



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월06일

(11) 등록번호 10-2162138

(24) 등록일자 2020년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/071 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0676 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7034809

(22) 출원일자(국제) 2015년05월07일

심사청구일자 2020년04월02일

(85) 번역문제출일자 2016년12월12일

(65) 공개번호 10-2017-0002630

(43) 공개일자 2017년01월06일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/029636

(87) 국제공개번호 WO 2015/175307

국제공개일자 2015년11월19일

(30) 우선권주장

61/994,259 2014년05월16일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02010051223 A1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

얀센 바이오테크 인코포레이티드

미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브  
800/850

(72) 발명자

레자니아 알리레자

미국 08869 뉴저지주 라리탄 루트 202 사우스  
1000

(74) 대리인

특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **췌장 내분비 세포에서 MAFA 발현을 향상시키기 위한 소분자의 용도****(57) 요약**

본 발명은 만능 줄기 세포(pluripotent stem cell)의 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포로의 분화를 촉진하기 위한 방법, 세포 배양물 및 분화 배지를 제공한다. 생성된 췌장 내분비 세포는 단일 호르몬성 인슐린 (single hormonal insulin), PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 하나 이상의 분화 단계에서, 배양은 배양 용기의 공기-액체 계면에서 수행될 수 있다.

(52) CPC특허분류

*C12N 2501/119* (2013.01)

*C12N 2501/40* (2013.01)

*C12N 2501/727* (2013.01)

*C12N 2501/999* (2013.01)

*C12N 2506/02* (2013.01)

*C12N 2506/22* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 분화된 만능 줄기 세포(pluripotent stem cell)의 집단 및 배지를 포함하는 시험관내(in vitro) 세포 배양물로서,

상기 분화된 세포의 10% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현하며, 상기 세포 집단은 RSK 저해제, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 또는 이들의 조합이 보충된 배지로 처리하여 수득된 것이며,

상기 시험관내 세포 배양물은 RSK 저해제, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 또는 이들의 조합이 보충된 배지를 포함하는,

시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 시험관내 세포 배양물이 RSK 저해제가 보충된 배지를 포함하는 것인, 시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, RSK 저해제가 RSK 저해제 II인, 시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 시험관내 세포 배양물이 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제가 보충된 배지를 포함하는 것인, 시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제가 EPZ-5676인, 시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 배지에 산화 방지제가 추가로 보충된, 시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 만능 세포가 인간 만능 세포인, 시험관내 세포 배양물.

#### 청구항 8

만능 세포를 배양하는 단계, RSK 저해제, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 또는 이들의 조합이 보충된 배지로 처리하여 상기 만능 세포를 더 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포로 분화시키는 단계를 포함하는, 만능 세포로부터 유래된 세포에서 MAFA 발현을 유도하는 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 배지에 RSK 저해제가 보충된, 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, RSK 키나제 저해제가 RSK 저해제 II인, 방법.

#### 청구항 11

제8항에 있어서, 배지가 항산화제를 추가로 포함하는, 방법.

#### 청구항 12

제8항에 있어서, 배지에 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제가 보충된, 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제가 EPZ-5676인, 방법.

#### 청구항 14

제8항에 있어서,

- (a) 만능 세포를 체장 내배엽/내분비 전구 세포로 분화시키는 단계;
- (b) 상기 체장 내배엽/내분비 전구 세포를 (i) SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, (ii) BMP 저해제, (iii) T3, T4, 이들의 유사체 또는 이들의 혼합물, 및 (iv) ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양하여 상기 체장 내배엽/내분비 전구 세포를 체장 내분비 세포로 분화시키는 단계; 및
- (c) 상기 체장 내분비 세포를 RSK 저해제, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 또는 이들의 조합이 보충된 배지로 처리하는 단계;

를 포함하는 방법.

#### 청구항 15

제8항에 있어서,

- (a) 인간 만능 줄기 세포를 (i) 액티빈 A 및 wnt3A 또는 (ii) GDF-8 및 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 중 어느 하나가 보충된 배지에서 배양하여 완성 내배엽 세포를 수득하는 단계;
- (b) 상기 완성 내배엽 세포를 체장 전장 전구 세포로 분화시키는 단계;
- (c) 상기 체장 전장 전구 세포를 체장 내배엽/내분비 전구 세포로 분화시키는 단계;
- (d) 상기 체장 내배엽/내분비 전구 세포를 (i) SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, (ii) BMP 저해제, (iii) T3, T4, 이들의 유사체 또는 이들의 혼합물, 및 (iv) ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양하여 상기 체장 내배엽/내분비 전구 세포를 체장 내분비 세포로 분화시키는 단계; 및
- (e) 상기 체장 내분비 세포를 RSK 저해제, 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 또는 이들의 조합이 보충된 배지로 처리하는 단계;

를 포함하는 방법.

#### 청구항 16

제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 만능 세포가 인간 세포인, 방법.

#### 청구항 17

제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 체장 내분비 세포가 단일 호르몬 인슐린, PDX1, NKX6.1 및 MAFA를 발현하는, 방법.

#### 청구항 18

제8항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 체장 내분비 세포를 현탁 배양 또는 공기-액체 계면에서 처리하는 것을 포함하는, 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

관련 출원과의 상호 참조

[0001]

[0002] 본 출원은, 모든 목적을 위하여 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 2014년 5월 16일자로 출원된 미국 가 특허 출원 제61/994,259호의 이익을 주장한다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 만능 줄기 세포(pluripotent stem cell)의 분화를 위한 방법, 및 이로부터 발생한 세포 및 집단에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 MAFA의 증가된 발현을 보이는 췌장 내분비 세포, 및 그러한 세포의 집단을 생성하기 위한 소정의 소분자의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

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

[0006] 척추동물 배아 발생에서, 만능 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. 이 과정에서 중간 단계는 완성 내배엽(definitive endoderm)의 형성이다.

[0007] 낭배형성 마지막까지, 내배엽은 내배엽의 전방, 중간 및 후방 영역을 독특하게 표시하는 인자들의 패널의 발현에 의해 인식될 수 있는 전방-후방 도메인(anterior-posterior domain)으로 나누어진다. 예를 들어, HHEX, 및 SOX2는 내배엽의 전방 영역을 확인해 주는 반면, CDX1, 2, 및 4는 후방 영역을 확인해 준다.

[0008] 내배엽 조직의 이주는, 내배엽이 상이한 중배엽 조직들과 아주 근접해지게 하며 이는 장관의 국지화를 돕는다. 이는 다수의 분비된 인자들, 예컨대 섬유아세포 성장 인자("FGF"), WNTs, 형질전환 성장 인자 베타("TGF- $\beta$ "), 레틴산, 및 골 형성 단백질("BMP") 리간드 및 이들의 길항제들에 의해 달성된다. 예를 들어, FGF4 및 BMP는 후장(hindgut) 내배엽에서의 CDX2 발현을 촉진하며 전방 유전자 HHEX 및 SOX2의 발현을 억제한다(문헌[2000 *Development*, 127:1563-1567]). 또한, WNT 신호전달(signaling)은, 후장 발생을 촉진하고 전장(foregut) 운명을 저해하도록 FGF 신호전달과 병행하여 작동하는 것으로 밝혀졌다(문헌[2007 *Development*, 134:2207-2217]). 마지막으로, 중간엽에 의해 분비된 레틴산은 전장-후장 경계부를 조절한다(문헌[2002 *Curr. Biol.*, 12:1215-1220]).

[0009] 특정 전사 인자들의 발현 수준을 이용하여 조직의 아이덴티티(identity)를 지정할 수 있다. 완성 내배엽의 원시 장관으로의 형질전환 동안, 장관은 제한된 유전자 발현 패턴에 의해 분자 수준에서 관찰될 수 있는 넓은 도메인들 내로 국지화되게 된다. 장관 내의 국지화된 췌장 도메인은 PDX1의 매우 높은 발현 및 CDX2 및 SOX2의 매우 낮은 발현을 나타낸다. PDX1, NKX6.1/PTF1A, 및 NKX2.2는 췌장 조직에서 높게 발현되고 CDX2의 발현은 장 조직에서 높다.

[0010] 췌장의 형성은 완성 내배엽의 췌장 내배엽으로의 분화로부터 생긴다. 배측(dorsal) 및 복측(ventra) 췌장 도메인은 전장 상피에서 생긴다. 또한, 전장은 식도, 기관, 폐, 갑상선, 위, 간, 및 담관계가 생기게 한다.

[0011] 췌장 내배엽의 세포는 췌장-십이지장 호메오박스(homeobox) 유전자 PDX1을 발현한다. PDX1의 부재 하에서는, 췌장은 복측 및 배측 원기(bud)의 형성 이상으로는 발달하지 못한다. 따라서, PDX1 발현이 췌장 기관형성에서 중요한 단계를 표시한다. 성숙한 췌장은 췌장 내배엽의 분화로부터 생기는 외분비 및 내분비 조직 둘 다를 포함한다.

[0012] 드'아무르(D'Amour) 등은 고농도의 액티빈과 저 혈청의 존재 하에서 인간 배아 줄기 세포-유래 완성 내배엽의 농축 배양물의 생성을 기재한다(문헌[*Nature Biotechnology* 2005, 23:1534-1541]; 미국 특허 제7,704,738호). 마우스의 신장 피막 하에 이들 세포를 이식하면 내배엽 조직의 특성을 갖는 더욱 성숙한 세포로 분화되었다(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). 면역 결핍 마우스의 지방 패드 내에 이들 췌장 전구 세포를 후속적으로 이식하면 3 내지 4개월의 성숙기 후에 기능성 췌장 내분비 세포의 형성이 유발되었다(미국 특허 제7,534,608호 및 미국 특허 제7,993,920호).

[0013] 피스크(Fisk) 등은 인간 배아 줄기 세포로부터의 췌장 섬 세포의 생성 시스템을 보고한다(미국 특허 제7,033,831호). 이 경우에, 분화 경로를 세 단계로 나누었다. 먼저, 인간 배아 줄기 세포를 소듐 부티레이트와

액티빈 A의 배합물을 이용하여 내배엽으로 분화시켰다 (미국 특허 제7,326,572호). 이어서 이 세포를, EGF 또는 베타셀룰린과 배합된 노긴 (Noggin)과 같은 BMP 길항제와 함께 배양하여 PDX1 양성 세포를 생성하였다. 마지막 분화는 니코틴아미드에 의해 유도하였다.

[0014] 또한, 소분자형 저해제 (inhibitor)가 췌장 내분비 전구 세포의 유도에 사용되어 왔다. 예를 들어, TGF- $\beta$  수용체 및 BMP 수용체의 소분자 저해제 (문헌[*Development* 2011, 138:861-871]; 문헌[*Diabetes* 2011, 60:239-247])가 췌장 내분비 세포의 수를 유의하게 향상시키는 데 사용되어 왔다. 게다가, 소분자 활성화제가 완성 내배엽 세포 또는 췌장 전구 세포를 생성하는 데 또한 사용되어 왔다 (문헌[*Curr. Opin. Cell Biol.* 2009, 21:727-732]; 문헌[*Nature Chem. Biol.* 2009, 5:258-265]).

[0015] HB9 (H1XB9 및 MNX1로도 알려짐)는 대략 배아 일수 (embryonic day) 8에 시작하는 췌장 발달 초기에 발현되는 기본 헬릭스-루프-헬릭스 (basic helix-loop-helix, "bHLH") 전사 활성화 단백질이다. PDX1 및 NKX6.1 발현 세포에서 발현되는, HB9의 발현은 췌장 상피에서 일시적이고 약 일수 10.5에 최고조에 달한다. 약 일수 12.5에, HB9 발현은 감소하고, 후기에는 단지  $\beta$  세포로만 제한된다. HB9의 삭제 돌연변이 (null mutation)에 대해 동형접합성인 마우스에서, 췌장의 배측 엽은 발달할 수 없다 (문헌[*Nat. Genet.* 23:67-70, 1999]; 문헌[*Nat. Genet.* 23:71-75, 1999]). HB9- $\beta$ - 세포는 낮은 수준의 글루코스 수송체, GLUT2, 및 NKX6.1을 발현한다. 더욱이, HB9 -/- 췌장은 인슐린 양성 세포의 수에서 유의한 감소를 나타내는 반면, 다른 췌장 호르몬의 발현에는 유의하게 영향을 주지 않는다. 따라서, HB9의 일시적인 제어는 정상  $\beta$  세포 발달 및 기능에 필수적이다.  $\beta$  세포에서 HB9 발현을 조절하는 인자들에 대해 많이 알려져 있지 않지만, 제브라피시 (zebrafish)에서의 최근 연구는 레틴산이 HB9의 발현을 양성적으로 조절할 수 있다는 것을 시사한다 (문헌[*Development*, 138, 4597-4608, 2011]).

[0016] 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 제13/998,883호에서는, 트라이요도타이로닌 ("T3") 이  $\beta$  세포로의 세포 분화에서 HB9 단백질 발현의 유도제로서 작용할 수 있다는 것이 증명되었다. T3 및 T4 중 하나 또는 둘 다를 사용하여 NKX6.1, PDX1 및 HB9에 대해 양성인 췌장 내배엽 세포를 생성하는 방법이 또한 거기에 개시되어 있다. 부가적으로, 그리고 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 제13/998,884호에 개시된 바와 같이, 췌장 내분비 마커의 발현이 공기-액체 계면에서의 배양 및 T3 및 액티빈 수용체-유사 키나제 ("ALK") 5 저해제의 사용에 의해 유의하게 향상될 수 있다는 것이 증명되었다.

[0017] 다양한 전사 인자들은 췌장 내분비 세포의 인슐린 분비  $\beta$  세포로의 분화를 조절한다. 이러한 인자들 중에는 "MAFA" (v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A)가 있다. 사실, MAFA는  $\beta$  세포의 글루코스 자극 인슐린 분비에서 마스터 조절자일 수 있는 것으로 여겨진다.

[0018] 일반적으로, 선조 세포 (progenitor cell)의 기능성  $\beta$  세포로의 분화 과정은 다양한 단계를 거치고 선조 세포, 예컨대 인간 만능 줄기 세포로부터 췌장 세포를 생성하는 프로토콜을 개선하는 데 큰 진전이 있어 왔다. 이러한 연구에서의 발전에도 불구하고, 선조 세포 분화 과정에서의 각 단계는 고유의 과제를 제시한다. 그렇기 때문에, 기능성 내분비 세포, 및 특히 기능성  $\beta$  세포를 생산하기 위한 추가의 분화 프로토콜 개발이 여전히 필요하다. 특히, 췌장 내분비 세포에서 MAFA의 발현이 향상되는 공정을 개발하는 것이 바람직하다.

### 도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a 내지 도 1m는 실시예 1에 따라 분화된 줄기 세포주 H1로부터의 PDX1, NKX6.1, PAX4, PAX6, NGN3, MAFA, ABCC8, 크로모그라닌-A, G6PC2, IAPP, 인슐린, 글루카곤 및 PTF1a의 미분화 ES 세포에 대한 유전자 발현의 배수 변화의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 묘사하는 그래프이다.

도 2a 내지 도 2c는 실시예 1에 따라 분화되고 하기에 대해 염색된 3기 세포의 FACS 프로파일을 묘사한다: 도 2a에서는 Ki67 (Y-축)과 공동-염색된 PDX1 (X-축); 도 2b에서는 CDX2 (Y-축)와 공동-염색된 PDX1 (X-축); 그리고 도 2c에서는 NKX6.1.

도 3a 내지 도 3d는 실시예 1에 따라 분화되고 하기에 대해 염색된 4기 세포의 FACS 프로파일을 묘사한다: 도 3a에서는 NKX6.1 (Y-축)과 공동-염색된 크로모그라닌 (X-축); 도 3b에서는 Ki67 (Y-축)과 공동-염색된 PDX1 (X-축); 도 3c에서는 인슐린 (Y-축)과 공동-염색된 NKX6.1 (X-축); 그리고 도 3d에서는 NeuroD1.

도 4a 내지 도 4e는 실시예 1에 따라 분화되고 하기에 대해 염색된 5기 세포의 FACS 프로파일을 묘사한다: 도 4a에서는 NKX6.1 (Y-축)과 공동-염색된 크로모그라닌 (X-축); 도 4b에서는 Ki67 (Y-축)과 공동-염색된 PDX1 (X-축); 그리고 도 4c에서는 인슐린 (Y-축)과 공동-염색된 NKX6.1 (X-축); 도 4d에서는 NeuroD1; 그리고 글루



카곤 (Y-축)과 공동-염색된 인슐린 (X-축).

도 5a 내지 도 5f는 실시예 1에 따라 분화되고 하기에 대해 염색된 6기 세포의 FACS 프로파일을 묘사한다: 도 5a에서는 NKX6.1 (Y-축)과 공동-염색된 크로모그라닌 (X-축); 도 5b에서는 Ki67 (Y-축)과 공동-염색된 PDX1 (X-축); 그리고 도 5c에서는 인슐린 (Y-축)과 공동-염색된 NKX6.1 (X-축); 도 5d에서는 Oct 3/4 (Y-축)와 공동-염색된 PAX6 (X-축); 도 5e에서는 글루카곤 (Y-축)과 공동-염색된 인슐린 (X-축); 그리고 도 5f에서는 FOXA2.

도 6a 내지 도 6f는 실시예 1에 따라 분화되고 하기에 대해 염색된 7기 세포의 FACS 프로파일을 묘사한다: 도 6a에서는 NKX6.1 (Y-축)과 공동-염색된 크로모그라닌 (X-축); 도 6b에서는 Ki67 (Y-축)과 공동-염색된 PDX1 (X-축); 그리고 도 6c에서는 인슐린 (Y-축)과 공동-염색된 NKX6.1 (X-축); 도 6d에서는 Oct 3/4 (Y-축)와 공동-염색된 PAX6 (X-축); 도 6e에서는 글루카곤 (Y-축)과 공동-염색된 인슐린 (X-축); 그리고 도 6f에서는 FOXA2.

도 7은 실시예 1에 따라 분화된 3기 내지 7기 세포로부터의 다중 채널 내배엽 마커 (FOXA2, PDX1, NKX6.1), 미분화 ES 세포 마커 (Oct3/4), 내분비 마커 (PAX6, IS1-1, NKX2.2, 크로모그라닌), 및 호르몬 (인슐린, 글루카곤)의 %발현에 대한 그래프이다.

도 8a 내지 도 8e는 6기 내지 7기에서 소분자로 처리된 후 미분화 세포에 대한 분화 세포의 인슐린 및 MAFA 발현의 배수 변화의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 묘사하는 그래프이다.

도 9는 미분화 세포에 대한 실시예 4의 분화 세포의 AXL 및 GAS6 발현의 배수 변화의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 묘사하는 그래프이다.

도 10a 내지 도 10f는 실시예 6에 따라 7기에서 소분자로 처리된 후 미분화 세포에 대한 분화 세포의 MAFA, UCN3, G6PC2, NKX6.1, PDX1 및 인슐린 발현의 배수 변화의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터의 그래프이다.

도 11a 내지 도 11d는 실시예 7에 따라 7기에서 소분자로 처리된 후 미분화 세포에 대한 분화 세포의 MAFA, PDX1, NKX6.1, 및 인슐린 발현의 배수 변화의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 묘사하는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명의 하기의 상세한 설명은 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 예시할 목적으로, 도면은 본 발명의 실시 형태를 보여준다. 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 설명하거나 예시하는 세부 항목으로 나뉘어진다.
- [0021] 본 발명은 소정의 소분자로 덜 성숙한 췌장 내분비 세포를 처리하여 더욱 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포를 생성하는 것에 관한 것이다. 본 발명의 소정의 실시 형태에서, 췌장 내분비 세포는 하나 이상의 단계에서, 단백질 메틸트랜스퍼라제 저해제, 오로라 키나제 (aurora kinase) 저해제, 및 p90 리보솜 S6 키나제 ("RSK") 저해제 중 하나 이상인 소분자의 존재 하에서 배양된다. 따라서, 본 발명은 만능 줄기 세포를 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포의 특성을 나타내는 세포로 분화시키기 위한 세포 배양물, 및 그러한 분화를 개시하고 촉진하는 분화 배지, 및 그러한 분화로부터 생성된 분화 세포 및 세포 집단을 제공한다. 본 발명의 방법은 췌장 내분비 세포 집단의 형성을 위해 제공되고, 본 방법에서는 세포의 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 더욱 바람직하게는 30% 이상 및 가장 바람직하게는 50% 이상이 단일 호르몬 인슐린을 발현하고, PDX1, NKX6.1 및 MAFA 양성이다.
- [0022] 유리하게 그리고 바람직하게는, 본 발명의 세포 배양물 및 분화 배지는 공기-액체 계면에서의 분화와 함께 사용될 수 있다. 배양은 만능 줄기로부터 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포로의 분화 경로에 관여하는 모든 단계 동안 공기-액체 계면에서 일어날 수 있거나, 또는 분화의 초기 단계들 동안에는 배지에 액침된 평면 배양물 상에서 배양시킨 후에, 분화의 하나 이상의 후기 단계들 동안에는 공기-액체 계면에서 배양시키는 것을 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 본 발명의 공정은 초기 단계들 내내 배지에 액침된 지지체 표면 상에서 만능 줄기 세포를 배양하는 것과, 이후에, 분화의 후기 단계들 동안 공기-액체 계면에서 배양하는 것의 조합을 포함한다. 그러한 실시 형태에서, 세포는 처음에 액침 배양을 위한 고체 표면에 시딩 (seeding)된 후 고체 지지체로부터 제거되고 공기-액체 계면에서의 배양을 위한 다공성 지지체에 재시딩될 수 있다. 대안적으로, 세포는 처음에 다공성 지지체 상에 시딩된 후 다공성 지지체는 분화 초기 동안 배지에 액침되고, 이어서 분화의 후기 동안 공기-액체 계면에 위치할 수 있다.
- [0023] 또 다른 실시 형태에서, 또한, 하나 이상의 단계들에서의 분화가 T3, T4, 이들의 유사체 중 하나 이상의 존재

하에서 및, 선택적으로 그러나 바람직하게는, 액티빈 수용체-유사 키나제 5 (activin receptor-like kinase 5, "ALK 5") 저해제와 함께 수행된다. 바람직한 실시 형태에서, 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 집단은 T3, T4, 이들의 유사체 중 하나 이상 및 췌장 내분비 세포에 대한 ALK 5 저해제를 함유하는 배지에서 배양된다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 생성된 췌장 내분비 세포는 T3, T4, 이들의 유사체 중 하나 이상 및 ALK 5 저해제를 함유하는 배지의 존재 하에서 추가로 분화된다.

[0024] 본 발명의 특별한 발견은 췌장 내배엽 세포를 ALK 5 저해제 및 타이로이드 수용체 효능제 중 하나 이상의 조합으로 처리한 후 생성된 췌장 내분비 세포를 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 오로라 키나제 저해제, 및 RSK 저해제 중 하나 이상과의 조합에서 배양하면 세포에서 MAFA 발현 수준이 증가할 뿐 아니라 단일 호르몬 인슐린, MAFA, PDX1, 및 NKX6.1을 발현하는 집단에서의 세포수도 유의하게 향상된다는 것이다. 본 발명은 공기-액체 계면에서의 분화와 함께 사용될 때 특별한 유용성을 갖는다.

[0025] **정의**

[0026] 줄기 세포는 단일 세포 수준에서 그의 자기-재생 및 분화 능력 둘 모두에 의해 규정되는 미분화된 세포이다. 줄기 세포는 자기-재생 선조체, 비-재생 선조체, 및 최종 분화된 세포를 포함하는 자손 세포를 생산할 수 있다. 또한, 줄기 세포는 시험관내(*in vitro*)에서 다중 배엽층 (내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능성 세포로 분화하는 그의 능력을 특징으로 한다. 또한, 줄기 세포는 이식 후 다중의 배엽층의 조직이 생기게 하며, 배반포 내로의 주입 이후, 비록 전부는 아니더라도, 사실상 대부분의 조직에 기여한다.

[0027] 줄기 세포는 그의 발생능에 따라 분류된다. 만능 줄기 세포는 모든 배아 세포형을 생성시킬 수 있다.

[0028] 분화는 특화되지 않은 ("미결된") 또는 덜 특화된 세포가 특화된 세포, 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화 세포는 세포의 계통 내에서 보다 특화된 ("결정된") 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "결정된"은 분화 경로에서, 통상적인 환경 하에서 특정 세포형 또는 세포형의 서브세트로 계속 분화할 것이며, 통상적인 환경 하에서 다른 세포형으로 분화할 수 없거나 덜 분화된 세포형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행한 세포를 말한다. "탈분화 (de-differentiation)"는 세포가 세포의 계통 내의 덜 특화된 (또는 결정된) 위치로 되돌아가는 과정을 말한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 세포의 계통은 세포의 유전, 즉, 어느 세포로부터 왔는지 그리고 어떤 세포를 발생시킬 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 관심 계통의 세포의 표현형과 특이적으로 관련되며 미결정 세포가 관심 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있는 특징을 말한다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심 세포에서 차등적으로 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 검출 가능한 수준은 다른 세포와 비교하여 관심 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮아서, 대상 세포가 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것을 이용하여 다른 세포로부터 확인되어 구별될 수 있다.

[0030] 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 세포측정 ("PCR")에 의한 양성은 보통 약 30 주기 (Ct) 이하인 반면; PCR에 의한 음성은 보통 약 31 주기 초과이다.

[0031] 만능 줄기 세포의 기능성 췌장 내분비 세포로의 분화를 정지 (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 장관 세포 ("2기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 말한다. "3기"는 제3 단계, 즉, 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 전장 내배엽 세포 ("3기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 말한다. "4기"는 제4 단계, 즉, 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 췌장 전장 전구 세포 ("4기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 말한다. "5기"는 제5 단계, 즉, 췌장 전장 전구 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 다의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 말한다. 6기는 제6 단계, 즉, 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 미성숙 베타 세포인 췌장 내분비 세포("6기 세포")의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 말한다. 6기 세포는 단일 호르몬 인슐린을 발현하고 PDX1, NKX6.1 및 크로모그라닌 양성이다. 본 발명의 집단 및 본 발명의 세포의 생산 과정에서, 그리고 생산을 위해, 제7 단계, "7기"는 미성숙 베타 세포인 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의, 성숙한 베타 세포이고 6기 세포와 비교하여 더욱 성숙한 표현형을 갖는 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화에 대해 사용되고 이를 말한다. "7기 세포"는, 단일 호르몬 인슐린+, MAFA+, NKX6.1+, 및 PDX1+이지만 또한 미성숙 베타 세포보다 더 높은 수준으로 MAFA를 발현하는 췌장 내분비 세포를 의미한다. 부가적으로, 7기를 이행함으로써 생성된 세포 집단은 6기의 세포 집단과 비교하여 더 높은 백분율의 MAFA 양성 및 단일 호르몬 인슐린 발현 세포를 갖는다.

[0032] 특정 집단에서의 모든 세포가 동일한 속도로 이러한 단계들을 통해 진행되는 것은 아니라는 것에 주목해야 한다. 결과적으로, 시험관내 세포 배양물에서, 특히 후기 분화 단계에서 집단에 존재하는 다수의 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 위해, 상기 확인된 단계들과 관련된 다양한 세포형들의 특징들이 본 명세서에 기재된다.

[0033] 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 적어도 하나를 발현한다: FOXA2 (간세포 핵인자 3-β (hepatocyte nuclear factor 3-β, "HNF3-β")로도 알려짐), GATA4, SOX17, CXCR4, 브라큐리 (Brachyury), 세르베루스 (Cerberus), OTX2, 구세코이드 (goosecoid), C-키트 (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, HNF4 α의 증가가 관찰될 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "장관 세포"는, 완성 내배엽으로부터 유래하고 모든 내배엽성 기관, 예컨대 폐, 간, 췌장, 위, 및 장이 생기게 할 수 있는 세포를 말한다. 장관 세포는 완성 내배엽 세포에 의해 발현되는 것에 비해 사실상 증가된 그의 HNF4 α 발현을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 2기 동안 HNF4 α의 mRNA 발현에서 10 내지 40배 증가가 관찰될 수 있다.

[0035] 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 HNF4 α. 전장 내배엽 세포는 장관 세포와 비교하여 PDX1의 발현 증가를 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 3기 배양물에서 세포의 50% 초과가 전형적으로 PDX1을 발현한다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "췌장 전장 전구 세포"는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포를 말한다: PDX1, NKX6.1, HNF6, NGN3, SOX9, PAX4, PAX6, ISL1, 가스트린 (gastrin), FOXA2, PTF1a, PROX1 및 HNF4 α. 췌장 전장 전구 세포는 PDX1, NKX6.1, 및 SOX9 중 하나 이상의 발현에 대해 양성인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "췌장 내배엽 세포"는 하기 마커들 중 하나 이상을 발현하는 세포를 말한다: PDX1, NKX6.1, HNF1β, PTF1α, HNF6, HNF4 α, SOX9, NGN3, 가스트린; HB9, 또는 PROX1. 췌장 내배엽 세포는 그의 사실상의 CDX2 또는 SOX2 발현의 부족을 특징으로 할 수 있다.

[0038] 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 하나 이상을 발현한다: NGN3; NKX2.2; NeuroD1; ISL1; PAX4; PAX6; 또는 ARX. 췌장 내분비 전구 세포는 그의 NKX2.2 및 NeuroD1 발현을 특징으로 할 수 있다.

[0039] 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 더하여, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커는 NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, ARX, NKX2.2, HB9 및 PAX6 중 하나 이상을 포함한다. 췌장 내분비 세포의 서브세트 중 하나는, 인슐린은 발현할 수 있으나 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 및 췌장 폴리펩티드는 발현할 수 없는 세포인 "미성숙 베타 세포"이다. 게다가, 미성숙 베타 세포의 특징적인 마커는 NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, NKX2.2, HB9 및 PAX6 중 하나 이상을 포함한다. 췌장 내분비 세포

의 두번째 서브세트는, 인슐린은 발현할 수 있으나 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 및 췌장 폴리펩티드는 발현할 수 없는 세포인 "성숙 베타 세포"이다. 부가적으로, 성숙 베타 세포의 특징적인 마커는 NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, NKX2.2, HB9, PAX6 및 MAFA 중 하나 이상을 포함한다. 췌장 내분비 세포의 또 다른 서브세트는, 성숙 베타 세포의 특징적인 마커를 발현하고 덜 성숙한 베타 세포의 것과 비교하여 강력하고 증가된 글루코스 부하 (glucose challenge)에 응하는 인슐린 방출과 함께 그의 PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3 $\beta$ , HB9, MAFA 및 PAX6 발현을 특징으로 할 수 있는 것이다.

[0040] 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.

[0041] 본 명세서에서 "d1", "1d", 및 "일수 1 (day 1)"; "d2", "2d", 및 "일수 2" 등은 상호교환적으로 사용된다. 이들 숫자 문자 조합은 본 출원의 단계적 분화 프로토콜 중의 상이한 단계에서의 인큐베이션의 특정 일을 말한다.

[0042] "LDN-193189"는 상하이 켐파트너, 컴퍼니, 리미티드 (Shanghai ChemPartner, Co., LTD)로부터 입수 가능한 BMP 수용체 저해제인 ((6-(4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)-3-(피리딘-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘, 하이드로클로라이드))를 말한다.

[0043] **만능 줄기 세포의 특성화, 공급원, 확장 및 배양**

[0044] **A. 만능 줄기 세포의 특성화**

[0045] 만능 줄기 세포는 지정된 TRA-1-60 항체 및 TRA-1-81 항체 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 벨링게임 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.

[0046] 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 형성하고, 삼배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.

[0047] 증식된 만능 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.

[0048] **B. 만능 줄기 세포의 공급원**

[0049] 임의의 만능 줄기 세포가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 만능 줄기 세포의 예시적인 유형은 확립된 만능 세포주를 포함하고, 이에겐 전-배아 조직 (예컨대, 배반포), 배아 조직, 또는 임신 동안 임의의 시점에, 전형적으로는 그러나 반드시 아닌, 대략 10 내지 12주의 임신 전에 취해진 태아 조직이 포함된다. 비-제한적 예는 인간 배아 줄기 세포 ("hESC") 또는 인간 배아 생식 세포의 확립된 세포주, 예컨대, 인간 배아 줄기 세포주 H1 (NIH 코드: WA01), H7 (NIH 코드: WA07), H9 (NIH 코드: WA09) (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 위셀 리서치 인스티튜트 (WiCell Research Institute)), 및 SA002 (스웨덴 예테보리 소재의 셀라르티스 에이비 코퍼레이션 (Cellartis AB Corporation))이다.

[0050] 지지 세포(feeder cell)의 부재 하에서 이미 배양된 만능 줄기 세포 집단으로부터 취해진 세포가 또한 적합하다. 다수의 만능성 관련 전사 인자들, 예컨대 OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, 및 ZFP42의 강제 발현을 사용하여 성체 체세포로부터 유래되는, 유도된 만능 세포 (induced pluripotent cell, IPS), 또는 재프로그래밍된 만

능 세포 (문헌[*Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011, 12:165-185]; 또한 IPS는 문헌[*Cell*, 126(4): 663-676]을 참조함)가 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 방법에서 사용되는 인간 배아 줄기 세포는 또한 톰슨 (Thomson) 등 (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])에 의해 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 돌연변이 인간 배아 줄기 세포주, 예컨대, BG01v (미국 조지아주 애션스 소재의 브레사젠 (BresaGen)), 또는 성인 체세포로부터 유래된 세포, 예컨대, 문헌[Takahashi *et al.*, *Cell* 131: 1-12 (2007)]에 개시된 세포가 또한 사용될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 만능 줄기 세포는 하기에 기재된 방법들에 따라 유도될 수 있다: 리 (Li) 등 (문헌[*Cell Stem Cell* 4: 16-19, 2009]); 마헤랄리 (Maherali) 등 (문헌[*Cell Stem Cell* 1: 55-70, 2007]); 슈타트펠트 (Stadtfield) 등 (문헌[*Cell Stem Cell* 2: 230-240]); 나카가와 (Nakagawa) 등 (문헌[*Nature Biotechnol* 26: 101-106, 2008]); 타카하시 등 (문헌[*Cell* 131: 861-872, 2007]); 및 미국 특허 출원 공개 제2011/0104805호. 소정의 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 만능 줄기 세포는 "나이브 (naïve)"인 것으로 간주되거나 하기에 기재된 방법들에 따라 유도될 수 있다: 가프니 (Gafni) 등 (문헌[*Nature*, 504:282, 2013]), 및 웨어 (Ware) 등 (문헌[PNAS, 111: 4484-4489, 2014]). 이들 참고문헌, 특허, 및 특허 출원 모두는, 특히, 만능 세포의 단리, 배양, 확장 및 분화에 관련되므로, 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0051] 만능 줄기 세포의 다른 공급원은 유도된 만능 줄기 세포 (IPS, 문헌[*Cell*, 126(4): 663-676])를 포함한다. 적합한 세포의 또 다른 공급원은 인간 태줄 조직-유래 세포, 인간 양수-유래 세포, 인간 태반-유래 세포, 및 인간 반수성개체 (parthenote)를 포함한다. 일 실시 형태에서, 태줄 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 얻어질 수 있다. 다른 실시 형태에서, 양수-유래 세포는 미국 특허 출원 공개 제2007/0122903호의 방법을 사용하여 얻어질 수 있다. 이들 특허 출원들 각각의 개시는 세포의 단리 및 특성화에 관련되므로 전체적으로 본 명세서에 포함된다. 소정의 실시 형태에서, 만능 줄기 세포는 비-배아 기원의 것일 수 있다.

[0052] **C. 만능 줄기 세포의 확장 및 배양**

[0053] 만능 줄기 세포는 전형적으로 다양한 방식으로 만능 줄기 세포를 지지하는 지지 세포의 층 상에서 배양된다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는, 지지 세포가 본질적으로 없으나 그럼에도 불구하고 사실상의 분화를 겪지 않으면서 만능 줄기 세포의 증식을 지지하는 배양 시스템 내에서 배양될 수 있다. 분화 없이 무지지세포 배양에서의 만능 줄기 세포의 성장은 종종 미리 다른 세포형과 함께 배양함으로써 조절된 배지를 사용하여 지지된다. 대안적으로, 분화 없이 무지지세포 배양에서의 만능 줄기 세포의 성장은 화학적으로 한정된 배지를 이용하여 지지될 수 있다.

[0054] 만능 세포는 다양한 지지세포 층을 이용하여 또는 매트릭스 단백질 코팅된 용기를 사용함으로써 배양 중 쉽게 확장될 수 있다. 대안적으로, 세포의 일상적 확장을 위해, 상표 mTESR®1 (캐나다 브리티시컬럼비아주 밴쿠버 소재의 스템셀 테크놀로지스, 인크.(StemCell Technologies, Inc.))로 판매되는 배지와 같은 한정 배지 (defined medium)와 조합하여 화학적으로 한정된 표면이 사용될 수 있다. 만능 세포는 효소적 소화, 기계적 분리, 또는 다양한 칼슘 길레이터, 예컨대 에틸렌다이아민테트라아세트산 ("EDTA")을 사용하여 배양 플레이트로부터 쉽게 제거될 수 있다. 대안적으로, 만능 세포는 임의의 매트릭스 단백질 또는 지지세포 층의 부재 하에서 현탁 중 확장될 수 있다.

[0055] 만능 줄기 세포를 확장하고 배양하는 다수의 상이한 공지된 방법들이 청구된 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 루비노프 (Reubinoff) 등, 톰슨 등, 리차즈 (Richards) 등 및 미국 특허 출원 공개 제2002/0072117호의 방법을 사용할 수 있다. 루비노프 등(문헌[*Nature Biotechnology* 18: 399-404 (2000)]) 및 톰슨 등(문헌[*Science* 282: 1145-1147 (1998)])은 마우스 배아 섬유아세포 지지 세포 층을 사용한 인간 배반포로부터의 만능 줄기 세포주의 배양을 개시한다. 리차즈 등 (문헌[*Stem Cells* 21: 546-556, 2003])은 11개의 상이한 성인, 태아, 및 신생아의 지지 세포 층들의 패널에 대해 인간 만능 줄기 세포 배양물을 지지하는 그들의 능력을 평가하고, "성인 피부 섬유아세포 지지세포 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포주는 인간 배아 줄기 세포 형태를 유지하고 만능성 상태로 남아 있다"라고 언급하고 있다. 미국 특허 출원 공개 제2002/0072117호는 무지지세포 배양에서 영장류 만능 줄기 세포의 성장을 지지하는 배지를 생성하는 세포주를 개시한다. 이용된 세포주는 배아 조직으로부터 얻어지거나 배아 줄기 세포로부터 분화된 중간엽 및 섬유아세포-유사 세포주이다. 미국 특허 출원 공개 제2002/072117호는 또한 1차 (primary) 지지 세포 층으로서의 세포주의 사용을 개시한다.

- [0056] 만능 줄기 세포를 확장하고 배양하는 다른 적합한 공지된 방법들은, 예를 들어, 왕 (Wang) 등, 스토이코비치 (Stojkovic) 등, 미야모토 (Miyamoto) 등 및 아미트 (Amit) 등에 개시된다. 왕 등(문헌[*Stem Cells* 23: 1221-1227, 2005])은 인간 배아 줄기 세포로부터 유래된 지지 세포 층 상에서의 인간 만능 줄기 세포의 장기간 성장을 위한 방법을 개시한다. 스토이코비치 등(문헌[*Stem Cells* 2005 23: 306-314, 2005])은 인간 배아 줄기 세포의 자발적 분화로부터 유래된 지지 세포 시스템을 개시한다. 미야모토 등(문헌[*Stem Cells* 22: 433-440, 2004])은 인간 태반으로부터 얻어진 지지 세포의 공급원을 개시한다. 아미트 등(문헌[*Biol. Reprod* 68: 2150-2156, 2003])은 인간 포피로부터 유래된 지지 세포 층을 개시한다.
- [0057] 만능 줄기 세포를 확장하고 배양하는 다른 적합한 방법들은, 예를 들어, 인준자 (Inzunza) 등, 미국 특허 제 6,642,048호, 국제특허 공개 WO 2005/014799호, 쉬 (Xu) 등 및 미국 특허 출원 공개 제2007/0010011호에 개시된다. 인준자 등(문헌[*Stem Cells* 23: 544-549, 2005])은 인간 생후 포피 섬유아세포로부터의 지지 세포 층을 개시한다. 미국 특허 제6,642,048호는 무지지세포 배양에서 영양류 만능 줄기 세포의 성장을 지지하는 배지, 및 그러한 배지의 생산에 유용한 세포주를 개시한다. 미국 특허 제6,642,048호는 배아 조직으로부터 얻어지거나 배아 줄기 세포로부터 분화된 중간엽 및 섬유아세포-유사 세포주, 및 그러한 세포주를 유도하는 방법, 가공 배지, 및 그러한 배지를 사용한 줄기 세포의 성장을 보고한다. 국제특허 공개 WO 2005/014799호는 포유류 세포의 유지, 증식 및 분화를 위한 조절된 배지를 개시한다. 국제특허 공개 WO 2005/014799호는 그 개시에 따라 생산된 배양 배지가 뮤린 (murine) 세포; 특히 MMH (Met Murine Hepatocyte, Met 뮤린 간세포)로 불리는, 분화되고 불멸화된 트랜스제닉 (transgenic) 간세포의 세포 분비 활성화에 의해 조절된다고 보고한다. 쉬 등(문헌[*Stem Cells* 22: 972-980, 2004])은 인간 텔로머라제 역전사효소를 과다 발현하도록 유전자 변형된 인간 배아 줄기 세포 유도체로부터 얻은 조절된 배지를 개시한다. 미국 특허 출원 공개 제2007/0010011호는 만능 줄기 세포의 유지를 위한 화학적으로 한정된 배양 배지를 개시한다.
- [0058] 공지된 대안적인 배양 시스템은 배아 줄기 세포의 증식을 촉진할 수 있는 성장 인자로 보충된 무혈청 배지를 이용한다. 그러한 배양 시스템의 예는 전 (Cheon) 등, 레벤스타인 (Levenstein) 등 및 미국 특허 출원 공개 제 2005/0148070호를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 전 등(문헌[BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, October 19, 2005])은 배아 줄기 세포 자기-재생을 촉발할 수 있는 상이한 성장 인자가 보충된 조절되지 않은 혈청 대체 (serum replacement) 배지에서 배아 줄기 세포가 유지되는 무지지세포 무혈청 배양 시스템을 개시한다. 레벤스타인 등(문헌[*Stem Cells* 24: 568-574, 2006])은 bFGF로 보충된 배지를 이용하여 섬유아세포 또는 조절된 배지의 부재 하에서 인간 배아 줄기 세포의 장기 배양을 위한 방법을 개시한다. 미국 특허 출원 공개 제2005/0148070호는 혈청 없이 그리고 섬유아세포 지지 세포 없이 한정 배지에서 인간 배아 줄기 세포를 배양하는 방법을 개시하며, 이 방법은 알부민, 아미노산, 비타민, 미네랄, 적어도 하나의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 적어도 하나의 인슐린 또는 인슐린 대체물을 함유한 배양 배지에서 줄기 세포를 배양하는 단계를 포함하며, 배양 배지는 본질적으로 포유류 태아 혈청이 없으며 약 100 ng/ml 이상의, 섬유아세포 성장 인자 신호전달 수용체를 활성화시킬 수 있는 섬유아세포 성장 인자를 함유하며, 여기서 성장 인자는 단지 섬유아세포 지지세포 층 이외의 공급원으로부터 공급되며, 배지는 지지 세포 또는 조절된 배지 없이 미분화된 상태로 줄기 세포의 증식을 지지하였다.
- [0059] 만능 줄기 세포를 배양하고 확장하는 또 다른 공지된 적합한 방법은 미국 특허 출원 공개 제2005/0233446호, 미국 특허 제6,800,480호, 미국 특허 출원 공개 제2005/0244962호 및 국제특허 공개 WO 2005/065354호에 개시되어 있다. 미국 특허 출원 공개 제2005/0233446호는 미분화 영양류 원시 줄기 세포를 포함하는, 줄기 세포를 배양하는 데 유용한 한정 배지를 개시한다. 용액에서, 배지는 배양되는 줄기 세포와 비교할 때 사실상 등장성이 다. 주어진 배양물에서, 특정 배지는 기본 배지, 및 원시 줄기 세포의 사실상 미분화된 성장을 지지하는 데 필요한 양의 bFGF, 인슐린 및 아스코르브산 각각을 포함한다. 미국 특허 제6,800,480호는 사실상 미분화된 상태의 영양류-유래 원시 줄기 세포를 성장시키기 위한 세포 배양 배지가 제공되며 이 배지는 영양류-유래 원시 줄기 세포의 성장을 지지하기에 효과적인 저삼투압, 저 내독소 기본 배지를 포함한다고 보고한다. 미국 특허 제 6,800,480호의 개시는 또한 기본 배지는 영양류-유래 원시 줄기 세포의 성장을 지지하기에 효과적인 영양 혈청과, 지지 세포 및 지지 세포로부터 유래된 세포의 매트릭스 성분으로부터 선택된 기재와 조합된다고 보고한다. 이 배지는 또한 비필수 아미노산, 항산화제, 및 뉴클레오시드 및 피루베이트 염으로부터 선택된 제1 성장 인자를 포함하는 것으로 기재되어 있다. 미국 특허 출원 공개 제2005/0244962호는 그 개시의 일 태양은 영양류 배아 줄기 세포를 배양하는 방법을 제공하고 배양 중 줄기 세포는 본질적으로 포유류 태아 혈청이 없고 (바람직하게는 또한 본질적으로 어떠한 동물 혈청도 없고) 단지 섬유아세포 지지세포 층 이외의 공급원으로부터 공급된 섬유아세포 성장 인자의 존재 하에 있다고 보고한다.



- [0060] 국제특허 공개 WO 2005/065354호는, 본질적으로 무지지세포 및 무혈청인, 즉 기본 배지, 사실상 미분화된 포유류 줄기 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양의 bFGF, 인슐린 및 아스코르브산이 존재하는 한정 등장성 배양 배지를 개시한다. 더욱이, 국제특허 공개 WO 2005/086845호는 미분화 줄기 세포의 유지 방법을 개시하고, 상기 방법은 원하는 결과를 성취하기에 충분한 양의 시간 동안 세포를 미분화 상태로 유지하기에 충분한 양의 형질전환 성장 인자-베타 (transforming growth factor-beta, "TGF- $\beta$ ") 패밀리의 단백질들의 구성원, 섬유아세포 성장 인자 ("FGF") 패밀리의 단백질들의 구성원 또는 니코틴아미드에 줄기 세포를 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 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 매트릭젤(MATRIGEL)<sup>TM</sup>이라는 상표로 판매되는 재구성된 기저막 (미국 뉴욕주 코닝 소재의 코닝 인코포레이티드 (Corning Incorporated))이다. 매트릭젤<sup>TM</sup>은 실온에서 겔화하여 재구성된 기저막을 형성하는 엔젤브레스-홀름 스웜 (Engelbreth-Holm Swarm) 종양 세포 유래의 가용성 제제이다.
- [0062] 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.
- [0063] 만능 줄기 세포는 적합한 분포로 그리고 세포 생존, 증식, 및 바람직한 특징의 보유를 촉진하는 배지의 존재 하에서 기재 상에 플레이팅될 수 있다. 모든 이들 특성은 시딩 분포에 세심한 주의를 기울여 이익을 얻으며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 적합한 배양 배지는 하기 성분들로부터 제조될 수 있다: 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 라이프 테크놀로지스 코포레이션 (Life Technologies Corporation)에서 킵코(GIBCO)<sup>®</sup>라는 상표로 판매되는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, "DMEM") (카탈로그 번호 11965-092); 라이프 테크놀로지스 코포레이션에서 킵코<sup>®</sup>라는 상표로 판매되는 녹아웃 돌베코 변형 이글 배지(Knockout Dulbecco's Modified Eagle's medium, "KO DMEM") (카탈로그 번호 10829-018); 햄(Ham) F12/50% DMEM 기본 배지; 라이프 테크놀로지스에서 킵코<sup>®</sup>라는 상표로 판매되는 200 mM L-글루타민 (카탈로그 번호 25030-081); 라이프 테크놀로지스에서 킵코<sup>®</sup>라는 상표로 판매되는 비필수 아미노산 용액 (카탈로그 번호 11140-050); 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치 컴퍼니, 엘엘씨 (Sigma-Aldrich Company, LLC)의  $\beta$ -메르캅토에탄올 (카탈로그 번호 M7522); 라이프 테크놀로지스에서 킵코<sup>®</sup>라는 상표로 판매되는 인간 재조합 기본 섬유아세포 성장 인자 ("bFGF") (카탈로그 번호 13256-029).
- [0064] 인간 배아 줄기 세포의 대규모 확장 및 조절된 분화 과정은 또한 현탁 생물반응기를 사용하여 달성될 수 있다. 그러한 시스템은 조절된 배양 시스템에서 더 큰 효능으로 임상적으로 관련된 세포수를 생성할 수 있다. 그것은, 예를 들어 문헌[*Journal of Biotechnology*, May 2014, Vol. 178: 54-64], 문헌[*Stem Cell Reports*, Apr 2014, Vol. 3, No. 6:1132] 및 문헌[*Tissue Engineering Part C: Methods*, Feb 2013, Vol. 19, No. 2: 166-180]에 개시된 바와 같이 만능성 무린 및 hES 세포의 확장을 가능하게 하는 확립된 생물반응기 배양 시스템을 사용하는 것으로 알려져 있다.
- [0065] **만능 줄기 세포의 분화**
- [0066] 만능 세포가  $\beta$  세포로 분화될 때, 그것은 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 세포 및 완성 내배엽 세포로의 분화를 포함할 수 있다. 이후, 이들 세포는 장관 세포로 추가로 분화될 수 있으며, 이는 이어서 결국 전장 내배엽 세포로 분화될 수 있다. 전장 내배엽 세포는 췌장 전장 전구 세포로 분화될 수 있으며, 이는 이어서 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 전구 세포 또는 둘 다로 추가로 분화될 수 있다. 이 세포는 췌장 호르몬 생성 또는 분비 세포로 분화될 수 있다. 본 출원은, 바람직하게는 배지로 일부 채워진 배양 용기 내에 존재하는 공기-액체 계면에서 세포를 배양함으로써, 구체적으로는 5기 내지 7기 중 하나 이상에서 공기-액체 계면에서 세포를 배양함으로써, 만능 줄기 세포의 췌장 내분비 세포로의 단계별 분화를 제공한다.
- [0067] 갑상선 호르몬인 트라이요도타이로닌 ("T3") 및 타이록신 ("T4"), 및 이들의 유사체 중 하나 이상, 단독으로 또는 ALK 5 저해제와의 추가의 조합으로, 분화의 1기 내지 7기 중 하나 이상에서의, 그리고 바람직하게는 5기 내지 7기 각각에서의 세포 배양에 사용될 수 있다. 대안적으로, ALK 5 저해제는 분화의 하나 이상의 단계에서, 그러나 바람직하게는 5기 내지 7기 각각에서 단독으로 사용될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 갑상선 호르몬들 또는 이들의 유사체 중 하나 이상 및 ALK 5 저해제가 하나 이상의 분화 단계에서 그리고 바람직하게는 5기 내지 7기 각각에서 사용된다. 적합한 갑상선 호르몬 유사체는, 제한 없이, GC-1 (소베르티롬(Sobertirone))

(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈, 인크. (R&D Systems, Inc.)); 3,5-다이요오도타이로 프로피온산 ("DIPTA"); 문헌[J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 2008, 111: 262-267] 및 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. US 2003, 100: 10067-10072]에 논의된 KB-141; 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. US 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, 이들 개시는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 유용한 ALK5 저해제는 다음을 포함한다: ALK5 저해제 II (미국 뉴욕주 파밍데일 소재의 엔조 라이프 사이언시즈, 인크. (Enzo Life Sciences, Inc.)), 이는 또한 바람직한 ALK5 저해제임; ALK5i (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 악소라, 인크. (Axxora, Inc.)), SD208 (알앤디 시스템즈); TGF- $\beta$  저해제 SB431542 (미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 엑세스 바이오사이언시즈, 인크. (Xcess Biosciences, Inc.)); ITD-1 (엑세스 바이오사이언시즈); LY2109761 (엑세스 바이오사이언시즈); A83-01 (엑세스 바이오사이언시즈); LY2157299 (엑세스 바이오사이언시즈); TGF- $\beta$  수용체 저해제 V (미국 뉴저지주 집스타운 소재의 이엠디 밀리포어 케미칼 (EMD Millipore Chemical)); TGF- $\beta$  수용체 저해제 I (이엠디 밀리포어); TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV (이엠디 밀리포어); TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII (이엠디 밀리포어); TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII (이엠디 밀리포어); TGF- $\beta$  수용체 저해제 II (이엠디 밀리포어); TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI (이엠디 밀리포어); 및 TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI (이엠디 밀리포어).

[0068] 게다가, 본 발명의 바람직한 실시 형태에서, 방법은 하나 이상의 단계에서 세포를, 그러나 바람직하게는 7기 동안 세포를 항산화제, 예컨대 비타민 E, 아세틸 시스테인, 비타민 C, 항산화 보충제 (카탈로그 번호 A1345, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치 컴퍼니, 엘엘씨), 글루타티온, 수퍼옥사이드 디스무타제, 카탈라제 등 및 이들의 조합 중 하나 이상을 포함하는 분화 배지로 처리하는 단계를 포함한다. 또 다른 더욱 바람직한 실시 형태에서, 6기를 이행함에 있어서, 감마 세크레타제 저해제가 사용되고, 감마 세크레타제 저해제는 감마 세크레타제 저해제 XX (이엠디 밀리포어), 감마 세크레타제 저해제 XXI (이엠디 밀리포어), 감마 세크레타제 저해제 XVI (이엠디 밀리포어), N-[(3,5-다이플루오로페닐)아세틸]-L-알라닌-2-페닐글리신-1,1-다이메틸에틸 에스테르 ("DAPT") (카탈로그 번호2634, 영국 브리스틀 소재의 토크리스 바이오사이언스 (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  $\mu$ M, 대안적으로 약 0.1 내지 20  $\mu$ M, 및 바람직하게는 약 1 내지 10  $\mu$ M일 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.

[0069] 본 발명의 가장 바람직한 실시 형태에서, 소정의 소분자가 분화의 하나 이상의 단계의 배지에서, 바람직하게는 6기 및 7기 중 하나 또는 둘 다에서 사용된다. 관심 소분자는 오로라 키나제, p90 리보솜 S6 키나제, 또는 메틸 트랜스퍼라제 DOT1L을 억제할 수 있는 것이고 바람직하게는 배양된 세포의 산화적 스트레스를 줄이는 항산화제와 함께 사용된다. 유용한 그러한 저해제는 오로라 키나제 저해제 II (4-(4'-벤즈아미도아닐리노)-6,7-다이메톡시퀴나졸린), SNS 314 메실레이트 (N-(3-클로로페닐)-N'-[5-[2-(티에노[3,2-d]피리미딘-4-일아미노)에틸]-2-티아졸릴]우레아 메탄설포네이트), GSK1070916 (3-(4-(4-(2-(3-((다이메틸아미노)메틸)페닐)-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일)-1-에틸-1H-피라졸-3-일)페닐)-1,1-다이메틸우레아), TAK-901 (5-(3-(에틸설포닐)페닐)-3,8-다이메틸-N-(1-메틸피페리딘-4-일)-9H-피리도[2,3-b]인돌-7-카르복시아마이드), RSK 저해제 II (다이하이드로프테리딘 2-(3,5-다이플루오로-4-하이드록시-아닐리노)-8-아이소펜틸-5,7-다이메틸-7H-프테리딘-6-온의 라세미 혼합물), 및 EPZ-5676 (9H-퓨린-6-아민, 9-[5-데옥시-5-[[시스-3-[2-[6-(1,1-다이메틸에틸)-1H-벤즈이미다졸-2-일]에틸]사이클로부틸](1-메틸에틸)아미노]- $\beta$ -D-리보푸라노실]-), 및 이들의 조합을 포함한다. 특별히 관심 있는 것은 오로라 키나제 저해제 II, 및 RSK 저해제 II, 및 DOT1L의 저해제, 특히 EPZ-5676이다. 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  $\mu$ M, 대안적으로, 약 500 nM 내지 5  $\mu$ M, 및 바람직하게는 약 500 nM 내지 2  $\mu$ M일 것이다.

[0070] 만능 세포의 성숙한 표현형을 갖는 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화

[0071] 만능 줄기 세포의 특징은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 만능 줄기 세포의 추가의 특징은 계속 확인되고 있다. 만능 줄기 세포 마커는, 예를 들어, 하기 중 하나 이상의 발현을 포함한다: ABCG2, 크립토 (cripto), FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81. 이들은 RT-PCR로 검출 가능할 수 있다.

[0072] 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 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 또한 적합하다: ABCG2, 크립토, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, 및 TRA-1-81.

[0073] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 원시선 전구 세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 중내배엽 세포이다. 대안적 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 완성 내배엽 세포이다.

[0074] 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.

[0075] 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 호르몬들 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 세포를 의미하는 췌장 호르몬-발현 세포일 수 있다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 및 췌장 폴리펩티드. 바람직한 실시 형태에서, 췌장 내분비 세포는 인슐린-생산  $\beta$  세포이다.

[0076] 본 발명의 소정의 실시 형태에서, 성숙한 표현형의 췌장 내분비 베타 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에 도달하기 위해, 만능 줄기 세포로 시작하는 프로토콜이 사용된다. 이 프로토콜은 다음을 포함한다:

[0077] 1기: 세포 배양 라인에서 얻어진 만능 줄기 세포, 예컨대 배아 줄기 세포를 적당한 인자로 처리하여 완성 내배엽 세포의 형성을 유도한다.

[0078] 2기: 1기에서 생성된 세포를 적당한 인자로 처리하여 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성을 유도한다.

[0079] 3기: 2기에서 생성된 세포를 적당한 인자로 처리하여 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다.

[0080] 4기: 3기에서 생성된 세포를 적당한 인자로 처리하여 췌장 전장 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다. 세포는 4기 후기에서 공기-액체 계면에서 선택적으로 배양된다.

[0081] 5기: 4기에서 생성된 세포를 적당한 인자 - 소정의 실시 형태에서는, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상; (ii) ALK5 저해제; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 둘 다를 포함함 - 로 처리하고, 선택적으로 그리고 바람직하게는 공기-액체 계면에서 배양하여, 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도한다.

[0082] 6기: 5기에서 생성된 세포를 적당한 인자 - 소정의 실시 형태에서는, (i) T3, T4 또는 이들의 유사체 중 하나 이상; (ii) ALK5 저해제; (iii) 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상; (iv) (i) 및 (ii) 둘 다; (v) (i), (ii) 및 (iii); (vi) (i) 및 (iii); 또는 (vii), (ii) 및 (iii)을 포함함 - 로 처리하고, 선택적으로 그리고 바람직하게는 공기-액체 계면에서 배양하여, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도한다.

[0083] 7기: 6기에서 생성된 세포를 적당한 인자 - 소정의 실시 형태에서는, (i) T3, T4 또는 이들의 것 중 하나 이상; (ii) ALK5 저해제; (iii) 항산화제, (iv) 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 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 포함함 - 로 처리하고, 선택적으로 그리고 바람직하게는 공기-액체 계면에서 배양하여, 단일 호르몬 인슐린을 발현하고 PDX1, NKX6.1 및 MAFA 양성이며, 6기 세포보다 더 높은 MAFA 발현 수준을 갖고 생성된 세포 집단은 MAFA 양성 세포 및 단일 호르몬 인슐린 발현 세포 둘 다를 6기 세포보다 더 높은 백분율로 갖는 췌장 내분비 세포의 형성을 유도한다.

[0084] 소정의 실시 형태에서 본 발명은 만능 줄기 세포 (예를 들어, 전 (pre)-1기 세포)의 7기 세포로의 분화를 포함

하지만, 본 발명은 또한 다른 단계에서 7기 세포로의 세포 분화를 포함한다. 특히, 본 발명은 4기 내지 7기 세포의 분화를 포함한다. 더욱이, 과정이 개별 단계들에서 기재되어 있지만, 분화 과정에 걸친 세포의 처리 및 진행은 순차적이거나 연속적일 수 있다. 더욱이, 만능 줄기 세포의 6기 또는 7기 세포로의 분화는 현탁 배양에서 수행될 수 있다.

[0085] 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 면역검정법, 예컨대 절단된 재료의 면역조직화학적 분석, 웨스턴 블롯팅(Western blotting), 및 온전한 세포에서 접근 가능한 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.

[0086] 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.

[0087] 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. 그러나, 바람직하게는, 하기가 사용된다: 1기 - MCDB-131 (미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 라이프 테크놀로지스 코포레이션으로부터 입수 가능함) 또는 RPMI (시그마-알드리치로부터 입수 가능함); 2기 - MCDB-131 또는 둘베코 변형 이글 배지 F12 ("DMEM-F12"); 3기 내지 5기 - MCDB-131, BLAR (표 1), 또는 DMEM; 및 6기 및 7기 - BLAR 또는 CMRL (라이프 테크놀로지스). 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.

[0088] 1기: 만능 세포의 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.

[0089] 만능 줄기 세포는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해, 또는 본 발명에서 제안된 임의의 방법에 의해 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. 보고에 따르면, 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 유용한 방법이 하기에 개시되어 있다: 문헌[D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology* 23, 1534-1541 (2005)]; [Shinozaki *et al.*, *Development* 131, 1651-1662 (2004)]; [McLean *et al.*, 25, 29-38 (2007)]; [D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology* 24, 1392-1401 (2006)]. 부가적인 적합한 분화 방법들이 하기에 개시되어 있다: 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 제2012/0196365호. 이들 개시는 만능 줄기 세포의 완성 내배엽 세포로의 분화에 관련되므로 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0090] 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  $\beta$  ("GSK3 $\beta$ ") 저해제, 예컨대 미국 특허 출원 공개 제2010/0015711호 (전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 환형 아닐린-피리딘트라이아진 화합물로 보충된다. 바람직한 GSK3 $\beta$  저해제는 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  $\mu$ M, 대안적으로 약 0.5 내지 약 2.5  $\mu$ M, 바람직하게는 약 1  $\mu$ M의 MCX 화합물과 접촉시키는 것을 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.

[0091] 바람직한 실시 형태에서, 세포는 GDF8 및 MCX 화합물의 존재 하에서 1일 동안 배양된 후, GDF8 및 더 낮은 농도의 MCX 화합물의 존재 하에서 1일 동안 배양된 후, MCX 화합물의 부재 하에서의 GDF8의 존재 하에서 1일 동안 배양된다. 특히, 세포는 GDF8 및 약 1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에서 1일 동안 배양된 후, GDF8 및 약 0.1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에서 1일 동안 배양된 후, MCX 화합물의 부재 하에서의 GDF8의 존재 하에서 1일 동안 배양

된다. 대안적으로, 세포는 GDF8 및 약 1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에서 1일 동안 배양된 후, GDF8 및 약 0.1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에서 1일 동안 배양될 수 있다.

[0092] 대안적으로, 만능 줄기 세포는, 문헌[D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology* 23, 1534-1541 (2005)]에 개시된 바와 같이, 혈청의 부재 하에서 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. 또 다른 대안으로서, 만능 줄기 세포는, 문헌[D'Amour *et al.*, *Nature Biotechnology*, 2005]에 개시된 바와 같이, 혈청의 부재 하에서 액티빈 A를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 혈청과 함께 액티빈 A와 함께 세포를 배양함으로써 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 하에서 액티빈 A 및 WNT 리간드를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 WNT 리간드를 제거하고 혈청과 함께 액티빈 A와 함께 세포를 배양함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.

[0093] 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.

[0094] 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성은 특정 프로토콜을 이행하기 전과 후에 마커의 존재에 대해 시험함으로써 결정될 수 있다. 만능 줄기 세포는 전형적으로 그러한 마커를 발현하지 않는다. 따라서, 만능 세포의 분화는 세포가 완성 내배엽의 특징적인 마커를 발현하기 시작할 때 검출될 수 있다.

[0095] 2기: 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.

[0096] 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.

[0097] 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.

[0098] 3기: 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.

[0099] 2기를 이행하여 얻어진 장관 세포는 성장 배지, 예컨대 MCDB-131, DMEM, 또는 주문 제작 (custom) 배지, 예컨대 BLAR (표 I)에서 이 세포를 배양함으로써 3기 세포, 또는 전장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화될 수 있다. 배지는 다음으로 보충될 수 있다: (i) 섬유아세포 성장 인자, 바람직하게는, FGF7 또는 FGF10 및 더욱 바람직하게는 FGF7; (ii) 레티난 ("RA"); (iii) 소닉 헤지호그 (Sonic Hedgehog, "SHH") 신호전달 경로 길항제 (예컨대, 1-피페라진아민, N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-또

는 ((E)-4-벤질-N-((3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일), 에틸렌-피페라진-1-아민)인 스무튼트 길항제 1 (Smoothered Antagonist 1, "SANT-1"), 2-메톡시에틸 1,4,5,6,7,8-헥사하이드로-4-(3하이드록시페닐)-7-(2-메톡시페닐)-2-메틸-5-옥소-3-퀴놀린카복실레이트인 HPI-1, 및 바람직하게는 SANT-1); (iv) 단백질 키나제 C ("PKC") 활성화제, 예컨대 ((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(트라이플루오로메틸)페닐)-2,4-펜타다이에놀일아미노)벤조락탐 ("TPB"), 포르볼-12,13-다이부티레이트 ("PDBu"), 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트 ("PMA") 또는 인돌라탐 V ("ILV") 및 바람직하게는 TPB; (v) 골 형성 단백질 ("BMP") 저해제, 예컨대 LDN-193189, 노긴, 또는 코르딘 (Chordin) 및 바람직하게는 LDN-193189; 및 (vi) 아스코르브산. 대안적으로, 스무튼트 ("SMO") 수용체 저해제 (예컨대, MRT10 (N[[[3-벤조일아미노]페닐]아미노]티옥소메틸]-3,4,5-트라이메톡시벤즈아미드)) 또는 사이클로파민이 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.

[0100] 대안적으로, 2기 세포는 이 세포를 SMO 수용체 저해제, SANT-1, 레틴산, 및 노긴으로 보충된 배양 배지에서 배양함으로써 3기 세포로 분화될 수 있다. 세포는 대략 2 내지 4일, 바람직하게는 약 2일 동안 배양될 수 있다.

[0101] 일 실시 형태에서, 배지는 다음으로 보충된다: 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 mM 아스코르브산, 대안적으로 약 0.2 mM 내지 약 0.4 mM, 대안적으로 약 0.25 mM의 아스코르브산; 약 0.1  $\mu$ M 내지 약 0.4  $\mu$ M의 SANT-1; 약 100 내지 약 300 nM의 TPB; 및 약 50 nM 내지 약 200 nM, 및 약 100 nM의 LDN-193189. 다른 실시 형태에서, 배지는 약 25 ng/ml의 FGF-7, 약 1  $\mu$ M의 레틴산, 약 0.25  $\mu$ M의 SANT-1, 약 200 nM의 TPB, 약 100 nM의 LDN-193189, 및 약 0.25 mM의 아스코르브산으로 보충된다.

[0102] 일 실시 형태에서, 배지는 약 0.1  $\mu$ M 내지 약 0.3  $\mu$ M의 SANT-1, 약 0.5  $\mu$ M 내지 약 3  $\mu$ M의 레틴산 및 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml의 노긴으로 보충된다.

[0103] 4기 내지 7기: 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상과 함께 갑상선 호르몬 및 ALK 저해제 중 하나 또는 둘 다로 보충된 배양 배지로 처리함으로써, 바람직하게는 공기-액체 계면에서 배양함으로써 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 성숙한 표현형 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.

[0104] 일 실시 형태에서, 본 발명은 만능 세포의 체장 내분비 세포로의 경로에서의 모든 단계 동안 공기-액체 계면에서 배양하는 것을 고려하지만, 본 발명은 바람직하게는 평면 또는 액침 배양에서의 1기 내지 4기 세포의 형성 및 공기-액체 계면에서의 세포 배양에 의한 5기, 6기, 및 7기 세포의 형성을 제공한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서 4기, 5기 및 6기 세포를 배양하는 것을 포함하는 만능 세포의 분화의 단계적 방법에 관한 것이다. 소정의 실시 형태에서, 4기 내지 7기 동안 배양되는 세포는 공기-액체 계면에서 배양될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 4기 후기 내지 6기 세포, 또는 5기 및 6기 세포만이 공기-액체 계면에서 배양된다. 또 다른 대안적인 실시 형태에서, 1기 내지 4기는 액침 평면 배양에서 세포를 배양함으로써 수행되고 5기 내지 7기는 액침 현탁 배양에서 배양함으로써 수행된다.

[0105] 부가적으로, 5기, 6기, 및 7기 중 하나 이상, 및 바람직하게는 이들 모두의 단계 동안의 배양은 T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상, ALK5 저해제, 또는 T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상 및 ALK5 저해제 둘 다의 존재 하에서 수행된다. 바람직한 실시 형태에서, 5기, 6기 및 7기 중 하나 이상, 및 바람직하게는 이들 모두의 단계 동안의 배양은 바람직하게는 T3 및 ALK5 저해제의 존재 하에서 및 더욱 바람직하게는 T3 및 ALK5 저해제 II의 존재 하에서 수행된다. 갑상선 호르몬 또는 그의 유사체의 적합한 양은 약 0 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 10 내지 약 900 nM, 대안적으로 약 100 내지 약 800 nM, 대안적으로 약 200 내지 약 700 nM, 대안적으로 약 300 내지 약 600 nM, 대안적으로 약 400 내지 약 500 nM, 대안적으로 약 1 내지 약 500 nM, 대안적으로 약 1 내지 약 100 nM, 대안적으로 약 100 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 500 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 100 내지 약 500 nM, 대안적으로 약 1  $\mu$ M, 및 바람직하게는 약 0.1 내지 1  $\mu$ M이다. ALK5 저해제의 양은 약 250 nM 내지 2  $\mu$ M, 대안적으로 약 300 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 400 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 500 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 600 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 700 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 800 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 1000 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 1500 내지 약 2000 nM, 대안적으로 약 250 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 250 내지 약 500 nM, 대안적으로 약 300 내지 약 1000 nM, 대안



적으로 약 400 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 500 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 600 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 700 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 800 내지 약 1000 nM, 대안적으로 약 500 nM, 대안적으로 약 10  $\mu$ M, 및 바람직하게는 약 10  $\mu$ M이다.

[0106] 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 매트릭셀™일 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태에서, 다공성 기재는 다공성 필터 인서트이고, 이는 매트릭셀™로 코팅될 수 있다. 본 발명의 일 실시 형태에서, 다공성 기재는 코팅되지 않은 필터 인서트이다. 기재의 다공성은 세포 생존력을 유지하고 세포의 분화를 촉진하기에 충분해야 한다. 적합한 기재는 약 0.3 내지 약 3.0  $\mu$ m, 약 0.3 내지 약 2.0  $\mu$ m, 약 0.3 내지 약 1.0  $\mu$ m, 약 0.3 내지 약 0.8  $\mu$ m, 약 0.3 내지 약 0.6  $\mu$ m, 약 0.3 내지 약 0.5  $\mu$ m, 약 0.3 내지 약 3.0  $\mu$ m, 약 0.6 내지 약 3.0  $\mu$ m, 약 0.8 내지 약 3.0  $\mu$ m, 약 1.0 내지 약 3.0  $\mu$ m, 약 2.0 내지 약 3.0  $\mu$ m, 바람직하게는 약 0.4  $\mu$ m의 기공 크기 및 약 5천만개 내지 약 1억2천만개 기공/cm<sup>2</sup>, 약 6천만개 내지 약 1억1천만개 기공/cm<sup>2</sup>, 약 7천만개 내지 약 1억개 기공/cm<sup>2</sup>, 바람직하게는 약 8천만개 내지 약 1억개 기공/cm<sup>2</sup>, 약 9천만 내지 약 1억개 기공/cm<sup>2</sup>, 및 더욱 바람직하게는 약 1억개 기공/cm<sup>2</sup>의 기공 밀도를 갖는 필터 인서트를 포함한다.

[0107] 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.

[0108] 본 발명은 공기-액체 계면에서의 4기 내지 7기 세포, 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 이 세포는 4기의 초기 부분 - 약 1 내지 2일을 의미함 - 동안 액침 평면 배양에서 배양된 후, 4기의 후기 부분 - 약 일수 2 내지 일수 3을 의미함 - 동안 공기-액체 계면에서 배양될 수 있다. 바람직하게는, 4기는 ALI에서가 아니라 오히려 액침 배양에서 수행된다.

[0109] 일 실시 형태에서, 본 발명은 만능 줄기 세포로부터 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 이는 만능 줄기 세포를 배양하는 단계, 만능 줄기 세포를 전장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계; 전장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포를, 선택적으로 공기-액체 계면에서 배양함으로써, 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 방법은, (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제, 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지에 의한 처리를 포함할 수 있다. 방법은 (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지로 처리하고 평면 배양에서 배양함으로써 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (3기 세포)를 체장 전장 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (4기 세포)로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 또한 (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지로 처리하고 평면 배지에서 배양 또는, 그리고 바람직하게는, 공기-액체 계면에서 배양함으로써 체장 전장 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (4기 세포)를 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (6기 세포)로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 6기 세포를 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상 및, 선택적으로 그러나 바람직하게는 항산화제, 예컨대 비타민 E 또는, 바람직하게는, 아세틸 시스테인과 함께 (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지로 처리하여 6기와 비교할 때 더욱 성숙한 표현형을 갖고 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (7기 세포)로 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 유용한 아세틸 시스테인의 양은 약 0.1 내지 약 2 mM이다. 비타민 E의 양은 약 0.1 내지 약 10  $\mu$ M이다. 또 다른 실시 형태에서, 방법은 5기 세포를 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상과 함께 (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지로 처리하여 6기를 수행하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상과 함께 (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지로 5기 세포를 처리하여 6기를 수행한 후, 오로라 키나제 저해제, RSK 저해

제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상 및, 선택적으로 그러나 바람직하게는 항산화제, 예컨대 비타민 E 또는, 바람직하게는, 아세틸 시스테인과 함께 (i) 하나 또는 둘 다의 T3, T4 또는 이들의 유사체, (ii) ALK5 저해제 또는 (i) 및 (ii) 둘 다로 보충된 배지로 처리하여 7기를 수행한다.

[0110] 본 발명의 일 실시 형태는 성숙 베타 세포의 특징적인 마커를 발현하는 췌장 내분비 세포 (7기 세포)를 형성하는 방법이고, 방법은 바람직하게는 공기-액체 계면에서 배양함으로써 췌장 전장 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (4기 세포)를 7기 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 6기 세포, 또는 미성숙 베타 세포인 세포의 형성을 야기한다. 방법은, 바람직하게는 적어도 5기 내지 7기 동안, T3, T4, 또는 이들의 유사체, ALK5 저해제, 또는 둘 다로 보충된 배지로의 처리를 포함한다.

[0111] 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 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 90,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 80,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 70,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 60,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 50,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 40,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 30,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 20,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 10,000개 세포/ $\mu$ l, 약 1000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 5000개 세포/ $\mu$ l, 약 5000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 10,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 20,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 30,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 40,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 50,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 60,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 100,000개 세포/ $\mu$ l, 약 20,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 80,000개 세포/ $\mu$ l, 약 30,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 70,000개 세포/ $\mu$ l, 약 40,000개 세포/ $\mu$ l 내지 약 60,000개 세포/ $\mu$ l, 및 바람직하게는 약 50,000개 세포/ $\mu$ l를 갖는 현탁액으로부터 다공성 기재 상에 시딩될 수 있다. 세포는 개별 세포 또는 세포의 응집물 또는 세포괴를 함유하는 세포 현탁액의 액적으로서 시딩될 수 있다. 생성된 세포 침착물 (deposit)은 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $6 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $7 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $8 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $9 \times 10^6$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $1 \times 10^7$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $2 \times 10^7$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $3 \times 10^7$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $4 \times 10^7$  내지 약  $5 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $4 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $3 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $2 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $1 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $9 \times 10^6$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $8 \times 10^6$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $7 \times 10^6$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $5 \times 10^6$  내지 약  $6 \times 10^6$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $7 \times 10^6$  내지 약  $4 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $8 \times 10^6$  내지 약  $3 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 약  $9 \times 10^6$  내지 약  $2 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ , 및 바람직하게는 대략 약  $1 \times 10^7$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ 을 함유할 수 있다.

[0112] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 PDX1 및 NKX6.1을 공동-발현하는 세포의 집단을, 바람직하게는 공기-액체 계면에서 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 방법에 관한 것이다. 다른 실시 형태에서, 공기-액체 계면에서 배양된 췌장 내배엽 세포는 하기로부터 선택되는 화합물로 처리함으로써 췌장 내분비 세포로 추가로 분화된다: ALK5 저해제, BMP 저해제, 감마-세크레타제 저해제, 에프린 (Ephrin) 리간드, EphB 저해제, PKC 저해제, EGF $\alpha$  저해제, 레틴산, 비타민 C, T3/T4, 글루코스, 세포 주기 조절제, WNT 조절제, SHH 저해제, 오로라 저해제, 항산화제, 비타민 E, 아세틸-시스테인, 또는 이들의 조합.

[0113] 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 만능 세포를 분화시키는 단계적 방법에 관한 것이고, 이는 4기 내지 6기 세포를 충분한 양의 (i) T3, T4 및 이들의 유사체 중 하나 이상, (ii) ALK5 저해제, 또는 (i) 및 (ii) 둘 다를 함유하는 배지에서 배양하는 단계, 및 6기 세포를 선택적으로, 그리고 바람직하게는, 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상, 및 항산화제를 함유하는 배지에서 추가로 배양하여 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현하는 췌장 내분비 세포 및 췌장 내분비 세포의 집단을 생성하는 단계를 포함한다.



- [0114] 일부 실시 형태에서, 생성된 세포 집단의 세포들의 10% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 다른 실시 형태에서, 집단의 세포들의 20% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 다른 실시 형태에서, 집단의 세포들의 30% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 실시 형태에서, 집단의 세포들의 40% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 실시 형태에서, 집단의 세포들의 50% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 대안적인 실시 형태에서, 세포들의 60% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 대안적인 실시 형태에서, 집단의 세포들의 70% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 또 다른 실시 형태에서, 집단의 세포들의 80% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 다른 실시 형태에서, 집단의 세포들의 90% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다. 대안적인 실시 형태에서, 집단의 세포들의 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 이상이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현한다.
- [0115] 4기: 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 체장 전장 전구 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 1)인 분화 배지로 3기 세포를 처리하는 단계를 포함한다. 배지는 하기, 즉 (a) 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ALK5 저해제: TGF- $\beta$  수용체 저해제 V, TGF- $\beta$  수용체 저해제 I, TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI, TGF- $\beta$  수용체 저해제 III, TGF- $\beta$  저해제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 저해제 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, 노킨 또는 코르딘으로부터 선택되는 BMP 수용체 저해제; (e) TPB, PPBu, PMA, 및 ILV로부터 선택되는 PKC 활성화제; (f) FGF-7 또는 FGF-10으로부터 선택되는 섬유아세포 성장 인자; (g) 레틴산; 및 (h) 아스코르브산 중 하나 이상으로 보충될 수 있다. 예를 들어, 유용한 분화 배지를 제공하기 위해, 성장 배지, 예컨대 MCDB131 또는, 그리고 바람직하게는, BLAR는 SHH 신호전달 경로 길항제 (예컨대, SANT-1 또는 HPI-1), BMP 저해제 (예컨대, LDN-193189, 노킨 또는 코르딘), 아스코르브산, 및 PKC 활성화제 (예컨대, TPB, PDBu, PMA 또는 ILV)로 보충될 수 있다. 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 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제로 보충될 수 있다. 바람직한 실시 형태에서, 3기 세포는 약 0.25  $\mu$ M SANT-1; 약 100 nM RA; 약 2 ng/ml FGF7; 약 100 nM LDN-193189; 및 약 0.25 mM 아스코르브산; 및 약 200 nM로 보충된 배지로 3일 동안 처리될 수 있다.
- [0117] 4기에서, 세포는 전체 단계 동안 또는, 그리고 바람직하게는, 약 2 내지 3일의 평면 배양 후에 공기-액체 계면에서 배양될 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 공기-액체 계면에서 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포를 분화시키기 위한 시험관내 세포 배양을 제공하고, 이는 다음을 포함한다: (a) 배양 용기; (b) 용기 부피의 일부만을 채우기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 배지와 서로 접한 용기의 일부를 채우는 용기 내의 공기; (d) 배지와 공기 사이의 계면에 위치한 다공성 기재; 및 (e) 기재의 표면 상에 배치되어 배지가 세포 표면의 일부와만 접촉하게 한 만능 줄기 세포로부터 유래된 세포. 대안적으로, 4기는 전체적으로 평면 배양에서 수행될 수 있다.
- [0118] 다른 실시 형태에서, 4기를 완료한 세포는 로-관련 키나제 (Rho-associated kinase, "ROCK") 저해제, 예컨대 Y27632 ((1R,4r)-4-((R)-1-아미노에틸)-N-(피리딘-4-일)사이클로헥산카복스아미드), 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)설폰닐]호모피페라진, 2HC1) 및, SR3677 (N-[2-[2-(다이메틸아미노)에톡시]-4-(1H-피라졸-4-일)페닐]-2,3-다이하이드로-1,4-벤조다이옥신-2-카복스아미드 다이하이드로클로라이드)로 처리될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 약 1 내지 20  $\mu$ M, 대안적으로 약 1 내지 15  $\mu$ M, 대안적으로 약 1 내지 10  $\mu$ M, 바람직하게는 약 10  $\mu$ M의 ROCK 저해제가 사용될 수 있다.
- [0119] 소정의 실시 형태에서, 평면 배양에서 1 내지 2일 동안 배양된 세포를 의미하는 4기 후기 세포만이 4기의 완성을 위해 공기-액체 계면에서 후속 배양될 수 있다. 일 실시 형태에서, ROCK 저해제로 처리된 4기 후기 세포만이 공기-액체 계면에서 배양된다. 다른 실시 형태에서, 0.5 내지 약  $0.75 \times 10^5$ 개 세포/마이크로리터가 공기-액체 계면에서 배양되기 위해 시딩되고; 대안적으로, 약 2 내지  $6 \times 10^6$ 개 세포가 공기-액체 계면에서 배양되기 위해 시딩된다. 소정의 실시 형태에서, 세포는 공기-액체 계면에서 배양되기 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단

백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소, 예컨대 트리플 (TrypLE)<sup>TM</sup>, 아큐타제 (Accutase)<sup>TM</sup>, 또는 디스파제 (Dispase)<sup>TM</sup>를 함유하는 용액으로 처리될 수 있다.

[0120] 대안적인 실시 형태에서, 3기 세포는 ALK5 저해제, 노긴, 및 PKC 활성화제, 예컨대 TPB로 보충된 성장 배지를 포함하는 분화 배지로 처리될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 배지는 약 0.1  $\mu\text{M}$  ALK5 저해제, 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, 세포는 2일 동안 처리될 수 있고, 이어서 마지막 날에 세포는 단백질 분해 효소, 콜라겐 분해 효소 또는 둘 다, 예컨대 디스파제<sup>TM</sup>로 처리되고, 약 100 마이크로미터 미만의 지름을 갖는 세포괴로 부서진 후 ALK5 저해제 및 LDN-193189의 존재 하에서 배양될 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 4기 세포를 배양하는 것은 내분비-관련 마커와 함께 췌장 내배엽 마커를 유의하게 향상시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 공기-액체 계면에서 4기 세포를 배양하여 췌장 내배엽 마커 및 내분비-관련 마커를 향상시키는 방법을 제공한다.

[0121] 5기: 췌장 전장 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.

[0122] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은, 임의의 적합한 성장 배지일 수 있고 바람직하게는 MCDB-131, DMEM 또는, 그리고 바람직하게는 주문 제작 배지, 예컨대 BLAR (표 I)인 분화 배지로 4기 세포를 처리하는 단계를 포함한다. 배지는 하기, 즉 (a) 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ALK5 저해제: TGF- $\beta$  수용체 저해제 V, TGF- $\beta$  수용체 저해제 I, TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI, TGF- $\beta$  수용체 저해제 III, TGF- $\beta$  저해제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 저해제 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 코르딘으로부터 선택되는 BMP 수용체 저해제; (e) 레틴산; (f) 아스코르브산; (g) 헤파린; 및 (h) 황산아연 중 하나 이상으로 보충되고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 세포를 배양하여 세포를 5기 세포로 분화시킬 수 있다. 다른 실시 형태에서, 성장 배지는 또한 SMO 저해제 (예컨대, MRT10 또는 사이클로파민) 및 바람직하게는 FGF-7 또는 FGF-10으로부터 선택되는 섬유아세포 성장 인자 중 하나 또는 둘 다를 보충된다. 4기 세포의 처리를 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 수행하여 세포를 5기 세포로 분화시킨다.

[0123] 바람직한 실시 형태에서, 4기 세포는 세포를 약 0.1  $\mu\text{M}$  내지 약 0.4  $\mu\text{M}$ 의 SANT-1 및 바람직하게는 약 0.25  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ 의 T3, 및 약 10000 nM ALK5 저해제, 더욱 바람직하게는 ALK 5 저해제 II로 보충된 배지로 처리함으로써 5기 세포로 분화된다. 또 다른 실시 형태에서, 세포는 선택적으로 그리고 바람직하게는 또한 약 1 내지 15  $\mu\text{M}$ , 대안적으로 약 1 내지 10  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub>, 대안적으로 약 5 내지 10  $\mu\text{M}$ , 바람직하게는 약 10  $\mu\text{M}$  약 10  $\mu\text{M}$  황산아연 및 약 1 내지 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 바람직하게는 약 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린으로 처리된다. 4기 세포의 처리를 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 수행하여 세포를 5기 세포로 분화시킨다.

[0124] 또 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 4기 세포를 헤파린, SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, RA, BMP 수용체 저해제 및 ALK5 저해제로 보충된 배지로 처리하는 단계 및 세포를 공기-액체 계면에서 약 3일 동안 배양하여 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 RA, BMP 수용체 저해제 및 ALK5 저해제와 함께 SMO 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 다를 보충될 수 있다. 따라서, 일 실시 형태에서, 4기 세포를 헤파린, ZnSO<sub>4</sub>, SMO저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, RA, LDN-193189 및 ALK5 저해제 II로 보충된 배지로 처리함으로써 4기 세포는 5기 세포로 분화될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 다를 보충될 수 있다. 일 실시 형태에서, 4기 세포는 세포를 약 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린, 약 0.25  $\mu\text{M}$  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- $\beta$  수용체 저해제 V, TGF- $\beta$  수용체 저해제 I, TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI, TGF- $\beta$  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.

- [0125] 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  $\mu$ g/ml의 헤파린, 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 100 nM LDN-193189, 및 약 10000 nM의 ALK5 저해제 II로 보충된 배지로 처리된다. 또 다른 대안적인 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 4기 세포를 SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, RA, 및 ALK5 저해제로 보충된 배지로 처리하는 단계 및 세포를 바람직하게는 공기-액체 계면에서 약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 배양하여 세포를 5기 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 다로 보충될 수 있다. 일 실시 형태에서, 4기 세포는 세포를 약 0.25  $\mu$ M 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.
- [0126] 공기-액체 계면에서의 배양을 위해 시딩되는 세포의 양은 다양할 수 있다. 예를 들어, 공기-액체 계면에서 세포를 배양하기 위해, 약 0.5 내지  $6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l를 함유하는 세포 현탁액의 액적이 다공성 기재 (예를 들어, 필터) 상에 시딩될 수 있다. 공기-액체 계면에 위치한 다공성 기재 예컨대 필터 상에 시딩될 수 있는 현탁액은 약  $2 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 약  $4 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 약  $5 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 약  $5 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 약  $2 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $5 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 약  $2 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $4 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 또는 약  $3 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l를 함유할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 약  $0.5 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $0.75 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 약  $0.6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $0.75 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l; 또는 약  $0.5 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l 내지 약  $0.6 \times 10^5$ 개 세포/ $\mu$ l를 함유하는 세포 현탁액의 액적이 ALI에서 배양될 다공성 지지체 상에 시딩된다.
- [0127] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 4기 세포를 BMP 수용체 저해제 (예를 들어, LDN-193189, 노긴 또는 코르딘) 및 ALK5 저해제로 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  $\mu$ M T3로 보충될 수 있다. 세포는 피의 형태일 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 세포는 공기-액체 계면에서 배양되기 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소를 함유하는 용액으로 처리될 수 있다.
- [0128] 전술한 방법에 따라, 본 발명은 췌장 전장 전구체의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내배엽/췌장 내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공하고, 이는 다음을 포함한다: (a) 배양 용기; (b) 상기 용기 부피의 일부만을 채우기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 상기 배지와 서로 접한 상기 용기의 일부를 채우는 상기 용기 내의 공기; (d) 상기 배지와 상기 공기 사이의 계면에 위치한 다공성 기재; 및 (e) 상기 기재의 표면 상에 배치되어 상기 배지가 상기 세포 표면의 일부와만 접촉하게 한 만능 줄기 세포로부터 유래된 췌장 전장 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포.
- [0129] 6기: 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.
- [0130] 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 처리하는 단계를 포함한다. 배지는 하기, 즉 (a) 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ALK5 저해제: TGF- $\beta$  수용체 저해제 V, TGF- $\beta$  수용체 저해제 I, TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI, TGF- $\beta$  수용체 저해제 III, TGF- $\beta$  저해제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 저해제 II; (b) T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 갑상선 호르몬; (c) 바람직하게는 LDN-193189, 노긴 또는 코르딘으로부터 선택되는 BMP 수용체 저해제; (d) 감마 세크레타제 저해제, 예컨대 감마 세크레타제 저해제 XX, 감마 세크레타제 저해제 XXI, 감마 세크레타제 저해제 XVI, 또는 DAPT; (e) 아스코르브산; (f) 헤파린; 및 (g) 황산아연 중 하나 이상으로 보충되고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 2 내지 4일 동안, 바람직하게는 약 3일 동안 배양하여 5기 세포를 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 선택적으로, 배지는 추가적으로 SHH 신호전달 경로 길항제, 스무트드 수용체 저해제, 섬유아세포 성장 인자, 및 레틴산 중 하나 이상으로 보충될 수 있다.
- [0131] 바람직한 실시 형태에서, 5기 세포는 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 100 nM LDN-193189, 약 10000

nM의 ALK5 저해제 및 바람직하게는 ALK 5 저해제 II, 1  $\mu$ M T3, 약 100 nM의 감마 세크레타제 저해제로 보충된 배지로 약 7일 동안 처리하여 6기 세포로 분화될 수 있다. 대안적으로, 5기 세포는 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 1000 nM ALK5 저해제 및 1  $\mu$ M 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.

[0132] 대안적으로, 5기 세포는 헤파린, SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, BMP 저해제, T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물, 및 ALK5 저해제로 보충된 배지로 처리하고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 1 내지 7일, 대안적으로 약 6일, 대안적으로 약 7일 동안 배양하여 6기 세포로 분화될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 다로 보충될 수 있다. 예를 들어, 세포는 약 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 약 0.25  $\mu$ M 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 nM, 및 대안적으로 약 10,000 nM의 ALK5 저해제로 보충된 배지에서 배양될 수 있다. 적합한 ALK5 저해제는 SD-208, ALK5 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 V, TGF- $\beta$  수용체 저해제 I, TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI, TGF- $\beta$  수용체 저해제 III 및 이들의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0133] 바람직한 실시 형태에서, ALK5 저해제는 ALK5 저해제 II이다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 약 10000 nM의 ALK5 저해제 II가 사용된다. 따라서, 일 실시 형태에서, 5기 세포는 헤파린, SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, BMP 저해제, T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물, 및 ALK5 저해제로 보충된 배지로 처리하고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 바람직하게는 약 7일 동안 배양하여 6기 세포로 분화될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 SMO 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 다로 보충될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 세포는 공기-액체 계면에서 배양되기 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소를 함유하는 용액으로 처리될 수 있다.

[0134] 다른 실시 형태에서, 5기 세포는 헤파린, SMO 저해제 또는 SHH 신호전달 경로 길항제, BMP 저해제, T3, 및 ALK5 저해제 II로 보충된 배지로 처리하고, 공기-액체 계면에서 약 5일 내지 약 7일, 대안적으로 약 5일, 대안적으로 약 6일, 대안적으로 약 7일 동안 배양하여 6기 세포로 분화될 수 있다. 이러한 실시 형태에서, 배지는 약 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 100 nM LDN-193189, 약 1000 nM의 T3 및 약 10,000 nM의 ALK5 저해제 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 저해제 및 SHH 신호전달 경로 길항제 둘 다로 보충될 수 있다.

[0135] 본 발명의 특히 바람직한 실시 형태에서, 오로라 키나제 저해제, 바람직하게는 오로라 키나제 저해제 II, RSK 저해제, 바람직하게는 RSK 저해제 II, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 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  $\mu$ M 내지 약 10 nM일 수 있다.

[0136] 전술한 방법에 따라, 본 발명은 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공하고, 이는 다음을 포함한다: (a) 배양 용기; (b) 상기 용기 부피의 일부분을 채우기에 충분한 상기 용기 내의 성장 배지의 부피; (c) 상기 배지와 서로 접한 상기 용기의 일부를 채우는 상기 용기 내의 공기; (d) 상기 배지와 상기 공기 사이의 계면에 위치한 다공성 기재; 및 (d) 상기 기재의 표면 상에 배치되어 상기 배지가 상기 세포 표면의 일부와만 접촉하게 한 만능 줄기 세포로부터 유래된 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포.

[0137] 일 실시 형태에서는, 본 발명의 실시 형태에 따라 배양된 5기 세포가 활용되고 6기 세포로 분화되는 반면, 다른 실시 형태에서는 다른 프로토콜에 따라 배양된 5기 세포가 활용될 수 있다.

[0138] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 단일-호르몬 양성인 6기 세포의 형성을 야기한다. 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 6기에서 주문 제작 배지인 BLAR (표 I 참조)을 사용한다. 배지는 매일 또는 대안적으로 격일로 교환될 수 있고, 바람직하게는 교환된다.



- [0139] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서 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 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포, 내지 6기 세포를 배양하여 NKX6.1 6기 세포를 발현하는 단일 호르몬 인슐린 양성 세포를 형성하는 방법에 관한 것이다.
- [0140] 7기: 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 더욱 성숙한 표현형을 갖는 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화.
- [0141] 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 임의의 적합한 성장 배지, 바람직하게는, 예컨대 MCDB-131 또는 CMRL, 또는, 및 더욱 바람직하게는, 주문 제작 배지, 예컨대 BLAR (표 1)일 수 있는 분화 배지로 6기 세포를 처리하는 단계를 포함한다. 배지는 하기, 즉 (a) 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 ALK5 저해제: TGF- $\beta$  수용체 저해제 V, TGF- $\beta$  수용체 저해제 I, TGF- $\beta$  수용체 저해제 IV, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VIII, TGF- $\beta$  수용체 저해제 II, TGF- $\beta$  수용체 저해제 VI, TGF- $\beta$  수용체 저해제 III, TGF- $\beta$  저해제 SB431542, SD-208, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, ALK5i 및 ALK5 저해제 II; (b) T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 갑상선 호르몬; (c) 헤파린; (d) 황산아연; (e) 비타민 E, 비타민 C, 아세틸 시스테인, 항산화 보충제 A1345, 글루타티온, 피옥사이드 디스뮤타제, 카탈라제, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항산화제; 및 (f) 바람직하게는 오로라 키나제 저해제 II인 오로라 키나제 저해제, 바람직하게는 RSK 저해제 II인 RSK 저해제, 및 바람직하게는 EPZ 5676인 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제 중 하나 이상 중 하나 이상으로 보충되고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 7 내지 21일 동안, 바람직하게는 약 7 내지 10일 동안, 더욱 바람직하게는 약 7일 동안 배양하여 6기 세포를 7기 세포로 분화시킨다. 일 실시 형태에서, 성장 배지는 T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물, ALK5 저해제, 항산화제 및 오로라 키나제 저해제, 바람직하게는 오로라 키나제 저해제 II 또는 RSK 저해제, 바람직하게는 RSK 저해제 II로 보충된다. 6기 세포는 약 10000 nM의 ALK5 저해제 II, 약 1000 nM의 T3, 약 10  $\mu$ M의 6-하이드록시-2,5,7,8-테트라메틸 크로만-2-카복실산 ("트로록스 (Trolox)"), 및 약 1  $\mu$ M 내지 약 1  $\mu$ M의 오로라 키나제 저해제 II 또는 RSK 저해제 II로 보충된 배지로 약 7일 동안 처리하여 7기 세포로 분화될 수 있다.
- [0142] 일 실시 형태에서, 6기 세포는 약 10000 nM의 ALK5 저해제, 약 1  $\mu$ M의 T3, 약 2  $\mu$ M의, 오로라 키나제 저해제 II, RSK 저해제 II, 및 EPZ 5676 중 하나 이상, 및 약 1 mM N-아세틸 시스테인으로 보충된 배지로 처리하여 7기 세포로 분화될 수 있다. 대안적으로, 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 및 약 100 nM LDN-193189 중 하나 이상이 또한 첨가될 수 있다.
- [0143] 대안적으로, 6기 세포는 헤파린, T3, T4, 이들의 유사체 또는 이들의 혼합물, ALK5 저해제, 항산화제, 및 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제, DOT1L의 단백질 메틸 트랜스퍼라제 저해제 또는 이들의 혼합물로 보충된 배지로 처리하고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 7 내지 21일, 대안적으로 약 7 내지 10일, 바람직하게는 약 7일 동안 배양하여 7기 세포로 분화될 수 있다. 대안적인 실시 형태에서, 배지는 레틴산, SMO 저해제, SHH 신호 전달 경로 길항제, BMP 수용체 저해제, 및 N-아세틸 시스테인 중 하나 이상으로 보충될 수 있다.
- [0144] 바람직한 실시 형태에서, ALK5 저해제는 ALK5 저해제 II이다. 더욱 바람직한 실시 형태에서, 약 10000 nM의 ALK5 저해제 II가 사용된다. 따라서, 일 실시 형태에서, 6기 세포는 헤파린, T3, T4, 이들의 유사체 및 이들의 혼합물, 및 ALK5 저해제, 항산화제, 및 오로라 키나제 저해제, RSK 저해제 또는 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제로 보충된 배지로 처리하고, 바람직하게는 공기-액체 계면에서, 약 7일 동안 배양하여 7기 세포로 분화될 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 세포는 공기-액체 계면에서 배양되기 전에 세포 박리 용액, 예컨대 단백질 분해 효소 및 콜라겐 분해 효소를 함유하는 용액으로 처리될 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 실시 형태에서, 오로라 키나제 저해제, 바람직하게는 오로라 키나제 저해제 II, RSK 저해제, 바람직하게는 RSK 저해제 II, 및 단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제, 바람직하게는 EPZ 5676 중 하나 이상이 배지에 첨가된다. 첨가되는 양은 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 nM 내지 2000 nM 오로라 키나제 저해제, 더욱 바람직하게는 약 2000 nM 오로라 키나제 또는 RSK 저해제 또는 약 100 내지 500 nM DOT1L 저해제, 및 더욱 바람직하게는 약 1  $\mu$ M 내지 약 10 nM의 DOT1L 저해제일 수 있다.
- [0145] 전술한 방법에 따라, 본 발명은 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 성숙한 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 세포 배양을 추가로 제공하고, 이는 다음을 포함한다: (a) 배양 용기; (b) 상기 용기 부피의 일부만을 채우기에 충분한 상기 용기 내 성장 배지의 부피; (c) 상기 배지와 서로 접한 상기 용기의 일부를 채우는 상기 용기 내 공기; (d) 상기 배지와 상기 공기 사이의

계면에 위치한 다공성 기재; 및 (d) 상기 기재의 표면 상에 배치되어 상기 세포 표면의 일부만이 상기 배지에 접촉하는 만능 줄기 세포로부터 유래된 췌장 내배엽/내분비 전구 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포.

[0146] 일 실시 형태에서는, 본 발명의 실시 형태에 따라 배양된 6기 세포가 활용되고 7기 세포로 분화되는 반면, 다른 실시 형태에서는 다른 프로토콜에 따라 배양된 6기 세포가 활용될 수 있다.

[0147] 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 단일-호르몬 양성인 7기 세포의 형성을 야기한다. 따라서, 일 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1, 인슐린, PDX1, 및 MAFA를 공동-발현하는 7기 세포를 생성한다. 다른 실시 형태에서, 본 발명의 방법은 NKX6.1, PDX1, 인슐린 및 MAFA를 공동-발현하는 7기 세포를 생성한다. 또 다른 실시 형태에서, 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% 이상의 세포 각각이 인슐린, PDX1, NKX6.1, 및 MAFA를 발현하는 세포 집단이 생성된다.

[0148] 본 발명의 소정의 그리고 바람직한 실시 형태에서, 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.

[0149] 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포 내지 7기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, NKX6.1, PDX1, MAFA 및 인슐린을 공동-발현하는 7기 세포를 형성하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시 형태에서, 본 발명은 공기-액체 계면에서 4기, 바람직하게는 4기 후기 세포, 내지 7기 세포를 배양하여 NKX6.1, PDX1, 및 MAFA 7기 세포를 발현하는 단일 호르몬 인슐린 양성 세포를 형성하는 방법에 관한 것이다.

[0150] 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 배양된 4기 내지 7기 세포는 384 내지 6-웰 포맷의 상이한 배양 포맷에서 시험될 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 면역염색에 의해 측정함으로써, 또는 소분자/생물제제의 첨가에 의해 영향을 받은 세포에 의한 인자의 분비에 대해서는 ELISA에 의해 달성될 수 있다.

[0151] **본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 세포.**

[0152] 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 세포, 또는 세포의 집단을 제공한다. 본 발명은 또한, 바람직하게는 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포, 또는 세포 집단을 제공한다. 본 발명은 또한, 바람직하게는 NKX6.1 발현 (바람직하게는 약 30% 초과), PDX1 발현 (바람직하게는 약 30% 초과), 및 MAFA 발현 (바람직하게는 약 10% 초과)을 특징으로 하는, 성숙한 표현형의 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 인슐린 양성 세포 또는 인슐린 양성 세포의 집단을 제공한다.

[0153] **치료 방법.**

[0154] 본 발명은 치료 방법 및 특히 당뇨병을 앓거나, 당뇨병 발병의 위험이 있는 환자를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 치료 방법에 사용되기 위한 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 또는 얻어진 세포의 집단을 제공한다. 특히, 본 발명은 당뇨병을 앓거나, 당뇨병 발병의 위험이 있는 사람을 치료하는 방법에 사용되기 위한 본 발명의 방법에 의해 얻어질 수 있는 또는 얻어진 세포 또는 세포의 집단을 제공한다. 당뇨병은 1형 또는 2형일 수 있다.

[0155] 일 실시 형태에서, 치료 방법은 본 발명의 방법에 의해 얻어진 또는 얻어질 수 있는 세포를 환자에 이식하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 치료 방법은 만능 세포를, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같이, 시험관내에서 1기, 2기, 3기, 4기, 5기, 6기 또는 7기 세포로 분화시키는 단계, 및 분화 세포를 환자에 이식하는 단계를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 방법은 만능 줄기 세포를 분화시키는 단계 전에, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같이, 만능 줄기 세포를 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 방법은 이식 단계 후에 생체내 (*in vivo*)에서 세포를 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 방법들 중 어느 하나로 치료되는 환자는 포유류이고 바람직하게는 인간이다.

[0156] 일 실시 형태에서, 세포는 분산된 세포로서 이식될 수 있거나, 또는 괴로 형성되어 혈관계, 예를 들어, 간문맥으로 주입될 수 있다. 대안적으로, 세포는 생체적합성, 분해성, 중합체 지지, 다공성, 비-분해성 장치 내에 제



공될 수 있거나, 숙주의 면역계로부터 보호되기 위해 캡슐화될 수 있다. 일 실시 형태에서, 치료 방법은 이식 전에 세포를 3차원 지지체로 통합시키는 단계를 추가로 포함한다. 세포는 환자 내로 이식되기 전에 이 지지체 상에서 시험관내에서 유지될 수 있다. 대안적으로, 세포를 함유한 지지체는 추가의 시험관내 배양 없이 환자 내에 직접 이식될 수 있다. 지지체에는 이식된 세포의 생존과 기능을 촉진하는 적어도 하나의 약제학적 작용제가 선택적으로 혼입될 수 있다. 세포는 수용자 내의, 예를 들어 간, 천연 췌장, 신장 피막하 공간, 장막, 복막, 장막하 공간, 장, 위, 또는 피하 주머니를 포함한 적절한 부위에 이식될 수 있다.

[0157] 이식된 세포의 생체내 추가 분화, 생존 또는 활성을 향상시키기 위하여, 추가 인자, 예컨대 성장 인자, 항산화제 또는 항염증제가 세포의 투여 전에, 세포의 투여와 동시에, 또는 세포의 투여 후에 투여될 수 있다. 이들 인자는 내인성 세포에 의해 분비되어 제자리에서 투여된 세포에 노출될 수 있다. 이식된 세포는 내부 및 외부 투여된 당업계에 알려진 성장 인자의 임의의 조합에 의해 분화되도록 유도될 수 있다.

[0158] 이식에 사용되는 세포의 양은 이식 대상의 상태 및 이식 치료에 대한 반응을 포함한 다수의 인자에 좌우되고, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0159] 본 발명은 하기의 비제한적인 실시예를 고려함으로써 더욱 명확해질 것이다.

## [0160] 실시예

### [0161] 실시예 1

#### [0162] 공기-액체 계면에서 배양된 췌장 내배엽 세포 - 5기로부터 7기로의 MAFA 발현의 점진적 증가

[0163] 본 실시예는 5기 내지 7기 동안 공기-액체 계면 ("ALI")에서 배양되고 5기로부터 7기까지 T3 및 ALK5 저해제 II로 처리된 췌장 내배엽 세포에서의 MAFA 발현의 동태학을 입증한다. 계대 (passage) 42에서의 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포 (WA01 세포, 미국 위스콘신주 매디슨 소재의 위셀 리서치 인스티튜트)를, 10  $\mu$ M의 Rock 저해제 Y-27632 (카탈로그 번호 Y0503, 시그마-알드리치)로 보충된, 돌베코 변형 이글 배지; 영양 혼합물(Nutrient mixture) F-12 ("DMEM-F12") (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 라이프 테크놀로지스 코퍼레이션, 카탈로그 번호 11330-032), 1:100 희석 ("1X 농도")의 글루타맥스 (GlutaMAX)<sup>TM</sup> (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 35050-079), 0.25 mM 아스코르브산 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨, 카탈로그 번호 A4544), 100 ng/ml의 섬유아세포 성장 인자 2 ("FGF2") (미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 233-FB-025), 1 ng/ml의 형질전환 성장 인자 베타 ("TGF- $\beta$ ") (알앤디 시스템즈 인크., 카탈로그 번호 240-B-002), 1:100 희석의 인슐린-트랜스페린-셀레늄-에탄올아민 ("ITS-X") (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 51500056), 2% 무지방산 우태아 혈청 알부민 ("FAF-BSA") (미국 아이다호주 분 소재의 프롤리안트, 인크. (Proliant, Inc.), 카탈로그 번호 68700), 및 20 ng/ml의 인슐린-유사 성장 인자-1 ("IGF-1") (알앤디 시스템즈, 카탈로그 번호 291-G1-200)로 된 배지에서 1:30 희석의 매트릭젤<sup>TM</sup> (미국 뉴욕주 코닝 소재의 코닝 인코포레이티드, 카탈로그 번호 354230)로 코팅된 접시 상에 단일 세포로서  $1 \times 10^5$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ 로 시딩하였다. 시딩 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS (마그네슘 또는 칼슘이 없는 인산염 완충 식염수)로 세척한 후 1x 트리플<sup>TM</sup> 익스프레스 효소 (라이프 사이언스; 카탈로그 번호 14190)와 함께 3 내지 5분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 방출된 세포를 DMEM-F12로 행구고 1000 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠렛을 10  $\mu$ M Y-27632, 1:100 희석 ("1X 농도")의 글루타맥스<sup>TM</sup>, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml FGF2, 1 ng/ml TGF- $\beta$ , 1:100 희석의 ITS-X, 2% FAF-BSA 및 20 ng/ml IGF-1로 보충된 DMEM-F12 중에 재현탁하고 단일 세포 현탁액을 대략 1.3 내지  $1.5 \times 10^5$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ 로 시딩하였다. 배양물에 배지를 매일 공급하였고, 하기 프로토콜에 따라, 시딩 후 48시간째에 분화를 개시한 결과 초기 컨플루언시 (confluency)는 약 90%였다. 사용된 분화 프로토콜의 1기 내지 4기 동안에는, 배양물을 평면 부착 배양으로 유지하였고 5기 내지 7기 동안에는 공기-액체 계면에서 유지하였다.

#### [0164] 1기 (3일):

[0165] 매트릭젤<sup>TM</sup> (1:30 희석)-코팅 접시 상에 플레이팅된 세포를 먼저 1X 불완전 DPBS로 행군 후 하기의 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 0.5% FAF-BSA, 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨 (시그마-알드리치 카탈로그 번호 S3187); 1X 농도의 글루타맥스<sup>TM</sup>; 10 mM 농도의 글루코스 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 G8769)를 얻기 위해, 이 단계 및 사용된다면 다음 단계에서 4.5 mM D-글루코스 (시그마-알드리치, 카탈로그 번호 G8769); 100 ng/ml 성장/분화 인자 8 ("GDF8") (미국 뉴저지주 록키 힐 소재의 페프rotech (Peprotech), 카탈로그 번호 120-00); 및 1  $\mu$ M의 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 보충된 MCDB-131 배지 (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 10372-019). 이어서, 0.5% FAF-BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8, 및 0.1 μM MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 0.5%의 무지방산 BSA, 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 및 100 ng/ml GDF8로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0166] 2기 (2일):

[0167] 먼저 1X 불완전 DPBS로 세포를 행군 후, 0.5%의 FAF-BSA; 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨; 1X 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 0.25 mM 아스코르브산 및 25 ng/ml FGF7 (알앤디 시스템즈, 인크., 카탈로그 번호 251-KG.)로 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.

[0168] 3기 (2일):

[0169] 1:200 희석의 ITS-X; 4.5 mM 글루코스; 1X 글루타맥스™; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 μM SANT-1 (N-[(3,5-다이메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일)메틸렌]-4-(페닐메틸)-1-피페라진아민) (시그마 알드리치, 카탈로그 번호 S4572); 1 μM 레틴산 ("RA") (시그마 알드리치, 카탈로그 번호 R2625); 25 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 200 nM PKC 활성화제 ((2S, 5S-(E,E)-8-(5-(4-트라이플루오로메틸)페닐-2,4-펜타다이에놀일아미노)벤조락탐 ("TPB") (미국 뉴저지주 김스타운 소재의 이엠디 밀리포어 코포레이션; 카탈로그 번호 565740); 및 100 nM의 골 형성 단백질 ("BMP") 수용체 저해제 LDN-193189 (중국 상하이 소재의 상하이 캄파트너즈 컴퍼니 리미티드)로 보충된 BLAR 주문 제작 배지 (라이프 테크놀로지스에서 제조되었으며, 성분들은 표 I에 나열되어 있음)로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0170] 4기 (3일):

[0171] 1:200 희석의 ITS-X; 4.5 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 μM SANT-1; 100 nM RA; 2 ng/ml FGF7; 100 nM LDN-193189; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR 배지로 3일 동안 세포를 처리하였다. 4기 말 (3일째)에, 평면 접시 상에서 배양된 세포를 10 μM의 Y27632로 4시간 동안 처리하고, PBS로 행구고 1X 농도의 효소 트리플™ 익스프레스 엔자임 (라이프 테크놀로지스 코포레이션, 카탈로그 번호 12604-013)으로 실온에서 5분 동안 처리한 후, 효소를 제거하고 BLAR 배지로 행구고 세포 급개로 세포를 급어내었다. 생성된 세포 현탁액을 0.5 내지  $0.75 \times 10^6$  개 세포 (5 내지 10 μl 분취물 중)의 밀도로 6-웰 플레이트 내의 0.4 마이크로미터 다공성 세포 배양 필터 인서트 (코닝, 카탈로그 번호 353493) 상에 시딩하였다. 1.5 ml의 배지를 각 인서트의 바닥에 첨가하였고 어떠한 추가의 배지도 필터의 정점면(apical side), 또는 윗면에 첨가하지 않았다. 5기, 6기 및 7기의 지속기간 동안 배지를 매일 교체하였다.

[0172] 5기 (3일):

[0173] 공기-액체 계면에서 배양된 세포를 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스의 최종 농도를 얻기 위한 글루코스; 1X 글루타맥스™; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 mM 아스코르브산; 10 μg/ml의 헤파린 (시그마 알드리치, 카탈로그 번호 H3149), 10 μM ZnSO<sub>4</sub> (시그마 알드리치, 카탈로그 번호 Z0251), 0.25 μM SANT-1; 50 nM RA; 100 nM LDN-193189; 1 μM의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염 형태의 T3 (시그마 알드리치, 카탈로그 번호 T6397), 10000 nM의 2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘 ("ALK5 저해제 II") (미국 뉴욕주 파밍데일 소재의 엔조 라이프 사이언시즈, 인크., 카탈로그 번호 ALX-270-445)로 보충된 BLAR 배지로 3일 동안 처리하였다.

[0174] 6기 (7일):

[0175] 5기 세포를 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스의 최종 농도를 얻기 위한 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 1.5 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 mM 아스코르브산; 10 μg/ml의 헤파린, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>, 100 nM LDN-193189, 1 μM T3, 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 저해제 XX") (이엠디 밀리포어, 카탈로그 번호 #565789), 및 10000 nM ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지로 7일 동안 처리하였다.

[0176] 7기 (7일):

[0177] 6기 세포를 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스의 최종 농도를 얻기 위한 글루코스; 1X 글루타맥스™; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>, 1 μM T3, 10000 nM ALK5 저해제

II, 10  $\mu$ M 비타민 E 유사체 트롤록스 (이엠디 밀리포어, 카탈로그 번호 648471)로 보충된 BLAR 배지로 7 내지 15일 동안 처리하였다.

[0178] 도 1a 내지 도 1m은, 실시예 1에 개략적으로 나타낸 바와 같이 분화된 인간 배아 줄기 세포주 H1의 세포에서의 하기 유전자의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 나타낸다: PDX1 (도 1a); NKX6.1 (도 1b); PAX4 (도 1c); PAX6 (도 1d); NGN3 (도 1e); MAFA (도 1f); ABCC8 (도 1g); 크로모그라닌-A (도 1h); G6PC2 (도 1i); IAPP (도 1j); 인슐린 (도 1k); 글루카곤 (도 1l); 및 PTF1a (도 1m). 도 1f에 나타낸 바와 같이, 4기 및 5기를 6기 및 7기와 비교할 때 MAFA에서의 분명한 증가, 또는 상향조절이 베타 세포 계통을 향한 세포의 증가된 성숙을 입증하였다. 그러나, 6기 및 7기에서, MAFA에 대한 mRNA 발현은 성인 섬보다 낮았다.

[0179] [표 I]

BLAR 배지의 성분 목록	
성분	농도 (mM)
<b>아미노산</b>	
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
타이로신다이소듐	1.0E-02
발린	3.0E-02
<b>비타민</b>	
바이오틴	3.0E-05
콜린 클로라이드	5.0E-03
D-칼슘 판토테네이트	1.5E-03
엽산 칼슘 염	2.3E-03
나이아신아미드	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
<b>미네랄/기타</b>	
염화칼슘 (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	3.0E-01
황산제 2 구리 (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	4.8E-06
황산제 2 철 (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1.0E-03
황산마그네슘 (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	4.1E-01
염화칼륨 (KCl)	3.8E+00
중탄산나트륨 (NaHCO <sub>3</sub> )	1.4E+01
염화나트륨 (NaCl)	1.1E+02
제 2 인산나트륨 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	5.0E-01
황산아연 (ZnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	1.0E-04
아데닌	1.0E-03
D-글루코스 (텍스트로스)	5.0E+00
리포산	1.2E+05
페놀 레드	1.0E-02
소듐 피루베이트	1.0E+00
티미딘	9.8E-05

[0180]

[0181] 다양한 단계들의 추가 특성화를 위해, 3기, 4기, 5기, 6기, 및 7기에서 세포를 회수하고 형광-활성 유세포측정 (fluorescence-activated flow cytometry, "FACS")으로 분석하였다. 문헌[Diabetes, 61, 2016, 2012]에 기재된 바와 같이 그리고 표 III에 나열된 항체를 사용하여 FACS 염색을 수행하였다. 간략히 말하면, 트리플™ 익스프레스 (라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 12604)에서 3 내지 5분 동안 37°C에서 세포를 인큐베이션하고 단일 세포 현탁액으로 방출시키고, 이후에 이것을 0.2% BSA를 함유하는 PBS의 염색 완충액 (비디 사이언시즈(BD

Sciences), 카탈로그 번호 554657)으로 2회 세척하였다. 표면 마킹을 위해, 염색 완충액 중에 1:4로 희석된 0.5% 인간 감마 글로불린의 100  $\mu$ l 블로킹 완충액 중에 세포 ( $1 \times 10^5$  내지  $1 \times 10^6$ 개)를 재현탁하였다. 직접 결합된 1차 항체를 1:20의 최종 희석으로 세포에 첨가한 후 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색된 세포를 염색 완충액 중에서 2회 세척하고, 이어서 200  $\mu$ l 염색 완충액 중에 재현탁한 후, BD 칸토 (Canto) II에서의 FACS 분석 전에 생/사 식별을 위해 15  $\mu$ l의 7AAD 중에서 인큐베이션하였다. 먼저 녹색 형광 생/사 세포 염료(Green Fluorescent LIVE/DEAD cell dye, 라이프 테크놀로지스, 카탈로그 번호 L23101)와 함께 4℃에서 20분 동안 인큐베이션하고, 이후에 차가운 PBS로 1회 세척함으로써 세포내 항체 염색을 달성하였다. 250  $\mu$ l의 사이토폭스/사이토펜 (Cytofix/Cytoperm) 완충액 (BD 카탈로그 번호 554723) 중에 세포를 고정하고, 이어서 2% 정상 염소 혈청을 갖는 100  $\mu$ l의 펄 (Perm) 염색/블로킹 세척 완충 용액 중에 세포를 재현탁하였다. 세포를 경험적으로 사전-결정된 희석으로 1차 항체와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 펄/세척 완충액으로 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 적당한 항체와 함께 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후 BD FACS 칸토 II에서의 분석 전에 2회 세척하였다. 사용된 항체의 농도를 표 III에 나타내었다. 체장 마커에 대한 항체를 양성 대조군으로서의 미분화 H1 세포 또는 인간 섬을 사용하여 특이성에 대해 시험하였다. 2차 항체에 대해서는, 하기, 즉 1:500의 항-마우스 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor)® 647 (라이프 테크놀로지스), 1:200의 염소 항-토끼 PE (v) 또는 1:800의 당나귀 항-염소 알렉사 647 (라이프 테크놀로지스)을 첨가하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 펄/세척 완충액 중에서 최종 세척하고 BD FACS 디바 (Diva) 소프트웨어를 사용하여 BD FACS 칸토 II에서 분석하였는데, 이때 30,000개 이상의 사건이 획득되었다.

[0182] 도 2 내지 도 6은 3기, 4기, 5기, 6기 및 7기 각각에서 수집된 세포의 FACS 프로파일을 나타낸다. 도 4에 나타난 바와 같이, 5기에서는, 대략 15%의 세포가 인슐린 및 NKX6.1을 공동-발현 중이고 대략 21%의 PDX1 양성 세포가 PDX1 및 KI-67의 공동-발현에 의해 측정된 바와 같이 활성 세포 주기에 있었다 (약 23%; KI-67은 활성 세포 주기에 있는 세포를 나타냄). 그러나, 6기 및 7기 (도 5 및 도 6)에 따르면, 증식성 PDX1+ 세포에 있어서는 유의한 하락이 있었던 반면 (1 내지 2%), 인슐린을 공동-발현하는 NKX6.1+ 세포의 수에는 유의한 증가가 있었다 (6기에서 약 39% 및 7기에서 약 50%). 더욱이, 내분비 전구체 마커 ISL-1, NeuroD1, 및 NKX2.2를 발현하는 세포에 유의한 증가가 있었다. 이러한 결과는 6기 및 7기의 배양이 증식성 선조체 운명에서 벗어나 조기에 성숙하는 내분비 세포로의 세포의 빠른 성숙을 가능하게 했다는 것을 나타낸다. 게다가, 6기로부터 7기로의 진행을 연장시킴으로써 인슐린 및 NKX6.1을 공동-발현하는 세포의 백분율의 증가 (33%)가 관찰되었다 (도 5를 도 6과 비교할 때). 도 7은 3기로부터 7기까지의 다중 체장 내배엽 (FOXA2, PDX1, NKX6.1), 미분화 ES 세포 (Oct3/4), 내분비 (Pax6, ISL-1, NKX2.2, 크로모그라닌), 및 호르몬 (인슐린, 글루카곤)의 %발현을 요약한다.

[0183] [표 II]

FACS 분석에 사용된 항체 목록			
항원	종	공급원/카탈로그 번호	희석
글루카곤	마우스	시그마-알드리치 컴퍼니 엘엘씨/G2654	1:250
인슐린	토끼	미국 매사추세츠주 덴버스 소재의 셀 시그널링 테크놀로지, 인크. (Cell Signaling Technology, Inc.) /3014B	1:10
NKX6.1	마우스	미국 아이오와주 아이오와 시티 소재의 디벨롭멘탈 스터디즈 하이브리도마 뱅크 (Developmental Studies Hybridoma Bank) /F55A12	1:50
NKX2.2	마우스	디벨롭멘탈 스터디즈 하이브리도마 뱅크/74.5A5	1:100
PDX1	마우스	미국 캘리포니아주 산호세 소재의 비디 바이오사이언시즈/562161	1:50
Ki67	마우스	비디 바이오사이언시즈/558595	1:20
Pax6	마우스	비디 바이오사이언시즈, 561552	1:20
크로모그라닌 A	토끼	미국 캘리포니아주 카펫테리아 소재의 다코 (Dako)/A0430	1:40
ISL-1	마우스	비디 바이오사이언시즈/562547	1:20
NeuroD1	마우스	비디 바이오사이언시즈/563001	1:40
FOXA2	마우스	비디 바이오사이언시즈/561589	1:80
OCT3/4	마우스	비디 바이오사이언시즈/560329	1:20

[0184]

[0185] 실시예 2

[0186] MAFA 및 인슐린 발현 중 하나 또는 둘 다를 유의하게 상향조절할 수 있는 소분자를 확인하기 위한 스크리닝

[0187] 본 실시예는 체장 베타 세포를 향한 세포의 성숙을 유의하게 향상시킬 수 있는 소분자를 확인하는 것에 관한 것

이다. 계대 42에서의 인간 배아 줄기 세포주 H1 (WA01)의 세포를, 10  $\mu$ M의 Y-27632로 보충된, DMEM-F12, 글루타맥스™ (1:100 희석), 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 FGF2 (미국 미네소타주 소재의 알앤디 시스템즈), 1 ng/ml의 TGF- $\beta$ , ITS-X (1:100 희석), 2% FAF-BSA, 및 20 ng/ml의 IGF-1을 포함하는 배지에서 매트릭젤™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 단일 세포로서  $1 \times 10^5$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ 으로 시딩하였다. 시딩 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS (Mg 또는 Ca가 없는 인산염 완충 식염수)로 세척한 후 1x 트리플™ 익스프레스 효소 (라이프 사이언스; 카탈로그 번호 14190)와 함께 3 내지 5분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 방출된 세포를 DMEM-F12로 행구고 1000 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠렛을 10  $\mu$ M Y-27632, 1X 글루타맥스™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml FGF2, 1 ng/ml TGF- $\beta$ , 1:100 희석의 ITS-X, 2% FAF-BSA 및 20 ng/ml의 IGF-1로 보충된 DMEM-F12 중에 재현탁하고 단일 세포 현탁액을 대략 1.3 내지  $1.5 \times 10^5$ 개 세포/ $\text{cm}^2$ 으로 시딩하였다. 배양물에 배지를 매일 공급하였고, 하기 프로토콜에 따라, 시딩 후 48시간째에 분화를 개시한 결과 초기 컨플루언시는 약 90%였다. 달리 언급되지 않는다면, 실시예에서 사용된 배지, 시약, 분자 등의 공급원은 실시예 1에서 언급된 바와 같다.

[0188] 1기 (3일):

[0189] 매트릭젤™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 플레이팅된 세포를 먼저 1X 불완전 DPBS로 행군 후 하기 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 0.5% FAF-BSA; 0.0012 g/ml 중탄산나트륨; 1X 농도의 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 100 ng/ml GDF8; 및 1  $\mu$ M MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8, 및 0.1  $\mu$ M MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 및 100 ng/ml GDF8로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0190] 2기 (2일):

[0191] 먼저 1X 불완전 DPBS로 세포를 행군 후, 0.5%의 FAF-BSA; 0.0012 g/ml 중탄산나트륨; 1X 농도의 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 0.25 mM 아스코르브산 및 25 ng/ml FGF7로 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.

[0192] 3기 (2일):

[0193] 1:200 희석의 ITS-X; 4.5 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 0.0025 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1; 1  $\mu$ M RA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 200 nM TPB; 및 100 nM LDN-193189로 보충된 BLAR 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 처리하였다.

[0194] 4기 (3일):

[0195] 1:200 희석의 ITS-X; 4.5 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 0.0025 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1; 100 nM RA; 2 ng/ml FGF7; 100 nM LDN-193189; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR 배지로 3일 동안 세포를 처리한 후, 4기 말에, 평면 접시에서 배양된 세포를 10  $\mu$ M의 Y-27632로 4시간 동안 처리하고, PBS로 행구고 1X 농도의 트리플™로 5분 동안 실온에서 처리하고, 이어서 효소를 제거하고, BLAR 기초 배지로 행구고 세포 급개로 세포를 급어내었다. 생성된 세포 현탁액을 0.5 내지  $0.75 \times 10^6$ 개 세포 (5 내지 10  $\mu$ l 분취물 중)의 밀도로 6-웰 플레이트 내의 0.4 마이크로미터 다공성 세포 배양 필터 인서트 상에 시딩하였다. 1.5 ml의 배지를 각 인서트의 바닥에 첨가하였고 어떠한 추가의 배지도 필터의 정점면에 첨가하지 않았다. 5기, 6기 및 7기의 지속기간 동안 배지를 매일 교체하였다.

[0196] 5기 (3일):

[0197] 공기-액체 계면에서 배양된 세포를 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스; 1X 글루타맥스™; 0.0015 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 mM 아스코르브산; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 0.25  $\mu$ M SANT-1; 50 nM RA; 100 nM LDN-193189; 1  $\mu$ M의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 및 10000 nM의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지로 3일 동안 처리하였다.

[0198] 6기 (7일):

[0199] 5기 세포를 공기-액체 계면에서 배양하고 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 0.0015 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 mM 아스코르브산; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 100 nM



LDN-193189, 1  $\mu$ M의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 100 nM 감마 세크레타제 저해제 XX, 및 10000 nM ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지로 7일 동안 처리하였다.

[0200] 7기 (7일):

[0201] 6기 세포를 공기-액체 계면에서 배양하고 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 0.0015 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 1000 nM의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 10000 nM ALK5 저해제 II, 10  $\mu$ M 트롤록스로 보충된 BLAR 배지로 7일 동안 처리하였다.

[0202] 6기 또는 7기에서, 다양한 소분자들을 첨가하였고 그들의 효과를 실시간 PCR로 평가하였다. 표 III은 평가된 소분자 및 그들이 첨가된 시기를 나열한다.

[0203] [표 III]

평가된 소분자			
화학명/CAS #/분자식	목표	소분자명/판매회사/카탈로그 번호	농도
4-(아세틸아미노)-N-(2-아미노페닐)벤즈아미드/112522-64-2/C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 저해제	CI-994/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI109A	6 기에서 1 $\mu$ M
(E)-N-하이드록시-3-[4-[(2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)에틸아미노)메틸]페닐]프로판-2-엔아미드/404950-80-7/C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	히스톤 데아세틸라제 1 (HDAC1) 활성의 저해제	파노비노스타트 (Panobinostat, LBH-589)/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI009B	6 기에서 1 $\mu$ M
N-하이드록시-N'-페닐-옥탄다이아미드/149647-78-9/C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	히스톤 데아세틸라제 1 (HDAC1) 및 3 (HDAC3)의 저해제	SAHA/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI009C	6 기에서 1 $\mu$ M
N,N'-다이하이드록시옥탄다이아미드/38937-66-5/C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	HDAC1을 저해하는 것으로 밝혀진 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 저해제	SBHA/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI009D	6 기에서 1 $\mu$ M
6-(1,3-다이옥소-1H, 3H-벤조[데]아이소퀴놀린-2-일)-헥산산 하이드록시아미드 /287383-59-9/C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	히스톤 데아세틸라제 (HDAC)의 저해제	스크립타이드 (Scriptaid)/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI009E	6 기에서 1 $\mu$ M
[R-(E,E)]-7-[4-(다이메틸아미노)페닐]-N-하이드록시-4,6-다이메틸-7-옥소-2,4-헵타다이엔아미드 /58880-19-6/C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	히스톤 데아세틸라제의 저해제	트리코스타틴 (Trichostatin A)/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI009F	6 기에서 1 $\mu$ M
N1-[4-[(2R,4R,6S)-4-[[4,5-다이페닐-2-옥사졸릴]티오]메틸]-6-[4-(하이드록시메틸)페닐]-1,3-다이옥산-2-일]페닐]-N8-하이드록시-옥탄다이아미드/537049-40-4/C <sub>41</sub> H <sub>43</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S	히스톤 데아세틸라제 6의 저해제	투바신 (Tubacin)/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPI009G	6 기에서 1 $\mu$ M
평가된 소분자 (계속)			
1,4-다이메톡시-9(10H)-아크리딘티온/141992-47-4/C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> S	사이클린-의존성 키나제 (cdk) 4 저해제	NSC625987/토크리스 바이오사이언스/2152	6 기에서 1 $\mu$ M
4-[4,5-다이하이드로-5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-1H-피라졸-1-일]벤젠설폰아미드/71203-35-5/C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	Cdc42 GTP 가수분해효소의 저해제	ML141/토크리스 바이오사이언스/4266	6 기에서 1 $\mu$ M
N-(2-클로로페닐)-6-(피페리딘-4-일)이미다조[1,2-a]피리딘-3-카르복스아미드 옥살레이트/1198408-39-7/C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	EphB3 수용체 타이로신 키나제의 저해제	LDN211904 (EphB3 저해제)/미국 매세추세츠주 빌레리카 소재의 이엠티	6 기에서 1 $\mu$ M

[0204]



		멀리포어 코로레이션/428201- 5MG	
(S)-2-(4-(4-클로로페닐)-2,3,9- 트라이메틸-6H-티에노[3,2- f][1,2,4]트리아졸-6- 일)아세트아미드/1446144-04- 2/C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	브로모도메인 및 엑스트라 터미널 (bromodomain and extra terminal, BET) 패밀러 단백질 BRD4 의 CPIe 저해제	CPI203/미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60124-2	6 기에서 1 μM
1-(3,6-다이브로모-9H-카바졸-9-일)-3- (페닐아미노)프로판-2-올/301353-96- 8/C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	신경형성촉진성 (pro- neurogenic), 신경- 보호성 소분자	P7C3/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60017-2	6 기에서 1 μM
2-(4-벤조일페녹시)-N-(1- 벤질피페리딘-4- 일)아세트아미드/924416-43- 3/C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	아디포넥틴 수용체 (AdipoR)의 효능제	아디포론 (AdipoRon)/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60152-2s	6 기에서 1 μM
(S)-2-((S)-2-(3,5-다이플루오로페닐)- 2-하이드록시아세트아미도)-N-((S)-5- 메틸-6-옥소-6,7-다이하이드로-5H- 다이벤조[b,d]아제핀-7- 일)프로판아미드/209984-57- 6/C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	감마 세크레타제의 저해제	LY411575/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60078-5s	6 기에서 1 μM
2-(4-(tert-부틸)페닐)-1H- 벤조[d]이미다졸/49671-76-3/C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	PGC-1α 의 전사 활성화제	ZLN005/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60142-5s	6 기에서 1 μM
2-클로로-4-플루오로-3-메틸-N-(2-(4- 메틸피페라진-1-일)-5- 니트로페닐)벤즈아미드/1422389-91- 0/C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClFN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	WDR5-MLL 상호작용의 길항제	WDR5-C47/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60118-2	6 기에서 1 μM
3-피리디닐메틸 [[4-[[[(2-아미노페닐) 아미노]카르보닐]페닐] 메틸]카르바메이트/209783-80- 2/C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	HDAC 저해제; 항증식성; HDAC3 에 비해 HDAC1 을 우선적으로 억제함	MS-275/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./EPS002	6 기에서 1 μM
4-(다이메틸아미노)-N-[7- (하이드록시아미노)-7-옥소헵틸]- 벤즈아미드/251456-60-7/C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	HDAC 저해제; HDAC1 에 비해 HDAC6 에 대해 아형 선택적(subtype selective)임	M344/시그마 알드리치 컴퍼니 엘엘씨./M5820	6 기에서 1 μM
1-[[4-에틸-5-[5-(4-페녹시페닐)-1,2,4- 옥사다이아졸-3-일]-2-티에닐]메틸]-3- 아제티딘카복실산/913827-99- 3/C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	스핑고신-1-포스페이트 수용체 1 (S1P1) 효능제; 인간 S1P1 이 S1P3 에 비해 5000 배의 선택성을 나타냄	CS2100/영국 BS11 0QL 브리스톨 소재의 도크리스 바이오사이언스/4543	6 기에서 1 μM

[0205]

평가된 소분자 (계속)			
2-(4-브로모-2-클로로페녹시)-N-[[[4-[[[4,6-다이메틸-2-피리미디닐]아미노]설폰닐]페닐]아미노]티옥소메틸]아세트아미드/587841-73-4/ $C_{21}H_{19}BrClN_5O_4S_2$	Cdc42 의 선택적 저해제	ZCL278/토크리스 바이오사이언스/4794	6 기에서 1 $\mu$ M
N-(4-(2-아미노-3-클로로피리딘-4-일옥시)-3-플루오로페닐)-4-에톡시-1-(4-플루오로페닐)-2-옥소-1,2-다이하이드로피리딘-3-카르복스아미드/1025720-94-8/ $C_{25}H_{19}ClF_2N_4O_4$	c-Met, Axl, Ron 및 Tyro3 에 대한 Met-관련 저해제	BMS-777607/미국 텍사스주 휴스턴 소재의 셀렉 케미칼스 (Selleck Chemicals)/S1561	6 기에서 1 $\mu$ M
N-(2,6-다이플루오로페닐)-5-(3-(2-(5-에틸-2-메톡시-4-(4-(4-(메틸설폰닐)피페라진-1-일)피페리딘-1-일)페닐아미노)피리미딘-4-일)H-이미다조[1,2-a]피리딘-2-일)-2-메톡시벤즈아미드/1089283-49-7/ $C_{44}H_{47}F_2N_9O_5S$	IGF-1R 및 IR 의 저해제	GSK1904529A/셀렉 케미칼스/S1093	6 기에서 1 $\mu$ M
N-(4-(3-(2-아미노피리딘-4-일)피리딘-2-일옥시)페닐)-4-(4-메틸티오펜-2-일)프탈라진-1-아민/945595-80-2/ $C_{28}H_{21}N_7OS$	오로라 A/B/C 에 대한 판 (pan)-오로라 키나제 저해제	AMG-900/셀렉 케미칼스/S2719	6 기에서 1 $\mu$ M
5-((1-(3-아이소프로필-1,2,4-옥사디아아졸-5-일)피페리딘-4-일)메톡시)-2-(4-(메틸설폰닐)페닐)피리딘/1032823-75-8/ $C_{23}H_{28}N_4O_4S$	GPR119 효능제	GSK1292263/셀렉 케미칼스/S2149	6 기에서 1 $\mu$ M
4-(5-아미노-1-(2,6-다이플루오로벤조일)-1H-[1,2,4]트리아아졸-3-일아미노)-벤젠설포나미드/443797-96-4/ $C_{15}H_{12}F_2N_6O_3S$	CDK1/2 에 대해 최고의 효능을 갖는 판-CDK 저해제	JNJ-7706621/셀렉 케미칼스/S1249	6 기에서 1 $\mu$ M
6-(다이플루오로(6-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-[1,2,4]트리아아졸로[4,3-b]피리다진-3-일)메틸)퀴놀린/943540-75-8/ $C_{19}H_{13}F_2N_7$	c-Met 의 저해제	JNJ-38877605/셀렉 케미칼스/S1114	6 기에서 1 $\mu$ M
(R)-4-(8-사이클로펜틸-7-에틸-5-메틸-6-옥소-5,6,7,8-테트라하이드로프테리딘-2-일아미노)-3-메톡시-N-(1-메틸피페리딘-4-일)벤즈아미드/755038-02-9/ $C_{28}H_{39}N_7O_3$	PIk1 저해제	BI 2536/셀렉 케미칼스/S1109	6 기에서 1 $\mu$ M

[0206]

평가된 소분자 (계속)			
N-하이드록시-2-(4-(((1-메틸-1H-인돌-3-일)메틸아미노)메틸)피페리딘-1-일)피리미딘-5-카르복스아미드/875320-29-9/C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	HDAC1에 대해 최고의 효능을 갖고 HDAC 6 및 HDAC 7에 대해 최저의 효능을 갖는 HDAC 저해제; 2상 (Phase 2)	퀴시노스타트 (Quisinostat, JNJ-26481585)/셀렉 케미칼스/S1096	6기에서 1 μM
사이클로헥실 2,7,7-트라이메틸-4-(4-니트로페닐)-5-옥소-1,4,5,6,7,8-헥사하이드로퀴놀린-3-카르복실레이트/313967-18-9/C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	노치 (Notch) 신호전달의 저해제	FLI-06/셀렉 케미칼스/S7399	6기에서 1 μM
4H-[1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]벤조다이아제핀-4-아세트아미드, 6-(4-클로로페닐)-N-에틸-8-메톡시-1-메틸-, (4S)-/1260907-17-2/C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	BET 단백질에 대한 저해제	I-BET-762 (GSK525762)/셀렉 케미칼스/S7189	6기에서 1 μM
N-(6-(4-(2-(4-(4-메틸피페라진-1-일)메틸)-3-(트라이플루오로메틸)페닐)아미노)-2-옥소에틸)페녹시)피리미딘-4-일)사이클로프로판카르복스아미드/1421227-53-3/C <sub>29</sub> H <sub>31</sub> F <sub>3</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	설치류 및 인간 원시 (primary) 섬에서 체장 β 세포 증식을 촉진하는 소분자	WS6/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60097-2s	6기에서 1 μM
1-[3-[[[(2R,3S,4R,5R)-5-(4-아미노-5-브로모-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-7-일)-3,4-다이하이드록시 테트라하이드로푸란-2-일]메틸](아이소프로필)아미노]프로필]-3-[4-(2,2-다이메틸에틸)페닐]우레아/------/C <sub>28</sub> H <sub>40</sub> BrN <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	DOT1L 메틸트랜스퍼라제 저해제	SGC0946/셀렉 케미칼스/S7079	6기에서 1 μM
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]-/1380288-87-8/C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> N <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제	EPZ5676/셀렉 케미칼스/S7062	6기에서 1 μM
(2R)-2-(N-(2-플루오로-4-(1,2,4-옥사다이아졸-3-일)벤질)-4-클로로페닐설폰아미드)-5,5,5-트라이플루오로헥탄아미드/1146699-66-2/C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	Aβ40 및 Aβ42의 γ-세크레타제 저해제	아바가세스타트 (Avagacestat, BMS-708163)/셀렉 케미칼스/S1262	6기에서 1 μM
[1,1'-바이페닐]-3-카르복스아미드, N-[(1,2-다이하이드로-4,6-다이메틸-2-옥소-3-피리디닐)메틸]-5-[에틸(테트라하이드로-2H-피란-4-일)아미노]-4-메틸-4'-(4-모르폴리닐메틸)-/1403254-99-8/C <sub>34</sub> H <sub>44</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	EZH2 저해제	EPZ-6438/셀렉 케미칼스/S7128	6기에서 1 μM

[0207]

평가된 소분자 (계속)			
N-(4-(6,7-다이메톡시퀴놀린-4-일옥시)페닐)-N-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-다이카르복스아미드/849217-68-1/C <sub>28</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	VEGFR2 저해제	카보잔티닙 (Cabozantinib, XL184, BMS-907351) / 셀렉 케미칼스/S1119	6 기에서 1 μM
3-(벤조[d]티아졸-2-일)-6-에틸-7-하이드록시-8-(피페리딘-1-일메틸)-4H-크로텐-4-온/222716-34-9/C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	Skp2 저해제	SKP2-C25/엑세스 바이오사이언시즈, 인크./M60136-2s	6 기에서 1 μM
5-클로로-2-[(E)-2-[페닐(피리딘-2-일)메틸리덴]하이드라진-1-일]피리딘/199596-05-9/C17H13ClN4	주몬지 (Jumonji) 히스톤 데메틸라제 저해제	JIB-04/셀렉 케미칼스/S7281	6 기에서 1 μM
1H-1,2,4-트리아졸-3,5-다이아민, 1-(6,7-다이하이드로-5H-벤조[6,7]사이클로헵타[1,2-c]피리다진-3-일)-N3-[(7S)-6,7,8,9-테트라하이드로-7-(1-피롤리딘)-5H-벤조사이클로헵텐-2-일]-/1037624-75-1/C <sub>30</sub> H <sub>34</sub> N <sub>8</sub>	Axl 의 저해제	R428 (BGB324)/셀렉 케미칼스/S2841	7 기에서 1 μM
2-클로로-3-[2-(2,4-다이클로로페녹시)에톡시]-6-(플루오로메틸)피리딘/1355026-60-6/C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	강력한 스펅고신-1-포스페이트 수용체 4 (S1P4) 효능제	CYM50260/토크리스 바이오사이언스/4677	6 기 내지 7 기에서 2 μM
N,N-다이사이클로헥실-5-사이클로프로필-3-아이소사클카르복스아미드/945128-26-7/C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	선택적 스펅고신-1-포스페이트 수용체 3 (S1P3) 다른 자리 입체성	CYM5541/토크리스 바이오사이언스/4897	6 기 내지 7 기에서 2 μM
5-[4-페닐-5-(트라이플루오로메틸)티오펜-2-일]-3-[3-(트라이플루오로메틸)페닐]1,2,4-옥사다이아졸/256414-75-2/C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> OS	강력하고 선택적인 스펅고신-1-포스페이트 1 (S1P1) 수용체 효능제.	SEW2871/토크리스 바이오사이언스/2284	6 기 내지 7 기에서 2 μM
[9S-(9α,10β,11β,13α)]-2,3,10,11,12,13-헥사하이드로-10-메톡시-9-메틸-11-(메틸아미노)-9,13-에폭시-1H,9H-다이인돌로[1,2,3-gh:3',2',1'-lm]피롤로[3,4-j][1,7]벤조다이아조린-1-온/62996-74-1/C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	광범위 단백질 키나제 저해제	스타우로스포린 (Staurosporine)/토크리스 바이오사이언스/1285	6 기 내지 7 기에서 10 nM

[0208]

[0209]

소분자로 처리된 후 인슐린 및 MAFA 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 묘사하는 그래프인 도 8a 내지 도 8e에 나타난 바와 같이, 6기 및 7기에서의 비처리된 배양과 각각 비교할 때, EPZ-5676 (단백질 메틸트랜스퍼라제 DOT1L의 저해제) 및 AXL 저해제 (R428)의 첨가는 MAFA의 발현을 유의하게 상향조절하였다.

[0210]

### 실시예 3 (예언적)

[0211]

### 현탁 배양에서 인슐린, PDX-1, NKX6.1, 및 MAFA를 공동-발현하는 내분비 세포의 생성

[0212]

인간 배아 줄기 세포주 H1 (WA01)의 세포를, 10 μM의 Y-27632로 보충된, DMEM-F12, 글루타맥스™ (1:100 희석), 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml의 FGF2 (미국 미네소타주 소재의 알앤디 시스템즈), 1 ng/ml의 TGF-β, ITS-X (1:100 희석), 2% FAF-BSA, 및 20 ng/ml의 IGF-1을 포함하는 배지에서 매트릭젤™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 단일 세포로서 1 × 10<sup>5</sup> 개 세포/cm<sup>2</sup>으로 시딩한다. 시딩 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS (Mg 또는 Ca가 없는 인산염 완충 식염수)로 세척한 후 1x 트리플™ 익스프레스 효소와 함께 3 내지 5분 동안 37℃에서 인큐베이션한다. 방출된 세포를 DMEM-F12로 행구고 1000 rpm에서 5분 동안 회전시킨다. 생성된 세포 펠릿을 10 μM Y-27632, 1X 글루타맥스™, 0.25 mM 아스코르브산, 100 ng/ml FGF2, 1 ng/ml TGF-β, 1:100 희석의 ITS-X, 2% FAF-BSA 및 20 ng/ml의 IGF-1로 보충된 DMEM-F12 중에 재현탁하고 단일 세포 현탁액을 대략 1.3 내지 1.5 × 10<sup>5</sup> 개 세포/cm<sup>2</sup>으로 시딩한다. 배양물에 배지를 매일 공급하고, 하기 프로토콜에 따라, 시딩 후 48시간째에 분화를 개시한 결과 초기 컨플루언시는 약 90%였다. 1기 내지 4기는 평면 부착 배양으로 유지되는 반면, 5기 내지 7기는 현탁 배양으로 유지된다.

[0213]

### 1기 (3일):

[0214]

매트릭젤™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 플레이팅된 세포를 먼저 1X 불완전 DPBS로 행군 후 하기의 1기 배지에서 1일 동안 배양한다: 0.5% FAF-BSA, 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨; 1X 농도의 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 100 ng/ml GDF8; 및 1 μM MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8, 및 0.1 μM MCX 화합물로 보충된



MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양한다. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 및 100 ng/ml GDF8로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양한다.

[0215] 2기 (2일):

[0216] 먼저 1X 불완전 DPBS로 세포를 행군 후, 0.5%의 FAF-BSA; 1.2 g/1000 ml 중탄산나트륨; 1X 농도의 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 0.25 mM 아스코르브산 및 25 ng/ml FGF7로 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리한다.

[0217] 3기 (2일):

[0218] 1:200 희석의 ITS-X; 4.5 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 μM SANT-1; 1 μM RA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 200 nM TPB; 및 100 nM LDN-193189로 보충된 BLAR 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 처리한다.

[0219] 4기 (3일):

[0220] 1:200 희석의 ITS-X; 4.5 mM 글루코스; 1X 농도의 글루타맥스™; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 μM SANT-1; 100 nM RA; 2 ng/ml FGF7; 100 nM LDN-193189; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR 배지로 3일 동안 세포를 처리한 후, 4기 말에, 평면 접시에서 배양된 세포를 10 μM의 Y-27632로 4시간 동안 처리하고, PBS로 행구고 1X 농도의 스템프로 (StemPro)® 아큐타제® 효소 (라이프 테크놀로지스, #A11105-01)로 5분 동안 실온에서 처리하고, 효소를 제거하고, BLAR 기초 배지로 행구고 세포 급개를 사용하여 세포를 긁어내고 세포괴로 부순다 (< 100 마이크로미터). 세포괴를 일회용 폴리스티렌 125 ml 스피너 (Spinner) 플라스크 (코닝)로 옮기고, 아래와 같이 특정화된 5기 배지와 함께 현탁액 중에서 80 내지 100 rpm으로 회전시킨다.

[0221] 5기 (3일):

[0222] 괴로서 제조된 4기 세포를 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1X 글루타맥스™; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 mM 아스코르브산; 10 μg/ml의 헤파린, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0.25 μM SANT-1; 50 nM RA; 100 nM LDN-193189; 1 μM의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 및 10000 nM의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 3일 동안 현탁액 중에서 배양한다.

[0223] 6기 (7일):

[0224] 5기 세포를 현탁액 중에서 배양하고 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1X 농도의 글루타맥스™; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25 mM 아스코르브산; 10 μg/ml의 헤파린, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>, 100 nM LDN-193189, 1 μM의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 100 nM 감마 세크레타제 저해제 XX, 및 10000 nM ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지로 7일 동안 처리한다.

[0225] 7기 (15일):

[0226] 6기 세포를 현탁액 중에서 배양하고 1:200 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1X 농도의 글루타맥스™; 0.0015 g/ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10 μg/ml의 헤파린, 10 μM ZnSO<sub>4</sub>, 1 μM의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 10000 nM ALK5 저해제 II, 10 μM 트롤록스, 1 mM N-아세틸 시스테인, 및 2 μM AXL 저해제 (R428)로 보충된 BLAR 배지로 최대 15일 동안 처리한다.

[0227] 5기 내지 7기에서, 세포괴의 분취물들을 회수하고 PCR, FACS 및 면역 조직화학으로 인슐린, NKX6.1, PDX-1, 및 MAFA의 공동-발현에 대해 특성화한다. 그러한 시험의 결과는 동일한 세포 및 약 10% 이상이 그러한 발현을 보였던 세포 집단 내에서 인슐린, PDXI, NKX6.1 및 MAFA의 공동-발현을 보일 것으로 예상된다.

[0228] 실시예 4

[0229] AXL 및 공동-리간드 GAS6의 mRNA 발현은 7기 또는 인간 섬 세포에 대해 매우 낮다.

[0230] 인간 배아 줄기 세포주 H1 (WA01)의 세포를 에센셜 8 (Essential 8)™ ("E8") (비디 바이오사이언시즈; 카탈로그 번호 356231)을 포함하는 배지에서 매트릭셀™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 단일 세포로서  $1 \times 10^5$ 개 세포/cm<sup>2</sup>으로 시딩하였다. 시딩 후 48시간제에, 배양물을 1x 불완전 PBS로 세척한 후 1x 트리플™ 익스프레스 효소

(라이프 사이언스; 카탈로그 번호 14190)와 함께 3 내지 5분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 방출된 세포를 E8로 행구고 1000 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠릿을 10  $\mu$ M Y-27632로 보충된 E8 중에 재현탁하고 단일 세포 현탁액을 대략 1.3 내지  $1.5 \times 10^5$  개 세포/ $\text{cm}^2$ 으로 시딩하였다. 배양물에 E8 배지를 매일 공급하였고, 하기 프로토콜에 따라, 시딩 후 48시간째에 분화를 개시한 결과 초기 컨플루언시는 약 90%였다.

[0231] 1기 (3일):

[0232] 매트릭젤™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 플레이팅된 세포를 먼저 1X 불완전 DPBS로 행군 후 하기의 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 1X 농도의 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 100 ng/ml GDF8; 및 1.5  $\mu$ M MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스 농도, 100 ng/ml GDF8, 및 0.1  $\mu$ M MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨, 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 및 100 ng/ml GDF8로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0233] 2기 (2일):

[0234] 먼저 1X 불완전 DPBS로 세포를 행군 후, 0.5% FAF-BSA; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 1X 농도의 글루타맥스™; 4.5 mM D-글루코스; 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml FGF7로 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 배양하였다.

[0235] 3기 (2일):

[0236] 1:100 희석의 ITS-X; 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1; 1  $\mu$ M RA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM TPB; 및 100 nM LDN-193189로 보충된 BLAR 주문 제작 배지로 2일 동안 세포를 배양하였다.

[0237] 4기 (3일):

[0238] 1:100 희석의 ITS-X; 1X 농도의 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1; 0.1  $\mu$ M RA; 2 ng/ml FGF7; 100 nM LDN-193189; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR 배지에서 3일 동안 세포를 배양한 후, 4기 말에, 평면 접시에서 배양된 세포를 10  $\mu$ M의 Y-27632로 4시간 동안 처리하고, 1X 불완전 PBS로 행구고 1X 트리플™로 3 내지 5분 동안 실온에서 처리하였다. 효소를 제거하고, 세포를 방출하고 BLAR 배지로 행구고 일회용 폴리스티렌 125 ml 스피너 플라스크 내로 옮기고, 1000 rpm에서 3분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠릿을 대략  $0.5 \times 10^5$  개 세포/ $\text{cm}^2$ 의 밀도로 단일 세포로서 필터 인서트 (비디 바이오사이언시즈; 카탈로그 번호 3420) 상에 재현탁하였다 (총 25만 내지 50만개 세포/스팟 (spot)에 대해 스팟당 5 내지 10  $\mu$ L). 각각의 스팟팅된(spotted) 면적은 첨가된 세포의 부피에 따라 대략 1 내지 2 mm의 지름으로 측정되었다. 6-웰 인서트에 대해서는, 1.5 mL/웰을 각각의 인서트의 바닥에 첨가한 반면, 10 cm 필터 인서트에 대해서는 8 mL를 첨가하였다. 전형적으로, 6-웰 인서트의 웰당 20 내지 15개의 스팟을 사용하였고 10 cm 인서트에 대해서는 80 내지 90개의 스팟을 사용하였다.

[0239] 5기 (3일):

[0240] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 0.25  $\mu$ M SANT-1; 0.05  $\mu$ M RA; 100 nM LDN-193189, 1  $\mu$ M의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 및 10  $\mu$ M의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 4기 세포를 3일 동안 배양하였다.

[0241] 6기 (7일):

[0242] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 100 nM LDN-193189, 1  $\mu$ M의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 100 nM 갑마 세크레타제 저해제 XX, 및 10  $\mu$ M의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 5기 세포를 7일 동안 배양하였다.

[0243] 7기 (7일):

[0244] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/L 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린, 10  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ M의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 10  $\mu$ M의 ALK5 저해제 II, 1 mM N-아세

틸 시스테인, 및 2  $\mu$ M AXL 저해제 (R428)로 보충된 BLAR 배지에서 6기 세포를 7일 동안 배양하였다.

[0245] 4기, 일수 3에서, 5기, 일수 3에서, 6기, 일수 3에서, 및 7기, 일수 7에서, mRNA를 수집하고 AXL 및 GAS 6의 발현을 미분화 인간 줄기 세포 및 시체의 인간 섬 (미국 캘리포니아주 소재의 프로도 랩스 (Prodo Labs))과 비교하여 평가하였다. 도 9에 묘사된 바와 같이, AXL의 발현은 미분화 줄기 세포에서 높은 수준으로 존재하였다. 그러나, 췌장 내배엽, 췌장 내분비 및 미성숙 베타 세포로의 줄기 세포의 분화는 AXL 발현에서의 급격한 하락을 초래하였다. 더욱이, GAS6 발현은 4기 내지 7기에서 낮은 수준으로 유지되었다. AXL의 발현은 또한 미분화 줄기 세포와 비교할 때 인간 섬에서 유의하게 더 낮았다. 결과는 6기 및 7기 세포들이 매우 낮은 AXL 발현을 갖는다는 것을 보여준다.

[0246] 실시예 5

[0247] R428은 AXL 및 다수의 추가적인 키나제들을 저해함

[0248] 상이한 키나제를 표적화하는 AXL 저해제 R428의 효율을 100  $\mu$ M ATP 농도를 사용하는 키나제 프로파일링 서비스 (Kinase Profiling Service) (이엠디 밀리포어)로 평가하였다. R428을 1 및 10  $\mu$ M에서 시험하였다. 표 IV는 키나제를 표적화하는 효율과 함께 프로파일링된 키나제를 나열하며, 더 낮은 숫자는 특정 키나제의 더 강력한 억제제를 나타낸다.

[0249] [표 IV]

R428의 키나제 프로파일링

키나제	R428	
	1 $\mu$ M에서 1001010	10 $\mu$ M에서 1001010
ALK4(h)	84	48
오로라-A(h)	20	3
오로라-B(h)	1	0
Axl(h)	-1	-1
Blk(h)	27	2
CaMKII $\beta$ (h)	76	5
CaMKI $\delta$ (h)	76	24
CDK1/사이클린 B(Hh)	101	88
CDK5/p35(h)	101	94
CHK1(h)	71	23
CHK2(h)	47	9
CK2(h)	103	106
CK2 $\alpha$ 2(h)	112	97
CLK2(h)	78	28
cSRC(h)	51	10
EGFR(h)	89	40
R428의 키나제 프로파일링 (계속)		
Eph A 2(h)	54	12
FGFR1(h)	17	1
Flt3(h)	9	1
GSK3 $\alpha$ (h)	95	105
GSK3 $\beta$ (h)	106	99
IGF-1R(h)	93	58
IKK $\beta$ (h)	86	53
IR(h)	83	24
IRAK4(h)	94	51
JAK2(h)	96	41
JAK3(h)	69	18
MAPK1(h)	108	106
Met(h)	49	-1
NEK2(h)	60	10
PAK4(h)	97	73
PDGFR $\beta$ (h)	37	21
Pim-2(h)	87	74
PKA(h)	88	35
PKB $\alpha$ (h)	87	57
PKC $\alpha$ (h)	101	96
PKC $\beta$ 1(h)	102	95
PIk1(h)	83	65
PIk3(h)	101	81
Ret(h)	1	1
ROCK-1(h)	93	41
Rsk3(h)	2	1
SAPK3(h)	106	108
SAPK4(h)	94	91
TGFBR1(h)	97	69
TrkC(h)	47	13
ZAP-70(h)	92	66
ZIPK(h)	97	46

[0250]

[0251] 키나제 프로파일링 결과는 R428이 예상대로 AXL을 저해함을 나타낸다. 그러나, 부가적으로 R428은 1 및 10  $\mu$ M에서 RSK3, Ret, Flt, FGFR1, 오로라A 및 오로라B 키나제를 강력하게 저해한다. 이는 MAFA의 유도에서의 R428 작용의 기전은 AXL 수용체 저해에 의한 것이 아닐 수 있음을 의미한다. 사실, 본 명세서에서의 실시예들은, 7기에서의 AXL에 대한 mRNA 발현이, MAFA 발현의 유도에서의 R428 작용의 기전은 AXL 저해에 의한 것이 아니라 오히려 다른 키나제, 예컨대 RSK3 및 오로라 키나제의 저해에 의한 것임을 미약하게 강조하고 있음을 보여준다.

[0252] 실시예 6

[0253] 오로라 키나제 발현의 저해는 R428 부재 하에서 7기에서 MAFA 발현을 향상시켰다

[0254] 인간 배아 줄기 세포주 H1 (WA01)의 세포를 E8 배지에서 매트릭셀™ (1:30 희석) 코팅 접시 상에 단일 세포로서  $1 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup>으로 시딩하였다. 약 70 내지 80% 컨플루언시에서, 배양물을 1x 불완전 DPBS로 세척한 후 1x 트리플™ 익스프레스 효소와 함께 3 내지 5분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 방출된 세포를 E8로 행구고 1000 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠릿을 10  $\mu$ M Y-27632로 보충된 E8 중에 재현탁하고 단일 세



포 현탁액을 대략  $1.3 \times 10^5$  개 세포/ $\text{cm}^2$ 로 시딩하였다. 배양물에 E8 배지를 매일 공급하였고, 하기 프로토콜에 따라, 시딩 후 48시간째에 분화를 개시한 결과 초기 컨플루언시는 약 90%였다.

[0255] 1기 (3일):

[0256] 매트릭젤™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 플레이팅된 세포를 먼저 1X 불완전 DPBS로 행군 후 하기의 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 10 mM 최종 글루코스 농도; 100 ng/ml GDF8; 및 1.5  $\mu\text{M}$  MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨, 10 mM 최종 글루코스 농도, 100 ng/ml GDF8, 및 0.1  $\mu\text{M}$  MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨, 10 mM 최종 글루코스 농도, 및 100 ng/ml GDF8로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0257] 2기 (2일):

[0258] 1X 불완전 DPBS로 세포를 행군 후, 0.5%의 FAF-BSA; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 10 mM 최종 글루코스 농도; 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml FGF7로 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 배양하였다.

[0259] 3기 (2일):

[0260] 1:100 희석의 ITS-X; 10 mM 최종 글루코스 농도; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu\text{M}$  SANT-1; 1  $\mu\text{M}$  RA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM TPB; 및 100 nM LDN-193189로 보충된 BLAR 주문 제작 배지에서 2일 동안 세포를 배양하였다.

[0261] 4기 (3일):

[0262] 1:100 희석의 ITS-X; 10 mM 최종 글루코스 농도; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu\text{M}$  SANT-1; 0.1  $\mu\text{M}$  RA; 2 ng/ml FGF7; 100 nM LDN-193189; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR 배지에서 3일 동안 세포를 배양한 후, 4기 말에, 평면 접시에서 배양된 세포를 10  $\mu\text{M}$ 의 Y-27632로 4시간 동안 처리하고, 1X 불완전 PBS로 행구고 1X 트리플™로 3 내지 5분 동안 실온에서 처리하였다. 효소를 제거하고, 세포를 방출하고 BLAR 배지로 행구고 일회용 폴리스티렌 125 ml 스피너 플라스크 내로 옮기고, 1000 rpm에서 3분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠렛을 대략  $0.5 \times 10^5$  개 세포/ $\text{cm}^2$ 의 밀도로 단일 세포로서 필터 인서트 상에 재현탁하였다 (총 25만 내지 50만개 세포/스폿에 대해 스폿당 5 내지 10  $\mu\text{l}$ ). 각각의 스폿팅된 면적은 첨가된 세포의 부피에 따라 대략 1 내지 2 mm의 지름으로 측정되었다. 6-웰 인서트에 대해서는, 1.5 mL/웰을 각각의 인서트의 바닥에 첨가한 반면, 10 cm 필터 인서트에 대해서는 8 mL를 첨가하였다. 전형적으로, 6-웰 인서트의 웰당 20 내지 15개의 스폿을 사용하였고 10 cm 인서트에 대해서는 80 내지 90개의 스폿을 사용하였다.

[0263] 5기 (3일):

[0264] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.25  $\mu\text{M}$  SANT-1; 0.05  $\mu\text{M}$  RA; 100 nM LDN-193189, 1  $\mu\text{M}$ 의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 및 10  $\mu\text{M}$ 의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 4기 세포를 3일 동안 배양하였다.

[0265] 6기 (7일):

[0266] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 100 nM LDN-193189, 1  $\mu\text{M}$ 의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 100 nM 감마 세크레타제 저해제 XX, 및 10  $\mu\text{M}$ 의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 5기 세포를 7일 동안 배양하였다.

[0267] 7기 (7일):

[0268] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/L 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 헤파린, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$ 의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 10  $\mu\text{M}$ 의 ALK5 저해제 II, 1 mM N-아세틸 시스테인으로 보충된 BLAR 배지에서 6기 세포를 7일 동안 배양하였다. 일부 배양물은 또한 2  $\mu\text{M}$  R428, 2  $\mu\text{M}$  오로라 키나제 저해제 VI (4-(4-(N-벤조일아미노)아닐리노)-6-메톡시-7-(3-(1-모르폴리노)프로폭시)퀴나졸린) (이엠디 밀리포어; 카탈로그 번호 18941), 또는 2  $\mu\text{M}$  오로라 키나제 저해제 II (4-(4'-벤즈아미도아닐리노)-6,7-다이메톡시퀴나졸린) (이엠디 밀리포어; 카탈로그 번호 189404) 중 하나를 포

함하였다.

[0269] 7기, 일수 7에서, mRNA를 수집하고 MAFA, UCN3, PDX1, NKX6.1, 인슐린 및 G6PC2의 발현을 미분화 인간 줄기 세포와 비교하여 평가하였다. 도 10에 묘사된 바와 같이, R428의 제거는 MAFA 발현에서의 유의한 감소를 야기하였다. 성숙한 베타 세포의 두 마커인 UCN3 및 G6PC2 발현에서의 유의한 증가가 R428로 처리되지 않은 배양물에 대해 확인되었는데, 이는 R428이 MAFA 발현은 증가시키더라도, 이 화합물은 다른 베타 세포 성숙 마커를 감소시킨다는 것을 제시한다. R428 대신 오로라 키나제 저해제의 사용은 MAFA 발현을 회복시킨 반면, G6PC2 수준을 감소시키지는 않았다. 따라서, 7기에서 R428에 의한 MAFA 발현의 유도는 아마도 AXL 저해에 의한 것이 아니라 오히려 오로라 키나제의 저해에 의한 것이었을 것이다. 오로라 키나제 저해제 II의 사용은 MAFA 발현에서의 증가 및 UCN3 및 G6PC2 발현의 유지를 야기하였다.

[0270] 실시예 7

[0271] 오로라 키나제 또는 RSK의 저해는 R428 부재 하에서 7기에서 MAFA 발현을 향상시켰다

[0272] 인간 배아 줄기 세포주 H1 (WA01)의 세포를 E8 배지에서 매트릭셀™ (1:30 희석) 코팅 접시 상에 단일 세포로서  $1 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup>으로 시딩하였다. 약 70 내지 80% 컨플루언스에서, 배양물을 1x 불완전 DPBS로 세척한 후 1x 트리플™ 익스프레스 효소와 함께 3 내지 5분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 방출된 세포를 E8로 행구고 1000 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠릿을 10  $\mu$ M Y-27632로 보충된 E8 중에 재현탁하고 단일 세포 현탁액을 대략 1.3 내지  $1.5 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup>으로 시딩하였다. 배양물에 E8 배지를 매일 공급하였고, 하기 프로토콜에 따라, 시딩 후 48시간째에 분화를 개시한 결과 초기 컨플루언시는 약 90%였다.

[0273] 1기 (3일):

[0274] 매트릭셀™ (1:30 희석)-코팅 접시 상에 플레이팅된 세포를 먼저 1X 불완전 DPBS로 행군 후 하기의 1기 배지에서 1일 동안 배양하였다: 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 10 mM 최종 글루코스 농도; 100 ng/ml GDF8; 및 1.5  $\mu$ M MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨, 10 mM 최종 글루코스 농도, 100 ng/ml GDF8, 및 0.1  $\mu$ M MCX 화합물로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다. 이어서, 0.5% FAF-BSA, 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨, 10 mM 최종 글루코스 농도, 및 100 ng/ml GDF8로 보충된 MCDB-131 배지에서 추가 1일 동안 세포를 배양하였다.

[0275] 2기 (2일):

[0276] 1X 불완전 DPBS로 세포를 행군 후, 0.5%의 FAF-BSA; 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 10 mM 최종 글루코스 농도; 0.25 mM 아스코르브산 및 50 ng/ml FGF7로 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 배양하였다.

[0277] 3기 (2일):

[0278] 1:100 희석의 ITS-X; 10 mM 최종 글루코스 농도; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1; 1  $\mu$ M RA; 25 ng/ml FGF7; 0.25 mM 아스코르브산; 300 nM TPB; 및 100 nM LDN-193189로 보충된 BLAR 주문 제작 배지에서 2일 동안 세포를 배양하였다.

[0279] 4기 (3일):

[0280] 1:100 희석의 ITS-X; 10 mM 최종 글루코스 농도; 2.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1; 0.1  $\mu$ M RA; 2 ng/ml FGF7; 100 nM LDN-193189; 0.25 mM 아스코르브산; 및 200 nM TPB로 보충된 BLAR 배지에서 3일 동안 세포를 배양한 후, 4기 말에, 평면 접시에서 배양된 세포를 10  $\mu$ M의 Y-27632로 4시간 동안 처리하고, 1X 불완전 PBS로 행구고 1X 트리플™로 3 내지 5분 동안 실온에서 처리하였다. 효소를 제거하고, 세포를 방출하고 BLAR 배지로 행구고 일회용 폴리스티렌 125 ml 스피너 플라스크 내로 옮기고, 1000 rpm에서 3분 동안 회전시켰다. 생성된 세포 펠릿을 대략  $0.5 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup>의 밀도로 단일 세포로서 필터 인서트 상에 재현탁하였다 (총 25만 내지 50만개 세포/스폿에 대해 스폿당 5 내지 10  $\mu$ l). 각각의 스폿팅된 면적은 첨가된 세포의 부피에 따라 대략 1 내지 2 mm의 지름으로 측정되었다. 6-웰 인서트에 대해서는, 1.5 mL/웰을 각각의 인서트의 바닥에 첨가한 반면, 10 cm 필터 인서트에 대해서는 8 mL를 첨가하였다. 전형적으로, 6-웰 인서트의 웰당 20 내지 15개의 스폿을 사용하였고 10 cm 인서트에 대해서는 80 내지 90개의 스폿을 사용하였다.

[0281] 5기 (3일):

[0282] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu$ g/ml의 헤파린,

10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0.25  $\mu\text{M}$  SANT-1; 0.05  $\mu\text{M}$  RA; 100 nM LDN-193189, 1  $\mu\text{M}$ 의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 및 10  $\mu\text{M}$ 의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 4기 세포를 3일 동안 배양하였다.

[0283] 6기 (7일):

[0284] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/1000 ml 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 헤파린, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 100 nM LDN-193189, 1  $\mu\text{M}$ 의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 100 nM 감마 세크레타제 저해제 XX, 및 10  $\mu\text{M}$ 의 ALK5 저해제 II로 보충된 BLAR 배지에서 5기 세포를 7일 동안 배양하였다.

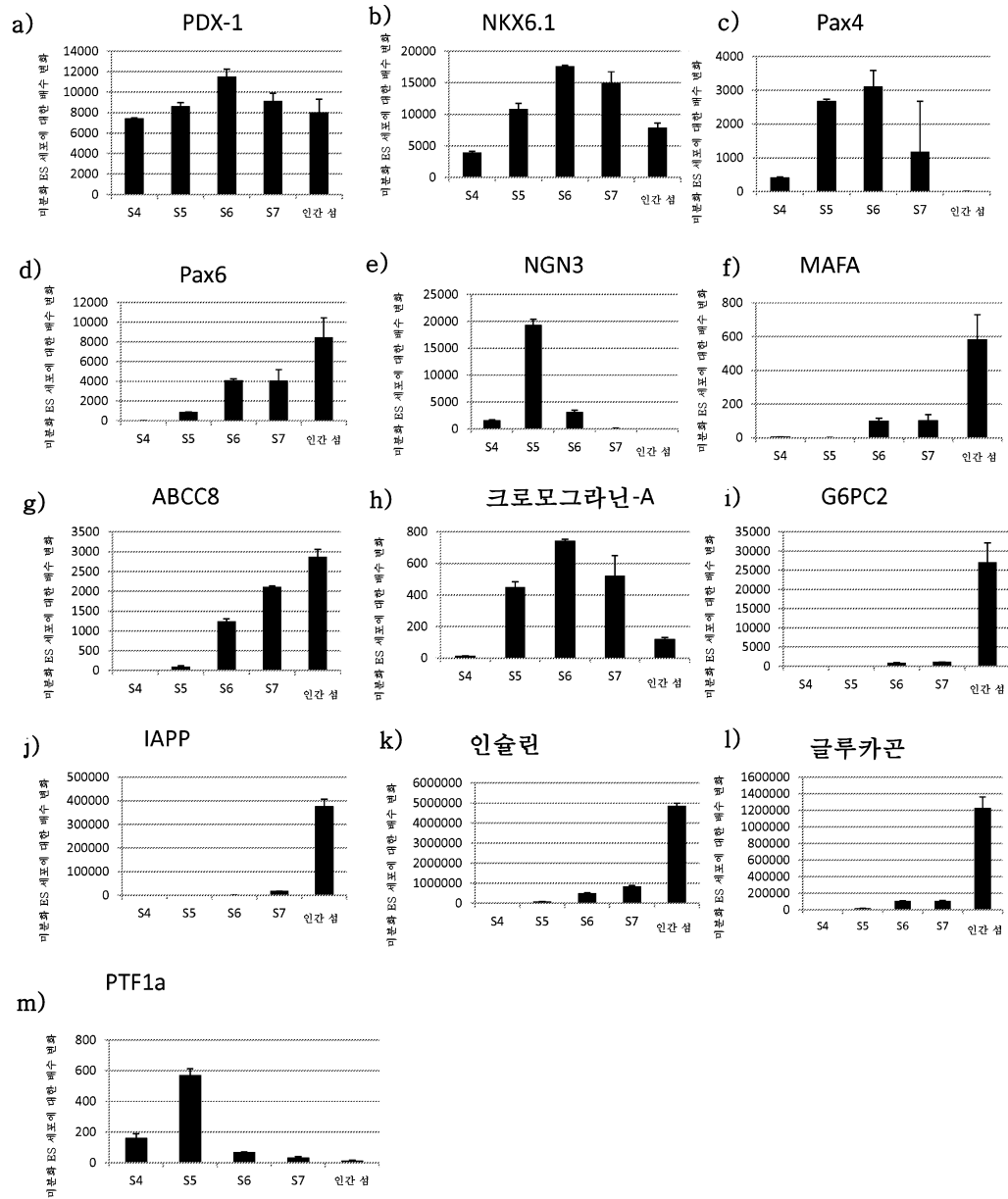
[0285] 7기 (7일):

[0286] 1:100 희석의 ITS-X; 20 mM 글루코스 (최종); 1.5 g/L 중탄산나트륨; 2% FAF-BSA; 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 헤파린, 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 1  $\mu\text{M}$ 의 3,3', 5-트라이요오도-L-타이로닌 소듐 염으로서의 T3, 10  $\mu\text{M}$  ALK5 저해제 II, 1 mM N-아세틸 시스테인으로 보충된 BLAR 배지에서 6기 세포를 14일 동안 배양하였다. 일부 배양물은 또한 2  $\mu\text{M}$  R428, 2 내지 5  $\mu\text{M}$  RSK 저해제 II (2-(3,5-다이플루오로-4-하이드록시-아닐리노)-8-아이소펜틸-5,7-다이메틸-7H-프테리딘-6-온) (이엠디 밀리포어; 카탈로그 번호 559286-5MG), 2 내지 5  $\mu\text{M}$  오로라 키나제 저해제 II (이엠디 밀리포어), 또는 2 내지 5  $\mu\text{M}$  RSK 저해제 II 및 2 내지 5  $\mu\text{M}$  오로라 키나제 II 저해제의 조합 중 하나를 포함하였다.

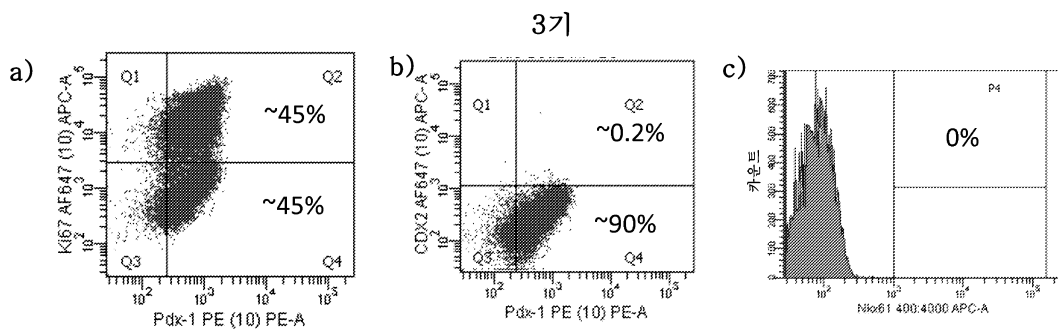
[0287] 7기, 일수 14에서, mRNA를 수집하고 미분화 인간 줄기 세포와 비교하였다. 도 11에 묘사된 바와 같이, R428의 제거는 MAFA 발현에서의 유의한 감소를 야기하였다. R428 대신 오로라 키나제 저해제 II의 사용은 MAFA 발현을 회복시켰다. 유사하게, R428 대신 RSK 저해제의 사용은 MAFA 발현을 회복시켰다. R428 대신 오로라 키나제 저해제 II 및 RSK 저해제의 사용은 MAFA 발현을 추가로 향상시켰다. 이 데이터는 R428에 의한 MAFA 발현의 유도는 아마도 AXL 저해에 의한 것이 아니라 오히려 오로라 키나제, RSK 또는 이들의 조합의 저해에 의한 것이었을 것임을 나타낸다.

도면

도면1



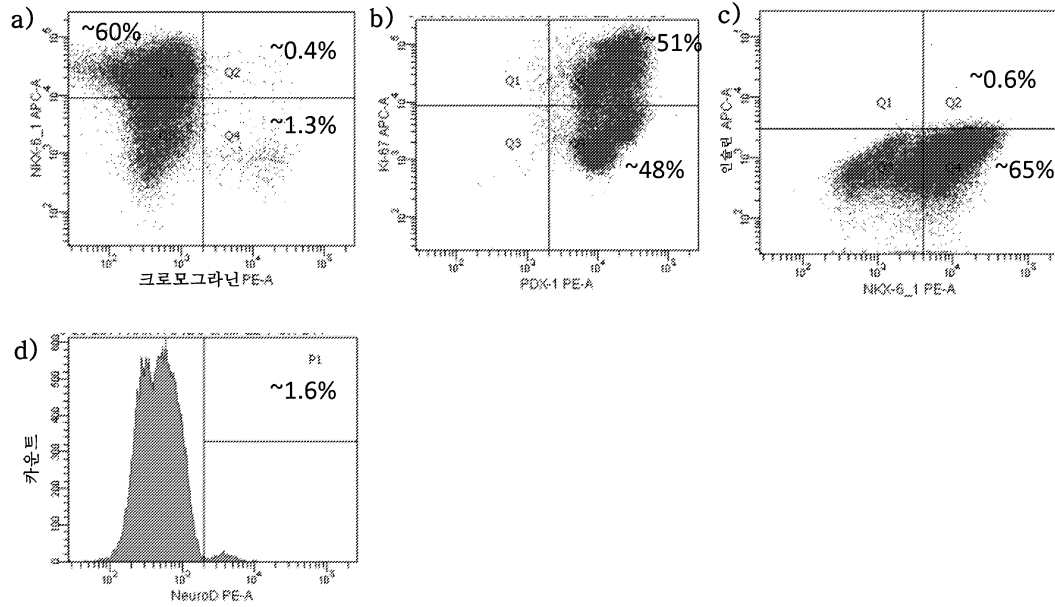
도면2





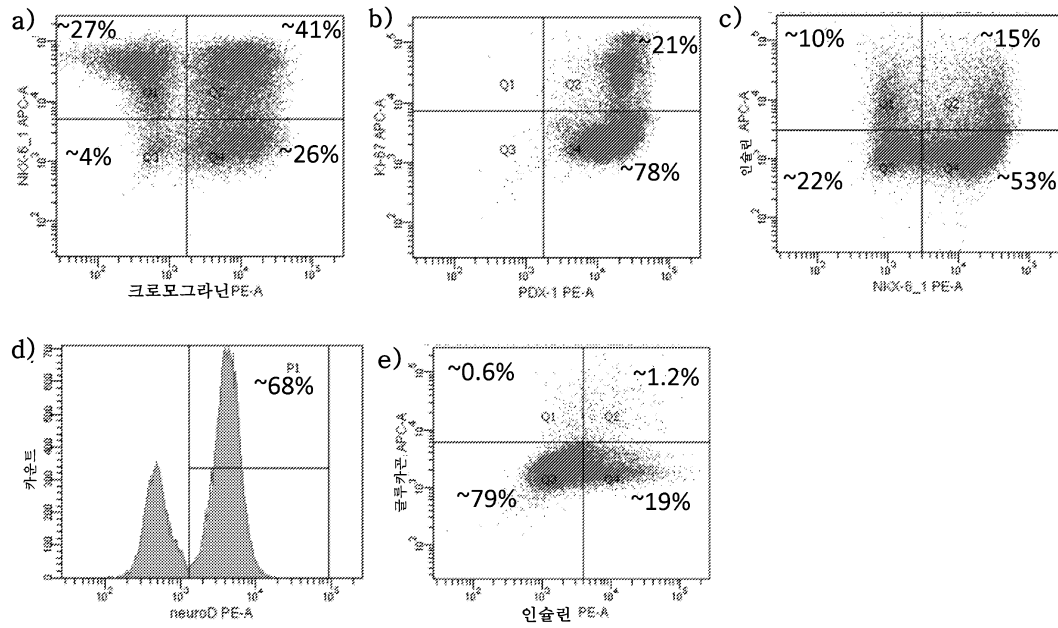
도면3

4기

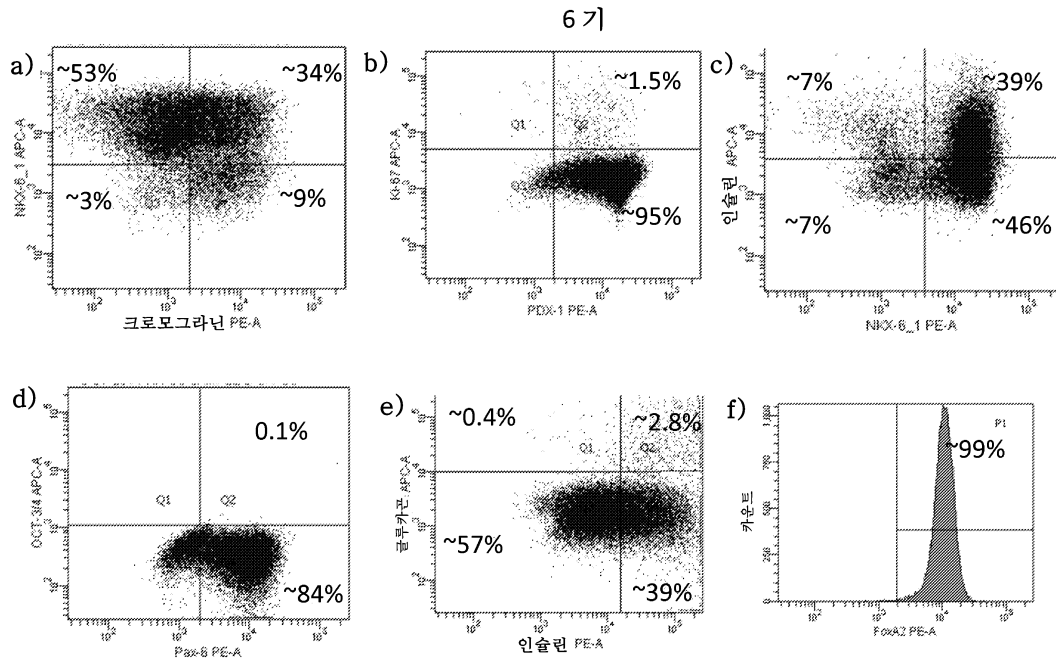


도면4

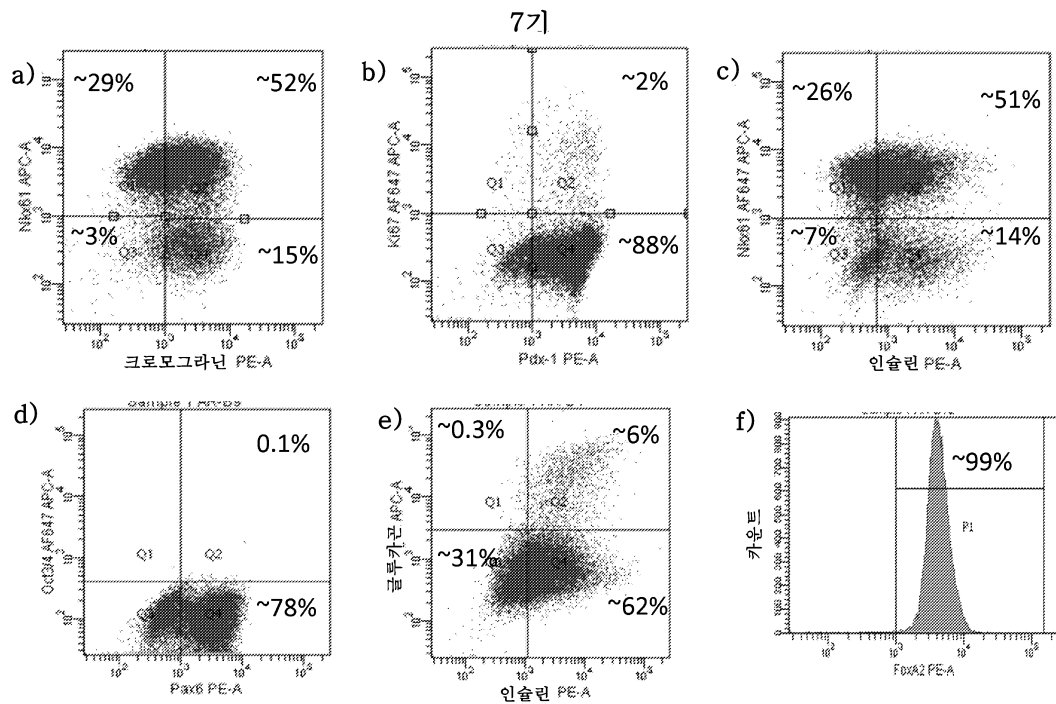
5기



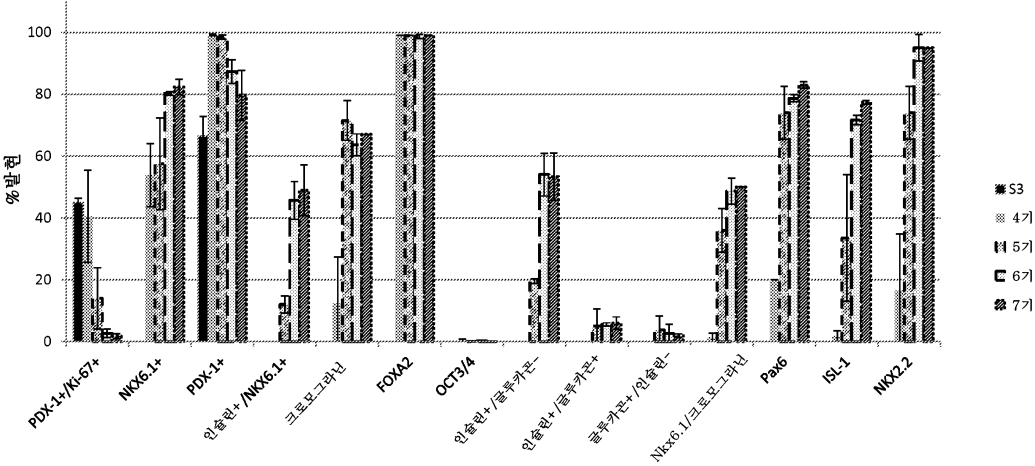
도면5



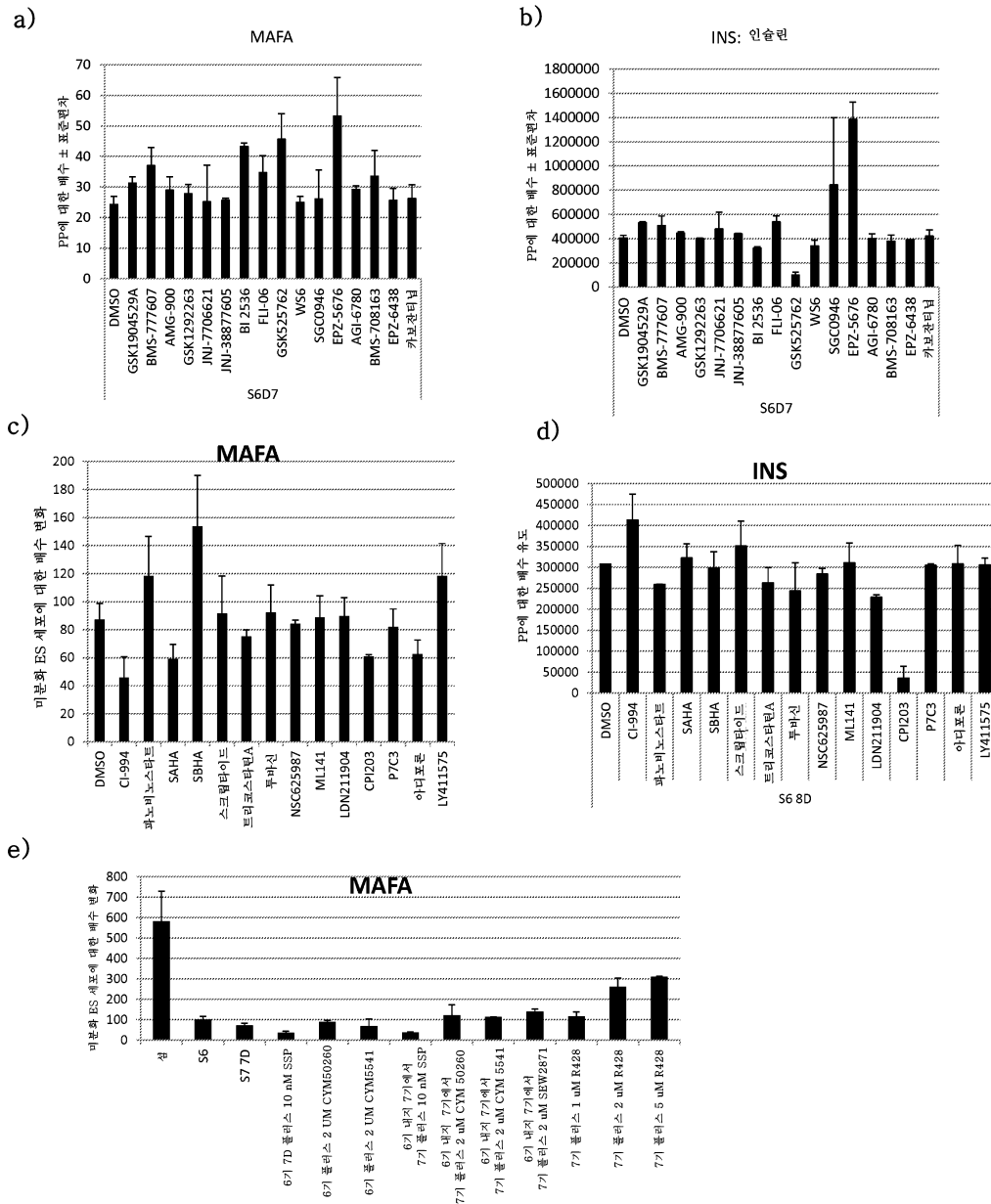
도면6



도면7

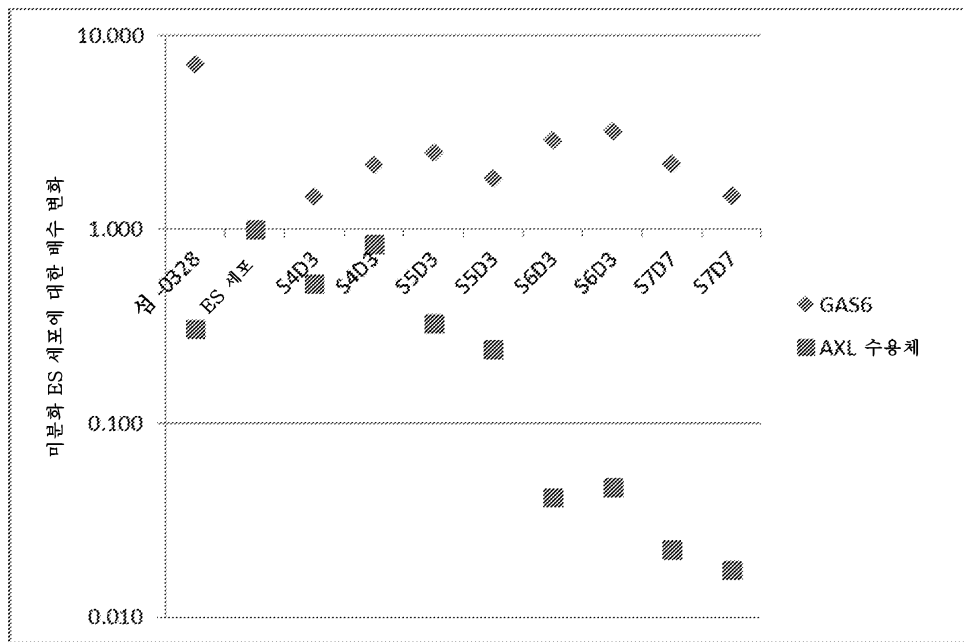


도면8

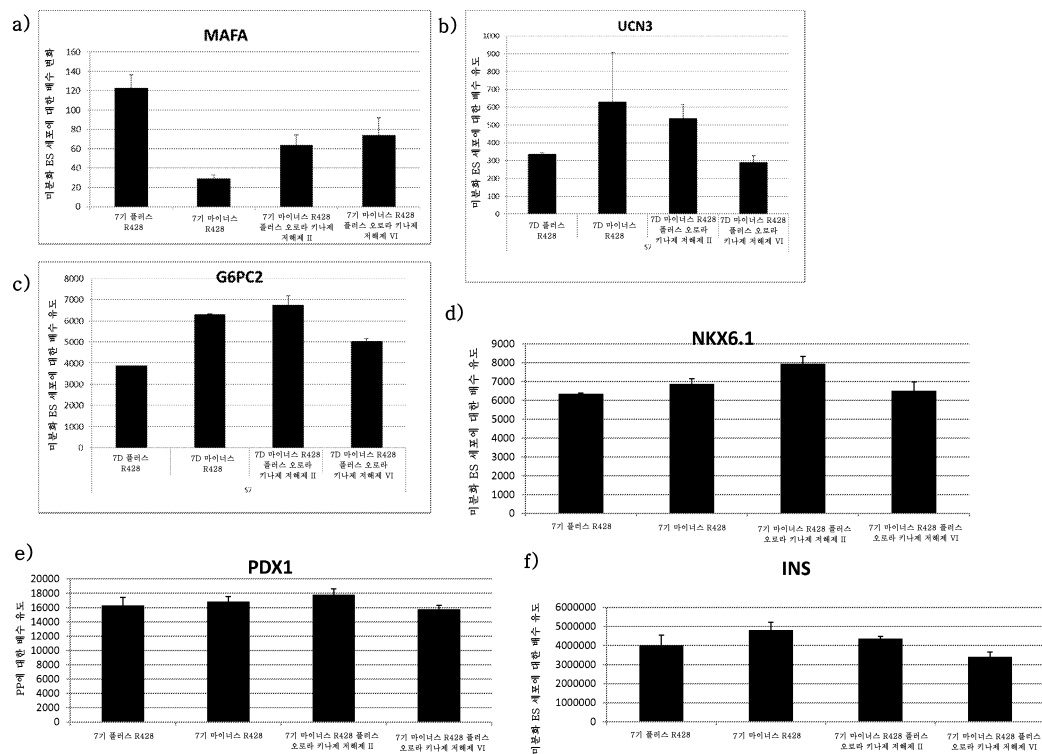




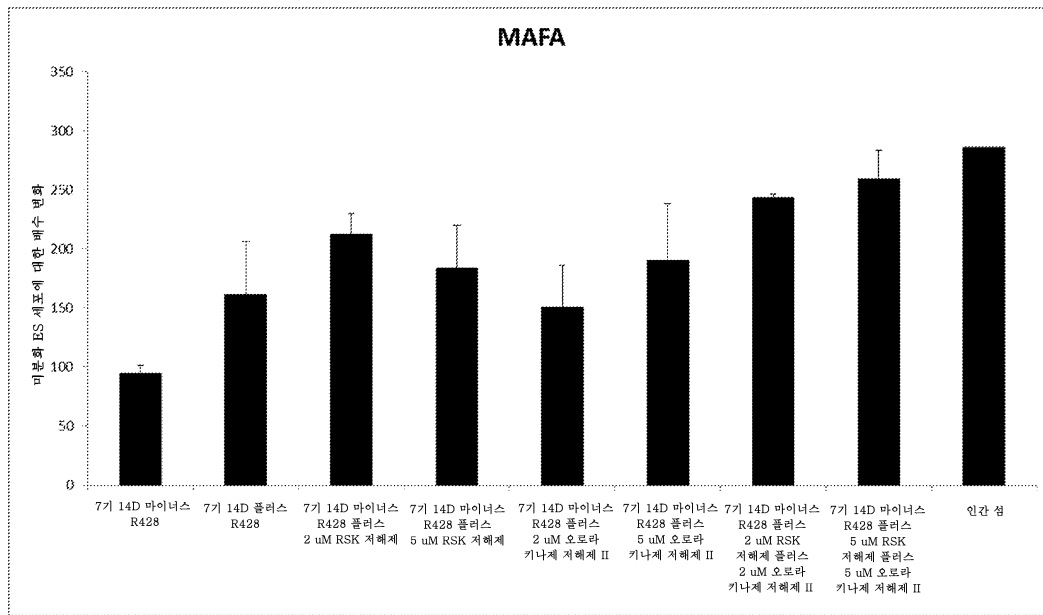
도면9



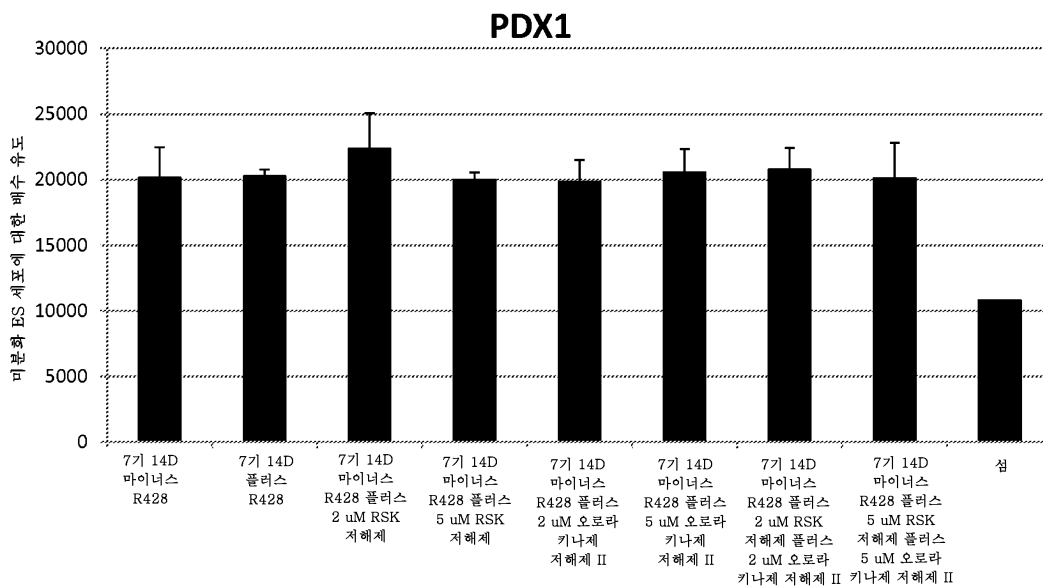
도면10



도면11a

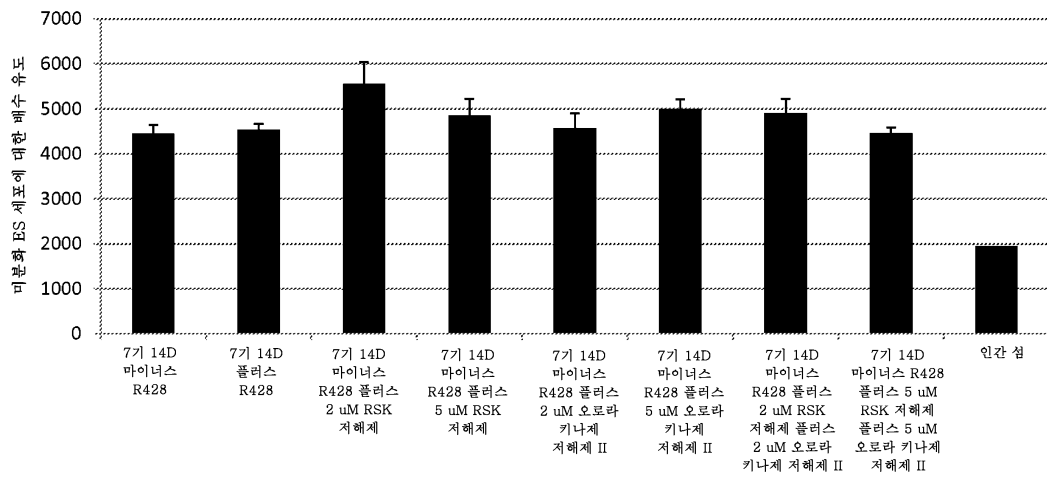


도면11b



도면11c

# NKX6.1



도면11d

# INS

