는 7일 동안 접촉되는 방법.

청구항 17

청구항 1 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 약 5일 동안 접촉되는 방법.

청구항 18

청구항 1 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 6일 또는 7일 동안 접촉되는 방법.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 18 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 약 5일 동안 접촉되는 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 6일 또는 7일 동안 접촉되는 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 약 15일 동안 접촉되는 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 16일 또는 17일 동안 접촉되는 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 줄기 세포와의 최초 접촉으로부터 약 4일에 증가되는 방법.

청구항 24

청구항 23에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도로부터 약 200% 내지 약 1000%만큼 증가되는 방법.

청구항 25

청구항 23 또는 청구항 24에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도로부터 약 500%만큼 증가되는 방법.

청구항 26

청구항 23 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제의 농도는 약 1 μM 에서 약 5 μM 내지 약 10 μM 로 증가되는 방법.

청구항 27

청구항 23 내지 청구항 26 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 약 6 μM 의 농도로 증가되는 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 청구항 27 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 비표준 Wnt 신호전달 및 표준 Wnt 신호전달을 억제할 수 있는 것인 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 청구항 28 중 어느 한 항에 있어서,

Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 IWP2, IWR1-엔도, XAV939, IWP-01, Wnt-C59, IWP-L6, 및 ICG-001, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 청구항 29 중 어느 한 항에 있어서,

Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 IWP2를 포함하는 방법.

청구항 31

청구항 1 내지 청구항 30 중 어느 한 항에 있어서,

FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 FGF18, FGF17, FGF8a, FGF8b, FGF4, FGF2, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 청구항 31 중 어느 한 항에 있어서,

FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 중간뇌의 확장을 유발하고 중간뇌 유전자 발현을 상향조절할 수 있는 것인 방법.

청구항 33

청구항 32에 있어서,

FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 FGF18, FGF17, FGF8a, FGF4, FGF2, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서,

FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 FGF18을 포함하는 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 청구항 34 중 어느 한 항에 있어서,

SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 TGF β/액티빈-노달 신호전달의 억제제, 골 형태형성 단백질(BMP) 신호전달의 억제제, 또는 이의 조합을 포함하는 방법.

청구항 36

청구항 35에 있어서,

TGF β/액티빈-노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 ALK5의 억제제를 포함하는 방법.

청구항 37

청구항 35 또는 청구항 36에 있어서,

TGF β/액티빈-노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 SB431542, SB431542의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 38

청구항 37에 있어서,

SB431542의 유도체는 A83-01을 포함하는 방법.

청구항 39

청구항 35 내지 청구항 38 중 어느 한 항에 있어서,
TGFβ/액티빈-노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 SB431542를 포함하는 방법.

청구항 40

청구항 35에 있어서,
BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 LDN193189, 노긴, 도르소모르핀, LDN193189의 유도체, 노긴의 유도체, 도르소모르핀의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 41

청구항 35 또는 청구항 40에 있어서,
BMP의 적어도 하나의 억제제는 LDN-193189를 포함하는 방법.

청구항 42

청구항 1 내지 청구항 41 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 글리코젠 합성효소 키나제 3β(GSK3β) 신호전달의 억제제를 포함하는 방법.

청구항 43

청구항 1 내지 청구항 42 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 CHIR99021, CHIR98014, AMBMP 히드로클로라이드, LP 922056, 리튬, 디옥시콜산, BIO, SB-216763, Wnt3A, Wnt1, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 44

청구항 1 내지 청구항 43 중 어느 한 항에 있어서,
Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 CHIR99021을 포함하는 방법.

청구항 45

청구항 1 내지 청구항 44 중 어느 한 항에 있어서,
SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 SHH 단백질, 평활화 작용제(SAG), 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 46

청구항 45에 있어서,
상기 SHH 단백질은 재조합 SHH, 변형된 N-말단 SHH, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 47

청구항 46에 있어서,
상기 변형된 N-말단 SHH는 N-말단에 2개의 이소류신을 포함하는 방법.

청구항 48

청구항 46 또는 청구항 47에 있어서,
상기 변형된 N-말단 SHH는 비변형 N-말단 SHH에 대해 적어도 약 90%의 서열 동일성을 갖는 방법.

청구항 49

청구항 48에 있어서,
상기 비변형 N-말단 SHH는 비변형 마우스 N-말단 SHH 또는 비변형 인간 N-말단 SHH인 방법.

청구항 50

청구항 46 내지 청구항 49 중 어느 한 항에 있어서,
상기 변형된 N-말단 SHH는 SHH C25II를 포함하는 방법.

청구항 51

청구항 45에 있어서,
상기 SAG는 푸르모르파민을 포함하는 방법.

청구항 52

청구항 1 내지 청구항 51 중 어느 한 항에 있어서,
상기 분화된 세포의 적어도 약 80%는 상기 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 15일에 FOXA2 및 EN1을 발현하는 방법.

청구항 53

청구항 1 내지 청구항 52 중 어느 한 항에 있어서,
상기 분화된 세포의 약 80% 초과 또는 약 90% 초과는 상기 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 16일에 FOXA2 및 EN1을 발현하는 방법.

청구항 54

청구항 1 내지 청구항 53 중 어느 한 항에 있어서,
중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커는 EN1, OTX2, TH, NURR1, FOXA2, PITX3, LMX1A, LMO3, SNCA, ADCAP1, CHRNA4, SOX6, DAT, VMAT2, WNT1, GIRK2, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 55

청구항 1 내지 청구항 54 중 어느 한 항에 있어서,
상기 분화된 세포는 PAX6, EMX2, LHX2, SMA, SIX1, PITX2, SIM1, POU4F1, PHOX2A, BARHL1, BARHL2, GBX2, HOXA1, HOXA2, HOXB1, HOXB2, POU5F1, NANOG, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커를 발현하지 않는 방법.

청구항 56

청구항 1 내지 청구항 55 중 어느 한 항에 있어서,
적어도 하나의 양성 표면 마커를 발현하고 적어도 하나의 음성 표면 마커를 발현하지 않는 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 57

청구항 56에 있어서,
상기 적어도 하나의 양성 표면 마커는 CD171, CD184, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 58

청구항 56 또는 청구항 57에 있어서,

상기 적어도 하나의 양성 표면 마커는 CD184를 포함하는 방법.

청구항 59

청구항 56 내지 청구항 58 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 음성 표면 마커는 CD49e, CD99, CD340, 및 이의 조합으로부터 선택되는 방법.

청구항 60

청구항 56 내지 청구항 59 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 음성 표면 마커는 CD49e를 포함하는 방법.

청구항 61

청구항 56 내지 청구항 60 중 어느 한 항에 있어서,

CD184를 발현하고 CD49e를 발현하지 않는 세포를 분류하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 62

청구항 1 내지 청구항 61 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포는 다능 줄기 세포인 방법.

청구항 63

청구항 1 내지 청구항 62 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포는 비배아 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 다능 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 64

청구항 1 내지 청구항 63 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포는 인간 줄기 세포, 비-인간 영장류 줄기 세포, 또는 설치류 줄기 세포인 방법.

청구항 65

청구항 1 내지 청구항 64 중 어느 한 항에 있어서,

상기 줄기 세포는 인간 줄기 세포인 방법.

청구항 66

시험관 내 분화된 세포의 세포 개체군으로서,

상기 시험관 내 분화된 세포는 청구항 1 내지 청구항 65 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득되는 세포 개체군.

청구항 67

청구항 66의 세포 개체군을 포함하는 조성물.

청구항 68

청구항 67에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물인 조성물.

청구항 69

(a) SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제;

(b) SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제;

- (c) Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제;
- (d) Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제; 및
- (e) FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제;를 포함하는, 줄기 세포의 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체로의 분화를 유도하기 위한 키트.

청구항 70

청구항 69에 있어서,

- (f) 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현하는 분화된 세포의 개체군으로의 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 설명서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 71

(a) 청구항 66의 세포 개체군; 또는

- (b) 청구항 67 또는 청구항 68의 조성물; 중 하나의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 신경계 장애를 갖는 대상체에서 적어도 하나의 증상을 예방, 모델링, 및/또는 치료하는 방법.

청구항 72

청구항 71에 있어서,

상기 신경계 장애는 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소를 특징으로 하는 방법.

청구항 73

청구항 72에 있어서,

상기 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소는 연령과 관련된 것인 방법.

청구항 74

청구항 71 내지 청구항 73 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경계 장애는 파킨슨증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 75

청구항 71 내지 청구항 74 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경계 장애는 파킨슨증, 파킨슨병, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 76

청구항 71 내지 청구항 75 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경계 장애에 대한 증상은 경련, 운동완만증, 굽은 자세, 자세 불안정, 경직, 연하곤란, 및 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 77

대상체에서 신경계 장애를 갖는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방, 모델링, 및/또는 치료하는 데 사용하기 위한 청구항 66의 세포 개체군 또는 청구항 67 또는 청구항 68의 조성물.

청구항 78

청구항 77에 있어서,

상기 신경계 장애는 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소를 특징으로 하는 사용하기 위한 세포 개체군 또는 조성물.

청구항 79

청구항 78에 있어서,

상기 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소는 연령과 관련된 것인 사용하기 위한 세포 개체군 또는 조성물.

청구항 80

청구항 77 내지 청구항 79 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경계 장애는 파킨슨증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사용하기 위한 세포 개체군 또는 조성물.

청구항 81

청구항 77 내지 청구항 80 중 어느 한 항에 있어서,

상기 신경계 장애는 파킨슨증, 파킨슨병, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사용하기 위한 세포 개체군 또는 조성물.

청구항 82

청구항 77 내지 청구항 81 중 어느 한 항에 있어서,

신경계 장애에 대한 증상은 경련, 운동완만증, 굽은 자세, 자세 불안정, 경직, 연하곤란, 및 치매로 이루어진 군으로부터 선택되는 사용하기 위한 세포 개체군 또는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 4월 2일에 출원된 미국 가출원 번호 63/004,138에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용은 그 본문이 본 명세서에 참조로서 포함되고, 그에 대한 우선권이 주장된다.

[0003] **1. 서론**

[0004] 본 발명은 중간뇌 도파민(mDA) 뉴런 및 이의 전구체의 생성 방법, 이러한 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 및 이의 전구체 및 이러한 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 신경계 장애를 예방, 모델링(modeling), 및/또는 치료하기 위한 mDA 뉴런 및 이를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

배경 기술

[0005] **2. 발명의 배경**

[0006] 파킨슨병(PD)은 경련, 경직, 및 운동완만증과 같은 잘 알려진 운동 증상을 유발하는 mDA 뉴런의 손실을 특징으로 한다(Lees, *et al.* Lancet 373, 2055-2066 (2009)). 장, 후각 또는 피질 뉴런과 같은 다른 세포 유형도 영향을 받지만(Del Tredici, *et al.* Neuropathol Appl Neurobiol 42, 33-50 (2016)), mDA 뉴런은 새로운 세포 기반 치료법 개발(Barker, *et al.* Nature reviews Neurology 11, 492-503 (2015); Tabar, *et al.* Nat Rev Genet 15, 82-92 (2014)) 및 PD 질환 모델링(Sanchez-Danes, *et al.* EMBO Mol Med 4, 380-395 (2012); Miller, *et al.* Cell stem cell 13, 691-705 (2013); Chung, *et al.* Stem Cell Reports 7, 664-677 (2016); Reinhardt, *et al.* Cell stem cell 12, 354-367 (2013); Chung, *et al.* Science 342, 983-987 (2013); Cooper, *et al.* Sci Transl Med 4, 141ra190 (2012))의 핵심 초점으로 남아 있다. 인간 ES 및 iPS 세포를 둘 다 포함하는 인간 다능(pluripotent) 줄기 세포(hPSC)는 시험관 내에서 mDA 뉴런을 유도하기 위해 선택하는 세포 유형이 되었다. 인간 mDA 유도의 진전에도 불구하고 새로운 프로토콜이 필요하다. 세포 치료를 위해, 사용될 mDA 뉴런의 최적 유형 및 단계에 대한 명확한 합의가 아직 없으며 hPSC 유래의 것 대(vs) 1차 태아 DA 뉴런의 거동에서 상당한 분자 및 기능적 차이가 시험관 내(La Manno, *et al.* Cell 167, 566-580 e519 (2016)) 및 생체 내에서(Tiklova, *et al.* Nature communications 10, 581 (2019)) 보고되었다. 또한, 신뢰할 수 있는 세포 정제 전략이 없으며 hPSC 유래의 mDA 뉴런의 세포 생존은 낮게 유지된다(그래프트된 세포의 ~10%)(Sanchez-Danes, *et al.* EMBO Mol

Med 4, 380-395 (2012)). 낮은 mDA 생존은 임상 세포 투여량의 가변성을 유발할 수 있고 보다 광범위한 PD 커뮤니티를 위한 이 기술의 일상적인 적용을 복잡하게 만든다. 이러한 문제는 세포 치료 및 질환 모델링 적용 둘 다를 위해 중요하다.

[0007] 인간 질환 모델링에서, hPSC 주(line)에 걸친 mDA 뉴런 수율 및 순도의 변화로 질환 관련 표현형을 감지하기 위한 노이즈가 도입되고 신약 개발 노력은 복잡해진다. 정의된 mDA 뉴런 하위유형에 대한 접근은 PD의 세포 유형 특이적 취약성의 메커니즘에 대한 연구를 가능하게 할 것이다(Surmeier, *et al.* Cold Spring Harb Perspect Med 2, a009290 (2012); Anderegg, *et al.* FEBS Lett 589, 3714-3726 (2015); Chung, *et al.* Hum Mol Genet 14, 1709-1725 (2005); Brichta and Greengard. Front Neuroanat 8, 152 (2014)). 정의되고, 보다 강력한 mDA 뉴런 배양물에 대한 접근 및 mDA 뉴런 하위유형을 구동할 가능성은 PD 질환 모델링의 노력을 대단히 가속화할 것이고 향후 mDA 뉴런 세포 치료를 위한 개선된 제품을 허용할 수 있다.

[0008] 따라서, 개선된 생체 내 생존을 가지고 파킨슨병과 같은 신경계 장애를 치료하기에 적합한 mDA 뉴런을 생성하기 위한 개선된 방법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0009] 3. 발명의 요약

[0010] 본 발명은 mDA 뉴런 및 이의 전구체를 생성하는 방법, 이러한 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 및 이의 전구체, 이러한 세포를 포함하는 조성물, 및 신경계 장애를 예방 및/또는 치료하기 위한 이러한 세포 및 조성물의 용도를 제공한다.

[0011] 본 발명은 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 시험관 내 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 줄기 세포를 데카펜타플레직에 대한 작은 모체(Small Mothers Against Decapentaplegic, SMAD) 신호전달의 적어도 하나의 억제제, 소닉 헤지호그(Sonic hedgehog, SHH) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제, 및 윙리스(wingless, Wnt) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 접촉시키는 단계; 및 세포를 섬유아세포 성장 인자(FGF) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제 및 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉시켜 중간뇌 도파민 뉴런(mDA) 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현하는 분화된 세포의 개체군(population)을 수득하는 단계;를 포함한다.

[0012] 소정 구현예에서, 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 15일 이내에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 접촉은 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 10일, 11일, 12일, 또는 13일에 개시된다.

[0013] 소정 구현예에서, 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 적어도 약 1일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 최대 약 30일 또는 최대 약 25일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 약 5일, 약 15일, 또는 약 20일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 4일, 5일, 6일, 7일, 14일, 15일, 19일, 또는 20일 동안 접촉된다.

[0014] 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 5일에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 적어도 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 20일 이내에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 대부분의 중간뇌 도파민 뉴런 전구체가 유사분열-후 뉴런으로 분화되기 전에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 18일 이내에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 대부분의 중간뇌 도파민 뉴런 전구체가 유사분열-후 뉴런으로 분화되기 전에 개시된다. 소정 구현예에서, 세포와 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 접촉은 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 10일, 11일, 12일, 또는 13일에 개시된다. 소정 구현예에서,

세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 적어도 약 1일 동안 및/또는 최대 약 20일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 적어도 약 3일 동안, 및/또는 최대 약 10일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 적어도 4일 동안, 및/또는 최대 7일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 약 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 4일, 5일, 6일, 또는 7일 동안 접촉된다.

[0015] 소정 구현예에서, 세포는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 약 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 6일 또는 7일 동안 접촉된다.

[0016] 소정 구현예에서, 세포는 SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 약 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 6일 또는 7일 동안 접촉된다.

[0017] 소정 구현예에서, 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 약 15일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 16일 또는 17일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 줄기 세포와의 최초 접촉으로부터 약 4일에 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도로부터 약 200% 내지 약 1000%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도로부터 약 500%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 약 1 μ M에서 약 5 μ M 내지 약 10 μ M로 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 약 6 μ M의 농도로 증가된다.

[0018] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 표준 Wnt 신호전달을 억제할 수 있다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 비표준 Wnt 신호전달 및 표준 Wnt 신호전달을 억제할 수 있다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 IWP2, IWR1-엔도, XAV939, IWP-01, IWP12, Wnt-C59, IWP-L6, ICG-001, LGK-974, IWR-1, ETC-159, iCRT3, IWP-4, 살리노마이신, 피르비늄 파모에이트, iCRT14, FH535, CCT251545, KYA1797K, 우고닌(Wogonin), NCB-0846, 핵사크로로펜, PNU-74654, KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), 트립토나이드, BC2059, PKF115-584, 퀘르세틴, NSC668036, G007-LK, MSAB, LF3, JW55, 이소퀘르시트린, WIKI4, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 IWP2, IWR1-엔도, IWP-01, IWP12, Wnt-C59, IWP-L6, LGK-974, IWR-1, ETC-159, iCRT3, IWP-4, 살리노마이신, 피르비늄 파모에이트, iCRT14, FH535, CCT251545, 우고닌, NCB-0846, 핵사크로로펜, KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), BC2059, PKF115-584, 퀘르세틴, NSC668036, G007-LK, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 XAV939, ICG-001, PNU-74654, 트립토나이드, KYA1797K, MSAB, LF3, JW55, 이소퀘르시트린, WIKI4, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 IWP2를 포함한다.

[0019] 소정 구현예에서, FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 FGF18, FGF17, FGF8a, FGF8b, FGF4, FGF2, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 중간뇌의 확장을 유발하고 중간뇌 유전자 발현을 상향조절할 수 있다. 소정 구현예에서, FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 FGF18, FGF17, FGF8a, FGF4, FGF2, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 FGF18을 포함한다.

[0020] 소정 구현예에서, SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 TGF β /액티빈(Activin)-노달(Nodal) 신호전달의 억제제, 골 형태형성 단백질(BMP) 신호전달의 억제제, 또는 이의 조합을 포함한다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 ALK5의 억제제를 포함한다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 SB431542, SB431542의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, SB431542의 유도체는 A83-01을 포함한다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 SB431542를 포함한다. 소정 구현예에서, BMP 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 LDN193189, 노긴(Noggin), 도르소모르핀, LDN193189의 유도체, 노긴의 유도체, 도르소모르핀의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, BMP의 적어도 하나의 억제제는 LDN-193189를 포함한다.

[0021] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 글리코겐 합성효소 키나제 3 β (GSK3 β) 신호전달의 억제제를 포함한다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 CHIR99021, CHIR98014, AMBMP

히드로클로라이드, LP 922056, 리튬, 디옥시폴산, BIO, SB-216763, Wnt3A, Wnt1, Wnt5a, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 CHIR99021을 포함한다.

[0022] 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 SHH 단백질, 평활화 작용제(SAG), 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, SHH 단백질은 재조합 SHH, 변형된 N-말단 SHH, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 N-말단에 2개의 이소류신을 포함한다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 비변형 N-말단 SHH에 대해 적어도 약 90%의 서열 동일성을 갖는다. 소정 구현예에서, 비변형 N-말단 SHH는 비변형 마우스 N-말단 SHH 또는 비변형 인간 N-말단 SHH이다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 SHH C251I를 포함한다. 소정 구현예에서, SAG는 푸르모르파민을 포함한다.

[0023] 소정 구현예에서, 분화된 세포의 적어도 약 80%는 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 약 15일에 FOXA2 및 EN1을 발현한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포의 약 80% 초과 또는 약 90% 초과는 줄기 세포와 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제의 최초 접촉으로부터 16일에 FOXA2 및 EN1을 발현한다.

[0024] 소정 구현예에서, 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커는 EN1, OTX2, TH, NURR1, FOXA2, PITX3, LMX1A, LMO3, SNCA, ADCAP1, CHRNA4, GIRK2, ALDH1A1, SOX6, WNT1, VMAT2, DAT (SLC6A3), 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 분화된 세포는 PAX6, EMX2, LHX2, SMA, SIX1, PITX2, SIM1, POU4F1, PHOX2A, BARHL1, BARHL2, GBX2, HOXA1, HOXA2, HOXB1, HOXB2, POU5F1, NANOG, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커를 발현하지 않는다.

[0025] 소정 구현예에서, 방법은 적어도 하나의 양성 표면 마커를 발현하고 적어도 하나의 음성 표면 마커를 발현하지 않는 세포를 분리하는 단계를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 양성 표면 마커는 CD171, CD184, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 양성 표면 마커는 CD184를 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 음성 표면 마커는 CD49e, CD99, CD340, 및 이의 조합으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 음성 표면 마커는 CD49e를 포함한다. 소정 구현예에서, 방법은 CD184를 발현하고 CD49e를 발현하지 않는 세포를 분류하는 단계를 포함한다.

[0026] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 다능 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 비배아 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 다능 줄기 세포, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 인간 줄기 세포, 비-인간 영장류 줄기 세포, 또는 설치류 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.

[0027] 본 발명은 시험관 내 분화된 세포의 세포 개체군을 제공하며, 여기서 시험관 내 분화된 세포는 본 명세서에서 개시된 분화 방법에 의해 수득된다.

[0028] 본 발명은 본 명세서에 개시된 세포 개체군을 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물이다.

[0029] 또한, 본 발명은 줄기세포에서 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체로의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 (a) SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제, (b) SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제; (c) Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제; (d) Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제; 및 (e) FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제를 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 (f) 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현하는 분화된 세포의 개체군으로의 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 설명서를 추가로 포함한다.

[0030] 본 발명은 대상체에서 신경계 장애를 예방, 모델링, 및/또는 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 본 명세서에 개시된 세포 개체군 또는 본 명세서에 개시된 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 개시된 세포 개체군 또는 본 명세서에 개시된 조성물은 대상체에서 신경계 장애를 예방, 모델링, 및/또는 치료하는 데 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 신경계 장애는 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소를 특징으로 한다. 소정 구현예에서, 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소는 연령과 관련이 있다. 소정 구현예에서, 신경계 장애는 파킨슨증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 다발성 경화증, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 신경계 장애는 파킨슨증, 파킨슨병, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 신경계 장애의 증상은 경련, 운동완만증, 굽은 자세, 자세 불안정, 경

직, 연하곤란, 및 치매로 이루어진 군으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

4. 도면의 간단한 설명

도 1은 상이한 프로토콜을 사용하여 분화된 mDA 세포에서 ALDH1A1 유도에 대한 Wnt 신호전달의 효과를 보여준다. FGF18이 있거나 없는, Wnt-부스트, Wnt-부스트 + IWP2 (10일-16일), 또는 Wnt-부스트 + IWP2(12일-16일) 프로토콜을 사용하여 생성된 16일차에 분화된 mDA 세포에서 FOXA2, LMX1A, EN1, WNT1, OTX2, ALDH1A1 및 PAX6의 mRNA 발현 수준을 평가하였다. SMA mRNA 발현 수준은 검출할 수 없었다.

도 2a 및 2b는 FGF18 및 IWP2와 조합된 Wnt 부스트 프로토콜이 최적의 A/P 및 D/V 패턴화된 mDA 전구체를 생성했음을 보여준다. 도 2a는 상이한 프로토콜을 사용하여 16일차에 분화된 mDA 전구체의 FACS 분석을 보여준다. 세포를 항-EN1 및 항-FOXA2 항체로 염색하였다. 도 2b는 16일차에 분화된 mDA의 면역 염색 이미지를 보여준다.

도 3은 분화된 세포에서 마커 유전자의 발현에 대한 IWP2의 효과를 나타낸다. 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 16일차에 분화된 세포에서 FOXA2, LMX1A, OTX2, EN1, ALDH1A1, BARHL2, BARHL1, PAX6, ALDH2, 및 WNT1의 mRNA 발현 수준을 측정하였다.

도 4는 분화된 세포에서 마커 유전자의 발현에 대한 IWP2의 효과를 보여준다. 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 40일차에 분화된 세포에서 FOXA2, LMX1A, OTX2, EN1, ALDH1A1, PAX6 및 PITX3의 mRNA 발현 수준을 평가하였다.

도 5는 이중 분류 전략의 게이팅 패러다임을 보여준다. 분화된 mDA 세포는 CD49e 및 CD184 마커 단백질의 발현을 기반으로 분류되었다.

도 6은 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 형태를 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 7은 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 도파민 뉴런 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 8은 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 비도파민 뉴런 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 9a-9c는 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. 도 9a는 FOXA2, TH, 및 MAP2의 발현을 보여준다. 도 9b는 ALDH1A1, EN1, 및 TH의 발현을 보여준다. 도 9c는 ALDH1A1, EN1, 및 TH의 발현을 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 10a-10b는 세포를 마우스에 이식한 후 분화된 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 분화된 세포를 수득하였고, 마우스에 이식하였다. 이식 1개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였다. hNCAM, TH, 및 ALDH1A1의 발현을 평가하였다(도 10a). Ki67의 발현도 평가하였다(도 10b).

도 11a 내지 11c는 세포를 마우스에 이식한 후 분화된 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 분화된 세포를 수득하였고, 마우스에 이식하였다. 이식 1개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였다. 도 11a는 SC121의 발현을 보여준다. 도 11b는 TH 및 Nurr1-GFP의 발현을 보여준다. 도 11c는 ALDH1A1 및 SOX6-RFP의 발현을 보여준다.

도 12는 분화된 세포에서 마커 유전자의 발현에 대한 IWP2의 효과를 보여준다. 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 16일차에 분화된 세포에서 마커 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하였다.

도 13은 분화된 세포에서 마커 유전자의 발현에 대한 IWP2의 효과를 보여준다. 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 40일차에 분화된 세포에서 다양

[0031]

한 유전자의 mRNA 발현 수준을 평가하였다.

도 14a 및 14b는 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 60일차에 분화된 세포의 면역형광 염색의 대표적인 이미지를 보여준다. 도 14a는 각각의 조건에 대해 FOXA2, TH, 및 MAP2를 발현하는 60일차에 분화된 세포의 면역 염색 이미지를 보여준다. 도 14b는 60일차에 TH+ 도파민 뉴런 중에서 EN1의 차등 발현을 나타내는, EN1 및 TH를 표시한 상이한 염색 패널을 보여준다.

도 15는 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 16은 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 17은 분류된 60일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 18은 분류된 60일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 19는 12일부터 16일까지 IWP2 및 FGF18을 첨가하거나 첨가하지 않은, 그리고 17일부터 30일까지 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 30일차에 분화된 세포에서 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다.

도 20은 12일부터 25일까지, 또는 12일부터 16일까지 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, 그리고 12일부터 16일까지 FGF18을 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt-부스트 프로토콜로부터 생성된 25일차에 분화된 세포의 FACS 매개 분류를 보여준다.

도 21은 분류된 28일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다. 세포는 12일부터 25일까지, 또는 12일부터 16일까지 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, 그리고 12일부터 16일까지 FGF18을 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt 부스트 하에서 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 22는 분류된 28일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 비도파민 뉴런 마커 유전자의 mRNA 발현을 보여준다. 세포는 12일부터 25일까지, 또는 12일부터 16일까지 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, 그리고 12일부터 16일까지 FGF18을 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt 부스트 하에서 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 23은 분류된 28일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 면역 염색 이미지를 보여준다. 세포는 12일부터 25일까지, 또는 12일부터 16일까지 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, 그리고 12일부터 16일까지 FGF18을 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt 부스트 하에서 시험관 내 분화 25일째에 분류되었다.

도 24는 세포를 마우스에 이식한 후 분화된 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 분화된 세포를 수득하였고, 마우스에 이식하였다. 이식 1개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였다. FOXA2, SC121, ALDH1A1, EN1 및 Ki67의 발현을 평가하였다.

도 25는 세포를 마우스 뇌에 이식한 후 분화된 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 분화된 세포를 수득하였고, 마우스에 이식하였다. 이식 1개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였고 Ki67로 표시된 임의의 증식 세포에 대해 평가하였다.

도 26은 (16일차에 분화된) 도파민 전구체의 동결 배치의 마우스 선조체내 그래프트의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 16일차에 분화된 세포를 수득하였고, 제어된 속도의 냉동기를 사용하여 동결했다. 동결된 세포를 해동하고 NOD-SCID 마우스의 선조체에 직접 이식하였다. 이식 1개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였다.

도 27은 세포를 마우스에 이식한 후 분화된 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 분화된 세포를 획득하였고, 마우스에 이식하였다. 이식 4개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였다.

도 28은 분류된 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포를 마우스에 이식한 후 분화된 세포의 대표적인 면역 염색 이미지를 보여준다. Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜 하에 시험관 내 분화 25일째에 세포를 분류하고, 마우스에 이식하였다. 이식 1개월 후 그래프팅된 세포를 면역 염색하였다.

도 29는 TH 양성 세포 중 *PITX3* 및 *NURR1*의 대표적인 RNA 형광 인-시츄(FISH) 이미지를 보여준다. mRNA 신호는 세포 내 점으로 측정되었고, 분화 동안 35일, 59일, 및 82일에 점의 수를 정량화하였다. Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (12일-16일) 프로토콜을 사용하여 분화된 세포를 획득하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 5. 발명의 상세한 설명

[0033] 본 발명은 mDA 뉴런 및 이의 전구체를 생성하는 방법, 이러한 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 및 이의 전구체, 이러한 세포를 포함하는 조성물, 및 신경계 장애를 예방 및/또는 치료하기 위한 이의 용도를 제공한다.

[0034] Wnt 신호전달은 mDA 뉴런 사양에 중요하다. 본 발명자들의 이전 연구는 Wnt-부스팅으로 EN1의 강력한 유도 및 후뇌 및 시상하부 둘 다의 억제 및 전뇌 운명이 초래됨을 보여준다. 예를 들어, WO2016/196661에 개시된 Wnt-부스팅 방법을 참고하며, 이는 그 전문이 참조로서 포함된다. 그러나, 연장된 Wnt 신호전달은 mDA 뉴런 분화 및 하위유형 사양을 방해할 수 있다. 또한, *PITX3* 및 *ALDH1A1*의 발현은 이전 분화 프로토콜에서 차선책 수준에 있다. 본 발명은 Wnt 억제제를 사용한 치료가 mDA 뉴런 유도를 개선할 수 있다는 발견에 기초한다. 또한, Wnt 억제제를 사용한 이러한 치료는 EN1 및 다른 mDA 뉴런 마커의 발현에 부정적인 영향을 미치지 않으며, 예를 들어, Wnt 억제제를 포함하는 본 명세서에서 개시된 분화 방법은 EN1 및 다른 mDA 뉴런 마커의 지속적인 발현을 초래한다. 또한, Wnt 억제제를 사용한 치료는 오염 마커(비-mDA 뉴런 마커)의 출현을 증가시키지 않는다.

[0035] 또한 본 발명은 Wnt 억제제 치료가 A9 하위유형 뉴런 및 A10 하위유형 뉴런의 더 나은 구분으로 이어진다는 발견에 기초한다. 소정 구현예에서, Wnt 억제제 치료는 A9 하위유형 mDA(예로, *ALDH1A1*)를 나타내는 마커의 mRNA 발현에 영향을 미친다(예로, 증가시킨다). A9 하위유형 뉴런을 나타내는 마커의 비제한적 예는 *LMO3*, *ALDH1A1*, *SOX6*, *VGLUT2*, 및 *NDNF*를 포함한다. 소정 구현예에서, Wnt 억제제 치료는 시험관 내 및 생체 내에서 (EN1⁺ 세포 중에서) *ALDH1A1*⁺ 세포의 수를 증가시킨다. *ALDH1A1* 발현은 EN1 공동 발현이 없이 높을 수 있고, *ALDH1A1*⁺EN1⁻ 세포는 반드시 A9 하위유형 뉴런인 것은 아니며 명확히 정의된 세포가 아니다. Wnt 억제제 치료를 포함하는 본 명세서에서 개시된 분화 방법은 그래프팅 후 시험관 내 및 생체 내에서 *ALDH1A1* 및 EN1 둘 다를 발현하는 세포의 높은 생성을 초래한다. 소정 구현예에서, Wnt 억제제 치료는 A10 하위유형 mDA를 나타내는 마커의 mRNA 발현에 추가로 영향을 미친다(예로, 증가시킨다). A10 하위유형 뉴런을 나타내는 마커의 비제한적 예는 *CALB1*, *CALB2*, *OTX2*, *CCK*, *VGAT(Slc32a1)*, 및 *VIP*를 포함한다. A9 및 A10 하위유형 마커의 증가된 mRNA 발현은 A9 및 A10 하위유형 뉴런의 적절한 사양을 지원한다. 예를 들어, 특정 A10 하위유형 뉴런 마커(예로, *CALB1* 및 *CALB2*)는 세포가 A9 또는 A10 아이덴티티(identity)를 나타내도록 적절하게 지정된 경우에만 볼 수 있다.

[0036] 또한, Wnt 억제제 치료는 증식을 감소시키고 mDA 뉴런 성숙도 마커의 발현을 증가시킬 수 있다. mDA 뉴런 성숙도 마커의 비제한적 예는 *DAT*, *VMAT2*, *PITX3*, *CHRNA6*, 및 *CHRN3*를 포함한다.

[0037] 또한, Wnt 억제제 치료는 분화를 개선하고 남아 있는 Ki67⁺ 증식 세포를 감소시킬 수 있으며, 이는 DA 뉴런의 안전성 프로필을 개선할 수 있다.

[0038] 또한, 본 명세서에서 개시된 분화 방법(예로, Wnt 억제제 치료를 포함함)에 의해 줄기 세포로부터 유래된 그래프팅된 도파민 뉴런은 섬유, 특히 기능 회복을 가장 효율적으로 촉발할 것으로 예상되는 *ALDH1A1* 섬유의 성장이 개선된다.

[0039] 또한, 본 발명은 본 발명에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 및 이의 전구체가 개선된 생체 내 생존율을 가지고, 예를 들어 생체 내 이식 후 수 개월 또는 심지어 수 년 동안 생존할 수 있다는 발견에 기초한다.

[0040] 본 발명은 인간 사용 직전의 임상 등급 프로토콜을 포함하는, 줄기 세포(예로, 인간 다능 줄기 세포(hPSC))로부터의 신경 유도 및 mDA 뉴런 분화를 위한 개선된 프로토콜을 제공한다. 개선된 mDA 뉴런 분화 프로토콜에 대한

접근을 통해 현장에서 더 적은 수의 세포를 사용하고, 보다 완전한 mDA 뉴런 복원을 달성하며 잠재적인 부작용을 줄일 수 있다. 따라서, 본 발명에 개시된 프로토콜은 안전성을 개선하는 한편, 그래프트 내 세포 유형을 오염시키는 효과는 불분명하게 남아 있다. 마지막으로, 본 발명에 개시된 프로토콜은 접시에서 인간 질환을 모델링할 때 mDA 뉴런의 정밀도 및 재현성을 향상시킨다. 본 발명에 개시된 프로토콜은 mDA 분화의 충실도와 견고성을 개선한다. 본 발명에 개시된 프로토콜은 광범위하게 적용될 수 있고 광범위하게 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에 개시된 주제의 비제한적인 구현에는 본 명세서 및 실시예에 의해 설명된다.

[0042] 제한이 아닌 발명의 명료함을 위해, 상세한 설명은 다음 하위 섹션으로 나뉜다.

[0043] 5.1. 정의;

[0044] 5.2. 줄기세포의 분화 방법;

[0045] 5.3. 세포 개체군 및 조성물;

[0046] 5.4. 신경계 장애의 예방, 모델링, 및/또는 치료 방법; 및

[0047] 5.5. 키트.

[0048] **5.1. 정의**

[0049] 본 명세서에서 이용되는 용어는 일반적으로 본 발명의 맥락 내에서 그리고 각각의 용어가 이용되는 구체적 맥락에서, 본 기술분야에서의 이들의 일반 의미를 갖는다. 소정 용어가 아래에서, 또는 명세서의 다른 곳에서 논의되어, 본 발명의 조성물 및 방법 그리고 이들을 어떻게 제조하고 이용하는지의 설명에 있어서 실시자에게 추가적인 가이드를 제공한다.

[0050] 용어 "약" 또는 "대략"은 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 때의 특정 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내를 의미하며, 부분적으로 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 의존할 것이다. 예를 들면, "약"은 본 기술분야의 관례에 따라 3 또는 3 초과의 표준 편차 내임을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 해당 값의 최대 20%, 예컨대, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1%까지의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 상기 용어는 크기의 차수(order) 내, 예컨대 값의 5배 내 또는 2배 내를 의미할 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 사용될 때, "신호 전달 단백질"에 대한 용어 "신호전달"은 막 수용체 단백질에 대한 리간드 결합 또는 일부 다른 자극에 의해 활성화되거나 달리 영향 받는 단백질을 나타낸다. 신호 전달 단백질의 예는 비제한적으로 SMAD, 베타-카데닌을 포함하는, 윙리스(Wnt) 복합체 단백질, NOTCH, 전환 성장 인자 베타(TGFP), 액티빈, 노달, 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3P) 단백질, 뼈 형태형성 단백질(BMP) 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)를 포함한다. 여러 세포 표면 수용체 또는 내부 수용체 단백질에 있어서, 리간드-수용체 상호작용은 세포의 반응에 직접 연관되지 않는다. 리간드 활성화된 수용체는 세포의 거동에 대한 리간드의 궁극적인 생리적 효과가 생성되기 전에 먼저 세포 내부의 다른 단백질과 상호작용할 수 있다. 종종, 몇몇 상호작용 세포 단백질의 연쇄 거동은 수용체 활성화 또는 억제 이후 변경된다. 수용체 활성화에 의해 유도되는 전체 세포 변화 세트는 신호 전달 메커니즘 또는 신호전달 경로로 불린다.

[0052] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "신호"는 세포 구조 및 기능에서의 변화를 제어하는 내부 및 외부 인자를 나타낸다. 이들은 성질 상 화학적 또는 물리적일 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "리간드"는 수용체에 결합하는 분자 및 단백질, 예로, 전환 성장 인자-베타(TGFP), 액티빈, 노달, 뼈 형태형성 단백질(BMP) 등을 나타낸다.

[0054] 본 명세서에서 사용될 때, "억제제"는 분자 또는 경로의 신호전달 기능(예로, Wnt 신호전달 경로, 및 SMAD 신호 전달)을 방해하는(예로, 줄이는, 감소시키는, 억제하는, 제거하는, 또는 차단하는) 화합물 또는 분자(예로, 소분자, 펩타이드, 펩타이드 모사체, 천연 화합물, siRNA, 안티센스 핵산, 앵타머, 또는 항체)를 나타낸다. 억제제는 언급되는 단백질(신호전달 분자, 언급되는 신호전달 분자에 관여되는 임의의 분자, 언급되는 연관된 분자, 예컨대 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3β))(예로, 비제한적으로, 본 명세서에 기재된 신호전달 분자를 포함)의 임의의 활성을 변화시키는 임의의 화합물 또는 분자일 수 있다. 예를 들어, SMAD 신호전달의 억제제는 예로, 직접적으로 SMAD 신호전달과 접촉하거나, SMAD mRNA와 접촉하거나, SMAD의 입체형태 변화를 유도하거나, SMAD 단백질 수준을 감소시키거나, 또는 신호전달 파트너와의 SMAD 상호작용을 방해하고, SMAD 표적 유전자의 발현에 영향을 미침으로써 기능할 수 있다.

- [0055] 억제제는 상류 신호전달 분자(예로, 세포의 도메인 내에서, 신호전달 분자 및 효과의 예에는 다음이 포함된다: 뼈 형태형성 단백질을 격리하고, ALK 수용체 1,2,3, 및 6의 활성화를 억제함으로써 하류 SMAD 활성화를 방지하는 노긴. 마찬가지로, 코르딘(Chordin), 케르베루스(Cerberus), 폴리스타틴(Follistatin)은 유사하게 SMAD 신호전달의 세포의 활성화를 격리한다. 막통과 단백질 밤비(Bambi) 역시 세포의 TGFβ 신호전달 분자를 격리하는 슈도-수용체로서 작용한다)를 가로챌으로써 생물학적 활성, 예로, SMAD 생물학적 활성을 간접적으로 조절하는 분자도 포함한다. 상류 또는 하류 단백질을 차단하는 항체가 단백질 신호전달 등의 세포의 활성화를 중화하기 위한 용도로서 고려된다. 앞선 예는 SMAD 신호전달 억제에 관한 것이지만, 비슷하거나 유사한 메커니즘을 사용하여 다른 신호전달 분자를 억제할 수 있다. 억제제의 예는 비제한적으로 SMAD 신호전달 억제를 위한 LDN193189(LDN) 및 SB431542(SB)(LSB), 및 Wnt 억제를 위한 IWP2를 포함한다. 억제제는 언급되는 분자의 억제를 결국 유도하는, 언급된 신호전달 분자의 상류 분자에 결합하고 이에 영향을 미침으로써 유도되는 억제에 부가하여, 경쟁적 억제(또 다른 공지된 결합 화합물의 결합을 배제하거나 줄이는 방식으로 활성 부위에 결합함) 및 알로스테리 억제(단백질의 활성 부위에 대한 화합물의 결합을 방해하는 방식으로 단백질 입체형태를 변화시키는 방식으로 단백질에 결합함)의 관점에서 설명된다. 억제제는 신호전달 표적에 실제로 접촉함으로써 신호전달 표적 또는 신호전달 표적 경로를 억제하는 "직접적 억제제"일 수 있다.
- [0056] 본 명세서에서 사용될 때, "활성화제"는 분자 또는 경로의 신호전달 기능, 예로, Wnt 신호전달, SHH 신호전달 등의 활성화를 증가시키거나, 유도하거나, 자극하거나, 활성화하거나, 촉진하거나, 또는 향상시키는 화합물을 나타낸다.
- [0057] 리간드에 대해 본 명세서에 사용된 용어 "Wnt" 또는 "윙리스"는 Wnt 수용체, 예컨대 프리즐드(Frizzled)의 수용체 및 LRPDerailed/RYK 수용체 패밀리와 상호작용할 수 있는 분비된 단백질(예로, 인간의 인테그레이션 1) 군을 나타낸다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "Wnt 또는 윙리스 신호전달 경로"는 β-카테닌을 포함하고 또는 포함하지 않고 매개되는, Wnt 패밀리의 리간드 및 Wnt 패밀리의 수용체, 예컨대 프리즐드 및 LRPDerailed/RYK 수용체로 이루어진 신호전달 경로를 나타낸다. Wnt 신호전달 경로는 표준 Wnt 신호전달(예로, β-카테닌에 의한 매개) 및 비표준 Wnt 신호전달(β-카테닌이 없는 매개)을 포함한다.
- [0058] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "유도체"는 유사한 코어 구조를 갖는 화학적 화합물을 나타낸다.
- [0059] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "세포의 개체군" 또는 "세포 개체군"은 적어도 2개 세포의 군을 나타낸다. 비제한적 예에서, 세포 개체군은 적어도 약 10개, 적어도 약 100개, 적어도 약 200개, 적어도 약 300개, 적어도 약 400개, 적어도 약 500개, 적어도 약 600개, 적어도 약 700개, 적어도 약 800개, 적어도 약 900개, 적어도 약 1000개 세포를 포함할 수 있다. 개체군은 하나의 세포 유형을 포함하는 순수한 개체군, 예컨대 중간뇌 DA 전구체의 개체군, 또는 분화되지 않은 줄기 세포의 개체군, 예로, A9 하위유형 중간뇌 도파민 뉴런의 개체군일 수 있다. 대안적으로, 개체군은 하나를 초과하는 세포 유형을 포함할 수 있으며, 예를 들어 혼합된 세포 개체군, 예로, A9 하위유형 중간뇌 도파민 뉴런 및 A10 하위유형 중간뇌 도파민 뉴런의 혼합된 세포 개체군일 수 있다.
- [0060] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "줄기 세포"는 배양 중 무한한 기간 동안 분열하고 특화된 세포를 생성하는 능력을 갖는 세포를 나타낸다.
- [0061] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "배아 줄기 세포" 및 "ESC"는 배양 중 연장된 기간 동안 분화하지 않고 분열할 수 있고, 3개의 일차 배엽의 세포 및 조직으로 발달하는 것으로 알려져 있는, 착상 전기 배아로부터 유래되는 원시(분화되지 않은) 세포를 나타낸다. 인간 배아 줄기 세포는 인간 배아에서 유래되는 배아 줄기 세포를 나타낸다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "인간 배아 줄기 세포" 또는 "hESC"는 최대로 주머니배 단계까지를 포함하는 초기 단계의 인간 배아에서 유래되고, 배양 중 연장된 기간 동안 분화하지 않고 분열할 수 있으며, 3개 일차 배엽의 세포 및 조직으로 발달하는 것으로 알려져 있는 유형의 다능 줄기 세포를 나타낸다.
- [0062] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "배아 줄기 세포주"는 최대 수 일, 수 개월 내지 수 년 동안 분화하지 않고 증식을 허용하는 시험관 내 조건 하에 배양된 배아 줄기 세포의 개체군을 나타낸다.
- [0063] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "다능"은 내배엽, 중배엽, 및 외배엽을 포함하는 유기체의 3가지 발달 배엽으로 발달하는 능력을 나타낸다.
- [0064] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "전능(totipotent)"은 신체의 모든 세포 유형에 더하여 배아의 조직, 예컨대 태반을 이루는 모든 세포 유형을 생성하는 능력을 나타낸다.
- [0065] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "다중능(multipotent)"은 신체 중 하나를 초과하는 세포 유형으로 발달하는 능

력을 나타낸다.

- [0066] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "유도된 다능 줄기 세포" 또는 "iPSC"는 체세포로의 소정 배아 유전자(예컨대 비제한적으로 OCT4, SOX2, 및 KLF4 트랜스유전자)의 도입에 의해 형성되는 유형의 다능 줄기 세포를 나타낸다 (예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Takahashi and Yamanaka Cell 126, 663-676(2006)] 참조).
- [0067] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "뉴런"은 신경계의 기본적 기능 단위인 신경 세포를 나타낸다. 뉴런은 세포체 및 그 돌기 - 축삭 및 적어도 하나의 가지돌기로 구성된다. 뉴런은 시냅스에서 신경전달물질을 방출함으로써 다른 뉴런 또는 세포에 정보를 전달한다.
- [0068] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "분화"는 특화되지 않은 배아 세포가 특화된 세포, 예컨대 뉴런, 심장, 간, 또는 근육 세포의 특징을 획득하는 공정을 나타낸다. 분화는 보통 세포 표면에 임베딩된 단백질이 관여되는 신호 전달 경로를 통해, 세포의 유전자와 세포 외부의 물리적 및 화학적 조건의 상호작용에 의해 제어된다.
- [0069] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "지정된 분화"는 특정한(예를 들어, 요망되는) 세포 유형, 예컨대 중간뇌 도파민 뉴런 또는 이의 전구체로의 분화를 유도하는 줄기 세포 배양 조건의 조작을 나타낸다. 줄기 세포에 대해, "지정된 분화"는 다능 상태에서 보다 성숙한 또는 특화된 세포 운명으로의 줄기 세포의 전이를 촉진하는 소분자, 성장 인자 단백질, 및 다른 성장 조건의 이용을 나타낸다.
- [0070] 세포에 대해 본 명세서에서 사용되는 용어 "분화 유도"는 내정 세포 유형(유전형 및/또는 표현형)의 비-내정 세포 유형(유전형 및/또는 표현형)으로의 변화를 나타낸다. 따라서, "줄기 세포에서의 분화 유도"는 줄기 세포와 상이한 특징, 예컨대 유전형(예로, 마이크로어레이와 같은 유전 분석에 의해 결정되는 유전자 발현에서의 변화) 및/또는 표현형(예로, mDA 뉴런 또는 이의 전구체의 단백질 마커, 예컨대 EN1, OTX2, TH, NURR1, FOXA2, LMX1A, PITX3, LMO3, SNCA, ADCAP1, CHRNA4, ALDH1A1, SOX6, WNT1, DAT, VMAT2, 및 GIRK2의 발현에서의 변화)을 갖는 자손 세포로 분열하도록 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)를 유도하는 것을 나타낸다.
- [0071] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "세포 배양"은 연구 또는 의학적 치료를 위한 인공 배지 중 시험관 내 세포의 성장을 나타낸다.
- [0072] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "배양 배지"는 배양 용기, 예컨대 페트리 플레이트, 멀티웰 플레이트 등에서 세포를 커버하는 액체를 나타내며, 세포에 영양을 공급하고 이를 지지하는 영양분을 함유한다. 배양 배지는 세포에서 요망되는 변화를 생성하기 위해 첨가되는 성장 인자도 포함할 수 있다.
- [0073] 본 명세서에서 사용될 때, 세포 또는 세포들과 화합물(예로, 적어도 하나의 억제제, 활성화제, 및/또는 유도제)의 "접촉"이라는 용어는 세포 또는 세포들의 화합물에 대한 접근을 허용하는 위치에서 화합물을 제공하는 것을 나타낸다. 접촉은 임의의 적합한 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 접촉은 요망되는 농도를 달성하기 위해 농축된 형태의 화합물을 세포 또는 세포의 개체군으로, 예를 들어 세포 배양의 맥락에서 첨가함으로써 달성될 수 있다. 접촉은 또한 제형화된 배양 배지의 성분으로서 화합물을 포함시켜 달성될 수 있다.
- [0074] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "시험관 내"는 인공 환경 및 인공 환경 내에서 일어나는 공정 또는 반응을 나타낸다. 시험관 내 환경으로는 비제한적으로 시험관 및 세포 배양이 예시된다.
- [0075] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "생체 내"는 자연 환경(예로, 동물 또는 세포) 및 자연 환경 내에서 일어나는 공정 또는 반응, 예컨대 배아 발달, 세포 분화, 신경관 형성 등을 나타낸다.
- [0076] 본 명세서에서 사용될 때, 유전자 또는 단백질에 관련된 용어 "발현"은 검정, 예컨대 마이크로어레이 검정, 항체 염색 검정 등을 이용해서 관찰될 수 있는 mRNA 또는 단백질의 제조를 나타낸다.
- [0077] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "마커" 또는 "세포 마커"는 특정 세포 또는 세포 유형을 확인시켜주는 유전자 또는 단백질을 나타낸다. 세포에 대한 마커는 하나의 마커로 제한되지 않을 수 있으며, 마커는 지정된 마커의 군이 하나의 세포 또는 세포 유형을 또 다른 세포 또는 세포 유형으로부터 확인시켜줄 수 있도록 하는 마커의 "패턴"을 나타낼 수 있다.
- [0078] 본 명세서에 개시된 임의의 세포에 대해 언급되는 경우, 본 명세서에서 사용된 용어 "로부터 유래된" 또는 "로부터 확립된" 또는 "로부터 분화된"은 임의의 조작, 예컨대 비제한적으로 단일 세포 단리, 시험관 내 배양, 예를 들어 단백질, 화학물질, 방사선, 바이러스로의 감염, DNA 서열, 예컨대 형태원(morphogen) 등으로의 형질감염을 이용한 처리 및/또는 돌연변이화, 배양된 모체 세포에 함유되는 임의의 세포의 선택(예컨대 연속 배양에 의함)을 이용하여 세포주, 조직(예컨대 해리된 배아, 또는 유체)에서 궁극적인 모체 세포로부터 수득된(예로,

단리된, 정제된 등) 세포를 나타낸다. 유래된 세포는 성장 인자, 사이토카인, 선택된 사이토카인 처리의 진행, 접착성, 접착성의 부재, 분류 절차 등에 대한 반응에 의해 혼합된 개체군으로부터 선택될 수 있다.

[0079] 본 명세서에서 "개체" 또는 "대상체"는 척추동물, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물, 예를 들어, 포유동물이다. 포유동물은 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 및 애완동물을 포함한다. 비-인간 동물 대상체의 비제한적 예는 설치류 예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 및 기니아피그; 토끼; 개; 고양이; 양; 돼지; 염소; 소; 말; 및 비-인간 영장류 예컨대 유인원 및 원숭이를 포함한다.

[0080] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "질환"은 세포, 조직, 또는 기관의 정상 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 나타낸다.

[0081] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 치료받는 개체 또는 세포의 질환 과정을 변경하기 위한 시도에서의 임상적 개입을 나타내며, 예방을 위해 또는 임상적 병리 과정 동안 수행될 수 있다. 치료의 치료적 효과는 비제한적으로 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리적 결과의 감소, 전이의 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 경감 또는 호전, 및 진정 또는 개선된 예후를 포함한다. 질환 또는 장애의 진행을 방지함으로써, 치료는 영향 받은 또는 진단 받은 대상체 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서 장애로 인한 악화를 방지할 수 있지만, 또한 치료는 장애의 위험이 있는 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체의 장애 개시 또는 장애 증상을 방지할 수 있다.

[0082] **5.2. 줄기 세포의 분화 방법**

[0083] 본 발명은 줄기 세포를 데카펜타플렉스에 대한 작은 모체(SMAD) 신호전달의 적어도 하나의 억제제("SMAD 억제제"로 지칭됨), 소닉 헤지호그(SHH) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제("SHH 활성화제"로 지칭됨), 및 윙 리스(Wnt) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제("Wnt 활성화제"로 지칭됨)와 접촉시키는 단계; 및 세포를 섬유아 세포 성장 인자(FGF) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제("FGF 활성화제"로 지칭됨) 및 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 접촉시켜, mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현하는 분화된 세포를 포함하는 세포 개체군을 수득하는 단계;를 포함하는 줄기 세포의 분화를 유도하는 방법을 제공한다.

[0084] Wnt 신호전달 억제제의 사용은 mDA 뉴런 유도를 향상시킬 수 있으며, 예로, 더 넓은 세트의 mDA 뉴런의 유도를 허용한다. 연장된 Wnt 신호전달은 mDA 뉴런 분화 및 하위유형 사양을 방해할 수 있다(Andersson, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2013);110, E602-610). 예로, Wnt 신호전달의 억제제를 이용하여, Wnt 신호전달을 억제하면 mDA 뉴런 마커(A9 하위유형 mDA 뉴런 마커, 예로 ALDH1A1을 포함) 및 A10 하위유형 mDA 뉴런 마커(예로, CALB1) 및 mDA 뉴런 성숙도 마커(비제한적으로 DAT, VMAT2, PITX3, CHRNA6, 및 CHRNB3을 포함)의 발현이 증가된다. Wnt 신호전달의 억제제는 A9 하위유형 mDA 뉴런 마커의 발현에 영향을 미칠 수 있다. A9 하위유형 중간뇌 도파민 뉴런을 나타내는 마커의 비제한적 예는 LMO3, ALDH1A1, SOX6, VGLUT2, 및 NDNF를 포함한다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 억제제는 A9 하위유형 mDA 뉴런 마커의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 억제제는 ALDH1A1의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 억제제는 A10 하위유형 mDA 뉴런 마커의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 억제제는 CALB1의 발현을 증가시킨다.

[0085] 또한, 본 명세서에서 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 개선된 섬유 성장, 남아있는 Ki67⁺ 증식 세포의 감소, 및 개선된 생체 내 생존을 가지고, 이는 이들 세포를 치료 용도에 더 적합하게 만든다. 소정 구현예에서, 본 명세서에서 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 1년, 최대 약 2년, 최대 약 3년, 최대 약 4년, 또는 최대 약 5년 생존할 수 있다. 소정 구현예에서, 본 명세서에서 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런은 생체 내 이식 후 최대 약 1개월, 최대 약 2개월, 최대 약 3개월, 최대 약 4개월, 최대 약 5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 1년, 최대 약 2년, 최대 약 3년, 최대 약 4년, 또는 최대 약 5년 생존할 수 있다.

[0086] **5.2.1. 줄기 세포**

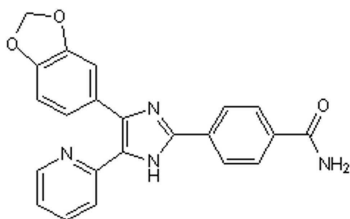
[0087] 본 발명에 개시된 주제는 mDA 뉴런 및 이의 전구체를 생성하기 위해 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 시험관 내 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 다능 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 다능 줄기 세포는 배아 줄기 세포(ESC), 유도된 다능 줄기 세포(iPSC), 및 이의 조합으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 다능 줄기 세포이다. 본 발명에 개시된 방법과 함께 사용될 수 있는 줄기 세포의 비제한적 예는 비배아 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 비배아 다능 세포, 및 조작된 다능 세포를 포함한다. 소정 구현예에서,

줄기 세포는 인간 줄기 세포이다. 인간 줄기 세포의 비제한적 예는 인간 배아 줄기 세포(hESC), 인간 다능 줄기 세포(hPSC), 인간 유도 다능 줄기 세포(hiPSC), 인간 단성생식 줄기 세포, 원시 생식 세포-유사 다능 줄기 세포, 배반엽상피(epiblast) 줄기 세포, F-클래스 다능 줄기 세포, 신체 줄기 세포, 암 줄기 세포, 또는 계통 특이적 분화가 가능한 임의의 다른 세포를 포함한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포(hESC)이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 인간 유도 다능 줄기 세포(hiPSC)이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 비인간 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 비인간 영장류 줄기 세포이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 설치류 줄기 세포이다.

[0088] 소정 구현예에서, 줄기 세포 또는 이의 자손 세포는 도입된 이중성 핵산을 함유하며, 여기서 상기 핵산은 요망되는 핵산 또는 단백질 산물을 인코딩할 수 있거나 정보 값을 가질 수 있다(예를 들어, 그 전문이 참조로서 포함되는 U.S. 특허 번호 6,312,911 참조). 단백질 산물의 비제한적 예는 생체 내 조영 연구를 통해 검출가능한 마커, 예를 들어 수용체 또는 다른 세포막 단백질을 포함한다. 마커의 비제한적 예는 형광 단백질(예컨대 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질(EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal), 시안 형광 단백질(ECFP, Cerulean, CyPet, mTurquoise2), 및 황색 형광 단백질 유도체(YFP, Citrine, Venus, YPet, EYFP)), β -갈락토시다제(LacZ), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(cat), 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(neo), 효소(예컨대 옥시다제 및 퍼옥시다제), 및 항원성 분자를 포함한다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "리포터 유전자" 또는 "리포터 구축물"은 쉽게 검출가능하거나 쉽게 검정가능한 단백질, 예컨대 유색 단백질, 형광 단백질 예컨대 GFP 또는 효소 예컨대 베타-갈락토시다제(lacZ 유전자)를 인코딩하는 핵산을 포함하는 유전적 구축물을 나타낸다. 소정 구현예에서, 리포터는 조기 유사분열-후 mDA 뉴런 마커 유전자, 예를 들어, NURR1의 재조합 프로모터에 의해 구동될 수 있다.

[0089] 5.2.2. SMAD 억제제

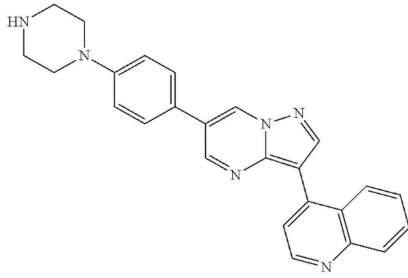
[0090] SMAD 억제제의 비제한적 예는 전환 성장 인자 베타(TGF β)/액티빈-노달 신호전달의 억제제("TGF β /액티빈-노달 억제제"로 지칭됨), 및 뼈 형태형성 단백질(BMP) 신호전달의 억제제를 포함한다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 억제제는 TGF β , BMP, 노달, 및 액티빈을 포함하는 리간드를 중화하거나, 및/또는 수용체 및 하류 작용 인자의 차단을 통해 그의 신호 경로를 차단할 수 있다. TGF β /액티빈-노달 억제제의 비제한적 예는 WO/2010/096496, WO/2011/149762, WO/2013/067362, WO/2014/176606, WO/2015/077648, 문헌[Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar;27(3):275-80, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1;30(7):715-20 (2012)]에 개시된 것을 포함하며, 이들 문헌은 모든 목적을 위해 본 명세서에 이의 전문이 참조로서 포함된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 TGF β /액티빈-노달 억제제는 ALK5의 억제제, ALK4의 억제제, ALK7의 억제제, 및 이의 조합으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 억제제는 ALK5의 억제제를 포함한다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로부터 선택되는 소분자이다. "SB431542"는 번호 CAS 301836-41-9, 분자식 $C_{22}H_{18}N_4O_3$, 및 명칭 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아마이드를 갖는 분자를 나타내며, 예를 들어, 아래의 구조를 참고한다:



[0091] 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 억제제는 SB431542를 포함한다. 소정 구현예에서, TGF β /액티빈-노달 억제제는 SB431542의 유도체를 포함한다. 소정 구현예에서, SB431542의 유도체는 A83-01이다.

[0093] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SMAD 억제제는 BMP 신호전달의 억제제("BMP 억제제"로 지칭됨)를 포함한다. BMP 억제제의 비제한적 예는 WO2011/149762, 문헌[Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar;27(3):275-80, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1;30(7):715-20]에 개시된 것을 포함하며, 이의 전문이 참조로서 포함된다. 소정 구현예에서, BMP 억제제는 LDN193189, 노긴, 도르소모르핀, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로부터 선택되는 소분자이다. "LDN193189"는 소분자 DM-3189, IUPAC 명칭 4-(6-(4-(피페라진-1-일)페닐)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)퀴놀린을 나타내며, 이것

의 화학식은 $C_{25}H_{22}N_6$ 이고 하기 식을 갖는다.



[0094]

[0095]

LDN193189는 SMAD 신호전달 억제제로서 기능할 수 있다. LDN193189는 또한 ALK2, ALK3, 및 ALK6, 단백질 티로신 키나제(PTK)의 매우 강력한 소분자 억제제이며, I형 TGFβ 수용체의 ALK1 및 ALK3 패밀리의 구성원의 신호전달을 억제하여, 뼈 형태형성 단백질(BMP) BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, 및 액티빈 사이토카인 신호를 포함하는 여러 생물학적 신호의 전달 및 이어서 Smad1, Smad5, 및 Smad8의 SMAD 인산화의 억제를 일으킨다(본 명세서에 참조로서 포함되는, 문헌[Yu et al. (2008) Nat Med 14:1363-1369; Cuny et al. (2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 4388-4392]).

[0096]

소정 구현예에서, BMP 억제제는 LDN193189를 포함한다. 소정 구현예에서, BMP 억제제는 노킨을 포함한다.

[0097]

소정 구현예에서, 줄기 세포는 하나의 SMAD 억제제, 예로, 하나의 TGFβ/액티빈-노달 억제제에 노출된다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제는 SB431542이다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제는 SB431542의 유도체이다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제는 A83-01이다.

[0098]

소정 구현예에서, 줄기 세포는 2개의 SMAD 억제제에 노출된다. 소정 구현예에서, 2개의 SMAD 억제제는 TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제이다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 SB431542 또는 A83-01, 및 LDN193189 또는 노킨에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 SB431542 및 LDN193189에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 A83-01 및 LDN193189에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 SB431542 및 노킨에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 A83-01 및 노킨에 노출된다.

[0099]

소정 구현예에서, 줄기 세포는 적어도 약 5일, 또는 적어도 약 10일 동안 적어도 하나의 SMAD 억제제에 노출되거나 이와 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 최대 약 5일, 또는 최대 약 10일 동안 적어도 하나의 SMAD 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 약 5일 내지 약 10일 동안 적어도 하나의 SMAD 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 약 5일 동안 적어도 하나의 SMAD 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 6일 동안 적어도 하나의 SMAD 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 7일 동안 적어도 하나의 SMAD 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 0일부터 6일까지 적어도 하나의 SMAD 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SMAD 억제제는 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 6일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SMAD 억제제는 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 6일까지 매일(날마다) 첨가된다.

[0100]

소정 구현예에서, 세포는 TGFβ/액티빈-노달 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 TGFβ/액티빈-노달 억제제의 농도는 약 1 μM 내지 약 20 μM, 약 1 μM 내지 약 10 μM, 약 1 μM 내지 약 15 μM, 약 10 μM 내지 약 15 μM, 약 5 μM 내지 약 10 μM, 약 5 μM 내지 약 15 μM, 약 5 μM 내지 약 20 μM, 또는 약 15 μM 내지 약 20 μM이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 TGFβ/액티빈-노달 억제제의 농도는 약 1 μM 내지 약 10 μM이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 TGFβ/액티빈-노달 억제제의 농도는 약 5 μM이다. 약 10 μM. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 TGFβ/액티빈-노달 억제제의 농도는 약 10 μM이다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제는 SB431542 또는 이의 유도체(예로, A83-01)를 포함한다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제는 SB431542를 포함한다.

[0101]

소정 구현예에서, 세포는 BMP 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 BMP 억제제의 농도는 약 50 nM 내지 약 500 nM, 또는 약 100 nM 내지 약 500 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 500 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 300 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 400 nM, 또는 약 100 nM 내지 약 250 nM, 또는 약 100 nM 내지 약 250 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 250 nM, 또는 약 250 nM 내지 약 300 nM이다. 소

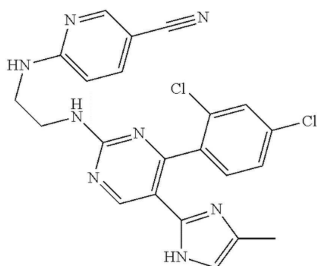
정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 BMP 억제제의 농도는 약 200 nM 내지 약 300 nM이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 BMP 억제제의 농도는 약 150 nM, 약 200 nM, 약 250 nM, 약 300 nM, 또는 약 350 nM이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 BMP 억제제의 농도는 약 250 nM이다. 소정 구현예에서, BMP 억제제는 LDN193189 또는 이의 유도체를 포함한다. 소정 구현예에서, BMP 억제제는 LDN193189를 포함한다.

[0102] 소정 구현예에서, 세포는 TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제와 동시에 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 약 5일 동안 TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 6일 동안 TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 7일 동안 TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 0일부터 6일까지 TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제는 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 6일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, TGFβ/액티빈-노달 억제제 및 BMP 억제제는 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 6일까지 매일(날마다) 첨가된다.

[0103] 5.2.3. Wnt 활성화제

[0104] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 GSK3β를 낮춘다. 따라서, 소정 구현예에서, Wnt 활성화제는 GSK3β 억제제이다. GSK3P 억제제는 WNT 신호전달 경로를 활성화할 수 있다(예를 들어 문헌[Cadigan, *et al.*, *J Cell Sci.* 2006;119:395-402; Kikuchi, *et al.*, *Cell Signaling.* 2007;19:659-671]을 참조하며, 이는 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다. 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "글리코젠 합성효소 키나제 3β 억제제" 또는 "GSK3β 억제제"는 글리코젠 합성효소 키나제 3β 효소를 억제하는 화합물을 나타내며, 예를 들어 문헌[Doble, *et al.*, *J Cell Sci.* 2003;116:1175-1186]을 참조하며, 이는 그 전문이 본 명세서에 참조로서 포함된다. GSK3β 억제제의 비제한적 예는 CHIR99021, BIO ((3E)-6-브로모-3-[3-(히드록시아미노)인돌-2-일리덴]-1H-인돌-2-온), AMBMP 히드로클로라이드, LP 922056, SB-216763, CHIR98014, 리툼, 3F8, 디옥시콜산, 및 W02011/149762, W013/067362, 문헌[Chambers *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2012 Jul 1;30(7):715-20, Kriks *et al.*, *Nature.* 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Calder *et al.*, *J Neurosci.* 2015 Aug 19;35(33):11462-81]에 개시된 것을 포함하며, 상기 문헌들은 모두 그 전문이 참조로서 포함된다.

[0105] Wnt 활성화제의 비제한적 예는 CHIR99021, Wnt3A, Wnt1, Wnt5a, BIO ((3E)-6-브로모-3-[3-(히드록시아미노)인돌-2-일리덴]-1H-인돌-2-온), AMBMP 히드로클로라이드, LP 922056, SB-216763, CHIR98014, 리툼, 3F8, 디옥시콜산, 및 W02011/149762, W013/067362, 문헌[Chambers *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2012 Jul 1;30(7):715-20, Kriks *et al.*, *Nature.* 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Calder *et al.*, *J Neurosci.* 2015 Aug 19;35(33):11462-81]에 개시된 것을 포함하며, 상기 문헌들은 모두 그 전문이 참조로서 포함된다. 소정의 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 CHIR99021, Wnt3A, Wnt1, Wnt5a, BIO, CHIR98014, 리툼, 3F8, 디옥시콜산, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 CHIR99021 또는 이의 유도체를 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 CHIR99021을 포함한다. "CHIR99021"("아미노피리미딘" 또는 "3-[3-(2-카복시에틸)-4-메틸피롤-2-메틸리덴]-2-인돌리논"이라고도 알려져 있음)은 하기 식을 갖는 IUPAC 명칭 6-(2-(4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-메틸-1H-이미다졸-2-일)피리미딘-2-일아미노)에틸아미노)니코티노니트릴을 나타낸다.



[0106]

[0107] CHIR99021은 고도로 선택적이며, 관련된 및 관련되지 않은 키나제 패널에 대해 거의 천배의 선택성을 나타내고, 인간 GSK3β에 대해 IC50=6.7 nM이고 설치류 GSK3β 상동체에 대해 나노몰 농도의 IC50 값을 갖는다.

[0108] 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 5일, 적어도 약 10일, 적어도 약 15일, 또는 적어도 약 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 5일, 최대 약 10일, 최대

약 15일, 또는 최대 약 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 15일, 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 10일 내지 약 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 15일 동안 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 16일 동안 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 17일 동안 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 0일부터 16일까지 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 16일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 16일까지 매일(날마다) 첨가된다.

[0109] 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 활성화제의 농도는 세포에 대한 그의 노출 동안 증가된다("Wnt 부스트"로도 지칭됨). 소정 구현예에서, 증가 또는 Wnt 부스트는 적어도 하나의 Wnt 활성화제에 대한 세포의 최초 노출로부터 적어도 약 2일, 적어도 약 4일, 또는 적어도 약 5일에 개시된다. 소정 구현예에서, 증가 또는 Wnt 부스트는 적어도 하나의 Wnt 활성화제에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 4일에 개시된다.

[0110] 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 5일, 또는 적어도 약 10일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 5일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 5일, 최대 약 10일, 또는 최대 약 15일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 10일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉된다.

[0111] 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 내지 약 15일, 또는 약 5일 내지 약 10일, 또는 약 10일 내지 약 15일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 내지 약 10일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일, 약 10일, 또는 약 15일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 5일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 6일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 4일부터 9일까지 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 10일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 12일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 13일 동안 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 4일부터 16일까지 증가된 농도의 적어도 하나의 Wnt 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다.

[0112] 소정 구현예에서, Wnt 부스트 전에 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 최초 농도는 약 5 μM 미만, 약 3 μM 미만, 또는 약 1.5 μM 미만, 또는 약 1.5 μM 미만이고, 비제한적으로, 약 0.01 μM 내지 약 5 μM , 약 0.01 μM 내지 약 3 μM , 약 0.05 μM 내지 약 3 μM , 약 0.1 μM 내지 약 3 μM , 약 0.5 μM 내지 약 3 μM , 약 0.5 μM 내지 약 2 μM , 약 0.5 μM 내지 약 1 μM , 또는 약 0.5 μM 내지 약 1.5 μM 을 포함한다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 전에 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 최초 농도는 약 1 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 전에 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 최초 농도는 약 1.5 μM 미만, 예를 들어, 약 1 μM , 약 0.1 μM , 약 0.2 μM , 약 0.3 μM , 약 0.4 μM , 약 0.5 μM , 약 0.6 μM , 약 0.7 μM , 약 0.8 μM , 또는 약 0.9 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 전에 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 최초 농도는 약 1 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 전에 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 최초 농도는 약 0.5 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 전에 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 최초 농도는 약 0.7 μM 이다.

[0113] 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 3 μM 이상, 약 5 μM 이상, 약 10 μM 이상, 약 15 μM 이상, 또는 약 20 μM 이상이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 3 μM 내지 약 15 μM , 약 3 μM 내지 약 10 μM , 또는 약 5 μM 내지 약 10 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 5 μM 내지 약 10 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 3 μM , 약 3.5 μM ,

약 4 μM , 약 4.5 μM , 약 5 μM , 약 5.5 μM , 약 6 μM , 약 6.5 μM , 약 7 μM , 약 7.5 μM , 약 8 μM , 약 8.5 μM , 약 9 μM , 약 9.5 μM , 또는 약 10 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 3 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 6 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 7 μM 이다. 소정 구현예에서, Wnt 부스트 후 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 증가된 농도는 약 7.5 μM 이다.

[0114] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 50% 내지 약 2000%, 또는 약 100% 내지 약 1500%, 또는 약 150% 내지 약 1500%, 또는 약 200% 내지 약 1500%, 또는 약 250% 내지 약 1500%, 또는 약 300% 내지 약 1500%, 또는 약 300% 내지 약 1000%, 또는 약 300% 내지 약 400%, 또는 약 500% 내지 약 1000%, 또는 약 800% 내지 약 1000%, 또는 약 900% 내지 약 1000%, 또는 약 950% 내지 약 1000%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 300% 내지 약 1000%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 300% 내지 약 500%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 900% 내지 약 1000%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 200%, 약 250%, 약 300%, 약 350%, 약 400%, 약 450%, 약 500%, 약 550%, 약 600%, 650%, 약 700%, 약 750%, 약 800%, 약 850%, 약 900%, 약 950%, 약 1000%, 약 1050%, 또는 약 1100%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 200%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 300%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 350%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 500%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 950%만큼 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 최초 농도로부터 약 1000%만큼 증가된다.

[0115] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 약 1 μM 에서 약 5 μM 내지 약 10 μM 로 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 약 1 μM 에서 약 6 μM 로 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 약 1 μM 에서 약 3 μM 내지 약 5 μM 로 증가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제의 농도는 약 1 μM 에서 약 3 μM 로 증가된다.

[0116] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 GSK3 β 억제제를 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 CHIR99021 또는 이의 유도체를 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 활성화제는 CHIR99021을 포함한다.

[0117] 5.2.4. SHH 활성화제

[0118] 본 명세서에 사용될 때, 용어 "소닉 헤지호그", "SHH", 또는 "Shh"는 헤지호그(hedgehog)로 불리는 포유동물 신호 전달 경로 패밀리의 적어도 3개 단백질 중 하나인 단백질을 나타내며, 또 다른 것은 사막 헤지호그(desert hedgehog, DHH)이고, 세 번째 것은 인도 헤지호그(Indian hedgehog, IHH)이다. SHH는 막통과 분자 패치(Patched, PTC) 및 평활화(Smoothened, SMO)와 상호작용함으로써 적어도 2개의 막통과 단백질과 상호작용한다. SHH는 전형적으로 PTC와 결합하고, 이어서 신호 전달인자로서의 SMO의 활성화를 허용한다. SHH의 부재 하에, PTC는 전형적으로 SMO를 억제하며, 이는 다시 전사 억제인자를 활성화함으로써 소정 유전자의 전사가 일어나지 않는다. SHH가 존재하고 PTC에 결합하는 경우, PTC는 SMO의 기능을 방해할 수 없다. SMO가 억제되지 않으면, 소정 단백질은 핵으로 들어가서 소정 유전자가 활성화될 수 있도록 하는 전사 인자로서 작용할 수 있다(Gilbert, 2000 *Developmental Biology* (Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc., Publishers 참조). 소정 구현예에서, SHH 활성화제는 PTC 또는 SMO에 결합할 수 있는 분자 또는 화합물을 포함하여, SHH 신호 전달 경로를 활성화할 수 있는 임의의 분자 또는 화합물을 나타낸다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SHH 활성화제는 PTC에 결합하는 분자, SMO에 결합하는 분자, 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. SHH 활성화제의 비제한적 예는 WO10/096496, WO13/067362, 문헌[Chambers *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):275-80, 및 Kriks *et al.*, *Nature.* 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에 개시된 것을 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SHH 활성화제는 SHH 단백질, SMO 작용제, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, SHH 단백질은 재조합 SHH, 변형된 N-말단 SHH, 또는 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 재조합 SHH는 N-말단 단편 및 C-말단 단편을 포함한다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 N-

말단에 2개의 이소류신을 포함한다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 비변형 N-말단 SHH와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 비변형 인간 N-말단 SHH와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 비변형 마우스 N-말단 SHH와 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 약 99% 서열 동일성을 갖는다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 SHH C25II를 포함한다. 소정 구현예에서, 변형된 N-말단 SHH는 SHH C24II를 포함한다.

[0119] SMO 작용제(SAG)의 비제한적 예는 푸르모르파민, GSA10, 및 20(S)-히드록시 콜레스테롤을 포함한다. 소정 구현예에서, SAG는 푸르모르파민을 포함한다.

[0120] 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 5일, 또는 적어도 약 10일 동안 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 5일, 또는 최대 약 10일 동안 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 내지 약 10일 동안 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 동안 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 6일 동안 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 7일 동안 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 0일부터 6일까지 적어도 하나의 SHH 활성화제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SHH 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 6일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 SHH 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 0일부터 6일까지 매일(날마다) 첨가된다.

[0121] 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 SHH 활성화제의 농도는 약 50 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 약 20 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 약 300 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 약 400 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 약 500 ng/ml 내지 약 1000 ng/ml, 약 400 ng/ml 내지 약 800 ng/ml, 약 400 ng/ml 내지 약 700 ng/ml, 약 400 ng/ml 내지 약 600 ng/ml, 또는 약 500 ng/ml 내지 약 600 ng/ml이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 SHH 활성화제의 농도는 약 400 ng/ml 내지 약 600 ng/ml이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 SHH 활성화제의 농도는 약 400 ng/ml, 약 450 ng/ml, 약 500 ng/ml, 약 550 ng/ml, 또는 약 600 ng/ml이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 SHH 활성화제의 농도는 약 500 ng/ml이다.

[0122] 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 SHH C25II를 포함한다.

[0123] 5.2.5. FGF 활성화제

[0124] FGF 패밀리는 수용체 티로신 키나제에 신호를 보내는 분비된 신호전달 단백질(분비된 FGF)을 포함한다. 계통발생적 분석은 22 *Fgf* 유전자가 각각 2~4개의 구성원을 함유하는 7개의 하위패밀리(subfamily)로 배열될 수 있음을 시사한다. 가지 길이는 각각의 유전자 사이의 진화적 거리에 비례한다.

[0125] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF8a, FGF17, FGF18, FGF8b, FGF2, FGF4, 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF8a, FGF17, FGF18, FGF2, FGF4, 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF8a, FGF17, 및 FGF18로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0126] FGF8 하위패밀리는 FGF8a, FGF8b, FGF17, 및 FGF18로 구성된다. 척추동물 중간뇌 및 소뇌의 초기 패턴화는 FGF8a, FGF8b, FGF17 및 FGF18을 생성하는 중간뇌/후뇌 조직인자에 의해 조절된다. FGF8b는 FGF8a, FGF17, 및 FGF18과 다르게 기능하는 것으로 나타났다(Liu *et al.*, *Development*. 2003 Dec;130(25):6175-85). FGF8b는 r1 유전자 Gbx2를 유도하고 경로 억제제 *Spry1/2*를 강력하게 활성화할 뿐만 아니라, 중간뇌 유전자 *Otx2*를 억제할 수 있는 유일한 단백질이다(Liu 2003). 또한, FGF8b는 소뇌 발달과 관련하여, 유도된 Gbx2 도메인과 중간뇌의 나머지 *Otx2* 영역 사이의 접합부를 따라 조직인자를 확장한다(Liu 2003). 대조적으로, FGF8a, FGF17, 및 FGF18은 중간뇌의 확장을 유발하고 중간뇌 유전자 발현을 상향조절한다(Liu 2003).

[0127] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 중간뇌의 확장을 유발하고 중간뇌 유전자 발현을 상향조절할 수 있다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 중간뇌 발달을 촉진할 수 있다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF8a, FGF17, FGF18, FGF2, FGF4, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF8a, FGF17, FGF18, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF18이거나 이를 포함한다.

- [0128] 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 적어도 약 1일, 적어도 약 3일, 적어도 약 5일, 적어도 약 8일, 또는 적어도 약 10일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 적어도 약 5일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 적어도 약 4일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 최대 약 5일(예로, 최대 5일, 최대 6일, 또는 최대 7일), 또는 최대 약 10일(예로, 최대 8일, 최대 9일, 최대 10일, 최대 11일, 최대 12일), 또는 최대 약 15일, 또는 최대 약 20일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 적어도 4일 동안 및/또는 최대 7일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 1일 내지 약 20일, 약 1일 내지 약 15일, 약 1일 내지 약 5일, 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 15일, 또는 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 20일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 1일 내지 약 10일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 3일, 약 5일, 또는 약 8일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 1일 내지 약 5일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 5일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 4일 동안 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 5일 동안 접촉되거나 이에 노출된다.
- [0129] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 적어도 약 5일, 또는 적어도 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 15일 이내 또는 약 20일 이내에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 18일 이내에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 15일, 약 10일 내지 약 18일, 약 5일 내지 약 15일, 또는 약 10일 내지 약 20일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 5일 내지 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 12일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 13일에 개시된다.
- [0130] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 10일에 개시되고, 세포는 적어도 FGF 활성화제와 약 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 12일 또는 13일에 개시되고, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 4일 또는 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 12일부터 16일까지 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 16일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 16일까지 매일(날마다) 첨가된다.
- [0131] 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 FGF 활성화제의 농도는 약 10 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 50 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 500 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 400 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 300 ng/ml, 약 100 ng/ml 내지 약 200 ng/ml, 또는 약 100 ng/ml 내지 약 250 ng/ml 이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 FGF 활성화제의 농도는 약 100 ng/ml 내지 약 200 ng/ml이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 FGF 활성화제의 농도는 약 100 ng/ml이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 FGF 활성화제의 농도는 약 200 ng/ml이다.
- [0132] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 FGF 활성화제는 FGF18을 포함한다.

[0133] 5.2.6. Wnt 억제제

[0134] Wnt 신호전달은 표준 Wnt 신호전달 및 비표준 Wnt 신호전달을 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 표준 Wnt 신호전달을 억제할 수 있다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 표준 Wnt 신호전달 및 비표준 Wnt 신호전달 둘 다를 억제할 수 있다. 표준 Wnt 신호전달 및 비표준 Wnt 신호전달을 둘 다 억제할 수 있는 Wnt 억제제의 비제한적 예는 IWP2, IWR1-엔도, IWP-01, Wnt-C59, IWP-L6, IWP12, LGK-974, IWR-1, ETC-159, iCRT3, IWP-4, 살리노마이신, 피르비늄 파모에이트, iCRT14, FH535, CCT251545, 우고닌, NCB-0846, 헥사크로로펜, KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), BC2059, PKF115-584, 퀘르세틴, NSC668036, G007-LK, 및 이의 유도체를 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 IWP2, IWR1-엔도, XAV939, IWP-01, Wnt-C59, IWP-L6, LGK-974, IWR-1, Wnt-C59, ETC-159, iCRT3, IWP-4, ICG-001, 살리노마이신, 피르비늄 파모에이트, iCRT14, FH535, CCT251545, KYA1797K, 우고닌, NCB-0846, 헥사크로로펜, PNU-74654, KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), 트립토나이드, IWP12, BC2059, PKF115-584, 퀘르세틴, NSC668036, G007-LK, MSAB, LF3, JW55, 이소퀘르시트린, WIKI4 (Wnt 억제제 키나제 억제제 4), 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 IWP2, IWR1-엔도, IWP-01, IWP12, Wnt-C59, IWP-L6, LGK-974, IWR-1, ETC-159, iCRT3, IWP-4, 살리노마이신, 피르비늄 파모에이트, iCRT14, FH535, CCT251545, 우고닌, NCB-0846, 헥사크로로펜, KY02111, SO3031 (KY01-I), SO2031 (KY02-I), BC2059, PKF115-584, 퀘르세틴, NSC668036, G007-LK, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 XAV939, ICG-001, PNU-74654, 트립토나이드, KYA1797K, MSAB, LF3, JW55, 이소퀘르시트린, WIKI4, 이의 유도체, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 IWP2 또는 이의 유도체를 포함한다.

[0135] 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 1일, 적어도 약 3일, 적어도 약 5일, 적어도 약 8일, 적어도 약 10일, 적어도 약 15일, 또는 적어도 약 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 5일, 또는 최대 약 10일, 또는 최대 약 15일, 최대 약 20일, 최대 약 25일, 또는 최대 약 30일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 1일 내지 약 20일, 약 1일 내지 약 15일, 약 1일 내지 약 5일, 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 15일, 또는 약 5일 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 15일, 또는 약 15일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 30일, 약 10일 내지 약 25일, 약 15일 내지 약 30일, 약 15일 내지 약 25일, 약 20일 내지 약 30일, 약 20일 내지 약 25일, 또는 약 25일 내지 약 30일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 1일 내지 약 10일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 10일 내지 약 15일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 15일 내지 약 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 15일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 4일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 5일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 6일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 7일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 14일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 15일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 19일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 20일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 세포는 16일, 17일, 18일, 21일, 22일, 또는 23일 동안 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되거나 이에 노출된다.

[0136] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 접촉되는 세포는 mDA 뉴런 전구체 및 mDA 뉴런을 포함한다.

[0137] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 적어도 약 5일, 또는 적어도 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 15일 이내 또는 약 20일 이내에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 5일 내지 약 20일, 약 5일 내지 약 20일, 약 10일 내지 약 15일, 약 5일 내지 약 15일, 또는 약 10일 내지 약 20일에 개시된다. 소정 구현예

에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 5일 내지 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 10일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 11일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 12일에 개시된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 13일에 개시된다.

[0138] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 약 10일에 개시되고, 세포는 적어도 Wnt 억제제와 약 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉 또는 이에 대한 세포의 노출은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉 또는 이에 대한 세포의 최초 노출로부터 12일 또는 13일에 개시되고, 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제와 4일 또는 5일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제와 12일부터 16일까지 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 16일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 16일까지 매일(날마다) 첨가된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제와 12일부터 25일까지 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 25일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 25일까지 매일(날마다) 첨가된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제와 12일부터 30일까지 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 30일까지 매일 또는 매 2일마다 첨가된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 12일부터 30일까지 매일(날마다) 첨가된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제 및 적어도 하나의 FGF 활성화제와 동시에 접촉되거나 이에 노출된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제 및 적어도 하나의 FGF 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 함께 첨가된다.

[0139] 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 억제제의 농도는 약 0.5 μM 내지 약 20 μM , 약 0.5 μM 내지 약 10 μM , 약 0.5 μM 내지 약 5 μM , 약 0.5 μM 내지 약 1 μM , 약 0.5 μM 내지 약 2 μM , 약 5 μM 내지 약 10 μM , 약 10 μM 내지 약 20 μM , 약 1 μM 내지 약 2 μM , 또는 약 1 μM 내지 약 5 μM 이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 억제제의 농도는 약 0.5 μM 내지 약 2 μM 이다. 소정 구현예에서, 세포와 접촉되거나 이에 노출되는 적어도 하나의 Wnt 억제제의 농도는 약 1 μM 이다.

[0140] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 Wnt 억제제는 IWP2를 포함한다.

[0141] 5.2.7. 예시적인 방법

[0142] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 적어도 하나의 TGF β /액티빈-노달 억제제(예로, SB431542, 예로, 약 10 μM 의 농도에서), 적어도 하나의 BMP 억제제(예로, LDN193189, 예로, 약 250 nM의 농도에서), 및 적어도 하나의 SHH 활성화제(예로, SHH C25II, 예로, 약 500 ng/ml의 농도)와 약 5일 동안(예로, 7일, 예로, 0일부터 6일까지) 접촉되거나 이에 노출되고, 세포는 적어도 하나의 Wnt 활성화제(예로, CHIR99021, 예로, 약 1 μM 의 농도에서)와 약 5일 동안(예로, 4일, 예로, 0일부터 3일까지), 그리고 약 6 μM 의 농도에서 약 5일 동안(예로, 6일, 예로, 4일부터 9일까지), 및 약 3 μM 의 농도에서 약 5일 동안(예로, 7일, 예로, 10일부터 16일까지) 접촉된다. 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제(예로, FGF18, 예로, 약 100 ng/ml의 농도에서)와 접촉되거나 이에 노출되며, 여기서 적어도 하나의 FGF 활성화제와 세포의 접촉은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉으로부터 약 10일(예로, 10일 또는 12일)에 개시되고, 세포는 적어도 하나의 FGF 활성화제와 약 5일 동안(예로, 5일(12일부터 16일까지) 또는 7일(10일부터 16일까지)) 접촉된다. 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제(예로, IWP2, 예로, 약 1 μM 의 농도에서)와 접촉되거나 이에 노출되고, 여기서 적어도 하나의 Wnt 억제제와 세포의 접촉은 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉으로부터 약 10일(예로, 10일 또는 12일)에 개시되고, 세포는 적어도 하나의 Wnt 억제제와 약 5일(예로, 5일(12일부터 16일까지)), 7일(예로, 10일부터 16일까지), 약 15일(예로, 14일(12일

부터 25일까지)), 또는 약 20일(예로, 19일(12일부터 30일까지)) 동안 접촉된다.

[0143] 5.2.8. 세포 배양 배지

[0144] 소정 구현예에서, 상술한 억제제 및 활성화제는 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 첨가된다. 적합한 세포 배양 배지는 비제한적으로 녹아웃(Knockout)[®] 혈청 대체(Serum Replacement)("KSR") 배지, 뉴로바살(Neurobasal)[®] 배지(NB), N2 배지, B-27 배지, 및 에센셜(Essential) 8[®]/에센셜 6[®] ("E8/ E6") 배지, 및 이의 조합을 포함한다. KSR 배지, NB 배지, N2 배지, B-27 배지, 및 E8/E6 배지는 상업적으로 이용가능하다. KSR 배지는 배양에서 분화되지 않은 hESC를 성장시키고 유지하도록 최적화된 정의된, 무혈청 제형물이다.

[0145] 소정 구현예에서, 세포 배양 배지는 KSR 배지이다. KSR 배지의 성분은 WO2011/149762에 개시되어 있다. 소정 구현예에서, KSR 배지는 녹아웃 DMEM, 녹아웃 혈청 대체, L-글루타민, Pen/Strep, MEM, 및 13-머캅토에탄올을 포함한다. 소정 구현예에서, 1 리터의 KSR 배지는 820 ml의 녹아웃 DMEM, 150 ml의 녹아웃 혈청 대체, 10 ml의 200 mM L-글루타민, 10 ml의 Pen/Strep, 10 ml의 10 mM MEM, 및 55 μM의 13-머캅토에탄올을 포함한다.

[0146] 소정 구현예에서, 세포 배양 배지는 E8/E6 배지이다. E8/E6 배지는 인간 다능 줄기 세포의 성장과 확장을 지원하는 피더-프리(feeder-free) 및 제노-프리(xeno-free) 배지이다. E8/E6 배지는 체세포 재프로그래밍을 지원하는 것으로 입증되었다. 또한, E8/E6 배지는 PSC의 배양을 위한 맞춤형 배지의 제형물을 위한 기반으로 사용될 수 있다. E8/E6 배지의 일 예가 문헌[Chen et al., Nat Methods 2011 May;8(5):424-9]에 서술되어 있으며, 이는 그 전문이 참조로서 포함된다. E8/E6 배지의 일 예가 WO15/077648에 개시되어 있으며, 이는 그 전문이 참조로서 포함된다. 소정 구현예에서, E8/E6 세포 배양 배지는 DMEM/F12, 아스코르브산, 셀레늄, 인슐린, NaHCO₃, 트랜스페린, FGF2 및 TGFβ를 포함한다. E8/E6 배지는 E8/E6 배지에 활성 BMP 성분이 포함되어 있지 않다는 점에서 KSR 배지와 다르다. 따라서, 소정 구현예에서, E8/E6 배지를 사용하여 본 발명에 개시된 줄기 세포를 배양하여 mDA 뉴런 또는 이의 전구체로 분화시키는 경우, 적어도 하나의 BMP 억제제는 E8/E6 배지에 첨가될 필요가 없다. 소정 구현예에서, E8/E6 배지를 사용하여 본 발명에 개시된 줄기 세포를 배양하여 mDA 뉴런 또는 이의 전구체로 분화시키는 경우, 적어도 하나의 BMP 억제제는 E8/E6 배지에 첨가된다.

[0147] 5.2.9. 분화된 세포

[0148] 소정 구현예에서, 방법은 분화된 세포의 세포 개체군을 수득하는 것을 포함하고, 여기서 분화된 세포의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%는 mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현한다. mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 마커의 비제한적 예는 engrailed-1(engrailed-1, EN1), 오르소덴티클 호메오박스(orthodenticle homeobox 2, OTX2), 티로신 히드록실라제(TH), 핵 수용체 관련-1 단백질(NURR1), 포크헤드 박스 단백질 A2(FOXA2), 및 LIM 호메오박스 전사 인자 1 알파(LMX1A), PITX3, LMO3, SNCA, ADCAP1, CHRNA4, ALDH1A1, DAT, VMAT1, SOX6, WNT1, 및 GIRK2를 포함한다.

[0149] 소정 구현예에서, 분화된 세포는 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉으로부터 적어도 약 10일(예로, 약 15일, 약 20일, 약 30일, 약 40일, 또는 약 50일)에 mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포는 적어도 하나의 SMAD 억제제와 세포의 최초 접촉으로부터 약 15일(예로, 15일, 16일, 또는 17일)에 mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현한다.

[0150] 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 mDA 뉴런 유도를 개선할 수 있다. 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 A9 하위유형 mDA 뉴런 마커, A10 하위유형 mDA 뉴런 마커, 및 mDA 뉴런 성숙도 마커 중 적어도 하나의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 ALDH1A1의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 CALB1의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 DAT의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 VMAT2의 발현을 증가시킨다. 소정 구현예에서, 적어도 Wnt 억제제를 이용한 세포의 치료는 DAT 및 VMAT2의 발현을 증가시킨다.

[0151] 소정 구현예에서, 분화된 세포의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%)는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 줄기 세포의 최초 접촉으로부터 약 15일에 ALDH1A1을 발현한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%)는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 줄기 세포의 최초 접촉으로부터 16일에 ALDH1A1을 발현한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 60%,

적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%)는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 줄기 세포의 최초 접촉으로부터 약 25일에 ALDH1A1을 발현한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포의 적어도 약 50% (예로, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%)는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 줄기 세포의 최초 접촉으로부터 약 30일에 ALDH1A1을 발현한다.

[0152] 또한, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 개선된 섬유 성장, 남아있는 Ki67⁺ 증식 세포의 감소, 및 개선된 생체 내 생존을 가지며, 이는 이들 세포를 치료 용도에 더 적합하게 만든다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 적어도 약 2주, 적어도 약 3주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 2개월, 적어도 약 3개월, 적어도 약 4개월, 적어도 약 5개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 1년, 적어도 약 2년, 적어도 약 3년, 적어도 약 4년, 또는 적어도 약 5년 후에 적어도 하나의 mDA 뉴런 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 적어도 약 2주 후에 적어도 하나의 mDA 뉴런 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 최대 약 1개월, 최대 약 2개월, 최대 약 3개월, 최대 약 4개월, 최대 약 5개월, 최대 약 6개월, 최대 약 1년, 최대 약 2년, 최대 약 3년, 최대 약 4년, 또는 최대 약 5년 후에 적어도 하나의 mDA 뉴런 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 약 1개월 후에 적어도 하나의 mDA 뉴런 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 약 2개월 후에 적어도 하나의 mDA 뉴런 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 약 1개월 후에 TH, EN1, NURR1, 및 ALDH1A1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 약 2개월 후에 TH, EN1, NURR1, 및 ALDH1A1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 또는 이의 전구체는 생체 내 이식 후 적어도 약 2개월 후에 TH, EN1, NURR1, 및 ALDH1A1로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커의 검출가능한 발현 수준을 갖는다.

[0153] 소정 구현예에서, 본 발명에 개시된 방법으로부터 유래된 분화된 세포는 PAX6, EMX2, LHX2, SMA, SIX1, PITX2, SIM1, POU4F1, PHOX2A, BARHL1, BARHL2, GBX2, HOXA1, HOXA2, HOXB1, HOXB2, POU5F1, NANOG, 및 이의 조합으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커를 발현하지 않거나 이것의 낮은 발현을 갖는다.

[0154] 소정 구현예에서, 세포는 SMA, SIX1, PITX2, SIM1, POU4F1, 및/또는 PHOX2A의 발현을 감소시키는 데 효과적인 농도 및 시간 동안 본 명세서에 기재된 활성화제 및 억제제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 PAX6, BARHL1, 및/또는 BARHL2의 발현을 감소시키는 데 효과적인 농도 및 시간 동안 본 명세서에 기재된 활성화제 및 억제제와 접촉된다.

[0155] 소정 구현예에서, 분화된 세포의 적어도 약 80%는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 줄기 세포의 최초 접촉으로부터 약 15일에 FOXA2 및 EN1을 발현한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포의 약 80% 초과(예로, 약 85% 초과 또는 약 90% 초과)는 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제와 줄기 세포의 최초 접촉으로부터 16일에 FOXA2 및 EN1을 발현한다.

[0156] 5.2.10. 분류 방법

[0157] 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 분화 방법은 적어도 하나 또는 적어도 2개의 표면 마커에 기초하여 mDA 뉴런 및 이의 전구체를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 표면 마커는 음성 표면 마커이고, 여기서 세포는 검출가능한 수준의 음성 표면 마커를 발현하지 않는다. 소정 구현예에서, 표면 마커는 양성 표면 마커이고, 여기서 세포는 검출가능한 수준의 양성 표면 마커를 발현한다.

[0158] 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 분화 방법은 검출가능한 수준의 적어도 하나의 음성 표면 마커를 발현하지 않는 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 분화 방법은 검출가능한 수준의 적어도 하나의 양성 표면 마커를 발현하는 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 분화 방법은 검출가능한 수준의 적어도 하나의 음성 표면 마커를 발현하지 않고 검출가능한 수준의 적어도 하나의 양성 표면 마커를 발현하는 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다.

[0159] 소정 구현예에서, 적어도 하나의 음성 표면 마커는 CD49e, CD99, CD340, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터

선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 음성 표면 마커는 CD49e를 포함한다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 양성 표면 마커는 CD171, CD184, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정 구현예에서, 적어도 하나의 양성 표면 마커는 CD184를 포함한다.

- [0160] 소정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 분화 방법은 검출가능한 수준의 CD49e를 발현하지 않고 검출가능한 수준의 CD184를 발현하는 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다.
- [0161] 본 기술분야에 공지된 임의의 표면-마커 기반 세포 단리 기술이 본 발명에 개시된 방법에서 사용될 수 있다. 소정 구현예에서, 유동 세포측정법은 본 발명에 개시된 단리 방법에 사용된다.
- [0162] 5.2.11. mDA 전구체의 mDA 뉴런으로의 분화
- [0163] 소정 구현예에서, 세포(mDA 전구체)는 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제, 예를 들어, L-글루타민, 뇌-유래 신경영양 인자(BDNF), 신경교 세포-유래 신경영양 인자(GDNF), 순환 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 형질전환 성장 인자 베타(TGFβ, 예로, TGFβ3), 아스코르브산(AA), 및 DAPT(이는 N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-알라닐-2-페닐]글리신-1,1-디메틸에틸 에스테르; LY-374973, N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르; 또는 N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르로도 알려져 있음)와 추가로 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 상기 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제와 적어도 약 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 또는 적어도 약 10일 또는 그 이상, 예를 들어, 약 2일 내지 약 20일, 약 3일 내지 약 19일, 약 4일 내지 약 18일, 약 5일 내지 약 17일, 약 6일 내지 약 16일, 약 7일 내지 약 15일, 약 8일 내지 약 15일, 약 9일 내지 약 14일, 또는 약 10일 내지 약 13일 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 상기 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제와 최대 약 2일, 최대 약 3일, 최대 약 4일, 최대 약 5일, 최대 약 6일, 최대 약 7일, 최대 약 8일, 최대 약 9일, 또는 최대 약 10일 또는 그 이상 동안 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 상기 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제와 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 또는 약 8일 동안 접촉된다.
- [0164] 소정 구현예에서, 세포는 L-글루타민과 약 0.5 mM 내지 약 5 mM, 또는 약 1 mM 내지 약 5 mM, 또는 약 1.5 mM 내지 약 2.5 mM, 또는 약 1 mM 내지 약 2 mM의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 L-글루타민과 약 2 mM의 농도에서 접촉된다.
- [0165] 소정 구현예에서, 세포는 BDNF와 약 5 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 40 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml 내지 약 40 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 30 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 20 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml 내지 약 30 ng/ml의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 BDNF와 약 20 ng/ml의 농도에서 접촉된다.
- [0166] 소정 구현예에서, 세포는 아스코르브산(AA)과 약 50 nM 내지 약 500 nM, 또는 약 100 nM 내지 약 500 nM, 또는 약 100 nM 내지 약 400 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 400 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 300 nM, 또는 약 100 nM 내지 약 300 nM의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 AA와 약 200 nM의 농도에서 접촉된다.
- [0167] 소정 구현예에서, 세포는 GDNF와 약 5 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 40 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml 내지 약 40 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 30 ng/ml, 또는 약 10 ng/ml 내지 약 20 ng/ml, 또는 약 20 ng/ml 내지 약 30 ng/ml의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 GDNF와 약 20 ng/ml의 농도에서 접촉된다.
- [0168] 소정 구현예에서, 세포는 cAMP와 약 200 nM 내지 약 800 nM, 또는 약 200 nM 내지 약 700 nM, 또는 약 300 nM 내지 약 700 nM, 또는 약 300 nM 내지 약 600 nM, 또는 약 400 nM 내지 약 600 nM, 또는 약 450 nM 내지 약 550 nM의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 cAMP와 약 500 nM의 농도에서 접촉된다.
- [0169] 소정 구현예에서, 세포는 TGFβ3과 약 0.01 ng/ml 내지 약 5 ng/ml, 또는 약 0.1 ng/ml 내지 약 4 ng/ml, 또는 약 0.5 ng/ml 내지 약 5 ng/ml, 또는 약 1 ng/ml 내지 약 3 ng/ml, 또는 약 1 ng/ml 내지 약 2 ng/ml의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 TGFβ3과 약 1 ng/ml의 농도에서 접촉된다.
- [0170] 소정 구현예에서, 세포는 DAPT와 약 1 nM 내지 약 50 nM, 또는 약 5 nM 내지 약 50 nM, 또는 약 1 nM 내지 약 20 nM, 또는 약 5 nM 내지 약 20 nM, 또는 약 1 nM 내지 약 10 nM, 또는 약 5 nM 내지 약 10 nM, 또는 약 5 nM 내지 약 15 nM, 또는 약 10 nM 내지 약 20 nM, 또는 약 10 nM 내지 약 30 nM, 또는 약 30 nM 내지 약 50 nM의 농도에서 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 DAPT와 약 10 nM의 농도에서 접촉된다.
- [0171] 소정 구현예에서, 분화된 중간뇌 DA 전구체는 U.S. 공개 번호 2015/0010514에 기재된 바와 같이 추가로 배양되

며, 이는 그 전문이 참조로서 포함된다.

[0172] 5.3. 세포 개체군 및 조성물

[0173] 본 발명은 본 명세서에서, 예로, 섹션 5.2에 개시된 방법에 의해 획득된 시험관 내 분화된 세포의 세포 개체군을 제공한다.

[0174] 본 발명은 시험관 내 분화된 세포의 세포 개체군을 제공하고, 여기서 세포의 적어도 약 50%(예로, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%)는 mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현한다. mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 마커의 비제한적 예는 EN1, OTX2, TH, NURR1, FOXA2, LMX1A, PITX3, LMO3, SNCA, ADCAP1, CHRNA4, SOX6, ALDH1A1, WNT1, DAT, VMAT1, 및 GIRK2를 포함한다. 본 발명은 이러한 세포 개체군을 포함하는 조성물도 제공한다. 소정 구현예에서, 시험관 내 분화된 세포는 본 명세서에서, 예로, 섹션 5.2에 기재된 분화 방법에 의해 획득된다.

[0175] 소정 구현예에서, 분화된 세포의 약 50% 미만(예로, 약 45% 미만, 약 40% 미만, 약 35% 미만, 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 또는 약 0.1% 미만)은 PAX6, EMX2, LHX2, SMA, SIX1, PITX2, SIM1, POU4F1, PHOX2A, BARHL1, BARHL2, GBX2, HOXA1, HOXA2, HOXB1, HOXB2, POU5F1, NANOG, 및 이의 조합으로부터 선택되는 적어도 하나의 마커를 발현한다.

[0176] 또한, 본 발명은 본 명세서에 개시된 임의의 세포 개체군을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0177] 소정 구현예에서, 세포는 생체적합성 스캐폴드 또는 매트릭스, 예를 들어, 세포가 대상체에 이식되거나 그래프팅될 때 조직 재생을 용이하게 하는 생체적합성 3차원 스캐폴드를 추가로 포함하는 조성물에 포함된다. 소정 구현예에서, 생체적합성 스캐폴드는 세포의 매트릭스 물질, 합성 중합체, 사이토카인, 콜라겐, 폴리펩타이드 또는 단백질, 피브로넥틴을 포함하는 다당류, 라미닌, 케라틴, 피브린, 피브리노겐, 히알루론산, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 아가로스 또는 젤라틴, 및/또는 하이드로겔을 포함한다(예로, U.S. 공개 번호 2015/0159135, 2011/0296542, 2009/0123433, 및 2008/0268019를 참조하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 참조로서 포함된다). 소정 구현예에서, 조성물은 중간뇌 DA 세포로의 이식된/그래프팅된 세포의 성숙을 촉진하기 위한 성장 인자를 추가로 포함한다.

[0178] 소정 구현예에서, 약 1×10^4 내지 약 1×10^{10} , 약 1×10^4 내지 약 1×10^5 , 약 1×10^5 내지 약 1×10^9 , 약 1×10^5 내지 약 1×10^6 , 약 1×10^5 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 , 약 1×10^7 내지 약 1×10^8 , 약 1×10^8 내지 약 1×10^9 , 약 1×10^8 내지 약 1×10^{10} , 또는 약 1×10^9 내지 약 1×10^{10} 세포의 세포 개체군을 포함하는 조성물이 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 이의 약 1×10^5 내지 약 1×10^7 세포가 대상체에게 투여된다.

[0179] 소정 구현예에서, 상기 조성물은 동결된다. 소정 구현예에서, 상기 조성물은 적어도 하나의 동결방지제, 예를 들어, 비제한적으로, 디메틸설폭시드(DMSO), 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜, 수크로스, 트레할로스, 텍스트로스, 또는 이의 조합을 추가로 포함한다.

[0180] 소정 구현예에서, 조성물은 생체적합성 스캐폴드 또는 매트릭스, 예를 들어, 세포가 대상체에 이식되거나 그래프팅될 때 조직 재생을 용이하게 하는 생체적합성 3차원 스캐폴드를 추가로 포함한다. 소정 구현예에서, 생체적합성 스캐폴드는 세포의 매트릭스 물질, 합성 중합체, 사이토카인, 콜라겐, 폴리펩타이드 또는 단백질, 피브로넥틴을 포함하는 다당류, 라미닌, 케라틴, 피브린, 피브리노겐, 히알루론산, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 아가로스 또는 젤라틴, 및/또는 또는 하이드로겔을 포함한다(예로, U.S. 공개 번호 2015/0159135, 2011/0296542, 2009/0123433, 및 2008/0268019를 참조하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 참조로서 포함된다).

[0181] 소정 구현예에서, 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이다. 조성물은 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 및 다발성 경화증을 포함하는 신경퇴행성 장애를 예방 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0182] 본 발명에 개시된 주제는 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 분화된 세포 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는 장치를 제공한다. 장치의 비제한적 예는 주사기, 미세 유리관, 정위 바늘(stereotactic needle) 및 캐놀러

(cannula)를 포함한다.

- [0183] **5.4. 신경계 장애의 예방, 모델링, 및/또는 치료 방법**
- [0184] 본 명세서에 개시된 세포 개체군 및 조성물(예로, 섹션 5.4에 개시된 것)은 신경계 장애를 갖는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방, 모델링, 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 개시된 주제는 신경계 장애를 갖는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방, 모델링, 및/또는 치료하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 본 발명에 개시된 줄기-세포-유래 mDA 뉴런 또는 이를 포함하는 조성물의 유효량을 신경계 장애를 앓는 대상체 내로 투여하는 것을 포함한다. 소정 구현예에서, 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물이다.
- [0185] 소정 구현예에서, 신경계 장애는 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소를 특징으로 한다. 중간뇌 도파민 뉴런 기능의 감소는 연령과 관련될 수 있다.
- [0186] 소정 구현예에서, 신경계 장애에 대한 증상은 경련, 운동완만증, 굽은 자세, 자세 불안정, 경직, 연하곤란, 및 치매로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0187] 신경계 장애의 비제한적 예는 파킨슨증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 및 다발성 경화증을 포함한다. 소정 구현예에서, 신경계 장애는 파킨슨증 또는 파킨슨병이다.
- [0188] 소정 구현예에서, 신경계 장애는 파킨슨병이다. 파킨슨병의 일차 운동 징후는, 예를 들어, 비제한적으로, 손, 팔, 다리, 턱 및 얼굴의 경련, 운동완만증 또는 운동 느려짐, 사지 및 몸통의 경직 또는 강직 및 자세 불안정 또는 손상된 균형 및 조정을 포함한다.
- [0189] 소정 구현예에서, 신경계 장애는 파킨슨증 질환이며, 이는 운동을 제어하는 뇌의 일부인 기저핵에서 도파민 부족에 연관되는 질환을 나타낸다. 증상에는 경련, 운동완만증(극심한 운동 느려짐), 굽은 자세, 자세 불안정, 및 경직이 포함된다. 파킨슨증 질환의 비제한적 예는 피질기저 변성, 레비 소체 치매, 다중 시스템 위축, 및 진행성 핵상 마비를 포함한다.
- [0190] 세포 또는 조성물은 신경계 장애의 예방, 모델링, 및/또는 치료를 위해 대상체에 전신으로 또는 직접 투여되거나 제공될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포 또는 조성물은 관심 기관(예로, 중추 신경계(CNS))으로 직접 주사된다. 소정 구현예에서, 세포 또는 조성물은 선조체 내로 직접 주사된다.
- [0191] 세포 또는 조성물은 임의의 생리적으로 허용가능한 비히클 중 투여될 수 있다. 세포 또는 조성물은 편재된 주사, 정위(OT) 주사, 전신 주사, 정맥내 주사, 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포 또는 조성물은 정위(OT) 주사를 통해 신경퇴행성 장애를 앓는 대상체에 투여된다.
- [0192] 세포 또는 조성물은 멸균 액체 조제물, 예로, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액, 또는 점성 조성물로 편리하게 제공될 수 있고, 이는 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조제물은 보통 겔, 다른 점성 조성물, 및 고체 조성물보다 제조하기 더 쉽다. 추가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해, 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 특정 조직과 더 긴 접촉 기간을 제공하기 위해 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 담체를 포함할 수 있고, 이는, 예를 들어, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 폴리올(예로, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 적합한 이의 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 멸균 주사용 용액은 요망되는 바에 따라, 다양한 양의 다른 성분과 함께 요구되는 양의 적절한 용매 중, 본 발명에 개시된 주제의 조성물, 예로, 본 발명에 개시된 줄기-세포-유래 전구체를 포함하는 조성물을 포함시켜 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과의 혼합물일 수 있다. 조성물은 또한 동결건조될 수 있다. 조성물은 요망되는 투여 및 제조 경로에 따라, 보조 물질, 예컨대 습윤제, 분산제, 또는 유화제(예로, 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는 점도 향상 첨가제, 보존제, 풍미제, 색상 등을 함유할 수 있다. 표준 참고서, 예컨대 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985]이 과도한 실험 없이 적합한 조제물을 제조하기 위해 참조될 수 있다.
- [0193] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트화제, 및 완충제를 포함하는 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 확보될 수 있다. 주사용 약학 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 이용에 의해 일으킬 수 있다.
- [0194] 요망되는 경우, 조성물의 점도는 약학적으로 허용 가능한 증점제를 이용하여 선택된 수준으로 유지될 수 있다.

쉽게 그리고 경제적으로 이용가능하고 함께 작업하기 쉬우므로 메틸셀룰로스가 이용될 수 있다. 다른 적합한 증점제는, 예를 들어, 잔탄 고무, 카복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 카보머 등을 포함한다. 증점제의 농도는 선택되는 제제에 의존할 수 있다. 중요한 점은 선택된 점도를 달성할 양을 이용하는 것이다. 적합한 담체 및 다른 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정 투여 형태, 예로, 액체 투여 형태의 성질(예로, 조성물이 용액, 현탁액, 겔 또는 다른 액체 형태, 예컨대 경시 방출 형태 또는 액체 충전 형태로 제형화되어야 하는지 여부)에 의존할 것이다.

[0195] 본 기술분야의 기술자는 조성물의 성분이 화학적으로 불활성이도록 선택되어야 하며, 본 발명에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 생활성 또는 효능에 영향을 미치지 않을 것임을 인식할 것이다. 이는 화학적 및 약학적 이론의 기술자에게 문제를 제시하지 않거나, 또는 문제는 표준 참고서를 참조하여 또는 본 발명 및 본 명세서에서 인용된 문헌으로부터 단순한 실험에 의해(과도한 실험이 관여되지 않고) 쉽게 회피될 수 있다.

[0196] 세포의 치료적 용도에 관한 하나의 고려사항은 최적 효과를 달성하기 위해 필요한 세포의 양이다. 최적 효과에는 비제한적으로, 신경퇴행성 장애를 앓는 대상체의 CNS 영역의 재증식, 및/또는 대상체의 CNS의 개선된 기능이 포함된다.

[0197] "유효량"(또는 "치료적 유효량")은 치료 시 유의하거나 요망되는 임상 결과에 영향을 미치기 충분한 양이다. 유효량은 적어도 하나의 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 치료의 관점에서, 유효량은 신경퇴행성 장애를 호전시키거나, 완화하거나, 안정화하거나, 역전시키거나 또는 진행을 늦추거나, 또는 신경퇴행성 장애의 병리적 결과를 다르게 줄이기 충분한 양이다. 유효량은 일반적으로 케이스별 기준으로 의사에 의해 결정되며, 본 기술분야의 기술자의 기술 범위 내에 있다. 유효량을 달성하기 위해 적절한 투여량을 결정할 때 몇몇 요인이 전형적으로 고려된다. 이들 요인에는 대상체의 연령, 성별 및 체중, 치료받는 상태, 상태의 중증도 및 형태 그리고 투여되는 세포의 유효 농도가 포함된다.

[0198] 소정 구현예에서, 세포의 유효량은 신경계 장애를 앓는 대상체의 CNS 영역에서 재증식하기 충분한 양이다. 소정 구현예에서, 세포의 유효량은 신경퇴행성 장애를 앓는 대상체의 CNS의 기능을 개선하기 충분한 양이며, 예로, 개선된 기능은 정상 개인의 CNS 기능의 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%일 수 있다.

[0199] 투여될 세포의 양은 치료받는 대상체에 있어서 변할 것이다. 소정 구현예에서, 세포의 약 1×10^4 내지 약 1×10^{10} , 약 1×10^4 내지 약 1×10^5 , 약 1×10^5 내지 약 1×10^9 , 약 1×10^5 내지 약 1×10^6 , 약 1×10^5 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 , 약 1×10^7 내지 약 1×10^8 , 약 1×10^8 내지 약 1×10^9 , 약 1×10^8 내지 약 1×10^{10} , 또는 약 1×10^9 내지 약 1×10^{10} 이 대상체에 투여된다. 소정 구현예에서, 세포의 약 1×10^5 내지 약 1×10^7 이 신경계 장애를 앓는 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 세포의 약 1×10^6 내지 약 1×10^7 이 신경계 장애를 앓는 대상체에게 투여된다. 소정 구현예에서, 세포의 약 1×10^6 내지 약 4×10^6 이 신경계 장애를 앓는 대상체에게 투여된다. 유효 용량으로 간주될 양의 정확한 결정은 특정 대상체의 체격, 연령, 성별, 체중, 및 상태를 포함한, 각 대상체에 대한 개별적 요인에 기반할 수 있다. 투여량은 본 발명 및 본 기술분야의 지식으로부터 본 기술분야의 기술자에 의해 쉽게 확인될 수 있다.

[0200] **5.5. 키트**

[0201] 본 발명에 개시된 주제는 mDA 뉴런 또는 이의 전구체로의 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 (a) SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제, (b) Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제, (c) SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제, (d) FGF 신호전달의 적어도 하나의 활성화제, 및 (e) Wnt 신호전달의 적어도 하나의 억제제를 포함한다. 소정 구현예에서, 키트는 (f) mDA 뉴런 또는 이의 전구체를 나타내는 적어도 하나의 마커를 발현하는 분화된 세포의 개체군으로의 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 설명서를 추가로 포함한다.

[0202] 소정 구현예에서, 설명서는 특정 순서로의 줄기 세포와 억제제(들) 및 활성화제(들)의 접촉을 포함한다. 억제제(들) 및 활성화제(들)의 접촉 순서는 줄기 세포의 배양을 위해 이용되는 세포 배양 배지에 의해 결정될 수 있다.

[0203] 소정 구현예에서, 설명서는 본 발명의 방법(섹션 5.2 참조)에 의해 기재된 바와 같은 억제제(들) 및 활성화제(들)과 줄기 세포의 접촉을 포함한다.

- [0204] 소정 구현예에서, 본 발명은 단위 투여량 형태로 본 명세서에 개시된 세포 개체군 또는 조성물의 유효량을 포함하는 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 치료 조성물을 함유하는 멸균 용기를 포함한다; 이러한 용기는 상자, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 가방, 파우치, 블리스터-팩, 또는 본 기술분야에 공지된 다른 적합한 용기 형태일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 라미네이트지, 금속 호일, 또는 약제의 보유에 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다.
- [0205] 소정 구현예에서, 키트는 세포 개체군 또는 조성물을 신경계 장애를 앓는 대상체에게 투여하기 위한 설명서를 포함한다. 설명서는 신경계 장애를 갖는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방, 모델링, 및/또는 치료하기 위한 세포 또는 조성물의 이용에 관한 정보를 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 설명서는 다음 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; 신경계 장애 또는 이의 증상을 갖는 대상체의 적어도 하나의 증상을 예방, 모델링, 및/또는 치료하기 위한 투여량 일정 및 투여; 주의사항; 경고; 적응증; 금기; 과용량 정보; 유해 반응; 동물 약리; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 설명서는 용기 상에 직접(존재하는 경우), 또는 용기에 적용된 표지로, 또는 용기 내에 또는 이와 함께 공급되는 별도 시트, 팜플렛, 카드, 또는 폴더로 인쇄될 수 있다.
- [0206] **6. 실시예**
- [0207] 본 발명에 개시된 주제는 하기 실시예를 참조로 더 잘 이해될 것이며, 이는 제한으로서가 아니라 본 발명에 개시된 주제의 예시로서 제공된다.
- [0208] **실시예 1: 예시적인 중간뇌 DA 뉴런 분화 프로토콜**
- [0209] 다음은 소정 구현예에 따른 본 발명에 개시된 방법의 예시적인 프로토콜이다.
- [0210] 0일: 아큐타제(Acutase)로 단일 세포로 만든 hPSC/hiPSC로부터의 세포를 공급하고 Y-약물이 있는 배지 1 중의 겔트렉스(Geltrex)-코팅된 플레이트 상에 400,000 세포/cm²의 밀도로 플레이트했다.
- [0211] 1일 - 2일: 세포는 100% 포화도(confluence)에 도달해야 한다. 세포에 배지 1을 이중 공급했다.
- [0212] 3일: 세포에 배지 1을 공급했다.
- [0213] 4일: 세포에 배지 2를 공급했다. CHIR-부스트 프로토콜의 경우, CHIR 농도는 WA-09 hESC 주-매개 분화를 위해 1 μM에서 6 μM로 변경되었다(이는 hPSC/hiPSC 주에 따라 약간 다를 수 있음).
- [0214] 5일 - 6일: 세포에 배지 2를 이중 공급했다.
- [0215] 7일: 세포에 배지 3을 공급했다.
- [0216] 8일 - 9일: 세포에 배지 3을 매일 공급했다.
- [0217] 10일: 세포에 배지 4를 공급했다.
- [0218] 11일: 세포를 37°C에서 30분 동안 아큐타제와 함께 인큐베이션하였다; 배지 4 중에 800,000 세포/cm²의 밀도로 세포를 플레이트했다.
- [0219] 12일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 5를 공급했다.
- [0220] 12-16일: 세포에 배지 5를 매일 공급했다; 16일에, FACS 분석으로 측정했을 때, 90% 이상의 세포가 FOXA2⁺/EN⁺였다.
- [0221] 16일 - 100일: 세포에 배지 6을 매일 공급했다.
- [0222] 배지 1 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 μM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C5II, 및 1 μM CHIR.
- [0223] 배지 2 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 mM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C5II, 및 6 μM CHIR.
- [0224] 배지 3 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 및 6 μM CHIR.
- [0225] 배지 4 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 3 μM CHIR, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM 아스코르브산(AA), 20 ng/ml GSNF, 0.5 mM dcAMP, 및 1 ng/ml TGF-β3.
- [0226] 배지 5 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 3 μM CHIR, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA,

20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 1 μM IWP2, 및 100 ng/ml FGF18.

[0227] 배지 6 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 및 10 nM DAPT.

[0228] 이 실시예에 기재된 프로토콜은 실시예 3에서 "Wnt-부스트 + FGF18(12일-16일) + IWP2(12일-16일)"로 지칭된다.

[0229] **실시예 2: 예시적인 중간뇌 DA 뉴런 분화 프로토콜**

[0230] 다음은 소정 구현예에 따른 본 발명에 개시된 방법의 예시적인 프로토콜이다.

[0231] 0일: 아큐타제로 단일 세포로 만든 hPSC/hiPSC로부터의 세포를 공급하고 Y-약물이 있는 배지 1 중의 겔트렉스-코팅된 플레이트 상에 400,000 세포/cm²의 밀도로 플레이트했다.

[0232] 1일 - 2일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 1을 이중 공급했다.

[0233] 3일: 세포에 배지 1을 공급했다.

[0234] 4일: 세포에 배지 2를 공급했다. CHIR-부스트 프로토콜의 경우, CHIR 농도는 WA-09 hESC 주 매개 분화를 위해 1 μM에서 6 μM로 변경되었다(이는 hPSC/hiPSC 주에 따라 약간 다를 수 있음).

[0235] 5일 - 6일: 세포에 배지 2를 이중 공급했다.

[0236] 7일: 세포에 배지 3을 공급했다.

[0237] 8일 - 9일: 세포에 배지 3을 매일 공급했다.

[0238] 10일: 세포에 배지 4를 공급했다.

[0239] 11일: 세포를 37°C에서 30분 동안 아큐타제와 함께 인큐베이션하였다; 배지 4 중에 800,000 세포/cm² 밀도로 세포를 플레이트했다.

[0240] 12일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 5를 공급했다.

[0241] 12-16일: 세포에 배지 5를 매일 공급했다; 16일에, FACS 분석으로 측정했을 때, 90% 이상의 세포가 FOXA2⁺/EN⁺였다.

[0242] 16일 - 100일: 세포에 배지 6을 매일 공급했다.

[0243] 배지 1 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 μM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 1 μM CHIR.

[0244] 배지 2 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 mM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 6 μM CHIR.

[0245] 배지 3 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 및 6 μM CHIR.

[0246] 배지 4 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 1 μM IWP2, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM 아스코르브산(AA), 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 및 1 ng/ml TGF-β3.

[0247] 배지 5 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 1 μM IWP2, 및 100 ng/ml FGF18.

[0248] 배지 6 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 및 DAPT(10 nM).

[0249] 이 실시예에 기재된 프로토콜은 실시예 3에서 "Wnt-부스트 + FGF18(12일-16일) + IWP2(10일-16일)"로 지칭된다.

[0250] **실시예 3: mDA 뉴런 분화 동안 Wnt 억제제 치료**

[0251] 상이한 WNT 신호전달 유전자는 도파민 신경 하위유형에 연결된다. 알데하이드 탈수소효소 1 패밀리에 속하는 A1(ALDH1A1)은 마우스 및 인간 mDA 뉴런 발달 동안 hDA2 하위유형(A9 유형)에 대한 마커이다(La Manno, *et al.* Cell 167, 566-580 e519 (2016); Toledo, *et al.* Br J Pharmacol 174(24), 4716-4724 (2017)). ALDH1A1은 단백질의 알데하이드 탈수소효소 패밀리에 속하며 알코올 대사의 주요 산화 경로의 두 번째 효소이다.

- [0252] hPSC 및 hiPSC는 분화 방법에 사용되었다. 먼저, 상이한 프로토콜로 분화된 mDA 세포에서 ALDH1A1 유도에 대한 Wnt 신호전달의 효과를 평가했다. FGF18(12-16일)이 있거나 없는, Wnt-부스트, Wnt-부스트 + IWP2(10일-16일), 및 Wnt-부스트 + IWP2(12일-16일) 프로토콜을 사용하여 생성된 16일차에 분화된 mDA 세포에서 FOXA2, LMX1A, EN1, WNT1, OTX2, ALDH1A1 및 PAX6의 mRNA 발현 수준을 평가하였다(도 1).
- [0253] "Wnt-부스트 + FGF18(12-16일) + IWP2(12일-16일)" 프로토콜은 실시예 1에 기재되어 있다.
- [0254] "Wnt-부스트 + FGF18(12-16일) + IWP2(10일-16일)" 프로토콜은 실시예 2에 기재되어 있다.
- [0255] 이 실시예에서 언급된 "Wnt-부스트" 프로토콜은 아래에 제공된다.
- [0256] 0일: 아큐타제로 단일 세포로 만든 hPSC/hiPSC로부터의 세포를 공급하고 Y-약물이 있는 배지 1 중의 젤트렉스-코팅된 플레이트 상에 400,000 세포/cm²의 밀도로 플레이트했다.
- [0257] 1일 - 2일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 1을 이중 공급했다.
- [0258] 3일: 세포에 배지 1을 공급했다.
- [0259] 4일: 세포에 배지 2를 공급했다. CHIR-부스트 프로토콜의 경우, CHIR 농도는 WA-09 hESC 주 매개 분화를 위해 1 μM에서 6 μM로 변경되었다(이는 hPSC/hiPSC 주에 따라 약간 다를 수 있음).
- [0260] 5일 - 6일: 세포에 배지 2를 이중 공급했다.
- [0261] 7일: 세포에 배지 3을 공급했다.
- [0262] 8일 - 9일: 세포에 배지 3을 매일 공급했다.
- [0263] 10일: 세포에 배지 4를 공급했다.
- [0264] 11일: 세포를 37°C에서 30분 동안 아큐타제와 함께 인큐베이션하였다; 배지 4 중에 800,000 세포/cm²의 밀도로 세포를 플레이트했다.
- [0265] 12일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 5를 공급했다.
- [0266] 12-16일: 세포에 배지 5를 매일 공급했다; 16일에, FACS 분석으로 측정했을 때, 90% 이상의 세포가 FOXA2⁺였다.
- [0267] 16일 - 100일: 세포에 배지 6을 매일 공급했다.
- [0268] 배지 1 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 μM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 1 μM CHIR.
- [0269] 배지 2 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 mM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 6 μM CHIR.
- [0270] 배지 3 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 및 6 μM CHIR.
- [0271] 배지 4 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 3 μM CHIR, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM 아스코르브산(AA), 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 및 1 ng/ml TGF-β3.
- [0272] 배지 5 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3.
- [0273] 배지 6 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 및 10 nM DAPT.
- [0274] SMA mRNA 발현 수준은 검출할 수 없었다. FGF18 및 IWP2와 조합된 Wnt-부스트 프로토콜은 최적의 A/P 및 D/V 패턴화된 전구체를 생성했으며, 여기서 90% 이상의 세포가 FOXA2/EN1 이중 양성이다(도 2a). 도 2a는 상이한 프로토콜을 사용하여 16일차에 분화된 mDA 전구체의 FACS 분석을 보여준다. 상이한 프로토콜을 사용하여 16일차에 분화된 mDA의 면역 염색 이미지를 도 2b에 나타낸다. 또한, FGF18이 있거나 없는, Wnt-부스트, Wnt-부스트 + IWP2(12일-16일) 프로토콜을 사용하여 생성된 분화된 mDA 세포에서 16일차에 FOXA2, LMX1A, OTX2, EN1, ALDH1A1, BARHL2, BARHL1, PAX6, ALDH2, 및 WNT1의 mRNA 발현 수준을 평가하였다(도 3). 분화된 세포에서 마커 유전자의 발현에 대한 IWP2의 효과를 결정하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 40일차에 분화된 세포에서 FOXA2, LMX1A,

OTX2, EN1, ALDH1A1, PAX6 및 PITX3의 mRNA 발현 수준을 평가하였다. 본 발명은 16일차에 매우 높은 사중 양성 세포의 존재를 관찰하였다(FOXA2/LMX1A, OTX2/EN1). 또한, EN1의 높은 발현은 FGF18에 의해 구동되었다. 또한, IWP2 및 FGF18의 첨가에 의해 ALDH1A1, WNT1, PITX3, DAT, DDC, VMAT2의 발현이 증가된 반면, IWP2는 Ki67, SMA 및 SIX1의 발현을 낮추었다. FOXA2, TH, 및 MAP2(도 14a), 및 EN1 및 TH(도 14b)의 발현을 보여주는 60일 차에 분화된 세포의 면역 염색 이미지를 수집했다.

[0275] FGF18 및 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 25일차에 분화된 세포의 FACS 매개 분류를 수행했다(도 5). 분화된 mDA 세포는 CD49e 및 CD184 단백질 마커의 발현을 기반으로 분류되었다. 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 형태를 도 6에 나타낸다. FOXA2, LMX1A, EN1, NURR1, ALDH1A1, PITX3, DAT, VMAT2, CALB1, CALB2, PITX2, BARHL1, SIM1, PHOX2A, POU4F1의 mRNA 발현 수준을 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 평가 및 분석하였다(도 7 및 8). FOXA2, TH, 및 MAP2(도 9a) 및 ALDH1A1, EN1, 및 TH(도 9b-9c)의 발현을 보여주는 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 면역 염색 이미지를 수집했다. 또한, TH 및 EN1(도 17) 및 ALDH1A1, EN1, 및 TH(도 18)의 발현을 보여주는 분류된 60일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 면역 염색 이미지를 수집했다.

[0276] 다음으로, "Wnt-부스트" 프로토콜 또는 "Wnt-부스트 + FGF18(12-16일) + IWP2(12일-16일)" 프로토콜을 사용하여 세포를 분화시키고, 마우스에 이식하였다. 그래프팅된 세포는 이식 1개월 후에 면역 염색하였다. hNCAM, TH, ALDH1A1, FOXA2, SC121, EN1, Ki67의 발현을 평가하였다(도 10a, 10b, 및 24). 또한, 그래프팅된 세포는 이식 후 2개월 후에 면역 염색하였다. SC121, TH, Nurr1, ALDH1A1, 및 SOX6의 발현 수준을 결정하였다(도 11a-11c).

[0277] **실시예 4: WNT 억제제의 최적화**

[0278] 이 실시예는 WNT 치료의 시간적 창 및 농도를 최적화하고, 비표준 신호전달의 재활성화가 최적 수준의 mDA 뉴런 분화 또는 성숙을 위해 필요한지 여부를 시험하도록 설계된다. 사전의 데이터(나타내지 않음)는 표준 신호전달 단독의 억제(예로, 표준 신호전달의 선택적 억제제(예로, XAV939; AXIN을 안정화시키는 탄키라제 억제제)를 사용함으로써)는 IWP2 치료에 필적하는 결과를 얻기에 충분하지 않을 수 있음을 시사한다. IWP2는 비표준 신호전달 및 표준 신호전달을 둘 다 억제한다. PITX3, DAT, 및 VMAT2의 발현은 qRT-PCR 및 면역세포화학(ICC)에 의해 정량화된다. IWP2 (또는 다른 후보 WNT 억제제)는 EN1의 발현이나 오염 마커(SIX1 및 SMA)의 출현에 부정적인 영향을 미치지 않는 것이 확인되었다. 최적화된 조건은 남성 및 여성 주를 포함한 hPSC 주(3 hESC 및 3 iPSC 주; 각각 ≥3의 독립적 분화)에 걸쳐 검증되었다(Zimmer, *et al.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 115, E8775-E8782 (2018)).

[0279] **실시예 5: 생성된 mDA 뉴런의 시험관 내 상세한 분자 및 기능 평가**

[0280] 본 발명에 개시된 분화 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런 아이덴티티를 검증한다. 이 검증에는 i) ICC 및 인 시추 발현에 의한 마커 발현(ALDH1A1 및 PITX3을 포함함)의 심층적 시간적 특성화; ii) 시간 경과에 따른 벌크 RNAseq의 분석(0일, 11일, 16일, 25일, 40일, 60일); iii) 본 발명에 개시된 분화 방법이 임상 등급 mDA 뉴런에 대해 사전에 확립된 QC("방출 기준")와 일치하거나 초과하는지 여부를 평가하기 위해 임상 등급 mDA 뉴런 분화를 최적화하기 위해 개발된 42개의 정렬된 qRT-PCR 마커 세트의 사용; iv) 분화 30일, 50일, 및 70일에 이전에 기술된 바와 같은(Kriks, *et al.* Nature 480, 547-551 (2011)) HPLC(전기화학적 검출)에 의한 DA 방출의 측정에 의한 mDA 뉴런의 생화학적 성숙도의 평가; 및 v) 시험관 내 전기생리학적 연구에 의한 성숙도 수준(예로, 휴지기 막 전위, 입력 저항), 및 자율적인 페이스 메이킹 또는 Sag 전류의 존재를 포함하는 mDA 뉴런 특이적 매개변수에서의 차이의 결정이 포함된다. 본 발명에 개시된 분화 방법에 의해 개발된 mDA 뉴런에서 방출된 KCL-유발 DA는 이전의 방법보다 더 일찍 그리고 세포 기준 당 더 높은 수준으로 발생할 것으로 예상된다. 자발적인 시험관 내 네트워크 활동의 출현은 고밀도 미세 전극 어레이 시스템(MEA)을 사용하여 검증된다.

[0281] **실시예 6: 생성된 mDA 뉴런의 생체 내 기능 평가**

[0282] 생체 내 생존 및 기능을 평가하기 위해 세포를 16일째에 이식한다. 병변이 없는 NSG 마우스의 선조체 내로 단기 이식(1개월)을 수행하여 기능 연구(n=5/그룹)를 시작하기 전에 각 치료 군에 대한 강력한 단기 생존을 확인한다. 기능 연구의 경우, 6OHDA 병변이 있는 래트 숙주(*nu/nu* 래트)에서 6개월 간의 이식 연구를 실행한다. 군은 i) 식염수 대조군, ii) Wnt-부스트, iii) Wnt-부스트 + FGF18, iv) Wnt-부스트 + FGF18/IWP2 (n=10/그룹)이다. 이전에 기술된 바와 같이(Kriks, *et al.* Nature 480, 547-551 (2011)) 래트는 이식 전에 내측 전뇌

다발(MFB)을 표적으로 하는 편측 60HDA 병변을 받는다. 안정적인 회전 행동(> 6회전/분, 매주 2회 연속 시험)이 있는 동물만 포함된다. 암페타민으로 유도된 회전(한 달에 한 번 간격으로) 외에도 스테핑 및 실린더 시험(Kriks, *et al.* Nature 480, 547-551 (2011))을 포함한 여러 비약물 유도 검정(그래프팅 전 및 그래프팅 후 3개월 및 6개월에)을 모니터링한다. 이전에 기술된 바와 같이(Kriks, *et al.* Nature 480, 547-551 (2011)) 이식은 정위 수술 및 숙주 선조체 내로의 200×10^3 세포($2 \mu\text{l}$ 부피)의 주입을 통해 수행된다. 모든 조건은 암페타민 유도 행동에서 상당한 회복(식염수 대조군에 비해)을 촉발하는 한편, FGF18 및 FGF18/IWP2 프로토콜은 보다 빠른 회복을 촉발하고 늦은 시점에 회전 검정에서 과잉 보상(음의 점수)을 보일 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 본 발명에 개시된 분화 방법에 의해 생성된 mDA 뉴런의 그래프트는 일반적으로 암페타민 회전보다 복원하기가 더 어려운 스테핑 및 실린더 시험에서 향상된 회복을 보여준다.

[0283] 실시예 7: 조직학적 분석

[0284] 조직학적 분석은 i) 생존 mDA 뉴런의 총 수(그래프팅 내 TH+ 세포의 입체학적 총수); ii) 인간 핵 항원(hNA)과의 공동-발현에 의해 확인된 TH+ 세포의 인간 아이덴티티; iii) mDA 뉴런 아이덴티티, 하위유형 및 생화학적 성숙의 마커(TH/EN1/FOXA2, TH/DAT/VMAT2, TH/GIRK2/CALB); iv) 섬유 성장의 정도(TH/hNCAM 및/또는 TH/SC121에 의한 선조체 신경계분포의 %); v) 비도파민 뉴런(GABA, 세로토닌, 글루타메이트)의 백분율 및 vi) 신경교 세포(GFAP, Olig2) 및 기타 증식(Ki67) 세포의 백분율에서 차이가 있는지 여부를 다루기 위해 수행한다.

[0285] 실시예 8: mDA 뉴런 분화 동안 Wnt 억제제 치료

[0286] 이 실시예는 실시예 3의 업데이트된 실험을 보여준다. FGF18이 있거나 없는, Wnt-부스트, Wnt-부스트 + IWP2(12일-16일) 프로토콜을 사용하여 생산된 분화된 mDA 세포에서 16일차에 FOXA2, LMX1A, OTX2, EN1, ALDH1A1, WNT1, BARHL1, PAX6, OTX2, 및 NKX2-2의 mRNA 발현 수준을 평가하였다. 본 발명은 IWP2 노출이 Wnt 부스트 및 Wnt 부스트 + FGF18 조건 둘 다에서 16일차에 증가된 ALDH1A1 뿐만 아니라 높은 내인성 WNT1 발현을 초래함을 발견하였다. 또한, IWP2 노출은 PAX6 및 NKX2-2 발현을 낮췄다(도 12). 40일차에 분화된 세포에서도 유사한 변화가 관찰되었다(도 13). 12일부터 16일까지 FGF18 및/또는 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 생성된 60일차에 분화된 세포의 면역 염색은 FGF18 및 IWP2 노출이 FOXA2 및 TH 발현의 높은 비율을 유지하고(도 14a) 세포 내 EN1 및 TH의 발현을 증가시켰음(도 14b)을 확인시켜 주었다.

[0287] FGF18 및 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않은 Wnt-부스트 프로토콜을 사용하여 25일차에 분화된 세포의 FACS 매개 분류를 수행했다. 분화된 mDA 세포는 CD49e 및 CD184 단백질 마커의 발현을 기반으로 분류되었다. FOXA2, LMX1A, EN1, NURR1, ALDH1A1, PITX3, DAT, VMAT2, CALB1, PITX2, BARHL1, SIM1, 및 PHOX2A의 mRNA 발현 수준을 분류된 40일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 평가하였다(도 15 및 16). 분류된 60일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포의 면역 염색 이미지는 ALDH1A1, EN1, 및 TH의 발현을 보여주었다(도 17 및 18).

[0288] 실시예 9: Wnt 억제제에 대한 노출 증가

[0289] Wnt 억제제에 대한 노출 증가를 시험하였다. 12일부터 25일까지 Wnt 억제제에 노출된 예시적인 중간뇌 DA 뉴런 분화 프로토콜은 다음과 같다:

[0290] 0일: 아큐타제로 단일 세포로 만든 hPSC/hiPSC로부터의 세포를 공급하고 Y-약물이 있는 배지 1 중의 겔트렉스-코팅된 플레이트 상에 400,000 세포/cm²의 밀도로 플레이트했다.

[0291] 1일 - 2일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 1을 이중 공급했다.

[0292] 3일: 세포에 배지 1을 공급했다.

[0293] 4일: 세포에 배지 2를 공급했다. CHIR-부스트 프로토콜의 경우, CHIR 농도는 WA-09 hESC 주 매개 분화를 위해 1 μM에서 6 μM로 변경되었다(이는 hPSC/hiPSC 주에 따라 약간 다를 수 있음).

[0294] 5일 - 6일: 세포에 배지 2를 이중 공급했다.

[0295] 7일: 세포에 배지 3을 공급했다.

[0296] 8일 - 9일: 세포에 배지 3을 매일 공급했다.

[0297] 10일: 세포에 배지 4를 공급했다.

- [0298] 11일: 세포를 37°C에서 30분 동안 아큐타제와 함께 인큐베이션하였다; 배지 4 중에 800,000 세포/cm² 밀도로 세포를 플레이트했다.
- [0299] 12일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 5를 공급했다.
- [0300] 12-16일: 세포에 배지 5를 매일 공급했다; 16일에, FACS 분석으로 측정했을 때, 90% 이상의 세포가 FOXA2⁺/EN⁺였다.
- [0301] 16일 - 25일: 세포에 배지 6을 매일 공급했다.
- [0302] 25일 - 100일: 세포에 배지 7을 매일 공급했다.
- [0303] 배지 1 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 μM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 1 μM CHIR.
- [0304] 배지 2 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 mM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 6 μM CHIR.
- [0305] 배지 3 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 및 6 μM CHIR.
- [0306] 배지 4 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 1 μM IWP2, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM 아스코르브산(AA), 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 및 1 ng/ml TGF-β3.
- [0307] 배지 5 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 1 μM IWP2, 및 100 ng/ml FGF18.
- [0308] 배지 6 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 1 μM IWP2, 및 DAPT(10 nM).
- [0309] 배지 7 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μM AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF-β3, 및 DAPT(10 nM).
- [0310] 12일부터 30일까지 Wnt 억제제에 노출된 예시적인 중간뇌 DA 뉴런 분화 프로토콜은 다음과 같다:
- [0311] 0일: 아큐타제로 단일 세포로 만든 hPSC/hiPSC로부터의 세포를 공급하고 Y-약물이 있는 배지 1 중의 겔트렉스-코팅된 플레이트 상에 400,000 세포/cm²의 밀도로 플레이트했다.
- [0312] 1일 - 2일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 1을 이중 공급했다.
- [0313] 3일: 세포에 배지 1을 공급했다.
- [0314] 4일: 세포에 배지 2를 공급했다. CHIR-부스트 프로토콜의 경우, CHIR 농도는 WA-09 hESC 주 매개 분화를 위해 1 μM에서 6 μM로 변경되었다(이는 hPSC/hiPSC 주에 따라 약간 다를 수 있음).
- [0315] 5일 - 6일: 세포에 배지 2를 이중 공급했다.
- [0316] 7일: 세포에 배지 3을 공급했다.
- [0317] 8일 - 9일: 세포에 배지 3을 매일 공급했다.
- [0318] 10일: 세포에 배지 4를 공급했다.
- [0319] 11일: 세포를 37°C에서 30분 동안 아큐타제와 함께 인큐베이션하였다; 배지 4 중에 800,000 세포/cm² 밀도로 세포를 플레이트했다.
- [0320] 12일: 세포는 100% 포화도에 도달해야 한다. 세포에 배지 5를 공급했다.
- [0321] 12-16일: 세포에 배지 5를 매일 공급했다; 16일에, FACS 분석으로 측정했을 때, 90% 이상의 세포가 FOXA2⁺/EN⁺였다.
- [0322] 16일 - 30일: 세포에 배지 6을 매일 공급했다.
- [0323] 30일 - 100일: 세포에 배지 7을 매일 공급했다.
- [0324] 배지 1 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 μM SB, 250 nM LDN, 500

ng/ml SHH C25II, 및 1 μ M CHIR.

[0325] 배지 2 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 10 mM SB, 250 nM LDN, 500 ng/ml SHH C25II, 및 6 μ M CHIR.

[0326] 배지 3 조성물: 뉴로바살 배지, N2 보충제, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 및 6 μ M CHIR.

[0327] 배지 4 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 1 μ M IWP2, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μ M 아스코르브산(AA), 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 및 1 ng/ml TGF- β 3.

[0328] 배지 5 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μ M AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF- β 3, 1 μ M IWP2, 및 100 ng/ml FGF18.

[0329] 배지 6 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μ M AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF- β 3, 1 μ M IWP2, 및 DAPT(10 nM).

[0330] 배지 7 조성물: 뉴로바살 배지, B27 보충제, Pen/Strep, L-글루타민, 20 ng/ml BDNF, 0.2 μ M AA, 20 ng/ml GDNF, 0.5 mM dcAMP, 1 ng/ml TGF- β 3, 및 DAPT(10 nM).

[0331] 본 발명은 30일까지 IWP2에 대한 지속적인 노출이 ALDH1A1의 발현을 추가로 유도했음을 발견하였다(도 19). 도 20은 12일부터 25일까지, 또는 12일부터 16일까지 IWP2를 첨가하거나 첨가하지 않고, 그리고 12일부터 16일까지 FGF18을 첨가하거나 첨가하지 않은, Wnt-부스트 프로토콜로부터 생성된 25일차에 분화된 세포의 FACS 매개 분류 전략을 보여주었다. 분류된 28일차에 분화된 CD49^{위크}/CD184^{위크} 세포 및 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포에서 마커 유전자의 mRNA 발현을 측정했다(도 21 및 22). 도 19의 결과와 일치하게, 12일부터 25일까지 IWP2에 대한 노출은 ALDH1A1의 발현을 추가로 유도하였다. 이 결과는 면역형광 염색을 사용하여 확인하였다(도 23).

[0332] **실시예 10: 분화된 세포의 생체 내 이식**

[0333] 실시예 3의 생체 내 이식 실험을 반복하여 수행하였다. IWP2 및 FGF18 프로토콜을 사용한 Wnt 부스트에 따라 생성된 분화된 세포는 선조체 신경분포 개선, EN1 발현 유지, A9 유형 ALDH1A1⁺ 세포 증가, 뿐만 아니라 증식 세포(Ki67⁺ 세포) 수 감소와 같은 많은 그래프트 이점을 가졌다(도 24 및 25).

[0334] 이식 4개월 후, IWP2 및 FGF18 프로토콜을 사용한 Wnt 부스트에 따라 생성된 이식된 세포는 거의 전체 선조체 영역만을 덮는 A9 유형 DA 뉴런 축삭 돌기를 가졌다(도 27).

[0335] 다음으로, 분류된 CD49^{위크}/CD184^{스트롱} 세포를 마우스에 이식하였다. 세포는 Wnt-부스트 또는 Wnt-부스트 + FGF18/IWP2(12-16일) 프로토콜 하에서 시험관 내 분화 25일차에 분류되었다. 그래프팅된 세포는 이식 1개월 후에 면역 염색하였다. 이식된 세포는 양호한 생존을 보였고 두 조건 모두에서 TH 및 FOXA2를 발현하는 균질한 DA 개체군을 가졌다(도 28). RNA 인 시츄 검정을 사용하여 IWP2 및 FGF18(12일 - 16일)이 있거나 없는 Wnt 부스트 하에서 시험관 내 분화된 세포의 PITX3 발현도 측정하였다(도 29).

[0336] **실시예 11: 분화된 세포의 생체 내 이식**

[0337] 본 발명에 개시된 프로토콜에 의해 생성된 세포의 임상적 관련성을 시험하기 위해 동결된 분화된 세포(규격품 세포 공급원)의 이식을 조사하였다. 2개의 동결된 배지 세포를 이식하고 면역 염색하고 그래프팅 1개월 후 TH 및 HNA에 의해 평가하였다(도 26). 이식된 세포는 2개의 상이한 배지에서 TH 및 FOXA2와 같은 mRNA 마커의 발현에 의해 우수한 그래프트 생존을 보임으로써, 본 발명에 개시된 방법이 임상적으로 관련이 있음을 입증하였다(도 26).

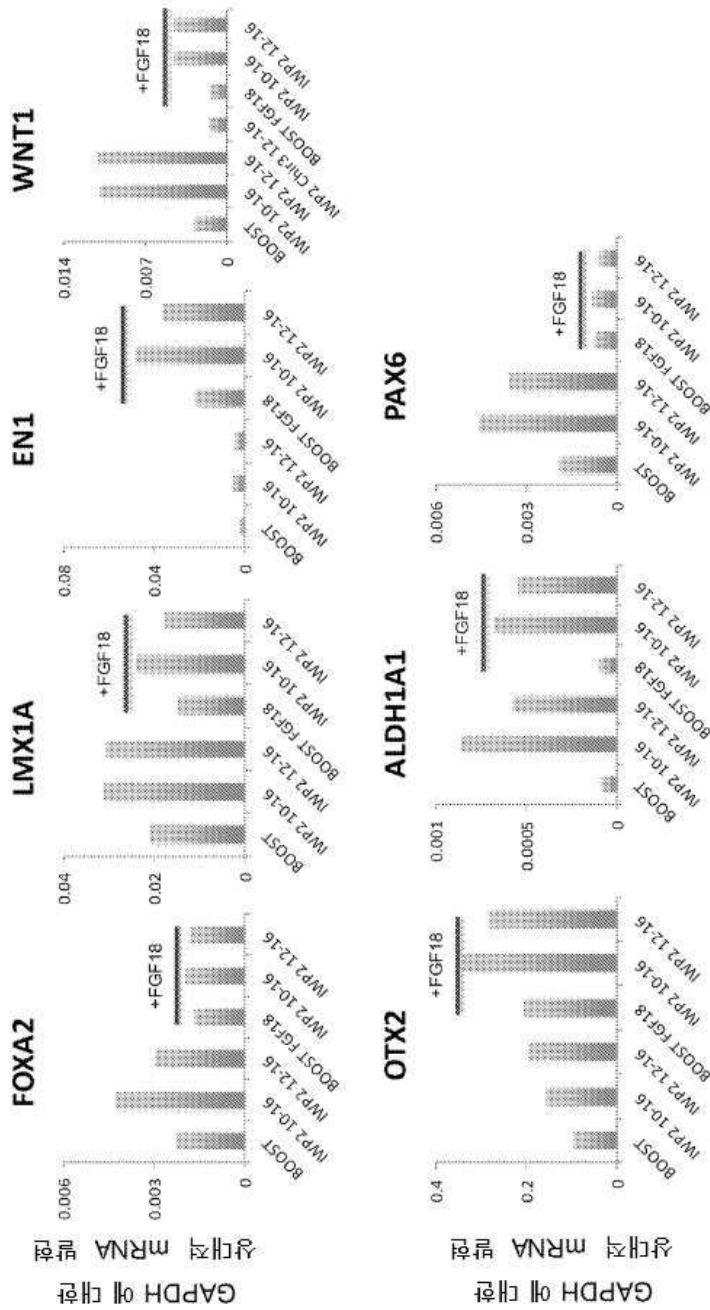
[0338] 본 발명에 개시된 주제 및 그 장점이 상세히 기재되었으나, 다양한 변화, 치환 및 변경이 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않고 본 명세서에서 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 또한, 본 출원의 범위는 명세서에 기재된 공정, 기계, 제조, 및 물질 조성, 수단, 방법 및 단계의 소정 구현예에 제한되려는 것이 아니다. 본 기술 분야의 기술자가 본 발명에 개시된 주제, 공정, 기계, 제조, 물질 조성, 수단, 방법 또는 단계의 개시로부터 쉽게 이해할 바와 같이, 본 명세서에 기재된 해당하는 구현예와 실질적으로 동일한 기능을 수행하거나 실질적으로 동일한 결과를 달성하는 현재 존재하거나 이후 개발될 것은 본 발명에 개시된 주제에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 첨부된 청구범위는 이의 범위 내에 이러한 공정, 기계, 제조, 물질 조성, 수단, 방법 또는 단계를 포함하려는 것이다.

[0339]

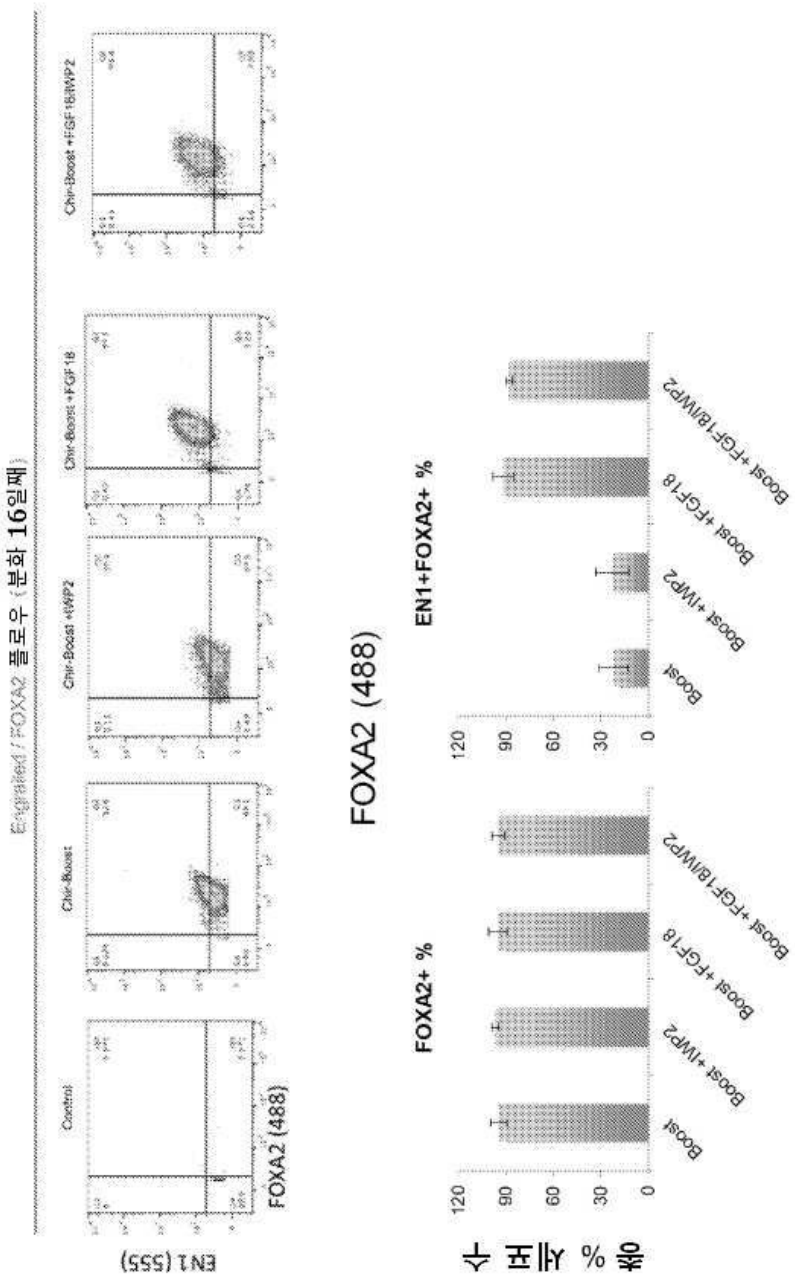
특히, 특허 출원, 공보, 제품 설명, 프로토콜, 및 서열 등록 번호가 본 출원에 걸쳐 인용되며, 그 개시는 모든 목적에 대해 이의 전문이 본 명세서에 참조로 포함된다.

도면

도면1

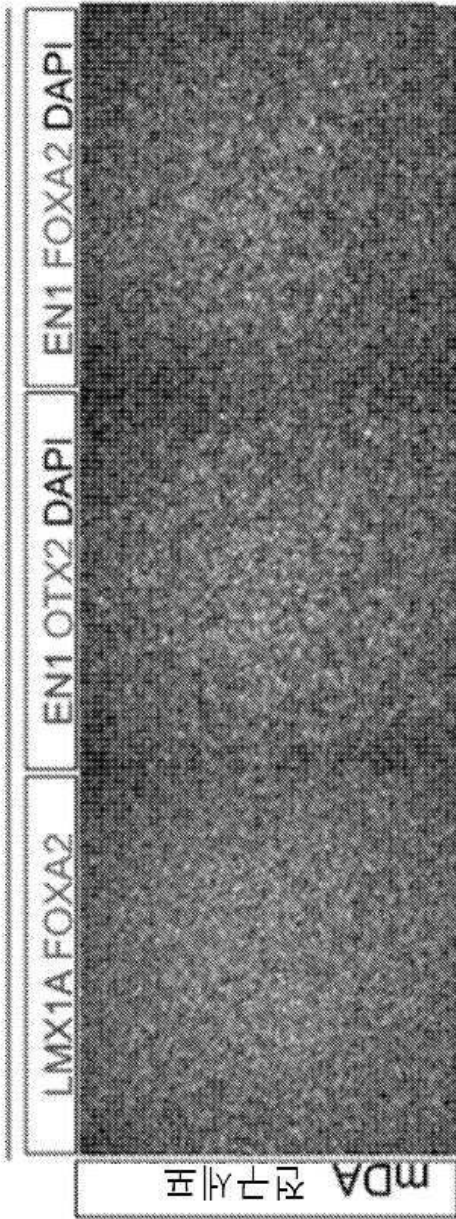


도면2a

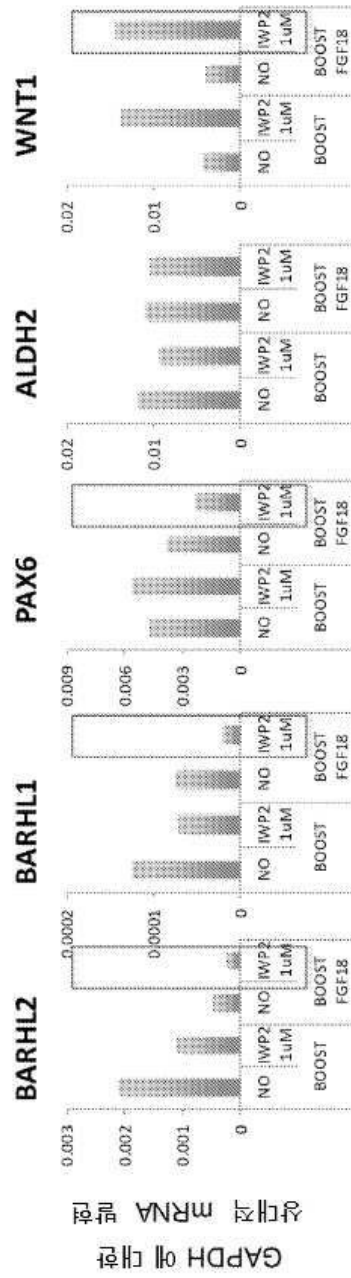
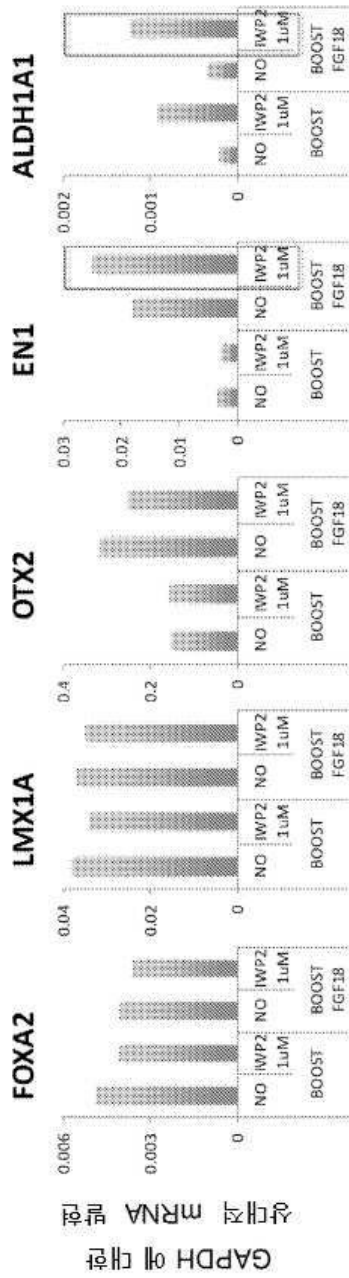


도면2b

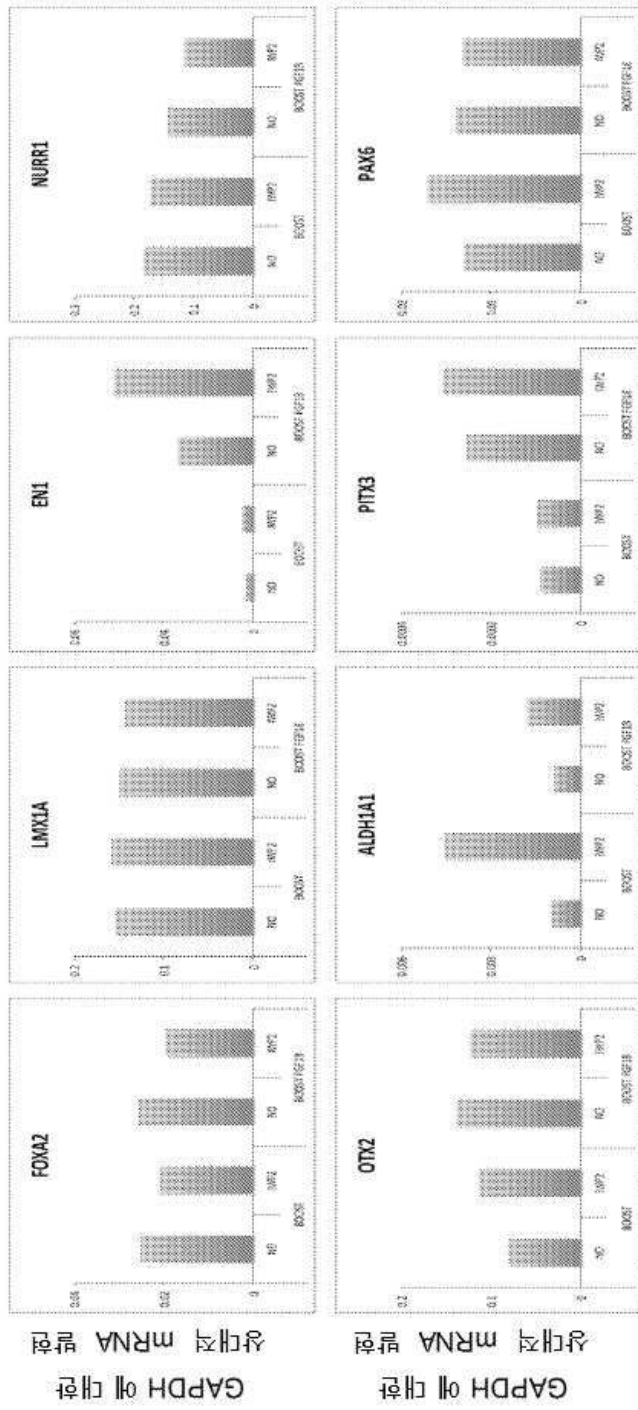
Chir-부스트+FGF18/IWP2



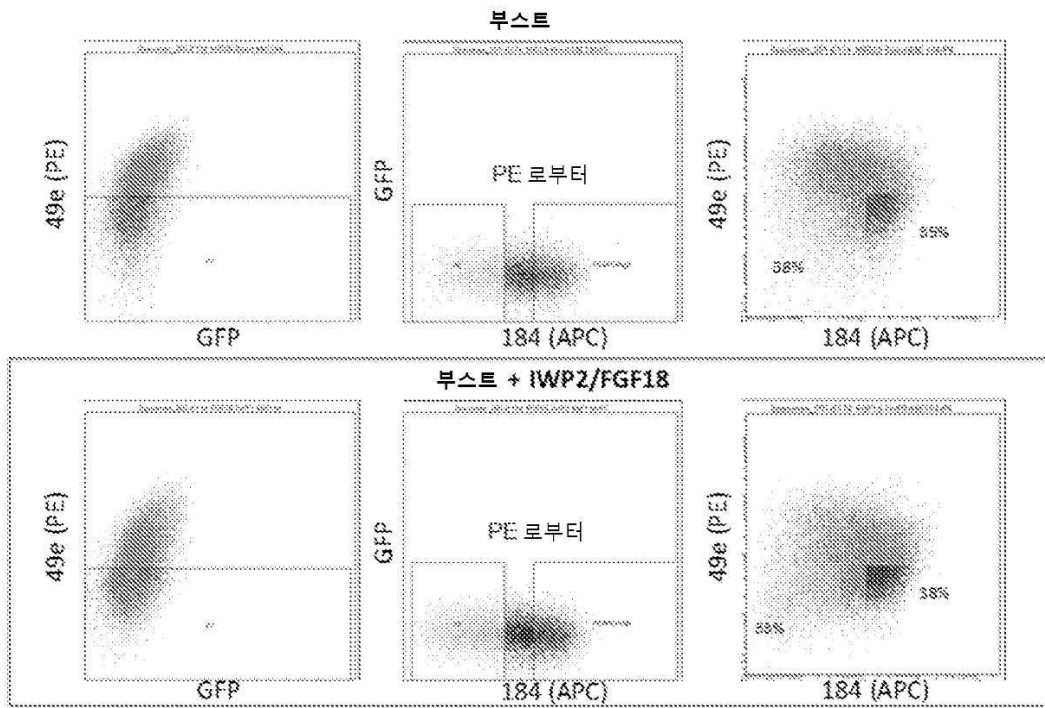
도면3



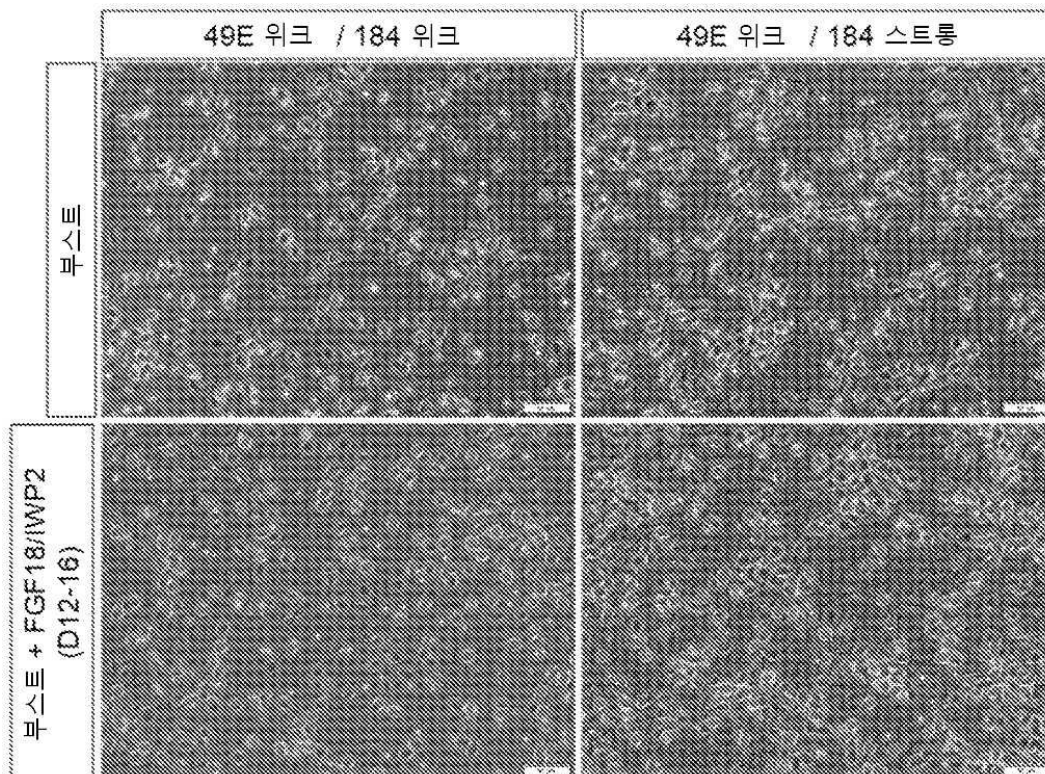
도면4



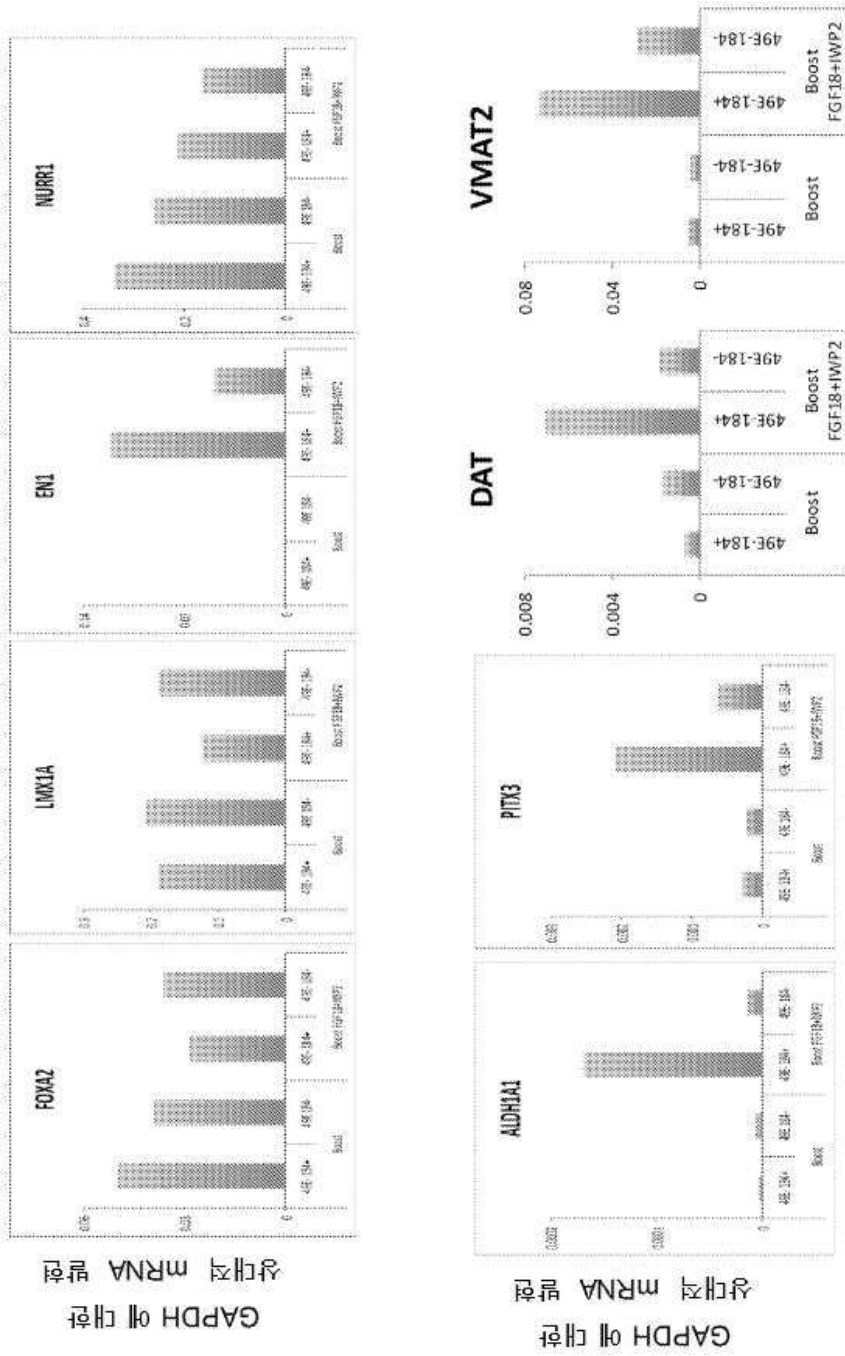
도면5



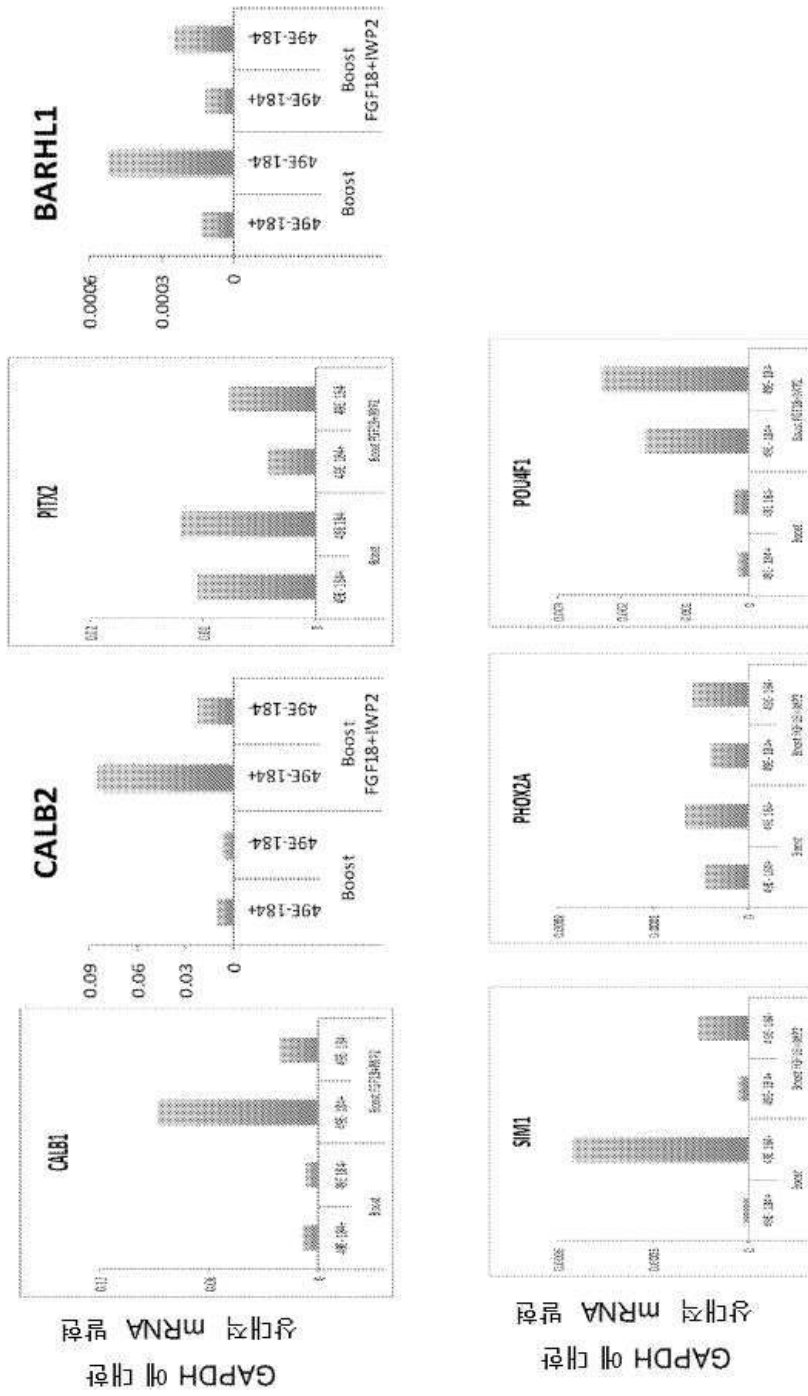
도면6



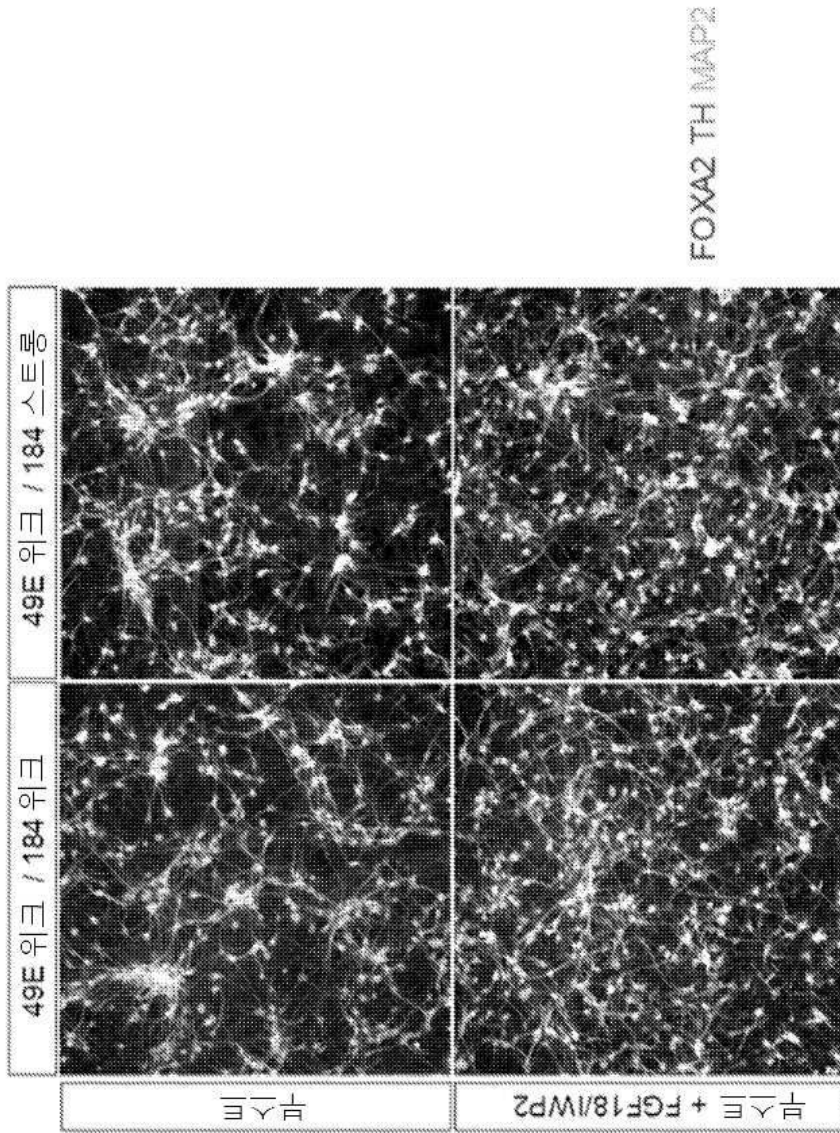
도면7



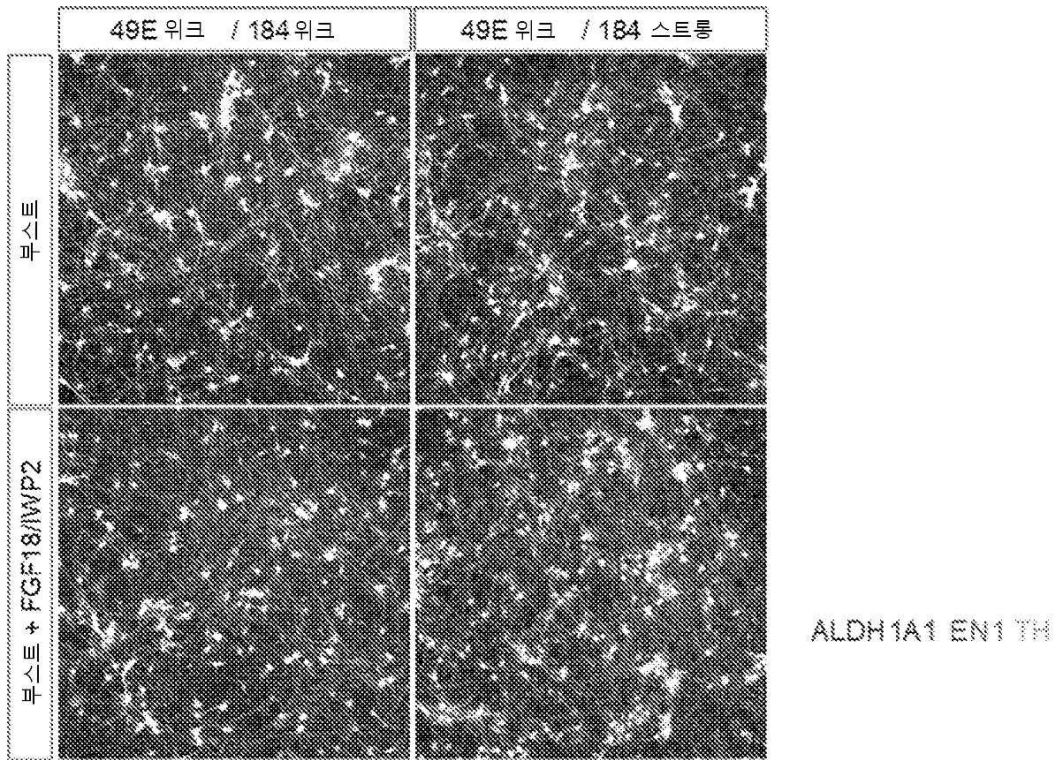
도면8



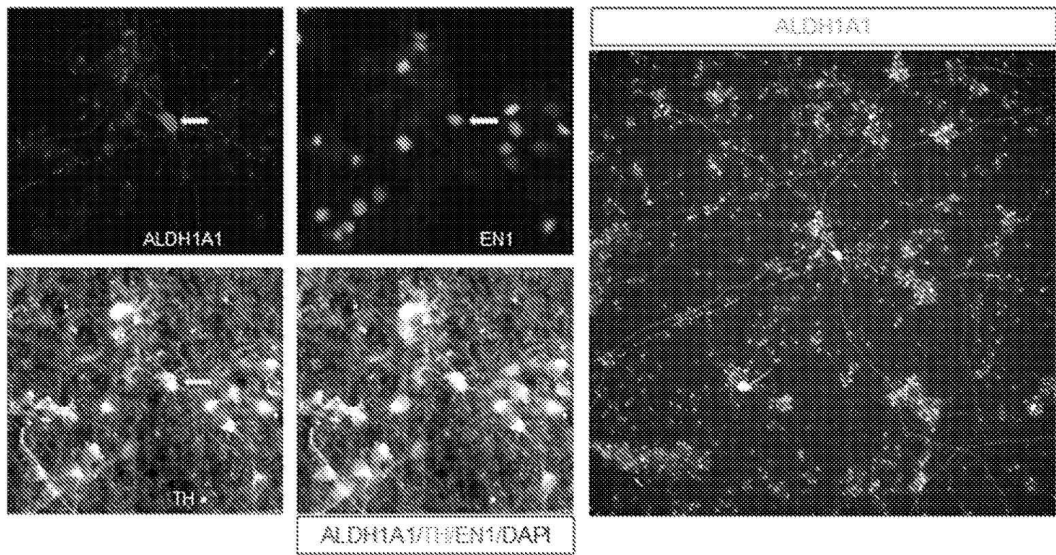
도면9a



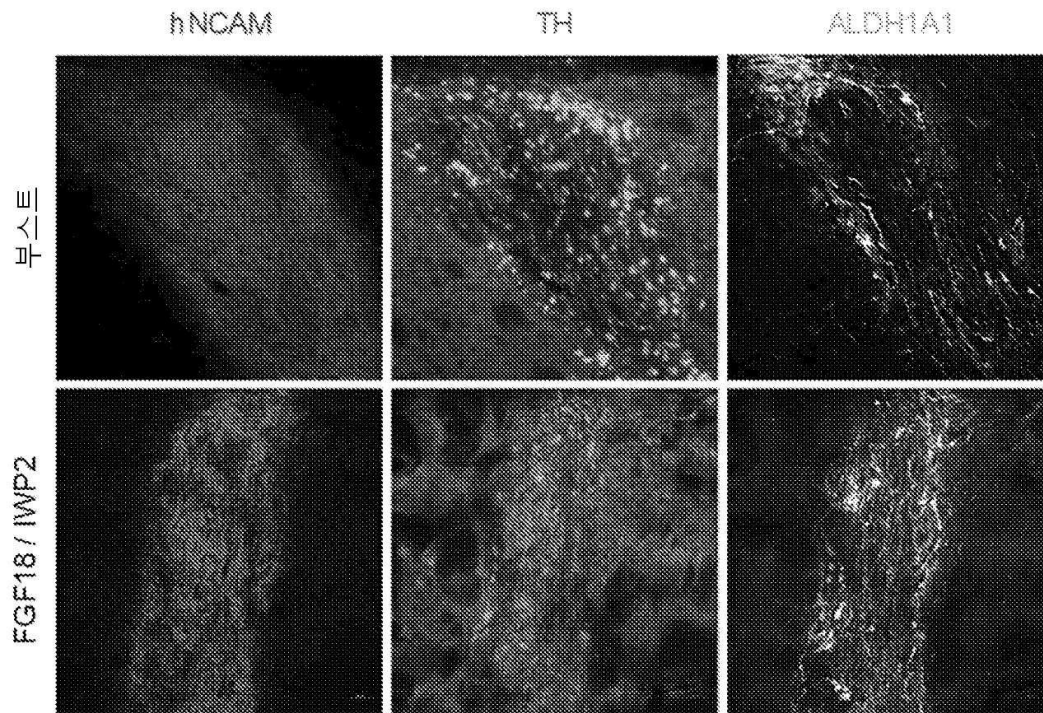
도면9b



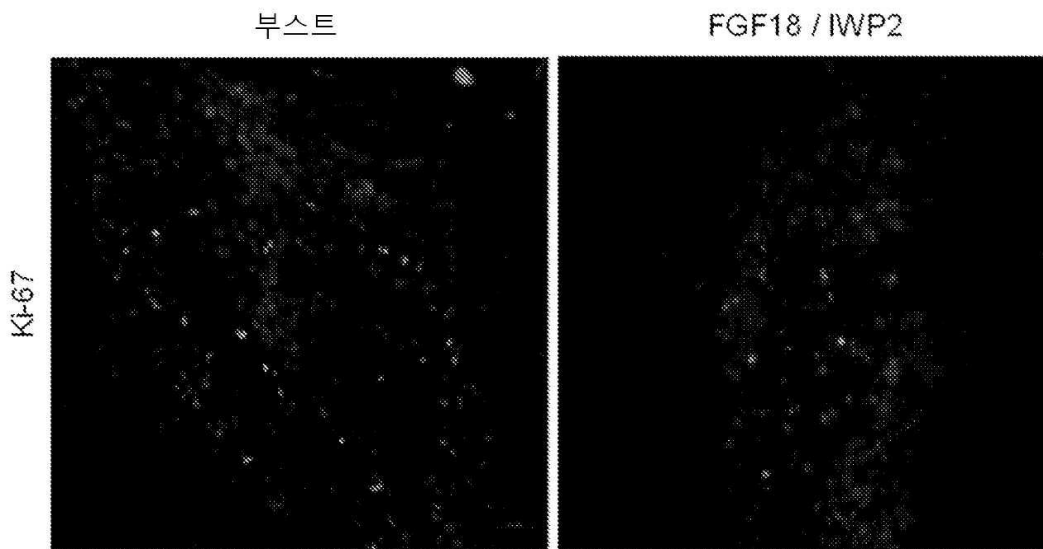
도면9c



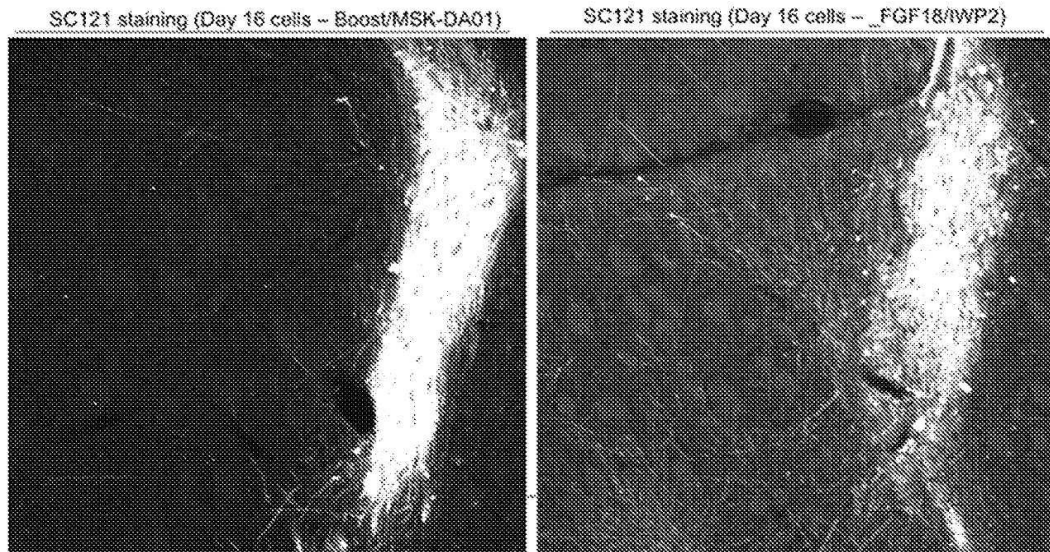
도면10a



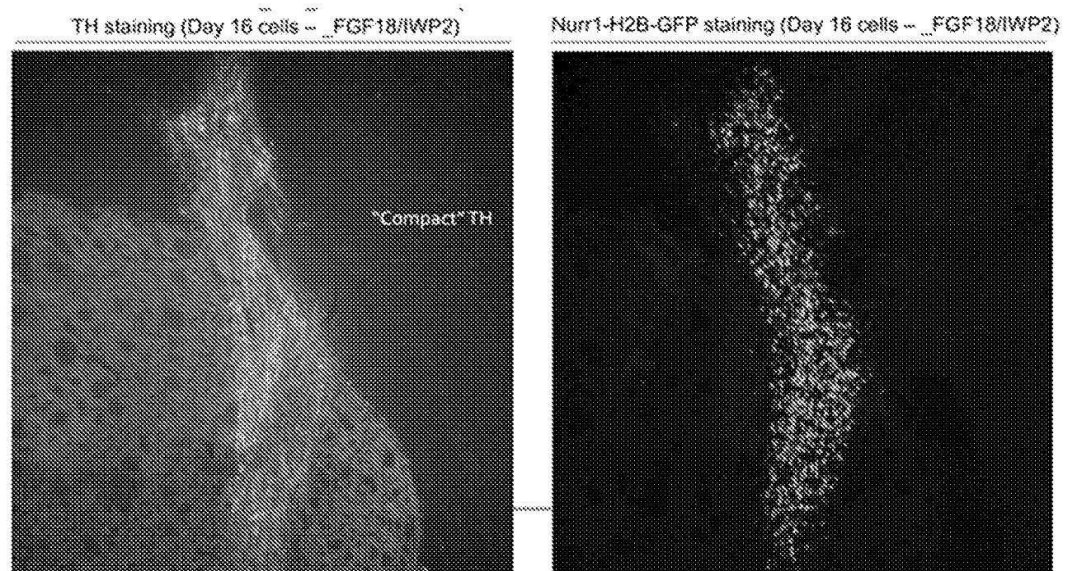
도면10b



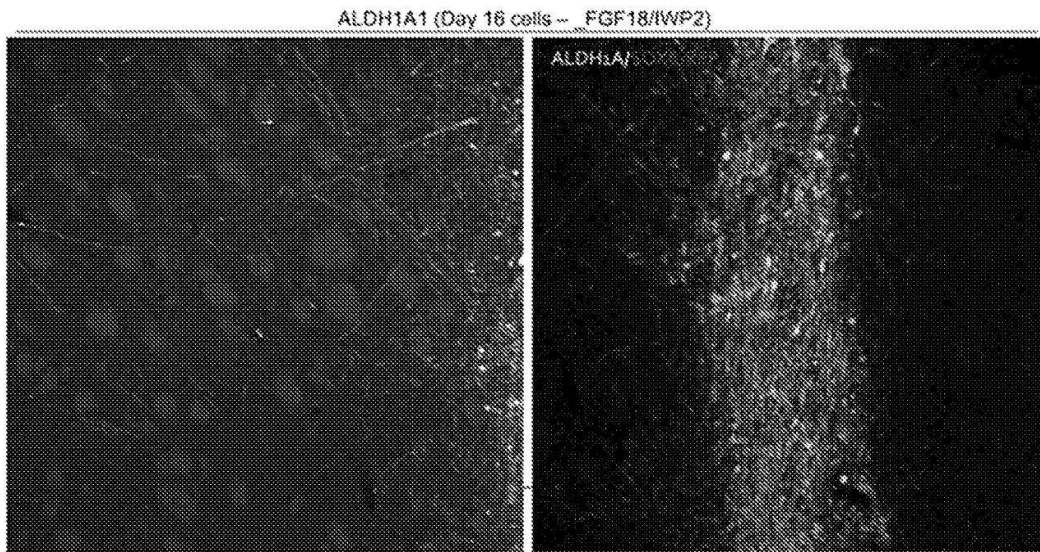
도면11a



도면11b

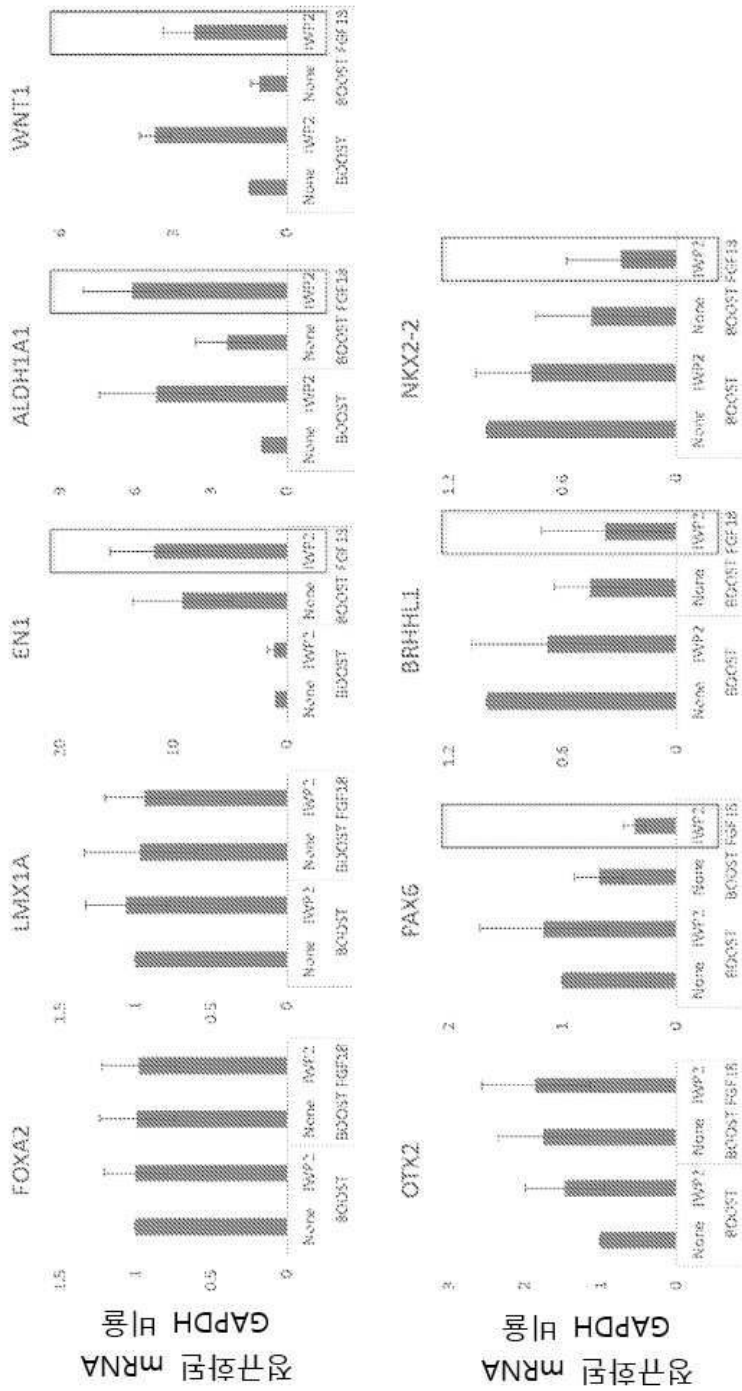


도면11c



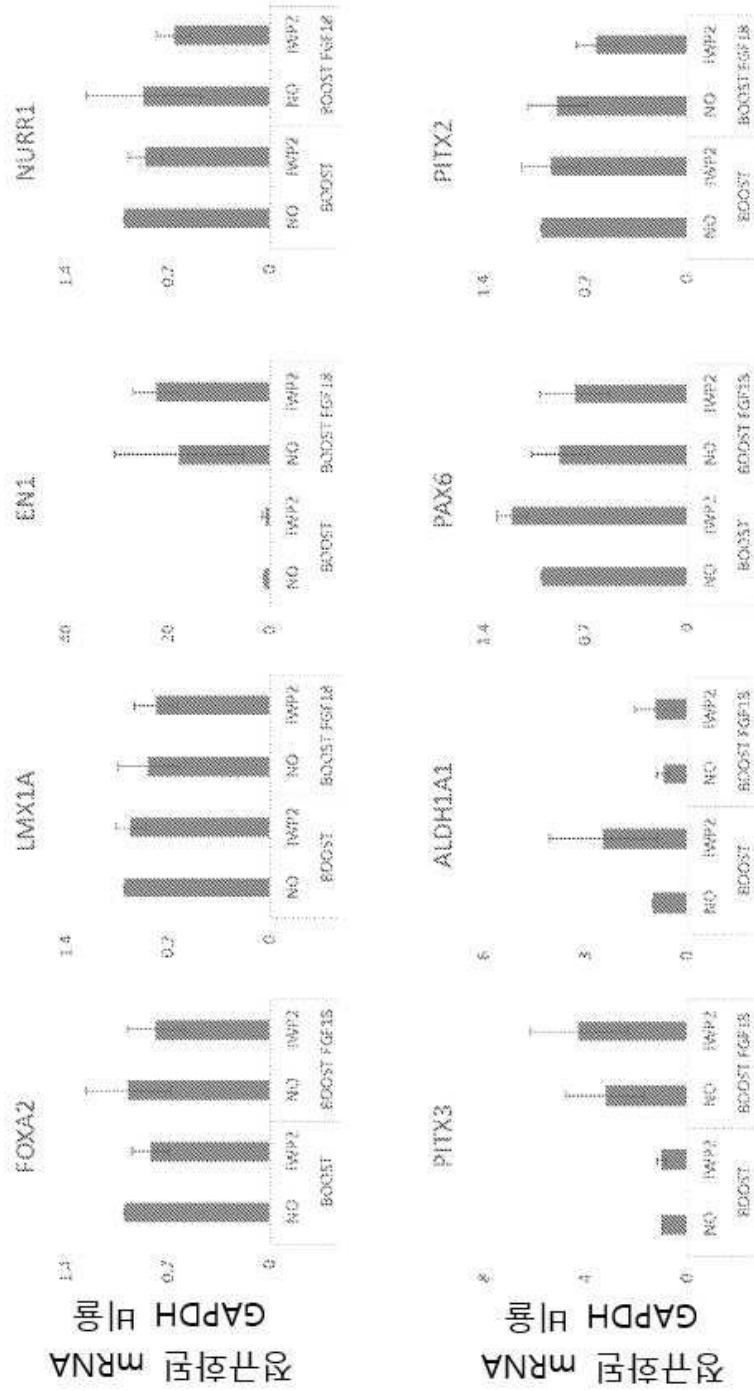
도면12

FGF18 및 IWP2 는 D12부터-D16까지 치료되었다 (16일)



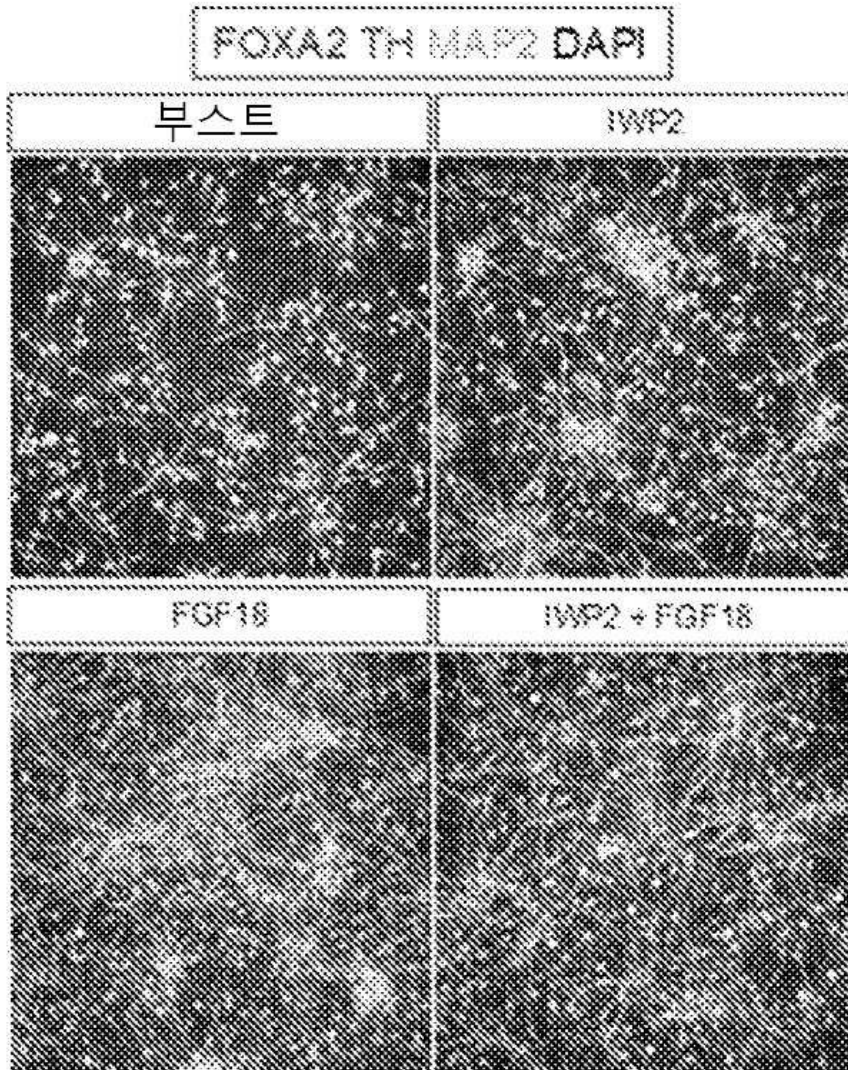
도면13

FGF18 및 IWP2 는 D12부터-D16까지 치료되었다 (40일)



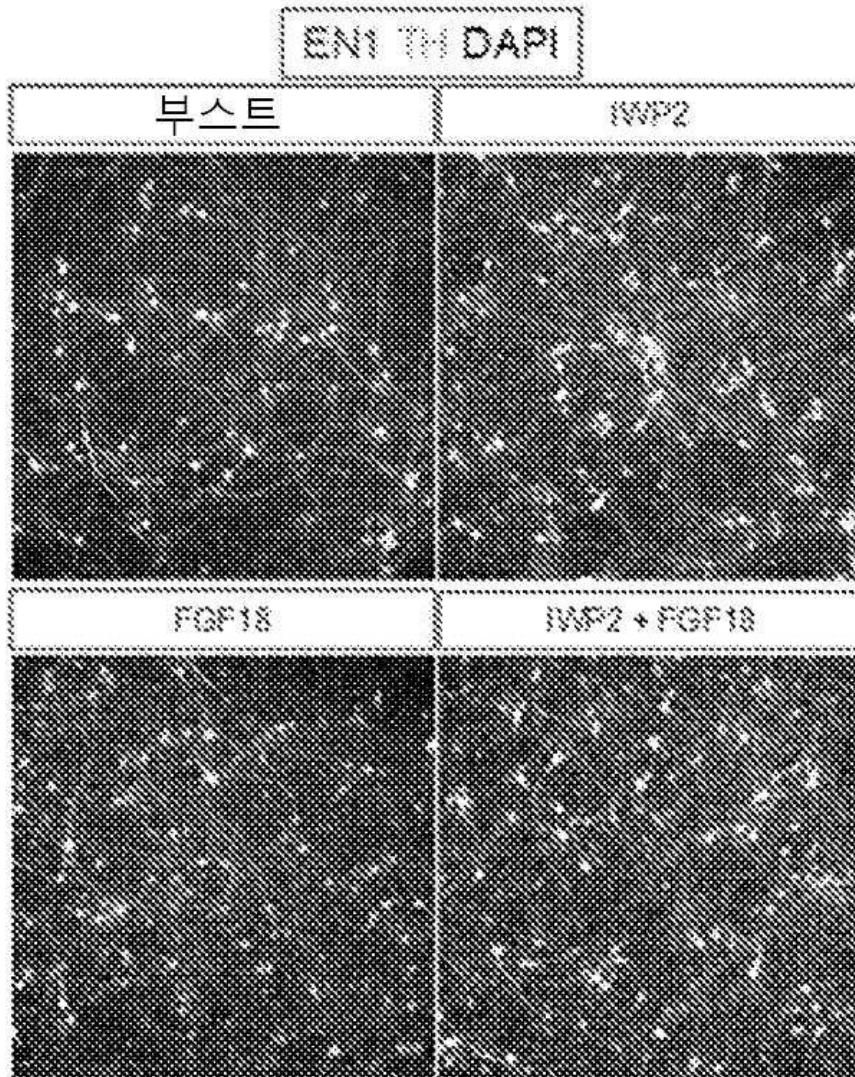
도면14a

60일차에 mDA 분화된 세포의 면역 염색



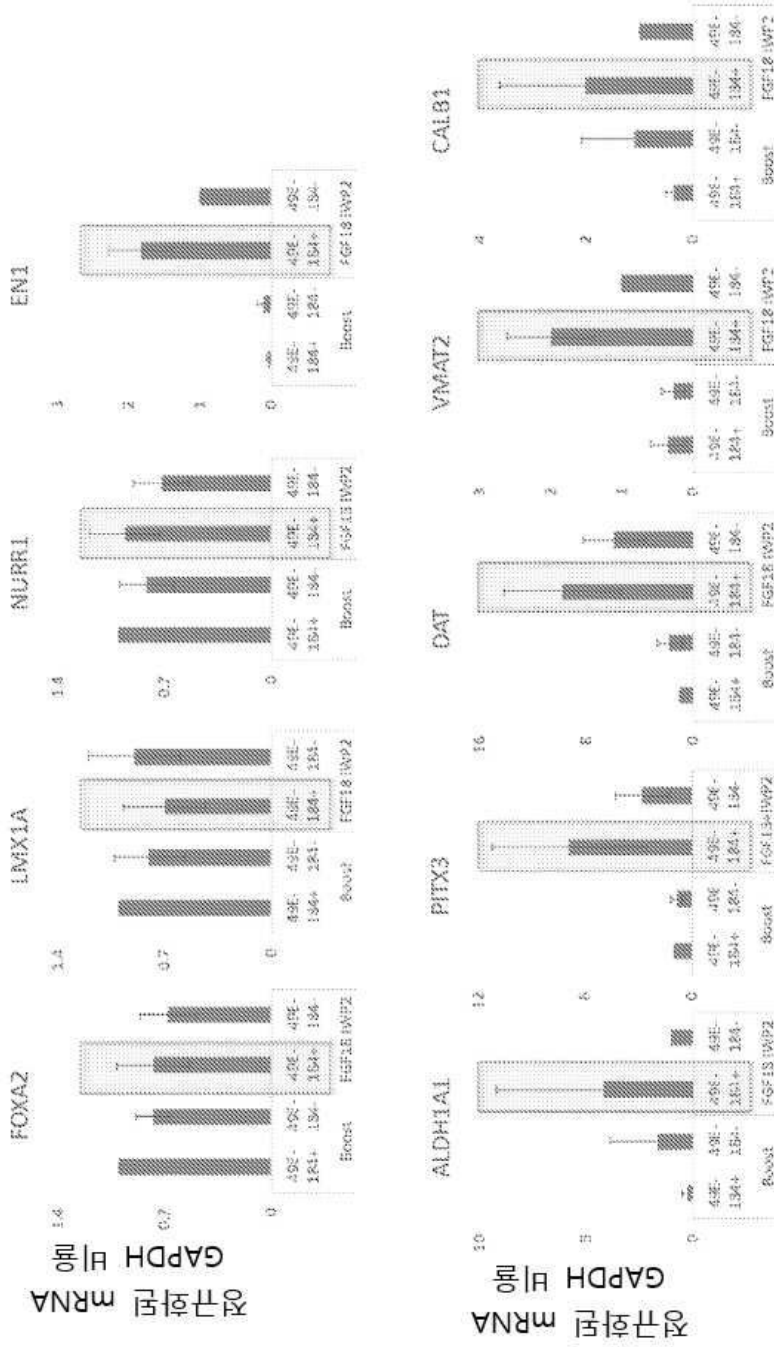
도면14b

60일차에 mDA 분화된 세포의 면역 염색



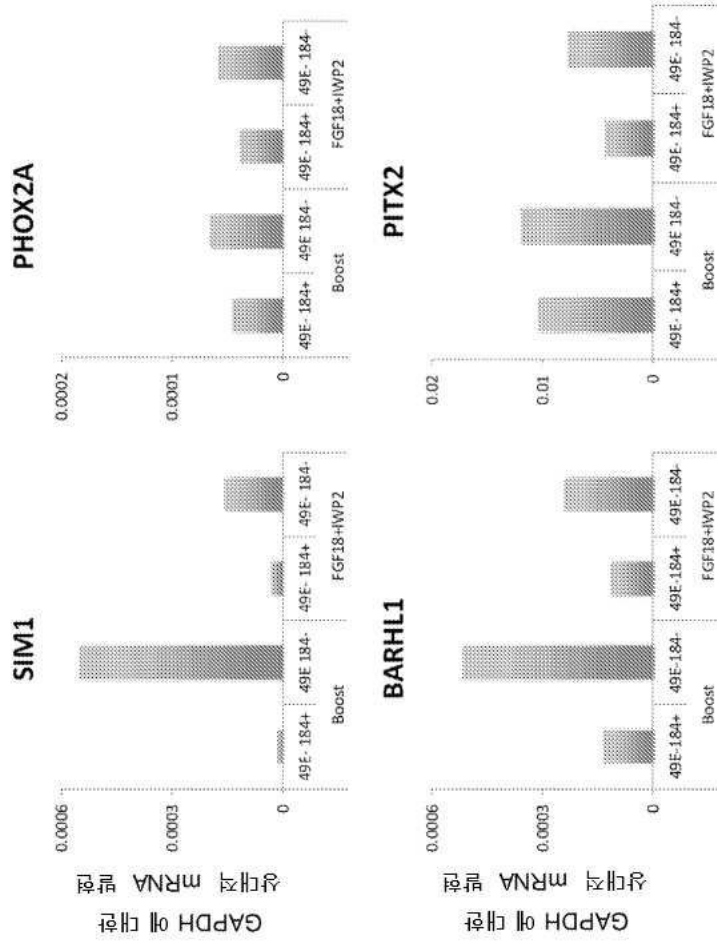
도면15

25일자에 CD 마커(184, 49E)에 의해 FACS-분류된
40일차 mDA 세포의 상대적 mRNA 발현



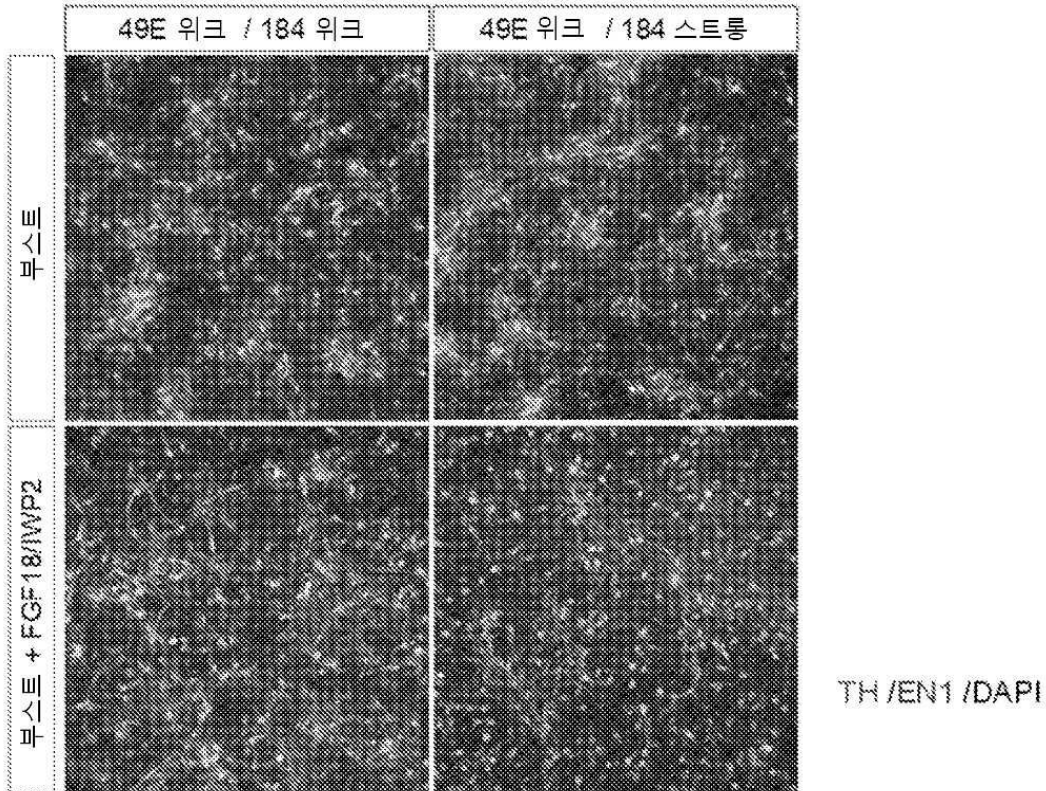
도면16

25일차에 CD 마커(184, 49E)에 의해 FACS-분류된
40일차 mDA 세포의 상대적 mRNA 발현



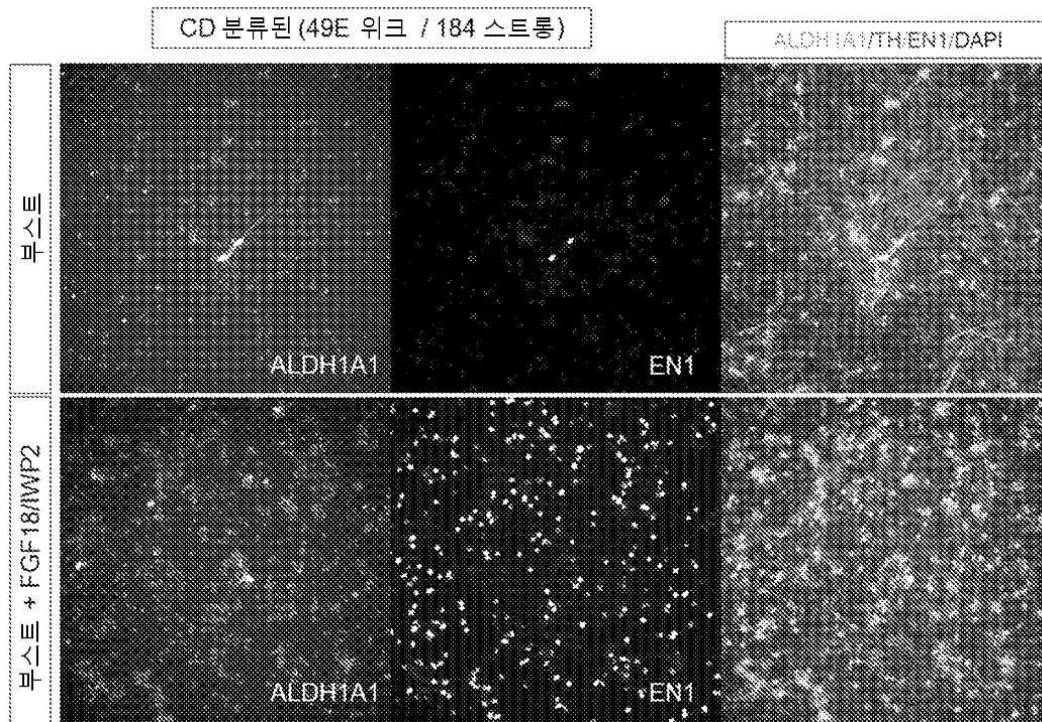
도면17

60일차에 mDA 분화된 세포의 면역 염색



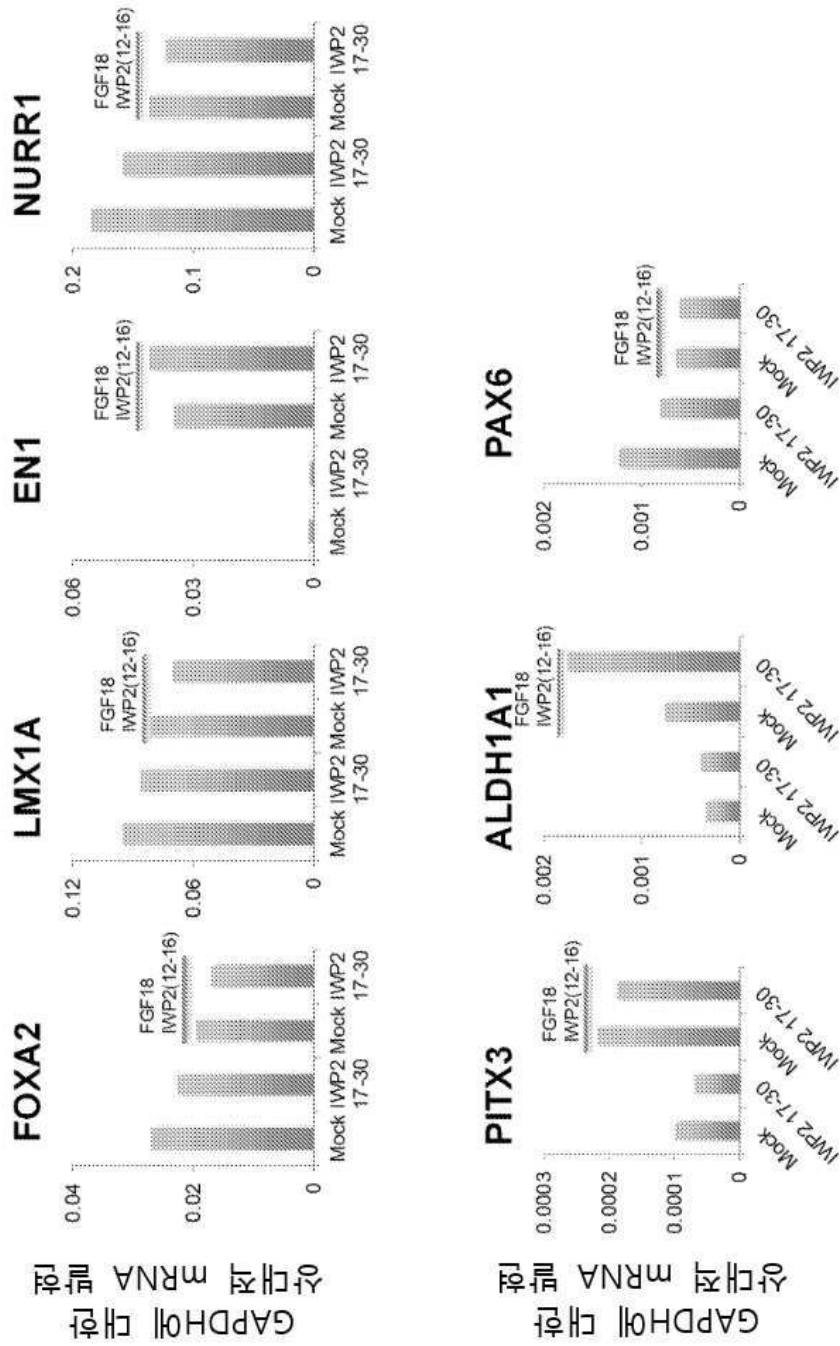
도면18

60일차에 mDA 분화된 세포의 면역 염색



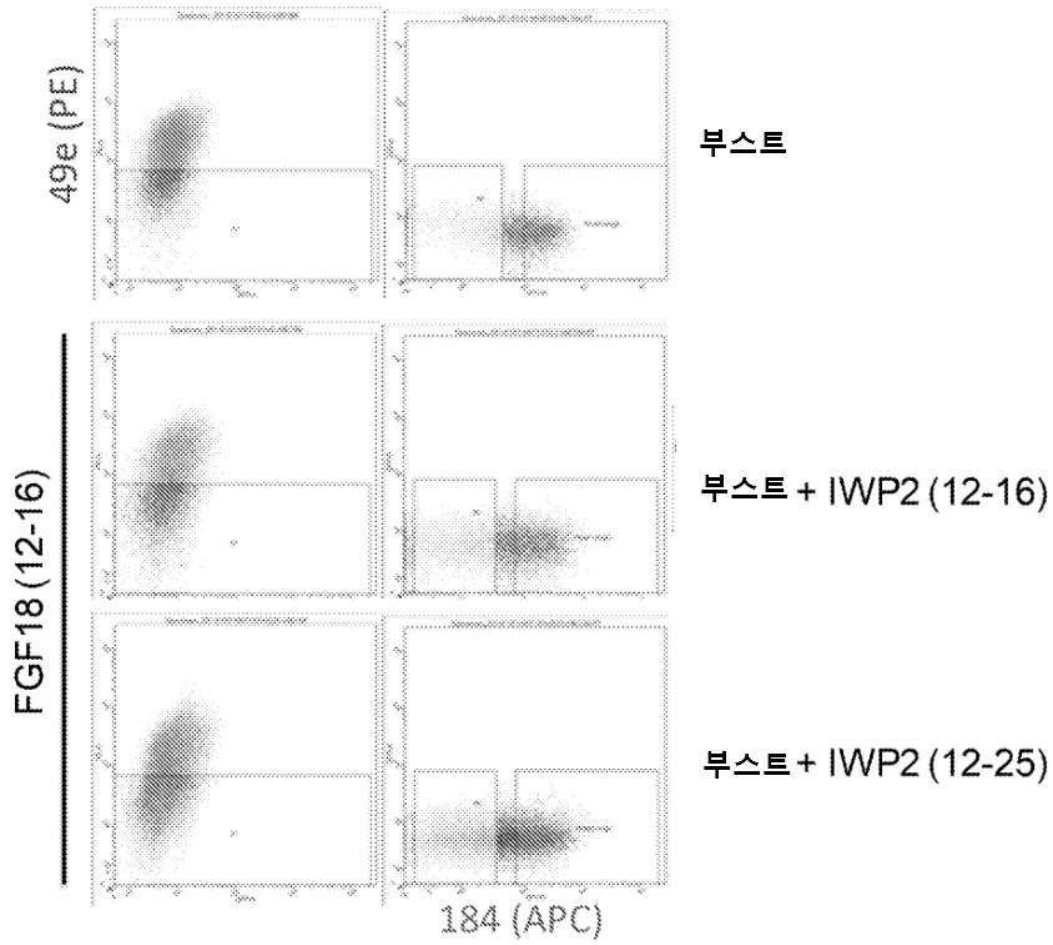
도면19

분화 30일차의 mRNA 발현 (분류되지 않음)
30일까지 IWP2에 계속 노출됨



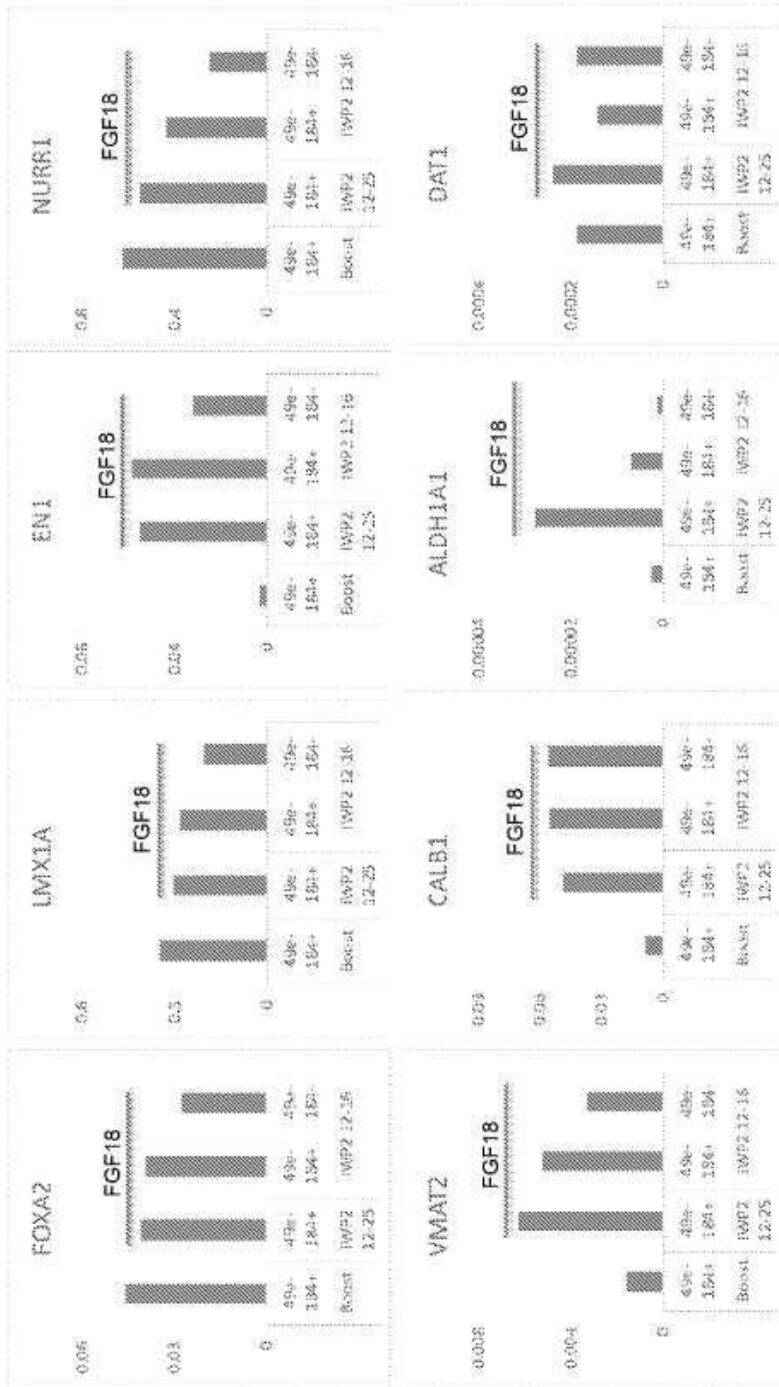
도면20

25일차에 CD49e 및 184에 의한 FACS



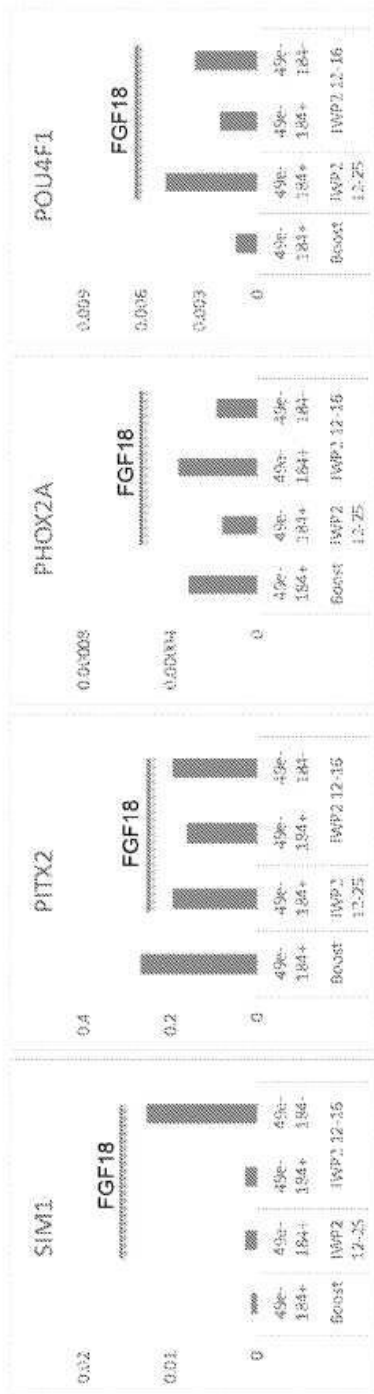
도면21

mDA 분화의 28일차에 상대적 mRNA 발현 (25일차에 49E 및 184에 의해 분류됨)



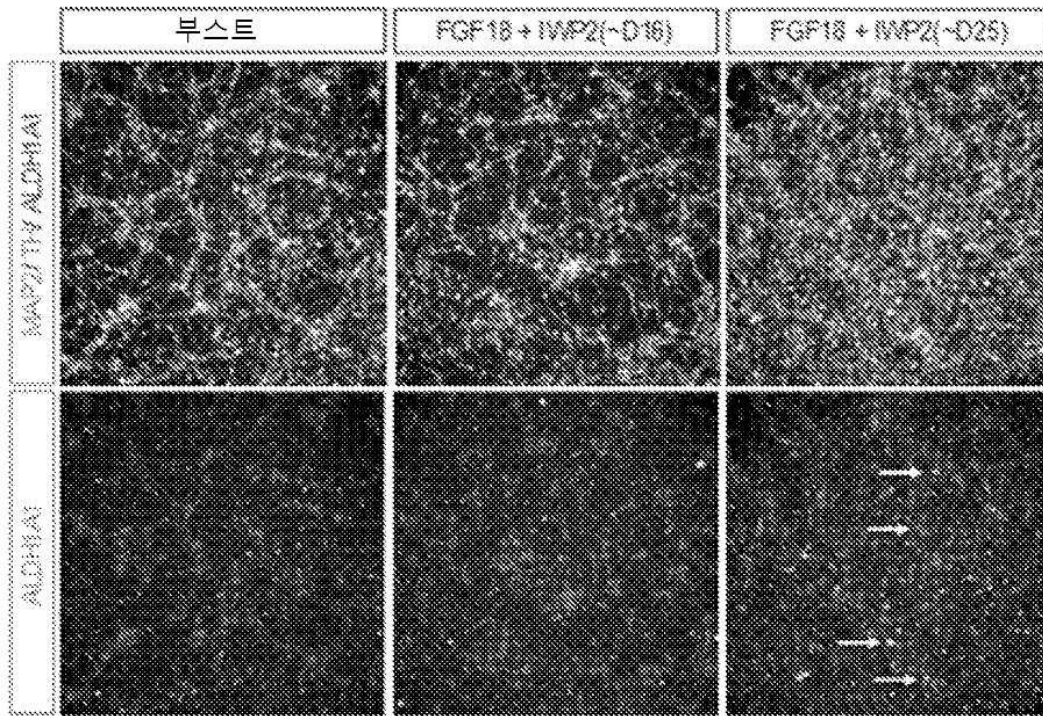
도면22

mDA 분화의 28일차에 상대적 mRNA 발현 (25일차에 49E 및 184에 의해 분류됨)



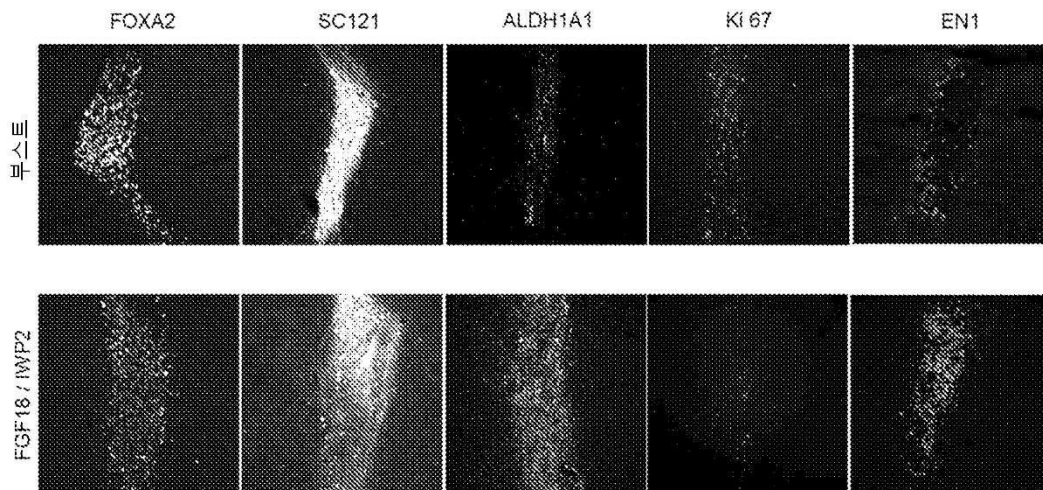
도면23

28일 mDA 뉴런의 특성화 [25일차에 FACS (49e- 184+)]

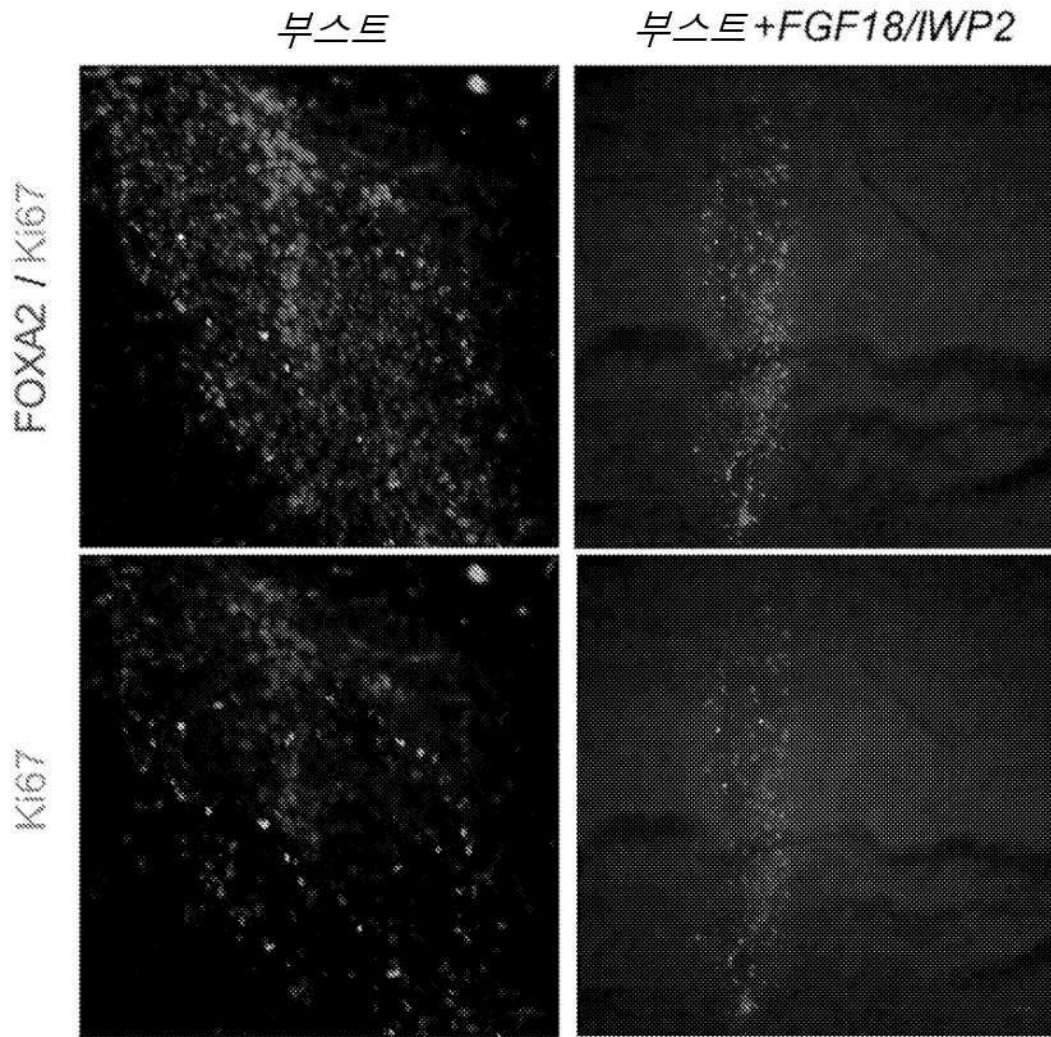


도면24

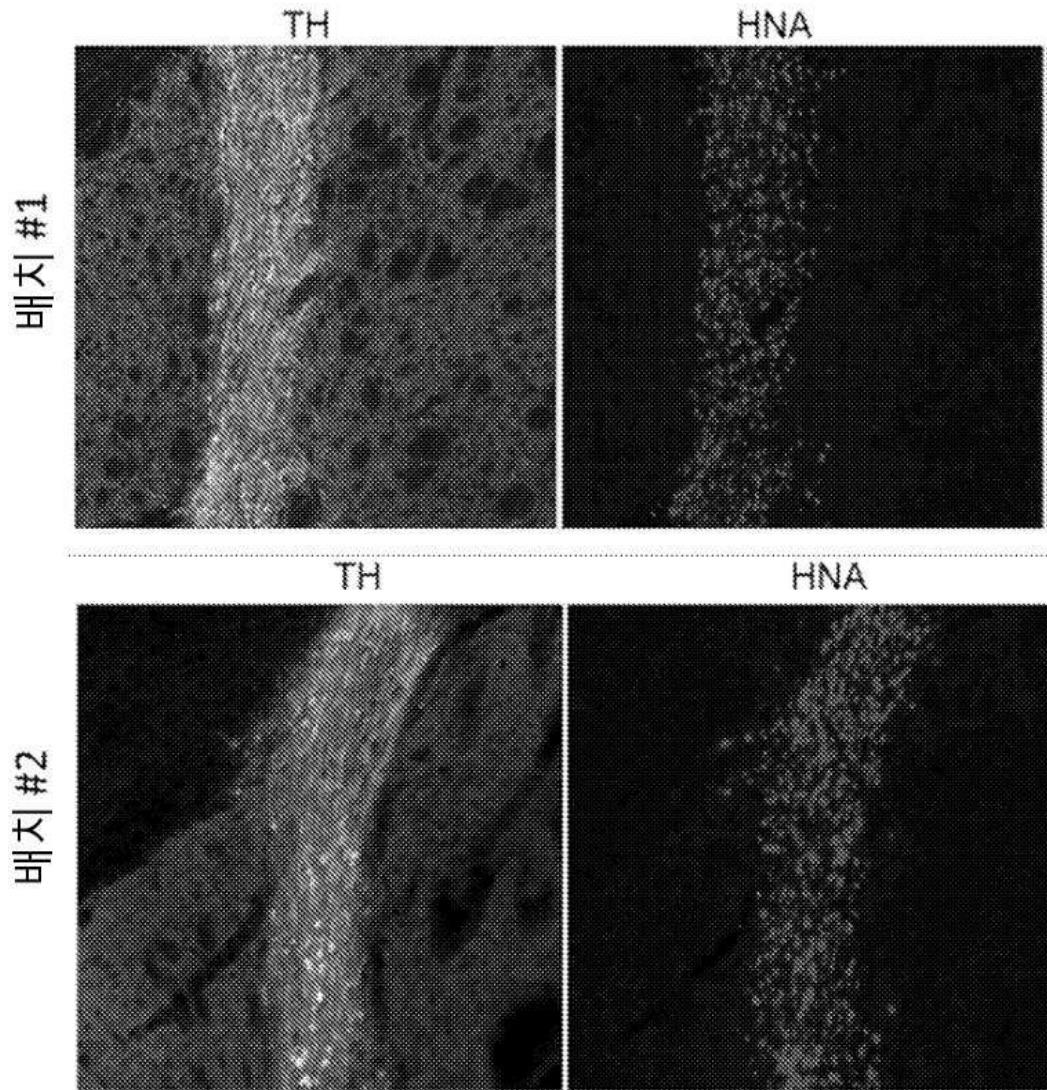
FGF18 / IWP2 조건은 모든 개선에 “더하여”
그래프트 내 증식 세포(Ki67+)를 감소시킨다



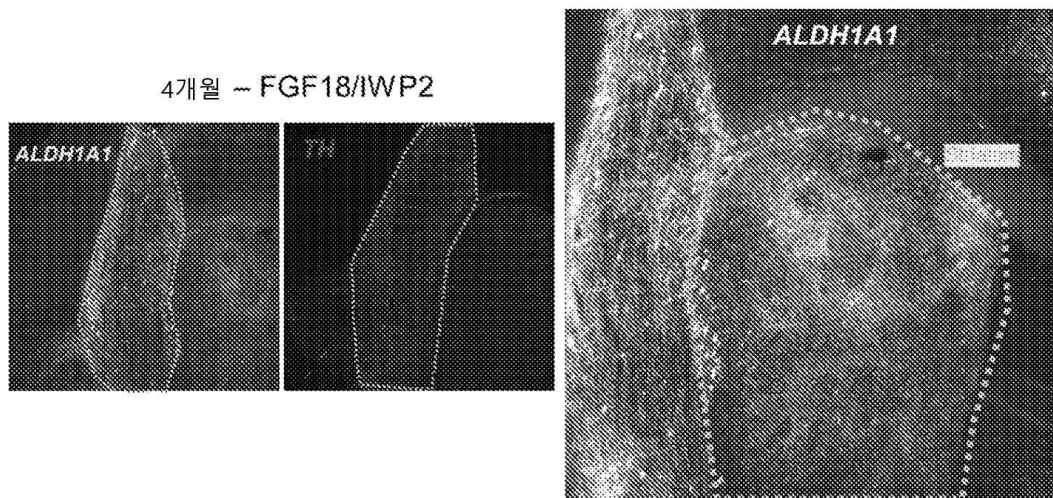
도면25



도면26

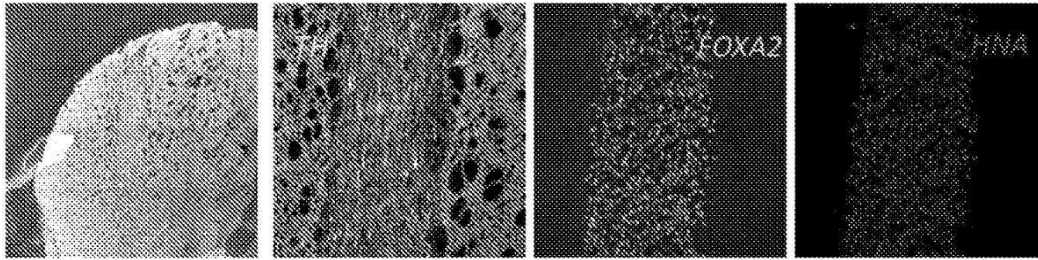


도면27

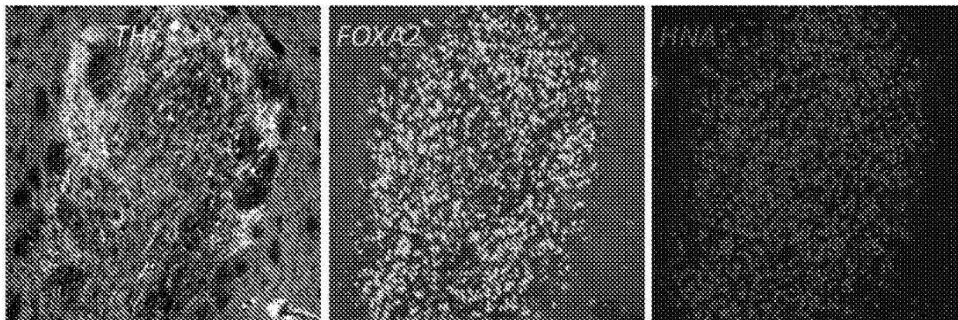


도면28

CD 분류된 부스트

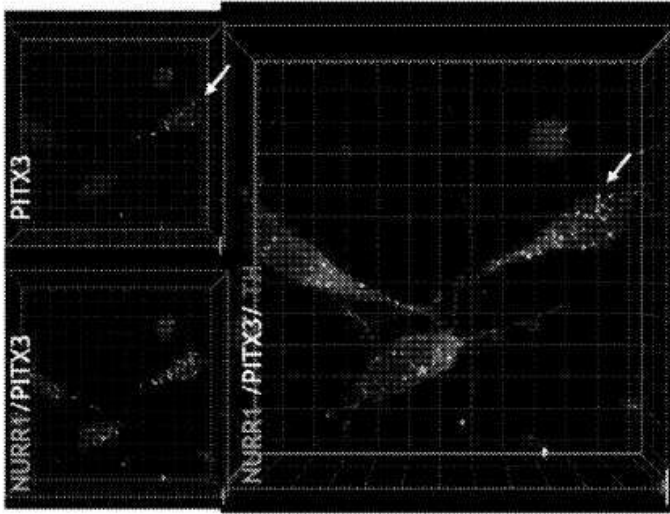


CD 분류된 FGF18+IWP2



도면29

부스트 + FGF18/WP2



부스트

