



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월22일
 (11) 등록번호 10-1841271
 (24) 등록일자 2018년03월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/00* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 5/063 (2013.01)
C12N 5/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2017-7021141(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2010년12월16일
 심사청구일자 2017년08월23일
 (85) 번역문제출일자 2017년07월27일
 (65) 공개번호 10-2017-0090530
 (43) 공개일자 2017년08월07일
 (62) 원출원 특허 10-2012-7018933
 원출원일자(국제) 2010년12월16일
 심사청구일자 2015년11월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/060770
 (87) 국제공개번호 WO 2011/079018
 국제공개일자 2011년06월30일
 (30) 우선권주장
 61/289,692 2009년12월23일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Kroon, E. et al., Nature Biotechnology, April
 2008, vol.26, no.4, pp. 443-452

(73) 특허권자
얀센 바이오테크 인코포레이티드
 미국, 펜실베이니아주 19044, 호삼, 럿지뷰 드라이브 800
 (72) 발명자
데이비스 자넷
 미국 뉴저지주 08558 스킨만 그랜드뷰 로드 199
파멘터 크리스틴
 미국 뉴저지주 08558 스킨만 그랜드뷰 로드 199
티틀보 케빈
 미국 뉴저지주 08558 스킨만 그랜드뷰 로드 199
 (74) 대리인
특허법인한성

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **인간 배아 줄기 세포의 분화**

(57) 요약

본 발명은 인슐린 생성 세포로의 만능 줄기 세포의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 췌장 내 분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
C12N 5/067 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

a) 인간 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계; 및

b) H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌(Wortmannin), SB-203580, SB-202190, 티르포스틴(Tyrphostin) 25, 티르포스틴 AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론(Kenpaullone), HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 키나아제 억제제로 보충된 분화 배지에서 상기 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함하며,

상기 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 SOX17, GATA4, HNF3 베타, GSC, CER1, 노달, FGF8, 브라키어리, Mix-유사 호메오박스 단백질, FGF4, CD48, 에오메소터민(EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-키트, CD99 및 OTX2로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하고,

상기 배양 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 PDX1, HNF1 베타, PTF1 알파, HNF6, HB9 및 PROX1로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 배양 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는,

배양 내배엽 세포를 생성하는 방법.

청구항 2

H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴 AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 키나아제 억제제로 보충된 분화 배지에서 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 인간 세포를 배양 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함하며,

상기 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 인간 세포는 인간 만능 줄기 세포로부터 유도된 것이고,

상기 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 SOX17, GATA4, HNF3 베타, GSC, CER1, 노달, FGF8, 브라키어리, Mix-유사 호메오박스 단백질, FGF4, CD48, 에오메소터민(EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-키트, CD99 및 OTX2로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하며,

상기 배양 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 PDX1, HNF1 베타, PTF1 알파, HNF6, HB9 및 PROX1로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 배양 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는,

배양 내배엽 세포를 생성하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 (b)가

완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 섬유아세포 성장 인자 및 헤지호그(hedgehog) 신호전달 경로 억제제 KAAD-사이클로파민으로 보충된 배지에서 처리하고,

그 후 상기 섬유아세포 성장 인자 및 KAAD-사이클로파민을 함유하는 배지를 제거하고,

이어서 상기 세포를 레티노산; 섬유아세포 성장 인자; KAAD-사이클로파민; 및 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴 AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 키나아제 억제제로 보충된 배지에서 배양하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 섬유아세포 성장 인자 및 헤지호그(hedgehog) 신호전달 경로 억제제 KAAD-사이클로파민으로 보충된 배지에서 처리하고,

그 후 상기 섬유아세포 성장 인자 및 KAAD-사이클로파민을 함유하는 배지를 제거하고,

이어서 상기 세포를 레티노산; 섬유아세포 성장 인자; KAAD-사이클로파민; 및 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴 AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 키나아제 억제제로 보충된 배지에서 배양하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 섬유아세포 성장 인자가 FGF-7인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항 또는 제4항에 있어서, 레티노산, 섬유아세포 성장 인자, KAAD-사이클로파민 및 키나아제 억제제로 보충된 배지가 액티빈 A로 추가로 보충되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제3항 또는 제4항에 있어서, 레티노산, 섬유아세포 성장 인자, KAAD-사이클로파민 및 키나아제 억제제로 보충된 배지가 노긴(noggin)으로 추가로 보충되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 H-9, H-89, GF 109203X 또는 HA-1004인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 PP2 또는 PP1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 LY 294002 또는 보르트만닌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 SB-203580 또는 SB-202190인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 티르포스틴 25, 티르포스틴 AG1478 또는 티르포스틴 46인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 GW 5074인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 켄파울론인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 HNMPA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 AG490인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 Y27632인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 키나아제 억제제가 ML-7인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포가 췌장 내배엽 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된, 2009년 12월 23자로 출원된 미국 가출원 제61/289,692호의 이익을 주장한다.

[0002] 기술분야

[0003] 본 발명은 만능 줄기 세포의 인슐린 생성 세포로의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0004] 제I형 당뇨병 및 이식가능한 랭게르한스섬의 부족에 대한 세포-대체 치료법에서의 진전에서는 생착 (engraftment)에 적절한 인슐린-생산 세포, 또는 β 세포의 공급원을 개발하는 데 관심이 집중되었다. 한 가지 접근법은 예를 들어 배아 줄기 세포와 같은 만능 줄기 세포로부터의 기능성 β 세포의 생성이다.

[0005] 척추동물 배아 발생 동안, 만능 세포는 낭배형성 (gastrulation)으로 알려진 과정에서 삼배엽층 (외배엽, 중배엽, 및 내배엽)을 포함하는 세포군을 생성한다. 예를 들어, 갑상선, 흉선, 췌장, 소화관, 및 간과 같은 조직은 중간 단계를 통해 내배엽으로부터 발생할 것이다. 이 과정에서 중간 단계는 완성 내배엽 (definitive endoderm)의 형성이다. 완성 내배엽 세포는 HNF3 베타, GATA4, MIXL1, CXCR4 및 SOX17과 같은 많은 마커를 발현한다.

[0006] 췌장의 형성은 완성 내배엽의 췌장 내배엽으로의 분화로부터 생긴다. 췌장 내배엽의 세포는 췌장-십이지장 호메오박스 (homeobox) 유전자, PDX1을 발현한다. PDX1의 부재 하에서는, 췌장은 복측 원기 (ventral bud) 및 배측 원기 (dorsal bud)의 형성 이상으로는 발달하지 못한다. 따라서, PDX1 발현이 췌장 기관형성에서 중요한 단계를 특징짓는다. 성숙한 췌장은 다른 세포형 중에서도 외분비 조직 및 내분비 조직을 포함한다. 외분비 및 내분비 조직은 췌장 내배엽의 분화로부터 생긴다.

[0007] 췌도 세포의 특징을 지닌 세포가 마우스의 배아 세포로부터 시험관 내에서 유도된 것으로 보고되었다. 예를 들어, 루멜스키 (Lumelsky) 등 (문헌[Science 292:1389, 2001])은 마우스 배아 줄기 세포가 췌도와 유사한 인슐린 분비 구조로 분화한 것을 보고하였다. 소리아 (Soria) 등 (문헌[Diabetes 49:157, 2000])은 마우스 배아 줄기 세포로부터 유도된 인슐린 분비 세포가 스트렙토조토신 유도된 당뇨 마우스에 이식 시에 혈당을 정상화시켰음을 보고하였다.

[0008] 일 예에서, 호리 (Hori) 등 (문헌[PNAS 99: 16105, 2002])은 마우스 배아 줄기 세포를 포스포이노시티드 3-키나아제의 억제제 (LY294002)로 처리하여 β 세포와 닮은 세포를 생성하였음을 기술하였다.

[0009] 다른 예에서, 블리츠주크 (Blyszczuk) 등 (문헌[PNAS 100:998, 2003])은 구성적으로 Pax4를 발현하는 마우스 배아 줄기 세포로부터 인슐린 생산 세포를 생성하는 것을 보고하였다.

[0010] 미칼레프 (Micallef) 등은 레티노산이 PDX1 양성 췌장 내배엽을 형성하는 배아 줄기 세포의 의무를 조절할 수 있음을 보고한다. 레티노산은 배아에서 낭배형성의 마지막에 해당하는 기간 동안 배아 줄기 세포 분화의 4일째에

배양물에 첨가될 때 PDX1 발현을 유도하는 데 가장 효과적이다 (문헌[Diabetes 54:301, 2005]).

- [0011] 미야자키 (Miyazaki) 등은 Pdx1을 과다 발현하는 마우스 배아 줄기 세포주를 보고한다. 그들의 결과는 외인성 Pdx1 발현이 생성된 분화된 세포에서 인슐린, 소마토스타틴, 글루코키나아제, 뉴로제닌3, p48, Pax6 및 HNF6의 발현을 명백히 향상시켰음을 보여준다 (문헌[Diabetes 53: 1030, 2004]).
- [0012] 스쿠디 (Skoudy) 등은 액티빈 (activin) A (TGF-β 슈퍼패밀리의 구성원)가 마우스 배아 줄기 세포에서 외분비 췌장 유전자 (p48 및 아밀라아제) 및 내분비 유전자 (Pdx1, 인슐린, 및 글루카곤)의 발현을 상향조절함을 보고한다. 최대 효과는 1 nM 액티빈 A를 이용할 때 관찰되었다. 그들은 또한 인슐린 및 Pdx1 mRNA의 발현 수준이 레티노산에 의해 영향을 받지 않지만, 3 nM FGF7 처리가 Pdx1의 전사체의 수준을 증가시킴을 관찰하였다 (문헌 [Biochem. J. 379: 749, 2004]).
- [0013] 쉬라키 (Shiraki) 등은 배아 줄기 세포의 PDX1 양성 세포로의 분화를 특이적으로 향상시키는 성장 인자의 효과를 연구하였다. 이들은 TGF-β2가 재현가능하게 더 높은 비율의 PDX1 양성 세포를 생성함을 관찰하였다 (문헌 [Genes Cells. 2005 Jun; 10(6): 503-16]).
- [0014] 고든 (Gordon) 등은 Wnt 신호전달 억제제와 함께 액티빈의 존재 하의 그리고 혈청의 부재 하의, 마우스 배아 줄기 세포로부터의 브라키어리(brachyury) [양성]/HNF3 베타 [양성] 내배엽 세포의 유도를 보여주었다 (미국 특허 출원 공개 제2006/0003446A1호).
- [0015] 고든 등 (문헌[PNAS, Vol 103, page 16806, 2006])은 "Wnt 및 TGF-베타/ 노달/ 액티빈 신호전달은 동시에 전방부 원시선의 발생에 필요하였다"고 언급한다.
- [0016] 그러나, 배아 줄기 세포 발생의 마우스 모델은 예를 들어, 인간과 같은 고등 포유류에서의 발생 프로그램을 정확하게 모방하지 않을 수 있다.
- [0017] 톰슨 (Thomson) 등은 인간 배반포로부터 배아 줄기 세포를 분리하였다 (문헌[Science 282:114, 1998]). 동시에, 기어하트 (Gearhart)와 동료들은 태아 생식선 조직으로부터 인간 배아 생식 (hEG) 세포주를 유도하였다 (문헌[Shamblott *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13726, 1998]). 백혈병 억제 인자 (LIF)와 함께 배양함으로써 간단하게 분화를 방지할 수 있는 마우스 배아 줄기 세포와는 달리, 인간 배아 줄기 세포는 매우 특별한 조건 하에서 유지되어야 한다 (미국 특허 제6,200,806호; 국제특허 공개 WO 99/20741호; 국제특허 공개 WO 01/51616호).
- [0018] 드'아무르 (D'Amour) 등은 고농도의 액티빈과 저 혈청의 존재 하에서 인간 배아 줄기 세포-유래 완성 내배엽의 농축 배양물의 생성을 개시한다 (문헌[Nature Biotechnology 2005]). 마우스의 신장 피막하에 이들 세포를 이식하면 일부 내배엽 기관의 특징을 가진 보다 성숙한 세포로의 분화가 야기되었다. 인간 배아 줄기 세포-유래 완성 내배엽 세포는 FGF-10의 첨가 후에 PDX1 양성 세포로 추가로 분화될 수 있다 (미국 특허 출원 공개 제 2005/0266554A1호).
- [0019] 드'아무르 등 (문헌[Nature Biotechnology--24, 1392-1401 (2006)])은 "우리는 인간 배아 줄기 (hES) 세포를 췌장 호르몬 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 췌장 폴리펩티드 및 그렐린을 합성할 수 있는 내분비 세포로 전환시키는 분화 방법을 개발하였다. 이 과정은 도중에 완성 내배엽, 창자관 내배엽, 췌장 내배엽, 및 내분비 전구체를 닮은 단계들을 통해 세포를 내분비 호르몬 발현 세포가 되도록 함으로써 생체내 췌장 기관형성을 모방한다"고 밝혔다.
- [0020] 다른 예에서, 피스크 (Fisk) 등은 인간 배아 줄기 세포로부터 췌도 세포를 생성하는 시스템을 보고한다 (미국 특허 출원 공개 제2006/0040387A1호). 이 경우에, 분화 경로를 세 단계로 나누었다. 인간 배아 줄기 세포를 먼저 소듐 부티레이트와 액티빈 A의 조합을 이용하여 내배엽으로 분화시켰다. 이어서, EGF 또는 베타셀룰린과 조합된 노긴 (Noggin)과 같은 TGF-β 길항제를 이용하여 세포를 배양하여 PDX1 양성 세포를 생성하였다. 마지막 분화는 니코틴아미드에 의해 유도되었다.
- [0021] 일 예에서, 벤베니스트리 (Benvenistry) 등은 "우리는 PDX1의 과다 발현이 췌장에 풍부한 유전자의 발현을 향상시켰으며 인슐린 발현의 유도는 생체 내에서만 존재하는 추가의 신호를 필요로 할 수 있다고 결론내린다"라고 진술한다 (문헌[Benvenistry *et al*, Stem Cells 2006; 24:1923-1930]).
- [0022] 다른 예에서, 그라핀-보튼 (Gravin-Botton) 등은 "Ngn3의 조기 활성화는 췌장 조상세포(progenitor)의 풀을 고갈시키면서 글루카곤 [양성] 세포를 거의 배타적으로 유도하였다. E11.5에서와 같이, PDX-1 조상세포는 인슐린 [양성] 및 PP [양성] 세포로의 분화에 대하여 적격성으로 되었다"라고 진술한다 (문헌[Johansson KA *et al*,

Developmental Cell 12, 457-465, March 2007]).

[0023] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서의 NGN3의 발현은 상기 세포가 인슐린 발현 세포로 추가로 분화되는 능력을 감소시킬 수 있다. 이전의 연구에 의하면 NGN3을 발현하는 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 추가의 분화에 처해질 때 인슐린 발현 세포보다 글루카곤 발현 세포를 생성할 가능성이 더 큰 것으로 밝혀졌다. 그러나, NGN3 발현이 췌장 내분비 세포 또는 췌장 내분비 전구 세포 (예를 들어, 글루카곤 또는 인슐린 발현 세포를 형성할 수 있는 세포)의 형성에 필요하다. 따라서, 인슐린 발현 세포 쪽으로 췌장 내분비 전구 세포의 궁극적인 운명을 인도하는 데 있어서 NGN3의 일시적인 조절이 중요하다.

[0024] 따라서, 인슐린 발현 세포로 분화하는 잠재력을 보유하는 한편, 현재의 임상적 필요성에 대처하도록 확장될 수 있는 만능 줄기 세포주를 확립하기 위한 조건을 개발하는 것에 대한 상당한 필요성이 여전히 남아있다. 본 발명은 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공함으로써, 인슐린 발현 세포를 향한 인간 배아 줄기 세포의 분화 효율을 향상시키는 대안적인 접근법을 취한다.

발명의 내용

[0025] 일 실시형태에서, 본 발명은

[0026] a) 만능 줄기 세포를 배양하는 단계,

[0027] b) 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계,

[0028] c) 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 분화시키는 데 사용되는 배지를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌 (Wortmannin), SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 (Tyrophostin) 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론 (Kenpaullone), HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 보충하면서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계, 및

[0029] d) 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0030] 일 실시형태에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 분화시키는 데 사용되는 배지는 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 보충된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 개시내용을 분명하게 하고 제한되지 않기 위해, 본 발명의 상세한 설명은 본 발명의 특정 특징, 실시형태 또는 출원을 기술 또는 예시하는 하기 부분으로 구분된다.

[0032] 정의

[0033] 줄기 세포는 단일 세포 레벨에서 자가 재생하고 분화하여 자가 재생 조상세포, 비재생 조상세포, 및 최종 분화 세포를 비롯한 자손 세포 (progeny cell)를 생성하는 그의 능력에 의해 규정되는 미분화 세포이다. 줄기 세포는 또한 다수의 배엽층 (내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능성 세포로 시험관 내에서 분화하는 그의 능력, 및 이식 후 다수의 배엽층의 조직이 생기게 하며 배반포 내로의 주입 후, 전부는 아니라 하더라도 대부분의 조직에 실질적으로 기여하는 그의 능력을 특징으로 한다.

[0034] 줄기 세포는 그들의 발생 잠재력에 의해 분류된다: (1) 모든 배아 및 배자의 세포 유형이 생기게 할 수 있음을 의미하는 전능성; (2) 모든 배아 세포 유형이 생기게 할 수 있음을 의미하는 만능성; (3) 세포 계통의 하위세트이지만 모두 특정 조직, 기관 또는 생리학적 시스템 내에 있는 하위세트가 생기게 할 수 있음을 의미하는 다능성 (예를 들어, 조혈 줄기 세포 (hematopoietic stem cell, HSC)는 HSC (자가-재생), 혈구 세포 제한된 소기능성 (oligopotent) 조상세포 및 혈액의 정상 성분인 모든 세포 유형 및 요소 (예를 들어, 혈소판)를 포함하는 자손을 생성할 수 있음); (4) 다능 줄기 세포보다 더 제한된 하위세트의 세포 계통이 될 수 있음을 의미하는 소기능성; 및 (5) 단일 세포 계통 (예를 들어, 정자발생 줄기 세포)이 생기게 할 수 있음을 의미하는 단일기능성.

[0035] 분화는 특화되지 않은 ("미결된") 또는 덜 특화된 세포가 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포와 같은 특화된

세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화된 또는 분화-유도된 세포는 세포의 계통 내에서 보다 특화된 ("결정된 (committed)") 위치를 차지한 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "결정된"은 분화 경로에서, 통상적인 환경 하에서 특정 세포형 또는 세포형의 서브셋으로 계속 분화할 것이며, 통상적인 환경하에서 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 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포의 계통은 세포의 유전, 즉 어느 세포로부터 왔는지 그리고 어떤 세포가 생성되게 할 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 관심있는 계통의 세포의 표현형과 특이적으로 관련되며 미결정 세포가 관심있는 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있는 특징을 말한다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포", 또는 "제1기 세포", 또는 "제1기"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: SOX17, GATA4, HNF3 베타, GSC, CER1, 노달 (Nodal), FGF8, 브라키어리, Mix-유사 호메오박스 단백질, FGF4 CD48, 에오메소더민 (eomesodermin) (EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-Kit, CD99, 또는 OTX2. 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 원시선 전구 세포, 원시선 세포, 중내배엽 세포 및 완성 내배엽 세포를 포함한다.

[0037] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포"는 하기 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: PDX1, HNF1 베타, PTF1 알파, HNF6, NKX6.1 또는 HB9. 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 취장 내배엽 세포, 원시 창자관 (primitive gut tube) 세포, 및 후방 전장 (posterior foregut) 세포를 포함한다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "완성 내배엽"은 낭배형성 동안 외피(epiblast)로 인한 세포의 특징을 갖고 위장관로 및 그의 유도체를 형성하는 세포를 말한다. 완성 내배엽 세포는 하기 마커를 발현한다: HNF3 베타, GATA4, SOX17, 세르베루스 (Cerberus), OTX2, 구스코이드 (gooseoid), C-키트, CD99 및 MIXL1.

[0039] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심있는 세포에서 차등적으로 발현되는 핵산 또는 폴리펩티드 분자이다. 이와 관련하여, 차등 발현은 양성 마커의 수준 증가 및 음성 마커의 수준 감소를 의미한다. 마커 핵산 또는 폴리펩티드의 검출가능한 레벨은 다른 세포에 비하여 대상 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮아, 대상 세포가 당업계에 알려진 다양한 방법 중 임의의 것을 이용하여 다른 세포로부터 확인되어 구별될 수 있다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "취장 내분비 세포" 또는 "취장 호르몬 발현 세포"는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스태틴, 및 취장 폴리펩티드.

[0041] 만능 줄기 세포의 단리, 증식 및 배양

[0042] 만능 줄기 세포의 특성화

[0043] 만능 줄기 세포는 시기-특이적 배아 항원 (stage-specific embryonic antigen, SSEA) 3 및 4, 및 Tra-1-60 및 Tra-1-81로 표기되는 항체를 이용하여 검출가능한 마커 중 하나 이상을 발현할 수 있다 (문헌[Thomson *et al.*, Science 282:1145, 1998]). 시험관 내에서 만능 줄기 세포의 분화는 SSEA-4, Tra 1-60, 및 Tra 1-81 발현 (존재하는 경우)의 손실 및 SSEA-1의 발현 증가로 이어진다. 미분화된 만능 줄기 세포는 전형적으로 알칼리성 포스파타아제 활성을 가지며, 이 활성은 상기 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고, 이어서 제조사 (미국 캘리포니아주 벨링게임 소재의 벡터 래보러토리즈 (Vector Laboratories))가 설명한 바와 같이, 기질로서 벡터 레드 (Vector Red)를 이용하여 발색시킴으로써 검출될 수 있다. 미분화된 만능 줄기 세포는 또한 전형적으로 RT-PCR에 의해 검출할 때, OCT4 및 TERT를 발현한다.

[0044] 증식된 만능 줄기 세포의 다른 바람직한 표현형은 모든 삼배엽층의 세포, 즉, 내배엽, 중배엽 및 외배엽의 조직으로 분화하는 잠재력이다. 만능 줄기 세포의 만능성은 예를 들어, 세포를 중증 복합형 면역결핍증 (severe combined immunodeficient, SCID) 마우스내로 주사하고, 형성되는 기형종을 4% 파라포름알데히드를 이용하여 고정하고, 이어서 삼배엽층으로부터의 세포 유형의 증거에 대해 그들을 조직학적으로 조사함으로써 확인할 수 있다. 대안적으로, 다능성은 배양체 (embryoid body)를 형성하고, 삼배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.

[0045] 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 필요하며, 이는 세포가 모든 인간 염색체가 존재하며 눈에 띄게 변경되지 않은 정배수체임을 의미한다.

- [0046] 만능 줄기 세포의 공급원
- [0047] 사용될 수 있는 만능 줄기 세포의 유형은 전-배아 (pre-embryonic) 조직 (예를 들어, 배반포), 배아 조직, 또는 임신 동안 그러나 전형적으로 약 10-12주 임신 전일 필요는 없는 임의의 시점에 취한 태아 조직을 비롯한, 임신 후 형성된 조직으로부터 유래된 만능 세포의 확립된 주를 포함한다. 비제한적인 예로는 수립된 인간 배아 줄기 세포주 또는 인간 배아 생식 세포주, 예를 들어, 인간 배아 줄기 세포주 H1, H7, 및 H9 (WiCell)가 있다. 이러한 세포의 초기 수립 또는 안정화 시에 본 명세서의 조성물의 사용도 고려되며, 이 경우에는 공급원 세포는 공급원 조직으로부터 직접 취한 일차 다능 세포일 것이다. 영양 세포의 부재 하에서 이미 배양된 만능 줄기 세포 집단으로부터 취한 세포가 또한 적합하다. 돌연변이 인간 배아 줄기 세포주, 예를 들어, BG01v (BresaGen (Athens, GA))가 또한 적합하다.
- [0048] 일 실시형태에서, 인간 배아 줄기 세포는 톰슨 등에 의해 (미국 특허 제5,843,780호; 문헌[Science 282:1145, 1998]; 문헌[Curr. Top. Dev. Biol. 38:133 ff., 1998]; 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:7844, 1995]) 개시된 바와 같이 제조된다.
- [0049] 만능 줄기 세포의 배양
- [0050] 일 실시형태에서, 만능 줄기 세포는 전형적으로 다양한 방식으로 만능 줄기 세포를 지지하는 영양 세포층 상에서 배양된다. 대안적으로, 만능 줄기 세포는 본질적으로 영양 세포가 없지만, 그럼에도 불구하고 실질적인 분화를 거치지 않고 만능 줄기 세포의 증식을 지지하는 배양 시스템에서 배양된다. 영양세포가 없는 배양에서 분화 없는 만능 줄기 세포의 성장은 이전에 다른 세포 유형을 이용하여 배양함으로써 조절된 배지를 이용하여 지지된다. 대안적으로, 영양세포가 없는 배양에서 분화 없는 만능 줄기 세포의 성장은 화학적 규명 배지를 이용하여 지지된다.
- [0051] 예를 들어, 뤼비노프 (Reubinoff) 등 (문헌[Nature Biotechnology 18: 399 - 404 (2000)]) 및 톰프슨 등 (문헌 [Science 6 November 282.1998: Vol. 282. no. 5391, pp. 1145 - 1147])은 마우스 배아 섬유아세포 영양 세포층을 사용하여 인간 배반포로부터 만능 줄기 세포주를 배양하는 것을 개시한다.
- [0052] 리차즈 (Richards) 등 (문헌[Stem Cells 21: 546-556, 2003])은 인간 만능 줄기 세포 배양을 지지하는 능력에 대해 11가지 상이한 인간 성인, 태아 및 신생아 영양 세포층의 패널을 평가하였다. 리차즈 등은 "성인 피부 섬유아세포 영양세포 상에서 배양된 인간 배아 줄기 세포주는 인간 배아 줄기 세포 형태를 유지하며 만능으로 남아 있다"고 진술한다.
- [0053] 미국 특허 출원 공개 제20020072117호는 영양세포가 없는 배양에서 영양류 만능 줄기 세포의 성장을 지지하는 배지를 생성하는 세포주를 개시하고 있다. 이용된 세포주는 배아 조직으로부터 얻어지거나 배아 줄기 세포로부터 분화된 중간엽 및 섬유아세포-유사 세포주이다. 미국 특허 출원 공개 제20020072117호는 또한 일차 영양 세포층으로서의 당해 세포주의 사용을 개시하고 있다.
- [0054] 다른 예에서는, 왕 (Wang) 등 (문헌[Stem Cells 23: 1221-1227, 2005])은 인간 배아 줄기 세포로부터 유래된 영양 세포층 상에서 인간 만능 줄기 세포의 장기 성장을 위한 방법을 개시한다.
- [0055] 다른 예에서는, 스토코빅 (Stojkovic) 등 (문헌[Stem Cells 2005 23: 306-314, 2005])은 인간 배아 줄기 세포의 자발적 분화로부터 유래된 영양 세포 시스템을 개시한다.
- [0056] 추가 예에서, 미야모토 (Miyamoto) 등 (문헌[Stem Cells 22: 433-440, 2004])은 인간 태반으로부터 얻은 영양 세포의 공급원을 개시한다.
- [0057] 아미트 (Amit) 등 (문헌[Biol. Reprod 68: 2150-2156, 2003])은 인간 포피로부터 유래된 영양 세포층을 개시한다.
- [0058] 다른 예에서, 인준자 (Inzunza) 등 (문헌[Stem Cells 23: 544-549, 2005])은 인간 출생후 포피 섬유아세포 유래의 영양 세포층을 개시한다.
- [0059] 미국 특허 제6642048호는 영양세포가 없는 배양에서 영양류 만능 줄기 (primate pluripotent stem, pPS) 세포의 성장을 지지하는 배지 및 그러한 배지의 생성에 유용한 세포주를 개시한다. 미국 특허 제6642048호는 "본 발명은 배아 조직으로부터 얻어지거나 배아 줄기 세포로부터 분화된 중간엽 및 섬유아세포-유사 세포주를 포함한다. 그러한 세포주를 유도하고, 배지를 가공하고, 조절된 배지를 이용하여 줄기 세포를 성장시키는 방법이 이 개시 내용에 기재되고 예시된다."라고 진술한다.

- [0060] 다른 예에서, 국제특허 공개 W02005014799호는 포유류 세포의 유지, 증식 및 분화를 위한 조절된 배지를 개시한다. 국제특허 공개 W02005014799호는 "본 발명에 따라 생성된 배양 배지는 뮤린 세포, 특히 MMH (Met 뮤린 간 세포 (Met Murine Hepatocyte))로 불리는, 분화되고 불멸화된 트랜스제닉 (transgenic) 간세포의 세포 분비 활성에 의해 조절된다"고 진술한다.
- [0061] 다른 예에서, 수 (Xu) 등 (문헌[Stem Cells 22: 972-980, 2004])은 인간 텔로머라아제 역전사효소를 과다 발현 하도록 유전적으로 변형된 인간 배아 줄기 세포 유도체로부터 얻은 조절된 배지를 개시한다.
- [0062] 다른 예에서, 미국 특허 출원 공개 제20070010011호는 만능 줄기 세포의 유지를 위한 화학적으로 규명된 배양 배지를 개시한다.
- [0063] 대안적인 배양 시스템은 배아 줄기 세포의 증식을 촉진할 수 있는 성장 인자로 보충된 무-혈청 배지를 이용한다. 예를 들어, 천 (Cheon) 등 (문헌[BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, October 19, 2005])은 배아 줄기 세포 자가-재생을 일으킬 수 있는 상이한 성장 인자로 보충된 비조절된 혈청 대체 (serum replacement, SR) 배지에서 배아 줄기 세포가 유지되는 영양세포가 없는 무-혈청 배양 시스템을 개시한다.
- [0064] 다른 예에서, 레벤스타인 (Levenstein) 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.
- [0065] 다른 예에서, 미국 특허 출원 공개 제20050148070호는 혈청 없이 그리고 섬유아세포 영양 세포 없이 규명된 배지에서 인간 배아 줄기 세포를 배양하는 방법을 개시하였으며, 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, 상기 배양 배지는 본질적으로 포유류 태아 혈청이 없으며, 섬유아세포 성장 인자 신호전달 수용체를 활성화시킬 수 있는 섬유아세포 성장 인자를 적어도 약 100 ng/ml 함유하며, 여기서 성장 인자는 단지 섬유아세포 영양세포층 이외의 공급원으로부터 공급되며, 배지는 영양 세포 또는 조절된 배지 없이 미분화된 상태로 줄기 세포의 증식을 지지한다.
- [0066] 다른 예에서, 미국 특허 출원 공개 제20050233446호는 미분화 영양류 원시 줄기 세포를 비롯한 줄기 세포를 배양하는데 유용한 규명된 배지를 개시하고 있다. 용액 중에서, 배지는 배양되는 줄기 세포와 비교할 때 사실상 등장성이다. 주어진 배양물에서, 특정 배지는 기본 배지 및 원시 줄기 세포의 사실상 미분화된 성장을 지지하는 데 필요한 양의 bFGF, 인슐린 및 아스코르브산 각각을 포함한다.
- [0067] 다른 예에서, 미국 특허 제6800480호는 "일 실시형태에서, 사실상 미분화된 상태의 영양류-유래 원시 줄기 세포를 성장시키기 위한 세포 배양 배지가 제공되며 이 배지는 영양류-유래 원시 줄기 세포의 성장을 지지하기에 효과적인 저 삼투압, 저 내독소 기본 배지를 포함한다. 기본 배지는 영양류-유래 원시 줄기 세포의 성장을 지지하기에 효과적인 영양 혈청과, 영양 세포 및 영양 세포로부터 유래된 세포외 매트릭스 성분으로 이루어진 균으로부터 선택된 기질과 조합된다. 배지는 추가로 비필수 아미노산, 산화방지제, 및 뉴클레오시드와 피루베이트 염으로 이루어진 균으로부터 선택된 제1 성장 인자를 포함한다."고 진술한다.
- [0068] 다른 예에서, 미국 특허 출원 공개 제20050244962호는 "일 태양에서 본 발명은 영양류 배아 줄기 세포를 배양하는 방법을 제공한다. 본질적으로 포유류 태아 혈청이 없는(바람직하게는 또한 본질적으로 임의의 동물 혈청이 없는) 배지에서 그리고 단지 섬유아세포 영양 세포층 이외의 공급원으로부터 공급된 섬유아세포 성장 인자의 존재 하에서 줄기 세포를 배양한다. 바람직한 형태에서, 이전에는 줄기 세포 배양을 지속하기 위해 필요했던 섬유아세포 영양세포층이 충분한 섬유아세포 성장 인자의 첨가에 의해 불필요해지게 된다."고 진술한다.
- [0069] 추가의 예에서, 국제 특허 공개 W02005065354호는 본질적으로 영양세포가 없는 그리고 무혈청인 규명된 등장성 배양 배지를 개시하며, 이 배지는 a. 기본 배지; b. 사실상 미분화된 포유류 줄기 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양의 bFGF; c. 사실상 미분화된 포유류 줄기 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양의 인슐린; 및 d. 사실상 미분화된 포유류 줄기 세포의 성장을 지지하기에 충분한 양의 아스코르브산을 포함한다.
- [0070] 다른 예에서, 국제특허 공개 W02005086845호에는 미분화 줄기 세포의 유지 방법이 개시되어 있는데, 상기 방법은 줄기 세포를 원하는 결과를 성취하기에 충분한 양의 시간 동안 미분화 상태로 유지하기에 충분한 양의 형질 전환 성장 인자-베타 (transforming growth factor-beta, TGF-β) 패밀리의 단백질류의 구성원, 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 패밀리의 단백질류의 구성원 또는 니코틴아미드 (NIC)에 줄기 세포를 노출시키는 것을 포함한다.
- [0071] 만능 줄기 세포는 적합한 배양 기재 상에 플레이팅할 수 있다. 일 실시형태에서, 적합한 배양 기재는 세포외

매트릭스 성분, 예를 들어, 기저막으로부터 유래된 것들, 또는 부착 분자 수용체-리간드 커플링의 일부를 형성할 수 있는 것들이다. 한 실시형태에서, 적합한 배양 기질은 매트리지겔 (MATRIGEL) (등록상표) (백톤 디켄슨 (Becton Dickenson))이다. 매트리지겔 (등록상표)은 실온에서 젤화하여 재구성된 기저막을 형성하는 엔젤브레스-홈-스왐 (Engelbreth-Holm Swarm) 종양 세포 유래의 용해성 제제이다.

- [0072] 다른 세포의 매트릭스 성분 및 성분 혼합물이 대안으로서 적합하다. 증식되는 세포 유형에 따라, 이것은 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 헤파란 설페이트 등을 단독으로 또는 다양한 조합으로 포함할 수 있다.
- [0073] 만능 줄기 세포는 적합한 분포로 그리고 세포 생존, 증식, 및 바람직한 특징의 보유를 촉진하는 배지의 존재 하에서 기재상에 플레이팅할 수 있다. 모든 이들 특성은 씨딩(seeding) 분포에 세심한 주의를 기울여 이익을 얻으며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0074] 적합한 배양 배지는 하기 성분들, 예를 들어, 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)(DMEM), 깁코(Gibco) # 11965-092; 녹아웃(Knockout) 돌베코 변형 이글 배지 (KO DMEM), 깁코 # 10829-018; 햄(Ham's) F12/50% DMEM 기본 배지; 200 mM L-글루타민, 깁코 # 15039-027; 비-필수 아미노산 용액, 깁코 11140-050; β -머캅토에탄올, 시그마(Sigma) # M7522; 인간 재조합 엽기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 깁코 # 13256-029로부터 제조될 수 있다.
- [0075] NGN3 및 NKX6.1의 발현 증가를 갖는 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단의 형성
- [0076] 일 실시형태에서, 본 발명은
- [0077] a) 만능 줄기 세포를 배양하는 단계,
- [0078] b) 만능 줄기 세포를 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계,
- [0079] c) 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 분화시키는 데 사용되는 배지를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄과올론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 보충하면서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계, 및
- [0080] d) 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함하는 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0081] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 만능 줄기 세포의 분화
- [0082] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성은 특정 프로토콜을 이행하기 전후에 마커의 존재에 대해 시험함으로써 결정될 수 있다. 만능 줄기 세포는 전형적으로 그러한 마커를 발현하지 않는다. 따라서, 만능 세포의 분화는 세포가 그들을 발현하기 시작할 때 검출된다.
- [0083] 만능 줄기 세포는 당업계의 임의의 방법에 의해 또는 본 발명에서 제안된 임의의 방법에 의해 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0084] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 문헌[D'Amour *et al.*, Nature Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005)]에 개시된 방법에 따라 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0085] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 문헌[Shinozaki *et al.*, Development 131, 1651 - 1662(2004)]에 개시된 방법에 따라 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0086] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 문헌[McLean *et al.*, Stem Cells 25, 29 - 38 (2007)]에 개시된 방법에 따라 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0087] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 문헌[D'Amour *et al.*, Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된 방법에 따라 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0088] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 혈청 부재 하에서 액티빈 A를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 액티빈 A와 혈청을 이용하여 세포를 배양하고, 이어서 상이한 농도의 액티빈 A와 혈청을 이용하여 세포를

배양함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. 이러한 방법의 예는 문헌 [Nature Biotechnology 23, 1534 - 1541 (2005)]에 개시된다.

- [0089] 예를 들어 만능 줄기 세포는 혈청 부재 하에서 액티빈 A를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 다른 농도의 혈청 및 액티빈 A를 이용하여 세포를 배양함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. 이 방법의 예는 문헌[D' Amour *et al.*, Nature Biotechnology, 2005]에 개시된다.
- [0090] 예를 들어 만능 줄기 세포는 혈청 부재 하에서 액티빈 A와 Wnt 리간드를 함유하는 배지에서 만능 줄기 세포를 배양하고, 이어서 Wnt 리간드를 제거하고 혈청 및 액티빈 A를 이용하여 세포를 배양함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. 이 방법의 예는 문헌[Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된다.
- [0091] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0092] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제11/779,311호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0093] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제60/990,529호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0094] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제61/076,889호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0095] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제61/076,900호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0096] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제61/076,908호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0097] 예를 들어, 만능 줄기 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제61/076,915호에 개시된 방법에 따라 만능 줄기 세포를 처리함으로써 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0098] 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 분화
- [0099] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 당업계의 임의의 방법에 의해 또는 본 발명에서 제안된 임의의 방법에 의해 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0100] 예를 들어, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 문헌 [D'Amour *et al.*, Nature Biotechnol. 24:1392-1401, 2006]에 개시된 방법에 따라 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0101] 예를 들어, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 섬유아세포 성장 인자 및 헤지호그 신호전달 경로 억제제 KAAD-사이클로파민으로 처리하고, 이어서 섬유아세포 성장 인자 및 KAAD-사이클로파민을 함유하는 배지를 제거하고, 그 후 세포를 레티노산, 섬유아세포 성장 인자 및 KAAD-사이클로파민을 함유하는 배지에서 배양함으로써, 취장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이 방법의 예는 문헌[Nature Biotechnology 24, 1392 - 1401 (2006)]에 개시된다.
- [0102] 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는

세포를 레티노산 및 적어도 하나의 섬유아세포 성장 인자로 소정 기간 동안 처리함으로써, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.

- [0103] 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된, 미국 특허 출원 제11/779,311호에 개시된 방법에 따라, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 레티노산 및 적어도 하나의 섬유아세포 성장 인자로 소정 기간 동안 처리함으로써, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0104] 본 발명의 일 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는, 미국 특허 출원 제60/990,529호에 개시된 방법에 따라 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0105] 분화 효율은 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시킴으로써 결정될 수 있다.
- [0106] 배양되거나 단리된 세포에서 단백질 및 핵산 마커의 발현을 평가하는 방법은 당업계에서의 표준이다. 이들은 정량적 역전사효소 폴리머라아제 연쇄 반응 (RT-PCR), 노던 블롯, 동소 (*in situ*) 혼성화(예컨대, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 2001 supplement)] 참고) 및 면역분석, 예를 들어, 단면 재료의 면역조직화학 분석, 웨스턴 블롯팅 및 온전한 세포에서 접근가능한 마커의 경우, 예를 들어, 유세포 분석(FACS) (예를 들어 문헌[Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)] 참고)을 포함한다.
- [0107] 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, 커넥신43(CONNEXIN43), 커넥신45, OCT4, SOX2, 나노그(Nanog), hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, Tra 1-81.
- [0108] 만능 줄기 세포를 본 발명의 방법으로 처리한 후, 분화된 세포는 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포에 의해 발현된 CXCR4와 같은 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제 (예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시켜 정제할 수 있다.
- [0109] 본 발명에 사용하기에 적합한 만능 줄기 세포는 예를 들어, 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 SA002 (스웨덴 소재의 셀라르티스(Cellartis))를 포함한다. 만능 세포의 특징적인 하기의 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 또한 본 발명에 사용하기에 적합하다: ABCG2, 크립토, CD9, FOXD3, 커넥신43, 커넥신 45, OCT4, SOX2, 나노그, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, Tra 1-60, 및 Tra 1-81.
- [0110] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커는 SOX17, GATA4, HNF3 베타, GSC, CER1, 노달, FGF8, 브라키어리, Mix-유사 호메오박스 단백질, FGF4 CD48, 에오메소더민(EOMES), DKK4, FGF17, GATA6, CXCR4, C-키트, CD99 및 OTX2로 이루어진 군으로부터 선택된다. 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 원시 선 전구 세포이다. 대안적인 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 중내배엽 세포이다. 대안적인 태양에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 완성 내배엽 세포이다.
- [0111] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커는 PDX1, HNF1 베타, PTF1 알파, HNF6, HB9 및 PROX1로 이루어진 군으로부터 선택된다. 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 태양에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내배엽 세포이다.
- [0112] 일 실시형태에서, 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 본 발명은 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0113] 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 것은 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켈파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 처리하는 것에 의해 달성할 수 있다. 대안적으로, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키

는 것은 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 처리하는 것에 의해 달성할 수 있다.

- [0114] 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 X, Y 및 Z로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 처리하는 경우에, 세포를 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 사용되는 배지를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 보충하는 것에 의해 세포를 처리한다.
- [0115] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 X, Y 및 Z로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 처리하는 경우에, 세포를 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 사용되는 배지를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켄파울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 보충하는 것에 의해 세포를 처리한다.
- [0116] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 NGN3 및 NKX6.1의 발현 증가를 갖는 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화
- [0117] 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 당업계의 임의의 방법에 의해 또는 본 발명에서 제안된 임의의 방법에 의해 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다.
- [0118] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 액센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양하고, 이어서 액센딘 4를 함유하는 배지를 제거하고, 그 후 액센딘 1, IGF-1 및 HGF를 함유하는 배지에서 상기 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이 방법의 예는 문헌[D' Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006]에 개시된다.
- [0119] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 DAPT (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 미국 미주리주) 및 액센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이 방법의 예는 문헌[D' Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006]에 개시된다.
- [0120] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 액센딘 4를 함유하는 배지에서 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다. 이 방법의 예는 문헌[D' Amour *et al*, Nature Biotechnology, 2006]에 개시된다.
- [0121] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된 미국 특허 출원 제11/736,908호에 개시된 방법에 따라 노치 신호전달 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0122] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된 미국 특허 출원 제11/779,311호에 개시된 방법에 따라 노치 신호전달 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0123] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된 미국 특허 출원 제60/953,178호에 개시된 방법에 따라 노치 신호전달 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.
- [0124] 예를 들어, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 라이프스캔 인코포레이티드에 허여된 미국 특허 출원 제60/990,529호에 개시된 방법에 따라 노치 신호전달 경로를 억제하는 인자로 췌장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 처리함으로써, 췌장 내분비 계통의 특징적인 마커

를 발현하는 세포로 추가로 분화된다.

- [0125] **체장 내분비 계통의 특징적인 마커는 NGN3, NEUROD, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, NGN3, 및 PTF-1 알파로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 체장 내분비 세포는 하기 호르몬 중 적어도 하나를 발현할 수 있다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 및 체장 폴리펩티드. 체장 내분비 계통의 특징적인 마커 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 태양에서, 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 체장 내분비 세포이다. 체장 내분비 세포는 체장 호르몬 발현 세포일 수 있다. 대안적으로, 체장 내분비 세포는 체장 호르몬 분비 세포일 수 있다.**
- [0126] **본 발명의 일 태양에서, 체장 내분비 세포는 β 세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포이다. β 세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 PDX1, 및 하기의 전사 인자 중 적어도 하나를 발현한다: NGN3, NKX2.2, NKX6.1, NEUROD, ISL1, HNF3 베타, MAFA, PAX4, 및 PAX6. 본 발명의 일 태양에서, β 세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 β 세포이다.**
- [0127] **본 발명은 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 방법을 제공한다.**
- [0128] **일 실시형태에서, 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 집단에서 NGN3 및 NKX6.1의 발현을 증가시키는 것은 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켈과울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 처리하는 것에 의해 달성할 수 있다.**
- [0129] **체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켈과울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 처리하는 경우에, 세포를 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 데 사용되는 배지를 H-9, H-89, GF 109203X, HA-1004, PP2, PP1, LY 294002, 보르트만닌, SB-203580, SB-202190, 티르포스틴 25, 티르포스틴, AG1478, 티르포스틴 46, GW 5074, 켈과울론, HNMPA, AG490, Y27632 및 ML-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물로 보충하는 것에 의해 세포를 처리한다.**
- [0130] **본 발명은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되지만, 이에 의해 제한되지는 않는다.**
- [0131] **실시예**
- [0132] **실시예 1**
- [0133] **NGN3 발현을 매개하는 소분자 유사체에 대한 선별**
- [0134] **전사 인자 NGN3의 발현은 조상세포의 내분비 세포 운명을 향한 진행 동안 필요하다. 이러한 과정의 효율을 증가시키는 것은 바람직한 결과이다. 소분자 화합물의 선별을 효소 억제제가 분화 동안 전승된 세포 신호를 조절할 수 있으며, 중요한 전사 인자, 예컨대 NGN3의 유전자 발현에서의 직접 또는 간접적인 효과를 갖는다는 가정에서 수행하였다.**
- [0135] ***검정용 세포의 제조:* 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 원액 (stock) 배양물은 평균 매 4일마다 계대배양하면서 MEF 조절 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스즈 (BD Biosciences); 카달로그 번호 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/ml 디스파제 (dispase) (인비트로젠 카달로그 번호 17105-041) 의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고, 이어서 MEF 조절 배양 배지로 단층을 행구고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수집하고 잔여 디스파제를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비로 분할하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라즈마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다. 소형화된 검정법 형식에서의 선별을 위하여, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를 기재된 바와 같이 디스파제 처리를 사용하여 배양물로부터 수집하고, 100 μ l/웰의 부피를 사용하여, 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스즈; 카달로그 번호 356231)-코팅된 96-웰 블랙 (black) 플레이트 (팩카드 뷰플레이트 (Packard ViewPlates); 퍼킨엘머 (PerkinElmer); 카달로그 번호 6005182) 상에 1:2 (표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 부착되게 놔둔 다음, 8 ng/ml bFGF (알앤디 시스템즈 (R&D Systems); 카달로그 번호 233-FB)가 보충된 MEF-조절 배지를 매일**

공급하면서 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였다. 플레이트를 검정법의 기간 내내 가슴 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0136] **화합물의 제조:** 2개의 상용의 소분자 키나아제 억제제의 라이브러리를 사용하여 선별을 행하였다(바이오몰 인터 내셔널 (BioMol Int1); 카달로그 번호 2832A (V2.2) 및 이엠디 바이오사이언스즈 (EMD Biosciences): 카달로그 번호 539745). 표 1 및 표 2는 각각 이들 바이오몰 및 이엠디 키나아제 억제제 라이브러리 내의 화합물을 기술 한다. 이들 라이브러리로부터의 화합물을 96-웰 플레이트 형식에서 10 mM 원액으로 이용가능하게 만들고, 100% DMSO에 용해화시키고, -80°C에서 보관하였다. 라이브러리 화합물을 100% DMSO (시그마 (Sigma); 카달로그 번호 D2650) 중에 2.5mM의 중간 농도로 추가로 희석하고, 또한, 이용시까지 -80°C에서 보관하였다. 검정 일에, 화합 물을 DMEM 고 글루코스 배지에 1:12.5로 희석하여, 8% DMSO 중의 200 uM 작업 원액을 제공한 다음, 2.5 μM 화 합물 및 0.1% DMSO의 최종 농도를 위해 각 검정법 시험 웰에 1:80으로 추가 희석하였다.

[0137] **분화 및 선별 검정법:** 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 새로운 분취물 (100μl)로 대체시킴으로써, 매일 공급하면 서, 분화 프로토콜의 단계 1을 3일에 걸쳐 수행하였다. 검정 제1 일에, 2% 알부민 소 분획 V, 무 지방산 (FAF BSA) (프롤리안트 인코포레이티드 (Proliant Inc.); 카달로그 번호 : SKU 68700), 100 ng/ml 액티빈 A (페프로 테크; 카달로그 번호 120-14), 20 ng/ml Wnt3a (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 1324-WN/CF) 및 8ng/ml bFGF (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 233-FB)를 함유하는 RPMI-1640 배지 (인비트로젠; 카달로그 번호: 22400)를 사용하여 웰에 공급하였다. 검정 제2 및 제3 일에, Wnt3a를 제거하였던 것을 제외하고, 웰에 동일한 배지를 공 급하였다. 모든 웰에 동일하게 공급하고, 처리하였다.

[0138] 분화 프로토콜의 단계 2는 2일에 걸쳐서 수행하였다. 각각의 웰에서 배지를 흡입하고, 2% FAF BSA, 50ng/ml FGF7 (페프로테크; 카달로그 번호 100-19) 및 250 nM KAAD-사이클로파민 (칼바이오펜; 카달로그 번호 239804)을 함유하는 DMEM:F12 배지 (인비트로젠; 카달로그 번호 11330-032)의 새 분취물 (100μl)로 대체함으로써, 세포에 매일 공급하였다. 모든 웰에 동일하게 공급하고, 처리하였다.

[0139] 분화 프로토콜의 단계 3은 4일에 걸쳐서 수행하였다. 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 0.1% 알부맥스 (Albumax) (인비트로젠; 카달로그 번호: 11020-021), 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS-X; 인비트로젠; 카달로그 번호 51500056), 50 ng/ml FGF7, 100 ng/ml 노긴 (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로 파민, 2 μM 올-트랜스 레티노산 (RA) (시그마-알드리치; 카달로그 번호 R2625) 및 30 ng/ml 액티빈 A가 보충된 DMEM-고 글루코스 (인비트로젠; 카달로그 번호 10569)의 새로운 분취물 (200 μl)로 대체함으로써, 세포에 격일 로 공급하였다. 단계 3 동안에, 키나아제 억제제의 시험 샘플을 2개의 별개의 플레이트 (플레이트 A 및 B) 내 의 단일 웰에 첨가하고; 제3 플레이트 (플레이트 C)를 미처리된 채로 놔두었다. 각 플레이트에서, 총 16개의 대조군 웰을 임의의 시험 화합물 없이, 당량의 0.1% DMSO로 처리하였다.

[0140] 분화 프로토콜의 단계 4는 3일에 걸쳐서 수행하였다. 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐 린-트랜스페린-셀레늄, 100 ng/ml 노긴, 및 1 μM Alk 5 억제제 (악소라; 카달로그 번호 ALX-270-445)가 보충된 DMEM-고 글루코스의 새로운 분취물 (200 μl)로 대체함으로써, 세포에 1일 및 2일에 공급하고, 3일에는 공급하지 않았다. 단계 4 동안에, 키나아제 억제제의 시험 샘플을 2개의 별개의 플레이트 (플레이트 B 및 C) 내의 단일 웰에 첨가하고; 제3 플레이트 (플레이트 A)를 미처리된 채로 놔두었다. 각 플레이트에서, 총 16개의 대조군 웰 을 임의의 시험 화합물 없이, 당량의 0.1% DMSO로 처리하였다.

[0141] **고 함량 분석:** 단계 4의 종료시, 모든 검정 플레이트로부터 배지를 흡입시키고, 이어서, 실온에서 2가 양이온 이 없는 PBS (인비트로젠; 카달로그 번호 14190)에 희석한 4% 파라포름알데히드 (시그마-알드리치; 카달로그 번 호 158127)로 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 1회 세정하였다. 샘플 웰을 실온에서 20분 동안 0.5% 트리톤 X-100 (VWR; 카달로그 번호 VW3929-2)으로 투과화시키고, PBS로 2회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 중의 5% 당나귀 혈청 (잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch); 카달로그 번호 017-000-121)으로 블로킹하였다. 일차 항체 (양 항-NGN3; 알앤디 시스템즈; AF3444)를 5% 당나귀 혈청에서 1:300으로 희석하고, 실온에서 1시간 동안 각 웰에 첨가하였다. PBS에서 2회 세정한 후에, 알렉사 플루오르 647 당나귀 항-양 2차 항체 (인비트로젠; 카달로그 번호 A21448)를 1:100 희석하고, 실온에서 30분 동안 각 샘플 웰에 첨가하고, 이어서, PBS에서 2회 세정하였다. 핵을 대비염색하기 위해, 4 μg/ml 웨히스트 (Hoechst) 33342 (인비트로젠; 카달로그 번호 H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고, 이미지를 위해 100 μl/웰 PBS에 두었다.

[0142] 이미징은 웨히스트 33342 및 알렉사 플루오르 647을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 셀 어널라이저(Cell Analyzer) 1000 (지이 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 단독의 이차 항체

로 염색된 양성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 NGN3 강도의 측정을 IN 셀 디벨로퍼 툴박스 (Cell Developer Toolbox) 1.7 (지이 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 총 NGN3 단백질 발현은 세포 면적을 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0143] 이러한 단일 실험에서 6개의 검정법 플레이트를 처리하기 위하여 사용한 2개의 키나아제 억제제 라이브러리의 조합으로부터의 선별 결과를 표 3에 나타내었다. 나타난 데이터는 단독의 DMSO 비히클을 갖는 웰에서의 염색에 비한 개별 화합물로 처리된 웰에 대한 NGN3 염색의 강도의 대표적인 비이다. 단독의 단계 3 또는 단독의 단계 4 또는 단계 3 및 4의 조합 동안 투여한 개별 화합물에 대한 강도의 비뿐 아니라, 순위 정렬 비교를 나타내었다. 비히클 처리된 대조군에 비하여 1.4 초과와 강도 비를 갖는 화합물을 확인 및 추가의 평가를 위한 히트 (hit)로 태그화하였다. 특히 흥미롭게, 표 4에 약속된 바와 같이, 이들 화합물은 내분비 분화 동안에 NGN3의 최적의 발현 패턴에 수반될 수 있는 몇몇 세포 신호전달 경로를 표적화하는 것으로 보인다.

[0144] 실시예 2

[0145] NKX6.1 및 NGN3 발현을 매개하는 소분자 유사체에 대한 선별

[0146] NGN3과 함께 NKX6.1의 발현은 조상세포의 내분비 세포 운명을 향한 진행 동안 필요하다. 키나아제 억제제의 선별을 행하여, 분화 동안 하나 또는 둘 모두의 마커의 발현을 상향-조절할 수 있는지를 결정하였다. 이러한 실시예에서, 또한 HDAC 억제제 트리코스타틴 A를 분화 프로토콜에 포함시켜, 염색질 리모델링을 조절하고, 아마도 유전자 전사를 증가시켰을 것이다.

[0147] *검정용 세포의 제조*: 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 원액 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조절 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스즈; 카달로그 번호 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/ml 디스파제 (인비트로젠 카달로그 번호 17105-041) 의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고, 이어서 MEF 조절 배양 배지로 단층을 행하고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수집하고 잔여 디스파제를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비로 분할하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라스마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다. 소형화된 검정법 형식에서의 선별을 위하여, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를 기재된 바와 같이 디스파제 처리를 사용하여 배양물로부터 수집하고, 100 µl/웰의 부피를 사용하여, 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스즈; 카달로그 번호 356231)-코팅된 96-웰 블랙 (black) 플레이트 (팩카드 뷰플레이츠 (Packard ViewPlates); 퍼킨엘머 (PerkinElmer); 카달로그 번호 6005182) 상에 1:2 (표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 부착되게 놔둔 다음, 8ng/ml bFGF (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 233-FB)가 보충된 MEF-조절 배지를 매일 공급하면서, 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였다. 플레이트를 검정법의 기간 내내 가습 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.

[0148] *화합물의 제조*: 표 1에 정의된 단일의 상용의 소분자 키나아제 억제제 라이브러리 (바이오몰 인터내셔널; 카달로그 번호 2832A(V2.2))를 사용하여 선별을 행하였다. 이러한 라이브러리로부터의 화합물을 96-웰 플레이트 형식에서 10 mM 원액으로 이용가능하게 만들고, 100% DMSO에 용해화시키고, -80°C에서 보관하였다. 라이브러리 화합물을 100% DMSO (시그마; 카달로그 번호 D2650) 중에 2.5 mM의 중간 농도로 추가로 희석하고, 또한 이용시 까지 -80°C에서 보관하였다. 검정 일에, 화합물을 DMEM 고 글루코스 배지에 1:12.5로 희석하여, 8% DMSO 중의 200 µM 작업 원액을 제공한 다음, 2.5 µM 화합물 및 0.1% DMSO의 최종 농도를 위해 각 검정법 시험 웰에 1:80으로 추가 희석하였다.

[0149] *분화 및 선별 검정법*: 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 새로운 분취물 (100µl)로 대체시킴으로써, 매일 공급하면서, 분화 프로토콜의 단계 1을 3일에 걸쳐 수행하였다. 검정 제1 일에, 2% 알부민 소분획 V, 무 지방산 (FAF BSA) (프롤리앙트 인코포레이티드; 카달로그 번호 : SKU 68700), 100 ng/ml 액티빈 A (페프로테크; 카달로그 번호 120-14), 20 ng/ml Wnt3a (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 1324-WN/CF) 및 8 ng/ml bFGF (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 233-FB)를 함유하는 RPMI-1640 배지 (인비트로젠; 카달로그 번호: 22400)를 사용하여 웰에 공급하였다. 검정 제2 및 제3 일에, Wnt3a를 제거하였던 것을 제외하고, 웰에 동일한 배지를 공급하였다.

모든 웰에 동일하게 공급하고, 처리하였다.

- [0150] 분화 프로토콜의 단계 2는 2일에 걸쳐서 수행하였다. 각각의 웰에서 배지를 흡입하고, 2% FAF BSA, 50 ng/ml FGF7 (페프로테크; 카달로그 번호 100-19) 및 250 nM KAAD-사이클로파민 (칼바이오켄; 카달로그 번호 239804)을 함유하는 DMEM:F12 배지 (인비트로젠; 카달로그 번호 11330-032)의 새 분취물 (100 μ l)로 대체함으로써, 세포에 매일 공급하였다. 모든 웰에 동일하게 공급하고, 처리하였다.
- [0151] 분화 프로토콜의 단계 3은 5일에 걸쳐서 수행하였다. 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 0.1% 알부맥스 (인비트로젠; 카달로그 번호: 11020-021), 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS-X; 인비트로젠; 카달로그 번호 51500056), 50 ng/ml FGF7, 100 ng/ml 노긴 (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민, 2 μ M 올-트랜스 레티노산 (RA) (시그마-알드리치; 카달로그 번호 R2625), 30 ng/ml 액티빈 A 및 100 nM 트리코스테틴 A (TsA; 시그마; 카달로그 번호 T8552)가 보충된 DMEM-고 글루코스의 새로운 분취물 (200 μ l)로 대체하여, 세포에 격일로 공급하였다. 단계 3 동안에, 키나아제 억제제의 시험 샘플을 2일 및 4일에 단일의 웰에 첨가하였다. 각 플레이트에서, 총 16개의 대조군 웰을 임의의 시험 화합물 없이, 당량의 0.1% DMSO로 처리하였다.
- [0152] 분화 프로토콜의 단계 4는 3일에 걸쳐서 수행하였다. 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 100 ng/ml 노긴, 1 μ M Akt 5 억제제 (악소라; 카달로그 번호 ALX-270-445) 및 1 μ g/ml DAPT (시그마; 카달로그 번호 D5942)가 보충된 DMEM-고 글루코스의 새로운 분취물 (200 μ l)로 대체하여, 세포에 매일 공급하였다. 단계 4 동안에, 키나아제 억제제의 시험 샘플을 제1 일에 100 nM 트리코스테틴 A와 함께 단일의 웰에 첨가한 다음, 2일 및 3일의 공급 동안에 둘 모두의 키나아제 억제제의 시험 샘플과 TsA를 생략하였다. 각 플레이트에서, 총 16개의 대조군 웰을 임의의 시험 화합물 없이, 당량의 0.1% DMSO로 처리하였다.
- [0153] 고 함량 분석: 단계 4의 종료시, 모든 웰로부터 배지를 흡입시키고, 이어서, 실온에서 2가 양이온이 없는 PBS (인비트로젠; 카달로그 번호 14190)에 희석한 4% 파라포름알데히드 (시그마-알드리치; 카달로그 번호 158127)로 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 1회 세정하였다. 샘플 웰을 실온에서 20분 동안 0.5% 트리톤 X-100 (VWR; 카달로그 번호 VW3929-2)으로 투과화시키고, PBS로 2회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 중의 5% 당나귀 혈청 (잭슨 이뮤노리서치; 카달로그 번호 017-000-121)으로 블로킹하였다. 일차 항체 (양 항-NGN3; 알앤디 시스템즈; AF3444 또는 마우스 항-NKX6.1; 아이오와 대학교; 카달로그 번호 F55A12)를 5% 당나귀 혈청에서 희석하고 (항-NGN3에 대해서는 1:300; 항-NKX6.1에 대해서는 1:500), 실온에서 1시간 동안 각 웰에 첨가하였다. PBS에서의 2회의 세정 후에, 알렉사 플루오르 647 당나귀 항-양 이차 항체 (인비트로젠; 카달로그 번호 A21448) 및 알렉사 플루오르 488 당나귀 항-마우스 이차 항체 (인비트로젠; 카달로그 번호 A21202)를 1:100으로 희석하고 (이차 항체 둘 모두), 실온에서 30분 동안 각 샘플에 첨가하고, 이어서, PBS로 2회 세정하였다. 핵을 대비 염색하기 위해, 4 μ g/ml 웨히스트 33342 (인비트로젠; 카달로그 번호 H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고, 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.
- [0154] 이미지화는 웨히스트 33342 및 알렉사 플루오르 488 및 알렉사 플루오르 647을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 셀 어널라이저 1000 (지이 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 각각 단독의 이차 항체로 염색된 양성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물 검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 NGN3 또는 NKX6.1 강도의 측정을 IN 셀 디벨로퍼 툴박스 1.7 (지이 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 총 NGN3 또는 NKX6.1 단백질 발현은 세포 면적을 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.
- [0155] 이러한 선별로부터의 결과를 표 5, 표 6 및 표 7에 요약하였다. 표 5 내의 데이터는 단독의 DMSO가 있는 웰 내의 평균 염색에 비한 개별 화합물로 처리된 각 웰에 대한 NGN3 및 NKX6.1 염색의 대표적인 비를 도시한다. 또한, NGN3 또는 NKX6.1 중 어느 하나에 대한 단백질 발현에서의 각 화합물에 대한 영향의 순번도 또한 나타내었다. 표 6은 NGN3 및/또는 NKX6.1 발현에 대하여 양성의 효과를 갖는 최고 16개 히트에 대한 정렬된 순위를 열거한 것이다. 표 7은 이들 최고 히트에 해당하는 표적 및 신호 전달 경로를 요약한 것이다. 이러한 선별로부터 다수의 히트를 갖는 경로는 내분비 운명 결정에 결정적인 이들 2개의 전사 인자에서의 효과에 영향을 갖는 것에 대한 가장 큰 타당성을 갖는 것으로 보일 것이다.

- [0156] 실시예 3
- [0157] NKX6.1 및 NGN3 발현을 매개하는 소분자 유사체에 대한 확인
- [0158] NGN3과 함께 NKX6.1의 발현은 조상세포의 내분비 세포 운명을 향한 진행 동안 필요하다. 키나아제 억제제의 선별을 반복하여, 임의의 소분자 화합물이 분화 동안 하나 또는 둘 모두의 마커의 발현을 상향-조절할 수 있는지를 결정하였다. 이러한 실시예에서, 또한 HDAC 억제제 트리코스타틴 A를 분화 프로토콜에 포함시켜, 염색질 리모델링을 조절하였고, 아마도 유전자 전사를 증가시켰을 것이다.
- [0159] 검정용 세포의 제조: 인간 배아 줄기 세포 (H1 인간 배아 줄기 세포주)의 원액 배양물은 평균 매 4일마다 계대 배양하면서 MEF 조절 배지 내 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스즈; 카달로그 번호 356231)-코팅된 접시 상에서 미분화된, 만능 상태로 유지시켰다. 세포 배양물을 1 mg/ml 디스파제 (인비트로젠 카달로그 번호 17105-041)의 용액에 37°C에서 5 내지 7분 동안 노출시키고, 이어서 MEF 조절 배양 배지로 단층을 행구하고 부드럽게 긁어서 세포 클러스터를 회수함으로써 계대배양하였다. 클러스터를 저속에서 원심분리하여 세포 펠렛을 수집하고 잔여 디스파제를 제거하였다. 세포 클러스터를 일상적인 유지 배양을 위해 1:3 또는 1:4 비로 분할하였다. 모든 인간 배아 줄기 세포주는 50미만의 계대배양수로 유지시키고, 정상 핵형 및 마이코플라스마의 부재에 대해 일상적으로 평가하였다. 소형화된 검정법 형식에서의 선별을 위하여, H1 인간 배아 줄기 세포의 클러스터를 기재된 바와 같이 디스파제 처리를 사용하여 배양물로부터 수집하고, 100 µl/웰의 부피를 사용하여, 감소된 성장 인자 매트릭셀 (BD 바이오사이언스즈; 카달로그 번호 356231)-코팅된 96-웰 블랙 플레이트 (팩카드 뷰플레이즈; 퍼킨엘머; 카달로그 번호 6005182) 상에 1:2 (표면적)의 비로 고르게 분산시키면서 플레이팅하였다. 세포가 부착되게 놔둔 다음, 8 ng/ml bFGF (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 233-FB)가 보충된 MEF-조절 배지를 매일 공급하면서 1 내지 3일의 기간에 걸쳐 로그상 성장을 회복하도록 하였다. 플레이트를 검정 기간 내내, 가슴 박스에서 37°C, 5% CO₂로 유지하였다.
- [0160] 화합물의 제조: 표 1에 정의된 단일의 상용의 소분자 키나아제 억제제 라이브러리 (바이오몰 인터내셔널; 카달로그 번호 2832A(V2.2))를 사용하여 확인 선별을 행하였다. 이러한 라이브러리로부터의 관심있는 화합물 히트를 96-웰 플레이트 형식에서 10 mM 원액으로 이용가능하게 만들고, 100% DMSO에 용해화시키고, -80°C에서 보관하였다. 관심있는 개별 라이브러리 화합물을 100% DMSO (시그마; 카달로그 번호 D2650) 중에 2.5mM의 중간 농도로 추가로 희석하고, 또한 이용시까지 -80°C에서 보관하였다. 검정 일에, 관심있는 이들 개별 화합물을 DMEM 고 글루코스 배지에 1:12.5로 희석하여, 8% DMSO 중에 200 µM 작업 원액을 제공한 다음, 2.5 µM 화합물 및 0.1% DMSO의 최종 농도를 위하여 각 시험 웰에 1:80으로 추가로 희석하였다.
- [0161] 분화 및 선별 검정법: 각 웰로부터 배지를 흡입하고, 새로운 분취물 (100µl)로 대체시킴으로써, 매일 공급하면서, 분화 프로토콜의 단계 1을 3일에 걸쳐 수행하였다. 검정 제1 일에, 2% 알부민 소분획 V, 무지방산 (FAF BSA) (프롤리앙트 인코포레이티드; 카달로그 번호 : SKU 68700), 100 ng/ml 액티빈 A (페프로테크; 카달로그 번호 120-14), 20 ng/ml Wnt3a (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 1324-WN/CF) 및 8 ng/ml bFGF (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 233-FB)를 함유하는 RPMI-1640 배지 (인비트로젠; 카달로그 번호: 22400)를 사용하여 웰에 공급하였다. 검정 제2 및 제3 일에, Wnt3a를 제거하였던 것을 제외하고, 웰에 동일한 배지를 공급하였다. 모든 웰에 동일하게 공급하고, 처리하였다.
- [0162] 분화 프로토콜의 단계 2는 2일에 걸쳐서 수행하였다. 각각의 웰에서 배지를 흡입하고, 2% FAF BSA, 50 ng/ml FGF7 (페프로테크; 카달로그 번호 100-19) 및 250 nM KAAD-사이클로파민 (칼바이오펜; 카달로그 번호 239804)을 함유하는 DMEM:F12 배지 (인비트로젠; 카달로그 번호 11330-032)의 새 분취물 (100 µl)로 대체함으로써, 세포에 매일 공급하였다. 모든 웰에 동일하게 공급하고, 처리하였다.
- [0163] 분화 프로토콜의 단계 3은 4일에 걸쳐서 수행하였다. 배지를 각 웰로부터 흡입하고, 0.1% 알부맥스 (인비트로젠; 카달로그 번호: 11020-021), 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (ITS-X; 인비트로젠; 카달로그 번호 51500056), 50 ng/ml FGF7, 100 ng/ml 노긴 (알앤디 시스템즈; 카달로그 번호 3344-NG), 250 nM KAAD-사이클로파민, 2 µM 올-트랜스 레티노산 (RA) (시그마-알드리치; 카달로그 번호 R2625) 및 20 ng/ml 액티빈 A가 보충된 DMEM 고 글루코스 (인비트로젠; 카달로그 번호 10569)의 새로운 분취물 (200 µl)로 대체함으로써 세포에 격일로 공급하였다. 단계 3 동안에, 키나아제 억제제의 3종의 시험 샘플을 1일 및 3일의 공급 시에 웰에 첨가하였다. 각 플레이트에서, 총 16개의 대조군 웰을 임의의 시험 화합물 없이, 당량의 0.1% DMSO로 처리하였다.
- [0164] 분화 프로토콜의 단계 4는 4일에 걸쳐서 수행하였다. 배지를 각 웰로부터 흡입하고, 0.1% 알부맥스, 0.5x 인슐린-트랜스페린-셀레늄, 100 ng/ml 노긴 및 1 µM Alk 5 억제제(악소라; 카달로그 번호 ALX-270-445)가 보충된

DMEM-고글루코스의 새로운 분취물 (200 μ l)로 대체하여, 세포에 격일로 공급하였다. 단계 4 동안에, 키나아제 억제제의 3중의 시험 샘플을 1일 및 3일의 공급 시에 웰에 첨가하였다. 각 플레이트에서, 총 16개의 대조군 웰을 임의의 시험 화합물 없이, 당량의 0.1% DMSO로 처리하였다.

[0165] 고 함량 분석: 단계 4의 종료시, 모든 웰로부터 배지를 흡입시키고, 이어서, 실온에서 2가 양이온이 없는 PBS (인비트로젠; 카달로그 번호 14190)에 희석한 4% 파라포름알데히드 (시그마-알드리치; 카달로그 번호 158127)로 20분 동안 고정시킨 다음, PBS로 1회 세정하였다. 샘플 웰을 실온에서 20분 동안 0.5% 트리톤 X-100 (VWR; 카달로그 번호 VW3929-2)으로 투과화시키고, PBS로 2회 세정하고, 실온에서 30분 동안 PBS 중의 5% 당나귀 혈청 (잭슨 면역노리서치; 카달로그 번호 017-000-121)으로 블로킹하였다. 일차 항체 (양 항-NGN3; 알앤디 시스템즈; AF3444 또는 마우스 항-NKX6.1; 아이오와 대학교; 카달로그 번호 F55A12)를 5% 당나귀 혈청에서 희석하고 (항-NGN3에 대해서는 1:300; 항-NKX6.1에 대해서는 1:500), 실온에서 1시간 동안 각 웰에 첨가하였다. PBS에서의 2회의 세정 후에, 알렉사 플루오르 647 당나귀 항-양 이차 항체 (인비트로젠; 카달로그 번호 A21448) 및 알렉사 플루오르 488 당나귀 항-마우스 이차 항체 (인비트로젠; 카달로그 번호 A21202)를 1:100으로 희석하고 (이차 항체 둘 모두), 실온에서 30분 동안 각 샘플에 첨가하고, 이어서, PBS로 2회 세정하였다. 핵을 대비 염색하기 위해, 4 μ g/ml 웨히스트 33342 (인비트로젠; 카달로그 번호 H3570)를 실온에서 10분 동안 첨가하였다. 플레이트를 PBS로 1회 세정하고, 이미지화를 위해 100 μ l/웰 PBS에 두었다.

[0166] 이미지화는 웨히스트 33342 및 알렉사 플루오르 488 및 알렉사 플루오르 647을 사용해 염색된 세포에 대한 51008bs 이염색단을 이용하는 IN 셀 어널라이저 1000 (지이 헬스케어)을 사용해 수행하였다. 노출 시간은 각각 단독의 이차 항체로 염색된 양성 대조군 웰로부터 최적화하였다. 웰 당 15개 필드의 이미지를 취득하여, 생물검정 및 후속한 염색 과정 동안의 임의의 세포 상실에 대해 보상하였다. 총 세포수 및 총 NGN3 또는 NKX6.1 강도의 측정을 IN 셀 디벨로퍼 툴박스 1.7 (지이 헬스케어) 소프트웨어를 사용해 각각의 웰로부터 취득하였다. 핵의 분할을 회색조 수준(기준선 범위 100-300) 및 핵 크기를 바탕으로 측정하였다. 총 NGN3 또는 NKX6.1 단백질 발현은 세포 면적을 곱한 세포의 총 형광으로서 정의된, 총 강도 또는 집적 강도로서 기록하였다. 배경은 200 내지 3500의 회색조 범위의 허용 기준을 바탕으로 제거하였다. 각 웰에 대한 총 강도를 양성 대조군에 대한 평균 총 강도로 나누어서, 총 강도 데이터를 정규화하였다.

[0167] 이들 연구에 대한 결과는 표 8에 나타내었다. 2개의 화합물 (켄파올론 및 BML-259)은 대조군 처리에 비하여 NGN3 또는 NKX6.1 발현 중 어느 하나에서 증가된 효과가 확인되지 않았으며, 이를 갖지 않았다. 이러한 검정법에서 나머지 화합물은 하나 또는 둘 모두의 전사 인자에서 긍정적인 영향을 보였으며, 이는 이전의 결과를 확실하게 하며, 이들이 관련된 신호전달 경로의 중요성을 강조한다.

표 1

마이오블 키나아제 억제제 라이브러리 (카달로그 번호 2832, v2.2)

플레이트 위치	CAS #	화합물 명칭 또는 ID 번호	분자량	표적
B1	167869-21-8	PD-98059	267.3	MEK
B2	109511-58-2	U-0126	380.5	MEK
B3	152121-47-6	SB-203580	377.4	p38 MAPK
B4	84477-87-2	H-7	364.3	PKA, PKG, MLCK 및 PKC.
B5	84468-17-7	H-9	324.3	PKA, PKG, MLCK 및 PKC.
B6	62996-74-1	스타우로스포린	466.5	Pan-특이적
B7	133550-35-5	AG-494	280.3	EGFRK, PDGFRK
B8		AG-825	397.5	HER1-2

[0168]

B9	125697-92-9	라벤두스틴(Lavendustin) A	381.4	EGFRK
B10	136831-49-7	RG-14620	274.1	EGFRK
B11	118409-57-7	티르포스틴 23	186.1	EGFRK
B12	118409-58-8	티르포스틴 25	202.1	EGFRK
C1	122520-85-8	티르포스틴 46	204.2	EGFRK, PDGFRK
C2	122520-86-9	티르포스틴 47	220.2	EGFRK
C3	122520-90-5	티르포스틴 51	268.2	EGFRK
C4	2826-26-8	티르포스틴 1	184.2	티로신 키나아제 억제제에 대한 음성 대조군
C5	116313-73-6	티르포스틴 AG 1288	231.2	티로신 키나아제

[0169]

C6	63177-57-1	티르포스틴 AG 1478	315.8	EGFRK
C7	71897-07-9	티르포스틴 AG 1295	234.3	티로신 키나아제
C8	10537-47-0	티르포스틴 9	282.4	PDGFRK
C9		HNMPA (하이드록시-2-나프탈레닐메틸포스폰산)	238.2	IRK
C10	120685-11-2	PKC-412	570.6	PKC 억제제
C11	10083-24-6	피세아타놀(Piceatannol)	244.3	Syk
C12	172889-26-8	PP1	281.4	Src 패턴티
D1	133550-35-3	AG-490	294.3	JAK-2
D2		AG-126	215.2	IRAK

[0170]

D3		AG-370	259.3	PDGFRK
D4		AG-879	316.5	NGFRK
D5	154447-36-6	LY 294002	307.4	PI 3-K
D6	19545-26-7	보르브만닌(Wortmannin)	428.4	PI 3-K
D7	133052-90-1	GF 109203X	412.5	PKC
D8	548-04-9	하이페리신(Hypericin)	504.4	PKC
D9	138489-18-6	Ro 31-8220	553.7	PKC
D10	123-78-4	스핑고신(Sphingosine)	299.5	PKC
D11	127243-85-0	H-89	519.2	PKA
D12	84478-11-5	H-8	338.3	PKA, PKG

[0171]

E1	91742-10-8	HA-1004	329.8	PKA, PKG
E2	103745-39-7	HA-1077	327.8	PKA, PKG
E3		HDBA (2-하이드록시-5-(2,5-다이하이드록시벤질아미노)벤조산)	275.3	EGFRK, CaMK II
E4	127191-97-3	KN-62	721.9	CaMK II
E5		KN-93	501	CaMK II
E6	109376-83-2	ML-7	452.7	MLCK
E7	105637-50-1	ML-9	361.3	MLCK
E8	452-06-2	2-아미노퓨린	135.1	p58 PITSLRE 베타 1
E9	158982-15-1	N9-아이소프록렐-올로마우신 (Olomoucine)	326.4	CDK

[0172]

E10	101622-51-9	올로마우신	298.3	CDK
E11	101622-50-8	아이소-올로마우신	298.4	올로마우신에 대한 음성 대조군
E12	186692-46-6	로스코비틴(Roscovitine)	354.5	CDK
F1	24386-93-4	5-요오도투베르시딘	392.2	ERK2, 약테노신 키나아제, CK1, CK2,
F2	62004-35-7	LFM-A13	360	BTK
F3	152121-30-7	SB-202190	331.3	p38 MAPK
F4	172889-27-9	PP2	301.8	Src 패밀리
F5	208260-29-1	ZM 336372	389.4	cRAF
F6	5812-07-7	SU 4312	264.3	Fik1

[0173]

F7	146535-11-7	AG-1296	266.3	PDGFRK
F8	220904-83-6	GW 5074	520.9	cRAF
F9	6865-14-1	팔미토일-DL-카르니틴 CI	436.1	PKC
F10	82-08-6	로틀레린(Rottlerin)	516.6	PKC 베타
F11	446-72-0	제니스테인	270.2	티로신 키나아제
F12	486-66-8	다이트제인(Daidzein)	254.2	제니스테인에 대한 음성 대조군.
G1	63177-57-1	에르브스태틴(Erbstatin) 유사체	194	EGFRK
G2	6151-25-3	쿠에르세틴(Quercetin) 2 수화물	338.3	PI 3-K
G3		SU1498	390.5	Fik1

[0174]

G4	4452-06-6	ZM 449829	182.2	JAK-3
G5	195462-67-7	BAY 11-7082	207.3	IKK 경로
G6	53-85-0	DRB (5,6-다이클로로-1-b-D-리보푸라노실벤즈이미다졸)	319.1	CK II
G7		HBDDE (2,2',3,3',4,4'-헥사하이드록시-1,1'-바이페닐-6,6'-다이메탄올 다이메틸 에테르)	338.4	PKC 알파, PKC 감마
G8	129-56-6	SP 600125	220.2	JNK
G9	479-41-4	인디루빈	262	GSK-3 베타, CDK5
G10	160807-49-8	인디루빈-3'-모녹심	277.3	GSK-3 베타

[0175]

G11	146986-50-7	Y-27632	338.3	ROCK
G12	142273-20-9	퀴파올론	327.2	GSK-3 베타
H1	121-40-4	테레익산(Terreic acid)	154.1	BTK
H2	35943-35-2	트리시리빈(Triciribine)	320.3	Akt 신호전달 경로
H3		BML-257	326.4	Akt
H4		SC-514	224.3	IKK2
H5		BML-259	260.4	Cdk5/p25
H6	520-36-5	아피게닌(Apigenin)	270.2	CK-II
H7		BML-265 (에를로티닙(Erlotinib) 유사체)	305.4	EGFRK
H8	53123-88-9	라파마이신	914.2	mTOR

[0176]

표 2

EMD 칼마이오젠 키나아제 억제제 라이브러리 (카달로그 번호 539745)

플레이트 위치	CAS #	화합물 명칭 또는 ID 번호	분자량
A2	127191-97-3	KN-62	721.9
A3	587871-26-9	ATM 키나아제 억제제	395.5
A4	905973-89-9	ATM/ATR 키나아제 억제제	555.8
A5	237430-03-4	알스테르파울론	293.3
A6	852527-97-0	알스테르파울론, 2-시아노에틸	346.3
A7	496864-16-5	알로이신 A, RP107	267.3
A8	496864-15-4	알로이신, RP106	281.4
A9	220792-57-4	아미노프르발라놀 A	403.9

[0177]

A10	866405-64-3	AMPK 억제제, 화합물 C	399.5
A11	879127-16-9	오로라 키나아제 억제제 III	413.4
B2	443797-96-4	오로라 키나아제/Cdk 억제제	435.4
B3	160807-49-8	인디루빈-3'-모노실	277.3
B4	19542-67-7	BAY 11-7082	207.2
B5	189232-42-6	보헤민(Bohemine)	340.4
B6	220749-41-7	Cdk1 억제제	294.7
B7	190654-01-4	Cdk1 억제제, CGP74514A	385.9
B8	443798-55-8	Cdk1/2 억제제 III	425.4

[0178]

B9	40254-90-8	Cdk1/5 억제제	185.2
B10	301836-43-1	카제인 키나아제 I 억제제, D4476	398.4
B11	934358-00-6	카제인 키나아제 II 억제제 III, TBCA	463.8
C2	546102-60-7	Cdk4 억제제	404.2
C3	141992-47-4	Cdk4 억제제 II, NSC 625987	271.3
C4	265312-55-8	Cdk4 억제제 III	284.3
C5	300801-52-9	Cdc2-유사 키나아제 억제제, TG003	249.3
C6	516480-79-8	Chk2 억제제 II	363.8
C7	212779-48-1	화합물 52	346.8

[0179]

C8	199986-75-9	Cdk2 억제제 III	400.5
C9	444723-13-1	Cdk2 억제제 IV, NU6140	422.5
C10	784211-09-2	Cdk/Crk 억제제	473.4
C11		ERK 억제제 III	318.3
D2	146986-50-7	ROCK 억제제, Y-27632	338.3
D3	865362-74-9	ERK 억제제 II, FR180204	327.3
D4		ERK 억제제 II, 음성 대조군	328.3
D5		파스카프라이신, 합성	306.8
D6		GSK-3b 억제제 I	222.3

[0180]

D7	478482-75-6	GSK-3b 억제제 II	395.2
D8	487021-52-3	GSK-3b 억제제 VIII	308.3
D9	667463-62-9	GSK-3 억제제 IX	356.2
D10		GSK-3 억제제 X	398.2
D11	626604-39-5	GSK-3b 억제제 XI	349.3
E2	330161-87-0	SU6656	371.5
E3	404828-08-6	GSK-3 억제제 XIII	301.4
E4	244148-46-7	아이소그라눌라티비트	276.3
E5	186611-52-9	IC261	311.3

[0181]

E6	507475-17-4	IKK-2 억제제 IV	279.3
E7		인디루빈 유도체 E804	365.4
E8	129-56-6	JNK 억제제 II	220.2
E9		JNK 억제제, 음성 대조군	234.2
E10	345987-15-7	JNK 억제제 V	372.5
E11	312917-14-9	JNK 억제제 IX	350.4
F2	41179-33-3	MK2a 억제제	349.4
F3	894804-07-0	JNK 억제제 VIII	356.4
F4	97161-97-2	K-252a, 노카르디옵시스(Nocardiosis) 종	467.5

[0182]

F5	142273-20-9	켄파롤론	327.2
F6	139298-40-1	KN-93	501.0
F7		MEK 억제제 I	374.5
F8	623163-52-0	MEK 억제제 II	289.7
F9	305350-87-2	MEK1/2 억제제	335.4
F10	522629-08-9	MNK1 억제제	244.2
F11	545380-34-5	NF-kB 활성화 억제제	356.4
G2	581098-48-8	p38 MAP 키나아제 억제제 III	404.5
G3	219138-24-6	p38 MAP 키나아제 억제제	365.8

[0183]

G4	167869-21-8	PD 98059	267.3
G5	152121-53-4	PD 169316	360.3
G6	165806-53-1	SB220025	338.4
G7	212844-53-6	플르말라놀 A	388.9
G8		GSK3b 억제제 XII, TWS119	318.3
G9	127243-85-0	H-89, 2 염산염	519.3
G10		SB 202474, p38 MAPK 억제 연구에 있어서 음성 대조군	279.3
G11	152121-30-7	SB 202190	331.3

[0184]

H2	152121-47-6	SB 203580	377.4
H3	103745-39-7	HA 1077, 2 염산염 파수딜(Fasudil)	364.3
H4	135897-06-2	SB 218078	393.4
H5	318480-82-9	SC-68376	236.3
H6	72873-74-6	SKF-86002	297.4
H7		스팡고신 키나아제 억제제	339.2
H8	62996-74-1	스타우로스포린, 스트렙토마이세스 종	466.5
H9	52029-86-4	STO-609	374.4
H10	666837-93-0	SU9516	241.3
H11	871307-18-5	Tp12 키나아제 억제제	404.8

[0185]

표 3

EMDII 및 바이오물 키나아제 억제제 라이브러리

				NGN3 강도					
				투여 단계 3		투여 단계 4		투여 단계 3 및 4	
라이브러리	웰	표적	억제제	순위	비	순위	비	순위	비
바이오물 키나아제 억제제	F - 4	Src 패밀리	PP2	8	1.81	2	2.50	1	2.49
바이오물 키나아제 억제제	D - 5	PI 3-K	LY 294002	7	1.82	9	1.63	2	2.46
바이오물 키나아제 억제제	B - 3	p38 MAPK	SB-203580	3	2.23	7	1.88	3	2.34

[0186]

EMDII 키나아제 억제제	H - 2	p38	SB 203580	19	1.53	52	1.08	4	2.22
EMDII 키나아제 억제제	H - 5	p38	SC-68376	29	1.41	121	0.69	5	2.12
바이오물 키나아제 억제제	B - 4	PKA, PKG, MLCK 및 PKC.	H-7	5	1.93	5	2.18	6	2.08
EMDII 키나아제 억제제	G - 10	p38 억제제가 아님	SB 202474, p38 MAPK 에 대한 음성 대조군	116	0.88	62	1.03	7	2.02
EMDII 키나아제 억제제	A - 7	(CDK1/2/5)(GSK3i)	알로이신 A, RP107	58	1.25	55	1.06	8	1.97

[0187]

EMDII 키나아제 억제제	H - 3	ROCK	HA 1077, 파수틸	47	1.32	20	1.40	9	1.93
바이오물 키나아제 억제제	F - 3	p38 MAPK	SB-202190	11	1.72	58	1.05	10	1.83
EMDII 키나아제 억제제	A - 2	CAMKII	KN-62	110	0.93	107	0.81	11	1.82
바이오물 키나아제 억제제	G - 11	ROCK	Y-27632	120	0.84	1	2.67	12	1.78
바이오물 키나아제 억제제	D - 11	PKA	H-89	2	2.57	4	2.23	13	1.75

[0188]

바이오물 키나아제 억제제	C - 6	EGFRK	티르포스틴 AG 1478	15	1.62	10	1.57	14	1.74
EMDII 키나아제 억제제	A - 3	ATM	ATM 키나아제 억제제	54	1.28	88	0.91	15	1.70
바이오물 키나아제 억제제	C - 12	Src 패밀리	PP1	4	2.05	12	1.48	16	1.67
바이오물 키나아제 억제제	E - 1	PKA, PKG	HA-1004	6	1.82	3	2.30	17	1.63
EMDII 키나아제 억제제	B - 9	CDK1/5	Cdk1/5 억제제	83	1.12	100	0.85	18	1.61

[0189]

EMDII 키나아제 억제제	C - 7	CDC28	화합물 52	67	1.22	122	0.68	19	1.61
EMDII 키나아제 억제제	F - 9	MEK1/2	MEK1/2 억제제	94	1.03	110	0.77	20	1.60
바이오물 키나아제 억제제	H - 7	EGFRK	BML-265 (에플로르티닙 유도체)	16	1.58	30	1.25	21	1.59
EMDII 키나아제 억제제	G - 4	MEK1/2	PD 98059	71	1.21	78	0.96	22	1.57
EMDII 키나아제 억제제	F - 2	MK2a	MK2a 억제제	107	0.95	80	0.95	23	1.54

[0190]

EMDII 키나아제 억제제	H - 6	p38	SKF-86002	46	1.32	92	0.89	24	1.49
바이옴 키나아제 억제제	C - 9	IRK	HNMPA	93	1.06	39	1.19	25	1.38
바이옴 키나아제 억제제	B - 5	PKA, PKG, MLCK 및 PKC.	H-9	1	2.62	6	1.97	26	1.36
바이옴 키나아제 억제제	H - 6	CK-II	아피게닌	38	1.35	120	0.70	27	1.32
바이옴 키나아제 억제제	E - 2	PKA, PKG	HA-1077	12	1.69	35	1.21	28	1.30

[0191]

바이옴 키나아제 억제제	D - 12	PKA, PKG	H-8	28	1.43	16	1.45	29	1.30
바이옴 키나아제 억제제	E - 10	CDK	올로마우신	25	1.46	41	1.17	30	1.30
EMDII 키나아제 억제제	F - 8	MEK	MEK 억제제 II	105	0.96	96	0.88	31	1.28
EMDII 키나아제 억제제	H - 4	CHK1	SB 218078	61	1.23	29	1.25	32	1.27
바이옴 키나아제 억제제	C - 7	티로신 키나아제	티르포스틴 AG 1295	90	1.07	48	1.12	33	1.24

[0192]

바이옴 키나아제 억제제	F - 7	PDGFRK	AG-1296	43	1.33	82	0.94	34	1.24
바이옴 키나아제 억제제	C - 3	EGFRK	티르포스틴 51	79	1.16	28	1.26	35	1.22
바이옴 키나아제 억제제	F - 5	cRAF	ZM 336372	23	1.48	114	0.76	36	1.19
바이옴 키나아제 억제제	C - 2	EGFRK	티르포스틴 47	40	1.35	47	1.12	37	1.18
바이옴 키나아제 억제제	F - 6	Fik1	SU 4312	37	1.35	65	1.01	38	1.13

[0193]

바이옴 키나아제 억제제	H - 4	IKK2	SC-514	20	1.52	64	1.01	39	1.13
EMDII 키나아제 억제제	D - 11	GSK3	GSK-3b 억제제 XI	132	0.62	44	1.15	40	1.13
EMDII 키나아제 억제제	C - 6	CHK2	Chk2 억제제 II	63	1.23	66	1.00	41	1.11
EMDII 키나아제 억제제	D - 3	ERK	ERK 억제제 II, FR180204	55	1.27	33	1.22	42	1.11
EMDII 키나아제 억제제	A - 10	AMPK	AMPK 억제제, 화합물 C	32	1.38	87	0.92	43	1.08

[0194]

EMDII 키나아제 억제제	E - 8	JNK	JNK 억제제 II	48	1.31	115	0.75	44	1.08
바이옴 키나아제 억제제	B - 8	HER1-2	AG-825	106	0.96	37	1.20	45	1.06
EMDII 키나아제 억제제	B - 10	CK1/ALK/p38	카제인 키나아제 I 억제제, D4476	100	0.99	45	1.13	46	1.05
바이옴 키나아제 억제제	B - 11	EGFRK	티로포스틴 23	36	1.36	13	1.47	47	1.05
바이옴 키나아제 억제제	H - 1	BTK	태레이산	10	1.78	15	1.46	48	1.05

[0195]

EMDII 키나아제 억제제	F - 11	NF-카파 B	NF-kB 활성화 억제제	121	0.84	125	0.65	49	1.04
EMDII 키나아제 억제제	E - 5	CHK1	IC261	118	0.87	131	0.55	50	1.04
바이옴 키나아제 억제제	D - 7	PKC	GF 109203X	101	0.99	26	1.29	51	1.04
EMDII 키나아제 억제제	A - 11	오로라/LCK/BMX/IGF1R/S YK	오로라 키나아제 억제제 III	87	1.10	67	1.00	52	1.03
바이옴 키나아제 억제제	G - 12	GSK-3 베타	헨파울론	14	1.66	23	1.32	53	1.03

[0196]

EMDII 키나아제 억제제	B - 4	NF-카파 B	BAY 11-7082	123	0.83	79	0.96	54	1.03
바이오물 키나아제 억제제	C - 4	티로신 키나아제 억제제에 대한 음성 대조군	티르포스틴 1	131	0.66	49	1.12	55	1.02
바이오물 키나아제 억제제	F - 12	제니스테인에 대한 음성 대조군.	다이드제인	62	1.23	19	1.41	56	1.01
바이오물 키나아제 억제제	D - 10	PKC	스펙고신	72	1.20	25	1.30	57	1.00
바이오물 키나아제 억제제	E - 8	p58 PITSLRE 베타 1	2-아미노푸린	111	0.93	60	1.04	58	1.00

[0197]

바이오물 키나아제 억제제	G - 3	Flk1	SU1498	68	1.21	59	1.04	59	0.99
바이오물 키나아제 억제제	B - 10	EGFRK	RG-14620	114	0.89	17	1.44	60	0.97
EMDII 키나아제 억제제	H - 11	TPL2	Tpl2 키나아제 억제제	99	0.99	76	0.97	61	0.96
바이오물 키나아제 억제제	G - 8	JNK	SP 600125	31	1.38	89	0.91	62	0.95
EMDII 키나아제 억제제	G - 11	p38	SB 202190	50	1.30	38	1.20	63	0.94

[0198]

바이오물 키나아제 억제제	D - 3	PDGFRK	AG-370	70	1.21	70	0.98	64	0.94
바이오물 키나아제 억제제	F - 8	cRAF	GW 5074	39	1.35	111	0.77	65	0.94
바이오물 키나아제 억제제	D - 6	PI 3-K	보르트말닌	9	1.80	50	1.10	66	0.93
EMDII 키나아제 억제제	D - 2	ROCK	ROCK 억제제, Y-27632	122	0.83	14	1.46	67	0.93
바이오물 키나아제 억제제	D - 2	IRAK	AG-126	18	1.53	85	0.93	68	0.92

[0199]

바이오물 kina아제 억제제	C - 5	티로신 kina아제	티르포스틴 AG 1288	104	0.98	34	1.22	69	0.91
EMDII kina아제 억제제	F - 7	MEK	MEK 억제제 I	126	0.74	102	0.85	70	0.91
EMDII kina아제 억제제	H - 10	CDK1/2/4	SU9516	89	1.09	132	0.54	71	0.91
바이오물 kina아제 억제제	G - 9	GSK-3 베타, CDK5	인디루민	115	0.88	124	0.66	72	0.91
EMDII kina아제 억제제	A - 4	ATM/ATR	ATM/ATR kina아제 억제제	82	1.14	43	1.15	73	0.89

[0200]

EMDII kina아제 억제제	G - 2	p38	p38 MAP kina아제 억제제 III	22	1.51	18	1.43	74	0.89
EMDII kina아제 억제제	G - 9	PKA	H-89, 2-염산염	57	1.26	24	1.31	75	0.89
EMDII kina아제 억제제	D - 6	GSK3	GSK-3b 억제제 I	96	1.03	75	0.97	76	0.89
EMDII kina아제 억제제	G - 3	p38	p38 MAP kina아제 억제제	53	1.28	94	0.89	77	0.88
바이오물 kina아제 억제제	E - 11	올로마우신에 대한 음성 대조군	아이소- 올로마우신	34	1.38	22	1.37	78	0.88

[0201]

바이오물 kina아제 억제제	E - 9	CDK	N9- 아이소프로필- 올로마우신	73	1.19	93	0.89	79	0.87
바이오물 kina아제 억제제	E - 12	CDK	로스코비틴	52	1.28	108	0.79	80	0.86
바이오물 kina아제 억제제	H - 3	Akt	BML-257	33	1.38	51	1.09	81	0.86
바이오물 kina아제 억제제	F - 11	티로신 kina아제	제니스테인	27	1.44	11	1.56	82	0.85
바이오물 kina아제 억제제	E - 3	EGFRK, CaMK II	HDBAd	85	1.11	95	0.89	83	0.84

[0202]

EMDII 키나아제 억제제	C - 11	ERK	ERK 억제제 III	78	1.16	27	1.28	84	0.84
바이오물 키나아제 억제제	C - 1	EGFRK, PDGFRK	티르포스틴 46	66	1.22	21	1.40	85	0.84
바이오물 키나아제 억제제	F - 2	BTK	LFM-A13	51	1.29	105	0.83	86	0.83
EMDII 키나아제 억제제	E - 3	GSK	GSK-3 억제제 XIII	17	1.56	98	0.87	87	0.82
바이오물 키나아제 억제제	B - 7	EGFRK, PDGFRK	AG-494	84	1.12	63	1.03	88	0.82

[0203]

바이오물 키나아제 억제제	F - 9	PKC	팔미토일-DL- 카르니틴 CI	92	1.06	74	0.97	89	0.82
바이오물 키나아제 억제제	H - 5	Cdk5/p25	BML-259	41	1.34	77	0.96	90	0.80
바이오물 키나아제 억제제	G - 10	GSK-3 배타	인디루민-3- 모녹실	86	1.10	53	1.08	91	0.80
EMDII 키나아제 억제제	D - 7	GSK3	GSK-3b 억제제 II	109	0.94	81	0.94	92	0.77
바이오물 키나아제 억제제	G - 6	CK II	DRB	49	1.31	84	0.93	93	0.76

[0204]

EMDII 키나아제 억제제	C - 5	CDC2	Cdc2-유사 키나아제 억제제, TG003	44	1.33	61	1.04	94	0.75
바이오물 키나아제 억제제	B - 2	MEK	U-0126	75	1.17	8	1.73	95	0.74
EMDII 키나아제 억제제	D - 10	GSK3	GSK-3 억제제 X	136	0.44	56	1.05	96	0.71
바이오물 키나아제 억제제	D - 1	JAK-2	AG-490	60	1.24	71	0.98	97	0.70
EMDII 키나아제 억제제	B - 11		카제인 키나아제 II 억제제 III,	69	1.21	36	1.21	98	0.70

[0205]

			TBCA						
EMDII 키나아제 억제제	H - 9		STO-609	91	1.06	126	0.62	99	0.69
바이오몰 키나아제 억제제	G - 4	JAK-3	ZM 449829	59	1.24	83	0.94	100	0.68
바이오몰 키나아제 억제제	C - 11	Syk	피세아타눔	65	1.22	69	0.98	101	0.65
EMDII 키나아제 억제제	A - 5		알스테르파울 론	103	0.98	119	0.72	102	0.64
EMDII 키나아제	F - 6	CAMKII	KN-93	108	0.94	113	0.76	103	0.61

[0206]

억제제									
EMDII 키나아제 억제제	F - 3	JNK	JNK 억제제 VIII	42	1.34	46	1.12	104	0.60
EMDII 키나아제 억제제	D - 8	GSK3	GSK-3b 억제제 VIII	77	1.17	103	0.85	105	0.60
바이오몰 키나아제 억제제	G - 2	PI 3-K	쿠에르세틴 2 수화물	21	1.51	128	0.59	106	0.59
EMDII 키나아제 억제제	E - 9	JNK 억제제가 아님	JNK 억제제, 음성 대조군	74	1.18	72	0.98	107	0.59
EMDII 키나아제	E - 4		아이소크라탈 라티미드	76	1.17	99	0.86	108	0.59

[0207]

억제제									
EMDII 키나아제 억제제	B - 3		인디루빈-3'- 모독실	97	1.02	118	0.72	109	0.57
EMDII 키나아제 억제제	B - 7		Cdk1 억제제, CGP74514A	119	0.86	123	0.67	110	0.55
바이오몰 키나아제 억제제	B - 9	EGFRK	라벤투스틴 A	98	1.01	40	1.17	111	0.54
바이오몰 키나아제 억제제	E - 5	CaMK II	KN-93	113	0.90	86	0.93	112	0.54
바이오몰 키나아제	D - 4	NGFRK	AG-879	102	0.99	112	0.77	113	0.53

[0208]

억제제									
바이오물 키나아제 억제제	G - 1	EGFRK	에르보스테인 유사체	35	1.38	109	0.77	114	0.53
EMDII 키나아제 억제제	C - 3		Cdk4 억제제 II, NSC 625987	64	1.23	54	1.06	115	0.51
EMDII 키나아제 억제제	F - 5		켄과올론	124	0.80	106	0.82	116	0.46
바이오물 키나아제 억제제	F - 10	PKC 델타	로블레핀	133	0.61	136	0.39	117	0.45
EMDII 키나아제	B - 5	CDK1	브헤닌	30	1.39	90	0.90	118	0.44

[0209]

억제제									
바이오물 키나아제 억제제	E - 4	CaMK II	KN-62	125	0.80	32	1.23	119	0.44
바이오물 키나아제 억제제	G - 7	PKC 알파, PKC 감마	HBDDE	88	1.09	134	0.48	120	0.43
바이오물 키나아제 억제제	E - 7	MLCK	ML-9	134	0.61	73	0.97	121	0.40
EMDII 키나아제 억제제	E - 10		JNK 억제제 V	130	0.66	101	0.85	122	0.39
EMDII 키나아제	G - 6		SB220025	95	1.03	130	0.55	123	0.36

[0210]

억제제									
EMDII 키나아제 억제제	A - 8		알로이신, RP106	80	1.15	91	0.89	124	0.35
EMDII 키나아제 억제제	E - 6	IKK2	IKK-2 억제제 IV	26	1.44	116	0.74	125	0.35
바이오물 키나아제 억제제	E - 6	MLCK	ML-7	127	0.73	31	1.25	126	0.35
바이오물 키나아제 억제제	C - 8	PDGFRK	티르포스틴 9	135	0.58	135	0.40	127	0.34
바이오물 키나아제	G - 5	IKK 경로	BAY 11-7082	128	0.71	127	0.60	128	0.34

[0211]

억제제									
바이오몰 키나아제 억제제	H - 2	Akt 신호전달 경로	트리시리빈	13	1.68	129	0.57	129	0.34
EMDII 키나아제 억제제	C - 8	CDK2	Cdk2 억제제 III	24	1.46	117	0.73	130	0.32
EMDII 키나아제 억제제	G - 7		푸르발라눔 A	112	0.91	133	0.53	131	0.32
EMDII 키나아제 억제제	G - 5	p38	PD 169316	45	1.32	97	0.87	132	0.31
EMDII 키나아제	D - 4		ERK 억제제 II, 음성 대조군	56	1.26	57	1.05	133	0.31

[0212]

억제제									
EMDII 키나아제 억제제	F - 10		MNK1 억제제	81	1.15	42	1.16	134	0.31
EMDII 키나아제 억제제	C - 9		Cdk2 억제제 IV, NU6140	129	0.70	68	0.99	135	0.29
바이오몰 키나아제 억제제	H - 8	mTOR	라파마이신	117	0.87	104	0.84	136	0.25

[0213]

표 4

표적 경로	억제제	부여 단계 3		부여 단계 4		부여 단계 3 및 4	
		순위	비	순위	비	순위	비
Src 패밀리	PP2	8	1.81	2	2.50	1	2.49
PI 3-K	LY 294002	7	1.82	9	1.63	2	2.46
p38 MAPK	SB-203580	3	2.23	7	1.88	3	2.34
p38	SB 203580	19	1.53	52	1.08	4	2.22
p38	SC-68376	29	1.41	121	0.69	5	2.12
PKA, PKG, MLCK 및 PKC.	H-7	5	1.93	5	2.18	6	2.08

[0214]

p38 억제제가 아님	SB 202474, p38 MAPK 에 대한 음성 배조균	116	0.88	62	1.03	7	2.02
(CDK1/2/5)(GSK 3i)	알로이신 A, RP107	58	1.25	55	1.06	8	1.97
ROCK	HA 1077, 파수틸	47	1.32	20	1.40	9	1.93
p38 MAPK	SB-202190	11	1.72	58	1.05	10	1.83
CAMKII	KN-62	110	0.93	107	0.81	11	1.82
ROCK	Y-27632	120	0.84	1	2.67	12	1.78
PKA	H-89	2	2.57	4	2.23	13	1.75
EGFRK	티르포스틴 AG	15	1.62	10	1.57	14	1.74

[0215]

	1478						
ATM	ATM 키나아제 억제제	54	1.28	88	0.91	15	1.70
Src 패밀리	PP1	4	2.05	12	1.48	16	1.67
PKA, PKG	HA-1004	6	1.82	3	2.30	17	1.63
CDK1/5	Cdk1/5 억제제	83	1.12	100	0.85	18	1.61
CDC28	화합물 52	67	1.22	122	0.68	19	1.61
MEK1/2	MEK1/2 억제제	94	1.03	110	0.77	20	1.60
EGFRK	BML-265 (에를로티닙 유사제)	16	1.58	30	1.25	21	1.59

[0216]

MEK1/2	PD 98059	71	1.21	78	0.96	22	1.57
MK2a	MK2a 억제제	107	0.95	80	0.95	23	1.54
p38	SKF-86002	46	1.32	92	0.89	24	1.49
PKA, PKG, MLCK 및 PKC.	H-9	1	2.62	6	1.97	26	1.36
PKA, PKG	HA-1077	12	1.69	35	1.21	28	1.30
PKA, PKG	H-8	28	1.43	16	1.45	29	1.30
CDK	올로마우신	25	1.46	41	1.17	30	1.30
cRAF	ZM 336372	23	1.48	114	0.76	36	1.19
IKK2	SC-514	20	1.52	64	1.01	39	1.13

[0217]

EGFRK	티르포스틴 23	36	1.36	13	1.47	47	1.05
BTK	테레익산	10	1.78	15	1.46	48	1.05
GSK-3 베타	켄콰올론	14	1.66	23	1.32	53	1.03
제니스테인에 대한 음성 대조군	다이브제인	62	1.23	19	1.41	56	1.01
EGFRK	RG-14620	114	0.89	17	1.44	60	0.97
PI 3-K	보르프란닌	9	1.80	50	1.10	66	0.93
ROCK	ROCK 억제제, Y-27632	122	0.83	14	1.46	67	0.93
IRAK	AG-126	18	1.53	85	0.93	68	0.92

[0218]

p38	p38 MAP 키나아제 억제제 III	22	1.51	18	1.43	74	0.89
티로신 키나아제	제니스테인	27	1.44	11	1.56	82	0.85
EGFRK, PDGFRK	티르포스틴 46	66	1.22	21	1.40	85	0.84
GSK	GSK-3 억제제 XIII	17	1.56	98	0.87	87	0.82
MEK	U-0126	75	1.17	8	1.73	95	0.74
PI 3-K	권조 루에르세틴	21	1.51	128	0.59	106	0.59
IKK2	IKK-2 억제제 IV	26	1.44	116	0.74	125	0.35
Akt 신호전달 경로	트리시러빈	13	1.68	129	0.57	129	0.34
CDK2	Cdk2 억제제 III	24	1.46	117	0.73	130	0.32

[0219]

표 5

				NKX6.1 강도		NGN3 강도	
웰	표적 활성	화합물	전체 핵	비	순위	비	순위
B - 5	PKA, PKG, MLCK 및 PKC.	H-9	1.00	7.36	1	2.24	1
D - 8	PKC	하이페리신	1.07	2.15	18	2.22	2
D - 5	PI 3-K	LY 294002	1.08	6.84	2	2.18	3
D - 11	PKA	H-89	1.09	5.39	3	2.13	4
F - 4	Src 패밀러	PP2	1.01	4.07	7	2.09	5
B - 3	p38 MAPK	SB-203580	1.07	5.05	4	1.95	6
C - 6	EGFRK	티르포스틴 AG 1478	1.10	2.41	14	1.89	7
F - 8	cRAF	GW 5074	1.06	3.48	10	1.78	8
D - 6	PI 3-K	보르트만닌	1.10	3.87	9	1.67	9
E - 1	PKA, PKG	HA-1004	1.08	3.88	8	1.55	10
D - 7	PKC	GF 109203X	1.05	4.54	6	1.53	11

[0220]

C - 12	Src 패밀리	PP1	0.99	1.90	22	1.43	12
F - 3	p38 MAPK	SB-202190	1.08	1.90	23	1.40	13
G - 11	ROCK	Y-27632	1.08	1.31	40	1.40	14
G - 12	GSK-3 베타	켄파울론	0.99	3.18	11	1.32	15
C - 9	IRK	HNMPA	1.01	2.31	15	1.32	16
B - 4	PKA, PKG, MLCK 및 PKC.	H-7	1.02	1.99	21	1.26	17
B - 7	EGFRK, PDGFRK	AG-494	1.10	1.57	30	1.26	18
C - 7	티로신 키나아제	티르포스틴 AG 1295	1.08	1.43	36	1.26	19
H - 7	EGFRK	BML-265 (에블로티닙 유사체)	1.06	2.15	17	1.25	20
B - 12	EGFRK	티르포스틴 25	1.02	4.68	5	1.24	21
E - 2	PKA, PKG	HA-1077	1.02	1.46	34	1.20	22
F - 7	PDGFRK	AG-1296	1.09	1.74	25	1.18	23

[0221]

E - 9	CDK	N9- 아이소프로필- 올로마우신	1.05	1.42	37	1.18	24
B - 11	EGFRK	티르포스틴 23	1.03	1.43	35	1.17	25
D - 12	PKA, PKG	H-8	0.99	1.21	45	1.16	26
C - 5	티로신 키나아제	티르포스틴 AG 1288	1.04	1.63	27	1.15	27
E - 11	올로마우신 에 대한 음성 대조군	아이소- 올로마우신	1.04	1.51	31	1.14	28
F - 6	Fik1	SU 4312	1.07	1.01	55	1.12	29
C - 11	Syk	피세아타놀	1.07	1.32	39	1.10	30
G - 8	JNK	SP 600125	1.04	1.67	26	1.09	31
H - 11		DMSO	1.03	1.04	53	1.09	32
E - 5	CaMK II	KN-93	1.04	1.10	51	1.03	33
E - 12	CDK	로스코비틴	1.03	0.67	75	1.03	34
F - 11	티로신 키나아제	제니스테인	1.03	1.10	52	1.02	35

[0222]

B - 8	HER1-2	AG-825	1.05	1.12	50	1.00	36
B - 10	EGFRK	RG-14620	1.02	1.26	41	1.00	37
F - 9	PKC	팔미토일-DL-카르니틴 CI	1.05	1.19	47	0.99	38
E - 10	CDK	올로마우신	1.04	1.22	44	0.99	39
D - 10	PKC	스핑고신	1.04	1.62	28	0.99	40
G - 6	CK II	DRB	1.01	1.50	32	0.98	41
C - 3	EGFRK	티르포스틴 51	1.04	1.46	33	0.97	42
F - 2	BTK	LFM-A13	0.97	1.82	24	0.96	43
E - 8	p58 PITSLRE 베타 1	2-아미노퓨린	1.07	0.93	61	0.93	44
B - 9	EGFRK	라벤두스틴 A	1.02	0.98	57	0.92	45
G - 7	PKC 알파, PKC 감마	HBDDE	1.07	0.92	63	0.91	46
D - 2	IRAK	AG-126	0.99	1.21	46	0.86	47
H - 12		DMSO	1.02	0.75	69	0.86	48

[0223]

H - 6	CK-II	아피게닌	1.05	0.77	68	0.84	49
F - 5	cRAF	ZM 336372	1.06	1.36	38	0.83	50
F - 12	제니스테인 에 대한 음성 대조군.	다이드제인	1.03	0.92	62	0.83	51
C - 1	EGFRK, PDGFRK	티르포스틴 46	1.05	2.54	13	0.82	52
H - 9		DMSO	1.03	0.95	60	0.81	53
B - 1	MEK	PD-98059	0.92	2.02	20	0.81	54
H - 1	BTK	테레익산	1.02	1.24	42	0.81	55
H - 5	Cdk5/p25	BML-259	1.04	0.83	67	0.80	56
C - 2	EGFRK	티르포스틴 47	1.00	1.13	49	0.79	57
H - 2	Akt 신호전달 경로	트리시리빈	0.73	2.06	19	0.78	58
D - 3	PDGFRK	AG-370	1.01	1.15	48	0.77	59
G - 10	GSK-3 베타	인디루빈-3'- 모녹심	0.96	0.92	64	0.74	60

[0224]

C - 4	티로신 키나아제 억제제에 대한 음성 대조군	티르포스틴 1	1.00	0.95	59	0.73	61
G - 4	JAK-3	ZM 449829	1.01	1.23	43	0.73	62
D - 1	JAK-2	AG-490	1.04	2.26	16	0.72	63
D - 4	NGFRK	AG-879	1.03	0.39	80	0.72	64
G - 2	PI 3-K	쿠에르세틴 2 수화물	0.97	1.03	54	0.71	65
G - 5	IKK 경로	BAY 11-7082	0.93	1.00	56	0.68	66
H - 10		DMSO	0.99	0.88	65	0.67	67
G - 9	GSK-3 베타, CDK5	인디루빈	1.01	0.59	77	0.66	68
E - 6	MLCK	ML-7	0.98	2.84	12	0.65	69
B - 2	MEK	U-0126	0.87	0.68	73	0.65	70
G - 3	Fik1	SU1498	1.01	0.70	72	0.65	71
E - 3	EGFRK, CaMK II	HDBA	0.99	0.88	66	0.64	72

[0225]

H - 4	IKK2	SC-514	0.95	0.71	71	0.62	73
E - 7	MLCK	ML-9	1.06	1.60	29	0.59	74
F - 10	PKC 델타	로틀레린	0.24	0.96	58	0.56	75
E - 4	CaMK II	KN-62	0.96	0.71	70	0.56	76
H - 3	Akt	BML-257	0.98	0.68	74	0.55	77
H - 8	mTOR	라파마이신	0.47	0.65	76	0.39	78
C - 10	PKC 억제제	PKC-412	0.17	0.45	79	0.39	79
G - 1	EGFRK	에르브스테틴 유사체	0.82	0.38	81	0.34	80
D - 9	PKC	Ro 31-8220	0.09	0.48	78	0.30	81
B - 6	Pan-특이적	스타우로스포린	0.13	0.17	83	0.30	82
C - 8	PDGFRK	티르포스틴 9	0.28	0.29	82	0.29	83
F - 1	ERK2, 아데노신 키나아제, CK1, CK2,	5-요오도부베르시딘	0.08	0.13	84	0.27	84

[0226]

표 6

순위	NKX6.1 순위	NGN3 순위
1	H-9	H-9
2	LY 294002	하이페리신
3	H-89	LY 294002
4	SB-203580	H-89
5	티르포스틴 25	PP2
6	GF 109203X	SB-203580
7	PP2	티르포스틴 AG 1478
8	HA-1004	GW 5074
9	보르트만닌	보르트만닌
10	GW 5074	HA-1004
11	켄파울론	GF 109203X
12	ML-7	PP1
13	티르포스틴 46	SB-202190

[0227]

14	티르포스틴 AG 1478	Y-27632
15	HNMPA	켄파울론
16	AG-490	HNMPA

[0228]

표 7

경로	화합물
PKC/PKA/PKG	H-9, 하이페리신, H-89, GF 109203X, HA-1004
SRC 키나아제	PP2, PP1
PI3 키나아제	LY 294002, 보르트만닌
p38 MAP 키나아제	SB-203580, SB-202190
EGF 수용체 키나아제	티르포스틴 25, 티르포스틴 AG1478, 티르포스틴 46
cRAF	GW 5074
GSK3 베타	켄파울론
IRK	HNMPA
JAK2	AG490
ROCK	Y27632
MLCK	ML-7

[0229]

표 8

		전체 핵	NKX6.1		NGN3	
플레이트	처리 [농도]	비	세포 계수 비	강도 비	세포 계수 비	강도 비
플레이트 1	PD-98059 [2.5uM]	0.96	2.08	2.37	2.21	2.41
플레이트 1	SB-203580 [2.5uM]	1.05	2.93	2.58	5.26	4.74
플레이트 1	H-7 [2.5uM]	1.09	2.02	1.88	2.75	2.44
플레이트 1	H-9 [2.5uM]	1.13	1.93	1.76	2.85	2.47
플레이트 1	AG-490 [2.5uM]	0.99	3.78	4.20	2.48	2.35
플레이트 1	LY 294002 [2.5uM]	1.03	6.54	6.60	4.93	4.43
플레이트 1	GF109203X [2.5uM]	0.82	5.20	3.57	4.17	3.33
플레이트 1	H-89 [2.5uM]	1.08	2.41	2.30	4.00	3.74
플레이트 1	KN-62 [1uM]	1.02	0.69	0.61	0.81	0.77

[0230]

플레이트 1	KN-93 [1uM]	1.05	0.59	0.55	0.84	0.79
플레이트 1	대조군 처리	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
플레이트 2	HA-1004 [2.5uM]	1.08	2.83	2.66	2.77	2.49
플레이트 2	HA-1077[2.5uM]	1.07	1.48	1.31	2.57	2.27
플레이트 2	SB-202190 [2.5uM]	1.08	2.12	1.90	4.53	3.91
플레이트 2	PP2 [2.5uM]	1.04	2.06	1.71	6.21	6.12
플레이트 2	GW 5074 [2.5uM]	1.11	2.77	2.32	3.15	2.79
플레이트 2	퀴파올론 [2.5uM]	1.02	0.53	0.45	1.52	1.40
플레이트 2	BML-259 [2.5uM]	0.99	1.08	1.02	1.21	1.23
플레이트 2	BML-265 [2.5uM]	0.97	6.12	6.34	4.50	4.65
플레이트 2	KN-62 [1uM]	1.03	0.71	0.67	0.72	0.71
플레이트 2	KN-93 [1uM]	1.04	0.75	0.76	0.93	0.93
플레이트 2	대조군 처리	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

[0231]

[0232]

본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 간행물은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 본 발명의 다양한 측면은 실시예 및 바람직한 실시형태를 참조로 하여 상기 예시되었음에도, 본 발명의 범주는 전술한 상세한 설명에 의해서가 아니라 본 특허 법칙의 원칙 하에 적절하게 의도되는 하기 청구항에 의해 정의되는 것으로 생각될 것이다.