

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2020년 12월 24일 (24.12.2020) WIPO | PCT

WO 2020/256162 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/0793 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/007266
- (22) 국제출원일: 2019년 6월 17일 (17.06.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2019-0071402 2019년 6월 17일 (17.06.2019) KR
- (71) 출원인: (주)넥셀 (NEXEL CO.,LTD.) [KR/KR]; 02580 서울시 동대문구 왕산로 21, 9층, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김동규 (KIM, Dongkyu); 07215 서울시 영등포구 당산로42길 13, 102동 903호, Seoul (KR). 조건식 (CHO, Gunsik); 02150 서울시 중랑구 망우로 346, 102동 1305호, Seoul (KR). 김수빈 (KIM, Subin); 04904 서울시 광진구 능동로57길 30-6, 203호, Seoul (KR). 우동훈 (WOO, Donghun); 02749 서울시 성북구 오혜산로16가길 40, 102동 406호, Seoul (KR). 한충성 (HAN, Choongseong); 07671 서울시 강서구 등촌로 163, 101동 1301호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이재만 (LEE, Jaeman); 08390 서울시 구로구 디지털로 26길 111, 405호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR DIFFERENTIATION FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL TO GLUTAMATERGIC NEURON BY USING INHIBITOR OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR, AND GLUTAMATERGIC NEURON ESTABLISHED THEREBY

(54) 발명의 명칭: 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법 및 이를 통해 마련된 글루타메이트성 신경세포

(57) Abstract: The present invention relates to a method for differentiation from a human pluripotent stem cell to a glutamatergic neuron by using an inhibitor of an insulin-like growth factor receptor, and a glutamatergic neuron produced thereby, the method comprising: step A of culturing a human pluripotent stem cell (hPSC) in a neuroectoderm differentiation-inducing medium containing N2 and B27 to induce differentiation to neuroectoderm; step B of culturing the neuroectoderm which has differentiated by the induction in step A in a neural progenitor cell differentiation-inducing medium to induce differentiation to a neural progenitor cell; and step C of culturing the neural progenitor cell which has differentiated by the induction in step B in a glutamatergic neuron differentiation-inducing medium to induce differentiation to a glutamatergic neuron, wherein step A is a step in which the neuroectoderm differentiation-inducing medium where the human pluripotent stem cell (hPSC) is cultured to induce differentiation to neuroectoderm is additionally treated with an inhibitor of the BMP signaling pathway, an inhibitor of the TGFβ signaling pathway, and an inhibitor insulin-like growth factor receptor (IGFIR).

(57) 요약서: 본 발명은 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법 및 이를 통해 생성된 글루타메이트성 신경세포에 관한 것으로, 인간 전분화능 줄기세포(hPSC, human Pluripotent Stem Cell)를 N2 및 B27이 포함된 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경외배엽 세포(Neuroectoderm)로 분화 유도시키는 A 단계; 상기 A 단계를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경전구세포(Neural Progenitor cell)로 분화 유도시키는 B 단계; 및 상기 B 단계를 통해 분화 유도된 신경전구세포를 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 간 글루타메이트성 신경세포(Glutamatergic neuron)로 분화 유도시키는 C 단계; 를 포함하며, 상기 A 단계는 신경외배엽세포로의 분화 유도를 위해 인간 전분화능 줄기세포(hPSC)가 배양되는 신경외배엽 유도용 배지에 BMP 신호전달체계의 억제제, TGFβ 신호전달체계의 억제제 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGFIR)의 억제제를 추가 처리하는 단계이다.



WO 2020/256162 A2

명세서

발명의 명칭: 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법 및 이를 통해 마련된 글루타메이트성 신경세포 기술분야

[1] 본 발명은 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용하여 인간 전분화능 줄기세포로부터 신속하게 글루타메이트성 신경세포를 마련하기 위한 기술에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 인간 전분화능 줄기세포(hPSC, human Pluripotent Stem Cell)는 자가증식과 분화의 특성을 갖춘 줄기세포 중 생체의 거의 모든 조직으로 분화가 가능한 분화능을 지닌 줄기세포에 해당한다.

[4] 이러한 인간 전분화능 줄기세포는 안정적으로 대량 배양이 가능하기 때문에 재생의학, 질병의 기전연구 등을 비롯한 다양한 분야에 적용 가능한데, 특히 용이한 수득이 어려운 인간 유래 조직 및 이를 이용한 여구에 대체제로서 큰 가치를 지니고 있다.

[5] 그 중에서도, 가장 접근이 어려운 조직 중 하나인 인간의 뇌 조직과 관련한 신경세포의 경우, 대체 방안으로 인간 전분화능 줄기세포를 이용해 대량 생산 가능한 인간 신경세포를 통해 다양한 동물 모델을 이용한 연구가 가능해진다.

[6] 이에 따라, 최근에는 인간 전분화능 줄기세포를 이용한 인간 신경세포의 분화 방법 및 해당 방법을 통한 수율 향상을 위한 다양한 연구들이 진행되고 있으며, 구체적인 보고예로 Nat Biotechnol. 2009 Mar; 27(3):275-80, Nat Protoc. 2012 Oct;7(10):1836-46 등이 공개되어 있다.

[7] 또한, 인간 전분화능 줄기세포를 이용한 인간 신경세포의 분화 방법의 기술적 개선과 관련하여 마련된 종래기술에 대한 선행문헌에는 대한민국 등록특허공보 제10-1182758호의 "아가로스 겔을 이용한 신경줄기세포의 분화 방법"(이하, '종래기술'이라고 함)이 있다.

[8] 하지만, 종래기술을 비롯한 기존의 인간 전분화능 줄기세포를 이용한 인간 신경세포의 분화 방법의 경우 수율의 고도화를 제공하기 위한 기술을 적용하더라도 전체 분화의 유도를 통해 인간 전분화능 줄기세포 유래 신경세포를 수득함에 소요되는 기간이 평균 30일에 해당되어 오랜 기간이 걸린다는 한계점이 존재하였다.

[9] 이에 따라, 현재 종래기술을 비롯한 기존의 인간 전분화능 줄기세포를 이용한 인간 신경세포의 분화 방법보다 더 빠른 기간 내에 고수율의 기능성 신경세포를 수득할 수 있는 분화 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[10]

발명의 상세한 설명**기술적 과제**

[11] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 창작된 것으로서, 본 발명의 목적은 인간 전분화능 줄기세포로부터 신속하게 글루타메이트성 신경세포를 마련할 수 있는 분화 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[12] 상기 목적을 달성하기 위하여 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법은, 인간 전분화능 줄기세포(hPSC, human Pluripotent Stem Cell)를 N2 및 B27이 포함된 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경외배엽 세포(Neuroectoderm)로 분화 유도시키는 A단계; 상기 A단계를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경전구세포(Neural Progenitor cell)로 분화 유도시키는 B단계; 및 상기 B단계를 통해 분화 유도된 신경전구세포를 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 간 글루타메이트성 신경세포(Glutamatergic neuron)로 분화 유도시키는 C단계;를 포함하며, 상기 A단계는 신경외배엽세포로의 분화 유도를 위해 인간 전분화능 줄기세포(hPSC)가 배양되는 신경외배엽 유도용 배지에 BMP 신호전달체계의 억제제, TGF β 신호전달체계의 억제제 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제를 추가 처리하는 단계이다.

[13] 여기서, 상기 A단계는 N2 및 B27이 포함된 DMEM/F12 배지에 BMP 신호전달체계의 억제제 150nM 내지 250nM, TGF β 신호전달체계의 억제제 5 μ M 내지 15 μ M 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제 500nM 내지 1000nM가 추가 처리된 상기 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 인간 전분화능 줄기세포를 6일 동안 배양하여 신경외배엽 세포로 분화 유도시키는 단계일 수 있다.

[14] 또한, 상기 신경외배엽 분화 유도용 배지는 DMEM/F12 배양액 50ml를 기준으로 N2를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고, B27를 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함할 수 있다.

[15] 그리고 상기 B단계는 DMEM/F12 배양액 25ml와 Neurobasal 배양액 25ml로 혼합된 배양액을 기준으로 N2를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고, B27을 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함하는 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 상기 A단계를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 7일 동안 배양하여 신경전구세포로 분화 유도시키는 단계일 수 있다.

[16] 또한, 상기 C단계는, 배지에 Poly-L-Ornithine 및 Laminin을 코팅 처리한 뒤, 상기 B단계를 통해 분화 유도된 신경전구세포를 5 \times 10⁴ Cells/cm²의 농도로 접종시키는 C-1단계; 상기 C-1단계를 통해 코팅 처리 및 신경전구세포의 접종이

완료된 배지에 Neurobasal 배양액 50ml 및 B27 0.5ml 내지 1.5ml을 포함시키며, BDNF 5ng/ml 내지 15ng/ml, GDNF 5ng/ml 내지 15ng/ml 및 아스코르브산(scorbic acid) 180 μ M 내지 220 μ M이 추가 처리되도록 하여 상기 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지를 마련하는 C-2단계; 상기 C-2단계를 통해 마련된 상기 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에서 상기 C-1단계를 통해 접종된 신경전구세포를 7일 이상 배양하여 글루타메이트성 신경세포로 분화 유도시키는 C-3단계;를 포함할 수 있다.

- [17] 한편, 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 글루타메이트성 신경세포는 앞서 설명된 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법을 통해 마련된다.

[18]

발명의 효과

- [19] 본 발명에 의하면 다음과 같은 효과가 있다.
- [20] 첫째, 인간 전분화능 줄기세포로부터 신경외배엽 세포로의 분화 유도가 종래와 비교해 빠른 기간 내에 이루어질 수 있다.
- [21] 둘째, 최종적으로 수득되는 글루타메이트성 신경세포의 배양 및 분화 속도를 빠르게 하여 종래에 비해 신속한 분화작업이 이루어질 수 있다.
- [22] 셋째, 인간 전분화능 줄기세포 유래 글루타메이트성 신경세포를 인간 뇌 조직의 관련 질병 기전연구의 대체 모델로서 이용함에 더욱 효율성을 극대화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도1은 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 관한 순서도이다.
- [24] 도2는 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제의 적용 여부에 따른 신경외배엽 세포들의 특이적 유전자별 발현양상을 비교한 그래프이다.
- [25] 도3은 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제의 적용 시 신경외배엽 세포의 특이적 유전자별 발현양상을 날짜에 따라 비교한 그래프이다.
- [26] 도4는 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제의 적용 여부에 따른 신경외배엽 세포들의 후속분화과정을 관찰 비교한 사진이다.
- [27] 도5는 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법을 통해 수득된 글루타메이트성 신경세포의 특성 확인을 위한 면역염색실험 결과이다.
- [28] 도6은 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법을 통해 수득된 글루타메이트성 신경세포의 TUBB3의 발현비율을 확인한 결과 그래프이다.

- [29] 도7은 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법을 통해 수득된 글루타메이트성 신경세포의 전기적 활성을 측정 분석한 결과이다.
- [30] 도8은 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법을 통해 수득된 글루타메이트성 신경세포와 종래의 분화방법을 통해 수득된 글루타메이트성 신경세포 간의 유전자 발현 양상을 비교 분석한 결과 그래프이다.

[31]

발명의 실시를 위한 형태

- [32] 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 첨부된 도면을 참조하여 더 구체적으로 설명하되, 이미 주지된 기술적 부분에 대해서는 설명의 간결함을 위해 생략하거나 압축하기로 한다.

[33] **1. 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 관한 설명**

- [34] 본 발명에 따른 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법이 어떠한 과정으로 이루어지는지에 대해 이하에서 도1을 참조하여 상세하게 설명한다.

[35] **(1) 신경외배엽 세포 분화 유도단계<S100>**

- [36] 본 단계(S100)에서는 인간 전분화능 줄기세포(hPSC, human Pluripotent Stem Cell)를 N2 및 B27이 포함된 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경외배엽 세포(Neuroectoderm)로 분화 유도시키는 과정이 이루어진다.

- [37] 여기서, 신경외배엽 세포 분화 단계(S100)는 신경외배엽세포로의 분화 유도를 위해 인간 전분화능 줄기세포(hPSC)가 배양되는 신경외배엽 유도용 배지에 BMP 신호전달체계의 억제제(LDN193189), TGF β 신호전달체계의 억제제(SB431542) 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)를 추가 처리하는 것을 가장 큰 특징으로 삼고 있다.

- [38] 더욱 구체적으로, 신경외배엽 세포 분화 단계(S100)는 N2(Thermo Fisher사 제품) 및 B27(Thermo Fisher사 제품)이 포함된 DMEM/F12 배지(Hyclone사 제품)에 BMP 신호전달체계의 억제제 150nM 내지 250nM, TGF β 신호전달체계의 억제제 5 μ M 내지 15 μ M 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제 500nM 내지 1000nM가 추가 처리된 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 인간 전분화능 줄기세포를 6일 동안 배양하여 신경외배엽 세포로 분화 유도시킨다.

- [39] 아울러, N2 및 B27이 포함된 DMEM/F12 배지(Hyclone사 제품)에 해당하는 신경외배엽 분화 유도용 배지는 DMEM/F12 배양액 50ml를 기준으로 N2를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고, B27를 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함이 바람직하다.

- [40] 결과적으로, 신경외배엽 분화 유도용 배지는 DMEM/F12 배양액 50ml를

기준으로 N2를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고, B27를 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함된 상태에, BMP 신호전달체계의 억제제 150nM 내지 250nM, TGFβ 신호전달체계의 억제제 5μM 내지 15μM 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제 500nM 내지 1000nM이 추가 처리된 후, 인간 전분화능 줄기세포(hPSC)가 배양될 경우 6일만에 신경외배엽 세포로 분화 유도가 진행된다.

- [41] 가장 바람직하게는 신경외배엽 분화 유도용 배지가 DMEM/F12 배양액 50ml를 기준으로 N2를 0.5ml의 부피로 포함하고, B27를 1.0ml의 부피로 포함된 상태에, BMP 신호전달체계의 억제제 200nM, TGFβ 신호전달체계의 억제제 10μM 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제 500nM이 추가 처리되어 마련된다.
- [42] 또한, DMEM/F12 배지(Hyclone사 제품) 내 신경외배엽 세포 분화 유도를 위한 배양은 CO₂ 5%의 호흡환경, 37°C의 온도환경 내에서 진행될 수 있으나, 이에 한정되지는 아니한다.
- [43] 이와 관련해, 신경외배엽 세포의 분화를 위해 마련되는 DMEM/F12 배지(Hyclone사 제품)에 첨가되는 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)는 500nM 내지 1000nM의 농도 조건을 갖춤이 바람직한데, 이는 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)가 500nM 미만의 농도를 갖출 경우 신경외배엽 세포로의 분화 유도에 의해 발현되어야 하는 특정 유전자의 발현 수준이 현저히 낮게 측정되며 신경외배엽 세포로의 분화 유도에 더욱 많은 시간이 소요되어 종래와 큰 차이를 보이지 못하며, 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)가 1000nM을 초과한 농도를 갖출 경우 분화 유도과정에서 세포가 생존하지 못하거나, 추후 진행될 신경전구세포로의 분화 유도 과정에 기능상 부정적 영향을 끼치는 문제점이 발생하기 때문이다.
- [44] 구체적으로, 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)의 추가 처리는 신경외배엽 분화 유도 기간의 단축에 가장 중요한 역할로 작용하게 되는데, 인간 전분화능 세포가 다양한 세포로의 분화능력과 함께 지니고 있는 높은 수준의 자가재생능력(Self-Renewal)을 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)가 효과적으로 억제하기 때문이다.

[45]

[46] (2) 신경전구세포 분화 유도단계<S200>

[47] 본 단계(S200)에서는 신경외배엽 세포 분화 단계(S100)를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경전구세포(Neural Progenitor cell)로 분화 유도시키는 과정이 이루어진다.

[48] 여기서, 신경전구세포 분화 유도단계(S200)는 DMEM/F12 배양액(Hyclone사 제품) 25ml와 Neurobasal 배양액(Thermo Fisher사 제품) 25ml로 혼합된 배양액을 기준으로 N2(Thermo Fisher사 제품)를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고,

B27(Thermo Fisher사 제품)을 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함하는 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 신경외배엽 세포 분화 단계(S100)를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 7일 동안 배양하여 신경전구세포로 분화 유도시킨다.

[49] 또한, 신경전구세포 분화 유도용 배지 내 신경전구세포 분화 유도를 위한 배양은 CO₂ 5%의 호흡환경, 37°C의 온도환경 내에서 진행될 수 있으나, 이에 한정되지는 아니한다.

[50] 가장 바람직하게는 신경전구세포 분화 유도용 배지가 DMEM/F12 배양액 25ml와 Neurobasal 배양액 25ml를 기준으로 N2를 0.5ml의 부피로 포함하고, B27를 1.0ml의 부피로 포함된 상태로 마련된다.

[51]

[52] (3) 글루타메이트성 신경세포 분화 유도단계<S300>

[53] 본 단계(S300)에서는 신경전구세포 분화 유도단계(S200)를 통해 분화 유도된 간 신경전구세포를 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 간 글루타메이트성 신경세포(Glutamatergic neuron)로 분화 유도시키는 과정이 이루어진다.

[54] 여기서, 글루타메이트성 신경세포 분화 유도 단계(S130)는 우선적으로 배지에 Poly-L-Ornithine 및 Laminin을 코팅 처리한 뒤, 신경전구세포 분화 유도단계(S200)를 통해 분화 유도된 신경전구세포를 5×10⁴ Cells/cm²의 농도로 접종시키는 과정이 진행된다.

[55] 다음으로, 배지 내 Poly-L-Ornithine(Sigma 제품) 및 Laminin(Sigma 제품)의 코팅처리 및 신경전구세포의 접종이 완료된 배지에 Neurobasal 배양액(Thermo Fisher 제품) 50ml 및 B27 0.5ml 내지 1.5ml을 포함시키며, BDNF(Peprotech 제품) 5ng/ml 내지 15ng/ml, GDNF(Peprotech 제품) 5ng/ml 내지 15ng/ml 및 아스코르브산(scorbic acid, Peprotech 제품) 180μM 내지 220μM이 추가 처리되도록 하여 상기 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지를 마련한다.

[56] 가장 바람직하게는, 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지가 Neurobasal 배양액(Thermo Fisher사 제품) 50ml를 기준으로 B27 1.0ml을 포함하며, BDNF(Peprotech 제품) 10ng/ml, GDNF(Peprotech 제품) 10ng/ml 및 아스코르브산(scorbic acid, Peprotech 제품) 200μM가 추가 처리된 상태로 마련된다.

[57] 또한, 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지 내 글루타메이트성 신경세포 분화 유도를 위한 배양은 CO₂ 5%의 호흡환경, 37°C의 온도환경 내에서 진행될 수 있으나, 이에 한정되지는 아니한다.

[58] 최종적으로, 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에 접종된 신경전구세포는 7일 이상 배양되어 글루타메이트성 신경세포로 분화 유도된다.

[59] 이와 같은 일련의 과정을 통해 종래에 비해 빠른 속도로 글루타메이트성 신경세포를 마련할 수 있으며, 이를 대체 모델로 하여 진행되는 각종 뇌 조직 및 신경세포 관련 연구들의 진행은 더욱 높은 수준의 고효율을 갖출 수 있게 된다.

[60]

[61] 2. 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포의 분화 유도속도의 비교 및 기능성 확인 실험에 관한 설명

[62] 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포와 관련하여 아래에서는 다양한 실험들을 통해 방법적 특징의 도출 과정 및 분화 유도속도 향상의 비교 및 정도를 설명하고, 더 나아가 이와 같이 빠른 속도로 분화 유도된 신경세포의 기능성의 온전함을 확인하고자 하였으며, 당업계의 기술자들에게 자명한 수단에 의한 성질 등을 정의하기 위한 목적으로 하기 실험 방법들을 이용하였다.

[63] 참고로, 아래 설명될 실험의 결과는 평균±표준오차(means±SEM)로 나타내었다. 통계학적인 유의성은 Student's t test를 사용하였으며, $p < 0.05$ 에 해당할 경우 유의하다고 판단하였다.

[64]

[65] (1) 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제의 적용 여부에 따른 신경외배엽 세포의 특이적 유전자 발현 양상 비교 실험

[66] 앞서 설명한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법 내 각 단계들 중 신경외배엽 세포 분화 단계(S100)의 결과 분화 유도되는 신경외배엽 세포와 관련한 특이적 발현 유전자들(PAX6, NESTIN, SOX1)의 mRNA 발현양상을 종래의 분화방법에 의해 분화 유도된 신경외배엽세포와 비교하였고, 해당 결과는 도2에 도시된 바와 같다.

[67] 우선, 해당 실험에 이용된 시험군은 신경외배엽 분화 유도용 배지가 DMEM/F12 배양액 50ml를 기준으로 N2를 0.5ml의 부피로 포함하고, B27를 1.0ml의 부피로 포함된 상태의 조건 및 배양 조건은 동일하고, 시험군 별 추가 처리되는 물질의 차이는 아래와 같다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

[68] - 시험군1: LDN193189 200nM+ SB431542 10 μ M (LSB로 명칭)

[69] - 시험군2: GSK1838705A 100nM

[70] - 시험군3: GSK1838705A 200nM

[71] - 시험군4: GSK1838705A 500nM

[72] - 시험군5: GSK1838705A 1000nM

[73] - 시험군6: LSB + GSK1838705A 100nM

[74] - 시험군7: LSB + GSK1838705A 200nM

[75] - 시험군8: LSB + GSK1838705A 500nM

[76] - 시험군9: LSB + GSK1838705A 1000nM

[77]

[78] 다음으로, 형성된 시험군을 이용해 9일 동안 분화 유도를 진행하고 분화된

세포와 관련한 특이적 발현 유전자들(PAX6, NESTIN, SOX1)의 mRNA level을 realtime PCR로 분석해본 결과, 도2에 도시된 바와 같았다.

[79] 구체적으로, 도2는 기존의 신경외배엽 분화유도 방식인 시험군1(LDN193189 + SB431542)을 기준으로 값들을 정리하여 그래프화하였으며, 그 결과, GSK1838705A의 단독 처리가 이루어진 시험군2 내지 시험군5는 신경외배엽 세포의 분화 유도가 원활하지 않지만, LDN+SB와 혼합처리된 시험군6 내지 시험군9는 좋은 시너지를 낸다는 것을 확인할 수 있었다.

[80] 특히, 시험군6 내지 시험군9의 경우, 도2에 도시된 바와 같이 SOX1이 높은 발현을 보였는데, SOX1은 초기 신경외배엽에는 발현하지 않다가 후기에 발현하는 유전자로 신경외배엽의 발달단계를 알 수 있는 중요한 유전자이다.

[81] 즉, 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)를 BMP 신호전달체계의 억제제(LDN193189) 및 TGF β 신호전달체계의 억제제(SB431542)와 함께 추가 처리 할 경우, 신경외배엽 세포로의 분화유도가 좀 더 빠르게 진행된다는 것을 확인할 수 있었다.

[82] 더 나아가, 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)를 BMP 신호전달체계의 억제제(LDN193189) 및 TGF β 신호전달체계의 억제제(SB431542)와 함께 추가 처리 할 경우를 전제로, 배양시점을 다양하게 하여 분화 유도되는 신경외배엽 세포와 관련한 특이적 발현 유전자들(PAX6, NESTIN, SOX1)의 mRNA 발현양상을 종래의 분화방법에 의해 분화 유도된 신경외배엽세포와 비교하였고, 해당 결과는 도3에 도시된 바와 같다.

[83] 구체적으로 분화유도 후 3일, 6일, 9일째 되는 날 세포를 수득해, mRNA 레벨을 확인해 보았다.

[84] 우선, 해당 실험에 이용된 시험군은 신경외배엽 분화 유도용 배지가 DMEM/F12 배양액 50ml를 기준으로 N2를 0.5ml의 부피로 포함하고, B27를 1.0ml의 부피로 포함된 상태의 조건 및 배양 조건은 동일하고, 시험군 별 추가 처리되는 물질의 차이는 아래와 같다. (*p < 0.05, **p < 0.01)

[85] - Stem cell: 분화유도 되기 전의 상태

[86] - 시험군10: LDN193189 200nM+ SB431542 10 μ M (LSB로 명칭)

[87] - 시험군11: LSB 처리 + GSK1838705A 500nM

[88] - 시험군12: LSB 처리 + GSK1838705A 1000nM

[89]

[90] 다음으로, 형성된 시험군을 이용해 3일, 6일, 9일 동안 분화 유도를 진행하고 분화된 세포와 관련한 특이적 발현 유전자들(PAX6, NESTIN, SOX1)의 mRNA level을 realtime PCR로 분석해본 결과, 도3에 도시된 바와 같았다.

[91] 여기서, 결과 값은 9일차 시험군10 (기존의 신경외배엽 분화유도 방식)을 기준으로 정리하여 그래프화 하였다.

[92] 그 결과, 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)를 처리한 시험군11 및 시험군12에서 전반적으로 높은 유전자발현을

보여주었는데, 특히 PAX6 유전자의 경우, 3일차 시험군11 및 시험군12의 값이 9일차 시험군10과 대등한 유전자 발현을 보이며 3일째부터 이미 높은 발현 수준을 보이고 있다.

[93] 더욱이, NESTIN 유전자도 마찬가지로 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)를 처리한 시험군11 및 시험군12는 3일차에 이미 9일차 시험군 10보다 높은 유전자 발현을 보여주었다.

[94] 아울러, SOX1 유전자의 경우도 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)를 처리한 시험군11 및 시험군12는 6일차에 9일차 시험군10 보다 높은 유전자 발현을 보여주며, 시험군11 및 시험군12이 9일째에 다 다르면 10배 이상의 높은 발현을 보여주고 있었다.

[95] 즉, 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제(GSK1838705A)의 처리가 신경외배엽 세포에 중요한 유전자들의 높은 발현을 3일 내지 6일의 빠른 시일 내에 유도한다는 것을 확인하였다.

[96]

[97] (2) 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제의 적용 여부에 따른 신경외배엽 세포의 후속분화과정의 비교 실험

[98] 앞서 설명한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법 내 각 단계들 중 신경외배엽 세포 분화 단계(S100)의 결과 분화 유도되는 신경외배엽 세포와 종래의 분화방법에 의해 분화 유도된 신경외배엽세포의 분화 시점 별 세포분화 형태를 관찰하여 비교하였으며, 해당 결과는 도4에 도시된 바와 같다.

[99] 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제(GSK1838705A)를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화 유도가 진행된 신경외배엽 세포는 9일째에 이미 도4에 도시된 바와 같이 Primitive rosette 구조(화살표)를 가지고 있는데 반해, 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 적용하지 않은 경우(LDN+SB)에는 Primitive rosette 의 구조가 불분명한 상태로 확인되었다.

[100] 더욱이, 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제(GSK1838705A)를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화 유도가 진행된 신경외배엽 세포가 13일째가 되어서는 도4에 도시된 바와 같이 신경발달 후기에 관찰되는 Definitive rosette(화살표머리)의 구조가 다수 발견된다는 것을 확인할 수 있었다.

[101] 또한, 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제(GSK1838705A)를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화 유도가 진행된 신경외배엽 세포가 20일째가 되어서는 도4에 도시된 바와 같이 최종 분화되어 대부분의 세포가 신경세포의 전형적인 모습(세포 중앙(핵)에서부터 길게 뻗어 나온 신경돌기 구조)을 보여주고 있는데 반해, 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 적용하지 않은 경우(LDN+SB)에는

다른 모양의 세포가 다수 섞여 있음을 확인할 수 있었다.

- [102] 다시 말해, 최종분화로 진행해 보았을 때도, 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제(GSK1838705A)를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화 유도 시 진행될 경우 최종 수득되는 신경세포가 높은 순도(다른 세포의 섞임이 없이 균일한 신경세포 형태)를 갖춤을 알 수 있다.

[103]

- [104] (3) 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포의 특성 분석 실험

- [105] 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포의 세포학적 특성이 제대로 갖춰진 온전한 상태인지를 확인하기 위해, 글루타메이트성 신경세포가 발현한다고 알려진 TUBB3, SYP, 그리고 vGLUT1을 잘 발현하고 있음을 형광면역염색법으로 확인하였으며, 해당 결과는 도5에 도시된 바와 같다.

- [106] 도5의 결과는 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 신경세포가 정말 글루타메이트성 신경세포인지를 확인한 결과로서, 대부분의 세포가 TUBB3, SYP, 그리고 vGLUT1 유전자에 대한 강한 발현 강도를 보여줌을 알 수 있었으며, DAPI 약물은 세포핵을 염색하기 위해 사용하였다.

- [107] 더 나아가, 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 신경세포의 순도를 확인 하였으며, 해당 결과는 도6에 도시된 바와 같이 95% 이상으로 높았다.

- [108] 구체적으로, 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 신경세포를 FACS 분석을 통해 성숙한 신경세포의 유전자인 TUBB3의 발현 비율을 확인해 보았고, 그 결과 96%가 넘는 높은 순도의 세포임을 검증하였다.

- [109] 마지막으로, Micro Electrodearray (MEA, Axion Biosystems) 실험을 통해 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 신경세포가 높은 활성을 보여주고 있다는 것을 확인하여 세포학적 특성이 기능적으로도 성숙한 상태임을 확인하였다.

- [110] 구체적으로, 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 신경세포의 전기적 활성을 측정해보기 위해 Microelectrode array (MEA, Axion Biosystems) 장비를 이용해 spike rate 활성을 분석해 보았으며, 해당 결과는 도7에

도시된 바와 같다.

[111] 도7에 도시된 바와 같이, 하얀색 점들은 각각 하나의 전극을 의미하는데, 본 전극 위에 분화유도과정이 완료된 글루타메이트성 신경세포가 접촉하고 있는 상황이며, 신경세포에서 생성된 전기적 신호는 전극을 통해 전해져 강도에 따라 다른 색으로 변환되어 나타남. 실험결과에서도 확인할 수 있듯이, 대부분의 전극에서 초당 5번 이상의 강한 전기적 신호가 나타나고 있었으며, 이는 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제(GSK1838705A)를 이용해 분화 유도시킨 글루타메이트성 신경세포가 기능적으로도 성숙하다는 것을 의미한다.

[112]

[113] (4) 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제의 적용 여부에 따른 글루타메이트성 신경세포의 특이적 유전자 발현 양상 비교 실험

[114] 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포와 종래의 분화방법에 의해 분화 유도된 글루타메이트성 신경세포의 특이적 유전자 발현 양상을 비교했으며, 해당 결과는 도8에 도시된 바와 같다.

[115] 도8에 도시된 바와 같이, 신경세포의 일반적인 유전자(MAP2, SYP, TUJ1)의 발현은 큰 차이가 없는데 반해, 신경세포의 성숙도를 나타내는 이온채널 유전자의 일부(KCND2, SCN1A, CACNA1B)에서 본 발명의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포가 종래에 비해 1.5 내지 2배 가량 높은 유전자 발현을 보여주었다.

[116] 즉, 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제(GSK1838705A)를 이용해 분화 유도시킨 글루타메이트성 신경세포에서 일부 성숙도의 개선이 관찰되었다는 것을 의미한다.

[117] 본 발명에 개시된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의해서 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 보호범위는 아래 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 인간 전분화능 줄기세포(hPSC, human Pluripotent Stem Cell)를 N2 및 B27이 포함된 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경외배엽 세포(Neuroectoderm)로 분화 유도시키는 A단계;
 상기 A단계를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 신경전구세포(Neural Progenitor cell)로 분화 유도시키는 B단계; 및
 상기 B단계를 통해 분화 유도된 신경전구세포를 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에서 배양하여 간 글루타메이트성 신경세포(Glutamatergic neuron)로 분화 유도시키는 C단계;를 포함하며, 상기 A단계는 신경외배엽 세포로의 분화 유도를 위해 인간 전분화능 줄기세포(hPSC)가 배양되는 신경외배엽 유도용 배지에 BMP 신호전달체계의 억제제, TGF β 신호전달체계의 억제제 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제를 추가 처리하는 단계인 것을 특징으로 하는
 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 A단계는 N2 및 B27이 포함된 DMEM/F12 배지에 BMP 신호전달체계의 억제제 150nM 내지 250nM, TGF β 신호전달체계의 억제제 5 μ M 내지 15 μ M 및 인슐린 유사 성장인자 수용체(IGF1R)의 억제제 500nM 내지 1000nM가 추가 처리된 상기 신경외배엽 분화 유도용 배지에서 인간 전분화능 줄기세포를 6일 동안 배양하여 신경외배엽 세포로 분화 유도시키는 단계인 것을 특징으로 하는
 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
 상기 신경외배엽 분화 유도용 배지는 DMEM/F12 배양액 50ml를 기준으로 N2를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고, B27를 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함하는 것을 특징으로 하는
 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 B단계는 DMEM/F12 배양액 25ml와 Neurobasal 배양액 25ml로 혼합된 배양액을 기준으로 N2를 0.4ml 내지 0.6ml의 부피로 포함하고, B27을 0.5ml 내지 1.5ml의 부피로 포함하는 신경전구세포 분화 유도용 배지에서 상기 A단계를 통해 분화 유도된 신경외배엽 세포를 7일 동안

배양하여 신경전구세포로 분화 유도시키는 단계인 것을 특징으로 하는 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법.

[청구항 5]

제1항에 있어서,

상기 C단계는,

배지에 Poly-L-Ornithine 및 Laminin을 코팅 처리한 뒤, 상기 B단계를 통해 분화 유도된 신경전구세포를 5×10^4 Cells/cm²의 농도로 접종시키는

C-1단계;

상기 C-1단계를 통해 코팅 처리 및 신경전구세포의 접종이 완료된 배지에 Neurobasal 배양액 50ml 및 B27 0.5ml 내지 1.5ml을 포함시키며, BDNF 5ng/ml 내지 15ng/ml, GDNF 5ng/ml 내지 15ng/ml 및 아스코르브산(scorbic acid) 180 μ M 내지 220 μ M이 추가 처리되도록 하여 상기 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지를 마련하는 C-2단계; 및

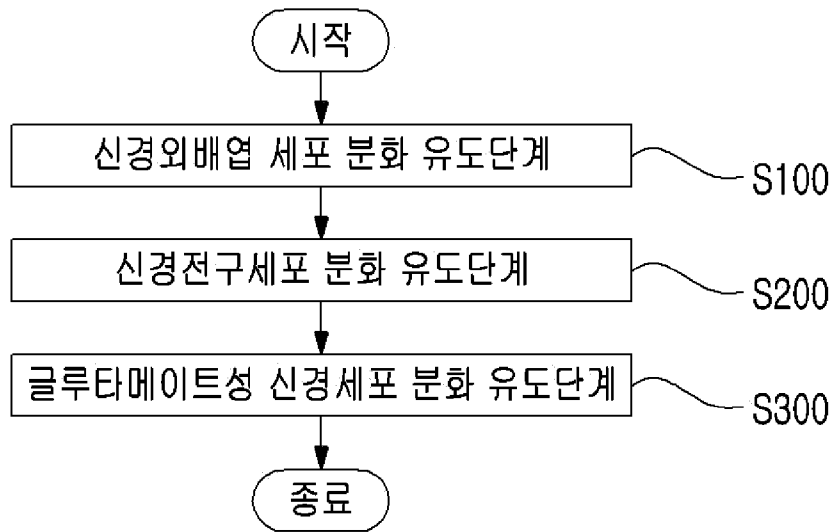
상기 C-2단계를 통해 마련된 상기 글루타메이트성 신경세포 분화 유도용 배지에서 상기 C-1단계를 통해 접종된 신경전구세포를 7일 이상 배양하여 글루타메이트성 신경세포로 분화 유도시키는 C-3단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는

인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법.

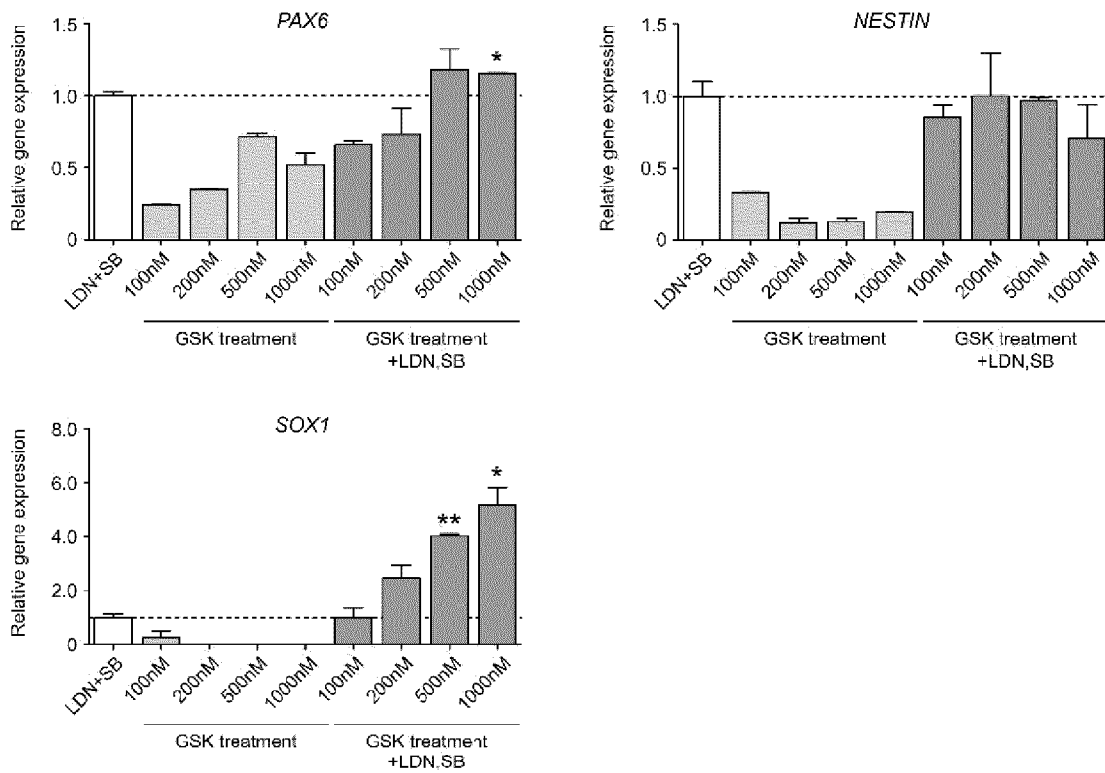
[청구항 6]

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 인슐린 유사 성장인자 수용체의 억제제를 이용한 인간 전분화능 줄기세포로부터의 글루타메이트성 신경세포 분화방법에 의해 분화된 글루타메이트성 신경세포.

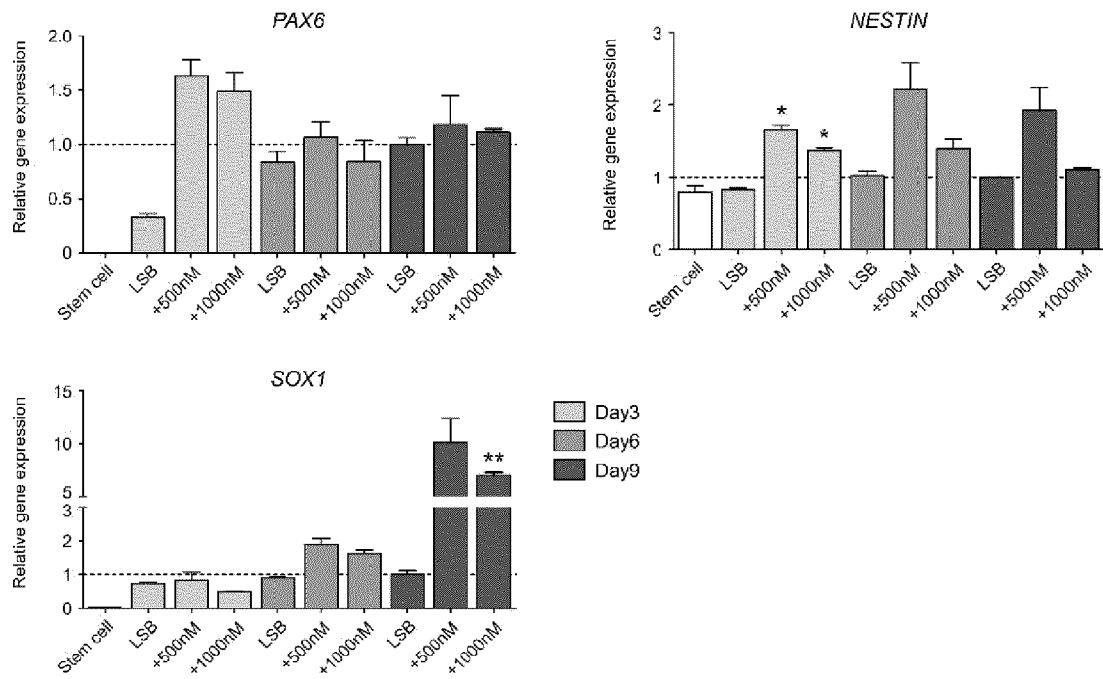
[도1]



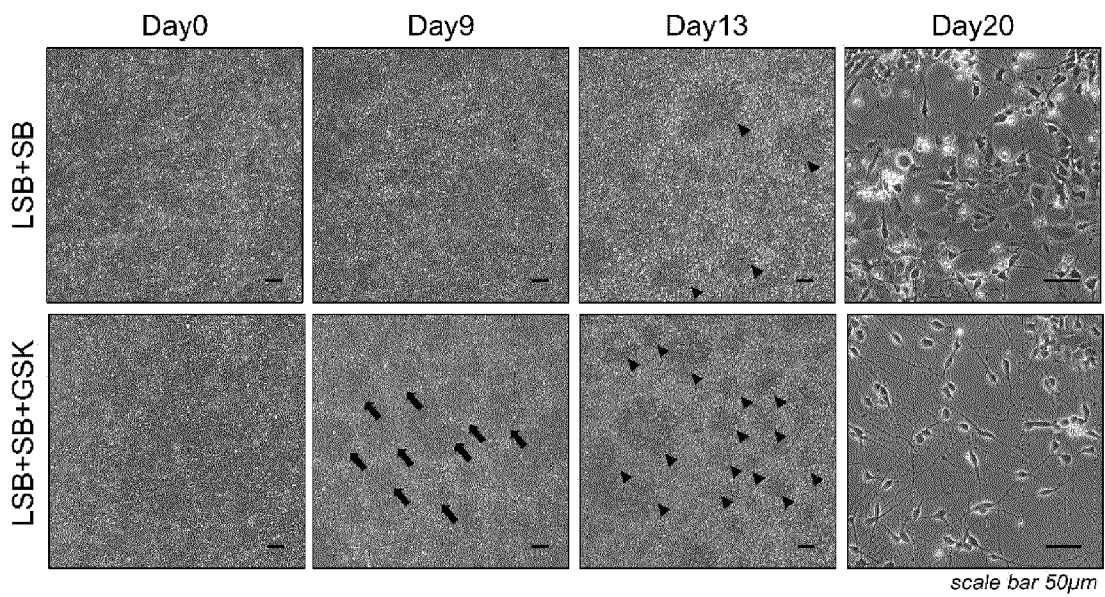
[도2]



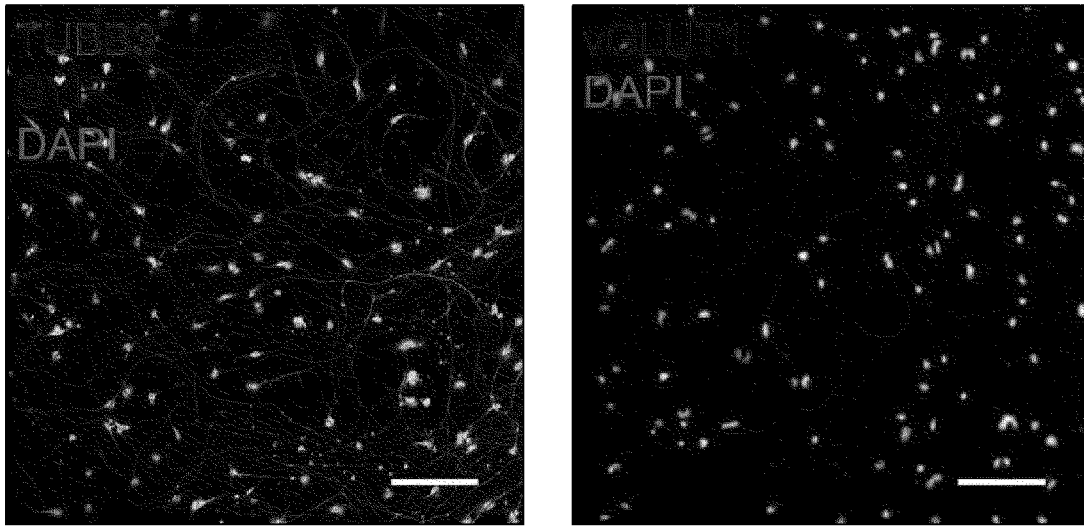
[도3]



[도4]

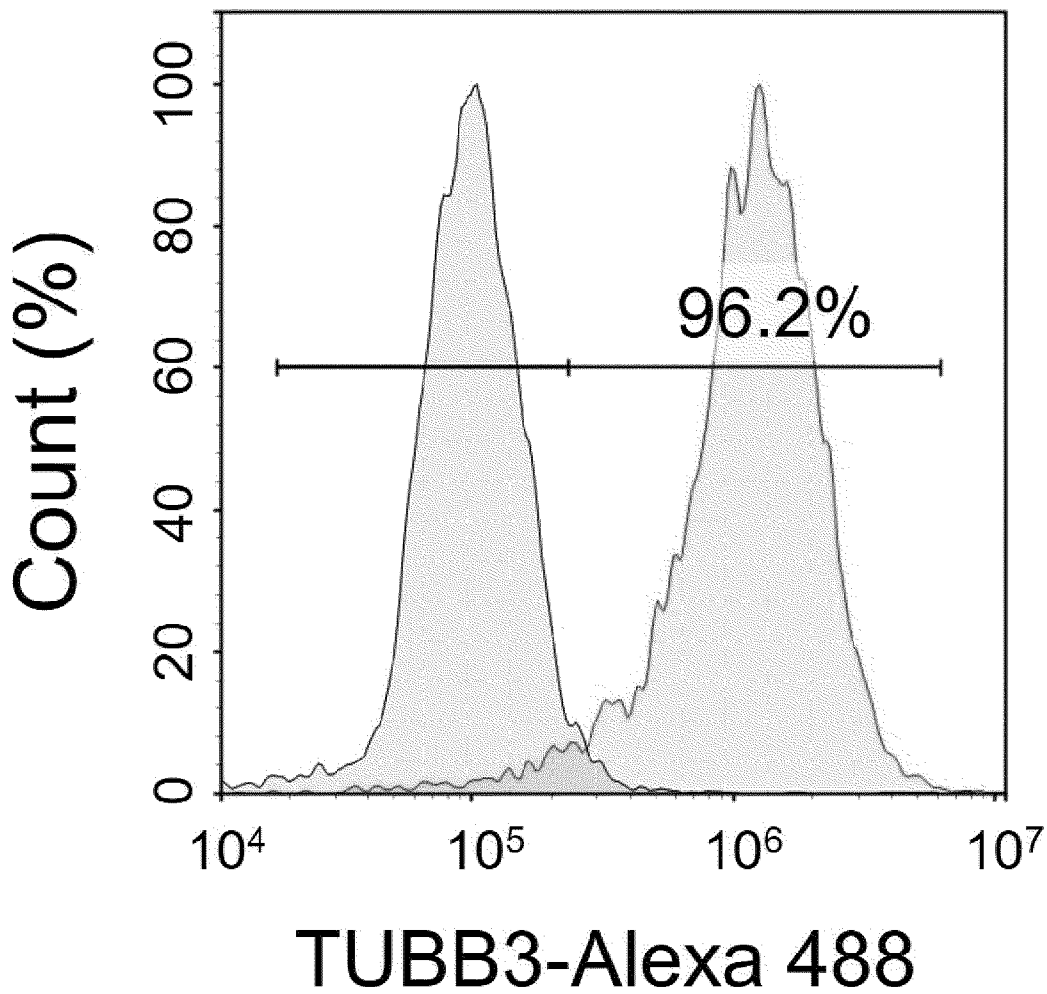


[도5]

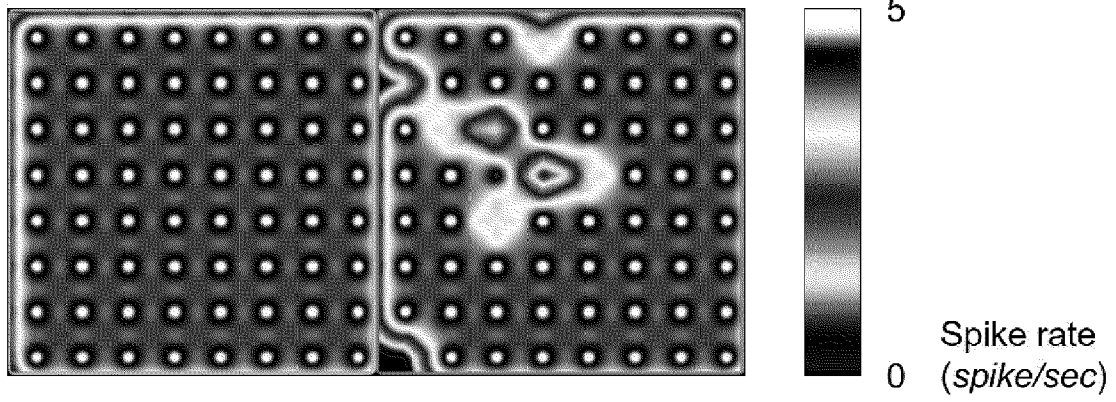


scale bar 50 μ m

[도6]



[도7]



[도8]

