



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년01월28일  
 (11) 등록번호 10-1942769  
 (24) 등록일자 2019년01월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/071* (2010.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/0676* (2013.01)  
*C12N 5/0606* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7020570
- (22) 출원일자(국제) 2013년12월18일  
 심사청구일자 2016년12월28일
- (85) 번역문제출일자 2015년07월28일
- (65) 공개번호 10-2015-0101467
- (43) 공개일자 2015년09월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/075959
- (87) 국제공개번호 WO 2014/105546  
 국제공개일자 2014년07월03일
- (30) 우선권주장  
 61/747,672 2012년12월31일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Diabetes, 2012, Vol. 61, p. 2016-2029  
 (2012.08.published)\*  
 JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, 2005, VOL.  
 204, p.286-296\*  
 Nature Biotechnology, 2006, Vol. 24, No.11,  
 p.1392-1401 (2006)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
**얀센 바이오테크 인코포레이티드**  
 미국, 펜실베이니아주 19044, 호삼, 럽지뷰 드라이브 800
- (72) 발명자  
**레자니아 알리레자**  
 미국 08869 뉴저지주 라리탄 루트 202 사우스 1000
- (74) 대리인  
**특허법인한성**

전체 청구항 수 : 총 33 항

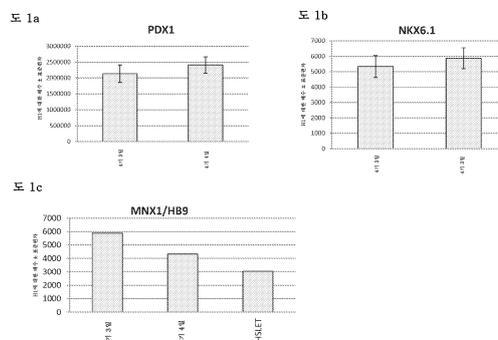
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **HB9 조절제를 사용하는 인간 배아 줄기세포의 체장 내분비 세포로의 분화**

**(57) 요약**

본 발명은 만능 줄기세포에서 PDX1, NKX6.1 및 HB9을 발현하는 체장 내배엽 세포로의 분화를 촉진하는 방법을 제공한다. 특히, 본 방법은 4기 내지 6기 세포를 갑상선 호르몬(예를 들어, T3), ALK5 저해제 또는 둘 모두와 함께 배양하는 것을 포함한다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

*C12N 2501/117* (2013.01)  
*C12N 2501/16* (2013.01)  
*C12N 2501/19* (2013.01)  
*C12N 2501/385* (2013.01)  
*C12N 2501/415* (2013.01)  
*C12N 2501/727* (2013.01)  
*C12N 2501/999* (2013.01)  
*C12N 2506/02* (2013.01)  
*C12N 2533/90* (2013.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

PDX1 및 NKX6.1을 공동발현하는 인간 세포를 충분한 양의 (i) 트리오오도타이로닌(T3), 또는 (ii) 트리오오도 타이로닌(T3), 티록신(T4), GC-1, 3,5-디오오도타이로프로피온산(DITPA), KB-141, MB07344, T0681 및 GC-24 중 에서 선택되는 갑상선 호르몬과 ALK5 저해제를 포함하는 배지에서 처리하는 것에 의해, 상기 세포에서 HB9의 발 현을 향상시키는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 갑상선 호르몬이 T3인 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, NKX2.2의 발현을 감소시키거나/감소시키고, SOX2 및 알부민의 발현을 억제시키는 방법.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 전장(foregut) 내배엽 세포를 PDX1 및 NKX6.1을 공동발현하는 인간 세포로 분화하는 단계를 포 함하는 방법.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 배지가 SANT-1, 레티노산, 아스코르브산, BMP 수용체 저해제 및 PKC 활성화제 중에서 하나 이 상으로 추가로 보충되는 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, BMP 수용체 저해제가 LDN-193189, 노긴(Noggin) 및 코딘(Chordin) 중에서 선택되고, PKC 활성 화제가 TPB, PDBu, PMA 및 ILV 중에서 선택되는 방법.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 세포를 (i) 트리오오도타이로닌, 또는 (ii) 트리오오도타이로닌, 티록신, GC-1, 3,5-디오오도 타이로프로피온산, KB-141, MB07344, T0681 및 GC-24 중에서 선택되는 갑상선 호르몬과 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양함으로써 배양 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 형성하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하는 방법:

- (a) 인간 만능 줄기세포를 배양하는 단계;
- (b) 상기 인간 만능 줄기세포를 (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-온으로 처리하여, 상기 인간 만능 줄기세포를 완성 내배엽 계통 의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화하는 단계;
- (c) 상기 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 FGF-7 및 아스코르브산으로 처리하여, 상기 완 성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 장관(gut tube) 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화하는 단계; 및
- (d) 상기 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 (1) SANT-1, 레티노산 및 노긴, 또는 (2) FGF-7, 레티 노산, SANT-1, PKC 활성화제, BMP 저해제 및 아스코르브산으로 처리하여, 상기 장관 세포의 특징적인 마커를 발 현하는 세포를 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화하는 단계.

**청구항 9**

췌장 전장(foregut) 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 인간 세포를 트리오오도타이로닌 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양하는 것을 포함하는, 췌장 전장 전구세포의 분화 동안 (a) HB9의 발현을 증가시키고 (b) SOX2 및 알부민의 발현을 억제시키는 방법.

**청구항 10**

(a) 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 인간 세포를 트리오오도타이로닌 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양하여 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 인간 세포를 생성하는 단계; 및  
(b) 상기 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 인간 세포를 트리오오도타이로닌 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 글루카곤, 소마토스타틴 및 그렐린을 하향조절하는 방법.

**청구항 11**

제10항에 있어서, (a) 및 (b) 단계의 배지가 SANT-1, 레티노산 및 아스코르브산으로 추가로 보충되는 방법.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 FGF-7이 보충된 배지에서 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 13**

만능 줄기세포로부터 유래된 세포를 갑상선 호르몬이 보충되고 ALK5 저해제는 없는 제1 성장 배지에서 2일 내지 3일의 기간동안 배양하고,

이어서 수득된 세포 집단을 갑상선 호르몬 및 ALK5 저해제 양자 모두가 보충된 추가의 성장 배지에서 3일 내지 6일간 배양하고,

임의로 상기 세포를 갑상선 호르몬은 포함하되 ALK5 저해제는 없는 배지에서 3일의 기간동안 추가로 배양하는 단계를 포함하며,

상기 갑상선 호르몬은 트리오오도타이로닌, 티록신, GC-1, 3,5-디오오도타이로프로피온산, KB-141, MB07344, T0681, GC-24 또는 이들의 혼합물 중에서 선택되는, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생성하는 방법.

**청구항 14**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II, ALK5i, SD208, TGF-β 저해제 SB431542, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, TGF-β 수용체 저해제 V, TGF-β 수용체 저해제 I, TGF-β 수용체 저해제 IV, TGF-β 수용체 저해제 VII, TGF-β 수용체 저해제 VIII, TGF-β 수용체 저해제 II, TGF-β 수용체 저해제 VI 및 TGF-β 수용체 저해제 III으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II인 방법.

**청구항 16**

제7항에 있어서, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포가 인슐린을 생성하는 방법.

**청구항 17**

a. 배양 용기;

b. 트리오오도타이로닌, 티록신, GC-1, 3,5-디오오도타이로프로피온산, KB-141, MB07344, T0681, GC-24 및 이들의 혼합물 중에서 선택되는 갑상선 호르몬, 또는 갑상선 호르몬과 ALK5 저해제 양자 모두가 보충된 성장 배지를 포함하는 다량의 분화 배지; 및

c. 인간 만능 줄기세포로부터 유래된 분화된 세포 집단으로서, 상기 분화된 세포의 적어도 10%가 PDX1, NKX6.1 및 HB9를 공동발현하는 분화된 세포 집단을 포함하는 시험관내 세포 배양물.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 성장 배지가 MCDB131인 세포 배양물.

**청구항 19**

제17항에 있어서, 성장 배지가 하나 이상의 하기 성분으로 추가로 보충되는 세포 배양물:

- a. MRT10 또는 사이클로파민으로부터 선택된 스무스드 수용체(smoothened receptor) 저해제;
- b. SANT-1 또는 HPI-1로부터 선택된 SHH 신호전달 경로 길항제;
- c. LDN-193189, 노킨 또는 코딘으로부터 선택된 BMP 수용체 저해제;
- d. TPB, PDBu, PMA 및 ILV로부터 선택된 PKC 활성화제;
- e. FGF7 또는 FGF10으로부터 선택된 섬유아세포 증식인자;
- f. 레티노산;
- g. 아스코르브산;
- h. 헤파린; 및
- i. 황산아연.

**청구항 20**

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 배지가 SANT-1, 레티노산 및 아스코르브산으로 추가로 보충되는 세포 배양물.

**청구항 21**

취장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 분화된 만능 줄기세포 집단을 포함하는 시험관내 세포 배양물로서, 상기 분화된 세포의 적어도 10%가 PDX1, NKX6.1 및 HB9를 발현하고, 상기 분화된 만능 줄기세포 집단이 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득되는 시험관내 세포 배양물.

**청구항 22**

제17항에 있어서, 분화된 세포 집단이  $\beta$  세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 또는 인슐린을 생산하는 세포를 포함하는 세포 배양물.

**청구항 23**

제21항에 있어서, 분화된 세포 집단이  $\beta$  세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 또는 인슐린을 생산하는 세포를 포함하는 세포 배양물.

**청구항 24**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 의해 획득되는 세포 집단으로서, 상기 세포의 적어도 10%가 PDX1, NKX6.1 및 HB9를 발현하는 세포의 집단.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 인슐린 및 NKX6.1을 발현하는 세포의 집단.

**청구항 26**

제9항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II, ALK5i, SD208, TGF- $\beta$  저해제 SB431542, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, 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 및 TGF- $\beta$  수

용체 저해제 III으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II인 방법.

**청구항 28**

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II, ALK5i, SD208, TGF-B 저해제 SB431542, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, 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 및 TGF- $\beta$  수용체 저해제 III으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II인 방법.

**청구항 30**

제13항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II, ALK5i, SD208, TGF-B 저해제 SB431542, ITD-1, LY2109761, A83-01, LY2157299, 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 및 TGF- $\beta$  수용체 저해제 III으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 31**

제30항에 있어서, ALK5 저해제가 ALK5 저해제 II인 방법.

**청구항 32**

제10항에 있어서, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포가 인슐린을 생성하는 방법.

**청구항 33**

제13항에 있어서, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포가 인슐린을 생성하는 방법.

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원과의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 전체적으로 참고로 포함된 미국 가출원 제61/747,672호(2012년 12월 31일자로 출원됨)를 우선권으로 주장한다.

[0003] 본 발명은 세포 분화 분야이다. 보다 특히, 본 발명은 척장 내배엽 및 내분비 세포에서 HB9의 조절제로서의 특정한 갑상선 호르몬 또는 이의 유사체 및 ALK5 저해제의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] I형 진성 당뇨병 및 이식가능한 랑게르한스섬의 부족에 대한 세포-대체 치료법의 진전은 생착(engraftment)에 적절한 인슐린-생산 세포 또는 β 세포의 공급원을 개발하는데 관심을 집중하여 왔다. 한 가지 접근법은 배아 줄기세포와 같은 만능 줄기세포(pluripotent stem cell)로부터 기능적 β 세포를 생성시키는 것이다.

[0005] 척추동물 배아 발생에서, 만능 세포는 낭배형성(gastrulation)으로 알려진 과정에서 삼배엽층(외배엽, 중배엽, 및 내배엽)을 포함하는 세포군을 생성한다. 갑상선, 흉선, 척장, 소화관, 및 간과 같은 조직은 중간 단계를 통해 내배엽으로부터 발생할 것이다. 이 과정에서 중간 단계는 완성 내배엽의 형성이다.

[0006] 낭배형성 마지막까지, 내배엽은 내배엽의 전방, 중간 및 후방 영역을 독특하게 표시하는 인자들의 패닐의 발현에 의해 인식될 수 있는 전방-후방 도메인(anterior-posterior domain)으로 나뉘어진다. 예를 들어, HHEX 및 SOX2는 내배엽의 전방 영역을 확인시켜 주는 반면에, CDX1, 2 및 4는 내배엽의 후방 영역을 확인시켜 준다.

[0007] 내배엽 조직의 이동은, 내배엽이 상이한 중배엽 조직들과 아주 근접해지게 하며 이는 장관의 국지화를 돕는다. 이는 FGF, WNT, TGF-β, 레티노산(RA) 및 BMP 리간드 및 이들의 길항제와 같은 과잉의 분비형 인자들에 의해 달성된다. 예를 들어, FGF4 및 BMP는 추정 후장 내배엽에서의 CDX2 발현을 촉진하며 전방 유전자 HHEX 및 SOX2의 발현을 억제한다(문헌[2000 *Development*, 127:1563-1567]). 또한 WNT 신호전달(signaling)은 후장(hindgut) 발생을 촉진하고 전장(foregut) 운명을 저해하도록 FGF 신호전달과 병행하여 작동하는 것으로 밝혀졌다(문헌[2007 *Development*, 134:2207-2217]). 마지막으로, 중간엽에 의해 분비된 레티노산은 전장-후장 경계를 조절한다(문헌[2002 *Curr Biol*, 12:1215-1220]).

[0008] 특정 전사 인자들의 발현 수준을 이용하여 조직의 아이덴티티(identity)를 지정할 수 있다. 완성 내배엽의 원시 장관(primitive gut tube)으로의 형질전환 동안, 장관은 제한된 유전자 발현 패턴에 의해 분자 수준에서 관찰될 수 있는 넓은 도메인들 내로 국지화되게 된다. 장관 내의 국지화된 척장 도메인은 매우 높은 PDX1 발현 및 매우 낮은 CDX2와 SOX2 발현을 나타낸다. PDX1, NKX6.1, PTF1A, 및 NKX2.2는 척장 조직에서 고도로 발현되며 CDX2의 발현은 장 조직에서 높다.

[0009] 척장의 형성은 완성 내배엽의 척장 내배엽으로의 분화로부터 야기된다. 배측(dorsal) 및 복측(ventral) 척장 도메인은 전장 상피에서 발생한다. 전장은 또한 식도, 기관, 폐, 갑상선, 위, 간, 척장 및 담관계가 생성되도록 한다.

[0010] 척장 내배엽의 세포는 척장-십이지장 호메오박스(homeobox) 유전자 PDX1을 발현한다. PDX1의 부재 하에, 척장은 복측 원기(bud) 및 배측 원기의 형성 이상으로는 발달하지 못한다. 따라서, PDX1 발현은 척장 기관형성에서 중요한 단계를 나타낸다. 성숙한 척장은 척장 내배엽의 분화로부터 생성되는 외분비 조직 및 내분비 조직 둘 모두를 함유한다.

[0011] 드'아무르(D'Amour) 등은 고농도의 액티빈과 저 혈청의 존재 하에 인간 배아 줄기세포-유래 완성 내배엽의 농축 배양물의 생산을 기술한다(문헌[*Nature Biotechnology* 2005, 23:1534-1541]; 미국 특허 제7,704,738호). 보고에 의하면, 마우스의 신장 피막 하에 이들 세포를 이식하면 내배엽 조직의 특성을 갖는 더욱 성숙한 세포로 분화되었다(미국 특허 제7,704,738호). 인간 배아 줄기세포-유래된 완성 내배엽 세포는 FGF10 및 레티노산의 첨가 후에 PDX1 양성 세포로 추가로 분화될 수 있다(미국 특허출원 공개 제2005/0266554호). 면역 결핍 마우스의 지방 패드 내에 이들 척장 전구세포를 후속적으로 이식하면 3 내지 4개월의 성숙기 후에 기능성 척장 내분비 세포의 형성이 유발되었다(미국 특허 제7,993,920호 및 미국 특허 제7,534,608호).

[0012] 피스크(Fisk) 등은 인간 배아 줄기세포로부터의 척장 섬세포의 생성 시스템을 보고한다 (미국 특허 제7,033,831호). 이 경우에, 분화 경로를 세 단계로 나누었다. 먼저 인간 배아 줄기세포를 부티르산나트륨과 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 배양하여PDX1 양성 세포를 생성하였다. 마지막 분화는 니코

틴아미드에 의해 유도되었다.

- [0013] 또한 소분자 저해제는 췌장 내분비 전구 세포의 유도에 사용되었다. 예를 들어, TGF- $\beta$  수용체 및 BMP 수용체의 소분자 저해제(문헌[*Development* 2011, 138:861-871]; 문헌[*Diabetes*2011, 60:239-247])가 사용되어 췌장 내분비 세포의 수를 현저하게 향상시켰다. 게다가, 소분자 활성화제가 완성 내배엽 세포 또는 췌장 전구 세포의 생성에 또한 사용되었다 (문헌[*Curr Opin Cell Biol*2009, 21:727-732]; 문헌[*Nature Chem Biol* 2009, 5:258-265]).
- [0014] HB9(H1XB9 및 MNX1로도 공지됨)는 대략 배발생 8일에서 시작하여 췌장 발달에서 조기에 발현되는 bHLH 전사 활성화제 단백질이다. HB9는 또한 척삭 및 척수에서 발현된다. HB9의 발현은 일시적이며 췌장 상피에서 약 10.5일에 최고치이며, 이는 PDX1 및 NKX6.1 발현 세포에서 발현된다. 약 12.5일에, HB9 발현은 감소되고, 후기 단계에서 이는 오직  $\beta$  세포로만 제한된다. H1XB9의 널 돌연변이(null mutation)에 동종접합인 마우스에서, 췌장의 배측 분엽(dorsal lobe)은 발달하지 못한다(문헌[*Nat Genet* 23:67-70, 1999]; 문헌[*Nat Genet* 23:71-75, 1999]). HB9-/-  $\beta$ -세포는 글루코스 수송체, GLUT2 및 NKX6.1을 낮은 수준으로 발현한다. 게다가, HB9 -/- 췌장은 인슐린 양성 세포의 수의 현저한 감소를 나타내는 반면에, 다른 췌장 호르몬의 발현에는 현저하게 영향을 미치지 않는다. 따라서, HB9의 시간적 제어는 정상적  $\beta$  세포 발달 및 기능에 필수적이다.  $\beta$  세포에서 HB9 발현을 조절하는 인자에 관해 많은 것이 공지되어 있지 않지만, 제브라피시에서의 최근 연구는 레티노산이 HB9의 발현을 긍정적으로 조절할 수 있음을 제시한다(문헌[*Development*, 138, 4597-4608, 2011]).
- [0015] 갑상선 호르몬인 타이록신("T4") 및 트리요오도타이로닌("T3")은 갑상선에 의해 생산되는 타이로신계 호르몬이며 주로 대사작용의 조절을 책임지고 있다. 혈중 갑상선 호르몬의 주요 형태는 T4로서 이는 T3보다 더 긴 반감기를 갖는다. 혈중으로 방출되는 T4 대 T3의 비는 대략 20 대 1이다. T4는 세포 내에서 데이오디나제(deiodinase)에 의해 보다 활성인 (T4보다 3배 내지 4배 더 강력한) T3으로 전환된다.
- [0016] T3은 갑상선 호르몬 수용체 TR $\alpha$ 1 및 TR $\beta$ 1(TR)에 결합한다. TR은 레티노이드 X 수용체와 함께 이중이량체화되는 핵 호르몬 수용체이다. 이 이량체는 리간드의 부재하에 갑상선 반응 요소(TRE)에 결합하고 전사 억제인자로서 작용한다. TR에 대한 T3의 결합은 TRE 의존적 유전자의 억제를 감소시키고 각종 표적 유전자의 발현을 유도한다. 수많은 연구가,  $\beta$  세포 증식의 증가, 아포토시스(apoptosis)의 감소 및 인슐린 분비의 개선에 있어 T3의 역할을 제시하였지만, 세포 분화에서의 이의 역할은 규정되지 않았다.
- [0017] 형질전환 성장 인자  $\beta$  (TGF- $\beta$ )는 성장 제어, 분화, 이동, 세포 생존, 섬유화 및 발생 운명의 특징을 포함하는 많은 생물학적 과정에 관여하는 다면발현성 사이토카인의 큰 패밀리의 구성원이다. TGF- $\beta$  슈퍼패밀리 구성원은 II형 및 I형 수용체를 포함하는 수용체 복합체를 통해서 신호를 전달한다. TGF-B 리간드(예를 들어, 액티빈 및 GDF(성장 분화 인자)는 II형 수용체를 I형 수용체와 화합하도록 한다. II형 수용체는 복합체 내에서 I형 수용체를 인산화시키고 활성화시킨다. 하기와 같은 5종의 포유동물 II형 수용체 및 7종의 I형 수용체(ALK 1 내지 7)가 있다: T $\beta$ R-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II 및 AMHR-II. 액티빈 및 관련 리간드는 ActR-II 또는 ActR-IIB 및 ALK4 또는 ALK5의 조합을 통해 신호를 전달하고, BMP는 ALK2, ALK3 및 ALK6과 함께 ActR-II, ActR-IIB 또는 BMPR-II의 조합을 통해 신호를 전달한다. AMH는 AMHR-II와 ALK6의 복합체를 통해 신호를 전달하고, 결절(nodal)은 최근에 ActR-IIB와 ALK7의 복합체를 통해 신호를 전달하는 것으로 나타났다(문헌[*Ce11*. 2003, 113(6):685-700]). TGF-B 리간드가 적절한 수용체에 결합한 후, 후속적 신호는 주로 Smad의 복합체의 활성화를 통해 핵으로 전달된다. 활성화시, I형 수용체는 Smad의 수용체-조절형 서브패밀리의 구성원들을 인산화시킨다. 이것은 상기 구성원들을 활성화시켜 이들이 공통의 매개체 Smad인 Smad4와 복합체를 형성할 수 있도록 한다. Smad 1, 5 및 8은 ALK 1, 2, 3 및 6에 대한 기질인 반면, Smad 2 및 3은 ALK 4, 5 및 7에 대한 기질이다(문헌[*FASEB J* 13:2124-2105]). 활성화된 Smad 복합체는 핵 내에 축적되고, 여기서 이들은 통상 다른 특이적 DNA-결합 전사 인자들과 연합하여 표적 유전자의 전사에 직접적으로 관여한다. TGF- $\beta$ 에 대한 수용체를 선택적으로 저해하는 화합물이 치료적 적용을 위해 그리고 각종 줄기세포 집단으로부터 분화 및 재프로그래밍 범주에서 세포 운명을 조절하기 위해 개발되었다. 특히, ALK5 저해제는 배아 줄기세포의 분화를 내분비 운명으로 유도하기 위해 이미 사용된 바 있다(문헌[*Diabetes*, 2011, 60(1):239-47]).
- [0018] 일반적으로, 선조세포(progenitor cell)의 기능적  $\beta$  세포로의 분화 과정은 다양한 단계를 거친다. 그러나, 인간 배아 줄기("hES") 세포를 시험관 내에서 계속해서 단계들을 통해  $\beta$ -세포와 유사한 세포로 결정되도록 유도하는 것은 도전과제이며 hES 세포로부터 기능적  $\beta$ -세포의 생산은 간단한 과정이 아닌 것으로 인정되고 있다. 선조세포의 분화 과정에서의 각 단계는 특별한 과제를 제시한다. 인간 만능 줄기세포와 같은 선조세포로부터 췌장 세포를 생성시키기 위한 프로토콜의 개선에 있어서 발전이 이루어졌음에도 불구하고, 기능성 내분비 세포

및 특히  $\beta$  세포를 유발하는 프로토콜을 생성시킬 필요성이 여전히 존재한다.

**도면의 간단한 설명**

[0019]

도 1a 내지 도 1c는 실시예 1에 개요된 바와 같이 췌장 내배엽/내분비 전구세포로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 하기 유전자들의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다: PDX1 (도 1a); NKX6.1 (도 1b); 및 HB9 (도 1c).

도 2a 내지 도 2c는 다음에 대해서 실시예 1에 개요된 바와 같이 췌장 내배엽/내분비 전구세포로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 FACS 분석 결과를 도시한 것이다: PDX1 (도 2a), NKX6.1(도 2b), HB9(도 2c).

도 3a 및 도 3b는 NKX6.1, 인슐린 또는 HB9에 대해 면역염색된 세포의 영상을 도시한 것이다. 세포는 실시예 1에 개요된 바와 같이 췌장 내배엽/내분비 전구세포로 분화시켰다. 도 3a는 NKX6.1 (좌측 창) 및 인슐린 (우측 창)에 대한 면역염색을 도시한 것이다. 도 3b는 HB9 (좌측 창) 및 인슐린(우측 창)에 대한 면역염색을 도시한 것이다.

도 4a, 도 4b 및 도 4c는 실시예 2에 개요된 바와 같이 4기 내지 6기로 분화된 배아 줄기세포주 H1의 4기의 3일째(패널 A), 5기의 4일째 (패널 B) 및 6기의 3일째(패널 C)에서 PDX1, NKX6.1 및 HB9의 발현율%의 FACS 데이터를 도시한 것이다.

도 5a는 실시예 2에 개요된 바와 같이 분화된 세포에 대한 2기 내지 6에서의 HB9의 mRNA 발현을 인간 섬세포와 비교하여 도시한 것이다.

도 5b는 NKX6.1(좌측 창) 및 HB9(우측 창)에 대해 면역염색된, 실시예 2에 개요된 바와 같이 분화된 4기의 3일째 세포의 영상을 도시한 것이다.

도 6a 내지 도 6j는 실시예 2에 개요된 바와 같이 4기로 분화되고 이어서 오직 4기, 4기 내지 5기 또는 4기 내지 6기에서 처리된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 하기 유전자들의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다. 도 6a 내지 도 6j는 다음에 대한 데이터를 도시한 것이다: NKX6.1 (도 6a); PDX1 (도 6b); NKX2.2 (도 6c) 글루카곤(도 6d); 인슐린(도 6e); 소마토스타틴 (도 6f); CDX2 (도 6g); 알부민 (도 6h); 가스트린 (도 6i); 및 SOX2 (도 6j).

도 7a 및 도 7b는 대조군(도 7a) 및 실시예 2에 개요된 바와 같이 처리된 배양물(도 7b)의 면역염색 결과를 도시한다. 6기에서 대조군 (도 7a) 및 처리된 배양물(도 7b)의 면역염색은 6기에서 대조군(도 7a)과 비교하여 T3 처리군(도 7b)에서 HB9 양성 세포 수의 현저한 증가를 나타냈다.

도 8a 및 도 8b는 실시예 3에 개요된 바와 같이 6기로 분화된 세포에 대한 6기의 7일째에서의 NKX6.1 및 HB9의 면역염색을 도시한 것이다. 도 8c는 실시예 3에 개요된 바와 같이 6기로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 HB9의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다.

도 9a 및 도 9b는 실시예 3에 개요된 바와 같이 6기로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 각각 6기의 5일째 및 15일째에서의 HB9의 FACS 데이터를 도시한 것이다.

도 10a 내지 도 10e는 실시예 4에 개요된 프로토콜에 따라서 분화된 세포에 대한 6기의 6일째에서의 NKX6.1 및 HB9의 면역염색을 도시한 것이다. T3은 NKX6.1 양성 췌장 내배엽 전구 세포 중에서 HB9 양성 세포의 수를 용량 의존적 방식으로 현저하게 향상시켰다.

도 11a 내지 도 11i는 실시예 4에 개요된 바와 같이 6기로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 하기 유전자들의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다: SOX2 (도 11a); NKX6.1 (도 11b); NKX2.2 (도 11c); 가스트린 (도 11d); PDX1 (도 11e); NGN3 (도 11f); PAX6 (도 11g); PAX4 (도 11h); 인슐린 (도 11i); 글루카곤 (도 11j); 그렐린 (도 11k); 및 소마토스타틴 (도 11l).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0020]

하기 본 발명의 상세한 설명은 첨부 도면과 함께 읽을 때 더 잘 이해될 것이다. 도면은 본 발명의 특정 실시형태를 예시하기 위한 목적으로 제공된다. 그러나, 본 발명은 제시된 정확한 배열, 예 및 수단에 한정되지 않는다. 개시 내용의 명확함을 위하여, 그리고 제한하지 않고서, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 본 발명의 소정의 특징, 실시형태, 또는 응용을 설명하거나 예시하는 세부 항목으로 나뉘어진다.

- [0021] 본 발명은 특정 갑상선 호르몬 또는 이의 유사체 및 ALK5(TGF $\beta$  I형 수용체 키나제) 저해제를 특수한 배양 순서로 사용하는 것을 통한 NKX6.1, PDX1 및 HB9에 대해 양성인 췌장 내배엽 세포의 생성에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 만능 줄기세포로부터 유래된 세포를 NKX6.1, PDX1 및 HB9를 발현하는  $\beta$  세포 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 시험관내 세포 배양물을 제공한다. 본 발명은 시험관내 세포 배양을 통해 이러한 세포를 수득하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 발명은 T3, T4 또는 이의 유사체의 포함이 세포를 분화시키는데 있어서 HB9 단백질 발현의 유도제로서 작용하여  $\beta$  세포로의 분화를 촉진한다는 발견에 기초한다. HB9는 3기 또는 4기에서 단백질 수준에서 발현되지 않는다. 따라서, 본 발명은 HB9 단백질 발현을 조절함으로써 줄기세포를 분화시키는 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 T3 또는 T4, 또는 이의 유사체 및 ALK5 억제제를 특수한 배양 순서로 사용하는 것을 통한 NKX6.1, PDX1 및 HB9에 대해 양성인 췌장 내배엽 세포의 생성을 제공한다.
- [0022] 정의
- [0023] 줄기세포는 단일 세포 수준에서 이의 자가-재생 및 분화 능력 둘 모두에 의해 규정되는 미분화된 세포이다. 줄기세포는 자가 재생 선조세포, 비-재생 선조세포, 및 최종 분화된 세포를 포함하는 자손 세포를 생성할 수 있다. 또한 줄기세포는 시험관 내에서 다수의 배엽층 (내배엽, 중배엽 및 외배엽)으로부터 다양한 세포 계통의 기능성 세포로 분화하는 이의 능력을 특징으로 한다. 또한 줄기세포는 이식 후 다수의 배엽층의 조직을 생성시키며, 배반포 내로의 주사 후, 비록 전부는 아니더라도, 사실상 대부분의 조직에 기여한다.
- [0024] 줄기세포는 이들의 발생 능력에 의해 분류된다. 만능 줄기세포는 모든 배아 세포 유형을 생성시킬 수 있다.
- [0025] 분화는 특화되지 않은("미결정") 또는 덜 특화된 세포가 예를 들어, 신경 세포 또는 근육 세포와 같은 특화된 세포의 특징을 획득하는 과정이다. 분화된 세포는 세포의 계통 내에서 보다 특수화된("결정된(committed)") 위치를 차지하는 것이다. 분화 과정에 적용될 때, 용어 "결정된"은 분화 경로에서, 정상 환경 하에 특정 세포 유형 또는 세포 유형의 서브셋으로 계속 분화할 것이며, 정상 환경 하에 다른 세포 유형으로 분화할 수 없거나 덜 분화된 세포 유형으로 돌아갈 수 없는 시점까지 진행된 세포를 말한다. "탈분화"(de-differentiation)는 세포가 세포의 계통 내의 덜 특화된 (또는 결정된) 위치로 되돌아가는 과정을 말한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포의 "계통"은 세포의 유전, 즉, 어느 세포로부터 유래되었는지 그리고 어떤 세포를 발생시킬 수 있는지를 규정한다. 세포의 계통은 세포를 발생과 분화의 유전적 체계 내에 둔다. 계통 특이적 마커는 관심있는 계통의 세포의 표현형과 특이적으로 관련되는 특징을 말하며, 미결정 세포가 관심있는 계통으로 분화하는지를 평가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0026] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "마커"는 관심있는 세포에서 차등적으로 발현되는 핵산 또는 폴리펩티드 분자이다. 이러한 맥락에서, 차등 발현(differential expression)은 미분화 세포에 비교하여 양성 마커에 대한 증가된 수준 및 음성 마커에 대한 감소된 수준을 의미한다. 마커 핵산 또는 폴리펩티드의 검출가능한 수준은 다른 세포에 비하여 관심있는 세포에서 충분히 더 높거나 더 낮음으로써, 관심있는 세포가 당업계에 공지된 다양한 방법 중 어떠한 것을 사용하더라도 다른 세포로부터 확인되어 구별될 수 있도록 한다.
- [0027] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세포는 특정 마커가 그 세포에서 충분히 검출될 때 특정 마커에 "대해 양성"이거나 또는 "양성"이다. 이와 유사하게, 세포는 특정 마커가 그 세포에서 충분히 검출되지 않을 때 특정 마커에 "대해 음성"이거나 또는 "음성"이다. 특히, FACS에 따른 양성은 통상 2% 초과인 반면, FACS에 따른 음성 역치는 통상 1% 미만이다. PCR에 따른 양성은 통상 34회 사이클(Cts) 미만인 반면, PCR에 따른 음성은 통상 34.5 회 사이클 초과이다.
- [0028] 만능 줄기세포를 정지(static) 상태 시험관내 세포 배양물 중에서 기능적 췌장 내분비 세포로의 분화를 복제하고자 하는 시도로, 분화 과정은 흔히 수많은 연속적 단계들을 통한 처리로서 여겨진다. 특히, 분화 과정은 통상적으로 여섯 단계를 통한 처리로서 여겨진다. 이러한 단계적 진행에서, "1기"는 만능 줄기세포에서 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (이하, 대안적으로 "1기 세포"로도 지칭됨)로의 분화인 분화 과정의 제1 단계를 말한다. "2기"는 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (이하, 대안적으로 "2기 세포"로도 지칭됨)로의 분화인 제2 단계를 말한다. "3기"는 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 (이하, 대안적으로 "3기 세포"로도 지칭됨)로의 분화인 제3 단계를 말한다. "4기"는 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포(이하, 대안적으로 "4기 세포"로도 지칭됨)로의 분화인 제4 단계를 말한다. "5기"는 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 췌장 내배엽 세포 및/또는 췌장 내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포(이하, "췌장 내배엽/내분비 전구

세포" 또는 대안적으로 "5기 세포"로도 총칭됨)로의 분화인 제5 단계를 말한다. "6기"은 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 췌장 내분비 세포에서 특징적인 마커를 발현하는 세포 (이하, 대안적으로 "6기 세포"로도 지칭됨)로의 분화를 말한다.

[0029] 그러나, 특정 집단의 모든 세포가 이러한 단계들을 통해 동일한 속도로 진행되지 않는다는 것이 주지되어야 한다. 따라서, 시험관내 세포 배양물 중에서, 특히 후기 분화 단계에서 집단에 존재하는 대다수의 세포보다 분화 경로를 따라 덜 또는 보다 많이 진행된 세포의 존재를 검출하는 것은 드문 일이 아니다. 예를 들어, 5기에서 세포 배양 동안 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커의 출현을 보는 것은 드문 일이 아니다. 본 발명을 설명하기 위한 목적으로, 상기 언급된 단계들과 연관된 각종 세포 유형의 특징이 본 명세서에 기재된다.

[0030] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "완성 내배엽 세포"는 낭배의 외피(epiblast)로 인한 세포의 특징을 갖고 위 장관로 및 이의 유도체를 형성하는 세포를 말한다. 완성 내배엽 세포는 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현한다: FOXA2 (간세포 핵 인자 3-β ("HNF3β")로도 공지됨), GATA4, SOX17, CXCR4, 브라츄리(Brachyury), 세르베루스(Cerberus), OTX2, 구스코이드, C-Kit, CD99 및 MIXL1. 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커는 CXCR4, FOXA2 및 SOX17를 포함한다. 따라서, 완성 내배엽 세포는 이의 CXCR4, FOXA2 및 SOX17의 발현을 특징으로 할 수 있다. 또한, 세포가 1기에서 유지되는 것이 허용되는 시간 길이에 따라서 HNF4 α의 증가가 관찰될 수 있다.

[0031] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "장관 세포"는 폐, 간, 췌장, 위 및 창자와 같은 모든 내배엽 기관을 발생시킬 수 있는 완성 내배엽 세포로부터 유래된 세포를 말한다. 장관 세포는 완성 내배엽 세포에 의해 발현된 HNF4 α보다 사실상 증가된 이의 HNF4 α 발현을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, HNF4 α의 mRNA 발현의 10배 내지 40배 증가가 2기 동안 관찰될 수 있다.

[0032] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "전장 내배엽 세포"는 식도, 폐, 위장, 간, 췌장, 담낭 및 십이지장의 일부분을 발생시킬 수 있는 내배엽 세포를 말한다. 전장 내배엽 세포는 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현한다: PDX1, FOXA2, CDX2, SOX2 및 HNF4 α. 전장 내배엽 세포는 장관 세포와 비교해서 PDX1 발현의 증가를 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 3기 배양에서 50% 초과와 세포가 전형적으로 PDX1을 발현한다.

[0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 전장 전구세포"는 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: PDX1, NKX6.1, HNF6, NGN3, SOX9, PAX4, PAX6, ISL1, 가스트린, FOXA2, PTF1a, PROX1 및 HNF4 α. 췌장 전장 전구세포는 PDX1, NKX6.1 및 SOX9의 발현에 대해 양성인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 내배엽 세포"는 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 말한다: PDX1, NKX6.1, HNF1 β, PTF1 α, HNF6, HNF4 α, SOX9, NGN3; 가스트린 HB9 또는 PROX1. 췌장 내배엽 세포는 이의 사실상 CDX2 또는 SOX2 발현의 결여를 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 내분비 전구세포"는 췌장 호르몬 발현 세포가 될 수 있는 췌장 내배엽 세포를 말한다. 췌장 내분비 전구세포는 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현한다: NGN3; NKX2.2; NeuroD1; ISL1; PAX4; PAX6; 또는 ARX. 췌장 내분비 전구세포는 이의 NKX2.2 및 NeuroD1 발현을 특징으로 할 수 있다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "췌장 내분비 세포"는 하기 호르몬들 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 세포를 말한다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴, 그렐린, 및 췌장 폴리펩티드. 이들 호르몬 외에도, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커는NGN3, NeuroD1, ISL1, PDX1, NKX6.1, PAX4, ARX, NKX2.2 및 PAX6 중 하나 이상을 포함한다. β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 췌장 내분비 세포는 이의 인슐린 및 하기 전사 인자들 중 적어도 하나의 발현을 특징으로 할 수 있다. PDX1, NKX2.2, NKX6.1, NeuroD1, ISL1, HNF3β, MAFA 및 PAX6.

[0037] 본 명세서에서 "d1", "1d" 및 "1일"; "d2", "2d" 및 "2일" 등은 상호교환적으로 사용된다. 이들 수와 문자의 조합은 본 출원의 단계적 분화 프로토콜 동안 상이한 단계에서의 특정 항온처리일을 지칭한다.

[0038] "글루코스"는 본 명세서에서 천연에서 통상 발견되는 당인 텍스트로스를 지칭하기 위해 사용된다.

[0039] "NeuroD1"는 본 명세서에서 췌장 내분비 선조세포에서 발현되는 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 확인하기 위해 사용된다.

[0040] "LDN-193189"는 미국 마이애미 캠프리지 소재의 스템젠트 인코포레이티드(Stemgent, Inc.)로부터 상표명 STEMOLECULE™ 하에 입수가가능한 BMP 수용체 저해제인((6-(4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)-3-(피리딘-4-일)피라졸로[1,5-a]피리딘, 하이드로클로라이드 DM-3189))를 말한다.

[0041] **만능 줄기세포의 특징규명, 공급원, 증폭 및 배양**

[0042] **A. 만능 줄기세포의 특징규명**

[0043] 만능 줄기세포는 단계-특이적 배아 항원(SSEA: stage-specific embryonic antigen) 3 및 4, 및 Tra-1-60 및 Tra-1-81 항체를 사용하여 검출가능한 마커 중 하나 이상을 발현시킬 수 있다(문헌[Thomson *et al.* 1998, *Science* 282:1145-1147]). 시험관 내에서 만능 줄기세포의 분화는 Tra-1-60 및 Tra-1-81 발현의 손실을 야기한다. 미분화된 만능 줄기세포는 전형적으로 알칼리 포스파타제 활성을 가지며, 이 활성은 상기 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정시키고 이어서 제조업자(미국 캘리포니아주 소재의 벡터 레보러토리즈(Vector Laboratories®))에 의해 기재된 바와 같이, 기질로서 VECTOR® Red를 이용하여 발색시킴으로써 검출될 수 있다. 미분화된 만능 줄기세포는 또한 전형적으로 RT-PCR로 검출되는 바와 같이 OCT4 및 TERT를 발현한다.

[0044] 증식된 만능 줄기세포의 다른 바람직한 표현형은 모든 삼배엽층: 내배엽, 중배엽 및 외배엽 조직의 세포로 분화하는 잠재력이다. 줄기세포의 만능성은 예를 들어, 세포를 중증 복합형 면역결핍증(SCID) 마우스에게 주사하고, 형성되는 기형종을 4% 파라포름알데히드를 이용하여 고정하고, 이어서 이러한 삼배엽층으로부터의 세포 유형의 증거에 대해 조직학적으로 검사함으로써 확인할 수 있다. 대안적으로, 만능성은 배양체 (embryoid body)를 형성시키고 삼배엽층과 관련된 마커들의 존재에 대해 이 배양체를 평가함으로써 결정될 수 있다.

[0045] 증식된 만능 줄기세포주는 표준 G-밴딩 기술을 이용하여 핵형을 결정하고 상응하는 영장류 종의 공개된 핵형과 비교할 수 있다. "정상 핵형"을 가진 세포를 수득하는 것이 바람직하며, 이는 세포가 모든 인간 염색체가 존재하며 두드러지게 변경되지 않은 정배수체임을 의미한다.

[0046] **B. 만능 줄기세포의 공급원**

[0047] 사용될 수 있는 만능 줄기세포의 예시적 유형은 전-배아 조직(예를 들어, 배반포), 배아 조직, 또는 임신 동안 임의의 시점에서, 필수적은 아니나 전형적으로 약 10 내지 12주의 임신 전에 취해진 태아 조직을 포함하는 확립된 만능 세포주를 포함한다. 비제한적인 예로는 예를 들어 인간 배아 줄기세포주 H1, H7, 및 H9 (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 와이셀 리서치 인스티튜트(WiCell Research Institute))와 같은 확립된 인간 배아 줄기세포 또는 인간 배아 생식 세포주가 있다. 영양세포(feeder cell)의 부재 하에서 이미 배양된 만능 줄기세포 집단으로부터 취한 세포가 또한 적합하다. OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 및 ZFP42와 같은 다수의 만능성 관련 전사 인자들의 강제 발현을 사용하여 성체 체세포로부터 유도한 유도성 만능 세포(IPS) 또는 재프로그래밍된 만능 세포가 또한 사용될 수 있다(문헌[*Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011, 12:165-185]; 또한 문헌[IPS, *Cell*, 126(4): 663-676] 참조). 본 발명의 방법에서 사용되는 인간 배아 줄기세포는 또한 톰슨(Thomson) 등에 의해 기재된 바와 같이 제조될 수 있다(미국 특허 제5,843,780호 문헌[*Science*, 1998, 282:1145-1147]; 문헌[*Curr Top Dev Biol* 1998, 38:133-165]; 문헌[*Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995, 92:7844-7848]). BG01v (조지아주 애션스 소재의 브레사젠(BresaGen))와 같은 돌연변이 인간 배아 줄기세포주 또는 문헌[Takahashi *et al.*, *Cell* 131: 1-12 (2007)]에 개시된 세포와 같은 성인 체세포로부터 유래된 세포를 사용할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 발명에서 사용하기에 적합한 만능 줄기세포는 문헌[Li *et al.* (*Cell Stem Cell* 4: 16-19, 2009)]; 문헌[Maherali *et al.* (*Cell Stem Cell* 1: 55-70, 2007)]; 문헌[Stadtfeld *et al.* (*Cell Stem Cell* 2: 230-240)]; 문헌[Nakagawa *et al.* (*Nature Biotechnol* 26: 101-106, 2008)]; 문헌[Takahashi *et al.* (*Cell* 131: 861-872, 2007)]; 및 미국 특허출원 공개 제2011/0104805호에 기재된 방법에 따라서 유래될 수 있다. 특정 실시형태에서, 만능 줄기세포는 비-배아 기원의 것일 수 있다. 이들 모든 참조문헌, 특허 및 특허원은 특히 만능 세포의 분리, 배양, 증폭 및 분화에 관한 것인 경우 본 명세서에서 그 전문이 참조로 인용된다.

[0048] **C. 만능 줄기세포의 증폭 및 배양**

[0049] 일 실시형태에서, 만능 줄기세포는 전형적으로 다양한 방식으로 만능 줄기세포를 지지하는 영양세포 층 상에서 배양된다. 대안적으로, 만능 줄기세포는 본질적으로 영양세포가 없지만, 그럼에도 불구하고 사실상 분화를 거치지 않고 만능 줄기세포의 증식을 지지하는 배양 시스템에서 배양된다. 영양세포가 없는 배양에서 분화 없는 만능 줄기세포의 성장은 이미 다른 세포 유형을 이용하여 배양함으로써 조건화된 배지를 이용하여 지지된다. 대안적으로, 영양세포가 없는 배양에서 분화 없는 만능 줄기세포의 성장은 화학적 규명 배지를 이용하여 지지된다.

[0050] 다양한 영양세포 층을 사용하거나 매트릭스 단백질 코팅된 용기를 사용함으로써 배양물 중에서 만능 세포를 용이하게 증폭시킬 수 있다. 대안적으로, 세포의 일상적 증폭을 위해, mTsr®1 배지(캐나다 밴쿠버 소재의 스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies))와 같은 한정 배지와 조합된 화학적으로 한정된 표면을 사용할 수 있다. 만능 세포는 효소적 분해, 기계적 분리 또는 EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산)와 같은 다양한 칼슘 킬레

이터를 이용하여 배양 플레이트로부터 용이하게 제거될 수 있다. 대안적으로, 만능 세포는 임의의 매트릭스 단 백질 또는 영양세포층의 부재 하에 현탁액 중에서 증폭될 수 있다.

[0051] 만능 줄기세포의 많은 상이한 증폭 및 배양 방법을 청구된 본 발명에서 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 문헌[Reubinoff *et al.*, Thompson *et al.*, Richard *et al.*] 및 미국 특허출원 공개 제2002/0072117호의 방법을 사용할 수 있다. 루비노프(Reubinoff) 등(문헌[*Nature Biotechnology* 18: 399-404 (2000)] 및 톰슨(Thompson) 등(문헌[*Science* 282: 1145-1147 (1998)])은 마우스 배아 섬유아세포 영양세포 층을 사용하여 인간 배반포로부터 만능 줄기세포주를 배양하는 것을 개시한다. 리차드(Richards) 등(문헌[*Stem Cells* 21: 546-556, 2003])은 11종의 상이한 인간 성체, 태아 및 신생아 영양세포 층의 패널을 인간 만능 줄기세포 배양을 지지하는 이들의 능력에 대해 평가하였으며, 성체 피부 섬유아세포 영양세포에서 배양된 인간 배아 줄기세포주가 인간 배아 줄기세포 형태를 보유하고 만능성을 유지함을 주목하였다. 미국 특허출원 공개 제2002/0072117호는 영양세포-비함유 배양물에서 영장류 만능 줄기세포의 성장을 지지하는 배지를 생산하는 세포주를 개시하고 있다. 이용된 세포주는 배아 조직으로부터 수득되거나 배아 줄기세포로부터 분화된 중간엽 및 섬유아세포-유사 세포주이다. 미국 특허출원 공개 제2002/072117호는 또한 1차 영양세포 층으로서의 상기 세포주의 용도를 개시하고 있다.

[0052] 만능 줄기세포를 증폭 및 배양하는 다른 적합한 방법은 예를 들어 문헌[Wang *et al.*, Stojkovic *et al.*, Miyamoto *et al.* 및 Amit *et al.*]에 개시되어 있다. 왕(Wang) 등(문헌[*Stem Cells* 23: 1221-1227, 2005])은 인간 배아 줄기세포로부터 유래된 영양세포 층에서 인간 만능 줄기세포를 장기간 성장시키는 방법을 개시하고 있다. 스토이코비치(Stojkovic) 등(문헌[*Stem Cells* 2005 23: 306-314, 2005])은 인간 배아 줄기세포의 자발적 분화로부터 유래된 영양세포 시스템을 개시하고 있다. 미야모토(Miyamoto) 등(문헌[*Stem Cells* 22: 433-440, 2004])은 인간 태반으로부터 수득된 영양세포의 공급원을 개시하고 있다. 아미트(Amit) 등(문헌[*Biol. Reprod* 68: 2150-2156, 2003])은 인간 포피로부터 유래된 영양세포층을 개시한다.

[0053] 다른 실시형태에서, 만능 줄기세포를 증폭 및 분화시키는 다른 적합한 방법은 예를 들어, 인준자(Inzunza) 등, 미국 특허 제6,642,048호, 국제 특허 공개 제 2005/014799호, 쉬(Xu) 등 및 미국 특허출원 공개 제 2007/0010011호에 개시되어 있다. 인준자 등(문헌[*Stem Cells* 23: 544-549, 2005])은 인간 출생후 포피 섬유아세포로부터의 영양세포 층을 개시하고 있다. 미국 특허 제6,642,048호는 영양세포-비함유 배양물에서의 영장류 만능 줄기세포의 성장을 지지하는 배지 및 이러한 배지의 생산에 유용한 세포주를 개시한다. 미국 특허 제 6,642,048호는 배아 조직으로부터 얻어지거나 배아 줄기세포로부터 분화된 중간엽 및 섬유아세포-유사 세포주 뿐만 아니라 이러한 세포주를 유도하는 방법, 배지의 처리 방법 및 이러한 배지를 이용하여 줄기세포를 성장시키는 방법을 개시한다. 국제 특허 공개 제2005/014799호는 포유동물 세포의 유지, 증식 및 분화를 위한 조건화된 배지를 개시한다. 국제 특허 공개 제2005/014799호는 명세서를 통해 생산된 배양 배지가 쥐 세포, 특히 MMH (Met 쥐 간세포)로 명명된 분화된 불멸화된 유전자이식(transgenic) 간세포의 세포 분비 활성에 의해 조건화됨을 보고한다. 쉬 등(문헌[*Stem Cells* 22: 972-980, 2004])은 인간 텔로머라제 역전사효소를 과발현하도록 유전적으로 변형된 인간 배아 줄기세포로부터 수득된 조건화된 배지를 개시한다. 미국 특허출원 공개 제 2007/0010011호는 만능 줄기세포의 유지를 위한 화학적 한정 배양 배지를 개시한다.

[0054] 대안적인 배양 시스템은 배아 줄기세포의 증식을 촉진할 수 있는 성장 인자로 보충된 무-혈청 배지를 이용한다. 이러한 배양 시스템의 예는 천(Cheon) 등, 레벤슈타인(Levenstein) 등 및 미국 특허 공개 제2005/0148070호를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 천 등(문헌[BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870, October 19, 2005])은 배아 줄기세포가 배아 줄기세포의 자가 재생을 유발할 수 있는 상이한 성장 인자가 보충된 비조건화된 혈청 대체물(SR) 배지 중에서 유지되는 무-영양세포, 무-혈청 배양 시스템을 개시한다. 레벤슈타인 등(문헌 [Stem Cells 24: 568-574, 2006])은 bFGF로 보충된 배지를 이용하여 섬유아세포 또는 조건화된 배지의 부재 하에서 인간 배아 줄기세포의 장기간 배양하는 방법을 개시한다. 미국 특허 출원 공개 제 2005/0148070호는 혈청을 함유하지 않고 섬유아세포 영양세포를 함유하지 않는 한정 배지에서 인간 배아 줄기세포를 배양하는 방법을 개시하며, 이 방법은 알부민, 아미노산, 비타민, 미네랄, 적어도 하나의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 적어도 하나의 인슐린 또는 인슐린 대체물을 함유한 배양 배지에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하며, 상기 배양 배지는 본질적으로 포유동물 태아 혈청이 없으며 적어도 약 100 ng/mL의 섬유아세포 성장 인자 신호전달 수용체를 활성화시킬 수 있는 섬유아세포 성장 인자를 함유하며, 여기서 성장 인자는 단지 섬유아세포 영양세포 층 이외의 공급원으로부터 공급되며, 배지는 영양세포 또는 조건화된 배지 없이 미분화된 상태의 줄기세포의 증식을 지지한다.

[0055] 만능 줄기세포를 증폭 및 배양하는 다른 적합한 방법은 미국 특허출원 공개 제 2005/0233446호, 미국 특허 제

6,800,480호, 미국 특허출원 공개 제2005/0244962호 및 국제 특허 공개 제2005/065354호에 개시되어 있다. 미국 특허출원 공개 제2005/0233446호는 미분화된 영장류 원시 줄기세포를 포함하는 줄기세포를 배양하는데 유용한 한정 배지를 개시한다. 용액에서, 배지는 배양되는 줄기세포와 비교할 때 사실상 등장성이다. 정해진 배양에서, 특정 배지는 원시 줄기세포의 미분화 성장을 사실상 지지하는데 필요한 양의 기본 배지 및 각각의 bFGF, 인슐린 및 아스코르브산을 포함한다. 미국 특허 제6,800,480호는 사실상 미분화된 상태의 영장류 유래의 원시 줄기세포를 성장시키기 위한 세포 배양 배지가 제공됨을 보고하며, 이 배지는 영장류 유래의 원시 줄기세포의 성장을 지지하기에 효과적인 낮은 삼투압의 낮은 내독소 기본 배지를 포함한다. 특허 제6,800,480호의 개시내용은 추가로 기본 배지가 영장류 유래의 원시 줄기세포의 성장을 지지하기에 효과적인 영양 혈청과, 영양세포 및 영양세포로부터 유래된 세포의 매트릭스 성분으로 이루어진 균으로부터 선택된 기체와 조합된다고 보고한다. 상기 배지는 또한 비필수 아미노산, 항산화제와, 뉴클레오사이드 및 피루베이트 염으로 이루어진 균으로부터 선택된 제1 성장 인자를 포함한다는 것이 주지된다. 미국 특허출원 공개 제2005/0244962호는, 명세서의 일 태양이 영장류 배아 줄기세포를 배양하는 방법을 제공하고, 배양물 중의 줄기세포가 포유동물 태아 혈청이 본질적으로 없고(바람직하게는 본질적으로 어떠한 동물 혈청도 없고) 단지 섬유아세포 영양세포 층 이외의 공급원으로부터 공급된 섬유아세포 성장 인자의 존재 하에 있음을 보고하고 있다.

[0056] 국제 특허 공개 제2005/065354호는 본질적으로 무-영양세포 및 무혈청의 한정된 등장성 배양 배지를 개시하며, 이 배지는 기본 배지 bFGF; 인슐린 및 아스코르브산을 포함한다. 게다가, 국제 특허 공개 제2005/086845호에는 미분화 줄기세포의 유지 방법이 개시되어 있는데, 상기 방법은 줄기세포를 원하는 결과를 성취하기에 충분한 양의 시간 동안 미분화된 상태로 유지하기에 충분한 양의 형질전환 성장 인자-β (TGF-β) 패밀리의 단백질의 구성원, 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 패밀리의 단백질의 구성원 또는 니코틴아미드 (NIC)에 줄기세포를 노출시키는 것을 포함한다.

[0057] 만능 줄기세포는 적합한 배양 기체 상에 도달될 수 있다. 일 실시형태에서, 적합한 배양 기체는 기저막으로부터 유래된 것들 또는 부착 분자 수용체-리간드 커플링의 일부를 형성할 수 있는 것들과 같은 세포의 매트릭스 성분이다. 일 실시형태에서, 적합한 배양 기체는 매트릭스(MATRIGEL™)(백튼 디켄슨(Becton Dickinson))이다. 매트릭스(MATRIGEL™)은 실온에서 겔화되어 재구성된 기저막을 형성하는 엔젤브레스-홀름-스왐(Engelbreth-Holm Swarm) 종양 세포 유래의 가용성 제제이다.

[0058] 다른 세포의 매트릭스 성분 및 성분 혼합물이 대안으로서 적합하다. 증식될 세포 유형에 따라, 이것은 라미닌, 피브로넥틴, 프로테오글리칸, 엔탁틴, 헤파란 설페이트 등을 단독으로 또는 다양한 조합으로 포함할 수 있다.

[0059] 만능 줄기세포는 적합한 분포로 그리고 세포 생존, 번식 및 바람직한 특징의 유지를 촉진하는 배지의 존재 하에 기체상에 도달될 수 있다. 모든 이러한 특징들은 접종 분포에 세심한 주의를 기울임으로써 이익을 얻으며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 적합한 배양 배지는 예를 들어 하기 성분들로부터 제조될 수 있다: 상표명 Gibco™(제품 번호 11965-092) 하에 라이프 테크놀로지스 코포레이션(뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에 의해 시판되는 돌베코 변형 이글 배지(DMEM); 상표명 Gibco™(제품 번호 10829-018) 하에 라이프 테크놀로지스 코포레이션(뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에 의해 시판되는 녹아웃(Knockout) 돌베코 변형 이글 배지(KO DMEM); 햄(Ham's) F12/50% DMEM 기본 배지 상표명 Gibco™(제품 번호 15039-027) 하에 라이프 테크놀로지스 코포레이션(뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에 의해 시판되는 200 mM L-글루타민 상표명 Gibco™(제품 번호 11140-050) 하에 라이프 테크놀로지스 코포레이션(뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에 의해 시판되는 비필수 아미노산 용액 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치 컴퍼니 엘엘씨(Sigma-Aldrich Company, LLC)에 의해 시판되는 β-머캅토에탄올(제품 번호 M7522); 및 상표명 Gibco™(제품 번호 13256-029) 하에 라이프 테크놀로지스 코포레이션(뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에 의해 시판되는 인간 재조합 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF).

[0060] **만능 줄기세포의 분화**

[0061] 만능 세포가 β 세포로 분화되는 동안, 이들은 각각이 특정 마커의 존재 또는 부재를 특징으로 할 수 있는 다양한 단계들을 거쳐 분화된다. 세포의 이들 단계로의 분화는 배양 배지에 첨가되는 특정 인자의 존재 또는 결여를 포함하는 특수한 배양 조건에 의해 달성된다. 일반적으로, 이러한 분화는 만능 줄기세포의 완성 내배엽 세포로의 분화를 수반할 수 있다. 이어서 이들 완성 내배엽 세포는 장관 세포로 추가 분화될 수 있고 이는 이어서 전장 내배엽 세포로 분화될 수 있다. 전장 내배엽 세포는 췌장 전장 전구세포로 분화될 수 있고, 이는 다시 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 전구세포 또는 둘 모두로 분화될 수 있다. 이어서, 이들 세포는 췌장 호르몬 생산 세포(예를 들어, β 세포)로 분화될 수 있다.

[0062] 본 발명은 갑상선 호르몬(예를 들어, T3, T3 유사체, T4, T4 유사체 또는 이들의 조합(본 명세서에서 "T3/T4"로

서 총칭됨)) 및 ALK5 저해제를 사용하는 만능 줄기세포의 체장 내분비 세포로의 단계적 분화를 제공한다. 본 발명은 또한 갑상선 호르몬(예를 들어, T3/T4) 또는 ALK5 저해제를 사용하는 만능 줄기세포의 체장 내분비 세포로의 단계적 분화를 제공한다. 적합한 갑상선 호르몬 유사체는 다음을 포함할 수 있다: 알&디 시스템스 인코퍼레이티드(R & D Systems, Inc.)로부터 입수가 가능한 GC-1(소베르티롬(Sobertiro)), 카탈로그# 4554; DITPA(3,5-디요오도티아프로피온산); 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[PLoS One, 2010, 5e8722] 및 문헌[J. Lipid Res. 2009, 50: 938-944]; 및 문헌[PLoS One, 2010 e8722 and Endocr. Pract. 2012, 18(6): 954-964, 이의 개시 내용은 그 전문이 본 명세서에서 참조로 인용된다]에 논의된 GC-24. 유용한 ALK5 저해제는 다음을 포함한다: ALK5 저해제 II (뉴욕주 파밍데일 소재의 엔조(Enzo)); ALK5i (캘리포니아주 샌 디에고 소재의 악소라(Axxora)); SD208 (알& 디 시스템즈(미네소타주)); TGF-B 저해제 SB431542 (엑세스 바이오사이언시즈(Xcess Biosciences)(캘리포니아주 샌 디에고)); ITD-1 (엑세스 바이오사이언시즈(캘리포니아주 샌 디에고)); LY2109761 (엑세스 바이오사이언시즈(캘리포니아주 샌 디에고)); A83-01 (엑세스 바이오사이언시즈(캘리포니아주 샌 디에고)); LY2157299 (엑세스 바이오사이언시즈(캘리포니아주 샌 디에고)); TGF-β 수용체 저해제 V (이엠디 케미칼스(EMD Chemicals), 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 I (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 IV (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 VII (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 VIII (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 II (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 VI (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운); TGF-β 수용체 저해제 III (이엠디 케미칼스, 뉴저지주 깁스타운).

[0063] 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 만능 줄기세포의 분화

[0064] 만능 줄기세포의 특징은 당업자에게 널리 공지되어 있으며, 만능 줄기세포의 추가의 특징은 계속 확인되고 있다. 만능 줄기세포 마커는 예를 들어, 다음 중 하나 이상의 발현을 포함한다: ABCG2; 크립토(cripto); FOXD3; CONNEXIN43; CONNEXIN45; OCT4; SOX2; NANOG; hTERT; UTF1; ZFP42; SSEA-3; SSEA-4; TRA-1-60; 및 TRA-1-81.

[0065] 예시적 만능 줄기세포는 인간 배아 줄기세포주 H9 (NIH 코드: WA09), 인간 배아 줄기세포주 H1 (NIH 코드: WA01), 인간 배아 줄기세포주 H7(NIH 코드: WA07) 및 인간 배아 줄기세포주 SA002(스웨덴 소재의 셀라르티스(Cellartis))를 포함한다. 또한, 만능 세포의 특징적인 하기 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 적합하다: ABCG2, 크립토, CD9, FOXD3, CONNEXIN43, CONNEXIN45, OCT4, SOX2, NANOG, hTERT, UTF1, ZFP42, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 및 TRA-1-81.

[0066] 또한 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에서 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 실시형태에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 원시전조 전구세포이다. 대안적 실시형태에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 중내배엽 세포이다. 대안적 실시형태에서, 완성 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 완성 내배엽 세포이다.

[0067] 또한, 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 세포가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일 실시형태에서, 체장 내배엽 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 체장 내배엽 세포이며, 여기서 PDX1 및 NKX6.1의 발현은 CDX2 및 SOX2의 발현보다 사실상 더 높다. PDX1 및 NKX6.1의 발현이 CDX2 또는 SOX2의 발현보다 적어도 2배 높은 세포가 특히 유용하다.

[0068] 일 실시형태에서, 하기 호르몬들 중 적어도 하나를 발현할 수 있는 체장 내분비 세포가 생성된다: 인슐린, 글루카곤, 소마토스타틴 또는 체장 폴리펩티드. 체장 내분비 계통의 특징적인 마커들 중 적어도 하나를 발현하는 전구세포가 본 발명에서 사용하기에 또한 적합하다. 본 발명의 일 실시형태에서, 체장 내분비 계통의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 체장 내분비 세포이다. 바람직한 실시형태에서, 체장 내분비 세포는 인슐린-생산 β 세포이다.

[0069] 본 발명의 특정 실시형태에서, 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에 도달하기 위해, 만능 줄기세포 또는 유도성 만능 세포, 바람직하게는 만능 줄기세포로 시작하는 프로토콜을 이용한다. 상기 프로토콜은 하기 단계들을 포함한다:

[0070] 1기: 세포 배양주로부터 수득된 배아 줄기세포와 같은 만능 줄기세포를 적절한 인자로 처리하여 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도한다.

- [0071] 2기: 1기로부터 생성된 세포를 적절한 인자로 처리하여 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다.
- [0072] 3기: 2기로부터 생성된 세포를 적절한 인자로 처리하여 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다.
- [0073] 4기: 3기로부터 생성된 세포를 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도하기에 적절한 인자(특정 실시형태에서 T3/T4를 포함)로 처리한다.
- [0074] 5기: 4기로부터 생성된 세포를 적절한 인자(특정 실시형태에서, (i) T3/T4; (ii) ALK5 저해제 또는 (iii) T3/T4와 ALK 5 저해제 둘 모두)로 처리하여 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다.
- [0075] 6기: 5기로부터 생성된 세포를 적절한 인자(특정 실시형태에서, T3/T4, ALK5 저해제 또는 둘 모두를 포함)로 처리하여 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 추가 분화를 유도한다.
- [0076] 본 발명은 특정 실시형태에서 만능 줄기세포를 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 포함하나, 본 발명은 다른 중간 단계로부터 생성된 세포를 췌장 내분비 세포로 분화시키는 것도 포함한다. 특히, 본 발명은 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 포함한다. 게다가, 본 과정은 별개의 단계로 기재되며, 처리 뿐만 아니라 분화 과정을 통한 세포의 진행은 순차적이거나 연속적일 수 있다.
- [0077] 배양되거나 단리된 세포에서 단백질 및 핵산 마커의 발현을 평가하는 방법은 당업계에서의 표준이다. 이러한 방법들은 RT-PCR, 노던 블롯, 원위치(*in situ*) 하이브리드화(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 2001 supplement)]참고) 및 면역검정법(예를 들어, 절단된 재료의 면역조직화학적 분석, 웨스턴 블롯팅 및 온전한 세포에서 접근가능한 마커의 경우 FACS) (예를 들어, 문헌[Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)]참고)을 포함한다. 또한, 분화 효율은 관심대상의 세포 유형의 특징적인 마커를 발현하는 세포에 의해 발현되는 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제(예를 들어, 항체)에 처리 세포 집단을 노출시킴으로써 결정할 수 있다.
- [0078] 분화된 세포는 추가 정제할 수도 있다. 예를 들어, 만능 줄기세포를 본 발명의 방법으로 처리한 후, 정제될 분화된 세포에 의해 특징적으로 발현된 단백질 마커를 특이적으로 인식하는 제제(예를 들어, 항체)에 처리된 세포 집단을 노출시켜 분화된 세포를 정제할 수 있다.
- [0079] 1기: 만능 줄기세포의 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화
- [0080] 만능 줄기세포는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 또는 본 발명에서 제안된 임의의 방법에 의해 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킬 수 있다. 만능 줄기세포를 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 적합한 방법은 하기에 개시되어 있다: 미국 특허출원 공개 제 2007/0254359호 미국 특허출원 공개 제 2009/0170198호 미국 특허출원 공개 제 2009/0170198호 미국 특허출원 공개 제 2011/0091971호 미국 특허출원 공개 제 2010/0015711호 미국 특허출원 공개 제 2010/0015711호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190111호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190112호 미국 특허출원 공개 제 2012/0196365호 미국 특허출원 공개 제 20100015711호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190111호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190112호 미국 특허출원 공개 제 2012/0196365호 미국 특허출원 공개 제 20100015711호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190111호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190112호 미국 특허출원 공개 제 2012/0196365호 미국 특허출원 공개 제 20100015711호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190111호 미국 특허출원 공개 제 2012/0190112호 미국 특허출원 공개 제 2012/0196365호 미국 특허출원 제 61/076,900호 미국 특허출원 제 61/076,908호 및 미국 특허출원 제 61/076,915호(이들은 만능 줄기세포 및 만능 줄기세포에서 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화에 관한 것인 경우 그 전문이 참조로 인용된다).
- [0081] 본 발명의 일 실시형태에서, 만능 줄기세포를 액티빈 A 및 Wnt3A가 보충된 배지로 처리하여 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생성시킨다. 처리는 만능 줄기세포를 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 A를 함유하는 배지와 접촉시키는 것을 포함한다. 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 이들의 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 촉진하기 위해 약 2일 내지 5일, 바람직하게는 2일 내지 3일 동안

배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 만능 세포를 1일 동안 액티빈 A 및 Wnt3A의 존재 하에 배양한 다음, 액티빈 A (Wnt3A 존재 없이)의 존재 하에 배양한다.

[0082] 본 발명의 다른 실시형태에서, 만능 줄기세포는 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화를 유도하기 위해 성장 분화 인자 8 ("GDF8") 및 글리코겐 신타제 키나제-3  $\beta$  ("GSK3 $\beta$ ") 저해제(예를 들어, 미국 특허출원 공개 제2010/0015711에 기재된 사이클릭 아닐린-피리디노트리아진 화합물 이는 전문이 본 명세서에서 참조로 인용된다)가 보충된 배지로 처리한다. 바람직한 GSK3 $\beta$  저해제는 본 명세서에서 "MCX 화합물"로서 지칭되는 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-온이다. 처리는 만능 줄기세포를 약 50 ng/ml 내지 약 150 ng/ml, 대안적으로 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml, 대안적으로 약 100 ng/ml의 GDF8가 보충된 배지와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 처리는 또한 세포를 약 0.1 to 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 이들의 완성 내배엽 세포로의 분화를 촉진하기 위해 약 2일 내지 5일, 바람직하게는 약 3일 내지 4일 동안 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 만능 세포를 GDF8 및 MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양한 다음, GDF8과 낮은 농도의 MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양한 다음, GDF8의 존재 하에 MCX 화합물의 부재하에 1일 동안 배양한다. 특히, 세포를 GDF8과 약 1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양한 다음, GDF8과 약 0.1  $\mu$ M의 MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양한 다음, GDF8의 존재 하에 MCX 화합물의 부재 하에 1일 동안 배양할 수 있다. 대안적 실시형태에서, 세포를 GDF8과 약 1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양한 다음, GDF8과 약 0.1  $\mu$ M MCX 화합물의 존재 하에 1일 동안 배양할 수 있다.

[0083] 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 생성은 특정 프로토콜을 따르기 전과 후의 마커의 존재에 대해 시험함으로써 결정할 수 있다. 만능 줄기세포는 전형적으로 이러한 마커를 발현하지 않는다. 따라서, 만능 세포의 분화는 이 세포가 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하기 시작할 때 검출할 수 있다.

[0084] 2기: 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화

[0085] 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가 분화될 수 있다. 일 실시형태에서, 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성은 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 섬유아세포 증식인자("FGF")7 또는 FGF10을 함유하는 배지와 함께 배양하여 이들 세포를 분화시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 배양 배지는 약 25 ng/ml 내지 약 75 ng/ml, 대안적으로 약 30 ng/ml 내지 약 60 ng/ml, 대안적으로 약 50 ng/ml의 FGF7 또는 FGF10, 바람직하게는 FGF7를 포함할 수 있다. 세포는 이러한 조건들하에 약 2일 내지 3일, 바람직하게는 약 2일 동안 배양할 수 있다.

[0086] 다른 실시형태에서, 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화는 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 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, 대안적으로 약 0.25 mM의 아스코르브산을 포함할 수 있다. 배양 배지는 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 FGF7 또는 FGF10, 바람직하게는 FGF7을 포함할 수 있다. 예를 들어, 배양 배지는 약 0.25 mM의 아스코르브산 및 약 25 ng/ml의 FGF-7을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 2일 동안 FGF7 및 아스코르브산으로 처리한다.

[0087] 3기: 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화

[0088] 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 추가 분화될 수 있다. 일 실시형태에서 2기 세포는 이들 세포를 스무스드(Smoothened; "SMO") 수용체 저해제 (예를 들어, 사이클로파민 또는 MRT10 (N-[[[3-벤조일아미노]페닐]아미노]티옥소메틸]-3,4,5-트리메톡시벤즈아미드) 또는 소닉 헤지호그(Sonic Hedgehog; "SHH") 신호전달 경로 길항제(예를 들어, 스무스드 길항제 1("SANT-1") ((E)-4-벤질-N-((3,5-디메틸-1-페닐-1H-피라졸-4-일) 메틸렌-피페라진-1-아민)) 또는 헤지호그 경로 경로 저해제 1("HPI-1") (2-메톡시에틸 1,4,5,6,7,8-헥사하이드로-4-(3-하이드록시페닐)-7-(2-메톡시페닐)-2-메틸-5-옥소-3-퀴놀린카복실레이트), 레티노산 및 노긴(Noggin)이 보충된 배양 배지에서 배양함으로써 3기 세포로 추가 분화시킨다. 대안적으로, 배지는 SMO 저해제, SHH 신호전달 경로 길항제, 레티노산 및 노긴으로 보충될 수 있다. 상기 세포는 대략 2일 내지 4일, 바람직하게는 약 2일 동안 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 배지는 약 0.1  $\mu$ M 내지 약 0.3  $\mu$ M의 SANT-1, 약 0.5  $\mu$ M 내지 약 3  $\mu$ M의 레티노산 및 약 75 ng/ml 내지 약 125 ng/ml의 노

긴으로 보충된다. 다른 실시형태에서, 배지는 약 0.25  $\mu\text{M}$ 의 SANT-1, 약 2  $\mu\text{M}$ 의 레티노산 및 약 100 ng/ml의 노긴으로 보충된다.

[0089] 대안적 실시형태에서, 2기 세포는 이 2기 세포를 FGF7 또는 FGF10, 레티노산, SMO 수용체 저해제(예를 들어, MRT10 또는 사이클로파민) 또는 SHH 신호전달 경로 길항제(예를 들어, SANT-1 또는 HPI-1), 단백질 키나제 C ("PKC") 활성화제(예를 들어, ((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-2,4-펜타디에노일아미노)벤조락탐)("TPB"); 뉴저지주 깁스타운 소재의 이엠디 케미칼스 인코포레이티드(EMD Chemicals Inc.)), 포르볼-12,13-디부티레이트("PDBu"), 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트("PMA") 또는 인돌라탐 V ("ILV"), 골 형성 단백질(bone morphogenic protein; "BMP") 저해제(예를 들어, LDN-193189, 노긴 또는 코딘(Chordin)) 및 아스코르브산이 보충된 배지로 처리함으로써 3기 세포로 추가 분화된다. 다른 실시형태에서, 배지는 FGF7 또는 FGF10, 레티노산, SMO 저해제, SHH 신호전달 경로 길항제(예를 들어, SANT-1), PKC 활성화제(예를 들어, TPB), BMP 저해제(예를 들어, LDN-193189) 및 아스코르브산으로 보충될 수 있다. 세포는 이러한 성장 인자, 소분자 작용제 및 길항제의 존재 하에 약 2일 내지 3일 동안 배양할 수 있다.

[0090] 일 실시형태에서, 배지는 약 15 ng/ml 내지 약 35 ng/ml의 FGF7, 약 0.5  $\mu\text{M}$  내지 약 2  $\mu\text{M}$ 의 레티노산, 약 0.1  $\mu\text{M}$  내지 약 0.4  $\mu\text{M}$ 의 SANT-1, 약 100 nM 내지 약 300 nM의 TPB, 약 50 nM 내지 약 200 nM의 LDN-193189 및 약 0.15 mM 내지 약 0.35 mM의 아스코르브산으로 보충된다. 다른 실시형태에서, 배지에는 약 25 ng/ml의 FGF7, 약 1  $\mu\text{M}$ 의 레티노산, 약 0.25  $\mu\text{M}$ 의 SANT-1, 약 200 nM의 TPB, 약 100 nM의 LDN-193189 및 약 0.25 mM의 아스코르브산이 보충된다.

[0091] 4기 내지 6기: 갑상선 호르몬 T3/T4 또는 ALK5 저해제, 또는 T3/T4와 ALK5 저해제 둘 모두가 보충된 배양 배지로의 처리에 의한 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포에서 췌장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로의 분화

[0092] 본 발명은 갑상선 호르몬 T3/T4 또는 ALK5 저해제 또는 T3/T4 및 ALK5 저해제 둘 모두가 보충된 배양 배지로의 처리에 의한 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 추가 분화를 제공한다. 일부 실시형태에서, 본 발명은 4기 내지 6기 중 하나 이상에서 (a) T3, (b) ALK5 저해제 또는 (c) T3 및 ALK5 저해제가 보충된 배양 배지로 처리하는 것에 의한 4기 내지 6기에서 이러한 세포의 추가 분화를 제공한다.

[0093] 일 실시형태에서, 본 발명은 만능 줄기세포로부터 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생산하는 방법을 제공하며, 이는 다음을 포함한다:

- [0094] a. 만능 줄기세포를 배양하는 단계
- [0095] b. 만능 줄기세포를 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계 및
- [0096] c. 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 (i) T3/T4, (ii) ALK5 저해제 또는 (iii) T3/T4와 ALK5 저해제 둘 모두가 보충된 배지로 처리하여 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계.

[0097] 일 실시형태에서, 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는  $\beta$  세포이다. 다른 실시형태에서, 생성된 세포는 NKX6.1, PDX1 및 HB-9에 대해 양성이다. 본 방법은 NKX6.1 양성 췌장 내배엽 전구세포에서 HB9 양성 세포의 수를 향상시킬 수 있다. 본 방법은 또한 NKX2.2 또는 SOX2 또는 둘 모두의 발현 뿐만 아니라 알부민 발현을 감소시킬 수 있다. 본 방법은 또한 T3/T4가 보충된 배지에서 췌장 내배엽/내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 배양함으로써  $\beta$  세포를 포함하는 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 제공할 수 있다. 만능 줄기세포로부터 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생산하는 방법은 표 I 내지 III에 제시되었거나 본 명세서에 기재된 배양 조건을 이용할 수 있다. 일 실시형태에서, ALK 5 저해제는 SD208 (2-(5-클로로-2-플루오로페닐)프테리딘-4-일)피리딘-4-일-아민)이다. 다른 실시형태에서, ALK5 저해제 II ((2-(3-(6-메틸피리딘-2-일)-1H-피라졸-4-일)-1,5-나프티리딘), ALX-270-445, 엔조(ENZO), 뉴욕주 파밍데일 소재)도 또한 사용될 수 있다.

[0098] 4기 내지 6기에서 세포를 T3/T4, ALK5 저해제 또는 둘 모두가 보충된 배양 배지로 처리하는 것은 몇가지 장점을 제공한다. 예를 들어, 4기 내지 6기에서 갑상선 호르몬의 첨가는 글루카곤, 소마토스타틴 및 그렐린을 현저하게 하향조절하는 한편, 5기에서는 인슐린 발현을 중간정도로 증가시킨다. 4기 내지 6기에서 T3/T4의 첨가는 또한 NKX6.1 및 PDX1 발현에 영향을 주지 않으면서 NKX2.2 발현을 현저하게 감소시키는 것으로 보인다. 게다가, 4기 내지 6기에서 T3/T4 첨가는 CDX2 (창자 마커) 발현에 영향을 주지 않으면서 SOX2 (위 마커) 및 알부민(간 마커) 발현을 억제한다. 또한, 미처리된 대조군과 비교하여, 4기에서 T3 처리는 6기에서 HB9 양성 세포의 수를

증가시킨다. 게다가, T3 처리는 HB9를 발현하는 NKX6.1 양성 세포의 수를 증가시켰다. ALK5 저해제와 T3/T4 둘 모두에 대한 연장된 노출은 NKX6.1의 강력한 발현을 유지하면서 HB9 발현을 현저하게 향상시키는 것으로 보인다. 배양 배지 중에 T3/T4의 포함은 NKX6.1 양성 체장 내배엽 전구세포에서 용량 의존적 방식으로 HB9 양성 세포의 수를 현저하게 향상시키는 것으로 보인다.

[0099] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명은 적어도 갑상선 호르몬 T3/T4이 보충된 배지로 처리함으로써, 4기 내지 6기에 제공된 분화된 세포에서 글루카곤, 소마토스타틴 및 그렐린을 하향조절하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 적어도 갑상선 호르몬 T3/T4가 보충된 배지로 처리함으로써, NKX6.1 및 PDX1을 발현하는 4기 내지 6기에서 제공된 분화된 세포에서 NKX 2.2 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 갑상선 호르몬 T3/T4 및 임의로 ALK5 저해제를 함유한 배지에서 배양함으로써 HB9를 발현하는 NKX6.1 양성 세포를 증가시키는 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 방법은 표 I 내지 III에 제시된 배양 조건을 사용한다.

[0100] 본 발명의 일 실시형태는 갑상선 호르몬T3/T4, ALK5 저해제 또는 둘 모두(예를 들어, T3 및 ALK5 저해제)가 보충된 배지로 처리함으로써 전장 내배엽의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 포함하는 β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 형성 방법이다. 생성된 세포는 NKX6.1, PDX1 및 Hb-9에 대해 양성이다. 본 방법을 사용하여 NKX6.1 양성 체장 내배엽 전구세포에서 HB9 양성 세포의 수를 향상시킬 수 있다. 본 방법을 또한 사용하여 NKX2.2의 발현을 감소시킬 수 있다. 추가로, 본 방법을 사용하여 SOX2 및 알부민 발현을 억제할 수 있다. 갑상선 호르몬은 T3일 수 있다. 또한 본 방법을 사용하여, HB9 발현을 T3 및 ALK5 저해제가 보충된 배지로 배양되지 않은 세포와 비교하여 향상시킬 수 있다. 게다가, 본 방법은 체장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3/T4가 보충된 배지에서 배양함으로써 T3/T4가 보충된 배지에서 β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 형성시키는 것을 포함한다. 본 방법은 표 I 내지 III에 제시되었거나 본 명세서에 기재된 배양 조건을 이용할 수 있다.

[0101] 본 발명의 또 다른 실시형태는 체장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포, 체장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 또는 체장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3/T4 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양함으로써 상기 세포에서 글루카곤, 소마토스타틴 및 그렐린을 하향조절하는 방법이다. 배지는 SMO 저해제, SHH 신호전달 경로 길항제(예를 들어, SANT-1), 레티노산 및 아스코르브산으로 추가 보충될 수 있다. 대안적으로, 배지는 SMO 저해제, SHH 신호전달 경로 길항제 또는 레티노산 및 아스코르브산으로 추가 보충될 수 있다. 배지는 특히 4기에서 사용되는 경우, 바람직하게는 FGF7로 보충될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 방법은 표 I 내지 III에 제시되었거나 본 명세서에 기재된 배양 조건을 이용한다.

[0102] 구체적으로, 특정 실시형태에서, 세포는 4기 내지 6기에서(즉, 4기 및 5기 및 6기에서, 또는 4기 및 5기에서, 또는 5기 및 6기에서, 또는 4기 및 6기에서) 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 예시적 배양 조건을 나타내는 하기 표 I에 개요된 바와 같이 처리될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나의 단계(예를 들어, 4기)에서의 임의의 하나의 처리는 다른 단계(예를 들어, 5기)에서의 임의의 하나의 처리와 병용될 수 있다.

[0103] 대안적 실시형태에서, 본 발명은 만능 줄기세포로부터 유래된 세포를 체장 내분비 β 세포의 특징적인 마커 뿐만 아니라 PDX1, NKX6.1 및 HB9를 발현하는 세포로 분화시키기 위한 시험관내 세포 배양물을 제공한다. 세포 배양물은 배양 용기, 분화 배지 및 만능 줄기세포로부터 유래된 분화된 세포 집단을 포함한다. 세포 배양물은 분화된 세포 집단의 적어도 10%가 PDX1, NKX6.1 및 HB9를 발현하는 분화된 세포 집단을 제공한다. 상기 세포 배양물에서 유용한 배지는 표 I 내지 III에 제시되어 있으며 바람직하게는 T3/T4 또는 ALK5 저해제 또는 둘 모두를 함유한다.

[0104] [표 1]

본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 예시적 배양 조건

	4 기	5 기	6 기
다음의 처리	3 기 세포	4 기 세포	5 기 세포
적어도 다음으로 처리	T3	ALK5 저해제 + T3	T3
	T3	ALK5 저해제 + T3	ALK5 저해제 + T3
	T3	T3	T3
다른 임의의 성분	다음 중 하나 이상: SANT-1 레티노산 아스코르브산 FGF7 BMP 수용체 저해제 (예를 들어, LDN-193189) PKC 활성화제 (예를 들어, TPB)	다음 중 하나 이상: SANT-1 레티노산 아스코르브산	다음 중 하나 이상: SANT-1 레티노산 아스코르브산
처리 기간	약 2 내지 4 일, 바람직하게는 약 3 일	약 2 내지 4 일, 바람직하게는 약 3 일	약 2 내지 4 일, 바람직하게는 약 3 일

[0105]

[0106]

T3이 일반적으로 바람직하지만, T3 대신에 다른 갑상선 호르몬을 사용할 수 있다. 특히, T3 대신에 T4 뿐만 아니라 T3 및 T4의 적합한 유사체를 사용할 수 있다. 적합한 갑상선 호르몬 유사체는 다음을 포함할 수 있다: 알 & 디 시스템즈 인코포레이티드(R & D Systems, Inc.)로부터 입수가 가능한 GC-1(Sobertrome), 카탈로그 # 4554; DITPA (3,5-디요오도타이로프로피온산); 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[PLoS One, 2010, 5e8722] 및 문헌[J. Lipid Res. 2009, 50: 938-944]에 논의된 T0681; 및 문헌[PLoS One, 2010 e8722] 및 문헌[Endocr. Pract. 2012, 18(6): 954-964, 이의 개시내용은 그 전문이 본 명세서에서 참조로 인용된다]에 논의된 GC-24. T3, ALK5 저해제, SANT-1, 레티노산, 아스코르브산, FGF7, LDN-193189 및 TPB의 양은 각 단계에서 달라질 수 있다. 이들 성분의 예시적인 적합 범위는 하기 표 II에 제시되어 있다.

[0107]

[표 11]

본 발명의 방법에서 사용하기에 적합한 배양 성분의 예시적 양

성분	예시적 적합 양	대안적으로
T3	약 0 내지 1,000 nM	약 1 내지 약 1000 nM, 약 10 내지 약 900 nM, 약 100 내지 약 800 nM, 약 200 내지 약 700 nM, 약 300 내지 약 600 nM, 약 400 내지 약 500 nM, 약 1 내지 약 500 nM, 약 1 내지 약 100 nM, 약 100 내지 약 1000 nM, 약 500 내지 약 1000 nM, 약 100 nM, 약 500 nM, 또는 약 1 μM
ALK5 저해제	약 250 nM 내지 약 2 μM	약 300 내지 약 2000 nM, 약 400 내지 약 2000 nM, 약 500 내지 약 2000 nM, 약 600 내지 약 2000 nM, 약 700 내지 약 2000 nM, 약 800 내지 약 2000 nM, 약 1000 내지 약 2000 nM, 약 1500 내지 약 2000 nM, 약 250 내지 약 1000 nM, 약 250 내지 약 500 nM, 약 300 내지 약 1000 nM, 약 400 내지 약 1000 nM, 약 500 내지 약 1000 nM, 약 600 내지 약 1000 nM, 약 700 내지 약 1000 nM, 약 800 내지 약 1000 nM, 약 100 nM, 약 500 nM 또는 약 1 μM
SANT-1	약 0.1 μM 내지 약 0.3 μM	약 0.25 μM
레티노산	3 기의 경우 약 100 내지 2000 nM 4 기, 5 기 및 6 기의 경우 약 25 nM 내지 약 150 nM	3 기의 경우 약 200-1800, 약 300-1700, 약 400-1500, 약 500-1500, 약 500-1000 nM 4 기, 5 기 및 6 기의 경우 약 25nM 내지 약 100 nM, 약 50 nM 내지 약 150 nM, 약 50 nM 내지 약 100 nM, 약 25 nM, 약 50 nM 또는 약 100 nM

[0108]

성분	예시적 적합 양	대안적으로
아스코르브산	약 0.1 내지 약 0.4 mM	약 0.1 내지 약 0.3 mM, 약 0.1 내지 약 0.25 mM, 약 0.1 내지 약 0.2 mM, 약 0.1 내지 약 0.15 mM, 약 0.15 내지 약 0.4 mM, 약 0.2 내지 약 0.4 mM, 약 0.25 내지 약 0.4 mM, 약 0.3 내지 약 0.4 mM, 약 0.1 mM, 약 0.2 mM, 약 0.3mM, 약 0.4 mM 또는 약 0.25 mM
FGF7	약 2 내지 약 35 ng/ml	약 2 내지 약 30 ng/ml, 약 5 내지 약 25 ng/ml, 약 10 내지 약 20 ng/ml, 약 2 내지 약 25 ng/ml, 약 2 내지 약 20 ng/ml, 약 2 내지 약 15 ng/ml, 약 2 내지 약 10 ng/ml, 약 2 내지 약 5 ng/ml, 약 5 내지 약 35 ng/ml, 약 10 내지 약 35 ng/ml, 약 15 내지 약 35 ng/ml, 약 20 내지 약 35 ng/ml, 약 25 내지 약 35 ng/ml, 약 30 내지 약 35 ng/ml, 약 2 ng/ml, 약 5 ng/ml, 약 10 ng/ml, 약 15 ng/ml, 약 20 ng/ml 약 25 ng/ml, 약 30 ng/ml 또는 약 35 ng/ml
BMP 수용체 저해제 (예를 들어, LDN)	약 50 내지 약 150 nM	약 50 내지 약 140 nM, 약 50 내지 약 130 nM, 약 50 내지 약 120 nM, 약 50 내지 약 110 nM, 약 50 내지 약 100 nM, 약 50 내지 약 90 nM, 약 50 내지 약 80 nM, 약 60 내지 약 150 nM, 약 70 내지 약 150 nM, 약 80 내지 약 150 nM, 약 90 내지 약 150 nM, 약 100 내지 약 150 nM, 약 80 내지 약 120 nM, 약 90 내지 약 110 nM, 약 50 nM, 약 100 nM 또는 약 150 nM.
PKC 활성화제 (예를 들어,	약 50 내지 약 150 nM	약 50 내지 약 140 nM, 약 50 내지 약

[0109]

성분	예시적 적합 양	대안적으로
TPB)		130 nM, 약 50 내지 약 120 nM, 약 50 내지 약 110 nM, 약 50 내지 약 100 nM, 약 50 내지 약 90 nM, 약 50 내지 약 80 nM, 약 60 내지 약 150 nM, 약 70 내지 약 150 nM, 약 80 내지 약 150 nM, 약 90 내지 약 150 nM, 약 100 내지 약 150 nM, 약 80 내지 약 120 nM, 약 90 내지 약 110 nM, 약 50 nM, 약 100 nM 또는 약 150 nM.

[0110]

- [0111] 일 실시형태에서, 본 발명의 방법은 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 SANT-1, 레티노산 ("RA"), FGF7, LDN-193189, 아스코르브산 및 TPB가 보충된 배지로 약 2일 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 처리하여, 이를 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 포함한다. 특히, 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 100 nM TPB가 보충된 배지로 3일 동안 처리될 수 있다. 일 실시형태에서, 배지는 약 1  $\mu$ M의 T3과 같은 T3으로 추가 보충된다. 다른 실시형태에서, 배지는 약 1  $\mu$ M의 ALK5 저해제와 같은 ALK5 저해제로 보충될 수 있다.
- [0112] 대안적 실시형태에서, 본 발명의 방법은 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 SANT-1, RA, 아스코르브산 및 ALK5 저해제가 보충된 배지로 약 2일 내지 3일 동안 처리하여 상기 세포를 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 배지는 T3으로 추가 보충될 수 있다. 일 실시형태에서, 4기 세포는 이 세포를 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산 및 약 500 nM ALK5 저해제가 보충된 배지로 처리함으로써 5기 세포로 분화시킨다. 다른 실시형태에서, 4기 세포는 이 세포를 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 1  $\mu$ M ALK5 저해제 및 0 내지 1000 (예를 들어, 100) nM T3/T4이 보충된 배지로 약 2일 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 처리함으로써 5기 세포로 추가 분화시킨다. 일 실시형태에서, 본 발명의 실시형태에 따라 유도된 4기 세포는 이 용되어 5기 세포로 분화되는 한편, 다른 실시형태에서는 다른 프로토콜에 따라 유도된 4기 세포를 이용할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 일 실시형태에서, 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포는 이를 SANT-1, RA, 아스코르브산 및 (1) T3/T4 또는 (2) T3/T4와 ALK5 저해제가 보충된 배지로 약 2일 내지 4일, 바람직하게는 약 3일 동안 처리함으로써 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킨다. 예를 들어, 5기 세포를 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산 및 약 1  $\mu$ M의 T3/T4가 보충된 배지로 약 3일 동안 처리하여 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 대안적으로, 5기 세포를 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 500 nM ALK5 저해제 및 10 nM T3/T4가 보충된 배지로 약 3일 동안 처리하여 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 대안적으로, 5기 세포를 약 0.25  $\mu$ M SANT-1, 약 50 nM RA, 약 0.25 mM 아스코르브산, 약 1  $\mu$ M of ALK5 저해제 및 0 내지 1000 nM T3/T4가 보충된 배지로 약 3일 동안 처리하여 6기 세포로 분화시킬 수 있다. 세포는 경우에 따라 이러한 배지에서 예를 들어, 총 약 15일 동안 추가로 배양할 수 있다.
- [0114] 일 실시형태에서는 본 발명의 실시형태에 따라 유도된 5기 세포를 이용하여 6기 세포로 분화시키는 한편, 다른 실시형태에서는 다른 프로토콜에 따라 유도된 5기 세포를 이용할 수 있다.
- [0115] 본 발명의 일 태양은 4기 내지 6기 세포를 T3/T4 또는 ALK5 저해제 또는 이들의 조합을 포함하는 배지에서 처리하여 HB9의 발현을 향상시키는 방법을 제공한다. 4기, 5기 및 6기 세포는 각각 췌장 전장 전구세포, 췌장 내배엽/내분비 전구세포 및 췌장 내분비 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 처리된 세포 집단은 미처리된 배양물보다 적어도 2배 많은 HB9 단백질을 발현한다. 다른 실시형태에서, 인슐린의 발현 수준은 미처리된 배양물과 비교해서 처리된 배양물에서 긍정적으로 영향을 받는다. 그러나, 소마토스타틴, 그렐린 및 글루카곤의 발현은 미처리된 배양물에 비해서 처리된 배양물에서 감소된다. 추가의 실시형태에서, 5기 세포는 사실상 CDX2 또는 SOX2를 발현하지 않는다.
- [0116] 추가의 실시형태에서, 본 발명은 NKX6.1, PDX1 및 HB9 단백질에 대해 양성인 췌장 내배엽 계통 세포 집단을 생성시키기에 충분한 양의 T3/T4 또는 ALK5 저해제 또는 이들의 조합을 포함하는 배지에서 4기 내지 6기 세포를 배양하는 것을 포함하는, 만능 세포의 단계적 분화 방법에 관한 것이다. 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 5%는 HB9 단백질을 발현한다. 또 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 10%는 HB9 단백질을 발현한다. 대안적 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 20%는 HB9 단백질을 발현한다. 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 30%는 HB9 단백질을 발현한다. 대안적 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 40%는 HB9 단백질을 발현한다. 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 50%는 HB9 단백질을 발현한다. 또 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 60%는 HB9 단백질을 발현한다. 대안적 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 70%는 HB9 단백질을 발현한다. 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 80%는 HB9 단백질을 발현한다. 또 다른 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 90%는 HB9 단백질을 발현한다. 대안적 실시형태에서, PDX1 및 NKX6.1 공동양성 세포의 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%는 HB9 단백질을 발현한다.

[0117] 일부 실시형태에서, PDX1, NKX6.1 및 HB9 단백질 양성 세포로 이루어진 췌장 내배엽 계통 세포 집단은 추후의 기능적 췌장 내분비 세포로의 생체 내 성숙을 위해 당뇨병 동물에게 이식된다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 생성된 인슐린 및 NKX6.1 발현 세포를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 만능 줄기세포와 같은 전구 세포를 HB9를 발현하는 췌장 내배엽 계통의 세포로 단계적 분화시키는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 이들 단계 중 하나 이상을 포함한다. 특히, 본 방법은 만능 줄기세포를 완성 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계를 포함한다. 상기 단계는 약 3일이 소요될 수 있다. 이어서 이들 세포를 적절한 조건하에 배양하여 이들 세포를 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킨다. 일 실시형태에서, 세포는 약 2일 동안 배양할 수 있다. 이어서, 장관 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시킨다. 이러한 분화는 세포를 약 2일 동안 배양함으로써 달성할 수 있다. 추가의 실시형태에서, 만능 줄기세포는 인간 배아 만능 줄기세포이다.

[0118] 이어서, 이들 세포는 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화되고, 이는 다시 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있고, 이는 이어서 췌장 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화될 수 있다. HB9를 발현하는 췌장 내배엽 계통 세포로의 분화를 달성하기 위해, 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 및 췌장 내배엽/내분비 전구세포를 액티빈 수용체 저해제(바람직하게는, ALK5 저해제) 및/또는 T3/T4 갑상선 호르몬 중 하나 이상과 함께 배양할 수 있다. 일 실시형태에서, 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 및 췌장 내배엽/내분비 전구세포는 T3/T4와 함께 배양된다. 다른 실시형태에서, 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 및 췌장 내배엽/내분비 전구세포는 액티빈 수용체 저해제와 함께 배양된다. 대안적 실시형태에서, 세포는 액티빈 수용체 저해제와 T3/T4 둘 모두와 함께 배양된다. 본 발명의 방법은 HB9를 발현하는 췌장 내배엽 계통의 세포로 분화될 수 있는 어떠한 세포에라도 적합하다. 표 III은 본 발명의 방법의 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적 배양 조건을 제시한다. 하기 표 III에서 사용되는 바와 같이, "MCX"는 MXC 화합물이고, "AA"는 액티빈이고, "ALK5 inh."는 ALK5 저해제이고, "RA"는 레티노산, "Vit. C"는 아스코르브산이고, "inh."는 저해제이고, "act."는 활성화제이다. 특정 실시형태에서, 하나의 단계(예를 들어, 1기, 2기, 3기, 4기, 5기 또는 6기 중 어느 하나)에서의 처리 중 어느 하나는 다른 단계(예를 들어, 1기, 2기, 3기, 4기, 5기 또는 6기 중 어느 하나)에서의 처리 중 어느 하나와 병용될 수 있다.

[0119] [표 III]

본 발명의 방법의 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적 배양 조건

	1기	2기	3기	4기	5기	6기
다음의 처리	만능 줄기세포	1기 세포	2기 세포	3기 세포	4기 세포	5기 세포
적어도 다음으로 처리	AA & Wnt3A					
	GDF8 & MCX					
		FGF7 & Vit. C				
			SANT-1, RA & 노킨			
			FGF7, 레티노산, SANT-1, PKC act.(예를 들어, TPB), BMP inh. (예를 들어, LDN-193189), & Vit. C			
				T3	ALK5 inh. + T3	T3
기타 임의의 성분				T3	ALK5 inh. + T3	ALK5 inh. + T3
				T3	T3	T3
				다음 중 하나 이상: SANT-1 RA Vit. C FGF7 BMP 수용체 Inh. (예를 들어, LDN-193189) PKC act. (예를 들어, TPB)	다음 중 하나 이상: SANT-1 RA Vit.C	다음 중 하나 이상: SANT-1 RA Vit. C
처리 기간	약 2 내지 5일; 바람직하게는 약 3 내지 4일	약 2 내지 3일; 바람직하게는 약 2일	약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 2일	약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일	약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일	약 2 내지 4일, 바람직하게는 약 3일

[0120]

[0121]

일 실시형태에서, 본 발명은 T3을 포함하는 배지에서 췌장 내배엽 계통 세포 집단을 배양함으로써 HB9 발현을 향상시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 췌장 내배엽 계통 세포 집단은 사실상 CDX2 또는 SOX2를 발현하지 않는다. 다른 실시형태에서, 췌장 내배엽 계통 세포 집단은 만능 세포의 단계적 분화에 의해 수득된다. 추가의 실시형태에서, 만능 세포는 인간 배아 만능 세포이다.

[0122]

일 실시형태에서, 본 발명은 ALK5 저해제를 포함하는 배지에서 췌장 내배엽 계통 세포 집단을 배양함으로써 HB9 발현을 향상시키는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 췌장 내배엽 계통 세포 집단은 만능 세포의 단계적 분화에 의해 수득된다. 일부 실시형태에서, 만능 세포는 인간 배아 만능 세포이다.

[0123]

바람직한 실시형태에서, 본 발명은 ALK5 저해제 및 T3을 포함하는 배지에서 췌장 내배엽 계통 세포 집단을 배양함으로써 HB9 발현을 향상시키는 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 췌장 내배엽 계통 세포 집단은 만능 세포의 단계적 분화에 의해 수득된다. 추가의 실시형태에서, 만능 세포는 인간 배아 만능 세포이다.

[0124]

다른 실시형태에서, 본 발명은 PDX1 및 NKX6.1 공동발현 세포를 충분한 양의 T3, ALK5 저해제 또는 이들의 조합을 포함하는 배지로 처리함으로써 이러한 세포에서 HB9의 발현을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0125]

본 발명의 일 실시형태는 하기 단계들을 포함하는, 만능 줄기세포로부터 β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 생산하는 방법이다: (a) 만능 줄기세포를 배양하는 단계 (b) 만능 줄기세포를 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계 및 (c) 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3/T4, ALK5 저해제 또는 둘 모두가 보충된 배지로 처리하여 β 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 단계. 생성된 세포는 NKX6.1, PDX1 및 Hb-9에 대해 양성일 수 있다. 본 방법을 사용하여, 췌장 내배엽 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 NKX6.1 양성 세포 중에서 HB9 양성 세포의 수를 향상시킬 수 있다. 또한 본 방법을 사용하여 NKX2.2의 발현을 감소시킬 수도 있다. 더욱이, 본 방법은 SOX2 및 알부민 발현을

억제한다. 게다가, 본 방법을 사용하여, 인슐린을 발현하는 세포의 수율을 증가시킬 수 있다.

- [0126] 일 실시형태에서, T3이 사용된다. 본 방법은 T3 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 또한 본 방법은 T3 및 ALK5 저해제가 보충된 배지로 배양되지 않은 세포와 비교하여 HB9 발현을 향상시킬 수 있다. 배지는 또한 SMO 저해제, SHH 신호전달 경로 길항제(예를 들어, SANT-1), 레티노산 및 아스코르브산 중 하나 이상(예를 들어, 1개, 2개, 3개 또는 모두)으로 추가 보충될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 방법은 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3이 보충되고 또한 ALK5 저해제가 추가 보충될 수 있는 배지에서 배양함으로써  $\beta$  세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 제공한다.
- [0127] 본 발명의 또 다른 실시형태는 전장 내배엽 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3/T4, ALK5 저해제 또는 둘 모두가 보충된 배지로 처리함으로써  $\beta$  세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시키는 것을 포함하는,  $\beta$  세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포의 생산 방법이다. 특정 실시형태에서, 배지는 BMP 수용체 저해제 및 PKC 활성화제로 추가 보충된다. 생성된 세포는 바람직하게는 NKX6.1, PDX1 및 Hb-9에 대해 양성이다. 본 방법을 사용하여, NKX6.1 양성 췌장 내배엽 전구세포 중에서 HB9 양성 세포의 수를 향상시키고/시키거나, NKX2.2 발현을 감소시키고/시키거나, SOX2 및 알부민 발현을 억제할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, T3이 사용된다. 본 방법은 또한 T3 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있다. 또한 본 방법은 HB9 발현을 T3 및 ALK5 저해제가 보충된 배지로 배양되지 않은 세포와 비교하여 HB9 발현을 향상시킬 수 있다. 게다가, 본 방법은 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3 및 임의로 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양함으로써  $\beta$  세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 형성시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0128] 본 발명의 또 다른 실시형태는 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포를 T3/T4 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 배양함으로써 HB9 발현을 증가시키고 SOX2 및 알부민 발현을 억제하는 방법이다. 본 발명의 대안적 실시형태는 T3/T4 및 ALK5 저해제가 보충된 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함하는 췌장 전장 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포, 췌장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 또는 내분비 세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포 내에서 글루카곤, 소마토스타틴 및 그렐린의 하향조절 방법이다. 배지는 SMO 저해제, SHH 신호전달 경로 길항제(예를 들어, SANT-1), 레티노산 및 아스코르브산 중 하나 이상으로 추가 보충될 수 있다. 일 실시형태에서, 세포는 4기 세포이고, 배지는 FGF7로 추가 보충된다.
- [0129] 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 의해 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다.
- [0130] 본 발명은 치료 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 당뇨병을 앓고 있거나 당뇨병의 발병 위험에 처한 환자의 치료 방법을 제공한다.
- [0131] 본 발명은 또한 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다. 특히, 본 발명은 당뇨병을 앓고 있거나 당뇨병의 발병 위험에 처한 환자의 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득된 세포 또는 세포 집단을 제공한다.
- [0132] 당뇨병은 1형 또는 2형 당뇨병일 수 있다.
- [0133] 일 실시형태에서, 치료 방법은 본 발명의 방법에 의해 수득 가능한 또는 수득된 세포를 환자에게 이식하는 것을 포함한다.
- [0134] 일 실시형태에서, 치료 방법은
- [0135] 만능 줄기세포를 예를 들어 본 명세서에서 기재한 바와 같이 시험관 내에서 1기, 2기, 3기, 4기, 5기 또는 6기 세포로 분화시키는 단계 및
- [0136] 분화된 세포를 환자에게 이식하는 단계를 포함한다.
- [0137] 일 실시형태에서, 본 방법은 만능 줄기세포의 분화 단계 전에 만능 줄기세포를 예를 들어 본 명세서에서 기재한 바와 같이 배양하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0138] 일 실시형태에서, 본 방법은 이식 단계 후에 세포를 생체 내에서 분화시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0139] 일 실시형태에서, 환자는 포유동물, 바람직하게는 인간이다.
- [0140] 일 실시형태에서, 세포는 분산된 세포로서 이식될 수 있거나, 간문맥 내로 주입될 수 있는 클러스터(cluster)로

형성될 수 있다. 대안적으로, 세포는 생체적합성 분해성 중합체성 지지체, 다공성 비분해성 장치로 제공되거나 또는 캡슐화되어 숙주 면역 반응으로부터 보호될 수 있다. 세포는 수용체의 적절한 부위에 이식될 수 있다. 이식 부위는 예를 들어, 간, 천연 채장, 신장 피막하 공간, 장막, 복막, 장막하 공간, 장, 위, 또는 피하 주머니를 포함한다.

[0141] 생체 내 이식된 세포의 추가 분화, 생존 또는 활성을 향상시키기 위해, 성장 인자, 항산화제 또는 소염제와 같은 추가의 인자를 세포 투여 전에, 세포 투여와 동시에, 또는 세포 투여 후에 투여할 수 있다. 이들 인자는 내인성 세포에 의해 분비되어 원위치에서(*in situ*) 투여된 세포에 노출될 수 있다. 이식된 세포는 내인성 및 외부 투여된 당업계에 공지된 성장 인자의 임의의 조합에 의해 분화되도록 유도될 수 있다.

[0142] 이식에 사용되는 세포의 양은 환자의 상태 및 치료법에 대한 반응을 비롯한 다양한 많은 인자에 의존하며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0143] 일 실시형태에서, 치료 방법은 세포를 이식 전에 3차원 지지체에 혼입하는 것을 추가로 포함한다. 세포는 환자 내로 이식되기 전에 이 지지체 상에서 시험관 내에서 유지될 수 있다. 대안적으로, 세포를 함유한 지지체는 추가의 시험관내 배양 없이 환자에서 직접 이식될 수 있다. 지지체에는 이식된 세포의 생존과 기능을 촉진하는 적어도 하나의 약학 제제가 선택적으로 혼입될 수 있다.

[0144] 본 명세서 전체에 걸쳐 인용된 간행물은 본 명세서에 이의 전문이 참고로 포함된다. 본 발명을 하기 실시예에 의해 추가로 예시하지만 하기 실시예에 의해 한정되지는 않는다.

[0145] 실시예

[0146] 실시예 1

[0147] 인간 만능 세포로부터 유래된 채장 내배엽 집단을 생성시키는 이미 공개된 프로토콜은 사실상 HB9 단백질을 발현하지 않는다.

[0148] 본 실시예는 본 실시예에서 기재된 바와 같이 만능 줄기세포로부터 유래된 세포에서의 HB9의 발현 패턴의 동정에 관한 것이다. 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포(계대 40)를 단일 세포로서  $1 \times 10^5$ 개 세포/cm<sup>2</sup>로 10 μM의 Y27632(Rock 저해제, 카탈로그 번호 Y0503, 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치)가 보충된 MTESR® 1 배지(캐나다 밴쿠버 소재의 스템셀 테크놀로지스)에서 매트릭셀™ (1:30 희석액 뉴저지주 소재의 비디 바이 오사이언시스(BD Biosciences))-코팅된 접시 상에 접종하였다. 접종 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS(Mg 또는 Ca가 없는 포스페이트 완충 식염수) 중에서 세척하였다. 이어서 배양물을 문헌(*Diabetes*, 61, 2016, 2012)에 이미 기재된 바와 같이 채장 내배엽/내분비 전구세포로 분화시켰다. 사용된 분화 프로토콜은 다음과 같았다:

[0149] a. 1:30 매트릭셀™ 코팅된 표면에 도달된 미분화 H1 세포의 60 내지 70% 컨플루언트(confluent) 부착성 배양물을 0.2% 소 태아 혈청 (FBS) (유타주 소재의 하이클론(Hyclone)), 100 ng/ml 액티빈-A (AA; 페프로-테크 뉴저지주 록키 힐 소재) 및 20 ng/ml의 Wnt3A (알&디 시스템즈)가 보충된 RPMI 1640 배지(인비트로젠 (Invitrogen))에 오직 1일 동안만 노출시켰다 그 다음 2일 동안, 세포를 0.5% FBS 및 100 ng/ml AA를 함유한 RPMI에서 배양하였다.

[0150] b. (a)로부터 생성된 세포를 3일 동안 2% FBS 및 50 ng/ml의 FGF7(페프로-테크)가 보충된 DMEM-F12 배지 (인비트로젠)에 노출시켰다.

[0151] c. (b)로부터 생성된 배양물을 0.25 μM SANT-1(시그마-알드리치 미주리주 세인트 루이스 소재), 2 μM 레티노산(시그마-알드리치), 100 ng/ml의 노킨(알&디 시스템즈) 및 1% (v/v)의 보충제(상표명 B27®하에 시판)(카탈로그 번호 17504044, 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재의 라이프 테크놀로지스)가 보충된 DMEM-HG 배지(인비트로젠)에서 4일 동안 지속시켰다.

[0152] d. (c)로부터 생성된 세포를 1 μM ALK5 저해제(ALK5i; 뉴욕주 파밍데일 소재), 100 ng/ml의 노킨, 50 nM TPB ((2S,5S)-(E,E)-8-(5-(4-(트리플루오로메틸)페닐)-2,4-펜타디에노일아미노)벤조락탐 이엠디 케미칼스 인코포레이티드, 뉴저지주 깁스타운 소재) 및 1% B27가 보충된 DMEM-HG 배지에서 단층 방식으로 3일 동안 배양하였다. 배양 마지막날 동안, 세포를 5 mg/mL 디스파제로 5분 동안 처리한 다음, 조심스럽게 피펫팅하여 혼합하고 세포괴(cell clump)( $< 100 \mu\text{m}$ )로 파괴하였다. 상기 세포 클러스터(cell cluster)를 일회용 폴리스티렌 125 ml 스피너 플라스크(코닝(Corning))로 이전하고, 1 μM ALK5 저해제, 100 ng/ml의 노킨 및 1% B27이 보충된

DMEM-HG를 함유한 현탁액 중에서 80 내지 100 rpm으로 밤새 회전시켰다.

[0153] (d)의 마지막에, mRNA를 관련 채장 내배엽/내분비 유전자의 PCR 분석을 위해 수거하였다. 총 RNA를 RNeasy® 미니 키트(키아젠(Qiagen)); 캘리포니아주 발렌시아 소재)로 추출했고, 고성능 cDNA 역전사 키트 (캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))를 제조업자의 지침에 따라서 사용하여 역전사시켰다. cDNA는 주문 제작식 태크먼® 어레이즈(Taqman® Arrays) (어플라이드 바이오시스템즈) 위로 미리 부하된 태크먼® 유니버설 마스터 믹스(Taqman® Universal Master Mix) 및 태크먼® 유전자 발현 검정법 (Taqman® Gene Expression Assays)을 이용하여 증폭시켰다. 데이터를 시퀀스 디텍션 소프트웨어(Sequence Detection Software)(어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 분석하고,  $\Delta\Delta Ct$  방법 (즉, 내부 통제(internal control)로 수정된 qPCR 결과( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{샘플}} - \Delta Ct_{\text{기준}}$ ))을 사용하여 미분화된 인간 배아 줄기(hES) 세포에 대해 정규화시켰다. 모든 프라이머는 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구매하였다. FACS 및 면역형광 분석을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다(문헌[Diabetes, 61, 20126, 2012]). HB9 항체를 발달 연구 하이브리도마 은행(Developmental Studies Hybridoma Bank)(아이오와주 소재의 아이오와 대학교)으로부터 취득하였다. 본 실시예에서 사용되는 바와 같이, Y27632 ((1R,4r)-4-((R)-1-아미노에틸)-N-(피리딘-4-일)사이클로헥산카복스아미드)는 세포-투과성 소분자 Rho 연관 키나제(ROCK) 저해제이다.

[0154] 도 1a 내지 도 1c는 실시예 1에 개요된 바와 같이 채장 내배엽/내분비 전구세포로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 하기 유전자들의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다: PDX1 (도 1a), NKX6.1(도 1b), 및 HB9 (도 1c). 도 1에 도시된 바와 같이, PDX1, NKX6.1 및 HB9의 강력한 mRNA 발현은 이들 배양물에서 검출되었다. 또한, HB9의 mRNA 발현은 인간 사체 섬세포와 비교해서 이들 세포에서 동등하거나 높았다. 그러나, 도 2에 도시된 바와 같이, PDX1 및 NKX6.1의 유전자 발현 데이터는 FACS 분석으로 측정된 바와 같은 상응하는 단백질의 높은 발현과 일치하는 반면, HB9의 mRNA 발현은 HB9의 단백질 발현과 불일치하였다. (d)의 완료 이튿날, 즉 5일째에, 세포의 약 1%가 HB9에 대해 양성인 반면, 세포의 약 50%는 NKX6.1 양성이었고 약 90%는 PDX1 양성이었다. 세포의 면역염색도 또한 FACS 데이터를 확인시켜 주었다. 도 3a 및 도 3b에 도시된 바와 같이, 상당 수의 NKX6.1 양성 세포 및 적은 인슐린 양성 세포가 세포괴 내에 존재하였다. 그러나, 면역염색으로 HB9 양성 세포는 검출되지 않았다(도 3b).

[0155] 실시예 2

[0156] 4기 내지 6기에서 T3 첨가는 HB9 양성 세포의 수를 향상시킨다

[0157] 본 실시예는 HB9 양성 세포의 수를 현저하게 향상시키는 4기 내지 6기에서 T3 첨가에 관한 것이다.

[0158] 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포(계대 40)를 단일 세포로서  $1 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup> 로 10  $\mu$ M의 Y27632가 보충된 mTeSR®1 배지에서 마트리젤™ (1:30 희석액 뉴저지주 소재의 BD 바이오사이언시즈)-코팅된 접시 상에 접종하였다. 접종 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS(Mg 또는 Ca가 없는 포스페이트 완충 식염수) 중에서 세척하였다. 배양물을 하기 개요된 프로토콜에 의해 채장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시켰다.

[0159] a. 1기 (3일): 줄기세포를 2% 무지방산 BSA (프롤리언트(Proliant) 카탈로그 번호 68700), 0.0012 g/ml 중탄산나트륨(시그마-알드리치, 카탈로그 번호 S3187), 1X 글루타맥스™(GlutaMax™)(인비트로젠, 카탈로그 번호 35050-079), 4.5 mM D-글루코스(시그마-알드리치, 카탈로그 번호 G8769), 100 ng/ml GDF8 (알&디 시스템즈) 및 1  $\mu$ M의 MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지(인비트로젠 카탈로그 번호 10372-019)에서 1일 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2% 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1  $\mu$ M MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지에서 추가로 1일 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2% 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8이 보충된 MCDB-131 배지에서 추가로 1일 동안 배양하였다.

[0160] b. 2기 (2일): 이어서, 1기 세포를 2% 무지방산 BSA; 0.0012 g/ml의 중탄산나트륨 1X 글루타맥스™ 4.5 mM의 D-글루코스 0.25 mM의 아스코르브산(미주리주 소재의 시그마) 및 25 ng/mL의 FGF7(미네소타주 소재의 알&디 시스템즈)가 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.

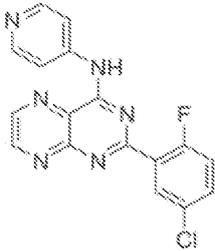
[0161] c. 3기 (2일): 이어서, 2기 세포를 ITS-X(Gibco® 인슐린, -트랜스페린-셀레늄-에탄올아민 캘리포니아주 소재의 인비트로젠)의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0017 g/mL의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1(미주리주 소재의 시그마); 1  $\mu$ M의 RA(미주리주 소재의 시그마); 25 ng/mL의 FGF7;

0.25 mM의 아스코르브산 200 nM의 TPB(PKC 활성화제 카탈로그 번호 565740; 뉴저지주 김스타운 소재의 이엠티 케미칼스); 및 100 nM의 LDN (BMP 수용체 저해제 카탈로그 번호 04-0019; 스템젠트)가 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.

[0162] d. 4기 (3일): 이어서, 3기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0017 g/mL의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 100 nM의 RA; 2 ng/mL의 FGF7; 100 nM의 LDN-193189; 0.25 mM의 아스코르브산 및 100 nM TPB가 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.

[0163] e. 5기 (3일): 이어서, 4기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 0.25 mM의 아스코르브산 및 500 nM of ALK5 저해제 SD208가 보충된 MCDB-131로 3일 동안 처리하였다. SD208은 문헌[Molecular Pharmacology 2007, 72:152-161]에 개시된 하기 화학식 I의 구조를 갖는 2-(5-클로로-2-플루오로페닐)프테리딘-4-일]피리딘-4-일-아민이다. SD208은 TGF-βR I 키나제의 ATP-경쟁적 저해제인 2,4-이치환된 프테리딘이다.

[0164] [화학식 (I)]



[0165] f. 6기 (3일 내지 15일): 5기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25 μM의 SANT-1; 50 nM의 RA; 0.25 mM 아스코르브산이 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.

[0167] 일부 배양물에서, 1 μM T3 (T6397, 미주리주 소재의 시그마)를 4기 내지 6기에서 첨가하였다. 4기 내지 6기의 마지막에, 대조군 및 처리군 배양물을 FACS 및 면역염색으로 분석하였다. 게다가, 2기 내지 6기에서 대조군 및 처리군 배양물에 대한 mRNA를 수거하였다.

[0168] 도 4는 PDX1, NKX6.1 및 HB9에 대한 4기(도 4a), 5기(도 4b) 및 6기(도 4c)에서의 FACS 데이터를 도시한다. 4기 내지 6기에서 상당한 수의 PDX1 및 NKX6.1 양성 세포가 있었지만, 실시예 1의 데이터와 일치하여 HB9의 발현은 훨씬 낮았다. HB9의 발현은 5기에서 최고치였으며 6기에서 감소되었다. 종합적으로, 실시예 2에 개요된 프로토콜을 사용하여 생성시킨 세포에 대한 HB9 발현은 실시예 1에 개요된 프로토콜을 사용하여 생성시킨 세포와 비교하여 보다 높았다. 도 5a는 2기 내지 6기에서 인간 섬세포와 비교한 HB9의 mRNA 발현을 도시한다. 실시예 1과 유사하게, 3기 내지 4기에서의 HB9의 mRNA 발현 수준은 인간 섬세포와 동등하였지만, HB9 단백질 발현은 4기에서 매우 낮았다(도 5b).

[0169] 도 6a 내지 도 6j는 실시예 2에 개요된 바와 같이 4기로 분화되고 오직 4기, 4기 내지 5기 또는 4기 내지 6기에서 처리된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 하기 유전자들의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한다: NKX6.1 (도 6a); PDX1 (도 6b); NKX2.2 (도 6c); 글루카곤 (도 6d); 인슐린(도 6e); 소마토스타틴 (도 6f); CDX2 (도 6g); 알부민 (도 6h); 가스트린 (도 6i); 및 SOX2 (도 6j). 4기 내지 6기에서의 T3 첨가는 5기에서 인슐린 발현을 중간정도로 증가시키면서 글루카곤, 소마토스타틴 및 그렐린을 현저하게 하향조절하였다. 4기 내지 6기에서의 T3 첨가는 명백하게 NKX6.1 및 PDX1 발현에 영향을 주지 않으면서 NKX2.2 발현을 현저하게 감소시킨 것으로 보인다. 게다가, T3 첨가는 CDX2 (창자 마커) 발현에 영향을 주지 않으면서 SOX2 (위 마커) 및 알부민(간 마커) 발현을 억제하였다. 6기에서 대조군 및 처리군 배양물의 면역염색으로 6기에서 대조군(도 7a)와 비교하여 T3 처리군(도 7b)에서 HB9 양성 세포의 수가 현저하게 증가된 것으로 나타났다. 또한, 증가된 수의 NKX6.1 양성 세포는 T3 처리된 배양물에서 HB9 발현을 나타냈다.

[0170] 실시예 3

[0171] 6기에서 T3 및 ALK5 저해제의 병용 처리는 HB9의 발현을 향상시킨다

[0172] 본 실시예는 6기에서 배지에서 ALK5 저해제와 T3의 병용이 HB9의 발현을 현저하게 증가시킨다는 것을 입증한다.

- [0173] 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포(계대 40)를 단일 세포로서  $1 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup> 로 10  $\mu$ M의 Y27632가 보충된 mTeSR®1 배지에서 매트릭셀™ (1:30 희석액 뉴저지주 소재의 BD 바이오사이언시스)-코팅된 접시 상에 접종하였다. 접종 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS(Mg 또는 Ca가 없는 포스페이트 완충 식염수) 중에서 세척하였다. 배양물을 하기 개요된 프로토콜에 의해 체장 내배엽/내분비 계통으로 분화시켰다.
- [0174] a. 1기 (3일): 세포를 2% 무지방산BSA (프롤리언트(Proliant) 카탈로그 번호 68700), 0.0012 g/ml 중탄산나트륨(시그마-알드리치 카탈로그 번호 S3187), 1X 글루타맥스™ (인비트로젠 카탈로그 번호35050-079), 4.5 mM D-글루코스(시그마-알드리치 카탈로그 번호G8769), 100 ng/ml GDF8 (알&디 시스템즈) 및 1  $\mu$ M MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지(인비트로젠 카탈로그 번호10372-019)에서 1일 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2% 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1  $\mu$ M MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지에서 추가로 1일 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2% 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8이 보충된 MCDB-131 배지에서 추가로 1일 동안 배양하였다.
- [0175] b. 2기 (2일): 이어서, 1기 세포를 2% 무지방산 BSA; 0.0012 g/ml의 중탄산나트륨 1X 글루타맥스™ 4.5 mM의 D-글루코스 0.25 mM의 아스코르브산(미주리주 소재의 시그마) 및 25 ng/mL의 FGF7(미네소타주 소재의 알&디 시스템즈)가 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.
- [0176] c. 3기 (2일): 2기 세포를 ITS-X(캘리포니아주 소재의 인비트로젠)의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0017 g/mL의 중탄산나트륨 2% 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M SANT-1(미주리주 소재의 시그마); 1  $\mu$ M RA(미주리주 소재의 시그마); 25 ng/mL FGF7; 0.25 mM 아스코르브산 200 nM TPB(PKC 활성화제 카탈로그 번호 565740; 뉴저지주 김스타운 소재의 이엠디 케미칼스); 및 100 nM의LDN (BMP 수용체 저해제 카탈로그 번호 04-0019; 스템젠트)가 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.
- [0177] d. 4기 (3일): 3기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0017 g/mL의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1; 100 nM의 RA; 2 ng/mL의 FGF7; 100 nM의 LDN-193189; 0.25 mM의 아스코르브산 100 nM TPB 및 1  $\mu$ M T3이 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.
- [0178] e. 5기 (3일): 4기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1; 50 nM의 RA; 0.25 mM의 아스코르브산 1  $\mu$ M ALK5 저해제 SD208 및 100 nM T3이 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.
- [0179] f. 6기 (3 내지 15일): 5기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1; 500 nM ALK5 저해제, 50 nM RA; 0.25 mM 아스코르브산 및 10 nM T3이 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.
- [0180] 도 8a 및 도 8b는 6기 7일째에서 NKX6.1 및 HB9에 대한 면역염색을 도시한다. 도 8c는 실시예 3에 개요된 바와 같이 6기로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 HB9 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다. 면역염색 영상과 함께 HB9의 mRNA 발현은 ALK5 저해제 및 T3에의 연장된 노출이 NKX6.1의 강력한 발현을 유지하면서 HB9의 발현을 현저하게 향상시키는 것 같음을 나타낸다. 도 9a 및 도 9b는 각각 6기 5일째 및 15일째에서의 FACS 데이터를 도시한다. 6기 세포의 상당 부분은 6기 15일째 배양물에서 HB9의 발현을 나타낸다.
- [0181] **실시예 4**
- [0182] **T3은 용량 의존적 방식으로 HB9의 발현을 향상시킨다**
- [0183] 본 실시예는 T3을 용량 의존적 방식으로 사용하여 6기에서 NKX6.1의 발현을 유지하면서 HB9 발현을 향상시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포(계대 40)를 단일 세포로서  $1 \times 10^5$  개 세포/cm<sup>2</sup> 로 10  $\mu$ M의 Y27632가 보충된 mTeSR®1 배지에서 매트릭셀™ (1:30 희석액 뉴저지주 소재의 BD 바이오사이언시스)-코팅된 접시 상에 접종하였다. 접종 후 48시간째에, 배양물을 불완전 PBS(Mg 또는 Ca가 없는 포스페이트 완충 식염수) 중에서 세척하였다. 배양물을 하기 개요된 프로토콜에 의해 체장 내배엽/내분비 전구세포의 특징적인 마커를 발현하는 세포로 분화시켰다.
- [0184] a. 1기 (3일): 세포를 2% 무지방산 BSA (프롤리언트 카탈로그 번호 68700), 0.0012 g/ml 중탄산나트륨(시그마-알드리치 카탈로그 번호 S3187), 1X 글루타맥스™(인비트로젠 카탈로그 번호 35050-079), 4.5 mM D-글루코

스(시그마-알드리치 카탈로그 번호 G8769), 100 ng/ml GDF8 (알&디 시스템즈) 및 1  $\mu$ M MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지(인비트로젠 카탈로그 번호 10372-019)에서 1일 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2% 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스, 100 ng/ml GDF8 및 0.1  $\mu$ M MCX 화합물이 보충된 MCDB-131 배지에서 추가로 1일 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 2% 무지방산 BSA, 0.0012 g/ml 중탄산나트륨, 1X 글루타맥스™, 4.5 mM D-글루코스 및 100 ng/ml GDF8이 보충된 MCDB-131 배지에서 추가로 1일 동안 배양하였다.

[0185] b. 2기 (2일): 이어서, 1기 세포를 2% 무지방산 BSA; 0.0012 g/ml의 중탄산나트륨 1X 글루타맥스™ 4.5 mM의 D-글루코스 0.25 mM의 아스코르브산(미주리주 소재의 시그마) 및 25 ng/mL의 FGF7(미네소타주 소재의 알&디 시스템즈)가 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.

[0186] c. 3기 (2일): 이어서 2기 세포를 ITS-X(캘리포니아주 소재의 인비트로젠)의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0017 g/mL의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1(미주리주 소재의 시그마); 1  $\mu$ M의 RA(미주리주 소재의 시그마); 25 ng/mL의 FGF7; 0.25 mM의 아스코르브산 200 nM의 TPB(PKC 활성화제 카탈로그 번호 565740; 뉴저지주 깁스타운 소재의 이엠펠 케미칼스); 및 100 nM의 LDN (BMP 수용체 저해제 카탈로그 번호 04-0019; 스텝젠트)가 보충된 MCDB-131 배지로 2일 동안 처리하였다.

[0187] d. 4기 (3일): 이어서, 3기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0017 g/mL의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1; 100 nM의 RA; 2 ng/mL의 FGF7; 100 nM의 LDN-193189; 0.25 mM의 아스코르브산 100 nM TPB가 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.

[0188] e. 5기 (3일): 이어서, 4기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1; 50 nM의 RA; 0.25 mM의 아스코르브산 1  $\mu$ M ALK5 저해제 SD208 및 0 내지 1000 nM T3이 보충된 MCDB-131 배지로 3일 동안 처리하였다.

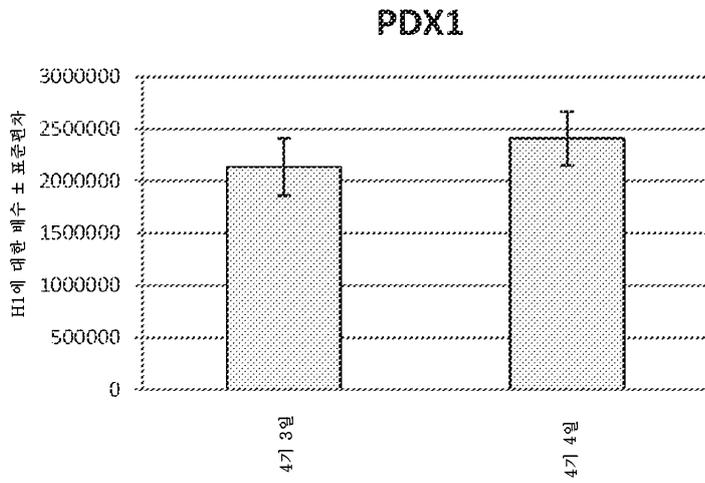
[0189] f. 6기 (6일): 이어서, 5기 세포를 ITS-X의 1:200 희석액 4.5 mM의 글루코스 1X 글루타맥스™ 0.0015 g/ml의 중탄산나트륨 2%의 무지방산 BSA; 0.25  $\mu$ M의 SANT-1; 500 nM ALK5 저해제 50 nM의 RA; 0.25 mM 아스코르브산 및 0 내지 1000 nM T3이 보충된 MCDB-131 배지로 6일 동안 처리하였다.

[0190] 도 10a 내지 도 10e는 6기의 6일째에서 NKX6.1 및 HB9에 대한 면역염색을 도시한다. T3은 NKX6.1 양성 체장 내 배엽 전구세포 중에서 HB9 양성 세포의 수를 용량 의존적 방식으로 현저하게 향상시켰다. 도 11a 내지 도 11i은 실시예 4에 개요된 바와 같이 6기로 분화된 인간 배아 줄기세포주 H1의 세포에서 하기 유전자들의 발현의 실시간 PCR 분석으로부터의 데이터를 도시한 것이다: SOX2 (도 11a); NKX6.1 (도 11b); NKX2.2 (도 11c); 가스트린(도 11d); PDX1 (도 11e); NGN3 (도 11f); PAX6 (도 11g); PAX4 (도 11h); 인슐린(도 11i); 글루카곤 (도 11j); 그렐린 (도 11k); 및 소마토스타틴 (도 11l).

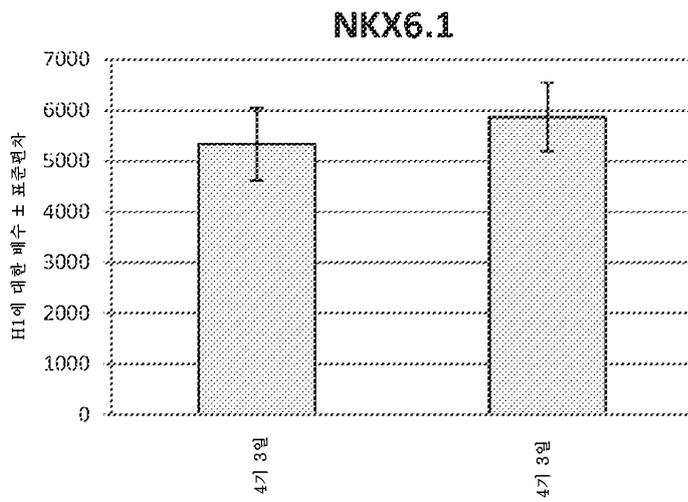
[0191] 본 발명을 다양한 특정한 재료, 절차 및 실시예를 참고로 하여 본 명세서에서 설명하고 예시하였지만, 본 발명은 이 목적용으로 선택된 재료 및 절차의 특정한 조합에 제한되지 않음이 이해된다. 당업자에 의해 인지될 바와 같이, 이러한 상세 사항에 대한 다양한 변화가 암시될 수 있다. 본 명세서 및 실시예는 단지 예시적인 것으로 간주되는 것으로 의도되며, 이때 본 발명의 실제 범주 및 사상은 하기 특허청구범위에 의해 나타난다. 본 출원에서 언급되는 모든 참고 문헌, 특허 및 특허 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면

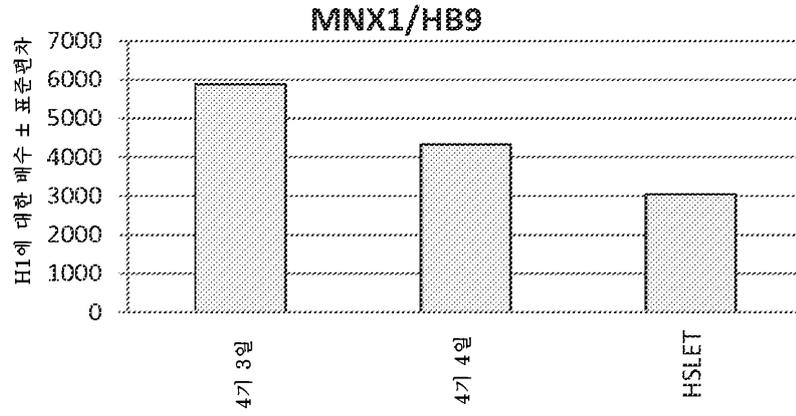
도면1a



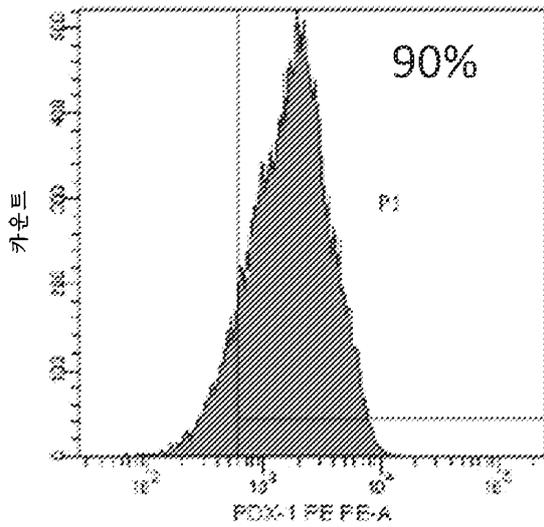
도면1b



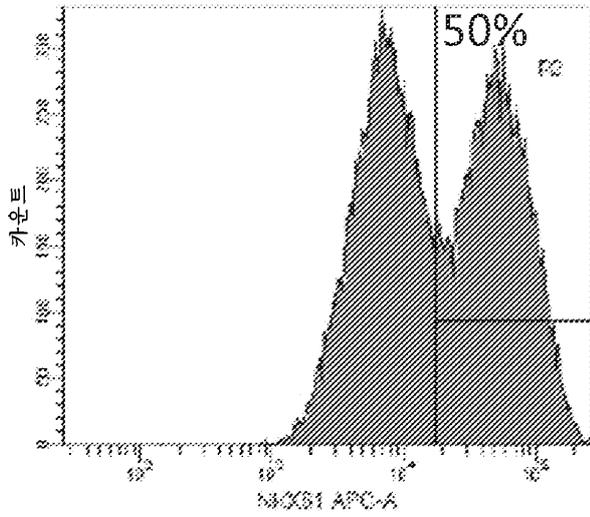
도면1c



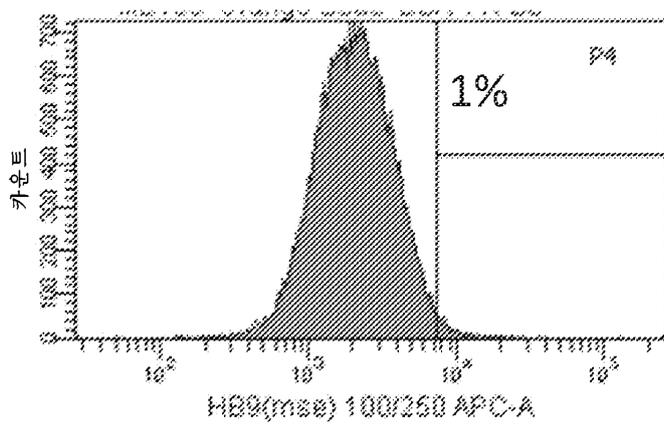
도면2a



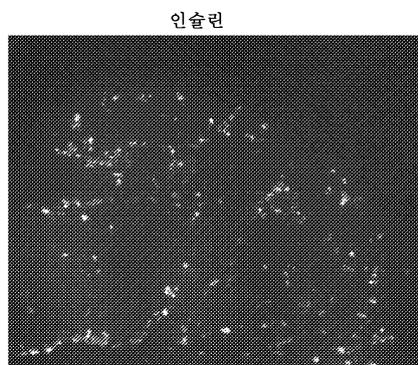
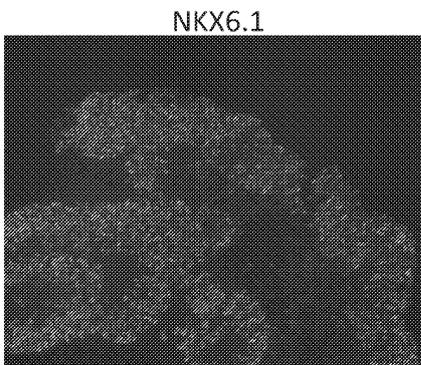
도면2b



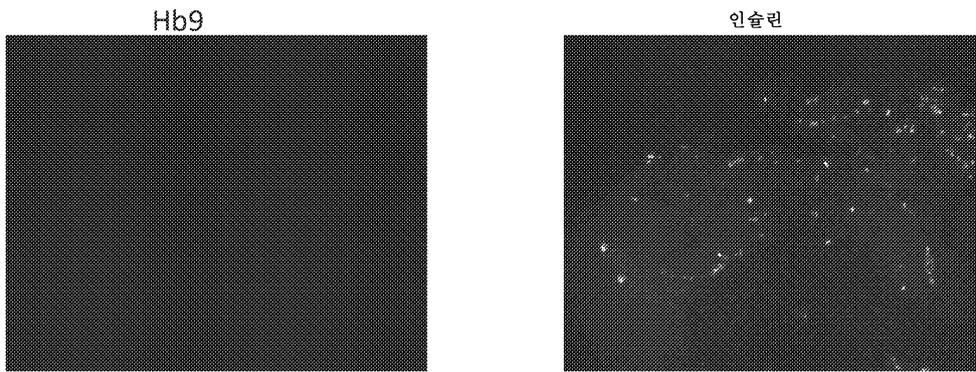
도면2c



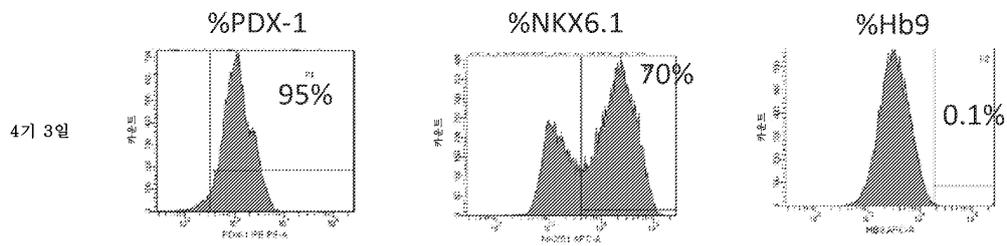
도면3a



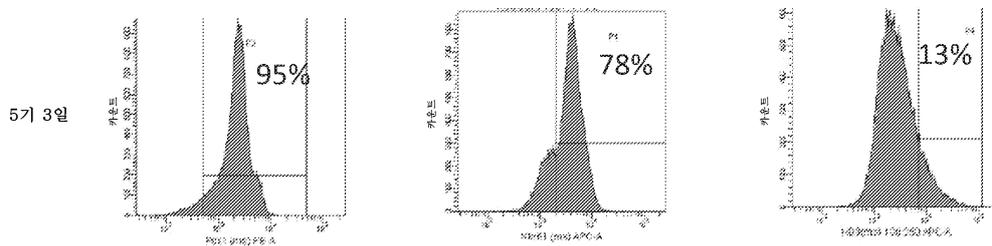
도면3b



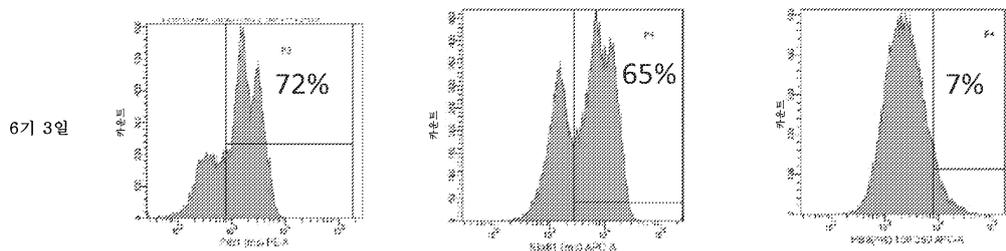
도면4a



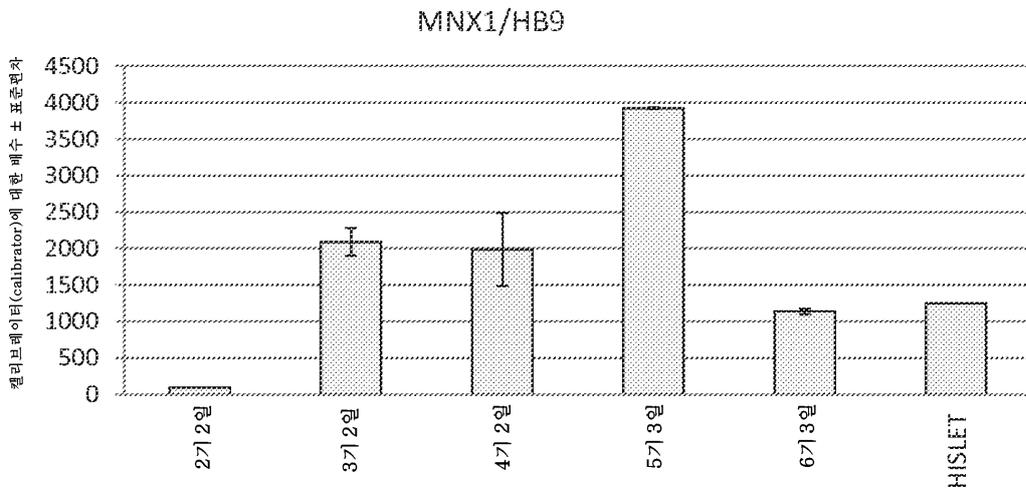
도면4b



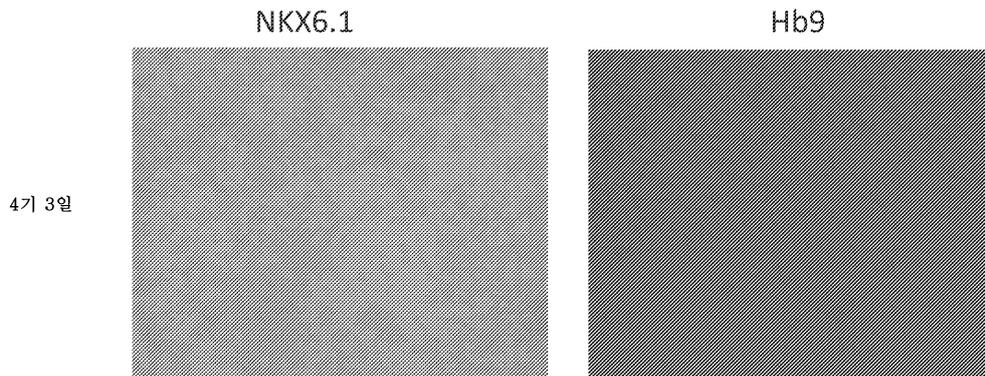
도면4c



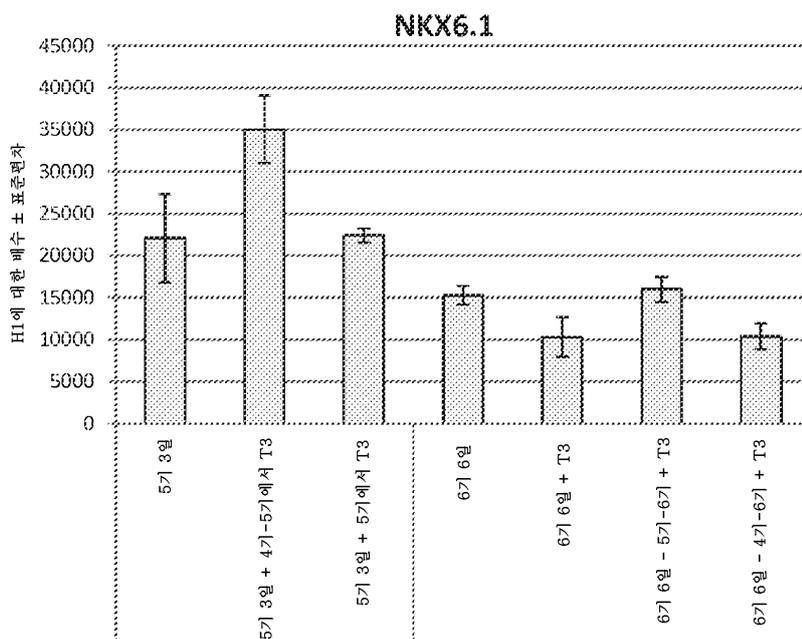
도면5a



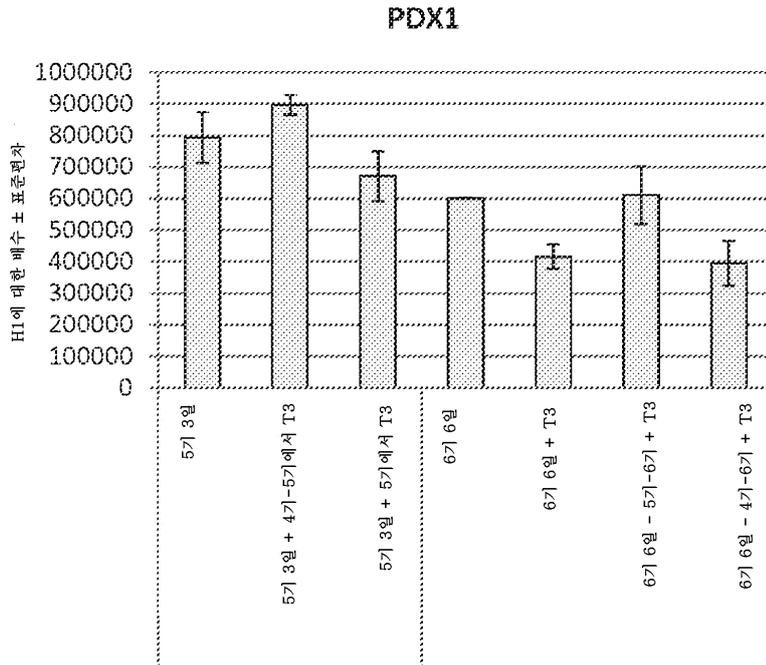
도면5b



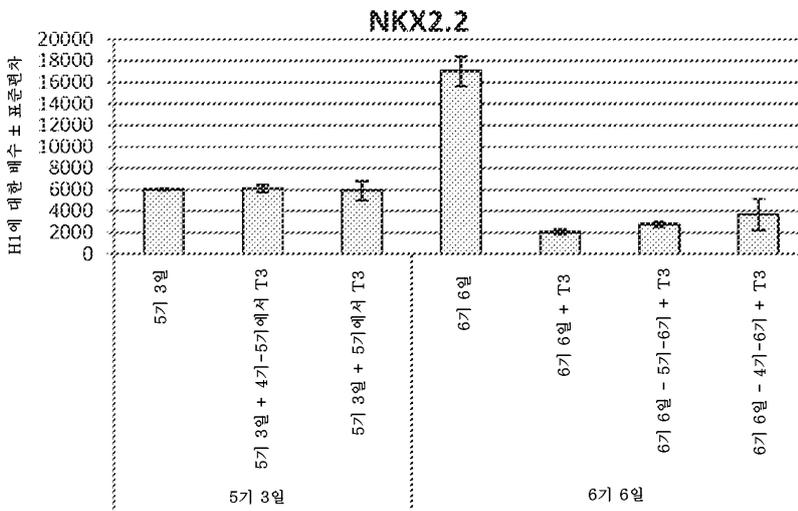
도면6a



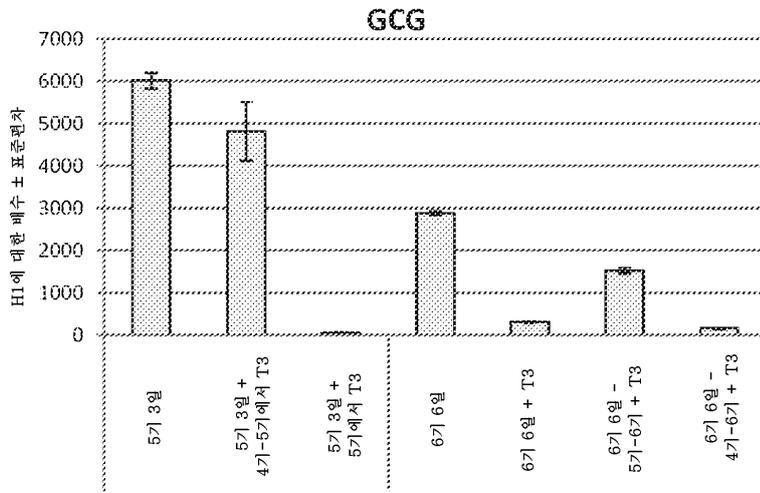
도면6b



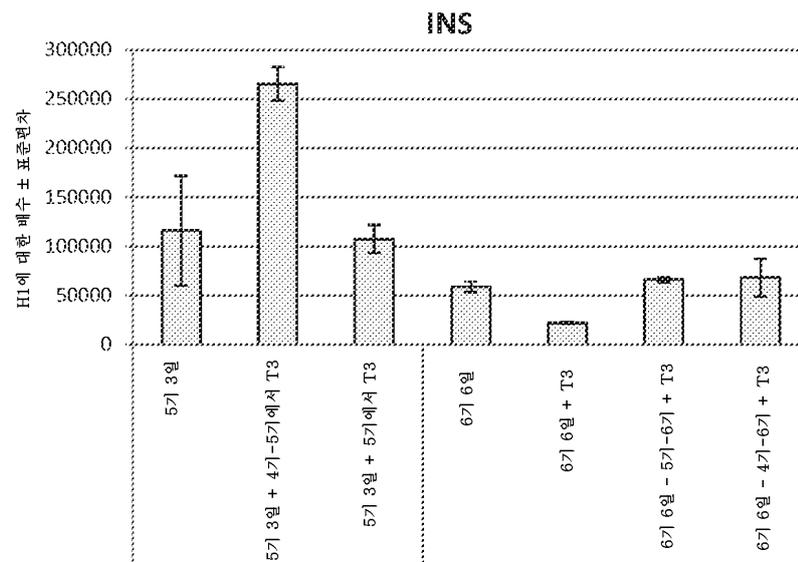
도면6c



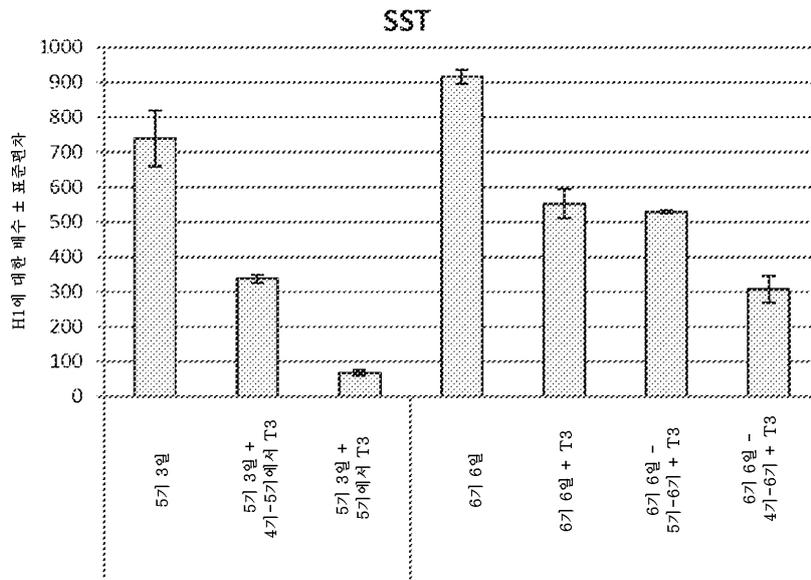
도면6d



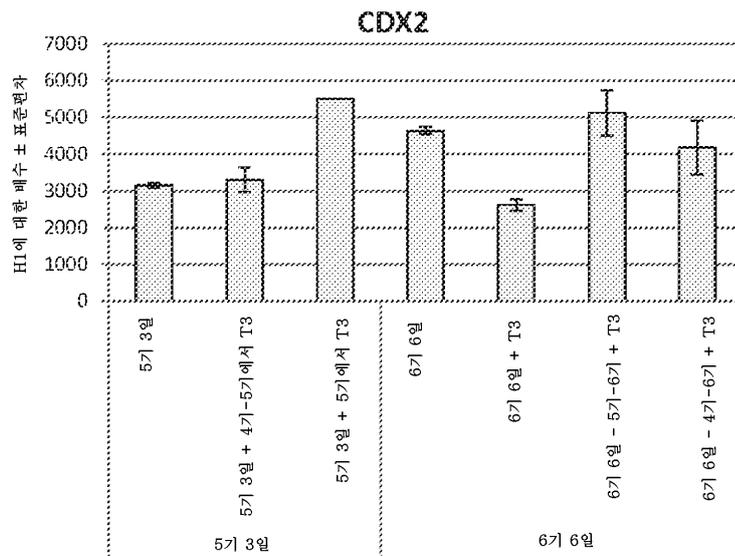
도면6e



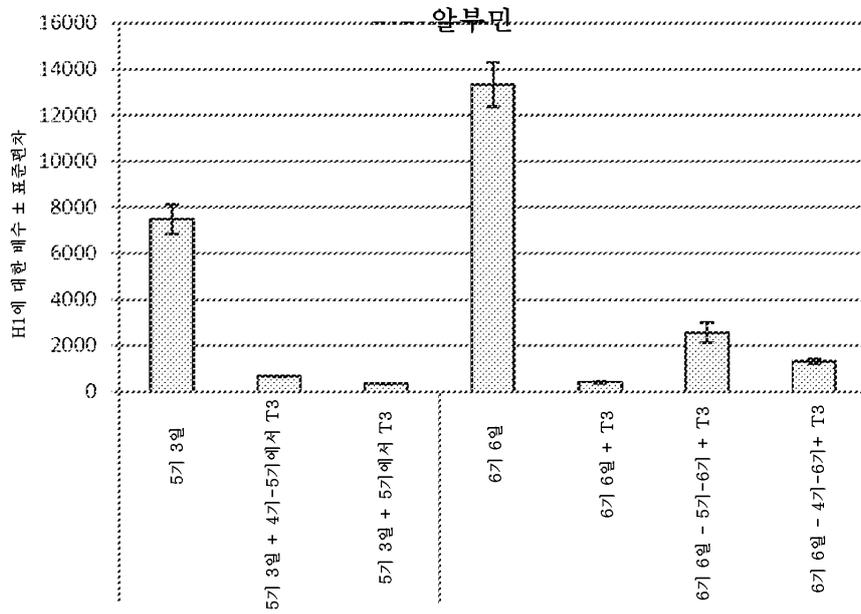
도면6f



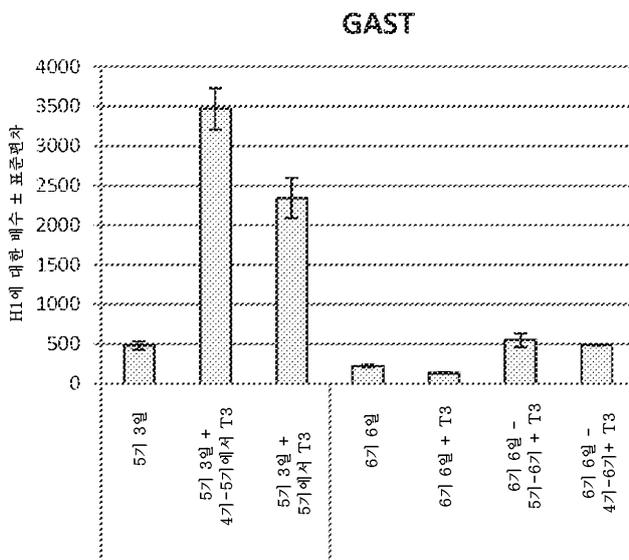
도면6g



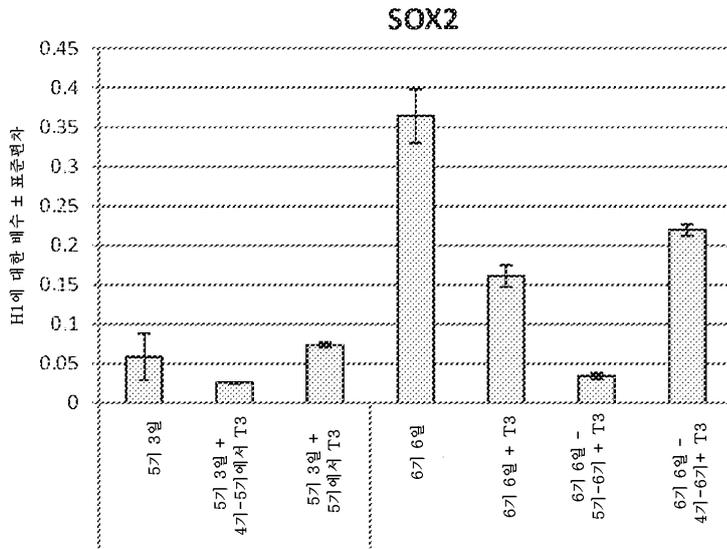
도면6h



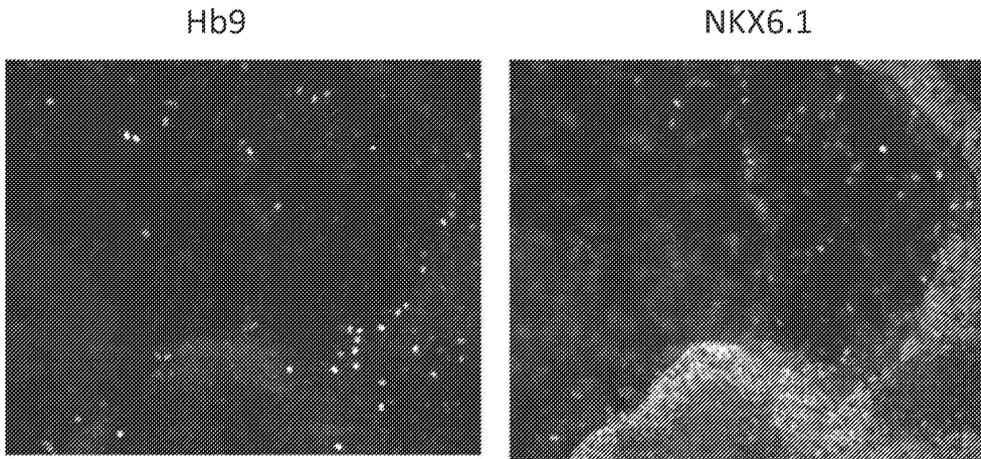
도면6i



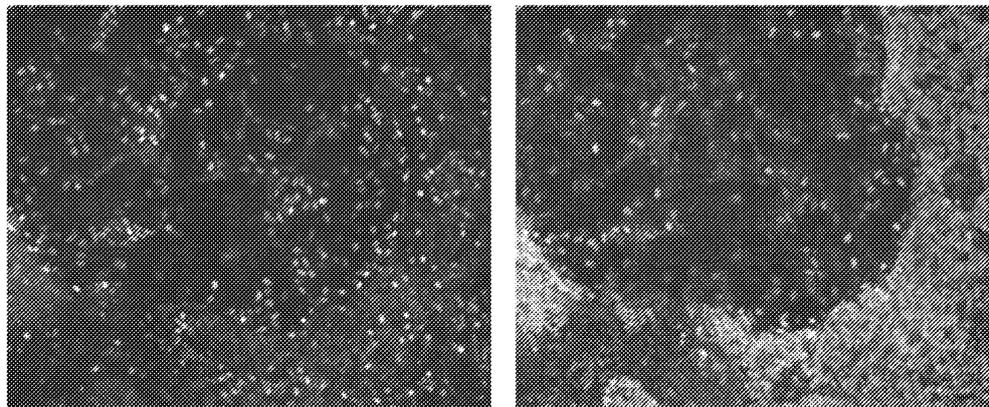
도면6j



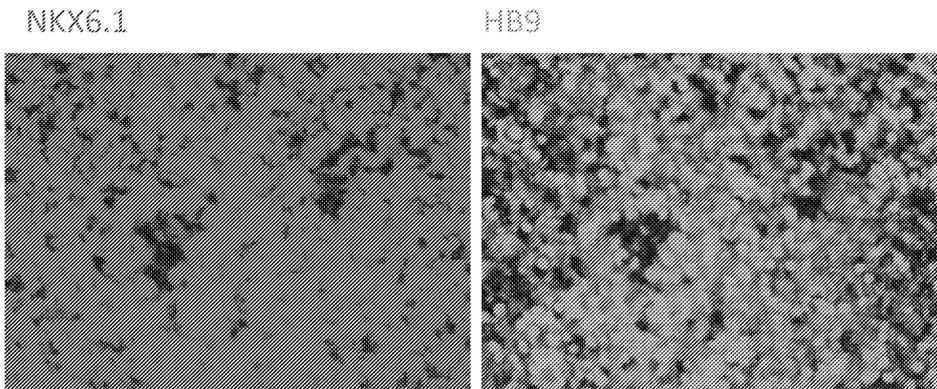
도면7a



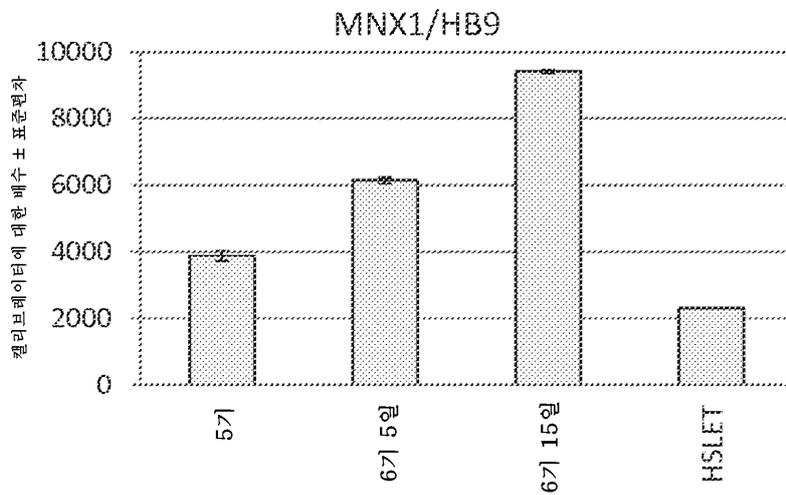
도면7b



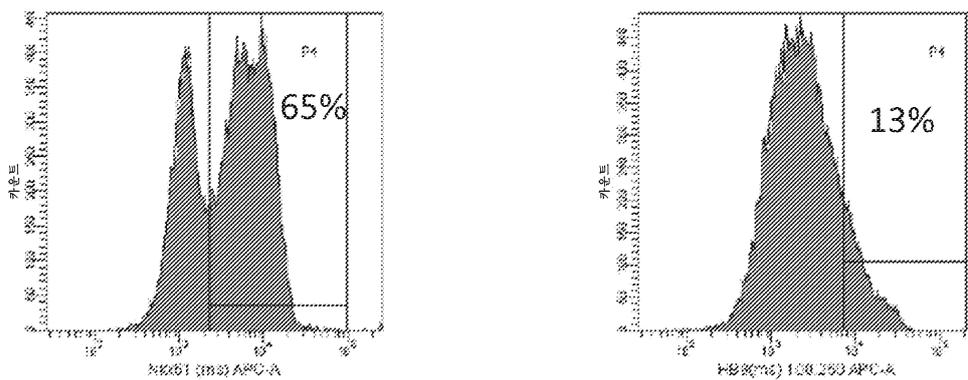
도면8a



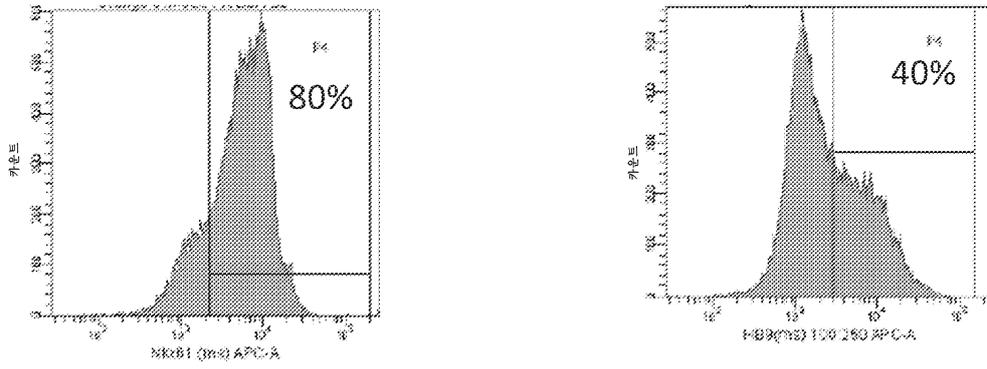
도면8b



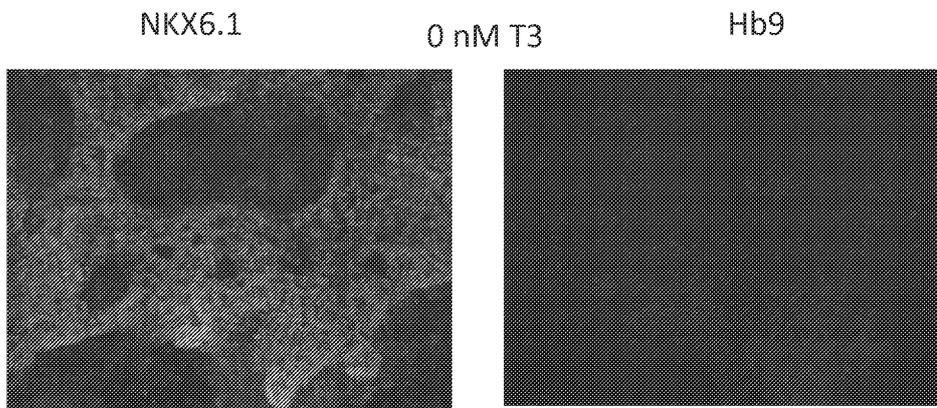
도면9a



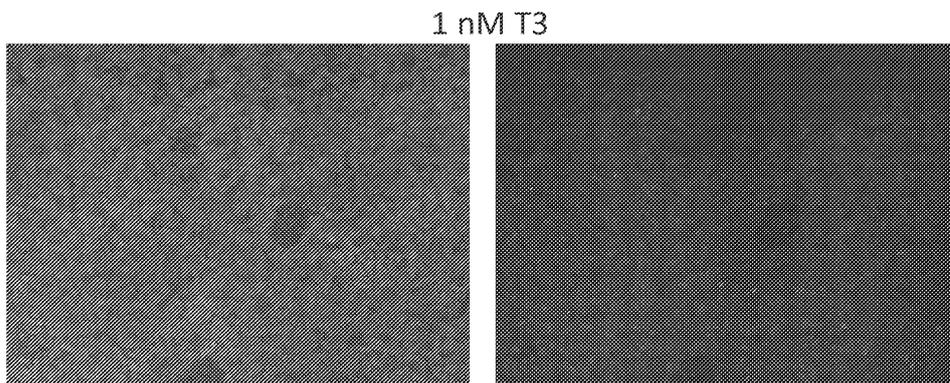
도면9b



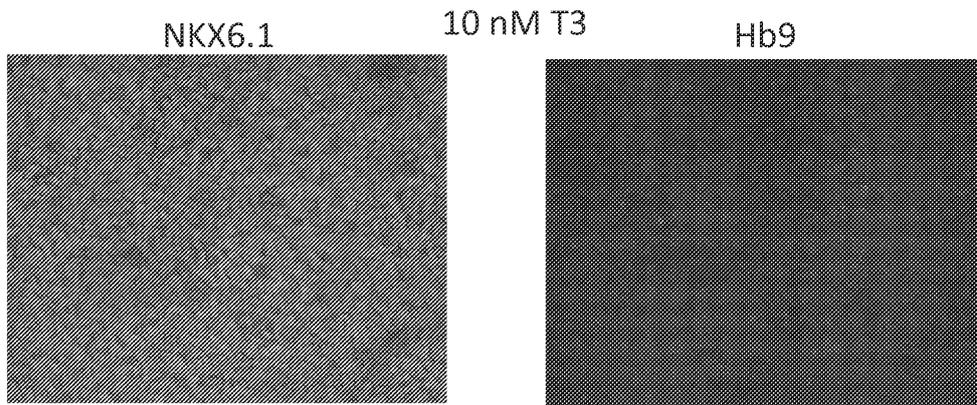
도면10a



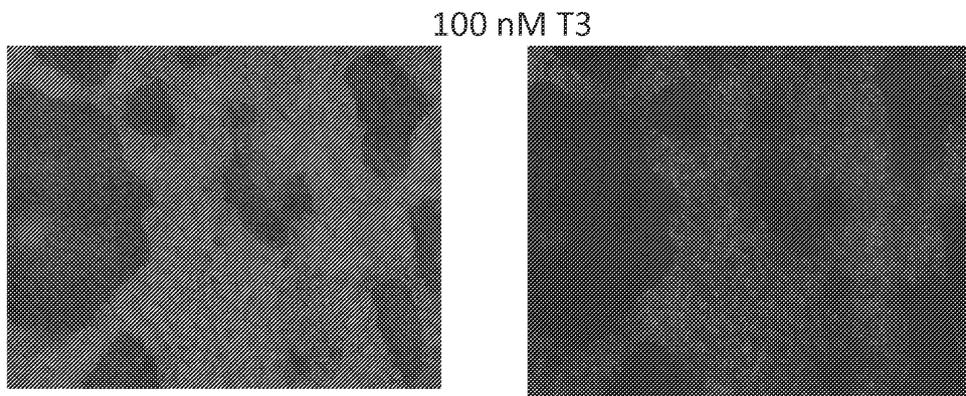
도면10b



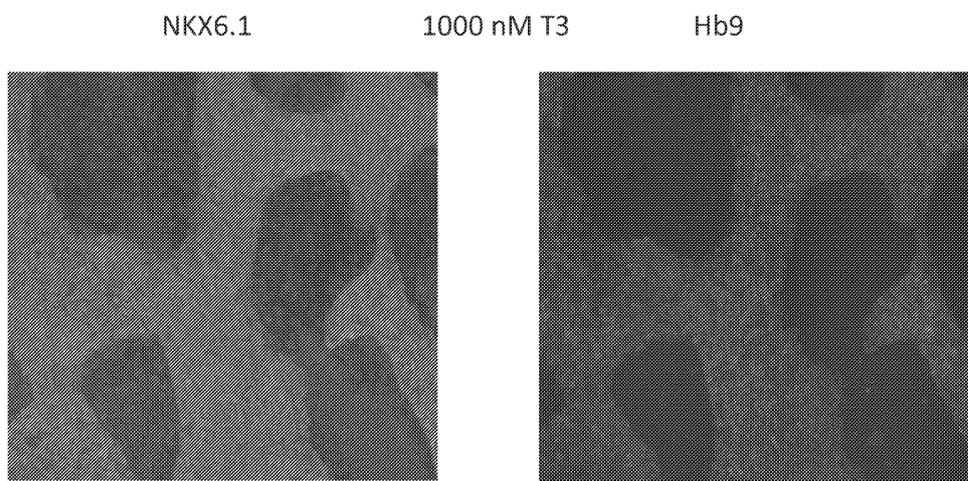
도면10c



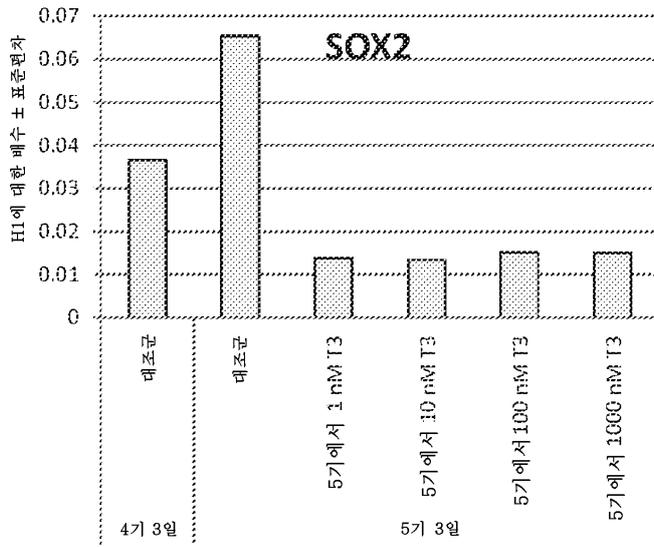
도면10d



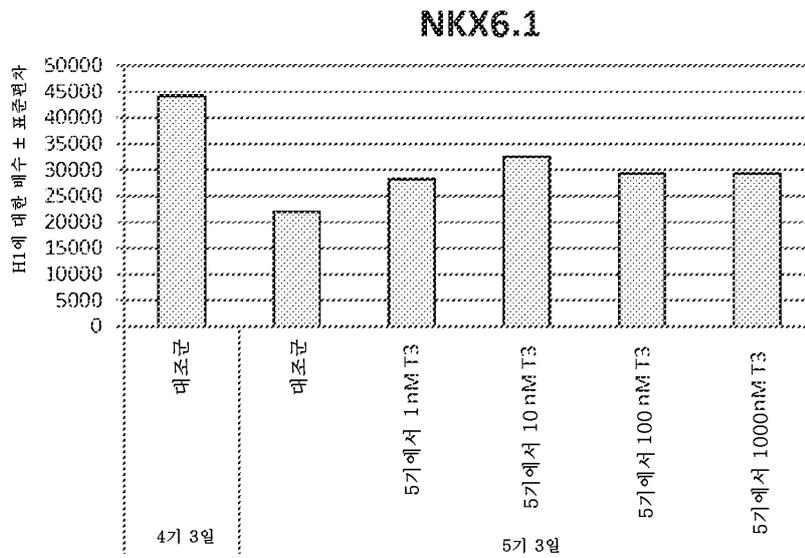
도면10e



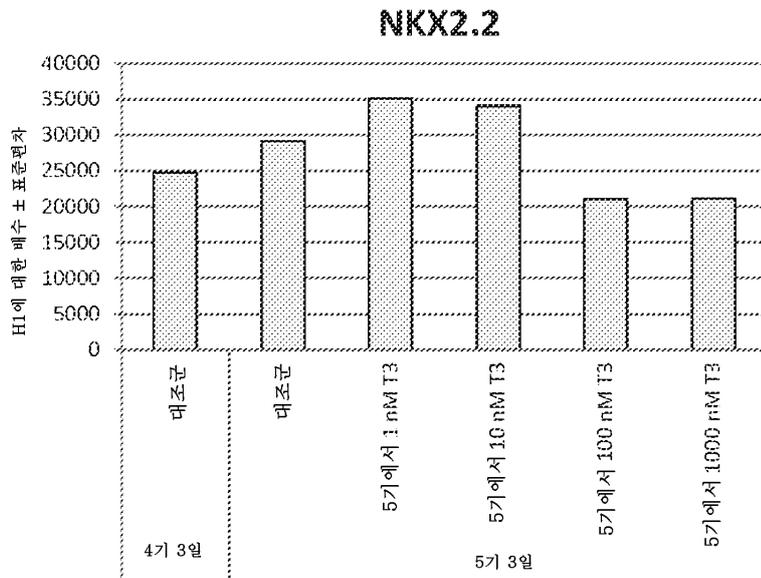
도면11a



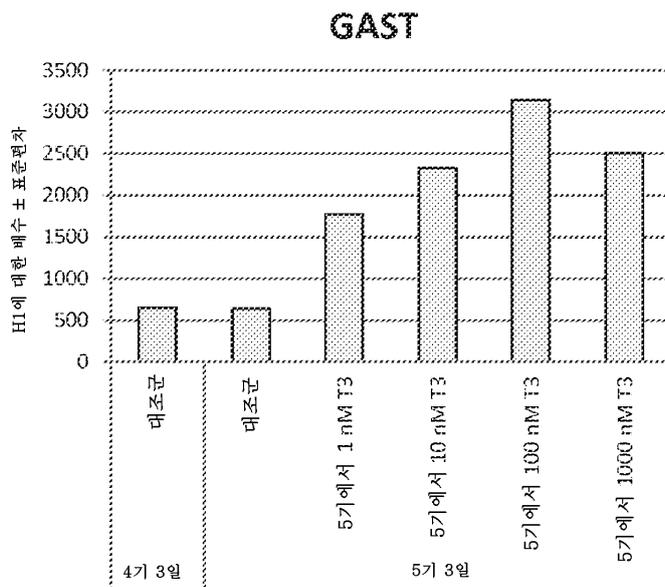
도면11b



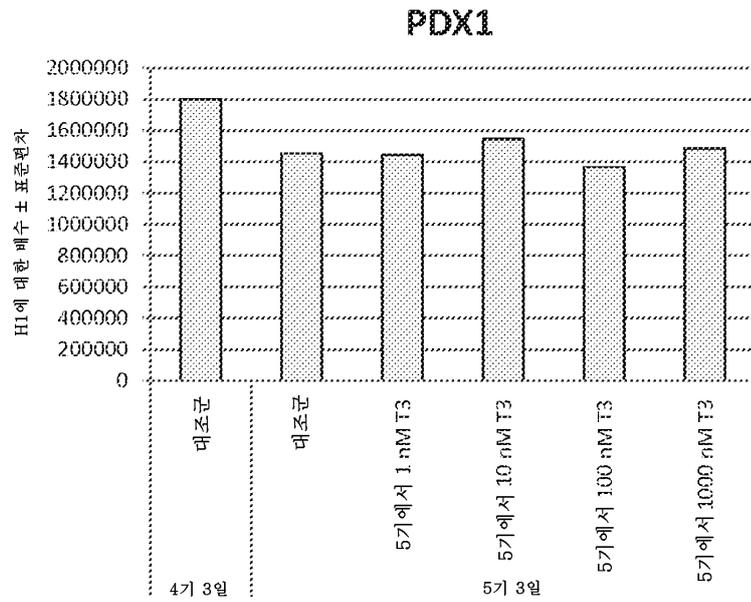
도면11c



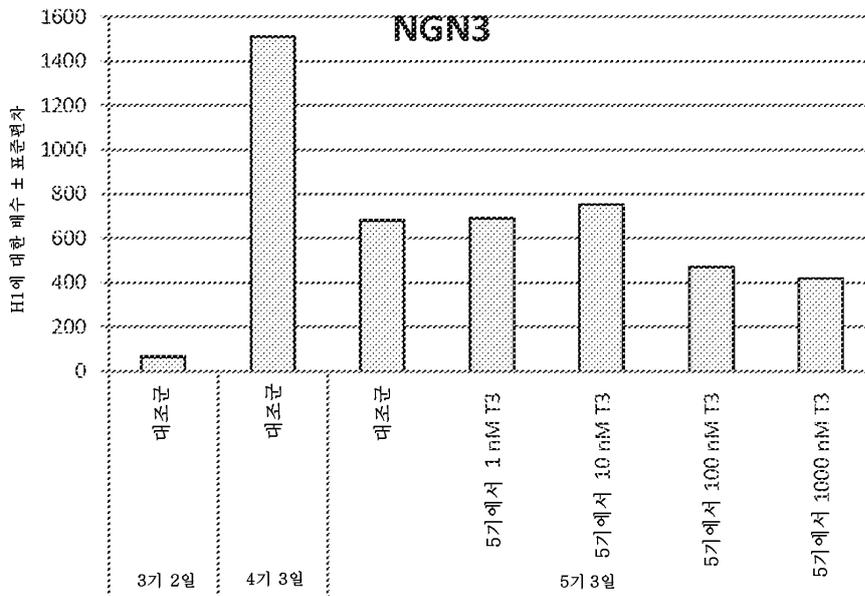
도면11d



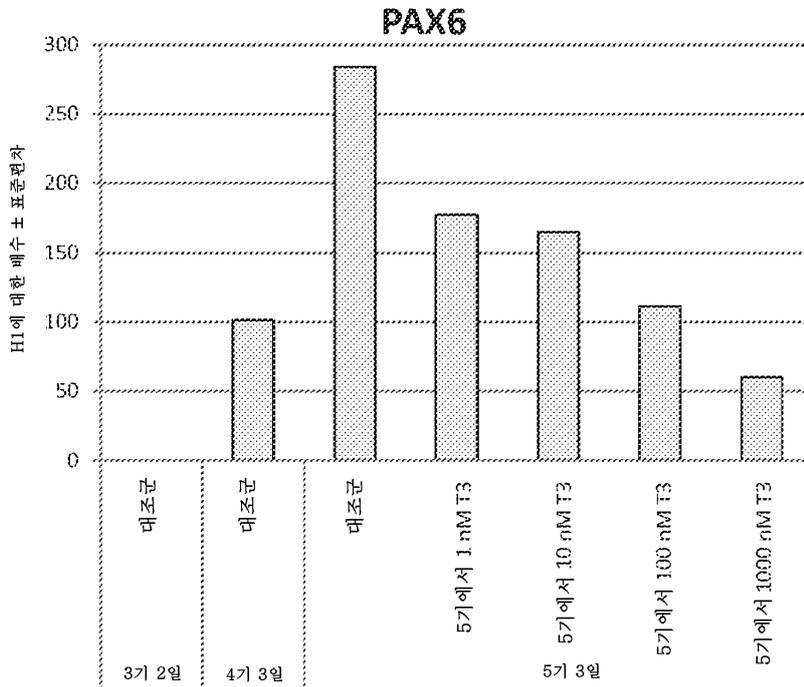
도면11e



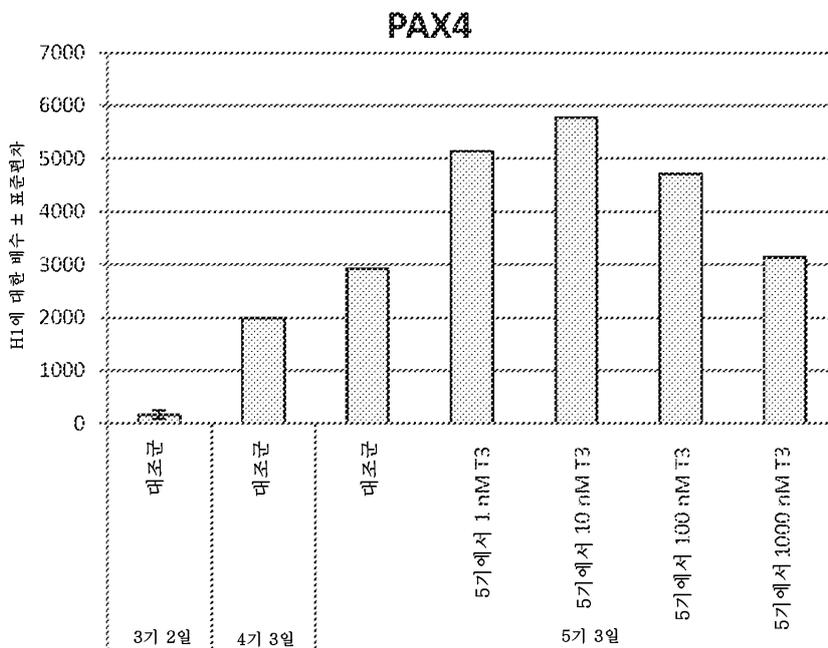
도면11f



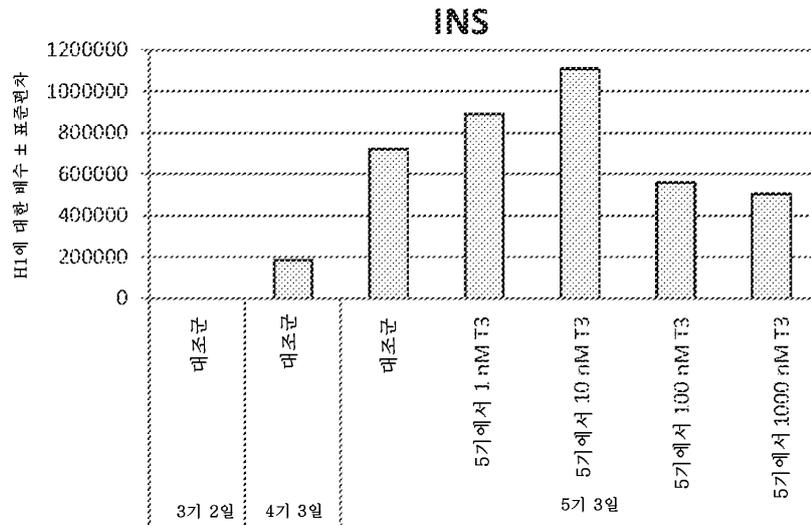
도면11g



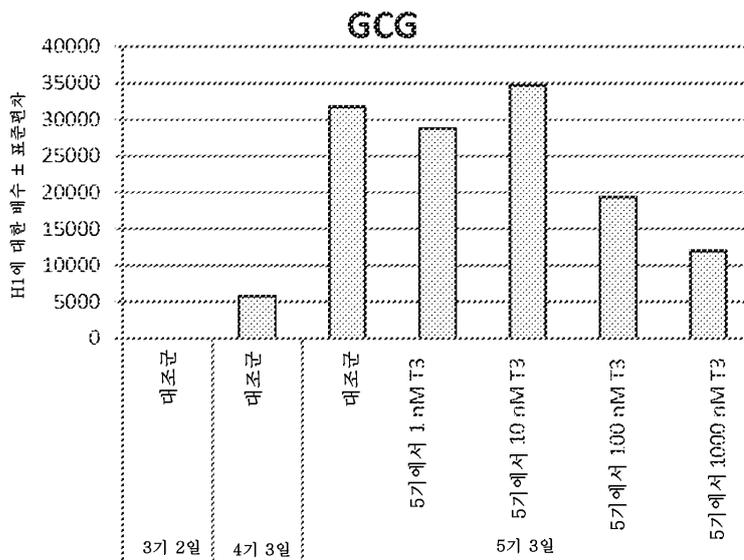
도면11h



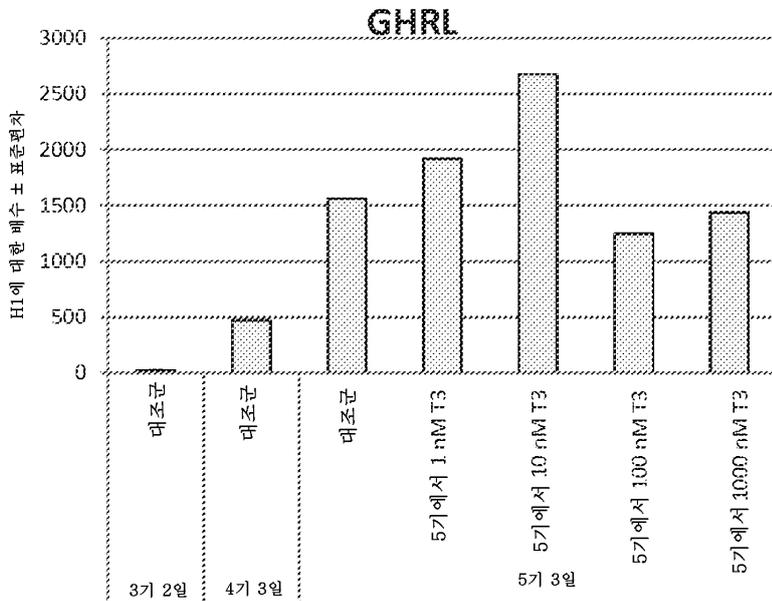
도면11i



도면11j



도면11k



도면11l

