(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0041196
(43) 공개일자 2025년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12M 3/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0676 (2013.01)
C12M 27/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7009036(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년06월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7040656
원출원일자(국제) 2017년06월14일
심사청구일자 2023년11월24일
(85) 번역문제출일자 2025년03월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/037373
(87) 국제공개번호 WO 2017/222879
국제공개일자 2017년12월28일
(30) 우선권주장
62/352,968 2016년06월21일 미국(US)

(71) 출원인
얀센 바이오테크 인코포레이티드
미국 펜실베이니아주 19044 호샴 릿지뷰 드라이브 800/850
(72) 발명자
리크 세바스티앙
미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 메리필드 로우 3210
레자니아 알리레자
미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 제너럴 아토믹스 코트 3550
(74) 대리인
특허법인한성

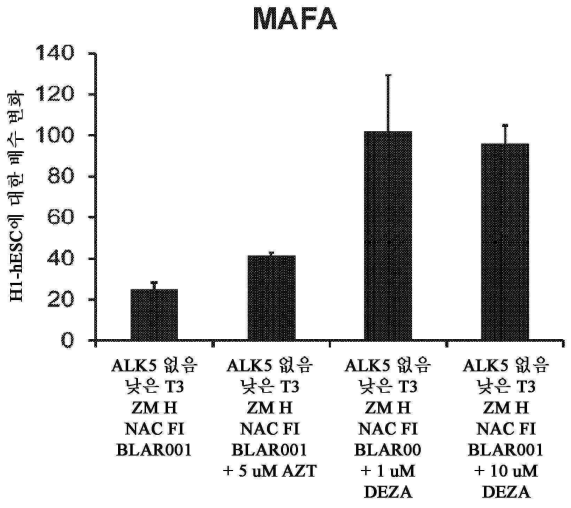
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 및 2-상 인슐린 분비 반응을 나타내는 인간 만능 줄기 세포 유래 기능성 베타 세포의 생성**

(57) 요 약

본 발명은 췌장 내분비 세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A를 발현하는 췌장 베타 세포로 분화시키는 방법을 제공한다. 이들 췌장 베타 세포는 만능 줄기 세포의 단계적 분화에 의해 얻어질 수 있다. 췌장 베타 세포는 췌도 세포와 유사한 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 및 글루코스-자극된 인슐린 분비를 나타낸다.

대 표 도 - 도2a



(52) CPC특허분류
C12N 2501/395 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2501/91 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

미성숙 췌장 베타 세포,

성숙 기능성 췌장 베타 세포, 및

UNC0638, UNC0642, UNC0646, TC-E5003, A366, PF03814735, ZM447439, SB747651A, PFI1, LY303511, MS436, 5-아자시티딘(AZT), 3-데아자네플라노신 A(DEZA), 피록사미드, CI994 또는 MC1568 중 하나 이상으로 보충된 배지를 포함하는 시험관 내 배양물로서, 여기서 성숙 기능성 베타 세포는 배지가 없이 생성된 성숙 기능성 베타 세포보다 더 높은 속도로 글루코스 자극에 대한 반응으로 산소를 소비하는 것인, 시험관내 배양물.

청구항 2

제1항에 있어서, 배지가 i) 헤파린, ii) N-아세틸 시스테인, 및 iii) T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상으로 추가 보충되는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 3

제1항에 있어서, 배지가 ALK5 억제제를 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 4

제1항에 있어서, 배지가 ALK5 억제제로 추가 보충되는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 5

제1항에 있어서, 배지가

i) ZM447439;

ii) 헤파린;

iii) N-아세틸 시스테인; 및

iv) T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상으로 보충되고;

배지가 ALK5 억제제를 함유하지 않는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 6

제5항에 있어서, 배지가 T3로 보충되는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 7

제1항에 있어서, 배지가 DEZA로 보충되는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 8

제1항에 있어서, 배지가 AZT로 보충되는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 9

제1항에 있어서, 성숙 기능성 췌장 베타 세포가 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡을 나타내는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 10

제9항에 있어서, 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡이, 기저 산소 소비율에 비하여 20% 내지 80%의 범위의 글

루코스 자극 후 산소 소비율 반응을 가지는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 11

제10항에 있어서, 글루코스 자극 후 적어도 15분에 산소 소비율 반응이 발생하는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 12

제1항에 있어서, 성숙 기능성 췌장 베타 세포가 글루코스-자극 인슐린 분비를 나타내는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 13

제12항에 있어서, 글루코스-자극 인슐린 분비가 글루코스 자극에 대한 반응으로 2-상 인슐린 분비를 포함하는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 14

제13항에 있어서, 2-상 인슐린 분비의 제1 단계가 기저 분비에 비하여 적어도 4배 내지 적어도 8배 증가하고, 제2 단계가 기저 분비에 비하여 적어도 2배 내지 적어도 4배 증가하는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 15

제12항에 있어서, 인슐린 분비가 글루코스 자극 후 적어도 5분 내지 적어도 10분에 발생하는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 16

제1항에 있어서, 배양물이 현탁 배양물인 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 17

제1항에 있어서, 성숙한 기능성 췌장 베타 세포 및 미성숙 췌장 베타 세포가 공기 액체 계면에서 배양되는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 18

제1항에 있어서, 성숙 기능성 췌장 베타세포가 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A1을 발현하는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 19

제1항에 있어서, 배지가

a) T3 또는 T4; 및

b) AZT, DEZA 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는, 시험관내 배양물.

청구항 20

제1항 내지 제19항에 중 어느 한 항의 시험관내 배양물을 포함하는 생물반응기 또는 롤러 병.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 전체적으로 참고로 포함된 미국 가출원 제62/352,968호 (2016년 6월 21일로 출원됨)에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 만능 줄기 세포의 분화로부터 생성되는 시험관내 기능성 췌장 베타 세포, 및 집단의 생성 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 미토콘드리아 호흡/활성 반응 및 2-상 인슐린 분비 반응을 나타내는 베타 세포 또는 베타 세포의 집단에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 제I형 진성 당뇨병 및 이식 가능한 랑게르한스섬의 부족에 대한 세포-대체 치료법에서의 진전에서는 생착(engraftment)에 적절한 인슐린-생산 세포, 또는 베타 (β) 세포의 공급원을 개발하는 데 관심이 집중되어 왔다. 한 가지 접근법은 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 세포와 같은 만능 줄기 세포로부터의 기능성 베타 세포의 생성이다.

[0006] 척추동물 배아 발생에서, 만능성 세포는 낭배형성(gastrulation)으로 알려진 과정에서 삼배엽층 (외배엽, 중배엽, 및 내배엽)을 포함하는 세포군을 생성한다. 갑상선, 흉선, 췌장, 소화관, 및 간과 같은 조직은 중간 단계를 통해 내배엽으로부터 발생할 것이다.

[0007] 드'아무르(D'Amour) 등은 고농도의 액티빈 및 저 혈청의 존재 하의 인간 배아 줄기 세포-유래 완성 내배엽의 강화된 배양물의 생성을 기재하였다 (문헌[*Nature Biotechnology* 2005, 23:1534-1541]; 미국 특허 제7,704,738호). 마우스의 신장 피막 하에 이들 세포를 이식하면 내배엽 조직의 특성을 갖는 더 성숙한 세포로의 분화가 유발되었다 (미국 특허 제7,704,738호). 인간 배아 줄기 세포-유래 완성 내배엽 세포는 FGF-10 및 레틴산의 첨가 후에 PDX1 양성 세포로 추가로 분화될 수 있다 (미국 특허 출원 공개 제2005/0266554호). 면역결핍 마우스의 지방 패드 내에 이들 췌장 전구 세포를 후속적으로 이식하면 3 내지 4 개월의 성숙기 후에 기능성 췌장 내분비 세포의 형성이 유발되었다 (미국 특허 제7,534,608호 및 미국 특허 제7,993,920호).

[0008] 소분자 억제제가 췌장 내분비 전구 세포의 유도에 사용되어 왔다. 예를 들어, TGF-β 수용체 및 BMP 수용체의 소분자 억제제 (문헌[Development 2011, 138:861-871]; 문헌[Diabetes 2011, 60:239-247])가 췌장 내분비 세포의 수를 향상시키기 위하여 사용되었다. 부가적으로, 소분자 활성화제가 완성 내배엽 세포 또는 췌장 내배엽 세포를 생성하기 위해 또한 사용되어 왔다 (문헌[*Curr. Opin. Cell Biol.* 2009, 21:727-732]; 문헌[*Nature Chem. Biol.* 2009, 5:258-265]).

[0009] 일반적으로, 선조 세포 (progenitor cell)의 기능성 베타 세포로의 분화 과정은 다양한 단계를 통해 진행하며, 선조 세포, 예컨대 인간 만능 줄기 세포로부터 췌장 세포를 생성하는 프로토콜을 개선함에 있어서 진전이 있어 왔다. 이러한 연구에서의 발전에도 불구하고, 선조 세포 분화 과정 중의 각각의 단계는 고유의 과제를 제시한다. 그렇기 때문에, 기능성 췌장 내분비 세포, 및 특히 기능성 베타 세포를 생성하는 목적으로 추가의 분화 프로토콜 개발이 여전히 필요하다. 특히, 기능성 베타-세포와 함께 관찰되는 신속하고 조절된 글루코스-자극된 인슐린 분비 ("GSIS")가 가능한 글루코스 반응성 인슐린-생성 세포의 *시험관내* 생성을 제공하는 것이 바람직하다. 구체적으로, 미토콘드리아 호흡/활성의 증가에 이어서 제1 상 및 제2 상 인슐린 분비의 증가를 나타내는, 시험관내 기능성 베타-세포의 생성 방법을 제공하는 것이 바람직하다.

[0010] GSIS는 글루코스 수송체 (용질 담체 패밀리 2 구성원 1; SLC2A1; 또는 통상적으로 글루코스 수송체 1로 지칭됨; 인간 베타 세포에 대한 GLUT1), 및 해당작용으로 명명된 과정을 통한 피루베이트로의 글루코스의 대사를 통한 베타-세포 내로의 글루코스의 유입에 의해 시작된다. 미토콘드리아 내로의 피루베이트의 유입, TCA (트라이카르복실산, 및 이후의 전자 수송 사슬 ("ETC" 및 여기에서는 "미토콘드리아 활성" 또는 "미토콘드리아 호흡"으로 지칭됨) 사이클을 통한 그의 대사작용은 인슐린 엑소사이토시스 (exocytosis)와 긴밀하게 커플링되어 신속하고 정확한 양의 인슐린 방출을 보장한다.

[0011] 췌도 내의 기능성 베타 세포는 2 개의 순차적 단계에서 글루코스 농도의 갑작스런 증가 시에 인슐린을 분비하는 것으로 나타났다 (문헌[Henquin *et al. Diabetologia* (2009) 52 (5):739-751]). 둘 모두의 단계의 진폭 및 지속기간은 세포내 Ca^{2+} 신호 또는 상가적인 분비 커플링 인자의 동력학에 의해 조절된다. 제1 상(1st) 인슐린 분비는 결합되고 용이하게 방출가능한 인슐린 과립의 작은 풀의 엑소사이토시스를 나타낸다. 진폭이 낮지만 지속기간이 더 긴 인슐린 분비의 제2 상 (2nd)은 과립의 저장 풀 (reserve pool)로부터의 과립의 전위, 및 방출을 위한 그의 도킹/프라이밍을 나타낸다. 베타 세포에서의 성숙의 주요 마커인 이중상 GSIS는 인간 발생의 산후 단계까지 검출되지 않으며, 미성숙 베타-세포에서 관찰되는 단일상 GSIS와는 대조적이다 (문헌 [Otonkoski *et al. Diabetes* (1988) 37:286-291]).

[0012] 제2 형 당뇨병에서는, GSIS의 제1 상이 부재하고; GSIS의 제2 상 또한 감소된다. 베타-세포 수가 자가면역 공

격을 통해 심하게 감소되는 제1 형 당뇨병은 강력한 이중상 GSIS가 결여된 것으로 보고되어 있다 (문헌 [Krogvold *et al. Diabetes* (2015) 64:2506-2512]).

발명의 내용

[0013] 구체화되고 완전히 기재된 바와 같이, 본 발명은 만능 줄기 세포의 분화로부터 생성되는 시험관내 기능성 베타-세포 (기능성 췌장 베타-세포), 및 세포의 집단의 생성 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 미토콘드리아 호흡/활성 반응 및 2-상 인슐린 분비 반응을 나타내는 기능성 췌장 베타-세포 (인슐린 생성 세포) 또는 기능성 베타-세포의 집단을 생성하는 것에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 일 태양은 만능 줄기 세포를 기능성 베타-세포로 분화시키는 방법이다. 본 발명의 특정 태양은 췌장 내배엽 세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A1을 발현하는 기능성 베타 세포로 분화시키는 방법이다. 실시 형태에서, 본 방법은 UNC0638, UNC0642, UCN0646, TC-E5003, A366, PF03814735, ZM447439, SB747651A, PFI1, LY303511, MS436, AZT, DEZA, 피록사미드, CI9994 또는 MC1568 중 하나 이상의 소분자로 보충된 배양 배지에서 췌장 내분비 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0015] 본 발명의 일 실시 형태는 췌장 내분비 세포의 *시험관내* 분화에 의해 얻어진 단일 호르몬 인슐린, PDX1, NKX6.1 및 MAFA를 발현하는 기능성 췌장 베타-세포의 시험관내 집단이다. 일부 실시 형태에서, 기능성 베타-세포의 집단은 또한 UCN3 및 SLC2A1을 공동-발현한다. 실시 형태에서, MAFA 발현은 미성숙 베타-세포에 비교하여 증가된다. 실시 형태에서, 기능성 베타 세포의 시험관내 집단은 UNC0638, UNC0642, UCN0646, TC-E5003, A366, PF03814735, ZM447439, SB747651A, PFI1, LY303511, MS436, AZT, DEZA, 피록사미드, CI9994 또는 MC1568 중 하나 이상의 소분자로 보충된 배지에서 췌장 내분비 세포를 배양함으로써 얻어진다.

[0016] 본 발명의 추가의 실시 형태는, 만능 줄기 세포를 췌장 내분비 세포로 분화시키는 단계; 및 췌장 내분비 세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A1을 발현하는 기능성 베타 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 만능 줄기 세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A를 발현하는 기능성 베타 세포로 분화시키는 방법이다. 실시 형태에서, MAFA 발현은 미성숙 베타-세포에 비교하여 증가된다. 실시 형태에서, 본 방법은 UNC0638, UNC0642, UCN0646, TC-E5003, A366, PF03814735, ZM447439, SB747651A, PFI1, LY303511, MS436, AZT, DEZA, 피록사미드, CI9994 또는 MC1568 중 하나 이상의 소분자로 보충된 배양 배지에서 췌장 내분비 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0017] 상기 기재된 각각의 실시 형태에서, 배양 배지는 ZM447439, 헤파린, N-아세틸 시스테인 및 제형 I 중 하나 이상으로 추가로 보충된다. 상기 실시 형태에서, 배양 배지는 T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상으로 추가로 보충된다. 상기 실시 형태에서, 배양 배지는 ALK5 억제제로 보충된다. 상기 일부 실시 형태에서, 배양 배지는 ALK5 억제제가 결여되어 있다. 상기 본 발명의 실시 형태에서, 배양 배지는 AZT 또는 DEZA로 보충된다. 상기 일부 실시 형태에서, 배양 배지는 AZT 및 DEZA 둘 모두로 보충된다.

[0018] 상기 기재된 본 발명의 실시 형태에서, 배지는 감마 세크레타제 억제제로 추가로 보충된다. 상기 실시 형태 중 일부에서, 배양 배지는 T3으로 보충된다. 일부 실시 형태에서, T3은 1 nM 내지 1 μM의 범위이다. 특정 실시 형태에 있어서, T3은 1 nM 내지 100 nM의 범위이다.

[0019] 추가로, 상기 기재된 본 발명의 실시 형태에서, 기능성 베타-세포는 하기 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포의 단계적 분화에 의해 얻어진다: 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포; 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포; 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포; 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포; 췌장 내분비 전구 세포; 및 미성숙 베타 세포 (췌장 내분비 세포)의 특징적인 마커를 발현하는 세포.

[0020] 상기 기재된 각각의 실시 형태에서, 본 방법은 공기-액체 계면에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 상기 기재된 일부 실시 형태에서, 본 방법은 현탁액, 예를 들어 현탁액 중의 세포 클러스터에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0021] 상기 실시 형태에서, 분화된 기능성 베타-세포는 미성숙 베타-세포보다 더 높은 수준으로 MAFA를 발현한다. 실시 형태에서, 분화된 기능성 베타-세포는 미성숙 베타-세포보다 더 높은 수준으로 UCN3을 발현한다. 상기 일부 실시 형태에서, MAFA 및 UCN3의 발현은 미성숙 베타-세포에서의 발현에 비교하여 증가된다.

[0022] 상기 본 발명의 실시 형태에서, 기능성 베타-세포의 집단은 글루코스-자극된 인슐린 분비 및 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡을 나타낸다. 상기 기재된 실시 형태에서, 글루코스-자극된 인슐린 분비 및 글루코스-의존성

미토콘드리아 호흡은 인간 췌도 세포의 것과 유사하다. 상기 기재된 본 발명의 실시 형태에서, 기능성 베타-세포는 다중상으로 인슐린을 분비한다.

[0023] 상기 기재된 실시 형태에서, 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡은 기저 산소 소비율에 비하여 약 20% 내지 약 80% 범위의 글루코스 자극 후 최대 산소 소비율 반응을 갖는다. 실시형태에서, 산소 소비율 반응은 글루코스 자극 후 15 분 이상 후에 발생하였다.

[0024] 상기 실시 형태에서, 글루코스-자극된 인슐린 분비는 글루코스 자극에 반응하는 신속한 이중상 인슐린 분비를 포함한다. 실시 형태에서, 이중상 인슐린 분비의 제1 상은 기저선 분비에 비하여 4 배 이상의 증가 내지 8 배 이상의 증가를 가지며, 이중상 인슐린 분비의 제2 상은 기저선 분비에 비하여 2 배 이상 내지 4 배 이상의 증가를 갖는다. 실시형태에서, 인슐린 분비는 글루코스 자극 후 5 분 이상 내지 10 분 이상 후에 발생한다.

[0025] 일부 실시 형태에서, 만능 줄기 세포를 분화시키는 방법은 하기 단계를 포함한다: 만능 줄기 세포를 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("1기 세포")로 분화시키는 단계; 1기 세포를 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("2기 세포")로 분화시키는 단계; 2기 세포를 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("3기 세포")로 분화시키는 단계; 3기 세포를 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("4기 세포")로 분화시키는 단계; 4기 세포를 췌장 내배엽/내분비 전구 세포 (췌장 내배엽 세포 및 췌장 내분비 전구 세포 중 하나 또는 둘 모두의 특징적인 마커를 발현하는 세포; "5기")로 분화시키는 단계; 5기 세포를 미성숙 베타-세포 (췌장 내분비 세포; "6기")로 분화시키는 단계; 및 6기 세포를 기능성 베타-세포 (췌장 내분비 세포; "7기")로 분화시키는 단계.

[0026] 실시 형태에서, 분화 방법은 MCX 화합물 및 GDF-8로 보충된 배지에서 만능 줄기 세포를 배양함으로써 만능 줄기 세포를 1기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다.

[0027] 실시 형태에서, 본 방법은 FGF7 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 1기 세포를 배양함으로써 1기 세포를 2기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다.

[0028] 실시 형태에서, 본 방법은 FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 활성화제, BMP 억제제 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 2기 세포를 배양함으로써 2기 세포를 3기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다.

[0029] 실시 형태에서, 본 방법은 FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 활성화제, BMP 억제제 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 3기 세포를 배양함으로써 3기 세포를 4기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다.

[0030] 실시 형태에서, 본 방법은 SANT-1, PKC 활성화제, BMP 억제제, 아스코르브산으로 보충된 배지에서 4기 세포를 배양함으로써 4기 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 배지는 T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 추가로 보충된다. 일부 실시 형태에서, 배지는 ALK5 억제제로 추가로 보충된다.

[0031] 실시 형태에서, 본 방법은 BMP 억제제, 아스코르브산, T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 보충된 배지에서 5기 세포를 배양함으로써 5기 세포를 췌장 내분비 세포로 배양하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 배지는 T3으로 보충된다. 일부 실시 형태에서, T3은 1 nM 내지 1 μM의 범위이다. 소정의 실시 형태에서, T3은 1 nM 내지 100 nM의 범위이다. 일부 실시 형태에서, 배지는 ALK 5 억제제로 추가로 보충된다. 다른 실시 형태에서, 배양 배지는 ALK5 억제제로 보충되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 배지는 감마 세크레타제 억제제로 추가로 보충된다. 소정의 실시 형태에서, 배지는 ZM447439, 헤파린, N-아세틸 시스테인 및 제형 I 중 하나 이상으로 보충된다. 실시 형태에서, 배양 배지는 AZT 또는 DEZA로 보충된다. 일부 실시 형태에서, 배양 배지는 AZT 및 DEZA 둘 모두로 보충된다. 실시 형태에서, 본 방법은 공기-액체 계면에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 현탁액, 예를 들어 현탁액 중의 세포 클러스터에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0032] 상기 기재된 분화 방법의 각각의 실시 형태들에서, 췌장 내배엽 세포 ("4기 세포")는 냉동보존될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 췌장 내배엽 세포를 췌장 내분비 전구 세포로 분화시키는 방법은 냉동보존된 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0033] 상기 기재된 각각의 실시 형태에서, 만능 줄기 세포는 인간 만능 줄기 세포, 예컨대 인간 배아 줄기 세포일 수 있다. 일 실시 형태에서, 만능 줄기 세포는 인간 H1 또는 H9 세포일 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 실시 형태는, 하기 단계를 포함하는, 만능 줄기 세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A를 발현하는 기능성 베타 세포로 분화시키는 방법이다: (a) 액티빈 A 및 WNT3A로 보충된 배지에서 만능 줄기 세포를 배양함으로써 얻어지는 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 만능 줄기 세포를 분화시키는 단계;

(b) 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 미성숙 베타-세포로 분화시키는 단계; 및 (c) UNC0638, UNC0642, UCN0646, TC-E5003, A366, PF03814735, ZM447439, SB747651A, PFI1, LY303511, MS436, AZT, DEZA, 피록사미드, CI9994 또는 MC1568 중 하나 이상으로 보충된 배지에서 미성숙 베타-세포를 배양함으로써 미성숙 베타-세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A1을 발현하는 기능성 베타-세포로 분화시키는 단계. 본 방법에 사용되는 만능 줄기 세포는 인간 만능 줄기 세포, 예컨대 인간 배아 줄기 세포일 수 있다. 일 실시 형태에서, 만능 줄기 줄기 세포는 인간 CyT49 세포이다.

[0035] 이들 기능성 베타 세포는 인간 췌도 세포와 유사한 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 또는 글루코스-자극된 인슐린 분비를 가질 수 있다. 또한, 기능성 베타 세포는 다중상으로 인슐린을 분비할 수 있다.

[0036] 이러한 방법의 소정의 실시 형태에서, 배양 배지는 ALK5 억제제가 결여되어 있다. 일부 실시 형태에서, 배양 배지는 헤파린, N-아세틸 시스테인, 제형 I 및 T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 추가로 보충된다. 다른 실시 형태에서, 배양 배지는 T3으로 보충된다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 ZM447439, 헤파린, N-아세틸 시스테인 및 T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 보충되고, ALK5 억제제를 함유하지 않는다. 배지는 T3, AZT 또는 DEZA로 보충될 수 있다.

[0037] 본 방법은 미성숙 베타 세포를 공기-액체 계면에서, 현탁 클러스터에서, 롤러 병 내에서 또는 마이크로캐리어 상에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 본 방법은 미성숙 베타 세포를 롤러 병 내에서 배양하는 단계를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 본 방법은 미성숙 베타 세포를 마이크로캐리어 상의 롤러 병 내에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0038] 본 방법에서 만능 줄기 세포를 미성숙 베타-세포로 분화시키는 단계는 (a) 액티빈 A 및 WNT3A로 보충된 배지에서 만능 줄기 세포를 배양함으로써, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("1기 세포")로 분화시키는 단계; (b) 1기 세포를 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("2기 세포")로 분화시키는 단계; (c) 2기 세포를 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("3기 세포")로 분화시키는 단계; (d) 3기 세포를 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 ("4기 세포")로 분화시키는 단계; (e) 4기 세포를 췌장 내분비 전구 세포("5기")로 분화시키는 단계; 및 (f) 5기 세포를 미성숙 베타-세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 단계 e 및 단계 f는 공기-액체 계면에서, 현탁 클러스터에서, 롤러 병 내에서 또는 미코캐리어 상에서 배양하는 단계를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 단계 e 및 단계 f는 롤러 병 내에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 단계 e 및 단계 f는 미성숙 베타 세포를 마이크로캐리어 상의 롤러 병 내에서 배양하는 단계를 포함한다.

[0039] 소정의 실시 형태에서, 본 방법은 FGF7 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 1기 세포를 배양함으로써 1기 세포를 2기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 본 방법은 또한 FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 활성화제 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 2기 세포를 배양함으로써 2기 세포를 3기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 소정의 실시 형태에서, 배지는 BMP 억제제가 결여되어 있다. 또 다른 실시 형태에서, 본 방법은 FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 활성화제 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 3기 세포를 배양함으로써 3기 세포를 4기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 다시, 소정의 실시 형태에서, 배지는 BMP 억제제가 결여되어 있다.

[0040] 다른 실시 형태에서, 본 방법은 SANT-1, PKC 활성화제, BMP 억제제 및 아스코르브산으로 보충된 배지에서 4기 세포를 배양함으로써 4기 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 배지는 T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 추가로 보충될 수 있다.

[0041] 대안적인 실시 형태에서, 본 방법은 BMP 억제제, 아스코르브산, T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 보충된 배지에서 5기 세포를 배양함으로써 5기 세포를 미성숙 베타-세포로 배양하는 단계를 포함한다. 배지는 ALK 5 억제제 또는 감마 세크레타제 억제제로 추가로 보충될 수 있다. 본 방법은 또한, ALK5 억제제가 결여되고 ZM447439, AZT, N-아세틸 시스테인, DEZA, 제형 I 및 T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상으로 보충된 배지에서 미성숙 베타-세포를 배양함으로써, 미성숙 베타-세포를 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A를 발현하는 기능성 베타 세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0042] 상기 기재된 분화 방법의 각각의 실시 형태에서, 배양은 현탁 배양 또는 세포 응집 현탁 배양일 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 배양은 롤러 병 내에서, 마이크로캐리어 상에서, 또는 롤러 병 내의 마이크로캐리어 상에서 실행될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1a 내지 도 1h는 7기에서 MAFA 또는 UCN3 발현을 상향조절하는 소분자에 대한 스크리닝 결과를 나타낸다. 도 1a 및 도 1d 는, 7기에서 UNC0638 (선택적 G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), UNC0646 (강력하고 선택적인 G9a/GLP 억제제), UNC0642 (강력하고 선택적인 G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), TC-E5003 (선택적 PRMT1 아르기닌 메틸트랜스퍼라제 억제제), A366 (강력하고 선택적인 G9a/GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), PF03814735 (오로라 키나제 A 및 B 억제제), ZM447439 (오로라 키나제 B를 억제함), SB747651A 다이하이드로클로라이드 (강력한 MSK1 억제제; 다른 AGC 그룹 키나제 또한 억제함), PFI1 (BET 브로모도메인 억제제), LY303511 (BRD2, BRD3 및 BRD4 억제제), MS436 (강력하고 선택적인 BRD4 브로모도메인 억제제), 및 MC1568 (HDAC 클래스 II (IIa)를 선택적으로 억제함)로 처리한 후에, MAFA의 7기 발현이 S6D7, 또는 비처리 또는 DMSO 처리 배양물에 비교하여 유의하게 상향조절되었음을 나타낸다. 도 1e 내지 도 1h는 7기에서 5-아자시티딘 ("AZT") (DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제), 피록사미드 (히스톤 데아세틸라제 억제제), 및 CI994 (히스톤 데아세틸라제 억제제)의 첨가 후에, UCN3의 7기 발현이 S6D7, 또는 비처리 또는 DMSO 처리 배양물에 비교하여 증가하였음을 나타낸다. 모든 조건 S7D7; ALI 클러스터.

도 2a 및 도 2b는 MAFA 또는 UCN3 상향-조절제로서 선택된 소분자의 강건성을 나타내며, 그 이유는 그들의 효과가 상이한 7기 조건화 프로토콜에 걸쳐 유지되었기 때문이다. 3-데아자네플라노신 A ("DEZA")는 MAFA의 효과적인 상향-조절제이지만 UCN3에 대해서는 그렇지 않음이 확인되었다 (도 2a). AZT는 7기 중에 UCN3 상향-조절제이지만 MAFA 상향-조절제는 아닌 것으로 확인 되었다 (도 2b). 모든 조건 S7D7; ALI 클러스터.

도 3a 내지 도 3m은, 7일의 개선된 7기 조건화 후에, ALI 세포 클러스터 내의 성숙 마커 세트의 유전자 발현이 인간 췌도에서 관찰된 수준으로 증가됨을 나타낸다. 7기 분화 중에 이용되는 개선은, (i) ALK5 억제제 II의 제거; (ii) T3 농도의 강하; (iii) DEZA의 첨가; (iv) AZT의 첨가; (v) ZM의 첨가; (vi) 글루코스 농도를 5.56 mM로 낮추는 단계; 및 (vii) 정의된 비타민, 비-필수 아미노산, 지질, 소듐 피루베이트 및 미량 원소 (제형 I - 표 XII)의 칵테일의 첨가를 포함한다. 도 3a는 INHBB가 ALK5 억제제 II를 이용하는 조건에서 인간 췌도에서 관찰되는 발현을 초과하여 강화되었고, AZT/DEZA의 부재 또는 존재 하에 ALK5 억제제의 제거는 INHBB를 인간 췌도에서 관찰되는 수준으로 감소시켰음을 나타낸다. 도 3b는 INHA 발현이 ALK5 억제제 II의 제거에 의해 ALI 클러스터 내에서 인간 췌도 수준으로 증가되었음을 나타낸다. 각각 도 3c 및 도 3d에 나타낸 MAFA 및 SLC2A1 발현은 ALK5 억제제 II의 제거에 의해 감소되는 반면에, AZT/DEZA의 첨가는 MAFA 및 SLC2A1 발현을 인간 췌도 수준으로 구조한다. UCN3 (도 3e), G6PC2 (글루코스 -6-포스파타아제 촉매 서브유닛 2; 도 3f), 및 PDK1 (피루베이트 데하이드로게나제 키나제 1; 도 3g) 발현은 AZT/DEZA의 첨가 및 ALK5 억제제 II의 제거에 의해 ALI 클러스터 내에서 인간 췌도 이상의 수준으로 증가되었다. INS (인슐린; 도 3h), GJD2 (간극 연접 단백질, 델타 2; 또한 CX36/코넥신 36; 도 3i), SIX2 (SIX 호메오박스 2; 도 3j), 및 PDX1 (도 3k)의 발현은 첫째로 ALK5 억제제 II의 제거에 의해, 그리고 둘째로 AZT/DEZA의 첨가에 의해 점진적인 단계적 방식으로 증가하였다. NKX6.1 (도 3l), 및 GLP1R (글루카곤 유사 펩티드 1 수용체; 도 3m)의 발현은 조건에 걸쳐 유의하게 변화하지 않았지만, ALI 클러스터에서의 그의 발현은 일관되게 인간 췌도에서 관찰된 수준 이상이었다. 모든 조건 S7D7; ALI 클러스터.

도 4a 내지 도 4e는, 단백질 존재의 관점에서, S7D7에서 하기 성숙 마커를 공동-발현하는 ALI 세포 클러스터 내의 C-펩티드 세포의 생성을 나타낸다: PDX1 (도 4a), NKX6.1 (도 4b), MAFA (도 4c), SLC2A1 (도 4d) 및 UCN3 (도 4e). 대표적인 인간 췌도 염색을 좌측 컬럼에 나타낸다. ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR001 조건은 중간 컬럼에 나타낸다. ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR004 조건은 우측 컬럼에 나타낸다. 모든 조건 S7D7; ALI 클러스터.

도 5a 내지 도 5f는, 구체적으로 7기 특이적 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT, DEZA, FI, BLAR001' 조건화에 의한, ALI 상의 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학을 나타내는 S7D7에서의 C-펩티드 세포의 생성을 나타낸다. 도 5a는 인간 췌도가 높은 D-글루코스에 신속하게 반응하고 (주입 ("ip") 후 15 분 후에 기준선에 비해 OCR 123.3% ± 12.92에 의해 입증됨), 시간 경과에 따라 높은 OCR을 유지하였음을 나타낸다(131.5% ± 11.32; 72 분 ip). 역으로, 미성숙 C-펩티드 양성 세포가 강화된 S6D7 ALI 클러스터는 높은 D-글루코스 에 대한 신속한 OCR 반응이 결여되어 있고 (104.4% ± 3.37; 15 분 ip), 시간 경과에 따른 상대적으로 약한 OCR 반응 (113.3% ± 4.51; 72 분 ip)을 나타낸다. 도 5d는 S7D7 ALI 클러스터 그룹 내에서만 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR001' 조건이 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학 (112.4% ± 3.25 - 15 분 ip; 129.5% ± 3.78 - 72 분 ip)을 나타냈음을 나타낸다. 미성숙 S6D7

ALI 클러스터와 구별할 수 없는 글루코스-의존성 미토콘드리아 동력학을 나타내는 S7D7 ALI 클러스터 조건: 'ALK5, T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR001' (100.3% ± 4.04 − 15 분 ip; 107.8% ± 6.51 − 72 분 ip) (도 5b); 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR001' (96.9% ± 3.06 − 15 분 ip; 109.0% ± 4.58 − 72 분 ip) (도 5c); 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR004' (103.4% ± 4.76 − 15 분 ip; 113.6% ± 6.72 − 72 분 ip) (도 5e); 및 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR004' (102.1% ± 4.04 − 15 분 ip; 112.7% ± 3.38 − 72 분 ip) (도 5f).

도 6a 내지 도 6l은 현탁 배양에서 미성숙 췌장 베타 세포로 분화된 Aggrewell™ 세포 클러스터를 나타낸다. 도 6a는 (i) 신선한 S4D3 단층 또는 S4D3 냉동보존된 세포를 (ii) Aggrewell™ 방법을 통해 (iii) 세포 클러스터로 조립한 절차를 도시한다. 도 6b는 췌장 내배엽 TF PDX1 (*상부, 좌측*), 및 NKX6.1 (*상부, 중간*)의 높은 단백질 존재, 그러나 내분비 TF NEUROD1의 낮은 단백질 존재 (*상부, 우측*); TF SOX2 (*하부, 중간*) 및 CDX2 (*하부, 우측*)를 할당하는 대안적인 비-췌장 내배엽 계통이 S4D5 Aggrewell™ 클러스터에서 검출되었음을 나타낸다. 도 6c에서 FACS 분석은, 99.3 ± 0.1%의 세포가 $PDX1^+$ (*좌측*), 84.4 ± 0.1%가 $NKX6.1^+$ (*중간*)였으나, 2.2 ± 0.4%가 $NKX6.1^+$ $NEUROD1^+$ (*우측*)이거나 1.35 ± 0.55%가 $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ (*중간*)였음을 나타낸다 (S4DS Aggrewell™ 클러스터). 도 6d는, S4D3 단층에 비교하여 PDX1 *(상부,* 좌측), NKX6.1 *(상부,* 우측)의 높은 유전자 발현, 및 NEUROD1 *(하부,* 좌측) 및 CHGA (*하부, 우측*)의 낮은 발현이 유지되었으므로, S4D3 냉동보존된 세포로부터 유래된 S4D4 Aggrewell™ 클러스터에서 강건한 췌장 내배엽 특징이 유지되었음을 나타낸다. 도 6e는 (i) 신선한 S4D3 단층 또는 S4D3 냉동보존된 세포를 (ii) Aggrewell™ 방법을 통해 세포 클러스터로 조립하고, (iii) 현탁 배양에서 (iv) S6D6에 의해 미성숙 베타-세포로 분화시킨 절차를 도시한다. S6D6 Aggrewell™ 클러스터의 FACS 분석은, 78.5 ± 1.87%의 세포가 $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ (좌측, 도 6f), 73.6 ± 4.34%가 $NKX6.1^+$ $NEUROD1^+$ (우측, 도 6f), 그리고 38.4 ± 5.96%가 $NKX6.1^+$ 인슐린$^+$ (좌측, 도 6g)였으므로, 강건한 미성숙 베타-세포 단백질 프로파일을 나타낸다. 인슐린 양성 집단의 대부분 (총 세포의 50.2 ± 6.92%는 인슐린$^+$였음)은 $NKX6.1^+$ (*좌측*, 도 6g)였고 글루카곤-양성이 아니었다 (7.43 ± 1.49% 인슐린$^+$ 글루카곤$^+$; (*우측*, 도 6g)). 도 6h는, IF에 의해 S6D6에서 Aggrewell™ 클러스터 내의 C-펩티드$^-$양성 세포의 대부분이 둘 모두 PDX1+ *(*좌측) 및 NKX6.1+ *(*중간)임을 나타낸다. 도 6i는 성숙 게이트키퍼 TF MAFA (*우측*)의 단백질 존재가 S6D6에서 이미 용이하게 검출되었고, S6D6 내지 S6D7에서의 이전의 ALI 클러스터 (문헌 *[Nature Biotechnology*, 2014 (32) 11, 1121-1133])보다 더 높은 수준으로 발현되었음을 나타낸다 (또한 ALI S7D7 비교를 위한 도 3c 참조). 인슐린 발현 (도 6j), PDX1 (도 6k) 및 NKX6.1 (도 6l)의 발현은 S6D6 내지 S6D7에서의 이전의 ALI 클러스터보다 높았다.

도 7a 내지 도 7m은 현탁 배양에 의한 S7D7 Aggrewell™ 클러스터의 성숙 췌장 베타 세포로의 생성을 나타낸다. 도 7a는 (i) 신선한 S4D3 단층 또는 S4D3 냉동보존된 세포를 Aggrewell™으로 조립하고, (ii & iii) 5기, 6기 및 7기를 통해 현탁 배양에 의해 조건화하여 (iv) S7D7 Aggrewell™ 클러스터를 생성하는 절차를 도시한다. 7기 중에 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001'에 의해 배양된 S7D7 Aggrewell™ 클러스터는 기저선 베타-세포 단백질 프로파일을 유지하였다 (도 7b 및 도 7c). 세포의 89%는 $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ (*좌측*, 도 7b), 77.7%는 $NKX6.1^+$ $NEUROD1^+$ (*우측*, 도 7b), 그리고 40.8%는 $NKX6.1^+$ 인슐린$^+$ (*좌측*, 도 7c)였다. 인슐린 양성 집단의 대부분 (총 세포의 46.4%는 인슐린$^+$였음)은 $NKX6.1^+$ (*좌측*, 도 7c) 였고 글루카곤-양성이 아니었다(3.9% 인슐린$^+$ 글루카곤$^+$; (*우측*, 도 7c)). 성숙 마커 MAFA (도 7d), UCN3 (도 7e), SLC2A1 (도 7f), G6PC2 (도 7g), 인슐린 (도 7h) 및 NKX6.1 (도 7i)의 유전자 발현은 7기 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004' 조건화 S7D7 Aggrewell™ 클러스터 내의 인간 췌도 수준 이상이었다. MAFA (도 3c), G2PC2 (도 3f), 인슐린 (도 3h) 및 NKX6.1 (도 3l) 과 같은 성숙 마커의 발현 수준 S7D7은 ALI 클러스터에서보다 Aggrewell™ ('ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004')에서 훨씬 더 크다. 도 7j 내지 도 7m은, 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004' 7기 조건화에 DEZA 및 AZT를 첨가하는 것이, 단백질 존재의 관점에서, PDX1 (도 7j; *하부, 좌측*), NKX6.1 (도 7j; *하부, 중간*), MAFA (도 7k; *하부, 좌측*), UCN3 (도 7k; *하부, 중간*), 및 SLC2A1 (도 7k; *하부, 우측*)을 S7D7에서 공동-발현하는 유의한 수의 비-글루카곤 (도 7j; *하부, 우측*) C-펩티드 세포를 생성하였음을 나타낸다. 도 7l 및 도 7m은, 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004'-특이적 7기 조건화에 의한, 단백질 존재의 관점에서 S7D7까지 성숙 마커: PDX1 (도 7l; *하부, 좌측*), NKX6.1 (도 7l; *하부, 중간*), MAFA (도 7m; *하부, 좌측*), SLC2A1 (도 7m; *하단, 우측*)을 공동-발현했지만, 글

루카곤 (도 7l; *하부, 우측*) 또는 UCN3 (도 7m; *하부, 중간*)은 발현하지 않은 C-펩티드 세포의 생성을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8l는 인간 췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 및 GSIS 동력학을 이용한 현탁 배양에 의한 만능 줄기 세포 유래 성숙 췌장 베타 세포의 생성을 나타낸다. 도 8a 및 도 8b 둘 모두는, 인간 췌도 세포가 높은 D-글루코스에 신속하게 반응하고 (15 분 ip 후에 기준선에 비해 OCR 123.3% ± 12.92에 의해 입증됨), 시간 경과에 따라 높은 OCR을 유지하였음을 나타낸다 (131.5% ± 11.32; 72 분 ip). 미성숙 C-펩티드 양성 세포가 강화된 S6D7 ALI 클러스터는 높은 D-글루코스 에 대한 신속한 OCR 반응이 결여되어 있고 (104.4% ± 3.37; 15 분 ip), 시간 경과에 따른 상대적으로 약한 OCR 반응 (113.3% ± 4.51; 72 분 ip)을 나타낸다. 현탁액 중의 Aggrewell™ 클러스터와 관련하여, S7D13에서 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR004' 조건에서, 인간 췌도 유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학이 관찰되었다 (110.7% ± 2.46 – 15 분 ip; 125.9% ± 2.27 – 72 분 ip) (도 8a). 현탁액 중의 "ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT, DEZA, FI, BLAR004' Aggrewell™ 클러스터는 높은 글루코스 자극에 반응하여 인간 췌도 수준 초과의 산소를 소모하였다 (162.0% ± 11.51 – 15 분 ip; 177.1% ± 0.99 – 72 분 ip) (도 8b). 도 8c는 인간 췌도 내의 성숙 베타 세포가 글루코스 자극에 반응하는 신속한 이중상 인슐린 분비의 다중 라운드에 대한 능력을 나타냈음을 나타낸다. 인간 췌도는 인슐린 분비의 "온-오프 (on-off)" 스위칭의 다중 라운드에 대한 능력을 나타냈다. 시험된 모든 조건은 KCl에 대한 강한 인슐린 분비 반응을 나타냈다 (도 8c 내지 도 8i). 엑센딘-4의 첨가는 나타낸 인간 췌도의 GSIS 반응의 진폭을 증가시키지 않았지만, ALI 또는 Aggrewell™ GSIS 프로파일과의 비교를 위해 포함되었다 (도 8d). 7기 중에 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC FI'로 조건화된 S7D21-ALI 클러스터는, BLAR001 (도 8e)에서든 BLAR004 (도 8f)에서든, 제1 이중상 GSIS 반응 (제1 GSIS 반응의 약 4 내지 10 배 제1 상)을 나타냈지만, 상대적으로 느린 제2 이중상 GSIS 반응은 나타내지 않았다. ALI 클러스터는 자극 후 3 mM D-글루코스의 재관류 시에 인슐린 분비의 제2 상을 차단하는 능력을 갖지 않았다. 7기 중에 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI BLAR004'로 조건화된 S7D14 Aggrewell™ 클러스터는 강한 제1 이중상 GSIS (제1 GSIS 반응의 약 5 배 제1 상)를 나타냈으며, 이어서 GSIS를 완전히 차단하는 능력, 및 약한 제2 단일상 반응 (도 8g)을 나타냈다. 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI BLAR004' 조건화에 DEZA 및 AZT를 첨가함으로써, S7D14 Aggrewell™ 클러스터는 다중 라운드의 인간-췌도-유사 이중상 GSIS (제1 GSIS 반응의 약 5 내지 7 배 제1 상), 및 높은 글루코스 펄스들 사이에서 GSIS를 완전히 차단하는 능력을 나타냈다 (도 8h 및 도 8i).

도 9a 내지 도 9q는 다중 유형의 현탁 배양물 중의 CyT49 hESC로부터 유래된 췌장 내배엽의 생성을 나타낸다. 도 9a는 CyT49 hESC-유래 췌장 내배엽을 생성하기 위한 단계적 분화 프로토콜을 도시한다. 중요한 전사 인자 ("TF")가 각각의 단계에 대해 표시된다. 도 9b는 ml 당 수백만 개의 세포에서 hESC 입력에 대해 생성된 S4D3 세포의 수를 나타낸다. 도 9c는 0.1 PBS 미니 (Mini) 및 0.5 PBS 미니에 대한 S4D3 수율을 나타낸다. 예를 들어, 0.5 PBS 현탁 배양 포맷에 대해, PEC-01 d12 (2.23 ± 0.090)보다 현저하게 더 높은, 하나의 hESC 세포 당 4.08 ± 0.854 개의 세포를 생성하였다. 도 9c는 100 ml (0.1 PBS)로부터 500 ml (0.5 PBS)의 배지 부피로 스케일 업될 때 S4D3 총 세포 수율 (백만개 세포 단위)의 대략 6 배 증가를 나타낸다. 도 9d 및 도 9e는 2-리터 롤러 병 (도 9d 우측), 0.1 PBS (도 9e 중간), 및 0.5 PBS (도 9e 우측) 현탁액 포맷으로부터의 S4D3 응집체의 위상차 이미지 및 직경 (마이크로미터 단위)을 도시하며; 2-리터 롤러 병 생성된 PEC-01 d12 (도 9d 좌측), 및 PEC-01 d15 (좌측 도 9e)를 종래 기술의 예로서 나타낸다. 0.1 PBS 및 0.5 PBS 현탁 배양에 의해 생성된 S4D3 응집체는 롤러 병 생성된 응집체보다 균일하게 더 작다. 도 9f 내지 도 9l은 S4D3 응집체에 대한 유전자 발현을 나타낸다. CyT49 hESC에 대한 NKX6.1 (도 9f), PTF1A (도 9g), PDX1 (도 9h), SOX2 (도 9i), CDX2 (도 9j), NEUROD1 (도 9k), 및 CHGA (도 9l)의 유전자 발현은 2-리터 롤러 병, 0.1 PBS 및 0.5 PBS에서 생성된 S4D3 응집체, 및 2-리터 롤러병 생성된 PEC-01 d15에 나타낸다. 도 9f 내지 도 9l은 PEC-01 d15 (종래 기술)에 비하여, 대안적인 내배엽 계통 및 초기 췌장 내분비 분화의 발현을 제한하면서, 췌장 내배엽 유전자 프로그램의 강력한 유도를 나타낸다. 도 9n 내지 도 9p는, 2-리터 롤러 병 생성된 PEC-01 d12 응집체 (도 9m), 및 PEC-01 d15 응집체 (도 9q)에 비하여, 췌장 내배엽 마커 (예를 들어, PDX1, NKX6.1)는 강력한 단백질 공동-국소화되지만, 대안적인 내배엽 계통의 단백질 마커 (예를 들어, SOX2, CDX2) 및 2-리터 롤러 병 (도 9n), 0.1 PBS (도 9o), 및 0.5 PBS (도 9p)에서 새로운 프로토콜에 의해 생성된 S4D3 응집체에 대한 내분비 분화에 대한 마커 (예를 들어, CHGA)는 그렇지 않음을 나타낸다.

도 10a 내지 도 10ab는 다중 유형의 현탁 배양물 중의 CyT49 hESC로부터 유래된 인슐린 생성 세포의 생성을 나타낸다. 도 10a는 CyT49 hESC-유래 비기능성 인슐린-생성 세포를 생성하기 위한 개시된 단계적 분화 프로토콜을 도시한다. 5기 조건화에 입력된 S4D3 CyT49 hESC-유래 세포로 시작하여 각각의 단계에 대해 중요한 전사 인자 ("TF")를 나타낸다. 도 10b는 ml 당 수백만 개의 세포에서 hESC 입력에 대해 생성된 S6D7 세포의 수를 나타

낸다. 예를 들어, 새로운 프로토콜을 이용하는 0.5 PBS 현탁 배양 포맷에 대해, 하나의 hESC 세포 당 2.4 ± 0.169 개의 S6D7 세포가 생성되었다. 도 10c는 0.1 PBS 및 0.5 PBS 배양물의 S6D7 수율을 나타낸다. 도 10c는 100 ml (0.1 PBS)로부터 500 ml (0.5 PBS)의 배지 부피로 스케일 업될 때 S6D7 총 세포 수율 (백만개 세포 단위)의 대략 7.5 배 증가를 나타낸다. 도 10d는 2-리터 롤러 병 (도 10d 좌측), 0.1 PBS (도 10d 중간), 및 0.5 PBS (도 10d 우측) 현탁액 포맷으로부터의 S5D3 응집체의 위상차 이미지를 도시한다. 도 10e는 2-리터 롤러 병 (도 10e 좌측), 0.1 PBS (도 10e 중간) 및 0.5 PBS (도 10e 우측) 현탁액 포맷으로부터의 S6D7 응집체의 위상차 이미지를 각각의 도면 아래에 표시된 응집체 직경과 함께 도시한다. 도 10f는 2-리터 롤러 병 (도 10f 좌측), 및 0.1 PBS (도 10f 우측) 현탁액 포맷으로부터의 S7D13 응집체의 위상차 이미지를 도시한다. 0.1 PBS 및 0.5 PBS에 의한 현탁 배양은 7기 전체에 걸쳐 조밀한 응집체 구조를 유지한다. 역으로, 6기 내지 7기 응집체는 느슨하게 되어 2-리터 롤러 병 현탁 배양에서 세포의 시트를 형성한다. 도 10g 내지 도 10n은 S4D3, S5D3, S6D7 및 S7D7에서의 유전자 발현을 나타낸다. 도 10g 내지 도 10n은, 새로운 프로토콜을 사용하는 모든 현탁 배양 방법이 강건한 췌장 모노-호르몬 인슐린-생성 세포 유전자 시그너처를 유도하였으며; 2-리터 롤러 병, 0.1 PBS 및 0.5 PBS 현탁 방법은 PDX1 (도 10g), NKX6.1 (도 10h), CHGA (도 10i), NEUROD1 (도 10j), NGN3 (도 10k), 인슐린 (도 10l), MAFA (도 10m), 및 글루카곤 (도 10n)의 발현을 상대적으로 동일하게 유도하였음을 나타낸다. 도 10o 내지 도 10t는, 0.5 PBS 내의 S5D3에서 (도 10o 및 도 10p), 2-리터 롤러 병 내의 S6D7에서 (도 10q), 0.1 PBS 내의 S6D7에서 (도 10r), 2-리터 롤러 병 내의 S7D13에서 (도 10s), 그리고 0.1 PBS 내의 S7D14에서 (도 10t), CHGA, NKX6.1, 인슐린과 같은 인슐린-생성 세포 마커의 단백질 공동-국소화가 단계적으로 형성되지만 글루카곤은 그렇지 않음을 나타낸다. 도 10u는 PEC-01-유래 S6D7 세포에 대한 CHGA, 인슐린 또는 글루카곤을 공동-발현하는 NKX6.1 세포의 우세성 뿐만 아니라 인슐린 및 글루카곤 공동-발현 세포의 우세성을 나타낸다. 도 10u는 2-리터 롤러 병에서 PEC-01 유래 S6D7 응집체에 대한, 폴리-호르몬 인슐린-생성 세포의 높은 우세성, 및 따라서 낮은 수의 모노-호르몬 인슐린-양성 세포를 나타낸다. 도 10v는 PEC-01-유래 S6D7; 0.1 PBS S7D14 및 롤러 병 (RB) S7D13에 대한 글루카곤 및 NKX6.1의 공동-국소화를 나타낸다. 도 10v는 모든 인슐린$^{+}$ 글루카곤$^{+}$ 세포가 시험된 모든 조건에서 NKX6.1 존재에 대해 음성임을 나타낸다 (새로운 프로토콜을 이용하는 PEC-01-유래 S6D7; 0.1 PBS S7D14 및 RB S7D13). 도 10w 내지 도 10ab는, 0.1 PBS 내의 S6D7에서 (도 10w 및 도 10x), 0.1 PBS 내의 S7D16에서 (도 10y 및 도 10z), 그리고 2-리터 롤러 병 내의 S7D23에서 (도 10aa 및 도 10ab) 인슐린-생성 세포 마커, 예컨대 시냅토파이신 (범-내분비 마커 (pan-endohysin)), NKX6.1, 인슐린 및 MAFA의 단백질 공동-국소화를 나타낸다. 7기까지, 비기능성 모노-호르몬 인슐린-생성 세포를 나타내는, 시냅토파이신, NKX6.1, 인슐린 및 MAFA 사이의 강건한 단백질 공동-국소화가 관찰되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 본 발명의 하기의 상세한 설명은 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 도면은 본 발명의 소정의 실시 형태를 예시하기 위해 제공된다. 그러나, 본 발명은 도시된 정밀한 배열, 예 및 수단에 한정되지 않는다. 개시의 명확함을 위하여, 그리고 제한하지 않고서, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 본 발명의 소정의 특징, 실시 형태, 또는 응용을 기재하거나 예시하는 세부 항목으로 나뉘어진다.

[0045] ***A. 정의***

[0046] 줄기 세포는 단일 세포 수준에서 그의 자기-재생 및 분화 능력 둘 모두에 의해 규정되는 미분화된 세포이다. 줄기 세포는 자기-재생 선조체, 비재생 선조체, 및 최종 분화된 세포를 포함하는 자손 세포를 생성할 수 있다. 줄기 세포는 또한 시험관내에서 다수의 배엽층(내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능적 세포로 분화하는 그의 능력을 특징으로 한다. 또한, 줄기 세포는 이식 후에 다수의 배엽층의 조직을 생기게 하며, 배반포 내로의 주입 이후, 비록 전부는 아니더라도, 사실상 대부분의 조직에 기여한다. 줄기 세포는 그의 발생능(developmental potential)에 따라 분류된다. 만능 줄기 세포는 모든 배아 세포형을 생성시킬 수 있다.

[0047] 분화는 특화되지 않은 ("미결된") 또는 덜 특화된 세포가 특화된 세포, 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화된 세포는 세포의 계통 내에서 보다 특수화된 ("수임된(committed)") 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "수임된"은 분화 경로에서, 정상 환경 하에 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 하위세트로 계속 분화될 것이며, 정상 환경 하에 상이한 세포 유형으로 분화될 수 없거나 덜 분화된 세포 유형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행된 세포를 지칭한다. "탈분화(de-differenciation)"는 세포가 세포의 계열 내의 덜 특화된(또는 수임된) 위치로 되돌아가는 과정을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 세포의 계통은 세포의 유전, 즉, 어느 세포로부터 왔는지 그리고 어떤 세포를 생기게 할 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 관심 계통의 세포

의 표현형과 특이적으로 관련되며 미수임 세포가 관심 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있는 특징을 지칭한다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심 세포에서 차별적으로 발현되는 핵산 또는 폴리펩티드 분자이다. 이러한 맥락에서, 차등 발현 (differential expression)은 미분화 세포 또는 다른 분화 단계의 세포와 비교하여 양성 마커에 대한 증가된 수준 및 음성 마커에 대한 감소된 수준을 의미한다. 마커 핵산 또는 폴리펩티드의 검출가능한 수준은 다른 세포에 비하여 관심 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮아서, 관심 세포가 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것을 이용하여 다른 세포로부터 확인되어 구별될 수 있다.

[0049] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "세포 밀도" 및 "접종 밀도"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며 고체 또는 반고체 평면 또는 곡면 기재의 단위 면적 당 접종된 세포의 수를 지칭한다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "현탁 배양물"은 표면에 부착되기보다는 오히려 배지 중에 현탁된 세포, 단일 세포 또는 클러스터의 배양물을 지칭한다.

[0051] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 세포는 특정 마커가 그 세포에서 충분히 검출될 때 특정 마커에 "대하여 양성", "양성", 또는 "+"이다. 이와 유사하게, 세포는 특정 마커가 그 세포에서 충분히 검출되지 않을 때 특정 마커에 "대하여 음성", "음성" 또는 "-"이다. 특히, 형광 활성화 세포 분류 세포측정 (fluorescence activated cell sorting cytometry, "FACS")에 의한 양성은 보통 약 2% 초과인 반면, FACS에 의한 음성 역치는 보통 약 1% 미만이다. 중합효소 연쇄 반응 세포 분석법 ("PCR")에 의한 양성은 통상 약 30 사이클 (Ct) 이하인 반면에; PCR에 의한 음성은 통상 약 31 사이클 초과이다.

[0052] 만능 줄기 세포의 기능성 췌장 내분비 세포로의 분화를 정치 (static) 시험관내 세포 배양에서 모사하려는 시도에서, 분화 과정은 종종 다수의 연속적인 단계들을 통해 진행되는 것으로 여겨진다. 특히, 분화 과정은 보통 다수의 단계들을 통해 진행되는 것으로 여겨진다. 이러한 단계적인 분화에서, "1기"는 분화 과정에서의 제1 단계, 즉, 만능 줄기 세포의 완성 내배엽 ("1기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 말한다. "2기"는 제2 단계, 즉, 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 원시 장관 세포 ("2기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 지칭한다. "3기"는 제3 단계, 즉, 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 전장 내배엽 세포 ("3기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 지칭한다. "4기"는 제4 단계, 즉, 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 췌장 내배엽 세포 ("4기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 지칭한다. "5기"는 제5 단계, 즉, 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 췌장 내배엽 세포 및 췌장 내분비 전구 세포 (총괄하여, "5기 세포" 또는, 대안적으로, "췌장 내배엽/내분비 전구 세포"로 지칭됨) 중 하나 또는 둘 모두의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 지칭한다. 6기는 제6 단계, 즉, 췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 미성숙 베타 세포("6기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 지칭한다. 본 발명의 세포 및 본 발명의 세포의 집단의 생성 과정에서, 그리고 생성을 목적으로, 제7 단계, "7기"는 미성숙 베타 세포 (췌장 내분비 세포)의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 기능성 베타 세포의 특징적인 마커를 발현하고 6기 세포에 비교하여 더 성숙한 표현형을 갖는 세포로의 분화에 대해 사용되고 이를 지칭한다. "더 성숙한 표현형을 갖는 기능성 베타-세포" 또는 "7기 세포"는 6기 세포와 비교할 때 단일 호르몬 인슐린+, MAFA+, NKX6.1+, UCN3+, SLC2A1+ 및 PDX1+일 뿐만 아니라, 덜 성숙한 췌장 내분비 세포, 특히 미성숙 베타-세포보다 더 높은 수준으로 MAFA를 발현하는 췌장 내분비 세포를 의미한다.

[0053] 특정 집단에서의 모든 세포가 동일한 속도로 이러한 단계들을 통해 진행되는 것은 아니라는 것에 주목해야 한다. 결과적으로, 시험관내 세포 배양에서, 특히 후기 분화 단계에서 집단에 존재하는 대부분의 세포들보다 더 적거나 더 많은 분화 경로를 진행한 세포의 존재를 검출하는 것은 드문 일이 아니다. 예를 들어, 5기에서의 세포 배양 동안 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커의 출현을 보는 것은 드문 일이 아니다. 본 발명을 설명하기 위하여, 상기 확인된 단계들과 관련된 다양한 세포 유형들의 특징들이 본 명세서에 기재된다.

[0054] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "완성 내배엽"은 낭배형성 동안 상배엽으로부터 생기는 세포의 특징을 보유하며 위장관 및 그의 유도체를 형성하는 세포를 말한다. 완성 내배엽 세포는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현한다: FOXA2 (간세포 핵 인자 3-β (HNF3-β)로도 알려짐), GATA4, SOX17, CXCR4, 단미증(Brachyury), 세르베루스(Cerberus), OTX2, 구스코이드(goosecoid), C-Kit, CD99, 및 MIXL1. 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커들은 CXCR4, FOXA2, 및 SOX17이다. 따라서, 완성 내배엽 세포는 그의 CXCR4, FOXA2, 및 SOX17 발현을 특징으로 할 수 있다. 게다가, 세포가 1기에 남아 있도록 허용되는 시간의 길이에 따라, HNF4α의 증가가 관찰될 수 있다.

[0055] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "원시 장관 세포"는, 완성 내배엽으로부터 유래되고 모든 내배엽성 기관, 예컨대 폐, 간, 췌장, 위, 및 장이 생기게 할 수 있는 세포를 지칭한다. 장관 세포는 완성 내배엽 세포에 의해 발현되는 것에 비해 사실상 증가된 그의 HNF4α 발현을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 2기 동안 HNF4α의 mRNA 발현에서 10 내지 40배 증가가 관찰될 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "전장 내배엽 세포"는 식도, 폐, 위, 간, 췌장, 담낭, 및 십이지장의 일부가 생기게 하는 세포를 말한다. 전장 내배엽 세포는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현한다: PDX1, FOXA2, CDX2, SOX2 및 HNF4α. 전장 내배엽 세포는 장관 세포에 비하여 PDX1의 발현 증가를 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 3기 배양물에서 세포의 50% 초과가 전형적으로 PDX1을 발현한다.

[0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 내배엽 세포"는 하기 마커 중 하나 이상을 발현하는 세포를 지칭한다: PDX1, NKX6.1, HNF1β, PTF1α, HNF6, HNF4α, SOX9, NGN3, 가스트린; HB9 또는 PROX1. 췌장 내배엽 세포는 그의 사실상의 CDX2 또는 SOX2 발현의 결여를 특징으로 할 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "췌장 내분비 전구 세포"는 췌장 호르몬 발현 세포가 될 수 있는 췌장 내배엽 세포를 말한다. 췌장 내분비 전구 세포는 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현한다: NGN3; NKX2.2; NeuroD1; ISL1; PAX4; PAX6; 또는 ARX. 췌장 내분비 전구 세포는 그의 NKX2.2 및 NeuroD1 발현을 특징으로 할 수 있다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "췌장 내분비 세포"는 하기 호르몬들 중 하나 이상을 발현할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 및 췌장 폴리펩티드. 이들 호르몬에 부가하여, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커는 NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, ARX, NKX2.2, HB9 및 PAX6 중 하나 이상을 포함한다.

[0060] "베타 세포" ("β 세포")는 인슐린을 발현할 수 있지만 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린 및 췌장 폴리펩티드는 발현할 수 없는 췌장 내분비 세포이다. β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 췌장 내분비 세포는 그의 인슐린 및 하기 전사 인자들 중 하나 이상의 발현을 특징으로 할 수 있다: PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3β, HB9, MAFA 및 PAX6.

[0061] "기능성 베타-세포"는 신속하고 조절된 글루코스-자극된 인슐린 분비 ("GSIS"), 구체적으로는 미토콘드리아 호흡/활성의 증가, 이어서 인슐린 분비의 제1 상 및 제2 상 ("이중상 GSIS")의 증가를 보장하는 잘 확립된 과정을 나타내는 췌장 내분비 세포이다. 상세하게는, 기능성 베타-세포는 이중상 GSIS의 하기 특징 중 하나 이상을 나타낸다: (i) 인슐린 분비를 이용한 미토콘드리아 호흡/활성의 커플링; (ii) 고조된 요구 (여기서는 높은 글루코스 농도로서 정의됨)에 대한 신속한 인슐린 분비 반응; (iii) 요구가 진정된 후에 인슐린 분비를 신속하게 턴오프하는 능력; (iv) 인슐린 분비의 "온-오프" 스위칭의 다중 라운드에 대한 능력; (v) 요구에 의해 지시된 바와 같이 정확한 양의 인슐린을 분비하는 능력; 및 (vi) 다중 인슐린 분비촉진물질 (예를 들어, 엑센딘 -4, 또는 아미노산 – L-글루타민 및 L-아르기닌)에 반응하는 능력. 기능성 β 세포는 그의 인슐린 및 하기 전사 인자들 중 하나 이상의 발현을 특징으로 할 수 있다: PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3β, HB9, PAX6, MAFA, SLC2A1, UCN3 및 GLP1R.

[0062] "미성숙 베타 세포"는 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡/활성을 나타내지 않는 췌장 내분비 세포이며, 이중상 GSIS 이다. β 세포에 특징적인 마커를 발현하는 미성숙 베타 세포는 그의 인슐린 및 하기 전사 인자들 중 하나 이상의 발현을 특징으로 할 수 있다: PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3β, HB9, MAFA 및 PAX6.

[0063] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "공기-액체 계면" 또는 "ALI"는 개방된 배양 용기 또는 부분적으로 배지로 채워진 배양 용기에 존재하는 공기-액체 계면을 말한다. 본 명세서에서 편의상 "공기"로 지칭하였지만, 본 발명은 주위 환경에서 발견되는 조성 및 기체의 혼합물로 한정되지는 않는다. 구체적으로, 본 발명은 주위 환경과 다른 조성을 갖는, 예를 들어, 특정 성분에 대해 농축된 혼합물 또는 특정 성분이 고갈되거나 제거된 혼합물을 포함하는 기체 혼합물을 고려하고 포함한다.

[0064] "d1", "1d", 및 "제1일"; "d2", "2d", 및 "제2일" 등은 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 이들 숫자 문자 조합은 본 출원의 단계적 분화 프로토콜 중의 상이한 단계에서의 인큐베이션의 특정 일을 지칭한다.

[0065] 제1 상 (1st) 인슐린 분비는 글루코스 농도의 갑작스런 증가 시에, 결합되고 용이하게 방출가능한 인슐린 과립의 작은 풀의 신속한 엑소사이토시스를 나타낸다.

[0066] 진폭이 낮지만 1st 상 인슐린 분비에 비교하여 지속기간이 더 긴 인슐린 분비의 제2 상 (2nd)은 과립의 저장 풀로

부터의 과립의 전위, 및 방출을 위한 그들의 결합/프라이밍을 나타낸다.

[0067] OCR은 산소 소비율로서 정의되며, 구체적으로 전자 수송 사슬 ("ETC")을 통한 미토콘드리아 호흡의 지표이고; 이는 미토콘드리아 활성의 직접적인 측정값이다.

[0068] "유효량" 또는 "치료적 양" 또는 그 안의 등가물은 hESC의 어느 정도의 분화 또는 하나 이상의 이전의 분화 단계에 처해진 것과 같은 부분적으로 분화된 hESC의 추가의 분화를 제공하기 위해 존재해야 하는 화합물의 양을 지칭한다. 추가의 예에서, 화합물은 hESC의 배양 배지에 존재할 수 있거나 일부 성장 단계 중에 hESC에 첨가될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 화합물, 제제, 소분자 또는 성장 인자는 췌장 호르몬 분비 세포를 포함하는 완성 내배엽, 전장, 췌장 전장 및 췌장 내배엽-계통 세포를 생성하기 위해 사용된다. 특정 예에서, 줄기 세포는 임의의 분화 전에 또는 분화의 1기 중에 화합물, 제제, 소분자 또는 성장 인자에 노출될 수 있으며, 반면에 다른 예에서 줄기 세포는, 예를 들어, 완성 내배엽과 같은 중간 세포 유형으로 먼저 분화된 후에 화합물, 제제, 소분자 또는 성장 인자에 노출될 수 있다.

[0069] 본 발명의 "화합물", "소분자 화합물" 또는 그의 등가물은 본 명세서에 개시된 일반 화학식 (예를 들어, 표 XI)에 포함되는 화합물을 지칭하며, 그의 구조가 본 명세서에 개시된 화학식 또는 그의 유사체 내의 임의의 특정 화합물을 포함한다. 본 발명의 화합물은 그들의 화학 구조 또는 화학명에 의해 동정될 수 있다. 화학 구조 및 화학명이 상충되는 경우, 화학 구조가 화합물의 정체를 결정한다. 본 발명의 화합물은 하나 이상의 키랄 중심 또는 이중 결합을 함유할 수 있으므로, 입체이성질체, 예컨대 이중-결합 이성질체 (즉, 기하 이성질체), 거울상이성질체 또는 부분입체이성질체로서 존재할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 도시된 화학 구조는 입체이성질체적으로 순수한 형태 (예를 들어, 기하학적으로 순수하거나, 거울상이성체적으로 순수하거나 부분입체이성질체적으로 순수함) 및 거울상이성질체 및 입체이성질체의 혼합물을 포함하는 예시된 화합물의 모든 가능한 거울상이성질체 및 입체이성질체를 포함한다. 거울상 이성질체 및 입체이성질체의 혼합물은 당업자에게 잘 알려진 분리 기술 또는 키랄 합성 기술을 사용하여 그들의 성분 거울상이성질체 또는 입체이성질체로 광학분할될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한, 하나 이상의 원자가 천연에서 통상적으로 발견되는 원자 질량과는 상이한 원자 질량을 갖는 동위원소 표지된 화합물을 포함한다. 본 발명의 화합물에 포함될 수 있는 동위원소의 예에는 2H, 3H, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, 31P, 32P, 35S, 18F 및 36Cl이 포함될 수 있지만 이로 제한되지 않는다. 추가로, 본 발명의 화합물의 부분 구조가 예시될 경우, 브래킷은 분자의 나머지에 대한 부분적인 구조의 부착점을 나타내는 것으로 이해되어야 한다.

[0070] ***B. 만능 줄기 세포의 특성화***

[0071] 만능성 줄기 세포는 지정된 TRA-1-60 및 TRA-1-81 항체들 중 하나 이상을 발현할 수 있다(문헌[Thomson *et al.* 1998, *Science* 282:1145-1147]). 시험관내에서 만능 줄기 세포의 분화는 TRA-1-60 및 TRA-1-81 발현의 손실로 이어진다. 미분화된 만능 줄기 세포는 전형적으로 알칼리성 포스파타제 활성을 갖는데, 이러한 활성은 세포를 4% 파라포름알데하이드로 고정한 후, 벡터® 레드 (VECTOR® Red)라는 상표로 판매되는 알칼리성 포스파타제 기질 키트로 제조사 (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 벡터 래버러토리즈, 인크. (Vector Laboratories, Inc.))에 의해 기재된 바와 같이 현상함으로써 측정될 수 있다. 미분화된 만능 줄기 세포는 또한 전형적으로, 역전사 중합효소 연쇄 반응 ("RT-PCR")에 의해 검출되는 바와 같이, OCT4 및 TERT를 발현한다.

[0072] 증식된 만능 줄기 세포의 다른 바람직한 표현형은 모든 삼배엽층, 즉 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 세포로 분화하는 잠재력이다. 줄기 세포의 만능성은, 예를 들어, 세포를 중증 복합형 면역결핍증 (severe combined immunodeficiency, "SCID") 마우스 내로 주사하고, 형성되는 기형종을 4% 파라포름알데하이드를 이용하여 고정하고, 이어서 이들 삼배엽층으로부터의 세포형의 증거에 대해 조직학적으로 조사함으로써 확인될 수 있다. 대안적으로, 만능성은 배양체(embryoid body)를 생성하여 3개의 배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.

[0073] 증식된 만능성 줄기 세포주는 표준 G-밴딩 기술을 이용하여 핵형을 결정하고 상응하는 영장류 종의 공개된 핵형과 비교할 수 있다. "정상 핵형"을 가진 세포를 얻는 것이 바람직한데, 이때 정상 핵형이란, 세포가, 모든 인간 염색체가 존재하며 눈에 띄게 변경되지 않은 정배수체임을 의미한다.

[0074] ***C. 만능 줄기 세포의 공급원***

[0075] 임의의 만능 줄기 세포가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 만능 줄기 세포의 예시적인 유형은 확립된 만능 세포주를 포함하고, 이에는 전-배아 조직 (예컨대, 배반포), 배아 조직, 또는 임신 동안 임의의 시점에, 전형적으로는 그러나 반드시는 아니고, 대략 10 내지 12주의 임신 전에 취해진 태아 조직이 포함된

다. 비제한적인 예는 인간 배아 줄기 세포 ("hESC") 또는 인간 배아 생식 세포, 예컨대 인간 배아 줄기 세포주 H1 (NIH 코드: WA01), H7 (NIH 코드: WA07), H9 (NIH 코드: WA09) (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 WiCell Research Institute), 및 SA002 (스웨덴 고테부르크 소재의 Cellartis AB Corporation))의 확립된 세포주이다.

[0076] 지지 세포(feeder cell)의 부재 하에서 이미 배양된 만능성 줄기 세포 집단으로부터 취해진 세포가 또한 적합하다. 다수의 만능성 관련 전사 인자, 예컨대 OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 및 ZFP42의 강제 발현을 사용하여 성체 체세포로부터 유도한 유도 만능 세포 (IPS) 또는 재프로그래밍된 만능 세포 (문헌[*Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011, 12:165-185]; 또한 IPS, 문헌[*Cell*, 126 (4): 663-676] 참조) 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 인간 배아 줄기 세포는 또한 톰슨(Thomson) 등에 의해 기재된 바와 같이 제조될 수 있다 (미국 특허 제5,843,780호; 문헌[Science, 1998, 282:1145-1147]; 문헌[Curr Top Dev Biol 1998, 38:133-165]; 문헌 *[Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92:7844-7848]). 돌연변이 인간 배아 줄기 세포주, 예컨대 BG01v (미국 조지아주 애선스 소재의 BresaGen), 또는 성체 인간 체세포로부터 유래된 세포, 예컨대 문헌[Takahashi *et al.*, Cell 131:1-12 (2007)]에 개시된 세포 또한 사용될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 만능 줄기 세포는 하기 문헌에 기재된 방법에 따라 유도될 수 있다: 문헌[Li *et al.*, *Cell Stem Cell* 4: 16-19, 2009]; 문헌[Maherali *et al.*, *Cell Stem Cell* 1: 55-70, 2007]; 문헌[Stadtfeld *et al.*, *Cell Stem Cell* 2: 230-240)]; 문헌[Nakagawa *et al*, *Nature Biotechnol* 26: 101-106, 2008)]; 문헌[Takahashi *et al*, *Cell* 131: 861-872, 2007)]; 및 미국 특허 출원 공개 제2011/0104805호. 소정의 실시 형태에서, 본 발명에 사용하기에 적합한 만능 줄기 세포는 "나이브 (naïve)"로 간주될 수 있으며, 문헌[Gafni *et al.*, *Nature*, 504:282, 2013], 및 문헌[Ware *et al.*, PNAS, 111: 4484－4489, 2014]에 기재된 방법에 따라 유도된다. 이들 참고문헌, 특허, 및 특허 출원 모두는, 특히, 만능성 세포의 단리, 배양, 확장 및 분화에 관련되므로, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0077] 만능 줄기 세포의 다른 공급원은 유도 만능 줄기 세포 (IPS, 문헌[*Cell*, 126(4):663-676])를 포함한다. 적합한 세포의 또 다른 공급원은 인간 탯줄 조직-유래 세포, 인간 양수-유래 세포, 인간 태반-유래 세포, 및 인간 반수성개체 (parthenote)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 탯줄 조직-유래 세포는 미국 특허 제7,510,873호의 방법으로 얻어질 수 있다. 다른 실시 형태에서, 태반 조직-유래 세포는 미국 특허 출원 공개 제2005/0058631호의 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 다른 실시 형태에서, 양수-유래 세포는 미국 특허 출원 공개 제2007/0122903호의 방법을 사용하여 얻을 수 있다. 이들 특허 출원들 각각의 개시는 세포의 단리 및 특성화에 관련되므로 전체적으로 본 명세서에 포함된다. 소정 실시 형태에서, 만능성 줄기 세포는 비-배아 기원의 것일 수 있다.

[0078] ***D. 만능 줄기 세포의 확장 및 배양***

[0079] 만능 줄기 세포를 확장하고 배양하는 다수의 상이한 공지된 방법들이 청구된 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 만능 줄기 세포는 적합한 배양 기재 상에 플레이팅될 수 있다. 일 실시 형태에서, 적합한 배양 기재는 세포외 매트릭스 성분, 예컨대, 기저막으로부터 유래된 것들 또는 부착 분자 수용체-리간드 커플링의 일부를 형성할 수 있는 것들이다. 적합한 배양 기재는 매트리겔(MATRIGEL)™이라는 상표로 판매되는 재구성된 기저막 (미국 뉴욕주 코닝 소재의 코닝 인코포레이티드 (Corning Incorporated))이다. 매트리겔™은 실온에서 겔화하여 재구성된 기저막을 형성하는 엔젤브레스-홈 스왐 (Engelbreth-Holm Swarm) 종양 세포 유래의 가용성 제제이다.

[0080] 당업계에 공지된 다른 세포외 매트릭스 성분 및 성분 혼합물이 대안으로서 적합하다. 증식되는 세포형에 따라, 이것은 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 헤파린 설페이트 등을 단독으로 또는 다양한 조합으로 포함할 수 있다.

[0081] 적합한 분포로, 그리고 세포 생존, 증식, 및 바람직한 특징의 보유를 촉진하는 배지의 존재 하에, 만능 줄기 세포를 기재 상에 플레이팅할 수 있다. 모든 이들 특성은 시딩 분포에 세심한 주의를 기울여 이익을 얻으며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 적합한 배양 배지는 하기 성분으로부터 제조될 수 있다: 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 Life Technologies Corporation 에 의해 상표명 GIBCO® (카탈로그 번호 11965-092)로 판매되는 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's medium) ("DMEM"); Life Technologies Corporation에 의해 상표명 GIBCO® (카탈로그 번호 10829-018)로 판매되는 녹아웃 (Knockout) 둘베코 변형 이글 배지 ("KO DMEM"); 햄 (Ham's) F12/50% DMEM 기본 배지; Life Technologies에 의해 상표명 GIBCO® (카탈로그 번호 25030-081)로 판매되는 200 mM L-글루타민; Life Technologies에 의해 상표명 GIBCO® (카탈로그 번호 11140-050)로 판매되는 비-필수 아미노산 용액; β-메르캅토에탄올, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma-Aldrich Company (카탈로그 번호 M7522); Life Technologies에 의해 상표명 GIBCO® (카탈로그 번호

13256-029)로 판매되는 인간 재조합 염기성 섬유아세포 성장 인자 ("bFGF"). 인간 배아 줄기 세포의 대규모 확장 및 조절된 분화 과정은 또한 현탁 생물반응기를 사용하여 달성될 수 있다.

[0082] ***E. 만능 줄기 세포의 분화***

[0083] 만능 세포가 기능성 β 세포로 분화될 때, 그들은 다양한 단계들을 거쳐 분화되며, 각각의 단계는 특정 마커의 존재 또는 부재를 특징으로 할 수 있다. 이들 단계로의 세포의 분화는 배양 배지에 첨가되는 소정의 인자들의 존재 및 결여를 포함하는 구체적인 배양 조건들로 달성된다. 일반적으로, 이러한 분화는 만능 줄기 세포의 완성 내배엽 계통 및 완성 내배엽 세포로의 분화를 포함할 수 있다. 이어서, 세포는 원시 장관 세포로 추가로 분화될 수 있으며, 이는 이어서 결국 전장 내배엽 세포로 분화될 수 있다. 전장 내배엽 세포는 췌장 내배엽 세포로 분화될 수 있으며, 이는 이어서 췌장 내분비 전구 세포 또는 췌장 내배엽/췌장 내분비 전구 세포로 추가로 분화될 수 있다. 이 세포는 췌장 호르몬 생성 또는 분비 세포로 분화될 수 있다. 본 출원은, 바람직하게는 배지로 일부 충전된 배양 용기 내에 존재하는 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 세포를 배양함으로써, 구체적으로는 5기 내지 7기 중 하나 이상에서 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 세포를 배양함으로써, 만능 줄기 세포의 췌장 내분비 세포로의 단계별 분화를 제공한다.

[0084] 갑상선 호르몬인 트라이요오도타이로닌 ("T3") 및 타이록신 ("T4"), 및 이들의 유사체 중 하나 이상이, 단독으로 또는 ALK-5 억제제와의 추가의 조합으로, 분화의 1기 내지 7기 중 하나 이상에서, 바람직하게는 5기 내지 7기 각각에서 세포 배양에 사용될 수 있다. 대안적으로, ALK-5 억제제는 분화의 하나 이상의 단계에서, 그러나 바람직하게는 5기 내지 7기 각각에서, 더욱 바람직하게는 5기 및 6기에서 단독으로 사용될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 갑상선 호르몬 또는 이들의 유사체 중 하나 이상 및 ALK5 억제제가 하나 이상의 분화 단계에서, 바람직하게는 5기 및 6기에서, 더욱 바람직하게는 5기 및 6기 각각에서 사용된다. 적합한 갑상선 호르몬 유사체는, 제한 없이, GC-1 (소버티롬) (미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 R&D Systems, Inc.로부터 입수가능함); 3,5-다이요오도트라이프로피온산 ("DIPTA"); 문헌[*J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008, 111: 262-267] 및 문헌[*Proc. Natl. Acad.* Sci. 2001, 2003(100), 10067-10072]에 논의된 KB-141; 문헌[*Proc. Natl. Acad.* Sci. 2001, 2007(104), 15490-15495]에 논의된 MB07344; 문헌[*J. Lipid Res.*, May 2009, 50:938] 및 문헌[*Endocr. Pract. 2012*, 18(6): 954-964]에 논의된 T0681을 포함할 수 있으며, 이들은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 유용한 ALK5 억제제는, 또한 바람직한 ALK5 억제제인 ALK5 억제제 II (미국 뉴욕주 파밍데일 소재의 Enzo Life Sciences, Inc.); ALK5i (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Axxora, Inc.), SD208 (R&D Systems); TGF-β 억제제 SB431542 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Xcess Biosciences, Inc.); ITD-1 (Xcess Biosciences); LY2109761 (Xcess Biosciences); A83-01 (Xcess Biosciences); LY2157299 (Xcess Biosciences); TGF-β 수용체 억제제 V (미국 뉴저지주 깁스타운 소재의 EMD Millipore Chemical);TGF-β 수용체 억제제 I (EMD Millipore); TGF-β 수용체 억제제 IV (EMD Millipore); TGF-β 수용체 억제제 VII (EMD Millipore); TGF-β 수용체 억제제 VIII (EMD Millipore); TGF-β 수용체 억제제 II (EMD Millipore); TGF-β 수용체 억제제 VI (EMD Millipore); 및 TGF-β 수용체 억제제 VI (EMD Millipore)를 포함한다.

[0085] 본 발명의 부가적인 바람직한 실시 형태에서, 본 방법은 하나 이상의 단계에서 세포를 처리하는 단계, 그러나 바람직하게는 7기 중에 항산화제, 예컨대 비타민 E, 아세틸 시스테인, 비타민 C, 항산화 보충물 (카탈로그 번호 A1345, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma-Aldrich Company, LLC), 글루타티온, 수퍼옥사이드 디스뮤타제, 카탈라제 등 및 이들의 조합 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 분화 배지로 세포를 처리하는 단계를 포함한다. 더욱 더 바람직한 실시 형태에서는, 6기를 실행함에 있어서, 감마 세크레타제 억제제가 사용되며, 이는 감마 세크레타제 억제제 XX (EMD Millipore), 감마 세크레타제 억제제 XXI (EMD Millipore), 감마 세크레타제 억제제 XVI (EMD Millipore), N-[(3,5-다이플루오로페닐)아세틸]-L-알라닐-2-페닐]글리신-1,1-다이메틸에틸 에스테르 ("DAPT") (카탈로그 번호 2634, 영국 브리스톨 소재의 Tocris Bioscience) 등 및 이들의 조합일 수 있다. 감마 세크레타제 저해제의 유용한 양은 약 50 nM 내지 5000 nM, 바람직하게는 약 50 nM 내지 500 nM일 수 있다. 항산화제의 양은 약 0.1 내지 100 μM, 대안적으로 약 0.1 내지 20 μM, 및 바람직하게는 약 1 내지 10 μM일 수 있다. 대안적으로, 항산화제의 유용한 양은 약 100 nM 내지 5 mM, 약 1000 nM 내지 2 mM, 및 바람직하게는 약 0.1 내지 1 mM일 수 있다.

[0086] 본 발명의 실시 형태에서, 분화의 하나 이상의 단계의 배지에, 바람직하게는 6기 및 7기 중 하나 또는 둘 모두에서 소정의 소분자가 사용된다. 관심의 대상인 소분자는 오로라 키나제, p90 리보솜 S6 키나제, 또는 메틸 트랜스퍼라제 수용체 DOT1L을 억제할 수 있는 것들이며, 바람직하게는 배양된 세포의 산화적 스트레스를 감소시키는 항산화제와 함께 사용된다. 특히 관심의 대상인 것은 오로라 키나제 억제제 II 및 RSK 억제제 II이다. 오로라 키나제 억제제 II는 (4-(4′-벤즈아미도아닐리노)-6,7-다이메톡시퀴나졸린)의 명칭으로 공지된 세포 투과

성 화합물이다. RSK 억제제 II는 다이하이드로프테리디논 2-(3,5-다이플루오로-4-하이드록시-아닐리노)-8-아이소펜틸 -5,7-다이메틸-7H-프테리딘-6-온의 라세미 혼합물이다. 관심의 대상인 다른 오로라 키나제 억제제는 ZM447439 및 PF03814735를 포함한다. DOT1L의 단백질 메틸트랜스퍼라제 수용체 억제제, 특히 EPZ-5676 또한 관심의 대상이다. EPZ-5676은 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 S-아데노실 메티오닌 ("SAM") 억제제이다. 이 화합물은 세포 증식을 억제하는 것으로 나타난 DOT1L (텔로미어 침묵 1 교란제-유사(disruptor of telomere silencing 1-like)) 메틸트랜스퍼라제 억제제이다. 이는 화학명 9H-퓨린-6-아민, 9-[5-데옥시-5-[[시스-3-[2-[6-(1,1-다이메틸에틸)-1H-벤즈이미다졸-2-일]에틸]사이클로부틸](1-메틸에틸)아미노]-β-D-리보푸라노실]- 및 (2R,3R,4S,5R)-2-(6-아미노퓨린-9-일)-5-[[[3-[2-(6-tert-부틸-1H-벤즈이미다졸-2-일)에틸]사이클로부틸]-프로판-2-일아미노]메틸]옥솔란-3,4-다이올로 알려져 있다. 관심의 대상인 추가의 억제제는 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 5-아자시티딘 ("AZT"), 히스톤 데아세틸라제 억제제, 예컨대 피록사미드 및 CI994이다. 관심의 대상인 추가의 분자는 UNC0638, UNC0646, UNC0642 및 A366 (G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), TC-E5003 (PRMT1 아르기닌 메틸트랜스퍼라제 억제제), SB747651A 다이하이드로클로라이드 (MSK1 억제제; 다른 AGC 그룹 키나제 또한 억제함), PFI1 (BET 브로모도메인 억제제), LY303511 (BRD2, BRD3 및 BRD4 억제제), MS436 (BRD4 브로모도메인 억제제), 및 MC1568 (HDAC 클래스 II를 선택적으로 억제함), 및 3-데아자네플라노신 A ("DEZA")를 포함한다.

[0087] 본 발명의 바람직한 실시 형태에서, 소분자는 6기 및 7기 중 하나 이상의 배지에서 그리고 더욱 바람직하게는 7기에서 사용된다. 유용한 소분자의 양은 성숙 마커의 최고 발현을 보이는 양을 선택함으로써 결정될 수 있고 그러한 양은 독성 효과를 생성하지 않는다. 전형적으로, 유용한 양은 약 500 nM 내지 10 μM, 대안적으로, 약 500 nM 내지 5 μM, 및 바람직하게는 약 500 nM 내지 2 μM일 것이다.

[0088] **성숙 표현형을 갖는 췌장 내분비 세포(기능성 베타-세포)의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 만능 세포의 분화**

[0089] 만능성 줄기 세포의 특징은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 만능성 줄기 세포의 추가의 특징은 계속 확인되고 있다. 만능 줄기 세포 마커는, 예를 들어, 하기 중 하나 이상의 발현을 포함한다: ABCG2, 크립토, FOXD3, 코넥신43, 코넥신45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. 이들은 RT-PCR로 검출 가능할 수 있다.

[0090] 예시적인 만능 줄기 세포는 인간 배아 줄기 세포주 H9 (NIH 코드: WA09), 인간 배아 줄기 세포주 H1 (NIH 코드: WA01), 인간 배아 줄기 세포주 H7 (NIH 코드: WA07) 및 인간 배아 줄기 세포주 SA002를 포함한다. 만능 세포의 특징적인 하기 마커 중 하나 이상을 발현하는 세포 또한 적합하다: ABCG2, 크립토, CD9, FOXD3, 코넥신43, 코넥신45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 및 TRA-1-81.

[0091] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커를 발현하는 세포는 원시선 전구 세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통에 특징적인 마커를 발현하는 세포는 중내배엽 세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 완성 내배엽 세포이다.

[0092] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 또한 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 태양에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내배엽 세포이며, 여기서 PDX1 및 NKX6.1의 발현은 CDX2 및 SOX2의 발현보다 사실상 더 높다. 소정의 실시 형태에서, FACS로 측정된 바와 같이, 세포들의 30% 초과는 PDX1 및 NKX6.1을 발현하고 세포들의 30% 미만은 CDX2 또는 SOX2를 발현한다. PDX1 및 NKX6.1의 발현이 CDX2 또는 SOX2의 발현보다 적어도 2배 더 높은 세포가 특히 유용하다.

[0093] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 또한 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 태양에서, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내분비 세포이다. 췌장 내분비 세포는 하기 호르몬 중 하나 이상을 발현할 수 있는 췌장 호르몬-발현 세포일 수 있다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 또는 췌장 폴리펩티드. 바람직한 실시 형태에서, 췌장 내분비 세포는 인슐린-생산 β 세포이다.

[0094] 본 발명의 소정의 실시 형태에서, 기능성 베타-세포 (성숙 표현형의 췌장 내분비 베타 세포)의 특징적인 마커를 발현하는 세포에 도달하기 위해, 만능 줄기 세포로 시작하는 프로토콜이 사용된다. 이 프로토콜은 다음을 포함한다:

1기: 세포 배양 라인에서 얻어진 배아 줄기 세포와 같은 만능 줄기 세포를 적당한 인자로 처리하여 완성 내배엽 세포의 형성을 유도한다.
2기: 1기에서 생성된 세포를 적당한 인자로 처리하여 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 유도한다.
3기: 2기에서 생성된 세포를 적당한 인자로 처리하여 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다.
4기: 3기에서 생성된 세포를 적당한 인자로 처리하여 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다. 세포는 4기 후기에 공기-액체 계면에서, 또는 현탁 배양에서 임의로 추가 배양되며; 4기 후기의 경우에는 세포를 공기-액체 계면으로 이행시키거나, 현탁액 중에 배양되는 클러스터로서 응집시킨다.
5기: 4기에서 생성된 세포를, 소정의 실시 형태에서, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상; (ii) ALK5 억제제; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 모두를 포함하는 적당한 인자로 처리하고, 임의로 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양하여 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도한다.
6기: 5기에서 생성된 세포를, 소정의 실시 형태에서, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상; (ii) ALK5 억제제; (iii) 감마 세크레타제 억제제, RSK 억제제, 골형성 단백질 (BMG) 수용체 억제제 및 DOT1L 의 단백질 메틸트랜스퍼라제 억제제 중 하나 이상; (iv) (i) 및 (ii) 둘 모두; (v) (i), (ii) 및 (iii); (vi) (i) 및 (iii); 또는 (vii) (ii) 및 (iii)을 포함하는 적당한 인자로 처리하고, 임의로 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양하여 췌장 내분비 세포, 특히 미성숙 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도한다.
7기: 6기에서 생성된 세포를, 소정의 실시 형태에서, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상; (ii) ALK5 억제제; (iii) 산화방지제, (iv) 오로라 키나제 억제제, RSK 억제제 및 DOT1L 의 단백질 메틸트랜스퍼라제 억제제 중 하나 이상; (v) (i) 및 (ii); (vi) (i) 및 (iii); (vii) (i) 및 (iv); (viii) (ii) 및 (iii); (ix) (ii) 및 (iv); (x) (i), (ii) 및 (iii); (xi) (i), (iii) 및 (iv); (xii) (ii), (iii) 및 (iv); (xiii) (i), (ii) 및 (iv); (xiv) (iii) 및 (iv); 또는 (xv) (i), (ii), (iii) 및 (iv)를 포함하는 적당한 인자로 처리하고, 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양하여, 단일 호르몬 인슐린을 발현하고 PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA 양성이며 6기 세포보다 더 높은 수준의 MAFA 발현을 갖는 기능성 베타-세포, 췌장 내분비 세포의 형성을 유도하며, 생성된 세포 집단은 6기 세포보다 더 높은 MAFA 양성 및 단일 호르몬 인슐린 발현 세포 둘 모두의 백분율을 갖는다.

[0095]

[0096] 소정의 실시 형태에서 본 발명은 만능 줄기 세포 (예를 들어, 전 (pre)-1기 세포)의 7기 세포로의 분화를 포함하지만, 본 발명은 또한 다른 단계에서 7기 세포로의 세포 분화를 포함한다. 특히, 본 발명은 4기 내지 7기 세포의 분화를 포함한다. 과정이 개별 단계들로 기재되어 있지만, 분화 과정에 걸친 세포의 처리 및 진행은 순차적이거나 연속적일 수 있다. 만능 줄기 세포의 6기 또는 7기 세포로의 분화는 현탁 배양에서 실행될 수 있다.

[0097] 분화의 효율은 관심 분화 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 작용제, 예컨대 항체에, 처리된 세포 집단을 노출시킴으로써 결정될 수 있다. 배양되거나 단리된 세포에서 단백질 및 핵산 마커의 발현을 평가하는 방법은 당업계에서의 표준이다. 이러한 방법은 RT-PCR, 노던 블롯(Northern blot), 제자리 (*in situ*) 혼성화 (예를 들어, 문헌[*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds. 2001 supplement)] 참조), 및 면역분석, 예컨대, 절편화된 재료의 면역조직화학적 분석, 웨스턴 블롯팅 및 온전한 상태의 세포에서 접근가능한 마커의 경우 유세포분석(FACS) (예를 들어 문헌[Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)] 참조)을 포함한다.

[0098] 분화 세포는 또한 추가로 정제될 수 있다. 예를 들어, 만능 줄기 세포를 본 발명의 방법으로 처리한 후, 분화 세포는, 정제되는 분화 세포에 의해 특징적으로 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 작용제, 예컨대 항체에, 처리된 세포 집단을 노출시켜 정제될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 분화된 세포는 정제되지 않는다.

[0099] 세포 분화에 바람직한 충분한 양의 비타민, 미네랄, 염, 글루코스, 아미노산 및 담체 단백질을 함유하는 임의의 적합한 성장 배지가 다양한 1기 내지 7기에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 하기를 사용한다: 1기- MCDB-131 (미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 Life Technologies Corporation으로부터 입수가능함) 또는 RPMI (Sigma-Aldrich로부터 입수가능함); 2기 – MCDB-131 또는 둘베코 변형 이글 배지 F12 ("DMEM – F12"); 3기 내지 5기 – MCDB-131, BLAR (표 1 및 표 IV), 또는 DMEM; 및 6기 및 7기 – BLAR 또는 CMRL (Life Technologies). 바람직하게는, 배지의 글루코스 농도는 1기 내지 4기에 대해서는 약 10 mM로 또는, 더욱 바람직하게는, 약 10 mM 미만으로, 그리고 5기 내지 7기에 대해서는 약 10 mM 초과로 유지된다. 바람직하게는 7기의 경우, 배지는 충분한 양의 비타민, 비-필수 아미노산, 지질, 소듐 피루베이트 및 미량 원소, 예를 들어 제형 I 을 함유한다.

[0100] **1기: 만능 세포의 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0101] 만능 줄기 세포는 당업계에 공지된 방법에 의해, 또는 본 발명에 제안된 방법에 의해 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기에 유용한 것으로 보고된 방법은 문헌 [D'Amour *et al.*, Nature *Biotechnology* 23, 1534-1541 (2005)]; 문헌[Shinozaki *et al.*, *Development* 131, 1651-1662 (2004)]; 문헌[McLean *et al.*, *Stem Cells* 25, 29-38 (2007)]; 및 문헌[D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology* 24, 1392- 1401 (2006)]에 개시되어 있다. 부가적인 적합한 분화 방법이 미국 특허 출원 공개 제2007/0254359호; 미국 특허 출원 공개 제2009/0170198호; 미국 특허 출원 공개 제2011/0091971호; 미국 특허 출원 공개 제2010/0015711호; 미국 특허 출원 공개 제2012/0190111호; 미국 특허 출원 공개 제2012/0190112호; 및 미국 특허 출원 공개 제2012/0196365

호에 개시되어 있다. 이들 개시는 만능 줄기 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화에 관련되므로 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0102] 일 실시 형태에서, 만능 세포는 적합한 성장 배지, 바람직하게는 MCDB-131 또는 RPMI로 처리된다. 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도하도록 배지는 바람직하게는 성장 분화 인자, 예컨대 성장 분화 인자 8 ("GDF8"), 및 글리코겐 합성효소 키나제-3 β ("GSK3β") 저해제, 예컨대 미국 특허 출원 공개 제2010/0015711호 (전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 환형 아닐린-피리딘트라이아진 화합물로 보충된다. 바람직한 GSK3β 억제제는 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로[19.3.1.1 ~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 ("MCX 화합물")이다. 처리는 만능 줄기 세포를 약 50 ng/ml 내지 약 150 ng/ml, 대안적으로 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml, 바람직하게는 약 100 ng/ml의 GDF8로 보충된 배지와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 처리는 또한 세포를 약 0.1 내지 약 5 μM, 대안적으로 약 0.5 내지 약 2.5 μM, 바람직하게는 약 1 μM의 MCX 화합물과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 만능 세포는 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 촉진하기 위해 약 2 내지 5일, 바람직하게는 약 2 내지 3일 동안 배양될 수 있다.

[0103] 바람직한 실시 형태에서, 세포는 GDF8 및 MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양된 후, GDF8 및 더 낮은 농도의 MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양된 후, MCX 화합물의 부재 하에서의 GDF8의 존재 하에 1일 동안 배양된다. 특히, 세포는 GDF8 및 약 1 μM MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양된 후, GDF8 및 약 0.1 μM MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양된 후, MCX 화합물의 부재 하에서의 GDF8의 존재 하에 1일 동안 배양된다. 대안적으로, 세포는 GDF8 및 약 1 μM MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양된 후, GDF8 및 약 0.1 μM MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양될 수 있다.

[0104] 대안적으로, 만능 줄기 세포는, 문헌[D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology* 23, 1534-1541 (2005)]에 개시된 바와 같이, 혈청의 부재 하에 액티빈 A를 함유하는 배지에서 배양되고, 이어서 세포를 액티빈 A 및 혈청과 함께 배양한 후, 세포를 상이한 농도의 혈청 및 액티빈 A와 함께 배양할 수 있다. 다른 대안에서, 만능 줄기 세포는, 문헌[D' Amour *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2005]에 개시된 바와 같이, 혈청의 부재 하에 액티빈 A를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 혈청과 함께 액티빈 A와 함께 세포를 배양하는 단계에 의해 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. 또한, 만능 줄기 세포는, 문헌[D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology* 24, 1392-1401 (2006)]에 개시된 바와 같이, 혈청의 부재 하에 액티빈 A 및 WNT 리간드를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 WNT 리간드를 제거하고 혈청과 함께 액티빈 A와 함께 세포를 배양하는 단계에 의해 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.

[0105] 본 발명의 일 실시 형태에서, 만능 줄기 세포는 액티빈 A 및 WNT3A로 처리되어 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 야기한다. 처리는 만능 줄기 세포를 약 50 ng/ml 내지 약 150 ng/ml, 대안적으로 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml, 대안적으로 약 100 ng/ml의 액티빈 A와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 처리는 또한 세포를 약 10 ng/ml 내지 약 50 ng/ml, 대안적으로 약 15 ng/ml 내지 약 30 ng/ml, 대안적으로 약 20 ng/ml의 WNT3A와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 만능 세포는 완성 내배엽 세포에 도달하기 위해 대략 3일 동안 배양될 수 있다. 일 실시 형태에서, 세포는 액티빈 A 및 WNT3A의 존재 하에서 1일 동안 배양된 후, 나머지 동안에는 (WNT3A가 존재하지 않는 상태로) 액티빈 A의 존재 하에서 배양된다.

[0106] 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 검출하기 위해, 특정 프로토콜을 실행하기 전과 후에 마커의 존재에 대해 세포를 시험할 수 있다. 만능성 줄기 세포는 전형적으로 그러한 마커를 발현하지 않는다. 따라서, 만능 세포의 분화는 세포가 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하기 시작할 때 검출될 수 있다.

[0107] **2기: 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0108] 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 성장 배지, 예컨대 MCDB-131 또는 DMEM-F12에서 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화될 수 있다. 일 실시 형태에서, 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성은 섬유아세포 성장 인자 ("FGF"), 바람직하게는 FGF7 또는 FGF10을 함유하는 배지로 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양하여 세포를 분화시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 세포 배양물은 약 10 ng/ml 내지 약 75 ng/ml, 대안적으로 약 25 ng/ml 내지 약 75 ng/ml, 더욱 대안적으로 약 30 ng/ml 내지 약 60 ng/ml, 대안적으로 약 50 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자, 바람직하게는 FGF7 또는 FGF10,

더욱 바람직하게는 FGF7, 및 가장 바람직하게는 약 25 ng/ml FGF7을 포함할 수 있다. 세포는 이러한 조건 하에서 약 2 내지 3일, 바람직하게는 약 2일 동안 배양될 수 있다.

[0109] 다른 실시 형태에서, 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성은 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 섬유아세포 성장 인자, 바람직하게는, FGF7 또는 FGF10, 및 아스코르브산 (비타민 C)과 함께 배양하는 것을 포함한다. 배양 배지는 약 0.1 mM 내지 약 0.5 mM 아스코르브산, 대안적으로 약 0.2 mM 내지 약 0.4 mM 아스코르브산, 대안적으로 약 0.25 mM의 아스코르브산을 포함할 수 있다. 세포 배양물은 또한 약 10 ng/ml 내지 약 35 ng/ml, 대안적으로 약 15 ng/ml 내지 약 30 ng/ml, 대안적으로 약 25 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자, 바람직하게는 FGF7 또는 FGF10, 더욱 바람직하게는 FGF7을 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포 배양물은 약 0.25 mM의 아스코르브산 및 약 25 ng/ml의 FGF7을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 1기 세포는 FGF7 및 아스코르브산으로 2일 동안 처리된다.

[0110] **3기: 원시 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0111] 2기에서 생성된 원시 장관 세포는 성장 배지, 예컨대 MCDB-131, DMEM, 또는 주문 제작 (custom) 배지, 예컨대 BLAR (표 I)에서 이들 세포를 배양하는 단계에 의해 3기 세포, 또는 전장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화될 수 있다. 배지는 (i) 섬유아세포 성장 인자, 바람직하게는 FGF7 또는 FGF10, 더욱 바람직하게는 FGF7; (ii) 레티노산 ("RA"); (iii) 1-피페라진아민, N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)- 또는 ((E)-4-벤질-N-((3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일) 메틸렌]-4-(페닐메틸)- 또는 ((E)-4-벤질-N-((3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일), 에틸렌-피페라진-1-아민)인 소닉 헤지호그 (Sonic Hedgehog) ("SHH") 신호전달 경로 길항제 (예컨대 평활화 길항제 1 (Smoothened Antagonist 1) ("SANT-1"), 2-메톡시에틸 1,4,5,6,7,8-헥사하이드로-4-(3하이드록시페닐)-7-(2-메톡시페닐)-2-메틸-5-옥소-3-퀴놀린카르복실레이트인 HPI-1, 바람직하게는 SANT-1; (iv) 단백질 키나제 C ("PKC") 활성화제, 예컨대 ((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(트라이플루오로메틸)페닐)-2,4-펜타다이엔오실아미노)벤조락탐) ("TPB"), 포볼-12,13-다이부티레이트 ("PDBu"), 포볼-12-미리스테이트-13-아세테이트 ("PMA") 또는 인돌락탐 V ("ILV"), 바람직하게는 TPB; (v) 골형성 단백질 ("BMP") 억제제, 예컨대 LDN-193189, 노긴 또는 코르딘, 바람직하게는 LDN-193189; 및 (vi) 아스코르브산으로 보충될 수 있다. 대안적으로, 평활화 ("SMO") 수용체 억제제 (예컨대, MRT10 (N[[[3-벤조일아미노)페닐]아미노]티옥소메틸]-3,4,5-트라이메톡시벤즈아미드)) 또는 사이클로파민 또한 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포 배양물은 약 100 nM 내지 약 500 nM, 대안적으로 약 100 nM 내지 약 400 nM, 대안적으로 약 200 nM의 PKC 활성화제를 포함할 수 있다. 세포는 이들 성장 인자, 소분자 효능제 및 길항제의 존재 하에서 약 2 내지 4일 동안, 바람직하게는 약 2 내지 3일 동안, 더욱 바람직하게는 약 2일 동안 배양될 수 있다.

[0112] 대안적으로, 3기 세포는 SMO 수용체 억제제, SANT-1, 레티노산 및 노긴으로 보충된 배양 배지에서 이들 세포를 배양함으로써 2기 세포로부터 얻을 수 있다. 세포는 대략 2 내지 4일, 바람직하게는 약 2일 동안 배양될 수 있다.

[0113] 일 실시 형태에서, 배지는 약 10 ng/ml 내지 약 35 ng/ml, 대안적으로 약 15 ng/ml 내지 약 30 ng/ml, 대안적으로 약 25 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자, 바람직하게는 FGF7 또는 FGF10, 더욱 바람직하게는 FGF7; 약 0.1 mM 내지 약 0.5 mM의 아스코르브산, 대안적으로 약 0.2 mM 내지 약 0.4 mM, 대안적으로 약 0.25 mM의 아스코르브산; 약 0.1 μM 내지 약 0.4 μM의 SANT-1; 약 100 내지 약 300 nM의 TPB; 및 약 50 nM 내지 약 200 nM, 및 약 100 nM의 LDN-193189로 보충된다. 다른 실시 형태에서, 배지는 약 25 ng/ml의 FGF-7, 약 1 μM의 레틴산, 약 0.25 μM의 SANT-1, 약 200 nM의 TPB, 약 100 nM의 LDN-193189, 및 약 0.25 mM의 아스코르브산으로 보충된다.

[0114] 일 실시 형태에서, 배지는 약 0.1 μM 내지 약 0.3 μM의 SANT-1, 약 0.5 μM 내지 약 3 μM의 레티노산 및 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml의 노긴으로 보충된다.

[0115] **4기: 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0116] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은, 임의의 적합한 성장 배지일 수 있고 바람직하게는 MCDB-131, DMEM, 또는 주문 제작 배지, 예컨대 BLAR (표 I)인 분화 배지로 3기 세포를 처리함으로써 4기 세포를 유도하는 단계를 포함한다. 배지는 하기 중 하나 이상으로 보충될 수 있다: (a) TGF-β 수용체 억제제 V, TGF-β 수용체 억제제 I, TGF-β 수용체 억제제 IV, TGF-β 수용체 억제제 VII, TGF-β 수용체 억제제 VIII, TGF-β 수용체 억제제 II,

TGF-β 수용체 억제제 VI, TGF-β 수용체 억제제 III, TGF-β 억제제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 억제제 II; (b) T3, T4, T3의 유사체, T4의 유사체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 갑상선 호르몬; (c) SANT-1 또는 HIP-1로부터 선택되는 SHH 신호전달 경로 길항제; (d) LDN-193189, 노긴 또는 클로딘으로부터 선택되는 BMP 수용체 억제제; (e) TPB, PPBu, PMA 및 ILV로부터 선택되는 PKC 활성화제; (f) FGF-7 또는 FGF-10으로부터 선택되는 섬유아세포 성장 인자; (g) 레티노산; 및 (h) 아스코르브산. 예를 들어, 유용한 분화 배지를 제공하기 위해, 성장 배지, 예컨대 MCDB131 또는, 바람직하게는 BLAR을 SHH 신호전달 경로 길항제 (예컨대, SANT-1 또는 HPI-1), BMP 억제제 (예컨대, LDN-193189, 노긴 또는 코르딘), 아스코르브산, 및 PKC 활성화제 (예컨대, TPB, PDBu, PMA 또는 ILV)로 보충할 수 있다.

[0117] 그러한 배지에서 3기 세포를 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 2 내지 3일, 더욱 바람직하게는 약 3일 동안 배양하는 것은 보통 3기 세포를 4기 세포로 분화시키기에 충분하다. 다른 실시 형태에서, 배지는 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제로 보충될 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 약 0.25 μM의 SANT-1; 약 100 nM의 RA; 약 2 ng/ml의 FGF7; 약 100 nM의 LDN-193189; 약 0.25 mM의 아스코르브산; 및 약 200 nM의 TPB로 보충된 배지로 3일 동안 3기 세포를 처리할 수 있다.

[0118] 4기에서, 세포는 전체 단계 중에, 또는 약 2 내지 3일의 평면 배양 후에 공기-액체 계면에서 배양될 수 있다. 구체적으로 본 발명은, 하기를 포함하는, 공기-액체 계면에서 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포를 분화시키기 위한 시험관내 세포 배양을 제공한다: (a) 배양 용기; (b) 용기의 부피의 일부분만을 충전하기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 배지에 인접하는 용기의 일부분을 충전하는 용기 내의 공기; (d) 매질과 공기 사이의 계면에 위치하는 다공성 기재; 및 (e) 배지가 세포의 표면의 일부분과만 접촉하도록 기재의 표면 상에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포. 대안적으로, 4기는 전체적으로 평면 배양에서 수행될 수 있다.

[0119] 대안적으로 4기에서, 약 2 내지 3일의 평면 배양 후에, 세포를 세포 클러스터로 응집시킬 수 있다. 구체적으로 본 발명은, 하기를 포함하는, 세포 클러스터와 같은 응집된 세포로서 제조된 세포를 분화시키기 위한 시험관내 세포 배양을 제공한다: (a) 세포의 응집을 촉진하거나 세포 클러스터를 형성하는 배양 용기; (b) 상기 용기 내의 성장 배지 (배양 배지)의 부피; 및 (c) 세포가 응집되고 클러스터를 형성하도록 유도되도록 용기 내에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포. 실시 형태에서, 용기는 웰 또는 마이크로웰을 갖는 플레이트, 예컨대, Aggrewell™ 플레이트 (마이크로웰 플레이트; 캐나다 밴쿠버 소재의 STEMCELL Technologies Inc.)이다. 특히, 예를 들어 Aggrewell™ 플레이트를 사용하여, 균일한 크기 및 형상의 세포의 응집체를 형성하기 위해, 마이크로웰을 갖는 플레이트에서 세포 클러스터를 제조한다. 실시 형태에서, 웰 또는 마이크로웰 당 약 500 내지 2000 개의 세포를 접종하여, 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 제조한다. 특히, 웰 또는 마이크로웰 당 약 50 내지 약 3000 개의 세포가 접종되며, 바람직하게는 약 50 내지 약 2000 개의 세포, 약 50 내지 1000 개의 세포, 약 50 내지 약 900 개의 세포, 약 50 내지 약 800 개의 세포, 약 100 내지 약 800 개의 세포, 약 250 개 내지 약 800 개의 세포, 또는 약 500 개 내지 약 800 개의 세포가 접종된다. 더욱 바람직하게는, 웰 또는 마이크로웰 당 약 700 내지 약 800 개의 세포가 접종된다.

[0120] 추가의 실시 형태에서, 세포를 응집시키는 방법에 의해 형성된 세포 클러스터는 현탁 (현탁 배양)에서 추가로 배양될 수 있으며, 이는 웰 또는 마이크로웰로부터 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 제거하는 단계 및 현탁 배양 용기 내에 응집된 세포/세포 클러스터를 접종하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 응집된 세포/세포 클러스터를 약 0.75×10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0×10^6 개의 세포/ml, 바람직하게는 약 1×10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0×10^6 개의 세포/ml, 더욱 바람직하게는 약 1.5×10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0×10^6 개의 세포/ml의 세포 밀도로 현탁 배양물에 접종한다. 당업자에게 공지된 임의의 현탁 배양 시스템이 응집된 세포의 현탁 배양에 유용할 수 있다. 특히, 현탁 배양 시스템은 플라스크 내의 응집된 세포 또는 세포 클러스터, 예컨대 스피너 플라스크 또는 스피너 휠 플라스크를 접종하는 단계를 포함할 수 있다.

[0121] 다른 실시 형태에서, 4기를 완료한 세포 (2 또는 3일의 배양 후)는 로-관련 키나제 (Rho-associated kinase, "ROCK") 억제제, 예컨대 Y27632 ((1R,4r)-4-((R)-1-아미노에틸)-N-(피리딘-4-일)사이클로헥산카르복스아미드), GSK269962 (N-[3-[[2-(4-아미노-1,2,5-옥사다이아졸-3-일)-1-에틸-1H-이미다조[4,5-c]피리딘-6-일]옥시]페닐]-4-[2-(4-모르폴리닐)에톡시]벤즈아미드), H1152 ((S)-(+)-2-메틸-1-[(4-메틸-5-아이소퀴놀리닐)설포닐]호모피페라진, 2HCl) 및, SR3677 (*N*-[2-[2-(다이메틸아미노)에톡시]-4-(1*H*-피라졸-4-일)페닐-2,3-다이하이드로-1,4-벤조다이옥신-2-카르복스아미드 다이하이드로클로라이드)로 처리될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 약 1 내지 20 μM, 약 1 내지 15 μM, 약 1 내지 10 μM, 또는 약 10 μM의 ROCK 억제제가 사용될 수 있다.

[0122] 본 명세서의 본 발명의 소정의 실시 형태에서, 4기 후기 세포, 예를 들어, 부착 평면 배양에서 1 내지 2일 또는

1 내지 3일 동안 배양된 세포만이 4기의 완료를 위해 후속적으로 공기-액체 계면에서 배양되거나 세포 클러스터와 같은 응집된 세포로 배양될 수 있다. 본 명세서의 본 발명의 일 실시 형태에서, ROCK 억제제로 처리된 4기 후기 세포는 공기-액체 계면에서 배양된다. 실시 형태에서, 0.5 내지 약 0.75 × 10^5 개의 세포/마이크로리터를 접종하여 공기-액체 계면에서 배양하고; 대안적으로, 약 2 내지 6 × 10^6 개의 세포를 접종하여 공기-액체 계면에서 배양한다. 다른 실시 형태에서, ROCK 억제제로 처리된 4기 후기 세포를 배양하여 세포를 응집시켜 세포 클러스터와 같은 응집된 세포를 형성한다. 실시 형태에서, 세포는 세포의 응집, 또는 세포 클러스터 (세포의 3 차원 응집체)를 용이하게 하는 용기 내에 접종된다. 일부 실시 형태에서, 용기는 웰 또는 마이크로웰을 갖는 플레이트이다. 특히, 예를 들어 Aggrewell™ 플레이트 (캐나다 밴쿠버 소재의 STEMCELL Technologies Inc.)를 사용하여, 균일한 크기 및 형상의 세포의 응집체를 형성하기 위해, 마이크로웰을 갖는 플레이트에서 세포 클러스터를 제조한다. 실시 형태에서, 웰 또는 마이크로웰 당 약 50 내지 3000 개의 세포를 접종하여, 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 제조한다. 특히, 웰 또는 마이크로웰 당 약 50 내지 약 3000 개의 세포가 접종되며, 바람직하게는 약 50 내지 약 2000 개의 세포, 약 50 내지 1000 개의 세포, 50 내지 900 개의 세포, 50 내지 800 개의 세포, 100 내지 800 개의 세포, 250 개 내지 800 개의 세포, 또는 약 500 개 내지 약 800 개의 세포가 접종된다. 더욱 바람직하게는, 웰 또는 마이크로웰 당 약 700 내지 800 개의 세포를 접종한다. 다른 실시 형태에서, 응집된 세포 또는 세포 클러스터는 현탁액 중에 추가로 배양된다. 소정의 실시 형태에서, 공기-액체 계면에서 배양하는 단계 또는 세포를 응집시키기 위해 배양하는 단계, 예컨대 세포 클러스터를 형성하는 단계 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소, 예컨대 TrypLE™, Accutase™, 또는 Dispase™를 함유하는 용액으로 평면 배양 중의 부착 세포를 처리할 수 있다.

[0123] 대안적인 실시 형태에서, ALK5 억제제, 노긴 및 PKC 활성화제, 예컨대 TPB로 보충된 성장 배지를 포함하는 분화 배지로 3기 세포를 처리함으로써, 3기 세포로부터 4기 세포를 얻을 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 배지는 약 0.1 μM ALK5 억제제, 약 100 ng/mL의 노긴, 및 약 500 nM TPB로 보충될 수 있다. 세포 배양은 단층 포맷일 수 있다. 처리는 총 약 3일 동안 계속될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 세포를 2일 동안 처리한 후, 마지막 날에 세포를 단백질 분해 효소, 콜라겐 분해 효소 또는 둘 모두로 처리하여 단일 세포 현탁액을 생성할 수 있다. 생성되는 세포를 공기-액체 계면에 접종하거나 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 생성하기 위해 접종할 수 있다. 단일 세포를 약 100 마이크로미터 미만의 직경을 갖는 세포 클러스터로 응집시키고, 이어서 ALK5 억제제 및 LDN-193189의 존재 하에 배양할 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 약 100 마이크로미터 미만의 지름을 갖는 세포괴는 약 200 nM ALK5 저해제 및 약 100 nM LDN-193189로 보충된 배지에서 배양될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 4기 세포를 배양하는 단계는 내분비-관련 마커와 함께 췌장 내배엽 마커를 유의하게 향상시킬 수 있다.

[0124] **5기: 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0125] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은, 임의의 적합한 성장 배지일 수 있고 바람직하게는 MCDB-131, DMEM, 또는 주문 제작 배지, 예컨대 BLAR (표 I)인 분화 배지로 4기 세포를 처리하는 단계에 의한, 5기 세포의 생성을 포함한다. 배지는 하기 중 하나 이상으로 보충될 수 있다: (a) TGF-β 수용체 억제제 V, TGF-β 수용체 억제제 I, TGF-β 수용체 억제제 IV, TGF-β 수용체 억제제 VII, TGF-β 수용체 억제제 VIII, TGF-β 수용체 억제제 II, TGF-β 수용체 억제제 VI, TGF-β 수용체 억제제 III, TGF-β 억제제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 억제제 II; (b) T3, T4, T3의 유사체, T4의 유사체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 갑상선 호르몬; (c) SANT-1 또는 HIP-1로부터 선택되는 SHH 신호전달 경로 길항제; (d) LDN-193189, 노긴 또는 클로딘으로부터 선택되는 BMP 수용체 억제제; (e) 레티노산; (f) 아스코르브산; (g) 헤파린; 및 (h) 황산아연, 및 세포를 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 배양하여 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계. 다른 실시 형태에서, 성장 배지는 또한 SMO 억제제 (예컨대, MRT10 또는 사이클로파민) 및 FGF-7 또는 FGF-10으로부터 선택되는 섬유아세포 성장 인자 중 하나 또는 둘 모두로 보충된다. 4기 세포의 처리를 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 실행하여 세포를 5기 세포로 분화시킨다.

[0126] 바람직한 실시 형태에서, 4기 세포는 세포를 약 0.1 μM 내지 약 0.4 μM의 SANT-1 및 바람직하게는 약 0.25 μM SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.1 mM 내지 약 0.5 mM 아스코르브산, 대안적으로 약 0.2 mM 내지 약 0.4 mM 및 바람직하게는 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 50 nM 내지 약 200 nM 및 바람직하게는 약 100 nM LDN-193189, 약 1 μM의 T3, 및 약 10000 nM ALK5 저해제, 더욱 바람직하게는 ALK 5 저해제 II로 보충된 배지로 처리함으로써 5기

세포로 분화된다. 또 다른 실시 형태에서, 세포는 임의로 약 1 내지 15 μM, 대안적으로 약 1 내지 10 μM, 대안적으로 약 5 내지 10 μM, 바람직하게는 약 10 μM의 황산아연 ($ZnSO_4$) 및 약 1 내지 100 μg/ml, 바람직하게는 약 10 μg/ml의 헤파린으로 또한 처리된다. 4기 세포의 처리를 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 수행하여 세포를 5기 세포로 분화시킨다.

[0127] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 4기 세포를 헤파린, SMO 억제제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, RA, BMP 수용체 억제제 및 ALK5 억제제로 보충된 배지로 처리함으로써 5기 세포를 얻는 단계 및 세포를 공기-액체 계면에서 약 3일 동안 배양하여 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 RA, BMP 수용체 억제제 및 ALK5 억제제와 함께 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 모두로 보충될 수 있다. 따라서, 일 실시 형태에서, 4기 세포를 헤파린, $ZnSO_4$, SMO 억제제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, RA, LDN-193189 및 ALK5 억제제 II로 보충된 배지로 4기 세포를 처리함으로써 5기 세포로 분화시킬 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 모두로 보충될 수 있다. 일 실시 형태에서, 4기 세포는 세포를 약 10 μg/ml의 헤파린, 약 0.25 μM SANT-1, 약 50 nM RA, 약 50 nM LDN-193189, 약 10 nM의 T3 및 약 1000 nM ALK5 저해제로 보충된 배지로 처리함으로써 5기 세포로 분화된다. 적합한 ALK5 저해제는 SD-208, ALK5 저해제 II, TGF-β 수용체 저해제 V, TGF-β 수용체 저해제 I, TGF-β 수용체 저해제 IV, TGF-β 수용체 저해제 VII, TGF-β 수용체 저해제 VIII, TGF-β 수용체 저해제 II, TGF-β 수용체 저해제 VI, TGF-β 수용체 저해제 III 및 이들의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 4기 세포의 처리를 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 수행하여 세포를 5기 세포로 분화시킨다.

[0128] 바람직한 실시 형태에서, ALK5 저해제는 ALK5 저해제 II이다. 다른 바람직한 실시 형태에서, 약 10000 nM의 ALK5 저해제 II가 사용된다. 대안적인 바람직한 실시 형태에서, 4기 세포는 약 10 μg/ml의 헤파린, 약 0.25 μM SANT-1, 약 50 nM RA, 약 100 nM LDN-193189, 및 약 10,000 nM (10 mM)의 ALK5 억제제 II로 보충된 배지로 처리된다. 또 다른 대안적인 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 4기 세포를 SMO 억제제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, RA, 및 ALK5 억제제로 보충된 배지로 처리하는 단계 및 세포를 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 배양하여 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 모두로 보충될 수 있다. 일 실시 형태에서, 4기 세포는 세포를 약 0.25 μM SANT-1, 약 50 nM RA, 약 50 nM LDN-193189, 약 1 nM T3 및 약 1000 nM의 ALK5 저해제로 보충된 배지로 처리함으로써 5기 세포로 분화된다.

[0129] 공기-액체 계면에서의 배양을 위해 시딩되는 세포의 양은 다양할 수 있다. 예를 들어, 공기-액체 계면에서 세포를 배양하기 위해, 약 0.5 내지 6 × 10^5 개의 세포/μl를 함유하는 단일-세포 현탁액의 액적이 다공성 기재 (예를 들어, 필터) 상에 접종될 수 있다. 현탁액은 공기-액체 계면에 위치된 필터와 같은 다공성 기재 상에 접종될 수 있는 약 2 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 6 × 10^5 개의 세포/μl; 약 4 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 6 × 10^5 개의 세포/μl; 약 5 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 6 × 10^5 개의 세포/μl; 약 5 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 6 × 10^5 개의 세포/μl; 약 2 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 5 × 10^5 개의 세포/μl; 약 2 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 4 × 10^5 개의 세포/μl; 또는 약 3 × 10^5 개의 세포/μl를 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 약 0.5 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 0.75 × 10^5 개의 세포/μl; 약 0.6 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 0.75 × 10^5 개의 세포/μl; 또는 약 0.5 × 10^5 개의 세포/μl 내지 약 0.6 × 10^5 개의 세포/μl를 함유하는 단일-세포 현탁액의 액적을 ALI에서 배양할 다공성 지지체 상에 접종한다.

[0130] 현탁 배양을 위해, 세포 클러스터를 마이크로웰을 갖는 플레이트에서 생성시키고, 이어서 이를 현탁 배양 시스템에 접종한다. 실시 형태에서, Aggrewell™ 플레이트를 사용하여 응집을 유도하며, 여기에서는 웰 또는 마이크로웰 당 약 50 내지 3000 개의 세포를 접종하여 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 제조한다. 특히, 웰 또는 마이크로웰 당 약 50 내지 약 3000 개의 세포가 접종되며, 바람직하게는 약 50 내지 약 2000 개의 세포, 약 50 내지 1000 개의 세포, 약 50 내지 약 900 개의 세포, 약 50 내지 약 800 개의 세포, 약 100 내지 약 800 개의 세포, 약 250 개 내지 약 800 개의 세포, 또는 약 500 개 내지 약 800 개의 세포가 접종된다. 더욱 바람직하게는, 웰 또는 마이크로웰 당 약 700 내지 약 800 개의 세포가 접종된다. 응집된 세포/세포 클러스터를 약 0.75 × 10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0 × 10^6 개의 세포/ml, 바람직하게는 약 1 × 10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0 × 10^6 개의 세포/ml, 약 1.25 × 10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0 × 10^6 개의 세포/ml, 더욱 바람직하게는 약 1.5

× 10^6 개의 세포/ml 내지 약 2.0 × 10^6 개의 세포/ml의 세포 밀도로 현탁 배양물에 접종한다.

[0131] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 4기 세포를 BMP 수용체 억제제 (예를 들어, LDN-193189, 노긴 또는 코르딘) 및 ALK5 억제제로 보충된 배지로 약 1일 동안 처리하여 4기 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 배지는 약 100 nM의 LDN-193189 및 약 100 nM의 ALK5 저해제 및 약 1 μM T3로 보충될 수 있다. 세포는 부착 평면 배양물 또는 클러스터의 형태일 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 세포는 공기-액체 계면에서 배양하는 단계 또는 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 형성하기 위해 배양하는 단계 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소를 함유하는 용액으로 세포를 처리할 수 있다.

[0132] 전술한 방법에 따라 본 발명은, 하기를 포함하는, 췌장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (췌장 내배엽/췌장 내분비 전구 세포)로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공한다: (a) 배양 용기; (b) 상기 용기의 부피의 일부분만을 충전하기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 상기 배지에 인접하는 상기 용기의 일부분을 충전하는 상기 용기 내의 공기; (d) 상기 배지와 상기 공기 사이의 계면에 위치된 다공성 기재; 및 (e) 상기 배지가 상기 세포의 표면의 일부분에만 접촉하도록 상기 기재의 표면 상에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포.

[0133] 전술한 방법에 따라, 대안적으로 본 발명은, 하기를 포함하는, 췌장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (췌장 내배엽/췌장 내분비 전구 세포)로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공한다: (a) 세포의 응집을 촉진하거나 세포 클러스터를 형성하는 배양 용기; (b) 상기 용기 내의 성장 배지 (배양 배지)의 부피; (c) 세포가 응집되어 클러스터를 형성하도록 유도되도록 용기 내에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포; 및 (d) 현탁액 (현탁 배양물) 중에 배치된 생성된 세포 클러스터. 실시 형태에서, 세포 응집을 위한 용기는 웰 또는 마이크로웰을 갖는 플레이트, 예컨대 Aggrewell™ 플레이트 (마이크로웰 플레이트; 캐나다 밴쿠버 소재의 STEMCELL Technologies Inc.)이다. 실시 형태에서, 현탁 배양 시스템은 플라스크, 예를 들어 스피너 플라스크 또는 스피너 휠 플라스크와 같은 현탁 배양 용기 내에 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 접종하는 단계를 포함할 수 있다.

[0134] **6기: 췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 미성숙 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0135] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 임의의 적합한 성장 배지, 바람직하게는, 예컨대 MCDB-131 또는 CMRL, 및 더욱 바람직하게는, 주문 제작 배지, 예컨대 BLAR (표 I)일 수 있는 분화 배지로 5기 세포를 처리함으로써 6기 세포를 얻는 단계를 포함한다. 배지는 하기 중 하나 이상으로 보충될 수 있다:

[0136] (a) TGF-β 수용체 억제제 V, TGF-β 수용체 억제제 I, TGF-β 수용체 억제제 IV, TGF-β 수용체 억제제 VII, TGF-β 수용체 억제제 VIII, TGF-β 수용체 억제제 II, TGF-β 수용체 억제제 VI, TGF-β 억제제 III, TGF-β 억제제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 억제제 II로 이루어진 군으로부터 선택된 ALK5 억제제; (b) T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 갑상선 호르몬; (c) 바람직하게는 LDN-193189, 노긴 또는 클로딘으로부터 선택된 BMP 수용체 억제제; (d) 감마 세크레타제 억제제, 예컨대 감마 세크레타제 억제제 XX, 감마 세크레타제 억제제 XXI, 감마 세크레타제 억제제 XVI, 또는 DAPT; (e) 아스코르브산; (f) 헤파린; 및 (g) 황산아연. 5기 세포를 6기 세포로 분화시키기 위해, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 또는 현탁 배양에서, 약 2 내지 4, 바람직하게는 약 3일 동안 세포를 배양할 수 있다. 임의로, 배지는 SHH 신호전달 경로 길항제, 평활화 수용체 억제제, 섬유아세포 성장 인자 및 레티노산 중 하나 이상으로 추가로 보충될 수 있다.

[0137] 바람직한 실시 형태에서, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 100 nM LDN-193189, 약 10,000 nM의 ALK5 억제제 및 바람직하게는 ALK 5 억제제 II, 1 μM T3, 약 100 nM의 감마 세크레타제 억제제로 보충된 배지로 약 7일 동안 처리함으로써, 5기 세포를 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 대안적으로, 5기 세포는 약 0.25 μM SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 1000 nM ALK5 저해제 및 1 μM T3으로 보충된 배지로 약 3일 동안 처리하여 6기 세포로 분화될 수 있다. 세포는 그러한 배지에서, 필요하다면 추가 2일, 또는 그 이상 동안 배양될 수 있다.

[0138] 대안적으로, 헤파린, SMO 억제제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, BMP 억제제, T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물, 및 ALK5 억제제로 보충된 배지로 처리하고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 또는 현탁 배양에서 약 1 내지 7일, 대안적으로 약 6일, 대안적으로 약 7일 동안 배양함으로써, 5기 세포를 6기 세포로 분화시킬 수

있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 모두로 보충될 수 있다. 예를 들어, 세포는 약 10 ㎍/ml의 헤파린, 약 0.25 μM SANT-1, 약 100 nM LDN-193189, 약 1000 nM T3 및 약 500 내지 약 10,000 nM, 대안적으로 약 500 nM, 대안적으로 약 1000 mM, 및 대안적으로 약 10,000 nM의 ALK5 저해제로 보충된 배지에서 배양될 수 있다. 적합한 ALK5 저해제는 SD-208, ALK5 저해제 II, TGF-β 수용체 저해제 V, TGF-β 수용체 저해제 I, TGF-β 수용체 저해제 IV, TGF-β 수용체 저해제 VII, TGF-β 수용체 저해제 VIII, TGF-β 수용체 저해제 II, TGF-β 수용체 저해제 VI, TGF-β 수용체 저해제 III 및 이들의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0139] 바람직한 실시 형태에서, ALK5 저해제는 ALK5 저해제 II이다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 약 10,000 nM (10 mM)의 ALK5 억제제 II가 사용된다. 따라서, 일 실시 형태에서, 헤파린, SMO 억제제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, BMP 억제제, T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물, 및 ALK5 억제제로 보충된 배지로 처리하고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 또는 현탁 배양에서, 바람직하게는 약 7일 동안 배양함으로써, 5기 세포를 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 모두로 보충될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양되기 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소를 함유하는 용액으로 세포를 처리할 수 있다.

[0140] 다른 실시 형태에서, 헤파린, SMO 억제제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, BMP 억제제, T3, 및 ALK5 억제제 II로 보충된 배지로 처리하고, 공기-액체 계면에서 약 5일 내지 약 7일, 대안적으로 약 5일, 대안적으로 약 6일, 대안적으로 약 7일 동안 배양함으로써, 5기 세포를 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 이러한 실시 형태에서, 배지는 약 10 ㎍/ml의 헤파린, 약 0.25 μM SANT-1, 약 100 nM LDN-193189, 약 1000 nM의 T3 및 약 10,000 nM의 ALK5 억제제 II로 보충될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 배지는 황산아연 ($ZnSO_4$)으로 추가로 보충될 수 있다. 예를 들어, 배지는 약 10 mM $ZnSO_4$로 추가로 보충될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 억제제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 모두로 보충될 수 있다.

[0141] 본 발명의 특히 바람직한 실시 형태에서, 오로라 키나제 억제제, 바람직하게는 오로라 키나제 억제제 II, RSK 억제제, 바람직하게는 RSK 억제제 II, 및 DOT1L의 단백질 메틸 트랜스퍼라제 억제제, 바람직하게는 EPZ-5676 중 하나 이상이 배지에 첨가된다. 첨가되는 양은 오로라 키나제 및 RSK 저해제에 대해 약 100 내지 5000 nM, 대안적으로 약 1000 내지 5000 nM, 대안적으로 약 2000 내지 5000 nM, 대안적으로 약 3000 내지 5000 nM, 및 바람직하게는 약 1000 내지 2000 nM, 그리고 DOT1L 저해제에 대해 약 100 내지 1000 nM, 및 더욱 바람직하게는 약 1 μM 내지 약 10 nM일 수 있다.

[0142] 전술한 방법에 따라 본 발명은, 하기를 포함하는, 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 미성숙 베타 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공한다: (b) 상기 용기의 부피의 일부분만을 충전하기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 상기 배지에 인접하는 상기 용기의 일부분을 충전하는 상기 용기 내의 공기; (d) 상기 배지와 상기 공기 사이의 계면에 위치된 다공성 기재; 및 (e) 상기 배지가 상기 세포의 표면의 일부분에만 접촉하도록 상기 기재의 표면 상에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포.

[0143] 전술한 방법에 따라, 대안적으로 본 발명은, 하기를 포함하는, 췌장 내분비 전구 세포 (또는 췌장 내배엽/내분비 전구 세포)의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 미성숙 베타 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 세포 배양을 추가로 제공한다: (a) 세포의 응집을 촉진하거나 세포 클러스터를 형성하는 배양 용기; (b) 상기 용기 내의 성장 배지 (배양 배지)의 부피; (c) 세포가 응집되어 클러스터를 형성하도록 유도되도록 용기 내에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포; 및 (d) 현탁액 (현탁 배양물) 중에 배치된 생성된 세포 클러스터. 실시 형태에서, 세포 응집을 위한 용기는 웰 또는 마이크로웰을 갖는 플레이트, 예컨대 Aggrewell™ 플레이트이다. 실시 형태에서, 현탁 배양 시스템은 플라스크, 예를 들어 스피너 플라스크 또는 스피너 휠 플라스크와 같은 현탁 배양 용기 내에 응집된 세포 또는 세포 클러스터를 접종하는 단계를 포함할 수 있다.

[0144] 일 실시 형태에서는, 본 발명의 실시 형태에 따라 배양된 5기 세포를 이용하고 6기 세포로 분화시키는 반면에, 다른 실시 형태에서는 다른 프로토콜에 따라 배양된 5기 세포를 본 방법에 이용하여 6기 및 7기 세포를 얻을 수 있다.

[0145] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 단일-호르몬 양성인 6기 세포의 형성을 유발한다. 따라서, 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1, 인슐린, 크로모그라닌 및 PDX1을 공동-발현하는 6기 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1 및 인슐린을 공동-발현하는 6기 세포를 생성한다. 본 발명의 소정의

실시 형태에서, 방법은 4기 내지 6기 또는 4기 후기 내지 6기 또는 5기 및 6기에 주문 제작 배지인 BLAR (표 I 참조)을 사용한다. 배지는 매일 또는 대안적으로 격일로 교환될 수 있다.

[0146] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포 내지 6기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, NKX6.1 및 크로모그라닌을 공동-발현하는 6기 세포를 형성하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포, 내지 6기 세포를 배양함으로써, NKX6.1 6기 세포를 발현하는 단일 호르몬 인슐린 양성 세포를 형성하는 방법에 관한 것이다.

[0147] **7기: 미성숙 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 2-상 GSIS 및 미토콘드리아 호흡 반응이 가능한 기능성 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.**

[0148] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 임의의 적합한 성장 배지, 바람직하게는, 예컨대 MCDB-131 또는 CMRL, 또는 더욱 바람직하게는, 주문 제작 배지, 예컨대 BLAR001 (표 1) 또는 BLAR004 (표 IV)일 수 있는 분화 배지로 7일 동안 6기 세포를 처리하는 단계를 포함한다.

[0149] 배지는 하기 중 하나 이상으로 보충된다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨, 및 ITS-X의 1:200 희석액으로 보충됨; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 ㎍/ml의 헤파린 ("H"); 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 1 mM N-아세틸 시스테인 ("NAC"); 0.5 μM의 ZM447439 ("ZM"); 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 (표 XII) – RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질 농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A (Corning, 카탈로그 번호 25-021)의 1:2000 희석액; 미량 원소 B (Corning, 카탈로그 번호 25-022)의 1:2000 희석액. 7기를 얻기 위해 첨가될 수 있는 부가적인 화합물은 약 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 5 μM 5-아자시티딘 ("AZT") (Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 A2385); 또는 약 1 μM 3-데아자네플라노신 A ("DEZA") (Biovision, Inc., 카탈로그 번호 2060)를 포함한다. 7기 세포를 얻는 실시 형태에서, 배지는 ALK5 억제제를 함유하지 않는다.

[0150] 일 실시 형태에서, 약 10 nM의 T3, 약 0.5 μM의 하나 이상의 오로라 키나제 억제제 II, 및 약 1 mM N-아세틸 시스테인으로 보충된 배지로 처리함으로써, 6기 세포를 7기 세포로 분화시킬 수 있다. 대안적으로, 헤파린, T3, T4, 이들의 유사체 또는 이들의 혼합물, 항산화제, 및 오로라 키나제 억제제 또는 이들의 혼합물로 보충된 배지로 처리하고 공기-액체 계면에서, 또는 현탁 배양에서 약 7 내지 21일, 대안적으로 약 7 내지 10일, 바람직하게는 약 7일 동안 배양함으로써, 6기 세포를 7기 세포로 분화시킬 수 있다.

[0151] 전술한 방법에 따라 본 발명은, 하기를 포함하는, 췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 기능성 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공한다: (b) 상기 용기의 부피의 일부분만을 충전하기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 상기 배지에 인접하는 상기 용기의 일부분을 충전하는 상기 용기 내의 공기; (d) 상기 배지와 상기 공기 사이의 계면에 위치된 다공성 기재; 및 (e) 상기 배지가 상기 세포의 표면의 일부분에만 접촉하도록 상기 기재의 표면 상에 배치된 만능 줄기 세포로부터 유래된 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포.

[0152] 일 실시 형태에서는, 본 발명의 실시 형태에 따라 배양된 6기 세포를 이용하고 7기 세포로 분화시키는 반면에, 다른 실시 형태에서는 다른 프로토콜에 따라 배양된 6기 세포를 본 방법에 이용하여 7기 세포를 얻을 수 있다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 단일-호르몬 양성인 7기 세포의 형성을 유발한다. 따라서, 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1, 크로모그라닌, PDX1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 공동-발현하는 7기 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1, PDX1, 인슐린, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 공동-발현하는 7기 세포를 생성한다. 또 다른 실시 형태에서는, 각각의 세포, 세포 집단의 약 10% 이상, 대안적으로 약 20% 이상, 대안적으로 약 30% 이상, 대안적으로 약 40% 이상, 대안적으로 약 50% 이상, 대안적으로 약 60% 이상, 대안적으로 약 70% 이상, 대안적으로 약 80% 이상, 또는 대안적으로 약 90% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현하는 세포 집단이 생성된다.

[0153] 일부 실시 형태에서는, 생성된 세포 집단의 세포의 10% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다. 다른 실시 형태에서는, 집단의 세포의 20% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다. 다른 실시 형태에서는, 집단의 세포의 30% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 실시 형태에서는, 집단의 세포의 40% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 실시 형태에서는, 집단의 세포의 50% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 실시 형태에서는, 세포의 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1,

UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다. 대안적인 실시 형태에서는, 집단의 세포의 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 또는 99% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현한다.

[0154] 본 발명의 소정의 실시 형태 및 바람직한 실시 형태에서, 본 방법은 4기 내지 7기 또는 4기 후기 내지 7기, 또는 5기, 6기 및 7기에서 주문 제작 배지인 BLAR (표 I)을 사용한다. 배지는 바람직하게는 매일 또는 대안적으로 격일로 교환될 수 있다.

[0155] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포 내지 7기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, NKX6.1, PDX1, MAFA, UCN3, SLC2A1 및 크로모그라닌을 공동-발현하는 7기 세포를 형성하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포, 내지 7기 세포를 배양함으로써 NKX6.1, PDX1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA 7기 세포를 발현하는 단일 호르몬 인슐린 양성 세포 (기능성 베타-세포)를 형성하는 방법에 관한 것이다.

[0156] 본 발명은 만능 세포의 췌장 내분비 세포로의 경로로부터의 모든 단계에 대해 공기-액체 계면에서의 배양을 고려하지만, 본 발명은 평면 또는 액침 배양에서의 1기 내지 4기 세포의 형성 및 공기-액체 계면에서의, 또는 현탁 배양 중의 세포 배양에 의한 5기, 6기, 및 7기 세포의 형성을 제공한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서 4기, 5기 및 6기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 만능 세포의 단계적 분화 방법에 관한 것이다. 소정의 실시 형태에서, 4기 내지 7기 중에 배양되는 세포는 공기-액체 계면에서 배양될 수 있다. 다른 실시 형태에서는, 4기 후기 내지 6기 세포, 또는 5기 및 6기 세포만이 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양된다. 또 다른 대안적인 실시 형태에서, 1기 내지 4기는 평면 배양에서 세포를 배양함으로써 실행하고, 5기 내지 7기, 또는 6기 내지 7기, 또는 7기만은 현탁 배양에서 배양함으로써 실행한다.

[0157] 부가적으로, 5기, 6기 및 7기 중 하나 또는 전부 중의 배양은 T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상 및 ALK5 억제제, 또는 T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상; 또는 ALK5 억제제의 존재 하에 실행된다. 바람직한 실시 형태에서, 5기, 6기 및 7기 중 하나 이상, 및 바람직하게는 이들 모두의 단계 중의 배양은 T3 및 ALK5 억제제의 존재 하에, 더욱 바람직하게는 T3 및 ALK5 억제제 II의 존재 하에 실행된다. 더욱 바람직한 실시형태에 있어서, 7기 중의 배양은 저농도에서 T3의 존재 하에 실행된다. 바람직한 실시 형태에서, 7기 중의 배양은 ALK5 억제제가 포함되지 않은 상태로 실행된다.

[0158] 세포가 공기-액체 계면 ("ALI")에서 배양될 때, 세포가 윗면은 공기와, 그리고 아랫면은 세포 배양 배지와 접촉되게 하도록 세포는 다공성 기재 상에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 충분한 부피의 배지가 다공성 기재 (예를 들어, 필터 인서트 (filter insert))를 함유하는 배양 용기의 바닥에 첨가될 수 있어서 배지는 기재에 있는 세포의 바닥면과는 접촉하지만 세포를 둘러싸거나 액침되게 하지는 않는다. 적합한 다공성 기재는 세포의 성장 및 분화에 악영향을 주지 않을 임의의 물질로 형성될 수 있다. 예시적인 다공성 기재는 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 테레프탈레이트 ("PET"), 폴리에스테르 또는 폴리카르보네이트로 제조된다. 적합한 다공성 기재는 코팅되거나 코팅되지 않을 수 있다. 일 실시 형태에서, 코팅은 매트리겔™일 수 있다. 본 발명의 다른 실시 형태에서, 다공성 기재는 다공성 필터 인서트이고, 이는 MATRIGEL™로 코팅될 수 있다. 본 발명의 다른 실시 형태에서, 다공성 기재는 코팅되지 않은 필터 인서트이다. 기재의 다공성은 세포 생존력을 유지하고 세포의 분화를 촉진하기에 충분해야 한다.

[0159] 공기-액체 계면에서의 세포의 배양은 다공성 기재, 예컨대 다공성 필터 인서트 상에 세포를 시딩하는 것을 포함한다. 소정의 실시 형태에서, 기재의 기공 크기는 약 0.3 내지 약 3 마이크로미터의 범위일 수 있다. 시딩은 단층 배양으로부터의 단일 세포 또는 단층 배양으로부터의 세포괴로서의 세포를 현탁액으로 방출하고 이어서 단일 세포 현탁액 또는 현탁된 세포 배양물을 ALI에서 다공성 기재 상에 분취(aliquot)함으로써 달성될 수 있다. 세포는 약 1000 개의 세포/μl 내지 약 100,000 개의 세포/μl를 갖는 현탁액으로부터 다공성 기재 상에 접종될 수 있다. 세포는 개별 세포 또는 세포의 응집물 또는 세포괴를 함유하는 세포 현탁액의 액적으로서 시딩될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 미국 특허 출원 공개 제2014/0186305호에 개시된 방법을 사용하여 공기-액체 계면에서 세포를 배양할 수 있으며, 그의 개시 내용은 만능 줄기 세포를 공기 액체 계면에서 배양하고 분화시키는 단계에 관련되므로 본 명세서에 포함된다.

[0160] 배지는 격일로 또는, 바람직하게는 매일 교환되거나 다시 채워질 수 있다. 다공성 기재의 위에서 성장한 세포는 일반적으로 단일 세포가 아니라 오히려 시트의 형태이거나 응집된 세포괴(cell cluster)로 존재한다. ALI에서 배양된 세포는 배지에 액침된 세포와 비교할 때 더 높은 산소 분압(oxygen tension)을 겪을 수 있다.

[0161] 소정의 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 현탁 배양에서 세포를 클러스터로서 배양 및 분화시킴으로써 실행할

수 있다. 만능 줄기 세포의 현탁 배양 및 분화를 위한 예시적인 적합한 방법이 미국 특허 출원 공개 제 2014/0242693호 및 제2014/0242693호에 개시되어 있으며, 이들의 개시 내용은 현탁 클러스터를 사용하여 만능 줄기 세포를 배양 및 분화시키는 단계에 관련되므로 본 명세서에 포함된다. 특정 실시 형태에서 본 발명은, 세포가 응집되고 클러스터를 형성하는 것을 유도하도록 성장 배지 (배양 배지)를 갖는, 세포의 응집 또는 세포 클러스터의 형성을 촉진하는 배양 용기에 세포를 접종하는 단계를 포함하는, 세포 클러스터와 같은 응집된 세포로서 제조된 세포를 분화시키는 단계를 포함하는 시험관내 세포 배양을 제공한다. 실시 형태에서, 세포의 응집을 유도하기에 유용한 용기는 웰 또는 마이크로웰을 갖는 플레이트, 예를 들어, Aggrewell™ 플레이트이다. 생성된 응집된 세포 또는 세포 클러스터는 현탁액 (현탁 배양) 중에 추가로 배양되며, 이는 마이크로웰로부터 응집된 세포/세포 클러스터를 제거하는 단계 및 응집된 세포가 현탁액 중에 분화되도록 현탁 배양 용기 내에 이들을 접종하는 단계를 포함한다.

[0162] 본 발명의 실시 형태는 공기-액체 계면에서의, 또는 현탁액 중의 4기 후기 내지 7기, 바람직하게는 5기 내지 7기 세포의 형성을 포함한다. 세포는 만능 줄기 세포를 분화시키거나 3기, 4기, 5기 또는 6기 세포를 추가로 분화시킴으로써 형성될 수 있다. 4기 세포는 공기-액체 계면에서 전적으로 배양될 수 있거나, 세포가 4기의 초기 부분 (약 1 내지 2일) 동안 액침 평면 배양에서 배양된 후, 4기의 후기 부분 (약 제2일 내지 제3일) 동안 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양될 수 있다. 바람직하게는, 4기는 ALI에서, 또는 현탁액 중에 실행되는 것이 아니라 액침 배양에서 실행된다.

[0163] 일 실시 형태에서 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 만능 줄기 세포로부터 기능성 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생성하는 방법을 제공한다: 만능 줄기 세포를 배양하는 단계; 만능 줄기 세포를 췌장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계; 및 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양함으로써, 췌장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계. 본 방법은 (i) T3, T4 또는 이들의 유사체; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지를 이용한 처리를 포함할 수 있다. 본 방법은 (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 또는 둘 모두; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지로 처리하고 평면 배양에서 배양함으로써, 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (3기 세포)를 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (4기 세포)로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 본 방법은 또한 (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 또는 둘 모두; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지로 처리하고 평면 배양에서 배양하거나 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양함으로써, 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (4기 세포)를 미성숙 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (6기 세포)로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 본 방법은 오로라 키나제 억제제, RSK 억제제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 억제제 및 임의로 항산화제, 예컨대 비타민 E 또는 아세틸 시스테인 중 하나 이상과 함께 (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 또는 둘 모두; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지로 처리함으로써, 6기 세포를 기능성 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하고 6기 세포에 비교하여 더 성숙한 표현형을 갖는 세포 (7기 세포)로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 유용한 아세틸 시스테인의 바람직한 양은 약 0.1 내지 약 2 mM이다. 비타민 E의 바람직한 양은 약 0.1 내지 약 10 μM이다. 또 다른 실시 형태에서, 본 방법은 감마 세크레타제 억제제, RSK 억제제 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 억제제 중 하나 이상과 함께, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 또는 둘 모두; (ii) ALK5 억제제 또는; (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지로 5기 세포를 처리함으로써 6기를 실행하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 감마 세크레타제 억제제, RSK 억제제 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 억제제 중 하나 이상과 함께, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 또는 둘 모두; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지로 5기 세포를 처리함으로써 6기를 실행한 후에, 오로라 키나제 억제제, RSK 억제제, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 억제제, 및 임의로 항산화제, 예컨대 비타민 E 또는 아세틸 시스테인과 함께, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 또는 둘 모두; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두로 보충된 배지로 처리함으로써 7기를 실행한다.

[0164] 본 발명의 일 실시 형태는, 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양함으로써 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (4기 세포)를 7기 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 기능성 베타 세포 (성숙 표현형의 특징적인 마커를 발현하는 췌장 내분비 세포) (7기 세포)를 형성하는 방법이다. 더 성숙한 표현형의 기능성 베타-세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 PDX1 및 하기 전사 인자 중 하나 이상을 발현한다: NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3β, MAFA, UCN3, SLC2A1, PAX4, HB9 및 PAX6. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1, PDX1, HB9 및 MAFA에 대해 양성인 6기 세포의 형성을 유발한다. 바람직하게는, 적어도 5기 내지 7기 중에, 본 방법은 T3, T4 또는 이들의 유사체, ALK5 억제제, 또는 둘 모두로 보충된 배지로 처리하는 단계를 포함한다. 6기 세포는 NKX6.1, PDX1, HB9 및 MAFA에 대해 양성인 세포일 수 있

다. 다른 실시 형태에서, 6기 또는 7기 세포는 단일 호르몬 양성 세포이다. 예를 들어, 6기 및 7기 세포는 (a) NKX6.1 및 크로모그라닌을 공동-발현하거나; (b) NKX6.1 및 인슐린을 공동-발현하거나; (c) NKX6.1, PDX1, MAFA 및 단일 호르몬 인슐린을 공동-발현하는 세포일 수 있다. 7기 세포는 6기 세포에 비교하여 세포 집단 내에서 증가된 수준 및 증가된 수의 세포에서 단일 호르몬 인슐린 및 MAFA를 발현한다.

[0165] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 PDX1 및 NKX6.1을 공동-발현하는 세포의 집단을, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양하고 분화시킴으로써 단일 호르몬 양성 세포 (예를 들어, NKX6.1 및 인슐린을 공동-발현하는 세포 또는 NKX6.1 및 크로모그라닌을 공동-발현하는 세포)의 수를 향상시키는 방법을 제공한다. 다른 실시 형태에서는, 공기-액체 계면에서, 또는 현탁액 중에 배양된 췌장 내배엽 세포를 하기로부터 선택되는 화합물로 처리함으로써 기능성 베타-세포로 추가로 분화시킨다: ALK5 억제제, BMP 억제제, 감마-세크레타제 억제제, 에프린 리간드, EphB 억제제, PKC 억제제, EGFr 억제제, 레티노산, 비타민 C, T3/T4, 글루코스, 세포 주기 조절제, WNT 조절제, SHH 억제제, 오로라 억제제, 항산화제, 비타민 E, 아세틸-시스테인, 또는 이들의 조합.

[0166] 추가의 실시 형태에서 본 발명은, 충분한 양의 (i) T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상; (ii) ALK5 억제제; 또는 (i) 및 (ii) 둘 모두를 함유하는 배지에서 4기 내지 6기를 배양하는 단계; 및 오로라 키나제 억제제, RSK 억제제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 억제제 중 하나 이상 및 항산화제를 임의로 함유하는 배지에서 6기 세포를 추가로 배양하여 인슐린, PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA를 발현하는 기능성 베타-세포 (성숙 표현형의 췌장 내분비 세포) 및 기능성 베타-세포의 집단을 생성하는 단계를 포함하는, 만능 세포의 단계적 분화 방법에 관한 것이다.

[0167] 본 명세서에 기재된 방법에 따라 생성된 6기 및 7기 세포는 또한 췌장 호르몬 및 내분비 마커의 분비에 미치는 효과에 대해 화합물을 스크리닝하는 데 사용하기에 적합하다. 특히, ALI에서, 또는 현탁 배양에서 배양된 4기 내지 7기 세포를 384 내지 6-웰 포맷의 상이한 배양 포맷에서 시험할 수 있다. 그러한 포맷은 췌장 내배엽, 췌장 내분비 전구체, 췌장 내분비, 및 췌장 베타 세포 마커의 후속 발현에 대한 다양한 용량 및 시간 간격에서의 다양한 소분자 또는 생물제제의 평가를 가능하게 한다. 그러한 평가는, 유전자 발현은 PCR에 의해, 단백질 발현은 FACS 또는 면역 염색에 의해 측정함으로써, 또는 소분자/생물제제의 첨가에 의해 영향을 받은 세포에 의한 인자의 분비에 대해서는 ELISA에 의해 달성될 수 있다.

[0168] ***F. 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 세포.***

[0169] 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 7기 세포, 또는 7기 세포의 집단을 제공한다. 소정의 실시 형태에서, 세포 또는 세포 집단은 분화 후 정제되지 않는다. 소정의 실시 형태에서, 이들 7기 세포는 단일 호르몬 인슐린을 발현하며 PDX1, NKX6.1, UCN3, SLC2A1 및 MAFA 양성이고; 부가적으로 이들 세포는 6기 세포보다 더 높은 수준의 MAFA 발현을 갖는다. 세포는 6기 세포 (미성숙 베타-세포)보다 더 높은 수준으로 UCN3을 발현한다. 생성된 세포 집단은 6기 세포보다 더 높은 백분율의 MAFA 양성 및 단일 호르몬 인슐린 발현 세포 둘 모두를 갖는다. 본 발명은 또한, NKX6.1 발현 (바람직하게는 약 30% 초과), PDX1 발현 (바람직하게는 약 30% 초과), UCN3 발현 (바람직하게는 약 10% 초과), SLC2A1 발현 (바람직하게는 약 10% 초과) 및 MAFA 발현 (바람직하게는 약 10% 초과)을 특징으로 하는, 기능성 베타-세포 (성숙 표현형의 췌장 내분비 세포)의 특징적인 마커를 발현하는 인슐린 양성 세포 또는 인슐린 양성 세포의 집단을 제공한다.

[0170] 본 발명의 실시 형태에서, 7기 세포 또는 세포 집단은 인슐린 생성 세포 또는 인슐린 생성 세포의 집단이다. 인슐린 생성 세포는 인간 췌도 세포와 유사한 글루코스에 대한 미토콘드리아 호흡/활성 및 GSIS 반응을 나타내는 기능적으로 성숙한 베타 세포이다. 본 발명의 실시 형태에서, 기능적으로 성숙한 베타 세포는 현탁 배양에서 생성된다.

[0171] 실시 형태에서, 기능성 베타-세포는 글루코스-자극된 인슐린 분비 및 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡을 나타낸다. 실시 형태에서, 글루코스-자극된 인슐린 분비 및 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡은 인간 췌도 세포의 것과 유사하다. 본 발명의 실시 형태에서, 기능성 베타-세포는 다중상으로 인슐린을 분비한다.

[0172] 실시 형태에서, 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡은 기저 산소 소비율에 비하여 약 20% 내지 약 80%, 바람직하게는 약 20% 내지 약 70%, 20% 내지 약 60%, 더욱 바람직하게는 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75% 또는 약 80% 범위의 글루코스 자극 후 최대 산소 소비율 반응을 갖는다. 실시 형태에서, 산소 소비율 반응은 글루코스 자극 후 10 분 내지 약 15 분, 바람직하게는 약 10 분, 약 11 분, 약 12 분, 약 13 분, 약 14 분, 약 15 분 이상 후에 발생한다. 실시 형태에서, 기저 OCR에 비하여 더 높은 산소 소비율은 60 분 이상 내지 80 분 이상, 바람직하게는 70 분 이상 내지 80 분 이상,

더욱 바람직하게는 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 또는 80 분 이상 동안 유지된다.

[0173] 상기 실시 형태에서, 글루코스-자극된 인슐린 분비는 글루코스 자극에 반응하는 신속한 이중상 인슐린 분비를 포함한다. 실시 형태에서, 이중상 인슐린 분비의 제1 상은 기준선 분비에 비하여 4 배 이상 내지 8 배 이상의 증가, 바람직하게는 기준선 분비에 비하여 4 배 증가, 5 배의 증가, 6 배의 증가, 7 배의 증가 또는 8 배 이상의 증가를 갖는다. 실시 형태에서, 이중상 인슐린 분비의 제2 상은 기준선 분비에 비하여 2 배 이상 내지 4 배 이상의 증가, 바람직하게는 기준선 분비에 비하여 2 배의 증가, 3 배의 증가 또는 4 배 이상의 증가를 갖는다. 실시 형태에서, 인슐린 분비는 글루코스 자극 후 5 분 이상 내지 10 분 이상, 바람직하게는 글루코스 자극 후 5 분 이상, 6 분 이상, 7 분 이상, 8 분 이상, 9 분 이상 또는 10 분 이상 발생한다.

[0174] 표 A 및 표 B는 본 발명의 방법의 실시 형태에 사용하기에 적합한 예시적인 배양 조건을 예시한다. 하기 표 A 및 표 B에 사용된 바와 같이, "MCX"는 MCX 화합물이고, "AA"는 액티빈이며, "ALK5 inh."는 ALK5 억제제이고, "RA"는 레티노산이며, "Vit. C"는 아스코르브산이고, "inh."는 억제제이며, "act."는 활성화제이다. 소정의 실시 형태에서, 하나의 단계 (예를 들어, 1기, 2기, 3기, 4기, 5기, 6기 또는 7기 중 임의의 하나)에서의 처리 중 어느 하나는 다른 단계 (예를 들어, 1기, 2기, 3기, 4기, 5기, 6기 또는 7기 중 어느 하나)에서의 처리 중 임의의 하나와 조합될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 표 A의 것들과 상이한 방법에 의해 얻어진 4기 세포는 표 B에 나타낸 배양 조건을 사용하여 5기 내지 7기 세포로 분화될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 표 A 및 표 B의 것들과 상이한 방법에 의해 얻어진 5기 세포는 표 b에 나타낸 배양 조건을 사용하여 6기 또는 7기 세포로 분화될 수 있다. 또 다른 실시 형태에서, 표 A 및 표 B의 것들과 상이한 방법에 의해 얻어진 6기 세포는 표 B에 나타낸 배양 조건을 사용하여 7기 세포로 분화될 수 있다.

[0175] [표 A]

본 발명의 실시 형태에 따른 1 기 내지 4 기 세포를 얻기 위한 예시적인 배양 조건

	1 기	2 기	3 기	4 기
처리 대상	만능 줄기 세포	1 기 세포	2 기 세포	3 기 세포
기본 함유	AA 및 Wnt3A			
	GDF8 및 MCX			
		FGF7		
		FGF7 및 Vit. C		
			SANT-1, RA 및 노긴	
			FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 작용제 (*예를 들어* TPB), BMP 억제제 (*예를* 들어, LDN-193189) 및 Vit. C	
			FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 작용제 (*예를* 들어, TPB) 및 Vit. C	
				FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC 작용제 (*예를 들어* TPB), BMP 억제제 (*예를* 들어, LDN-193189) 및 Vit. C
다른 임의의 성분	0.5% FAF-BSA	0.5% FAF-BSA		BLAR 배지 2% FAF-BSA
처리의 지속기간	대략 2 내지 5 일; 바람직하게는 약 3 내지 4 일	대략 2 내지 3 일; 바람직하게는 약 2 일; 1 기에서 AA 및 Wnt3A 의 경우, 바람직하게는 약 3 일,	대략 2 내지 4 일, 바람직하게는 약 2 일	대략 2 내지 4 일, 바람직하게는 약 3 일
배양 조건	평면 배양 또는 세포 클러스터 (현탁 배양) (롤러 병)	평면 배양 또는 세포 클러스터 (롤러 병)	평면 배양 또는 세포 클러스터 (롤러 병)	평면 배양 임의로 4 기의 마지막에 Y-화합물을 사용하여 세포를 ALI 에 접종함 alternatively cells are transitioned to clusters; 세포 클러스터 또는 롤러 병으로 이행됨

[0176]

[0177] [표 B]

본 발명의 실시 형태에 따른 5기 내지 7기 세포를 얻기 위한 예시적인 배양 조건

	5기	6기	7기
처리 대상	4기 세포	5기 세포	6기 세포
기본 함유	SANT-1, PKC 작용제 (*예를 들어* TPB), BMP 억제제 (*예를* 들어, LDN-193189), Vit C, ALK5 억제제 (*예를 들어*, ALK5 억제제 II), T3		
	SANT-1, PKC 작용제 (*예를 들어* TPB), BMP 억제제 (*예를* 들어, LDN-193189), ALK5 억제제 (*예를 들어*, ALK5 억제제 II), T3		
		BMP 억제제 (*예를* 들어, LDN-193189), ALK5 억제제 (*예를 들어*, ALK5 억제제 II), T3, 감마 세크레타제 억제제, 헤파린	
		BMP 억제제 (*예를* 들어, LDN-193189), Vit C, ALK5 억제제 (*예를 들어*, ALK5 억제제 II), T3, 감마 세크레타제 억제제, 헤파린	
			T3, N-아세틸 시스테인, ZM447439, 헤파린, ± ALK5
			T3, N-아세틸 시스테인, ZM447439, 헤파린, ALK5 + 하기 중 하나: UNC0638, UNC0642, TC-E5003, A366, PF03814735 SB747651, PFI1, LY303511, MS436 또는 MC1568
			T3, N-아세틸 시스테인, ZM447439, 헤파린, ALK5 없음 + 하기 중 하나: UNC0638, UNC0642, TC-E5003, A366, PF03814735 SB747651, PFI1, LY303511, MS436 또는 MC1568
			ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC
			ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT 및 DEZA
다른 임의의 성분	T3 을 T4 또는 갑상선 호르몬 유사체로 대체함 $ZnSO_4$	$ZnSO_4$	$ZnSO_4$ ALK5 억제제 T3 을 T4 또는 갑상선 호르몬 유사체로 대체함 AZT DEZA
처리의 지속기간	대략 2 내지 4 일, 바람직하게는 약 3 일	대략 6 내지 8 일, 바람직하게는 약 7 일	대략 6 내지 7 일; 대안적으로 대략 7 내지 14 일; 대안적으로 약 7 내지 23 일
배양 조건	ALI 또는 세포 클러스터 (현탁 배양물) (롤러 병)	ALI 또는 세포 클러스터 (롤러 병)	ALI 또는 세포 클러스터 (롤러 병)

[0178]

[0179] 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 간행물은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 본 발명을 하기 실시예에 의해 추가로 예시하지만 이로 제한되지는 않는다.

[0180] **실시예**

[0181] 하기 실시예에 사용된 재료 및 화합물의 공급처를 표 X에서 확인한다.

[0182] **실시예 1**

[0183] **MAFA 또는 UCN3 발현을 상향조절하는 소분자의 스크리닝 및 동정.**

[0184] 하기 실시예는 MAFA (v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) 또는 UCN3 (유로코르틴 3) 을 포함하는 성숙 베타 세포 마커의 유전자 발현을 증가시키는 단계를 통해 췌장 베타 세포의 성숙 상태를 향상시킬 수 있는 소분자의 동정에 관한 것이다. 10 μM의 Rock 억제제 Y-27632 ("Y-화합물")로 보충된, 둘베코 변형 이글 배지 영양소 혼합물 F-12 ("DMEM-F12"), 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자 2 ("FGF2"), 1 ng/ml의 형질전환 성장 인자 베타 ("TGFβ"), 1:100 희석으로 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민 ("ITS-X"), 2% 무지방산 소 혈청 알부민 ("FAF-BSA"), 및 20 ng/ml의 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1")의 배지 중에, 1:30 희석으로 코팅된 디쉬 상의 MATRIGEL™ 상에, 계대 28에서 EZ8 배지를 갖는 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포 ("H1-hESC")를 단일 세포로서 0.094×10^6 개의 세포/㎠로 접종하였다. 접종 후 처음 24 시간 동안에만 Y-화합물을 첨가하였다. 접종 후 48시간에, 배양물을 불완전 PBS(마그네슘 또는 칼슘이 없는 포스페이트 완충 식염수) 중에 세척하였다.

[0185] 도 1a 내지 도 1h의 경우, 배양물을 하기 프로토콜을 사용하여 분화시켰다. 프로토콜의 1기 내지 4기 중에, 배양은 평면 부착 배양으로 유지하였다.

[0186] a. 1기 (3일): 세포를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨 (미주리주 세인트루이스 소재의 Sigma-Aldrich Co. LLC, 카탈로그 번호 5761)을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X

농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml 성장 분화 인자 8 ("GDF8"), 및 1.5 μM의 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 ("MCX 화합물")로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1 μM MCX 화합물로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8로 보충한 MCDB-131에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0187] b. 2기 (2일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 7 ("FGF7")로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0188] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민); 1 μM 레티노산("RA"); 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM의 PKC 활성화제 ((2S, 5S-(E,E)-8-(5-(4-트라이플루오로메틸)페닐-2,4,-펜타다이에노일아미노)벤조락탐("TPB"); 및 골형성 단백질 ("BMP") 수용체 억제제 LDN-193189-HCl ("LDN-HCL")로 보충한 BLAR001 주문 제작 배지 (표 I 참조)로 2일 동안 세포를 처리하였다. 3기의 제1일에 사용된 LDN-HCL의 농도는 100 nM이었고, 3기의 제2일의 경우에는 10 nM이었다.

[0189] d. 4기 (3일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 50 nM LDN-HCl; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다. 4기의 마지막에(3일), 평면 디쉬 상에서 배양된 세포를 공기-액체-계면 ("ALI") 상에 접종하였다. 구체적으로, 세포를 10 μM의 Y-27632로 4 시간 동안 처리하고, PBS로 헹구고, 1X의 농도에서 효소 TrypLE™ Express Enzyme으로 대략 2 분 동안 처리하고, 이어서 효소를 제거하고, 플라스크를 부드럽게 두드림으로써 MATRIGEL™ 표면 상으로부터 세포를 제거하였다. 생성된 세포 현탁액을 0.5 내지 1.0 × 10^6 개의 세포 (5 μl 분취물 중)의 밀도로 10 cm 플레이트 상의 0.4 마이크로미터 또는 3.0 마이크로미터 다공성 세포 배양 필터 인서트 상에 접종하였다. 8.0 ml의 배지를 각각의 인서트의 바닥에 첨가하였고 어떠한 추가의 배지도 필터의 정점면(apical side), 또는 윗면에 첨가하지 않았다. 5기, 6기 및 7기의 지속기간 동안 배지를 매일 교체하였다.

[0190] e. 5기 (3일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 3,3′ , 5-트라이요오도-L-트리오닌 소듐 염 형태의 1 μM의 T3; 10 μM의 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘 ("ALK5 억제제 II" 또는 "ALK5")으로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 3일 동안 세포를 처리하였다.

[0191] f. 6기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린; 10 μM $ZnSO_4$; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM ALK5 억제제 II; 및 100 nM (S,S)-2-[2-(3,5-다이플루오로페닐)아세틸아미노]-N-(5-메틸-6-옥소-6,7-다이하이드로-5H-다이벤조[b,d]아제핀-7-일)프로피온아미드 ("감마 세크레타제 억제제 XX")로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 7일 동안 세포를 처리하였다.

[0192] g. 7기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 1 μM의 T3; 10 μM의 ALK5 억제제 II; 1 mM N-아세틸 시스테인 ("NAC")으로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 세포를 처리하였다.

[0193] 부가적으로, 도 1a 내지 도 1h의 경우, 7기(S7) 중에, 세포를 20 mM D-글루코스 + BME 비타민 보충물 (100X의 1:100 희석)에서 조건화하고, 표 XI에 열거되고 기재된 바와 같이 모든 79 개의 소분자에 노출시켰다. 79 개의 소분자 중에서, 하기 화합물이 MAFA 또는 UCN3의 발현을 유도하였다: (i) 제불라린; (ii) 로메구아트립; (iii) 5-아자시티딘; (iv) 미톡산트론 다이하이드로클로라이드; (v) EGCG; (vi) 피세틴; (vii) SGI 1027; (viii) 테모졸로마이드; (ix) LO02; (x) C646; 및 (xi) SGC0946.

[0194] 도 2a 및 도 2b의 경우, 하기 프로토콜을 사용하여 배양물을 분화시켰다: 프로토콜의 1기 내지 4기 중에, 배양은 평면 부착 배양으로 유지하였다.

[0195] a. 1기 (3일): 세포를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-, 100 ng/ml 성장 분화 인자 8 ("GDF8"), 및 1.5 μM의 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 ("MCX 화합물")로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1 μM MCX 화합물로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8로 보충한 MCDB-131에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0196] b. 2기 (2일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 7 ("FGF7")로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0197] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민); 1 μM 레티노산("RA"); 0.25 mM의 아스코르브산; 300 nM의 PKC 활성화제 ((2S, 5S-(E,E)-8-(5-(4-트라이플루오로메틸)페닐-2,4,-펜타다이에노일아미노)벤조락탐 ("TPB"); 및 골형성 단백질 ("BMP") 수용체 억제제 LDN-193189-HCl ("LDN-HCL")로 보충한 BLAR001 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다. 3기의 제1일에 사용된 LDN-HCL의 농도는 100 nM 이었고, 3기의 제2일의 경우에는 50 nM이었다.

[0198] d. 4기 (3일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 70 nM LDN-HCl; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다. 4기의 마지막에(3일), 평면 디쉬 상에서 배양된 세포를 공기-액체-계면 ("ALI") 상에 접종하였다. 구체적으로, 세포를 10 μM의 Y27632로 4 시간 동안 처리하고, PBS로 헹구고, 1X의 농도에서 효소 TrypLE™ Express Enzyme으로 대략 2 분 동안 처리하고, 이어서 효소를 제거하고, 플라스크를 부드럽게 두드림으로써 MATRIGEL™ 표면 상으로부터 세포를 제거하였다. 생성된 세포 현탁액을 0.5 내지 1.0 × 10^6 개의 세포 (5 μl 분취물 중)의 밀도로 10 cm 플레이트 내의 0.4 마이크로미터 또는 3.0 마이크로미터 다공성 세포 배양 필터 인서트 상에 접종하였다. 8.0 ml의 배지를 각각의 인서트의 바닥에 첨가하였고 어떠한 추가의 배지도 필터의 정점면, 또는 윗면에 첨가하지 않았다. 5기, 6기 및 7기의 지속기간 동안 배지를 매일 교체하였다.

[0199] e. 5기 (3일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 ㎍/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 3,3′ , 5-트라이요오도-L-트리오닌 소듐 염 형태의 1 μM의 T3; 10 μM의 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘 ("ALK5 억제제 II" 또는 "ALK5")으로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 3일 동안 세포를 처리하였다.

[0200] f. 6기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 ㎍/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM ALK5 억제제 II; 및 100 nM (S,S)-2-[2-(3,5-다이플루오로페닐)아세틸아미노]-N-(5-메틸-6-옥소-6,7-다이하이드로-5H-다이벤조[b,d]아제핀-7-일)프로피온아미드 ("감마 세크레타제 억제제 XX")로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 7일 동안 세포를 처리하였다.

[0201] g. 7기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 ㎍/ml의 헤파린 ("H"); 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 1 mM N-아세틸 시스테인 ("NAC")으로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 세포를 처리하였다.

[0202] 추가로 도 2a 및 도 2b의 경우, 0.5 μM의 ZM447439 ("ZM"); 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 (표 XII) – RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질

농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A의 1:2000 희석액; 및 미량 원소 B의 1:2000 희석액을 7일 동안 첨가하였다. 7기 중에 첨가되는 부가적인 화합물은 5 μM 5-아자시티딘 ("AZT"); 또는 1 μM 또는 10 μM 3-데아자네플라노신 A ("DEZA")를 포함하였다.

[0203] 본 명세서에 기재된 실시 형태는 본 출원인의 독점적인 BLAR 배지, 구체적으로는 BLAR001 또는 BLAR004 배지를 사용한다. BLAR 배지는, 2012년 12월 31일자로 출원된 제61/747,662호의 이익을 주장하는, 둘 모두 2013년 12월 18일자로 출원된 제PCT/US13/75939호 및 미국 특허 출원 제13/998,884호에 최초로 기재되었고; 이어서 문헌 [Rezania et al. (2014) *Nature Biotech,* 32 (11) 1124-1134, Supplemental Table 3 (published online, September 11, 2014)]에 다시 기재되었으며, 이들 참고문헌은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. BLAR001 및 BLAR004는 열거된 제제 또는 부형제의 농도 또는 수준에 있어서 상이하다.

[0204] [표 I]

BLAR001 배지의 성분 목록

아미노산	**농도 (mM)**
글리신	3.0E-02
알라닌	3.0E-02
아르기닌	3.0E-01
아스파라긴	1.0E-01
아스파르트산	1.0E-01
시스테인	2.0E-01
글루탐산	3.0E-02
히스티딘	1.1E-01
아이소류신	1.0E-02
류신	9.0E-02
라이신 하이드로클로라이드	1.5E-01
메티오닌	3.0E-02
페닐알라닌	3.0E-02
프롤린	1.0E-01
세린	1.0E-01
트레오닌	3.0E-02
트립토판	2.0E-03
티로신 다이나트륨	1.0E-02
발린	3.0E-02
비타민	
비오틴	3.0E-05
콜린 클로라이드	5.0E-03
D-칼슘 판토테네이트	1.5E-03
엽산 칼슘 염	2.3E-03
니아신아미드	4.9E-03
피리독신 하이드로클로라이드	9.7E-04
리보플라빈	1.0E-05
티아민 하이드로클로라이드	3.0E-03
비타민 B12	3.7E-06
i-이노시톨	2.8E-03
염/미네랄	
염화칼슘 ($CaCl_2$-$2H_2O$)	3.0E-01
황산제 2 구리 ($CuSO_4$-$5H_2O$)	4.8E-06
황산제 2 철 ($FeSO_4$-$7H_2O$)	1.0E-03
황산마그네슘 ($MgSO_4$-$7H_2O$)	4.1E-01
염화칼륨 (KCl)	3.8E+00
중탄산나트륨 ($NaHCO_3$)	1.4E+01
염화나트륨 (NaCl)	1.1E+02
제 2 인산나트륨 (Na_2HPO_4-$7H_2O$)	5.0E-01
황산아연 ($ZnSO_4$-H_2O)	1.0E-04
기타	
아데닌	1.0E-03
D-글루코스 (덱스트로스)	5.0E+00
리포산	1.2E-05
페놀 레드	1.0E-02
소듐 피루베이트	1.0E+00
티미딘	9.8E-05

[0205]

[0206] 일반적으로, 본 명세서의 실시 형태는 실질적으로 1기 내지 7기에서 상기 기재된 바와 같이 인간 만능 세포를 분화시킨다. 7기의 경우, 다양한 소분자들을 첨가하였고 정량적 실시간 PCR에 의해 그들의 효과를 평가하였다. 표 II는 소분자 및 그들의 표적을 열거한다. 이들 소분자를 평가하였고, 각각의 2 μM 을 7기에 첨가하였다. 본 실시예에서 시험된 화합물의 화학명 및 구조를 표 XI에 나타낸다.

[0207] [표 II]

평가된 소분자

분자명	표적	Tocris Biosciences 카탈로그 번호
제불라린	DNA 메틸트랜스퍼라제 및 시티딘 디아미나제 억제제	2293
데시타빈	DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제	2624
RG 108	비-뉴클레오사이드 DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제	3295
로메구아트립	O6-메틸구아닌-DNA 메틸트랜스퍼라제 (MGMT) 억제제	4359
5-아자시티딘	DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제	3842
미톡산트론 다이하이드로클로라이드	토포아이소머라제 II 억제제; 면역억제제 및 항신생물제	4250
EGCG	DNMT1 억제제	4524
피세틴	DNMT1 억제제	5016
SGI 1027	DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제	5155
테모졸로마이드	DNA-메틸화 항종양제	2706
L002	p300 억제제	5045
C 646	선택적 p300/CBP HAT 억제제	4200
SGC 0946	고도로 강력하고 선택적인 DOT1L 억제제; 세포 투과성	4541
UNC 0224	강력한 G9a 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제	3861
UNC 0638	선택적 G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제	4343
BIX 01294	G9a-유사 단백질 및 G9a 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제	3364
UNC 0646	강력하고 선택적인 G9a/GLP 억제제	4342
UNC 0642	강력하고 선택적인 G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제	5132
TC-E 5003	선택적 PRMT1 아르기닌 메틸트랜스퍼라제 억제제	5099
A 366	강력하고 선택적인 G9a/GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제	5163
KU 55933	강력하고 선택적인 ATM 키나제 억제제	3544
KU 60019	강력한 ATM 키나제 억제제	4176
PF 03814735	오로라 키나제 A 및 B 억제제	4821
ZM 447439	오로라 키나제 B 를 억제함	2458
U0126	MEK1 및 2 의 강력하고 선택적인 억제제	1144
SL 327	MEK1 및 MEK2 의 선택적 억제제; 뇌 침투제	1969
H 89 다이하이드로클로라이드	단백질 키나아제 A 억제제	2910
SB 747651A 다이하이드로클로라이드	강력한 MSK1 억제제; 다른 AGC 그룹 키나제 또한 억제함	4630
SNS 314 메실레이트	강력한 범-오로라 키나제 억제제	4584
캄페롤	RSK2 억제제; 히스톤 H3Ser10 인산화를 차단함	3603
PRT 4165	Bmi1/Ring1A 의 억제제; 히스톤 H2A 유비퀴틴화를 차단함	5047
P 22077	USP7 억제제; Tip60 (KAT5) 히스톤 라이신 아세틸트랜스퍼라제의 탈유비퀴틴화를 차단함	4485
PFI 1	BET 브로모도메인 억제제	4445
I-BET 151 하이드로클로라이드	BET 브로모도메인 억제제	4650
LY 303511	BRD2, BRD3 및 BRD4 억제제	2418
MS 436	강력하고 선택적인 BRD4 브로모도메인 억제제	5173
SGC-CBP 30	강력한 CREBBP/EP300 브로모도메인 억제제	4889
I-CBP 112	선택적 CREBBP/EP300 브로모도메인 억제제	4891

[0208]

분자명	표적	Tocris Biosciences 카탈로그 번호
브로모스포린	광범위 브로모도메인 억제제	4758
PFI 3	강력하고 선택적인 SMARCA4 및 폴리브로모 1 억제제; SMARCA2 또한 억제함	5072
UNC 926 하이드로클로라이드	L3MBTL1 도메인 억제제	4516
UNC 1215	L3MBTL3 Kme 판독기 도메인의 강력한 억제제; 세포 투과성	4666
TC-H 106	클래스 I 히스톤 데아세틸라제 억제제	4270
MC 1568	HDAC 클래스 II (IIa)를 선택적으로 억제함	4077
피록사미드	히스톤 데아세틸라제 억제제	4403
CI 994	히스톤 데아세틸라제 억제제	2952
SBHA	히스톤 데아세틸라제 억제제	3810
KD 5170	히스톤 데아세틸라제 억제제	4001
LMK 235	선택적 HDAC4/HDAC5 억제제	4830
TCS HDAC6 20b	선택적 HDAC6 억제제	4805
PCI 34051	강력하고 선택적인 히스톤 데아세틸라제 8 (HDAC8) 억제제; T 세포-유래 세포주에서 아폽토시스를 유도함	4643
스크립타이드	히스톤 데아세틸라제 억제제	2421
NSC 3852	히스톤 데아세틸라제 억제제	2521
소듐 4-페닐부티레이트	히스톤 데아세틸라제 억제제	2682
M 344	히스톤 데아세틸라제 억제제	2771
발프로산, 소듐 염	히스톤 데아세틸라제 억제제	2815
SAHA	클래스 I 및 II HDAC 억제제	4652
GSK J2	GSK-J1 의 비활성 이성질체 (카탈로그 번호 4593)	4688
GSK J5	GSK J4 의 비활성 이성질체 (카탈로그 번호 4594); 세포 투과성	4689
GSK J1	강력한 히스톤 데메틸라제 JMJD3/UTX 억제제	4593
GSK J4	히스톤 데메틸라제 JMJD3/UTX 억제제; 세포 투과성	4594
다미노지드	선택적 히스톤 데메틸라제 KDM2/7 서브패밀리 억제제	4684
트래닐사이프로민 하이드로클로라이드	라이신-특이적 데메틸라제 1 (LSD1)의 비가역적 억제제; MAO 또한 억제함	3852
RN 1 다이하이드로클로라이드	LSD1 억제제	4977
IOX 1	히스톤 데메틸라아제 억제제; 세포 투과성	4464
JIB 04	범 주몬지 (Jumonji) 히스톤 데메틸라제 억제제; 생체내 활성	4972
시르티놀	선택적 시르투인 패밀리 데아세틸라제 억제제	3521
스플리토마이신	Sir2p 억제제	1542
레스베라트롤	SIRT1 활성화제	1418
EX 527	선택적 SIRT1 억제제	2780
테노빈-1	SIRT1 및 SIRT2 억제제; p53을 활성화함	3365
살레미드	SIRT1 및 SIRT2 억제제	4127
AK 7	선택적 SIRT2 억제제; 뇌 침투제	4754
3-아미노벤즈아미드	PARP 억제제; DNA 를 탈메틸화함	0788
PJ 34 하이드로클로라이드	강력한 PARP 억제제; 갑상선암 세포에서 후성유전학적 마크를 변경함	3255
IOX 2	강력하고 선택적인 HIF-1α 프롤릴 하이드록실라제-2 (PHD2) 억제제	4451
포르스콜린	PKA 활성화제; HDAC5 의 핵 유출을 차단함	1099
레티노산	내인성 레티노이드; HDAC-매개 유전자 억제를 변경함	0695

[0209]

[0210] **분화된 세포의 정량화 및 특성화:** 다양한 단계에서의 유전자 발현의 정량화를 위해, 실질적으로 문헌[Rezania et al. (2014), *supra*.]에 기재된 바와 같이, 인간 췌도, H1-hESC, 6기 제7일 (S6D7), 및 7기 제7일 내지 7기 제14일 (S7D7 내지 S7D14) 세포를 ALI 클러스터로서 수확하였다. 주문 제작 Taqman Arrays (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Applied Biosystems)를 사용하여 세포에서 유전자 발현을 평가하였다. 데이터를 Sequence Detection 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Applied Biosystems)를 사용하여 분석하고, 하우스키핑 유전자로서 GAPDH를 사용하여 ΔΔCt 방법을 사용하여 미분화된 H1-hESC에 대해 정규화하였다. 프라이머 상세사항은 표 III에 약술되어 있다.

[0211] [표 III]

RT-qPCR 프라이머 목록.

	유전자	검정 ID
1	MAFA	Hs04419861_sH
2	UCN3	Hs00846499_s1
3	GAPDH	Hs99999905_m1

[0212]

[0213] 도 1a 내지 도 1d는 소분자로 처리한 후의 MAFA의 발현의 정량적 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시하는 그래프이며, 여기서 다양한 소분자는 7기 (S7D7)에서 S6D7, 또는 비처리 또는 DMSO 처리 배양물에 비교하여 MAFA의 발현을 증가시킨다. UNC0638 (도 1a; 선택적 G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), UNC0646 (도 1a; 강력하고 선택적인 G9a/GLP 억제제), UNC0642 (도 1a; 강력하고 선택적인 G9a 및 GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), TC-E5003 (도 1b; 선택적 PRMT1 아르기닌 메틸트랜스퍼라제 억제제), A366 (도 1b; 강력하고 선택적인 G9a/GLP 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 억제제), PF03814735 (도 1b; 오로라 키나제 A 및 B 억제제), ZM447439 (도 1b; 오로라 키나제 B를 억제함), SB747651A 다이하이드로클로라이드 (도 1b; 강력한 MSK1 억제제; 다른 AGC 그룹 키나제 또한 억제함), PFI1 (도 1b; BET 브로모도메인 억제제), LY303511 (도 1b; BRD2, BRD3 및 BRD4 억제제), MS436 (도 1b; 강력하고 선택적인 BRD4 브로모도메인 억제제), 및 MC1568 (도 1c; HDAC 클래스 II (IIa)를 선택적으로 억제함)의 첨가는 7기에서 S6D7, 또는 비처리 또는 DMSO 처리 배양물에 비교하여 MAFA의 발현을 유의하게 상향조절하였다. 도 1e 내지 도 1h는 소분자로 처리한 후의

UCN3의 발현의 정량적 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시하는 그래프이며, 5-아자시티딘 ("AZT") (도 1e; DNA 메틸트랜스퍼라제 억제제), 피록사미드 (도 1g; 히스톤 데아세틸라제 억제제), 및 CI994 (도 1g; 히스톤 데아세틸라제 억제제)의 첨가는 7기에서 S6D7, 또는 비처리 또는 DMSO 처리 배양물에 비교하여 UCN3의 발현을 유의하게 상향조절하였다.

[0214] 도 2a 및 도 2b는 MAFA 또는 UCN3 상향-조절제로서 선택된 소분자의 강건성을 나타내며, 이는 그들의 효과가 상이한 7기 조건화 프로토콜에 걸쳐 유지되기 때문이다.

[0215] 도 1a 및 도 2b에 나타낸 배양 조건은 7기 (S7)에서의 하기 변화에 의해 도 1과 상이하다: (i) ALK5 억제제 II의 제거 ("ALK5"); (ii) T3 농도의 강하 ("낮은 T3"); (iii) ZM447439의 첨가 ("ZM"); 및 (iv) 비타민, 미량 원소, 지질 및 아미노산의 칵테일의 첨가 (제형 I - 표 XII). 구체적으로, 시험한 기본 조건은 하기와 같다: (1) ALK5 억제제 II 없음 ("ALK5"); (2) 낮은 T3; (3) 낮은 ZM; (4) 낮은 H; (5) 낮은 NAC; (6) FI; 및 BLAR001. AZT는 7기 중에 UCN3 상향-조절제이지만(도 2b) MAFA 상향-조절제는 아닌 것으로(도 2a) 확인되었다. 시험된 소분자에 부가하여, 3-데아자네플라노신 A ("DEZA"; 도 2a)는, 심지어 ZM447439의 존재 하에서도, MAFA의 효과적인 상향-조절제이지만 UCN3 발현에 대해서는 그렇지 않은 것으로(도 2b) 확인되었다.

[0216] 요약하면, 본 실시예는 7기 중에 성숙 마커 MAFA, 또는 UCN3 발현을 상향 조절하는 소분자의 동정을 나타낸다.

[0217] **실시예 2**

[0218] **공기-대-액체 계면에서의, 개선된 성숙 마커 발현을 가지며 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학을 갖는 내분비 세포의 생성.**

[0219] 하기 실시예는, 하기 성숙화 마커를 공동-발현하고 인간 췌도 세포와 유사한 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학을 나타내는 C-펩티드 (프로-인슐린 분자에서 인슐린 A- 및 B-쇄를 연결하는 짧은 31 개 아미노산 폴리펩티드) 세포의 생성을 나타낸다: PDX1 (췌장 및 십이지장 호메오박스 1); NKX6.1 (NK6 호메오박스 1); MAFA UCN3; SLC2A1 (용질 담체 패밀리 2 멤버 1; GLUT1/글루코스 수송체 1로도 불림). 10 μM의 Rock 억제제 Y-27632 ("Y-화합물")로 보충된, 둘베코 변형 이글 배지 영양소 혼합물 F-12 ("DMEM-F12"), 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자 2 ("FGF2"), 1 ng/ml의 형질전환 성장 인자 베타 ("TGFβ"), 1:100 희석으로 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민 ("ITS-X"), 2% 무지방산소 혈청 알부민 ("FAF-BSA"), 및 20 ng/ml의 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1")의 배지 중에, 1:30 희석으로 MATRIGEL™ 코팅된 디쉬 상에, 계대 28에서 EZ8 배지를 갖는 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포 ("H1-hESC")를 단일 세포로서 0.094 × 10^6 개의 세포/㎠로 접종하였다. 접종 후 48시간에, 배양물을 불완전 PBS(마그네슘 또는 칼슘이 없는 포스페이트 완충 식염수) 중에 세척하였다.

[0220] 도 3a 내지 도 3m, 도 4a 내지 도 4e 및 도 5a 내지 도 5f의 경우, 하기 프로토콜을 사용하여 배양물을 분화시켰다. 프로토콜의 1기 내지 4기 중에, 배양은 평면 부착 배양으로 유지하였다.

[0221] a. 1기 (3일): 세포를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml 성장 분화 인자 8 ("GDF8"), 및 1.5 μM의 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 ("MCX 화합물")로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1 μM MCX 화합물로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8로 보충한 MCDB-131에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0222] b. 2기 (2일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 7 ("FGF7")로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0223] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민); 1 μM 레티노산("RA"); 0.25 mM의 아스코르브산; 300 nM의 PKC 활성화제 ((2S, 5S-(E,E)-8-(5-(4-트라이플루오로메틸)페닐-2,4,-펜타다이에노일아

미노)벤조락탐 ("TPB"); 및 골형성 단백질 ("BMP") 수용체 억제제 LDN-193189-HCl ("LDN-HCL")로 보충한 BLAR001 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다. 3기의 제1일에 사용된 LDN-HCL의 농도는 100 nM 이었고, 3기의 제2일의 경우에는 50 nM이었다.

[0224] d. 4기 (3일) 및 S4D3에서의 ALI-이행: 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 70 nM LDN-HCl; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다. 4기의 마지막에(3일), 평면 디쉬 상에서 배양된 세포를 공기-액체-계면 ("ALI") 상에 접종하였다. ALI 이행의 경우, 세포를 10 μM의 Y-화합물로 4 시간 동안 처리하고, PBS로 헹구고, 1X의 농도에서 효소 TrypLE™ Express Enzyme으로 대략 2 분 동안 처리하고, 이어서 효소를 제거하고, 플라스크를 부드럽게 두드림으로써 MATRIGEL™ 표면 상으로부터 세포를 제거하였다. 생성된 세포 현탁액을 0.5 내지 1.0 × 10^6 개의 세포 (5 μl 분취물 중)의 밀도로 10 cm 플레이트 내의 0.4 마이크로미터 또는 3.0 마이크로미터 다공성 세포 배양 필터 인서트 상에 접종하였다. 8.0 ml의 배지를 각각의 인서트의 바닥에 첨가하였고 어떠한 추가의 배지도 필터의 정점면, 또는 윗면에 첨가하지 않았다. 5기, 6기 및 7기의 지속기간 동안 배지를 매일 교체하였다.

[0225] e. 5기 (3일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 3,3′ , 5-트라이요오도-L-트리오닌 소듐 염 형태의 1 μM의 T3 (Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 T6397); 10 μM의 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘 ("ALK5 억제제 II" 또는 "ALK5")으로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 3일 동안 세포를 처리하였다.

[0226] f. 6기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM의 Zn_3O4; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM ALK5 억제제 II; 및 100 nM (S,S)-2-[2-(3,5-다이플루오로페닐)아세틸아미노]-N-(5-메틸-6-옥소-6,7-다이하이드로-5H-다이벤조[b,d]아제핀-7-일)프로피온아미드 ("감마 세크레타제 억제제 XX")로 보충된 BLAR001 배지로 ALI 상에서 7일 동안 세포를 처리하였다.

[0227] g. 7기 (7일): ALI 상의 세포를 2 종류의 주문 제작 BLAR 배지, BLAR001 및 BLAR004로 처리하였다. 제1 배지는, 7일 동안 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 1 mM N-아세틸 시스테인 ("NAC"); 0.5 μM의 ZM447439 ("ZM"); 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 – RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질 농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A의 1:2000 희석액; 미량 원소 B의 1:2000 희석액으로 보충된 BLAR001 배지이다 (성분 목록은 표 I에 약술되어 있음). 7기 중에 첨가되는 부가적인 화합물은 1 μM의 T3 또는 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 10 μM ALK5 억제제; 5 μM 5-아자시티딘 ("AZT"); 또는 1 μM 또는 10 μM 3-데아자네플라노신 A ("DEZA")를 포함하였다.

[0228] 제2 배지는, 7일 동안 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 1 mM N-아세틸 시스테인 ("NAC"); 0.5 μM의 ZM447439 ("ZM"); 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 – RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질 농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A의 1:2000 희석액; 미량 원소 B의 1:2000 희석액으로 보충된 BLAR004 배지이다 (성분 목록은 표 IV에 약술되어 있음). 7기 중에 첨가되는 부가적인 화합물은 1 μM의 T3 또는 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 10 μM ALK5 억제제; 5 μM 5-아자시티딘 ("AZT"); 또는 1 μM 또는 10 μM 3-데아자네플라노신 A ("DEZA")를 포함하였다.

[0229] [표 IV]

BLAR 배지의 성분 목록

아미노산	농도 (mM)
글리신	2.0E-01
알라닌	2.0E-01
아르기닌	5.0E-02
아스파라긴	2.0E-02
아스파르트산	2.0E-02
시스테인	3.0E-02
글루탐산	5.0E-02
히스티딘	8.0E-02
아이소류신	7.0E-02
류신	1.5E-01
라이신 하이드로클로라이드	2.0E-01
메티오닌	2.0E-02
페닐알라닌	6.0E-02
프롤린	1.0E-01
세린	1.0E-01
트레오닌	1.4E-01
트립토판	5.0E-02
타이로신다이소듐	6.0E-02
발린	2.0E-01
비타민	
비오틴	3.0E-05
콜린 클로라이드	5.0E-03
D-칼슘 판토테네이트	1.5E-03
엽산 칼슘 염	2.3E-03
니아신아미드	4.9E-03
피리독신 하이드로클로라이드	9.7E-04
리보플라빈	1.0E-05
티아민 하이드로클로라이드	3.0E-03
비타민 B12	3.7E-06
i-이노시톨	2.8E-03
DL-알파-토코페롤 아세테이트	1.0E-03
아스코르브산	5.0E-02
레티놀, 모두 트랜스 (Vit. A)	1.0E-04
25-하이드록시비타민 D	3.0E-05
비타민 K1- (필로퀴논)	1.0E-09
파라-아미노벤조산	3.0E-04
콜레스테롤	1.0E-04
염	
염화칼슘 ($CaCl_2$-$2H_2O$)	3.0E-01
황산제 2 구리 ($CuSO_4$-$5H_2O$)	4.8E-06
황산제 2 철 ($FeSO_4$-$7H_2O$)	1.0E-03
황산마그네슘 ($MgSO_4$-$7H_2O$)	4.1E-01
염화칼륨 (KCl)	3.8E+00
중탄산나트륨 ($NaHCO_3$)	1.4E+01
염화나트륨 (NaCl)	1.1E+02
제 2 인산나트륨 (Na_2HPO_4-7H2O)	5.0E-01
황산아연 ($ZnSO_4$-H_2O)	1.0E-04
기타	
아데닌	1.0E-03
D-글루코스 (덱스트로스)	5.0E+00
리포산	1.2E-05
페놀 레드	1.0E-02
소듐 피루베이트	1.0E-01
티미딘	9.8E-05
푸트레신	1.0E-02
글루타티온	1.0E-03

[0230]

[0231] **분화된 세포의 특성화 및 정량화:** 다양한 단계에서의 유전자 발현의 정량화를 위해, 문헌[Rezania et al., *Nature Biotechnology*, 2014; 32(11): 1121-1133]에 기재된 바와 같이, 인간 췌도, H1-hESC, 6기 제7일 (S6D7), 및 7기 제7일 내지 7기 제14일 (S7D7 내지 S7D14) 세포를 ALI 클러스터로서 수확하였다. 주문 제작 Taqman Arrays (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Applied Biosystems)를 사용하여 세포에서 유전자 발현을 평가하였다. 데이터를 Sequence Detection 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Applied Biosystems)를 사용하여 분석하고, 하우스키핑 유전자로서 GAPDH를 사용하여 ΔΔCt 방법을 사용하여 미분화된 H1-hESC에 대해 정규화하였다. 프라이머 상세사항은 표 V에 약술되어 있다.

[0232] [표 V]

qRT-PCR 프라이머 목록.

	유전자	검정 ID
1	GJD2	Hs00950432_m1
2	GLP1R	Hs00157705_m1
3	INHA	Hs00171410_m1
4	INHBB	Hs00173582_m1
5	PDK1	Hs00176853_m1
6	SIX2	Hs00195590_m1
7	UCP2	Hs01075227_m1
8	SLC2A1	Hs00892681_m1
9	G6PC2	Hs01549773_m1
10	INS	Hs00355773_m1
11	NKX6.1	Hs00232355_m1
12	PDX1	Hs00236830_m1
13	NEUROD1	Hs00159598_m1
14	CHGA	Hs00154441_m1
15	MAFA	Hs04419861_sH
16	UCN3	Hs00846499_s1
17	GAPDH	Hs99999905_m1

[0233]

[0234] 다양한 단계에서의 단백질 공동-국소화의 정량화를 위하여, 인간 췌도 및 S7D7 세포를 ALI 세포 클러스터로서 수집하고, 면역형광 ("IF")에 의해 분석하였다. 실질적으로 상기 문헌[Rezania *et al.* (2014)]에 기재된 바와 같이, 그리고 본 명세서에서 표 VI에 열거된 항체를 사용하여, H1-hESC-유래 세포를 제조하고 염색하였다. 냉동절편화를 위해, 세포를 PBS로 헹구고, 이어서 4℃에서 4% PFA 중에 하룻밤 고정시켰다. 고정 후, 4% PFA를 제거하고, 세포를 PBS로 2 회 헹구고, 30% 수크로스 용액 중에 4℃에서 하룻밤 인큐베이션하였다. 샘플을 OCT 용액 중에 냉동보존하고, 5 μm 절편을 Superfrost 플러스 슬라이드 (미국 펜실베이니아주 래드너 소재의 VWR International, LLC, 카탈로그 번호 48311-703) 상에 놓았다.

[0235] IF-염색을 위하여, 1차 항체를 4℃에서 하룻밤 적절한 희석물로 첨가하고, 한편 2차 항체를 실온에서 30분 동안 첨가한 후, PBS로 헹구고, Vectastain 마운팅 시약을 DAPI (미국 캘리포니아주 벌링게임 소재의 Vector Laboratories Inc., 카탈로그 번호 H-1200)와 함께 첨가하였다. Nikon Ti 형광 현미경 (미국 뉴욕주 멜빌 소재의 Nikon Instruments, Inc.)을 사용하여 절편을 시각화하였다.

[0236] [표 VI]

IF 분석에 사용된 항체 목록

항원	종	공급처	희석
C-펩티드	마우스	Abcam (카탈로그 번호 ab8297)	1:100
글루카곤	토끼	Abcam (카탈로그 번호 ab92517)	1:100
PDX1	염소	R&D Systems (카탈로그 번호 AF2419)	1:33
MAFA	토끼	Life Span Biosciences (카탈로그 번호 LP9872)	1:100 (항원 회수)
GLUT1	토끼	Abcam (카탈로그 번호 ab115730)	1:300
NKX6.1	토끼	Novus Biologicals (카탈로그 번호 NBP1-49672)	1:100
UCN3	토끼	Novus Biologicals (카탈로그 번호 NBP1-80732)	1:100 (항원 회수)
NEUROD1	토끼	Abcam (카탈로그 번호 16508)	1:100
KI67	토끼	Abcam (카탈로그 번호 ab16667)	1:100 (항원 회수)
SOX2	염소	Sigma (카탈로그 번호 sc-17320)	1:50
CDX2	마우스	BioGenex (카탈로그 번호 MU392A-UC)	1:50
당나귀 항-마우스 IgG (H+L) 2 차 항체, Alexa Fluor 488	마우스	Life Technologies (카탈로그 번호 A21202)	1:50
당나귀 항-토끼 IgG (H+L) 2 차 항체, Alexa Fluor 546	토끼	Life Technologies (카탈로그 번호 A10040)	1:100 내지 1:200
당나귀 항-염소 IgG (H+L) 2 차 항체, Alexa Fluor 546	염소	Life Technologies (카탈로그 번호 A11056)	1:50

[0237]

[0238] 다양한 단계에서 글루코스-의존성 미토콘드리아 활성의 정량화를 위해, 성숙 인간 췌도, S6D7 ALI 클러스터, 및 S7D7 ALI 클러스터를 수확하고, 20 mM D-글루코스의 주입 전 및 후에 XF^{e}24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, 카탈로그 번호 102238-100) 상에서 그들의 산소 소비율 ("OCR")을 측정하였다. ALI 클러스터를 그들의 7기 조건화로부터 제거하고, 37℃ 비-CO2 환경 및 기준선 OCR을 달성하도록 설계된 배지 둘 모두에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 예비-인큐베이션 배지는 XF 기본 배지 중에 1 mM D-글루코스, 1 mM L-글루타민 및 1 mM 소듐 피루베이트를 함유한다. 사전 인큐베이션 후에, Seahorse 기계 상에 ALI 클러스터를 로딩하고, 하기 측정을 실행하였다: (i) 3X 기준선 OCR (사전 -D-글루코스 주입); 및 (ii) 5X D-글루코스 후 (주입 후 인큐베이션 시간: 72 분). 모든 OCR 측정을 스피너 내의 ALI 또는 Aggrewell 클러스터의 개별 샘플의 DNA 함량에 대해 정규화하였다. QIAamp DNA MicroKit (Qiagen, 카탈로그 번호 56304)에 의해 DNA를 단리하고, NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, 카탈로그 번호 ND8000)에 의해 DNA 함량을 측정하였다.

[0239] 도 3a 내지 도 3m은, 7일의 7기 조건화 후에, ALI 세포 클러스터에서 성숙 마커 세트의 유전자 발현이 인간 췌도에서 관찰된 수준으로 증가됨을 나타낸다. 성숙 마커는 본 명세서에서 신속한 글루코스-자극된 인슐린 분비(GSIS)를 양성 자극하는 것과 관련된 유전자로서 정의된다. 하기 목록은 ALI 클러스터에서 S7D7에 의한 성숙 마커의 유전자 발현을 개선하는 것으로 관찰된 7기 분화 프로토콜의 변화를 상술한다: (i) ALK5 억제제 II의 제거; (ii) T3 농도의 강하; (iii) DEZA의 첨가; (iv) AZT의 첨가; (v) ZM의 첨가; (vi) 글루코스 농도를 5.56 mM로 낮추는 단계; 및 (vii) 정의된 비타민, 비-필수 아미노산, 지질, 소듐 피루베이트 및 미량 원소 (제형 I — "FI")의 칵테일의 첨가. 7기 중의 BLAR001 및 BLAR004 기반 조건화 둘 모두에 대한 성숙 유전자의 유전자 발현 시그너처에 관하여 유사한 관찰 및 결과가 나타났다. 도 3a는 ALK5 억제제 II를 이용하는 조건에서 INHBB가 인간 췌도에서 나타나는 발현을 초과하여 강화되었음을 나타낸다. 관찰은, S7-세포에서, ALK5 억제제 II에 의한 TGFB1 (형질전환 성장 인자 베타 1)의 억제는 GSIS 과정을 억제하는 음성 TGF-베타 신호전달 프로파일을 유도함을 시사한다. AZT/DEZA의 부재 또는 존재 하의 ALK5 억제제의 제거는 인간 췌도에서 나타나는 수준으로 INHBB를 감소킴으로써 7기 중에 GSIS에 대한 음성 TGF-베타 신호전달 영향을 제거하는 것으로 관찰되었다. 부가적으로, 도 3b는 INHA 발현이 ALK5 억제제 II의 제거에 의해 ALI 클러스터 내의 인간 췌도 수준으로 증가되는 것으로 관찰되었음을 나타낸다.

[0240] 각각 도 3c 및 도 3d에 나타낸 MAFA 및 SLC2A1 발현은 ALK5 억제제 II의 제거에 의해 감소된 것으로 관찰된 반

면에, AZT/DEZA의 첨가는 MAFA 및 SLC2A1 발현을 인간 췌도 수준으로 구조한다. UCN3 (도 3e), G6PC2 (글루코스 -6-포스파타아제 촉매 서브유닛 2; 도 3f), 및 PDK1 (피루베이트 데하이드로게나제 키나제 1; 도 3g) 발현은 AZT/DEZA의 첨가 및 ALI 클러스터 내의 ALK5 억제제 II의 제거에 의해 인간 췌도 이상의 수준으로 증가되었다. INS (인슐린; 도 3h), GJD2 (간극 연접 단백질, 델타 2; 또한 CX36/코넥신 36; 도 3i), SIX2 (6 호메오박스 2; 도 3j), 및 PDX1 (도 3k)의 발현은 첫째로 ALK5 억제제 II의 제거에 의해, 그리고 둘째로 AZT/DEZA의 첨가에 의해 점진적인 단계적 방식으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 조건에 걸쳐 NKX6.1 (도 3l), 및 GLP1R (글루카곤 유사 펩티드 1 수용체; 도 3m)의 발현에는 변화가 관찰되지 않았지만, ALI 클러스터에서의 그의 발현은 일관되게 인간 췌도에서 관찰된 수준 이상이었다.

[0241] 도 4a 내지 도 4e는, 단백질 존재의 관점에서, S7D7에서 하기 성숙 마커를 공동-발현하는 ALI 세포 클러스터 내의 C-펩티드 세포의 생성을 나타낸다: PDX1 (도 4a), NKX6.1 (도 4b), MAFA (도 4c), SLC2A1 (도 4d) 및 UCN3 (도 4e). 도 4a 내지 도 4e 각각에 대해, IF-염색은 상부 행 상의 C-펩티드 및 하부 행 내의 관심의 대상인 성숙 단백질과 함께 단일 채널로서 도시되어 있다. 대표적인 인간 췌도 염색은 좌측 칼럼에 나타내고, ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR001 조건은 중간 칼럼에 나타내며, ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR004 조건은 우측 컬럼에 나타낸다. 인간 췌도에서 관찰되는 바와 같이, 전부는 아니더라도 대부분의 C-펩티드 양성 세포는 PDX1 (도 4a) 및 NKX6.1 (도 4b)에 대해 동시-양성이었다. C-펩티드 양성 세포의 유의한 부분은 또한 BLAR001 및 BLAR004 조건 둘 모두에 걸쳐 MAFA (도 4c), SLC2A1 (도 4d) 및 UCN3 (도 4e)에 대해 동시-양성이었다. 그러나, MAFA, SLC2A1 및 UCN3의 발현은 C-펩티드 동시-양성 세포로 제한되지 않았다.

[0242] 도 5a 내지 도 5e는, 구체적으로 7기 특이적 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT, DEZA, FI, BLAR001' 조건화에 의한, 공기-대-액체 계면 ("ALI") 상의 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학을 나타내는 S7D7에서의 C-펩티드 세포의 생성을 나타낸다. 산화성 소비율 ("OCR")에 의해 나타나는 미토콘드리아 호흡 또는 활성은 기준선 및 20 mM D-글루코스 주입 후에 측정하였다. 72 분의 기간에 걸친 5 개의 OCR 측정을 20 mM D-글루코스 주입 후에 실행하였고, 측정은 각각의 개별 샘플의 DNA 함량에 의해 정규화된 OCR의 기준선에 대한 백분율로서 도시되어 있다. 도 5a는 인간 췌도 (흑색 원 라인)가 높은 D-글루코스에 신속하게 반응하고 (주입 ("ip") 후 15 분 ("min") 후에 기준선에 비해 OCR 123.3% ± 12.92에 의해 입증됨), 시간 경과에 따라 높은 OCR을 유지하였음을 나타낸다(131.5% ± 11.32; 72 분 ip). 역으로, 미성숙 C-펩티드 양성 세포가 강화된 S6D7 ALI 클러스터 (회색 삼각형 선)는 높은 D-글루코스에 대한 신속한 OCR 반응이 결여되어 있고 (104.4% ± 3.37; 15 분 ip), 시간 경과에 따른 상대적으로 약한 OCR 반응 (113.3% ± 4.51; 72 분 ip)을 나타내는 것으로 관찰되었다. 도 5d는 S7D7 ALI 클러스터 그룹 내에서만 ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR001 조건 (회색 정사각형 라인)이 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학 (112.4% ± 3.25 – 15 분 ip; 129.5% ± 3.78 – 72 분 ip)을 나타내는 것으로 관찰되었음을 도시한다. 하기 S7D7 ALI 클러스터 조건 (흑색 정사각형 라인)은 미성숙 S6D7 ALI 클러스터와 구별할 수 없는 글루코스-의존성 미토콘드리아 동력학을 나타내는 것으로 관찰되었다: ALK5, T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR001 (100.3% ± 4.04 – 15 분 ip; 107.8% ± 6.51 – 72 분 ip) (도 5b); ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR001 (96.9% ± 3.06 – 15 분 ip; 109.0% ± 4.58 – 72 분 ip) (도 5c); ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR004 (103.4% ± 4.76 – 15 분 ip; 113.6% ± 6.72 – 72 분 ip) (도 5e); 및 ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT/DEZA, FI, BLAR004 (102.1% ± 4.04 – 15 분 ip; 112.7% ± 3.38 – 72 분 ip) (도 5f).

[0243] 요약하면, 본 실시예는 7기 조건화에 개선을 포함하는 것이 ALI 상의 hESC-유래 성숙 베타-세포의 성숙 상태를 향상시킴을 입증한다. 구체적으로, 본 실시예는 다수의 베타-세포 성숙 마커를 공동-발현하는 C-펩티드 세포의 ALI 상에서의 생성을 나타내며, 인간 췌도와 유사한 베타-세포-특이적 기능성, 예컨대 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡을 나타낸다.

[0244] **실시예 3**

[0245] **가변성 현탁 배양을 가능하게 하는 세포 클러스터 포맷의 강건한 췌장 내배엽 및 미성숙 베타-세포의 생성**

[0246] 하기 실시예는 가변성 현탁 배양을 가능하게 하는 Aggrewell™ 세포 클러스터 포맷에서의 강건한 췌장 내배엽 또는 미성숙 베타 세포의 생성을 나타낸다. 본 실시예에 사용된 현탁 배양물은 스피너 플라스크에서 배양된 Aggrewell™ 클러스터 ("스피너 내의 Aggrewell™ 클러스터")였다. 10 μM의 Rock 억제제 Y-27632 ("Y-화합물")로 보충된, 둘베코 변형 이글 배지 영양소 혼합물 F-12 ("DMEM-F12"), 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자 2 ("FGF2"), 1 ng/ml의 형질전환 성

장 인자 베타 ("TGFβ"), 1:100 희석으로 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민 ("ITS-X"), 2% 무지방산 소 혈청 알부민 ("FAF-BSA"), 및 20 ng/ml의 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1")의 배지 중에, 1:30 희석으로 MATRIGEL™ 코팅된 디쉬 상에, 계대 28에서 EZ8 배지를 갖는 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포 ("H1-hESC")를 단일 세포로서 0.094 × 10^6 개의 세포/㎠로 접종하였다. 접종 후 처음 24 시간 동안에만 Y-화합물을 첨가하였다. 접종 후 48시간에, 배양물을 불완전 PBS(마그네슘 또는 칼슘이 없는 포스페이트 완충 식염수를 의미하는 "-/-"로서 표기함) 중에 세척하였다.

[0247] 도 6a 내지 도 6l의 경우, 배양물을 하기 프로토콜을 사용하여 분화시켰다. 4기 제3일에, 부가적인 48 시간 동안 (4기 제5일 또는 S4D5) 배양함으로써 (하기에 더욱 상세하게 기재된 바와 같이) 신선한 S4D3 단층 또는 냉동보존된 S4D3 세포로부터 Aggrewell™ 세포 클러스터를 제조한 점을 제외하고는, 도 6i 내지 도 6l에 나타낸 S6D6 ALI 세포 클러스터를 상기 기재된 바와 같이 배양하였다. 배지를 분화 프로토콜 전체에 걸쳐 매일 교환하였다.

[0248] a. 1기 (3일): 세포를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-, 100 ng/ml 성장 분화 인자 8 ("GDF8"), 및 1.5 μM의 14-프로프-2-엔-1-일-3,5,7,14,17,23,27-헵타아자테트라사이클로 [19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]헵타코사-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-노나엔-16-온 ("MCX 화합물") (GSK-3β 억제제)로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1 μM MCX 화합물로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8로 보충한 MCDB-131에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0249] b. 2기 (2일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 7 ("FGF7")로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0250] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민); 1 μM 레티노산 ("RA") (Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 R2625); 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM의 PKC 활성화제 (2S, 5S-(E,E)-8-(5-(4-트라이플루오로메틸)페닐-2,4,-펜타다이에노일아미노)벤조락탐 ("TPB"); 및 골형성 단백질 ("BMP") 수용체 억제제 LDN-193189-HCl ("LDN-HCL")로 보충한 BLAR001 주문 제작 배지 (표 I 참조)로 2일 동안 세포를 처리하였다. 3기의 제1일에 사용된 LDN-HCL의 농도는 100 nM이었고, 3기의 제2일의 경우에는 10 nM이었다.

[0251] d. 4기 (3일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 70 nM LDN-HCl; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다.

[0252] e. 4기 제3일 단층의 냉동보존: S4D3 단층으로부터의 냉동보존된 세포 뱅크를 하기 절차에 의해 확립하였다. 요약하면, S4D3 단층을 10 μM Y-화합물로 4 시간 동안 처리하였다. 이어서, TrypLE™ Express Enzyme으로 세포를 단일 세포 현탁액으로서 방출한 후, '방출' 배지 ("섹션 k" 에 상술된 바와 같이 4 kU/ml DNase I 및 10 μM Y-화합물로 보충된 4기 완전 배지)로 효소를 중화시켰다. 단일 세포를 스핀 다운하고, 저온 '방출' 배지에 재현탁시키고, Nucleocounter® NC-100에 의해 계수하였다. 저온 '냉동보존'배지 (60% KSR; 15% BLAR001; 5% HEPES (1 M 농도); 20% DMSO)를 1 대 1 비로 저온 '방출' 배지 중의 단일 세포 현탁액에 첨가하였다. 4.5 ml의 1 대 1 '냉동 보존/방출' 배지 중의 5.0 × 10^6 개의 세포를 단일 5 ml 냉동보존 바이알에 첨가하였다. 바이알 (들)을 CRF (Controlled rate Freezer) (Planar PLC, 카탈로그 번호 Kryo 360)로 옮겼으며, 여기서 하기 동결 프로파일에 의해 세포를 동결하고 액체 질소 중에 장기간 보관하였다. CRF 동결 절차는 표 VII에 나타낸다.

[0253] f. 냉동보존된 S4D3 단층 세포의 해동: 5.0 × 10^6 개의 S4D3 단층 세포를 함유하는 동결된 5 ml 바이알을 37℃ 수조에서 2 분 동안 해동시켰다. 세포를 S4D3 후 배지에서 수집하고 (하기 섹션 "g" 에 상술됨), Aggrewell™

400EX 플레이트의 Aggrewell™ 웰 당 대략 787 개의 세포의 밀도로 첨가하였다.

[0254] g. Aggrewell™ 클러스터 이행을 위한 4기 (2일): Aggrewell™ 클러스터 생성을 위해, 4기 제3일 단층 세포, 또는 해동된 냉동보존된 4기 제3일 세포를 Y 화합물로 4 시간 동안 처리하고, PBS로 헹구고, Accutase Cell Detachment 용액으로 3 분 동안 처리하고, 이어서 효소를 제거하고, 플라스크를 부드럽게 두드림으로써 MATRIGEL™ 표면 상에서 세포를 제거하였다. 생성된 세포 현탁액을 Aggrewell™ 400EX 플레이트의 Aggrewell™ 웰 당 대략 787 개의 세포의 밀도로 첨가하고, 플레이트를 100 × g에서 부드럽게 스핀 다운하여, Aggrewell™ 클러스터를 생성하였다. 클러스터당 세포의 양은 50 내지 3000 세포의 범위일 수 있다. 4기 제3일 단층 세포를 Aggrewell™ 클러스터로 이행시키고, 응집 후 48 시간 배양하기 위해 사용된 배지는 하기와 같다 ("S4D3 후 배지"): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 70 nM LDN-HCl; 0.25 mM의 아스코르브산; 및 200 nM의 TPB로 보충된 BLAR001 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다. 10 μM Y-화합물 및 2 μg/ml 인간 재조합 라미닌을 처음 24 시간 동안에만 배지에 첨가하였다. 본 명세서에서 S4D5로 지칭되는 2일 후에, Aggrewell™ 클러스터를 Aggrewell™ 플레이트의 웰로부터 제거하고, PBS0.1MAG 스피너로 옮겼다 ("현탁액 중의 Aggrewell 클러스터").

[0255] h. 5기 (3일): 5기 배지에서 3일 동안 S4D5 Aggrewell™ 클러스터를 Aggrewell™400EX 플레이트로부터 회수하고, 1.5 내지 2.0 백만 개의 세포/ml의 세포 밀도로 27 rpm (분당 회전수)의 회전 속도를 갖는 PBS0.1MAG 스피너로 옮겼다. 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 3,3',5-트라이요오도 -L-트리오닌 소듐 염 형태의 1 μM의 T3; 및 10 μM의 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘 ("ALK5 억제제 II" 또는 "ALK5") 으로 보충된 BLAR001 배지로 세포를 처리하였다. 4 kU/ml의 DNaseI 및 5 μM Y-화합물을 5기 제1일에만 보충하였다.

[0256] i. 6기 (6일 내지 8일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM의 ALK5 억제제 II; 및 100 nM (S,S)-2-[2-(3,5-다이플루오로페닐)아세틸아미노]-N-(5-메틸-6-옥소-6,7-다이하이드로-5H-다이벤조[b,d]아제핀-7-일)프로피온아미드 ("감마 세크레타제 억제제 XX")로 보충된 BLAR001 배지 중에 Aggrewell™ 클러스터를 처리하였다.

[0257] [표 VII]

CRF 동결 절차.

S4D3 단층 동결 프로파일			
단계	냉각 속도 (℃/min)	목표 온도 (℃)	다음으로 냉각
1	대기	4	해당 없음
2	온도를 기다림	4	챔버
		6	샘플
3	1	-7	샘플
4	25	-45	챔버
5	10	-25	챔버
6	0.2	-45	샘플
7	25	-160	챔버
8	유지 (20 분)	-160	해당 없음

[0258]

[0259] **분화된 세포의 정량화 및 특성화:** 다양한 단계에서 단백질 공동-국소화를 정량화하기 위하여, S4D5 Aggrewell™ 클러스터 및 S6D6 Aggrewell™ 클러스터를 수확하고 면역형광 ("IF")에 의해 분석하였다. 사용한 특성화 절차 및 시약은 실시예 2의 표 VI에 나타낸 바와 같았다.

[0260] 다양한 단계에서 유전자 발현의 정량화를 위해, 4기 제5일 Aggrewell™ 클러스터 및 6기 제6일 Aggrewell™ 클러스터를 수확하고, 문헌[*Nature Biotechnology*, (32) 11, 1121-1133]에 기재된 바와 같이 역전사효소 정량적 중합효소 연쇄 반응 ("qRT-PCR")에 의해 분석하였다. 사용한 특성화 절차 및 시약은 실시예 2의 표 V에 나타낸 바와 같았다.

[0261] 단백질 존재 공동-국소화의 정량화를 위해, 4기 제5일 Aggrewell™ 클러스터 및 6기 D6 Aggrewell™ 클러스터를 수확하고, 형광-활성화 유세포 분석법 (fluorescence-activated flow cytometry, "FACS")에 의해 분석하였다.

문헌[*Nature Biotechnology*, 2014 (32) 11, 1121-1133]에 기재된 바와 같이, 그리고 표 VII에 열거된 항체를 사용하여 FACS 염색을 수행하였다. 분화된 세포를 37℃에서 5 내지 10 분 동안 TrypLE™ Express 중에 인큐베이션하고, 단일 세포 현탁액으로 방출한 후, 0.2% BSA를 함유하는 PBS의 염색 완충액으로 그들을 2 회 세척하였다. 4℃에서 30 분 동안 LIVE/DEAD Violet Fluorescent 반응성 염료를 이용한 후, 저온 PBS 중에 단회 세척함으로써 세포내 항체 염색을 수행하였다. 300 μl의 Cytofix/Cytoperm Buffer 중에 세포를 고정하였고, 이어서 Perm/Wash Buffer에 2 회 세척하였다. 이어서, 세포를 4℃에서 30분 (비접합된 항체의 경우) 또는 1시간 (접합된 항체의 경우) 동안 적절한 항체와 함께 인큐베이션하고, 이어서 2회 세척한 후, BD FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 BD FACS Canto II 상에서 분석하였으며, 30,000회 이상의 사건을 획득하였다. 생존 불가능한 세포를 FACS 분석 동안 배제시키고, 동종형 항체 ("IgG")를 사용함으로써 게이팅(gating)을 결정하였다.

[0262] [표 VIII]

FACS 분석에 사용된 항체 목록.

항원	종	공급처/카탈로그 번호	희석
Alexa Fluor 647 항-KI67	마우스	BD, 카탈로그 번호 561126	무희석
PE 항-PDX1	마우스	BD, 카탈로그 번호 562161	무희석
Alexa Fluor 647 항-인슐린	토끼	Cell Signaling, 카탈로그 번호 9008S	1:80
인슐린	토끼	Cell Signaling, 카탈로그 번호 3014S	1:10
PE 항-NKX6.1	마우스	BD, 카탈로그 번호 563023	1:40
CHGA	토끼	DAKO, 카탈로그 번호 IS502	1:10
PE 항-NEUROD1	마우스	BD, 카탈로그 번호 563001	1:40
글루카곤	마우스	Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 G2654	1:250
항-마우스 IgG (H+L) 2 차 항체, Alexa Fluor 647 접합체	염소	Life technology, 카탈로그 번호 A21235	1:4000
F(ab')2 항-토끼 IgG (H+L) 2 차 항체, RPE 접합체	염소	Life technology, 카탈로그 번호 A10542	무희석

[0263]

[0264] 도 6a는 (i) 신선한 S4D3 단층 또는 S4D3 냉동보존된 세포를 (ii) Aggrewell™ 방법을 통해 (iii) 세포 클러스터로 조립한 절차를 도시한다. 도 6b는 췌장 내배엽 TF PDX1 (*상부, 좌측*), 및 NKX6.1 (*상부, 중간*)의 높은 단백질 존재, 그러나 내분비 TF NEUROD1 (*상부, 우측*), TF SOX2를 할당하는 대체 비-췌장 내배엽 계통 (*하부, 중간*), 및 CDX2 (*하부, 우측*)의 낮은 단백질 존재가 S4D5 Aggrewell™ 클러스터에서 검출되었음을 나타낸다. FACS 분석 (도 6c)은, 99.3 ± 0.1%의 세포가 $PDX1^+$ (*좌측*), 84.4 ± 0.1%가 $NKX6.1^+$ (*중간*)였으나, 2.2 ± 0.4%가 $NKX6.1^+$ $NEUROD1^+$ (*우측*)이거나 1.35 ± 0.55%가 $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ (*중간*) 였음을 나타낸다. 도 6d는, S4D3 단층에 비교하여 PDX1 (*상부,* 좌측), NKX6.1 (*상부,* 우측)의 높은 유전자 발현, 및 NEUROD1 (*하부,* 좌측) 및 CHGA (*하부, 우측*)의 낮은 발현이 유지되었으므로, S4D3 냉동보존된 세포로부터 유래된 S4D4 Aggrewell™ 클러스터에서 강건한 췌장 내배엽 특징이 유지되었음을 나타낸다. 전체적으로, S4D5 Aggrewell™ 클러스터는 문헌[*Nature Biotechnology*, 2014 (32) 11, 1121-1133]에 보고된 이전의 4기 세포보다 더 큰 정도의 비-내분비 췌장 내배엽 특징을 나타냈다. Aggrewell™ 클러스터가 베타 세포를 향한 분화에 기초하여 현탁 배양물을 개발하는 가변성 시작점을 제공하므로, 그 결과는 유의하다.

[0265] 도 6e는 (i) 신선한 S4D3 단층 또는 S4D3 냉동보존된 세포를 (ii) Aggrewell™ 방법을 통해 세포 클러스터로 조립하고, (iii) 현탁 배양에서 (iv) S6D6에 의해 미성숙 베타-세포로 분화시킨 절차를 도시한다. S6D6 Aggrewell™ 클러스터의 FACS 분석은, 78.5 ± 1.87%의 세포가 $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ (좌측, 도 6f), 73.6 ± 4.34%가 $NKX6.1^+$ $NEUROD1^+$ (우측, 도 6f), 그리고 38.4 ± 5.96%가 $NKX6.1^+$ $인슐린^+$ (좌측, 도 6g)였으므로, 미성숙 베타-세포 단백질 프로파일을 나타낸다. 인슐린 양성 집단의 대부분 (총 세포의 50.2 ± 6.92%는 $인슐린^+$였음)은 $NKX6.1^+$ (*좌측*, 도 6g)였고 글루카곤-양성이 아니었다 (7.43 ± 1.49% $인슐린^+$ $글루카곤^+$; (*우측*, 도 6g)). 도 6h는, IF에 의해 S6D6에서 Aggrewell™ 클러스터 내의 $C\text{-펩티드}^-$양성 세포의 대부분이 둘 모두 PDX1+ (좌측) 및 NKX6.1+ (중간)였음을 나타낸다. 의외로, 성숙 게이트키퍼 TF MAFA (*우측*)의 단백질 존재가 S6D6에서 이미 용이하게 검출되었고, S6D6 내지 S6D7에서의 이전의 ALI 클러스터 (문헌 [*Nature Biotechnology*, 2014 (32) 11, 1121-1133])보다 더 높은 수준으로 발현되었다 (도 6i; 또한 ALI S7D7 비교를 위한 도 3c 참조). 유사하게, 인슐린 (도 6j), PDX1 (도 6k) 및 NKX6.1 (도 6l)의 발현은 S6D6 내지 S6D7에서의 이전의 ALI 클러스터보다 더 높았다. 결과는 S4D5 Aggrewell™ 클러스터를 현탁 배양에서 미성숙 베타-세포 상태를 향해 배양하여, 기능성 성숙 베타-세포로의 현탁 배양 기반 분화를 위한 가변성이고 준비된 시작점을 제공할 수 있음을 증명한다.

[0266] 요약하면, 본 실시예는 4기 세포가 그들의 췌장 내배엽 표현형을 유지하면서 세포 클러스터로 응집되게 할 수 있음을 나타낸다. 또한, 이들 4기 세포 클러스터는 가변성 현탁 배양에 의해 강건한 미성숙 베타-세포 표현형

(6기)을 향해 추가로 분화될 수 있다.

[0267] **실시예 4**

[0268] **성숙 인간 췌도와 유사한 베타-세포 성숙 마커 발현 및 단백질 존재가 향상된 내분비 세포의 현탁 배양 생성**

[0269] 하기 실시예는 하기 성숙 마커, PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A1의 공동-발현 및 단백질 존재를 나타내는 C-펩티드 세포의 현탁 배양에 의한 생성을 나타낸다. 10 μM의 Y-화합물로 보충된, DMEM-F12, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 FGF2, 1 ng/ml의 TGFβ, 1:100 희석으로 ITS-X, 2% FAF-BSA, 및 20 ng/ml의 IGF-1의 배지 중에, 1:30 희석으로 MATRIGEL™ 코팅된 디쉬 상에, 계대 28에서 EZ8 배지로 배양한 H1-hESC 세포주의 세포를 단일 세포로서 0.094 × 10^6 개의 세포/㎠로 접종하였다. 접종 후 처음 24 시간 동안에만 Y-화합물을 첨가하였다. 접종 후 48 시간에, 배양물을 PBS (-/-) 중에 세척하였다.

[0270] 도 7a 내지 도 7m의 경우, 배양물을 하기 프로토콜을 사용하여 분화시켰다. 프로토콜의 1기 내지 4기 중에, 배양은 평면 부착 배양으로 유지하였다. S4D3 단층, 또는 냉동보존된 S4D3 세포로부터 시작하여, Aggrewell™ 세포 클러스터를 제조하고, 부가적인 48 시간 동안 배양하였다 (4기 제5일 또는 S4D5). 배지를 분화 프로토콜 전체에 걸쳐 매일 교환하였다. 5기, 6기 및 제7기 중에, 제6일에 비교하여 6기가 7일에 걸쳐 일어나는 점을 제외하고는, 실시예 3에 기재된 바와 같이 현탁 배양에서 Aggrewell™ 클러스터를 배양하였다.

[0271] a. 1기 (3일): 세포를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8, 및 1.5 μM의 MCX 화합물로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1 μM GSK-3β 억제제로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8로 보충한 MCDB-131에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0272] b. 2기 (2일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml FGF7로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0273] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM의 SANT-1; 1 μM의 RA; 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM의 TPB; 및 LDN-HCl로 보충된 BLAR001 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다. 3기의 제1일에 사용된 LDN-HCL의 농도는 100 nM이었고, 3기의 제2일의 경우에는 10 nM이었다.

[0274] d. 4기 (3일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 70 nM LDN-HCl; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다.

[0275] 4기 제3일 단층의 냉동보존: S4D3 단층으로부터의 냉동보존된 세포 뱅크를 실시예 3 및 표 VII에 약술된 절차에 의해 확립하였다.

[0276] e. 냉동보존된 S4D3 단층 세포의 해동: 5.0 ×10^6 개의 S4D3 단층 세포를 함유하는 동결된 5 ml 바이알을 실시예 3에 기재된 바와 같이 해동시켰다.

[0277] f. Aggrewell™ 클러스터 이행을 위한 4기 (2일): 실시예 3에 기재된 바 같이 4기 제3일 단층 세포, 또는 해동된 냉동보존된 4기 제3일 세포로부터 Aggrewell™ 클러스터를 생성하였다.

[0278] g. 5기 (3일): 5기 배지에서 3일 동안 S4D5 Aggrewell™ 클러스터를 Aggrewell™400EX 플레이트로부터 회수하고, 1.5 내지 2.0 백만 개의 세포/ml의 세포 밀도로 27 rpm (분당 회전수)의 회전 속도를 갖는 PBS0.1MAG 스피너로 옮겼다. 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 ㎍/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 및 10 μM의 ALK5 억제제 II로 보충된 BLAR001

배지로 세포를 처리하였다. 4 kU/ml DNaseI 및 5 μM Y-화합물을 5기 제1일에만 보충하였다.

[0279] h. 6기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM의 ALK5 억제제 II, 및 100 nM의 감마 세크레타제 억제제 XX로 보충된 BLAR001 배지 중에 Aggrewell™ 클러스터를 처리하였다.

[0280] i. 7기 (6일 내지 7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"), 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 1 mM NAC; 0.5 μM ZM; 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 – RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질 농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A의 1:2000 희석액; 미량 원소 B의 1:2000 희석액으로 보충된 BLAR001 또는 BLAR004 배지 중에 7일 동안 Aggrewell™ 클러스터를 처리하였다. 7기 중에 첨가된 부가적인 화합물은 4 μM AZT; 또는 1 μM DEZA를 포함하였다. 명확함을 위해, 상기 기재된 농도를 이용하는 2 개의 조건에서 (BLAR001 또는 BLAR004 기본 배지 중 어느 하나에서) 현탁액 중의 Aggrewell™ 클러스터를 7기 중에 배양하였다: (i) ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC; (ii) ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT, DEZA.

[0281] 5기, 6기 및 7기의 경우, S4D5 Aggrewell™ 클러스터 또는 S4D3-이행된 ALI 클러스터로 시작하여 세포 배양물을 조건화하였다. S4D5 Aggrewell™ 클러스터를 Aggrewell™400EX 플레이트로부터 회수하고, 1.5 내지 2.0 백만 개의 세포/ml의 세포 밀도로 27 rpm (분당 회전수)의 회전 속도를 갖는 PBS0.1MAG 스피너로 옮겼다.

[0282] **분화된 세포의 정량화 및 특성화:** 실시예 2 및 실시예 3에 기재된 바와 같이 IF, FACS 및 qRT-PCR에 의해 7기 Aggrewell™ 클러스터 및 인간 췌도를 특성화하였다.

[0283] 도 7a는 (i) 신선한 S4D3 단층 또는 S4D3 냉동보존된 세포를 Aggrewell™으로 조립하고, (ii & iii) 5기, 6기 및 7기를 통해 현탁 배양에 의해 조건화하여 (iv) S7D7 Aggrewell™ 클러스터를 생성하는 절차를 도시한다. S6D6 Aggrewell™ 클러스터에서 관찰된 바와 같이 (도 6f 및 도 6g), 7기 중에 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001'에 의해 배양된 S7D7 Aggrewell™ 클러스터는 기저선 베타-세포 단백질 프로파일을 유지하였다 (도 7b 및 도 7c). 세포의 89%는 $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ (*좌측*, 도 7b), 77.7%는 $NKX6.1^+$ $NEUROD1^+$ (*우측*, 도 7b), 그리고 40.8%는 $NKX6.1^+$ 인슐린$^+$ (*좌측*, 도 7c)였다. 인슐린 양성 집단의 대부분 (총 세포의 46.4%는 인슐린$^+$였음)은 $NKX6.1^+$ (*좌측*, 도 7c) 였고 글루카곤-양성이 아니었다(3.9% 인슐린$^+$ 글루카곤$^+$; (*우측*, 도 7c)).

[0284] 기준선 베타-세포 프로파일에 부가하여, 성숙 마커 MAFA (도 7d), UCN3 (도 7e), SLC2A1 (도 7f), G6PC2 (도 7g), 인슐린 (도 7h) 및 NKX6.1 (도 7i)의 유전자 발현은 7기 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004' 조건화 S7D7 Aggrewell™ 클러스터 내의 인간 췌도 수준 이상이었다. 성숙 마커, 예를 들어 MAFA (도 3c); G2PC2(도 3f); 인슐린 (도 3h); 및 NKX6.1 (도 31)의 S7D7에서의 발현 수준은 ALI 클러스터에서보다 Aggrewell™ ('ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004')에서 훨씬 더 컸다.

[0285] 실제로, 도 7j 내지 도 7m은, 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004' 7기 조건화에 DEZA 및 AZT를 첨가하는 것이, 단백질 존재의 관점에서, PDX1 (도 7j; *하부, 좌측*), NKX6.1 (도 7j; *하부, 중간*), MAFA (도 7k; *하부, 좌측*), UCN3 (도 7k; *하부, 중간*) 및 SLC2A1 (도 7k; *하부, 우측*)을 S7D7에서 공동-발현하는 유의한 수의 비-글루카곤 (도 7j; 하부, 우측) C-펩티드 세포를 생성하였음을 나타낸다. 각각의 도면에 대해, IF-염색을 상부 행 상의 C-펩티드와 함께 단일 채널로서 나타낸다. MAFA, SLC2A1 및 UCN3의 단백질 존재는 C-펩티드 양성 세포로 제한되지 않지만, 세포 집단의 약 10% 이상이 C-펩티드, PDX1, NKX6.1, MAFA, SLC2A1, 및 UCN3의 공동-발현을 나타낼 것으로 예상된다. 반면에, 도 7l 및 도 7m은, 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004'-특이적 7기 조건화에 의한, 단백질 존재의 관점에서 S7D7까지 성숙 마커의 부분 세트: PDX1 (도 7l; *하부, 좌측*), NKX6.1 (도 7l; *하부, 중간*), MAFA (도 7m; *하부, 좌측*), SLC2A1 (도 7m; *하단, 우측*)을 공동-발현했지만, 글루카곤 (도 7l; *하부, 우측*) 및 UCN3 (도 7 M; *하부, 중간*)은 발현하지 않은 C-펩티드 세포의 생성을 나타낸다. Aggrewell™ 클러스터의 7기 'ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004' 조건화는, 유전자 발현 및 단백질 존재에 의해 평가될 때 성숙 성인 인간 췌도와 유사한 유의한 수의 성숙 베타-세포를 생성하였다.

[0286] 요약하면, 본 실시예는 7기 조건화의 변화에 의해 기능성 베타-세포를 향한 현탁 배양에서 4기 세포 클러스터를 추가로 분화시킬 수 있음을 나타낸다. 구체적으로, 실시예 4는 현탁 배양물 중의 세포 클러스터 내에서 C-펩티

드 세포의 생성을 나타내며, 이는 베타-세포의 적절한 기능성에 필수적인 베타-세포 성숙 마커를 공동-발현한다.

[0287] **실시예 5**

[0288] **성숙한 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 및 글루코스 자극된 인슐린 분비 동력학을 갖는 내분비 세포의 현탁 배양 생성**

[0289] 하기 실시예는 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 및 글루코스 자극된 인슐린 분비 ("GSIS") 동력학을 갖는 현탁 배양에 의한 기능적으로 성숙한 베타-세포의 생성을 나타낸다. 배양 조건은 실시예 4에서와 동일하다. 10 μM의 Y-화합물로 보충된, DMEM-F12, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 FGF2, 1 ng/ml의 TGFβ, 1:100 희석으로 ITS-X, 2% FAF-BSA, 20 ng/ml의 IGF-1의 배지 중에, 1:30 희석으로 MATRIGEL™ 코팅된 디쉬 상에, 계대 28에서 EZ8 배지로 배양한 H1-hESC 세포주의 세포를 단일 세포로서 0.094 × 10^6 개의 세포/㎠로 접종하였다. 접종 후 처음 24 시간 동안에만 Y-화합물을 첨가하였다. 접종 후 48 시간에, 배양물을 PBS (-/-) 중에 세척하였다.

[0290] 도 8a 내지 도 8i의 경우, 배양물을 하기 프로토콜을 사용하여 분화시켰다. 프로토콜의 1기 내지 4기 중에, 배양은 평면 부착 배양으로 유지하였다. S4D3 단층, 또는 냉동보존된 S4D3 세포로부터 시작하여, Aggrewell™ 세포 클러스터를 제조하고, 부가적인 48 시간 동안 배양하였다 (4기 제5일 또는 S4D5). 배지를 분화 프로토콜 전체에 걸쳐 매일 교환하였다. 실시예 3에 기재된 바와 같이, 5기, 6기 및 7기 중에 Aggrewell™ 클러스터를 현탁 배양에서 배양하였다. 도 8e 및 도 8f 에 나타낸 ALI 클러스터를 실시예 2에 기재된 바와 같이 배양하였다. 요약하면:

[0291] a. 1기 (3일): 세포를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8, 및 1.5 μM의 MCX 화합물로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1 μM GSK-3β 억제제로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8로 보충한 MCDB-131에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0292] b. 2기 (2일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml FGF7로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0293] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM의 SANT-1; 1 μM RA; 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM의 TPB; 및 LDN-HCl로 보충된 BLAR001 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다. 3기의 제1일에 사용된 LDN-HCL의 농도는 100 nM이었고, 3기의 제2일의 경우에는 10 nM이었다.

[0294] d. 4기 (3일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 1% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 70 nM LDN-HCl; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다.

[0295] e. 4기 제3일 단층의 냉동보존: S4D3 단층으로부터의 냉동보존된 세포 뱅크를 실시예 3 및 표 VII에 약술된 절차를 사용하여 확립하였다.

[0296] f. 냉동보존된 S4D3 단층 세포의 해동: 5.0 ×10^6 개의 S4D3 단층 세포를 함유하는 동결된 5 ml 바이알을 실시예 3에 기재된 바와 같이 해동시켰다. ALI 또는 Aggrewell TM 클러스터로의 이행에 동일한 절차를 적용할 수 있다.

[0297] g. Aggrewell™ 클러스터 이행 또는 S4D3 ALI 클러스터 이행을 위한 4기 (2일): 실시예 3에 기재된 바 같이 4기 제3일 단층 세포, 또는 해동된 냉동보존된 4기 제3일 세포로부터 Aggrewell™ 클러스터를 생성하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이, 4기 제3일 세포에서 ALI 클러스터를 생성하였다.

[0298] 실시예 4와 유사하게, 5기, 6기 및 7기의 경우, S4D5 Aggrewell™ 클러스터 또는 S4D3-이행된 ALI 클러스터로 시작하여 세포 배양물을 조건화하였다. S4D5 Aggrewell™ 클러스터를 Aggrewell™ 400EX 플레이트로부터 회수하고, 1.5 내지 2.0 백만 개의 세포/ml의 세포 밀도로 27 rpm (분당 회전수)의 회전 속도를 갖는 PBS0.1MAG 스피너로 옮겼다.

[0299] h. 5기 (3일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 및 10 μM의 ALK5 억제제 II로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 Aggrewell™ 또는 ALI 클러스터를 처리하였다. Aggrewell™ 클러스터의 경우, 4 kU/ml DNaseI 및 5 μM Y-화합물을 5기 제1일에만 보충하였다.

[0300] i. 6기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM의 ALK5 억제제 II, 및 100 nM의 감마 세크레타제 XX로 보충된 BLAR001 배지 중에 Aggrewell™ 또는 ALI 클러스터를 처리하였다.

[0301] j. 7기 (7일 내지 14일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"), 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 1 mM NAC; 0.5 μM ZM; 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 – RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질 농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A의 1:2000 희석액; 미량 원소 B의 1:2000 희석액으로 보충된 BLAR001 또는 BLAR004 배지 중에 7일 동안 Aggrewell™ 또는 ALI 클러스터를 처리하였다. 7기 중에 첨가된 부가적인 화합물은 4 μM AZT; 또는 1 μM DEZA를 포함하였다. 명확함을 위해, 상기 기재된 농도를 이용하는 2 개의 조건에서 (BLAR001 또는 BLAR004 기본 배지 중 어느 하나에서) 현탁액 중의 Aggrewell™ 또는 ALI 클러스터를 7기 중에 배양하였다: (i) ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC; (ii) ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT, DEZA. 도 8a, 도 8b, 도 8h, 도 8i: 7기 중에, 현탁액 중의 Aggrewell 클러스터를 하기 2 가지 조건에서 S7D13 또는 S7D14로 배양하였다: (i) ALK5 없음, 낮은 T3, 0.5 μM ZM, 10 μg/ml H, 1 mM NAC; (ii) S7D1 내지 S7D5 – ALK5 없음, 낮은 T3, 0.5 μM ZM, 10 μg/ml H, 1 mM NAC; 5 μM AZT; 1μM DEZA; S7D6 내지 S7D13 또는 S7D14 – ALK5 없음, 낮은 T3, 0.5 μM ZM, 10 μg/ml H, 1 mM NAC.

[0302] **분화된 세포의 정량화 및 특성화:** 글루코스-의존성 미토콘드리아 활성의 정량화를 위해, S6D7 ALI 클러스터, 7기 Aggrewell™ 클러스터 및 성숙 인간 췌도를 실시예 2에 기재된 바와 같이 Seahorse XF^e24 장치에 의해 특성화하였다. ALI/Aggrewell™ 클러스터 또는 인간 췌도를 수확하고, 20 mM D-글루코스의 주입 전 및 후에 그들의 산소 소비율 ("OCR")을 XF^e24 Extracellular Flux Analyzer 상에서 측정하였다. ALI/Aggrewell™ 클러스터 또는 인간 췌도를 그들의 7기 조건화로부터 제거하고, 37℃ 비-CO_2 환경, 및 기준선 OCR을 달성하도록 설계된 배지 둘 모두에서 2 시간 동안 인큐베이션하였다. 예비-인큐베이션 배지는 XF 기본 배지 중에 1 mM D-글루코스, 1 mM L-글루타민 및 1 mM 소듐 피루베이트를 함유한다. 사전 인큐베이션 후에, Seahorse 기계 상에 ALI/Aggrewell™ 클러스터 또는 인간 췌도를 로딩하고, 하기 측정을 실행하였다: (i) 3X 기준선 OCR (사전 -D-글루코스 주입); (ii) 5X D-글루코스 후 (주입 후 인큐베이션 시간: 72 분). 모든 OCR 측정을 개별 샘플의 DNA 함량에 대해 정규화하였다. QIAamp DNA MicroKit에 의해 DNA를 단리하고, NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer에 의해 DNA 함량을 측정하였다.

[0303] 글루코스-의존성 인슐린 분비의 정량화를 위하여, 7기 ALI 클러스터, Aggrewell™ 클러스터 및 성숙 인간 췌도를 세포 관류 시스템 (미국 플로리다주 마이애미 소재의 BioRep Technologies, 카탈로그 번호 PERI4-02)에 의해 특성화하였다. 요약하면, 인슐린 분비를 기준선으로 정규화하기 위하여, ALI/Aggrewell TM 클러스터 또는 인간 췌도를 따뜻한 (37℃) 크렙스 완충액 (Kreb's Buffer) (표 IX) 내로 옮겼다. 세포를 관류 챔버 (BioRep Technologies, 카탈로그 번호 PERI-CHAMBER) 내로 로딩하고, (i) 3 mM D-글루코스; (ii) 16.7 mM D-글루코스 ± 100 ng/ml 엑센딘-4 ("Ex4"); 및 (iii) 3 mM D-글루코스를 갖는 25 mM KCl로 보충된 4회의 순차적인 크렙스 완충액으로 연속적으로 관류하였다 (100 μl/min의 유속). 특정 관류 프로토콜을 각각의 도면에 나타낸다. 관류액 샘플을 매 분마다 수집하고, C-PEPTIDE ELISA (스웨덴 웁살라 소재의 Mercodia, 카탈로그 번호 10-1136-01)에 의해 C-펩티드 단백질 수준 (ng/ml 단위)을 검출하였다.

[0304] [표 IX]

크렙스 완충제 (pH 7.4)의 성분

	카탈로그 번호	농도
NaCl	Sigma-Aldrich S7653	7.5 g/1000 ml
KCl	Sigma-Aldrich B9333	0.357 g/1000 ml
$CaCl_2$	Sigma-Aldrich C1016	0.277 g/1000 ml
$MgSO_4$	Sigma-Aldrich M7506	0.144 g/1000 ml
Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich 71643	0.144 g/1000 ml
KH_2PO_4	Sigma-Aldrich P5655	0.16 g/1000 ml
$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich S5761	0.42 g/1000 ml
HEPES	Thermo Fisher Scientific15630080	10 mM

[0305]

[0306] 도 8a 및 도 8b는 20 mM D-글루코스에 대한 현탁액 중의 S7D13 Aggrewell™ 클러스터의 미토콘드리아 반응을 나타낸다. 도 8a 및 도 8b 둘 모두는 인간 췌도 (흑색 원 라인)가 높은 D-글루코스에 신속하게 반응하고 (주입 ("ip") 후 15 분 ("min") 후에 기준선에 비해 OCR 123.3% ± 12.92에 의해 입증됨), 시간 경과에 따라 높은 OCR을 유지하였음을 나타낸다(131.5% ± 11.32; 72 분 ip). 역으로, 미성숙 C-펩티드 양성 세포가 강화된 S6D7 ALI 클러스터 (회색 삼각형 선)는 높은 D-글루코스 에 대한 신속한 OCR 반응이 결여되어 있고 (104.4% ± 3.37; 15 분 ip), 시간 경과에 따른 상대적으로 약한 OCR 반응 (113.3% ± 4.51; 72 분 ip)을 나타낸다. 현탁액 중의 Aggrewell™ 클러스터와 관련하여, S7D13에서 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI, BLAR004' 조건에서, 인간 췌도 유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학이 관찰되었다 (110.7% ± 2.46 – 15 분 ip; 125.9% ± 2.27 – 72 분 ip) (회색 정사각형 라인) (도 8a). 반면에, 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI BLAR001 또는 BLAR004' S7D7 ALI 클러스터는 인간-췌도 수준 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 동력학을 나타내지 않았다 (도 5c 및 도 5e). 부가적으로, 현탁액 중의 "ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, AZT, DEZA, FI, BLAR004' Aggrewell™ 클러스터는 높은 글루코스 자극에 반응하여 인간 췌도 수준을 유의하게 초과하는 산소를 소모하였다 (162.0% ± 11.51 – 15 분 ip; 177.1% ± 0.99 – 72 분 ip) (회색 정사각형 라인) (도 8b). DEZA 및 AZT는 7기 조건화의 처음 4일 동안에만 투여되었으며, 이는 AZT 및 DEZA에 의해 얻어진 기능성 미토콘드리아 반응성이 7기 Aggrewell™ 클러스터에서 10일 이상 동안 안정적임을 암시하였다.

[0307] 도 8c는 인간 췌도 내의 성숙 베타 세포가 글루코스 자극에 반응하는 신속한 이중상 인슐린 분비의 다중 라운드에 대한 능력을 나타냈음을 나타낸다. 제2 이중상 GSIS 반응을 제1 이중상 GSIS 반응에 둔화 비교 (blunted compared)하였다 (제1 GSIS 반응의 약 7 내지 8 배 제1 상). 또한, 인간 췌도는 인슐린 분비의 "온-오프" 스위칭의 다중 라운드에 대한 능력, 및 KCl-매개 막 탈분극 시의 대규모 인슐린 과립 방출에 대한 능력을 나타냈다. 시험된 모든 조건은 KCl에 대한 강한 인슐린 분비 반응을 나타냈다 (도 8c 내지 도 8i). 엑센딘-4 ("Ex4")의 첨가는 나타낸 인간 췌도에서 GSIS 반응의 진폭을 증가시키지 않았지만, ALI 또는 Aggrewell™ GSIS 프로파일과의 비교를 위해 포함되었다 (도 8d). 7기 중에 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC FI'로 조건화된 S7D8 내지 S7D10 ALI 클러스터는, BLAR001 (도 8e)에서든 BLAR004 (도 8f)에서든, 단일 이중상 GSIS 반응 (제1 GSIS 반응의 약 4 내지 10 배 제1 상)을 나타냈지만, 상대적으로 느린 제2 이중상 GSIS 반응은 나타내지 않았다. 또한, ALI 클러스터는 자극 후 3 mM D-글루코스의 재관류 시에 인슐린 분비의 제2 상을 차단하는 능력을 갖지 않았다. 반면에, 7기 중에 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI BLAR004'로 조건화된 S7D14 Aggrewell™ 클러스터는 강한 제1 이중상 GSIS (제1 GSIS 반응의 약 5 배 제1 상)를 나타냈으며, 이어서 GSIS를 완전히 차단하는 능력, 및 약한 제2 단일상 반응 (도 8g)을 나타냈다. 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, FI BLAR004' 조건화에 DEZA 및 AZT를 첨가함으로써, S7D14 Aggrewell™ 클러스터는 다중 라운드의 인간-췌도-유사 이중상 GSIS (제1 GSIS 반응의 약 5 내지 7 배 제1 상), 및 높은 글루코스 펄스들 사이에서 GSIS를 완전히 차단하는 능력을 나타냈다 (도 8h 및 도 8i). 도 8h 및 도 8i는 'ALK5 없음, 낮은 T3, ZM, H, NAC, DEZA, AZT BLAR004' S7D14 Aggrewell™ 클러스터 조건의 2 개의 생물학적 반복실험을 나타낸다. 도 8h 및 도 8i에서 DEZA 및 AZT는 7기 조건화의 처음 4일 동안에만 투여되었으며, 이는 AZT 및 DEZA에 의해 얻어진 강건한 이중상 GSIS 반응이 7기 Aggrewell™ 클러스터에서 10일 이상 동안 안정적임을 암시하였다.

[0308] 요약하면, 실시예 5는 인간-췌도-유사 글루코스-의존성 미토콘드리아 호흡 및 GSIS 동력학을 가진 세포 응집 및

현탁 배양에 의한 hESC-유래 기능성 베타-세포 (7기)의 생성을 나타낸다.

[0309] [표 X]

실시예 1 내지 실시예 5에 사용된 재료 및 화합물의 공급처

재료/화합물	공급처
(S,S)-2-[2-(3,5-다이플루오로페닐)아세틸아미노]-N-(5-메틸-6-옥소-6,7-다이하이드로-5H-다이벤조[b,d]아제핀-7-일)프로피온아미드 ("감마 세크레타제 억제제 XX")	EMD Millipore, 카탈로그 번호 565789
0.2% BSA	미국 캘리포니아주 산호세 소재의 BD Biosciences, 카탈로그 번호 554657
2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘 ("ALK5 억제제 II" 또는 "ALK5")	미국 뉴욕주 패밍데일 소재의 Enzo Life Sciences, Inc., 카탈로그 번호 ALX-270-445
3,3',5-트라이요오도-L-트리오닌 나트륨	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 T6397
30% 수크로스 용액	미국 오하이오주 솔론 소재의 Amresco, 카탈로그 번호 0335
4% PFA	미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 158127
5 ml 냉동보존 바이알	Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 5000-0050
5-아자시티딘 ("AZT")	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 A2385
Accutase Cell Detachment Solution	Stem Cell Technologies, 카탈로그 번호 07920
Aggrewell™ 400EX 플레이트	캐나다 밴쿠버 소재의 STEMCELL Technologies Inc.; 카탈로그 번호 27840
아스코르브산	미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Aldrich Co. LLC, 카탈로그 번호 A4544
BME 비타민 보충물	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 B6891
화학적으로 정의된 지질 농축물	Gibco by Life Technologies, 카탈로그 번호 11905
Cytofix/Cytoperm Buffer	미국 캘리포니아주 산호세 소재의 BD Biosciences, 카탈로그 번호 554723
데아자네플라노신 A ("DEZA")	Biovision, Inc., 카탈로그 번호 2060
D-글루코스	미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma-Aldrich Co. LLC, 카탈로그 번호 G8769
DMEM-F12	미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies Corporation, 카탈로그 번호 11330-032
DMSO	Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 D2650
DNaseI	Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 9003-98-9
엑센딘-4 ("Ex4")	Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 E7144
EZ8 배지	Gibco by Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 A151690
무지방산 소 혈청 알부민	미국 아이다호주 분 소재의 Proliant, Inc., 카탈로그 번호 68700
섬유아세포 성장 인자 2	미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 R & D Systems Inc., 카탈로그 번호 233-FB-025
섬유아세포 성장 인자 7 (“FGF7”)	미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 R&D Systems, Inc., 카탈로그 번호 251-KG
GlutaMAX™	미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies Corporation, 카탈로그 번호 35050-079
성장 분화 인자 8 ("GDF8")	미국 뉴저지주 록키 힐 소재의 Peprotech, 카탈로그 번호 120-00
H1-hESC	WA01 세포, 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 WiCell Research Institute
헤파린 ("H")	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 H3149
HEPES	Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 15630080
인간 재조합 라미닌 521	BioLamina, 카탈로그 번호 LN-521-03–인간 재조합 라미닌 521
불완전 PBS (마그네슘 또는 칼슘이 없는 인산염 완충 식염수)	미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies, 카탈로그 번호 14190

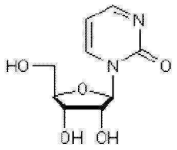
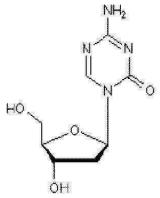
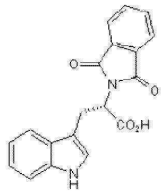
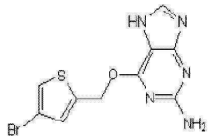
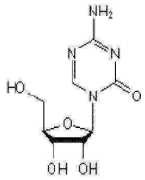
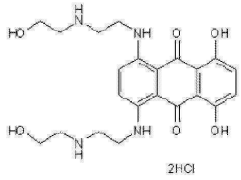
[0310]

재료/화합물	공급처
인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1")	미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 R & D Systems Inc., 카탈로그 번호 291-G1-200
인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민	미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies, 카탈로그 번호 51500056
KSR	Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 10828028
LDN-193189-HCl ("LDN-HCL") (6-(4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)-3-(피리딘-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘, 하이드로클로라이드, BMP 수용체)	중국 상하이 소재의 Shanghai ChemPartners Co Ltd., 카탈로그 번호 CG468-141007, 로트/배치 20141212
L-글루타민	Gibco by Life Technologies, 카탈로그 번호 25030-081
LIVE/DEAD Violet Fluorescent 반응성 염료	미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies, 카탈로그 번호 L34955
MATRIGEL™	미국 뉴욕주 코닝 소재의 Corning Incorporated, 카탈로그 번호 356231
MCDB-131 배지	미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies, 카탈로그 번호 ME120219L2
MEM 비-필수 아미노산 보충물	Gibco by Life Technologies, 카탈로그 번호 111400
N-아세틸 시스테인 ("NAC")	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 A9165
Nucleocounter ® NC-100	덴마크 알레뢰드 소재의 Chemometec, 카탈로그 번호 900-004
OCT 용액	미국 캘리포니아주 토랜스 소재의 Sakura Finetek USA Inc., 카탈로그 번호 4583
PBS0.1MAG 스피너	미국 캘리포니아주 카마릴로 소재의 PBS Biotech Inc., 카탈로그 번호 1A-0.1-D-001
Perm/Wash Buffer	미국 캘리포니아주 산호세 소재의 BD Biosciences, 카탈로그 번호 554722
다공성 세포 배양 필터 인서트, 0.4 마이크로미터	Corning, 카탈로그 번호 3419
다공성 세포 배양 필터 인서트, 3.0 마이크로미터	Corning, 카탈로그 번호 3420
레티노산 (“RA”)	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 R2625
RPMI 비타민 보충물	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 R7256
SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민)	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 S4572
중탄산나트륨	미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Aldrich Co. LLC, 카탈로그 번호 5761
소듐 피루베이트	Gibco by Life Technologies, 카탈로그 번호 11360
TPB	중국 상하이 소재의 Shanghai ChemPartners Co Ltd., 카탈로그 번호 주문 제작, 로트/배치 CP-0007242-101
미량 원소 A	Corning, 카탈로그 번호 25-021
미량 원소 B	Corning, 카탈로그 번호 25-022
형질전환 성장 인자 베타 ("TGF-β")	미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 R & D Systems Inc., 카탈로그 번호 240-B-002
TrypLE™ Express Enzyme	Life Technologies Corporation, 카탈로그 번호 12604-013
XF 기본 배지	Seahorse Bioscience, 카탈로그 번호 102340-100
Y-27632 (“Y-화합물”)	미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Aldrich Co. LLC, 카탈로그 번호 Y-0503
ZM447439 (“ZM”)	Selleckchem.com, 카탈로그 번호 S1103
$ZnSO_4$	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 Z0251

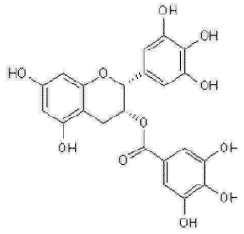
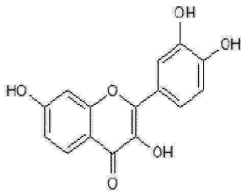
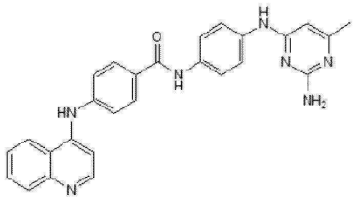
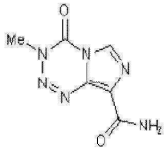
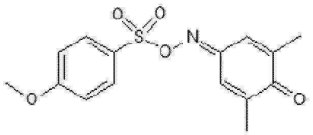
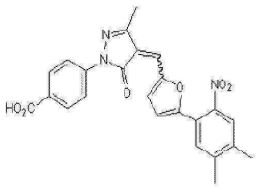
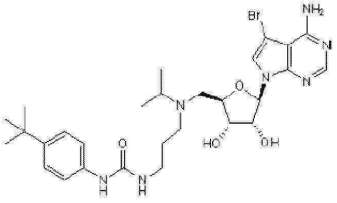
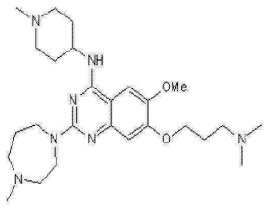
[0311]

[0312] [표 XI]

실시예 1 에서 시험된 화합물의 화학명 및 구조

제불라린 *카탈로그 번호 2293*  대안명: NSC 309132 화학명: 1-β-D-리보푸라노실-2(1*H*)-피리미디논	데시타빈 *카탈로그 번호 2624*  대안명: 2'-데옥시-5-아자시티딘, 5-아자-2'-데옥시시티딘, NSC 127716 화학명: 4-아미노-1-(2-데옥시-β-D-*에리트로*-펜토푸라노실)-1,3,5-트라이아진-2(1*H*)-온
RG 108 *카탈로그 번호 3295*  화학명: *N*-프탈릴-L-트립토판	로메구아트립 *카탈로그 번호 4359*  대안명: Pu 트린 -2 화학명: 6-[(4-브로모-2-티에닐)메톡시]-9*H*-퓨린-2-아민
5-아자시티딘 *카탈로그 번호 3842*  화학명: 4-아미노-1β-D-리보푸라노실-1,3,5-트라이아진-2(1*H*)-온	미톡산트론 다이하이드로클로라이드 *카탈로그 번호 4250*  화학명: 1,4-다이하이드록시-5,8-*비스*[(2-하이드록시에틸)아미노]에틸)아미노]-9,10-안트라센다이온 다이하이드로클로라이드

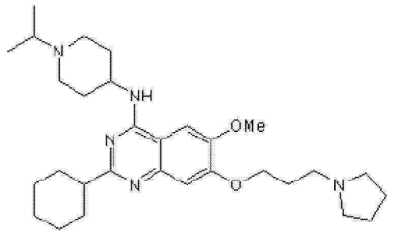
[0313]

EGCG *카탈로그 번호 4524*  대안명: 에피갈로카테킨 갈레이트 화학명: 3,4,5-트라이하이드록시벤조산 *(2R, 3R)*-3,4-다이하이드로-5,7-다이하이드록시-2-(3,4,5-트라이하이드록시페닐)-*2H*-1-벤조피란-3-일-에스테르	피세틴 *카탈로그 번호 5016*  화학명: 2-(3,4-다이하이드록시페닐)-3,7-다이하이드록시-*4H*-1-벤조피란-4-온
SGI 1027 *카탈로그 번호 5155*  화학명: *N*-[4-[(2-아미노-6-메틸-4-피리미디닐)아미노]페닐]-4-(4-퀴놀리닐아미노)벤즈아미드	테모졸로마이드 *카탈로그 번호 2706*  대안명: NSC 362856, CCRG 81045 화학명: 3,4-다이하이드로-3-메틸-4-옥소이미다조[5,1-*d*]-1,2,3,5-테트라진-8-카르복스아미드
L002 *카탈로그 번호 5045*  화학명: 4-[*O*-[(4-메톡시페닐) 설포닐]옥심]-2,6-다이메틸 -2,5-사이클로헥스다이엔-1,4-다이온	**C 646** *카탈로그 번호 4200*  화학명: 4-[4-[[5-(4,5-다이메틸 -2-니트로페닐)-2-푸라닐]메틸렌]-4,5-다이하이드로-3-메틸-5-옥소-1*H*-피라졸-1-일]벤조산
SGC 0946 *카탈로그 번호 4541*  화학명: 1-[3-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-아미노-5-브로모-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-7-일)-3,4-다이하이드록시테트라하이드로푸란-2-일]메틸](아이소프로필)아미노]프로필]-3-[4-(2,2-다이메틸에틸)페닐]우레아	**UNC 0224** *카탈로그 번호 3861*  화학명: 7-[3-(다이에틸아미노)프로폭실]-2-(펙사하이드로-4-메틸-1*H*-1,4-다이아제핀-1-일)-6-에폭시-*N*-(1-에틸-4-피페리디닐)-4-퀴나졸린아민

[0314]

UNC 0638

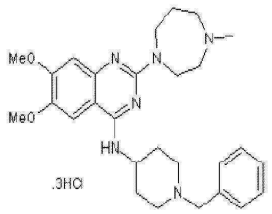
카탈로그 번호 4343



화학명: 2-사이클로헥실-6-메톡시-*N*-[1-(1-메틸에틸)-4-피페리디닐]-7-[3-(1-피롤리디닐)프로폭시]-4-퀴나졸린아민

BIX 01294

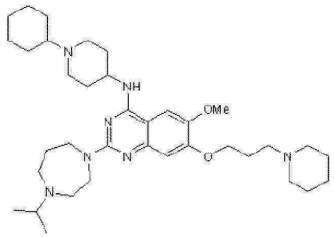
카탈로그 번호 3364



화학명: 2-(헥사하이드로-4-메틸-1*H*-1,4-다이아제핀-1-일)-6,7-다이메톡시-*N*-[1-(페닐메틸)-4-피페리디닐]-4-퀴나졸린아민 트라이하이드로클로라이드

UNC 0646

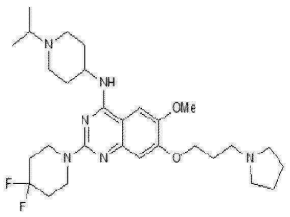
카탈로그 번호 4342



화학명: *N*-(1-사이클로헥실-4-피페리디닐)-2-[헥사하이드로-4-(1-메틸에틸)-1*H*-1,4-다이아제핀-1-일]-6-메톡시-7-[3-(1-피페리디닐)프로폭시]-4-퀴나졸린아민

UNC 0642

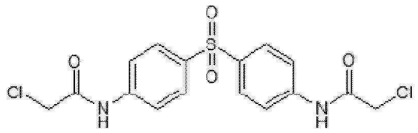
카탈로그 번호 5132



화학명: 2-(4,4-다이플루오로-1-피페리디닐)-6-메톡시-*N*-[1-(1-메틸에틸)-4-피페리디닐]-7-[3-(1-피롤리디닐)프로폭시]-4-퀴나졸린아민

TC-E 5003

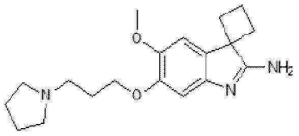
카탈로그 번호 5099



화학명: *N,N'*-(설포닐다이-4,1-페닐렌)비스(2-클로로아세트아미드)

A 366

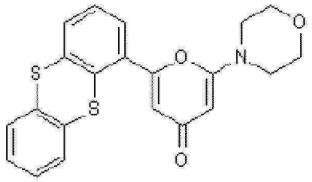
카탈로그 번호 5163



화학명: 5'-메톡시-6'-[3-(1-피롤리디닐)프로폭시]스피로[사이클로부탄-1,3'-[3*H*]인돌]-2'-아민

KU 55933

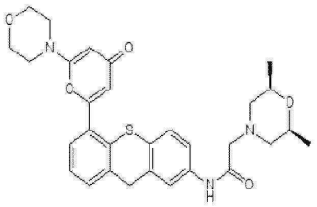
카탈로그 번호 5344



화학명: 2-(4-모르폴리닐)-6-(1-티안트레닐)-4*H*-피란-4-온

KU 60019

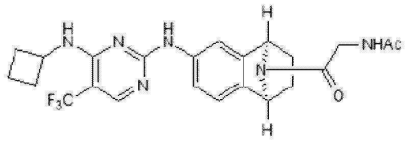
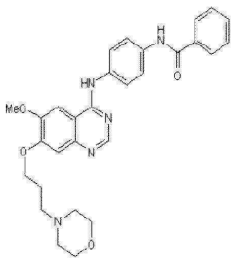
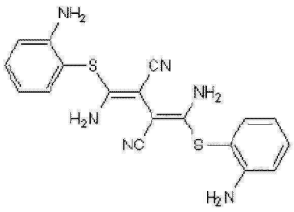
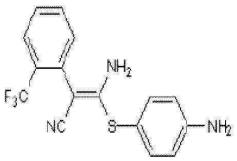
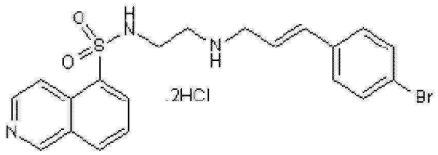
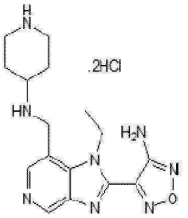
카탈로그 번호 4176

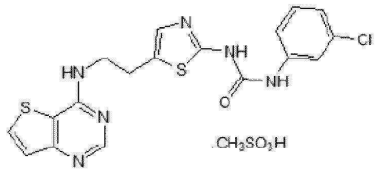
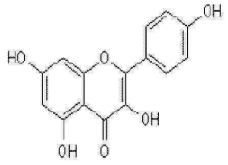
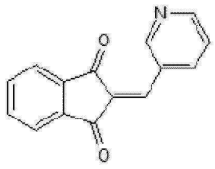
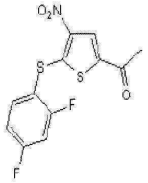
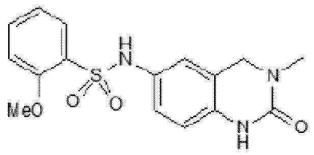
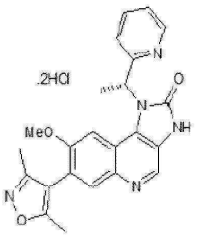
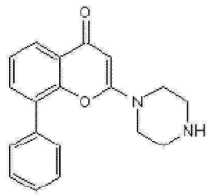
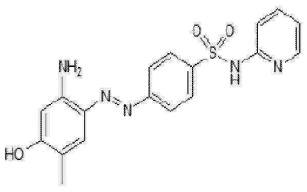


화학명: (2*R*, 6*S*-렌)-2,6-다이메틸-*N*-[5-[6-(4-모르폴리닐)-4-옥소-4*H*-피란-2-일]-9*H*-티옥산텐-2-일-4-모르폴린아세트아미드

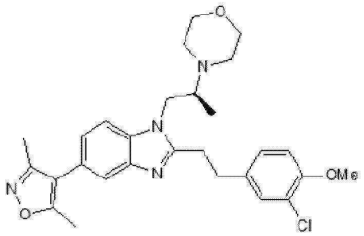
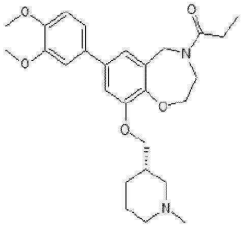
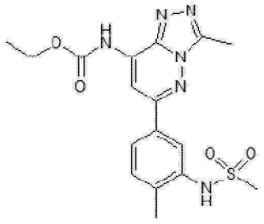
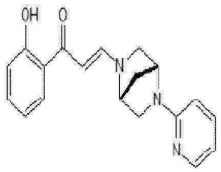
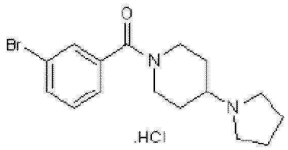
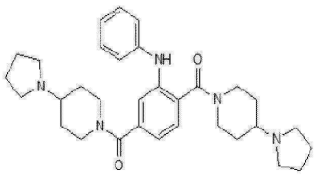
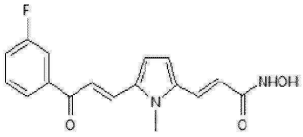
[0315]

[0316]

PF 03814735 *카탈로그 번호 4821*  화학명: *N*-[2-(1S, 4R)-6-[[4-(사이클로부틸아미노)-5-(트라이플루오로메틸)-2-피리미딘]아미노]-1,2,3,4-테트라하이드로나프탈렌-1,4-이민-9-일]-2-옥소에틸]-아세트아미드	**ZM 447439** *카탈로그 번호 2458*  화학명: *N*-[4-[[6-메톡시-7-[3-(4-모르폴리닐)프로폭실]-4-퀴나졸리닐]아미노] 페닐]벤즈아미드
U0126 카탈로그 번호 1144  화학명: 1,4-다이아미노-2,3-다이시아노-1,4-*비스*[2-아미노페닐티오]부타다이엔	**SL 327** *카탈로그 번호 1969*  화학명: α-[아미노[(4-아미노페닐)티오]메틸렌]-2(트라이플루오로메틸) 벤젠아세토니트릴
H 89 다이하이드로클로라이드 *카탈로그 번호 2910*  화학명: *N*-[2-[[3-(4-브로모페닐)-2-프로페닐]아미노]에틸]-5-아이소퀴놀린설폰아미드 다이하이드로클로라이드	SB 747651A 다이하이드로클로라이드 카탈로그 번호 4630  화학명: 2-(4-아미노-1,2,5-옥사다이아졸-3-일)-1-에틸-*N*-4-피페리디닐-1*H*-이미다조[4,5-c]피리딘-7-메탄아민다이하이드로클로라이드

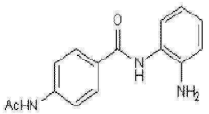
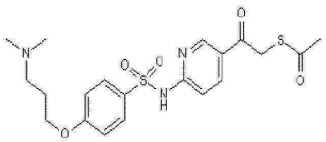
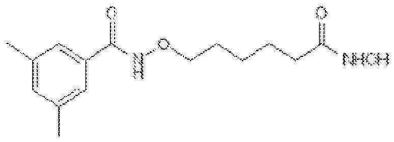
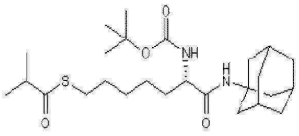
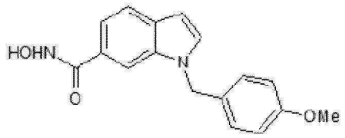
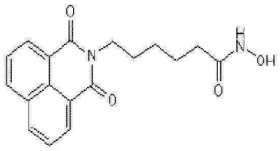
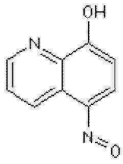
SNS 314 메실레이트 *카탈로그 번호 4584*  화학명: *N*-(3-클로로페닐)-*N*'-[5-[2-(티에노[3,2-d]피리미딘-4-일아미노)에틸]-2-티아졸릴]우레아	**캄페롤** 카탈로그 번호 3603  대안명: 캠페롤 화학명: 3,5,7-트라이하이드록시-2-(4-하이드록시페닐)-4*H*-1-벤조피란-4-온
PRT 4165 카탈로그 번호 5047  화학명: 2-(3-피리디닐메틸렌)-1*H*-인덴-1,3(2*H*)-다이온	**P 22077** 카탈로그 번호 4485  화학명: 1-[5-[(2,4-다이플루오로페닐)티오]-4-니트로-2-티에닐]-에탄온
PFI 1 카탈로그 번호 4445  화학명: 2-메톡시-*N*-(3-메틸-2-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로퀴나졸린-6-일)벤젠설폰아미드	I-BET 151 다이하이드로클로라이드 카탈로그 번호 4650  화학명: 7-(3,5-다이메틸-4-아이속사졸릴)-1,3-다이하이드록시-8-메톡시-1-[(1*R*)-1-(2-피리디닐)에틸]-2*H*-이미다조[4,5-c]퀴놀린-2-온 다이하이드로클로라이드
LY 303511 *카탈로그 번호 2418*  화학명: 2-(1-피페라지닐)-8-페닐-4*H*-1-벤조피란-4-온	**MS 436** *카탈로그 번호 5173*  화학명: (*E*)-4-[2-(2-아미노-4-하이드록시-5-메틸페닐)다이아제닐]-*N*-2-피리디닐벤젠설폰아미드

[0317]

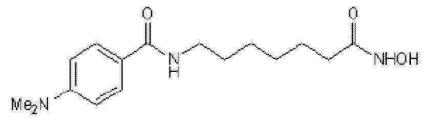
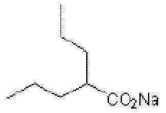
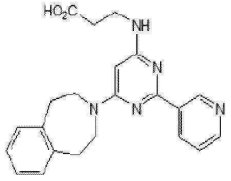
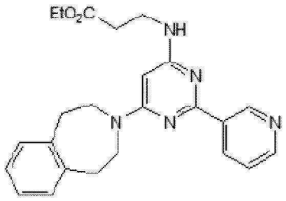
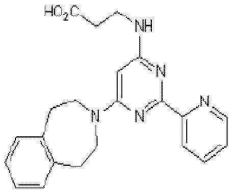
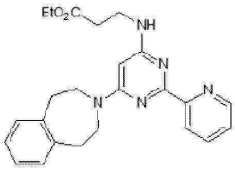
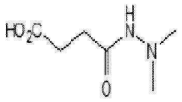
SGC-CBP30 *카탈로그 번호 4889*  화학명: 2-[2-(3-클로로-4-메톡시페닐)에틸]-5-(다이메틸-1,2-옥사졸-4-일)-1-[(2*S*)-2-(모르폴린-4-일)프로필]-1*H*-1,3-벤조다이아졸	**I-CBP 112** *카탈로그 번호 4891*  화학명: 1-[7-(3,4-다이메톡시페닐)-9-[[(3*S*)-1-메틸피페리딘-3-일]메톡시]-2,3,4,5-테트라하이드로-1,4-벤즈옥사제핀-4-일]프로판-1-온
브로모스포린 *카탈로그 번호 4758*  화학명: *N*-[(6-3-메탄설폰아미도-4-메틸페닐)-3-메틸-[1,2,4]트라이아졸로[4,5-b]피리다진-8-일]카르바메이트	**PFI 3** *카탈로그 번호 5072*  화학명: (2*E*)-1-(2-하이드록시페닐)-3-[(1*R*,4*R*)-5-(피리딘-2-일)-2,5-다이아자바이사이클로[2.2.1]헵탄-2-일]-1-온
UNC 926 하이드로클로라이드 *카탈로그 번호 4516*  화학명: (3-브로모페닐)[4-(1-피롤리디닐)-1-피페리디닐]메탄온 하이드로클로라이드	**UNC 1215** *카탈로그 번호 4666*  화학명: 2-페닐아미노-1,4-[4-(피롤리디닐)피페리디닐]벤즈아미드
TC-H 106 *카탈로그 번호 4270*  화학명: *N1*-(2-아미노페닐)-*N7*-(4-메틸페닐)헵탄다이아미드	**MC 1568** *카탈로그 번호 4077*  화학명: 3-[5-(3-(3-플루오로페닐)-3-옥소프로펜-1-일)-1-메틸-1*H*-피롤-2-일]-*N*-하이드록시-2-프로펜아미드

[0318]

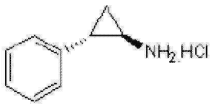
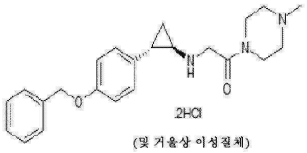
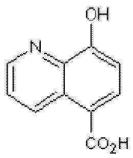
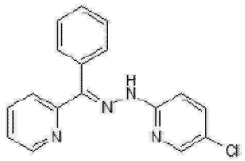
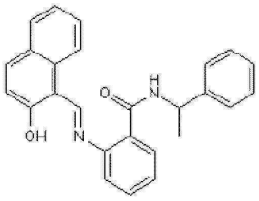
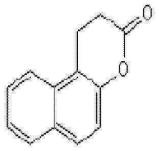
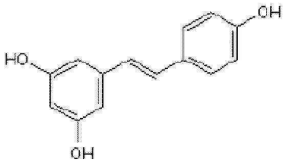
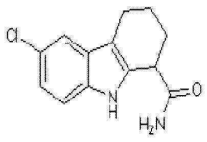
[0319]

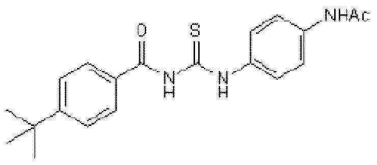
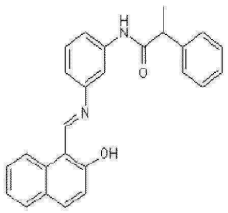
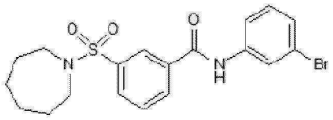
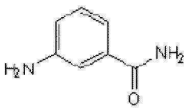
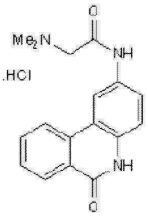
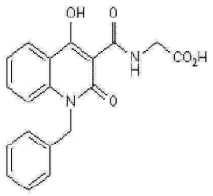
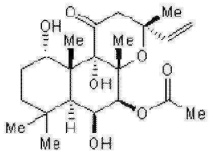
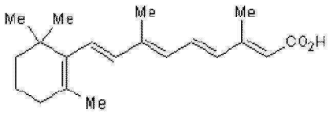
피록사미드 카탈로그 번호 4403  화학명: *N*-하이드록시-*N'*-3-피리디닐옥탄다이아미드	**CI 994** 카탈로그 번호 2952  대안명: *N*-아세틸디날린 화학명: 4-(아세틸아미노)-*N*-(2-아미노페닐)벤즈아미드
SBHA 카탈로그 번호 3810  화학명: *N,N'*-다이하이드록시옥탄다이아미드	**KD 5170** 카탈로그 번호 4001  화학명: *S*-[2-[6-[[[4-[3-(다이메틸아미노)프로폭시]페닐]설포닐]아미노]-3-피리디닐]-2-옥소에틸]에탄티오산 에스테르
LMK 235 카탈로그 번호 4830  화학명: *N*-[[6-(하이드록시아미노)-6-옥소헥실]옥시]-3,5-다이메틸벤즈아미드	**TCS HDAC6 20b** 카탈로그 번호 4805  화학명: 2-메틸프로판티오산-*S*-[(6*S*)-6-[[(1,1-다이메틸에톡시)카르보닐]아미노]-7-옥소-7-(트라이사이클[3.3.1.1^{3,7}]데크-1-일아미노)헵틸]에스테르
PCI 34051 카탈로그 번호 4643  화학명: *N*-하이드록시-1-[(4-메톡시페닐)메틸]-1*H*-인돌-6-카르복스아미드	스크림타이드 카탈로그 번호 2421  화학명: *N*-하이드록시-1,3-다이옥소-1,3-다이옥소-1*H*-벤즈[de]아이소퀴놀인-2(3*H*)-헥산아미드
NSC 3852 카탈로그 번호 2521  화학명: 5-니트로소-8-퀴놀리놀	소듐 4-페닐부티레이트 카탈로그 번호 2682  대안명: 4-PB, 소듐 페닐부티레이트 화학명: 4-페닐부티르산, 소듐 염

[0320]

M 344 카탈로그 번호 2771  화학명: 4-(다이에틸아미노)-*N*-[7-(하이드록시아미노)-7-옥소헵틸]벤즈아미드	발프로산, 소듐 염 *카탈로그 번호 2815*  대안명: VPA, 소듐 발프로에이트 화학명: 소듐 2-프로필펜타노에이트
SAHA *카탈로그 번호 4652*  대안명: 보리노스탯 화학명: *N*-하이드록시-*N'*-페닐옥탄다이아미드	**GSK J2** *카탈로그 번호 4688*  화학명: *N*-[2-(3-피리디닐)-6-(1,2,4,5-테트라하이드로-3*H*-3-벤즈아제핀-3-일)-4-피리미딜]-β-알라닌 에틸 에스테르
GSK J5 *카탈로그 번호 4689*  화학명: *N*-[2-(3-피리디닐)-6-(1,2,4,5-테트라하이드로-3*H*-3-벤즈아제핀-3-일)-4-피리미디닐]-β-알라닌 에틸 에스테르	**GSK J1** *카탈로그 번호 4593*  화학명: *N*-[2-(2-피리디닐)-6-(1,2,4,5-테트라하이드로-3*H*-3-벤즈아제핀-3-일)-4-피리미디닐]-β-알라닌
GSK J4 *카탈로그 번호 4594*  화학명: *N*-[2-(2-피리디닐)-6-(1,2,4,5-테트라하이드로-3*H*-3-벤즈아제핀-3-일)-4-피리미디닐]-β-알라닌 에틸 에스테르	다미노지드 *카탈로그 번호 4684*  화학명: 1-(2,2-다이메틸하이드라지드)부탄다이오산

[0321]

트래닐사이프로민 하이드로클로라이드 *카탈로그 번호 3582*  대안명: 2-PCPA 화학명: (±)-트랜스-2-페닐사이클로프로필아민	RN 1 다이하이드로클로라이드 *카탈로그 번호 4977*  (및 기울상 이성질체) 화학명: 1-(4-메틸-1-피페라지닐)-2-[[(1*R**, 2*S**)-2[4-페닐메톡시]페닐]사이클로프로필]아미노]에탄온 다이하이드로클로라이드
IOX 1 *카탈로그 번호 4464*  대안명: 5-카르복시-8HQ 화학명: 8하이드록시-5-퀴놀린카르복실산	**JIB 04** *카탈로그 번호 4972*  화학명: 5-클로로-2-[(*E*)-2-[페닐(피리딘-2-일)메틸리덴] 하이드라진-1-일]피리딘
시르티놀 *카탈로그 번호 3521*  화학명: 2-[[(2-하이드록시-1-나프탈레닐)메틸렌]아미노] -*N*-(1-페닐에틸)벤즈아미드	스플리토마이신 *카탈로그 번호 1542*  화학명: 1,2-다이하이드로-3*H*-나프토[2,1-b]피란-3-온
레스베라트롤 *카탈로그 번호 1418*  화학명: 5-[(1*E*)-2-(4-하이드록시페닐)에테닐]-1,3,벤젠다이올	**EX 527** *카탈로그 번호 2780*  화학명: 6-클로로-2,3,4,9-테트라하이드로-1*H*-카르바졸 -1-카르복스아미드

<table>
<tr>
<td>테노빈-1
카탈로그 번호 3365

화학명: N-[[[4-(아세틸아미노)페닐]아미노]티옥소메틸]-4-(1,1-다이메틸에틸)벤즈아미드</td>
<td>살레미드
카탈로그 번호 4127

화학명: N-[3-[[(2-하이드록시-1-나프탈레닐)메틸렌]아미노]페닐]-α-메틸벤젠아세트아미드</td>
</tr>
<tr>
<td>AK 7
카탈로그 번호 4754

화학명: N-(3-브로모페닐)-3-[(헥사하이드로-1H-아제핀-1-일)설포닐]벤즈아미드</td>
<td>3-아미노벤즈아미드
카탈로그 번호 0788

대안명: 3-ABA</td>
</tr>
<tr>
<td>PJ 34 하이드로클로라이드
카탈로그 번호 3255

화학명: N-(5,6-다이하이드로-6-옥소-2-페난트리디닐)-2-아세트아미드 하이드로클로라이드</td>
<td>IOX 2
카탈로그 번호 4451

화학명: N-[[1,2-다이하이드로-4-하이드록시-2-옥소-1-(페닐메틸)-3-퀴놀리닐]카르보닐]글리신</td>
</tr>
<tr>
<td>포르스콜린
카탈로그 번호 1099

화학명: [3R-(3α,4aβ,5β,6β,6aα,10α,10aβ,10bα)]-5-(아세틸옥시)-3-에테닐도데카하이드로-6,10,10b-트라이하이드록시-3,4a,7,710 a-펜타메틸-1H-나프토[2,1-b]피란-1-온</td>
<td>레티노산
카탈로그 번호 0695

대안명: 트레티노인, ATRA
화학명: 3,7-다이메틸-9-(2,6,6-트라이메틸-1-사이클로헥센-1-일)-2E,4E,6E,8E,-노나테트라에노산</td>
</tr>
</table>

[0322]

[0323] [표 XII]

제형 I의 성분

성분	농도	공급처
RPMI 비타민 보충물	1:200 희석	Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 R7256
MEM 비-필수 아미노산 보충물	1:200 희석	Life Technologies, 카탈로그 번호 111400
화학적으로 한정된 지질 농축물	1:2000 희석	Gibco by Life Technologies, 카탈로그 번호 11905
소듐 피루베이트	1:200 희석	Life Technologies, 카탈로그 번호 111360
미량 원소 A	1:2000 희석	Corning, 카탈로그 번호 25-021
미량 원소 B	1:2000 희석	Corning, 카탈로그 번호 25-022

[0324]

[0325] 상기 예는 다양한 소분자를 기재하며, 이는 전형적으로 세포 주기 억제제로서 작용하지만, 예상외로 본 명세서의 본 발명에 기재될 때까지 그들은 PDX1, NKX6.1, MAFA, UCN3 및 SLC2A1 을 포함하는 주요 성숙 베타-세포 마커의 발현을 유도한다.

[0326] **실시예 6:**

[0327] **다중 유형의 현탁 배양에서 CyT49 hESC로부터 유래된 췌장 내배엽의 생성.**

[0328] 하기 실시예는 다중 현탁 배양 포맷 (롤러 병 및 PBS Biotech MagLift™ 수직 휠 생물반응기)에서 분화 프로토콜을 이용하여, 인간 만능 줄기 세포, 특히 CyT49 인간 배아 줄기 세포주 ("hESC")로부터 유래된 췌장 내배엽 세포의 개선된 생성을 나타낸다. 표 XIII은 CyT49 hESC-유래 췌장 내배엽에 대해 이루어진 특정 향상을 열거한다. 특히, CyT49 hESC로부터 생성된 췌장 내배엽은, 둘 모두 인슐린-생성 세포의 추가의 효율적인 생성을 위한

중요한 요건인, 대안적인 내배엽 계통 및 내분비 분화 둘 모두의 더 낮은 우세성을 나타내며, H1 hESC-유래 췌장 내배엽과 더 유사하다 (실시예 3). 또한, CyT49 hESC-유래 췌장 내배엽을 생성하기 위해 필요한 시간은 5일 만큼 감소된다. 새로운 CyT49 hESC-유래 췌장 내배엽 프로토콜을 롤러 병 및 생물반응기 포맷에 적용하여 스케일-아웃 및 스케일 업 제조 둘 모두를 가능하게 할 수 있다.

[0329] [표 XIII]

췌장 내배엽의 생성에 대한 개선.

	CyT49 hESC-유래 PEC-01	H1 hESC-유래 (실시예 3)	새로운 CyT49 hESC-유래 (실시예 6)
프로토콜 지속기간	15 일	10 일	10 일
다른 내배엽 계통의 우세성	중간체	낮음	낮음
내분비 분화의 우세성	중간체	낮음	낮음
포맷	롤러 병, 생물반응기 (제 8,895,300 호; 제 8,445,273 호)	스케일-업; 생물반응기 (현재 개시)	롤러 병, 생물반응기 (현재 개시)

[0330]

[0331] 표 XIV는 개선된 CyT49 hESC-유래 췌장 내배엽의 생성을 위한 분화 프로토콜로 이루어진 주요 조정을 약술한다. 주요 차이점은 3기 및 4기 중의 BMP-억제의 결여, 및 기본 배지로서의 MCDB131 (1기 및 2기) 및 BLAR001 (3기 및 4기)의 사용을 포함한다.

[0332] [표 XIV]

췌장 내배엽으로의 hESC-유래 분화 프로토콜.

시기	1 기	2 기	3 기	4 기
CyT49 hESC-유래 PEC-01	Wnt3A, AA, ITS; RPMI1640	FGF7, TGF-베타 억제제 IV, ITS; RPMI1640	TTNPB, KAAD-사이클로파민, 노긴, B27, ITS; DMEM/HI 글루코스	EGF, FGF7, 노긴, B27; DMEM/HI 글루코스
H1 유래 (실시예 3)	MCX, GDF8; MCDB131	FGF7; MCDB131	FGF7, SANT, TPPB, LDN, RA, ITSX; BLAR001	FGF7, SANT, TPPB, LDN, RA, ITSX; BLAR001
새로운 CyT49 hESC-유래 (실시예 6)	Wnt3A, AA, ITSX; MCDB131	FGF7; MCDB131	FGF7, SANT, TPPB, RA, ITSX; BLAR001	FGF7, SANT, TPPB, RA, ITSX; BLAR001

[0333]

[0334] 1:100X GlutaMAX ("DMEM-F12"; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 Life Technologies, 카탈로그 번호 10565), 1:10 희석으로 ("10% 농도") XenoFree ("XF") 넉아웃 혈청 대체물 (Knockout Serum Replacement) ("KSR"; Life Technologies, 카탈로그 번호 12618), 1:100 희석으로 ("1X 농도") MEM 비-필수 아미노산, 1:100 희석으로 ("1X 농도") 페니실린-스트렙토마이신, 10 ng/ml의 인간 액티빈 A (미국 미네소타주 미니애폴리스 소재의 R&D Systems, 카탈로그 번호 338-AC), 및 10 ng/ml 인간 헤레귤린-베타 1 (미국 뉴저지주 록키힐 소재의 PeproTech, 카탈로그 번호 100-03)을 갖는 둘베코 변형 이글 배지 영양소 (DMEM) 혼합물 F-12의 성장 배지 중에, 조직 배양 처리된 디쉬 상에 작업 세포 뱅크 4A의 계대 27 ("WCB4A")에서 인간 배아 줄기 세포주 CyT49의 세포 ("CyT49-hESC"; NIH 등록 0041)를 0.033 × 10^6 개의 세포/㎠로 단일 세포로서 접종하였다. 1:10 희석으로 인간 혈청 AB("10% 농도"; 미국 버지니아주 윈체스터 소재의 valley Biomedical, 카탈로그 번호 HP-1022)를 접종 후 처음 24 시간 동안에만 사용하였다. 접종 후 96 시간에, 컨플루언트 CyT49 hESC 배양물을 상기 언급된 성장 배지에서 계대하였다. 대안적으로, Accumax (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Innovative Cell Technologies, 카탈로그 번호 AM105) 처리 (37℃에서 3 분)에 의해 컨플루언트 CyT49 hESC를 단일 세포 현탁액으로서 방출시키고, 1:100X GlutaMAX (Life Technologies, 카탈로그 번호 10565), 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신, 1:50 희석으로 StemPro® 보충물 (Life Technologies, 카탈로그 번호 ME130070L1), 10 ng/ml 인간 액티빈 A, 10 ng/ml 인간 헤레귤린-베타 1, 및 200 ng/ml LR3-IGF1 (미국 매사추세츠주 뉴버리포트 소재의 Cell Sciences, 카탈로그 번호 LRM001)의 DMEM-F12 배지 중에, 31 rpm의 속도로, 그리고 롤러 병 (미국 뉴욕주 코닝 소재의 Corning, 카탈로그 번호 CLS431644) 내에서 ml 당 백만 개의 세포의 농도로 응집시켰다.

[0335] 도 9a 내지 도 9q에서, 하기 프로토콜 (도 9a 에 도시됨)을 사용하여 현탁 배양 포맷으로 배양물을 분화시켰다. 프로토콜의 1기 내지 4기 중에, 현탁 배양물을 31 rpm에서 2-리터 롤러 병 ("RB"), 45 rpm에서 0.1 PBS 미니 또는 0.5 PBS 미니 MagLift™ 수직 휠 생물반응기 (미국 캘리포니아주 캠마릴로 소재의 PBSBiotech) 중의 어느 하나 내에 유지하였다. "0.1PBS"는 100 ml 미니 MagLift™ 수직 휠 생물반응기를 지칭하고, "0.5PBS"는 500 ml 미니 MagLift™ 수직 휠 생물반응기를 지칭한다. CyT49 hESC 응집체를 2-리터 롤러 병의 500 ml 배지 부피, 0.1 PBS 미니의 100 ml 배지 부피, 또는 0.5 PBS 미니의 500 ml 배지 부피에 ml 당 대략 0.18 내지 0.36 백만 개의 세포로 투입하였다. 세포 배양 배지는 매일 교환하였다.

[0336] a. 1기 (2일): 미분화 ES 응집체를 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1:100 희석 ("1X 농도")으로 GlutaMAX™, 10 mM의 D-글루코스 최종 농도를 얻기 위한

4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml 인간 액티빈 A, 50 ng/ml 마우스 Wnt3A (R and D Systems, 카탈로그 번호 1324-WN), 및 1:10000 희석으로 ITS-X ("인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민"; 미국 매사추세츠주 월섬 소재의 ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 51500056)으로 보충한 MCDB-131 배지. 이어서, 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X 농도의 GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml 인간 액티빈 A 및 1:10000 희석의 ITS-X로 보충한 MCDB-131 배지에서 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0337] b. 2기 (3일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, 0.5% FAF-BSA, 1X GlutaMAX™, 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스, 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml 섬유아세포 성장 인자 7 ("FGF7"; PeproTech, 카탈로그 번호 AF-100-19)로 보충한 MCDB-131 배지로 2일 동안 응집체를 처리하였다.

[0338] c. 3기 (2일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 0.25% FAF-BSA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 μM SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민); 1 μM 레티노산("RA"); 0.25 mM 아스코르브산; 및 300 nM의 PKC 활성화제 ((2S, 5S-(E,E)-8-(5-(4-트라이플루오로메틸)페닐-2,4,-펜타다이에노일아미노)벤조락탐 ("TPB")으로 보충한 BLAR001 주문 제작 배지로 2일 동안 응집체를 처리하였다.

[0339] d. 4기 (3일): 3.6 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 10 mM D-글루코스의 농도를 얻기 위한 4.5 mM D-글루코스; 1X 농도의 GlutaMAX™; 0.25% FAF-BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 2 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 및 300 nM TPB로 보충된 BLAR001 배지로 3일 동안 응집체를 처리하였다.

[0340] 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된 미국 특허 제8,445,273호; 제8,895,300호에는 적어도 하기 열거된 프로토콜에 의해 생성된 PEC-01 ("췌장 내배엽 세포 – 01") d15가 기재되어 있다. CyT49 hESC 응집체를 ml 당 1.0 μl 내지 2.0 μl 응집체 펠렛 부피 ("APV")로 투입하였다. 하기 프로토콜의 1기 내지 4기를 31 rpm으로 회전하는 500 ml 부피로 2-리터 롤러 병에서 현탁 배양물로서 유지하였다.

[0341] a. 1기 (2일; d1 내지 d2): 1X 농도의 GlutaMAX™; 0.2% 우타아 혈청 ("FBS"; 미국 유타주 로간 소재의 HyClone, 카탈로그 번호 SH30070.03); 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; ITS의 1:5000 희석액 (미국 매사추세츠주 월섬 소재의 Invitrogen, 카탈로그 번호 41400); 100 ng/ml 액티빈 A; 및 50 ng/ml Wnt3A로 보충한 RPMI1640 배지 (Life Technologies, 카탈로그 번호 21870-076)로 1일 동안 미분화 ES 응집체를 처리하였다. 이어서, 1X 농도의 GlutaMAX™; 0.2% 우태아 혈청; 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; ITS의 1:5000 희석액; 100 ng/ml 액티빈 A; 및 50 ng/ml Wnt3A로 보충한 RPMI1640 배지 중에 부가적인 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0342] b. 2기 (3일; d3 내지 d5): 1X 농도의 GlutaMAX™; 0.2% 우태아 혈청; 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; ITS의 1:1000 희석액; 25 ng/ml 인간 FGF7; 및 2.5 uM 형질전환 성장 인자-베타 억제제 IV ("TGF-β"; 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재의 EMD Bioscience, 카탈로그 번호 616454)로 보충한 RPMI1640 배지로 1일 동안 응집체를 처리하였다. 이어서, 1X 농도의 GlutaMAX™; 0.2% 우태아 혈청; 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; ITS의 1:1000의 희석액; 및 25 ng/ml 인간 FGF7로 보충한 RPMI1640 배지 중에 부가적인 2일 동안 세포를 배양하였다.

[0343] c. 3기 (3일; d6 내지 d8): 1:50 희석으로 B-27 보충물 (Invitrogen, 카탈로그 번호 17504-044); 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; 1X 농도의 GlutaMAX™; ITS의 1:1000의 희석액; 3 nM TTNPB ("4-[(E)-2-(5,6,7,8-테트라하이드로-5,5,8,8-테트라메틸-2-나프탈레닐)-1-프로페닐] 벤조산"; 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 Sigma Aldrich, 카탈로그 번호 T3757); 0.25 uM KAAD-사이클로파민 ("3-케토-N-아미노에틸-N'-아미노카프로일 다이하이드로신나모일 사이클로파민"; 캐나다 노스요크 소재의 Toronto Research Chemicals, 카탈로그 번호 K171000); 및 50 ng/ml 인간 노긴 (R and D Systems, 카탈로그 번호 3344-NG)으로 보충한 DMEM-HI 글루코스 배지 (Invitrogen, 카탈로그 번호 11960-051)로 3일 동안 응집체를 처리하였다.

[0344] d. 4기 (3일; d9 내지 d12; d12는 "PEC-01 d12"로 지칭함): 1:50 희석으로 B-27 보충물; 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; 1X 농도의 GlutaMAX™; 50 ng/ml 인간 표피 성장 인자 ("EGF"; PeproTech, 카탈로그 번호 AF-100-15); 50 ng/ml FGF7; 및 50 ng/ml의 인간 노긴으로 보충한 DMEM-HI 글루코스 배지로 3일 동안 응집체를 처리하였다.

[0345] e. D12에서의 냉동보존: 1X 농도의 GlutaMAX™; 15% 농도의 DMSO ("다이메틸 설폭사이드"; 미국 텍사스주 오스틴 소재의 Origen Biomedical, 카탈로그 번호 CP-10); 60% 농도의 XF-무함유 KSR; 및 25 mM HEPES 완충 용액 ("N-2-하이드록시에틸피페라 -N-2-에탄 설폰산"; ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 15630080)으로 보충

된 DMEM-HI 글루코스 배지에 응집체를 재현탁시켰다. 제어된 속도 냉동기 ("CRF"; 영국 셰퍼튼 선버리-온-템즈 소재의 Planer PLC, 카탈로그 번호 Kryo 560-16) 내에서 하기 프로토콜을 사용하여 d12 응집체를 냉동보존하였다: (1) 시작 온도 -2.0 C; (2) -2.0 C/min 내지 -9.0℃; (3) -9.0 C에서 10 분 동안, 그리고 수동으로 동결을 시작함; (4) -0.2 C/min 내지 -40 C; (5) -25 C/min 내지 -150℃; (6) 액체 질소 저장소로 옮김.

[0346] f. PEC-01로의 후-냉동보존 (3 일; d13 내지 d15): 1:50 희석으로 B-27 보충물; 1X 농도의 페니실린-스트렙토마이신; 1X 농도의 GlutaMAX™; 50 ng/ml 인간 표피 성장 인자 ("EGF"; PeproTech, 카탈로그 번호 AF-100-15); 50 ng/ml FGF7; 및 50 ng/ml의 인간 노긴으로 보충한 DMEM-HI 글루코스 배지로 3일 동안 응집체를 처리하였다. 제1일에만 10 U/ml DNase I (스위스 바젤 소재의 Roche, 카탈로그 번호 04536282001)을 배지에 보충한다.

[0347] **분화된 세포의 특성화:** 문헌[*Nature Biotechnology*, 2014, (32) 11, 1121-1133]에 기재된 바와 같이, 2-리터 롤러 병, 0.1 PBS 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 유전자 발현의 정량화를 위해, CyT49-hESC, 4기 제3일 ("S4D3"), 및 PEC-01 d15 응집체를 수확하였다. 주문 제작 Taqman Arrays (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Applied Biosystems)를 사용하여 세포에서 유전자 발현을 평가하였다. 데이터를 Sequence Detection 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Applied Biosystems)를 사용하여 분석하고, 하우스키핑 유전자로서 GAPDH를 사용하여 ΔΔCt 방법을 사용하여 미분화된 CyT49-hESC에 대해 정규화하였다. 프라이머 상세 사항은 표 XV에 약술되어 있다.

[0348] [표 XV]

qRT-PCR 프라이머 목록.

	유전자	검정 ID
1	*PTF1A*	Hs00603586_g1
2	*CDX2*	Hs00230919_m1
3	*SOX2*	Hs01053049_s1
4	*NKX6.1*	Hs00232355_m1
5	*PDX1*	Hs00236830_m1
6	*NEUROD1*	Hs00159598_m1
7	*CHGA*	Hs00154441_m1
8	*GAPDH*	Hs99999905_m1

[0349]

[0350] 2-리터 롤러 병, 0.1 PBS, 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 단백질 존재 공동-국소화의 정량화를 위해, CyT49-hESC, 4기 제3일 ("S4D3"), 및 PEC-01 d15 응집체를 수확하고 형광-활성화 유세포 분석법 ("FACS")에 의해 분석하였다. 문헌[*Nature Biotechnology*, 2014 (32) 11, 1121-1133]에 기재된 바와 같이, 그리고 표 XVI에 열거된 항체를 사용하여 FACS 염색을 수행하였다. 분화된 세포를 실온에서 20 분 동안 Accumax (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Innovative Cell Technologies, 카탈로그 번호 AM105) 중에 인큐베이션하고, 단일-세포 현탁액 으로 방출한 후, 그들을 autoMACS Running Buffer (독일 베르기슈 소재의 Miltenyl Biotec, 카탈로그 번호 120-091-221)로 2회 세척하고, 실온에서 30 분 동안 4% 파라포름알데하이드 ("4% PFA"; Sigma-Aldrich, 카탈로그 번호 158127) 중에 고정시키고, 이어서 autoMACS Running buffer 중에 2 회 세척하였다. 이어서, 세포를 적절한 항체 (표XVI)와 함께 인큐베이션한 후, BD FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 BD FACS Canto II 상에서 분석하였으며, 30,000회 이상의 사건을 획득하였다. 생존 불가능한 세포를 FACS 분석 동안 배제시키고, 동종형 항체 ("IgG")를 사용함으로써 게이팅(gating)을 결정하였다.

[0351] [표 XVI]

FACS 분석에 사용된 항체 목록.

항원	종	공급처/카탈로그 번호	희석
Alexa Fluor 647 항-NKX6.1	마우스	BD, 카탈로그 번호 563338	1:3
PE 항-PDX1	마우스	BD, 카탈로그 번호 562161	1:2
Alexa Fluor 405 항-CHGA	마우스	Novus Biologicals, 카탈로그 번호 NBP2-33198AF405	1:100
PerCP-Cy™5.5 항-SOX2	마우스	BD, 카탈로그 번호 561506	1:2
PE 항-CDX2	마우스	BD, 카탈로그 번호 563428	1:4

[0352]

[0353] 2-리터 롤러 병, 0.1 PBS, 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 세포 수율의 정량화를 위해, CyT49-hESC 및 4기 제3일 ("S4D3") 응집체를 수확하고, Nucleocounter® NC-100 (덴마크 알레로드 소재의 Chemometec, 카탈로그 번호 NC-100)에 의해 계수하였다.

[0354] 도 9a는 새로운 프로토콜을 이용하여 췌장 내배엽 (예를 들어, S4D3)을 향해 CyT49 hESC를 분화시킨 방법을 도시한다. PEC-01 d12 및 PEC-01 d15가 종래 기술의 예로서 본 명세서에 강조되어 있다. 현탁 배양 방법, 즉 2-

리터 롤러 병, 또는 0.1 PBS 또는 0.5 PBS 수직 휠 생물반응기는, 췌장 내배엽 중간체를 통한 인슐린-생성 세포의 상업적 규모 생성을 위한 그들의 상용성에 기초하여 이용하였다. 2-리터 롤러 병 포맷이 췌장 내배엽 세포의 스케일-아웃에 유용한 도구이지만, 그것은 인슐린-생성 세포의 궁극적인 상업적 규모에 이상적이지 않다. PBS Biotech MagLift™ 수직 휠 생물반응기 시스템은, 부피를 증가시키고 시간 경과에 따라 작은/컴팩트한 응집체 크기를 유지하면서 인슐린-생성 세포 생성을 점진적으로 개선하는 능력을 제공할 대안적인 스케일-업 시스템이다. 도 9b는, 예상된 바와 같이, S4D3에서의 세포 수율이 hESC 입력에 비하여 세포 수의 유의한 확장을 반영하였음을 나타낸다. 새로운 프로토콜을 이용하는 모든 현탁 배양 방법에 걸쳐 S4D3 세포 대 hESC 입력의 비는 일관적이었으며; 2-리터 롤러 병에 대해 4.30 ± 0.782, 0.1PBS에 대해 3.27 ± 0.585, 그리고 0.5PBS에 대해 4.08 ± 0.854였고, 종래 기술 (hESC 입력 당 2.23 ± 0.090 PEC-01 d12 세포)로부터 현저하게 증가하였다. 추가로, 개시된 분화 프로토콜이 PBS MagLift™ 수직 휠 생물반응기 시스템을 사용하여 효과적으로 스케일-업될 수 있다는 것을 도 9c에 나타내었다. 배지 부피를 100 ml (0.1PBS)로부터 500 ml (0.5PBS)로 증가시켰을 때, S4D3 수율의 대략 6 배 증가가 관찰되었다 (도 9c). 부가적으로, 0.1PBS (약 150 ± 33.2 마이크로미터) 또는 0.5PBS (약 153 ± 37.6 마이크로미터) 현탁액 포맷을 이용하여, 롤러 병 기반 S4D3 (약 274 ± 92.5 마이크로미터), 및 PEC-01 d12 (약 259 ± 55.3 마이크로미터)에 비해 균일하게 더 작은 S4D3 응집체를 생성하였다. 0.1PBS 및 0.5PBS (PEC-01 d15; 약 191 ± 45.4 마이크로미터) (도 9d 및 도 9e)를 이용하여 관찰되는 규모로 PEC-01 응집체 크기를 감소시키기 위해서는 PEC-01 d12의 냉동보존, 해동 및 추가의 3-일 배양이 필요하였다. 모든 현탁 배양 방법에 걸쳐 새로운 CyT49 hESC-유래 분화 프로토콜을 이용하여 강건한 췌장 내배엽 표현형을 달성하였음을 입증하였다. *NKX6.1* (도 9f), *PTF1A* (도 9g), *PDX1* (도 9h)은 모두 PEC-01 d15와 유사하게 2-리터 롤러 병, 0.1PBS, 0.5PBS 방법에서 유의하게 유도되었다. *SOX2*(대안적인 내배엽 계통; 도 9i), *NEUROD1* (초기 내분비 분화; 도 9k) 및 CHGA (초기 내분비 분화; 도 9l)의 증가된 발현을 유발한 PEC-01 d15 분화 프로토콜과는 달리, 새로운 분화 프로토콜은 CyT49에서 시험된 모든 현탁 배양 방법에서 이들 비-췌장 내배엽 마커를 감소시켰다. 실제로, 비-췌장 내배엽의 이러한 강화는 단백질-수준에서 평가되는 췌장 내배엽 생성의 효율을 감소시킨다. PEC-01 d12 (약 38.0%; 도 9m)에 비해, 새로운 CyT49 hESC-유래 분화 프로토콜을 이용하는 모든 새로운 S4D3 현탁 배양 방법에 걸쳐 PDX1과 NKX6.1 사이의 단백질 공동-국소화가 향상되었으며; 2-리터 롤러 병 약 64.6% (도 9n), 0.1PBS 약 48.9% (도 9o), 및 0.5PBS 약 65.3% (도 9p)였다. 또한, 새로운 CyT49 hESC-유래 분화 프로토콜을 이용하는 모든 새로운 S4D3 현탁 배양 방법과는 달리, PEC-01 d12에서 관찰된 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$ 췌장 내배엽의 약 49%는 $SOX2^+$ (도 9m) 또한 발현하였으며; 2-리터 롤러 병 약 2.0% (도 9n), 0.1PBS 약 10.0% (도 9o), 및 0.5PBS 약 6.2% (도 9p)였다. PEC-01 d12에서 관찰된 췌장 내배엽의 상대적으로 낮은 백분율은 또한, 모든 새로운 S4D3 현탁 배양 방법에 비해 증가된 초기 내분비 분화의 우세성 (약 49.6%; 도 9m)에 의해 반영되며; 2-리터 롤러 병 약 26.9% (도 9n), 0.1PBS 약 26.6% (도 9o), 및 0.5PBS 약 30.2% (도 9p)였다. PDX1 및 NKX6.1의 공동-국소화 (PEC-01 d15; 약 47.5%; 도 9q)를 SOX2 (약 22.5%; 도 9q) 및 CHGA (약 42.5%; 도 9q)의 감소에 의해 미약하게 증가시키기 위해서는 PEC-01 d12의 냉동보존, 해동, 및 부가적인 3일 세포 배양이 필요하였다. 모든 유형의 현탁 배양에 걸쳐 S4D3에서의 낮은 *CDX2* 유전자 발현 (도 9j)에 의해 반영되는 바와 같이, NKX6.1과 CDX2 사이의 단백질 공동-국소화는 시험된 모든 조건 (도 9m 내지 도 9q)에 걸쳐 낮았다.

[0355] **실시예 7:**

[0356] **다중 유형의 현탁 배양에서 CyT49 hESC로부터 유래된 인슐린 생성 세포의 생성.**

[0357] 하기 실시예는 다중 현탁 배양 포맷 (롤러 병, 및 0.1PBS 및 0.5PBS Biotech MagLift™ 수직 휠 생물반응기 둘 모두)에서 새로운 분화 프로토콜을 이용하여, CyT49 인간 배아 줄기 세포주 ("hESC")로부터 유래된 췌장 인슐린-생성 세포의 개선된 생성을 나타낸다. 표 XVII은 CyT49 hESC-유래 인슐린-생성 세포에 대해 이루어진 특정 향상을 열거한다. PEC-01-유래 및 PEC-01-유사-유래 인슐린 생성 세포와 지속기간이 유사하지만 (종래 기술은 문헌[*Stem Cells Transl Med*, 2015 (10) 4, 1214-1222]), CyT49 hESC로부터 인슐린-양성 세포를 생성하기 위해 사용되는 새로운 분화 프로토콜은, 모노-호르몬 인슐린-생성 세포에서의 PDX1, NKX6.1, CHGA, MAFA의 단백질 존재, 및 폴리-호르몬 인슐린-생성 세포 (INS^+ GCG^+ 둘 모두)의 유의한 감소를 통해, 모노-호르몬 인슐린-생성 세포 (INS^+ 단독)의 향상된 생성을 나타낸다. 모노-호르몬 인슐린-양성 세포 내의 GCG-존재의 결여, 및 NKX6.1, MAFA-존재의 유도는 인간-췌도-유사 기능기의 궁극적인 획득을 위한 요건이다 (실시예 2 내지 실시예 5). 또한, 새로운 CyT49 hESC-유래 췌장 인슐린-생성 세포 프로토콜은, 최초로, 롤러 병에 의한 스케일-아웃보다 더 잘 취급할 수 있는 생물반응기에서의 스케일-업 능력, 인슐린-생성 세포의 궁극적인 상업적 세포 제조를 나타낸

다 (실시예 7).

[0358] [표 XVII]

인슐린-생성 세포의 생성에 대한 개선.

	PEC-1-유사 유래 인슐린-생성 세포 (CyT49)	H1 hESC-유래 (실시예 2 내지 실시예 4)	새로운 CyT49 hESC-유래 (실시예 7)
프로토콜 지속기간	12 내지 21 일 (7 기)	17 일 (7 기)	17 내지 25 일 (7 기)
총 INS^+ 세포의 우세성	약 45%	약 50%	약 50%
INS^+ GCG^+ 세포의 우세성	중간체; 약 15%	낮음; 약 4%	낮음; 약 6.6%
INS^+ $NKX6.1^+$ 세포 내의 MAFA 존재?	평가되지 않았으나 매우 낮은 유전자 발현	예	예
포맷	회전하는 6-웰 플레이트	생물반응기 (현재 개시)	롤러 병, 생물반응기 (현재 개시)

[0359]

[0360] 표 XVIII은 개선된 CyT49 hESC-유래 췌장 내배엽의 생성을 위한 분화 프로토콜로 이루어진 주요 조정을 약술한다. 주요 차이점은 사용되는 소분자 및 기본 배지를 포함한다. 약어는 하기를 포함한다: Nic - 니코틴아미드; MG - Matrigel; GSI - 감마-세크레타제 억제제; ROCKi - 로-관련 단백질 키나제 억제제.

[0361] [표 VIII]

인슐린-생성 세포에 대한 hESC-유래 분화 프로토콜.

시기	5 기	6 기	7 기
PEC-01-유래 인슐린-생성 세포 (CyT49) (문헌[Stem Cell Trans Med, 2015])	노긴, KGF, EGF, GSI, ROCKi, B-27; DMEM/HI 글루코스	Nic, ROCKi, B-27; CMRL1066	Nic, MG, ROCKi, T3, Nic, B-27; CMRL1066
H1 hESC-유래 (실시예 2 내지 실시예 4)	SANT, RA, LDN, ALK5 억제제, T3, 헤파린; BLAR001	LDN, ALK5 억제제, T3, XX, 헤파린; BLAR001	T3, 헤파린, NAC, 제형 I; BLAR001
새로운 CyT49 hESC-유래 (실시예 7)	SANT, RA, LDN, ALK5 억제제, T3, 헤파린; BLAR001	LDN, ALK5 억제제, T3, XX, 헤파린; BLAR001	T3, 헤파린, NAC, 제형 I; BLAR001

[0362]

[0363] 실시예 6 에 기재된 바와 같이 작업 세포 뱅크 4A ("WCB4A")의 계대 27에서 인간 배아 줄기 세포주 CyT49 ("CyT49-hESC"; NIH 등록 0041)의 세포를 접종하고 유지하였다. 또한, 실시예 6 에 기재된 바와 같이, CyT49 hESC 응집 및 1기 내지 4기를 통한 분화를 수행하였다.

[0364] 도 10a 내지 도 10ab의 경우, 하기 프로토콜 (도 10a 에 도시됨)을 사용하여 5기 내지 7기 중에 현탁 배양 포맷으로 배양물을 추가로 분화시켰다. 프로토콜의 5기 내지 7기 중에, 현탁 배양물을 31 rpm에서 롤러 병, 45 rpm에서 0.1 PBS 미니 또는 0.5 PBS 미니 MagLift™ 수직 휠 생물반응기 중의 어느 하나 내에 유지하였다. "0.1PBS"는 100 ml 미니 MagLift™ 수직 휠 생물반응기를 지칭하고, "0.5PBS"는 500 ml 미니 MagLift™ 수직 휠 생물반응기를 지칭한다. 인슐린-생성 세포의 기능성을 유도하기 위한 칵테일이 포함되지 않고 다른 개시의 대상이므로, 7기 분화 프로토콜은 기본 조건화로 지칭된다는 것에 유의한다. 5기 및 6기 중에는, 배지 교환이 매일 일어난 반면에, 7기에서는 배지를 격일로 교환하였다.

[0365] a. 5기 (3일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 및 10 μM의 ALK5 억제제 II로 보충한 BLAR001 배지로 S4D3 CyT49 (실시예 6 - 새로운 CyT49 hESC-유래 프로토콜) 또는 PEC-01 d15 유래 응집체를 처리하였다.

[0366] b. 6기 (7일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 20 mM D-글루코스의 최종 농도를 달성하기 위한 14.5 mM D-글루코스; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"); 10 μM $ZnSO_4$; 100 nM LDN-HCl; 1 μM의 T3; 10 μM의 ALK5 억제제 II 및 100 nM의 감마 세크레타제 억제제 XX로 보충된 BLAR001 배지 중에 응집체를 처리하였다. 6기 내지 7기를 위해 0.5 PBS 현탁 배양물 중의 S5D3 응집체를 0.1 PBS 현탁 배양물로 옮겼다.

[0367] c. 7기 (7 내지 23일): 2.7 g/1000 ml 중탄산나트륨을 함유하고, ITS-X의 1:200 희석액; 1X GlutaMAX™; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린 ("H"), 10 nM의 T3 ("낮은 T3"); 1 mM NAC"); 및 제형 I ("FI")을 구성하는 하기 성분 - RPMI 비타민 보충물의 1:200 희석액; MEM 비-필수 아미노산 보충물의 1:200 희석액; 화학적으로 정의된 지질 농축물의 1:2000 희석액; 소듐 피루베이트의 1:200 희석액; 미량 원소 A의 1:2000 희석액; 미량 원소 B의 1:2000 희석액으로 보충된 BLAR001 배지 중에 응집체를 처리하였다.

[0368] **분화된 세포의 특성화:** 문헌[*Nature Biotechnology*, 2014, (32) 11, 1121-1133] 및 실시예 1에 기재된 바와 같이, 롤러 병, 0.1 PBS 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 유전자 발현의 정량화를 위해, CyT49-hESC, 4기 제3일 ("S4D3"), 5기 제3일 ("S5D3"), 6기 제7일 ("S6D7") 및 7기 제7일 ("S7D7") 응집체를 수확하였다. 프라이머 상세사항은 표 XIX에 약술되어 있다.

[0369] [표 XIX]

qRT-PCR 프라이머 목록.

	유전자	검정 ID
1	*NGN3*	Hs00360700_g1
2	*인슐린*	Hs00355773_m1
3	*MAFA*	Hs01651425_s1
4	*NKX6.1*	Hs00232355_m1
5	*PDX1*	Hs00236830_m1
6	*NEUROD1*	Hs00159598_m1
7	*CHGA*	Hs00154441_m1
8	*GAPDH*	Hs99999905_m1

[0370]

[0371] 롤러 병, 0.1 PBS 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 단백질 존재 공동-국소화의 정량화를 위해, CyT49-hESC, 5기 제3일 ("S5D3"), 6기 제7일 ("S6D7"), 7기 제13일 ("S7D13") 및 7기 제14일 ("S7D14") 응집체를 수확하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 형광-활성화 유세포 분석법 ("FACS")에 의해 분석하였다. FACS 분석에 사용된 항체 목록을 표 XX에 나타낸다.

[0372] [표 XX]

FACS 분석에 사용된 항체 목록.

항원	종	공급처/카탈로그 번호	희석
Alexa Fluor 647 항-NKX6.1	마우스	BD, 카탈로그 번호 563338	1:3
항-PAX4 (비접합됨)	염소	R and D Systems, 카탈로그 번호 AF2614	1:40
Alexa Fluor 405 항-CHGA	마우스	Novus Biologicals, 카탈로그 번호 NBP2-33198AF405	1:100
Alexa Fluor 488 항-인슐린	마우스	Novus Biologicals, 카탈로그 번호 NBP2-34738AF488	1:10
BV421 항-글루카곤	마우스	BD, 카탈로그 번호 565891;	1:10
Alexa Fluor 488 항-염소 IgG	염소	Jackson Laboratories, 카탈로그 번호 705-546-147	1:400

[0373]

[0374] 롤러 병, 0.1 PBS, 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 세포 수율의 정량화를 위해, CyT49-hESC, 및 6기 제7일 ("S6D7") 응집체를 수확하고, Nucleocounter® NC-100 (덴마크 알레로드 소재의 Chemometec, 카탈로그 번호 NC-100)에 의해 계수하였다.

[0375] 롤러 병, 0.1 PBS 또는 0.5 PBS 현탁 배양 방법을 이용하는 단백질 공동-국소화의 정량화를 위해, 6기 제7일 ("S6D7"), 7기 제16일 ("S7D16") 및 7기 제23일 ("S7D23") 응집체를 수확하고, 면역형광 ("IF")에 의해 분석하였다. 문헌[*Nature Biotechnology*, 2014 (32) 11, 1121-1133] 및 이전의 실시예 둘 모두에 기재된 바와 같이, 그리고 본 명세서의 표 XXI에 열거된 항체를 사용하여, CyT49-hESC-유래 응집체를 제조하였다.

[0376] [표 XXI]

IF 분석에 사용된 항체 목록

항원	종	공급처	희석
인슐린	마우스	셀 시그널링(Cell Signaling) (카탈로그 번호 8138BF)	1:250
MAFA	토끼	Life Span Biosciences (카탈로그 번호 LP9872)	1:100 (항원 회수)
시냅토파이신	토끼	Novus Biologicals (카탈로그 번호 NB120-16659)	1:50
NKX6.1	토끼	Life Span Biosciences (카탈로그 번호 LP9878)	1:1000

[0377]

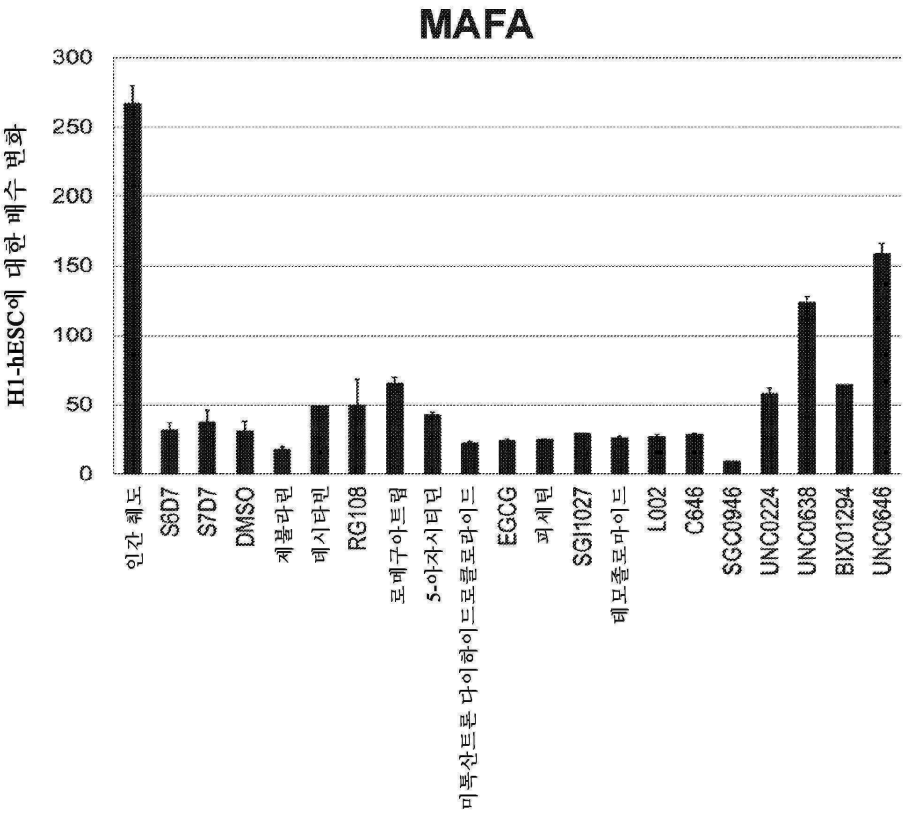
[0378] 도 10a는 S4D3 CyT49-유래 hESC를 5기 내지 7기에 걸쳐 인슐린-생성 세포를 향해 분화시키기 위해 사용되는 새로운 프로토콜을 도시한다. 구체적으로, 본 발명에서 유래된 인슐린-생성 세포는 PDX1, NKX6.1, CHGA, 인슐린 및 MAFA의 공동-발현 및 단백질 존재를 나타냈지만, 글루카곤은 그렇지 않았다. 도 10b는 S6D7에서의 세포 수율이 2-리터 롤러 병 ("RB") (0.95 ± 0.31 S6D7-내지-hESC 입력) 및 0.1 PBS (0.92 ± 0.23 S6D7-내지-hESC 입력) 현탁 배양 방법에 대한 초기 hESC 입력과 대략 동일함을 나타낸다. 현저하게, 0.5 PBS 포맷을 사용하는 현탁 배양은 S6D7에서 최고 세포 수율을 나타내었으며; 하나의 hESC 세포 입력에 대해 2.4 ± 0.169 개의 S6D7

세포가 생성되었다. 또한, MagLift™ 수직 휠 생물반응기 시스템을 사용하여 5기 내지 7기 분화 프로토콜을 효과적으로 스케일-업할 수 있음이 입증되었다 (도 10c 참조). 배지 부피를 100 ml (0.1 PBS)로부터 500 ml (0.5 PBS)로 증가시켰을 때, S6D7 수율의 대략 7.5 배 증가가 관찰되었다 (도 10c). 부가적으로, 0.1 PBS 또는 0.5 PBS 현탁액 포맷을 이용하는 것은 2-리터 롤러 병 기반 응집체에 비해 균일하게 더 작은 S5D3 (도 10d), S6D7 (도 10e) 및 S7D13 및 S7D14 (도 10f) 응집체를 유발하였다. 요약하면, 롤러 병을 사용하여 개시된 프로토콜로 배양된 S6D7 응집체 현탁액은 하기 직경을 나타내었다: RB 약 265 ± 79.0 마이크로미터 (도 10e 좌측), 0.1PBS 약 190 ± 59.9 마이크로미터 (도 10e 중간) 및 0.5PBS 약 227 ± 59.0 마이크로미터 (도 10e 우측). 또한, PBS Mini MagLift™ 수직 휠 생물반응기를 이용하는 것은, 인간-췌도 수준 기능성을 위해 필요한, 조밀한 응집체 크기 및 구조를 S7D14 (도 10f)에 걸쳐 유지하였다 (실시예 7). 역으로, 2-리터 롤러 병 현탁액 중의 S7D13 응집체는 결국 그들의 조밀한 응집체 구조를 상실하였고, 느슨한 셀형 시트를 형성하였다 (도 10f). 새로운 프로토콜을 사용하는 모든 현탁 배양 방법이 강건한 췌장 인슐린-생성 세포 유전자 시그너처를 유도했고; RB, 0.1 PBS 및 0.5 PBS는 베타-세포 전사 인자 *PDX1* (도 10g), *NKX6.1* (도 10h); 내분비 마커/전사 인자 *CHGA* (도 10i), *NEUROD1* (도 10j), *NGN3* (도 10k); 베타-세포 호르몬 *인슐린* (도 10l); 및 초기 베타-세포 성숙 전사 인자 *MAFA* (도 10m)의 발현의 유지/증가를 유도함이 입증되었다. 역으로, 2-리터 롤러 병 ("PEC-01-유도")에서 새로운 분화 프로토콜을 사용하여 PEC-01 d15 응집체를 인슐린-생성 세포로 분화시킬 경우, *인슐린* 발현과 함께 *글루카곤*의 유의한 유도가 관찰되었다 (도 10l, 도 10n). 실제로, 문헌[*Nature* Biotechnology, 2014, (32) 11, 1121-1133]에 앞서 기재된 바와 같이, 단백질 존재 분석은 새로운 분화 프로토콜이 CyT49 hESC 세포주에서 모노-호르몬, 인슐린 생성 세포 (6기 및 7기)의 생성을 유발하는 강건한 췌장 내분비 전구체 (5기)를 유도하였음을 입증하였다. 도 10o는, S5D3까지, 0.5PBS에서 배양된 응집체의 대략 54.1%가 $CHGA^+$ $NKX6.1^+$ (모든 현탁액 포맷에 대해 S4D3에서의 약 1% $CHGA^+$ $NKX6.1^+$ 로부터 증가됨; 도 9n 내지 도 9p)였음을 나타냈으며, 이는 높은 비율의 내분비 분화의 결과이다 - S5D3에서 $PAX4^+$ $CHGA^+$ 세포에 대한 강화에 의해 나타남. PAX4는 췌장에서 내분비 분화의 동인인 NGN3의 직접적인 표적 유전자이다. S7D13 및 S7D14까지, 모든 현탁액 포맷에서 $NKX6.1^+$ $인슐린^+$ 세포의 총 수가; S5D3에 대략 15.4% (도 10p)로부터 S6D7에 RB에서 약 40.3% (도 10q); S6D7에 0.1PBS에서 약 44.7% (도 10r); S7D13에 RB에서 약 51.8% (도 10s); 및 S7D14에 0.1PBS에서 약 48.9% (도 10t)까지 극적으로 증가하였다. 유사하게, S7D13 내지 S7D13까지, $NKX6.1^+$ $CHGA^+$ 세포의 백분율은 S4D3에 약 1%로부터 (도 9n 내지 도 9p) S6D7에 RB에서 약 81.0% (도 10q); S6D7에 0.1PBS에서 약 88.7% (도 10r); S7D13에 RB에서 약 79.6% (도 10s); 및 S7D14에 0.1PBS에서 약 80.9% (도 10t)까지 증가하였다. 7기에서 새로운 프로토콜에 의해 생성된 대부분의 $NKX6.1^+$ $인슐린^+$ 세포는 모노-호르몬이었고, 알파-세포 호르몬 글루카곤에 대해 강화되지 않았으며; S6D7에 RB에서 약 18.8% $인슐린^+$ $글루카곤^+$ (도 10q); S6D7에 0.1PBS에서 약 14.4% (도 10r); S7D13에 RB에서 약 7.7% (도 10s); 및 S7D14에 0.1PBS에서 약 6.5% (도 10t)였음이 입증되었다. 또한, 폴리-호르몬 세포는 7기 (도 10s 및 도 10t)까지 총 세포의 단지 작은 분율만을 구성했음이 입증되었으며, 이는 아마도 H1-유래 S4D3 세포에 비해 CyT49-유래 S4D3 세포에서 본질적으로 수가 더 많은 $CHGA^+$ $NKX6.1^-$ 집단으로부터 기원할 것이다 (실시예 3). 현저하게, S6D7에 2-리터 롤러 병에서 PEC-01-유래 응집체는 인슐린과 글루카곤 사이의 약 41.9% 공동-국소화를 나타내었다. 시험된 모든 조건에서, S6D7에 2-리터 롤러 병, 및 S7D14에 새로운 프로토콜 S4D3-유래 0.1PBS, S7D13에 2-리터 롤러 병에서의 PEC-01-유래 응집체에 대해 나타낸 바와 같이, $GLUCGAON^+$ $인슐린^+$ 세포는 $NKX6.1^+$가 아니었다 (도 10v). 인슐린-생성 내분비 세포의 강건한 유도는 IP-분석에서 반영되었다. RB 또는 0.1 PBS 포맷에서 배양된 응집체는 S6D7 (0.1 PBS – 도 10w) 및 S7D16 내지 D23 (RB – 도 10aa; 0.1 PBS – 도 10y) 둘 모두에 시냅토파이신$^+$ $NKX6.1^+$ $인슐린^+$ 세포에 대해 크게 강화된 것으로 나타났다. 추가로, 조기 성숙 전사 인자 MAFA는 S6D7에 0.1 PBS에서 이미 유도되었고 (도 10x), S7D23에 RB에서 (도 10ab), 그리고 S7D16에 0.1 PBS에서 (도 10z) 인슐린-양성 세포와 7기에 공동-존재하게 되었다.

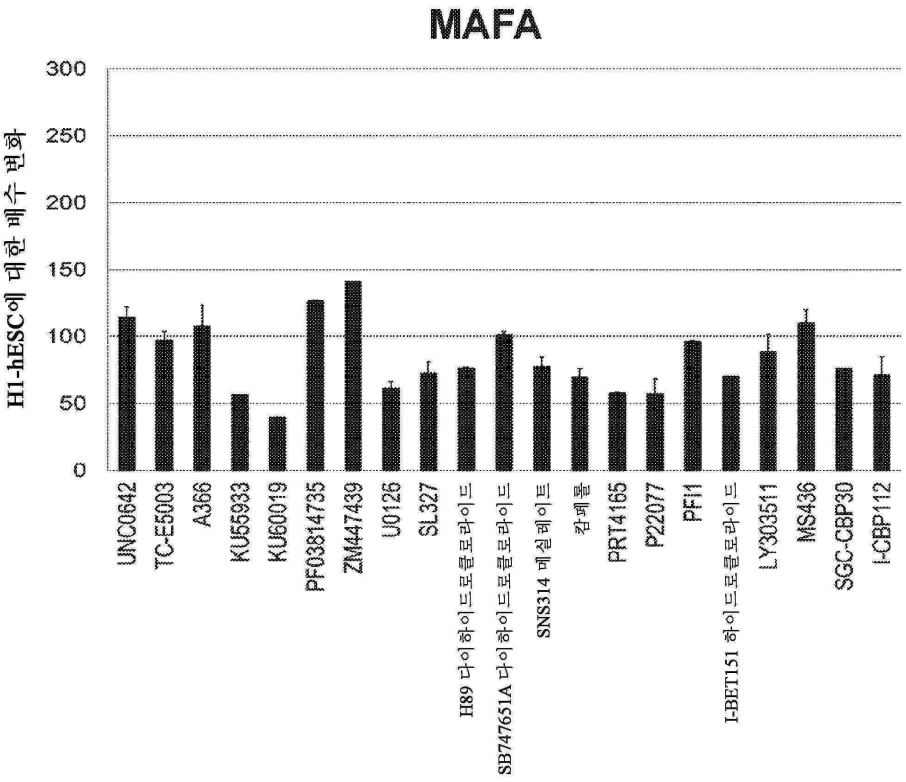
[0379] 본 발명을 다양한 특정한 재료, 절차 및 실시예를 참조하여 본 명세서에 기재하고 예시하였지만, 본 발명은 그 목적으로 선택된 재료 및 절차의 특정 조합으로 제한되지 않음이 이해된다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 이러한 상세 사항에 대한 다양한 변화가 암시될 수 있다. 본 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되는 것으로 의도되며, 이때 본 발명의 실제 범주 및 사상은 하기 청구범위에 의해 나타난다. 본 출원에서 언급되는 모든 참고 문헌, 특허 및 특허 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면

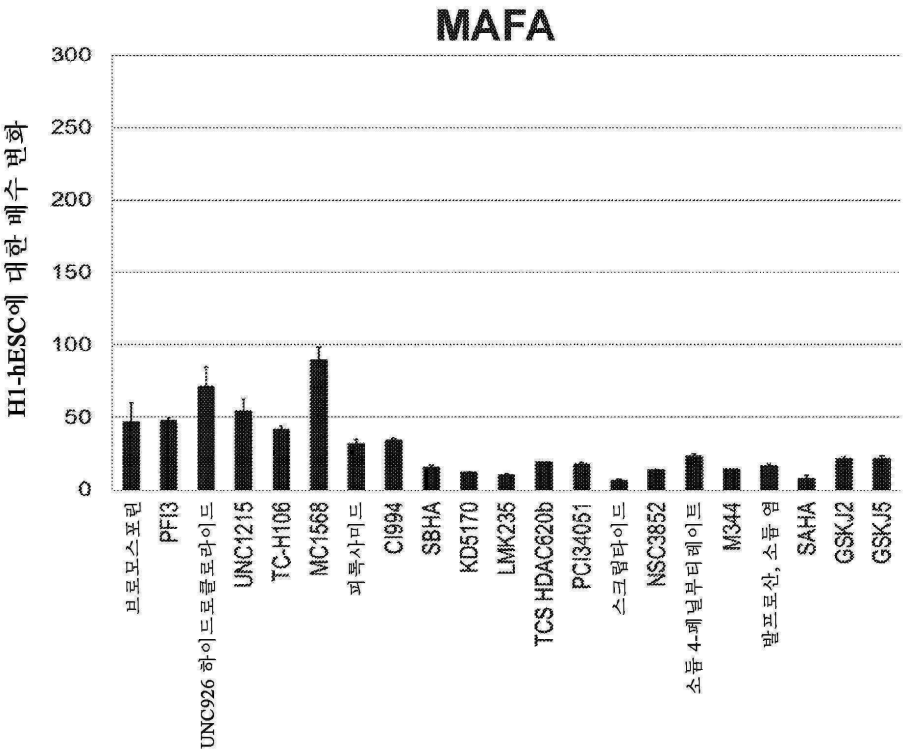
도면1a


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
300
250
200
150
100
50
0
인간 췌도
S6D7
S7D7
DMSO
계불라린
메시타빈
RG108
로메구아트립
5-아자시티딘
미톡산트론 다이하이드로클로라이드
EGCG
피세틴
SGI1027
테모졸로마이드
L002
C646
SGC0946
UNC0224
UNC0638
BIX01294
UNC0646

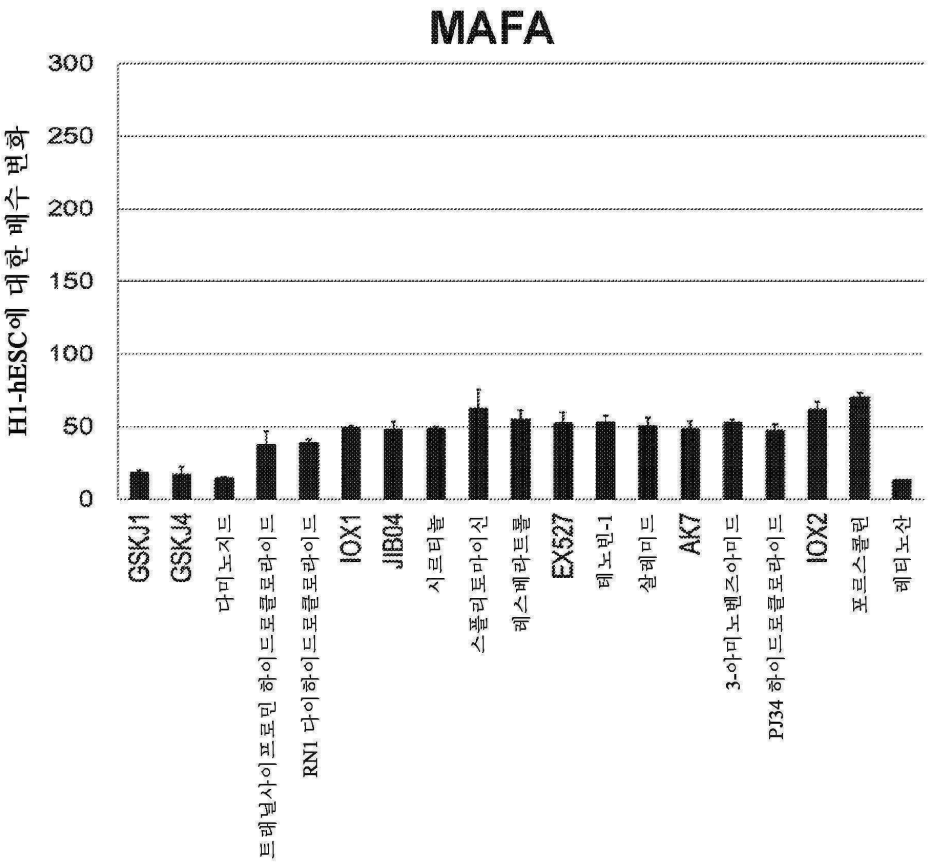
도면1b


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
300
250
200
150
100
50
0
UNC0642
TC-E5003
A366
KU55933
KU60019
PF03814735
ZM447439
U0126
SL327
H89 다이하이드로클로라이드
SB747651A 다이하이드로클로라이드
SNS314 메실레이트
캄페롤
PRT4165
P22077
PFI1
I-BET151 하이드로클로라이드
LY303511
MS436
SGC-CBP30
I-CBP112

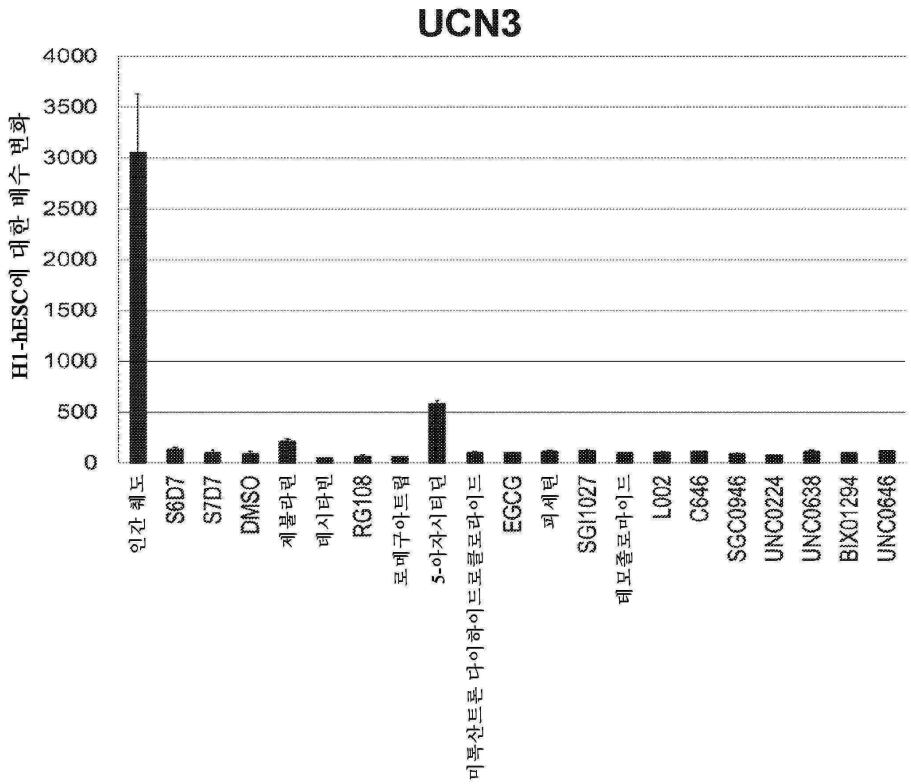
도면1c


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
300
250
200
150
100
50
0
프로모스포린
PFI3
UNC926 하이드로클로라이드
UNC1215
TC-H106
MC1568
피록사미드
CI994
SBHA
KD5170
LMK235
TCS HDAC620b
PCI34051
스크립타이드
NSC3852
소듐 4-페닐부티레이트
M344
발프로산, 소듐 염
SAHA
GSKJ2
GSKJ5

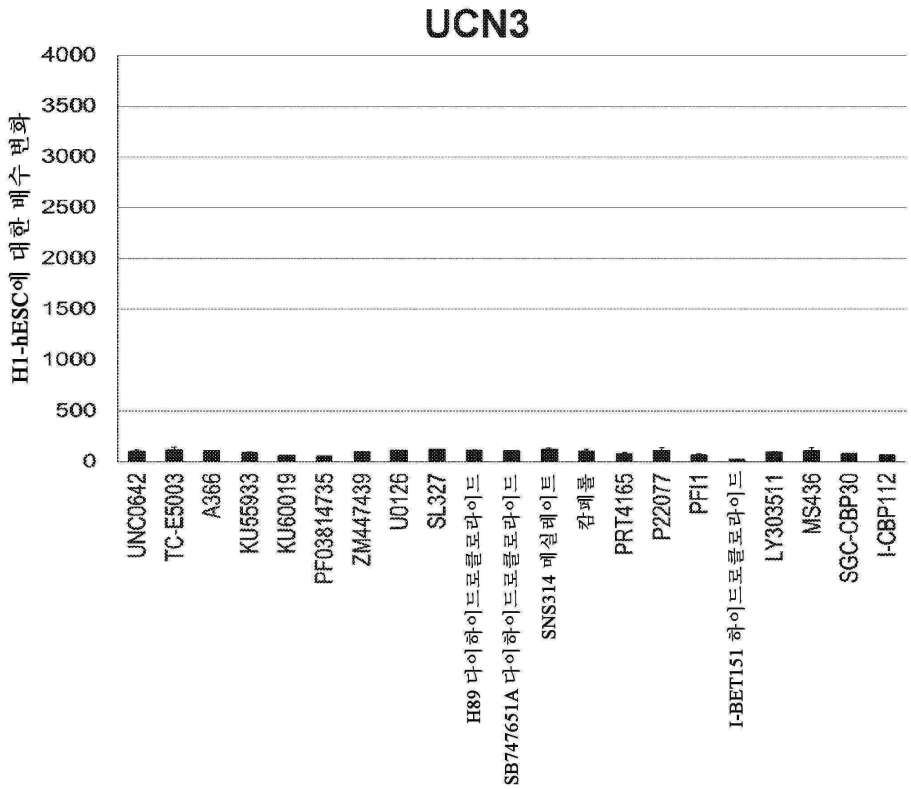
도면1d


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
300
250
200
150
100
50
0
GSKJ1
GSKJ4
다미노지드
트래닐사이프로민 하이드로클로라이드
RN1 다이하이드로클로라이드
IOX1
JIB04
시르티뉼
스플리토마이신
메스베라트롤
EX527
테노빈-1
살레미드
AK7
3-아미노벤즈아미드
PJ34 하이드로클로라이드
IOX2
포르스콜린
레티노산

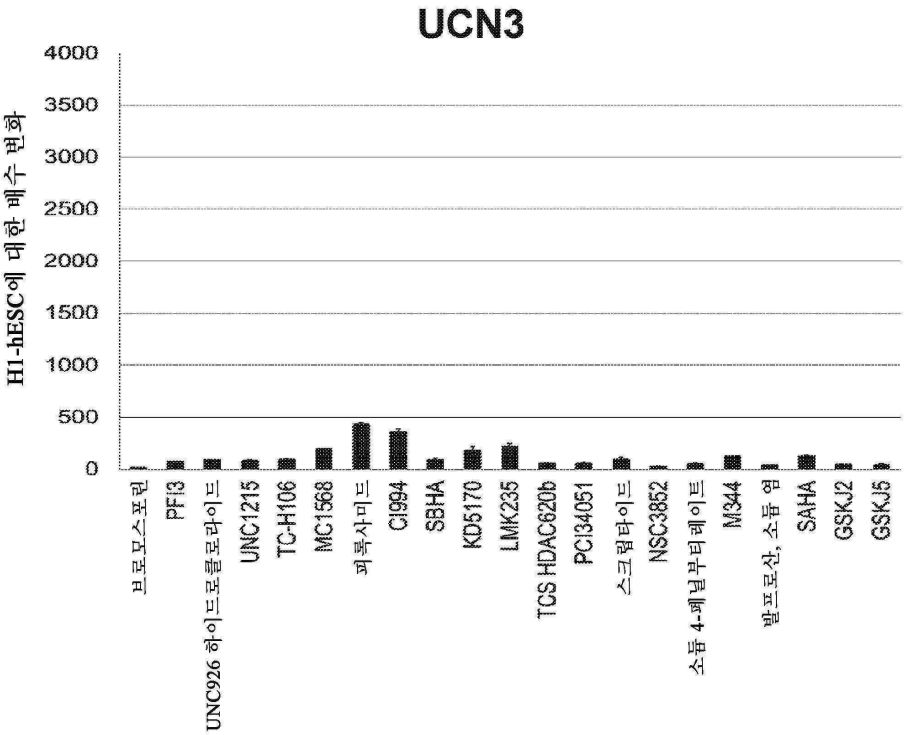
도면1e


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
인간 췌도
S6D7
S7D7
DMSO
계불라린
메시타린
RG108
로메구아트륨
5-아자시티딘
미톡산트론 다이하이드로클로라이드
EGCG
피세틴
SGI1027
테모줄로마이드
L002
C646
SGC0946
UNC0224
UNC0638
BIX01294
UNC0646

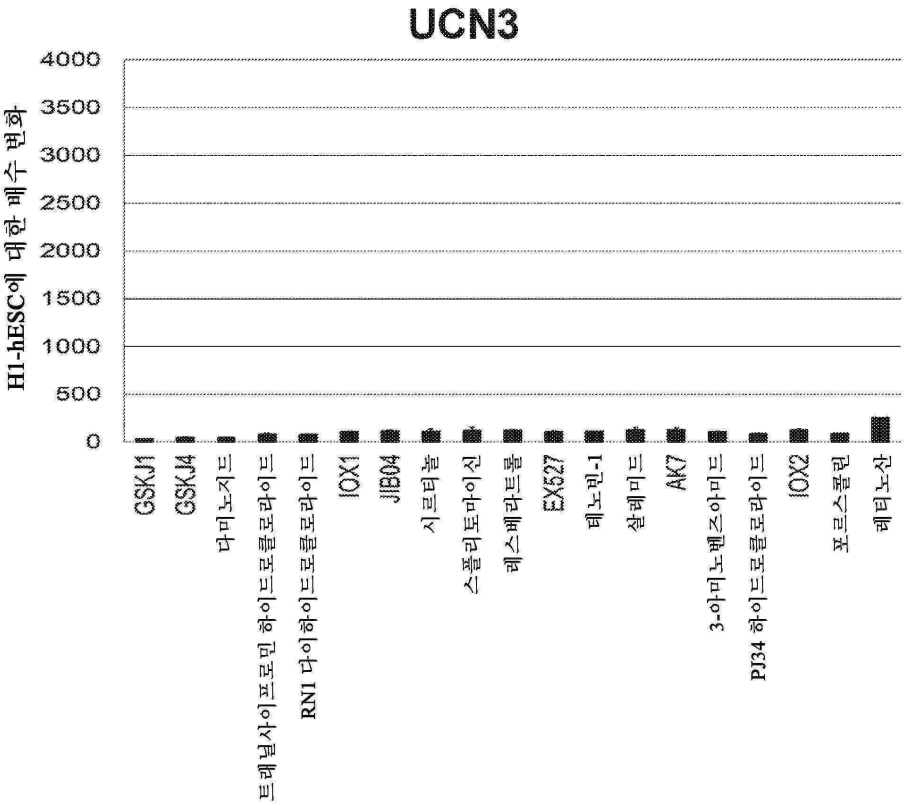
도면1f


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
UNC0642
TC-E5003
A366
KU55933
KU60019
PF03814735
ZM447439
U0126
SL327
H89 다이하이드로클로라이드
SB747651A 다이하이드로클로라이드
SNS314 메실레이트
캄페롤
PRT4165
P22077
PFI1
I-BET151 하이드로클로라이드
LY303511
MS436
SGC-CBP30
I-CBP112

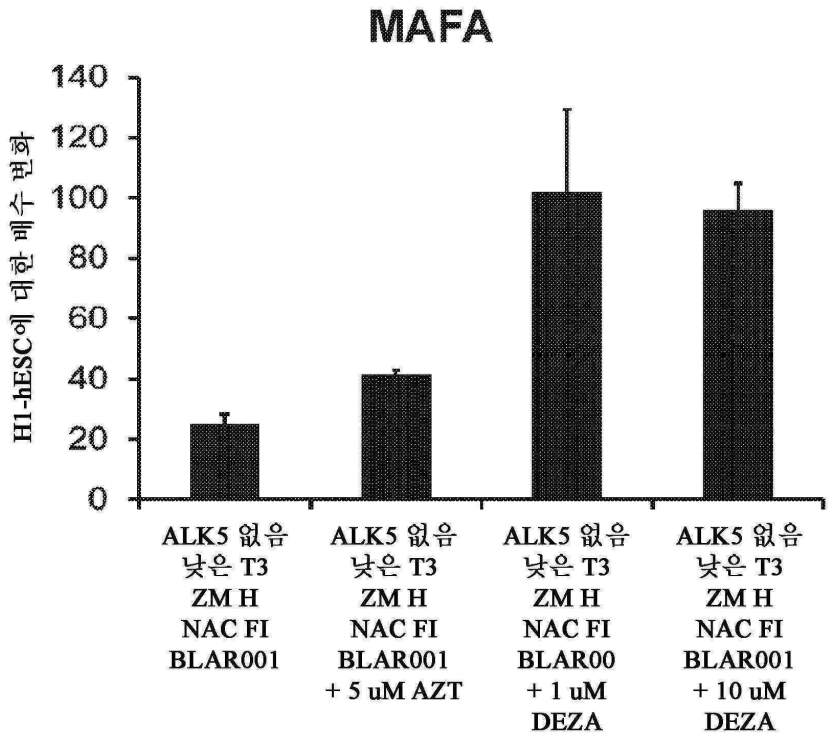
도면1g


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
브로모스포린
PFI3
UNC926 하이드로클로라이드
UNC1215
TC-H106
MC1568
피록사미드
CI994
SBHA
KD5170
LMK235
TCS HDAC6 20b
PCI34051
스크립타이드
NSC3852
소듐 4-페닐부티레이트
M344
발프로산, 소듐 염
SAHA
GSKJ2
GSKJ5

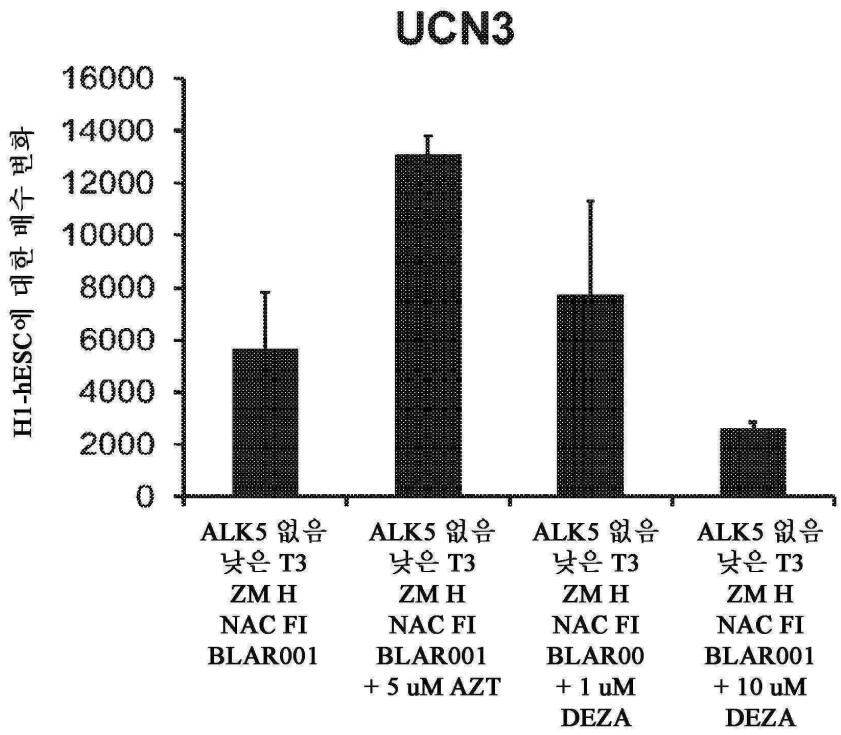
도면1h


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
GSKJ1
GSKJ4
다미노지드
트레닐사이프로민 하이드로클로라이드
RN1 다이하이드로클로라이드
IOX1
JIB04
시르티뇰
스플리토마이신
레스베라트롤
EX527
테노린-1
살레미드
AK7
3-아미노벤즈아미드
PJ34 하이드로클로라이드
IOX2
포르스콜린
레티노산

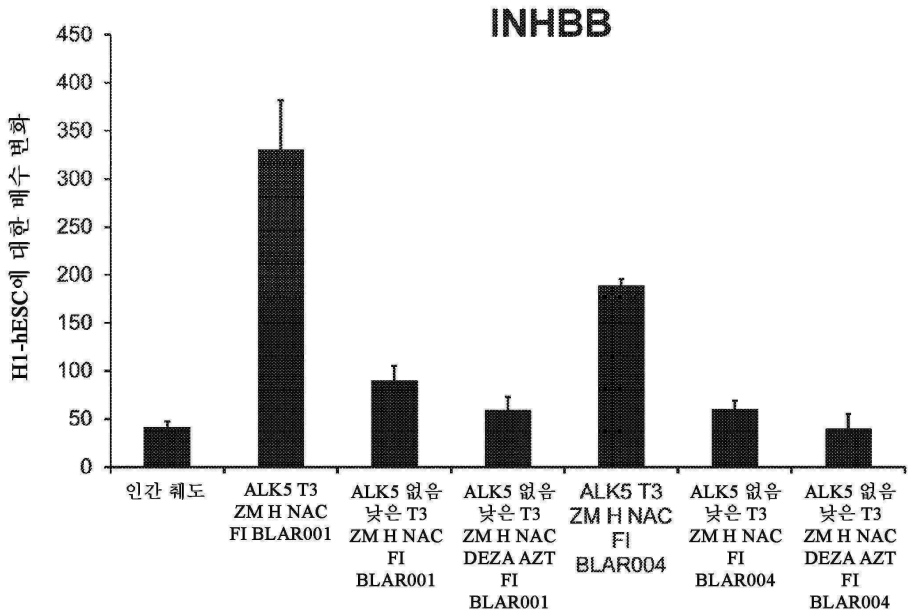
도면2a


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
140
120
100
80
60
40
20
0
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 + 5 uM AZT
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR00 + 1 uM DEZA
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 + 10 uM DEZA

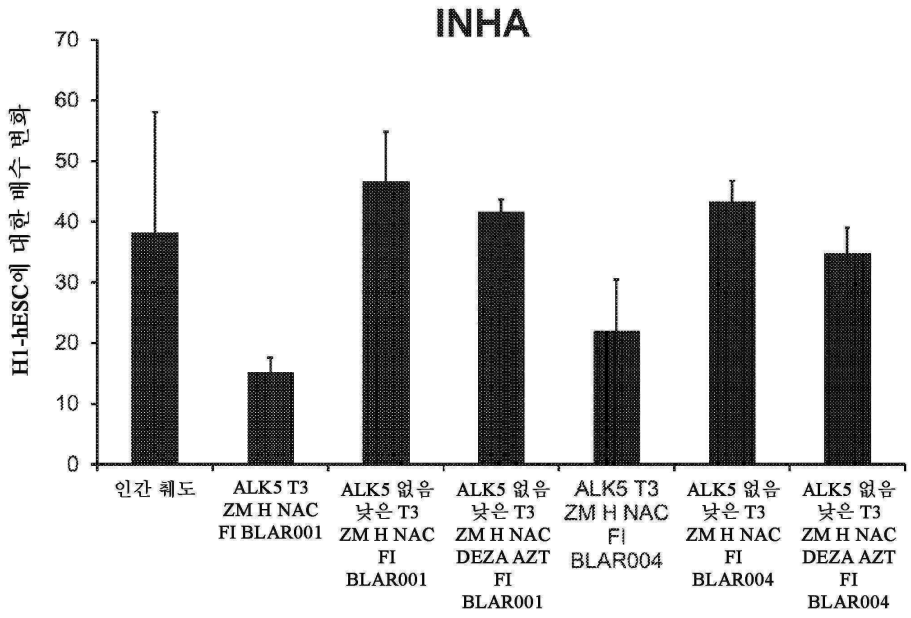
도면2b


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 + 5 uM AZT
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR00 + 1 uM DEZA
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 + 10 uM DEZA

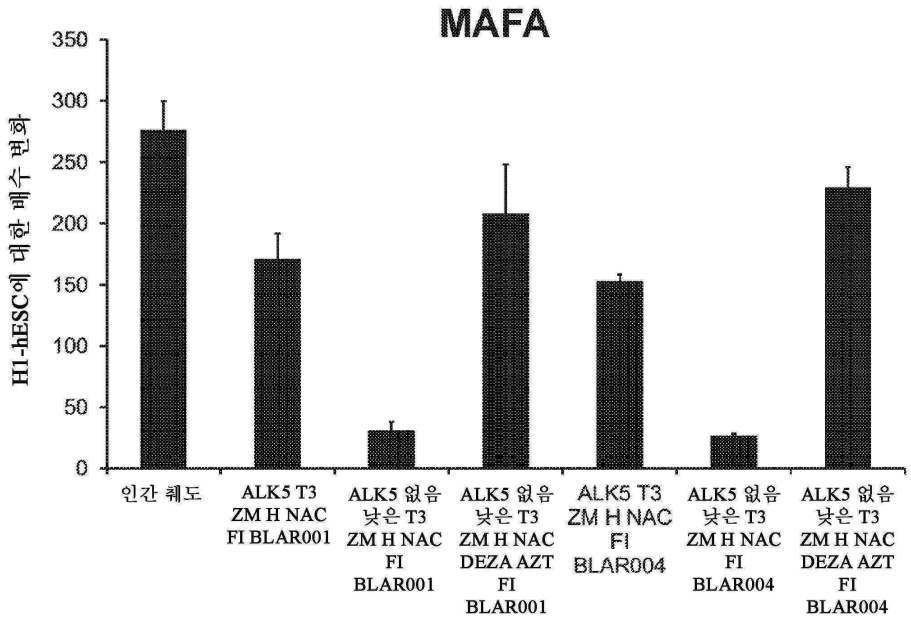
도면3a


INHBB
H1-hESC에 대한 배수 변화
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

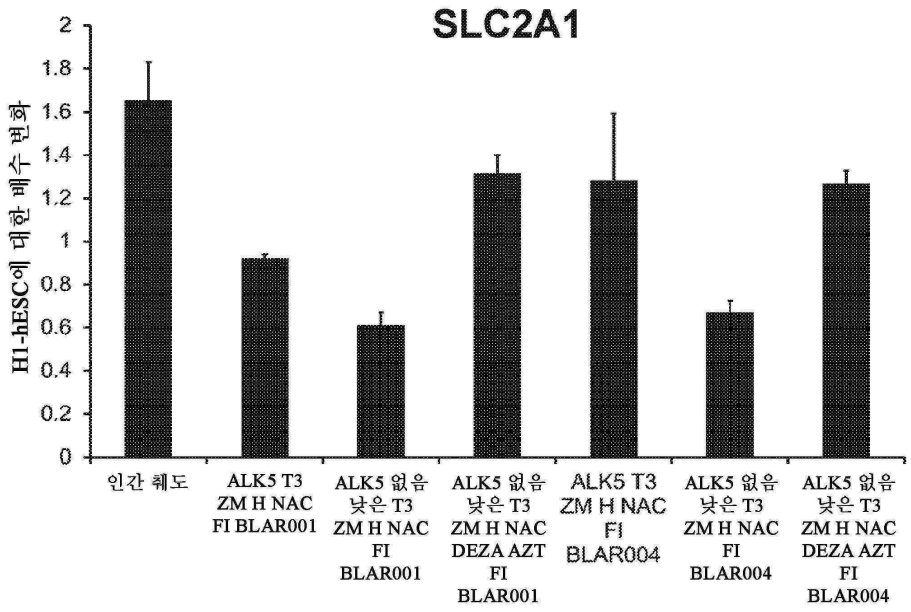
도면3b


INHA
H1-hESC에 대한 배수 변화
70
60
50
40
30
20
10
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

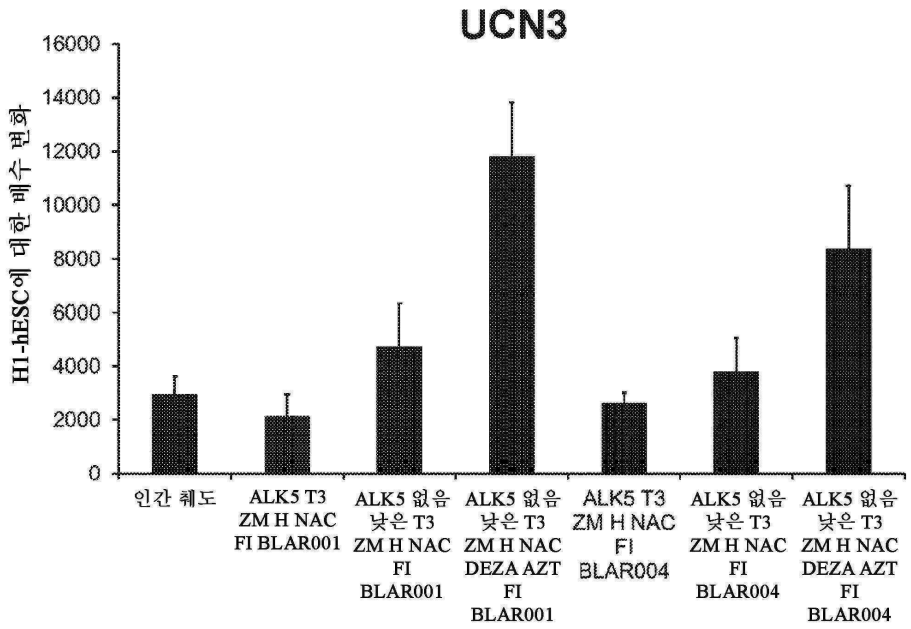
도면3c


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
350
300
250
200
150
100
50
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

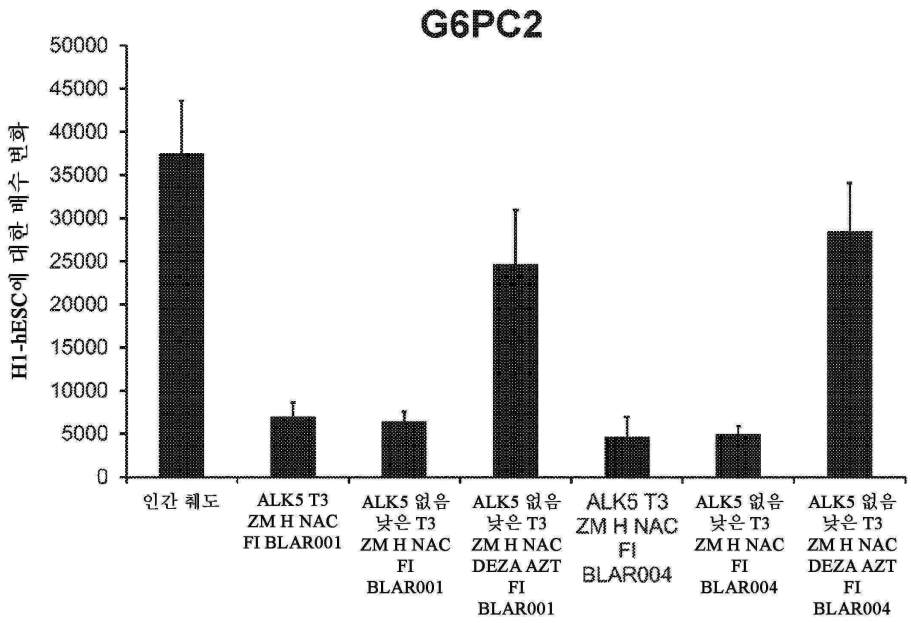
도면3d


SLC2A1
H1-hESC에 대한 배수 변화
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

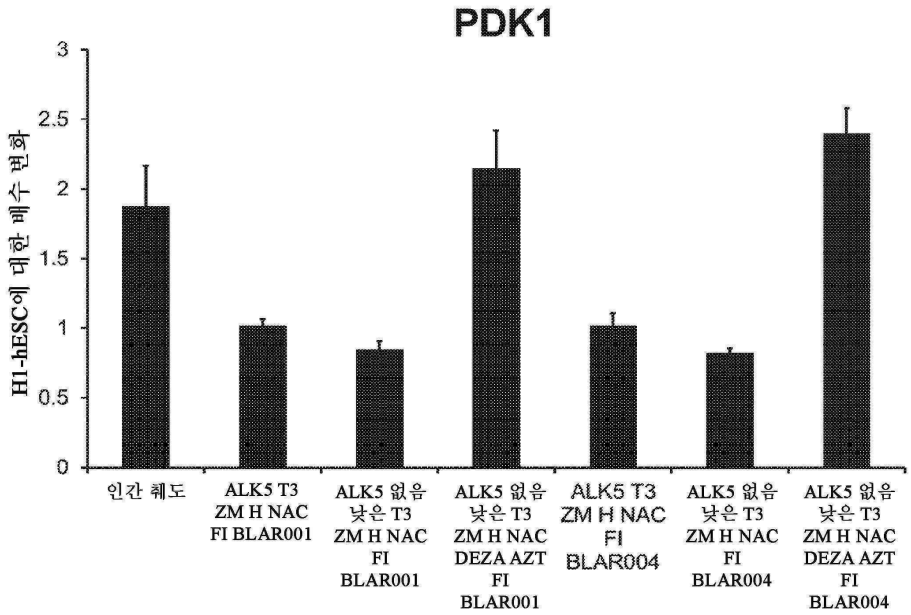
도면3e


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

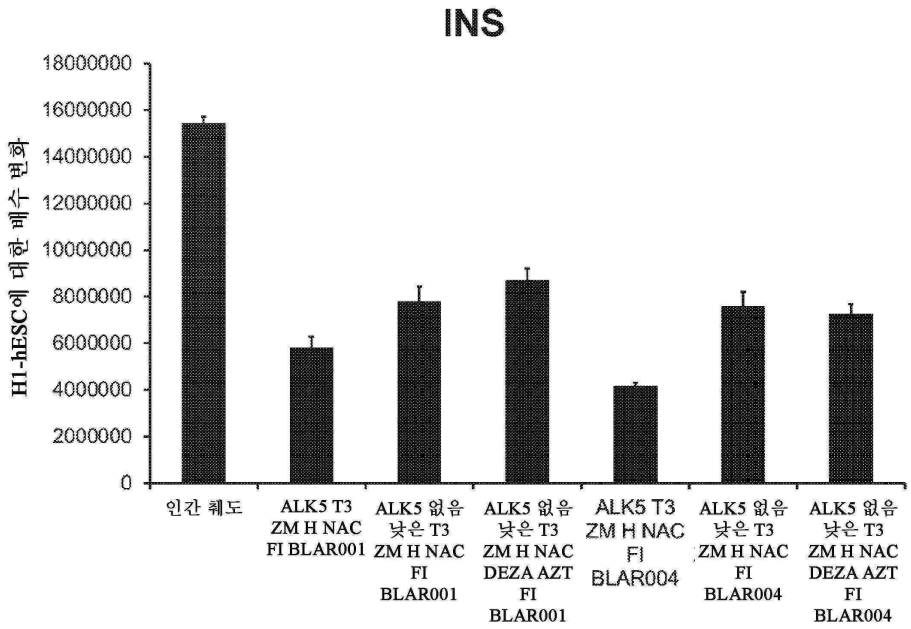
도면3f


G6PC2
H1-hESC에 대한 배수 변화
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

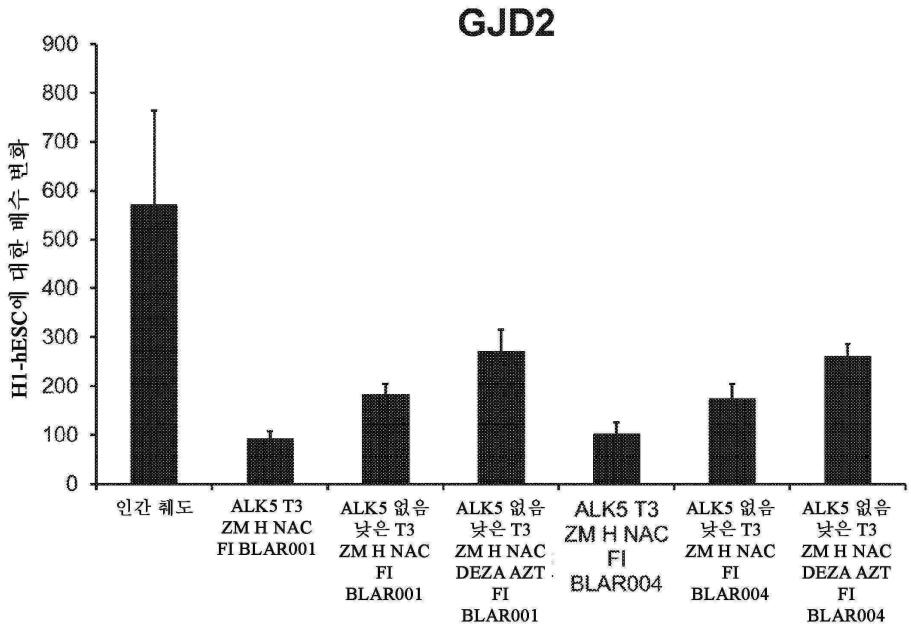
도면3g


PDK1
H1-hESC에 대한 배수 변화
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

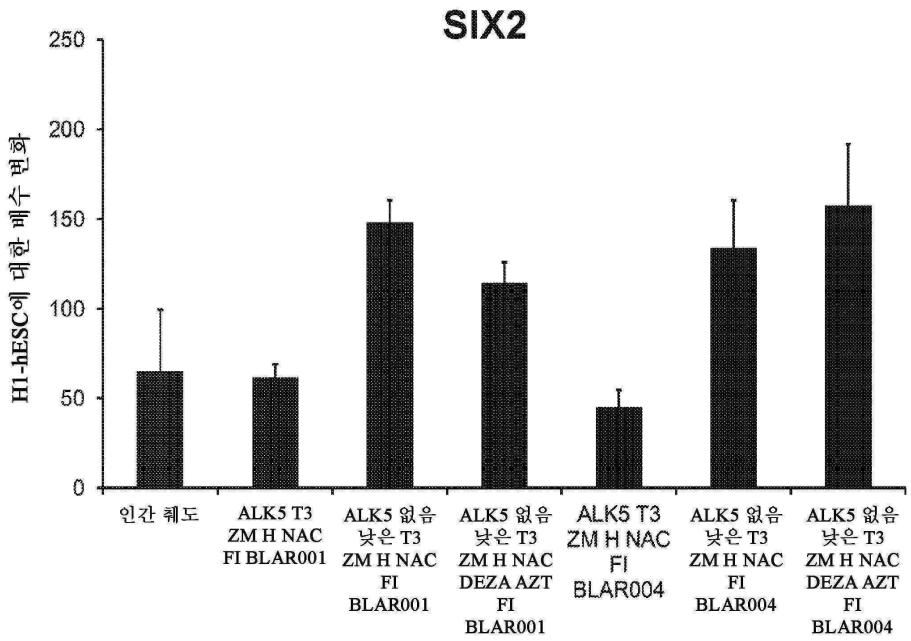
도면3h


INS
H1-hESC에 대한 배수 변화
18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

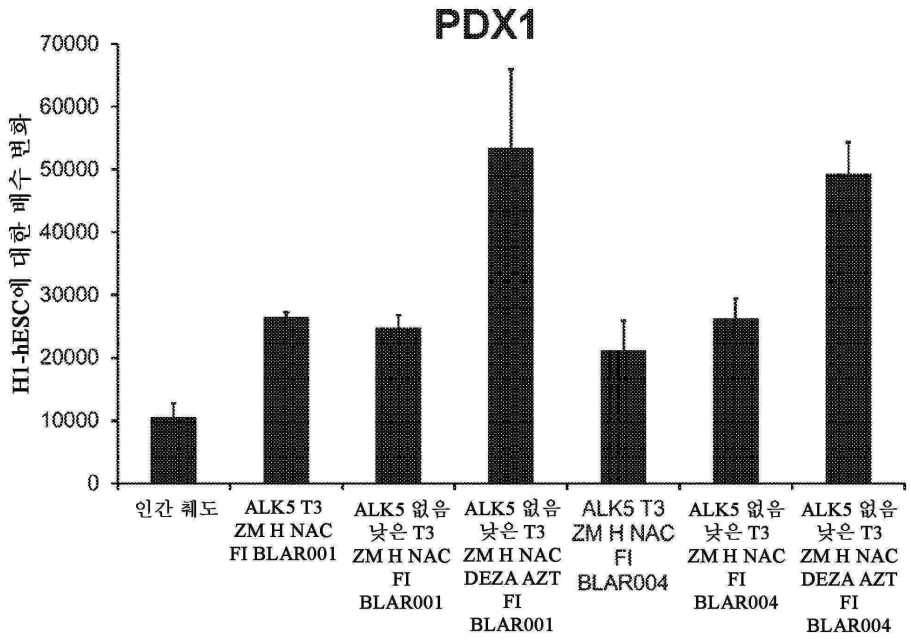
도면3i


GJD2
H1-hESC에 대한 배수 변화
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

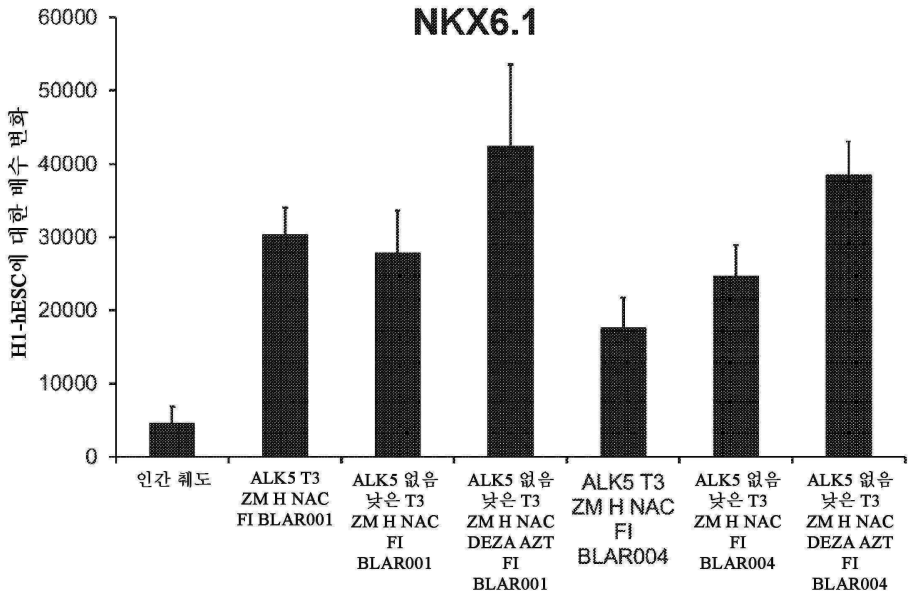
도면3j


SIX2
H1-hESC에 대한 배수 변화
250
200
150
100
50
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

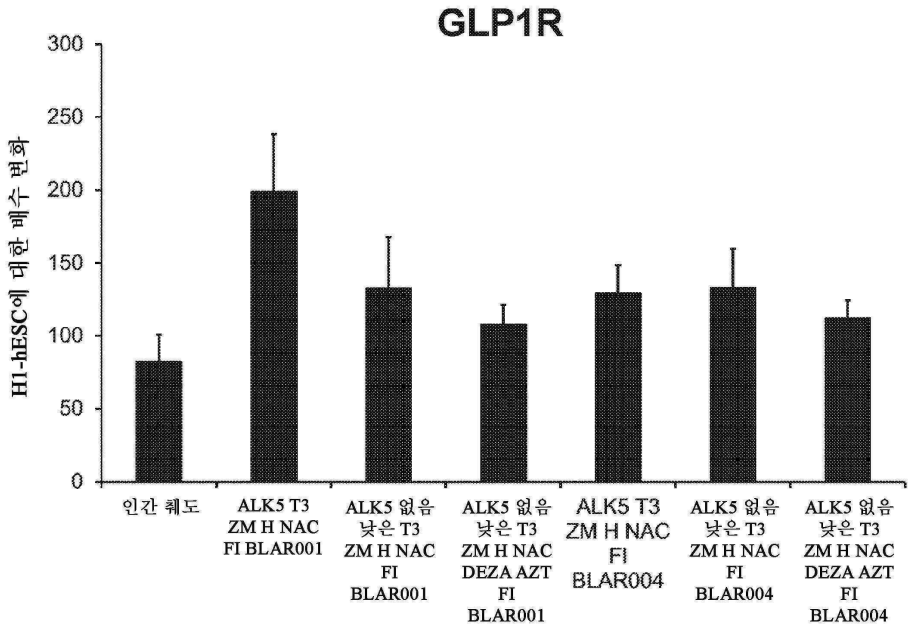
도면3k


PDX1
H1-hESC에 대한 배수 변화
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

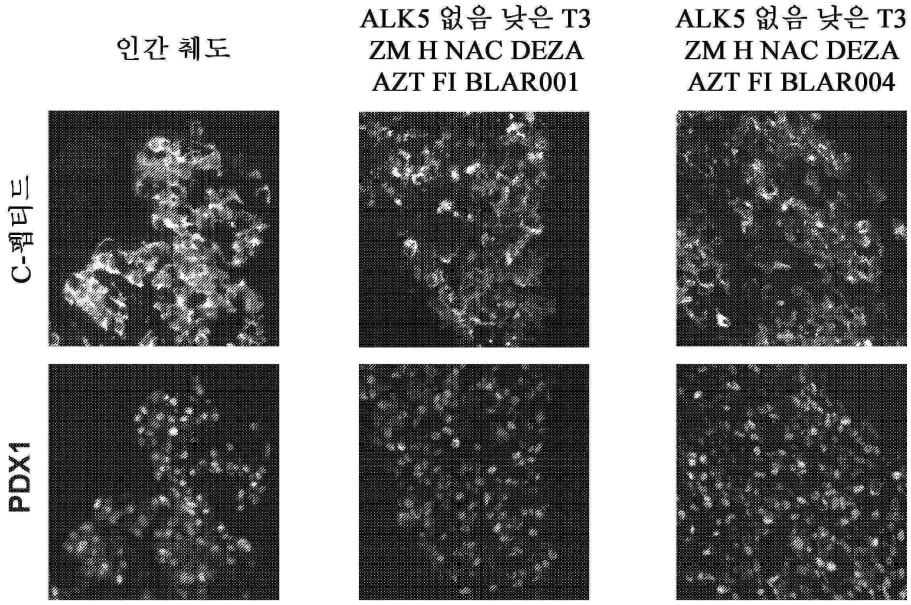
도면31


NKX6.1
H1-hESC에 대한 배수 변화
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

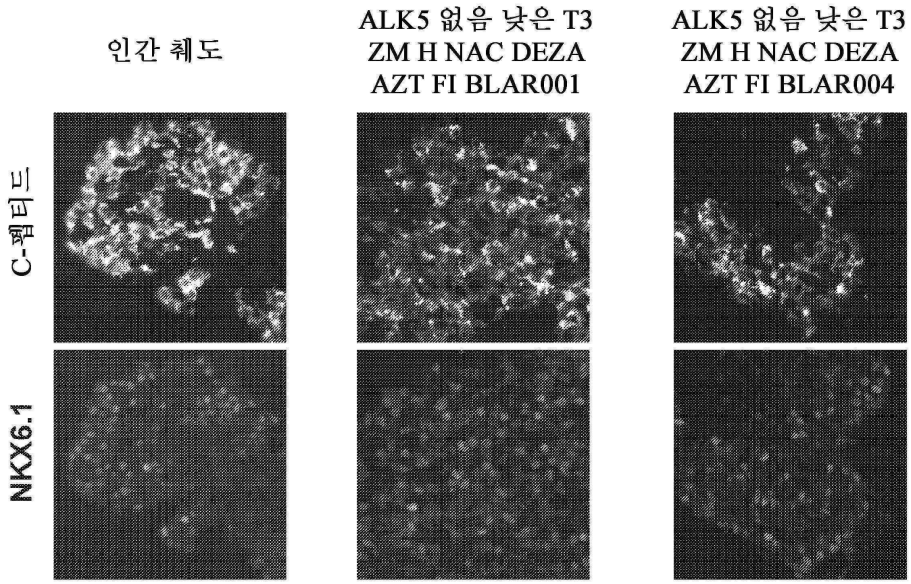
도면3m


GLP1R
H1-hESC에 대한 배수 변화
300
250
200
150
100
50
0
인간 췌도
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR004
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004

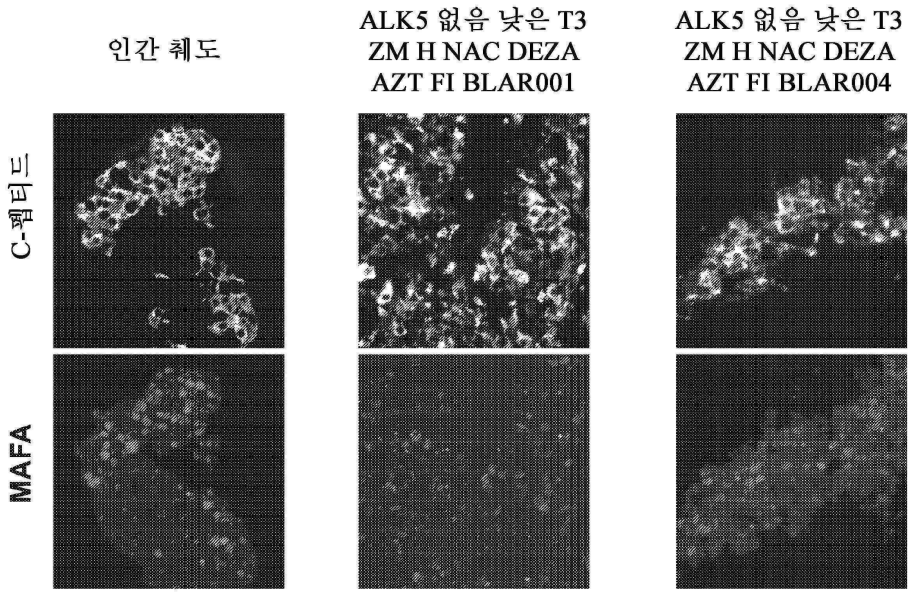
도면4a


인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR004
C-펩티드
PDX1

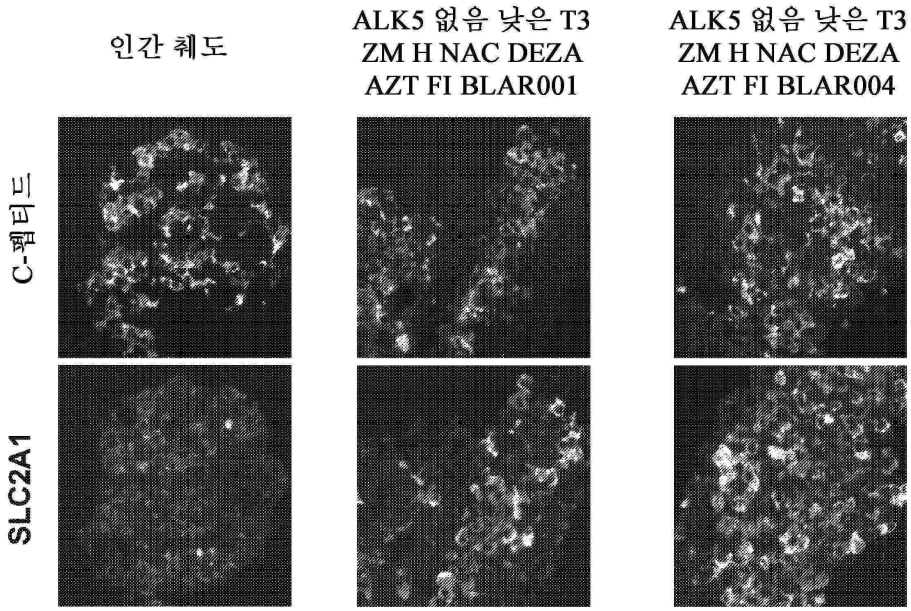
도면4b


인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR004
C-펩티드
NKX6.1

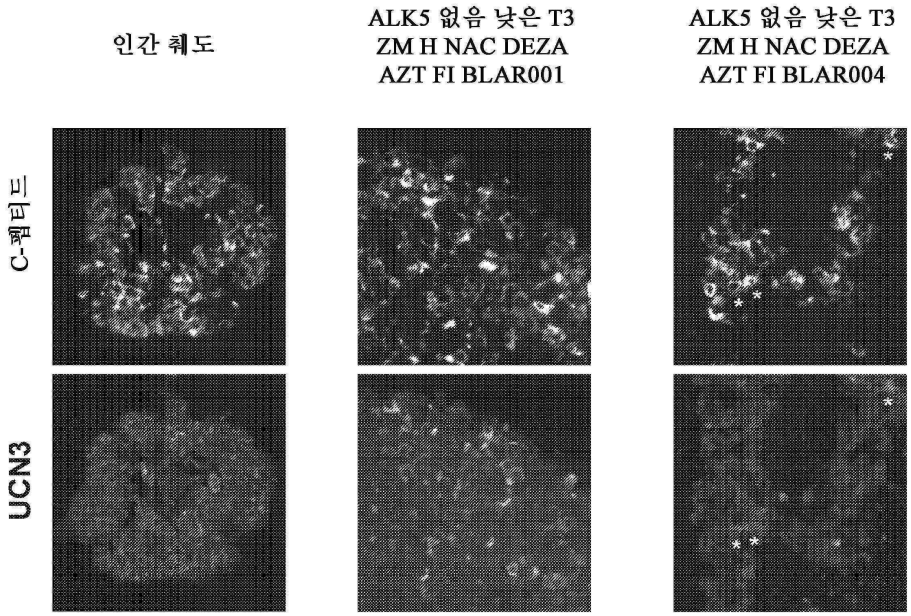
도면4c


인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR004
C-펩티드
MAFA

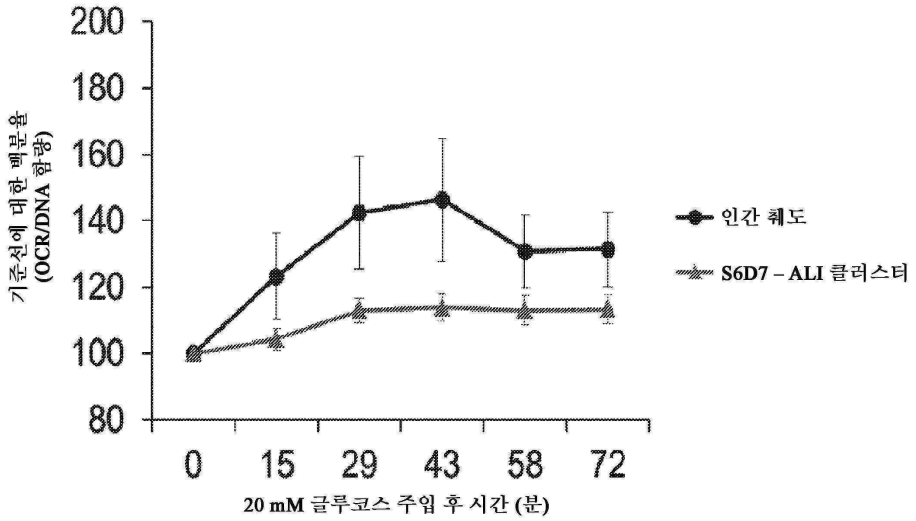
도면4d


인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR004
C-펩티드
SLC2A1

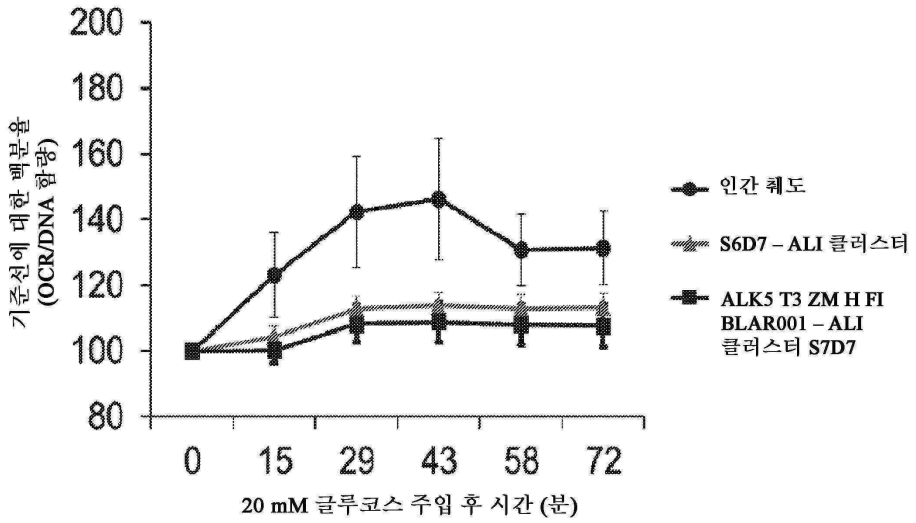
도면4e


인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR001
ALK5 없음 낮은 T3
ZM H NAC DEZA
AZT FI BLAR004
C-펩티드
UCN3

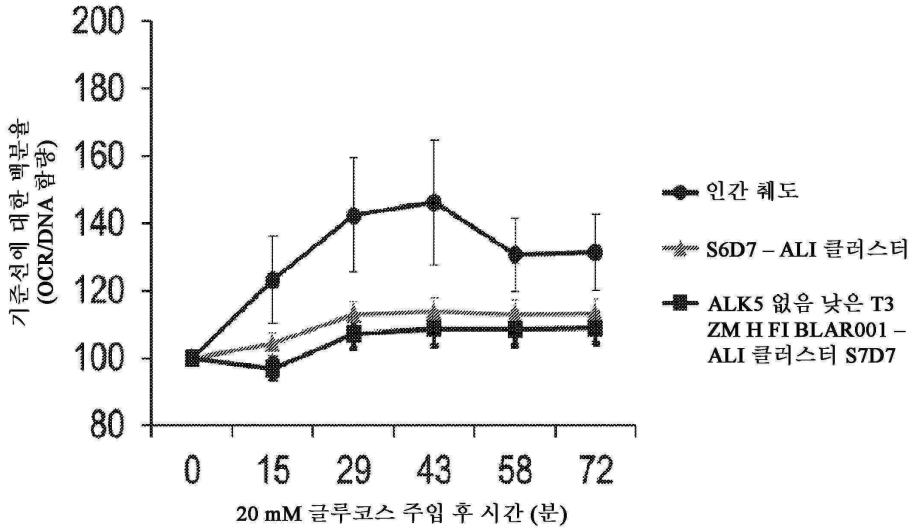
도면5a



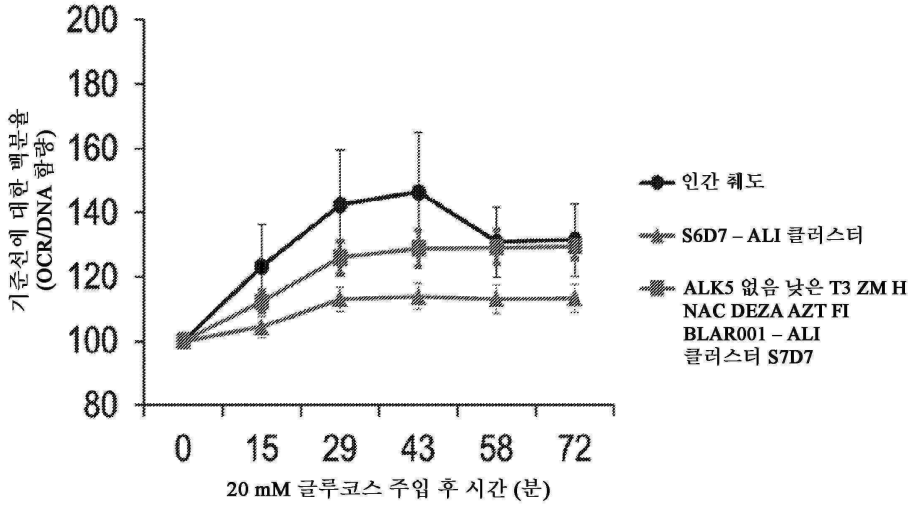
도면5b



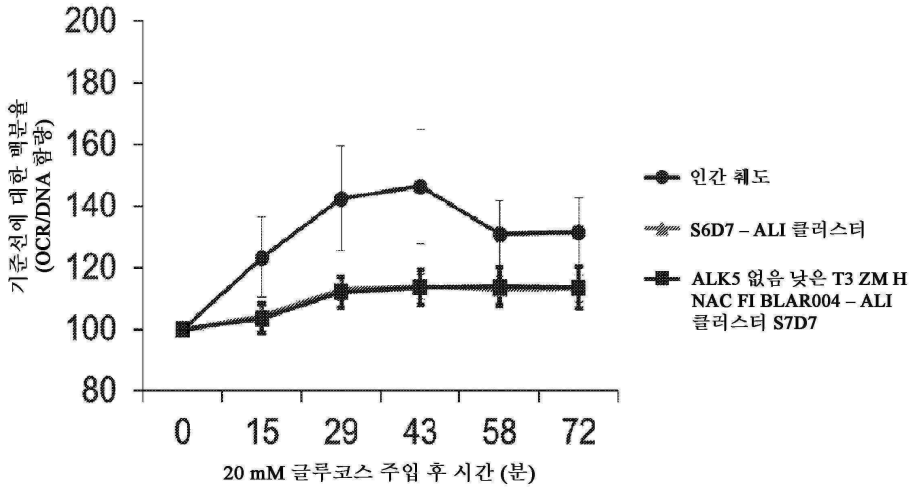
도면5c



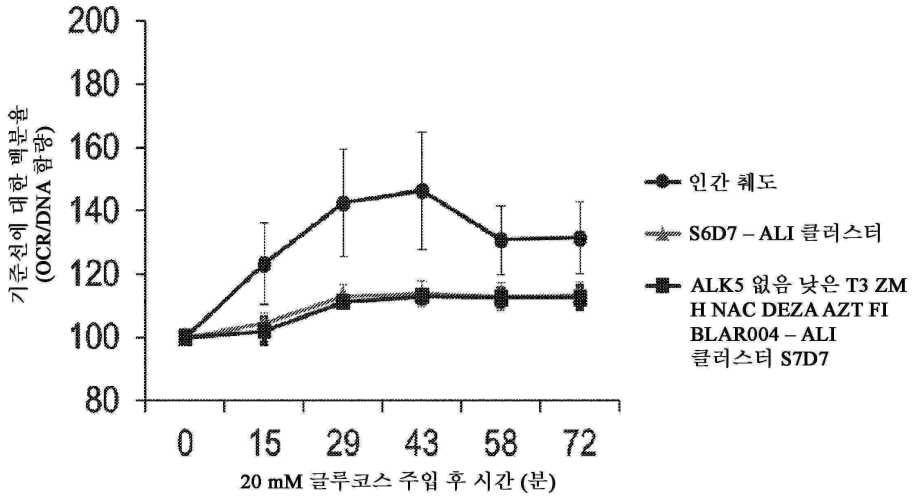
도면5d



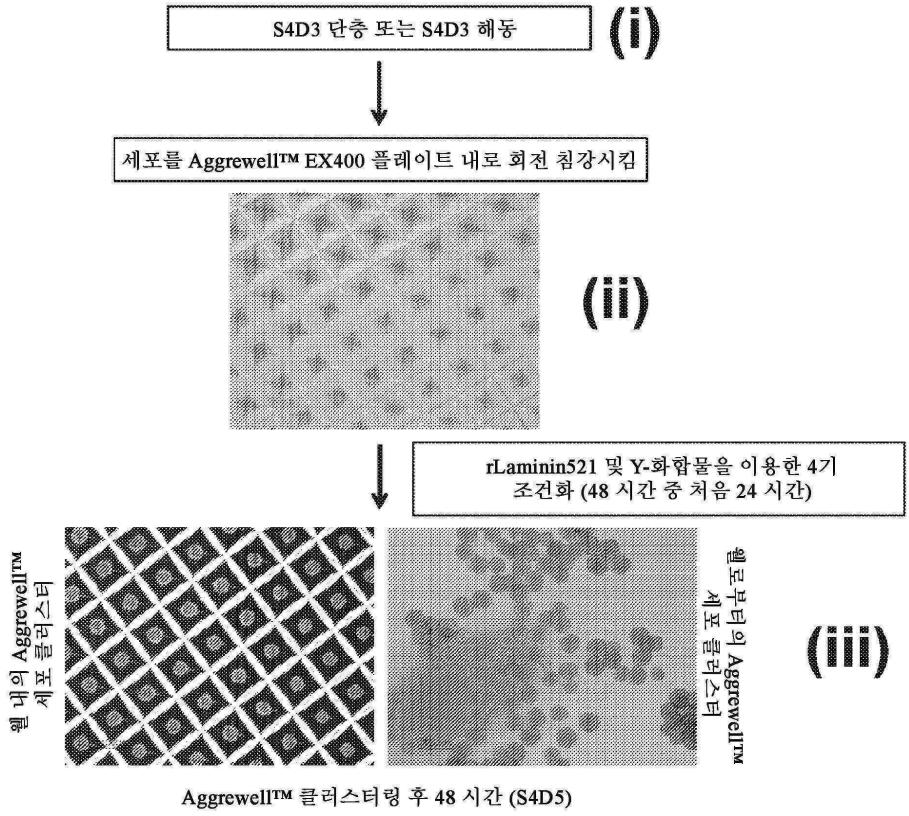
도면5e



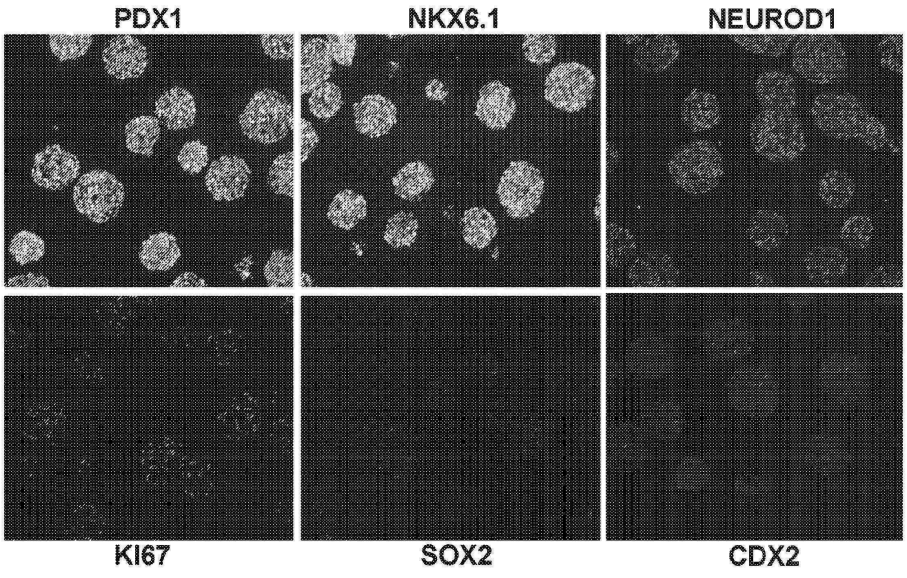
도면5f



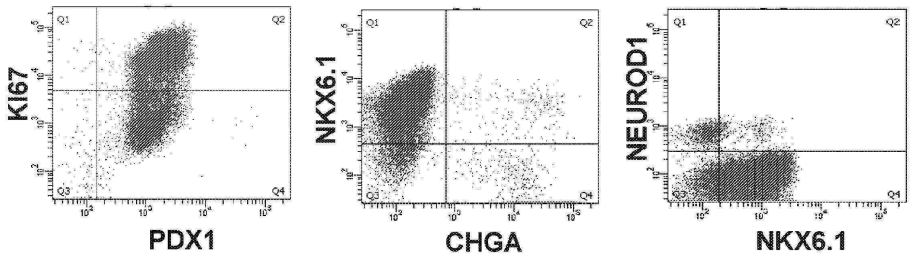
도면6a


S4D3 단층 또는 S4D3 해동
(i)
세포를 Aggrewell™ EX400 플레이트 내로 회전 침강시킴
(ii)
rLaminin521 및 Y-화합물을 이용한 4기
조건화 (48 시간 중 처음 24 시간)
웰 내의 Aggrewell™
세포 클러스터
웰로부터의 Aggrewell™
세포 클러스터
(iii)
Aggrewell™ 클러스터링 후 48 시간 (S4D5)

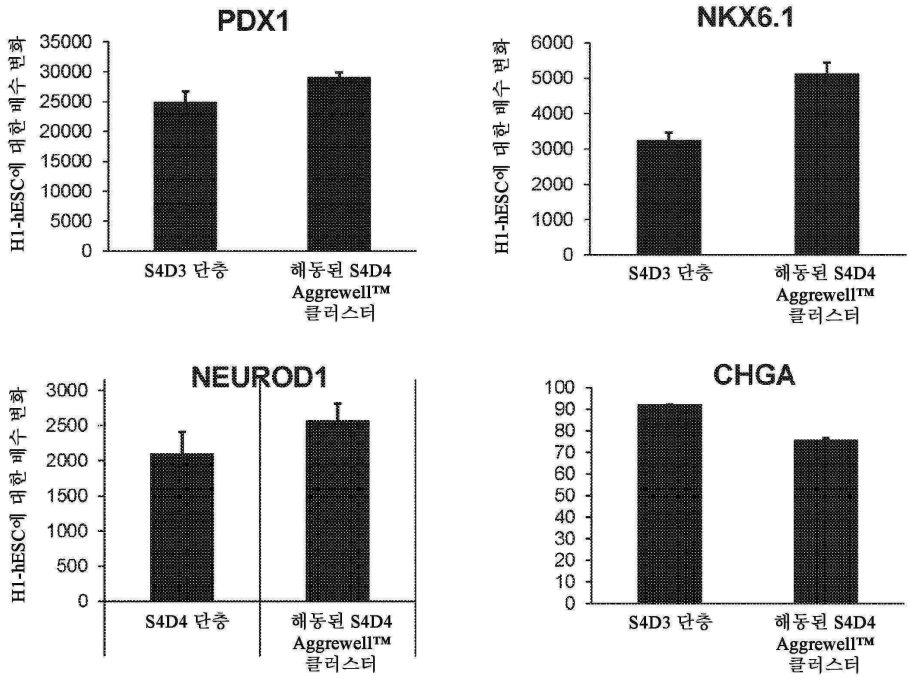
도면6b


PDX1
NKX6.1
NEUROD1
KI67
SOX2
CDX2

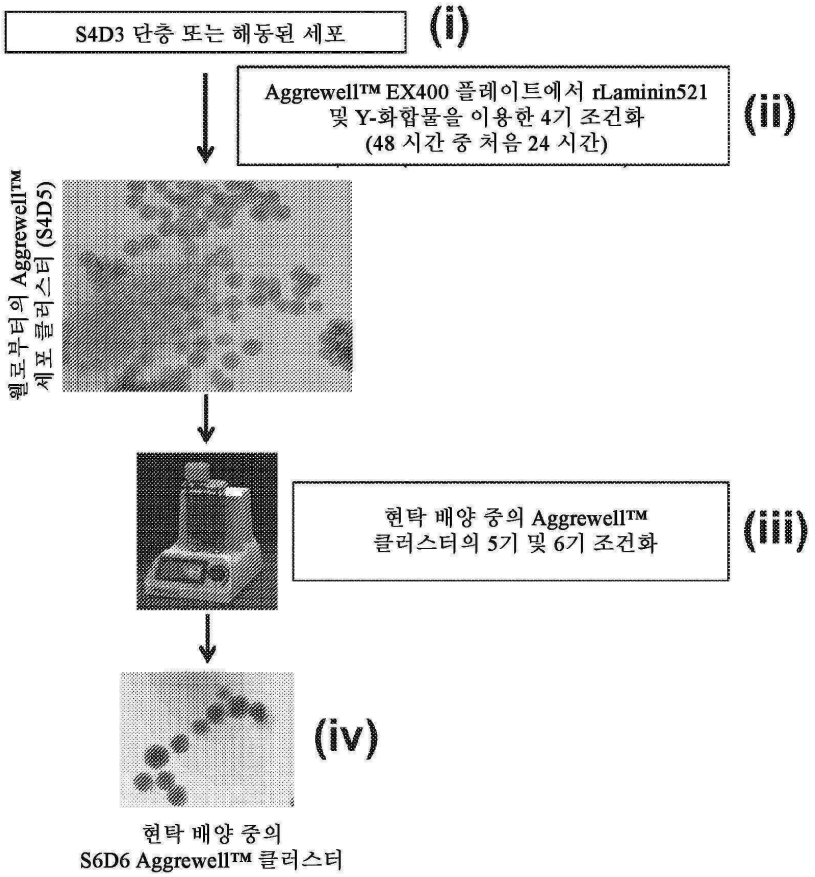
도면6c


KI67
PDX1
NKX6.1
CHGA
NEUROD1
NKX6.1

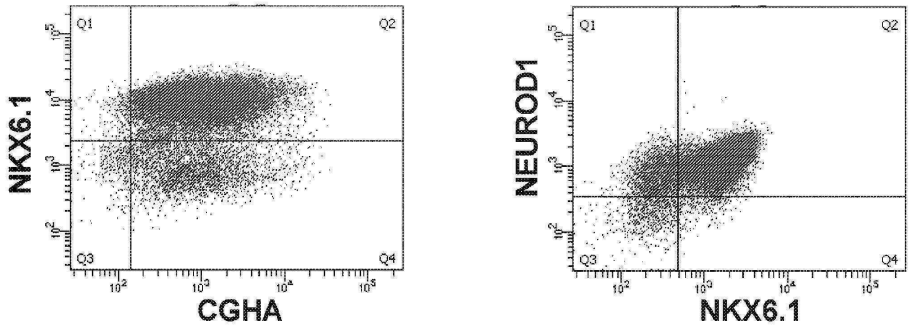
도면6d


PDX1
H1-hESC에 대한 배수 변화
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
S4D3 단층
해동된 S4D4 Aggrewell™ 클러스터
NKX6.1
H1-hESC에 대한 배수 변화
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
S4D3 단층
해동된 S4D4 Aggrewell™ 클러스터
NEUROD1
H1-hESC에 대한 배수 변화
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
S4D4 단층
해동된 S4D4 Aggrewell™ 클러스터
CHGA
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
S4D3 단층
해동된 S4D4 Aggrewell™ 클러스터

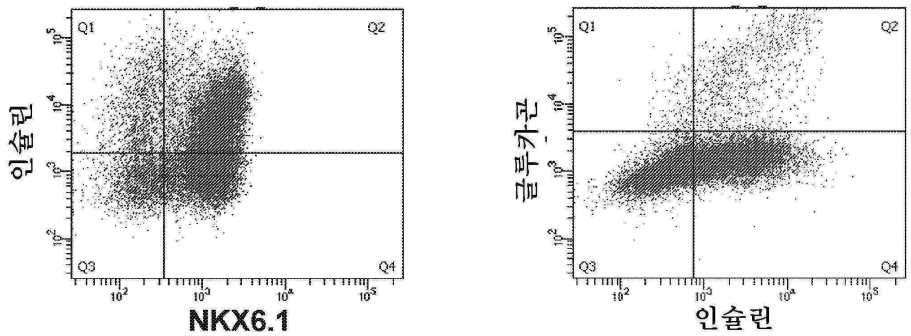
도면6e



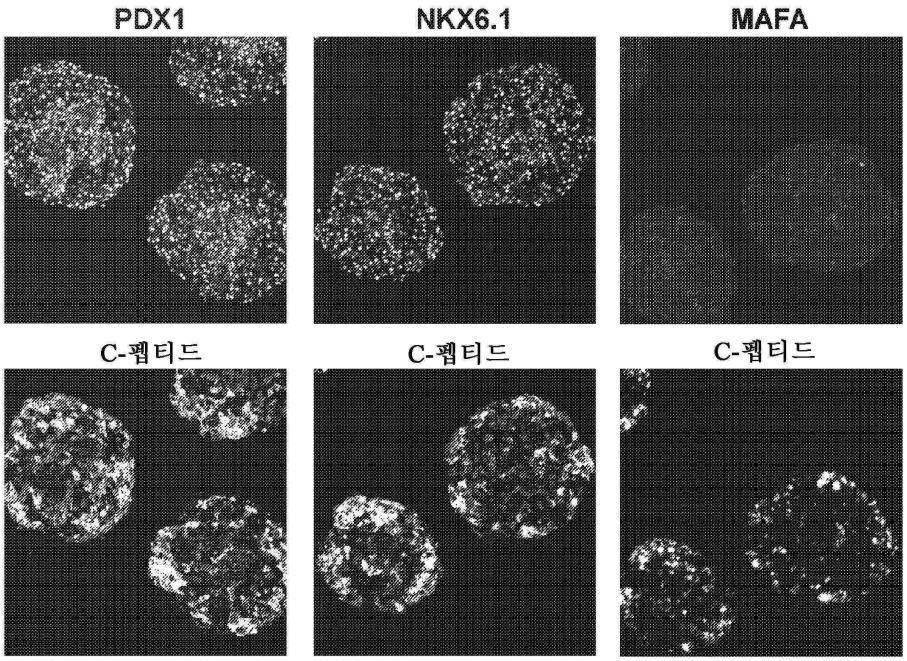
도면6f



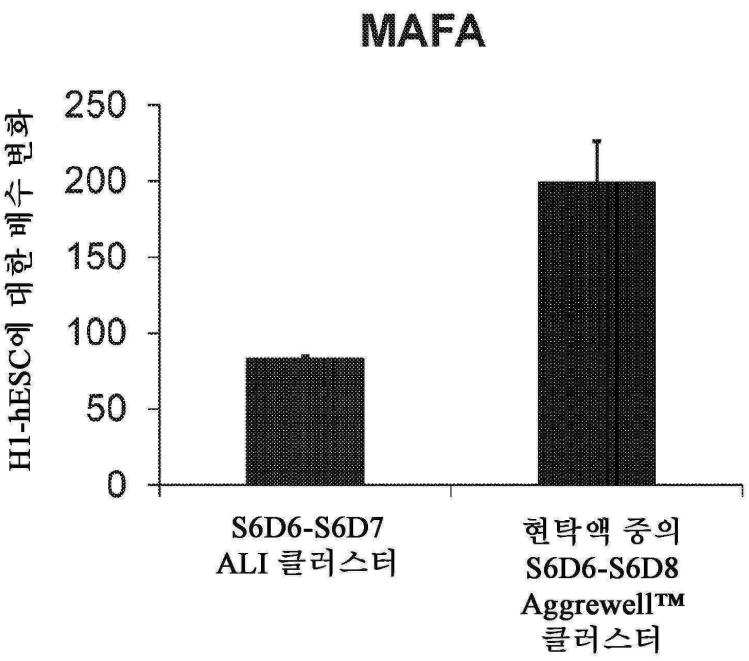
도면6g



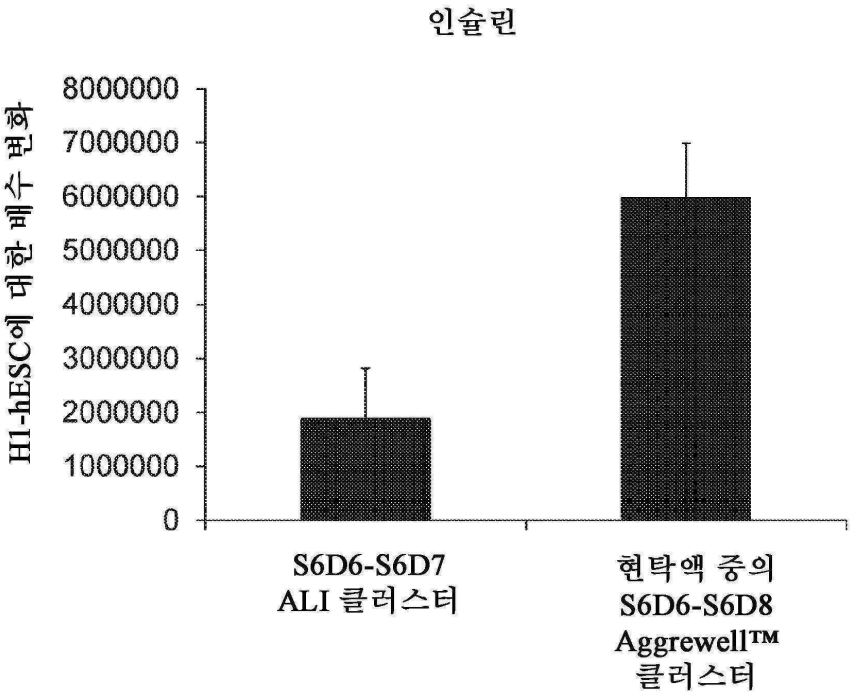
도면6h


PDX1
NKX6.1
MAFA
C-펩티드
C-펩티드
C-펩티드

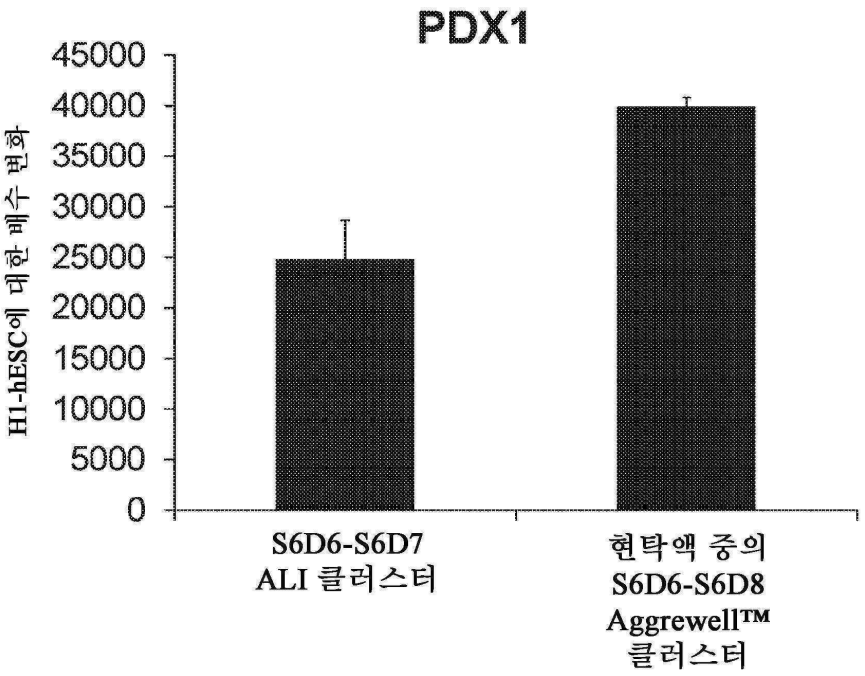
도면6i


MAFA
H1-hESC에 대한 배수 변화
250
200
150
100
50
0
S6D6-S6D7
ALI 클러스터
현탁액 중의
S6D6-S6D8
Aggrewell™
클러스터

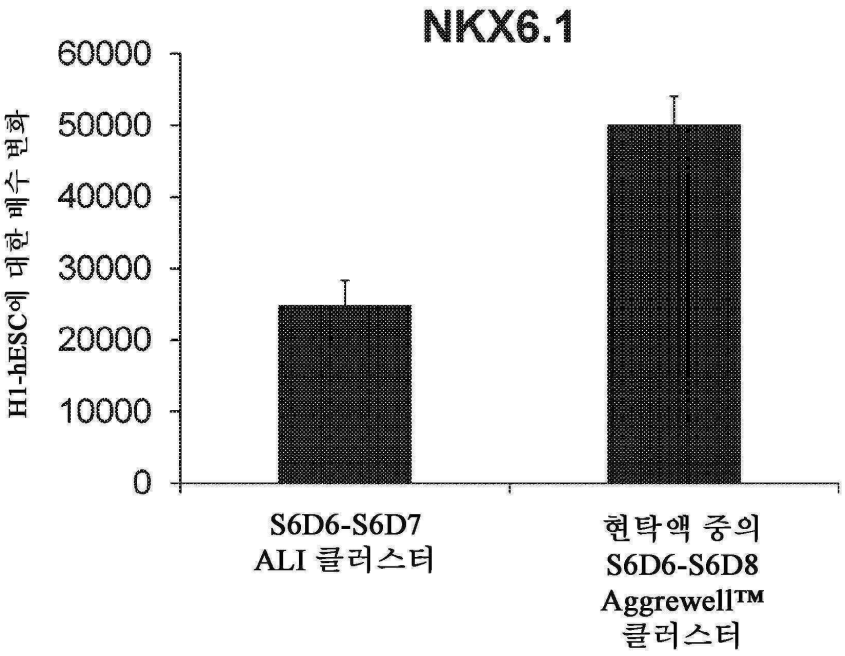
도면6j


인슐린
H1-hESC에 대한 배수 변화
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
S6D6-S6D7
ALI 클러스터
현탁액 중의
S6D6-S6D8
Aggrewell™
클러스터

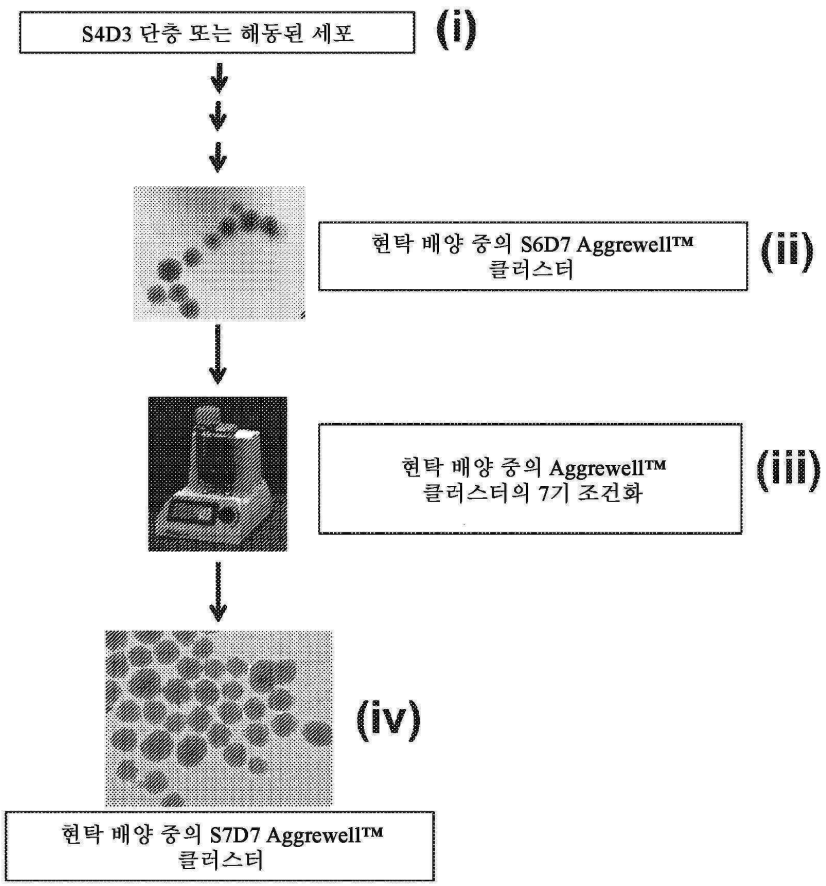
도면6k


PDX1
H1-hESC에 대한 배수 변화
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
S6D6-S6D7
ALI 클러스터
현탁액 중의
S6D6-S6D8
Aggrewell™
클러스터

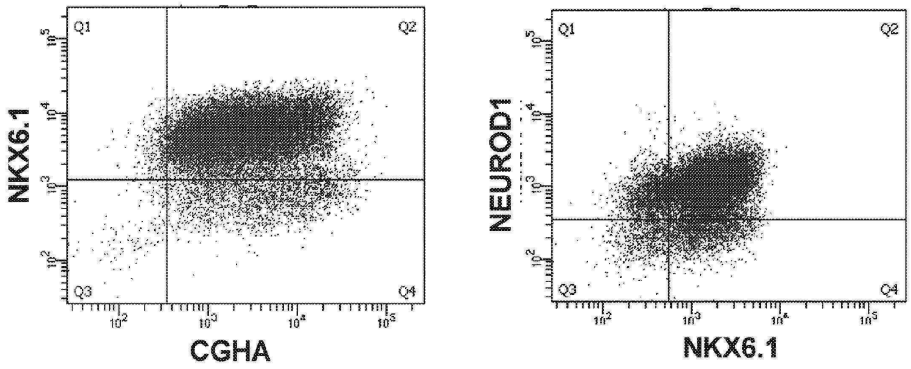
도면61


NKX6.1
H1-hESC에 대한 배수 변화
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
S6D6-S6D7
ALI 클러스터
현탁액 중의
S6D6-S6D8
Aggrewell™
클러스터

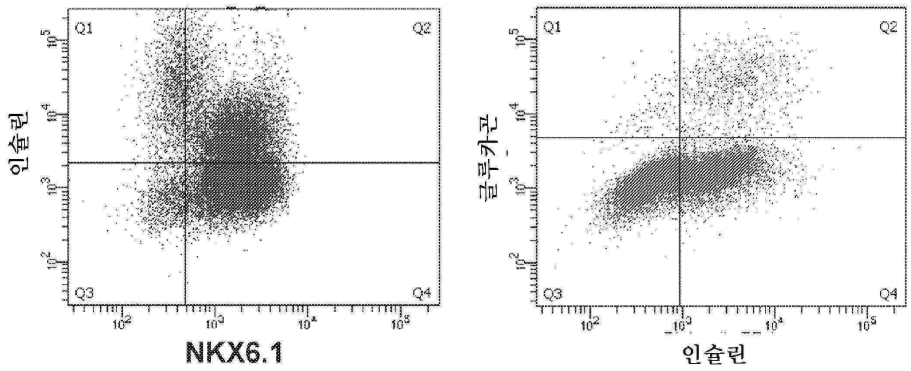
도면7a


S4D3 단층 또는 해동된 세포
(i)
현탁 배양 중의 S6D7 Aggrewell™
클러스터
(ii)
현탁 배양 중의 Aggrewell™
클러스터의 7기 조건화
(iii)
(iv)
현탁 배양 중의 S7D7 Aggrewell™
클러스터

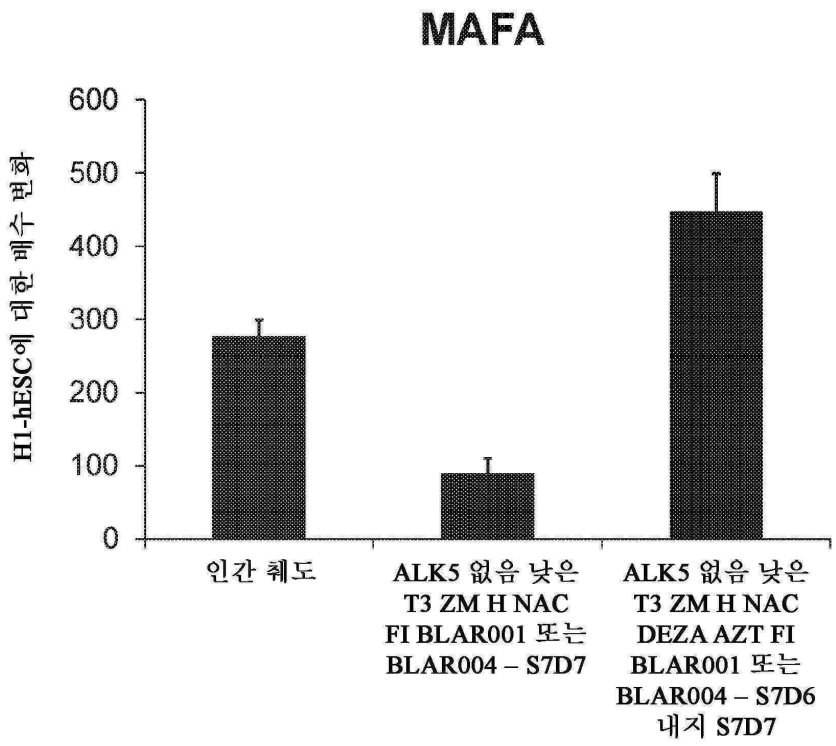
도면7b



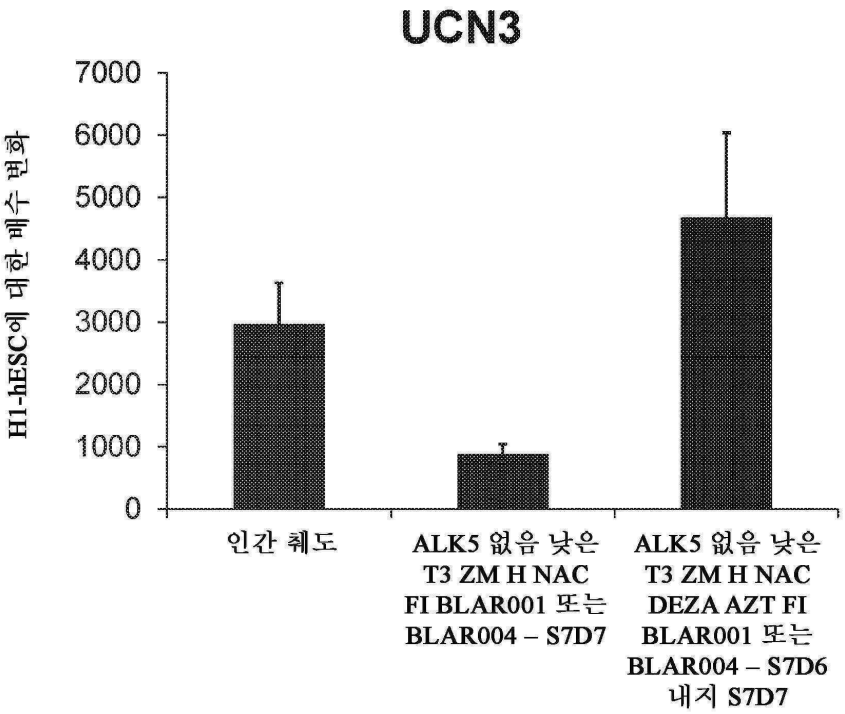
도면7c



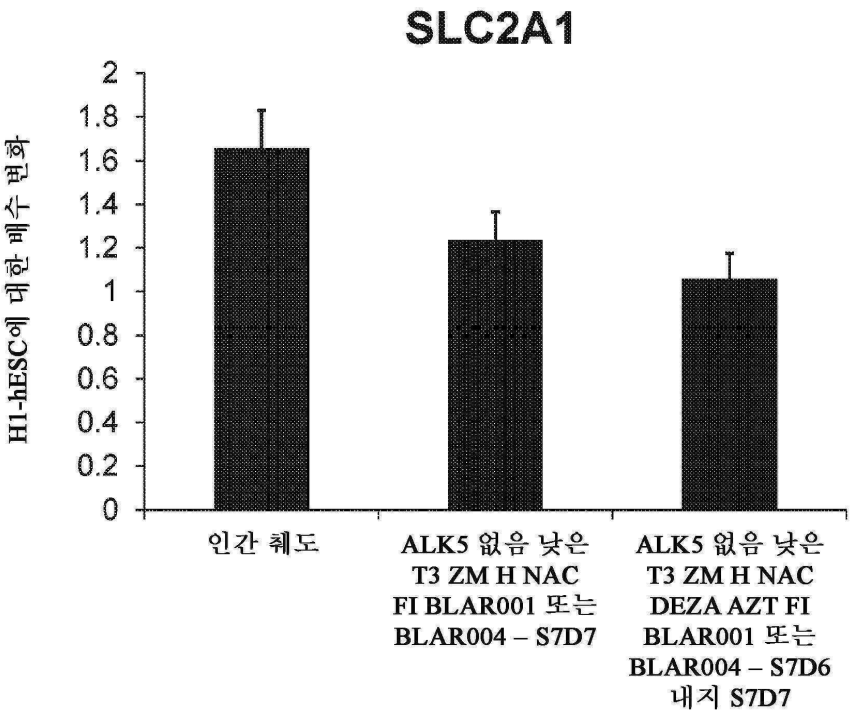
도면7d



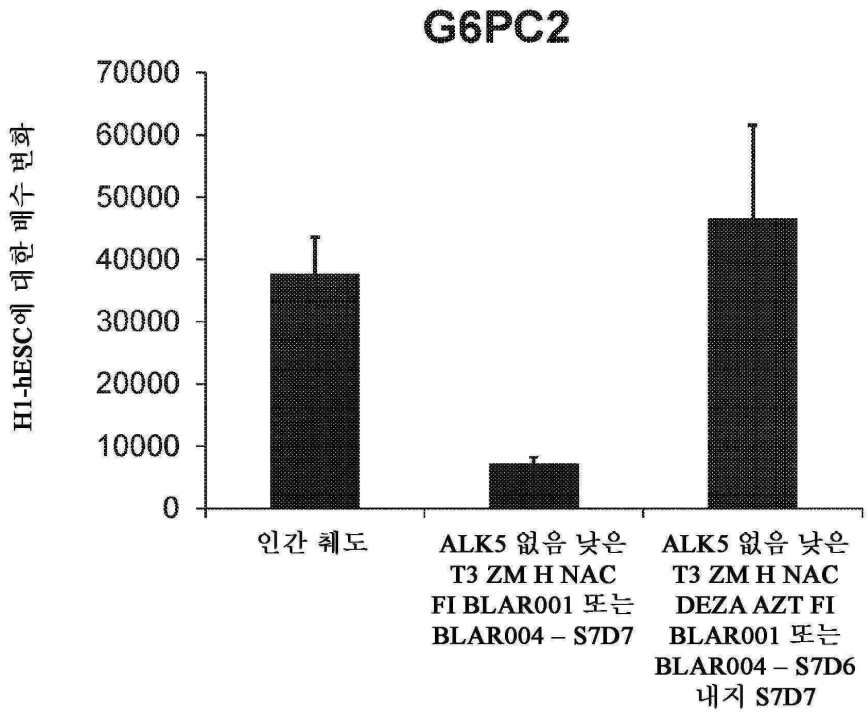
도면7e


UCN3
H1-hESC에 대한 배수 변화
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D7
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D6 내지 S7D7

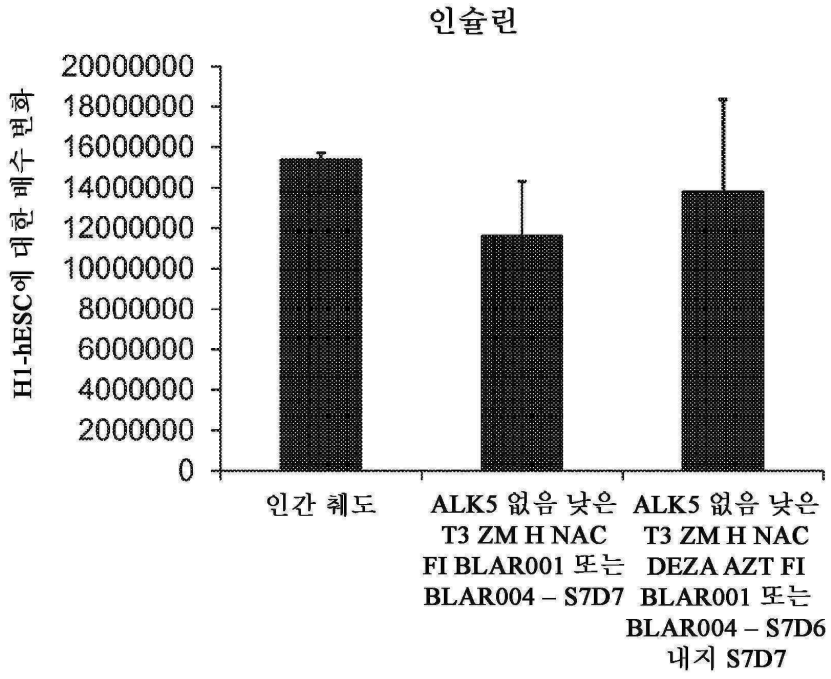
도면7f


SLC2A1
H1-hESC에 대한 배수 변화
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D7
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D6 내지 S7D7

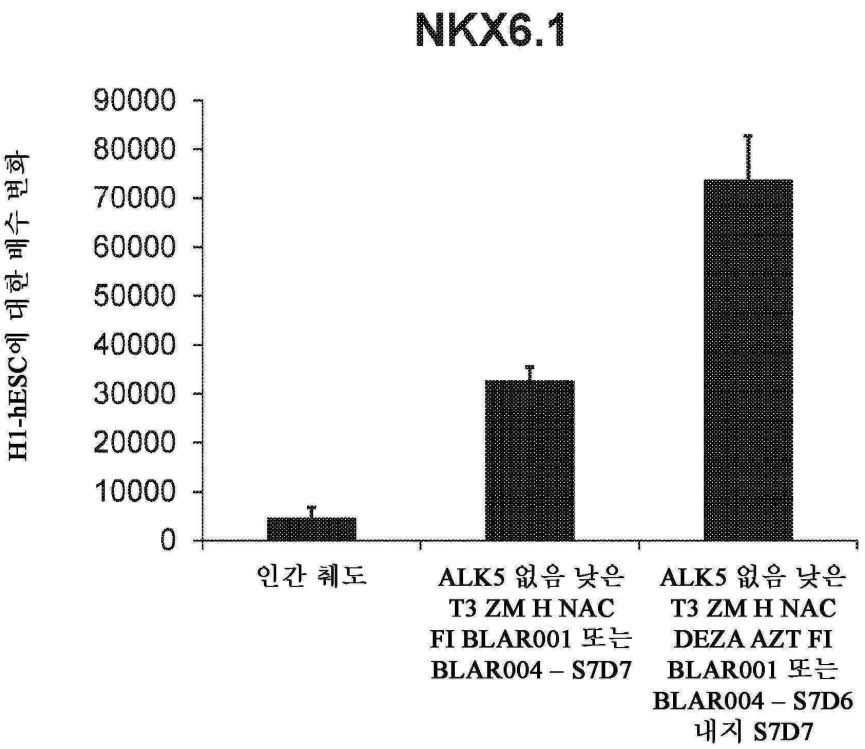
도면7g


G6PC2
H1-hESC에 대한 배수 변화
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D7
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D6 내지 S7D7

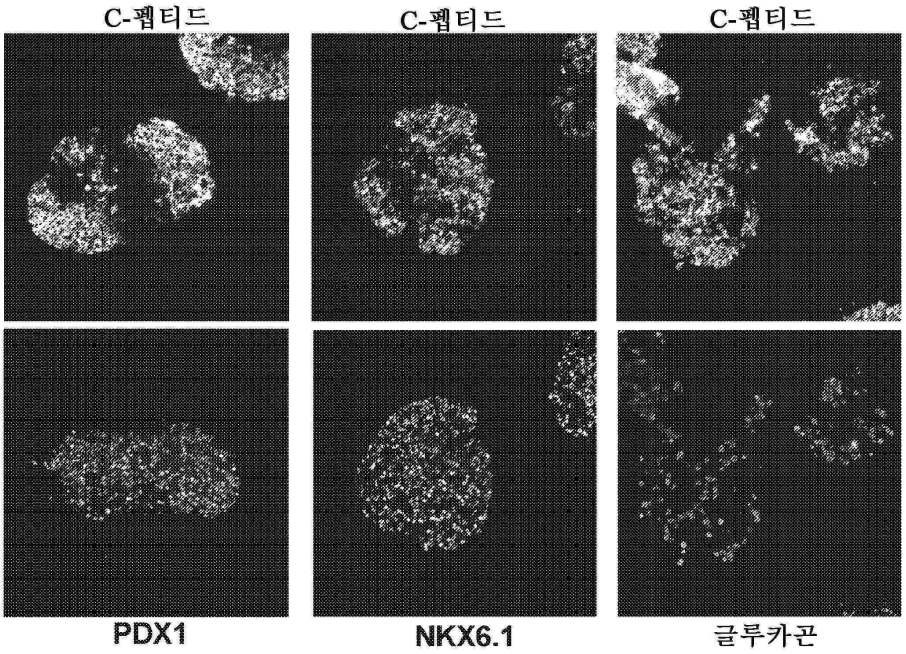
도면7h


인슐린
H1-hESC에 대한 배수 변화
20000000
18000000
16000000
14000000
12000000
10000000
8000000
6000000
4000000
2000000
0
인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D7
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D6 내지 S7D7

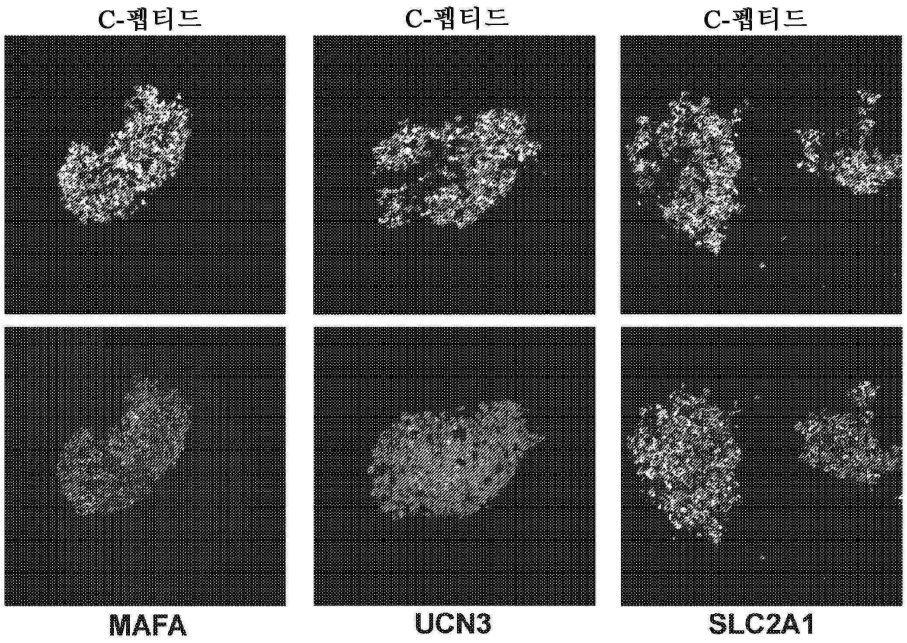
도면7i


NKX6.1
H1-hESC에 대한 배수 변화
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
인간 췌도
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D7
ALK5 없음 낮은 T3 ZM H NAC DEZA AZT FI BLAR001 또는 BLAR004 – S7D6 내지 S7D7

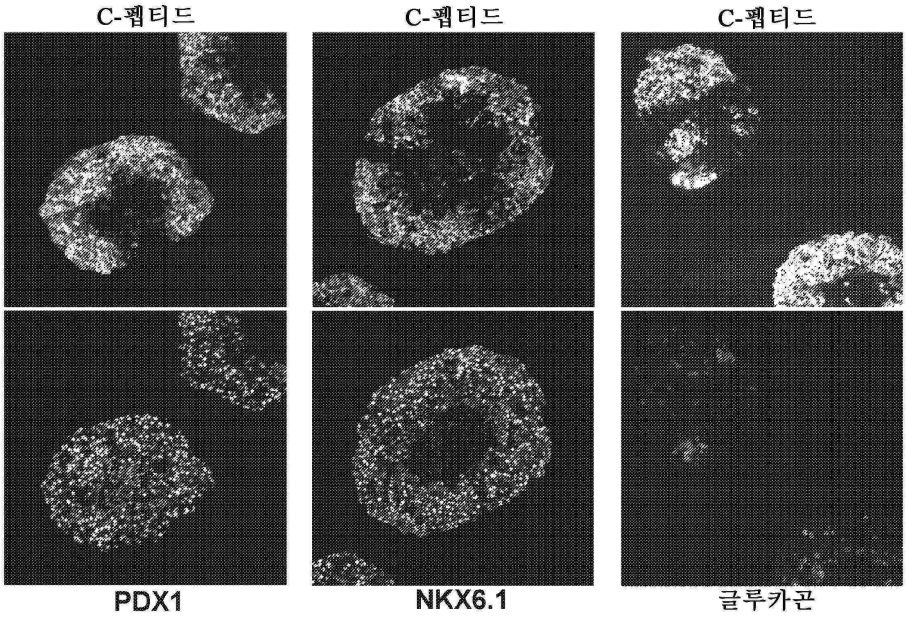
도면7j


C-펩티드
C-펩티드
C-펩티드
PDX1
NKX6.1
글루카곤

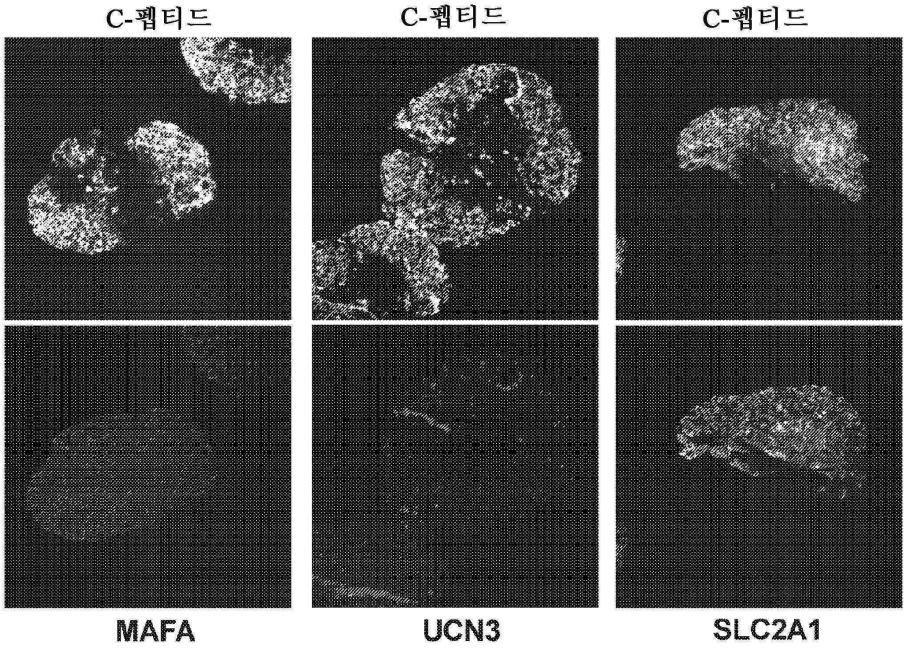
도면7k


C-펩티드
C-펩티드
C-펩티드
MAFA
UCN3
SLC2A1

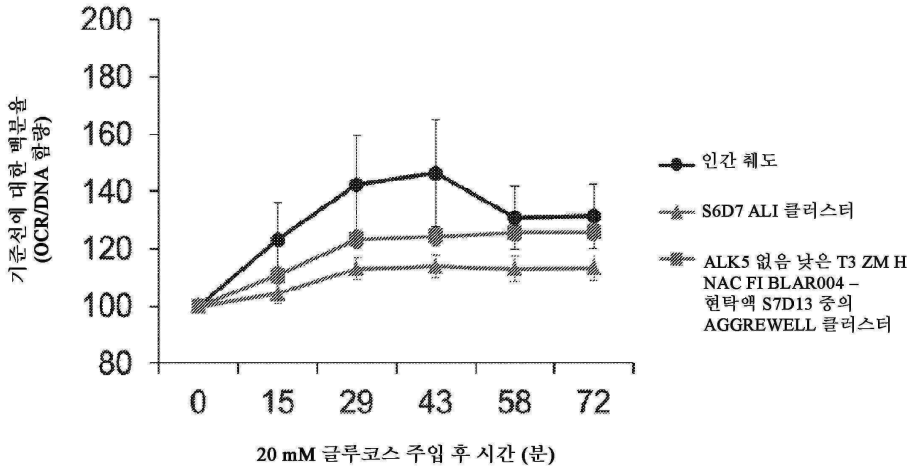
도면7l


C-펩티드
C-펩티드
C-펩티드
PDX1
NKX6.1
글루카곤

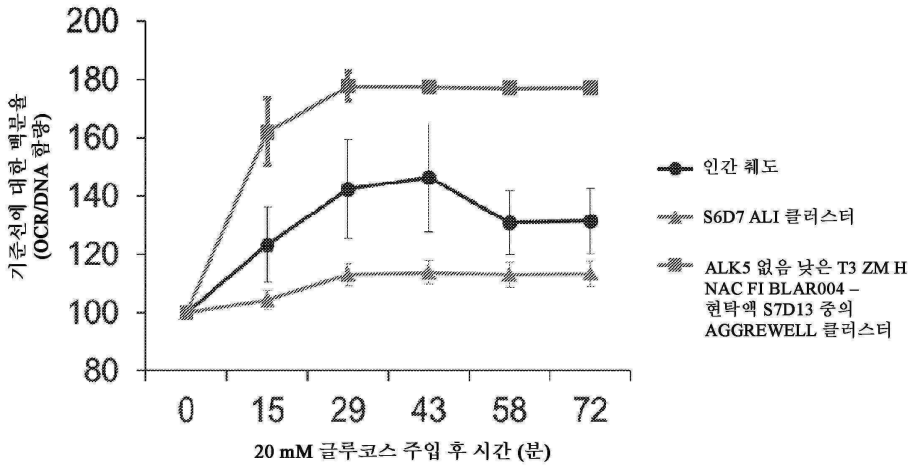
도면7m



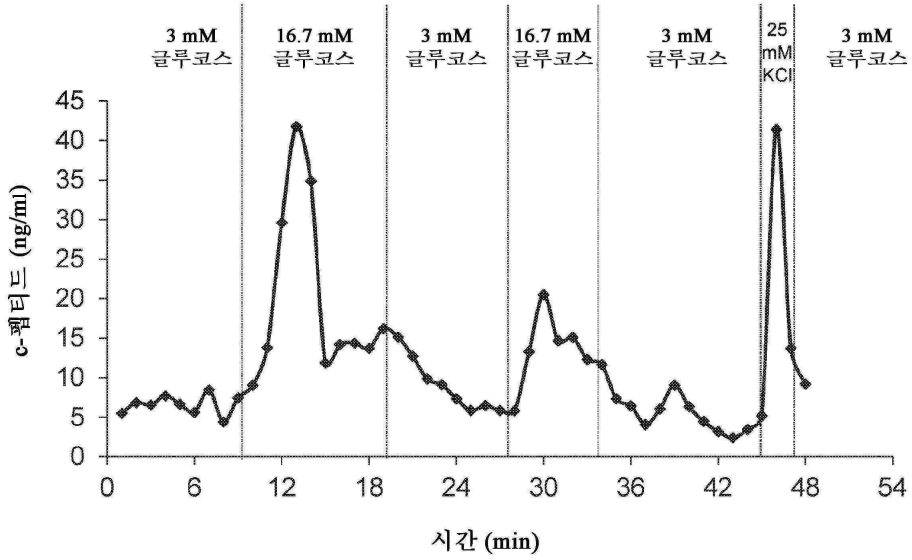
도면8a



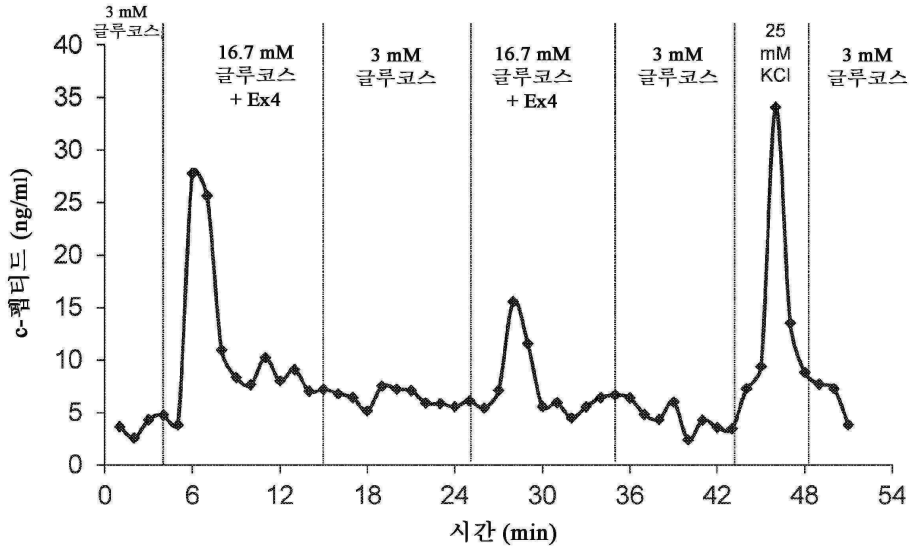
도면8b



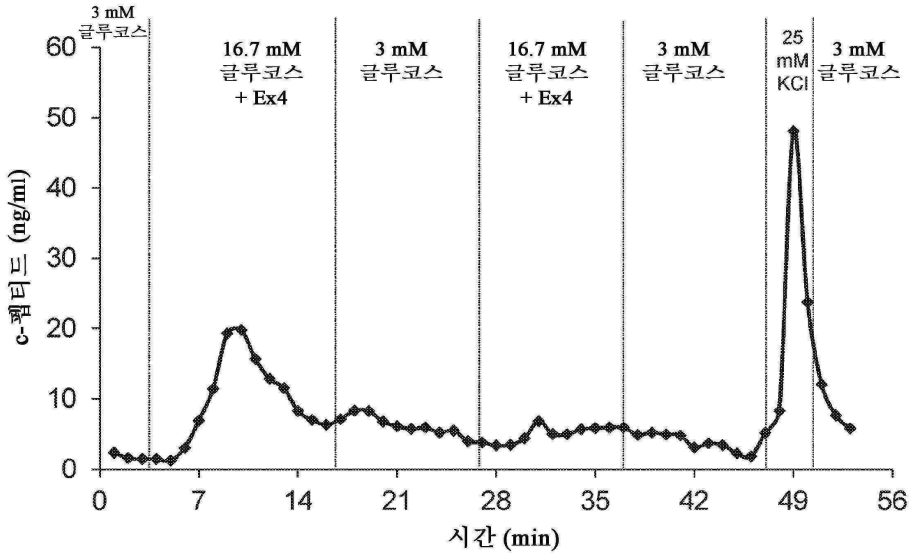
도면8c


3 mM
글루코스
16.7 mM
글루코스
3 mM
글루코스
16.7 mM
글루코스
3 mM
글루코스
25
mM
KCl
3 mM
글루코스
c-펩티드 (ng/ml)
시간 (min)

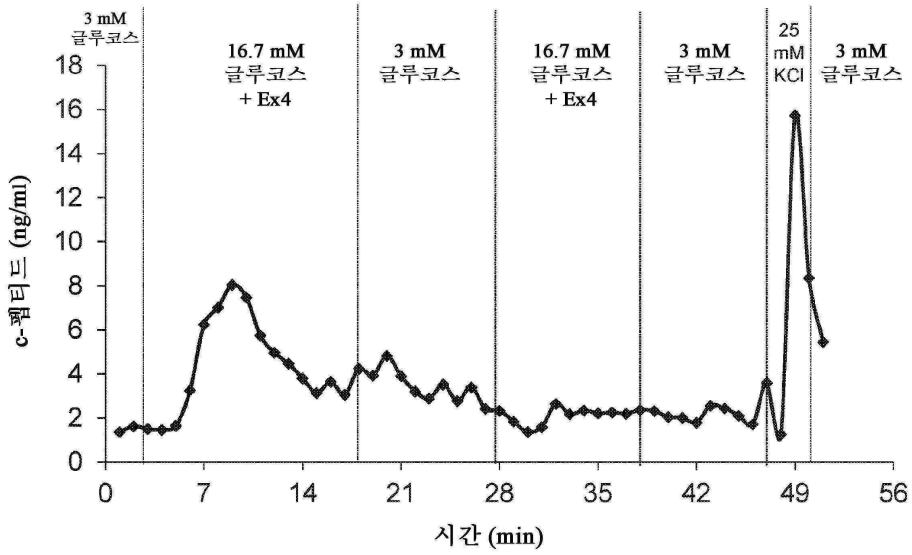
도면8d


3 mM
글루코스
16.7 mM
글루코스
+ Ex4
3 mM
글루코스
16.7 mM
글루코스
+ Ex4
3 mM
글루코스
25
mM
KCl
3 mM
글루코스
c-펩티드 (ng/ml)
시간 (min)

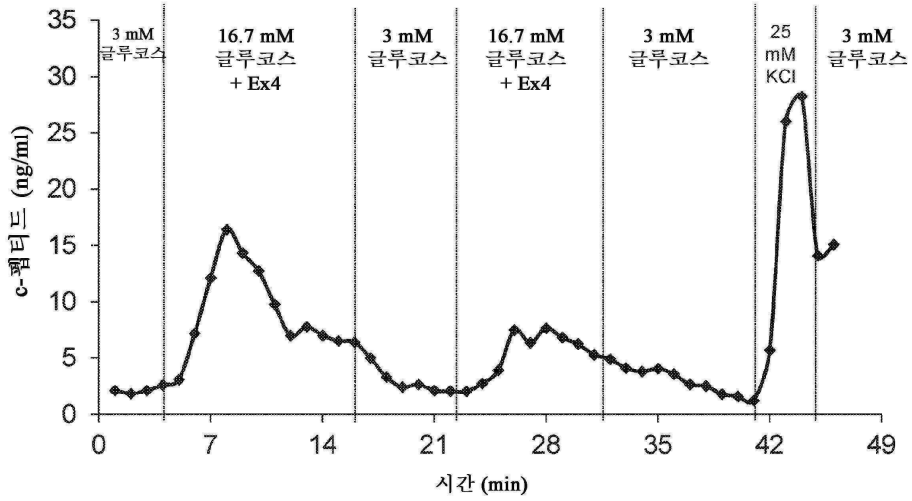
도면8e


3 mM 글루코스
16.7 mM 글루코스 + Ex4
3 mM 글루코스
16.7 mM 글루코스 + Ex4
3 mM 글루코스
25 mM KCl
3 mM 글루코스
c-펩티드 (ng/ml)
0
10
20
30
40
50
60
0
7
14
21
28
35
42
49
56
시간 (min)

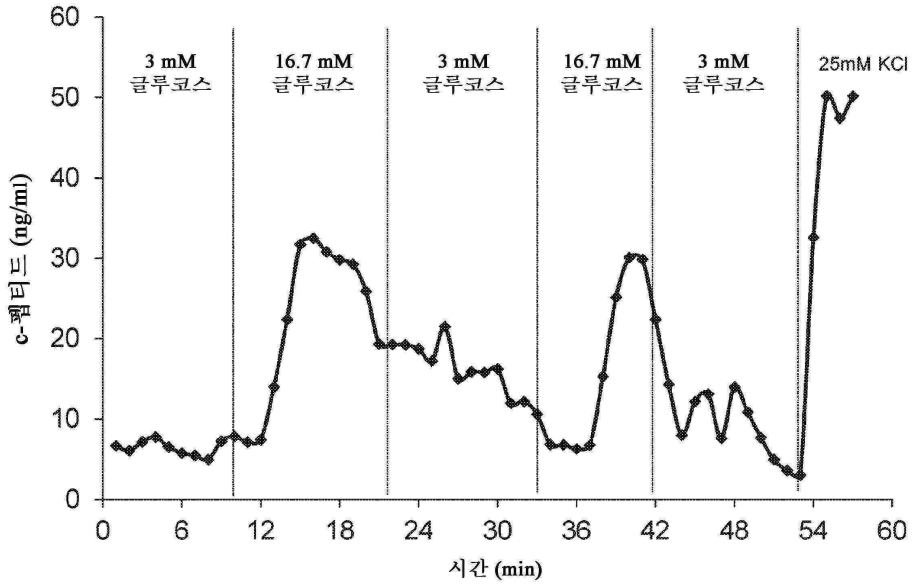
도면8f


3 mM 글루코스
16.7 mM 글루코스 + Ex4
3 mM 글루코스
16.7 mM 글루코스 + Ex4
3 mM 글루코스
25 mM KCl
3 mM 글루코스
c-펩티드 (ng/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
0
7
14
21
28
35
42
49
56
시간 (min)

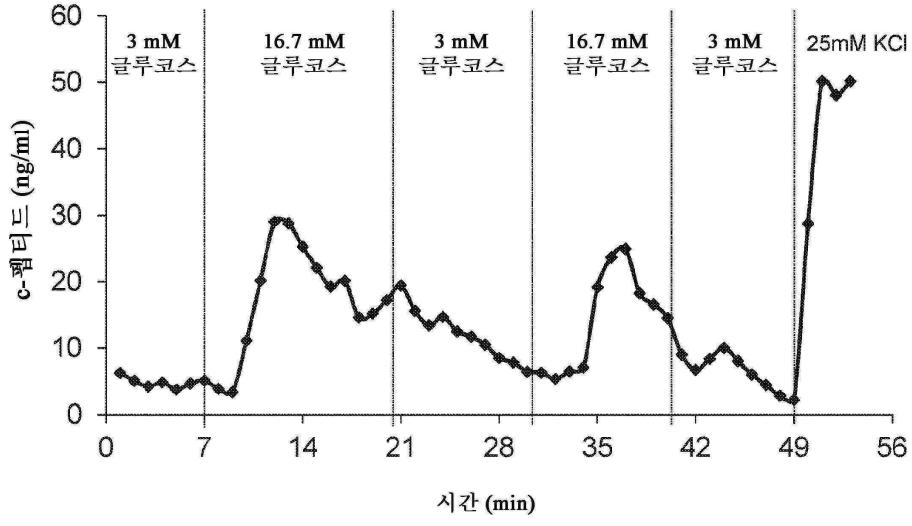
도면8g



도면8h



도면8i



도면9a

인간 ES 세포 - CyT49-hESC	완성 내배엽 *1기(2일)*	원시 장관 *2기 - (3일)*	전장 내배엽 *3기 - (2일)*	췌장 내배엽 *4기 - (3일)*
	MCDB131 0.5% FAF-BSA	MCDB131 0.5% FAF-BSA	BLAR001 0.25% FAF-BSA	BLAR001 0.25% FAF-BSA
	액티빈 A Wnt 3A ITSX	Fgf7	Fgf7 SANT TPPB RA	Fgf7 SANT TPPB RA
	FOXA2	FOXA2	FOXA2 PDX1	FOXA2 PDX1 NKX6.1

도면9b

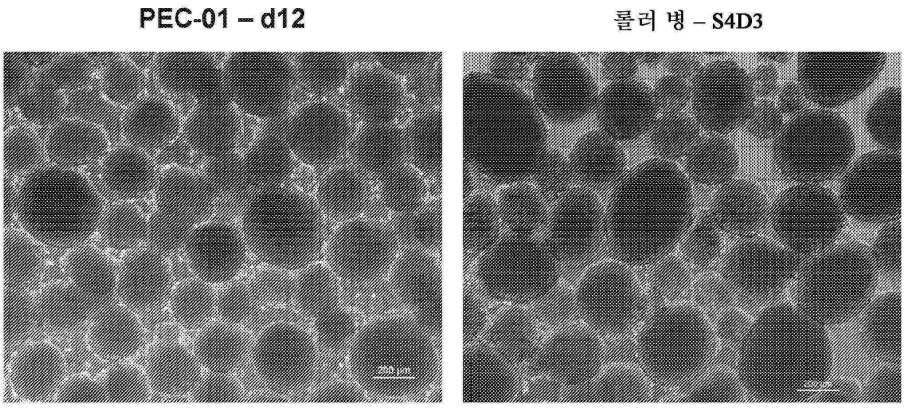
유형	hESC 입력 *[mL 당 백만개 세포]*	S4D3 *[mL 당 백만개 세포]*	S4D3:: hESC 입력
롤러 병	0.181 ± 0.019	0.780 ± 0.216	4.30 ± 0.782
0.1 PBS 미니	0.324 ± 0.003	1.06 ± 0.179	3.27 ± 0.585
0.5 PBS 미니	0.301 ± 0.025	1.21 ± 0.246	4.08 ± 0.854

유형	PEC-01 d12:: hESC 입력
PEC-01 d12	2.23 ± 0.090

도면9c

유형	S4D3 수율 *[백만개 세포]*
0.1 PBS 미니	106.0 ± 17.9
0.5 PBS 미니	606.2 ± 122.9

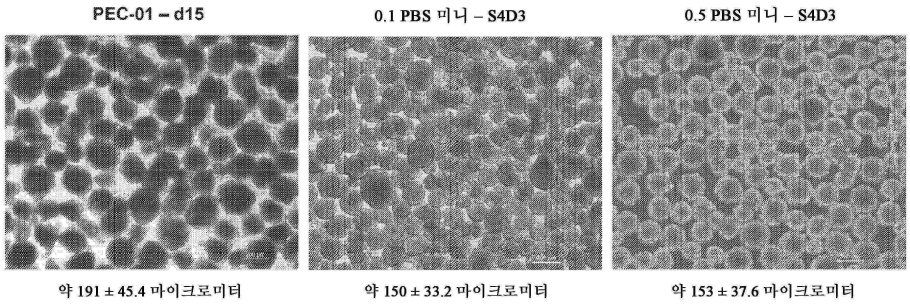
도면9d



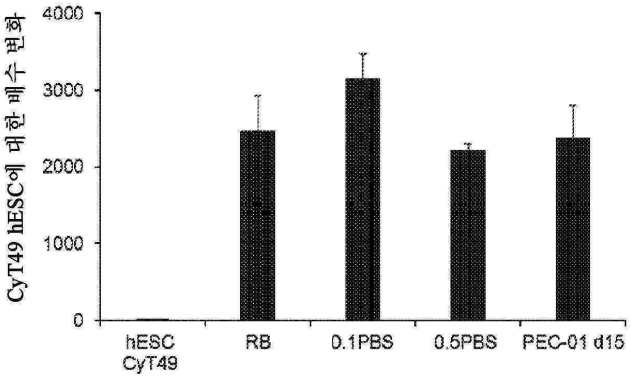
약 259 ± 55.3 마이크로미터

약 274 ± 92.5 마이크로미터

도면9e

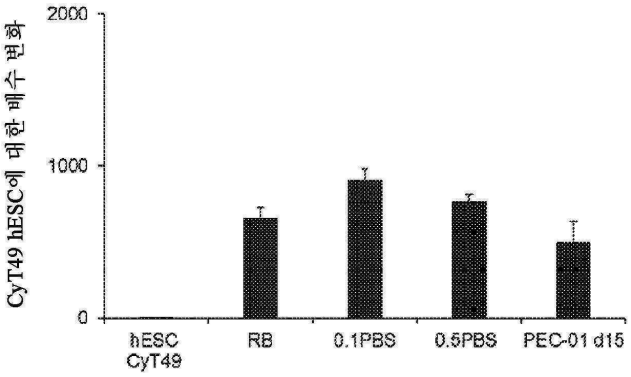


도면9f



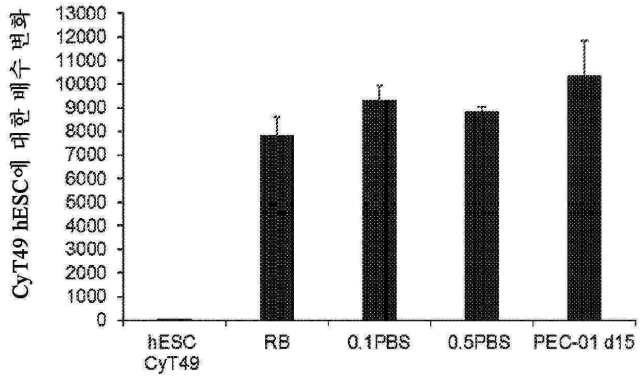
NKX6.1

도면9g



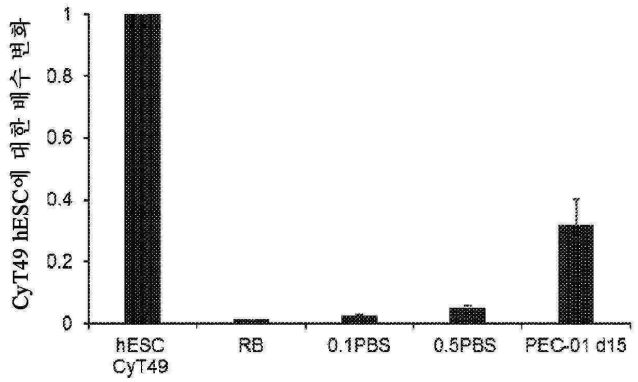
PTF1A

도면9h



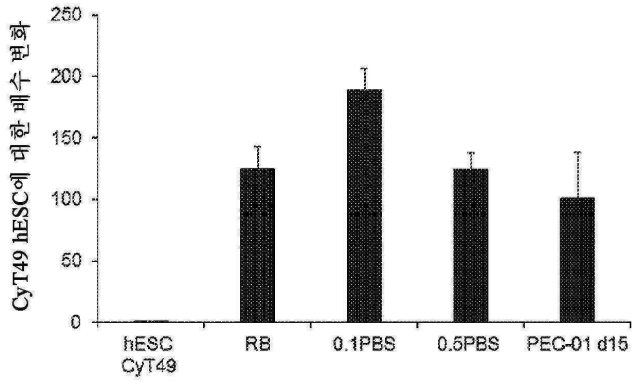
PDX1

도면9i



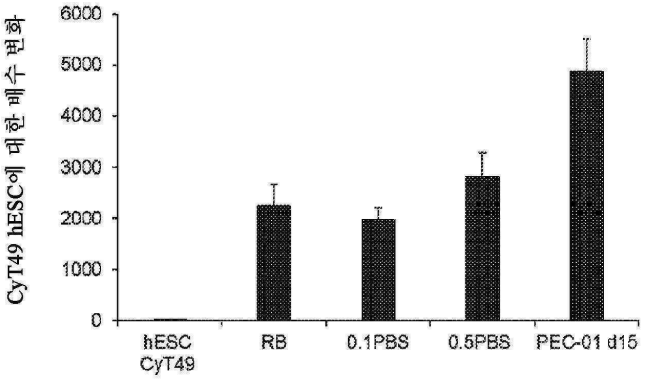
SOX2

도면9j



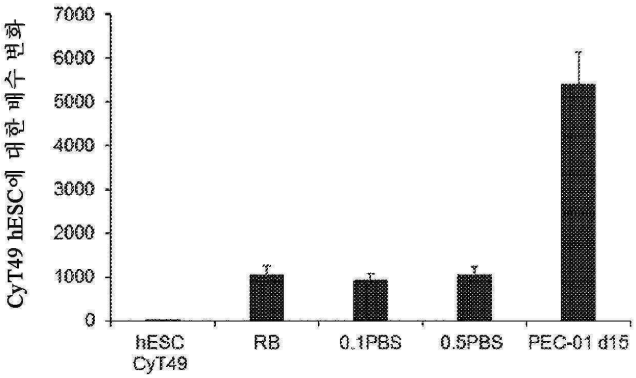
CDX2

도면9k



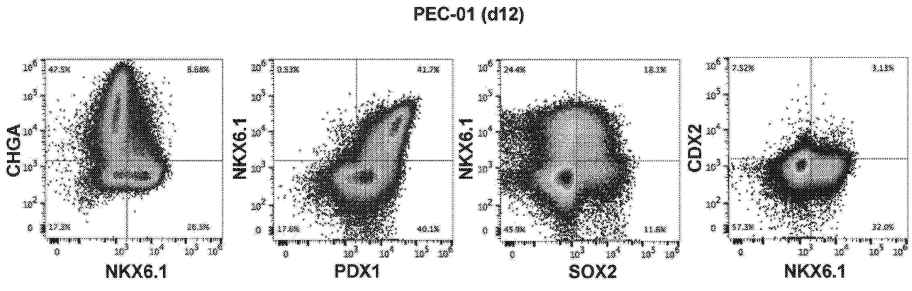
NEUROD1

도면9l



CHGA

도면9m



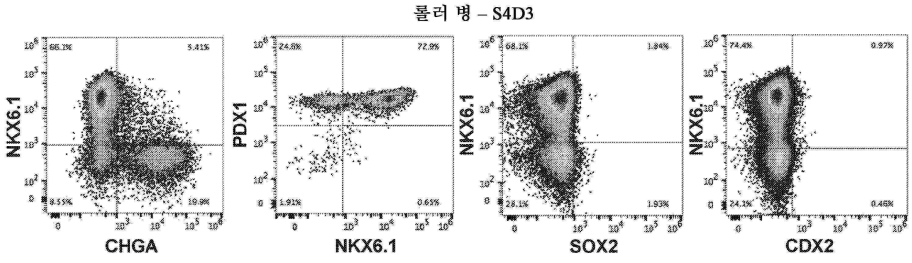
총 CHGA⁺ NKX6.1⁺는 약 0.19%이다. 총 CHGA⁺는 약 49.6%이다.

총 PDX1⁺는 약 87.0%이다. 총 NKX6.1⁺는 약 52.8%이다. 총 PDX1⁺ NKX6.1⁺는 약 38.0%이다.

SOX2⁺인 총 PDX1⁺ NKX6.1⁺는 약 49.0%이다.

CDX2⁺인 총 PDX1⁺ NKX6.1⁺는 약 2.7%이다.

도면9n



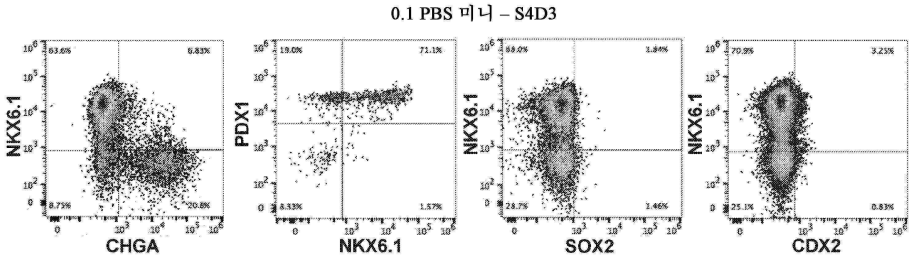
총 $CHGA^+$ $NKX6.1^+$는 약 0.5%이다. 총 $CHGA^+$는 약 26.9%이다.

총 $PDX1^+$는 약 98.3%이다. 총 $NKX6.1^+$는 약 77.2%이다. 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 64.6%이다.

$SOX2^+$인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 2.0%이다.

$CDX2^+$인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 2.1%이다.

도면9o



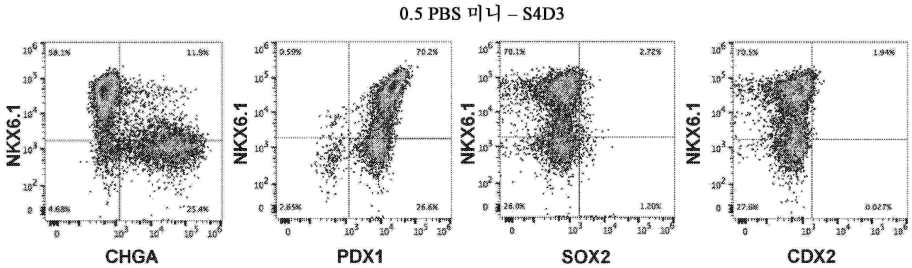
총 $CHGA^+$ $NKX6.1^+$는 약 1.16%이다. 총 $CHGA^+$는 약 26.6%이다.

총 $PDX1^+$는 약 92.1%이다. 총 $NKX6.1^+$는 약 75.1%이다. 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 48.9%이다.

$SOX2^+$ 인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 10.0%이다.

$CDX2^+$ 인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 6.0%이다.

도면9p



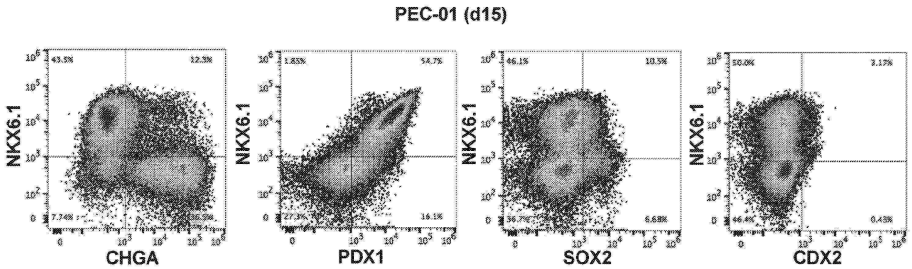
총 $CHGA^+$ $NKX6.1^+$는 약 0.03%이다. 총 $CHGA^+$는 약 30.2%이다.

총 $PDX1^+$는 약 97.9%이다. 총 $NKX6.1^+$는 약 79.4%이다. 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 65.3%이다.

$SOX2^+$인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 6.2%이다.

$CDX2^+$인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 0.3%이다.

도면9q



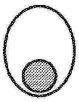
총 $CHGA^+$ $NKX6.1^+$는 약 1.2%이다. 총 $CHGA^+$는 약 42.5%이다.

총 $PDX1^+$는 약 75.0%이다. 총 $NKX6.1^+$는 약 59.9%이다. 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 47.5%이다.

$SOX2^+$인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 22.5%이다.

$CDX2^+$인 총 $PDX1^+$ $NKX6.1^+$는 약 6.1%이다.

도면10a

S4D3 CyT49 hESC 유래 세포	췌장 내분비 전구체 *5기 (3 일)*	미성숙 베타-세포 *6기 - (7일)*	베타-세포 성숙 *7기 - (7 내지 23일)*
	BLAR001 2.0% FAF-BSA	BLAR001 2.0% FAF-BSA	BLAR001 2.0% FAF-BSA 제형 I
	SANT RA LDN ALK5 억제제 T3 헤파린	LDN ALK5 II 억제제 T3 헤파린 XX	T3 헤파린 NAC
	 PDX1 NKX6.1 CHGA NGN3	 PDX1 NKX6.1 CHAGA 인슐린	 PDX1 NKX6.1 CHGA 인슐린 MAFA

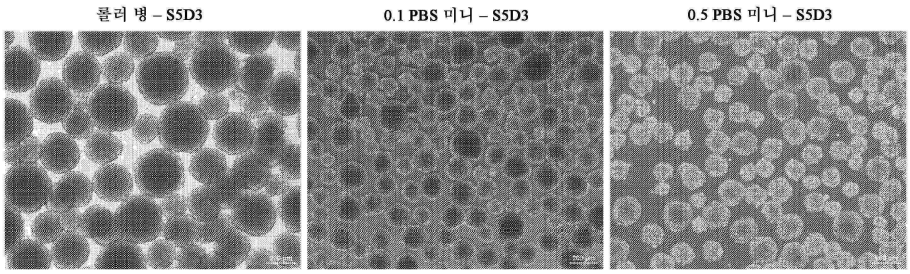
도면10b

유형	hESC 입력 [mL 당 백만개 세포]	S6D7 [mL 당 백만개 세포]	S6D7:: hESC 입력
롤러 병	0.253 ± 0.088	0.240 ± 0.059	0.95 ± 0.31
0.1 PBS 미니	0.324 ± 0.003	0.299 ± 0.079	0.92 ± 0.23
0.5 PBS 미니	0.301 ± 0.025	0.746 ± 0.154	2.4 ± 0.169

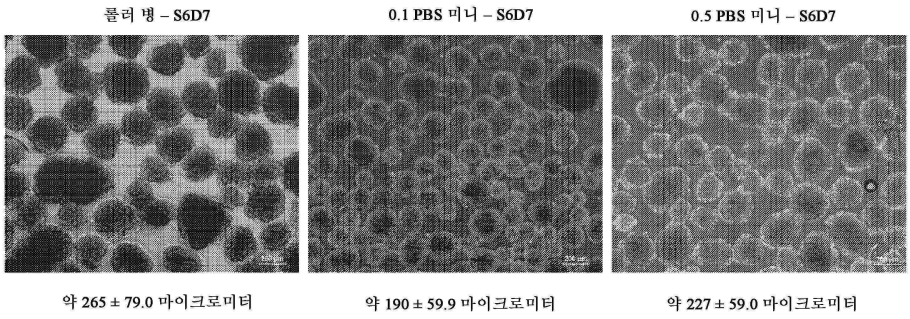
도면10c

유형	S6D7 수율 *[mL 당 백만개 세포]*
0.1 PBS 미니	29.90 ± 7.90
0.5 PBS 미니	223.8 ± 46.2

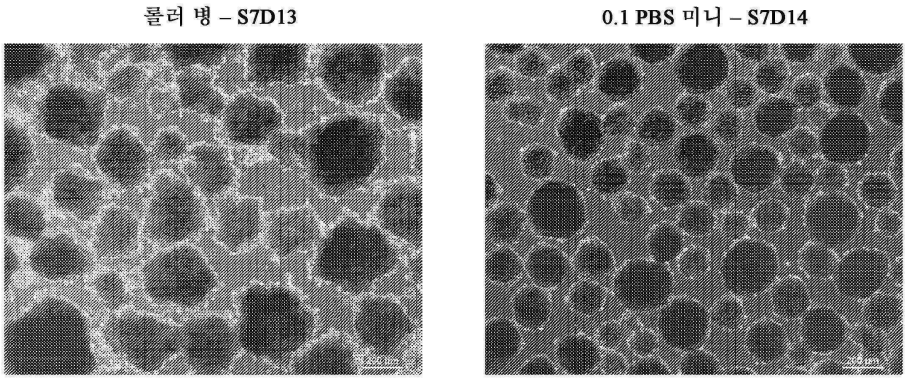
도면10d



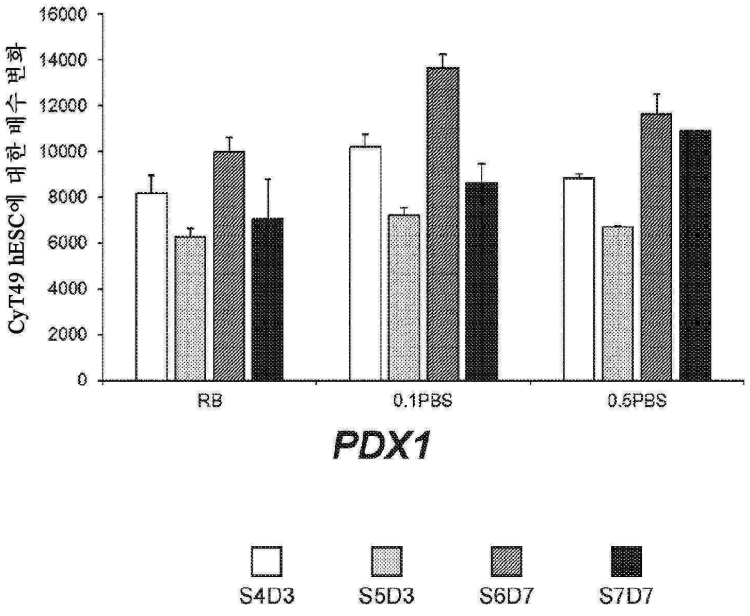
도면10e



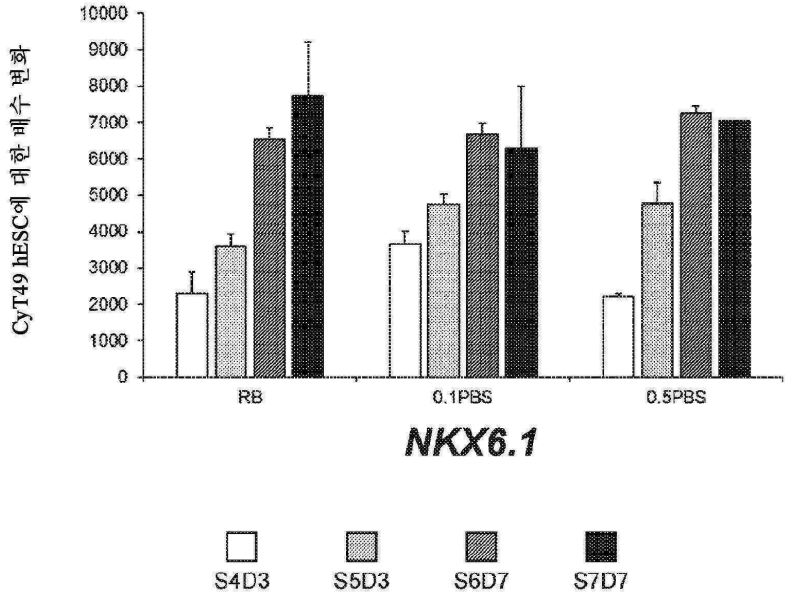
도면10f



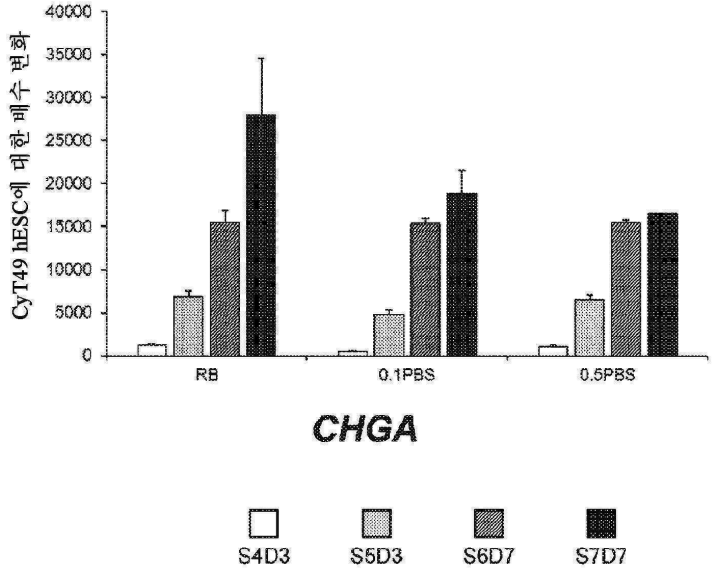
도면10g



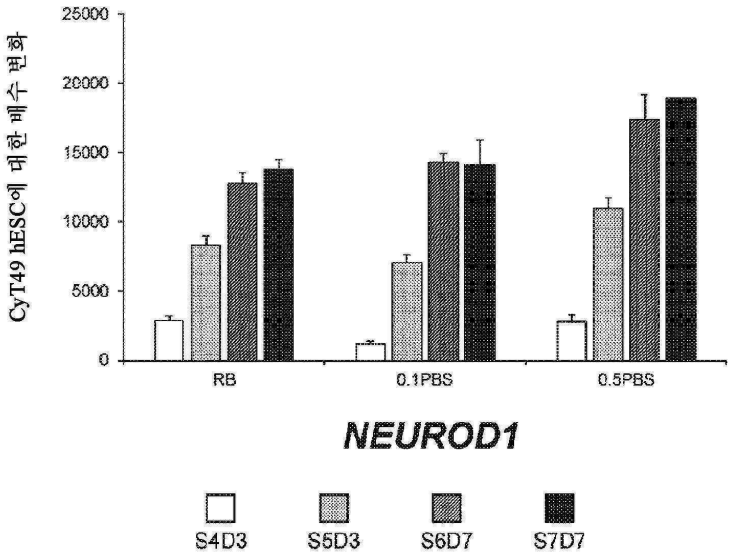
도면10h


CyT49 hESC에 대한 배수 변화
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
RB
0.1PBS
0.5PBS
NKX6.1
S4D3
S5D3
S6D7
S7D7

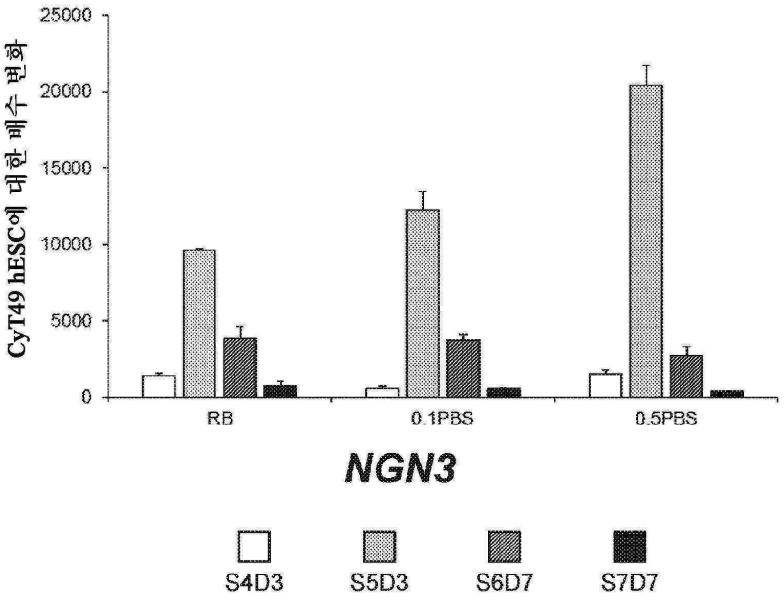
도면10i


CyT49 hESC에 대한 배수 변화
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
RB
0.1PBS
0.5PBS
CHGA
S4D3
S5D3
S6D7
S7D7

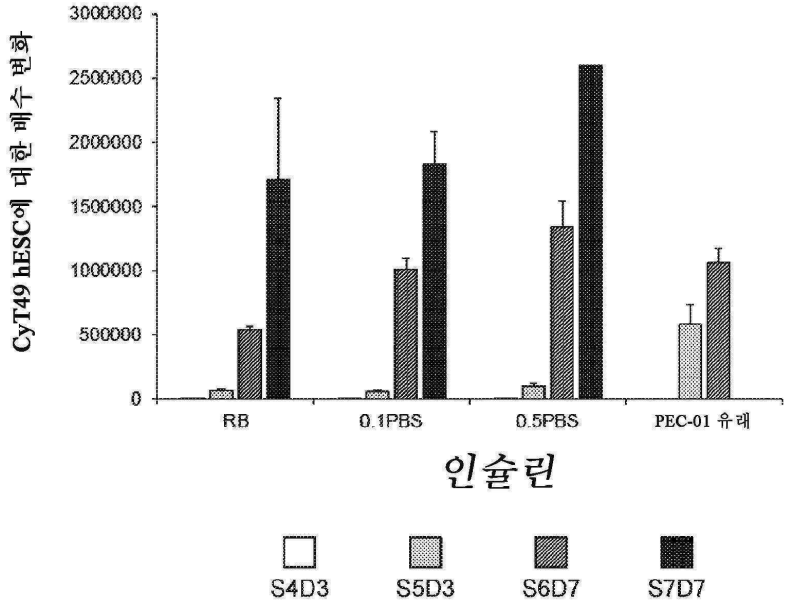
도면10j


CyT49 hESC에 대한 배수 변화
25000
20000
15000
10000
5000
0
RB
0.1PBS
0.5PBS
NEUROD1
S4D3
S5D3
S6D7
S7D7

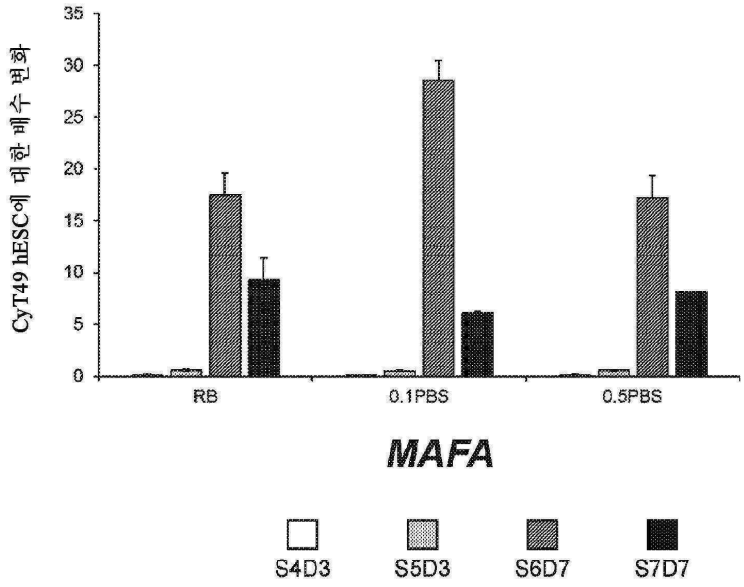
도면10k


CyT49 hESC에 대한 배수 변화
25000
20000
15000
10000
5000
0
RB
0.1PBS
0.5PBS
NGN3
S4D3
S5D3
S6D7
S7D7

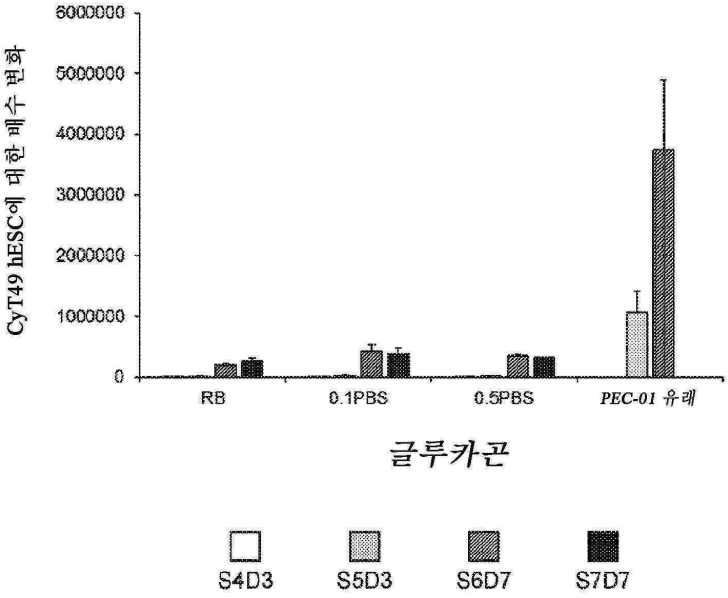
도면101


CyT49 hESC에 대한 배수 변화
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
RB
0.1PBS
0.5PBS
PEC-01 유래
인슐린
S4D3
S5D3
S6D7
S7D7

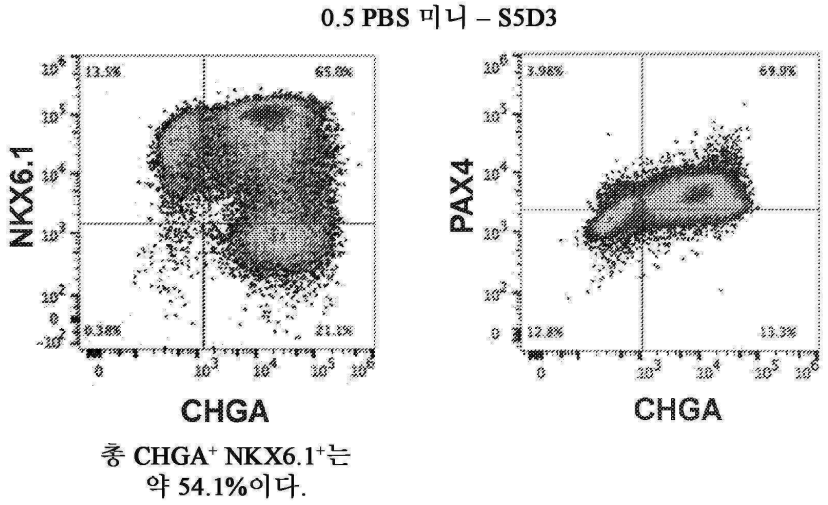
도면10m


CyT49 hESC에 대한 배수 변화
35
30
25
20
15
10
5
0
RB
0.1PBS
0.5PBS
MAFA
S4D3
S5D3
S6D7
S7D7

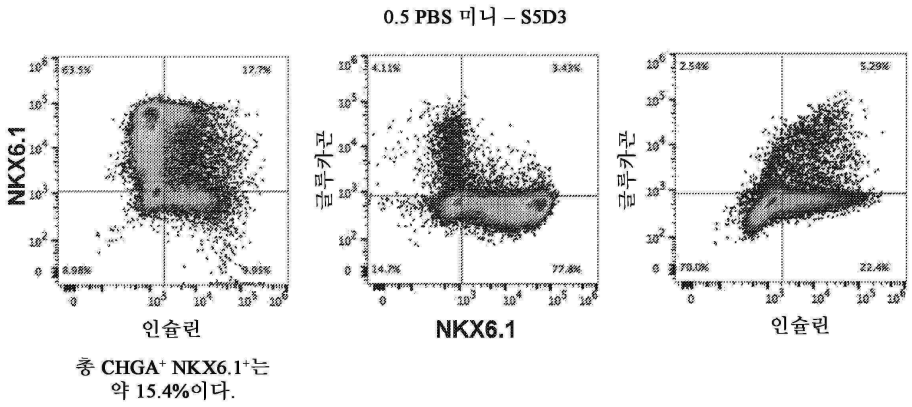
도면10n



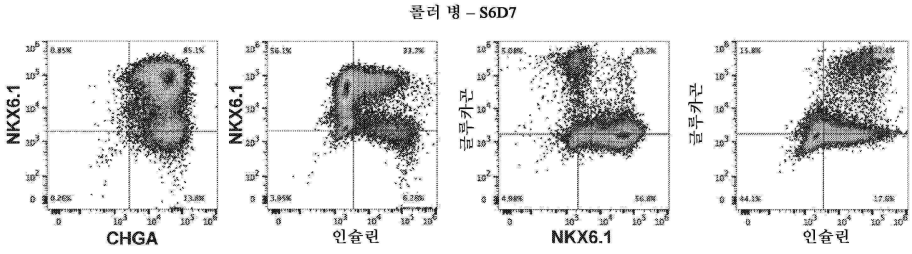
도면10o



도면10p



도면10q

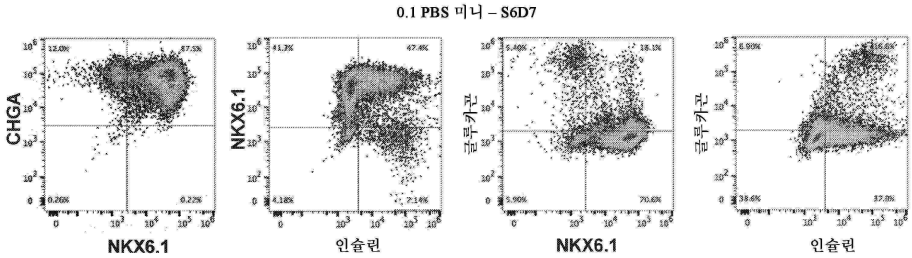


총 CHGA⁺ NKX6.1⁺는 약 81.0%이다.

총 CHGA⁺ NKX6.1⁺는 약 40.3%이다.

총 인슐린⁺ 글루카곤⁺는 약 18.8%이다.

도면10r

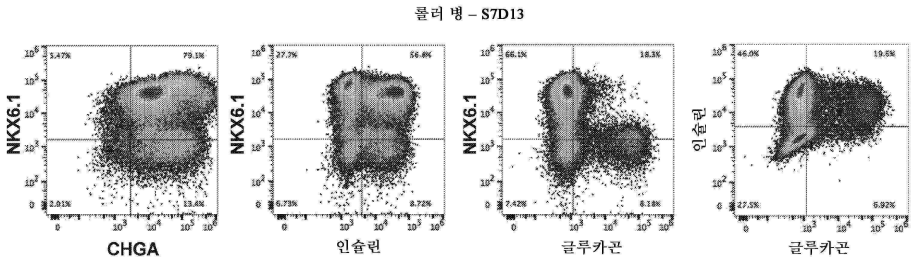


총 CHGA⁺ NKX6.1⁺는 약 88.7%이다.

총 NKX6.1⁺ 인슐린⁺는 약 44.7%이다.

총 인슐린⁺ 글루카곤⁺는 약 14.4%이다.

도면10s

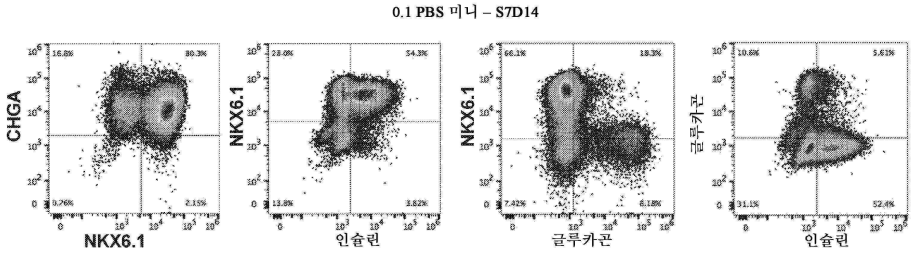


총 CHGA⁺ NKX6.1⁺는 약 79.6%이다.

총 NKX6.1⁺ 인슐린⁺는 약 51.8%이다.

총 인슐린⁺ 글루카곤⁺는 약 7.7%이다.

도면10t

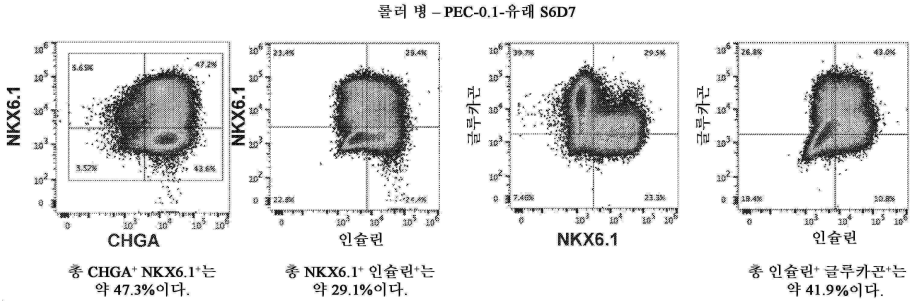


총 CHGA⁺ NKX6.1⁺는 약 80.9%이다.

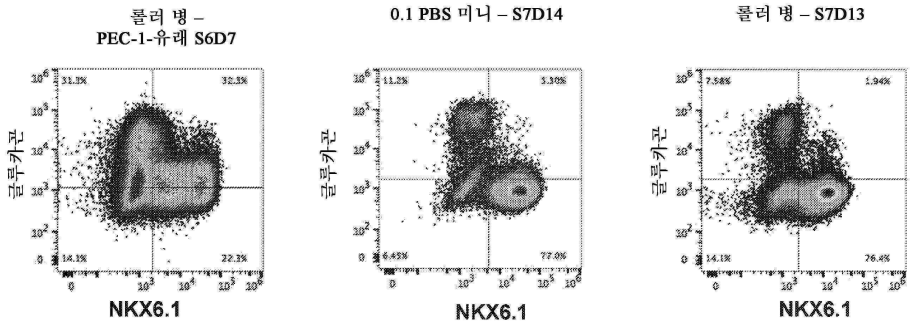
총 NKX6.1⁺ 인슐린⁺는 약 48.9%이다.

총 인슐린⁺ 글루카곤⁺는 약 6.5 %이다.

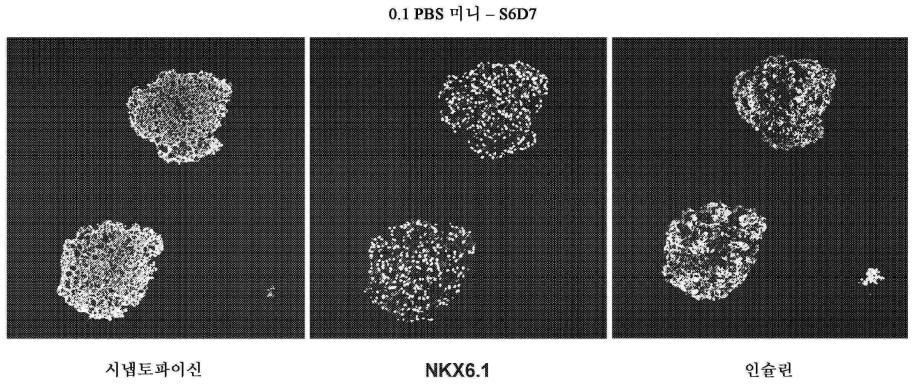
도면10u



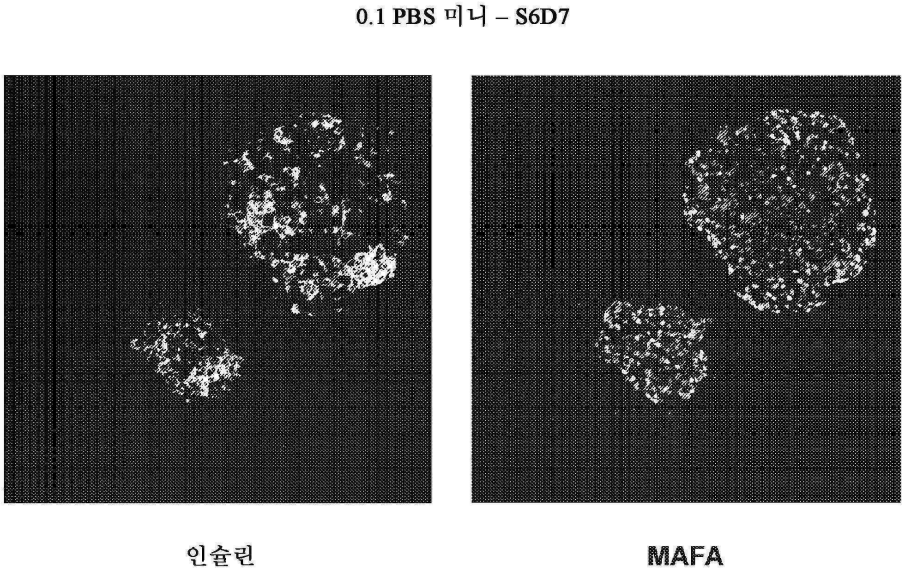
도면10v



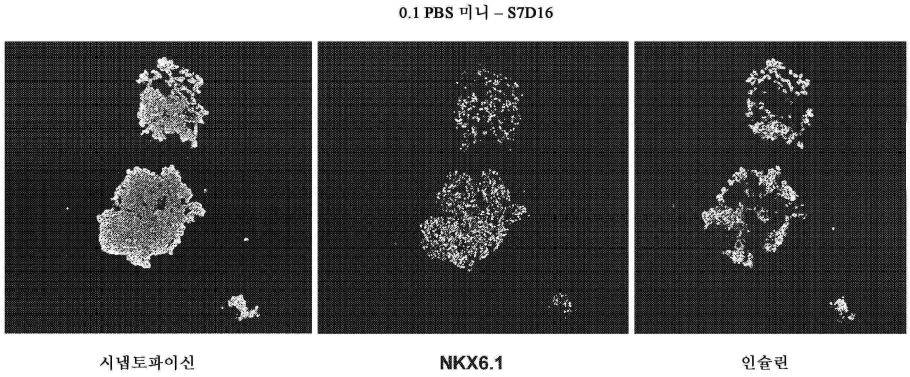
도면10w



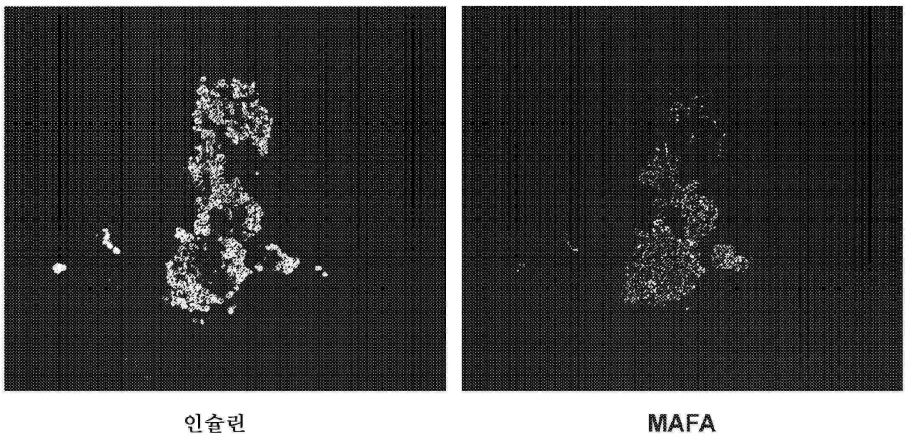
도면10x



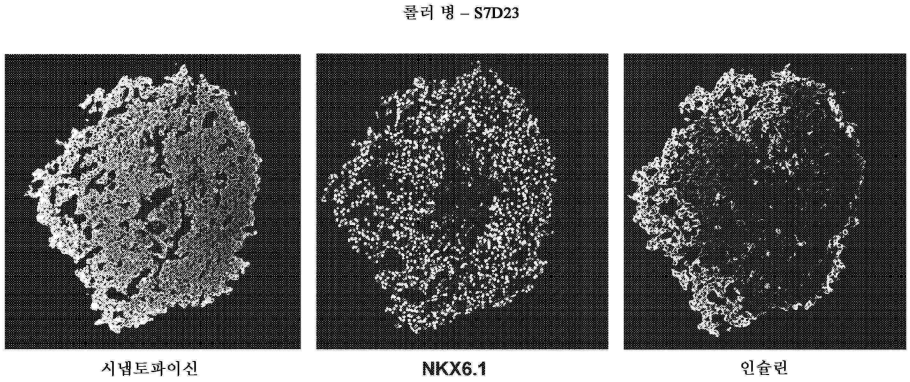
도면10y



도면10z



도면10aa



도면10ab

