



등록특허 10-2069900



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월11일
(11) 등록번호 10-2069900
(24) 등록일자 2020년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) *C12M 1/10* (2006.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2013-0133324
(22) 출원일자 2013년11월05일
심사청구일자 2018년10월18일

(65) 공개번호 10-2014-0059729
(43) 공개일자 2014년05월16일
(30) 우선권주장
13/672,688 2012년11월08일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20100112691 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 21 항

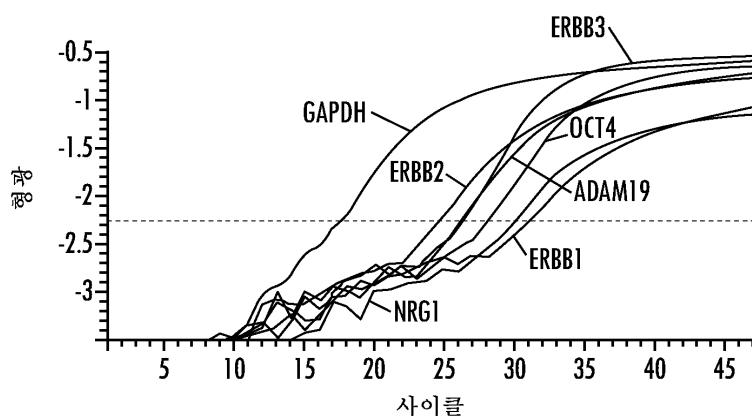
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 규모조정가능한 영장류 만능 줄기 세포 응집체 혼탁 배양물 및 그의 분화

(57) 요 약

본 발명은 미분화된 또는 분화된 배아 줄기 세포 단일 세포 혼탁액으로부터 미분화된 또는 분화된 배아 줄기 세포 응집체 혼탁 배양물을 제조하는 방법 및 그의 분화 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

생리학상 허용되는 배지 내에 혼탁액 중 영장류 만능 줄기 세포 (pPSC) 응집체를 포함하는 롤러 병이며, 여기서 pPSC 응집체는 롤러 병 내에서 3 rpm 내지 20 rpm의 속도의 롤러 병의 회전으로 형성되는 것인 롤러 병.

청구항 2

제1항에 있어서, pPSC 응집체가 100 내지 300 마이크로미터의 직경을 갖는 것인 롤러 병.

청구항 3

제1항에 있어서, 300 마이크로미터 초과의 직경을 갖는 pPSC 응집체는 실질적으로 존재하지 않는 것인 롤러 병.

청구항 4

제1항에 있어서, pPSC 응집체가 OCT4, NANOG, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-81 및 Tra-1-60으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것인 롤러 병.

청구항 5

제1항에 있어서, pPSC 응집체가 인간 세포인 롤러 병.

청구항 6

제5항에 있어서, pPSC 응집체가 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 롤러 병.

청구항 7

제1항에 있어서, 혼탁액 중 pPSC 응집체가

- pPSC의 미분화된 성장을 지지하는 배양 배지 중 미분화된 pPSC를 롤러 병에 접종하는 단계; 및
 - pPSC를 3 rpm 내지 20 rpm의 회전 속도로 교반하여 pPSC 응집체를 형성함으로써, pPSC 응집체를 포함하는 롤러 병을 생성시키는 단계
- 를 포함하는 방법에 의해 생성된 것인 롤러 병.

청구항 8

제7항에 있어서, pPSC 응집체가 100 내지 300 마이크로미터의 직경을 갖는 것인 롤러 병.

청구항 9

제7항에 있어서, 300 마이크로미터 초과의 직경을 갖는 pPSC 응집체는 실질적으로 존재하지 않는 것인 롤러 병.

청구항 10

제7항에 있어서, pPSC 응집체가 OCT4, NANOG, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-81 및 Tra-1-60으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 것인 롤러 병.

청구항 11

제7항에 있어서, pPSC 응집체가 인간 세포인 롤러 병.

청구항 12

제11항에 있어서, pPSC 응집체가 인간 배아 줄기 세포 (hESC) 및 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포인 롤러 병.

청구항 13

제7항에 있어서, 회전 속도가 5 rpm 내지 20 rpm 범위인 롤러 병.

청구항 14

제7항에 있어서, 회전 속도가 5 rpm 내지 12 rpm 범위인 롤러 병.

청구항 15

제7항에 있어서, 단계 a에서의 미분화된 pPSC가 단일 세포 pPSC의 혼탁액인 롤러 병.

청구항 16

a. pPSC의 미분화된 성장을 지지하는 배양 배지 중 미분화된 pPSC의 단일 세포 혼탁액을 롤러 병에 접종하는 단계; 및

b. 롤러 병 내에서 단일 세포 혼탁액을 3 rpm 내지 20 rpm의 회전 속도로 교반하여 pPSC 세포 응집체를 형성함으로써, 생리학상 허용되는 배지 내에 혼탁액 중 pPSC 응집체를 포함하는 롤러 병을 제조하는 단계

를 포함하는, 제1항의 롤러 병을 제조하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 미분화된 pPSC가 해동된 pPSC의 혼탁액인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 회전이 5 rpm 내지 20 rpm인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 회전 속도가 5 rpm 내지 12 rpm인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, pPSC가 인간 세포인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, pPSC가 hESC 및 iPSC로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 연방 정부의 지원을 받은 연구 또는 개발에 관한 언급

[0002] 본 발명의 개발 동안 수행된 작업 중 일부는 미국 국립 보건원 승인 번호 5 R24 RR021313-05의 미국 정부 자금을 이용하였다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

[0003] 관련 출원

[0004] 본 출원은 2011년 8월 29일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/220,590호의 35 U.S.C. § 120하 일부 계속 출원이고, 이것은 2008년 11월 4일자로 출원된 미국 특허 출원 제12/264,760호 (현재 미국 특허 제8,008,075호, 2011년 8월 30일 허여)의 일부 계속 출원이며, 이들 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 본질적으로 혈청 및 공급자(feeder)가 존재하지 않는 혼탁액 세포 응집체 조성물, 및 세포 응집체 혼탁액을 분화시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0007] 발명의 배경

[0008] 현재까지, 포유동물 만능 세포, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 인간 배아 출기 세포 (hESC)의 대규모 제조 방법 ("규모증대")을 위한 효율적인 시스템은 없다. hESC를 시험관내 미분화 상태로 유지하기 위해서, hESC를 마우스 배아 섬유모세포 (MEF) 공급자에서 유지하고, 수동적인 기계적 해리 (예를 들어, 미세박리)를 행하고 개개의 콜로니 조각을 이동시켜 계대배양한다. 이러한 방법은 미분화된 hESC 또는 분화된 hESC의 대규모 제조가 필요 없는 연구, 유전자 표적화, 약물 발견, 시험관내 독성학에는 충분하지만, 미래의 임상적 용도에는 효소 적용을 비롯하여 hESC의 안정적인 대규모 증식을 위한 개선된 방법이 요구된다.

[0009] hESC의 효소적 증식이 수행될 수 있지만, 이러한 방법은 hESC가 생존을 위해서 세포-세포 상호작용 및 또한 측분비 및 자가분비 신호에 의존적이기 때문에 기술적 단점을 갖는다. 따라서, hESC는 단일 세포로 존재하는 경우보다 이러한 세포 미소환경을 선호한다. 또한, hESC의 효소적 해리는 비정상적인 핵형을 야기하고 유전자적 및 후성적 변화를 초래할 수 있다는 보고가 있다. 따라서, 고도로 지지되는 배양 환경을 제공함과 동시에 오랜 배양 기간에 걸쳐서 만능, 다능 또는 유전자 안정성을 손상시키지 않으면서 미분화된 hES 또는 분화된 hESC의 적절한 대규모 증식 (즉, 제조 방법)을 허용하는 것이 필수적이다.

[0010] 인간 만능 세포는 여러 질환 상태, 예컨대 당뇨병 및 파킨슨병에서 인간 발병의 초기 단계를 조사하고 또한 치료적 개입하기 위한 독특한 기회를 제공한다. 예를 들어, hESC 유래의 인슐린-생산 β -세포의 사용은 공여자 체장으로부터의 세포를 이용하는 현행 세포 요법 절차보다 방대한 개선점을 제공할 것이다. 당뇨병 치료를 위한 현행 세포 요법은 공여자 체장으로부터의 세포를 이용하며, 이식에 필요한 고품질 섬세포(islet cell)의 부족에 의해 제한된다. 단일 유형 I 당뇨병 환자를 위한 세포 요법은 대략 8×10^8 개 체장 섬세포의 이식을 필요로 한다 ([Shapiro et al. 2000, N Engl J Med 343:230-238], [Shapiro et al. 2001a, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 15:241-264], [Shapiro et al. 2001, British Medical Journal 322:861]). 이와 같이, 성공적인 이식에 충분한 섬세포를 수득하기 위해서는 2개 이상의 건강한 공여자 장기가 필요하다.

[0011] 따라서, hESC는 초기 배아 내 만능 세포 생물학 및 분화의 기초가 되는 메카니즘을 조사하기 위한 유력한 모델 시스템을 대표하고, 또한 포유동물의 유전자 조작 기회 및 이로 인한 상업적, 의학적 및 농업적 용도를 제공한다. 추가로, hESC의 적절한 증식 및 분화는 세포 손상 또는 기능장애로 인한 질환의 치료를 위한 이식에 적합한 세포의 무제한적인 공급원을 생성하는데 잠재적으로 이용될 수 있다. 다른 만능 세포 및 세포주, 예를 들어 국제 특허 출원 WO 99/53021에 기재된 바와 같은 초기 원시성 외배엽-유사 (EPL) 세포, 생체내 또는 시험관내 유도된 ICM/상배엽(epiblast), 생체내 또는 시험관내 유도된 원시성 외배엽, 원시 배세포 (EG 세포), 기형암종 세포 (EC 세포), 및 탈분화 또는 핵 이식에 의해 유도된 만능 세포는 이러한 특성 및 용도 중 일부 또는 전부를 공유할 것이다. 국제 특허 출원 WO 97/32033 및 미국 특허 제5,453,357호는 설치류 이외의 종으로부터의 세포를 포함하는 만능 세포를 기재한다. 인간 ES 세포는 국제 특허 출원 WO 00/27995, 및 미국 특허 제6,200,806호에 기재된 바 있고, 인간 EG 세포는 국제 특허 출원 WO 98/43679에 기재된 바 있다.

[0012] ES 세포의 만능성 및 분화를 조절하는 생화학적 메카니즘에 대하여는 거의 이해된 바 없다. 그러나, 이용 가능한 제한적인 경험적 데이터 (및 훨씬 더 입증되지 않은 증거)는 시험관내 배양 조건하에 만능 ES 세포를 계속 유지하는 것이 세포외 환경에 존재하는 시토카인 및 성장 인자의 존재에 의존적임을 시사한다.

[0013] 인간 ESC는 인간 세포 요법을 위한 상당량의 고품질 분화 세포를 개발할 출발 물질의 공급원을 제공하지만, 이들 세포는 임상적 안전성 및 효능에 관해 예상되는 규제 지침에 부합되는 조건에서 수득되고/거나 배양되어야 한다. 이러한 지침은 배지를 cGMP와 함께 공급되는 모든 성분과 함께 사용하라고 요구할 것이다. 이러한 화학적으로 규정된/GMP 표준 조건의 발전은, 인간에서의 치료 목적을 위해 hESC 및 hESC로부터 유도된 세포를 사용하는 것을 용이하게 하는데 필요하다.

[0014] 추가로, hESC 기재의 세포 대체 요법의 실제 사용은, 규제 지침에 순응하는 대규모 배양 및 분화 조건을 가능케 하는 방법의 개발을 필요로 할 것이다. 여러 연구진이 hESC를 위한 간소화된 성장 조건을 보고하였지만, 이들 연구에는 실질적인 제한이 있다. 그러나, 현재까지는, 만능 세포의 성공적인 단리, 장기간의 클론 유지, 유

전자 조작 및 배선 전달은 일반적으로 어려운 일이었다.

[0015] 출기 세포에 대한 대부분의 세포 배양 조건은 배지 내에 혈청 대체물 (KSR)을 여전히 함유한다 ([Xu et al. 2005 *Stem Cells*, 23:315-323], [Xu et al. 2005 *Nature Methods*, 2:185-189], [Beattie et al. 2005 *Stem Cells*, 23:489-495], [Amit et al. 2004 *Biol. Reprod.*, 70:837-845], [James et al. 2005 *Development*, 132:1279-1282]). KSR은 소 혈청 알부민 (BSA)의 고도로 정제된 공급원이 아니라 그의 조절 분획물을 함유한다. 다른 것들은 단지 단기간 연구만이 수행되었기 때문에, 오랜 기간에 걸쳐서 그 조건이 만능성의 유지를 가능하게 하는 것인지의 여부가 명확하지 않다 ([Sato et al. 2004, *Nature Med.* 10:55-63], 미국 특허 공개 제2006/0030042호 및 제2005/0233446호). 다른 것들은 FGF2, 액티빈 A, 및 인슐린을 함유하는 화학적으로 규정된 배지 내에서 만능성을 장기간 유지하는 것을 보여주었으나, 상기 세포는 인간 혈청으로 코팅하고 이 것을 세포의 플레이팅 이전에 "세척해 낸" 플레이트상에서 성장한 것이었다 ([Vallier et al. 2005 *J Cell Sci.*, 118(Pt 19):4495-509]). FGF2는 모든 상기 배지의 성분이었지만, 이것이 1차 또는 2차 자가-재생 신호를 제공하는지의 여부는 명확하지 않고 ([Bendall et al. 2007 *Nature* 448:1015-1027]), 특히 일부 제제에서와 같이 높은 농도 (최대 100 ng/mL, [Xu et al. 2005 *Nature Methods*, 2:185-189])로 사용할 필요가 있다.

[0016] 추가로, 이들 연구진 모두가 그의 배지 내에 $\mu\text{g/mL}$ 수준의 인슐린을 포함시켰거나, 또는 KSR의 사용으로 인해 인슐린이 존재하게 하였다. 전형적으로, 인슐린은 인슐린 수용체와의 결합을 통해 글루코스 대사 및 "세포 생존" 신호전달에서 기능한다고 여겨진다. 그러나, 생리학상 농도 초과의 수준에서는 인슐린이 또한 IGF1 수용체에도 보다 더 낮은 효율로 결합하여 PI3 키나제/AKT 경로를 통한 통상적인 성장 인자 활성을 부여할 수도 있다. KSR 또는 이들 다른 배지 조건 내 이러한 높은 수준의 인슐린 ($\mu\text{g/mL}$ 수준)의 존재/요건은 hESC에 의해 발현되는 IGF1 수용체에 대한 결합을 통해 주요 활성이 유발된다는 것을 시사한다 ([Sperger et al. 2003 *PNAS*, 100(23):13350-13355]). 다른 이들은, hESC 내에서 IGF1R 및 세포내 신호전달 경로 구성원의 완전한 보완책이 발현되었음을 알아냈고, 이것은 상기 경로의 기능적 활성을 의미하는 것일 수 있다 ([Miura et al. 2004 *Aging Cell*, 3:333-343]). 인슐린 또는 IGF1은 hESC의 자가-재생에 필요한 주요 신호를 유발할 수 있으며, 이는 지금까지 hESC 배양을 위해 개발된 모든 조건이 인슐린, KSR에 의해 제공된 인슐린, 또는 혈청에 의해 제공된 IGF1을 함유한다는 사실에 의해 시사되는 바이다. 이러한 개념을 뒷받침하는 것으로서, PI3 키나제가 hESC 배양에서 억제되면 세포가 분화된다는 것이 확인된 바 있다 ([D'Amour et al. 2005, *Nat. Biotechnol* 23:1534-41], [McLean et al. 2007 *Stem Cells* 25:29-38]).

[0017] 최근의 간행물은 hESC에 대해 규정된 인간화 배지에 대해 개략적인 설명을 제공한다 ([Ludwig et al. *Nature Biotechnology*, published online January 1, 2006, doi:10.1038/nbt1177]). 그러나, 이러한 최근 제제는 hESC의 종식에 영향을 미친다고 제안된 여러 인자, 예를 들어 FGF2, TGF β , LiCl, γ -아미노부티르산 및 피페콜산을 포함한다. 이러한 최근 규정된 세포 배양 배지는 또한 인슐린도 함유한다는 점에 주목한다.

[0018] 인슐린/IGF1, 혜레귤린, 액티빈 A 신호전달의 조합을 기초로 하는 hESC의 자가-재생 신호전달 패러다임은 본 출원인에 의해 이전에 보고된 바 있다. 문헌 [Wang et al. 2007 *Blood* 110:4111-4119]을 참조한다. 이와 관련하여, 본 발명자들은 외인성 FGF2 신호가 중복적이고 필요하지 않다는 것을 발견하였다 ([Schulz & Robins 2009, 상기 문헌] Schulz & Robins 2009, (In: Lakshmiapthy et al. eds., *Emerging Technology Platforms for Stem Cells*. John Wiley & Sons., Hoboken, NJ, pp. 251-274)). 혜레귤린은 EGF 성장 인자 패밀리의 구성원이다. EGF, TGF β , 혜파린 결합-EGF (hb-EGF), 뉴레귤린- β (또한, 혜레귤린- β (HRG- β), 신경교 성장 인자 등으로 명명되기도 함), HRG- α , 암피레귤린, 베타셀룰린, 및 에피레귤린을 포함하지만 이에 제한되지 않는 적어도 14종의 구성원이 존재한다. 모든 이들 성장 인자는 EGF 도메인을 함유하고, 막횡단 단백질로서 전형적으로 우선 발현되어 메탈로프로테이나제 (구체적으로는, ADAM) 단백질에 의해 프로세싱되어 가용성 액토도메인 성장 인자를 생성한다. EGF 패밀리 구성원은 ErbB1, 2, 3 및 4 세포 표면 수용체의 동종이량체 또는 이종이량체와 상이한 친화도로 상호작용한다 ([Jones et al. *FEBS Lett.*, 1999, 447:227-231]). EGF, TGF α 및 hbEGF는 ErbB1/1 (EGFR) 동종이량체 및 ErbB1/2 이종이량체와 높은 친화도 (1 내지 100 nM 범위)로 결합하고, HRG- β 는 ErbB3 및 ErbB4와 매우 높은 친화도 (< 1 nM 범위)로 결합한다. 활성화된 ErbB 수용체는 PI3 키나제/AKT 경로 및 또한 MAPK 경로를 통해 신호를 전달한다. ErbB2 및 ErbB3은 hESC에서 가장 고도로 발현되는 성장 인자 수용체이고 ([Sperger et al. 2003, *PNAS*, 100:13350-13355]), HRG- β 는 마우스 원시 배세포의 종식을 지지하는 것으로 이전에 보고된 바 있다 ([Toyoda-Ohno et al. 1999, *Dev. Biol.*, 215:399-406]). 추가로, ErbB2의 과발현 및 후속적인 부적절한 활성화는 종양발생과 관련이 있다 ([Neve et al. 2001 *Ann. Oncol.*, 12(Suppl 1):S9-13], [Zhou & Hung, 2003 *Semin. Oncol.* 30(5 Suppl 16):38-48], [Yarden, 2001, *Oncology*, 61 Suppl 2:1-13]). 인간 ErbB2 (염색체 17q) 및 ErbB3 (염색체 12q)은 일부 hESC에서 삼염색체로서 축적되는 것으로

관찰된 염색체상에 존재한다 ([Draper et al. 2004 *Nat. Biotechnol.* 22:53-4], [Cowan et al. 2004 *N Engl. J. Med.* 350(13):1353-6], [Brimble et al. 2004 *Stem Cells Dev.*, 13:585-97], [Maitra et al. 2005 *Nat. Genet.* 37:1099-103], [Mitalipova et al. 2005 *Nat. Biotechnol.* 23:19-20], [Draper et al. 2004 *Stem Cells Dev.*, 13:325-36], [Ludwig et al. *Nature Biotech.*, published online January 1, 2006, doi:10.1038/nbt1177]).

[0019] ErbB2 및 ErbB3 ([Brown et al. 2004 *Biol. Reprod.*, 71:2003-11], [Salas-Vidal & Lomeli, 2004 *Dev Biol.* 265:75-89])은 마우스 배반포에서 발현되지만 내부 세포괴(inner cell mass) (ICM)로 특이적으로 한정되는 것은 아니고, ErbB1, EGF 및 TGF β 는 인간 배반포에서 발현된다 ([Chia et al. 1995 *Development*, 122(2):299-307]). HB-EGF는 인간 IVF 배반포 배양에 있어서 증식 효과를 갖고 ([Martin et al. 1998 *Hum. Reprod.* 13:1645-52], [Sargent et al. 1998 *Hum. Reprod.* 13(Suppl 4):239-48]), 15% 혈청에서 성장시킨 마우스 ES 세포에 중간 정도의 추가의 효과를 갖는다 ([Heo et al. 2006 *Am. J. Phys. Cell Physiol.* 290:C123-33, Epub 2005 Aug 17]). ErbB2/-, ErbB3/-, 뉴레귤린1/- ([Britsch et al. 1998 *Genes Dev.*, 12:1825-36]), ADAM17/- ([Peschon et al. 1998 *Science*, 282:1281-1284]) 및 ADAM19/- ([Horiuchi 2005 *Dev. Biol.* 283:459-71]) 널(null) 배아에서는 이식전 및 이식후 초기 발생이 영향을 받는 것으로 여겨지지는 않는다. 따라서, hESC에서 ErbB 수용체 패밀리를 통한 신호전달의 중요성은 현재까지 불명확하다.

[0020] 뉴레귤린-1 (NRG1)은 다중 스플라이싱 및 단백질 프로세싱 변이체를 나타내는 거대 유전자이다. 이것은 많은 수의 단백질 이소형을 생성하는데, 이것들은 본원에서 통칭하여 뉴레귤린이라 지칭된다. 뉴레귤린은 세포 표면 막횡단 단백질로서 우세하게 발현된다. 세포외 영역은 이뮤노글로불린-유사 도메인, 탄수화물 개질 영역 및 EGF 도메인을 함유한다. NRG1 발현 이소형은 이전에 검토된 바 있다 ([Falls 2003 *Exp. Cell Res.* 284:14-30]). 세포 막 메탈로프로테아제 ADAM17 및 ADAM19는 뉴레귤린-1의 막횡단 형태(들)를 가용성 뉴레귤린/헤레귤린으로 프로세싱하는 것으로 나타난 바 있다. HRG- α 및 HRG- β 는 뉴레귤린의 절단된 엑토도메인으로, EGF 및 다른 도메인을 함유한다. EGF 도메인은 ErbB 수용체의 결합 및 활성화에 관여하기 때문에, 오직 상기 도메인만을 함유하는 재조합 분자가 이 단백질의 본질적으로 모든 가용성 성장 인자 효과를 나타낼 수 있다 ([Jones et al. 1999 *FEBS Lett.* 447:227-31]). 또한, EGF 도메인과 ErbB 수용체의 상호작용을 통해 인접 세포에서의 직접적인 신호전달을 촉발하는 것으로 여겨지는, 뉴레귤린의 프로세싱된 막횡단 이소형도 존재한다.

[0021] 여전히, 배양시에 만능성을 유지하는 hESC 연구의 진행에 있어서 중요한 진전은 임상적 안전성 및 효능에 관해 예상되는 규제 지침에 부합되는 배지 및 세포 배양 조건의 확인일 것이다. 가장 좋은 것은 hESC에 대하여 화학적으로 규정된 배지를 이용하는 것이지만, 화학적으로 규정되지 않은 성분이 GMP 표준에 따라 생성된다면 이것들도 허용 가능할 것이다. 따라서, 치료 목적에 사용될 수 있는 만능 줄기 세포 집단의 배양 및 안정화를 위한 방법 및 조성물을 확인할 필요가 있고, 상기 배양 조성물은 규정되고/거나 GMP 표준에 따라 생성된 것이다.

[0022] 이식 후 기능할 수 있는 위탁(committed) 전구 또는 분화 세포 유형의 제조는 hESC-기재의 치료 연구 잠재성에 대한 중요한 전망이다. 단계별 프로토콜을 이용할 때, 특히 본원에 기재되고 출원인의 특허 및 비-특허 간행물(본원에서도 언급됨)에 이전에 기재된 바와 실질적으로 유사한 4-단계 단계별 프로토콜을 이용할 때, 영장류 만능 줄기 세포 (pPSC), 예를 들어 hESC 또는 iPSC는 단계 4 종료까지 췌장 유형 세포의 혼합 집단으로 분화시킬 수 있는 분화 가능한 세포이다. 상기 세포의 혼합물을 적어도 통상 "췌장 전구세포" 또는 "췌장 내배엽" 또는 "췌장 상피" (둘다 또한 "PE"라 지칭되기도 함) 또는 "PDX1-양성 췌장 내배엽" 또는 "췌장 내배엽 세포" 또는 "PEC"라 지칭되는 세포 또는 그의 등가물을 함유한다.

[0023] PEC의 세포 조성물은 문헌 [Kroon et al. 2008 *Nature Biotechnology* 26:443-52] 및 미국 특허 제7,534,608호, 제7,695,965호 및 제7,993,920호 (발명의 영문명칭: METHODS FOR MAKING INSULIN IN VIVO), 및 제8,278,106호 (발명의 영문명칭: ENCAPSULATION OF PANCREATIC CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 본 출원인의 이전 특허 및 비-특허 출원에 기재된 바와 같이 완전히 특징규명된 바 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 유동 세포측정법을 이용하였을 때, PEC의 10개 초파의 상이한 개발 로트로부터의 20개 초파의 샘플 정량화는 하기 유형의 세포를 나타냈다. 상기 세포 혼합물의 약 50% (33% 내지 60% 범위)는 NKX6-1은 발현하지만 크로모그라닌(Chromogranin) (CHGA)은 발현하지 않는 세포로 이루어졌다. 약 44% (33% 내지 62% 범위)의 다중-호르몬 내분비 세포는 CHGA를 발현하였다. CHGA 양성 세포는 생체내 이식 또는 이식 후에 글루카곤 발현 세포로 발생 및 성숙하는 것으로 나타났다. 약 7% (1.3% 내지 13% 범위)는 PDX1은 발현하지만, 동시에 CHGA 또는 NKX6-1은 발현하지 않았다 (PDX1 단독 집단). 상기 혼합물 또는 집단 내 매우 적은 군의 세포인 약 1% (0.27% 내지 6.9% 범위)는 상기 마커 중 어느 것도 발현하지 않았다: PDX1도 발현하지 않고 NKX6-1 또는 CHGA도 발현하지 않았다 (또는 삼중 음성 세포). 따라서, PEC

또는 그의 등가물은 상기 세포의 이러한 집단 또는 혼합물을 지칭한다. PEC 조성물 또는 집단은 또한 실시예 27 및 표 12에 보다 상세하게 기재된다. 문헌 [Kroon et al. 2008, 상기 문헌], [Schulz et al. 2012, 상기 문헌]을 참조하며, 상기 문헌의 개시내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0024] 캡슐화 또는 비-캡슐화된 이식된 PEC는, 췌장 전구세포의 내분비 계통으로의 드 노보(*de novo*) 위탁 및 이후 글루코스-반응성 β -세포로의 추가 성숙에 주로 관여하는 것으로 여겨지는 메카니즘을 통해 섭-유사 구조가 생체내 기능을 수행하게 한다. 따라서, 이러한 이식편은 혈액 글루코스를 감지할 수 있고 프로세싱된 인간 인슐린의 계량 방출에 반응할 수 있으며 마우스에서 스트렙토조토신 (STZ)-유도 고혈당증에 대해 보호할 수 있다. 문헌 [Kroon et al. 2008, 상기 문헌]을 참조한다.

[0025] 다른 후보 췌장 계통이 hESC로부터 유도된 바 있으나, 장기간 글루코스-반응성 인간 c-펩티드 분비 및 STZ-유도 고혈당증에 대한 보호 둘다에 대해 규정할 때어느 것도 생체내에서 실질적인 생착후 기능을 수행한다고 입증된 바 없다. 동물 모델에서의 기능 입증 없이는, 이를 대안적인 프로토콜의 규모조정성 또는 임상적 잠재성을 측정하기가 어렵다. 문헌 [Cai J. et al. 2009 J Mol Cell Biol 2:50-60], [Johannesson et al. 2009 PLoS One 4:e4794], [Mfopou et al. 2010 Gastroenterology 138:2233-2245], [Ungrin et al. 2011 Biotechnol Bioeng. Dec 2. doi:10.1002/bit.24375], [Clark et al. 2007 Biochem Biophys Res Commun 356:587-593], [Jiang et al. 2007 Cell Res 17:333-344] 및 [Shim et al. 2007 Diabetologia 50:1228-1238]을 참조하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0026] 본원에 기재된 본 발명은 규정된 배지를 사용하고 공급자가 존재하지 않는 조건이 hESC의 단일 세포 계대배양 및 벌크(bulk) 배양을 지지할 수 있다는 본 출원인의 이전 입증문헌을 따른다. 문헌 [Schulz & Robins 2009, 상기 문헌], 및 미국 특허 제8,278,106호 (발명의 영문 명칭: ENCAPSULATION OF PANCREATIC CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS)를 참조하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. hESC-기재의 기술을 임상 시험으로 진행시키는데 중요한 것은, 비교가능한 규모조정성을 입증하는 일이다. 증식 효율을 증진시키는데 있어서의 개선은 또한 시간을 절약하고 비용 절감을 달성할 것이고, 또한 배양시 소요되는 시간에 따른 집단 이동의 가능성을 최소화할 것이다. 문헌 [Maitra et al. 2005 Nat Genet 37:1099-1103]을 참조하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 중요한 것은, 예를 들어 동결보존된 hESC를 함유하는 본원 기재의 롤러 병을 이용한 규모조정이 단기간 및 장기간 연구 및 개발 전략을 위한 생성물 제조를 위해 규정되고 일관된 물질을 제공한다는 점이다.

발명의 내용

발명의 요약

[0028] 본 발명은 기본적인 염 영양 용액 및 ErbB3 리간드를 포함하고, 본질적으로 혈청이 존재하지 않는 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명은 또한 기본적인 염 영양 용액을 포함하는 조성물, 및 분화가능한 세포에서 ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성을 자극하는 수단에 관한 것이다.

[0030] 본 발명은 분화가능한 세포를 세포 배양 표면에 플레이팅하는 단계, 상기 분화가능한 세포에 기본적인 염 영양 용액을 제공하는 단계, 및 ErbB3에 특이적으로 결합하는 리간드를 제공하는 단계를 포함하는, 분화가능한 세포의 배양 방법에 관한 것이다.

[0031] 본 발명은 분화가능한 세포를 세포 배양 표면에 플레이팅하는 단계, 및 상기 분화가능한 세포에 기본적인 염 영양 용액을 제공하고 상기 분화가능한 세포에서 ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성을 자극하는 수단을 제공하는 단계를 포함하는, 분화가능한 세포의 배양 방법에 관한 것이다.

[0032] 본 발명은 또한 소화시키기 전에 배양 챔버에 함유된 분화가능한 세포의 층에 소화 용액을 제공하고, 여기서의 소화는 세포의 층을 단일 세포로 분리 분해하는 것인 단계를 포함하는, 분화가능한 세포의 배양 방법에 관한 것이다. 소화 후에는, 상기 단일 세포를 기본적인 염 영양 용액 및 ErbB3 리간드를 포함하는 분화가능한 세포 배양 용액을 함유하는 새로운 조직 배양 챔버에 배치한다. 일단 배양한 후에는, 분화가능한 단일 세포를 단일 세포의 성장 및 분열을 허용하는 조건하에 둔다.

[0033] 본 발명은 미분화된 상태로 팽창을 허용하는 부착 성장 배양 조건에서 hES 세포를 배양하고; 부착 hES 세포 배양물을 단일 세포 혼탁 배양물로 해리시키고; 단일 세포 혼탁 배양물이 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체를 형성하는 시기까지 단일 세포 혼탁 배양물을 교반함으로써 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체의 형성을 허용하는 제1

분화 배양 조건으로 단일 세포 혼탁 배양물을 접촉시킴으로써, 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체를 생성하는 것에 의해, 만능 hES 부착 배양물로부터 혼탁액 중 hES 세포 응집체를 생성하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 단일 세포 혼탁 배양물의 교반은 약 80 rpm 내지 160 rpm에서 회전시킴으로써 수행된다.

[0034] 본 발명은 또한 미분화된 상태로 팽창을 허용하는 부착 성장 배양 조건에서 hES 세포를 배양하고; hES 세포를 분화시키고 부착 hES-유래 세포를 생성하는 데 적합한 제1 분화 배양 조건으로 미분화된 hES 세포를 접촉시키고; 부착 hES 유도된 세포를 단일 세포 혼탁 배양물로 해리시키고; 단일 세포 혼탁 배양물이 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체를 형성하는 시기까지 단일 세포 혼탁 배양물을 교반함으로써 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체의 형성을 허용하는 제2 분화 배양 조건으로 단일 세포 혼탁 배양물을 접촉시킴으로써, 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체를 생성하는 것에 의해, hES-유래 단일 세포 혼탁액으로부터 혼탁액 중 hES-유래 세포 응집체를 생성하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 단일 세포 혼탁 배양물의 교반은 약 80 rpm 내지 160 rpm에서 회전시킴으로써 수행된다.

[0035] 본 발명은 혼탁액 중 영장류 만능 줄기 세포 (pPSC) 응집체를 함유하는 롤러 병에 관한 것이다. 본 발명의 특정 측면들에서, pPSC 응집체는 인간 배아 줄기 세포 (hESC), 유도 만능 줄기 세포 (iPSC) 및/또는 다른 인간 만능 줄기 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 세포이다. 한 실시양태에서, 롤러 병은 배기되지 않지만, 인큐베이터 또는 오븐 용량에 따라 배기될 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한 만능 줄기 세포 배양 조건으로 pPSC를 접촉시키고, pPSC 응집체가 형성될 때까지 배양물을 교반함으로써, 롤러 병 내에 pPSC 응집체를 생성하는 것에 의해, pPSC 응집체를 함유하는 롤러 병을 생성하는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, pPSC 배양물의 교반은 약 3 rpm, 약 4 rpm, 약 5 rpm, 약 6 rpm, 약 7 rpm, 약 8 rpm, 약 9 rpm, 약 10 rpm, 약 11 rpm, 약 12 rpm, 약 13 rpm, 약 14 rpm, 약 15 rpm, 약 16 rpm, 약 17 rpm, 약 18 rpm, 약 19 rpm, 약 20 rpm, 약 21 rpm, 약 22 rpm, 약 23 rpm, 약 24 rpm, 약 25 rpm, 약 26 rpm, 약 27 rpm, 약 28 rpm, 약 29 rpm 및 약 30 rpm에서 회전시킴으로써 수행된다. 전형적으로, pPSC 배양물의 교반은 약 5 rpm, 약 6 rpm, 약 7 rpm, 약 8 rpm, 약 9 rpm, 약 10 rpm, 약 11 rpm 및 약 12 rpm에서 회전시킴으로써 수행된다.

[0037] 본 발명의 또 다른 측면은 pPSC를 분화시키는 배양 조건으로 분화가능한 또는 미분화된 pPSC 응집체를 접촉시키고, pPSC-유래 응집체의 형성까지 pPSC 응집체 배양물을 교반함으로써, 롤러 병 내의 혼탁액 중 pPSC-유래 응집체를 생성하는 것에 의해, 롤러 병 내의 pPSC 응집체를 분화시키는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, pPSC-유래 응집체 혼탁 배양물의 교반은 약 3 rpm, 약 4 rpm, 약 5 rpm, 약 6 rpm, 약 7 rpm, 약 8 rpm, 약 9 rpm, 약 10 rpm, 약 11 rpm, 약 12 rpm, 약 13 rpm, 약 14 rpm, 약 15 rpm, 약 16 rpm, 약 17 rpm, 약 18 rpm, 약 19 rpm, 약 20 rpm, 약 21 rpm, 약 22 rpm, 약 23 rpm, 약 24 rpm, 약 25 rpm, 약 26 rpm, 약 27 rpm, 약 28 rpm, 약 29 rpm 및 약 30 rpm에서 회전시킴으로써 수행된다. 전형적으로, pPSC 배양물의 교반은 약 5 rpm, 약 6 rpm, 약 7 rpm, 약 8 rpm, 약 9 rpm, 약 10 rpm, 약 11 rpm 및 약 12 rpm에서 회전시킴으로써 수행된다.

[0038] 본 발명의 또 다른 실시양태는 롤링 병 유형의 용기 내의 유체 유동이 회전 또는 병의 롤링을 요구하지 않는 롤링 이동을 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 롤링 유형 이동은 실질적으로 롤링 용기를 사용하지 않고 재생성된다. 또 다른 실시양태에서, 영장류 만능 줄기 세포 배양물에는, 예를 들어 난류가 거의 없거나 없는 부드럽고 순차적인 방식으로 유체를 펌핑 또는 유동시킴으로써 유체 이동이 부여된다. 그러한 실시양태에서, 임의의 저류는 일반적으로 임의의 다른 가까운 저류(들)와 평행하다. 이 유형의 이동은 또한 층류 유동 (통상적으로 점성 유체, 특히 낮은 점도에서 이동하는 것들을 이동시키는 데 사용됨) 또는 유선형 유동 (지속적 이동의 유체 이동)을 특징으로 한다. 또 다른 실시양태에서, 유체 이동은 챔버 내에서 유체 유동을 분배하여 세포의 연속적인 균일한 혼탁액을 생성하는 하나 이상의 배플을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 유체 이동은 변류기 판, 분포 채널, 및/또는 유동 채널의 하나 또는 조합을 포함한다. 각각의 실시양태에서, 세포 응집, 성장 및 분화 동안 용기 내부에 무균 환경을 보장하는 배양 용기 상에 적어도 하나 이상의 밀봉체가 포함된다.

[0039] 본 발명은 또한 만능 세포 배양물의 세포 밀도를 최적화하거나, 다양한 성장 인자, 예를 들어 FGF10, EGF, KGF, 노린 및 레티노산, 아폽토시스 억제제, Rho-ки나제 억제제 등의 농도를 다양화함으로써 hES-유래 세포 응집체 혼탁액의 생성된 세포 배양물 및/또는 집단의 조성물을 풍부화 또는 다양화하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0040]

도 1은 한정된 조건 (8 ng/mL FGF2, 100 ng/mL LR-IGF1, 1 ng/mL 액티빈 A)에서 성장한 BG01v 중 ADAM19, 뉴레큘린1, 및 ErbB1-3의 실시간 RT-PCR 발현 분석을 나타낸다. GAPDH 및 OCT4 대조군 반응이 나타나 있다.

도 2는 AG879를 이용한 BG01v 세포의 증식 억제를 나타낸다. BG01v 세포를 6-웰 단에 플레이팅하고, 플레이팅 후 24 시간 DMSO (a), 50 nM-20 μ M AG1478 (b), 또는 100 mM-20 μ M AG879 (c)에 노출시켰다. 배양 5 일 후, 배양물을 고정시키고, 알칼리성 포스파타제 활성을 위해 염색하였다. AG1478은 이들 농도 (b에 나타낸 20 μ M)에서 증식에 영향을 주지 않는 것으로 나타났지만, AG879는 5 μ M (c)에서 실질적으로 세포 성장을 감속시켰다.

도 3은 10 ng/mL HRG- β , 10 ng/mL 액티빈 A, 200 ng/mL LR-IGF1 및 8 ng/mL FGF2를 함유하는 한정된 배양 배지 (a 및 b), 및 10 ng/mL HRG- β , 10 ng/mL 액티빈 A, 및 200 ng/mL LR-IGF1을 함유하는 한정된 배양 배지 (DC) (c 및 d)인 DC-HAIF에서 배양된 BG01v 세포의 형태를 나타낸다.

도 4는 마우스 ES 세포 (a) 및 MEF (b)에서의 RT-PCR에 의한 ADAM19, 뉴레큘린1, 및 ErbB1-4의 발현을 나타낸다.

도 5는 마우스 ES 세포에서의 ErbB1 및 ErbB2 신호전달의 억제를 나타낸다. 2×10^5 마우스 R1 ES 세포를 1000 U/mL 마우스 LIF (ESGRO)를 갖는 10% KSR인 10% FBS 중 1:1000 매트리겔(MATRIGEL)TM 상에 플레이팅하였다. 다음날, DMSO (담체 대조군), 1 내지 50 μ M AG1478, 또는 1 내지 50 μ M AG879를 새로운 배지와 함께 첨가하였다. 배양물을 제8일에 고정시키고, 알칼리성 포스파타제 활성을 위해 염색하였다. DMSO (a) 및 1 내지 50 μ M AG1478 (b 및 c)은 명백히 증식을 억제하지 않았다. AG879는 50 μ M에서 실질적으로 세포 성장을 억제하였고 (d 및 f 비교), 20 μ M에서 증식을 감속시킬 수 있다 (e).

도 6은 조건화 배지 (CM)에서 성장한 BG02 세포의 증식 억제를 나타낸다. (a) 50 μ M AG825는 CM에서 성장하는 BG02 hESC의 증식을 억제하였다. (b) AG825는 hESC에서 ErbB2 Y1248 인산화를 억제한다. (c) 성장 인자의 여러가지 조합에서 CyT49 hESC의 일련의 계대배양의 콜로니 카운팅. (d) BG02 세포를 이용한 hESC 증식에서의 IGF1 및 HRG의 역할의 세포 카운팅 분석 (좌측). (e) 2회 반복된 실험의 OCT4/DAPI 면역염색은 IGF1 및 HRG가 ActA/FGF2 조건에 의해 OCT4⁺ 세포의 비율을 유의하게 증가시켰음을 입증하였다. (f) 성장 인자를 밤새 고갈시키고, DC-HAIF로 고갈시킨 후 15 분 동안 펼성한 BG01 DC-HAIF hESC의 RTK 블로팅 분석; 또는 지속-상태 배양물을 나타낸다 (좌측). 정규화된 상대 강도의 평균 및 범위를 플로팅한다 (우측).

도 7은 여러가지 성장 인자 조합으로 한정된 조건에서 성장시킨 마우스 ES 세포를 나타낸다. (a)는 2×10^5 세포를 여러가지 성장 인자 조합에서 8 일 동안 성장시킨 후 AP⁺ 콜로니의 스코어링을 나타낸다. (b 내지 g)는 여러가지 성장 인자에서 성장시킨 AP⁺ 콜로니의 4x 확대 화상을 나타낸다.

도 8은 DC-HAIF 배지에서 유지된 인간 ES 세포의 특성화를 나타낸다. (a) BG02 DC-HAIF p25 세포로부터의 기형 종의 분석은 외배엽, 중배엽 및 내배엽에 만능 분화 가능성을 입증하였다. (b) 분화된 15% FCS/5% KSR에서 배양된 BG02 세포의 면역염색. (c) CM (64 계대) 또는 DC-HAIF (규정 배지 중 10 또는 32 계대)에서 유지된 BG02 세포 중 47,296 전사체 프로브를 함유하는 고밀도 일루미나 센트릭스 인간-6 발현 베드칩(human density Illumina Sentrix Human-6 Expression Beadchips)을 이용하여 검출된 전사체의 분포의 벤 다이어그램. (d) BG02 DC-HAIF p32 세포의 전사 프로파일이 CM에서 유지된 BG02 세포와 매우 유사하고 (상부), DC-HAIF 중 초기 및 후기 계대 배양물에서 실질적으로 변화되지 않았음 (하부)을 입증하는 산포도 분석. (e) 비드스튜디오 (Beadstudio) 소프트웨어를 이용하여 생성된 여러가지 접단에서의 상대적 유전자 발현의 계층적 클러스터링 계통수.

도 9는 DC-HAIF 배지의 존재하에서의 인간화 세포외 매트릭스 (ECM) 상에서 배양된 세포의 형태를 나타낸다. (a) 성장 인자-감소된 매트리겔TM (1:200으로 희석) 상에서 성장한 CyT49 세포 (1:200으로 희석). CyT49 세포는 또한 (b) 전체 인간 혈청, (c) 인간 피브로네틴, 및 (d) 비트로그로(VITROGRO)TM로 코팅된 조직 배양 접시 상에서 성장시킬 수 있다.

도 10은 인간 ES 세포의 단일 세포 계대배양을 나타낸다. (a 내지 d) 아큐테이즈(ACCUTASE)TM로 계대배양시키고, 60 mm 배양 접시에서 약 5×10^5 세포를 플레이팅한 후의 BG02 세포의 단계별 영상화. (a) 접시에 부착된 생존 세포를 나타내는 초기 플레이팅 후 1.5 시간. (b) 플레이팅 후 20 시간에서, 대다수의 세포가 응집하여 작은 콜로니를 형성하였다. 이들 콜로니는 플레이팅 후 제4일까지 증식에 의해 팽창되고 (c), 5 내지 6 일의 기

간에 걸쳐 전체 접시를 덮는 상피-유사 단층을 형성한다 (d). (e) DC-HAIF 중 아큐테이즈™로 19 회 계대배양 시킨 BG02 배양물에서 입증된 정상 납성 핵형.

도 11은 (a) 아큐테이즈™, (b) 0.25% 트립신/EDTA, (c) TrypLE, 또는 (d) 베르센(Versene)을 이용한 인간 ES 세포의 단일 세포 계대배양 후의 세포 형태를 나타낸다.

도 12는 DC-HAIF에서 배양된 인간 ES 세포의 대규모 성장을 나타낸다. (a) $>10^{10}$ 세포로 팽창된 후의 BG02 세포의 유동 세포측정 분석. $>85\%$ 의 세포가 OCT4, CD9, SSEA-4, TRA-1-81을 발현하였다. (b) 만능 OCT4, NANOG, REX1, SOX2, UTF1, CRIPTO, FOXD3, TERT 및 DPPA5의 마커의 발현의 RT-PCR 분석. 분화된 세포주, α -태아단백질 (AFP), MSX1 및 HAND1의 마커는 검출되지 않았다. (c) 인간 염색체-특이적 반복체를 이용한 형광 계내 혼성화 (FISH)는 hChr 12, 17, X 및 Y에 대한 정상 카피수의 유지를 입증하였다.

도 13은 7 계대, 또는 >2 개월 동안 FGF2의 부재하에서 HRG- β 및 IGF1를 포함하는 규정 배지에서 성장시킨 hESC BG02 세포의 형태 (a) 및 정상 핵형 (b)을 나타낸다.

도 14는 DC-HAIF (32 계대) 또는 DC-HAI (10 계대)에서 유지한 hESC (BG02)로부터의 전사체의 산포도 분석을 나타낸다. 많은 비율의 발현된 전사체가 샘플 둘 다에서 검출되었고, 전사는 외인성 FGF2의 부재하에서 hESC를 배양함으로써 실질적으로 변경되지 않았다. 상관 계수 (R^2)를 >0 의 발현 수준을 갖는 모든 검출된 전사체 (모든 점), 또는 >0.99 의 검출 신뢰 수준을 나타내는 전사체 (R^2 선택, 점선 타원형으로 나타낸 점)를 이용하여 생성하였다. 각진 선은 2배 차이의 평균 및 한계를 기술한다.

도 15는 DC-HAIF에서 유지된 초기 및 후기 계대배양 BG02 세포의 여러가지 접단에서의 상대적 유전자 발현의 계통적 클러스터링 계통수를 나타낸다. 세포는 긴밀하게 클러스트화되고 (약 0.0075), 조건화된 배지 (CM)에서 유지된 BG02 및 BG03 세포와 매우 유사성을 보유하였다 (약 0.037). DC-HAI에서 유지된 BG02 세포는 또한 검사된 다른 hESC 접단과 긴밀하게 클러스트화되었다. 도 15에서 설명한 방식에 의해, CM은 조건화된 배지이고; DC는 상기 한정된 바와 같은 DC-HAIF인 한정된 배양 배지이고; ap는 아큐테이즈™ 단일 세포 계대배양이고; DC-HAI는 FGF2가 없는 것을 제외하고는 본원에 정의된 DC-HAIF과 동일하다.

도 16은 96-웰 및 384-웰 플레이트 중의 DC-HAIF에서 배양된 BG02 세포의 형태 및 알칼리성 포스파타제 염색을 나타낸다. (a) 96-웰 플레이트의 1 웰에서 성장한 BG02 세포 (10^4 세포/웰)의 위상 대조 영상화 및 (b) 알칼리성 포스파타제 염색. (c) 384-웰 플레이트의 1 웰에서 성장한 BG02 세포 (10^3 세포/웰)의 위상 대조 영상화 및 (d) 알칼리성 포스파타제 염색.

도 17은 혼탁 배양물 중 DC-HAIF에서 성장시킨 BG02의 암소 화상을 나타낸다. 제2일 및 제6일 배양물을 나타낸다. 화상은 4x 배율을 이용하여 캡처하였다.

도 18은 DC-HAIF 중 부착 및 혼탁 배양물에서의 성장 속도를 나타낸다. 1×10^6 BG02 세포를 부착 및 혼탁 배양물 중 패럴렐 웰에 플레이팅하고, 세포 카운팅을 제1일 내지 제6일에 수행하였다.

도 19는 혼탁액 및 부착 hESC의 qPCR 분석을 나타낸다. 혼탁액 (S. hESC) 및 부착 (hESC) 배양물에서 성장한 BG02 세포는 OCT4와 필적할 만한 수준을 나타내고, SOX17 발현이 없었다. 부착 세포는 완전 내배엽 (DE)으로 분화하고, 혼탁액 hESC는 혼탁액 중 완전 내배엽 (S. DE d3)으로 분화하며, 둘 다는 OCT4의 예상되는 현저한 하향 조절 및 SOX17 발현의 상향 조절을 나타내었다.

도 20은 혼탁 배양물 중 Y27632의 존재하에서의 hESC 응집의 향상을 나타낸다. 2×10^6 BG02 세포를 3 mL DC-HAIF 또는 DC-HAIF + Y27632에, 6-웰 단에, 100 rpm의 회전 플랫폼 상의 인큐베이터에 접종하였다. 응집체의 향상을 제1일 및 제3일에 캡처하였다.

도 21은 Y27632의 존재하에서의 혼탁액 응집체의 RT-PCR 분석을 나타낸다. RT-PCR을 팽창된 배양물 상에서 수행하여 만능성의 마커의 발현을 평가하였다. OCT4, NANOG, REX1, SOX2, UTF1, CRIPTO, FOXD3, TERT 및 DPPA5의 발현이 검출된 반면, 분화된 세포주 AFP, MSX1 및 HAND1의 마커는 검출되지 않았다.

도 22 a 내지 p는 마커 유전자 OCT4 (패널 a), BRACH (패널 b), SOX17 (패널 c), FOXA2 또는 HNF3베타 (패널 d), HNF1베타 (패널 e), PDX1 (패널 f), NKX6.1 (패널 g), NKX2.2 (패널 h), INS (패널 i), GCG (패널 j), SST (패널 k), SOX7 (패널 l), ZIC1 (패널 m), AFP (패널 n), HNF4A (패널 o) 및 PTF1A (패널 p)의 발현 패턴을 나

타내는 막대 차트이며, 철저한 목록은 아니지만, 만능 인간 배아 줄기 (hES) 세포 (단계0, d0), 완전 내배엽 세포 (단계1; d2), PDX1-음성 전장 내배엽 세포 (단계2; d5), PDX1-양성 내배엽 세포 (단계3, d8), 췌장 내배엽 세포 (단계4; d11), 췌장 내분비 전구체 및/또는 호르몬 분비 세포 (단계5; d15)를 확인하는 데 이용될 수 있는 마커이다.

도 23은 배양물 중 배지의 총 부피 (mL)에 관한 혼탁액 중 세포 응집체의 직경 (μm)의 범위를 나타내는 그래프이다.

도 24 a 내지 d는 이들이 유도되는 hES 세포 배양물의 세포 밀도에 관한 hES-유래 세포 중 마커 유전자 PDX1 (패널 a), NKX6.1 (패널 b), NGN3 (패널 c) 및 NKX2.2 (패널 d)의 발현 패턴을 나타내는 막대 차트이다.

도 25는 제0일에서의 만능 세포의 세포 응집체 직경 (d0) 및 제2일, 제5일, 제8일 및 제12일에서의 분화하는 세포 응집체의 직경 (각각 d2, d5, d8 및 d12)을 나타내는 차트이다. 세포 응집체 크기를 측정하고, 최소, 최대, 제2 사분위수 및 제3 사분위수, 및 중위를 나타내도록 플롯팅하였다. 각각의 일은 1×10^6 세포/mL (좌측) 및 2×10^6 세포/mL (우측)으로부터 형성된 세포 응집체에 대한 플롯을 나타낸다.

도 26 a 내지 d는 룰링 병 용기 포맷 중 다양한 지시된 마커 유전자의 발현 패턴을 나타내는 막대 차트이다. 각각의 차트의 좌측 샘플은 6-웰 단에서 형성된 제0일 (d0) 세포 응집체 (만능 세포 마커 대조군)를 나타낸다. 막대로 마킹된 샘플은 (좌측에서 우측으로): 제0일에 미분화된 응집체, 및 제2일, 제5일, 제8일 및 제12일에 분화하는 응집체를 나타낸다. 흑색 막대, 1×10^6 세포/mL에서의 룰링 병; 흑색 점선 막대, 2×10^6 세포/mL에서의 룰링 병; 회색 막대, 6-웰 단.

도 27 a 내지 d는 실시예 27의 표 11 및 12에 기재된 보다 큰 룰링 병 용기 포맷 중 다양한 지시된 마커 유전자의 발현 패턴을 나타내는 막대 차트이다. 좌측 샘플은 6-웰 단 hESC 응집 및 분화 (대조군; 도 27a)를 나타내고; 제0일, 제2일, 제5일, 제8일 및 제12일의 배기된 (V) 또는 비-배기된 (NV) 490 cm^2 롤러 병 (약 1.2L 용량)에서의 분화를 나타낸다. 제2일 샘플은 배양물의 손실 때문에 마지막 490V 샘플 (훨씬 우측 칼럼)에 대해 수집되지 않았다. 동일한 d0 대조군을 각각의 롤러 병 분화 (별표)에 대해 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041]

종합체 스캐폴드, 매트릭스 및/또는 젤 내로 개별적 세포를 접종하는 것에 기초하는 조직 유전자조작의 사전에 공지된 방법과 반대로, 본원에 기재된 방법은 조직 형성의 빌딩 블록으로서 만능 hES 단일 세포 혼탁액 또는 hES-유래 (분화된) 단일 세포 혼탁액으로부터 형성된 세포 응집체 혼탁액을 이용한다. 세포 응집체는 대개 수백 내지 수천의 개별적 세포로 구성되며, 이는 최종 분화된 생성물에 집합적으로 기여하는 접속적 부착 및 세포 외 매트릭스를 통해 접속된다. 이와 관련하여, 세포 응집체는 보다 전형적인 유전자조작된 조직에 비해 다수의 성능 이점을 제공하는 조직의 유형으로서 정의될 수 있다.

[0042]

본 발명의 한 실시양태에서, 만능 줄기 세포 배양물 또는 hES-유래 세포 배양물의 단일 세포 혼탁액으로부터 hES 세포 응집체 혼탁액을 제조하는 방법이 제공된다. 만능 줄기 세포는 처음에 섬유모세포 공급자 상에서 배양될 수 있거나, 이들은 공급자가 없는 것일 수 있다. hESC를 단리하고 이들을 인간 공급자 세포 상에서 배양하는 방법은 그의 전문이 본원에 참고로 도입되고 발명의 명칭이 인간 공급자 세포 상에서의 인간 배아 줄기 세포의 배양 방법인 미국 특허 제7,432,104호에 기재되어 있다. 공급자 상에서 배양된 hESCs로부터 직접 제조되거나 개시된 만능 ES 세포 응집체 혼탁 배양물은 예를 들어 부착 배양물 중에서처럼 hESC 단층을 제조해야 할 필요를 회피한다. 이를 방법은 실시예 17 및 18에 상세하게 기재되어 있다.

[0043]

본 발명의 다른 실시양태는 분화 배지, 예를 들어 작용제, 바람직하게는 수용체의 TGF β 패밀리를 활성화시킬 수 있는 TGF β 패밀리 구성원을 함유하는 분화 배지 내로 세포 응집체 혼탁액을 직접 제조하는 방법을 제공한다. 그러한 작용제로는 액티빈 A, 액티빈 B, GDF-8, GDF-11, 및 노달(Nodal)을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 분화 배지 내에서 세포 응집체 혼탁액을 제조하는 방법은 만능 줄기 세포 배지, 예를 들어 스템프로(StemPro) 중에서 세포 응집체 혼탁 배양물의 제조를 제공하는 본원에 또한 기재된 다른 방법과 구별된다.

[0044]

본 발명의 또 다른 실시양태는 분화된 hES 세포 배양물 ("hES-유래 세포 배양물" 또는 "hES-유래 세포(들)"로도 칭함), 예를 들어 다무어(D'Amour) 등 2005, 상기 문헌 및 문헌 [D'Amour et al. 2006, Nature Biotech 26 2006: 1392-1401)]에 기재된 것과 같은 단계 1, 2, 3, 4 및 5로부터의 세포로부터 형성된 세포 응집체 혼탁액의

제조 방법을 제공한다. 따라서, 본원에 기재된 세포 응집체의 제조 방법은 hES 또는 hES-유래 세포의 임의의 하나의 만능 또는 다능 단계에 한정되지 않으며, 오히려 이용 방식 및 세포 유형 최적화에 대한 필요는 어느 방법이 바람직한지를 기술할 것이다. 이들 방법은 실시예 19 내지 22에 상세하게 기재되어 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 여러가지 성장 인자의 농도를 다양화함으로써, 생성된 세포 조성물을 제어하는, 예를 들어 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포 및/또는 PDX1-내배엽 세포의 백분율을 제어하는 방법이 제공된다. 이들 방법은 실시예 21에 상세하게 기재되어 있다.

[0046] 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 용어는 관련 당업계의 통상의 기술자에 의해 통상적인 용법에 따라 이해되어야 한다. 하기 제공된 용어의 정의 외에, 분자 생물학에서의 통상의 용어의 정의는 또한 문헌 [Rieger et al. 1991 *Glossary of genetics: classical and molecular*, 5th Ed., Berlin: Springer-Verlag]; 및 [Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al. Eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1998 Supplement)]에서 발견될 수 있다. 명세서 및 특허청구범위에 사용된 단수형태는 사용되는 문맥에 따라 하나 또는 그 이상을 의미할 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어 "세포"는 적어도 하나의 세포가 사용될 수 있음을 의미할 수 있다.

[0047] 또한, 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위의 목적상, 달리 나타내지 않는 한, 명세서 및 특허청구범위에 사용된 성분의 양, 물질의 백분율 또는 비율, 반응 조건 및 다른 수치를 표현하는 모든 수는 용어 "약"에 의해 모든 경우 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 나타내지 않는다면, 다음의 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 설명된 수치 파라미터는 본 발명에 의해 얻어질 것으로 추구되는 목적하는 특성에 따라 다양할 수 있는 근사치이다. 적어도 그리고 특허청구범위에 대한 등가물의 신조의 적용을 제한하는 시도가 아닌 것으로서, 각각의 수치 파라미터는 적어도 보고된 유효 숫자의 수의 관점에서 및 통상적인 배경 기술을 적용함으로서 해석되어야 한다.

[0048] 본원에 사용된 "약"은 "약"으로 언급된 수가 인용된 수 플러스 또는 마이너스 인용된 수의 1 내지 10%를 포함하는 것을 의미한다. 예를 들어, "약" 100 세포는 95 내지 105 세포 또는 상황에 따라 99 내지 101 세포만큼 작음을 의미할 수 있다. 본원에 나타날 때는 언제든지, "1 내지 20"과 같은 수치 범위는 소정의 범위에서 각각의 정수를 지칭한다: 예를 들어, "1 내지 20 세포"는 1 세포, 2 세포, 3 세포 등, 20 세포를 포함하여 이하까지를 의미한다. 약이 비-정수로 표현되는 범위를 변형할 경우, 이는 표현되는 유효 숫자의 동일한 정도에 대해 인용되는 수 플러스 또는 마이너스 1 내지 10%를 의미한다. 예를 들어, 약 1.50 내지 2.50 mM은 1.35 M만큼 적은 것 또는 2.75M만큼 많은 것 또는 0.01의 증가로 사이에 있는 임의의 양을 의미할 수 있다.

[0049] 본 발명은 hES-유래 단일 세포 혼탁액으로부터 hES-유래 세포 응집체를 제조하는 방법을 제공한다. 다양한 기계적 및 비-생리학적 인자가 배양물 중 세포의 이동 및 응집, 최적 세포 응집체 생존성 및 성능과 상관되는 유체 기계적 미소-환경에 영향을 줄 뿐만 아니라 규모증대에 사용될 수 있는 표준화 변수를 제공하기 때문에, 다양한 배양 용기, 접시, 삼각 플라스크, 생물반응기, 병 등에서 성장하거나 분화하는 세포의 이동, 및 존재하는 경우 세포에 대한 다양한 배지 조건의 효과를 특성화하는 것이 필요하다. 이들 인자의 일부는 전단 속도 및 전단 응력, 임의의 세포 배지 내의 다양한 성장 인자의 세포 밀도 및 농도를 들 수 있으나, 이들에 한정되지 않는다.

[0050] 전단 속도 및 전단 응력은 시스템 내에서 유체 전단을 한정하는 기계적 특성이다. 전단 속도는 소정의 거리에 대한 유체 속도로서 정의되며, sec^{-1} 로 표현된다. 전단 속도는 전단 응력에 비례하며, 전단 속도 (\square) = 전단 응력 (t)/점도 (μ)이다. 전단 응력은 세포 표면에 탄젠트적으로 작용하는 유체 전단력으로서 정의되며, 단위 면적 당 힘 (dyne/cm^2 또는 N/m^2)으로 표현된다. 전단 응력은 지나간 고정된 세포를 이동시키는 교반된 액체, 고정된 액체를 통해 이동하는 교반된 세포 또는 교반된 동적 유체 환경 내에서 이동하는 세포에 의해 생성될 수 있다. 유체 점도는 전형적으로 포이즈로 측정되며, 1 포이즈= $1 \text{ dyne sec/cm}^2 = 100 \text{ 센티포이즈 (cp)}$ 이다. 공지된 가장 작은 점성 유체 중 하나인 물의 점도는 0.01 cp이다. 배지 내의 진핵 세포의 전형적인 혼탁액의 점도는 25°C의 온도에서 1.0 내지 1.1 cp이다. 밀도 및 온도 둘 다는 유체의 점도에 영향을 줄 수 있다.

[0051] 유체 속도 또한 유동이 층류인지 난류인지를 기술한다. 층류는 점성력이 우세할 경우 일어나며 평활하고 심지어 낮은 속도에서 유선형을 특징으로 한다. 반대로, 높은 속도 및 관성력은 난류 동안 우세하며, 공간 및 시간을 가로질러 유동에서의 희오리, 보르티스 및 혼돈된 과동의 출현을 특징으로 한다. 레이놀드 수(Reynold's number) (Re)로 공지된 무차원 값은 전형적으로 층류 또는 난류의 존재를 정량화하는 데 사용된다. 레이놀드 수는 점성력에 대한 관성의 비이며, (밀도*속도*길이 스케일)/(점도)로 정량화된다. 층류는 $Re < 2300$ 에서 우세

한 반면, 난류는 $Re > 4000$ 인 경우 우세하다. 유체 속도에 관한 이 관계에 기초하여, 레이놀드 수 및 따라서 유체 유동이 층류인지 난류인지에 대한 정도는 혼탁액 중 세포에 의해 경험되는 전단 속도 및 전단 응력에 정비례 한다. 그러나, 높은 전단 응력 조건은 층류 및 난류 유체 환경 둘 다에서 생성될 수 있다. 처음에, 액체는 표면에 바로 인접한 유동이 없는 경계 층 또는 영역을 생성하는 인력을 경험하는 고체 표면에 가장 가까운 유체와 함께 이동에 저항하는 경향이 있다. 이는 유체 유동의 표면으로부터 중심으로 유체 속도의 구배를 생성한다. 속도 구배의 협준함은 액체가 이동하는 속도 및 경계 층으로부터 가장 높은 유체 속도의 영역으로의 거리의 함수이다. 용기를 통과하는 또는 주위의 액체 유속이 가속화됨에 따라, 유동의 속도는 액체의 점도를 극복하고, 평활한 층류 구배는 난류의 생성을 파괴한다. 토마스(Thomas) 등은 난류 조건하의 세포 용해가 국소적으로 높은 전단 응력 및 고에너지 소멸 비율의 영역에서 가장 빈번히 일어남을 보여주었다. 문헌 [Thomas et al. (1994) Cytotechnology 15: 329-335]을 참조한다. 이들 영역은 랜덤하게 나타나지만, 대개 속도 구배가 가장 높은 경계 층 가까이에서 발견된다. 유체 속도의 이러한 랜덤한 파동은 세포 배양-기반 제조 시스템의 규모증대에 결국 부정적 영향을 가질 수 있는 매우 높은 전단 응력의 영역을 발생시킬 수 있다. 따라서, 그러한 시스템에서 전단력의 주요 공급원을 제어함으로써 포유동물 세포 배양 제조 규모증대 시스템 내의 세포 밀도 및 생존성을 유지할 수 있는 방법에 대한 필요가 존재한다.

[0052] 헨츨러(Henzler) (문헌 [Henzler, 2000, Particle stress in bioreactors, In Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Schepers, T. Ed. Springer-Verlag, Berlin] 및 콜로머(Colomer) 등 (문헌 [Colomer, J. et al. 2005. Experimental analysis of coagulation of particles under low-shear flow. Water Res. 39:2994])에 의해 제공된 방법에 따라, 회전하는 6-웰 접시 내의 벌크 유체의 유체 기계적 특성이 계산되었다. 무차원 응력은 난류 상수*(응집체 직경/콜모고로프(Kolmogorov) 마이크로스케일) 2 난류 지수와 동등하다. 전단 응력은 무차원 응력*유체 밀도*(동점도*전력 유입) $^0.5$ 와 동등하다. 전단 속도는 전단 응력/동점도와 동등하다. 전력 유입 및 콜모고로프 마이크로스케일의 계산을 위해, 레이놀드 수가 각각의 회전 비율에서 요구되며, (회전 비율*플라스크 직경) 2 /점도와 동등하다. 전력 유입 및 콜모고로프 마이크로스케일 둘 다는 레이놀드 수의 함수이며, 모든 전단 응력 및 전단 속도 계산은 회전 속도에 따라 다양하다.

[0053] 더욱이, 전단 응력 및 전단 속도는 무차원 응력의 함수이고, 이는 형성되는 응집체의 직경에 의존적이며, 그러므로 응집체에 의해 경험되는 전단 응력 및 속도는 회전에서 시간에 따라 증가할 것으로 예상된다. 계산 예는 100 내지 200 μm 의 응집체 직경 및 60 내지 140 rpm의 회전 속도에 대해 실시예 17에 나타낸다. 시간에 대한 벌크 유체에서의 평균 전단의 추정치를 제공하기 위해 이들 방법을 이용하였다. 그러나, 경계 효과로 인해 혈관 벽에서의 전단 응력이 가장 높을 것으로 예상된다. 벽 전단 응력을 추정하기 위해, 레이(Ley) 등은 6-웰 디쉬에서의 벽 전단 응력은 회선 반경*(밀도*동적 점도*(2π *회전 속도) 3) $^0.5$ 와 동등하다고 제안하였다. 이러한 접근법을 이용하여, 60 rpm 내지 140 rpm 범위의 회전 속도에 대해 벽 전단 응력을 계산하였으며, 이는 실시 예 18에 나타낸다. 벌크 유체에서의 응집체에 의해 경험되는 시간-평균 전단 응력과 달리, 벽에서 발생하는 전단 응력은 응집체 직경과는 관계가 없다는 점에 주목한다.

[0054] 배양 세포 밀도는 또한 조직 기능에 대해 중대한 인자이고, 2차원인 전통적인 조직 (예를 들어, 부착성 조직 구축물)에서 달성하고/거나 최적화하는 것이 어렵다. 분화에 대한 세포 밀도의 효과는 실시예 20에 더 상세히 기재되어 있다. 세포 응집체는 생체내 세포 밀도 및 입체형태를 더 정확하게 반영하는 조직화된 3차원 (3D) 건축물을 가정하여 이러한 제한을 극복할 수 있다. 결과적으로, 세포가 그의 의도된 구조를 달성하는데 걸리는 기간은 유의하게 감소되고/거나 더 일관되고 효율적이 될 수 있다. 더욱이, 3D 응집체 포맷에서 세포는 보다 최적으로 분화하고 기능할 수 있으며, 이는 이 건축물이 부착 배양보다 정상 생리상태를 더 가깝게 닮기 때문이다. 또한, 제조 방법에 수반된 기계적 곤란은 예를 들어, 부착 배양에서의 기계적 곤란과 비교하여 혼탁 배양물 중에 자유롭게 부유하고 있는 세포 응집체에 덜 손상을 준다.

[0055] 전형적인 제조-규모 혼탁 배양물은 또한 세포 밀도를 최대화하면서 세포 생존율을 유지시키는 방법으로서 배지의 연속식 관류를 이용한다. 이 문맥에서, 배지 교환은 부착 세포 및 혼탁된 응집체에 상이하게 영향을 미치는 배양물에 유체 전단을 부여한다. 고정 부착 세포는 배지가 세포 표면을 가로질러 접선으로 유동할 때 유체 전단 응력으로 처리된다. 대조적으로, 혼탁된 응집체는 응집체 표면을 가로질러 유의하게 더 적은 전단 응력을 경험하며, 이는 응집체가 적용된 전단력에 반응하여 텁블링에 자유롭기 때문이다. 연장된 전단 응력이 부착 ES 세포에 유해할 것이고, 혼탁된 응집체 포맷이 최적의 생존 및 기능에 바람직할 것으로 예상된다. 그러므로 만능 줄기 세포 및/또는 만능 줄기 세포로부터 유도된 다능 전구 세포의 생산을 위한 효율적인 제조 방법, 및 전단 속도 및 전단 응력과 관련된 상기 관찰한 역학에 대한 필요성에 기초하여, 본 발명은 혼탁액 포맷으로, 구체적으로 세포 응집체 혼탁액 포맷으로 만능 줄기 세포 및/또는 만능 줄기 세포로부터 유도된 다능 전구 세포를

생산하기 위한 최초의 제조 방법을 제공한다.

[0056]

본원에서 사용되는 "단일 세포 혼탁액" 또는 그의 등가물은 임의의 기계적 또는 화학적 수단에 의한 hES 세포 단일 세포 혼탁액 또는 hES-유래 단일 세포 혼탁액을 지칭한다. 1차 조직, 배양물 중 부착된 세포, 및 응집체로부터 단일 세포 혼탁액을 형성시키기 위해 세포 클러스터를 해리시키기 위한 여러 방법, 예를 들어 물리적 힘(기계적인 해리, 예컨대 세포 스크래퍼, 좁은 구멍 피펫을 통한 연화처리, 미세 바늘 흡인, 볼텍스 이해 및 강제 여과 내지 깨끗한 나일론 또는 스테인레스 스틸 메쉬), 효소(효소적 해리, 예컨대 트립신, 콜라겐나제, 아큐테이즈 등), 또는 상기 두 가지의 조합이 존재한다. 추가로, hESC의 단일 세포 해리를 지지할 수 있는 방법 및 배양 배지 조건은 멀티웰 플레이트 검정을 위한 확장, 세포 분류 및 제한 접종에 유용하고 배양 절차 및 클론 확장의 자동화를 가능하게 한다. 그러므로, 본 발명의 한 실시양태는 미분화된 만능 hES 세포 또는 분화된 hESC의 장기 유지 및 효율적인 확장을 지지할 수 있는 안정한 단일 세포 효소적 해리 hES 세포 또는 hES-유래 세포 배양 시스템을 제조하는 방법을 제공한다.

[0057]

본원에서 사용되는 "롤러 병" 또는 "롤링 병" 또는 그의 등가물은 그의 축에 대해 회전하도록 개조된 실린더형 용기를 지칭한다. 이를 용기는 예를 들어 코닝(Corning), 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) 및 다른 제조업체를 통해 판매되는 롤러 병, 및 또한 드럼, 배럴, 및 그의 측벽 위에서 회전될 수 있는 다른 병 유형 용기를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본원에 기재된 롤러 병은 실린더형이어야 하거나 원형 단면을 가져야 하는 것은 아니다. 이들은 예를 들어 일정한 폭의 비-원형의 닫힌 곡선일 수 있다. 한 실시양태에서, 곡선은 미국 특허 번호 제5,866,419호에 기재된 바와 같이 레루(Reuleaux) 삼각형 또는 등근 모서리를 갖는 레루 삼각형이며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 원형 단면 롤러 병은 무한한 수의 그러한 곡선이 존재하고 본 발명에 의해 고려되기 때문에 평활 회전을 제공하기 위한 유일한 형상 또는 기하학이 아니다. 그러나, 그러한 곡선은 일반적으로 산업에서 접하게 되지 않으며, 이는 병을 회전시키는데 사용되는 대부분의 기계가 곡선에 대해 수직으로 러닝하는 수평축이 고정 위치에서 유지되는 것을 요구하기 때문이고, 이는 비-원형 롤러에 대해서는 그러하지 않은데 이는 회전 동안 전후 번역 운동을 갖는 축을 갖기 때문이다. 다른 실린더형 롤러 병에서와 같이 통상적인 원형 운동 이외에 이 추가의 운동 또는 회전은 원형 롤러 병과 비교하여 기체 교환을 향상시킬 수 있다.

[0058]

전형적인 실린더형 롤러 병은 하단 벽, 상단 벽, 및 하단 벽과 상단 벽 사이에서 연장하는 실린더형 측벽을 포함한다. 상단 벽은 롤러 병의 내부에 대한 접근을 제공하는 개구부를 포함한다. 그러한 롤러 병의 내부 표면은 세포 상호작용 및/또는 부착을 위한 활성 표면을 제공한다. 이런 이유로, 문헌 [Oxford Dictionary of Biochemistry]는 롤러 병이 부착 세포의 단층의 배양을 위해 사용되는 실린더형 용기임을 제공한다. 실제로, 롤러 병은 많은 양의 세포, 예컨대 부착 세포를 성장시키는데, 또는 세포에 의해 분비되는 세포 부산물, 예컨대 제약 물질을 생산하는데 바람직하다. 롤러 병의 실린더형 측벽은 평활하거나 패턴화될 수 있고, 여기서 패턴화는 세포 성장 표면적을 증가시키고 병이 측벽의 축에 대해 회전시 병의 전체 내부 표면적으로 액체의 흐름을 촉진시키기 위해 하단 벽으로부터 상단 벽으로 실질적으로 연장한다.

[0059]

롤러 병의 단면 (원형 또는 비-원형)과는 관계없이, 액체 성장 배지는 롤러 병에 도입되고 그 내부에 함유된다. 병의 회전 움직임은 내부 표면을 액체 배지로 젖은 상태로 유지시키며, 이에 의해 세포의 성장을 촉진시킨다. 적절한 장치의 회전 롤러가 본 발명의 롤러 병을 회전시키는데 사용된다.

[0060]

롤러 병은 통상적으로 유리, 스테인레스 스틸 또는 투명한 플라스틱, 예컨대 폴리스티렌, 폴리우레탄, 폴리비닐 클로라이드, 폴리카르보네이트, 폴리올레핀, 예컨대 폴리프로필렌, 글리콜이 첨가된 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 에틸렌 글리콜-1,4, 시클로헥산 디메탄올 테레프탈레이트 코폴리에스테르 등으로 구축된다. 도립 현미경 상에 병을 위치시킴으로써 세포 성장을 모니터링할 수 있기 때문에 투명한 물질이 바람직하다.

[0061]

수동 및 자동화 롤러 병 시스템이 제약, 생화학 및 의학 분야에서 예컨대 세포 성장 및 감염, 이종 당단백질 제조, 백신 제조, 및 고밀도 식물 세포 배양을 위한 방법에서 40년 넘게 사용되어 왔다. 문헌 [Tanaka et al. 1983, Biotechnol. Bioeng. 25:2359]; [Tanaka 1987, Process Biochem. Aug., 106]; [Hong, et al. 1989, Biotechnol. Prog. 5:137]; [Elliot 1990, Bioprocess Tech. 10:207]; [Tsao 1992, Annals N.Y. Acad. Sci. 665:127]; [Pennell & Milstein 1992, J. of Immun. Meth. 146:43]; [Olivas et al., 1995, Immun. Meth. 182, 73 (1995)]; [Singhvi et al. 1996, Cytotechnology 22:79]; 및 [Kunitake et al. 1997, Biotechnology 52:3289]을 참조하며, 상기 문헌들은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 추가로, 세포 배양 생성물 (즉, 백신)의 산업적 규모 제조를 위해, 세포는 심지어 단위 작동 기반 시스템을 사용하는 경우에도 최종 성장기 동안 미세-담체 배양물로의 이동 전에 롤러 병에서 빈번하게 계대배양된다. 문헌 [Edy, 1984, Adv. Exp. Med.

Biol. 172:169]을 참조하며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0062] 지금까지, 부착 세포의 배양을 위한 롤러 병의 광범위한 사용은 여러 인자의 결과로 볼 수 있다. 과정은 하기에 따라 좌우된다: (i) 충분한 부피의 배지 또는 유체를 함유하고 축방향으로 회전되는 수평 실린더형 용기; 롤러 병 규모증대는 길이의 함수이기 때문에 규모증대 개발 또는 발명이 필요치 않으며, 산업을 위한 개발 일정 감소 및 신규한 생성물을 위한 시장으로의 더 빠른 도입에 이르게 하고; (ii) 롤러 병 시스템은 일정한 유체-기체 접촉을 허용하는데, 즉 축방향 회전으로 인해 회전할 때에 항상 적어도 병의 내부 표면을 코팅하는 유체 또는 배지의 박층이 존재하고; 이 층은 유체-기체 교환 증가를 허용하고, 병이 회전할 때에 상기 기체가 롤러 병의 하단에서 배지의 풀에 존재하는 세포로 다시 돌아가고; (iii) 1개 이상의 롤러 병이 전체 로트의 오염을 초래하는 것은 아니기 때문에, 대규모 배양에서 연장된 시간 동안 멸균 조건을 유지하는 것이 가능하고; (iv) 영양소 및 폐기물-생성물 수준의 정밀한 제어가 가능하고; (v) 세포의 직접 모니터링, 예를 들어 단계 1 내지 4 이후 세포의 효율적인 분화 및 적절한 세분화를 보장하기 위한 특정 세포 마커의 확인은 상대적으로 간단하다.

[0063] 3차원 세포 응집체를 배양하기 위한 롤러 병 또는 롤러 유형 용기의 사용에 제한되는 것을 원치 않으나, 예를 들어 롤러 병 또는 드럼 상에서 회전하는 실린더형 유형의 용기에 의해 생성되는 운동을 이용하지 않으나 본 발명의 세포 응집체를 제조하기 위한 다른 수단이 존재하는 것으로 의도된다. pPSC를 응집시키는데 사용되는 운동의 유형은 일반적으로 예를 들어 더 많은 층류를 생성하기 위해 용기 또는 챔버를 에어로졸화함으로써 생성될 수 있다. 운동은 또한 본원에 기재된 롤러 병으로 달성되는 바와 유사한 운동을 생성하기 위해 유체 배지 또는 심지어 세포 그 자체의 유입 및 유출을 돋는 유입구 및 유출구 포트를 가짐으로써 생성될 수 있다. 운동은 또한 하나 이상의 유량 분포기 또는 유량 분포기들의 조합의 사용으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 그러한 유량 분포기는 챔버 내의 유체 또는 배지의 유량을 분포시키고 이에 의해 3차원 세포 응집체의 연속적 균일한 혼합물을 생성하는 배플을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 유량 분포기는 하나 이상의 디플렉터 판, 분포 채널 및/ 또는 유량 채널의 조합일 수 있으며, 이는 롤러 병 유형, 실린더형 용기 또는 챔버에서 필연적 발생 없이 롤러 병에서 발견되는 바와 유사한 유체 움직임을 생성한다. 그러므로, 난류가 아닌 방식으로 유체 운동을 생성하는 대안적 수단은 세포 충돌을 촉진하고 세포를 서로 부착하게 하고 본원에 기재된 바와 같은 세포 응집체를 형성시키기에 충분한 낮은 전단력을 아직 생성한다.

[0064] 여전히, 롤러 병에서 성장하는 부착 또는 정착 의존성 세포의 특정 특성은 그의 단점을 갖는다. 예를 들어, 부착 세포 성장은 본래 세포가 부착할 실질적인 표면적을 필요로 하고, 롤러 병은 성장을 위해 이용가능한 표면적으로 제한된다. 롤러 병에서의 통상의 혼합 방법은 모든 목적, 예를 들어 세포 식재 또는 접종, 세포 성장 및/ 또는 바이러스 전파 및 확장을 위해 균일한 비율로 한 방향으로의 회전이다. 부착 및 정착 의존성 세포를 배양하기 위한 대부분의 롤러 병 방법의 표준 회전 빈도수는 약 0.125 rpm 내지 5 rpm이다. 이들 배양을 위해, 용기 벽에 대한 부착 후에만 세포가 후속적으로 증식하고 세포 시트를 형성할 수 있기 때문에, 세포가 가능한 한 급속하게 롤러 병의 측면과 접촉하게 되는 것이 중요하다. 용기의 내벽에 대한 느린 세포 부착은 세포의 낮은 생존율 및/ 또는 불균질한 식재를 초래하고, 이런 이유로 롤러 병 표면 상의 불균질한 성장을 초래한다. 더욱이, 세포는 병이 회전할 때에 침수된 표면-부착된 세포 시트로부터 적절한 영양소 (예를 들어 산소)를 얻거나 독소 (예를 들어 이산화탄소)를 적절히 제거하지 않기 때문에, 비효율적인 혼합은 세포 성장을 제한한다. 흥미롭게도, 이들 단점은 혼탁액 중 분화가능한 만능 세포의 응집, 성장, 확장 및 분화를 위해 롤러 병을 사용하는데 있어서 중요하지 않다.

[0065] 상기 기재된 특성 및 추가로 6-웰 단 등에서 hES 세포 응집체를 제조하는 방법의 출원인 자신의 개시내용을 고려하여, 당업자는 만능 줄기 세포 응집체를 제조하기 위한 롤러 병의 사용으로 돌아가지 않을 것이다. 문헌 [Schulz et al. 2012, Stem Cells 7: 1-17, e37004] 및 미국 특허 번호 제8,153,429호 및 제8,008,075호를 참조하며, 상기 문헌들은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다. 예를 들어, 상기 문헌 [Schulz et al. 2012]은 만능 줄기 세포가 원형 또는 방사형 움직임 또는 운동 또는 회전을 이용하여 효과적으로 응집될 수 있다고 교시하며, 상기 움직임 또는 운동 또는 회전은 중앙 볼텍스에 걸쳐 부여되고, 세포를 배양 용기의 중간에서 더 높은 국부 밀도로 끌어당기고, 예를 들어 세포를 6-웰 단의 웰의 중심 또는 3각 플라스크의 중심 또는 생물반응기의 중심으로 회전성 포맷에 기초하여 끌어당긴다. 본래 롤러 병이 그의 측벽 상으로 회전하고 그의 기저 상에서 회전하지 않기 때문에, 이 방사형 볼텍스는 롤러 병에서 달성할 수 없으며, 이런 이유로 중앙 볼텍스 운동을 포함하는 시스템으로부터 포함하지 않는 시스템으로 이동시키는 방법, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 롤러 병은 직관할 수 없다.

[0066] 본 출원인은 hES 세포의 요동, 교반 및 원심분리 연구를 포함하는 다른 유형의 운동을 이용하는 정치 배양의 연구를 수행하였고, 이들 유형의 운동은 hES 세포 응집체 또는 분화가능한 세포 응집체를 형성시킬 수 없었다.

추가로, 이들 조건 하에 형성된 이들 hES 또는 hES 세포-유래 응집체는 생체내에서 기능성 글루코스 반응형 세포 유형을 발생시키지 않았으며, 이는 PEC의 임의의 성공적인 제조 방법의 궁극적 시험이다. 상기 문헌 [Kroon et al. 2008] 및 상기 문헌 [Schulz et al. (2012)]을 참조한다. 그래서, 오직 움직임 및 운동 단독이 만능 줄기 세포 또는 hES 세포 혼탁액 응집체 또는 분화가능한 세포 응집체를 형성하기에 충분하지 않기 때문에 그렇다고 말할 수 없다. 이들 연구 (데이터는 나타내지 않음)는 오직 유체 움직임 및 그러한 움직임으로 생성된 힘이상의 것이 단일 세포 만능 줄기 세포의 안정한 세포-세포 응집체로의 전이를 초래하는 세포 응집체 형성에 필수적인 부착성 접촉을 촉진한다는 것을 나타내었다.

[0067] 상기 간략히 언급된 바와 같이, 롤러 병의 회전은 중앙 볼텍스에 대해 발생하는 6-웰 단, 3각 플라스크 등의 회전과 매우 상이하다. 롤러 병에서, 배양 부피의 대부분은 병이 그의 측벽 상에서 회전시 병의 하단에 남아 있고, 병이 회전할 때에 유체 또는 배양 배지의 박층이 내부 병 표면을 코팅한다. 이 유체 박층은 병이 회전할 때에 기체 교환을 증가시키고, 그러므로 전반적으로 배양 배지에 대한 O₂ 수준을 증가시킨다; 즉 배양 배지의 박층이 배양 배지의 대부분이 잔류하고 이를 함유하는 병의 하단으로 되돌아가면, 이는 O₂의 양을 증가시킨다. 이어서, 이 운동이 특히 부착 세포에 대한 당업계의 표준인 매우 저속 (예를 들어 0.125 내지 5 rpm)에서 회전시 충분한 세포-대-세포 접촉 또는 충돌을 허용하면서 동시에 영장류 만능 줄기 세포 (pPSC) 응집체를 형성시키기에 충분한 낮은 전단력을 유지시키고 분화가능한 세포 응집체를 단독으로 분화시킨다는 것을 직관할 수 없다.

[0068] 세포를 응집, 성장, 계대배양, 확장 및 분화시키기 위해 롤러 병을 사용하는 것은 2개의 포맷 간의 상이한 회전 속도 때문에 6-웰 단, 3각 플라스크, 생물반응기와는 또한 상이하다. 6-웰 단, 3각 플라스크, 생물반응기 등은 예를 들어 약 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 및 120 rpm의 더 높은 회전 속도를 이용하며, 이는 적어도 세포 응집체가 배양물 중에 클러스터 또는 더 큰 세포괴를 뭉치거나 형성시키는 것을 방지할 목적으로 필요로 된다. 뭉쳐진 세포 클러스터 (예를 들어, 300 μ m 이상의 큰 응집체)는 더 작고 (약 100 내지 200 μ m) 크기가 균일한 거의 구형의 세포 응집체와 혼동되지 않는다는 것을 주목한다. 대조적으로, 롤러 병에서 pPSC의 응집, 성장, 계대배양, 확장 및 분화는 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10 rpm의 상대적으로 낮은 회전 속도에서 수행된다. 더 낮은 이들 회전 속도는 6-웰 단, 3각 플라스크, 생물반응기 등에서 발생하는 동일한 정도의 전단력을 생성하지 않으며, 출원인의 이전 경험 (상기 문헌 [Schulz et al. 2012] 참조)을 고려하여, 세포 응집체 형성이 이들 조건 하에 성공할 것이란 것을 예상하지 못하였다.

[0069] 다른 세포 배양 용기보다 만능 줄기 세포를 응집, 성장, 계대배양, 확장 및 분화시키기 위해 롤러 병을 사용하는 것의 장점은, 가장 작은 롤러 병에서 최적화되면 방법은 추가의 실질적인 발명 없이 더 큰 병에서 매우 유사하게 작용할 것이란 점이다. 예를 들어, 동일한 표준 단면을 가지나 실질적으로 더 큰 용량을 갖는 더 긴 병을 이용함으로써, 또는 병의 어레이를 이용함으로써, 전체 배양괴는 동일한 병 직경, 직경/부피 비 및 회전 속도를 이용하여 규모조정될 수 있다. 롤러 병 길이의 증가 (규모조정)는 세포 응집 또는 분화 과정에 영향을 미치지 않는다. 그래서, 490 cm² 롤러 병 (캡을 포함하여 직경 11.12 cm, 길이 17.30 cm)으로부터 850 cm² 롤러 병 (캡을 포함하여 직경 11.63 cm, 길이 27.36 cm)으로 1750 cm² 롤러 병 (캡을 포함하여 직경 11.73 cm, 길이 53.16 cm) 또는 그 이상으로의 세포 과정 또는 제조의 규모조정은 본원에 기재된 것 이외의 변형을 실질적으로 또는 유의하게 포함하지 않는다.

[0070] 적어도 상기 이유로, 롤러 병에서의 세포 제조의 규모조정성은 6-웰 단, 3각 플라스크, 생물반응기 등의 회전 플랫폼 시스템과 상이하다. 예를 들어, 1 x 10⁶개 세포/mL의 1L 만능 줄기 배양물을 달성하기 위해, 약 삼십 (30) 개의 6-웰 단이 필요로 된다. 또 다른 방식으로 말하면, 팔십(80) 개의 6-웰 단 (전체 480개의 웰)을 이용하는 대신에, 당업자는 오직 4개의 850 cm² 롤러 병을 필요로 할 것이다. 당업자는 롤러 병 배양에 필요한 더 적은 조작 및 노동이 제조에 있어서의 개선이라는 것을 인식할 것이다. 또한, 상이한 규모로 회전 플랫폼을 사용하는 경우 응집을 달성하기 위해, 부피, 속도 및 회전 반경의 조정이 반드시 이루어져야 한다. 예를 들어 코니칼 플라스크에서의 영장류 PSC 응집이 달성될 수 있으나, 상대적으로 높은 회전 속도, 약 150 rpm에서 최선으로 발생하고, 이는 세포 사멸 증가 (데이터 나타내지 않음)를 초래하는 너무 큰 난류 및 전단력을 유발시킨다. 병 또는 단지(jar)를 요동 플랫폼 상에 위치시키는 것만으로는 본원에 기재된 세포 혼탁액 응집체 (데이터 나타내지 않음)를 생성시키지 않는다. 요동 운동은 적절한 세포-세포 접촉 및 부착을 지지하기 위한 적합한 유체 운동을 생성시키지 않으며, 잠재적으로 너무 큰 난류 및 전단력을 생성시켜, 세포 사멸 증가를 유발한다. 유사하게, 정사각형 형상의 병 및 15 cm 유리 단지는 유사한 이유로 pPSC 응집체 형성을 규모증대시키기에는 부적합한 배양 용기이다 (데이터 나타내지 않음). 추가로, 단지 세포-대-세포 접촉 단독은, hES 세포의 단일 세포 혼탁액을 원심분리한 후 세포 펠릿이 회수될 때 세포 응집체가 관찰되지 않았기 때문에 (데이터 나타내지 않음)

pPSC 응집체가 형성되게 하지 않는다. 그러므로, 효율적이고 일관된 세포 응집 (일관된 응집체 직경 포함)을 지지하는 적절한 유체 운동을 갖는 진정으로 규모조정가능한 시스템을 발견하는 것은 전혀 간단하거나 통상적이지 않으며, 당업자가 예측하거나 예상하는 것보다 더 어렵다. 사실은, 부착 및 정착 의존성 세포 유형의 큰 규모증대 배양을 위해 전통적으로 사용되어 왔던, 30배 이하의 속도 감소와 결합된 롤러 병이 본원에 기재된 바와 같이 pPSC 응집체의 제조 및 분화에 적합한 조건을 제공한다는 것은 놀라운 일이다.

[0071] 본원에서 사용되는 용어 "접촉시키는" (즉, 세포, 예를 들어 분화가능한 세포를 화합물과 접촉시키는)은 시험관내에서 화합물 및 세포를 함께 인큐베이션하는 것 (예를 들어, 배양에서 세포에 화합물을 첨가하는 것)을 포함하는 것으로 의도된다. 용어 "접촉시키는"은 대상체에서 자연적으로 발생할 수 있는 ErbB3 리간드 및 임의로 TGF- β 패밀리의 구성원을 포함하는 제한 세포 배지에 대한 세포의 생체내 노출 (즉, 천연 생리학적 과정의 결과로 발생할 수 있는 노출)을 포함하는 것으로 의도되지 않는다. ErbB3 리간드 및 임의로 TGF- β 패밀리의 구성원을 포함하는 제한 세포 배지와 세포를 접촉시키는 단계는 임의의 적합한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 세포는 부착 배양물 또는 혼탁 배양물 중에서 처리될 수 있다. 제한 배지와 접촉되는 세포는 세포를 안정화시키거나 세포를 분화시키기 위해 세포 분화 환경으로 추가로 처리될 수 있는 것으로 이해된다.

[0072] 본원에서 사용되는 용어 "분화하다"는 이로부터 유도된 세포 유형보다 더 분화된 세포 유형의 생성을 지칭한다. 그러므로 상기 용어는 부분적으로 및 말단에 분화되는 세포 유형을 포함한다. hESC로부터 유도된 분화 세포는 일반적으로 hES-유래 세포 또는 hES-유래 세포 응집체 배양물, 또는 hES-유래 단일 세포 혼탁액, 또는 hES-유래 세포 부착 배양물 등으로 지칭된다.

[0073] 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로"는 상당한 범위 또는 정도를 지칭하며, 예를 들어 이 문맥에서 "실질적으로 유사한"은 또 다른 방법과 상당한 범위 또는 정도로 유사하거나 상당한 범위 또는 정도로 이와 상이한 한 방법을 기술하는데 사용된다. 그러나, 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로 존재하지 않는", 예를 들어 "실질적으로 존재하지 않는" 또는 "오염물이 실질적으로 존재하지 않는" 또는 "혈청이 실질적으로 존재하지 않는" 또는 "인슐린 또는 인슐린 유사 성장 인자가 실질적으로 존재하지 않는" 또는 그의 등가물은 용액, 배지, 보충제, 부형제 등에 혈청, 오염물 또는 그의 등가물이 적어도 98%, 또는 적어도 98.5%, 또는 적어도 99%, 또는 적어도 99.5%, 또는 적어도 100% 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 한 실시양태에서, 혈청을 함유하지 않거나, 또는 100% 무-혈청이거나 또는 혈청이 실질적으로 존재하지 않는 제한 배양 배지가 제공된다. 역으로, 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로 유사한" 또는 그의 등가물은 조성물, 과정, 방법, 용액, 배지, 보충제, 부형제 등이 본원의 명세서에 사전에 기재된 것 또는 그 전문이 본원에 포함된 사전에 기재된 과정 또는 방법과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 유사하다는 것을 의미한다.

[0074] 본 발명의 특정 실시양태에서, 용어 "풍부한"은 대략 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 초과의 목적 세포 계통을 함유하는 세포 배양물을 지칭한다.

[0075] 본원에서 사용되는 용어 화합물의 "유효량" 또는 그의 등가물은 공급자 세포의 부재하에 및 혈청 또는 혈청 대체물의 부재하에 1개월 초과 동안 배양물 중에 분화가능한 세포의 안정화를 수행하기 위한, 제한 배지의 나머지 성분의 존재하에 충분한 화합물의 농도를 지칭한다. 이 농도는 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0076] 본원에서 사용되는 용어 "발현하다"는 분자를 발현하지 않는 세포에서보다 분자를 발현하는 세포에서 분자의 수준이 측정가능하게 더 높도록 하는 세포에서의 폴리뉴클레오티드의 전사 또는 폴리펩티드의 번역을 지칭한다. 분자의 발현을 측정하는 방법은 당업자에게 익히 공지되어 있으며, 제한 없이 노던 블로팅, RT-PCR, 계내 혼성화, 웨스턴 블로팅 및 면역염색을 포함한다.

[0077] 세포, 세포주, 세포 배양물 또는 세포 집단을 지칭할 때 사용되는 용어 "단리된"은 세포, 세포주, 세포 배양물 또는 세포 집단이 시험관내에서 배양될 수 있도록 세포의 천연 공급원으로부터 실질적으로 분리된 것을 지칭한다. 또한, 용어 "단리하는"은 둘 이상의 세포의 군 중에서 하나 이상의 세포의 물리적 선택을 지칭하는데 사용되며, 여기서 세포는 세포 형태 및/또는 다양한 마커의 발현에 기초하여 선택된다.

[0078] 본 발명은 다음의 발명의 바람직한 실시양태의 상세한 설명 및 본원에 포함된 실시예를 참조하여 보다 쉽게 이해될 수 있다. 그러나, 본 조성물 및 방법을 개시하고 기재하기 전에, 본 발명이 특정한 핵산, 특정한 폴리펩티드, 특정한 세포 유형, 특정한 숙주 세포, 특정한 조건 또는 특정한 방법 등으로 제한되지 않으며, 이들은 이와 같이 물론 변화될 수 있고, 수많은 변형 및 변화가 당업자에게 명백할 것이라는 것이 이해되어야 한다.

[0079] 클로닝, DNA 단리, 증폭 및 정제에 관한 표준 기술, DNA 리가제, DNA 폴리미라제, 제한 엔도뉴클레아제 등이 관여하는 효소 반응에 관한 표준 기술, 및 다양한 분리 기술은 공지되어 있으며 당업자가 통상 이용하는

기술이다. 다수의 표준 기술은 문헌 [Sambrook et al. 1989 "Molecular Cloning", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York]; [Maniatis et al. 1982 "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York]; [Wu (ed.) 1993 Meth. Enzymol. 218, Part I]; [Wu (ed.) 1979 Meth. Enzymol. 68]; [Wu et al. (eds.) 1983 Meth. Enzymol. 100 and 101]; [Grossman and Moldave (eds.) 1980 Meth. Enzymol. 65]; [Miller (ed.) 1972 "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York]; [Old and Primrose, 1981 "Principles of Gene Manipulation", University of California Press, Berkeley]; [Schleif & Wensink, 1982 "Practical Methods in Molecular Biology"]; [Glover (ed.) 1985 "DNA Cloning" Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK]; [Hames and Higgins (eds.) 1985 "Nucleic Acid Hybridization", IRL Press, Oxford, UK]; 및 [Setlow and Hollaender 1979 "Genetic Engineering: Principles and Methods", Vols. 1-4, Plenum Press, New York]에 기재되어 있다. 사용되는 약어 및 명명법은 당해 분야 및 본원에서 언급되는 것과 같은 전문 잡지에서 통상 사용되는 표준인 것으로 간주된다.

[0080] 본 발명은 기본 염 영양 용액 및 유효량의 ErbB3 리간드를 포함하는 조성물 및 방법에 관한 것으로, 상기 조성물에는 본질적으로 혈청이 존재하지 않는다. 본 발명의 조성물 및 방법은 세포, 특히 분화가능한 세포의 배양에 유용하다. 분화가능한 세포를 배양하는 동안 여러 시점에 다양한 성분들을 상기 세포 배양물에 첨가하여 배지가 본원에 기재된 것 이외의 다른 성분들을 함유할 수 있게 할 수 있는 것으로 이해된다. 그러나, 배양물의 제조 동안 또는 분화가능한 세포의 배양 동안 적어도 한 시점에서, 규정된 배지는 기본 염 영양 용액 및 ErbB2-유도된 티로신 키나제를 활성화하기 위한 수단을 포함하는 것으로 고려된다.

[0081] 본원에 기재된 기본 염 영양 용액을 사용하여 세포 성장 및 hESC의 생존력을 유지시키지만, 본 발명의 다른 실시양태에서는 만능성을 유지하기 위한 또는 만능 세포의 분화를 위한 또 다른 줄기 세포 배양 배지, 예컨대 이들로 한정되지는 않지만, KSR (인비트로젠(Invitrogen)), 또는 무-이종물질(xeno-free) KSR (인비트로젠), 스템프로(StemPro)® (인비트로젠), mTeSR™1 (스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies)) 및 HEScGRO (밀리포어(Millipore)), DMEM 기초 배지 등이 실질적으로 유사한 방식으로 작동한다.

[0082] 또 다른 실시양태에서, hESC는 세포외 매트릭스 단백질 (ECM), 예를 들어 매트리겔의 부재 및/또는 존재 하에 본원에 기재된 규정된 배지에서 배양된다. ECM의 부재 하에 배양된 인간 ES 세포는 약 0.5 내지 10% 인간 혈청 (hS), 또는 300K 및/또는 100K 컷-오프(cut-off) 스피in 칼럼 (마이크로콘(Microcon))으로부터의 hS 보유물 분획을 함유한다. hES 세포 응집체 혼탁액은, 37°C에서 약 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간 및 24시간 동안 hESC를 hS 또는 hS 보유물 분획을 함유하는 배지에서 직접 인큐베이션하거나; 또는 hS 또는 hS 보유물 분획을 갖는 배양 용기를 인큐베이션한 후에 생성될 수 있다. hS 또는 hS 보유물 분획 함유 배지 중의 hESC에 대한 평판 효율은, PCT/US2007/062755에 기재된 바와 같이 DC-HAIF에서 배양된 hESC 또는 ECM으로서 매트리겔™ 또는 다른 유사한 매트릭스를 사용하는 DC-HAIF 배지에서 배양된 hESC에서 관찰된 것과 유사하다. 실질적으로 혈청을 함유하지 않은 규정된 배지에서 hESC를 배양하는 방법은 그의 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 출원 제11/8875,057호 (2007년 10월 19일 출원, 발명의 명칭 {METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDER-FREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM})에 기재되어 있다.

[0083] 또 다른 실시양태에서, hES 세포 응집체 혼탁액을, 실질적으로 혈청이 존재하지 않고 추가로 외인성 추가된 섬유모세포 성장 인자 (FGF)가 없는 배지에서 배양하였다. 이는, 혈청은 없지만 FGF를 비롯하여 외인성 추가된 성장 인자를 함유하는 배지에서 hESC를 배양하는 것을 필요로 하는 미국 특허 제7,005,252호 (Thomson(톰슨))와 구별된다.

[0084] 세포 조절은 막을 가로지는 세포외 신호 전달을 통해 수행될 수 있고, 이어서 이는 세포 내부에서 생화학적 경로를 조정한다. 단백질 인산화는, 세포내 신호가 분자에서 분자로 전달되어 최종적으로 세포 반응을 일으키는 하나의 과정을 나타낸다. 이러한 신호 전달 캐스케이드는 고도로 조절되며, 포스파타제 뿐만 아니라 여러 단백질 키나제의 존재에 의해 입증되는 바와 같이 종종 중복된다. 인간에서 단백질 티로신 키나제는 당뇨병, 암을 비롯한 수많은 질환 상태의 발병에서 상당한 역할을 하며, 또한 다양한 선천성 증후군과 관련이 있는 것으로 알려져 있음이 보고된 바 있다. 세린 트레오닌 키나제, 예를 들어 Rho 키나제는 억제시 당뇨병, 암, 및 다양한 염증성 심혈관 장애 및 AIDS를 비롯한 인간 질환의 치료와 관련성을 가질 수 있는 한 부류의 효소이다. 지금까지 확인/고안된 대다수의 억제제는 ATP-결합 부위에서 작동한다. 이러한 ATP-경쟁적 억제제는 ATP-결합 부위의 보다 불량한 보존 영역을 표적으로 하는 그의 능력으로 인해 선택성을 나타낸다.

[0085] 작은 GTP 결합 단백질의 Rho 키나제 패밀리는 Rho A-E 및 G, Rac 1 및 2, Cdc42, 및 TC10을 포함한 10종 이상

의 구성원을 함유한다. 억제제는 종종 ROK 또는 ROCK 억제제로 언급되며, 이는 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. RhoA, RhoB 및 RhoC의 이펙터 영역은 동일한 아미노산 서열을 갖고, 유사한 세포내 표적을 갖는 것으로 여겨진다. Rho 키나제는 Rho의 주요 하류 매개인자로 작동하며, α (ROCK2) 및 β (ROCK1)의 2가지 이소형으로 존재한다. Rho 키나제 패밀리 단백질은 그의 N-말단 도메인에 촉매 (키나제) 도메인, 그의 중간 부분에 코일드-코일 (coiled-coil) 도메인 및 그의 C-말단 도메인에 추정 플렉스트린-상동성 (PH) 도메인을 갖는다. ROCK의 Rho-결합 도메인은 코일드-코일 도메인의 C-말단 부분에 위치하고, Rho의 GTP-결합된 형태의 결합은 키나제 활성을 향상시킨다. Rho/Rho-키나제-매개 경로는 안지오텐신 II, 세로토닌, 트롬빈, 엔도텔린-1, 노르에피네프린, 혈소판-유래 성장 인자, ATP/ADP 및 세포외 뉴클레오티드, 및 우로텐신 II를 비롯한 수많은 효능제에 의해 개시되는 신호 전달에서 중요한 역할을 한다. 그의 표적 이펙터/기질의 조절을 통해 Rho 키나제는 평활근 수축, 액틴 세포골격 조직화, 세포 부착 및 운동성 및 유전자 발현을 비롯하여 다양한 세포 기능에서 중요한 역할을 한다. Rho 키나제 단백질은 동맥경화증의 발병기전과 연관이 있는 것으로 알려진 다수의 세포 기능을 매개하는 역할을 하므로, 이 키나제의 억제제는 또한 다양한 동맥경화성 심혈관 질환의 치료 또는 예방에 유용하고, 아테로스동맥경화증으로 진행되는 것으로 여겨지는 내피 수축 및 내피 투과성의 향상에 관여할 수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 실시양태에서, 세포 생존을 촉진 및/또는 지지하는 작용제, 예를 들어 Rho-키나제 억제제 Y-27632, 파수딜, 및 H-1152P 및 ITS (인슐린/트랜스페린/셀레늄; 갑코)를 다양한 세포 배양 배지에 첨가한다. 이러한 세포 생존 작용제는 부분적으로 해리된 hES 세포 또는 hES-유래 배양물, 예를 들어 전장 내배엽, 체장 내배엽, 체장 상피, 체장 전구 집단 등, 특히 해리된 체장 내배엽 및 체장 전구 집단의 재결합을 촉진함으로써 기능한다. hES 또는 hES-유래 세포의 생존 증가는, 세포가 (세포외 매트릭스의 존재 또는 부재, 혈청의 존재 또는 부재, 공급자의 존재 또는 부재 하에) 혼탁액 중의 세포 응집체로부터 생성되었는지 또는 부착 플레이트 배양물로부터 생성되었는지와 무관하게 얻어졌다. 이들 세포 집단의 생존 증가는 세포-분별장치를 이용한 정제 시스템을 용이하게 하면서 개선시키고, 이에 따라 개선된 세포 회수를 가능하게 한다. 또한, Rho 키나제 억제제, 예컨대 Y27632의 사용은 해리된 단일 세포를 연속 계대배양하는 동안 또는 초저온 보존으로부터 그의 생존을 촉진시켜, hES-유래 세포 유형의 팽창을 가능하게 할 수 있다. Rho 키나제 억제제, 예컨대 Y27632는 hES 및 hES-유래 세포 배양에 대해 시험되었지만, Rho 키나제 억제제는 다른 세포 유형, 예를 들어 일반적으로, 이들로 한정되지는 않지만, 장, 폐, 흉선, 신장을 포함한 상피 세포, 및 또한 색소 망막 상피와 같은 신경 세포 유형에 적용될 수 있다.

[0086] 본원에서 사용된 용어 "분화가능한 세포"는 적어도 일부 성숙 세포로 분화될 수 있거나, 또는 적어도 일부 성숙 세포로 분화될 수 있는 세포의 분화에 참여, 예를 들어 다른 세포와 융합할 수 있는 세포 또는 세포 집단을 기술하는데 사용된다. 본원에서 사용된 "일부 성숙 세포", "전구 세포", "미성숙 세포", "전구체 세포", "다능 세포" 또는 그의 동의어는 또한 말단 분화된 세포, 예를 들어 완전 내배엽 세포, PDX1-음성 전장 내배엽 세포, PDX1-양성 체장 내배엽 세포 (추가로 PDX1-양성 체장앞 내배엽 세포 및 PDX1-양성 체장 내배엽 정단(tip) 세포를 포함함)를 포함한다. 이들 모두는 동일한 장기 또는 조직으로부터의 성숙 세포의 표현형, 예컨대 형태 또는 단백질 발현 중 하나 이상의 특성을 나타내는 세포이지만, 하나 이상의 다른 세포 유형으로 추가 분화될 수 있다. 예를 들어, 정상 성숙 간세포는 전형적으로 특히 알부민, 피브리노겐, 알파-1-항트립신, 프로트롬빈 응고 인자, 트랜스페린과 같은 단백질, 및 시토크롬 P-450과 같은 해독 효소 등을 발현한다. 따라서, 본 발명에서 정의된 "일부 성숙 간세포"는 알부민 또는 또 다른 1종 이상의 단백질을 발현하거나, 또는 정상 성숙 간세포의 외형 또는 기능을 취하기 시작할 수 있다.

[0087] 크기 및 형상이 둘 다 다양할 수 있는, 이전에 공지된 방법으로 생성된 세포 응집체와는 대조적으로, 본원에 기재된 세포 응집체 및 방법은 좁은 크기 및 형상 분포를 가지며, 즉, 세포 응집체는 크기 및/또는 형상이 실질적으로 균일하다. 세포 응집체의 크기 균일성은 분화 성능 및 배양의 균질성에 있어 매우 중요하다. 응집체에 대한 기초 질량 수송 분석을 적용하면, 큰 응집체의 중심으로의 산소 및 영양분의 확산은 투과성이 동일하다고 가정시 보다 작은 응집체로의 확산에 비해 느릴 것으로 예상된다. 응집된 ES 세포의 체장 계통 세포로의 분화는 특정한 성장 인자의 시간적 적용에 따라 달라지므로, 상이한 직경의 응집체 혼합물을 갖는 배양물은 균일한 (크기 및 형상) 세포 응집체 배양물에 비해 비-동기화될 수 있다. 이러한 세포 응집체 혼합물은 이종성을 유발하고, 불량한 분화 성능을 초래하여 궁극적으로 대규모 제조 및 생산에 적용 불가능해질 수 있다. 본원에서 사용된 세포 응집체는 다양한 형상, 예를 들어 특히 구형, 실린더형 (바람직하게는 동일한 높이 및 직경을 가짐) 또는 막대형일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 다른 형상의 응집체가 사용될 수 있지만, 일반적으로 세포 응집체는 구형 또는 실린더형인 것이 바람직하다. 또 다른 실시양태에서, 세포 응집체는 구형이고, 실질적으로 크기 및 형상이 균일하다. 예를 들어, 세포 응집체의 크기가 상이하고 균일하지 않다면, 세포를 신뢰성 있게 제조하고 이에 대해 대규모 공정을 수행하는 것이 어려울 것이다. 따라서, 본원에서 사용된 어구 "실질적

으로 균일한" 또는 "크기 및 형상이 실질적으로 균일한" 또는 그의 동의어는 응집체의 균일성의 범위가 약 20% 이하임을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 응집체의 균일성의 범위는 약 15%, 10% 또는 5% 이하이다.

[0088] 응집체 당 정확한 세포 수는 중요하지 않지만, 각각의 응집체의 크기 (이에 따른 응집체 당 세포 수)는 중심 세포로 확산되는 산소 및 영양분의 용량에 의해 제한되고, 또한 상기 수는 세포 유형 및 세포 유형의 영양 요건에 따라 달라질 수 있다는 것을 당업자는 알 것이다. 세포 응집체는 응집체 당 최소 수의 세포 (예를 들어, 2 또는 3개의 세포)를 포함할 수 있거나, 또는 응집체 당 수백 또는 수천개의 세포를 포함할 수 있다. 전형적으로, 세포 응집체는 응집체 당 수백 내지 수천개의 세포를 포함한다. 본 발명의 목적을 위해, 세포 응집체의 크기는 전형적으로 약 50 마이크로미터 내지 약 600 마이크로미터이지만, 세포 유형에 따라 그 크기는 상기 범위 미만이거나 초과일 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 응집체의 크기는 약 50 마이크로미터 내지 약 250 마이크로미터, 또는 약 75 내지 200 마이크로미터이고, 바람직하게는 이들 크기는 약 100 내지 150 마이크로미터이다. 대조적으로, 혼탁액에서 발생할 수 있는 실린더형 또는 비-구형 세포 응집체는 단축 및 장축 (예를 들어, X, Y 및 Z)과 같이 직경이 동일하지 않은 응집체이다. 이러한 비-구형 세포 응집체는 직경 및 높이가 약 500 마이크로미터 내지 600 마이크로미터로, 크기가 커지는 경향이 있다. 그러나, 본원에 기재된 방법에서, 이들 비-구형 hES 세포 응집체는, 아직 분화되지 않은 경우 분화가 개시되면 구형이 된다. 비-구형 세포 응집체에는, 이들로 한정되지는 않지만, 실린더형 및 입방형 세포 응집체가 포함되지만, 크기 및 형상은 여전히 균일하다.

[0089] 여러 세포 유형이 본원에 기재된 세포 응집체를 형성하는데 이용될 수 있다. 일반적으로, 세포 유형의 선택은 조작될 3차원 구축물의 유형 (예를 들어, 췌장, 간, 폐, 신장, 심장, 방광, 혈관 등을 비롯한 다양한 장기 구조)에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 3차원 구조가 췌장인 경우, 세포 응집체는 유리하게는 췌장에서 통상 발견되는 세포 유형 또는 유형들 (예를 들어, 내분비 세포, 예컨대 인슐린, 글루카곤, 그렐린, 소마토스타틴 유형 세포, 및 또한 내피 세포, 평활근 세포 등)을 포함할 것이다. 당업자는 목적하는 3차원 조직 또는 장기의 유형에 기초하여 세포 응집체에 적절한 세포 유형을 선택할 수 있다. 적합한 세포 유형의 비제한적이 예에는 특히 줄기 세포 (예를 들어, 성인 및 배아), 수축 또는 근육 세포 (예를 들어, 가로무늬근 세포 및 평활근 세포), 신경 세포 (예를 들어, 신경교, 수지상 및 뉴런), 결합 조직 (예컨대, 골, 연골, 골 형성 세포 및 연골 세포로 분화하는 세포, 및 럼프 조직), 실질 세포, 상피 세포 (예컨대, 공동 및 혈관 또는 통로에서 내충을 형성하는 내피 세포, 외분비 상피 세포, 상피 흡착 세포, 각화 상피 세포 (예를 들어, 각질세포 및 각막 상피 세포), 세포외 매트릭스 분비 세포, 점막 상피 세포, 신장 상피 세포, 폐 상피 세포, 유방 상피 세포 등), 및 미분화 세포 (예컨대, 배아 세포, 줄기 세포 및 기타 전구체 세포)가 포함된다.

[0090] 본원에 기재된 세포 응집체는 동종-세포 응집체 또는 이종-세포 응집체일 수 있다. 본원에서 사용된 "동종-세포", "단일-세포" 세포 응집체 또는 그의 동의어는 혼탁액 내 복수의 세포 응집체를 나타내며, 각각의 세포 응집체는 실질적으로 단일 세포 유형의 복수의 살아있는 세포를 포함하고, 예를 들어 본원에 기재된 hES 세포 응집체를 생성하는 방법은 만능 hESC로 실질적으로 이루어진, 완전 내배엽 세포, 전장 내배엽 세포로 실질적으로 이루어진, 췌장 내배엽 세포로 실질적으로 이루어진 실질적으로 동종-세포일 수 있으며, 추가로 PDX1-양성 췌장 앞 내배엽 세포, PDX1-양성 췌장 내배엽 세포, PDX1-양성 췌장 내배엽 정단 세포, 췌장 내분비 전구체 세포, 췌장 내분비 세포 등을 포함할 수 있다.

[0091] 본원에서 사용된 용어 "본질적으로" 또는 "실질적으로"는 임의의 세포 응집체 혼탁액 유형에 존재하는 성분 또는 세포의 최소한의 양 또는 감소된 양을 의미하며, 예를 들어 "본질적으로 또는 실질적으로 균질한" 또는 "본질적으로 또는 실질적으로 동종-세포"인 본원에 기재된 혼탁액 중의 세포 응집체는 "본질적으로 hESC", "본질적으로 또는 실질적으로 완전 내배엽 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 전장 내배엽 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 PDX1-음성 전장 내배엽 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 PDX1-양성 췌장앞 내배엽 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 PDX1-양성 췌장 내배엽 또는 전구 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 PDX1-양성 췌장 내배엽 정단 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 췌장 내분비 전구체 세포", "본질적으로 또는 실질적으로 췌장 내분비 세포" 등으로 구성된다.

[0092] 실질적으로 동종-세포성 세포 응집체 혼탁 배양물 중 일부는, 예를 들어 배양물 내 전체 hES-유래 세포 중 약 50% 미만의 hESC, 약 45% 미만의 hESC, 약 40% 미만의 hESC, 약 35% 미만의 hESC, 약 30% 미만의 hESC, 약 25% 미만의 hESC, 약 20% 미만의 hESC, 약 15% 미만의 hESC, 약 10% 미만의 hESC, 약 5% 미만의 hESC, 약 4% 미만의 hESC, 약 3% 미만의 hESC, 약 2% 미만의 hESC 또는 약 1% 미만의 hESC를 포함하는 hES-유래 세포 응집체 혼탁 배양물이다. 또 다른 방식으로 언급하면, hES-유래 세포 응집체 혼탁 배양물, 예를 들어 PDX1-음성 전장 내배엽, PDX-양성 췌장앞 내배엽 세포, PDX1-양성 췌장 내배엽 또는 전구 세포, PDX1-양성 췌장 정단 세포, 췌장 내분비 전구 세포 및 췌장 내분비 세포가 50% 이상, 55% 이상, 60% 이상, 65% 이상, 70%

이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상을 차지한다.

[0093] 본원에서 사용된 "이종-세포", "다-세포" 또는 그의 동의어는, 각각의 개별 세포 응집체가 적어도 2, 3, 4, 5, 6 또는 그 이상의 세포 유형, 또는 적어도 하나의 세포 유형의 복수의 세포, 및 비-세포 성분, 예를 들어 세포 외 매트릭스 (ECM) 물질 (예를 들어, 콜라겐, 피브로네틴, 라미닌, 엘라스틴 및/또는 프로테오글리칸)을 포함하는 세포 응집체를 나타낸다. 이러한 ECM 성분은 세포에 의해 자연 분비될 수 있거나, 또는 다르게는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법으로 세포를 유전자 조작하여 ECM 물질 및/또는 세포 부착 분자, 예컨대 특히 셀렉틴, 인테그린, 이뮤노글로불린 및 카드레린의 발현 수준을 다양하게 할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 천연 ECM 물질 또는 ECM 물질을 모방하는 임의의 합성 성분을 응집체 형성 중에 응집체로 혼입할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 hES-유래 세포 응집체, 예컨대 혼장 상피 또는 혼장 내배엽 세포 응집체 (또는 단계 4 세포 응집체)의 제조 방법은 혼장 상피 또는 내배엽 세포로 실질적으로 이루어지지만, 또한 적은 세포 수의 다른 비-혼장 상피 유형 세포, 또는 다른 내배엽 전구체, 및 심지어 혼장 내분비성 분비 세포 (예를 들어, 인슐린 분비 세포)로 이루어질 수도 있다.

[0094] 명확히 하기 위해, 본원에 기재된 및 본원에 기재된 혼탁액 방법으로 생성된 동종- 또는 이종-세포 응집체는, 당업계 및 기타 분야에서 기술되며 배상체 (EB)로 언급되는 동일한 세포 응집체가 아니다. EB는, ES 세포가 단층 배양물에서 과성장하거나, 또는 규정되지 않은 배지 내 혼탁 배양물에서 유지되거나 또는 다수의 배엽층 조직으로의 비-방향성 프로토콜 (즉, 무작위 분화)을 통해 분화되는 경우 나타나는 분화 및 미분화 세포의 세포 응집체이므로, 배상체는 본원에 기재된 세포 응집체와 명확히 구분된다. 대조적으로, 실시예 17 및 20에서 상세히 논의된 바와 같이, 본 발명은, hESC를 부착 플레이트 배양물 상에서 효소로 해리시켜 단일 세포 혼탁액을 제조하고, 이어서 상기 세포가 함께 세포 응집체를 형성하게 한 후; 이어서 이들 세포 응집체 혼탁 배양물을 실질적으로 상기 문헌 [D' Amour et al. 2005] 및 상기 문헌 [D' Amour et al. 2006]에 기재된 바와 같이 분화에 사용한다. EB와 본 발명의 세포 응집체의 기타 차이는 하기에서 추가로 논의한다.

[0095] 배상체 (EB)를 제조하는 다른 방법을 기술한다. 본원에서 사용된 용어 "배상체", "응집체" 또는 그의 동의어는, ES 세포가 단층 배양물에서 과성장하거나, 또는 규정되지 않은 배지 내 혼탁 배양물에서 유지되거나 또는 다수의 배엽층 조직으로의 비-방향성 프로토콜을 통해 분화되는 경우 나타나는 분화 및 미분화 세포의 응집체를 나타낸다. 즉, EB는 본원에 기재된 만능 줄기 세포의 단일 세포 혼탁액으로부터 형성되지 않고; hES-유래 만능 세포의 부착 배양으로부터 형성된 EB도 아니다. 이러한 특징만으로도 본 발명은 배상체와 명확하게 구분가능하다.

[0096] 배상체는 통상 형태 기준에 의해 구분가능한 여러 배엽층으로부터의 상이한 세포 유형의 혼합물이다. 배상체는 통상 세포 집단으로 구성된 형태학적 구조를 나타내며, 이들 대부분은 비-방향성 분화, 즉, 예컨대 미분화된 세포가 규정된 성장 인자의 부재 하에 고농도의 혈청에 노출되는 경우 발생하는 분화를 겪는 배아 줄기 (ES) 세포로부터 유도된다. EB 형성에 적합한 배양 조건 (예를 들어, 마우스 ES 세포에 대한 백혈병 억제 인자 또는 다른 유사한 차단 인자의 제거) 하에 ES 세포를 증식시키고, 분화하기 시작하는 작은 세포 집단을 형성한다. 첫째, 인간 ES 세포에 대한 약 1 내지 4일의 분화에 따라, 작은 세포 집단이 외부층 상에 내배엽 세포의 층을 형성하고, 이는 "간단한 배상체"로 여겨진다. 둘째, 인간 ES 세포에 대한 분화 후 약 3 내지 20일에 따라, 외배엽 및 중배엽 세포 및 유도체 조직의 광범위한 분화로 특징지어지는 "복잡한 배상체"가 형성된다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본원에서 사용되는 EB는 간단한 EB 및 복잡한 EB 둘 다를 포함한다. 배상체가 ES 세포의 배양물에 형성된 시점의 측정은 통상 당업자에 의해 예를 들어 형태의 육안 검사로 실시된다. 배양 조건에 따라 약 20개 이상의 부동 세포 집단이 EB인 것으로 여겨진다. 예를 들어, 문헌 [Schmitt et al. (1991) Genes Dev. 5, 728-740]; [Doetschman et al. 1985, J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45]을 참조한다. 또한, 상기 용어는 배아 생식 영역으로부터 추출된 원시 세포인 원시 배세포로부터 유도된 동등한 구조를 나타낸다: 예를 들어, 문헌 [Shambott et al. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13726]을 참조한다. 적절한 인자로 처리시 원시 배세포 (때때로 당업계에서 EG 세포 또는 배아 배세포로 언급됨)는 배상체가 유도될 수 있는 만능 ES 세포를 형성한다; 예를 들어, 미국 특허 제5,670,372호 및 상기 문헌 [Shambott et al.]을 참조한다.

[0097] EB 제조를 위한 다양한 방법, 예를 들어 문헌 [Ng et al. 2008 Nature Protocols 3:468-776]에 기재된 것과 같은 스핀 배상체, 문헌 [Bauwens et al. 2008, Stem Cells 26:2300-10, Epub 2008 Jun 26]에 기재된 것과 같은 마이크로-패턴화된 세포 외 매트릭스 섬에 플레이팅된 단일 세포 혼탁액으로부터 제조된 EB가 존재한다. 그러나, 이들 방법은 hESC 및 hES-유래 세포의 대규모 제조 (생산)에 대하여 매우 고 비용이며 덜 효율적인데, 이들은 규모증대된 제조가 실제 개시될 수 있도록 하기 이전에 너무 많은 단계를 요구하기 때문이다. 예를 들어, 상기 문헌 [Bauwens et al.]은 세포를 선별하여 혼탁 배양을 시작할 수 있도록 하기 이전에 먼저 hESC를 성

장 인자 감소된 매트리겔™ 상에 접종하여야 한다. 맞춤형 마이크로-페더화된 조직 배양 판이 요구되기 때문에, 상기 방법의 시간 및 비용은 이를 다루기 힘들도록 한다. 추가로, 상기 문헌 [Ng et al.]에 의해 이용되는 방법 또한 보다 균일한 EB를 생성하기 위한 원심분리의 이용으로 인해 hESC 및 hES-유래 세포의 대규모증대 제조에 대하여 비용-효율적이지 않다. 이들 방법은 표면적 제약에 의해 제한되며, 이는 또한 그의 규모조정성에 영향을 준다. 마지막으로, 이들 방법 모두에서, 세포 응집체는 본 발명에서와 같이 만능 줄기 세포의 단일 세포 혼탁액으로부터 제조되지 않는다.

[0098]

본 발명에 기재된 세포 응집체와는 달리, 배상체는 3개의 배엽으로부터의 다양한 세포 유형으로 구성되어 있으며 전형적으로는 미분화된 ES 세포의 응집체의 비-지향적 분화 신호, 예컨대 20% 태아 소 혈청에의 노출에 의해 생성되는 세포 응집체이다. 이 비-지향적 방법론의 결과는 시험관내에서 정상적 배아 발생을 모방하려고 하는 세포 유형의 혼합물이다. 이러한 접근법은 배아 발생을 시험하기 위한 기초 연구 수준에서 유용한 반면, 세포 수율, 집단 동일성, 집단 순도, 배치 일관성, 안전성, 세포 기능 및 우수한 비용이 주요 고려사항인 임의의 대규모 세포 요법 제조 공정에 대해서는 받아들여지지 않는다. 게다가, 배상체로부터 소정의 세포 유형을 정제하기 위해 이용되는 임의의 풍부화 전략에 관계없이, 분화 프로토콜은 거대 집단의 단일 세포 유형을 생성하는 직접적인 방법을 제공하지 않는다. 후속적으로, 오염물 집단이 항상 우세할 것이며, 특정한 집단을 정제하기 위한 임의의 시도를 방해할 것이다. ES 세포의 응집체의 생성 및 분화에 대한 모든 이전 작업은 그의 방법론에서 하기 요소 중 하나 이상을 갖는다: 1) 인간 ES 세포 대신 마우스의 사용, 2) 정상 세포 부착 방법 대신에 세포를 응집시키기 위한 원심분리에 의존하는 강제 응집 프로토콜, 3) 정적 조건에서의 세포 덩어리의 응집, 4) 응집체를 생성하기 위한 비-단일 세포 분리 또는 표면으로부터의 세포의 스크레이핑(scraping), 5) 모든 배엽의 세포 유형 및 배상체의 형성을 유발하는 15-20% 소 태아 혈청을 사용하는 세포 응집체의 비-지향적 분화, 6) 단지 소규모로 수행될 수 있는 "현적" 조건에서의 형성. 본 발명자들의 지식 상, 배상체를 분화시키기 위해 15-20% FCS를 이용하지 않는 연구만이 강제 응집에 의해 세포 응집체가 형성되며 이어서 중배엽에 적절한 배지를 사용하여 응집체가 즉시 분화되는 프로토콜을 기재한다 (문헌 [Ng et al. 2005, Blood 106:1601]). 그러나, 이 작업에서, 연구자들은 정적 응집체 배양물에서의 10-12일 이후에 배상체를 비-응집체 부착성 배양물에 전달하여 본 출원과의 비교를 무의미하게 하였다. 모든 이전 작업과는 반대로, 본 출원은 1) 인간 ES 세포를 단일 세포로 분리시키고, 이어서 응집체 직경 및 세포 생존의 제어를 개선하기 위해 최적화된 전단 속도로의 회전 배양에 의해 응집체를 생성하고, 2) ES 세포 응집체를 분화성 내배엽, 이어서 전장 내배엽, 이어서 췌장앞 전장 내배엽, 이어서 췌장 내배엽 및 최종적으로 췌장 내분비 세포로 직접 분화시키는 방법을 제시한다. 이 분화 프로토콜은 완전 내배엽 및 췌장 계통 집단을 높은 효율 및 최소량의 오염물 집단으로 생성한다. 게다가, ES 세포 응집 및 분화를 위한 이러한 접근법은 배상체를 생성하지 않으며, 이는 모든 다른 공개된 연구와는 완전히 반대이다.

[0099]

분화된 및 미분화된 세포의 혼합물이며 전형적으로는 여러 배엽으로부터의 세포로 이루어져 있고 무작위 분화를 거치는 배상체와는 달리, 본원에 기재된 세포 응집체는 만능, 다능, 이능 또는 단능 유형 세포, 예를 들어 배아 세포, 완전 내배엽, 전장 내배엽, PDX1 양성 췌장 내배엽, 췌장 내분비 세포 등의 응집체로서 존재하는 본질적으로 또는 실질적으로 호모-세포형이다.

[0100]

본 발명은 대규모 제조에 쉽게 적용될 수 있는 공정을 사용하여 크기 및 형상이 실질적으로 균일한 세포 응집체를 재현가능하게 제조할 수 있는 비용 효율적인 제조 공정 또는 방법을 제공함으로써 상기 문제점들을 다룬다. 한 특정한 실시양태에서, 분화가능한 세포는 본 발명의 세포 배지를 사용하여 혼탁 배양물에서 확대된다. 또 다른 특정한 실시양태에서, 분화가능한 세포는 혼탁액에서 유지 및 확대되며, 즉 이들은 미분화형으로 남아있거나, 또는 추가의 분화가 방지된다. 세포 배양의 관점에서의 용어 "확대"는 당업계에서와 같이 사용되며, 세포 증식 및 세포의 수의 증가, 바람직하게는 생존 세포의 수의 증가를 의미한다. 구체적 실시양태에서, 세포는 약 1 일, 즉, 약 24 시간 초과 동안 배양함으로써 배양 혼탁액에서 확대된다. 보다 구체적인 실시양태에서, 세포는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 일, 또는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 주 동안 배양함으로써 혼탁 배양물에서 확대된다.

[0101]

본원에 기재된 분화 배양 조건 및 hES-유래 세포 유형은 상기 문헌 [D'Amour et al. 2006]에 기재된 것과 실질적으로 유사하다. 상기 문헌 [D'Amour et al. 2006]은 다음의 5 단계 분화 프로토콜을 기재한다: 단계 1 (실질적으로 완전 내배엽 제조를 달성함), 단계 2 (실질적으로 PDX1-음성 전장 내배엽 제조를 달성함), 단계 3 (실질적으로 PDX1-양성 전장 내배엽 제조를 달성함), 단계 4 (실질적으로 췌장 내배엽 또는 상피 또는 췌장 내분비 전구세포 제조를 달성함) 및 단계 5 (실질적으로 호르몬 발현 내분비 세포 제조를 달성함). 중요하게는, 최초로, 모든 이들 세포 유형이 본원에 기재된 혼탁액 방법에 의해 생성될 수 있다.

- [0102] 본원에서 사용되는 "완전 내배엽 (DE)"은 소화관 튜브의 세포 또는 소화관 튜브로부터 유도된 장기로 분화될 수 있는 다능 내배엽 계통 세포를 의미한다. 특정 실시양태에 따르면, 완전 내배엽 세포는 포유동물 세포이며, 바람직한 실시양태에서, 완전 내배엽 세포는 인간 세포이다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 완전 내배엽 세포는 소정의 마커를 발현하거나 또는 유의하게 발현하는데 실패한다. 일부 실시양태에서, SOX17, CXCR4, MIXL1, GATA4, HNF3베타, GSC, FGF17, VWF, CALCR, FOXQ1, CMKOR1, CRIP1 및 CER로부터 선택되는 하나 이상의 마커가 완전 내배엽 세포에서 발현된다. 다른 실시양태에서, OCT4, 알파-태아단백질 (AFP), 트롬보모듈린 (TM), SPARC, SOX7 및 HNF4알파로부터 선택되는 하나 이상의 마커가 완전 내배엽 세포에서 유의하게 발현되지 않는다. 또한, 완전 내배엽 세포 집단 및 그의 제조 방법은 미국 특허 출원 번호 11/021,618 (제목: DEFINITIVE ENDODERM; 2004년 12월 23일자로 출원됨)에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0103] 본 발명의 또 다른 실시양태는 "PDX1-음성 전장 내배엽 세포", "전장 내배엽 세포"로 지칭되는 세포 배양물 및 세포 응집체, 또는 그의 등가물에 관한 것이다. 또한, PDX1-음성 전장 내배엽 세포는 다능이며, 흉선, 갑상선, 부갑상선, 폐/기관지, 간, 인두, 인두 파우치, 십이지장의 일부 및 유스타키오관을 비제한적으로 포함하는 다양한 세포 및 조직으로 유도될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전장 내배엽 세포는 마커 SOX17, HNF1B, HNF1 알파, FOXA1을 유의하게 발현하지 않는 비 전장 내배엽 세포, 예를 들어 완전 내배엽 또는 PDX-양성 내배엽과 비교하여 증가된 수준의 SOX17, HNF1B, HNF1 알파, FOXA1을 발현한다. 또한, PDX1-음성 전장 내배엽 세포는 0 만큼 낮은 수준의 PDX1, AFP, SOX7 및 SOX1을 발현한다. 또한, PDX1-음성 전장 내배엽 세포 집단 및 그의 제조 방법은 미국 특허 출원 번호 11/588,693 (제목: PDX1-expressing dorsal and ventral foregut endoderm; 2006년 10월 27일자로 출원됨)에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0104] 본 발명의 다른 실시양태는 "PDX1-양성 췌장 전장 내배엽 세포", "PDX1-양성 췌장앞 내배엽"의 세포 배양물 또는 그의 등가물에 관한 것이다. PDX1-양성 췌장앞 내배엽 세포는 다능이며, 위, 장 및 췌장을 비제한적으로 포함하는 다양한 세포 및/또는 조직으로 유도될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDX1-양성 췌장앞 내배엽 세포는 마커 PDX1, HNF6, SOX9 및 PROX1을 유의하게 발현하지 않는 비 췌장앞 내배엽 세포와 비교하여 증가된 수준의 PDX1, HNF6, SOX9 및 PROX1을 발현한다. 또한, PDX1-양성 췌장앞 내배엽 세포는 0 만큼 낮은 수준의 NKX6.1, PTF1A, CPA 및 cMYC를 발현한다.
- [0105] 본 발명의 다른 실시양태는 "PDX1-양성 췌장 내배엽 세포", "PDX1-양성 췌장 전구세포", "췌장 상피", "PE"의 세포 배양물 또는 그의 등가물에 관한 것이다. PDX1-양성 췌장 전구 세포는 다능이며, 선방, 관 및 내분비 세포를 비제한적으로 포함하는 췌장에서의 다양한 세포로 유도될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDX1-양성 췌장 전구 세포는 마커 PDX1 및 NKX6.1을 유의하게 발현하지 않는 비 췌장앞 내배엽 세포와 비교하여 증가된 수준의 PDX1 및 NKX6.1을 발현한다. 또한, PDX1-양성 췌장 전구 세포는 0 만큼 낮은 수준의 PTF1A, CPA, cMYC, NGN3, PAX4, ARX 및 NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST, 및 PP를 발현한다.
- [0106] 대안적으로, 본 발명의 다른 실시양태는 "PDX1-양성 췌장 내배엽 정단 세포"의 세포 배양물 또는 그의 등가물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, PDX1-양성 췌장 내배엽 정단 세포는 PDX1-양성 췌장 전구 세포와 유사한 증가된 수준의 PDX1 및 NKX6.1을 발현하지만, PDX1-양성 췌장 전구 세포와는 달리, PDX1-양성 췌장 내배엽 정단 세포는 추가로 증가된 수준의 PTF1A, CPA 및 cMYC를 발현한다. 또한, PDX1-양성 췌장 내배엽 정단 세포는 0 만큼 낮은 수준의 NGN3, PAX4, ARX 및 NKX2.2, INS, GCG, GHRL, SST, 및 PP를 발현한다.
- [0107] 또한, 본 발명의 다른 실시양태는 "췌장 내분비 전구체 세포", "췌장 내분비 전구 세포"의 세포 배양물 또는 그의 등가물에 관한 것이다. 췌장 내분비 전구 세포는 다능이며, 알파, 베타, 베타 및 PP 세포를 포함하는 내분비 세포의 성숙을 유도한다. 일부 실시양태에서, 췌장 내분비 전구 세포는 다른 비-내분비 전구 세포 유형과 비교하여 증가된 수준의 NGN3, PAX4, ARX 및 NKX2.2를 유도한다. 또한, 췌장 전구 세포는 0 만큼 낮은 수준의 INS, GCG, GHRL, SST 및 PP를 발현한다.
- [0108] 본 발명의 또 다른 실시양태는 시험관내 만능 세포로부터 유도되는 세포, 예를 들어 알파, 베타, 베타 및/또는 PP 세포 또는 그의 조합물을 의미하는 "췌장 내분비 세포", "췌장 호르몬 분비 세포", "췌장섬 호르몬-발현 세포"의 세포 배양물, 또는 그의 등가물에 관한 것이다. 내분비 세포는 예를 들어 인슐린, 글루카곤, 그렐린, 소마토스타틴 및 췌장 폴리펩티드 또는 그의 조합물을 발현하는 폴리-호르몬 또는 단일-호르몬일 수 있다. 그러므로, 내분비 세포는 하나 이상의 췌장 호르몬을 발현하며, 이는 인간 췌장섬 세포의 기능의 적어도 일부를 갖는다. 췌장섬 호르몬-발현 세포는 성숙 또는 미성숙일 수 있다. 미성숙 췌장섬 호르몬-발현 세포는 소정의 마커의 차등 발현을 기초로 하거나 또는 그의 기능적 성능, 예를 들어 시험관내 또는 생체내 글루코스 반응성을 기초로 성숙 췌장섬 호르몬-발현 세포와 구별될 수 있다. 또한, 췌장 내분비 세포는 0 만큼 낮은 수준의 NGN3,

PAX 4, ARX 및 NKX2.2를 발현한다.

[0109] 대부분의 상기 세포 유형은 중간엽 완전 내배엽 세포와 비교하여 볼 때 상피화된다. 일부 실시양태에서, 체장 내배엽 세포는 관련 미국 특허 출원 번호 11/588,693 (제목: PDX1 EXPRESSING DOSAL AND VENTRAL FOREGUT ENDODERM; 2006년 10월 27일자로 출원됨) 및 미국 특허 출원 번호 11/115,868 (제목: PDX1-expressing endoderm; 2005년 4월 26일자로 출원됨)의 표 3으로부터 선택되는 하나 이상의 마커, 및/또는 표 4로부터 선택되는 하나 이상의 마커를 발현하며, 여기서 상기 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0110] 본 발명은 그의 공급원 또는 그의 가소성과는 무관하게 분화가능한 세포에 유용한 조성을 및 방법을 고려한다. 세포의 "가소성"은 대략적으로는 당엽계에서와 같이 본원에서 사용된다. 즉, 세포의 가소성은 배아, 태아 또는 성장된 유기체로부터의 조직 또는 장기에서 발견되는 특정한 세포 유형으로 분화하기 위한 세포의 능력을 의미한다. 세포가 "보다 가소성"이면, 세포가 분화될 수 있는 조직이 보다 많아진다. "만능 세포"에는 만능, 다능, 소분화능(oligopotent) 및 단능 세포, 및/또는 배아, 태아 또는 성장된 유기체에서 발견되는 모두가 아니더라도 여러가지의 성숙 또는 부분적으로 성숙한 세포 유형으로 분화되거나 또는 유도될 수 있는 세포 및 그의 자손이 포함된다. "다능 세포"에는 다능, 소분화능 및 단능 전구 세포, 및/또는 하나 이상의 성숙 또는 부분적으로 성숙한 세포 유형으로 분화되거나 또는 유도될 수 있지만, 다능 세포로부터 유도된 성숙 또는 부분적으로 성숙한 세포 유형이 특정한 조직, 장기 또는 장기 계통의 세포로 제한되는 것 이외의 세포 및 그의 자손이 포함된다. 예를 들어, 다능 조혈 전구 세포 및/또는 그의 자손은 하나 이상의 유형의 소분화능 세포, 예컨대 골수 전구 세포 및 림프 전구 세포로 분화되거나 또는 유도되는 능력, 및 또한 혈액에서 보통 발견되는 다른 성숙 세포 성분으로 유도되는 능력을 소유한다. "소분화능 세포"에는 성숙 또는 부분적으로 성숙한 세포로 분화되는 능력이 다능 세포에 비해 보다 제한되는 세포 및 그의 자손이 포함된다. 그러나, 소분화능 세포는 소분화능 및 단능 세포, 및/또한 소정의 조직, 장기 또는 장기 계통의 하나 이상의 성숙 또는 부분적으로 성숙한 세포 유형으로 분화되는 능력을 여전히 보유할 수 있다. 소분화능 세포의 한 예는 골수 전구 세포이며, 이는 최종적으로는 성숙 또는 부분적으로 성숙한 적혈구, 소관, 호흡기구, 호산구, 호중구 및 단핵구로 유도될 수 있다. "단능 세포"에는 다른 단능 세포 및/또는 한 유형의 성숙 또는 부분적으로 성숙한 세포 유형으로 분화되거나 또는 유도되는 능력을 소유하는 세포 또는 그의 자손이 포함된다.

[0111] 본원에서 사용되는 분화가능한 세포는 만능, 다능, 소분화능 또는 심지어 단능일 수 있다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 분화가능한 세포는 만능 분화가능한 세포이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 만능 분화가능한 세포는 배아 줄기 세포, ICM/상배엽 세포, 원시 외배엽 세포, 원시 배세포 및 기형암종 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 특정한 실시양태에서, 분화가능한 세포는 포유동물 배아 줄기 세포이다. 보다 특정한 실시양태에서, 분화가능한 세포는 인간 배아 줄기 세포이다.

[0112] 또한, 본 발명은 동물 내의 임의의 공급원으로부터의 분화가능한 세포이되, 단 세포는 본원에 기재된 것과 같이 분화가능한 것이 고려된다. 예를 들어, 분화가능한 세포는 배아, 또는 그 안의 임의의 원시 배엽, 태반 또는 융모막 조직, 또는 보다 성숙한 조직, 예컨대 지방, 골수, 신경 조직, 유방 조직, 간 조직, 체장, 상피, 호흡, 성선 및 근육 조직을 비롯한 성인 줄기 세포로부터 수확될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 분화가능한 세포는 배아 줄기 세포이다. 다른 구체적 실시양태에서, 분화가능한 세포는 성인 줄기 세포이다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 줄기 세포는 태반- 또는 융모막-유래 줄기 세포이다.

[0113] 물론, 본 발명은 분화가능한 세포를 생성할 수 있는 임의의 동물로부터의 분화가능한 세포의 사용을 고려한다. 분화가능한 세포가 수확되는 동물은 척추동물 또는 무척추동물, 포유동물 또는 비-포유동물, 인간 또는 비-인간일 수 있다. 동물 공급원의 예에는 영장류, 설치류, 개, 고양이, 말, 소 및 돼지가 포함되지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0114] 본 발명의 분화가능한 세포는 당엽자들에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 유도될 수 있다. 예를 들어, 인간 만능 세포는 탈분화 및 핵 치환 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 추가적으로, 본 발명에서 사용되는 인간 ICM/상배엽 세포 또는 원시 외배엽 세포는 생체내 또는 시험관내 유도될 수 있다. 원시 외배엽 세포는 WO 99/53021에 기재된 것과 같이 부착 배양물 내에서 생성되거나 또는 혼탁 배양물 내의 세포 응집체로서 생성될 수 있다. 게다가, 인간 만능 세포는 수동 계대 배양 방법, 및 벌크 계대 배양 방법, 예컨대 효소적 또는 비-효소적 계대 배양을 비롯한 당엽자들에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 계대 배양될 수 있다.

[0115] 특정 실시양태에서, ES 세포가 이용되는 경우에, 배아 줄기 세포는 정상적 핵형을 갖는 반면, 다른 실시양태에서, 배아 줄기 세포는 비정상적 핵형을 갖는다. 한 실시양태에서, 대부분의 배아 줄기 세포는 정상적 핵형을 갖는다. 시험된 중기 중 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 초과, 또는 95% 초과가 정

상적 핵형을 나타낼 것으로 고려된다.

[0116] 또 다른 실시양태에서, 대부분의 배아 줄기 세포는 비정상적 핵형을 갖는다. 시험된 종기 중 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 초과, 또는 95% 초과가 비정상적 핵형을 나타낼 것으로 고려된다. 특정 실시양태에서, 비정상적 핵형은 세포를 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 20회 초과의 계대 배양 동안 배양시킨 후에 분명하다. 한 구체적 실시양태에서, 비정상적 핵형은 적어도 1개의 상염색체의 삼염색체를 포함하며, 여기서 상염색체는 염색체 1, 7, 8, 12, 14 및 17로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 비정상적 핵형은 1개 초과의 상염색체를 포함하며, 여기서 1개 초과의 상염색체 중 적어도 1개는 염색체 1, 7, 8, 12, 14 및 17로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 상염색체는 염색체 12 또는 17이다. 또 다른 실시양태에서, 비정상적 핵형은 추가의 성별 염색체를 포함한다. 한 실시양태에서, 핵형은 2개의 X 염색체 및 1개의 Y 염색체를 포함한다. 또한, 염색체의 전위가 일어날 수 있다고 고려되며, 그러한 전위는 용어 "비정상적 핵형" 내에 포함된다. 상기 염색체 이상 및 다른 염색체 이상의 조합 또한 본 발명에 포함된다.

[0117] 조성물 및 방법은 기본 염 영양 용액을 포함한다. 본원에서 사용되는 기본 염 영양 용액은 정상 세포 대사에 필수적인 물 및 소정의 벌크 무기 이온을 세포에 제공하며, 세포내 및 세포외 삼투압 균형을 유지시키며, 에너지원으로서 탄수화물을 제공하며, 배지를 생리학적 pH 범위 내로 유지시키기 위한 완충 시스템을 제공하는 염의 혼합물을 의미한다. 기본 염 영양 용액의 예에는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM), 최소 필수 배지 (MEM), 기초 이글 배지 (BME), RPM1 1640, Ham F-10, Ham F-12, α-최소 필수 배지 (α-MEM), 글래스고 최소 필수 배지 (G-MEM), 및 이스코브 변형 둘베코 배지, 및 그의 혼합물이 포함되지만, 이들로 제한되지는 않는다. 한 특정한 실시양태에서, 기본 염 영양 용액은 DMEM 및 Ham F12의 대략 50:50 혼합물이다.

[0118] 조성물은 추가로 미량 원소를 포함할 수 있는 것으로 고려된다. 미량 원소는 예를 들어 미디어테크(Mediatech)로부터 구입할 수 있다. 미량 원소의 비제한적 예에는 알루미늄, 염소, 슬레이트, 철, 카드뮴, 코발트, 크로뮴, 게르마늄, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 포스페이트 및 마그네슘을 포함하는 화합물이 포함되지만 이들로 제한되지는 않는다. 미량 원소를 함유하는 화합물의 구체적인 예에는 AlCl_3 , AgNO_3 , $\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, CdCl_2 , CdSO_4 , CoCl_2 , CrCl_3 , $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, CuSO_4 , 제2철 시트레이트, GeO_2 , KI , KBr , Li , 몰리브데넘산, MnSO_4 , MnCl_2 , NaF , Na_2SiO_3 , NaVO_3 , NH_4VO_3 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, NiSO_4 , RbCl , 셀레늄, Na_2SeO_3 , H_2SeO_3 , 셀레나이트 · 2Na, 셀레노메티오논, SnCl_2 , ZnSO_4 , ZrOCl_2 , 및 그의 혼합물 및 염이 포함되지만, 이들로 제한되지는 않는다. 셀레늄, 셀레나이트 또는 셀레노메티오논이 존재하는 경우에, 이는 대략 0.002 내지 대략 0.02 mg/L의 농도일 수 있다. 추가적으로, 히드록실아파타이트 또한 존재할 수 있다.

[0119] 아미노산이 규정 배지에 첨가될 수 있는 것이 고려된다. 그러한 아미노산의 비제한적 예에는 글리신, L-알라닌, L-알라닐-L-글루타민, L-글루타민/글루타액스, L-아르기닌 히드로클로라이드, L-아스파라긴- H_2O , L-아스파르트산, L-시스테인 히드로클로라이드- H_2O , L-시스틴 2HCl, L-글루탐산, L-히스티딘 히드로클로라이드- H_2O , L-이소류신, L-류신, L-리신 히드로클로라이드, L-메티오닌, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-히드록시프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신 이나트륨 염 2수화물 및 L-발린이 있다. 특정 실시양태에서, 아미노산은 L-이소류신, L-페닐알라닌, L-프롤린, L-히드록시프롤린, L-발린, 및 이들의 혼합물이다.

[0120] 또한, 규정 배지가 아스코르브산을 포함할 수 있는 것이 고려된다. 바람직하게는, 아스코르브산은 대략 1 mg/L 내지 대략 1000 mg/L, 또는 대략 2 mg/L 내지 대략 500 mg/L, 또는 대략 5 mg/L 내지 대략 100 mg/L, 또는 대략 10 mg/L 내지 대략 100 mg/L의 초기 농도로, 또는 대략 50 mg/L로 존재한다.

[0121] 게다가, 조성물 및 방법은 또한 혈청 알부민, 트랜스페린, L-글루타민, 지질, 항생제, β -메르캅토에탄올, 비타민, 미네랄, ATP 및 존재할 수 있는 유사한 성분과 같은 다른 성분을 포함할 수 있다. 존재할 수 있는 비타민의 예에는 비타민 A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₇, B₉, B₁₂, C, D₁, D₂, D₃, D₄, D₅, E, 토코트리에놀, K₁ 및 K₂가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 당업자는 소정의 배양액에서 사용하기 위해 미네랄, 비타민, ATP, 지질, 필수지방산 등의 최적의 농도를 결정할 수 있다. 보충물의 농도는, 예를 들어 약 0.001 μM 내지 약 1mM, 또는 그 초과일 수 있다. 보충물이 제공될 수 있는 농도의 구체적 예에는 약 0.005 μM , 0.01 μM , 0.05 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1.0 μM , 2.0 μM , 2.5 μM , 3.0 μM 4.0 μM , 5.0 μM , 10 μM , 20 μM , 100 μM 등이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 한 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 비타민 B₆ 및 글루타민을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 비타민 C 및 철 보충물을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물

및 방법은 비타민 K₁ 및 비타민 A를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 비타민 D₃ 및 ATP를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 비타민 B₁₂ 및 트랜스페린을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 토코트리에놀 및 β-메르캅토에탄올을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 글루타민 및 ATP를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 오메가-3 지방산 및 글루타민을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 오메가-6 지방산 및 비타민 B₁을 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 조성물 및 방법은 α-리놀렌산 및 B₂를 포함한다.

[0122] 본 발명의 조성물은 본질적으로 무혈청이다. 본원에서 사용된 "본질적으로 무혈청"은 본 발명의 용액에서 혈청의 부재를 지칭한다. 혈청은 본 발명의 조성물 및 방법에 대해 본질적인 성분이 아니다. 따라서, 조성물 중 어느 하나에서의 혈청의 존재는 단지, 예를 들어 1차 세포 배양으로부터의 잔류 혈청 또는 출발 물질로부터의 불순물에 기인하여야 한다. 예를 들어, 본질적으로 무혈청 배지 또는 환경은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 미만의 혈청을 함유할 수 있고, 여기서 본원에서 개선된 배지 또는 환경의 생물활성 유지 용량이 여전히 관찰된다. 본 발명의 구체적 실시양태에서, 본질적으로 무혈청 조성물은 혈청 또는 혈청 대체물을 함유하지 않거나, 또는 규정 배지에 첨가된 혈청 또는 혈청 대체물 성분의 단리로부터 미량의 혈청 또는 혈청 대체물만을 함유한다.

[0123] 본 발명의 조성물 및 방법은 또한 분화가능한 세포 내에서 ErbB2 티로신 키나제 활성을 자극하기 위한 수단을 포함한다. 한 구체적 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 적어도 하나의 ErbB3 리간드의 존재를 포함한다. 전형적으로, ErbB3 리간드는 ErbB3 수용체와 결합하고, ErbB2 수용체와 이량체화될 것이다. 다시, ErbB2 수용체는 일반적으로 분화가능한 세포 내에서 세포내 티로신 키나제 활성에 대해 원인이 된다.

[0124] 본원에서 사용된 "ErbB3 리간드"는 ErbB3에 결합하는 리간드를 지칭하고, 이는 다시 ErbB2와 이량체화되고, 따라서 ErbB2/ErbB3 이종이량체 수용체의 ErbB2 부분의 티로신 키나제 활성을 활성화시킨다. ErbB3 리간드의 비제한적 예에는 뉴레귤린-1; 뉴레귤린-1의 스플라이스 변이체 및 이소형 (HRG-β, HRG-α, Neu 분화 인자 (NDF), 아세틸콜린 수용체-유도 활성 (ARIA), 신경교 성장 인자 2 (GGF2), 및 감각 및 운동 뉴런-유래 인자 (SMDF)를 포함하나 이에 제한되지는 않음); 뉴레귤린-2; 뉴레귤린-2의 스플라이스 변이체 및 이소형 (NRG2-β를 포함하나 이에 제한되지는 않음); 에피레귤린; 및 비레귤린(Biregulin)이 포함된다.

[0125] 한 실시양태에서, ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성을 자극하기 위한 수단은, 뉴레귤린-1, 헤레귤린-β (HRG-β), 헤레귤린-α (HRG-α), Neu 분화 인자 (NDF), 아세틸콜린 수용체-유도 활성 (ARIA), 신경교 성장 인자 2 (GGF2), 모터-뉴런 유래 인자 (SMDF), 뉴레귤린-2, 뉴레귤린-2β (NRG2-β), 에피레귤린, 비레귤린, 및 이들의 변이체 및 기능적 단편으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 ErbB3 리간드를 포함한다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성을 자극하기 위한 하나 초과의 수단, 예를 들어 하나 초과의 ErbB3 리간드를 사용하는 것 (이에 제한되지는 않음)을 포함한다.

[0126] 본 발명의 조성물 및 방법의 보다 구체적인 실시양태에서, ErbB3 리간드는 HRG-β 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편이다. 한 실시양태에서, 배양 첨가제 단백질, 폴리펩티드 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편이 유래한 좋은 배양된 세포의 종과 동일하다. 예를 들어, 마우스 ES 세포가 배양되는 경우, 무스 무스쿨루스 (*Mus musculus*) HRG-β 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 HRG-β는 배양액에서 첨가제로서 사용될 수 있고, "동일한 종의 것"으로 간주된다. 다른 실시양태에서, 생물학적 첨가제가 유래한 좋은 배양된 세포와 상이하다. 예를 들어, 마우스 ES 세포가 배양되는 경우, 인간 HRG-β 서열과 동일한 아미노산 서열을 갖는 HRG-β는 배양액에서 첨가제로서 사용될 수 있고, "상이한 종의 것"으로 간주된다.

[0127] 본원에서 사용된 "기능적 단편"은 전장 폴리펩티드로서 유사한 생리학상 또는 세포 효과를 발휘하는 전장 폴리펩티드의 단편 또는 스플라이스 변이체이다. 유사한 생리학상 또는 세포 효과가 보여지는 한, 기능적 단편의 생물학적 효과는 범위 또는 강도에 있어 전장 폴리펩티드와 동일할 필요는 없다. 예를 들어, HRG-β의 기능적 단편은 ErbB2-유도된 티로신 키나제를 검출가능하게 자극할 수 있다.

[0128] 본원에서 사용된 용어 "변이체"에는 키메라 또는 융합 폴리펩티드, 상동체, 유사체, 오르토로그 및 파라로그가 포함된다. 게다가, 참조 단백질 또는 폴리펩티드의 변이체는 아미노산 서열이 참조 단백질 또는 폴리펩티드와 적어도 약 80% 동일한 단백질 또는 폴리펩티드이다. 구체적 실시양태에서, 변이체는 참조 단백질 또는 폴리펩티드와 적어도 약 85%, 90%, 95%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 심지어 100% 동일하다. 본원에서 사용된 용어 "상응하다" 및 "상응하는"은, 이들이 서열 정렬에 관한 경우, 참조 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들어 야생형 인간 또는 마우스 뉴레귤린-1 이내에 열거된 위치, 및 참조 단백질 또는 폴리펩티드 상의 위치로 정렬한

변형된 단백질 또는 폴리펩티드에서의 상기 위치를 의미하는 것으로 의도된다. 따라서, 대상체 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열이 참조 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열로 정렬된 경우, 참조 단백질 또는 폴리펩티드 서열의 특정 열거된 위치에 "상응하는" 서열은 참조 서열의 이들 위치로 정렬한 서열이나, 필수적으로 참조 서열의 이러한 정확한 수적 위치에 존재하지 않는다. 서열 사이의 상응하는 아미노산을 결정하기 위해 서열을 정렬하는 방법은 하기 기재된다.

[0129] 예를 들어 TGF- β 를 코딩하는 참조 아미노산 서열과, 예를 들어 적어도 약 95% "동일한" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 아미노산 서열이 참조 TGF- β 를 코딩하는 참조 아미노산 서열 중 각 100개의 아미노산 당 최대 약 5개의 변형을 포함할 수 있는 것을 제외하여, 폴리펩티드의 아미노산 서열이 참조 서열과 동일한 것을 의미하는 것으로 이해된다. 다시 말하면, 참조 아미노산 서열과 적어도 약 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 웨프티드를 수득하기 위해서, 참조 서열의 최대 약 5%의 아미노산 잔기가 결실되거나 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있거나, 또는 참조 서열에서 전체 아미노산 중 최대 약 5%의 아미노산 수가 참조 서열 내로 삽입될 수 있다. 참조 서열의 이러한 변형은, 참조 서열 내의 아미노산 사이에서 개별적으로 또는 참조 서열 내의 하나 이상의 인접한 기에 배치된, 참조 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단 위치에서, 또는 이들 말단 위치 사이의 어느 곳에서나 일어날 수 있다.

[0130] 본원에서 사용된 "동일성"은 참조 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 비교하여 뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열의 동일성의 척도이다. 일반적으로, 서열은 최고 순서 매칭을 이루기 위해 정렬된다. "동일성" 그 자체는 당업계-인식 의미를 가지며, 공개 기술을 사용하여 계산될 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York (1988)]; [Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York (1993)]; [Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994)]; [von Heinje, G., Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press (1987)]; 및 [Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York (1991)] 참조). 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열 사이의 동일성을 측정하기 위한 몇몇 방법이 있으며, 용어 "동일성"은 또한 당업자에게 널리 공지되어 있다 (문헌 [Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988)]). 2개의 서열 사이의 동일성 또는 유사성을 측정하기 위해 흔히 사용되는 방법에는, 문헌 [Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego (1994)] 및 [Carillo, H. & Lipton, D., Siam J Applied Math 48:1073 (1988)]에 기재된 것들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 컴퓨터 프로그램은 또한 동일성 및 유사성을 계산하는 방법 및 알고리즘을 함유할 수 있다. 2개의 서열 사이의 동일성 및 유사성을 측정하기 위한 컴퓨터 프로그램 방법의 예에는 GCG 프로그램 팩키지 (문헌 [Devereux, et al. 1984 Nucleic Acids Research 12:387]), BLASTP, ExPASy, BLASTN, FASTA (문헌 [Atschul et al. 1990, J Molec Biol 215:403]) 및 FASTDB가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 동일성 및 유사성을 측정하기 위한 방법의 예는 문헌 [Michaels & Garian 2000, Current Protocols in Protein Science, Vol 1, John Wiley & Sons, Inc.]에 논의되어 있으며, 이는 참조로 포함된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 2개 이상의 폴리펩티드 사이의 동일성을 측정하기 위해 사용된 알고리즘은 BLASTP이다.

[0131] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 2개 이상의 폴리펩티드 사이의 동일성을 측정하기 위해 사용된 알고리즘은 FASTDB이고, 이는 문헌 [Brutlag et al. (1990, Comp. App. Biosci. 6:237-245)] (본원에 참조로 포함됨)의 알고리즘을 기재로 한다. FASTDB 서열 정렬에서, 질의(query) 및 대상체 서열은 아미노산 서열이다. 서열 정렬의 결과는 % 동일성으로 나타낸다. % 동일성을 계산하기 위해 아미노산 서열의 FASTDB 정렬에서 사용될 수 있는 파라미터에는 매트릭스=PAM, k-튜플(tuple)=2, 미스매치 패널티=1, 연결 패널티=20, 무작위화 기 길이=0, 컷오프 점수=1, 캡 패널티=5, 간격 크기 패널티 0.05, 윈도우 크기=500 또는 대상체 아미노산 서열의 길이 중 더 짧은 것이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0132] 대상체 서열이 내부 부가 또는 결실 때문이 아니라 N-말단 또는 C-말단 부가 또는 결실 때문에 질의 서열보다 더 짧거나 더 긴 경우, FASTDB 프로그램은 % 동일성을 계산할 때 대상체 서열의 N-말단 및 C-말단의 절단 또는 첨가를 고려하지 않기 때문에, 수동 보정이 이루어질 수 있다. 5' 또는 3' 말단에서 절단된 대상체 서열에 대하여, 질의 서열에 비해, 질의 서열의 전체 염기의 퍼센트로서, 매칭되거나 정렬되지 않은 참조 서열에 대한 N- 및 C- 말단인 질의 서열의 염기 수를 계산함으로써 % 동일성이 보정된다. FASTDB 서열 정렬의 결과는 매칭/정렬을 결정한다. 이어서, 정렬 백분율을 % 동일성에서 빼고, 명시된 파라미터를 사용하여 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산하여, 최종 % 동일성 점수에 도달한다. 상기 보정된 점수는, 정렬이 서로 "상응하는" 방법뿐만 아니라 백분율 동일성을 측정하는 목적을 위해 사용될 수 있다. 각 참조 또는 대상체 서열의 N- 또는 C-말단을

지나서 확장된 질의 (대상체) 서열 또는 참조 서열의 잔기는 % 동일성 점수를 수동으로 조정하는 목적을 위해 고려될 수 있다. 즉, 비교 서열의 N- 또는 C-말단과 매칭되거나 정렬되지 않은 잔기는 % 동일성 점수 또는 정렬 넘버링을 수동으로 조정하는 경우에 계산될 수 있다.

[0133] 예를 들어, 90개의 아미노산 잔기 대상체 서열은 % 동일성을 결정하기 위해 100개의 잔기 참조 서열로 정렬된다. 대상체 서열의 N-말단에서 결실이 발생하고, 따라서 FASTDB 정렬은 N-말단에서 10개의 제1 잔기의 매칭/정렬을 나타내지 않는다. 10개의 쌍을 이루지 않은 잔기는 서열 중 10% (매칭되지 않은 N- 및 C-말단에서의 잔기 수/질의 서열에서의 잔기의 총 수)를 나타내고, 따라서 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 % 동일성 점수로부터 10%를 뺀다. 나머지 90개의 잔기가 완전히 매칭되는 경우, 최종 % 동일성은 90%가 될 것이다. 또 다른 예에서, 90개의 잔기 대상체 서열은 100개의 참조 서열과 비교된다. 이 때, 결실은 내부 결실이어서, 질의 서열과 매칭되거나/정렬되지 않은 대상체 서열의 N- 또는 C-말단에는 잔기가 없다. 이러한 경우, FASTDB에 의해 계산된 % 동일성은 수동으로 보정되지 않는다.

[0134] 또한, 본 발명은 키메라 또는 융합 폴리펩티드를 제공한다. 본원에서 사용되는 "키메라 폴리펩티드" 또는 "융합 폴리펩티드"는 상이한 제2 폴리펩티드와 작동적으로 연결된 참조 폴리펩티드의 구성원 중 적어도 일부분을 포함한다. 제2 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드와 실질적으로 동일하지 않은 폴리펩티드에 상응하는 아미노산 서열을 가지며, 이는 동일하거나 상이한 유기체로부터 유도된다. 융합 폴리펩티드에 대하여, 용어 "작동적으로 연결된"은, 두 서열이, 사용된 서열에 기인하여 제안된 기능을 충족시키도록, 참조 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드가 서로 융합되는 것을 나타내는 것으로 의도된다. 제2 폴리펩티드는 참조 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서 융합 폴리펩티드는 GST-IGF-1 융합 폴리펩티드이고, 여기서 IGF-1 서열은 GST 서열의 C-말단에 융합된다. 그러한 융합 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드의 정체를 촉진시킨다. 또 다른 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 그의 N-말단에서 이종 신호 서열을 함유할 수 있다. 특정 숙주 세포 (예를 들어, 포유동물 숙주 세포)에서, 폴리펩티드의 발현 및/또는 분비는 이종 신호 서열의 사용을 통해 증가될 수 있다.

[0135] 단편 및 융합 폴리펩티드 이외에, 본 발명은 자연 발생 폴리펩티드의 상동체 및 유사체를 포함한다. "상동체"는 본원에서 유사하거나 "동일한" 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 각각 갖는 2개의 핵산 또는 폴리펩티드로 정의된다. 상동체에는 하기 정의된 바와 같은 대립유전자 변이체, 오르토로그, 파라로그, 효능체 및 길항체가 포함된다. 용어 "상동체"는, 유전자 코드의 축중성 때문에 참조 뉴클레오티드 서열과 상이하고, 따라서 참조 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 것과 같은 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 추가로 포함한다. 본원에서 사용된 "자연 발생"은 자연적으로 발생하는 핵산 또는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0136] 폴리펩티드의 효능체는 실질적으로 동일한, 또는 하위세트의, 폴리펩티드의 생물학적 활성을 보유할 수 있다. 폴리펩티드의 길항체는 폴리펩티드의 자연 발생 형태의 활성 중 하나 이상을 억제할 수 있다.

[0137] 본 발명의 조성물 및 방법의 또 다른 보다 구체적인 실시양태에서, ErbB3 리간드는 HRG- β 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편이다. 추가로, ErbB3 리간드의 비제한적 예는 미국 특허 번호 6,136,558, 6,387,638 및 7,063,961에 개시되어 있으며, 이들은 참조로 포함된다.

[0138] 일반적으로, 헤레귤린은 그의 C-말단 부분에 대해 상이한 2개의 변이체 EGF-유사 영역을 기준으로, 2개의 주요 유형 (알파 및 베타)으로 분류된다. 그러나, 이들 EGF-유사 영역은 그 안에 함유된 6개의 시스테인 잔기의 간격에 있어 동일하다. 아미노산 서열 비교를 기준으로, 홈즈(Holmes) 등은 EGF-유사 도메인에서의 첫번째 및 여섯번째 시스테인 사이에서, HRG가 혼파린-결합 EGF-유사 성장 인자 (HB-EGF)와 45% 유사하고, 암페레귤린 (AR)과 35% 동일하고, TGF- α 와 32% 동일하고, EGF와 27% 동일한 것을 발견하였다.

[0139] 44 kDa의 neu 분화 인자 (NDF)는 인간 HRG의 래트 등가물이다. HRG 폴리펩티드와 유사하게, NDF는 이뮤노글로불린 (Ig) 상동성 도메인을 갖고, 이어서 EGF-유사 도메인을 가지며, N-말단 신호 펩티드를 결여한다. 본원에, EGF-유사 영역의 서열을 기재로, 알파 또는 베타 폴리펩티드로 분류되는, 적어도 6종의 별개 섬유모세포 프로-NDF가 있다. 이소형 1 내지 4는 EGF-유사 도메인 및 막황단 도메인 사이에서 가변적인 신축을 기반으로 특성화된다. 따라서, 상이한 NDF 이소형은 대안적인 스플라이싱에 의해 생성되고, 별개의 조직-특이적 기능을 수행할 수 있는 것으로 보인다. 참조로 포함된 유럽 특허 번호 505 148; 및 국제 특허 공개 번호 WO 93/22424 및 WO 94/28133을 참조한다.

[0140] 본 발명의 한 실시양태에서, 조성물 및 방법은 외인성 인슐린 및 인슐린 치환물이 없다. 어구 "외인성 인슐린 또는 인슐린 치환물"은 본 발명의 조성물 또는 방법에 의도적으로 첨가되지 않은 인슐린 또는 인슐린 치환물을

나타내기 위해 본원에서 사용된다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, 방법 및 조성물은 고의적으로 공급된 인슐린 또는 인슐린 치환물이 없다. 그러나, 조성물 또는 방법은 내인성 인슐린이 필수적으로 없는 것은 아니다. 본원에서 사용된 "내인성 인슐린"은 배양된 세포가 본 발명의 방법에 따라 배양되는 경우 저절로 인슐린을 생성할 수 있는 것을 나타낸다. 또한, 내인성 인슐린은 1차 세포 배양으로부터의 잔류 불순물 또는 출발 물질로부터 불순물을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 구체적인 예에서, 본원의 조성물 및 방법은 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 $\mu\text{g/mL}$ 미만의 인슐린을 함유한다.

[0141] 본원에서 사용된 용어 "인슐린"은, 정상적인 생리학상 농도에서 인슐린 수용체와 결합하고 인슐린 수용체를 통해 신호전달을 유도할 수 있는 단백질, 또는 그의 변이체 또는 단편을 지칭한다. 용어 "인슐린"은 천연 인간 인슐린의, 또는 다른 포유동물 인슐린의, 또는 이들 서열에 대한 임의의 상동체 또는 변이체의 폴리펩티드 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 추가로, 용어 인슐린은 인슐린 수용체를 통해 신호전달을 유도하기 위해 인슐린 수용체와 결합할 수 있는 폴리펩티드 단편을 포함한다. 용어 "인슐린 치환물"은 인슐린과 실질적으로 유사한 결과를 제공하기 위해 인슐린 대신에 사용될 수 있는 임의의 아연 함유 화합물을 지칭한다. 인슐린 치환물의 예에는 염화아연, 아연 니트레이트, 브로민화아연 및 황산아연이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0142] 명확하게는, 본 발명에서 고려하는 바와 같이, 인슐린-유사 성장 인자는 인슐린 치환물 또는 인슐린의 상동체가 아니다. 따라서, 또 다른 구체적 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 하나 이상의 인슐린-유사 성장 인자 (IGF) 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편의 사용을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 임의의 외인성 인슐린-유사 성장 인자 (IGF)가 없다. 구체적 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 ng/mL 미만의 IGF-1을 함유한다.

[0143] 본원에서 사용된 용어 "IGF-1R의 활성화제"는 세포 증식, 분화 및 아폽토시스를 조절하는 데 있어 중축 역할을 하는 미토겐을 지칭한다. IGF-1R 활성화제의 효과는 다른 수용체를 통해 매개될 수 있지만, 이들은 전형적으로 IGF-1R를 통해 매개된다. IGF-1R은 또한 종양 바이러스 단백질 및 종양유전자 생성물에 의해 유도된 세포 형질 전환에 관여하고, 상호작용은 특이적 결합 단백질 (IGFBP)의 기에 의해 조절된다. 추가로, IGFBP 프로테아제의 큰 기는 IGFBP를 가수분해하고, 이에 따라 결합된 IGF의 방출이 일어나고, 이어서 IGF-IR과 상호작용할 수 있는 이들의 능력이 재개된다. 본 발명의 목적을 위해, 리간드, 수용체, 결합 단백질 및 프로테아제는 모두 IGF-1R의 활성화제인 것으로 고려된다. 한 실시양태에서, IGF-1R의 활성화제는 IGF-1 또는 IGF-2이다. 추가 실시양태에서, IGF-1R의 활성화제는 IGF-1 유사체이다. IGF-1 유사체의 비제한적 예에는 LongR3-IGF1, 데스 (Des)(1-3)IGF-1, $[\text{Arg}^3]\text{IGF-1}$, $[\text{Ala}^{31}]\text{IGF-1}$, 데스(2,3) $[\text{Ala}^{31}]\text{IGF-1}$, $[\text{Leu}^{24}]\text{IGF1}$, 데스(2,3) $[\text{Leu}^{24}]\text{IGF-1}$, $[\text{Leu}^{60}]\text{IGF-1}$, $[\text{Ala}^{31}][\text{Leu}^{60}]\text{IGF-1}$, $[\text{Leu}^{24}][\text{Ala}^{31}]\text{IGF-1}$, 및 이들의 조합이 포함된다. 추가 실시양태에서, IGF-1 유사체는 인간 인슐린 성장 인자-1의 재조합 유사체인 LongR3-IGF1이다. LongR3-IGF1은 초기에 대략 1 ng/mL 내지 대략 1000 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 5 ng/mL 내지 대략 500 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 50 ng/mL 내지 대략 500 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 100 ng/mL 내지 대략 300 ng/mL 의 농도로 또는 대략 100 ng/mL 의 농도로 존재하는 것으로 고려된다.

[0144] 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 형질전환 성장 인자 베타 (TGF- β) 또는 TGF- β 패밀리 구성원 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편을 포함한다. 본원에서 사용된 용어 "TGF- β 패밀리의 구성원" 등은, TGF- β 패밀리의 공지된 구성원과의 상동성으로 인해, 또는 TGF- β 패밀리의 공지된 구성원과의 기능에 있어서의 유사성으로 인해 당업자에 의해 일반적으로 TGF- β 패밀리에 속하는 것으로 특성화되는 성장 인자를 지칭한다. 본 발명의 특정한 실시양태에서, TGF- β 패밀리의 구성원이 존재하는 경우, TGF- β 패밀리 구성원 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편은 SMAD 2 또는 3을 활성화시킨다. 특정 실시양태에서, TGF- β 패밀리의 구성원은 노달, 액티빈 A, 액티빈 B, TGF- β , 골 형태발생 단백질-2 (BMP2) 및 골 형태발생 단백질-4 (BMP4)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, TGF- β 패밀리의 구성원은 액티빈 A이다.

[0145] 노달이 존재하는 경우에, 이것은 초기에 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 2000 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 1 ng/mL 내지 대략 1000 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 10 ng/mL 내지 대략 750 ng/mL , 또는 보다 바람직하게는 대략 25 ng/mL 내지 대략 500 ng/mL 의 농도로 존재하는 것이 고려된다. 사용되는 경우에, 액티빈 A는 초기에 대략 0.01 ng/mL 내지 대략 1000 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 100 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 25 ng/mL 의 농도, 또는 가장 바람직하게는 대략 10 ng/mL 의 농도로 존재하는 것이 고려된다. 존재하는 경우에, TGF- β 는 초기에 대략 0.01 ng/mL 내지 대략 100 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 50 ng/mL , 또는 보다 바람직하게는 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 20 ng/mL 의 농도로 존재하는 것이 고려된다.

[0146]

본 발명의 추가 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 FGF 수용체의 활성화제가 없다. 현재 섬유모세포 성장 인자의 패밀리의 22개 이상의 공지된 구성원이 있으며, 이들 인자는 4개의 FGF 수용체 중 최소한 하나의 것에 결합한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "FGF 수용체의 활성화제"는 FGF 패밀리의 공지된 구성원과의 상동성으로 인해, 또는 FGF 패밀리의 공지된 구성원과의 기능에 있어서의 유사성으로 인해 FGF 패밀리에 속하는 것으로 당업자에 의해 일반적으로 특징화되는 성장인자를 지칭한다. 특정 실시양태에서, FGF 수용체의 활성화제는 FGF, 예컨대 그러나 비제한적으로 α -FGF 및 FGF2이다. 특정한 실시양태에서, 조성물 및 방법은 외인성 FGF2가 없다. 본원에 사용된 어구 "외인성 FGF2"는 섬유모세포 성장 인자 2, 즉 본 발명의 조성물 또는 방법에 의도적으로 첨가되지 않는 염기성 FGF를 가리킨다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, 방법 및 조성물은 의도적으로 공급되는 FGF2가 없다. 그러나, 조성물 또는 방법은 내인성 FGF2가 반드시 없어야 하는 것은 아닐 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "내인성 FGF2"는 배양된 세포가 본 발명의 방법에 따라 배양될 때 저절로 FGF2를 생성할 수 있는 것을 가리킨다. "내인성 FGF2"는 또한 초기 세포 배양물로부터의 잔류 불순물 또는 출발 물질로부터의 불순물을 가리키는데 사용될 수 있다. 구체적 예에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 ng/mL 미만의 FGF2를 함유한다.

[0147]

그러나, 본 발명의 조성물 및 방법이 FGF 폴리펩티드, 그의 기능적 단편 또는 그의 변이체 중 임의의 것을 비롯한, FGF 수용체의 1 이상의 활성화제를 포함할 수 있는 것이 고려된다. FGF2가 존재하는 경우에, 이것이 초기에 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 100 ng/mL, 보다 바람직하게는 대략 0.5 ng/mL 내지 대략 50 ng/mL, 보다 바람직하게는 대략 1 ng/mL 내지 대략 25 ng/mL, 보다 바람직하게는 대략 1 ng/mL 내지 대략 12 ng/mL의 농도, 또는 가장 바람직하게는 대략 8 ng/mL의 농도로 존재하는 것이 고려된다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 FGF2 이외에 FGF 수용체의 1 이상의 활성화제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물 및 방법은 FGF-7, FGF-10 또는 FGF-22 중 1 이상 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편을 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, FGF-7, FGF-10 및 FGF-22 중 2 이상의 조합, 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, FGF-7, FGF-10 및 FGF-22 중 3 모두, 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편이 존재한다. FGF-7, FGF-10 또는 FGF-22 중 임의의 것 또는 변이체 또는 기능적 단편이 존재하는 경우에, 각각이 초기에 대략 0.1 ng/mL 내지 대략 100 ng/mL, 보다 구체적으로 대략 0.5 ng/mL 내지 대략 50 ng/mL, 보다 구체적으로 대략 1 ng/mL 내지 대략 25 ng/mL, 보다 구체적으로 대략 1 ng/mL 내지 대략 12 ng/mL의 농도, 또는 가장 구체적으로 대략 8 ng/mL의 농도로 존재하는 것이 고려된다.

[0148]

추가의 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 혈청 알부민 (SA)을 포함한다. 구체적 실시양태에서, SA는 소 SA (BSA) 또는 인간 SA (HAS)이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, SA의 농도는 약 0.2% 부피 대 부피 (v/v) 초과, 약 10% v/v 미만이다. 보다 더 구체적인 실시양태에서, SA의 농도는 약 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1.0%, 1.2%, 1.4%, 1.6%, 1.8%, 2.0%, 2.2%, 2.4%, 2.6%, 2.8%, 3.0%, 3.2%, 3.4%, 3.6%, 3.8%, 4.0%, 4.2%, 4.4%, 4.6%, 4.8%, 5.0%, 5.2%, 5.4%, 5.6%, 5.8%, 6.0%, 6.2%, 6.4%, 6.6%, 6.8%, 7.0%, 7.2%, 7.4%, 7.6%, 7.8%, 8.0%, 8.2%, 8.4%, 8.6%, 8.8%, 9.0%, 9.2%, 9.4%, 9.6% 및 9.8% (v/v) 초과이다.

[0149]

추가 실시양태에서, 조성물 및 방법은 1개 이상의 불용성 기재를 포함한다. 예를 들어, 분화가능한 세포는, 비제한적으로 폴리스티렌, 폴리프로필렌과 같은 화합물을 포함하는 세포 배양 표면 상에 위치할 수 있다. 표면은 결국 불용성 기재로 코팅될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 불용성 기재는 콜라겐, 피브로넥틴 및 그의 단편 또는 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 불용성 기재의 다른 예는 피브린, 엘라스틴, 피브로넥틴, 라미닌 및 니도겐을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0150]

따라서, 본 발명의 세포 배양 환경 및 방법은 부착 배양으로 세포를 플레이팅하는 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "플레이팅된" 및 "플레이팅하는"은 세포를 부착 배양으로 성장시키는 것을 가능하게 하는 임의의 과정을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "부착 배양"은 결국 기재의 또 다른 표면 코팅, 예컨대 하기 열거되는 것, 또는 배양에서 세포를 증식시키거나 또는 안정화시키는 임의의 다른 화학적 또는 생물학적 물질로 결국 코팅될 수 있는 불용성 기재로 코팅될 수 있는 고체 표면 상에서 세포가 배양되는 세포 배양 시스템을 지칭한다. 세포는 고체 표면 또는 기재에 단단히 부착될 수 있거나 부착되지 않을 수 있다. 부착 배양을 위한 기재는 폴리오르니틴, 라미닌, 폴리-리신, 정제된 콜라겐, 젤라틴, 피브로넥틴, 테나신, 비트로넥틴, 엔탁틴, 혜파린 술페이트 프로테오글리칸, 폴리 당분해 산 (PGA), 폴리 락트산 (PLA), 및 폴리 락트산-글리콜산 (PLGA) 중 임의의 하나 또는 조합을 포함할 수 있다. 또한, 부착 배양을 위한 기재는 공급자 층에 의해 놓여진, 또는 만능 인간 세포 또는 세포 배양물에 의해 놓여진 매트릭스를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포외 매트릭스"는 고체 기재, 예컨대 그러나 비제한적으로 상기 기재된 것, 뿐만 아니라 공급

자 세포 층에 의해 또는 만능 인간 세포 또는 세포 배양물에 의해 놓여진 매트릭스를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 매트리겔™-코팅된 판 상에 플레이팅된다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 피브로넥틴-코팅된 판 상에 플레이팅된다. 특정 실시양태에서, 세포가 피브로넥틴 상에 플레이팅된 경우에, 판은 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인간 혈장 피브로넥틴 (인비트로젠, #33016-015)으로 코팅됨으로써 제조되고, 조직 등급 물에서 2-3 시간 동안 실온에서 희석된다. 또 다른 실시양태에서, 혈청은 배지 중에 24 시간 이하 동안 위치시켜 세포를 플라스틱에 플레이팅되도록 한다. 혈청을 사용하여 세포의 부착을 촉진시키는 경우에, 이어서 배지는 제거되고, 본질적으로 무혈청인 조성물은 플레이팅된 세포에 첨가된다.

[0151] 본 발명의 조성물 및 방법은 분화가능한 세포를 공급자 세포 또는 공급자 층이 본질적으로 존재하지 않는 조건에서 배양하는 것을 고려한다. 본원에 사용된 바와 같은 "공급자 세포"는 시험관내에서 성장하고, 즉 표적 세포와 함께 배양되고 그의 분화의 현재 단계에서 표적 세포를 안정화시키는 세포이다. 본원에 사용된 바와 같은 "공급자 세포 층"은 용어 "공급자 세포"와 교환하여 사용될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "공급자 세포가 본질적으로 존재하지 않는"은 공급자 세포를 함유하지 않거나, 또는 최소한의 수의 공급자 세포를 함유하는 조직 배양 조건을 지칭한다. "최소한의"는 분화가능한 세포가 공급자 세포 상에서 배양될 수 있는 이전 배양 조건으로부터 현재 배양 조건에 걸친 공급자 세포의 수를 의미한다. 상기 방법의 한 실시양태에서, 조건 배지는 그의 분화의 현재 상태에서 표적 세포를 안정화시키는 공급자 세포로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, 규정 배지는 공급자 세포로부터 수득되지 않은 배지인 비-조건 배지이다.

[0152] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "안정화시키다"는, 세포의 분화 단계 또는 세포의 배양에 관련하여 사용되는 경우에, 세포가 배양에서 다중 계대에 걸쳐, 바람직하게는 배양에서 무기한으로 증식을 지속할 것이고, 배양에서 모두가 아니더라도 대부분의 세포가 동일한 분화 단계인 것을 가리킨다. 또한, 안정화된 세포가 분열하는 경우에, 분열은 전형적으로 동일한 세포 유형의 세포를 얻거나 또는 동일한 분화 단계의 세포를 얻는다. 안정화된 세포 또는 세포 집단은 일반적으로, 세포 배양 조건이 변경되지 않는 한 추가로 분화하거나 또는 탈-분화하지 않고, 세포는 계대를 지속하며, 과성장하지 않는다. 한 실시양태에서, 안정화된 세포는 안정한 상태에서 무기한으로 또는 적어도 2 초과의 계대 동안 증식할 수 있다. 보다 구체적인 실시양태에서, 세포는 3 계대, 4 계대, 5 계대, 6 계대, 7 계대, 8 계대, 9 계대 초과, 10 계대 초과, 15 계대 초과, 20 계대 초과, 25 계대 초과, 또는 30 계대 초과 동안 안정하다. 한 실시양태에서, 세포는 대략 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6 개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 또는 11개월 초과의 연속식 계대 동안 안정하다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 대략 1년 초과의 연속식 계대 동안 안정하다. 한 실시양태에서, 줄기 세포는 이들이 분화되는 것이 요구될 때까지, 규정 배지에서 일상적인 계대에 의해 만능 상태의 배양으로 유지된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "증식"은 세포 배양에서 세포 수가 증가하는 것을 지칭한다.

[0153] 특정 실시양태에서, 조성물 및 방법은 BMP 신호전달의 불활성화제를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "BMP 신호전달의 불활성화제"는 1 이상의 BMP 단백질 또는 그의 상류 또는 하류 신호전달 성분 중 임의의 것의 활성에 대해 그의 가능한 신호전달 경로 중 임의의 것을 통해 길항작용하는 작용제를 지칭한다. BMP 신호전달을 불활성화시키는데 사용되는 화합물(들)은 당업계에 공지되거나, 또는 이후에 발견되는 임의의 화합물일 수 있다. BMP 신호전달의 불활성화제의 비제한적 예는 우세-음성, 절두형 BMP 수용체, 가용성 BMP 수용체, BMP 수용체-Fc 키메라, 노진, 폴리스타틴, 코르딘, 그램린, 세르베루스/DAN 패밀리 단백질, 벤트로핀, 고용량 액티빈 및 암니온레스를 포함한다.

[0154] 특정 실시양태에서, 조성물 및 방법은 1 이상의 호르몬, 시토카인, 아디포카인, 성장 호르몬 또는 그의 변이체 또는 기능적 단편을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 규정 배지에 존재하는 성장 호르몬이 규정 배지와 함께 배양되는 분화가능한 세포와 동일한 종일 것이라는 것이 여기서 고려된다. 따라서, 예를 들어, 인간 세포가 배양되는 경우에, 성장 호르몬은 인간 성장 호르몬이다. 배양된 세포와 상이한 종인 성장 호르몬을 사용하는 것이 또한 고려된다. 바람직하게는 호르몬, 시토카인, 아디포카인 및/또는 성장 호르몬은 대략 0.001 ng/mL 내지 대략 1000 ng/mL , 보다 바람직하게는 대략 0.001 ng/mL 내지 대략 250 ng/mL , 또는 보다 바람직하게는 대략 0.01 ng/mL 내지 대략 150 ng/mL 의 초기 농도로 존재한다.

[0155] 본 발명의 조성물 및 방법에 포함될 수 있는 시토카인 및 아디포카인의 예는 비제한적으로 시토카인의 4 α -나선형 다발 패밀리, 시토카인의 인터류킨-1 (IL-1) 패밀리, 시토카인의 IL-17 패밀리 및 시토카인의 케모카인 패밀리를 포함한다. 물론, 본 발명은 시토카인의 각각의 이를 패밀리의 구성원 및 하위부류, 예컨대 그러나 비제한적으로 CC 케모카인, CXC 케모카인, C 케모카인 및 CX₃C 케모카인, 인터페론, 인터류킨, 림프독소, c-kit 리간드, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 단핵구-대식세포 콜로니-자극 인자 (M-CSF), 과립구 콜로니

-자극 인자 (G-CSF), 랩틴, 아디포넥틴, 레지스틴, 플라스미노겐 활성화제 억제제-1 (PAI-1), 종양 괴사 인자-알파 (TNF α), 종양 괴사 인자-베타 (TNF β), 백혈병 억제 인자, 비스파틴, 레티놀 결합 단백질 4 (RBP4), 에리트로포이에틴 (EPO), 트롬보포이에틴 (THPO)을 고려한다. 물론, 당업자는 본 발명이 상기-열거된 인자의 변이체 또는 기능적 단편을 고려한다는 것을 이해할 것이다.

[0156] 본 발명은 분화가능한 세포를 세포 배양 표면 상에 플레이팅하고, 기본 염 영양 용액을 세포에 제공하고, 세포에서 ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성을 자극하기 위한 수단을 제공하는 것을 포함하는, 분화가능한 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다.

[0157] 한 실시양태에서, 분화가능한 세포는 혈청 또는 혈청 대체물의 부재 하에, 및 공급자 세포 층의 부재 하에 1 이상의 본 발명의 조성물과 접촉하여, 세포가 1개월 이상 동안 미분화된 상태로 유지된다. 만능성은 표면 마커, 전사 마커, 핵형, 및 3개의 배엽층의 세포로 분화할 수 있는 능력과 관련한 세포의 특성화로 결정될 수 있다. 이들 특성은 당업자에게 잘 공지되어 있다.

[0158] 본 발명의 실시양태는 인간 만능 줄기 세포, 예컨대 hESC, 예를 들어 그러나 비제한적으로 CyT49, CyT203, CyT25, BG01, BG02 및 MEL1, 및 유도 만능 줄기 (iPS) 세포, 예컨대 iPSC-482c7 및 iPSC-603 (Cellular Dynamics International, Inc., Madison, Wisconsin) 및 iPSC-G4 및 iPSC-B7 (Shinya Yamanaka, Center for iPS Cell Research, Kyoto University)를 비롯한 다양한 분화가능한 pPSC를 기재하며; G4 및 B7을 사용한 연구는 그의 전문이 본원에 참조로 포함된, 2010년 4월 22일에 출원된 명칭 탈분화된 리프로그래밍된 세포로부터 유도된 세포 조성물 (CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELL)의 미국 특허 출원 번호 12/765,714에 자세히 기재되어 있다. 특정 이들 인간 만능 줄기 세포는 국가 등록기관, 예컨대 미국 국립 보건원 (NIH)에 등록되어 있고, NIH 인간 줄기 등록물 (예를 들어, CyT49 등록 번호 #0041)으로 목록화되어 있다. CyT49 및 다른 가용 세포주에 대한 정보는 또한 월드와이드 웹 stemcells.nih.gov/research/registry에서 찾을 수 있다. 여전히 다른 세포주, 예를 들어 BG01 및 BG01v는 각각 WiCell®, 위스콘신 국제 줄기 세포 (WISC) 은행 (카탈로그 번호 BG01)의 계열사 및 ATCC (카탈로그 번호 SCRC-2002)에 의해 제3자에게 시판되고 유통된다. 본원에 기재된 다른 세포주가 생물학적 저장소, 예컨대 WiCell® 또는 ATCC에 의해 등록되거나 유통되지 않더라도, 이러한 세포주는 연구원, 실험실 및/또는 기관으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 공중에게 입수 가능하다. 세포주 및 시약이 필요한 공중은 예를 들어 생명과학 당업자에게 익숙하다. 전형적으로, 이들 세포 또는 물질의 이전은 세포주 또는 물질의 소유주 및 수용자 사이의 표준 물질 이전 계약 방식에 의해 이루어진다. 이들 유형의 물질 이전은 연구 환경에서, 특히 생명과학에서 흔히 일어난다. 실제로, 출원인은 CyT49 (2006), CyT203 (2005), CyT25 (2002), BG01 (2001), BG02 (2001), BG03 (2001) 및 BG01v (2004)를 비롯하여 이들이 유도되고 특성화된 시점 아래로, 상업적 및 비영리 산업 파트너 및 공동연구자와의 이러한 계약을 통해 세포를 이전하였다. 팔호 안의 데이터는 세포주 또는 물질이 공중에게 입수 가능하게 된 시점을 가리킨다.

[0159] 2006년 8월에, 클리만스카야 (Klimanskaya) 등은 hESC가 단일 할구로부터 유래할 수 있으며, 이런 이유로 원상태의 배로 유지되고 그의 파괴를 야기하지 않음을 입증하였다. 생체검사는 미세조작 기술을 사용하여 각각의 배아로부터 수행하고, 열아홉 (19)개의 ES-세포-유사 파생물 및 두 (2)개의 안정한 hESC주를 수득한다. 이들 hESC주는 육 (6)개월에 걸친 동안 미분화된 상태로 유지될 수 있으며, 정상 핵형 및 만능의 마커, 예를 들어 Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, 나노그 및 알칼리성 포스파타제의 발현을 나타낸다. 이들 hESC는 분화하고, 시험관내에서 세 (3)개의 모든 배엽층의 유도체를 형성하고 생체내에서 기형종을 형성하였다. 배아의 파괴 없이 신규한 줄기 세포주를 생성하는 이들 방법은 인간 배아를 사용하는 것과 관련하여 윤리적 우려가 있다. 그의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Klimanskaya et al. 2006 Nature 444:481-5, Epub 2006 Aug 23]을 참조한다.

[0160] 우선권 가출원 미국 특허 출원 번호 60/805,039의 2006년 6월 16일의 최초 출원 이후에, 본원은 특정 CyT 또는 BG hES 세포주를 사용하였으나, 다른 연구자들은 다른 인간 만능 줄기 세포주, 예를 들어 그러나 비제한적으로 H7, H9, HUES7, H1, HSF6, chHES-8 (ch= 중국), chHES-20 및 chHES-22, H9, BG01, BG02, HUES4, HUES8, HUES9 및 HUES 2; 그의 전문이 본원에 참조로 포함된 2010년 4월 22일 출원된 명칭 탈분화된 리프로그래밍된 세포로부터 유도된 세포 조성물의 미국 특허 공개 번호 2010-0272695에 기재된 다른 유도 만능 (iPS) 줄기 세포주, 예컨대 DiPS-H1 & DiPS-H2 (T1-당뇨병 특이적 iPS 세포) 및 다른 iPS 세포; 및 인간 만능 줄기 세포, 예컨대 인간 단위생식 줄기 세포 (hpSC)를 사용하는 최초에 기재된 방법 또는 그의 변형을 사용하는 보고서를 공개하였다. 예를 들어 그의 전문이 참조로 본원에 포함되는 문헌 [D' Amour et al. 2005, Nature Biotechnology 23:1534-1541; Cai et al. 2007, Hepatology, 45:1229-39; King et al. 2008, Regen. Med. 3:175-80; Zhou et al. 2008, Stem Cells & Development 17:737-750; Brunner et al. 2009, Genome Res. 19:1044-1056; Maehr et al.

2009, PNAS 106:15768-15773; Argawal et al. 2008, Stem Cells 26:1117-1127; Bingham et al. 2009, Stem Cells & Devel 18:1-10; Borowiak et al. 2009, Cell Stem Cell 4:348-358; Chen et al. 2009, Nature Chem Biology 5:258:265; Revazova et. al. 2007, Cloning Stem Cells 9:432-449; Turovets et. al. 2011, Differentiation 81:292-8, Epub 2011 Feb 8]을 참조한다. 따라서, 본 발명의 방법이 본원에 기재된 만능 세포에 제한되지 않는다는 것을 입증하는 풍부한 증거가 연구단체에 의해 제공된다.

[0161]

표 1 및 2는 각각 연구 및/또는 상업용 목적으로 입수가능하고 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 특정 hESC 및 iPSC의 추가될 수 있는 목록이다. 표 1 및 2의 정보는 문헌 및 공개적으로 입수가능한 데이터베이스, 예를 들어 미국 매사추세츠주 우스터 매사추세츠 의과 대학에 위치한 미국 국립 보건원 (NIH) 줄기 세포 등록소, 인간 배아 줄기 세포 등록소 및 국제 줄기 세포 등록소로부터 얻어진다. 이들 데이터베이스는 세포주가 입수가능해지고 등록됨에 따라 주기적으로 업데이트된다.

표 1: 인간 ES 세포주

기관(국가)	명칭
미국	
브레사젠, 인크.(BresaGen, Inc.; 미국 조지아주 아테네 소재)	BG01, BG02, BG03; BG04; BG01v
인비트로젠(미국)	BG01v/hOG
시데라, 인크.(CyThera, Inc.; 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재)	CyT49, CyT203, CyT25
게론 코포레이션(Geron Corporation; 미국 캘리포니아주 멘로파크 소재)	GE01, GE07, GE09, GE13, GE14, GE91, GE92 (H1, H7, H9, H13, H14, H9.1, H9.2)
캘리포니아 대학교(미국 캘리포니아주 샌프란시스코 소재)	UC01, UC06 (HSF-1, HSF-6); UCSFB1, UCSFB2, UCSFB3, UCSFB4, UCSFB5, UCSFB6, UCSFB7, UCSFB8, UCSFB9 & UCSFB10
위스콘신 얼럼나이 연구 기관(Wisconsin Alumni Research Foundation; 미국 위스콘신주 매디슨 소재)	WA01, WA07, WA09, WA13, WA14 (H1, H7, H9, H13, H14)
소아 병원 코포레이션(Children's Hospital Corporation ; 미국 소재)	CHB-1, CHB-2 CHB-3 CHB-4, CHB-5, CHB-6, CHB-8, CHB-9, CHB-10, CHB-11 & CHB-12
록펠러 대학교(미국 소재)	RUES1, RUES2 & RUES3
하버드 대학교(미국 소재)	HUES1, HUES2, HUES3, HUES4, HUES5, HUES6, HUES7, HUES8, HUES9, HUES10, HUES11, HUES12, HUES13, HUES14, HUES15, HUES16, HUES17, HUES18, HUES19, HUES20, HUES21, HUES22, HUES23, HUES24, HUES25, HUES26, HUES27, HUES28; HUES48; HUES49; HUES53; HUES55 & HUES 56
마운트 시나이 호스-사무엘 루넨펠드 연구소(Mt Sinai Hospital-Samuel Lunenfeld Research Institute; 미국 소재)	CA1 & CA2
소아 기념 병원(Children's Memorial Hospital; 미국 소재)	CM-1, CM-2, CM-5, CM-6, CM-7, CM-8, CM-11, CM-12, CM-13, CM-14, CM-16

[0162]

기관(국가)	명칭
휴스턴의 텍사스 헬스 사이언스 센터 대학교(미국 소재)	CR1 & CR2
캘리포니아 줄기 세포, 인크.(California Stem Cell, Inc.; 미국 소재)	CSC14
코네티컷 대학교 의과대학/치과대학(미국 소재)	CSC14, CT1, CT2, CT3, & CT4
광저우 의과대학 제 3 협력 병원 (미국 소재)	FY-3PN; FY-hES-1; FY-hES-3; FY-hES-5; FY-hES-7 & FY-hES-8
어드밴스드 셀 테크놀로지, 인크.(Advanced Cell Technology, Inc.; 미국 소재)	MA 01; MA 09; MA 42; MA 50; MA135; NED 1; NED 2; NED 3 & NED 4
스탠포드 대학교(미국 소재)	MFS5
뉴욕 대학교 의과대학(미국 소재)	NYUES1; NYUES2; NYUES3; NYUES4; NYUES5; NYUES6 & NYUES7
리프로지네틱스, 엘엘씨(Reprogenetics, LLC; 미국 소재)	RNJ7
캘리포니아 대학교(미국 로스앤젤레스 소재)	UCLA1; UCLA2 & UCLA3
이스턴 버지니아 의과대학(미국 소재)	ES-76; ES-78-1; ES-78-2
생식 유전자 연구소(Reproductive Genetics Institute, 미국 소재)	RG-222; RG-230; RG-249; RG-308; RG-313; RG-148; 근육긴장성 이영양증 1 (DM1), 발병, 46,XY; RG-153; 근육긴장성 이영양증 1 (DM1), 발병, 46,XX; RG-170; 근육 이영양증, 베커 유형 (BMD), 발병, 46,XY; RG-186; 헌팅تون병 (HD), 발병, 46,XX; RG-194; 헌팅تون병 (HD), 발병, 46,XY; RG-233; 해모글로빈 베타 유전자자리(HBB), 발병 (HbS/HbS - 겹상 적혈구성 빈혈), 46,XX; RG-245; 에머리-드레이풀스 근육 이영양증, X-연관성 (EDMD), 담체, 47,XXY;

기관(국가)	명칭
	RG-246; 에머리-드레이퍼스 근육 이영양증, X- 연관성 (EDMD), 발병, 46,XY; RG-271; 비틀림 이상긴장증 1 (DYT1), 상염색체 우성, 발병 (N/GAG del), 46,XY; RG-283; 근육 이영양증, 뒤시엔느 유형 (DMD), 발병, 46,XY; RG-288; 낭성 섬유증 (CF), 발병 (델타 F508/델타 F508), 46,XY; RG-289; 낭성 섬유증 (CF), 발병 (델타 F508/델타 F508), 46,XX; RG-301; 근육 이영양증, 뒤시엔느 유형(DMD) 발병, 46,XY; RG-302; 근육 이영양증, 뒤시엔느 유형 (DMD), 담체, 46,XX; RG-315; 신경섬유증증, 유형 I(NF1), 발병 (R19 47X/N), 46,XY; RG-316; 결절성 경화증, 유형 1(TSC1), 발병 (N/IVS7+1 G-A); RG-316; 결절성 경화증, 유형 1(TSC1), 발병 (N/IVS7+1 G-A); RG-320; 결절성 경화증, 유형 1(TSC1), 발병 (N/IVS7+1 G-A); RG-326; 슬와 익상편 증후군(POPLITEAL PTERYGIUM SYNDROME: PPS),발병 (R84H/N), 46,XY; RG-328; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병, 46,XY; RG-330; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병, 46,XY; RG-333; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병, 46,XX; RG-356; 해모글로빈 알파 유전자자리(HBA), 발병 (-알파 /-), 46,XX; RG-357; 에머리-드레이퍼스 근육 이영양증, X- 연관성 (EDMD), 발병, 46,XY; RG-358; 에머리-드레이퍼스 근육 이영양증, X- 연관성 (EDMD), 발병, 46,XY; RG-399; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병, 46,XX; RG-401; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병, 46,XX; RG-402; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병, 46,XX; RG-403; 안면건갑상완 근육 이영양증 1A (FSHD), 발병; RG-404; 척수성 근육 위축, 유형 I (SMA1), 발병, 46,XY; RG-406; 비틀림 이상긴장증 1, 상염색체 우성 (DYT1), 발병 (N/GAG del); RG-413; 유방암, 가족성 (BRCA2),발병 (N/IVS7 GT del) & 다중 내분비 신생물, 유형 I (MEN1), 발병 (N/3036 4bp del); RG-414; 다중 내분비 신생물, 유형 I (MEN1), 발병 (N/3036 4bp del);

기관(국가)	명칭
	RG-415; 헌팅تون병 (HD), 발병;
	RG-416; 남성 섬유증 (CF), 발병 (델타 F508/1717-1 G-A);
	RG-417; 남성 섬유증 (CF), 발병 (델타 F508/1717-1 G-A);
	RG-418; 헤모글로빈 베타 유전자자리 (HBB), 발병 (cd8+G /619del);
	RG-420; 헤모글로빈 베타 유전자자리 (HBB), 발병 (cd8+G/619del);
	RG-422; 남성 섬유증 (CF), 발병 (N1303K/델타 F508);
	RG-423; 남성 섬유증 (CF), 담체 (N/델타 F508);
	RG-424; 다중 내분비 신생물, TYPE 2 (MEN2B), 발병 (M918T/N);
	RG-426; 펠리제우스-메르츠바히 질환 (PMLD), 발병;
	RG-428; 결절성 경화증, 유형 1 (TSC1), 발병 (N/IVS7+1 G-A)
<hr/>	
남미	
인스티튜토 데 바이오사이언시아스(Instituto de Biociências; 브라질 상파울로 소재)	BR-1
<hr/>	
중동	
테크니온-이스라엘 공과대학(Technion-Israel Institute of Technology; 이스라엘 하이파 소재)	TE03, TE04, TE06 (I 3, I 4, I 6)
하다사 대학병원(Hadassah University Hospital; 이스라엘 소재)	HAD 1; HAD 2; HAD 3; HAD 4; HAD 5; HAD 6
예루살렘 히브루 대학교(Hebrew University of Jerusalem)	HEFX1
테크니온-이스라엘 공과대학 로안 연구소(Royan Institute; 이란 소재)	I3; I3.2; I3.3; 14; 16; 16.2; J3; J3.2 ARMD.1.H.iPSC.2; BOM.1.H.iPSC.1; CNS.1.H.iPSC.10; CNS.2.H.iPSC.7; FHC.1.H.iPSC.3; GSD.1.H.iPSC.7; HER.1.H.iPSC.1; LCA.1.H.iPSC.1; LHON.1.H.iPSC.5; R.1.H.iPSC.1; R.1.H.iPSC.4; R.1.H.iPSC.9; 로안 H1; 로안 H10; 로안 H2; 로안 H3; 로안 H4; 로안 H5; 로안 H6; 로안 H7; 로안 H8; 로안 H9; RP.1.H.iPSC.2;

기관(국가)	명칭
	RP2.H.iPSC.3; TYR.1.H.iPSC.1; USH.1.H.iPSC.6
유럽	
셀라티스 에이비(Cellartis AB; 스웨덴 고텐베르그 소재)	SA001, SA002 (살그렌스카 1, 살그렌스카 2); SA002.2; SA003; AS034.1; AS034.1.1; AS034.2; AS038; AS046; FC018; AS085; AS094; SA111; SA121; SA142; SA167; SA181; SA191; SA196; SA202; SA203; SA211; SA218; SA240; SA279; SA348; SA352; SA399; SA461; SA502; SA506; SA521; SA540; SA611
카롤린스카 연구소(Karolinska Institutet; 스웨덴 소재)	HS181; HS207; HS235; HS237; HS293; HS306; HS346; HS351; HS356; HS360; HS361; HS362; HS363; HS364; HS366; HS368; HD380; HS382; HS400; HS401; HS402; HS415; HS420; HS422; HS426; HS429; HS429A; HS429B; HS429C; HS429D; HS475; HS480; HS481; HS539
에테보리 대학교(Göteborg University; 스웨덴 에테보리 소재)	SA04-SA19 (살그렌스카 4- 살그렌스카 19)
카롤린스카 연구소(스웨덴 스톡홀름 소재)	KA08, KA09, KA40, KA41, KA42, KA43 (hICM8, hICM9, hICM40, hICM41, hICM42, hICM43)
제네바 대학교(스위스 소재)	CH-ES1
바젤 대학교(스위스 소재)	CH-ES3; CH-ES3; CH-ES5
로슬린 셀스 엘티디(Roslin Cells Ltd; 영국 소재)	RC2; RC3; RC4; RCS
뉴캐슬어폰타인 대학교(University of Newcastle upon Tyne; 영국 소재)	NCL-1; NCL-2; NCL-3; NCL-4; NCL-5; NCL-6; NCL-7; NCL-8; NCL-9
로슬린 연구소(에든버러 소재) & 게론 코포레이션(Geron Corporation; 영국 소재)	RH1; RH2; RH3; RH4; RH5; RH6; RH7; RH9;
맨체스터 대학교(영국 소재)	Man 2
런던 킹스 대학(영국 소재)	KCL-001 (이전에 WT3)
세필드 대학교(영국 세필드 소재)	SHEF-1; SHEF-2; SHEF-3; SHEF-4; SHEF-5; SHEF-6; SHEF-7; SHEF-8
에든버러 대학교 & 옥스포드 대학교; 캠브리지 대학교 (영국 소재)	Edi-1; Edi-2; Edi-3; Edi-4
로슬린 셀스 엘티디, 로슬린 연구소, 에든버러 대학교 &	RCM-1; RC-1; RC-2; RC-3; RC-4; RC-5; RC-6; RC-7; RC-8; RC-9; RC-10

기관(국가)	명칭
맨체스터 대학교, 중앙 맨체스터 & 맨체스터 소아 대학병원 NHS 트러스트(영국 소재)	
런던 킹스 대학 & 가이즈 병원 트러스트(King's College London & Guy's Hospital Trust) / 가이즈 & 세인트 토마스	KCL-003-CF1 (0 전에 CF1); KCL-005-HD1; KCL008-HD-2; KCL009- trans-1; KCL-001 (WT-3); KCL-001 (WT-4)
자선재단(Charitable Foundation of Guy's & St Thomas) (영국 소재)	
줄기세포 사이언시스 엘티디(Stem Cell Sciences Ltd: SCS; 호주 소재) & 호주 줄기세포 센터(Australian Stem Cell Centre :ASCC)	MEL-1; MEL-2; MEL-3; MEL-4
에든버러대학교(영국 소재)	CB660
액소디아 엘티디.(Axordia Ltd.) (영국 소재)	Shef-1; Shef-2; Shef-3; Shef-4; Shef-5; Shef-6; Shef-7
노팅엄 대학교(영국 소재)	Nott-1; Nott-2
바르셀로나 재생의학 센터(스페인 소재)	ES-2; ES-3; ES-4; ES-5; ES-6; ES-7; ES-8; ES-9; ES-10; ES-11EM; cFA404-KiPS4F-1; cFA404-KiPS4F-3; KiPS3F-7; KiPS4F-1; KiPS4F-8
펠리페 왕자 조사센터(Principe Felipe Centro de Investigacion; 스페인 소재)	VAL-3; VAL-4; VAL-5; VAL-6M; VAL-7; VAL-8; VAL-9; VAL-10B
브뤼셀 자유 대학교(Université Libre de Bruxelles; 벨기에 소재)	ERA-1; ERA2; ERA-3; ERAMUC-1; ERAMUC-1
브뤼셀브리에대학교(Vrije Universiteit Brussel; 벨기에 소재)	VUB01; VUB02; VUB06; VUB07; VUB03_DM1; VUB04_CF; VUB05_HD; VUB08_MFS; VUB09_FSHD; VUB10_SCA7; VUB11_FXS; VUB13_FXS; VUB14; VUB19_DM1; VUB20_CMT1A; VUB22_CF; VUB23_OI; VUB24_DM1; VUB26; VUB27; VUB28_HD_MFS
중앙 맨체스터 및 맨체스터 소아 대학병원 NHS(Central Manchester and Manchester Children's University Hospitals NHS; 영국 소재)	Man 1; Man 2

기관(국가)	명칭
파리 11 대학(Université Paris-Sud 11; 프랑스 소재)	CL01; CL02; CL03; PB04; PB05; PB05-1; PB06; PB06-1; PB07; PB08; PB09; PB10
INSERM (프랑스 소재)	OSCAR; STR-I-155-HD; STR-I-171-GLA; STR-I-189-FRAXA; STR-I- 203-CFTR; STR-I-209-MEN2a; STR-I-211-MEN2a; STR-I-221-Sca2; STR-I-229-MTMX; STR-I-231-MTMX; STR-I-233-FRAXA; STR-I-251- CFTR; STR-I-301-MFS; STR-I-305-APC; STR-I-315-CMT1a; STR-I- 347-FRAXA; STR-I-355-APC; STR-I-359-APC
마사리크 대학교(Masaryk University; 체코 소재)	CCTL 6; CCTL 8; CCTL 9; CCTL 10; CCTL 12; CCTL 13; CCRL 14
올보르 대학교(Aalborg University; 덴마크 소재)	CLS1; CLS2; CLS3; CLS4
코펜하겐 대학교(덴마크 소재)	LRB001; LRB002; LRB003; LRB004; LRB005; LRB006; LRB007; LRB008; LRB009; LRB010; LRB011; LRB013; LRB014; LRB016; LRB017; LRB018;
덴마크 남부대학교	KMEB1; KMEB2; KMEB3; KMEB4; KMEB
헬싱키 대학교(핀란드 소재)	FES21; FES22; FES29; FES30; FES61; FES75
坦페레 대학교(핀란드 소재)	Regea 06/015; Regea 06/040; Regea 07/027; Regea 07/046; Regea 08/013; Regea 08/017; Regea 08/023; Regea 08/056
라이덴 대학교 의학 센터(네덜란드 소재)	HESC-NL1; HESC-NL2; HESC-NL3; HESC-NL4
러시아 과학 아카데미(러시아 소재)	ESM01; ESM02; ESM03;
이스탄불 기념 병원(터키 소재)	MINE: NS-2; NS-3; NS-4; NS-5; NS-6; NS-7; NS-8; NS-9; NS-10; OZ-1; OZ-2; OZ-3; OZ-4; OZ-5; OZ-6; OZ-7; OZ-8
호주	
모나쉬 대학교(호주 소재)	엔비(Envy)
프린스 오브 웨일스 병원(Prince of Wales Hospital; 호주 시드니 소재)	E1C1; E1C2; E1C3; E1C4; 인데버 1; 인데버 2; hES3.1; hES3.2; hES3.3
시드니 IVF 리미티드(호주 소재)	SIVF01; SIVF03; SIVF05; SIVF06; SIVF07; SIVF08; SIVF09; SIVF10; SIVF11; SIVF12; SIVF13
아시아	
고토대학교(일본 소재)	201B1; 201B2; 201B3; 201B6; 201B7; 243H1; 243H7; 246G1; 246G3; 246G4; 246G5; 246G6; khES-1; khES-2; khES-3;
싱가폴 줄기세포	ESI-013; ESI-014; ESI-017; ESI-027; ESI-035; ESI-049; ESI-051; ESI-

기관(국가)	명칭
컨소시엄(Singapore Stem Cell Consortium)	053
ES 세포 인터내셔널 피티이 엘디(ES Cell International Pte Ltd; 싱가폴 소재)	ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, ES06 (HES-1, HES-2, HES-3, HES-4, HES-5, HES-6
마리아 바이오텍 코.엘티디- 마리아 불임 병원 의학 연구소(Maria Biotech Co. Ltd. – Maria Infertility Hospital Medical Institute; 한국 서울 소재)	MB01, MB02, MB03; MB04; MB05; MB06; MB07; MB08; MB09
미즈메디 병원- 서울대학교(MizMedi Hospital— Seoul National University; 한국 서울 소재)	MI01 (Miz-hES1); Miz-hES2; Miz-hES3; Miz-hES4; Miz-hES5; Miz- hES6; Miz-hES7; Miz-hES8; Miz-hES9; Miz-hES10; Miz-hES11; Miz- hES12; Miz-hES13; Miz-hES14; Miz-hES15;
포천 CHA 대학교 의과대학 CHA (한국 소재)	CHA-hES3; CHA-hES4
서울대학교 (한국 소재)	SNUhES1; SNUhES2; SNUhES3; SNUhES4; SNUhES11; SNUhES16
국립생물과학센터/기초연구 타타 연구소(National Centre for Biological Sciences/Tata Institute of Fundamental Research; 인도 방갈로르 소재)	NC01, NC02, NC03 (FCNCBS1, FCNCBS2, FCNCBS3); BJT-헵 19; BJT-헵 20
릴라이언스 생명과학(Reliance Life Sciences; 인도 뭄바이 소재)	RL05, RL07, RL10, RL13, RL15, RL20, RL21 (RLS ES 05, RLS ES 07, RLS ES 10
국립생식건강 연구소(National Institute for Research in Reproductive Health; 인도 소재)	KIND-1; KIND-2
기초연구 타타 연구소(Tata Institute of Fundamental Research; 인도 소재)	FCNCBS1; FCNCBS2; FCNCBS3
가오슝 의과대학교(대만 소재)	T1; T2; T3; T4; T5
중난 대학교(중국 소재)	chESC-3 (H3); chESC-8; chESC-20; chESC-22; EBNA1+H9
중국 과학 아카데미 대학원(중국	hPES-1; hPES-2

기관(국가)	명칭
화중 과학기술대학교(중국 소재)	hES-8; hES18
베이징대학교 제 3 병원(중국 소재)	B4; B7; PKU1; PKU2
상하이 자오통 대학교	SHhES1
의과대학(중국 소재)	
상하이 제 2 의과 대학교(중국 소재)	SH1; SH2; SH4; SH7; SH28; SH35; SH35a; SH38; SH39; SH42
순이센 대학교(중국 소재)	CHES-1; SYSU-1; SYSU-2
순이센 대학교 제 2 협력 병원(중국 소재)	CHE-1; CHE-2; CHE-3
광저우 의과대학 제 3 협력 병원(중국 소재)	FY-hES-5; FY-hES-9; FY-hES-10;; FY-hES-11

표 2: 인간 유도 만능 줄기(hIPS) 세포주 목록

기관	세포주
위스콘신-매디슨 대학교(미국 소재)	<ol style="list-style-type: none"> IPS(포피)-1 (정상; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> [Thomson]2007, <i>Science</i>. 2007 318:1917-20.) IPS(포피)-2 (정상; 46XY; Yu, J., <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS(포피)-3 (정상; 46XY Yu, J. <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS(포피)-4 (정상; 46XY; Yu, J. <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS(IMR90)-1 (정상; 46XX; Yu, J. <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS(IMR90)-2 (정상; 46XX; Yu, J. <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS(IMR90)-3 (정상; 46XX; Yu, J. <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS(IMR90)-4 (정상; 46XX; Yu, J. <i>et al.</i> 상기 문헌). IPS-SMA-3.5 (정상; 46XY; 유형 1 척수성 근육 위축; Ebert <i>et al.</i> 2009, <i>Nature</i>. 457:277-80) IPS-SMA-3.6 (정상; 46XY; 유형 1 척수성 근육 위축; Ebert <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌)

기관	세포주
	11. IPS-WT (정상; 46XX; 유형 1 척수성 근육 위축; Ebert <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌)
캘리포니아 대학교(미국 로스앤젤레스 소재)	1. IPS-1 (Karumbayaram, S. <i>et al.</i> 2009, <i>Stem Cells</i> 27:806-811; Lowry, <i>et al.</i> 2008, <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 105:2883-8) 2. IPS-2 (Karumbayaram, <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌; Lowry <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 3. IPS-5 (Lowry <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 4. IPS-7 (Lowry <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 5. IPS-18 (Karumbayaramet al. 2009, 상기 문헌; Lowry <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 6. IPS-24 (Lowry <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 7. IPS-29 (Lowry <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
마운트 시나이 병원(사무엘 루넨펠드 연구소: Samuel Lunenfeld Research Institute; 미국 소재)	1. (Woltjen <i>et al.</i> 2009, <i>Nature</i> 458:766-70) 2. 61 (Woltjen <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌) 3. 66 (Woltjen <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌) 4. 67 (Woltjen <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌) 5. HIPSC117 (Kaji <i>et al.</i> 2009, <i>Nature</i> 458:771-5) 6. HIPSC121 (Kaji <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌) 7. HIPSC122 (Kaji <i>et al.</i> 2009, 상기 문헌)
소아 병원 – 보스턴(미국 소재)	1. 551-IPS8 (Park <i>et al.</i> 2008, <i>Nature</i> 451:141-6). 2. ADA-IPS2 ((ADA-SCID) 아데노신 테아미나제 결핍-관련 종종 복합 면역 결핍 (GGG>AGG, 액손 7, ADA 유전자); Park <i>et al.</i> 2008, <i>Stem Cells Cell</i> 134:877-86) 3. ADA-IPS3 ((ADA-SCID) 아데노신 테아미나제 결핍-관련 종종 복합 면역 결핍 (GGG>AGG, 액손 7, ADA 유전자); (Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 4. BJ1-IPS1 (Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 5. BMD-IPS1 (남성; (BMD) 베커 근육 이영양증 (디스트로핀에서의 확인되지 않은 돌연변이); (Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 6. BMD-IPS4 (정상; 46XY; (BMD) 베커 근육 이영양증 (디스트로핀에서의 확인되지 않은 돌연변이); (Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 7. DH1CF16-IPS1 (정상; 46XY; (Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 8. DH1CF32-IPS2 (남성; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 9. DH1F-IPS3-3(정상; 46XY; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 10. DMD-IPS1 ((정상; 46XY; DMD) 뒤티엔느 근육 이영양증 (액손 45-52 의 결실, 디스트로핀 유전자; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 11. DMD-IPS2 (남성; (DMD) 뒤티엔느 근육 이영양증 (액손 45-52 의 결실,

기관	세포주
	디스트로핀 유전자; (Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	12. DS1-IPS4 (남성; 다운증후군 (삼염색체 21); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	13. DS2-IPS1 (남성; 다운증후군 (삼염색체 21);(Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	14. DS2-IPS10 (남성; 다운증후군 (삼염색체 21); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	15. GD-IPS1(남성; (GD) 고서 질환 유형 III (AAC > AGC, 엑손 9, G-삽입, 뉴클레오티드 84 of cDNA, GBA 유전자; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	16. GD-IPS3 (남성; (GD) 고서 질환 유형 III (AAC > AGC, 엑손 9, G-삽입, 뉴클레오티드 84 of cDNA, GBA 유전자; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	17. HFIB2-IPS2 (Park, I. H., <i>et al.</i> 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	18. HFIB2-IPS4 (Park, I. H., <i>et al.</i> 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	19. HFIB2-IPS5 (Park, I. H., <i>et al.</i> 2008. Generation of human-induced pluripotent stem cells Nat Protoc. 3:1180-6 ; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	20. JDM-IPS1 (정상, 46XX; 소아 당뇨병 (다인성); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	21. JDM-IPS1 (정상, 46XX; 소아 당뇨병 (다인성); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	22. JDM-IPS2 (여성; 소아 당뇨병 (다인성); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	23. JDM-IPS3 (여성; 소아 당뇨병 (다인성); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	24. LNSC-IPS2 (여성; 레쉬-니한 증후군 (담체, HPRT1 의 이형접합성; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	25. MRC5-IPS7 (남성; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	26. MRC5-IPS12 (정상; 46XY; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	27. MRC5-IPS1 (남성; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	28. PD-IPS1 (남성; 파킨슨병 (다인성); Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	29. SBDS-IPS1 (남성; 스와치만-보디안-다이아몬드 증후군(Swachman-Bodian-Diamond Syndrome) (IV2 + 2T>C and IV3 - 1G>A, SBDS 유전자; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
	30. SBDS-IPS2
	31. SBDS-IPS3 (정상; 46XY; 스와치만-보디안-다이아몬드 증후군 (IV2 + 2T>C and IV3 - 1G>A, SBDS 유전자; Park <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
하버드대학교(미국 소재)	1. A29a (46XX; (ALS) 근위축성 측삭 경화증 (L144F [Leu144 > Phe] 슈퍼옥시드 디스뮤타제의 우성 대립유전자 (SOD1) 유전자; 백인; Dimos <i>et al.</i> 2008, <i>Science</i> 321:1218-21)

기관	세포주
	2. A29b (46XX; (ALS) 근위축성 측삭 경화증 (L144F [Leu144 > Phe] 슈퍼옥시드 디스뮤타제의 우성 대립유전자 (SOD1) 유전자; 백인; Dimos, J. T., <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌) 3. A29c (46XX; (ALS) 근위축성 측삭 경화증 (L144F [Leu144 > Phe] 슈퍼옥시드 디스뮤타제의 우성 대립유전자 (SOD1) 유전자; 백인; Dimos, J. T., <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
솔크 연구소(미국 소재)	1. 모발-IPS1 (Aasen, <i>et al.</i> [Belmonte, J. C.] 2008, <i>Nat Biotechnol.</i> 26:1276-84) 2. 모발-IPS2 (Aasen, T., <i>et al.</i> 2008, 상기 문헌)
로안 연구소(이란 소재)	1. R.I.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 2. BOM.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 3. FHC.1.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 4. GSD.1.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 5. TYR.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 6. HER.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 7. R.1.H.iPSC.4 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 8. R.1.H.iPSC.9 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 9. RP2.H.iPSC.3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 세포) 10. LCA.1.H.iPSC.1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 세포) 11. USH.1.H.iPSC.6 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 12. RP.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 13. ARMD.1.H.iPSC.2 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 섬유모세포) 14. LHON.1.H.iPSC.5 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 세포) 15. CNS.1.H.iPSC.10 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 세포) 16. CNS.2.H.iPSC.7 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; iPS 세포)
바르셀로나 재생의학 센터(스페인 소재)	1. KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 포피 각질세포; 46XY) 2. KiPS3F-7 (OCT4, Sox2, KLF4); 인간 포피 각질세포 3. KiPS4F-8 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 인간 포피 각질세포; 46XY) 4. cFA404-KiPS4F-1 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 표피 각질세포; 46XY) 5. cFA404-KiPS4F-3 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 표피 각질세포; 46XY)

기관	세포주
파리 제 11 대학 (프랑스 소재)	<ol style="list-style-type: none"> PB03 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 46XX; 렌티바이러스) PB04 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 베타-지중해빈혈 발병; 46XY; 렌티바이러스) PB05-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 베타-지중해빈혈 발병; 46XY; 렌티바이러스) PB05 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 베타-지중해빈혈 발병; 46XY; 렌티바이러스) PB06 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 다운증후군; 47XY, +21; 렌티바이러스) PB06-1 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 다운증후군; 47XY, +21; 렌티바이러스) PB07 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 원발성 양수 세포; 46XY; 렌티바이러스) PB08 (OCT4, Sox2, KLF4, c-Myc; 원발성 양수 세포; 46XY; 렌티바이러스) PB09 (Oct4, Sox2, Lin28, Nanog; 원발성 양수 세포; 46XY; 렌티바이러스) PB10 (Oct4, Sox2; 원발성 양수 세포 46XY, 렌티바이러스)
교토 대학교(일본 소재)	<ol style="list-style-type: none"> 201B1 (인간 섬유모세포; 46XX) 201B2 (인간 섬유모세포; 46XX) 201B3 (인간 섬유모세포; 46XX) 201B6 (인간 섬유모세포; 46XX) 201B7 (인간 섬유모세포; 46XX) 243H1 (인간 섬유모세포) 243H7 (인간 섬유모세포) 246B1 (정상, 46XX) 246B2 (정상, 46XX) 246B3 (정상, 46XX) 246B4 (정상, 46XX) 246B5 (정상, 46XX) 246B6 (정상, 46XX) 246G1 (인간 섬유모세포; Takahashi <i>et al.</i> 2007, <i>Cell</i> 131:861-72) 246G3 (인간 섬유모세포; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌)

[0174]

기관	세포주
상하이 생물과학 연구소(중국 소재)	<ol style="list-style-type: none"> 246G4 (인간 섬유모세포; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 246G5 (인간 섬유모세포; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 246G6 (인간 섬유모세포; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 253F1 (정상, 46XX; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 253F2 (정상, 46XX; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 253F3 (정상, 46XX; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 253F4 (정상, 46XX; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) 253F5 (정상, 46XX; Takahashi <i>et al.</i> 2007, 상기 문헌) HAFDC-IPS-6 (Li <i>et al.</i> 2009, <i>Hum Mol Genet.</i> 2009 18:4340-9) IPS-S (Liao <i>et al.</i> 2008, <i>Cell Res.</i> 18:600-3)

[0175]

iPSC(유도 만능 줄기 세포)에 관하여, 출원인은 이전에 그의 전체가 참조로 본원에 포함되는 2010년 4월 22일자로 출원한, 분화된 리프로그래밍된 세포로부터 유도된 세포 조성물이라는 표제의 미국 특허 출원 번호

12/765,714 (미국 특허 공보 번호 2010-0272695)에서 세포 응집체 혼탁액 분화를 자세히 설명했다. 인간 iPSC 응집을 실시예 27에서 더 자세히 설명한다. 미국 특허 공보 번호 2010-0272695 및 본원의 실시예 27은 세포의 성장, 생존, 증식 및 세포-세포 부착을 향상, 증가, 및/또는 촉진하기 위해 세포 배양 배지 중의 적어도 Rho 키나제 또는 ROCK 억제제의 포함을 설명한다. 예를 들어, Y-27632를 사용하는 경우, 농도는 약 0.01 내지 약 1000 μ M, 전형적으로 약 0.1 내지 약 100 μ M, 및 주로 약 1.0 내지 약 50 μ M, 및 대부분 약 5 내지 20 μ M 범위일 수 있다. 파수딜/HA1077을 사용하는 경우, 상기 언급된 Y-27632 농도보다 약 2 또는 3배로 사용할 수 있다. H-1152를 사용하는 경우, 상기 언급된 Y-27632 농축량의 대략 한 분획, 예를 들어, 약 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 또는 1/60로 사용할 수 있다. 사용되는 ROCK-억제제의 농도는 억제제의 생물활성과 효력 및 이것을 사용하는 조건에 부분적으로 의존할 것이다. 또한, ROCK 억제제로 처리하는 시간 또는 단계는 특히 세포의 성장, 생존, 증식 및 세포-세포 부착을 향상, 증가, 및/또는 촉진하는 것을 달성하는 것과 같은 원하는 효과를 제공하는데 제한되지 않는다.

[0177] 본원에서 설명하는 세포 응집체를 포함되는 세포 유형(들)에 따라 전형적으로 선택되는 생리학상 허용되는 임의의 배지에 혼탁할 수 있다. 예를 들어, 조직 배양 배지는 당 및 아미노산, 성장 인자, 항생제 (오염을 최소화하기 위한) 등과 같은 필수 영양소를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 분화가능한 세포를 본원에서 설명하는 세포 배지를 사용하여 혼탁액에서 배양한다. 세포 배양의 맥락에서 사용된 용어 "혼탁액"은 당업계에서 사용되는 것과 같이 사용된다. 즉, 세포 배양 혼탁액은 세포 또는 세포 응집체가 표면에 부착하지 않는 세포 배양 환경이다. 당업자는 이에 제한되지 않지만 플로우 후드(Flow hood), 인큐베이터 및/또는 필요한 경우, 예를 들어 회전기 플랫폼, 진탕기 등의 일정한 움직임에서 세포를 유지하는데 사용하는 장치를 포함하는 혼탁액 배양 기술이 친숙할 것이다. 본원에서 사용된 것으로서, 세포가 움직이는 경우 또는 세포의 즉각적 환경이 세포에 대해 움직이고 있는 경우, 세포를 "움직이고 있다"고 한다. 하나의 실시양태에서, 세포가 "움직이고 있는" 것으로 유지되는 경우, 움직임은 세포가 전단 응력에 노출되는 것을 피하거나 방지하기 위해 디자인된 "부드러운 움직임" 또는 "부드러운 교반"일 것이다.

[0178] 세포 응집체를 만드는 다양한 방법은 예를 들어, 세포가 조직 배양 배지의 역전된 드롭에서 세포가 응집되는 곳인 드롭의 바닥에 가라앉는 "현적" 방법; 실험실 플라스크에서 세포 혼탁액을 진탕; 및 이러한 기술의 다양한 변형과 같이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 그의 전체가 본원에 참조로 포함되는, 문헌 [Timmins *et al.* 2004, *Angiogenesis* 7:97-103; Dai *et al.* 1996, *Biotech Bioeng* 50:349-56; Foty *et al.* 1996, *Development* 122 :1611-20; Forgacs *et al.* 2001, *J. Biophys.* 74, 2227-2234; Furukawa *et al.* 1998, *Cell Transplantation* 10:441-45; Glicklis *et al.* 2004, *Biotech Bioeng* 86:672-80; Carpenedo *et al.* 2007, *Stem Cells* 25:2224-34; 및 Korff *et al.* 2001, *FASEB J.* 15:447-57]을 참조한다. 더 최근에, 세포 응집체를 혼탁액으로 마이크로페턴화된 콜로니를 스크래핑하고, 마이크로타이터 판 밖의 콜로니를 원심분리하고, 혼탁액으로 또는 피펫을 사용하여 디스롯지(dislodge)하고 혼탁된 콜로니를 페턴화된 마이크로웰에서 성장시킴으로써 형성하였다(Ungrin *et al.* 2008 PLoS ONE 3:1-12; Bauwens *et al.* 2008 *Stem Cells*, 2008년 6월 26일자로 온라인에서 공개됨). 세포 응집체를 생성하기 위해 본원에서 설명한 이러한 방법을 사용할 수 있지만, 본원에서 생성한 세포 응집체는 문헌 (D' Amour *et al.* 2006, 상기 문헌)에서 기재한 바와 같이 분화-발생이 동시에 진행되는데 최적화되어 있다. 또한, 이러한 다른 방법과 달리, 본원에 설명한 혼탁액 중의 세포 응집체를 생성하는 방법은 대규모로 제조하기 위해 수정할 수 있다.

[0179] 일반적으로, 본 발명의 세포 배지 조성물은 적어도 매일 한 번 새로 채워주지만, 혼탁액 배양의 특정한 필요 및 상황에 따라 더 자주 또는 더 적게 배지를 바꿔줄 수 있다. 시험관내에서, 세포를 일반적으로 배치 모드로 배양 배지에서 성장시키고 (즉, 배치식으로 공급하고) 다양한 배지 조건에 노출시킨다. 본원에 설명한 것으로서, 세포는 부착 배양으로서 접시-배양에서 존재하거나 혼탁액 중의 세포 응집체로서 존재하고, 주변 배양 배지와 접촉시키면서 유지시키고; 폐 배지는 주기적으로 교체한다. 일반적으로, 배양 배지는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24시간마다, 또는 그의 임의의 분획마다 새로 채워줄 수 있다. 추가의 실시예에서, 배지를 그에 제한되지 않지만, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9일마다 또는 2일 이상마다, 또는 이 사이에서 임의의 시간 간격과 같이 더 적게 새로 채울 수 있다.

[0180] 또한, 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 자주 교체해야 하는 성장 인자 및 기타 작용제의 열화를 방지하기 위해 관류 방법을 사용하거나; 기간에 걸쳐 배양 배지로부터 폐기물을 감소시키는 수단으로서 관류를 사용한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,320,963은 혼탁액 세포의 관류 배양을 위한 생물반응기를 설명하고 있다. 미국 특허 번호 5,605,822는 관류에 의한 배양으로의 HSC 세포의 성장을 위한 성장 인자를 제공하기 위해 기질 세포를

사용하는 생물반응기 시스템을 설명하고 있다. 미국 특허 번호 5,646,043은 HSC 세포의 성장을 위한 배지 조성물을 포함하는 연속적이고 주기적인 관류에 의한 HSC 세포의 성장을 설명하고 있다. 미국 특허 번호 5,155,035는 유체 배지 회전에 의한 세포의 혼탁액 배양을 위한 생물반응기를 설명하고 있다. 이를 참조는 그의 전체가 본원에 모두 포함된다.

[0181] 일반적으로, 본 발명의 배지 조성물에서 혼탁액 중에 배양된 세포는 매주 정도에 "스플릿"하거나 "계대"하지만, 혼탁액 배양의 특정한 필요 및 상황에 따라 세포를 더 자주 또는 더 적게 스플릿할 수 있다. 예를 들어, 세포를 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일마다, 또는 그 이상의 일마다, 또는 그 사이의 임의의 시간 간격마다 스플릿할 수 있다. 본원에 사용한 것으로서, 세포 배양의 맥락에서 용어 "스플릿"하거나 "계대"하는 것은 당업계에서 사용되는 것과 같이 사용된다. 즉, 세포 배양 스플릿팅, 또는 계대는 이전 배양물로부터 세포를 수집하고 이후 수집한 (수거된) 세포의 더 적은 수를 새로운 세포 배양 용기에 이동시키는 것이다. 일반적으로, 세포를 계대하는 것은 건강한 세포 배양 환경에서 세포가 성장을 지속할 수 있게 한다. 필수적으로 포함하는 것은 아니지만, 세포의 성장 팽창 동안 함께 군집되었던 세포를 분해하는데 사용할 수 있는 효소적 또는 비-효소적 방법의 사용을 포함할 수 있는, 세포 배양 계대 과정 및 방법이 당업자에게는 익숙할 것이다.

[0182] 일부 경우에서, 세포 사멸의 정도는 배양하는 세포 (혼탁 및 부착)에서 계대 후 즉시 발생할 수 있다. 한 실시 양태에서, 분화가능한 세포는 24시간 초과 동안 세포 배지를 새로 채우는 것을 지연시킴으로써 계대하는 것으로부터 "회복"될 수 있다. 따라서, 세포 배지를 더 자주 바꿔줄 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 세포 사멸의 억제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 완타나베(Wantanabe) 등은 최근 해리 후 인간 ES 세포를 보호하기 위한 Rho-관련 키나제 억제제, Y27632의 사용을 기재하고 있다. 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Wantanabe et al. Nat. Biotechnol., 25:681-686 2007]을 참조한다. 추가의 실시양태에서, 세포 배양 배지는 계대 후 즉시 세포 사멸을 방지 또는 감소시키기 위해 카스파제 억제제, 성장 인자 또는 다른 영양 인자를 포함할 수 있다. 사용할 수 있는 화합물의 구체적 예는 그에 제한되지 않지만 모두 상업적으로 입수 가능한 HA 1077, 디히드로클로라이드, 히드록시파우딜, Rho 키나제 억제제, Rho-키나제 억제제 II, Rho 키나제 억제제 III, 키나제 억제제 IV 및 Y27632를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 세포 계대 동안 또는 계대 후 즉시 세포 사멸을 방지 또는 감소시키기 위해 사용하는 화합물 또는 인자를 세포가 계대 과정으로부터 회복된 후 세포 배양 배지로부터 제거할 수 있다. 추가 실시양태에서, 분화되지 않은 ES 세포는 표준 기초 배지에서 효과적으로 응집하고 해리 및 응집 동안 생존도를 유지하기 위한 Y27632 또는 다른 개입제가 요구되지 않는다.

[0183] 추가 실시양태에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 또한 계면활성제의 존재 또는 용도를 포함할 수 있다. 한 특정한 실시양태에서, 조성물 및 방법은 혼탁액 배양의 맥락에서 1개 이상의 계면활성제를 포함한다. 계면활성제는 당업계에서 익히 공지되어 있으며 일반적으로 말하자면 자연에서 친양쪽성이다. 구체적 실시양태에서, 본 발명은 음이온성, 양이온성, 비-이온성 또는 쯔비터이온성인 1개 이상의 계면활성제의 용도를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법에 사용되는 계면활성제의 농도는 통상 스크리닝 및 최적화의 문제이다. 예를 들어, 오웬 (Owen) 등은 HeLa 세포 및 인간 양막 세포에 대한 세포 배양 기술에서 계면활성제의 용도를 보고했다. 본원에 참조로 포함된 문헌 [Owen et al. J. Cell. Sci., 32:363-376 (1978)]을 참조한다. 사용할 수 있는 계면활성제의 예는 그에 제한되지 않지만, 나트륨 도데실 술페이트 (SDS), 암모늄 라우릴 술페이트, 및 다른 알킬 술페이트 염, 나트륨 라우레트 술페이트 (SLES), 알킬 벤젠 술포네이트, 비누, 또는 지방산 염, 세틸 트리메틸암모늄 브로마이드 (CTAB) (헥사데실 트리메틸 암모늄 브로마이드), 및 다른 알킬트리메틸암모늄 염, 세틸피리디늄 클로라이드 (CPC), 폴리에톡실화 탈로우 아민 (POEA), 벤즈알코늄 클로라이드 (BAC), 벤제토늄 클로라이드 (BZT), 도데실 베타인, 도데실 디메틸아민 옥시드, 코카미도프로필 베타인, 코코 암포 글리시네이트, 알킬 폴리 (에틸렌 옥시드), 플루로낙 F68과 같은 폴리(에틸렌 옥시드) 및 폴리(프로필렌 옥시드)의 공중합체, 그에 제한되지 않지만, 옥틸 글루코시드, 테실 말토시드, 지방 알콜, 세틸 알콜, 올레일 알콜, 코카미드 MEA, 코카미드 DEA 및 코카미드 TEA 및/또는 폴리옥시에틸렌-소르비탄 모노라우레이트 (트윈)과 같은 알킬 폴리글루코시드를 포함한다.

[0184] 본원에 기재된 실시양태는 낮은 전단 환경을 유지함으로써 시스템에서 세포 밀도 수행을 유지하고 유체 전단 응력을 최소화하는 hESC를 증식하고/하거나 분화시키는 대규모 제조 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 60mm 접시, 6-웹 플레이트, 회전 병, 생물반응기 (예를 들어, 스피너 플라스크), 용기 등에서 세포 혼탁액을 배양함으로써 규모증대된 시스템을 전핵 세포에서 제조함으로써 낮은 전단 환경을 유지하기 위한 방법을 제공한다. 대안적으로, 세포를 배양하기 위한 연속식 관류 시스템에는 세포의 혼탁액을 제공하기 위해 생물반응기 또는 용기에서 교반 또는 움직임, 산화 및 예를 들어 성장 및/또는 분화를 위한 신선한 영양소의 공급이 요구된다. 세포 혼탁액을 수득하기 위해, 생물반응기 용기는 전형적으로 전단 응력의 또한 가능한 공급원인 1개 이상의 움직임

수 있는 기계적 교반 장치를 사용한다.

[0185] 일정한, 최적화된 교반 전단 속도를 설정하고 유지하는 것은 세포 성장 및 생존도를 유지하기 위해 중요하다. 예를 들어 증가된 전단 속도는 다음의 측면에서 유해하다: (1) 과잉 전단은 에너지 소비를 증가시키고, (2) 과잉 전단은 막 표면에서 확산에 간섭하며, (3) 과잉 전단은 특정 화합물의 생물활성을 박탈시킬 수 있고, (4) 과잉 전단은 파열 장력 역치 상에서 세포막을 기형화시켜 세포 용해를 일으킬 수 있다. 따라서, 세포 응집체의 직경 및 특정 세포주의 단일 세포 해리 및 전단에 대한 감수성에 따라 5 내지 500 sec⁻¹ 최적 범위내에서 전단을 유지하는 것이 바람직하다. 본 발명의 방법에서 유용한 배위에 의해 생성된 전단 속도의 예는 응집체 직경이 100 내지 200 μm 이고 6-웰 접시에 대해 회전 속도 60 내지 140 rpm인 것에 대해 실시예 17에 나타낸다. 이들 값은 회전 동안 벌크 유체에서 발생하는 평균 전단 응력 시간을 추정한다. 그러나, 용기의 벽에서 전단 응력을 경계 효과로 인해 더 높을 것이라는 것이 예상된다. 레이(Ley) 등 (상기 참조)의 방법을 사용하여, 벽 전단 응력을 60 rpm 내지 140 rpm 범위인 회전 속도에 대해 계산하였고 실시예 17 내지 19에 나타냈다.

[0186] 또한, 세포 혼탁액의 부드러운 교반을 생성하는 수단 및 장치의 다른 예가 존재하며 이는 프로펠러, 또는 다른 기계적 수단, 블래더, 유체 또는 기체 유동-기반 수단, 초음파 정상파 생성기, 로킹 또는 회전 플랫폼 또는 세포 혼탁액을 생성하는 그의 조합과 같은 임펠러를 포함하여 당업자에게 익히 공지되어 있다. 본 발명의 방법에서, 회전 플랫폼은 세포가 6-웰 플레이트에서, 전단 속도를 400 sec⁻¹ 미만으로 생성하는 경우 배지에서 세포를 혼탁시키기 위한 예시적 수단이다. 교반된 혼합 유체 혼탁액을 생성하기 위한 회전기 유형 또는 메카니즘에 상관없이, 벌크 유체에서 추정되는 시간-평균 전단 속도 및 전단 응력은 연관될 수 있는 모든 유체 혼합 장치에 의한 정규화 인자를 제공한다. 장치 사이에 유체 요법은 이의 프로파일 및 충류 또는 난류 유동의 정도에 따라 다양할 수 있지만, 전단 계산은 상이한 메카니즘에 의해 혼탁시키는 장치에서 유동을 동등화하기 위한 기반을 제공한다. 예를 들어, 임펠러 직경 4 cm, 용기 폭 6.4 cm, 임펠러 각도는 90도, 및 임펠러 폭 0.1 cm인 스파너 플라스크 125 mL에 대해, 임펠러 회전 속도 135 rpm은 응집체 직경 100 μm 에 대해 100 rpm으로 회전하는 5 mL 배지인 6-웰 접시로서 벌크 유체에서 동일한 시간-평균 전단 속도 및 전단 응력을 생성할 것이다.

[0187] 본 발명의 방법은 또한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30일 내지 40일 초과, 50일 초과 범위의 기간에 대해 규모증대된 시스템의 제조에서 낮은 전단 환경을 유지하는데 사용할 수 있다. 예시적인 수행 시간은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30일 내지 40일 초과, 50일 초과이다.

[0188] 분화가능한 세포를 본 발명의 규정 배지와 접촉시키기 전 및/또는 후 효소적, 비-효소적, 또는 수동적 해리 방법을 사용하여 계대시킬 수 있다는 것을 고려한다. 효소적 해리의 비-제한적 예는 트립신, 콜라제나제, 디스파제, 및 아큐테이즈™와 같은 프로테아제의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, 아큐테이즈™는 접촉시킨 세포를 계대하는 데 사용한다. 효소적 계대 방법을 사용하는 경우, 생성된 배양물을 단일선, 이중선, 삼중선, 및 사용한 효소에 따라 크기가 다양한 세포의 군집의 혼합물을 포함할 수 있다. 비-효소적 해리 방법의 비-제한적 예는 세포 분산 완충제이다. 수동적 계대 기술은 문헌 [Schulz et al. 2004 Stem Cells, 22:1218-38]에서와 같이 당업계에 잘 기재되어 있다. 계대 방법의 선택은 존재하는 경우, 세포의 기질의 선택에 의해 영향받고, 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0189] 한 구체적 실시양태에서, 분화가능성 세포의 배양 방법은, 배양 챔버에 들어 있는 분화가능성 세포층에 분리 용액을 제공한 다음, 분리시키는 단계를 포함하며, 상기 분리는 세포층을 단일 세포로 해체시킨다. 분리 후에, 단일 세포는 줄기 세포 배양 용액과 함께 새로운 조직 배양 챔버에 위치시키며, 상기 줄기 세포 배양 용액은 기본 염 영양 용액 및 ErbB3 리간드를 포함한다. 배양 후에, 단일 줄기 세포를 단일 세포가 성장하고 분열되게 하는 조건에 위치시킨다. 또 다른 구체적 실시양태에서, 분화가능성 세포의 배양 방법은 배양 챔버에 들어 있는 분화가능성 세포 응집물에 분리 용액을 제공한 다음, 분리시키는 단계를 포함하며, 상기 분리는 세포 응집체를 단일 세포 또는 더 작은 세포 응집체로 해체시킨다.

[0190] 본 발명의 방법에서 사용되는 분해 용액은 세포에 광범위한 독성을 초래하지 않으면서 세포를 단일 세포로 해체 또는 분해시킬 수 있는 임의의 분해 용액일 수 있다. 분해 용액의 예로는, 비제한적으로, 트립신, 아큐테이즈™, 0.25% 트립신/EDTA, TrypLE, 또는 베르센™ (EDTA) 및 트립신을 포함한다. 본 발명의 방법은, 적어도 약간의 단일 세포로 분해시켜서 재-배양할 수 있다면, 전면층 또는 혼탁액의 모든 세포를 단일 세포로 분해시킬 필요는 없다.

- [0191] 배양의 개시 시 또는 계대 후 중 어느 하나에서, 분화가능성 세포를 임의의 밀도로 접종하여, 단일 세포를 배양 챔버 내에 넣을 수 있다. 접종된 세포의 세포 밀도는, 비제한적으로 부착 또는 혼탁 배양물의 사용, 사용하는 세포 배양 배지의 특정 조제법, 성장 조건 및 배양 세포의 고려할 용도를 포함하는 다양한 요인에 따라 조정될 수 있다. 세포 배양 밀도의 예로는, 비제한적으로 0.01×10^5 개 세포/mL, 0.05×10^5 개 세포/mL, 0.1×10^5 개 세포/mL, 0.5×10^5 개 세포/mL, 1.0×10^5 개 세포/mL, 1.2×10^5 개 세포/mL, 1.4×10^5 개 세포/mL, 1.6×10^5 개 세포/mL, 1.8×10^5 개 세포/mL, 2.0×10^5 개 세포/mL, 3.0×10^5 개 세포/mL, 4.0×10^5 개 세포/mL, 5.0×10^5 개 세포/mL, 6.0×10^5 개 세포/mL, 7.0×10^5 개 세포/mL, 8.0×10^5 개 세포/mL, 9.0×10^5 개 세포/mL, 또는 10.0×10^5 개 세포/mL, 또는 그 이상을 포함하며, 예를 들어 5×10^7 개 세포/mL 이하 또는 그 사이의 임의의 값에서는 세포 생존이 우수하게 배양된다.
- [0192] 상기에 추가하여, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "작동시키는 세포 밀도" 또는 "작동 상의 세포 밀도" 또는 그의 등가물은 hES 세포 배양을 증식 또는 분화시키는 생성물을 얻기 위해 제조 공정 또는 시스템을 작동시킬 때의 세포 밀도를 의미한다. 이러한 세포 밀도는 시스템에 공급되는 영양소, 예컨대 비타민, 미네랄, 아미노산 또는 대사물, 뿐만 아니라 환경적 조건, 예컨대 산소 분압이 세포 생존율을 유지시키기에 충분할 때의 것이다. 별도로, 이러한 세포 밀도는 노폐물이 세포 생존율을 유지시키기에 충분한 속도로 시스템으로부터 제거될 수 있을 때의 것이다. 이러한 세포 밀도는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0193] 유지될 수 있는 작동시키는 세포 밀도는 적어도 약 0.5×10^6 개 세포/mL에서부터이다. 전형적인 규모증대 시스템에서, 작동시키는 세포 밀도는 약 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 약 25×10^6 개 세포/mL일 수 있다. 예시적인 밀도는 약 2.5×10^6 개 세포/mL, 22×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^7 개 세포/mL 이하일 수 있다. 본 발명의 방법에서, 세포 생존율은 적어도 약 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 약 100% 이하이다. 다른 규모증대 시스템에서, 작동시키는 세포 밀도 및 허용가능한 세포 생존율 수준은 당업자가 인식할 수 있으며, 당업자에게 익히 공지된 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 배치 (배치식), 유가식 및 연속식 영양공급 형태에서, 세포 밀도는 약 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 15×10^6 개 세포/mL일 수 있다.
- [0194] 분화가능성 세포는 또한 그의 형성성 또는 다른 특성에 영향을 미치는 문자 또는 인자에 대해 스크리닝하는데 이용할 수 있다. 예를 들어, 분화가능성 세포는 아폽토시스, 분화 또는 증식을 유도하는 작용제, 뿐만 아니라 분화가능성 세포로부터 생성되는 분화 세포주서의 유사한 효과를 확인하는데 사용할 수 있다.
- [0195] 본 발명의 조성물 및 방법이 단일 세포 계대를 가능하게 하기 때문에, 분화가능성 세포는 고처리량 세팅, 예컨대 비제한적으로, 96-웰 플레이트 및 384-웰 플레이트에서 성공적으로 배양된다. 도 16은, 본원에 기재된 방법을 이용하여 96-웰 및 384-웰 플레이트 둘다에서 DC-HAIF 중에 배양된 BG02 세포의 형태 및 알칼리성 포스파타제 염색을 나타낸다. 간단히, 아큐테이즈™를 이용함으로써 분열시켜, 96-웰 및 384-웰 플레이트에 플레이팅하고, 배양한 hESC 세포는, 다른 배양 접시를 이용하여 관찰한 것과 유사한 플레이팅 효율을 나타냈다. 또한, 상기 세포는 콜로니를 형성하고, 더 작은 환경에서 5일에 걸쳐 성공적으로 확장되었다. 이러한 더 작은 배양물은 형태학적으로 미분화된 상태이며, 미분화 세포의 마커인 알칼리성 포스파타제에 대해 한결같이 양성으로 염색되었다. 더욱이, hESC는, ACEA 바이오사이언시스, 인크.(ACEA Biosciences, Inc.) (www.aceabio.com)로부터 RT-CES™ 방법을 이용하여 세포 증식 및 생존율을 측정하는데 이용될 수 있는 임피던스의 실시간 측정을 제공하는 96-웰 배양 장치 (도시하지 않음)에서 또한 성장시킬 수 있다. 이러한 접근법은, 분화가능성 세포에 대한 미묘하거나 즉각적인 효과, 뿐만 아니라 실시간으로 증식, 아폽토시스 및 형태 변화의 측정의 무표지 확인 및 정량화를 가능하게 할 수 있다.
- [0196] 본 발명의 조성물 및 방법은, 상기 조성물 및 방법이 기본 염 영양 용액 및 ErbB2 유도된 티로신 키나제 활성을 활성화시키는 수단을 포함하기만 하면, 상기 열거되거나 또는 본원의 다른 곳에 기재된 성분의 임의의 조합을 실질적으로 함유할 수 있다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 조성물 및 방법의 성분은 프로토콜 디자인에 따라 달라질 것이다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 96-웰 플레이트 및/또는 384-웰 플레이트에서 분화가능성 세포를 배양하는 것에 관한 것이다. 정말로, 본 발명의 방법 및 조성물을 이용함으로써, 세포 배양 챔버, 즉 배양 접시는 더 이상 특정 치수로 제한되지 않는다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 hES 세포를 생성시키는 특정 배양 챔버 치수 및/또는 수단 및 장치를 어떤 방식으로든 제한하지 않는다.
- [0197] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 수가지의 유용한 특징을 갖는다. 예를 들어, 본원에 기재된 조성물 및 방법은

인간 발달의 초기 단계를 모델링하는데 유용하다. 더욱이, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 또한 예컨대 순수 조직 또는 세포 유형의 발달에 의한 질환 상태, 예컨대 신경변성 장애, 당뇨병 또는 신부전에서의 치료적 개입을 위해 제공할 수 있다.

[0198] 분화가능성 세포로부터 분화되는 세포 유형은, 비제한적으로 약물 발견, 약물 개발 및 시험, 독성학, 치료 목적 뿐만 아니라 기초 과학 연구를 위한 세포 생산을 포함하는 연구 및 개발의 다양한 분야에서 수가지 용도를 갖는다. 이러한 세포 유형은 광범위한 연구 분야에서 관심을 끄는 분자를 발현한다. 이는 표준 참고 텍스트에 기재된 바와 같은 다양한 세포 유형의 기능에 필요한 것으로 공지된 분자를 포함한다. 이러한 분자는, 비제한적으로 시토카인, 성장 인자, 시토카인 수용체, 세포외 매트릭스, 전사 인자, 분비된 폴리펩티드 및 다른 분자, 및 성장 인자 수용체를 포함한다.

[0199] 본 발명의 분화가능성 세포는 세포 분화 환경과의 접촉을 통해 분화할 수 있는 것으로 간주된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포 분화 환경"은 분화가능성 세포가 분화되도록 유도하거나 또는 분화 세포에 풍부한 인간 세포 배양물이 되도록 유도하는 세포 배양 조건을 의미한다. 바람직하게는, 성장 인자에 의해 유도된 분화 세포 계통은 사실상 동질일 수 있다. 용어 "동질"은 목적 세포 계통의 대략 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 초과를 함유하는 집단을 의미한다.

[0200] 세포 분화 배지 또는 환경은 본 발명의 분화가능성 세포를 부분적으로, 말기애 또는 역으로 분화시키는데 사용할 수 있다. 본 발명에 따라, 세포 분화 환경의 배지는, 예를 들어 KODMEM 배지 (녹아웃 둘베코 변형 이글 배지(Knockout Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM, 햄 F12 배지(Ham's F12 Medium), FBS (태아 소 혈청), FGF2 (섬유모세포 성장 인자 2), KSR 또는 hLIF (인간 백혈병 억제 인자)를 포함하는 각종 성분을 함유할 수 있다. 세포 분화 환경은 또한 보충물, 예컨대 L-글루타민, NEAA (비필수 아미노산), P/S (페니실린/스트렙토마이신), N2, B27 및 β -메르캅토에탄올 (β -ME)을 함유할 수 있다. 비제한적으로, 피브로네틴, 라미닌, 헤파린, 헤파린 술페이트, 레틴산, 표피 성장 인자 패밀리 (EGF)의 구성원, FGF2, FGF7, FGF8 및/또는 FGF10를 비롯한 섬유모세포 성장 인자 패밀리 (FGF)의 구성원, 혈소판 유래 성장 인자 패밀리 (PDGF)의 구성원, 형질전환 성장 인자 (TGF)/골 형태발생 단백질 (BMP)/성장 및 분화 인자 (GDF) 인자 패밀리 길항체 (비제한적으로 노긴, 폴리스타틴, 코르딘, 그레믈린, 세르베루스/DAN 패밀리 단백질, 벤트로핀, 고용량 액티빈, 및 암니온레스 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함함)를 포함하는 추가의 인자를 세포 분화 환경에 첨가할 수 있는 것으로 간주된다. TGF/BMP/GDF 길항체는 또한 TGF/BMP/GDF 수용체-Fc 키메라의 형태로 첨가될 수 있다. 첨가될 수 있는 다른 인자는, 비제한적으로 엘타-유사 단백질 및 재기드 패밀리 뿐만 아니라 노치(Notch) 가공처리 또는 절단의 억제제, 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함하는, 노치 수용체 패밀리를 통한 신호전달을 활성화시키거나 불활성화시킬 수 있는 분자를 포함한다. 다른 성장 인자는 인슐린 유사 성장 인자 패밀리 (IGF)의 구성원, 인슐린, 윙레스 관련 (WNT) 인자 패밀리, 및 헤지호그 인자 패밀리 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 추가의 인자는 중내배엽 줄기/전구세포, 내배엽 줄기/전구세포, 중배엽 줄기/전구세포, 또는 완전 내배엽 줄기/전구세포 증식 및 생존 뿐만 아니라 이를 전구세포 유도체의 생존 및 분화를 촉진시키기 위해 첨가할 수 있다.

[0201] 본원에 기재된 조성물은 시험 화합물이 분화가능성 세포의 만능, 증식 및/또는 분화를 조절할 수 있는지를 측정하기 위한 시험 화합물의 스크리닝에 유용하다. 분화가능성 세포의 만능, 증식 및/또는 분화는 당업자에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 비제한적 방법으로는 세포 형태, 다양한 마커의 발현, 기형종 형성, 세포수 조사 및 임피던스 측정을 포함한다.

[0202] 분화가능성 세포의, 목적 세포 계통 또는 이의 미분화된 상태의 유지로의 진행은, 목적 세포 계통의 마커 유전자 특징의 발현 뿐만 아니라 분화가능성 세포 유형의 마커 유전자 특징의 결여를 정량화함으로써 모니터링할 수 있다. 이러한 마커 유전자의 유전자 발현을 정량화하는 한 방법은 정량적 PCR (Q-PCR)의 이용을 통해서이다. Q-PCR을 수행하는 방법은 당업계에 익히 공지되어 있다. 당업계에 공지된 다른 방법도 마커 유전자 발현을 정량화시키는데 사용될 수 있다. 마커 유전자 발현은 관심 마커 유전자에 특이적인 항체를 사용함으로써 검출할 수 있다.

[0203] 특정 실시양태에서, 스크리닝 방법은, (a) 분화가능성 세포를 제공하는 단계; (b) 기본 염 영양 용액 및 ErbB3 리간드를 포함하는 조성물 중에서 세포를 배양하는 단계 (상기 조성물은 본질적으로 무혈청임); (c) 세포를 시험 화합물에 접촉시키는 단계; 및 상기 화합물에 접촉시킨 상기 세포에서 만능, 증식 및/또는 분화가 증가 또는 감소되었는지 측정하는 단계 (상기 증가는 화합물이 만능, 증식 및/또는 분화를 조절하였음을 나타냄)를 포함하

는, 분화가능성 세포의 만능, 증식 및/또는 분화를 조절할 수 있는 화합물을 확인하는 방법을 포함한다. 특정 실시양태에서, ErbB3 리간드는 HRG- β 이다. 다른 실시양태에서, ErbB3 리간드는 시험 화합물로 대체하여 시험 화합물의 효과를 측정할 수 있다. 예를 들어, 시험 화합물에 의한 만능, 증식 및/또는 분화에 대한 효과는 ErbB3 리간드에 의한 만능, 증식 및/또는 분화에 대한 효과와 비교하여 분화가능성 세포에 대한 시험 화합물의 효과를 측정할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 조성물은 본 발명의 스크리닝 방법에 사용할 수 있는 것으로 간주된다.

[0204] 또 다른 실시양태에서, 세포를 ErbB3 리간드 (ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성)의 부재 중에 배양시켜 세포에 대한 ErbB3 리간드 (ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성)의 부재의 효과를 측정할 수 있다.

[0205] 본원에 기재된 방법을 이용함으로써, 다른 세포 유형을 실질적으로 함유하지 않은 목적 세포 계통을 포함하는 조성물을 제조할 수 있다. 별도로, 분화가능성 세포 및 목적 세포 계통의 혼합물을 포함하는 조성물도 제조할 수 있다.

[0206] 본 발명의 일부 실시양태에서, 목적 세포 계통의 세포는 상기 세포에 특이적인 친화성 태그를 이용함으로써 단리할 수 있다. 표적 세포에 특이적인 친화성 태그의 한 예로는, 표적 세포의 세포 표면에는 존재하지만 본원에 기재된 방법에 의해 제조되는 세포 배양물에서 발견될 수 있는 다른 세포 유형에는 실질적으로 존재하지 않는 마커 폴리펩티드에 특이적인 항체이다.

[0207] 본 발명은 또한 키트에 관한 것으로, 상기 키트는 기본 염 영양 용액 및 ErbB2-유도된 티로신 키나제 활성을 자극시킬 수 있는 하나 이상의 화합물을 포함한다. 한 실시양태에서, 키트는 본원에서 기재된 바와 같은 하나 이상의 ErbB3 리간드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 하나 초과의 ErbB3 리간드를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 TGF- β 또는 TGF- β 패밀리 구성원 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 하나 초과의 TGF- β 또는 TGF- β 패밀리 구성원 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 섬유모세포 성장 인자 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 하나 초과의 섬유모세포 성장 인자 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 FGF-7, FGF-8, FGF-10, FGF-22 또는 변이체 또는 그의 기능적 단편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 혈청 알부민을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 혈청 및/또는 하나 이상의 불용성 기질, 및/또는 하나 이상의 분해 용액을 포함한다.

[0208] 본 발명의 키트는 상기 열거되거나 또는 본원의 다른 곳에 기재된 성분의 임의의 조합을 실질적으로 함유할 수 있다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 키트에 공급되는 성분은 키트에 대해 의도되는 용도에 따라 달라질 것이다. 따라서, 키트는 본 출원에 열거된 다양한 기능을 수행하기 위해 디자인될 수 있으며, 이에 따라 이러한 키트의 성분은 달라질 것이다.

[0209] 본 출원 전반에서, 다양한 간행물이 참고된다. 이들 간행물의 모든 개시 및 이들 간행물 내에서 인용된 참고문헌 그 전체가, 본 발명에 관련되는 기술 배경을 더욱 완전히 설명하기 위해 이로써 본 출원에 그 전체를 참고로 도입된다.

실시예

[0211] 인간 배아 줄기 세포주 BG01v (브레사젠 인크.(BresaGen, Inc.), 조지아주 애센즈)를 본원에 기재된 실현 중 일부에서 사용하였다. BG01v hESC 세포주는 핵형 면에서 변이체인 세포주이고, 특이적인 삼염색체를 함유하는 안정한 핵형을 나타낸다 (핵형: 49, XXY,+12,+17). 모체 배양물을 기준에 기재된 바와 같이 유지시켰다 (문헌 [Schulz et al. 2003, BMC Neurosci., 4:27]; [Schulz et al. 2004, Stem Cells 22:1218-38]; [Rosler et al. 2004, Dev. Dynamics, 229:259-274]; [Brimble et al. 2004 Stem Cells Dev. 13:585-596]). 간략하게, 콜라게나제 계대로 세포를 매트리겔™ 또는 피브로넥틴으로 코팅된 접시에서 DMEM:F12 + 20% KSR, 8 ng/ml FGF2, 2 mM L-글루타민, 1× 비-필수 아미노산, 0.5 U/ml 페니실린, 0.5 U/ml 스트렙토마이신, 0.1 mM β -메르캅토에탄올 (시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트 루이스)을 포함하는 마우스 배아 섬유모세포 (MEF)로부터의 조건화 배지 (MEF-CM)에서 성장시켰다.

[0212] 본원에서 테스트된 규정 배양 (DC) 배지는 DMEM/F12, 2 mM 글루타맥스, 1x 비-필수 아미노산, 0.5 U/ml 페니실린, 0.5 U/ml 스트렙토마이신, 10 μ g/ml 트랜스페린 (모두 미국 캘리포니아주 칼스배드의 인비트로젠으로부터의 것임), 0.1 mM β -메르캅토에탄올 (시그마), 0.2% 무지방산 콘(Cohn) 분획 V BSA (세롤로지칼스 (Serologicals)), 1× 미량 원소 혼합물 A, B 및 C (셀그로(Cellgro)) 및 50 μ g/ml 아스코르브산 (시그마)을

포함하였다. FGF2 (시그마), LongR3-IGF1 (JRH 바이오사이언시스(JRH Biosciences)), 헤레귤린- β EGF 도메인 (HRG β , 페프로테크(Peprotech)), TGF β (R&D 시스템즈(R&D systems)), 노달 (R&D 시스템즈), LIF (R&D 시스템즈), EGF (R&D 시스템즈), TGF α (R&D 시스템즈), HRG α (R&D 시스템즈), BMP4 (R&D 시스템즈), 및 액티빈 A (R&D 시스템즈)가 포함되는 다양한 수준의 재조합 성장 인자를 사용하였다. LongR3-IGF1은 IGF1 결합 단백질에 대한 친화도가 감소된 IGF1의 변형판이고, 이들 중 일부는 hESC에서 발현된다. DC-HAIF는 10 ng/ml HRG- β , 10 ng/ml 액티빈 A, 200 ng/ml LR-IGF1 및 8 ng/ml FGF2를 함유하는 상기와 같은 규정 배양 배지이다. DC-HAI는 10 ng/ml HRG- β , 10 ng/ml 액티빈 A, 및 200 ng/ml LR-IGF1을 함유하는 상기와 같은 규정 배양 배지이다. DC-HAIF 및 DC-HAI 양쪽 모두에서, LR-IGF1 성분이 당연히 IGF1로 교체될 수 있다.

[0213] 성장 인자 감소형 BD 매트리겔™ 매트릭스 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크)를 저온 DMEM/F-12에서 약 1:30 내지 약 1:1000의 최종 농도 범위로 희석함으로써 매트리겔™로 코팅된 접시가 제조되었다. 한 실시양태에서, 매트리겔™의 농도는 약 1:200이다. 1 ml/35 mm 접시를 사용하여 1-2시간 동안 실온에서 또는 적어도 밤새 4°C에서 접시를 코팅하였다. 플레이트를 4°C에서 1주일까지 보관하였다. 매트리겔™ 용액을 사용 직전에 제거하였다.

[0214] 테스트 조건에 대해, 모체 배양물을 다중 조건의 비교를 위해 6웰 접시 내로 플레이팅하였다. 전형적으로 배양물을 테스트 조건 내로 직접적으로 플레이팅하였다. 배양물을 매일 평가하였고, 플레이팅 4 내지 5일 후에 형태학적 기준을 기초로 등급을 매겼다. 1 내지 5의 등급 척도는 전체 배양물을 시험하고, 미분화 콜로니의 전체 비율, 이의 상대적인 크기, 및 명백한 분화를 나타내는 콜로니 또는 콜로니의 일부의 비율을 평가하는 것을 수반하였다. 5등급은 대규모의 미분화 콜로니 및 무시할 수 있는 분화가 있는 "이상적인" 배양물을 가리킨다. 4등급은 매우 양호하지만 약간의 명백한 분화가 있는 배양물을 가리킨다. 3등급은 허용가능하지만 콜로니의 약 절반이 명백한 분화를 나타내는 배양물을 가리킨다. 2등급 배양물은 우세하게 분화되고, 때때로 추정 미분화 세포가 있다. 1등급 배양물은 분화된 콜로니를 함유하거나, 또는 배양물이 부착되지 않거나 생존하지 않았다. 미분화 세포의 양호한 확장을 나타낸 배양물을 이러한 조건에서의 장기 배양을 평가하기 위해 계대시켰다.

실시예 1 - BG01v 세포에서의 ErbB1-3, Nrg1 및 ADAM19의 발현

[0215] 실시간 RT-PCR을 사용하여 BG01v 세포에서의 ErbB1-3, 뉴레귤린 및 ADAM-19의 발현을 입증하였다 (도 1). 100 ng/ml LongR3-IGF1 (LR-IGF1), 8 ng/ml FGF2 및 1 ng/ml 액티빈 A를 함유하는 상기 기재된 바와 같은 DC 배지에서 배양된 BG01v 세포를 수확하고, RN이지(RNeasy) 미니 키트 (퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 RNA를 제조하였다. 아이스크립트(iScript) 키트 (바이오라드(Biorad))를 사용하여 제1 가닥 cDNA를 제조하였고, MJ 리서치 옵티콘(MJ Research Opticon) 열 사이클러를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다.

[0216] ADAM19 (Hs00224960_m1), EGFR (Hs00193306_m1), ErbB2 (Hs00170433_m1), ErbB3 (Hs00176538_m1), NRG1 (Hs00247620_m1), OCT4 (Hs00742896_s1) 및 대조군 GAPDH에 대한 주문형 택맨(TaqMan) 검정 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))을 택맨 유니버설(universal) PCR (어플라이드 바이오시스템즈)과 함께 사용하였다. 미분화 BG01v 세포에서의 이러한 전사체의 발현을 입증하는 실시간 증폭 플롯이 도 1에서 제시된다.

실시예 2 - ErbB2의 억제가 BG01v 세포의 증식을 감속시킨다

[0217] EGF 도메인 패밀리의 리간드들이 ErbB 패밀리의 수용체 티로신 키나제에 결합한다. hESC에서의 ErbB 티로신 키나제의 공지된 억제제의 효과를 시험하기 위해, BG01v 세포를 100 ng/ml LongR3-IGF1, 8 ng/ml FGF2 및 1 ng/ml 액티빈 A를 함유하는 규정 배양 배지 (DC)에서 1:1000으로 희석된 매트리겔™ 상에 6웰 트레이에 플레이팅하였다. 다음 날, DMSO (담체 대조군), 50 nM-20 μ M AG1478 (ErbB1 억제제), 또는 100 nM-20 μ M AG879 (ErbB2 억제제)를 새로운 배지와 함께 첨가하였다. 매일 배지를 교환하면서 세포를 추가로 5일 동안 배양하였다. 그 후, 배양물을 고정시키고, 알칼리성 포스파타제 활성을 대해 염색하였다.

[0218] 대조군 및 AG1478 배양 세포에서 AP+ BG01v 세포의 준-전면성장(subconfluent) 콜로니가 관찰되었고 (도 2a 및 b), 이는 DMSO 또는 AG1478 (50 nM - 20 μ M)이 세포 증식에 대한 명백한 효과가 없었음을 가리킨다. 그러나, AG879는 5 μ M에서 세포 성장을 실질적으로 억제하였고 (도 2c), 20 μ M에서 세포 사멸을 야기하였다 (제시되지 않음). AG879에서 성장된 배양물은 분화하는 것으로 보이지 않았고, 만능 형태 및 알칼리성 포스파타제 활성을 유지하는 것으로 보였으며, 이는 AG879가 분화를 유도하지 않으면서 증식을 억제하는 것으로 보인다는 것을 가리키고, BG01v 세포가 세포 생존을 위해 ErbB2 신호전달에 의존한다는 것을 시사한다. 반대로, 상기와 유사한 조건에서 성장된 BG01v 세포는 증식을 위해 ErbB1 신호에 의존하지 않는 것으로 보인다.

실시예 3 - 헤레귤린을 함유하는 규정 배지에서 BG01v 세포가 유지된다

- [0222] ErbB2 및 ErbB3의 발현 및 AG879로의 증식 억제는 BG01v 세포에 활성인 내인성 ErbB 신호전달이 있다는 것과 이들이 외인성 HRG- β 에 또한 반응할 수 있다는 것을 시사하였다. BG01v 세포를 1:1000로 희석된 매트리겔™ 상에서 10 ng/ml HRG- β , 200 ng/ml LongR3-IGF1, 8 ng/ml FGF2 및 10 ng/ml 액티빈 A를 함유하는 DC 배지에서 성장시켰다 (도 3a 및 b). 이러한 세포들을 4회의 계대 동안 또는 >20일 동안 성장시켰고, 이들은 미분화 형태를 나타냈으며, 상승된 자발적 분화를 나타내지 않았다.
- [0223] 또한, BG01v 세포를 10 ng/ml HRG β , 200 ng/ml LongR3-IGF1, 및 10 ng/ml 액티빈 A를 함유하는 DC 배지에서도 2회의 계대 동안 또는 >13일 동안 유지시켰다. 이러한 배양물은 정상적으로 증식되었고, 매우 낮은 자발적 분화를 나타냈으며, 이는 BG01v 세포가 FGF2의 부재 하에 HRG β 가 있는 규정 배지에서 유지될 수 있음을 입증하였다.
- [0224] **실시예 4 - ES 세포에서의 ErbB2-유도된 티로신 키나제의 역할**
- [0225] RT-PCR에서 mESC가 ADAM19, 뉴레글린1 (Nrg1), 및 ErbB1-4를 발현한다는 것이 입증되었다 (도 4a). mESC에서, ErbB1보다 높은 수준으로 ErbB2 및 3이 발현되는 것으로 나타났고, 이때 낮은 수준의 ErbB4가 검출되었다. 이러한 데이터는 mESC 자가-재생을 구동시키는 것에서 내인성 HRG- β 가 수반될 수 있음을 시사한다.
- [0226] 마우스 배아 섬유모세포 (MEF)에서의 ErbB 수용체 전사체의 발현을 또한 시험하였다 (도 4b). MEF는 마우스 및 인간 EC 세포 및 ES 세포를 유지하기 위해 조직학적으로 사용된 E12.5-13.5 내장으로부터 유도된 세포들의 이종 성 집단이다. 이러한 집단에서의 Nrg1 및 Adam19의 발현은 HRG- β 액토도메인의 MEF-조건화 배지에 또한 존재하고 만능성에 유의한 효과를 발휘할 수 있다는 것을 시사한다.
- [0227] AG1478 및 AG879를 사용하여 마우스 ES 세포에서의 HRG/ErbB 신호전달의 역할을 시험하였다. R1 마우스 ES 세포를 DMEM, 10% FBS, 10% KSR, 0.5 U/ml 폐니실린, 0.5 U/ml 스트렙토마이신, 1×NEAA, 1 mM 피루브산나트륨, 1000 U/ml LIF (ESGRO), 0.1 mM β -ME에서 표준 조건 하에 유지시켰고, 0.5% 트립신/EDTA로 계대시켰다. 2×10^5 개의 세포/웰을 6웰 트레이에서 1:1000로 희석된 매트리겔™ 상에 플레이팅하였다. 플레이팅한 다음날, DMSO (담체 대조군), 1-50 μ M AG1478, 또는 1-50 μ M AG879를 새로운 배지와 함께 첨가하였다. 매일 배지를 교환하면서 세포를 추가로 8일 동안 배양하였다. 그 후, 배양물을 고정시키고, 알칼리성 포스파타제 활성을 대해 염색하였다.
- [0228] 알칼리성 포스파타제 양성 mESC의 준-전면성장 콜로니가 관찰되면서, DMSO 및 1-50 μ M AG1478는 세포 증식에 대한 명백한 효과가 없었다 (도 5a-c). 그러나, AG879는 50 μ M에서 세포 성장을 실질적으로 억제하였고 (도 5d 및 5f 비교), 20 μ M에서 증식을 늦출 수 있었다 (도 5e). AG879에서 성장된 mESC는 분화하는 것으로 보이지 않았고, 만능 형태 및 알칼리성 포스파타제 활성을 유지하는 것으로 보였다.
- [0229] 이러한 결과들은 AG879가 mESC의 분화를 유도하지 않으면서 이의 증식을 억제하는 것으로 보였다는 것을 가리켜서, mESC가 증식을 위해 ErbB2 신호전달을 필요로 한다는 것을 시사한다. 역으로, mESC는 증식을 위해 ErbB1 신호에 의존적인 것으로 보이지 않는다. 증식을 억제하는데 필요한 AG879의 농도는 규정 배지에서 성장된 BG01v 세포에 대한 것보다 mESC에 대해 약 10 \times 더 높았고, 이는 mESC 조건에 사용된 혈청이 약물 활성을 방해하였을 수 있거나, 인간 ErbB2 티로신 키나제에 대한 것보다 마우스 ErbB2 티로신 키나제에 대해 AG879의 친화도가 낮거나, 또는 ErbB2가 상이한 종의 ES 세포의 경우에 약간 상이한 역할을 할 수 있다는 것을 가리킨다.
- [0230] ErbB2 티로신 키나제의 또 다른 고도로 선택적인 억제제인 티르포스틴 AG825 (문헌 [Murillo, et al. 2001, Cancer Res 61:7408-12])를 사용하여 인간 ESC에서의 ErbB2의 역할을 조사하였다. AG825가 조건화 배지(CM)에서 성장 중인 hESC의 증식을 유의하게 억제하였다 (도 6a). AG825는 광범위한 세포 사멸 없이 증식을 억제하였고, 생존 hESC가 >5일 동안 유지될 수 있었다 (제시되지 않음). 웨스턴 블로팅은 AG825가 DC-HAIF에서 성장 중인 고갈/해레글린 (HRG) 펄스(pulsed) hESC에서 티로신-1248에서의 ErbB2의 자가인산화를 억제하였음을 나타냈다 (도 6b). 따라서, ErbB2 신호전달의 파괴가 hESC 증식을 심하게 억제하였다. 규정 성장 조건에서 hESC를 확립하기 위해, 배양물을 CM 조건에서 DC-HAIF으로 직접적으로 계대시킬 수 있었고, 이는 최소의 자발적 분화를 나타냈다 (도 6c). 본 발명의 실시양태들 중 하나의 정황에서 LongR3-IGF1 및 HRG가 자가-재생 및 증식에서 주요한 역할을 하였음이 콜로니 및 세포-계수 검정에서 확인되었다 (도 6d, 6e). IGF1R, IR, FGF2 α , ErbB2, 및 ErbB3의 인산화가 항정 상태 DC-HAIF 배양 및 DC-HAIF가 펄스된 고갈 배양 양쪽 모두에서 또한 관찰되었다 (도 6f).
- [0231] **실시예 5 - 규정 조건에서의 마우스 ES 세포의 배양**

[0232] 마우스 ES 세포에서의 HRG/ErbB2 신호전달의 역할을 추가로 시험하기 위해, 성장 인자들의 조합을 사용하여 DC 배지에서 R1 ES 세포의 증식을 시험하였다. 1×10^5 개의 세포/웰을 0.2% 젤라틴으로 코팅된 6웰 트레이에서 10 ng/ml HRG- β , 100 ng/ml LongR3-IGF1, 1 ng/ml 액티빈 A, 1000 U/ml 마우스 LIF 또는 10 ng/ml BMP4의 조합을 함유하는 DC 내에 플레이팅하였다 (하기 표 3). 8일에 걸쳐 증식을 관찰하였다.

[0233] 적어도 LIF/HRG- β 또는 LIF/BMP4를 함유하는 조건에서만 생존 콜로니가 성장하였다 (표 3). LongR3-IGF1 또는 액티빈이 이러한 조합에 첨가되었을 때 추가적인 명백한 이점이 관찰되지 않았다. 대조군 모체 배양에서 정상적인 증식이 관찰되었고, 어떠한 성장 인자도 없는 규정 배지에서는 생존 콜로니가 관찰되지 않았다.

[0234] <표 3>

HRG	IGF	액티빈	LIF	BMP4	성장
+					아니오
+			+		예
+	+				아니오
+	+		+		예
+	+	+			아니오
+	+	+	+		예
+		+			아니오
+		+	+		예
			+	+	예
+			+	+	예

[0235]

[0236] 10 또는 50 ng/ml HRG- β , 10 ng/ml EGF, 1000 U/ml LIF 또는 10 ng/ml BMP4의 선별된 조합으로 2×10^5 개의 세포/웰을 6웰 트레이에서 1:1000 매트리겔™에 플레이팅함으로써 정량적 검정을 수행하였다. 배양물을 8일 동안 성장시키고, 고정시키고, 알칼리성 포스파타제 콜로니의 개수를 계수하였다 (도 7a). 성장 인자 없는 규정 조건에서는 콜로니가 관찰되지 않았고, HRG- β , HRG- β /EGF 및 HRG- β /BMP 조합으로는 <45개의 콜로니가 관찰되었다. 1358개의 콜로니가 LIF 단독에서 관찰된 한편, 10 ng/ml HRG- β /LIF 및 50 ng/ml HRG- β /LIF 조합에서는 각각 4114개 및 3734개의 콜로니가 관찰되었다. 이는 규정 조건에서, LIF 단독이 실질적인 만능 신호를 제공하였고, HRG- β 가 이러한 조건에서 증식성 mESC 콜로니의 개수를 배가시키는 것 이상으로 LIF와의 큰 상승작용적 효과를 나타냈음을 가리켰다. 이러한 조건에서 저배율 영상 또한 이러한 상승작용적 증식 효과를 가리킨다 (도 7b-g).

실시예 6 - DC-HAIF에서 유지된 인간 배아 줄기 세포 (hESC)의 만능성의 특성화

[0238] 다중 접근법을 사용하여 DC-HAIF에서의 hESC의 성형성의 유지를 확증하였다. 6개월 (25회의 계대) 동안 DC-HAIF에서 배양된 BG02 세포가 복합적인 기형종 (도 8a) 및 시험관 내에서의 3개의 배엽의 대표물 (도 8b)을 형성하는 잠재력을 유지하였다. 전사 분석을 사용하여 CM 및 DC-HAIF에서 유지된 hESC 세포의 전반적인 발현을 비교하였다 (문헌 [Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20]). 11,600개를 초과하는 전사체가 10회 및 32회 계대 동안 DC-HAIF에서 성장된 BG02 세포, 및 64회의 계대 동안 CM에서 성장된 BG02 세포에서 검출되었다. 공지된 hESC 마커 예컨대 CD9, DNMT3, NANOG, OCT4, TERT 및 UTF1 (제시되지 않음)을 포함하여, 모든 집단에 대해 공통적인 약 10364개의 전사체가 있었다 (도 8c). CM 배양과 DC-HAIF 배양의 비교에서 (R^2 선택=0.928), 뿐만 아니라 초기 계대 세포와 후기 계대 세포의 비교에서 (R^2 선택=0.959), 높은 상관 계수가 관찰되었다 (도 8d). 계층 군집 분석에서, DC-HAIF에서 유지된 BG02 세포가 촘촘하게 군을 이루었고, CM에서 유지된 BG02 및 BG03 세포에 대한 밀접한 유사성을 유지하였음을 입증되었다 (도 8e). 이러한 데이터는 배상체 또는 섬유모세포와 비교하여 미분화 hESC가 촘촘하게 군집되었음을 나타내는 기준의 분석 (문헌 [Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20])과 일관된다. 따라서, 본 발명의 조성물에서 유지된 세포는 만능성의 주요 마커를 유지할 수 있다. 그러므로, 본 발명의 조성물을 분화가능한 세포의 자가-재생을 지지하기 위한 단순 배지로서 사용할 수 있다.

- [0239] **실시예 7 - DC-HAIF 내의 인간화 세포의 매트릭스 (ECM)에서의 인간 배아 줄기 세포 (hESC)의 유지**
- [0240] ErbB2 신호전달의 역할을 조사하고 hESC에 대한 규정 배지를 개발하기 위해, DC-HAIF 배양물이 먼저 성장 인자가 감소된 매트리겔™ 1:30으로 코팅된 배양 접시 상에서 확장되었지만, 1:200 (도 9a), 또는 1:1000으로 희석된 이러한 기판 상에서 성공적으로 장기로 유지될 수도 있었다. 인간 혈청 (도 9b); 인간 피브로네틴 (도 9c); 또는 특허권이 있는 인간화 ECM인 비트로그로(VITROGRO)™ (도 9d)로 코팅된 조직 배양 접시 상에서 BG02 및 CyT49 hESC가 또한 >5회의 계대 동안 유지될 수 있었다.
- [0241] **실시예 8 - 인간 배아 줄기 세포 (hESC)의 단일 세포 계대**
- [0242] 특정 삼배수체, 특히 hChr12 및 17의 삼배수체가 특정 준-최적 배양 조건 하에 hESC에서 축적된다는 것이 여러 연구 그룹에서 입증되었다 (문헌 [Baker et al. 2007, Nat. Biotech. 25:207-15]). 삼배수체의 발현은 배양물이 계대에서 단일 세포로 분할되는 경우에 불량한 세포 생존에 가장 직접적으로 관련되는 것으로 보여, 추정되는 강력한 선택적 성장 장점을 이러한 이수배수체를 보유하는 세포에 제공한다. 역으로, 본 발명의 한 실시양태인 DC-HAIF에서 성장 중인 hESC는 단일 세포로 분할된 후에 플레이팅에서 높은 생존율을 유지하였다 (도 10a-d). BG01 및 BG02 세포는 아큐테이즈™로 계대된 후에 각각 > 18회 및 19회의 계대 동안 정상적인 핵형을 유지하였다 (도 10e). 세포에서의 정상적인 핵형의 유지는 hESC 배양물을 단일 세포로 분해하는 것이 본질적으로 DC-HAIF에서 유지된 hESC에서의 이러한 삼배수체의 축적에 이르지 않았음을 입증하였다. BG01 및 BG02 배양물이 여러 계대 작용제로 단일 세포로의 분해에 의해 또한 계대되었다 (도 11). 배양물을 아큐테이즈™, 0.25% 트립신/EDTA, TrypLE, 또는 베르센™ (EDTA)으로 5회의 계대 동안 분할시키고, 핵형을 분석하였다. 다양한 세포 분해 시약을 사용하여, hESC를 본 발명의 조성물에서 배양하고 계대시키는 것이 적어도 2개의 인간 배아 세포주에서 정상적인 핵형을 유지하였음이 데이터에서 입증된다.
- [0243] 본 발명의 조성물을 사용하여, 미분화 hESC의 대규모 확장이 또한 가능하다. 60 mm 플레이트 내의 BG02 세포의 출발 전면성장 배양물을 4회의 계대를 통해 DC-HAIF에서 확장시켜, 단일 실험에서 20일 이내에 $>1.12 \times 10^{10}$ 개의 세포가 생성되었다. 유동 세포측정법에 의해 시험했을 때 배지 내의 세포의 >85%가 OCT4, CD9, SSEA-4, TRA-1-81와 같은 만능 마커의 발현을 유지하는 것에 의해 입증되는 바와 같이, 배양물이 미분화로 남아 있었다 (도 12a). 기타 만능 마커의 발현이 RT-PCR에 의해 또한 관찰된 한편, 분화 계통의 마커인 α-태아단백질, MSX1 및 HAND1은 검출되지 않았다 (도 12b). 형광 계내 혼성화 분석에서, DC-HAIF에서 배양 및 계대된 세포가 hChr12 (98% 2-카피), hChr17 (98% 2-카피), hChrX (95% 1-카피) 및 hChrY (98% 1-카피)에 대한 예상 카피수를 유지하였음이 입증되었다 (도 12c). 정상적인 정배수성 염색체 함량 및 밴딩(banding) 프로파일이 이러한 세포에서 유지되었음이 핵형 분석에서 또한 입증되었다.
- [0244] **실시예 9 - 생리학적 농도에서 적용되었을 때 인슐린 및 IGF1이 hESC에 상이한 효과를 발휘한다**
- [0245] 현재까지 hESC에 대한 보고된 본질적으로 모든 배양 조건은 생리학적 수준을 초과하는 인슐린을 포함하고, 이는 IR 및 IGF1R 양쪽 모두를 자극할 수 있다. IGF1과 비교하여 인슐린 및 인슐린-대체물이 발휘하는 활성을 구별하기 위해, hESC를 규정 배지 조건에서 생리학적 수준의 이러한 성장 인자들에서 배양하였다. 인슐린 및 IGF1의 농도를 약 0.2 내지 약 200 ng/ml로 적정하였고, 5일 후 세포를 계수함으로써 세포 증식을 모니터링하였다. 성공적으로 확장된 배양물을 연속적으로 5회 계대하였다. 생리학적 수준의 IGF1은 hESC 배양물의 확장을 지지한 반면, 생리학적 수준의 인슐린은 그렇지 않았고, 이는 인슐린 또는 인슐린-대체물의 활성이 IGF1을 대신할 수 없다는 것과 IGF1 및 인슐린 (또는 인슐린 대체물)이 hESC에 대한 작용과 관련하여 별도 클래스의 생물학적 활성을 나타낸다는 것을 가리킨다.
- [0246] **실시예 10 - 보충물의 효과를 스크리닝하는 방법**
- [0247] 중등도의 밀도로 성장 중인 hESC의 성장 또는 분화에 대한 비타민 B₁₂ 및 비타민 B₆의 효과를 먼저 시험하기 위해, BG02 세포를 아큐테이즈™를 사용하여 분할하고, 1×10^5 개의 세포/웰을 6웰 트레이에서 규정 배양 (DC) 배지 내에 플레이팅하였다. DC 배지는 10 ng/ml HRG-β, 200 ng/ml LongR3-IGF1, 및 10 ng/ml FGF10을 함유하였다. 비타민 B₆ (0.5 μM) 및/또는 비타민 B₁₂ (0.5 μM)를 실험 웰에 첨가하였다. 7일 후에 각각의 조건에서의 세포수를 계수하였다. 실험 웰 및 대조군 웰 양쪽의 세포 계수 및 콜로니 계수는 세포 성장에 대한 비타민 B₆ 및 비타민 B₁₂의 효과에 대한 통찰을 제공하였다.
- [0248] 또한, 분화 마커, 예컨대 OCT4를 실험 웰에서 검정하여 분화가능성 세포의 분화 상태에 대한 첨가물 및 보충물

의 효과를 결정할 수 있었다.

[0249] 실시예 11 - FGF2 부재 하에서의 hESC 배양

[0250] BG02 세포를 DC-HAI에서 20회의 계대 동안 장기로 유지시켰고 (도 13a), BG01 세포를 또한 연속적으로 DC-HAI에서 계대시켰으며, 양쪽 모두 FGF2가 부재하였다. 배양물이 악화되거나 명백한 분화를 나타내지 않았고, 배양기간에 걸쳐 미분화 콜로니의 정상적인 확장을 나타냈다. BG02 배양물에서의 정상적인 남성 핵형의 유지가 DC-HAI에서의 6회의 계대 후에 입증되었다 (도 13b, 20/20의 정상적인 증기 펼침).

[0251] 전사 분석을 사용하여, DC-HAIF 및 DC-HAI에서 유지된 hESC 세포에서의 전반적인 발현을 비교하였다. 전체 세포 RNA를 트리졸(Trizol) (인비트로젠)을 사용하여 hESC로부터 단리하고, DNase I (인비트로젠)로 제조사가 제안한 프로토콜에 따라 처리하였다. 100 ng의 전체 RNA로 일루미나(Illumina) RNA 증폭 키트를 사용하여 샘플 증폭을 수행하였고, 미표지 UTP와의 1:1 비로 비오텐-16-UTP (퍼킨 엘머 라이프 앤드 애널리티컬 사이언시스(Perkin Elmer Life and Analytical Sciences))의 혼입에 의해 표지하였다. 표지된 증폭 물질 (어레이 당 700 ng)을 제조사의 설명서 (일루미나 인크.(Illumina, Inc.))에 따라 47,296개의 전사체 프로브를 함유하는 일루미나 센트릭스 허먼-6 익스프레션 비드칩(Illumina Sentrix Human-6 Expression Beadchip)에 혼성화시켰다. 어레이를 일루미나 비드 어레이 리더(Illumina Bead Array Reader) 공초점 스캐너로 스캐닝하고, 1차 데이터 프로세싱, 배경 차감 및 데이터 분석을 일루미나 비드스튜디오(Illumina BeadStudio) 소프트웨어를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 0.99의 최소 검출 신뢰 접수 (표적 서열 신호가 음성 대조군과 구별 가능하였음을 가리키는 계산된 차단값)를 사용하여 전사체 발현의 존재 또는 부재를 구별하였다. 다른 hESC 샘플들에 대해 기재된 병렬 접근법을 사용하여 데이터 분석을 수행하였다 (문헌 [Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20]). 계층 군집화를 기준에 기재된 바와 같이 수행하였고 (문헌 [Liu et al. 2005, BMC Dev Biol 6:20]), 이는 ANOVA ($p<0.05$)에 의해 확인된 차별적으로 발현된 유전자들을 사용하여 유사성 척도로서 평균 연관 및 유클리드 거리를 기초로 하였다. 어레이 제작에서 사용된 감도 및 품질 제어 테스트 및 비드스튜디오 소프트웨어에서 사용된 알고리즘의 상세한 설명은 일루미나 인크.(캘리포니아주 샌디에고)에서 입수 가능하다. 공지된 hESC 마커 예컨대 CD9, DNMT3, NANOG, OCT4, TERT 및 UTF1 (제시되지 않음)을 포함하여, 대다수의 검출된 전사체가 DC-HAIF 및 DC-HAI BG02 배양물 양쪽에서 검출되었다. 높은 상관 계수가 DC-HAIF 및 DC-HAI 배양물의 비교에서 관찰되었다 (R^2 선택=0.961) (도 14). 계층 군집 분석에서, DC-HAI에서 유지된 BG02 세포가 촘촘하게 군을 이루었고 DC-HAIF에서 유지된 세포, 뿐만 아니라 다중 배양 양식의 BG02 및 기타 hESC 세포주에 대한 밀접한 유사성을 유지하였음이 입증되었다 (도 15). 이러한 데이터는 배상체 또는 섬유모세포와 비교하여 미분화 hESC가 촘촘하게 군집되었음을 나타내는 기준의 분석 (문헌 [Liu et al. 2006, BMC Dev Biol 6:20])과 일관된다.

[0252] 또한, 기준에 외인성 FGF2의 부재 하에 성장된 배양물에서 만능성의 유지를 나타낸 SCID-베이지 마우스에서 형성된 복합 기형종에서 DC-HAI에서 유지된 BG02 세포가 중배엽, 내배엽 및 외배엽의 대표물로 분화되었다 (제시되지 않음).

[0253] 단일 세포 계대의 정황에서 외인성 FGF2가 필요하였는지를 시험하기 위해, BG01 세포를 아큐테이즈™로 계대시키고, 10 ng/ml HRG- β 및 200 ng/ml LongR3-IGF1 (DC-HI)만 함유하는 규정 조건에서 성장시켰다. 이러한 DC-HI 배양물이 10회의 계대 동안 유지되었고, 명백한 분화 또는 증식 감속을 나타내지 않았다.

[0254] 이러한 연구들은 hESC가 헤레귤린 및 IGF1을 최소로 함유하는 규정 배지에서 유지될 때 외인성 FGF2의 제공이 필요하지 않다는 것을 명확하게 입증하였다. 또한, FGF2가 부재하는 배양물이 전사 프로파일 및 생체 내에서의 중배엽, 내배엽 및 외배엽으로의 분화가 포함되는 만능성의 주요 성질을 유지하였다.

[0255] 실시예 12 - 혼탁 배양물

[0256] BG02 세포의 출발 배양물을 본원에 기재된 바와 같이 1:200 매트리겔로 코팅된 접시 상에서 DC-HAIF 배지에서 유지시켰고, 아큐테이즈™로의 계대에 의해 분할시켰다. 혼탁 배양을 개시시키기 위해, BG02 세포를 아큐테이즈™로 분해시키고, 저-부착 6웰 트레이에 DC-HAIF 내에 1.6, 3, 또는 6×10^5 개의 세포/ml (3 ml 부피 내의 0.5, 1, 또는 2×10^6 개의 세포)의 밀도로 놓았다. 트레이를 5% CO₂의 습식 인큐베이터 내의 80-100 rpm의 회전식 플랫폼 상에 놓았다. 이러한 조건 하에, hESC가 24시간 이내에 형태학적으로 생존 세포의 소형 구체로 합체되었다.

[0257] 제2일에 웰 내의 배지를 교환하고, 그 후 매일 교환하였다. 명백한 분화의 징후 없이 경시적으로 더 크게 자라면서 혼탁 응집체가 계속 증식하였다 (도 17). 일부 응집체가 대다수보다 훨씬 더 커짐에 따라, 일부 구체는

배양 과정에 걸쳐 계속 응집하였다. 또한, 배양 중 처음 며칠 동안 합체 과정에서 구형이 아닌 응집체가 관찰될 수 있었다. 이러한 계속되는 응집을 제한하기 위해, 38 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 DNaseI이 일부 혼탁 배양물에서 처음 24시간 동안 포함되었다. 비교적 더 큰, 그러나 더 적은 응집체가 DNaseI의 존재 하에 형성되면서, 이러한 접근법은 초기 응집에 도움이 되는 것으로 보였다. 그러나, DNaseI 처리가 구체들의 후속 합체를 감소시켰는지 및 DNaseI에 대한 노출이 일관적으로 이러한 응집체들을 분할 시 부수기 더 어렵게 만들었는지는 명확하지 않다.

[0258] 혼탁 배양물을 약 7일마다 아큐테이즈™로 분해시켰고, 새로운 구체가 확립되었다. 여러 실험에서 밀도가 달랐지만, 이러한 밀도 범위 ($1.6\text{--}6 \times 10^5$ 개의 세포/ ml) 내에서 확립된 구체는 형태학적인 분화 징후 없이 12회를 초과하는 계대 또는 >80 일 동안 배양에서 유지될 수 있었다. 연속적으로 계대된 혼탁액 hESC의 FISH 분석을 또한 수행하여, 통상적인 이수배수체에 대한 염색체 개수를 평가하였다. 6회의 계대 동안 혼탁액에서 성장된 BG02 세포는 hChr 12 (96% 2개의 카피, n=788), hChr 17 (97% 2개의 카피, n=587), hChr X (97% 1개의 카피, n=724) 및 hChr Y (98% 1개의 카피, n=689)에 대한 정상적인 수를 나타냈다.

실시예 13 - 혼탁 배양에서의 분화가능한 세포의 확장

[0260] 혈청 또는 분화 유도제의 존재 하에서의 배상체 배양과 달리, DC-HAIF 내의 hESC의 혼탁 응집체는 분화하는 것으로 보이지 않았다. 명백한 내장 내배엽 또는 풋양막 공간을 닮은 구조의 형성 (양쪽 모두 배상체 분화의 고전적인 징후임)이 관찰되지 않았다. 분화 과정을 더욱 면밀하게 시험하기 위해, 배양물을 다시 1:200로 희석된 매트리겔™의 부착 조건 내로 놓았고, DC-HAIF에서 배양하였다. 이러한 배양물들 또한 주로 미분화였고, 증가된 분화의 명백한 형태학적 징후 예전대 더 크고 편평한 세포의 존재 또는 구조화된 영역을 나타내지 않았다.

[0261] 세포 계수를 사용하여 부착 배양과 비교하여 혼탁액에서의 세포의 상대적인 성장률을 평가하였다. 이러한 실험에서, BG02 세포의 부착 배양물을 아큐테이즈™로 계대시켰고, 약 1×10^6 개의 세포를 병렬 혼탁 또는 부착 배양 웰에 놓았다. 개별적인 웰을 제1일-제6일에 계수하고, 로그 스케일로 플롯팅하였다 (도 18). 더 높은 초기 비율의 hESC가 부착 배양에서 24시간 후 생존한 한편 (~90% 대 ~14%), 그 후에는 성장률이 유사하였다. 이는 hESC가 전통적인 부착 배양에서와 같이 혼탁 배양에서 신속하게 증식할 수 있었음을 가리켰다. 계대 동안 수행된 세포 계수는 이러한 단순 혼탁 시스템에서 가능한 확장량을 측정하게 한다. 5×10^5 개의 세포가 접종된 여러 배양물에서, 약 10^7 개 이상의 세포가 7일 후에 생성되었다. 혼탁 배양에서의 7일 후의 확장은 약 20배 이상의 확장으로 평균화되었고, 이때 관찰된 최대 확장은 투입 세포수의 $\sim 24 \times$ 였다.

실시예 14 - 혼탁 배양에서 확장된 분화가능한 세포의 특성

[0263] 정량적 RT-PCR (qPCR)을 사용하여, DC-HAIF 내에서 혼탁 및 부착 배양으로 성장된 hESC에서의 유전자 발현을 비교하였다. 유사한 수준의 만능 세포의 마커인 OCT4가 양쪽 배양 양식에서 관찰되어, 혼탁액에서 유지된 배양물이 주로 미분화였음이 확증되었다. 완전 내배엽의 마커인 SOX17가 어느 한쪽 hESC 집단에서 발현되지 않았다. 혼탁액 내의 응집체로서 완전 내배엽으로 분화하는 혼탁액 hESC의 잠재력을 qPCR 분석에서 또한 시험하였다. 병렬 조건을 사용하여 부착 및 혼탁액 hESC를 분화시켰다. hESC 배양물을 2% BSA, 100 ng/ml 액티빈 A, 8 ng/ml FGF2 및 25 ng/ml Wnt3A를 함유하는 RPMI로 24시간 동안 처리한 후, 2일 동안 Wnt3A가 없는 동일한 배지에서 처리하였다. 미분화 hESC와 비교하여 완전 내배엽 샘플 양쪽 모두에서 유사하게 OCT4 발현이 하향조절되었고 SOX17 발현이 상향조절되었다. 이러한 분화 분석에서, 완전 내배엽의 가능성있는 형성에 의해 입증되는 바와 같이 DC-HAIF 내의 혼탁액에서 배양된 hESC가 이의 분화 잠재력을 유지하였음이 확증되었다.

실시예 15 - 혼탁 배양에서의 아폽토시스 억제제 첨가

[0265] 혼탁액에서의 초기 계대 후의 세포 손실을 약화하기 위해, 아폽토시스 억제제를 배지에 첨가하였다. p160-Rho-연관 코일드-코일 키나제 (ROCK)의 억제제인 Y-27632를 배지에 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 12에서와 같이 세포를 계대하였다.

[0266] 인큐베이터 내의 100 rpm의 회전식 플랫폼 상에서 2×10^6 개의 단일 세포를 6웰 접시 내에 3 ml DC-HAIF 배지에 접종함으로써 BG02 세포의 혼탁액 응집체를 형성시켰다 (표 4, 실험 A). 10 μM Y27632 ROCK 억제제를 실험 과정 동안 테스트 웰에 첨가하였고, 배양물을 매일 관찰하였으며, 24시간 후 (제1일) 및 4일 또는 5일 후에 계수하였다. 도 20에 나타난 바와 같이, Y27632 첨가는 혼탁 배양의 초기 응집 단계에 대한 지대한 효과가 있었다. 억제제가 없는 배지에서 응집된 세포와 비교하여, Y27632의 존재 하에 훨씬 더 많은 응집체가 형성되었다 (도 20). 더 많은 생존 세포가 억제제의 존재 하에 존재하였음이 세포 계수에서 확증되었다 (표 4, 실험 A). 세포

수에서의 이러한 차이가 배양 기간 과정에 걸쳐 지속되었고, 이때 억제제가 없는 배양물과 비교하여 제4일에 더 많은 세포가 또한 관찰되었다. 이전의 혼탁 배양 실험과 같이, Y27632에 노출된 세포 또한 연속적으로 계대될 수 있었고, 미분화 상태로 유지될 수 있었다 (제시되지 않음). 응집체를 다시 분할했을 때, Y27632 처리 시에 거의 2배 많은 세포가 관찰되었다 (표 4 실험 A). Y27632의 존재 하에 혼탁 배양에서 성장된 BG02 세포가 여전히 미분화였음이 RT-PCR 분석에서 입증되었다 (도 21).

[0267] 이전 실험들이 혼탁 및 부착 배양에서의 세포의 성장률이 초기 24시간 후 유사하였음을 나타냈기 때문에, 이러한 초기 기간 후에 Y27632가 제거된 실험을 수행하였다 (표 4, 실험 B). 이전의 관찰과 일관되게, Y27632가 초기 계대 후 hESC의 초기 생존 및 응집을 강화하였지만, 24시간 후에 억제제를 제거하는 것이 제5일에 분석된 세포의 개수 및 생존율 계산에 음성적으로 영향을 미치지 않았다. 미처리 배양물에서의 3.9×10^6 개의 세포와 비교하여 1.4×10^7 개 (+Y27632) 및 1.8×10^7 개 (+/-Y27632)의 생존 세포가 억제제가 존재할 때 생성되었다. 이러한 분석은 Y27632가 혼탁 hESC 배양의 최초 24시간 동안 영향이 가장 커음을 확증하였다.

[0268] Y27632의 존재 하에 관찰된 강화된 생존 및 응집으로 인해, 혼탁 배양물 접종에 사용된 세포의 개수를 감소시킬 수 있는지를 시험하기 위해 실험을 수행하였다 (표 4, 실험 C). 이전의 실험들은 3 ml DC-HAIF 당 약 5×10^5 개의 세포 이하의 낮은 밀도로 ES 세포를 접종하는 것이 잘 작용하지 않았음을 가리켰다. ROCK 억제제의 첨가가 더 낮은 밀도에서의 세포 접종을 허용할 것인지를 결정하기 위해, 다양한 세포 농도 (약 2×10^6 개의 전체 세포 내지 약 1×10^5 개의 전체 세포)를 사용하여 6웰 트레이에서 3 ml DC-HAIF 내에 세포를 혼탁 배양물에 접종하였다. $10 \mu M$ Y27632를 모든 조건에 첨가하였고, 세포 개수 및 생존율을 제5일에 평가하였다. 낮은 접종 밀도에서도 성공적인 응집 및 확장이 관찰되었다. 1×10^5 개의 세포만 접종된 배양물에서도 생존 세포의 약 13배 확장이 관찰되었다. 따라서 Y27632로 ROCK를 억제하는 것이 이러한 혼탁액 시스템에서 훨씬 더 낮은 밀도의 hESC의 초기 생존을 용이하게 하였다.

[0269] <표 4>

아웃도시스 억제제의 존재 및 부재 하에서의 혼탁 배양물

Expt.	처리	접종	세포수: 전체 (생존율, %)		
A	HAIF	2×10^6	p0, 제1일 1.9×10^6 (3.5×10^5 , 19%)	p0, 제4일 1.8×10^6 (1.3×10^6 , 75%)	p1, 제4일 2.5×10^6 (2.2×10^6 , 88%)
		2×10^6	+Y27632 1.6×10^6 (1.2×10^6 , 74%)	7.8×10^6 (7.1×10^6 , 91%)	4.6×10^6 (4.2×10^6 , 91%)
				p0, 제5일	
B	HAIF	2×10^6	2.9×10^6 (5.5×10^5 , 26%)	4.8×10^6 (3.9×10^6 , 81.3%)	
		2×10^6	+Y27632 1.9×10^6 (1.4×10^6 , 73%)	1.5×10^7 (1.4×10^7 , 92%)	
	+/-Y27632	2×10^6	N/A	1.9×10^7 (1.8×10^7 , 96%)	
C	+Y27632	2×10^6		p0, 제5일	
		1×10^6	1.9×10^6 (1.6×10^6 , 84%)	1.4×10^7 (1.2×10^7 , 90%)	
		5×10^5	8.7×10^5 (6.6×10^5 , 76%)	8.6×10^6 (7.8×10^6 , 91%)	
		2.5×10^5	4.6×10^5 (3.5×10^5 , 75%)	5.7×10^6 (5.3×10^6 , 93%)	
		10^5	2.6×10^5 (2.3×10^5 , 91%)	2.7×10^6 (2.5×10^6 , 91%)	
			6.8×10^4 (5.4×10^4 , 79%)	1.4×10^6 (1.3×10^6 , 92%)	

Expt.= 실험: p0 = 계대 0, p1 = 계대 1; N/A= 입수가능하지 않음; 세포수 및 백분율은 각각 1개 및 0개의 소수점으로 반올림된다.

[0270]

실시예 16 - 다양한 배지에서의 혼탁 배양물

[0271] ES 세포의 혼탁액이 FGF2 및/또는 액티빈 A의 부재 하에 배양될 수 있는지를 결정하기 위해, 이러한 인자들의 존재 또는 부재하는 다양한 배지에서 ES 세포를 배양하였다. 표 5는 혼탁 배양물로부터의 세포 계수 결과를 나타내고, 외인성 FGF2의 부재 하에서 (HAI 조건), 뿐만 아니라 외인성 FGF2 또는 액티빈 A 없이도 (HI 조건), 혼

탁 배양물이 성공적으로 확장될 수 있었음을 가리킨다. Y27632 첨가는 모든 조건에서 제5일까지 생성된 세포의 수율을 증가시켰다. 또한, 각각의 배지 내의 세포가 분화의 형태학적인 징후 없이 성공적으로 계대되었다.

[0273]

<표 5>

다양한 배지에서의 혼탁 배양물

처리	접종	세포수: 전체 (생존율, %)	배수 확장
		p0, 제5일	
HAIF	2×10^6	7.7×10^6 (6.5×10^6 , 83%)	3.25
HAI	2×10^6	7.0×10^6 (6.3×10^6 , 91%)	3.15
HI	2×10^6	6.4×10^6 (5.3×10^6 , 83%)	2.65
HAIF+Y276 32	2×10^6	1.5×10^7 (1.3×10^7 , 90%)	6.5
HAI+Y2763 2	2×10^6	1.5×10^7 (1.3×10^7 , 91%)	6.5
HI+Y27632	2×10^6	1.9×10^7 (9.2×10^6 , 49%)	4.6

[0274]

실시예 17 - 최적화된 전단 속도가 혼탁액 세포 응집체의 증가된 생존, 균일한 밀도 및 크기를 초래한다

[0276]

혼탁 세포 배양물에서 유지될 수 있는 임의의 세포주가 본원에 개시된 시스템, 방법 및 장치로부터 이익을 얻을 수 있고, 이에 따라 사용될 수 있는 것으로 구상된다. 세포는 인간 세포주 CyT49, CyT203, Cyt25, BG01 및 BG02, 마우스, 개, 및 비-인간 영장류 줄기 세포주, 뿐만 아니라 기타 등등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 포유동물 세포를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0277]

본원에서 제공되는 결과는 반응기 장치의 작동 매개변수, 특히 배양물 유동 속도 및 제공되는 전단력에 따라 세포 증식 및 분화가 대조군 수준에서 유지될 수 있거나 또는 약화될 수 있음을 가리킨다. 세포 배양물 상에 가해진 전단력이 세포 증식에 대한 유의한 효과가 있을 수 있다. 대칭적인 시스템, 예컨대 본원에서 사용된 회전식 플랫폼은 균일하고, 주로 충류성인 전단 응력을 용기 주변에 제공하는 한편, 비대칭적인 시스템 및 마운팅(mounting), 예컨대 교반-탱크 생물반응기는 국소적으로 높은 전단 응력을 특징으로 하는 난류 영역이 있다. 따라서, 생물반응기 또는 세포 배양 장치가 대칭적인 시스템이 아니면, 배양물 유동 방향이 회전으로부터 초래되는 전단 응력의 성질 및 정도 양쪽 모두에 영향을 미친다.

[0278]

물론, 최적의 회전 속도는 배양물 특이적이고, 세포 배양물 내의 세포수, 배양 배지의 점도, 배지 유형, 혼탁액 내의 특정 세포의 강건성 (일부 세포는 다른 것보다 더 높은 수준의 전단력을 견딜 수 있음) 등에 따라 변할 수 있다. 최적의 회전 속도는 사용가능한 특정 조건 세트에 대해 쉽게 결정된다. 특히, 본원에서 기재되고 구상되는 회전 속도는 충류 조건을 유지하기 위해 유용하다. 따라서, 본원에 기재된 실험은 1) 세포 증식 및 분화가 대조군 수준에서 또는 이와 유사한 수준에서 유지되는 조건; 및 2) 세포 증식 및 분화가 약화되는 조건 하에 있었다. 하기는 hES 세포 응집체 배양물 또는 분화된 hES 세포 응집체 배양물을 유지시키는데 잘 작용하는 일반적인 방법이다. 당업자는 본원에서 제공된 설명을 기초로 세포 응집체의 크기 및 형상을 최적화할 수 있다.

[0279]

하기의 표 6은 세포 응집체의 직경 (μm)과 관련되는 바와 같이 전단 속도 및 전단 응력을 기재한다. 케도형 회전기 (바른스테드 랩라인 다목적 회전기(Barnstead LabLine Multipurpose Rotator))를 사용하는 다양한 회전 속도에서 인간 ES 세포를 1일, 2일, 3일 및/또는 4일 동안 응집시켰다: 60 rpm, 80 rpm, 100 rpm, 120 rpm, 130 rpm, 140 rpm, 150 rpm 및 160 rpm. 표 6은 세포 응집체가 겪는 효과적인 전단 속도가 이러한 세포 응집체의 직경에 좌우된다는 것을 또한 입증한다.

[0280]

<표 6>

세포 응집체의 크기는 전단 속도 및 전단 응력에 좌우된다

응집체 직경 (μm)	회전 속도 (rpm)	무차원 응력	전단 응력 (다인/ cm^2)	전단 속도 (1/초)
200	140	0.94	3.16	322.24
	120	0.76	2.06	210.12
	100	0.59	1.24	126.82
	80	0.43	0.66	67.05
	60	0.29	0.30	30.17
175	140	0.72	2.42	246.72
	120	0.58	1.58	160.87
	100	0.45	0.95	97.10
	80	0.33	0.50	51.33
	60	0.22	0.23	23.10
150	140	0.53	1.78	181.26
	120	0.43	1.16	118.19
	100	0.33	0.70	71.34
	80	0.24	0.37	37.71
	60	0.16	0.17	16.97
125	140	0.37	1.23	125.88
	120	0.30	0.80	82.08
	100	0.23	0.49	49.54
	80	0.17	0.26	26.19
	60	0.11	0.12	11.79
100	140	0.24	0.79	80.56
	120	0.19	0.51	52.53
	100	0.15	0.31	31.71
	80	0.11	0.16	16.76
	60	0.07	0.07	7.54

[0281]

[0282]

어떻게 회전 속도가 ES 응집체의 직경을 제어하는지를 결정하기 위해, 본 발명가들은 100 rpm, 120 rpm 또는 140 rpm에서의 회전에 의해 ES 응집체를 생성시켰다. 회전 배양에서 2일 후에 취해진 5× 위상 대조 영상으로부터 응집체 직경을 정량하였다. 100 rpm 배양물에 대해, 평균 직경 $+$ / $-$ SD는 $198 \mu\text{m} +/ - 21 \mu\text{m}$ 였다. 120 rpm 배양물에 대해, 평균 직경 $+$ / $-$ SD는 $225 \mu\text{m} +/ - 28 \mu\text{m}$ 였다. 140 rpm 배양물에 대해, 평균 직경 $+$ / $-$ SD는 $85 \mu\text{m} +/ - 15 \mu\text{m}$ 였다. ANOVA 및 투키(Tukey) 다중 비교 사후 시험을 사용하였을 때 각각의 직경 분포가 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.001$). 표 6에 나타난 바와 같이, 60 rpm에서 140 rpm으로 전단 속도가 기하급수적으로 증가하고, 예를 들어, $100 \mu\text{m}$ 직경 응집체에 대한 전단 속도가 100 rpm에서는 약 30 sec $^{-1}$ 이고 140 rpm에서는 약 80 sec $^{-1}$ 이며, 이는 약 3배 증가이다. 전형적으로, 140 rpm을 초과하는 회전 속도에서 더 크고 덜 균일한 hES 세포 응집체가 초래되었다. 또한, 세포 응집체 배양물을 먼저 감소된 회전 속도, 예를 들어, 60 rpm 내지 80 rpm에서 약 1일 동안 배양한 후에, 세포 응집체의 크기 및/또는 형상에 대한 어떠한 유해 효과도 없이 더 높은 회전 속도 (예를 들어, 100 rpm~140 rpm 이상)에서 배양할 수 있다.

[0283]

세포 응집체의 직경이 전단 속도에 따라 변했지만, 다양한 조건들, 즉 상이한 회전 속도 및/또는 상이한 크기 및 형상의 세포 응집체 간에 유전자 발현에서의 지대한 효과가 없었음을 주지하는 것이 중요하다. 즉, 만능 hESC 또는 hES-유래 세포 유형 (예를 들어, 완전 내배엽, 전장 내배엽, PDX1-내배엽, 췌장 내배엽 및 내분비 세포)에 대해 관찰된 서명 마커들이 [D'Amour et al. 상기 문헌] 및 관련 출원 (본원에 참고로 포함됨)에 기재된 것들과 일관되었다.

[0284]

세포 생존 또는 세포 생존율에 대한 회전 속도, 전단 속도 및 전단 응력의 효과를 결정하기 위해, 감소된 속도 (예를 들어, 60 rpm 내지 80 rpm)에서의 1일에 의해 생존이 개선되었음을 입증되었다. 예를 들어, 60 rpm 내지 140 rpm의 회전 속도에서 세포 생존이 적어도 60%이거나 이보다 높았다. 또한, 더 높은 회전 속도 (예를 들어, 100 rpm 이상)와 비교하여 감소된 회전 속도 배양물에서 d1, d2 및 d3에 세포 응집체의 수가 더 높았다. 세포 응집체가 더 높은 회전 속도 (예를 들어, 140 rpm 이상)에서 배양되었을 때 유의한 과과 및 분해가 또한 존재하였다. 총괄적으로, 이러한 데이터는 세포 응집체가 먼저 적어도 1일 동안 감소된 회전 속도에서 배양되었을 때 세포 생존이 증가되지만, 회전 속도가 100 rpm 내지 140 rpm으로 증가되었을 때 세포 생존이 유의하게 하락하지 않았음을 가리켰다; 그러나, 140 rpm 미만의 회전 속도에서의 분화가 선호된다.

[0285]

또한, 배양물 부피가 전단 속도 및 전단 응력에 영향을 미치고, 차례로 이들은 상기 논의된 바와 같이 세포 응

집체의 크기 및 형상의 균일성에 영향을 미친다. 예를 들어, 4 ml에서 시작된 것과 비교하여 6 ml에서 단일 세포 혼탁 배양물이 세포 응집체를 형성하기 시작했을 때 더욱 균일한 크기 및 형상의 세포 응집체가 초래되었다. 도 23을 참조하고, 이에 의하면 4 ml를 사용하여 배양된 경우에는 세포 응집체의 직경이 50 마이크로미터 미만 내지 250 마이크로미터 초과로 다양했던 반면에, 6 ml로 배양된 경우에는 직경 범위가 더 좁촘하였고, 50 마이크로미터 초과 내지 200 마이크로미터 미만 범위였다. 기재된 세포 응집체는 부착 hES 세포 배양물로부터 제조된 단일 세포 혼탁 배양물로부터 시작되었지만, hES-유래 부착 플레이트 배양물로부터 시작된 세포 응집체 혼탁 배양물이 유사하게 거동할 것으로 예상될 것이다. 따라서, 아마도 배지 부피는 세포 응집체 혼탁 배양물이 시작되는 단계에 독립적일 것이다.

[0286] 또한, hES 세포 응집체를 다양한 상이한 배지 조건에서 배양할 수 있다. 예를 들어, hES 세포 응집체 배양물을 스템프로(StemPro)® 함유 배지, DMEM/F12 함유 배지; 또는 20% 녹아웃 혈청 대체물 (KSR, 인비트로젠)을 함유하는 DMEM/F12 배지; 또는 20 ng/ml FGF (R&D 시스템즈) 및 20 ng/ml 액티빈 A (R&D 시스템즈)을 추가로 함유하는 스템프로® 및 DMEM/F12 배지; 또는 10 ng/ml 헤레큘린 B를 추가로 함유하는 스템프로® 및 DMEM/F12 배지에서 유지시킬 수 있다. 대안적으로, 본원에서 언급된 배지 및 시판되는 배지 중 임의의 것에 제노-프리(xeno-free) KSR (인비트로젠)이 또한 보충될 수 있다. 마지막으로, 외인성 FGF를 추가로 함유하지 않는 상기 배지 중 임의의 것에서 세포 응집체가 또한 생산 및 배양될 수 있다.

실시예 18 - 혼탁액 내의 hES 세포 응집체가 내배엽-계통 유형 세포로 분화될 수 있다

[0288] 실질적으로 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌], 및 미국 특허 공개 번호 2005/0266554, 2005/0158853, 2006/0003313, 2006/0148081, 2007/0122905 및 2007/0259421 (이의 전문이 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같이, 인간 배아 줄기 (hES) 세포를 유지시키고 시험관 내에서 완전 내배엽 (단계 1), 전장 내배엽 및 PDX1 내배엽으로 분화시켰다.

[0289] 간략하게, 미분화 만능 hES 부착 (플레이트) 세포를 마우스 배아 섬유모세포 공급자 층 (밀리포어, 기존의 케미콘(Chemicon) 또는 스페셜티 미디어(Specialty Media)) 상에서 또는 인간 혈청으로 코팅된 60 mm 플레이트 (0.1 내지 20% 최종 농도; 벨리 바이오메디컬(Valley Biomedical)) 상에서 20% 녹아웃 혈청 대체물 (인비트로젠/깁코(Gibco))), 1 mM 비필수 아미노산 (인비트로젠/깁코), 글루타맥스 (인비트로젠/깁코), 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠/깁코), 0.55 mM 2-메르캅토에탄올 (인비트로젠/깁코) 및 4 ng/ml 내지 20 ng/ml 재조합 인간 FGF2 (R&D 시스템즈)가 보충된 DMEM/F12 (미디어테크(Mediatech)) 내에서 유지시켰다. 대안적으로, 상기 배지에 KSR 제노-프리 (깁코) 및 인간 혈청이 보충될 수 있다. 또한, 코팅되지 않은 배양 플레이트 상에 hESC를 접종한 후 인간 혈청을 첨가하였다. 낮은 투여량의 액티빈 A (2-25 ng/ml, R&D 시스템즈)를 성장 배양 배지에 첨가하여 미분화 성장을 유지하는 것을 보조하였다. 제0일 (d0)의 부착 만능 hESC가 높은 수준의 만능 단백질 마커인 OCT 4를 발현하였다. 도 1의 패널 a, 플레이트 대조군, d0을 참조한다.

[0290] 실질적으로 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 세포를 수동으로 또는 효소에 의해 다시 계대시켰다. 혼탁 배양물을 분리시키고, 원추형 튜브로 옮기고, 1000 rpm에서 약 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 제거하고, 바이셀 세포 분석기(ViCell Cell Analyzer)를 사용하여 표준 세포 계수를 수행하였다. 세포주, 및 계대 전의 배양일 수에 따라, 60 mm 플레이트로부터의 전형적인 세포수는 3×10^6 개 내지 12×10^6 개의 세포 범위이다. 1차 세포 혼탁액 내의 세포수가 결정되었으면, 혼탁액을 상기 기재된 바와 같이 제노-프리 KSR을 함유하는 배지 또는 스템프로®로 1×10^6 개의 세포/ml의 최종 부피로 추가로 희석하였다. 이러한 부피를 $>4 \times 10^6$ 개의 세포/ml로 증가시킬 수 있지만, 더 빈번한 공급을 필요로 할 수 있다. ROCK 억제제 Y27632 (악소라(Axxora))를 세포 혼탁액에 약 1-15 μ M, 전형적으로는 10 μ M의 최종 농도로 첨가하고, 부드럽게 역전시킴으로써 튜브를 혼합하였다. 일부 경우에, 응집체 형성 속도를 제어하기 위해 Y27632를 혼탁액에 첨가하지 않았다. 그 후, 재현탁된 세포를 저-결합 6웰 접시의 각각의 웰에 균질하게 분배하고 (웰 당 약 5 ml의 세포 혼탁액), 분화 전에 약 1-4일 동안 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식 플랫폼 상에 놓았다.

[0291] 이러한 배양 기간 동안, hES 세포 응집체가 형성되었고, 4 ml의 배지를 4 ml의 Y27632가 없는 신선한 스템프로® 배지, 또는 제노-프리 KSR이 보충된 기재된 배지 중 임의의 것으로 교체함으로써 매일 적어도 1-2회 배양물에 공급하였다. 임의의 응집을 파괴하거나 방지하고, 회전 동안 응집체가 부유하게 할 수 있는 표면 장력을 깨기 위해, 가능한 한 신속하게 배지 교환 ("공급")을 수행하여야 한다. 또한, 세포 응집체의 성장, 및 이의 크기 및 형상 균일성을 최대화하기 위해, 임의의 긴 기간 동안 회전식 플랫폼 또는 장치로부터 세포 응집체를 제거하지 않아야 한다. 따라서, 업계에 잘 확립되어 있는 hES 세포 부착 배양물로부터 hES 세포 응집체가 생산될

수 있다.

[0292] 이제 hES 세포 응집체가 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌]에 실질적으로 기재된 바와 같이 혼탁액에서 응집체로서 직접적으로 분화될 수 있다. 간략하게, 스템프로® (Y27632 없음) 배지, 또는 제노-프리 KSR이 보충된 기재된 배지 중 임의의 것을 웰에서 제거하고 (예를 들어 흡인하고), hES 세포 응집체를 5 ml의 무혈청 RMPI (카탈로그 15-040-CV; 미디어테크), 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠) 및 글루타맥스 (인비트로젠) (RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지로 또한 지정됨), 0% FBS, 1% PenStrep, 1% 글루타맥스로 세척하였다. 그 후, 6웰 접시를 다시 회전식 플랫폼 상에 1-2분 동안 놓은 후, 세척 배지를 제거하였다. 이를 2회 이상 또는 인슐린 및/또는 IGF-I이 충분히 제거될 때까지 반복하였는데, 이는 다능성 및 ES 자가 재생의 유지에 필요하지만, 제어되는 동시성 계통-지향성 분화에 동일한 인자들이 해롭기 때문이다. 다양한 외인성 미토겐의 첨가 및 제거에 의한 모든 내배엽-계통으로의 분화를 실질적으로 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌]에 기재되고 하기에 더욱 상세하게 기재된 바와 같이 100 rpm에서 수행하였다.

완전 내배엽으로의 분화 (단계 1)

[0294] 인간 ES 세포 응집체를 첫날에는 RPMI, 100 ng/ml 액티빈 A 및 다양한 농도의 FBS (US 규정 FBS, 하이클론 (HyClone), 카탈로그 번호 SH30070.03), 및 25 ng/ml - 75 ng/ml Wnt3a에서, 제2일 및 제3일에는 100 ng/ml 액티빈 A 및 다양한 농도의 FBS (하이클론)를 추가로 함유하는 RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지에서 분화시켰다 (d0 내지 d2). 대부분의 분화 실험에서, 3일 단계 1 프로토콜을 사용하거나 원하는 경우에 FBS 농도는 처음 24시간 (d1)에 대해서는 0%, 두 번째 24시간 (d2)에 대해서는 0.2%, 세 번째 24시간 (d3)에 대해서는 0.2 %였다. 바람직하게는, 2일 단계 1 프로토콜이 수행된다.

[0295] 2일 단계 1 프로토콜 말기의 혼탁 배양물 내의 hES-유래 세포 응집체의 QPCR 분석은 부착 플레이트 대조군과 비교하여 hES 응집체의 완전 내배엽으로의 고도로 효율적인 지향성 분화를 가리켰다. 100 rpm, 120 rpm 및 140 rpm에서 세포 응집체가 형성되었다. 일부 실험에서, hES-유래 응집체를 분화 전에 생물반응기 (스피너 플라스크)로 옮겼다. 부착 hES 세포 배양물, 뿐만 아니라 완전 내배엽 세포로 분화된 hES 세포 배양물을 대조군으로서 사용하였다. 미분화 hES 세포 응집체 및 부착 플레이트 대조군과 비교하여 SOX17 및 FOXA2의 발현 수준 증가가 부착 배양물 및 혼탁액 내의 세포 응집체에서 관찰되었다. 도 22의 패널 c (SOX17) & d (FOXA2), 단계 1 (d2) 참조. 또한, 오염성 배아바깥 및 내장 내배엽과 연관된 유전자인 SOX7의 발현 수준이 완전 내배엽 부착 플레이트 대조군과 비교하여 완전 내배엽 세포 응집체에서 유의하게 감소되었다. 도 22의 패널 1, 단계 1 (d2) 참조.

[0296] CXCR4 및 HNF3베타 (FoxA2) 단백질을 사용하는 유동 세포측정법 분석은 ES 세포-유래 응집체의 지향성 분화가 97% 이상 CXCR4-양성, 97% 이상 HNF3베타-양성, 95% 이상 CXCR4/HNF3베타 공동-양성인 응집체를 초래하였음을 가리켰다.

[0297] hES 세포 응집체 분화의 효율을 추가로 평가하기 위해, ES-유래 세포 응집체의 냉동절편을 면역세포화학 및 공초점 현미경검사를 사용하여 SOX17 및 HNF3베타 발현에 대해 시험하였다. 염색된 냉동절편의 영상 분석에서, 단계 1 말기의 모든 세포 (완전 내배엽 세포)의 ~90% 초과가 HNF3베타 및/또는 SOX17을 발현하였음이 입증되었다.

[0298] 이러한 데이터는 모두 세포 응집체로서의 ES 세포의 고도로 효율적인 분화가 달성될 수 있고, 완전 내배엽의 서명 마커의 발현 수준을 기초로 본원에 기재된 바와 같은 완전 내배엽을 생산하는 방법이 부착 플레이트 배양물의 분화와 비교하여 더욱 효율적임을 가리킨다.

PDX1-음성 전장 내배엽 세포로의 분화 (단계 2)

[0300] 단계 1로부터의 인간 완전 내배엽 세포 응집체를 PBS+/+에서 간략하게 세척한 후, 2% FBS, 및 25 ng - 50 ng/ml KGF (R&D 시스템즈)를 추가로 함유하는 RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지에서 추가로 2일 또는 3일 동안 분화시켰다. 일부 실험에서, 5 μ M SB431542 (시그마 알드리치, 인크.(Sigma Aldrich, Inc.)) 또는 2.5 μ M TGF-베타 억제제 IV (칼바이오켐(Calbiochem))를 단계 2의 첫날 동안 첨가하였고, 대안적으로는 RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지/0.2% FBS/ITS (인슐린/트랜스페린/셀레늄)이었다.

[0301] 실질적으로 상기 논의된 바와 같이 QPCR 분석을 수행하였다. HNF1베타 및 HNF4알파의 발현 수준 증가가 부착 플레이트 대조군과 비교하여 세포 응집체 배양물에서 관찰되었다. 도 22의 패널 e (HNF1B) 및 패널 o (HNF4알파), 단계 2 (d5) 참조. 특이적인 단계 0, 1, 2 및 5 hES 또는 hES-유래 세포 응집체 (또는 분화된 응집체에 대한 "dAgg")를 생산하는 방법이 패널 o에서 약간 변형되었다. 이러한 정황에서의 분화된 세포 응집체는 이들

이 유도되는 상응하는 단계의 부착 플레이트 대조군 배양물로부터 시작된 분화된 hES 또는 hES-유래 세포 응집체 배양물을 지칭한다. 예를 들어, 단계 1에서, 분화된 세포 응집체 ("dAgg") 혼탁 배양물이 단계 0 부착 플레이트로부터 출발하였고, 이를 본원에 기재된 배지 중 임의의 것에서 약 24h 동안 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식 플랫폼 상에서 인큐베이션하였다. 그 후, 이러한 분화된 세포 응집체를 상응하는 부착 플레이트 대조군과 함께 단계 1 완전 내배엽 세포로 추가로 분화시켰다. 도 22의 패널 o는 단계 1의 분화된 세포 응집체 또는 부착 플레이트 대조군에서 유의한 HNF4알파 (HNF4A) 발현이 없다는 것을 나타낸다. 대조적으로, 유사한 방법을 단계 2 샘플에 대해 수행하였고, 이는 HNF4A의 발현 수준 증가를 일으켰다. 단계 5 샘플에 대해 HNF4A 발현이 또한 강건하다.

[0302] 또한, 배아바깥 내배엽과 연관된 유전자 (SOX7)의 발현 수준이 플레이트 대조군과 비교하여 hES-유래 세포 응집체 배양물에서 유의하게 감소되었다. 도 22의 패널 1, 단계 2 (d5) 참조. 따라서, 혼탁 배양물에서의 세포 응집체에 의한 PDX1-음성 전장 내배엽 세포의 지향성 분화가 배아바깥 내배엽 오염물을 제거한다는 것이 입증된다.

[0303] 총괄적으로, 이러한 데이터는 모두 hES 세포 응집체의 지향성 분화가 고도로 효율적이고, PDX1-음성 전장 내배엽의 서명 마커의 발현 수준을 기초로 전장 내배엽 세포를 생산하는 방법이 부착 플레이트 배양물의 분화와 비교하여 개선된다는 것을 가리킨다.

PDX1-양성 전장 내배엽 세포로의 분화 (단계 3)

[0305] 단계 2로부터의 전장 내배엽 세포를 무혈청 RMPI, 글루타맥스 (인비트로젠) 및 페니실린/스트렙토마이신 (인비트로젠) + 0.5X B27-보충물 (인비트로젠/깁코), 및 1 μ M 내지 2 μ M 레티노산 (RA, 시그마) 및 0.25 nM KAAD-시클로파민 (토론토 리서치 케미칼스(Toronto Research Chemicals)); 또는 1 μ M 내지 2 μ M 레티노산, 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 50 ng/ml 노긴 (R&D 시스템즈)에서 1일 내지 3일 동안 추가로 분화시켰다. 대안적으로, 0.2 μ M 내지 0.5 μ M RA 및 0.25 nM KAAD-시클로파민을 1일 동안 배지에 첨가하였다. 일부 실험에서, RA 또는 KAAD-시클로파민이 세포 응집체 배양물에 첨가되지 않았다. 또 다른 실시양태에서는, 유효 농도의 0.1 – 0.2% BSA가 첨가되었다.

[0306] PDX1의 발현 수준 증가가 부착 플레이트 대조군과 비교하여 hES-유래 세포 응집체에서 관찰되었다. 도 22의 패널 f (PDX1), 단계 3 (d8) 참조. 또한, 배아바깥 내배엽과 연관된 유전자 (SOX7) 및 내장 내배엽과 연관된 유전자 (AFP)의 발현 수준이 플레이트 대조군과 비교하여 hES-유래 세포 응집체 배양물에서 유의하게 감소되었다. 도 22의 패널 1 (SOX7) 및 패널 n (AFP), 단계 3 (d8) 참조. 따라서, 혼탁 배양물에서의 세포 응집체에 의해 PDX1-양성 전장 내배엽 세포를 생산하기 위한 지향성 분화가 배아바깥 내배엽 오염물을 제거한다는 것이 입증된다.

[0307] 총괄적으로, 이러한 데이터는 hES 세포 응집체의 지향성 분화가 고도로 효율적이고, PDX1-양성 내배엽의 서명 마커의 발현 수준을 기초로 PDX1-양성 내배엽을 생산하는 방법이 부착 배양물 대조군과 비교하여 부착 플레이트 배양물과 비교하여 개선된다는 것을 가리킨다.

췌장 내배엽 또는 췌장 내분비 전구 세포로의 분화 (단계 4)

[0309] 단계 4에서, 단계 3 배양물로부터 RA를 인출하고, 배양물을 DMEM + B27 (1:100 집코)로 1회 세척한 후, 4-8일 동안 DMEM+1XB27 보충물 단독으로 또는 DMEM+1XB27와 하기의 인자들 중 임의의 것 또는 모두 또는 이의 임의의 조합으로 세척을 교체하였다: 노긴 (50 ng/ml), FGF10 (50 ng/ml), KGF (25-50 ng/ml), EGF (25-50 ng/ml), 1-5% FBS. RA가 첨가되지 않은 경우, 30-100 ng/ml의 노긴 (R&D 시스템즈)을 배지에 1-9일 동안 첨가하였다. 추가로, 일부 실험에서, 25 ng/ml의 FGF10을 또한 첨가하였다.

[0310] NKX6.1 및 PDX-1 및 PTF1A의 발현 수준 증가가 ES 세포-유래 응집체 및 상응하는 부착 플레이트 대조군에서 관찰되었다. 도 22의 패널 f (PDX1), 패널 g (NKX6.1) 및 패널 p (PTF1A), 단계 4 (d11) 참조. 도 22의 패널 p에서, 막대 차트는 혼탁액 내의 hES 및/또는 hES-유래 세포 응집체가 이들이 유도된 부착 플레이트 배양물 내의 세포수에 영향을 받았는지 여부를 결정하는 방법으로부터의 결과를 도해한다. 패널 p는 1×10^7 개의 세포에 대한 결과만을 나타내지만, 다양한 접종 수, 예를 들어 1×10^6 개 내지 2×10^7 개의 세포로부터 세포-응집체 혼탁 배양물이 시작되었다. 모두 실질적으로 유사하였고, 생존율이 양호하고 세포 사멸이 거의 없는 세포 응집체 배양물을 생산하였다. 예를 들어, 단계 4에서, 분화된 세포 응집체 혼탁 배양물 ("dAgg")이 d5 (단계 2) 부착 플레이트로부터 시작되었고, 이를 본원에 기재된 배지 중 임의의 것에서 약 24h 동안 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식

플랫폼 상에서 다시 인큐베이션하였다. 그 후, 이러한 분화된 세포 응집체를 PTF1A를 발현하는 단계 4 췌장 내 배엽 유형 세포로 추가로 분화시켰다 (패널 p). 상응하는 단계 4 부착 플레이트 대조군과 비교하여, PTF1A의 발현이 증가되었다.

[0311] 또한, AFP의 발현 수준이 부착 플레이트 대조군과 비교하여 hES-유래 세포 응집체에서 유의하게 감소되었다. 도 22의 패널 n, 단계 4 (d11) 참조. 따라서, 혼탁 배양물에서의 세포 응집체에 의해 PDX1-양성 췌장 내배엽 세포를 생산하기 위한 지향성 분화가 내장 내배엽 오염물을 제거한다는 것이 입증되었다.

[0312] NKX6.1, HNF3베타 및 크로모그라닌(Chromogranin) (CHG) 단백질을 사용하는 유동 세포측정법 분석은 hES-유래 세포 응집체의 지향성 분화가 53% 이상 CHG-양성, 40% 이상 NKX6.1 및 CHG 공동-양성인 세포 응집체, 및 소량의 HNF3베타 및 기타 유형의 세포를 초래하였음을 가리켰다.

[0313] 단계 4 말기에 면역세포화학 및 공초점 현미경검사를 사용하여 hES-유래 응집체의 냉동절편을 NKX6.1, PDX1 및 NKX2.2 발현에 대해 시험하였다. 영상 분석은 응집된 세포의 췌장 내배엽 (또는 PDX1-양성 췌장 내배엽)으로의 고도로 효율적인 분화를 가리켰고, 이때 거의 모든 세포가 PDX1을 발현하였고, 다수의 세포가 NKX6.1 (세포의 약 40%) 및/또는 NKX2.2 (세포의 약 40%)를 발현하였다.

호르몬 발현 내분비 세포로의 분화 (단계 5)

[0315] 단계 5 분화를 위해, 단계 4의 분화된 세포 응집체를 CMRL (인비트로젠/김코) 또는 RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지, 및 $0.5 \times$ B27-보충물에서 연속시켰다. 일부 실험에서, 단계 5 동안 0.2-5% 농도 범위의 인간 혈청 (밸리 바이오메디컬) 또는 소 태아 혈청을 또한 배지에 보충하였다.

[0316] 다시, 단계 2-4로부터의 세포 유형과 유사하게, 부착 플레이트 대조군과 비교하여 특이적 세포 유형과 연관된 유전자의 발현 증가가 관찰되었다. 예를 들어, 인슐린 (INS), 글루카곤 (GCG) 및 소마토스타틴 (SST) 호르몬의 발현 수준 증가가 관찰되었다. 도 22의 패널 i (INS), 패널 j (GCG) 및 패널 k (SST), 단계 5 (d15) 참조. 또한, 외배엽과 연관된 유전자는 AFP 및 ZIC1의 발현 수준이 부착 플레이트 대조군과 비교하여 hES-유래 세포 응집체에서 유의하게 감소되었다. 도 22의 패널 m (ZIC1) 및 패널 n (AFP), 단계 5 (d15) 참조. 따라서, 혼탁 배양물에서의 세포 응집체에 의해 췌장 내분비 세포를 생산하기 위한 지향성 분화가 외배엽 및 내장 내배엽 오염물을 제거한다는 것이 입증된다.

[0317] 기재된 프로토콜의 제23일의 유동 세포측정법 분석에 의해 hES-유래 호르몬 발현 내분비 응집체 세포의 생산이 확증되었다. 먼저 응집체를 녹아웃 혈청 대체물 (KSR; 김코/인비트로젠, 일관성에 대해 0063 비교) 또는 제노-프리 KSR (인비트로젠)을 대안적으로 포함하는 5 ml DMEM/F12에서 140 rpm에서 형성시킨 후, 100 rpm에서 분화시켰다. NKX6.1, 크로모그라닌 A, 인슐린, 글루카곤 및 소마토스타틴 단백질 발현의 분석은 ES 세포-유래 응집체가 ~20% NKX6.1+/크로모그라닌 A- 췌장 상피 및 ~74% 크로모그라닌 A+ 내분비 조직을 포함한다는 것을 가리켰다. 또한, 세포의 11%가 인슐린을 발현하고, 14%가 글루카곤을 발현하였으며, 11%가 소마토스타틴을 발현하였다. 이를 중에서, 인슐린+ 세포의 68%가 단일 양성이고, 글루카곤+ 세포의 70%가 양성이며, 소마토스타틴-양성 세포의 52%가 단일 양성이다. 이러한 단일 호르몬 양성 정도는 대부분 다호르몬 세포인 부착 배양물에 대해 기재된 값들을 초과한다.

[0318] 호르몬 발현 내분비 세포에 대한 응집체 분화의 효율을 추가로 평가하기 위해, 단계 5 동안 면역세포화학 및 공초점 현미경검사를 사용하여 글루카곤, 인슐린 및 소마토스타틴 발현에 대해 ES-유래 응집체의 냉동절편을 시험하였다. $20 \times$ 의 냉동절편의 영상 분석은 응집된 세포의 호르몬 양성으로의 고도로 효율적인 분화를 가리켰고, 이때 거의 모든 세포가 글루카곤, 소마토스타틴 또는 인슐린을 발현하였다. 또한, 기존의 부착 배양 실험과 대조적으로, 응집체 내의 대다수의 세포가 발달 동안 생체 내에서 일어나는 것과 같이 단일 호르몬을 발현하는 것으로 보였다.

실시예 19 - 다양한 단계로부터의 부착 배양은 세포 응집체를 형성할 수 있고 췌장 내배엽 유형 세포로 분화시킬 수 있다

[0320] 하기에서는 hES-유래 세포 응집체의 생성이 바로 만능 hESC로부터 시작될 수는 없지만, 세포 응집이 직접적으로 분화 배지 내에서 시작될 수 있을 뿐만 아니라 (제0일 세포 응집체), 분화되거나 hES-유래 세포로부터 시작될 수 있으며, 예를 들어 세포 응집체가 단계 1, 2, 4 및 5 또는 hES-유래 세포로부터 생성될 수 있음을 입증한다.

제0일 세포 응집체

[0322] 단계 1의 제1일 (d0)에 생성된 세포 응집체: 부착 만능 hESC를 성장시키고, 수동으로 또는 효소적으로 계대시키

고, 분리시키고, 계수하고, 펠릿화하고, 펠릿을, RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지를 함유하며 100 ng/ml 액티빈 A 및 25 ng/ml 내지 75 ng/ml Wnt3a, 0.2%의 FBS (하이클론)를 추가로 함유하는 분화 배지 기재에서 약 1×10^6 세포/ml 내지 4×10^6 세포/ml의 최종 부피로 재현탁시켰다. 이 부피는 4×10^6 세포/ml 초과로 증가시킬 수 있지만, 더 빈번한 공급을 요구할 수 있다. 때때로 DNase를 10-50 ng/ml의 농도로 포함시킬 수 있다. 일부 경우에서, ROCK 억제제 Y27632 (악소라)를 1-15 μM , 전형적으로 10 μM 의 최종 농도로 세포 혼탁액에 첨가하였다. 또한 다른 경우에서, 약 1:2000 내지 1:5000의 ITS (인슐린/트랜스페린/셀레늄, 갑코)를 배양물에 첨가하였다. Rho-키나제 억제제 및 ITS 둘 다 세포 생존을 지지하기 위해 첨가하였다. 재현탁된 세포를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 낮은 결합 6웰 접시의 각 웰에 동등하게 분배하고, 밤새 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식 플랫폼 상에 위치시켰다. 이 배양 기간 동안, 균일한 크기 및 형상의 세포 응집체가 형성되었다. 따라서, 보다 높은 밀도의 배양물일수록, PDX1-양성 췌장 내배엽 또는 PDX-양성 췌장 전구 유형 세포를 효과적으로 풍부하게 하거나 실질적으로 풍부하게 한다. 추가의 세부사항은 실시예 21에 제공된다.

[0323] 이어서, 단계 1의 d0에 생성된 세포 응집체에, RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지를 함유하며 다음 2-3일을 위해 100 ng/ml 액티빈 A 및 0.2%의 FBS (하이클론)를 추가로 함유하는 추가의 분화 배지를 매일 최대 1-2회 공급하였다. 프로토콜의 후속 단계 (단계 2-5)는 ES 응집체에 대해 실질적으로 상기 기재된 바와 같다.

[0324] 단계 1 - 제2일 내지 제3일

[0325] 단계 1의 d2-d3에 생성된 세포 응집체: 부착 hESC를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 성장시키고, 계대시킨 다음, 실질적으로 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 단계 1로 분화시켰다.

[0326] 단계 1의 말기에 부착 배양물 (분화 프로토콜로의 약 d2 또는 d3; 완전 내배엽 유형 세포)을 PBS-/-로 1회 세척하고, 1 ml 또는 5 ml 피펫을 사용하여 37°C에서 약 2-5분 동안 2 ml의 예비-가온된 아큐테이즈에 의해 단일 세포로 분리시켰다. 이어서, RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지 중 10% FBS 4 ml를 첨가하고, 단일 세포 혼탁액을 40 마이크로미터 청색 필터 (BD 바이오사이언시스)를 통해 50 ml 원추형 튜브로 여과하였다. 세포를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 계수하고, 펠릿화 (원심분리)하였다.

[0327] 이어서, 세포 펠릿을 2% FBS + DNase (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics)) 및 100 ng/ml 액티빈 A를 추가로 함유하는 RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지 중에 재현탁시켰다. 별법으로, 세포 펠릿을 RMPI, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지 + 2% FBS 및 DNase (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 25 ng 내지 50 ng/ml KGF (R&D 시스템즈) 중에 재현탁시켰다. 일부 실험에서, 5 μM SB431542 (시그마 알드리치, 인크.) 또는 2.5 μM TGF-베타 억제제 IV (칼바이오캠)를 KGF와 함께 포함시켰다. 일부 실험에서, Y27332 (10 μM)를 포함시켰다. 재현탁된 세포를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 낮은 결합 6웰 접시의 각 웰에 동등하게 분배하고, 밤새 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식 플랫폼 상에 위치시켰으며, 그 시간 동안 균일한 크기 및 형상의 세포 응집체가 형성되었다.

[0328] 이어서, 단계 1의 말기에 생성된 세포 응집체를 추가로 분화시켰다. 프로토콜의 후속 단계 (단계 2-5)는 실시예 17 및 18에서 상기 ES 응집체에 대해 실질적으로 상기 기재된 바와 같다.

[0329] 단계 2 - 제5일 내지 제6일

[0330] 단계 2의 d5-d6에 생성된 세포 응집체: 부착 hESC를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 성장시키고, 계대시킨 다음, 실질적으로 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 단계 2로 분화시켰다. 단계 2를 위해, 단계 1로부터의 부착 세포를 PBS+/+ 중에서 간단히 세척한 다음, 2% FBS, 글루타맥스, 페니실린/스트렙토마이신 및 25 ng 내지 50 ng/ml KGF가 보충된 RPMI (R&D 시스템즈)에서 3일 동안 추가로 분화시켰다. 일부 실험에서, 5 μM SB431542 (시그마 알드리치, 인크.) 또는 2.5 μM TGF-베타 억제제 IV (칼바이오캠)를 단계 2의 제1일 동안 첨가하였다.

[0331] 단계 2의 말기에 부착 배양물 (분화 프로토콜로의 약 d5 또는 d6; 전장 유형 세포)을 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 단일 세포로 분리시키고, 계수하고, 펠릿화하였다. 이어서, 세포 펠릿을, DMEM, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지를 함유하며 추가로 하기를 함유하는 분화 배지 중에 재현탁시켰다: 1X B27-보충물 및 DNase (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 로슈 다이아그노스틱스) 및 무 FBS 또는 1-2% FBS 또는 0.5%-10% 인간 혈청 (hS) 및 1 μM 내지 2 μM 레티노산 (RA, 시그마) 및 0.25 nM KAAD-시클로파민 (토론토 리서치 케미칼스); 또는 1 μM 내지 2 μM 레티노산, 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 50 ng/ml 노린 (R&D 시스템즈); 또는 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 100 ng/ml 노린; 또는 100 ng/ml 노린; 또는 0.2 μM 내지 0.5 μM RA 및 0.25 nM KAAD-시클로파민; 또는 0.2 μM 내지 0.5 μM RA 및 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 50 ng/ml 노린. 일부 실험에서, Y27332 (10 μM)를 포함시켰

다.

[0332] 재현탁된 세포를 각 웨로 동등하게 분배하고, 밤새 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식 플랫폼 상에 위치시켰으며, 그 시간 동안 균일한 크기 및 형상의 세포 응집체가 형성되었다.

[0333] 단계 2의 말기에 생성된 세포 응집체를 회전식 플랫폼 상에서 추가로 분화시키고, 추가로 하기를 함유하는 DMEM, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지를 추가의 0-2일 동안 매일 1-2회 공급하였다: 1X B27-보충물 1 μ M 내지 2 μ M 레티노산 (RA, 시그마) 및 0.25 nM KAAD-시클로파민 (토론토 리서치 케미칼스); 또는 1 μ M 내지 2 μ M 레티노산, 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 50 ng/ml 노긴 (R&D 시스템즈); 또는 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 100 ng/ml 노긴; 또는 100 ng/ml 노긴; 또는 0.2 μ M 내지 0.5 μ M RA 및 0.25 nM KAAD-시클로파민; 또는 0.2 μ M 내지 0.5 μ M RA 및 0.25 nM KAAD-시클로파민 + 50 ng/ml 노긴.

[0334] 이어서, 단계 2의 말기에 생성된 세포 응집체를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 단계 3, 4 및 5로 추가로 분화시켰다.

단계 4 및 5 - 제10일 내지 제30일

[0335] 단계 4의 d10-d14에 생성된 세포 응집체: 다시, 부착 hESC를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 성장시키고, 계대시킨 다음, 실질적으로 문헌 [D'Amour et al. 2006, 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 단계 2로 분화시켰다.

[0336] 단계 3을 위해, 단계 2로부터의 부착 세포를, 1X B27-보충물 및 1 μ M 내지 2 μ M RA 및 0.25 nM KAAD-시클로파민을 추가로 함유하는 DMEM, Pen/Strep 및 글루타맥스 배지에서 1 내지 3일 동안 추가로 분화시켰다. 다른 경우에, 50 ng/ml 노긴을 RA 및 KAAD-시클로파민과 함께 첨가하였다. 별법으로, 0.2 μ M 내지 0.5 μ M의 RA 및 0.25 nM의 KAAD-시클로파민을 단지 1일 동안 배지에 첨가하였다. 또한, 다른 실험에서는, 어떠한 날에도 RA 또는 KAAD-시클로파민을 첨가하지 않았다. 단계 4에서, 세포에 글루타맥스, 페니실린/스트렙토마이신 및 1X B27-보충물로 보충된 DMEM을 매일 1-2회 공급하였다. 단계 4 세포를 실시예 17 및 18에 이미 기재된 바와 같이 단계 5 세포로 추가로 분화시킬 수 있다.

[0337] 단계 4에서의 부착 배양물 (분화 프로토콜로의 약 d10 - d14; 췌장 상피 및 내분비 유형 세포) 또는 단계 5에서의 부착 배양물 (분화 프로토콜로의 약 제16일 내지 제30일; 내분비 전구체 및 내분비 세포)을 유사하게 단일 세포로 분리시키고, 계수하고, 펠릿화하였다. 이어서, 세포 펠릿을, Pen/Strep 및 글루타맥스, 및 1X B27-보충물 및 DNase (50-100 μ g/ml, 로슈 다이아그노스틱스) 및 0-2% FBS로 보충된 DMEM CMRL 중에 재현탁시켰다. 일부 실험에서, Y27332 (10 μ M)를 포함시켜 세포 생존을 지지하였다. 세포를 6웰 플레이트로 동등하게 분배하고, 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 4시간 내지 밤새 100 rpm 내지 140 rpm의 회전식 플랫폼 상에 위치시켰다.

[0338] 또한, 실시예 17-19에서와 같이 단계 2 및 단계 5에서 생성된 세포 응집체는 그들이 유도된 부착 플레이트 배양물에 비해 췌장 세포 유형이 효과적으로 풍부하였다. 예를 들어, 한 전형적인 실험에서, 단계 2에서 생성되고 단계 4에서 유동 세포측정법에 의해 분석된 세포 응집체는 적어도 98% 췌장 세포 유형 (73% 크로모그라닌 A 양성 내분비 세포 및 25% Nkx6.1 양성 췌장 내배엽 (PE)) 및 2% 비-췌장 세포 유형으로 이루어진 반면, 세포 응집체가 유도된 부착 플레이트 배양물은 약 73% 췌장 세포 유형 (33% 크로모그라닌 A 양성 내분비 세포 및 40% Nkx6.1 양성 PE) 및 27% 비-췌장 세포 유형으로 이루어졌다. 따라서, 단계 2에서의 응집은 췌장 세포-유형을 일으킨 전구세포를 효과적으로 풍부하게 할 수 있고, 비-췌장 세포 유형을 고갈시킬 수 있다. 유사하게, 전형적인 실험에서, 단계 5에서 생성되고 유동 세포측정법에 의해 분석된 세포 응집체는 적어도 75% 크로모그라닌 A 양성 내분비 세포 유형으로 이루어진 반면, 세포 응집체가 유도된 부착 플레이트 배양물은 약 25% 크로모그라닌 A 양성 내분비 세포 유형으로 이루어졌다. 따라서, 단계 5에서의 응집은 췌장 내분비 세포를 효과적으로 풍부하게 할 수 있다.

[0339] 따라서, 본원에 기재된 방법은 세포 응집체 혼탁액에서 hESC의 직접-분화의 효율을 개선하는 방법을 제공할 뿐만 아니라, 오염물 집단을 갖는 hES-유래 췌장 세포 유형 (또는 응집체) (예를 들어 외배엽, 영양 외배엽, 내장 내배엽 및 배아마깥 내배엽)을 감소시키면서 동시에 췌장 세포 유형 (예를 들어 췌장 내배엽 및 내분비 세포)을 풍부화하는 방법을 제공한다.

실시예 20 - 세포 밀도는 hES 세포 분화 결과에 영향을 준다

[0340] 하기에서는 세포 밀도의 변화가 소정의 배지 및 성장 인자 조건 내에서 분화 결과에 영향을 줌을 입증한다. 세포 밀도의 조정으로부터 초래된 분화 효율 결과는 내인성으로 생성된 신호전달 분자의 가변 농도를 반영하고,

이들 분자의 농도 의존적 영향이 세포 분화에 영향을 준다.

[0343] 분화 배지에서 직접 생성된 d0 세포 응집체를 포함하는, 인간 ES 세포 응집체 및 hES-유래 세포 응집체를 실질적으로 상기 기재된 바와 같이 생성시켰다. 단계 1 및 2를 통한 약 5일의 분화 후에, 분화 세포 응집체를 모으고, 상이한 접종 밀도로 개별 웰에 재-분취하였다, 예를 들어 전장 내배엽 단계 세포 응집체 혼탁액의 28 ml 혼탁액을 웰 당 4, 6, 8 또는 10 ml (세포 밀도의 2.5배 범위)로 접종하거나 재-분취하였다. 이러한 세포 분배를 이중으로 수행하고, 1 세트의 웰에 50 ng/ml의 노린을 함유하는 단계 3 배지 (DMEM/PenStrep/글루타맥스 + 1% B27 보충물 (vol/vol) + 0.25 uM KAAD-시클로파민 + 3 nM TTNPB)를 공급하였으며, 다른 세트의 웰은 25 ng/ml의 노린을 함유하였다. 단계 3을 매일 배지 교환하면서 3일 동안 진행하였다. 세포 샘플을 단계 3의 3일 말기 (또는 약 제8일)에, 그리고 다시 단계 4 (또는 약 제14일) 후에 실시간 QPCR 분석을 위해 이중으로 취하였다.

[0344] 단계 3 동안 사용된 세포 밀도 및 노린 농도는 췌장 내배엽 전구세포 및/또는 내분비 전구세포 또는 전구체를 나타내는 유전자의 발현에 대하여 상이한 영향을 주었다. 간략하게, 세포 밀도의 증가와 췌장 전구 세포 유형 (예를 들어, 췌장 내배엽, 췌장 상피, PDX1-양성 췌장 내배엽)의 상응하는 증가 사이에 선형 관계가 존재하였다. 예를 들어, 단계 3 (또는 제8일) 후에 세포 밀도의 증가는 PDX1과 NKX6-1의 증강된 유전자 발현에 의해 나타나는 것처럼 췌장 전구세포의 세포 수를 상응하게 증가시켰다. 도 24a 및 24b 참조. 대조적으로, 단계 4 (또는 제14일) 후에 세포 밀도의 증가와 내분비 전구 세포 유형의 상응하는 감소 사이에 역의 관계가 존재하였다. 예를 들어, 세포 밀도가 감소함에 따라, 단계 3 (또는 제8일) 후에 적어도 NGN3 및 NKX2-2의 발현이 감소하였다. 도 24c 및 24d 참조.

[0345] 또한, 임의의 소정의 세포 밀도에서의 노린의 낮은 농도 (예를 들어, 25 ng/ml)는 NGN3 및 NKX2-2의 발현 감소에 의해 나타난 것처럼 내분비 전구 세포 유형을 감소시켰다. 도 24c 및 24d 참조. 세포 배양물 중 노린의 이러한 세포 밀도 독립적 효과는 세포로부터 내인성으로 생성된 BMP 신호가 외인성으로 첨가된 노린에 의해 길항됨을 시사한다. 내인성으로 생성된 신호의 분화 결과에 대한 영향은 단지 BMP에 제한되는 것이 아니며, 배지 내로 세포에 의해 분비된 다른 성장 인자 및/또는 작용제가 단독으로 또는 외인성 성장 인자 및/또는 작용제와 조합되어 유사하거나 대조적인 효과를 나타낼 수 있다.

실시예 21 - 풍부한 췌장 내배엽 또는 내분비 세포 유형을 생성하는 세포 응집체 혼탁 배양물의 최적화

[0347] hES-유래 세포 응집체 집단의 세포 조성물은 다양한 성장 인자 및/또는 작용제의 농도를 제어함으로써 특정 세포 유형에 대해 최적화된다. 본원에 기재된 췌장 세포 조성물은, hES 세포 부착 배양물, d0 세포 응집체 (만능 줄기 세포 배지가 아닌 분화 배지 내로 직접 제조된 것을 제외하고는, hES 부착 배양물로부터 개시되는 세포 응집체)로부터 또는 이전 실시예에 기재된 바와 같은 실질적으로 다양한 분화 단계에서의 hES-유래 세포 부착 배양물로부터 유도된 단일 세포 혼탁 배양물로부터 제조된 hES-유래 세포 응집체 혼탁액이다. 단계 4 동안, 세포 응집체는 다양한 농도의 인자: NOGGIN (N), KGF (K), FGF10 (F) 및 EGF (E)에 노출된다. 분화된 hES 세포 응집체의 세포 조성물을 CHGA, NKX6.1 및 PDX1을 비롯한 마커의 패널을 이용하여 유동 세포측정법 분석에 의해 평가하였다. 임의의 세포 집단 내 내분비 세포, 췌장 내배엽 세포, PDX1+ 내배엽 세포 및 비-췌장 세포의 전체 백분율은 표 6에 나타낸다.

[0348] 표 6에서의 데이터는, 특정의 성장 인자의 농도 및 비율을 제어함으로써, 생성된 조성물을 특정 세포 유형에 대해 최적화시킬 수 있음을 입증한다. 예를 들어, KGF 및 EGF의 농도를 저하시킴으로써 췌장 내배엽 유형 세포의 백분율을 내분비 유형 세포에 비해 증가시켰다 (예를 들어, K(25)E(10) 및 71% 대 22.1%). 반대로, 고농도의 KGF 및 EGF, 및 Noggin 및 FGF10의 포함 (예를 들어, N(50)F(50)K(50)E(50))은 췌장 내배엽 유형 세포의 수를 감소시켰고, 전체 수는 내분비 유형 세포의 수에 필적하였다 (예를 들어, 39.6% 대 40.1%). 보다 고농도의 Noggin 및 KGF (예를 들어, N(50)K(50)) 또는 성장 인자를 첨가하지 않는 것은 췌장 내배엽 세포 유형에 비해 생성된 집단 내에서 내분비 유형 세포의 집단을 증가시켰다. 또한, 비-췌장 세포 유형 (즉, 비 PDX1-양성 유형 세포)의 백분율은 KGF 및 EGF의 수준을 감소시킴으로써 상당히 감소되거나 (예를 들어, K(25)E(10); 1.51%) 또는 임의의 성장 인자를 첨가하지 않음으로써 상당히 감소될 수 있다 (1.53%).

[0349] 따라서, 표 7은 분화의 특정 단계 (예를 들어, 단계 4)에서 배양 배지 중 상이한 성장 인자의 적어도 다양한 농도가 췌장 내배엽, 내분비, PDX1-양성 내배엽 또는 비-췌장 세포 유형의 특정 집단을 유의하게 증가시키고/거나 감소시킴을 명백하게 입증한다.

[0350]

<표 7> 세포 조성물에 대한 성장 인자의 효과

응집 단계	단계 4 배지 중 인자(ng/mL)	내분비	췌장 내분비	PDX1+ 내분비	비-췌장	총
ESC	K(25)E(10)	CHGA+	CHGA-NKX6.1+ PDX1+	CHGA-NKX6.1/- PDX1+	CHGA-NKX6.1+/- PDX1-	100.1
ESC	K(25)E(10)	22.1	71.0	3.0	4.0	100.0
단계 1 제0일	K(25)E(10)	29.0	67.1	2.37	1.61	100.0
단계 1 제0일	N(50)K(50)F(50)E(50)	25.4	68.9	2.87	2.01	99.2
단계 1 제0일	아무것도 첨가하지 않음	40.1	39.6	13.30	6.85	99.9
단계 1 제0일	N(50)K(50)	69.4	27.4	1.46	1.53	99.8
단계 1 제0일	N(50)K(50)	52.2	30.4	13.9	3.48	99.9
단계 2 제0일	K(25)E(10)	38.8	50.8	2.17	8.22	100.0
단계 2 제5일	N(50)K(50)	42.3	42.3	12.2	3.20	99.9
단계 2 제5일	K(25)E(10)	28.3	59.4	7.36	4.97	100.0

[0351]

[0352]

또 다른 방법은 2008년 4월 8일 출원된 발명의 명칭 [METHODS FOR PURIFYING ENDODERM AND PANCREATIC ENDODERM CELLS DERIVED FROM HESC]의 미국 특허 출원 12/107,020 (이는 본원에 그 전문이 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 특정한 hES-유래 세포 유형에 대한 풍부화 또는 정제를 위해 존재한다. 본원은 문헌 [D'Amour et al., 2005, 상기 문헌 및 2006, 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 각각의 단계 1, 2, 3, 4 및 5에서 생성된 모든 세포 유형을 비롯한 다양한 hES-세포 유형을 풍부화하는 방법을 기재한다. 본원은 CD30, CD49a, CD49e, CD55, CD98, CD99, CD142, CD165, CD200, CD318, CD334 및 CD340을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 항체를 사용한다.

[0353]

hES-유래 세포 또는 세포 응집체를 풍부화하는 방법은 항체 친화도 수단을 이용하는 방법에 제한되지는 않지만, 특정 세포 유형의 풍부화를 허용하는 이용가능거나 또는 당업자에게 널리 공지될 임의의 방법을 포함할 수 있다. 풍부화는 또 다른 세포 유형 또는 배양물로부터 하나의 세포 유형을 고갈시키거나 또는 분리함으로써 달성될 수 있다.

[0354]

실시예 22 - 생체내 성숙하고 인슐린에 반응성인 췌장 내배엽의 세포 응집체 혼탁액

[0355]

본원에 기재된 바와 같은 세포 응집체 혼탁액의 제조 및 제작 방법이 생체내 기능하는 췌장 전구 세포를 제공한다는 것을 입증하기 위해, 실시예 17-21에서의 상기 hES-유래 세포 응집체 (예를 들어, PDX1-양성 내배엽, 췌장 내배엽, 췌장 상피, 내분비 전구체, 내분비 세포 등)를 동물 내로 이식하였다. 정상 및 당뇨병-유발 동물 내로의 이식 방법, 동물의 생체내 글루코스 반응 측정 및 이에 따라 생체내 성숙한 이식 세포의 인슐린 생산은 실질적으로 문헌 [Kroon et al. 2008, 상기 문헌] 및 2007년 7월 5일 출원된 발명의 명칭 [METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES]의 미국 특허 출원 번호 11/773,94 (이는 그 전문이 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같이 수행되었다. 인간 C-펩티드의 실질적으로 유사한 수준이 문헌 [Kroon et al. 2008, 상기 문헌] 및 상기 미국 특허 출원 번호 11/773,944에 나타낸 바와 같이 유사한 시간 주기에서 이들 동물의 혈청 중에서 관찰되었다.

[0356]

본원에 기재된 방법, 조성물 및 장치는 현재 바람직한 실시양태를 대표하는 것이고 예시적이며 본 발명의 범주에 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명의 취지 내에 포함되는 변화, 대안, 변형 및 변이 및 기타 용도가 당업자에게 발생할 것이고, 본 개시내용의 범주에 의해 정의된다. 따라서, 다양한 치환 및 변형이 본 발명의 범주 및 취지로부터 벗어나지 않는 한 본원에 개시된 본 발명에 대해 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

[0357]

명료성을 위해 별개의 실시양태의 내용에 기재된 본 발명의 특징의 특징이 또한 단일 실시양태로 조합하여 제공될 수 있는 것으로 인지된다. 예를 들어, 혼탁액 중에서 hES-유래 세포 응집체를 제조하는 방법을 생성하고 최적화시켜 임의의 내배엽 계통 세포 유형, 예를 들어, 췌장 계통 유형 세포, 간 계통 유형 세포, 상피 계통 유형 세포, 갑상선 계통 세포 및 흉선 계통 세포를 생산하며, 따라서 여기에 구체적으로 기재된 hES-유래 세포 유형에만 제한되는 것은 아니다. 반대로, 간결성을 위해 단일 실시양태의 내용에 기재된 본 발명의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위조합으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 부착 플레이트 배양물로부터 또는 혼탁액으로부터, 미분화 부착 플레이트 배양물로부터 또는 혼탁액으로부터, 및 분화된 부착 플레이트 배양물로부터 또는 혼탁액 중의 세포 응집체로부터 hES 및 hES-유래 세포 응집체를 생성하는 기재된 방법은 단지 예시적이지만, 방법의 조합이 또한 사용될 수 있음이 명백하다.

[0358]

실시예 23 - 인간 만능 줄기 세포 및 췌장 전구 세포의 동결보존 및 저장

[0359] 부착 hES 세포 배양물을 실시에 24에 기재된 계대배양 프로토콜에 따라 수집하고 모으고 카운팅하였다. 세포 펠릿을 사전-가온된 약 50% hESC 배양 배지 (성장 인자 없음) / 50% 인간 혈청 중에 재-현탁시켰다. 동등 부피의 약 80% hESC 배양 배지 (성장 인자 없음) / 20% DMSO를 와류시키면서 적가하였다. 세포 1 mL를 약 24 시간 동안 날젠 미스터 프로스티(Nalgene Mr. Frosty) 용기 내에서 -80°C에서 동결을 위한 1.8 mL 크리오바이알에 분배하고, 그 후에 액체 N₂에 옮겼다. 실질적으로 유사한 방법을 cGMP 하에 수행하였다.

[0360] 상기 방법은 만능 또는 분화가능한 줄기 세포의 동결보존을 기재한다. 만능 줄기 세포로부터 분화된 세포, 예를 들어, 췌장 전구 세포의 동결보존은 사전에 2009년 11월 13일에 출원된 발명의 명칭 [ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS]의 미국 특허 출원 번호 12/618,659에 상세하게 기재되어 있으며, 출원 및 관련 출원은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0361] **실시예 24 - 를러 병을 비롯한 다양한 배양 용기에서 미분화 인간 만능 줄기 세포의 부착 배양, 계대배양 및 확장**

[0362] 세포 응집체-기반의 세포 요법 생성물, 특히 인간 만능 줄기 세포로부터 유도된 것의 제조에 대한 주요 병목현상은 혼탁액 중의 3-차원 세포 응집체의 형성이다. 구체적으로, 병목현상은 단층 부착 만능 줄기 세포를 취하고 이들을 만능 줄기 세포 응집체, 즉 혼탁 응집체 배양물 내로 전달하는 것이다. 상기 기재된 바와 같이, 예를 들어 6-웰 트레이에서 hES 세포 응집체를 형성시키고, 후속적으로 6-웰 트레이 또는 다른 배양 용기 포맷, 예를 들어 생물반응기, 병 등 중 어느 하나에서 분화시킬 수 있다. 하기 실시예에 기재된 본 발명의 실시양태는 혼탁액 중 세포 응집체로서의 만능 줄기 세포의 성장, 계대배양 및 확장 방법 뿐만 아니라 를러 병에서의 세포 응집체의 분화 방법을 제공한다. 실시예 25를 참조한다.

[0363] **인간 만능 줄기 세포의 배양 및 확장.** 해동시, 또는 규칙적인 계대배양시, 해리된 hESC를 상이한 세포 배양 용기에서 각각 3 및 4 일의 성장 주기 동안 50,000 또는 33,000개 세포/cm²로 플레이팅하였다. 글루타맥스를 함유한 DMEM/F12로 이루어진 hESC 성장 배지 (XF HA)는 10% v/v 크세노-유리 녹아웃 혈청 대체물, 1% v/v 비-필수 아미노산, 0.1 mM 2-메르캅토에탄올, 1% v/v 폐니실린/스트렙토마이신, 10 ng/mL 혜레귤린-1 β 및 10 ng/mL 액티빈 A로 보충하였다. 오직 플레이팅일에만 (처리 1 일), 세포 부착은 상기 기재된 바와 같은 크세노-유리 배양 배지의 첨가와 동시에 비-가열 불활성화 인간 AB 혈청 (발레이 바이오메티칼) 약 10% (vol/vol)를 포함함으로써 용이해졌다. 표준화된 플레이팅 부피 0.2 mL/cm²를 적어도 하기 표 8에 기재된 바와 같은 다양한 조직 배양 트레이, T-플라스크 및 세포 공장에 사용하였다. 사용된 성장 배지의 부피를 각 추가 공급일 동안 증가시키고, 이를 또한 표 8에 나타내었다.

[0364] <표 8> 부착 hES 세포 배양물의 배양 및 확장

용기 유형	60mm	T75	T175	삼중 T175	2-스택	5-스택
S.A.	19.6 cm ²	80 cm ²	175 cm ²	525 cm ²	1272 cm ²	3180 cm ²
플레이팅	4	16	35	105	260	650
d1	5.5	22	50	150	350	875
d2	7	28	60	180	450	1100
d3	8.5	35	80	240	550	1350

mL 단위 부피; SA: 표면적

[0365] **계대배양 인간 만능 줄기 세포.** 계대배양일에, 배양물에 새로운 성장 배지를 공급하고, 4-8 시간 동안 배양시킨 다음 해리시켰다. 배양물을 PBS (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))로 세척하고, 6 분 동안 약 37°C에서 미리-가온된 아큐테이즈 (이노베이티브 셀 테크놀로지스(Innovative Cell Technologies))를 사용하여 해리시켰다. 일부 실험에서, 아큐테이즈를 첨가하고, 이어서 즉시 흡인시켜 (즉 4-6 분 미만), 세포 해리를 최소량의 작용 부피의 잔류 시약 중에서 달성하고, 이는 세포 공장을 비롯한 특정 배양 용기를 이용하여 작용하는 경우에 바람직하여 배지 교환 단계의 수를 최소화한다. 아큐테이즈에 대한 노출 후에, 3x 부피의 차가운 hESC 배지 (혜레귤린 또는 액티빈 없음)를 첨가하고, 세포를 해리시키고 수집하였다. 해리된 세포를 3x 부피의 차가운 hESC 배지 (혜레귤린 또는 액티빈 없음)를 사용하여 서서히 수집하고, 비셀(ViCell) 자동화 세포 카운터 (BD

바이오사이언시스) 또는 혈구계를 이용하여 카운팅하고, 5 분 동안 200 x g에서 원심분리하고, 동일한 배양 조건 하에서의 후속 플레이팅을 위해 세포 펠릿을 새로운 성장 배지 중에 1-10 x 10⁶개 세포/mL로 재현탁시켰다.

[0367] 표 8은 사용된 다양한 배양 용기 및 배지 부피를 기재하지만, 당업자는 본원에 구체적으로 기재되지 않은 다른 배양 용기가 본원에 기재된 상세한 설명을 기초로 하여 인간 만능 줄기 세포의 성장, 계대배양 및 확장에 대해 사용될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 예를 들어, 롤러 병에서의 혼탁액 분화 방법에 대해서는 실시예 25를 참조한다.

[0368] 일부 연구에서, 계대배양된 hESC를 신규한 비코팅 6-웰 트레이 배양 용기에 세포 부착 없이 첨가하고, 회전시켜 상기 기재된 바와 같은 응집체를 형성하였다. 전형적으로, 10 ng/mL 헤레큘린-1 β 및 10 ng/mL 액티빈 A로 보충된 스템프로® hESC SFM 배지 (라이프 테크놀로지스), 또는 XF-HA 배지는 hESC의 혼탁 배양을 위해 사용되었다. 세포 배양을 가습 인큐베이터 내 37°C 및 8% CO₂에서 수행하였다.

[0369] 롤링 병 포맷에서 만능 줄기 세포의 응집을 시험하기 위해, 부착 hESC 배양물로부터, 또는 해동하고 세척하고 배양 배지 중에 혼탁시킨 동결 세포의 바이알로부터 직접 hESC 응집에 대한 상기 기재된 바와 같이 실질적으로 제조된 10⁶개 hESC/mL의 단일 세포 혼탁액을 각각 그의 측면 상에 놓인 동안 회전될 수 있는 관형 형상을 갖는 상이한 용기에 넣었다. 10 mL 세포 혼탁액을 함유한 50 mL 투브 및 30 mL 또는 120 mL의 세포 혼탁액 중 어느 하나를 함유한 150 mL 병을 약 37°C에서 혼성화 오븐에 넣고, 약 5 rpm으로 회전시켰다. 회전은 벨트-인, 가변 속도, 기계식 병 회전기를 이용하여 달성되었다. 초기 연구에서, 오븐을 CO₂로 기체 처리하지 않았다. 세포 응집 제어의 목적을 위해, 동시 연구를 6-웰 트레이를 이용하여 수행하였다. 응집체 직경 및 형태학을 기초로 하여, 만능 줄기 세포 응집체는 롤링 병 포맷 및 대조 6-웰 트레이 포맷에서 성공적으로 형성되었다. 만능 줄기 세포 응집체는 또한 플라스틱 단지를 이용하여 이전 실험에서 형성되었다. 이들 연구는 응집이 속도, 용기 형상 및 유체 역학에 관련하여 6-웰 트레이에서의 회전 배양과 완전히 상이한 용기 포맷에서 효과적으로 진행될 수 있음을 입증하였다. 게다가, 이 롤링 병 포맷은 본원에 기재된 방법의 실질적인 최적화 없이 확장가능하여, 주요 병목현상 영역을 우회하는 것이 가능할 것이다.

실시예 25- 롤러 병에서의 만능 줄기 세포 응집 및 분화

[0371] 인간 ES 세포 (실시예 24)를 150 mL 병 중에서 응집시키고, 상기 기재된 바와 같이 출원인의 단계 1-4 분화 프로토콜을 이용하여 혼장 전구세포 (또는 PEC)로 분화시켰다. 150 mL 롤러 병을 스템프로® hESC SFM 배지 또는 XF HA 배지 중 1 x 10⁶개 세포/mL 또는 2 x 10⁶개 세포/mL 세포 밀도의 120 mL 세포 혼탁액으로 접종하였다 (표 9 참조).

[0372] 단계 1-4 배지 조건은 실질적으로 상기 기재된 것과 같았고 (상기 문헌 [Schulz et al. (2012)] 참조), 이는 표 9에 요약되어 있다. hESC 응집 및 단계 1-4 분화 전반에 걸쳐 약 5 rpm, 8 rpm, 10 rpm 또는 12 rpm의 회전 속도로 시험하였고, CO₂ 가스처리는 인큐베이터 내에 포함시키지 않았다. CO₂ 가스처리는 어떠한 마개가 롤러 병과 함께 사용되었는지에 따라 달라질 수 있다 (예를 들어, 플러그 마개, 통기 또는 비-통기 마개). 도 25에 롤러 병 응집 및 분화 동안 형성된 세포 응집체의 평균 직경 크기를 나타내었다.

[0373] 각각의 박스 플롯은 최소, 최대, 제2 및 제3 사분위수, 및 초기 비분화 (d0) 및 분화 세포 응집체 (d2, d5, d8 및 d12)의 중앙값을 보여준다. 세포 응집체 직경을 두 조건 모두에 대해 측정하였다. 초기에 형성된 세포 응집체의 평균 직경은 배양물을 약 1 x 10⁶개 세포/mL로 접종한 경우에 2 x 10⁶개 세포/mL에 비해 더 컸다. 그러나, 분화의 후기 단계 (예를 들어, 단계 3-4)에서 직경 크기는 유사하였고 구별불가능하였다. 도 25는 또한 롤러 병에서 형성된 분화 세포 응집체 및 6-웰 트레이에서 수행된 이전 혼탁액 분화 실험 동안 형성된 것 사이에 실질적인 차이가 없음을 보여준다. 롤러 병에서의 분화는 또한 6-웰 트레이, 생물반응기 등에서 수행된 배양에서 사전에 관찰된 바와 같은 응집체 직경의 전형적인 확장 및 수축을 보여주었다 (도 25). 응집체 직경은 초기 세포 밀도와 독립적이었고, 초기 hESC 또는 미분화된 세포 성장 배지 조성물과 독립적이었다. 간략하게, 세포 응집체는 단계 1 및 2 동안 확장되었고 (도 25, d0 및 d2), 단계 3 동안 수축되었고 (도 25, d5), 단계 4 동안 다시 확장되었다 (도 25, d8 및 d12). 분화 전반에 걸쳐, 세포 응집체는 명백한 응집 (예를 들어, 300 마이크로미터 이상의 큰 응집체) 또는 전단-파괴를 나타내지 않았다.

[0374] <표 9> 6월 트레이 및 롤러 병에서의 단계 1-4 분화에 대한 배지 조건

시점 (일)	단계 (1-4)	배지 조건	롤러 병 속도 (rpm)	6월 트레이 속도 (rpm)
d(-1)	hESC	XF HA, SP	5, 8, 10 또는 12	95
	웅집			
d0	1	r0.2FBS-ITS1:5000 A100	5, 8, 10 또는 12	95
d1		r0.2FBS-ITS1:5000 A100	5, 8, 10 또는 12	95
d2	2	r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5, 8, 10 또는 12	95
d3		r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5, 8, 10 또는 12	95
d4		r0.2FBS-ITS1:1000 K25	5, 8, 10 또는 12	105
d5	3	db-CTT3 N50	5, 8, 10 또는 12	105
d6		db-CTT3 N50	5, 8, 10 또는 12	105
d7		db-CTT3 N50	5, 8, 10 또는 12	105
d8	4	db-N50 K50 E50	5, 8, 10 또는 12	105
d9		db-N50 K50 E50	5, 8, 10 또는 12	95
d10		db-N50 K50 E50	5, 8, 10 또는 12	95
d11		db-N50 K50 E50	5, 8, 10 또는 12	95
d12		db-N50 K50 E50	5, 8, 10 또는 12	95

XF HA, 10% v/v의 제노-프리 녹아웃 혈청 대체물, 1% v/v 비-필수 아미노산, 0.1 mM 2-메르캅토에탄올, 1% v/v 폐니실린/스트렙토마이신 (모두 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)로부터 입수), 10 ng/mL 혼례글린-1 β (페프로테크(Peprotech)) 및 10 ng/mL 엑티빈 A (알엔디 시스템스(R&D Systems))로 보증된 글루타메스 함유 DMEM/F12; SP, 스템프로(StemPro)® hESC SFM (라이프 테크놀로지스); r0.2FBS: RPMI 1640 (미디어테크(Mediatech)); 0.2% FBS (하이클론(HyClone)); 1x 글루타메스-1 (라이프 테크놀로지스), 1% v/v 폐니실린/스트렙토마이신; ITS: 1:5000 또는 1:1000 회색된 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (라이프 테크놀로지스); A100: 100 ng/mL 제조합 인간 엑티빈 A (알엔디 시스템스); W50: 50 ng/mL 제조합 마우스 Wnt3A (알엔디 시스템스); K25: 25 ng/mL 제조합 인간 KGF (알엔디 시스템스); IV: 2.5 μ M TGF- β RI 키나제 억제제 IV (EMD 바이오사이언스(EMD Bioscience)); db: 0.5x B-27 보증물 (라이프 테크놀로지스), 1x 글루타메스-1 및 1% v/v 폐니실린/스트렙토마이신으로 보증된 DMEM HI 글루코스 (하이클론); CTT3: 0.25 μ M KAAD-시클로파민 (토론토 리서치 케미칼스(Toronto Research Chemicals)) 및 3 nM TTNPB (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)); N50: 50 ng/mL 제조합 인간 노린 (알엔디 시스템스); K50: 50 ng/mL 제조합 인간 KGF (알엔디 시스템스); E50: 50 ng/mL 제조합 인간 EGF (알엔디 시스템스); hESC 웅집에서, 단계 1-4 분화에서 또는 둘 다에서 5, 8, 10, 12 rpm 회전 속도로 수행하였다.

[0375]

[0376] 단계 1-4 전반에 걸친 유전자 발현을 검사하기 위해, Q-PCR을 이용하여 1×10^6 개 세포/mL 대 2×10^6 개 세포/mL 출발 세포 밀도로 수행한 분화를 분석하였다 (도 26). 특정 유전자만을 도 26에 나타내었지만, 본 출원인은 이전에 각각의 단계 1-4에서의 많은 유전자의 발현 및 비-발현을 상세하게 기재하였다. 예를 들어, 2012년 7월 3일 등록된 발명의 명칭 [METHODS FOR CULTURING PLURIPOTENT STEM CELLS IN SUSPENSION USING ERBB3 LIGANDS]의 미국 특허 번호 8,211,699; 2011년 7월 26일 등록된 발명의 명칭 [PREPRIMITIVE STREAK AND MESENDOERM CELLS]의 7,958,585; 2009년 3월 31일 등록된 발명의 명칭 [DEFINITIVE ENDODERM (CYTHERA.045 A)]의 7,510,876; 2009년 6월 2일 등록된 발명의 명칭 [METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM]의 7,541,185; 2009년 12월 1일 등록된 발명의 명칭 [EXPANSION OF DEFINITIVE ENDODERM]의 7,625,753; 2010년 4월 13일 등록된 발명의 명칭 [METHODS FOR INCREASING DEFINITIVE ENDODERM PRODUCTION]의 7,695,963; 2010년 4월 27일 등록된 발명의 명칭 [DEFINITIVE ENDODERM]의 7,704,738; 2011년 8월 9일 등록된 발명의 명칭 [METHODS FOR INCREASING DEFINITIVE ENDODERM PRODUCTION]의 7,993,916; 2011년 8월 30일 등록된 발명의 명칭 [STEM CELL AGGREGATE SUSPENSION COMPOSITIONS AND METHODS OF DIFFERENTIATION THEREOF]의 8,008,075; 2012년 5월 29일 등록된 발명의 명칭 [COMPOSITIONS AND METHODS FOR SELF-RENEWAL AND DIFFERENTIATION IN HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS]의 8,178,878; 2012년 7월 10일 등록된 발명의 명칭 [METHODS FOR IDENTIFYING FACTORS FOR DIFFERENTIATING DEFINITIVE ENDODERM]의 8,216,836; 2009년 5월 19일 등록된 발명의 명칭 [METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES]의 7,534,608; 2010년 4월 13일 등록된 발명의 명칭 [METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES]의 7,695,965; 2011년 8월 9일 등록된 발명의 명칭 [METHODS OF PRODUCING PANCREATIC HORMONES]의 7,993,920; 2012년 3월 6일 등록된 발명의 명칭 [ENDOCRINE PRECURSOR CELLS, PANCREATIC HORMONEEXPRESSING CELLS AND METHODS OF PRODUCTION]의 8,129,182; 2007년 10월 19일 출원된 발명의 명칭 [METHODS AND COMPOSITIONS FOR FEEDERFREE PLURIPOTENT STEM CELL MEDIA CONTAINING HUMAN SERUM]의 미국 특허 출원 번호 11/875,057; 2009년 11월 13일 출원된 발명의 명칭 [ENCAPSULATION OF PANCREATIC LINEAGE CELLS DERIVED FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS]의 12/618,659 (이들 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 분화 방법에서 높은 정도의 신뢰도만을 수득한 후, 본 출원인은 서명 마커로서 더 작은 세트의 마커를 선택하여 도 26에 나타낸 바와 같이 다양한 단계 1-4 세포 집단을 나타내고 확인하였다.

[0377]

도 26은 롤링 병 형식으로 분화된 세포 응집체가 6-웰 트레이에서 동시에 수행한 분화 연구 (대조군, 도 26)에 따라 각 단계의 분화에서 예상되는 전형적인 서명 마커를 발현한다는 것을 나타낸다. 유사하게, 예상한 경우에 서명 마커 발현의 부재가 관찰되었다. 예를 들어, 만능 줄기 세포 마커 예컨대 OCT4 및 Nanog는 모든 배양 조건에 있어서 d0에 존재하였다 (도 26a). 유사하게, 롤러 병 분화 및 6-웰 트레이 분화를 모두에서 중내배엽 마커 MIXL1 및 Eomes의 일시적 상향-조절이 있었다 (도 26, 흑색 막대, 흑색 빛금 막대, 회색 막대 각각 비교). 단계 2 세포는 6-웰 트레이에서 분화된 단계 2 유형 세포에 대해 관찰된 것과 유사하게 SOX17 및 HNF3 β [FOXA2]를 발현하는 완전 내배엽을 생산하였다. 단계 4 유형 세포는 6-웰 트레이에서 분화된 배양물에 대해 관찰된 것과 유사하게 PDX1 및 NKX6.1을 발현하였다 (도 26, 흑색 막대, 흑색 빛금 막대, 회색 막대 각각 비교). 마지막으로, 표적을 벗어난 계통에 대한 마커의 발현은 6-웰 트레이 및 150 mL 롤링 병에서 분화된 배양물에서 실질적으로 상이하였고, 이는 분화의 제어가 롤링 형식에서 엄격히 유지됨을 나타낸다. 이들 마커는 ZIC1 (외배엽 계통), 초기 발현 PAX6 (뉴런 계통), SOX7 (배아바깥 내배엽), CDX2 (영양외배엽), 및 초기 발현의 AFP (난황낭)를 포함하였다.

[0378]

<표 10a> 대형 롤러 병에서의 pPSC 분화

병 부피	병 표면적	응집 부피	마개, 통기 (V); 비-통기 (NV)	펠릿 부피 d0	% 혼입 d0	응집체 직경 (μ m)
1200 mL	490 cm^2	275 mL	V	1050 μ L	79.6	177 \pm 23
1200 mL	490 cm^2	275 mL	NV	1090 μ L	78	167 \pm 21
2275 mL	850 cm^2	580 mL	V	2300 μ L	76	171 \pm 26
6-웰 트레이	-	33 mL/트레이	-	~105 μ L/트레이	~75	136 \pm 15

[0379]

[0380]

pPSC가 롤러 병 형식에서 소규모로 응집될 수 있음이 입증되면 (실시예 25), 보다 큰 배양물을 제조하여 롤러 병에서의 hESC에서 PEC로의 응집 및 분화의 실제적인 규모조정성을 입증하였다. CyT49 hESC를 사용한 실험을 표 10에 나타낸 바와 같이 수행하였다. 인간 ESC를 스템프로® hESC SFM 배지 중에서 응집시키고, 다른 만능 줄기 세포 배지, 예를 들어 인간 혈청 알부민 (HAS) 함유 및 무함유 XF HA 배지를 다른 실험에 사용하였다 (데이터는 나타내지 않음). 제0일 (d0)에 hESC 응집체가 각각의 조건에서 효과적으로 형성되었다. 표 10에 요약된 실험 배양물을 8rpm으로 회전시켰다. 다른 실험에서, 5, 10 및 12 rpm에서의 응집을 이용하였고, hESC 응집체가 8 rpm에서 6-웰 트레이 및 롤러 병에서 관찰된 것과 유사한 형태 및 직경으로 형성되었다 (데이터는 나타내지 않음). hESC 응집을 낮은 범위의 회전 속도, 예를 들어 5, 6 및 7 rpm에서, 또는 스템프로® hESC SFM (라이프 테크놀로지스) 배지를 사용하여 수행한 일부 경우에, 세포 응집체의 응집에서의 증가가 관찰되었다 (즉, 300 μ m 초과의 구조; 데이터는 나타내지 않음). 일부 실험은 통기 병 마개를 사용하여 수행한 반면 (V), 다른 실험은 통기 병 마개를 사용하지 않았다 (NV). 통기는 분화 과정에 실질적인 차이를 만들지 않거나, qPCR 유전자 발현 분석에 의해 결정된 바와 같이 hESC의 적당한 사양에 영향을 미치지 않는 것으로 보였다 (도 26). 요컨대, 롤러 병에서의 hESC 응집을 다양한 회전 속도 (예를 들어, 약 5 내지 12 rpm)에 걸쳐 다양한 만능 줄기 세포 배양 배지를 사용하여, 통기 또는 비-통기 병 마개, 및 CO₂ 가스처리 또는 비-가스처리 인큐베이터에서 달성할 수 있었다. 이들 다양한 인자는 응집체의 형태, 형상 및 평균 직경 크기를 실질적으로 변화시키지 않는 것으로 보였다.

[0381]

실시예 27- 롤러 병에서의 줄기 세포 응집체의 규모화된 분화

[0382]

인간 ESC 응집을 1200 mL 또는 490 cm^2 롤러 병을 사용하여 실질적으로 실시예 25 및 26에 상기 기재된 바와 같이 다시 수행하였다. 각각의 롤러 병 응집에서의 hESC 응집체가 일정하고 유사한 것으로 보이기 때문에 (예를 들어, 형태 및 직경 크기), 응집체를 모으고, 펠릿화하고, 응집체의 펠릿을 표 11에 따른 분화를 위해 1200 mL 또는 490 cm^2 롤러 병 사이에 분배하였다. hESC 응집체 펠릿의 총 부피는 대략 4400 μ L였고, 표 11에 따른 분화를 위해 4 x 1200 mL 병 (490 cm^2)으로 재분배하였다. 분화를 표 9에 상기 기재된 바와 같이 수행하였다. 낮은 회전 속도에서 회전시킨 병에서 소량의 응집이 관찰된 것을 제외하고는 분화 배양물은 유사한 형태를 나타내었다 (데이터는 나타내지 않음). 그러나, 제12일 (단계 4)까지의 응집체 펠릿 부피는 시험된 모든 조건에 대해 유사하였고, 회수된 모든 세포 펠릿은 각각의 병에서 출발 펠릿 부피와 비교하여 약 1:1 수율이었다 (약 1100 μ L). 표 11을 참조한다.

[0383]

pPSC의 응집은 hESC에 제한되지 않는다. 인간 iPSC를 표 11에 열거된 조건 하에 hESC에 대해 상기 기재된 것과 실질적으로 유사한 방식으로 시험하였다. 인간 iPSC-482c7 (셀룰라 다이나믹스 인터내셔널 임크. (Cellular Dynamics International Inc.), 미국 위스콘신주 매디슨)을 490cm^2 롤러 병에서 응집시켰다. hiPSC의 총 출발 부피는 1×10^6 개 세포/mL에서 단지 약 25 mL였다. 응집 플랫폼은 다양한 세포 부피에 걸쳐, 심지어 출발 부피 와 보다 큰 490cm^2 롤러 병 사이의 차이가 더 큰 경우에도 잘 수행하기에 충분히 강건하였다. 인간 iPSC 세포 응집체는 상기 기재된 바와 같은 6-웰 트레이 또는 롤러 병에서 응집된 hESC와 형태학적으로 유사한 것으로 보였고, 즉 iPSC 응집체 크기는 겉보기 응집 없이 약 100 내지 약 300 마이크로미터 범위였다. 또한, 2010년 4월 22일 출원된 발명의 명칭 [CELL COMPOSITIONS DERIVED FROM DEDIFFERENTIATED REPROGRAMMED CELLS]의 미국 특허 출원 번호 12/765,714 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 사전에 기재된 바와 같이, Rho 키나제 억제제의 사용은 pPSC 응집체 분화를 개선하였으며; 그러나, '714 출원은 hESC 응집을 보여주지 않았기 때문에 (단지 분화), 상기 출원은 출발 pPSC 배양물 중 예를 들어 $10 \mu\text{M}$ Y-27632의 사용이 또한 pPSC 응집을 개선한다는 것을 보여주지 않았다. hESC 응집을 롤러 병에서 수행할 수 있기 때문에, 롤러 병에서의 세포 응집체 분화를 또한 실질적으로 '714 출원 또는 관련 출원에 상세히 기재된 바와 같이, 또는 실질적으로 본원에 기재된 바와 같이 및 표 9에 따라 수행할 수 있다.

[0384]

추가로, hESC 응집체의 완전성을 입증하기 위해, hESC 응집체를 롤러 병에서 처음 형성시킨 다음, 후속적으로 6-웰 트레이에서 분화시켰다. 이는 예를 들어 상이한 회전 속도로, 그리고 상이한 만능 줄기 세포 배지를 사용하여 다양한 조건 하에 롤러 병에서 처음 형성된 hESC 응집체를 사용하여 수행하였다. 6-웰 트레이에서의 롤러 병 hESC 응집체의 분화는 hESC 응집체가 6-웰 트레이에서 처음 형성된 경우에 관찰된 것 (대조군; 데이터는 제시하지 않음)과 응집체 형상 및 직경, 및 세포 형태가 비슷하였다. 따라서, 롤러 병에서의 hESC 응집체의 완전성은 포맷 변화로 인하여는 실질적으로 변화되지 않는다.

[0385]

롤러 병을 사용하는 규모조정이 응집체로의 세포의 혼입을 손상시키지 않는다는 것을 입증하기 위해, 응집체 형성 후에 살아있는 미혼입 세포의 세포 계수를 제0일 (즉, 응집의 개시의 18-24시간 후)에 수행하였고, 이는 투입 세포의 약 75-80%가 미분화 hESC 응집체에 혼입되었음을 확인시켰으며, 이는 6-웰 트레이에서 관찰된 것 (약 75%)과 비슷하거나 또는 보다 우수하다. 상기 문헌 [Schulz et al. 2012] 도 S4, S6을 참조한다. XF HA 배지를 사용하는 연구가 약 50% 내지 약 77%의 혼입의 범위를 제공 (데이터는 제시하지 않음)했기 때문에, 혼입의 백분율은 사용된 만능 줄기세포 배양 배지에 따라 달라질 수 있다.

[0386]

표 11 및 9에 따른 분화 과정의 Q-PCR 분석은 적절한 계통 특성화가 PEC의 형성까지의 각각의 단계에서 일어났다는 것을 입증하였다. 도 27a-d를 참조한다. 표 11에 열거된 바와 같은 4개의 배양물은 각각 만능의 마커 (예를 들어, OCT4, 나노그)의 하향-조절 및 중내배엽의 마커 (예를 들어, MixL1, 에오메스)의 일시적 상향-조절을 나타내었다. 도 27a를 참조한다. 완전 내배엽의 마커 (예를 들어, SOX17 및 HNF3 β)는 예상된 바와 같이 제2일부터 발현되었고, 이어서 다른 내배엽 및 혼장 마커 (예를 들어, HNF1 β , PDX1, NKX6-1, PTF1A, NGN3 및 NKX2-2)가 발현되었다. 도 27b를 참조한다. 중요하게, 표적-외 계통 (비-내배엽 또는 비-혼장 계통)을 나타내는 마커는 6-웰 트레이 대조군 분화와 비교시 상승되지 않았고 (예를 들어, PAX6, SOX7, CDX2, AFP 및 ZIC1), 따라서 혼장 특성화의 엄격한 제어는 이를 규모조정된 분화 실험에서 유지되었다. 도 27c를 참조한다. 예를 들어, 전형적으로 일부 분화에서 산발적으로 발생하는 부수적인 표적-외 집단의 존재를 나타내는 AFP 발현은 6-웰 트레이 대조군에서 낮았다. 도 27d 및 상기 문헌 [Schulz et al. 2012]을 참조한다. AFP 발현은 롤러 병 배양물에서는 심지어 보다 낮았고, 이는 잠재적으로 제12일 응집체에서의 상기 부수 집단에서의 감소를 나타낸다. 도 27d를 참조한다.

[0387]

다단계 (단계 1-4) 프로토콜을 이용하여 hESC로부터 분화된 혼장 세포 배양물의 세포 구성을 평가하기 위해, 공동-염색의 조합에 기반한 유동 세포측정법 분석을 실질적으로 문헌 [Kelly et al. 2011, Nature Biotech 29:750-56]; 상기 문헌 [D'Amour et al. 2005; Kroon et al. 2008, Schulz et al. 2012] (이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 이전에 기재된 바와 같이 이용하였다. 상기 문헌 [Schulz et al. 2012]은, 예를 들어 37회 이상의 분화 실행에 대한 광범위한 유동 세포측정법 분석 및 PEC 세포 구성을 보여주었다 (도 2). 문헌 [Schulz et al.]은 약 26-36% CHGA $^-$ / NKX6-1 $^+$ / PDX1 $^{+/-}$, 약 46-56% CHGA $^+$ / NKX6-1 $^{+/-}$ / PDX1 $^{+/-}$ (폴리-호르몬 내분비 세포), 약 10-15% CHGA $^-$ / NKX6-1 $^-$ / PDX1 $^+$ (PDX1-단독 내배엽 세포) 및 3% 미만의 CHGA $^-$ / NKX6-1 $^-$ / PDX1 $^-$ (나머지 또는 삼중 음성 세포)로 이루어진 PEC의 세포 구성을 기재하였다. 상기 문헌 [Schulz et al. 2012] 도 2c를 참조한다.

[0388]

유사하게, 유동 세포측정법 분석을 표 11에 제시된 바와 같이 롤러 병에서 분화된 단계 4 (제12일) PEC 배양물상에서 수행하였다. PEC 구성은 상기 문헌 [Schulz et al.]에 이전에 기재된 것과 일치하였고, 4개의 롤러 병 조건으로부터의 평균 뿐만 아니라 정확한 백분율이 표 12에 도시되어 있다. 이들 규모조정된 롤러 병 분화로부터의 PEC는 약 40% CHGA⁻ / NKX6-1⁺ / PDX1^{+/-}, 약 43 % CHGA⁺ / NKX6-1^{+/-} / PDX1^{+/-} (또는 폴리호르몬 내분비 세포), 약 10 % CHGA⁻ / NKX6-1⁻ / PDX1⁺ (또는 PDX1-단독 내배엽 세포), 및 약 2% CHGA⁻ / NKX6-1⁻ / PDX1⁻ (또는 나머지 세포; 또는 삼중 음성 세포)를 보여주었다. PEC 구성의 유동 세포측정법 분석은 또한 5 및 8 rpm의 상이한 회전 속도도, 또는 통기 또는 비-통기 병 마개의 유형도 PEC 세포 구성에 대해 명백한 효과를 갖지 않았다는 것을 나타낸다. 상기 기재된 바와 같이, 그리고 Q-PCE 분석에 기반하여, 이들 조건은 PEC로 가는 도중에 단계 1-4 세포의 계통 특성화를 일으키는 것으로 보이지 않았다 (도 26). 따라서, 상기 연구 및 분석은 규모조정 가능한 롤링 병 포맷에서의 hESC 응집 및 PEC로의 분화의 유효성을 확인시켰다.

[0389]

<표 11> 대형 롤러 병에서의 pPSC 응집

[0390]

<표 12> 단계 1-4 분화 후 롤러 병으로부터의 PEC 세포 구성

병 표면적 (1200 mL)	응집 부피	마개, 통기 (V); 비-통기(NV)	속도	단계 4, 제12일 밸류 부피
490 cm ²	275 mL	V	5 rpm	1000 μL
490 cm ²	275 mL	NV	5 rpm	1100 μL
490 cm ²	275 mL	V	8 rpm	800 μL
490 cm ²	275 mL	NV	8 rpm	1200 μL
		CHGA+ (다중- 호르몬 내분비) - CHGA- (NKX6.1+ PDX1+ 또는 단독)	CHGA- NKX6.1- PDX1+ (PDX 나머지- 삼중 음성)	CHGA- NKX6.1- PDX1- 나머지- 삼중 음성)
RB- A 490cm ² V 8rpm	40.2	41.0	16.8	1.92
RB- B 490cm ² NV 8rpm	45.5	41.5	11.6	1.36
RB- C 490cm ² V 5rpm	43.6	35.0	20.1	1.34
RB- D 490cm ² NV 5rpm	43.8	42.9	9.71	3.65
평균, RB A-D	43.25	40.1	14.55	2.07

*V, 통기; NV, 비-통기;

[0391]

[0392]

상기 기재된 방법 및 구성은 시험관내에서 배양된 세포에 관한 것으로 인지될 것이다. 그러나, 상기 기재된 시험관내 분화 세포 구성은 생체내 적용에 이용될 수 있다. 본원에 기재된 구성의 용도는 적어도 본 출원인의 미국 특허 번호 7,534,608; 7,695,965; 및 7,993,920; 발명의 명칭 [METHODS FOR PRODUCING PANCREATIC HORMONES], 이들은 각각 2009년 5월 19일, 2010년 4월 13일, 2011년 8월 9일에 등록됨; 및 8,278,106, 발명의 명칭 [ENCAPSULATION OF PANCREATIC CELLS DERIVED FROM PLURIPOTENT STEM CELLS] (이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 상세히 기재되어 있다. 본원에 기재된 구성의 용도 및 기능은 또한 본 출원인에 의해 상기 문헌 [Kroon et al. 2008 및 Schulz et al. 2012] (이들은 또한 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 비롯한 선행 비-특허 공개에 보고되어 있다.

[0393]

따라서, 다양한 치환, 변형 또는 촉적화, 또는 조합이 본 발명의 범주 및 취지를 벗어나지 않으면서 본원에 개시된 실시양태에 대해 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 상기 기재된 바와 같이, 롤러 병은 다양한 크기, 형상을 가질 수 있으며, 잠재적으로 심지어 용기의 형상이 실린더형이 아니지만 롤러 병의 것과 동일한 움직임을 모방하는 방법이 이용될 수 있다. 추가로, 다양한 유형의 pPSC 배지, 예컨대 XF HA 또는 스템프로® hESC SFM 배지 및 다른 유형의 배지 (예를 들어, mTeSR™ 배지, 에센셜(Essential)™ 8, 또는 pPSC 또는 유사 세포의 성장 및 배양을 위해 산업에서 통상적으로 사용되는 임의의 다른 pPSC 배지)의 사용이 전적으로 예상된다는 것이 상기 설명으로부터 명백하다.

[0394]

예를 들어, 응집 및/또는 분화가 기체처리 (예를 들어, CO₂ 및 다른 기체)를 요구하는지의 여부는 사용된 롤러 병 마개의 유형 (예를 들어, 통기 또는 비통기)에 부분적으로 의존할 수 있다. CO₂는 표준 조직 배양 인큐베이터에서 배양 조건에 쉽게 혼입될 수 있다. 그러나, 외부 CO₂를 전혀 사용하지 않는 (미기체처리) 응집 및/또는 분화는 규모조정에서 제조에 대해 특정의 이점을 가져올 수 있다: 보다 큰 부피/병 및 따라서 대규모 제조 실행 당 보다 적은 병. 또한, 병의 대규모 어레이는 인큐베이터와 비교하여 사람이 드나들 수 있는 고온의 방에서

실행될 수 있고, 이는 규모조정 과정에서 로보틱스 및 자동화의 도입을 크게 단순화시킨다.

[0395] 특정의 배양 용기가 본원에 기재되어 있지만 (예를 들어, 6 웨л 트레이, 생물반응기, 3각 플라스크, 롤러 병 등), 다른 유사한 배양 용기, 예를 들어 유사한 크기, 형상, 치수 및 기능을 갖는 것들이 고려된다. 상업용 롤러 병, 예컨대 코닝의 플라스틱 및 유리 롤러 병은 크기가 490 cm^2 (100 내지 150 mL를 수용함); 850 cm^2 (170 내지 255 mL를 수용함); 1700 cm^2 (340 내지 510 mL를 수용함); 1750 cm^2 (350 내지 525 mL를 수용함); 670-680 cm^2 (135 내지 200 mL를 수용함); 840 cm^2 (170 내지 255 mL를 수용함); 1170 cm^2 (235 내지 350 mL를 수용함); 1330 cm^2 (265 내지 400 mL를 수용함); 1585 cm^2 (315 내지 475 mL); 및 1585 cm^2 (315 내지 475 mL를 수용함) 범위이다.

[0396] 3각 플라스크는 원추형의 형상이고, 점점 가늘어지는 물체 및 좁은 목을 갖는다. 비커와 구별되는 이러한 형상은 내용물을 외부 기계 장치로 또는 손으로 와류시키거나 또는 교반하도록 허용하고, 한편 좁은 목은 내용물을 넘쳐 흐르지 않게 하고 비커와 비교하여 중발 손실을 감소시키며, 원추형 플라스크의 편평 바닥은 이것을 안정하게 한다. 본원에 기재된 본 발명은 유사한 형상을 갖는 다른 용기를 고려한다.

[0397] 여전히 본원에 기재된 본 발명은 또한 생물반응기, 또는 생물학적 활성 환경을 지원하는 임의의 제조되거나 또는 조작된 장치 또는 시스템의 사용을 고려한다. 이러한 생물반응기는 통상적으로 실린더형이고, 크기가 리터 내지 세제곱미터 범위이다. 다수의 상업적으로 입수가능한 생물반응기가 존재하며, 당업자는 본원에 제공된 상세한 설명을 고려하여 그 과정에 맞는 용기를 선택하도록 안내될 수 있다.

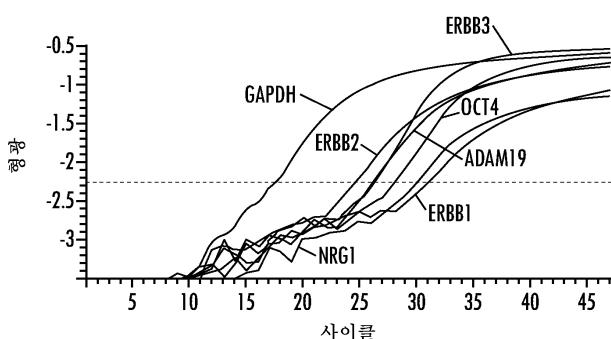
[0398] 따라서, 당업자는 본 발명 설명 및 제조 권고사항에 기반하여 그의 규모증대 배양 필요에 대해 적절한 크기의 롤러 병을 쉽게 선택할 수 있다.

[0399] 본 명세서에 언급된 모든 공개 및 특허는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

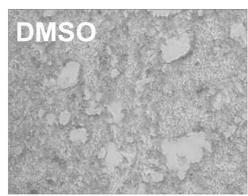
[0400] 하기 특허청구범위에서, 그리고 본 개시내용 전반에 걸쳐 사용된 어구 "~로 본질적으로 이루어진"은 어구 뒤에 열거된 임의의 요소를 포함하는 것을 의미하고, 열거된 요소에 대한 개시내용에 명시된 활성 또는 작용을 방해하거나 그에 기여하지 않는 다른 요소로 제한된다. 따라서, 어구 "~로 본질적으로 이루어진"은 열거된 요소가 요구되거나 또는 강제적이지만, 다른 성분이 임의적이고, 이들이 열거된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지의 여부에 따라 존재할 수 있거나 또는 존재할 수 없다는 것을 나타낸다.

도면

도면1



도면2a



도면2b



도면2c



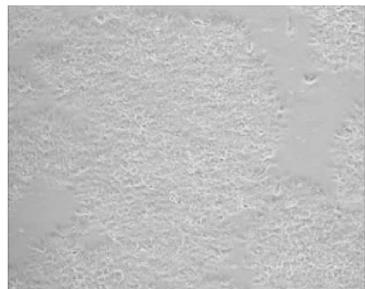
도면3a



도면3b



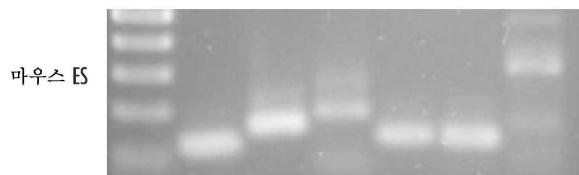
도면3c



도면3d



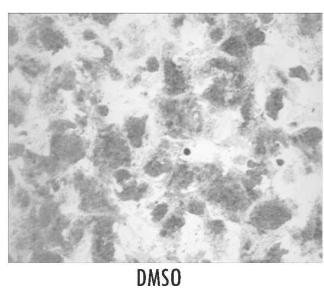
도면4a



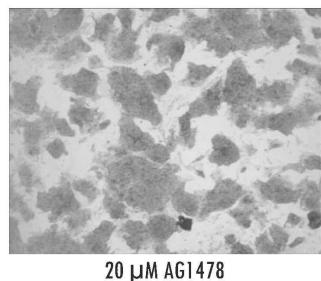
도면4b



도면5a

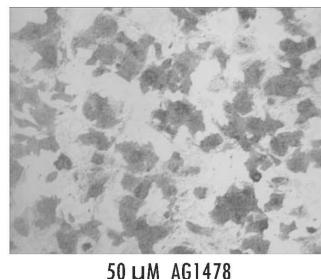


도면5b



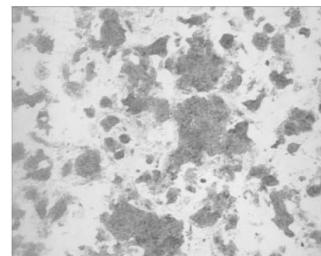
20 μM AG1478

도면5c



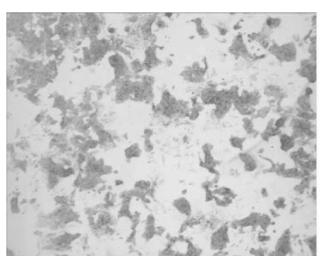
50 μM AG1478

도면5d



10 μM AG879

도면5e

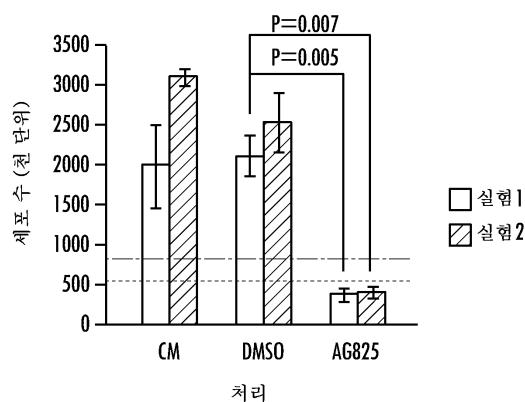


20 μM AG879

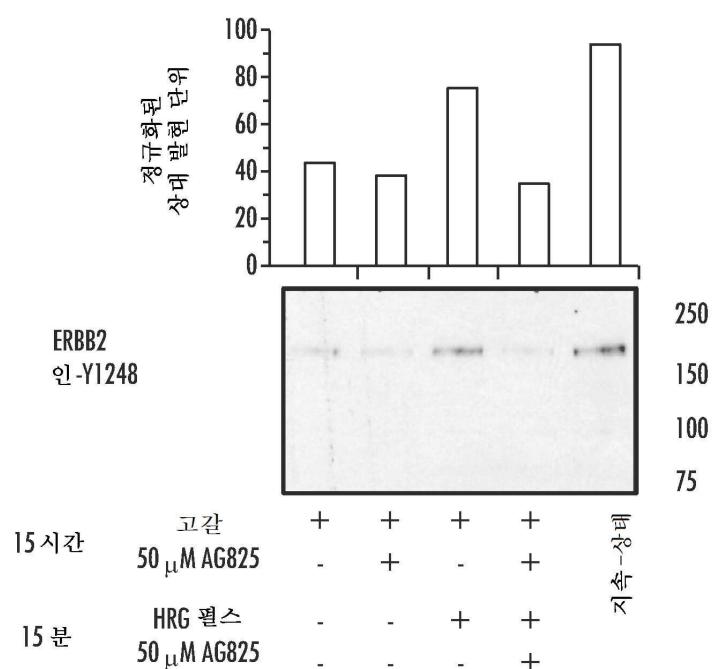
도면5f



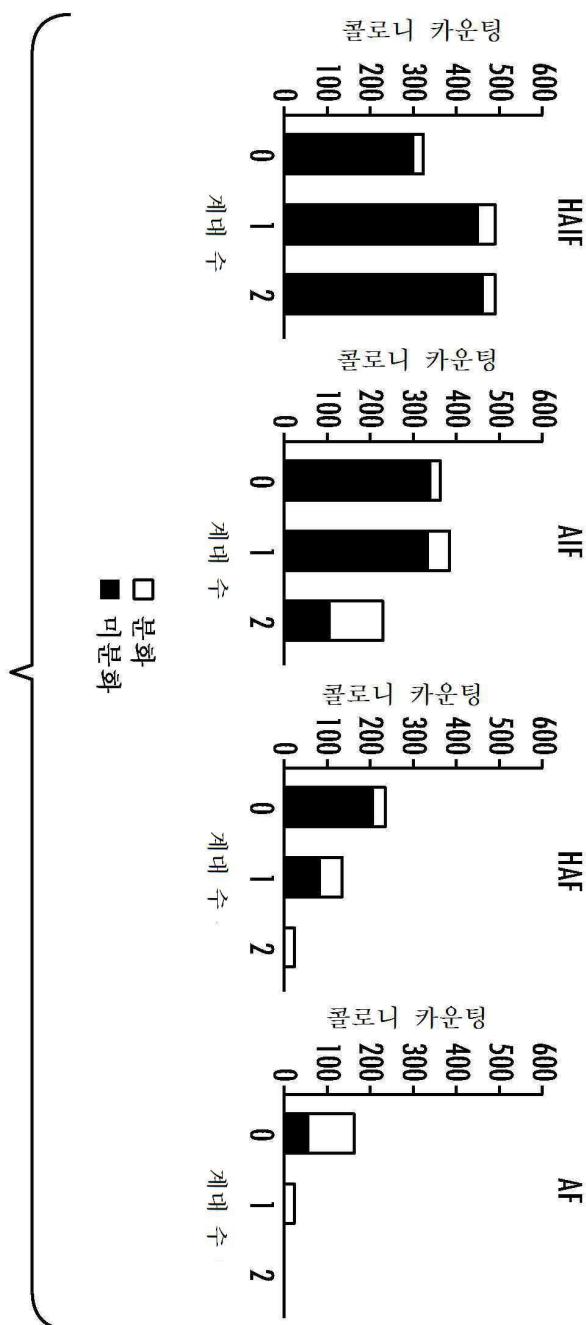
도면6a



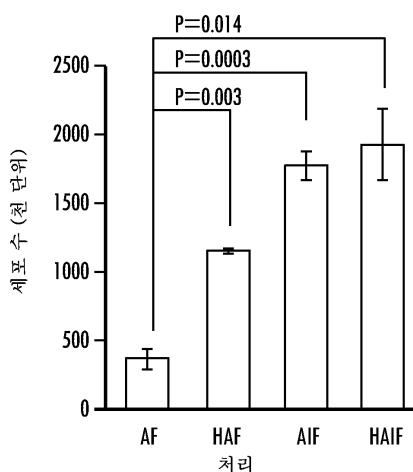
도면6b



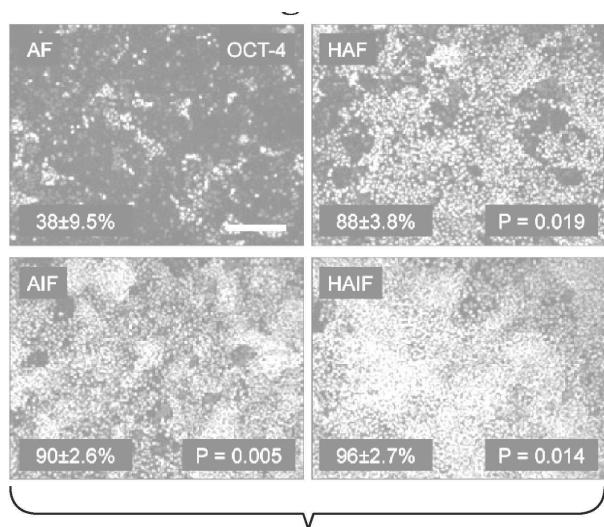
도면6c



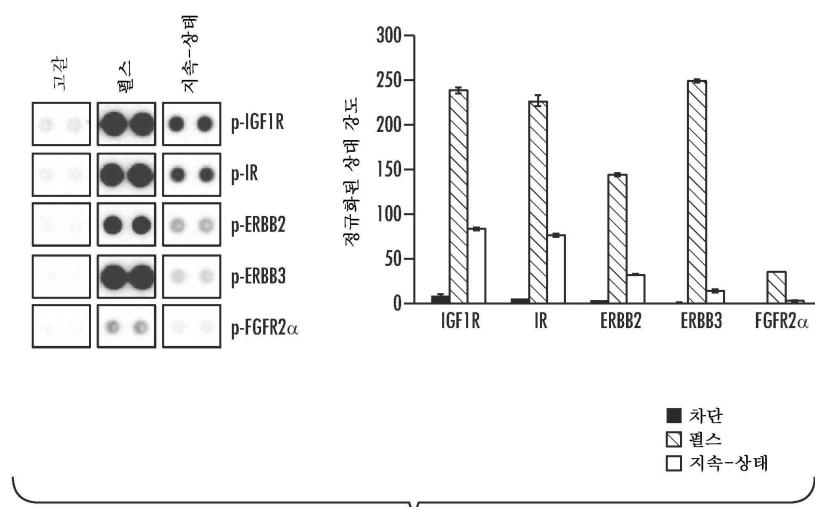
도면6d



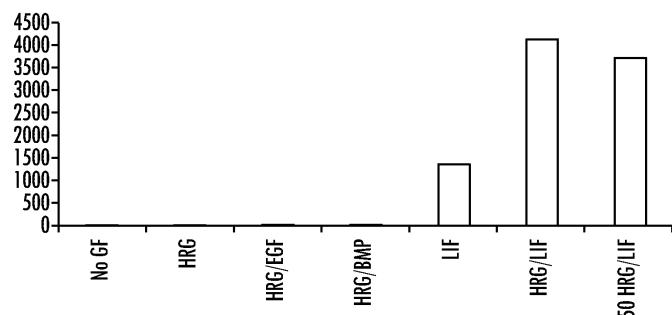
도면6e



도면6f



도면7a



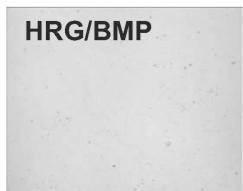
도면7b



도면7c



도면7d



도면7e



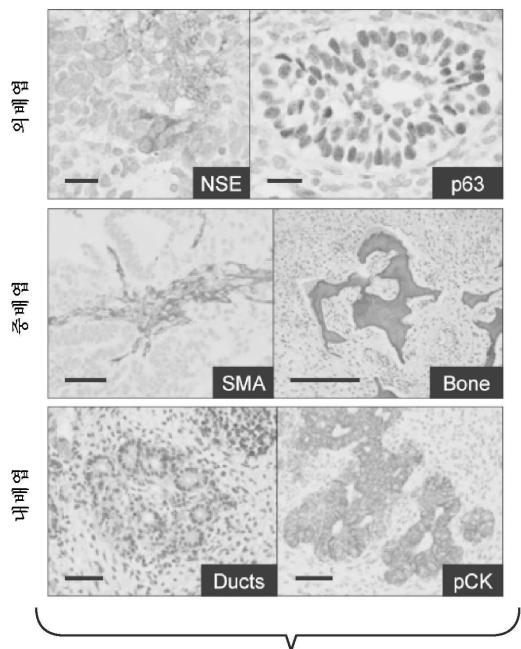
도면7f



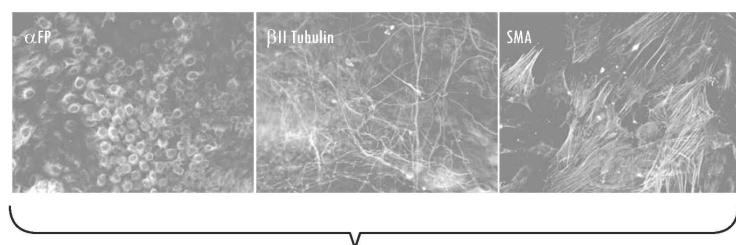
도면7g



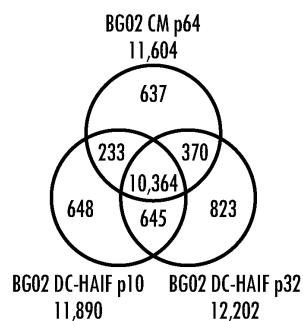
도면8a



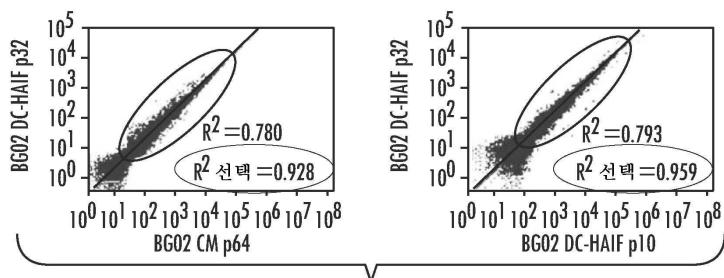
도면8b



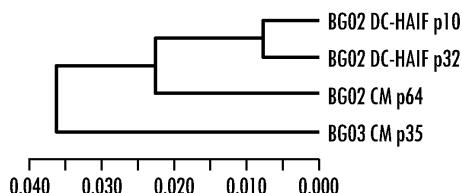
도면8c



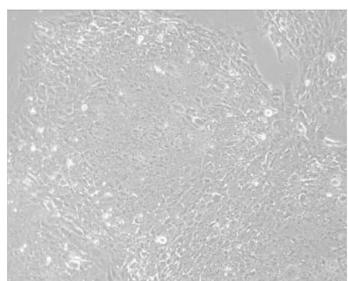
도면8d



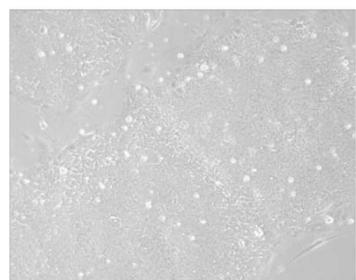
도면8e



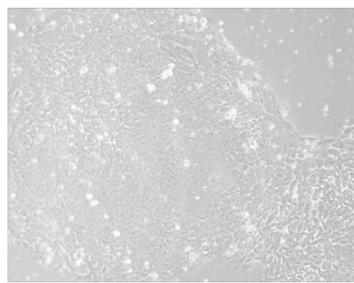
도면9a



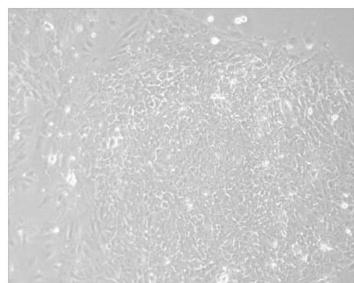
도면9b



도면9c



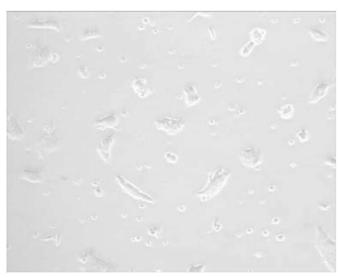
도면9d



도면10a



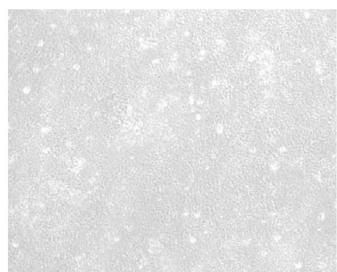
도면10b



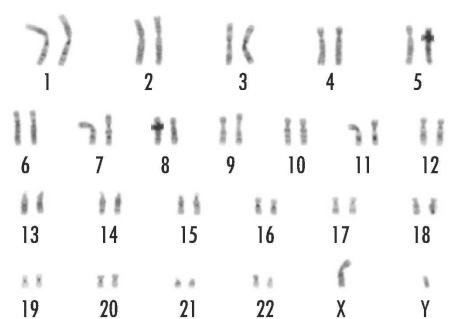
도면10c



도면10d



도면10e



도면11a



도면11b



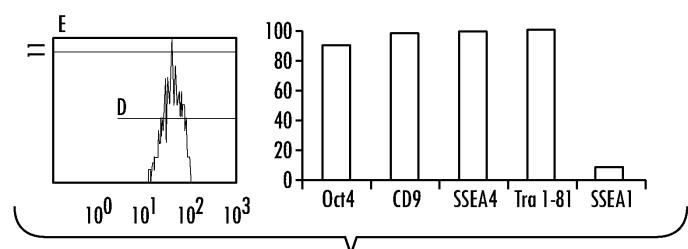
도면11c



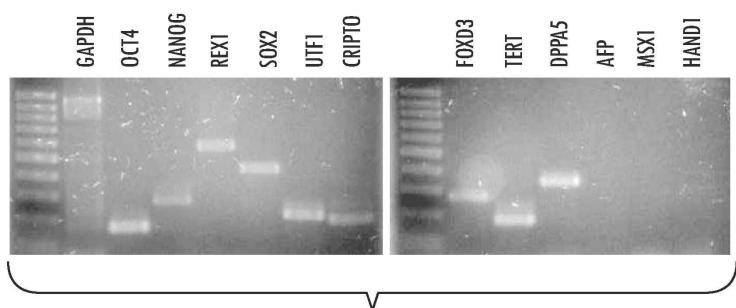
도면11d



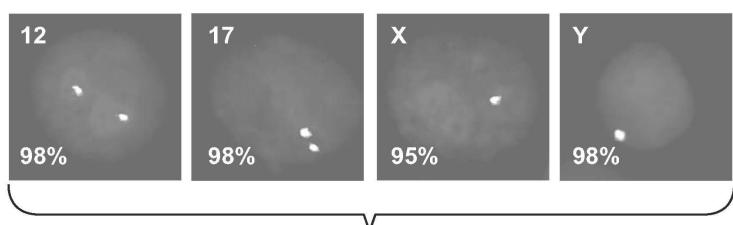
도면12a



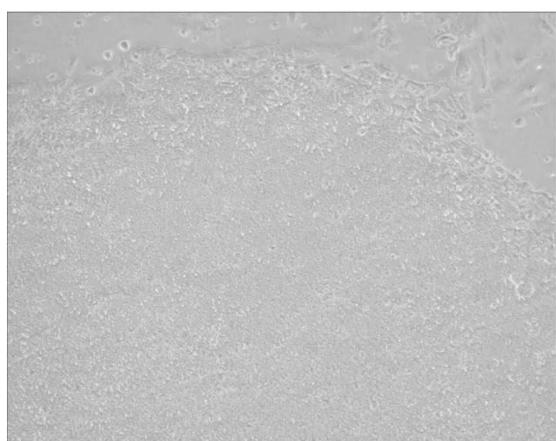
도면12b



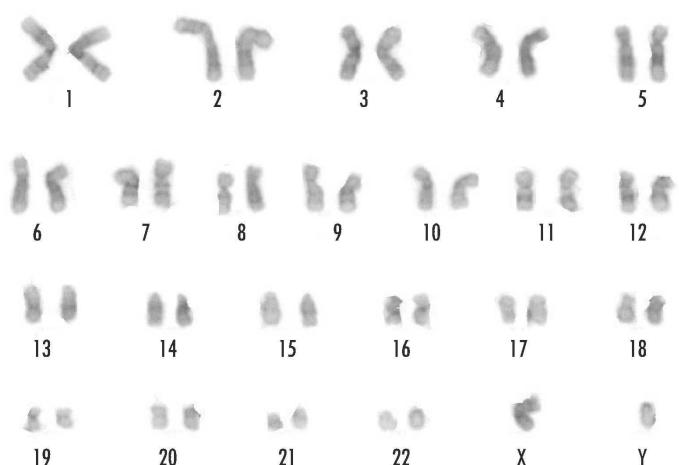
도면12c



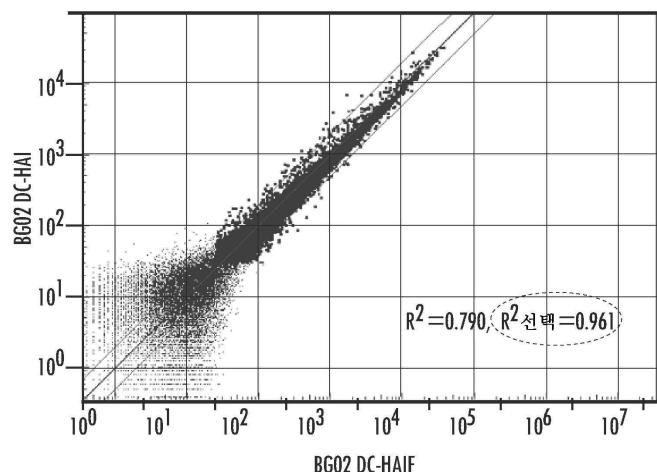
도면13a



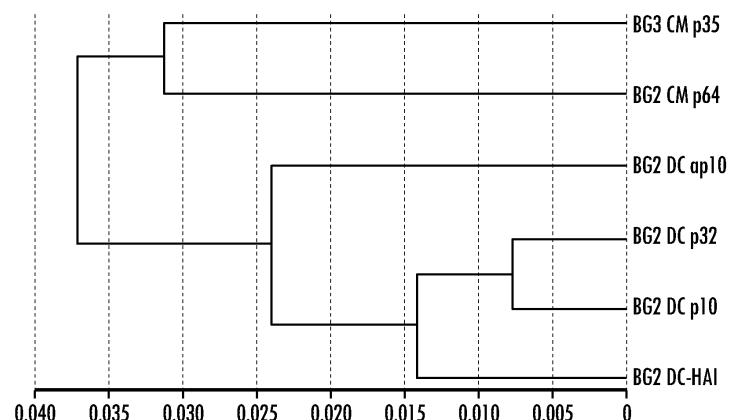
도면13b



도면14



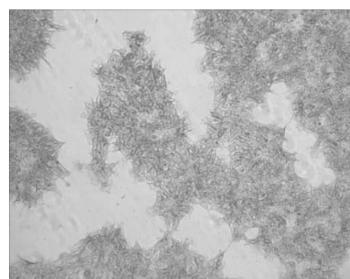
도면15



도면16a



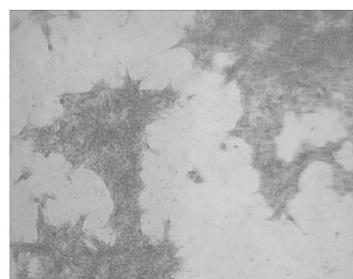
도면16b



도면16c

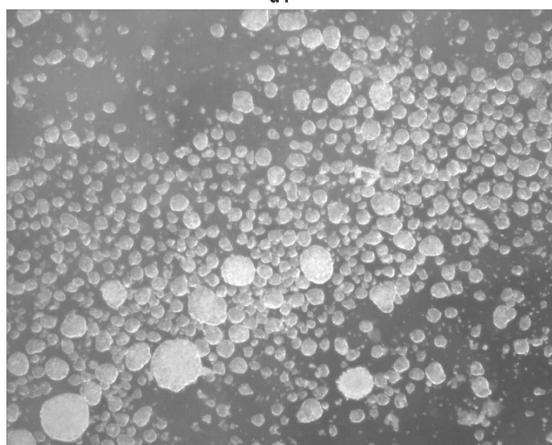


도면16d

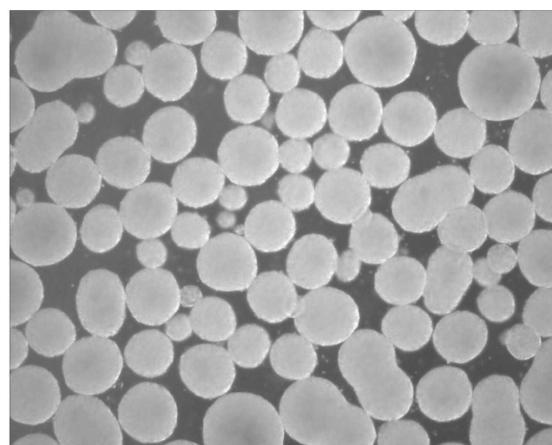


도면17

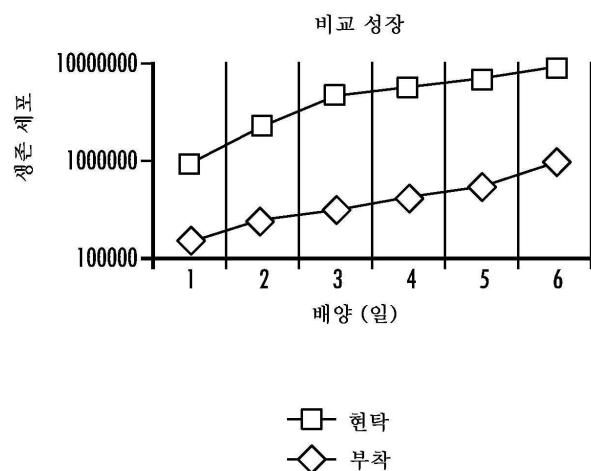
d1



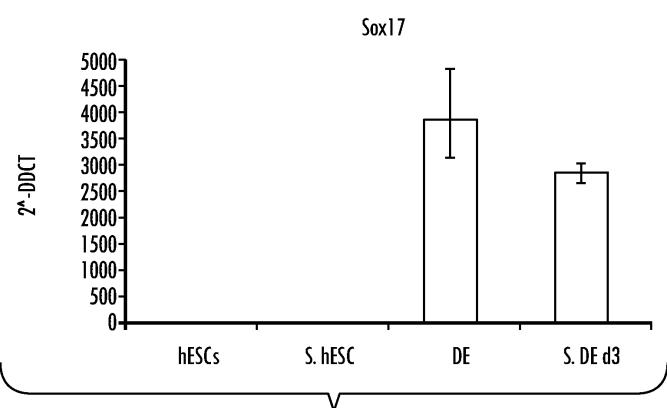
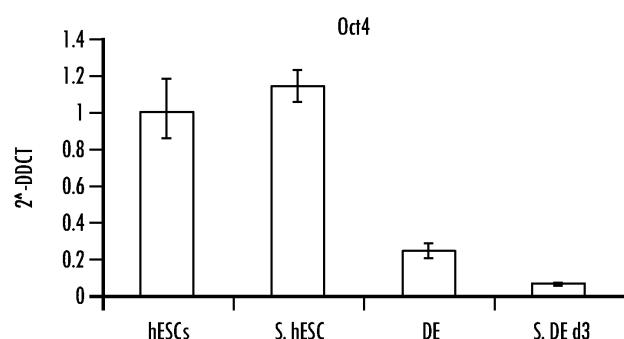
d6



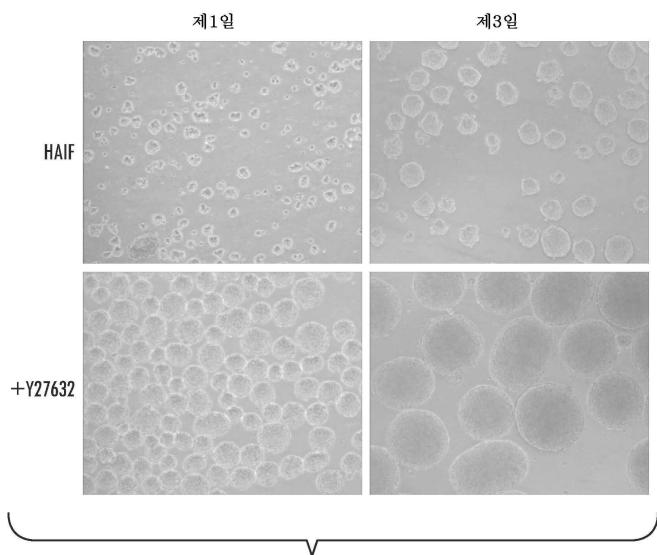
도면18



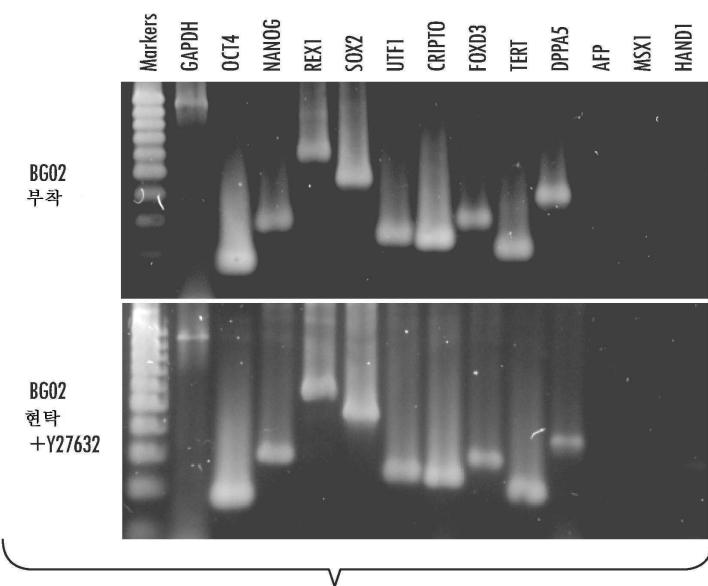
도면19



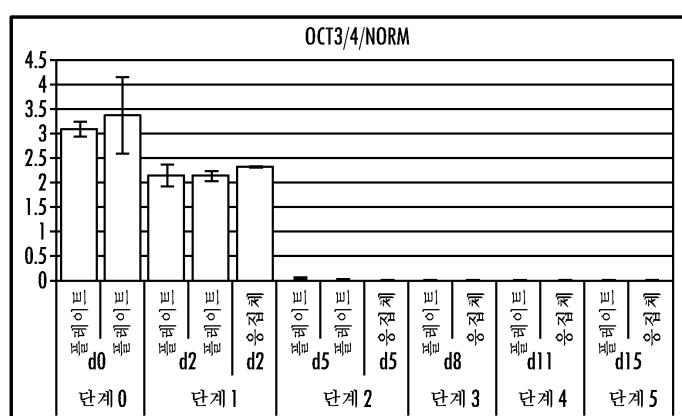
도면20



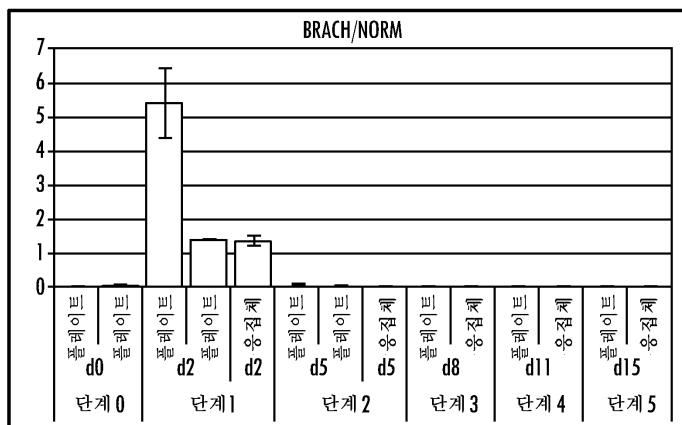
도면21



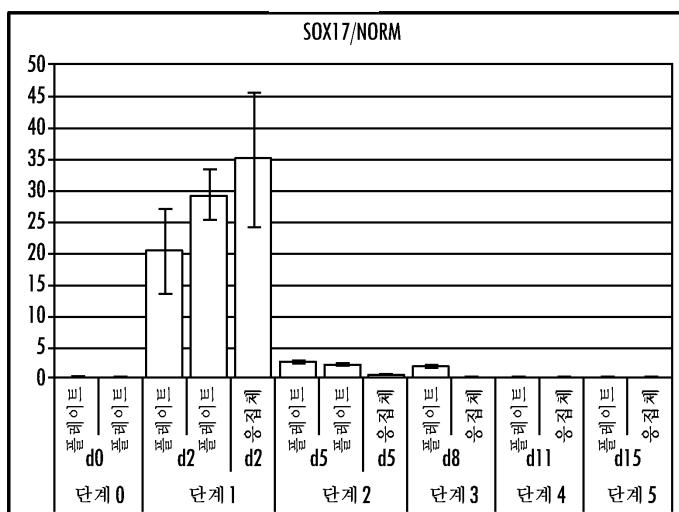
도면22a



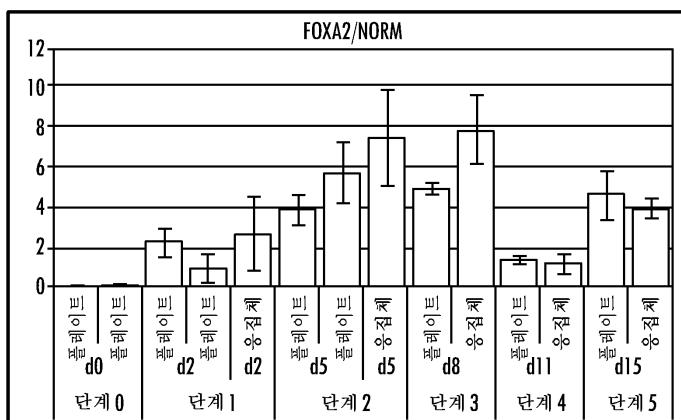
도면22b



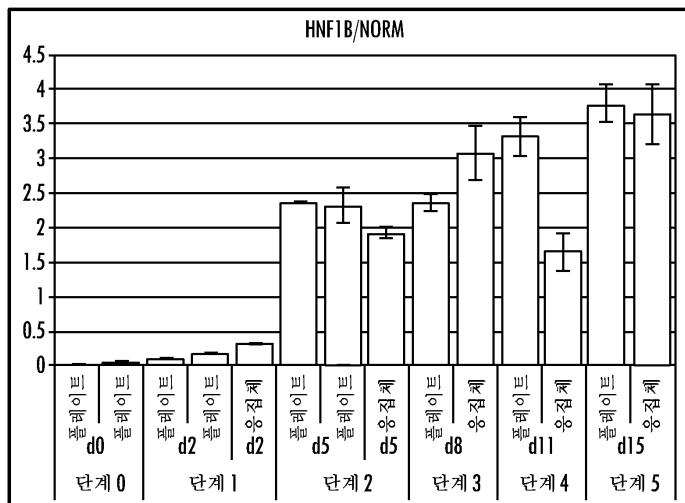
도면22c



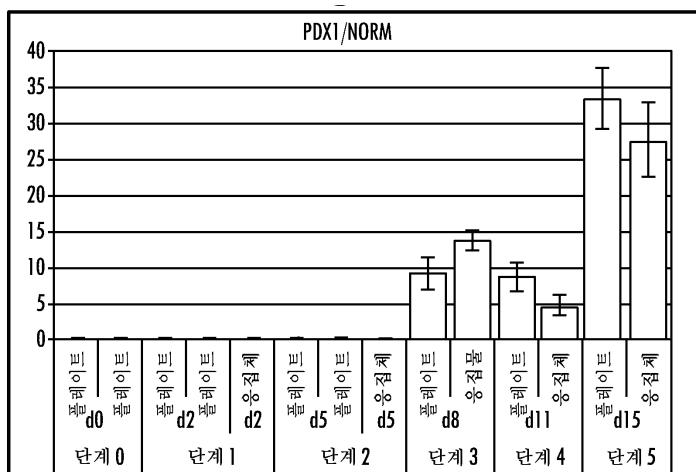
도면22d



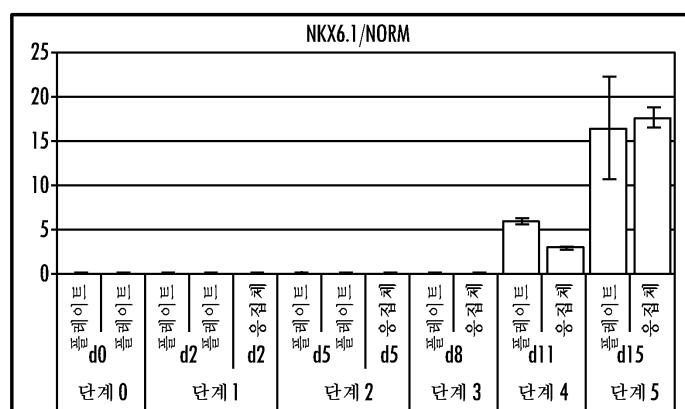
도면22e



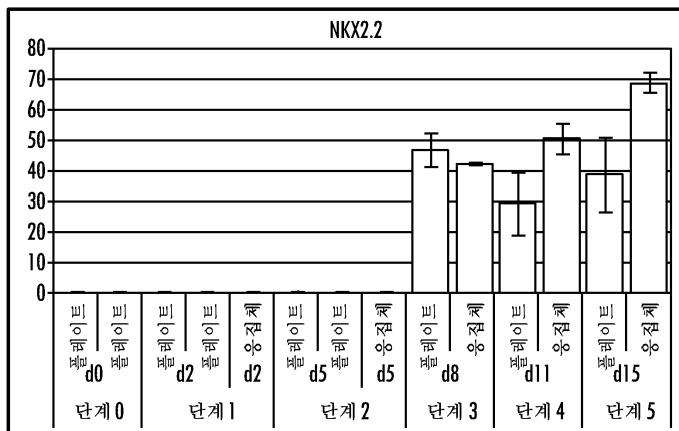
도면22f



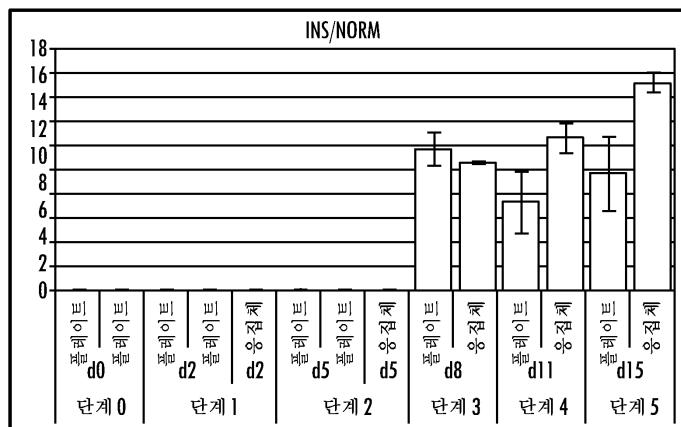
도면22g



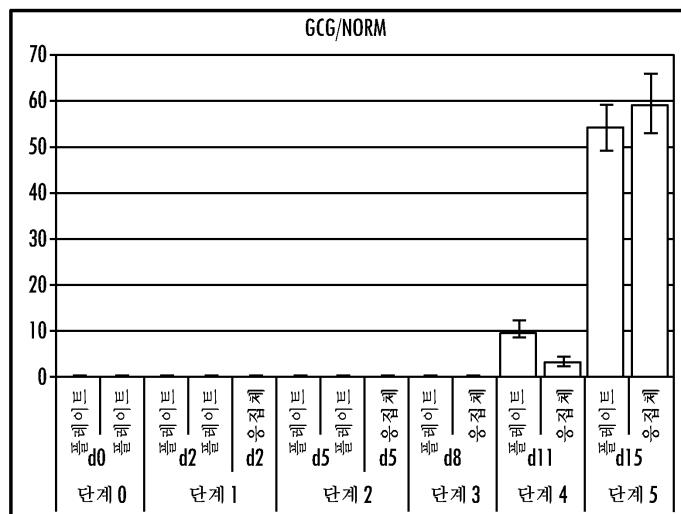
도면22h



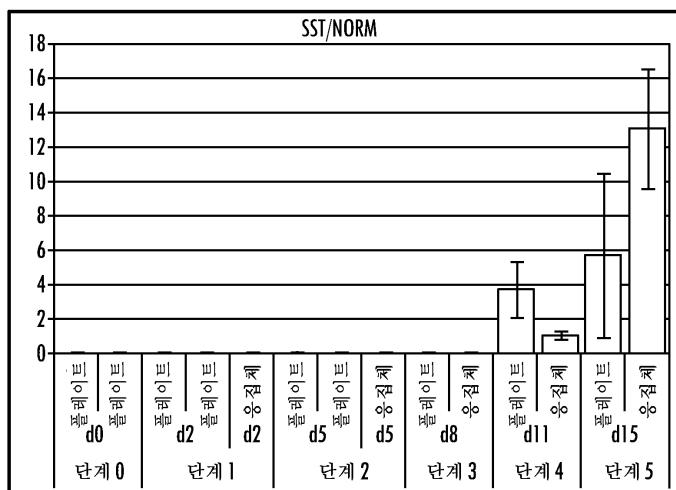
도면22i



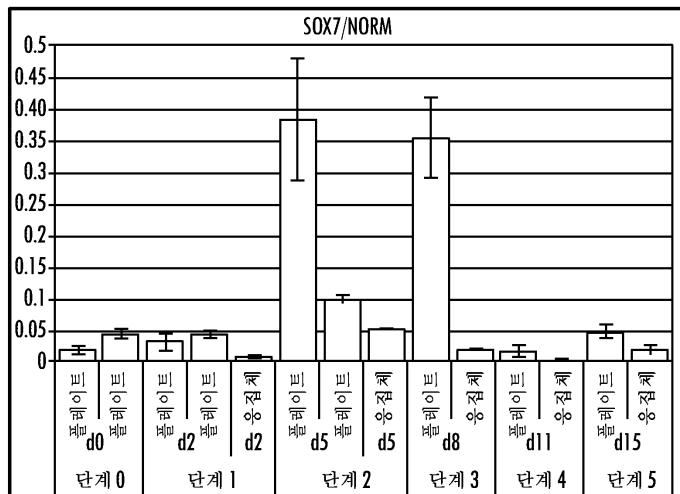
도면22j



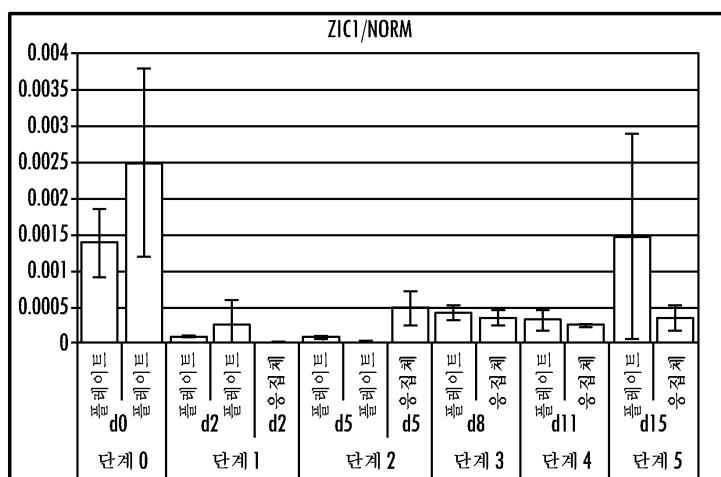
도면22k



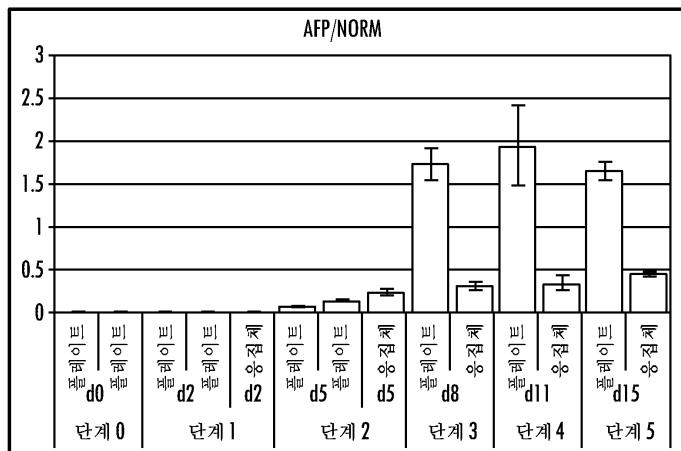
도면22l



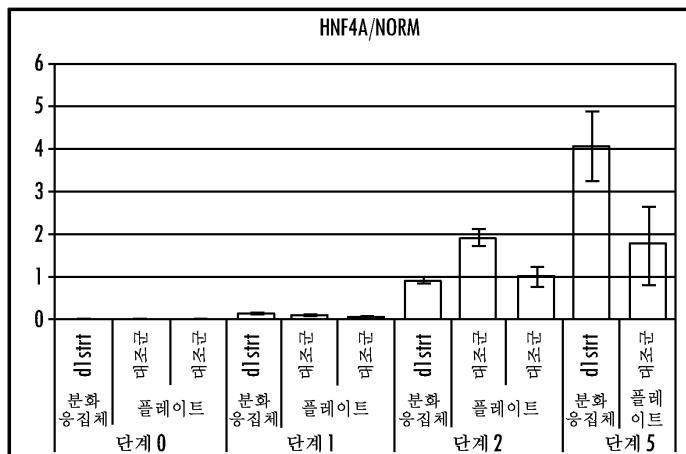
도면22m



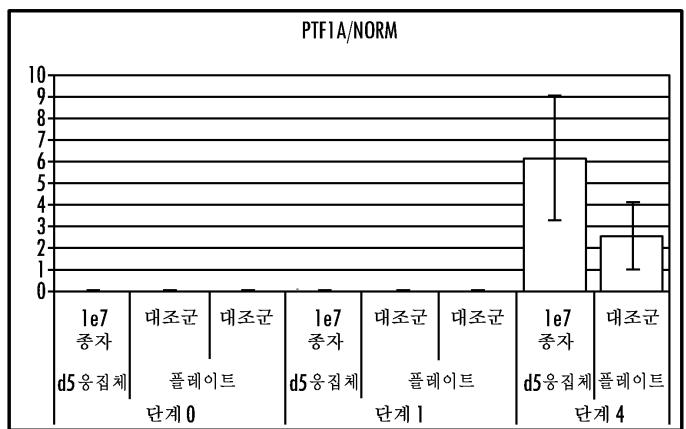
도면22n



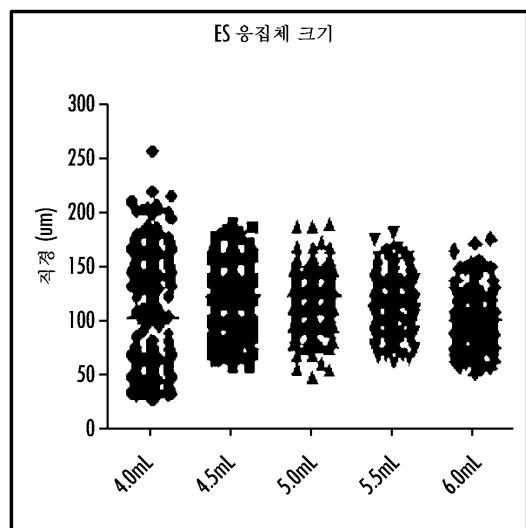
도면22o



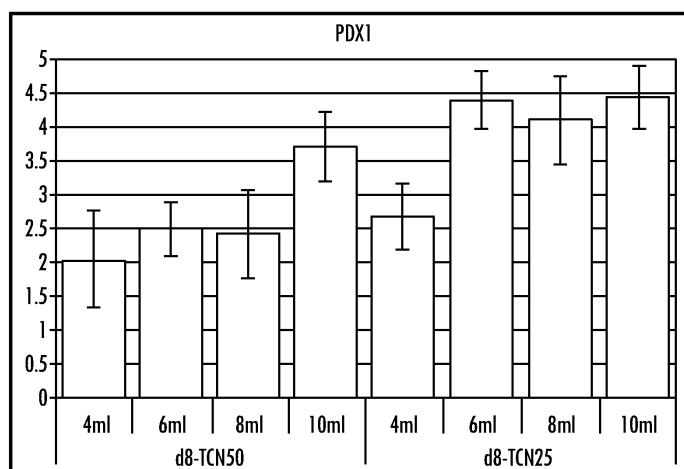
도면22p



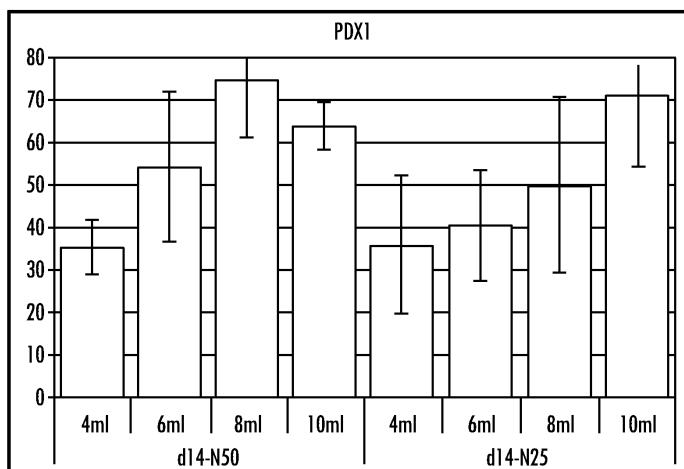
도면23



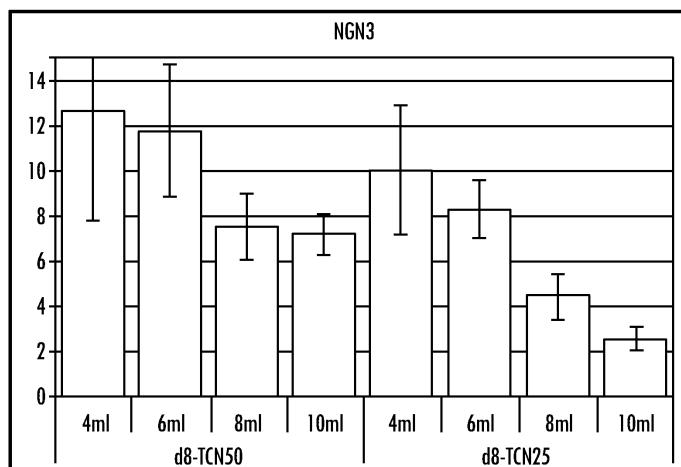
도면24a



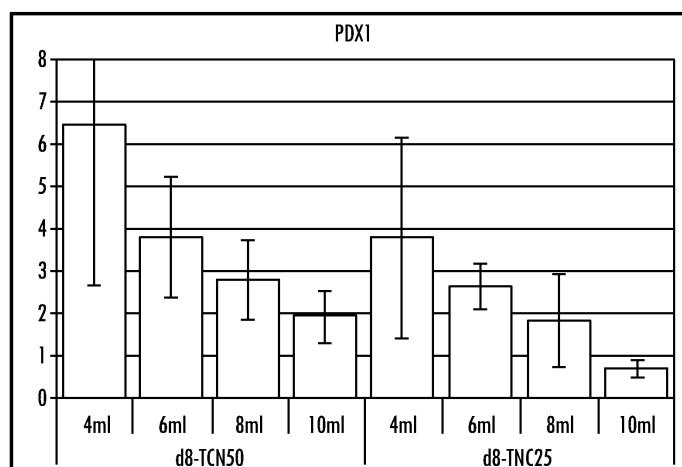
도면24b



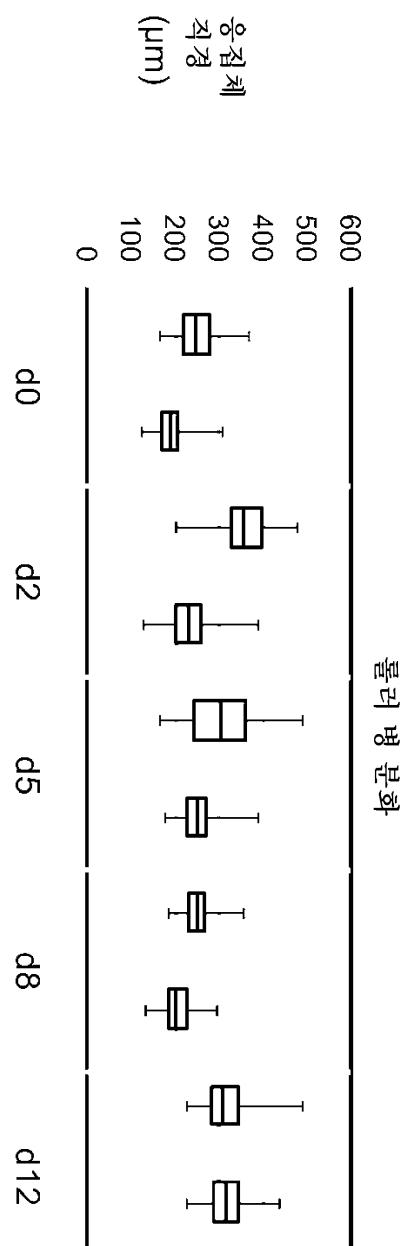
도면24c



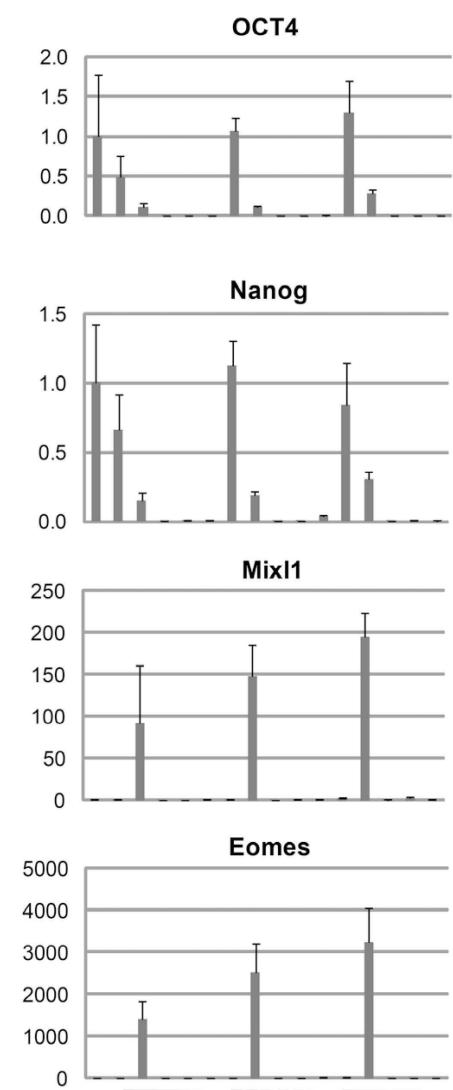
도면24d



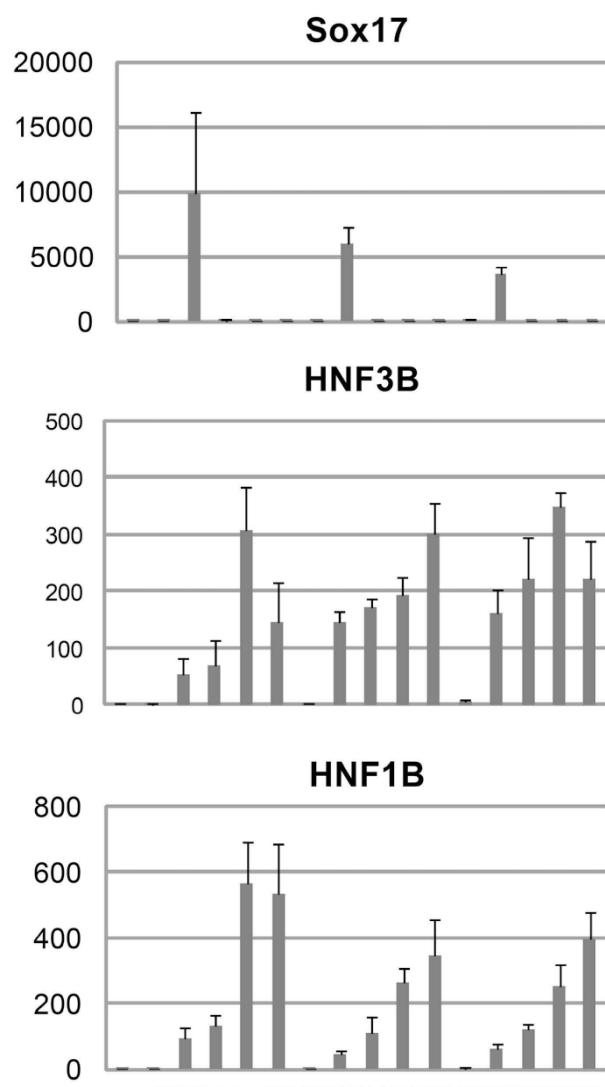
도면25



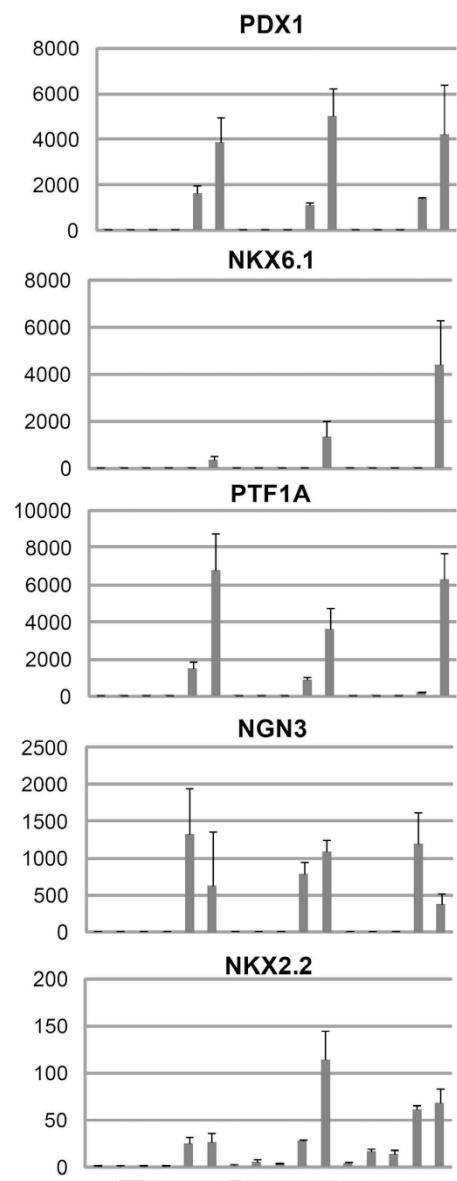
도면26a



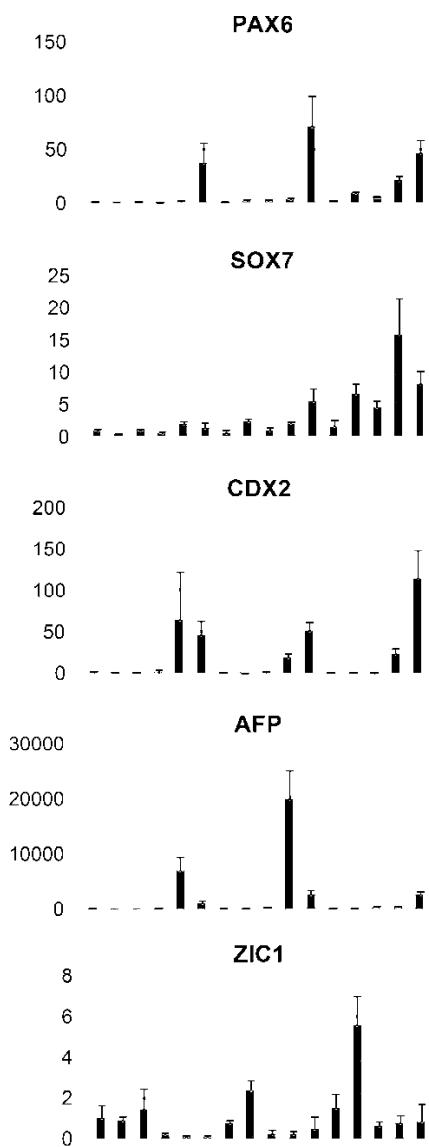
도면26b



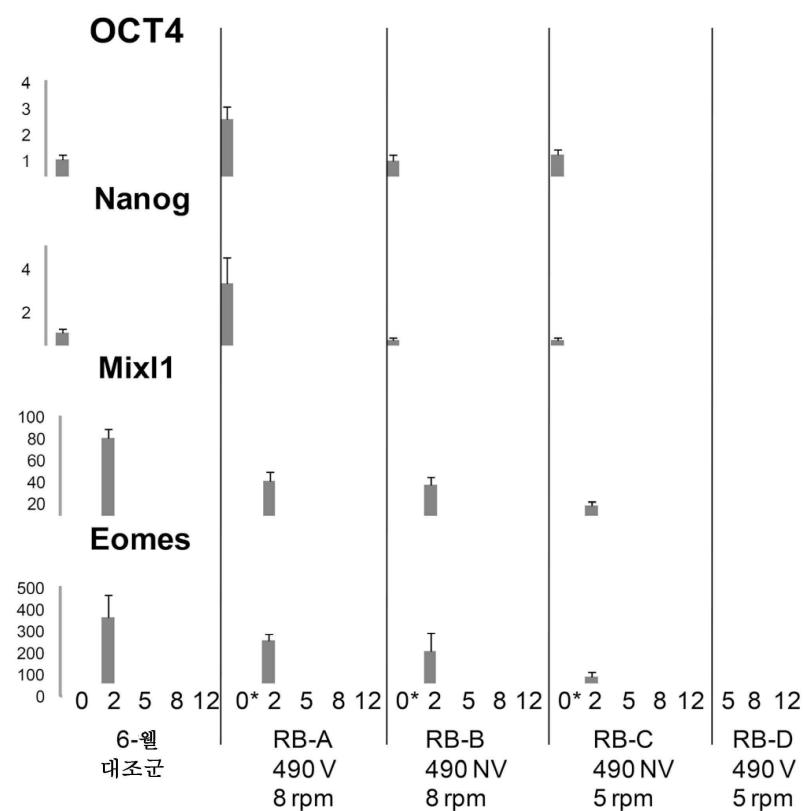
도면26c



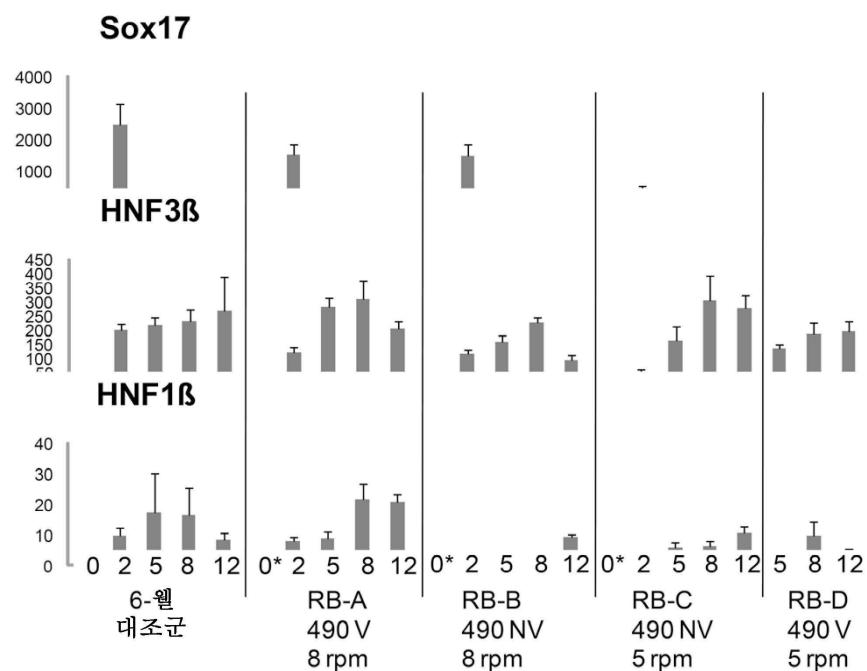
도면26d



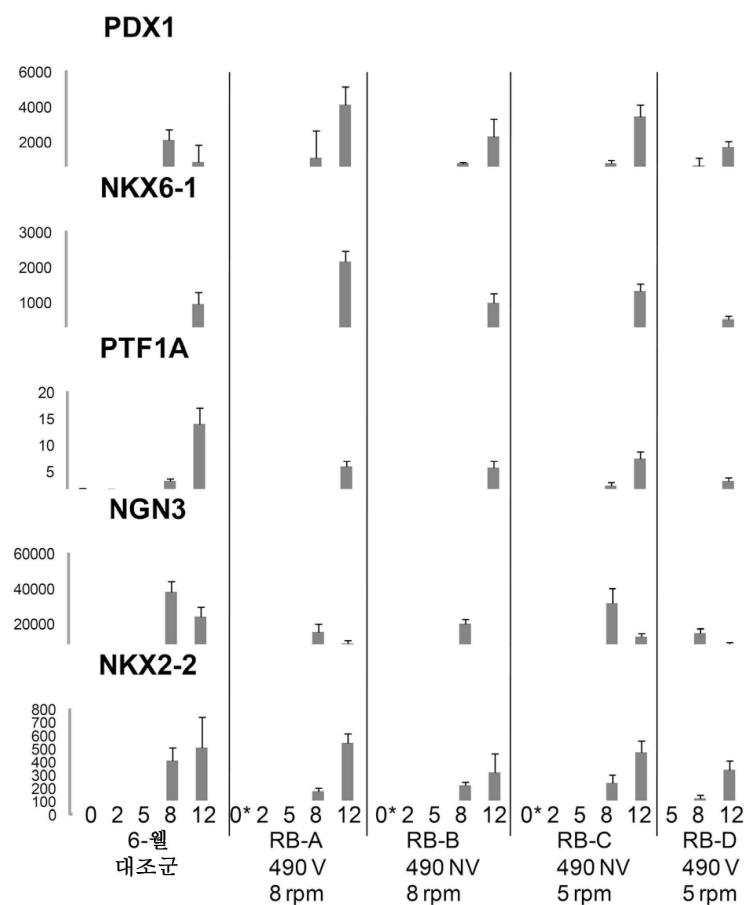
도면27a



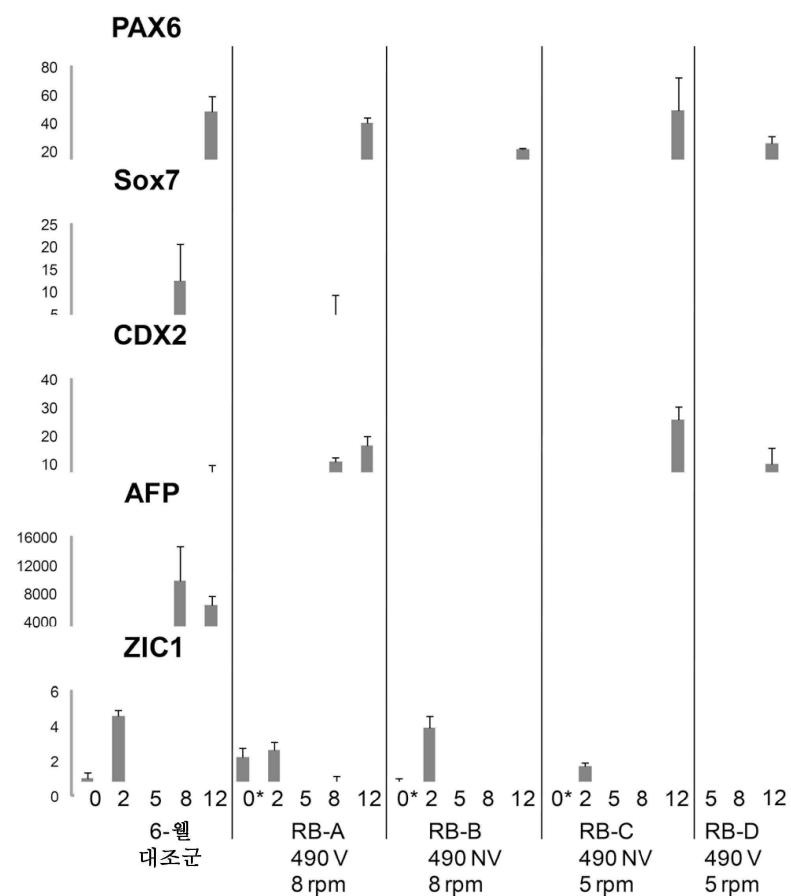
도면27b



도면27c



도면27d



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

Tra-1-80

【변경후】

Tra-1-81

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 4

【변경전】

Tra-1-80

【변경후】

Tra-1-81