



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년12월05일
 (11) 등록번호 10-1089591
 (24) 등록일자 2011년11월29일

(51) Int. Cl.

C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/07* (2010.01)

(21) 출원번호 10-2004-7008713

(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년12월06일

심사청구일자 2007년12월04일

(85) 번역문제출일자 2004년06월05일

(65) 공개번호 10-2004-0068197

(43) 공개일자 2004년07월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2002/039089

(87) 국제공개번호 WO 2003/050249

국제공개일자 2003년06월19일

(30) 우선권주장

60/338,885 2001년12월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

US05902577 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문현

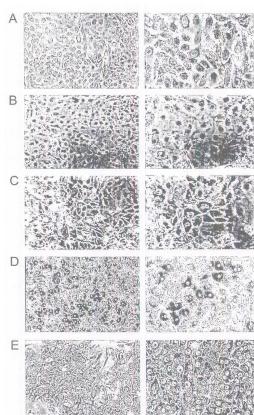
전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 윤소라

(54) 인간 배아 줄기세포 유래의 섬세포

(57) 요 약

본 개시는 배아 줄기세포로부터 체장 섬세포를 생산하는 시스템을 제공한다. 분화는 내배엽 세포 방향으로 개시되어, 섬전구체 및 성숙한 인슐린-분비 세포의 출현을 촉진하는 시약을 사용하여 집중된다. 고품질의 섬세포 집단은 연구, 약물 스크리닝, 또는 재생의약에서의 용도를 위해 상업적인 양으로 생산될 수 있다.

대 표 도 - 도1

특허청구의 범위

청구항 1

내인성 c-펩티드를 발현하고 영장류 다능성 줄기(pPS)세포의 확립된 세포주와 동일한 계놈을 갖는 세포 무리를 포함하는, pPS 세포를 분화시켜 수득되는 분리된 영장류 세포 집단.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 세포의 5% 이상이 두 가지 이상의 하기 마커를 발현하는 분화된 세포 집단: Pdx1, Ngn3, 인슐린, IAPP 및 Nkx6.1.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 고혈당 비-비만 당뇨(NOD; non-obese diabetic) 마우스로 이식된 경우 공복 혈당 수준이 200mg/dL 아래로 떨어지는 것을 야기하는 분화된 세포 집단.

청구항 4

제 1 및 제 2 세포 집단을 포함하고, 상기 제 1 세포 집단은 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 분화된 세포 집단을 포함하고, 제 2 세포 집단은 이들이 분화되는 비분화된 pPS 세포주를 포함하는, 췌장 호르몬 분비 세포를 생성하는 시스템.

청구항 5

pPS 세포 또는 이들의 자손을 적어도 섬세포 분화인자의 혼합물 중에서 배양하고, 이에 의해 c-펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 세포 집단을 수득하는 것을 포함하는 c-펩티드 발현 세포를 수득하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 섬세포 분화인자의 혼합물이 하기를 포함하는 방법:

- 하기 중 하나 이상: 엑티빈 A, 니코틴아미드, 시클로파민, 베타셀룰린, 및 IGF-1; 및/또는
- TGF- β 길항제 및 하나 이상의 미토겐.

청구항 7

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 뉴로케닌3 과 같은 췌장 전사인자의 발현을 야기하도록 세포를 유전적으로 변경하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

하기를 포함하는 인슐린 c-펩티드의 생산을 위한 장치:

- a) 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 분화된 세포 집단, 및
- b) 세포 집단의 통과는 막지만, 상기 세포 집단에 의해 분비되는 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴은 통과시키는 반투막.

청구항 9

인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴의 결핍, 또는 제 1 형 당뇨와 연관된 상태의 치료용 의약의 제조에서 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 분화된 세포 집단을 사용하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, pPS 세포가 인간 배아 줄기세포이거나, 또는 인간 포배로부터 수득된 세포의 자손인 분리된 세포 집단.

청구항 11

제 4 항에 있어서, pPS 세포가 인간 배아 줄기세포이거나, 또는 인간 포배로부터 수득된 세포의 자손인 시스템.

청구항 12

제 5 항에 있어서, pPS 세포가 인간 배아 줄기세포이거나, 또는 인간 포배로부터 수득된 세포의 자손인 방법.

청구항 13

제 8 항에 있어서, pPS 세포가 인간 배아 줄기세포이거나, 또는 인간 포배로부터 수득된 세포의 자손인 장치.

청구항 14

제 9 항에 있어서, pPS 세포가 인간 배아 줄기세포이거나, 또는 인간 포배로부터 수득된 세포의 자손인 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 세포 생물학, 배아 줄기세포, 및 세포분화에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 췌장의 내분비 기능을 갖는 분화된 세포를 제공한다.

[관련 출원에 대한 참조사항]

[0003] 본 출원은 2001년 12월 7일에 출원한 미국 출원 60/338,885에 대하여 우선권 주장을 한다.

배경 기술

[0004] 미국 당뇨협회는 현재 미국에 당뇨로 확인된 사람이 5백만 명이며, 위험한 상태에 있는 사람은 천만을 넘는 것으로 추정하고 있다.

[0005] 상기 질병에 관한 비용 및 이에 따른 미국 경제에 미치는 파급효과는 경이적이다. 당뇨병 관리로 년간 총 980 억 달러를 지출하며, 이는 미국에서 쓰여지는 매 7달러의 건강관련 비용 중 일 달러에 해당한다. 매년 새로운 24,000건의 당뇨에 의해 야기되는 당뇨병성 실명이 있다. 당뇨는 신장기능 부전의 주원인이며, 새로운 투석환자의 약 40%를 기여한다. 당뇨는 또한 다리 절단의 가장 흔한 원인으로, 매년 이로 인해 56,000개의 다리가 절단된다. 당뇨인 일인 당 발생하는 일인 당 건강관리 비용은 비당뇨인 사람의 2,669달러에 비하여 매년 10,071 달러에 달한다.

[0006] 제 1 형 당뇨병(또한 인슐린 의존형 당뇨병으로도 알려짐)은 심한 경우로 모든 당뇨환자의 5-10%에 해당한다. 병변은 환자의 체장 인슐린-분비 베타 세포가 자가면역 반응에 의해 제거되기 때문에 발생한다. 현재의 임상 하에서는, 이러한 상태는 규칙적인 인슐린 주사, 음식에 대한 계속적인 주의, 및 인슐린 용량을 조절하기 위한 계속적인 혈당 수준의 모니터에 의해 관리된다. 재조합 인슐린 시장은 2005년까지 40억 달러에 이를 것으로 추산된다. 물론 인슐린의 이용가능성이 제 1 형 당뇨환자에게는 목숨을 구해주는 것이다. 그러나 당뇨인이 준수 해야 하는 매일의 규칙은 상당히 귀찮은 것이며, 누구에게나 효과적인 것도 아니라는 것에는 의문이 없다.

[0007] 이러한 이유로, 기증된 체장으로부터 분리된 섬세포를 당뇨인에게 이식하는 수 개의 임상시도가 진행 중에 있다. 이는 최근의 섬세포의 분리 및 배양에 있어서의 발전에 의해 가능하게 되었다. 미국 특허 제4,797,213 호는 랑게르한스의 섬세포 분리를 기술하고 있다. 미국 특허 제4,439,521호는 스스로 번식하는 체장 섬-유사 구조를 생산하는 방법을 보고한다. 미국 특허 제5,919,703호는 체장 섬세포의 제조 및 저장에 대해 보고한다. 미국 특허 제5,888,816호는 뇌하수체 및 시상하부 축출물을 사용한 체장 세포의 배양 기술에 대해 보고한다. WO 00/72885는 비-체장 섬조직에서의 조절된 체장 호르몬 생산의 유도 방법을 보고한다. WO 00/78929는 체장 섬세포를 만드는 방법에 대해 보고한다. Kim 등(Gene Dev. 15:111, 2001)은 체장의 발생 및 기능을 조절하는 세포내 신호를 개관한다. Yamaoka 등(Int.J.Mol.Med.3:247, 1999)은 체장 섬의 발생, 및 인자들 예컨대 소닉 헤지호그(Sonic hedgehog) 및 액티빈, PDX1 및 Is11과 같은 전사인자, EGF 및 HGF같은 성장인자, 인슐린 및 상장 호르몬과 같은 호르몬, 및 N-CAM 및 카드레린 같은 세포부착 분자의 잠정적 역할에 대해 개관한다.

[0008] Peck 등(Ann. Med.33:186, 2001)은 제 1 형 당뇨병의 치료를 위한 좀더 나은 대용 섬조직의 빌딩블록으로 체장 줄기세포가 사용될 수 있다는 것을 제안한다. WO 00/47721은 인슐린 양성 전구세포를 유도하는 방법에 대해 보고한다. WO 01/39784는 네스틴-양성인 섬세포에서 분리된 체장줄기세포에 대해 보고한다. WO 01/77300은 샘파리(acinar), 관상(ductal), 및 섬세포로 분화하는 능력을 갖는 것으로 제안된 인간 체장 표피 전구세포에 대해 보고한다. Deutsch 등(Development 128:871, 2001)은 배아 내배엽내의 체장 및 간에 대한 이잠재적인(bipotential) 전구체 집단에 대해 기술한다. Zulewski 등(Diabetes 50:521, 2001)은 내분비, 외분비, 및 간 표현형으로 분화하는 성체 체장 섬에서 분리된 다능성 네스틴-양성 줄기세포에 대해 기술한다. 미국 특허 제6,326,201호(Curis Inc.)는 체장판으로부터 세포를 분리하고 배양하여 만들어진 체장 전구세포에 대해 기술한다. 현재의 섬세포 이식에 관한 임상적 경험은 Bretzel 등(Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 190(Suppl.2):S384, 2001) 및 Oberholzer 등(Ann. N.Y. Acad. Sci.875:189, 1999)에 의해 개관된다. 현재의 임상시험은 전형적으로 두개 이상의 기증 체장 유래의 세포를 주입하는 것을 포함한다. 비록 상기 치료가 성공적인 것으로 판명되더라도, 현재의 공급원으로는 자격 있는 모든 제 1 형 당뇨환자의 치료에 사용하기에는 재료가 불충분할 것이다.

[0009] 다른 유형의 세포로 분화하는 배아 유래의 다능성 줄기세포의 가망성을 이용하여 수개의 기관에서 개발적 연구가 수행되었다. 보고에 의하면 섬세포 계통의 특징을 갖는 세포가 마우스의 배아 세포로부터 유래되었다고 한다. 예를 들면, Lumelsky 등(Science 292:1389, 2001)은 마우스 배아 줄기세포의 체장 섬과 유사한 인슐린 분비 구조로의 분화를 보고한다. Soria 등(Diabetes 49:157, 2000)은 마우스 배아 줄기세포에서 유래한 인슐린 분비 세포가 스트렙토조토신 유도된 당뇨마우스에서 당혈증을 정상화한다고 보고한다.

[0010] 안타깝게도, 배아 줄기세포 발생의 마우스 모델은 이에 한정된 특이한 경우이며, 다른 종에도 적용할 수 있는 분화에 대한 전략을 제공하지는 않는다. 사실, 다능성 줄기세포는 극소수의 다른 포유류 종에서 재현 가능하게 분리되어 왔다. 최근에 와서야, Thomson 등이 인간 포배(Science 282:114, 1998)에서 배아 줄기세포를 분리하

였다. 동시에, Gearhart 및 동료들도 태아 생식샘 조직으로부터 인간 배아 생식(hEG) 세포주(Shamblott 등 Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726, 1998)를 유도하였다. 단순히 백혈병 억제 인자(LIF)와의 배양으로 분화를 막을 수 있는 마우스 배아 줄기세포와는 달리, 인간 배아 줄기세포는 매우 특별한 조건에서 유지되어야만 한다 (미국 특허 제6,200,806호; WO 99/20741; WO 01/51616). 따라서 인간 다능성 세포를 온전히 기능하는 분화된 세포유형으로 분화시키기 위해서는 완전히 새로운 패러다임의 개발이 필요하다.

[0011] Jacobson 등(Transplant. Proc. 33:674, 2001)은 리서스(rhesus)의 배아 줄기세포로부터 창자 및 췌장 내배엽의 분화를 보고하였다. Assady 등(Diabetes 50:1691, 2001)은 배양 배지의 면역조직화학법 및 효소-연결 면역 분석법으로, 배아유사체로 분화한 인간 배아 줄기세포에 의한 인슐린의 생산을 규명하였다. 물론, 배아유사체는 무수히 다양한 상이한 세포유형을 포함하며(WO 01/51616), Assady는 인슐린 분비세포를 분리하거나 또는 풍부화된 집단을 생산할 수 있는 분화조건을 결정하려는 시도는 하지 않았다.

[0012] 배아 줄기세포 유래된 섬세포가 상업적으로도 성공할 수 있는 제안이 되기 위해서는, 고순도의 섬세포 집단을 제공하는 새로운 절차를 개발할 필요가 있다.

요약

[0014] 본 발명은 다능성 세포로부터 섬세포 계통의 세포로 분화한 영장류 세포의 효과적인 생산 시스템을 제공한다. 세포 집단은 섬 전구세포에 대해 상당히 풍부화된 것으로 기술된다. 이어서, 섬 전구세포는 나아가 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 또는 셋 모두의 조합을 분비하는 세포를 함유하는 집락으로 분화될 수 있다.

[0015] 따라서, 본 발명의 하나의 구현예는 영장류의 다능성 줄기(pPS)세포(예컨대 배아 줄기세포)를 분화시켜 수득되는 세포 집단이며, 여기에서 세포의 5% 이상이 내인성 유전자로부터 4가지 섬세포 단백질 중 하나 이상을 분비한다: 호르몬류 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 췌장 폴리펩티드로 알려진 명백히 불활성인 산물. 상기 세포는 세 가지 내분비 호르몬의 각각을 분비하는 세포를 함유하는 무리로 있을 수 있으며, 다른 조직 유형은 최소 한도로 포함되도록 처리될 수 있다. 본 발명의 상기 세포는 본원에서 후에 열거된 표현형 마커에 의해 확인될 수 있다. 기능적 효능은 고혈당 대상체에게 투여시 공복 혈당 수준을 개선하는 능력으로 확인될 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예는 자가-재생을 할 수 있으며 성숙한 섬세포인 자손을 형성할 수 있는 분화된 세포 집단이다. 이는 세포가 더이상 다능성이 아니지만, 증식 시에 섬세포를 형성하는 능력을 보유한다는 것을 의미한다. 집단에서 비분화된 다능성 세포의 비율은 바람직하게는 최소화되며, 임의의 잔류하는 비분화된 세포는 추가 증식 시에 섬세포 형성을 책임지는 세포는 아니다. 임의적으로, 줄기세포의 복제 능력은 텔로미라아제 활성을 증가시킴으로서 향상될 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예는 폴리펩티드-분비 세포를 수득하는 방법이며, 여기에서, 예를 들면 배아유사체 또는 초기 외배엽을 함유하는 다른 형태를 형성함으로써 pPS 세포의 분화가 개시된다. 상기 세포는 이어서 분화인자의 혼합물, 예컨대 노긴(Noggin)과 같은 TGF- β 길항제, 액티빈 A, n-부티레이트, 또는 하기에 열거된 다른 인자와의 조합물에서 배양된다. 추가하여, 또는 대안적으로, 세포는 예컨대 뉴로게닌 3(Neurogenin 3)과 같은 췌장 전사인자의 발현을 야기하도록 유전적으로 변경될 수 있다.

[0018] 본 발명의 추가의 구현예는, 본 발명의 세포 조성물을 사용하여, 섬세포 기능을 조정하는 이의 능력에 대해 화합물을 스크리닝하는 방법이다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예는 본 발명의 섬세포를 키워서 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴을 만드는 방법이다. 또한 본 발명의 세포를 포함하는 약학조성물 및 장치가 포함된다. 본 발명의 세포, 조성물, 및 장치는 대상체에서 특히 제 1 형 당뇨병 치료에서 섬세포 기능의 재구성에 유용하지만, 제 1 형 당뇨병의 치료에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 이러한 구현예는 다음의 상세한 설명에서 추가로 설명된다.

발명의 상세한 설명

[0021] 본 발명은 다능성 줄기 세포로부터 섬세포를 효율적으로 분화시키는 방법을 제시함으로써 인간 섬세포의 대형 집합체 생성의 문제를 해결한다.

[0022] 내배엽성 계통 쪽으로 분화를 개시함으로써, 그리고 섬세포 증식을 수월하게 하는 인자 존재 하의 배양에 의해 분화과정을 집중시키는 것에 의해, 줄기세포가 섬세포분화경로를 따르도록 할 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명은 성숙한 섬세포를 형성할 수 있는, 다능성 섬세포 전구체가 풍부한 세포 집단을 생산하는 시스템을 제공

한다. 바람직하다면, 성숙한 내분비호르몬-분비세포를 유지하기 위해 분화과정이 지속될 수 있다.

[0023] 분화과정을 최적화 하는데 대한 도움으로서, 본 개시는 분화경로를 일련의 연속적 단계로 분할하는 전략을 제공한다. 이런 식으로, 분화경로 각각의 단계를 따라 세포를 진행하게 하는데 효과적인 인자가 규명될 수 있다.

[0024] 실시예 5에서 기술된 예시에서, 분화과정은 하기와 같이 진행된다. 단계 1에서는, 무영양세포 배양물 유래의 비분화된 인간 배아 줄기세포는 분화되어 부유배양 중에 내배엽 세포를 포함하는 혼합된 세포 응집체를 형성하였다. 레티노산이 강화 인자 셀레늄 및 T3와 조합하여 초기의 분화 작용제로 사용되었다. 단계 2에서는, 췌장 전구세포로의 분화는 노린(200ng/ml), EGF(20ng/ml) 및 bFGF(2ng/ml)를 포함하는 배지 중에서의 배양에 의해 영향을 받았다. 단계 3에서는, 최종-단계 섬세포로의 분화는 노린, EGF 및 bFGF를 빼내고, 대신에 10mM 니코틴 아미드에서 세포를 배양하여 유도되었다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 항체-검출 가능한 수준의 인슐린 c-펩티드 및 소마토스타틴을 합성하는 세포 무리를 수득하였다.

[0025] pPS 세포로부터 섬줄기세포를 효과적으로 생산하는 방법이 중요한데, 왜냐하면 pPS 세포는 영속적으로 증식하도록 야기될 수 있기 때문이다. 본 발명은 무한정 양의 섬진구세포 및 성숙한 섬세포를 형성하도록 수입되는 자손 생산에 사용될 수 있는 시스템을 제공한다.

[0026] 다음의 개시는 본 발명의 섬세포 시험 및 생산에 대한 정보를 추가로 제공한다. 이는 또한 상기 세포가 연구, 약제 개발, 및 섬세포 기능장애와 관련된 병징의 치료관리에 어떻게 사용될 수 있는지에 대한 광범위한 예시를 제공한다.

정의

[0028] 본 개시의 목적을 위해, 용어 "섬세포"는 최종적으로 분화된 췌장 내분비세포, 및 통상 췌장 내분비세포로 분류되는 자손을 형성하도록 수입된 임의의 전구세포를 언급하는 것이다. 상기 세포는 인정된 형태적 특성 및 섬세포 계통에 특징적인 표현형 마커의 일부(하기에 예시됨)를 발현한다. 성숙한 알파세포는 글루카곤을 분비하고; 성숙한 베타세포는 인슐린을 분비하고; 성숙한 델타세포는 소마토스타틴을 분비하고; PP 세포는 췌장 폴리펩티드를 분비한다.

[0029] "섬전구세포(islet progenitor)", "섬전구세포(islet precursor)" 또는 "섬줄기세포"는 실질상 내분비호르몬을 분비하지 않는 세포이지만, 증식하여 최종 분화된 세포를 생산하는 능력은 갖는다. 이는 또한 자가-재생의 능력을 갖는다. 초기의 섬전구세포는 다잠재성이며, 이는 이들이 적어도 2가지 잠재적으로는 4가지의 모든 성숙한 섬세포 유형을 형성할 수 있다는 것을 의미한다.

[0030] "췌장 전구세포", 전구세포, 또는 줄기세포는 췌장 내분비세포 및 췌장 외분비세포 모두를 형성할 수 있다.

[0031] 세포 개체발생의 맥락에서, 형용사 "분화된"은 상대적인 용어이다. "분화된 세포"는 비교되는 세포보다 발생경로를 따라 더 진행된 세포이다. 정상적인 개체발생의 과정에 있는 다능성 배아 줄기세포는 먼저 췌장세포 및 다른 내배엽 세포유형을 형성할 수 있는 내배엽 세포로 분화한다는 것이 본 발명의 가정이다. 분화는 더 나아가 췌장 경로에 이르며, 여기에서 세포의 ~98%가 외분비, 세관, 또는 기질세포가 되며, ~2%가 내분비세포가 된다. 초기 내분비 세포는 섬전구세포이며, 이는 이어서 인슐린, 글루카곤 소마토스타틴, 또는 췌장성 폴리펩티드의 분비를 전문으로 하는 기능적 내분비 세포로 더욱 분화한다.

[0032] 본원에서 사용된 대로의 "분화 작용제"는 섬계통의 분화된 세포(전구세포 및 최종 분화된 세포를 포함하는)를 생산하기 위해 본 발명의 배양 시스템 중에 사용된 화합물 집합 중 하나를 언급하는 것이다. 화합물의 작용방식과 관련해서는 어떠한 제한도 의도되지 않는다. 예를 들면, 작용제는 표현형의 변화를 유도 또는 보조하며, 특정의 표현형을 갖는 세포의 성장을 촉진하거나 또는 다른 것의 성장을 지연하는 것에 의해 분화과정을 도울 수 있다. 이는 그렇지 않다면 원하지 않는 세포 유형으로의 경로로 분화가 유도될 수 있는 세포 집단에 의해 합성되거나 또는 배지 중에 있을 수도 있는 다른 인자에게는 또한 억제제로 작용할 수도 있다.

[0033] 원형 "영장류의 다능성 줄기세포"(pPS 세포)는 수정후 임의의 시기에 전배아, 배아, 또는 태아 조직으로부터 유래된 다능성 세포이며, 예컨대 8-12주령 SCID 마우스에서 기형종을 형성하는 능력 같은 당업계의 인정된 표준시험에 따라서, 세가지의 배세포총(내배엽, 중배엽, 및 외배엽) 모두의 유도체인 수개의 상이한 세포 유형의 자손을 적합한 조건하에서 생산할 수 있는 특징을 갖는다. 상기 용어는 다양한 종류의 줄기세포의 확립된 세포주 및 기술된 방식대로 다능성인 일차(or primary) 조직으로부터 수득된 세포를 포함한다.

[0034] pPS 세포의 정의에는 Thomson 등(Science 282:1145, 1998)에 의해 기술된, 인간 배아 줄기(hES)세포; 다른 영

장류 유래의 배아 줄기세포, 예컨대 리서스 줄기세포(Thomson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995), 마모세트(marmoset)줄기세포(Thomson 등, Biol. Reprod. 55:254, 1996) 및 인간 배아 생식(hEG)세포(Shambrott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998)로 예시되는, 다양한 유형의 배아 세포가 포함된다. 용어에는 다른 유형의 다능성 세포도 또한 포함된다. 세가지 모든 배세포층의 유도체인 자손을 생산할 수 있는 영장류 유래의 임의의 세포가, 이들이 배아조직, 태아조직, 또는 다른 기원에서 유래되었는지에 상관없이 포함된다. pPS 세포는 바람직하게는 악성종양 기원에서 유래된 것은 아니다. 세포가 핵형적으로 정상인 것이 바람직하다(그러나 언제나 그런 것은 아님).

[0035] 집단 중에 줄기세포 및 이들의 유도체의 상당부분이, 배아 또는 성체 기원의 분화된 세포와는 명백히 구분되는, 비분화된 세포의 형태적 특징을 나타내는 경우 pPS 세포 배양물을 "비분화"된 것으로 기술한다. 비분화된 pPS 세포는 당업자라면 쉽게 인식할 수 있으며, 전형적으로 2차원적인 현미경 시야에서 높은 핵/세포질의 비율 및 현저한 핵을 갖는 세포 집락으로 보인다. 집단내의 비분화된 세포 집락은 종종 분화된 주변 세포에 의해 둘러싸여 있을 것이라는 것이 이해되어야 한다.

[0036] "영양세포"는 제2유형의 세포가 자랄 수 있는 환경을 제공하기 위해, 다른 유형의 세포와 함께 공배양되는 세포의 한가지 유형이다. 특정 유형의 pPS 세포는 일차 마우스 배아 섬유모세포, 불멸화된 마우스 배아 섬유모세포, 또는 hES 세포로부터 분화한 인간 섬유모세포와 같은 세포에 의해 지원될 수 있다. pPS 세포의 성장을 지원하기 위해 새로운 영양세포가 추가되지 않는 상태에서 분할 후 적어도 한번의 분열을 거쳤다면 pPS 세포 집단은 영양세포가 "본질적으로 없는"것으로 언급된다.

[0037] 용어 "배아유사체"는 pPS 세포가 단층 배양에서 과성장하는 경우, 또는 부유배양 중에 유지된 경우에 나타나는 분화 및 비분화된 세포의 응집체를 언급하는 것으로, "응집체"와 동의어인 기술분야의 용어이다. 배아유사체는 전형적으로 수개의 배엽층(germ layer)으로부터 유래되고, 면역세포화학법으로 검출할 수 있는 세포 마커 및 형태적 기준에 의해 구별될 수 있는, 상이한 세포 유형의 혼합물이다.

[0038] "성장 환경"은 관심 있는 세포가 시험관내에서 증식, 분화 또는 성숙 할 환경이다. 환경의 특성은 세포가 배양되는 배지, 존재할 수 있는 임의의 성장인자 또는 분화인자, 및 만약 있다면 지원구조(예컨대 고형 표면상의 기질)를 포함한다.

[0039] 세포는 폴리뉴클레오티드가 인공적 조작의 임의의 적당한 수단으로 세포내로 전달된 경우, 또는 세포가 폴리뉴클레오티드를 물려받은 원래 변경된 세포의 자손인 경우에 "유전적으로 변경된" 또는 트랜스펙션된 것으로 언급된다.

일반적 기술

[0041] 분자 유전학 및 유전 공학의 일반적인 방법은 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Sambrook 등, Cold Spring Harbor); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Miller & Calos 편저); 및 *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel 등 편저, Wiley & Sons)의 현재 판에 기술되어 있다. 세포 생물학, 단백질 화학, 및 항체 기술은 *Current Protocols in Protein Science* (J.E. Colligan 등 편저, Wiley & Sons); *Current Protocols in Cell Biology* (J.S. Bonifacino 등, Wiley & Sons) 및 *Current Protocols in Immunology* (J.E. Colligan 등 편저, Wiley & Sons)에서 찾을 수 있다. 본 개시 중에 언급된 시약, 클로닝 벡터, 및 유전자조작용 키트는 시중의 업체, 예컨대 BioRad, Stratagene, Invitrogen, ClonTech 및 Sigma-Aldrich Co.에서 구입할 수 있다.

[0042] 세포 배양방법은 일반적으로 *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (R.I. Freshney 편저, Wiley & Sons); *General Techniques of Cell Culture* (M.A. Harrison & I.F. Rae, Cambridge Univ. Press), 및 *Embryonic Stem Cells: Methods and Protocols* (K. Turksen 편저, Humana Press)의 현재 판에 기술되어 있다. 조직 배양에 필요한 물건 및 시약은 시중의 업체 예컨대 Gibco/BRL, Nalgene-Nunc International, Sigma Chemical Co. 및 ICN Biochemicals에서 구입할 수 있다.

[0043] 본 개시와 관련된 특별한 연구는 J.E.Brinns의 *The Comparative Physiology of the Pancreatic Islet*, Springer-Verlag 1988; E.J. Vinik 등 편저의 *Pancreatic Islet Cell Regeneration and Growth*, Kluwer 1992; 및 R.P. Lanza 등 편저의 *Immunomodulation of Pancreatic Islet* (*Pancreatic Islet Transplantation*, Vol2), Springer Verlag 1994를 포함한다.

줄기세포의 공급원(source)

[0045] 본 발명은 다양한 유형의 줄기세포를 사용하여 실시될 수 있다. 본 발명에서의 사용에 적합한 줄기세포 중에는 임신 후 형성된 조직으로부터 유래된 영장류 다능성 줄기(pPS)세포, 예컨대 임신중 임의의 시기에 수합된 포배, 또는 태아 또는 배아조직이 있다. 제한하지 않는 예로는 하기에 예시된 대로, 배아 줄기세포 또는 배아 생식세포의 일차 배양물 또는 확립된 세포주가 있다.

[0046] 본 발명의 기술은 또한 먼저 비분화세포주를 확립함이 없이 섬세포가 될 수 있는 잠재성을 갖는 일차 세포로부터 직접 섬세포를 유도하는, 일차 배아 또는 태아 조직을 가지고 직접 적용될 수 있다. 특정 상황하에서, 본 발명의 방법은 또한 제대혈, 태반 또는 특정 성체조직 유래의 다능성 세포를 사용하여 실시될 수도 있다.

배아 줄기세포

[0048] 배아 줄기세포는 영장류 종 일원의 포배로부터 분리될 수 있다(미국특허 제5,843,780호; Thomson 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7844, 1995). 인간 배아 줄기세포(hES)는 Thomson 등(미국특허 제6,200,806호; Science 282:1145, 1998; Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998) 및 Reubinoff 등(Nature Biotech. 18:399, 2000)에 의해 기술된 기술을 사용하여 인간 포배 세포로부터 제조될 수 있다. hES 세포와 동등한 세포 유형은 이들의 다능성 유도체, 예컨대 WO 01/51610(Bresagen)에 개관된 원시적인 외배엽-유사(EPL)세포를 포함한다.

[0049] hES 세포는 인간의 착상전의 배아로부터 수득될 수 있다. 대안적으로는, 시험관 수정된(IVF) 배아가 사용될 수 있거나 또는 일-세포기 인간 배아가 포배기까지 증식될 수 있다(Bongso 등, Hum Reprod 4:706, 1989). 배아는 G1.2 또는 G2.2 배지 중에서 포배기까지 배양될 수 있다(Gardner 등, Fertil. Steril. 69:84, 1998). 투명층(zona pellucida)을 프로나아제(Sigma)에 깊게 노출시켜 발생된 포배로부터 제거한다. 포배를 1:50 희석의 토끼 항-인간 이자세포 항혈청에 30분간 노출시킨 후, DMEM 중에서 5분 동안 3회 세척하고, 1:5 희석의 기니픽 보체(Gibco)에 3분 동안 노출시키는, 면역수술에 의해 세포속덩이를 분리한다(Solter 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:5099, 1975). DMEM 중에서 2회의 추가 세척 후에, 용해된(lzyed) 영양외배엽 세포는 부드러운 파이펫팅으로 온전한 속세포덩이(ICM)로부터 제거되고 ICM은 mEF 영양세포층 위에 플레이트된다.

[0050] 9 내지 15일 후에, 속세포덩이-유래의 증식물을 1mM EDTA가 들어있는 칼슘 및 마그네슘이 없는 인산 완충 식염수(PBS)에 노출, 디스파아제 또는 트립신에 노출, 또는 마이크로파이펫으로의 물리적 분리에 의하여 소옹집으로 분리하며; 그리고 이어서 새로운 배지 중에서 mEF 상에 재플레이트한다. 비분화된 형태를 갖는 성장 집락을 마이크로파이펫으로 개별적으로 선택하고, 물리적으로 소옹집으로 분리하여, 재플레이트한다. ES-유사 형태는 뚜렷하게 높은 핵 대 세포질의 비율 및 현저한 핵을 갖는 조밀한 집락으로 특징된다. 초래된 ES세포를 이어 깊은 트립신처리, Dulbecco's PBS(2mM EDTA 포함)에 노출시키거나, 유형 IV 콜라겐아제(~200U/ml; Gibco)에 노출시키거나, 또는 마이크로파이펫으로 개별 집락을 선택하여 매 1-2 주마다 일상적으로 분할한다. 약 50 내지 100개 세포의 소옹집 크기가 최적이다.

배아 생식세포

[0052] 인간 배아 생식(hEG)세포는 마지막 생리기간 후 약 8-11 주에 수합한 인간 태아 물질에 존재하는 원시 생식세포로부터 제조될 수 있다. 적합한 제조 방법은 Shambrott 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998 및 미국 특허 제6,090,622호에 기술된다.

[0053] 요약하면, 생식용기는 비옹집된 세포를 형성하기 위해 처리되었다. EG 성장 배지는 DMEM, 4500mg/L D-glucose, 2200mg/L mM NaHCO₃; 15% ES 용 소태아 혈청(BRL); 2mM 글루타민(BRL); 1mM 소디움 피루베이트(BRL); 1000-2000 U/mL 인간 재조합 백혈병 억제 인자(LIF, Genzyme); 1-2ng/mL 인간 재조합 bFGF(Genzyme); 및 10 μM 포르스콜린(10% DMSO 중)이다. 96웰 조직배양 플레이트는 LIF, bFGF 또는 포르스콜린이 없는 변형된 EG 성장 배지 중에서 3일간 배양되고, 5000 rad γ-조사로 불활성화된 서브-컨플루언트 한 영양세포 층(예를 들면, STO 세포, ATCC No. CRL 1503)으로 제조된다. ~0.2mL 의 일차 생식세포(PGC) 혼탁액을 각각의 웰에 추가한다. 각각의 웰을 조사된 STO 마우스 섬유모세포로 미리 준비된 24-웰 배양 디쉬의 한 웰로 옮기며, 첫 번째 계대(passage)는 EG 성장배지 중에서 7-10일 후에 된다. EG 세포와 일치되는 세포 형태가 관찰될 때까지, 전형적으로는 7-30일 또는 1-4 계대 후까지 배지를 매일 교체하면서 세포를 배양한다.

비분화 상태에서의 pPS 세포의 증식

[0055] pPS 세포는 분화를 촉진함이 없이 증식만을 촉진하는 배양 조건을 사용하여, 배양에서 계속적으로 증식될 수 있다. 예시적인 혈청-포함 ES 배지는 80% DMEM(예컨대 녹-아웃(Knock-Out)DMEM, Gibco), 20%의 규정된(defined)

소태아혈청(FBS, Hyclone) 또는 혈청 대체물(WO 98/30679), 1% 비-필수 아미노산, 1mM L-글루타민, 및 0.1mM β -메르캅토에탄올로 만들어진다. 사용 바로 전에, 인간 bFGF를 4ng/mL(WO 99/20741, Geron Corp)로 추가한다. 전통적으로 ES 세포는 전형적으로 배아 또는 태아조직으로부터 유래된 섬유모세포인 영양세포층상에서 배양된다.

[0056] Geron의 과학자들은 pPS 세포가 영양세포가 없이도 비분화 상태에서 유지될 수 있다는 것을 발견하였다. 무-영양세포 배양을 위한 환경은 적절한 배양 기질, 구체적으로 세포와 매트릭스 예컨대 Matrigel[®] 또는 라미닌을 포함한다. 전형적으로, 효소성 소화는 세포가 완전히 분산되기 전(말하자면, 콜라게이나제 IV로 ~5분)에 중지된다. ~10 내지 2000개 세포의 소응집은 이어서 더이상 분산하지 않고 기질 위에 직접 플레이트된다.

[0057] 무-영양세포 배양은 분화하지 않고 세포의 증식을 지원하는 인자를 포함하는 영양 배지에 의해 지원된다. 상기 인자는, 배지를 상기인자를 분비하는 세포, 예컨대 조사된(~4000rad)일차 마우스 배아 섬유모세포, 텔로머라이즈드 마우스 섬유모세포, 또는 pPS 세포 유래의 섬유모세포-유사 세포와 배양함으로써 배지 내로 도입될 수 있다. 배지는 20% 혈청 대체물 및 4ng/mL bFGF로 보충된 무혈청 배지 예컨대 KO DMEM 중에서 $\sim 5-6 \times 10^4 \text{ cm}^{-2}$ 의 밀도로 영양세포를 플레이트하여 조건화 될 수 있다. 1-2 일간 조건화된 배지는 추가로 bFGF로 보충되고, 그리고 1-2일간 pPS 세포 배양을 지원하기 위해 사용된다. 무-영양세포 배양 방법의 특징은 국제 특허 공보 WO 01/51616; 및 Xu 등, Nat. Biotechnol. 19:971, 2001에서 추가로 논의된다.

[0058] 현미경 하에서, ES 세포는 높은 핵/세포질 비율, 현저한 핵, 및 분간하기 어려운 세포연접을 갖는 조밀한 집락 형성을 갖는 것으로 보인다. 영장류 ES 세포는 단계-특이적인 배아 항원(SSEA) 3 및 4, 및 Tra-1-60 및 Tra-1-81 (Thomson 등, Science 282:1145, 1998)로 명명된 항체를 사용하여 검출할 수 있는 마커를 발현한다. 마우스 ES 세포는 SSEA-1에 대한 양성대조군으로서, 그리고 SSEA-4, Tra-1-60, 및 Tra-1-81에 대한 음성대조군으로서 사용될 수 있다. SSEA-4는 인간 배아 암종(hEC) 세포상에 항상 존재한다. 시험관내 pPS 세포의 분화는 SSEA-4, Tra-1-60, 및 Tra-1-81 발현의 상실로 이어지고, 비분화된 hEG 세포상에도 또한 발견되는 SSEA-1의 증가된 발현으로 이어진다.

섬세포 및 이들의 유도체 제조를 위한 재료 및 실험방법

[0059] 본 발명의 섬세포는 원하는 표현형을 가진 세포를 풍부하게 하는(원하는 세포의 과성장, 또는 다른 세포유형의 억제 또는 사멸에 의함) 특별한 성장 환경 중에서 줄기세포를 배양하고, 분화시키며, 또는 재프로그램함으로써 수득된다. 이러한 방법은 앞부분에서 기술된 영장류 다능성 줄기(pPS)세포를 포함하는, 많은 유형의 줄기세포에 적용할 수 있다.

단계별 분화

[0060] pPS 세포로부터 섬세포의 농축(enrichment) 및 생산은 체장 세포 및 다른 세포 유형의 형성에 있어 다잠재성인 초기단계 전구세포를 형성함으로써 용이하게 될 수 있다는 것이 본 발명의 가정이다. 통상적인 생각으로, 이 전략은 먼저 관련있는 수임된 공통의 전구세포가 풍부한 세포집단을 형성하고, 이어서 섬세포 형성에 대해 점점 특화되는 더욱 성숙한 세포로 추가로 분화시키는 것을 포함한다. 본 전략에 의하면, 성숙한 섬으로의 pPS 세포의 분화는 수개의 계획적인 단계에서 수행된다.

[0063] 비분화된 pPS 세포 및 성숙한 섬세포 사이의 하나의 중간체는 미성숙 내배엽 세포이다. 개체발생의 초기에, 내배엽 세포는 GI 관 및 호흡계, 및 중요 소화기관(간 및 체장)의 표피세포를 만들 수 있다. 섬세포는 두-단계 접근법을 사용하여 생성될 수 있다. 단계 1은 공통 내배엽 전구세포의 집단을 수득하는 것을 포함한다. 단계 2는 내배엽 전구체를 체장 내분비세포로 성숙하게 하는 것을 포함한다. 실시예 3에서 예시된 대로, pPS 세포는 간세포 분화 작용제 n-부티레이트와의 배양에 의해 내배엽 분화 경로를 따르도록 개시될 수 있다. 추가의 정교한 간세포 분화 패러다임은 국제 특허 공보 WO 01/81549(Geron Corporation)에 기술된다. 소닉 헤지호그는 간 특이성에 관련된 것으로 생각되어지며, 그래서 배양 배지 중에 시클로파민(소닉 헤지호그의 억제제)의 포함은 세포를 체장 계통으로 전환하는데 도움을 주는 것으로 생각된다. 분화는 이어서 최종 분화 인자 니코틴아미드(시클로파민 및 액티빈A의 존재 하에서)를 사용하여 후속 단계로 더욱 진행되어진다.

[0064] 본 접근법의 추가의 설명으로, 분화 경로는 세 단계로 나뉘어진다. pPS 세포는 먼저 내배엽(단계 1)으로 분화되고, 이어서 -아마도 수임된 체장 전구체(마커 Pdx1로 확인 가능함)의 수준에서, 두 번째 중간체로 분화된다(단계 2). 더 발전된 분화 단계(단계 3)는 사용자가 성숙한 섬을 얻기 원한다면 수행될 수 있다. 설명을 하자면, 단계 1을 성취하기 위해서, pPS 세포는 n-부티레이트 및 액티빈A의 조합을 사용하여 창자(gut) 내배엽에 대

한 마커를 갖는 세포로 분화될 수 있다(실시예 4). 대안적으로, 내배엽 세포를 함유하는 이종집단은 강화 작용제(셀레늄 및 갑상선 호르몬 예컨대 T3)의 존재 하에서 레티노산과 pPS 세포를 배양함으로써 제조될 수 있다(실시예 5). 단계 2를 달성하기 위해서, 세포는 마이토겐(FGF 패밀리의 일원, EGF 또는 베타셀룰린과 조합가능)과 조합하여 TGF- β 길항제, 예컨대 노진과 배양될 수 있다. 또한 시클로파민으로 헤지호그 신호를 막는 것이 도움이 될 수 있다. 단계 3은 이미 기술된 대로 최종 분화 작용제로 니코틴아미드를 사용하여 달성될 수 있다(실시예 5). 대안적으로, 전사인자는 Pdx1 양성 췌장 전구체로부터 성숙한 섬세포로의 진행을 야기하는 직접적인 조작에 의해 활성화 될 수 있다(실시예 6).

[0065] 분화에 대한 단계별 접근법은 독자를 위한 길잡이를 의도한 것이며, 명백히 제시하는 경우를 제외하고는 본 발명을 제한하는 것은 아니다. 분화경로는 더욱 많은 단계로 구분될 수 있으며, 따라서 단계별 분화는 증가하는 방식으로 최적화 될 수 있다. 예를 들면, 췌장 전구체 및 성숙한 섬 사이의 잠재적인 중간체는 췌장 내분비세포를 형성하는 것으로 수임된 전구세포이다. 반면, 상황에 따라서는, 효과적인 분화 작용제는 동시에 상이한 단계의 세포에 작용하도록, 또는 분화 경로를 따라 연속단계(cascading)효과를 촉진하도록 조합될 수 있다.

[0066] 바람직한 최종 단계 세포집단은 부분적으로는 이의 의도된 용도에 의존할 것이다. 예를 들면, 수임된 섬전구세포는 일반적인 섬 부족의 치료, 및 시험관내의 섬분화 연구용으로 특히 가치가 있을 수 있다. 초기의 전구세포는 재생에 대하여 더 큰 능력을 가질 수 있다. 인슐린 또는 즉각적인 호르몬의 생산이 요구되어지는 다른 내분비 호르몬의 고수준 발현을 나타내는 세포집단이 필요하다. 분화과정은 따라서 목적하는 수준의 성숙도를 나타내는 단계에서 과정을 중단하며, 맞춤화될 수 있다.

[0067] 하기의 부분은 기술된 방법으로 분화를 촉진하는데 있어 효과적인 조직배양 및 유전자 트랜스펙션 기술을 제공한다.

분화과정의 개시

[0069] 내배엽 세포로 pPS 세포의 분화를 시작하는 두 가지 접근법이 있다. 하나는 세포를 새로운 기질에 플레이트하거나, 또는 분화를 억제하는 가용성 인자 또는 세포외 매트릭스를 제거하기 위해 배지를 교환하는 것이다. 이는 때로 "직접적 분화방법"으로 언급되며, 일반적 용어로 국제 특허 공보 WO 01/51616, 및 미국 특허공보 제20020019046호에 기술된다. 직접적 분화방법에서는 통상적으로 잔존하는 영양세포에 의해 야기되는 분화과정에 있어서의 잠재적인 부작용을 피할 수 있는, pPS세포의 무-영양세포 배양으로 시작하는 것이 바람직하다. 실시예 4는 초기 분화인자를 포함하는 배지를 도입함으로써 창자 내배엽이 직접적 분화방법에 의해 생산되는 예시를 제공한다.

[0070] 다른 접근법은 비분화된 pPS 세포를 부유배양 하는 것이며, 이는 이들의 배아유사체 또는 응집체 형성을 야기한다. 예를 들면, pPS 세포는 짧은 콜라겐나아제 소화로 수합되고, 무리로 분해되며, 비부착 세포 배양 플레이트로 계대된다. 응집체는 2-3일 마다 양분을 주고, 적절한 기간, 전형적으로 4-8일 후에 수합한다(실시예 1 & 5). 어떤 경우에, 분화는 배지 중의 다른 인자에 의해 증강된다: 예를 들면, 레티노산(실시예 5) 또는 디메틸суլ포시드(DMSO). 조건에 따라서, 응집체는 일반적으로, 상당한 빈도의 내배엽 세포를 포함하는 이종집단의 세포유형을 형성하며 시작할 것이다. 배아유사체는 이어서 분산되고 분화과정의 다음 단계를 위해 기질 예컨대 라민 또는 피브로넥틴 상에 재플레이트되거나; 또는 비부착 플레이트 및 적절한 배지를 사용하여 부유배양으로 계대된다.

[0071] 직접적 분화 또는 응집체 중의 분화는 하기에 열거된 마커를 사용한 내배엽 세포의 존재에 대하여 모니터될 수 있다. 일단 충분한 정도의 내배엽이 수득되면, 세포를 재플레이트하거나 그렇지 않다면 단계 II의 시작을 위해 조작된다. 특정 상황에서는, 섬세포의 유지 또는 분화는 세포를 미세덩어리 무리(예를 들면, 50-5000 세포)로 유지하여, 알파, 베타, 및 엘타 세포가 직접적으로 상호 작용할 수 있다면 향상될 수 있다.

[0072] 이런 방식으로 일단 공통의 전구세포가 만들어지면, 이들은 특이적 분화인자와 배양될 수 있거나/있고 다음의 부분에서 기술한 대로 섬-특이적 유전자 또는 프로모터로 유도될 수 있다.

가용성 인자를 이용한 섬세포로의 더 진행된 분화유도

[0074] 배양물을 섬경로 단계를 따라 더 분화시키기 위해, pPS 세포 또는 이들의 분화된 자손을 섬분화 인자의 카테일 중에서 배양할 수 있다. 단독으로, 또는 조합하여, 각각의 인자는 원하는 유형으로의 전환 빈도를 증가시킬 수 있으며, 섬표현형을 갖는 세포의 과성장을 야기할 수 있으며, 다른 세포 유형의 성장은 억제할 수 있거나, 또는 또다른 방식으로 섬세포를 풍부하게 할 수 있다. 본 발명을 실시하기 위해서 섬세포가 풍부해지는 결과를 초래

하는 기전을 이해할 필요는 없다. 하기는 후보 분화인자의 제한하지 않는 리스트이다.

표 1

[0075]

표 1: pPS 세포로부터 섬세포로의 분화를 위한 인자			
인자	화합물 유형 또는 패밀리	제안된 기능	초기의 작용농도
시클로파민	스테로이드성 알칼로이드	헤지호그 신호전달의 억제자; 또한 콜레스테롤 생합성의 억제자로서도 작용할 수 있음	10 μM
베타셀룰린	EGF 패밀리 일원	베타세포분화의 미토겐 또는 촉진제. 상기 두 가지 기능은 단백질의 상이한 영역에 기인함.	4nM
액티빈 A	TGF-β 패밀리 일원	분화인자, 관유사 세포주의 내분비 췌장세포로 분화를 야기함	4nM
엑센틴-4	글루카곤-유사 펩티드 1 작용제	GLP-1(하기 참조)의 더욱 안정한 형태	20nM
글루카곤-유사 펩티드 1(GLP1)	펩티드호르몬, 글루카곤 유전자의 단백질 산물 중 하나; G-단백질 커플드 수용체 리간드	글루코스 생산, 인슐린 분비를 유도함, 베타 세포 신생을 유도함, 베타 세포 증식을 유도함,	20nM
간세포 성장인자(HGF)	c-Met 수용체의 리간드	HGF를 과발현하는 트렌스제닉 동물의 베타 세포 질량을 증가 시킴. 관유사 세포주로부터 베타세포 형성을 유도함.	10ng/ml
니아신아미드(니코틴아미드)	비타민 B 패밀리의 일원	세포의 산화상태 및/또는 ADP-리보실화에 영향을 미칠 수 있음; 베타 세포 분화를 촉진함	10mM
인슐린-유사 성장인자I(IGF-1)	펩티드 호르몬	베타 세포 미토겐	10nM
n-부티레이트		히스톤 데아세틸라아제 억제제(간세포의 생산을 위해 사용됨)	0.5mM 내지 2.5mM
레티노산(all-trans)	레티노이드	분화인자	10 μM
성장 호르몬 (인간 뇌하수체 소마토트로핀)	소마토트로핀/프로락틴 패밀리	베타 세포 미토겐	100ng/ml
태반 락토겐	소마토트로핀/프로락틴 패밀리	PL을 과발현하는 트렌스제닉 동물의 베타 세포 질량, 임신동안의 베타 세포 미토겐을 증가시킴.	50ng/ml
혈관내피성장인자(VEGF)	Flt-1 및 Flk-1은 수용체임. PDGF/VEGF 패밀리	내피 섬전구세포에 대한 가능한 미토겐	50ng/ml
인슐린-유사 성장 인자 II(IGF-II)	인슐린 패밀리	IGF-1, 미토겐과 유사, 췌장 발생 및 기능에 있어서는 강력하게 연관된 것은 아님.	10nM

[0076]

표 1: pPS 세포로부터 섬세포로의 분화를 위한 인자			
인자	화합물 유형 또는 패밀리	제안된 기능	초기작용 농도
3-이소부틸-1-메틸 잔틴(IBMX)	포스포디에스터라아제 억제제, cAMP 수준 증가시킴.	인슐린 분비 증가시킴.	100 μM
워트마닌	PI-3 키나아제 억제제	인슐린 분비를 증가시킬 수 있음	30nM
가스트린	펩티드 호르몬	베타 세포 신생을 촉진할 수 있음	10ng/ml
콜레시스토키닌	창자 호르몬	섬의 성숙을 보조할 수 있음	5 μM
신경성장인자 (NGF)	NGF 패밀리	인슐린 분비 증가시킴	50ng/ml
효피 성장인자(EGF)	EGF 패밀리(상기 베타셀룰린 참조)	트렌스제닉 과발현이 베타세포의 증식으로 이어짐	4nM

각질세포 성장인자(KGF), 아카 FGF7	FGF 패밀리	트랜스제닉 과발현은 베타세포의 증식으로 이어짐	10ng/ml
혈소판-유래 성장인자(PDGF)	PDGF 패밀리(상기 VEGF 참조)	잠재적 전구체 미토겐	50ng/ml
재생유전자(Reg)	Reg 패밀리	췌장 손상 후 섭 재생에서 기능함	100ng/ml
섬 신생관련 단백질(INGAP)	Reg 패밀리	섬 재생에서 기능할 수 있음	100ng/ml

[0077] 동일한 수용체에 결합하는 다른 리간드 또는 항체도 본 개시에서 언급된 임의의 수용체 리간드와 동등한 것으로 간주될 수 있다.

[0078] 전형적으로, 적어도 두개, 세개 또는 세개를 초과하는 이러한 인자는 분화 칵테일로 조합된다. 인간 단백질이 바람직하나, 종간 동족체 및 이형체가 또한 사용될 수도 있다. 임의의 상기 인자들 대신에, 독자는 동일한 수용체에 결합하거나 또는 동일한 신호전달 경로를 자극하는 다른 리간드, 예컨대 수용체-특이적 항체를 사용할 수 있다. 부가적으로, 다른 성분도 상이한 경로를 따라 분화를 유도하기 위해 존재할 수도 있는 다른 인자의 효과를 중화하기 위해 배지 중에 포함될 수 있다.

[0079] 임의의 이러한 인자의 효능은 섬세포 경로를 따라 하나 이상의 단계의 분화를 촉진할 수 있는 조합에 도달하기 위한 매트릭스 전략을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 효능은 하기에 기술된 것과 같은 표현형 마커를 사용하여, 목적한 중간단계 세포 또는 최종 단계 세포의 표현형 출현을 모니터함으로써 평가된다. 예를 들면, 내분비 췌장 분화 또는 증식을 유도하는 것으로 믿어지는 인자는 표준 배양 조건에서 Pdx1 발현의 유도 및 후속적인 인슐린 발현을 유도하는 이들의 능력에 대하여 시험된다.

[0080] 부분요인설계 전략이 효율적인 방법으로 수개의 화합물을 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 각각의 인자는 두 수준으로 배정된다: 예를 들면, 배양물 매트릭스는 하나의 수준에 대하여는 피브로넥틴으로 그리고 두 번째 수준에 대하여는 라미닌으로 배정될 것이다. 64 인자 조합(64 실험)에서, 어느 인자(15-20개의 군으로부터)가 실질적으로 통계학적으로 의미 있는 방식으로 분화에 영향을 주는지 결정하는 것이 가능하다. 이러한 전략에 의한 분석에 적합한 조합은 시클로파민, TGF 패밀리 일원들(TGF-α, 액티빈 A, 액티빈 B, TGFβ1, TGFβ3), 엑센틴4, 니코틴아이드, n-부티레이트, DMSO, all-trans 레티노산, GLP-1, 골형태발생 단백질들(BMP-2, BMP-5, BMP-6, BMP-7), 인슐린-유사 성장인자 (IGF-I, IGF-II), 섬유모세포 성장인자(FGF7, FGF10, bFGF, FGF4), 기타 성장인자(EGF, 베타셀룰린, 성장호르몬, HGF), 기타 호르몬(프로락틴, 콜레시토키닌, 가스트린 I, 태반 락토겐), TGF-β 패밀리 길항체 (노긴, 폴리스타틴, 코르딘), IBMX, 워트마닌, 텍사메타존, Reg, INGAP, cAMP 또는 cAMP 활성화제(포르스콜린), 및 세포외 매트릭스 성분(라미닌, 피브로넥틴)을 포함한다. 최근에 출현한 세포 집단은 표현형 마커에 의해 분석되며, 발현 패턴은 어느 인자가 분화경로 상에서 양성 또는 음성의 영향을 갖는지 결정하기 위해 분석된다.

유전적으로 변형된 세포를 사용한 분화의 유도 또는 모니터링

[0082] 분화 및 분리 전략을 최적화 하는데 있어, 조직-특이적 프로모터가 수용체 유전자의 발현을 유도하는 벡터로 유전적으로 변경된 세포를 사용하는 것이 때로는 도움이 된다.

[0083] 섬전구세포에 특이적인 적합한 프로모터는 Pdx1(NT_009799), 뉴로게닌 3(NT_008583), 뉴로D1(NT_005265), 네스틴(NT_004858), 및 Ptfla-p48(NT_008705)의 전사를 구동하는 것들을 포함한다. 성숙한 섬세포에 특이적인 적합한 프로모터는 인슐린(GenBank Accession NT_009308), 글루카곤(NT_022154), 소마토스탁틴(NT_005962), 또는 췌장 폴리펩티드(NT_010755)의 발현을 유도하는 것들이다. 선택된 프로모터(상류방향 서열의 ~0.5 내지 5kB)의 효과적인 최소 서열은 PCR로 증폭되어 표준 플라스미드, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 또는 레트로바이러스 벡터내로, 적합한 리포터 유전자의 발현을 유도하는 위치에 연결된다. 적합한 리포터 유전자는 형광분자(예컨대 녹색형광 단백질 또는 루시페라아제)를 코딩하거나, 검출 가능한 효소(예컨대 알칼린 포스파타아제)를 코딩하거나, 또는 항체 또는 렙틴 결합으로 검출될 수 있는 세포 표면 항원(임의의 이종 단백질 또는 탄수화물)을 생산한다.

[0084] 조직-특이적 프로모터로 트랜스펙션된 세포는 이미 기술된 방법으로 분화절차를 최적화 하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 트랜스펙션된 비분화된 pPS 세포 또는 분화의 초기단계에 있는 세포는 다양한 분화 방식을 거칠 수 있으며, 이어서 섬-특이적 프로모터에 의해 구동된 발현을 나타내는 세포의 비율에 대해 분석될 수 있다. 이는 효과적인 분화 작용제, 배양 환경, 및 시기의 빠른 판독을 제공한다. 이어서 원 유전형을 갖는 높

은 질의 섬계통 집단을 생성하기 위해 트랜스펙션되지 않은 세포와 최적의 절차가 사용될 수 있다.

[0085]

조직-특이적 프로모터로 트랜스펙션된 세포는 또한 기계적 분류 달성을 위한 수단으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 프로모터는 약물-저항성 표현형, 예컨대 네오마이신 저항성 유전자(약물 G418에 대한 저항성 수여) 또는 블라스티시딘 저항성 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 경우에, 세포가 일단 분화되면, 이들은 원하는 세포 유형의 증식을 촉진하기 위해 약물과 배양된다. 대안적으로, 리포터 유전자는 형광분자를 코딩하거나, 또는 검출할 수 있는 표면 항원의 발현을 야기한다. 이러한 경우에, 관심 있는 세포는 직접 또는 간접적 형광에 근거한 세포 분류, 또는 면역흡착에 의하여 분화된 세포의 집단으로부터 분리된다. 비-복제성, 비-삽입성 벡터(예컨대 아데노바이러스 벡터)가 분리 단계 동안 일과성 트랜스펙션에 사용될 수 있으며, 이는 후속적인 세포 증식 시에 희석되어서 원 유전형을 갖는 세포가 되도록 한다.

[0086]

세포는 또한 섬세포 또는 이들의 전구세포에 대한 분화경로로 더욱더 직접적으로 유도하기 위한 목적으로 유전적으로 변경될 수 있다. 섬세포에서 정상적으로 발현되는 특정 유전자의 의도적인 상향조절은 덜 분화된 세포로 하여금 성숙한 섬세포에 더욱 적합한 유전적 발현 프로필을 가져오게 할 것이라는 것이 가정된다. 적합한 유전자는 하류단계의 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있는 전사조절인자를 코딩하는 것을 포함한다. 췌장 계통발생의 후보자(대략 경로상 이들 위치의 순서대로)는 Sox17 (GenBank Accession NM_022454), Hlx9b (NM_005515), Pdx1 (NM_000209), 뉴로케닌3 (NM_020999), Pax4 (NM_006193) 또는 뉴로D1 (NM_002500), Is11 (NM_002202), Nkx2.2 (NM_002509), 및 Nkx6.1 (NM_006168)을 포함한다.

[0087]

이러한 접근법의 예시는 실시예 6에 제공된다. 섬세포 분화 방식에 있어서 세포의 형질도입으로 유발된 뉴로케닌 3 발현은 하류단계 조절 유전자, 및 섬 호르몬을 코딩하는 유전자의 발현을 증강시킨다. 뉴로케닌은 뉴로D-관련된 bHLH 전사인자(발생중인 신경계에서 활성이 있는 신경 결정 유전자)의 패밀리이다.

[0088]

분화된 세포의 특징들

[0089]

세포는 표현형 기준, 예컨대 형태적 특징의 현미경적 관찰, 발현된 세포마커의 검출 및 정량, 시험관내 측정 가능한 기능적 기준, 및 숙주 동물로의 주입시 양태에 따라서 특징화될 수 있다.

[0090]

표현형 마커

[0091]

본 발명의 세포는 섬세포에 특징적인 다양한 종류의 표현형 마커를 발현하는 지에 따라서 특징화될 수 있다. 유용한 마커는 표 2에 나타낸 것을 포함한다.

표 2

표2: 세포 규명을 위한 표현형 마커	
SSEA-4	배아줄기 및 생식 세포
Oct-4	비분화된 배아 다능성 세포
텔로머라아제 역전사 효소(TERT)	무한정 복제가 가능한 세포(예를 들면, 비분화된 pPS 세포)
Pdx1	췌장으로 되는 십이지장부위에 있는 췌장성 돌기 형성전에 발현됨. 성숙한 베타세포에서도 또한 발현됨.
뉴로케닌 3(Ngn3)	섬전구세포의 마커
글루카곤	알파 세포
Nkx6.1	베타 세포마커
클루코키나아제	베타 세포마커
인슐린 또는 프로인슐린	성숙한 베타 세포
소마토스տ틴	엘타 세포
췌장 폴리펩티드	PP 세포
섬 아밀로이드 폴리펩티드(IAPP)	섬 마커
Islet-1	섬마커, 또한 신경 발현
베타-2/뉴로D	볍 섬세포 마커
HNF3b	내배엽 마커
HNF4a	내배엽 마커
Sox17	화정성 내배엽 마커

아밀라아제	외분비 세포
HES	외분비 췌장 마커
네스틴	잡재적 전구세포 마커
소닉 헤지호그	신호전달 분자, 췌장 형성에 부재가 요구됨
CK19	췌장관 마커(가능한 췌장 전구체)
Glut-2	글루코스 운반체
패치드(patched) 동족체	헤지호그 수용체
스무든드(smoothene d) 동족체	헤지호그 수용체

[0093] 조직-특이적 마커는 임의의 적합한 면역학적 기술-예컨대 세포-표면 마커에 대한 흐름 면역세포화학법, 또는 세포내 또는 세포-표면 마커에 대한 면역조직화학법(예를 들면, 고정된 세포 또는 조직 절편의)을 사용하여 검출될 수 있다. 자세한 흐름세포측정분석 방법은 Gallacher 등, Blood 96:1740, 2000에 제공된다. 임의적으로는 세포의 고정 후에, 그리고 임의적으로는 표시된 2차 항체 또는 표시를 증폭하기 위한 다른 콘쥬게이트를 사용하여, 상당할 정도의 검출할 수 있는 양의 항체가 표준 면역세포화학 또는 흐름세포측정분석에서, 항원에 결합하는 경우, 세포 표면 항원의 발현은 양성으로 정의된다. 현재 특이적 항체의 공급원은 하기를 포함한다: 인슐린, Sigma Aldrich(I2028); 글루카곤, Sigma Aldrich(G2654); 소마토스타틴, Santa Cruz Biotech (sc-7820); 뉴로케닌 3, Chemicon (AB5684); 네스틴, BD Transduction Labs(N17220); α -아밀라아제, Sigma Aldrich(A8273); Glut-2, Alpha Diagnostics(GT-22A).

[0094] 조직특이적 유전자 산물의 발현은 또한 노던 블롯 분석, 도트-블롯 부합 분석법, 또는 표준 증폭 방법에서 서열-특이적 프라이머를 사용한 역전사효소로 개시된 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)으로 mRNA 수준에서 검출될 수 있다. 더 자세한 것은 미국 특허 제5,843,780호를 참조. 본 개시에 열거된 특정의 마커에 대한 서열 데이터는 GenBank와 같은 공중 데이터베이스로부터 수득될 수 있다.

[0095] 초기의 평가는 광범위한 개체발생적 프로필을 제공하는 마커의 조합을 사용하여 수행될 수 있다; 예를 들면, 초기의 췌장 세포에 대하여는 Pdx1; 초기의 췌장 내분비 세포에 대하여는 Ngn3; 및 성숙한 베타세포에 대하여는 인슐린. 세포는 전에 기술된 분화 패러다임으로부터 정해진 간격(말하자면, 매주)으로 수합된다. 이러한 마커에 대해 양성으로 시험된 세포는 이어서 다른 마커, 예컨대 IAPP 및 Nkx6.1의 발현에 대하여 분석될 수 있다. 일단 세포가 특징화되면, 각 단계의 분화인자 조합 및 시기가 최적화된다.

[0096] 본 발명의 특정 구현에는 세포의 적어도 2%, 5%, 10%, 또는 이를 초과하는 세포가 상기 언급된 표면 마커를 단독으로, 또는 조합하여 갖는 집단에 관한 것이다. 내분비 기능은 많은 연구 및 치료적 적용에 있어 중요하며, 적어도 5%의 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 또는 췌장 폴리펩티드를 분비하는 세포를 함유하는 집단인 경우가 특히 관심있는 것이며, 이러한 내분비 호르몬-분비 세포로 분화할 수 있는 전구세포와 마찬가지로 관심 있는 것이다. 알파, 베타, 및 엘타 세포 사이의 상호작용이 탈분화를 예방하며 효율적인 내분비 호르몬 분비를 유지하는데 중요할 수 있다는 것이 본 발명의 가정이다. 본 발명은 또한 이러한 2 또는 3 가지의 세포 유형을 포함하는, 이들 자신이 만든 매트릭스에 결합되어 있거나, 배양 중 공급된 매트릭스 성분에 결합되어있거나, 또는 마이크로캡슐화되어 있는 세포의 덩어리 또는 무리(아마도 크기는 50-5,000 세포)를 또한 포함한다.

[0097] 낮은 잔존 비율의 비분화된 pPS 세포가 있는 집단이 또한 바람직하다. 1% 미만, 또는 0.2% SSEA-4 양성, Oct-4 양성, 또는 내인성 텔로미라아제 역전사효소의 발현에 대하여 양성인 것이 바람직한 집단이다. 바람직한 집단은 또한 특정의 다른 세포 유형, 예컨대 간세포(일부민 양성세포), 골격근육세포(myoD 양성), 민무늬근육세포(민무늬근육 액틴), 섬유모세포 형태를 갖는 세포, 또는 뉴론(β -튜불린 III 또는 NCAM 양성 세포)를 상대적으로 낮은 비율(<5%, 1%, 또는 0.2%)로 갖는다.

[0098] pPS 세포의 확립된 세포주로부터 유래된 경우, 본 발명의 세포집단 또는 분리된 세포는 이들이 유래된 세포주와 동일한 계놈을 가질 것이다. 임의의 핵형 비정상에 더하여, 이는 pPS 세포 및 섬세포간의 염색체 DNA는 90%를 초과하여 동일할 것이라는 것을 의미하며, 이는 섬세포가 정상적 체세포분열의 과정을 통하여 비분화된 계통으로부터 수득된다면 추측될 수 있다. 내인성 유전자를 없애거나(knock-out) 또는 트랜스유전자를 도입하기 위해 재조합 방법으로 처리된 섬세포도, 모든 무조작된 유전적 요소는 보존되기 때문에, 여전히 이들이 유래한 계통과 동일한 계놈을 갖는 것으로 간주된다.

[0099] 동물모델 실험

[0100] 섬세포를 임상 적용용으로 사용하는 목적에 있어서 세포 집단이 숙주 동물의 섬시스템을 재구성하는 능력에 상당한 관심이 있다. 재구성은 수개의 잘 확립된 동물모델을 사용하여 시험될 수 있다.

[0101] 비-비만 당뇨(NOD) 마우스는 수주령에 나타나는 췌도염을 유발하는 유전적 결함을 갖는다(Yoshida 등, Rev. Immunogenet. 2:140, 2000). 암컷의 60-90%에서 20-30 주까지 혼성당뇨병이 발생한다. 면역-관련된 병리학은 인간 제 1 형 당뇨병의 그것과 유사한 것으로 보인다. 제 1 형 당뇨병의 다른 모델은 트랜스유전자 및 녹아웃 돌연변이를 갖는 마우스이다(Wong 등, Immunol. Rev. 169:93, 1999). 자발적 제 1 형 당뇨병에 대한 래트 모델은 최근에 Lenzen 등(Diabetologia 44:1189, 2001)에 의해 보고되었다. 한번의 스트렙토조토신의 복강내 주사 방법(Soria 등, Diabetes 49:157, 2000)으로 또는 낮은 일회량으로 스트렙토조토신의 연속적인 주사(Ito 등, Environ. Toxicol. Pharmacol. 9:71, 2001)로 고혈당(>500mg 글루코스/dL)이 마우스에서 유도될 수 있다. 이식된 섬세포의 효능을 시험하기 위해, 정상 수준(<200mg/dL)으로의 글루코스 회복에 대하여 마우스를 모니터한다.

[0102] 더 큰 동물이 만성적 고혈당 증상의 휴유증을 추적하는데 좋은 모델을 제공한다. 개는 췌장을 제거하거나(J. Endocrinol. 158:49, 2001) 또는 갈락토스를 먹여서(Kador 등, Arch. Ophthalmol. 113:352, 1995) 인슐린 의존성으로 만들 수 있다. 또한 키이스흔드 개에서는 유전되는 제 1 형 당뇨병 모델이 있다(Am. J. Pathol. 105:194, 1981). 개 모델을 이용한 초기의 연구(Banting 등, Can. Med. Assoc. J. 22:141, 1922)로 인해 1925년 2월에 몇 명의 캐나다인이 스토퍼홀름으로의 긴 항해를 하게 되었다.

[0103] 예시로서, 하기의 동물에서 pPS 유래된 섬세포를 사용하여 예비연구가 수행될 수 있다: a)비-당뇨 누드(T-세포 결핍) 마우스; b) 스트렙토조토신 처리에 의해 당뇨병이 된 누드 마우스; 및 c) 부분적 췌장 절단 후 섬 재생 과정에 있는 누드 마우스. 이식된 세포의 수는 ~1000-2000개의 정상 인간 섬과 동등하며, 신장 캡슐 밑에, 간, 또는 췌장에 이식된다. 비-당뇨 마우스에 대하여는, 최종점은 이식 생존율(조직화학적 검사)의 평가 및 생화학적 분석, RIA, ELISA, 및 면역조직화학적 방법에 의한 인슐린 생산의 결정일 수 있다. 스트렙토조토신 처리된 동물 및 부분적 췌장 절단된 동물도 또한 생존, 대사 조절(혈당) 및 체중 증가에 대해 평가될 수 있다.

[0104] 분화된 세포의 유전적 변형

[0105] 본 발명의 섬전구세포는 상당한 중식 능력을 가진다. 원한다면, 복제 능력은 세포 중의 텔로머라아제 역전사효소의 수준을 증가시키거나, 또는 내인성 유전자로부터의 전사를 증가시키거나, 또는 트랜스유전자를 도입하는 것에 의해 더욱 향상될 수 있다. 특히 적합한 것은 국제 특허 출원 WO 98/14592에 제공된, 인간 텔로머라아제(hTERT)의 촉매 성분이다. 인간 세포에서 텔로머라아제의 트랜스펙션 및 발현은 Bodnar 등, Science 279:349, 1998 및 Jiang 등, Nat. Genet. 21:111, 1999에 기술되어 있다. 유전적으로 변경된 세포는 표준 방법에 따라서, RT-PCR, 텔로머라아제 활성(TRAP 분석), hTERT에 대한 면역세포화학적 염색, 또는 복제 능력에 의해 hTERT 발현에 대해 평가될 수 있다. 세포를 불멸화하는 다른 방법, 예컨대 myc, SV40 큰 T 항원, 또는 MOT-2를 코딩하는 DNA로 세포를 형질전환하는 것이 고려될 수 있다(미국 특허 제5,869,243호, 국제 특허출원 WO 97/32972 및 WO 01/23555).

[0106] 원한다면, 본 발명의 세포는 시험관내에서 비분화세포를 제거하기 위해, 또는 생체내에서 복귀변이체에 대한 안전망을 위해 준비될 수 있거나 또는 추가로 처리될 수 있다. 집단으로부터 비분화된 줄기세포를 없애는 한가지 방법은 작동 유전자가 비분화 세포에서 선호되는 발현을 야기하는 프로모터 - 예컨대 TERT 프로모터 또는 OCT-4 프로모터의 조절 하에 있는 벡터로 집단을 트랜스펙션하는 것이다. 작동 유전자는 세포 분류를 안내 할 리포터, 예컨대 녹색형광 단백질 일 수 있다. 작동 유전자는 예를 들면, 독소 또는 아폽토시스 매개자, 예컨대 캐스페이스(Shinoura 등, Cancer Gene Ther. 7:739, 2000)를 코딩하며, 세포에 직접적으로 용해적(lytic)일 수 있다. 작동 유전자는 세포를 외부 작용체, 예컨대 항체 또는 전구약물의 독성효과에 민감하게 만드는 효과를 가질 수 있다. 예로는 발현이 되는 세포로 하여금 갠시클로비어(USSN 60/253,443)에 민감하게 하는 헤르페스 단순 티미딘 키나아제(tk) 유전자이다. 대안적으로, 작동 유전자는 비분화된 표현형으로 복귀하는 임의의 세포를 생체내에서 자연적으로 나타나는 항체에 민감하게 되도록 하는 외래 결정인자의 세포 표면 발현을 야기할 수 있다(USSN 60/253,357).

[0107] 연구 및 임상 치료에서 섬세포의 용도

[0108] 본 발명은 많은 수의 섬전구세포, 및 성숙한 섬세포를 생산하는 방법을 제공한다. 상기의 세포집단은

중요한 연구, 개발, 및 상업적 목적에 다양하게 사용될 수 있다.

[0109] 본 발명의 세포는 다른 계통 유래의 세포에서 선택적으로 발현되는 cDNA로 상대적으로 오염되지 않은 cDNA 라이브러리의 제조에 사용될 수 있다. 본 발명의 분화된 세포는 또한 표준 방법에 따라, 섬전구세포 및 이들의 유도체의 마커에 특이적인 모노클로날 또는 폴리클로날 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0110] 특히 관심이 있는 것은 약물 개발 및 임상적 치료를 위한 본 발명의 조성물의 용도이다.

약물 스크리닝

[0112] 본 발명의 섬세포는 섬전구세포 및 이들의 다양한 자손의 특성에 영향을 미칠 인자들(예컨대 용매, 작은 분자 약물, 웨티드, 폴리뉴클레오티드) 또는 환경적 조건(예컨대 배양조건 또는 조작)에 대하여 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다.

[0113] 가장 좋은 예는 인슐린 합성 또는 분비를 상향 또는 하향 조절하는 잠재성을 가지는 작은 분자 약물의 효과에 대한 섬세포 무리 또는 균질한 베타세포 제제의 용도이다. 세포는 시험 화합물과 조합되고, 이어서, 예를 들면 배양 배지의 면역분석 또는 RT-PCR로 발현 또는 분비속도의 변화에 대해 모니터된다.

[0114] 본 발명의 다른 스크리닝 방법은 섬세포 성장, 발생, 또는 독성에 미치는 잠재적 효과에 대한 약학 화합물의 시험에 관한 것이다. 이 유형의 스크리닝은 화합물이 섬세포에 약리효과를 갖도록 고안된 경우만이 아니라, 또한 다른 부분에서 초기 약리효과를 위해 고안된 화합물의 섬-관련 부작용에 대해 시험하는데도 적당하다.

[0115] 세 번째의 실시예에서, pPS 세포(비분화된 또는 분화된)는 섬세포로의 성숙을 촉진하는 인자, 또는 장기 배양에서 섬세포의 증식 및 유지를 촉진하는 인자를 스크리닝하기 위해 사용된다. 예를 들면, 후보 분화인자 또는 성숙인자는, 추가의 배양에 대한 목적하는 기준 및 세포의 용도에 따라, 이들을 상이한 웰의 세포에 첨가하고, 이어서 초래되는 임의의 표현적 변화를 결정함으로서 시험된다. 이는 pPS 유래된 섬만이 아니라, 체장으로부터 분리된 섬세포 및 이들의 전구세포에도 향상된 유도 및 배양 방법에 이르게 할 수 있다.

[0116] 독자는 일반적으로 표준 교과서인 "In vitro Methods in Pharmaceutical Research", Academic Press, 1997, 및 미국 특허 제5,030,015호를 참조한다. 후보 약학적 화합물의 활성도 평가는 일반적으로 본 발명의 분화된 세포를 후보 화합물과 단독으로, 또는 다른 약물과 조합으로 조합하는 것을 포함한다. 본 발명자들은 화합물에 기인하는 세포의 형태, 마커 표현형, 또는 기능적 활성도에 있어서 임의의 변화(비처리된 세포 또는 불활성 화합물로 처리된 세포와 비교하여)를 결정하며, 이어서 관찰된 변화와 화합물의 효과를 연관시킨다.

[0117] 세포독성이 세포 생활도, 생존, 형태, 및 특정 마커 및 수용체의 발현에 대해 미치는 효과로 먼저 결정될 수 있다. 염색체 DNA에 대한 약물의 효과는 DNA 합성 또는 복구를 측정함으로서 결정될 수 있다. 특히 세포주기에 있어 계획되지 않은 시기에, 또는 세포 복제에 필요한 수준을 초과한 [³H]-티미딘 또는 BrdU 편입이 약물 효과와 일치한다. 목적하지 않는 효과는 염색체 중기 스프레드로 결정된, 시스터 크로마티드 교환의 비정상적 비율을 또한 포함할 수 있다. 좀더 자세한 것은 A. Vickers (pp 375-410, "In vitro Methods in Pharmaceutical Research," Academic Press, 1997)를 참조하면 된다.

섬기능의 재구성

[0119] 본 발명은 또한 섬기능을 되돌리기 위해 이러한 치료가 필요한 환자에서 섬전구세포 또는 이들의 유도체의 용도를 제공한다. 체장 내분비 호르몬(인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴)의 불충분한 생산과 연관된 임의의 상태, 또는 분비의 적절한 조절 불능이 적합한 대로 본 발명에 따라 제조된 세포로의 치료가 고려될 수 있다. 특히 관심있는 것은 제 1 형 (인슐린-의존성) 당뇨병의 치료이다.

[0120] 치료를 위한 환자는 입원하여 확인된 장기간 외인성 인슐린 의존성, 및 수용가능한 위험 프로필에 근거하여 선택된다. 환자는 kg 체중당 약 10,000 섬세포 동등물을 받는다. 알로타입 불일치를 극복하기 위해, 환자는 수술 전에 항-거부 약물 예컨대 FK506 및 라파마이신(경구) 및 다클리주마브(정맥)로 시작한다. 섬세포는 관(catheter)을 통하여 간문액으로 주입된다. 환자는 이어서 간의 기능을 결정하기 위해 복부 초음파 및 혈액 검사를 거친다. 매일의 인슐린 요구량을 추적하여, 필요하다면 환자에게 두 번째 이식을 한다. 추적 모니터링은 약물 수준, 면역기능, 일반적 건강상태, 및 당뇨 환자가 인슐린 비의존성을 유지하는지의 여부를 알기위해 빈번한 혈액 검사를 포함한다.

[0121] 당뇨 환자의 관리에 대한 일반적 접근법은 표준 교과서, 예컨대 *Textbook of Internal Medicine*, 3판,

W.N. Kelley 편저, Lippincott-Raven, 1997; 및 전문적인 참조문헌 예컨대 *Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text* 2판, D. Leroith 편저, Lippincott Williams & Wilkins 2000; *Diabetes (Atlas of Clinical Endocrinology Vol. 2)* C.R. Kahn 등 편저, Blackwell Science 1999; 및 *Medical Management of Type 1 Diabetes* 3판, McGraw Hill 1998에 제공된다. 제 1 형 당뇨병의 치료를 위한 섬세포의 용도는 *Cellular Inter-Relationships in the Pancreas: Implications for Islet Transplantation*, L. Rosenberg 등 저, Chapman & Hall 1999; 및 *Fetal Islet Transplantation*, C.M. Peterson 등 편저, Kluwer 1995에서 자세히 검토된다.

[0122] 언제나와 마찬가지로, 환자 선택, 투여 방법, 및 췌장 내분비 세포의 투여량에 있어서 궁극적인 책임은 관리하는 임상의의 책임이다.

[0123] 상업적인 배포를 위해, 본 발명의 섬세포는 전형적으로 인간 투여를 위해 충분히 무균적인 상태에서 제조된 등장성 부형제를 함유하는 약학 조성물의 형태로 공급된다. 본 발명은 또한 이들의 제조, 배포, 또는 사용 동안의 어느 때나 존재하는 세포 세트를 포함한다. 상기 세포 세트는 본 개시에 기술되고, 이 유형으로 제한되는 것은 아닌 분화된 pPS 유래된 세포(섬세포, 이들의 전구체, 서브티입, 등등)로 예시되는, 비분화된 pPS 세포 또는 때로는 동일한 개념을 공유하는 다른 분화된 세포유형들과 조합으로 두개 이상 세포 집단의 임의의 조합을 포함한다. 세트의 각각의 세포 유형은 동일한 시설에서, 또는 동일한 주체 또는 비즈니스 관계를 공유하는 상이한 주체의 조절 하에 있는 상이한 장소에서, 함께 또는 분리된 용기에 포장될 수 있다.

[0124] 세포 조성물의 의약용 제형에 있어 일반적 원칙에 대하여는 *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, G. Morstyn & W. Sheridan 편저, Cambridge University Press, 1996을 참조하면 된다. 조성물은 임의적으로는 원하는 목적, 예컨대 당뇨치료에 대한 서면 안내가 있는 적절한 용기에 포장된다.

장치

[0125] 본 발명의 세포는 또한 하나 이상의 췌장 섬세포의 내분비성 폴리펩티드를 생산하도록 고안된 기계적 장치에 있어 기능적 성분으로서 사용될 수 있다.

[0126] 가장 단순한 형태로, 장치는 세포 집단의 통과를 방지하여, 장치에 유지하지만, 세포집단에 의해 분비되는 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴은 통과시키는 반투막 뒤에 있는 pPS 유래된 섬세포 포함한다. 이는 탈분화를 억제하는 세포 상호작용을 하도록 전형적으로 세포 무리의 형태로 마이크로 캡슐화된 섬세포를 포함한다. 예를 들면, 미국 특허 제4,391,909호는 인슐린 크기의 단백질은 통과시키나, 분자량 100,000을 초과하는 분자는 통과시키지 못하도록 교차 연결된 >3000 분자량의 다당류 중합체로 이루어진 원형의 반투막에 캡슐화된 섬세포를 기술한다. 미국 특허 제6,023,009호는 아가로스 및 아가로펩틴으로 이루어진 반투막에 캡슐화된 섬세포를 기술한다. 이런 성질의 마이크로캡슐은 당뇨 환자의 체강으로의 투여에 적합하며, 그리고 조직적합성 문제 및 박테리아에 대한 민감성의 감소에 특정 장점을 가지는 것으로 생각되어진다.

[0127] 당뇨 환자로의 이식용, 또는 체외 치료용의 더욱 정교한 장치가 또한 고려된다. 미국 특허 제4,378,016은 체외 부분, 피하 부분 및 호르몬 생산 세포를 포함하는 교체가능한 주머니를 포함하는 인공 내분비 샘을 기술한다. 미국 특허 제5,674,289호는 주변 조직과 통하는 하나 이상의 혈관신생설에 대하여 반투막으로 분리된, 섬실을 갖는 생체인공 췌장을 기술한다. 유용한 장치는 전형적으로 섬세포를 포함하도록 맞추어진 실, 및 섬세포로부터 분비되는 단백질을 수집하는 반투막에 의해 섬세포로부터 분리된 실을 가지며, 그리고 이는 또한 신호, 예를 들면, 순환하는 글루코스 수준을 섬세포로 다시 보내도록 할 수 있다.

실시예

[0135] 하기의 실시예는 이로 제한되지 않는 본 발명의 구체적인 구현예의 추가의 예시로서 제공된다.

실시예 1: 배아 줄기세포의 무영양세포 증폭

[0136] 비분화된 인간 배아 줄기(hES)세포의 확립된 세포주를 실질적으로 영양세포가 없는 배양 환경에서 유지하였다.

[0137] 표준 절차(WO 01/51616)에 따라 분리된 일차 마우스 배아 섬유모세포(mEF)를 이용하여 조건화된 배지가 미리 준비되었다.

[0138] hES 배양물은 Matrigel® 코팅된 플레이트로 계대되었다. 시딩 약 일주일 후에 배양물은 컨플루언트하게 되었으며 계대될 수 있었다. 이러한 조건에서 180일 넘게 유지된 배양물은 계속해서 ES-유사 형태를 나타내었다.

SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, 및 알칼린 포스파타아제는 면역세포화학법으로 평가된 대로, hES 집락에 의해서는 발현되지만, 집락 사이에 있는 분화된 세포에 의해서는 발현되지 않았다. 다능성은 이들에게 특정한 세포 유형을 만드는 확립된 프로토콜을 거쳐 확인되었다.

[0140] 실시예 2. hES 세포로부터 간세포의 유도

[0141] 비분화된 hES 세포는 서브컨플루언트한 배양 중에서 DMSO를 사용하여 전반적인 분화 과정을 개시하는 전략을 사용하여 인간 간세포의 특징을 가지는 세포로 분화되었다. 상기 세포는 이어서 Na-부티레이트의 추가로 간세포-유사 세포를 형성하도록 유도되었다.

[0142] 간단하게, hES 세포는 분할 후에 2-3일 동안 비분화된 배양조건에서 유지되었다. 이 시점에서, 세포는 50 내지 60% 컨플루언트하였으며 배지는 1% DMSO를 포함하는 비조건화된 SR 배지로 교환되었다(단계 II). 배양물에 SR 배지를 매일 4일 동안 공급하였고 이어서 1% DMSO 및 2.5% Na-부티레이트를 포함하는 비조건화된 SR 배지로 교환하였고, 6일 동안 매일 이를 공급하였다(단계 III). 이어서, 이를 콜라겐상에 재플레이트하였으며, 간세포-친화적 성장인자들의 칵테일을 포함하는 간세포 성숙배지 중에서 배양하였다(단계 IV). 결과는 표 3에 요약되어 있다.

표 3

표 3: 간세포 분화 프로토콜			
단계 I 비분화 세포 (컨플루언트 할 때까지)	단계 II 분화전 (4 일)	단계 III 간세포 분화 (6 일)	단계 IV 간세포 성숙 (7-9 주 만; 4 일)
무영양세포 조건	20% SR 배지 + 1% DMSO	20% SR 배지 + 1% DMSO + 2.5mM 부티레이트	HCM 30ng/ml hEGF + 10ng/ml TGF-α + 30ng/ml HGF + 2.5mM 부티레이트

[0144] 도 1은 수득된 간세포-유사 세포를 보여준다. 좌측 컬럼: 10 X 확대; 우측 컬럼: 40 X 확대. 부티레이트의 존재 하에서 4일이 되면, 배양 중의 80%를 초과하는 세포는 직경이 크며, 큰핵 및 과립성 세포질을 함유한다 (A열). SR 배지 중에서 5일 후에, 세포를 HCM으로 바꾸었다. 이를 후에, 많은 세포가 다핵성이며, 큰 다양형 모양을 가진다(B열). HCM에서 4일이 되면, 다핵성 다양형 세포가 흔하며, 더 어두운 세포질을 가지며(C 열), 이 기준에 의하면 이들 세포는 새로 분리된 인간 성인 간세포(D 열) 또는 태아 간세포를 닮아 있다(E 열).

[0145] 실시예 3: 간세포 경로에서 초기 세포로부터 인슐린 분비세포의 수득

[0146] 인슐린 분비 세포는 실시예 2에서 기술된 간세포 분화 프로토콜의 변형을 사용하여 H9 세포주의 hES 세포로부터 유래되었다.

[0147] 간단하게, 단계 I에서, hES 세포는 실시예 1에 기술된 대로 마우스 배아 섬유모세포로 조건화된 SR 배지를 사용하여 이들의 마지막 계대 후 7-8 기간에 걸쳐 컨플루언트될 때까지 자라도록 하였다. 단계 II에서, 10 μM 시클로파민이 추가된 1% DMSO를 포함하는 비조건화된 SR 배지로 배지를 교환하였고, 세포를 4일 동안 배양하였다. 단계 III에서, 세포를 B27 보충제가 들어있으며, 0.5mM 부티레이트(간세포 프로토콜 보다 5배 더 낮음), 10 μM 시클로파민, 4nM 액티빈A 및 10mM 니코틴아미드를 포함하는 RPMI1640 배지 중에서 11일 동안 배양하였다. 이어서 세포를 수합하고, 고정하여, 인슐린 발현에 대하여 염색하였고(1:500 희석의 Sigma 마우스 모노클로날 항-인슐린 항체사용) 핵을 검출하기 위해 DAPI로 대조 염색하였다. 단계 IV에서, 세포는 B27로 보충되고 그리고 있을지도 모르는 섬분화 인자를 포함하는 RPMI에서 11일 동안 배양하여 RPMI1640/B27로 성숙되었다.

[0148] 도 2는 4nM 액티빈A, 4nM 베타셀룰린, 10nM IGF-1, 및 10mM 니코틴아미드로 단계 IV에서 배양된 세포의 결과를 보여준다. 위쪽 패널의 등근 고리는 DAPI 청색-염색된 핵을 나타낸다. 시야의 중간에 중심을 둔 확산된 염색은 적색 형광 염색으로, 세포내에서 발현 및 고정된 인슐린을 나타낸다. 웰에 있는 세포의 약 1%가 인슐린을 발현하는 것으로 추정되었다. 같은 슬라이드 상의 다른 세포 무리 또는 이소타입 대조군에서는 인슐린 염색이 관찰되지 않았다.

[0149] **실시예 4: 창자 내배엽의 형성 죄적화에 의한 섬세포 경로의 진입**

[0150] 본 실시예는 자궁에서 일어나는 정상 발생을 모방하여, pPS 세포로부터 섬세포의 단계적 유도의 예를 제공한다.

[0151] 본 실험의 개시 재료로서 제공되는 hES 세포의 H7 및 H9 세포주를 표준 무영양세포 조건을 사용하여 컨플루언트하게 배양하였다. 분화를 개시하기 위해, 배지를 B27(Invitrogen) 및 하기의 대체물 중 하나로 보충된 RPMI 1640으로 교환하였다:

- 더이상의 첨가물은 없음(배지 대조군)

- 4nM 액티빈A (R&D systems)

- 0.5mM 소디움 부티레이트 (Sigma)

- 액티빈 A 및 부티레이트 모두

[0156] 배지를 총 8일 간의 처리일 동안 매일 (하루는 제외함) 교환하였다.

[0157] 상기 기간의 종료 시, 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 헹구고, $400\mu\text{l}$ 의 RTL 용해 완충액(Qiagen)을 첨가하여 용해물(lysate)을 준비하였다. 제조자의 권고에 따라서 Qiagen RNAeasy Mini Kit를 사용하여 RNA를 준비하였다. 상기 RNA는 DNase로 처리되었고, 무작위 프라임된 제 1 스트랜드 cDNA를 Invitrogen Preamplification First Strand cDNA kit를 사용하여 제조자의 사용방법에 따라서 준비하였다. Sox17, HNF1알파, 및 HNF3베타에 대한 프라이머 및 프로브 세트를 사용하여 각각의 cDNA 시료로 표준 실시간 RT-PCR(Taqman)을 수행하였다. 발현 수준을 정상화(normalization)하기 위해, 시코필린에 대한 프로브 및 프라이머 세트(Applied Biosystems)를 사용하여 Taqman 병행분석을 수행하였다. 췌장 표준에 비교된 각각의 시료의 상대적인 발현양은 델타 델타 Ct 방법(Applied Biosystems)을 사용하여 계산되었다.

[0158] 도 3은 창자 내배엽에 대한 마커의 발현 수준을 보여준다. 결과는 인간 태아 췌장에서의 발현 수준에 표준화된다. 비교를 위해 비분화된 hES 세포(개시 세포주)에서의 발현 수준을 또한 보여준다. 액티빈 A 및 소디움 부티레이트 양자의 조합에 의해 세가지의 마커가 가장 효과적으로 유도되었다. Sox17은 비분화된 H9 세포에서 고수준(2.3 상대적 발현)으로 발현되었으나, 두 가지 첨가제로는 32 상대적 발현 수준(100배가 넘는 증가)까지 유도되었다. H7 세포에서, 유도의 수준은 태아 췌장의 0.007 배로부터 태아 췌장의 79배로의 증가(10,000배가 넘는 증가)를 보이며, 더욱 극적이었다. HNF3베타는 0.5미만의 상대적 발현으로부터 5.1 또는 6.3 까지 증가(10배가 넘는 증가)하였다. HNF4알파의 수준은 0.1 미만의 상대적 발현 수준으로부터 1.0이 넘는 발현수준까지 증가(10배가 넘는 증가)하였다.

[0159] 이들 세가지 마커의 신뢰성 있는 유도는 이들 hES 유도된 세포가 창자 내배엽의 중요한 특징을 가진다는 것을 확인한다. 상기 세포들은 다음으로 계대배양되어 췌장 형성을 유도하는 인자로 처리되었으며, 주요 췌장 마커인 Pdx1의 유도로 모티터되었다.

[0160] **실시예 5: 장기간의 응집 배양물 중에서 첨가제를 사용한 섬세포의 수득**

[0161] hES 세포의 H9 세포주를 실시예1에서와 같이 mEF 배지 중에서 비분화된 형태로 배양하였다. 상기 세포는 1:1의 mEF 조건화된 배지 및 DFB+로 이루어진 혼합 배지 중에서 부유배양(배아유사체를 형성함)되었다. DFB+는 B27 첨가제(1x), 인슐린($25\mu\text{g}/\text{ml}$), 프로게스테론($6.3\text{ng}/\text{ml}$), 푸트레신($10\mu\text{g}/\text{ml}$), 셀레늄(셀레나이트의 형태, $100\text{ng}/\text{ml}$), 트렌스페린($50\mu\text{g}/\text{ml}$), 및 갑상선 호르몬 수용체 리간드 T3($40\text{ng}/\text{ml}$)로 보충된 DMEM/F12 배지이다. 다음날, $10\mu\text{M}$ 의 all-trans 레티노산을 첨가하였다. 세 번째 날에, 배지를 $10\mu\text{M}$ 의 all-trans 레티노산이 들어있는 DFB+로 교환하였고, 이후 7일 동안 격일로 공급하였다(단계 1).

[0162] 단계 2를 개시하기 위해, all-trans 레티노산을 제거하고 노린($200\text{ng}/\text{ml}$), EGF($20\text{ng}/\text{ml}$) 및 bFGF($2\text{ng}/\text{ml}$)을 포함하는 배지로 대체하였다. 상기 세포에 14일 동안 격일로 공급되었다(단계 1).

[0163] 단계 3을 위해서, 노린, EGF 및 bFGF를 제거하고, 세포를 니코틴아미드(10mM)를 포함하는 DFB+ 배지 중에서 배양하였다. 배지를 5일 동안 격일로 교환하였다. 세포를 이어 하루 동안 코팅된 챔버슬라이드에 플레이트하고, 고정하고 인슐린의 c-펩티드, 또는 소마토스타틴에 대한 항체로 염색하였다. c-펩티드는 분비 전에 제거되는 프로인슐린의 구성부분이다. 이는 배지의 성분으로서 존재하는 인슐린과 세포에서 생산된 인슐린을 구

분하는데 유용하다.

[0164] 도 4는 결과를 보여준다. 위쪽 및 중간 패널은 성숙된 혀장 베타 세포의 무리를 나타내며, 저 및 고 배율에서의 인슐린 c-펩티드에 대한 염색을 보여준다. 아래 패널은 섬 델타 세포의 마커인, 소마토스타틴의 염색을 보여준다. Taqman 실시간 RT-PCR로 인슐린 및 글루카곤이 이들 세포에 의해 mRNA 수준에서 발현된다는 것을 확인하였다.

실시예 6: 뉴로케닌3 유전자 발현에 의한 최종단계의 섬경로로의 구동

[0166] 본 실험은 단계 III의 분화동안 섬세포 계통에 특징적인 유전자 발현 프로필의 보강에 있어서의 섬관련 유전자 과발현의 효율성을 증명한다.

[0167] 기본(constitutive) 프로모터의 조절하에 있는 전사 조절자 유전자 뉴로케닌 3을 포함하는 아데노바이러스 벡터를 구축하였다. AdNgn3은 복제 불능이며, AdMAX™ 벡터 구축 키트(Microbix Biosystems, Toronto)를 이용하여 구축된 E1- 및 E3- 결합된 재조합 아데노바이러스 5를 기본으로 하는 벡터이다. Ngn3 cDNA 645bp(GenBank Accession # NM_020999)는 pDC515 셔틀 벡터의 mCMV(뮤린 거대세포바이러스 즉발초기 유전자) 프로모터 하류방향에 클로닝되었다. ATG 개시 코돈 바로 위의 자연적 서열 TAGAAAGG는 컨센서스 Kozak 서열 GCCACC로 바꾸었다. Ngn3 삽입체 및 Ad 게놈 플라스미드(AdMAX 플라스미드)를 포함하는 셔틀 플라스미드를 상동 재조합이 일어나도록 E1- 발현 293세포로 공트랜스펙션하였다. 플라크를 분리하고, 바이러스 원액은 293 세포에서 증폭하였고, 이어서 CsCl 밀도구배 원심분리로 정제하였다. 바이러스 입자 농도는 A₂₆₀에서의 흡광도를 측정하여 결정하였고, 감염성 역가는 표준 플라크 분석법으로 결정하였다.

[0168] H7 계통의 인간 hES 세포를 혼탁하고 실시예 5에서와 같은 혼합 배지 중에서 배양하였다. all-trans 레티노산(10 μM)을 다음날 배지에 첨가하였다. 7일 후에 DFB+ 배지 플러스 EGF(20ng/ml) 및 bFGF(2ng/ml) 중에서 Matrigel® 상에 EB를 플레이트하였다. 배양 5일 후에, 세포를 MOI 50의 AdNgn3 벡터로 감염하였다. AdGFP(직접분화를 유도하지 않을 것으로 기대되는, 초록 형광 단백질 유전자를 포함하는 동등한 벡터)를 음성대조군으로 사용하였다. MOI 50의 AdNgn3 또는 AdGFP 바이러스를 4시간 동안 EGF(20ng/ml)를 포함하는 1ml DFB+ 배지 중에서 6-웰 플레이트에 있는 세포에 직접 적용하였고, 이어서 추가의 동일한 배지 2ml을 각각의 웰에 추가하였다. 이후 배지를 격일로 교환하였다. 세포를 감염 후 2일 또는 8일에 수합하였고, 실시예 4에서와 같이 실시간 RT-PCR에 의한 분석을 위해 RNA를 분리하였다. 면역조직화학분석을 위해 챔버슬라이드에 플레이트된 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정하고, 블록하여, 글루카곤에 대한 항체(1:1000)로 염색한 후, FITC 콘쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG(1:500)로 염색하였다.

[0169] 도 5는 형질도입 9일 후 뉴로케닌3으로 형질도입된 세포의 면역세포화학 염색을 보여준다. 여기 플레이트된 배아유사체는 항체로 검출 가능한 글루카곤 발현의 실질적인 수준을 나타낸다.

[0170] 도 6(A) 및 (B)는 뉴로케닌3 형질도입된 세포(검은색 막대)에서, 음성대조군(사선 막대)과 비교된 mRNA 발현 수준을 보여준다. 실시간 RT-PCR 데이터는 인간 태아 혀장에서의 발현수준으로 정상화된다.

[0171] 뉴로케닌3이 하류 단계에 있는 여러 유전자가 형질도입된 세포에서 특이적으로 상향 조절되는 것이 발견되었다. 뉴로D1 및 Nkx2.2는 모두 2일째에 상당히 상향 조절되었으며; Nkx6.1은 8일 째에 상향 조절되었다. 인슐린 및 글루카곤 발현은 또한 8일 째 상당히 상향 조절되었으며, 이는 유전자 트랜스펙션 전략이 임상적으로 중요한 섬세포의 최종-단계 산물을 만드는 세포로의 성숙을 상당히 증강시킨다는 것을 나타낸다.

[0172] 당업자라면 본 발명의 정신, 또는 첨부된 청구항의 범위에서 벗어남 없이 통상적인 최적화 정도의 문제에서 본 발명이 변형될 수 있다는 것을 이해 할 것이다.

[0173] 다수의 종속항을 가능하게 하는 법안에서 실행될 본 발명의 구현예는 하기를 포함한다.

[0174] 1. 세포의 5% 이상이 내인성 유전자로부터 하나 이상의 하기의 단백질을 분비하는, 영장류 다능성 줄기(pPS)세포를 분화하여 수득되는 분리된 세포 집단: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 또는 혀장 폴리펩티드.

[0175] 2. 인슐린을 분비하는 세포, 글루카곤을 분비하는 세포, 및 소마토스타틴을 분비하는 세포를 함유하는, 영장류 다능성 줄기(pPS)세포를 분화하여 수득되는 분리된 세포 무리.

- [0176] 3. 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 세포의 5% 이상이 두 가지 이상의 하기 마커를 발현하는 세포 집단: Pdx1, Ngn3, 인슐린, IAPP, 및 Nkx6.1.
- [0177] 4. 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 1% 미만의 비분화된 pPS 세포를 함유하는 세포 집단.
- [0178] 5. 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 고혈당 NOD 마우스로 이식된 경우 공복 혈당 수준이 200mg/dL 아래로 떨어지도록 하는 것을 야기하는 세포 집단.
- [0179] 6. 제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상승된 수준으로 텔로머라아제 역전사효소(TERT)를 발현하도록 유전적으로 변경된 세포 집단.
- [0180] 7. 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 영장류 배아 줄기세포의 확립된 세포주와 동일한 계놈을 가지는 세포 집단.
- [0181] 8. 제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 분화된 세포 집단, 및 이들이 수득된 비분화된 pPS 세포주를 포함하는, 두개의 세포 집단.
- [0182] 9. pPS 세포 또는 이들의 자손을 섬세포 분화인자의 혼합물 중에서 배양하고, 이에 의해 5% 이상의 세포가 내인성 유전자로부터 하나 이상의 하기의 단백질을 분비하는 세포 집단을 수득하는 것을 포함하는 폴리펩티드-분비 세포를 수득하는 방법: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 췌장 폴리펩티드.
- [0183] 10. 제 9 항에 있어서, pPS 세포가 배아유사체, 또는 간세포 또는 창자 내피의 특징을 갖는 세포를 형성하도록 분화되는 방법.
- [0184] 11. 제 9 항 내지 제 10 항에 있어서, 섬세포 분화인자의 혼합물이 하기 중 하나 이상을 함유하는 방법: 액티빈 A, 닉코틴아미드, 시클로파민, 베타셀룰린, 및 IGF-1.
- [0185] 12. 제 9 항 내지 제 10 항에 있어서, 섬세포 분화인자의 혼합물이 TGF- β 길항제 및 하나 이상의 미토겐을 함유하는 방법.
- [0186] 13. 제 9 항 내지 제 12 항에 있어서, 췌장 전사인자, 예컨대 뉴로게닌3의 발현을 야기하도록 세포를 유전적으로 변경하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0187] 14. 제 1 항 내지 제 8 항에 있어서, 제 9 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 수득된 분화된 세포 집단.
- [0188] 15. 하기 단계를 포함하는 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴을 생산하는 방법:
- [0189] a) 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 또는 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 분화된 세포 집단을 배양하는 단계, 및
- [0190] b) 상기 배양된 세포에 의해 분비된 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴을 수합하는 단계.
- [0191] 16. 하기를 포함하는 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴의 생산을 위한 장치:
- [0192] a) 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 또는 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 분화된 세포 집단, 및
- [0193] b) 세포 집단의 통과는 막지만, 상기 세포 집단에 의해 분비된 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴은 통과시키는 반투막.
- [0194] 17. 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 또는 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 분화된 세포 집단을 함유하는 약학 조성물.
- [0195] 18. 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 또는 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 분화된 세포 집단과 화합물을 조합하고, 상기 화합물과의 조합으로부터 야기된 세포 집단에서의 임의의 표현형 또는 대사 변화를 결정하며, 상기 변화를 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴의 분비를 조정하는 화합물의 능력과 연관시키는 것을 포함하는, 섬세포 기능을 조절하는 이의 성능에 대하여 화합물을 스크리닝하는 방법.
- [0196] 19. 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 또는 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 분화된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서의 섬세포 기능을 재구성하는 방법.

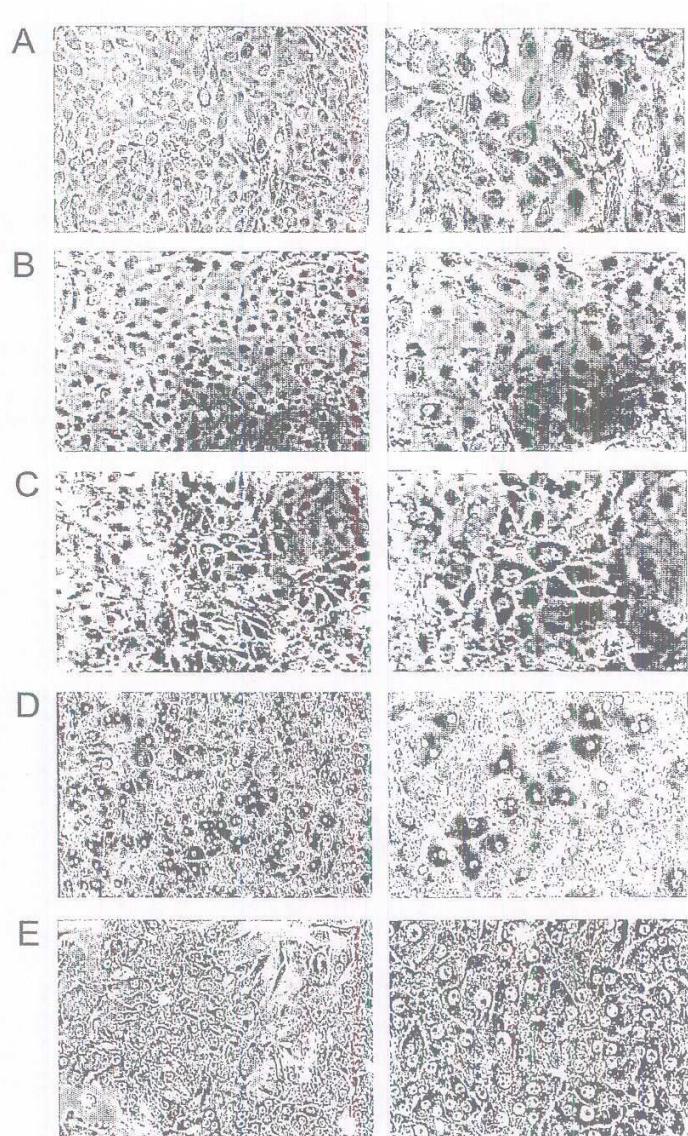
- [0197] 20. 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 또는 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 분화된 세포 집단을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 제 1 형 당뇨병을 치료하는 방법.
- [0198] 21. 인슐린, 글루카곤, 또는 소마토스타틴의 결핍과 연관된 상태의 치료를 위한 의약제조에 있어서 제 1 항 내지 제 8 항에 따른 또는 제 9 항 내지 제 13 항의 방법에 따라 수득된 분화된 세포 집단의 용도.
- [0199] 22. 상태가 제 1 형 당뇨병인, 제 18 항에 따른 용도.
- [0200] 23. pPS 세포가 인간 포배로부터 수득된 세포의 자손인 제 1 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단, 장치, 방법, 또는 용도.
- [0201] 24. pPS 세포가 인간 배아 줄기세포인 제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단, 장치, 방법, 또는 용도.

도면의 간단한 설명

- [0129] **도 1**은 분화 및 성숙과정 동안 hES-유도된 간세포를 보여준다(10X, 40X). A열은 5mM 소디움 n-부티레이트를 포함하는 배지에서 배양 4일 후의 세포를 보여준다. 배양물 중 80% 초파의 세포가 큰 핵 및 과립성 세포질을 포함한다. 세포는 2-4일 동안 특수 간세포 배양 배지에 바꾸어 넣었다(B 및 C 열). 다핵성 다각형 세포가 보편적이다. ES-유도된 간세포는 새로 분리된 인간 성체 간세포(D 열) 및 태아 간세포(E 열)와 형태적 특성을 공유한다.
- [0130] **도 2**는 인슐린을 발현하는 hES-유도된 세포를 보여준다. 분화 전략은 췌장 세포와 간세포가 공통의 초기 전구체를 갖는다는 가정에 근거한다. 초기의 분화는 시클로파민이 배양 배지에 포함되는 것을 제외하고는, 간세포의 경우와 유사하였다. 세포는 다음으로 섬 분화인자 액티빈A, 니코틴아미드, 시클로파민, 및 낮은 농도의 n-부티레이트와 배양되었다. 최종적으로, 세포는 섬세포의 과성장을 촉진하기 위해 액티빈A, 베타셀룰린, 니코틴아미드, 및 IGF-1과 11일 동안 배양되었다. DAPI 염색된 세포핵은 위쪽 패널에 나타나있다. 아래 패널의 상응하는 부분은 인슐린에 대한 확산된 적색 항체를 보여준다.
- [0131] **도 3**은 hES 세포가 단계적인 방식으로 섬세포 계통 발생의 경로를 따라 진행하는 프로토콜의 결과를 보여준다. 세가지의 창자 내배엽 마커의 발현이 mRNA 수준에서 분석되었고, 췌장에서의 발현 수준으로 표준화(normalize)되었다. 비분화되거나 또는 비특이적으로 분화된 세포에서의 발현은 낮았지만, 그러나 n-부티레이트 및 액티빈A의 조합이 창자 내배엽의 특징을 갖는 세포의 분화 또는 선택을 야기했다.
- [0132] **도 4**는 hES 세포를 전이배지 중에서 그리고 이어서 미토겐 및 섬세포 분화인자, 노진을 포함하는 배지 중에서 장기간 응집 배양한 프로토콜의 결과를 보여준다. 위쪽 및 중간 패널은 저 및 고배율에서의 인슐린 C-펩티드의 염색을 보여주며, 이는 성숙한 췌장 베타세포의 무리를 나타낸다. 아래 패널은 엘타세포의 마커인, 소마토스타틴에 대한 염색을 보여준다.
- [0133] **도 5**는 전사조절자 유전자인 뉴로케닌3을 포함하는 벡터로 트랜스펙션 후 9일 후에, 섬세포분화 패러다임 중의 세포를 보여준다. 세포는 항체로 검출할 수 있는 고수준의 글루카곤 발현을 보여준다.
- [0134] **도 6(A)** 및 **도 6(B)**는 뉴로케닌3 형질도입된 세포(검은색 막대)에서의, 음성대조군(사선줄 막대)과 비교한 mRNA 발현 수준을 보여준다. 트랜스펙션된 유전자는 인슐린 및 글루카곤의 발현 증강을 유도하며, 빠르게는 2일째에 하류 단계 유전자 뉴로 D1 및 Nkx2.2의 상향 조절을 야기한다.

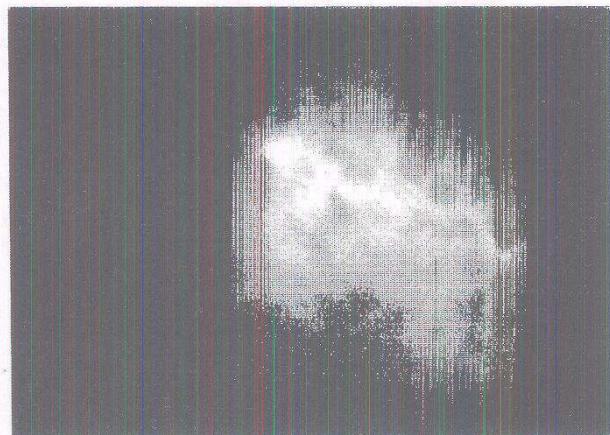
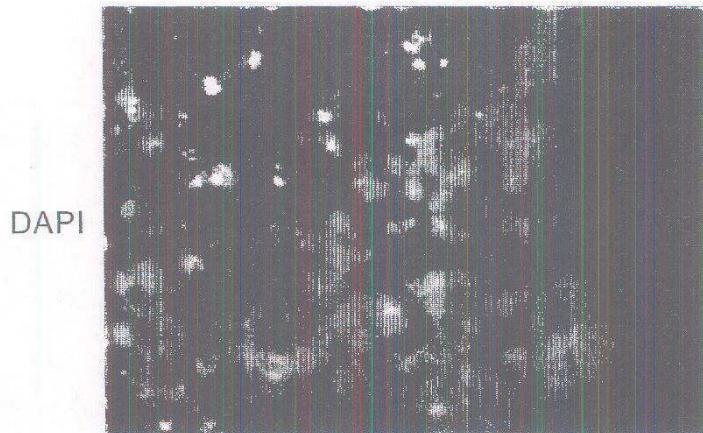
도면

도면1

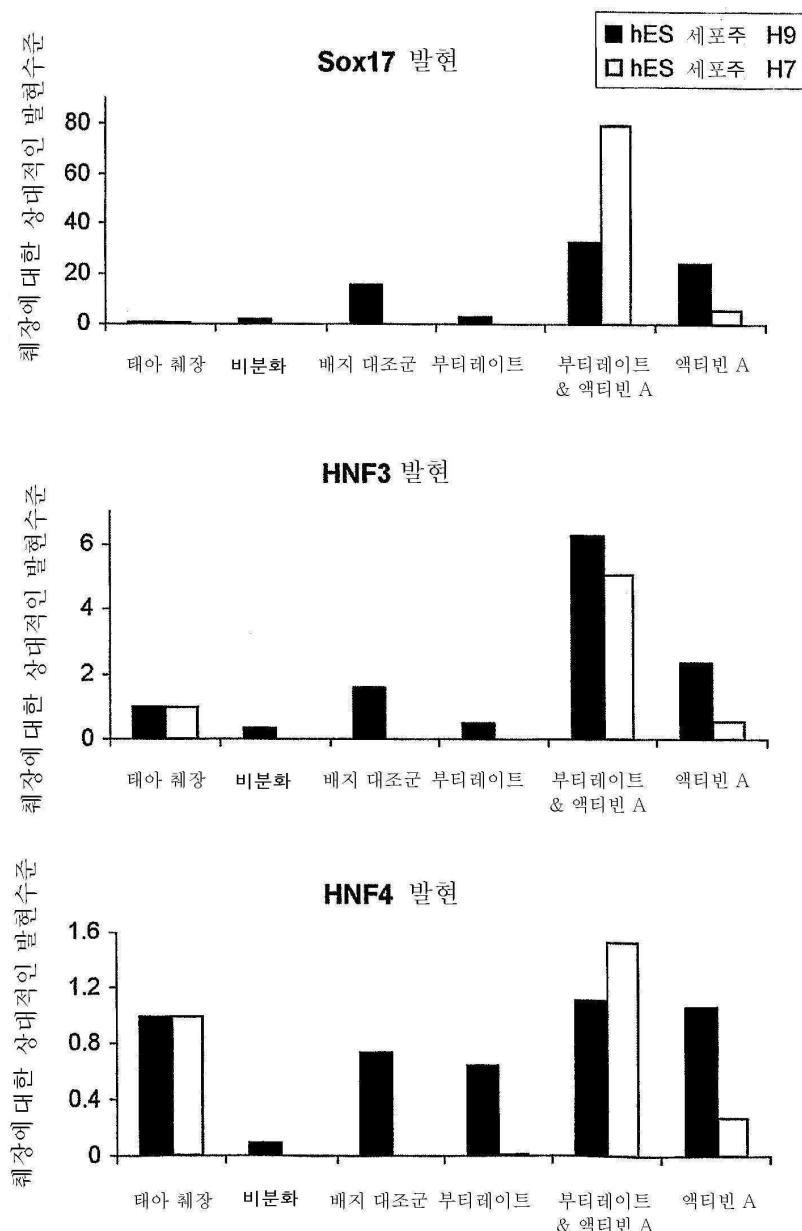


도면2

hESC-유래 섬세포에 의한 인슐린의 발현

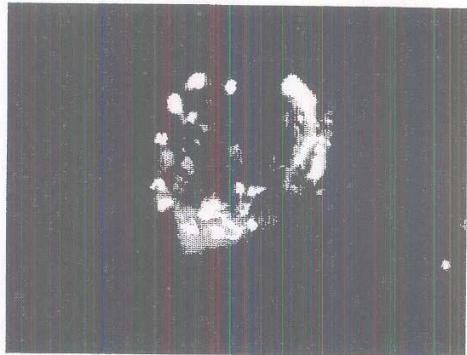


도면3

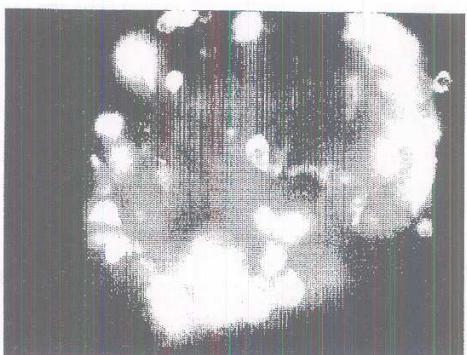


도면4

A



B



C

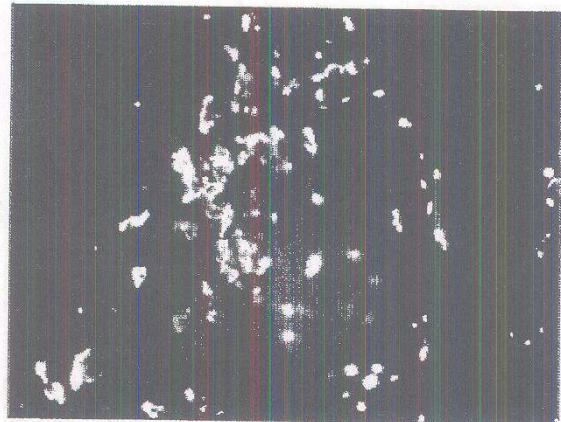


도면5

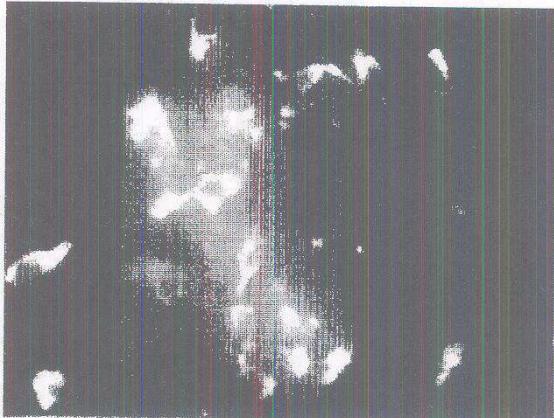
뉴로게닌3 으로 트렌스팩션된 세포에 의한

글루카곤 발현

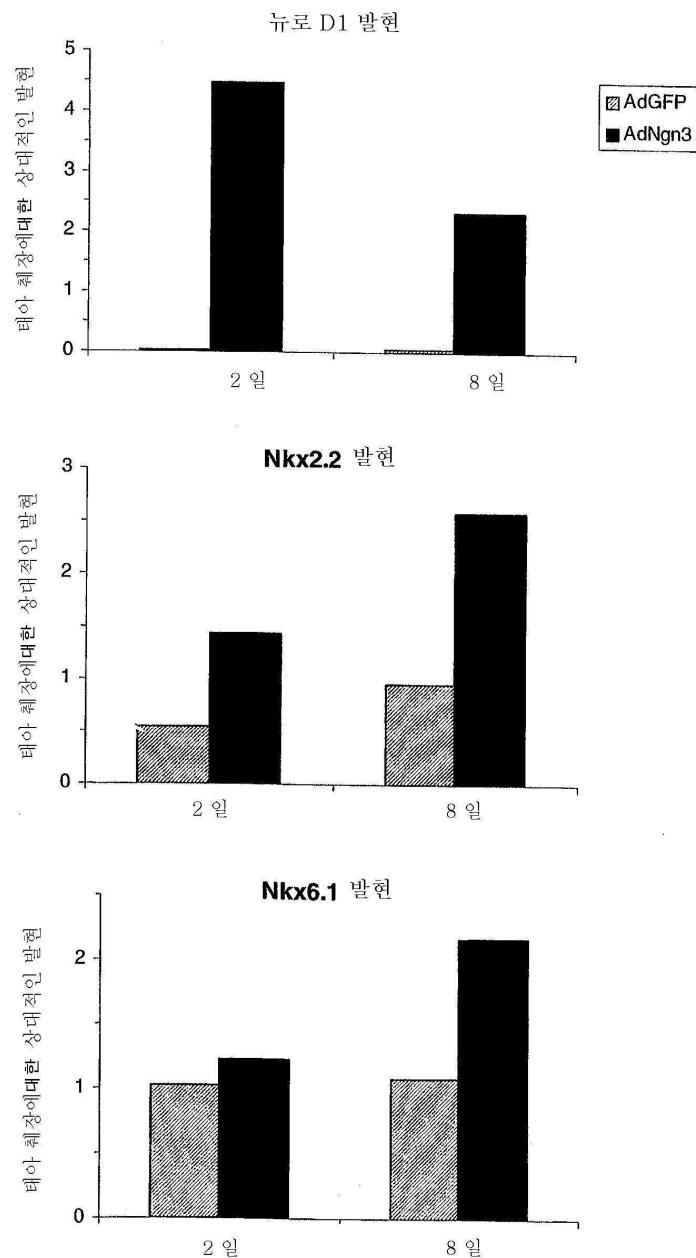
20x



40x



도면6A



도면6B

