(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월01일
(11) 등록번호 10-2679619
(24) 등록일자 2024년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) *A61K 35/30* (2015.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7003399(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년06월01일
심사청구일자 2022년02월25일
(85) 번역문제출일자 2022년01월28일
(65) 공개번호 10-2022-0020416
(43) 공개일자 2022년02월18일
(62) 원출원 특허 10-2017-7037050
원출원일자(국제) 2016년06월01일
심사청구일자 2021년06월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/035312
(87) 국제공개번호 WO 2016/196661
국제공개일자 2016년12월08일
(30) 우선권주장
62/169,379 2015년06월01일 미국(US)
62/169,444 2015년06월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2014110790 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
(72) 발명자
스튜더 로렌즈
미국 뉴욕주 10065 뉴욕 이. 68번 스트리트 415
이리온 스테판
미국 뉴욕주 10023 뉴욕 웨스트 70번 스트리트 24
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태평양

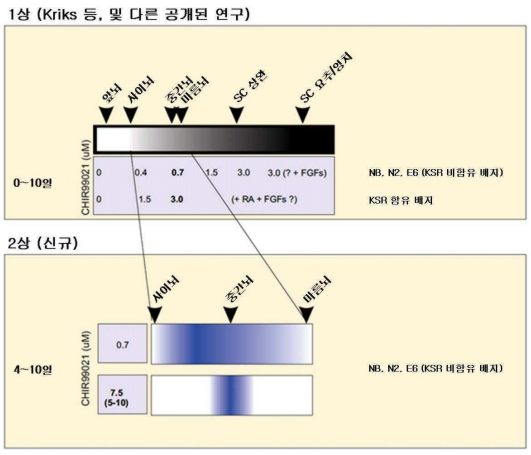
전체 청구항 수 : 총 28 항 심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **중간뇌 도파민(MDA) 뉴런의 시험관내 분화 방법**

(57) 요 약

본원에 개시된 요지는 인간 줄기 세포의 중간뇌 도파민 뉴런, 및 이의 전구체로의 시험관내 분화 유도 방법, 및 이러한 방법에 의해 생성되는 세포를 제공한다. 본원에 개시된 요지는 또한 신경변성 장애의 치료를 위한 이러한 세포의 용도를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
C12N 2501/13 (2013.01)
C12N 2501/15 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/41 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2506/02 (2013.01)

(72) 발명자
도미시마 마크
미국 뉴저지주 07928 채텀 우드랜드 로드 54
크릭스 손자
미국 캘리포니아주 94102 샌프란시스코 아파트 1625 마켓 스트리트 1390

(56) 선행기술조사문헌
JP2014532440 A*
KR101696874 B1
KR1020150015294 A
KR1020150015294 A
WO2013067362 A1
WO2015020234 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

Forkhead box 단백질 A2(FOXA2) 및 LIM 호메오박스 전사 인자 1 알파(LMX1A)을 발현하는 세포를 포함하는 제2 세포 모집단으로부터 유래되는 시험관내 분화된 중뇌 도파민 뉴런의 제1 세포 모집단으로서,

상기 제2 세포 모집단은 다능 줄기 세포를 Small Mothers Against Decapentaplegic(SMAD) 신호전달의 적어도 하나의 억제제, Sonic hedgehog(SHH) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제 및 wingless(Wnt) 신호전달의 적어도 하나의 활성화제에 노출시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득되고;

상기 세포와 접촉되는 상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 (a) 상기 세포와 상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 접촉으로부터 2일 및 6일 사이에 증가되고, (b) 상기 세포와 접촉되는 상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도의 250% 내지 1800%만큼 증가되며;

상기 제1 세포 모집단 내의 최대 1%의 세포는 paired box 단백질 6(PAX6)을 검출가능한 수준으로 발현하고; 및

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도는 0.1 μM 내지 1 μM인 제1 세포 모집단.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 시험관내 분화된 중뇌 도파민 뉴런은 티로신 하이드록실라제(TH), engrailed-1(EN-1), 및 nuclear receptor related-1 단백질(NURR1) 중 하나 이상을 검출가능한 수준으로 발현하는 제1 세포 모집단.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 시험관내 분화된 중뇌 도파민 뉴런은 Ki67을 검출가능한 수준으로 발현하지 않는 제1 세포 모집단.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 제1 세포 모집단 또는 상기 제2 세포 모집단은 폴리시알릴트랜스퍼라제(PST)를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드로 형질감염되고 상기 PST를 발현하거나, 상기 제1 세포 모집단 또는 상기 제2 세포 모집단은 외인성 PST와 접촉되는 제1 세포 모집단.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도는 상기 세포와 상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 접촉으로부터 4일차에 증가되는 제1 세포 모집단.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도 증가는 상기 세포와 접촉되는 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 최초 농도의 400% 내지 1450%인 제1 세포 모집단.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도 증가는 상기 세포와 접촉되는 Wnt 신호전달의 적어도 하나

의 활성화제의 최초 농도의 700% 내지 1050%인 제1 세포 모집단.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도 증가는 3 μM 및 10 μM 사이의 농도로의 증가인 제1 세포 모집단.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도 증가는 3 μM의 농도로의 증가인 제1 세포 모집단.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제의 농도 증가는 7.5μM의 농도로의 증가인 제1 세포 모집단.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

상기 다능 줄기 세포는 인간 비배아 줄기 세포, 비인간 영장류 비배아 줄기 세포, 설치류 비배아 줄기 세포, 인간 배아 줄기 세포, 비인간 영장류 배아 줄기 세포, 설치류 배아 줄기 세포, 인간 유도된 다능 줄기 세포, 비인간 영장류 유도된 다능 줄기 세포, 설치류 유도된 다능 줄기 세포, 인간 재조합 다능 세포, 비인간 영장류 재조합 다능 세포, 및 설치류 재조합 다능 세포로부터 선택되는 제1 세포 모집단.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

상기 SMAD 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 적어도 하나의 억제제, BMP의 억제제, 또는 이들의 조합을 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 13

청구항 12에 있어서,

상기 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 적어도 하나의 억제제는 TGFβ 수용체의 억제제를 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 TGFβ 수용체의 억제제는 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]벤즈아마이드(SB431542)를 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 15

청구항 12에 있어서,

상기 BMP의 적어도 하나의 억제제는 4-(6-(4-(피페라진-1-일)페닐)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)퀴놀린(LDN193189), Noggin, 또는 이들의 조합을 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 16

청구항 1에 있어서,

상기 SHH 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 SHH 단백질, Smoothened 작용제, 또는 이들의 조합을 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

상기 SHH 단백질은 재조합 SHH, 정제된 SHH, 또는 이들의 조합을 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 재조합 SHH는 SHH C25II를 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 Smoothened 작용제는 푸르모르파민을 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 20

청구항 1에 있어서,

상기 Wnt 신호전달의 적어도 하나의 활성화제는 CHIR99021, Wnt3A, Wnt1, 또는 이들의 조합을 포함하는 제1 세포 모집단.

청구항 21

청구항 1 내지 청구항 20 중 어느 한 항의 제1 세포 모집단을 포함하는 조성물.

청구항 22

청구항 21에 있어서,

생체적합성 스캐폴드 또는 매트릭스를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 23

청구항 22에 있어서,

상기 생체적합성 스캐폴드는 상기 세포가 대상체에 임플란트되거나 이식될 때 조직 재생을 촉진하는 생체적합성 3차원 스캐폴드인 조성물.

청구항 24

신경변성 장애의 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는데 사용하기 위한 청구항 21의 조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서,

상기 신경변성 장애는 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 및 다발성 경화증으로부터 선택되는 조성물.

청구항 26

청구항 25에 있어서,

상기 신경변성 장애는 파킨슨 질환인 조성물.

청구항 27

청구항 24에 있어서,

상기 조성물은 상기 대상체의 기관 내로 직접 주사되는 조성물.

청구항 28

청구항 24에 있어서,

상기 조성물은 상기 대상체의 선조체 내로 직접 주사되는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 그 각각에 대해 우선권이 청구되고 그 각각의 내용이 본원에서 이의 전문이 참조로 포함되는 2015년 6월 1일에 출원된 U.S. 가출원 번호 62/169,379, 및 2015년 6월 1일에 출원된 U.S. 가출원 번호 62/169,444에 대해 우선권을 청구한다.

[0003] **1. 도입**

[0004] 본원에 개시된 요지는 인간 줄기 세포로부터 유도되는 중간뇌 도파민(DA) 뉴런, 및 이의 전구체, 그리고 신경학적 장애의 세포-기반 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] **2. 발명의 배경**

[0006] 이전에, 배아 및 신체 줄기 세포는 신경변성 질환을 위한 치료제 및 모델 시스템으로 이용되었다. 배아 및 신체 줄기 세포의 유도된 분화에 관한 연구 및 기술 개발은 중추 신경계(CNS) 질환, 예컨대 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 및 다발성 경화증 분야에서 일어났다. 그러나 이러한 연구 결과는 생체내 뉴런 기능 회복능을 거의 나타내지 못했고 종종 환자에서 원치 않는 종양 성장을 일으켰다.

[0007] 따라서, 신경변성 장애, 예컨대 파킨슨 질환의 치료에서 이용될 뉴런 전구 세포를 분화시키기 위한 조성물 및 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0008] **3. 발명의 요약**

[0009] 본원에 개시된 요지는 적어도 부분적으로 시험관내 분화에 의해 인간 줄기 세포로부터 유도된, 중간뇌 도파민(DA) 뉴런(mDA), 및 이의 전구체에 관한 것이다.

[0010] 본원에 개시된 요지는 중간뇌 도파민(DA) 뉴런, 및 이의 전구체가 Sonic Hedgehog(SHH) 신호전달의 활성화, 및 wingless(Wnt) 신호전달의 활성화와 함께, SMAD 신호전달의 이중 억제에 의해(예를 들어, TGFβ/Activin(Activin)-Nodal 신호전달 및 BMP 신호전달의 억제에 의해) 인간 줄기 세포로부터 분화될 수 있다는 발견에 관한 것이며, 여기서 Wnt 활성화 화합물의 농도는 SMAD 억제제, SHH 활성화제, 및 Wnt 활성화제에 대한 세포의 최초 접촉 후 약 4일차에 증가된다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 방법은, 예를 들어, 미성숙 전구 세포의 마커, 예를 들어, PAX6의 발현을 감소시키고, 이식 후 기능적 티로신 하이드록실라제 발현 mDA 세포로 분화하는 세포를 제조함으로써 Wnt 활성화 화합물의 증가를 포함하지 않는 중간체 DA 세포로의 줄기 세포 분화 방법에 비해 장점을 제공한다.

[0011] 소정 구현예에서, 세포는 DA 뉴런 계통 활성화제 및 억제제, 예를 들어, 뇌-유래 신경영양 인자(BDNF), 아교 세포-유래 신경영양 인자(GDNF), 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 전환 성장 인자 베타(TGFβ, 예를 들어, TGFβ3), 아스코르브산(AA), 및 DAPT(또한, N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-알라닐-2-페닐]글리신-1,1-디메틸에틸 에스테르; LY-374973, N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르; 또는 N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르로 알려져 있음)와 추가 접촉된다.

[0012] 소정 구현예에서, 본원에 개시된 요지는 모집단 또는 복수의 인간 줄기 세포를 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제(즉, 제1 SMAD 억제제), BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제(즉, 제2 SMAD 억제제), wingless(Wnt) 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 Sonic Hedgehog(SHH) 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함하는 인간 줄기 세포의 중간뇌 DA 전구체로의 시험관내 분화 유도 방법을 제공한다. 소

정 구현예에서, 억제제 및 활성화제는 세포에 동시에 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달 활성화제의 농도는 세포가 Wnt 활성화제와 최초 접촉된 후 적어도 약 2, 3, 4, 5 또는 6일차에 증가된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상 동안 증가된 농도의 Wnt 활성화제와 접촉된다.

[0013] 소정 구현예에서, 세포는 중간뇌 DA 뉴런, 또는 이의 전구체의 하나 이상의 마커, 예를 들어, 비제한적으로 engrailed-1(EN-1), orthodenticle 호메오박스 2(OTX2), 티로신 하이드록실라제(TH), nuclear receptor related-1 단백질(NURR1), forkhead box 단백질 A2(FOXA2), 및 LIM 호메오박스 전사 인자 1 알파(LMX1A)의 검출가능한 발현 수준을 증가시키는 데 효과적인 양의 상기 제제와 접촉된다.

[0014] 소정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 뉴런-특이적 클래스 III 베타-튜불린(Tuj1), Trefoil 인자 패밀리 3(TTF3), paired-like 호메오도메인 3(PITX3), achaete-scute 복합체(ASCL), 초기 B-세포 인자 1(EBF-1), 초기 B-세포 인자 3(EBF-3), 트랜스타이레틴(TTR), 시냅신, 도파민 트랜스포터(DAT), 및 G-단백질 커플링된, 내향 정류 칼륨 채널(Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 및/또는 CD99의 검출가능한 발현 수준을 증가시키는 데 효과적인 양의 상기 제제와 접촉된다.

[0015] 본 개시는 또한 본원에 기재된 방법에 따라 제조되는, 중간뇌 DA 세포, 또는 이의 전구체의 하나 이상의 마커를 발현하는 시험관내 분화된 세포 모집단을 제공한다. 소정 구현예에서, 분화된 세포 모집단은 인간 줄기 세포 모집단으로부터 유도된다. 본원에 개시된 요지는 추가로 이러한 분화된 세포 모집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0016] 소정 구현예에서, 세포는 paired box 단백질(PAX6) 및/또는 Ki67의 검출가능한 발현 수준을 감소시키는 데 효과적인 양의 상기 제제와 배양된다. 소정 구현예에서, 세포는 검출가능한 수준의 PAX6 및/또는 Ki67을 발현하지 않는다.

[0017] 소정 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 제조되는 세포는, 예를 들어 유세포 측정을 이용하여, CD142 발현, 및/또는 콜린성 수용체(CHRNB3) 발현에 기반하여 정렬되고, 선택되고, 단리될 수 있다.

[0018] 소정 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 제조되는 세포는 추가로 폴리시알릴트랜스퍼라제, 예를 들어, 박테리아 폴리시알릴트랜스퍼라제, 예컨대 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 폴리시알릴트랜스퍼라제(PST_{Nm})와 접촉될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포는 재조합 폴리시알릴트랜스퍼라제를 발현하는 재조합 세포이다.

[0019] 추가로, 본원에 개시된 요지는 줄기 세포의 분화 유도 키트를 제공한다.

[0020] 소정 구현예에서, 키트는 (a) 전환 성장 인자 베타(TGFβ)/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제(즉, 제1 SMD 억제제), (b) 뼈 형태형성 단백질(BMP) 신호전달의 하나 이상의 억제제(즉, 제2 SMAD 억제제), (c) wingless(Wnt) 신호전달의 하나 이상의 활성화제, (d) Sonic Hedgehog(SHH) 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 (e) 중간뇌 DA 뉴런, 또는 이의 전구체의 하나 이상의 마커를 발현하는 분화된 세포 모집단으로의 줄기 세포 분화를 유도하기 위한 지침을 포함한다.

[0021] 소정 구현예에서, 본 개시는 본원에 기재된 방법에 따라 제조되는 줄기 세포-유래 전구체를 포함하는 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포-유래 세포는 성숙한 분화된 세포, 예를 들어, 중간뇌 DA 세포이다.

[0022] 소정 구현예에서, 상기 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 상기 BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, 상기 Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3β)를 저하시킨다. 소정 구현예에서, 상기 Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 CHIR99021, WNT3A, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 소분자이다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 활성화제는 재조합 SHH, 정제된 SHH, C25II, 및 smoothened(SMO) 수용체 작용제, 예컨대 소분자 푸르모르파민, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0023] 소정 구현예에서, 상기 인간 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포, 인간 유도 다능 줄기 세포, 인간 단성생식 줄기 세포, 원시 종자 세포-유사 다능 줄기 세포, 배아덩이위판 줄기 세포, 및 F-클래스 다능 줄기 세포로 구성되는 군으로부터 선택된다. 인간 유도 다능 줄기 세포(iPSC)는 더 분화된 세포, 예를 들어, 배아 유전자(예컨대 비제한적으로 OCT4, SOX2, cMyc, 및 KLF4 트랜스유전자)의 체세포(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Takahashi and Yamanaka, Cell 126, 663-676 (2006)] 참고) 내로의 도입에 의해 형성되는 분화된 체세포로부

터 제조된 세포이다.

[0024] 소정 구현예에서, 방법은 추가로 상기 분화된 세포 모집단으로 중간뇌 DA 뉴런의 모집단으로의 상기 분화된 세포의 성숙을 선호하는 조건을 거치는 단계를 포함한다.

[0025] 본원에 개시된 요지는 추가로 대상체에서 신경변성 장애, 예를 들어, 파킨슨 질환의 치료 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 방법은 신경변성 장애를 앓는 대상체 내로 본원에 기재된 분화된 세포 모집단의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0026] 본원에 개시된 요지는 추가로 신경변성 장애를 치료하기 위한 본원에 기재된 분화된 세포 모집단을 제공한다.

[0027] 본원에 개시된 요지는 추가로 신경변성 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서 본원에 기재된 분화된 세포 모집단의 용도를 제공한다.

[0028] 상기 내용은 후술되는 상세한 설명이 더 잘 이해될 수 있도록 하기 위해 본 출원의 특징 및 기술적 장점을 다소 광범위하게 개략하였다. 출원의 청구범위의 주제를 형성하는 본 출원의 추가 특징 및 장점이 이후 기재될 것이다. 당분야 숙련가에게는 개시된 개념 및 구체적 구현예가 본 출원의 동일한 목적을 수행하기 위해 다른 구조를 변형하거나 설계하기 위한 기반으로 쉽게 이용될 수 있음이 이해될 것이다. 또한 당분야 숙련가에게는 이러한 균등한 구성이 첨부되는 청구범위에 나타낸 바와 같은 출원의 정신 및 범위에서 벗어나지 않음이 인식될 것이다. 본 출원의 특징으로 여겨지는 신규한 특징은 그 구성 및 작동 방법 모두에 있어서 추가 목적 및 장점과 함께 하기 기재로부터 더 잘 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0029] **4. 도면의 간략한 설명**

도 1은 Wnt 범프(bump)에서 제조된 중간뇌 DA 뉴런뿐만 아니라 다른 뇌 영역의 뉴런 없이 KSR 배지(비-GMP) 또는 E8/NB/N2 배지(GMP V1) 중 문헌[Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에 기재된 방법에 따른 10일 동안의 hESC의 분화를 나타낸다. D4~D10에 7.5 μM(또는 5~10 μM) Wnt 범프를 이용하는 방법예 1에 따른 E8/NB/N2 배지 중 hESC의 배양은 중간뇌 DA 세포의 제조에 특이적이었다.

도 2는 Wnt 범프 없이 KSR 배지(비-GMP) 또는 E8/NB/N2 배지(GMP V1) 중 문헌[Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에 기재된 방법에 따라 22 내지 27일에 분화된 hESC에서 PAX6, TH, NURR1, FOXA2, 및 LMX1A의 발현을 나타낸다. 세포를 수확하고, 나타낸 유전자에 대해 qRT-PCR에 의해 분석하였다(n=조건 당 3 내지 14). 데이터를 정상화된 cT값으로 나타내며, 수가 적을수록 더 높은 유전자 발현을 시사한다.

도 3은 Wnt 범프 없이 KSR 배지(비-GMP) 또는 E8/NB/N2 배지(GMP V1) 중 문헌[Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에 기재된 방법에 따라, 및 3 μM(GMP V2A) 또는 7.5 μM(GMP V2B) Wnt 범프와 함께 E8/NB/N2 배지 중 hESC를 배양하는 단계를 포함하는, 실시예 1에 기재된 방법에 따라 22 내지 27일에 분화된 hESC에서 PAX6, TH, NURR1, FOXA2, LMX1A, 및 En-1의 발현을 나타낸다. 세포를 수확하고, 나타낸 유전자에 대해 qRT-PCR에 의해 분석하였다(n=조건 당 3 내지 14). 데이터를 정상화된 cT값으로 나타내며, 수가 적을수록 더 높은 유전자 발현을 시사한다. GMP V2A 및 GMP V2B에 따라 배양된 세포는 더 높은 수준의 En-1을 발현하였다.

도 4는 분화된 중간뇌 DA 세포를 확인하기 위해 이용될 수 있는 중간뇌 DA 마커를 나타낸다.

도 5는 E8/매트리겔 조건 하에 유지된 후, Wnt 범프 없이, 0.7 μM Wnt를 함유하는 NB/N2 배지 중 문헌[Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에 의해 기재된 방법에 따라 25일 동안 분화된 hESC가 생체내 증식 영역을 나타냄을 보여준다. 분화 후, 세포를 비손상, 면역약화 마우스 내로 이식하고, 이식편을 4주 후 수확하였다. 인간 NCAM, FOXA2 및 TH에 대해 ICC에 의해 섹션을 분석하였다. FOXA2를 발현하는 다수의 TH+ 세포가 관찰된 반면, 이식편 코어 내에는 hNCAM+ 세포 클러스터도 검출되었다. 이들 패치는 또한 신경 전구 상태를 시사하는, PAX6을 발현하였다.

도 6a~b는 (a) E8/매트리겔 조건 하에 유지된 후 실시예 1에 의해 기재된 GMP V2A(0.7 μM Wnt 배경의 존재 하의 3 μM Wnt 범프) 및 GMP V2B(0.7 μM Wnt 배경의 존재 하의 7.5 μM Wnt 범프) 배양 방법에 따라 NB/N2 배지 중 25일 동안 분화된 hESC가 높은 수준의 EN-1 및 TH를 발현하는 중간뇌 DA 세포의 분화를 유도하였음을 나타낸다. 중간뇌 DA 뉴런을 고정하고 시험관내 TH 및 EN-1(상부 패널) 및 NURR1 및 LMX1A(하부 패널)에 대해 염색하였다. (b) GMP V2B 프로토콜에 따라 분화된 중간뇌 DA 세포를 비손상, 면역약화 마우스의 선조체 내로 이식하였고, 이식 3주 후 증강된 섬유 성장 및 hNCAM 및 TH의 발현을 나타내었다.

도 7은 E8/매트리겔 조건 하에 유지된 후 실시예 1에 의해 기재된 GMP V2B(0.7 μM Wnt 배경의 존재 하의 7.5 μM Wnt 범프) 배양 방법에 따라 NB/N2 배지 중 25일 동안 분화된 hESC에서 PAX6 발현 세포가 제거된 반면 FOXA2 발현 세포는 유지하였음을 나타낸다. 세포를 수확하고 FOXA2 및 PAX6의 존재에 대해 유세포 측정에 의해 분석하였다.

도 8은 냉동보존된 중간뇌 DA 뉴런이 '신선 상태' 세포와 비교되는 경우 생체내에서 유사하게 거동함을 나타낸다. "신선 상태"의 3-주차 이식편 및 마우스 내로 이식된 "냉동 상태" 세포의 4-주차 이식편에서 Hncam 및 TH의 발현을 비교하였다. 두 이식편은 모두 오른쪽의 삽입 패널에서 강조된 바와 같이, 섬유 성장의 초기 징후를 나타내었다.

도 9a~b는 (a) MACS 유세포 측정을 이용하여 CD142를 발현하는 중간뇌 DA 세포의 세포 정렬을 나타낸다. 정렬 전("이전"), 플로우 쓰루(flow through)(음성 분획) 및 24일차, CD142 정렬된 mDA 뉴런의 양성 분획을 나타낸다. 피코에리트린을 CD142에 콘주게이션하고 항-PE 비드를 단리를 위해 이용하여 결과를 가시화하였다. (b) 6회 실험에 걸친 일관성을 나타낸다.

도 10a~b는 mDA 뉴런이 비손상 마우스 및 파킨슨증 원숭이에서 생존함을 나타낸다. (a) CD142 정렬된 mA 세포가 생체내 생존한다. 문헌[Kirks et al.]에 기재된 방법에 따라 KSR 중 제조된 mDA 뉴런을 CD142에 대해 FACS에 의해 정렬하고 마우스 내로 이식하였다. 이식편을 이식 30일 후 수확하여 TH 및 hNCAM의 발현에 대해 분석하였다. (b) KSR 프로토콜-유래(Kriks et al.) mDA 뉴런은 비-인간 영장류(NHP)에서 1년간 생존한다. 25일차 mDA 뉴런을 파킨슨증 원숭이 내로 이식하고, 이식편을 이식 12개월 후 수집하였다. 섹션을 인간 세포질(SC121) 및 TH를 검출하는 항체로 염색하였다. 상부 절반은 정규 및 반전 이미지를 나타내는 반면, 하부 절반은 더 높은 확대 배율을 나타낸다. 데이터는 MACS 정렬된 세포가 마우스에 이식된 CD142 정렬된 mDA 세포와 필적하는 생존을 나타내었음을 시사한다.

도 11a~d는 시험관내 mDA 뉴런의 폴리시알릴트랜스퍼라제(나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 폴리시알릴트랜스퍼라제(PST_{Nm})) 처리 효과를 나타낸다. (a) 폴리시알릴화(PSA) 수준에 대한 냉동보존의 효과를 나타낸다. mDA 세포는 PST_{Nm}로 처리하거나 변형 없이 놔두었다. 세포의 절반은 고정한 반면, 나머지 절반은 냉동보존하였다. 냉동 상태 세포를 1주 후 해동하고 또한 고정하였다. 세포를 PSA에 대해 면역염색하고 유세포 측정에 의해 분석하였다. 검은 선은 신선 상태, 비염색 세포를 나타낸다. PSTNm-유도된 PSA의 염색은 냉동 상태 및 비냉동 상태 세포에서 동일하다. 파란선은 신선 상태 분석된 미처리 세포를 나타내며, 빨간선 및 녹색선은 신선 상태(빨간색), 또는 냉동 보관 후(녹색) 분석된 PSTNm 처리된 세포이다. (b) CD142 세포 정렬된 세포 상에서 PSTNm 처리 효과를 나타낸다. 미처리(왼쪽), 또는 PSTNm 처리(오른쪽) CD142 정렬된 세포 배양에서 1일 후 TAU-1 염색의 대표 이미지. (c) PSTNm-처리, CD142 정렬된 세포가 증강된 축삭 길이를 나타내었음을 보여준다. 세포를 1일 또는 4일차에 분석하고, 이미지를 NIH의 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 정량하였다. (d) PSA 수준이 생체내 지속됨을 나타낸다. PSTNm 처리된 mDA 뉴런을 마우스의 선조체에 이식하고, PSA 수준을 이식 2주 후 가시화하였다. 조건 별로 2개 시야 필드(FOV 1 및 FOV 2)를 나타낸다. 오른쪽 그래프는 결과를 요약한다.

도 12는 모의 이식된 래트에 비해, 실시예 2에 의해 기재된 바와 같이 분화되고 16일차에 냉동보존된 mDA 전구체가 이식된 손상된 래트의 회전 거동을 나타낸다. 래트를 이식 전, 및 이식 1, 2, 3, 4 및 5개월 후 시험하였다. 암페타민 투여에 의해 회전 거동을 유도하였다. 이식받은 손상된 래트는 이식 4개월 후 모의 이식된 래트에 비해 회전 거동의 통계적으로 유의미한 감소를 나타내었다.

도 13은 실시예 2에 의해 기재된 바와 같이 분화되고 16일차에 냉동보존된 mDA 전구체가 이식된 손상된 래트에서 hNCAM, TH, 및 GIRK2의 생체내 발현을 나타낸다. 이식된 이식편을 이식 5개월 후 검사하였다. TH 염색은 전형적인 mDA 형태를 나타내었다. TH 양성 뉴런은 또한 GIRK2 양성이었다.

도 14는 실시예 2에 따라 분화되고 16일차에 냉동보존된 mDA 전구체가 해동 및 비-인간 영장류로의 이식 후 6주 동안 생존하였음을 나타낸다. 이식된 이식편은 이식편 코어로부터 강력한 섬유 성장을 나타내었고, 또한 전형적인 mDA 형태를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] **5. 발명의 상세한 설명**

[0031] 본원에 개시된 요지는 중간뇌 도파민(mDA) 세포 또는 이의 전구체의 하나 이상의 마커를 발현하는 세포에 대한 인간 줄기 세포의 분화 유도 방법, 이러한 마커를 발현하는 세포 조성물, 및 신경변성 장애의 치료 방법에 관한

것이다.

[0032] 개시의 명확성 목적을 위해 그리고 비제한적으로, 상세한 설명은 하기 서브섹션으로 구분된다:

[0033] 5.1. 정의;

[0034] 5.2. 줄기 세포의 분화 방법;

[0035] 5.3. 신경변성 장애의 치료 방법; 및

[0036] 5.4. 키트.

[0037] ***5.1*** *정의*

[0038] 본 명세서에서 이용되는 용어는 일반적으로 본 발명의 맥락 내에서 그리고 각각의 용어가 이용되는 구체적 맥락에서, 당분야에서의 이들의 일반 의미를 갖는다. 소정 용어가 아래에서, 또는 명세서의 다른 곳에서 논의되어, 본 발명의 조성물 및 방법 그리고 이들을 어떻게 제조하고 이용하는지의 설명에 있어서 실시자에게 추가적인 가이드를 제공한다.

[0039] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정되는 바와 같이 특정 값에 대해 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이는 부분적으로 값이 어떻게 측정되는지 또는 결정되는지, 즉, 측정 시스템의 한계에 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 당분야에서의 관례에 따라, 3 또는 3 초과 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 예로, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1% 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정에 관해, 용어는 값의 한 단위 크기 이내, 예로, 5-배 이내, 또는 2-배 이내를 의미할 수 있다.

[0040] "신호 전달 단백질"에 대해 본원에서 이용되는 용어 "신호전달"은 막 수용체 단백질에 대한 리간드 결합 또는 일부 다른 자극에 의해 활성화되거나 달리 영향 받는 단백질을 나타낸다. 신호 전달 단백질의 예에는 비제한적으로 SMAD, wingless(Wnt) 복합체 단백질, 예컨대 베타-카테닌, NOTCH, 전환 성장 인자 베타(TGFβ), Activin, Nodal, 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3P) 단백질, 뼈 형태형성 단백질(BMP) 및 섬유아세포 성장 인자(FGF)가 포함된다. 여러 세포 표면 수용체 또는 내부 수용체 단백질에 있어서, 리간드-수용체 상호작용은 세포의 반응에 직접 연관되지 않는다. 리간드 활성화된 수용체는 세포의 거동에 대한 리간드의 궁극적인 생리적 효과가 생성되기 전에 먼저 세포 내부의 다른 단백질과 상호작용할 수 있다. 종종, 몇몇 상호작용 세포 단백질의 연쇄 거동은 수용체 활성화 또는 억제 이후 변경된다. 수용체 활성화에 의해 유도되는 전체 세포 변화 세트는 신호 전달 기전 또는 신호전달 경로로 불린다.

[0041] 본원에서 이용되는 용어 "신호"는 세포 구조 및 기능에서의 변화를 제어하는 내부 및 외부 인자를 나타낸다. 이들은 성질 상 화학적 또는 물리적일 수 있다.

[0042] 본원에서 이용되는 용어 "리간드"는 수용체에 결합하는 분자 및 단백질, 예로, 전환 성장 인자-베타(TFGβ), Activin, Nodal, 뼈 형태형성 단백질(BMP) 등을 나타낸다.

[0043] 본원에서 이용되는 "억제제"는 분자 또는 경로의 신호전달 기능을 방해하는(예로, 줄이는, 감소시키는, 억제하는, 제거하는, 또는 차단하는) 화합물 또는 분자(예로, 소분자, 펩타이드, 펩타이드 모사체, 천연 화합물, siRNA, 안티센스 핵산, 앱타머, 또는 항체)를 나타낸다. 억제제는 하나의 예에 있어서, 직접적으로 SMAD 신호전달과 접촉하거나, SMAD mRNA와 접촉하거나, SMAD의 입체형태 변화를 유도하거나, SMAD 단백질 수준을 감소시키거나, 또는 신호전달 파트너(예로, 본원에 기재된 것들 포함)와의 SMAD 상호작용을 방해하고 SMAD 유전자(예로, 본원에 기재된 것들)의 발현에 영향을 미침으로써, 언급되는 단백질(신호전달 분자, 언급되는 신호전달 분자에 관여되는 임의의 분자, 언급되는 연관된 분자, 예컨대 글리코겐 합성효소 키나제 3β(GSK3β))(예로, 비제한적으로, 본원에 기재된 신호전달 분자 포함)의 임의의 활성을 변화시키는 임의의 화합물 또는 분자일 수 있다. 억제제에는 또한 상류 신호전달 분자(예로, 세포외 도메인 내에서, 신호전달 분자 및 효과의 예에는 뼈 형태형성 단백질을 격리하고, ALK 수용체 1,2,3, 및 6의 활성화를 억제함으로써 하류 SMAD 활성화를 방지하는 Noggin. 마찬가지로, 유사하게 SMAD 신호전달의 세포외 활성화제를 격리하는 Chordin, Cerberus, Follistatin. 역시 세포외 TGFb 신호전달 분자를 격리하는 슈도-수용체로서 작용하는 막통과 단백질 Bambi가 포함됨)를 가로챔으로써 생물학적 활성, 예를 들어, SMAD의 생물학적 활성을 간접적으로 조절하는 분자가 포함된다. 상류 또는 하류 단백질을 차단하는 항체가 단백질 신호전달 등의 세포외 활성화제를 중화하기 위한 용도를 위해 고려된다. 억제제는 다시 언급되는 분자의 억제를 유도하는, 언급되는 신호전달 분자의 상류 분자에 결합하고 이에 영향을 미침으로써 유도되는 억제에 부가하여, 경쟁적 억제(또 다른 공지된 결합 화합물의 결합을 배제하거나 줄이는 방식

으로 활성 부위에 결합함) 및 알로스테리 억제(단백질의 활성 부위에 대한 화합물의 결합을 방해하는 방식으로 단백질 입체형태를 변화시키는 방식으로 단백질에 결합함)의 관점에서 설명된다. 억제제는 신호전달 표적에 실제로 접촉함으로써 신호전달 표적 또는 신호전달 표적 경로를 억제하는 "직접적 억제제"일 수 있다.

[0044] 본원에서 이용되는 "활성화제"는 분자 또는 경로의 신호전달 기능, 예로, Wnt 신호전달, SHH 신호전달 등의 활성화를 증가시키거나, 유도하거나, 자극하거나, 활성화하거나, 촉진하거나, 또는 증강시키는 화합물을 나타낸다.

[0045] 본원에서 이용되는 용어 "유도체"는 유사한 코어 구조를 가지는 화학적 화합물을 나타낸다.

[0046] 본원에서 이용되는 용어 "세포의 모집단" 또는 "세포 모집단"은 적어도 2개 세포의 군을 나타낸다. 비제한적 예에서, 세포 모집단에는 적어도 약 10개, 적어도 약 100개, 적어도 약 200개, 적어도 약 300개, 적어도 약 400개, 적어도 약 500개, 적어도 약 600개, 적어도 약 700개, 적어도 약 800개, 적어도 약 900개, 적어도 약 1000개 세포가 포함될 수 있다. 모집단은 하나의 세포 유형을 포함하는 순수한 모집단, 예컨대 중간뇌 DA 전구체의 모집단, 또는 분화되지 않은 줄기 세포의 모집단일 수 있다. 대안적으로, 모집단은 하나를 초과하는 세포 유형을 포함할 수 있다, 예를 들어 혼합된 세포 모집단일 수 있다.

[0047] 본원에서 이용되는 용어 "줄기 세포"는 배양 중 무한한 기간 동안 분열하고 특화된 세포를 생성하는 능력을 갖는 세포를 나타낸다.

[0048] 본원에서 이용되는 용어 "배아 줄기 세포" 및 "ESC"는 배양 중 연장된 기간 동안 분화하지 않고 분열할 수 있고, 3개의 일차 배엽의 세포 및 조직으로 발달하는 것으로 알려져 있는, 착상-전 단계 배아로부터 유도되는 원시(분화되지 않은) 세포를 나타낸다. 인간 배아 줄기 세포는 인간 배아에서 유래되는 배아 줄기 세포를 나타낸다. 본원에서 이용되는 용어 "인간 배아 줄기 세포" 또는 "hESC"는 최대로 주머니배 단계까지를 포함하는 초기 단계의 인간 배아에서 유도되며, 배양 중 연장된 기간 동안 분화하지 않고 분열할 수 있고, 3개 일차 배엽의 세포 및 조직으로 발달하는 것으로 알려져 있는 유형의 다능 줄기 세포를 나타낸다.

[0049] 본원에서 이용되는 용어 "배아 줄기 세포주"는 최대 수 일, 수 개월 내지 수년 동안 분화하지 않고 증식을 허용하는 시험관내 조건 하에 배양된 배아 줄기 세포의 모집단을 나타낸다.

[0050] 본원에서 이용되는 용어 "전능(totipotent)"은 신체의 모든 세포 유형에 더하여 배아외 조직, 예컨대 태반을 이루는 모든 세포 유형을 생성하는 능력을 나타낸다.

[0051] 본원에서 이용되는 용어 "다중능(multipotent)"은 신체의 하나를 초과하는 세포 유형으로 발달하는 능력을 나타낸다.

[0052] 본원에서 이용되는 용어 "다능(pluripotent)"은 내배엽, 중배엽, 및 외배엽을 포함하는 유기체의 3가지 발달 배엽으로 발달하는 능력을 나타낸다.

[0053] 본원에서 이용되는 용어 "유도된 다능 줄기 세포" 또는 "iPSC"는 체세포로의 소정 배아 유전자(예컨대 비제한적으로 OCT4, SOX2, 및 KLF4 트랜스유전자)의 도입에 의해 형성되는 유형의 다능 줄기 세포를 나타낸다(예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌[Takahashi and Yamanaka Cell 126, 663-676(2006)] 참고).

[0054] 본원에서 이용되는 용어 "체세포"는 생식세포(난세포 또는 정자) 이외에 신체의 임의의 세포를 나타낸다; 때때로 "성체" 세포로 불린다.

[0055] 본원에서 이용되는 용어 "신체(성체) 줄기 세포"는 자가 재생(실험실에서) 및 분화 모두에 있어서 제한된 능력을 갖는, 여러 기관 및 분화된 조직에서 확인되는 상대적으로 드문 분화되지 않은 세포를 나타낸다.

[0056] 본원에서 이용되는 용어 "뉴런"은 신경계의 기본적 기능 단위인 신경 세포를 나타낸다. 뉴런은 세포체 및 그 돌기-축삭 및 하나 이상의 가지돌기로 구성된다. 뉴런은 시냅스에서 신경전달물질을 방출함으로써 다른 뉴런 또는 세포에 정보를 전달한다.

[0057] 본원에서 이용되는 용어 "증식"은 세포수의 증가를 나타낸다.

[0058] 본원에서 이용되는 용어 "분화되지 않은"은 특화된 세포 유형으로 아직 발달하지 않은 세포를 나타낸다.

[0059] 본원에서 이용되는 용어 "분화"는 특화되지 않은 배아 세포가 특화된 세포, 예컨대 뉴런, 심장, 간, 또는 근육 세포의 특징을 획득하는 공정을 나타낸다. 분화는 보통 세포 표면에 임베딩된 단백질이 관여되는 신호전달 경로를 통해, 세포의 유전자와 세포 외부의 물리적 및 화학적 조건의 상호작용에 의해 제어된다.

[0060] 본원에서 이용되는 용어 "지정된 분화"는 특정한(예를 들어, 요망되는) 세포 유형, 예컨대 신경, 신경 능선, 머리 기원판, 및 비-신경 외배엽 전구체로의 분화를 유도하는 줄기 세포 배양 조건의 조작을 나타낸다.

[0061] 줄기 세포에 대해 본원에서 이용되는 용어 "지정된 분화"는 다능 상태에서 보다 성숙한 또는 특화된 세포 운명으로의 줄기 세포의 전이를 촉진하는 소분자, 성장 인자 단백질, 및 다른 성장 조건의 이용을 나타낸다.

[0062] 세포에 대해 본원에서 이용되는 용어 "분화 유도"는 내정 세포 유형(유전형 및/또는 표현형)의 비-내정 세포 유형(유전형 및/또는 표현형)으로의 변화를 나타낸다. 따라서, "줄기 세포에서의 분화 유도"는 줄기 세포와 상이한 특징, 예컨대 유전형(예로, 유전 분석, 예컨대 마이크로어레이에 의해 결정되는 유전자 발현에서의 변화) 및/또는 표현형(예로, 중간뇌 DA 세포, 또는 이의 전구체의 단백질 마커, 예컨대 EN-1, OTX2, TH, NURR1, FOXA2, 및 LLMX1A의 발현에서의 변화)을 갖는 자손 세포로 분열하도록 하는 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)의 유도를 나타낸다.

[0063] 본원에서 이용되는 용어 "세포 배양"은 연구 또는 의학적 치료를 위한 인공 배지 중 시험관내 세포 성장을 나타낸다.

[0064] 본원에서 이용되는 용어 "배양 배지"는 배양 용기, 예컨대 페트리 플레이트, 멀티웰 플레이트 등에서 세포를 커버하는 액체를 나타내며, 세포에 영양을 공급하고 이를 지지하는 영양분을 함유한다. 배양 배지에는 또한 세포에서 요망되는 변화를 생성하기 위해 첨가된 성장 인자가 포함될 수 있다.

[0065] 본원에서 이용되는 용어인 세포 또는 세포들과 화합물(예로, 하나 이상의 억제제, 활성화제, 및/또는 유도제)의 "접촉"은 세포 또는 세포들의 화합물에 대한 접근을 허용하는 위치에서 화합물을 제공하는 것을 나타낸다. 접촉은 임의의 적합한 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 접촉은 요망되는 농도를 달성하기 위해 농축된 형태의 화합물을 세포 또는 세포의 모집단으로, 예를 들어 세포 배양의 맥락에서 첨가함으로써 달성될 수 있다. 접촉은 또한 제형화된 배양 배지의 성분으로서 화합물을 포함시켜 달성될 수 있다.

[0066] 본원에서 이용되는 용어 "시험관내"는 인공 환경 및 인공 환경 내에서 일어나는 공정 또는 반응을 나타낸다. 시험관내 환경으로는 비제한적으로 시험관 및 세포 배양이 예시된다.

[0067] 본원에서 이용되는 용어 "생체내"는 자연 환경(예로, 동물 또는 세포) 및 자연 환경 내에서 일어나는 공정 또는 반응, 예컨대 배아 발달, 세포 분화, 신경관 형성 등을 나타낸다.

[0068] 유전자 또는 단백질에 관해 본원에서 이용되는 용어 "발현"은 검정, 예컨대 마이크로어레이 검정, 항체 염색 검정 등을 이용해서 관찰될 수 있는 mRNA 또는 단백질의 제조를 나타낸다.

[0069] 본원에서 이용되는 용어 "마커" 또는 "세포 마커"는 특정 세포 또는 세포 유형을 확인시켜주는 유전자 또는 단백질을 나타낸다. 세포에 대한 마커는 하나의 마커로 제한되지 않을 수 있으며, 마커는 지정된 마커군이 하나의 세포 또는 세포 유형을 또 다른 세포 또는 세포 유형으로부터 확인시켜줄 수 있도록 하는 마커 "패턴"을 나타낼 수 있다.

[0070] 본원에 개시된 임의의 세포에 대해 언급되는 경우, 본원에서 이용되는 용어 "로부터 유도된" 또는 "로부터 확립된" 또는 "로부터 분화된"은 임의의 조작, 예컨대 비제한적으로 단일 세포 단리, 시험관내 배양, 예를 들어 단백질, 화학물질, 방사선, 바이러스로의 감염, DNA 서열, 예컨대 형태원(morphogen) 등으로의 형질감염을 이용한 처리 및/또는 돌연변이화, 배양된 모체 세포에 함유되는 임의의 세포의 선택(예컨대 연속 배양에 의한)을 이용하여 세포주, 조직(예컨대 해리된 배아, 또는 유체)에서 궁극적인 모체 세포로부터 수득된(예로, 단리된, 정제된 등) 세포를 나타낸다. 유도된 세포는 성장 인자, 사이토카인, 선택된 사이토카인 처리 진행, 접착성, 접착성의 부재, 정렬 절차 등에 대한 반응에 의해 혼합된 모집단으로부터 선택될 수 있다.

[0071] 본원에서 "개체" 또는 "대상체"는 척추동물, 예컨대 인간 또는 비-인간 동물, 예를 들어, 포유동물이다. 포유동물에는 비제한적으로 인간, 비-인간 영장류, 농장 동물, 스포츠 동물, 설치류 및 애완동물이 포함된다. 비-인간 동물 대상체의 비제한적 예에는 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 햄스터, 및 기니아픽; 토끼; 개; 고양이; 양; 돼지; 염소; 소; 말; 및 비-인간 영장류, 예컨대 유인원 및 원숭이가 포함된다.

[0072] 본원에서 이용되는 용어 "질환"은 세포, 조직, 또는 기관의 정상 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 나타낸다.

[0073] 본원에서 이용되는 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 치료받는 개체 또는 세포의 질환 과정을 변경하기 위한 시도에서의 임상적 개입을 나타내며, 예방을 위해 또는 임상적 병리 과정 동안 수행될 수 있다. 치료의 치료적 효과

에는 비제한적으로 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적인 또는 간접적인 병리적 결과의 감소, 전이의 방지, 질환 진행 속도의 감소, 질환 상태의 경감 또는 호전, 및 진정 또는 개선된 예후가 포함된다. 질환 또는 장애의 진행을 방지함으로써, 치료는 영향 받은 또는 진단받은 대상체 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체에서 장애로 인한 악화를 방지할 수 있지만, 또한 치료는 장애의 위험이 있는 또는 장애를 갖는 것으로 추정되는 대상체의 장애 개시 또는 장애 증상을 방지할 수 있다.

[0074] *5.2 줄기 세포의 분화 방법*

[0075] 본원에 개시된 요지는 적어도 부분적으로 중간뇌 도파민(DA) 뉴런, 및 이의 전구체가 Sonic Hedgehog(SHH) 신호전달의 활성화, 및 wingless(Wnt) 신호전달의 활성화와 함께, SMAD 신호전달의 이중 억제에 의해(예를 들어, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달 및 BMP 신호전달의 억제에 의해) 인간 줄기 세포로부터 분화될 수 있다는 발견에 기반하며, 여기서 Wnt 활성화 화합물의 농도는 SMAD 억제제, SHH 활성화제, 및 Wnt 활성화제에 대한 세포의 최초 접촉 후 4일차에 증가된다. 소정의 비제한적 구현예에서, 상기 Wnt 활성화 화합물의 농도 증가는 상기 증가 전 Wnt 활성화 화합물 농도의 약 400% 내지 1000%일 수 있다. 소정의 비제한적 구현예에서, 상기 Wnt 활성화제의 더 높은 농도는 적어도 약 7 또는 8일 동안 유지될 수 있다. 소정의 비제한적 구현예에서, Wnt 활성화의 증가는 제2 또는 추가의 Wnt 활성화제를 첨가함으로써 달성된다. 세포는 추가로 중간뇌 DA 계통 특이적 활성화제 및 억제제, 예를 들어, BDNF, GDNF, cAMP, TGFβ, AA, 및 DAPT와 접촉될 수 있다. 소정의 비제한적 구현예에서, 증가된 Wnt 활성화제 농도의 유효량은 Wnt 활성화제와 접촉된 세포 모집단에서 PAX6 발현의 검출가능한 수준을 줄이는 농도이다. 소정의 비제한적 구현예에서, PAX6 발현은 세포의 모집단에서 검출 불가능하다.

[0076] 본원에 개시된 요지는 줄기 세포(예로, 인간 줄기 세포)의 시험관내 분화 유도 방법을 제공한다. 인간 줄기 세포의 비제한적 예에는 인간 배아 줄기 세포(hESC), 인간 다능 줄기 세포(hPSC), 인간 유도된 다능 줄기 세포(hiPSC), 인간 단성생식 줄기 세포, 원시 종자 세포-유사 다능 줄기 세포, 배아덩이위판 줄기 세포, F-클래스 다능 줄기 세포, 신체 줄기 세포, 암 줄기 세포, 또는 계통 특이적 분화가 가능한 임의의 다른 세포가 포함된다. 소정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포(hESC)이다. 소정 구현예에서, 인간 줄기 세포는 인간 유도된 다능 줄기 세포(hiPSC)이다.

[0077] 본 출원에 의해 기재된 방법에 따라 이용될 수 있는 줄기 세포의 비제한적 예에는 또한 인간, 비인간 영장류 또는 설치류 비배아 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 유도된 비배아 다능 세포 및 조작된 다능 세포가 포함된다.

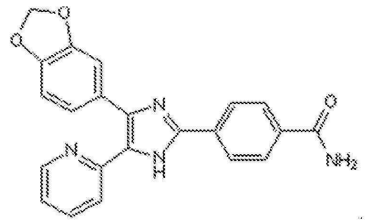
[0078] 소정의 비제한적 구현예에서, 줄기 세포 또는 이의 자손 세포는 도입된 이종성 핵산을 함유하며, 여기서 상기 핵산은 요망되는 핵산 또는 단백질 산물을 인코딩할 수 있거나 정보 값을 가질 수 있다(예를 들어, 그 전문이 참조로 포함되는 U.S. 특허 번호 6,312,911 참고). 요망되는 단백질 산물의 비제한적 예에는 생체내 조영 연구를 통해 검출가능한 마커, 예를 들어 수용체 또는 다른 세포막 단백질, 예컨대 비제한적으로 인간 나트륨 요오드 심포터(symporter)가 포함된다.

[0079] 마커의 비제한적 예에는 추가로 형광 단백질(예컨대 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질(EBFP, EBFP2, Azurite mKalama1), 시안 형광 단백질(ECFP, Cerulean, CyPet, mTurquoise2), 및 황색 형광 단백질 유도체(YFP, Citrine, Venus, YPet, EYFP)), β-갈락토시다제(LacZ), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(cat), 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(neo), 효소(예컨대 옥시다제 및 페록시다제), 및 항원성 분자가 포함된다. 본원에서 이용되는 용어 "리포터 유전자" 또는 "리포터 구축물"은 쉽게 검출가능하거나 쉽게 검정 가능한 단백질, 예컨대 유색 단백질, 형광 단백질, 예컨대 GFP 또는 효소, 예컨대 베타-갈락토시다제(lacZ 유전자)를 인코딩하는 핵산을 포함하는 유전적 구축물을 나타낸다. 소정 구현예에서, 리포터는 mDA 마커 유전자, 예를 들어, TH 및/또는 En-1의 재조합 프로모터에 의해 유도될 수 있다.

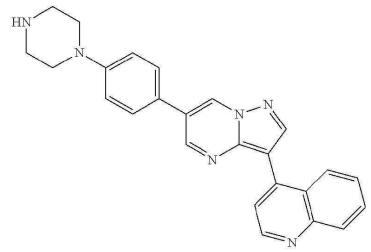
[0080] 소정 비제한적 구현예에서, 줄기 세포, 또는 이의 자손 세포는 세포의 대사 공정, 예를 들어, 글루코스 대사 및/또는 콜린 대사를 증가시키거나 감소시키는 도입된 이종성 핵산을 함유하며, 여기서 세포는 변경된 대사 활성으로 인해 양전자 방출 단층촬영(PET)을 이용하여 생체내 조영될 수 있다.

[0081] 소정 구현예에서, 본원에 개시된 분화 방법은 인간 줄기 세포의 모집단을 전환 성장 인자 베타(TGFβ)/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이는 Small Mothers Against Decapentaplegic(SMAD) 신호전달의 억제를 일으킨다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 억제제는 TGFβ, 뼈 형태형성 단백질(BMP), Nodal, 및 Activin을 포함하는 리간드를 중화하거나, 수용체 및 하류 작용인자의 차단을 통해 이의 신호 경로를 차단한다. TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 억제제의 비제한적 예는 WO/2010/096496, WO/2011/149762, WO/2013/067362, WO/2014/176606, WO/2015/077648, 문헌[Chambers et al.,

Nat Biotechnol. 2009 Mar;27(3):275-80, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1;30(7):715-20(2012)]에 개시되어 있고, 이는 모든 목적을 위해 본원에 이의 전문이 참조로 포함된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 SB431542, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 소분자이다. "SB431542"는 번호 CAS 301836-41-9, 분자식 $C_{22}H_{18}N_4O_3$, 및 명칭 4-[4-(1,3-벤조디옥솔-5-일)-5-(2-피리디닐)-1H-이미다졸-2-일]-벤즈아마이드를 갖는 분자를 나타내며, 예를 들어, 아래의 구조를 참고한다:

[0082]  .

[0083] 본원에 개시된 분화 방법은 추가로 인간 줄기 세포를 BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 이는 SMAD 신호전달의 억제를 일으킨다. SMAD 신호전달의 억제제의 비제한적 예는 WO2011/149762, 문헌[Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar;27(3):275-80, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1;30(7):715-20]에 개시되어 있으며, 이의 전문이 참조로 포함된다. 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 LDN193189, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 소분자이다. "LDN193189"는 소분자 DM-3189, IUPAC 명칭 4-(6-(4-(피페라진-1-일)페닐)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)퀴놀린을 나타내며, 하기 식을 가지는 $C_{25}H_{22}N_6$의 화학식을 갖는다:

[0084] 

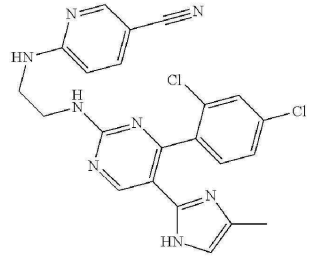
[0085] LDN193189는 SMAD 신호전달 억제제로서 기능할 수 있다. LDN193189는 또한 ALK2, ALK3, 및 ALK6, 단백질 티로신 키나제(PTK)의 매우 강력한 소분자 억제제이며, I형 TGFβ 수용체의 ALK1 및 ALK3 패밀리 구성원의 신호전달을 억제하여, 뼈 형태형성 단백질(BMP) BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, 및 Activin 사이토카인 신호를 포함하는 여러 생물학적 신호의 전달 및 이어서 Smad1, Smad5, 및 Smad8의 SMAD 인산화의 억제를 일으킨다(본원에 참조로 포함되는, Yu et al.(2008) Nat Med 14:1363-1369; Cuny et al.(2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 4388-4392).

[0086] 본원에 개시된 분화 방법은 추가로 인간 줄기 세포를 Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 리간드에 대해 본원에서 이용되는 용어 "WNT" 또는 "wingless"는 WNT 수용체, 예컨대 Frizzled 및 LRPDerailed/RYK 수용체 패밀리의 수용체와 상호작용할 수 있는 분비된 단백질(즉 인간에서 Int1(integration 1))군을 나타낸다. 신호전달 경로에 대해 본원에서 이용되는 용어 "WNT" 또는 "wingless"는 β-카테닌을 포함하고 또는 포함하지 않고 매개되는, Wnt 패밀리 리간드 및 Wnt 패밀리 수용체, 예컨대 Frizzled 및 LRPDerailed/RYK 수용체로 이루어진 신호 경로를 나타낸다. 본원에 기재된 목적에 있어서, 바람직한 WNT 신호전달 경로에는 β-카테닌, 예로, WNT/-카테닌에 의한 매개가 포함된다.

[0087] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 Wnt 신호전달의 활성화를 위해 GSK3β를 줄인다. 따라서 Wnt 신호전달의 활성화제는 GSK3β 억제제일 수 있다. GSK3P 억제제는 WNT 신호전달 경로를 활성화할 수 있으며, 예로, 이의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Cadigan, et al., J Cell Sci. 2006;119:395-402; Kikuchi, et al., Cell Signaling. 2007;19:659-671]을 참고한다. 본원에서 이용되는 용어 "글리코겐 합성효소 키나제 3β 억제제"는 글리코겐 합성효소 키나제 3β 효소를 억제하는 화합물을 나타내며, 예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Doble, et al., J Cell Sci. 2003;116:1175-1186]을 참고한다.

[0088] Wnt 신호전달의 활성화제 또는 GSK3β 억제제의 비제한적 예는 이의 전문이 참조로 포함되는 WO2011/149762,

WO13/067362, 문헌[Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012 Jul 1;30(7):715-20, Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51, 및 Calder et al., J Neurosci. 2015 Aug 19;35(33):11462-81]에 개시되어 있다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 CHIR99021, 이의 유도체, 및 이의 혼합물로 구성되는 군으로부터 선택되는 소분자이다. "CHIR99021"(또한 "아미노피리미딘" 또는 "3-[3-(2-카복시에틸)-4-메틸피롤-2-메틸리덴닐]-2-인돌리논"으로 알려져 있음)은 하기 화학식을 갖는 IUPAC 명칭 6-(2-(4-(2,4-디클로로페닐)-5-(4-메틸-1H-이미다졸-2-일)피리미딘-2-일아미노)에틸아미노)니코티노니트릴을 나타낸다:

[0089] 

[0090] CHIR99021는 고도로 선택적이며, 관련된 및 관련되지 않은 키나제 패널에 대해 거의 천배의 선택성을 나타내고, 인간 GSK3β에 대해 IC50=6.7 nM이고 설치류 GSK3β 상동체에 대해 나노몰 농도의 IC50 값을 갖는다.

[0091] 소정의 비제한적 구현예에서, 본원에 기재된 세포의 모집단은 농도 약 0.001 내지 2 μM, 또는 약 0.01 내지 1.5 μM, 또는 약 0.1 내지 1 μM, 또는 약 0.5 내지 0.8 μM, 또는 약 0.7 μM인 초기 농도의 CHIR99021과 접촉되며, 여기서 CHIR99021의 농도는 본원에서 기재된 바와 같이, 예를 들어, CHIR99021에 대한 세포의 최초 접촉 후 약 4일차에 약 2 내지 15 μM, 또는 약 3 내지 14 μM, 또는 약 4 내지 13 μM, 또는 약 5 내지 12 μM, 또는 약 6 내지 11 μM, 또는 약 7 내지 10 μM, 또는 약 8 내지 9 μM, 또는 약 3 내지 10 μM, 또는 약 5 내지 10 μM, 또는 약 3 μM, 또는 약 7.5 μM로 증가된다.

[0092] 본원에 개시된 분화 방법은 추가로 인간 줄기 세포를 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본원에서 이용되는 용어 "Sonic hedgehog", "SHH" 또는 "Shh"는 hedgehog로 불리는 포유동물 신호전달 경로 패밀리의 적어도 3개 단백질 중 하나인 단백질을 나타내며, 또 다른 것은 desert hedgehog(DHH)이고, 세 번째 것은 Indian hedgehog(IHH)이다. Shh는 막통과 분자 Patched(PTC) 및 Smoothened(SMO)과 상호작용함으로써 적어도 2개의 막통과 단백질과 상호작용한다. Shh는 전형적으로 PTC와 결합하고, 이어서 신호 전달인자로서의 SMO의 활성화를 허용한다. SHH의 부재 하에, PTC는 전형적으로 SMO를 억제하며, 이는 다시 전사 억제인자를 활성화함으로써 소정 유전자의 전사가 일어나지 않는다. Shh가 존재하고 PTC에 결합하는 경우, PTC는 SMO의 기능을 방해할 수 없다. SMO가 억제되지 않으면, 소정 단백질은 핵으로 들어가서 소정 유전자가 활성화될 수 있도록 하는 전사 인자로서 작용할 수 있다(문헌[Gilbert, 2000 Developmental Biology(Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc., Publishers)] 참고). 소정 구현예에서, Sonic hedgehog(SHH) 신호전달의 활성화제는 PTC에 결합하는 분자 또는 화합물 또는 Smoothened 작용제 등을 포함하는, SHH 신호전달 경로를 활성화하는 임의의 분자 또는 화합물을 나타낸다. Wnt 신호전달 또는 GSK3β 억제제의 비제한적 예는 WO10/096496, WO13/067362, 문헌[Chambers et al., Nat Biotechnol. 2009 Mar;27(3):275-80, 및 Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에 개시되어 있다. 이러한 화합물의 예는 재조합 SHH, 정제된 SHH, 단백질 Sonic hedgehog(SHH) C25II(즉, SHH를 활성화하기 위해 SHH 수용체에 결합할 수 있는 전장 쥐과 sonic hedgehog 단백질의 재조합 N-말단 단편, 예를 들어, R and D Systems 카탈로그 번호: 464-5H-025/CF) 및 소분자 Smoothened 작용제, 예컨대, 푸르모르파민이다.

[0093] 소정 구현예에서, 상술된 억제제 및 활성화제가 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 첨가된다. 적합한 세포 배양 배지에는 비제한적으로 Knockout® 혈청 대체("KSR") 배지, Neurobasal® 배지(NB), N2 배지, B-27 배지, 및 Essential 8®/Essential 6®("E8/E6") 배지, 및 이의 조합이 포함된다. KSR 배지, NB 배지, N2 배지, B-27 배지, 및 E8/E6 배지는 상업적으로 이용 가능하다. KSR 배지는 배양 중 분화되지 않은 hESC 세포를 성장시키고 유지하기 위해 최적화된, 정의된, 혈청-비함유 제형물이다.

[0094] 소정 구현예에서, 세포 배양 배지는 KSR 배지이다. KSR 배지의 성분은 WO2011/149762에 개시되어 있다. 소정 구현예에서, KSR 배지는 Knockout DMEM, Knockout 혈청 대체제, L-글루타민, Pen/Strep, MEM, 및 13-머캅토에탄올을 포함한다. 소정 구현예에서, 1 리터의 KSR 배지는 820 mL의 Knockout DMEM, 150 mL의 Knockout 혈청 대체제, 10 mL의 200 mM L-글루타민, 10 mL의 Pen/Strep, 10 mL의 10 mM MEM, 및 55 μM의 13-머캅토에탄올을 포함

한다.

[0095] 소정 구현예에서, 줄기 세포는 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제, SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제가 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 첨가된다.

[0096] 소정 구현예에서, 세포 배양 배지는 E8/E6 배지이다. E8/E6 배지는 인간 다능 줄기 세포의 성장 및 증식을 지지하는 영양세포-비함유 및 이종물질-비함유 배지이다. E8/E6 배지는 체세포 재프로그래밍을 지지하는 것으로 입증되었다. 또한, E8/E6 배지는 PSC의 배양을 위한 맞춤형 배지의 제형물에 대한 기재로서 이용될 수 있다. 하나의 예시적인 E8/E6 배지는 그 전문이 참조로 포함되는 문헌[Chen et al., Nat Methods 2011 May;8(5):424-9]에 기재되어 있다. 하나의 예시적인 E8/E6 배지는 그 전문이 참조로 포함되는 WO15/077648에 개시되어 있다. 소정 구현예에서, E8/E6 세포 배양 배지는 DMEM/F12, 아스코르브산, 셀레늄, 인슐린, $NaHCO_3$, 트랜스페린, FGF2 및 TGFβ를 포함한다. E8/E6 배지에 활성 BMP 또는 Wnt 성분이 포함되지 않는다는 점에서 E8/E6 배지는 KSR 배지와 상이하다. 따라서 소정 구현예에서, E8/E6 배지가 본원에 개시된 줄기 세포의 모집단이 고유감각기의 모집단으로 분화하도록 배양하기 위해 이용되는 경우, SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제(예로, BMP를 억제하는 것들)가 E8/E6 배지에 첨가되는 것은 요구되지 않는다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 소정 구현예에서, 줄기 세포는 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제와 접촉되며, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제가 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 첨가된다. 소정 구현예에서, BMP가 추가로 배지에 첨가될 수 있다.

[0097] 소정 구현예에서, 본원에 개시된 요지는 인간 줄기 세포의 중간뇌 DA 뉴런, 또는 이의 전구체로의 시험관내 분화 유도 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 줄기 세포는, 예로, 같은 날 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 이들 억제제를 첨가함으로써, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 동시에 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제의 농도는 세포가 Wnt 활성화제와 최초 접촉된 후 적어도 약 2, 3, 4, 5 또는 6일차에 증가된다.

[0098] 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 적어도 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상, 예를 들어, 약 4일 내지 10일, 또는 약 5일 내지 9일, 또는 약 6일 내지 8일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 최대 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 7일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 0일부터 10일까지 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 매일 또는 매 2일마다 첨가된다(예로, 0일, 2일, 4일, 6일, 8일, 및 10일차에 첨가됨). 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 0일, 1일, 3일, 4일, 및 6일차에 첨가된다.

[0099] 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 1 내지 20 μM, 또는 약 2 내지 19 μM, 또는 약 3 내지 18 μM, 또는 약 4 내지 17 μM, 또는 약 5 내지 16 μM, 또는 약 6 내지 15 μM, 또는 약 7 내지 14 μM, 또는 약 8 내지 13 μM, 또는 약 9 내지 12 μM, 또는 약 10 내지 11 μM, 및 이들 사이의 값인 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13 μM의 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 10.8 μM인 농도로 세포와 접촉된다.

[0100] 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 적어도 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상, 예를 들어, 약 4일 내지 10일, 또는 약 5일 내지 9일, 또는 약 6일 내지 8일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 최대 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 7일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 0일부터 10일까지 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 매일 또는 매 2일마다 첨가된다(예로, 0일, 2일, 4일, 6일, 8일, 및 10일차에 첨가됨). 소정 구현예에서, 하나 이상의 억제제는 0일, 1일, 3일, 4일, 및 6일차에 첨가된다.

[0101] 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 50 내지 500 nM, 또는 약 75 내지 475 nM, 또

는 약 100 내지 450 nM, 또는 약 125 내지 425 nM, 또는 약 150 내지 400 nM, 또는 약 175 내지 375 nM, 또는 약 200 내지 350 nM, 또는 약 225 내지 325 nM, 또는 약 250 내지 300 nM, 및 이들 사이의 값인 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 150, 200, 250, 300, 또는 350 nM의 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제는 약 250 nM의 농도로 세포와 접촉된다.

[0102] 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 적어도 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상, 예를 들어, 약 4일 내지 10일, 또는 약 5일 내지 9일, 또는 약 6일 내지 8일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 최대 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 7일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 0일부터 10일까지 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 매일 또는 매 2일마다 첨가된다(예로, 0일, 2일, 4일, 6일, 8일, 및 10일차에 첨가됨). 소정 구현예에서, 하나 이상의 억제제는 0일, 1일, 3일, 4일, 및 6일차에 첨가된다.

[0103] 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 50 내지 1000 ng/mL, 또는 약 100 내지 950 ng/mL, 또는 약 150 내지 900 ng/mL, 또는 약 200 내지 850 ng/mL, 또는 약 250 내지 800 ng/mL, 또는 약 300 내지 750 ng/mL, 또는 약 350 내지 700 ng/mL, 또는 약 400 내지 650 ng/mL, 또는 약 450 내지 600 ng/mL, 또는 약 500 내지 550 ng/mL, 및 이들 사이의 값인 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 400, 450, 500, 550, 또는 600 ng/mL의 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 500 ng/mL의 농도로 세포와 접촉된다.

[0104] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 적어도 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 이상, 예를 들어, 약 4일 내지 20일, 또는 약 4일 내지 19일, 또는 약 4일 내지 18일, 또는 약 4일 내지 17일, 또는 약 4일 내지 16일, 또는 약 4일 내지 15일, 또는 약 4일 내지 14일, 또는 약 4일 내지 13일, 또는 약 4일 내지 12일, 또는 약 4일 내지 11일, 또는 약 4일 내지 10일, 또는 약 4일 내지 9일, 또는 약 4일 내지 8일, 또는 약 4일 내지 7일, 또는 약 4일 내지 6일, 또는 약 5일 내지 19일, 또는 약 6일 내지 17일, 또는 약 7일 내지 16일, 또는 약 8일 내지 15일, 또는 약 9일 내지 14일, 또는 약 10일 내지 13일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 최대 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20일 이상 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 12일 동안 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 0일부터 12일까지 줄기 세포를 포함하는 세포 배양 배지에 매일 또는 매 2일마다 첨가된다(예로, 0일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일, 및 12일차에 첨가됨). 소정 구현예에서, 하나 이상의 억제제는 0일, 1일, 3일, 4일, 6일, 7일, 9일, 10일, 및 11일차에 첨가된다.

[0105] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 0.05 내지 15 μM, 또는 약 0.1 내지 14 μM, 또는 약 0.5 내지 13 μM, 또는 약 1 내지 12 μM, 또는 약 1.5 내지 11 μM, 또는 약 2 내지 10 μM, 또는 약 2.5 내지 9.5 μM, 또는 약 3 내지 9 μM, 또는 약 3.5 내지 8.5 μM, 또는 약 4 내지 8 μM, 또는 약 4.5 내지 7.5 μM, 또는 약 5 내지 7 μM, 또는 약 5.5 내지 6.5 μM, 및 이들 사이의 값인 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1 μM의 농도로 세포와 접촉된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제는 약 0.7 μM의 농도로 세포와 접촉된다.

[0106] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 Wnt 활성화제와 최초 접촉된 후 적어도 약 2, 3, 4, 5 또는 6일차에, 예를 들어, 약 2일 내지 10일, 또는 약 3일 내지 9일, 또는 약 4일 내지 8일, 또는 약 5일 내지 7일차에 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 세포가 Wnt 활성화제와 최초 접촉된 후 최대 약 2, 3, 4, 5 또는 6일차에 증가된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상, 예를 들어, 약 4일 내지 20일, 또는 약 5일 내지 19일, 또는 약 6일 내지 18일, 또는 약 7일 내지 17일, 또는 약 8일 내지 16일, 또는 약 9일 내지 15일, 또는 약 8일 내지 14일, 또는 약 9일 내지 13일, 또는 약 10일 내지 12일 동안 증가된 농도의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상 동안 증가된 농도의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11일 동안 증가된 농도의 Wnt 활성화제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 8일 동안 증가된 농도의 Wnt 활성화제와 접촉된다.

[0107] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 약 2 내지 15 μM, 또는 약 3 내지 14 μM, 또는 약 4 내

지 13 μM, 또는 약 5 내지 12 μM, 또는 약 6 내지 11 μM, 또는 약 7 내지 10 μM, 또는 약 8 내지 9 μM의 농도로 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 약 3 내지 10 μM, 또는 약 5 내지 10 μM의 농도로 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 약 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5 또는 10 μM의 농도로 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 약 3 μM의 농도로 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 약 7.5 μM의 농도로 증가된다.

[0108] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 세포에 접촉된 최초 농도로부터 약 50 내지 2000%, 또는 약 100 내지 1950%, 또는 약 150 내지 1900%, 또는 약 200 내지 1850%, 또는 약 250 내지 1800%, 또는 약 300 내지 1750%, 또는 약 350 내지 1700%, 또는 약 400 내지 1650%, 또는 약 450 내지 1600%, 또는 약 500 내지 1550%, 또는 약 550 내지 1500%, 또는 약 600 내지 1450%, 또는 약 650 내지 1400%, 또는 약 700 내지 1350%, 또는 약 750 내지 1300%, 또는 약 800 내지 1250%, 또는 약 850 내지 1200%, 또는 약 900 내지 1150%, 또는 약 950 내지 1100%, 또는 약 1000 내지 1050%, 및 이들 사이의 값만큼 증가된다. 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 세포에 접촉된 최초 농도로부터 약 400 내지 1450%, 또는 약 700 내지 1050%, 및 이들 사이의 값만큼 증가된다.

[0109] 소정 구현예에서, Wnt 신호전달의 활성화제의 농도는 세포에 접촉된 최초 농도로부터 약 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950%, 1000%, 1050%, 또는 1100% 이상만큼 증가된다.

[0110] 구체적이고 비제한적 구현예에서, 세포는 약 10.8 μM 농도의 TGFβ/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제(즉, 제1 SMAD 억제제), 예를 들어, SB431542; 약 250 nM 농도의 BMP 신호전달의 하나 이상의 억제제(즉, 제2 SMAD 억제제), 예를 들어, LDN193189; 약 0.7 μM 농도의 Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 예를 들어, CHIR99021; 및 약 500 ng/mL 농도의 SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉되며; 여기서 세포는 약 7일 동안(즉, 배양 0일부터 6일까지) 억제제와 접촉되며, CHIR99021의 농도는 세포 배양 4일차에 3 μM 또는 7.5 μM로 증가된다.

[0111] 소정 구현예에서, 세포는 약 11일 동안(즉, 배양 0일부터 11일까지) Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제와 접촉되며, 여기서 세포는 세포 배양 4일 내지 11일에 7.5 μM의 CHIR99021과 접촉되거나; 세포는 4일 내지 9일에 7.5 μM의 CHIR99021에 이어, 세포 배양 10일 내지 11일에 3 μM의 CHIR99021과 접촉된다.

[0112] 소정 구현예에서, 세포는 engrailed-1(EN-1), orthodenticle 호메오박스 2(OTX2), 티로신 하이드록실라제(TH), nuclear receptor related-1 단백질(NURR1), forkhead box 단백질 A2(FOXA2), 및 LIM 호메오박스 전사 인자 1 알파(LMX1A) 중 하나 이상의 검출가능한 발현 수준을 증가시키기에 효과적인 농도로 및 시간 동안 본원에 기재된 활성화제 및 억제제와 접촉된다.

[0113] 소정 구현예에서, 세포는 뉴런-특이적 클래스 III 베타-튜불린(Tuj1), Trefoil 인자 패밀리 3(TTF3), paired-like 호메오도메인 3(PITX3), achaete-scute 복합체(ASCL), 초기 B-세포 인자 1(EBF-1), 초기 B-세포 인자 3(EBF-3), 트랜스타이레틴(TTR), 시냅신, 도파민 트랜스포터(DAT), 및 G-단백질 커플링된, 내향 정류 칼륨 채널(Kir3.2/GIRK2), CD142, DCSM1, CD63 및/또는 CD99 중 하나 이상의 검출가능한 발현 수준을 증가시키기에 효과적인 농도로 및 시간 동안 본원에 기재된 활성화제 및 억제제와 접촉된다.

[0114] 소정 구현예에서, 세포는 DA 뉴런의 하나 이상의 마커, 예를 들어, CD142의 검출가능한 발현 수준을 증가시키기에 효과적인 농도로 및 시간 동안 본원에 기재된 활성화제 및 억제제와 접촉되거나, 세포는 A9 유형 뉴런 세포이다.

[0115] 소정 구현예에서, 세포는 paired box 단백질(PAX6) 및 Ki67의 발현을 감소시키기에 효과적인 농도로 및 시간 동안 본원에 기재된 활성화제 및 억제제와 접촉된다.

[0116] 소정 구현예에서, 세포는 추가로 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제, 예를 들어, L-글루타민, 뇌-유래 신경영양 인자(BDNF), 아교 세포-유래 신경영양 인자(GDNF), 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 전환 성장 인자 베타(또한 TGFβ, 예를 들어, TGFβ3), 아스코르브산(AA), 및 DAPT(N-[(3,5-디플루오로페닐)아세틸]-L-알라닐-2-페닐]글리신-1,1-디메틸에틸 에스테르; LY-374973, N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르; 또는 N-[N-(3,5-디플루오로펜아세틸)-L-알라닐]-S-페닐글리신 t-부틸 에스테르로 알려져 있음)와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상, 예를 들어, 약 2일 내지 20일, 약 3일 내지 19일, 약 4일 내지 18일, 약 5일 내지 17일, 약 6일 내지 16일, 약 7일 내지 15일, 약 8일 내지 15일, 약 9일 내지 14일, 또는 약 10일 내지 13일 동안 상기 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제

및 억제제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 최대 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 이상 동안 상기 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 4, 5, 6, 7, 또는 8일 동안 상기 DA 뉴런 계통 특이적 활성화제 및 억제제와 접촉된다.

[0117] 소정 구현예에서, 세포는 약 0.5 내지 5 mM, 또는 약 1 내지 4 mM, 또는 약 1.5 내지 3 mM의 농도로 L-글루타민과 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 2 mM의 농도로 L-글루타민과 접촉된다.

[0118] 소정 구현예에서, 세포는 약 5 내지 50 ng/mL, 또는 약 10 내지 40 ng/mL, 또는 약 15 내지 30 ng/mL, 또는 약 18 내지 25 ng/mL의 농도로 BDNF와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 20 ng/mL의 농도로 BDNF와 접촉된다.

[0119] 소정 구현예에서, 세포는 약 50 내지 500 nM, 또는 약 100 내지 400 nM, 또는 약 150 내지 300 nM, 또는 약 180 내지 250 nM의 농도로 AA와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 200 nM의 농도로 AA와 접촉된다.

[0120] 소정 구현예에서, 세포는 약 5 내지 50 ng/mL, 또는 약 10 내지 40 ng/mL, 또는 약 15 내지 30 ng/mL, 또는 약 18 내지 25 ng/mL의 농도로 GDNF와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 20 ng/mL의 농도로 GDNF와 접촉된다.

[0121] 소정 구현예에서, 세포는 약 200 내지 800 nM, 또는 약 250 내지 750 nM, 또는 약 300 내지 700 nM, 또는 약 350 내지 650 nM, 또는 약 400 내지 600 nM, 또는 약 450 내지 550 nM의 농도로 cAMP와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 500 nM의 농도로 cAMP와 접촉된다.

[0122] 소정 구현예에서, 세포는 약 0.01 내지 5 ng/mL, 또는 약 0.05 내지 4 ng/mL, 또는 약 0.1 내지 3 ng/mL, 또는 약 0.5 내지 2 ng/mL의 농도로 TGFβ3와 접촉된다. 소정 구현예에서, 세포는 약 1 ng/mL의 농도로 TGFβ3와 접촉된다.

[0123] 소정 구현예에서, 분화된 중간뇌 DA 전구체는 그 전문이 참조로 포함되는, U.S. 공개 번호 2015/0010514에 기재된 바와 같이 추가 배양된다.

[0124] 소정 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 제조되는 세포는, 예를 들어, 유세포 측정을 이용하여, CD142 발현, 또는 콜린성 수용체(CHRNB3) 발현에 기반해서 정렬되고, 선택되고, 단리될 수 있다.

[0125] 소정 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 따라 제조되는 세포는 추가로 폴리시알릴트랜스퍼라제, 예를 들어, 박테리아 폴리시알릴트랜스퍼라제, 예컨대 나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 폴리시알릴트랜스퍼라제(PST_{Nm})와 접촉될 수 있다. 소정 구현예에서, 세포는 재조합 폴리시알릴트랜스퍼라제를 발현하는 재조합 세포이다.

[0126] ***5.3*** *신경변성 장애의 치료 방법*

[0127] 중간뇌 DA 뉴런, 또는 이의 전구체(또한 "줄기-세포-유래 중간뇌 DA 전구체" 또는 "mDA" 전구체로 불림)의 하나 이상의 마커를 발현하는 시험관내 분화된 세포는 신경변성 장애의 치료를 위해 이용될 수 있다. 본원에 개시된 요지는 신경변성 장애를 앓는 대상체 내로 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 신경변성 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0128] 신경변성 장애의 비제한적 예에는 파킨슨 질환, 헌팅턴 질환, 알츠하이머 질환, 및 다발성 경화증이 포함된다.

[0129] 소정 구현예에서, 신경변성 질환은 파킨슨 질환이다. 파킨슨 질환의 일차 운동 징후에는, 예를 들어 비제한적으로, 손, 팔, 다리, 턱 및 얼굴의 경련, 운동완만증 또는 운동 느려짐, 사지 및 몸통의 경축 또는 경직 및 자세 불안정 또는 손상된 균형 및 조정이 포함된다.

[0130] 소정 구현예에서, 신경변성 질환은 파킨슨증 질환이며, 이는 운동을 제어하는 뇌의 일부인 기저핵에서 도파민 부족에 연관되는 질환을 나타낸다. 증상에는 경련, 운동완만증(극심한 운동 느려짐), 굽은 자세, 자세 불안정, 및 경축이 포함된다. 파킨슨증 질환의 비제한적 예에는 피질기저 변성, 레비 소체 치매, 다중 시스템 위축, 및 진행성 핵상 마비가 포함된다.

[0131] 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체는 신경변성 장애의 치료 또는 예방을 위해 대상체에 전신으로 또는 직접 투여되거나 제공될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체는 관심 기관(예로, 중추 신경계(CNS) 또는 말초 신경계(PNS))으로 직접 주사된다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체는 선조체 내로 직접 주사된다.

[0132] 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체는 임의의 생리적으로 허용 가능한 비히클 중 투여될 수 있다. 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체 및 약학적으로 허용 가능한 비히클을 포함하는 약학적 조성물이 또한 제공된다. 본

원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체 및 상기 세포를 포함하는 약학적 조성물은 편재된 주사, 정위(OT) 주사, 전신 주사, 정맥내 주사, 또는 비경구 투여를 통해 투여될 수 있다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체는 정위(OT) 주사를 통해 신경변성 장애를 앓는 대상체에 투여된다.

[0133] 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체 및 상기 세포를 포함하는 약학적 조성물은 멸균 액체 조제물, 예로, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀젼, 분산액, 또는 점성 조성물로 편리하게 제공될 수 있고, 이는 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조제물은 보통 겔, 다른 점성 조성물, 및 고체 조성물보다 제조하기 더 쉽다. 추가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해, 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 특정 조직과 더 긴 접촉 기간을 제공하기 위해 적절한 점도 범위 내에서 제형화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 담체를 포함할 수 있고, 이는, 예를 들어, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 적합한 이의 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 멸균 주사용 용액은 요망되는 바에 따라, 다양한 양의 다른 성분과 함께 요구되는 양의 적절한 용매 중, 본원에 개시된 요지의 조성물, 예로, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체를 포함하는 조성물을 포함시켜 제조될 수 있다. 이러한 조성물은 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 덱스트로스 등과의 혼합물일 수 있다. 조성물은 또한 동결건조될 수 있다. 조성물은 요망되는 투여 및 제조 경로에 따라, 보조 물질, 예컨대 수화제, 분산제, 또는 유화제(예로, 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는 점도 증강 첨가제, 보존제, 풍미제, 색상 등을 함유할 수 있다. 표준 참고서, 예컨대 본원에 참조로 포함되는 문헌[REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE", 17th edition, 1985]이 과도한 실험 없이 적합한 조제물을 제공하기 위해 참조될 수 있다.

[0134] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트화제, 및 완충제를 포함하는 조성물의 안정성 및 멸균성을 증강시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물의 작용 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 등에 의해 확보될 수 있다. 주사용 약학 형태의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 이용에 의해 일으킬 수 있다. 그러나 본원에 개시된 요지에 따르면, 이용되는 임의의 비히클, 희석제, 또는 첨가제는 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체와 상용성이어야 할 것이다.

[0135] 요망되는 경우, 조성물의 점도는 약학적으로 허용 가능한 증점제를 이용하여 선택된 수준으로 유지될 수 있다. 쉽게 그리고 경제적으로 이용 가능하고 함께 작업하기 쉬우므로 메틸셀룰로스가 이용될 수 있다. 다른 적합한 증점제에는, 예를 들어, 잔탄 고무, 카복시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 카보머 등이 포함된다. 증점제의 농도는 선택되는 제제에 의존할 수 있다. 중요 포인트는 선택된 점도를 달성할 양을 이용하는 것이다. 적합한 담체 및 다른 첨가제의 선택은 정확한 투여 경로 및 특정 투여량 형태, 예로, 액체 투여량 형태의 성질에(예로, 조성물이 용액, 현탁액, 겔 또는 다른 액체 형태, 예컨대 경시 방출 형태 또는 액체 충전 형태로 제형화되어야 하는지 여부에) 의존할 것이다.

[0136] 당분야 숙련가는 조성물의 성분이 화학적으로 불활성이도록 선택되어야 하며, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 생활성 또는 유효성에 영향을 미치지 않을 것임을 인식할 것이다. 이는 화학적 및 약학적 이론의 숙련가에게 문제를 제시하지 않거나, 또는 문제는 표준 텍스트를 참조하여 또는 본 개시 및 본원에서 인용되는 문헌으로부터 단순한 실험에 의해(과도한 실험이 관여되지 않고) 쉽게 회피될 수 있다.

[0137] 소정의 비제한적 구현예에서, 본원에 기재된 세포 및 전구체는 생체적합성 스캐폴드 또는 매트릭스, 예를 들어 세포가 임플란트되거나 대상체에 이식되는 경우 조직 재생을 촉진하는 생체적합성 3차원 스캐폴드를 추가로 포함하는 조성물에 포함된다. 소정의 비제한적 구현예에서, 생체적합성 스캐폴드는 세포외 매트릭스 물질, 합성 중합체, 사이토카인, 콜라겐, 폴리펩타이드 또는 단백질, 다당류, 예컨대 파이브로넥틴, 라미닌, 케라틴, 피브린, 피브리노겐, 히알루론산, 헤파린 설페이트, 콘드로이틴 설페이트, 아가로스 또는 젤라틴, 및/또는 하이드로겔을 포함한다(예로, 이들 각각의 내용의 전문이 참조로 포함되는, U.S. 공개 번호 2015/0159135, 2011/0296542, 2009/0123433, 및 2008/0268019 참고). 소정 구현예에서, 조성물은 추가로 임플란트된/이식된 세포의 중간뇌 DA 세포로의 성숙을 촉진하기 위한 성장 인자를 포함한다.

[0138] 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 치료적 이용에 관한 하나의 고려사항은 최적 효과를 달성하기 위해 필요한 세포의 양이다. 최적 효과에는 비제한적으로, 신경변성 장애를 앓는 대상체의 CNS 및/또는 PNS 영역의 재증식 및/또는 대상체의 CNS 및/또는 PNS의 개선된 기능이 포함된다.

[0139] "유효량"(또는 "치료적 유효량")은 치료 시 유익하거나 요망되는 임상 결과에 영향을 미치기 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 용량으로 대상체에 투여될 수 있다. 치료의 관점에서, 유효량은 신경변성 장애 또는 뇌하수체 장애를 호전시키거나, 완화하거나, 안정화하거나, 역전시키거나 또는 진행을 늦추거나, 또는 신경병성 장애

의 병리적 결과를 다르게 줄이기 충분한 양이다. 유효량은 일반적으로 케이스별 기준으로 의사에 의해 결정되며, 당업자의 기술 범위 내에 있다. 유효량을 달성하기 위해 적절한 투여량을 결정할 때 몇몇 요인이 전형적으로 고려된다. 이들 요인에는 대상체의 연령, 성별 및 체중, 치료받는 상태, 상태의 중증도 및 형태 그리고 투여되는 세포의 유효 농도가 포함된다.

[0140] 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 유효량은 신경변성 장애를 앓는 대상체의 CNS 및/또는 PNS 영역에서 재증식하기 충분한 양이다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 유효량은 신경변성 장애를 앓는 대상체의 CNS 및/또는 PNS의 기능을 개선하기 충분한 양이며, 예로, 개선된 기능은 정상 개인의 CNS 및/또는 PNS의 기능의 약 1%, 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%일 수 있다.

[0141] 투여될 세포의 양은 치료받는 대상체에 있어서 변할 것이다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 약 1×10^{4} 내지 약 1×10^{10}, 약 1×10^{4} 내지 약 1×10^{5}, 약 1×10^{5} 내지 약 1×10^{9}, 약 1×10^{5} 내지 약 1×10^{6}, 약 1×10^{5} 내지 약 1×10^{7}, 약 1×10^{6} 내지 약 1×10^{7}, 약 1×10^{6} 내지 약 1×10^{8}, 약 1×10^{7} 내지 약 1×10^{8}, 약 1×10^{8} 내지 약 1×10^{9}, 약 1×10^{8} 내지 약 1×10^{10}, 또는 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{10}이 대상체에 투여된다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 약 1×10^{5} 내지 약 1×10^{7}이 신경변성 장애를 앓는 대상체에 투여된다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 약 1×10^{6} 내지 약 1×10^{7}이 신경변성 장애를 앓는 대상체에 투여된다. 소정 구현예에서, 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 약 1×10^{6} 내지 약 4×10^{6}이 신경변성 장애를 앓는 대상체에 투여된다. 유효 용량으로 간주될 양의 정확한 결정은 특정 대상체의 체격, 연령, 성별, 체중 및 상태를 포함하는, 각각의 대상체에 개별적인 요인에 기반할 수 있다. 투여량은 본 개시 및 당분야의 지식으로부터 당분야 숙련가에 의해 쉽게 확인될 수 있다.

[0142] 소정 구현예에서, 신경변성 장애를 치료하기 위해 신경변성 장애를 앓는 대상체에 투여되는 세포는 본원에 개시된 줄기-세포-유래 중간뇌 DA 전구체로부터 분화된/성숙된 뉴런의 모집단이다.

[0143] *5.4 키트*

[0144] 본원에 개시된 요지는 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 키트는 (a) 전환 성장 인자 베타(TGFβ)/Activin-Nodal 신호전달의 하나 이상의 억제제, (b) BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제, (c) Wnt 신호전달의 하나 이상의 활성화제, (d) SHH 신호전달의 하나 이상의 활성화제, 및 (e) 중간뇌 DA 뉴런, 또는 이의 전구체의 하나 이상의 마커를 발현하는 분화된 세포의 모집단으로 줄기 세포의 분화를 유도하기 위한 지침을 포함한다.

[0145] 소정 구현예에서, 키트는 BMP/SMAD 신호전달의 하나 이상의 억제제를 포함하지 않는다.

[0146] 소정 구현예에서, 키트는 추가로 BMP 신호전달의 하나 이상의 활성화제를 포함한다.

[0147] 소정 구현예에서, 지침은 특정 순서로의 줄기 세포와 억제제(들), 활성화제(들) 및 분자(들)의 접촉을 포함한다. 억제제(들), 활성화제(들) 및 분자(들)의 접촉 순서는 줄기 세포의 배양을 위해 이용되는 세포 배양 배지에 의해 결정될 수 있다.

[0148] 소정 구현예에서, 지침은 본 개시의 방법(상기, 섹션 5.2 참고)에 의해 기재된 바와 같은 줄기 세포와 억제제(들), 활성화제(들) 및 분자(들)의 접촉을 포함한다.

[0149] 소정 구현예에서, 본 개시는 단위 투여량 형태로 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 모집단 또는 상기 전구체를 포함하는 조성물의 유효량을 포함하는 키트를 제공한다. 소정 구현예에서, 줄기-세포-유래 세포는 성숙한 분화된 세포, 예를 들어, 중간뇌 DA 뉴런이다. 소정 구현예에서, 키트는 치료 조성물을 함유하는 멸균 용기를 포함한다; 이러한 용기는 상자, 앰플, 병, 바이알, 튜브, 가방, 파우치, 블리스터-팩, 또는 당분야에 공지된 다른 적합한 용기 형태일 수 있다. 이러한 용기는 플라스틱, 유리, 라미네이트지, 금속 호일, 또는 약제의 보유에 적합한 다른 물질로 제조될 수 있다.

[0150] 소정 구현예에서, 키트는 본원에 개시된 줄기-세포-유래 전구체의 모집단 또는 이를 포함하는 조성물을 신경변성 장애를 앓는 대상체에게 투여하기 위한 지침을 포함한다. 지침은 신경변성 장애의 치료 또는 예방을 위한 세포 또는 조성물의 이용에 관한 정보를 포함할 수 있다. 소정 구현예에서, 지침은 다음 중 적어도 하나를 포함한다: 치료제의 설명; 신경변성 장애 또는 이의 증상을 치료 또는 예방하기 위한 투여량 일정 및 투여; 주의사항;

경고; 적응증; 금기; 과용량 정보; 유해 반응; 동물 약리; 임상 연구; 및/또는 참고문헌. 지침은 용기 상에 직접(존재하는 경우), 또는 용기에 적용된 표지로, 또는 용기 내에 또는 이와 함께 공급되는 별도 시트, 팜플렛, 카드, 또는 폴더로 인쇄될 수 있다.

[0151] 6. 실시예

[0152] 본원에 개시된 요지는 하기 실시예를 참조로 더 잘 이해될 것이며, 이는 제한으로서가 아니라 본원에 개시된 요지의 예시로서 제공된다.

[0153] 6.1 실시예 1: 줄기 세포-유래 중간뇌 도파민(DA) 전구 세포의 제조 방법.

[0154] 요약

[0155] 인간 배아 줄기 세포(hESC)는 잠재적으로 신체의 모든 세포 유형을 생성할 수 있다. 장기 목표는 완전한 인간 계통 트리를 시험관내 재생성하는 전략의 개발이다. 본 실시예는 hESC를 중간뇌 도파민 뉴런 전구체 세포로 분화시키는 전략을 기재하며, 여기서 세포를 SB431542(TGFβ/Activin-nodal 신호전달 억제제), LDN193189(BMP/SMAD 신호전달 억제제), Sonic Hedgehog(SHH), 및 CHIR99021(wingless(Wnt) 신호전달을 증가시키는 GSK3β 억제제)가 보충된 신경기본(neurobasal, NB)/N2 배지(선택적으로 E6 배지를 포함할 수 있음) 중에 분화시켰고, 여기서 세포가 4일 또는 5일 동안 성장 인자와 함께 최초 배양된 후 CHIR99021의 농도를 증가시켰다("범프"). 세포를 7일 또는 8일 동안 증가된 농도의 CHIR99021과 배양하였다. 이어서 세포를 DA 뉴런 성장 인자 뇌-유래 신경영양 인자(BDNF), 아교 세포-유래 신경영양 인자(GDNF), 사이클릭 아데노신 모노포스페이트(cAMP), 전환 성장 인자 베타 3(TGFβ3), 아스코르브산(AA), 및 DAPT와 배양하여 중간뇌 DA 전구체를 제조하였다.

[0156] 방법

[0157] hESC는 분화 전에 E8/매트리겔 배지 중에 유지하였다. 세포를 다음 배양 전략에 따라 성장 인자가 보충된 NB/N2 배지 중에 분화시켰으며, 여기서 세포를 4일차에 3 μM 범프 또는 5일차에 7.5 μM 범프와 함께 배양하였다.

[0158] 3 μM 범프 프로토콜(GMP V2A)

[0159] · 0일(D0): hESC를 E8/매트리겔 배지로부터 다음과 같이 분화 인자가 보충된 신경기본(NB)/N2 배지를 포함하는 분화 배지로 옮겼다(D0 배지에는 또한 세포 생존을 증강시키기 위해 10 μM Y-27632 ROCK(Rho-associated, coiled-coil 함유 단백질 키나제) 억제제가 포함되었다). 세포는 약 2백만 개 세포/mL의 농도였다:

[0160] - 250 nM LDN193189

[0161] - 10 μM SB431542

[0162] - 500 ng/mL SHH

[0163] - 0.7 μM CHIR99021

[0164] · D1: 분화 배지를 Y-27632를 포함하지 않는 신선 상태 분화 배지로 교환하였다.

[0165] · D2: 배지 교환 없었다.

[0166] · D3: 배지를 D1에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0167] · D4: 분화 배지를 3 μM CHIR99021을 포함하는(그리고 Y-27632를 포함하지 않는) 신선 상태 분화 배지로 교환하였다.

[0168] · D5: 배지 교환 없었다.

[0169] · D6: 배지를 D4에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0170] · D7: 분화 배지를 3 μM CHIR99021이 보충된 NB/N2를 포함하는(그리고 LDN193189, SB431542, SHH 또는 Y-27632는 포함하지 않는) 신선 상태 배지로 교환하였다.

[0171] · D8: 배지 교환 없었다.

[0172] · D9: 배지를 D7에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0173] · D10: 배지를 3 μM CHIR99021, BDNF, GDNF, cAMP, TGFβ3, 및 AA를 포함하는 신선 상태 NB/B27 배지로 교환

하였다.

[0174] · D11: 배지를 D10에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0175] · D12: 배지가 추가로 DAPT를 포함하고 CHIR99021을 포함하지 않는 것을 제외하고, 배지를 D10에 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0176] · D13~D19: 배지를 D12에 기재된 바와 같이 교환하였다(배양 기간은 최대 D27 이상일 수 있고, D17 또는 D18에 적어도 1회 계대가 포함된다).

[0177] · D20: 배지를 세포에서 흡인 제거하고, 세포를 세척하여 NB 배지 중에 현탁한 후 플레이트 접종하였다.

[0178] · 이어서 세포를 초기 중간뇌 DA 마커 조합의 발현에 대해 시험하였다: 1) OTX2/EN/LMX1A 및 2) PAX6/FOXA2/EN/ 및 NKX2.2 또는 NKX6.1; 또는 후기 중간뇌 DA 마커 조합: 1) TH/EN/FOXA2 및 2) LMX1A/OTX2/NURR1.

[0179] · 세포로 냉동보존 또는 마우스 내 이식을 거쳤다.

[0180] · 마우스 내 이식을 위해, 세포를 150,000개/마이크로리터 농도로 HBSS + HEPPES 중에 현탁하고, 여기서 5~6백만 개 세포를 면역결핍 마우스 내로 그래프팅하였다.

[0181] 7.5 μM 범프 프로토콜(GMP V2B)

[0182] · 0일(D0): hESC를 E8/매트리겔 배지로부터 다음과 같이 분화 인자가 보충된 신경기본(NB)/N2 배지를 포함하는 분화 배지로 옮겼다(D0 배지에는 또한 세포 생존을 증강시키기 위해 10 μM Y-27632 ROCK(Rho-associated, coiled-coil 함유 단백질 키나제) 억제제가 포함되었다). 세포는 약 2백만 개 세포/mL의 농도였다:

[0183] - 250 nM LDN193189

[0184] - 10 μM SB431542

[0185] - 500 ng/mL SHH

[0186] - 0.7 μM CHIR99021

[0187] · D1: 분화 배지를 Y-27632를 포함하지 않는 신선 상태 분화 배지로 교환하였다.

[0188] · D2: 배지 교환 없었다.

[0189] · D3: 배지를 D1에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0190] · D4: 배지 교환 없었다.

[0191] · D5: 분화 배지를 7.5 μM CHIR99021을 포함하는(그리고 Y-27632를 포함하지 않는) 신선 상태 분화 배지로 교환하였다.

[0192] · D6: 배지 교환 없었다.

[0193] · D7: 분화 배지를 7.5 μM CHIR99021이 보충된 NB/N2를 포함하는(그리고 LDN193189, SB431542, SHH 또는 Y-27632는 포함하지 않는) 신선 상태 배지로 교환하였다.

[0194] · D8: 배지 교환 없었다.

[0195] · D9: 배지를 D7에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0196] · D10: 배지를 3 μM CHIR99021, BDNF, GDNF, cAMP, TGFβ3, 및 AA를 포함하는 신선 상태 NB/B27 배지로 교환하였다.

[0197] · D11: 배지를 D10에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0198] · D12: 배지가 추가로 DAPT를 포함하고, CHIR99021을 포함하지 않는 것을 제외하고, 배지를 D10에 대해 기재된 바와 같이 교환함,

[0199] · D13~D19: 배지를 D12에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다(배양 기간은 최대 D27 이상일 수 있고, D17 또는 D18에 적어도 1회 계대가 포함된다).

[0200] · D20: 배지를 세포에서 흡인 제거하고, 세포를 세척하여 NB 배지 중에 현탁한 후 플레이트 접종하였다.

[0201] · 세포를 초기 중간뇌 DA 마커 조합: 1) OTX2/EN/LMX1A 및 2) PAX6/FOXA2/EN/ 및 NKX2.2 또는 NKX6.1; 또는 후기 중간뇌 DA 마커 조합: 1) TH/EN/FOXA2 및 2) LMX1A/OTX2/NURR1의 발현에 대해 시험하였다.

[0202] · 세포로 냉동보존 또는 마우스 내 이식을 거쳤다.

[0203] · 마우스 내 이식을 위해, 세포를 150,000/마이크로리터의 농도로 HBSS + HEPPES 중에 현탁하고, 여기서 5~6백만 개 세포를 면역결핍 마우스 내로 그래프팅하였다.

[0204] **결과**

[0205] 문헌[Kriks et al., Nature. 2011 Nov 6;480(7378):547-51]에는 이중 SMAD 억제, SHH 활성화, 및 Wnt 활성화를 포함하는 KSR 배지 중(후술된 바와 같은 "범프" 없이) 세포를 배양함으로써 hESC를 중간뇌 DA 세포로 분화시키기 위한 프로토콜이 기재된다. 그러나, KSR 배지는 정의되지 않았으며, 분화 프로토콜을 이용하여 제조된 세포는 이식 후 생체내 수행이 불량하다. 본 발명의 실시예에 따라 분화된 세포는 NB/N2 배지 중 이중 SMAD 억제(SB431542 및 LDN193189를 통해), SHH 활성화 및 Wnt 활성화를 포함하는 배양 프로토콜을 이용하며, 여기서 Wnt의 농도는 배양 D4 또는 D5에 0.7 μM 기준선 농도로부터 5~10 μM로 증가된다(즉, Wnt "범프").

[0206] 도 1에 나타낸 바와 같이, KSR 배지(비-GMP) 중 또는 E8/NB/N2 배지(GMP V1) 중 문헌[Kriks et al.]에 의해 기재된 방법에 따른 hESC의 분화는 중간뇌 DA 뉴런을 제조하였다; 그러나, 다른 뇌 영역의 뉴런도 제조되었다. 세포를 D4~D10에 7.5 μM(또는 5~10 μM) Wnt 범프를 이용하는 본 실시예의 방법에 따라 E8/NB/N2 배지 중 배양한 경우, 중간뇌 DA 세포가 특이적으로 제조되었다.

[0207] 도 2에 나타낸 바와 같이, KSR 배지(비-GMP) 중 또는 E8/NB/N2 배지(GMP V1) 중 문헌[Kriks et al.]에 의해 기재된 방법에 따른 hESC의 분화는 둘 다 유사한 수준의 PAX6, TH, NURR1, FOXA2, 및 LMX1A를 발현하는 세포를 제조하였다. 그러나, 둘 중 어느 한 배지를 이용하여 제조된 세포는 세포가 설치류 내로 이식된 경우 불량한 생존을 나타내었다.

[0208] hESC를 E8/NB/N2 배지 및 3 μM(GMP V2A) 또는 7.5 μM(GMP V2B) Wnt 범프를 이용하여 분화시킨 경우, 세포는 또한 KSR(비-GMP) 또는 E8/NB/N2(GMP V1)를 이용한 Kriks 등의 프로토콜에서와 유사한 수준의 PAX6, TH, NURR1, FOXA2, 및 LMX1A를 발현하였다. 그러나, GMP V2A 또는 GMP V2B 프로토콜에 따라 분화된 세포는 더 높은 수준의 중간뇌 DA 마커 EN-1을 발현하였다(도 3). 도 4는 분화된 세포를 확인하기 위해 이용될 수 있는 다른 중간뇌 DA 마커를 기재한다.

[0209] E8/NB/N2 배지 중 Kriks 등의 프로토콜을 이용하여 분화된 hESC는 때때로 25일 동안의 분화 및 비손상, 면역약화 마우스 내 이식 후 생체내 Hncam, FOXA2, 및 TH를 발현하는 DA 세포의 우수한 생존을 야기했다. 이식편은 이식 후 4주차에 검사하였다. 그러나, 세포는 조밀한 Hncam 발현 패치를 나타내며, 또한 PAX6에 대해서도 양성이어서, 신경 전구 상태를 시사하였다(도 5). GMP V2A(3 μM 범프) 또는 GMP V2B(7.5 μM 범프)에 따라 배양된 hESC는 시험관내 증가된 NURR1, LMX1A, EN-1, 및 TH 수준을 발현하는 DA 세포를 제조하였고(도 6a), PAX6은 발현하지 않았다(도 7). 또한, 비손상, 면역약화 마우스의 선조체 내로 이식된 GMP V2B(7.5 μM 범프) 프로토콜을 이용하여 분화된 중간뇌 DA 세포는 Hncam 패치 없이, 그래프팅 3주 후 증강된 섬유 성장 및 hNCAM 및 TH 발현을 나타내었다(도 6b). 추가적으로, 세포가 이식 전에 냉동보존된 경우, 세포는 이전에 냉동보존되지 않은 마우스 내 그래프팅된 세포의 섬유 성장과 유사한 섬유 성장을 나타내었다(도 8).

[0210] 도 9a~b에 나타낸 바와 같이, GMP V2A 또는 GMP V2B 프로토콜에 따라 제조된 세포는 CD142 발현에 기반하여 성공적으로 정렬시킬 수 있다. 추가적으로, KSR 배지 중 Kirks 등에 의해 기재된 방법에 따라 배양되고, CD142 발현에 기반하여 정렬된 중간뇌 DA 세포를 마우스 및 비-인간 영장류 내 그래프팅하였다. 도 10a~b에 나타낸 바와 같이, 이들 세포는 마우스(이식 30일 후) 및 비-인간 영장류(이식 1년 후) 내로 이식된 경우 단기 생존하며, 다수의 TH 발현 뉴런을 함유한다.

[0211] 또한, 분화된 중간뇌 DA 세포의 폴리시알릴트랜스퍼라제(나이세리아 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 폴리시알릴트랜스퍼라제(PST_{Nm})) 처리로 인한 증가된 수준의 폴리시알릴화는 냉동-해동 사이클 후, 및 마우스 내 생체내 이식 후 안정하였다. 추가적으로, CD142 세포 정렬은 폴리시알릴트랜스퍼라제 처리에 의해 영향 받지 않았다(도 11a, b 및 d). 추가로, 미처리 세포는 마우스 내 이식 후 생체내 주지 가능한 성장 없이 약 10%의 뉴런을 가진 반면, 폴리시알릴트랜스퍼라제 처리된 세포는 마우스의 선조체에서 mDA 세포의 그래프팅 2주 후 어느

것도 100 μm 미만 길이의 축삭을 갖지 않았다.

[0212] 6.2 실시예 2: 줄기 세포-유래 중간뇌 도파민(DA) 전구 세포의 제조 방법.

[0213] **요약**

[0214] 본 실시예는 실시예 1에 기재된 GMP V2A 분화 프로토콜의 변형된 버전을 제공한다.

[0215] 분화 전에 hESC는 E8/매트리겔 배지 중에 유지하였다. 세포를 하기 배양 전략에 따라 성장 인자가 보충된 NB/N2/B27 배지 중에 분화시켰고, 여기서 세포를 4일차에 7.5 μM 범프와 함께 배양하였다.

[0216] 7.5 μM 범프 프로토콜(GMP V2B의 변형)

[0217] • 0일(D0): hESC를 E8/매트리겔 배지로부터 다음과 같이 분화 인자가 보충된 신경기본(NB)/N2/B27 배지를 포함하는 분화 배지로 옮겼다(D0 배지에는 또한 세포 생존을 증강시키기 위해 10 μM Y-27632 ROCK(Rho-associated, coiled-coil 함유 단백질 키나제) 억제제가 포함되었다). 세포는 약 7억 5천만 개 세포/L의 농도였다:

[0218] - 2 mM L-글루타민

[0219] - 250 nM LDN193189

[0220] - 10.8 μM SB431542

[0221] - 500 ng/mL SHH

[0222] - 0.7 μM CHIR99021

[0223] • D1: 분화 배지를 Y-27632를 포함하지 않는 신선 상태 분화 배지로 교환하였다.

[0224] • D2: 배지 교환 없었다.

[0225] • D3: 배지를 D1에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0226] • D4: 분화 배지를 7.5 μM CHIR99021을 포함하는(그리고 Y-27632를 포함하지 않는) 신선 상태 분화 배지로 교환하였다.

[0227] • D5: 배지 교환 없었다.

[0228] • D6: 배지를 D4에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0229] • D7: 분화 배지를 2 mM L-글루타민 및 7.5 μM CHIR99021이 보충된 NB/N2/B27을 포함하는(그리고 LDN193189, SB431542, SHH 또는 Y-27632는 포함하지 않는) 신선 상태 배지로 교환하였다.

[0230] • D8: 배지 교환 없었다.

[0231] • D9: 배지를 D7에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0232] • D10: 배지를 2 mM L-글루타민, 3 μM CHIR99021, 20 ng/mL BDNF, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3, 및 200 nM AA를 포함하는 신선 상태 NB/B27 배지로 교환하였다.

[0233] • D11: 세포를 계대 배양하고 배지를 D10에 대해 기재된 바와 같이 교환하여 15억 개 세포/L의 농도를 달성하였다.

[0234] • D12: 배지가 추가로 10 μM DAPT를 포함하고, CHIR99021은 포함하지 않는 것을 제외하고, 배지를 D10에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0235] • D13~D15: 성숙 배지. 배지를 D12에 대해 기재된 바와 같이 교환하였다.

[0236] • D16: 세포를 수확하고 NB 중에 냉동보존하였다.

[0237] **방법**

[0238] **5.0 시약 및 물질**

[0239] 5.1 Texwipe 멸균 TechniSat 사전 포화 와이퍼(Fisher, Cat# 19-003-239) 또는 균등물

[0240] 5.2 원심분리 튜브(Fisher, 15 mL용 Cat# 05-538-51; Fisher, 50 mL용 Cat# 05-538-49) 또는 균등물

[0241] 5.3 조직 배양 플레이트(Fisher, 15 cm용 Cat# 08-772-24) 또는 균등물

[0242] 5.4 조직 배양 플라스크(Fisher, 75 cm^2용 Cat# 13-680-65; Fisher, 225 cm^2용 Cat# 12-565-221) 또는 균등물

[0243] 5.5 멸균 폴리스티렌 혈청 피펫(Fisher, 2 mL용 Cat# 13-675-47; Fisher, 5 mL용 Cat# 13-678-11D; Fisher, 10 mL용 Cat# 13-678-11E; Fisher, 25 mL용 Cat# 13-678-11; Fisher, Cat# 13-678-11F; Fisher, 100 mL용 Cat# 13-675-73) 또는 균등물

[0244] 5.6 멸균 흡인 피펫(Fisher, Cat# 13-678-20D) 또는 균등물

[0245] 5.7 zCellometer 계수 슬라이드(Nexcelom, Cat# CHT4-PD-100-003) 또는 균등물

[0246] 5.8 멸균 피펫 팁(Fisher, 20 ㎕용 Cat# 21-403-00; Fisher, 200 ㎕용 Cat# 21-403-01; Fisher, 1000 ㎕용 Cat# 21-403-02) 또는 균등물

[0247] 5.9 냉동바이알(Fisher, Cat# 12-565-164N) 또는 균등물

[0248] 5.10 CryoColor Code Cap 삽입물(Fisher, 흰색용 Cat# 12-565-242; Fisher, 분류된 색상용 Cat# 12-565-180) 또는 균등물

[0249] 5.11 세포 여과기(Fisher, 40 μM용 Cat# 08-771-1) 또는 균등물

[0250] 5.12 AOPI(Nexcelom, Cat# CS2-0106-5 mL)

[0251] 5.13 DMEM/F-12(Life Technologies, Cat# 11320)

[0252] 5.14 Accutase® 세포 탈착 용액(Innovative Cell Technology, Cat #AT104)

[0253] 5.15 Geltrex™ LDEV-비함유 감소된 성장 인자(Life Technologies, Cat# A14132-01)

[0254] 5.16 마그네슘 클로라이드 비함유 칼슘 클로라이드 비함유 CTS™(Cell Therapy Systems) DPBS(Life Technologies, Cat# A1285601)

[0255] 5.17 B27(비타민 A 비함유)(Life Technologies, Cat# 12587-010)

[0256] 5.18 N2 보충물 B(Stem Cell Technologies, Cat# 07156)

[0257] 5.19 신경기본(Neurobasal) 배지(Life Technologies, Cat# 21103049)

[0258] 5.20 50 mg/mL 겐타마이신[선택적](Life Technologies, Cat# 15750078) 5.21 500 μM LDN 193189(SSCRF-RP-011)

[0259] 5.22 10.8 mM SB431542(SSCRF-RP-013)

[0260] 5.23 100 ㎍/mL Shh(SSCRF-RP-014)

[0261] 5.24 15 mM CHIR99021(SSCRF-RP-004)

[0262] 5.25 10 ㎍/mL BDNF(SSCRF-RP-003)

[0263] 5.26 10 mM Y-27632(SSCRF-RP-016)

[0264] 5.27 100 mM 아스코르브산(SSCRF-RP-002)

[0265] 5.28 10 ㎍/mL GDNF(SSCRF-RP-007)

[0266] 5.29 100 mM dbcAMP(SSCRF-RP-006)

[0267] 5.30 2 ㎍/mL TGF-베타 3(SSCRF-RP-015)

[0268] 5.31 10 mM DAPT(SSCRF-RP-005)

[0269] 5.32 4 mM HCl(SSCRF-RP-008)

[0270] 5.33 15 mg/mL 폴리-L-오르니틴(SSCRF-RP-012)

[0271] 5.34 1 mg/mL 인간 파이브로넥틴(SSCRF-RP-001)

[0272] 5.35 1 mg/ml Cultrex 마우스 라미닌 I(SSCRF-RP-010)

[0273] 5.36 Essential 8™ 배지(SSCRF-FR-002)

[0274] 5.37 200 mM L-글루타민(SSCRF-RP-009)

[0275] **6.0 설비**

[0276] 6.1 Gilson 조정형 피펫장치(Pipetman-p1000, p200, p20, p10, p2) 또는 균등물

[0277] 6.2 Integra Pipetteboy Pro Pipetaid 장치 또는 균등물

[0278] 6.3 Cellometer® Vision 시스템

[0279] 6.4 CO_2 인큐베이터(Nuaire IR Autoflow CO_2 물-재킷 포함 인큐베이터) 또는 균등물

[0280] 6.5 Sorvall Legend XTR 원심분리기(Thermo Scientific, Cat# 75004520) 또는 균등물

[0281] 6.6 CryoMed 속도제어 냉동장치(Thermo Scientific, Cat# 7450) 또는 균등물

[0282] 6.7 도립 현미경(Olympus CK2) 또는 균등물

[0283] 6.8 생물학적 안전 실험대(Baker SterileGARD 클래스 II) 또는 균등물

[0284] **7.0 절차**

[0285] 7.1 **분화 개시 전날: Geltrex 해동**

[0286] 7.1.1 4℃에서 하룻밤 동안 또는 얼음 결정이 남지 않을 때까지 6×5 mL 냉동 상태 Geltrex™ 바이알을 해동한다.

[0287] 7.2 **0일: hESC 영양공급 및 Geltrex 코팅**

[0288] 7.2.1 모든 WA09 hESC 배양에 신선 상태 E8 배지를 공급한다.

[0289] 7.2.2 48 x T75 플라스크에 배치 기록#를 번호를 높여가며 표지한다. 이후 각각의 업무를 순차적으로 수행한다.

[0290] 7.2.3 Geltrex™:DMEM/F12의 1:30 혼합물을 제조한다.

[0291] 7.2.3.1 870 mL의 저온 DMEM/F12를 1 L 병에 첨가한다.

[0292] 7.2.3.2 30 mL Geltrex™을 조심스럽게 첨가한다. 각각의 Geltrex™ 바이알을 병으로부터 DMEM/F12로 1회 세척하여 대부분의 산물을 회수한다.

[0293] 7.2.3.3 수행한 후, 단단히 마개를 닫고, 뒤집어서 Geltrex를 배지와 혼합한다. 침강을 방지하기 위해 때때로 사용 중간 중간 조심스럽게 휘젓는다.

[0294] 7.2.4 Geltrex™ 코팅이 시작된 시간을 기록한다.

[0295] 7.2.5 각각의 T75 용기를 15 mL Geltrex™로 순차 코팅한다.

[0296] 7.2.6 Geltrex™ 인큐베이션이 시작된 시간을 기록한다.

[0297] 7.2.7 2~3시간 동안 실온에서 후드 내에서 인큐베이션한다.

[0298] 7.2.8 흡인이 시작되는 시간을 기록한다.

[0299] 7.2.9 인큐베이션 후, Geltrex™를 흡인하고 15 mL 일반 신경기본 배지를 첨가한다. 세포를 플레이트 접종할 준비가 될 때까지 용기를 실온에 둔다.

[0300] 7.2.10 Geltrex™이 용기에서 제거된 시간을 기록한다.

[0301] 7.3 **0일: 세포 설정 및 유도**

[0302] **주:** 7.3은 제조실 별로 2명의 독립적 운영자가 동시 수행할 수 있다. 처리 시간을 줄이기 위해 2개의 실에서 동

시에 처리할 수 있다. 동종성을 확보하기 위해 산물을 플레이트 접종 전에 풀링해야 한다.

[0303] **주:** 요구되는 것보다 수율이 높은 경우, 48개 플라스크만 플레이트 접종할 수 있다. 수율이 48개 플라스크보다 적은 경우, 수행을 중단한다.

[0304] 7.3.1 시작 전에, Accutase® one 단일 용기를 OCT4+ QC(SSCRF-SOP-107) 및 cDNA 제조(SSCRF-SOP-109)를 위해 이용하고 수율을 평가한다.

[0305] 7.3.1.1 밀도, 콜로니 크기 및 표면에 걸친 콜로니의 분포에 기반하여 대표적 플레이트를 확인한다.

[0306] 7.3.1.2 배지를 세포로부터 흡인하고 Accutase®를 첨가한다.

[0307] 7.3.1.2.1 T225 플라스크 당 15 mL

[0308] 7.3.1.2.2 15 cm 디쉬 당 10 mL

[0309] 7.3.1.3 20~30분 동안 37℃에서 세포를 인큐베이션한다.

[0310] 7.3.1.4 10 mL 피펫을 이용하여, 세포를 제거하고 균일한 현탁액으로 분쇄한다.

[0311] 7.3.1.5 50 mL 코니칼 튜브 내로 피펫팅하고, 10 mL E8 배지를 첨가한다(총 20 mL).

[0312] 7.3.1.6 실온에서 5분 동안 200xg에서 원심분리한다.

[0313] 7.3.1.7 배지를 흡인하고, 5 mL E8 배지를 첨가한다.

[0314] 7.3.1.8 세포 계수를 수행한다(7.3.20 참고)

[0315] 7.3.1.9 $3x10^6$개 세포를 SSCRF-SOP-109로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(QC용 cDNA 제조).

[0316] 7.3.1.10 $3x10^6$개 세포를 SSCRF-SOP-107로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(OCT4 측정).

[0317] 7.3.1.11 QC 튜브를 별도 운영자에게 제출하여 QC 실험실로 가져간다.

[0318] 7.3.2 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189, 10.8 μM SB431542, 500 ng/mL Shh, 0.7 μM CHIR 및 10 μM Y-27632를 함유하는 2.5 L의 NB/N2/B27을 제조한다.

[0319] 7.3.3 입력 WA09#(배치#) 및 연관된 데이터를 배치 기록에 기록한다.

[0320] 7.3.4 12개 용기의 배치에서 순차적으로 하나씩 작업한다.

[0321] **주**: 이는 운영자 별로 수행한다.

[0322] 7.3.5 흡인이 시작된 시간을 기록한다.

[0323] 7.3.6 인큐베이터로부터 WA09 hESC의 12개 용기를 꺼내고, 세포로부터 배지를 흡인하고, Accutase®를 첨가한다:

[0324] 7.3.6.1 T225 플라스크 당 15 mL

[0325] 7.3.6.2 15 cm 디쉬 당 10 mL

[0326] 7.3.7 20~30분 동안 37℃에서 세포를 인큐베이션한다.

[0327] 7.3.8 Accutase® 인큐베이션 시작 시간을 배치 기록에 기록한다.

[0328] 7.3.9 12개[T225] 또는 6개[15 cm] x 50 mL 코니칼 튜브 어셈블리를 시작한다.

[0329] 7.3.10 Accutase® 인큐베이션 종료 시간을 배치 기록에 기록한다.

[0330] 7.3.11 10 mL 피펫을 이용하여, 각 용기의 표면에 걸쳐 Accutase®로 약 5~10회 세척하여 범프가 보이지 않을 때까지 세포를 탈착하고 분쇄한다.

[0331] 7.3.12 Accutase® 중 해리된 세포를 50 mL 코니칼 튜브로 옮긴다.

[0332] 7.3.13 건조 용기의 표면을 신선 상태 E8 배지로 세척하여(Accutase®와 동일 부피를 이용함) 잔여 세포를 회수하고, 코니칼 튜브에 세포-Accutase®를 첨가한다.

[0333] **주**: 예를 들어, 15 mL Accutase®를 함유하는 T225 플라스크를 코니칼 튜브로 옮긴다. 이어서 건조 플라스크를 15 mL의 E8 배지로 세척하고, 회수된 세포-E8을 15 mL Accutase®-세포를 함유하는 코니칼 튜브에 첨가한다(총 30 mL). 10 mL Accutase®를 함유하는 15 cm 디쉬를 코니칼 튜브로 옮긴 후, 10 mL 신선 상태 E8로 세척한다(총 20 mL). 2개의 15 cm 디쉬를 하나의 코니칼 튜브에 풀링할 수 있다(총 40 mL).

[0334] **주**: 가능한 경우, 보관 목적을 위해 생존 샘플도 냉동보존해야 한다. 생존 샘플은 FreSR-S 및 QC 실험실 "USER1"의 냉동보존 프로토콜을 이용하여 단세포로 냉동할 수 있다.

[0335] 7.3.14 세포를 실온에서 200xg에서 5분 동안 원심분리한다.

[0336] 7.3.15 배지를 흡인하고 각각의 펠렛을 신선 상태 일반 신경기본 배지 10 mL 내로 온화하게 재현탁한다.

[0337] 7.3.16 3개 튜브를 신선 상태 50 mL 코니칼 튜브 내로 풀링한다(배치 당 총 2 x 50 mL 코니칼 튜브를 제공함).

[0338] 7.3.17 세포를 실온에서 200xg에서 5분 동안 원심분리한다.

[0339] 7.3.18 배지를 흡인하고 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189, 10.8 μM SB431542, 500 ng/mL Shh, 0.7 μM CHIR 및 10 μM Y-27632를 함유하는 총 5 ml NB/N2/B27을 이용하여 온화하게 재현탁한다. 모든 용기가 처리될 때까지 4℃에 둔다.

[0340] 7.3.19 모든 용기가 처리된 후, 모든 세포를 풀링하고 200 mL로 만든다.

[0341] 7.3.20 풀링된 세포를 계수한다:

[0342] 7.3.20.1 일반 신경기본 배지(성장 인자 비함유) 중 공지된 희석도의 세포를 제조한다.

[0343] 7.3.20.2 20 uL의 희석된 세포를 20 uL의 AOPI와 혼합한다.

[0344] 7.3.20.3 Cellometer® 슬라이드 상에 20 uL의 세포/AOPI 혼합물을 로딩한다.

[0345] 7.3.20.4 슬라이드를 슬롯 내에 넣는다.

[0346] 7.3.20.5 프로그램 파일 'hES Cells AOPI'를 선택한다.

[0347] 7.3.20.6 하기 포맷 "DA01 Lot#MMDDYY d0"을 이용하여 파일명을 제공한다.

[0348] 7.3.20.7 희석 값을 입력한다.

[0349] 7.3.20.8 F1 채널을 이용하여, 기계의 오른쪽 노브를 이용해서 세포에 포커싱한다.

[0350] 7.3.20.9 포커싱이 맞춰지면, 'Count'를 누른다.

[0351] 7.3.21 생활성 및 비-생활성 세포/mL의 총 수, 세포의 총 수, 및 생활성%를 기록한다.

[0352] 7.3.22 3×10^6개 세포를 MICR-CULT-SOP-1634(멸균성)로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다. 3×10^6개 세포를 PT-OP-7020(미코플라즈마)로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다. 제출 전에 각각을 1 mL로 만들고, 처리를 위해 별도 운영자에게 보낸다.

[0353] 7.3.23 세포 농도를 1 L 당 7억 5천만 개 세포로 조정한다(총 2 L가 필요함).

[0354] 7.3.23.1 7억 5천만 개 세포를 달성하기 위해 필요한 부피를 계산한다.

[0355] 7.3.23.2 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189, 10.8 μM SB431542, 500 ng/mL Shh, 0.7 μM CHIR 및 10 μM Y-27632를 함유하는 NB/N2/B27의 각각의 1 L 병으로부터 계산된 부피를 제거한다.

[0356] 7.3.23.3 각각의 1 L 병에 7억 5천만 개 세포를 함유하는 계산된 부피를 첨가한다.

[0357] 7.3.24 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0358] 7.3.25 Geltrex™-코팅된 플라스크에서 일반 신경기본 배지를 흡인한다.

[0359] 7.3.26 각각의 T 75에 40 mL의 세포 현탁액을 조심스럽게 첨가한다.

[0360] **주**: 피펫팅 전에 세포를 조심스럽게 현탁해야 한다.

[0361] 7.3.27 플라스크를 조심스럽게 두드려서 표면을 세포로 균일하게 코팅한다.

[0362] **주**: 세포 분포는 현미경 상에서 확인할 수 있다.

[0363] 7.3.28 교란하지 않고 후드에서 10~15분 동안 가라앉게 둔다.

[0364] 7.3.29 플라스크를 인큐베이터로 조심스럽게 옮긴다.

[0365] 7.3.30 5% CO_2에서 37℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션한다.

[0366] 7.4 **1일: 영양공급(0.7 μM CHIR)**

[0367] 7.4.1 **제어 포인트**: BR에 나타낸 플라스크의 융합성을 확인한다. 배양은 100% 융합성이어야 한다. 나타낸 플라스크의 융합성을 주지한다.

[0368] 7.4.2 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0369] 7.4.3 기존 배지를 흡인하고 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189 및 10.8 μM SB 431542, 500 ng/mL SHH 및 0.7 μM CHIR99021을 함유하는 NB/N2/B27 배지를 T75 당 40 mL씩 온화하게 첨가한다.

[0370] 7.5 **2일: 배지 교환 없음**

[0371] 7.6 **3일: 영양공급(0.7 μM CHIR)**

[0372] 7.6.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0373] 7.6.2 기존 배지를 흡인하고 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189 및 10.8 μM SB 431542, 500 ng/mL SHH 및 0.7 μM CHIR99021을 함유하는 NB/N2/B27 배지 40 mL을 온화하게 첨가한다.

[0374] 7.7 **4일: 영양공급(7.5 μM CHIR 범프)**

[0375] 7.7.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0376] 7.7.2 기존 배지를 흡인하고 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189 및 10.8 μM SB431542, 500 ng/mL SHH 및 7.5 μM CHIR을 함유하는 NB/N2/B27/ 배지 40 mL을 온화하게 첨가한다.

[0377] 7.8 **5일: 배지 교환 없음**

[0378] 7.9 **6일: 영양공급(7.5 μM CHIR)**

[0379] 7.9.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0380] 7.9.2 기본 배지를 흡인하고 2 mM L-glut, 250 nM LDN193189 및 10.8 μM SB431542, 500 ng/mL SHH 및 7.5 μM CHIR99021을 함유하는 NB/N2/B27 배지 40 mL을 온화하게 첨가한다.

[0381] 7.10 **7일: LDN, SB 및 SHH 제거**

[0382] 7.10.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0383] 7.10.2 기본 배지를 흡인하고 2 mM L-glut 및 7.5 μM CHIR99021을 함유하는 NB/N2/B27 배지 40 mL을 온화하게 첨가한다.

[0384] 7.11 **8일: 배지 교환 없음**

[0385] 7.12 **9일: 영양공급(7.5 μM CHIR) 및 PO 코팅**

[0386] 7.12.1 7.5 μM CHIR로 영양공급한다:

[0387] 7.12.1.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0388] 7.12.1.2 기존 배지를 흡인하고 2 mM L-glut 및 7.5 μM CHIR99021을 함유하는 NB/N2/B27 배지 40 mL을 온화하게 첨가한다.

[0389] 7.12.2 PO 코팅:

[0390] 7.12.2.1 각각의 T75 플라스크에 배치 기록#를 번호를 높여가며 표지한다. 각각의 업무를 순차적으로 수행한다.

[0391] 7.12.2.2 플라스크 당 15 mL의 DPBS 중 15 μg/mL 폴리-L-오르니틴으로 48 x T75를 코팅한다.

[0392] **주**: 720 mL이 요구되지만 넉넉하게 800 mL로 만든다.

[0393] 7.12.2.3 하룻밤 동안 5% CO_2에서 37℃에서 인큐베이션한다.

[0394] 7.13 **10일: 영양공급(3 μM CHIR, DAPT 비함유) 및 F/L 코팅**

[0395] 7.13.1 3 μM CHIR로 플레이트에 영양공급한다.

[0396] 7.13.1.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0397] 7.13.1.2 기본 배지를 흡인하고 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 3 μM CHIR99021을 함유하는 NB/B27 배지 40 mL을 온화하게 첨가한다.

[0398] 7.13.2 F/L 코팅:

[0399] 7.13.2.1 플라스크를 4개의 배치로 처리할 수 있다.

[0400] 7.13.2.2 흡인한 후, 15 mL의 DPBS를 첨가한다.

[0401] 7.13.2.3 온화하게 두드려 세척한 뒤 2회 더 반복하여 총 3 x DPBS 세척한다.

[0402] 7.13.2.4 흡인한 후, 15 mL의 DPBS 중 2 μg/mL 파이브로넥틴/라미닌을 첨가한다.

[0403] **주**: 720 mL이 요구되지만 넉넉하게 800 mL로 만든다.

[0404] 7.13.2.5 하룻밤 동안 5% CO_2에서 37℃에서 플레이트를 인큐베이션한다.

[0405] 7.14 **11일: 계대**

[0406] **주:** 7.14는 제조실 별로 2명의 독립적 운영자가 동시 수행할 수 있다. 처리 시간을 줄이기 위해 2개의 실에서 플라스크를 동시에 처리할 수 있다. 동종성을 확보하기 위해 산물을 플레이트 접종 전에 풀링해야 한다.

[0407] **주:** 요구되는 것보다 수율이 높은 경우, 48개 플라스크만 계대 배양할 수 있다. 수율이 1×10^9개 총 세포보다 적은 경우, 배치가 중단될 수 있다.

[0408] 7.14.1 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 3 μM CHIR99021을 함유하는 NB/B27 배지 2.5 L를 제조한다.

[0409] 7.14.2 순차적으로, 12개 용기의 배치 별로 하나씩 작업한다.

[0410] 7.14.3 플라스크를 후드에서 조심스럽게 꺼내고, 순차 배열하고, 흡인이 시작되는 때를 기록한다.

[0411] 7.14.4 기존 배지를 흡인하고 T75 당 5 mL의 Accutase®를 첨가한다.

[0412] 7.14.5 최종 Accutase® 첨가 후 인큐베이션 시작 시간을 기록한다.

[0413] 7.14.6 30~40분 동안 37℃에서 인큐베이션한다.

[0414] 7.14.7 파이브로넥틴/라미닌 코팅을 흡인하여 웰을 최대한 건조하게 만들고, 건조될 때까지 후드 하에 플라스크를 개방한 채 둔다.

[0415] 7.14.8 50 mL 코니칼 튜브를 순차 표지하여 계대 배양되는 T75 플라스크와 매칭한다.

[0416] 7.14.9 후드에서, 조심스럽게 멸균 기법을 이용하여, 플라스크 당 하나의 표지된 50 mL 코니칼 튜브에

40 ㎛ 청색 세포 여과기를 설치한다.

[0417] 7.14.10 인큐베이션 시간이 경과하면, 인큐베이션 중지 시간을 기록한다.

[0418] 7.14.11 플레이트를 인큐베이터에서 꺼낸다.

[0419] 7.14.12 10 mL 피펫을 이용해서, 세포를 약 5~10회 힘주어 피펫팅하여 클러스터를 부순다.

[0420] 7.14.13 40 μM 필터를 통해 분쇄된 세포를 조심스럽게 피펫팅한다.

[0421] 7.14.14 15 mL 일반 신경기본 배지를 건조 플라스크에 첨가하여 뒤에 남은 세포를 회수한다.

[0422] 7.14.15 40 μM 필터에 회수된 세포를 함유하는 신경기본 배지를 첨가한다.

[0423] **주**: 상기 단계에서 2개 용기를 동일한 튜브 내로 처리할 수 있다.

[0424] 7.14.16 필터를 조심스럽게 꺼내어 폐기한다. 튜브의 캡을 닫는다.

[0425] 7.14.17 각각의 T75 플라스크에 대해 공정을 반복한다.

[0426] 7.14.18 세포를 실온에서 200xg에서 5분 동안 원심분리한다.

[0427] 7.14.19 배지를 흡인하고 10 mL 일반 신경기본 배지에 각각의 펠렛을 재현탁한다.

[0428] 7.14.20 4개 이하 튜브로부터의 펠렛을 50 mL 코니칼 튜브 내로 조합한다.

[0429] 7.14.21 세포를 실온에서 200xg에서 5분 동안 원심분리한다.

[0430] 7.14.22 배지를 흡인하고 각각의 펠렛을 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 3 μM CHIR99021을 함유하는 10 mL NB/B27 배지 중에 재현탁한다.

[0431] **주**: 더 많은 용기가 처리되어야 하는 경우, 세포를 4℃에 보관할 수 있다.

[0432] 7.14.23 모든 용기가 처리되면, 모든 세포를 풀링하고 2 mM L- glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 3 μM CHIR99021을 함유하는 NB/B27 배지를 이용하여 최종 부피를 200 mL로 만든다.

[0433] 7.14.23.1 일반 신경기본 배지 중 공지된 희석도의 세포를 제조한다.

[0434] 7.14.23.2 20 uL의 희석된 세포를 20 uL의 AOPI와 혼합한다.

[0435] 7.14.23.3 Cellometer® 슬라이드 상에 20 uL의 세포/AOPI 혼합물을 로딩한다.

[0436] 7.14.23.4 슬라이드를 Cellometer® 내로 삽입한다.

[0437] 7.14.23.5 프로그램 파일 'mDA Neurons AOPI'를 선택한다.

[0438] 7.14.23.6 하기 포맷 "DA01 Lot#MMDDYY d11"을 이용하여 파일명을 제공한다.

[0439] 7.14.23.7 희석 값을 입력한다.

[0440] 7.14.23.8 F1 채널을 이용하여, 기계의 오른쪽 노브를 이용해서 세포에 포커싱한다.

[0441] 7.14.23.9 포커싱이 맞춰지면, 'Count'를 누른다.

[0442] 7.14.24 생활성 및 비-생활성 세포/mL의 총 수, 세포의 총 수, 및 생활성%를 기록한다.

[0443] 7.14.25 3×10^6개 세포를 SSCRF-SOP-109로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(QC용 cDNA 제조).

[0444] 7.14.26 3×10^6개 세포를 PT-OP-7020으로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(미코플라즈마). 제출 전 1 mL로 만든다.

[0445] 7.14.27 3×10^6개 세포를 MICR-CULT-SOP-1634로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(멸균성). 제출 전 1 mL로 만든다.

[0446] **주**: 가능한 경우, 샘플을 또한 보관용 생존 샘플을 냉동보존하기 위해 제출해야 한다. 생존 샘플은 Stem-

Cellbanker® 및 QC 실험실에서 냉동보존 프로토콜 "USER1"을 이용하여 단세포로 냉동할 수 있다.

[0447] 7.14.28 연관된 SOP에 따른 처리를 위해 별도 운영자에게 모든 QC 샘플을 보낸다.

[0448] 7.14.29 세포 농도를 1 L 당 15억 개 세포로 조정한다(총 2 L 필요).

[0449] 7.14.29.1 15억 개 세포를 달성하기 위해 요구되는 부피를 계산한다.

[0450] 7.14.29.2 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 3 μM CHIR99021을 함유하는 NB/B27 배지의 각각의 1 L 병으로부터 계산된 부피를 제거한다.

[0451] 7.14.29.3 각각의 1 L 병에 15억 개 세포를 함유하는 계산된 부피를 첨가한다.

[0452] **주**: 세포 수율이 $3x10^9$ 미만이지만 $1x10^9$ 초과인 경우, 세포를 최종 농도 $1.5x10^6$개 세포/mL로 만드는 데 필요한 mL 수를 계산하고, 최대한 많은 플라스크를 플레이트 접종한다.

[0453] 7.14.30 각각의 T75에 40 mL의 세포 현탁액을 첨가한다(총 $60x10^6$개 세포).

[0454] **주**: 피펫팅 전에 세포를 조심스럽게 현탁해야 한다.

[0455] 7.14.31 균일한 세포 현탁을 확보하기 위해 플레이트를 조심스럽게 두드린다.

[0456] 7.14.32 플레이트를 10분 동안 실온에서 인큐베이션하며 둔다.

[0457] 7.14.33 플라스크를 인큐베이터로 조심스럽게 옮긴다.

[0458] **주**: 현미경 상에서 플라스크를 스팟 별로 확인하여 균일한 코팅을 확보한다.

[0459] 7.14.34 하룻밤 동안 5% CO_2에서 37℃에서 플레이트를 인큐베이션한다.

[0460] 7.15 **영양공급 12일(CHIR 제거, DAPT 첨가[성숙 배지])**

[0461] 7.15.1 **제어 포인트**: 플라스크의 융합성을 스팟 별로 확인하고 BR 상에 기록한다. 배양은 100% 융합성이어야 한다. 나타낸 플라스크의 융합성을 주지한다.

[0462] **주**: 계대 동안 최대 수의 플라스크가 확보되지 않는 경우, 성숙 배지를 다음 날 이용할 수 있다.

[0463] 7.15.2 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0464] 7.15.3 기존 배지를 흡인하고 각각의 T75 플라스크에 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 10 μM DAPT를 함유하는 NB/B27 배지를 온화하게 첨가한다.

[0465] 7.16 **13일(성숙 배지)**

[0466] 7.16.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0467] 7.16.2 기존 배지를 흡인하고 각각의 T75 플라스크에 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 10 μM DAPT를 함유하는 NB/B27 배지를 온화하게 첨가한다.

[0468] 7.17 **14일(성숙 배지)**

[0469] 7.17.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0470] 7.17.2 기존 배지를 흡인하고 각각의 T75 플라스크에 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 10 μM DAPT를 함유하는 NB/B27 배지를 온화하게 첨가한다.

[0471] 7.18 **15일(성숙 배지)**

[0472] 7.18.1 한 번에 하나씩 각각의 T75 플라스크를 순차적으로 조작한다.

[0473] 7.18.2 기존 배지를 흡인하고 각각의 T75 플라스크에 2 mM L-glut, 20 ng/mL BDNF, 200 nM AA, 20 ng/mL GDNF, 500 nM cAMP, 1 ng/mL TGFβ3 및 10 μM DAPT를 함유하는 NB/B27 배지를 온화하게 첨가한다.

[0474] 7.19 **16일: 세포 수확 및 냉동보존**

[0475] **주:** 7.14는 제조실 별로 2명의 독립적 운영자가 동시 수행할 수 있다. 처리 시간을 줄이기 위해 2개의 실에서

플라스크를 동시에 처리할 수 있다. 동종성을 확보하기 위해 산물을 플레이트 접종 전에 풀링해야 한다.

[0476] 7.19.1 순차적으로 표지하고, 모든 냉동튜브를 4℃에서 냉각한다.

[0477] 7.19.2 박스에 로트# 및 튜브 범위를 순차적으로 표지한다.

[0478] 7.19.3 흡인 개시 전 시간을 주지한다.

[0479] 7.19.4 12개의 배치를 순차 작업하며, 플라스크로부터 기존 배지를 흡인하고, T75 당 5 mL Accutase® 를 첨가한다.

[0480] 7.19.5 인큐베이션 시작 시간을 기록한다.

[0481] 7.19.6 30~40분 동안 37℃에서 인큐베이션한다.

[0482] 7.19.7 후드에서, 50 mL 코니칼 튜브에 40 ㎛ 청색 세포 여과기를 설치한다(2개 T75 플라스크에 대해 1개 코니칼 튜브).

[0483] 7.19.8 인큐베이션 후 인큐베이터로부터 플라스크를 꺼내고, 시간을 배치 기록에 기록한다.

[0484] 7.19.9 10 mL 피펫을 이용하여, 클러스터가 더 이상 보이지 않을 때까지 약 5~10회 피펫팅한다.

[0485] 7.19.10 40 μM 필터를 통해 조심스럽게 세포 현탁액을 옮긴다.

[0486] 7.19.11 15 mL 신경기본 배지를 건조 플라스크로 첨가하여 세포를 회수한다.

[0487] 7.19.12 동일한 40 μM 필터를 통해 회수된 세포를 신경기본 배지로 옮긴다.

[0488] 7.19.13 각각의 플라스크에 대해 순차적으로 반복한다.

[0489] 7.19.14 실온에서 200xg에서 5분 동안 세포를 원심분리한다.

[0490] 7.19.15 배지를 흡인하고 5 mL 신경기본 배지 중 각각의 펠렛을 재현탁한다.

[0491] **주**: 모든 용기가 처리될 때까지 코니칼 튜브를 4℃에 보관한다.

[0492] 7.19.16 모든 용기가 처리되면, 모든 세포를 풀링하여 부피를 총 200 mL로 만든다.

[0493] 7.19.17 세포 계수를 수행한다:

[0494] 7.19.17.1 일반 신경기본 배지 중 공지된 희석도의 세포를 제조한다.

[0495] 7.19.17.2 20 uL의 희석된 세포를 20 uL의 AOPI와 혼합한다.

[0496] 7.19.17.3 Cellometer® 슬라이드 상에 20 uL의 세포/AOPI 혼합물을 로딩한다.

[0497] 7.19.17.4 Cellometer® 내로 슬라이드를 삽입한다.

[0498] 7.19.17.5 프로그램 파일 'mDA Neurons AOPI'를 선택한다.

[0499] 7.19.17.6 하기 포맷 "DA01 Lot#MMDDYY d16 cryo"를 이용하여 파일명을 제공한다.

[0500] 7.19.17.7 희석 값을 입력한다.

[0501] 7.19.17.8 F1 채널을 이용하여, 기계의 오른쪽 노브를 이용해서 세포에 포커싱한다.

[0502] 7.19.17.9 포커싱이 맞춰지면, 'Count'를 누른다.

[0503] 7.19.18 생활성 및 비-생활성 세포/mL의 총 수, 세포의 총 수, 및 생활성%를 기록한다.

[0504] 7.19.19 3×10^6개 세포를 SSCRF-SOP-109로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(QC용 cDNA 제조).

[0505] 7.19.20 3×10^6개 세포를 PT-OP-7020으로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(미코플라즈마). 일반 신경기본 배지로 1 mL로 만든다.

[0506] 7.19.21 3×10^6개 세포를 MICR-CULT-SOP-1634로 표지된 냉동튜브 내로 분취한다(멸균성). 일반 신경기

본 배지로 1 mL로 만든다.

[0507] 7.19.22 연관된 SOP에 따른 처리를 위해 별도 운영자에게 튜브를 보낸다.

[0508] 7.19.23 SOP-SSCRF-105에 따라 잔여 세포를 냉동보존한다(16일차 최종 산물의 냉동보존).

[0509] 7.19.24 수행한 뒤, 세포를 냉동고에서 신속히 꺼내어 사전 표지된 상자 내에 넣고 수송장치 내로 로딩한다.

[0510] 7.19.25 상자를 액체 질소로 옮긴다.

[0511] 7.19.26 정보를 배치 기록에 기록한다.

[0512] 16일차에 냉동보존된 세포를 해동하여 손상된 래트(NIH 누드, Taconic Biosciences, Inc.)(즉, 파킨슨증 래트 모델) 내에 이식하였다. 암페타민-유도된 회전 거동을 이식된 래트 및 모의 이식된 래트에서 이식 전, 및 이식 1, 2, 3, 4 및 5개월 후에 검사하였다. hNCAM, 및 mDA 마커 TH(티로신 하이드록실라제) 및 GIRK2(G 단백질-활성화된 내향 정류 칼륨 채널 2)의 생체내 발현을 이식 5개월 후에 검사하였다.

[0513] 16일차에 냉동보존된 세포를 해동하여 비-인간 영장류 내로 이식하였다. 이식된 이식편으로부터의 섬유 성장 및 세포 형태를 이식 6주 후 검사하였다.

[0514] **결과**

[0515] 도 12에 나타낸 바와 같이, 손상된 래트 내로 mDA 전구체의 이식 4개월 후, 이식을 수여받은 래트는 모의 처리된 래트에 비해 분 당 더 적은 회전을 나타내었다. 이식 후 5개월차에, 이식된 이식편의 면역세포화학 분석은 이식편이 mDA 형태에 전형적인 TH 염색을 나타냄을 보여주었으며, 여기서 TH 양성 뉴런은 GIRK2 발현에 대해서도 양성이었다(도 13).

[0516] 비-인간 영장류 내로 이식된 mDA 전구체 이식편의 형태를 이식 6주 후 검사하였다. 이식편은 이식편 코어로부터 강력한 섬유 성장을 나타내었고, 또한 전형적인 mDA 형태를 나타내었다(도 14).

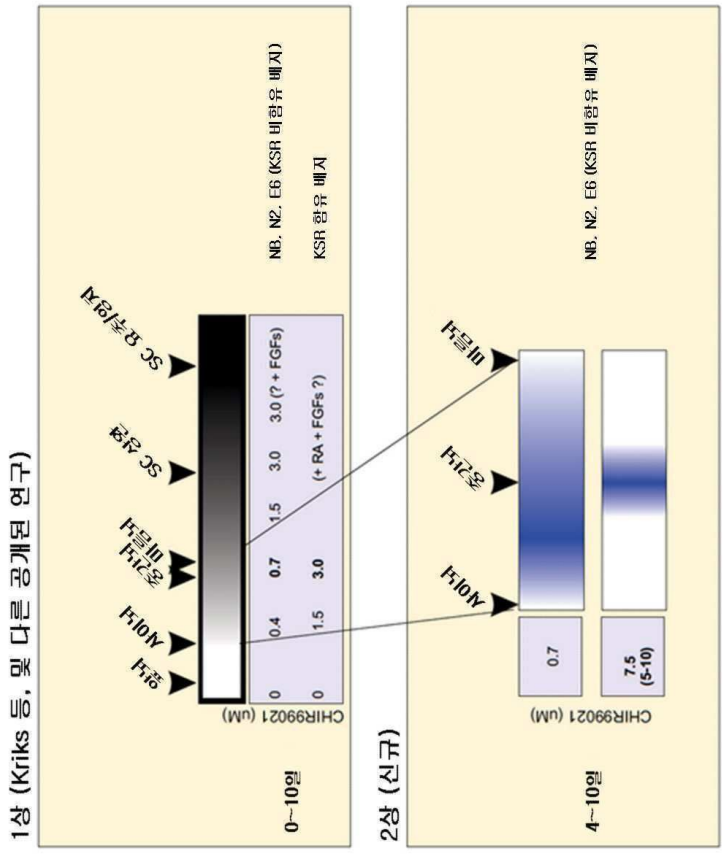
[0517] * * *

[0518] 본원에 개시된 요지 및 그 장점이 상세히 기재되었으나, 다양한 변화, 치환 및 변경이 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 정신 및 범위에서 벗어나지 않고 여기서 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 또한, 본 출원의 범위는 명세서에 기재된 공정, 기계, 제조, 물질 조성, 수단, 방법 및 단계의 특정 구현예에 제한되려는 것이 아니다. 당업자가 본원에 개시된 요지의 개시로부터 쉽게 이해할 바와 같이, 본원에 기재된 해당하는 구현예와 실질적으로 동일한 기능을 수행하거나 실질적으로 동일한 결과를 달성하는 현재 존재하거나 이후 개발될 공정, 기계, 제조, 물질 조성, 수단, 방법 또는 단계는 본원에 개시된 요지에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 첨부된 청구범위는 이의 범위 내에 이러한 공정, 기계, 제조, 물질 조성, 수단, 방법 또는 단계를 포함하려는 것이다.

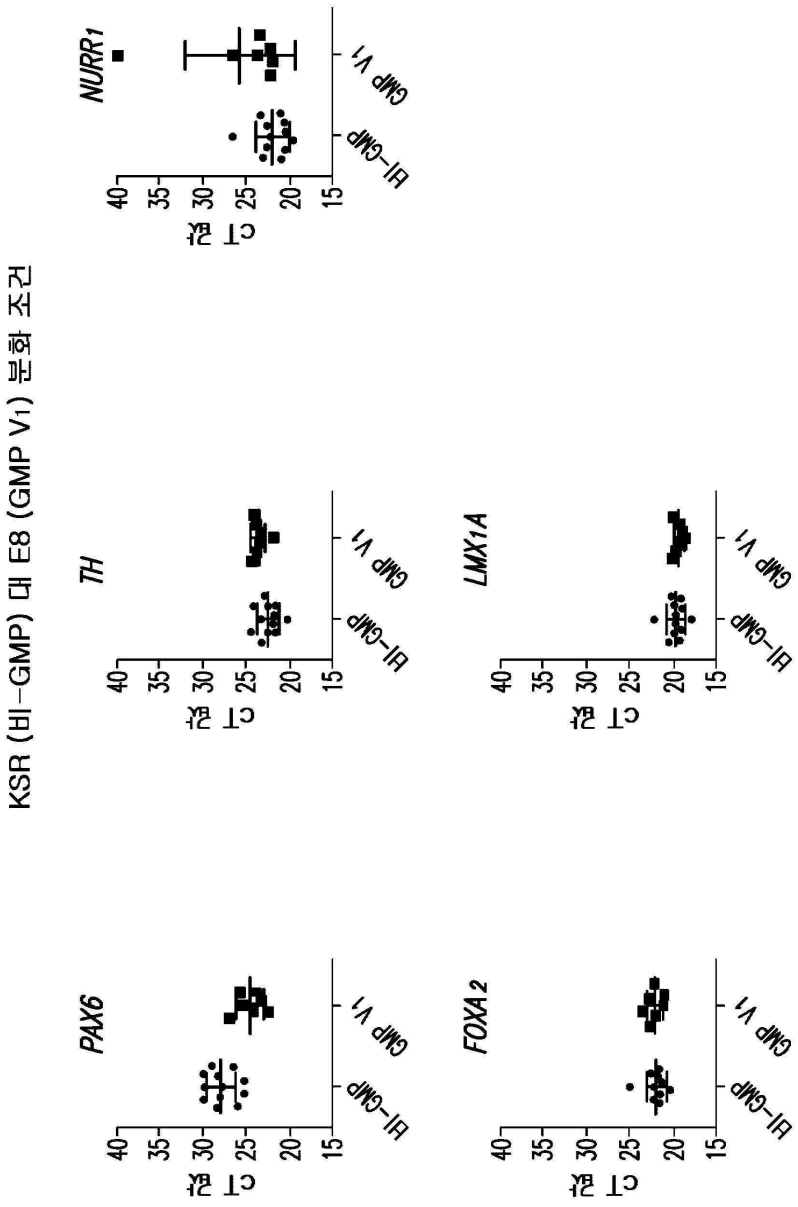
[0519] 특허, 특허 출원, 공보, 제품 설명 및 프로토콜이 본 출원에 걸쳐 인용되며, 그 개시는 모든 목적에 대해 이의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

도면

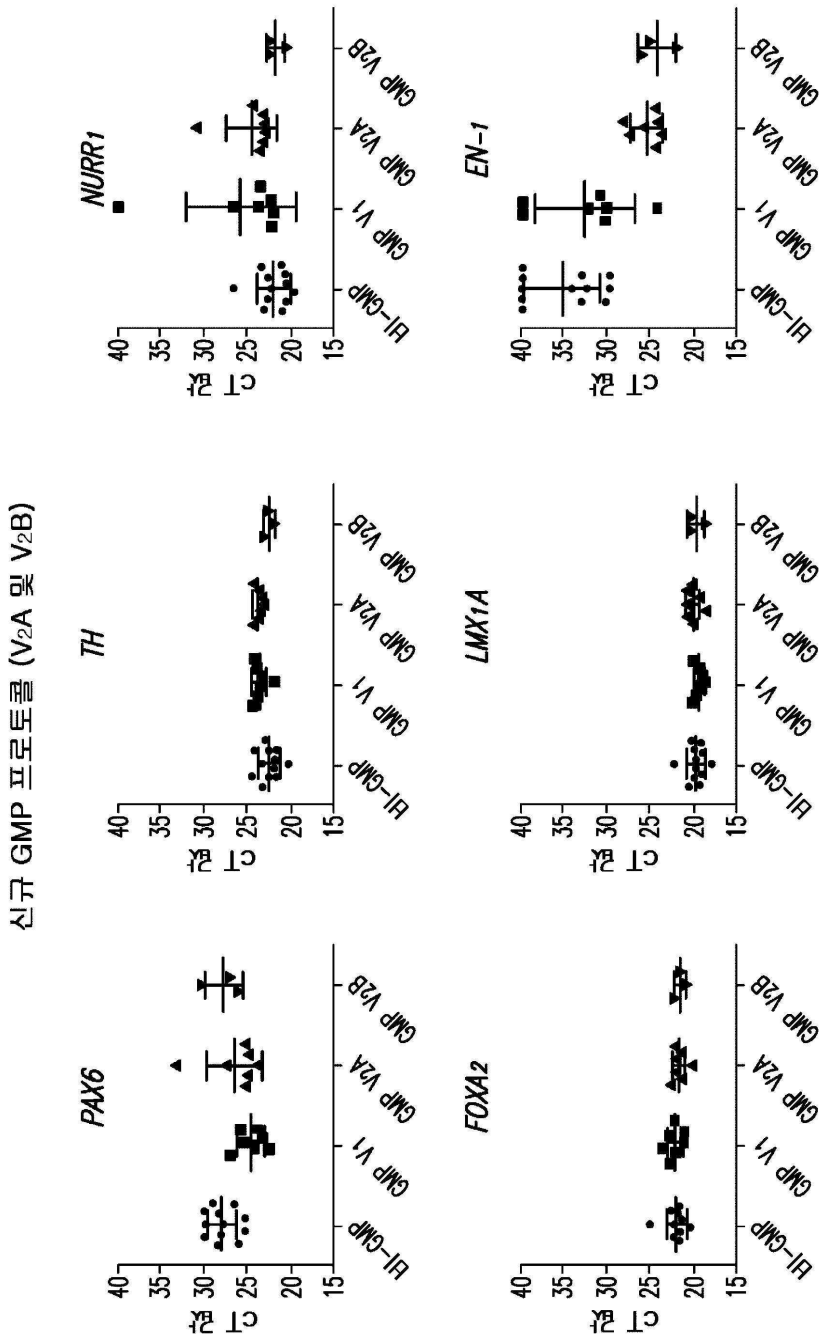
도면1


1상 (Kriks 등, 및 다른 공개된 연구)
0~10일
CHIR99021 (uM)
0
0.4
0.7
1.5
3.0
3.0 (? + FGFs)
(+ RA + FGFs ?)
NB, N2, E6 (KSR 비함유 배지)
KSR 함유 배지
2상 (신규)
4~10일
CHIR99021 (uM)
0.7
7.5
(5-10)
NB, N2, E6 (KSR 비함유 배지)

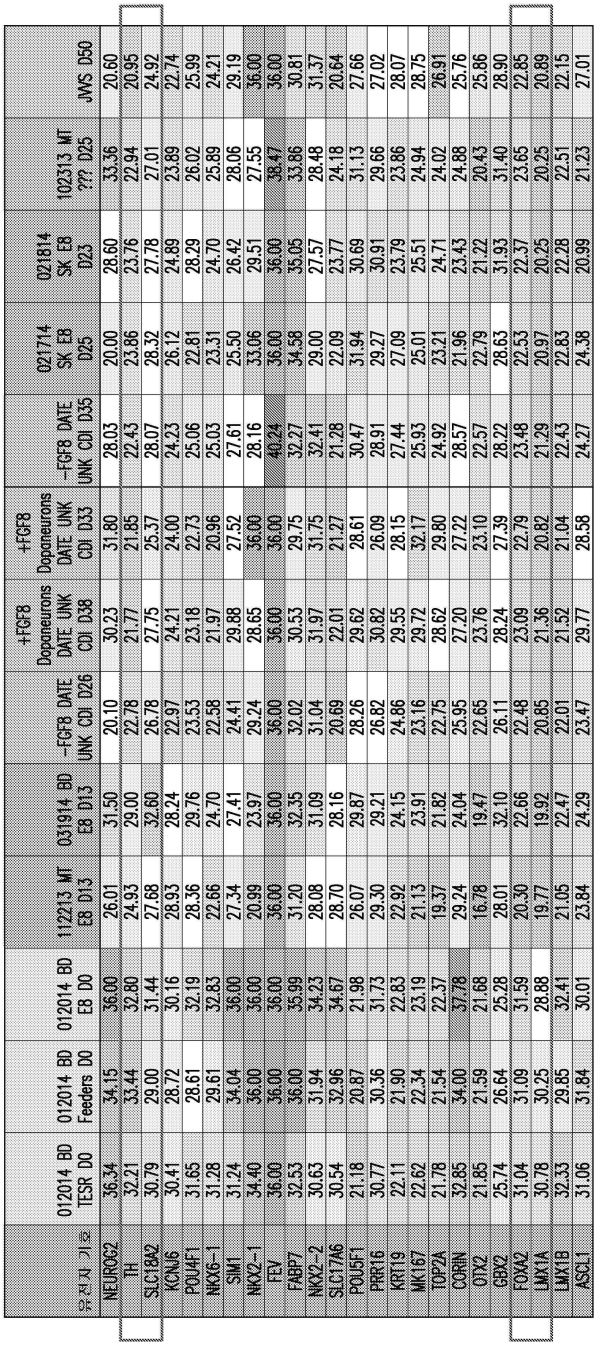
도면2


KSR (비-GMP) 대 E8 (GMP V1) 분화 조건
NURR1
TH
LMX1A
PAX6
FOXA2
CT 값
40
35
30
25
20
15
비-GMP
GMP V1

도면3

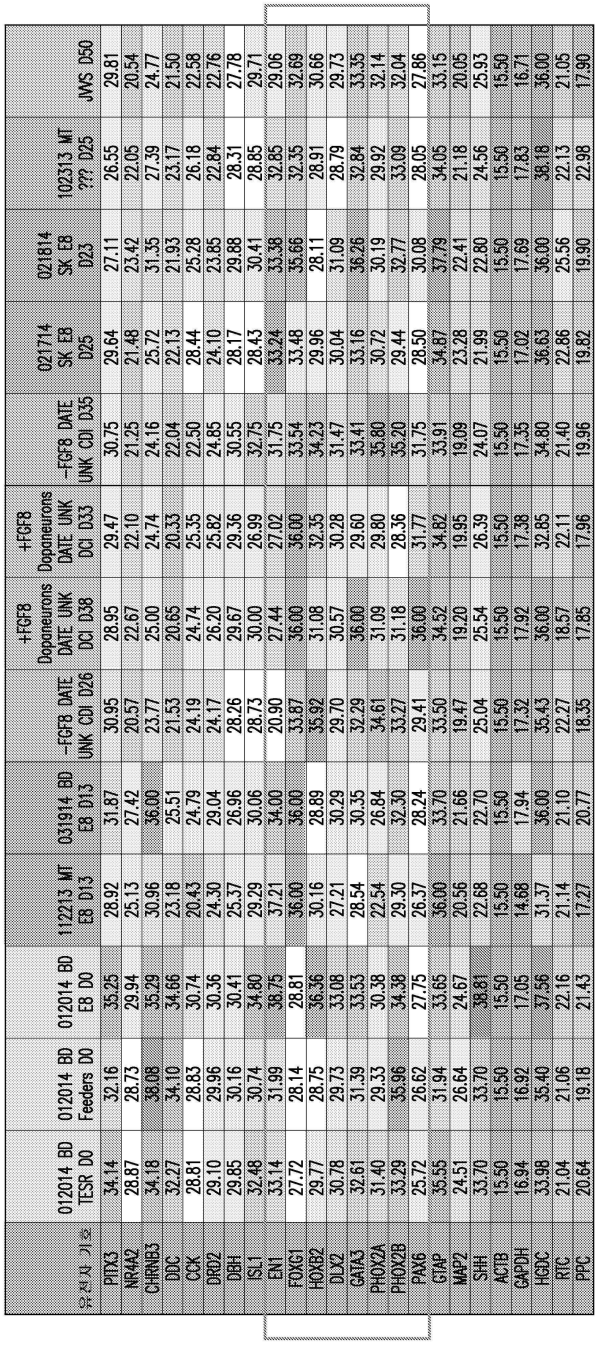

신규 GMP 프로토콜 (V2A 및 V2B)
NURR1
EN-1
TH
LMX1A
PAX6
FOXA2
CT 값
40
35
30
25
20
15
LI-GMP
GMP V1
GMP V2A
GMP V2B

도면4a



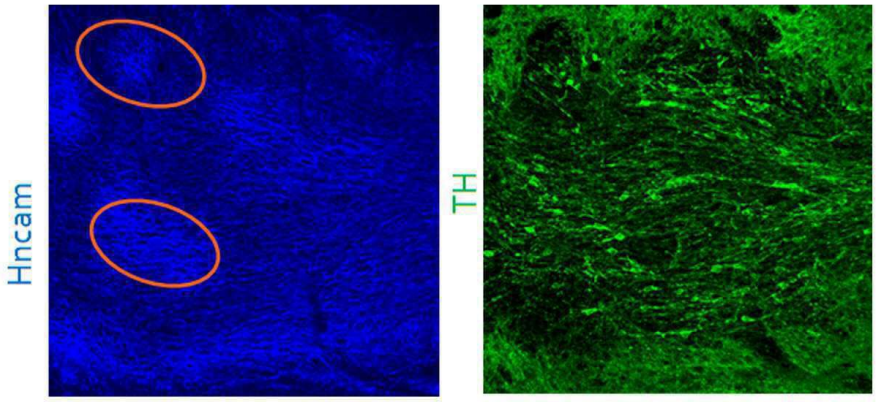
유전자 기호	012014 BD TESR D0	012014 BD Feeders D0	012014 BD EB D0	112213 WT EB D13	031914 BD EB D13	-FGF8 DATE UNK CDI D26	+FGF8 Dopaneurons DATE UNK CDI D38	+FGF8 Dopaneurons DATE UNK CDI D33	-FGF8 DATE UNK CDI D35	021714 SK EB D25	021814 SK EB D23	102313 WT ??? D25	JWS D50
NEUROG2	36.34	34.15	36.00	26.01	31.50	20.10	30.23	31.80	28.03	20.00	28.60	33.36	20.60
TH	32.21	33.44	32.80	24.93	29.00	22.78	21.77	21.85	22.43	23.86	23.76	22.94	20.95
SLC18A2	30.79	29.00	31.44	27.68	32.80	26.78	27.75	25.37	28.07	28.32	27.78	27.01	24.92
KCNJ6	30.41	28.72	30.16	28.93	28.24	22.97	24.21	24.00	24.23	26.12	24.89	23.89	22.74
POU4F1	31.65	28.61	32.19	28.36	29.76	23.53	23.18	22.73	25.06	22.81	28.29	26.02	25.99
NKX6-1	31.28	29.61	32.83	22.66	24.70	22.58	21.97	20.96	25.03	23.31	24.70	25.89	24.21
SIM1	31.24	34.04	36.00	27.34	27.41	24.41	29.88	27.52	27.61	25.50	26.42	28.06	29.19
NKX2-1	34.40	36.00	36.00	20.99	23.97	29.24	28.65	36.00	28.16	33.06	29.51	27.55	36.00
FEV	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	36.00	40.24	36.00	36.00	38.47	36.00
FABP7	32.53	36.00	35.99	31.20	32.35	32.02	30.53	29.75	32.27	34.58	35.05	33.88	30.81
NKX2-2	30.63	31.94	34.23	28.08	31.09	31.04	31.97	31.75	32.41	29.00	27.57	28.48	31.37
SLC17A6	30.54	32.96	34.67	28.70	28.16	20.69	22.01	21.27	21.28	22.09	23.77	24.18	20.64
POU5F1	21.18	20.87	21.98	26.07	29.87	28.26	29.62	28.61	30.47	31.94	30.69	31.13	27.66
PRR16	30.77	30.36	31.73	29.30	29.21	26.82	30.82	26.09	28.91	29.27	30.91	29.66	27.02
KRT19	22.11	21.90	22.83	22.92	24.15	24.86	29.55	28.15	27.44	27.09	23.79	23.86	28.07
MK167	22.62	22.34	23.19	21.13	23.91	23.16	29.72	32.17	25.93	25.01	25.51	24.94	28.75
TOP2A	21.78	21.54	22.37	19.37	21.82	22.75	28.62	29.80	24.92	23.21	24.71	24.02	26.91
CORIN	32.85	34.00	37.78	29.24	24.04	25.95	27.20	27.22	28.57	21.96	23.43	24.88	25.76
OTX2	21.85	21.59	21.68	16.78	19.47	22.65	23.76	23.10	22.57	22.79	21.22	20.43	25.86
GBX2	25.74	26.64	25.28	28.01	32.10	26.11	28.24	27.39	28.22	28.63	31.93	31.40	28.90
FOXA2	31.04	31.09	31.59	20.30	22.66	22.48	23.09	22.79	23.48	22.53	22.37	23.65	22.85
LMX1A	30.78	30.25	28.88	19.77	19.92	20.85	21.36	20.82	21.29	20.97	20.25	20.25	20.89
LMX1B	32.33	29.85	32.41	21.05	22.47	22.01	21.52	21.04	22.43	22.83	22.28	22.51	22.15
ASCL1	31.06	31.84	30.01	23.84	24.29	23.47	29.77	28.58	24.27	24.38	20.99	21.23	27.01

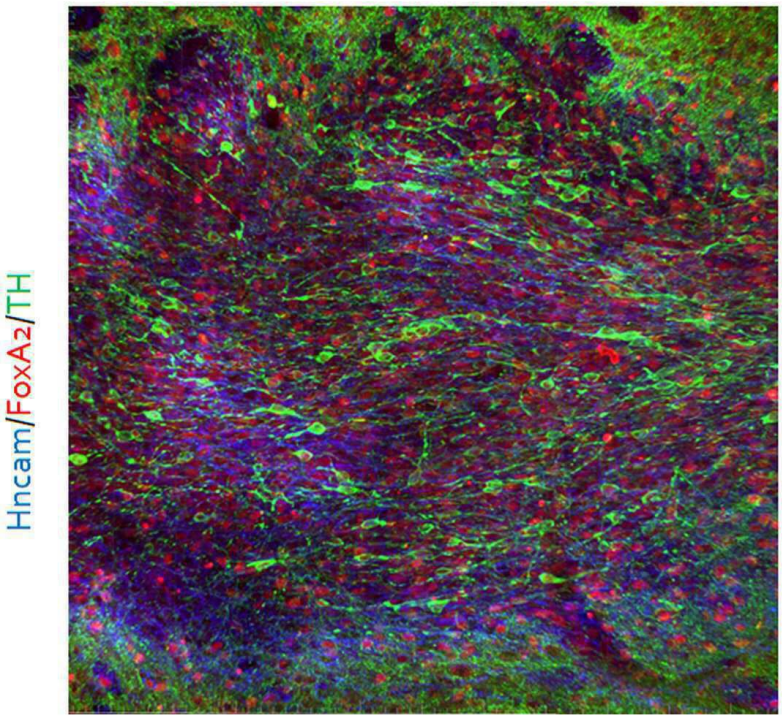
도면4b



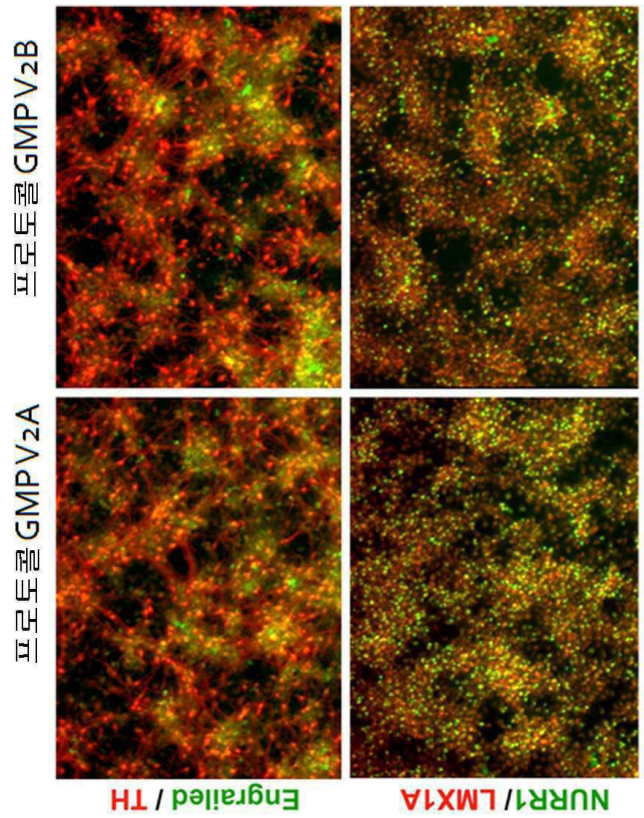
유전자 기호	012014 BD TESR D0	012014 BD Feeders D0	012014 BD EB D0	112213 WT EB D13	031914 BD EB D13	-FGF8 DATE UNK CDI D26	+FGF8 Dopaneurons DATE UNK DCI D38	+FGF8 Dopaneurons DATE UNK DCI D33	-FGF8 DATE UNK CDI D35	021714 SK EB D25	021814 SK EB D23	102313 WT ??? D25	JWS D50
PITX3	34.14	32.16	35.25	28.92	31.87	30.95	28.95	29.47	30.75	29.64	27.11	26.55	29.81
NR4A2	28.87	28.73	29.94	25.13	27.42	20.57	22.67	22.10	21.25	21.48	23.42	22.05	20.54
CHRNB3	34.18	38.08	35.29	30.96	36.00	23.77	25.00	24.74	24.16	25.72	31.35	27.39	24.77
DDC	32.27	34.10	34.66	23.18	25.51	21.53	20.65	20.33	22.04	22.13	21.93	23.17	21.50
CCK	28.81	28.83	30.74	20.43	24.79	24.19	24.74	25.35	22.50	28.44	25.28	26.18	22.58
DRD2	29.10	29.96	30.36	24.30	29.04	24.17	26.20	25.82	24.85	24.10	23.85	22.84	22.76
DBH	29.85	30.16	30.41	25.37	26.96	28.26	29.67	29.36	30.55	28.17	29.88	28.31	27.78
ISL1	32.48	30.74	34.80	29.29	30.06	28.73	30.00	26.99	32.75	28.43	30.41	28.85	29.71
EN1	33.14	31.99	38.75	37.21	34.00	20.90	27.44	27.02	31.75	33.24	33.38	32.85	29.06
FOXG1	27.72	28.14	28.81	36.00	36.00	33.87	36.00	36.00	33.54	33.48	35.66	32.35	32.69
HOXB2	29.77	28.75	36.36	30.16	28.89	35.92	31.08	32.35	34.23	29.96	28.11	28.91	30.66
DLX2	30.78	29.73	33.08	27.21	30.29	29.70	30.57	30.28	31.47	30.04	31.09	28.79	29.73
GATA3	32.61	31.39	33.53	28.54	30.35	32.29	36.00	29.60	33.41	33.16	36.26	32.84	33.35
PHOX2A	31.40	29.33	30.38	22.54	26.84	34.61	31.09	29.80	35.80	30.72	30.19	29.92	32.14
PHOX2B	33.29	35.96	34.38	29.30	32.30	33.27	31.18	28.36	35.20	29.44	32.77	33.09	32.04
PAX6	25.72	26.62	27.75	26.37	28.24	29.41	36.00	31.77	31.75	28.50	30.08	28.05	27.86
GTAP	35.55	31.94	33.65	36.00	33.70	33.50	34.52	34.82	33.91	34.87	37.79	34.05	33.15
MAP2	24.51	26.64	24.67	20.56	21.66	19.47	19.20	19.95	19.09	23.28	22.41	21.18	20.05
SIH	33.70	33.70	38.81	22.68	22.70	25.04	25.54	26.39	24.07	21.99	22.80	24.56	25.93
ACTB	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50
GAPDH	16.94	16.92	17.05	14.68	17.94	17.32	17.92	17.38	17.35	17.02	17.69	17.83	16.71
HGDC	33.98	35.40	37.56	31.37	36.00	35.43	36.00	32.85	34.80	36.63	36.00	38.18	36.00
RTC	21.04	21.06	22.16	21.14	21.10	22.27	18.57	22.11	21.40	22.86	25.56	22.13	21.05
PPC	20.64	19.18	21.43	17.27	20.77	18.35	17.85	17.96	19.96	19.82	19.90	22.98	17.90

도면5



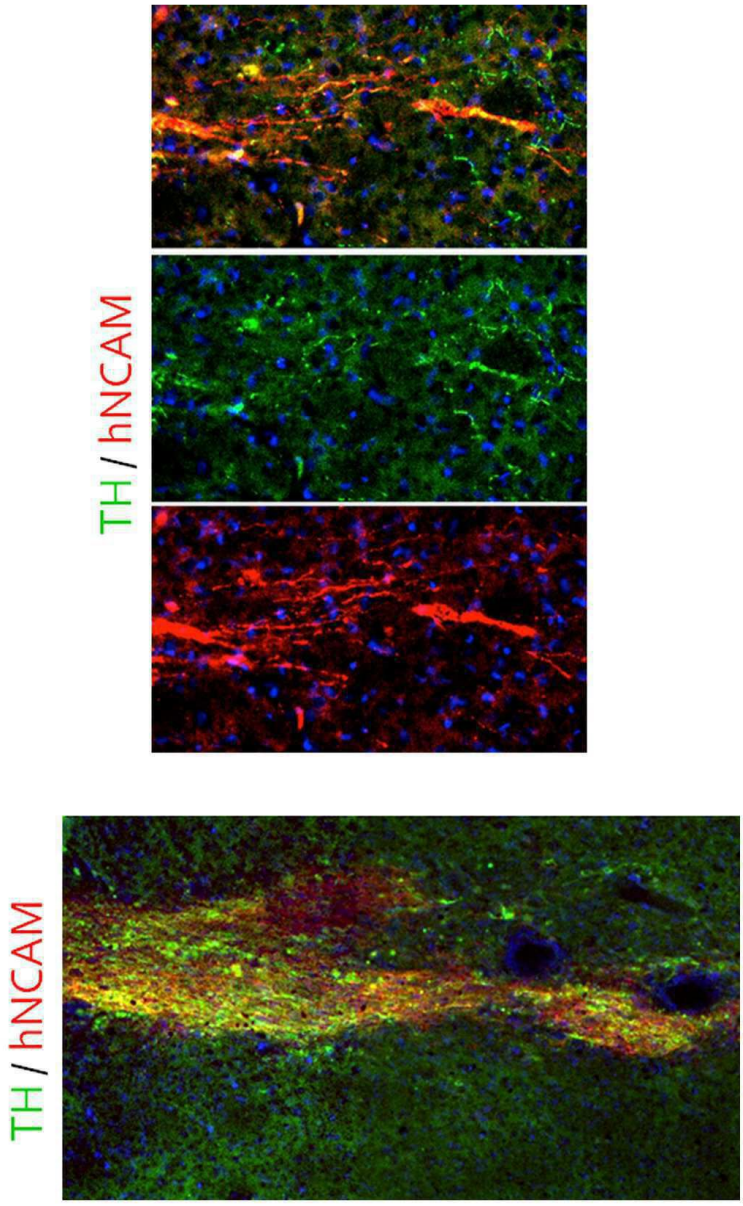


도면6a

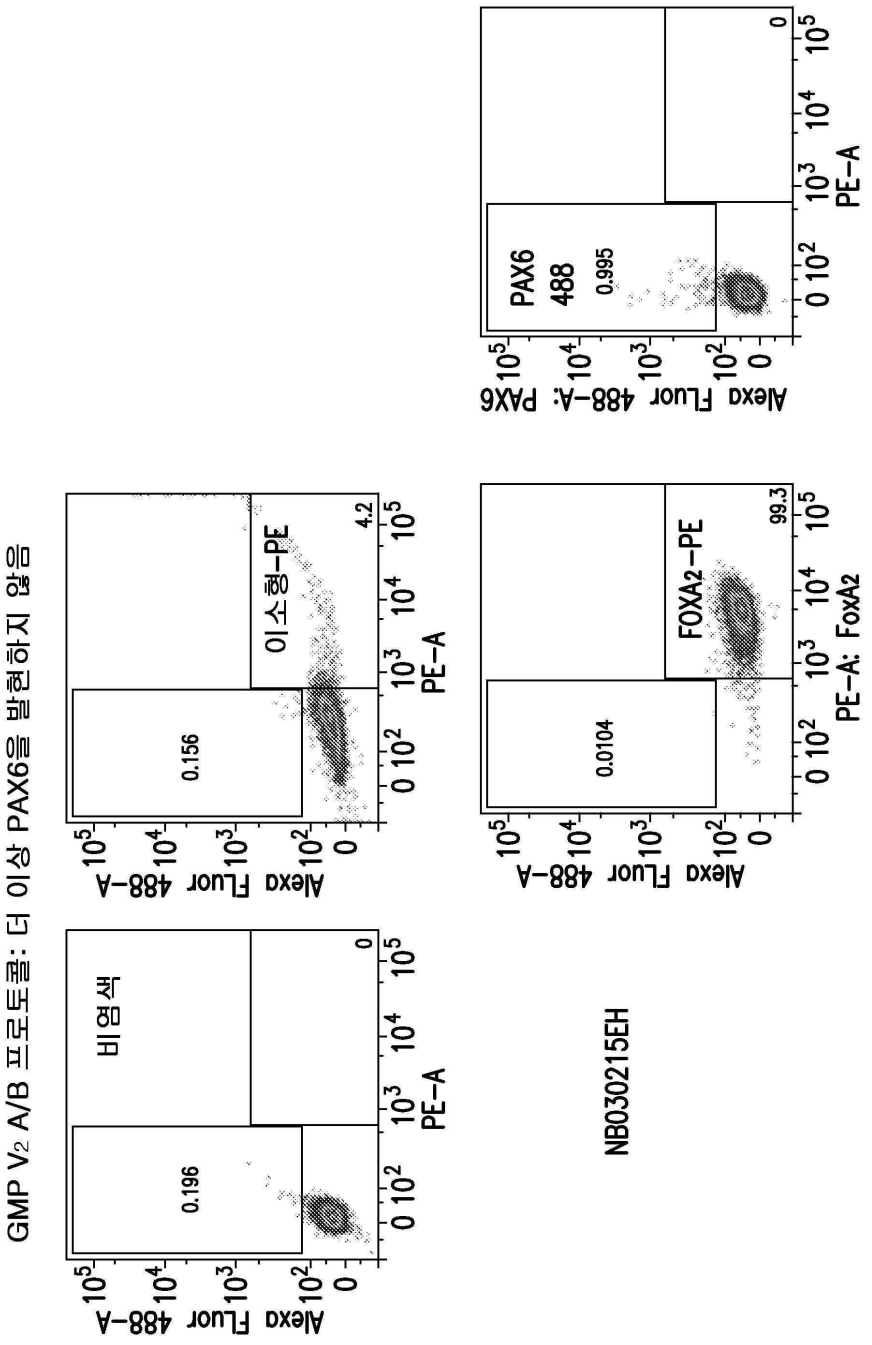


유전자 발현 패널	
Engrailed	< 23 사이클
GBX2	> 30 사이클
PAX6	> 30 사이클
NKX2.1	> 30 사이클

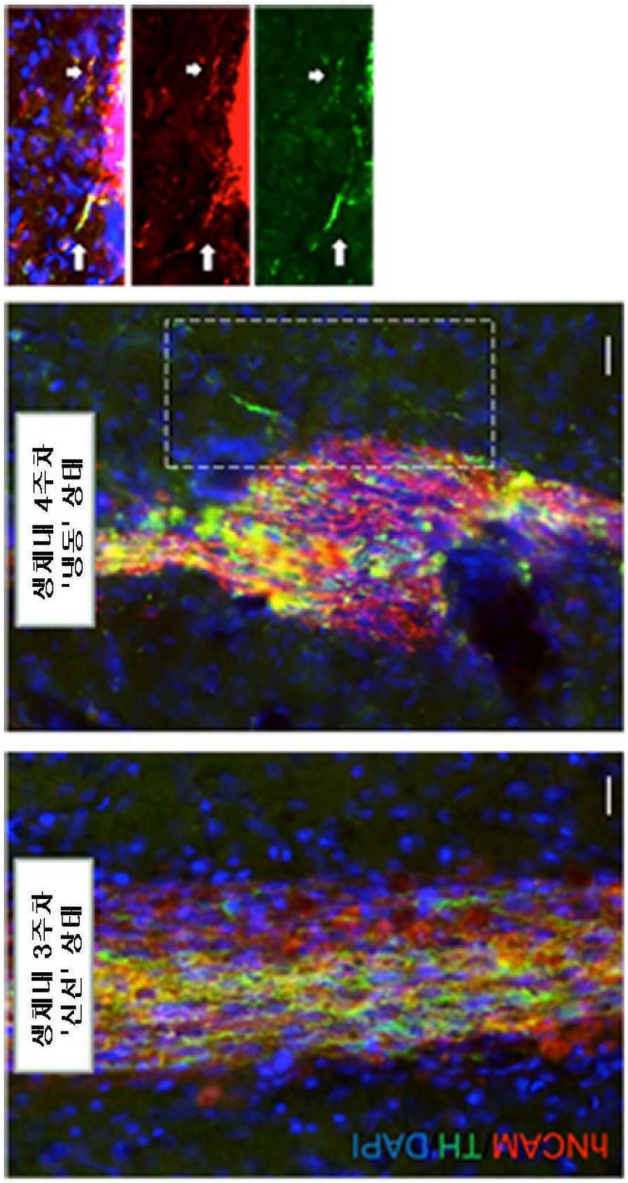
도면6b



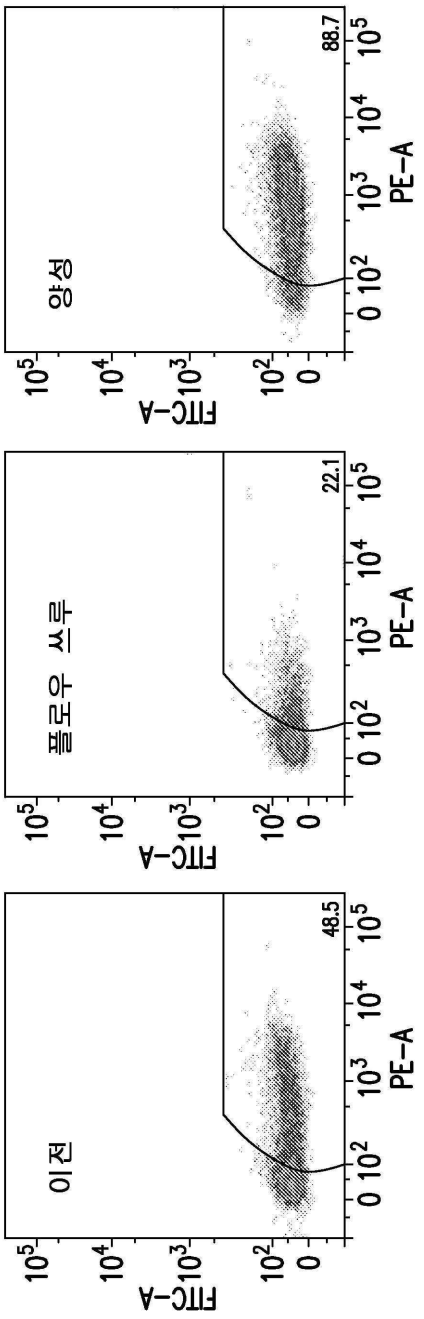
도면7


GMP V2 A/B 프로토콜: 더 이상 PAX6을 발현하지 않음
비염색
0.196
Alexa Fluor 488-A
PE-A
이소형-PE
0.156
4.2
FOXA2-PE
0.0104
99.3
PE-A: FoxA2
PAX6
488
0.995
Alexa Fluor 488-A: PAX6
NB030215EH

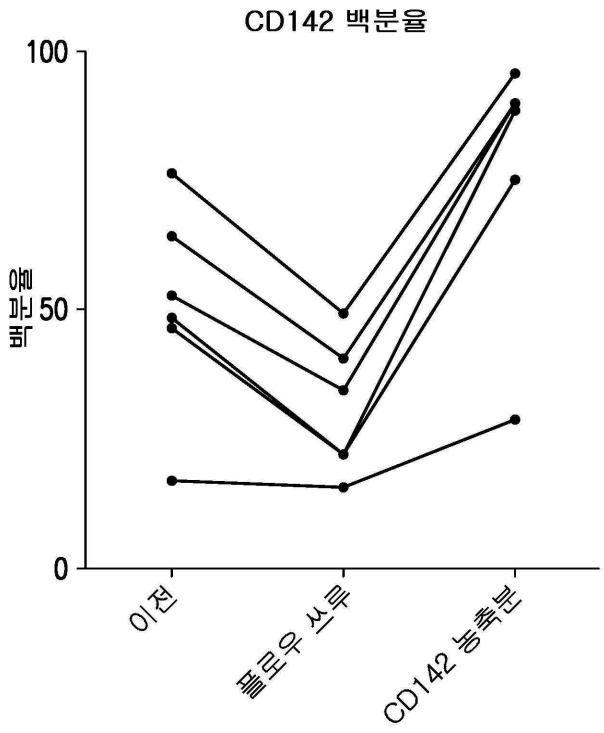
도면8



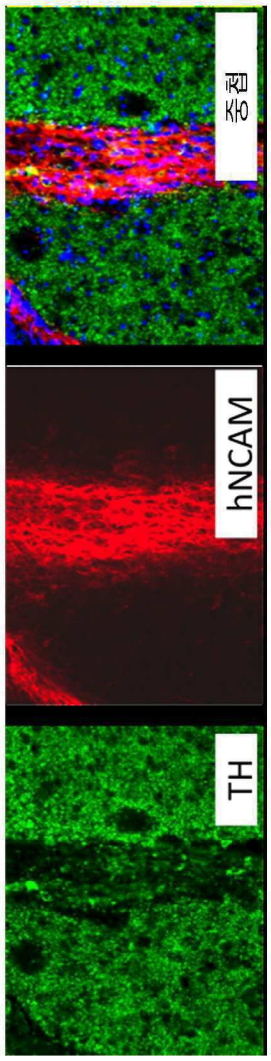
도면9a



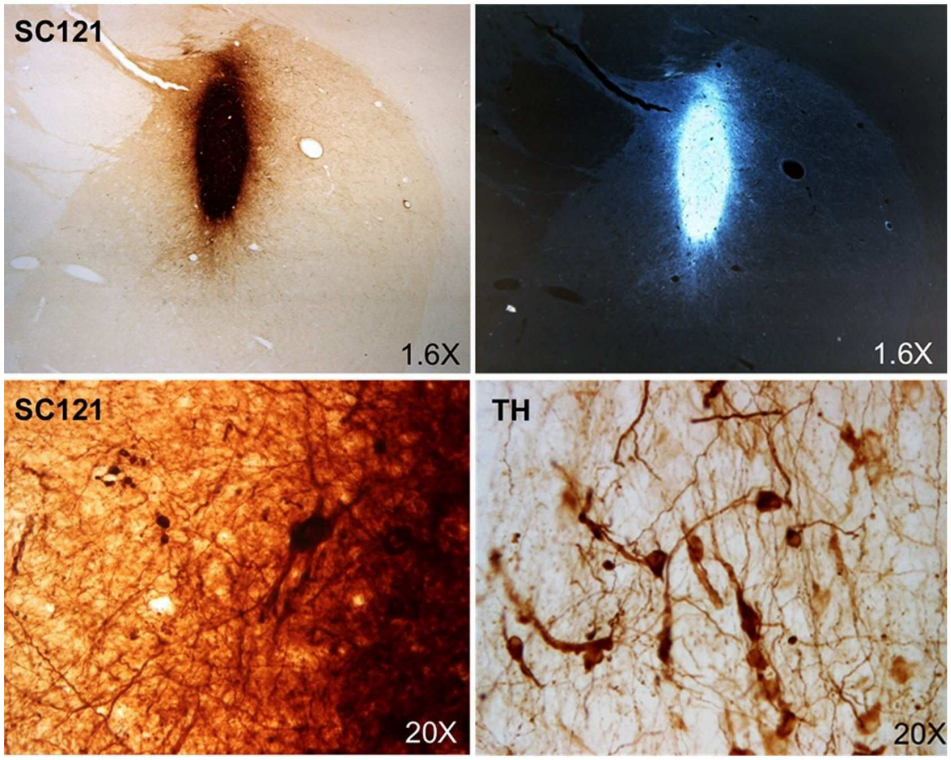
도면9b



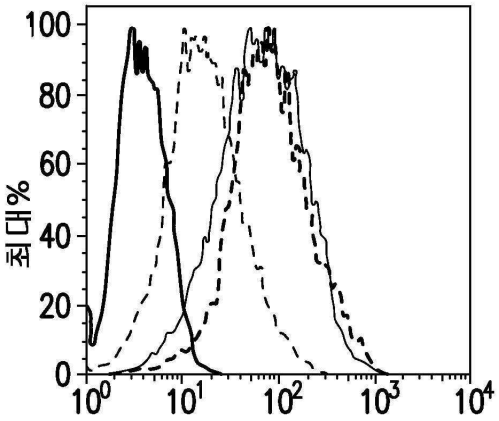
도면10a



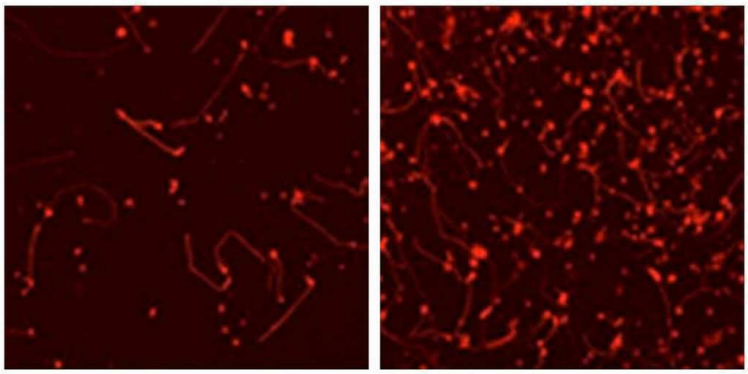
도면10b



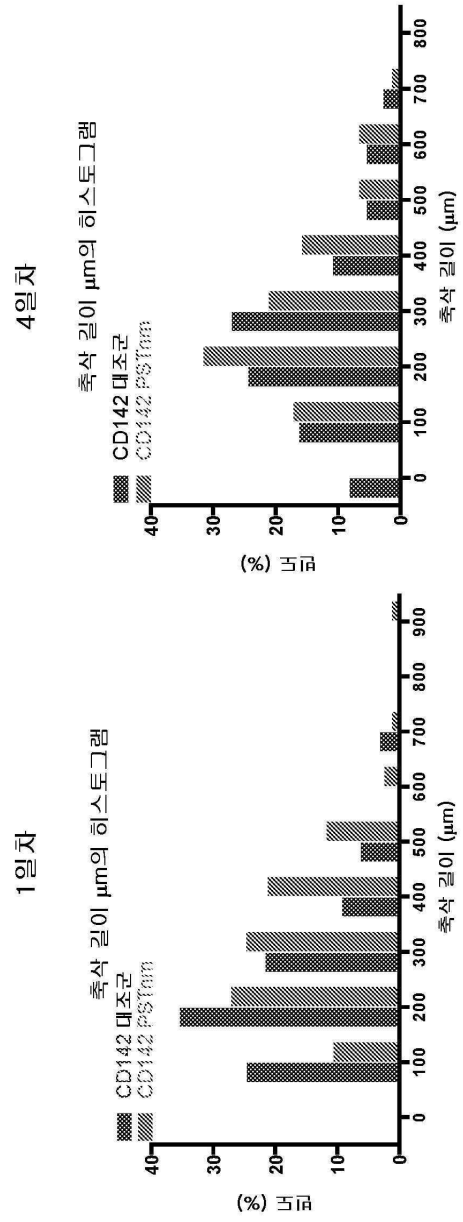
도면11a



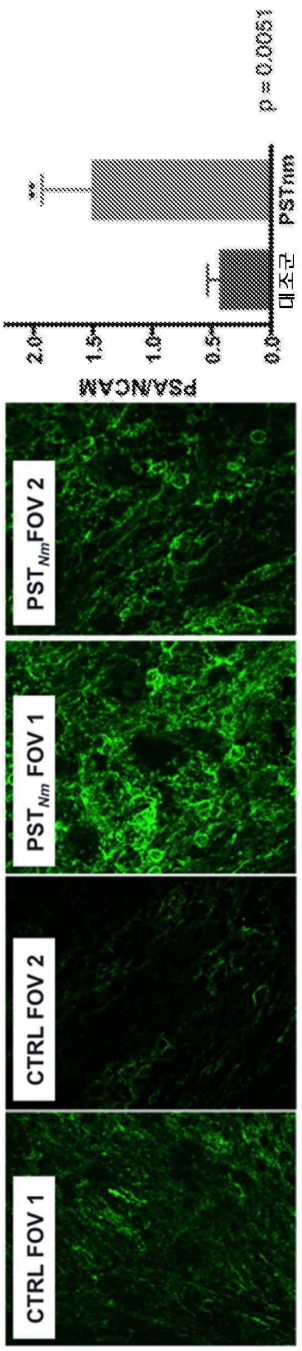
도면11b



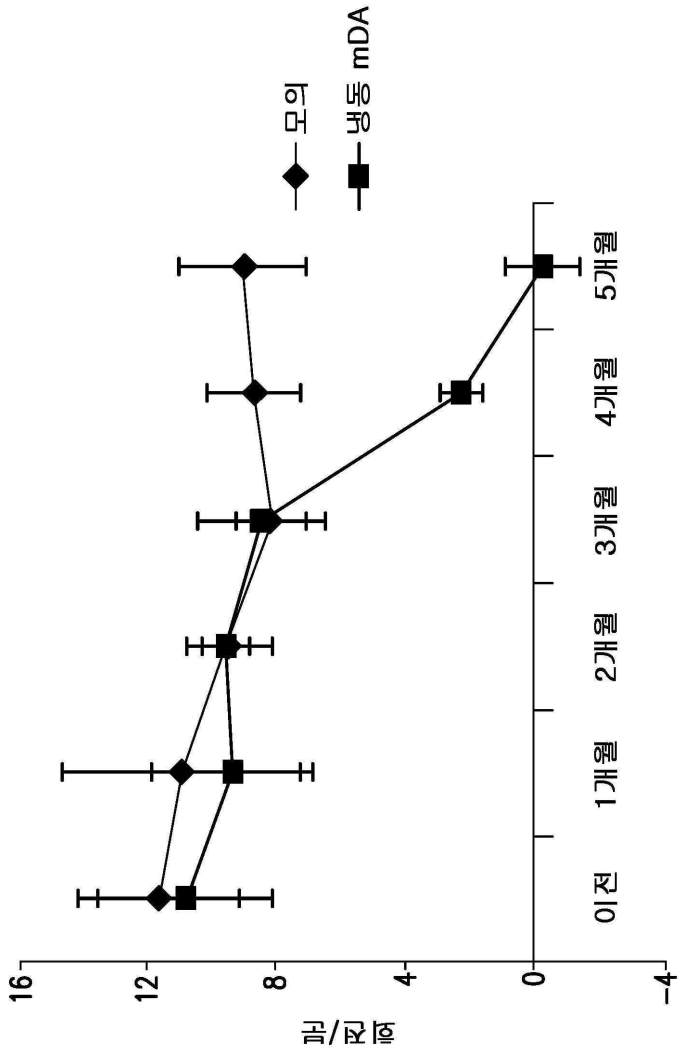
도면11c


4일자
축삭 길이 μm의 히스토그램
CD142 대조군
CD142 PSTim
빈도 (%)
축삭 길이 (μm)
1일자
축삭 길이 μm의 히스토그램
CD142 대조군
CD142 PSTim
빈도 (%)
축삭 길이 (μm)

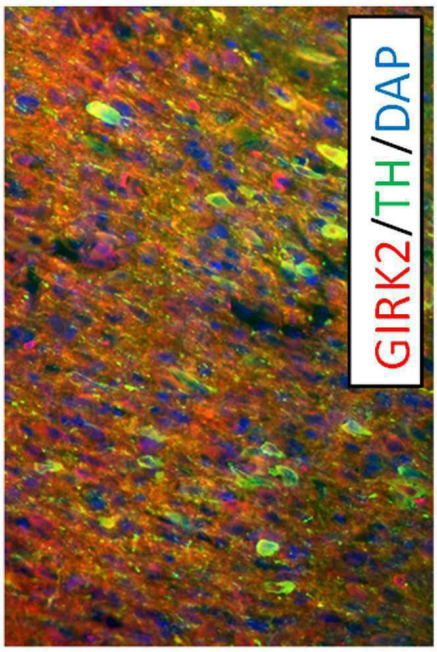
도면11d

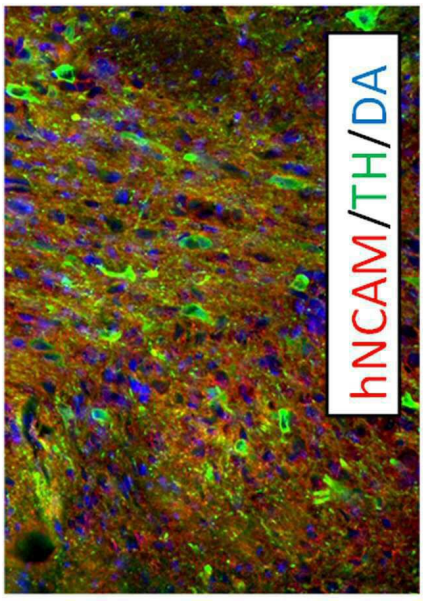

p = 0.0051
**
대조군
PSTnm
PSA/NCAM
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTRL FOV 1
CTRL FOV 2
PST Nm FOV 1
PST NmFOV 2

도면12



도면13





도면14

