

명세서

발명의 명칭: 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물

기술분야

- [1] 본 출원은 2022년 3월 14일자 한국 특허출원 제10-2022-0031249호 및 2023년 3월 13일자 한국 특허출원 제10-2023-0032368호에 기초한 우선권의 이익을 주장하며, 해당 한국 특허 출원의 문헌에 개시된 모든 내용을 본 명세서의 일부로서 포함한다.
- [2] 본 발명은 돼지 만능성 줄기세포의 배양용 배지 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 줄기세포 (stem cells)에서 만능성(pluripotency)의 획득 및 유지는 대사 산물, 신호 분자 및 세포외기질(ECM; extracellular matrix)과 같은 외부 요인을 통해 관련 유전자의 활성화에 의해 달성 또는 유지된다. 탄수화물, 아미노산, 지질과 같은 대사 산물은 체외에서 세포를 배양하는데 필요한 기본 구성 요소로서 줄기세포의 생리학적 특징과 만능성을 조절한다. 사이토카인(cytokines) 및 호르몬(hormones)을 포함한 다양한 신호 분자(signaling molecules)는 세포 신호 전달 체계의 활성화를 촉발하여 만능성을 지원하고 줄기 세포의 분화를 억제하는데 중요한 역할을 한다. 보고된 바에 따르면, 만능성은 배아 발달 동안 동적으로 변하며, naive, formative 및 primed 상태와 같은 여러 단계로 구성된 연속체를 구성한다. 각 단계에서의 만능성은 신호 분자들의 서로 다른 조합에 의해 조절된다는 것이 입증되었으며, 만능성을 유지하기 위한 새로운 분자를 발견하기 위해 수많은 노력이 진행 중이다.
- [4] 세포외기질은 콜라겐(collagen), 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin) 등의 구조 단백질로 구성되어 있으며 세포 부착 및 생존할 수 있는 물리적 환경을 제공한다. 세포는 인테그린 수용체에 의해 세포외기질 단백질을 인식하여 세포 증식, 생존 및 노화를 조절한다. 만능성 줄기세포의 체외 배양을 위해 오랫동안 생쥐 섬유아세포(fibroblasts)로 만들어진 지지세포(feeder cells)가 사용되어 왔다. 상기 지지세포는 주변분비 인자와 부착성 ECM 표면을 제공함으로써 만능성 줄기세포의 만능성을 유지하는 것으로 알려져 있다.
- [5] 지지세포의 사용은 체외에서 만능성 줄기세포를 배양하는 데 이점이 있지만, 생체의 오염(xenobiotic contamination) 및 세포 간 편차(cell-to-cell variation)에 관한 몇 가지 문제가 제기되었다. 따라서, 생쥐 섬유아세포에서 유래한 지지세포를 대체하기 위한 수많은 연구가 시도되었다. 먼저, 지지세포를 대신하여 생쥐 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts) 배양 배양액(conditioned media)을 사용하거나, 인간 배아 줄기세포 연구에서는 포피 섬유아세포(foreskin fibroblasts), 자궁내막 유래 세포(endometrium-derived cells) 및 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)와 같은 동종(allogenic) 세포를 사용하여 새로운 배양 조건을 개발했다.

- [6] 하지만 일부 배양 조건은 세포 기원에 따라 만능성 줄기세포의 미분화 상태를 지원할 수 없었지만, 몇몇 단백질체(proteome) 분석을 통해 만능성에 도움이 되는 지지세포(pluripotency-supportive feeder cells)가 FGF2, TGF β 1, Activin A, WNT를 포함하는 다양한 사이토카인을 높게 발현하는 것으로 확인했다. 이러한 분자들은 지지세포가 없이도 만능성줄기세포에서 만능성 관련 유전자의 발현을 향상시키는 것으로 입증되었다.
- [7] 또한, 지지세포에 의해 제공되는 세포외기질은 Matrigel, 또는 콜라겐, 라미닌, 피브로넥틴과 같은 단일 성분으로의 대체 가능성에 대해 연구되고 있다.
- [8] 배아 줄기세포(embryonic stem cells)와 같은 돼지 만능성 줄기세포는 농업생명공학 및 비교 발달 생물학 연구에 적용할 수 있는 세포원으로 간주된다. 하지만, 돼지는 만능성이 확립되는 초기 착상 전 배아발달에서 생쥐와 사람의 배아와 비교하여 독특한 분자생물학적 특징을 가지고 있기 때문에, 많은 연구자들이 돼지에서 배아 줄기세포 확립에 실패하였다. 이에 앞선 발명에서 본 연구진은 돼지 만능성에 관여하는 다양한 성장인자를 발굴하여 돼지 특이적 새로운 성장인자 조합이 포함된 화학적으로 정의된 배지(chemically defined medium)를 개발하였고, 이를 생쥐 섬유아세포 유래 지지세포와 함께 사용하여 생체 내 분화능(in vivo differentiation potential)이 있는 돼지 배아 줄기세포를 세계 최초로 확립하였다. 하지만, 앞서 개발한 배양액 조성으로 돼지 배아 줄기세포를 지지세포가 없는 환경에서 배양하였을 때 만능성을 유지하지 못하고 분화가 되는 것을 확인하였다.
- [9] 생쥐의 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblasts)로 만들어진 지지세포는 섬유아세포 성장 인자 2(FGF2), 형질전환 성장 인자 β 1(TGF β 1), 액티빈 A, WNT, 온코스타틴 M 및 인터루킨-6(IL-6)을 비롯한 다양한 사이토카인을 생성한다. 그 중 FGF2는 사람 배아 줄기세포의 만능성을 유지하는 핵심 요소로 사용되어 왔으며, 지지세포 품질의 기준인 액티빈 A는 생쥐 배아 섬유아세포를 배양한 배양배지(conditioned media)에 풍부하다. 실제로, 액티빈 A와 WNT를 포함하는 배지는 지지세포가 없는 상태에서 인간 배아 줄기세포의 만능성 유지를 도왔다. 그러나 FGF2, Activin A 또는 TGF β 1 및 WNT 길항제는 지지세포가 없는 환경에서 인간 만능성줄기세포와 달리, 유사한 조건에서 돼지 배아 줄기세포는 체외배양에 실패하였다. 이는 지지세포 없이 돼지 배아 줄기세포를 체외배양하기 위해서는 추가적인 성장인자 혹은 신호전달물질(signaling molecules)가 포함된 새로운 배양 조건의 확립이 필요하다는 것을 입증한다.
- [10] 이러한 배경하에서, 본 발명의 발명자들은 돼지 만능성 줄기세포 배양용 조성물을 다각도로 연구한 결과, 본 발명의 배양용 조성물을 사용하는 경우 지지세포에 비의존적인 돼지 만능성 줄기세포 배양이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [11] [선행기술문헌]
- [12] [특허문헌]
- [13] (특허문헌 1) 한국 등록특허 제10-2142400호 (등록일: 2020.08.03.)

- [14] [비특허문헌]
- [15] (비특허문헌 1) Choi KH, Lee DK, Oh JN, Kim SH, Lee M, Woo SH, Kim DY, Lee CK. Pluripotent pig embryonic stem cell lines originating from in vitro-fertilized and parthenogenetic embryos. *Stem Cell Res.* 2020 Dec;49:102093.
- [16] (비특허문헌 2) Choi KH, Lee DK, Oh JN, Kim SH, Lee M, Kim SW, Lee CK. Transcriptome profiling of pluripotent pig embryonic stem cells originating from uni- and biparental embryos. *BMC Res Notes.* 2020 Mar 11;13(1):144.
- [17] (비특허문헌 3) Choi KH, Lee DK, Kim SW, Woo SH, Kim DY, Lee CK. Chemically Defined Media Can Maintain Pig Pluripotency Network In Vitro. *Stem Cell Reports.* 2019 Jul 9;13(1):221-234.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [18] 본 발명은 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적은 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 이용하여 지지세포 비의존적 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [20] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 LDN-193189를 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 일 구현예에 따라, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 추가로 FGF2, 액티빈 A, IWR-1, 및 CHIR99021에서 선택되는 어느 하나 이상의 성분을 포함할 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 구현예에 따라, 본 발명은 상기 LDN-193189가 포함된 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 이용한 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법을 제공한다.
- [23] 본 발명의 일 구현예에 따라, 본 발명은 LDN-193189를 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨가액 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [24] 본 발명에 따른 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 지지세포 없이도 만능성/줄기세포능을 유지할 수 있으므로, 지지세포 의존 배양 방법으로 인해 발생가능한 문제점을 해소할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포에 LDN-193189를 농도별로 처리했을 때의 세포 형태이다(배율 100배).
- [26] 도 2는 지지세포 없이 배양된 돼지 줄기세포(ff-ESCs^{LDN-}, ff-ESCs^{LDN+}) 및 지지세포와 함께 배양된 돼지 배아 줄기세포(control)에서의 다양한 유전자 발현을 분

석한 결과이다. 도 2A는 만능성 유전자 및 SMAD 신호전달체계의 면역학적 염색을 나타낸 결과이고, 도 2B는 지지세포에서 분비되는 SMAD 신호전달체계 관련 유전자의 발현량을 나타낸 결과이고, 도 2C는 만능성 표지 유전자의 발현에 대한 qPCR 분석결과이고, 도 2D는 영양외배엽 마커 유전자의 발현에 대한 qPCR 분석 결과이다.

- [27] 도 3은 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포에서, LDN-193189의 최적의 농도를 분석한 결과이다. 도 3A는 LDN-193189의 농도를 세분화하여 Annexin V 염색을 처리한 결과이고, 도 3B는 상기 Annexin V 염색 처리로 인한 세포사멸율을 나타낸 결과이고, 도 3C는 WST-8 assay 결과이고, 도 3D는 Ki-67 염색 결과이다.
- [28] 도 4는 다양한 농도의 FGF2, 액티빈 A, 및 CHIR99021로 배양한 LDN-193189 처리된 돼지 배아 줄기세포에서 만능성 관련 유전자의 발현을 qPCR로 분석한 결과이다.
- [29] 도 5는 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포의 특성을 분석한 결과이다. 도 5A는 돼지 배아 줄기세포의 전형적인 형태 및 AP 염색(하단, AP 염색 이미지). (스케일 바, 400 μ m) 결과이고, 도 5B는 돼지 배아 줄기세포의 핵형이고, 도 5C는 돼지 배아 줄기세포에서 만능성 표지 유전자에 대한 면역염색 결과이고(스케일 바, 200 μ m), 도 5D는 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포에서 만능성 및 분화 표지 유전자의 발현에 대한 qPCR 분석결과이다.
- [30] 도 6은 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포에서 유래한 배아체에 관한 것으로, 도 6A는 돼지 배아 줄기세포에서 유래한 배아체의 형태(스케일 바, 400 μ m)이고, 도 6B는 돼지 배아 줄기세포 및 분화된 세포에서 만능성 및 분화 표지 유전자의 발현에 대한 qPCR 분석결과이다.
- [31] 도 7은 돼지 배아 줄기세포에서 형성된 기형종의 조직학적 분석 결과이다.
- [32] 도 8은 다양한 세포외기질로서 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신 또는 1형 콜라겐에서 배양한 돼지 배아줄기세포의 배양을 나타낸 결과이다.
- [33] 도 9는 KSR을 FBS로 대체한 배양액에서 LDN-193189의 기능을 분석한 결과이다.
- [34] 도 10은 LDN-193189의 지지세포 위에서 키운 돼지 배아줄기세포에 대한 효과를 나타낸 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [36] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.

- [37] 본 개시내용의 특정의 특성을 기술하고 청구함에 있어서, 다음의 용어는 달리 지정되지 않는 한 이하에 기술된 정의에 따라 사용될 것이다.
- [38] 본 명세서에서 어떤 양태들이 “~를 포함하는”이란 용어와 함께 기술되더라도, “~로 구성된” 및/또는 “본질적으로 ~로 구성된”의 관점에서 기술된 다른 유사 양태들 또한 제공된다는 것이 이해되어야 한다.
- [39] 본 발명에서 용어 “배지”, “배양 배지”, “배양용 배지”, “배지 조성물” 또는 “배양용 조성물”은 체외 배양 조건에서 줄기세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 영양물질을 포함하는 배양액을 의미하는 것으로서 본 명세서에서는 구분되지 않고, 혼용하여 사용할 수 있다.
- [40] 본 발명에서 “돼지 만능성 줄기세포의 배양”은 돼지 만능성 줄기세포가 만능성(pluripotency)/줄기세포성(stemness)을 유지한 채로, 특정 계열(lineage)의 세포로 분화하지 않고, 세포증식하는 것을 의미한다.
- [41] 돼지 만능성 줄기세포에는 돼지 배아 줄기세포(pig embryonic stem cell) 또는 돼지 유도 만능줄기세포(pig induced pluripotent stem cell)일 수 있고, 상기 만능성 줄기세포는 통상적으로 당업계에 공지된 어떠한 방법을 이용하여 획득할 수 있다.
- [42] 본 발명에서 용어 “배아 줄기세포”는 수정란이 모체의 자궁에 착상하기 직전인 포배기 배아에서 내세포괴(inner cell mass)를 추출하여 체외에서 배양한 것으로서, 개체의 모든 조직의 세포로 분화할 수 있는 만능성(pluripotent)이거나 전능성(totipotent)일 수 있는 세포를 의미하며, 넓은 의미로는 배아 줄기세포로부터 유래한 배아체(embryoid bodies)도 포함한다. 배아체는 배아 줄기세포의 다양한 조직 형태로의 자발적 분화 과정에서 줄기세포에 의해 형성된 중간구조이며, 배아 줄기세포의 배양 중에 형성된 응집물(aggregate) 형태이다. 한편, 본 발명의 배아 줄기세포는 돼지에서 유래한 돼지 배아 줄기세포이다.
- [43] 배아 줄기세포는 외배엽, 중배엽 및 내배엽성 줄기세포로 분화할 수 있다.
- [44] 본 발명에서 용어 “분화(differentiation)”란 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다. 다능성 배아줄기세포는 계통이 한정된 전구세포(예컨대, 외배엽성 세포, 중배엽성 세포 또는 내배엽성 세포 등)로 분화한 후, 다른 형태의 전구세포로 더 분화될 수 있고(예컨대, 혈관모세포 등), 그 뒤 특정 조직(예컨대, 혈관 등)에서 특징적인 역할을 수행하는 말기 분화세포(예컨대, 혈관내피세포 및 혈관 평활근세포 등)로 분화될 수 있다.
- [45] 따라서, 본 발명의 돼지 만능성 배아 줄기세포의 만능성은 본 발명의 배지 조성물을 이용하여 배양된 돼지 배아 줄기세포의 일정수를 면역억제 마우스에 이식하였을 때, 외배엽, 중배엽 및 내배엽성 세포로 분화할 수 있는지 여부로 분석할 수 있다.
- [46] 본 발명에서 용어 “유도 만능 줄기세포” 또는 “iPSC(induced pluripotent stem cell)”는 체세포 또는 이미 분화된 세포를 처리하여 만능 분화성을 갖게된 세포를 의미한다. 여기에서 처리하는 방법은 화합물, 유전적 변환 또는 특정 조건으로

배양하는 방법 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. “돼지 유도 만능 줄기 세포” 또는 “piPSC”는 돼지의 체세포 또는 돼지의 분화된 세포를 처리하여 만능 분화성을 갖게 된 세포를 의미한다.

- [47] 본 발명 용어, “계대 배양”은 세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 주기적으로 세포의 일부를 새로운 배양용기에 옮긴 후 배양배지를 갈아주면서 세포의 대(代)를 계속 이어서 배양하는 방법을 의미한다. 상기 용어, “계대(passage)”는 배양 용기에서 초기 종배양부터 동일한 배양 용기에 세포가 왕성하게 자라는 시기(confluence)까지의 다능성 줄기세포로의 성장을 의미한다. 한정된 공간을 가진 배양용기 내에서 세포의 수가 늘어나면서 일정시간이 지나면 증식 영양분이 소비되거나 오염 물질이 쌓여 세포가 자연히 죽게 되므로, 건강한 세포의 수를 늘리기 위한 방법으로 사용되며, 통상적으로 한 차례 배지(배양용기)를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1 계대 (1 passage)라고 한다. 계대 배양의 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 기계적 분리 또는 효소적 분리로 수행될 수 있다.
- [48] 본 발명의 발명자들은 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 개발하기 위해 다양한 방법으로 연구를 지속한 결과, LDN-193189를 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 개발하였다.
- [49] 발명의 일 실시예에서, 상기 LDN-193189는 10 nM 내지 1000 nM의 농도로 포함한다.
- [50] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포는 돼지 배아 줄기세포 또는 돼지 유도 만능 줄기세포이다.
- [51] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 돼지 만능성 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 사용될 수 있다.
- [52] 발명의 일 실시예에서, 상기 지지세포 비의존적 배양은 세포외기질 (Extracellular Matrix; ECM) 또는 매트릭젤(Matrigel®) 또는 이의 대체체가 코팅된 배양용기에서 세포배양되는 것이다.
- [53] 발명의 일 실시예에서, 상기 지지세포 비의존적 배양은 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 1형 콜라겐 또는 매트릭젤(Matrigel®)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양하는 것이다.
- [54] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에는, FGF2, 액티빈 A(Activin A), 및 CHIR99021이 추가로 포함될 수 있다.
- [55] 발명의 일 실시예에서, 상기 FGF2의 농도는 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml이고, 상기 액티빈 A의 농도는 0.1 ng/ml 내지 10 ng/ml이고, 상기 CHIR99021의 농도는 0.1 내지 4.5 μ M이고, 상기 IWR-1의 농도는 0.1 μ M 내지 5 μ M 일 수 있다.
- [56] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 돼지 만능성 줄기세포의 증식을 촉진하고, 세포 사멸을 저해한다.
- [57] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 돼지 만능성 줄기세포 콜로니의 숫자를 증가시키고, 콜로니의 크기를 증가시킨다.

- [58] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 돼지 만능성 줄기세포의 줄기세포능/전분화능을 강화시킨다.
- [59] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 무혈청 또는 혈청성분을 0.1 내지 3 중량%를 함유할 수 있다.
- [60] 발명의 일 실시예에서, LDN-193189를 유효성분으로 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨가용 조성물을 제공한다.
- [61] 발명의 일 실시예에서, 상기 돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨가용 조성물에서 상기 LDN-193189는 10 nM 내지 1000 nM의 농도로 포함될 수 있다.
- [62] 본 발명은 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 돼지 만능성 줄기세포에 처리하여 배양하는 단계를 포함하고, 상기 돼지 만능성 줄기세포는 돼지 배아 줄기세포 또는 돼지 유도만능 줄기세포인 것인, 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법을 제공한다.
- [63] 발명의 일 실시예에서, 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법은 지지세포 비의존적으로 배양할 수 있다.
- [64] 발명의 일 실시예에서, 상기 지지세포 비의존적 배양 방법은 세포외기질 (Extracellular Matrix; ECM) 또는 매트리젤(Matrigel)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양할 수 있다.
- [65] 발명의 일 실시예에서, 상기 지지세포 비의존적 배양은 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 1형 콜라겐 또는 매트리젤(Matrigel)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양할 수 있다.
- [66] 상기 세포외기질은 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 1형 콜라겐 외에 이 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 세포외기질을 포함할 수 있다.
- [67] 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에는 LDN-193189이 포함됨으로써, 돼지 만능성 줄기세포의 증식 또는 성장 촉진되고, 줄기세포 사멸이 저해되고, 줄기세포 콜로니의 숫자 및 크기가 증가되고, 줄기세포의 줄기세포능 (stemness) 및 분화능이 강화되는 효과를 가진다.
- [68] 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에 있어서, LDN-193189는 줄기 세포 배양에 사용되는 배지에 첨가되어 사용될 수 있다.
- [69] 상기 LDN-193189는 BMP(bone morphogenetic) pathway 저해제로서, ALK1, ALK2, ALK3, 및 ALK6를 저해한다고 알려져 있다. LDN-193189는 인간 만능성 줄기세포에서 신경 원시세포(neural progenitor cell) 또는 체장세포로의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있고, 마우스 만능성 줄기세포의 분화를 유도하는 것으로 알려져 있다.
- [70] 하지만, 본 발명에서 상기 LDN-193189는 돼지 만능성 줄기세포의 줄기세포능/만능성을 유지하고, 분화를 억제하는 효과를 가진다는 것을 발견하였다. 이와 같은 효과는 기존의 LDN-193189의 효과와는 상반된 결과이고, 이는 배아 줄기세포의 종에 따라 줄기세포능을 유지하는 기전이 상이하고, 배아 줄기세포 배양용 배

지 역시 상기 배아 줄기세포의 종에 따라 다르게 사용되어야 한다는 점을 나타내는 결과이다.

- [71] 상기 돼지 만능성 배아 줄기세포 배양용 배지 조성물에 포함된 LDN-193189의 농도는 10 nM 내지 1000 nM이다. LDN-193189의 농도가 10 nM 미만인 경우 특별한 효과가 없으며, 1000 nM 초과인 경우 세포 독성을 보인다. 본 발명의 일 구현예에 따른 돼지 만능성 배아 줄기세포 배양용 배지 조성물에 포함된 LDN-193189은 100 nM의 농도이지만, 이에 제한되지 않는다.
- [72] 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 추가적으로 FGF2, 액티빈 A, CHIR99021 및 IWR-1가 포함될 수 있다.
- [73] 본 발명의 일 구현예에 따른 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에 추가적으로 포함된 FGF2, 액티빈 A, CHIR99021 및 IWR-1은 각각 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml, 0.1 ng/ml 내지 10 ng/ml, 0.1 μ M 내지 4.5 μ M 및 0.1 μ M 내지 5 μ M의 농도를 가진다. FGF2의 농도가 0.1 ng/ml 미만인 경우 특별한 효과가 없으며, 100 ng/ml 초과인 경우 농도 증가에 따른 추가적인 효과가 없거나, 세포에 독성을 가진다. 액티빈 A의 농도가 0.1 ng/ml 미만인 경우 특별한 효과가 없으며, 10 ng/ml 초과인 경우 농도 증가에 따른 추가적인 효과가 없거나, 세포에 독성을 가진다. CHIR99021의 농도가 0.1 μ M 미만인 경우 특별한 효과가 없으며, 4.5 μ M 초과인 경우 세포에 독성을 가진다. IWR-1의 농도가 0.1 μ M 미만인 경우 특별한 효과가 없으며, 5 μ M 초과인 경우 농도 증가에 따른 추가적인 효과가 없거나 세포에 독성을 가진다. 본 발명의 일 구현예에 따른 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에 포함된 FGF2, 액티빈 A, CHIR99021 및 IWR-1은 각각 20 ng/ml, 5 ng/ml, 0.5 μ M 및 0.5 μ M의 농도를 가지지만, 이에 제한되지 않는다.
- [74] 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지의 기본배지는 이 기술분야의 통상의 기술자들에게 널리 알려진 배지라면 제한없이 사용될 수 있다. 상기 기본배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), IMDM(Isocove's Modified Dulbecco's Medium), DMEM/F-12를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [75] 본 발명의 일 실시예에서는 DMEM/F-12 기본 배지를 사용한다.
- [76] 본 발명의 배양용 배지 조성물에는 추가적으로, 박테리아, 곰팡이 등의 감염을 막기 위해 항생제, 항진균제 및/또는 마이코플라스마의 성장을 예방하는 해당 업계에서 일반적으로 사용하는 물질을 사용하는 것이 바람직하다. 항생제로는 페니실린-스트렙토마이신 등 통상적으로 세포배양에 사용되는 항생제를 모두 이용 가능하며, 항진균제로는 알포레리신 B, 마이코플라스마 억제제로는 젠타마이신, 시프로플로사신, 아지트로마이신 등의 일반적으로 사용하는 물질을 사용

할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 시판되는 항생제-항진균제(antibiotic-antimycotic; AA)(Gibco)가 사용될 수 있다.

- [77] 또한, 본 발명의 배양용 조성물에는 1% 글루타맥스(또는 글루타민)과 0.1 mM 베타-머캅토에탄올을 포함될 수 있다.
- [78] 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 지지세포 비의존성 돼지 만능성 줄기세포 배양에 사용될 수 있다.
- [79] 일반적으로 만능성 줄기세포 또는 배아 줄기세포 배양시 만능성 또는 줄기세포능을 유지하기 위해 마우스 섬유아세포 등의 지지세포를 사용하여 왔으나(지지세포 의존성 배양), 생체외 오염/세포간 편차 등의 문제점이 있어, 만능성 줄기세포의 대량 배양은 지지세포 비의존적으로 수행하려는 시도가 있어왔다. 하지만, 돼지 만능성 줄기세포의 경우 인간 배아 줄기세포에서 이용되는 지지세포 비의존성 배양 배지를 사용하는 경우, 만능성/줄기세포능이 유지되지 않았다. 하지만, 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 이용하는 경우 지지세포 없이도 돼지 만능성 줄기세포의 만능성/줄기세포능이 유지되는 것을 확인하였다.
- [80] 또한, 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 무혈청 또는 또는 혈청 성분을 0.1 내지 3 중량% 함유하는 것일 수 있다.
- [81] 상기 무혈청 배지는 인간을 포함한 동물로부터 유래된 혈청(동물 유래 혈청)을 일정 함량 이상 함유하지 않는 임의의 배양 배지를 의미한다. 예를 들어, 무혈청 배지는 동물 유래 혈청을 총 조성물 함량 대비 0.1 중량% 미만 또는 0.01 중량% 미만으로 포함할 수 있으며, 구체적으로 동물 유래 혈청을 함유하지 않을 수 있다.
- [82] 본 발명은 LDN-193189를 유효성분으로 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨가액 조성물을 제공한다.
- [83] 본 발명의 조성물의 이용으로 돼지 만능성 줄기세포를 안정적으로 증식 및 배양할 수 있고, 재현성 있는 시험 및 생산 공정의 확립이 가능하다.
- [84] 또한, 본 발명은 본 발명의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 돼지 만능성 줄기세포에 처리하여 배양하는 단계를 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법에 관한 것이다.
- [85] 상기 돼지 만능성 줄기세포의 배양은 지지세포 비의존적인 방법으로 배양될 수 있으며, 이때 돼지 만능성 줄기세포는 세포외기질 또는 매트릭젤(Matrigel®) 또는 이의 대체제(젤라틴, 콜라겐, 라미닌 피브로넥틴, 폴리-D-리신(poly-D-lysine), 폴리-L-리신(poly-L-lysine) 등)가 코팅된 배양 용기에서 배양될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [86] 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 모든 숫자는, 언급되었든지 아니든지, 모든 경우에 용어 “약”에 의해 수식될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 정밀한 수치는 본 개시내용의 추가적인 실시양태를 형성하는 것으로 이해되어야 한다. 실시예에 개시된 수치

의 정확성을 보장하기 위해 노력을 기울였다. 그러나, 측정된 모든 수치는 내재적으로 이의 각각의 측정 기법에서 실측된 표준 편차로부터 생성된 특정 오차값을 함유할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [87] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [88]
- [89] 실시예 1. 배양 배지에 따른 돼지 배아 줄기세포의 배양능 분석
- [90] 실시예 1-1. 돼지 배아 줄기세포의 분리
- [91] 동물의 관리 및 실험적 사용은 서울대학교 실험동물윤리위원회(IACUC)의 승인을 받았다(승인번호: SNU-191025-4-4 및 SNU-201019-1-2). 임신한 ICR 마우스와 흉선이 없는 누드 마우스는 각각 Samtaco Bio Inc.(한국) 및 OrientBio Inc.(한국)에서 구입하였다. 생쥐는 서울대학교 실험동물자원관리원의 표준 프로토콜에 따라 유지하였다.
- [92] 배반포로부터 돼지 배아 줄기세포의 분리 및 생쥐 섬유아세포를 이용한 지지세포의 생산은 KR10-2142400의 방법으로 하였다.
- [93]
- [94] 실시예 1-2. 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 의존적 배양
- [95] 돼지 배아 줄기세포를 지지세포와 함께 배양하는데 사용되는 '배아 줄기세포 배양 배지'는 DMEM/F12 기반 배지로서 15 %(v/v) 녹아웃 혈청 대체제(Knock-out serum replacement; KSR), 0.1 %(v/v) 화학적으로 정의된 지질 농축액(Lipid concentrate, LC), 1X GlutaMAX®, 0.1 mM β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol), 1X MEM 비필수 아미노산, 및 1X 항생제-항진균제(antibiotics-antimycotics) (앞서 언급한 물질은 모두 Gibco, Gaithersburg, MD, USA에서 구입하였다), 20 ng/mL hrFGF2(fibroblast growth factor 2) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 5ng/mL ActA(액티빈; activin A)(R&D Systems), 1.5 μM CHIR99021(CH, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) 및 2.5 μM IWR-1(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 포함한다.
- [96] 돼지 배아 줄기세포를 지지세포와 함께 5-7일마다 계대배양하였다. 계대배양 24시간 전에 돼지 배아 줄기세포를 10 μM Y-27632(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 포함하는 앞서 언급한 '배아 줄기세포 배양 배지'로 배양하였다. 충분히 자란 배아 줄기세포 군집은 TrypLE® Express(Gibco)를 사용하여 작은 덩어리로 분리하였다. 이 세포 덩어리를 새로운 지지세포로 옮기고 10 μM Y-27632(Santa Cruz Biotechnology)를 포함하는 '배아 줄기세포 배양 배지'로 24시간 동안 배양한다. 24시간 후에 지지세포에 부착된 배아 줄기세포를 Y-27632를

포함하지 않는 '배아 줄기세포 배양 배지'로 4-6일 동안 배양한다. 배지는 24시간마다 교체되었고 5 % CO₂, 37 °C의 조건에서 배양하였다.

[97]

[98] 실시예 1-3. 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양

[99] 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양(feeder-free culture)을 위해, 지지세포에서 배양된 돼지 배아 줄기세포를 '지지세포 비의존적 배양을 위한 배아 줄기세포 배양 배지 (이하 'FF-배아 줄기세포 배양 배지')를 사용하여 1:5 ~ 1:10 분할 비율로 Matrix™로 코팅된 배양접시(SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)에서 배양하였다.

[100] FF-배아 줄기세포 배양배지는 DMEM/F12 기반 배지로서 15 %(v/v) KSR, 0.1 %(v/v) LC, 1X 글루타맥스, 0.1 mM β-머캅토에탄올(β-mercaptoethanol), 1X MEM 비필수 아미노산, 및 20 ng/mL hrFGF2(R&D Systems), 5 ng/mL ActA(R&D Systems), 1.5 μM CHIR99021(CH, Cayman Chemical), 2.5 μM IWR-1(Sigma-Aldrich), 1X 항생제-항진균제(antibiotics-antimycotics, 앞서 언급한 물질은 모두 Gibco, Gaithersburg, MD, USA에서 구입하였다), 및 100 nM LDN-193189(Cayman Chemical)를 포함한다.

[101] 돼지 배아 줄기세포를 5-7일마다 계대배양하였다. 계대배양 24시간 전에 돼지 배아 줄기세포를 10 μM Y-27632(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 포함하는 'FF-배아 줄기세포 배양 배지'로 배양하였다. 다음으로, TrypLE® Express(Gibco)를 사용하여 배양된 줄기세포를 작은 덩어리로 분리하였다. 이 세포를 새로운 Matrix™ 코팅 플레이트로 옮기고 10 μM Y-27632(Santa Cruz Biotechnology)를 포함하는 'FF-배아 줄기세포 배양 배지'로 24시간 동안 배양하였다. 다음으로, 부착된 줄기세포를 Y-27632가 없는 'FF-배아 줄기세포 배양 배지'로 4-6일 동안 배양하였다. 배지는 24시간마다 교체하였고 5 % CO₂, 37 °C의 조건에서 배양하였다.

[102]

[103] 실시예 1-4. 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 있어서, LDN-193189 효과 분석 (세포 형태 분석)

[104] 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 있어서, ALK2/3 억제제인 LDN-193189의 영향을 분석하기 위해 Annexin V 염색을 통한 LDN-193189 세포 독성을 확인하였다 (도 1). LDN-193189 처리의 최적 농도를 찾기 위하여 농도에 따른 세포독성 실험을 진행하였고, Annexin V 염색은 1000 nM 이상의 LDN-193189에서 높은 세포독성이 있음을 보여주었다. 또한 1000 nM 이상의 농도에서 24시간 이상의 처리는 대부분의 세포의 사멸을 유도하였다.

[105]

[106] 실시예 1-5. 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 있어서, LDN-193189 처리 효과 분석 (유전자 발현 분석)

- [107] 배양 기간에 따른 만능성 관련 유전자, 분화 관련 유전자 등의 발현양을 분석하기 위해 돼지 배아 줄기세포를 지지세포 없이 100 nM LDN-193189을 포함하는 'FF-배아 줄기세포 배양 배지'(ff-ESCs^{LDN+}), 및 LDN-193189을 포함하지 않는 'FF-배아 줄기세포 배양 배지'(ff-ESCs^{LDN-})를 이용하여 배양하였고, 대조군으로 돼지 배아 줄기세포를 지지세포와 함께 앞서 언급한 배아 줄기세포 배양 배지(Control ESCs)를 이용하여 배양하였다.
- [108] 각각의 배지를 이용한 플레이팅 후 2일, 4일, 6일째 되는 날 세포를 수득하였다. Total RNA는 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용하여 추출하고 cDNA는 High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하여 합성했다. cDNA는 표 1에 나열된 프라이머 세트와 DyNAmo HS SYBR Green qPCR 키트 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)를 사용하여 증폭하였다.

[109] [표1]

Species	Genes	Sequences	Annealing Tm (° c)	Size (bp)
Pig	OCT4a	5'- CTTGGAGAGCCCTGGT TTTACT -3'	64	159
		5'- GCCAGGTCCGAGGATCAAC -3'		
	SOX2	5'- CGGCGGTGGCAACTCTAC -3'	64	100
		5'- TCGGGACCACACCATGAAAG -3'		
	NANOG	5'- CATCTGCTGAGACCCTCGAC -3'	60	195
		5'- GGGTCTGCGAGAACACAGTT -3'		
	CDX2	5'- GCCAAGTGAAAACCAGGACGA -3'	60	120
		5'- GCTCGGCCTTTCTCCGAATG -3'		
	TEAD4	5'- GTCGGCGCAAGATCATCCTA -3'	60	159
		5'- CCTGGATCTCACGGGCTTTT -3'		
	EOMES	5'- CCAACCACGTCTGCACATTG -3'	60	206
		5'- AAGCGGTGTACATGGAGTCG -3'		
	T	5'- CTGTGAGAGGTATCCTGCCCT -3'	64	184
		5'- GGGACTCATGGGAAACATGC -3'		
	BMP2	5'- GAAGGAAGGGAACCCGGTC -3'	60	84

		5'- CGGGGACACGTCCATTGAAA -3'		
	BMP4	5'- CGTTGGTCTCGAGTATCCCG -3'	60	106
		5'- AGAGTTTTTCGCTGGTCCCTG -3'		
	BMP7	5'- ACTTCGACGACAGCTCCAAC -3'	60	200
		5'- AAATACCCTCACACGCCTGC -3'		
	PAX6	5'- AGAGAAGACAGGCCAGCAAC -3'	60	169
		5'- GGCAGAGCACTGTAGGTGTT -3'		
	AMY2	5'- TGCTCTTGAATGTGAGCGGT -3'	60	206
		5'- TACGGACGCCAACGTTGTTA -3'		
	GAPDH	5'- TGCTCCTCCCCGTTTCGAC -3'	60	100
		5'- ATGCGGCCAAATCCGTTC -3'		

[110] 도 2에서와 같이, 지지세포 비의존적 배양시, 돼지 배아줄기세포의 특성 변화를 확인하였다. 도 2A는 만능성 유전자 및 SMAD 신호전달체계의 면역학적 염색을 나타낸 결과이고, 도 2B는 지지세포에서 분비되는 SMAD 신호전달체계 관련 유전자의 발현량을 나타낸 결과이다.

[111] 돼지 배아줄기세포를 배양할 때 필수적인 지지세포를 제거를 하면 줄기세포 능을 잃고 다른 세포로 분화가 유도된다. 초기배아의 경우 중배엽성 조직으로 분화가 되도록 프로그래밍이 되어있어 이에 관여하는 신호전달체계중에 하나 인 SMAD 신호전달 단백질의 발현을 확인하였다. 줄기세포의 증식에 관여하는 phosphor-SMAD2/3 단백질 외에도 분화에 관여하는 phosphor-SMAD1/5 단백질의 발현이 확인되었다. 실제로 배아줄기세포의 만능성 유지에 관여하는 지지세포 에서 이 신호전달체계의 활성을 억제하는 다양한 유전자들 (Grem1, Grem2, Chrd, Nog)이 발현하는 것을 확인하였다(도 2A 2B).

[112] 또한, 도 2C 및 도 2D에서와 같이, SMAD1/5 신호전달 체계의 억제인 LDN-193189 (250 nM)의 처리가 돼지 배아줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 미치는 영향을 확인하였다.

[113] 지지세포에서 분비되는 SMAD1/5 신호전달체계의 억제 유전자가 돼지 배아줄기세포의 만능성 유지에 도움을 준다는 가설을 입증하기 위하여 SMAD1/5 신호전달체계 억제제인 LDN-193189를 지지세포가 없이 배양된 돼지 배아줄기세포에 처리하였다. 그 결과, 지지세포를 제거하였을 때 변화하였던 만능성 및 중배엽성 조직 발달에 관여하는 유전자가 지지세포위에서 배양한 수준으로 회복되는 것을 확인하였다.

[114]

- [115] 실시예 2. 돼지 배아 줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 있어서, LDN-193189의 최적의 농도 및 FGF2, Activin 2 및 CHIR99021의 농도별 영향 분석
- [116] 실시예 2-1. LDN-193189의 최적의 농도 분석
- [117] 100 nM 내지 1000 nM 사이에서 LDN-193189를 포함하는 'FF-배아 줄기세포 배양 배지'의 최적의 농도를 확인하기 위하여 농도를 세분화하여 annexin V 염색을 진행하였다(도 3A). 750 nM 이상의 농도에서는 세포사멸율이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(도 3B). Ki-67 염색 결과는 100 nM 내지 1000 nM 사이의 유의적인 차이는 보이지 않았지만(도 3D), WST-8 결과는 500 nM 이상의 농도에서 유의적인 세포 활성 감소를 확인하였다(도 3C). 실제로 LDN-193189는 높은 농도에서 LDN-193189는 줄기세포의 증식에 관여하는 Activin A 신호전달체계를 억제한다고 알려져있다. 따라서 최종 처리농도는 BMP 신호전달 체계만을 억제하고 세포 독성이 존재하지 않는 최대 농도인 100 nM로 확정하였다.
- [118]
- [119] 실시예 2-2. FGF2, Activin 2 및 CHIR99021의 농도별 분석
- [120] 배양액에 포함되는 신호전달 물질의 농도 최적화를 위해, FGF2, Activin A, CHIR99021 및 IWR-1의 물질을 다양한 농도로 처리하였다(도 4A 및 4B). 도 4A는 Ki-67 염색을 통한 증식율을 확인한 결과이고, 도 4B는 WST-8 assay를 통해 세포 활성을 확인한 결과이다.
- [121] Ki-67 염색을 통한 증식율을 확인한 결과, FGF2는 농도가 증가함에 따라 세포 분열중인 세포의 비율이 점진적으로 증가하였다. 그러나, WST-8 assay를 통해 세포 증식과 세포독성을 동시에 측정한 결과, 100 ng/ml 이상의 농도에서는 세포독성으로 인해 세포 활성이 감소하는 것을 확인하였다.
- [122] Activin A는 Ki-67 염색 및 WST-8 assay의 결과에서 모두 10 ng/ml 이상의 농도에서는 세포독성 및 증식률이 저하되는 것을 확인하였다. 따라서, Activin A의 최적의 농도는 1 ng/ml 내지 5 ng/ml임을 확인하였다.
- [123] CHIR99021의 증식률은 CHIR99021을 처리하지 않은 그룹과 비교하면, 농도가 증가함에 따라 점진적으로 감소하였다. 하지만 WST-8의 결과는 0.1 μ M 내지 0.5 μ M의 농도로 해당 물질을 처리하였을 때 줄기세포의 활성 및 증식율이 개선되는 것을 확인하였다.
- [124] IWR-1은 농도가 증가할수록 분열중인 세포의 비율이 점진적으로 증가하였다. 하지만 IWR-1의 높은 농도에서 세포 독성을 보여 0.5 μ M의 농도로 처리하였을 때 가장 높은 세포 활성을 보였다.
- [125]
- [126] 실시예 3. 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포의 특성화 (characterization)
- [127] 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포의 면역 세포화학 분석을 위해, 세포 샘플을 4 °C에서 10분 동안 방치하고 30분 동안 4%(w/v) 파라포름알데히

드에서 고정했다. DPBS(Dulbecco's phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후, 샘플을 비특이적 결합 방지를 위해 염소 혈청(goat serum) 10%(v/v)이 포함된 DPBS으로 1시간 동안 처리하였다. 혈청 처리된 세포는 OCT4(1:200; SC-9081, Santa Cruz Biotechnology), SOX2(1:200; AB5603, Millipore, Billerica, MA, USA), NANOG(1:200; 500-P236, Peprotech, NJ, USA), SSEA1(1:200; MAB4301, Millipore) 및 SSEA4(1:200; MAB4304, Millipore)로 면역세포화학 분석을 진행하였다. 핵 단백질(예: OCT4, SOX2 및 NANOG)의 경우 항체를 적용하기 전 고정된 세포를 혈청 처리 전에 0.1%(v/v) Triton X-100(Sigma-Aldrich)으로 15분 동안 처리하였다. 1차 항체를 처리한 후, Alexa Fluor-conjugated 2차 항체를 실온에서 3시간 동안 처리하였다. 세포의 핵은 Hoechst 33342(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 확인하였다. 실험결과는 도립 형광 현미경(Eclipse TE2000-U, Nikon, Konan, Japan)을 사용하여 염색된 세포의 이미지를 시각화하였다.

- [128] 알칼리성 인산분해효소 (alkaline phosphatase, AP) 염색을 위해 세포를 30분 동안 4%(w/v) 파라포름알데하이드에 고정시키고 nitro blue tetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate toluidine salt stock solution(Roche, Basel, Switzerland)을 포함하는 완충용액으로 상온에서 30분간 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 도립 현미경으로 시각화하였다.
- [129] 지지세포 없이 매트릭젤® 코팅된 배양 용기에서 LDN-193189가 포함된 “배아 줄기세포 배양 배지”를 처리하여 배양한 돼지 배아 줄기세포의 군집의 모습은 지지세포와 함께 배양된 돼지 배아 줄기세포의 군집과 유사하게 편평한 단층이었으며, 높은 핵 대 세포질 비율을 갖는 상피세포 형태 즉, 전형적인 배아 줄기세포의 형태를 나타냈다(도면 5A). 또한, 지지세포 없이 배양된 줄기세포는 정상 핵형(36+XX)을 가지고(도 5B), 장기 배양(10회 계대 이상) 동안 안정적으로 유지되었다.
- [130] 지지세포 없이 배양된 줄기세포는 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase) 활성을 나타내었고(도 5A 하단), 지지세포와 함께 배양된 돼지 배아 줄기세포와 마찬가지로 OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1 및 SSEA4와 같은 만능성 표지인자(단백질)를 발현했다(도 5C). qPCR 분석은 돼지 배아 줄기세포가 지지세포 없이 장기간 배양하는 동안 OCT4, SOX2 및 NANOG와 같은 만능성 관련 유전자와 영양막 분화 관련 유전자가 대조군 돼지 배아 줄기세포의 유전자와 비교하여 안정적으로 발현되었음을 보여주었다(도 5D).
- [131] (IVF-ES-11, PG-ES-3: 돼지 배아줄기세포주, W/ feeder : 지지세포위에서 배양한 그룹, W/O feeder: 지지세포 비의존적 배양 그룹)
- [132]
- [133] 실시예 4. 배양 배지에 따른 돼지 배아 줄기세포의 분화능 분석
- [134] 실시예 4-1. 배아체(Embryoid Body)법을 사용한 돼지 배아 줄기세포의 분화 유도

- [135] 지지세포 없이 배양된 배아 줄기세포를 TrypLE Express(Gibco)를 사용하여 단일 세포로 분리하고 5일 동안 다른 사이토카인이 포함되지 않은 15 %(v/v) FBS 및 10 μ M Y-27632(1일차에만 처리)를 포함하는 DMEM을 이용하여 부유 배양하였다. 부유 배양 후, 해리된 세포가 응집되어 배아체를 형성하였고, 이를 0.1 %(w/v) 젤라틴이 코팅된 배양접시에서 15 %(v/v) FBS를 함유하는 DMEM을 통해 2-3 주 동안 부착배양하였다.
- [136] 지지세포 없이 배양한 돼지 배아 줄기세포는 부유배양을 통해 배아체를 형성하였고, 이어서 배양 접시에 부착하여 자발적으로 분화되었다(도 6A). 체외 분화를 통해 돼지 배아 줄기세포는 3개의 생식층(germ layer) 마커(PAX6[외배엽], AMY2[내배엽], BMP4[중배엽])가 높게 발현을 하였지만, 만능성 마커 유전자는 qPCR에 의해 분석된 바와 같이 점진적으로 하향 조절되었다(도 6B).
- [137] (IVF-ES-11, PG-ES-3: 돼지 배아 줄기세포주, ESC: 배아 줄기세포, Ebs: 배아체, Diff. 배양 접시 부착에 의해 체외분화된 배아체)
- [138]
- [139] **실시예 5. 기형종 형성 분석**
- [140] 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포 약 $5-10 \times 10^6$ 개를 50 %(v/v) BD Matrigel Matrix(BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 및 10 μ M Y-27632를 포함하는 200 μ L의 '배아 줄기세포 배양 배지'에 재현탁시켰다. 다음으로, 재현탁된 돼지 줄기세포를 5주령 무흉선 누드 마우스(athymic nude mice, OrientBio)의 피하에 주사하였다. 이식 후 2-3개월 후 1-2 cm 기형종을 채취하여 4 %(w/v) 파라포름 알데히드에 고정하고 파라핀에 포매한 후 광학현미경 검사를 위해 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다.
- [141] 그 결과, 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포가 면역이 결핍된 생쥐(누드마우스)의 피하에 이식하면 기형종으로 분화되었음을 반복적으로 확인했다. 기형종은 조직학적으로 3개의 배엽층을 나타내는 다양한 조직으로 구성되었다(도 7). 따라서, 지지세포 없이 배양된 돼지 배아 줄기세포도 다능성 분화능(외배엽, 중배엽, 내배엽)을 가진다는 점을 확인하였다.
- [142]
- [143] **실시예 6. 다양한 세포외기질에서 배양액 분석**
- [144] 돼지 배아줄기세포의 지지체 비의존적 배양을 위한 배양배지의 다양한 세포외기질(ECM: extracellular matrix)에서의 활용 가능성을 평가하기 위하여 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 1형 콜라겐으로 코팅된 세포배양접시에서 줄기세포의 배양을 시도하였다. 도 8은 다양한 세포외기질로서 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신 또는 1형 콜라겐에서 배양한 돼지 배아줄기세포의 배양을 나타낸 결과이다.
- [145] 만능성 표지인자인 NANOG와 SSEA4를 면역학적 염색법을 통해 확인한 결과, 세포외기질에 따른 세포의 만능성과 증식능과 같은 특성의 편차는 존재하였지

만, 새로운 배양액을 이용하여 다양한 기질위에서 돼지 배아줄기세포의 특성 유지가 가능함을 확인하였다.

[146]

[147] 실시예 7. 소태아혈청(FBS)을 포함하는 배양 조건 분석

[148] 혈청대체제인 KSR이 포함된 배지에서 LDN-193189의 처리가 돼지 배아줄기세포의 지지세포 비의존적 배양에 효과가 있는 것을 확인하였다.

[149] 추가적으로 혈청대체제가 아닌 소태아혈청 (FBS; fetal bovine serum)이 포함된 배양액에서 해당 물질이 돼지 배아줄기세포의 만능성 유지에 도움이 되는지 확인하였다. 도 9는 KSR을 FBS로 대체한 배양액에서 LDN-193189의 기능을 분석한 결과로서, 도 9A는 만능성 표지 인자 NANOG와 SSEA4를 통한 돼지 배아줄기세포의 특성을 분석(흰색 점선 테두리: 분화된 부분)한 결과이고, 도 9B는 FBS가 포함된 배양배지에서 LDN-193189의 처리 여부에 따른 만능성 및 중배엽성 조직 발달 관련 유전자의 발현 변화를 나타낸 결과이다.

[150] 만능성 표지인자인 NANOG와 SSEA4를 면역학적 염색법을 통해 확인한 결과, FBS가 포함된 배양액은 돼지 배아줄기세포의 분화를 유도하여 NANOG 및 SSEA4의 발현이 감소한 세포 군집이 다수 발견이 되었다. 이러한 현상은 LDN-193189의 처리를 통해 완화되는 것을 확인하였고, qPCR 분석은 FBS가 포함된 환경내에서 LDN-193189의 처리를 통해 중배엽 관련 유전자의 발현을 감소시켜 줄기세포의 만능성 유지에 도움을 주는 결과를 보여주었다.

[151]

[152] 실시예 8. 지지 세포가 존재하는 배양조건에서의 활용 가능성 확인

[153] LDN-193189가 포함된 지지세포 비의존적 배양을 위한 배지의 지지세포 위에서 키운 돼지 배아줄기세포에 대한 영향을 확인하였다.

[154] 도 10은 LDN-193189의 지지세포 위에서 키운 돼지 배아줄기세포에 대한 효과를 나타낸 결과로서, 도 10A는 LDN-193189를 처리한 지지세포 상에서 키운 돼지 배아줄기세포의 만능성 표지인자 (NANOG, SSEA4)의 발현 (흰색 점선 테두리: 분화된 세포 군집)을 나타낸 결과이고, 도 10B는 phosphor-SMAD1/5의 발현에 대한 LDN-193189의 효과를 나타낸 결과이고, 도 10C는 phosphor-SMAD2/3의 발현에 대한 LDN-193189의 효과를 나타낸 결과이고, 도 10D는 qPCR을 통한 LDN-193189를 처리한 지지세포 상에서 키운 돼지 배아줄기세포의 만능성 및 중배엽성 조직 발달 관련 유전자의 발현 확인한 결과이다.

[155] LDN-193189의 처리는 지지세포 위에서 키운 돼지 배아줄기세포의 자발적 분화를 감소시키고, SSEA4 표지인자의 발현을 강화시켰다. 이는 중배엽성 분화에 관여하는 SMAD1/5 신호전달 체계를 억제하고 줄기세포의 증식에 관여하는 SMAD2/3 신호전달을 활성화시키기 때문으로 추측된다. 또한, qPCR 분석은 LDN-193189의 처리는 다양한 중배엽성 조직 발달에 관여하는 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 확인되었다.

청구범위

- [청구항 1] 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에 있어서, LDN-193189를 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 LDN-193189는 10 nM 내지 1000 nM의 농도인 것인, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포는 돼지 배아 줄기세포 또는 돼지 유도 만능 줄기세포인 것인, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 지지세포 비의존적 배양에 사용하기 위한, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 지지세포 비의존적 배양은 세포외기질(Extracellular Matrix; ECM) 또는 매트릭젤(Matrigel®)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양하는 것인, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 지지세포 비의존적 배양은 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 1형 콜라겐 또는 매트릭젤(Matrigel®)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양하는 것인, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물에는, FGF2, 액티빈 A(Activin A), CHIR99021 및 IWR-1이 추가로 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 FGF2의 농도는 0.1 ng/ml 내지 100 ng/ml이고, 상기 액티빈 A의 농도는 0.1 ng/ml 내지 10 ng/ml이고, 상기 CHIR99021의 농도는 0.1 μ M 내지 4.5 μ M이고, 상기 IWR-1의 농도는 0.1 μ M 내지 5 μ M인, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 줄기세포의 증식을 촉진하고, 세포 사멸을 저해하는 것을 특징으로 하는, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 줄기세포 콜로니의 숫자를 증가시키고, 콜로니의 크기를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물.

- [청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 줄기세포의 줄기세포
능/전분화능을 강화하는 것을 특징으로 하는, 돼지 만능성 줄기세포 배양
용 배지 조성물.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
상기 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물은 무혈청 또는 혈청성분
을 0.1 내지 3 중량%를 함유하는 것을 특징으로 하는, 돼지 만능성 줄기세
포 배양용 배지 조성물.
- [청구항 13] 돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨가용 조성물에 있어서, 상기 조성물은
LDN-193189를 유효성분으로 포함하는 돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨
가용 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 LDN-193189는 10 nM 내지 1000 nM의 농도인 것을 특징으로 하는,
돼지 만능성 줄기세포 배양액 첨가용 조성물.
- [청구항 15] 제1항의 돼지 만능성 줄기세포 배양용 배지 조성물을 돼지 만능성 줄기세
포에 처리하여 배양하는 단계를 포함하고,
상기 돼지 만능성 줄기세포는 돼지 배아 줄기세포 또는 돼지 유도만능 줄
기세포인 것인, 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 배양방법은 지지세포 비의존적으로 배양하는 것을 특징으로 하는,
돼지 만능성 줄기세포 배양 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 지지세포 비의존적 배양은 세포외기질(Extracellular Matrix; ECM) 또
는 매트릭젤(Matrigel)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양하는 것인, 돼
지 만능성 줄기세포 배양 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 지지세포 비의존적 배양은 피브로넥틴, 라미닌, 폴리-L-리신, 1형 콜
라겐 또는 매트릭젤(Matrigel)이 코팅된 배양용기에서 세포를 배양하는 것
인, 돼지 만능성 줄기세포 배양 방법.